

畜試黑豬肌肉生長抑制素互補DNA選殖及其 mRNA 表現量與新生仔豬出生體重相關性分析⁽¹⁾

劉芳爵^{(2) (4)} 陳全木⁽³⁾

收件日期：95年12月29日；接受日期：96年5月10日

摘要

本試驗目的探討畜試黑豬仔豬之出生體重與肌肉生長抑制素 mRNA 含量之相關性，同時進行畜試黑豬肌肉生長抑制素互補 DNA (cDNA) 核酸序列選殖、以及畜試黑豬與不同豬種間肌肉生長抑制素 cDNA 核酸序列分析。試驗結果顯示，在採集 6 胎出生 24 小時內新生畜試黑豬仔豬平均體重最輕和最重仔豬各 6 頭之後腿部位肌肉樣品，利用半定量 RT-PCR 方法分析肌肉生長抑制素之 mRNA 含量，出生體重較輕仔豬組 (1.0 ± 0.1 kg) 之肌肉生長抑制素 mRNA 表現量顯著高於體重較重仔豬組 (1.5 ± 0.2 kg) 約 1.97 倍，顯示肌肉生長抑制素基因表現量高可能具有抑制畜試黑豬仔豬出生體重之作用。試驗並利用逆轉錄作用聚合酶鏈反應產生 cDNA 產物，再用 nested PCR 方法，選殖畜試黑豬肌肉生長抑制素 cDNA 之編碼區域 1128 bp，並將其接合於 pGEM-T Easy 載體，轉形至大腸桿菌中，經大量培養後，萃取質體 DNA 進行序列分析，並將定序完成之核酸資料，利用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 與 DNAMAN 套裝軟體比對序列，確認畜試黑豬其肌肉生長抑制素之 cDNA 序列與梅山豬、杜洛克與約克夏等豬種相似度為 100%，將可供後續進行基因功能分析與調控之研究。

關鍵詞：肌肉生長抑制素、出生體重、核酸定序、豬。

緒言

依據畜試所民國 91 至 93 年間，有關畜試黑豬一號母豬之分娩窩仔數、分娩活仔豬頭數及離乳仔豬頭數，成績分別為 10.1、7.9 與 6.8 頭，同時在仔豬出生均體重為 1.27 ± 0.25 kg，與商業用 LY 二品種母豬繁殖性狀比較有偏低之現象。分析畜試黑豬仔豬在分娩活仔豬頭數和離乳仔豬頭數偏低，除母豬個體因素之外，部分原因，可能受仔豬出生體重略低和整齊度較差所致，容易造成剛出生體型較小之仔豬吮乳不易，進而導致新生仔豬發生餓死現象 (蔡等，2003)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1364 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 國立中興大學生命科學系。

(4) 通訊作者，E-mail：fcliu@mail.tlri.gov.tw。

Shaoqan *et al.* (1998) 文獻指出，新生體重較輕之仔豬和幼鼠，在肌肉生長抑制素 (myostatin) mRNA表現量有較高現象，顯示肌肉生長抑制素會影響新生仔豬和幼鼠之出生體重。當肌肉生長抑制素mRNA表現量下降時，反而具有提高家畜肌肉量之作用 (McPherron and Lee, 1997)。本所營養組曾試圖利用提高飼糧離胺酸含量改善畜試黑豬仔豬和肉豬之生長性能，但效果不顯著 (劉及徐，2000)。McConnell *et al.* (1971) 指出豬隻之瘦肉表現量與離胺酸利用率呈正相關，推測畜試黑豬離胺酸利用率不佳之原因，部分可能受肌肉生長抑制素基因的影響。在抑制肌肉生長抑制素基因表現之方法，最常以造成該基因突變方式，達到抑制該基因作用之目的 (Szabo *et al.*, 1998)。因此，本試驗在分析畜試黑豬仔豬之出生體重與肌肉生長抑制mRNA量之相關性，同時選殖畜試黑豬肌肉生長抑制素cDNA核酸序列，俾供後續進行基因功能分析與調控之研究，改善畜試黑豬仔豬之出生體重、整齊度與育成率。

材料與方法

I. 試驗動物

試驗採用24小時內新生之畜試黑豬仔豬共12頭，由6胎新生仔豬中，分別選取體重最輕與最重仔豬各6頭之後腿部位肌肉樣品，萃取肌肉之總核糖核酸 (total RNA)，供進行mRNA表現量分析。畜試黑豬母豬於懷孕期至分娩後24小時期間，母豬飼糧之營養分需要量均依照「台灣地區飼養標準—豬 (1990)」推薦量配製，飼養期間採任飼並供應充足之清潔飲水。

II. 總核糖核酸萃取與互補去氧核糖核酸 (cDNA)

肌肉total RNA之萃取方法，主要依據 TRIzol reagent萃取RNA試劑組說明書建議之步驟 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA)，首先取約 1 g肌肉加入TRIzol後，經離心、75%酒精清洗與用異丙醇沉澱以及風乾等步驟後，得到肌肉之Total RNA。再取 300 μ g total RNA，利用 poly (A⁺) RNA with the FastTrack[®] MAG mRNA 分離 mRNA 套組 (Invitrogen Carlsbad)，分離與純化帶有 poly (A⁺) 之RNA，再取 5 μ l poly (A⁺) RNA，進行 RT-PCR 產生 cDNA 產物，此步驟之實施方法採用SuperScrip[™] III Reverse Transcriptase 分析套組說明書推薦之步驟 (Invitrogen Carlsbad)。

III. 肌肉生長抑制素 mRNA表現量之分析、肌肉生長抑制素cDNA選殖以及序列分析

將肌肉cDNA試驗樣品，利用primer3 web-based PCR primer prediction網站提供之引子設計軟體，設計肌肉生長抑制素專一性之引子，進行PCR增幅300 bp之肌肉生長抑制素cDNA產物，其專一性之引子，分別為前置引子5'-CTGTGATG AGCACTCAACAGAATC-3'與反制引子5'-TCACACTCTCCAGAGCAGTAA C TG-3'，同時其PCR反應條件為94℃ 2分鐘分離雙股DNA成單股DNA，接續進行30循環之增幅，分別以94℃ 30秒、65℃ 30秒與72℃ 30秒等條件進行。另外設計一組引子作為內部控制組 (internal control)，採用GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) 之cDNA序列，利用前述軟體設計其引子，增幅300 bp之GAPDH PCR產物，其引子分別為前置引子5'-ATTGCCCTCAACGACCACT-3'與反置引子5'-GAGGCCATGTGGACCATGA-3'，PCR反應條件為94℃ 2分鐘做為分離雙股DNA，接續進行30循環之增幅，條件分別為 94℃ 30秒、63℃ 30秒與72℃ 30秒進行。取10 μ L之PCR產物，進行1.5%瓊脂膠片電泳，以溴化乙錠染色，照像記錄。電泳圖形運用數位式影像分析 (Molecular imager VersaDoc System; Bio-rad) 掃描至電腦中，以軟體 (PDQuest[™] version 7.3.1; Bio-rad) 分析每條量亮帶之相對亮度並以此定量。

肌肉生長抑制素 mRNA之選殖，運用巢式聚合酶連鎖反應方法，利用上述軟體設計其專一性之引子，分別為前置引子 5'-GGTGTGGCAAGTTGTCT CTCA-3' 與反置引子 5'-ACTTCATG AGCACCCACAGA-3'，PCR反應條件為94℃ 2分鐘做為分離雙股DNA，接續進行30循環之增幅，條件分別為94℃ 30秒、57℃ 30秒與72℃ 30秒。將選殖之PCR產物，利用T4 結合酶連結於pGEM-T Easy載體（如圖1；Promega, Madison, WI, USA），再利用42℃ 時間為45秒進行熱衝擊（heat shock），將該載體送入大腸桿菌，接著立即冰浴15分鐘，隨後塗抹於已添加 7 μ L IPTG（20%；isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside; Sigma, CA, USA）、40 μ L X-gal（2%；bromo-4-chloro-3-indolyl-b -D-galacto-pyranoside; Sigma）與 50 pmole/ μ L ampicillin之LB agar（Luria - Bertani agar; Difco, Detroit, MI, USA），於37℃下過夜培養。篩選培養基上呈白色菌落者，將其挑至含 50 pmole/ μ L ampicillin的LB液體培養基中，在37℃下振盪培養（140 rpm）18小時。取1.5 ml菌液於微量離心管中，以套組QIAprep plasmid（Qiagen Inc.）抽取質體DNA，並以 dideoxy chain termination method 進行核酸序列定序，以及利用Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）進行核酸序列比對。不同豬種間肌肉生長抑制素cDNA序列比對，則採用套裝軟體DNAMAN Version 4.115 multiple sequence alignment，進行比對分析。

IV. 統計分析

試驗之各項數據採用 SAS（1999）電腦套裝軟體進行統計分析，以一般線性模式程序（GLM）進行變方分析，並以鄧肯氏多變域測定法（Duncan's multiple range test）比較處理組平均值間之差異顯著性。

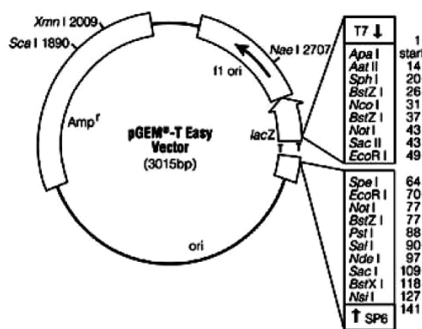


圖 1. pGEM-T Easy 載體。

Fig. 1. The map of pGEM-T Easy Vector.

結果與討論

I. 畜試黑豬新生仔豬體重與肌肉生長抑制素 mRNA表現量相關性分析

比較分析畜試黑豬新生仔豬體重與肌肉生長抑制素 mRNA表現量之相關性，採集出生24小時內新生畜試黑豬仔豬體重最輕組（1.0 \pm 0.1 kg）和最重組（1.5 \pm 0.2 kg）之肌肉樣品，將肌肉樣品利用萃取總RNA試劑，將約 1 g 肌肉中之總RNA萃取出後，利用MMLV逆轉錄酶進行RT-

PCR藉以得到肌肉樣品之cDNA產物，並利用可增幅300 bp PCR產物之肌肉生長抑制素與GAPDH之引子對，進行PCR反應，利用1.5% 瓊脂膠片進行電泳與利用PDQuest™軟體，進行肌肉生長抑制素與GAPDH mRNA表現量之分析。結果如圖2與3所示，出生體重較輕仔豬組其肌肉生長抑制素 mRNA表現量 ($69 \text{ ng}/5 \mu\text{l}$) 高於體重較重仔豬組1.97倍 ($35 \text{ ng}/5 \mu\text{l}$)，而此結果與Shaoqan *et al.* (1998) 文獻結論相似。前述之結果顯示，肌肉生長抑制素基因表現量高可能具有抑制畜試黑豬仔豬出生體重之作用。

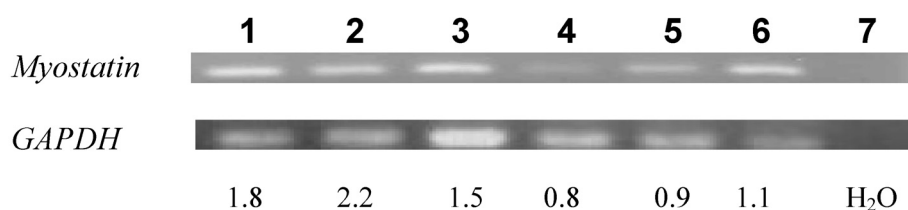


圖 2. 半定量方法分析肌肉生長抑制素mRNA含量。

Fig. 2. The amount of *myostatin* mRNA amplified by Semi-quantitative RT-PCR. The level of *myostatin* mRNA in low birth weight ($1.0 \pm 0.1 \text{ kg}$) were higher than those of high birth weight ($1.5 \pm 0.2 \text{ kg}$) ; (top panel, right lanes 1-3 showed *myostatin* mRNA levels from piglets of the lower birth weight (top panel, left lanes 4-6 showed *myostatin* mRNA levels from the higher birth weight piglets, lane 7 showed negative control) . Bottom panel showed *GAPDH* as internal controls.

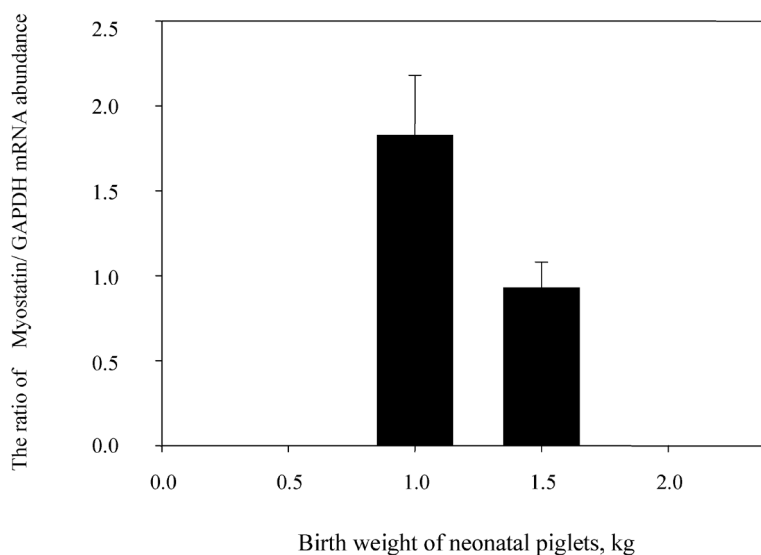


圖 3. 半定量方法分析仔豬體重與肌肉生長抑制mRNA含量柱狀圖。

Fig. 3. The bar graph between amount *myostatin* mRNA and birth weight of neonatal piglets by Semi-quantitative RT-PCR of bar scheme.

II. 畜試黑豬肌肉生長抑制素cDNA序列選殖、核酸序列分析與豬種間之序列比對

採用畜試黑豬一號仔豬之後腿肌肉樣品，進行總核糖核酸萃取純化，再利用poly (A⁺) RNA with the FastTrack[®] MAG mRNA 分離mRNA套組，得到帶有poly (A⁺) RNA，並取 5 μ l poly (A⁺) RNA，進行 RT-PCR 得到 cDNA 產物。再運用專一性引子，以nested PCR產生 1254 bp之產物（如圖4），並將其接合於pGEM-T Easy載體上，再將其轉形至大腸桿菌細胞後，培養於LB 培養液中，最後抽出質體DNA，利用限制酶 *EcoR* I 進行分切，確認該1254 bp之cDNA，已接合於pGEM-T Easy載體上（圖5）。接續進行核酸序列定序，運用前置引子 T7: 5'-GATTAGGTGACACTATAG-3'與反置引子 SP6: 5'-TAATACGACTCACTATA GGG-3'，將 1254 bp PCR產物之核酸序列定序完成，並將定序完成之核酸資料利用NCBI (national center for biotechnology information) 網站提供之核苷酸-核苷酸-BLAST比對序列，結果顯示畜試黑豬肌肉生長抑制素編碼區域之1128 bp mRNA完全與NCBI 網站GENBANK豬肌肉生長抑制素之mRNA核酸序列相符 (Accession number: AF019623)。另外在豬種間肌肉生長抑制素之mRNA核酸序列比對，結果顯示畜試黑豬一號編碼區域之1128 bp肌肉生長抑制素mRNA核苷酸序列與梅山豬、杜洛克豬、約克夏等豬種肌肉生長抑制素mRNA相似度為100%（圖6）。

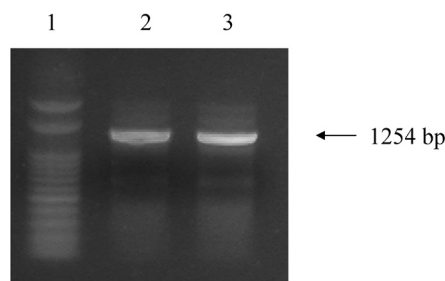


圖 4. 運用nested PCR方法選殖肌肉生長抑制素之cDNA。

Fig. 4. Cloning the full length cDNA of *myostatin* with nested PCR.

Lane 1 represented 100 bp DNA marker.

Lane 2-3 represented 1254 bp of *myostatin* cDNA.

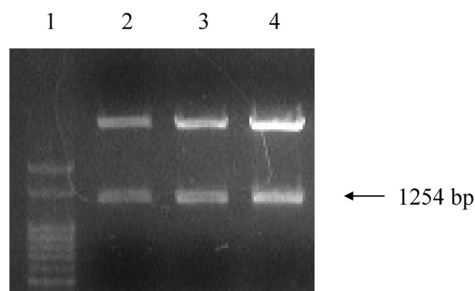


圖 5. 以限制酶確認分析肌肉生長抑制素 1254 bp cDNA結合於pGEM-T Easy載體。

Fig. 5. Identification of *myostatin* 1254 bp cDNA ligated into pGEM-T Easy Vector by restriction enzyme digestion.

Lane 1 represents 100 bp DNA marker.

Lane 2-4 represent plasmid DNA ligated 1254 bp *myostatin* cDNA fragment cut by *EcoR* I restriction enzyme.

Yorkshire myostatin mRNA	0
Duroc myostatin mRNA	0
Meishan myostatin mRNA	0
TLRI myostatin mRNA	gacgtcgcacatgctccccggcccatggcggccgcggaat	40
Consensus		
Yorkshire myostatin mRNA	0
Duroc myostatin mRNA	0
Meishan myostatin mRNA	0
TLRI myostatin mRNA	tcgatttggtgtggcaagtgtgtctctcagacagtgcaggca	80
Consensus		
Yorkshire myostatin mRNA	0
Duroc myostatin mRNA	0
Meishan myostatin mRNA	0
TLRI myostatin mRNA	ttaaaaatgttctgttgccgttactcaaaagcaaaagtataaa	120
Consensus		
Yorkshire myostatin mRNA	0
Duroc myostatin mRNA	0
Meishan myostatin mRNA	0
TLRI myostatin mRNA	ggaagaataggaacaaggaggaagattgtattgatttta	160
Consensus		
Yorkshire myostatin mRNAATGCAAAAACCTGCAAACTCTATGTTTATATTTACCT	35
Duroc myostatin mRNAATGCAAAAACCTGCAAACTCTATGTTTATATTTACCT	35
Meishan myostatin mRNAATGCAAAAACCTGCAAACTCTATGTTTATATTTACCT	35
TLRI myostatin mRNA	aaatcATGCAAAAACCTGCAAACTCTATGTTTATATTTACCT	200
Consensus	atgcaaaaaactgcaaatctatgtttatatatttacct	
Yorkshire myostatin mRNA	GTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCCGTGGATCTGAATGAG	75
Duroc myostatin mRNA	GTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCCGTGGATCTGAATGAG	75
Meishan myostatin mRNA	GTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCCGTGGATCTGAATGAG	75
TLRI myostatin mRNA	GTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCCGTGGATCTGAATGAG	240
Consensus	gtttatgctgattgttgcctgggtcccggtggatctgaatgag	
Yorkshire myostatin mRNA	AACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGT	115
Duroc myostatin mRNA	AACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGT	115
Meishan myostatin mRNA	AACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGT	115
TLRI myostatin mRNA	AACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGGAAAAAGAGGGGCTGT	280
Consensus	aacagcgagcaaaaggaaaatgtggaaaaagaggggctgt	
Yorkshire myostatin mRNA	GTAATGCAATGTATGTGGAGACAAAACACTAAATCTTCAAG	155
Duroc myostatin mRNA	GTAATGCAATGTATGTGGAGACAAAACACTAAATCTTCAAG	155
Meishan myostatin mRNA	GTAATGCAATGTATGTGGAGACAAAACACTAAATCTTCAAG	155
TLRI myostatin mRNA	GTAATGCAATGTATGTGGAGACAAAACACTAAATCTTCAAG	320
Consensus	gtaatgcatgtatgtggagacaaaacactaaatcttcaag	
Yorkshire myostatin mRNA	ACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATCCTCAGTAAACTTCGC	195
Duroc myostatin mRNA	ACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATCCTCAGTAAACTTCGC	195
Meishan myostatin mRNA	ACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATCCTCAGTAAACTTCGC	195
TLRI myostatin mRNA	ACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATCCTCAGTAAACTTCGC	360
Consensus	actagaagccataaaaaatcaaatcctcagttaaacttcgc	
Yorkshire myostatin mRNA	CTGGAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGAC	235
Duroc myostatin mRNA	CTGGAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGAC	235
Meishan myostatin mRNA	CTGGAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGAC	235
TLRI myostatin mRNA	CTGGAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGAC	400
Consensus	ctggaaacagctcctaaccattagcaaaagatgctataagac	
Yorkshire myostatin mRNA	AACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGA	275
Duroc myostatin mRNA	AACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGA	275
Meishan myostatin mRNA	AACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGA	275
TLRI myostatin mRNA	AACTTTTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAAGTATTGA	440
Consensus	aacttttggcccaaagctcctccactccgggaactgattga	
Yorkshire myostatin mRNA	TCAGTACGATGTCCAGAGAGATGACAGCAGTGATGGCTCC	315
Duroc myostatin mRNA	TCAGTACGATGTCCAGAGAGATGACAGCAGTGATGGCTCC	315
Meishan myostatin mRNA	TCAGTACGATGTCCAGAGAGATGACAGCAGTGATGGCTCC	315
TLRI myostatin mRNA	TCAGTACGATGTCCAGAGAGATGACAGCAGTGATGGCTCC	480
Consensus	tcagtacgatgtccagagagatgacagcagtgatggctcc	
Yorkshire myostatin mRNA	TTGGAAGATGATGATTATCAGCTACGACGGAACGATCA	355
Duroc myostatin mRNA	TTGGAAGATGATGATTATCAGCTACGACGGAACGATCA	355

Meishan myostatin mRNA	TTGGAAGATGATGATTATCACGCTACGACGGAAACGATCA	355
TLRI myostatin mRNA	TTGGAAGATGATGATTATCACGCTACGACGGAAACGATCA	520
Consensus	ttggaagatgatgattatcacgctacgacggaaacgatca	
Yorkshire myostatin mRNA	TTACCATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGA	395
Duroc myostatin mRNA	TTACCATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGA	395
Meishan myostatin mRNA	TTACCATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGA	395
TLRI myostatin mRNA	TTACCATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGA	560
Consensus	ttaccatgcctacagagtctgatcttctaagtgcagtgga	
Yorkshire myostatin mRNA	AGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAA	435
Duroc myostatin mRNA	AGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAA	435
Meishan myostatin mRNA	AGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAA	435
TLRI myostatin mRNA	AGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTTAAATTTAGCTCTAAA	600
Consensus	aggaaaacccaaatgctgcttctttaaatttagctctaaa	
Yorkshire myostatin mRNA	ATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATAT	475
Duroc myostatin mRNA	ATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATAT	475
Meishan myostatin mRNA	ATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATAT	475
TLRI myostatin mRNA	ATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATAT	640
Consensus	atacaatacaataaagtagtaaaggcccaactgtggatata	
Yorkshire myostatin mRNA	ATCTGAGACCCGTCAGAGACTCCTACAACAGTGTGTTGTGCA	515
Duroc myostatin mRNA	ATCTGAGACCCGTCAGAGACTCCTACAACAGTGTGTTGTGCA	515
Meishan myostatin mRNA	ATCTGAGACCCGTCAGAGACTCCTACAACAGTGTGTTGTGCA	515
TLRI myostatin mRNA	ATCTGAGACCCGTCAGAGACTCCTACAACAGTGTGTTGTGCA	680
Consensus	atctgagacccgtcagagactcctacaacagtgtgtgtgca	
Yorkshire myostatin mRNA	AATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGG	555
Duroc myostatin mRNA	AATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGG	555
Meishan myostatin mRNA	AATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGG	555
TLRI myostatin mRNA	AATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGG	720
Consensus	aatcctgagactcatcaaaccatgaaagacggtacaagg	
Yorkshire myostatin mRNA	TATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAG	595
Duroc myostatin mRNA	TATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAG	595
Meishan myostatin mRNA	TATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAG	595
TLRI myostatin mRNA	TATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAG	760
Consensus	tatactggaatccgatctctgaaacttgacatgaacccag	
Yorkshire myostatin mRNA	GCACCTGGTATTGTCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTG	635
Duroc myostatin mRNA	GCACCTGGTATTGTCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTG	635
Meishan myostatin mRNA	GCACCTGGTATTGTCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTG	635
TLRI myostatin mRNA	GCACCTGGTATTGTCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTG	800
Consensus	gcactgggtatttggcagagcattgatgtgaagacagtgtt	
Yorkshire myostatin mRNA	GCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTTAGGCATT	675
Duroc myostatin mRNA	GCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTTAGGCATT	675
Meishan myostatin mRNA	GCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTTAGGCATT	675
TLRI myostatin mRNA	GCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAATCCAACCTTAGGCATT	840
Consensus	gcaaaattggctcaaacaacctgaatccaacttaggcatt	
Yorkshire myostatin mRNA	GAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTG	715
Duroc myostatin mRNA	GAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTG	715
Meishan myostatin mRNA	GAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTG	715
TLRI myostatin mRNA	GAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTG	880
Consensus	gaaatcaaagcttttagatgagaatgggtcatgatcttgctg	
Duroc myostatin mRNA	TAACCTTCCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCCCTT	755
Meishan myostatin mRNA	TAACCTTCCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCCCTT	755
TLRI myostatin mRNA	TAACCTTCCCAGGACCAGGAGAAGATGGGCTGAATCCCTT	920
Consensus	taaccttcccaggaccaggagaagatgggctgaatccctt	
Yorkshire myostatin mRNA	TTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCCAGG	795
Duroc myostatin mRNA	TTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCCAGG	795
Meishan myostatin mRNA	TTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCCAGG	795
TLRI myostatin mRNA	TTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACACCAAAAAGATCCAGG	960
Consensus	tttagaagtcaaggtaacagacacaccaaaaagatccagg	
Yorkshire myostatin mRNA	AGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTCAACAGAAT	835
Duroc myostatin mRNA	AGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTCAACAGAAT	835
Meishan myostatin mRNA	AGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTCAACAGAAT	835
TLRI myostatin mRNA	AGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTCAACAGAAT	1000
Consensus	agagattttggactcgactgtgatgagcactcaacagaat	

Yorkshire myostatin mRNA	CTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGC	875
Duroc myostatin mRNA	CTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGC	875
Meishan myostatin mRNA	CTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGC	875
TLRI myostatin mRNA	CTCGATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGC	1040
Consensus	ctcgatgctgctgcttaccctctaactgtggatttttgaagc	
Yorkshire myostatin mRNA	TTTTGGATGGGACTGGATTATTGCACCCAAAAGATATAAG	915
Duroc myostatin mRNA	TTTTGGATGGGACTGGATTATTGCACCCAAAAGATATAAG	915
Meishan myostatin mRNA	TTTTGGATGGGACTGGATTATTGCACCCAAAAGATATAAG	915
TLRI myostatin mRNA	TTTTGGATGGGACTGGATTATTGCACCCAAAAGATATAAG	1080
Consensus	ttttggatgggactggattattgcacccaaaagatataag	
Yorkshire myostatin mRNA	GCCAGTTACTGCTCTGGAGAGTGTGAATTTGTATTTTAC	955
Duroc myostatin mRNA	GCCAGTTACTGCTCTGGAGAGTGTGAATTTGTATTTTAC	955
Meishan myostatin mRNA	GCCAGTTACTGCTCTGGAGAGTGTGAATTTGTATTTTAC	955
TLRI myostatin mRNA	GCCAAATTACTGCTCTGGAGAGTGTGAATTTGTATTTTAC	1120
Consensus	gccaa ttactgctctggagagtggtgaattttgtatttttac	
Yorkshire myostatin mRNA	AAAAATACCCCTCACACTCATCTTGTGCACCAAGCAAACCC	995
Duroc myostatin mRNA	AAAAATACCCCTCACACTCATCTTGTGCACCAAGCAAACCC	995
Meishan myostatin mRNA	AAAAATACCCCTCACACTCATCTTGTGCACCAAGCAAACCC	995
TLRI myostatin mRNA	AAAAATACCCCTCACACTCATCTTGTGCACCAAGCAAACCC	1160
Consensus	aaaaataccctcacactcatcttgtgcaccaagcaaaccc	
Yorkshire myostatin mRNA	CAGAGGTTTCAGCAGGCCCTGCTGTACTCCACAAAGATG	1035
Duroc myostatin mRNA	CAGAGGTTTCAGCAGGCCCTGCTGTACTCCACAAAGATG	1035
Meishan myostatin mRNA	CAGAGGTTTCAGCAGGCCCTGCTGTACTCCACAAAGATG	1035
TLRI myostatin mRNA	CAGAGGTTTCAGCAGGCCCTGCTGTACTCCACAAAGATG	1200
Consensus	cagaggtttcagcaggccctgctgtactccacaaagatg	
Yorkshire myostatin mRNA	TCTCCAATCAATATGCTATATTTTAATGGCAAAGAACAAA	1075
Duroc myostatin mRNA	TCTCCAATCAATATGCTATATTTTAATGGCAAAGAACAAA	1075
Meishan myostatin mRNA	TCTCCAATCAATATGCTATATTTTAATGGCAAAGAACAAA	1075
TLRI myostatin mRNA	TCTCCAATCAATATGCTATATTTTAATGGCAAAGAACAAA	1240
Consensus	tctccaatcaatatgctatatattttaatggc aaagaacaaa	
Yorkshire myostatin mRNA	TAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTG	1115
Duroc myostatin mRNA	TAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTG	1115
Meishan myostatin mRNA	TAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTG	1115
TLRI myostatin mRNA	TAATATATGGGAAAATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTG	1280
Consensus	taatatatgggaaaattccagccatggtagtagatcgctg	
Yorkshire myostatin mRNA	TGGGTGCTCATGa.....	1128
Duroc myostatin mRNA	TGGGTGCTCATGa.....	1128
Meishan myostatin mRNA	TGGGTGCTCATGa.....	1128
TLRI myostatin mRNA	TGGGTGCTCATGagataataactagtggaattcgcgccgc	1320
Consensus	tgggtgctcatga	
Yorkshire myostatin mRNA	1128
Duroc myostatin mRNA	1128
Meishan myostatin mRNA	1128
TLRI myostatin mRNA	ctgcagggtcgaccatatgggagagctcccaacgcgttggg	1360
Consensus		
Yorkshire myostatin mRNA	1128
Duroc myostatin mRNA	1128
Meishan myostatin mRNA	1128
TLRI myostatin mRNA	tgcatagc	1368
Consensus		

圖 6. 運用DNAMAN軟體進行豬種間肌肉生長抑制素互補DNA核酸序列比對。

Fig. 6. Using the DNAMAN software to align mRNA between different porcine Species. TLRI was abbreviated from TLRI No.1 Black Pigs.

總合上述結果，利用半定量RT-PCR方法，分析畜試黑豬出生體重較輕仔豬之肌肉生長抑制素 mRNA 表現量顯著高於體重較重仔豬約1.97倍，顯示肌肉生長抑制素基因表現量高可能具有抑制仔豬出生體重之作用。同時此試驗已完成畜試黑豬肌肉生長抑制素 mRNA 完整之核酸序列選殖，俾供後續進行該基因功能分析與調控之研究。

參考文獻

- 臺灣地區養豬飼養標準編輯委員會。1990。臺灣地區飼養標準－豬。臺灣地區養豬飼養標準編輯委員會編。台北。台灣。
- 蔡金生、劉建甫、李茂盛、陳添福、蘇天明、顏念慈、廖宗文、黃鈺嘉、張秀鑾、陳義雄、王政騰。2003。畜試黑豬繁殖性能及生長性能之探討。畜產研究 36 (4) : 317-325。
- 劉芳爵、徐阿里。2000。熱能與離胺酸對台灣黑豬與三品種雜交肉豬生長性能及屠體性狀之影響。畜產研究 33 (2) : 165-174。
- McConnell, J. C., K. M. Barth and S. A. Griffin. 1971. Nutrient digestibility and nitrogen metabolism studies at different stages of growth with fat and lean type swine fed two levels of protein. J. Anim. Sci. 32 (4) : 654-657.
- McPherron, A. C. and S. J. Lee. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 12457-12461.
- SAS. 1999. SAS User's Guide: Statistics, Release 6.12 ed., SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Shaoquan, J. I., R. L. Losinski, S. G. Corenelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. F. S. Depreux and M. E. Spurlock. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: Tissue specificity and developmental and postnatal regulation. Am. J. Physiol. 275 (44) : R1265-R1273.
- Szabo, G., G. Dallmann, G. Muller, L. Patthy, M. Soller and L. Varga. 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. Mamm. Genome 9 : 671-672.

Cloning of myostatin cDNA and analysis of the relation between birth weight and myostatin mRNA expression levels of neonatal TLRI No.1 black pigs⁽¹⁾

Fang-Chueh Liu^{(2) (4)} and Chuan-Mu Chen⁽³⁾

Received : Dec. 29, 2006 ; Accepted : May 10, 2007

Abstract

The objective of this study was to survey the relation between *myostatin* mRNA amounts and birthweight of neonatal TLRI No.1 black pigs, and to clone the *myostatin* cDNA. Skeletal muscle of hind legs from neonatal piglets of lower (1.0 ± 0.1 kg, $n = 6$) and heavier birthweight (1.5 ± 0.2 kg, $n = 6$) were sampled, and the amounts of *myostatin* mRNA were determined by using semi-quantitative RT-PCR. The result showed the *myostatin* mRNA amounts of the piglets with lower birthweight was 1.97 times higher than those with heavier birthweight. The results suggested that *myostatin* gene might possess unique impact on neonatal TLRI No.1 black pig. In *myostatin* cDNA cloning, methodologies adopted the reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) to yield first strand cDNA and performed the nest-PCR to generate 1128 bp *myostatin* cDNA. Afterward the amplified cDNA was ligated into pGEN-T vector, and then transformed the ligated vectors into competent cells and inoculated the transformed competent cells into LB broth and culture at 37°C for overnight. The plasmid DNA was extracted from cultivated competent cells which was applied to perform nucleotides sequencing using the dideoxy chain termination method and aligned its sequencing identity using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). The results showed that sequencing identity of *myostatin* cDNA sequences extracted from TLRI No. 1 black pig was consistent with other porcine species such as Meishan, Duroc and Yorkshire. Therefore, the preliminary results suggested that we might further apply the cloned *myostatin* cDNA to investigate its gene function or regulative mechanism.

Key words: Myostatin, Birth weight, Nucleotide sequencing, Pig.

(1) Contribution No.1364 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture.

(2) Nutrition Division, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Life Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw