

# 大黄鱼 Myostatin-1 基因启动子克隆及生物信息学分析

董小敬 薛良义\*

(宁波大学 生命科学与生物工程学院, 315211)

**摘 要** Myostatin 基因属于 TGF- $\beta$  超家族, 是动物骨骼肌生长发育的负调控因子。在已克隆大黄鱼 Myostatin-1 基因编码序列的基础上, 采用基因组步移的方法, 首次克隆到约 1k bp 的大黄鱼 Myostatin-1 启动子序列。该启动子序列与已报道的金鲷和大口黑鲈相应序列的相似度分别为 90% 和 75%。该序列具有 1 个 TATA box、1 个 CAAT box、5 个 E-box 位点, 此外还具有 MyoD, USF, MEF2, SP1, NF-Y 等多种转录因子结合位点。

**关键词** 大黄鱼 Myostatin-1 启动子 克隆 生物信息学分析

**中图分类号** Q959 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)05-0035-06

## Cloning and bioinformatic analysis of myostatin-1 gene promoter in *Larimichthys crocea*

DONG Xiao-jing XUE Liang-yi\*

(College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, 315211)

**ABSTRACT** Myostatin is a member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, which functions as a negative regulator for the development and growth of skeletal muscle in animal. Based on the cloned myostatin-1 gene of *Larimichthys crocea*, the promoter sequence of *L. crocea* myostatin-1 gene was cloned by genomic walking. The sequencing results indicate that it shares 90% and 75% homology identity with the corresponding reported sequences of *Sparus aurata* and *Micropterus almoides*, respectively. Bioinformatic analysis showed that myostatin-1 gene contains one consensus sequences of TATA box, a CAAT box and five putative E-boxes known as the binding sites to myogenic basic helix-loop-helix transcription factors. In addition, it also possesses many transcription factor binding sites, such as MyoD, USF, MEF2, SP1 and NF-Y. These results are expected to be the basis for further studies on the regulation and expression of this gene.

**KEY WORDS** *Larimichthys crocea* Myostatin-1 promoter  
Cloning Bioinformatic analysis

国家自然科学基金(30871916)资助

\* 通讯作者。E-mail: xueliangyi@nbu.edu.cn

收稿日期: 2009-10-18; 接受日期: 2010-02-01

作者简介: 董小敬(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子生物学研究。E-mail: dongxiaojing198310@163.com, Tel: (0574)87600165

生长分化因子-8(Growth differentiation factor 8, GDF-8)属 TGF- $\beta$ (Transforming growth factor beta)超家族,是一种对骨骼肌生长具有负调控作用的重要细胞因子,因此又称肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN)。MSTN 基因的突变或缺失会导致动物肌肉细胞的增生和肌纤维的肥大。该基因敲除的小鼠,其骨骼肌重量增加到正常小鼠的两倍左右(Mcpherron *et al.* 1997)。由于 MSTN 基因突变而导致肌肉的增加在牛(Marchitelli *et al.* 2003)、羊(Clop *et al.* 2006)、狗(Mosher *et al.* 2007)和人(Schuelke *et al.* 2004)中都有报道。在斑马鱼 *Danio rerio* 中利用 RNAi 技术和转基因技术抑制 MSTN 基因的表达,其肌肉明显比正常鱼发达(Xu *et al.* 2003; Acosta *et al.* 2005)。

与哺乳动物相比,许多鱼类的 MSTN 基因具有两种类型:MSTN-1 和 MSTN-2(Rodgers *et al.* 2007),如金鲷 *Sparus aurata*、红鳍东方鲀 *Fugu rubripes*、石首鱼 *Umbrina cirrosa*、斑马鱼、虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 和大西洋鲑 *Salmo salar* 等,且两种类型的 MSTN 基因在组织特异性表达上存在较大的差异。在斑马鱼中 MSTN-1 除了在骨骼肌中表达外,在脑、眼、肠、肾和心中也有表达,MSTN-2 主要在脑中的嗅叶和视叶中表达(Maccatrozzo *et al.* 2001)。金鲷的 MSTN-1 在骨骼肌、脑、眼、心和肠等表达明显,在脂肪组织和肾脏中微量表达,而 MSTN-2 则主要在中枢神经系统中表达,在性腺中也检测到表达(Maccatrozzo *et al.* 2001a、b)。在我们的研究中,大黄鱼 *Larimichthys crocea* MSTN-1 主要在肌肉、脑和肠中表达,而 MSTN-2 则主要在脑和脂肪组织中表达,肌肉中并未检测到表达(孙升 2008)。目前对鱼类 MSTN-1 的研究较为深入,已在多种鱼类中克隆到 MSTN-1,并对该基因的特征进行了一些分析,本实验室也克隆得到大黄鱼 MSTN-1 (AY842934)(Xue *et al.* 2006)的基因序列。

为进一步研究大黄鱼 MSTN 基因表达调控、活性及其生物学作用,作者在本实验室克隆的大黄鱼 MSTN-1 基因基础上,利用基因组步移的方法获得了大黄鱼 MSTN-1 基因的启动子序列,并对它的特性进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

大黄鱼样本取自浙江象山港养殖网箱,用无菌剪刀取背部肌肉组织分装于 1.5ml 离心管中,并迅速置于液氮灌中带回实验室,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。

Genome Walking Kit 与克隆载体 pMD18-T Vector 均购自 Takara 公司。饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、氯仿/异戊醇(24:1)和 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术公司。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

采用常规的酚-氯仿提取法。取约 100mg 组织,用剪刀尽量剪碎,加入 500 $\mu\text{l}$  裂解液(10mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100mmol/L EDTA, 400mmol/L NaCl, 1% SDS)和 5 $\mu\text{l}$  蛋白酶 K(20mg/ml)。混匀后置于 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴消化直至组织消化完全,期间每 20min 晃动 1 次。裂解物用等体积的饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提 1 次,4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 000r/min 离心 10min。取上清液加入 1/10 体积的 3mol/L NaOAc 和二倍体积  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的无水乙醇沉淀,4~6h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12 000r/min 离心 20min。沉淀物用 70% 酒精洗涤两次,室温自然干燥。待酒精挥发完全后,用 100 $\mu\text{l}$  无菌去离子水溶解。

#### 1.2.2 基因组步移

根据本实验室克隆的大黄鱼 MSTN-1 基因的 DNA 序列(AY842934)和 Genome Walking Kit 的特异性引物设计原则,使用 Primer 5.0 软件在靠近起始密码子的下游区域设计两条特异性反向引物 SP1(5'-CTGGT-GCGTCTCTTGGTCAC-3')和 SP2(5'-GAGACAGATG CATT GT CTCTC-3'),在上游区域设计 1 条特异性反向引物 SP3(5'-GGACTGGGTTTGG ATTAA TGT C-3')。

以提取的大黄鱼基因组 DNA 为模板,利用 AP4 引物(试剂盒提供)和特异性引物 SP1 进行第 1 轮 PCR,

反应体系为:基因组 DNA,100ng;dNTP Mixture(2.5mmol/L each),8 $\mu$ l;10 $\times$ LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus),5 $\mu$ l;TaKaRa LA Taq(5U/ $\mu$ l),0.5 $\mu$ l;AP4 (100pmol/ $\mu$ l),1 $\mu$ l;SP1(10pmol/ $\mu$ l),1 $\mu$ l;加水补齐至 50 $\mu$ l。反应程序如下:先进行预变性(94 $^{\circ}$ C,1 min 和 98 $^{\circ}$ C,1 min)和 5 个循环的高退火温度的高特异性反应(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,65 $^{\circ}$ C退火 1 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min),然后进行 1 个循环的极低退火温度的低特异性反应(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,25 $^{\circ}$ C退火 3 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min),再进行以下 15 个循环,每个循环包括两个高退火温度的高特异性反应(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,65 $^{\circ}$ C退火 1 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min)和 1 个低退火温度的低特异性反应(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,44 $^{\circ}$ C退火 1 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min)。以第 1 轮 PCR 反应液 1 $\mu$ l 作为第 2 轮 PCR 模板,利用 AP4 和特异性引物 SP2 进行第 2 轮 PCR,反应程序如下:每个循环都首先进行两个高退火温度(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,60 $^{\circ}$ C退火 1 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min),然后进行 1 个低退火温度的低特异性反应(94 $^{\circ}$ C变性 30 s,44 $^{\circ}$ C退火 1 min,72 $^{\circ}$ C延伸 2 min),共 15 个循环。再以第 2 轮 PCR 反应液 1 $\mu$ l 作为第 3 轮 PCR 模板,利用 AP4 和特异性引物 SP3 进行第 3 轮 PCR,反应程序与第 2 轮 PCR 相同。除了模板和特异性引物不同外,第 2 轮 PCR 和第 3 轮 PCR 的反应体系与第 1 轮的反应体系相同。

### 1.2.3 PCR 产物克隆及测序

PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,切下目的片段,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化,将回收产物连接至 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,含氨苄青霉素的 LB 培养基初步筛选阳性克隆,再结合菌液 PCR 法进一步确定筛选的阳性克隆。DNA 序列由上海英骏生物技术有限公司测定。

### 1.2.4 生物信息学分析

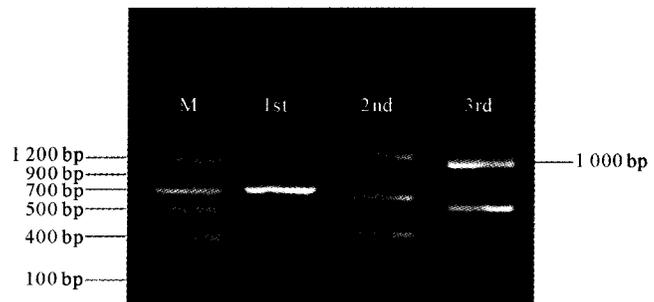
将获得的序列利用 Blast 进行相似性搜索。采用启动子预测软件([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 预测启动子和转录起始位点的位置。采用 TFSEARCH(<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>),TESS(<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>)和 MatInspector (Genomatix,<http://www.genomatix.de>)等多个软件确定转录因子结合位点。

采用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)对已获得的大黄鱼 MSTN-1 基因的启动子序列和已克隆到的斑马鱼(AY323521)、大口黑鲈 *Microppterus almoides* (EF071854)、大西洋鲑(EF392862)、尖吻鲈 *Lates calcarifer* (EF672685)、金鲷(EU881511)、牙鲆 *Paralichthys olivaceus* (DQ997779)、虹鳟(DQ136028)、溪红点鲑(AY227656)、花鲈 *Lateolabrax japonicas* (AY965685) 和斑点叉尾 *Lctalurus punctatus* (AF396747)等 10 种鱼类 MSTN 基因启动子进行多序列比对。采用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 构建大黄鱼 MSTN-1 启动子的系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 基因组步移结果

以大黄鱼基因组 DNA 为模版,经基因组步移的 3 轮 PCR 扩增后,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到约 1kb 的目的条带(图 1)。



说明: M:Marker; 1<sup>st</sup>:第 1 轮 PCR 反应结果; 2<sup>nd</sup>:第 2 轮 PCR 反应结果; 3<sup>rd</sup>:第 3 轮 PCR 反应结果

Note: M:Marker; 1<sup>st</sup>:The first PCR product; 2<sup>nd</sup>:The second PCR product; 3<sup>rd</sup>:The third PCR product

图 1 大黄鱼 MSTN-1 启动子基因组步移产物琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic walking product of *L. crocea* MSTN-1 promoter

## 2.2 大黄鱼 MSTN-1 启动子序列测定

基因组步移的第 3 轮 PCR 扩增产物,经纯化回收、克隆和测序,结果见图 2。在图 2 序列中,有 960bp 是新获得的基因序列,最后 3 个碱基为翻译起始密码子。

## 2.3 大黄鱼 MSTN-1 启动子序列特征

序列分析表明,克隆到的 DNA 片段含有许多启动子的特征序列,在翻译起始密码子 ATG 上游存在典型的 TATA box(-131~-136)、CAAT box(-175~-179)和 E-box(图 2)。

此外,该基因启动子区域还含有 NF-Y、SP1 等转录因子结合位点(表 1)。

## 2.4 系统进化分析

Blastn 的结果显示,大黄鱼 MSTN-1 启动子序列与金鲷 MSTN-1 启动子及大口黑鲈 MSTN 启动子的序列相似度最高,分别为 90% 和 75%。利用 Clustal W 比对大黄鱼 MSTN-1 与金鲷 MSTN-1 的启动子和大口黑鲈 MSTN 的启动子近端序列,可看出 TAA box、CAAT box、GH-CSE 和 POU1F1a 结合位点高度保守。

大黄鱼 MSTN-1 启动子序列与迄今已研究过的 10 种鱼类 MSTN 基因启动子的系统进化树见图 3。

## 3 讨论

本实验使用的 Genome Walking Kit 是一种根据已知基因组 DNA 序列,高效获取侧翼未知序列的试剂

盒,相对于其他传统方法具有高效、简便、特异性高等特点,不需要酶切、添加接头等。主要原理是根据已知 DNA 序列,分别设计 3 条同向且退火温度较高的特异性引物 SP,与试剂盒中提供的其中一种兼并引物 AP 进行热不对称 PCR 反应。本实验的第 3 次 PCR 反应结果有两条较亮的扩增条带,割胶回收后测序检测,约 1kb 的条带为目的条带。该 DNA 片段含有许多启动子的特征序列,如 TATA box、CAAT box 和 E-box,且它与金鲷等鱼类 MSTN-1 的启动子具有非常高的相似性,表明本实验克隆到的是大黄鱼 MSTN-1 基因的启动子。

多序列比对显示启动子近端序列保守性最高,该区域含有 TATA box、CAAT box、GH-CSE 和部分 E-box 序列。此外,POU1F1a 区域的序列保守性也较高。目前已研究过的鱼类 MSTN 基因的启动子都有 1~2

```

-1029 CGGTATCGGAGTATTTGGTGTTCACACTTTAGAGTACTGAGTGTGATCTGAATGCACCAGGAATGAGAAA
-959 ACACGCAATCTTCGACTATCCGAGCAGACTTGAAAGCATCTTTGATGTTTTTATTTATGCATTTTTGTAT
-889 TTTACTTTTCAAAATCCCACACTCACTCAGGTTGCAGCTGTGACGTCTCTAATGTGAATGACGTGAAGTC
      E-box5
-819 GCCACAGATGGGCCATCTCCTCGTGTGTACAATCTGGTTTCCACCAACAAACGTTTGAACAATTTGGA
-749 CTAATGTTTTTATTTAGCTTTTGTCTTTTTTTAATTCCTGTACAGAACGACGCATTTACATATTTGA
-679 TTGGAGGTGAGCGGAATCAAAATCAAAAATGAATATGATCTATCCTGATGAGACGGACTTGATTGCAATG
-609 GATTCAACIGTAACTGTTTTTTTCCCTCATAAATGAAATCTAATTCCTTAAACACACAGTGTGCATCCA
      E-box4                                     E-box3
-539 TGTACCTGCCACCAAGACAATTCATGTCTGATGATTATTGTGGCCGAGTAAAAACGAATCTGAGG
-469 AAAAACTTTTTATTTTTAAAGTGGTATTATTAATAAAAAAGATTAGACGAGTGTTCCTTTATTAATGTGC
-399 ATTAATATTCTTTAATCGCGATCACAATACTCATCAGAACATATAGCACAGACAGTCCGGTCTCGCTCT
-329 CTGCGCTCATTGCGCAACCACTGTAAGAAAAGTGAATTTATCCATGTGAGGACTCGTTCAGCACATGCTC
      E-box2                                     E-box1
-259 ACAGTCTCCATCCCTTTATGGCTTGACAACGAAAAAAGTTTTTCATGTGAGTGGTTAAAAATTCATTGTT
-189 GCCTGTCCAGCCAATCATAGTTTTTTGACGACACAAAAAGAGTTAAAGTTGGAGTATAAAAAGGTGCGCGC
      CAAT box                                     TATA box
-119 TAATAAAGTATGATGCTTATCAGTGTGGGACATTAATCCAAACCCAGTCCAGTTCGCGGCTCAGGTC
      SP3
-49  ACAAACCAAGGGATCTTTTTTTCAAACCAAACTCACACTGAGAGACAATG
      +1
  
```

说明: E-box, CAAT box 和 TATA box, 以及 SP3 结合位点都用下划线标出, 黑体部分为预测的启动子核心序列。左边的数字表示与翻译起始密码子 ATG 的距离

Note: E-box, CAAT box, TATA box and binding site for SP3 are underlined and the predicted promoter core region is shown in boldface. Numbers in the left are the distances from ATG

图 2 大黄鱼 MSTN-1 基因启动子的主要转录因子结合位点分析

Fig. 2 Main transcription factor binding sites analysis

of *L. crocea* MSTN-1 promoter

个 TATA box,而有些哺乳动物的 MSTN 基因的启动子具有 3 个 TATA box,如绵羊(Du *et al.* 2005)、牛(Funkenstein *et al.* 2009)。比较大黄鱼 MSTN-1、金鲷 MSTN-1、大口黑鲈 MSTN、花鲈 MSTN、虹鳟 MSTN-1a 和斑马鱼 MSTN-1 等基因的启动子序列,可看出这些序列的 TATA box 的位点都很相近,除大黄鱼外,其余鱼类至少存在 7 个 E-box 结合位点,但 E-box 的位置在不同鱼类中存在差异,只有大黄鱼、金鲷、大口黑鲈、花鲈之间的位置相对保守。基于 MSTN 基因启动子序列构建的进化树也反映了同属于鲈形目的大黄鱼、金鲷和大口黑鲈的 MSTN 基因启动子序列保守性较高。

表 1 大黄鱼 MSTN-1 基因启动子转录因子的名称及结合位点的位置

Table 1 Distribution of transcriptional response elements on *L. crocea* MSTN-1 promoter

名称 Name	位置 Location	序列 Sequence
E-box1(USF, MyoD)	-263~-268	CACATG
E-box2(USF)	-282~-287	CATGTG
E-box3	-546~-551	CAGTTG
E-box4 (E12, E47)	-600~-605	CAACTG
E-box5(MyoD)	-850~-855	CAGCTG
E12/E47	-444~-448	TGCGT
NF-Y	-171~-185	GTCCAGCCAATCATAG
MEF-2	-449~-460	TTATTTTTTAAA
MEF-3	-856~-866, -775~-787	CACTCAGGTTG/CAATCTGGTTTCA
POU1F1	-898~-906	TTTATGCAT
C-Ets-1	-707~-717	TAATTCCTGTA
C/EBP	-310~-323	TCATTGCGCAACCA
GH-CSE	-113~-118	AATAAA
SP1	-972~-976, -962~-966, -760~-764	GCACC/TGAGA/TTTGA

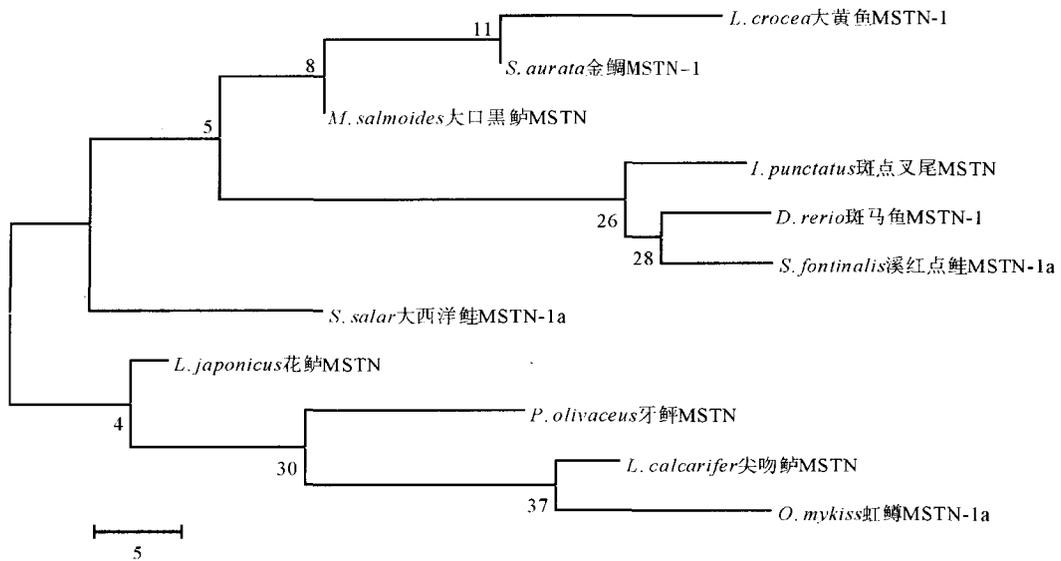


图 3 基于 MSTN 基因启动子序列构建的 NJ 树(数字表示 bootstrap 值)

Fig. 3 The neighbor joining (NJ) consensus tree based on the MSTN promoter sequences from 11 fishes(numbers indicating the bootstrap value)

分析大黄鱼 MSTN-1 启动子序列可看出转录因子 SP1、E47、MyoD、MEF2、USF 和 NF-Y 等和肌肉的发育有关,其中 MyoD、MEF2 等转录因子结合位点同样在金鲷(Funkenstein *et al.* 2009)、溪红点鲑(Roberts

*et al.* 2003)、斑马鱼(Xu *et al.* 2003; Kerr *et al.* 2005)、虹鳟(Garikipati *et al.* 2006)、大西洋鲑(Ostbye *et al.* 2007)和花鲈(Ye *et al.* 2007)中存在。另外,AP-1、E47、SP1、c-Ets-1、NF-1 等结合位点的功能很广泛,能在不同的组织和器官中起作用。本实验室已报道了大黄鱼 MSTN-1 基因在成鱼体内的肌肉组织、肝脏、肾脏、脾脏、肠和脑等 6 个组织和器官中都有表达(Xue *et al.* 2006),表明大黄鱼中的 MSTN-1 基因除了参加肌肉的生长和发育调控外,还可能参与机体的其他功能。

## 参 考 文 献

- 孙 升. 2008. 大黄鱼 *gdf-8* II 基因克隆与表达分析. 见:宁波大学硕士学位论文
- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O., and Estrada, M. P. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 119(4): 324~331
- Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoird, X., Bib, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J. M., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C., and Georges, M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* 38:813~818
- Du, R., Chen, Y. F., An, X. R., Yang, X. Y., Ma, Y., Zhang, L., Yuan, X. L., Chen, L. M., and Qin, J. 2005. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep. *DNA Seq.* 16: 412~417
- Funkenstein, B., Balas, V., Rebhan, Y., and Pliatner, A. 2009. Characterization and functional analysis of the 5 flanking region of *Sparus aurata* myostatin-1 gene. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 153: 55~62
- Garikipati, D. K., Gahr, S. A., and Rodgers, B. D. 2006. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *Endocrinol.* 190: 879~888
- Kerr, T., Roalson, E. H., and Rodgers, B. D. 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evolution Development*, 7(5): 390~400
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., and Patarnello, T. 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar. Biotechnol.* 3: 224~230
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., and Patarnello, T. 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509(1): 36~40
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., and Patarnello, T. 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream *Sparus aurata*: sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar. Biotechnol.* 3: 224~230
- Marchitelli, C., Savarese, M. C., Crisa, A., Nardone, A., Marsan, P. A., and Valentini, A. 2003. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Genome*, 14: 392~395
- Mcpherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*, 387: 83~90
- Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G., and Ostrander, E. A. 2007. A Mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3, e79. doi:10.1371/journal.pgen.0030079
- Ostbye, T. K., Wetten, O. F., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K. S., Yafe, A., Etzioni, S., Moen, T., and Andersen, O. 2007. Myostatin (MSTN) gene duplication in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. *Gene*, 403: 159~169
- Roberts, S. B., and Goetz, F. W. 2003. Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Mol. Cell. Endocrinol.* 210: 9~20
- Rodgers, B. D., Roalson, E. H., Weber, G. M., Roberts, B., and Goetz, F. W. 2007. A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *Am. J. Physiol. : Endocrinol. Metab.* 292:E371~E372
- Schuelke, M., Wagner, K. R., Stolz, L. E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J. F., and Lee, S. J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New Engl. J. Med.* 350:2 682~2 688
- Xu, C., Wu, G., and Zohar, Y. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 206(22): 4 067~4 079
- Xue, L. Y., Qian, K. X., and Qian, H. Q. 2006. Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Mol. Biol. Rep.* 33: 129~136
- Ye, H. Q., Chen, S. L., Sha, Z. X., and Liu, Y. 2007. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch *Lateolabrax japonicus*. *Mar. Biotechnol.* 9: 262~272