

张鑫,孙洪新,刘月,等. 绵羊背最长肌组织中 *TMOD4* 基因表达差异研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):48-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.011

绵羊背最长肌组织中 *TMOD4* 基因表达差异研究

张鑫^{1,2}, 孙洪新², 刘月², 刘玉芳¹, 敦伟涛², 张清阳¹, 夏翠³, 白莹¹, 陈晓勇^{2,3}

(1. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056000;

2. 河北省畜牧兽医研究所, 河北保定 071000; 3. 河北农业大学动物医学院/动物科技学院, 河北保定 071000)

摘要: 研究旨在比较分析不同发育阶段绵羊背最长肌中 *TMOD4* 基因的表达水平。采用 qRT-PCR 和 Western-Blot 技术检测绵羊 1、7、13 月龄 3 个阶段背最长肌中 *TMOD4* 基因 mRNA 和蛋白质的相对表达量。结果表明, *TMOD4* 的 mRNA 在 1 月龄绵羊背最长肌组织中表达量最高, 13 月龄次之, 7 月龄低于 13 月龄, 其中 1 月龄与 7 月龄、13 月龄之间差异极显著 ($P < 0.01$), 7 月龄与 13 月龄之间差异显著 ($P < 0.05$)。TMOD4 蛋白水平在 1 月龄中最高, 7 月龄次之, 13 月龄中最低, 1 月龄与 7 月龄和 13 月龄之间差异极显著 ($P < 0.01$), 7 月龄与 13 月龄之间差异显著 ($P < 0.05$)。结果表明, *TMOD4* 基因与绵羊背最长肌组织发育相关。

关键词: 绵羊; *TMOD4* 基因; 背最长肌; 表达水平

中图分类号: S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0048-05

原肌球蛋白调节蛋白 4 (tropomodulin4, TMOD4) 基因编码修饰蛋白——TMOD4 蛋白在骨骼肌细胞中与肌动蛋白慢速生长末端结合, 阻止其延展或聚合, 维持肌动蛋白丝的稳定, 在原肌球蛋白与肌动蛋白的相互作用中发挥了重要作用^[1]。

TMOD 基因家族共有 4 个亚型, 分别是

TMOD1、*TMOD2*、*TMOD3* 和 *TMOD4*^[2]。*TMOD1* 主要表达于终分化细胞^[3], *TMOD2* 主要在神经元表达^[4], *TMOD3* 普遍表达^[5], *TMOD4* 在骨骼肌和心脏中高度表达^[6]。已有研究表明, *TMOD4* 与 *TMOD1* 高度相同, 功能相似。*TMOD1* 的过度表达会导致心肌细胞的收缩功能减弱, 小鼠上 *TMOD1* 的超表达或抑制表达会造成心肌功能异常, 转基因小鼠试验发现超表达 *TMOD1* 会造成小鼠胚胎的发育异常^[7]。有研究显示, 在成纤维细胞和成肌细胞中的 *TMOD1* 通过减少肌特异性基因的表达而抑制了肌源性分化^[8], 表明 *TMOD1* 可能在肌源性细胞的分化中起到抑制作用。*TMOD4* 和 *TMOD1* 的序列相似并且蛋白功能可相互替换^[9], 并且 *TMOD1* 大量存在于有纤维分裂后的终末分化细胞中, 包括横纹肌、红细胞、晶状体纤维细胞和神经元^[4]。

TMOD4 是哺乳动物骨骼肌中主要的 *TMOD* 亚

收稿日期: 2019-06-13

基金项目: 河北省重点研发计划 (编号: 18226624D); 河北省现代农业产业技术体系羊产业创新团队专项资金 (编号: HBCT2018140201, HBCT2018140403)。

作者简介: 张鑫 (1994—), 男, 河北定州人, 硕士研究生, 主要从事动物分子遗传研究。E-mail: 609014591@qq.com。

通信作者: 白莹, 博士, 副教授, 主要从事动物分子遗传育种研究, E-mail: 562625563@qq.com; 陈晓勇, 博士, 研究员, 主要从事动物遗传繁育研究及养羊生产技术推广工作, E-mail: chenxiaoyong-2000@163.com。

[3] 张兴富. 提高农作物种子质量的作用[J]. 现代园艺, 2016(18): 228.

[4] 杨青川, 孙彦, 康俊梅. 紫花苜蓿耐盐相关基因克隆研究进展[J]. 草地学报, 2005(3): 253-256.

[5] 周以飞, 戴艳, 潘大仁, 等. 花叶病毒侵染的果蔗 (*Badila*) 的基因表达[J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2006, 35(3): 288-291.

[6] 乔建明, 王洪军, 李举文, 等. 土壤盐碱地现状、改良利用及盐碱治理在新疆农业发展中的意义[J]. 新疆农垦科技, 2015(10): 54-56.

[7] 努尔凯麦尔·木拉提, 王希东, 帕尔哈提·阿布都克日木. 骆驼刺叶片总 RNA 提取方法比较[J]. 喀什师范学院学报, 2013

(6): 44-46.

[8] Sambrook L J, Man I T, Fritsch E F. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.

[9] 甘晓燕, 石磊, 陈虞超, 等. 梭梭 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因克隆及分析[J]. 西北植物学报, 2012, 32(2): 225-230.

[10] 郭长奎, 罗淑萍, 沙依拉, 等. 沙棘耐盐基因 *HrNHX1* 的克隆及 3'UTR 序列分析[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(5): 1031-1035.

[11] 石庆华, 代培红, 许磊. 骆驼蓬总 RNA 的 4 种提取方法比较[J]. 内蒙古农业大学学报 (自然科学版), 2010, 13(4): 152-155.

[12] 蔡小宁, 杨平, 贡爱玲, 等. 盐芥 *ThNHX1* 基因的 3'RACE[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(21): 5485-5486, 5524.

型,在心肌中的作用与 *TMOD1* 相当^[10-11]。在非洲爪蟾早期肌纤维细胞中 *TMOD4* 基因与肌纤维细胞早期分化高度相关^[12],已有研究证明猪背最长肌中 *TMOD4* 参与调控脂肪沉积与肌纤维发育^[13-14]。*TMOD4* 基因共有 9 个外显子和 8 个内含子,其启动子上游序列有 2 个结合位点:MEF2A 和 C/EBP δ ,而这 2 个位点的靶基因分别与肌纤维生长和脂肪分子生成有关,当 *TMOD4* 高表达时,促进脂肪沉积,抑制肌纤维发育;低表达时,抑制脂肪生成,促进肌纤维生长^[14]。以上研究说明,*TMOD4* 与肉质高度相关,但目前没有任何关于绵羊的 *TMOD4* 基因的表达研究,本研究比较不同月龄绵羊背最长肌组织中 *TMOD4* 的 mRNA 和蛋白水平,目的是为 *TMOD4* 表达水平与绵羊肌肉发育相关性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

样品来自河北连生农业开发有限公司种羊场,所选试验动物为寒泊羊一代,相同月龄绵羊在相同的饲养管理条件下饲养,满足正常的生长营养需求。选择 1 月龄、7 月龄的公绵羊各 3 只,13 月龄公绵羊 2 只,于目标日龄当天屠宰,采集 8 个样品的背最长肌组织,置于液氮中速冻,之后存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存备用。

表 1 引物序列、退火温度及 PCR 产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)	退火温度($^{\circ}\text{C}$)
<i>GAPDH</i>	F: CACCCTCAAGATTGTCAGC; R: CAGTGGATCATAAGTCCCTCC	107	60
<i>TMOD4</i>	F: AGCAACGACAAGGAGGTAGAGGAG; R: AGGCTACGATTCTCACGCAACATG	188	60

1.3.3 cDNA 合成 总 RNA 反转录采用 5X All - In - One RT Master Mix 试剂盒操作说明进行反转录。在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 离心管中配制反应液,总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反转录体系及条件:RNA Template $2\text{ }\mu\text{g}$, AccuRT Reaction Mix (4) $2\text{ }\mu\text{L}$, 加无酶水补足至 $8\text{ }\mu\text{L}$ 。置于 PCR 仪中 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min 或室温孵育 5 min,取出后置于冰上冷却,加入 AccRT Reaction Stopper($5\times$) $2\text{ }\mu\text{L}$, $5\times$ All - In - One RT Master Mix $4\text{ }\mu\text{L}$, 无酶水 $6\text{ }\mu\text{L}$, 总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。将 PCR 管短暂离心混匀置于 PCR 仪中,反应程序为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。反应完成后取出 cDNA 产物置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 试验全程冰上进行,每个样品设置 3 个重复。按照 Eva Green $2\times$ qPCR

1.2 主要试剂及仪器

5X All - In - One MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit) 试剂盒 ($G492, 100\times 20\text{ }\mu\text{L}$); EvaGreen $2\times$ qPCR MasterMix - no DYE 荧光定量试剂盒 (MasterMix - S, $4\times 1.25\text{ mL}$); 兔抗人 *TMOD4* 多克隆抗体, Affinity Biosciences 常州市祥泰生物科技有限公司; 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体; Western 试剂盒 (内含山羊抗兔及山羊抗鼠 IgG); ND - 1000 核酸蛋白测定仪; 组织蛋白裂解液和 PMSF; BCA 蛋白定量试剂盒; 微量移液器 (Eppendorf, 德国); 凝胶成像系统 (MiniBis, 以色列); PCR 扩增仪 (Bio - Rad, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (罗氏 - 96, 瑞士); 电泳仪 (六一生物, 中国); 酶标仪 (RT - 6000 型号); Western 全自动蛋白分析系统。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 本试验采用 Trizol 试剂盒说明书提取绵羊背最长肌的总 RNA, DEPC 水溶解, 电泳检测 RNA 完整性, 测定总 RNA 的浓度和纯度, 调整浓度至 $500\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 引物设计与合成 通过参考文献和查询 NCBI 数据库选取 *TMOD4* 基因的引物序列, 内参基因选用 *GAPDH*。所有引物由生工生物工程股份有限公司石家庄分部合成, 引物序列见表 1。

Master Mix - no DYE 荧光定量试剂盒说明书进行操作 (表 2、表 3), 采用罗氏 - 96 荧光定量 PCR 仪对不同月龄绵羊背最长肌组织内 *TMOD4* 基因的相对表达量进行分析, 观察扩增的熔解曲线。采用 Excel 软件处理实时荧光定量 PCR 结果, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 相对定量计算公式, 分析绵羊不同月龄背最长肌组织中 *TMOD4* 基因 mRNA 的相对表达量。

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

成分	用量
Eva Green $2\times$ qPCR Master Mix	$10\text{ }\mu\text{L}$
Forward Primer	$0.6\text{ }\mu\text{L}$
Reverse Primer	$0.6\text{ }\mu\text{L}$
Template DNA	$1\text{ }\mu\text{L}$
Nuclease - Free H_2O	补足至 $20\text{ }\mu\text{L}$

表 3 荧光定量 PCR 反应程序

步骤	温度 (℃)	时间 (s)	循环数
酶激活	95	600	1
变性	95	15	65
退火/延伸	60	30	
熔解曲线	95	10	1
	65	60	
	97	1	
保存	37	30	1

1.3.5 Western – Blot 采用 RIPA 蛋白裂解液(强)提取背最长肌组织总蛋白,样品质量与裂解液量的比例为 1 g : 10 mL,BCA 法测定蛋白浓度。样品的制备方法与传统 Western Blot 相同,根据 Western 全自动蛋白表达分析系统说明书进行后续操作。结束后用 Western 全自动蛋白表达分析软件进行灰度值分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取和 qRT – PCR

测定的 RNA 浓度在 1 000 ng/μL 左右, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为 1.9 ~ 2.0。采用 1% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,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。

由图 1 可知,根据最佳反应体系和反应条件建立内参基因 *GAPDH* 和目的基因 *TMOD4* 的标准曲线,回归系数(r^2)分别为 0.993 和 0.991,斜率分别为 -3.231 和 -3.228,目的基因与内参基因差值均 <0.1,说明 C_T 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。扩增曲线符合标准的“S”形曲线,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 不同月龄公绵羊背最长肌 *TMOD4* 基因 mRNA 的相对表达量

图 2 表明,不同月龄对 *TMOD4* 基因 mRNA 相对表达量有极显著影响($P < 0.01$)。在 1 月龄表达量最高且极显著高于 13 月龄和 7 月龄($P < 0.01$),13 月龄和 7 月龄之间差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同月龄绵羊背最长肌 *TMOD4* 蛋白相对表达量

采用 Western 全自动蛋白表达分析系统的

Western – blot 技术检测不同月龄绵羊背最长肌组织 *TMOD4* 蛋白表达量,目的蛋白 *TMOD4* 和内参蛋白 *GAPDH* 条带清晰,不同月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 Western 全自动蛋白表达分析系统自带的分析软件进行分析计算,*TMOD4* 与内参对比,进行半定量分析。由图 3 和图 4 可知,月龄的差异对 *TMOD4* 蛋白相对表达量有极显著影响($P < 0.01$)。绵羊在 1 月龄时,*TMOD4* 蛋白的相对表达量最高,平均值为 2.05;13 月龄时表达量最低,平均值为 0.34。随月龄的增加,绵羊背最长肌 *TMOD4* 蛋白相对表达量呈下降的趋势,1 月龄最高,与 7 月龄、13 月龄表达量差异极显著($P < 0.01$);7 月龄次之,与 13 月龄差异显著($P < 0.05$);13 月龄最低。

3 讨论

TMOD4 是哺乳动物骨骼肌中主要的 *TMOD* 亚型,在心肌中的作用与 *TMOD1* 相当。*TMOD4* 基因共有 9 个外显子和 8 个内含子,其启动子上游序列有 2 个结合位点:MEF2A 和 C/EBPδ,而这 2 个基因分别与肌纤维生长和脂肪分子生成有关,当 *TMOD4* 高表达时,促进脂肪沉积,抑制肌纤维发育;低表达时,抑制脂肪生成,促进肌纤维生长^[14]。本研究中,绵羊在 1 月龄时,*TMOD4* mRNA 表达水平最高,其次是 13 月龄,最低是 7 月龄,*TMOD4* mRNA 水平随月龄增加大幅下降最后趋于平缓略微上升;绵羊在 1 月龄时 *TMOD4* 蛋白水平最高,在 7 月龄时次之,13 月龄最低,*TMOD4* 蛋白水平随月龄增加呈大幅下降趋势且后期趋于平缓。试验所选绵羊为寒泊羊,具有较高的产肉能力,而 *TMOD4* 作为参与决定肉质的重要基因之一,表达量趋势可以解读为在绵羊发育早期主要是脂肪沉积抑制肌纤维发育,而中后期则主要促进骨骼肌的发育并且抑制脂肪生成。乔永等研究湖羊不同月龄脂肪沉积发现,在绵羊早期脂肪沉积最快^[15],本研究结果与之相似。

Nworu 等对非洲爪蟾胚胎细胞进行原位杂交试验发现,*TMOD4* 基因在骨骼肌组织早期肌原纤维至关重要,控制骨骼肌发育^[16]。*TMOD4* 在终末分化细胞中也大量存在,在横纹肌中,*TMOD4* 与原肌球蛋白协同作用,结合并限制肌动蛋白细纤维尖端肌动蛋白单体交换,在骨骼肌快速收缩中占主导地位。本研究中 *TMOD4* 在早期绵羊背最长肌组织中

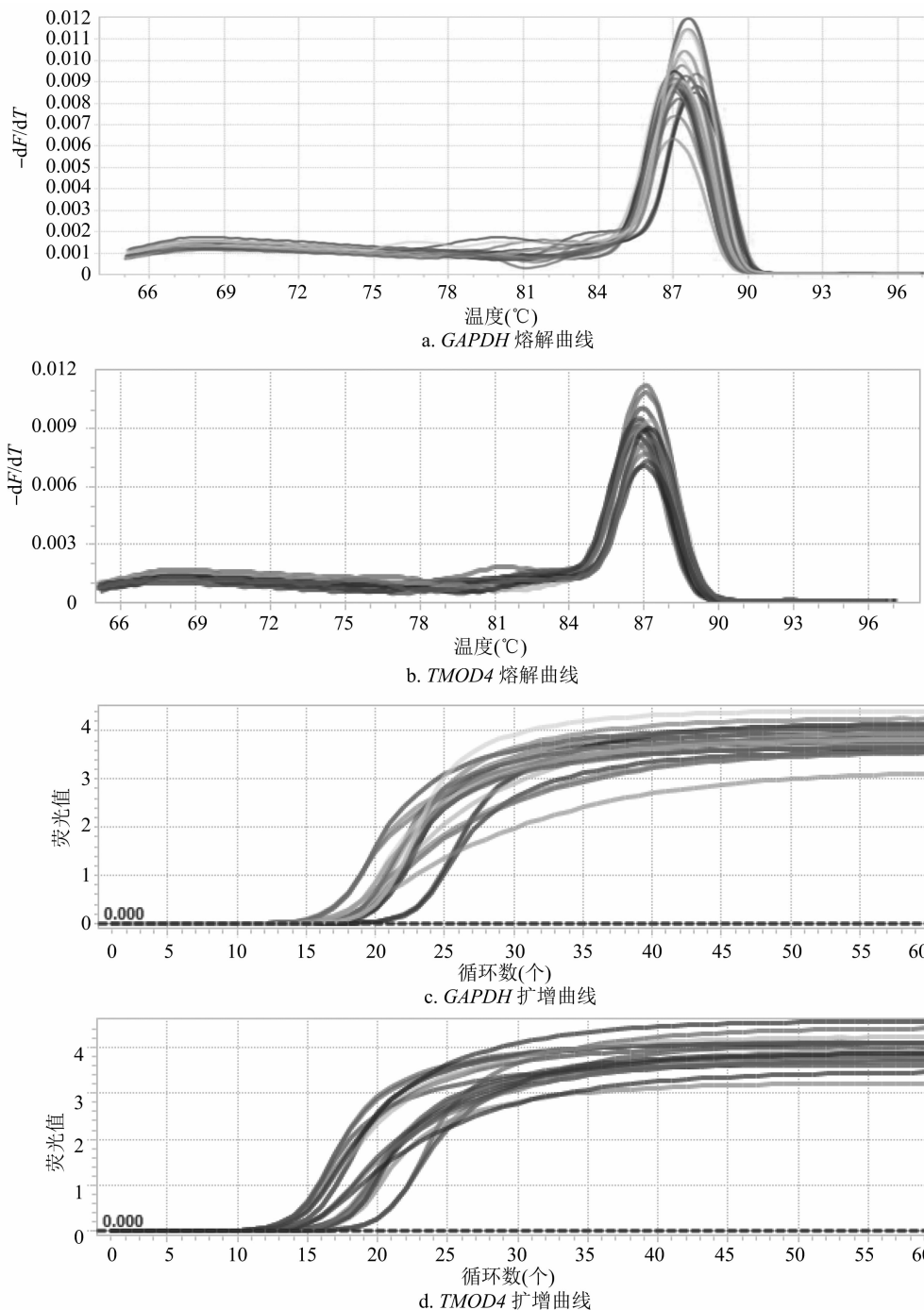


图1 目的基因和内参基因的熔解曲线和扩增曲线

表达量最高,为肌纤维发育和骨骼肌的生长做准备,并且羔羊活泼好动,骨骼肌收缩迅速,所以此阶段绵羊 *TMOD4* 表达量最高。随着月龄增加,绵羊骨骼肌发育完全,肌纤维粗壮,肌间脂肪减少,活动减少,*TMOD4* 表达水平降低。

本研究初步探讨了 *TMOD4* 在绵羊不同月龄间的表达差异和大体趋势,相关 *TMOD4* 对肉质品质的影响还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Catharine A C, Fritz - Six K L, Almenar - Queral A, et al. Leiomodins: larger members of the tropomodulin (*Tmod*) gene family [J]. *Genomics*, 2001, 73(2): 127 - 139.
- [2] Fath T, Fischer R S, Dehmelt L, et al. Tropomodulins are negative regulators of neurite outgrowth [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(4): 291 - 300.
- [3] Fischer R S, Fowler V M. Tropomodulins: life at the slow end [J].

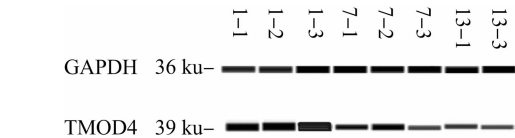
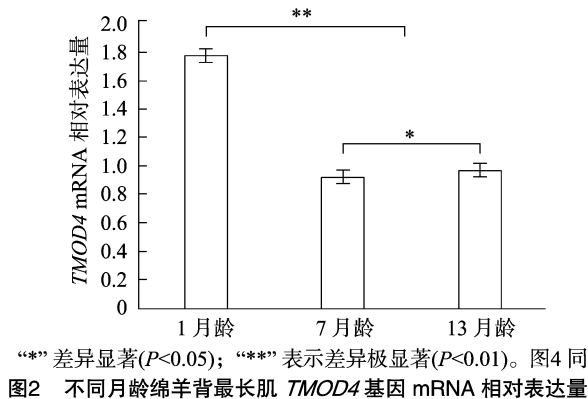
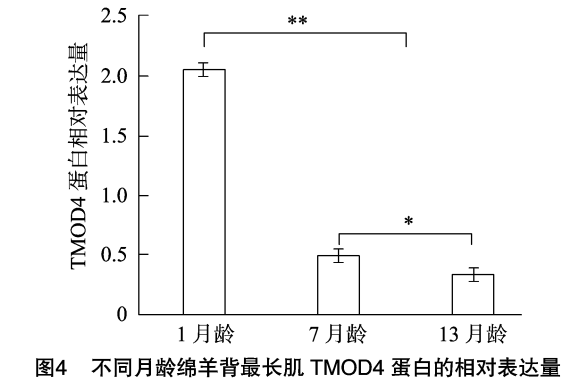


图3 不同月龄绵羊 TMOD4 蛋白的表达



Trends in Cell Biology,2003,13(11):593-601.

[4] Ono Y, Schwach C, Parker B A, et al. Disruption in the tropomodulin1 (*Tmod1*) gene compromises cardiomyocyte development in murine embryonic stem cells by arresting myofibril maturation[J]. *Developmental Biology*,2005,282(2):336-348.

[5] Fischer R S,Yarmola E G,Weber K L,et al. Tropomodulin 3 binds to actin monomers[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2006,281(47):36454-36465.

[6] Fritz - Six K L,Patrick R C,Fischer R S,et al. Aberrant myofibril assembly in tropomodulin1 null mice leads to aborted heart development and embryonic lethality[J]. *Journal of Cell Biology*,2003,163(5):1033-1044.

[7] Patrick R C,Zoghbi H Y. Sequencing, expression analysis, and mapping of three unique human tropomodulin genes and their mouse orthologs[J]. *Genomics*,2000,63(1):97-107.

[8] Kajimura S,Seale P,Spiegelman B M. Transcriptional control of brown fat development [J]. *Cell Metabolism*,2010,11(4):257-262.

[9] Gokhin D S,Fowler V M. Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology [J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*,2011(5):1-16.

[10] Gokhin D S,Roberta B N,Nancy E K,et al. Tmod1 and CP49 synergize to control the fiber cell geometry, transparency, and mechanical stiffness of the mouse lens [J]. *PLoS One*,2012,7(11):e48734.

[11] Yao W,Sung L A. Specific expression of E - Tmod (Tmod1) in horizontal cells; implications in neuronal cell mechanics and glaucomatous retina [J]. *Molecular & Cellular Biomechanics: MCB*,2009,6(1):71-82.

[12] Suzuki T,Kasamatsu A,Miyamoto I,et al. Overexpression of TMOD1 is associated with enhanced regional lymph node metastasis in human oral cancer[J]. *International Journal of Oncology*,2016,48(2):607-612.

[13] Fowler V M, Moyer J, Nowak R B, et al. Expression of tropomodulin1 (Tmod1) in the heart rescues embryonic lethality of Tmod1 null mice and results in a mild hemolytic anemia due to absence of Tmod1 in red blood cells [J]. *Blood*,2005,106(11):807.

[14] Xiao Z,Zheng H,Liu X H,et al. The switch role of the Tmod4 in the regulation of balanced development between myogenesis and adipogenesis[J]. *Gene*,2013,532(2):263-271.

[15] 乔 永. 湖羊羔羊不同部位肌肉肌内脂肪沉积相关基因表达的发育性变化研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.

[16] Nworu C U, Kraft R, Schnurr D C, et al. Leiomodlin 3 and tropomodulin 4 have overlapping functions during skeletal myofibrillogenesis[J]. *Journal of Cell Science*,2015,128(2):239-250.