

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：歐柏榮 博士

Advisor: Bor-Rung Ou, Ph.D.

不同品系豬種之第八生長分化因子基因 5' 調節區之多樣性

The Single Nucleotide Polymorphism of Myostatin 5'

Regulatory Region in Different Breeds of Porcine



研究生：黃建德

Graduate student: Chien-Te Huang

中華民國九十五年六月

June, 2006

目 錄

	頁
目錄.....	
圖次.....	
表次.....	
壹、中文摘要.....	1
貳、緒言.....	2
參、文獻檢討.....	3
一、動物第八生長分化因子.....	3
1. 動物第八生長分化因子之發現.....	3
2. 動物第八生長分化因子之結構.....	5
3. 動物第八生長分化因子之生理功能.....	6
4. 動物第八生長分化因子之調節.....	9
二、種豬生長性狀與屠體性狀之介紹.....	11
肆、材料與方法.....	19
伍、結果.....	32
陸、討論.....	57
柒、結論.....	68
捌、參考文獻.....	69

玖、英文摘要.....	82
拾、小傳.....	84

圖 次

	頁
圖一、不同品種豬第八生長分化因子之 cDNA 序列比對分析.....	38
圖二、為不同豬種之 β -actin 和第八生長分化因子 5' 調節區域 PCR 產物之電泳圖.....	42
圖三、不同種豬之第八生長分化因子 5' 調節區域比對.....	43
圖四、人、小鼠與豬第八生長分化因子 5' 調節區域之比對.....	49
圖五、第八生長分化因子 5' 調節區域之轉錄調節元件.....	51
圖六、第八生長分化因子 5' 調節區域在兩個 SNP 位點所出現之不同轉錄調節元件.....	53
圖七、報導基因質體之建構.....	54
圖八、轉染預備試驗.....	55
圖九、C2C12 細胞轉染試驗之分析.....	56

表 次

	頁
表一、不同品種第八生長分化因子 5' 調節區域, Inr 上游 698 與 686 位置 SNP 之組合.....	48
表二 豬之第八生長分化因子 5' 調節區域轉錄調節元件.....	52

壹、摘要

動物第八生長分化因子 (myostatin) 為調控骨骼肌生長發育之負調節因子，當第八生長分化因子發生突變時，骨骼肌肉量會顯著增加，同時減低肌肉中脂肪含量。本研究目的在探討不同豬種第八生長分化因子基因 5' 調節區域是否呈現核? 酸多樣性 (single nucleotide polymorphism ; SNP)，進而影響第八生長分化因子表現。將不同豬品種之血液 DNA 以 PCR 方法擴增第八生長分化因子基因 5' 端調節區域約 1.2 Kb 片段，並利用核? 酸定序技術分析其序列，結果發現不同豬種之第八生長分化因子基因 5' 端調節區域出現兩個 SNP，分別在轉錄起始位置上游 698 bp 與 686 bp 之位置。因豬種不同，發現此兩個位點有兩種不同組合，脂肪含量較少之杜洛克品種，其位點則分別為 G 和 A，含有較多脂肪之約克夏與藍瑞斯品系所出現兩個位點分別是 A 和 G，此外，台灣特有品種蘭嶼豬，其核? 酸亦是 G 和 A；將此三種不同組合之 SNP (包括 LYD 三雜交豬之 AA 組合)，利用報導基因載體 pGL3 轉染 C2C12 肌原細胞之體外試驗，結果顯示三種不同 SNP 組合對報導基因之表現上並無顯著差異。綜合上述在約克夏、藍瑞斯、杜洛克與蘭嶼豬等不同豬種之第八生長分化因子基因 5' 端調節區域上游 698 bp 與 686 bp 會出現 SNP，此 SNP 在不同豬品種對第八生長分化因子基因表現的影響則有待進一步的澄清。

貳、緒 言

豬肉在肉品市場一直是人類主食之一，不但歷史悠久，而且馴養方法早在數十年前已進入科學化，可以大量飼養食用豬隻。站在生產者或消費者角度來看，都會期待豬肉更鮮美，更廉價，可讓市場更廣大。為達這樣目的，許多改良方法孕育而生，例如品種雜交，可以達到性能改良，如增加生育率、瘦肉率或是增加生長速度；飼料營養調配，可以因應不同生長階段或狀況所需之最適合之營養，達到最佳生理功能；改良生活環境，使得飼養動物可以減少緊迫，有更健康之生存狀態等方法。

近年來，也因為科學進步，在許多基因之搜尋與功能探究上，都有相當大之突破。西元 1997 年，科學家 McPherron 等人利用基因剔除技術，發現了一個特殊基因，缺乏此基因對肌肉生長有相當大幫助，而又不會使生物致死，此基因被命名為第八生長分化因子。自此之後，對第八生長分化因子之研究陸續被報導出來，包括自然界就存在之生物體、突變第八生長分化因子使其失去功能所造成之肌肉雙倍牛與調控機制路徑等。

本研究主要探討，在不同豬種是否會因為第八生長分化因子基因上游調控區域之差異，而影響第八生長分化因子基因表現，造成其脂肪與瘦肉比例有所不同。

參、文獻檢討

一、動物第八生長分化因子

肌肉發生學是指在胚胎發育的過程中，體節細胞經過一系列的增殖、遷移、分化，最終形成肌肉組織之過程。在這複雜過程中，從分化之確定與維持、細胞遷移、細胞增殖、最終之分化以及損傷後的組織修復，每步驟均涉及許多基因之協調作用。動物第八生長分化因子是近年來被發現屬於 TGF- β (transforming growth factor- β) 超級家族新成員，在控制骨骼肌之生長發育及分化扮演非常重要角色。

(一) 動物第八生長分化因子之發現

McPherron 等人在 1997 年，根據 TGF- β 家族基因 DNA 序列之高度保留區域，設計非專一性引子，用 PCR 方法擴增之新產物，以該產物作為探針篩選小鼠骨骼肌 cDNA 基因庫，得到一個新 cDNA 序列，經分析後，由此 cDNA 轉譯成為有 376 個氨基酸所組成之蛋白質，稱它為動物第八生長分化因子 (growth and differentiation factor-8; GDF-8) 或是 myostatin。其蛋白質序列與 TGF- β 家族者具有許多相似特徵，包括在蛋白質 N 端為疏水性，且具有分泌訊號區，具有 2 個蛋白酶切位，於 C 端區域有高度保留區切位 RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg)，並含 9 個半胱氨酸 (cysteine)，此區域序列與

同為 TGF- β 家族之 GDF-11 有很高的相似度(McPherron *et al.*, 1997 ; Nakashima *et al.*, 1999)。

在動物體的肌肉生長調節表現上，第八生長分化因子呈現負調節功能。自小鼠胚胎發育第 9.5 天起，於體節處可測得其表現，且會持續表現抑制肌肉發育。在成熟小鼠骨骼肌中，第八生長分化因子在骨骼肌均有表現，而在脂肪組織亦可測得；第八生長分化因子基因剔除小鼠身上，發現純合子之變異種與正常小鼠比較，其肌肉量顯著多於正常小鼠，單一部位骨骼肌約是正常小鼠 2 倍，肌肉纖維除了有肥大的現象，纖維數目也增多 (McPherron *et al.*, 1997)；而雜合子變異種表現並不如純合子變異種那樣明顯，肌肉表現量約較正常小鼠比多 25 %，可見第八生長分化因子表現會隨著基因變異完全與否而不同 (McPherron and Lee, 2002)。

在不同物種皆可測得第八生長分化因子基因，其在人類染色體是位於 2q.32.2，長約 7.7 kb (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998)，小鼠則位於染色體 1 27.8 cM(Szabo *et al.*, 1998)，牛是位在 2q.11 (Smith *et al.*, 1997)，而豬是位於 15q2.3 (Sonstegard *et al.*, 1998)；不同物種中，都會表現在骨骼肌，且具有相似之基因結構：包括有 3 個外顯子 (exon) 與 2 個內含子 (intron) (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998)。除此之外，其 C 端區域序列保留性很高，在人、鼠、豬、雞、火雞，以及魚類均是 (McPherron and Lee, 1997 ; Maccatrozzo *et al.*, 2001 ; Ostbye *et al.*, 2001 ; Rescan *et al.*, 2001 ; Roberts and Goetz, 2001 ;

Rodgers and Weber, 2001 ; Rodgers *et al.*, 2001 ; Kocabas *et al.*, 2002)。若第八生長分化因子突變發生在牛，包括高度保留區域點突變、區域突變或者是終止密碼提早出現，而使得胺基酸序列不完整，均呈現肌肉倍增之表現型 (Grobet *et al.*, 1997, 1998 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron and Lee, 1997)。由上述可知，第八生長分化因子為抑制肌肉生長發育之重要因子。

第八生長分化因子基因表現隨著生物體成長而變化，起初第八生長分化因子被認為僅存在於骨骼肌中，其他組織中均檢測不到 (McPherron and Lee, 1997)，但後續研究指出第八生長分化因子 mRNA 也表現於其他組織中，例如，在羊和牛心臟組織中纖維和心肌細胞分別有第八生長分化因子表現 (Sharma *et al.*, 1999)，豬乳腺體中亦可測得 (Ji *et al.*, 1998)。而魚類中，第八生長分化因子之表現不侷限在肌肉 (Rodgers *et al.*, 2001)。

(二) 動物第八生長分化因子之結構

第八生長分化因子活化為具有生物功能蛋白質之過程可能應與 TGF- β 家族成員相似。在小鼠體內，需經二次蛋白質水解；第一次會將 N 端含有 24 個胺基酸之訊號勝 (Signal peptide) 片段水解，剩下片段則發生在第 240 個到 243 個胺基酸位置，序列為 RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg)，形成未經醱化之片斷，其個別分子量約為 27 kDa 之 N 端與約 12 kDa 之 C 端，而具有生物活性之第八生長分化因子則

是分子量約 25 kDa 之 C 端同合子 (homodimer) (McPherron *et al.*, 1997)。於 CHO (Chinese hamster ovary) 細胞實驗中，建構一個會針對 RSRR 氨基酸序列，水解之 furin protease 外源性質體，同時轉染可大量表現第八生長分化因子蛋白質，經純化其蛋白質後，再與第八生長分化因子抗體結合，結果顯示，分別有顯著之第八生長分化因子之 N 端、C 端與 C 端同合子存在 (Lee and McPherron, 2001)。

相關報告中提及具有活性之第八生長分化因子，均意指為 C 端同合子之片段，而 N 端片段則稱為 propeptide；第八生長分化因子 propeptide 與其他 TGF- β 家族基因之 propeptide 可能有相同功能，在蛋白質摺疊成形過程扮演重要角色。有研究利用細菌生產重組第八生長分化因子，但發現細菌所生產之第八生長分化因子，要達到生物功效，所需添加濃度非常高 (100-500 μ M)，可能是因為其折疊的三度空間不同之故 (Thomas *et al.*, 2000； Taylor *et al.*, 2001)。第八生長分化因子 propeptide 具另一功能，即為調節 C 端片段水解，研究指出，可以大量表現第八生長分化因子 propeptide 之基因轉殖小鼠，其肌肉生長量顯著高於正常小鼠，此為肌纖維數量與肌纖維直徑分別增加 40% 與 21% 所致 (Lee and McPherron, 2001； Yang *et al.*, 2001)，或者將經突變無法被水解之第八生長分化因子全長，直接利用腹腔注射，肌肉生長量也可以達到顯著增加之結果 (Wolfman *et al.*, 2003)。

(三) 動物第八生長分化因子之生理功能

於第八生長分化因子基因剔除 (knockout) 小鼠實驗可以觀察出，不論是同型合子剔除或異型合子剔除，在 2-5 月齡時，體重均較正常小鼠多出約 30%；更進一步發現，在同型合子，個別肌肉重量均為正常小鼠 2 倍以上，而胸肌表現量更達 2.6 倍，體脂肪重量則無差異，造成這些現象除了有肌肉纖維細胞肥大外，還伴隨著細胞數目增加 (McPherron *et al.*, 1997)。另一第八生長分化因子基因剔除之小鼠實驗發現，於 9 月齡時，體重與正常小鼠已無差異，但是於肌肉重量卻顯著大於正常小鼠，原因是基因剔除小鼠體脂肪量較少；第八生長分化因子基因剔除小鼠分別與野鼠色基因座 (agouti yellow lethal ; Ay) 有缺陷與肥胖老鼠 (obese ; Lep ob/ob) 兩種肥胖小鼠交配後，結果顯示後代有第八生長分化因子缺陷者，體脂肪堆積狀況也顯著減少 (McPherron and Lee, 2002)。在 dominant negative 之基因轉殖鼠研究中，利用骨骼肌專一啟動子磷酸肌酸啟動子 (creatine kinase promoter) 結合第八生長分化因子水解處突變之 cDNA (氨基酸序列 RSRR 置換成 GLDG)，這項改變，使得具有功能之內源性第八生長分化因子量下降 23-40 %，導致與基因剔除小鼠實驗很相似之結果，雖然肌纖維截面積並無顯著不同，但數目顯著增多，肌肉重量也明顯增加 35 % (Zhu *et al.*, 2000)。

和上述實驗相反地，利用注射腫瘤細胞到裸鼠 (nude mice)，可以使得重組 (recombinant) 第八生長分化因子蛋白質過量表現 (Overexpression) 之小鼠研究顯示，重組第八生長分化因子大量表

現之小鼠，總體重在注射後第 16 天，較對照組減少約 33%，分別檢視後腿腓腸肌與胸肌，減少 35-50%，在子宮旁和腹腔脂肪累積處，脂肪量也明顯減少，這些減少之重量，與進食量或腫瘤重量並無關，而是由於肌肉纖維細胞相對較小，其直徑平均值較對照組小了 25% (Zimmers *et al.*, 2002); 在同樣類型之基因轉殖小鼠實驗中，運用只會表現肌肉之啟動子，分別為 MCK (muscle-specific creatine kinase promoter) 與 MCK-3E (muscle-specific creatine kinase promoter with triple E-box mutation)，當作 h-MSTN (human-myostatin) 重組基因之啟動子，其結果也顯示，兩種基因轉殖雄鼠，在 42 天性成熟後分析，不同部位骨骼肌重量均較正常小鼠明顯減少約 20%，體重少了 10%，這也是因為單位面積肌纖維細胞變少又變小所導致；但與上一個基因過量表現實驗結果也有不同處，像基因轉殖母鼠肌肉減少量並不顯著，只有 MCK-3E 啟動子之基因轉殖母鼠心肌重量減少 17%，可能是第八生長分化因子在不同性別會有不盡相同之表現 (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003)。

在自然界也有第八生長分化因子基因發生缺陷之動物，像是雙倍肌肉 (double-muscled) 種牛，尤其比利時藍牛 (Belgian Blues) 與皮埃蒙特牛 (Piedmontese) 是最廣為報導被研究，不但外觀較普通種牛強壯，瘦肉產量較多，肉質在口感上更為可口，所以在繁殖、保種方面，較受畜牧業者喜愛 (Wheeler *et al.*, 2001)。會造成皮埃蒙特牛體型改變原因，經研究指出，是因為坐落於染色體 2q. 11 之第八生長分

化因子 DNA 編碼序列 (coding sequence) 在第 938 位置發生 G 置換成 A 之情形 , 使得蛋白質在摺疊成型時 , 少了一個內部雙硫鍵 , 導致蛋白質失去生物活性(Smith *et al.*, 1997), 這就是為何皮埃蒙特牛 , 血液內第八生長分化因子蛋白質表現量雖然與正常牛相同 , 但卻無生物活性之因 , 而使得肌肉生長較為發達(Berry *et al.*, 2002 ; Kambadur *et al.*, 1997); 比利時藍牛 , 則是第八生長分化因子 DNA 編碼序列在外顯子 3 (exon 3) 缺少了 11 個核? 酸 (從第 937 核? 酸到第 947 核? 酸), 因而蛋白質序列發生框構平移突變 (frame shift mutation), 在第 275 個胺基酸後與正常第八生長分化因子不同 , 共缺少了 102 個胺基酸。也因此第八生長分化因子失去作用 , 造成肌肉倍增體型 (McPherron and Lee, 1997 ; Grobet *et al.*, 1997 ; Kambadur *et al.*, 1997); 上述同型合子之雙倍肌肉比利時藍牛生理狀況 , 其肌肉組成與第八生長分化因子基因剔除小鼠很相似 , 在 24 月齡觀察發現 , 除了屠體肌肉量明顯較其他不同種牛重 , 肌纖維數量也較多 , 肌肉內脂肪比例明顯較少 (Wegner *et al.*, 2000), 在異型合子之之雜交牛也是如此 (Casas *et al.*, 1998)。

(四) 動物第八生長分化因子之調節

生物體內第八生長分化因子訊息傳遞 , 被認為與 TGF - β 家族基因相同 , 是透過細胞膜上 type 和 type 接受器 (type and type serine/ threonine kinase receptors), 當第八生長分化因子與 type

和 type 形成複合體後, type 接收器上之磷酸根會使得 type 接收器被磷酸化, 進而使 Smad 蛋白質被磷酸化 Smad 為重要訊息傳遞起始蛋白質, 可將細胞外 TGF- β 訊息傳遞到細胞內(Massagué *et al.*, 1998); 於接受器共鍵結 (cross-linking) 實驗中發現, 第八生長分化因子可以與 activin type (ActR) 接受器, 像是 ActR A 與 ActR B (Lee & McPherron, 2001 ; Rebbapragada *et al.*, 2003)。其中又與 ActR B 鍵結能力較為強; 在透過 dominant negative 試驗, 使小鼠體內 ActR B 基因表現量大為下降, 發現其表現型結果與第八生長分化因子基因剔除小鼠相同, 同樣增加了肌纖維數目與肌纖維直徑致使肌肉生長量明顯增加。這結果並非只因第八生長分化因子在訊息傳遞過程遇到阻礙所造成, 但關係應該相當密切 (Lee and McPherron, 2001), 第八生長分化因子不單透過 ActR B, 還利用 ALK4(activin receptor-like kinase 4 or ActRIB) 或 ALK5 (TBRI) 接收器進行傳遞訊息, 達到磷酸化 Smad2/ Smad3 蛋白質, 進而影響下游基因之表現, 以達到生物體恆定現象 (Rebbapragada *et al.*, 2003)。

利用細胞實驗探討第八生長分化因子於細胞內之表現, 如在 C2C12 細胞實驗中, 將純化重組第八生長分化因子蛋白質加入培養液中或是轉染可將第八生長分化因子 mRNA 抑制之 antisense 載體, 皆觀察到第八生長分化因子具有抑制 C2C12 細胞增殖 (proliferation) 與分化 (differentiation) 的能力, 此乃由於第八生長分化因子增加 p21 表現, 使 Cdk2 表現下降, Rb 無法被磷酸化, 進而抑制細胞增生能力

變差 (Thomas *et al.*, 2000 ; R´ios *et al.*, 2001)。此外第八生長分化因子也抑制調控肌肉細胞分化因子，像 MyoD、 myogenin 和 Myf-5，令細胞無法達到分化(Langley *et al.*, 2002 ; R´ios *et al.*, 2002 ; Joulia *et al.*, 2003)；於肌肉細胞特有的前驅細胞衛星細胞 (satellite cell) 實驗中發現，在缺乏第八生長分化因子之狀況下，可讓原本功能與幹細胞相似、為修補壞死肌肉而細胞週期 (cell cycle) 靜止之衛星細胞，開始進行細胞分化與分裂，在成熟生物體內，增加細胞數目，這有別於初生生物體狀況 (McCroskery *et al.*, 2003)，但與利用腫瘤生產大量重組第八生長分化因子之實驗結果，相對於少量第八生長分化因子之對照組，肌肉纖維細胞可以較多也較大 (Zimmers *et al.*, 2002)。這些細胞實驗與上述活體實驗結果均一致，第八生長分化因子可藉由抑制肌肉細胞分化與分裂，達到抑制肌肉細胞生長之效果。

在生物體內也有其他因素會調節第八生長分化因子之活性，例如上述提及第八生長分化因子 propeptide，可抑制第八生長分化因子活性 (Lee & McPherron, 2001 ; Yang *et al.*, 2001 ; Wolfman *et al.*, 2003)；follistatin，在生物體內最早被發現之功能為透過調控激濾泡素 (Follicle stimulating hormone)與 activin 結合，而抑制濾泡成熟。之後研究得知其也會影響 TGF - β 家族基因，像是會抑制 BMP (Bone morphogenetic proteins) (Lin *et al.*, 2003)。研究指出，在會大量表現 follistatin 之基因轉殖小鼠發現，小鼠肌肉量會大增 327% (Lee & McPherron, 2001)，而且會抑制腫瘤所生產之重組第八生長分化因子

活性 (Zimmers *et al.*, 2002)。之後更有研究證實 , follistatin 與第八生長分化因子具有高度親和性 , 這些結果很可能是因為 follistatin 可以直接抑制第八生長分化因子所致 (Amthor *et al.*, 2004)。

二、種豬生長性狀與屠體性狀之介紹

豬肉在全世界為人類主食之一 , 養豬事業也是畜牧業重要生產項目 , 根據聯合國世界糧農組織 (Food and Agriculture Organization, FAO), 於 1999 年資料統計報告 , 全世界養殖頭數約為 9.1 億頭 , 一年屠宰數為 11.4 億頭 , 豬肉年產量 8,843 萬噸 (畜牧要覽 養豬篇 增修版), 而且依據聯合國世界糧農組織資料顯示 , 直到 2004 年一年全球豬肉屠宰總數仍達到 10 億頭 , 可見豬肉市場到目前為止 , 還維持龐大且恆定狀態 ; 而對於養豬業者而言 , 如何滿足市場需求 , 同時又減低飼養成本 , 是他們最為努力之方向。因此 , 增加飼料換肉率、減少疾病發生飼養等方法 , 便因應而生 , 其中以利用品種改良 , 為較直接 , 且快速達到目的方法之一 , 舉例來而言 : 利用生長快速之豬種 , 在人工昂貴地區 , 可節省人力 , 而母豬之多產性能 , 可以降低成本 , 肥肉市場價錢較低 , 可以選擇瘦肉率高之種豬做為優先考量 , 如此一來也令養豬業者獲得較大利益 (畜牧要覽 養豬篇 增修版)。

全世界或台灣養豬業者所常用之品種 , 簡介如下 (畜牧要覽 養豬篇 增修版) :

(一) 藍瑞斯 (Landrace)

其品種來源簡述如下：在十九世紀時歐洲許多國家已有地方性品系 (Land) 或豬種 (races)，而首先被承認的品種即為丹麥藍瑞斯；自 1895 起研究者即開始應用科學方法改良其成為一醃肉型 (bacon type；適合用作為加工用肉) 豬種，生產醃肉外銷英國。後來因丹麥曾於某時期禁止種豬外銷，歐美其他國家隨即應用其本國已有的藍瑞斯豬種發展為各國特有之藍瑞斯豬種，但仍被認為大部分具有丹麥藍瑞斯血統，台灣地區曾引進瑞典、挪威、英國、美國等系之藍瑞斯品種。

此品種之特徵簡述如下：垂耳，耳朵適大，向前傾斜，蓋向顏面，皮膚平滑無皺紋，無黑斑。毛色全白，柔軟而有光澤。體側深長，有 16-17 對肋骨，後臀方正，四肢稍短，下頷平整。每胎出生總頭數約 9.4 頭，八週齡仔豬體重約為 15.7 公斤。成熟公豬體重約 330 公斤，母豬約 270 公斤。

(二) 約克夏 (Yorkshire 或稱大白豬 Large White)

其品種來源簡述如下：該品種於十九世紀初期出現於英國北部約克夏郡及其鄰近地區，原為地區性品系之混合，而後逐漸形成一較具特性之白色品種，依其體型又分為小、中與大白豬三類。於十八世紀末期英國人曾自義大利引進中國豬以改進地方品系，藉由豬隻早期之脂肪堆積來達到改進繁殖力的目的；隨後逐漸地形成一個具有直立耳朵、長體型且繁殖佳的大型豬品系。本豬約於 1900 年左右即已引進

臺灣。

此品種之特徵簡述如下：面寬而略凹，耳朵稍大而薄，向上前直立，其近緣毛柔軟，忌耳長及下垂。皮膚全白而平滑，無皺紋，無斑點。毛色全白，柔軟而有光澤。軀體長而深，且平整；體側尤其深且長，但有時腿部缺乏豐滿。每胎出生總頭數約 11 頭，八週齡仔豬體重約為 14.5 公斤。成熟公豬體重約 370 公斤，母豬約 340 公斤。

（三）杜洛克（Duroc 或 Duroc-Jersey）

其品種來源簡述如下：豬種源自歐洲，由移民者攜入美洲大陸繁殖而形成。杜洛克主要係來自兩個紅色豬種的混合品種，一為因區域而命名之紅娟姍（Jersey）；另一則為杜洛克（Duroc），係取自有名之賽馬為名。後來因當時農村環境需要，農民將玉米等農作物轉變為肥豬肉，並加以鹽漬以度過冬天，故而形成一特殊公系品種。之後因市場需求之變遷，再加上優良選拔效應，而將原有肥肉型杜洛克一改而為目前之高效率精肉型（Meat type；強調瘦肉產量與品質）豬種。本品種豬於 1960 年引進台灣地區。

此品種之特徵簡述如下：耳朵大小適中，根部向上直立，耳端向前傾斜，耳緣毛柔軟，忌耳朵直豎。皮膚平滑無皺紋，紅棕色毛，有光澤，毛質良好。忌有黑色或白色斑點之毛捲及漩渦。軀體長度為中等長。每胎出生總頭數約 8.7 頭，八週齡仔豬體重約為 14 公斤。成熟公豬體重達 300 450 公斤，母豬則為 270 315 公斤。

（四）桃園豬（Taoyuan）

其品種來源簡述如下：桃園種原為龍潭陂種，西元 1910 年起總稱為桃園種，俗稱台灣黑豬，在台灣養豬事業中佔有重要地位。其來源傳說不一，有謂為 1877 年左右，居民前往廣東嘉應州鎮明縣參拜祖廟時，攜歸繁殖者；有謂其為 1887 年左右，輸入之廣東豬種選育繁殖而成。

此品種之特徵簡述如下：體型中等，從側面看，體軀呈長方形，皮膚灰白色，背毛黑少且粗，自頸部起至背部有剛毛，公豬尤為明顯，背凹陷，腹大而下垂。四肢粗短強健，前肢直立，蹄大堅實且分蹄明顯。於三、四月齡起皮膚開始有明顯皺襞，隨年齡增長日趨明顯，肩部有明顯皺襞形如盾甲。尾巴直而不捲，且常不停擺動。出生活頭數約為 8 頭，三週齡活頭數與仔豬體重分別為 7.1 8.3 頭與 3.2 3.7 公斤。

（五）梅山豬（Meishan）

其品種來源簡述如下：梅山豬原產中國大陸江蘇省梅山縣，並於 1974 年起與同屬太湖地區豬種，統稱太湖豬，以高繁殖力著稱於世。梅山豬初產女豬產仔數與歐美品種豬相近，但經產母豬平均可產 12 頭以上的仔豬，是全世界已知豬品種中產仔數最高者之一。因此，梅山豬廣受全球重視且為改良豬種繁殖力之重要遺傳基因資源。

此品種之特徵簡述如下：頭大額寬，額部皺褶多，耳大軟而下垂，耳尖與嘴角齊或超過。背凹，腹部下垂，皮膚厚且粗糙，毛色黑色或青灰色，毛稀疏。四肢短粗，末端為白色，俗稱四白腳；乳頭以 8 對

者居多，三週齡活頭數與仔豬體重分別為 11 頭與 4.0 公斤。

(六) 蘭嶼豬 (Lanyu)

其品種來源簡述如下：畜產試驗所台東種畜繁殖場於 1980 年自蘭嶼引進 4 公 16 母為蘭嶼豬種原族群。1987 年行政院農業委員會將之列為國家保種族群，自此維持 15 公 45 母行逢機配種的種畜群，以保存遺傳上的多樣性。

此品種之特徵簡述如下：蘭嶼豬為蘭嶼島上的小型黑色豬種，因其耳小直立，又名小耳種豬，此豬種適應亞熱帶溼熱氣候，耐粗飼，抗病力強。

而實際在品種改良應用上，最常見是利用藍瑞斯、約克夏或是杜洛克三種品種做雜交，達到體型增大、生長速度與瘦肉率等方面提升。各方面比較而言，國外報告指出，在以達到體重 113.5 公斤重之時間來計算，約克夏為 176.34 天 杜洛克為 173.93 天 藍瑞斯為 175.54 天，瘦肉率增加速度約克夏為 256.51g/d (gram/day) 杜洛克為 263.05 g/d、藍瑞斯為 259.46 g/d，背脂累積狀況，約克夏為 1.79 公分，杜洛克為 1.68 公分、藍瑞斯為 1.78 公分，腰眼面積大小分別是約克夏為 42.65 cm²、杜洛克為 43.12 cm²、藍瑞斯為 43.20 cm²，整體屠體性狀是以瘦肉率高與生長速率快之杜洛克表現較佳 (Chen *et al.*, 2003)。在美國地區針對加拿大種豬研究報告也提出，杜洛克品種脂肪累積較少、生長速率較快 (Li *et al.*, 1994)。西元 2001 年台灣研究報告提到，

台灣進口種豬，藍瑞斯、約克夏和杜洛克性狀達 110 公斤體重之日增重，經中央畜產會統計，分別為 1030 g、970 g 和 1000 g，背脂厚度分別為 1.40 cm、1.37 cm 和 1.36 cm，在台灣科技研究所統計則是，1083 g、991g 和 1038 g，背脂厚度分別為 1.36 cm、1.42 cm 和 1.36 cm，結果與國外研究相同處為，杜洛克脂肪累積較少（王，2001）。但是也有報告指出約克夏在三種品種中，脂肪累積相對較少（Cassady *et al.*, 2002）。

中國品種，像蘭嶼豬在不同餵飼試驗中，體重達 50 公斤之生長性狀背脂厚度以 2.68 cm 最薄，在每日增重方面，以任飼組之 340 g 為最快速（李等，2003）；梅山豬，閩公豬平均活體重在 122.6 kg 之屠體性狀測量指出，平均背脂厚度為 3.7 cm，瘦肉率為 34.1%（顏，2004），桃園豬在 65.2 kg 之屠體性狀測量指出，平均背脂厚度為 2.2 cm，瘦肉率為 40.0%（林等，1993）。在上述品種中，不難由背脂厚度做判斷，以進口豬種體脂肪含量遠低於中國本土豬種，其中又以杜洛克為最佳。

在生殖能力上，則以中國品種之梅山豬品種有名，研究指出，在台灣之藍瑞斯、約克夏和杜洛克之平均出生仔豬頭數是，8.96 頭、8.98 頭與 8.90 頭（王，2001）；而梅山豬生產第七胎之平均值為 11.6 頭（顏，2004）。將特定品系雜交豬分別與梅山豬或杜洛克品系進行雜交，觀察其生殖能力。與梅山豬雜交者窩仔數（11.5 隻/窩）明顯高於與杜洛克雜交者（9.4 隻/窩）（Young, 1995），其他雖然與梅山豬雜交可以

使生育率上升，但必須犧牲肉之品質跟杜洛克雜交之後代比較，與梅山豬雜交之後代顯然背脂率明顯上升，日增重也較低(Young, 1998)。

在不同品種豬之間，基因體 DNA 差異其實是非常小。但是，不同豬種所表現出之特徵，卻是那麼顯而易見；本實驗目的試圖解讀不同豬種第八生長分化因子調節區域之差異，了解在有相同第八生長分化因子蛋白質情況下，觀察第八生長分化因子基因上游調節區域序列是否有差異，若存在差異，是否會導致第八生長分化因子表現不同，使得品種之間瘦肉與脂肪累積有差異。

肆、材料與方法

實驗設計分為二個部分，第一部分，首先將不同豬種之第八生長分化因子基因上游調節區域 1.2 kb 區域做序列分析比對，探討調節區域序列是否有差異；第二部分是將具有不同序列調節區域建構到報導質體內，分析經轉染過之肌肉細胞株其報導酵素分泌量之多寡，以推測調節區域序列是否會對基因表現造成影響。

一、第八生長分化因子 5' 調節區域分析

(一) 實驗動物 DNA 之製備

1、種豬血液收集

本實驗所使用血液樣本採集自五種不同品系之純種豬，分別為藍瑞斯、杜洛克、約克夏及三品種雜交豬 (LYD) 各 4 頭 (財團法人動物科技研究所提供)，與蘭嶼豬 4 頭 (國立台灣大學動物科學技術學系提供)，而桃園豬 2 頭與梅山豬 1 頭則是透過民間豬場取得。

2、血液基因體 (genomic) DNA 的抽取

本實驗採用 InstaGene™ Whole Blood Kit (Bio-Rad) 進行 genomic DNA 萃取，方法簡述如下：

將含 EDTA 抗凝血劑的全血 200 μ l 置於 2 ml 微量離心管，加入 800 μ l Lysis Buffer，混合均勻後，室溫靜置 8 分鐘，去除上清液，加

入 200 μ l lysis buffer 輕微震盪後，去除上清液，加入 100 μ l InstaGene Matrix，置於 70 $^{\circ}$ C 培養 8 分鐘，輕微震盪 1 分鐘後，於 94 $^{\circ}$ C 培養 4 分鐘，再輕微震盪 1 分鐘，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液，即為 genomic DNA。

(二) 豬第八生長分化因子之調節區域之選殖及定序

1、引子製備

反應引子的設計決定了聚合酵素鏈鎖反應產物專一性與反應成敗，本實驗參考 NCBI 文獻發表之豬 β -actin 基因序列 (AJ312193)，並利用 Seq Web Version 2 設計 PCR 專一性引子，設計增殖 β -actin 基因片段 pig-b 60 (5'-CCACTGGCATTGTCATGGAC-3') pig-b 417 (5'-AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG-3')，豬第八生長分化因子基因 (AY208121)，設計增殖第八生長分化因子 5'端之上游調節區域片段 myo-prom-1184 (5'-TTCTCTGCTCCCAGACCTTACC-3') myo-prom 186 (5'-TAGGAGCTGTTTCCAGGCGAAG-3')。

本研究所使用之引子均委託銳基國際股份有限公司代為合成，並將所有的引子濃度調整為 10 μ M 備用。

2、聚合? 鏈鎖反應

(1) 引子條件：

β -actin 基因所使用引子為 pig-b 60 與 pig-b 417, PCR 擴增之產物預計為 357 bp, 其 PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘 50 $^{\circ}$ C 0.5 分鐘及 72

0.5 分鐘，共進行 25 個循環。

第八生長分化因子基因之調節區域使用引子為 myo-prom-1184 與 myo-prom 186，PCR 擴增之產物預計為 1394 bp 其 PCR 反應條件為 95 1 分鐘、55 1.5 分鐘及 72 1.5 分鐘，共進行 25 個循環。

(2) PCR 反應之進行：

在取得genomic DNA後，再依現有發表文獻所載之基因序列，並配合載體（vector）之特性，設計合適之含有限制酵素切點之引子；利用加入適當的引子（primers）、dNTP（即為dATP、dTTP、dGTP、dCTP等DNA的組成成分）、Taq聚合酵素（Taq polymerase）等反應物，於聚合酵素鏈鎖反應儀反覆的升溫降溫，將原樣品DNA加以篩選、複製。再以電泳法依PCR產物在膠片所跑距離與已知分子大小之標示物做比對，檢視產物分子大小。

本論文所用之試驗條件，均為每50 μ l之PCR反應，所需之試劑量最後濃度為：dNTP為0.2 mM、MgCl₂為1.5 mM、引子各為0.2 nM、Taq DNA polymerase則為2.5 unit、所添加之DNA為50 ng，其餘體積不足者則添加去離子滅菌水。

(3) 瓊脂糖膠電泳

實驗方法是用1 X TAE（40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA）緩衝溶液製備1%瓊脂糖凝膠（agarose gel），煮沸溶解，冷卻至約55-65，將之倒入膠體成形容器中，凝固備用。將凝膠置入水平電泳槽，覆以1 X TAE緩衝溶液。取適量PCR產物與6 X gel loading dye

混合，置入凝膠的孔內，另加DNA marker，一起於電壓125伏特下通電進行電泳30分鐘。電泳完成後，取出凝膠，將其浸泡於含有5 µg/ml EtBr (Ethidium Bromide Solution) 之TAE溶液中5分鐘，置於紫外燈箱觀察呈色DNA條帶，並照相記錄結果。(註：DNA大小2-3 kb以上，使用0.8 % 瓊脂膠糖凝膠；0.2-1.5 kb則使用1.0-2.0 % 瓊脂膠糖凝膠。)

(4) 膠體純化

本研究採用QIA quick Gel Extraction Kit(QIAGEN), 方法簡述如下：

將目標之DNA色帶自瓊脂糖膠體取下，置於微量離心管中秤重，加入3倍膠體重之QC溶液，於50 °C中加熱10分鐘，確認全部溶解後，加入與產物等體積之異丙醇(isopropanol)混合；將混合液吸取至QIA quick spin column，以13,000 rpm之離心機轉速，離心1分鐘，取其上清液，加入0.5 ml QG溶液，再以13,000 rpm離心1分鐘，去除濾出液，再加0.75 ml PE溶液至QIA quick spin column，離心1分鐘，去除濾出液後，再以13,000 rpm離心1分鐘，最後加入適量滅菌水，離心1分鐘，將PCR產物純化下來。

3、接合反應 (Ligation)

本研究使用 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) 來進行接合試驗，方法簡述如下：

依序加入以下試劑於微量離心管：取適量之PCR產物與1 µl pGEM-T Easy Vector (50 ng/µl) 混合，再加入5 µl 2 X ligase buffer，1

μl T4 DNA ligase (3 U/ μl), 加入滅菌二次水定量至10 μl , 均勻混合後, 置於4 °C 反應18小時以上, 第2天轉形至勝任細胞。

4、勝任細胞製備與轉型

(1) 勝任細胞(Competent cell)之製備

本研究使用之勝任細胞為 Library Efficiency® DH5 Competent Cells (Invitrogen) 經多次使用後自行培養。本研究所使用之 Luria-Bertani (LB), 其主要成分如下所示: 1% tryptone、0.5% yeast extract 和 0.5% NaCl, 經由高溫高壓滅菌處理; 而 LB 固體培養基為每公升之 LB 培養液加入 15 克 Bacto-agar, 經高溫高壓滅菌後, 冷卻至 55 °C, 倒入培養皿內, 待其凝固。

利用傳統氯化鈣 (CaCl_2) 法製備勝任細胞, 其方法簡述如下: 於製備前一天, 自 -70°C 取出儲存的菌種, 培養在 LB 培養液中, 並置於 37°C 恆溫箱中振盪培養過夜。置於 37°C 繼代培養至 OD_{600} 為 0.4。將菌液倒入 50 ml 離心管, 置於冰上 5-10 分鐘後, 以 $4000 \times g$ 於 4 °C 下離心 10 分鐘以收集細胞; 小心倒棄上清液, 以 $1/3$ 菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl_2 緩慢加入, 並使菌體懸浮其中, 置於冰浴中 30 分鐘後, 於 4 °C 下, 以 $4000 \times g$ 的離心力離心 10 分鐘; 倒棄上清液, 重複上述步驟, 同樣加入 10 ml 冰的 0.1 M CaCl_2 使菌體懸浮其中、並置於冰浴 30 分鐘後, 以 $4000 \times g$ 於 4 °C 下離心 10 分鐘, 倒棄上清液; 再加入 $1/25$ 菌液體積的冰冷 0.1 M CaCl_2 含 10% 甘油溶液懸浮混勻; 並迅速分裝入微量離心管, 置於 -70°C 保存。

(2) 勝任細胞之轉型 (transformation)

取勝任細胞在冰浴上退冰，加入質體連接溶液混合之，置冰上30分鐘後，於42°C乾浴器中培養90秒，進行熱休克 (heat shock) 處理，加入1ml LB培養液，置於37°C恆溫箱振盪培養1小時，將此載體細菌塗於含抗生素100 µg/ml ampicillin之LB固體培養基上，在表面塗有40 µl X-gal (80 µg/ml ; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside溶於N,N'-dimethylformamide) 與 IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside , 0.1 M) 以進行藍白篩選，置於37°C恆溫箱中約12~16小時，待菌落長出後，挑出白色菌落再培養，加以分析DNA序列。

5、質體萃取

本研究使用 Gene-Spin™ Miniprep Purification Kit (Protech Technology) 做質體萃取，方法簡述如下：

取培養達 OD₆₀₀ 為 0.6 之菌液，分別倒入 1.5 ml 微量離心管中，以 6000 rpm，離心 2 分鐘後，倒去上清液。沉澱之菌體，加入 200 µl Solution I 配方，劇烈振盪使菌體完全懸浮，置於室溫 5 分鐘。加入 200 µl Solution II 配方，蓋上管蓋後將管子反覆上下搖動 3 次，加入 200 µl Solution III 配方，溫和搖勻。以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，小心吸取上清液至 spin column 中。以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾出液，並加入 700 µl 之 wash buffer，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。去除濾出液再以 12,000 rpm 離心 3 分鐘，再將 spin column 置於乾浴槽 42

烘乾 10 分鐘；最後加適量滅菌水到 spin column，於室溫靜置 1 分鐘後，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，將 DNA 溶液收集後備用。

6、序列比對與分析

(1) DNA定序

本實驗採用 Applied Biosystem 公司之 Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 來進行 DNA 定序反應，方法簡述如下：

取 200 到 500 ng 帶有目標基因的 plasmid DNA，加入 3.2 pmol 的質體專一引子 M13R(5'-GTAAAACGACGCGGCCAGT-3')或 M13F (5'-AACAGCTATGACCATG-3') 及 2 µl Big Dye 混合液，加滅菌水至 10 µl；再將反應物進行 PCR 反應，設定條件為 90 10 秒、50 5 秒、60 4 分鐘，共進行 25 個循環。將上述反應物取出，加入 2 µl sodium acetate (3M、pH 值 5.0) 及 50 µl 100%酒精，置於室溫培養 15 分鐘，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液；收集沉澱之 DNA 待其殘留之酒精完全揮發後，加入變性劑 Hi-Di™ Formamide，以 ABI genetic analyzer 310 分析其 DNA 序列。

(2) 序列比對

本實驗使用序列比對軟體，為國家衛生研究院提供之 Seqweb Version 2。

(3) 序列分析

本實驗所用序列分析軟體，是使用 The BioInformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) 之 WWW Signal Scan 所分析。

二、C2C12 肌原細胞株之培養與繼代、外源基因轉染試驗與分析

(一) C2C12 肌原細胞株之培養與繼代

本研究中所使用的細胞株 C2C12 購買自 ATCC (ATCC[®] no. CRL-1772)。細胞培養與繼代方法簡述如下：

C2C12細胞培養在含有抗生素1%之P/S (penicillin-streptomycin ; GIBGO Cat. No.15140-122) 與10% FBS (fetal bovine serum ; Hyclone Cat. No. SV30014.03) 之DMEM (Dulbecco's modification of eagles medium ; GIBGO Cat. No. 12100-046) 培養液中，並且培養於37 含有5% CO₂及飽和溼度的培養箱中；當細胞長至70%滿度時，進行繼代培養；繼代時先將所有培養液移除，用含有0.25% trypsin-EDTA (GIBCO 15400-054) 之HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) 溶液清洗培養皿2次；再加入適量的溶液，於37 下作用數十秒，輕拍培養皿，使細胞自培養皿脫落；加入DMEM培養液，將含有細胞之 trypsin-EDTA 溶液收集至離心管；以1300 X g 離心5分鐘，去除 trypsin-EDTA 溶液；把離心管內細胞沉澱物敲散後，加入適量新鮮之 DMEM 培養液將細胞重新懸浮；取適量含有細胞之DMEM培養液分散到各培養皿內，將之培養於37 含有5%CO₂及飽和溼度的培養箱中。

(二) 外源基因轉染 C2C12 試驗

1、報導基因構築之引子製備

在構築報導質體時所用之共同引子為 myo-prom-Bgl (5'-CGC CAGATCTGATTTTAAAATCAATACAATCTTTC-3') 與 myo-prom-Mlu 1184 (5'-ATAACGCGTTTCTCTGCTCCCAGACCTTA-3') 可產生 1184bp 產物； myo-prom-Mlu 400 (5'-ATAACGCGTTTAAA GTTTCACTAATAAAG-3') 則可產生 431 bp 產物； pig-promyo-Mlu 800 (5'-ATAACGCGTTTAATCTGCAACTTTAG-3') 則可產生 831 bp 產物。

本研究所使用之引子均委託銳基國際股份有限公司代為合成，並將所有的引子濃度調整為 10 μ M 備用。

2、聚合? 鏈鎖反應

(1) 引子條件：

在構築報導質體時所用之引子分別用 myo-prom-Mlu 1184 與 myo-prom-Bgl , PCR 擴增之產物預計為 1195 bp , 其 PCR 反應條件為 95 1 分鐘、 50 1 分鐘及 72 1 分鐘 , 共進行 25 個循環； pig-promyo-Mlu 800 與 myo-prom-Bgl , PCR 擴增之產物預計為 833 bp , 其 PCR 反應條件為 95 1 分鐘、 50 1 分鐘及 72 1 分鐘 , 共進行 25 個循環； myo-prom-Mlu 400 與 myo-prom-Bgl , PCR 擴增之產物預計為 431 bp , 其 PCR 反應條件為 95 1 分鐘、 50 1 分鐘及 72 1 分鐘 , 共進行 25 個循環。

所用之試驗條件，均為每50 μ l之PCR反應，樣品則是取實驗前段，已經DNA序列分析，含有不同SNP之pGEN-T Easy載體；所需之

試劑量最後濃度為：dNTP為0.2 mM、 $MgCl_2$ 為1.5 mM、引子為0.2 nM、Taq DNA polymerase則為2.5 unit、所添加之DNA為10 ng、其餘體積不足者則添加去滅菌離子水。

3、限制酵素切割 DNA、純化與接合反應

本研究使用之限制酵素為 *Mlu* (Promega) 與 *Bgl* (Promega), 樣品則為 pGL3 promoter (Promega) 與以構築報導質體引子用 PCR 方法大量製作之產物, 方法簡述如下：

取適量之 DNA 後加入 0.5 μ l 之 *Mlu* (10 u/ μ l) 與 *Bgl* (10 u/ μ l), 並加入 2 μ l 10 X D buffer, 加滅菌水至 20 μ l, 置於 37 保溫箱中反應 1 小時。完成切割後, 馬上將反應產物加入等體積之三氯甲烷 (chloroform) 與酚 (phenol) 激烈震盪 30 秒後, 取上清液, 加入 1/3 體積 3 M 醋酸鈉 (sodium acetate) 與等體積之無水酒精 (ethanol), 混合均勻後, 置於 -80 1 小時, 取出後離心 13,000 X g 30 分鐘; 去除上清液; 加 200 μ l 70% 酒精, 離心 13,000 X g 5 分鐘, 置於乾浴槽 60 5 分鐘, 去除多餘的酒精。

取經限制酵素處理過之基因片段與載體, 加入 5 μ l 之 2 X ligase buffer, 1 μ l T4 DNA ligase (3 U/ μ l), 加入滅菌水至 10 μ l, 均勻混合後, 置於 4°C 反應過夜; 第 2 天轉形至 DH5-a 勝任細胞, 抽出質體, 再用其專一性引子, 執行 PCR 反應, 以確定片段是否正確。

4、萃取轉染細胞用之質體

本研究採用 QIAGEN Plasmid Midi Kits (QIAGEN) 萃取轉染細

胞用之質體，方法簡述如下：

取培養至OD₆₀₀為0.6之菌液，分批倒入50 ml離心管中，以4、6,000 rpm，離心15分鐘，倒去上清液。將沉澱菌體加入4 ml P1配方，劇烈振盪使菌體完全懸浮。加入4 ml P2配方，蓋上管蓋後將管子反覆上下搖動5次，置於室溫5分鐘，加入4 ml P3配方，溫和搖動5次，置於冰上15分鐘。將離心管在4、20,000 rpm下離心30分鐘，小心吸取上清液，放置於乾淨之離心管中，於4、20,000 rpm離心15分鐘。並以QBT溶液浸潤QIAGEN-tip 100，待QBT溶液自然流出，將離心過之上清液加入QIAGEN-tip 100過濾。等上清液流乾後，於QIAGEN-tip 100分別加入兩次10 ml QC溶液，以清洗QIAGEN-tip 100濾膜。等QC溶液流完後、更換乾淨之收集容器、加入5 ml QF溶液到QIAGEN-tip 100，將DNA萃取出。再將萃出液加入3.5 ml異丙醇混合均勻，以4、15,000 X g 離心30分鐘，去除上清液後，加入2 ml 70 %酒精，以15,000 X g 離心10分鐘。完全除上清液後，加入適量之滅菌水將DNA溶解備用。

5、外源基因轉染

本研究採用 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 進行外源基因轉染 C2C12 試驗，方法簡述如下：

將 C2C12 培養至六至八分滿（60-80% confluence）時，以 lipofection，將含有不同第八生長分化因子調節區域基因之載體，送入細胞內。

用適量體積之 DMEM 混合實驗所需之 Lipofectamine 2000，混合均勻；相同地，用同體積之 DMEM 混合載體，再將已混合好之 Lipofectamine 2000 與載體均勻混合在一起，於室溫下靜置 30 分鐘，再加入 DMEM 均勻混合。靜置完成後，細胞先以 DMEM 清洗過二次，去除原本培養基中 FBS 與抗生素成分。將混合好質體加到培養基中，培養於 37 細胞培養箱，6 小時後，將培養液更換為新鮮含有 10% FBS 與 P/S 之 DMEM，再放回 37 細胞培養箱，繼續培養 48 小時。

(三) 外源基因轉染 C2C12 試驗之分析

本實驗採用 Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent (Roche) 與 Luciferase Assay System (Promega) 來進行分析，步驟簡述如下：

1、C2C12 上清液

將已經轉染並培養 48 小時細胞之培養液去除，用 phosphate buffer solution (PBS) 清洗 2 次，用 Luciferase Assay System 所提供之 1 X lysis buffer 加 300 μ l 到培養基內，浸洗細胞後迅速刮下。把含有細胞之 lysis buffer 吸到微量離心管內，進行震盪 15 秒後，於冰上靜置 10 分鐘，以 12,000 X g 離心 2 分鐘，取上清液保存於 -70 。

2、細胞總蛋白質測量

本研究是依據 Bradford 法 (Bradford, 1976)。所使用試劑購 BIO-RAD，以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 為標準品，

測其有效偵測範圍0.1-50 μg 分析時將待測樣品與分析試劑(Bradford Solution) 以4 : 1之比例混均 , 於室溫下反應5分鐘 , 以分光光度計測量595nm吸收值。再配合標準曲線 , 以內插法求得蛋白質濃度。

3、 β -galactosidase 測量

取C2C12上清液70 μl , 加入100 μl Substrate Reagent (β -gal Substrate與Assay Buffer以1:99比例混合) , 置於微量離心管中37 作用1小時後 , 再取Initiation Reagent 50 μl (Enhancer與Initiation Solution 以1:5比例混合) 置於玻璃管內 , 將混和物加入後輕搖數次 , 置於OPTOCOMP™ I Luminometers 內偵測20秒。

4、Luciferase 測量

取 100 μl 以混合之 Luciferase Assay Reagent (由 Luciferase Assay Substrate 與 Luciferase Assay Buffer 依說明書混合) 加到玻璃管內 , 並取 50 μl C2C12 上清液 , 輕搖數次 , 置於 OPTOCOMP™ I Luminometers 內偵測 10 秒。

5、統計分析

本實驗採用 Sgwin 程式 , 進行 one-way ANOVA 計算。

伍、結 果

一、豬之動物第八生長分化因子 (Myostatin) 基因序列、氨基酸序列之探討

檢索 GenBank 中現有被登錄之第八生長分化因子序列，在不同品系種豬，分別有 4 段完整 cDNA 序列被登錄，分別是約克夏 (AF188638)、梅山豬 (AF188637)、漢布夏 (AF188636) 與杜洛克 (AF188635)，經比對分析後，發現彼此間之 cDNA 沒有差異(圖一)，再轉換成 375 個胺基酸序列，也是相同結果，由此結果得知，不同品種豬生長性狀之間與氨基酸序列應是沒有相關性。

二、豬之動物第八生長分化因子 (Myostatin) 調節區域之選殖

本實驗所欲探討之區域為第八生長分化因子上游調節區域，檢視調節區域序列，是否會因品種不同，而有差異。首先根據豬第八生長分化因子基因之 genomic DNA 序列 (AY208121)，設計二個寡核? 酸引子，分別是 myo-prom-1184 (5'-TTCTCTGCTCCCAGACCTTACC-3') 與 myo-prom 186 (5'-TAGGAGCTGTTTCCAGGCGAAG-3')，用來增殖第八生長分化因子上游調節區域片段，其 PCR 產物為 1371 bp。實驗中同時針對可在各組織常在性表現之 β -actin 基因 (AJ312193)，設計增殖 β -actin 基因片段之引子分別為 pig-b 60 (5'-CCACTGGCATTGTCATGGAC-3') 與 pig-b 417 (5'-AGGAAGGA

GGGCTGGAAGAG-3’), 其 PCR 產物為 358 bp, 以作為實驗之內部對照。

自豬全血中萃取出 genomic DNA, 以此 1 μ g DNA 當作做模板, 分別和 pig-b 60 加 pig-b 417 與 myo-prom-1184 加 myo-prom 186 引子進行 PCR, 並進行第八生長分化因子調節區域選殖。結果顯示, 在使用 pig-b 60 與 pig-b 417 這對引子, 可以在不同樣品得到 β -actin 之 358 bp 片段 (圖二之 A), 代表這些 genomic DNA 品質尚佳; 接著繼續進行第八生長分化因子調節區域選殖, 結果顯示, 利用 myo-prom-1184 及 myo-prom 186 引子進行 PCR, 自不同樣品可得到介於 1 kb 與 1.5 kb 間之產物, 與預估第八生長分化因子調節區域長度約 1.4 kb 相似 (圖二之 B)。

為進一步確定 PCR 產物是否為第八生長分化因子調節區域, 實驗進一步將 PCR 產物從瓊脂糖膠切下, 進行膠體純化後, 執行接合作用, 接至 pGEM-T Easy Vector 上, 再將接合過之質體用熱休克方式 (heat-shock) 轉型至 DH5-a 勝任細胞內, 培養適量後, 塗抹於含有抗生素 ampicillin、IPTG 與 X-gal, 雙重篩選方式之瓊脂糖膠上, 再培養約 16 小時。將不產生 Lac Z 酵素之白色菌落挑出分別培養, 抽出質體, 利用 myo-prom-1184、myo-prom 186 引子進行 PCR, 重複確認質體正確性, 將產生正確片段之質體, 進行 DNA 序列分析。

每一個樣品至少取 2 個以上不同菌落所抽出之質體做序列分析, 每段質體再分成三個段落, 確保分析之正確性; 將分析好之序列

分別比對；結果顯示（圖三），在不同品種之間啟動密碼子（start codon），上游 808 與 796 位置出現不同位點變化（在本研究中，後續統一說法為，位在轉錄起始位置上游 698 與 686 位置）；其組合方式在藍瑞斯與約克夏為 AG；杜洛克、蘭嶼豬、梅山豬、桃園豬為 GA；而還有另一個 LYD 三品種雜交豬，出現另一種組合為 AA。除了這兩個位點有出現差異外，其餘序列皆完全相同；但在轉錄起始位置上游 698 與 686 位置，除了約克夏，四個樣品均為 AG 組合外，並不是同品系間是完全相同（表一），甚至同一個體結果也不一定相同。在藍瑞斯，四隻種豬只有一隻在三重複實驗下，結果是一致，在上述兩個位點組合為 AG，還有另一種 GA 之組合，相同狀況也出現在其他品種；約克夏，有三隻在三重複實驗下，結果是一致，兩個位點組合為 AG，但也有另一種 GA 之組合出現；杜洛克，有一個樣品完全為 GA 組合，另外也有 AG 組合出現；蘭嶼豬為三個樣品為 GA 組合，有一個樣品還有出現 AG 組合；LYD 三品種雜交豬有一個樣品完全為 AA 組合，其他三個樣品也有 AG 組合出現；梅山豬與桃園豬因採樣問題，一個樣品可分析之 genomic DNA 量只足夠分析一次，將之列入參考，所出現之組合都為 GA。

三、豬之動物第八生長分化因子之調節區域序列分析

首先，將本實驗所得之第八生長分化因子上游調節區域，找到位於啟動密碼子前之轉錄起始位置（Inr；initiator）。但因採樣限制，無

法進行研究，而且也尚未有研究結果發表，所以藉由已知之人類第八生長分化因子 genomic DNA 進行比對，推論轉錄起始位置；豬之第八生長分化因子轉錄起始位置若與人類相似，應在轉譯起始位置（translation initiation site）上游 110 bp，在序列 CA 後方（圖四），且人、豬與小鼠在調節區域 1.7 kb 相似度高達 73 %。

將此序列（SNP 位置組合為 GA 時），利用 The BioInformatics & Molecular Analysis Section（BIMAS）之 WWW Signal Scan 分析；結果顯示，豬第八生長分化因子調節區域 1173 bp 內之 DNA 轉錄所必需，且最常見之順式元件（cis-acting element），包括有 2 個 TATA box 與 1 個 CCAAT box；還有調節肌肉細胞分化元件，如 10 個 E-box 及為 1 個 MEF2-1 與 MEF2-2；其他與基因調控有關元件，分別為 2 個 CACCC box，4 個 GATA box，1 個 HiNF-A binding site，1 個 IgPE-1 binding site，1 個 LF-A1 binding site，1 個 TFE3 binding site，1 個 Enhancer，1 個 PEA3 binding site，1 個 H4TF1 binding site，1 個 NEF binding site，1 個 YY1 binding site 與 5 個 POU protein binding site（圖五、表二）。

若將不同 SNP 狀況加入分析預測後，則會出現不同結果（圖六），GA 組合（SNP 之組合，第一個核？酸為上游 698 位置，第二個核？酸為上游 686 位置）在該處是沒有出現順式元件，若為 AA 組合時，則會因為 698 位置核？酸由 G 改變為 A，出現一個 PEA3 binding site；若為 AG 組合時，則會因為 686 位置核？酸由 A 改變為 G，再出現 1

個元件 enhancer，這樣之改變很可能造成第八生長分化因子表現會有差異。

四、豬之動物第八生長分化因子之調節區域報導載體構築與細胞實驗分析

為了進一步了解出現在Inr上游698與686位置之差異，是否影響第八生長分化因子表現，將三種不同組合（GA、AA、AG）之1.2 kb調節區域，建構至具有螢火蟲螢光基因（fire fly luciferase gene）之pGL3報導載體上做分析。

首先之預備試驗，要了解使用何種細胞以及何種條件為最佳分析狀態；將先前建構於pGEN-T easy上之不同SNP調節區域，利用含有酵素限制？序列之引子，myo-prom-Bgl（具有*Bgl*切位）與myo-prom-Mlu 1184（具有*Mlu*切位）進行PCR，可產生1195 bp產物，大量製造三種不同組合調節區域，將PCR產物進行膠體純化，再經酵素限制？*Bgl*與*Mlu*切割，再純化後備用。另一方面也大量生產pGL3-enhancer載體，經酵素限制？*Bgl*與*Mlu*切割，再純化後，與先前處理過之PCR產物行接合作用，製成不同SNP調節區域之報導載體；分別命名為myo-GA1.2、myo-AA1.2、myo-AG1.2用相同方法，以myo-prom-Mlu 400產生從不含start codon上游第一個位置之調節區域431 bp之產物，還有pig-promyo-Mlu 800可產生從不含start codon上游第一個位置之調節區域833 bp產物，分別命名為

myo-0.4與myo-0.8 (圖七)。

將所建構完成之報導質體，與要作為轉染效率內部控制組pCH110質體 (具有 β -galactosidase基因)，分別做共同轉染，轉染L6 (rat myoblast)、L8 (rat myoblast)、C2C12 (mouse myoblast) 三種不同細胞株，用以選擇最適細胞株與最適條件；利用 β -galactosidase染色法，觀察轉染效率，結果顯示，以取pCH110與pGL3-control各1 μ g效果較其他兩組佳，又以在C2C12內表現量為最多 (圖八A)。為確定C2C12是一適當模式，也針對內源性第八生長分化因子做偵測，結果顯示，C2C12的確有內源性第八生長分化因子表現。後續實驗就以C2C12及其最適之條件進行 (圖八B)。

共同轉染試驗，是用3.5公分細胞培養皿，C2C12養至約七成，每一次實驗除了pCH110質體1 μ g外，分別加入myo-0.4、myo-0.8、myo-GA1.2、myo-AA1.2、myo-AG1.2與當做對照用pGL-control載體各1 μ g，共有六組處理。每一個處理均為二重複，共測試七次；實驗結果必須偵測總蛋白質量、 β -galactosidase表現量與luciferase表現量，計算方法以在相同蛋白質量與相同轉染效率 (β -galactosidase表現作為參考值) 狀況下，將luciferase表現量，以pGL-control結果為基準，利用one-way ANOVA計算；結果發現，myo-0.4之表現為處理組中較最好，而myo-GA 1.2表現最差，處理組彼此之間無顯著差異 ($P>0.05$) (圖九)。

1

100

MSTN-D ATGCAAAAAC TGCAAATCTA TGTTTATATT TACCTGTTTA TGCTGATTGT TGCTGGTCCC GTGGATCTGA ATGAGAACAG CGAGCAAAAAG GAAAATGTGG
MSTN-H ATGCAAAAAC TGCAAATCTA TGTTTATATT TACCTGTTTA TGCTGATTGT TGCTGGTCCC GTGGATCTGA ATGAGAACAG CGAGCAAAAAG GAAAATGTGG
MSTN-M ATGCAAAAAC TGCAAATCTA TGTTTATATT TACCTGTTTA TGCTGATTGT TGCTGGTCCC GTGGATCTGA ATGAGAACAG CGAGCAAAAAG GAAAATGTGG
MSTN-Y ATGCAAAAAC TGCAAATCTA TGTTTATATT TACCTGTTTA TGCTGATTGT TGCTGGTCCC GTGGATCTGA ATGAGAACAG CGAGCAAAAAG GAAAATGTGG

101

200

MSTN-D AAAAAGAGGG GCTGTGTAAT GCATGTATGT GGAGACAAAA CACTAAATCT TCAAGACTAG AAGCCATAAA AATTCAAATC CTCAGTAAAC TTCGCCTGGA
MSTN-H AAAAAGAGGG GCTGTGTAAT GCATGTATGT GGAGACAAAA CACTAAATCT TCAAGACTAG AAGCCATAAA AATTCAAATC CTCAGTAAAC TTCGCCTGGA
MSTN-M AAAAAGAGGG GCTGTGTAAT GCATGTATGT GGAGACAAAA CACTAAATCT TCAAGACTAG AAGCCATAAA AATTCAAATC CTCAGTAAAC TTCGCCTGGA
MSTN-Y AAAAAGAGGG GCTGTGTAAT GCATGTATGT GGAGACAAAA CACTAAATCT TCAAGACTAG AAGCCATAAA AATTCAAATC CTCAGTAAAC TTCGCCTGGA

201

300

MSTN-D AACAGCTCCT AACATTAGCA AAGATGCTAT AAGACAACCTT TTGCCCAAAG CTCCTCCACT CCGGGAAGT ATTGATCAGT ACGATGTCCA GAGAGATGAC
MSTN-H AACAGCTCCT AACATTAGCA AAGATGCTAT AAGACAACCTT TTGCCCAAAG CTCCTCCACT CCGGGAAGT ATTGATCAGT ACGATGTCCA GAGAGATGAC
MSTN-M AACAGCTCCT AACATTAGCA AAGATGCTAT AAGACAACCTT TTGCCCAAAG CTCCTCCACT CCGGGAAGT ATTGATCAGT ACGATGTCCA GAGAGATGAC
MSTN-Y AACAGCTCCT AACATTAGCA AAGATGCTAT AAGACAACCTT TTGCCCAAAG CTCCTCCACT CCGGGAAGT ATTGATCAGT ACGATGTCCA GAGAGATGAC

301

400

MSTN-D AGCAGTGATG GCTCCTTGGG AGATGATGAT TATCACGCTA CGACGGAAAC GATCATTACC ATGCCTACAG AGTCTGATCT TCTAATGCAA GTGGAAGGAA
MSTN-H AGCAGTGATG GCTCCTTGGG AGATGATGAT TATCACGCTA CGACGGAAAC GATCATTACC ATGCCTACAG AGTCTGATCT TCTAATGCAA GTGGAAGGAA
MSTN-M AGCAGTGATG GCTCCTTGGG AGATGATGAT TATCACGCTA CGACGGAAAC GATCATTACC ATGCCTACAG AGTCTGATCT TCTAATGCAA GTGGAAGGAA
MSTN-Y AGCAGTGATG GCTCCTTGGG AGATGATGAT TATCACGCTA CGACGGAAAC GATCATTACC ATGCCTACAG AGTCTGATCT TCTAATGCAA GTGGAAGGAA

401

500

MSTN-D AACCCAAATG CTGCTTCTTT AAATTTAGCT CTAAAATACA ATACAATAAA GTAGTAAAGG CCCAACTGTG GATATATCTG AGACCCGTCA AGACTCCTAC
MSTN-H AACCCAAATG CTGCTTCTTT AAATTTAGCT CTAAAATACA ATACAATAAA GTAGTAAAGG CCCAACTGTG GATATATCTG AGACCCGTCA AGACTCCTAC
MSTN-M AACCCAAATG CTGCTTCTTT AAATTTAGCT CTAAAATACA ATACAATAAA GTAGTAAAGG CCCAACTGTG GATATATCTG AGACCCGTCA AGACTCCTAC
MSTN-Y AACCCAAATG CTGCTTCTTT AAATTTAGCT CTAAAATACA ATACAATAAA GTAGTAAAGG CCCAACTGTG GATATATCTG AGACCCGTCA AGACTCCTAC

501

600

MSTN-D AACAGTGTTT GTGCAAATCC TGAGACTCAT CAAACCCATG AAAGACGGTA CAAGGTATAC TGGAATCCGA TCTCTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT
MSTN-H AACAGTGTTT GTGCAAATCC TGAGACTCAT CAAACCCATG AAAGACGGTA CAAGGTATAC TGGAATCCGA TCTCTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT
MSTN-M AACAGTGTTT GTGCAAATCC TGAGACTCAT CAAACCCATG AAAGACGGTA CAAGGTATAC TGGAATCCGA TCTCTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT
MSTN-Y AACAGTGTTT GTGCAAATCC TGAGACTCAT CAAACCCATG AAAGACGGTA CAAGGTATAC TGGAATCCGA TCTCTGAAAC TTGACATGAA CCCAGGCACT

700

601

MSTN-D GGTATTTGGC AGAGCATTGA TGTGAAGACA GTGTTGCAA ATTGGCTCAA ACAACCTGAA TCCAACCTAG GCATTGAAAT CAAAGCTTTA GATGAGAATG
MSTN-H GGTATTTGGC AGAGCATTGA TGTGAAGACA GTGTTGCAA ATTGGCTCAA ACAACCTGAA TCCAACCTAG GCATTGAAAT CAAAGCTTTA GATGAGAATG
MSTN-M GGTATTTGGC AGAGCATTGA TGTGAAGACA GTGTTGCAA ATTGGCTCAA ACAACCTGAA TCCAACCTAG GCATTGAAAT CAAAGCTTTA GATGAGAATG
MSTN-Y GGTATTTGGC AGAGCATTGA TGTGAAGACA GTGTTGCAA ATTGGCTCAA ACAACCTGAA TCCAACCTAG GCATTGAAAT CAAAGCTTTA GATGAGAATG

701

800

MSTN-D GTCATGATCT TGCTGTAACC TTCCCAGGAC CAGGAGAAGA TGGGCTGAAT CCCTTTTTAG AAGTCAAGGT AACAGACACA CAAAAAGAT CCAGGAGAGA
MSTN-H GTCATGATCT TGCTGTAACC TTCCCAGGAC CAGGAGAAGA TGGGCTGAAT CCCTTTTTAG AAGTCAAGGT AACAGACACA CAAAAAGAT CCAGGAGAGA
MSTN-M GTCATGATCT TGCTGTAACC TTCCCAGGAC CAGGAGAAGA TGGGCTGAAT CCCTTTTTAG AAGTCAAGGT AACAGACACA CAAAAAGAT CCAGGAGAGA
MSTN-Y GTCATGATCT TGCTGTAACC TTCCCAGGAC CAGGAGAAGA TGGGCTGAAT CCCTTTTTAG AAGTCAAGGT AACAGACACA CAAAAAGAT CCAGGAGAGA

801

900

MSTN-D TTTTGGACTC GACTGTGATG AGCACTCAAC AGAATCTCGA TGCTGTCGTT ACCCTCTAAC TGTGGATTTT GAAGCTTTTG GATGGGACTG GATTATTGCA
MSTN-H TTTTGGACTC GACTGTGATG AGCACTCAAC AGAATCTCGA TGCTGTCGTT ACCCTCTAAC TGTGGATTTT GAAGCTTTTG GATGGGACTG GATTATTGCA
MSTN-M TTTTGGACTC GACTGTGATG AGCACTCAAC AGAATCTCGA TGCTGTCGTT ACCCTCTAAC TGTGGATTTT GAAGCTTTTG GATGGGACTG GATTATTGCA
MSTN-Y TTTTGGACTC GACTGTGATG AGCACTCAAC AGAATCTCGA TGCTGTCGTT ACCCTCTAAC TGTGGATTTT GAAGCTTTTG GATGGGACTG GATTATTGCA

901

1000

MSTN-D CCCAAAAGAT ATAAGGCCAA TTAGTGCTCT GGAGAGTGTG AATTTGTATT TTTACAAAAA TACCCTCACA CTCATCTTGT GCACCAAGCA AACCCCAGAG
MSTN-H CCCAAAAGAT ATAAGGCCAA TTAGTGCTCT GGAGAGTGTG AATTTGTATT TTTACAAAAA TACCCTCACA CTCATCTTGT GCACCAAGCA AACCCCAGAG
MSTN-M CCCAAAAGAT ATAAGGCCAA TTAGTGCTCT GGAGAGTGTG AATTTGTATT TTTACAAAAA TACCCTCACA CTCATCTTGT GCACCAAGCA AACCCCAGAG
MSTN-Y CCCAAAAGAT ATAAGGCCAA TTAGTGCTCT GGAGAGTGTG AATTTGTATT TTTACAAAAA TACCCTCACA CTCATCTTGT GCACCAAGCA AACCCCAGAG

1001

1100

MSTN-D GTTCAGCAGG CCCCTGCTGT ACTCCCACAA AGATGTCTCC AATCAATATG CTATATTTTA ATGGCAAAGA ACAAATAATA TATGGGAAAA TTCCAGCCAT
MSTN-H GTTCAGCAGG CCCCTGCTGT ACTCCCACAA AGATGTCTCC AATCAATATG CTATATTTTA ATGGCAAAGA ACAAATAATA TATGGGAAAA TTCCAGCCAT
MSTN-M GTTCAGCAGG CCCCTGCTGT ACTCCCACAA AGATGTCTCC AATCAATATG CTATATTTTA ATGGCAAAGA ACAAATAATA TATGGGAAAA TTCCAGCCAT
MSTN-Y GTTCAGCAGG CCCCTGCTGT ACTCCCACAA AGATGTCTCC AATCAATATG CTATATTTTA ATGGCAAAGA ACAAATAATA TATGGGAAAA TTCCAGCCAT

1101

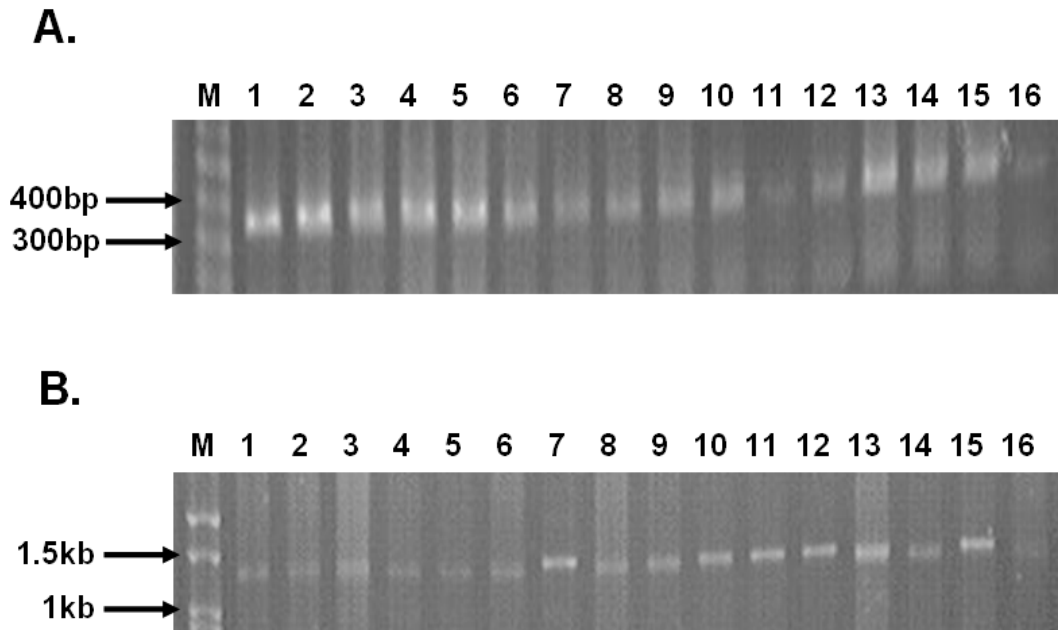
1128

MSTN-D GGTAGTAGAT CGCTGTGGGT GCTCATGA
MSTN-H GGTAGTAGAT CGCTGTGGGT GCTCATGA
MSTN-M GGTAGTAGAT CGCTGTGGGT GCTCATGA
MSTN-Y GGTAGTAGAT CGCTGTGGGT GCTCATGA

(接續前頁)

圖一、不同品種豬第八生長分化因子之 cDNA 序列比對分析。MSTN-D 表示品種為杜洛克，檢索編號為 AF188635，MSTN-H 表示品種為漢布夏，檢索編號為 AF188636，MSTN-M 表示品種為梅山豬，索編號為 AF188638、MSTN-Y 表示品種為約克夏，檢索編號為 AF188638。

Fig 1. Alignment of myostatin cDNA sequences from different breeds of porcine. MSTN-D represents Duroc (GenBank accession number AF188635); MSTN-H represents Hampshire (GenBank accession number AF188636); MSTN-M represents Meishan (GenBank accession number AF188638); MSTN-Y represents Yorkshire (GenBank accession number is AF188638).



圖二、為不同豬品種之 β -actin 和第八生長分化因子 5' 調節區域 PCR 產物之電泳圖；

(A) β -actin 基因，產物為 358 bp；(B) 第八生長分化因子調節區域，產物為 1371 bp；M：標記物，lane 1-4：杜洛克，lane 5-8：藍瑞斯，lane 9-12：約克夏，lane 13-16：蘭嶼豬。

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of β -actin and myostatin PCR products from different breeds of porcine. (A) Amplification of a β -actin from fragment. The size of the amplicon is 358 bp. (B) Amplification of the myostatin 5' regulatory region. The expected size of the amplicon is 1371 bp. M: DNA molecular marker; lane 1-4: Duroc; lane 5-8: Landrace; lane 9-12: Yorkshire; lane 13-16; Taiwan Lanyu.

	-1184											-1085
AY20812	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-Duroc	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-Landrac	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-Yorkshi	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-Lanyu	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MTST-Meishan	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-Taoyuan	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAAT.C	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
MSTN-F	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAATGC	CCTGCCAGGT	GTCTGCCCTC	TGGTCAAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA	CAGAATTGGG		
	-1084											-985
AY20812	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-Duroc	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-Landrac	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-Yorkshi	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-Lanyu	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MTST-Meishan	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-Taoyuan	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
MSTN-F	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA	CATTTTTTAC		
	-984											-885
AY20812	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-Duroc	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-Landrac	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-Yorkshi	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-Lanyu	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MTST-Meishan	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-Taoyuan	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		
MSTN-F	TTTCACCACT	GGAAATCTGA	GGCAAACCTGC	ATTATCAGTC	ATAAAATTCA	TTATCTTTCT	ATTCTAAGTT	ATTCTAAGCT	TATTCTAAGC	TCAGATAGCT		

	-884								-808	-796	-785
AY20812	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGGA	AACTGAGCAC	
MSTN-Duroc	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGAA	AACTGAGCAC	
MSTN-Landrac	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGGA	AACTGAGCAC	
MSTN-Yorkshi	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGGA	AACTGAGCAC	
MSTN-Lanyu	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGAA	AACTGAGCAC	
MTST-Meishan	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGAA	AACTGAGCAC	
MSTN-Taoyuan	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGAA	AACTGAGCAC	
MSTN-F	GACATTATCC	TCTTGGTAAT	AAACAATGAA	AAAACACATC	TTCTGAGCAA	TATTAATCTG	CAACTTTAGG	ATAGGAAAAA	ATCAGTTGAA	AACTGAGCAC	
	-784										-685
AY20812	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-Duroc	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-Landrac	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-Yorkshi	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-Lanyu	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MTST-Meishan	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-Taoyuan	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
MSTN-F	GATTTTCACG	TGAATAAAAAG	ATATTATTTA	AAAATAATTC	CATGTGTAAT	ATAACAGAAT	AAGTATGATT	TTCATTATGT	ACTAGAAAATT	TAGTCAGGAA	
	-684										-585
AY20812	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-Duroc	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-Landrac	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-Yorkshi	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-Lanyu	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MTST-Meishan	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-Taoyuan	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	
MSTN-F	AACAAGTTTC	TCAAATTATA	GCTGAATATA	TTTTACTAGT	ATCACAATCT	TAAATTTTAA	TTCAGGTCTT	CCTAATTTAA	ATCTGTATTT	CTCTGATTAC	

-584-485

AY20812	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-Duroc	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-Landrac	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-Yorkshi	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-Lanyu	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MTST-Meishan	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-Taoyuan	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC
MSTN-F	ACAGGACTAA	AAATAATTTA	AAACAGCAAA	TAAAATTCTT	TTTTCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC

-484-385

AY20812	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-Duroc	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-Landrac	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-Yorkshi	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-Lanyu	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MTST-Meishan	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-Taoyuan	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT
MSTN-F	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA AAAA	GAATTACTTA	TTTAAATTAC	AATTTTAAAG	TTTCACTAAT	AAAGATTAAT	AATATTTAAG	TGCAGTTTAT

-384-285

AY20812	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-Duroc	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-Landrac	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-Yorkshi	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-Lanyu	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MTST-Meishan	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-Taoyuan	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC
MSTN-F	ATTATTGTTA	ACATAGATTT	TAATTTTTCA	AATGTCACAT	ATATCTTTCA	TTATTTGTAG	ATTTATTTCT	TTTATGAAGT	AGTCAAATGA	ATCAGCTCAC

-284 -185

AY20812	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-Duroc	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-Landrac	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-Yorkshi	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-Lanyu	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MTST-Meishan	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-Taoyuan	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT
MSTN-F	CCTTGACTGT	AACAAAATAC	TGTTTGGTGA	CTTGTGACAG	ACAGGGTTTT	AACCTCTGAC	AGCGAGATTC	ATTGTGGAGC	AAGAGCCAAT	CATAGATCCT

-184 -85

AY20812	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-Duroc	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-Landrac	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-Yorkshi	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-Lanyu	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MTST-Meishan	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-Taoyuan	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT
MSTN-F	GACGACACTT	GTCTCATCAA	GTGGAATATA	AAAAGCCACT	TGGAATACAG	TATAAAAGAT	TCACTGGTGT	GGCAAGTTGT	CTCTCAGACA	GTGCAGGCAT

-84 -1

AY20812	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-Duroc	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-Landrac	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-Yorkshi	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-Lanyu	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MTST-Meishan	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-Taoyuan	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG
MSTN-F	TAAAATTTTG	CTTGCCGTTA	CTCAAAAAGCA	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAGGAG	AAAGATTGTA	TTGATTTTAA	AATCATG

(接續前頁)

圖三、不同種豬第八生長分化因子 5'調節區域之比對。在 start codon 上游 808 與 796 位置(方塊框之位置)有 SNP 現象產生;AY20812: 為設計引子時所參考之序列,其餘為本實驗之資料,分別代表 MSTN-Duroc: 杜洛克、MSTN-Landrac: 藍瑞斯、MSTN-Yorkshi: 約克夏、MSTN-Lanyu: 蘭嶼豬、MTST-Meishan: 梅山豬、MSTN-Taoyuan: 桃園豬、MSTN-F: 雜交豬。

Fig. 3. Alignment of myostatin 5' regulatory region from different breeds of porcine. SNPs were found at position 808 and 796 upstream of the start codon. GenBank accession number AY20812 was used to design the primers. MSTN-Duroc, MSTN-Landrac, MSTN-Yorkshi, MSTN-Lanyu, MTST-Meishan, MSTN-Taoyuan and MSTN-F represented the breeds of porcine analysed.

表一、不同品種豬第八生長分化因子 5'調節區域，Inr 上游 698 與 686 位置（在 start codon 上游 808 與 796 位置）SNP 之組合
 Table 1. SNPs combinations of myostatin 5' regulatory region at the position 698 and 686 upstream of Inr from different breeds of porcine

Breed	Sample N	Repeat N	individual sample result : nt 698/nt 686												genotype ratio		
			No. 1			No. 2			No. 3			No. 4			AG	GA	AA
			AG	GA	AA	AG	GA	AA	AG	GA	AA	AG	GA	AA			
Landrace	4	13	2	1	0	2	2	0	3	0	0	2	1	0	9	4	0
Duroc	4	12	0	4	0	1	2	0	1	2	0	1	1	0	3	9	0
Yorkshire	4	9	3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	0	9	0	0
F	4	12	1	0	1	2	0	1	0	0	3	3	0	1	6	0	6
Lanyu	4	12	0	3	0	0	3	0	0	3	0	1	2	0	1	11	0
Meishan	1	2	0	2	0		N/A			N/A			N/A		0	2	0
Taoyuan	2	2	0	1	0	0	1	0		N/A			N/A		0	2	0

- * Sample N : 樣品採樣數目 ; Repeat N : 樣品共重複次數 ; N/A : 未採樣 ; genotype ratio : 為SNP之組合，第一個核? 酸為698位置，第二個核? 酸為686位置。
- * Sample N: numbers of sampling; Repeat N: times of repeats; N/A: did not get sample ; gene type: the combinations of SNPs at position 698, and position 686.

	-1073											-985
MSTN-pro-hum	AAAAGCTCTA	TTCTCTGCTC	CCAGACTTTA	CCCCAAATCC	CTGCCAGGTG	TCTGCCCTCT	GGTCAAAATG	AGAAATTGGC	AAAGGGGTGC	AAACATATCG		
MSTN-pro-pig	~~~~~	TTCTCTGCTC	CCAGACCTTA	CCCCAAATCC	CTGCCAGGTG	TCTGCCCTCT	GGTC.AAATG	AGAAACTGGC	AAAGGGGTGC	AAACCTAGCA		
MSTN-pro-mou	AAAAGCACCA	TTCTCTGC.C	CTAGACTCTA	GCCCAGATCC	CTGCCAGGTG	TCTGCCCTCT	GGTCAAAATG	AGACGCTGGC	AAAGGGGTGC	TAGCCTGTGA		
	-984											-885
MSTN-pro-hum	CAGTATTGGG	AAACAACAAA	AGGTCACCCC	TTTATCATGA	TGCTCTTTCT	CTTTTATGTG	CTCATAATAT	TCTGATATAA	TTTATAGAGA	ATAGATACTG		
MSTN-pro-pig	CAGAATTGGG	AAACAGAAAA	ATGGGCACCC	TTTATTATGG	TGCTCCTTCT	CTTTTATGTG	TTTACAATAC	TTGGGCATAA	TTTACAGAGA	ATAGATACTA		
MSTN-pro-mou	CAGTA.TGGG	AACGCAACAA	AGGACACCCC	TCTA....CA	TGCGACTTGC	TCTTTGTGTG	CTCACGGGAC	.CTGACATCA	TTCACAGAGA	ACACAGATTG		
	-884											-807
MSTN-pro-hum	CACTTTTTAC	TCTCTGGATA	TTTACTGCTG	GAAATCTGAG	GCAAAGTGTA	ATAATCTCTG	CCATGCCAGT	TA.TAAAATT	CATTATCT..	.TAGTCTA..		
MSTN-pro-pig	CATTTTTTAC	T.....	TTCACCACTG	GAAATCTGAG	GCAAAGTGCA	TTA.....TCAGT	CA.TAAAATT	CATTATCTTT	CTATTCTAAG		
MSTN-pro-mou	CAC..TTTAC	T.....	GTCAGCCCTG	GAAGTCTGAG	TCAAAGTAA	ATAAT.GCTC	CAGCGCTACT	TACAAAAATC	CATTATCTAC	TCGGCCTAA.		
	-806											-712
MSTN-pro-hum	.TGTTTCAGAG	ATTTTTCTA.CTAG	CTGGCATTAC	CCTCTTGGTA	AT.....AAA	CAATG.AAAA	ACACATCTTC	TGAGTTATGT	TAATCTGCAT		
MSTN-pro-pig	TTATTCTAAG	CTTATTCTAA	GCTCAGATAG	CTGACATTAT	CCTCTTGGTA	AT.....AAA	CAATGAAAAA	ACACATCTTC	TGAGCAATAT	TAATCTGCAA		
MSTN-pro-mou	..GTACAGAG	CCTGGCCT..CCTCG	CTGACAGGAT	TCTGTTGGCA	ATCAAAAAAAAA	AAAAAAAAAAAA	AAAAAGCAAC	ACTCAGTCTT	TAGTCTGTAT		
	-711											-626
MSTN-pro-hum	CTTTAGAATA	GGAAAT...A	ATAGCACTCA	GTCAAAAAGTT	CAGTATAAAT	TTCATATTAA	TAAAAGACAT	GAAACTATGT	AAAAATAATT	CCATGCACAA		
MSTN-pro-pig	CTTTAGGATA	GGAGAA...A	A.....TCA	GTTGAAAACT	GAGCACGATT	TTCACGTGAA	TAAAAGATATTATTT	AAAAATAATT	CCATGTGTAA		
MSTN-pro-mou	CTCTGTAATA	GAAAAATAGCA	ATACTTATAA	GCTGAAA.TC	AAGCACAGGT	TTTATGTTAG	TCAAAGCCAT	TAAGCTAT.C	AAAAGTAAAC	CCATGTACAC		
	-625											-526
MSTN-pro-hum	TATGTTATAA	TAACAATGAC	TTCCAATATT	TACTAAGAAT	TTAGTCA.GA	AAACAAGTTT	CTCAAATTAT	AGATGAAAAT	TCTCAACTAG	TATCATAATC		
MSTN-pro-pig	TATAACAGAA	TAAGTATGAT	TTTCATTATG	TACTAGAAAAT	TTAGTCAGGA	AAACAAGTTT	CTCAAATTAT	AGCTGAATAT	ATTTTACTAG	TATCACAATC		
MSTN-pro-mou	AGAAACGTCC	CAGGACTGGT	TTGTAATATG	TCCTGACAAA	TAAGCCATGA	AAACAAGCTC	CTCAAATTAC	TGATGCAACT	TTTTAGC.AG	GGTCACAAAC		
	-525											-434
MSTN-pro-hum	TAACTT... ..	TTAAT	TCAGGTCTTC	CTAATT....	..TTTATTTT	CCTAATTACT	TGGCACTAAA	AATAATTTAA	TACAACAAAT	AAAAATATTT		
MSTN-pro-pig	TAAATT... ..	TTAAT	TCAGGTCTTC	CTAATTTAAA	TCTGTATTTT	TCTGATTACA	CAGGACTAAA	AATAATTTAA	AACAGCAAAT	AAAATTTCTTT		
MSTN-pro-mou	TCAGCTTTCT	TAAATTAAG	TCAGCTCTTC	CTAGTT....	..TTTACTTC	.CTAATTACC	CAGCAC....TTAA	CGCA.....TATTT		

	-433		-338									
MSTN-pro-hum	TCTACTTCAA	ATACTTGCCT	AAACAATATA	AAATCATTTT	A.GTTTTTGA	GGAAGTA.AT	ATTTTC.ATAT	TTTAAATATG	TAGTATAAAT	TAAAATTGAC		
MSTN-pro-pig	T.TTCCTCAA	ATGTTTGTCT	AAATAATGTA	AAATCATTTT	ATTTTTTTGA	GGAAAAAGAC	ATTTCAACTT	TTTAAGTATG	AAGTGTA..	.AGAATTAC		
MSTN-pro-mou	TTTCCCTCAA	ATATTTGTTT	TAGTAACAAA	ACAGCACTCC	AAGTCTTAAA	GGATTAACAT	TTT...CTAT	TTTAAACACA	AAATCTAAAT	TAAAAATTAC		
	-337		-238									
MSTN-pro-hum	TTATTTAAAT	TACAA..TAA	GAGTT....G	TGTGAGGATT	AGTAAGATTT	AAGTACAGTT	TATATTATTG	CCAACATAGA	CTTTTGTTTT	TCAAATGTCA		
MSTN-pro-pig	TTATTTAAAT	TACAATTTTA	AAGTTTCACT	AATAAAGATT	AATAATATTT	AAGTGCAGTT	TATATTATTG	TTAACATAGA	TTTTAATTTT	TCAAATGTCA		
MSTN-pro-mou	TAACTTAAAT	GATA..GCAA	GAGTT....T	TACAGAGATT	AATAAGCTTT	AAGTACAGTT	TATATTAGT.	...ACACAGA	CTTCAATTTA	TCAAATGTCA		
	-237		-138									
MSTN-pro-hum	CAAATATCTT	TTATTATTTG	TAGATTTATT	TCTTTTATGA	AGTAGTCAAA	TGAATCAGCT	CACCCTTGAC	TGTAACAAAA	TACTGCTTGG	TGACTTGGGA		
MSTN-pro-pig	CATATATCTT	TCATTATTTG	TAGATTTATT	TCTTTTATGA	AGTAGTCAAA	TGAATCAGCT	CACCCTTGAC	TGTAACAAAA	TACTGTTTGG	TGACTTGTGA		
MSTN-pro-mou	CATATATCTT	TCATGATTTG	GGGATTTATT	TCATTTATGA	AGTAGTCAAA	TGAATCAGCT	TGCCCTCGAC	TGTAACAAAA	TACTGCTTGG	TGACTTGTGA		
	-137		-40									
MSTN-pro-hum	CAGACAGGGT	TTTAACCTCT	GACAGCGAGA	TTCATTGTGG	AGCAAGAGCC	AATCATAGAT	CCTGACGACA	CTTGTCTCAT	CTAAGTTGGA	ATATAAAAAG		
MSTN-pro-pig	CAGACAGGGT	TTTAACCTCT	GACAGCGAGA	TTCATTGTGG	AGCAAGAGCC	AATCATAGAT	CCTGACGACA	CTTGTCTCAT	C..AAGTGGA	ATATAAAAAG		
MSTN-pro-mou	CAGACAGGGT	TTTAACCTCT	GACAGCGAGA	TTCATTGTGG	AGCAGGAGCCAATCATAGAT	CCTGACGACA	CTTGTCTCCT	CTAAGTTGGA	ATATAAAAAG			
	-39		-1									
MSTN-pro-hum	CCACTTGAA	TACAGTATAA	AAGATTCACT	GGTGTGGCA	A	GTTGTCTCTC	AGACTGTACA	TGCATTAATA	TTTTGCTTGG	CATTACTCAA	AAGCAAAAAGA	
MSTN-pro-pig	CCACTTGAA	TACAGTATAA	AAGATTCACT	GGTGTGGCA	A	GTTGTCTCTC	AGACAGTGCA	GGCATTAAATA	TTTTGCTTGG	CGTACTCAA	AAGC.....A	
MSTN-pro-mou	CCACTTGAA	TACAGTATAC	A	G	GACTCCCT	GGCGTGGCAG	GTTGTCTCTC	GGACGGTACA	TGCACTAATA	TTTCACTTGG	CATTACTCAA	AAGC.....
MSTN-pro-hum	AAAGTAAAAG	GAAGAAACAA	GAACAAG...	..AAAAAAGA	TTATATTGATTTTAAAATCA	TG						
MSTN-pro-pig	AAAGTAAAAG	GAAGAAATAA	GAACAAG...	..GAGAAAAGA	TTGTATTGATTTTAAAATCA	TG						
MSTN-pro-mouAAAA	GAAGAAATAA	GAACAAGGA	AAAAAAAAGA	TTGTGCTGATTTTAAA	.A	TG					

圖四、人、小鼠與豬第八生長分化因子在 start codon (ATG) 上游 5' 調節區域之比對，在序列上之數字是依照豬之 DNA 數目所計算；-1 位置即為轉錄起始位置，方框位置為各個物種之 Inr。

Fig. 4. Alignment of the 5' regulatory region of myostatin in human, mouse and porcine. The DNA sequence was numbered according to the sequence of porcine myostatin. The location of -1 nucleotide specifies the transcription initiator (Inr).

-1073 TTCTCTGCTCCCAGACCTTACCCCAAATCCCTGCCAGGTGTCTGCCCTCT **E Box**
E Box
 -1023 GGTCAAATGAGAACTGGCAAAGGGGTGCAAACCTAGCACAGAATTGGGA
 -973 AACAGAAAAATGGGCACCCTTTATTATGGTGCTCCTTCTCTTTTATGTGT
 -923 TTACAATACTTGGGCATAATTTACAGAGAATAGATACTACATTTTTTACT
POU-protein **POU-protein**
 -873 TTCACCACTGGAAATCTGAGGCCAACTGCATTATCAGTCATAAAATTCAT
 -823 TATCTTTCTATTCTAAGTTATTCTAAGCTTATTCTAAGCTCAGATAGCTG
 -773 ACATTATCCTCTTGGTAATAACAATGAAAAACACATCTTCTGAGCAAT
E Box
 -723 ATTAATCTGCAACTTTAGGATAGGAGAAAATCAGTTGAAAACCTGAGCACG
E Box **MEF2-1** **E Box**
 -673 ATTTTCACGTGAATAAAAGATATTATTTAAAAATAATTCATGTGTAATA
POU-protein **POU-protein**
 -623 TAACAGAATAAGTATGATTTTCATTATGTACTAGAAATTTAGTCAGGAAA
 -573 ACAAGTTTCTCAAATTATAGCTGAATATATTTTACTAGTATCACAATCTT
 -523 AAATTTTAATTCAGGCTTCCCTAATTTAAATCTGTATTTCTCTGATTACA
MEF2-2 **E Box**
 -473 CAGGACTAAAAATAATTTAAACAGCAAATAAAATTCTTTTTCTCCTCAA
 -423 IGTTTGTCTAAATAATGTAAAATCATTATTTTTTTGAGGAAAAAGACA
 -373 TTTCAACTTTTTAAGTATGAAGTGAAAAGAATTACTTATTTAAATTACA
 -333 ATTTTAAAGTTTCACTAATAAAGATTAATAATATTTAAGTGCAGTTTATA
E Box
 -273 TTATTGTTAACATAGATTTTAATTTTTCAAATGTCACATATATCTTTCAT
E Box
 -223 TATTTGTAGATTTATTTCTTTTATGAAGTAGTCAAATGAATCAGCTCACC
 -173 CTTGACTGTAACAAAATACTGTTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTTTTA
POU-protein **CCAAT Box**
 -123 ACCTCTGACAGCGAGATTCATTGTGGAGCAAGAGCCAATCATAGATCCTG
E Box **TATA Box** **E Box**
 -73 ACGACACTTGTCTCATCAAGTGGAATATAAAAAGCCACTTGAATACAGT
TATA Box -1
 -23 ATAAAAGATTCACTGGTGTGGCAAGTTGTCTCTCAGACAGTGCAGGCATT
 AAAATTTTGCTTGGCGTTACTCAAAGCAAAGTAAAAGGAAGAAATAAG
 AACAAAGGAGAAAGATTGTATTGATTTTAAATCATGCAAAAACGTGGATC

圖五、豬之第八生長分化因子 5'調節區域之轉錄調節元件。利用 WWW Signal Scan 分析發現；有 2 個 TATA box 與 1 個 CCAAT box，還有調節肌肉細胞分化元件，有 10 個 E-box、1 個 MEF2-1 與 1 個 MEF2-2 和 5 個 POU protein binding site（分別在元件下方以底線標示）。

Fig. 5. WWW Signal Scan analysis of the myostatin 5' regulatory region of the porcine. In the sequence with the GA SNP combination, 2 TATA boxes, 1 CCAAT box, 8 E-boxes, 1 MEF2-1, 1 MEF2-2 and 5 POU protein binding sites (labeled underline) in the 5' regulatory region.

表二、第八生長分化因子 5'調節區域之轉錄調節元件

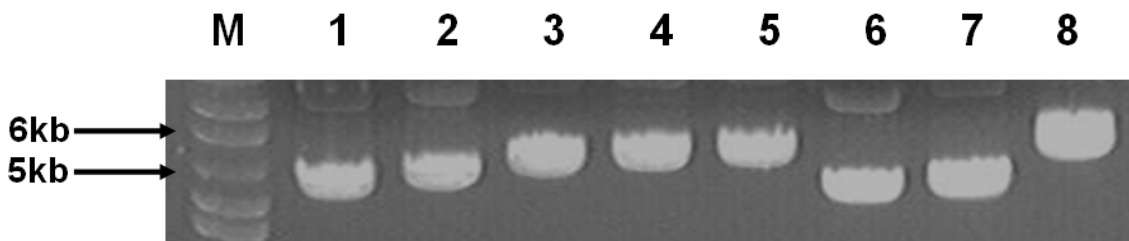
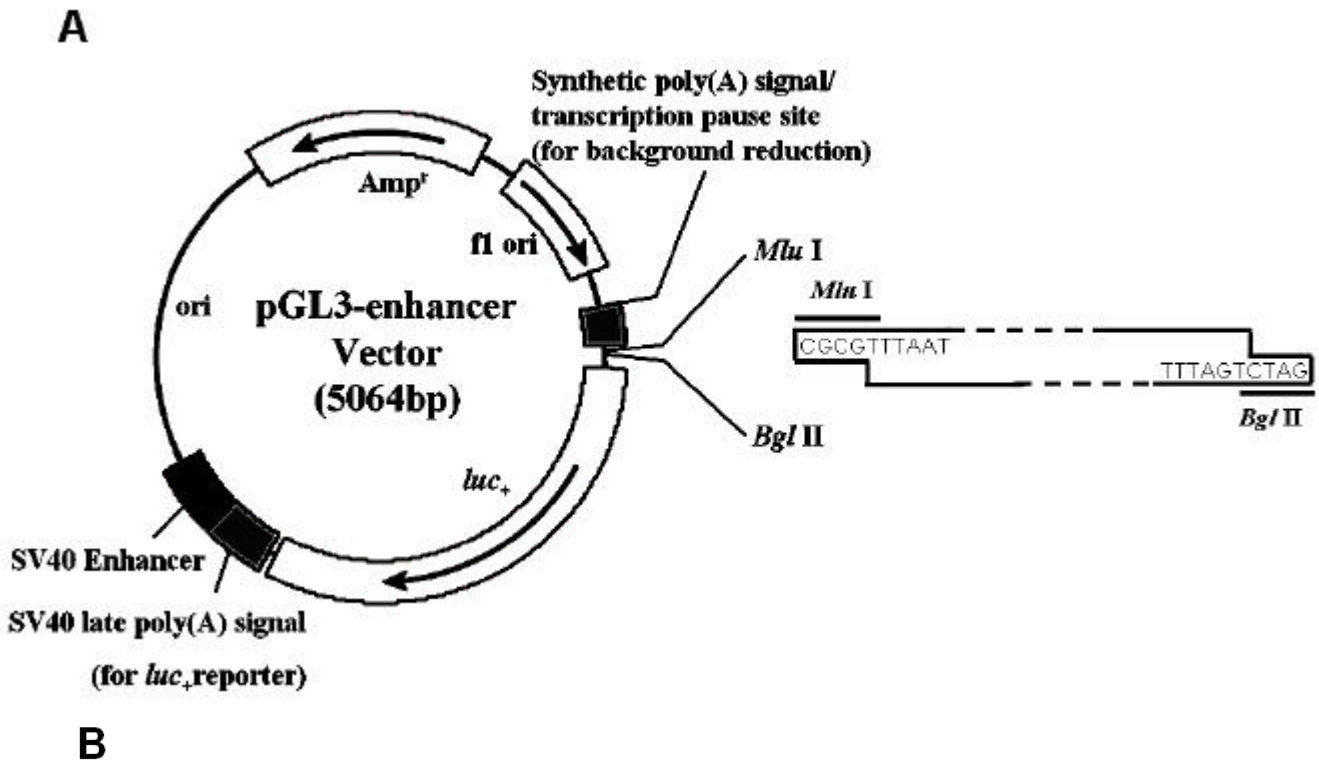
Table 2. Cis-acting element of myostatin 5' regulatory region.

Element	conserve sequence	binding factor	position
TATA box	TATAAA	TBP	-19/-24, -42/-48
CCAAT box	CCAAT	CBF	-85/-89
E-box	NTCANG	MRFs	-33/-38, -64/-69, -186/-191, -241/-246, -422/-427, -629/-634, -663/-668, -687/-692, -1015/-1020, -1034/-1039
MEF2-1	TTAAAAATAA	MEF2	-638/-647
MEF2-2	CTAAAAATAA	MEF2	-459/-468
CACCC box	CACCC	Sp1	-173/-177, -955/-959
GATA box	(A/T)GATA(A/G)	GATA family	-651/-656, -701/-706, -777/-782, -887/-892
HiNF-A	AAACACA	HiNF-A	-737/-743
IgPE-1	TGTGGCAA	IgPE-1	-7/1
LF-A1	GGGCA	LF-A1	-1027/-1031
TFE3	CATGAG	TFE3	-629/-634
POU-protein	(A/T) ₄ TNCAT	Pit-1/GHF-1	-103/-110, -600/-607, -632/-640, -824/-831, -843/-850
Enhancer	TTTCCA	Nuclear factor	-683/-688
H4TF1	GATTTC	H4TF1	-858/-863
NEF	CTGTC	NFI family	-113/-117, -131/-135, -135/-139
YY1	ATCATTTT	YY1	-395/-402
PEA3	AGGAAA	PEA3	-696/-701

(GA)	⁻⁷¹³ AACTTTAGGA TAGGAG<u>AAA</u> TCAGTTG<u>AA</u> ACTGAGCAG ⁻⁶⁷⁴
	Identified Element Sequence Position(s) in Transcription Site
	N/A
(AA)	AACTTTAGGA TAGG<u>AAAA</u> TCAGTTG<u>AA</u> ACTGAGCAG
	Identified Element Sequence Position(s) in Transcription Site
	PEA3 <u>AGGAAA</u> +701/+696
(AG)	AACTTTAGGA TAGG<u>AAAA</u> TCAGTTG<u>GAA</u> ACTGAGCAG
	Identified Element Sequence Position(s) in Transcription Site
	PEA3 <u>AGGAAA</u> +701/+696
	Enhancer <u>TTCCA</u> -683/-688

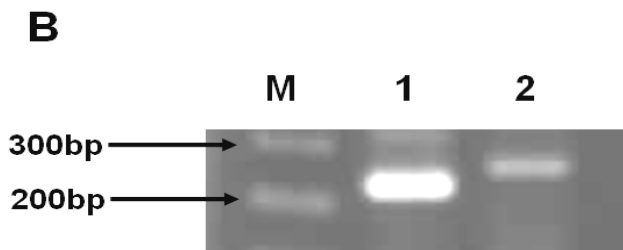
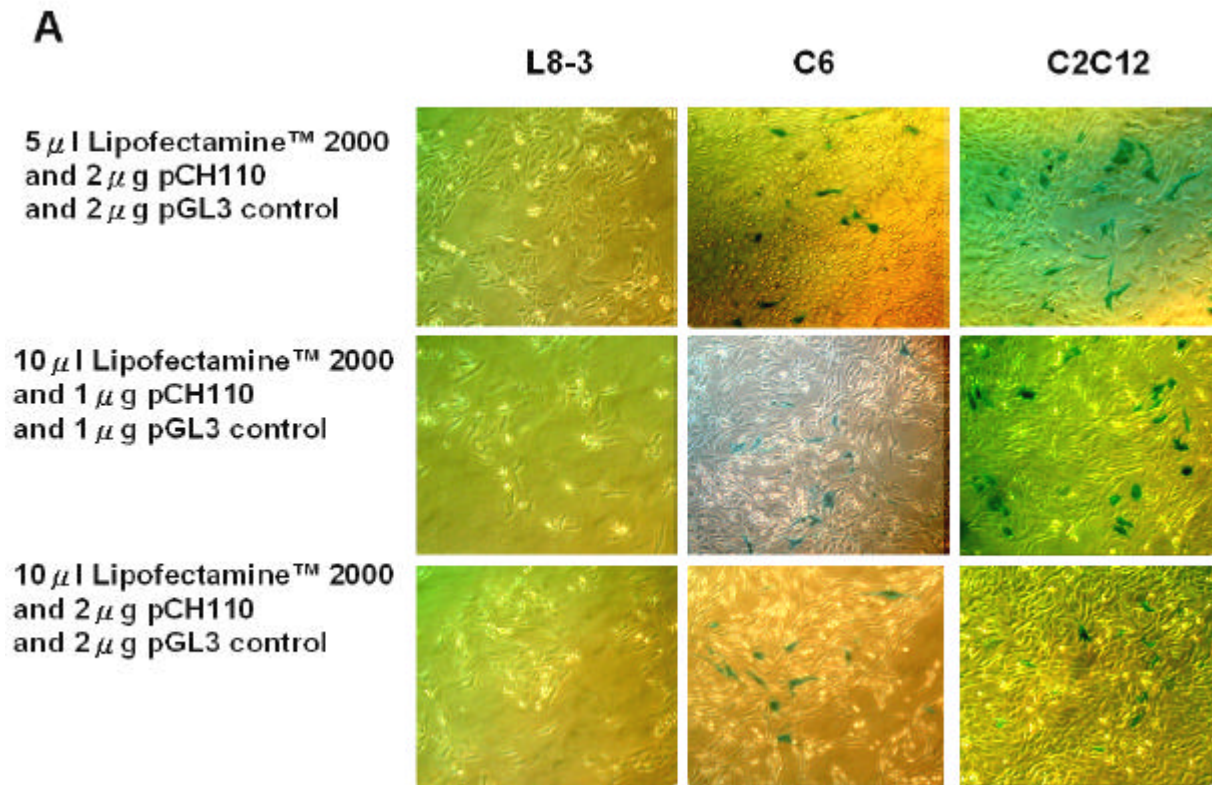
圖六、第八生長分化因子 5' 調節區域在兩個SNP位點（698與686兩個位點，在核? 酸下方有底線處），預測不同組合情形下，出現之順式元件。GA組合時，沒有出現順式元件，AA組合時，出現一個PEA3 binding site，若為AG組合時，則會有PEA3 binding site與enhancer。

Fig. 6. The different SNPs arrangements of at the position 698 and 686 upstream of the initiator myostatin 5' regulatory region were predicted to have different cis-acting elements. There is no cis-acting element predicted with the GA combination. If the association is AA combination led to a PEA3 binding site. AG combination was predicted to have a PEA3 binding site and enhancer.



圖七、報導基因質體之構築。(A) 為pGL3 enhancer與第八生長分化因子調節區域之PCR產物接合位置圖；(B) 為各別不同長度Mstn調節區域與實驗內部控制組之載體。M：標記物、lane 1：myo-0.4、lane 2：myo-0.8、lane 3：myo-GA1.2、lane 4：myo-AA1.2、lane 5：myo-AG1.2、lane 6：pGL3 control、lane 7：pGL3 promoter、lane 8：pCH110。

Fig. 7. Construction of reporter plasmid. (A) Map of pGL3 enhancer ligated with PCR products of myostatin 5' regulatory region promoter. (B) different lengths of myostatin 5' regulatory region promoter and internal control vectors. M: DNA molecular marker; lane 1 : myo-0.4; lane 2 : myo-0.8; lane 3 : myo-GA1.2; lane 4: myo-AA1.2; lane 5: myo-AG1.2; lane 6: pGL3 control; lane 7: pGL3 promoter; lane 8 : pCH110.

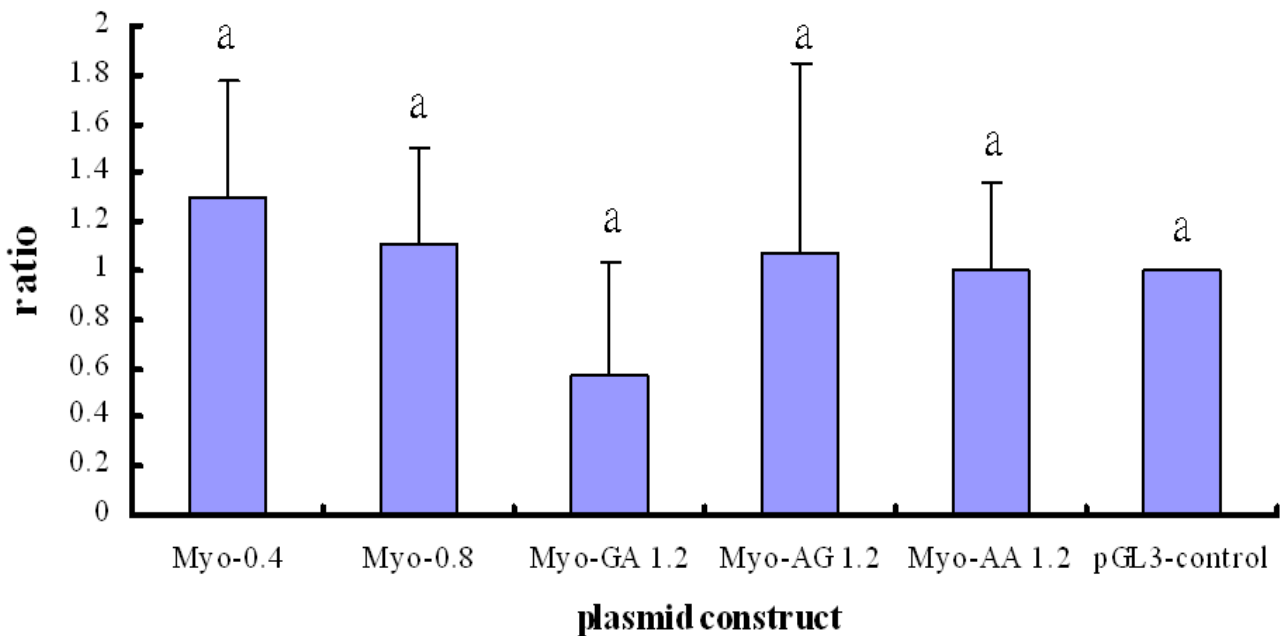


圖八、轉染預備試驗。(A) 不同細胞株L6、L8與C2C12，經不同條件之共同轉染6小時後，再經42小時培養，用X-gal偵測 β -galactosidase表現，其中以C2C12細胞株表現較佳；(B) 偵測C2C12細胞內有無第八生長分化因子 RNA表現，結果顯示lane 2在289 bp有band；M：標記物 lane 1： β -actin lane 2：myostatin。

Fig. 8. Transfection of myoblasts with reporter plasmid. (A) L6, L8 and C2C12 cells were transfected with pCH110 plasmid. Cells were transfected and incubated for 42 hrs, β -galactosidase activity was assayed by using X-gal. (B) Detection of myostatin RNA in C2C12 cells. RT-PCR was used to detect myostatin RNA. The size of 289 bp myostatin cDNA was found in C2C12 cells. M: DNA molecular marker; lane 1: β -actin; lane 2: myostatin.

	Myo-0.4	Myo-0.8	Myo-GA 1.2	Myo-AG 1.2	Myo-AA 1.2	pGL3-control
mean	1.294	1.106	0.575	1.076	1.003	1.000
S.D.	0.481	0.390	0.464	0.769	0.351	0.000

luciferase assay



圖九、C2C12細胞轉染試驗之分析。利用不同載體 (myo-0.4、 myo-0.8、 myo-GA1.2、 myo-AA1.2、 myo-AG1.2與pGL-control),所做之luciferase assay, 各處理之結果拿pGL3-control做基準, 利用one-way ANOVA計算, 結果各組間並無顯著差異。

Fig. 9. Activity assay of Luciferase derived from constructs with different regulatory region. The myo-0.4, myo-0.8, myo-GA1.2, myo-AA1.2, myo-AG1.2 and the control vector pGL-control were transfected into the C2C12. The luciferase activity of extracts prepared. The luciferase activity were normalized by the activity of pGL3-control and analyzed by the one-way ANOVA method. No significant different was observed between different constructs.

陸、討 論

一、豬第八生長分化因子之調節區域序列研究

(一) 豬動物第八生長分化因子轉錄起始位置 (Inr) 之預測

本實驗因樣品採樣受限，必須用預測方式，判斷豬之第八生長分化因子轉錄起始位置；到目前為止只有人類之第八生長分化因子 genomic DNA (AC 073120) 有利用 5'-RACE 方法，確認第八生長分化因子 Inr (Ma *et al.*, 2001)，經過比對後豬之第八生長分化因子 Inr，推測應該是在轉譯起始位置上游 110 bp，這個位置序列為 GGCAAGTTG，序列與人類完全相同 (圖四)，雖然與公認轉錄起始位置之判斷法 Py2 CA Py5 其中 Py：pyrimidine (C or T)，不完全相同，但在序列 CA 後方則是一樣，還有在這個 110 bp 區域中與人類序列相比對，只有 11 bp 不同，相似度達 90%；若是與小鼠之第八生長分化因子 genomic DNA (AY 204990)，則相異處增加至 23 bp，相似度降到 79%，而且小鼠第八生長分化因子 Inr 也不同于人類，是在更上游之位置，目前並未有相關報告發表。

(二) 不同品種豬第八生長分化因子 5' 調節區域之比較

在不同品種豬之間，已有學者對第八生長分化因子上游非轉譯區域之差異做比對，其研究針對國外引進豬種，篩選181頭約克夏、21頭藍瑞斯與35頭雙倍肌肉之約克夏，還有本土之豬種，分別為33頭二花臉與21頭湖北白豬作比較，方法是利用PCR-RFLP(polymerase chain

reaction – restriction fragment length polymorphism), 結果顯示, 在轉譯起始位置上游363 bp位置, 會發生SNP, 在使用酵素限制? *Dra I* 進行切位確認後, 在國外引進豬種品種, 有瘦肉量較多之體型, 多出現為T (92%以上), 其餘則為A, 而在中國之豬種, 體型偏肥胖, 則為A (93%以上), 其他則為T, 學者指出或許與第八生長分化因子之表現有關 (姜等, 2001); 相同方法之研究, 發現在約克夏、藍瑞斯、杜洛克與宰畜1號, 其結果一致, 包括27頭杜洛克, 也是為T (88.8%) 之表現 (楊等, 2002); 這些研究報告結果與本實驗所得到之結果不同, 也就是轉譯起始位置上游363 bp位置 (Inr上游254 bp), 無論是外國品種或是中國之品種, 在本實驗均為T之表現, 並無發現有A之結果。此區域經分析後, 並無任何相關順式元件出現。而這些研究實驗, 也並未針對本實驗所發現之SNP區域, 轉錄起始位置上游686與698, 做相關試驗。

(三) 同品種之種豬樣品間之差異

由表一結果顯示, 所採樣之樣品, 經分析 DNA 序列後, 並非所有個體均為相同結果, 像杜洛克, 四個個體, 其中有只有一個個體, 在 SNP 位置所出現之結果均為 GA 組合, 但剩餘三個, 除了有 GA 組合, 還有 AG 組合出現, 推斷可能原因, 為樣品之基因並非為同合子, 是由於品種確認方法, 多為靠外觀與品種性狀測定來確認, 因此雖基因呈現為異合子之狀態, 可能也不影響到品種性狀之表現。

經三次確認所出現為單一 SNP 組合, 並不能絕對代表此個體之

基因就是同合子，只能推斷其同合子之可能性很高，本實驗也利用這樣結果，將不同品種之 SNP，分別代表其品種之原始基因型，結果分別是杜洛克與蘭嶼豬為 GA 組合，藍瑞斯與約克夏為 AG 組合而梅山豬與桃園豬則因重複次數過少，僅供參考。

在 LYD 三品種雜交豬，SNP 還出現 AA 組合，這是其親代杜洛克、藍瑞斯與約克夏都沒有見到之組合，可能是因採樣數量過少，未能全部偵測到所有基因型，也可能是 LYD 三品種雜交豬，有參雜其他品種所導致；所以這樣之結果，可以知道在轉錄起始位置上游 686 與 698，為 SNP 之熱點 (hot-spot)，但若要完全知道其組合與品種之代表組合，必須更進一步研究，才能確認。

二、豬之動物第八生長分化因子5' 調節區域序列順式元件(cis-acting element) 分析

調節區域區之順式元件，對基因表現影響是可以很大，不亞於其他抑制因子，例如：TATA box、GC box與CCAAT box最常被談到之順式元件，在許多基因調節區域區域很常見到，若這些元件之序列被更改或刪除，很有可能造成基因不表現或表現下降。之前針對人類第八生長分化因子 5'調節區域研究指出，在Inr上游3.3 kb區域內，預估含有數種glucocorticoids可結合之順式元件，像glucocorticoid response element (GRE) 與androgen response element (ARE) 等，在試驗中加入dexamethasone後，偵測C2C12與L6內源性第八生長分化因子，結果

顯示,內源性第八生長分化因子表現量會隨dexamethasone濃度增加而增加 (Ma *et al.*, 2001); 所以本研究也針對豬第八生長分化因子 5' 調節區做順式元件分析, 以便後續研究。

(一) TATA box

TATA box共有兩個, 序列為TATAAA, 分別出現在-19/-24與-42/-48, 這是很早即被研究之元件, 很多基因上游均存在, 一般位置是出現在基因Inr上游25 bp內, 目前所知, TATA box會與TBP (TATA box binding protein) 結合, TBP是Pol II (RNA polymerase II) 在起始轉譯時, 最早結合到DNA序列上之轉錄因子, Pol II其他因子再相繼與TBP結合後, 啟動轉錄, 製造基因mRNA, 其重要性可見一般 (Hochheimer *et al.*, 2003), 本實驗結果在Inr上游25 bp內有發現一個TATA box。

(二) CCAAT box

CCAAT box有一個, 序列為CCAAT, 出現在-85/-89, 與TATA box相同, 在很早即被研究。很多基因上游均存在此一元件, 一般位置是出現在基因Inr上游80-300 bp之間, 最早發現會與CCAAT box結合之蛋白質是酵母菌HAP複合蛋白質, 會影響CYC1 (cytochrome c-1) 基因表現 (Edwards *et al.*, 1998); 在真核生物中與CCAAT box專一結合之因子, 稱為CBF (CCAAT-binding factor), 這由三個不同次單元所組合而成, 分別為CBF-A, CBF-B與CBF-C, 若其中任一個次單元突變或是將CCAAT-box做序列改變, 對基因表現影響非常大 (Cousty *et*

al., 1995)。

(三) E-box

E-box有10個，其序列為NTCANG (N可為A, T, G或C之其中一個)，分別位於-33/-38, -64/-69, -186/-191, -241/-246, -422/-427, -629/-634, -663/-668, -687/-692, -1015/-1020, -1034/-1039；轉錄因子MyoD(myogenic determination gene)家族之結構是屬於bHLH(basic region helix-loop-helix)蛋白質，在肌肉分化過程中為重要調節因子，會讓肌原細胞持續分化至最終肌肉細胞，MyoD家族包括了MyoD、myogenin、Myf5與MRF4，而E-box就是可以讓像MyoD家族類型之MRFs(myogenic regulatory factors)蛋白質結合之元件(Coustry *et al.*, 1995)。

(四) MEF2-1與MEF2-2

MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) 元件有2個，分別為MEF2-1與MEF2-2，其序列為TTAAAAATAA 和CTAAAAATAA，其MEF2-1位置在-638/-647，MEF2-2在-459/-468；MEF2家族是屬於MADS-box之轉錄因子，其在肌肉生成作用中，重要性與MyoD家族相同，MEF2家族尚包含了MEF2A, MEF2B, MEF2C 與MEF2D，會與MEF2元件結合，調節下游基因表現 (Naya *et al.*, 1999)。

(五) CACCC box

CACCC box有2個，其序列為CACCC，位置在-173/-177與-955/-959；CACCC box早期是在紅血球細胞中之 β -globin基因啟動子

發現，對於 β -globin表現是必要的 (Mantovani *et al.*, 1988)，後續研究發現，在紅血球細胞內，會與CACCC box結合之蛋白質是結構上具有Zinc fingers之Sp/KLF家族轉錄因子，以Sp1 (Stimulating Protein 1) 為例，如Sp1分布在相當多種類細胞中，包括癌細胞，在癌細胞功能則與生長與轉移有關 (Safe *et al.*, 2005)。

(六) GATA box

GATA box有4個，其序列為(A/T)GATA(A/G)，位置在-651/-656，-701/-706，-777/-782與-887/-892；目前發現會與GATA box結合之蛋白質是為GATA家族。其GATA-1，-2，-3蛋白質在調節造血過程站相當重要角色，GATA-4，-5，-6則分別有不同之功能，為具有zinc finger 結構之蛋白質 (Pikkarainen *et al.*, 2004)，最早研究之GATA-1，被認為在血球內具有增強erythroid基因與megakaryocytic基因之表現 (Zon *et al.*, 1991)。

(七) HiNF-A binding site

HiNF-A binding site有1個，其序列為AAACACA，位置在-737/-743；HiNF-A是一個細胞核因子，目前相關研究在H1、H3與H4 histone基因，HiNF-A會調控H1 histone基因轉錄，條件必須在高鹽度狀況下 (van *et al.*, 1988)；HiNF-A也會影響H4 histone之F0108基因，若將F0108啟動子HiNF-A binding site做刪除，結果顯示F0108基因表現量會下降6倍 (van *et al.*, 1989)。

(八) IgPE-1 binding site

IgPE-1 binding site有1個，其序列為TGTGGCAA，位置在-7/1；於之前研究指出，在IgH (immunoglobulin heavy chain) enhancer 啟動子序列中，加入IgPE-1蛋白質後，發現IgPE-1會與TGTGGCAA序列結合，而這段序列又與MSV (Moloney sarcoma virus) 和Py (polyoma virus) enhancer序列非常相似，推測其功能很可能相同(Schlokot *et al.*, 1986)。

(九) LF-A1 binding site

LF-A1 (liver factor A) binding site有1個，其序列為GGGCA，位置在-1027/-1031；LF-A1是肝臟特有之蛋白質，會調控在肝臟所生產之蛋白質，像在血液中會抑制蛋白水解酵素之a1AT (a-1-antitrypsin gene) 基因，若將a1AT啟動子做突變，使得LF-A1無法結合在啟動子，則會使得a1AT完全不表現 (Tripodi *et al.*, 1991)。

(十) TFE3 binding site

TFE3 (transcription factor E3) binding site有1個，其序列為CATGAG，位置在-629/-634；TFE3蛋白質是一個bHLH 並同時也擁有ZIP (leucine zipper) 結構之蛋白質，屬於Mitf家族成員，其功能是在調節蝕骨細胞基因表現，在較早之研究報告指出，利用合成之小鼠TFE3，發現可以調節加強Ig H-chain與 γ -chain基因表現 (Roman *et al.*, 1991)。

(十一) Enhancer

Enhancer有1個，其序列為TTTCCA，位置在-683/-688；研究指出，

在? immunoglobulin基因啟動子序列中，發現一個與simian virus 40相似序列，而enhancer序列可以與核蛋白結合，功能是可以增加基因之表現 (Gimble *et al.*, 1987)。

(十二) PEA3 binding site

PEA3 (polyoma virus enhancer A3) binding site有1個，其序列為AGGAAA，位置在-696/-701；PEA3功能可促進先驅細胞轉型至最終型態；較早實驗提到uPA (urokinase-type plasminogen activator) 是一個會將血液中plasmin前驅物血纖維蛋白溶? 原 (plasminogen)，活化成為plasmin之活化劑。在研究uPA之報告中指出，uPA啟動子有一個與PEA3結合之位置稱為PEA3/URTF site，而PEA3序列之最主要部分就是AGGAAA，它可以刺激基因表現，此序列也與Py(polyoma virus) enhancer序列相同 (Rorth *et al.*, 1990)。

(十三) H4TF1 binding site

H4TF1 (histone H4 gene-specific transcription factors) 有1個，其序列為GATTTC，位置在-858/-863；在生物體內，不分任何種類細胞，幾乎都有H4TF1，最早被研究出來，就如同其名，是啟動H4 histone基因轉錄因子，負責調節細胞周期 (La Bella *et al.*, 1991)。

(十四) NEF binding site

NEF (nuclear factor erythroid) binding site有4個，其序列為CTGTC，位置在-113/-117, -131/-135, -135/-139；這是在人或雞紅血球之 β -Globin基因上游均可見到之序列，NFE為具有zinc finger結構之蛋

白質，其功能目前研究較透徹是可以促進 β -Globin 基因轉錄 (Mantovani *et al.*, 1988)。

(十五) YY1

YY1 (Yin-Yang 1) 有1個，其序列為ATCATTTT，位置在-395/-402；YY1是一個具有zinc finger結構之蛋白質，普遍存在細胞核基質中，一般而言對於細胞分化與生長具有加強效果(Solway *et al.*, 1998)。

(十六) POU domain

POU domain有5個，其序列為(A/T)₄TNCAT (N可為A, T, G或C之其中一個)，位置在-103/-110, -600/-607, -632/-640, -824/-831, -843/-850；POU domain轉錄因子家族，命名是由pituitary-specific Pit-1, octamer-binding proteins (Oct-1 and Oct-2)和Unc-86三個基因，取其字首而來，這些蛋白質之共通點是在結構上都有POU-H與POU-S domain，因此將之歸類為同家族，但功能上並不完全相同，目前研究又將其功能在歸納分為6個次家族，像Pit-1/GHF-1是屬於第一次家族，由腦垂體前葉分泌，其功能是為調節生長素、泌乳素、激甲狀腺素等由腦垂體分泌之激素 (Andersen *et al.*, 2001)。先前研究指出，人類prolactin是由腦垂體所分泌，而在prolactin啟動子區域，即有觀察到有Pit-1 (pituitary-specific factor 1) 蛋白質可以結合之特殊調節區域 (Peers *et al.*, 1990)。

在不同第八生長分化因子5' 調節區域片段長度研究，包括啟動

密碼子前0.4 kb、0.8 kb與三種1.2 kb，經報導基因試驗，結果統計顯示，以0.4 kb表現量最高，再者是0.8 kb，最低者則為1.2 kb，但這三個不同長度片段，彼此之間並無差異（圖九）。

三 豬之動物第八生長分化因子5' 調節區域SNP與基因對報導基因表現之影響

在本實驗中，不同品種豬，在第八生長分化因子調節區域 698 與 686 位置 SNP 之組合似乎均有特定之組合。體型瘦肉率較高者如杜洛克為 GA，脂肪相對較多者如藍瑞斯、約克夏則為 AG，中國之豬種公認脂肪量更多者梅山豬、桃園豬為 GA，而蘭嶼豬也是 GA，還有 LYD 三品種雜交豬更出現在純種豬未觀察到之 AA 組合（表一）。

加上以報導基因轉染C2C12細胞實驗結果分析，這幾種組合之表現以AG較佳，其次AA，最後則為GA。歸納起來，應以AG組合最能使第八生長分化因子表現較好，推測原因可能是在SNP組合為AG時相較GA組合，cis-acting element有多出PEA3與enhancer，AA有PEA3，而PEA3與enhancer均有使基因表現增多之能力，反應在種豬體型上，瘦肉率應相對較低，而肥肉率應較高，而GA剛好完全相反，此結果似乎可以解釋具有瘦肉率較高之品種如杜洛克，和體脂肪較多之藍瑞斯與約克夏。

至於本土豬種如桃園豬與蘭嶼豬，雖然其SNP組合為GA，但是

並無表現出與其他純種豬相同之表現型，原因可能是（一）所採集分析之樣品數目，數量過小無法代表整個品種；（二）位於第八生長分化因子調節區域698與686位置，SNP之現象，無法明顯影響第八生長分化因子之表現；（三）於生物體內，足以影響第八生長分化因子因素非常多，無法經由細胞實驗來做解釋。

柒、結 論

一、在不同品種之豬，第八生長分化因子5'調節區域，在利用人之Inr前提下，所推測出之第698與686位置，觀察到SNP之現象，其組合是GA、AG、AA。

二、在C2C12細胞內，豬之第八生長分化因子5'調節區域第698與686位置SNP，對第八生長分化因子表現沒有顯著影響。

捌、參考文獻

- 中國畜牧學會。2001。畜牧要覽養豬篇。中國畜牧學會。臺北。
- 王旭昌。2002。丹麥與我國種豬育種制度之比較(上)。畜牧報導月刊 第三十期。
- 李啟忠、廖宗文、黃政齊、曾穎玉、朱賢彬、陳文誠、鄭連春。2003。蘭嶼豬餵飼不同飼料量及放牧對其生長及屠體性狀之影響。中畜會誌 32: 15-21。
- 林德育、顏念慈、蔡金生、張秀鑾、戴謙。1993。桃園豬生長體型與繁殖性狀之觀察。畜產研究 26(4) : 335-343。
- 姜運良、李甯、吳常信。2001。不同品種豬肌肉生長抑制素基因單核? 酸多態性分析。遺傳學報 28 : 840-8451。
- 楊秀芹、劉娣、李景芬、孫繼權。2002。豬 myostatin 基因 5' 調控區的? 切多態性分析。東北農業大學學報 33 : 209-212。
- 顏念慈。2004。畜產生物品種資源專輯。臺灣省畜產試驗所。台南。
- Amthor, H., G. Nicholas, I. McKinnell, C. F. Kemp, M. Sharma, R. Kambadur, and K. Patel. 2004. Follistatin complexes myostatin and antagonizes myostatin-mediated inhibition of myogenesis. Dev. Biol. 270:19-30.
- Andersen, B., and M. G. Rosenfeld. 2001. POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology

- provide insights into human disease. *Endocr. Rev.* 22:2-35.
- Ang, J., T. Ratovitski, J. P. Brady, M. B. Solomon, K. D. Wells, and R. J. Wall. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 60:351-361.
- Berry, C., M. Thomas, B. Langley, M. Sharma, and R. Kambadur. 2002. Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283:C135–C141.
- Cassady, J. P., L. D. Young, and K. A. Leymaster. 2002. Heterosis and recombination effects on pig growth and carcass traits. *J. Anim. Sci.* 80:2286-2302.
- Casas, E., J. W. Keele, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, T. S. Sonstegard, T. P. Smith, S. M. Kappes, and R. T. Stone. 1998. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 76:468-73.
- Chen, P., T. J. Baas, J. W. Mabry, J. C. M. Dekkers, and K. J. Koehler. 2003. Genetic parameters and trends for lean growth rate and its components in US Yorkshire, Duroc, Hampshire, and Landrace pigs. *J. Anim. Sci.* 80:2062-2070.
- Coustry, F., S. N. Maity, and B. de Crombrughe. 1995. Studies on transcription activation by the multimeric CCAAT-binding factor

- CBF. *J. Biol. Chem.* 270:468-475.
- Edwards, D., J. A. Murray, and A. G. Smith. 1998. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117:1015-1022.
- Gimble, J. M., D. Leven, and E. E. Max. 1987. B-cell nuclear proteins binding in vitro to the human immunoglobulin kappa enhancer: localization by exonuclease protection. *Mol. Cell. Biol.* 7:1815-1822.
- Grobet, L., L. J. Martin, D. Poncelet, D. Pirottin, B. Brouwers, J. Riquet, A. Schoeberlein, S. Dunner, F. Menissier, J. Massabanda, R. Fries, R. Hanset, and M. Georges. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17:71-74.
- Gonzalez-Cadavid, N. F., W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. S. Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver, and S. Bhasin. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:14938-14943.
- Hochheimer, A., and R. Tjian. 2003. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes dev.* 17:1309-1320.

- Immers, T. A., M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman, and S. J. Lee. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296:1486-1488.
- Ji, S., R. L. Losinski, S. G. Cornelius, G. R. Frank, G. M. Willis, D. E. Gerrard, F. F. Depreux, and M. E. Spurlock. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1265-R1273.
- Joulia, D., H. Bernardi, V. Garandel, F. Rabenoelina, B. Vernus, and G. Cabello. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286:263-275.
- Kambadur, R., M. Sharma, T. P. Smith, and J. J. Bass. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7:910-915.
- Kocabas, A. M., H. Kucuktas, R. A. Dunham, and Z. Liu. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta* 1575:99-107.
- La Bella, F., and N. Heintz. 1991. Histone gene transcription factor

- binding in extracts of normal human cells. *Mol. Cell. Biol.* 11:5825-5831.
- Langley, B., M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, and R. Kambadur. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by downregulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277:49831-49840.
- Lee, S. J., and A. C. McPherron. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9306-9311.
- Li, X., and B. W. Kennedy. 1994. Genetic parameters for growth rate and backfat in Canadian Yorkshire, Landrace, Duroc, and Hampshire pigs. *J. Anim. Sci.* 72:1450-454.
- Lin, S. Y., J. R. Morrison, D. J. Phillips, and D. M. de Kretser. 2003. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. *Reproduction* 126:133-148.
- Ma, K., C. Mallidis, J. Artaza, W. Taylor, N. Gonzalez-Cadavid, and S. Bhasin. 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:E1128-E1136.
- Maccatrozzo, L., L. Bargelloni, B. Cardazzo, G. Rizzo, and T. Patarnello. 2001. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509:36-40.

- Mantovani, R., N. Malgaretti, S. Nicolis, A. Rochi, B. Giglioni, and S. Ottolenghi. 1988. The effects of HPFH mutations in the human-globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid specific nuclear factors. *Nucleic Acids Res.* 16:7783-7797.
- Mantovani, R., N. Malgaretti, S. Nicolis, B. Giglioni, P. Comi, N. Cappellini, M. T. Bertero, F. Caligaris-Cappio, and S. Ottolenghi. 1988. An erythroid specific nuclear factor binding to the proximal CACCC box of the beta-globin gene promoter. *Nucleic Acids Res.* 16:4299-4313.
- Massagué, J. 1998. TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791.
- McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma, and R. Kambadur. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* 162:1135-1147.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- 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.
- McPherron, A. C., and S. J. Lee. 2002. Suppression of body fat

- accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109:595-601.
- Nakashima, M., T. Toyono, A. Akamine, and A. Joyner. 1999. Expression of growth / differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF- β superfamily during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 80:185-89.
- Naya, F. J., and E. Olson. 1999. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:683-688.
- Ostbye, T. K., T. F. Galloway, C. Nielsen, I. Gabestad, T. Bardal, and O. Andersen. 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268:5249-5257.
- Peers, B., M. L. Voz, P. Monget, M. Mathy-Hartert, M. Berwaer, A. Belayew, and J. A. Martial. 1990. Regulatory elements controlling pituitary-specific expression of the human prolactin gene. *Mol. Cell. Biol.* 10:4690-4700.
- Pikkarainen, S., H. Tokola, R. Kerkelä, and H. Ruskoaho. 2004. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. res.* 63:196-207.
- Ríos, R., I. Carneiro, V. M. Arce, and J. Devesa. 2001. Myostatin

- regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280:561-566.
- R´ios, R., I. Carneiro, V. M. Arce, and J. Devesa. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282(5):C993-C999.
- Rebbapragada, A., H. Benchabane, J. Wrana, A. J. Celeste, and L. Attisano. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor β - like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23:7230-7242.
- Reisz-Porszasz, S., Bhasin S., Artaza J. N., R. Shen, I. Sinha-Hikim, A. Hogue, T. J. Fielder, and N. F. Gonzalez-Cadavid. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of Myostatin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285:E876-E888.
- Rescan, P. Y. 2001. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 130:1-12.
- Rescan, P. Y., I. Jutel, and C. Ralli`ere. 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204:3523-3529.
- Roberts, S. B., and F. W. Goetz. 2001. Differential skeletal muscle

- expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.* 24639:1-5.
- Rodgers, B. D., and G. M. Weber. 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone Americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129:597-603.
- Rodgers, B. D., G. M. Weber, C. V. Sullivan, and M. A. Levine. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142:1412-1418.
- Roman, C., A. G. Matera, C. Cooper, S. Artandi, S. Blain, D. C. Ward, and K. Calame. 1992. mTFE3, an X-linked transcriptional activator containing basic helix-loop-helix and zipper domains, utilizes the zipper to stabilize both DNA binding and multimerization. *Mol. Cell. Biol.* 12:817-827.
- Rorth, P., C. Nerlov, F. Blasi, and M. Johnsen. 1990. Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucl. Acids Res.*

18:5009-5017.

Safe, S., and M. Abdelrahim. 2005. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur. J. Cancer* 41:2438-2448.

Schlokot, U., D. Bohmann, H. Schoeler, and P. Gruss. 1986. Nuclear factors binding specific sequences within the immunoglobulin enhancer interact differentially with other enhancer elements. *EMBO J.* 5:3251-3258.

Sharma, M., R. Kambadur, K. G. Matthews, W. G. Somers, G. P. Devlin, J. V. Conaglen, P. J. Fowke, and J. J. Bass. 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell Physiol.* 180:1-9.

Smith, T. P., N. L. Lopez-Corrales, S. M. Kappes, and T. S. Sonstegard. 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm. Genome* 8:742-744.

Solway, J., S. M. Forsythe, A. J. Halayko, J. E. Vieira, M. B. Hershenson, and B. Camoretti-Mercado. 1998. Transcriptional regulation of smooth muscle contractile apparatus expression. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 158:100-108.

Sonstegard, T. S., G. A. Rohrer, and T. P. L. Smith. 1998. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses.

- Anim. Genet. 29:19-22.
- 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.
- Taylor, W. E., S. Bhasin, J. Artaza, F. Byhower, M. Azam, J. Bass, and R. Kambadur. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E221-E228.
- Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass, and R. Kambadur. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275:40235-40243.
- Tripodi, M, C. Abbott, N. Vivian, R. Cortese, and R. Lovell-Badge. 1991. Disruption of the LF-A1 and LF-B1 binding sites in the human alpha-1-antitrypsin gene has a differential effect during development in transgenic mice. *EMBO J.* 10:3177-3182.
- van Wijnen, A. J., K. L. Wright, J. L. Stein, and G. S. Stein. 1989. Human H4 histone gene transcription requires the proliferation-specific nuclear factor HiNF-D. Auxiliary roles for HiNF-C (Sp1-like) and HiNF-A (high mobility group-like). *J. Biol. Chem.* 264:15034-15042.

- van Wijnen, A. J., K. L. Wright, R. F. Massung, M. Gerretsen, J. L. Stein, and G. S. Stein. 1988. Two target sites for protein binding in the promoter region of a cell cycle regulated human H1 histone gene. *Nucl. Acids Res.* 16:571-592.
- Wegner, J., E. Albrecht, I. Fiedler, F. Teuscher, H. J. Papstein, and K. Ender. 2000. Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.* 78:1485-1496.
- Wheeler, T. L., S. D. Shackelford, E. Casas, L. V. Cundiff, and M. Koohmaraie. 2001. The effects of piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *J. Anim. Sci.* 79:3069-3074.
- Wolfman, N. M., A. C. McPherron, W. N. Pappano, M. V. Davies, K. Song, K. N. Tomkinson, J. F. Wright, L. Zhao, S. M. Sebald, D. S. Greenspan, and S. J. Lee. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:15842-15846.
- Yang, J., T. Ratovitski, J. P. Brady, M. B. Solomon, K. D. Wells, and R. J. Wall. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 60:351-361.
- Young, L. D. 1995. Reproduction of F1 Meishan, Fengjing, Minzhu, and

- Duroc gilts and sows. *J. Anim. Sci.* 73:711-721.
- Young, L. D. 1998. Survival, body weights, feed efficiency, and carcass traits of 7/8 White Composite and 1/8 Duroc, 1/8 Meishan, 1/8 Fengjing, or 1/8 Minzhu pigs. *J. Anim. Sci.* 76:1550-1558.
- Zhu, X., M. Hadhazy, M. Wehling, J. G. Tidball, and E M. McNally. 2000. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett.* 474:71-75.
- Zimmers, T. A., M. V. Davies, L. G. Koniaris, P. Haynes, A. F. Esquela, K. N. Tomkinson, A. C. McPherron, N. M. Wolfman, and S. J. Lee. 2002. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296:486-1488.
- Zon, L. I., M. F. Gurish, R. L. Stevens, C. Mather, D. S. Reynolds, K. F. Austen, and S. H. Orkin. 1991. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J. Biol. Chem.* 266:22948-22953.

玖、英文摘要

The Single Nucleotide Polymorphism of Myostatin 5' regulatory Region in Different Breeds of Porcine

Abstract

Myostatin gene is a negative regulator that controls skeletal muscle growth and differentiation. In myostatin-mutated animals, the dramatic increase of skeletal muscle mass and relatively decrease of lipid proportion are observed. The objective of this study was to investigate the deoxyribonucleotide polymorphism of myostatin 5' regulatory region and its effect on myostatin expression in different breeds of porcine. The PCR method was used to amplify the 1.2 Kb fragment of myostatin 5' regulatory region from different breeds of porcine, and DNA sequencing was used to confirm the PCR products. Comparison and analysis of sequence data showed that there were two single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at the -698 bp and -686 bp, respectively, among different breeds of porcine examined. The SNPs for Duroc, the breed of less body fat, were G and A at -698 bp and -686 bp, respectively. The SNPs for Yorkshire and Landrace, the breeds of high body fat, were

G and A at -698 bp and -686 bp, respectively. In addition, the SNPs of Taiwan Lanyu breed were the same as Duroc. The SNPs of hybrid breeds were found to be A and A at -698 bp and -686 bp, respectively. Three genotypes of regulatory region with different SNPs were inserted at the upstream of the luciferase reporter gene, and the constructs were used to transfect C2C12 cells. The results showed that there was no significant difference among these constructs. The results in this study suggest that the SNPs of myostatin 5' regulatory region at -698 bp and -686 bp may associated with the myostatin expression in the pigs of Yorkshire, Landrace, Duroc and Taiwan Lanyu breed.

拾、小傳

作者係台灣省台北縣人，生於民國 61 年 5 月 31 日。先後畢業於新莊國民小學、新莊國中、省立泰山高中、國立屏東農專食品工業科與國立屏東技術學院食品技術系。民國 86 年退役，日後工作，均與食品、服務行業有相關性，民國 91 年考取東海大學畜產學研究所，師從歐柏榮博士研習分子生物學迄今。