

关岭牛 *MyoD I* 基因启动子真核表达载体的构建及其在小鼠 C2C12 细胞中的表达

桓聪聪^{1,2}, 许厚强^{2*}, 陈伟^{1,2}, 陈祥², 赵佳福², 张雯², 周迪², 夏丹²

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室/贵州大学动物科学学院/贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 本研究旨在探究关岭牛 4 个不同长度的 *MyoD I* 启动子的启动活性, 初步确定该基因核心启动子位置。采用实时荧光定量 PCR 技术对关岭牛不同组织中 *MyoD I* 基因的相对表达量进行检测。以关岭牛血液 DNA 为模板, 设计 5 端加磷的引物, PCR 扩增获得 4 个不同长度的关岭牛 *MyoD I* 启动子, 定向精确替换 pEGFP-N3 载体的 CMV 启动子区, 构建重组真核表达载体 pEGFP-N3-*MyoD I*。利用脂质体法将重组质粒瞬时转染小鼠 C2C12 细胞, 依据小鼠 C2C12 细胞发光的强弱判断 *MyoD I* 启动子的启动活性。结果显示, *MyoD I* 基因在关岭牛肌肉组织中表达量较高; 目的片段成功替换 pEGFP-N3 载体的 CMV 区; 重组质粒能在小鼠 C2C12 细胞中成功表达, 细胞在激发光下发绿色荧光。本研究成功构建了重组真核表达载体 pEGFP-N3-*MyoD I*, 4 个启动子均具有启动活性, 其中 P₃ 启动子在小鼠 C2C12 细胞中表达量最高, 初步推断 P₃ 启动子为该基因的核心启动子。

关键词: *MyoD I*; 真核表达载体; C2C12 细胞; 启动子; 基因表达量

中图分类号: S823; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0719-09

Construction of *MyoD I* Promoter Eukaryotic Expression Vector in Guanling Cattle and Its Expression in Mouse C2C12 Cells

HUAN Cong-cong^{1,2}, XU Hou-qiang^{2*}, CHEN Wei^{1,2}, CHEN Xiang²,
ZHAO Jia-fu², ZHANG Wen², ZHOU Di², XIA Dan²

(1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region of Ministry of Education, College of Animal Science, Guizhou University/Guizhou Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Guiyang 550025, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze promoter activity of 4 different lengths *MyoD I* promoters in Guanling cattle and determine preliminarily the position of the core gene promoter. The relative expression quantity was detected in different tissues of Guanling cattle by real-time quantitative PCR. The DNA extracted from Guanling cattle blood was as a template and the phosphorylated 5'end PCR primers was designed to amplify 4 different lengths *MyoD I* promoters in Guanling cattle, ultimately accurately replaced the CMV region of pEGFP-N3 vector and got eukaryotic expression vector pEGFP-N3-*MyoD I*. Then the recombinant plasmid was transiently transfected into mouse C2C12 cells by liposome method. The aim was to verify promoter activity of *MyoD I* promoter by Luminous intensity of mouse C2C12 cells. The expression level of

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2013ZX08009-004); 黔科合重大专项 (字[2013]6008 号); 贵州省科技厅农业攻关项目 (黔科合 NY 字[2012]3008 号); 贵州大学研究生创新基金 (研农 2014021)

作者简介: 桓聪聪 (1989-), 女, 河南许昌人, 硕士生, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: huancongcong@126.com

* 通信作者: 许厚强, 博士, 教授, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: houqiang0524@yahoo.com

MyoD I gene was the highest in muscle, the fragment was inserted into an expression vector, the recombinant plasmid could be successfully expressed in mouse C2C12 cells with green fluorescence under the excitation light. In this study, eukaryotic expression vector pEGFP-N3-*MyoD I* is successfully constructed, 4 promoters constructed show promoter activity, expression quantity of P_3 promoter is the highest, so P_3 promoter is regarded as the core promoter of *MyoD I* gene.

Key words: *MyoD I*; eukaryotic expression vector; C2C12 cell; promoter; relative expression quantity

启动子是位于基因 5' 端上游转录起始位点附近的一段 DNA 序列, 根据基因表达情况, 可分为组成型启动子和特异性启动子, 前者在各种组织中均能启动基因表达, 后者仅在一定发育时期的特定组织中启动基因表达, 肌肉特异性启动子在肌肉组织内能够高效地表达外源基因, 但在非肌肉组织内的启动效率很低^[1-2]。近年来, 国内外学者对肌肉特异性启动子的转录活性及其对肌肉细胞增殖和分化的作用进行了深入研究^[3], 但是由于肌肉细胞的分化特性和多种肌肉特异性启动子只在终末分化的肌肉细胞内才能启动基因表达, 所以在体外培养的肌源性干细胞内的启动效率很低, 给肌肉机理研究带来困难^[4-5]。

生肌调节因子家族 (Myogenic regulatory factors, MRFs), 也称生肌决定因子家族 (MDFs), 骨骼肌表达的生肌调节因子称为 *MyoD* 基因家族^[6]。*MyoD* 基因家族包括 4 种结构上相关的基因: *MyoD I*、*MyoG*、*Myf5* 和 *MRF4*^[7-8], 它们对生肌发生起重要调节作用, 可使成纤维细胞、成软骨细胞和平滑肌细胞向骨骼肌细胞分化, 影响家畜肌肉的生长。这些基因编码碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 蛋白, 通过调节肌肉分化阶段特异性蛋白的表达来参与肌细胞定向和分化。*Myf5* 和 *MyoD I* 在成肌细胞增殖过程中表达, *Myf5* 基因所起的作用基本能够被 *MyoD I* 基因替代, 二者的功能有许多相似的特征^[9-11]。MRFs 家族成员的表达时间和功能特点对于骨骼肌的发生、分化和成熟起着重要作用。*MyoD I* 和 *Myf5* 基因主要在骨骼肌发育早期的肌前体细胞向成肌细胞分化的过程中发挥作用, 而 *MyoG* 和 *MRF4* 基因主要在骨骼肌发育晚期的成肌细胞向终末骨骼肌纤维细胞分化的过程中发挥作用^[12-15]。

MyoD I (Myogenic differentiation I) 基因启动子为组织特异性启动子^[16], 是骨骼肌生长发育过程中重要的正调控基因。在形成肌肉特异基因转录调控中, *MyoD I* 起着总开关的作用, 可以结合到肌

细胞生成素、肌酸激酶 CK、肌球蛋白、结蛋白等基因启动子区发挥重要调控作用, 促进它们的转录激活^[17-18]。肌分化因子 *MyoD* 原名 *MyoD I*, 1987 年被首次克隆^[19]。现已知牛的 *MyoD I* 位于 15 号染色体, 为 2 648 bp, 有 3 个外显子。*MyoD I* 基因产物参与多种分化细胞向肌细胞转化, 可影响肌肉结构的表达。近年来, *MyoD I* 基因已经成为动物肉质改良育种的重要研究部分^[20-21]。目前在国内外, 该基因在小鼠、鸡和猪肌细胞生成的表达调控机制方面报道较多; 在牛方面主要集中在转录和翻译水平的研究, 而对 *MyoD I* 基因的表达调控和 *MyoD I* 基因启动子的功能和调控方面的研究较少^[22]。田璐等在 3 个黄牛品种及 4 个杂交肉牛群体 *MyoD* 基因多态性的研究中发现其显著影响肉牛多个肉质性状^[23], 由此可见, 研究 *MyoD I* 基因启动子有着十分重要的意义。李飞等已经证实 *MyoD I* 基因启动子为肌肉组织特异性启动子^[24], 但对 *MyoD I* 基因启动子的活性以及核心启动子位置并没有进行详细的研究。

本研究采用荧光定量 PCR 技术 (QRT-PCR) 对 *MyoD I* 基因进行了差异表达分析; 克隆关岭牛 *MyoD I* 基因 4 段启动子区, 成功构建 pEGFP-N3-*MyoD I* 真核表达载体; 通过转染小鼠 C2C12 细胞, 观察 C2C12 细胞的荧光强度进一步确定 *MyoD I* 基因启动子的活性及核心启动子位置, 同时为进一步构建 *MyoD I* 启动子转基因小鼠模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 感受态细胞、TransStart[®] Green qPCR SuperMix UDG、TransStart[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 反转录试剂盒、血液基因组 DNA 提取试剂盒、柱式质粒 DNA 抽提试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒购于上海生工生物工程技术服务

务有限公司; 真核表达载体 pEGFP-N3、限制性内切酶 *Sac I*、*Hind III*、 T_4 DNA 连接酶、DNA marker 均购于 TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶, dNTP 购于鼎国公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司; 二甲基亚砜、胰酶购自 Sigma 公司; C2C12 细胞系购自中科院上海细胞库。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采集同一头关岭牛背最长肌、小肠、肝、大腿肌、心、脂肪组织, 将新鲜的组织置于液氮中, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中。利用 Trizol 法对不同组织样品的总 RNA 进行提取, 并用微量分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 *TransStart*[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 反转

录试剂盒操作说明进行反转录得到 cDNA。RNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, Random Primer $1\text{ }\mu\text{L}$, gDNA Remove $1\text{ }\mu\text{L}$, *TransScript*[™] RT Mix $1\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ TS Reaction Mix $10\text{ }\mu\text{L}$, 补加 RNase-free 水到 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 进行后续的荧光定量 PCR 反应。

1.2.2 实时荧光定量 PCR

参照 NCBI 中牛 *β actin* (AY152693) 和 *MyoD I* (NM_001040478) 基因序列, 结合 Primer5.0 和 Oligo 软件进行分析设计特异性 qRT-PCR 引物(表 1), 引物由上海生工合成。

实时荧光定量 PCR 采用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系, 采用 Bio-rad iQ5 伯乐荧光定量 PCR 仪进行定量分析。每个样品不同基因的表达均以 *β actin* 为对照, 每个样品检测做 3 个平行试验。扩增反应结束后由熔解曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据标准曲线以及 Ct 值计算定量结果。

表 1 荧光定量 PCR 扩增引物序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters used for real-time quantitative PCR

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	片段长度/bp Fragment size
<i>MyoD I</i>	S:GCTACTTCGCGACCAGGAC	50.7	158
	A:CGCTGTAGTCCATCATGCCGT		
<i>βactin</i>	S:GCAGGTCATCACCATCGG	58.3	564
	A:GCTGTCACCTTCACCGTTC		

S. 上游引物; A. 下游引物

S. Sense; A. Antisense

1.2.3 数据分析

SPSS18.0 计算重复样品间 Ct 均值及标准偏差, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法处理数据, 分析 *MyoD I* 基因在不同组织中的差异表达量^[25]。首先计算各组织样的目的基因与内参基因的 Ct 值, 即 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{内参基因})$, 然后计算各组织样 ΔCt 平均值, 选取小肠做对照, 用其他组织样减去小肠组织样的 ΔCt , 即为比较的 Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$); $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示试验目的基因的表达相对于对照组变化的倍数^[26]。

1.2.4 PCR 扩增 *MyoD I* 启动子区

根据 GenBank 中公布的牛 *MyoD I* (GenBank No.: 281938) 基因序列, 用 FIRSTEF 程序 (<http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/>) 进行启动子预测, 另外结合实验室前期的工作结果, 用 Primer5.0 设计 4 对 5' 端加磷的引物(表 2), 引物由上海英骏生物技术有限

公司合成。以关岭牛血液 DNA 为模板扩增 *MyoD I* 启动子 $P_1 \sim P_4$ 片段, 扩增体系 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 条件(表 2): 98 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸; 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。反应产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 PCR 扩增不含 CMV 区的 pEGFP-N3 载体片段

以 pEGFP-N3 质粒为模板进行 PCR 扩增。上游引物: 5'-GCTAGCGCTACCGGACTCAGAT-3', 下游引物: 5'-ATTAATAACTAATGCA-TGGCGG-3', 总反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 10 个循环; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

表 2 用于 PCR 扩增的引物信息

Table 2 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
P ₁ (-1 895~+557 bp)	S: ACCTCCCGACATCATACATT A: GGTGGGTTGCTAGACG	55	80	2 452
P ₂ (-976~+17 bp)	S: GTGGAGTTCCGCTTGTTG A: CTCCCCACCCCTACTTTC	60	35	993
P ₃ (-420~+17 bp)	S: CTCCCTGATTCGGTAGATC A: CTCCCCACCCCTACTTTC	51	16	437
P ₄ (-108~+17 bp)	S: CTCCCTGCTCTGTTCTATT A: CTCCCCACCCCTACTTTC	56	7	125

S. 上游引物; A. 下游引物

S. Sense; A. Antisense

1.2.6 *MyoD I* 启动子与 pEGFP-N3 片段的连接及转化 将 PCR 获得的不同 DNA 片段分别用胶回收试剂盒回收纯化。将 4 段不同长度的 *MyoD I* 启动子片段分别与不含 CMV 区的 pEGFP-N3 片段平末端连接。连接产物转化至预先用 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 均匀涂布于含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 静置 1 h, 再倒置培养 16~24 h。

1.2.7 菌落 PCR 鉴定和重组质粒 PCR 鉴定 将含卡那霉素的 LB 固体培养基上长出的阳性克隆菌落编号, 再选取这些阳性菌落进行菌落 PCR。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

选取电泳中和阳性对照有一致条带的阳性菌落接种到含有硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中扩大培养, 用质粒提取试剂盒提取重组质粒。用提取的重组质粒作为模板, 进行重组质粒 PCR。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.2.8 重组质粒的酶切及测序鉴定 选取只能扩增出和阳性对照有一致条带的重组质粒, 用限制性内切酶 *Hind III* 酶切验证片段连接的顺序。酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。将同一阳性克隆的质粒送至上海英骏公司测序。

1.2.9 C2C12 细胞的培养和重组质粒的转染 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 条件下培养 C2C12 细胞。待 C2C12 细胞贴壁后, 根据培养基的颜色变化更换新的培养基。取处于对数生长期状态良好的细胞, 利用脂质体转染法转染重组质粒 pEGFP-N3-*MyoD I* 和对照空质粒 pEGFP-N3, 每个样品重复 3 孔。转染具体步骤: 转

染前 1 d 将小鼠 C2C12 细胞接种至 24 孔板中, 1×10^5 个 \cdot 孔⁻¹, 使细胞达到 90%~95%。用 50 μL Opti-MEM 稀释重组质粒 DNA, 轻轻混合, 取 2 μL LipofectamineTM2000 用 50 μL Opti-MEM 稀释, 轻轻混合, 室温孵育 5 min; 将 50 μL LipofectamineTM2000 混合物加入重组质粒混合物中, 总体积为 100 μL , 轻轻混合, 室温孵育 20 min; 将 100 μL DNA-LipofectamineTM2000 混合物加入 24 孔板中, 轻轻混匀, 培养 6 h 后更换培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 条件下培养。在转染后 24 h, 将培养板置于尼康荧光倒置显微镜下, 在蓝色滤镜下用 445~490 nm 的激发光源观察 C2C12 细胞有无表达的发绿色荧光的 GFP 物质^[27]。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 产物特异性分析

由图 1 可见, βactin 和 *MyoD I* 基因扩增曲线均呈现“S”形, 说明 βactin 和 *MyoD I* 基因的动力学曲线整体平行性较好, 曲线拐点清晰, 基线平而无明显上扬趋势。由图 2 可见, 熔解曲线图显示梯度模板熔解曲线集中。熔解曲线上只有一个明显的峰, 表明在实时荧光定量 PCR 过程中, 荧光强度均来自于特异性的扩增产物, 目的基因及内参基因没有产生非特异性扩增及引物二聚体, 引物特异性好。

2.2 *MyoD I* 基因在关岭牛不同组织中的 qRT-PCR 分析

结果显示, *MyoD I* mRNA 在所检测的 6 个组织样中均有表达, 且以小肠为对照, 背最长肌中表达量最高, 小肠中表达量最低(图 3)。

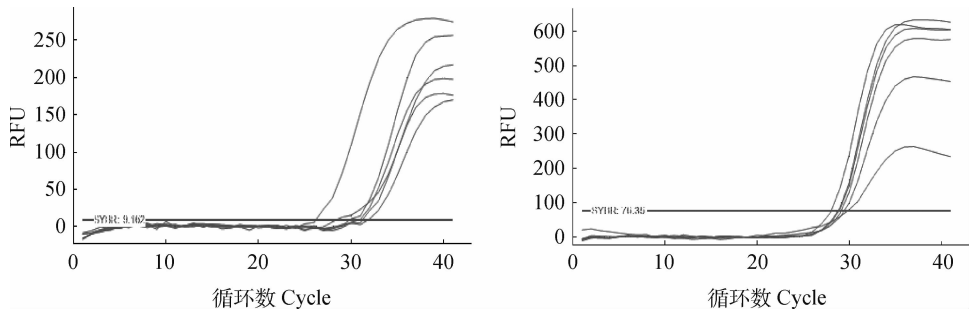


图 1 β -actin 和 *MyoD 1* 基因的扩增曲线

Fig. 1 The amplification curve of β -actin and *MyoD 1* genes

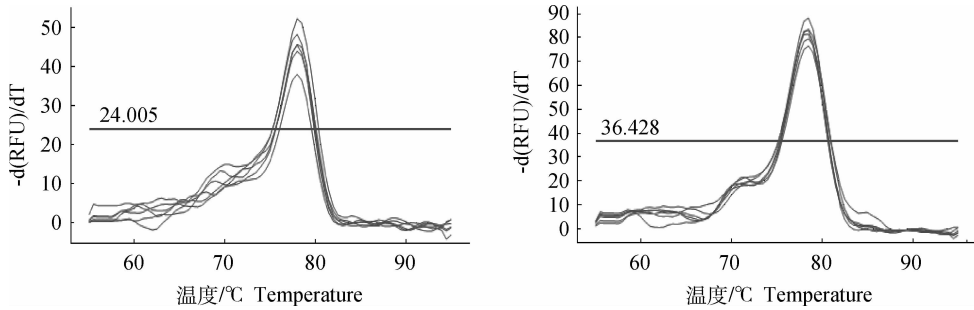
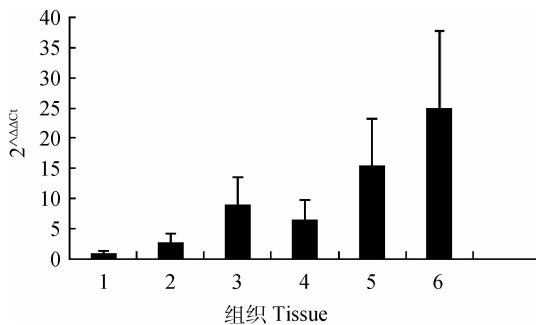


图 2 β -actin 和 *MyoD 1* 基因的熔解曲线

Fig. 2 The melting curve of β -actin and *MyoD 1* genes



1. 小肠; 2. 脂肪; 3. 肝; 4. 大腿肌; 5. 心; 6. 背最长肌

1. Small intestine; 2. Fat; 3. Liver; 4. Muscle of thigh;

5. Heart; 6. *Longissimus dorsi*

图 3 *MyoD 1* mRNA 在关岭牛不同组织中的表达

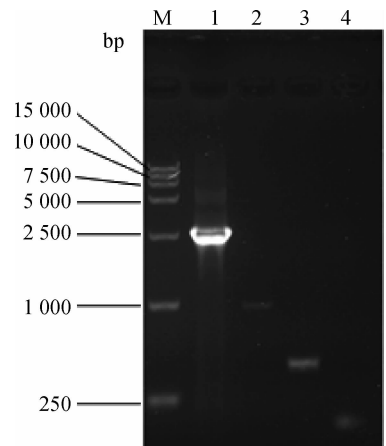
Fig. 3 The expressing level of *MyoD 1* gene in different tissues in Guanling cattle

2.3 *MyoD 1* 基因启动子片段的扩增

以提取的血液 DNA 为模板, 将 PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 分别在 2 452、993、437 和 125 bp 处出现条带, 与目的条带大小一致(图 4)。

2.4 扩增不含 CMV 区的 pEGFP-N3 载体片段

以摇菌提质粒获得的 pEGFP-N3 质粒为模板进行 PCR 扩增获得不含启动子区的 pEGFP-N3 载体片段, 获得的凝胶条带与目的条带一致(图 5)。



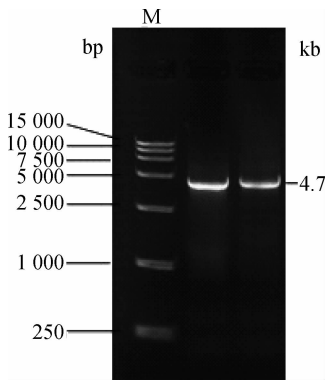
M. DNA 相对分子质量标准; 1、2、3、4. P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 PCR 产物
M. Marker 15000; 1, 2, 3, 4. The PCR products of P_1 , P_2 , P_3 , P_4

图 4 不同长度 *MyoD 1* 启动子片段 PCR 产物

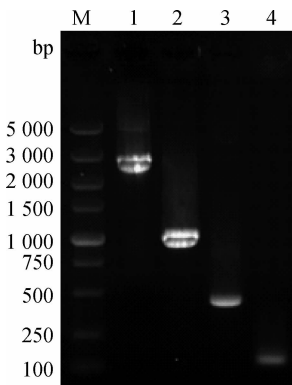
Fig. 4 PCR product of *MyoD 1* promoters with different length

2.5 重组质粒 pEGFP-N3-*MyoD 1* 的 PCR 鉴定

选取阳性重组质粒经 PCR 扩增出 2 452、993、437 和 125 bp 片段与阳性对照获得的 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 片段一致, 而阴性对照则没有目的片段出现。试验结果(图 6)和预期的一致。



M. DNA 相对分子质量标准;1,2. pEGFP-N3 载体目的条带
M. Marker15000;1,2. The target fragments of pEGFP-N3
图5 不含启动子区的 pEGFP-N3 载体片段 PCR 产物
Fig. 5 PCR product of pEGFP-N3 vector without promoter region



M. DNA 相对分子质量标准;1,2,3,4. P₁~P₄ 重组质粒 PCR 鉴定
M. Marker5000;1,2,3,4. PCR identification of P₁-P₄ reconstructed plasmid

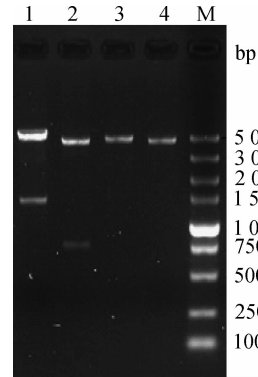
图6 重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of PCR product of reconstructed plasmid

2.6 重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I 酶切和测序鉴定

目的片段和质粒片段是平末端连接,酶切可以验证目的片段插入的顺序。重组质粒 pEGFP-N3-P₁ 和 pEGFP-N3-P₂ 分别在目的片段和质粒片段上有两个 *Hind* III 酶切位点,重组质粒 pEGFP-N3-P₁ 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切,可以获得大小约 1.4 和 5.3 kb 的条带(图 7);重组质粒 pEGFP-N3-P₂ 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切可以获得大小约 776 bp 和 4.3 kb 的条带。重组质粒 pEGFP-N3-P₃、pEGFP-N3-P₄ 只在质粒片段有一个 *Hind* III 酶切位点,重组质粒 pEGFP-N3-P₃、pEGFP-N3-P₄ 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切可分别得到大小约 4.6 和 4.2 kb 的条带。结果证明,P₁、P₂ 片段已经以正

确的顺序成功替换真核表达载体 pEGFP-N3 的 CMV 区;P₃、P₄ 片段成功替换真核表达载体 pEGFP-N3 的 CMV 区(图 8),但插入顺序还需要通过测序进一步验证。将英骏公司测序结果与 NCBI 中的序列进行比对,吻合度达到 99% 以上,表明 4 个不同的重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I 构建成功。



M. Marker5000; 1. pEGFP-N3-P₁; 2. pEGFP-N3-P₂; 3. pEGFP-N3-P₃; 4. pEGFP-N3-P₄

图7 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 7 Identification of restriction analysis of reconstructed plasmid

2.7 重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I 在小鼠 C2C12 细胞中的表达

重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I 和质粒 pEGFP-N3 转染小鼠 C2C12 细胞 30 h 后荧光达到最大值,用荧光倒置显微镜观察重组质粒在小鼠 C2C12 细胞中的表达情况。可见重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I 和质粒 pEGFP-N3 转染小鼠 C2C12 细胞,细胞荧光的表达量为 pEGFP-N3 > pEGFP-N3-P₃ > pEGFP-N3-P₂ > pEGFP-N3-P₄ > pEGFP-N3-P₁,且绿色荧光蛋白在部分小鼠 C2C12 细胞的细胞质和细胞核中均有表达,表现为强绿色荧光(图 9),推测 P₃ 可能为 MyoD I 基因的核心启动子区。

3 讨论

生肌调节因子(MRFs)家族是控制骨骼肌生成的关键调节因子。生肌分化因子(Myod I)是骨骼肌生长发育过程中重要的正调控基因,在肌肉特异基因转录调控中起着决定性的作用^[28]。

本试验采用 qRT-PCR 方法对 MyoD I 基因在关岭牛大腿肌、背最长肌、小肠、心、肝、脂肪 6 个组织中 mRNA 的表达量进行了测定。研究结果表明,MyoDI 基因在背最长肌中表达量最高,在心脏表

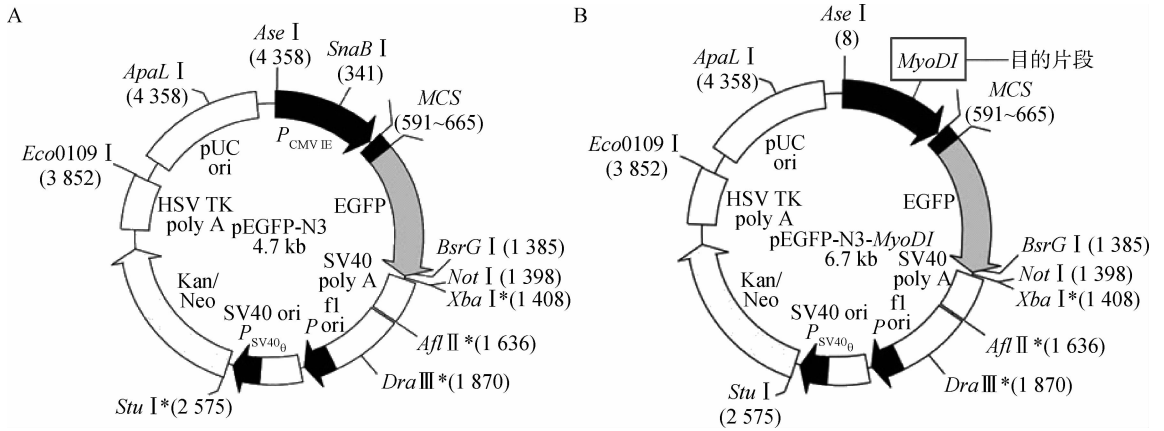
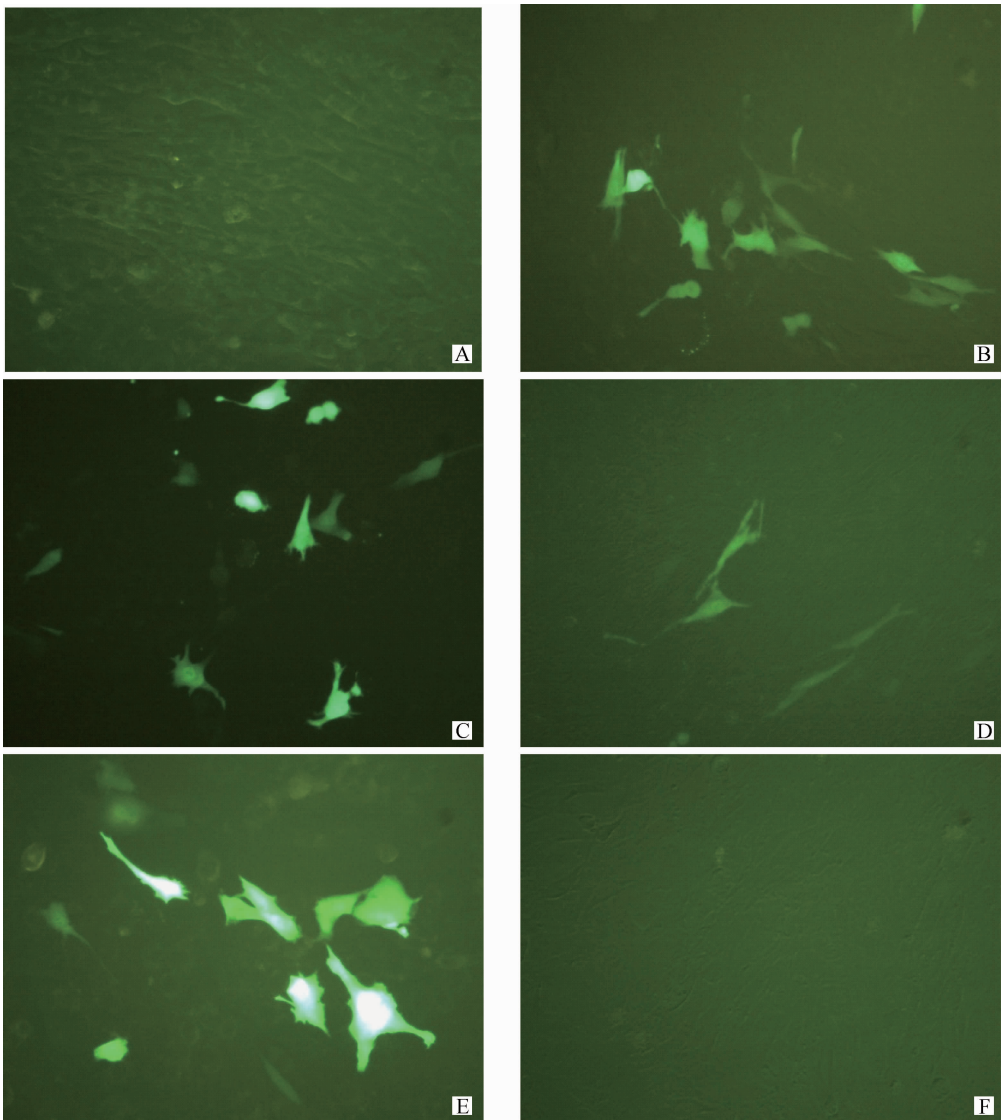


图 8 重组质粒 pEGFP-N3-MyoD I(B)与 pEGFP-N3 载体(A)
 Fig. 8 pEGFP-N3-MyoD I recombinant plasmid(B) and pEGFP-N3 vectors(A)



A. pEGFP-N3-P₁ 重组载体; B. pEGFP-N3-P₂ 重组载体; C. pEGFP-N3-P₃ 重组载体; D. pEGFP-N3-P₄ 重组载体; E. pEGFP-N3 载体; F. 未转染质粒组
 A. pEGFP-N3-P₁ reconstruction vector; B. pEGFP-N3-P₂ reconstruction vector; C. pEGFP-N3-P₃ reconstruction vector; D. pEGFP-N3-P₄ reconstruction vector; E. pEGFP-N3 vector; F. Plasmid untransfected
 图 9 重组表达载体 pEGFP-N3-MyoD I 转染 30 h 后小鼠 C2C12 细胞绿色荧光情况 200×
 Fig. 9 The green fluorescence of pEGFP-N3-MyoD transfected into C2C12 cell 200×

达量其次,在小肠中表达量最低。*MyoD I* 基因在肌肉中表达量相对较高,与李飞等^[24]证实的 *MyoDI* 基因为肌肉组织特异性基因的结论相一致。本研究选取了小鼠的成肌细胞(C2C12)为研究对象,在细胞水平上验证 *MyoD I* 基因启动子的功能和活性,为后续在小鼠体内验证启动子的功能和活性提供基础。

由于在扩增不含 CMV 区的 pEGFP-N3 载体片段时对克隆位置要求精确,因此本研究采用高保真 DNA 聚合酶进行扩增,与 P₁、P₂、P₃、P₄ 片段进行平末端连接,通过采用加磷的引物可以增加平末端连接的机率。试验通过菌液 PCR、酶切、测序的方法验证阳性克隆子,结果显示,与传统的双酶切方法相比,本方法具有不受酶切位点限制的优势,同时也避免引入新的酶切位点,克服了目的片段上有双酶切位点而导致在内切酶选择上的困难。通过此种方法可以实现载体的任意位置连接需要的目的片段而无需考虑酶切位点。

真核生物启动子属于 mRNA 基因启动子,位于结构基因 5' 端上游,主要包括 TATA-box、起始子、CAAT-box 和 GC-box 等。TATA-box 和起始子被称为核心启动子^[29-30],其中 TATA-box 是转录因子 TFIID 的 TBP 亚基的结合位点。本研究通过替换 pEGFP-N3 载体的 CMV 区,观察转染前后 C2C12 细胞的荧光强度,判定目的启动子的启动活性。结果显示,*MyoD I* 片段的 P₂、P₃、P₄ 片段均可启动 pEGFP-N3 载体的 EGFP 荧光蛋白表达区,启动活性为 P₃ > P₂ > P₄ > P₁。因此,推测 P₃ 可能为 *MyoD I* 基因核心启动子区,P₁ 和 P₂ 片段启动活性较低可能由于含有抑制启动子活性的区域,P₄ 片段由于长度较短可能缺失具有启动活性的核心区域,影响表达量。通过构建启动子 pEGFP-N3-*MyoD I* 真核表达载体,可为后续构建转基因小鼠模型提供分子学依据,为进一步验证 *MyoD I* 基因启动子活性与功能奠定基础。

4 结 论

本研究分析了关岭牛 *MyoD I* 基因在大腿肌、背最长肌、肝、脂肪、心、小肠 6 个组织中的表达量,克隆了 4 个关岭牛 *MyoD I* 基因启动子区,精确替换 pEGFP-N3 的 CMV 区,构建了重组表达载体 pEGFP-N3-*MyoD I*,转染小鼠 C2C12 细胞。结果显示,*MyoD I* 基因在关岭牛肌肉组织中表达量较高,推测出 P₃ 片段为 *MyoD I* 基因核心启动子区。

参考文献(References):

- [1] SALVA M Z. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle[J]. *Gene Therapy*, 2007, 2:320-329.
- [2] DU X H, GAN Q F, YUAN Z R, et al. Polymorphism of *MyoD1* and *Myf6* genes and associations with carcass and meat quality traits in beef cattle[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4):6708-6717.
- [3] KNEŽEVIĆ D, ĐURKIN I, KUŠEC G, et al. Influence of C489T SNP at *MYOD1* gene on carcass, meat quality traits and chemical composition of hybrid pigs[J]. *Agric Conspect Sci*, 2013, 78(3):193-196.
- [4] 李 硕, 郝 斐, 梁 浩, 等. 牛肌细胞生成素基因 (*MyoG*) 启动子的活性及组织特异性分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(1):87-93.
LI S, HAO P, LIANG H, et al. Activity and tissue-specific analysis of bovine (*Bos*) myogenin gene (*MyoG*) promoter[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(1):87-93. (in Chinese)
- [5] GALICIA-VÁZQUEZ G, DI MARCO S, LIAN X J, et al. Regulation of eukaryotic initiation factor 4 AII by *MyoD* during murine myogenic cell differentiation [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1):e87237.
- [6] STEFANON B, SGORLON S, GUIATTI D, et al. Association analysis between single nucleotide polymorphisms in the promoter region of *LEP*, *MYF6*, *MYOD1*, *OPN*, *SCD* genes and carcass traits in heavy pigs[J]. *Ita J Anim Sci*, 2013, 12(1):13.
- [7] STUPKA R, CITEK J, SPRYSL M, et al. The impact of *MYOG*, *MYF6* and *MYOD1* genes on meat quality traits in crossbred pigs[J]. *Afr J Biotechnol*, 2012, 11(88):15405-15409.
- [8] BLUM R, VETHANTHAM V, BOWMAN C, et al. Genome-wide identification of enhancers in skeletal muscle; the role of *MyoD1* [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(24):2763-2779.
- [9] HALL J K, BANKS G B, CHAMBERLAIN J S, et al. Prevention of muscle aging by myofiber-associated satellite cell transplantation [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(57):57.
- [10] VAN DER MEER S F, JASPERS R T, JONES D A, et al. Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle [J]. *Muscle Nerve*, 2011, 43(2):212-222.
- [11] MALATESTA M, MEOLA G. Structural and function alterations of the cell nucleus in skeletal muscle wasting: the evidence in situ[J]. *Eur J Histochem*, 2010, 54(4):44.

- [12] ZHANG B T, YEUNG S S, LIU Y, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension [J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 18 (11): 87.
- [13] LI H, ZHU C, TAO Z, et al. *MyoD* and *Myf6* gene expression patterns in skeletal muscle during embryonic and posthatch development in the domestic duck (*Anas platyrhynchos domestica*) [J]. *J Anim Breed Genet*, 2014, 131(3): 194-201.
- [14] SOUMILLION A, ERKENS J H F. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus [J]. *Mamm Genome*, 1997, 8: 564-568.
- [15] SZUHAI K, DE JONG D, LEUNG W Y, et al. Transactivating mutation of the *MYOD1* gene is a frequent event in adult spindle cell rhabdomyosarcoma [J]. *J Pathol*, 2014, 232(3): 300-307.
- [16] BOWLIN K M, EMBREE L J, GARRY M G, et al. *Kbtbd5* is regulated by *MyoD* and restricted to the myogenic lineage [J]. *Differentiation*, 2013, 86(4-5): 184-191.
- [17] KOHSAKA S, SHUKLA N, AMEUR N, et al. Acetyltransferase association and histone acetylation at the *MyoD1* locus during myogenic differentiation [J]. *FASEB J*, 2014, 28(1): 946.
- [18] AKIZAWA Y, KANNO H, KAWAMICHI Y, et al. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of *MYOD1* [J]. *Brain Dev*, 2013, 35(4): 349-355.
- [19] BLUM R, DYNLACHT B D. The role of *MyoD1* and histone modifications in the activation of muscle enhancers [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 778-784.
- [20] 黄 萌, 许尚忠, 笱林森, 等. 牛 *MyoD1* 基因遗传变异及其对胴体性状的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34 (9): 40-43.
- HUANG M, XU S Z, ZAN L S, et al. Polymorphism with exon 3 of the cattle *MyoD1* gene and their frequencies in carcass traits [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 34 (9): 40-43. (in Chinese)
- [21] YAO Z Z, FONG A P, CAO Y, et al. Comparison of endogenous and overexpressed *MyoD* shows enhanced binding of physiologically bound sites [J]. *Skeletal Muscle*, 2013, 3(1): 1-9.
- [22] 王秋华, 曹允考, 李树峰. 牛 *MyoG* 基因启动子的克隆及功能的初步分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(1): 37-43.
- WANG Q H, CAO Y K, LI S F. Cloning and preliminary functional analysis of bovine *MyoG* promoter [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43 (1): 37-43. (in Chinese)
- [23] 田 璐, 许尚忠, 岳文斌, 等. *MyoD* 基因对肉牛胴体性状影响的分析 [J]. 遗传, 2007, 29(3): 313-318.
- TIAN L, XU S Z, YUE W B, et al. Relationship between genotypes at *MyoD* locus and carcass traits in cattle [J]. *Hereditas*, 2007, 29(3): 313-318. (in Chinese)
- [24] 李 飞, 许厚强, 陈 伟, 等. 关岭牛 *MyoD* 基因启动子报告质粒的构建及活性验证 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, (4): 459-466.
- LI F, XU H Q, CHEN W, et al. Verification of activity and construction of the report plasmid of *MyoD I* gene promoter in Guanling cattle [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, (4): 459-466. (in Chinese)
- [25] 杨丽华, 白东义, 高雅罕, 等. 蒙古马运动相关基因的表达量差异研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44 (12): 1900-1906.
- YANG L H, BAI D Y, GAO Y H, et al. Characterization of exercise relevant genes in Mongolian horses [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44 (12): 1900-1906. (in Chinese)
- [26] 李 蓓, 何小龙, 芒 来. 蒙古马突触融合蛋白 17 (*STX17*) 基因多态性及在不同毛色皮肤组织中的表达分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(11): 1632-1637.
- LI B, HE X L, MANG L. Analysis on polymorphism and expression in different coat color skin of syntaxin-17 (*SKX17*) gene in Mongolian horse [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42 (11): 1632-1637. (in Chinese)
- [27] 黎 静, 周 军, 钟 梅, 等. 真核绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-N1-ZNF217 的构建及表达 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 391-393.
- LI J, ZHOU J, ZHONG M, et al. Construction and expression of the eukaryotic green fluorescent protein expression vector pEGFP-N1-ZNF217 [J]. *Journal of First Military Medical University*, 2010, 30(2): 391-393. (in Chinese)
- [28] VORONOVA A, COYNE E, AL MADHOUN A, et al. Hedgehog signaling regulates *MyoD* expression and activity [J]. *Biol Chem*, 2013, 288(6): 4389-4404.
- [29] KOHSAKA S, SHUKLA N, AMEUR N, et al. Acetyltransferase association and histone acetylation at the *MyoD1* locus during myogenic differentiation [J]. *FASEB J*, 2014, 28(1): 946.
- [30] 赵广珍, 贾 青, 张翠翠, 等. 猪 *MyoD1* 基因多态性与肉质性状的相关分析 [J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(4): 90-99.
- ZHAO G Z, JIA Q, ZHANG C C, et al. Relationship between polymorphism of *MyoD1* and meat quality traits in pig [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2012, 35(4): 90-99. (in Chinese)