

Myf5 基因在马身猪和大白猪背最长肌中的发育性表达研究

黎 威¹, 高鹏飞¹, 石建中², 张燕青¹, 徐 凯¹, 刘 宏², 郭晓红¹, 李步高¹, 曹果清^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 大同市种猪场, 大同 037000)

摘 要: 本研究旨在分析猪背最长肌中 *Myf5* 基因的发育性表达规律。采用实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 技术检测了马身猪和大白猪从初生~180 日龄 7 个阶段(初生、30、60、90、120、150 和 180 d)背最长肌中 *Myf5* 基因 mRNA 和蛋白质发育性表达规律。结果表明, 马身猪和大白猪背最长肌中 *Myf5* 基因 mRNA 相对表达量均表现出初生时最高, 30 日龄次之, 60 日龄时突然降低, 此后基本维持稳定状态的规律。马身猪背最长肌中 *Myf5* 蛋白的相对表达量初生时最高, 30 日龄时最低, 60~180 日龄阶段, 表达量呈现波动变化的不稳定趋势; 在大白猪中, *Myf5* 蛋白 60 日龄前的相对表达量极显著高于 60 日龄后的表达量 ($P < 0.05$), 60 日龄前各阶段间的表达量及 60 日龄后各阶段间的表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。在同一日龄阶段, 马身猪 *Myf5* 蛋白的表达量均显著或极显著地高于大白猪(60 日龄阶段除外)。 *Myf5* 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达与猪的遗传背景和发育阶段有关。

关键词: 猪; *Myf5*; 背最长肌; 发育性表达

中图分类号: S828.2; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)12-2081-07

Study on the Developmental Expression of *Myf5* Gene in *Longissimus Dorsi* Tissue of Mashen and Large White Pigs

LI Wei¹, GAO Peng-fei¹, SHI Jian-zhong², ZHANG Yan-qing¹, XU Kai¹, LIU Hong²,
GUO Xiao-hong¹, LI Bu-gao¹, CAO Guo-qing^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. Datong Pig Breeding Farm, Datong 037000, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the expression patterns of *Myf5* gene at the levels of mRNA and protein. The expression patterns of *Myf5* gene at the levels of mRNA and protein in *longissimus dorsi* at 7 developmental stages (1-, 30-, 60-, 90-, 120-, 150-, and 180-day-old) of Mashen and Large White pigs were studied by quantitative real-time PCR and Western-blot. The results showed that the highest mRNA relative expression of *Myf5* gene in *longissimus dorsi* was at 1-day-old, then at 30-day old both in Mashen and Large White pigs. The mRNA relative expression of *Myf5* gene decreased sharply at 60-day-old, then keep stable lower levels afterwards. The expression of *Myf5* protein in *longissimus dorsi* of Mashen pig at 1-day-old was the highest and the lowest at 30-day-old. During the stages from 60- to 180-day-old, the relative expression of *Myf5* protein in Mashen pig was in waves with trend of increase and decrease. In Large White pig, the relative expressions of *Myf5* protein at the stages before 60-day-old were significant

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 山西省科技攻关项目(20140311020-5; 20080311031); 山西省留学人员科技活动择优资助项目(614193); 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划; 山西农业大学“中青年学术带头人及学术骨干”支持计划

作者简介: 黎 威(1988-), 男, 湖北石首人, 硕士生, 主要从事分子遗传学与动物育种研究, E-mail: qq798983696@126.com; 高鹏飞(1980-), 男, 山西太谷人, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: gpf800411@126.com。黎 威和高鹏飞同为第一作者

* 通信作者: 曹果清, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: anniecao710502@aliyun.com

greater than those at the stages after 60-day-old, whereas the expressions at detected stages before 60-day-old or after 60-day-old were not significant different. At the same stages, the relative expression of *Myf5* protein in Mashen pig was always greater than that in Large White pig at all detected stages apart from that at 60-day-old. The expression patterns of *Myf5* at the levels of mRNA and protein were associated with the genetic background and the developmental stages of individuals.

Key words: pig; *Myf5* gene; *longissimus dorsi*; developmental expression

生肌调节因子 (Myogenic regulatory factors, MRFs) 家族控制着肌细胞的增殖和分化, 与肌纤维的数量和大小有密切的关系, 对肉质和风味有重要影响。该家族包括 *Myf5*、*MyoD*、*myogenin* (*MyoG*) 和 *Myf6* 等 4 种肌肉特异性转录因子, 其共同特点是含有碱性螺旋-环-螺旋 (Basic helix-loop-helix, bHLH) 结构, 当形成同源或异源二聚体时, 这些转录因子的碱性区可以与肌肉特异性基因的上游调控序列 E-box 结合, 激活基因表达, 激发生肌作用。在生肌过程中, *Myf5* 和 *MyoD* 决定成肌细胞的特化和成肌的起始, *MyoG* 和 *Myf6* 参与骨骼肌细胞的终末分化过程, 在晚期形成的肌管中表达^[1]。在动物出生后的个体发育过程中, 该基因家族主要是对肌卫星细胞的增殖分化起调节作用, 通过肌卫星细胞增殖分化, 与肌纤维融合来促进肌纤维的生长增粗^[2]。

在 MRFs 家族中, *Myf5* 是胚胎期最早被表达的基因, 其产物对成肌细胞命运的决定和维持起重要作用^[3]。在小鼠中, *Myf5* 基因在受精后第 8 天生皮肌节背内侧唇表达, 第 9.5 天在腹侧唇、肌节、鳃弓表达, 第 10 天开始在发育中的四肢和通过舌下神经髓迁移的成肌细胞中表达, 此后一直在骨骼肌前体细胞中表达, 直到在妊娠后期表达下调。在成年个体中, *Myf5* 基因只在卫星细胞和肌梭中表达^[4]。*Myf5* 缺失的小鼠, 肌生成起始失败, 直到 E10.5 天 *MyoD* 表达后, 肌生成程序被挽救; 当 *Myf5* 和 *MyoD* 都缺失时, 成肌细胞和分化的骨骼肌细胞都不出现^[5]。*Myf5* 激活生肌分化程序依赖于 *MyoG*、*MyoD* 和 *Myf6* 的存在。*myogenin*^{-/-}/*MyoD*^{-/-}/*Myf6*^{-/-} 小鼠, 在胚胎期 E15.5~16.5 阶段, 肋骨缺陷严重, 长度比正常小鼠短 30%, 表明 *Myf5* 基因在生肌节早期表达, 成肌细胞特化正常。但在新生儿阶段, 几乎检测不到 *Myf5* 的表达, 成肌细胞不分化, 检测不到 MHC, 脊柱弯曲, 肌纤维几乎全部缺失, 仅有的肌纤维也非常细, 且不发育, 出生后几分钟内死亡, 说明 *Myf5* 基因表达量的维持需要其他肌肉分化因子的作用^[6]。在成年个体

中, *Myf5* 在急性和慢性肌再生和维持肌肉稳态中起重要作用。成年 *Myf5* 缺失小鼠经冷伤害处理后, 出现轻微的持续性肌病, 表现出不稳定的肌再生, 出现肌纤维过度增长、分化延迟、脂肪细胞积累、纤维化等症状, 卫星细胞的增殖受中度伤害^[7]。对成年动物而言, 卫星细胞是肌肉损伤修复或再生的中介^[8], 成年卫星细胞大部分来源于胎儿期 (E15) 生肌过程中表达 *Myf5* 基因的祖细胞^[9]。

有关猪 *Myf5* 基因的研究较少。曹婷等^[10] 研究了五指山猪 30、210、360 日龄背部肌肉 *Myf5* 基因 mRNA 表达量, 发现 mRNA 的表达水平随着五指山猪年龄的生长而增加。丁国杰等^[11] 在猪 *Myf5* 基因第 1 外显子检测到 G→C 突变, 与瘦肉率有相关性。S. Maak 等^[12] 在猪 *Myf5* 基因 5' 调控区检测到 14 个 SNPs, 分别是 E1 区的 A242C 和 G536T, E2 区的 G69T 和 A211G, E3 区的 C197T、C430T 和 A485G, E4 区域的 C158T、C374T、C411G、A460C、C467G 和 C494T, 启动子区域的 C72T。X. Q. Wang 等^[13] 研究表明体外培养的蓝塘猪肌卫星细胞中 *Myf5* 表达量是长白猪的 2.4 倍。

马身猪是山西省地方猪种, 具有繁殖力高、抗逆性强、肉质品质好等优点, 但与国外猪种和培育品种相比, 生长速度慢, 饲料报酬低。大白猪为引入猪种, 具有增重快、饲料转化率高, 胴体瘦肉率高等特点。生肌因子 *Myf5* 对骨骼肌的产生和发育以及维持是必须的, 是生长和肉质相关性状的候选基因。本研究以马身猪和大白猪为研究对象, 利用荧光定量 PCR 技术和 Western-blot 技术检测马身猪和大白猪从初生~180 日龄不同发育阶段背最长肌 *Myf5* 基因在 mRNA 和蛋白质水平上的表达规律, 为阐明 *Myf5* 基因在骨骼肌发育、肌肉生长和肉质方面的作用机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验猪群及材料

试验动物由山西省大同市种猪场提供。选择马

身猪和大白猪作为试验动物,2 个猪种同一时间开始组建群体,在相同的饲养管理条件下饲养,满足正常生长营养需求。选取初生、30、60、90、120、150 和 180 d 的马身猪和大白猪各 4 头(公母各半,公猪断奶时去势),于目标日龄当天屠宰,取背最长肌组织,铝箔包裹后放于 1.5 mL 离心管中,置于液氮中速冻,之后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol[®] Reagent (Invitrogen, 美国), Prime-script[®] RT Master Mix (TaKaRa, 日本), SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (TaKaRa, 日本), 兔抗人 MYF5 多克隆抗体 (Santa Cruz, 美国), 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (博士德, 武汉), HRP-山羊抗兔 IgG (博士德, 武汉) 和 HRP-山羊抗鼠 IgG (博士德, 武汉)。Stratagene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (Stratagene, 美国), BCM-1000 型超净工作台 (安泰, 苏州), ND-1000 核酸蛋白测定仪 (Nanodrop, 美国); Mini-PROTEAN[®] Tetra system (BIO-RAD, 美国), Mini Trans-Blot[®] Cell Module (BIO-RAD, 美国), Universal Hood II 核酸蛋白成像仪

(BIO-RAD, 美国)。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 的提取 按照 Trizol[®] Reagent 试剂盒说明书提取猪背最长肌总 RNA, DEPC 处理水溶解, 电泳检测 RNA 的完整性, ND-1000 核酸蛋白测定仪测定总 RNA 的浓度和纯度, 调整浓度至 $500\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 左右, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 cDNA 合成 按照 Prime-Script[®] RT reagent kit 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 操作说明进行反转录。各样本取 1 000 ng 总 RNA, 以 Oligo (dT) 为反转录引物, 合成 cDNA 第一链。反转录体系: Total RNA 1 000 ng, $5\times$ Prime[®] RT Master Mix $6\ \mu\text{L}$, 加去 RNA 酶双蒸水至 $30\ \mu\text{L}$ 。反转录条件: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s; 反转录产物 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 引物设计与合成 根据猪 *Myf5* 基因 mRNA 序列 (KC456667. 1), 应用 Primer 3. 0 plus 软件 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) 在线设计引物。以 18S *rRNA* 为内参基因。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列、退火温度及 PCR 产物长度

Table1 Primer sequences, annealing temperature and PCR product size

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	PCR 产物长度/bp Length
<i>Myf5</i>	Forward: GGTCCAGAAAGAGCAGCAGT	60	150
	Reverse: GGAGAGGCAGTCCAGGTTG		
18S <i>rRNA</i>	Forward: CCCACGGAATCGAGAAAGAG	60	117
	Reverse: TTGACGGAAGGGCACCA		

1.3.4 实时荧光定量 PCR 取反转录合成的 cDNA 原液, 按照 2 倍梯度稀释 8 个浓度梯度制作 *Myf5* 和 18S *rRNA* 基因荧光定量 PCR 标准曲线、扩增曲线和熔解曲线, 之后对不同样本进行 qRT-PCR 检测。反应体系及程序参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, 日本) 试剂盒说明书设置。反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq II $10\ \mu\text{L}$, PCR Forward Primer ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.8\ \mu\text{L}$, PCR Reverse Primer ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.8\ \mu\text{L}$, ROX $0.4\ \mu\text{L}$, cDNA $2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $6\ \mu\text{L}$ 。扩增程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 20 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 20 s, 45 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s。每个样本每个基因重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基

因 mRNA 的相对表达量。

1.3.5 Western-blot 采用配制的 RIPA 蛋白裂解液(强)提取背最长肌总蛋白, 样品重(g)与裂解液量(mL)的比例为 1:10, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白质样品 $10\ \mu\text{L}$ (蛋白量为 $100\ \mu\text{g}$) 与 $2\ \mu\text{L}$ $5\times$ SDS 还原型蛋白上样缓冲液混合, 在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下变性 5 min, 然后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳条件为 80 V 30 min 跑浓缩胶, 120 V 2 h 跑分离胶。利用湿转法将胶上蛋白转移至 NC 膜上(恒压 100 V 1 h)。将 NC 膜置于 5% 脱脂奶粉封闭液中室温孵育 1 h, 分别在一抗 *Myf5* 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:3 000) 中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 用辣根过氧化物酶标记的二抗山

羊抗兔(Myf5, 1 : 3 000)和山羊抗鼠(GAPDH, 1 : 3 000)室温孵育 90 min, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。最后进行 ECL 显色, 拍照后用 BIO-RAD 凝胶成像仪自带的 Image lab™ software version 4.0 分析软件对目的条带进行灰度值分析。

1.3.6 数据统计与分析 采用 SAS v9.0 软件的 GLM 过程进行最小二乘分析, 模型中包括品种、性别、日龄等固定效应及相互之间的互作效应。初步分析后, 性别及性别与品种、性别与日龄的互作效应对 Myf5 基因 mRNA 或蛋白质相对表达量没有显著影响, 所以将这些效应剔除, 最终配合的模型:

$$y_{ijk} = \mu + B_i + D_j + BD_{ij} + e_{ijk}$$

其中, μ 为总体均值; y_{ijk} 为 Myf5 基因 mRNA 或蛋白质相对表达量; B_i 为品种效应 ($i=1, 2$); D_j 为日龄效应 ($j=1 \sim 7$); BD_{ij} 为品种与日龄的互作效应; e_{ijk} 为随机残差。

2 结果

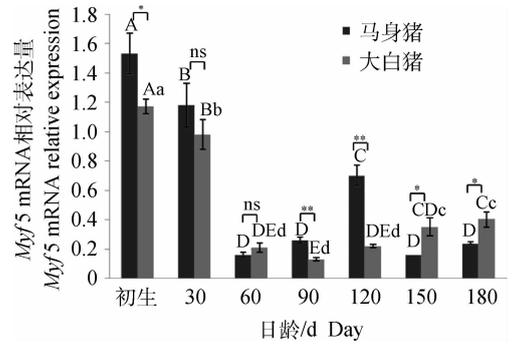
2.1 总 RNA 提取和 qRT-PCR

用 Nanodrop-1000 核酸蛋白测定仪测定总 RNA 的纯度和浓度, $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 比值为 1.9 ~ 2.0, 浓度在 $1\ 000 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 左右。用 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 发现 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 条带清晰(图略), 28S rRNA 和 18S rRNA 比值接近 2 : 1, 表明所提取的总 RNA 质量较好, 可用于后续试验。

根据试验的最优反应体系和反应条件建立了内参基因 18S rRNA 和目的基因 Myf5 的标准曲线, 回归系数(R^2) 分别为 0.992 和 0.999, 斜率分别为 -3.246 和 -3.24, 目的基因与内参基因差值均 < 0.1, 说明 Ct 值和模板起始浓度对数值之间具有良好的线性关系, 内参基因和目标基因有很高的扩增效率。扩增动力学曲线符合标准的“S”形曲线, 拐点清楚, 基线平稳, 目的基因和内参基因的熔解曲线均呈单峰, 无非特异性扩增及引物二聚体。

2.2 马身猪和大白猪不同日龄背最长肌 Myf5 基因 mRNA 的相对表达量

统计结果表明, 品种、日龄及品种与日龄的互作效应对 Myf5 基因 mRNA 相对表达量有极显著影响 ($P < 0.01$) (表 2)。马身猪和大白猪背最长肌中 Myf5 基因 mRNA 相对表达量均表现出初生时最高, 30 日龄次之, 随后随日龄的增长, 表达量迅速降低并基本维持稳定状态(马身猪 120 日龄表达量除外)(图 1)。



图中柱子的值为“平均数±标准误”。柱状图中, 同一品种内, 字母不同者表示差异显著(小写字母)或极显著(大写字母)。柱状图中, 同一发育阶段, “*”表示不同品种间差异显著 ($P < 0.05$), “**”表示差异极显著 ($P < 0.01$), “ns”表示差异不显著。图 4 同

Values in bar diagram are the “mean ± standard errors”. In the same breed, means with no common letter differ significantly, lower case letter and capital letter means the difference is significant at the levels of 0.05 and 0.01, respectively. At the same age, “*” means the difference between Mashen and Large White is significant at 0.05 level, “**” means the difference is significant at 0.01 level, “ns” means the difference is not significant. The same as Figure 4

图 1 马身猪和大白猪不同发育阶段背最长肌 Myf5 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 1 The mRNA relative expression of Myf5 gene in longissimus dorsi tissue at different stages of Mashen and Large White pigs

就马身猪和大白猪同一发育阶段而言, 在 30 和 60 日龄阶段, 马身猪和大白猪背最长肌中 Myf5 基因 mRNA 相对表达量差异不显著; 而在初生、90、120 日龄等阶段, 马身猪的表达量显著或极显著高于大白猪; 在 150 和 180 日龄, 大白猪的表达量显著高于马身猪(图 1)。

2.3 马身猪和大白猪不同日龄背最长肌 Myf5 蛋白相对表达量

采用 Western-blot 技术检测了马身猪和大白猪不同发育阶段背最长肌 Myf5 蛋白表达量, 结果见图 2 和图 3。由图可见, 目的蛋白 Myf5 和内参蛋白 GAPDH 条带清晰, 不同日龄间, 内参蛋白条带面积和灰度基本一致, 符合内参蛋白恒定表达的特性。蛋白条带面积和灰度值大小采用 BIO-RAD 凝胶成像系统自带的 Image lab 软件进行分析计算, Myf5 与内参对比, 进行半定量分析, 结果见表 3 和图 4。

由表 3 和图 4 可见, 品种、日龄及品种与日龄的互作效应对 Myf5 蛋白相对表达量有极显著影响 ($P < 0.01$)。马身猪初生时, Myf5 蛋白的相对表达量最高, 为 1.85; 30 日龄时表达量最低, 为 0.74;

表 2 *Myf5* 基因 mRNA 相对表达量的方差分析

Table 2 Analysis of variance for mRNA relative expression of *Myf5* gene

变异来源	自由度	平方和	F 值	P 值
Source of variation	df	Sum of squares	F-value	P-value
品种 Breed (B)	1	0.101 8	16.77	0.000 5
日龄 Day of age (DOA)	6	6.618 1	181.71	0.000 1
品种×日龄 B×DOA	6	0.463 5	12.73	0.000 1

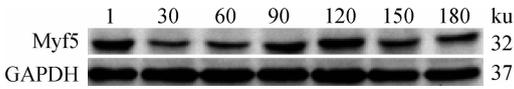


图 2 马身猪背最长肌 *Myf5* 蛋白的表达
Fig. 2 Expression of *Myf5* in *longissimus dorsi* tissue of Mashen pig

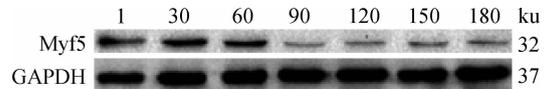


图 3 大白猪背最长肌 *Myf5* 蛋白的表达
Fig. 3 Expression of *Myf5* in *longissimus dorsi* tissue of Large White pig

表 3 *Myf5* 蛋白相对表达量的方差分析

Table 3 Analysis of variance for *Myf5* protein relative expression

变异来源	自由度	平方和	F 值	P 值
Source of variation	df	Sum of squares	F-value	P-value
品种 Breed (B)	1	3.45	638.40	0.000 1
日龄 Day of age (DOA)	6	2.10	64.75	0.000 1
品种×日龄 B×DOA	6	2.34	72.05	0.000 1

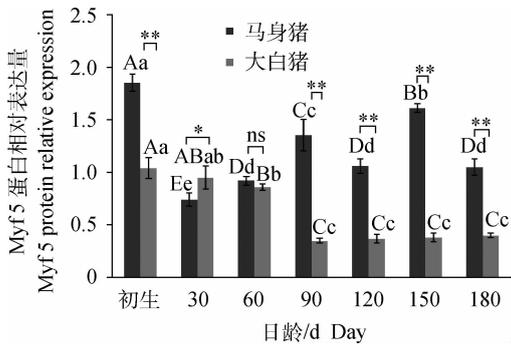


图 4 马身猪和大白猪不同发育阶段背最长肌 *Myf5* 的相对表达量

Fig. 4 *Myf5* protein relative expression in *longissimus dorsi* tissue at different stages of Mashen and Large White pigs

60~180 日龄阶段, *Myf5* 蛋白的相对表达量变化趋势呈现出波动变化的不稳定趋势(图 4)。随日龄的增长, 大白猪背最长肌中 *Myf5* 蛋白的相对表达量呈现逐渐降低的趋势, 初生时最高, 与 30 日龄的表达量差异不显著, 而极显著地高于 60 日龄以后各阶段的表达量($P < 0.01$); 90 日龄以后, 大白猪背最长肌中 *Myf5* 蛋白的表达量呈稳定状态, 这与马身猪

的表达规律不一致(图 4)。就猪种而言, 60 日龄时, 马身猪和大白猪背最长肌中 *Myf5* 蛋白表达量差异不显著; 30 日龄时, 大白猪的表达量显著高于马身猪($P < 0.05$); 而在其它各阶段, 马身猪 *Myf5* 蛋白的平均表达量均极显著高于大白猪($P < 0.01$)(图 4)。

3 讨论

曹婷等^[10]研究了五指山猪 30、210 和 360 日龄背部肌肉 *Myf5* 基因 mRNA 表达量, 发现 mRNA 的表达水平随着五指山猪年龄的生长而增加。本研究中, 从初生~180 日龄, 马身猪和大白猪背最长肌中 *Myf5* 基因 mRNA 表达量均表现出初生时最高, 30 日龄时次之, 此后表达量下降并一直维持在较低的水平(马身猪 120 日龄时除外), 研究结果与曹婷等^[10]的结果不一致, 这种差异可能是由试验动物的不同而造成的。五指山猪为小型猪, 成年体重仅 20~30 kg, 相当于同龄大型猪的 1/4~1/5, 其骨骼肌发育规律和生活习性可能与大型猪不同。陶志云等^[14]研究了鸭胚胎期和初生早期胸肌组织中 *Myf5* 基因 mRNA 表达的发育性变化, 发现呈波浪

型,在 13 胚龄时表达量相对较高,17 胚龄时下降,21 胚龄时有所上升,随后又下降,出雏后又上升到较高水平。在腿肌中,表达量呈“反√”型的表达趋势,在 13 胚龄时较高,随后下降,在出雏后又大幅度上升,达到最高水平,结果与本研究相近。Myf5 主要对成肌细胞早期命运的决定起重要作用,动物出生后,Myf5 主要在肌细胞的肌梭和肌卫星细胞中表达,通过肌卫星细胞参与肌纤维的再生和骨骼肌的生长。本研究表明仔猪初生时或断奶前,肌卫星细胞中 Myf5 表达量较高,为肌纤维的再生和骨骼肌的生长做准备。马身猪 120 日龄时 Myf5 基因 mRNA 表达量显著升高,可能与马身猪的行为学特性有关。马身猪为地方品种,抗逆性强,性成熟早,3~4 月龄就开始发情,活跃程度高,容易受伤。肌卫星细胞与受伤后肌纤维的修复和再生有关,而 Myf5 表达于肌卫星细胞中,所以此阶段 Myf5 的表达量较高。在马身猪中,Myf5 蛋白的表达规律是初生时最高,30 日龄时降低,此后表达量又逐渐升高,但始终低于初生时的表达量。而在大白猪中,初生时表达量最高,30 和 60 日龄的表达量稍有降低,但与初生时差异不显著;60 日龄以后的表达量显著低于 60 日龄之前,且呈稳定状态。不同发育阶段 Myf5 蛋白的表达规律与猪的生长规律相一致。60 日龄之前,仔猪活跃程度高,肌修复和再生能力强,Myf5 表达量高;60 日龄后,进入肥育期,活动减少,肌修复和再生能力减弱,Myf5 表达量低。

就品种而言,在同一日龄阶段,在 mRNA 水平上,在 120 日龄前,马身猪的表达量高于大白猪,150 和 180 日龄,大白猪的表达量高于马身猪。在蛋白质水平上,除 30 日龄大白猪的表达量显著高于马身猪,60 日龄大白猪和马身猪的表达量差异不显著外,在其他日龄阶段,马身猪的表达量均极显著地高于大白猪。原因可能是马身猪为地方猪种,其肌卫星细胞数目和增殖潜力要高于引入猪种^[13],且地方猪种运动能力强,肌损伤和肌再生程度高于大白猪,在个体出生后,Myf5 主要表达于肌卫星细胞中,参与肌肉损伤修复和骨骼肌生长,因此马身猪 Myf5 的表达量高于大白猪。本研究中,Myf5 基因 mRNA 和蛋白质表达模式不同,例如,在 30 日龄阶段,马身猪 Myf5 基因 mRNA 表达量高于大白猪,而在蛋白水平上,马身猪的表达量低于大白猪;在 60、150 和 180 日龄阶段,马身猪 Myf5 基因 mRNA 表达量低于大白猪,而蛋白质的表达量高于大白猪,

这种在 mRNA 和蛋白质水平上表达模式的差异可能是由于转录后调控所引起的。研究表明,虽然 Myf5 基因 mRNA 在小鼠脑部表达,但转录后 Myf5-3'UTR 可结合 miR-20 和 miR-31 而抑制翻译过程,因此在脑部检测不到 Myf5 蛋白^[15]。

本研究初步探讨了马身猪和大白猪背最长肌中 Myf5 基因从初生到 180 日龄阶段的发育性表达趋势,相关的基因表达调控机制及 Myf5 基因在肌肉生长和对肉质品质的影响等方面还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] RUDNICKI M A, JAENISH R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis[J]. *Biol Essays*, 1995, 17: 203-209.
- [2] CAMPION D R, RIEHARDSON L R, REAGAN J O, et al. Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle[J]. *Anim Sci*, 1981, 52(5): 1014-1018.
- [3] BRAUN T, RUDNICK M A, ARNOLD H H, et al. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death[J]. *Cell*, 1992, 71: 369-382.
- [4] RIBAS R, MONCAUT N, SILIGAN C, et al. Members of the TEAD family of transcription factors regulate the expression of Myf5 in ventral somitic compartments[J]. *Dev Biol*, 2011, 355: 372-380.
- [5] RUDNICKI M A, SCHNEGELSBURG P N J, STEAD R H, et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle[J]. *Cell*, 1993, 75: 1351-1359.
- [6] VALDEZ M R, RICHARDSON A J, KLEIN H W, et al. Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4[J]. *Dev Biol*, 2000, 219: 287-298.
- [7] MOREL B G, CHRÉTIEN F, FLAMANT P, et al. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis[J]. *Dev Biol*, 2007, 312: 13-28.
- [8] SEALE P, RUDNICKI M A. A new look at the origin, function, and “stem - cell” status of muscle satellite cells[J]. *Dev Biol*, 2000, 2: 115-124.
- [9] BIRESSI S, BJORNSON C, CARLIG P, et al. Myf5 expression during fetal myogenesis defines the developmental progenitors of adult satellite cells[J]. *Dev Biol*, 2013, 379: 195-207.

- [10] 曹 婷,侯冠彧,施力光,等.五指山猪不同组织中 *Myf5* 与 *MyoD1* 基因的表达研究[J].家畜生态学报,2012,33(5):12-15.
- [11] 丁国杰,刘 娣,李景芬.猪 *Myf5* 基因外显子 1 的多态性分析[J].江苏农业科学,2006,(3):125-127.
- [12] MAAK S, NEUMANN K, SWALVE H H. Identification and analysis of putative regulatory sequences for the *MYF5/MYF6* locus in different vertebrate species[J]. *Gene*, 2006, 379: 141-147.
- [13] WANG X Q, YANG W J, YANG Z, et al. The differential proliferative ability of satellite cells in Lantang and Landrace pigs [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e32537.
- [14] 陶志云,邹剑敏,宋 迟,等.鸭胚骨骼肌生肌调节因子 *MyoD1* 和 *Myf5* 发育性变化研究[J].中国家禽, 2012, 34(17): 16-19.
- [15] DAUBAS P, CRIST G C, BAJARD L, et al. The regulatory mechanisms that underlie inappropriate transcription of the myogenic determination gene *Myf5* in the central nervous system[J]. *Dev Biol*, 2009, 327: 71-82.

(编辑 郭云雁)