

牛MyoG 基因启动子的克隆与序列分析*

王 珊¹, 陈 宏^{1,2}, 蔡 欣¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 徐州师范大学 生物技术研究所, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] 根据GenBank 中已公布的人、猪和小鼠的MyoG 基因的5'侧翼和部分第一外显子序列设计PCR 引物, 用touch-down PCR 技术扩增了牛MyoG 基因的启动子序列, 构建了重组克隆载体 pGEM-T-MyoG, 并通过PCR 扩增、限制性酶切对阳性克隆进行了鉴定、测序及生物信息学分析。结果表明, 牛MyoG 基因的启动子序列(Genbank 中注册号为AY882581)长度为672 bp, 其与猪、人和小鼠相应序列的同源性分别为94%, 91%和88%, 且其不同物种之间具有一定的保守性。牛MyoG 基因启动子的克隆与序列分析为进一步研究牛MyoG 基因的表达调控奠定了基础。

[关键词] MyoG 基因; 启动子序列; 序列分析; 牛

[中图分类号] Q 343

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0012-05

肌细胞生成素(myogenin, MyoG)基因是成肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)家族的成员之一^[1]。MRFs 家族由MyoD 1, MRF4, MyoG 和MYF5 组成^[2], MyoD 1 和MyoG 是一类肌调节蛋白, 其中MyoD 1 确定肌源性的发生, MyoG 诱导骨骼肌的最终分化^[3]。MyoG 作为一个转录调节因子, 其表达启动了一系列骨骼肌特异的胚胎性受体和收缩蛋白(如胚胎型烟碱样乙酰胆碱受体、胚胎型troponin 亚基、胚胎型肌球蛋白重链等)的合成, 因此MyoG 是惟一的无可替代的成肌调节因子^[4]。Weintraub 等^[5]的研究表明, 单独敲除MyoG 基因的小鼠会由于严重的骨骼肌发育缺陷而死亡, 而单独敲除其他3 个基因的小鼠, 其骨骼肌均发育成功^[5]。作为一种肌细胞特异性转录因子, MyoG 具有以下功能: (1)调节自身基因的表达; (2)与生肌因子其他成员相互作用, 如MyoG 基因可调节MRF4 基因的表达; (3)调节肌肉特异基因如肌肉肌酸激酶、肌钙蛋白、肌球蛋白轻链基因的表达。可见, MyoG 基因的遗传变异与肌肉的生成相关, 并最终导致产肉量与肉质的变异。1989 年, Wright 等^[1]首先报道了该基因, 随后又有大量有关该基因突变与人类疾病关系的研究^[6]。目前, 国内外对该基因的表达调控与小鼠^[7]、鸡^[8]和猪^[9]的肌细胞生成机理等方面的相关研究较

多, 但对牛MyoG 基因的研究相对较少。为此, 本研究对牛MyoG 基因的启动子进行了克隆, 并对其进行了生物信息学分析, 以期对牛MyoG 基因的结构、表达调控及其突变与牛产肉性状等方面的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 血 样 从福建漳州种畜场随机选取10 头健康的成年闽南公牛, 颈静脉采血, 血液用ACD 抗凝后, 带回实验室低温保存。

1.1.2 试 剂 LA Taq DNA 聚合酶与限制性内切酶Sal I 均购自TaKaRa 公司; DNA 凝胶纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司; E. coli DH5 α , pGEM-T-easy 载体, T4DNA 连接酶和X-gal 购自Promega 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引 物 用ClustalW 软件将GenBank 中公布的人(Genbank 中注册号为AC105940)、猪(Genbank 中注册号为AY921006)和小鼠(Genbank 中注册号为M95800)MyoG 基因的5'侧翼和部分第一外显子序列进行比对, 主要参考猪的相应序列, 选取高保守区设计1 对引物。MYOGF: 5'-TTG AAA GGA GCA GAT GAG AG-3'; MYOGR: 5'-CA T

* [收稿日期] 2005-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471238); 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2003AA 243051); 河南省杰出人才创新基金项目(0521001900); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划基金项目(01140101)

[作者简介] 王 珊(1980-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 在读硕士, 主要从事动物遗传学研究。

[通讯作者] 陈 宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: chen hong1212@263.net

TCA CCT TCT TGA GTC TGC G-3' 引物由上海生物工程有限公司合成,预期扩增长度为700 bp。

1.2 牛基因组DNA 的提取

按照Chen 等^[10]的方法从牛血样中提取牛基因组DNA。

1.3 牛MyoG 基因启动子序列的 touch down PCR 扩增

PCR 反应总体积 25 μ L, 其中包括 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 100 ng 基因组DNA, 10 pmol/L 上、下游引物各 1 μ L, 加ddH₂O 补足体系。反应条件采用touch down PCR 策略^[11]: 94 预变性4 min; 96 变性20 s, 58 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 56 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 54 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 52 复性1 min, 72 延伸90 s, 3 个循环; 96 变性20 s, 50 复性1 min, 72 延伸90 s, 28 个循环; 最后72 延伸7 min。扩增产物用10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 重组克隆载体pGEM-TMyoG 的构建

将用凝胶纯化试剂盒回收的 PCR 产物与 pGEM-T-easy 载体连接, 连接体系 10 μ L: 2×Buffer 5.0 μ L, vector 1.0 μ L, PCR product 3.0 μ L, T₄DNA ligase (3 U/ μ L) 1.0 μ L。反应条件: 4

连接过夜。取连接产物5.0 μ L 转化DH5 α 菌株, 转化产物在含氨苄青霉素和 X-gal IPTG (X-gal/IPTG= 40 μ L/4 μ L) 的LB 培养基中培养。12 h 后, 挑取白斑于LB 培养液中进行单菌落培养, 37 下以260 r/min 摇菌过夜。用碱裂解法提取质粒。

1.5 重组克隆载体pGEM-TMyoG 的鉴定

1.5.1 PCR 鉴定 选取鉴定为阳性的克隆, 将重组的质粒DNA 作模板DNA, 所用引物与扩增序列时一致, 进行PCR 反应。PCR 反应总体积 25 μ L, 其中包括 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10×Buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L, 重组质粒DNA 100 ng, 10 pmol/L 上、下游引物各 1 μ L, 加ddH₂O 补足体系。反应条件: 94 预变性4 min; 96 变性30 s, 55 复性30 s, 72 延伸30 s, 30 个循环; 最后72 延伸5 min。扩增产物用10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.5.2 酶切鉴定 用Sal I 酶进行酶切鉴定。反应体系为10 μ L, 其中包括重组的质粒DNA 0.5 μ g, 10×酶Buffer 1.0 μ L, 加ddH₂O 补足体系。在37 恒

温箱内反应2 h 至酶切完全后, 对酶切产物进行10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 牛MyoG 基因启动子序列的测序与生物信息学分析

取阳性重组克隆送上海博亚生物技术公司测序(测序仪为ABI PRISM 3730)。将牛MyoG 基因启动子序列与人、猪和小鼠的MyoG 基因相应序列在NCBI 数据库中用Blastn 程序进行相似性分析, 并用ClustaW 程序进行多序列比对分析。用Neural Network Promoter Prediction (<http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html>) 和McPromoter prediction (<http://genes.mit.edu/McPromoter.html>) 程序来预测序列的转录起始位点和启动子。

2 结果与分析

2.1 牛MyoG 基因启动子序列的PCR 扩增

由图1 可知, 扩增到长度为672 bp 的片段, 大小与预期扩增的牛MyoG 基因5 侧翼和第1 部分外显子序列长度一致。

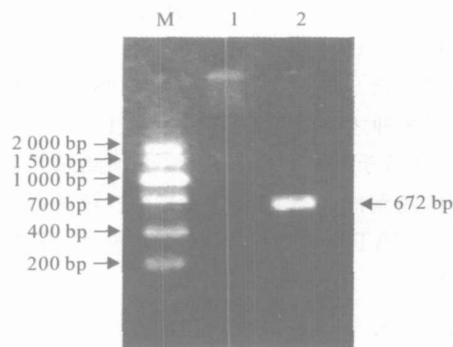


图1 牛MyoG 基因 touch down PCR 扩增产物电泳结果

M. DNA marker(Marker V); 1. 未加模板的空白对照; 2. PCR 扩增产物

Fig 1 Results of *Bovine*MyoG gene PCR amplification by touch down

M. Molecular weight marker(Marker V);

1. The control amplified without template; 2. PCR product

2.2 重组克隆载体pGEM-TMyoG 的鉴定

2.2.1 PCR 鉴定结果 图2 显示, 扩增到的672 bp 的片段与预期片段长度一致, 表明重组质粒中插入的是目的序列片段。

2.2.2 酶切鉴定结果 图3 表明, 酶切后得到了长为672 bp 的片段, 与MyoG 基因启动子的长度符合, 表明重组质粒中插入的是目的序列片段。

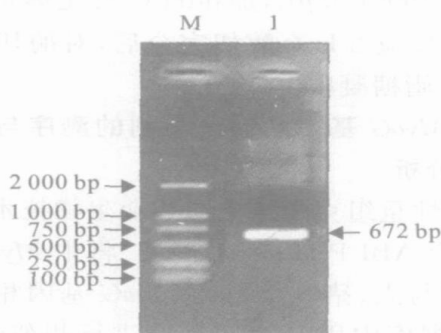


图2 重组质粒pGEM-T $MyoG$ 的PCR扩增鉴定

M. DNA marker; 1. 牛pGEM-T $MyoG$ 重组质粒

Fig 2 PCR amplification of pGEM-T- $MyoG$ recombinant plasm id

M. DNA marker; 1. pGEM-T $MyoG$ recombinant plasm id of *Bos grunniens*

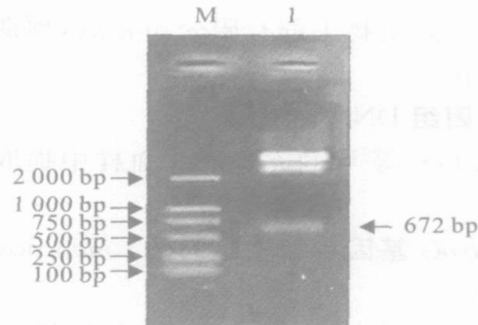


图3 重组质粒pGEM-T $MyoG$ 的 $Sal I$ 酶切鉴定

M. DNA marker; 1. 牛pGEM-T $MyoG$ 重组质粒

Fig 3 Restriction enzyme digestion of pGEM-T- $MyoG$ recombinant plasm id using $Sal I$

M. DNA marker; 1. pGEM-T $MyoG$ recombinant plasm id of *Bos grunniens*

2 3 牛 $MyoG$ 基因启动子的测序与生物信息学分析

2 3 1 测序结果 测序结果表明,牛 $MyoG$ 5侧翼和部分第1外显子序列长度为672 bp (Genbank中注册号为A Y882581)。其中5侧翼序列长378 bp,编码序列长294 bp,共编码98个氨基酸。

2 3 2 相似性分析结果 将此序列在NCBI数据库中进行Blastn分析,结果其与猪、人和小鼠相应序列的相似性分别为94%,91%和88%,表明此序列在不同物种之间具有一定的保守性。

2 3 3 启动子预测结果 启动子预测结果表明,2种程序预测到的转录起始位点一致,转录起始位点G均位于TA TA box下游66 bp和A TG上游49 bp处(图4)。

3 讨 论

肌纤维的生成受到成肌调节因子(MRFs)家族的调控, $MyoG$ 基因是MRFs的一员,是肌细胞终末分化的关键因子,在肌细胞的生成过程中起着中心调控作用,其表达产物可以终止成肌细胞的增殖。在单核成肌细胞融合为多核肌细胞这一过程中, $MyoG$ 是骨骼肌分化的必需因子。在脊椎动物肌细胞的分化和骨骼肌系统的发育过程中, $MyoG$ 基因具有重要意义,因此 $MyoG$ 基因的遗传变异被认为与肌肉的生成有关,并最终导致动物产肉量与肉质的变异。中国地方黄牛品种具有许多优良特性,但生长速度和牛肉品质与国外品种相比有较大差距。牛的产肉能力决定于肌纤维的数量和大小,而肌纤维的数量取决于胚胎发育的前70 d, $MyoG$ 基因在肌纤维发生过程中起着重要的调节作用,所以该基因在促进牛

生长方面的作用是不可替代的,极有可能成为牛生长性状的主效基因或遗传标记。本研究对牛 $MyoG$ 基因启动子进行了克隆和序列分析,为 $MyoG$ 基因的表达和调控机制奠定了基础,对于阐明牛生长速度的遗传机制具有重要意义。

相对于 $MyoG$ 基因的编码区而言,不同物种在 $MyoG$ 基因的5侧翼序列具有较大差异,所以根据序列同源比对结果所设计的PCR引物肯定存在特异性差、退火温度难以预测、二聚体多以及GC和AT含量无法调节等问题。本研究采用的touch-down PCR策略^[12],有效利用了PCR的指数扩增,以及PCR扩增反应可能在预期退火温度以上发生等特性,因此扩增过程中当退火温度以2℃的梯度从58℃递降到50℃时,特异退火的温度适合于引物与靶序列的结合,从而克服了引物特异性差等一系列问题。

本研究根据已公布的人、猪和小鼠 $MyoG$ 基因5'侧翼和部分第1外显子序列设计同源引物,采取touch-down PCR策略首次克隆和分析了牛 $MyoG$ 基因5侧翼序列部分第1外显子序列。通过Neural Network Promoter Prediction和McPromoter prediction程序从5侧翼序列中成功预测到了转录起始位点和启动子序列。将预测到的结果与已知的人和猪的 $MyoG$ 基因5侧翼和部分第1外显子序列进行多序列比对,进一步验证了预测结果的正确性。此结果为牛 $MyoG$ 基因的结构、表达调控及其突变与牛的产肉性状等相关研究,提供了重要的资料和依据。然而,要彻底搞清楚牛在骨骼肌的发生与分化过程中 $MyoG$ 基因的表达和调控机制,还需要利用克隆到的启动子序列构建相关的报告基因载体,在牛的

胚胎干细胞中分不同区段对启动子序列进行活性分析。

牛 Bovine	-----TCCCAGCTTCCATGCCCCACGGGGCTGTCGAGAAATGAAACTAGT	46
猪 Pig	AAGGAGCAGATGAGAGGAGAATGTGTCTCTCCCCACCTCCCCAGCCCCATGGGGCTGCAGAGAAATGAAACTAAT	254
人 Human	--GGAGCAGATGAGAGGGAATGTGT--CCTCCCCAACGCCCC--TGCCCCACAGGGCTGCTGAGAAATGAAACTAAT	855
	*** * ** ***** ***** ***** *	
牛 Bovine	CAGATTACACCCTGTGGCCTCCCTCCCAGTGCACGGGAGCCAGCTAGGGGTAGCCGGCTGGGGCGGGGCCGGGGTGGT	125
猪 Pig	CAAATTACACCCTATGGCCTCCTTACCCGTGCACAGGAGCCTGCTGGGGCAGGCTGGCTGTGGGGAGGG--GGGGTG--	324
人 Human	CAAATTACACCCGACGGCTCCCGACCCGTGCACAGGAGCCGCCTGGGCCAGG--GGCAGGCTGGCAGGGTGGGGTGG--	934
	** ***** ***** ** ***** ***** ** *** ** * * ** *****	
牛 Bovine	GTGTGCAGGGGAGAGGAAGGGGAATCACGTCTAATCCACTGTAAACGTCTTGATGTGCAGCAACAGCTTAGAGGGGG	205
猪 Pig	----CAGGGGAGAGGAAGGGGAATCACATCTAATCCACTGTAAACGTCTTGATGTGCAGCAACAGCTTAGAGGGGG	405
人 Human	GGGCCATCGCGGAGAAAGAAGGGGAATCACATCTAATCCACTGTAAACGCCTTGATGTGCAGCAACAGCTTAGAGGGGG-	1011
	* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
牛 Bovine	CTCAGGTTTCTGTGGCGTTGGCTATATTTATCTCTGGTTCCATGCCAGCGGGAGGGTTAAATGGCACCAGCAGTTGG	285
猪 Pig	CTCAGGTTTCTGTGGCGTTGGCTATATTTATCTCTGGTTCCATGCCAGCGGGAGGGTTAAATGGCACCAGCAGTTGG	545
人 Human	CTCAGGTTTCTGTGGCGTTGGCTATATTTATCTCTGGTTCCATGCCAGCGGGAGGGTTAAATGGCACCAGCAGTTGG	1090

	▽	
牛 Bovine	CGTGAGGGGCCGAGGAGCTTGGGGCTGGTGGCAGGAACAAGTCTCTTCTGACCCCATGGAGCTGTATGAGACCTCTCC	365
猪 Pig	CGTGAGGGGCTGCAGGAGCTTGGGGCTGGTGGCAGGAACAAGTCTTTCTGACCCCATGGAGCTGTATGAGACATCCCC	625
人 Human	CGTGAGGGGCTGCTGGAGCTTGGGGCTGGTGGCAGGAACAAGCCCTTTCGACCCCATGGAGCTGTATGAGACATCCCC	1170
	***** ** ***** ***** * *** ***** ***** ** *	
牛 Bovine	CTACTTCTATCAGGAACCTCACTTCTATGACGGGAGAACTACCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTTGAGCCGCCAGGCT	445
猪 Pig	CTACTTCTACCAGGAACCCCACTTCTATGACGGGAGAACTACCTGCCCTCCACCTCCAGGGCTTTGAGCCACCAGGCT	705
人 Human	CTACTTCTACCAGGAACCCCGCTTCTATGATGGGAGAACTACCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCT	1250
	***** ***** * ***** ***** ***** ***** ***** ** *	
牛 Bovine	ACGAGCGGGCTGAGCTCAGCCTGAGCCCTGAGGCTCGAGTGCCCTTGAAGACAAGGGTCTGGGGCTGCGGAGCACTGC	525
猪 Pig	ACGAGCGGACTGAGCTGAGTCTGAGCCCTGAGGCCGAGTGCCCTGGAAGATAAGGGCTGGGACCCCGAGCACTGC	785
人 Human	ACGAGCGGACGGAGCTACCCCTGAGCCCGAGGCCCGAGGCCCTTGAGGACAAGGGCTGGGACCCCGAGCACTGT	1330
	***** * ***** * ***** ***** * ** ***** ** * ***** ***** * * *****	
牛 Bovine	CCGGGCCAGTGCTGCCGTGGCGTGTAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCGGTGTCTGTGGACCGCGCGCGCCGACGCT	605
猪 Pig	CCAGGCCAGTGCTGCCGTGGGCATGTAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCGGTGTCTGTGGACCGTCGGCGGGCGCCGACGCT	865
人 Human	CCAGGCCAGTGCTGCCGTGGCGTGTAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCGGTGTCTGTGGACCGCGCGGGCGGCCACACT	1410
	** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** *****	
牛 Bovine	GAGAGAGAAGCGCAGACTCAAGAGGTGAATGAATGAAGCCTTCGAGGCCCTCAAGAGGAGCACCCTG	672
猪 Pig	GAGGAGAAGCGCAGGCTCAAGAAG---GTGAATGAGGCCTTTGAGGCCCTGAAGAGGAGCACCCTG	932
人 Human	GAGGAGAAGCGCAGGCTCAAGAAG---GTGAATGAGGCCTTCGAGGCCCTGAAGAGAAGCACCCTG	1477
	*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	

图4 牛 *MyoG* 基因序列与猪和人相应序列的 ClustalW 比对结果

*. 示相同的碱基; ▽. 示转录起始位点; ==. 示TATA框; —. 示起始密码子

Fig 4 A lignment of nucleotide sequence for *MyoG* gene of bovine with those of pig and human by ClustalW

*. The identical bases; ▽. The transcription initiation site; ==. TATA box; —. The translation initiation codon

[参考文献]

- [1] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD [J]. Cell, 1989, 56: 203-209
- [2] Rudnicki M A, Jaenisch R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis [J]. Bioessays, 1995, 17: 203-209
- [3] Brooks J S J, Lippincott W W. Disorders of soft tissue [J]. Diagnostic Surgical Pathology, 1999, 59: 131-222
- [4] Hasty P, Bradley A, Morris J H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene [J]. Nature, 1993, 364: 501-506
- [5] Weintraub H, Davis R, Tapscott S. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage [J]. Science, 1991, 251: 761-766
- [6] Tseng B S, Cavin S T, Hoffman E P, et al. Human bHLH transcription factor gene myogenin (MYOG): genomic sequence and negative mutation analysis in patients with severe congenital myopathies [J]. Genomics, 1999, 57 (3): 419-423
- [7] Edmondson D G, Olson E N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD 1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program [J]. Genes Dev, 1989, 3 (5): 628-640
- [8] Malik S, Huang C F, Schmidt J. The role of the CANN TG promoter element (E box) and the myocyte-enhancer-binding-factor-2 (MEF-2) site in the transcriptional regulation of the chick myogenin gene [J]. Eur J Biochem, 1995, 230(1): 88-96
- [9] Soumillion A, Erkens J H, Lenstra J A, et al. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus [J]. Mamm Genome, 1997, 8(8): 564-568
- [10] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Biochem Genet, 1995, 33: 297-306
- [11] CAI Xin, WU Jian-ping, XU Ming-xu, et al. Isolation of EST for CAPN1 of *Bos grunniens* with nested and touch-down PCR [J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For: Nat Sci Ed, 2005, 33(2): 14-18
- [12] Don R H, Cox P T, Wainwright B J. 'Touch-down' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification [J]. Nucleic Acid Research, 1991, 19(14): 4008

Cloning and analysis of the promoter sequence of bovine *MyoG* geneWANG Shan¹, CHEN Hong^{1,2}, CAI Xin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: *MyoG* gene was investigated to play a core role in regulating myogenesis. According to 5' flank regions and partial sequences of the first exon of *MyoG* of *Homo sapiens*, *Sos Scrofa* and *Mus musculus* published in GenBank, the homogeneous primers were designed to amplify the promoter region of *MyoG* of *Bos taurus* by performing touch-down PCR. The PCR product was ligated to pGEM-T-easy vector, and then *E. coli* DH5 α strain was transformed. Positive clones were identified by restriction endonuclease, PCR and sequencing. The promoter sequence of *MyoG* of *Bos taurus* was identified (GenBank Accession No. AY882581), which showed 94%, 91% and 88% homology with that of *Sos Scrofa*, *Homo sapiens* and *Mus musculus* respectively. It is indicated that the promoter sequence of *MyoG* was comparatively conservative among different species. Cloning and analyzing of the promoter region of *MyoG* made substantial basis for further research on the mechanism of regulation and expression of *MyoG* in *Bos taurus*.

Key words: *MyoG* gene; promoter sequence; sequence analysis; *Bos taurus*