

邹雪, 刘起, 周佳佳, 等. 团头鲂 *myomaker* 基因的鉴定及其在肌纤维发育中的功能[J]. 华中农业大学学报, 2025, 44(1): 201-210.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.022

团头鲂 *myomaker* 基因的鉴定及其 在肌纤维发育中的功能

邹雪¹, 刘起¹, 周佳佳¹, 吴天宇¹, 刘露莎¹, 高泽霞^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070; 2. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心/
湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 为探究 *myomaker* 基因在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肌纤维发育中的调控作用, 通过石蜡切片和 HE 染色方法分析不同日龄团头鲂肌纤维发育特征, 采用 RT-PCR 及 qRT-PCR 技术鉴定 *myomaker* 基因的 cDNA 序列, 并探讨该基因在团头鲂不同发育阶段及不同组织部位的时空表达模式。石蜡切片结果显示团头鲂肌纤维直径在 20~60 d 持续递增, 其中在 40、50 和 60 d 均显著递增 ($P < 0.05$), 且在 40~50 d 时其肌纤维直径递增最快。基因结构分析发现团头鲂 *myomaker* 基因全长 4 693 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子, 开放阅读框为 663 bp, 共编码 220 个氨基酸, 其编码蛋白为 7 次跨膜蛋白。氨基酸相似度比对显示 *myomaker* 基因保守性较高; 系统进化树分析显示, 团头鲂 *myomaker* 基因与鲤等鲤科鱼类的 *myomaker* 基因聚为一支, 具有最近的亲缘关系。荧光定量结果显示, *myomaker* 在 1 月龄团头鲂肌肉组织中表达量极其显著高于其他组织 ($P < 0.000 1$), 同时 *myomaker* 在团头鲂出膜后 15~30 d 表达量逐渐上升, 在 30 d 表达量最高 ($P < 0.05$)。基于形态学和基因表达特征, 推测 *myomaker* 基因在团头鲂 30 d 后肌纤维的融合中发挥重要的调控作用, 从而促进肌纤维的肥大。

关键词 肌纤维直径; 团头鲂; *myomaker* 基因; 基因表达; 肌纤维发育

中图分类号 Q959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)01-0201-10

肌肉既是鱼类的结构组织和动力器官, 同时也是人类重要蛋白质来源之一, 其生长发育直接影响了鱼类的生长速度和肌肉品质^[1-2]。肌肉在胚胎发育时期的生长主要是通过肌肉祖细胞的增殖和分化实现, 而胚后发育时期的生长则是依赖于肌纤维的增殖和肥大, 肌肉损伤的修复过程则依赖肌卫星细胞的增殖和分化^[3-5]。肌纤维作为肌肉组织的基本单位, 其形成首先是通过激活肌卫星细胞形成单核成肌细胞, 单核成肌细胞再进一步分化融合形成多核肌管和肌纤维, 这一过程包含肌细胞的增殖、迁移、分化和融合, 是一个涉及多基因和多通路的调控网络^[6-7]。

尽管骨骼肌细胞增殖和分化的转录调控机制研究较多^[8-10], 且发现许多参与细胞-细胞黏附和肌动蛋白动力学的蛋白质在成肌细胞融合中发挥作

用^[11], 但目前对于成肌细胞融合的协同调控机制的了解仍极为有限。直到 2013 年, Millay 等^[12]在小鼠 (*Mus musculus*) 胚胎发育过程中首次发现 *myomaker* 能调控成肌细胞的融合。此外, 在小鼠成体骨骼肌损伤修复过程中, *myomaker* 瞬时高丰度表达, 并且能有效促进成肌细胞融合^[13]。进一步的研究揭示 *myomaker* 在小鼠成肌细胞融合的初始阶段大量表达于成肌细胞表面, 并且在成肌细胞分化后作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的靶基因调控肌细胞的融合^[14-16]。人类 (*Homo sapiens*) *myomaker* 基因突变会导致 Carey-Fineman-Ziter syndrome (卡瑞-费尼曼-齐特综合症)。在斑马鱼 (*Danio rerio*) 和原鸡 (*Gallus gallus*) 中敲除 *myomaker* 基因均会影响成肌细胞的融合, 进而导致生长不良等问题^[17-18]。但是关于 *myomaker*

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(U21A20263); 中央高校基本科研业务费专项(2662022SCQD001); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-45-01)

邹雪, E-mail: zousnow@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 刘露莎, E-mail: liuls@mail.hzau.edu.cn

在经济鱼类中的功能及其调控作用的报道较少,目前研究发现,在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)孵化过程中,*myomaker*基因的表达量在孵化7~28 d及35~180 d均显著上调,并在其启动子上游26 bp发现了潜在的DNA甲基化调控位点^[19];在金头鲷(*Sparus aurata*)中,*myomaker*基因被证实在骨骼肌细胞分化和再生过程中发挥重要作用^[20];在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中*myomaker*基因编码1个434氨基酸的蛋白质,其编码区存在14个由30个核苷酸组成的小卫星序列(minisatellites),并且这些小卫星是虹鳟*Myomaker*发挥融合功能必不可少的条件^[21]。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),俗称武昌鱼,因其生长迅速、抗病力强、成活率高和养殖成本低等优点而成为我国重要的淡水养殖鱼类^[22]。目前,研究人员对团头鲂肌肉发育的分子调控机制开展了部分研究。Zhu等^[23-24]分析了不同发育阶段团头鲂生肌调节因子的表达量。Du等^[25]通过转录组测序分析了团头鲂骨骼肌损伤的修复和发育过程。此外,Liu等^[26]对生长快和生长慢的团头鲂进行肌肉组织全转录学分析,研究了circRNAs在其肌肉生长发育的作用。然而,关于团头鲂肌纤维融合调控方面的研究还比较有限。本研究通过RT-PCR鉴定了团头鲂*myomaker* cDNA序列,分析*myomaker*在团头鲂不同组织的分布和胚后不同发育时期肌肉组织的表达情况,揭示*myomaker*在团头鲂骨骼肌纤维融合中的作用,以为团头鲂肌肉生长发育的分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用团头鲂样品均取自华中农业大学水产学院南湖基地。随机选取3月龄团头鲂1尾,取其肌肉组织(白肌)用于基因鉴定试验;随机选取1月龄团头鲂个体3尾,取其肝脏、脑、肠道、肌肉、尾鳍共5个组织,用于组织特异性表达分析;选取同一批繁殖的团头鲂子代胚后发育不同时期(20、30、40、50和60 d)样品,取其背鳍起始位置下方、水平隔膜上方的肌肉组织置于肌肉固定液中保存,用于肌肉组织横截面切片观察分析;同时选取15、20、30、40、50和60 d不同发育时期团头鲂(每个发育时期3尾),取其背鳍起始位置下方、水平隔膜上方的肌肉组织块置于液氮速冻后-80℃保存,用于不同发育时期基因表达分析。

1.2 团头鲂不同发育时期肌肉组织切片分析

将固定好的肌肉组织置于浓度递增的乙醇溶液中进行脱水,处理后的肌肉组织放入石蜡中包埋,冷却后进行切片(切片厚度为5 μm),并用苏木精-伊红进行染色。切片用Pannoramic MIDI数字切片扫描仪(3DHISTECH公司,布达佩斯,匈牙利)进行扫描,并利用Image J 1.51s软件测量肌纤维直径 $[d=(\text{长轴}+\text{短轴})/2]$ 。

1.3 团头鲂*myomaker*基因的鉴定

采用Trizol法提取团头鲂肌肉组织总RNA,使用1%琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计KAIAO K5600(凯奥科技发展有限公司,北京)检测RNA质量和浓度,采用HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)(诺维赞生物科技股份有限公司,南京)反转录合成cDNA模板。从团头鲂基因组信息调取*myomaker*的基因序列并设计引物*MymkA*(表1),由武汉擎科公司合成。以团头鲂肌肉组织cDNA为模板,进行*myomaker*序列扩增。扩增条件为95℃预变性5 min,95℃30 s,65℃30 s,72℃30 s,35个循环,72℃延伸5 min。扩增产物通过1%琼脂糖检测产物的片段大小及单一性,产物切胶后,使用FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit(诺维赞生物科技股份有限公司,南京)纯化回收并送至武汉天一辉远有限公司进行克隆测序。

1.4 团头鲂*myomaker*生物信息学分析

通过NCBI Blast对团头鲂*myomaker*基因组序列(NC_063047.1)和cDNA序列进行对比,分析*myomaker*基因的结构。通过NCBI上的Open Reading Frame Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orf-finder/>)预测团头鲂*Myomaker*氨基酸序列,并使用Blast功能对氨基酸序列进行同源性比对。*Myomaker*的分子质量和理论等电点分别由Uniprot Database(<https://www.uniprot.org/>)、Compute pI/Mw tool(https://web.expasy.org/compute_pi/)预测。蛋白质跨膜结构由MHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepT-MHMM>)预测。使用Clustal X软件将团头鲂与其他物种的*Myomaker*氨基酸序列进行多重序列比对分析。采用最大似然法(maximum-likelihood, ML),利用MEGA11软件构建*myomaker*基因的系统进化树,并进行自展(bootstrap, 1 000 replicates)检验^[27]。

1.5 团头鲂*myomaker*时空表达分析

团头鲂5个不同组织和6个不同发育时期样品RNA的提取和逆转录与“团头鲂*myomaker*基因的鉴

表 1 本研究中用于基因克隆和表达的引物序列

Table 1 The primer sequences for genes cloning and expression in the study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Usages
MymkAF	CGCTTCTCCAAAAGATCTGG	65	鉴定 cDNA 序列
MymkAR	GCCTGTTTCTCGCATAAAGC		Identification of cDNA sequence
MymkRT2F	ATGGAGGCCATGGTCTATTTCT	65	基因表达分析
MymkRT2R	CTGTGCCATACACGCTGAAGTA		Gene expression analysis
β-Actin-R	CGTGCTGTTTTCCCTTCCATT	65	内参基因
β-Actin-L	CAATACCGTGCTCAAAGGATACTT		Housekeeping gene

定”中所使用的方法相同。根据团头鲂 *myomaker* cDNA 序列设计荧光定量引物 *MymkRT2*, 以 β -*Actin* 为内参基因(引物序列见表 1), 采用 Hieff™ qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox Plus) (翊圣生物科技有限公司, 上海) 试剂盒检测 *myomaker* 基因在团头鲂 5 个不同组织和 6 个不同时期的表达量水平。反应体系 20 μ L 包括 10 μ L Hieff™ qPCR SYBR® Green Master Mix, 9 μ L cDNA 模板, 1 μ L 引物。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.6 数据分析

数据采用平均值±标准误差的形式表示, 使用 Excel 软件进行数据统计与整理, 再使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和作图, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan’s 多重比较进行组间差异分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 团头鲂肌肉组织肌纤维直径与分布

本研究取团头鲂背鳍起始位置下方、水平隔膜上方的肌肉组织, 即图 1A 红框区域, B~F 分别为

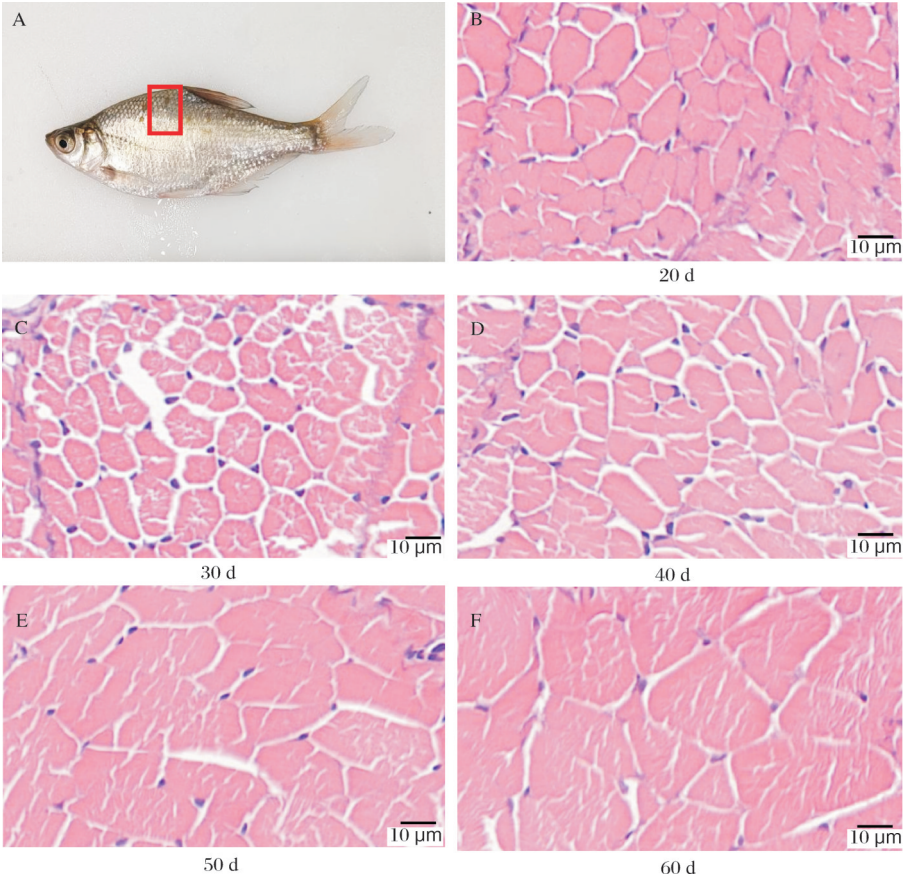
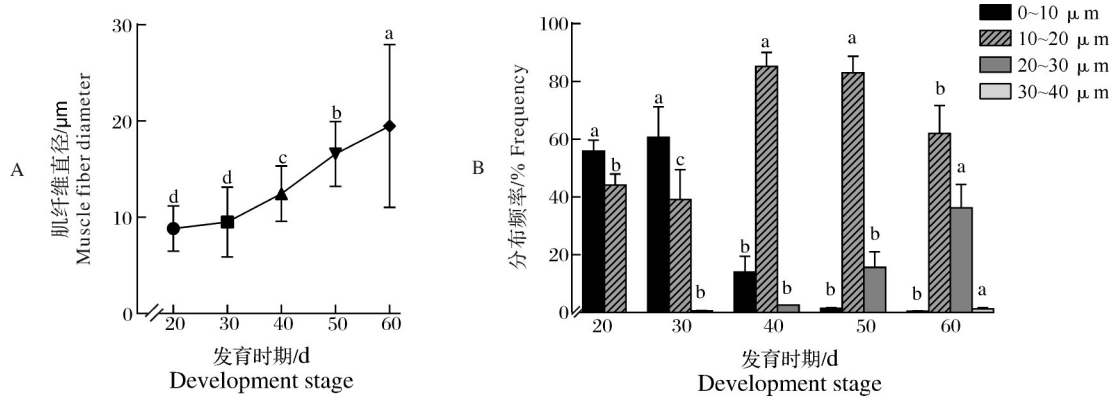


图 1 团头鲂取样位置(A)及不同日龄(B~F)团头鲂肌纤维横切面

Fig. 1 Sampling position of *Megalobrama amblycephala*(A) and cross sections of muscle fibers of *M. amblycephala* at different ages(B-F)

20、30、40、50和60 d团头鲂肌纤维的HE染色结果,切片显示日龄较大的团头鲂肌纤维直径明显大于日龄较小的团头鲂肌纤维直径。根据不同日龄将肌纤维直径进行统计分析,结果如图2A所示,随着日龄的增长,其肌纤维直径呈递增趋势,其中在40、50和60 d均显著递增($P<0.05$),且在40~50 d时其肌纤维

直径递增最快。30~40 d时,直径小于10 μm 的肌纤维比例从60.62%减少至13.98%($P<0.05$),10~20 μm 肌纤维的比例从39.09%增加至85.19%($P<0.05$);40~50 d时,其直径小于10 μm 的肌纤维比例从13.98%减少至1.43%,20 μm 以上肌纤维的比例从2.5%增加至15.59%(图2B)。



不同小写字母表示不同发育时期具有显著性差异($P<0.05$)。Different lowercase letters indicated significant differences in different developmental stages ($P<0.05$).

图2 不同日龄团头鲂肌纤维平均直径(A)及其分布频率(B)

Fig. 2 Statistical diagram of muscle fiber diameter(A) and the frequency of muscle fibers distributed in epaxial muscle of *M. amblycephala* from 20 d to 60 d(B)

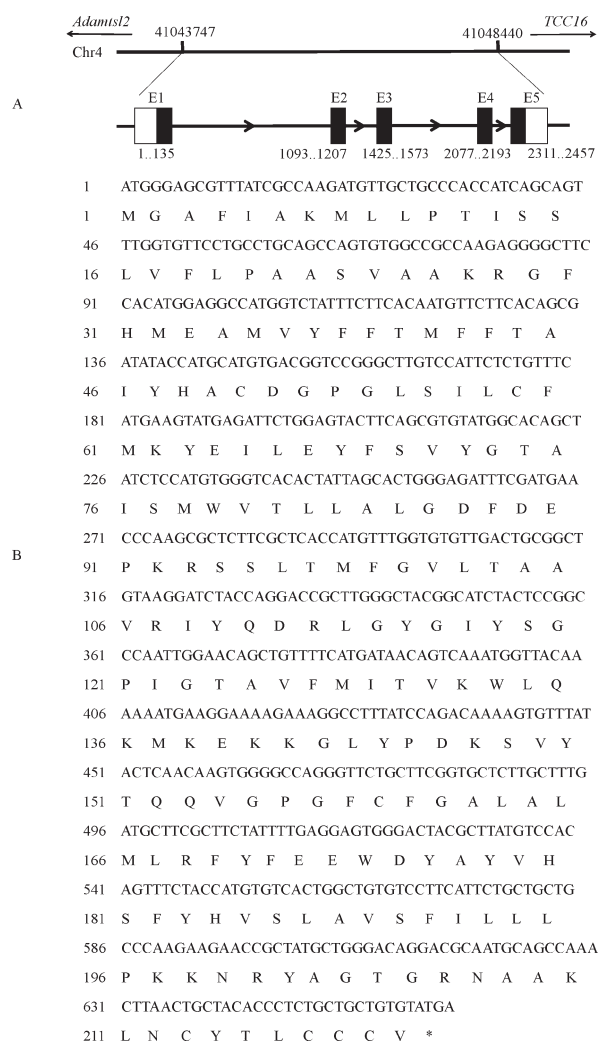
2.2 团头鲂 myomaker 序列及结构分析

Myomaker 基因位于团头鲂 4 号染色体 (Chr4) 41043747...41048440, 上下游基因分别为 *Adamtsl2* 和 *TCC16*, 全长 4 693 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子, 开放阅读框为 663 bp, 共编码 220 个 aa (图 3), 分子质量为 24.79 ku, 理论等电点为 8.99。

2.3 团头鲂 myomaker 基因同源性分析

对人 (*Hominidae*)、鼠 (*Mus musculus*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、湾鳄 (*Crocodylus porosus*)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、团头鲂及其他鱼类 Myomaker 的氨基酸序列进行对比分析, 结果显示 Myomaker 在各物种间较保守。哺乳动物 myomaker 基因编码 221 aa, 而在鱼类 myomaker 基因编码的氨基酸数目存在差异。例如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) myomaker 基因编码 434 aa, 斑马鱼 (*Danio rerio*) myomaker 基因编码 221 aa。氨基酸序列比对发现不同物种间 Myomaker 前 220 aa 保守性较高, 氨基酸序列 C 端存在一些变异 (图 4)。团头鲂 Myomaker 氨基酸序列与其他鲤科鱼类的序列相似性高达 98% 以上, 其中, 与鲤 (*Cyprinus carpio*) 的序列相似性为 98.63%, 与斑马鱼的序列相似性为 98.18%。而红点鲑 (*Salvelinus alpinus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和大鳞大马哈

鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*) 等鲑科鱼类的 Myomaker 氨基酸序列长度显著长于其他物种, 分别含有 411、434 和 477 个氨基酸, 并且在其编码区存在多个由 30 个核苷酸组成的小卫星序列。黄鳍棘鲷 (*Acanthopagrus latus*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、鳊 (*Siniperca chuatsi*) Myomaker 均含有 285 个氨基酸, 罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) Myomaker 含有 288 个氨基酸。所以, 尽管 Myomaker 在不同物种间的氨基酸序列存在一定的长度差异和变异, 但在进化过程中仍保持了较高的保守性, 尤其是在前 220 个氨基酸区域, 这表明 Myomaker 在肌肉发育中的功能可能具有重要的生物学意义。MHMM 预测跨膜蛋白结构显示, 团头鲂 myomaker 基因编码蛋白具有 7 个跨膜结构, 分别位于 5~25、32~49、65~85、94~109、117~134、151~171 和 178~195 氨基酸残基序列处 (图 5A); 黄鳍棘鲷 myomaker 基因编码蛋白为 285 个氨基酸, 其 7 个跨膜结构分别位于 5~25、32~49、65~85、94~109、115~135、151~171 和 178~195 氨基酸残基序列处 (图 5B); 大鳞大马哈鱼 myomaker 基因所编码的蛋白含 477 个 aa, 其 7 个跨膜结构分别位于 5~25、32~49、65~85、94~108、115~134、151~171 和 176~196 氨基酸残基序列处 (图 5C)。结果表



5'UTR和3'UTR使用白色方框表示,外显子使用黑色方框表示,内含子用加粗箭头线表示。5'UTR and 3'UTR are represented by white boxes, exons by black boxes and introns by bold arrow lines.

图3 *myomaker*基因结构(A)及团头鲂 *myomaker*基因全长序列(B)

Fig. 3 Structural organization of the *myomaker* gene (A) and full-length sequence of the *myomaker* gene in *M. amblycephala* (B)

明,团头鲂与黄鳍棘鲷、大鳞大马哈鱼的 *myomaker* 基因所编码蛋白质的氨基酸数目差别很大,但是它们的跨膜结构类似。

将团头鲂的 *Myomaker* 氨基酸序列与其他物种构建系统进化树(图6),结果显示鱼类和其他脊椎动物的该序列分别聚为一支,其中,团头鲂的 *Myomaker* 氨基酸序列最先与鲤、金线鲃(*Sinocyclocheilus rhinoceros*)等鲤科鱼的序列聚为一支。这也表明团头鲂与鲤的亲缘关系最近,与鸡、鼠、人等脊椎动物亲缘关系较远。

2.4 *myomaker*基因在团头鲂不同组织中的表达

团头鲂不同组织 *myomaker* 基因定量表达结果(图7)显示, *myomaker* 在1月龄团头鲂肌肉中的表达量极其显著高于肝脏、脑、肠道和尾鳍 ($P < 0.0001$)。

2.5 *myomaker*基因在不同日龄团头鲂肌肉组织中的表达分析

定量表达分析结果(图8)显示, *myomaker* 在团头鲂出膜后15~60 d均有表达,其中在15~30 d这段时间内表达量较高,并呈现逐渐增加的趋势,且在30 d时表达量显著高于其他时期 ($P < 0.05$),30 d后 *myomaker* 基因的表达量在肌肉组织中则呈现下降的趋势。

3 讨论

在小鼠和斑马鱼等物种中, *Myomaker* 作为一种肌肉特异性膜蛋白,精确地控制着成肌细胞的融合以防止非肌肉细胞核并入肌纤维^[12,14]。为探究 *myomaker* 基因在经济淡水鱼类团头鲂肌细胞肥大中的作用,本研究采用 RT-PCR 技术获得了团头鲂 *myomaker* 基因 cDNA 序列。

氨基酸序列比对发现 *Myomaker* 在大多数物种中仅包含 220 个氨基酸,不同物种 *Myomaker* 前 220 aa 保守性较高,但其氨基酸序列 C 端存在一些变异。红点鲃、虹鳟和大鳞大马哈鱼 *Myomaker* 氨基酸序列显著长于其他物种,附加氨基酸链主要由编码 30 个核苷酸的 12~17 个小卫星序列组成^[21]。除此之外,鳊等新真骨鱼亚群(*Neoteleostei*) *Myomaker* 氨基酸序列长度为 285~288 aa,其中不包含小卫星序列,且 221~288 aa 区间的序列在不同物种间非常保守。根据系统进化树结果与 *Myomaker* 氨基酸序列长度的变化,将硬骨鱼类的 *Myomaker* 分为三大支:220 aa 的骨鳔下区类群(*Otocephala*)、280⁺ aa 的新真骨鱼亚部(*Neoteleostei*)和 400⁺ aa 的原棘鳍鱼总目(*Protacanthopterygii*)。在四足动物和硬骨鱼骨鳔下区类群中为祖先 220~221 aa *myomaker* 基因,随着真骨鱼类的出现, *myomaker* 基因出现第 1 次扩增(60~70 aa),而后在原棘鳍鱼总目鱼类中,小卫星的出现进一步延长了 *Myomaker* 蛋白质序列^[21]。尽管 *myomaker* 基因发生了 2 次扩增,但其中的第 219 位和 220 位氨基酸未受扩增影响,仍然是肌纤维融合所必需的 2 种半胱氨酸。Landemaine 等^[21]通过免疫印迹法观察到虹鳟 *myomaker* 包括 14 个拓展的小卫星序列,并且这些

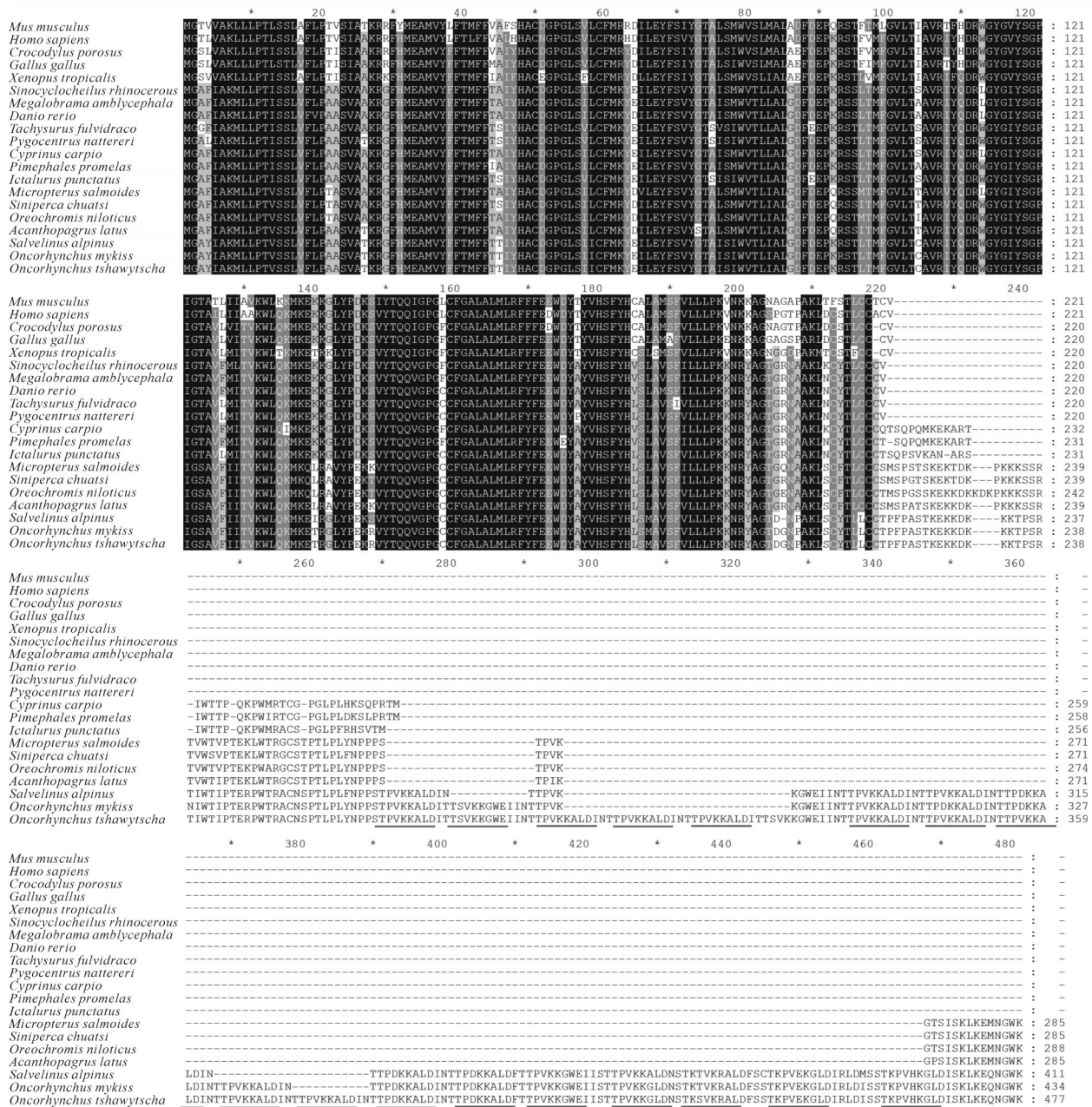


图 4 Myomaker 氨基酸序列多重对比分析

Fig. 4 Multiple alignment analysis Myomaker amino acid sequences

小卫星序列是虹鳟 *myomaker* 所表达蛋白发挥融合功能必不可少的条件。

Myomaker 蛋白定位于细胞膜, 也存在高尔基

体和囊泡中^[16]。经预测团头鲂 *myomaker* 所编码蛋白含有 7 个跨膜域, 其跨膜结构与黄鳍棘鲷、大鳞大马哈鱼相似, 且其主要嵌入在质膜中, 胞外 N 端和胞

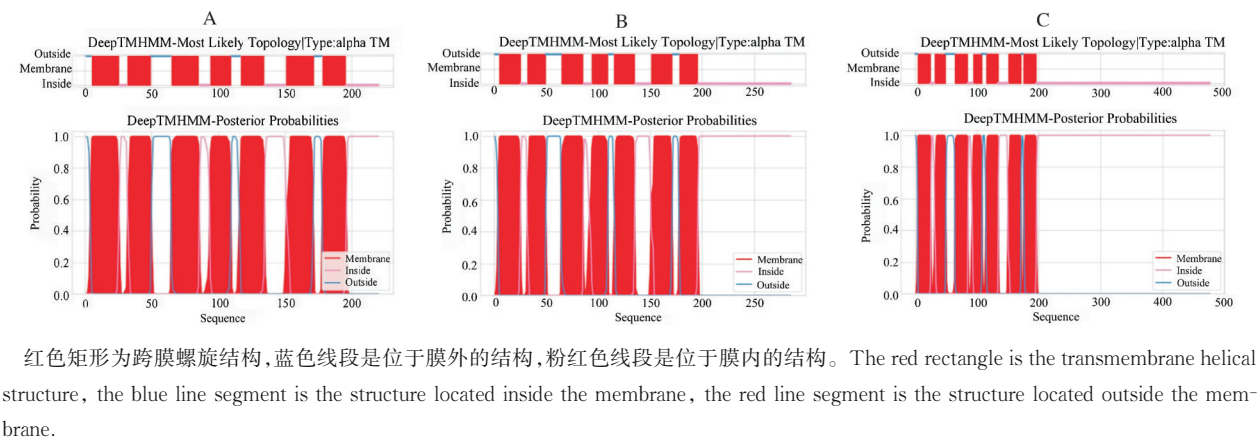


图 5 团头鲂(A)、黄鳍棘鲷(B)及大鳞大马哈鱼(C)Myomaker跨膜结构比较

Fig. 5 Comparison of Myomaker transmembrane structure of *M. amblycephala*(A), *Acanthopagrus latus*(B), and *Oncorhynchus tshawytscha*(C)

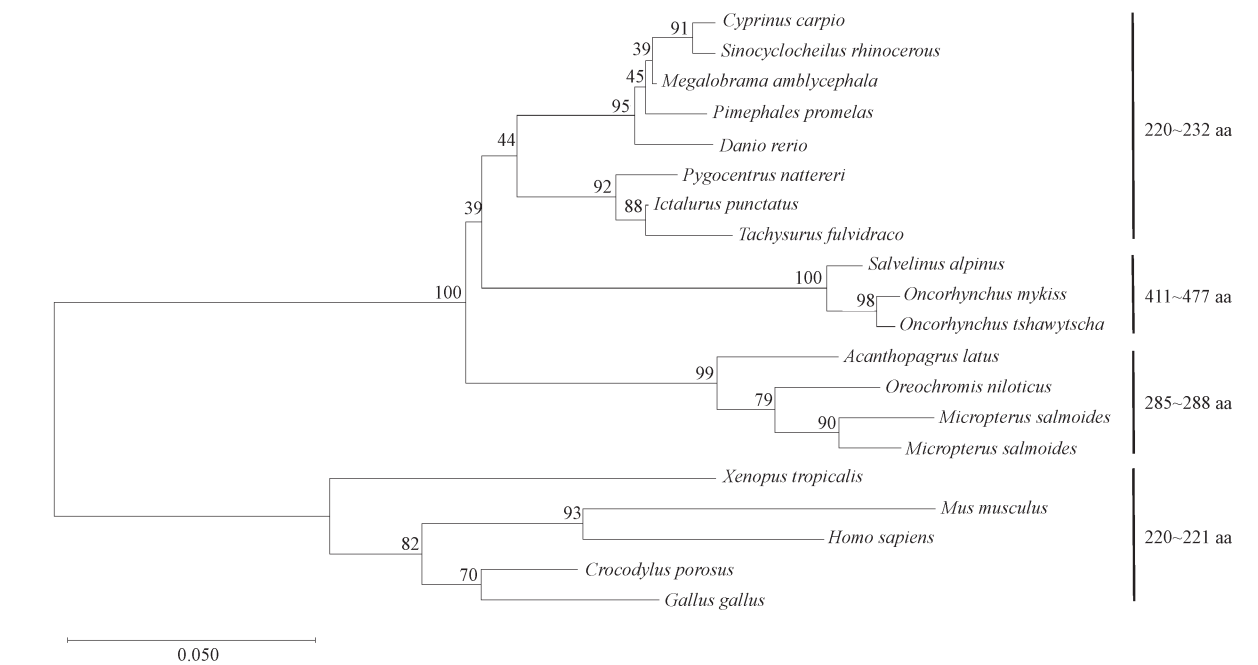


图 6 基于 Myomaker 氨基酸序列构建的系统发育树

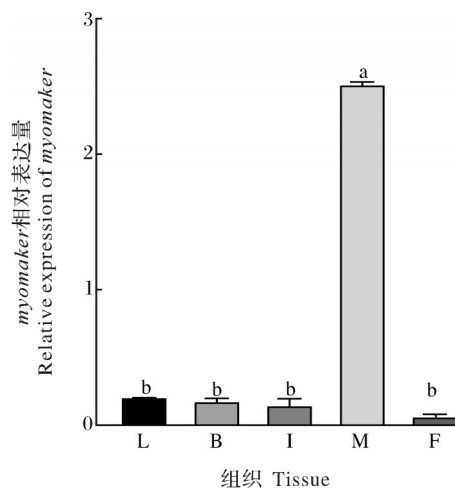
Fig. 6 Phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequence of Myomaker

内 C 端部分较小,与斑马鱼中 Myomaker 蛋白质结构类似^[17]。

之前的研究表明,*myomaker* 基因在肌肉发育和肌肉再生过程中介导成肌细胞的融合^[3]。荧光定量结果显示,在 1 月龄团头鲂的不同组织中,*myomaker* 基因在肌肉中的表达量最高,极其显著高于肝脏、脑、肠道和尾鳍($P<0.0001$)。这与小鼠、鸡、虹鳟和斑马鱼中的报道类似,小鼠胚胎原位杂交发现 *myomaker* 主要在小鼠肌肉组织中特异性表达,150 g 虹鳟中 *myomaker* 基因在红肌和白肌中高表

达^[12, 17-18, 21]。因此,*myomaker* 基因在团头鲂肌肉组织中极显著地高表达也提示该基因对团头鲂肌肉发育的重要作用。

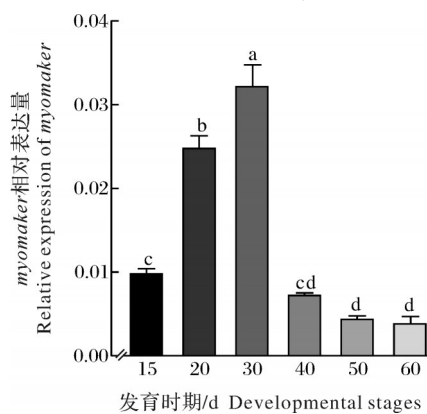
myomaker 基因在团头鲂不同发育阶段的肌肉组织中显著性差异表达,从 15 d 到 30 d *myomaker* 表达量逐渐上升,并在 30 d 时表达量最高,与其余时期具有显著差异($P<0.05$),而后随着团头鲂的生长发育其表达量逐渐降低。*myomaker* 基因在虹鳟的胚胎期、4 月龄(15 g)、8 月龄(150 g)和 18 月龄(1 500 g)虹鳟的白肌中均有表达,其表达量随着体质量的增



L: 肝脏 Liver; B: 脑 Brain; I: 肠道 Intestine; M: 肌肉 Muscle; F: 尾鳍 Fin; 不同小写字母表示 *myomaker* 在不同组织的表达差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters represent significant differences of *myomaker* expression in different tissues ($P < 0.05$).

图7 *myomaker*在团头鲂不同组织中的相对表达量

Fig. 7 The relative expression level of *myomaker* in different tissues of *M. amblycephala*



不同小写字母表示不同发育时期差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference at different developmental stage ($P < 0.05$).

图8 *myomaker*在不同发育时期团头鲂肌肉中的表达

Fig. 8 Expression of *myomaker* in the muscles of *M. amblycephala* at different developmental stages

加而减少^[21]。本研究石蜡切片-HE染色结果显示,在30~40 d时,团头鲂10 μm 以下肌纤维显著减少,10~20 μm 肌纤维显著增加,而后随着肌纤维的发育,20 μm 以上肌纤维显著增加。我们推测 *myomaker* 基因在团头鲂肌细胞肥大和成熟肌纤维的形成中发挥着重要的作用。而 Millay 等^[12]研究发现, *myomaker* 明显参与了膜融合反应,它能够刺激成肌细胞间的融合以及成纤维细胞与成肌细胞的融合。这也验证了我们的结论。

综上,本研究鉴定了团头鲂 *myomaker* 基因 cD-

NA 序列,并进行了氨基酸序列对比和系统进化分析;通过对团头鲂 *myomaker* 基因的组织表达特征、不同日龄肌肉组织中表达规律进行定量表达分析,结合组织切片分析,发现该基因在团头鲂肌纤维的融合中发挥重要作用,从而促进肌纤维的肥大。本研究结果有助于揭示团头鲂胚后肌纤维增殖和肥大的调控机制,可为团头鲂肌肉的快速生长提供理论支持。

参考文献 References

- [1] JOHNSTON I A, BOWER N I, MACQUEEN D J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish[J]. Journal of experimental biology, 2011, 214(10): 1617-1628.
- [2] 石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控[J]. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1145-1152. SHI J, CHU W Y, ZHANG J S. Muscle growth, differentiation and gene expression regulation in fish[J]. Acta hydrobiologica sinica, 2013, 37(6): 1145-1152 (in Chinese with English abstract).
- [3] BI P P, RAMIREZ-MARTINEZ A, LI H, et al. Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer[J]. Science, 2017, 356(6335): 323-327.
- [4] 朱艳, 张进威, 齐婧, 等. *Myomaker* 和 *Myomerger* 调控成肌细胞融合的分子机制[J]. 遗传, 2019, 41(12): 1110-1118. ZHU Y, ZHANG J W, QI J, et al. Molecular regulation mechanism of *Myomaker* and *Myomerger* in myoblast fusion[J]. Hereditas, 2019, 41(12): 1110-1118 (in Chinese with English abstract).
- [5] CHAL J, POURQUIÉ O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. Development, 2017, 144(12): 2104-2122.
- [6] ZANOUE N, GAILLY P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. Cellular and molecular life sciences, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [7] 程春芳, 万娟, 丁恺志, 等. 成肌细胞增殖与分化及其调控机制[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(14): 2200-2206. CHENG C F, WAN J, DING K Z, et al. Regulatory mechanism of myoblast proliferation and differentiation[J]. Chinese journal of tissue engineering research, 2023, 27(14): 2200-2206 (in Chinese with English abstract).
- [8] BENTZINGER C F, WANG Y X, RUDNICKI M A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis [J/OL]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012, 4(2): a008342 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342>.
- [9] MOHAMMADABADI M, BORDBAR F, JENSEN J, et al. Key genes regulating skeletal muscle development and growth

- in farm animals[J/OL]. *Animals*, 2021, 11(3): 835 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.3390/ani11030835>.
- [10] 阮宁. RASSF4对骨骼肌成肌细胞分化融合的影响及作用机制[D]. 吉林: 吉林大学, 2022: 5-6. RUAN N. Effect and mechanism of RASSF4 protein on the differentiation and fusion of skeletal muscle myoblasts [D]. Jining: Jilin University, 2022: 5-6(in Chinese with English abstract).
- [11] HINDI S M, TAJRISHI M M, KUMAR A. Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion[J/OL]. *Science signaling*, 2013, 6(272): re2 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003832>.
- [12] MILLAY D P, O'ROURKE J R, SUTHERLAND L B, et al. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation[J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 301-305.
- [13] MILLAY D P, SUTHERLAND L B, BASSEL-DUBY R, et al. Myomaker is essential for muscle regeneration[J]. *Genes & development*, 2014, 28(15): 1641-1646.
- [14] LEIKINA E, GAMAGE D G, PRASAD V, et al. Myomaker and myomerger work independently to control distinct steps of membrane remodeling during myoblast fusion[J]. *Developmental cell*, 2018, 46(6): 767-780.
- [15] CUI S, LI L, YU R T, et al. β -Catenin is essential for differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD and α -catenin[J/OL]. *Development*, 2019, 146(6): dev167080 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.1242/dev.167080>.
- [16] GAMAGE D G, LEIKINA E, QUINN M E, et al. Insights into the localization and function of myomaker during myoblast fusion[J]. *Journal of biological chemistry*, 2017, 292(42): 17272-17289.
- [17] SHI J, CAI M X, SI Y F, et al. Knockout of myomaker results in defective myoblast fusion, reduced muscle growth and increased adipocyte infiltration in zebrafish skeletal muscle[J]. *Human molecular genetics*, 2018, 27(20): 3542-3554.
- [18] LUO W, LI E X, NIE Q H, et al. Myomaker, regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast fusion[J]. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16(11): 26186-26201.
- [19] HUANG Y J, WU S X, ZHANG J R, et al. Methylation status and expression patterns of myomaker gene play important roles in postnatal development in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *General and comparative endocrinology*, 2019, 280: 104-114.
- [20] PERELLÓ -AMORÓS M, OTERO-TARRAZÓN A, JORGE-PEDRAZA V, et al. Myomaker and myomixer characterization in gilthead sea bream under different myogenesis conditions[J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(23): 14639 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.3390/ijms232314639>.
- [21] LANDEMAINE A, RAMIREZ-MARTINEZ A, MONESTIER O, et al. Trout myomaker contains 14 minisatellites and two sequence extensions but retains fusogenic function[J]. *Journal of biological chemistry*, 2019, 294(16): 6364-6374.
- [22] 陈宇龙, 张丽红, 周佳佳, 等. 团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 的克隆和表达[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(2): 1-8. CHEN Y L, ZHANG L H, ZHOU J J, et al. Cloning and expression analysis of *tnmd/xirp2a* genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(2): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [23] ZHU K C, YU D H, ZHAO J K, et al. Morphological analysis and muscle-associated gene expression during different muscle growth phases of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Genetics and molecular research*, 2015, 14(3): 11639-11651.
- [24] ZHU K C, WANG H L, WANG H J, et al. Characterization of muscle morphology and satellite cells, and expression of muscle-related genes in skeletal muscle of juvenile and adult *Megalobrama amblycephala* [J]. *Micron*, 2014, 64: 66-75.
- [25] DU J H, DU C, LI X H, et al. The mechanism of *Megalobrama amblycephala* muscle injury repair based on RNA-seq[J/OL]. *Gene*, 2022, 827, 146455 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146455>.
- [26] LIU L F, CHEN Y L, DIAO J H, et al. Identification and characterization of novel circRNAs involved in muscle growth of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22(18): 10056 [2023-10-09]. <https://doi.org/10.3390/ijms221810056>.
- [27] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular biology and evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.

Identification of *myomaker* gene in *Megalobrama amblycephala* and its role in muscle fiber development

ZOU Xue¹, LIU Qi¹, ZHOU Jiajia¹, WU Tianyu¹, LIU Lusha¹, GAO Zexia^{1,2}

1.Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
Key Lab of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological
Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education/ Hubei Province Famous Fish
Breeding and Healthy Aquaculture Engineering Technology Research Center, Wuhan 430070, China

Abstract To investigate the role of the *myomaker* gene in muscle hypertrophy in *Megalobrama amblycephala*, the cDNA sequence was identified using RT-PCR. The developmental characteristics of muscle fibers at various stages in *M. amblycephala* were analyzed through paraffin sections and HE staining. Additionally, the expression patterns of the *myomaker* gene at different developmental stages and in different tissues of *M. amblycephala* were examined using real-time PCR. The results showed that the length of the *myomaker* gene in *M. amblycephala* is 4 693 bp, containing 5 exons and 4 introns. The open reading frame of *myomaker* is 663 bp and encodes a protein of 220 amino acids with 7 transmembrane domains. An analysis of the amino acid sequences revealed that the *myomaker* protein sequences were highly conserved throughout evolution, and phylogenetic tree analysis demonstrated that the *myomaker* of *M. amblycephala* clustered with that of cyprinid fish, indicating a close evolutionary relationship. The results of paraffin sections showed that the diameter of muscle fibers was significantly increased from 30 d to 60 d ($P<0.05$), with the most rapid growth occurring between 40 d and 50 d. The real-time PCR results of muscle tissue at different developmental stages showed a gradual increase in expression from 15 to 30 days post hatching, peaking at 30 d ($P<0.05$). Combined with morphological data, these findings suggest that the *myomaker* gene plays an important role in muscle fiber fusion after 30 d, thereby promoting muscle fiber hypertrophy. Furthermore, the real-time PCR results indicated that the expression level of *myomaker* in the muscle tissue of one-month-old *M. amblycephala* was significantly higher than that in other tissues ($P<0.000 1$). These results demonstrate that the *myomaker* gene plays a significant regulatory role in the hypertrophy process of muscle fibers in *M. amblycephala*.

Keywords muscle fiber diameter; *Megalobrama amblycephala*; *myomaker* gene; gene expression; muscle development

(责任编辑:边书京)