

# 豬肌肉生長抑制素前胜肽cDNA之選殖與表現載體之構築<sup>(1)</sup>

劉芳爵<sup>(2) (4)</sup> 陳全木<sup>(3)</sup>

收件日期：96年4月15日；接受日期：96年7月2日

## 摘要

本試驗目的在進行肌肉生長抑制素前胜肽（myostatin propeptide）cDNA之選殖與其表現載體之構築，並將其轉形至酵母菌宿主細胞，藉以表現外源性之肌肉生長抑制素前胜肽產物。試驗採用已選殖1128 bp 肌肉生長抑制素互補去氧核糖核酸（cDNA）作為模板，利用巢式聚合酶連鎖反應（Nest PCR）選殖，合成828 bp之肌肉生長抑制素前胜肽PCR產物，並用限制酶截切，將肌肉生長抑制素前胜肽cDNA序列，再將之接入pGAPZ  $\alpha$  A中，完成表現載體（pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide）之建構。同時利用瓊脂電泳與限制酶截切、核苷酸序列分析與比對，確認肌肉生長抑制素前胜肽之開放譯讀框架沒有被破壞。並將此構築完成之表現載體轉形至酵母細胞，再經SDS-PAGE與西方墨點法分析，確認有2株具有較高表現外源性重組肌肉生長抑制素前胜肽之酵母菌轉形株。

關鍵詞：質體、前胜肽、表現載體。

## 緒言

依據本所畜試黑豬一號母豬之繁殖性能資料，其平均窩仔數、分娩活仔豬數和離乳仔豬數分別為10.1、7.9與6.8頭，且出生體重為 $1.27 \pm 0.25$  kg（蔡等，2003），顯示畜試黑豬在仔豬之分娩活仔豬數和離乳仔豬數有偏低現象，除母豬影響因素之外，部分原因受仔豬出生體重略低和整齊度較差所致，因此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。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mRNA表現量有較高現象，顯示肌肉生長抑制素和新生仔豬和幼鼠之出生體重有關。相反地，當肌肉生長抑制素mRNA表現量降低時，則反而有提高家畜禽肌肉量之作用（Jennifer *et al.*, 2002）。在抑制肌肉

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1370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

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）。近年來研究發現，小鼠之肌肉生長抑制素氮端（N-terminal）約 276 個胺基酸勝肽（肌肉生長抑制素前勝肽），具有抑制其基因表現之作用（Bogdanovich *et al.*, 2005）。因此，本試驗利用肌肉生長抑制素前勝肽編碼基因選殖以及建構肌肉生長抑制素前勝肽表現載體，俾供轉染至酵母菌宿主細胞，大量表現外源性肌肉生長抑制素前勝肽，並運用其調控肌肉生長抑制素基因表現，提升畜試黑豬仔豬之出生體重、育成率以及母豬之泌乳能力。

## 材料與方法

### I. 肌肉生長抑制素 cDNA 之選殖

運用已選殖豬肌肉生長抑制素 cDNA 作為模板，設計帶有 *EcoR* I 和 *Xba* I 兩個限制酶切位之致突變引子對（圖1），分別為前置引子5'-TGAATTCATGCAAAC TG C-3'與反置引子5'-TCTAGAGGATCTTTTGG-3'，利用巢式聚合酶連鎖反應方法，選殖 828 bp 肌肉生長抑制素前勝肽 cDNA，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℃、1分鐘以及1次之72℃、7分鐘延伸循環，合成肌肉生長抑制素前勝肽 cDNA。將選殖之PCR 產物，利用 T4 結合酶連結於 pGEM-T Easy 載體（如圖2；Promega, Madison），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  $\mu$ L IPTG（20%；isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside；Sigma）、40  $\mu$ L X-gal（2%；bromo-4-chloro- 3-indolyl-b -D- galacto-pyranoside；Sigma）與 50 pmole/ $\mu$ L ampicillin之LB agar（Luria - Bertani agar；Difco, Detroit, MI, USA），於 37℃ 下過夜培養，將該培養皿存放於 4℃ 冰箱中。

### II. 肌肉生長抑制素前勝肽 cDNA 之表現載體之構築與篩選

將帶肌肉生長抑制素前勝肽之大腸桿菌接種於 LB 培養液中，在 37℃ 培養箱培養 16 小時，萃取其質體 DNA，利用 *EcoR* I 和 *Xba* I 兩個限制酶截切產生 828 bp之肌肉生長抑制素前勝肽 cDNA。在表現載體之構築方面，選用 *Pichia* 之 pGAPZ  $\alpha$  A作為肌肉生長抑制素前勝肽之表現載體（Invitrogen Cor., California, USA），同時利用 *EcoR* I 和 *Xba* I 兩個限制酶截切 pGAPZ  $\alpha$  A 表現載體，再利用 T4接合酶於16℃下經 24 小時將其兩者接合，完成表現載體之建構（pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide）。並將構築完成之 pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide 載體，利用 25  $\mu$ g/ml Zeocin抗生素（Invitrogen Cor., California, USA）取代 ampicillin 其餘步驟均與前述篩選方法相同，進行篩選帶有 pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide 表現載體之勝任細胞轉形株。

### III. DNA 序列分析與比對

- (i) 肌肉生長抑制素 cDNA 序列與嵌入表現載體之肌肉生長抑制素前勝肽之開放譯讀框架（open reading frame）分析與比對在肌肉生長抑制素 cDNA 序列分析，首先由培養皿中篩選培養基上呈白色菌落者，將其挑至含 50 pmole/ $\mu$ L ampicillin 抗生素的 LB 液體培養基中，在 37℃ 下振盪培養18小時。取 1.5 ml菌液於微量離心管中，以套組 QIAprep plasmid（Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA.）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。在嵌入表現載體之肌肉生長抑制素前胜肽之開放譯讀框架（open reading frame）分析與比對，除抗生素選用 25  $\mu$ g/ml Zeocin之外，其餘均與肌肉生長抑制素篩選方法相同。

- (ii) 表現重組肌肉生長抑制素前胜肽酵母菌轉形株之分析，將構築之肌肉生長抑制素前胜肽表現載體，利用電穿孔儀（electroporator; MicroPulser Electroporator, Bio-rad）將其轉形至酵母菌細胞，再利用含 100  $\mu$ g/ml Zeocin 抗生素 YPD Agar 篩選肌肉生長抑制素前胜肽之酵母菌轉形株，並將上述轉形株依序接種含 5、10 以及 20 倍 Zeocin 抗生素之 YPD Agar，最後將酵母菌之轉形株接種於 YPD 培養液培養 72 小時後，離心取其上清液，並利用 15% SDS-PAGE（Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis）和西方墨點法分析，篩選具有表現外源性重組肌肉生長抑制素前胜肽之酵母菌轉形株。

## 結果與討論

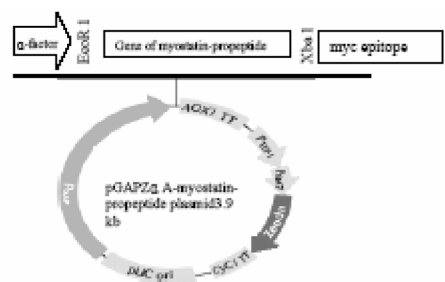
### I. 肌肉生長抑制素前胜肽 cDNA 之選殖

試驗採用帶有 1128 bp 肌肉生長抑制素 cDNA 核苷酸之大腸桿菌轉形株，經 LB 培養液培養後萃取其 DNA，作為選殖肌肉生長抑制素前胜肽之模板，利用致突變引子進行巢式聚合酶連鎖反應選殖出 828 bp 之肌肉生長抑制素前胜肽 cDNA（圖 2），再將其轉形至 DH5  $\alpha$  勝任細胞，再以 LB 培養液培養後萃取 DNA，並將上述質體 DNA 利用限制酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 截切與用 0.8% 瓊脂電泳分析，確認 PCR 產物為肌肉生長抑制素前胜肽之 cDNA（圖 3）。同時將上述 DNA 進行核苷酸定序，並將該核苷酸定序資料利用 NCBI（National center for biotechnology information）網站提供之核苷酸-核苷酸-BLAST 比對序列，確認該 PCR 產物帶有 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制酶切位以及肌肉生長抑制素前胜肽 cDNA 均與豬肌肉生長抑制素核苷酸序列相似度 100%（Yu *et al.*, 2005; Accession number NM214435）。

### II. 肌肉生長抑制素前胜肽表現載體之構築與分析

運用 *EcoR* I 和 *Xba* I 兩個限制酶截切上述勝任細胞之質體 DNA 與 pGAPZ  $\alpha$  A 之表現載體，利用 0.8% 瓊脂電泳回收用於肌肉生長抑制素前胜肽 cDNA（insert DNA）與 pGAPZ  $\alpha$  A 表現載體（圖 4），再用 T4 接合酶將兩者接合完成肌肉生長抑制素前胜肽表現載體（pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide）之建構。構築完成之 pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide 表現載體，再轉形至勝任細胞，利用含 Zeocin 抗生素培養皿進行篩選白色菌落，以及將其菌落接種於 LB 培養液培養後抽取其質體 DNA，利用 *EcoR* I 和 *Xba* I 兩個限制酶截切質體 DNA 最後確認肌肉生長抑制素前胜肽 cDNA 已接合於 pGAPZ  $\alpha$  A 表現載體上（圖 5），並將此質體 DNA 進行核苷酸序列分析，確認肌肉生長抑制素前胜肽之開放譯讀框架完整沒有被破壞（表 1; Yu *et al.*, 2005）。接續將構築之肌肉生長抑制素前胜肽表現載體，以限制酶 *Bal* II 截切進行線性化（linearization）後，再以電穿孔儀將此載體轉形至酵母細胞，並利用添加 100  $\mu$ g/ml Zeocin 抗生素培養皿，篩選肌肉生長抑制素前胜肽之酵母菌轉形株，同提高 Zeocin 抗生素添加濃度至 20 倍，藉以得到高肌肉生長抑制素前胜肽複製套數之酵母菌，結果共得到 4 株轉形株。再將此 4 株轉形株接種於 YPD 培養液培養 72 小時後，取其上清液並利用 SDS-PAGE 和西方墨點法分析，結果顯示其中 2 株酵母菌轉形株之重組肌肉生長抑制素前胜肽表現量較高（圖 6），可俾供後續大量表現外源性之肌肉生長抑制素前胜肽產物。

(A) pGAPZαA expression vector



(B) Mutagenic primer set

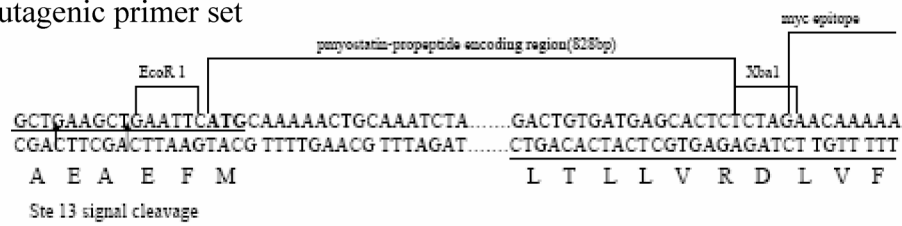


圖 1. 構築肌肉生長抑制素前勝肽表現載體之圖示。  
Fig. 1. The scheme of *myostatin propeptide* expression vector.

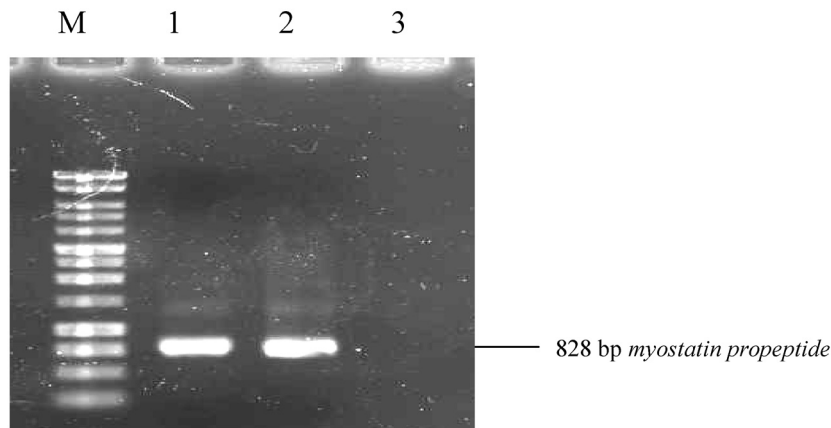


圖 2. 運用致突變引子增幅肌肉生長抑制素前勝肽 828 bp cDNA。  
Fig. 2. The 828 bp cDNA of *myostatin propeptide* was amplified with mutagenic primer set.  
M represented 1kb of DNA marker. Lanes 1 and 2 represented the PCR product of *myostatin propeptide*, respectively. Lane 3 represented H<sub>2</sub>O.

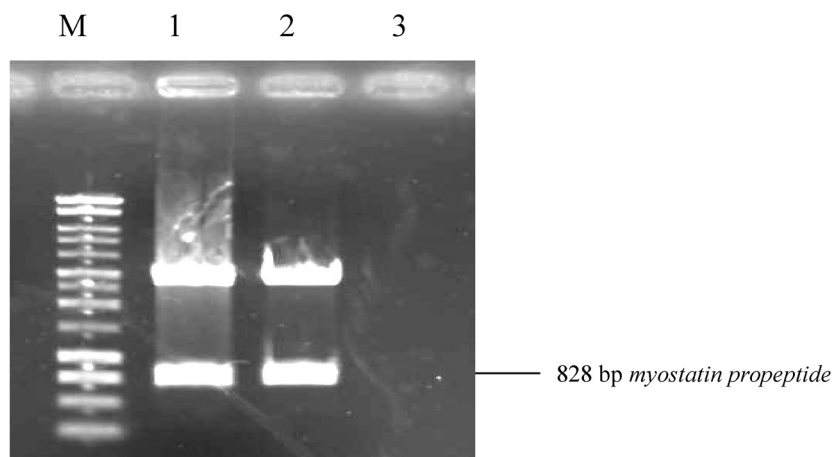


圖 3. 確認肌肉生長抑制素前勝肽之 828 bp cDNA 接合於 pGEM-T Easy 載體。

Fig. 3. Confirmation of pGEM-T Easy vector being ligated with *myostatin propeptide* cDNA (828 bp).

M represented 1 kb DNA marker. Lanes 1 and 2 respectively represented the plasmid DNA-extracted from competent cells being ligated with *myostatin propeptide* cDNA which was confirmed by *EcoR* I restriction enzyme digestion. Lane 3 represented H<sub>2</sub>O.

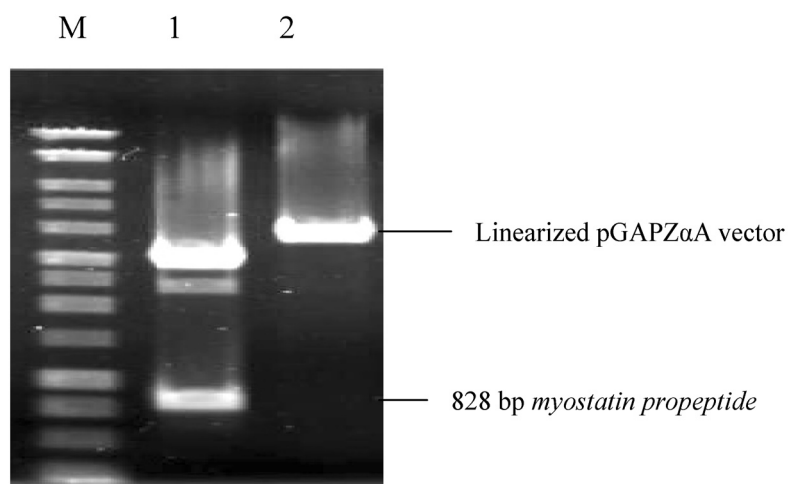


圖 4. 運用 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制酶截切勝任細胞轉形株之質體 DNA 與 pGAPZ  $\alpha$  A 載體。

Fig. 4. Digestion of plasmid DNA from competent cell transformant and pGAPZ  $\alpha$  A vector.

M represented 1kb DNA marker.

Lane 1 represented the digestion pattern of Plasmid DNA from competent cell transformants, which inserted 828 bp cDNA of *myostatin propeptide*. Digestion measurement was performed by using *EcoR* I and *Xba* I restriction enzymes.

Lane 2 represented pGAPZ  $\alpha$  A vector which was digested by *EcoR* I and *Xba* I restriction enzymes.

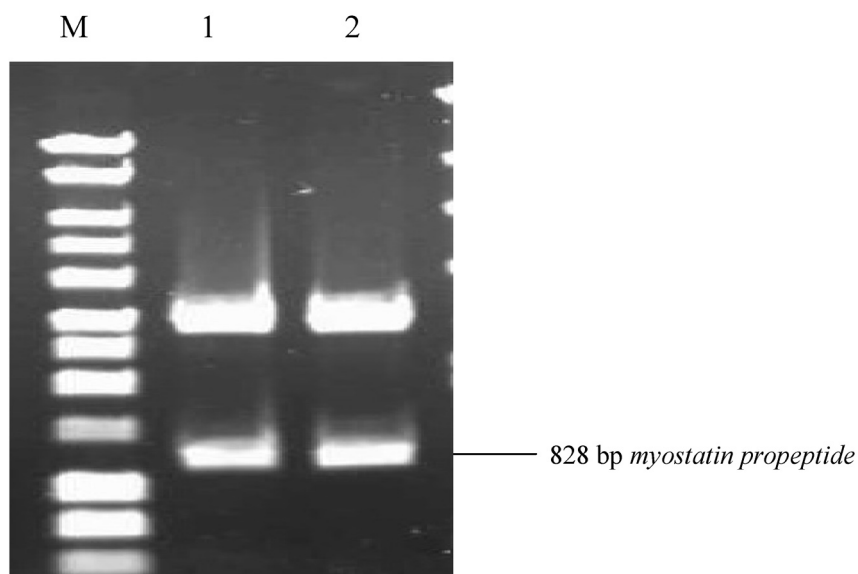


圖 5. 運用 *EcoR* I 和 *Xba* I 限制酶之截切分析 pGAPZ  $\alpha$  AMyostatin-propeptide 表現載體。

Fig. 5. Construction determination of pGAPZ  $\alpha$  AMyostatin-propeptide vector by using digestion analysis using *EcoR* I and *Xba* I restriction enzymes.

Mr. represented 1 kb DNA marker. Lane 1 and 2 respectively represented the 828 bp cDNA of *myostatin propeptide* ligated into pGAPZ  $\alpha$  AMyostatin- propeptide vectors which was digested by *EcoR* I and *Xba* I restriction enzymes

## 結論

完成建構肌肉生長抑制素前胜肽表現載體，經電穿孔轉形至酵母細胞後，再以 Zeocin 抗生素篩選、瓊脂電泳、核苷酸序列以及 SDS-PAGE 與西方墨點法等方法分析，確認有2株具有較高表現重組肌肉生長抑制素前胜肽之酵母菌轉形株，可表現外源性之肌肉生長抑制素前胜肽產物。

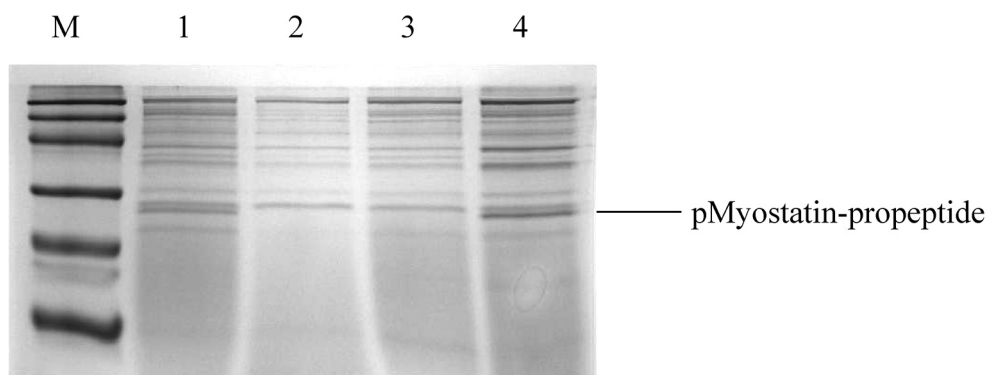
表 1. 接合於 pGAPZ  $\alpha$  A 表現載體之肌肉生長抑制素前勝肽 (828 bp cDNA) 與豬肌肉生長抑制素 cDNA (Accession number NM214435) 進行 BLAST 比對分析

Table 1. The 828 bp of *Myostatin propeptide* cDNA has been ligated with pGAPZ  $\alpha$  A vector applied to align with *sus scrofa myostatin* cDNA (Accession number NM214435) for BLAST analysis

Sequences' name	site	Sequences producing significant alignment	site
Mstn/Propept.	38	ATGCAAAACTGCAAATCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCC	97
Sus scrofa	1	ATGCAAAACTGCAAATCTATGTTTATATTTACCTGTTTATGCTGATTGTTGCTGGTCCC	60
Mstn/Propept.	98	GTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTGTGTAAT	157
Sus scrofa	61	GTGGATCTGAATGAGAACAGCGAGCAAAAGGAAAATGTGAAAAAGAGGGGCTGTGTAAT	120
Mstn/Propept.	158	GCACGTATGTAGAGACAAAACACTAAATCTTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATC	217
Sus scrofa	121	GCACGTATGTAGAGACAAAACACTAAATCTTCAAGACTAGAAGCCATAAAAAATTCAAATC	180
Mstn/Propept.	218	CTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGACAACCTT	277
Sus scrofa	181	CTCAGTAAACTTCGCCTGGAAACAGCTCCTAACATTAGCAAAGATGCTATAAGACAACCTT	240
Mstn/Propept.	278	TTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAACTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGAC	337
Sus scrofa	241	TTGCCCAAAGCTCCTCCACTCCGGGAACTGATTGATCAGTACGATGTCCAGAGAGATGAC	300
Mstn/Propept.	338	AGCAGTGATGGCTCCTTGGAAGATGATGATTATCAGCTACGACGGAACGATCATTACC	397
Sus scrofa	301	AGCAGTGATGGCTCCTTGGAAGATGATGATTATCAGCTACGACGGAACGATCATTACC	360
Mstn/Propept.	398	ATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGAAGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTT	457
Sus scrofa	361	ATGCCTACAGAGTCTGATCTTCTAATGCAAGTGGAAGGAAAACCCAAATGCTGCTTCTTT	420
Mstn/Propept.	458	AAATTTAGCTCTAAAATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATATATCTG	517
Sus scrofa	421	AAATTTAGCTCTAAAATACAATACAATAAAGTAGTAAAGGCCCAACTGTGGATATATCTG	480
Mstn/Propept.	518	AGACCCGTCAAGACTCCTACAACAGTGTTTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAAACCATG	577
Sus scrofa	481	AGACCCGTCAAGACTCCTACAACAGTGTTTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAAACCATG	540
Mstn/Propept.	578	AAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACT	637
Sus scrofa	541	AAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACT	600
Mstn/Propept.	638	GGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAA	697
Sus scrofa	601	GGTATTTGGCAGAGCATTGATGTGAAGACAGTGTTGCAAAATTGGCTCAAACAACCTGAA	660
Mstn/Propept.	698	TCCAACCTTAGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTGTAACC	757
Sus scrofa	661	TCCAACCTTAGGCATTGAAATCAAAGCTTTAGATGAGAATGGTCATGATCTTGCTGTAACC	720
Mstn/Propept.	758	TTCCCAGGACCAGGAGGAGATGGGCTGAATCCCTTTTTAGAAAGTCAAGGTAACAGACACA	816
Sus scrofa	721	TTCCCAGGACCAGGAGGAGATGGGCTGAATCCCTTTTTAGAAAGTCAAGGTAACAGACACA	780
Mstn/Propept.	817	CCAAAAAGATCCAGGAGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTC	861
Sus scrofa	781	CCAAAAAGATCCAGGAGAGATTTTGGACTCGACTGTGATGAGCACTC	828



## (A) SDS-PAGE



## (B) Western blot

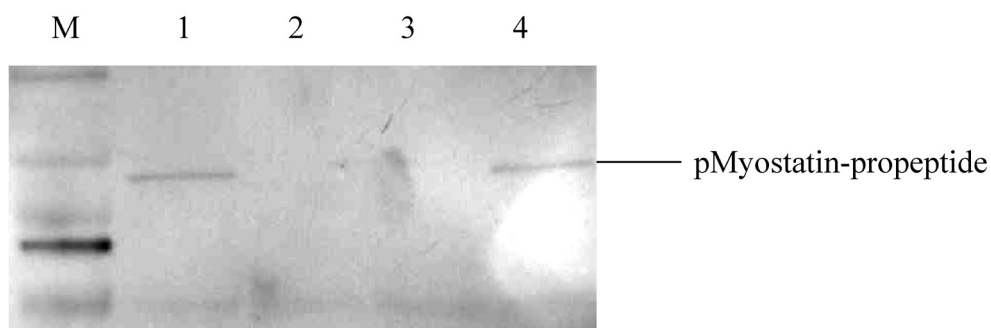


圖 6. 運用 15% SDS-PAGE 與西方墨點法分析重組肌肉生長抑制素前勝肽酵母菌轉形株。

Fig. 6. The analysis of the levels of recombinant myostatin-propeptide from yeast transformants

## (A) SDS-PAGE

M represented protein marker. Lane 1 and 4 respectively represented higher secretion of recombinant myostatin propeptide of yeasts transformed-clone.

Lane 2 and 3 respectively represented lower secretion of recombinant myostatin propeptide of yeasts transformed-clone.

## (B) Western blotting

M represented protein marker. Lane 1 and 4 respectively represented higher secretion of recombinant myostatin propeptide of yeast transformants, which were hybridized by anti-*myc* antibody at the diluted ratio 1:3000, and the same diluted ratio of anti-*myc*-HRP antibody.

Lane 2 and 3 respectively represented lower secretion of recombinant myostatin propeptide from yeast transformants, which could not hybridize with anti-*myc* antibody.



## 參考文獻

- 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。
- Bogdanovich, S., K. J. Perkins, T. O. B. Krag, L. A. Whittemore and T. S. Khurana. 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEBJ.* 19:543-549.
- Jennifer, J. H., M. V. Davies, A. A. Pearson, J. H. Wang, R. M. Hewick, N. M. Wolfman and Y. Qiu. 2002. Themyoostatin propeptide and follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Bio. Chem.* 277(43):40735-40741.
- 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.
- 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) hypermusclar mutation in mice. *Mamm. Genome* 9:671-672.
- Yu, Z., Y. Li, Q. Meng, J. Yuan, Z. Zhao, W. Li, X. Hu, B. Yan, B. Fan, S. Yu and N. Li. 2005. Comparative analysis of the pig BAC sequence involved in the regulation of myostatin gene. *Sci. China, C, Life Sci.* 48 (2):168-180.

# Cloning myostatin propeptide cDNA and construction of its expression vector <sup>(1)</sup>

Fang-Chueh Liu <sup>(2)(4)</sup> and Chuan-Mu Chen <sup>(3)</sup>

Received : Apr. 15, 2007 ; Accepted : Jul. 2, 2007

## Abstract

The objectives of this study were to clone porcine *myostatin propeptide* cDNA and to construct its expression vector, so as to transfer the expression vector into yeast cells to generate recombinant myostatin propeptide. The 1128 bp of *myostatin* cDNA being used as DNA template were used for performing nest-PCR to amplify the 828 bp of the *myostatin propeptide* cDNA. The amplified cDNA and pGEM-T Easy vector were ligated by T4 ligase, which transformed those vectors into competent cells afterward. The transformed competent cells of plasmid DNA and pGAPZ  $\alpha$  A expression vector were cleaved by using *EcoR* I and *Xba* I restriction enzymes, and both of them were ligated by T4 ligase to achieve construction of pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide expression vector. Those constructed vectors further were transferred to competent cells, and the transferred competent cells were cultivated in LB broth and their DNA was extracted to determine nucleotide sequencing. The above-mentioned results demonstrated that open reading frame of *myostatin propeptide* cDNA in pGAPZ  $\alpha$  A Myostatin-propeptide vector was complete. Those confirmed expression vectors were further transformed into yeast cells by using the electroporator.

We picked out 2 yeast transformed-clones because both had shown higher secretion of recombinant myostatin propeptide into supernatants, which was confirmed by using SDS-PAGE and western blot. From the results mentioned above, we were certain that these yeast transformants could be used to yield recombinant myostatin peptide.

Key words: Plasmid, Propeptide, Expression vector.

---

(1) Contribution No.1370 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

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