

松江鲈 *MRF4* 基因克隆与组织表达分析

张燕萍,邵芳,郑红梅,卢祥云,徐建荣,顾志良

(常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏 常熟 215500)

[摘要] *MRF4*(*myf6* 或 *herculin*)基因属于 MyoD 家族成员之一,为成肌细胞分化成肌管的重要调控因子. 本实验以松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)肌肉总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 结合 RACE 的方法,获得 1 049 bp 全长 cDNA 序列,包含了 1 个含有 720 个核苷酸的开放性阅读框(ORF),共编码 239 个氨基酸. 其编码区序列与石斑鱼同源性最高、为 91.81%,其次是东方红鲮鲷、为 83.40%,与哺乳类、鸟类的同源性在 65%左右,与爪蟾同源性最低仅为 59.65%. 预测松江鲈 *MRF4* 蛋白具有保守的 HLH 结构域,bHLH 结构域形成剪刀状 α -螺旋二聚体. 用荧光定量 PCR 方法检测发现,*MRF4* 基因的 mRNA 在松江鲈 6 种组织中均有表达,但其在肌肉组织中表达量极显著高于其他组织,提示其在肌肉的生长发育过程中起着重要作用.

[关键词] 松江鲈,*MRF4*,RACE,组织表达分析

[中图分类号]Q38;S917.4 [文献标志码]A [文章编号]1001-4616(2013)03-0108-08

Cloning and Tissue Expression Analyses of *MRF4* Gene in *Trachidermus Fasciatus*

Zhang Yanping, Shao Fang, Zheng Hongmei, Lu Xiangyun, Xu Jianrong, Gu Zhiliang

(College of Biological Science and Food Technology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract:The transcription factor *MRF4* is one member of MyoD family which have essential functions in myogenic lineage determination and muscle differentiation. In order to obtain full-length *MRF4* gene sequence and characterize its tissue expression profile in *Trachidermus fasciatus*, RT-PCR and rapid-amplification cDNA ends (RACE) were used. A full-length of 1049 bp *MRF4* cDNA, which contained a 720 bp long complete ORF encoding a 239 amino acid peptide. Multiple sequence comparison showed that the *T. fasciatus MRF4* had a high homology with *Epinephelus coioides* at 91.81%, followed by *Takifugu rubripes*. A homology with mammals and birds was at about 63%, and of the lowest homology with *Xenopus laevis* at 59.65%. The bHLH domain of *T. fasciatus MRF4* was forming α -helix dimer that like a scissors, and HLH sequence was highly homologous among different species. *MRF4* gene was detected in all 6 examined tissues, but its expression level in muscle was significantly higher than the amount of other tissues, implying that the fish *MRF4* gene would play an important role in muscle development.

Key words: *Trachidermus fasciatus*, *MRF4*, RACE, tissue expressional pattern

鱼类肌肉的生长、分化是其生长发育过程中的重要环节,受环境、基因和激素水平等多种因素的影响. 在基因水平上,肌肉生长发育及分化受作为正向调控因子的生肌调节因子(Myogenic regulatory factors, MRFs)和一些负向调控因子的调控. 生肌调节因子包括 4 个基因: *MyoD*、*MyoG*、*Myf5* 和 *MRF4* (也称 *myf6*),它们均属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子,能与 E 蛋白家族形成异源二聚体识别靶 DNA,从而激活肌肉生成的相关基因^[1]. 在发育过程中,MyoD 家族 4 个成员联合作用诱导前成肌细胞分化发育形成成肌纤维,但其各自具有特定的表达模式、存在时间、位置和表型,因此每个成员发挥不同的功能,具有不同的调控作用^[2,3]. 研究表明相对其他生肌调节因子的表达时间来说,*MRF4* 基因的 mRNA 出现较晚,在肌管生成期才出现,并在肌管成熟期的不同阶段大量进行表达^[4]. *MRF4* 作为调控成肌细胞分化为肌管

收稿日期:2012-09-23.
基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金资助(第 42 批)、常熟市科技局项目(CN201111).
通讯联系人:顾志良,博士,教授,研究方向:动物基因组学与分子遗传学. E-mail:zhiliangu88@hotmail.com

的重要调控因子,近年来对该基因在肌肉发育调控方面的作用机制研究成为一个热点.

松江鲈(*Trachidermus fasciatus*),又名四鳃鲈,属鲈形目、杜父鱼科、松江鲈鱼属,是我国四大名鱼之一,不但营养价值高而且还有药用价值. 近年来由于资源枯竭种群濒危,已被列为国家二级保护动物. 目前对松江鲈的研究主要集中在生态、生理、胚胎发育与繁殖习性等方面,养殖技术研究也较为广泛,但基因水平的研究甚少. 目前未克隆出松江鲈 *MRF4* 基因全序列,其在松江鲈生长发育过程中的表达变化规律及在肉质中的调控作用至今也未见报道. 鉴于生肌调节因子各个基因在水产养殖中的重要意义,本实验采用同源序列设计引物扩增结合 RACE 技术,克隆松江鲈 *MRF4* 基因全长 cDNA,并对其进行生物信息学和组织表达谱分析,为进一步分析该基因的结构和生物学功能及对松江鲈生长发育产生的影响奠定分子基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物及总 RNA 提取

由苏州市长江水产繁育工程研究中心提供松江鲈,活鱼宰杀后,迅速采集肌肉、脑、脾、肝脏、心脏和肠 6 种组织,液氮速冻后于 -80 ℃ 冰箱中保存. 采用 Trizol (Invitrogen, USA) 分别提取上述组织的总 RNA, RNase free dH₂O 充分溶解,具体提取步骤参照说明书. 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 质量, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) 测定其浓度与纯度,于 -80 ℃ 保存备用.

1.2 引物的设计和合成

根据 GenBank 登录的石斑鱼 (HM190248)、红鳍东方鲀 (NM_001032771) 等 *MRF4* 基因保守序列设计松江鲈 *MRF4* CDS 区 PCR 引物. 根据 RT-PCR 测序获得的松江鲈 *MRF4* 基因部分序列分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 的特异性引物 sjlmrf4spR2 和 sjlmrf4spF2. 引物 5'-RACE outer/inner primer 和 3'-RACE outer/inner primer 分别来自 TaKaRa 5'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 和 3'-Full RACE Kit 试剂盒. 用于定量 PCR 检测的松江鲈 *MRF4* 和 β -actin 基因的引物分别为 sjlmrf4qF/R、ducactinqF/R. 引物均由上海生工生物工程有限公司合成.

表 1 PCR 引物的信息
Table 1 Information of PCR primers

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp	退火温度(℃)	作用
lymrf4 F1 lymrf4 R1	GGAGCTTTTGTAGACCAACC ATCTCCACCTTGGGCAGCCT	402	58	cDNA 克隆
Sjlmrf4spR2 5'RACE Outer 5'RACE Inner	AGGTGCTGTAGTGTCATGAT CATGGCTACATGCTGACAGCCTA CGCGGATCCACAGCCTACTAATGATCAGTCGATG	128	58	5'UTR 扩增
sjlmrf4spF2 3'RACE Out 3'RACE Inner	AAGGTCTGCAAGAGGAAGTCTG TACCGTCGTTCCACTAGTGATT CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	730	58	3'UTR 扩增
sjlmrf4qF sjlmrf4qR	ACATCGAGGGCTTACAGGAT GCTCCTTCTCTCTGGTGAT	187	55	定量 PCR
ducactinqF ducactinqR	CACGGTATTGTCAACCACTG ACAGCCTGGATGGCTACATA	200	58	定量 PCR

1.3 RT-PCR 和 5'-RACE、3'-RACE

反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0.) 要求进行^[5]. 以合成的 cDNA 为模板,用引物 lymrf4F1/R1 扩增松江鲈 *MRF4* 基因中间 400 bp 片段,PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中鉴定,并用 DNA 回收试剂盒 (QIAEX II) 回收目的片段,回收产物与 pMD-18T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态,蓝白斑筛选挑取阳性克隆,PCR 检测为阳性的菌液送上海生工生物工程有限公司测序.

以总 RNA 为模板,按 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Kit (TaKaRa) 说明步骤进行松江鲈 *MRF4* 基因 5'和 3'端的序列扩增,将 PCR 产物克隆测序,具体方法同上^[5].

1.4 不同组织 mRNA 表达分析

将松江鲈不同组织总 RNA 稀释成同一浓度 (100 ng/ μ L),每种组织 3 个个体,取 5 μ L RNA 进行反转录反应,反转录按 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent kit) 要求进行,反应体系为 10 μ L:5 \times Pri-

meScript™ Buffer 2 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μM) 0.5 μL, Random 6 mers (100 μM) 0.5 μL, RNA (100 ng/μL) 5 μL; 再运用荧光定量 PCR 检测 (SYBR® Premix Ex Taq™), 反应体系总体积为 20 μL: SYBR Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μM) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μM) 0.4 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL, cDNA 1 μL, RNase-free dH₂O 7.8 μL; qRT-PCR 扩增条件为: 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s. 在 AB (应用生物系统) 公司的 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行.

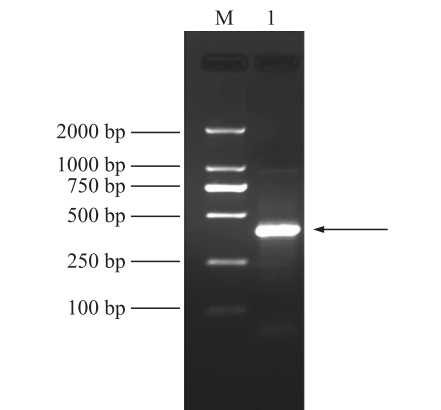
1.5 统计及生物信息分析软件

将获得的序列在 DNAMAN 5.0、ClustalX 1.83 软件上进行分析, 并进行物种间同源性比较. 利用 MEGA 4.1 软件进行进化树分析. 用 ExPASy 蛋白质组服务器中的 ProtParam 分析该预测蛋白的理化特性, ProtScale 程序计算基于 K-D 法的蛋白疏水性. 应用 NCBI 上的“BLASTP”程序以及在线蛋白质结构域和功能位点数据库 InterProscan (<http://www.ebi.ac.uk/interproscan>) 分析 MRF4 蛋白的功能属性. 利用在线工具 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的高级结构.

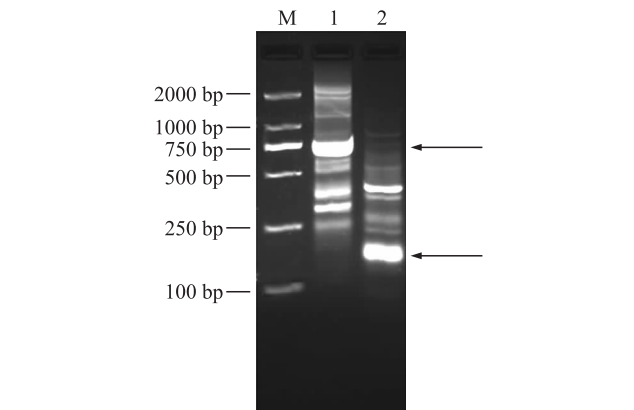
2 结果与分析

2.1 松江鲈 MRF4 基因全长 cDNA 扩增及克隆测序

以松江鲈肌肉总 RNA 为模板, 反转录后得到 cDNA, 用引物 lymrf4F1/R1 进行 PCR 扩增, 扩增后通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得长度为 450 bp 左右片段 (图 1). 经过 3'-RACE 和 5'-RACE 各两轮 PCR, 分别获得 750 bp 和 150 bp 的特异性条带 (图 2), 克隆测序后, 用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 去除重叠序列, 得到全长为 1 049 bp 的松江鲈 MRF4 cDNA 序列 (GenBank Accession NO.: JQ905628).



M: DL-2000 分子量标准; 1: RT-PCR 扩增产物
图 1 RT-PCR 扩增的松江鲈 MRF4 基因 cDNA
Fig. 1 The amplification product of *T. fasciatus* MRF4 cDNA by RT-PCR



M: DL-2000 分子量标准; 1: 3'-RACE 扩增产物; 2: 5'-RACE 扩增产物
图 2 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增的松江鲈 MRF4 基因 cDNA
Fig. 2 The amplification products of *T. fasciatus* MRF4 cDNA by 5'-RACE and 3'-RACE method

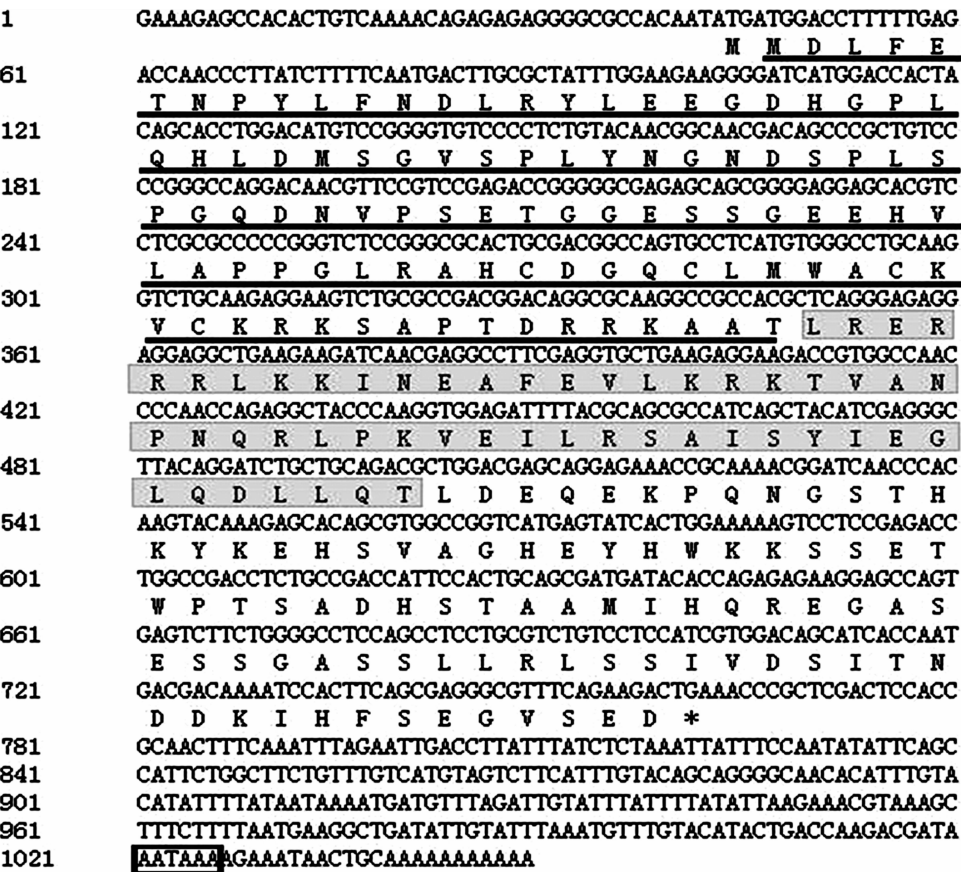
2.2 松江鲈 MRF4 基因全长 cDNA 和氨基酸序列分析

松江鲈 MRF4 基因全长 cDNA 为 1 049 bp, 包含一个含 720 个核苷酸的开放性阅读框, 其起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 共翻译编码 239 个氨基酸. 其 5'-UTR 区为 42 bp, 3'-UTR 区为 287 bp, 并有一个 AATAAA 加尾信号 (图 3). 通过 DNAMAN 软件进行序列比对发现, 松江鲈 MRF4 基因 CDS 区序列与石斑鱼同源性最高, 为 91.81%, 其次是东方红鲮鲷, 为 83.40%, 与哺乳类同源性在 62.77% ~ 65.73%, 与鸟类同源性在 66% 左右, 与爪蟾同源性为 59.65%; 进一步比对氨基酸序列发现, 与石斑鱼同源性高达 89.12%, 其次是东方红鲮鲷, 为 80.99%, 与哺乳类同源性在 55.69% ~ 58.43%, 鸟类为 59% 左右, 与爪蟾同源性最低, 仅为 53.67% (见表 2).

2.3 松江鲈 MRF4 基因生物信息学分析

通过 ExPASy 蛋白质组服务器中的 ProtParam 工具分析松江鲈 MRF4 蛋白的生理生化特征, 其等电点为 5.88, 分子量为 26 679.6, 由 3 691 个原子组成, 分子式为 C₁₁₅₀H₁₈₁₈N₃₄₀O₃₇₄S₉, 负电荷氨基酸残基总数为 36 (Asp+Glu), 正电荷氨基酸残基总数为 29 (Arg+Lys). 通过 ProtScale 工具分析其亲疏水性, 发现最小值为

-2.989,位于第159个氨基酸残基,具有高亲水性;最大值为1.600,位于第84个氨基酸残基,有较强的疏水性。进一步分析亲疏水性区域,在93~95,106~110,156~168,178~183这几段区域具有高亲水性(Score<-2),在135~141,212~223具有明显的疏水性(Score>0)(图4)。BlastP及其他在线软件预测松江鲈 *MRF4* 具有2个明显的结构域,一个是HLH结构域(102~153),另一个是其延伸结构Basic区(12~101)(图5),与MyoD家族其他因子结构相似。基于SWISS MODEL服务器的同源建模方法^[6,7]构建松江鲈 *MRF4* 蛋白结构,其明显具有HLH结构域,有螺旋-环-螺旋结构,且HLH形成 α -螺旋二聚体,与DNA结合(图6)。



碱性结构域用下划线表示；具边框和阴影部分序列为HLH结构；加尾信号用边框标出

图3 松江鲈 *MRF4* 基因全长 cDNA 的核苷酸及氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of *MRF4* gene and putative amino acid sequence of *MRF4* gene full length in *T. fasciatus*

表2 松江鲈与其他物种 *MRF4* 基因编码区的同源性比较

Table 2 Homologous comparisons of *MRF4* gene CDS between *T. fasciatus* and other species

物种	GenBank	碱基同源性(%)	氨基酸同源性(%)	编码氨基酸长度
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	GU339054	70.08	70.2	239
石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	HM190248	91.81	89.12	239
河豚 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	AY576806	82.85	80.17	239
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	NM_001032771	83.40	80.99	239
红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NM_001030746	67.87	58.47	242
绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	ACZ06579	65.31	60.41	240
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_002469	64.52	58.43	242
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	XM_001086944	65.73	58.43	242
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_181811	64.92	56.47	242
野猪 <i>Sus scrofa</i>	XM_003481764	64.52	55.69	242
北非羚羊 <i>Bubalus bubalis</i>	GU230795	64.52	56.47	242
小鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_008657	62.77	57.36	242
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NM_013172	63.44	56.98	242
光滑爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	NM_001088008	59.65	53.67	241

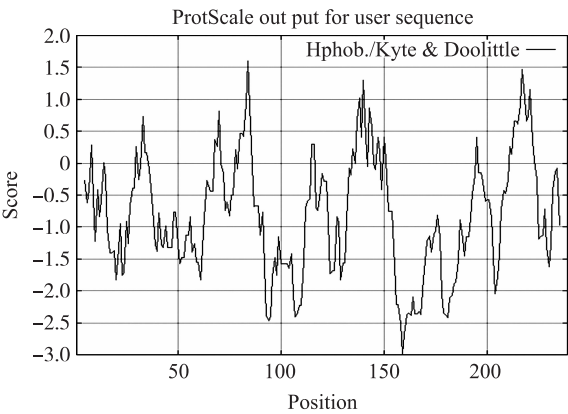


图 4 松江鲈 *MRF4* 氨基酸序列的疏水性图谱

Fig. 4 The hydrophobic property map of *T. fasciatus* *MRF4* gene amino acid sequence

2.4 松江鲈 *MRF4* 系统发育分析

利用 MEGA 4.1 软件构建包括松江鲈、小鼠、人等 15 个物种的分子进化树. 结果表明所有硬骨鱼形成一个大的分支, 哺乳类和鸟类形成另一个分支, 两栖类形成独立分支. 在硬骨鱼类形成的分支中, 松江鲈与石斑鱼首先成簇, 再与河豚成簇, 并有很高的自展值支持(图 7). 表明松江鲈与鲈形目、鲉形目鱼类亲缘关系较近, 与鲤形目鱼类的亲缘关系较远, 与鸟类和哺乳类的更远. 这与动物形态学分类相一致.

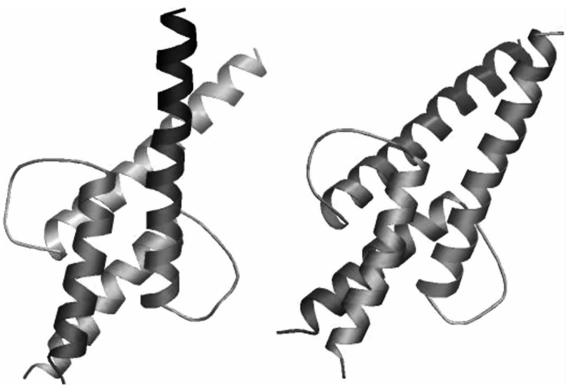


图 6 松江鲈 *MRF4* 蛋白三级结构的同源建模分析

Fig. 6 The analysis of 3D-structure of *T. fasciatus* *MRF4* protein

2.5 松江鲈 *MRF4* 基因 mRNA 组织表达分析

实时荧光定量 PCR 检测了 *MRF4* 基因在松江鲈不同组织中的表达量, 结果见图 8: 松江鲈肌肉、肝脏、心脏等 6 种组织中均检测到 *MRF4* 基因的表达, 其中在肌肉组织中高表达, 其 CT 值在 22 左右; 在肝脏中表达量最低, 几乎检测不到 *MRF4* 基因的表达. 松江鲈肌肉中 *MRF4* 基因 mRNA 的表达量与其他 5 种组织差异极显著 ($P < 0.0001$). 该结果提示 *MRF4* 基因在松江鲈肌肉发育过程中有着非常重要的作用.

3 讨论

MRF4 基因属于 MyoD 家族成员之一, 为成肌细胞分化成肌管的重要调控因子. 本研究通过 RACE 技术首次克隆获得松江鲈 *MRF4* 基因全长 1 049 bp 的 cDNA 序列, 包含 720 bp 的开放性阅读框, 编码含 239 个氨基酸残基的蛋白质, 碱基序列及蛋白质前体氨

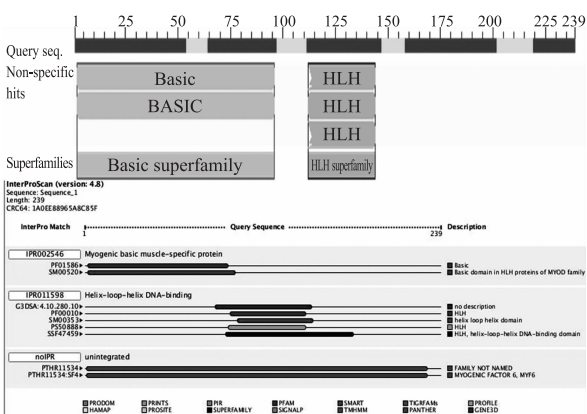


图 5 松江鲈 *MRF4* 蛋白结构域的预测结果

Fig. 5 Putative result of *T. fasciatus* *MRF4* protein domain

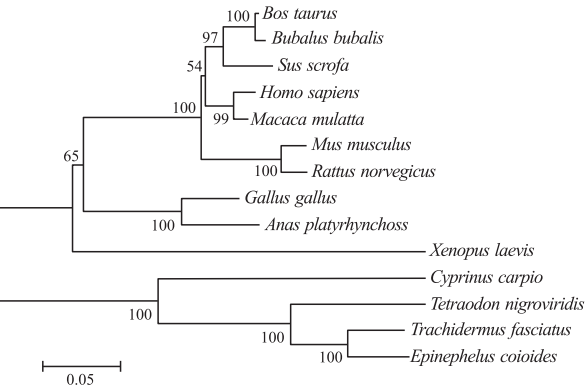


图 7 不同物种推导的 *MRF4* 氨基酸序列构建的 NJ 树

Fig. 7 Neighbour-Joining tree reconstructed based on *MRF4* amino acid

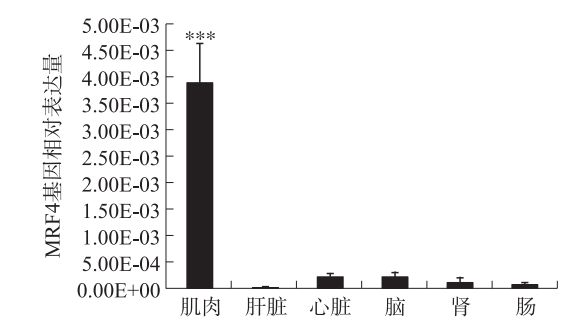


图 8 松江鲈不同组织 *MRF4* mRNA 的相对表达量

Fig. 8 The expression pattern of *T. fasciatus* *MRF4* gene in different tissues

[illegible]

“-”表示此位置缺失氨基酸;“*”表示保守氨基酸;HLH 结构用方框标出

图9 松江鲈 MRF4 氨基酸序列与其他物种的比对

Fig. 9 Comparisons of MRF4 amino acid sequence among *T. fasciatus* and other species

氨基酸序列与其他物种高度同源。本实验通过在线软件预测该蛋白的结构域,发现松江鲈 MRF4 蛋白具有 Basic(12 ~ 101) 和 HLH(102 ~ 153) 2 个明显的结构域。bHLH 高度保守,其中 Basic 结构是 HLH 螺旋结构的延伸,也是这一家族蛋白与 DNA 相互作用的区域,而 HLH 螺旋结构则是与许多其他因子相互作用的位点,是调控的重要区域。MyoD 家族识别的靶 DNA 具有共同序列: -CANNTG- (N 代表任何一种碱基),称为 E-box^[1]。MyoD 家族通过与 E 蛋白家族的另一类 bHLH 形成异二聚体识别靶 DNA 上的 E-box 并结合,从而活化肌肉特异性蛋白的表达^[8,9]。MyoD 家族成员对不同 E 蛋白的选择可能代表了不同成员对肌肉特异性基因进行调控表达的具体作用方式。基于同源建模构建了松江鲈 MRF4 蛋白结构,其形成剪刀状的二聚体结构,但该基因结构与功能之间的关系还需要进一步的实验验证。

在脊椎动物胚胎期肌生成过程中,4个生肌调节因子发挥的功能各不相同^[10],也有资料表明4种生肌调节因子除可自身激活外,还可以相互激活,相互作用构成肌肉发生的调节网络的中心,只要任一成员被激活,整个生肌调节网络便启动^[11,12],其他调节因子直接或间接通过其中的一个或几个调控肌肉的发生发育^[13,14].在肌卫星细胞培养实验中发现MRFs家族成员表达存在先后关系,首先检测到*myf5*的表达,接着几乎同时表达*MyoD*和*MyoG*,最后检测到*MRF4*的表达.小鼠幼体导入MRFs的无义突变实验证明了MRFs之间存在功能上的等级和替代关系,认为*MyoD*和*Myf5*为初级MRFs,其参与增殖的体节细胞定向为生肌细胞系;而*MyoG*和*MRF4*为次级MRFs,其促使成肌细胞进一步增殖分化为肌细胞,最后形成肌纤维。

维^[15]. *Myf5* 基因突变导致初生肌节缺失,但其引起的肌形成障碍随后被代偿^[16],同样 *myoD* 或 *myf6* 基因发生突变时,肌肉缺陷也不明显,但 *myf5/myoD/myf6* 同时突变导致胚胎肌肉生成量会急剧下降^[17]. 研究发现,缺失 *myf6* 基因的小鼠会形成正常的骨骼肌,但 myogenin 的表达量增加,说明 myogenin 可以补偿 *myf6* 的功能,然而 Zhu 等在 myogenin 缺失的小鼠中导入 *myf6* 基因,发现部分肌细胞恢复分化,认为 *myf6* 同样能代偿 myogenin 的功能^[18].

MRF4 基因主要在动物出生后激活,是唯一一个存在于成熟神经节中的生肌家族成员,亦位于其他生肌 bHLH 因子的下游,在肌纤维的形成和肌肉表型的维持中起作用^[19]. *MRF4* 与 MyoG 具同源性,二者共同控制肌肉分化. 肌肉分化过程中当 MyoG 表达时,*MRF4* 也开始表达^[20]. 汤展毅等构建了牛 *MRF4* 基因真核表达载体并在成肌细胞中表达,Western 印记和 RT-PCR 检测结果显示,转染了质粒的成肌细胞融合为肌管,表明 *MRF4* 基因促进了成肌细胞向肌肉细胞的分化^[21]. 然而 Xun 等人在研究肌节形成过程中发现 *MRF4* 具有双向性表达模型,*MRF4* 不单能通过抑制依赖 MyoD 的 p21WAF1 的表达来加速细胞增殖,同时过表达 *MRF4* 也会抑制细胞增殖,还会导致局部肌分化减少,由此认为 *MRF4* 和 MyoD 在肌生成过程中呈竞争性关系^[22]. Walter 等发现 *MRF4* 基因 mRNA 在斑马鱼快慢肌中表达量具有显著差异,慢肌中表达量远高于快肌,认为 *MRF4* 基因的表达与生长速度成反比,推测其为生长的候选基因^[23]. 随后林亚秋等人检测鲤 *MRF4* 基因发育性变化时发现其随鲤规格增大呈下降趋势,且在成鱼中的表达极显著低于其他规格($P<0.01$),也认为其可作为生长候选基因^[24]. Ali Mortazavi 等人转录组测序结果发现 *MRF4* 基因在肌肉组织中特异性表达^[25],而本实验通过实时荧光定量检测到 *MRF4* 基因 mRNA 在松江鲈多种组织中表达,但在肌肉组织中表达量很高,从另一方面证实其在肌肉发育过程中发挥重要的功能.

4 结论

本研究首次克隆获得了松江鲈 *MRF4* 基因全长 cDNA 序列,与其他物种具有高度同源性. 经预测松江鲈 *MRF4* 蛋白具有 Basic 和 HLH 2 个结构域,bHLH 结构域形成剪刀状 α -螺旋二聚体,且不同物种间 HLH 结构域氨基酸序列高度同源. 松江鲈 *MRF4* 基因在多种组织中表达,但在肌肉组织中的表达量显著高于其他组织,预示 *MRF4* 基因除了在松江鲈肌肉生长发育中起着重要调节的作用外,在其他组织发育过程中也可能存在一定的作用.

[参考文献]

- [1] Puri P L, Sartorelli V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications[J]. J Cell Physiol, 2000, 185(2): 155-173.
- [2] Sassoon D A. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis[J]. Dev Biol, 1993, 156(1): 11-23.
- [3] Parker M H, Seale P, Rudnicki M A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis[J]. Nat Rev Genet, 2003, 4(7): 497-507.
- [4] Sandelin A, Bailey P, Bruce S, et al. Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes[J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 99.
- [5] 卢祥云, 张营, 王星果, 等. 松江鲈肌肉生长抑制素基因克隆和序列特征分析[J]. 动物学研究, 2010, 31(4): 387-394.
- [6] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [7] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3 381-3 385.
- [8] Londhe P, Davie J K. Sequential association of myogenic regulatory factors and E proteins at muscle-specific genes[J]. Skelet Muscle, 2011, 1(1): 14.
- [9] Atchley W R, Zhao J. Molecular architecture of the DNA-binding region and its relationship to classification of basic helix-loop-helix proteins[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(1): 192-202.
- [10] Dedieu S, Mazeres G, Cottin P, et al. Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12[J]. Int J Dev Biol, 2002, 46(2): 235-241.

- [11] Fan C M, Li L, Rozo M E, et al. Making skeletal muscle from progenitor and stem cells: Development versus regeneration[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012, 1(3): 315–327.
- [12] Ling B M, Bharathy N, Chung T K, et al. Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(3): 841–846.
- [13] Cottle D L, McGrath M J, Cowling B S, et al. FHL3 binds MyoD and negatively regulates myotube formation[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 8): 1 423–1 435.
- [14] Shi X, Garry D J. Myogenic regulatory factors transactivate the Tceal7 gene and modulate muscle differentiation[J]. Biochem J, 2010, 428(2): 213–221.
- [15] Perry R L, Rudnick M A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation[J]. Front Biosci, 2000, 5: D750–767.
- [16] Kaul A, Koster M, Neuhaus H, et al. Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice[J]. Cell, 2000, 102(1): 17–19.
- [17] Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5: MyoD double-mutant mice[J]. Nature, 2004, 431(7007): 466–471.
- [18] Zhu Z, Miller J B. MRF4 can substitute for myogenin during early stages of myogenesis[J]. Dev Dyn, 1997, 209(2): 233–241.
- [19] Li C, Basarab J, Snelling W M, et al. The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits[J]. J Anim Sci, 2002, 80(5): 1 187–1 194.
- [20] Schnapp E, Pistocchi A S, Karampetsou E, et al. Induced early expression of mrf4 but not myog rescues myogenesis in the myod/myf5 double-morphant zebrafish embryo[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 4): 481–488.
- [21] 汤展毅, 严云勤, 高学军, 等. 牛 myf6 基因真核表达载体的构建及在成肌细胞中的表达[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2 793–2 799.
- [22] Jin X, Kim J G, Oh M J, et al. Opposite roles of MRF4 and MyoD in cell proliferation and myogenic differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 364(3): 476–482.
- [23] Walters E H, Stickland N C, Loughna P T. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes[J]. J Muscle Res Cell Motil, 2000, 21(7): 647–653.
- [24] 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.
- [25] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nat Methods, 2008, 5(7): 621–628.

[责任编辑: 黄 敏]