

鳊鱼生肌调节因子基因(*mrf4*)的克隆 及其在成鱼和胚胎中的表达

李虹辉¹, 许友卿¹, 刘小燕^{2*}, 刘知行², 王开卓³, 褚武英³, 张建社³, 丁兆坤^{1*}

(1.广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004; 2.湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;
3.长沙学院生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003)

摘 要: 为分析鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)生肌调节因子基因(*mrf4*)的特征, 阐明其在鳊鱼不同组织以及胚胎发育不同时期的表达规律, 用反转录 PCR 法扩增鳊鱼 *mrf4* 的 cDNA 序列, 并将其连入克隆载体, 进行测序、分析; 用荧光定量 PCR 检测 *mrf4* 基因在不同组织及胚胎发育不同阶段的表达情况。结果: 克隆的鳊鱼 *mrf4* cDNA 全长为 726 bp, 编码的蛋白质含 241 个氨基酸, 具有生肌调节因子的典型的碱性螺旋-环-螺旋结构; *mrf4* 在成体鳊鱼白肌、红肌、心脏、脑以及不同发育阶段的胚胎中均有表达, 在红肌中的表达量显著高于在其他组织中的表达量 ($P<0.05$); 在胚胎发育阶段的原肠期、尾芽期、肌肉效应期, *mrf4* 的表达量呈递增趋势, 而在胚胎发育的心搏期、血液循环期、仔鱼期, *mrf4* 的表达量呈递减趋势, 肌肉效应期 *mrf4* 的表达量明显高于胚胎发育的其他阶段的 *mrf4* 表达量 ($P<0.05$)。

关 键 词: 鳊鱼; 生肌调节因子基因(*mrf4*); 克隆; 表达分析

中图分类号: S965.1; Q781

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0631-05

Molecular cloning of myogenic regulatory factor 4 gene (*mrf4*) and its expression in adult and embryonic mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)

LI Hong-hui¹, XU You-qing¹, LIU Xiao-yan^{2*}, LIU Zhi-xing², WANG Kai-zhuo³,

CHU Wu-ying³, ZHANG Jian-she³, DING Zhao-kun^{1*}

(1.College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2.College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3.Department of Bioengineering and Environmental Sciences, Changsha University, Changsha 410003, China)

Abstract: To reveal the characteristics of the *mrf4* gene in the mandarin fish and analyze the expression pattern of *mrf4* in different tissues of the adult mandarin fish and in embryos from different developing stages. Reverse transcriptional PCR was used to amplify the *mrf4* cDNA sequence of mandarin fish, which was inserted into a cloning vector and sequenced. Quantitative real-time PCR was conducted on samples from different tissues of adult mandarin fish and from embryos of different stages. The results show that the *mrf4* gene of mandarin fish is 726 bp in length and encodes 241 amino acids which form a basic helix-loop-helix (bHLH). Expression of *mrf4* gene was observed in all tested samples including white muscle, red muscle, heart and brain of adult mandarin fish and embryos of different stages. Among the tissue from adult mandarin fish, *mrf4* gene expression in red muscle was significantly higher than that in the other tissues ($P<0.05$). For embryos, the expression of the *mrf4* increased from the gastrular stage to muscular effect stage, and decreased from the cardiac stage to larval fish with expression in muscular effect stage the highest, which is significantly higher than samples

收稿日期: 2013-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(31230076; 31072195)

作者简介: 李虹辉(1989—), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养、生理生化与分子生物学研究, lee19890925@163;

*通信作者, liuxy186@163.com; zhaokund@hotmail.com

from other stages ($P < 0.05$).

Key words: *Siniperca chuatsi*; myogenic regulatory factor 4 gene (*mrf4*); cloning; expression analysis

生肌调节因子 4(myogenic regulatory factor 4, MRF4)是生肌调节因子家族的成员,可与普遍表达的免疫球蛋白增强子结合因子(E2A)基因产物 E12 和 E47 等形成异二聚体,并结合于靶基因上游启动子和增强子,通过反式激活作用,促进肌肉特异基因的表达^[1-3];可诱导成肌细胞分化融合成肌管、促进肌纤维的形成并且维持肌肉的表型,可作为生长和肉质调控的候选基因^[4-7]。Miner 等^[8]利用人 *mrf4* 基因 cDNA 从小鼠基因组文库分离出 *mrf4* 基因。Hinterberger 等^[9]克隆了大鼠 *mrf4* 基因,人类 *mrf4* 基因位于 12 号染色体上^[10]。Gaspara 等^[11]在对爪蟾 *mrf4* 的研究中发现,它有 2 个 *mrf4* 基因,而且它们在胚胎发育以及肌肉再生过程中的表达模式互不相同,并且主要在后期的肌肉分化过程中起作用。

目前,对鱼类 *mrf4* 的研究还不广泛,仅有斑马鱼^[12]、牙鲆^[13]、斜带石斑鱼^[14]和鲤鱼^[15]中 *mrf4* 的相关报道。本研究根据石斑鱼 *mrf4* 基因设计引物,从鳊鱼 RNA 中克隆 *mrf4* 并探究 *mrf4* 在不同组织、不同胚胎发育阶段的表达规律,以期为理解和研究生肌调节因子家族对鳊鱼肌肉生长和肉质调控的作用提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试鱼:鳊鱼成鱼购自长沙洪山桥水产市场。解剖 4 条鳊鱼,取新鲜白肌、红肌、心脏、脑等,用液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱,备用。受精后的原肠期、尾芽期、肌肉效应期、心搏期、血液循环期、仔鱼期等不同发育阶段的胚胎各 100 枚(由湖南省水产所鳊鱼原种场提供)直接放入 Trizol(购自 Invitrogen 公司)试剂,并保存于 -80°C 冰箱。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取鳊鱼的白肌、红肌、心脏、脑组织以及不

同发育阶段的胚胎,用 Trizol 法提取总 RNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和纯度,保证其 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}=1.8 \sim 2.0$ 。以总 RNA 为模板,按反转录试剂盒(购自东洋纺生物科技有限公司)的说明进行 cDNA 第一链的合成。

1.3 *mrf4* cDNA 的克隆

根据 NCBI 中石斑鱼(*Epinephelus coioides*) *mrf4* 基因序列(GenBank 登录号为 HM190248),用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *mrf4*-F(5'-ATGATGGACCTTTTGTGAGACCAACCCTTA-3'), *mrf4*-R(5'-AGTTTTCGGAGATGTCCTCGCTGAA GTTG-3')用于鳊鱼 *mrf4* 的扩增。PCR 反应体系:无菌水 $15.25\ \mu\text{L}$, dNTP Mixture ($2.5\ \text{mmol/L}$) $4\ \mu\text{L}$, $10\times\text{LA PCR Buffer II}(\text{Mg}^{2+}\text{ Plus})\ 2.5\ \mu\text{L}$, 成鱼 cDNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, 引物 *mrf4*-F 和 *mrf4*-R(浓度 $10\ \mu\text{mol/mL}$)各 $1\ \mu\text{L}$, LA Taq 酶($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 $4\ \text{min}$; 94°C 变性 $30\ \text{s}$, 58°C 退火 $30\ \text{s}$, 72°C 延伸 $2\ \text{min}$, 共进行 35 个循环;最后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 OMEGA 纯化试剂盒进行胶回收。回收产物连接于 pMD[®]19-T Vector(购自宝生物工程(中国)有限公司),转化大肠杆菌(DH5 α)感受态细胞。转化后用 PCR 筛选转化子,经鉴定的阳性克隆送上海铂尚生物公司测序。测得序列用 DNA man 软件进行比对分析,用 MEGA 5.1 制作系统进化树。

1.4 鳊鱼 *mrf4* 基因在不同组织及不同胚胎发育阶段的表达分析

根据鳊鱼 β -actin 基因序列(GenBank 登录号为 AY885683)用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR(qPCR)内参引物: $\beta\text{F}(5'\text{-TGCGTGACATCAAG GAGAAGC-}3')$, $\beta\text{R}(5'\text{-GAGGAAGGAAGGCTGGA AGAG-}3')$,预期扩增片段的长度为 176 bp。在所得鳊鱼 *mrf4* 基因的 ORF 区域内设计引物, MF(5'-

AGACCAACCCTTATCTTTTCAATG-3'), MR(5'-CGGTCTCGGACGGAACATTAT-3'), 预期扩增片段的长度为 153 bp。分别以鳊鱼(白肌、红肌、心脏、脑组织)及胚胎的(原肠期、尾芽期、肌肉效应期、心搏期、血液循环期、仔鱼期)cDNA 为模板, 用设计的引物进行 qPCR 检测。qPCR 反应体系: 2×SYBR® Premix Ex Taq™(购自宝生物工程有限公司)12.5 μL, dH₂O 10 μL, cDNA 1 μL, 50×ROX Reference Dye 0.5 μL, 上、下游引物各 0.5 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 3 s, 62 °C 退火 20 s, 40 个循环; 绘制溶解曲线的温度为 65~95 °C, 每 0.05 °C 读板 1 次; 反应结束后所得试验数据用 Excel 2007 软件进行初步处理, 并参照文献[16]的方法计算目的基因的表达量, 每个样品设置 3 个

生物学重复, 3 个技术性重复。

1.5 数据分析

荧光定量数据采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *mrf4* cDNA 序列和推导的氨基酸序列的分析

经 TA 克隆获得了鳊鱼 *mrf4* 基因的 cDNA (GenBank 登录号为 JX682564), 其序列长度为 726 bp, 包括完整的开放阅读框, 编码 241 个氨基酸, 第 96 至 147 个氨基酸构成碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域。此结构域与其他物种的 bHLH 具有高度保守性(图 1)。

<i>Siniperca chuatsi</i>	ESSGEEHVLAPPGLRA-HCDGQCLMWACKICKRKSAPTDRRKAATLRERRRLKKINEAFD
<i>Epinephelus coioides</i>-.....
<i>Trachidermus fasciatus</i>-.....V.....E
<i>Sparus aurata</i>-..E.....
<i>Takifugu rubripes</i>	...D.....S...E.....
<i>Xenopus laevis</i>	DR.E.....QP...P...I...T.....E
<i>Gallus gallus</i>	D.....QPP...P...I...T.....E
<i>Homo sapiens</i>	D.....QPP...P...I...T.....E
<i>Siniperca chuatsi</i>	ALKRKTVANPNQRLPKVEILRSAISYIERLQDLLQTLDEQKTQKGSSHNFNVKEHSGTS
<i>Epinephelus coioides</i>L.....-N.....K-...VA.
<i>Trachidermus fasciatus</i>	V.....G.....P.N..T.KY-...VAG
<i>Sparus aurata</i>P.....E.....D.-N...S.KG...TVA.
<i>Takifugu rubripes</i>RS.S.A.DTR.D..QNRP.
<i>Xenopus laevis</i>	...R.....N.....HS..Q.D.P..ADEEP.SYNSKEAPV
<i>Gallus gallus</i>	...R.....HR..Q.D.M.EVAADP.SFSPKQ.NV
<i>Homo sapiens</i>	...R.....HR..Q...M.ELGVDP.SYRPKQENL

“ ” 表示碱性区; 阴影区域表示高度保守的 bHLH; “.” 代表相同的氨基酸; “-” 代表比对空缺的部分。

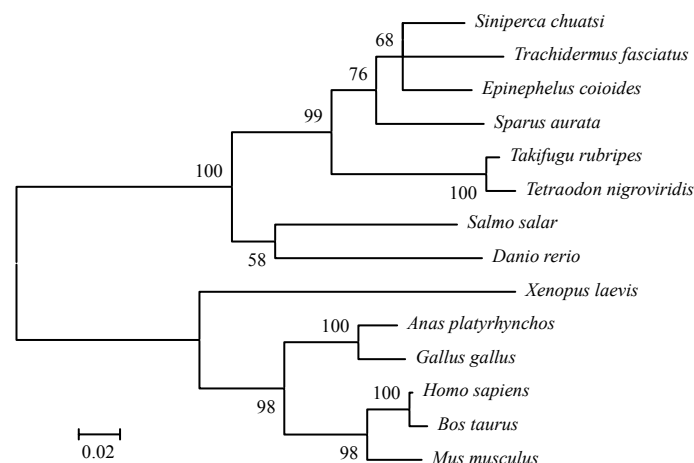
图 1 鳊鱼 MRF4 蛋白与其他脊椎动物 MRF4 同源序列比对

Fig. 1 Sequence alignments of mandarin fish MRF4 and other vertebrate MRF4 homologs

2.2 种间系统进化树的构建

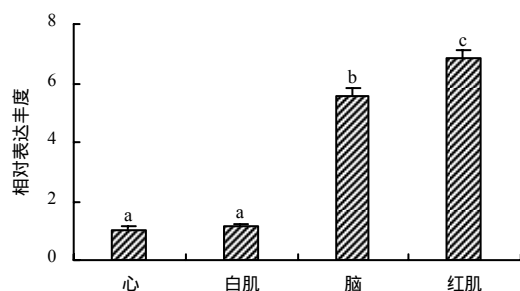
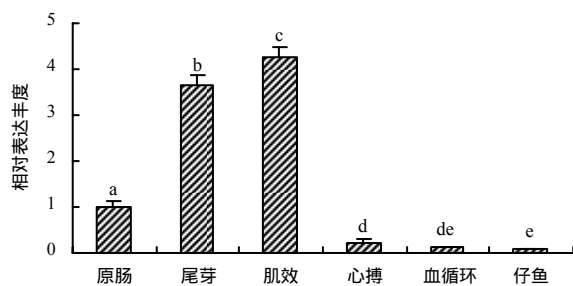
由图 2 可见, 鳊鱼 *mrf4* 与其他鱼类等低等脊椎动物的 *mrf4* 构成 1 个分支, 而非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、鸡 (*Gallus gallus*)、绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*)、牛(*Bos taurus*)、家鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的 *mrf4* 构成另外 1 个分支。由图 2 还可知, 鳊鱼与同为鲈形目鲈科的松江鲈鱼

(*Trachidermus fasciatus*)和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)的亲缘关系最近, 与金头鲷(*Sparus aurata*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)和黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)的亲缘关系稍远, 而与大西洋鲑(*Salmo salar*)和斑马鱼(*Danio rerio*)的亲缘关系最远。

图2 鳊鱼 *mrf4* 基因与其他物种 *mrf4* 的系统进化分析Fig.2 Phylogenetic analysis of mandarin fish *mrf4* with *mrf4* of other species

2.3 鳊鱼 *mrf4* 基因在组织以及胚胎发育阶段的表达差异

qPCR 的结果显示：成体鳊鱼中，*mrf4* 在红肌和脑组织中表达水平较高，在白肌与心脏中的表达相对较低(图 3)。在胚胎发育中，*mrf4* 在胚胎原肠期、尾芽期、肌肉效应期的表达呈递增趋势，在心搏期、血液循环期、仔鱼期的表达呈递减趋势。在胚胎发育阶段，肌肉效应期的 *mrf4* 表达最高，与原肠期、尾芽期、心搏期、血液循环期和仔鱼期的 *mrf4* 表达量之间的差异具有统计学意义(图 4)。

图3 鳊鱼 *mrf4* 在不同组织中的 mRNA 相对表达丰度Fig.3 The abundance of *mrf4* mRNA expression in different tissues of mandarin fish图4 鳊鱼 *mrf4* 在胚胎不同阶段的 mRNA 相对表达丰度Fig.4 The abundance of *mrf4* mRNA expression in different embryo stages of mandarin fish

3 讨论

本研究所得鳊鱼 *mrf4* cDNA 序列其编码的蛋白质与各物种的 *mrf4* 基因编码的蛋白质具有相似的结构。由系统进化树可见，鳊鱼 *mrf4* 与同属鲈形目的松江鲈和斜带石斑鱼在同一分支，说明其亲缘关系最近。鱼类 *mrf4* 与非洲爪蟾、鸡、绿头鸭、牛、家鼠以及人的同源性较低，推测与物种进化和亲缘关系有关。刘春伟等^[17]研究表明，可能由于进化程度不同，在哺乳动物中导致氧化型低密度脂蛋白受体 1 基因(*olrl*)在不同物种间同源性相差较大。

鳊鱼 *mrf4* 在白肌、红肌、心脏、脑组织中都有表达，其中以在红肌中的表达量最高，在脑中的表达量次之。笔者推测成体鳊鱼的 *mrf4* 基因可能在红肌组织维持和神经系统的调控中具有重要作用，但作用机理有待进一步研究。

鳊鱼胚胎发育按发育阶段可分为受精阶段、卵裂阶段、囊胚阶段、原肠胚阶段、神经胚阶段、器官形成阶段和孵化阶段^[18]。生肌调节因子 *mrf4* 主要在调控成肌细胞分化为成熟肌纤维过程中起重要作用^[19]。*mrf4* 在鱼类胚胎发育过程中的表达具有阶段性，如在牙鲈胚胎发育中，发现 *mrf4* 首先在胚后 4 h 表达量很低，随着发育的进行，其表达量慢慢升高，到胚后 23 h，表达量较高，直到仔鱼出膜，*mrf4* 的表达都维持在较高水平，而在出膜后 23 d 仍能检测到它的高水平表达^[20]，说明 *mrf4* 在牙鲈肌肉发育的后期分化过程起调节作用。2004 年，陈曜鸿^[21]发现

斑马鱼中存在2种类型的 *mrf4* (*mrf4-I* 及 *mrf4-II*) , 其中 *mrf4-I* 从体节中期开始被检测到表达且逐渐增强, 而 *mrf4-II* 在整个肌节形成时期都被检测到表达。Schnapp 等^[22]发现斑马鱼中, *mrf4* 也在体节出现时期开始表达。本研究发现, 在鳊鱼胚胎发育过程中, *mrf4* 从原肠期至肌肉效应期开始大量表达, 而肌肉是从原肠胚阶段的中胚层分化而来, 因此推测鳊鱼生肌调节因子 *mrf4* 在原肠胚、尾芽期及肌效应期的大量表达可能与肌肉的分化有关。*mrf4* 从心搏期开始表达量下降, 此时肌节已经形成, 肌肉的分化已经完成, 说明它在肌肉形成后的表达活性下降, 此时 *mrf4* 的主要作用可能是维持肌肉细胞的稳定。

参考文献:

- [1] Olson E N, Brennan T J, Chakraborty T, et al. Molecular control of myogenesis: Antagonism between growth and differentiation[J]. Mol Cell Biochem, 1991, 104(1/2): 7-13.
- [2] Buckingham M. Molecular biology of muscle development[J]. Cell, 1994, 78: 15-21.
- [3] Yun K, Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: Story of a core regulatory network and its context[J]. Current Opinion in Cell Biology, 1996, 8(6): 877-889.
- [4] Hughes S M, Schiaffino S. Control of muscle fiber size: A crucial factor in ageing[J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1999, 167(4): 307-312.
- [5] Sabourin L A, Rudnicki M A. The molecular regulation of myogenesis[J]. Clinical Genetics, 2000, 57(1): 16-25.
- [6] Sumariwalla V M, Klein W H. Similar myogenic functions for myogenin and *mrf4* but not *myod* in differentiated murine embryonic stem cells[J]. Genesis, 2001, 30(4): 239-249.
- [7] Maak S, Neumann K, Swalve H H. Identification and analysis of putative regulatory sequences for the *myf5/myf6* locus in different vertebrate species[J]. Gene, 2006, 379(1): 141-147.
- [8] Miner J H, Wold B. *Herculin*, a fourth member of the *myod* family of myogenic regulatory genes[J]. PNAS, 1990, 87(3): 1089-1093.
- [9] Hinterberger T J, Mays J L, Konieczny S F. Structure and myofiber-specific expression of the rat muscle regulatory gene *mrf4*[J]. Gene, 1992, 117(2): 201-207.
- [10] Braun T, Bober E, Winter B, et al. *myf-6*, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: Evidence for a gene cluster on chromosome 12[J]. EMBO J, 1990, 9(3): 821-831.
- [11] Gaspera B D, Sequeira I, Charbonnier F, et al. Spatio-temporal expression of *mrf4* transcripts and protein during *Xenopus laevis* embryogenesis[J]. Dev Dyn, 2006, 235(2): 524-529.
- [12] Hinitz Y, Osborn D P S, Carvajal J J, et al. *mrf4(myf6)* is dynamically expressed in differentiated zebrafish skeletal muscle[J]. Gene Expr Patterns, 2007, 7(7): 738-745.
- [13] 徐芑. 牙鲆成肌因子 *myogenin* 和 *mrf4* 的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院海洋研究所, 2007.
- [14] 桑庆. 斜带石斑鱼四种生肌调节因子基因的 cDNA 克隆及其表达模式分析[D]. 广州: 中山大学生命科学学院, 2010.
- [15] 林亚秋, 吉红, 郑玉才, 等. 鲤 *myf-6* 基因的克隆及其表达分析[J]. 西北农业学报, 2010, 19(9): 16-20.
- [16] 周瑞雪, 黄斌, 蒙涛, 等. 鳊碱性肌球蛋白轻链基因 cDNA 的克隆及其发育表达分析[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 927-934.
- [17] 刘春伟, 孙超. 猪 *OLR1* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5): 51-55.
- [18] 刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鳊的人工繁殖与胚胎发育观察[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2013, 31(2): 100-106.
- [19] 王守立, 杨光华, 步宏, 等. 人胚成肌细胞体外培养的生物学特性研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(2): 246-250.
- [20] Hinierberger T J, Sassoon D A, Rhodes S J, et al. Expression of the muscle regulatory factor *mrf4* during somite and skeletal myofiber development[J]. Developmental Biology, 1991, 147(1): 144-156.
- [21] 陈曜鸿. 两型斑马鱼肌肉调控因子 *mrf4-I* 及 *mrf4-II* 的分子结构、在胚胎早期发育的角色、转录调控与启动子分析[D]. 台北: 国立台湾大学分子与细胞生物学研究所, 2006.
- [22] Schnapp E, Pistocchi S A, Karampetsou E, et al. Induced early expression of *mrf4* but not *myog* rescues myogenesis in the *myod/myf5* double-morphant zebrafish embryo[J]. Journal of Cell Science, 2009, 122(4): 481-488.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维