

牛 *MyoG* 基因启动子的克隆及功能的初步分析

王秋华¹, 曹允考¹, 李树峰¹, 佟慧丽¹, 兴孝友¹, 李光鹏², 严云勤^{1*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 2. 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要: 本研究旨在比较日本和牛 *MyoG* 基因的不同长度片段启动子的活性强弱并初步探讨其中的机制。根据 GenBank 已公布的牛 *MyoG* 基因的启动子序列, 设计特异性 PCR 引物扩增日本和牛 *MyoG* 基因的一系列启动子缺失序列, 构建重组克隆载体 pMD18-T-MyoGpro, 对阳性克隆进行限制性酶切鉴定、测序及生物信息学分析, 进而构建一系列启动子缺失片段的 pGL3-MyoGpro 双荧光素酶表达载体, 转染牛肌源干细胞(MDSCs)和牛胎儿成纤维细胞, 并进行双报告基因活性检测。结果表明, 日本和牛 *MyoG* 基因的 166~2 125 bp 启动子都能不同程度的启动双荧光素酶报告基因在牛肌源干细胞中的表达, 且具有肌肉特异性。通过生物信息学分析得知日本和牛 *MyoG* 启动子序列中有 1 个 TATA 盒, 15 个 E-box, 并可能含有 MyoD、MEF2、MEF3、MTBF、TEF1、PRDF、Sp1、多个 SRF、ERE、GRE 及多个 Oct-1 等转录因子调控结合位点, 本试验通过比较不同长度启动子片段的活性并结合对上述转录因子的分析, 认为这些转录因子可能对启动子活性起着重要的调控作用。对牛 *MyoG* 基因启动子的克隆与功能和序列分析为进一步研究 *MyoG* 基因的表达调控奠定了基础。

关键词: *MyoG* 基因; 启动子序列; 转染; 双报告检测; 肌肉特异性; 生物信息学分析

中图分类号: S823; Q523.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0037-07

Cloning and Preliminary Functional Analysis of Bovine *MyoG* Promoter

WANG Qiu-hua¹, CAO Yun-kao¹, LI Shu-feng¹, TONG Hui-li¹, XING Xiao-you¹,
LI Guang-peng², YAN Yun-qin^{1*}

(1. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: This experiment was conducted to compare the activity of different fragments size of Wagyu *MyoG* promoter and investigate the potential mechanism. According to the sequence of Bovine myogenin published in GenBank, the primers were designed to amplify the promoter region of Wagyu *MyoG* by performing PCR. The PCR products were ligated to pMD18-T-MyoGpro cloning vector. Positive clones were identified by restriction endonuclease and sequencing. Then the Wagyu *MyoG* promoter dual-luciferase reporter gene vector(pGL3-MyoGpro) was constructed, and then was transfected into muscle derived stem cells(MDSCs) and fetal fibroblast cells of *Bos taurus*, and the activity of dual-luciferase reporter gene was detected. The activity and the specificity of these promoters during 166-2 125 bp were identified in MDSCs. Bioinformatics analysis showed that the promoter fragment contained one TATA-box, fifteen E-box and may contained binding sites of transcription factors MyoD, MEF2, MEF3, MTBF, TEF1, PRDF, Sp1, SRF, ERE, GRE and Oct-1. By comparing the activity of different promoter fragments and analyzing on these transcription factors, it initially indicate that these transcription factors may play an important role in regulation of promoter activity. Cloning and analyzing of the promoter region and function of *MyoG* lay a foundation for further research on the mechanism of regulation and expression of *MyoG* in *Bos taurus*.

收稿日期: 2011-02-18

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项基金(2008ZX08007-002)

作者简介: 王秋华(1985-), 女, 山东嘉祥人, 硕士, 主要从事分子克隆与启动子活性研究, E-mail: huawankiu@163.com

* 通讯作者: 严云勤, 教授, E-mail: yanyunqin@sohu.com

Key words: *MyoG* gene; promoter sequence; transfection; dual-luciferase reporter detection; muscle specificity; bioinformatics analysis

肌细胞生成素(Myogenin, MyoG)基因是生肌调节因子(Myogenic regulatory factors, MRFs)家族的成员之一。该家族由生肌决定因子(Myogenic determining factor, MyoD), 生肌调节因子 4(MRF4), 肌细胞生成素和生肌因子 5(Myogenic factor 5, MYF5)组成^[1]。MyoD 和 MyoG 是一类肌调节蛋白, 其中 MyoD 确定肌源性的发生, MyoG 诱导骨骼肌的末端分化^[2]。Weintraub 等^[3]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 个基因的小鼠骨骼肌发育均正常。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。MyoG 作为转录调节因子, 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 是唯一的无可替代的生肌调节因子^[4]。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^[5-6]。目前国内外主要集中在肌肉形成机理等方面的研究, 但对 *MyoG* 基因的表达和调控, *MyoG* 启动子的功能和调控等的研究较少, 对牛 *MyoG* 基因启动子的功能和调控方面的研究还未见报道。

为深入了解 *MyoG* 基因启动子的结构和功能, 本研究对牛 *MyoG* 基因的启动子进行克隆, 并对其生物信息学分析。根据分析结果, 构建一系列启动子缺失片段的 pGL3-MyoGpro 表达载体, 通过瞬时转染牛肌干细胞和牛的胎儿成纤维细胞, 检测启动子缺失片段的活性及其肌肉特异性, 寻找合适有效的启动子片段, 以期作为转基因家畜的生长提供一个优秀材料。通过对日本和牛 *MyoG* 启动子转录调控的研究, 以期作为牛 *MyoG* 基因的表达调控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 菌种与载体 菌株 DH5 α 、pMD18-T

Cloning Vector 购于大连 TaKaRa 生物技术有限公司; pGL3-Basic 表达载体由东北农业大学动物科技学院惠赠。

1.1.2 工具酶、试剂盒和其他试剂 限制性内切酶、DNA Marker 等购于大连 TaKaRa 生物技术有限公司; Tissue DNA Kit 购自 Omega 公司; Plasmid Mini Kit I、Gel Extraction Kit I 购自于北京 TransGen 生物技术有限公司。

1.1.3 DNA 分析软件 DNA 序列数据库: NCBI/GenBank/nucleotide; PCR 引物设计软件: Primer Premier 5.0; 同源性分析软件: DNAMAN, BLAST; 转录因子预测软件: AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>)^[7], MatInspector (<http://www.genomatix.de/en/index.html>)。

1.2 方法

1.2.1 日本和牛 *MyoG* 基因启动子的克隆与测序

利用 Tissue DNA Kit (Omega) 从日本和牛成纤维细胞中提取基因组总 DNA, 根据 GenBank 已公布的牛 *MyoG* 基因序列及其启动子序列, 利用 Primer 5.0 设计 1 对引物: Sense: 5'-CCCAATATAGGGATCGAACTCAGGTC-3', Antisense: 5'-TCA-GAAGAGACTTGTTCTGCCACC-3'。以日本和牛基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 25 μ L 总体积的反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增片段经 Gel Extraction Kit I 回收后, 以 3:1 的比例与 pMD18-T Cloning Vector 16 $^{\circ}$ C 连接。经 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切鉴定正确后, 命名为 pMD18-T-MyoGpro2125, 送由上海生工测序。

1.2.2 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失序列的克隆与测序

以 2 125 bp 日本和牛 *MyoG* 基因启动子生物信息学的分析为参考, 选取 9 个不同长度和位置的启动子片段, 分别设计相应的引物, 以 pMD18-T-MyoGpro2125 为模板, 进行 PCR 扩增(具体引物序列和反应条件见表 1)。

用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶回收试剂盒进行回收。回收 PCR 产物与 pMD18-T Cloning Vector 连接, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定, 鉴定正确后命名为 pMD18-T-MyoGpro1074,

表 1 用于 PCR 扩增的引物信息

Table 1 Information of primers for PCR

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	延伸时间/s Extension time	片段长度/bp Fragments size
pro1074	S:TATAAGACCAGAGCAACCCAGCCAAG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	60	90	1 074
pro819	S:CTGTAAATTCCAATCTCTGCTCTG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	58	90	819
pro633	S:CTGCCAATCCTTCTTACCCTG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	633
pro577	S:TGCTGTCACCCTCTGGAAAG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	577
pro373	S:ATTGAAAGGAGCAGATGAGG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	373
pro318	S:GGGGCTGTCGAGAAATGAAAAGTAG A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	318
pro254	S:GGAGCCAGCTAGGGGTAG A:AAGAGACTTGTTTCCTGCCAC	55	30	254
pro197	S:AGAGGGAAGGGGAATCAC A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	197
pro166	S:TAAACGTCTTGATGTGCAGC A:TCAGAAGAGACTTGTTTCCTGCCACC	55	30	166

S. 上游引物; A. 下游引物 S. Sense; A. Antisense

pMD18-T-MyoGpro819, pMD18-T-MyoGpro633, pMD18-T-MyoGpro577, pMD18-T-MyoGpro373, pMD18-T-MyoGpro318, pMD18-T-MyoGpro254, pMD18-T-MyoGpro197 和 pMD18-T-MyoGpro166, 送由上海生工测序。

1.2.3 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失序列 pGL3-MyoGpro 表达载体的构建 构建 pGL3-MyoGpro1074、pGL3-MyoGpro819、pGL3-MyoGpro633、pGL3-MyoGpro577、pGL3-MyoGpro373、pGL3-MyoGpro318、pGL3-MyoGpro254、pGL3-MyoGpro197 和 pGL3-MyoGpro166 一系列启动子缺失序列表达载体。质粒 DNA 提取、电泳、酶切、大肠杆菌感受态制备、转化、连接反应等具体操作见文献[8-9]。

1.2.4 瞬时转染 转染质粒用无内毒素质粒提取试剂盒提取。质粒转染试剂为聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)。转染前 24 h 将细胞以 $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ cells · well⁻¹ 的密度铺于 24 孔板内。待细胞完全贴壁生长至 80%~90% 融合时, 按照 PEI 转染操作步骤将各启动子 pGL3-MyoGpro 和内参

质粒 phRL-TK 以 50 : 1(W/W) 的比例分别共转染牛胎儿成纤维细胞和牛的肌源干细胞, pGL3-Basic 空载体和 phRL-TK 以同样的条件作为对照组共转染细胞, 转染 4 h 后, 换成分化培养液(2% HS, DMEM), 72 h 后收集细胞。上述试验独立重复 3 次。

1.2.5 双荧光素酶活性测定 采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega)测定报告基因的表达水平。试验步骤简述如下: 弃去 24 孔板中的细胞培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 100 μ L 细胞裂解液(1 $\times$ PLB), 室温放置 15 min 后, 收集细胞裂解液。取 20 μ L 细胞裂解液至荧光测定管中, 加入 100 μ L 检测试剂(Firefly luciferase, LARII), 混匀后用化学发光仪(FB 12 Luminometer)测定发光值, 记录 10 s 时的值, 最后加入 100 μ L 的 Stop&GLO 试剂, 测定作为内标的 Renilla 荧光素酶发光值, 同时检测 10 s 时的值, 两者比值即为荧光素酶的相对活性 RLA(Relative luciferase activity)。RLA 的数值为 3 次重复试验结果的“平均值 $\pm$ 标准差”。具体操作步骤参见 Promega 检测试剂盒说明

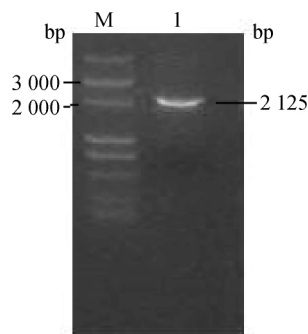
书。

1.2.6 统计分析 各组试验数据计算平均值及标准差。应用 SPSS17.0 软件包对各组试验数据之间的差异显著性进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段的克隆及鉴定

采用 P2125-S、P2125-A 引物,以日本和牛成纤维细胞基因组 DNA 为模板,扩增出一大小约 2 125 bp 的特异条带(图 1)。以 pMD18-T-MyoGpro2125 质粒为模板,用 pro1074、pro819、pro633、pro577、pro373、pro318、pro254、pro197 和 pro166 引物对进行 PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,分别在相应位置出现明亮条带(图 2)。

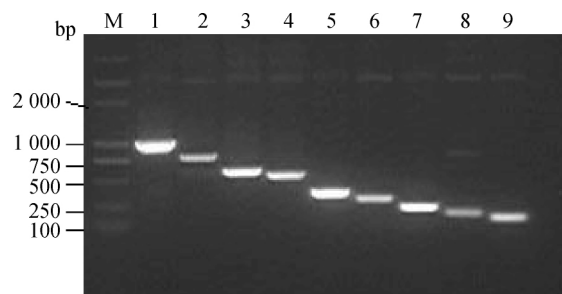


M. D2000 plus DNA Ladder; 1. PCR product using primer of P2125

图 1 2 125 bp 启动子的 PCR 结果

Fig. 1 PCR product of 2 125 bp promoter

2.2 日本和牛 *MyoG* 基因启动子片段的测序与生物信息学分析



M. D2000 plus DNA Ladder; 1-9. PCR products using primers of pro819, pro633, pro577, pro373, pro318, pro254, pro197, pro166 and pro1074

图 2 启动子缺失片段的 PCR 结果

Fig. 2 PCR products of different promoters

2.2.1 测序结果 分析表明启动子 2 125 bp 测序结果与 GenBank 发表序列的同源性为 99%,说明扩增片段来源正确,可用于后续试验。

2.2.2 生物信息学分析 生物信息学分析发现该区域有 1 个 TATA 盒,15 个 E-box 盒,另外还发现 *MyoG* 启动子序列中可能含有多个 *MyoD* (Myogenic determining factor), MEF2 (Myocyte enhancer factor 2), MEF3 (Myocyte enhancer factor 3), MTBF (Muscle-specific Mt binding factor), TEF1 (Transcriptional enhancer factor 1), PRDF (Positive regulatory domain I binding factor), Sp1 (Special protein 1), 多个 SRF (Serum response element binding factor), ERE (Estrogen response elements), GRE (Glucocorticoid response elements) 及多个 Oct-1 (Octamer binding protein 1) 等转录因子调控结合位点。转录因子调控结合位点(只包括部分结合位点)如图 3 所示。

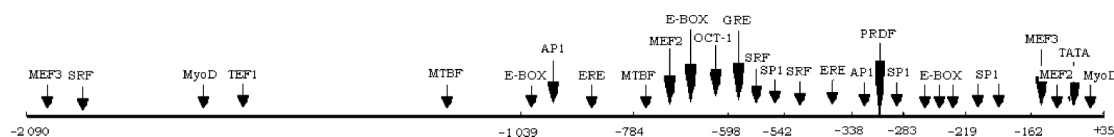


图 3 日本和牛 *MyoG* 基因启动子区域的转录因子结合位点简图

Fig. 3 Sketch of transcription factor binding sites in promoter sequence of Wagyu *MyoG*

2.2.3 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段 pMD18-T-MyoGpro 酶切鉴定 pMD18-T-MyoGpro 载体构建过程如图 4 所示。回收相应片段,以 3:1 的比例与 pMD18-T Cloning vector 4 °C 连

接,用 *Bgl* II 和 *Hind* III 进行双酶切,1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果表明目的片段大小与预期相符。酶切电泳见图 5。

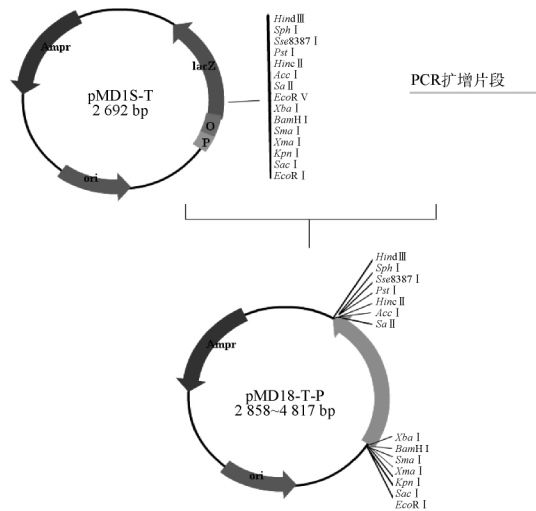
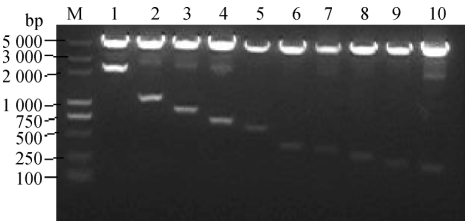


图 4 载体 pMD18-T-MyoGpro 的构建路线

Fig. 4 Schematic diagram of pMD18-T-MyoGpro vector construction

2.2.4 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段
pGL3-MyoGpro 酶切鉴定 构建过程如图 6 所示,用 *Kpn* I (*Bam*H I)和 *Hind* III 双酶切 pMD18-T-MyoGpro,用 *Kpn* I (*Bgl* II)和 *Hind* III 双酶切 pGL3-Basic,回收相应启动子片段和 4 800 bp 的 pGL3-Basic 载体大片段,连接,转化,挑取单菌落,提取质粒进行 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,获得相应启动子片段和 4 800 bp 的 2 条带,证明启动子

与载体 pGL3-Basic 的连接正确,命名为 pGL3-MyoGpro2125、pGL3-MyoGpro1074、pGL3-MyoGpro819、pGL3-MyoGpro633、pGL3-MyoGpro577、pGL3-MyoGpro373、pGL3-MyoGpro318、pGL3-MyoGpro197、pGL3-MyoGpro254、pGL3-MyoGpro166,经 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切鉴定,1.0% 琼脂糖凝胶电泳与预期相符。酶切电泳结果见图 7。



M. DNA 相对分子质量标准; 1~10. pMD18-T-MyoGpro2125、pMD18-T-MyoGpro1074、pMD18-T-MyoGpro819、pMD18-T-MyoGpro633、pMD18-T-MyoGpro577、pMD18-T-MyoGpro373、pMD18-T-MyoGpro318、pMD18-T-MyoGpro254、pMD18-T-MyoGpro197 和 pMD18-T-MyoGpro166 载体的酶切鉴定结果

M. D2000 plus DNA Ladder; 1-10. Restriction enzyme digestion products of the vector pMD18-T-MyoGpro2125, pMD18-T-MyoGpro1074, pMD18-T-MyoGpro819, pMD18-T-MyoGpro633, pMD18-T-MyoGpro577, pMD18-T-MyoGpro373, pMD18-T-MyoGpro318, pMD18-T-MyoGpro254, pMD18-T-MyoGpro197 and pMD18-T-MyoGpro166

图 5 质粒 pMD18-T-MyoGpro 酶切鉴定电泳结果

Fig. 5 Identification of pMD18-MyoGpro plasmid

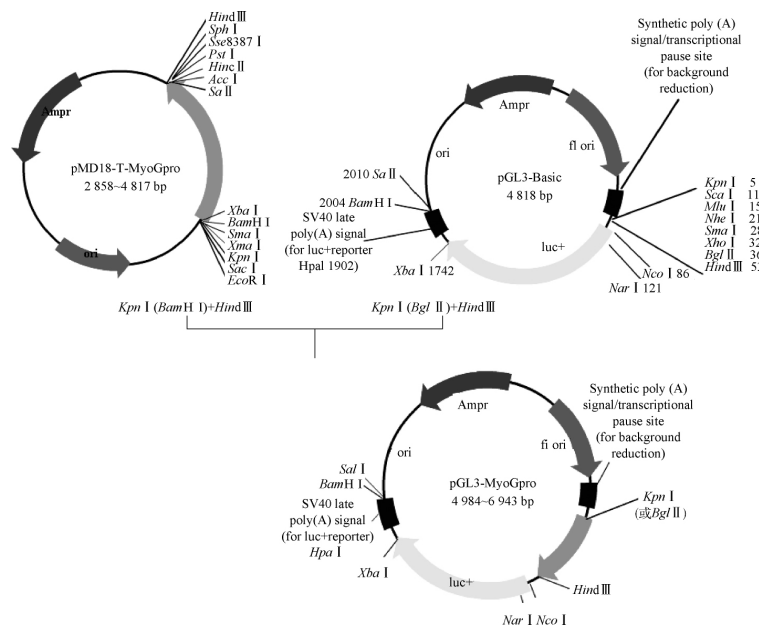
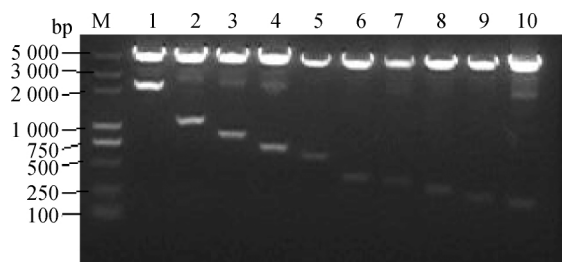


图 6 质粒 pGL3-MyoGpro 的构建路线

Fig. 6 Schematic diagram of pGL3-MyoGpro plasmid construction

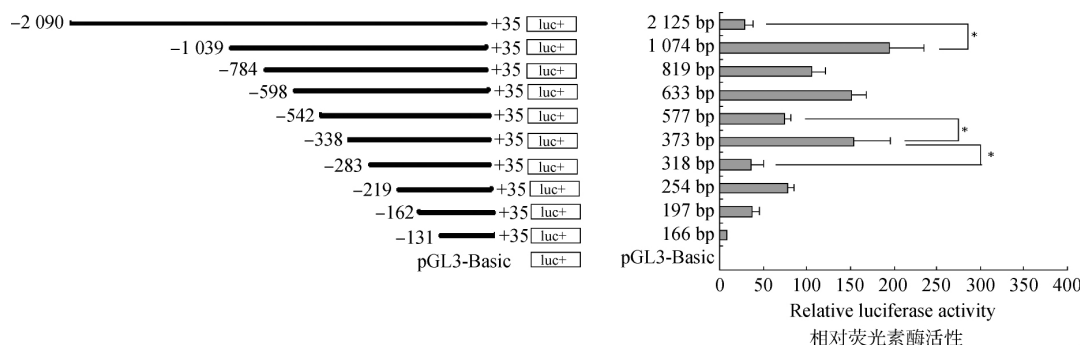


M. DNA 相对分子质量标准; 1~10. pGL3-MyoGpro1074、pGL3-MyoGpro819、pGL3-MyoGpro633、pGL3-MyoGpro577、pGL3-MyoGpro373、pGL3-MyoGpro318、pGL3-MyoGpro197、pGL3-MyoGpro254 和 pGL3-MyoGpro166 载体的酶切鉴定结果

M. D2000 plus DNA Ladder; 1-10. Restriction enzyme digestion products of the vector pGL3-MyoGpro1074, pGL3-MyoGpro819, pGL3-MyoGpro633, pGL3-MyoGpro577, pGL3-MyoGpro373, pGL3-MyoGpro318, pGL3-MyoGpro197, pGL3-MyoGpro254 and pGL3-MyoGpro166

图 7 质粒 pGL3-MyoGpro 酶切鉴定电泳结果

Fig. 7 Identification of pGL3-MyoGpro plasmid



柱的高度和钉型标记代表 3 次独立重复试验 (每次 3 个重复) 的“平均值±标准误差”, 方差分析结果用 * 标记, 代表差异显著 ($P < 0.05$)。下同

Data represent “means±SE” of three independent experiments performed in triplicates. Analysis of variance was performed and significant variations are indicated by the * ($P < 0.05$). The same as below

图 8 *MyoG* 启动子缺失片段在牛肌源干细胞中的活性

Fig. 8 Activity of different promoters of *MyoG* in bovine muscle derived stem cells

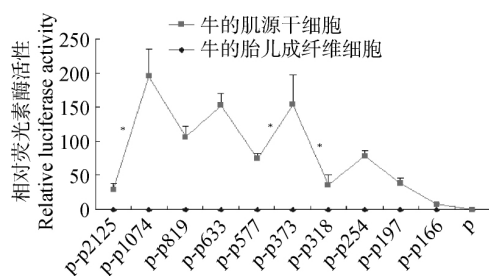


图 9 *MyoG* 启动子缺失片段在牛肌源干细胞和胎儿成纤维细胞中的活性比较

Fig. 9 Comparative activity of different promoters of *MyoG* in bovine fetal fibroblast cells and bovine muscle derived stem cells

2.2.5 日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段活性分析 用上述构建的 10 个质粒和 pGL3-Basic 质粒分别转染牛胎儿成纤维细胞和牛的肌源干细胞, 其中, pGL3-Basic 质粒作为阴性对照, 检测各自的启动子活性并经内对照海肾荧光素酶校正。

日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段在牛的肌源干细胞中具有不同的启动子活性 (图 8), 说明在某些区域存在着重要的调控元件。其中 1 074 和 373 bp 的启动子活性较高, 166 bp 的启动子活性最低; 373 bp 的启动子活性显著高于 577 和 318 bp 的启动子活性 ($P < 0.05$)。

日本和牛 *MyoG* 基因启动子缺失片段在牛胎儿成纤维细胞和牛肌源干细胞中的活性经内对照海肾荧光素酶校正后, 可以看出日本和牛 *MyoG* 基因启动子活性在细胞间的差异较大, 结果见图 9。启动子在牛肌源干细胞中的活性远远高于在牛胎儿

成纤维细胞中的活性, 说明日本和牛 *MyoG* 基因的启动子具有肌肉特异性。

3 讨论

脊椎动物肌肉组织中的肌纤维在胚胎期已经形成, 出生后数目不再改变。肌肉的生长主要依赖肌卫星细胞的增殖分化而导致肌纤维长度增加和周径增粗。牛的肌纤维数量取决于胚胎发育的 70 d^[10], *MyoG* 基因在肌肉发生过程中肌纤维形成时的作用是不可替代的, 极有可能成为牛生长性状的主要基因或遗传标记。本研究对牛 *MyoG* 基因启动子进行克隆并对其功能进行初步分析, 为 *MyoG* 基因的表达和调控机制奠定了基础。

为了研究日本和牛 *MyoG* 基因启动子的功能,本研究根据 GenBank 已发表的牛 *MyoG* 基因序列及其启动子序列,克隆了 10 个不同长度的启动子片段,转染牛肌源干细胞和牛胎儿成纤维细胞。双荧光素酶报告基因检测分析表明,日本和牛 *MyoG* 基因启动子为肌肉特异性启动子。

很多肌肉特异性基因都由 TEF1、SRF 和 MEF2 等转录因子进行调控^[11-13]。生物信息学分析发现,日本和牛 *MyoG* 基因 2 125 bp 启动子中含有这些转录因子的多个调控结合位点,这一发现说明日本和牛 *MyoG* 基因是肌肉特异性基因,进一步说明日本和牛 *MyoG* 基因的启动子具有肌肉特异性。这一结果与转染牛胎儿成纤维细胞和肌源干细胞后进行双荧光素酶报告基因检测得到的结果相符。

另外,还发现该启动子区域含有多个 E-box。E-box 这一位点是由碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族成员识别的^[14-16],很多肌肉特异性基因(如肌球蛋白轻链基因)启动子区都存在多个 E-box 共同调节基因的转录^[17]。我们的肌肉特异性检测结果同样也与其相符,都能够说明日本和牛 *MyoG* 基因的启动子具有肌肉特异性。

在本研究中,日本和牛 *MyoG* 基因的 166 bp 启动子片段即具有启动活性,1 074 bp 的启动子表现出最高的转录调控活性,但在 166~1 074 bp 之间,日本和牛 *MyoG* 基因启动子的活性并未呈现随着长度加长而升高的规律,且最长的启动子片段 2 125 bp 并不具有较高的活性,说明在 2 125 bp 长的日本和牛 *MyoG* 基因启动子序列中既存在对 *MyoG* 基因转录起正调控作用的元件也存在起负调控作用的元件。

其中, pGL3-MyoGpro373 与 pGL3-MyoGpro318 质粒相比,表现出增强启动子活性($P < 0.05$)的作用,这可能与这些区域中存在的多个 Sp1、PRDF、AP1、NF1 转录因子结合位点有关。但具体起增强作用的元件还需要进一步通过定点突变分析进行确定,另外是否有其他因子参与此增强作用也有待进一步的研究。

pGL3-MyoGpro577 与 pGL3-MyoGpro373 质粒相比,表现出减弱启动子活性($P < 0.05$)的作用,这说明在 373~577 bp 区域中有抑制启动子活性的元件,具体是哪些元件,也需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] WRIGHT W, SASSOON A, LIN V. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD[J]. *Cell*, 1989, 56: 203-209.
- [2] BROOKS J, LIPPINCOTT W. Disorders of soft tissue [J]. *Diagnostic Surgical Pathol*, 1999, 59: 131-222.
- [3] WEINTRAUB H, DAVIS R, TAPSCOTT S. The *MyoD* gene family: nodalpoint during specification of the muscle cell lineage[J]. *Science*, 1991, 251: 761-776.
- [4] HASTY P, BRADLEY A, MORRIS J. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene[J]. *Nature*, 1993, 364: 501-506.
- [5] TSENG B, CAVIN S, HOFFMAN E, et al. Human bHLH transcription factor gene *myogenin* (*MyoG*): genomic sequence and negative mutation analysis in patient with severe congenital myopathies [J]. *Genomics*, 1999, 57(3): 419-423.
- [6] KNAPP J, DAVIE J, MYER A, et al. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size[J]. *Development*, 2006, 133(4): 601-610.
- [7] GRABE N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites[J]. *In Silico Biol*, 2002, 2: S1-15.
- [8] 宋庆峰, 暴立娟, 李 杰. 新型毕赤酵母分泌表达载体的构建与功能验证[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(7): 55-59.
- [9] 李 杰, 李 晶, 朱延明, 等. DREB1A 基因植物表达载体的构建[J]. *东北农业大学学报*, 2003, 34(2): 199-204.
- [10] 高勤学, 刘 梅. 猪 *MyoG* 基因的 PCR-RFLP 分型及其生长性能和肌纤维数目的相关性分析[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(5): 330-332.
- [11] CHEN Z, FRIEDRICH G, SORIANO P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice[J]. *Genes*, 1994, 12(8): 2293-2301.
- [12] BLACK B, OLSON E. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) protein [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 167-196.
- [13] TOMOJI M, MAHESH P, GUPTA A, et al. TEF-1 and MEF2 transcription factors interact to regulate muscle-specific promoters[J]. *BBRC*, 2002, 294: 791-797.
- [14] APONE S, HAUSCHKA S. Muscle gene E-box control elements. Evidence for quantitatively different transcriptional activities and the binding of distinct regulatory factors[J]. *Biol Chem*, 1995, 270: 21420-21427.
- [15] CATALA F, WANNER R, BARTON P, et al. A skeletal muscle-specific enhancer regulated by factors binding to E and CArG boxes is present in the promoter of the mouse myosin light chain 1A gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 4585-4596.
- [16] CECCARELLI E, MCGREW M, NGUYEN T, et al. An E box comprises a positional sensor for regional differences in skeletal muscle gene expression and methylation[J]. *Dev Biol*, 1999, 213: 217-229.
- [17] RAO M, DONOGHUE M, MERLIE J, et al. Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16, 3909-3922.

(编辑 郭云雁)