

刘书鸣, 魏志恒, 彭鑫, 等. 鸡 SOX6 基因真核表达载体构建及其对成肌细胞分化相关基因表达的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 15-23.

LIU S M, WEI Z H, PENG X, et al. Construction of eukaryotic expression vector of chicken SOX6 gene and its effect on gene expression of myoblast differentiation [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 15-23.

鸡 SOX6 基因真核表达载体构建及其对成肌细胞分化相关基因表达的影响

刘书鸣¹, 魏志恒^{1,2}, 彭鑫^{1,2}, 周博¹, 夏磊¹, 裴军¹, 徐璐¹, 郁建峰¹, 顾志良¹

(1. 苏州工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500;

2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 为研究鸡性别决定区域 Y 盒蛋白转录因子 6 (SOX6) 基因时序表达和在成肌细胞分化中的作用, 采用荧光定量 PCR 方法检测鸡不同组织以及胚胎期 (E11~E19) 和出壳早期 (D0、D3、D6) 骨骼肌中 SOX6 mRNA 的表达; 通过 RT-PCR 扩增并克隆鸡 SOX6 基因的编码序列区 (CDS), 经测序分析并利用生物信息学工具预测鸡 SOX6 蛋白的理化性质和结构功能; 构建鸡 SOX6 基因的真核表达载体并转染至鸡原代成肌细胞, Western blot 技术检测重组蛋白的表达; 利用荧光定量 PCR 检测过表达和敲低 SOX6 基因对成肌分化相关基因表达的影响。结果显示: SOX6 mRNA 在鸡 12 种不同组织中均有表达, 其中在胸肌、腿肌较高, 而在肌胃和脾脏较低; SOX6 mRNA 在胚胎期 E11~E19 表达量逐渐增加, D6 期显著高于其他时期 ($P<0.05$); 获得鸡 SOX6 基因编码区全长 2 367 bp, 共编码 789 个氨基酸; 生物信息学分析鸡 SOX6 蛋白为中性、亲水性蛋白, 分子量为 87.533 kDa, 等电点为 6.99, 不稳定系数为 60.95, 脂肪系数为 62.51; 构建 SOX6 过表达载体并转染至鸡原代成肌细胞中, 成功表达出 SOX6-MYC 融合蛋白; 在成肌细胞中过表达 SOX6 后, 肌肉分化标志基因生肌分化因子 (MyoD) 和肌细胞生成素 (MyoG) mRNA 表达显著上升 ($P<0.05$), 而敲降 SOX6 后 MyoD 和 MyoG mRNA 表达显著下降 ($P<0.05$)。结果表明: SOX6 基因对成肌细胞分化发育具有调控作用, 为进一步分析 SOX6 基因功能奠定基础。

关键词: 鸡; SOX6 基因; 克隆; 真核表达; 成肌细胞分化

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)05-0015-09

Construction of eukaryotic expression vector of chicken SOX6 gene and its effect on gene expression of myoblast differentiation

LIU Shuming¹, WEI Zhiheng^{1,2}, PENG Xin^{1,2}, ZHOU Bo¹, XIA Lei¹, PEI Jun¹,
XU Lu¹, YU Jianfeng¹, GU Zhiliang^{1*}

(1. School of Biology and Food Engineering, Suzhou University of Technology, Changshu 215500, China;

2. School of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: This study was to investigate the temporal and spatial expression of chicken SOX6 gene and its role in myoblast differentiation. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of SOX6 mRNA in different tissues of chickens as well as in skeletal muscles during embryonic stage (E11-E19) and early post-hatching period (D0, D3, D6). The coding sequence region (CDS) of the SOX6 gene was amplified and cloned by RT-PCR. After sequencing, the physicochemical properties and structural functions of the SOX6 protein were predicted by bioinformatics tools. The eukaryotic expression vector of the SOX6 gene was constructed and transfected into the primary myoblasts in the chickens, and the recombinant protein was detected by Western blot. Finally, the effect of the overexpression and knockdown of the SOX6 gene on the expression of myogenic differentiation-related genes was detected by fluorescence quantitative PCR. The results showed that the SOX6 mRNA was expressed in 12 various tissues of the chickens, with higher expression in the pectoral muscle and leg muscle, and lower expression in the stomach and spleen. The expression of SOX6 mRNA gradually increased during the embryonic stage from E11 to E19, and was significantly higher in the D6 stage than in the other stages ($P<0.05$). The CDS of the chicken SOX6 gene was obtained by RT-

收稿日期: 2024-07-18; 修回日期: 2025-02-20

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20191476); 江苏省大学生创业创新重点项目 (202310333012Z)

第一作者: 刘书鸣, 男, 本科

* 通信作者: 顾志良, 博士, 教授, 主要从事鸡的遗传育种相关研究, E-mail: zhiliangu88@hotmail.com。

PCR. The total length of the coding region of the chicken SOX6 gene was 2 367 bp, encoding 789 amino acids. The bioinformatics analysis showed that the chicken SOX6 protein was a neutral, hydrophilic protein, with a molecular weight of 87.533 kDa, an isoelectric point of 6.99, instability coefficient of 60.95, and fat coefficient of 62.51. The SOX6 overexpression vector was constructed and transfected into chicken primary myoblasts, and SOX6-MYC fusion protein was successfully expressed. After SOX6 was overexpressed in the myoblasts, the mRNA expressions of the MyoD and MyoG genes increased significantly ($P < 0.05$), while the MyoD and MyoG mRNA expressions were significantly decreased after knocking down SOX6 ($P < 0.05$). The results indicated that the SOX6 gene played a regulatory role in the differentiation and development of the myoblasts. The results of this study lay a foundation for further analysis of the function of the SOX6 gene.

Keywords: chicken; SOX6 gene; cloning; eukaryotic expression; myoblast differentiation

成肌细胞增殖和分化是骨骼肌发育中最重要的生物过程之一, 性别决定区域 Y 盒蛋白转录因子 6 (SOX6) 基因在此过程中起着至关重要的作用^[1]。成肌细胞是肌源性前体, 在肌肉形成过程中发育成肌管, 肌管进一步分化形成肌纤维^[2]。肌纤维作为组成肌肉的基本单位, 其生长发育及类型组成是影响畜禽生长发育和肉品质的重要因素之一, 对于促进畜禽肉类生产非常重要^[3]。

SOX6 基因是肌肉发育中一个重要的转录因子, 通过多种机制影响肌纤维的分化和功能^[4]。这些机制包括调节特定基因表达的稳定性, 直接和间接的转录调控, 以及对肌纤维类型特异性基因表达的抑制和促进。Hagiwara 等^[5]研究表明, SOX6 通过抑制慢肌纤维特异性基因的表达来影响肌纤维的类型, 这表明了 SOX6 在肌纤维类型决定中的调节作用。An 等^[6]研究表明, SOX6 的蛋白水平受到 E6-AP 羧基末端同源 (HECT) 域 E3 泛素连接酶 Trip12 的调控, 说明 SOX6 的稳定性和功能在一定程度上受到泛素-蛋白酶体系统的调控。An 等^[7]通过全基因组测绘 SOX6 的结合位点, 发现 SOX6 直接或间接调控多个肌纤维特异性基因的转录, 这些基因的调控影响了肌肉的末端分化。

为了阐明鸡 SOX6 基因在胚胎发育和出壳早期肌纤维形成过程中的复杂调控功能, 探讨 SOX6 基因在胚胎发育和出壳早期肌肉形成过程的表达变化和功能, 本研究采用荧光定量 PCR 技术检测 SOX6 基因在鸡不同组织, 以及胚胎期和出壳早期腿肌组织中的时序性表达; 构建鸡 SOX6 基因的真核表达载体并设计合成干扰 SOX6 的 siRNA, 转染成肌细胞以揭示 SOX6 基因对成肌细胞分化相关基因的影响, 探讨该基因的功能和作用机制。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选取 3 只 4 周龄广西黄鸡 (常熟市新丰养鸡场), 屠宰后迅速采取以下 12 种组织: 肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肺、脑、胸肌、腿肌、肌胃、腺胃、小

肠和脂肪, 用 RNAiso Plus 试剂分别提取各组织总 RNA 后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。选取相同批次且孵化条件相同的胚胎期 11 d (E11)、12 d (E12)、13 d (E13)、15 d (E15)、17 d (E17)、19 d (E19) 的鹿苑鸡胚 (张家港市畜禽有限公司) 各 3 枚, 出壳后 0 d (D0)、3 d (D3)、6 d (D6) 雏鸡各 3 只。迅速分离出鸡 (胚) 的胸肌和腿肌组织, 投入液氮中速冻并迅速转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 以作备用。取出胚胎期 10.5 d (E10.5) 的鹿苑鸡胚 6 枚用于分离和培养鸡原代成肌细胞。

1.2 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、pCMV-3Tag-9、鸡胚浸出液等为本实验室保存。Not I 内切酶、Sal I 内切酶、PrimeScriptTM RT Master Mix、rTaq 酶、SYBR Premix Ex TaqTM II 等购自 TaKaRa 公司; 髓细胞增生原癌蛋白 (MYC) 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、 β -肌动蛋白 (β -Actin) 抗体购自于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Opti-MEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、马血清购自于 Gibco 公司; Lipofectamine 3000 Transfection Reagent、Lipofectamine RNAiMAX 购自于赛默飞世尔科技公司; DMEM 培养基购自普诺赛生物科技公司; 100 \times 青霉素/链霉素、1 000 \times 两性霉素、BeyoECL Moon 化学发光剂购自上海碧云天生物科技公司。

1.3 引物的合成与设计

根据 GenBank 中登录的原鸡 (*Gallus gallus*) SOX6 基因序列 (登录号: NM_001318451.2), 使用 Primer Premier 6.0 软件设计特异性引物及荧光定量 PCR 引物, 以 β -Actin (登录号: L08165) 和 18S rRNA (登录号: XR_006936397) 为内参基因, 引物序列见表 1。引物由金唯智生物科技有限公司和苏州泓迅生物科技有限公司合成。根据 NCBI 数据库中基因 SOX6 基因序列, 通过在线设计软件 (<http://rnaid-esigner.invitro-gen.com/rnaexpress/>) 设计干扰 SOX6 基因的 siRNA (表 2), 由苏州吉玛基因生物科技有限公司合成。

表 1 引物序列信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	登录号	扩增产物长度/bp
gga-SOX6-F1	ATGTCCTCCAAGCAGGCTAC	NM_001318451.2	2 367
gga-SOX6-R1	GTTGGCACTGACTGCCTCAT		
gga-SOX6cds-F3	TTGCGGCCGC gccacc ATGTCCTCCAAGCAGGCTAC	NM_001318451.2	2 383
gga-SOX6cds-R2	GCGTCGACGTTGGCACTGACTGCCTCAT		
gga-SOX6-qF	CCAGCAGGGATTCTCTTCC	NM_001318451.2	140
gga-SOX6-qR	GAGCTGCATACAGTTGCTGG		
gga-MyoG-qF2	ATCCAGTACATCGAGCGCC	NM_204184.2	201
gga-MyoG-qR2	ATCGCTCAGGAGGTGATCTGC		
gga-MyoD-qF1	ACTACAGCGGGAGTCAGAT	NM_204214.3	149
gga-MyoD-qR1	CCCATGCTTTGGGTCAATTTGG		
gga-β-Actin-qF	CACGGTATTGTCACCAACTG	L08165	218
gga-β-Actin-qR	ACAGCCTGGATGGCTACATA		
gga-18S rRNA-qF	CGTAGTCCGACCATAAACC	XR_006936397	227
gga-18S rRNA-qR	TCTGTCAATCCTGTCCGTG		

注: MyoG 为肌细胞生成素, MyoD 为生肌分化因子。序列中下划线处为酶切位点, 小写字母为 KOZAK 序列。

表 2 基因靶点 siRNA 序列信息

基因靶点	siRNA 序列 (5'→3')	
	正义链	反义链
siSOX6-12	GCAGGCUACCUCUCAUUUT	AAAUGGAGAGGUAGCCUGCTT
siSOX6-1532	GCCCACAGUUAACAGGGAATT	UUCCUGUUAACUGUGGGCTT
siSOX6-1762	GCUUUC AUGGUUUGGGCUATT	UAGCCCAAACCAUGAAGCTT
siRNA-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

注: siRNA-NC 为阴性对照。

1.4 鸡 SOX6 基因的组织表达分析

将 3 只 4 周龄广西黄鸡的 12 种组织总 RNA 用 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录获得相应的 RT 产物, 以 gga-SOX6-qF/qR 为引物, 通过荧光定量 PCR 检测 SOX6 基因在不同组织中表达情况。反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μL, ROX Reverse Dye II (50×) 0.4 μL, 上下游引物各 0.4 μL, cDNA 2.0 μL, ddH₂O 6.8 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。以 18S rRNA 为内参基因。

1.5 鸡 SOX6 基因在不同胚龄和出壳早期腿肌中时序表达分析

分别采集不同胚龄和出壳早期的鸡腿肌组织, 组织进行匀浆后, 通过 RNAiso Plus 试剂分别提取组织总 RNA, 反转录为 cDNA, 通过荧光定量 PCR 测定在不同胚龄及出壳早期 SOX6 基因的表达变化情况。具体方法同 1.4。

1.6 鸡 SOX6 基因的扩增及克隆测序

以广西黄鸡胸肌及腿肌组织 cDNA 为模板, gga-SOX6-F1/R1 为引物, PCR 扩增 SOX6 基因编码区。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP mix 2.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL, RT 产物 1.0 μL, *rTaq* 0.3 μL, ddH₂O 17.2 μL。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 120 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增得到的 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析并确认, 选取目标条带回收纯化, 并将纯化后的产物与 pMD-19T 在 16 °C 过夜连接后, 转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板中, 37 °C 培养箱中培养 12 h, 挑取单一菌落接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 225 r/min 摇床培养至菌液浑浊后, 进行菌液 PCR 筛选, 将阳性菌液小量提取质粒后测序验证, 命名为 gga-SOX6/pMD-19T。

1.7 生物信息学分析

使用在线生物信息学软件对鸡 SOX6 基因编码蛋

白的理化性质、结构和生物学功能进行预测，在线软件具体信息见表 3。

表 3 生物信息学在线分析软件工具

软件	网址	功能
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/	理化性质分析
ProScale	http://web.expasy.org/protscale/	亲/疏水性预测
SMART	http://smart.embl.de/	蛋白结构域预测
PSORT II	https://psort.hgc.jp/form.html	蛋白亚细胞定位
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_consensus.pl	二级结构预测
ExPASy SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/	三级结构预测

1.8 鸡 SOX6 基因真核表达载体构建

以克隆载体 *gga-SOX6/pMD-19T* 为模板，*gga-SOX6cds-F3/R2* 引物扩增 SOX6 基因的编码区。PCR 反应体系和反应条件同 1.6。将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收片段，*pCMV-3Tag-9* 载体和目的片段进行 *Sal I/Not I* 双酶切。酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，切胶回收。双酶切后的目的片段与真核表达载体 *pCMV-3Tag-9* 于 16 °C 连接 8 h 后，转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，对培养好的重组菌进行菌液 PCR 鉴定，并提取质粒测序验证。将测序正确的阳性菌扩大培养之后用无内毒素质粒大提试剂盒大提质粒。将该质粒命名为 *gga-SOX6/pCMV-3Tag-9*。

1.9 鸡 SOX6 重组蛋白的过表达和 Western blot 鉴定

鸡原代成肌细胞分离按照文献 [8] 方法进行适当修改。取出鸡胚 (E10.5)，PBS 清洗，取腿肌组织于烧杯中剪碎，加入 1.5 倍体积的 0.1% 胶原酶 I (PBS 配制) 和 1.5 倍体积的 0.25% 胰酶-EDTA，37.5 °C 作用 40 min，加入等体积的 DMEM+10% FBS 终止消化，滤过液于 1 200 r/min、3 min 室温离心，丢弃上清液，加入 5 mL 鸡成肌细胞培养液 (DMEM 含 10% FBS 和 1% 100 \times 青霉素/链霉素和 0.1% 1 000 \times 两性霉素) 重悬细胞，将所有细胞铺在培养皿中，37.5 °C 培养，差速贴壁处理 40 min，得到纯化的原代成肌细胞，适当摇动培养液计数细胞浓度。

以 2 \times 10⁵ cells/mL 的密度将鸡原代肌肉细胞接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，当细胞汇合度达到 70%~80% 时，用 Lipofectamine 3000 试剂进行细胞转染，每孔分别转入 1.5 μ g 质粒 *gga-SOX6/pCMV-3Tag-9*，以空载体 *pCMV-3Tag-9* 作为对照组。培养 48 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blot 鉴定。样品进行 SDS-PAGE 后将蛋白转印至 PVDF 膜上，用提前配制好的含 5% 脱脂奶粉的 1 \times TBST 溶液将 PVDF 膜置于往复脱色摇床上室温封闭 2 h，接着使用 1 \times TBST 溶液

将封闭后的 PVDF 膜清洗 3 次，每次清洗时间严格控制为 10 min；清洗完毕后，按照预估分子量将 β -Actin 部分与 SOX6 重组蛋白过表达部分剪开，两块膜分别进行相对应的 MYC 抗体和 β -Actin 抗体反应及清洗。用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 反应和清洗，最后，将 BeyoECL Moon 化学发光剂滴加至完成处理后的 PVDF 膜，在 UVP 成像系统中对结果进行曝光拍照。

1.10 鸡 SOX6 siRNA 敲低效率验证

将原代成肌细胞在增殖培养基培养下达到合适密度，按 2 \times 10⁵ cells/mL 接种至 12 孔板中，培养 24 h 至细胞密度达到 80% 后，将 siSOX6-12、siSOX6-1532、siSOX6-1762 这 3 种 siRNA 转染至鸡原代细胞，试验重复 3 次。37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后，吸弃鸡肌细胞增殖培养基，加入鸡肌细胞分化培养基，诱导成肌细胞分化肌管，培养 72 h 后，提取细胞总 RNA。RNA 的反转录根据 PrimeScriptTM RT Master Mix 试剂盒说明书进行操作。使用相应的引物进行荧光定量 PCR，检测 siRNA 的敲低效率，选择最佳敲低效率的 siRNA 进行后续干扰试验。荧光定量 PCR 反应体系和反应条件同 1.4。以 β -Actin 为内参基因。

1.11 鸡 SOX6 基因过表达、干扰对部分成肌分化相关基因的影响

按 2 \times 10⁵ cells/mL 将鸡原代成肌细胞接种到 12 孔板，培养 24 h 后，将空质粒、SOX6 过表达载体和 siNC、siRNA 分别转染鸡原代肌肉细胞，转染 48 h 后，吸弃鸡肌细胞增殖培养基，加入鸡肌细胞分化培养基 [DMEM (含丙酮酸钠) 含 10% 马血清和 2.5% 的鸡胚浸出液，1% 100 \times 青霉素/链霉素，0.1% 1 000 \times 两性霉素]，诱导成肌细胞分化第 3 天，收集细胞后用 RNAiso Plus 提取总 RNA。根据 Prime ScriptTM RT Master Mix 试剂盒说明书进行 RNA 的反转录，使用相应的引物进行荧光定量 PCR，检测成肌分化相关基因 MyoG、MyoD mRNA 相对表达量。荧光定量 PCR 反应体系和反应条件同 1.4。以 β -Actin

为内参基因。

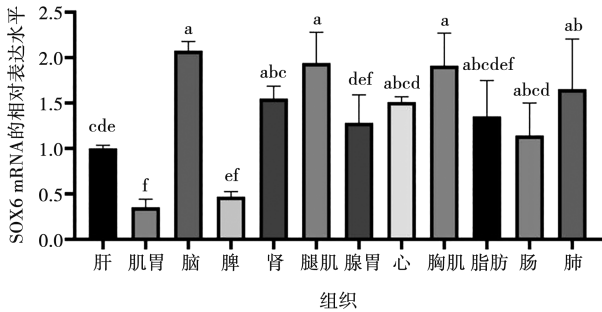
1.12 数据统计与分析

荧光定量 PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。数据采用 GraphPad Prism 8.0 (San Diego, USA) 统计软件进行统计,结果均以“平均值±标准误”表示。两组均值之间采用 *t* 检验进行比较分析;多组数据之间使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行比较,并使用 Tukey 法进行事后检验。 $P < 0.05$ 被认为差异显著, $P < 0.01$ 被认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 SOX6 基因的组织表达差异

荧光定量 PCR 检测鸡的 12 种组织 SOX6 mRNA 的表达情况见图 1。结果显示,SOX6 基因在鸡 12 种组织中均有表达,其中在脑、胸肌、腿肌、肺的表达量显著高于肝、肌胃、脾、腺胃 ($P < 0.05$),而在肝、肾、心、肠中的表达量显著高于肌胃 ($P < 0.05$),腿肌和胸肌表达量没有显著差异 ($P > 0.05$)。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同。

图 1 鸡 SOX6 基因在不同组织中的表达

2.2 鸡 SOX6 基因在不同胚龄和出壳早期腿肌中的时序表达

分别采集不同胚龄 E11、E13、E15、E17、E19 和出壳早期 D0、D3、D6 的雏鸡腿肌组织并测定其 SOX6 基因的表达变化情况。随着胚胎的发育,SOX6 基因表达量逐渐上升,而在出壳前后 E19、D0、D3 期比较平稳,从 D3 到 D6 期间,出现了显著升高 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 鸡 SOX6 基因的克隆及测序

用引物 gga-SOX6-F1/R1 从鸡肌肉组织 cDNA PCR 扩增 SOX6 基因编码区。经过 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,扩增产物大小与预期的结果相符,在 2 400 bp 左右能看到一条明亮特异性目的条带 (图 3)。将扩增的目的条带切胶回收后,连接到 pMD-19T 载体

上,经测序,SOX6 基因 CDS 长度为 2 367 bp,鉴定正确。

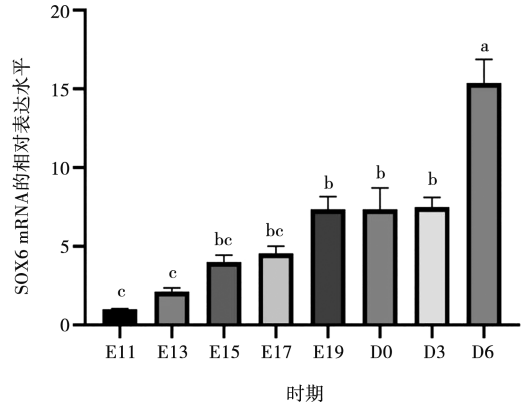
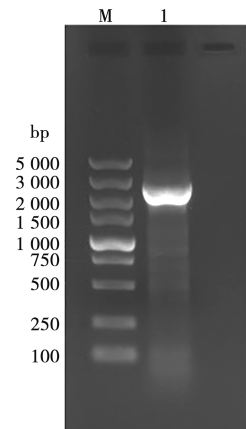


图 2 鸡 SOX6 基因在不同胚龄腿肌中的表达



M. DL5000 Plus DNA Marker; 1. 扩增产物。

图 3 鸡 SOX6 基因扩增结果

2.4 SOX6 蛋白结构与特性分析

2.4.1 理化性质分析

生物信息学分析广西黄鸡 SOX6 蛋白由 789 个氨基酸组成,分子式为 $C_{3763}H_{6049}N_{1101}O_{1223}S_{39}$, 分子质量为 87.533 ku, 理论等电点 (pI) 为 6.99, 推测该蛋白为中性蛋白。组成鸡 SOX6 蛋白的 20 种氨基酸中,丝氨酸 (Ser) 所占比例最高 (9.5%), 而色氨酸 (Trp) 含量最低 (0.6%), 其中带负电荷的氨基酸 [天冬氨酸 (Asp) 和谷氨酸 (Glu)] 94 个,带正电荷的氨基酸 [精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys)] 93 个。在哺乳动物网织红细胞内的半衰期为 30 h, 脂肪系数为 62.51。SOX6 蛋白的不稳定系数为 60.95, 高于阈值 40, 表明该蛋白不稳定。

2.4.2 亲/疏水性预测

经分析预测,广西黄鸡 SOX6 蛋白在第 269 位氨基酸处分值最高 (1.622), 在第 474 位氨基酸处分值最低 (-3.611) (图 4), 总平均亲水性 GRAVY 为

-0.834 1, 即 SOX6 为亲水性蛋白。

2.4.3 结构域预测及亚细胞定位

SMART 预测结果显示, SOX6 蛋白具有 1 个保守结构域 HMG, 位于第 581~651 位氨基酸处 (图 5)。PSORT II 预测显示, SOX6 蛋白主要定位于细胞核, 存在多个核定位信号和螺旋-卷曲结构, 进一步支持其在细胞核中调控基因表达。SOX6 蛋白没有信号肽和跨膜区, 不会通过分泌途径分泌到细胞外或嵌入细胞膜内。

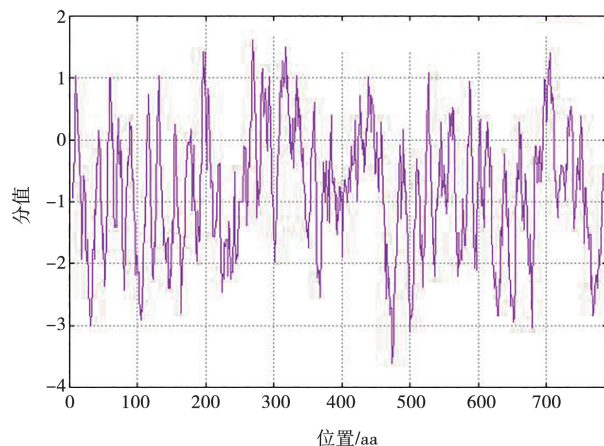


图 4 鸡 SOX6 蛋白亲/疏水性分析

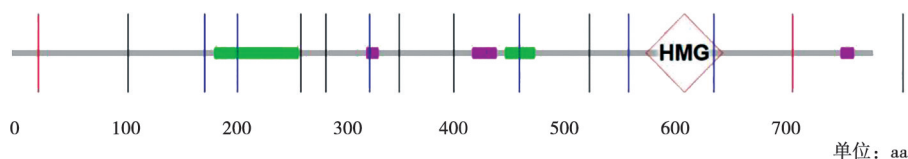


图 5 鸡 SOX6 蛋白结构域预测

2.4.4 二级结构及三级结构预测

使用 SOPMA 软件预测 SOX6 蛋白二级结构, 如图 6 显示, SOX6 蛋白二级结构包括 α -螺旋

(40.56%)、延伸链 (6.97%)、 β -转角 (4.94%) 及无规则卷曲 (47.53%)。利用 ExPASy SWISS-MODEL 在线平台构建可能的三级结构模型, 见图 7。

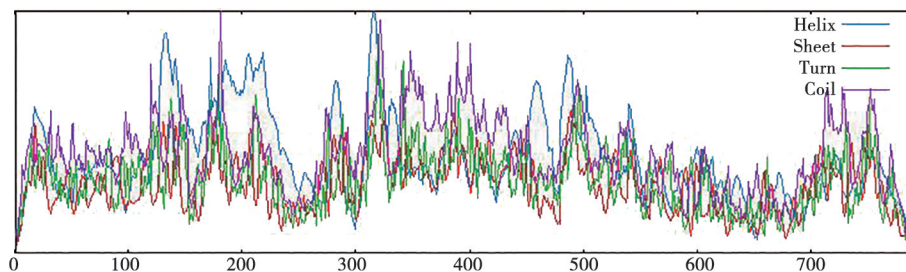


图 6 鸡 SOX6 蛋白二级结构预测



图 7 鸡 SOX6 蛋白三级结构预测

2.5 鸡 SOX6 真核表达载体鉴定

以 gga-SOX6/pMD-19T 质粒为模板, 使用 gga-SOX6cds-F3/R2 引物扩增 SOX6 基因的 CDS 区并回收该目的片段。将回收的目的片段经过 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切后与经同样双酶切的 pCMV-3Tag-9 连接后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 经培养后进行菌液 PCR 鉴定, 结果见图 8。选取其中一管菌液小量提取质粒后测序鉴定正确, 将该质粒命名为 gga-SOX6/pCMV-3Tag-9。

2.6 鸡 SOX6 基因在鸡原代成肌细胞中的过表达以及 Western blot 鉴定

将过表达载体 gga-SOX6/pCMV-3Tag-9 和空载体 pCMV-3Tag-9 分别转染鸡原代成肌细胞 (图 9A)。48 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blot 检测,

结果显示 (见图 9B), 在 SOX6 过表达区域, 使用 MYC 抗体在转染空白载体的细胞中没有检测到目的蛋白条带, 而在转染 *gga-SOX6/pCMV-3Tag-9* 的试验组样品中检测到了目的蛋白条带, 表明鸡 SOX6 与 MYC 在鸡原代成肌细胞中成功融合表达。

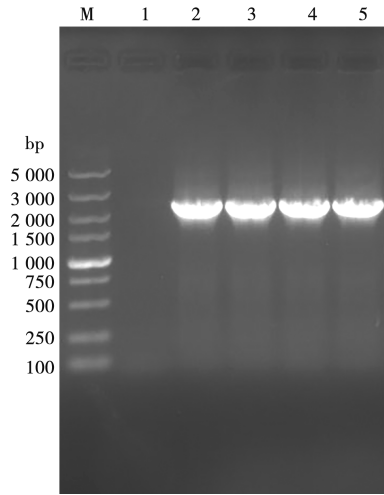


图 8 鸡 SOX6 基因表达载体菌液 PCR 验证
M. DL5000 Plus DNA Marker; 1. 阴性对照; 2~5. 菌液 PCR 扩增产物。

图 8 鸡 SOX6 基因表达载体菌液 PCR 验证

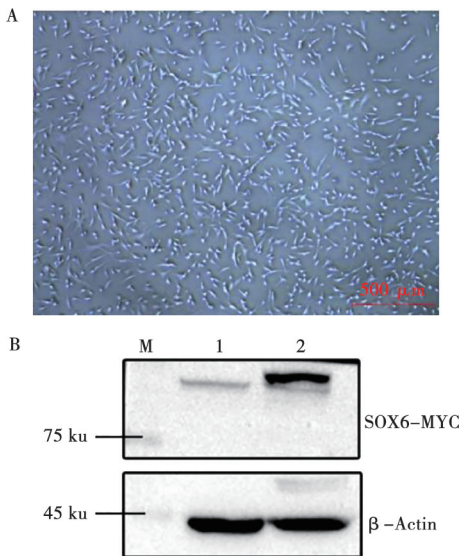


图 9 鸡原代成肌细胞过表达 SOX6-MYC 融合蛋白的 Western blot 检测
M. 分子量标准; 1. 转染 pCMV-3Tag-9; 2. 转染 *gga-SOX6/pCMV-3Tag-9*。

图 9 鸡原代成肌细胞过表达 SOX6-MYC 融合蛋白的 Western blot 检测

2.7 鸡 SOX6 siRNA 敲低效率验证

通过选择 SOX6 基因的 mRNA 特定区域作为 siRNA 的靶点, 设计 3 段 20~25 个核苷酸的 siRNA, 分别命名为 siSOX6-12、siSOX6-1532、siSOX6-1762, 并将其和 siRNA-NC (siNC) 分别转染至鸡原代成肌细胞, 提取总 RNA, 进行荧光定量 PCR 检测。由图 10 可知, 处理后细胞中 SOX6 mRNA 的表达量与对照组相比极显著降低了大约 90% ($P < 0.01$), 这表明该 3 种 siRNA 对于 SOX6 mRNA 的敲低效率均很高。选取其中的 siSOX6-1762 进行后续试验。

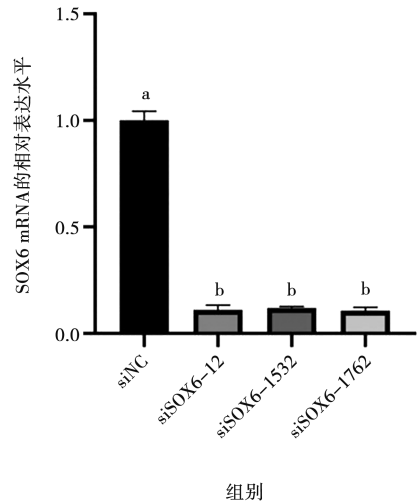


图 10 siRNA 对鸡 SOX6 基因 mRNA 表达的影响

2.8 鸡 SOX6 基因过表达和干扰后对部分成肌分化相关基因的影响

将过表达载体 *gga-SOX6/pCMV-3Tag-9* (试验组) 和空载体 pCMV-3Tag-9 (对照组) 分别转染鸡原代成肌细胞并诱导分化 3 d 后, 两组细胞形态上未见明显差异, 但检测发现与对照组相比, 过表达 SOX6 组细胞中 MyoD ($P < 0.01$) 和 MyoG ($P < 0.05$) 基因的表达水平极显著或显著升高 (图 11)。将 siSOX6-1762 (siSOX6) 和 siRNA-NC (siNC) 分别转染鸡成肌细胞并诱导分化 3 d 后, 两组细胞形态上也未见明显差异, 检测发现与对照组相比, 敲降 SOX6 组细胞中 MyoD ($P < 0.01$) 和 MyoG ($P < 0.05$) 基因的表达水平极显著或显著下降 (图 12)。

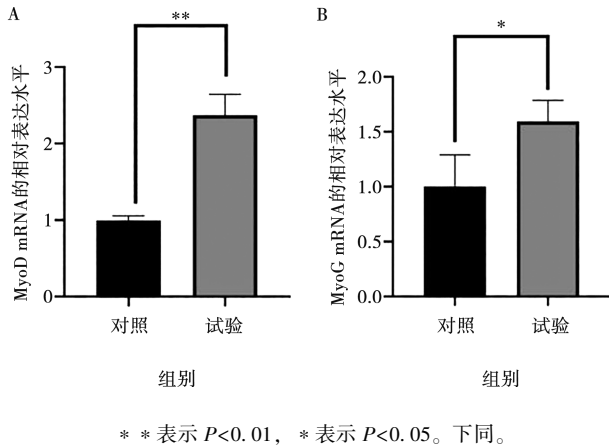


图 11 过表达鸡 SOX6 基因对 MyoD 及 MyoG 基因的表达影响

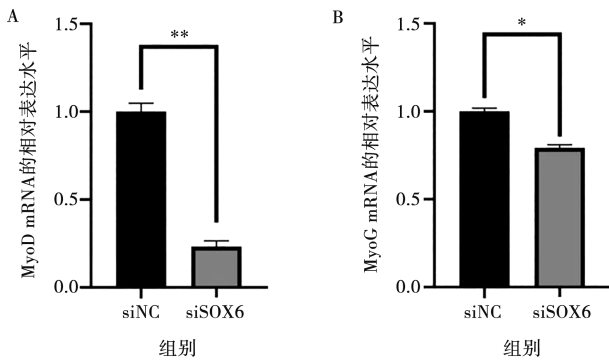


图 12 干扰鸡 SOX6 基因对 MyoD 及 MyoG 基因的表达影响

3 讨论

鸡肉的口感主要受肌纤维类型的影响，而肌纤维调控机制较为复杂。通过遗传和生物技术手段调控肌纤维的表达，可以显著改善鸡肉的风味和质地^[8]。研究表明，SOX6 通过调节特定的下游基因，如肌球蛋白重链 (MyHC) 的不同形式，从而影响肌纤维的类型转换，促进肌肉细胞从增殖状态向成熟状态的转化，SOX6 敲低导致慢速肌球蛋白基因上调，快速肌球蛋白基因下调^[8]。Zhang 等^[9]观察到 SOX6 在引导卫星细胞分化等方面发挥着至关重要的作用。SOX6 从不同方面发挥作用，可以从直接的基因调控到其他调节其功能的蛋白质进行相互作用，构建肌纤维类型确定中多种因素的相互作用。

本研究中，SOX6 在鸡胸肌和腿肌中的表达量较高。SOX6 基因在不同发育阶段呈现显著的变化，在鸡胚发育过程中，SOX6 基因表达具有时序性。从胚胎第 11 天 (E11) 到第 19 天 (E19)，SOX6 的表达量逐渐增加。在这段时间内，鸡的肌肉细胞 (肌纤维)

正在经历快速的分化和增殖，这是肌肉生长发育的关键阶段。在 E19、D0、D3 出壳前后进入相对稳定期，在出壳后 D6 时，SOX6 表达达到高峰。Liu 等^[10]研究结果表明，肌纤维增生发生在胚胎发生过程中，肥大主要发生在出壳后。张梓豪等^[11]研究发现，肌纤维在 E15、E17、D7 出现了较明显的增长，免疫荧光和 HE 染色观察发现 SOX6 能够促进成肌细胞的分化和肌管的形成。本试验结果表明，SOX6 基因在鸡胚生长发育过程中，表达量持续上升，表明肌纤维分化可能是持续性的，而在出壳后 3 d 肌肉的生长发育加快。

进一步通过构建真核过表达载体 gga-SOX6/pCMV-3Tag-9，转染鸡原代成肌细胞，成功表达了融合蛋白，同时设计鸡 SOX6 的干扰 siRNA，成功敲降成肌细胞中的 SOX6 表达。观察发现，过表达和敲降 SOX6 后，对成肌细胞诱导分化在两组细胞形态上分别与对照组未见明显差异，但是过表达 SOX6 促进了成肌细胞分化标志基因 MyoG、MyoD 表达，而敲降 SOX6 后抑制了 MyoG、MyoD 基因的表达。结果分别从正反两个方面表明 SOX6 基因与 MyoG、MyoD 的正调控相互作用模式，证明 SOX6 在鸡原代成肌细胞的分化过程中具有促进作用。生肌细胞调节因子家族 (MRFs) 是动物肌肉发育和分化过程中的重要调控因子，包括 MyoG、MyoD 成员，在肌肉发生过程中发挥着标志作用，是成肌分化的标准物^[12-13]。MyoD 基因过表达会抑制成肌细胞增殖，并促进成肌分化^[14-15]。MyoD 的表达通常标志着肌肉前体细胞从增殖转向分化的过程^[1, 16]。MyoG 基因调控肌细胞的终末分化，并在肌细胞的成熟和融合中发挥重要功能^[17]。MyoG 与 MyoD 共同合作，确保肌细胞从成肌细胞的前体阶段到成熟骨骼肌细胞的顺利转换，形成具有收缩能力的肌肉组织^[18]。相关研究表明，SOX6 可抑制慢纤维特异性基因，包括可能间接影响到 MyoD 和 MyoG 的活性，从而调控肌纤维的类型转换^[5, 19]。SOX6 的调节作用帮助保持快肌纤维的优势表达状态^[20]。MyoD 作为成肌分化的主要调控因子，进一步激活 MyoG 的表达，推动肌肉细胞的分化^[21]。MyoG 的活性促进 MyHC 基因如 MyH2 和 MyH3 的表达，这些基因编码的蛋白是肌肉收缩功能的直接执行者，决定了肌纤维的类型特征^[22-23]。因此，本文揭示的 SOX6 基因可以调控在鸡原代成肌细胞中关键生肌因子基因 MyoD、MyoG 的表达，对原代成肌细胞分化有促进作用，这也与本试验获得的在不同胚龄 SOX6 基因的时序性表达水平结果相一致。

4 结论

本研究发现 SOX6 基因在鸡 12 种不同组织中均

有表达, 其中在胸肌、腿肌较高; 对胚胎期后期和出壳早期雏鸡腿肌 SOX6 基因时序性表达发现, SOX6 的表达量逐渐增加, 到胚胎期 19 d 后进入稳定平台期, 在出壳后 6 d 显著升高; 成功构建真核重组表达载体 gga-SOX6/pCMV-3Tag-9, 在鸡的原代成肌细胞中成功融合表达 SOX6-MYC; 过表达 SOX6 基因, 成肌分化的标记基因 MyoD、MyoG 表达上升, 而敲降后, MyoD、MyoG 表达下降, 证明了 SOX6 基因对分化有促进作用。

参考文献:

- [1] YUAN P, FAN S, ZHAI B, et al. miR-181a-5p can inhibit the proliferation and promote the differentiation of chicken primary myoblasts [J]. *Br Poult Sci*, 2022, 63 (6): 813-820.
- [2] NIHASHI Y, SHINJI S, UMEZAWA K, et al. Myogenetic oligodeoxynucleotide complexed with berberine promotes differentiation of chicken myoblasts [J]. *Anim Sci J*, 2021, 92 (1): e13597.
- [3] 彭涛, 柳序. 家禽肌肉的形成及主要影响因素的研究进展 [J]. *湖南饲料*, 2022 (3): 11-16.
- [4] LEFEBVRE V. Roles and regulation of SOX transcription factors in skeletogenesis [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 133: 171-193.
- [5] HAGIWARA N, YEH M, LIU A. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236 (8): 2062-2076.
- [6] AN C I, DONG Y, HAGIWARA N. Genome-wide mapping of Sox6 binding sites in skeletal muscle reveals both direct and indirect regulation of muscle terminal differentiation by Sox6 [J]. *BMC Dev Biol*, 2011, 11: 59.
- [7] AN C I, GANIO E, HAGIWARA N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells [J]. *Skelet Muscle*, 2013, 3 (1): 11.
- [8] LIU Y F, ZHANG M, SHAN Y J, et al. Transcriptome sequencing analysis of the role of miR-499-5p and SOX6 in chicken skeletal myofiber specification [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 1008649.
- [9] ZHANG Z, LIN S, LUO W, et al. Sox6 differentially regulates inherited myogenic abilities and muscle fiber types of satellite cells derived from fast- and slow-type muscles [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (19): 11327.
- [10] LIU J, LEI Q, LI F, et al. Dynamic transcriptomic analysis of breast muscle development from the embryonic to post-hatching periods in chickens [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1308.
- [11] 张梓豪, 林树带, 黄幸, 等. Sox6 基因调控鸡骨骼肌分化和肌纤维类型的研究 [J]. *中国家禽*, 2019, 41 (9): 8-14.
- [12] ZAMMIT P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 19-32.
- [13] SHIN J, VELLEMAN S G, LATSHAW J D, et al. The ontogeny of delta-like protein 1 messenger ribonucleic acid expression during muscle development and regeneration; comparison of broiler and Leghorn chickens [J]. *Poult Sci*, 2009, 88 (7): 1427-1437.
- [14] CHEN L, WU Y L, DING H, et al. PHGDH promotes the proliferation and differentiation of primary chicken myoblasts [J]. *Br Poult Sci*, 2022, 63 (5): 581-589.
- [15] LI Y, YUAN P, FAN S, et al. miR-30a-3p can inhibit the proliferation and promote the differentiation of chicken primary myoblasts [J]. *Br Poult Sci*, 2022, 63 (4): 475-483.
- [16] CODATO R, PERICHON M, DIVOL A, et al. The SMYD3 methyltransferase promotes myogenesis by activating the myogenin regulatory network [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 17298.
- [17] ZHANG D, RAN J, LI J, et al. miR-21-5p regulates the proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cells by targeting KLF3 in chicken [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12 (6): 814.
- [18] PAN X, LIU B, CHEN S, et al. Nr4a1 as a myogenic factor is up-regulated in satellite cells/myoblast under proliferation and differentiation state [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513 (3): 573-581.
- [19] QUIAT D, VOELKER K A, PEI J, et al. Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (25): 10196-10201.
- [20] JACKSON H E, ONO Y, WANG X, et al. The role of Sox6 in zebrafish muscle fiber type specification [J]. *Skelet Muscle*, 2015, 5 (1): 2.
- [21] TAPSCOTT S J, DAVIS R L, LASSAR A B, et al. MyoD: a regulatory gene of skeletal myogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990, 280: 3-5.
- [22] AGARWAL M, SHARMA A, KUMAR P, et al. Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development [J]. *Development*, 2020, 147 (7): dev184507.
- [23] DENARDI C, AUSONI S, MORETTI P, et al. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123 (4): 823-835.