

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

博士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Doctoral Dissertation

斑馬魚 Myostatin 基因之分子調控與功能分析

Myostatin gene regulation and functional assay in



zebrafish

李秋月

Chiou-Yueh Lee

指導教授：吳金洌 博士

Advisor: Jen-Leih Wu, Ph.D

中華民國 九十九 年 一 月

January, 2010

國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

斑馬魚 myostatin 基因之分子調控與功能分析
Myostatin gene regulation and functional assay in
zebrafish

本論文係李秋月君 (D89623504) 在國立臺灣大學微生物與生化學研究所所完成之博士學位論文，於民國 99 年 1 月 8 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳金測

(簽名)

(指導教授)

黃健雄

陳志毅

陳振周

潘子明

龔詠毅

傅亭薇

系主任、所長

潘子明

(簽名)

謝 辭

本論文承蒙恩師 吳金洌博士長年細心指導並給與學生莫大的包容與教誨，並於完稿之後，詳加斧正，始得順利完成，師恩浩盪，永銘於心，特此表達無限的謝意。進修過程中，恩師除授業外，在為人處事、生活哲理方面，亦盡心的指點與關懷，使個人受益匪淺。

口試期間，感謝成功大學陳宗嶽博士、中央研究院臨海研究站陳志毅博士、國立臺灣海洋大學養殖研究所陸振岡博士、國立臺灣海洋大學養殖研究所龔紘毅博士、本所黃健雄博士、本所潘子明所長等提供許多寶貴的建議與指正，使論文更趨完備。

博士資格考期間，承蒙中央研究院細胞與個體生物研究所張繼堯博士、國立臺灣海洋大學養殖研究所陸振岡博士、本校畜牧研究所鄭登貴博士、本所黃健雄博士、本所潘子明博士、本所楊健志博士等多位老師對實驗之建議，在此謹表由衷的謝意。

感謝所上劉文雄老師、李敏雄老師、蘇南維老師及潘子明老師在進修期間對學生的關心與愛護，使我受益良多，在此由衷的感謝。

實驗期間蒙陳泓志先生、龔紘毅先生、胡紹陽先生、林志鴻先生、林壯宇、林錦華小姐、黃信傑先生、張雅南先生、陳建文先生在實驗上的幫助，使學生能順利完成論文，在此一併深深致謝。

感謝多年來實驗室的伙伴志律、汪汪、小皮、旺達、章文、子瑄、小草、建中、璟叡、Amali 及實驗室所有同仁在實驗上提供許多寶貴意見與建言，並於平時生活上及精神上互相鼓勵與關懷在此謹致最大的謝意；另外對於適時給予關懷與精神鼓舞、支持的雪良、浩浩、椒華、明輝、后儀、阿得、彭桑、小周、老何、李 sir 及多年來關心我的家人、同事及朋友因有你們的支持與鼓勵，才得以順利完成學業，謹獻上最真誠的謝意。

最後謝謝所有在此過程中曾幫助我的貴人及鼓勵我的所有人，謝謝你們。

摘要

哺乳類動物肌肉倍增基因(Myostatin) 缺乏會造成骨骼肌增加及變大導致成 ” 肌肉倍增” 表現型，Myostatin 在牛及人類主要表現在骨骼肌中，其突變或缺乏會造成骨骼肌細胞質量及數目的增加，是高等脊椎動物骨骼肌發育與生長之主要負調控因子；對魚類而言，myostatin 可在多種組織中表現，如腦、鰓、心臟、卵巢、眼睛、腎臟等器官，故其並非只單純調控肌肉組織生長，可能同時參與多種組織之調控機制。本實驗則分別從斑馬魚基因體基因庫及 24 小時 cDNA 基因庫中篩選基因體 DNA 及 cDNA ，分別探討 myostatin 基因之調控與功能。經選殖後得到 7 個有訊號的基因體 DNA ，其中有三個選殖株為 myostatin I 基因組，分別為 Zg 3-1 的 13.5Kb 、Zg 15-1 的 24Kb 及 Zg 17-3 的 15Kb ，其中以 15-1 包含有 myostatin I 基因的啟動子及基因組在內，為了分析啟動子的表現，利用 PCR 增幅方式取得啟動子片段 5.9Kb 、5.18Kb 、3.4Kb 、2.85Kb 、2.55Kb 、1.69Kb 及 0.6Kb 等 7 個片段，並將其構築至 pGL3-basic 冷光表現載體及 pEGFP-1 綠色螢光蛋白載體上，並將 pGL3-basic 冷光表現選殖株轉殖到 C2C12 、ZFL、NIH3T3 細胞中看其表現，在 C2C12 及 ZFL 細胞中以 3.4Kb 長的啟動子有最大活性，NIH3T3 細胞表現情形則以 0.6 Kb 有最佳活性，將含 pEGFP-MSYN 綠色螢光蛋白選殖株利用顯微注射打入斑馬魚胚胎中，觀察 myostatin 啟動子在生物體之表現情形，結果並無預期之綠色螢光之表現。

另為瞭解 myostatin 之功能，由斑馬魚 24 小時胚胎所合成的 cDNA 庫所選殖出 myostatin II 並將 exon III 刪除 281 bp 利用 vector base-RNA 方式將其構築至 pEGFP-C1 載體，利用顯微注射打入斑馬魚胚胎中，取得一個遺傳穩定 myostatin 基因 knockdown 的肌肉倍增斑馬魚。結果在胚胎早期發育時為全身發亮，至 72 小時開始往肝臟集中至 96 小時則表現於肝臟及脊椎且穩定綠色螢光表現於成魚中，經進一步交配後其子代仍可穩定且持續的表現。利用定量核酸聚合酶連鎖反

應分析確認 RNA 降低為野生組的 30%，肌肉蛋白質含量降為野生組的 36.76%；肌肉生成機制中相關標示因子 MyoD、myogenin、Mrf4 和 Myf5 之 RNA 增加為原來的 2 倍以上；分析第六代的成長速率，發現在 4 個月大時，其野生組和轉基因組兩組間平均體重 0.38 ± 0.05 公克及 0.55 ± 0.11 公克，轉基因組體重增加了 45%；經 t-test 統計分析兩組間彼此有顯著差異，進一步將一個月的稚魚切片及經 HE 染色分析肌肉纖維細胞大小由野生組平均值 $230.69 \pm 139.04 \mu\text{m}^2$ 增加至轉基因組之 $428.97 \pm 207.2 \mu\text{m}^2$ 平均增加了 85.95%，且兩者間具有顯著差異 ($p < 0.05$)。在本實驗中針對斑馬魚 myostatin 進行基因靜默 (gene silence) 可得到穩定遺傳世代表現之轉殖基因魚，這是首次成功得到具有 "double muscle" 表現型特徵的模式斑馬魚。

關鍵字：斑馬魚、肌肉倍增基因、啟動子、基因靜默、基因轉殖魚



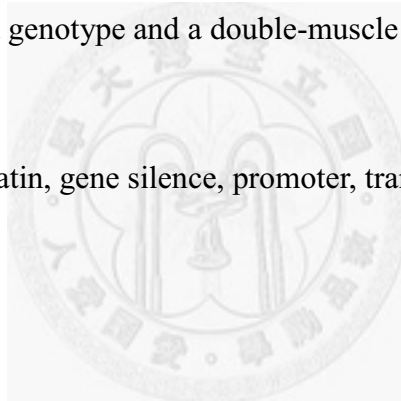
Abstract

Myostatin belongs to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, and is a secreted growth and differentiation factor and also a potent negative regulator of skeletal muscle development and growth. The myostatin (MSTN) null phenotype in mammals were characterized by extreme gains in skeletal muscles mass or “double muscle” as the cytokine negatively regulates skeletal muscle growth and development. Several aspects of MSTN biology in the fish were quite different from that in mammals. MSTN homologs had been identified in many different fish species. This diverse pattern of expression in fish suggests that the biological actions of MSTN may not be restricted to skeletal muscle but may additionally influence other fish tissues as well. In this study, we had established the zebrafish genomic library and obtained seven lambda clones by using the zebrafish MSTN I cDNA as probe. After subcloning, analysing and comparison sequence with the documented MSTN I cDNA, we found that Zg3-1 clone included 13.5Kb, Zg15-1 including 24 Kb and Zg17-3 including 15 Kb genomic clone. To analyze the promoter activity of myostatin I gene, we ligated 7 different DNA fragments of the myostatin I gene into pGL3-basic vector and constructed plasmids pMSTN5.9K, pMSTN5.18K, pMSTN3.4K, pMSTN2.85K, pMSTN2.55K, pMSTN1.69K and pMSTN0.6K. As transfection to C2C12, ZFL (zebrafish liver cell) and NIH3T3 cells, the expression of luciferase activity was analyzed. The results indicate that the 3.4Kb fragment of the zebrafish myostatin promoter had higher activities in C2C12 and ZFL cells.

We utilized microinjection of an antisense RNA-expressing vector to establish a myostatin gene knockdown hereditarily stable zebrafish strain with a double-muscle phenotype. Through real time-PCR and immunostaining analysis, the myostatin

messenger (m)RNA and protein levels of homozygous transgenic zebrafish were only 33% and 26% those of the non-transgenic control, respectively. And the mRNA level of myogenic regulatory factor markers, such as MyoD, myogenin, Mrf4, and Myf5 were dramatically increased in myostatin-suppressed transgenic fish compared to the non-transgenic controls. Although there was no significant difference in body length, homozygous transgenic zebrafish showed 45% heavier body weights than those of non-transgenic controls. Histochemical analysis of 1-month-old fry showed that the area of the cross-section of homozygous transgenic fish muscle fiber was twice as large as that of non-transgenic controls. This is the first model zebrafish with a hereditarily stable myostatin-suppressed genotype and a double-muscle phenotype.

Key word: zebrafish, myostatin, gene silence, promoter, transgene fish



目 錄

論文口試委員審定書	
謝辭-----	I
中文摘要-----	II
英文摘要-----	IV
目錄-----	V
圖目錄-----	IX
表目錄-----	X
第一章 文獻整理-----	1
1.1、肌肉倍增基因-----	1
1.2、Myostatin 的功能-----	4
1.3、肌肉生成-----	6
1.4、肌肉生成之調控機制-----	8
1.5、Myostatin 的調控-----	9
1.6、魚類的肌肉倍增基因-----	11
1.7、研究動機與目的-----	14
第二章 myostatin 啟動子的篩選與分析-----	15
2.1、摘要-----	15
2.2、前言-----	15
2.3、材料-----	16
2.3.1、實驗物種-----	16
2.3.2、實驗細胞-----	16
2.3.3、菌種-----	16
2.3.4、質體 DNA-----	17
2.3.5、TA cloning 載體-----	17
2.3.6、酵素-----	17
2.3.7、商品化反應試劑套組-----	17
2.3.8、藥品-----	18
2.4、方法-----	18
2.4.1、斑馬魚 myostatin 啟動子之篩選-----	18
2.4.1.1、噬菌體宿主細胞之培養-----	18
2.4.1.2、斑馬魚基因體基因庫轉印-----	18
2.4.1.3、核酸探針之製備-----	19
2.4.1.4、噬菌體溶菌斑雜合反應-----	20
2.4.2、Lambda 噬菌體重組基因之純化-----	20
2.4.3、myostatin 基因體之分離與鑑定-----	21

2.4.4、pMSTN-1 EGFP 載體之構築	22
2.4.5、勝任細胞製備	22
2.4.6、質體轉型	22
2.4.7、菌落雜合反應與顯影	23
2.4.8、小量質體製備	23
2.4.9、質體 DNA 的鑑定	24
2.4.10、大量質體製備	24
2.4.11、DNA 序列定序與分析	25
2.4.12、myostatin 啟動子選殖株之轉殖	25
2.4.13、pGL3-Basic 報導載體之構築	25
2.4.14、啟動子活性分析	26
2.5、結果	26
2.5.1、斑馬魚 myostatin I 啟動子選殖與分析	26
2.5.2、Myostatin I 啟動子活性分析	28
2.6、討論	35
第三章 Antisense myostatin 轉殖基因魚之功能分析	38
3.1、摘要	38
3.2、前言	38
3.3、材料	39
3.3.1、實驗物種	39
3.3.2、菌種	39
3.3.3、質體 DNA	39
3.3.4、TA cloning 載體	40
3.3.5、酵素	40
3.3.6、商品化反應試劑套組	40
3.3.7、藥品	40
3.4、方法	41
3.4.1、斑馬魚 myostatin cDNA 之篩選	41
3.4.1.1、噬菌體宿主細胞之培養	41
3.4.1.2、斑馬魚 cDNA 基因庫轉印	41
3.4.1.3、核酸探針之製備	42
3.4.1.4、噬菌體溶菌斑雜合反應	42
3.4.2、Lambda 噬菌體重組基因之純化	43
3.4.3、Myostatin cDNA 之分離與鑑定	44
3.4.4、pEGFP-C1 載體之構築	44
3.4.5、勝任細胞製備	45
3.4.6、質體轉型	45

3.4.7、菌落雜合反應與顯影	46
3.4.8、小量質體製備	46
3.4.9、質體 DNA 的鑑定	47
3.4.10、大量質體製備	47
3.4.11、cDNA 序列定序與分析	48
3.4.12、pMSTN-EGFP 斑馬魚胚胎顯微注射	48
3.4.13、斑馬魚魚卵之 RNA 抽取	48
3.4.14、1 step RT-PCR 偵測 myostatin 基因及肌肉相關基因	49
3.4.15、組織切片及染色	49
3.4.16、細胞大小統計分析	50
3.4.17、電顯組織塊包埋	50
3.5、結果	51
3.5.1、Antisense myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚表現	51
3.5.2、Antisense myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚基因型及形態	55
3.5.3、Myostatin 定量 PCR 和 Western 分析	55
3.5.4、Myostatin 基因靜默 (silence) 斑馬魚 60 hpf 的表現型	56
3.5.5、Myostatin 基因靜默斑馬魚肌肉生長相關基因之分析	56
3.5.6、生長速率和 myostatin 基因靜默斑馬魚成魚表現型	56
3.5.7、Myostatin 基因靜默斑馬魚肌肉細胞之影響	62
3.5.8、Myostatin 基因靜默斑馬魚成魚各組織之表現情形	66
3.5.9、Myostatin 基因靜默斑馬魚成魚背部肌肉之切片	66
3.6、討論	71
3.6.1、斑馬魚 myostatin cDNA 基因篩選及 SiRNA 序列反意 DNA 構築	71
3.6.2、Antisense myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚肌肉相關基因分析	73
第四章 總結與討論	76
4.1、總結論	76
4.2、未來展望	77
參考文獻	79
附錄	90

圖目錄

Fig. 2-1. Genomic structure and organization of zebrafish myostatin genes. -----	27
Fig. 2-2. Zebrafish myostatin gene genomic Zg15-1 and Zg17-3 clones.-----	29
Fig. 2-3. Sequencing analysis of the myostatin I promoter. -----	30
Fig. 2-4. The effect of 5'-deletions on the transcriptional activity of the myostatin I promoter in three different cell lines. -----	34
Fig. 3-1. The construction of vector-based RNA interference.-----	52
Fig 3-2. The EGFP expression of wild type and myostatin silence transgenic zebrafish. -----	57
Fig. 3-3. EGFP expression of transgenic zebrafish in F2 generation at different stages.	58
Fig. 3-4. The gene expression of vector-based RNAi transgenic zebrafish in different muscle markers at 1.5 month. -----	59
Fig 3-5. Quantitative RT-PCR analysis of zebrafish Myostatin I and II mRNA levels in 60 hpf stage. -----	60
Fig. 3-6. SDS-PAGE and immunoblotting of zebrafish myostatin -----	61
Fig. 3-7. Myogenesis-related gene expression analysis at 60 h post fertilization (hpf). 64	
Fig. 3-8. Comparison of body weight and length of wild type and transgenic zebrafish. -----	65
Fig. 3-9. Photomicrography of dorsal muscle in 1 month stage zebrafish.-----	67
Fig. 3-10. Muscle fiber size analysis of transgenic zebrafish. -----	68
Fig. 3-11. Quantitative analysis of myostatin in different tissues of adult wild type, heterozygote and homozygote zebrafish.-----	69
Fig.3-12. Photomicrography of adult zebrafish in longitudinal section.-----	70

表目錄

Table. 2-1. Distribution of selected transcription response elements on the zebrafish Myostatin I promoter. -----	33
Table 3-1. The hatch rate and EGFP expression rate of transgenic vector-based RNAi zebrafish by microinjection.-----	53
Table.3-2. The hatch rate and EGFP expression rate of transgenic vector-based RNAi zebrafish in F1 generation. -----	54
Table 3-3. Survival rate and deformity of myostatin suppressed transgenic zebrafish at the hatching-out stage. -----	63



第一章 文獻整理

1.1、肌肉倍增基因 (Double muscle gene ; Myostatin) :

Myostatin 基因在哺乳類主要表現在骨骼肌 (McPhenon *et al.*,1997)，其它組織如脂肪組織 (Gonzalez-cadavid *et al.*,1998)，乳腺 (Ji *et al.*, 1998)，心肌(Sharma *et al.*,1999)亦有少量表現，近年來研究發現人類、牛、羊或老鼠的 myostatin 基因產生突變或被剔除(knock-out)後會增加骨骼肌質量及肌肉大小造成 hypertrophy 或 hyperplasia (McPherron *et al.*, 1997 ; McPherron and Lee, 1997 ; Schuelke *et al.*, 2004 ; Lee, 2004)；當 Myostatin 活性被抑制除了增加肌肉質量外，並可增加肌肉強度 (strength) 及調控類胰島素生長因子的代謝途徑 (McPherron and Lee, 2002 ; Jeanplong *et al.*, 2003)，myostatin 過度表現的老鼠其成年時會產生 dramatic systemic wasting syndrome 進而造成肌肉的萎縮 (Zimmers, 2002)。

Myostatin 基因為一調控肌肉生成之負調控因子 (negative regulator)，為 1997 年 McPherron and Lee 由具肌肉倍增表現型 (double muscle phenotype) 的牛隻 (Belgian Blue and Piedmontese) 中所發現，主要表現在骨骼肌，此基因位於牛的第二條染色體上 (bovine chromosome 2 之 muscular hypertrophy (mh) locus 的位置上) (Grobet *et al.*, 1997 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron and Lee, 1997 ; Smith *et al.*, 1997 ; Westhusin, 1997)。當此基因產生突變則會造成肌肉倍增的表現型。McPherron 等人發現肌肉倍增表現型的 Belgian Blue 品系種牛在 exon 3 中的第 821-831 的位置上有 11 個核酸被刪除 (deletion)，造成 C 端 (C-terminal) 只有前 7 個胺基酸為正確轉譯，後面的蛋白質編碼產生框構平移突變 (protein frame shift mutation)，使下游 14 個胺基酸不轉譯，形成一個縮短不全的 myostatin 蛋白質 (truncated myostatin protein)(Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron and Lee, 1997 ; Casas *et al.*, 1999)。Piedmontese 品系的牛則因為 2 個位置發生核酸序列轉換作用 (nucleotide transition) 的改變，其分別為 exon 1 由 A 取代原本的 C，造成第 94

個蛋白質編碼由原本的 leucine 改變為 phenylalanine；另一個突變是發生在 exon 3 由 A 取代原本的 G，使第 313 個蛋白質編碼由原本的 cysteine 改變為 tyrosine，這樣的突變尤其是第二個轉換作用（transition）所取代的 cysteine，使 myostatin 的雙硫鍵鍵結改變造成 myostatin 三度空間結構（three-dimensional structure）的改變，而失去了原有的生物活性（biological activity），導致 Piedmontese 牛具有肌肉倍增的表現型（double muscle phenotype）（Smith *et al.*, 1997）。Myostatin 基因突變在人類上亦於 2004 年被發現，因為此基因的突變導致這位四歲小朋友具有較強壯的肌肉張力（Schuelke *et al.*, 2004）。在魚類研究方面利用 antisense morpholino knock-down 技術抑制斑馬魚胚胎中 myostatin I mRNA 的表現，造成細胞發育速度變快（Amali *et al.*, 2004）。

Myostatin 蛋白質由 376 個胺基酸所組成，其特徵為具有一段進行分泌作用（secretion）的訊息序列（signal sequence）外，尚有一段相似性極高的蛋白質水解區域（proteolytic processing site）—RXXR，同時在 C 端（C-terminal）含有 9 個保守模式的 cysteine 胺基酸（conserved pattern of cysteine residues），因上述結構特性與典型的轉化生長因子家族（transforming growth factor- β superfamily；TGF- β ）中特有的分子結構與功能一致，故將 myostatin 歸類於轉化生長因子中的一員（McPherron *et al.*, 1997）；轉化生長因子家族為一多功能的細胞激素（cytokine），其結構和功能為釋放胜肽（related peptide）包含細胞生長、分化因子（growth and differentiation factors）與組織修復過程（tissue repair processes）（Massague, 1990），這些因子主要調控胚胎早期發育（embryonic development）及維持成體組織的恒定狀態（homeostasis）。

人類的 myostatin 基因位在第二號染色體上，此基因含三個 exon 及兩個 intron，並轉譯為單一個 376 胺基酸大小的蛋白質前趨物（prepro-myostatin），將前 24 個胺基酸並將此訊息序列切掉變成 pro-myostatin，進一步由 furin family 酵素認識在第 240-243 個胺基酸 RSRR(Arg-Ser-Arg-Arg) 的位置再將 pro-myostatin

切成 N 端的 27.680 kDa 和 C 端的 12.400 kDa 兩段不同大小的片段 (Lee and McPherron, 2001 ; Thies *et al.*, 2001) ; 而 C 端 12.400 kDa 的片段進一步以雙硫鍵鍵結成二聚體 (dimer) 的非活性狀態的 latent state (Thomas, 2000 ; Lee and McPherron, 2001 ; Hill *et al.*, 2002 ; Wolfman *et al.*, 2003)第三次切割則位在 C 端的第 76 個胺基酸將 C 端切割成具有活性 (Lee, 2004) 。

Myostatin 在各物種間，蛋白質的大小亦不相同。老鼠 Myostatin 蛋白前趨物 (precursor) 分子量約為 52 kDa，經前修飾作用 (prepro processing) 後的成熟 myostatin (mature myostatin) 其分子量約為 15 kDa。自然界中 myostatin 則以雙硫鍵鍵結之二聚體 (disulfide-linked dimer) 的方式存在，因此在生物體內之 myostatin 會以未修飾 (unprocessed) 及修飾過 (processed form) 兩種型式存在，其分子量分別為 101 kDa 及 25 kDa (McPherron *et al.*, 1997)。

分析鮭魚骨骼肌、腸道、心臟、腦部及牛的肌纖維其蛋白分子量為 55 kDa (Sharma *et al.*, 1999; Thomus *et al.*, 2000)。大鼠肌肉的 myostatin 蛋白質分子量為 35 和 37 kDa，此結果類似 myostatin 單體 (Wehling *et al.*, 2000)，而小鼠的骨骼肌蛋白質分子量為 37 kDa (Zhu *et al.*, 2000)。鱒魚含非活化原胜肽 (Latent porpeptide) 蛋白質，大小為 25 kDa，吳郭魚和老鼠利用中國蒼鼠卵巢細胞表現出成熟的 myostatin 蛋白質大小分別為 13 和 15 kDa。而老鼠的 precursor protein 的蛋白大小為 52 kDa (McPherron *et al.*, 1997; Rodger *et al.*, 2001)。Fun 和 Rebban 在 2007 年研究顯示鮭魚的 precursor fusion protein 分別為 50 kDa、37 kDa 和 15 kDa，利用 0.5 個單位的 furin 酵素作用 50 小時，結果可將蛋白質前趨物切成 37 kDa 和 13~14 kDa 大小的 2 個蛋白質，同時分別於還原與未還原狀態下跑電泳，結果在未還原條件下可得到分子量為 37 kDa 的蛋白質，進一步可再分離出 13 kDa 和 25 kDa 大小的蛋白質 (Funkenstein and Rebban, 2007)。利用人類 myostatin 抗體進行鱒魚免疫分析，可看到一個 53 kDa 的蛋白質前趨物及 40 kDa 非活化相關胜肽 (latency associated peptid ; LAP) 及單體成熟胜肽 17 kDa (Martin and John, 2005)。

另外，McPherron 等人利用原位雜交技術 (whole-mount in situ hybridization) 確認在各個胚胎發育時期 myostatin 在老鼠胚胎 (mouse embryo) 上的表現位置，得知 myostatin 在胚胎發育過程中表現可分為兩個階段：第一階段在早期胚胎發育過程中 myostatin 僅表現於發育中之體節 (developmental somite)，經全胚胎原位雜交分析得知，受精 9.5 天後 (9.5 P.C.) 的老鼠胚胎，在體節的位置上即有 myostatin mRNA 被偵測到，同時藉由原位雜交分析，受精 10.5 天後 (10.5 P.C.) 老鼠胚胎切片得知，myostatin 表現侷限於體節發育成生肌節的區間 (myotome compartment)。第二階段則於胚胎後期發育過程中 myostatin 的表現則遍佈全身各個發育的肌肉 (developing muscles)，然而 myostatin 的表現並不隨著發育過程的結束而停止，在成體 (adult animals) 中仍然持續不斷的表現，McPherron 等人於 1997 年利用北方點墨分析 (northern blotting analysis)，得知 myostatin 在成體表現只侷限在各種不同的骨骼肌組織 (skeletal muscle tissues) 中，而其他的組織並沒有發現到 (McPherron *et al.*, 1997)。

1.2、Myostatin 的功能:

Myostatin 的生物功能 (biological function)，McPherron 等人利用老鼠的胚胎幹細胞 (embryonic stem cell) 以 homologous targeting 的技術來破壞 myostatin 基因，並篩選產生 myostatin 缺乏的老鼠，結果顯示利用 homologous gene targeting 所產生的老鼠其個體之骨骼肌明顯較正常老鼠 (wild-type mice) 更大且肌肉量 (muscle mass) 比正常老鼠增加 2-3 倍以上，然而體組成分析的結果顯示 myostatin 缺乏的老鼠與正常老鼠脂肪含量 (fat content) 差不多，此結果證明了 myostatin 缺乏的老鼠肌肉量的增加主要是來自骨骼肌肌肉量的增加，而非肌肉中脂肪含量的增加 (McPherron *et al.*, 1997)；為了進一步研究 myostatin 缺乏的老鼠其肌肉量的增加是因為細胞增殖作用 (hyperplasia) 或細胞肥大作用 (hypertrophy) 單獨造成的影響，或是由細胞增殖作用與細胞肥大作用兩者共同作用導致肌肉增

加的結果，因此利用組織切片分析不同的肌肉組織，發現主要促使骨骼肌肌肉量增加的主要原因是骨骼肌細胞進行大量細胞增殖作用，但相對的細胞肥大作用對肌肉量的增加亦有影響。

目前已被研究 myostatin gene 之脊椎動物，包括：老鼠 (murine)、大鼠 (rat)、人類 (human)、狒狒 (baboon)、牛 (bovine)、豬 (porcine)、羊 (ovine)、雞 (chicken)、火雞 (turkey) 以及斑馬魚 (zebrafish) (McPherron and Lee 1997; McPherron *et al.*, 1997)，其中牛 myostatin 位於第二號染色體的 muscular hypertrophy (mh) locus 的位置上 (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Westhusin, 1997; Fahrenkrug *et al.*, 1999; Pirottin *et al.*, 1999)，豬的 myostatin 位於第 15 號染色體之 muscular hypertrophy (mh) locus 的位置上 (Sonstegard *et al.*, 1998)，人類的 myostatin 則位於第二號染色體上的 muscular hypertrophy (mh) locus 的位置上 (Sonstegard *et al.*, 1998; Pirottin *et al.*, 1999)。

Myostatin 在老鼠和牛中的表現，只產生單一個 myostatin 轉錄產物 (single myostatin transcription product)，約 2.9 kb 的 mRNA，主要出現在骨骼肌 (skeletal muscle) 及少量表現在脂肪組織 (adipose tissue) (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997)；豬則有兩個 myostatin 轉錄產物，大小分別為 1.5 kb 和 0.8 kb，經分析其在各組織表現情形，發現在脂肪組織中並沒有偵測到，但其表現並不只表現於骨骼肌，同時在泌乳乳腺的長管狀分泌小葉 (tubuloalveolar secretory lobules of lactating mammary gland) 亦有表現，由此推測 myostatin 可能扮演著豬隻調控懷孕期或泌乳期乳腺成長發育的角色 (Ji *et al.*, 1998)；而 Sharma 等人利用 RT-PCR 技術，證實羊除了骨骼肌組織 (skeletal muscle tissues) 可偵測到 myostatin 以外，另外在胎兒 (fetal) 和成體 (adult) 的心臟組織中也有 myostatin 的表現，特別是浦金埃纖維 (Purkinje fibers) 的位置有較明顯的表現，且在心臟組織中易出現心肌梗塞 (post infarct) 的區域，myostatin 的表現比正常狀態時更顯著，因此認為 myostatin 在心臟病理機制 (cardiac pathophysiological conditions) 上扮演一個重要

的角色 (Sharma *et al.*, 1999)。

Zhu 等人於 2000 年，利用顯著負面的方法 (dominant negative manner) 產生 myostatin 突變的基因轉殖老鼠 (transgenic mice)，他們將 myostatin 蛋白質水解區域 (proteolytic processing site) 上的第 264-267 胺基酸的 RSRR 切割位置 (cleavage site) 的序列更改為 GLDG，造成 myostatin 無法正常切割而產生前修飾作用 (prepro-processing)，進而無法產生具有生物活性 (biological activity) 的成熟 myostatin (mature myostatin)，而此顯著的負面 (dominant negative) 效果，造成正常成熟之 myostatin (processed mature myostatin) 量下降 40%，導致骨骼肌肌肉量增加了 35%，產生具有肌肉倍增表現型基因轉殖老鼠，造成此結果之原因為肌肉細胞的肥大作用而非細胞增殖作用，因此作者得到一個推論：當少量抑制 myostatin 的表現只會影響細胞肥大作用，而大量抑制 myostatin 的表現則會同時影響細胞肥大作用與細胞增殖作用 (Zhu *et al.*, 2000)。

1.3、肌肉生成 (Myogenesis)：

脊椎動物的肌肉組織可分為三類：骨骼肌 (skeletal muscle)、平滑肌 (smooth muscle)、和心肌 (cardiac muscle)，其中由骨骼肌所組成的肌肉組織就是一般所謂肌肉的部分，可進行經自由意識傳達的動作。骨骼肌細胞為一多核長條形、具橫紋之纖維狀細胞，又稱為肌細胞 (myotubes)，肌細胞是由單核的肌纖維母細胞 (myoblasts) 經融合 (fusion) 後形成的一個多核體細胞融合形成的多核原生質塊 (syncytium)。脊椎動物肌肉的生成 (myogenesis) 分為三個階段：其由胚胎裡的中胚層 (mesodermal cells) 中的體節裡的肌纖維母細胞經過決定 (myoblasts determination)、遷移 (migration) 到生成肌肉組織的位置，並分化 (differentiation) 形成肌節 (myotome)，此時肌纖維母細胞不再進行細胞分裂並開始融合分化成肌肉組織 (myotubes) 以及肌纖維 (muscle fibers) (Lyons and Buckingham, 1993；Williams and Ordahl, 1994)。肌肉細胞的生成和發育在各個不同的發育時期需要不

同的基因表現與交互作用伴隨，在 1970 年代早期的研究顯示肌肉細胞的生成和發育受到四種肌肉生成基因 (myogenic gene) — MyoD (myoblast determination protein)、Myf5、myogenin 和 Mrf4 所調控，這四種肌肉生成基因在肌肉生成過程中分別扮演不同的角色。由於這些肌肉生成基因其蛋白質結構類似 MyoD (MyoD-like proteins)，且 MyoD 對這些肌肉生成基因具有上位調控 (up-regulation) (Weintraub *et al.*, 1989; Rudnicki *et al.*, 1992) 以及正迴饋調控 (positive feedback) 的機制 (Thayer *et al.*, 2001)，故將這四種肌肉生成基因歸類為 MyoD gene family (Weintraub *et al.*, 1991)。MyoD 基因家族有一個重要的性質，即它的上游有一個自身產物的結合部位，一旦 MyoD 基因獲得表現，即可以藉由正迴饋調節方式維持其持續表現，以保證肌肉細胞的分化進行和完成。研究發現 MyoD 的表現與細胞分裂相關基因的表現彼此間有相互拮抗的關係，部分的體節細胞經肌纖維母細胞決定分化成肌纖維母細胞的過程中 MyoD 扮演著相當重要的角色 (Davis *et al.*, 1987)，其亦可誘發非肌肉細胞分化成肌纖維母細胞 (Taylor and Jones, 1979; Lassar *et al.*, 1986)；而 Myf5 具有與 MyoD 類似的功能，其負責體節細胞之約定成為肌纖維母細胞的過程。另外在不同的研究中發現當單獨表現 MyoD 或 Myf5 的細胞仍然會分化成肌纖維母細胞再發育成正常的肌肉組織，但完全不表現 MyoD 和 Myf5 的細胞，卻無法正常分化成肌纖維母細胞，由此可知 MyoD 與 Myf5 的表現和肌纖維母細胞的形成以及存活有關，且 MyoD 與 Myf5 在功能上具有補償作用 (Braun *et al.*, 1992; Hasty *et al.*, 1993; Rudnicki *et al.*, 1993)；此外讓 Myogenin 基因產生突變結果導致肌纖維母細胞無法正常形成肌細胞，因此推論 myogenin 與肌纖維母細胞開始分化成肌肉細胞有關 (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993)；Mrf4 功能為完成肌肉蛋白之生合成及將肌細胞聚集為成熟且具有收縮功能之肌纖維的過程中扮演著極為重要的角色 (Venuti *et al.*, 1995)，上述四個肌肉生成基因，依其蛋白質構型，將其歸屬於 basic helix-loop-helix (bHLH) family，此基因家族利用 N 端 (N-terminus) 的鹼性胺基酸之正電與 DNA 結合，進行肌肉特定

基因的轉錄作用 (muscle-specific transcription)，而 C 端則利用疏水性胺基酸以分子間疏水性交互作用 (hydrophobic interaction) 與同種或類似的蛋白質分子形成同種二聚體 (homo-dimer) 或異種二聚體 (hetero-dimer) (Jones, 1990)，而這四種肌肉生成蛋白 (myogenic proteins) 又稱為肌肉專一性轉錄因子 (muscle-specific transcription factors) (Lassar *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990)。除此，另一個 basic helix-loop-helix 家族成員的抑制分化蛋白質又稱為 Id 蛋白 (inhibitor of differentiation protein)，可與肌肉專一性轉錄因子結合，形成異種二聚體，用來抑制肌肉特定基因的表現，進一步調控肌肉細胞的增殖 (proliferation) 而達到負回饋 (negative feedback) 的拮抗作用 (Benezra *et al.*, 1990; Jen *et al.*, 1992)。

1.4、肌肉生成之調控機制 (The mechanism of regulation in myogenic gene)：

肌肉細胞的生成和發育受到四種肌肉生成基因—MyoD、Myf5、myogenin 和 Mrf4 所調控，這四種肌肉生成基因在肌肉生成過程中分別扮演不同的角色。依據 McPherron 等人研究顯示 myostatin 在老鼠胚胎發育時期上的表現主要在其體節產生肌節的位置上，且 myostatin 的功能是因細胞增殖作用與細胞肥大作用，造成骨骼肌肌肉量的增加 (McPherron *et al.*, 1997) 而使老鼠具肌肉倍增表現型。相似的肌肉倍增表現型的牛則於 1999 年被發現，當 myostatin mRNA 產生突變且表現量高於正常牛隻，而 MyoD mRNA 的表現量也有相同結果 (Bass *et al.*, 1999)，同年 Ferrell 等人證實在 myostatin 基因上游的地方具有一個 MyoD 結合位置，因此推測 myostatin 的表現可能受到 MyoD 表現的影響 (Ferrell *et al.*, 1999)。

一般細胞的分裂是由 cell-cycle 中的 G1 phase 進入 DNA 合成的 S phase 開始，此作用受到許多不同的 cyclin 和 cyclin-dependent kinases 所調控 (Nigg, 1995)，此類調控包括：cyclin-E/Cdk2 複合體作用於 G1 phase 進入 S phase 的過程，cyclin-D/Cdk4 複合體與 cyclin-D/Cdk6 複合體參與 G1 phase 的反應，而

cyclins 和 Cdks 同時受到 CKIs (inhibitors of Cdks) 成員如：p15、p16、p21、p27 和 p57 等蛋白質所抑制；Cyclin/Cdk 複合體在 cell-cycle 中將 Rb (retinoblastoma susceptibility gene) 磷酸化 (phosphorylation) 進而使磷酸化的 Rb 基因失去與 E2F 轉錄因子的鍵結能力，未被鍵結 E2F 則具有轉錄活性可使 cell-cycle 突破 G1 phase 中的 restriction point 進入 S phase。Thomas 等人於 2000 年實驗結果得知，myostatin 會增加 p21 的量進而造成 Cdk2 protein 的下降，因此提出了一套調控 myoblast 增殖 (proliferation) 的假說；即正常的 myostatin 具特异性的上游調控 p21 的表現，p21 的增加抑制了 cyclin-E/Cdk2 磷酸化的能力，進而造成高磷酸化的 Rb 與 E2F 轉錄因子鍵結，因而失去由 G1 phase 進入 S phase 的能力 (Corrtnik *et al.*, 1992；Hiebert *et al.*, 1992；Weintraub *et al.*, 1992；Hollingsworth *et al.*, 1993)，此一假說說明具有雙倍肌肉表現型的牛和老鼠其肌肉細胞的增殖作用是因為 myostatin 的突變而失去調控肌纖維母細胞增殖的功能所導致的結果 (Thomas *et al.*, 2000)。

1.5、Myostatin 的調控：

Myostatin 蛋白質是一種分泌性的分化、生長調節因子，屬轉化生長因子家族的一員，此家族的蛋白質亦被歸類為細胞激素的一種，此一蛋白會被分泌到血液中並隨著內分泌系統的自分泌 (autocrine) 及旁分泌 (paracrine) 運輸方式到達目標細胞並進行調控。

目前 myostatin 調控機制方面的研究正多方面進行中，有關 myostatin 結合蛋白已知有 follistatin 及 follistatin 相關基因，如：FLRG，follistatin like-3，FSTL-3 和 follistatin related 胜肽或 FLRP 及生長/分化因子結合血液蛋白質(GASP-1)及 titin-T-cap，這些相關基因蛋白之作用分別為：T-cap 為 sarcomeric protein 與 titin 的 N 端結合幫助調控骨骼肌或組織肌肉細胞 T-cap 結合經推測在 golgi 其作用為防止其分泌的 N 端胜肽與 pro-myostatin 的 proleolytic processing 結合，myostatin

與 like follistatin 具有高親合力，而 FLRG 和 GASP-1 能預防 myostatin 與受體結合和活化(Lee and McPherron, 2001)，其交互作用則類似 TGF β -superfamily membrane (Koli *et al.*, 2001)。在人類腎臟上皮細胞 (293T) 研究結果顯示人類 Myostatin 在骨骼肌可能部份藉由 myostatin latent TGF β binding protein-3 (LTBP-3) 與 myostatin 在細胞外間質結合並減弱其生物活性，然而 ectopic 表現的 LTBP-3 在老鼠骨骼肌會增加橫切面之纖維面積；另外 decorin 為一間質結合蛋白 (Matrix-associated protein) 和 myostatin 以等比例作用具有高親和力但無非活化相關胜肽和防止與受體結合之活性(Anderson *et al.*, 2008)。Spatiotemporal expression 結果顯示 myostatin 和 decorin 在大鼠骨骼肌中其類似 decorin's 組成(Nishimura *et al.*, 2007)。其中小的 Leucine-rich proteoglycan 結合 myostatin 後可調節 collagen fibrillogenesis 和肌纖維母細胞增殖(Velleman *et al.*, 1999)。

c-ski 是一個 corepressor 當 smad 與 ski 結合後，能穩定的不活化 smad2/3/4 複合體(Xu *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2004)，結果顯示當抑制 smad2 和 smad3 的訊息後，有部分反應會藉由直接阻礙組蛋白去乙酰酶的活性(blocking histone deacetylase activity)，就像是連結一個轉錄輔助活化子 (transcriptional coactivator) (Akiyoshi *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2007)。c-ski 在核酸的作用相當於增強 myogenin transactivation 它直接作用在 myoD 和 MEF2 的異種二聚體，此結果顯示骨骼肌的 smad7 和 c-ski 在細胞外的負調控機制與 myostatin 或其他 TGF- β superfamily ligands 的訊息傳遞就如 smad2 和 smad3 (Kobayashi *et al.*, 2007)。

Myostatin 訊息不是遵循 smad 標準的 pathways 在進行，其奇特的影響 mitogenic pathways 方式是藉由 IGF-1 來刺激肌纖維母細胞增殖和細胞 progression，其中 IGF-1 會刺激肌纖維母細胞進而增加 p21 的活性，同時也會抑制其他刺激分化物質，而 myostatin 也會增加 p21 的活性，但不像 IGF-1 一樣會抑制其他刺激分化物質，然而 myostatin 會活化 Akt 及 MAPKS 因子，目前 myostatin 和 IGF-1 彼此互相交互作用不清楚，且 myostatin 如何刺激細胞循環

(cell cycle) 使其停留在 G2 phase 則尚待進一步探討。但已知 myostatin 被結合住時會抑制細胞分化(Thomas *et al.*, 2000; Rios *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001)

另一方面有研究顯示 myostatin 的訊息是經由肌肉細胞中的 activin receptor type II (ActRII B) 這一群組 (cascade) 的反應來進行，首先被推測 myostatin 與 type I receptor 結合 ALK5 與 ActRII B 受體結合，進而造成 smad2 和 3 磷酸化，而磷酸化之 smad2 或 smad3 會跟 smad4 形成複合體後進入細胞核，進而調節 myoD 和 myogenin 的表現。Myostatin 研究顯示與調節肌肉纖維細胞的表現有關，myostatin 與 ActRII B 被表現在肌肉細胞，其參與增殖與產生細胞內的相關蛋白，會造成 smad 的系統產生及下游 p38 和 Akt pathway 的進行，當藥物性抑制 myostatin 的情況下 MyoD 活性會增加，造成肌肉細胞變大(Lawlor and Arotwen, 2000; Zhu *et al.*, 2004; Morissette *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007)

1.6、魚類的肌肉倍增基因 (Fish myostatin gene)：

有關魚類 myostatin 的研究最早由 McPerron 等人於 1997 年在斑馬魚 (zebrafish) 體內發現的。相對於其他哺乳動物，例如：老鼠 (murine)、大鼠 (rat)、人類、狒狒、牛、豬、以及羊之 myostatin 都具有極高的相似性 (homology)。然而斑馬魚的 myostatin 與其他哺乳動物和鳥類的 myostatin 卻只有 88% 左右的相似性 (homology) (McPerron and Lee, 1997)。第二個自魚類中分離出 myostatin 是由 Rodgers 等人於 2001 年從莫三比克吳郭魚 (tilapia; *Oreochromis mossambicus*) 以及白鱸魚 (white bass; *Morone chrysops*) 體內所分離出，彼此間的相似性高達 95%，而與斑馬魚的 myostatin 則有 80% 的相似性，不過與其他哺乳動物和鳥類 myostatin 的相似性卻只有 60-70%。至於蛋白質水解區域 (proteolytic processing site) 則為 RARR 與斑馬魚的 -RIRR 以及其他哺乳動物和鳥類的 -RSRR 不同。另外 Rodgers 等人同樣地證實了 myostatin 在莫三比克吳郭魚中的表現，並不局限於骨骼肌，在眼睛、鰓絲、腦、腸、和卵巢都有表現，在精巢只有微量的表現，而肝

臟、腎臟、胃、和心臟卻無 myostatin 的表現，此結果顯示 myostatin 在莫三比克吳郭魚中不只是抑制骨骼肌的成長 (skeletal muscle growth) 在控制其他組織體內平衡成長 (homeostatic growth) 上亦扮演重要的角色，同時在鰓絲上發現 myostatin 的表現，因而推測魚類中的 myostatin 可能與魚體滲透壓的調節 (osmoregulation) 有密切的關係。另外在卵巢和精巢也有 myostatin 的表現推測 myostatin 可能與魚類生殖組織 (reproductive tissues) 的維持有密切的關係 (Rodgers *et al.*, 2001)。在莫三比克吳郭魚的魚苗 (larvae) 中發現 myostatin 在魚苗早期的發育過程中有很顯著的表現並非常迅速的上升到表現的最高點，由此推斷 myostatin 在魚苗早期的肌肉生成過程中，可能扮演十分重要的角色 (Rodgers *et al.*, 2001)。

Roberts 和 Goetz 在 2001 年從溪鱒 (brook trout; *Salvelinus fontinalis*) 中選殖出全長 myostatin，以及分別自黃鱸魚 (yellow perch; *Perca flavescens*)、mach-mach (*Coryphaena hippurus*)、小鯖魚 (little tunny; *Euthynnus alletteratus*)、以及國王鯖魚 (king mackerel; *Scomberomorus cavalla*) 中選殖出部份的 myostatin。其中由溪鱒中選殖出 2 個 myostatin 型 (myostatin isoforms)，表現在腦和肌肉組織的 myostatin 分別為腦和肌肉型 BT myostatin (b/m BT myostatin) 以及表現在卵巢組織的 myostatin 為卵巢型 BT myostatin (ov BT myostatin)，這 2 種 myostatin 的相似性高達 92%，而腦和肌肉型的 BT myostatin 與斑馬魚的 myostatin 則有 84% 的相似性，與其他哺乳動物和鳥類的 myostatin 卻只有 65% 的相似性，其中腦和肌肉型 BT myostatin 在腦中的表現集中分佈在視丘 (optic lobes)、後腦 (hindbrain) 以及下視丘 (hypothalamus) 等區域，而卵巢型 BT myostatin 在母魚排卵 (ovulation) 期間在卵巢組織 (ovarian tissue) 有異常高量的表現，故推論卵巢型 BT myostatin 與母魚排卵作用 (ovulation) 可能有密切的關係 (Roberts and Goetz, 2001)。2005 年 Biga 等人利用 real time PCR 來偵測斑馬魚之 GDF11 和 myostatin II，發現 GDF11 表現在卵巢、鰓、肌肉和頭部且在 24 小時有最高表現，而 myostatin I 則在 48 小時有最高表現 (Biga *et al.*, 2005)。2004 年 Amali 等人以 RT-PCR 分析

myostatin I 在斑馬魚各組織中之表現情形，發現腦、眼睛、腎臟、精巢、卵巢、消化道和心臟皆有表現，但肝臟及鰓則無表現，另在 1 cell stage 即可偵測到 myostatin I 的表現 (Amali *et al.*, 2004)。在 2005 年 Acosta 利用 RNAi 的方法將吳郭魚 myostatin 基因的 dsRNA 分子以顯微注射方式打到斑馬魚卵，75 天後發現注射 5.5 和 5.5×10^6 分子的斑馬魚其體重增加 39~45% (Acosta *et al.*, 2005)；而斑馬魚 myostatin II 基因在 2005 年 Kerr 等人利用 PCR 方法增幅 myostatin II，發現在 8 個 somite (13 hpf) 時才有 myostatin II 的表現，在 5.5 hpf、19hpf 及孵化時期皆無法偵測到 myostatin II 的表現，另利用原位雜交在 somite stage 仍無 myostatin II 的表現 (Kerr *et al.*, 2005)。

斑馬魚有兩個 myostatin 基因的表現分別為 myostatin I 的 1125 bp 與 myostatin II 的 1101 bp (Amali *et al.*, 2008)，經比對 myostatin I 和 II 序列一致度 (identity) 為 66%，經胺基酸之分析比較 2 個胺基酸的一致度與相似度分別為 60% 和 71%。然而形成非活化相關胜肽和具生物活性蛋白質其一致度和相似度分別為 57/71% 及 88/92% (Kerr *et al.*, 2005)。虹鱒 myostatin I 和 myostatin II 分別為 1600 bp 及 1100 bp。虹鱒 myostatin I 在各組織中皆有表現，而 myostatin II 則只表現在腦部和慢速肌當中。另有研究顯示，虹鱒之 myostatin I 和 II 彼此間有 94% 的相似度，但虹鱒之 myostatin I 和 II 和斑馬魚的 myostatin I 和 II 間有 84.2% 和 82.3% 相似度；和鳥類比較則只有 64.3% 和 63.8% 相似度。分析 3' 端具有功能性的 414 個核苷酸序列，發現和老鼠的 myostatin 有 90% 的相似度。Myostatin 在第三次切割時認識蛋白酶水解位置(位於胺基酸 267~270)並將 myostatin 切成具功能性的蛋白質，此功能性的蛋白質在虹鱒和斑馬魚間的相似度為 95%，和雞、老鼠之相似度為 89%。斑馬魚自己本身 myostatin I 和 II 之序列比對，全長相似度為 64.4%，一致度為 70.0%，在 exon I 和 exon II 的相似度為 49%，一致度為 67%，另具功能性的 exon III 序列的相似度為 79%。

魚類目前在 myostatin 啟動子方面研究較少，其中 Xu 等人利用肌肉特殊啟動子接上 myostatin prodomain 後轉殖到斑馬魚卵中看 myostatin 功能，發現在胚胎時期並未改變慢肌細胞及快肌肉細胞之分化及 myogenin 基因的表現。在斑馬魚的啟動子方面 Xu 等人篩選出的斑馬魚 myostatin 啟動子發現並無組織專一性，因此另外構築一個肌肉專一性 myosin light chain 啟動子接上 myostatin 基因後再接上 myosin light chain 增強子的含 EGFP 報導基因的質體，並將其轉殖至斑馬魚卵中得到的基因轉殖魚其中 line 1 的斑馬魚其表現在骨骼肌以外在腦部與脊柱也有微弱的綠色螢光表現，同時以定量分析 7、45 和 240 天大小 myogenic 相關基因發現在此轉殖魚中 MyoD、Myogenin 和 Myf5 控制組和基因轉殖組兩者並無差異(Xu *et al.*, 2003)

1.7、研究動機與目的：

由於 myostatin 在哺乳類動物中被發現只表現在骨骼肌當中，當此基因被剔除或產生突變時會造成肌肉倍增之外顯型(phenotype)，隨著它的被深入研究似乎能應用在治療某些造成肌肉萎縮的特殊疾病上。實驗室於 2004 年 Amali 等人已針對 myostatin I 之功能性探討並已發表，故本論文則希望透過模式生物(animal model) 斑馬魚 myostatin 之功能研究，藉由同源基因轉殖之概念來取得具有 myostatin 本身的啟動子啟動反義 RNA 的穩定魚種來抑制 myostatin 之功能，以產生肌肉倍增的斑馬魚種，以瞭解 myostatin 在斑馬魚中所扮演之角色，希望將來進而探討肌肉萎縮疾病之機制並尋求治療之方式。除此之外亦可作為後續之經濟魚種之開發應用及相關研究。

第二章 myostatin 啟動子的篩選與分析

2.1、摘要

本實驗則分別從斑馬魚基因體基因庫及 24 小時 cDNA 基因庫中篩選基因體 DNA 及 cDNA，分別探討 MSTN 基因之調控與功能，經選殖後得到 7 個有訊號的基因體 DNA，其中有三個選殖株為 MSTNI 基因組，分別為 3-1 的 13.5Kb、15-1 的 24Kb 及 17-3 的 15Kb，其中以 15-1 包含有 MSTNI 基因的啟動子及基因組在內，為了分析啟動子的表現，利用 PCR 增幅方式取得啟動子片段 5.9Kb、5.18Kb、3.4Kb、2.85Kb、2.55Kb、1.69Kb 及 0.6Kb 等 7 個片段，並將其構築至 pGL3-basic 冷光表現載體及 pEGFP-1 綠色螢光蛋白載體上，並將 pGL3-basic 冷光表現選殖株轉殖到 C2C12、ZFL、NIH3T3 細胞中看其表現，在 C2C12 及 ZFL 細胞中以 3.4Kb 長的啟動子有最大活性，而 NIH3T3 細胞表現情形則是 0.6 Kb 有最佳活性，將 pEGFP-1 綠色螢光蛋白選殖株利用顯微注射打入斑馬魚卵中，經孵化後以綠色螢光顯微鏡觀察，結果有比控制組亮但並無組織特異性。

2.2、前言

myostatin 啟動子的研究並不多見，其中針對斑馬魚方面則有 Xu 等人篩選出的斑馬魚 myostatin 啟動子，並將 1.2 Kb 大小的啟動子接上 EGFP 報導基因後打入魚胚胎中看其表現情形，結果並未如預期在肌肉表現，而是微弱的表現在基板 (floor plate) 和頭部，在其他組織而非骨骼肌，故推論 myostatin 在魚體的表現可能不像哺乳類動物具有組織專一性，因此另外構築一個肌肉專一性 myosin light chain 啟動子接上 myostatin 基因後再接上 myosin light chain 增強子的含 EGFP 報導基因的質體，並將其轉殖至斑馬魚卵中得到的基因轉殖魚其中 line 1 的斑馬魚其表現在骨骼肌以外在腦部與脊柱也有微弱的綠色螢光表現，同時以定量分析 7、45 和 240 天大小 myogenic 相關基因發現在此轉殖魚中 MyoD、Myogenin 和

Myf5 控制組和基因轉殖組兩者並無差異 (Xu *et al.*, 2003) 。

分析斑馬魚 2 kb 長的 myostatin 啟動子，TATA box 上游序列發現斑馬魚比人類、老鼠、牛及斑馬魚自己的 myostatin I 啟動子有較多的肌肉相關順式調節子，在 myostatin II 上游有許多維持 myogenesis 的 myogenic 調控因子及轉錄因子，且只發現在 myostatin II 啟動子上，其包含 3 個 androgen response elements、3 個 myo binding site、2 個 myogenin site、1 個 myogenic enhancer factor (MEF-3) 結合部位、1 個 glucocorticoid response element 和 1 個 muscle initiator site (Ma *et al.*, 2001; Crisa *et al.*, 2003)。在這些元素當中 myostatin II 啟動子另包含 MEF2 binding site 和 myostatin transcription factor (TET-1) 和多個 E-boxes (kerr *et al.*, 2005) 。

2.3、材料

2.3.1、實驗物種

斑馬魚基因庫 (zebrafish, *Danio rerio* genomic library)，由實驗室所合成提供。

2.3.2、實驗細胞

Zebrafish Liver cell

NIH3T3 cell

C2C12 cell

2.3.3、菌種

Escherichia coli XL-1 Blue MRA

Escherichia coli XL-1 Blue MRF'

Escherichia coli XL-10 Gold

DH5 α

2.3.4、質體 DNA:

pBluescript SK(-)：質體 DNA 上含有 Ampr 基因可抵抗 Ampicillin，在基因體次選殖 (Subclone)時使用。

pEGFP-1：質體 DNA 上含有 EGFP 螢光蛋白基因以及 Kan^r/Amp^r 基因可抵抗 Kanamycin 及 Ampicillin，但缺乏啟動子部份，可作為啟動子分析時的螢光表現質體。

2.3.5、TA cloning 載體：

質體 DNA 上含有 Amp^r 基因可抵抗 Ampicillin，用來接合 PCR 產物，以方便保存以及大量純化，可無須再透過 PCR 增幅的方式得到 DNA 片段。

2.3.6、酵素

限制酵素 BamH I、EcoR I、EcoR V、Hind III、Sac II、Xba I、Xho I(購自 NEB, New England BioLab 公司)；PCR 酵素:(1) Vio Taq DNA polymerase (2) Vent DNA polymerase (proofreading)；T4 DNA Ligase，DNase I-RNase free，T3 RNA polymerase，T7 RNA polymerase(購自 BM 公司)；Porteinase K(購自 Sigma 公司)

2.3.7、商品化反應試劑套組：

少量質體 DNA 萃取：Mini-M Plasmid DNA Extraction System；大量質體 DNA 萃取：Highpure plasmid Maxiprep kit (購自 invitrogen 公司)

α -³²P dCTP labeling：rediprimerTM II random primer labeling system (購自 Amersham 公司)

Gel Elution：Gel-M Plasmid Gel Extraction System(購自 VIOGENE 公司)

2.3.8、藥品:

Tris base, EDTA, NaCl, SDS, Formamide, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaOH, HCl, $CaCl_2$, Iso-propanol, Glycerol, Sucrose, Maltose, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Ethanol, Phenol, 氯仿, Acetic anhydride, Benzyl benzol, Triethanolamine, Benzyl alcohol, Formaldehyde, Sodium acetate(購自 Merck 公司), Ampicillin (購自 CALBIOCHEM), Protector RNase Inhibitor (購自 Roche 公司), Agarose, NBT/BCIP stock solution (購自波士特公司), methanol Polyethylene glycol 8000 (PEG 8000), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Ethidium Bromide (EtBr), MOPS (購自 Sigma 公司), Lipofectamine 2000 reagent (invitrogen 公司), TRIzol reagent (invitrogen), Fetal Bovine serum (購自 Gibco 公司)。

2.4、方法

2.4.1、斑馬魚 myostatin 啟動子之篩選

2.4.1.1、噬菌體宿主細胞之培養

自 $-80^{\circ}C$ 取出 XL-1 Blue MRA 菌種，以接種環於 LB 培養基上進行三區劃線，以分離出單一菌落。在 LB 培養基上挑取其單一菌落置入 15 mL 養菌管內含 3 mL 的 LB (添加 10 mM $MgSO_4$ /0.2% maltose) 培養液中，以 $37^{\circ}C$ 培養 2 小時，取出 20 μ L (1/100 體積) 的菌液加入以一公升錐形瓶內含 200 mL 的 LB (添加 10 mM $MgSO_4$ /0.2% maltose) 的培養液中持續培養，待培養至 OD_{600} 的吸光值為 0.5 時即可停止，並將菌液以 3000 Xg 於 $4^{\circ}C$ 下離心 15 分鐘後去除上清液，以冰的 10 mL (20X 濃縮) 10 mM $MgSO_4$ 將細胞沉澱物打散並置於 $4^{\circ}C$ 下備用(可於 $4^{\circ}C$ 下貯存一星期)。

2.4.1.2、斑馬魚基因體基因庫轉印

自基因體基因庫中取出重組基因噬菌體為篩選之目標，取 0.6 mL 的 XL-1 Blue MRA 宿主細胞加入 2.5 μ L 的噬菌體進行混合，並於 37°C 作用 10 分鐘，待作用完畢後取 15 mL 的養菌管加入 12 mL 溫熱 (48~50°C) 的 NZY top agar 並混合均勻，將混合液直接倒入直徑 15 公分的 NZY 固體培養基上，將培養基倒放至 37°C 培養箱培養隔夜後放置於 4°C 冰箱中冷卻 6 小時後，以 Hybond-N 尼龍膜平鋪於 NZY 固體培養基上 1 分鐘將溶菌斑轉印至尼龍膜上，並分別在四周以針孔標定記號以確認其相對位置，取出轉印後的尼龍膜置入 denature buffer 中漂洗 5 分鐘，再移入 neutralize buffer 中漂洗 5 分鐘，最後以 2 倍 SSC buffer 漂洗乾淨後置於 3 MM 的濾紙上風乾，風乾後的尼龍膜以 UV STRATALINKER 1800 利用紫外線將 DNA 固定於 Hybond-N 尼龍膜上。

2.4.1.3、核酸探針之製備

將 PCR 合成之 0.5 Kb 大小之 myostatin 部分序列的基因片段，以 Gel-M Plasmid Gel Extration System 萃取後利用 random primer labeling system 方式完成製備。將所得之 myostatin 基因片段取出 20 ng，並添加 TE buffer 使其總體積為 45 μ L，以 100°C 水浴 5 分鐘將雙股 DNA 解離成為單股 DNA 後立刻置於冰上 5 分鐘，將全部液體轉移至 rediprimer™ II 的反應管中，加入 5 μ L 的 α -³²P dCTP (specific activity 3000 ci/mmol)，以微量吸管進行上下吸放的動作將反應物混合均勻，置於 37°C 作用 20 分鐘後，加入 5 μ L 0.2 M EDTA 終止反應，並以 NucTrap Probe Purification Column (Stratagene) 去除游離的 α -³²P dCTP 以及較短的標定片段，以每次 50 μ L 的 STE buffer 沖洗管柱並分別回收沖洗之液體，分別於每一次回收液體中取 1 μ L 至新的微量離心管中檢測其放射線強度，以判定核酸探針片段之活性，將製備完成的放射線標定 DNA 探針以 100°C 加熱 5 分鐘將雙股 DNA 解離成為單股 DNA 後

置於冰上 5 分鐘，將所有核酸探針加入雜合盆中進行雜合反應。

2.4.1.4、噬菌體溶菌斑雜合反應

將含斑馬魚基因體基因庫尼龍膜置於雜合盆中以 50% Hybridization buffer 於 42°C 緩慢搖晃至少 2 小時進行預雜合 (Pre-Hybridization)，將已用放射線標定的核酸探針全部加入雜合盆中進行以 42°C 進行 12-16 小時雜合反應，作用完畢後將核酸探針回收至 50 mL 離心管中貯存，並將尼龍膜置於 0.1 X SSC-0.1% SDS wash buffer 中，分別以 25°C、37°C、42°C 各自清洗 30 分鐘，並視殘存的放射線強度更換 wash buffer 並且逐次調高清洗溫度，將清洗完成的尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後，平鋪於自動顯影卡夾中上面並放一片 X 光感光片，於 -80°C 自動顯影 72 小時。將 X 光片與 NZY 培養基上的針孔對齊後，挑出有訊號的溶菌斑，置於 SM buffer 中以 4°C 隔夜溶出噬菌體，並且再將噬菌體進行第二次、第三次的篩選便可挑出單一且獨立的目標基因溶菌斑。

2.4.2、Lambda 噬菌體重組基因之純化

以不同噬菌體與宿主細胞比例的 MOI 值 (multiplicity of infection) 以 15 mL 的養菌管進行 5 mL 12-16 小時的少量培養，觀察不同噬菌體的最佳 MOI 值(在 12-16 小時菌液呈現完全澄清且有白色絲狀物的比利即為最佳 MOI 值)，得到最佳培養條件後，以一公升之錐形瓶以 200 mL NZY 液體培養基進行培養，待 NZY 培養液呈現澄清時立刻加入 4 mL 氯仿 (2% 體積) 持續培養 15 分鐘使其停止生長，將培養液以 10,000 Xg 離心 20 分鐘兩次，取上清液並將其移至新的離心管中，加入 30 μ L 的 RNase (1 mg/ μ L) 以及 50 U DNase I (10 U/ μ L)，於 37°C 作用 2 小時，加入 NaCl 使其最終反應濃度為 1 M；再加入 PEG 8000 使其最後濃度為 10%，待混合均勻後置於冰上 1 小時，6,000 Xg 離

心 30 分鐘，將噬菌體沉澱下來，去除上清液後以 5 mL SM buffer 反覆沖洗沉澱物，加入等體積的氯仿進行萃取至少 2 次，將 PEG 8000 去除乾淨，並加入 SDS 使其最終濃度為 0.1%，再加入 Proteinase K 使最後濃度為 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 65°C 作用 1 小時後分別以等體積的 phenol 及氯仿萃取 1 次，再以氯仿萃取一次，取出上清液加入 2 倍體積的 100% 乙醇沉澱，並以 70% 乙醇清洗後風乾，視沉澱物多寡加入適量的二次蒸餾水回溶。

2.4.3、myostatin 基因體之分離與鑑定

將純化的基因體 DNA 選殖株分別以不同的限制酵素進行切割，將反應物全部進行洋菜膠膠體電泳，之後將電泳膠片置入 denature buffer 中緩慢搖晃 30 分鐘，並以二次蒸餾水洗去殘存的 denature buffer，再將電泳膠片置於 neutralize buffer 中緩慢搖晃 30 分鐘，之後再以二次蒸餾水將 neutralize buffer 清洗乾淨，後浸泡於 20 X SSC buffer 中並利用濕式轉漬法將基因體 DNA 轉漬至尼龍膜上準備進行南方墨點分析。南方墨點分析：取大小適當的塑膠盆，倒入 10 X SSC buffer，在塑膠盆上橫放一片厚玻璃片，在玻璃片鋪上寬度大小與電泳膠片寬度相當的 3 MM 濾紙，濾紙的長度以兩端可以接觸到盆底並可吸收 SSC buffer 為原則。將電泳膠片底部朝上置於 3 MM 濾紙上，並注意電泳膠片與濾紙之間不可有氣泡，若處理過程中產生氣泡，需將氣泡慢慢移除。剪裁一張與電泳膠體大小相當的 Hybond-N 尼龍膜平鋪於電泳膠體上方，亦須注意電泳膠體與尼龍膜之間亦不可產生氣泡，再覆蓋上兩張與電泳膠體等大的 3 MM 濾紙，每覆蓋一層均需要注意氣泡的產生與否，濾紙的上方疊上適當高度的衛生紙，於衛生紙頂端放置一片玻璃片再以 500 公克重物壓住，放置隔夜 DNA 即會轉印到 Hybond-N 尼龍膜上，轉印後在尼龍膜上以鉛筆標上記號及 DNA 相對位置後即可移除電泳片，並將 Hybond-N 尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後以 UV STRATALINKER 1800 利用紫外線自動連結器將 DNA 連結在尼龍膜上，以

備後續進行雜合反應。

2.4.4、pMSTN-1 EGFP 載體之構築

將 pEGFP-1 報告載體以 *Sac* II 與 *Hind* III 限制酵素進行酵素切割，待切割完成後以 phenol/chloroform 萃取，並以乙醇沉澱以二次蒸餾水回溶。將經切割完成後的報導載體與 DNA 片段以 T4 DNA ligase 進行接合反應，將此得到的重組 myostatin 啟動子含綠色螢光 EGFP 報導基因之選殖株命名為 pMSTN-(啟動子長度)，並準備進行質體轉形與質體 DNA 的抽取。

2.4.5、勝任細胞製備

自 -80°C 中取出 XL-1 Blue MRF、XL-10 Gold 菌種以接種環進行三區劃線，於 37°C 中培養 12~16 小時，挑出一個單一菌落於 15 mL 養菌管中以 3 mL 含有 20 mM MgSO_4 的 NZY 培養液中，於 37°C 中培養 12-16 小時，取出 30 μL (1/100 體積) 繼續放大於一公升之錐形瓶培養於 200 mL 含有 20 mM MgSO_4 的 NZY 培養液中，於 37°C 中培養至 OD_{600} 約為 0.4 時，將菌液收下以 3,000 Xg 離心 15 分鐘，倒去上清液後以 20 mL 冰冷的 0.1 M CaCl_2 內含 1% Glycerol 溶液將沉澱物均勻打散並置於冰上冷卻 30 分鐘，再以 3,000 Xg 離心 15 分鐘，去除上清液後以 2 mL 冰冷的 0.1 M CaCl_2 內含 1% Glycerol 溶液將沉澱物回溶後，於 4°C 放置隔夜後以每 200 μL 為一個單位分裝於微量離心管中，並貯存於 -80°C 中備用，隔天取一管冷凍貯存的勝任細胞 200 μL 加入 10 ng 標準 DNA 進行轉形試驗以確認勝任細胞的力價進行測試。

2.4.6、質體轉形

將接合完成的 myostatin 啟動子之 pMSTN-6.0Kb 等基因體 DNA 選殖株各自分別加入微量離心管中之不同的 XL-1 Blue MRF' 勝任細胞中，以微量吸管

混合均勻，放置於冰上靜置 30 分鐘後移至 42°C 的水浴槽內熱刺激 1 分 30 秒，隨後立刻置於冰上冷卻 2 分鐘後移入 15 mL 養菌管中，並加入 800 μ L 的 LB 培養液於 37°C 下震盪培養 30 分鐘，以 3,000 Xg 離心 5 分鐘後吸去 800 μ L 的上清液只留下 200 μ L 的體積，再把沉澱物打散分別以 1:3 的比例 (50 μ L : 150 μ L) 均勻的塗抹在兩個 9 公分培養皿且已事先鋪上 Hybond-N 尼龍膜的 LB-Ampicillin 培養基上，並倒放於 37°C 培養箱中培養 16 小時，準備進行菌落雜合反應。

2.4.7、菌落雜合反應與顯影

將長出菌落的培養基取出，另取一片新的 Hybond-N 尼龍膜放置於一新的 9 公分培養皿內含 LB-Ampicillin 培養基上，潤濕後取下並貼附於已長出菌落的尼龍膜上進行轉印及複製之動作，且以針孔進行方位的標定，新轉印的的尼龍膜繼續放置於新的 LB-Ampicillin 培養基上繼續培養至菌落重新再長出為止，而原本的尼龍膜分別依序以 Denature、Neutralization buffer 各自漂洗 5 分鐘後，再以二次蒸餾水短暫清洗後置於 3MM 濾紙上風乾，將已風乾的尼龍膜以 UV STRATALINKER 1800 做紫外線自動連結，將經過連結後含有 myostatin 啟動子菌落的尼龍膜置入雜合盆中，倒入適當量的 50% Hybridization buffer 以充分淹蓋尼龍膜為原則，隨即置於雜合箱中，以 42°C 緩慢搖晃進行預雜合，將事先已合成的核酸探針加入其中，同樣以 42°C 進行雜合反應 12 小時以上或是隔夜。將已雜合完成的尼龍膜以 Wash buffer 進行沖洗，分別以室溫、42°C 清洗後，再視放射線的強度逐步調高清洗溫度，最後將尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後固定，並放置於片夾中以 -80°C 進行 X 光片自動顯影。

2.4.8、小量質體製備

將 X 光片上的針孔標出，並判定訊號源的相對位置後，挑出菌落培養於 3

mL LB-Ampicillin 培養液中，於 37°C 培養隔夜 12 至 16 小時。將 1.5 mL 菌液倒入微量離心管中，以 3,500 Xg 低速離心 5 分鐘後，去除上清液並加入 100 μ L solution I 沖散沉澱物，再加入 200 μ L solution II 緩慢搖晃使其混合均勻後再加入 150 μ L solution III 上下搖晃至出現白色雲霧狀物體後以 12,000 Xg 高速離心 10 分鐘，將上清液轉移至新的微量離心管後加入等體積的 phenol 混合後以 8,000 Xg 離心 10 分鐘，取上層液至新的微量離心管並加入等體積的氯仿後以 8,000 Xg 離心 10 分鐘，取上層液至新的微量離心管並加入 1/10 體積的 3M NaOAc 與 2 倍體積的 100% 乙醇混合均勻後，放置於 -80°C 1 小時幫助沉澱，之後將質體 DNA 以 12,000 Xg 高速離心 15 分鐘，小心去除上清液並以 70% 乙醇溶液清洗沉澱物，倒去乙醇並且風乾 DNA 以適量的二次蒸餾水回溶。

2.4.9、質體 DNA 的鑑定

取適當小量製備的質體 DNA 以 *Sac* II 與 *Hind* III 共同切割後，進行膠體電泳並觀察所切割出的 DNA 片段是否與預期的片段大小一樣，確定後將正確的菌株取出 0.5 mL 菌液加上 0.5 mL 30% glycerol 混合均勻後置入 -80°C 冷凍櫃進行菌種保存，剩餘菌液則可接種到 2 公升的錐形瓶中含 Ampicilin 的 LB 液體培養液 1 L 中進行大量質體 DNA 製備以供其後續實驗用。

2.4.10、大量質體製備

以 Highpure plasmid Maxiprep kit 純化大量質體。將已鑑定的菌株取出其菌液 0.5 mL 加入事先已混合好 Ampicilin 的 LB 培養液以 37°C 150 Xg 震盪培養 12-16 小時後將菌液以 3,000 Xg 低速離心 15 分鐘後倒去上清液，以 10 mL Resuspension buffer 將沉澱物打散，再加入 10 mL lysis buffer 緩慢混合均勻並置於室溫 5 分鐘後加入 10 mL precipitation buffer，並以 3,000 Xg 離心 15 分

鐘，將上清液緩慢倒入層析管中，待層析完成後以 60 mL wash buffer 通過層析管以清洗雜質，之後將層析管置於另一支新的 50 mL 離心管上，以 15 mL elution buffer 將 DNA 溶出層析管，加入 10.5 mL 異丙醇混合均勻後，以 3,500 Xg 離心 30 分鐘，倒去上清液並以 70% 乙醇清洗沉澱物，最後以二次蒸餾水回溶 DNA。

2.4.11、DNA 序列定序與分析

DNA 定序工作外送至基龍米克斯公司進行 pMSTN-6 Kb 全長序列之定序工作，DNA 序列分析結果送回後利用 DNA star 軟體進行序列分析及限制酵素切點的分析。

2.4.12、myostatin 啟動子選殖株之轉殖

將 ZFL、C2C12、NIH3T3 細胞株繼代培養於六孔細胞培養盤中，經過 24 小時細胞貼附成長至八分滿後進行質體轉形。利用 Lipofectamine 2000 reagent 作質體轉形，取出 4 μ g 的質體 DNA 以不含血清的 L-15 培養液稀釋至總體積 50 μ L；取出 10 μ L lipofectamine 2000 以不含血清的 L-15 培養液稀釋至總體積 50 μ L 並放置於室溫下作用 5 分鐘，將兩者混合放置於室溫下反應 20 分鐘，再加入 0.4 mL 不含血清的 L-15 培養液混合後緩慢加入細胞盤中，放置於 28°C 培養箱中培養 3 小時後，將培養液吸乾，再加入 3 mL L-15 培養液培養 24 小時後即可觀察螢光的表現情形，以判定所構築的質體是否具有功能性。此實驗以含 myostatin 啟動子之各選殖株 pMSTN-6Kb EGFP 等作為轉形之質體，而 pEGFP-N1 則作為 positive control 由 CMV promoter 所驅動。

2.4.13、pGL3-Basic 報導載體之構築

將各種不同長度之 myostatin 啟動子正向接入含有報導基因 Luciferase 的

載體 pGL3-Basic 中，並將此得到的重組報導載體命名為 myostatin promoter-pGL 並進行質體轉形與小量質體 DNA 的抽取及大量純化。

2.4.14、起動子活性分析:

將不同長短片段的 myostatin promoter-pGL 報導載體分別以 lipofectamine 2000 reagent 將其作質體轉形到 ZFL、C2C12、NIH3T3 細胞株繼代培養於六孔細胞培養盤中，經過 24 小時細胞貼附成長至八分滿後進行質體轉形，並以 Luciferase 分析套組進行起動子活性分析。同時以 10 ng pRL-CMV (plasmid Renilla Luciferase reporter vector - CMV promoter) 載體進行對照組實驗，結果分析時以 pRL-CMV 為 1 其他實驗組分別和對照組相比而計算其活性大小。

2.5、結果

2.5.1、斑馬魚 myostatin I 啟動子選殖與分析：

經由斑馬魚基因組效價 1×10^7 PFU/mL genomic library 中選殖出 24 個有訊號的選殖株並經由三次複製、雜合反應後確認挑出 7 個單一並含有 myostatin 訊息 DNA 的 λ 噬菌體，經進一步的序列分析後取得兩個包含完整 myostatin I 基因組選殖株分別為 Zg15-1 的 24 Kb 及 Zg 17-3 的 15Kb 大小之基因組片段(Fig. 2-1)，定序後結果與電腦資料庫 NCBI Blast 比對分析後扣除基因組大小後該啟動子片段分別為 6.061 Kb 及 0.87 Kb 如 Fig. 2-2。經自動快速定序後結果如 Fig. 2-3 所示，並與現有斑馬魚基因資料庫中的序列比對其位於斑馬魚第 9 條染色體上，相似度為 97%，以 GCG 軟體分析啟動子上與肌肉調控相關的轉錄因子部分，結果如 Table 2-1 所示，其中針對與肌肉相關的調控因子進行分析整理，發現在 6.06 Kb 啟動子序列中在 ATG 前 104 bp 有第一個 TATA box，且可將其區分為 6 個 cluster，其中有與肌肉相轉錄因子共包含有 21 個 E box、6 個 TATA box、5 個 CAAT box、1 個 AP-1 binding site、8 個 N box

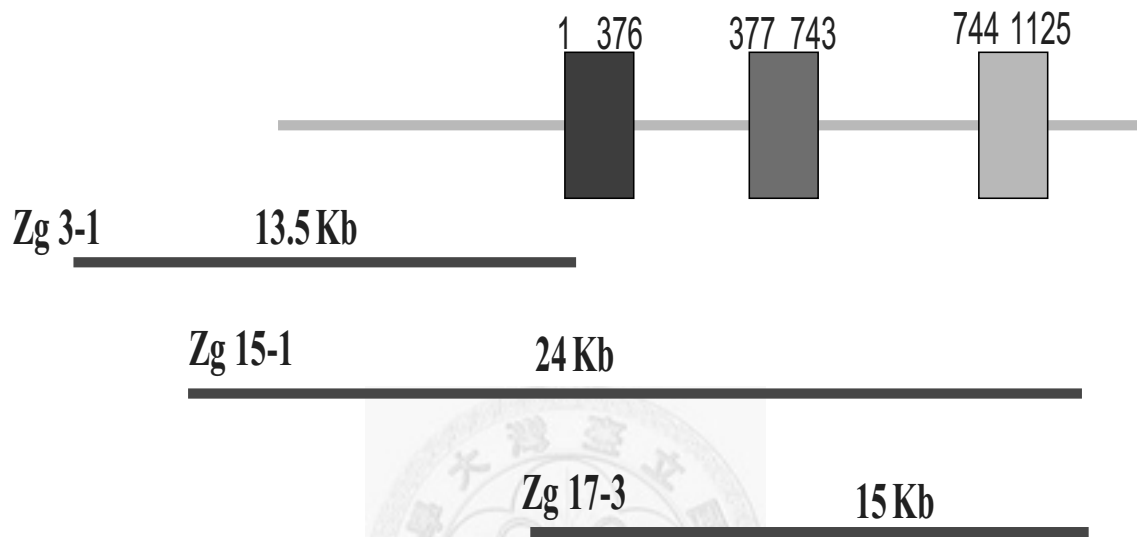


Fig. 2-1. Genomic structure and organization of zebrafish myostatin genes.

(transcription repressor)、4 個 myocyte enhance factor、2 個 MEF2、1 個 MEF3 和 1 個 muscle segment homeo box。

2.5.2、Myostatin I 啟動子活性分析：

分別將 6.06 Kb 啟動子序列利用酵素切割成 5.9 Kb、5.18 Kb、3.4 Kb、2.85 Kb、1.69 Kb、0.6 Kb 等不同大小片段並接到 pGL3-basic 及 pEGFP-1 載體上分別看其在不同細胞株及斑馬魚活體上表現情形，將所構築的啟動子片段轉殖於斑馬魚 ZFL 細胞株中結果以 3.4 Kb 片段大小有最強的活性(Fig. 2-4)，其次為 1.69 Kb 及 2.85 Kb，而在 C2C12 細胞株中則同樣以 3.4 Kb 有最大活性為對照組的 16 倍，其次為 0.69 Kb 的活性測試結果為對照組的 8 倍、2.55 Kb 活性測試結果為對照組的 7 倍；另在 NIH3T3 細胞分析的結果則以 0.6 Kb 片段具有最高活性，為對照組的 20 倍，其次為 2.55 Kb 的 11 倍，此結果顯示 Myostatin I 啟動子在斑馬魚肝細胞及老鼠肌肉細胞以 3.4 Kb 有最佳活性，但在人類肌纖維母細胞則以 0.6 Kb 有最佳活性，此結果顯示 myostatin I 啟動子在不同的細胞上具有不同的表現情形；同時將這些啟動子置換到含 EGFP 報導基因載體上，進一步轉殖至斑馬魚卵中探討不同片段啟動子在活體內的表現，結果並未如預期般有組織特異性之綠色螢光表現。

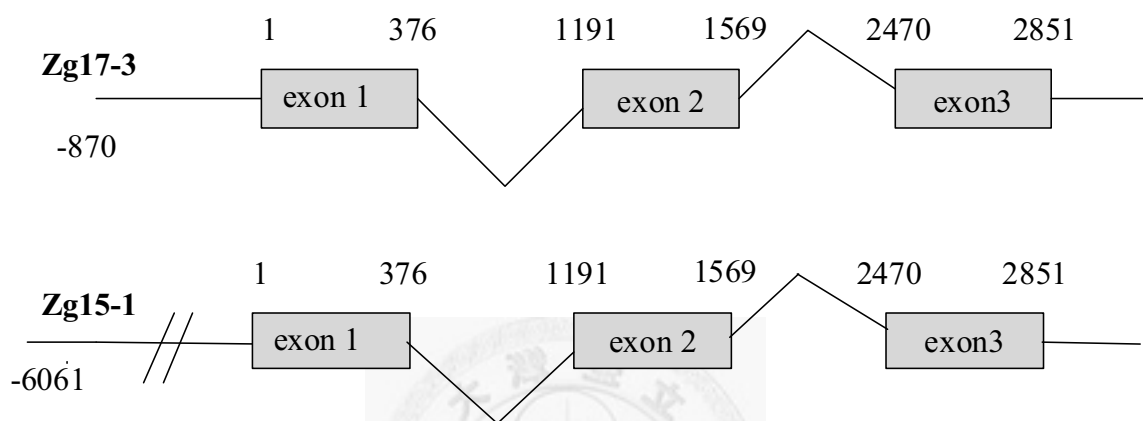


Fig. 2-2. Zebrafish myostatin gene genomic Zg15-1 and Zg17-3 clones.

-6166 CTCAGGCIAT GCCTCCACG CSTTGGGAGC TCTCCCATAT GGTCGACCCT CAGGCGCGCC GSAATTCACCT AGTGATTGCG AGCTCTAATA CGACTCNCIA ..

-6066 TAGGGGCTG ACTCGATC **CCCTCTGCTA AATAGTCTCA TA** GAGGATAT GCTTAATITT ATGCTATAAA TAGAGCACCT CTCTTATTA AAAATTAAAA ..

MEF-2 TATA box..

-5966 CTTAATGATT TTTAACATTC TAATTAITTG TTTTATAGC TGCRAAAAA AAAAACTTAT GATGGAATCT ATGGATCCCA CTTTACATG GTTCTGGGCA ..

-5866 TA**CGGTG**AA GTCAGAATTA TTTGCCCCCT TTTGAATCTT TTTCCTTTT AGAATTTTCC **CAAAAT**ATGT TTAATAGGGC AAGATAAITT TTCAAAGTAT | ..

E box22 E box21..

-5766 GCCTGATAAT ATTTTTTCTT CTAGATAAAG TCTTATTTGT TTTATTTGCG CTAGAATAAA AGCAGTTTTT TAATTTAAAA CCATTTTAAG GTCRAAATTA ..

-5666 TTAGCCCTT TAAACTATAT ATATATGTAG TATATATATA TAGTCTACCG AACRAAACCCT CATTAGTCAA TAACITGCCCT AATTACCTTA ACATGCCCTAG ..

-5566 TTAACCTGAT TGGCCTAGTT AAGCCCTTAG ATGTCACTTT AAGCTCTATA GAAGTGTCTT CAAAAATAGA GTAAAAAAT ATTTACTGTC ATCTGGCAA ..

-5466 AGAATAATAA ATCAGTTATT AGAAATTAGT TATTAAACT **ATTAATGTTA GAAATGCCIT GAAATAATCT** TCTCTCGIT AAACAGAAAT **TGGGGGAAA** ..

myocyte enhance factor E2F..

-5366 ATAAACAGGG AGGCTAATAA TTCATAATA ATTCTGACTT CAACTATATG TTGATATTAT TAGTTAAGTC AAATATCTAA TGATATGTCC ATGTTTTTAT ..

-5266 TCATTAGCAT **ATAATGTTA AAGTAACTCA** GTTCTAATT AGCTCAATT AAAGCTCAA TTGCTATTG CAGTAAACA TACTATTAAT TTACTCGTT ..

myocyte enhance factor..

-5166 **GTATCTCA ATAAGCTATC** ATGTAGTTAT AACCAATGTT CAGTATAGC ACAGACTTTT TATAATGTGC TTTATTTGAA AAGCATCTTA ATATTCTOCT ..

myocyte enhance factor..

-5066 CCTGGACTCG TCGTTCOAT TTGTTCCAC TGAATGCAC TTACTTCGGT TCAATGGGTC TATGAGTGT TAACCTCCGG CCGATTCAGT TTGATTTTGG ..

-4966 TT**CAACT**AT C**CTCAATG** ATTGCATCA AAAGATGAT TCGTTCACGG ATCGGACGTC TATTACGTA GCCTATTAT TATCCTGAGA AACGCTGC ..

E box20 E box19..

-4866 CTGAGGTTGG CTAAGACTA ACAGACTTTT CCTCCACG AAAGCCGTT GACTCGTTT CCTGTATAA CCAAAATCGA TAAGCTCA TTTATTAATA ..

-4766 **TAAATCC**CT TCTGTGAGG ATATTGTGAA TTCAAATGT TTTTAGGCT CTGTTTATAT GATAGCCAT ATTAACATTT **CCCGGTAT** TTTCTCTTC ..

TATA box muscle -specific Mt binding site ..

-4666 CGCTGACAC TCAATCCGT TGTTTACAT CAGACAAGGA CAACGACCG TCCCTGTCTG GAAATCTAA GTGATCAACA GTTAAACAC ATCATGATAT ..

-4566 AGGCTACAGT ATATGATGG AACGATATAT CCAAGAGAAG ACCGAGATTA CATTCTAGC TGTTTT **CGGG TG**TGTTTTTA AATTTCACGG TTGCT**ATTG** ..

E box18..

-4466 **AGTCAGAAA** GOCTCAAGGT CAGGCMAAA TATTATTTCT GAITGGGGG AAATCCCGA TGT**CTGGIT TGTAACTA** ACGCTAAAAG TGCACATTC ..

AP-1 binding site CCAT box..

-4366 TGTGATATA TCAGAGTGA TACATACCTA TTCAGACTGA AGGCTGTAAG CTTCCACGA ATGGACAAA CTTCAAGAA ATCAITTCAT **CCCGTG**GAA ..

E box17..

-4266 ATAGTTATT TAAAAAGAAA CTGAGATAA TCCACCTAA TCTGCTCT CCGTGTCCG TTGCTTACC GGAGATGAG AAAGCATGTT GATGAACCTG ..

-4166 CTCTGTAGG ATAAGTCCGG TCGAATTCA **GCAATG**CT CCGAGTCCA CSTATAATGA TGATAAGT TCGATTCT TCCAGTACA GGACGGCAT ..

E box16..

-4066 GGAGCTCAC ACTGCATAA TCCATGTTGC TTTTGAAGC CTTCTCTTA TTCCGAAAG GCCATC **CTTA TG**ACTTCTT TAAAGCTAGT GAATTA **CTTC** ..

E box15 muscle segment..

-3966 **CAATTCCTT** **CCCGTG**CAC ACTTATTC ACCTCTCTTT GCTAAAACT TTGTTGTAA ACTGGTAAA ATAGTTACT GCATACCG CAGACACAG ..

homeo box E box14..

-3866 TTGCGCTCG GTGATTTTG AAACACTATC GCGCATCTA GTGACAGAC ATGGCTGTT CAAATGCAA TATGCAAGC TCAATCCAT GCAAGGCC ..

-3766 ACCCTAGAGA GAGGTATGAA GTATCTCGCA ACAITTCMAA GCITTTAGT AAATATGAGA AAGCAAAATG CATTATCTG AITCCATGCA GGGAGAGAGA ..

-3666 GGACTACNG CTGAGATGA CATACATGAA **ATAATTCGG TTTCCACG** ACTCAGTAT AGGTTTGTGA GTCCTATGC CTTCTAAAGT AAGTAAAGT ..

MEF-3; skeletal muscle specific transcriptional enhance ..

-3566 AACACTGGIT AAGAAATATT TTTTCACTT CTTTGTTC AGTATGACGC TCGTCTTA ATAATGGAT AITGAATAT TTATGCGCC TCTACTGTG ..

-3466 TTAAT **CTAT G**AGTGTITT TTTTCTGTT **TACCCACG** CTTTCTCTAT **ATAAAGGGT** TCGACATGA AAOCCTAAAG AITGGTTTA GATAATAAIT ..

E box13 N box7 TATA box..

-3366 CACATAAC TCAATGATG GTCTTTTTG CAGCCAATAC AGCATCAIT CATCTTGCCA ATGACAGATA CAGTCTGC ACAGTGGCCA **GAGGAATTTT** ..

Muscle specific Mt- binding site..

-3266 GAGCCATCT TGCAGATAG TGGCCGGTC **ACTAGGAGGA** AAACATTTCC TGCTCGCTC CTCACACA CUCRAAATG GCTCATAAT ATTAGATAT ..

N box6..

Fig. 2-3. Sequencing analysis of the myostatin I promoter.

-3166 GGTGACTGTG GGGGCCATGG GAGATTITAA ATTTTACTTT TATGTTCAAT AAACCACTCT **GTCACCTAGTC** TTACGTGTG TAITTTGTGA TTATCATOCT ..
N box5..

-3066 GAGACACGGC ACCGCCCTCA GGATAAAATG TTTGAATAAG TGGGTG **CAACA TG** STCTCTCA GGATGGTTTG GGAGTCCITG GCAGTGACTT GCCCATCAAG ..
E box12..

-2966 CACAAAG **CATT TG** CCTAGGG GATGCCATGA TATTTCAACA CAAACCATCA CTGATACACC CCCATGCITC ACTCTGGACA TACAATAGTC TGGTGGTAT ..
E box11..

-2866 GCTTCTTTGG GCTTCTCCAC ACCGTAACTC TCTCGAAAG ACAGTGGGAA AAGACAGTGA AGGTGGACTC ATCAGAGAAC AATACATGTT TCACGTTGTC ..
-2766 CACAGCCCA TATTTTACT GCTGGCAACA CTGAAACTGA TGTTTGCATT GGCACAGTG ACCAAAGGTT TGGCCTATAGC AGCCACAGCA TGATATTA ..
-2666 TCCTGTGGAG GTCCGACGA ACAGTTTGG **TAATTCGCA ATGAGT**TGG CAGCCTATGT TTTATGTTT TTTTATACA ATCCAGTGA GCAGCCAAAC ..
CCAAT box..

-2566 ATCCCTTCA GACAGCTTCC TTTTGGGCC AACAGTACT CTACTGGAT GTGGTTGTC CTTCITGCTG TCTTGTCC **C A AATG C A C C A** GTGAGAGTG ..
E box10 N box4..

-2466 CACCAACAT TTGCCACTT TTGAAATCG ATATGTACC CATAATGTTG TGCATATTT AAGCGAAGCT GTGCATCAC TCCGTTGATT ATACTTTCAC ..
-2366 ACTCTGCCT TACTAGTAA ATGTGCAGT AATGAAGAT GGC **CACCTGGG** CTGGTCTAT TTAACATGA AACCTCAC ACTAAATGA CCAGTTTCAG ..
N box3..

-2266 TTTCAITACC CAGCCCTTT TGTATTATC TTTAAACTT ATCC **TGGTIT AAAAAAGTGA** /TGAAATGT TGAGTAAATC CATCTAAGGA ATAAAGTGG ..
MEF-2..

-2166 GGAAAAACT ACACATAAC TTTCAATTT GTGGAAGGAA TAGTTTGBA AAATGTCAA AGTTGTCTT GGAACCACTG AGGT **CAAGTG** SITTACACT ..
E box9..

-2066 GTAAAACCA ACAGTGTCAA CGTTGT **CAAA TG** AATGAGT GTAAGTCACT CAAAACGTAC TGAAGTTAA TTCTACT **CTT TTG** AAGATTT TTGATCTCG ..
E box8 E box7..

-1966 TGTGAAGT AATGAGTTGA TTAATACCT CATTACTAGG GC **CAGATG** GA ATCTGCAGAC ATTTT **GCT ATTTC** GGC AGAATTTCTG CAGATTTATG ..
E box6 Muscle specific Mt binding site..

-1866 CTGAATGATT TTGGAGTAT CATAACTAAA ATCTGAATAA TATATGAAT AAAAAATAT ATCTTTTAA CITGTATTA TGTACATTC CAAAT **CCAT** ..
CCAAT box..

-1766 TAGATCCCT TTAITTTGTA AACATGGA GTCTCTATA TAATATATCT ATCTAGATTC TGAATGGCC TACTTATTAC TTCACTTAA ATGGAGTAA ..
-1666 TTCACAGTAA TCATATAGAT TAGTTTTTT AACTCAATTT TTTGTGCA ATCGGCTCC TGAATGGTT TGAGTTACTT TAAATATTG GGGTTTACAG ..
-1566 TAA **GGGATT TTAITTTT** AA TAATGTACA TAAGAAAAAT TCAATCACT TTTGATGCA TTTACTATCA GTGACTAITT **GAGCAT** TGA AGTGTGCCAT ..
muscle specific Mt binding site CCAAT box..

-1466 TGAATGGTTG ACAACGTTTT TATGAGACA TATAAGCTA ACATGCTGG TTTACTGTGA ATTTACAACA GCTACTGTC CATGGCITG TGGGGCAAT ..
-1366 TGCTTTATA ATCCATCCA ACTTAATCA CGTGTACTTT GTAAACTGT AATTAGCTA ATGGTAAATC AACTTTTTCC TTTTAAATC TTTATTCAT ..
-1266 CTTATCCA CTTAACAT ATTAGATGA TAACTTTTT AATATAAATT ATATTAGTA GATATAACGC CGTTTTATCA GTTTATCCA TAAATGTTCA ..
TATA box..

-1166 CAGGCTGTG GTTTAGACC CAGCAACTT TTTGTGAGC GACTGAAT GAAATATGA CCGAATATT GCACTTATC CACTTATTA TTTGTATCA ..
-1066 TGCCAAATA AATAATGGAT TTGAAATATT **GATTOGGIT AAAAAATATG** TTTATCAAG AGAAACAAAC TGAACCTGAT GGGAAATCT TGACAGTCT ..
E2F..

-966 TGTTCACGT TTAGAGATCG CTGACTGACA TCACCAITGC CCGGTAATC AGTGAACCT AATGTCAITT TATTAGCTA CACATATGC AGACTACTAG ..
-866 TGGATCCAA ATATTTCTG ATGTAATAG GAATGTATGT AITGTCTAGA TCTGTGTAG TTTTGTIAT TTTGCTGTC ACCATCCTAC GTAGAATTA ..
-766 CTTTACAGC AITGACTAG AAAGATCTAC ATACCT **CAC TG** CTTGGIT AACGCTTA **C ACTG** TACTT **CCACAGATG** GCGCAITTA TCTATCCAC ..
E box5 E box4 N box2..

-666 CTTCTAAAT GAAGTAAAA TGCCGCACT ACATGGGAGT GTTGTGAATA AATAAGTGA ACTGTGATTA GTAAGATCT TACTGCTAAG ACAGAGGAGT ..
-566 TGAAGTACA GATAAACCA CTGACAGAG ATACGTTAAT TTTTATCCA **TTACTT** CTTT TCAACAC **CA CTG** AAAAAA GATAAGCCA GGAATGAGA ..
CCAAT box E box3..

-466 ATATTGGTG ATTTAGCAT GTTATTCAT **GTATAACTA** GCAAGTAAA TGATATACT ATGAAAATGA GTACGGTAT TGTGTTATAT **GGTAAATAT** ..
TATA box Myocyte enhancer..

Fig. 2-3. Continue.

-366 AACXGTAGC CTTTGT CHGC TG CGTTTGAC AAAATACCA AAGTGTGCAC GCACGAAAAT ATGTATTTTA AATGTTTGT A TTTTCATAA ATCTGCATAA .
factor E box2 .

-266 TTTCTCAGGT T CAAATG ATT TCC CCAGAG TCCTCAAAGA TGTGTATAC CTCITTAAGA GCTCGAAAAG AAGTCCAGCT CTGTCCATTA GGTTTATTGT .
E box1 N box1 .

-166 TCCCGCTCA GCCAATCATT GAATCTTAGC ACACAATAGA GTGGCCAAAG TTCCAGTATA AAAAGCCTG CCGAATTAA GCATGACATC TACTTGCCG .
TATA box .

-66 GTGCGTGTG AGGTTCAATT CCATAGCAA TCAGAACATC AAACATCCT AGCACGCT TGAACATG .

Fig. 2-3. Continue.



Table. 2-1. Distribution of selected transcription response elements on the zebrafish

Myostatin I promoter

Identified elements	position(s) from transcription initiation site
TATA box	-100/-105, -435/-430, -1224/-1219, -3417/-3412, -4787/-4760, -6002/-5995
CAAT box	-520/-515, -1484/-1480, -1861/-1865, -2637/-2621, -4402/-4384
AP-1 binding site	-4471/-4457
E-box	-264/-253, -350/-345, -499/-493, -707/-702, -720/-714, -1924/-1919, -1989/-1984, -2040/-2035, -2082/-2077, -2377/-2372, -2960/-2955, -3020/-3015, -3460/-3455, -3955/-3950, -4000/-3995, -4135/-4130, -4375/-4370, -4500/-4495, -4952/-4949, -4964/-4959, -5806/-5801, -5864/-5859
N-box	-231/-236, -695/-688, -2313/-2308, -2371/-2308, -2371/-2366, -3204/-3199, -3237/-3232, -3433/-3428
myocyte enhance factor	-379/-362, -5169/-5147, -5166/-5234, -5426/-5455
MEF2	-2212/-2206, -6049/-6025
MEF3	-3634/-3622
muscle specific Mt binding site	-1564/-1548, -1900/-1891, -3275/-3267, -4703/-4774
muscle segment homeo box	-3970/-3957

E box: HLH family that interact with a common DNA element .

N box: transcription repressor.

MEF3: skeletal muscle specific transcriptional enhance.

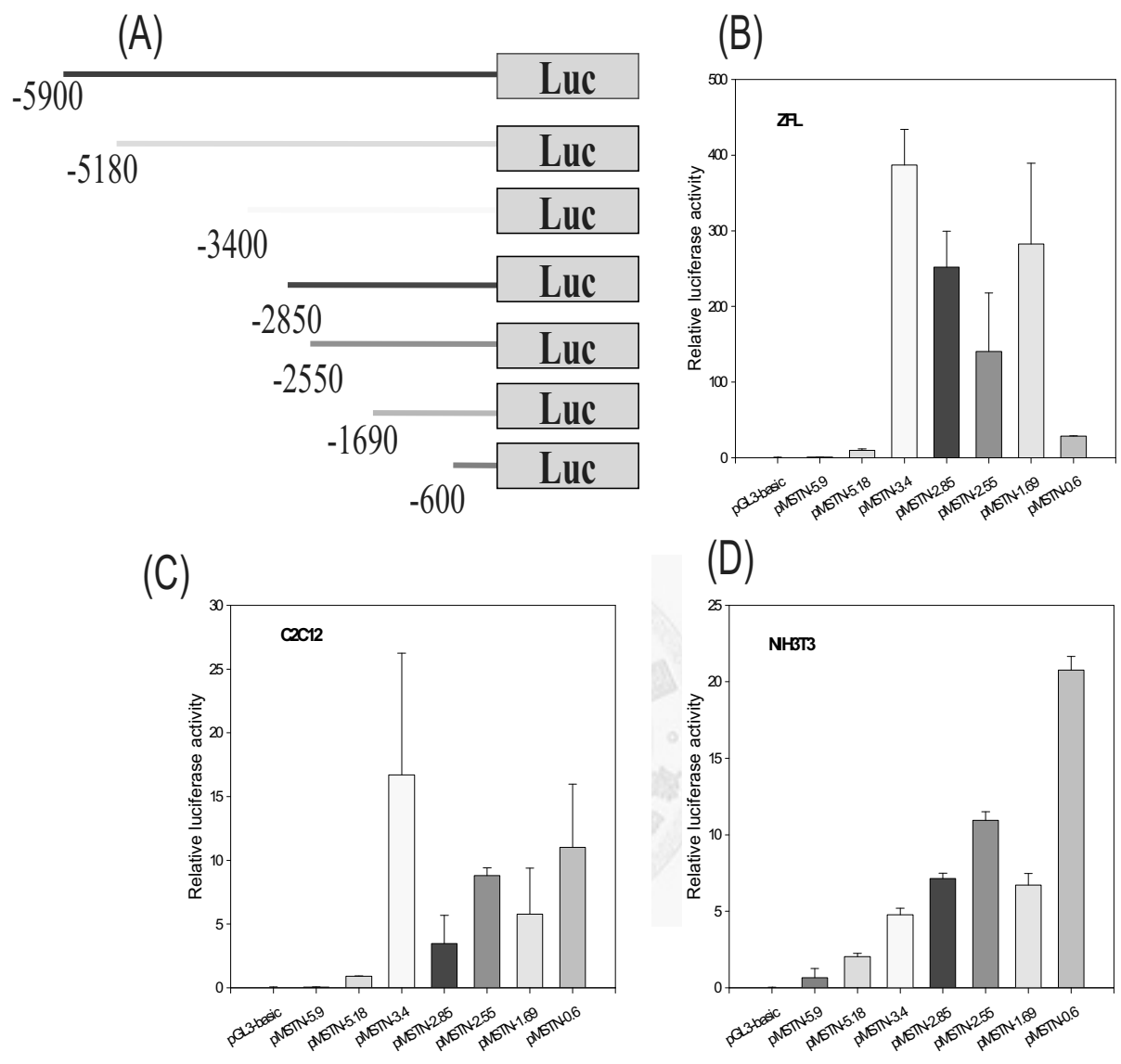


Fig. 2-4. The effect of 5'-deletions on the transcriptional activity of the myostatin I promoter in three different cell lines. (A) The 7 clones of myostatin promoter. (B) The activities of myostatin I promoter in ZFL. (C) The activities of myostatin promoter in C2C12. (D) The activities of myostatin promoter in NIH3T3.

2.6、討論

myostatin I 啟動子選殖與分析

利用基因組篩選出的 7 個選殖株中用 5' 端的探針篩出三株具有啟動子的片段，其中以 Zg 15-1 選殖株經次選殖出長 6.166 Kb 的啟動子，經序列比對與豬、牛、人、老鼠比較其相似度分別為 22.5%、46.1%、52.5% 及 47.5% (GenBank accession No AF093798, AF348479, AX058992 and AX139025 respectively)，同時比較有關其他物種啟動子中相對重要之轉錄因子發現不管在位置及數量上皆有極大的差異性，可能也因此造成 myostatin 基因在魚類多處表現之原因，進一步將 myostatin I 啟動子和已知各類生物中 1.6 Kb myostatin 啟動子比對，斑馬魚有 5 個 E box，老鼠、豬、人、牛則各有 5、15、6 及 10 個不等的 E box，其中 E-box 之序列為 NTCANG，為一轉錄因子，在肌肉分化過程中的重要調節因子 MyoD 家族(其結構屬於 bHLH；basic helix-loop-helix)蛋白質會與 E-box 結合進而調控肌肉的分化(Coustry *et al.*, 1995)。

myostatin 啟動子上與肌肉相關的轉錄因子分布情形和其他物種的分布有很大的差異；斑馬魚 myostatin I 啟動子 (Table 2-1) 結果分析發現位於 -3634 至 -3622 的位置上有一骨骼肌特異性的轉錄強化子 MEF3，與老鼠 2Kb 的 myostatin 啟動子中位於 -827~-837 bp 有一 MEF3 的骨骼肌特異性的轉錄強化子有相當大的落差；結果顯示 myostatin I 啟動子在 -2212~-2206 及 -6049~-6025 的位置上有兩個 MEF2，而 Kerr 等人分析斑馬魚 myostatin II 啟動子也發現有兩個 MEF2 分別位於 -1037~-1059 及 -1307~-1329 (Kerr *et al.*, 2005)，而 MEF2 (TTAAAATAA) 家族為 MADS-box 之轉錄因子，在肌肉生成過程中會與 MEF2 結合後調節下游基因的表現(Naya *et al.*, 1999)，另外斑馬魚 myostatin I 啟動子與其他物種啟動子不同的是在 -3970~-3975 有一 muscle segment homeo box 存在而其相關功能尚待進一步探討，綜合上述結果顯示斑馬魚 myostatin I 啟動子與肌肉相關的重要調控因子所坐落的位置大部分在啟動

子上游 3 Kb 以上的位置，此結果是否透露出斑馬魚 myostatin I 啟動子有關的肌肉主要調控區可能在 3Kb 以前或更上游的位置。另外和相似度較高的人類啟動子序列比對其上游相關轉錄因子，結果發現兩者差異很大，在 C2C12 細胞中人類 myostatin 啟動子的活性在 -3322 bp 中以 -1187 bp 長即具有最高活性，其中在 -1174 bp 上有一 MyoD 結合位置 (Ma *et al.*, 2001)，但斑馬魚 myostatin I 啟動子上並未搜尋到 MyoD 結合位置，此結果是否造成魚類 myostatin 無法專一性的表現於骨骼肌之因素之一，同樣的斑馬魚 myostatin I 啟動子在 C2C12 細胞中其最高活性在 pMSTN 3.4 Kb 的選殖株，其活性為控制組的 16 倍，比 2.85 Kb 的活性大 4 倍，而這兩個選殖株的差異在 3.4 Kb 啟動子中含有 E box 11 和 E box 12，另外還有一個 Muscle Mt-binding site 等三個具有肌肉特異性的結合位置 (Blackwell and Weintraub, 1990；Olson, 1990)，而在豬的 1.6 Kb 啟動子中活性增加為 13 倍，其中含有 E3、E4 和 E6 三個重要的 MyoD 結合位置 (Spiller *et al.*, 2002)，而老鼠 2.5 Kb 啟動子的活性最高，它含有 7 個 E box 若將其中的 E5 truncat 掉則會使啟動子的活性再增加 18%，但若將 E5 突變掉則活性下降成原來的 18% (Salerno *et al.*, 2004)，而不同的物種其啟動子活性亦不同，Xu 等人利用斑馬魚 1.2 Kb 大小的啟動子接上 EGFP 報導基因後打入魚胚胎中看其表現情形，結果並未如預期在肌肉表現，而是微弱的表現在基板 (floor plate) 和頭部，因此推論 myostatin 在魚體的表現可能在其他組織而非骨骼肌 (Xu *et al.*, 2003)，此與 Fig.4 的啟動子活性分析結果顯示 1.69 Kb 啟動子活性為控制組的 6 倍的結果具有一致性，此結果是否代表斑馬魚中具較強活性的啟動子的長度可能比 1.69 Kb 更長，且並非專一的表現於骨骼肌，其在魚體表現位置可能比哺乳類動物更複雜更多元。而 Xu 等人更進一步將啟動子換成在肌肉據專一性表現的 myosin light chain 啟動子及 1/3 mylc enhancer 來看 myostatin 基因的表現，結果其中有 33 個轉基因斑馬魚於骨骼肌及快速肌 (fast muscle) 有特殊表現，另外有一基因轉殖魚除了骨骼肌表

現外在腦部及脊椎亦有微量表現，此結果與本實驗的 antisense myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚在脊椎表現有相同的結果。

Kerr 等人分析斑馬魚 2 kb 長的 myostatin 啟動子，TATA box 上游序列發現斑馬魚比人類、老鼠、牛及斑馬魚自己的 myostatin I 啟動子有較多的肌肉相關順式調節子，在 myostatin II 上游有許多維持 myogenesis 的 myogenic 調控因子及轉錄因子，包含 3 個 androgen response elements、3 個 myo binding site、2 個 myogenin site、1 個 myogenic enhancer factor (MEF-3) 結合部位、1 個 glucocorticoid response element 和 1 個 muscle initiator site (Ma *et al.*, 2001; Crisa *et al.*, 2003)。在這些元素當中 myostatin II 啟動子另包含 MEF2 binding site 和 myostatin transcription factor (TET-1) 和多個 E-boxes (Kerr *et al.*, 2005)。

Xu 等人利用 genome walker 方法取得 6.4Kb 長的斑馬魚 myostatin 基因體選殖株，其中含有 1.2 K b 的 5' flanking 序列，和 5.2K 可轉譯單元。在啟動子部分，其中含有 2 個 E-box，即 E4 和 E5 其中靠近 myostatin 基因的 E4 和 E5 和牛的 E5 和 E6 類似，此結果和牛的 E5 和 E6 相似 (Spiller *et al.*, 2002)。ATG 上游 10 bp 有 TATA box，多個 MyoD binding site，其就像 E box，因 myoD 為二聚體時才具有功能，故推測其可能與 myoD 的調控有關 (Xu *et al.*, 2003)。

人類 myostatin 啟動子 3.3 Kb 中，預測含有 glucocorticoid 可結合之順式元件，如 glucocorticoid response element (GRE) 和 androgen response element (ARE) 等經由 C2C12 細胞實驗證實，GDF8 會隨著 dexamethasone 的添加濃度增加而增加。

第三章 Antisense myostatin 轉殖基因魚之功能分析

3.1、摘要

Myostatin 為一分泌性的生長及分化因子，分類上將其歸納在轉形生長因子超級家族(Transforming growth factor, TGF- β)，其主要作用為骨骼肌發育與生長之負調控因子。我們利用 vector base-RNA 方式以顯微注射建立一個遺傳穩定 myostatin 基因 knockdown 的肌肉倍增斑馬魚。利用定量核酸聚合酶連鎖反應分析確認轉基因斑馬魚 myostatin 之 mRNA 含量降低為野生組的 30%，肌肉蛋白質含量降為野生組的 36.76%。肌肉生成機制中相關標示因子 MyoD、Myogenin、Myf4 和 Myf5 之 RNA 增加為原來的 2 倍；分析第六代的成長速率，發現在 4 個月大時，其野生組和轉基因組兩組間平均體重 0.38 ± 0.05 公克及 0.55 ± 0.11 公克，轉基因組體重增加了 45%；經 t-test 統計分析兩組間彼此有顯著差異($p < 0.05$)。進一步將一個月的稚魚切片及經 HE 染色分析肌肉纖維大小由野生組平均值 $230.69 \pm 139.04 \mu\text{m}^2$ 增加至轉基因組之 $428.97 \pm 207.2 \mu\text{m}^2$ ，兩者間具有顯著差異($p < 0.05$)。這也是第一隻針對斑馬魚 myostatin 進行基因靜默 (gene silence) 而得到轉殖基因可穩定遺傳表現且其表現型特徵具有 "double muscle" 的模式斑馬魚。

3.2、前言

斑馬魚有兩個 myostatin 基因的表現分別為 myostatin I 的 1125 bp 與 myostatin II 的 1101 bp (Amali *et al.*, 2008)，經比對 myostatin I 和 II 序列一致度 (identity) 為 66%，經胺基酸之分析比較 2 個胺基酸的一致度與相似度分別為 60% 和 71%。然而形成非活化相關胜肽和具生物活性蛋白質其一致度和相似度分別為 57/71% 及 88/92% (Kerr *et al.*, 2005)。虹鱒 myostatin I 和 myostatin II 分別為 1600 bp 及 1100 bp。虹鱒 myostatin I 在各組織中皆有表現，而 myostatin II 則只表現在腦部和慢速肌當中。另有研究顯示，虹鱒之 myostatin I 和 II 彼此間有

94% 的相似度，但虹鱒之 myostatin I 和 II 和斑馬魚的 myostatin I 和 II 間有 84.2% 和 82.3% 相似度；和鳥類比較則只有 64.3% 和 63.8% 相似度。分析 3' 端具有功能性的 414 個核苷酸序列，發現和老鼠的 myostatin 有 90% 的相似度。Myostatin 在第三次切割時認識蛋白酶水解位置(位於胺基酸 267~270)並將 myostatin 切成具功能性的蛋白質，此功能性的蛋白質在虹鱒和斑馬魚間的相似度為 95%，和雞、老鼠之相似度為 89%。斑馬魚自己本身 myostatin I 和 II 之序列比對，全長相似度為 64.4%，一致度為 70.0%，在 exon I 和 exon II 的相似度為 49%，一致度為 67%，另具功能性的 exon III 序列的相似度為 79%。因此本實驗將相似度較高之 exon III 切除 281 bp 序列後，使用目前已知較強表現效果的 CMV 啟動子並接上報導基因 EGFP 與切除 281 bp 的反意 myostatin II DNA 進行斑馬魚胚胎顯微注射，希望能取得一穩定表現之肌肉倍增外顯型的 myostatin 降低表現之種魚，並進一步探討 myostatin II 在斑馬魚之生物功能。

3.3、材料

3.3.1、實驗物種：斑馬魚 (*Zebrafish, Danio rerio*)來自美國奧勒岡州立大學。

3.3.2、菌種

Escherichia coli XL-1 Blue MRA

Escherichia coli XL-1 Blue MRF'

Escherichia coli XL-10 Gold

DH5 α

3.3.3、質體 DNA

pBluescript SK(-)：質體 DNA 上含有 Ampr 基因可抵抗 Ampicillin，在基因體次選殖 (subclone)時使用。

pEGFP-C1：質體 DNA 上含有 CMV 啟動子及 EGFP 螢光蛋白報導基因以及 Kan^r/Amp^r 基因可抵抗 Kanamycin 及 Ampicillin 表現質體，可作為篩選基因轉殖魚的螢光標記。

3.3.4、TA cloning 載體

質體 DNA 上含有 Amp^r 基因可抵抗 Ampicillin，用來接合 PCR 產物，以方便保存以及大量純化，可無須再透過 PCR 增幅的方式得到 DNA 片段。

3.3.5、酵素

限制酵素 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III、*Sac* II、*Xba* I、*Xho* I (購自 NEB，New England BioLab. 公司)；PCR 酵素：(1) Vio Taq DNA polymerase (2) Vent DNA polymerase (proofreading)；T4 DNA Ligase，DNase I-RNase free，T3 RNA polymerase，T7 RNA polymerase (購自 BM 公司)；Proteinase K (購自 Sigma 公司)

3.3.6、商品化反應試劑套組

少量質體 DNA 萃取：Mini-M Plasmid DNA Extraction System；大量質體 DNA 萃取：Highpure plasmid Maxiprep kit (購自 invitrogen 公司)

α -³²P dCTP labeling：rediprimerTM II random primer labeling system (購自 Amersham 公司)

Gel Elution：Gel-M Plasmid Gel Extraction System (購自 VIOGENE 公司)

3.3.7、藥品

Tris-base，EDTA，NaCl，SDS，Formamide，MgSO₄ · 7H₂O，NaOH，HCl，CaCl₂，Iso-propanol，Glycerol，Sucrose，Maltose，Na₂HPO₄，NaH₂PO₄，

Ethanol, Phenol, Chlorform, Acetic anhydride, Benzyl benzol, Triethanolamine, Benzyl alcohol, Formaldehyde, Sodium acetate(購自 Merck 公司), Ampicillin(購自 CALBIOCHEM), Protector RNase Inhibitor (購自 Roche 公司), Agarose, NBT/BCIP stock solution (購自波士特公司), methanol Polyethylene glycol 8000 (PEG 8000), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Ethidium Bromide (EtBr), MOPS (購自 Sigma 公司), Lipofectamine 2000 reagent (invitrogen 公司), TRIzol reagent (invitrogen), Fetal Bovine serum (購自 Gibco 公司)。

3.4、方法

3.4.1、斑馬魚 myostatin cDNA 之篩選

3.4.1.1、噬菌體宿主細胞之培養

自 -80°C 取出 XL-1 Blue MRF' 菌種，以接種環於 LB 培養基上進行三區劃線，以分離出單一菌落。在 LB 培養基上挑取其單一菌落置入 3 mL 的 LB (添加 10 mM $\text{MgSO}_4/0.2\%$ maltose) 培養液中，以 37°C 培養 2 小時，取出 20 μL (1/100 體積) 的菌液加入以一公升錐形瓶內含 200 mL 的 LB (添加 10 mM $\text{MgSO}_4/0.2\%$ maltose) 的培養液中持續培養，待培養至 OD_{600} 的吸光值為 0.5 時即可停止，並將菌液以 3000 Xg 於 4°C 下離心 15 分鐘後去除上清液，以冰的 10 mL (20X 濃縮) 10 mM MgSO_4 將細胞沉澱物打散並置於 4°C 下備用(可於 4°C 下貯存一星期)。

3.4.1.2、斑馬魚 cDNA 基因庫轉印

自基因體基因庫中取出重組基因噬菌體為篩選之目標，取 0.6 mL 的 XL-1 Blue MRF' 宿主細胞加入 2.5 μL 的噬菌體進行混合，並於 37°C 作用 10 分鐘，待作用完畢後取 15 mL 的養菌管加入 12 mL 溫熱 ($48\sim 50^{\circ}\text{C}$) 的 NZY top agar 並混合均勻，將混合液直接倒入直徑 15 公分的 NZY 固體培養基

上，將培養基倒放至 37°C 培養箱培養隔夜後放置於 4°C 冰箱中冷卻 6 小時後，以 Hybond-N 尼龍膜平鋪於 NZY 固體培養基上 1 分鐘將溶菌斑轉印至尼龍膜上，並分別在四周以針孔標定記號以確認其相對位置，取出轉印後的尼龍膜置入 denature buffer 中漂洗 5 分鐘，再移入 neutralize buffer 中漂洗 5 分鐘，最後以 2 倍 SSC buffer 漂洗乾淨後置於 3 MM 的濾紙上風乾，風乾後的尼龍膜以 UV STRATALINKER 1800 利用紫外線將 DNA 固定於 Hybond-N 尼龍膜上。

3.4.1.3、核酸探針之製備

將 PCR 合成之 0.5 Kb 大小之 myostatin 部分序列的基因片段，以 Gel-M Plasmid Gel Extration System 萃取後利用 random primer labeling system 方式完成製備。將所得之 myostatin 基因片段取出 20 ng，並添加 TE buffer 使其總體積為 45 μ L，以 100°C 水浴 5 分鐘將雙股 DNA 解離成為單股 DNA 後立刻置於冰上 5 分鐘，將全部液體轉移至 rediprimerTM II 的反應管中，加入 5 μ L 的 α -³²P dCTP (specific activity 3000 ci/mmol)，以微量吸管進行上下吸放的動作將反應物混合均勻，置於 37°C 作用 20 分鐘後，加入 5 μ L 0.2 M EDTA 終止反應，並以 NucTrap Probe Purification Column (Stratagene) 去除游離的 α -³²P dCTP 以及較短的標定片段，以每次 50 μ L 的 STE buffer 沖洗管柱並分別回收沖洗之液體，分別於每一次回收液體中取 1 μ L 至新的微量離心管中檢測其放射線強度，以判定核酸探針片段之活性，將製備完成的放射線標定 DNA 探針以 100°C 加熱 5 分鐘將雙股 DNA 解離成為單股 DNA 後置於冰上 5 分鐘，將所有核酸探針加入雜合盆中進行雜合反應。

3.4.1.4、噬菌體溶菌斑雜合反應

將含斑馬魚基因體基因庫尼龍膜置於雜合盆中以 50% Hybridization buffer 於 42°C 緩慢搖晃至少 2 小時進行預雜合 (Pre-Hybridization)，將已用放射線標定的核酸探針全部加入雜合盆中進行以 42°C 進行 12-16 小時雜合反應，作用完畢後將核酸探針回收至 50 mL 離心管中貯存，並將尼龍膜置於 0.1 X SSC-0.1% SDS wash buffer 中，分別以 25°C、37°C、42°C 各自清洗 30 分鐘，並視殘存的放射線強度更換 wash buffer 並且逐次調高清洗溫度，將清洗完成的尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後，平鋪於自動顯影卡夾中上面並放一片 X 光感光片，於 -80°C 自動顯影 72 小時。將 X 光片與 NZY 培養基上的針孔對齊後，挑出有訊號的溶菌斑，置於 SM buffer 中以 4°C 隔夜溶出噬菌體，並且再將噬菌體進行第二次、第三次的篩選便可挑出單一且獨立的目標基因溶菌斑。

3.4.2、Lambda 噬菌體重組基因之純化

以不同噬菌體與宿主細胞比例的 MOI 值 (multiplicity of infection) 以 15 mL 的養菌管進行 5 mL 12-16 小時的少量培養，觀察不同噬菌體的最佳 MOI 值(在 12-16 小時菌液呈現完全澄清且有白色絲狀物的比例即為最佳 MOI 值)，得到最佳培養條件後，以一公升之錐形瓶以 200 mL NZY 液體培養基進行培養，待 NZY 培養液呈現澄清時立刻加入 4 mL 氯仿 (2% 體積) 持續培養 15 分鐘使其停止生長，將培養液以 10,000 Xg 離心 20 分鐘兩次，取上清液並將其移至新的離心管中，加入 30 μ L 的 RNase (1 mg/ μ L) 以及 50 U DNase I (10 U/ μ L)，於 37°C 作用 2 小時，加入 NaCl 使其最終反應濃度為 1 M；再加入 PEG 8000 使其最後濃度為 10%，待混合均勻後置於冰上 1 小時，6,000 Xg 離心 30 分鐘，將噬菌體沉澱下來，去除上清液後以 5 mL SM buffer 反覆沖洗沉澱物，加入等體積的氯仿進行萃取至少 2 次，將 PEG 8000 去除乾淨，並加入 SDS 使其最終濃度為 0.1%，再加入 Proteinase K 使最後濃度為 50 μ g/mL，

以 65°C 作用 1 小時後分別以等體積的 phenol 及氯仿萃取 1 次，再以氯仿萃取一次，取出上清液加入 2 倍體積的 100% 乙醇沉澱，並以 70% 乙醇清洗後風乾，視沉澱物多寡加入適量的二次蒸餾水回溶。

3.4.3、myostatin cDNA 之分離與鑑定

將純化的基因體 DNA 選殖株分別以不同的限制酵素進行切割，將反應物全部進行洋菜膠膠體電泳，之後將電泳膠片置入 denature buffer 中緩慢搖晃 30 分鐘，並以二次蒸餾水洗去殘存的 denature buffer，再將電泳膠片置於 neutralize buffer 中緩慢搖晃 30 分鐘，之後再以二次蒸餾水將 neutralize buffer 清洗乾淨，後浸泡於 20 X SSC buffer 中並利用濕式轉漬法將基因體 DNA 轉漬至尼龍膜上準備進行南方墨點分析。南方墨點分析：取大小適當的塑膠盆，倒入 10 X SSC buffer，在塑膠盆上橫放一片厚玻璃片，在玻璃片鋪上寬度大小與電泳膠片寬度相當的 3 MM 濾紙，濾紙的長度以兩端可以接觸到盆底並可吸收 SSC buffer 為原則。將電泳膠片底部朝上置於 3 MM 濾紙上，並注意電泳膠片與濾紙之間不可有氣泡，若處理過程中產生氣泡，需將氣泡慢慢移除。剪裁一張與電泳膠體大小相當的 Hybond-N 尼龍膜平鋪於電泳膠體上方，亦須注意電泳膠體與尼龍膜之間亦不可產生氣泡，再覆蓋上兩張與電泳膠體等大的 3 MM 濾紙，每覆蓋一層均需要注意氣泡的產生與否，濾紙的上方疊上適當高度的衛生紙，於衛生紙頂端放置一片玻璃片再以 500 公克重物壓住，放置隔夜 DNA 即會轉印到 Hybond-N 尼龍膜上，轉印後在尼龍膜上以鉛筆標上記號及 DNA 相對位置後即可移除電泳片，並將 Hybond-N 尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後以 UV STRATALINKER 1800 利用紫外線自動連結器將 DNA 連結在尼龍膜上，以備後續進行雜合反應。

3.4.4、pEGFP-C1 載體之構築

將 pEGFP-C1 報告載體以 *Sac* II 與 *Hind* III 限制酵素進行酵素切割，待切割完成後以 phenol/chloroform 萃取，並以乙醇沉澱以二次蒸餾水回溶。將經切割完成後的報導載體與 DNA 片段以 T4 DNA ligase 進行接合反應，將此得到的重組綠色螢光 EGFP-myostatin 報導基因之選殖株命名為 CMV-antiMSTN0.9K，並準備進行質體轉形與質體 DNA 的抽取。

3.4.5、勝任細胞製備

自 -80°C 中取出 XL-1 Blue MRF、XL-10 Gold 菌種以接種環進行三區劃線，於 37°C 中培養 12~16 小時，挑出一個單一菌落於 15 mL 養菌管中以 3 mL 含有 20 mM MgSO_4 的 NZY 培養液中，於 37°C 中培養 12-16 小時，取出 30 μL (1/100 體積) 繼續放大於一公升之錐形瓶培養於 200 mL 含有 20 mM MgSO_4 的 NZY 培養液中，於 37°C 中培養至 OD_{600} 約為 0.4 時，將菌液收下以 3,000 Xg 離心 15 分鐘，倒去上清液後以 20 mL 冰冷的 0.1 M CaCl_2 內含 1% Glycerol 溶液將沉澱物均勻打散並置於冰上冷卻 30 分鐘，再以 3,000 Xg 離心 15 分鐘，去除上清液後以 2 mL 冰冷的 0.1 M CaCl_2 內含 1% Glycerol 溶液將沉澱物回溶後，於 4°C 放置隔夜後以每 200 μL 為一個單位分裝於微量離心管中，並貯存於 -80°C 中備用，隔天取一管冷凍貯存的勝任細胞 200 μL 加入 10 ng 標準 DNA 進行轉形試驗以確認勝任細胞的力價進行測試。

3.4.6、質體轉形

將接合完成的 myostatin 啟動子之 pMSTN-6.0 等基因體 DNA 選殖株各自分別加入微量離心管中之不同的 XL-1 Blue MRF' 勝任細胞中，以微量吸管混合均勻，放置於冰上靜置 30 分鐘後移入 42°C 的水浴槽內熱刺激 1 分 30 秒，隨後立刻置於冰上冷卻 2 分鐘後移入 15 mL 養菌管中，並加入 800 μL 的 LB 培養液於 37°C 下震盪培養 30 分鐘，以 3,000 Xg 離心 5 分鐘後吸去

800 μL 的上清液只留下 200 μL 的體積，再把沉澱物打散分別以 1:3 的比例 (50 μL : 150 μL) 均勻的塗抹在兩個 9 公分培養皿且已事先鋪上 Hybond-N 尼龍膜的 LB-Ampicillin 培養基上，並倒放於 37°C 培養箱中培養 16 小時，準備進行菌落雜合反應。

3.4.7、菌落雜合反應與顯影

將長出菌落的培養基取出，另取一片新的 Hybond-N 尼龍膜放置於一新的 9 公分培養皿內含 LB-Ampicillin 培養基上，潤濕後取下並貼附於已長出菌落的尼龍膜上進行轉印及複製之動作，且以針孔進行方位的標定，新轉印的的尼龍膜繼續放置於新的 LB-Ampicillin 培養基上繼續培養至菌落重新再長出為止，而原本的尼龍膜分別依序以 Denature、Neutralization buffer 各自漂洗 5 分鐘後，再以二次蒸餾水短暫清洗後置於 3MM 濾紙上風乾，將已風乾的尼龍膜以 UV STRATALINKER 1800 做紫外線自動連結，將經過連結後含有 myostatin 啟動子菌落的尼龍膜置入雜合盆中，倒入適當量的 50% Hybridization buffer 以充分淹蓋尼龍膜為原則，隨即置於雜合箱中，以 42°C 緩慢搖晃進行預雜合，將事先已合成的核酸探針加入其中，同樣以 42°C 進行雜合反應 12 小時以上或是隔夜。將已雜合完成的尼龍膜以 Wash buffer 進行沖洗，分別以室溫、42°C 清洗後，再視放射線的強度逐步調高清洗溫度，最後將尼龍膜置於 3 MM 濾紙上風乾後固定，並放置於片夾中以 -80°C 進行 X 光片自動顯影。

3.4.8、小量質體製備

將 X 光片上的針孔標出，並判定訊號源的相對位置後，挑出菌落培養於 3 mL LB-Ampicillin 培養液中，於 37°C 培養隔夜 12 至 16 小時。將 1.5 mL 菌液倒入微量離心管中，以 3,500 Xg 低速離心 5 分鐘後，去除上清液並加入 100 μL solution I 沖散沉澱物，再加入 200 μL solution II 緩慢搖晃使其混合均勻後

再加入 150 μ L solution III 上下搖晃至出現白色雲霧狀物體後以 12,000 Xg 高速離心 10 分鐘，將上清液轉移至新的微量離心管後加入等體積的 phenol 混合後以 8,000 Xg 離心 10 分鐘，取上層液至新的微量離心管並加入等體積的氯仿後以 8,000 Xg 離心 10 分鐘，取上層液至新的微量離心管並加入 1/10 體積的 3M NaOAc 與 2 倍體積的 100% 乙醇混合均勻後，放置於 -80°C 1 小時幫助沉澱，之後將質體 DNA 以 12,000 Xg 高速離心 15 分鐘，小心去除上清液並以 70% 乙醇溶液清洗沉澱物，倒去乙醇並且風乾 DNA 以適量的二次蒸餾水回溶。

3.4.9、質體 DNA 的鑑定

取適當小量製備的質體 DNA 以 *Sac* II 與 *Hind* III 共同切割後，進行膠體電泳並觀察所切割出的 DNA 片段是否與預期的片段大小一樣，確定後將正確的菌株取出 0.5 mL 菌液加上 0.5 mL 30% glycerol 混合均勻後置入 -80°C 冷凍櫃進行菌種保存，剩餘菌液則可接種到 2 公升的錐形瓶中含 Ampecilin 的 LB 液體培養液 1 L 中進行大量質體 DNA 製備以供其後續實驗用。

3.4.10、大量質體製備

以 Highpure plasmid Maxiprep kit 純化大量質體。將已鑑定的菌株取出其菌液 0.5 mL 加入事先已混合好 Ampecilin 的 LB 培養液以 37°C 150 Xg 震盪培養 12-16 小時後將菌液以 3,000 Xg 低速離心 15 分鐘後倒去上清液，以 10 mL Resuspension buffer 將沉澱物打散，再加入 10 mL lysis buffer 緩慢混合均勻並置於室溫 5 分鐘後加入 10 mL precipitation buffer，並以 3,000 Xg 離心 15 分鐘，將上清液緩慢倒入層析管中，待層析完成後以 60 mL wash buffer 通過層析管以清洗雜質，之後將層析管置於另一支新的 50 mL 離心管上，以 15 mL elution buffer 將 DNA 溶出層析管，加入 10.5 mL 異丙醇混合均勻後，以 3,500 Xg 離

心 30 分鐘，倒去上清液並以 70% 乙醇清洗沉澱物，最後以二次蒸餾水回溶 DNA。

3.4.11、cDNA 序列定序與分析

cDNA 定序工作外送至基龍米克斯公司進行 pMSTN-6 Kb 全長序列之定序工作，DNA 序列分析結果送回後利用 DNA STAR 軟體進行序列分析及限制酵素切點的分析。

3.4.12、pMSTN-EGFP 斑馬魚胚胎顯微注射

以 PBS 為 Microinjection buffer 將 pMSTN-EGFP 濃度調整為 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以顯微注射方式將質體注入 1~2 細胞期的斑馬魚受精卵。利用倒立式螢光顯微鏡，以 488 nm 波長的光線激發綠色螢光蛋白，持續觀察綠色螢光蛋白的表現部位。

3.4.13、斑馬魚魚卵之 RNA 抽取

將魚卵水分去除，取約 50 mg 放至乾淨的離心管內，以均質棒將其磨碎均勻，並快速的加入 4°C 的 TRIzol 500 μL (視檢體大小決定體積)，充分的混合均勻，再加入總體積 1/5 的氯仿並混合均勻，放置冰上至少作用 10 分鐘，以 12,000 Xg 4°C 離心 15 分鐘，後抽取上層水層的液體，並移入乾淨的離心管內，加入等體積的酒精並放置冰上 10 分鐘以上，沉澱 RNA，並於 12,000Xg 4°C 下離心 15 分鐘，之後可見 RNA 沉澱物在離心管底部，去除上清液並以 DEPC 水配置的 70% 酒精清洗沉澱物 (加入的體積與當時 TRIzol 的量相同)，以振盪器振盪使沉澱物懸浮後，於 7,500Xg 4°C 下離心，如此重覆清洗兩次，並去除上清液，沉澱物放置室溫下風乾 10 分鐘，並加入 DEPC 水回溶 RNA，抽取出的 RNA 以分光光度計測定濃度與純度，以析光值 $\text{OD}_{260/280}$ 比例為 1.6~1.9

為佳。

3.4.14、1 step RT-PCR 偵測 myostatin 基因及肌肉相關基因

取 200 ng total RNA 分別用下列不同之 primer 進行 1 step RT-PCR 反應 myostatin II forward primer 5'-ATG TTT CTC CTT TTT TTT ATC TGA GC-3' 及 Reward primer 5'TCA AGA GCA ACC GCA AAG GAC TAC CAC CA 3' ; EF1 α (f), 5'-GGT GAG TTT GAG GCT GGT ATC TCC AAG AAC-3' ; EF1 α (r), 5'-GAA GCC AAC GTT GTC ACC AGG AGT GGC CTC-3' ; myostatin I F2, 5'-GCA TGT GGT CCA GTG GGT TAT-3' ; myostatin I R2, 5'-GTT GTC TGA ACT CAC ATG TGG AAC A-3' ; myostatin II F2, 5'-TCT CCT TTT TTA TCT GAG CTT TTG G-3' ; myostatin II R2, 5'-TCT CCA GGT GTC ACA AAT GCT T-3' ; MyoD(f), 5'-CAA GAG ATG CAC GTC CAC CA-3' ; MyoD(r), 5'-TTC TGA GAA GAG CCT GCA GAG AC-3' ; Myf5(f), 5'-AAC GCC TCC CCA AGG TAG A-3' ; Myf5(r), 5'-CGG CAG GCT GTA GTA TTG CTC-3' ; Myf4(f), 5'-AAG ACG GTG CCT AAT CCG AAC-3' ; Myf4(r), 5'-TCC AGC GAA TGC AAG AGG TC-3' ; Myogenin(f), 5'-CAA TGG TGG CTT CGA GCA A-3' ; Myogenin(r), 5'-TGT CTT CCA ACC CAA CTG TGG-3' , 並使用 invitrogen 1 step RT-PCR 分析套組並以 60°C, 30 分鐘, 94°C 2 分鐘 1 個循環, 94°C 30 秒、63°C 30 秒、72°C 2 分鐘, 35 個循環, 72°C 7 分鐘 1 個循環進行 DNA 增幅反應, 得到 RT-PCR 產物以 2 % 洋菜膠電泳分析, 之後浸泡 EtBr 染色 5 分鐘, 退染 30 分鐘, 放置 UV box 進行照相以記錄結果。

3.4.15、組織切片及染色

將欲切片之組織塊以石蠟包埋後用切片機將組織塊切成 6-8 μ M 厚並以載玻片將組織撈起並固定備用, 脫臘時分別使用 xylene 浸泡 10 分鐘兩次, 再分

別於 100%、95%、90%、80%、70% 酒精各浸泡 5 分鐘後用 PBS 緩衝液清洗 5 分鐘後進行染色，染色之染劑 Hematoxylin 及 Eosin 用 70% alcohol 配製 0.5% Eosin Y disodium，先用 Hematoxylin 浸泡 5 分鐘後用水沖掉 Hematoxylin，並用蒸餾水浸潤數秒後於 PBS 溶液中使組織切片呈藍色即可（約 5 分鐘），然後使用 95% 酒精浸泡 30 秒後再浸 eosin 30 秒後分別利用 95%、100%、100% 的 xylene I 及 xylene II 各浸泡 5 分鐘後浸泡於 xylene III 溶液中直到用膠封片。

3.4.16、細胞大小統計分析

細胞切片染色後之樣品利用正立螢光顯微鏡(Zeiss Axioplan 2 Imaging MOT)照相後使用電腦連結系統 MeatMorph 程式軟體進行細胞大小之面積分析。

3.4.17、電顯組織塊包埋

將斑馬魚成魚之背部組織塊切下後用 2% Glutaraldehyde 於 0.1 M Cacodylate buffer pH7.2 含 8% sucrose 固定液中於 4°C 下固定 30 分鐘，然後以含 10% DMSO 之 Cacodylate buffer 於 4°C 下洗濯 4-5 次，每次 20 分鐘，之後置孵浴液 (Incubation buffer) 中於 37°C 下做用 12-16 小時後以醋酸緩衝液於室溫下洗 2-3 次，然後以 1% 硫化胺作用 1 分鐘使成淺黑褐色，以醋酸緩衝液於室溫下洗 2-3 次，並以 1% 鎢酸再固定 4 小時後以蒸餾水洗 4-5 次，之後進行脫水及滲膠，並用 Epoxy 進行包埋後進行切片及電子顯微鏡觀察。

3.5、結果

3.5.1、Antisense Myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚表現

CMV-antiMSTN0.9K 之構築為將含 CMV 啟動子及 EGFP 基因之載體與 antisense myostatin 0.9K DNA 片段接合完成。CMV-antiMSTN0.9K 載體 DNA 經大量培養及純化後之以顯微注射方法進行基因轉殖，其中共注射了 1573 顆魚卵其結果如 Table 3-1，經顯微注射的斑馬魚魚卵其孵化率為 61.98%，孵化後進一步觀察其綠色螢光的表現，發現親代基因轉殖斑馬魚有綠色 EGFP 螢光的表現率為 41.74% (407/975)，經飼養後只有 4 隻斑馬魚 (三母一公，公魚生殖力較差)具遺傳性，交配後產生 F1 子代，子代具有螢光表現的比例分別為 55.7% 及 74.88% 如 Table 3-2。F1 子代基因轉殖斑馬魚產生綠色螢光情形，在受精後 2 個細胞期即可看到微弱的螢光表現，隨著胚胎發育於 12 小時即可在螢光顯微鏡下觀察到全身發亮的基因轉殖魚，然而隨著胚胎的發育成長魚體其他部位的螢光慢慢減弱，至 72 小時後慢慢集中至肝臟、眼睛及脊椎且螢光表現一直維持到成魚如 Fig. 3-2 和 Fig. 3-3。

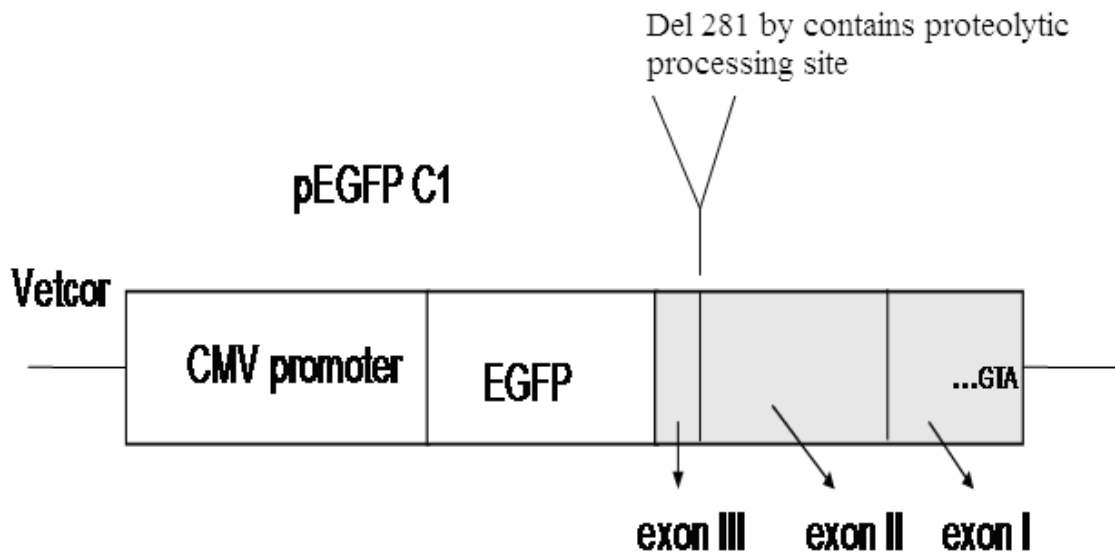


Fig. 3-1. The construction of vector-based RNA interference. The pEGFP C1 was fused with reverse partial zebrafish myostatin II cDNA.

Table 3-1. The hatch rate and EGFP expression rate of transgenic vector-based RNAi zebrafish by microinjection.

Injection No.	Hatch No.	Hatch rate	EGFP(+)	Expression rate
84	75	89.29%(75/84)	38	50.67%(38/75)
478	468	97.91%(468/478)	259	55.34%(259/468)
103	22	21.36%(22/103)	11	50.00%(11/22)
87	66	75.86%(66/87)	21	31.82%(21/66)
678	257	37.91%(257/678)	57	22.18%(57/257)
143	87	60.84%(87/143)	21	24.14%(21/87)
1,573	975	61.98%(975/1573)	407	41.74%(407/975)

Table.3-2. The hatch rate and EGFP expression rate of transgenic vector-based RNAi zebrafish in F1 generation.

Group	Total No.	Hatch No.	Hatch rate	EGFP(+)	Expression rate
Wild type	401	376	93.77%(376/401)	0	
	306	254	83.01%(254/306)	0	
	209	174	83.25%(174/209)	0	
	542	506	93.36%(506/542)	0	
Total NO.	1458	1310	89.85%(1310/1458)		
Female A	205	67	32.68%(67/205)	49	73.13%(49/67)
	220	175	79.55%(175/220)	130	74.29%(130/175)
	368	261	70.92%(261/368)	191	73.18%(191/261)
	479	357	74.53%(375/479)	109	30.53%(109/375)
Total NO.	1272	860	67.61%(861/1272)	479	55.70%(479/861)
Female B	456	315	69.08%(315/456)	242	76.83%(242/315)
	218	60	27.52%(60/218)	48	80.00%(48/60)
	244	226	92.62%(226/244)	160	70.80%(160/226)
Total NO.	918	601	65.47%(601/918)	450	74.88%(450/601)

3.5.2、Antisense myostatin 0.9K DNA 轉殖螢光魚基因型及形態

Myostatin 基因在哺乳類動物中只單純表現在骨骼肌中，且會造成肌肉增生，但魚類以目前來看似乎更複雜更多元。經分析 F1 和 F2 子代發現綠色螢光持續且穩定的表現於轉基因魚體中，且其子代之產卵率偏低且死亡率高，經以 RT-PCR 分析 45 天大的第一子代 F1 和第二子代 F2 的肌肉中相關基因之表現情形如 Fig. 3-4，結果 F1 之 myostatin I 增加為野生組的 1.53 倍，而 myostatin II 則降低為 0.86 倍，其他與肌肉或生長相關基因如：Desmin、Myogenin、GH、IGF2a 及 IGF BP3 等皆有增加的趨勢，其分別為野生組的 1.27、1.87、1.25、2.06 及 1.22 倍，而 F2 則在 RT-PCR 結果上其差異有趨緩的情形，其中 myostatin I 由上升 1.53 倍下降為 1.12 倍，Myogenin 及 IGF2a 則分別由 1.87 倍降為 1.31 倍及 2.06 倍降為 1.22 倍，同時在 F2 成魚時發現有高達 30~50% 的比例具有體色變淡的情形，但控制組則無此現象。

胚胎時期外觀正常的基因轉殖魚經飼養成魚後，當魚齡達 2~3 個月大時會有 30% 左右的魚會造成脊椎側彎的現象，以冷凍切片比較轉基因斑馬魚及野生組，發現轉基因魚的肌肉組織似乎較控制組為鬆散，唯此一結果尚待更多證據加以證明。

3.5.3、Myostatin 定量 PCR 和 Western 分析

分析第六代之基因轉殖魚 60 小時之 myostatin I 和 myostatin II 之 mRNA 的表現量，發現 heterozygous 和 homozygous 的 myostatin I 之 mRNA 的表現降低為野生組的 25%，myostatin II 之 mRNA 的表現降低為野生組的 30% 如 Fig. 3-5。而蛋白質的表現方面，利用人類 myostatin 抗體分析進行免疫分析結果，則分別在 27 kDa 和 17 kDa 大小的位置上有主要的蛋白質表現如 Fig. 3-6，經以 1394 camera Java package for Image J 分析蛋白質帶的密度發現

homozygous 組 27 kDa 的蛋白濃度為野生組的 36.75%，此結果與 Q-PCR 分析的 mRNA 結果有相同的下降趨勢，因此確認取得 myostatin 基因靜默的斑馬魚，其 myostatin 的 mRNA 及蛋白質含量皆下降為野生組的 30~36%。

3.5.4、Myostatin 基因靜默 (silence) 斑馬魚 60 hpf 的表現型

分別比較野生組、heterozygous 和 homozygous 之斑馬魚在 60hpf 的存活率中，野生組為 90.2%，heterozygous 為 82.23%，homozygous 為 50.9% 如 Table 3-3，其中存活下來的小魚在外觀上有不同的形態，其各比例分布情形統計如下：在尾部有彎曲之比例佔 12%，身體呈現 90° 彎曲佔 20.0%，身體呈 S 型佔 10%，另嚴重畸型佔 0.4%，此外在 60 hpf 以前死亡佔 34.8%，而野生組則無此畸型情形，Heterozygous 則約有 6.5% 在尾部有彎曲現象。

3.5.5、Myostatin 基因靜默斑馬魚肌肉生長相關基因之分析

分析 60 hpf 的穩定遺傳 (germline) 斑馬魚胚胎其肌肉生長相關基因 mRNA 的表現，發現 heterozygous 和 homozygous 在 MyoD 基因的表現量分別是野生組的 3.58 及 4.46 倍；而 myogenin 則分別為 2.22 倍及 1.6 倍；Myf5 則為 1.86 及 2.17 倍；而 Myf4 則分別為 2.11 倍，但 heterozygous 則 mRNA 量為野生組的 44.97 倍如 Fig. 3-7，此結果顯示 myostatin 表現量下降，造成 myogenesis 肌肉生長相關基因表現量皆上升。

3.5.6、生長速率和 myostatin 基因靜默斑馬魚成魚表現型

將 1,2,3,4 個月大的斑馬魚分別稱其體長和體重，結果顯示三組在體長方面其差異並不大 如 Fig. 3-8。4 個月大的魚其平均體重野生組為 0.38 ± 0.05 g，heterozygous 平均體重為 0.42 ± 0.09 g，homozygous 平均體重為 0.55 ± 0.11 g，heterozygous 體重增加 10%，身體質量 (body mass) 增加 45%，經進一步

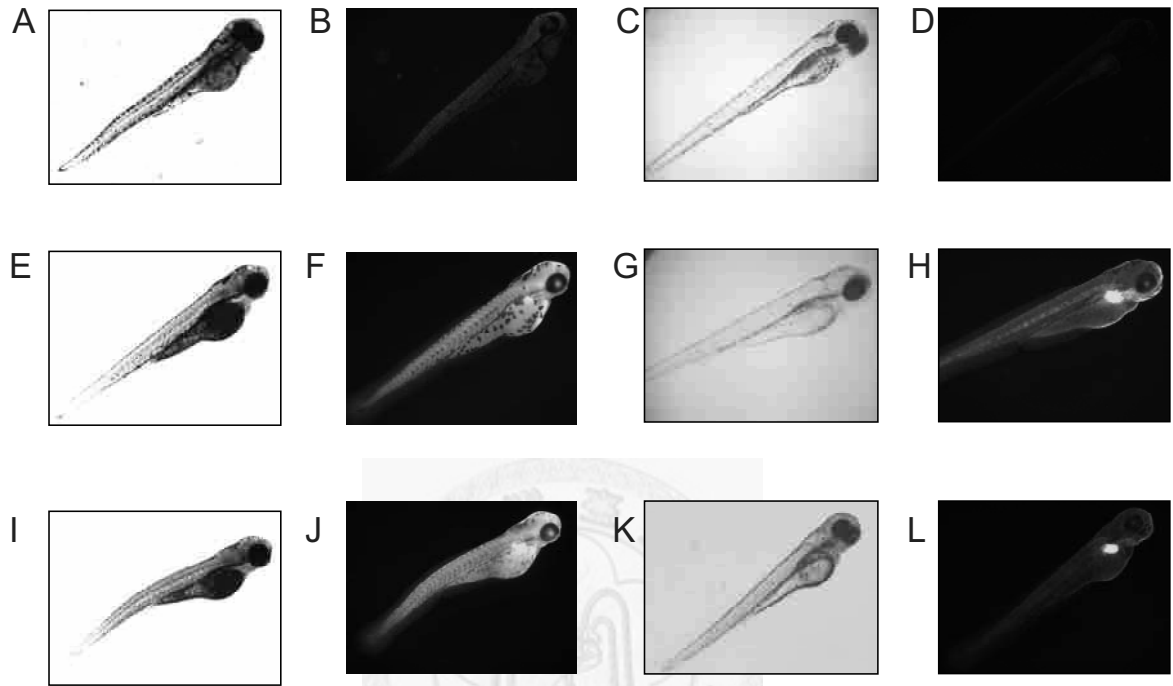


Fig 3-2. The EGFP expression of wild type and myostatin silence transgenic zebrafish. A, B, C, D were wild type. E, F, G, H were heterozygous. I, J, K, L were homozygous. A, B, E, F, I, J were 48 hpf stage. C, D, G, H were 72 hpf stage. A, E, I, C, G, K were bright field. B, F, J, D, H, L were fluorescent field.

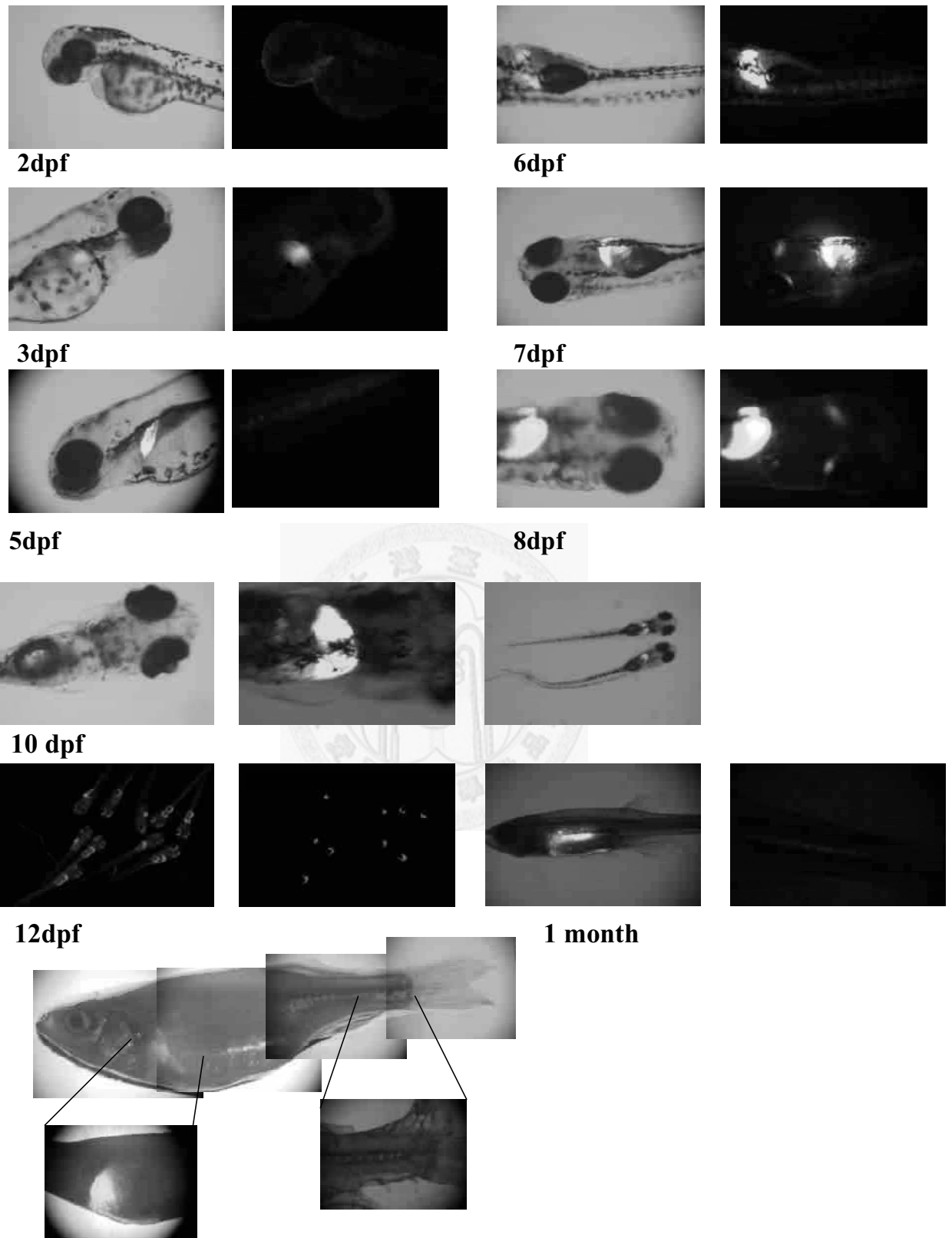
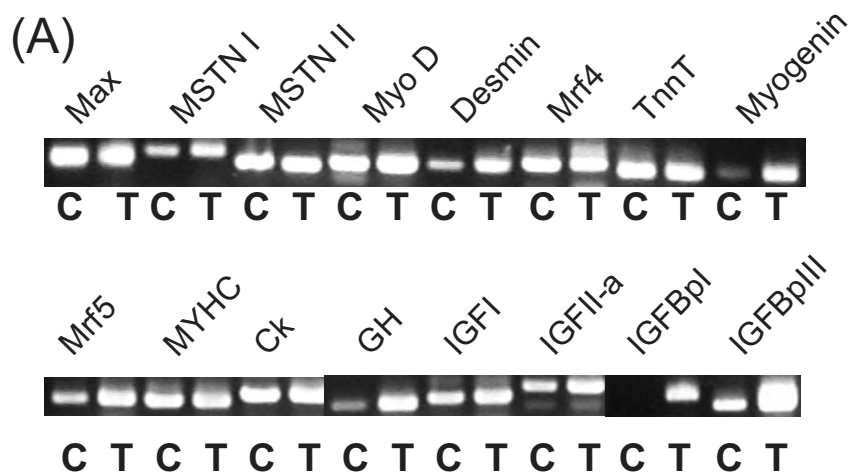


Fig. 3-3. EGFP expression of transgenic zebrafish in F2 generation at different stages.



(B)

	F1	F2
Max	1.00	1.00
myostatin-I	1.53	1.12
myostatin-II	0.86	0.84
MyoD	0.83	0.93
CK	0.92	1.01
Desmin	1.27	1.11
MRF4	1.20	1.21
TnnT	0.97	1.1
Myogenin	1.87	1.31
MRF5	1.23	1.28
MYHC	0.94	1.04
GH	1.25	1.25
IGF-1	1.08	1.07
IGF2a	2.06	1.22
IGFBP3	1.22	1.18

Fig. 3-4. The gene expression of different muscle markers in vector-based RNAi transgenic zebrafish at 1.5 month. (A) One step RT-PCR. C: wild type, T: transgenic. (B) The ratio of different muscle marker expressed in transgenic fish compared with wild type.

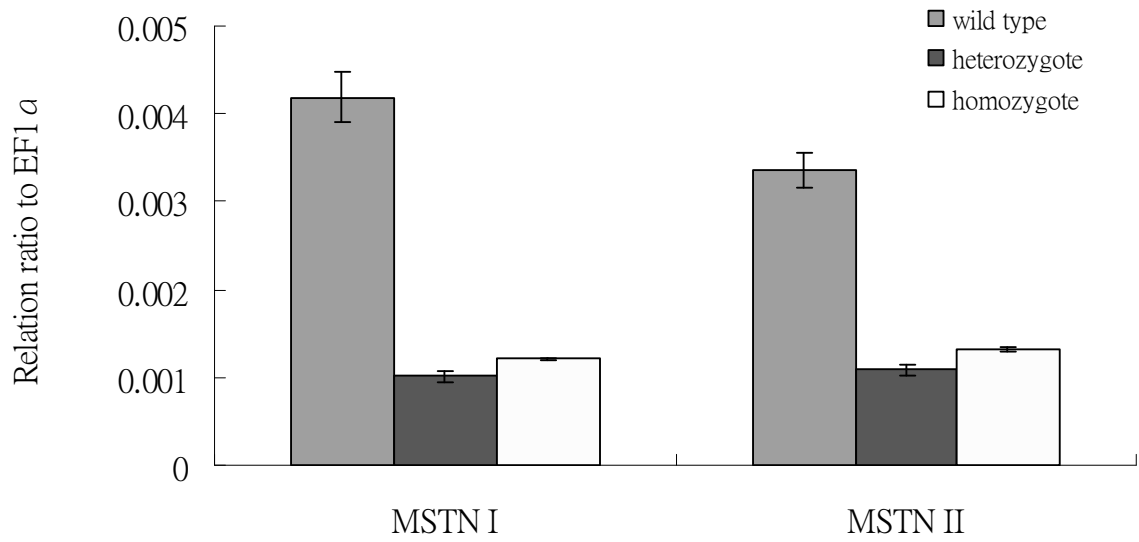
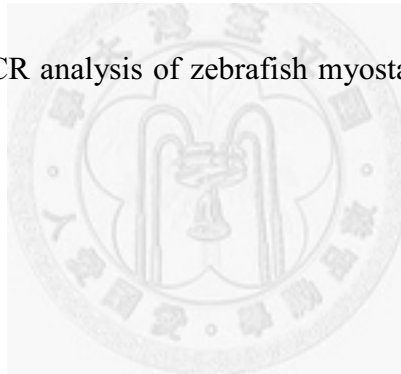


Fig 3-5. Quantitative RT-PCR analysis of zebrafish myostatin I and II mRNA levels in 60 hpf stage.



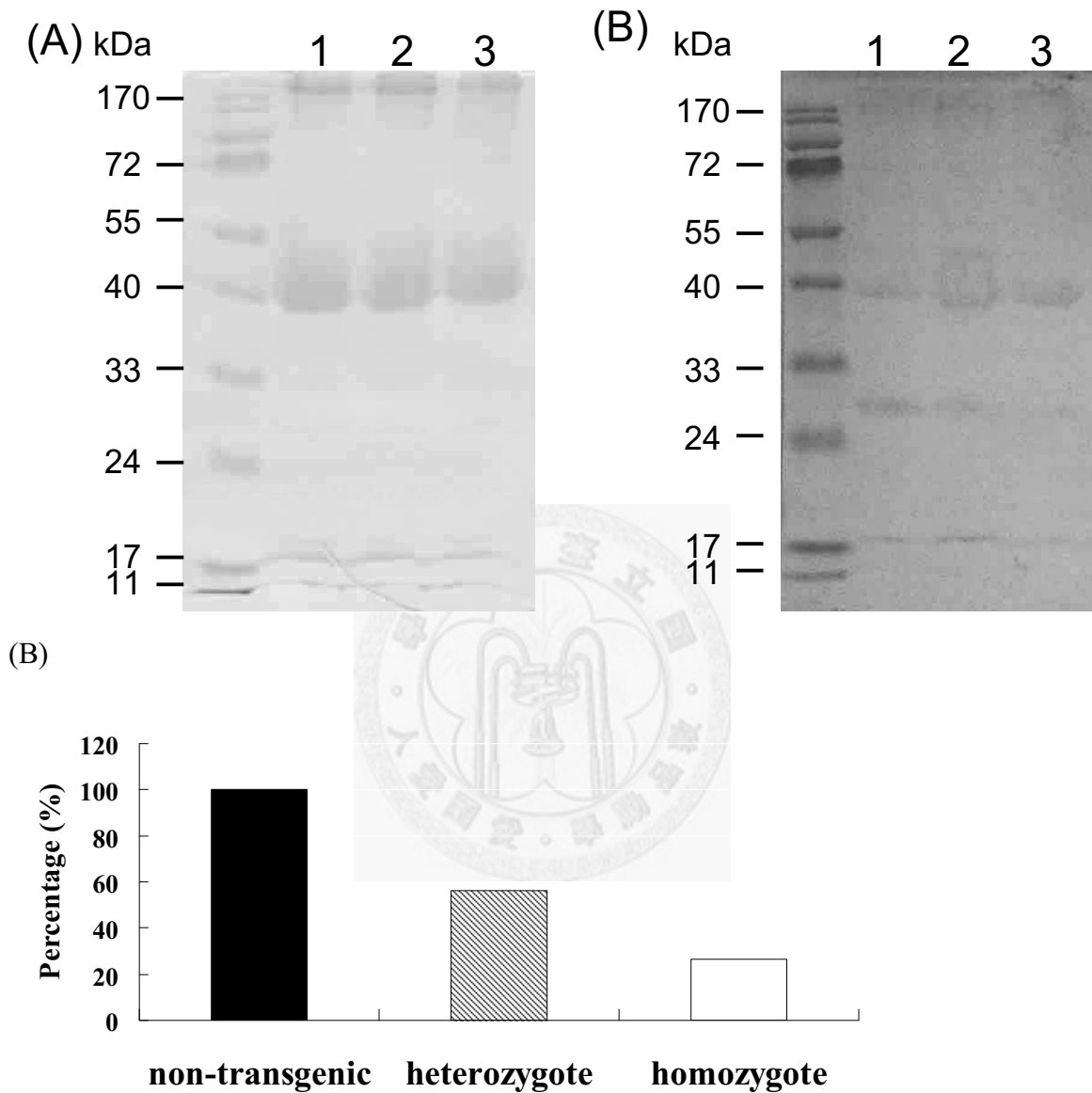


Fig. 3-6. SDS-PAGE and immunoblotting of zebrafish myostatin. (A) SDS-PAGE analysis of muscle protein. The relative molecular mass is indicated on the left. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Immunoblot analysis of Ig using rabbit anti-myostatin (for human) Ig antiserum. Lane 1, wild type; lane 2, heterozygote; lane 3, homozygote, muscle protein. (C) Quantitative analysis of zebrafish myostatin protein by Western blot assay.

由 t-test 分析 heterozygous 與野生組並無差異，而 homozygous 與野生組間則具有顯著差異 (significance) ($p < 0.05$) (Fig. 3-8A)。而 myostatin 基因靜默斑馬魚成魚表現型如 Fig. 3-8C 所示，homozygous 組的斑馬魚其背部肌肉及肥滿度較野生組要來得大，且外形符合陸上動物肌肉倍增基因表現型。Fig. 3-8C 圖所示，Homozygous 的魚其魚體體寬較寬大，且背部肌肉遠比野生組及 heterozygous 組來得寬厚，且體色較野生組淡。進一步將背部肌肉組織包埋、縱切，結果顯示於 Fig. 3-9。Myostatin 基因靜默斑馬魚肌肉背鰭下面的肌肉束排列明顯的變寬且長，但肌肉的排列不如野生組整齊。

3.5.7、Myostatin 基因靜默斑馬魚肌肉細胞之影響

取一個月大的魚進行切片及 HE 染色及切片後分析其肌肉細胞束的大小，結果如 Fig. 3-10 所示，A 圖分別為野生組、heterozygous、homozygous 組的切片結果，B 圖則經由 one way ANOVA two tail 統計分析結果，結果顯示野生組肌纖維細胞大小平均值為 $230.69 \pm 139.04 \mu\text{m}^2$ ；heterozygous 組肌纖維細胞大小平均值為 $278.59 \pm 107.20 \mu\text{m}^2$ ；homozygous 組肌纖維細胞大小平均值為 $428.97 \pm 207.2 \mu\text{m}^2$ ，各組間的結果具有顯著差異 ($p < 0.01$)，其中野生組肌纖維細胞大小 (fiber size) 在 $325 \mu\text{m}^2$ 以下者佔 78.3%，heterozygous 組在 $325 \mu\text{m}^2$ 以下者佔 71.3%，homozygous 組在 $325 \mu\text{m}^2$ 以下只佔 38.3%，由此結果很明顯的表示出 homozygous 的肌纖維細胞大小整個曲線分布向右偏移，且以平均值來看比野生組大了 $198 \mu\text{m}^2$ ，由此結果可證實在斑馬魚中 myostatin 基因的降低確實會造成細胞肥大 (hypertrophy)。

Table 3-3. Survival rate and deformity of myostatin suppressed transgenic zebrafish at the hatching-out stage

	Phenotype (%)					Dead
	-	+	++	+++	++++	
Non-transgenic	90.2	0	0	0	0	9.7
Heterozygote	82.2	6.5	0	0	0	10.3
Homozygote	50.9	12.0	20.0	10.8	0.4	34.8

-, normal; +, slight bend in body axis; ++, body axis $> 90^\circ$; +++, S-shaped body axis; +++++, serious deformity. Sample size n=1024 from F6.

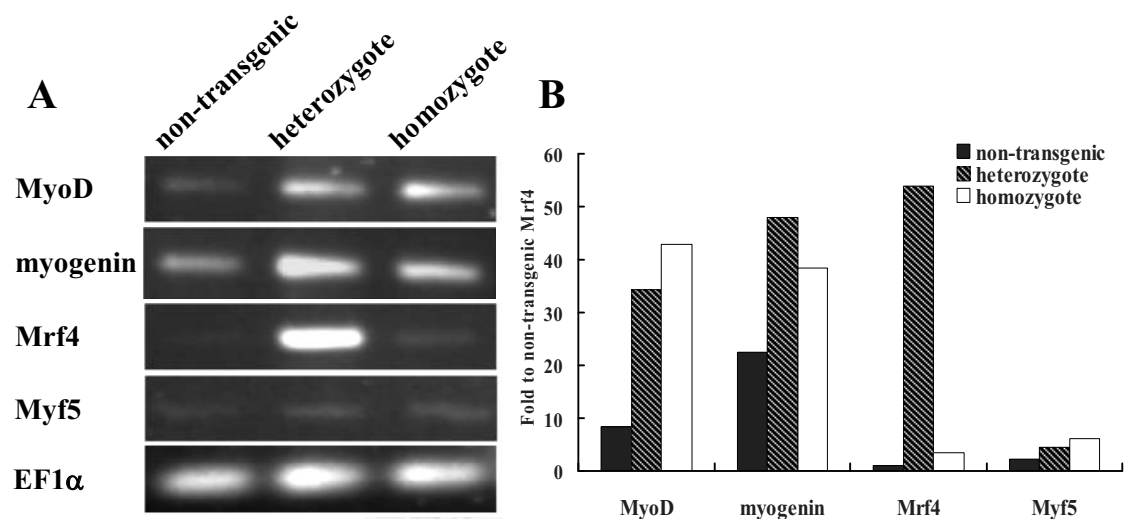


Fig. 3-7. Myogenesis-related gene expression analysis at 60 h post fertilization (hpf). (A) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. EF1 α amplified from the same samples was used as the internal control. (B) Quantitative analysis of RT-PCR products.

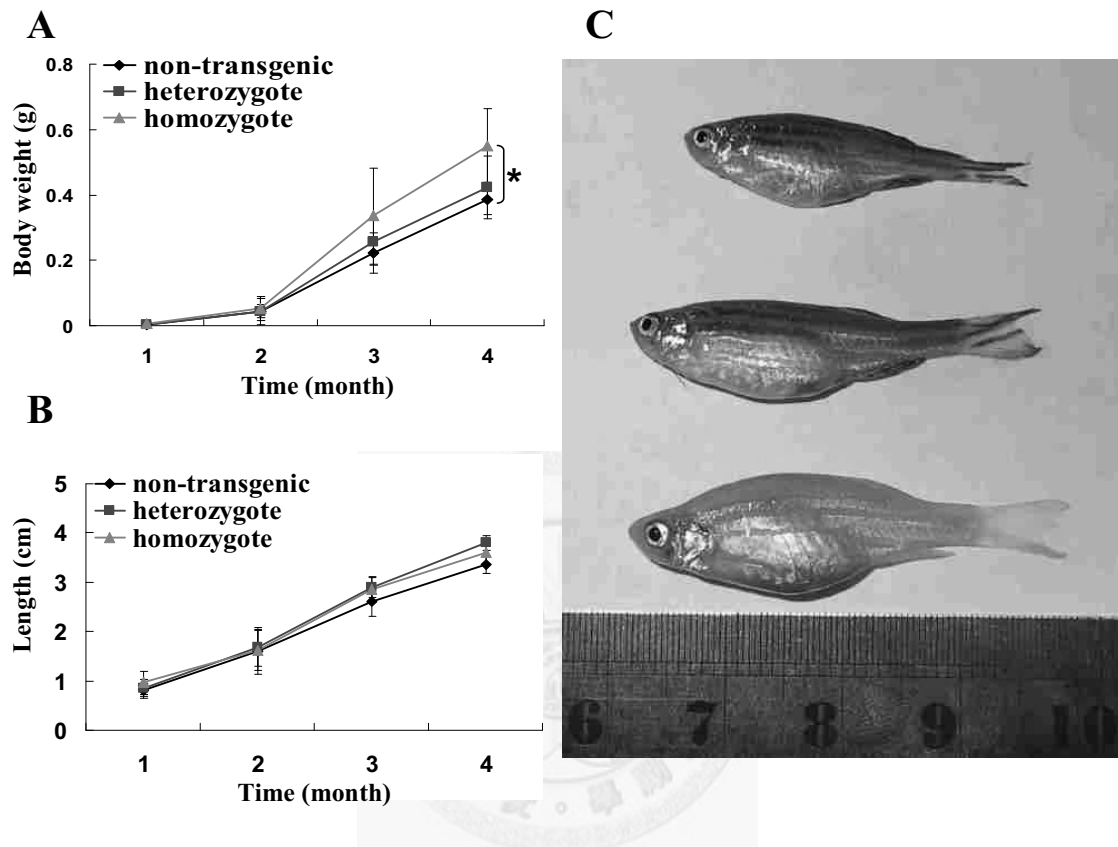


Fig. 3-8. Comparison of body weight and length of wild type and transgenic zebrafish. (A) The growth rate of body weight. (B) The growth rate of body length. (C) The phenotype of transgenic (lower), heterotransgenic (middle) and wild type (upper) zebrafish. Asterisk indicates that the P-value for homozygote fish vs. heterozygote fish and wild type fish <0.05 .

3.5.8、Myostatin 基因靜默斑馬魚成魚各組織之表現情形

利用定量 PCR 分析三組成魚中各組織表現情形結果如 Fig. 3-11. 所示。在各組織中以 EF 1 α 拉平基準線，以野生組肝臟之 myostatin 含量為 1 進行 myostatin 基因靜默斑馬魚與野生組進行比比較。野生組的表現情形 myostatin I 則以腦部、眼睛、肌肉、脾臟與皮膚含量較多，其次為腸道、心臟與鰓，而腎臟、精巢、卵巢、肝臟與鰭也有微量表現；myostatin II 則在脾臟表現量最高其次為心臟、腦部、肌肉、皮膚、腸道與鰓，其它組織表現則較少；而 homozygous 組在腦部、鰓、眼睛、腎臟、精巢、鰭與肌肉 myostatin I 與 II 的表現量皆上升，而皮膚、心臟、腸道、脾臟、卵巢、肝臟等皆下降，其中以卵巢與肝臟的下降最為明顯。

3.5.9、Myostatin 基因靜默斑馬魚成魚背部肌肉之切片

分別將成魚背部肌肉進行切片並用 HE 染色後觀察背部肌肉之變化情形，由 Fig. 3-12 結果顯示，野生組背部肌肉細緻緊密，而 heterozygous 組肌肉束鬆散且扭曲，homozygous 組肌肉束較 heterozygous 組緊密但細胞核較多且明顯經更高倍率觀察發現肌肉表面有增生集結之情形。

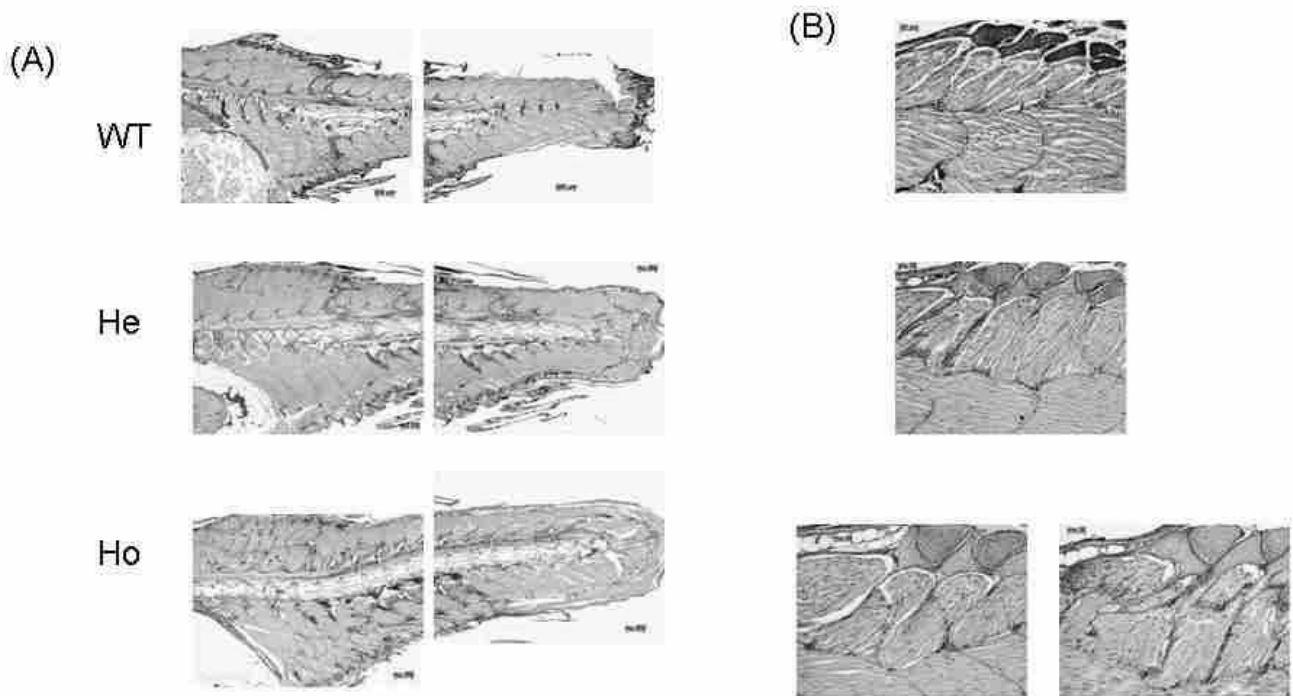


Fig. 3-9. Photomicrography of dorsal muscle in 1 month stage zebrafish. (A) Low magnification photomicrography of skeletal muscle in longitudinal section. (B) Hight magnification of longitudinal dorsal muscle.

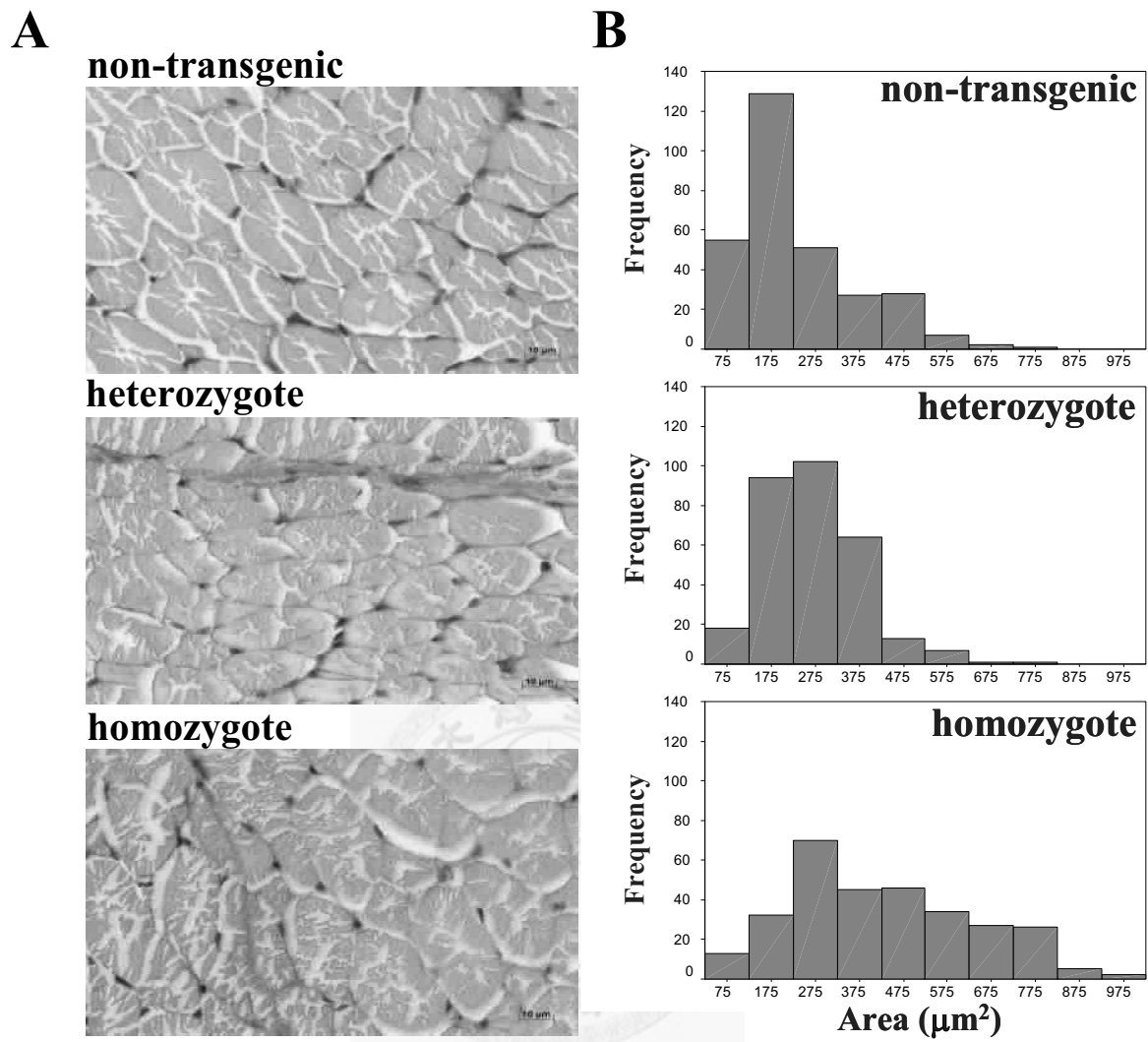


Fig. 3-10. Muscle fiber size analysis of transgenic zebrafish. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Left panels (A) show the higher magnification of representative areas from dorsal muscle. Right panels (B) show the distribution of fiber areas.

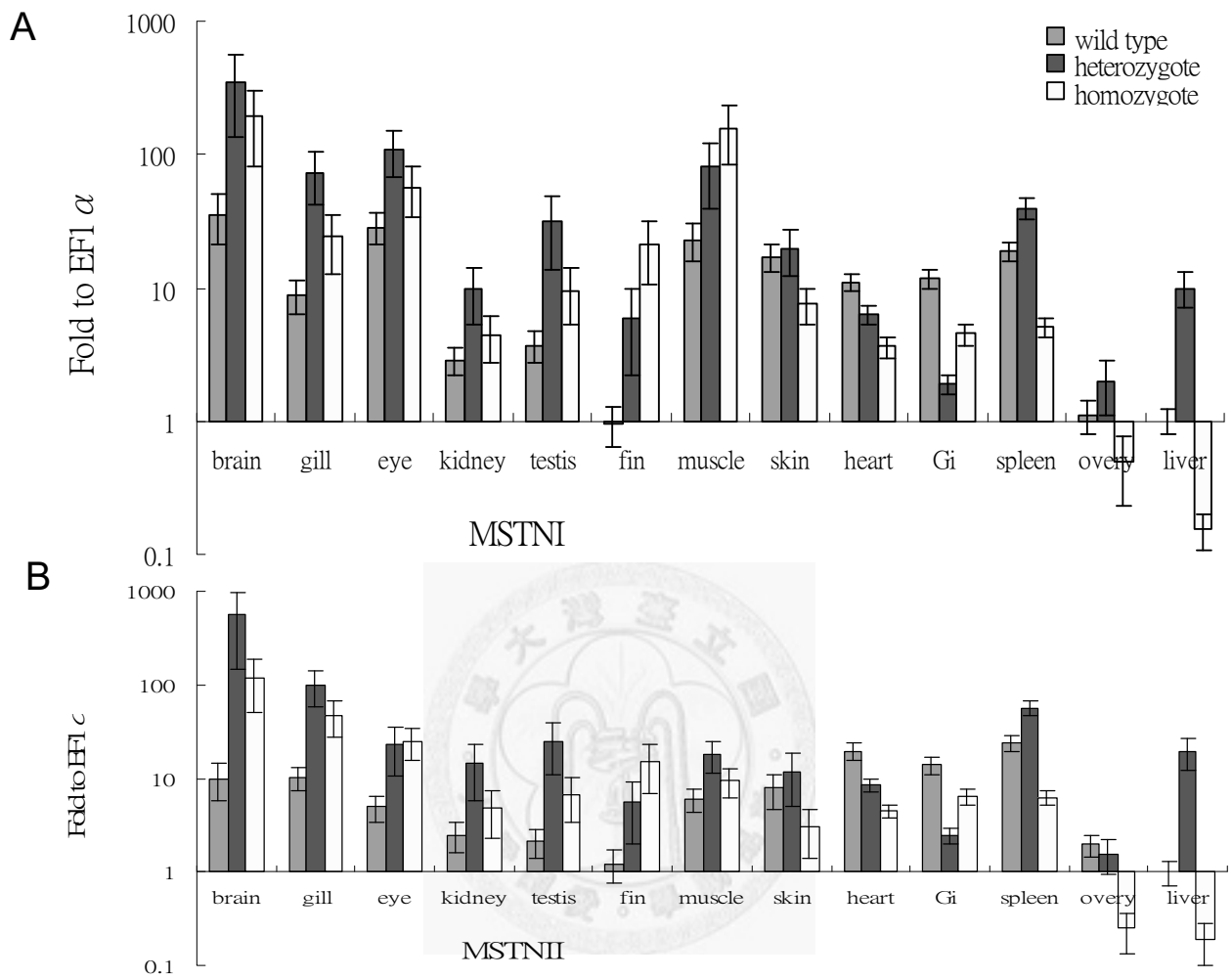


Fig. 3-11. Quantitative analysis of myostatin in different tissues of adult wild type, heterozygote and homozygote zebrafish. A: myostatin I, B: myostatin II. The total RNA was isolated from tissues of adult zebrafish and analyzed by using qRT-PCR. Transcription levels were normalized to EF1 α .

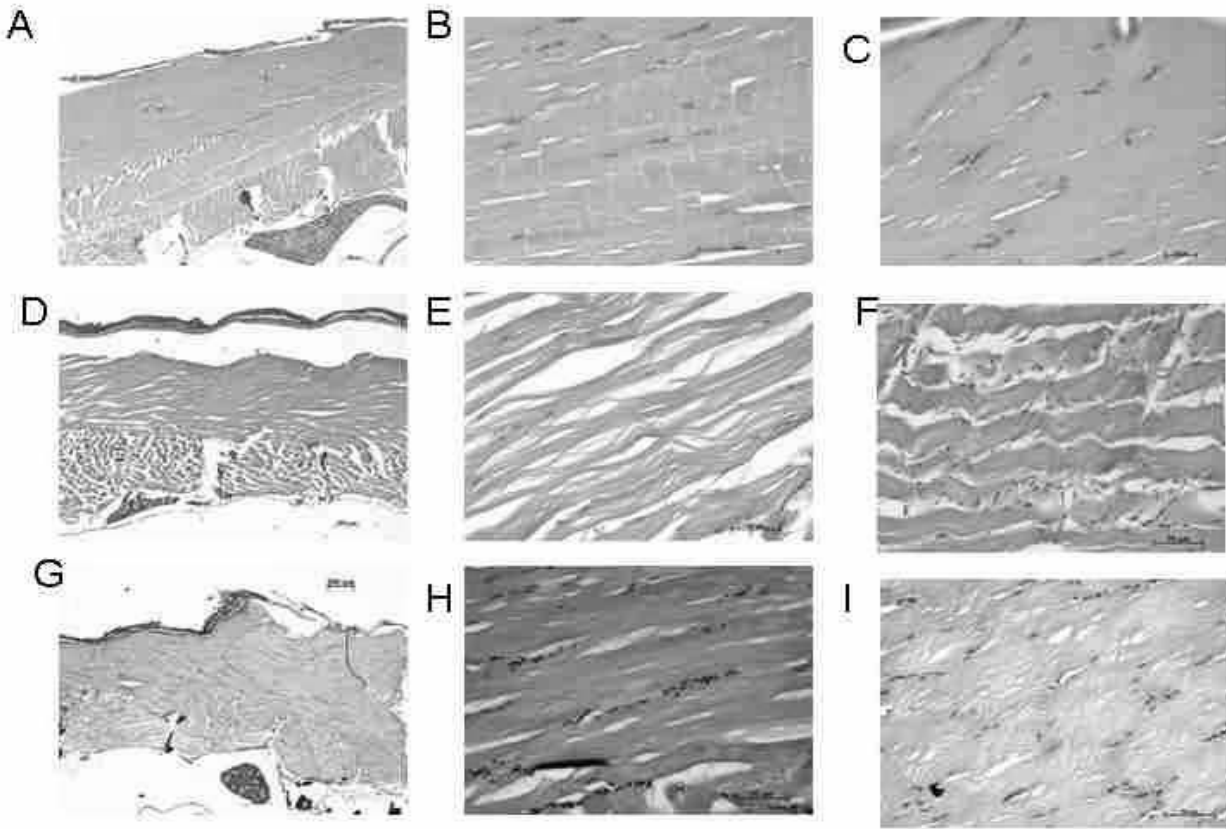


Fig.3-12. Photomicrography of adult zebrafish in longitudinal section. A, D, G, low magnification; B, C, E, F, H, I, high magnification. A, B, C were wild type. D, E, F, were heterozygote. G, H, I were homozygote.

3.6、討論

3.6.1、斑馬魚 myostatin II cDNA 基因篩選及 SiRNA 序列反意 DNA 構築

由 24 小時 cDNA 庫所篩選出的 cDNA 序列與 GenBank myostatin II 序列相同，而此結果與 Kerr 等人於 2005 年利用 RT-PCR 方法分析不同斑馬魚胚胎發育期中 myostatin II 的表現，在 19 小時及孵化時期 myostatin II 基因並不表現的結果並不一致 (Kerr *et al.*, 2005)。

分別利用 SiRNA 及 antisense DNA 二種方法在斑馬魚卵上看其基因功能，發現使用 Si-RNA 的構築載體經顯微注射斑馬魚胚胎，DNA 以一般 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度作顯微注射時，會造成胚胎在 12 小時內會開始增生，然後胚體開始萎縮至呈現整個魚卵空泡化只剩下卵鞘，與一般的胚胎死亡的白化現象不大相同，經觀察發現在 8 小時之後有些胚胎會像疊樓一樣在第一層細胞上面再堆疊生長上去，而非平面分裂，且有卵裂不正常及細胞增生的情形，最後整個細胞的生長調控失衡，是否因此啟動細胞死亡機制，最後造成細胞整個被分解消化而導致空泡化，經降低 DNA 注射濃度至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下時胚胎有少部分可暫時存活，但其孵化率及存活率皆很低，最後無法取得穩定抑制 myostatin 表現之遺傳性品系斑馬魚。相對的經顯微注射 CMV-antiMSTN0.9K 的魚卵其孵化率則有 61.98%，但孵化後 2~3 天其死亡率高，約有 30%之死亡率。經以螢光觀察其 EGFP 發亮情形，在親代有 41.74% 有螢光表現，經飼育至成魚後進行交配發現有 4 隻具有穩定遺傳性，其中子代部分的 EGFP 表現早期為全身產生螢光，直到 72 小時後則剩下肝臟及脊椎部分具有螢光，此與 Biga 等人 (Biga *et al.*, 2005) 的 myostatin II 在斑馬魚中的肌肉、頭部、腦、鰓、卵巢、精巢等多處組織會表現，但在肝臟並未表現的結果並不相同，經比對所構築的 CMV-antiMSTN0.9K 的序列發現在反意 DNA 的序列中有一段 'TGATTTTGT' 的序列是 liver enriched transcriptional 為肝臟專一性反應單元，因此推測此一肝臟專一性單元為造成 EGFP 的重組蛋白在肝臟大量表現的原因，至於其相關機

制則有待再更進一步的深入探討。

具遺傳性基因轉殖斑馬魚彼此交配後產生 F1 子代，其中以二隻不同母魚 A 和 B 分別和同一隻公魚交配產生的子代，母魚 A 與 B 的成長具有顯著差異。在螢光表現率因分別與有螢光表現的公魚交配，故 F1 之 EGFP 表現率高達 3/4，符合遺傳定律，因此進一步進行交配以挑出同源接合子的基因轉殖魚經配對後，發現 A 組 F2 子代產生的體色變淡情形且比例高達 42~52% 的機率，野生組則無此現象，然而在 TGF β 家族中的 FGF (fiboblast growth factor) 家族的目標受體為 tyrosine kinase，而 tyrosine 與體色有重要關聯 (Camp and Lardelli, 2001)，CMV-antiMSTN0.9K 和 myostatin II RNA 作用時同時對 tyrosinase 造成影響，因此基因轉殖魚經交配後產生一定比例的體色淡化的穩定遺傳品系魚種，因此為日後實驗方便觀察及後續胚胎發育情形之探討，故選擇體色較淡之基因轉殖斑馬魚為種魚繼續飼育，經一公一母配對繁殖 F3 子代之受精卵死亡率為 59.71%，比控制組 13.96% 高了近 45% 的死亡率，其中存活的胚胎中產生畸型的比例約有 10~30% 不等，經觀察基因轉殖魚嚴重畸型的仔魚一般皆無法存活，畸型較輕微之仔魚會隨著時間的增加具有回復正常的現象，有些小魚在 2 個月大前看不到有畸型的現象，但養至 3 個月後有些成魚會產生脊椎側彎的情形，就像人類的 scoliosis 疾病一樣。另基因轉殖魚中有 30% 左右的基因轉殖魚會造成畸型，輕微者呈 S 型或 L 型，最嚴重時則整個尾巴完全往後變曲而死亡。L 型畸型的仔魚在孵化後隨著時間的增加具有回復性，此結果是否與 myostatin 基因具有 regeneration 有關；S 型雖也具有回復性，但最後仍會有些彎曲，且在彎曲位置上發現 EGFP 的表現量有較高的情形，意味著因 CMV-antiMSTN0.9K 的作用點在此故造成脊椎彎曲變形，然而造成此種脊椎彎曲的現象主因是脊椎骨本身發育造成的影響，或是因為肌肉發育時未同時對稱發育而產生的結果則有待進一步釐清。

肌肉倍增基因在斑馬魚上的表現有 myostatin I 和 myostatin II-a 和 II-b

這兩種型式，而 myostatin I 和 myostatin II 其核苷酸序列相似度達 66%，其中具有功能的成熟蛋白相似度更高達 92%，因此不易區分二者之功能，因此曾在二者相異度較大的位置設計不同 SiRNA 序列來進行基因靜默實驗來探討 myostatin 基因的功能，分別設計 2 段 myostatin I 及一段 myostatin II SiRNA 序列以顯微注射方式打入斑馬魚胚胎，結果造成斑馬魚卵全部死亡，且經測試不同濃度的 myostatin SiRNA 構築質體劑量測試，結果發現以正常注射濃度 150ng~50ng 等不同劑量以顯微法注射到斑馬魚卵皆會造成斑馬魚胚胎死亡，由此結果似乎透漏出 myostatin 基因在魚類胚胎發育過程中不可或缺的重要性。

3.6.2、CMV-antiMSTN0.9K 轉殖螢光魚肌肉相關基因分析

經分析 CMV-antiMSTN0.9K 轉殖魚其 myostatin II mRNA 在胚胎發育的不同時期確定有被抑制或降低(Fig. 3-3.)其中分別分析 45 天 homozygous 的 F1 及 F2 的相關基因(Fig. 3-4.)發現在 F1 之 myostatin I 增加為控制組的 1.53 倍，而 myostatin II 則降低為 0.86 倍，而 MyoD 下降為原來的 0.83 倍 Myf5 上升為 1.23 倍，而此消長的結果與 Braune、Hasty 及 Rudnicki 等人所發表的 MyoD 和 Myf5 兩者具有互相補償作用(Braune *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*,1993)的結果相符合，另外 Myogenin 上升為 1.87 倍、GH 上升為 2.06 倍、IGF2a 及 IGF BP3 上升為 1.25 及 1.22 倍，此結果更說明為何 F1 的轉殖魚比野生組增加 10%重，且具有統計上的差異，相對的 F2 不管在基因表現及成長率則不如 F1 且 myostatin 和 myogen 相關基因彼此間有有相同趨勢，而由 myostatin I 和 myostatin II 的 mRNA 的表現量一增一減的結果是否兩者在不同時期生物體內所需的 myostatin I 和 myostatin II 量不同而產生互補或迴饋抑制情形，則尚待更進一步探討。

Xu 等人使用具肌肉組織專一性的 myosine light chain 啟動子來啟動 myostatin 結果雖有組織特異性但可能因啟動子不夠強，無法產生表現型的雙倍

肌肉魚種(double muscle fish)，且 myostatin 在魚類各組織皆有不同的表現量，也會因不同時期及組織不同而不同 (Kerr *et al.*, 2005)，因此我們使用目前已知較強且為非特異性的 CMV 啟動子進行構築，希望如此能產生表現型的雙倍肌肉斑馬魚種，並以此模式魚種來加以探討 myostatin 在魚類中的調控與表現情形。

將轉殖成功且具遺傳性基因轉殖斑馬魚彼此交配後產生 F1 子代，在螢光表現率因分別與有、無螢光表現的公魚交配並進行遺傳統計分析，故 F1 之 EGFP 表現率高達 3/4，符合遺傳定律，因此進一步再以單隻配對進行分析以挑出同源接合子的轉殖魚經配對後發現 F2 子代產生的體色變淡情形高達 42~52% 的機率，野生組則無此現象。曾有學者報告在腦部發生病變時動物體色會有變淡情形。因此為方便觀察後續胚胎發育情形，故選擇體色較淡之基因轉殖斑馬魚為種魚。經篩選 F3 子代之受精卵死亡率為 59.71%，比野生組 13.96% 高了近 45% 的死亡率，其中存活的胚胎中產生畸型的比例約有 10~30% 不等，其中約 20% 具有回復性，此結果可能與 myostatin 及 smad7 間的 autoregulation 有關。Kollias 等人指出 myostatin 下降會產生 autoregulation 是透過 smad7 來調控，當 smad7 overexpression 會迴饋抑制 myostatin 的表現，使 myostatin 的表現量下降，同時抑制 smad3 磷酸化，進而打斷 myostatin signal 的傳導。當 myostatin 量下降時 smad7 表現量亦會降低 (Kollias *et al.*, 2006)。

使用 real time RT-PCR 分析 F6 hatch of transgenic fish of myostatin I and myostatin II mRNA 分別降低為野生組的 25% 和 30% 同時分析 muscle marker: MyoD、myogenin、Mrf4、Myf5 結果 myogenesis 相關基因 mRNA 表現量皆比野生組增加 2-3 倍，此結果與 zebrafish knock down myostatin I 結果具有一致性 (Amali *et al.*, 2004)，而 myostatin 在胚胎受精後即有微量表現，在不同的時期表現量亦不同 (Rodgers *et al.*, 2001; Biga *et al.*, 2005) 且在吳郭魚魚苗時期有很明顯的上升，可見在魚苗早期的肌肉生成過程中相信 myostatin 扮演了非常重要的角色。

Thomas 等人將 myostatin 的 antisense 加入 C2C12 肌肉細胞中，會增加 p21 的表現使 Cdk2 表現下降，讓 Rb 無法被磷酸化而抑制細胞增生能力，同時也會抑制 MyoD、myogenin 和 Myf5 的分化，造成肌肉纖維細胞較大(Thomas *et al.*, 2000; Rios *et al.*, 2001; Zimmers *et al.*, 2002)，這也可以解釋斑馬魚中 myostatin 抑制後造成 MyoD、myogenin 和 Myf5 上升之趨勢有相同結果，但未發現有細胞數目增加的情形。在老鼠、牛、人類方面當 myostatin 缺損或 myostatin 被抑制會增加肌肉質量而此為肌纖維產生 hypertrophy 和 hyperplasia 的結果，此結果同時發現於雌性與雄性動物中 (McPherron and Lee 2002; Wagner *et al.*, 2005) 但在我們的結果中 Myostatin 靜默 2/3 只有增加肌肉質量，且成魚有較明顯的雙倍肌肉之情形，而此 Hypertrophy 的結果與 Zhu 等人的 myostatin 基因轉殖結果在肌肉纖維上只增加肌肉質量是藉由 hypertrophy 而不是 hyperplasia 的結果相似 (Zhu *et al.*, 2000)。另外利用 myostatin 基因序列只有 74% 相似度的 dsRNA 以 5×10^6 分子注射到斑馬魚之結果，纖維面積增加 48% (Acosta *et al.*, 2005)，與我們的 1 個月 stable line 斑馬魚肌肉纖維面積由 230.69 ± 139.04 增加到 $428.99 \pm 207.20 \mu\text{m}^2$ ，平均增加 85.95%，且整個肌肉纖維面積分佈向右偏移，顯示轉基因魚的細胞變大。而 Acosta 等人利用吳郭魚 myostatin 具活性的 C-terminal domain 268 胺基酸以不同濃度 5.5 和 5.5×10^6 molecule 注射到胚胎中，平均體重增加 39 和 45%，此結果與我們所得到的這隻斑馬魚的平均體重增加 45% 有相同的結果，且其整體的魚寬度較野生組要寬，且背部肌肉較大，似乎多了一塊背肌，以外在表現形我們這隻魚更符合雙倍肌肉斑馬魚。

第四章 總結與討論

4.1、總結論

經由斑馬魚基因組中選殖出兩個包含完整 myostatin I 基因組選殖株分別為 Zg15-1 的 24 Kb 及 Zg 17-3 的 15Kb 大小之基因組片段，定序後該啟動子片段分別為 6.061 Kb 及 0.87 Kb。發現在 6.06 Kb 啟動子序列中在 ATG 前 104 bp 有第一個 TATA box，另外與肌肉相關轉錄因子共包含有 21 個 E box、6 個 TATA box、5 個 CAAT box、1 個 AP-1 binding site、8 個 N box、4 個 myocyte enhance factor、2 個 MEF2、1 個 MEF3 和 1 個 muscle segment homeo box。

啟動子 3.4 Kb 片段在細胞株表現情形，以在 ZFL 及 C2C12 細胞株中有最強的活性；但將這些啟動子置換到含 EGFP 報導基因載體上，並轉殖至斑馬魚卵中結果並未如預期般有組織特異性之綠色螢光表現。

分析第六代之基因轉殖魚 60 小時之 myostatin mRNA 的表現量，降低為野生組的約 30%，蛋白質的表現方面，用人類 myostatin 抗體分析進行免疫分析結果 homozygous 組 27 kDa 的蛋白濃度為野生組的 36.75%。此二種結果與 Q-PCR 分析的 mRNA 結果有相同的下降趨勢。因此確認取得 myostatin 基因靜默的斑馬魚，其 myostatin 的 mRNA 及蛋白質含量皆下降為野生組的 30~36%。

分析 60 hpf 的穩定遺傳斑馬魚胚胎其肌肉生長相關基因 mRNA 的表現，結果顯示造成 myogenesis 肌肉生長相關基因表現量皆上升。在生長速率和 myostatin 基因靜默斑馬魚成魚表現型生長速率與體重結果顯示 4 個月大的魚其平均體重較野生組增加 45%。myostatin 基因靜默斑馬魚成魚表現型，外形符合陸上動物肌肉倍增基因表現型。

取一個月大的魚進行切片及 HE 染色及切片後分析其肌肉纖維細胞的大小，結果顯示較野生組肌纖維細胞大小增加 85.95%。由此結果可證實在斑馬魚中 myostatin 基因的降低確實會造成細胞肥大。

綜合上述結果可得到以下結論:

1. 斑馬魚 myostatin I 6.06 Kb 的啟動子活性分析，以 -3.4Kb 的片段在 C2C12 及 ZFL 細胞有最強的活性。
2. 分析穩定遺傳的 myostatin 靜默斑馬魚在 60 hpf 的 RNA 及蛋白質分別降低為 30% 和 36.75%。
3. 隨著 myostatin 被降低 myogenesis marker 亦下降 2~3 倍。
4. 此為第一隻外表表現型為肌肉倍增之斑馬魚模式魚種。
5. 成魚體重由野生組 0.38 ± 0.05 g 增加至 0.55 ± 0.11 g 增加了 45%。
6. 肌肉纖維細胞大小由野生組 230.69 ± 139.04 μm^2 增加至 428.99 ± 207.20 μm^2 平均增加了 85.95%。
7. 結果顯示，myostatin 表現被抑制後會造成斑馬魚肌肉細胞肥大。
8. myostatin 靜默斑馬魚在外觀及螢光表現上皆可穩定遺傳，並已培育至第 10 代。

4.2、未來展望

目前基因資料庫 NCBI 中已知魚類的 myostatin 序列有 69 種以上(Pie and Alvares, 2006 ; De Santis *et al.*, 2008)。這些魚類有部分會同時含有二種不同基因型，分別為 myostatin I 和 myostatin II。具有二種以上 myostatin 的魚類有鮭魚、鱒魚、斑馬魚、鱸魚、鯛魚、河魨等 6 種 (Ostbye, 2001)，在魚類中這二種基因型的 myostatin 在組織中各自功能則尚需進一步仔細探討。

在老鼠心臟初級纖維母細胞中 myostatin 表現量為細胞增殖的指標，當 myostatin 表現量高時，其心臟纖維母細胞增殖指數則較低。雖然 myostatin 會抑制心臟纖維母細胞之生長，但卻不會誘導其產生 apoptosis (McKoy *et al.*, 2007; Artaza *et al.*, 2007)。Myostatin 同時會抑制因 IGF1 或藥物(phenylepinephrine)所造成之心肌肥大。最近發現 myostatin 不止調節心肌之成長過程，同時在心肌中扮演為抑制性

內分泌之作用就如同它在骨骼肌中所作用一樣(Gaussin, 2005)。

Myostatin 在心臟中之表現量也可當作疾病生理之指標，如心肌梗塞 (myocardial infarction) 之病症中，利用免疫染色法發現在梗塞周圍 myostatin 之濃度會隨時間而穩定地增加且會持續 1 個月；另在長期游泳訓練之老鼠中發現 myostatin 表現量會較高，該老鼠同時具有心臟容量超負荷之障礙。這些表現就如同在骨骼肌受傷時 myostatin 之表現一樣，所以 myostatin 亦會影響心臟肌肉細胞之修復 (Modesti *et al.*, 2004)。

本實驗所建立 myostatin 降低的斑馬魚除了肌肉肥大與心包膜積水外也會造成後腦腫脹，而此一結果似乎由 Roberts 等人在溪鱒研究發現 myostatin 在腦部主要表現於後腦及視葉 (optic lobes)，其次為中腦與前腦可加以解釋當 myostatin 降低後會造成後腦變異而產生腫脹之現象。未來這隻基因轉殖魚除了可進一步探討 myostatin 在斑馬魚不同時期及不同組織的功能與機制同時更可應用於腦部及心臟方面之研究。

參考文獻

- 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.* 119:324-331.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K. and Kawabata, M. 1999. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem.* 274:35269-35277.
- Amali, A.A., Lin, C.J.F., Chen, Y.H., Wang, W.L., Gong, H.Y., Lee, C.Y., Ko, Y.L., Lu, J.K., Her, G.M., Chen, T.T. and Wu, J.L. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev. Dyn.* 229:847-856.
- Amali, A.A., Lin, C.J.F., Chen, Y.H., Wang, W.L., Gong, H.Y., Rekha, R.D., Lu, J.K., Chen, T.T. and Wu, J.L. 2008. Overexpression of myostatin2 in zebrafish reduces the expression of dystrophin associated protein complex (DAPC) which leads to muscle dystrophy. *J. Biomed. Sci.* 15:595-604.
- Anderson, S.B., Goldberg, A.L. and Whitman, M. 2008. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 283:7027-7035.
- Artaza, J.N., Reisz-Porszasz, S., Dow, J.S., Kloner, R.A., Tsao, J., Bhasin, S. and Gonzalez-Cadavid, N.F. 2007. Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. *Journal of Endocrinology* 194:63-76.
- Bass, J., Oldham, J., Sharma, M., and Kambadur, R. 1999. Growth factors controlling muscle development. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:191-197.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. 1990. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA-binding proteins. *Cell*

61:49-59.

- Biga, P.R., Roberts, S.B., Iliev, D.B., McCauley, L.A.R., Moon, J.S., Collodi, P., and Goetz, F.W. 2005. The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*. *Comp. Biochem. Physiol.* 141:218-230.
- Blackwell, T.K. and Weintraub, H. 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*. 250(4984):1104-1110.
- Braun, T., Rudnicki, M.A., Arnold, H.-H., and Jaenish, R. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71:369-382.
- Camp, E. and Lardelli, M. 2001. Tyrosinase gene expression in zebrafish embryos. *Dev Genes Evol.* 211:150-153.
- Casas, E., Keele, J.W., Fahrenkrug, S.C., Smith, T.P., Cundiff, L.V., and Stone, R.T. 1999. Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreeds segregating an inactive myostatin allele. *J. Anim. Sci.* 77:1686-1692.
- Corrtnik, D., *Et al.*, 1992. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends. Biochem. Sci.* 17:312-315.
- Coustry, F., Maity, S.N. and de Crombrughe, B. 1995. Studies on transcription activation by the multimeric CCAAT-binding factor CBF. *J. Biol. Chem.* 270:468-475.
- Crisa, A., Marchitelli, C., Savarese, M.C. and Valentini, A. 2003. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet. Genome Res.* 102:48-52.
- Davis R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B. and Weintraub, H. 1990. The myoD DNA binding

- domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60:733-746.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51:987-1000.
- De Santis, C., Evans, B.S., Smith-Keune, C. and Jerry, D.R. 2008. Molecular characterization, tissue expression and sequence variability of the barramundi (*Lates calcarifer*) myostatin gene. *BMC Genomics* 9:82.
- Fahrenkrug, S.C., Casas, E., Keele, J.W., and Smith, T.P. 1999. Technical note: direct genotyping of the double-muscling locus(mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR. *J. Anim. Sci.* 77:2028-2030.
- Ferrell, R.E., Conte, V., Lawrence, E.C., Roth, S.M., Hagberg, J.M., and Hurley, B.F. 1999. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics* 62:203-207.
- Funkenstein, B. and Rebhan, Y. 2007. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: Facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. *Protein Expr Purif.* 54: 54-65.
- Gaussin V, Depre C. 2005. Myostatin, the cardiac chalone of insulin-like growth factor-1. *Cardiovascular Research* 68:347-349.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S., and Bhasin, S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14938-14943.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., and Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the

- double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17:71-74.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E., and Klein, W.H. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501-506.
- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6:177-185.
- Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M. and Qiu, Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* 277: 40735-40741.
- Hollingsworth, R.E., J.R., Hensey C.E. and Lee, W.H. 1993. Retinoblastoma protein and the cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:55-62.
- Jeanplong, F., Bass, J.J., Smith, H.K., Kirk, S.P., Kambadur, R., Sharma, M., Oldham, J.M. 2003. Prolonged underfeeding of sheep increases myostatin and myogenic regulatory factor Myf-5 in skeletal muscle while IGF-I and myogenin are repressed. *J. Endocrinol.* 176:425-437.
- Jen, Y., Weintraub, H., and Benezra, R. 1992. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program; In vivo association of Id and E2A proteins. *Genes. Dev.* 6:1466-1479.
- Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F., and Spurlock, M.E. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol.* 275:R1265-R1273.
- Jones, N. 1990. Transcriptional regulation by dimerization: Two sides to an incestuous relationship. *Cell* 61:9-11.

- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., and Bass, J. J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome. Res.* 7:910-916.
- 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. *Evol. Dev.* 7:390-400.
- Kobayashi, N., Goto, K., Horiguchi, K., Nagata, M., Kawata, M., Miyazawa, K., Saitoh, M. and Miyazono, K. 2007. c-Ski activates MyoD in the nucleus of myoblastic cells through suppression of histone deacetylases. *Genes Cells.* 12:375-385.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Penttinen, C. and Keski-Oja, J. 2001. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* 52:354-62.
- Kollias, H.D., Perry, R.L., Miyake, T., Aziz, A. and McDermott, J.C. 2006. Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell Biol.* 26:6248-6260.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. and Kambadur, R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating myoD expression. *J. Biol. Chem.* 277:49831-49840.
- Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., and Weintraub, H. 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58:823-831.
- Lassar, A.B., Paterson, B.M., and Weintraub, H. 1986. Transfection of a DNA locus that mediated the conversion of C3H10T1/2 fibroblasts into myoblasts. *Cell* 47:649-656.
- Lawlor, M.A. and Rotwein, P. 2000. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Cell*

- Biol.* 20:8983-8995.
- Lee, S.J. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 20:61-86.
- Lee, S.J. and McPherron, A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:9306-9311.
- Lyons, G.E., and Buckingham, M.E. 1993. Developmental regulation of myogenesis in the mouse. *Semin. Dev. Biol.* 3:243-253.
- Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N. and Bhasin, S. 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:E1128-E1136.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Patarnello, P., Radelli, G., Mascarello, F. and Patarnello, T. 2002. Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum (*Umbrina cirrosa*, *Sciaenidae*). *Aquaculture* 205:49-60.
- Massagué, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:597-641.
- Mckoy, G., Bicknell, K.A., Patel, K., Brooks G. 2007. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Research* 74: 304-312.
- McPherron, A.C., and Lee, D.J. 1997. Double muscleing in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:12457-12461.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- McPherron, A.C. and Lee, D.J. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109:595-601.
- Modesti, P.A., Vanni, s., Bertolozzi, I., Cecioni, I., Lumachi, C., Perna, A.M., Boddi, M. and Gensini, G.F. 2004. Different growth factor activation in the right and left

- ventricles in experimental volume overload. *Hypertension*. 43:101-108
- Morissette, M.R., Cook, S.A., Foo, S., McKoy G., Ashida, N., Novikov, M., Scherrer-Crosbie, M., Li, L., Matsui, T., Brooks, G. and Rosenzweig, A. 2006. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circulation Research* 99:15-24.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364:532-535.
- Naya, F.J., Wu, C., Richardson, J.A., Overbeek, P. and Olson, E.N. 1999. Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development*. 126:2045-2052.
- Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471-480.
- Nishimura T, Oyama K, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A. 2007. Spatiotemporal expression of decorin and myostatin during rat skeletal muscle development. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 361: 896-902.
- Olson, E.N. 1990. MyoD family: a paradigm for development. *Genes Dev*. 4:1454-1461.
- Østbye, T.K. Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T. and Andersen, O. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem*. 268:5249-5257.
- Pie, M.R and Alvares, L.E. 2006. Evolution of myostatin in vertebrates: is there evidence for positive selection. *Mol. Phylogenet. Evol*. 41:730-734.
- Pirottin, D., Poncelet, D., Grobet, L., Royo, L.J., Brouwers, B., Masabanda, J., Takeda, H., Fries, R., Sugimoto, Y., Womack, J.E., Junner, S., and Georges, M. 1999.

- High-resolution, human-bovine comparative mapping based on a cosmid YAC contig spanning the bovine mh locus. *Mamm. Genome*. 10:289-293.
- Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M., and Devesa, J. 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:561-566.
- Roberts, S.B., and Goetz, F.W. 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS. Lett.* 491:212-216.
- Rodgers, B.D. and Weber, G.M. 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone Americana*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 129:597-603.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., and Levine, M.A. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142:1412-418.
- Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71:383-390.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N.J., Stead, r.H., Braun, T., Arnold, H.-H., and Jaenisch, R. 1993. Myo D or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351-1359.
- Salerno, M.S., Thomas, M., Forbes, D., Watson, T. Kambadur, R. and Sharma, M. 2004. Molecular analysis of fiber-type specific expression of murine myostatin promoter. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:C1031-C1040.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F. and Lee, S.J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle

- hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 350: 2682-2688.
- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J. and Bass, J.J. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.* 180:1-9.
- Smith, T.P., Lopez-Corrales, N.L., Kappes, S.M., and Sonstegard, t. S. 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm.Genome.* 8:742-744.
- Sonstegard, t.S., Kappes, s.M., Keele, J.W., and smith, T.P. 1998. Refinement of bovine chromosome 2 linkage map near the mh locus reveals rearrangements between the bovine and human genomes. *Anim. Genet.* 29:341-347.
- Spiller, M.P., Kambadur, R., Jeanplong, F., Thomas, M., Martyn, J.K., Bass, J.J. and Sharma, M. 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor myoD. *Mol. Cell. Biol.* 22:7066-7082.
- Suzuki, H., Yagi, K., Kondo, M., Kato, M., Miyazono, K. and Miyazawa, K. 2004. c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene.* 23:5068-5076.
- Taylor, S.M., and Jones P.A. 1979. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5azacytidine. *Cell* 17:771-779.
- Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Jr, Kull, F.C., and Jr, Gonzalez-Cadavid, N. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E221-E228.
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A. and Wolfman, N.M.. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors.* 18:251-259.

- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., and Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275:40235-40243.
- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., and Klein, W. H. 1995. Myogenesis is required for late but not early aspects of myogenesis during muscle development. *J. Cell. Biol.* 128:563-576.
- Velleman, S.G., Liu, X., Eggen, K.H. and Nestor, K.E. 1999. Developmental regulation of proteoglycan synthesis and decorin expression during turkey embryonic skeletal muscle formation. *Poult Sci.* 78:1619-1626.
- Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X. and Allen, R.E. 2005. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:2519-2524.
- Wehling, M., Cai, B., and Tidball, J.G.H. 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB. J.* 14:103-110.
- Weintraub, D.J., Prater, C.A. and Dean, D.C. 1992. Retinoblastoma protein switches the E2F site from a positive to negative element. *Nature* 358:259-261.
- Weintraub, H., *et al.*, 1991. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766.
- Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lasser, A.B., and Miller, D. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell line by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:5434-5438.
- Westhusin, M. 1997. From mighty mice to mighty cows. *Nat. Genet.* 17:4-5.
- Williams, B.A. and Ordahl, C.P. 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120:785-796.
- Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson,

- K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S. and Lee, S.J. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:15842-15846.
- Xu, W., Angelis, K., Danielpour, D., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Stavnezer, E. and Medrano, E.E. 2000. Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5924-5929.
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y. and Du, S.J. 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 260:4067-4079.
- Yang, W., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, N. and Zhu, D. 2006. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res.* 66:1320-1326.
- Yang, W., Zhang, Y., Li, Y.F., Wu, Z.G. and Zhu, D.H. 2007. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J. Biol. Chem.* 282:3799-3808.
- Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G. and McNally, E.M. 2000. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS. Lett.* 474:71-75.
- Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.F. and Stotish, R.L. 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26: 262-272.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M. and Lee, S.J. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296:1486-1488.

附 錄

培養基、培養液

LB broth

Bactotryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1000 mL

以滅菌釜 121°C 滅菌 30 分鐘

LB plate

Bactotryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
H ₂ O	1000 mL

以滅菌釜 121°C 滅菌 30 分鐘

LB/Ampicillin broth (plate)

LB	1000 mL
Ampicillin (100 mg/mL)	1 mL

LB/Kanamycin broth(plate)

LB	1000 mL
Kanamycin (50 mg/mL)	1 mL

NZY broth

NZ Amine (Casein hydrolysate)	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
H ₂ O	1000 mL

以滅菌釜 121°C 滅菌 30 分鐘

NZY plate

NZ Amine (Casein hydrolysate)	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
Agar	20 g
H ₂ O	1000 mL

以滅菌釜 121°C 滅菌 30 分鐘

NZY top agar

NZY broth	1000 mL
Agarose	7 g

緩衝溶液 (Buffer)

Microinjection Buffer

1 X PBS

0.1 % phenol red

DNA final concentration 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

DEPC-H₂O

Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	2 mL
ddH ₂ O	1000 mL

攪拌隔夜，高溫高壓滅菌處理。

10X MOPS Buffer

MOPS	41.85 g
NaOAc	4.1 g
EDTA	3.72 g
DEPC-H ₂ O	to 1000 mL

SM Buffer

2% gelatin	2.5 mL
1 M Tris-HCl	25 mL
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g
NaCl	2.9 g
ddH ₂ O	to 500 mL

Dnature Solution

NaCl	175.32 g
NaOH	40 g

Neutralization Solution

NaCl	175.5 g
Tris-HCl	175.6 g
Tris-Base	107.2 g
ddH ₂ O	to 2000 mL

TE Buffer

EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM

50% Hybridization Buffer

Formamide	50 mL
50% PEG 8000	20 mL
5 M NaCl	5 mL
1 M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	25 mL
0.5 M EDTA	0.1 mL
SDS	7 g

Wash Buffer

10% SDS	10 ml
20X SSC	5 mL
ddH ₂ O	to 1000 mL

RNA dilution buffer

20 X SSC	0.3 mL
----------	--------

formaldehyde 0.2 mL

DEPC-treated H₂O 0.5 mL

RNA transfer buffer

20 X SSC 100 mL

DEPC-treated H₂O 100 mL

PBT

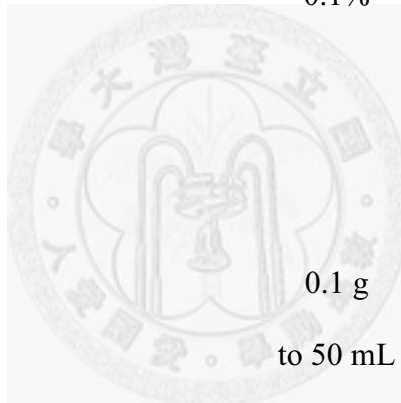
PBS (GibcoBRL) 1X

Tween-20 (Merck) 0.1%

2mg/mL Glycine / PBT

Glycine 0.1 g

PBT to 50 mL



4% Paraformaldehyde / PBS

Paraformaldehyde 2 g

10 X PBS 5 mL

ddH₂O 45 mL

加熱到 70°C 攪拌 2 小時，在冷卻至 4°C，加 4 μ L 1N NaOH 混合。放置 -20°C 冰箱保存。

2 X SSCT

20 X SSC 5 mL

10% Tween-20	0.5 mL
ddH ₂ O	44.5 mL

0.2 X SSCT

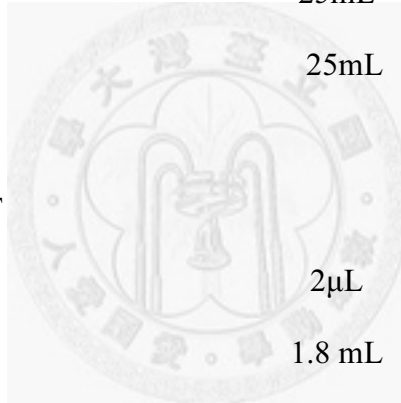
20 X SSC	0.5mL
10% Tween-20	0.5mL
ddH ₂ O	49 mL

50% Formamide / 2 X SSCT

100% Formamide	25mL
2 X SSCT	25mL

10µg Proteinase K / ml PBT

20 mg/mL Proteinase K	2µL
1 X PBS	1.8 mL
10% Tween-20	0.2 mL



In situ hybridization buffer

100% Formamide	25 mL
20 X SSC	12.5mL
20 mg/mL Heparin	125µL
10% Tween-20	0.5 mL
Total RNA	0.25 g
DEPC-treated H ₂ O	to 50 ml

BS blocking solution / PBT

Fetal Bovine serum	5 %
BSA	2 mg/mL
DMSO	1 %

Solution A (sheep anti-digoxigenin-AP Fab fragment, 1:500 X dilution)

Fetal Bovine serum	5 %
BSA	2 mg/mL
DMSO	1 %
0.75 U/ μ L Antibody	1.5 U/mL
Grouper powder	1% (w/v)

NTMT stain buffer

NaCl	100 mM
Tris-Cl (pH 9.5)	100 mM
MgCl ₂	50 mM
Tween-20	0.1%

Incubation buffer:

Pb(NO ₃) ₂	50 mg
Acetate buffer, 0.05M	50 mL
Sucrose	4 g
β -Glycerophosphate	3%

附表一、PCR 核酸引子序列

Primer name	sequence
EF1 α (f)	5'-GGT GAG TTT GAG GCT GGT ATC TCC AAG AAC-3'
EF1 α (r)	5'-GAA GCC AAC GTT GTC ACC AGG AGT GGC CTC-3'
Myostatin I F2	5'-GCA TGT GGT CCA GTG GGT TAT-3
Myostatin I R2	5'-GTT GTC TGA ACT CAC ATG TGG AAC A-3'
Myostatin II F2	5'-TCT CCT TTT TTA TCT GAG CTT TTG G-3'
Myostatin II R2	5'-TCT CCA GGT GTC ACA AAT GCT T-3'
MyoD(f)	5'-CAA GAG ATG CAC GTC CAC CA-3'
MyoD(r)	5'-TTC TGA GAA GAG CCT GCA GAG AC-3'
Myf5(f)	5'-AAC GCC TCC CCA AGG TAG A-3'
Myf5(r)	5'-CGG CAG GCT GTA GTA TTG CTC-3'
Myf4(f)	5'-AAG ACG GTG CCT AAT CCG AAC-3'
Myf4(r)	5'-AAG ACG GTG CCT AAT CCG AAC-3'
Myogenin(f)	5'-CAA TGG TGG CTT CGA GCA A-3'
Myogenin(r)	5'-TGT CTT CCA ACC CAA CTG TGG-3'
TnnT(f)	5'-TCA GAA GAA ACG TCA CAA TAA GGA TAC AC-3'
TnnT(r)	5'-CTC TCC TGC GCA GTG TAG TAA CCT CGT-3'
GH(f)	5'-TAA AAT CTT CCC TCT GTC GTT CTG -3'
GH(r)	5'-CAT CTA CAG GGT GCA GTT GGA ATC C-3'
Max(f)	5'-GCC GAA GAA TGA GCG AGA AC-3'
Max(r)	5'-TTA GCT ATC CTC CGG GCG AT-3'
CK(f)	5'-GAC CCC CAC TGG ATT CAC TG-3'
CK(r)	5'-TCC TTC ATG TTG CCA CCC TT-3'
Desmin(f)	5'-GAG CTC CAG CAC CTC AAT GAC -3'
Desmin(r)	5'-GCC TCG CTG ATA TTC TTG GC-3'
IGF1(f)	5'-GAC AGC TAT TTT GGT CAC CAC AGC TGT TCC-3'
IGF1(r)	5'-TGT ACA GTC GAG ACG GTA TGT GTG AAG TCT-3'
Myhc(f)	5'-GGA GCA GAC AGA GAG AGG ACG CAA AGT GG-3'
Myhc(r)	5'-CAA GAA GAA TGT CAA CAG GCT GCA GGA TC-3'
IGFBP3(f)	5'-TTG CGA CGA GCC TGT TGA TGA GC-3'
IGFBP3(r)	5'-ATC ATC TCC TGT TTG TTT GAA T-3'
IGFBP1(f)	5'-GCT GCT GCC TCG TCG CCT GTG CGT T-3'
IGFBP1(r)	5'-TGA CCA TCT AGA GAT GAT TCG CAC T-3'
IGF2a(f)	5'-ATG TTG ATA TCC AAC GTA ACG -3'
IGF2a(r)	5'-ATA TTT GGA GTA CTT CAC A-3'



Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish

Chiou-Yueh Lee^{a,b,c}, Shao-Yang Hu^c, Hong-Yi Gong^d, Mark Hung-Chih Chen^e, Jenn-Kan Lu^d, Jen-Leih Wu^{a,c,*}

^a Institute of Microbiology and Biochemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

^b Department of Food Science, Taipei College of Maritime Technology, Taipei, Taiwan, ROC

^c Laboratory of Marine Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, ROC

^d Department of Aquaculture, College of Life Sciences, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, ROC

^e Department of Biotechnology, Hungkuang University, Taichung, Taiwan, ROC

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2009

Available online 25 July 2009

Keywords:

Myostatin

Zebrafish

RNA interference

ABSTRACT

Myostatin belongs to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily and is a potent negative regulator of skeletal muscle development and growth. We utilized microinjection of an antisense RNA-expressing vector to establish a hereditarily stable myostatin gene knockdown zebrafish strain with a double-muscle phenotype. Real-time PCR and immunostaining revealed that the myostatin messenger (m)RNA and protein levels in homozygous transgenic zebrafish were 33% and 26% those of the non-transgenic controls, respectively. Also, the mRNA levels of myogenic regulatory factor markers such as MyoD, myogenin, Mrf4, and Myf5 were dramatically elevated in myostatin-suppressed transgenic fish compared to the non-transgenic controls. Although there was no significant difference in body length, homozygous transgenic zebrafish were 45% heavier than non-transgenic controls. Histochemical analysis showed that the cross-sectional area of the muscle fiber of homozygous transgenic fish was twice as large as that of non-transgenic controls. This is the first model zebrafish with a hereditarily stable myostatin-suppressed genotype and a double-muscle phenotype.

Crown Copyright © 2009 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The myostatin gene, a negative regulator of myogenesis, was discovered by McPherron and Lee in the Cattle breeds Belgian Blue and Piedmontese [1]. Myostatin, a myogenesis regulator, is generally expressed in skeletal muscles, and belongs to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, possessing all of the structural components common to the family. Mutations in the myostatin gene result in a “double-muscling” phenotype in many cattle breeds and mice [2,3]. Furthermore, a similar myostatin expression pattern was also observed in pigs [4] and chicken [5].

In adult mammals, myostatin is primarily expressed in skeletal muscle, which is thought to be the principal target tissue. However, subsequent studies revealed that myostatin is also expressed at a lower level in mammary glands [4], the heart, the spleen, and the brain, and it influences cardiac muscle growth processes as well as adipogenesis [6]. Due to the difficulties associated with conducting investigations within the uterus, the expression pat-

tern of myostatin in developing mammalian embryos mostly remains unclear. In mouse development, myostatin is only expressed in somites during early development, and in the late stage of embryonic development it is expressed throughout developing muscles [2].

In fish, myostatin not only inhibits skeletal muscle growth, but also plays important roles in maintenance of homeostatic tissue growth, osmolarity regulation, and reproductive tissue function [7]. In contrast to mammals, many studies were carried out to qualitatively and quantitatively investigate myostatin expression during the embryonic development of different fish species [8–12]. In zebrafish, two forms of myostatin genes (I and II) were found. Myostatin I messenger (m)RNA was shown to be a maternal transfer product; its zygotic expression reached the highest level at 48 h post-fertilization (hpf), whereas myostatin II was detected at the 8-somite stage (13 hpf) [10–12]. The tissue expression profile also revealed that the myostatin I gene is widely expressed in muscles, brain, eyes, kidneys, testes, ovaries, digestive tract, and heart; however, the myostatin II gene has a more limited expression profile, being confined mostly to the brain [6,9,10,12]. Only the myostatin I gene is dynamically regulated during development, while the myostatin II gene remains mostly constant during development [6,9].

* Corresponding author. Address: Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica, 128 Academia Road, Section 2, Nankang, Taipei 11529, Taiwan, ROC. Fax: +886 2 27858059.

E-mail address: jlwu@gate.sinica.edu.tw (J.-L. Wu).

Myostatin functions as a negative regulator of skeletal muscle growth. Skeletal muscles of mice produced by homologous gene targeting were obviously larger than those of wild-type (WT) mice, and the muscle mass increased to 2- to 3-fold over that of WT mice, due to increases in both cell number (hyperplastic growth) and cell size (hypertrophic growth) [2]. In mammals, RNA interference (RNAi) is usually used to obtain myostatin knockdown animals [13,14]. In fish, some studies of myostatin-null zebrafish were reported. Amali et al. microinjected antisense morpholinos into early developing embryos and found increases in the number and size of somites in this developmental period. They also noted upregulation of the transcription of the myogenesis-related genes MyoD and myogenin [10]. Xu et al. overexpressed a dominant negative myostatin prodomain in transgenic zebrafish, and the muscle cell number increased only slightly, and only in female fish [8]. Acosta et al. generated “giant zebrafish” by microinjecting tilapia myostatin double-stranded (ds)RNA into zebrafish eggs [15]. Although it is difficult to determine which form of the myostatin transcript or which myostatin paralog was affected in the above studies, these studies do indicate that the biological function of fish myostatin might not be limited to the negative regulation of skeletal muscle growth and development.

Since there is currently no gene knockout technique available in a fish species and there are no gene suppression model animals with a stable germline in fish, we used a vector-based RNAi approach to obtain a stable myostatin knockdown model fish to investigate myostatin's function in zebrafish. This is the first germline-stable myostatin-null zebrafish strain for investigating myostatin's expression and function.

Materials and methods

Fish maintenance. Zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a local aquarium supply store. Fish were cultured in a 20-L tank at 28 °C on a light/dark cycle of 14:10 h. For microinjection, fertilized eggs were collected at the one-cell stage after the onset of the light period.

Anti-myostatin-green fluorescent protein (GFP) plasmid construction. The myostatin II gene (equivalent to myostatin II AY687474) was screened from a 24-hpf zebrafish cDNA library (Stratagene). To facilitate tracing expression of the transgene, a DNA fragment containing 810 base pairs of the zebrafish myostatin II coding region was cloned into the EcoRI site of the pEGFP-C1 vector (Clontech) in an antisense orientation.

Microinjection of zebrafish embryos and production of transgenic zebrafish lines. Approximately 200 pl of the plasmid DNA (150 µg/ml) solution was injected into a one-cell stage embryo with a glass micropipette. Green fluorescence of transgenic embryos was observed and recorded with fluorescence microscopy (Leica, MZFL III). Germ line-integrated transgenic zebrafish were selected from these GFP-positive fish by raising them to sexual maturity and breeding them with non-transgenic fish.

Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from zebrafish hatching-out stage embryos with TRIZOL (Invitrogen). For all analyses, RNA samples were reverse-transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) using random primers. Real-time PCR was performed with the following conditions: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C using 2× SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystems) and 500 nM of forward and reverse primers. Each assay was run on an Applied Biosystems 7300 real-time PCR system in triplicate, and changes in expression were derived using the comparative C_T method. C_T values for both myostatin transcripts were normalized to those of EF 1α as the endogenous control. One-step RT-PCR

(Life technologies) was performed using total RNA (250 ng) extracted from the hatching-out stage embryos. EF 1α was used as an internal control and was amplified in the same PCR. The RT-PCR program was one cycle of 60 °C for 30 min and 2 min at 95 °C, followed by 25 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 1 min at 72 °C, with a final extension of one cycle of 7 min at 72 °C. All PCRs were carried out using an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler and RT-PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis.

Primer sequences. The primer sequences were as follows: EF 1α forward, 5'-GGT GAG TTT GAG GCT GGT ATC TCC AAG AAC-3' and reverse, 5'-GAA GCC AAC GTT GTC ACC AGG AGT GGC CTC-3'; myostatin I forward, 5'-GCA TGT GGT CCA GTG GGT TAT-3' and reverse, 5'-GTT GTC TGA ACT CAC ATG TGG AAC A-3'; myostatin II forward, 5'-TCT CCT TTT TTA TCT GAG CTT TTG G-3' and reverse, 5'-TCT CCA GGT GTC ACA AAT GCT T-3'; Myo D forward, 5'-CAA GAG ATG CAC GTC CAC CA-3' and reverse, 5'-TTC TGA GAA GAG CCT GCA GAG AC-3'; Myf 5 forward, 5'-AAC GCC TCC CCA AGG TAG A-3' and reverse, 5'-CGG CAG GCT GTA GTA TTG CTC-3'; Mrf 4 forward, 5'-AAG ACG GTG CCT AAT CCG AAC-3' and reverse, 5'-TCC AGC GAA TGC AAG AGG TC-3'; and myogenin forward, 5'-CAA TGG TGG CTT CGA GCA A-3' and reverse, 5'-TGT CTT CCA ACC CAA CTG TGG-3'.

Western blotting. Fifty micrograms of protein from each muscle sample was loaded and separated in a 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham). The membrane was blocked in TBST containing 5% skim milk. The membrane was incubated with a rabbit polyclonal antibody against human myostatin (Chemicon) at a 1:3000 dilution. After washing in TBST, the resulting membrane was incubated with polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG)-conjugated alkaline phosphatase (Sigma) diluted at 1:2000 with TBST. After washing with TBST, the specific protein bands were detected using 2% BCIP and NBT (Boston).

Growth evaluation and muscle histological analysis. To determine the body weight and body length, 6th generation (F6) transgenic fish were analyzed from 1 to 4 months. For the muscle histological analysis, six individual fish from each group were fixed in formalin for 1 h followed by routine paraffin sectioning and hematoxylin/eosin (H and E) staining. The cross-section at the base of the cloaca was selected to quantify the number of muscle fibers. The muscle fiber area was obtained from digitally imaged serial cross-sections of paraffin-embedded muscle. Individual muscle fibers were outlined, and the cross-sectional area was determined with a computer-assisted analysis system (MetaMorph™; Universal Imaging Corporation).

Results

Establishment of myostatin-suppressed transgenic zebrafish

In order to establish a heritable myostatin knockdown in zebrafish, we microinjected a myostatin antisense RNA expression vector into fertilized eggs, to create a transgenic line. An antisense myostatin II gene was fused to the carboxyl end of GFP and driven by the human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter; this facilitated the selection of transgenic zebrafish and the detection of antisense RNA transcription. The green fluorescence was observed everywhere in the transgenic zebrafish from the morula through the hatching-out stage; at 72 hpf, however, the green fluorescence was observed only in the liver (Fig. 1A). In total, four transgenic founders with heritable traits were obtained after screening embryos from 1600 microinjected fertilized eggs. The stable hereditary line has now been bred for more than ten generations.

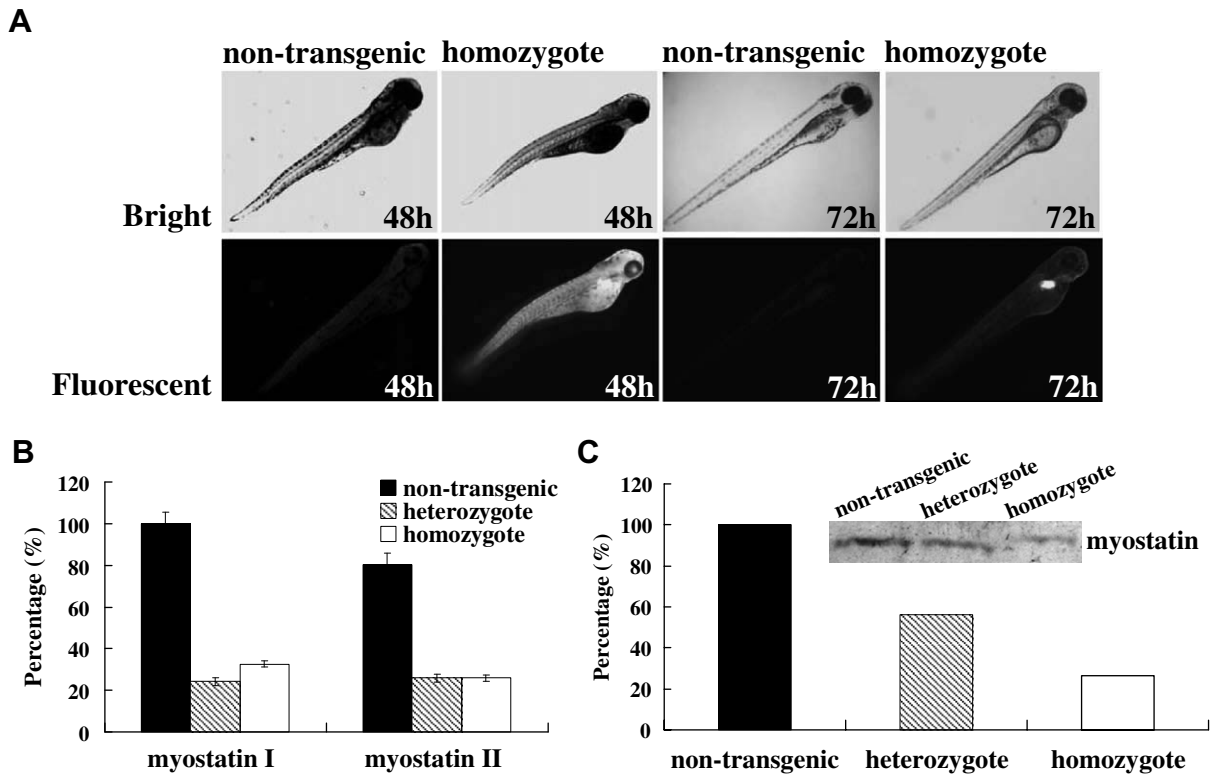


Fig. 1. Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) and myostatin in myostatin-suppressed transgenic and non-transgenic zebrafish. (A) EGFP expression in transgenic and non-transgenic zebrafish. (B) Quantitative analysis of zebrafish myostatin I and II mRNA by real-time polymerase chain reaction. Error bars indicate the standard error of the mean from three experiments. (C) Quantitative analysis of zebrafish myostatin protein by a Western blot assay.

Low survival rate and deformity of embryos in myostatin-suppressed transgenic zebrafish

Normal development of non-transgenic, heterozygous, and homozygous transgenic zebrafish at 60 hpf were 90.2%, 82.2%, and 50.9%, respectively. Homozygous myostatin-suppressed transgenic zebrafish embryos were observed to have high mortality and varying degrees of malformation that ranged from a very small bend in the body axis to more than 90° bending or an S-shaped body axis and serious deformity. Heterozygous embryos were observed to have less mortality and intermediate degrees of body axis bending (Table 1). The serious body axis bending later caused the death of embryos.

Downregulation of myostatin genes in myostatin-suppressed transgenic zebrafish

At 60 hpf, real-time RT-PCR analysis showed that the level of myostatin I mRNA in heterozygous F6 myostatin-suppressed transgenic fish was 24% that of the non-transgenic controls, and in the homozygotes it was 33%. The level of myostatin II mRNA was

26% that of the non-transgenic controls (Fig. 1B). To assess myostatin protein levels in the transgenic fish, we used human myostatin antibody, and this detected bands that migrated at 27 kDa in SDS-polyacrylamide gels (Fig. 1C inset). We used the 1394 camera Java package for ImageJ to analyze the density of the protein bands. This analysis revealed that the myostatin protein bands from heterozygotes were 56% as dense as those of the non-transgenic controls, and the homozygotes' bands were 26% as dense (Fig. 1C). Thus both the myostatin I and II genes were downregulated in the myostatin-suppressed fish, and this gene downregulation resulted in significantly lower myostatin protein levels.

Expression of myogenesis-related genes in transgenic fish

RT-PCR analysis of the transcription of myogenesis-related genes in 60-hpf zebrafish embryos showed that the MyoD mRNA levels in heterozygous and homozygous embryos were 4.1- and 5.1-fold higher than those of the non-transgenic control, respectively. Additionally, myogenin expression levels were 2.1- and 1.7-fold, Mrf4 levels were 54.0- and 3.5-fold, and Myf5 levels were 2.0- and 2.7-fold (Fig. 2) higher in heterozygous and homozygous embryos, respectively, than in those of the non-transgenic control. These results revealed that suppression of the myostatin genes increased the transcription of myogenic regulatory factor marker genes.

Growth effects of myostatin-suppressed transgenic fish

The average weights of 4-month-old non-transgenic control, heterozygous and homozygous fish were 0.38 ± 0.05 , 0.42 ± 0.09 , and 0.55 ± 0.11 g, respectively (Fig. 3A). A *t*-test analysis showed no significant difference between the heterozygous group and the non-transgenic controls, but a significant difference ($p < 0.01$)

Table 1
Survival rate and deformity of myostatin-suppressed transgenic zebrafish at the hatching-out stage.

	Phenotype (%)					Dead
	–	+	++	+++	++++	
Non-transgenic	90.2	0	0	0	0	9.7
Heterozygous	82.2	6.5	0	0	0	10.3
Homozygous	50.9	12.0	20.0	10.8	0.4	34.8

–, normal; +, slight bend in body axis; ++, body axis > 90°; +++, S-shaped body axis; +++++, serious deformity. Sample size $n = 1024$ from F6.

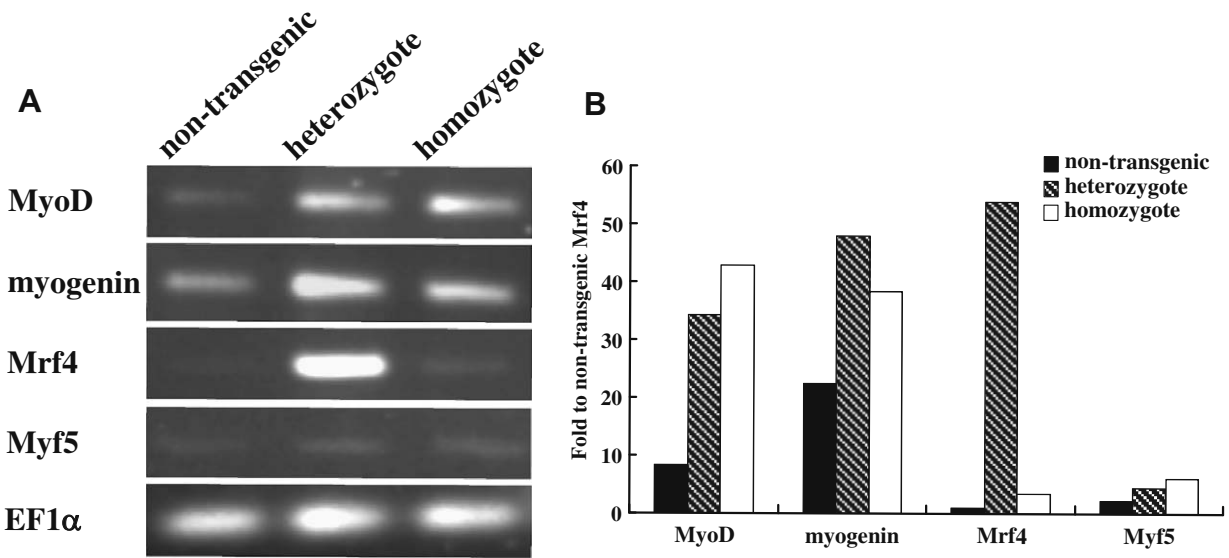


Fig. 2. Myogenesis-related gene expression analysis at 60 h post-fertilization (hpf). (A) Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. EF 1 α amplified from the same samples was used as the internal control. (B) Quantitative analysis of RT-PCR products.

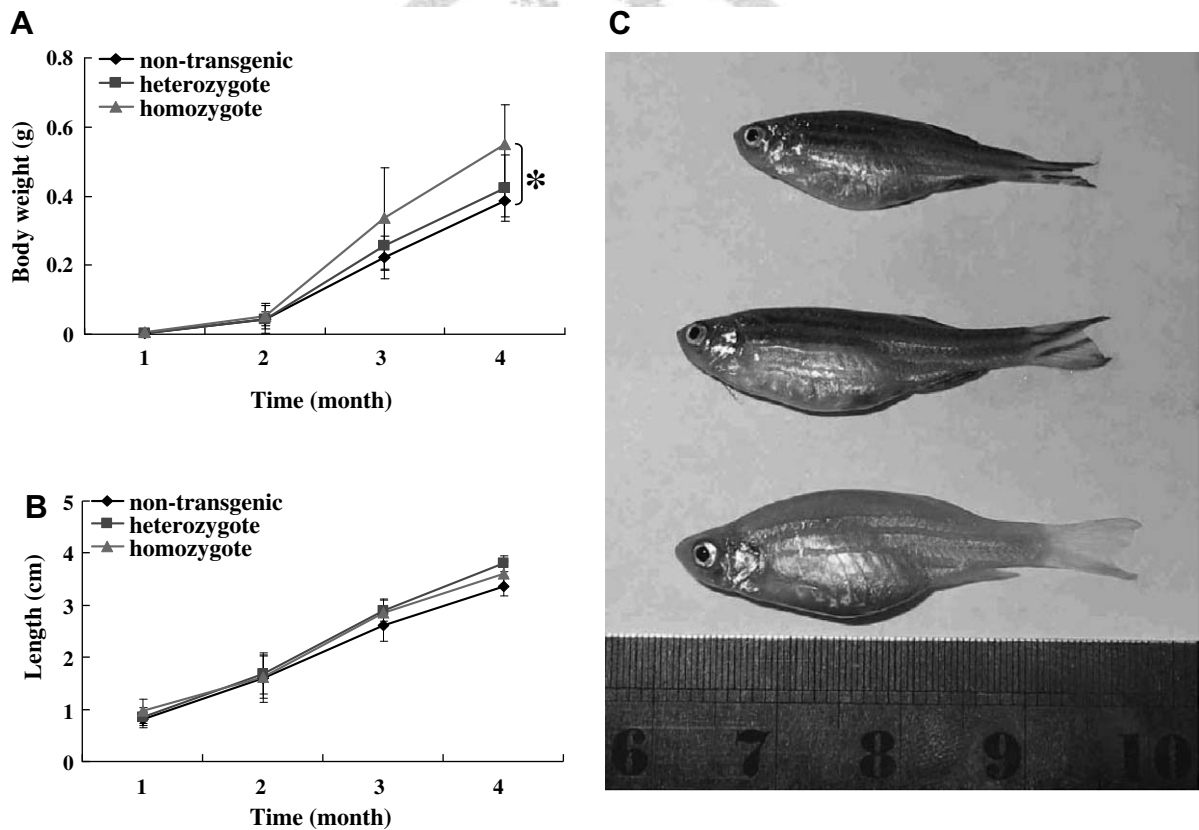


Fig. 3. Growth rate of transgenic and non-transgenic zebrafish. (A) The growth rate of body weight. (B) The growth rate of body length. (C) The phenotype of homozygous transgenic (lower), heterozygous transgenic (middle), and non-transgenic (upper) zebrafish. Error bars indicate the standard error of the mean from three experiments. An asterisk indicates the *p* value (<0.01) for homozygous versus heterozygous and non-transgenic fish.

between the homozygous group and the non-transgenic controls was observed. However, the body lengths of 1-, 2-, 3-, and 4-month-old zebrafish were not significantly different among the three groups (Fig. 3B). The phenotype of myostatin-suppressed adult fish is shown in Fig. 3C. Homozygous fish had wider bodies with wider and thicker dorsal muscles than the non-transgenic control and heterozygous fish.

Double-muscle effect of myostatin-suppressed transgenic fish

A histochemical analysis of muscle bundle cross-sections of 1-month-old fish was performed by H and E staining as shown in Fig. 4A. The resulting distribution was subjected to one-way ANOVA two-tailed statistical analysis (Fig. 4B). The average cross-sectional area of the muscle bundles in non-transgenic,

heterozygous, and homozygous transgenic zebrafish was 230.69 ± 139.04 , 278.59 ± 107.20 , and $428.97 \pm 207.20 \mu\text{m}^2$, respectively. There was a significant difference between the non-transgenic and homozygous transgenic zebrafish ($p < 0.01$); the percentage of transgenic zebrafish with fibers $< 325 \mu\text{m}^2$ was 78.3% of the non-transgenic controls, 71.3% of the heterozygotes, and 38.3% of the homozygotes. These results clearly show that the fiber size distribution of the homozygous group shifted to the right, and the average muscle fiber cross-sectional area of homozygous transgenic was $198 \mu\text{m}^2$ larger than that of the non-transgenic controls. All these data suggest that myostatin suppression caused hypertrophy in zebrafish.

Discussion

We used an antisense RNA expression vector to generate myostatin-suppressed transgenic zebrafish. The hatching rate of micro-injected eggs was 62%, but the death rate was quite high 2–3 days after hatching-out. The high mortality phenomenon was also found in our myostatin II morpholino RNA microinjection experiment, in which the majority of microinjected eggs showed embryo hyperplasia at 12 hpf. At this point, the embryos began to atrophy until the entire embryo became a vacuole and only the chorion was left (data not shown). Germ line transmission myostatin-suppressed zebrafish showed obvious green fluorescence through the early developmental stages. Due to this fluorescence, transgenic offspring were easy to distinguish without further complex analysis. We then set up one-to-one mating to select homozygous transgenic fish, and we found that some of the F2 generation had a light-

er body color than the wild-type group. We do not know whether the lighter body color was caused by the myostatin knockdown or not. Thus, to simplify the observation of embryo development, we chose those transgenic zebrafish with a light body color as our brood stock.

The GFP fusion construct allows the antisense myostatin RNA to simultaneously express green fluorescence. GFP expression in the progeny was distributed throughout the entire embryo at the early stage but remained only in the liver at 72 hpf. This liver-specific expression pattern was not specific to the CMV promoter; instead, its expression is more like that of a housekeeping promoter, driving gene expression everywhere. The signal for a change in the expression specificity may have come from insertion of the antisense myostatin DNA fragment. A BLAST search revealed that the zebrafish myostatin II gene contains the sequence TGATTTTGT, which is a potential liver-enriched transcriptional element. However, whether this element plays a role as a tissue-specific enhancer or not requires further investigation. Xu et al. used a rat myosin light chain gene promoter and enhancer to overexpress the myostatin prodomain, which acts as a dominant negative inhibitor of myostatin's function. Although the results showed tissue specificity, no significant change in myogenic gene expression was exhibited, and zebrafish with the double-muscle phenotype were not produced [8]. It has been shown that myostatin is differentially expressed in different tissues and at different stages in fish [10,11]. Thus, the strong housekeeping expression of the CMV promoter should be more suitable for producing the double-muscle phenotype in zebrafish, and it was used to study the regulation and expression of myostatin in fish.

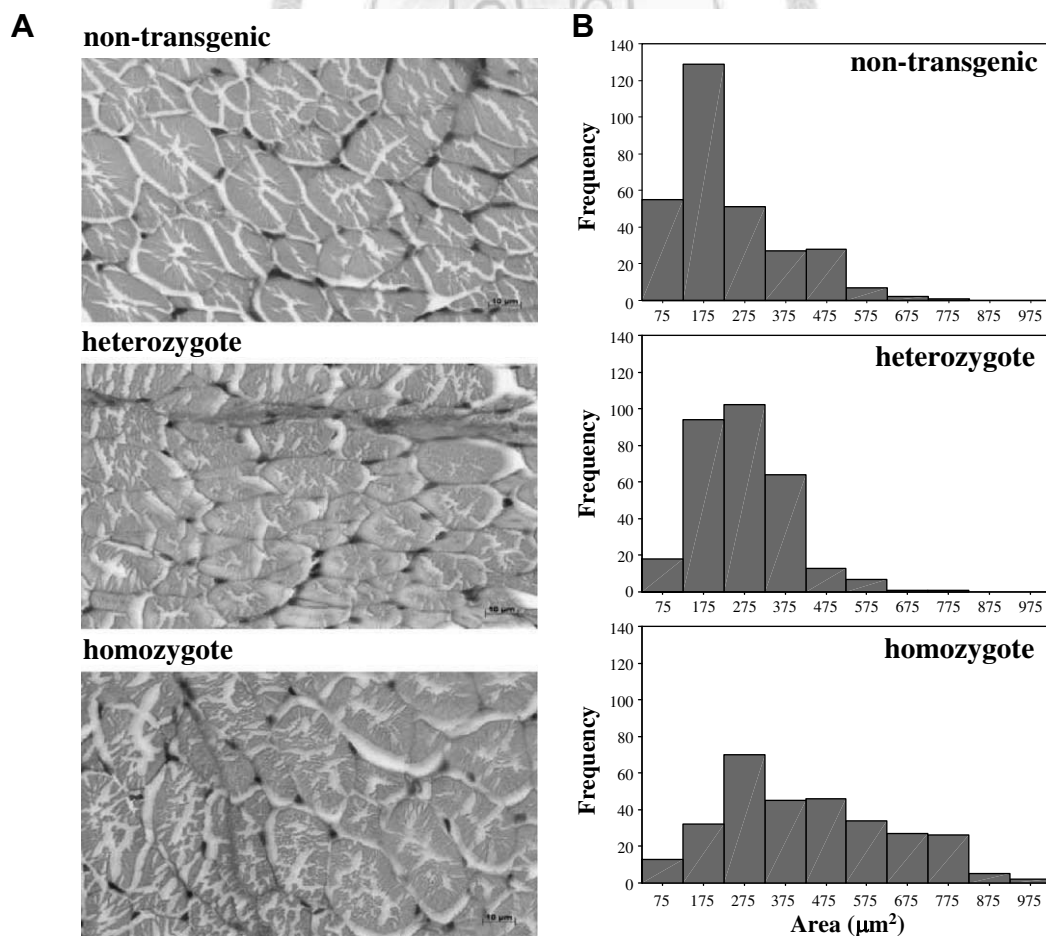


Fig. 4. Muscle fiber area analysis of transgenic and non-transgenic zebrafish. (A) Cross-section of dorsal muscle from 1-month-old fry. Sections were stained with hematoxylin and eosin. (B) Distribution analysis of the fiber area.

Real-time RT-PCR was used to analyze the expression of both the myostatin I and II genes in myostatin-suppressed transgenic zebrafish at 60 hpf. To our surprise, the efficiency of the suppression of myostatin I was almost the same as that of myostatin II. Perhaps the high identity and similarity of the coding regions of the zebrafish myostatin I and II genes and the low-precision requirement of the RNAi machinery enabled it to suppress myostatin I. RNAi caused the mRNA levels of myostatin I and II to drop to 1/3–1/4 the amount of the non-transgenic controls. Myostatin gene expression is regulated at the transcriptional level, and it has been shown that myostatin auto-regulates its own expression through a negative feedback loop through Smad7 [16]. An exogenous factor causing a reduction in endogenous myostatin mRNA may bring about a more complex regulatory response. Although expression of antisense myostatin RNA driven by the CMV promoter efficiently decreased endogenous myostatin mRNA in the early developmental stages, myostatin transcription inhibition gradually decreased after the later stages of development. In the meantime, the mRNA levels of the myogenic regulatory factor genes MyoD, myogenin, Mrf4 and Myf5 increased relative to those of the non-transgenic controls. The upregulation of MyoD and Mrf4 mRNA was more distinct than that of myogenin and Myf5. Our data agree with previous findings that knockdown of myostatin I in zebrafish causes an upregulation of the myogenic regulatory factors (MRFs) MyoD and myogenin [10].

Both hyperplasia and hypertrophy of skeletal muscle growth were found in mice with complete inhibition of myostatin gene function by transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin [17]. However, incomplete blocking of the function of the endogenous myostatin proteins led to hyperplasia or hypertrophy. Missense mutant myostatin caused hyperplasia but not hypertrophy in mouse muscle, whereas dominant negative myostatin produced hypertrophy without hyperplasia in muscle [15]. Hemizygous transgenic fish did not grow significantly larger than their non-transgenic siblings, and only the number of myofibers in the skeletal muscles increased. No significant difference in fiber size was found in transgenic zebrafish homozygous for myostatin prodomain overexpression (which acts as a dominant negative inhibitor) [8]. The muscle hyperplasia or hypertrophy effect found in myostatin dsRNA-microinjected zebrafish depended on the dose of dsRNA injected [15]. In our vector-based RNA interference transgenic zebrafish model, heterozygous transgenic fish showed no significant difference in growth compared to the controls; however, the muscle fiber cross-sectional area of homozygous transgenic fish was almost twice that of the non-transgenic controls, and they had wider bodies with bigger and thicker dorsal muscles. Nevertheless, there was no significant change in muscle fiber numbers between transgenic and non-transgenic fish (data not shown). This hypertrophic but not hyperplastic phenomenon may have been due to the incomplete inhibition of myostatin gene expression by myostatin RNAi. In addition, our hereditarily stable RNAi transgenic

fish showed that the effects on muscle mass were persistent throughout the life of the animals, and the effects were observed in both males and females. The establishment of a hereditarily stable myostatin-suppressed zebrafish offers a good model for investigating the functional role of myostatin in zebrafish and may serve as an animal model for drug screening due to the advantages of high-throughput zebrafish assays.

References

- [1] A.C. McPherron, S.J. Lee, Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12457–12461.
- [2] A.C. McPherron, A.M. Lawler, S.J. Lee, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member, *Nature* 387 (1997) 83–90.
- [3] R. Kambadur, M. Sharma, T.P. Smith, J.J. Bass, Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle, *Genome Res.* 7 (1997) 910–916.
- [4] S. Ji, R.L. Losinski, S.G. Cornelius, G.R. Frank, G.M. Willis, D.E. Gerrard, F.F. Depreux, M.E. Spurlock, Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) R1265–R1273.
- [5] H. Kocamis, D.C. Kirkpatrick-Keller, J. Richter, J. Killefer, The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development, *Growth Dev. Aging* 63 (1999) 143–150.
- [6] B.D. Rodgers, D.K. Garikipati, Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 513–534.
- [7] B.D. Rodgers, G.M. Weber, Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129 (2001) 597–603.
- [8] C. Xu, G. Wu, Y. Zohar, S.J. Du, Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish, *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 4067–4079.
- [9] L. Maccatrozzo, L. Bargelloni, B. Cardazzo, G. Rizzo, T. Patarnello, A novel second myostatin gene is present in teleost fish, *FEBS Lett.* 509 (2001) 36–40.
- [10] A.A. Amali, C.J. Lin, Y.H. Chen, W.L. Wang, H.Y. Gong, C.Y. Lee, Y.L. Ko, J.K. Lu, G.M. Her, T.T. Chen, J.L. Wu, Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1, *Dev. Dyn.* 229 (2004) 847–856.
- [11] P.R. Biga, S.B. Roberts, D.B. Iliev, L.A. McCauley, J.S. Moon, P. Colliodi, F.W. Goetz, The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 141 (2005) 218–230.
- [12] T. Kerr, E.H. Roalson, B.D. Rodgers, Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish, *Evol. Dev.* 7 (2005) 390–400.
- [13] C.M. Liu, Z. Yang, C.W. Liu, R. Wang, P. Tien, R. Dale, L.Q. Sun, Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice, *Gene Ther.* 15 (2008) 155–160.
- [14] A. Clop, F. Marcq, H. Takeda, D. Pirotton, X. Tordoir, B. Bibe, J. Bouix, F. Caiment, J.-M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J. Tobin, C. Charlier, M. Georges, A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep, *Nat. Genet.* 38 (7) (2006) 813–818.
- [15] J. Acosta, Y. Carpio, I. Borroto, O. Gonzalez, M.P. Estrada, Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 324–331.
- [16] D. Forbes, M. Jackman, A. Bishop, M. Thomas, R. Kambadur, M. Sharma, Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism, *J. Cell. Physiol.* 206 (2006) 264–272.
- [17] M. Nakatani, Y. Takehara, H. Sugino, M. Matsumoto, O. Hashimoto, Y. Hasegawa, T. Murakami, A. Uezumi, S. Takeda, S. Noji, Y. Sunada, K. Tsuchida, Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in *mdx* mice, *FASEB J.* 22 (2008) 477–487.