

肌细胞生成素基因的研究进展

何远清¹, 储明星², 王金玉¹

(1. 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

摘要: 综述了肌细胞生成素(myogenin, MYOG)基因在位置、结构、多态性及检测方法上的研究现状, 并初步探讨了 MYOG 基因与经济性状的关系。

关键词: 肌细胞生成素基因; 多态性; 经济性状

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)02-0235-04

Research Progress on Myogenin Gene

HE Yuan-Qing¹, CHU Ming-Xing², WANG Jin-Yu¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: In this paper we briefly introduced the location, structure, polymorphisms of myogenin gene, and discussed the relationships of myogenin gene with economic traits.

Key words: myogenin gene; genetic polymorphisms; economic traits

肌肉调节因子(muscle regulatory factor, MRF)基因家族的发现及其结构与功能的确定, 使人们对生肌过程本质的认识日渐深入。Naidu 等 1995 年指出, 碱性螺旋-环-螺旋(bHLH; basic helix-loop-helix)肌肉调节因子基因家族编码 4 种明显不同的肌肉特异性转录因子, 分别称为 MyoD、生肌素(myogenin, MYOG)、Myf5 和 MRF4, 这些蛋白质代表控制骨骼肌生成很多方面的关键调节因子^[1]。其中 MYOG 调控中胚层细胞分化为成肌细胞, 再由成肌细胞融合为肌纤维这一过程, 在肌细胞分化过程中起着中心调节作用。在去神经造成的骨骼肌 4 种 MRF 基因转录增强效果试验中, MYOG 反应最快且增强的幅度最高^[2]。

MYOG 基因是 MRF 基因家族中唯一在所有骨骼肌肌细胞系中均可表达的基因。近些年来, 欧美一些国家加强了对 MYOG 基因的研究。本文综述猪、小鼠、牛 MYOG 基因的研究进展。

1 MYOG 基因的位置和结构

1.1 MYOG 基因的位置

te Pas 等 1996 年利用猪/鼠体细胞杂交法将猪 MYOG 基因定位于 9 号染色体上^[3]。Soumillion 等 1997 年的研究结果也证实了 MYOG 基因遗传定位在猪 9 号染色体上^[4]。美国依阿华州立大学 Ernst 等 1998 年根据猪 cDNA 序列(GenBank 登录号 U14331)设计寡聚核苷酸引物扩增猪 MYOG 基因 1644bp 片段, 对 27 个猪/鼠体细胞杂交进行分析, 将猪 MYOG 基因精确定位于 9 号染色体的 q2.1-q2.6 区^[5]。

Beever 等通过连锁分析将 MYOG 基因定位到牛 16 号染色体上^[6,7]。Ryan 等 1997 年通过荧光原位杂交法也将 MYOG 基因定位到牛 16 号染色体上^[8]。

1.2 MYOG 基因的结构

Yee 等提供了小鼠 MYOG 基因启动子和 5' 侧翼区 DNA 的核苷酸序列(EMBL 登录号 X71910)^[9]。荷兰

收稿日期: 2003-01-07; 修回日期: 2003-10-21

基金项目: 国家高技术研究发展专项经费资助(课题编号: 2002AA211081) [Supported by National High Technology Research and Development Program of China (No. 2002AA211081)]

作者简介: 何远清(1978-), 男, 江苏盱眙人, 硕士生, 专业方向: 分子遗传学。Tel: 0514-7979350, E-mail: heyuanqing@tom.com

通讯作者: 储明星(1968-), 男, 安徽贵池人, 博士, 副研究员, 从事分子数量遗传学研究。Tel: 010-62816001, E-mail: mxchu@263.net

Soumillion等 1997 年根据人类和小鼠 *MYOG* 基因序列设计引物,通过 PCR 扩增猪基因组 DNA,获得两个长度分别为 2081bp 和 442bp 的扩增片段。将扩增片段克隆到 pUC18 并测序,发现它与人类和小鼠 *MYOG* 基因一样,猪 *MYOG* 基因也包括 3 个外显子,外显子 1 编码 bHLH 结构域,外显子 2 编码一个由 27 个氨基酸组成的转录激活结构域,外显子 3 编码 4 种 MyoD 蛋白共有的 C 端保守序列。猪 *MYOG* 氨基酸序列与人类和小鼠的 *MYOG* 氨基酸序列的同源性分别为 97% 和 96%,且 3 者在 bHLH 结构域的氨基酸序列完全相同。猪 *MYOG* 基因的两个内含子的碱基长度分别为 785bp 和 639bp,均比小鼠(513bp 和 526bp)和人类(131bp 和 125bp)*MYOG* 基因的相应区域长。以 *MYOG* 阳性噬菌体克隆测出 *MYOG* 基因启动子和 3' 端非编码序列,结果表明,启动子序列长 571bp,3' 非翻译序列长为 856bp,在 3397bp 和 3402bp 处有 1 个聚腺苷酸信号序列(AATAAA)。对转录因子共有的结合序列进行分析表明,它含有 3 个 E 框(CANNTG)结合序列,分别位于 508~513bp(E3)、201~215bp(E2)和 22~27bp(E1)处。在转录因子起始位点的 70bp 内有一个肌细胞增强因子 2(MEF-2)位点(454~464bp),一个核苷酸结合位点 1(NF-1)(469~481bp)和一个 TATA 序列框(494~498bp);在终止子 TGA 下游的 5kb 处有一被 CCC 所间断的 CA 重复序列。从转录起始位点上游 160bp 处起将猪 *MYOG* 基因序列与人类和小鼠 *MYOG* 基因的序列进行比较,发现它们有 96% 的同源性^[4]。

2 *MYOG* 基因的多态性

Ernst 等 1993 年首先采用 RFLP 法分析了猪 *MYOG* 基因的遗传变异,用限制性内切核酸酶 *Msp* I 酶切猪基因组 DNA,发现碱基长度为 4.9kb 和 4.2kb 的 DNA 片段为多态性片段,在 4 个二代家系和三代家系中进行遗传检验,发现含 4.9kb 和 4.2kb 片段的 *MYOG* 等位基因分离符合孟德尔分离定律。对来自 8 个品种且无亲缘关系的 83 头猪的 *MYOG* 等位基因的频率进行检测,发现含 4.9kb DNA 片段的 *MYOG* 等位基因出现频率为 0.42,含 4.2kb 片段的 *MYOG* 等位基因的出现频率为 0.58^[10]。Briley 等 1995 年使用从哺乳动物 *MYOG* 序列中设计的 PCR 引物,从猪基因组 DNA 中扩增出 215bp 的 PCR 产物并测序。结果表明它与鼠的 *MYOG* 有 89.7% 的序列同源性^[11]。te Pas 等 1996 年根据猪 *MYOG* 基因序列设计引物,建立了 *Msp* I-PCR-RFLP 法检测 *MYOG* 基因的遗传变异,发现 *MYOG* 基因有 3 个变异位点:一个为梅山猪所特有,一个为荷兰长白猪和杜洛克猪所特有,另一个为所有研究的猪种共有的变异位点,初步研究表明这些变异位点与猪初生重、肌纤维数有关^[3]。Mendez 等 1997 年也根据猪 *MYOG* 基因序列设计引物,用限制酶 *Nla* IV 酶切扩增产物,得到长度分别为 520bp 和 480bp 的多态性 DNA 片段,并由此来确定猪个体的基因

型,把 520bp 的 DNA 片段定义为等位基因 A,把 480bp 的 DNA 的片段定义为等位基因 B,对一个三代家系和二代家系的遗传图谱进行分析,结果表明该基因座的等位基因的分离符合孟德尔分离定律。对来自 10 个猪种且无血缘关系的 77 头猪进行检测,发现基因 A 的出现频率为 0.11,基因 B 的出现频率为 0.89。基因 B 以纯合子形式出现在约克夏、杜洛克、汉普夏、长白、皮特兰、巴克夏猪的概率为 100%,而梅山猪为 30%,最低;基因 A 以纯合子形式出现在梅山猪的概率为 50%,远远高于其他猪种^[12]。Soumillion 等 1997 年用 Southern 印迹法对 7 个品种(梅山、皮特兰、杜洛克、野猪、约克夏、荷兰长白、汉普夏)共 105 头无血缘关系猪的分析表明:猪 *MYOG* 基因座存在 3 个 *Msp* I 酶切多态位点,一个位于基因的 3' 端,一个位于内含子 2 内,一个梅山猪特异性 *Msp* I 酶切位点位于启动子内^[4]。Cieslak 等 2000 年采用 RFLP 法分析了两个农场 229 头猪 *MYOG* 基因的遗传变异,用限制酶 *Msp* I 酶切猪基因组 DNA,发现基因的 3' 端非翻译区碱基长度为 4.9kb 和 4.2kb 的 DNA 片段是多态性片段^[13]。

Beever 等 1997 年采用 RFLP 法分析了牛 *MYOG* 基因的遗传变异,发现 *MYOG* 基因座的等位基因数目为 3。在美国伊利诺斯参考群的家系半同胞家系中进行遗传检验,发现 *MYOG* 等位基因分离符合孟德尔分离定律^[6]。

3 *MYOG* 基因多态性检测方法的探讨

经查阅诸多关于 *MYOG* 基因检测的文献资料,除少量采用了 RFLP 法直接测定基因的多态性以外,大多数都采用了 PCR-RFLP 法。通常都采用常规 DNA 提取方法得到模板 DNA,然后在适当的 PCR 体系中通过引物扩增获得大量的 PCR 产物,再经过酶切、凝胶电泳和拍照等得到理想的 RFLP 电泳图谱,然后再对所得条带进行判型,并确认 *MYOG* 基因的多态性。此种方法虽好,但在限制酶消化过程中不可避免地会遇到酶切不完全或 DNA 降解现象,而且该方法只能检测已知的多态位点,不能检测 DNA 序列中存在的罕见的多态位点和未知突变,而目前国际上正流行另一种检测基因多态性的方法正好可以弥补上述不足,那就是 PCR-SSCP 法。其方法是用常规方法提取 DNA 后,通过 PCR 扩增目的片段,变性为单链后就可进行 SSCP 电泳分析。单链 DNA 片段因碱基序列不同(甚至是单个碱基的改变)在电泳时其泳动速率也不同,所以不需要限制酶消化就可以灵敏地检测出已知和未知的基因突变。虽然 PCR-SSCP 也受 PCR 效果、凝胶浓度等诸多因素的影响,但其操作简单,对 DNA 纯度的要求不高,尤其是对基因多态性的检测有非常高的灵敏度等优点,这些使我们有理由相信,对 *MYOG* 基因多态性的研究用 PCR-SSCP 法比较好^[14]。当然如果将 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 两种方法并用,得出结果并作出对比,这样的效果会更好。

4 MYOG 基因与经济性状的关系

Hasty 等 1993 年和 Nabeshima 等 1993 年通过胚胎干细胞基因打靶使小鼠 MYOG 基因失活,产生了突变纯合的小鼠,与非转基因或杂合窝同伴相比,由于骨骼肌的巨大缺损,这些纯合突变小鼠在出生前后致死。因此,MYOG 对功能骨骼肌发育是必需的^[15,16]。Yee 等、Cheng 等、Kim 等以转基因小鼠为模型,研究了小鼠胚胎发生期间 MYOG 基因转录和表达的调节^[9,17~19]。Wright 等 1989 年的研究结果表明 MYOG 是骨骼肌发育的一种正调控因子^[20]。Fujisawa-Sehara 等 1993 年的研究表明,在小鼠胚胎发生期间,MYOG 基因上游区促进骨骼肌细胞系的转录激活^[21]。Buonanno 等 1993 年的研究表明,MYOG 基因上游序列促进转基因小鼠组织和发育特异性表达^[22]。

Cieslak 等 2000 年对两个农场 229 头猪 MYOG 基因的遗传变异统计分析表明,经 *Msp* I 酶切后的 DNA 片段中,4.2kb/4.2kb 纯合子猪产肉率、腿肉率、腰肉率以及腰部眼肌面积均显著高于其他基因型($P < 0.01$)^[13]。Dwyer 等 1993 年对 7 窝($n = 66$)大白×长白猪的研究表明^[23]:体重 25~80kg 的猪平均日增重与肌纤维数呈正相关($r = 0.4149, P < 0.001$),猪增重;饲料比率与肌纤维数也呈正相关($r = 0.4191, P < 0.001$),这些结果表明,肌纤维数是出生后生长的一个重要决定因子。因此,具有高肌纤维数的猪窝同伴具有比低纤维数的同伴生长更快的倾向。林万华等 2002 年用 *Msp*I-PCR-RFLP 法检测了 21 窝($n = 97$)二花脸猪 MYOG 基因的遗传变异,同时分析了二花脸猪 MYOG 基因型与相关性状(初生重、20 日龄体重、断奶重等)之间的关系,结果表明^[24]:在二花脸猪不同的 MYOG 基因型间,初生重的差异极显著($P < 0.01$),71~80 天之间不同的 MYOG 基因型间肌纤维密度的生长差异显著($P < 0.05$),在一定程度上反映了 MYOG 基因可以影响二花脸猪的初生重和肌纤维数目。

5 小结

目前,对 MYOG 基因的研究已经引起国内外的关注。相信通过大量研究人员的共同努力,通过对该基因的横向和纵向的深入研究,所获得的研究成果将不仅为理解动物骨骼肌生长发育的分子生物学机制提供新的理论依据,而且可为提高家畜产肉性能提供一种崭新的手段,同时也将为医学上与肌肉病变有关的遗传病(肥胖症、肌肉萎缩等疾病)的基因治疗提供一种全新的思路,具有重要的理论意义和实践价值。

参考文献(References):

[1] Naidu P S, Ludolph D C, To R Q, Hinterberger T J, Konieczny S F. Myogenin and MEF2 function synergistically to acti-

vate the MRF4 promoter during myogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 1995,15(5):2707~2718.

- [2] Neville C M, Schmidt M, Schmidt J. Response of myogenic determination factors to cessation and resumption of electrical activity in skeletal muscle; a possible role for myogenin in denervation supersensitivity. *Cell Mol Neurobiol*, 1992,12(6):511~527.
- [3] te Pas M F W, Soumillion A, Rettenberger G, Van Den Bosch T J, Veninga G, Meuwissen T H E. Characterization of the porcine myogenin gene locus and association between polymorphism and growth traits. *Anim Genet*, 1996,27(Suppl. 2):117.
- [4] Soumillion A, Erkens J H F, Lenstra J A, Rettenberger G, te Pas M F W. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mammalian Genome*, 1997,8(8):564~568.
- [5] Ernst C W, Mendez E A, Robic A, Rothschild M F. Myogenin (MYOG) physically maps to porcine chromosome 9q2.1-q2.6. *J Anim Sci*, 1998,76(1):328.
- [6] Beever J E, Fisher S R, Guerin G, Lewin H A. Mapping of eight human chromosome 1 orthologs to cattle chromosomes 3 and 16. *Mammalian Genome*, 1997,8(7):533~536.
- [7] Beever J E, Fisher S R, Lewin H A. Polymorphism identification in the ACADM, AT3, IL10, MYOG and TSHB genes of cattle. *Animal Genetics*, 1997,28(5):373~374.
- [8] Ryan A M, Schelling C P, Womack J E, Gallagher Jr D S. Chromosomal assignment of six muscle-specific genes in cattle. *Animal Genetics*, 1997,28(2):84~87.
- [9] Yee S P, Rigby P W J. The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes and Development*, 1993,7(7a):1277~1289.
- [10] Ernst C W, Vaske D A, Larson R G, Rothschild M F. *Msp*I restriction fragment length polymorphism at the swine myogenin locus. *J Anim Sci*, 1993,71(12):3479.
- [11] Briley G P, Reecy J M, Grant A L, Bidwell C A. Cloning and expression of the porcine myogenin gene. *Animal Biotechnology*, 1995,6(2):79~92.
- [12] Mendez E A, Ernst C W, Rothschild M F. A novel DNA polymorphism of the porcine myogenin (MYOG) gene. *J Anim Sci*, 1997,75(7):1984.
- [13] Cieslak D, Kapelanski W, Blicharski T, Pierzchala M. Restriction fragment length polymorphisms in myogenin and myf3 genes and their influence on lean meat content in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2000,117(1):43~55.
- [14] Hayashi K. PCR-SSCP; a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl*, 1991,1(1):34~38.
- [15] Hasty P, Bradley A, Morris J H, Edmondson D G, Venuti J M, Olson E N, Klein W H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 1993,364(6437):501~506.

[16] Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, 1993, 364 (6437):532~535.

[17] Cheng T C, Hanley T A, Mudd J, Merlie J P, Olson E N. Mapping of myogenin transcription during embryogenesis using transgenes linked to the myogenin control region. *Journal of Cell Biology*, 1992,119(6):1649~1656.

[18] Cheng T C, Tseng B S, Merlie J P, Klein W H, Olson E N. Activation of the myogenin promoter during mouse embryogenesis in the absence of positive autoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(2):561~565.

[19] Kim S Y, Takahashi J, Tsutsumi K I, Yasuda Y. Function of the myogenin gene promoter in the muscular dystrophic transgenic dy/dy mouse. *Journal of Reproduction and Development*, 1997,43(1):39~46.

[20] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, 1989,56(4):607~617.

[21] Fujisawa-Sehara A, Hanaoka K, Hayasaka M, Hiromasa-Yagami T, Nabeshima Y. Upstream region of the myogenin gene confers transcriptional activation in muscle cell lineages during mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993,191(2):351~356.

[22] Buonanno A, Edmondson D G, Hayes W P. Upstream sequences of the myogenin gene convey responsiveness to skeletal muscle denervation in transgenic mice. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(24):5684~5693.

[23] Dwyer C M, Fletcher J M, Stickland N C. Muscle cellularity and postnatal growth in the pig. *J Anim Sci*, 1993,71(12):3339~3343.

[24] LIN Wan-Hua, HUANG Lu-Sheng, AI Hua-Shui, ZHOU Li-Hua, GUO Yuan-Mei, MA Jun-Wu, YAN Xue-Ming, LUO Ming. Influences of MyoG genotypes on early growth traits and muscular histological characteristics of Chinese Erhualian pig. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002, 10 (4):367~372.

林万华,黄路生,艾华水,周利华,郭源梅,麻骏武,晏学明,罗明. MyoG 基因型对二花脸猪早期生长性状及肌肉组织学特性的影响. *农业生物技术学报*,2002,10(4):367~372.

“全国首届动物生物技术学术研讨会暨中国农业生物技术学会动物生物技术分会成立大会”的通知

大会定于 5 月 24~27 日在杨凌国家农业高新技术产业示范区召开,由西北农林科技大学和杨凌国家农业高新技术产业示范区管委会承办。现就有关事项通知如下:

一、会议内容:动物生物技术学术研讨会(邀请国内及港台著名专家作专题报告);中国农业生物技术学会动物生物技术分会成立大会。

二、会议时间、地点:2004 年 5 月 24 日在陕西杨凌示范区田园大酒店报到,25~27 日开会。

三、会议费用:与会代表每人缴纳会议注册费 600 元,交通、住宿费自理。

四、会议论文:参加会议提交论文,篇幅 5000 字以内,中英文撰写均可。也可单独提交论文摘要。每篇论文版面费 500 元,论文摘要 300 元;论文内容包括:动物生物技术领域研究报告或文献综述,请用 Word2000 排版,具体格式请参照《农业生物技术学报》,截稿时期 2004 年 4 月 5 日。

五、联系人:雷安民副教授 13991377926(手机) 029-87012124(办) 029-87013368(传真)

E-mial:13991377926@126.com anminleiryan@china.com

杜忍让副主任 13186070599(手机) 029-87092102(办) 029-87012164(传真) E-mial:durr1945@sohu.com

通讯地址:西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心(184#信箱)

开户行:中国农业银行杨凌示范区支行 名称:中国农业生物技术学会动物生物技术分会 开户帐号:200501040003175

六、乘车路线:5 月 24 日在西安咸阳国际机场和西安火车站接站,其余时间自行前来。由西安火车站乘坐-103 路公交车到城西客运站,搭乘西安—杨凌长途班车即可。

七、会议回执:请与会代表于 2004 年 4 月 5 日前将参会回执表寄回会议联系人。

| | | | | | | | | |
|----------------|--|-----|--|-----|--|--------|-----|--|
| 姓 名 | | 性 别 | | 年 龄 | | 职称职务 | | |
| 单 位 | | | | | | | 邮 编 | |
| 通讯地址 | | | | | | | | |
| 电 话 | | | | 传 真 | | E-mail | | |
| 参会航班班次/火车车次 | | | | | | | | |
| 预定返程机票班次/火车票车次 | | | | | | | | |