

关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因子结合位点的筛选

张 雯^{1,2}, 许厚强^{1,2*}, 陈 伟^{1,2,3}, 陈 祥^{1,2}, 桓聪聪^{1,2,3}, 夏 丹^{1,2}, 周 迪^{1,2}

(1. 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, 贵阳 550025;

2. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 3. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

摘 要: 本研究旨在筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上的转录因子结合位点。根据 GenBank 已公布的牛 *MyoDI* 基因的启动子序列, 设计特异性 PCR 引物, 扩增贵州关岭牛 *MyoDI* 基因的启动子区, 构建重组克隆载体 pUCM-T-*MyoDI*-pro, 并对阳性质粒进行测序鉴定。再利用筛选试验和生物信息学分析筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上的转录因子结合位点。结果, 筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上含有的转录因子结合位点有 SATB1、Xbp、MEF2、Pax-3、Pbx1、PPAR、TF II D、COUP-TF、Gfi-1、HNF-1、HOX4C、NRF2 (ARE)、MEF1、RXR、SMUC、Snail、MyoD、VDR。结合在线软件分析和文献, 最终筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上含有 MyoD、TFIID、Pax3、MEF1、VDR 和 MEF2 转录因子结合位点, 这些转录因子对启动子活性起着重要的调控作用。结果显示, 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上含有 MyoD、TFIID、Pax3、MEF1、VDR 和 MEF2 转录因子结合位点。

关键词: *MyoDI* 基因; 转录因子结合位点; 启动子; 细胞核提取物; 生物信息学分析

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)07-1259-09

The Screening of Transcription Factor Binding Sites of *MyoDI* Promoter in Guanling Cattle

ZHANG Wen^{1,2}, XU Hou-qiang^{1,2*}, CHEN Wei^{1,2,3}, CHEN Xiang^{1,2},

HUAN Cong-cong^{1,2,3}, XIA Dan^{1,2}, ZHOU Di^{1,2}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region of Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: This experiment was conducted to screen the transcription factor binding sites of *MyoDI* promoter in Guizhou Guanling cattle. According to the sequence of bovine *MyoDI* gene published in GenBank, the specific primer was designed to amplify the promoter region of *MyoDI* gene in Guanling cattle. The PCR products was used to construct the recombinant cloning vector pUCM-T-*MyoDI*-pro. Positive plasmids were authenticated by sequencing. Then screening experiment and bioinformatics analysis were applied to screen the transcription factor binding sites of *MyoDI* promoter in Guanling cattle. The results showed that the transcription factor binding sites of *MyoDI* promoter in Guizhou Guanling cattle had SATB1, Xbp, MEF2, Pax-3, Pbx1, PPAR, TF II D, COUP-TF, Gfi-1, HNF-1, HOX4C, NRF2 (ARE), MEF1, RXR, SMUC, Snail, MyoD and VDR. Combined with online software analysis and literature, we ultimately screened out the MyoD, TFIID, Pax3, MEF1, VDR and MEF2 in *MyoDI* promoter. These transcription factors play an impor-

收稿日期: 2014-09-03

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08009-004); 黔科合重大专项贵州畜禽种质资源保存、创新与利用(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: 张 雯(1989-), 女, 四川达州人, 研究生, 主要从事动物遗传育种与种质资源创新研究, E-mail: aszhangwen@sina.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

tant role in regulation of promoter activity. The result indicate that the Guanling cattle *MyoDI* promoter contain MyoD, TFIID, Pax3, MEF1, VDR and MEF2 transcription factor binding sites.

Key words: *MyoDI* gene; transcription factor binding sites; promoter; nuclear extracts; bioinformatics analysis

生肌决定因子(Myogenic determination gene, MyoD)家族是肌肉生成过程中参与分子调控的一个重要基因家族^[1]。该家族在肌细胞的分化和特化过程中具有重要意义,它们只表达在骨骼肌细胞及其前体细胞中,在非肌细胞系中的表达会被其他特异性基因抑制^[2]。生肌决定因子 I 是 MyoD 家族的一员,它在肌肉特异基因的转录调控中起着总开关的作用^[1]。邱海芳等^[3]研究还表明,*MyoDI* 基因在肌肉发育过程中发挥了重要作用。田璐等^[4]研究发现,*MyoDI* 基因显著影响肉牛的多个肉质性状,如宰前活重、胴体重、净肉重、眼肌面积等。*MyoDI* 基因对肌肉的形成和肉质性状都具有显著影响,这引起了大家对该基因的重视。

国内外对 *MyoDI* 基因的研究在小鼠、鸡和猪的肌细胞生成机理等方面较多,在牛上对该基因的研究则主要集中在转录后和翻译水平^[5]。目前,李飞等^[6]研究表明,关岭牛 *MyoDI* 基因启动子具有启动活性,能在小鼠骨骼肌细胞中特异性表达,但对 *MyoDI* 基因转录调控的分子作用机制还不清楚。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^[7],但由于肌细胞的分化特性导致多种肌肉特异性启动子只在终末分化的肌细胞内才能启动基因转录表达,所以这些肌肉特异性启动子在体外培养的肌干细胞内的启动效率很低,这给肌肉机理研究带来了困难^[8-9]。关岭牛具有体质结实,肢蹄强健,行动灵活,耐劳、耐旱、耐粗饲、适应性强等特性,是一个适宜山区耕作和放牧,有较好的挽力和产肉性能,广大农户乐于饲养的优良地方牛品种^[10]。因此,本试验以关岭牛为试验对象对其 *MyoDI* 基因启动子区的转录因子结合位点进行筛选,为下一步研究提供方向。

转录因子是一类细胞核蛋白,而转录因子结合位点则是一些短的特定的 DNA 序列,一般为 5~10 个核苷酸,定位于启动子、增强子、沉默子等顺式作用元件。转录因子通过与靶基因调控区内转录因子结合位点结合,既可以启动一组特定基因的表达,也可以关闭一组特定基因的表达^[11-12]。这表明转录因子与

调控序列的相互作用在决定某个基因是否表达中起着重要的作用。随着对转录因子的深入研究,尤其是近几年染色质免疫沉淀及生物信息学的发展,对进一步研究基因的转录调控机制提供了思路和方法^[13]。本试验所用的试剂盒 Promoter-Binding TF Profiling Assay II 具有灵敏度高、检测速度快、检测种类多、操作简单等优点,克服了凝胶迁移试验和构建一系列启动子缺失或突变的报告体的复杂性。

综上所述,本试验利用探针和启动子竞争性的与转录因子结合的方法筛选 *MyoDI* 基因启动子区的转录因子结合位点,并结合生物信息学方法对关岭牛 *MyoDI* 基因启动子序列进行分析,从而确定 *MyoDI* 基因启动子区的转录因子结合位点。这对探究 *MyoDI* 基因的转录调控有重要意义,同时也为牛肉品质的改善和牛产肉性状的提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 购自大连 TaKaRa 公司; Promoter-Binding TF Profiling Assay II 和 Nuclear Extraction Kit (Catalog Number SK-0001) 试剂盒购自 Signosis 公司; 2 \times Es Taq MasterMix 和 BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪公司; 质粒小量抽提试剂盒、动物组织 DNA 提取试剂盒、T-载体 PCR 产物克隆试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工生物股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 关岭牛基因组 DNA 的提取 利用动物组织 DNA 提取试剂盒提取关岭牛背最长肌的基因组 DNA, 结果用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.2 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子的克隆 根据 GenBank 提供的牛 *MyoDI* 序列(登录号 NW_003104409), 利用在线软件 Promoter 2.0 预测该基因的启动子区, 并利用 Primer5.0 设计引物, 进行 *MyoDI* 基因启动子区的克隆。上游引物 F: 5'-ACCTCCCGACATCATACATT-3', 下游引物 R: 5'-GGTTTGGGTTGCTAGACG-3'。以关岭牛基因

组 DNA 为模板, 利用常规 PCR 反应进行扩增。20 mL 总体积的反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 80 s, 35 个循环; 最后再 72 °C 2 min, 1 个循环。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并用胶回收试剂盒进行回收纯化。

1.2.3 pUCm-T-*MyoDI*-pro 重组质粒的构建和鉴定 利用 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒进行 pUCm-T-*MyoDI*-pro 重组质粒的构建。将菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆载体送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序, 并利用 DNAMAN 将测序结果与 NCBI 上的序列进行比对。

1.2.4 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因子结合位点的筛选 利用 Promoter-Binding TF Profiling Assay II、所提的细胞核提取物和回收纯化的目的片段进行关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因

子结合位点的筛选试验(其原理是通过启动子片段和有标记的探针竞争性的与细胞核提取物里的蛋白结合, 再通过柱离心和洗脱等步骤将复合物 TF-bound probes 分离下来, 再将分离的复合物变性后与杂交板孵育, 最后利用多功能酶标仪检测结果。流程见图 1)。本试验选雄激素受体(Androgen receptor, AR)作为空白对照, 试验组与对照组的加样体系按表 1 进行(试验操作按试剂盒说明书进行)。试验结束后对试验结果进行处理分析。将测序正确的序列利用在线软件 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 和 ALGGEN ROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 进行 *MyoDI* 基因启动子区转录因子结合位点的预测, 综合试验结果和预测结果进行 *MyoDI* 基因启动子上的转录因子结合位点的筛选。

表 1 试验组与对照组体系

Table 1 The system of experimental group and control group

试剂 Reagent	试验组/ μ L Experimental group	对照组/ μ L Compare group
TF Binding buffer mix	15	15
TF Probe mix	3	3
Promoter PCR fragment	5	0
Nuclear extract	6	6
ddH ₂ O	1	6
总体积 Total volume	30	30

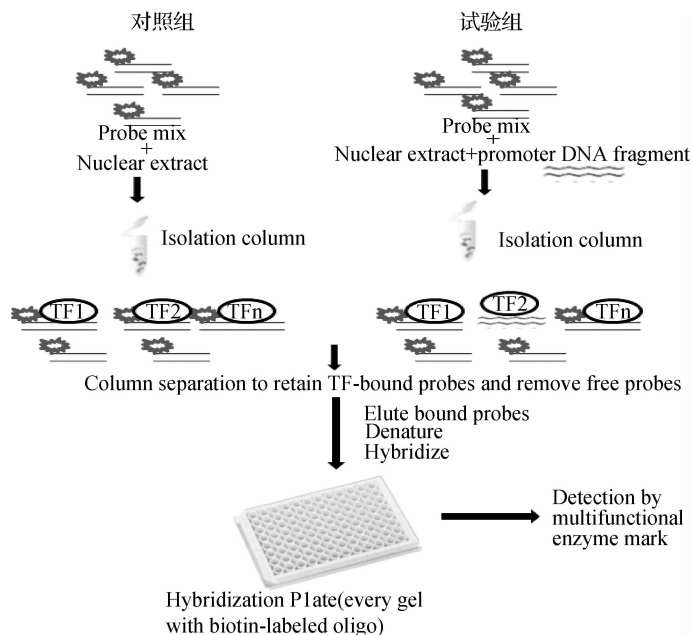


图 1 试验原理图

Fig. 1 The principle diagram of the experiment

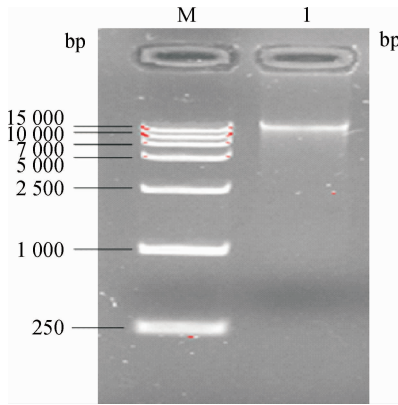
1.2.5 数据分析 本试验得到的数据按 Signosis 科研试剂产品中国总代理—武汉中帆生物科技有限公司提供的方法进行处理分析:对照组处理结果=对照组结果的平均值-空白组的平均值;试验组处理结果=试验组结果的平均值-空白组的平均值;判断值=对照组处理结果/试验组处理结果。

处理结果 >50 ,且判断值 >3 (这个标准由武汉中帆生物科技有限公司提供,因为数值太小的数据误差比较大)的确定启动子区含有相应的转录因子结合位点。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取

所提基因组 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,获得单一无明显拖尾的条带(图 2),表明可以用于目的片段的扩增。



M. DNA 相对分子质量标准;1. 基因组 DNA
M. DL15000 DNA marker;1. Genomic DNA

图 2 关岭牛基因组 DNA

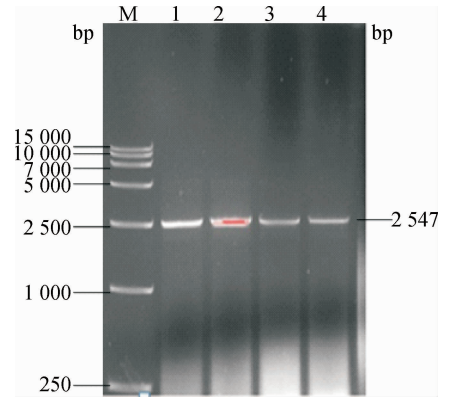
Fig. 2 The genomic DNA of Guanling cattle

2.2 *MyoDI* 基因启动子克隆

目的片段的扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,获得单一目的条带,目的片段大小与预期的牛 *MyoDI* 基因启动子区大小(2 547 bp)一致(图 3)。

2.3 pUCm-T-*MyoDI*-pro 重组质粒的构建和鉴定

以重组质粒为模板进行的目的片段的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得单一的目的条带,片段大小为 2 547 bp,与预期相符(图 4)。将此 PCR 产物送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,其测序结果与 NCBI 上的牛 *MyoDI* 基因启动子区序列的同源性为 99.41%(图 5),说明 pUCm-T-*MyoDI*-pro 构建成功。这个差异是关岭牛本身存



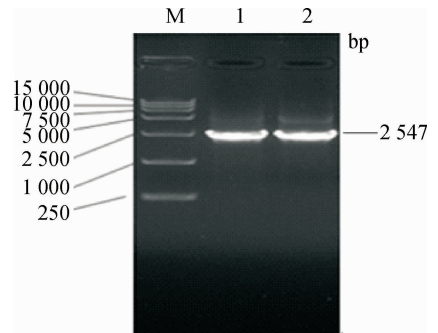
M. DNA 相对分子质量标准;1~4. 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区的 PCR 扩增产物

M. DL15000 DNA marker;1-4. PCR amplified products of Guanling cattle *MyoDI* promoter region

图 3 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区的克隆

Fig. 3 The cloning of the Guanling cattle *MyoDI* promoter region

在的,同时也用高保真酶进行了该片段的扩增和测序,测序结果表明,其与 NCBI 上的牛 *MyoDI* 基因启动子区序列也存在差异,与本试验的测序结果一致。



M. DNA 相对分子质量标准;1、2. 目的片段的克隆产物
M. DL15000 DNA marker;1,2. The cloning products of purpose fragments

图 4 以 pUCm-T-*MyoDI*-pro 为模板的目的片段的克隆

Fig. 4 The cloning of purpose fragment by the pUCm-T-*MyoDI*-pro as template

2.4 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区目的片段和细胞核提取物的浓度测定

以测序正确的 pUCm-T-*MyoDI*-pro 质粒为模板进行目的片段的扩增,将其 PCR 产物利用胶回收试剂盒回收后,用微量紫外分光光度计检测其浓度为 $370.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。利用多功能酶标仪和 BCA 蛋白定量试剂盒检测出关岭牛肌肉组织的细胞核提取物浓度约为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

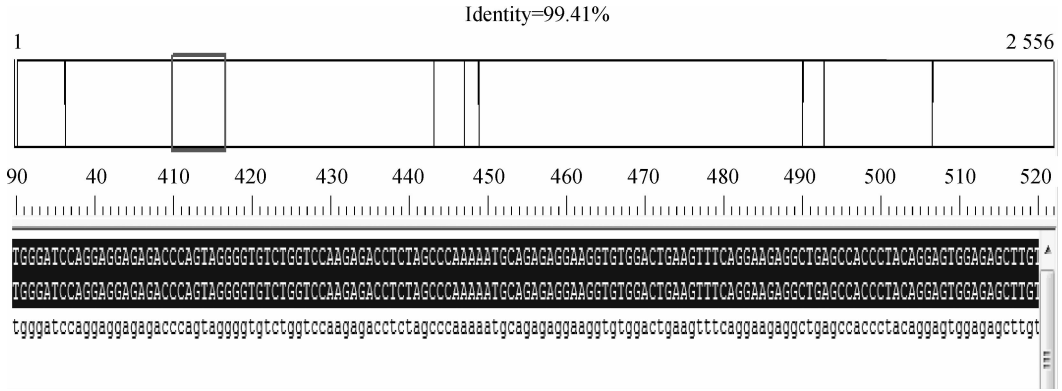
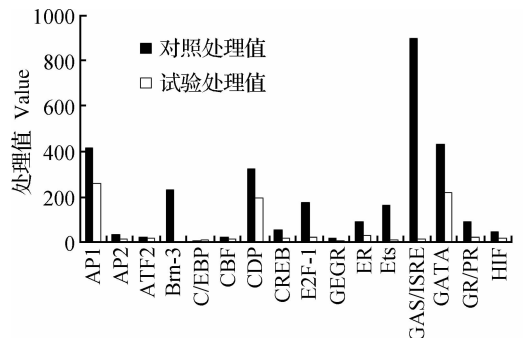


图 5 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子的序列与 NCBI 上序列的比对结果

Fig. 5 The comparison result between the sequence in the NCBI and the Guanling cattle *MyoDI* gene promoter sequence

2.5 关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区转录因子结合位点的筛选

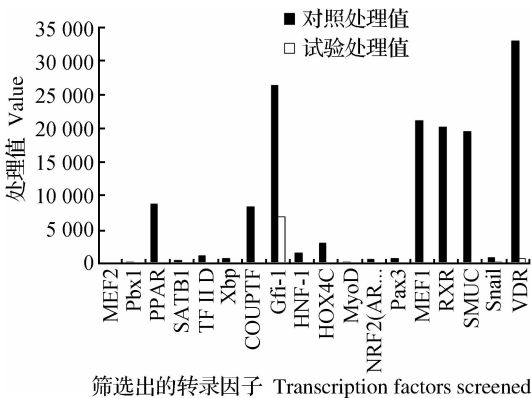
2.5.1 Promoter-Binding TF Profiling Assay II 的筛选结果 利用多功能酶标仪的化学发光检测功能对试验结果进行检测,得到一系列的数值,将数值按照试验方法里的数据分析进行处理。处理值代表的是发光强弱,实质是表示了细胞核提取物中的每个转录因子与对应的探针绑定后被洗脱下来的探针多少,间接表明了启动子上是否含有该转录因子结合位点。从处理的数据结果来看(图 6 和图 7),可以初步判定 *MyoDI* 基因启动子上有转录因子结合位点: SATB1、Xbp、MEF2、Pax-3、Pbx1、PPAR、TF II D、COUP-TF、Gfi-1、HNF-1、HOX4C、NRF2 (ARE)、MEF1、RXR、SMUC、Snail、MyoD、VDR。



部分未筛选出的转录因子 Transcription factors unscreened

图 7 部分未筛选出的转录因子的对照组与试验组的处理值的比较图

Fig. 7 The comparison chart of the control and experimental groups processing value of some transcription factors not screened



筛选出的转录因子 Transcription factors screened

图 6 筛选出的转录因子的对照组与试验组处理值的比较图

Fig. 6 The comparison chart of the control and experimental groups processing value of the transcription factors screened

2.5.2 在线软件对关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因子结合位点的预测

2.5.2.1 在线软件 TFSEARCH 的预测结果:利用

在线软件 TFSEARCH 分析关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上的转录因子结合位点,分析结果显示,其上也含有 *MyoD* 转录因子结合位点(表 2),与试验结果中含有的 *MyoD* 转录因子结合位点重复,进一步推测该基因启动子序列上存在 *MyoD* 转录因子结合位点。

2.5.2.2 在线软件 ALGGEN PROMO 的预测结果:利用在线软件 ALGGEN PROMO 分析关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上的转录因子结合位点,分析结果显示,其上也含有 MyoD、VDR 和 TFIID 转录因子结合位点(表 3),与试验结果吻合。

从试验结果可以得出,*MyoDI* 基因启动子上有 SATB1、Xbp、MEF2、Pax-3、Pbx1、PPAR、TF II D、COUP-TF、Gfi-1、HNF-1、HOX4C、NRF2 (ARE)、MEF1、RXR、SMUC、Snail、MyoD、VDR 转录因子结合位点;软件预测的结果中也含有 MyoD、VDR 和 TFIID 转录因子结合位点;又有文献报道说肌肉

特异性启动子中含有 T_{rex}/MEF-3 元件、MEF-1 元件、Pax3/7 元件、SRE 元件、MEF-2 元件、CACCC 盒等^[14] 转录调控元件。所以,本试验综合上述的结

果筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上有 MyoD、TFIID、Pax3、MEF1、MEF2、VDR 转录因子结合位点。

表 2 在线软件 TFSEARCH 对关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因子结合位点的预测结果

Table 2 The prediction results of transcription factor binding sites of *MyoDI* gene promoter in Guanling cattle by TFSEARCH

位置/bp Location	转录因子结合位点 Transcription factor binding sites
1~200	SRY, CdxA, GATA-2, GAATA-1, AML-la, p300, Pbx-1, GATA-3, MZF1, Lyf-1
200~400	C/EBP, HSF2, IK-2, HSF1, CdxA, STATx
400~600	CdxA, STATx, HSF2, MZF1
600~800	HNF-3b, CdxA, AML-la, GATA-1, GATA-3, SRY
800~1 000	CdxA, MZF1, AML-la, GATA-1, deltaE, EIK-1, USF, C/EBPb, C/EBPa
1 001~1 200	GATA-2, MZF1, C/EBP, GATA-1, SRY, HNF-3b, GATA-3, Sp1
1 201~1 400	AML-la, Nkx-2, AP-1, MZF1, CdxA, CP2
1 401~1 600	GATA-2, MZF1, CdxA, GATA-1, GATA-3, E2F, C/EBP
1 601~1 800	MZF1, Nkx-2, CP2, IK-2, NF-Kap, Sp1
1 801~2 000	CdxA, MZF1, NF-Kap, Sp1, MyoD, E2, GATA-2, GATA-3
2 001~2 200	GATA-1, GATA-2, GATA-3, Nkx-2
2 201~2 547	USF, N-Myc, Sp1, HSF2, P300, CdxA, SRY

表 3 在线软件 ALGGEN PROMO 对关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上转录因子结合位点的预测结果

Table 3 The prediction results of transcription factor binding sites of *MyoDI* gene promoter in Guanling cattle by ALGGEN PROMO

位置/bp Location	转录因子结合位点 Transcription factor binding sites
1~200	p300, GATA -2, YY1, HMG I(Y), STAT 4, ELF-1, MZF-1, GATA -1, STAT 5A, AR, c-Ets-2, SRY, VDR
200~400	300, GATA-2, STAT4, GATA-1, GATA-3, NF-X3, c-Jun, TFIIB, STAT5A, p53, TFIID, Pax-2
400~600	p300, YY1, STAT4, TFIIB, STAT5A, SRY, AP-3
600~800	p300, STAT4, c-Ets-1, GATA-1, NF-X3, TFIIB, STAT5A, SRY, TBP, TMF, MyoD, TFIID
800~1 000	AP-3, Myf-3, MyoD, Pax-2, c-Myb, factor, SXR: RXR-alpha, RelA, NF-AT3, NF-AT2, NF-AT1, Pax-5
1 001~1 200	YY1, STAT4, GATA-1, STAT5A, VDR, E47, NFI/CTF, p53, AP-3, NF-1, Myf-3, MyoD, c-Myb
1 201~1 459	p300, WT1 I, LCR-F1, CUTL1, C/EBPalph, C/EBPbeta, Elk-1
1 401~1 600	p300, WT1 I, PR B, PR A, CUTL1, GATA-2, Elk-1, R2, STAT5A, Pax-2, Pax-5
1 601~1 800	Sp3, Myf-3, MyoD, USF2b, TGIF, c-Fos, Pax-2, c-Myb, E2F-1, SXR: RXR-alpha
1 801~2 000	Nkx2-1, HNF-3beta, MZF-1, GATA -1, GATA -3, TFIIB, PPAR-alpha: RXR-alpha, VDR, Myf-3, MyoD, TFIID
2 001~2 200	p300, GATA-2, YY1, MZF-1, GATA-1, VDR, E47, p53, Sp3, Pax-2, c-Myb, Sp1
2 201~2 400	p300, STAT4, STAT5A, VDR, p53, Sp3
2 401~2 547	C/EBPalph, C/EBPbeta, YY1, VDR, AP-2alphaA, AP-3, E2F-1, Pax-5, RFX1, AhR, HOX11

3 讨 论

目前,李飞等^[6]已经证实,关岭牛 *MyoDI* 基因启动子为骨骼肌特异性启动子。本试验筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上含有 MEF1、Pax3 和 MEF2 转录因子结合位点,这与肌肉特异性启动子中含有 Trex/MEF-3 元件、MEF-1 元件、Pax3/7 元件、SRE 元件、MEF-2 元件、CACCC 盒等^[14] 转录调控元件的报道相符;与肌细胞增强因子 2 (MEF-2) 被认为是绝大部分肌肉特异性基因的保守元件^[15-19] 的报道也相符;关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区的测序结果显示其包含 MEF-1 元件的核心序列 5'-CANNTG-3' (N 代表任何一种碱基)^[14], 进一步证明关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区含有 MEF-1 元件。

MEF-1 和 MEF-2 元件在肌肉特异性启动子中具有重要的转录调控作用。H. Weintraub 等^[19] 研究发现,多数肌肉特异基因的上游调控区域存在 MEF-1 元件,该元件被碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 家族蛋白识别激活后发挥其调控作用,bHLH 结构主要存在于生肌调控家族因子中,如 MyoD、Myf5、Myogenin 和 MRF4,它们在骨骼肌生长和发育过程中起着至关重要的作用。有研究表明,具有 bHLH 结构域的 MyoD 蛋白能与靶基因启动子区的 MEF-1 等顺式作用元件结合而促进靶基因特异性转录,进而促进肌纤维的形成^[20],这可能与 *MyoDI* 能激活自身的表达^[4] 有关,对于保持成肌作用具有重要意义。M. J. Potthoff 等^[21] 在骨骼肌细胞的研究中发现 MEF2 与含 bHLH 结构的转录因子协同调控肌肉基因的表达并起始生肌分化;P. M. Cunha 等^[22] 研究发现,锌指结构转录因子 lame duck 可以与 MEF2 因子物理性协同结合,从而使转录因子 MEF2 更紧密地结合在肌肉特异性基因启动子的 MEF-2 元件上并驱使肌管融合;突变锌指结构转录因子或 MEF2 后均可阻碍肌管的融合。

Pax3/7 元件主要存在于生肌调控因子 MRF 基因启动子的上游调控区,发挥着起始 MRF 基因表达的作用,在胚胎的骨骼肌发育中起至关重要的作用^[14] 研究表明,当 Pax3 和 Myf5 均发生突变时,会导致骨骼肌细胞分化的失败^[23-24];缺少 Pax3 和 Pax7 这两种转录因子的小鼠,其后期肌肉发育失败^[25]。M. Buckingham 等^[26] 推断出 Pax3/7 复合物表达量的提高能加强生肌调控因子 MRF 对肌卫星细胞的激活、增殖并分化为肌纤维的指导;S.

Kuang 等^[27] 推断 Pax3/7 复合物在成体骨骼肌中具有肌肉修复和再生的潜在功能;P. Hu 等^[28] 发现 Pax3/7 复合物能与转录因子 FoxO3 协同激活成肌细胞 C2C12 中 *MyoD* 的表达,从而调控骨骼肌细胞的分化。

另外,转录因子 MyoD 能与 TCAP 基因启动子区的 DNA 序列结合,从而激活 TCAP 基因的表达,有利于肌原纤维的组装和成熟肌纤维的形成^[29],这些研究表明转录因子之间及与其相应的上游调控元件之间的相互作用对基因表达有着重要的作用。

本试验筛选出的转录因子结合位点 MyoD、MEF1、Pax3 和 MEF2 与上述报道相符,说明本试验的结果可靠,试验结果为后续深入研究这些转录因子对 *MyoDI* 基因启动子启动活性的影响研究奠定了理论基础,并为进一步了解 *MyoDI* 基因转录调控机制和表达机制提供依据。

4 结 论

本试验成功克隆了关岭牛 *MyoDI* 基因启动子区,并构建了 pUCm-T-*MyoDI*-pro 重组质粒,提取出关岭牛肌肉组织的细胞核提取物并测定出其浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。利用扩增出的关岭牛 *MyoD* I 基因启动子区、关岭牛肌肉组织的细胞核提取物和转录因子结合试剂盒进行筛选试验,再结合在线软件的分析,最后筛选出关岭牛 *MyoDI* 基因启动子上有 MyoD、TFIID、Pax3、MEF1、MEF2、VDR 转录因子结合位点,为后续的试验研究提供方向。

参考文献 (References):

- [1] ALVES H J, ALVARES L E, GABRIEL J E. Influence of the neural tube/notochord complex on MyoD expression and cellular proliferation in chicken embryos[J]. *Brazilian J Med Biol Res*, 2003, 36 (2): 191-197.
- [2] 田 璐,李俊雅,许尚忠,等. 动物生肌决定因子的研究进展[J]. 黄牛杂志, 2005, (1): 43-46.
TIAN L, LI J Y, XU S Z, et al. Research progress of animal Myostatin gene[J]. *Journal of Yellow Cattle Science*, 2005, (1): 43-46. (in Chinese)
- [3] 邱海芳,汪 超,张庆德,等. 猪 MyoDI 基因的多态性检测及与肉质性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29 (5): 593-596.
QIU H F, WANG C, ZHANG Q D, et al. PCR-RFLP polymorphism detection and relationship with meat

- quality traits of MyoD1 gene in pig[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(5): 593-596. (in Chinese)
- [4] 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)
- [5] 李永平, 梁炳生. MyoD 肌形成作用机制研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(1): 37-40. LI Y P, LIANG B S. Progress of muscle formation mechanism of MyoD[J]. *International Journal of Orthopaedics*, 2007, 28(1): 37-40. (in Chinese)
- [6] 李飞, 许厚强, 陈伟, 等. 关岭牛 MyoD I 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)
- [7] KNEŽEVIĆ D, ĐURKIN I, KUŠEĆ G, et al. Influence of C489T SNP at MYOD1 gene on carcass, meat quality traits and chemical composition of hybrid pigs[J]. *ACS*, 2013, 78(3): 193-196.
- [8] 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 F, 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)
- [9] GALICIA V G, DI M S, LIAN X J, et al. Regulation of eukaryotic initiation factor 4AII by MyoD during murine Myogenic cell differentiation[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e87237.
- [10] 罗启华, 王安娜. 贵州关岭黄牛发展现状与思考[J]. 草食家畜, 2011, (4): 15-16. LUO Q H, WANG A N. Guizhou Guanling cattle development status and thinking [J]. *Gress-feeding Livestock*, 2011, (4): 15-16. (in Chinese)
- [11] 闫晓红, 王宁. 转录因子与 microRNA 在基因表达调控中的功能联系及差异[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 10: 892-897. YAN X H, WANG N. Connections and differences between gene expression regulated by transcription factors and MicroRNAs[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 10: 892-897. (in Chinese)
- [12] 张娜, 尹继刚, 孙高超, 等. 真核生物转录因子及其研究方法进展[J]. 动物医学进展, 2009, (1): 75-79. ZHANG N, YIN J G, SUN G C, et al. Progress on transcription factors and their methods of study in eukaryon[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, (1): 75-79. (in Chinese)
- [13] 赵丹丹, 刘聪聪, 贾明玉, 等. 肌肉特异性基因启动子的上游转录调控元件研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, (5): 103-108. ZHAO D D, LIU C C, JIA M Y, et al. Progress of upstream transcriptional control elements in promoters of skeletal specific genes[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, (5): 103-108. (in Chinese)
- [14] 王秋华, 曹允考, 李树峰, 等. 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, et al. Cloning and preliminary functional analysis of bovine MyoG promoter[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(1): 37-43. (in Chinese)
- [15] BRYANTSEV A L, BAKER P W, LOVATO T L. Differential requirements for Myocyte Enhancer Factor-2 during adult Myogenesis in *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 2012, 361(2): 191-207.
- [16] DODOU E, XU S M, BLACK B L. MEF2c is activated directly by Myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development *in vivo*[J]. *Mech Dev*, 2003, 120(9): 1021-1032.
- [17] HENNEBRY A, BERRY C, SIRIETT V. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(3): C525-C534.
- [18] JUNG S Y, KO Y G. TRIM72, a novel negative feedback regulator of Myogenesis, is transcriptionally activated by the synergism of MyoD (or Myogenin) and MEF2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 238-245.
- [19] WEINTRAUB H, DAVIS R, LOCKSHON D, et al. MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: Occupancy of two sites is required for activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87(15): 5623-5627.
- [20] KNOLL A, NEBOLA M, DVORKA J, et al. Detection of a Dde I PCR-RFLP within intron 1 of the porcine (MYF3) locus[J]. *Anim Genet*, 1997, 28(4): 308-322.

- [21] POTTHOFF M J, OLSON E N. MEF2: A central regulator of diverse developmental programs[J]. *Development*, 2007, 134(23): 4131-4140.
- [22] CUNHA P M, SANDMANN T, GUSTAFSON E H, et al. Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses; Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(7): e1001014.
- [23] GOULDING M, LUMSDEN A, PAQUETTE A J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development[J]. *Development*, 1994, 120: 957-971.
- [24] TAJBAKHSI S, ROEANEOURT D, COSSU G, et al. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis; Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD[J]. *Cell*, 1997, 89: 127-138.
- [25] RELAIX F, ROCANCOURT D, MANSOURI A, et al. Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells[J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 948-953.
- [26] BUCKINGHAM M, RELAIX F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs; Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 645-673.
- [27] KUANG S, CHARGE S B, SEALE P, et al. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis[J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(1): 103-113.
- [28] HU P, GELES K G, PAIK J H, et al. Co-dependent activators direct myoblast specific MyoD transcription [J]. *Cell*, 2008, 15(4): 534-546.
- [29] 吴俊静, 梅书棋, 彭先文, 等. 肉质相关基因 TCAP 启动子与转录因子 MyoD 结合的 ChIP 分析[J]. *湖北农业科学*, 2013, 22: 5612-5614, 5617.
- WU J J, MEI S Q, PENG X W, et al. Detection of MyoD transcription factor binding with TCAP gene promoter by chromatin immunoprecipitation[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 22: 5612-5614, 5617. (in Chinese)

(编辑 郭云雁)