

张明,吕明,李瑞文,等. MRFs 家族基因在鲤鱼红肌和白肌中的表达差异[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):49-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.013

MRFs 家族基因在鲤鱼红肌和白肌中的表达差异

张明¹, 吕明¹, 李瑞文², 徐梓钧¹, 邬杨楠¹, 左璐璐¹, 林亚秋¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041; 2. 四川省成都市妇女儿童中心医院生殖与内分泌实验室, 四川成都 610091)

摘要:为探索生肌调节因子(myogenic regulator factors, MRFs)家族基因在鲤鱼肌纤维形成中的基本作用,利用荧光定量 PCR 技术分别检测 MRFs 家族各成员在鲤鱼红肌、白肌中的表达差异,并与红肌纤维的标志基因 *MyHC I* 及白肌纤维的标志基因 *MyHC II* 的表达水平进行关联分析。结果表明, *MyoD* 基因在鲤鱼红肌中的表达极显著高于在白肌中的表达,并与 *MyHC I* 基因的表达呈显著正相关, *Myf6* 在鲤鱼白肌中的表达极显著高于其在红肌中的表达水平,并与 *MyHC II* 基因的表达呈显著正相关, *Myf5*、*MyoG* 在鲤鱼红肌、白肌中的表达水平差异不显著。

关键词: MRFs 家族基因; 红肌; 背肌; 腹肌; 鲤

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0049-02

肌纤维类型及其组成对动物肉品质具有重要影响,肌纤维类型主要包括两大类: I 型(红肌、慢肌)、II 型(白肌、快肌)肌纤维。不同类型肌纤维特性不同(如收缩功能、线粒体成分、代谢特性等),进而导致肌肉品质存在差别^[1-2]。研究表明,若肌肉中红肌纤维比例高于白肌纤维,则肌肉的品质较好^[3-4]。Toniolo 等将肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC)基因的同工型作为肌纤维类型的分子标志^[5]。生肌调节因子(myogenic regulator factors, MRFs)家族基因在动物肌纤维的形成、分化中具有重要的调控作用,该家族编码 *MyoD1*、*Myf5*、*MyoG*、*Myf6* 等 4 种肌肉特异性转录因子具有不同的时空表达特性^[6-8]。本研究利用荧光定量 PCR 技术分析生肌调节因子家族 *MyoD*、*Myf5*、*MyoG*、*Myf6* 基因在鲤鱼红肌、白肌(背肌、腹肌)中的表达差异,并与红肌、白肌纤维标志基因 *MyHC I*、*MyHC II* 的表达水平进行关联分析,初步确定该家族基因在鲤鱼肌纤维形成中的作用,旨在为通过肌纤维类型调控鱼类肉质提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

所用鲤鱼购自西北农林科技大学安康水产试验示范站。选择体质量为 500 g 左右的成年鲤鱼 6 尾,致死迅速取其背部红肌、背肌、腹肌组织,用锡箔纸包好,置于 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.2 主要试剂

TRIzol 总 RNA 提取试剂盒与 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×) 均购自大连 TaKaRa 公司;反转录试剂盒、TaqDNA 聚合

酶均购自 Fermentas 公司;DEPC 原液由 Sigma 公司分装。

1.3 方法

1.3.1 鲤鱼红肌、白肌组织总 RNA 提取与反转录 取出备用的鲤鱼红肌、白肌组织,按照 TRIzol 试剂盒说明书的方法提取肌肉组织的 RNA,经过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,同时利用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。按照反转录试剂盒说明书的方法,取 1 g 总 RNA,以 Oligo(dT) 为引物反转录成 cDNA 第一链。

1.3.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 上登陆的 β -actin、*MyoD*、*Myf5*、*MyoG*、*Myf6*、*MyHC I*、*MyHC II* 序列(表 1),利用 Primer 5.0 软件设计这些基因的特异引物用来扩增在鲤鱼红肌、白肌中的表达差异。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 利用荧光定量 PCR 检测 *MyoD*、*Myf5*、*MyoG*、*Myf6*、*MyHC I*、*MyHC II* 基因在鲤鱼红肌、白肌中的表达水平。总反应体系为 20 μ L,其中 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×) PCR 10 μ L,模板 cDNA 1 μ L,上、下游引物各 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。反应程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 30 s,57.6 ~ 62.3 ℃ 退火 30 s,45 个循环;72 ℃ 延伸 30 s。

1.3.4 数据分析 采用 SPSS 13.0 软件分析数据,所得数据用“平均值 \pm 标准差”表示,采用 ANOVA 进行差异性显著性分析。荧光定量结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法进行分析^[9]。

2 结果与分析

2.1 *MyoD*、*Myf5*、*MyoG*、*Myf6* 基因在鲤鱼红肌、白肌中的表达差异

荧光定量检测 MRFs 家族基因在鲤鱼红肌、背肌、腹肌中的表达结果(图 1 至图 4)显示, *MyoD* 基因在鲤鱼红肌中的表达水平极显著高于在背肌、腹肌中的表达水平。 *Myf6* 基因在鲤鱼背肌、腹肌中的表达水平极显著高于其在红肌中的表达水平。 *Myf5*、*MyoG* 基因在鲤鱼红肌与背肌、腹肌中的表达水平差异不显著。

2.2 MRFs 家族基因与肌纤维标志基因 *MyHC I*、*MyHC II* 的相关性

MyoD 基因在鲤鱼红肌中的表达水平与 *MyHC I* 基因的

收稿日期:2014-11-26

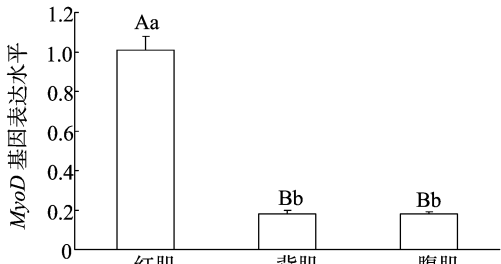
基金项目:国家自然科学基金(编号:31201990);四川省应用基础研究计划(编号:2014JY0088);西南民族大学国家级大学生创新创业训练计划(编号:X201410656057)。

作者简介:张明(1988—),男,重庆人,从事生物技术研究。
E-mail:zhangmingcoming@163.com。

通信作者:林亚秋,副教授,从事动物肉质调控研究。E-mail:linyq1999@163.com。

表 1 基因特异引物序列

基因名称	特异引物序列	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
β -actin	F:5'-GATTCGCTGGAGATGATGCT-3';R:5'-CGTGTAGAAGGTGTGATGCC-3'	58.0	219
<i>MyoD</i>	F:5'-TCTGAGAAACGCCATTAGTTACATC-3';R:5'-GCTGTCACTAACTGTTCCGTCTTCT-3'	61.0	193
<i>Myf6</i>	F:5'-TGCGATGGGCAGTGTCTTATG-3';R:5'-CAGCCTCTGGTTCGGATTGG-3'	62.0	168
<i>MyoG</i>	F:5'-CGCCACACTGAGGAGAAGA-3';R:5'-CCTGCTGGTTGAGAGAGCTGA-3'	62.0	173
<i>Myf5</i>	F:5'-GAGCCGCCACTATGAGGGAG-3';R:5'-TCTCCACCTTAGGAAGACGCTG-3'	57.6	111
<i>MyHC I</i>	F:5'-GGATGATGCTCTGCGTGTAAT-3';R:5'-TCAGCCAGTTTCCTTCTCTCTC-3'	62.3	138
<i>MyHC II</i>	F:5'-CCACTTCTCCCTGGTCCACTAC-3';R:5'-TCAACAACAGTGGGTAGAGAGTAG-3'	61.0	153



不同大写、小写字母表示差异极显著; 相同字母表示差异不显著
图1 *MyoD* 基因在鲤鱼红肌、背肌、腹肌中的表达差异

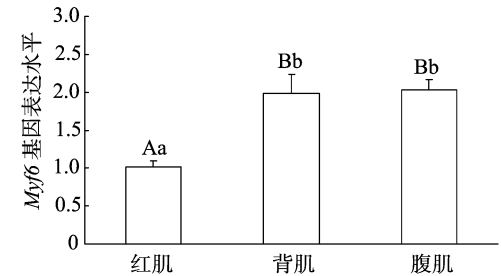


图2 *Myf6* 基因在鲤鱼红肌、背肌、腹肌中的表达差异

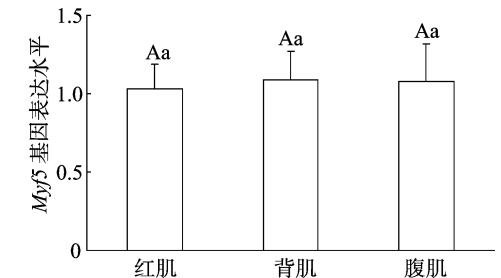


图3 *Myf5* 基因在鲤鱼红肌、背肌、腹肌中的表达差异

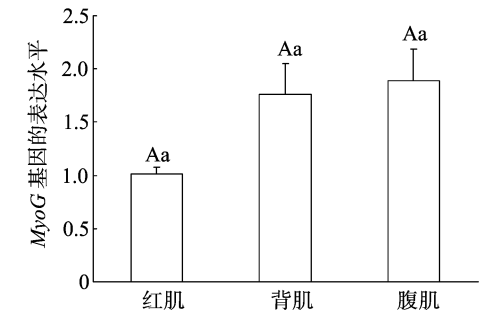


图4 *MyoG* 基因在鲤鱼红肌、背肌、腹肌中的表达差异

表达呈极显著正相关($r=0.908, P<0.01$), *Myf6* 在鲤鱼白肌中的表达水平与 *MyHC II* 基因的表达呈极显著正相关($r=1.000, P<0.01$)。

3 结论与讨论

MRFs 家族基因都具有典型的碱性螺旋环结构,控制着动物肌肉发育的整个过程(包括成肌细胞的增殖、分化和肌纤维的形成),是动物肌肉发育过程中重要的正向调控因子。因此研究其在鱼类肌纤维形成中的作用具有重要意义。MRFs 家族基因在哺乳动物、鱼类中的组织分布不同,在哺乳动物中仅在肌肉组织中表达^[10-11],在鱼类多种组织中均存在表达,但主要分布在肌肉组织中^[12-14]。生肌调节因子在红肌、白肌中表达水平的差异对 2 种肌肉的肌纤维形成、肌肉生长率有影响。本研究结果表明, *MyoD* 基因在鲤鱼红肌中的表达水平极显著高于其在白肌(背肌、腹肌)中的表达水平,并与红肌纤维的标志基因呈显著正相关。*Myf6* 基因在鲤鱼背肌、腹肌中的表达水平极显著高于其在红肌中的表达水平,并与白肌纤维的标志基因呈显著正相关。*MyoG*、*Myf5* 基因在鲤鱼红肌中的表达水平与在背肌和腹肌中的表达水平差异不显著,可见 *MyoD* 可能在鲤鱼的红肌纤维形成中发挥主要作用, *Myf6* 基因可能在鲤鱼的白肌纤维形成中发挥主要作用。*MyoD* 在啮齿动物的白肌中表达量较高, *Myogenin* 却表达量较低^[15],这与本试验结果不同,可能具有物种特异性。

参考文献:

[1] Berchtold M W, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(3): 1215-1265.
[2] Picard B, Jurie C, Duris M P, et al. Consequences of selection for higher growth rate on muscle fibre development in cattle [J]. *Livestock Science*, 2006, 102(1/2): 107-120.
[3] Lefaucheur L, Milan D, Ecolan P, et al. Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(7): 1931-1941.
[4] Bowker B C, Botrel C, Swartz D R, et al. Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers [J]. *Meat Science*, 2004, 68(4): 587-594.
[5] Toniolo L, Maccatrozzo L, Patrino M, et al. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization [J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2007, 292(5): C1915-C1926.

郭志海,王鹏凯,郗红丽,等. 杨梅 iPBS-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):51-54.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.014

杨梅 iPBS-PCR 反应体系的建立与优化

郭志海^{1,3}, 王鹏凯^{1,3}, 郗红丽^{1,2}, 黄颖宏^{1,2}, 费 艳^{1,2}

(1. 江苏省太湖常绿果树技术推广中心, 江苏苏州 215107; 2. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014;
3. 苏州农业职业技术学院, 江苏苏州, 215008)

摘要:利用已报道的 iPBS 引物 2249 和 3 个杨梅品种的 DNA 为模板进行 iPBS-PCR 扩增, 采用单因素法对杨梅 iPBS-PCR 反应体系的 4 个组分(dNTP、 Mg^{2+} 、引物、模板)用量进行优化, 确定了杨梅 iPBS-PCR 20 μ L 反应体系: 2 μ L 10 \times Taq buffer, 1.6 μ L 25 mmol/L Mg^{2+} , 1.6 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 1 μ L 10 μ mol/L 引物, 0.2 μ L 5 U/ μ L Taq 酶, 30 ng 模板 DNA。梯度 PCR 试验表明可以参考 iPBS 引物 Tm 值确定退火温度。利用上述体系对随机取样的 10 个品种用 4 条 iPBS 引物进行扩增, 得到了条带清晰、多态性好的 iPBS 谱带。

关键词:杨梅; iPBS-PCR; 体系优化

中图分类号: S667.601 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0051-04

杨梅(*Myrica rubra*)是杨梅科杨梅属常绿小乔木, 原产于我国, 主要生长在长江流域以南的丘陵山地。杨梅果实营养丰富, 具有较强的保健功能, 是南方经济效益较高的水果之一^[1]。我国杨梅栽培历史悠久, 生态环境的多样性产生了性状多样的品种、品系和类型, 形成了丰富的种质资源。利用形态学、同工酶等方法鉴定杨梅种质资源局限性大、效率低。因此, 常利用分子标记对杨梅种质资源进行分析, 包括遗传多样性、亲缘关系分析、品(杂)种鉴别等方面。目前, RAPD、AFLP、SRAP、ISSR、SSR、iPBS、ScoT 等技术^[2-7]在杨梅中都已得到应用^[8]。

收稿日期: 2015-05-13

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)2011]; 江苏省科技支撑计划(编号: BE2012361); 国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 20120389); 江苏省农业三新工程[编号: SXGC(2014)076]。

作者简介: 郭志海(1965—), 男, 江苏江阴人, 高级农艺师、副教授, 主要从事园艺种质资源研究。E-mail: Gzh8115@163.com。

通信作者: 王鹏凯, 讲师, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: mengxiao02181@hotmail.com。

iPBS 是以 LTR 类反转录转座子保守位点设计引物进行扩增的一种分子标记技术, 针对 LTR 类反转录转座子中 2 个 PBS(引物结合位点)区间进行扩增^[9]。该方法简单、有效, 可节约大量人力、物力, 不用预先获知 LTR 序列, 直接进行引物筛选。目前, 该技术已经成功应用于亚麻^[10]、大麦、小麦、苹果、玉米^[9]、葡萄^[11]等的研究。当材料、方法不同时, 需对扩增条件进行优化才能得出更科学的标记谱带。本研究利用单因素试验对杨梅 iPBS-PCR 反应体系进行优化, 通过对电泳结果的分析建立了杨梅 iPBS-PCR 反应体系。同时利用该反应体系对已有的 iPBS 引物进行初步筛选, 研究结果将为使用 iPBS 标记评价、鉴定杨梅种质资源提供了技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的杨梅种质资源材料均采自江苏省太湖常绿果树技术推广中心国家杨梅种质资源圃, 杨梅品种为晚稻(浙江舟山)、狗色头(江苏常熟)、浪荡子(江苏苏州东山)。PCR 试剂购于 TaKaRa 公司(10 \times rTaq buffer, 2.5 μ mol/L dNTP,

隆及其表达谱[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(2): 207-211。

[12] Ye H Q, Chen S L, Xu J Y. Molecular cloning and characterization of the Myf5 gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, 2007, 147(3): 452-459.

[13] Johansen K A, Overturf K. Sequence, conservation, and quantitative expression of rainbow trout Myf5 [J]. Comp Biochem Physiol: Part B, 2005, 140: 533-541.

[14] 林亚秋, 李瑞文, 郑玉才, 等. 齐口裂腹鱼和鲤鱼 H-FABP 基因的克隆及其表达谱[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(6): 554-560.

[15] Ekmark M, Rana Z A, Stewart G, et al. De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle [J]. The Journal of Physiology, 2007, 584: 637-650.

[6] Te Pas M F, Hulsege I, Coster A, et al. Biochemical pathways analysis of microarray results: regulation of myogenesis in pigs [J]. BMC Developmental Biology, 2007, 7: 66.

[7] Rescan P Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates [J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, 2001, 130(1): 1-12.

[8] Carvajal J J, Rigby P W. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle [J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(18): 3014-3018.

[9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[10] 王东林, 毛宝龄. 生肌调节因子及其作用机理[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 1995, 17(4): 157-160.

[11] 林亚秋, 张倡琿, 郑玉才, 等. 九龙牦牛肌细胞生成素基因的克