

研究报告

Research Report

关岭牛 *MyoD* 基因启动子报告质粒的构建及活性验证

李飞^{1,2} 许厚强^{2*} 陈伟² 陈祥² 刘敏^{1,2} 桓聪聪²

1 贵州大学生命科学学院, 贵阳, 550025; 2 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, 贵阳, 550025

* 通讯作者, houqiang0524@yahoo.com

摘要 为了克隆关岭牛 *MyoD* 基因启动子并验证其启动活性, 根据 GenBank 中牛的 *MyoD* 基因序列设计 PCR 引物, 用 PCR 技术扩增牛 *MyoD* 基因的启动子, 构建重组克隆载体 pUCmT-*MyoD*, 并通过 PCR 扩增、限制性酶切、测序及生物信息学分析对阳性克隆进行鉴定; 构建报告质粒 pGL3-*MyoD*, 并将其转染小鼠 C2C12、3T3-L1 细胞系, 检测其 24 h 后的双荧光素酶活性。实验结果获得了关岭牛 *MyoD* 基因启动子, 其序列长度为 993 bp, 并成功构建了 *MyoD* 启动子报告质粒; 双荧光素酶活性检测表明 pGL3-*MyoD* 在小鼠 C2C12 细胞中的表达是 pGL3 空载体 40.65 倍, 在小鼠 3T3-L1 细胞中的表达是空载体的 1.13 倍, *MyoD* 启动子在小鼠 C2C12 细胞中的表达高于 3T3-L1 细胞 (** $p < 0.01$)。结果表明关岭牛 *MyoD* 基因启动子具有启动活性, 在小鼠骨骼肌细胞中特异性表达。

关键词 *MyoD* 基因, 启动子, 荧光素酶, C2C12, 3T3-L1

Verification of Activity and Construction of the Report Plasmid of *MyoD* Gene Promoter in Guanling Cattle

Li Fei^{1,2} Xu Houqiang^{2*} Chen Wei² Chen Xiang² Liu Min^{1,2} Huan Congcong²

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

* Corresponding author, houqiang0524@yahoo.com

DOI: 10.3969/gab.032.000459

Abstract To verify the promoter activity of the *MyoD* gene by cloning promoter from the Guanling cattle, according to the *MyoD* gene sequence of cattle in GenBank, the PCR primers were designed. The gene promoter was amplified by using PCR technology to construct the recombinant cloning vector pUCmT-*MyoD*, and then identified the positive clones by the PCR amplifying, restriction enzymes analysis and bioinformatics analysis. The report plasmid pGL3-*MyoD* was constructed and transfected into the C2C12 and 3T3-L1 cells of mouse to detect the dual luciferase activity after 24 hours. We obtained the promoter of *MyoD* was obtained, and its sequence length was 993 bp. The report plasmid of *MyoD* gene promoter was constructed successfully. The expression of pGL3-*MyoD* was 40.65 times of pGL3 empty vector in mouse C2C12 cell, and was 1.13 times in 3T3-L1 cell through the method of relative activity of luciferase, which indicated that the expression of *MyoD* gene promoter in C2C12 cell was higher than that of 3T3-L1 cell in mouse (** $p < 0.01$). The results showed that the *MyoD* gene promoter of Guanling cattle contains the promoter activity and can specifically express in skeletal muscle cells.

Keywords *MyoD* genes, Promoter, Luciferase, C2C12, 3T3-L1

MRFs 家族由 *Myf4*、*Myf5*、*MyoG* 和 *MyoD* 组成, 控制肌肉的生成, *MyoD* (myogenic differentiation) 成, 它们是控制骨骼肌生成的关键调节因子, 共同控制骨骼肌生成, 基因便是其中之一(杨明娟和陈宏, 2010)。研究表明,

基金项目: 本研究由国家转基因生物新品种培育科技重大专项课题《牛组织特异性调控元件克隆和功能验证》(2011ZX0800-9004)、贵州省科技厅农业攻关计划《影响牛脂肪沉积组织特异性调控元件克隆和功能验证》(黔科 NY 字[2012]3008 号)和贵州大学研究生创新基金(校农科 2012007)项目共同资助

这些肌肉特异性转录因子与肌肉生长和肉质有着密切的关系。肌分化因子 *MyoD* 原名为 *MyoD* ,1987 年首次被克隆。*MyoD* 是在骨骼肌生成和再生时表达的一个转化因子,调节肌肉特异基因表达。近年来,它成为动物肉质改良育种的重要研究部分(黄萌等,2007)。赵金红等(2008)在我国地方黄牛 *MyoD* 第 1 外显子上发现了新的等位基因。目前,在国内外,该基因在小鼠、鸡和猪的肌细胞生成的表达调控机制方面研究较多,在牛上已有一些研究,包括遗传变异及功能研究等,但主要集中在转录后和翻译水平。*MyoD* 基因转录调控的分子机制尚不清楚(李永平和梁炳生,2007)。贵州关岭牛,体质结实,肢蹄强健,行动灵活,耐劳、耐旱、耐粗饲、适应性强等特性显著,是广大农户乐于饲养的地方牛品种,关岭牛是一个适宜山区耕作和放牧,有较好的挽力和产肉性能,数量多,商品率高的地方品种,但是目前存在着繁殖率低、个体小、体重轻等问题(罗启华和王安娜,2011)。

因此,本研究克隆了关岭牛 *MyoD* 基因启动子区,并对该启动子进行了生物信息学分析。根据分析结果,构建启动子 PGL3-*MyoD* 表达载体,通过瞬时转染小鼠成肌细胞和小鼠胚胎成纤维细胞,检测启动子的活性及骨骼肌特异性,以期为牛产肉性状及牛 *MyoD* 基因表达与调控等方面的研究提供理论依据。

1 结果与分析

1.1 PCR 扩增关岭牛 *MyoD* 基因的启动子并对其酶切鉴定

PCR 得到的片段长约 993 bp,与预期扩增片段长度一致。图 1 图所示,扩增到约 993 bp 的片段,表明重组质粒中插入的目的序列正确。酶切后得到了长约 993 bp 的特异目的条带,与大小约 2 773 bp 的载体片段,表明目的序列正确插入载体并且插入方向正确,重组质粒构建成功。见图 3。

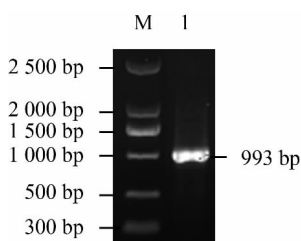


图 1 *MyoD* 基因启动子 PCR 扩增产物电泳结果

注: M: DNA Marker ; 1: PCR 扩增产物

Figure 1 Results of bovine *MyoD* gene PCR amplification

Note: M: DNA Marker ; 1: PCR amplification product

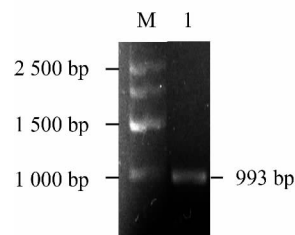


图 2 重组质粒 pUCm-T-*MyoD* 的 PCR 扩增

注: M: DNA Marker ; 1: 重组质粒 pUCm-T-*MyoD* 的 PCR 产物

Figure 2 Amplification the recombinant plasmid of pUCm-T-*MyoD* by PCR

Note: M: DNA Marker ; 1: PCR product of pUCm-T-*MyoD* recombinant plasmid

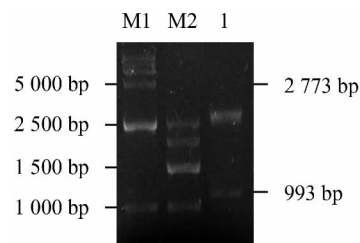


图 3 重组质粒 pUCm-T-*MyoD* 的双酶切鉴定(*Kpn* ; *Xho*)

注: M1: DNA Marker D15000; M2: DNA Marker ; 1: 重组质粒 pUCm-T-*MyoD* 的双酶切鉴定结果

Figure 3 The verification of pUCm-T-*MyoD* recombinant plasmid by enzyme digestion (*Kpn* ; *Xho*)

Note: M1: DNA Marker D15000; M2: DNA Marker ; 1: The result of restriction two enzyme digestion of pUCm-T-*MyoD* recombinant plasmid

1.2 重组克隆载体 pGL3-Basic-*MyoD* 的构建及鉴定

经 PCR 和双酶切、测序鉴定,成功完成 pGL3-Basic-*MyoD* 重组体的构建。图 4 结果显示重组真核表达质粒 pGL3-Basic-*MyoD* 大小约 5 811 bp,说明目的片段正确插入真核表达载体 pGL3-Basic 中,提取质粒正确,重组质粒构建成功。图 5 结果表明,用重组质粒 pGL3-Basic-*MyoD* 作为模板进行 PCR 后,片段大小约 993 bp 与目的片段大小相符,说明目的片段正确插入真核表达载体 pGL3-Basic 中。图 6 的结果表明,用酶 *Xho* 和 *Kpn* 对重组质粒 pGL3-Basic-*MyoD* 进行酶切后,得到约为 993 bp 目的片段与约 4 818 bp 的载体片段,说明目的片段正确插入真核表达载体 pGL3-Basic 中并且插入方向正确,重组质粒构建成功。

1.3 重组真核质粒 pGL3-Basic-*MyoD* 转染小鼠 C2C12、3T3-L1 细胞双荧光素酶活性检测结果

由图 7 可见,将 pGL3-Basic、PRL-TK 和 pGL-3-



图4 重组质粒 pGL3-Basic-MyoD
注: M: DNA Marker D15000; 1: pGL3-Basic-MyoD
Figure 4 Recombinant plasmid pGL3-Basic-MyoD
Note: M: DNA Marker D15000; 1: pGL3-Basic-MyoD

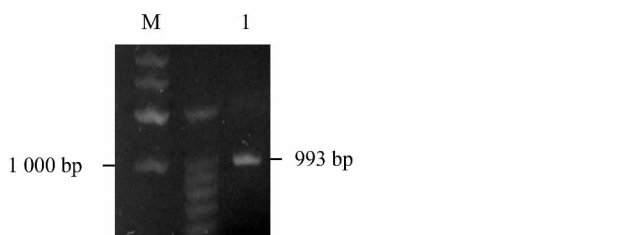


图5 重组质粒 pGL3-Basic-MyoD 为模板的 PCR 扩增
注: M: DNA Marker ; 1: 重组质粒 PGL3-Basic-MyoD 的 PCR 产物
Figure 5 Amplification the recombinant plasmid of PGL3-Basic-MyoD by PCR
Note: M: DNA Marker ; 1: PCR product of pGL3-Basic-MyoD recombinant plasmid

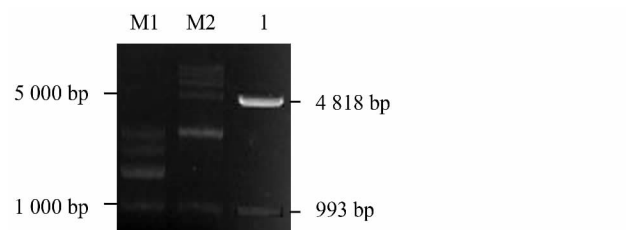


图6 重组质粒 pGL3-Basic-MyoD 的双酶切鉴定 (*Kpn* ; *Xho*)
注: M1: DNA Marker D15000; M2: DNA Marker ; 1: 重组质粒 pGL3-Basic-MyoD 的双酶切鉴定结果
Figure 6 Restriction two enzyme digestion of pGL3-Basic-MyoD recombinant plasmid by *Kpn* and *Xho*
Note: M1: DNA Marker D15000; M2: DNA Marker ; 1: The result of restriction two enzyme digestion of pGL3-Basic-MyoD recombinant plasmid

MyoD、PRL-TK 分别转入小鼠 C2C12 细胞系 24 h 后裂解细胞液进行双荧光素酶活性检测 pGL3-*MyoD* 在小鼠 C2C12 细胞系中其 M_1/M_2 的比值是 pGL3-Basic 空载体的 40.65 倍, 说明具有启动活性, 在小鼠 3T3-L1 细胞系中其 M_1/M_2 的比值为 pGL3-Basic 空载体的 1.13 倍。方差分析结果显示 pGL3-*MyoD* 小鼠 C2C12 细胞系中表达极显著于

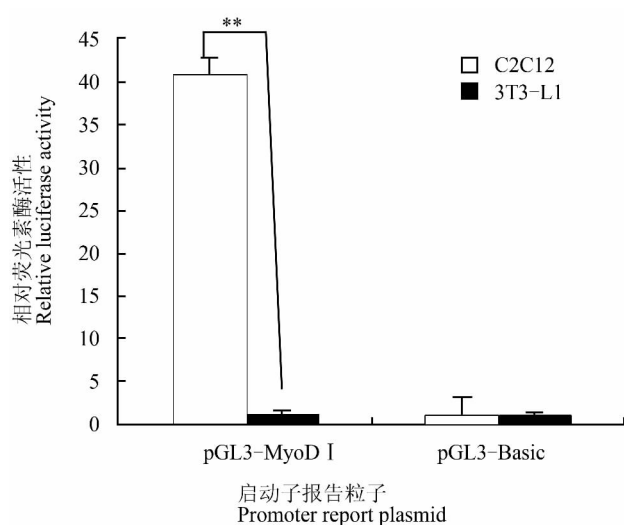


图7 pGL3-Basic, pGL3-*MyoD* 转染 C2C12 3T3-L1 细胞双荧光素酶活性检测结果柱的高度和钉型标记代
注: 数据表示 3 次独立重复试验的“平均值±标准误差”, 方差分析结果用 ** 标记, 代表差异极显著 (** $p < 0.01$)
Figure 7 The result of relative luciferase activities of pGL3-Basic-*MyoD* -promoter in C2C12, 3T3-L1 cell line
Note: Data represents “means±SE” of three independent experiments performed in triplicates; Analysis of variance was performed and significant variations are indicated by the ** ($p < 0.01$)

在小鼠 3T3-L1 细胞系中的表达 (** $p < 0.01$), 说明克隆得到的 *MyoD* 启动子片段具有启动活性, 并且在骨骼肌中特异性表达。

1.4 *MyoD* 启动子测序序列生物学分析

1.4.1 测序结果及转录因子结合位点分析

经过验证正确的质粒送往生工生物公司进行测序, 测序结果使用 TFSEARCH 程序对转录因子结合位点进行分析, 结果显示在转录起始位点上游的 -35~-20 bp 处存在顺式作用元件 TATA box, -84~-71 bp 处存在 GC box。转录起始位点 A 用黑色底纹表示, 转录起始位点上游还分别存在 AP1、AP2、AP4、SP1、HSF、MEF2、NF1、GATA-1、GATA-3、SRF 等转录因子结合位点(图 8)。

1.4.2 关岭牛 *MyoD* 启动子序列的相似性比对及构建分子系统进化树

对关岭牛 *MyoD* 启动子序列进行 BLAST 分析, 发现其(855~993)序列部分与绵羊、野猪、白犀牛和虎鲸该部分序列的相似性分别为 98%、91%、90%和 89%。表明此序列在不同物种之间具有一定的保守性, 见图 9。

将上述分析结果用 Clustal X 软件建立系统进化

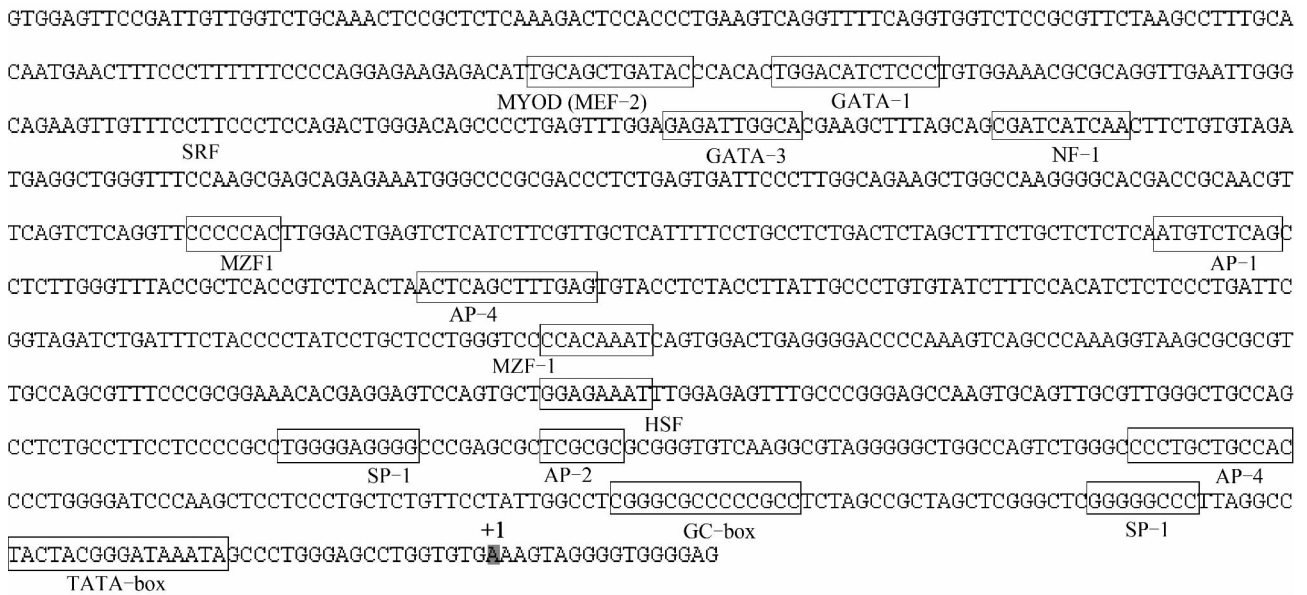


图 8 *MyoD* 启动子序列转录因子结合位点分析
Figure 8 The analysis of transcription factor binding sites of the *MyoD* promoter

<i>Bos taurus</i>	GGATCCCAAGCTCCTCCCTGCTCTGTTCTATTGGCCCTCGGGCGCCCCCGCCTCTAGCCGCTAGCTCGGGCTC-GGGG	926
<i>Ovisaries</i>	-----AAGCTCCTCCCTGCTCTGTTCTATTGGCCCTCGGGCGCCCCCGCCTAGCCGCTAGCTCGGGCTC-GGGG	69
<i>Susscrofa</i>	GGATCCCAAGCTCCTCCCGCTCTGTTCTATTGGCCCTCGGGAGCCCCCGCCTAGCCGCCAGCTCGGGCTC-GGGG	72
<i>Orcinus</i>	-----AAGCTCCTCCCGCTCTATTCTATTGGCCCTCGGGCGCCCCCGCCTAGCCGCCGGCTGCAGCTC-AGGG	68
<i>Ceratotherium</i>	-----AAGCTCCTCCCGCTCTGTTCTATTGGCCCTCGGGCGCCCCCGCCTAGCCGCCCGCTCTGTTCTGGGG	69
	*** **	
<i>Bos taurus</i>	GCCCTTAGGCTACTACTACGGGATAAATAGCCCTGGGAGCCTGGTGTGAAG--TAGGGGTGGGGA-	993
<i>Ovisaries</i>	GCCCTTAGGCTACTACTACGGGATAAATAGCCCTGGGAGCCTGGTGTGAAG--TAGGGGTGGGGA	136
<i>Susscrofa</i>	GCCCTTAGGCTACTACTACGGGATAAATAGCCCGGGAGCCTGGC-TCAAAGGGTAGGGGTGGGGA-	139
<i>Orcinus</i>	GCCCTTAGGCTACTACTACGGGATAAATAGCCCGGGAGCCTGGCTTGAAGT--TAGGGGTGGGGA-	135
<i>Ceratotherium</i>	GCCCTTAGGCTACTACTACGGGATAAATAGCCCGGGAGCCTGGTGTGAGAAGA--TAGGGGTGGGGA-	136

图 9 关岭牛 *MyoD* 启动子序列与绵羊,野猪,白犀牛和虎鲸相应序列的 Clustal X 比对结果

注: *: 表示相同的碱基

Figure 9 Alignment of nucleotide sequence for *MyoD* promoter of guanling cattle with those of *Ovis aries*, *Sus scrofa*, *Ceratotherium*, *Orcinus* by Clustal X

Note: *: The identical bases

树,可见牛科动物关岭牛首先与牛科羊亚科的绵羊聚为一类,亲缘关系最近,两者一起再与猪科动物野猪共同聚在偶蹄目的分支上,三者与奇蹄目白犀牛、鲸目虎鲸并列成三支,见图 10。

2 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 (高琴雪等, 2005; 王珊等, 2006)。在肌肉特异基因转录调控中 *MyoD* 起着总开关的作用,可以结合到肌细胞生成素(myogenin)、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。*MyoD* 缺失可导致成肌细胞的增殖和分化无法进行(Alves et al., 2003)。相反 *MyoD* 基因的过度表达会抑制成肌细胞的增殖过程,并促进成肌细胞分化形成成熟的肌纤维细胞。此外 *MyoD* 基因还会通过影响 *MyoG* 基因的活性来间接影响肌细胞的终端分化过程(Bhuiyan et al., 2009)。*MyoD* 介导的肌分化机制作为研究细胞分化的最佳模型,已成为当前众多学者研究的焦点,尤为重要(李永平和梁炳生, 2007)。

pGL3-Basic 作为一种常用的报告载体,因其结构中无启动子和增强子,故可通过检测荧光素酶报告基因的表达来定量检测所插入片段的启动活性,并且比较启动子的强弱和骨骼肌特异性(朱丹丹等, 2011)。

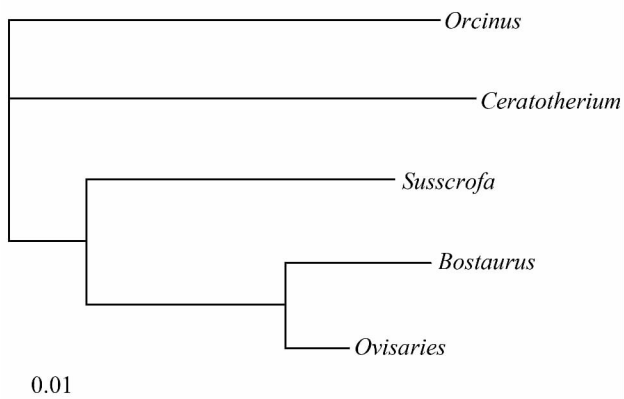


图 10 关岭牛 *MyoD* 启动子的系统进化树分析
Figure 10 Analysis of phylogenetic tree of *MyoD* promoter of guanling cattle

本实验成功构建了 pGL3-*MyoD* 报告基因载体, 转入小鼠 C2C12、3T3-L1 细胞系, 双荧光素酶活性检测结果显示 pGL3-*MyoD* 在小鼠 C2C12 细胞系中表达极显著于在小鼠 3T3-L1 细胞系中的表达 (** $p < 0.01$) 证明关岭牛 *MyoD* 启动子为骨骼肌特异性启动子。

很多肌肉特异性基因都由 *TEF1*、*SRF* 和 *MEF2* 等转录因子进行调控 (Maeda et al., 2002; 王秋华等, 2012), 使用 TFSEARCH 程序对 *MyoD* 启动子转录因子结合位点进行分析, 显示 *MyoD* 启动子区含有上述这些转录因子的多个调控结合位点, 进一步说明关岭牛 *MyoD* 启动子具有骨骼肌特异性, 这一结果与转染小鼠 C2C12、3T3-L1 细胞系进行双荧光素酶报告基因检测得到的结果相符。其中转录因子家族中的肌细胞增强因子 2 (MEF-2) 被认为是几乎所有肌肉特异性基因的保守元件 (Dodou et al., 2003; Miano, 2003; Hennebry et al., 2009; Jung and Ko, 2010; 王秋华等, 2012; Bryantsev et al., 2012), 血清反应因子 (SRF) 可独立的或与表达因子结合来调节肌肉特异性基因的表达 (Camoretti-Mereado et al., 2003; Biressi et al., 2008)。转录因子 NF1 和肌动蛋白参加了由 RNA 聚合酶介导的基因转录活动 (赵丽辉等, 2006)。可能正是因为存在这些肌肉特异性表达调控因子, 关岭牛 *MyoD* 启动子才能在小鼠 C2C12 细胞系中特异表达。关岭牛 *MyoD* 启动子序列与绵羊、野猪、白犀牛和虎鲸相应序列的 Clustal X 比对结果表明该部分序列在这几个物种具有较高的保守性, 可能这部分保守序列是 *MyoD* 启动子的核心启动子区域。对上述的 5 个物种 *MyoD* 基因启动子以构建系统进化树, 结果发现牛科动物关岭牛 *MyoD* 启动子序列与牛科羊亚科的绵羊最为接近, 其次是猪科野猪、奇蹄目白犀牛、鲸目虎鲸, 整个 *MyoD* 基因的进化符合物种进化的途径, 在进化上

并未受自然选择的影响而有较大的变异。

本研究为牛 *MyoD* 基因的表达调控以及牛产肉性状的研究提供了重要的资料和依据, 对通过转基因培育高产优质肉牛有重要意义, 为下一步构建 *MyoD* 基因启动子的亚克隆报告基因载体, 在小鼠的 C2C12 细胞系中分不同区段对启动子序列进行活性分析, 确定其核心启动子元件奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 血样

本实验室所保存的从贵州省安顺市西秀区幺铺镇屠宰场所采之关岭牛血样。

3.1.2 实验中所用试剂

2×*Taq* PCR MasterMix、*Taq* DNA Polymerase、限制性内切酶 *Xho*、*Kpn* 均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶纯化试剂从上海物工程有限公司购买; pUCm-T 载体、PGL3-Basic 载体、*E. coli* DH5α、T4 DNA 连接酶和 X-gal 购自 TaKaRa 公司, C2C12、3T3-L1 细胞系购自中科院上海细胞库, 其他的试剂均为国产的分析纯。

3.1.3 引物

依据 GenBank 中公布的牛 *MyoD* 基因序列 (Genbank 中 ID: 281938) 用 FIRSTEF 程序 (<http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/>) 进行启动子预测, 软件分析显示 -798~+121 段含有 SPI 结合位点等许多重要的 TFBS, 可能该区域具有启动活性。因为软件预测是数理统计, 而在真核生物中, 基因转录调节区可能远离启动子达几百甚至上千 bp, 相对较大, 因此, 最终选定 -976~+17 段作为含有最大启动子活性的片段。另外, 结合软件相预测的结果, 用 Primer 5 软件设计特异性引物, 见表 1, 引物由上海生物工程有限公司合成, 预期扩增长度为 993 bp。

3.1.4 仪器

PCR 仪 (BIO-RAD C1000 Touch™)、凝胶成像系统 (BIO-RAD ChemiDoc™)、细胞培养箱 (thermo)、电

表 1 用于 PCR 扩增的引物信息

Table 1 Information of primers for PCR

名称	引物序列 (5'-3')
Name	Primer sequence (5'-3')
<i>MyoD</i> pro993	S: GTGGAGTTCCTCGCTTGTTG A: CTCCCCACCCCTACTTTC

泳仪(BIO-RAD)、全温震荡培养箱(太华 HZQ-F160)、显微操作系统(尼康)、-80 超低温冰箱(thermo Ult1386)、Ultrospec2100Pro 紫外分光光度计(JE healthcare)、超净工作台(苏州净化设备 SW-CG-1F)、多功能酶标仪(Bio-Tek Synergy HT)、超高速台式落地冷冻离心机(Thermo)。

3.2 牛基因组 DNA 的提取

用上海生物工程有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒从关岭牛血样中提取基因组 DNA。

3.3 牛 *MyoD* 基因启动子序列 PCR 扩增

反应体系：取 0.5 mL PCR 管，加入基因组 DNA 100 ng，10 pmol/L 的上、下游引物各 1 μ L，2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ L，灭菌 ddH₂O 补至 20 μ L。扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min，1 个循环；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，56 $^{\circ}$ C 复性 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min，1 个循环；4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后，用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析扩增产物。

3.4 构建重组载体 pUCm-T-*MyoD* 启动子

将 pUCm-T 载体与胶回收试剂盒回收的 PCR 产物连接，连接体系 10 μ L：10 \times Buffer 1 μ L，pUCm-T vector 1 μ L，PCR product 3 μ L，T4 DNA ligase (3 U/ μ L) 1 μ L，PEG4000 1 μ L，灭菌 ddH₂O 补足体系。反应条件：16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 5 μ L 转化 *E. coli* DH5 α 菌株，转化产物在 Amp 和 X-gal、IPTG 的 LB 平板培养基中培养，在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12 h 后，挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中培养，以 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇菌 12 h。使用碱裂解法抽提质粒。

3.5 鉴定 pUCm-T-*MyoD* -pro 重组子

3.5.1 使用 PCR 方式鉴定

阳性 pUCm-T-*MyoD* -pro 作模板，引物同表 1，PCR 方法同 3.3。用 1.2% 琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳分析。

3.5.2 双酶切鉴定

用限制性内切酶 *Kpn* 和 *Xho* 进行双酶切鉴定。反应体系为 10 μ L，包括 pUCm-T-*MyoD* -pro 0.5 μ g，*Kpn* 1 μ L，10 \times Buffer 1 μ L，*Xho* 1 μ L，ddH₂O 补足反应体系。37 $^{\circ}$ C 反应 4 h，电泳分析反应液。

3.6 对 pUCm-T-*MyoD* -pro 进行测序

将 pUCm-T-*MyoD* 启动子送至上海生物工程公司测序（测序试剂为 BigDyeterminator v3.1，测序仪为

测序仪器为 ABI-PRISM3730）。

3.7 重组克隆载体 pGL3-Basic-*MyoD* 启动子的构建

(1) 用限制性内切酶 *Kpn* 和 *Xho* 将 pUCm-T-*MyoD* 启动子进行双酶切。方法同 3.5.2，1.2% 琼脂糖凝胶电泳回收 *MyoD* 启动子目的条带。

(2) 用限制性内切酶 *Kpn* 和 *Xho* 将载体 pGL3-Basic 进行酶切。方法同(1)，使用胶回收试剂盒回收载体 pGL3-Basic。

(3) 重组子 pGL3-Basic-*MyoD* 启动子的构建

连接方法同 3.4，取连接产物 5 μ L 转化 *E. coli* DH5 α 菌株，转化产物在含 Amp 和 IPTG 的 LB 平板培养基中培养。12 h 后，挑取白色单菌落于含 Amp 的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 以 200 r/min 摇菌 12 h 进行培养。用碱裂解法提取质粒。

3.8 鉴定重组克隆载体 pGL3-Basic-*MyoD* -pro

3.8.1 根据 PCR 技术鉴定

模板 DNA 为阳性 pGL3-Basic-*MyoD* -pro，引物为扩增序列时所用引物，PCR 反应方法同 3.3。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

3.8.2 双酶切鉴定

用限制性内切酶 *Kpn* 和 *Xho* 进行双酶切鉴定，方法同 3.5.2，并对酶切产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

3.8.3 测序鉴定

取阳性重组克隆 pGL3-Basic-*MyoD* 启动子送上海生物工程公司测序（测序仪为测序仪器为 ABI-PRISM3730，测序试剂为 BigDyeterminator v3.1）。

3.9 双荧光素酶报告基因检测报告质粒 pGL3-Basic-*MyoD* 的启动活性

使用胰蛋白酶液消化对数生长期的细胞，按 5×10^4 孔的密度接种 48 孔板，在 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 环境培养，细胞生长至 80% 融合时即可转染。转染前，弃原培养基，用无血清 1640 培养基洗涤细胞 1 次，轻轻加入 OPTI-MEM 250 μ L/孔，再逐滴加入 50 μ L 的 DNA-LF2000 复合物，轻摇使混合物与细胞充分的接触。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 6 h 后，用含双抗和 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基替换掉原来培养基，培养 24 h 后，收集细胞检测双荧光素酶活性，萤火虫荧光素酶激发底物释放的荧光所测值记为 M₁，海肾荧光素酶激发底物释放的荧光所测值记为 M₂，M₁ 与 M₂ 的比

值即为目的片段的荧光素酶相对活性,对每种质粒设2个重复孔,同一转染实验做3次重复(刘凤鸣,2010)。

3.10 对测序结果进行生物信息学分析

将测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析,并使用 Clustal X 软件比对关岭牛 *MyoD* 启动子与所 BLAST 出物种的相似性,并构建分子系统进化树,分析物种间的亲缘关系。

作者贡献

李飞、刘敏和桓聪聪负责整个实验实施过程及数据处理,通讯作者许厚强负责文章整体构思和实验设计,陈伟和陈祥对实验实施过程进行指导并整理实验相关的研究资料,全体作者参加了实验样品的采集。

致谢

本研究获得国家转基因生物新品种培育科技重大专项课题《牛组织特异性调控元件克隆和功能验证》(2011ZX08009-004)、贵州省科技厅农业攻关计划《影响牛脂肪沉积组织特异性调控元件克隆和功能验证》(黔科 NY 字[2012]3008 号)和贵州大学研究生创新基金(校农科 2012007)项目资助。特此致谢。

参考文献

Alves H.J., Alvares L.E., Gabriel J.E., and Coutinho L.L., 2003, Influence of the neural tube/notochord complex on *MyoD* expression and cellular proliferation in chicken embryos, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36 (2): 191-197

Bhuiyan M.S.A., Kim N.K., Cho Y.M., Yoon D., Kim K.S., Jeon J.T., and Lee J.H., 2009, Identification of SNPs in *MyoD* gene family and their associations with carcass traits in cattle, *Livestock Science*, 126(3): 292-297

Bryantsev A.L., Baker P.W., Lovato T.L., Jaramillo M.S., and Cripps R.M., 2012, Differential requirements for myocyte enhancer Factor-2 during adult myogenesis in *Drosophila*, *Dev. Biol.*, 361(2): 191-207

Biressi S., Messina G., Collombat P., Tagliafico E., Monteverde S., Benedetti L., Cusella-De-Angelis M.G., Mansouri A., Ferrari S., Tajbakhsh S., Broccoli V., and Cossu G., 2008, The homeobox gene *Arx* is a novel positive regulator of embryonic myogenesis, *Cell Death and Differentiation*, 15: 94-104

Camoretti-Mereado B., Dulin N.O., and Solway J., 2003, Serum response factor function and dysfunction in smooth muscle, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 137(2-3): 223-235

Dodou E., Xu S.M., and Black B.L., 2003, *mef2c* is activated di-

rectly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development *in vivo*, *Mechanisms of Development*, 120(9): 1021-1032

Gao Q.X., Liu M., Yang Y.Q., and Wang L.Y., 2005, Polymorphism analysis of porcine *MyoG* gene by PCR-RFLP and its association with growth traits and fiber number, *Zhongguo Shouyi Xuebao (Chinese Journal of Veterinary Science)*, 25(3): 330-332 (高勤学, 刘梅, 杨月琴, 王林云, 2005, 猪 *MyoG* 基因的 PCR-RFLP 分型及其与生长性能和肌纤维数目的相关性分析, *中国兽医学报*, 25(3): 330-332)

Huang M., Xu S.Z., Zan L.S., Gao X., and Chen J.B., 2007, Polymorphism with exon 3 of the cattle *MyoD* gene and their frequencies in carcass traits, *Zhongguo Xumu Shouyi (China Animal Husbandry and Veterinary)*, 34(9): 40-43 (黄萌, 许尚忠, 咎林森, 高雪, 陈金宝, 2007, 牛 *MyoD* 基因遗传变异及其对胴体性状的影响, *中国畜牧兽医*, 34(9): 40-43)

Hennebry A., Berry C., Siriatt V., O'Callaghan P., Chau L., Watson T., Sharma M., and Kambadur R., 2009, Myostatin regulates fibertype composition of skeletal muscle by regulating *MEF2* and *MyoD* gene expression, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296(3): C525-C534

Jung S.Y., and Ko Y.G., 2010, TRIM72, a novel negative feedback regulator of myogenesis, is transcriptionally activated by the synergism of *MyoD* (or myogenin) and *MEF2*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396(2): 238-245

Li Y.P., and Liang B.S., 2007, The research progress of *MyoD* muscle formation mechanism, *Guoji Gukexue Zazhi (International Journal of Orthopaedics)*, 28(1): 37-40 (李永平, 梁炳生, 2007, *MyoD* 肌形成作用机制研究进展, *国际骨科学杂志*, 28(1): 37-40)

Liu F.M., 2010, Identification of human PDCD4 promoter and the early analysis of its transcription regulation, Thesis for M.S., Shandong University, Supervisor: Zhang L.N., pp.34 (刘凤鸣, 2010, 人 PDCD4 启动子的确定及其转录调控的初步研究, 硕士学位论文, 山东大学, 导师: 张利宁, pp.34)

Luo Q.H., and Wang A.N., Guizhou Guanling cattle development status and thinking, *Caoshi Jiachu (Grass-Feeding Livestock)*, (4): 15-16 (罗启华, 王安娜, 2011, 贵州关岭牛发展现状与思考, *草食家畜*, (4): 15-16)

Maeda T., Gupta M.P., and Stewart A.F., 2002, TEF-1 and MEF2 transcription factors interact to regulate muscle specific promoters, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(4): 791-797

Miano J.M., 2003, Serum response factor: Toggling between disparate programs of gene expression, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 35(6): 577-593

Wang S., Chen H., and Cai X., Cloning and analysis of the promoter sequence of bovine *MyoG* gene, *Xibe Nonglin Keji Daxue Xuebao (Ziran Kexueban) (Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest (Nature Science Edition))*, 34 (8): 12-16 (王珊, 陈宏, 蔡欣, 2006, 牛 *MyoG* 基因启动子的克隆与序列分析, *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 34(8): 12-16)

- Wang Q.H., Cao Y.K., Li S.F., Tong H.L., Xing X.Y., Li G.P., and Yan Y.Q., 2012, Cloning and preliminary functional analysis of bovine *MyoG* promoter, *Xumu Shouyi Xuebao* (*Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*), 43(1): 37-43 (王秋华, 曹允考, 李树峰, 佟慧丽, 兴孝友, 李光鹏, 严云勤, 2012, 牛 *MyoG* 基因启动子的克隆及功能的初步分析, 畜牧兽医学报, 43(1): 37-43)
- Yang M.J., and Chen H., 2010, Research progress of *MRFs* gene family in bovine, *Zhongguo Nongye Kexue* (*China Cattle Science*), 36(6): 51-55 (杨明娟, 陈宏, 2010, 牛 *MRFs* 基因家族研究进展, 中国农业科学, 36(6): 51-55)
- Zhao J.H., Huang Y.F., Peng X.W., Wang G.F., Jiang A., and Gao L.F., 2008, PCR-SSCP analysis on partial coding sequence of the *MyoD* gene in southwestern cattle, *Zhongguo Xumu Zazhi* (*Chinese Journal of Animal Science*), 44(23): 1-4 (赵金红, 黄勇富, 彭祥伟, 王高富, 蒋安, 高立芳, 2008, 西南地方品种黄牛 *MyoD* 基因部分编码序列 PCR-SSCP 分析, 中国畜牧杂志, 44(23): 1-4)
- Zhu D.D., Gao X.J., Yan Y.Q., Liu X.F., and Lu L.M., 2011, Screening of bovine skeletal muscle-specific promoter, *Zhongguo Xumu Shouyi* (*China Animal Husbandry and Veterinary*), 38(3): 95-99 (朱丹丹, 高学军, 严云勤, 刘晓飞, 陆黎敏, 2011, 牛骨骼肌特异性启动子的筛选, 中国畜牧兽医, 38(3): 95-99)
- Zhao L.H., Jiang G.Q., Deng G.Z., and Wang L., 2006, Relation of actin with chromosome remodeling complex BAF and transcription factor NF1/CTF, *Dongbei Shida Xuebao* (*Ziran Kexue Bao*) (*Journal of Northeast Normal University* (Natural Science Edition)), 38(4): 100-105 (赵丽辉, 姜革强, 邓国忠, 王丽, 2006, 肌动蛋白与染色体改构复合物 BAF 和转录因子 NF1/CTF 之间的联系, 东北师大学报(自然科学版), 38(4): 100-105)