

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15208

黄颡鱼肌细胞生成素基因 cDNA 克隆及其在雌雄个体中的差异表达

梁宏伟^{1,2}, 李忠¹, 邹桂伟¹

1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070

摘要: 为了探究黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)肌细胞生成素(Myogenin, *MyoG*)基因的组成结构、功能特性以及在雌雄个体组织中的表达差异, 本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆获得黄颡鱼 *MyoG* 基因 1346 bp 全长 cDNA 序列, 其中序列包括 63 bp 的 5'非翻译区、521 bp 的 3'非翻译区和 762 bp 的开放阅读框(ORF), ORF 编码 253 个氨基酸。氨基酸序列包含 *MRFs* 基因家族的 Basic 结构域和螺旋-环-螺旋(HLH)结构域, 不含信号肽, 没有跨膜结构, 定位于细胞核内。氨基酸序列与蓝鳃(*Ictalurus furcatus*)同源性高达 94.1%, 基于氨基酸序列构建的 NJ 进化树显示黄颡鱼 *MyoG* 基因与同属鲴科鱼类关系最近, 表明 *MyoG* 基因在物种间比较保守。实时荧光定量 PCR 检测显示, *MyoG* 基因在雌雄个体心脏、肌肉等 8 种组织中均有表达, 但在肌肉中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$), 且在雄性中的表达量显著高于雌性($P<0.05$); Western blot 检测 *MyoG* 蛋白在雄性肌肉中的表达量高于雌性, 推测其可能是造成黄颡鱼雌雄生长差异的因素之一。本研究不仅为黄颡鱼雌雄生长差异和肌肉发育调控提供了研究基础, 也为黄颡鱼快速生长新品种(系)选育提供理论参考。

关键词: 黄颡鱼; 肌细胞生成素; 基因克隆; 表达分析; 雌雄差异

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0522-08

动物肌肉形成是一个复杂的过程, 肌纤维是肌肉的基本组成单位, 主要受到生肌调节因子(MRFs) *MyoD* 基因家族的调控, 该基因家族可编码结构和功能相关、进化保守的 4 种特异性转录因子: 肌细胞生成素(*MyoG*)、肌细胞决定因子(*MyoD*)、生肌因子 5(*Myf5*)和生肌因子 6(*Myf6*、*huculin* 或 *MRF4*)^[1-2]。这 4 个特异性转录因子功能各异, 在动物肌肉发生的不同时期表达^[3]。*MyoG* 是 *MyoD* 基因家族的重要成员, 在调控中胚层细胞分化为成肌细胞、促进成肌细胞增殖、使单核成肌细胞转变为多核的肌纤维, 以及肌细胞的形成和成熟过程中发挥中心调节作用, 具有其他转录因子不可替代的功能^[4]。*MyoG* 基因还是 *MyoD* 基因家族中唯一可在所有骨骼肌细胞中表

达的基因^[5]。研究表明, 敲除小鼠 *MyoG* 基因后会造造成小鼠严重的骨骼肌发育缺陷, 在本应发育成骨骼肌的部位仅有正常数量的单核细胞以及少量的肌纤维^[6-7], 而动物具有较多的肌纤维数量不仅可以提高产肉潜力和肌肉种类, 也会影响动物体尺等生产性状^[8-9]。此外, *MyoG* 基因的遗传变异与动物肌纤维数量和生长速度相关, 被认为是影响肌纤维特性、肌肉品质、生长性状的重要候选基因^[10-13]。鉴于此, 众多家畜^[14-15]和家禽^[10-11]以及 20 余种鱼类^[16-18]的 *MyoG* 基因被克隆测序, 研究人员对其功能也开展了相关研究。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)俗称黄蜡丁, 广泛分布于中国除西部高原和新疆地区外的江河、湖泊和水库等水域, 其肉质细嫩, 味道鲜美,

收稿日期: 2015-09-15; 修订日期: 2015-10-30.

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2011AA100401); 水产种质资源平台项目.

作者简介: 梁宏伟(1978-), 男, 副研究员, 博士, 从事水产动物遗传育种研究. E-mail: lianghw@yfi.ac.cn

通信作者: 邹桂伟(1963-), 研究员. E-mail: zougw@yfi.ac.cn

营养丰富,是中国当前重要的淡水经济养殖鱼类。自然状态下,同龄性成熟的黄颡鱼雄性个体明显大于雌性,雄性生长速度也显著快于雌性,因而全雄黄颡鱼的培育应运而生并且获得了显著的经济效益^[19]。但是,从生物体内在生长发育规律和调节机制方面分析造成黄颡鱼雌雄生长发育差异的研究还较为匮乏。本研究采用反转录 PCR (RT-PCR)和 RACE (cDNA 末端快速克隆)方法克隆黄颡鱼 *MyoG* 基因,对 *MyoG* 基因进行生物信息学分析,检测 *MyoG* 基因及 *MyoG* 蛋白在成体黄颡鱼雌雄个体组织中的表达,旨在探讨 *MyoG* 基因在黄颡鱼雌雄生长差异和肌肉发育调控中的潜在作用,为黄颡鱼雌雄差异研究提供基础资料,也为 *MyoG* 基因的深入研究和黄颡鱼快速生长新品种(系)选育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成

2 龄黄颡鱼雌雄各 10 尾来源于中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场,随机取样,雌性体重(50±5) g,全长(14±2) cm;雄性体重(70±8) g,全长(18±3) cm,卵巢和精巢均处于 IV 期。实验室麻醉后迅速取肌肉、鳃、心脏、肝、脾、脑、胃和肠组织,置于液氮冷冻。根据 TRIZOL Reagent (Introvigen)使用说明提取各组织总 RNA,

分光光度计检测浓度。以总 RNA 为模板,按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 (TaKaRa)试剂盒说明合成 cDNA 第一链,-20℃保存备用。

1.2 *MyoG* 基因 cDNA 全长克隆

从 NCBI 获取斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、蓝鲇(*Ictalurus furcatus*)等已知鱼类 *MyoG* 基因 mRNA 序列,序列比对后在其保守区设计引物 CPF 和 CPR(表 1)。以制备的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,50 μL 反应体系包括 1× Buffer 5 μL,上下游引物各 0.2 μmol/L, dNTPs 200 μmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, cDNA 模板约 100 ng。扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,再用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)回收目的产物。以 pMD-18T 为载体将回收产物转化到大肠杆菌感受态细胞,最后经 PCR 检测阳性克隆菌液送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。基于获得的黄颡鱼 *MyoG* cDNA 保守序列,分别设计 3'RACE 引物 P3 和 5'RACE 特异性引物 P51、P52(表 1),与 SMART RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)中的通用引物 UPM 配对(表 1),参照试剂盒说明分别进行 3'末端和 5'末端 RACE 扩增,扩增产物回收纯化、克隆并测序。

表 1 黄颡鱼 *MyoG* 基因克隆和表达引物
Tab. 1 Primers used in *MyoG* gene cloning and expression analysis

引物 primer	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 purpose
CPF	TTTGAGACCAACCCATACT	<i>MyoG</i> 基因中间保守区序列 PCR for conserved domain of <i>MyoG</i>
CPR	AGCAGCCGAGGACCTGTAAT	
UPM	CATTACGACTCACTATAGGGC	扩增 <i>MyoG</i> 基因 3'端序列 PCR for 3' end sequence of <i>MyoG</i>
P3	AAGACAAACCATCTCCGTCCTCC	
P51	CATCCTCCAGTGAGCAGGGTTC	扩增 <i>MyoG</i> 基因 5'端序列 PCR for 5' end sequence of <i>MyoG</i>
P52	CATCACGGGCACAGAAGGAGCG	
RT1	GTCCTCGGCTGCTCAGAGGGTGT	扩增 <i>MyoG</i> 基因的实时荧光定量引物 real-time quantitative PCR for <i>MyoG</i>
RT2	CCGTGATGCTGTCGACGATAGAT	
<i>β</i> -actin1	TGAGAGGTTCAAGTGCCAG	扩增内参 <i>β</i> -actin 实时荧光定量引物 real-time quantitative PCR for <i>β</i> -actin
<i>β</i> -actin2	TGTCAGCAATGCCAGGGTAC	

1.3 *MyoG* 基因序列分析

将克隆得到的 *MyoG* 基因 cDNA 序列保守区、

3'RACE和5'RACE核苷酸序列利用软件DNASTAR 6.0 进行拼接,获得 *MyoG* 基因 cDNA 序列全长。

将黄颡鱼 *MyoG* 基因 cDNA 序列在 NCBI 中进行序列同源比对。利用 DNASTAR 6.0 预测开放阅读框、分子量、等电点和氨基酸序列; 利用 ExPASy(<http://www.expasy.org/>)预测信号肽和疏/亲水性, NCBI 在线软件预测蛋白质结构域和细胞定位。在 NCBI 下载包括斑点叉尾鲷(AAS48084)、蓝鲷(AAS48404)和白鲷(*Ameiurus catus*, AAS67040)在内共 22 条脊椎动物 *MyoG* 基因序列, 基于 *MyoG* 基因编码氨基酸序列利用 MEGA 5.0 软件构建 Neighbor-joining (NJ) 系统进化树分析其系统进化。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 *MyoG* 基因在雌雄黄颡鱼中的表达

利用实时荧光定量 PCR 检测分子水平上 *MyoG* 基因在黄颡鱼不同组织的表达谱。根据获得的黄颡鱼 cDNA 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计并合成实时荧光定量 PCR 引物 RT1 和 RT2, 并以黄颡鱼 β -actin 基因为内参, 设计引物 β -actin1 和 β -actin2, 检测雌雄各 10 尾黄颡鱼 *MyoG* 基因在心脏、脑、肝、肾、肌肉、胃、肠和鳃组织中的表达。采用 15 μ L 反应体系, 其中上下游引物各 0.2 μ mol/L, 模板 50 ng, 1 $\times$ SYBR Premix ExTaq(TaKaRa)。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。所有实验设置 3 个重复, 结果利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据处理及分析, 用软件 SPSS 13.0 进行显著性检验。

1.5 Western blot 检测 *MyoG* 蛋白在雌雄黄颡鱼中的表达

利用 Western blot 检测 *MyoG* 蛋白在黄颡鱼雌雄个体中的表达。黄颡鱼雌雄个体各 2 尾取肌肉组织, 加入含蛋白酶抑制剂的蛋白抽提液冰浴研磨, 至组织完全裂解, 4 $^{\circ}$ C 条件下 14000 g 离心 15 min, 将蛋白抽提的上清液转移至离心管-80 $^{\circ}$ C 保存备用。通过酶标仪利用 BCA 蛋白质定量试剂盒(TIANGEN)根据说明书检测蛋白浓度, 将蛋白浓度均一化。将蛋白样本(约 20 μ g)与含 2% 巯基乙醇的 SDS-PAGE buffer 混合 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3 min。然后将上述混合液在 10% 丙烯酰胺凝胶中电泳, 随后将蛋白转移到聚偏氟乙烯树脂(PVDF)膜。与含 5% 牛血清蛋白(BSA)的溶液室温孵育 1 h 以封闭膜上的非

特异结合, 随后用 TBS/T 溶液以 5 min/次洗膜 3 次。封闭膜与小鼠 anti-myogenin (ab1835, Abcam) 抗体 4 $^{\circ}$ C 结合过夜, 再以 5 min/次洗膜 3 次。随后加入山羊抗小鼠的 HRP 标记的二抗(Santa Cruz Biotechnology), 室温孵育 1 h 以结合一抗, 再洗膜 3 次, 然后利用 ECL Plus detection kit 试剂盒(普利莱基因有限公司)进行检测, GK-330C+凝胶成像系统进行图像分析。

2 结果与分析

2.1 *MyoG* 基因 cDNA 序列克隆及氨基酸序列特征分析

克隆获得黄颡鱼 *MyoG* 基因 cDNA 序列全长为 1354 bp, 包括 63 bp 的 5'非翻译区(1~63), 762 bp 的开放阅读框区(64~825)和 521 bp 的 3'非翻译区(826~1346); 末端含多腺苷酸化信号 AATAAA 和 poly A 加尾信号 ATTAA, 碱基含量 A+T 为 54.5%, G+C 为 45.5%。核苷酸序列与鲇科鱼类蓝鲷(91%)、斑点叉尾鲷(90%)和白鲷(90%)同源性高, 与其他物种同源性相对较低(77%~81%)。序列 GenBank 登录号为 HQ246723。

黄颡鱼 *MyoG* 基因编码 253 个氨基酸, 由 20 种氨基酸组成, 丝氨酸(Ser)含量最高(13.8%), 色氨酸(Trp)含量最低(0.8%)。编码的蛋白质等电点 5.64, 分子量 28031.31 Da, 原子组成是 $C_{1196}H_{1892}N_{354}O_{401}S_{12}$ 。蛋白质 280 nm 时消光系数 0.78, 不稳定系数 60.56, 说明其为不稳定蛋白。脂肪系数 63.64, 总平均亲水性为-0.675, 为疏水性蛋白。预测黄颡鱼 *MyoG* 基因编码蛋白质的氨基酸序列, 未发现信号肽序列, 表明该蛋白属于非分泌型蛋白; 不存在跨膜结构, 说明其属于细胞外蛋白质; 序列 95~117 个氨基酸存在核定位信号(nuclear localization signal, NLS) KRKSVSMD, 表明该蛋白定位于细胞核内。蛋白质二级结构预测表明 *MyoG* 具有 MRFs 家族共有的延伸结构域 Basic 区和保守的螺旋-环-螺旋(HLH)结构域, 进而分析表明在 HLH 结构域中有 DNA 结合区(DNA binding region)、E-box/N-box 特异性位点(E-box/N-box specificity site)和二聚化结构(dimerization interface)3 个重要的功能区域(图 1)。

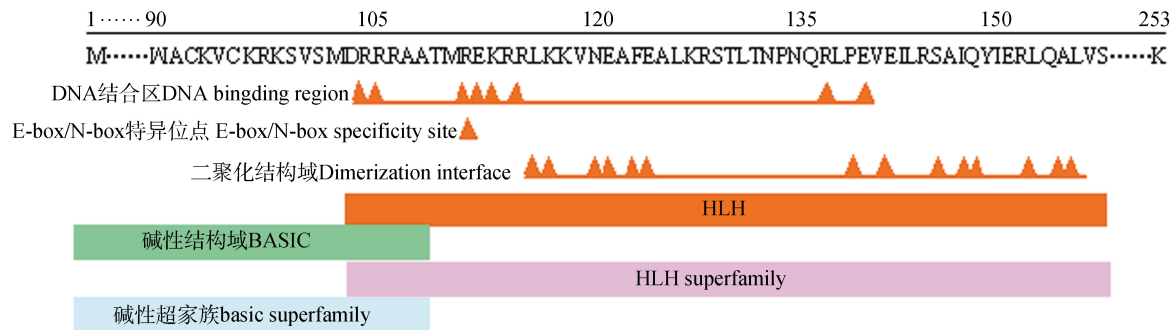


图 1 黄颡鱼 MyoG 蛋白结构域预测结果

Fig. 1 Prediction of *Pelteobagrus fulvidraco* MyoG protein structural domain

氨基酸序列同源性分析发现, 黄颡鱼 MyoG 与蓝鲇同源性为 94.1%、与斑点叉尾鲷为 93.7%、与白鲇为 92.9%, 而与鲤鱼(84.6%)、草鱼(83.4%)、斑马鱼(81.6%)等同源性也比较高, 说明 *MyoG* 基因编码的氨基酸序列在物种间比较保守。

2.2 *MyoG* 基因进化分析

对黄颡鱼在内的 23 个处于不同分类地位物种的 *MyoG* 基因编码氨基酸序列构建 NJ 系统进化树(图 2), 结果表明黄颡鱼 MyoG 首先与同属鲇形目的斑点叉尾鲷、蓝鲇和白鲇聚为一支, 然后与草鱼、赤眼鲢和斑马鱼等 6 种鲤科鱼类的分支聚在一起, 最后与黄鲢、松江鲈等 5 类重要养殖经济鱼类聚为鱼类分支; 哺乳类中偶蹄目牛和绵羊首先聚为一支, 再与小鼠、猪和人类的分支聚为属于哺乳类的高等动物分支; 两栖类非洲爪蟾介于哺乳类和鱼类的聚类分支之间。该结果说明 *MyoG* 基因在物种间比较保守, 且进化关系与物种的分类地位相关。

2.3 *MyoG* 基因在黄颡鱼雌雄成体的表达特征

MyoG 基因在黄颡鱼心脏、脑、肝、肾、肌肉、胃、肠和鳃组织中均有表达(图 3), 其中在肌肉表达丰度最高, 且与其他组织差异显著($P<0.05$)。分析 *MyoG* 基因在雌性和雄性黄颡鱼中的表达, 发现心脏、脑、肝等组织中的表达不存在雌雄差异, 而在肌肉组织中雄性表达量显著高于雌性表达量, 说明 *MyoG* 基因在黄颡鱼中的表达不仅存在组织差异, 而且存在性别差异。

2.4 *MyoG* 蛋白在雌雄黄颡鱼的表达特征

图 4 显示 *MyoG* 蛋白在雌雄黄颡鱼肌肉组织

中的表达, 内参蛋白为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)。结果表明, *MyoG* 蛋白在雌雄黄颡鱼肌肉组织中均有表达, 与内参蛋白 GAPDH 表达量相比, *MyoG* 蛋白仍有较高的表达量, 而且在雄性个体中的表达丰度高于雌性。

3 讨论

本研究依照同源克隆原理, 获得黄颡鱼 *MyoG* 基因 cDNA 序列全长。对 23 个物种 *MyoG* 基因的氨基酸序列比对和进化分析表明, 黄颡鱼与斑点叉尾鲷、蓝鲇和白鲇同源性最高(这 4 种鱼类都属于鲇形目), 与其他物种也有较高的同源性, 说明 *MyoG* 基因编码氨基酸在物种间具有较强的保守性, 且与物种分类地位相关, 该结果与斑马鱼、赤眼鲢和松江鲈等鱼类的研究结果一致^[17-18]。

黄颡鱼 *MyoG* 基因的二级结构存在两个明显的功能结构域: 延伸结构域 Basic 区和螺旋-环-螺旋(HLH)结构域; 在 HLH 结构域中存在 E-box/N-box 特异性位点、DNA 结合区和二聚化结构。*MyoG* 基因是 MRFs 家族重要成员, MRFs 家族典型特征是基因表达产物都含有一段碱性氨基酸富含区及随后的 HLH 结构域, 其中碱性氨基酸区富含精氨酸和赖氨酸, 提供靶 DNA 结合位点; HLH 结构域有与其他因子相互作用的位点, 使蛋白质之间形成二聚体, 结合 DNA 序列上的 E-box 位点(含有 CANNTG 保守序列), 从而调节肌肉特异性基因如肌肉肌酸激酶(MCK)、肌钙蛋

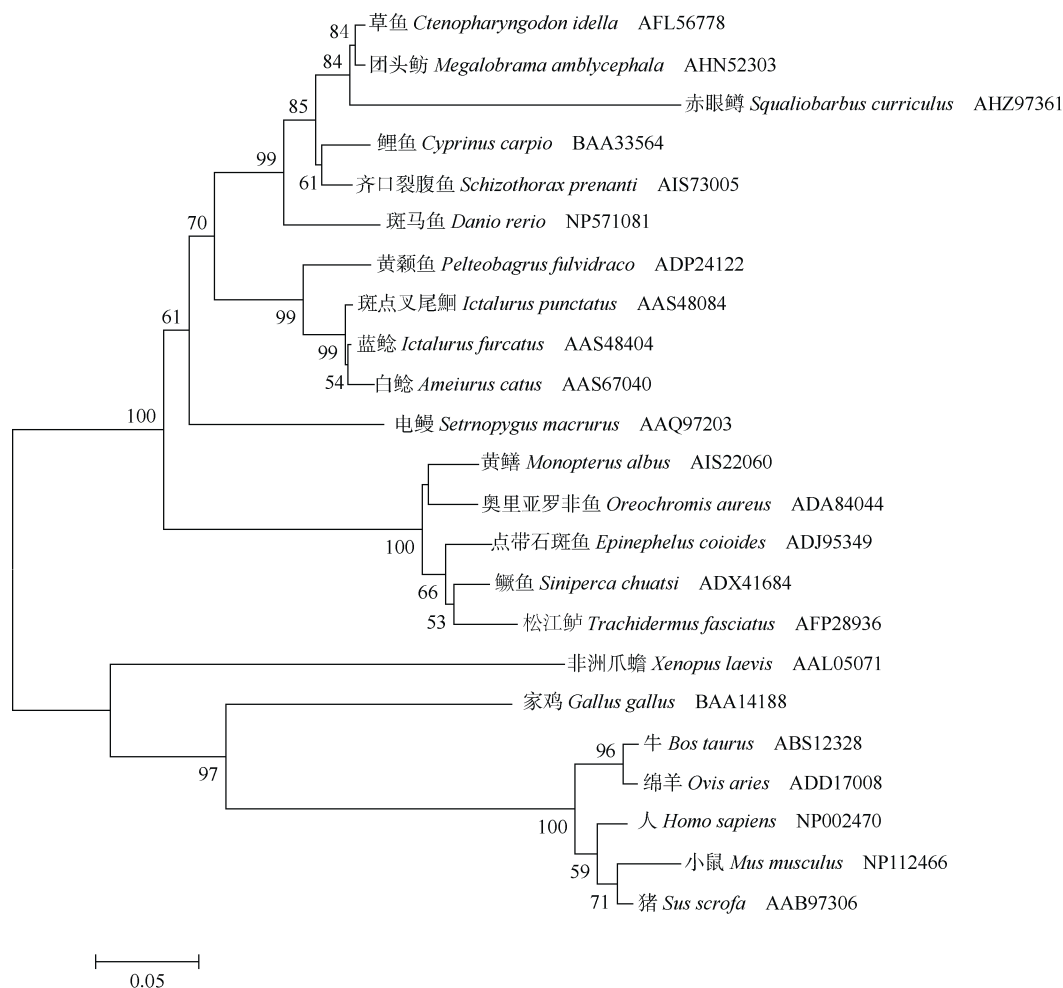


图 2 基于不同物种 MyoG 蛋白氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

分支上数字显示 1000 次抽样分析中大于 50% 支持率, 标尺代表遗传距离单位为 0.05/百万年。

Fig. 2 Neighbour-Joining tree of different species based on MyoG amino acid sequences

Higher than 50% bootstrap value in 1000 replications are shown on branches. Scale represents the genetic distance of 0.05/million years.

白(Tn)等的表达^[20]。HLH 序列一般由 60 个左右氨基酸组成^[21], 黄颡鱼 MyoG 基因的 HLH 结构域全长 56 个氨基酸(103~158), 已有报道的草鱼 HLH 结构域全长 57 个氨基酸(102~158), 赤眼鳟为 63 个氨基酸(95~157), 松江鲈为 61 个氨基酸(93~153)^[17-18, 22]; 为了进一步研究不同物种 bHLH 结构域特征, 以黄颡鱼为标准, 对其 MyoG 基因编码氨基酸序列 84~169 区域(形成 bHLH 的区域)进行序列比对, 结果发现不同物种 MyoG 在该区域序列高度保守, 说明 bHLH 作为功能结构域在 MyoG 中的必要性及重要性。

对 MyoG 基因在黄颡鱼组织中的表达谱分析

发现, MyoG 基因在肌肉中高表达, 在心脏、脑、肝、肾、胃、肠和鳃组织中低表达。这与鲢鱼 MyoG 基因表达研究结果一致^[23]。草鱼 MyoG 基因表达谱表明其除了在草鱼白肌中高表达外, 在脑、肝和鳃中也有较高表达量^[22]; 赤眼鳟 MyoG 基因在肌肉中表达量最高, 肾、心脏和脑中表达量次之^[18]; 鳊鱼 MyoG 基因在肌肉和心脏中高表达, 在脑组织中表达量较低^[24]; 而 MyoG 基因仅在松江鲈成鱼肌肉^[17]和牙鲈成鱼骨骼肌中表达^[20]。这些结果表明, MyoG 基因在不同物种的其他组织中表达有差异, 但均在肌肉组织高表达, 这表明 MyoG 基因是鱼类肌肉发育所必需的调控因子。此外, 黄

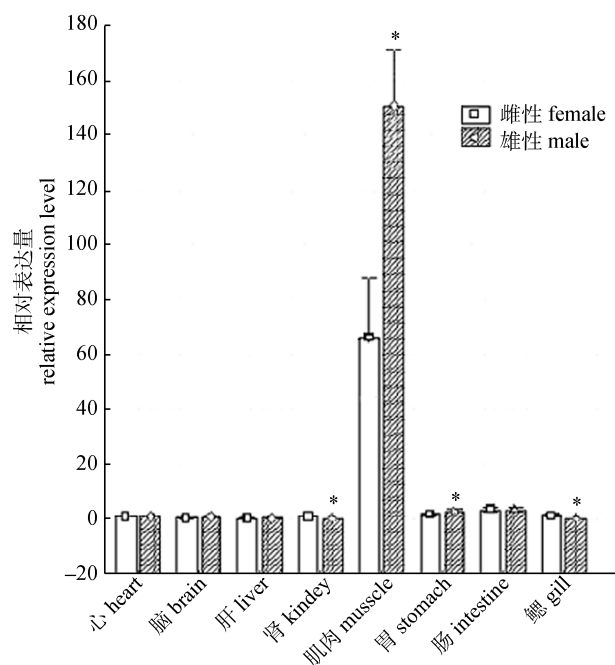


图3 *MyoG* 基因在黄颡鱼雌雄个体不同组织中的差异表达
*表示雌雄间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 *MyoG* gene expression in male and female *Pelteobagrus fulvidraco*

Significant difference ($P < 0.05$) between female and male is indicated by asterisks.

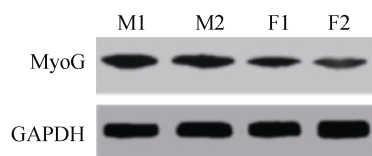


图4 *MyoG* 蛋白在黄颡鱼雌雄个体肌肉组织中的表达
M1 和 M2 表示雄性个体, F1 和 F2 表示雌性个体.

Fig. 4 *MyoG* protein expression in muscle of *Pelteobagrus fulvidraco*
M1 and M2: male; F1 and F2: female.

鲮鱼 *MyoG* 基因表达谱与鲢鱼 *MyoG* 基因表达谱一致, 与其他鱼类存在差异, 分析原因可能是黄颡鱼和鲢鱼同属于鲢科鱼类, 因而具有相似的表达谱, 但是否其他鲢科鱼类 *MyoG* 基因也具有类似的表达谱, 是否 *MyoG* 基因表达具有种属特异性还需要进一步研究。

MyoG 作为一种肌细胞特异性转录因子, 不仅可以调节自身基因表达, 而且能与生肌因子其他成员相互作用, 调节肌肉特异性基因的表达从而影响动物的生产性能^[25]。研究表明, 在胚胎期

骨骼肌发育之前移除 *MyoG* 基因会导致小鼠呈现严重的骨骼肌缺陷, 说明 *MyoG* 基因对于骨骼肌的分化是必需的^[26]。而在胚胎期肌肉发育后 *MyoG* 缺失的小鼠尽管有发育正常的骨骼肌, 但个体比对照组小 30%, 说明 *MyoG* 基因的缺失可扰乱正常的机体生长^[27]。此外, *MyoG* 基因在体型矮小、生长缓慢的小型五指山猪与生长速度快、屠宰率和瘦肉率高的长白猪中存在显著的表达差异^[28]; *MyoG* 基因 5'调控区的多态位点与肉鸡胸肌率和肌纤维密度存在相关性^[29], 表明该基因与动物产肉性能相关。生产实践中, 雄性黄颡鱼不仅个体显著大于雌性, 而且生长速度也比雌性快, 表现出明显的雌雄生长差异。本研究中雌雄黄颡鱼 *MyoG* 基因的分子及蛋白表达水平均表现为雄性黄颡鱼显著高于雌性。对于低等生物鱼类而言, 生长发育过程中生长速度和个体大小存在种间和同种不同个体间的差异^[22], 但也存在性别差异^[30-31], 而且普遍认为个体大小差异主要受躯干骨骼肌增殖的制约和限制^[21]。从本研究 *MyoG* 基因在黄颡鱼雌雄个体中的差异表达可推测, *MyoG* 基因是影响黄颡鱼雌雄个体生长差异的一个重要因素。

获得优质高效的经济鱼类养殖对象, 除了要洞悉不同品种的生长环境, 也要充分了解控制鱼类肌肉生长的内在分子机理。本研究一方面为黄颡鱼的生长发育研究提供了新思路, 也为其他低等生物雌雄个体生长差异研究提供借鉴; 另一方面对从基因表达方面揭示鱼类性别与生产性能关系, 培育优质高效的黄颡鱼新品种(系)具有参考作用。

参考文献:

- [1] Qiu H L, Yu J X, Chen H Q. Advances on structure and function of *MyoG*[J]. China Journal of Bioinformatics, 2007, 5(4): 190-192. [邱华玲, 于建兴, 陈宏权. *MyoG* 基因结构与功能研究进展[J]. 生物信息学, 2007, 5(4): 190-192.]
- [2] Rescan P Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates[J]. Comp Biochem Physiol B, 2001, 130(1): 1-12.
- [3] Carvajal J J, Rigby P W. Regulation of gene expression in vertebrate skeletal muscle[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(18): 3014-3018.

- [4] Song X C, Wei H J, Yang Y F, et al. Sequence structure and bioinformation analysis of *MyoG* gene in different species[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 44(7): 64–68. [宋兴超, 魏海军, 杨镒峰, 等. 不同物种肌细胞生成素基因序列结构与功能特性的生物信息学分析[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(7): 64–68.]
- [5] Hastly P, Bradley A, Morris J H, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene[J]. Nature, 1993, 364: 501–506.
- [6] Miner J H, Wold B H. A fourth member of the *MyoD* family of myogenic regulatory genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(3): 1089–1093.
- [7] Edmondson D G, Olson E N. A gene with homology to the myc similarity region of *MyoD1* is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program[J]. Genes Dev, 1989, 3(5): 628–640.
- [8] Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G, et al. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection[J]. Livest Prod Sci, 2000, 66(2): 177–188.
- [9] Tepas M F W, Verburg F J, Gerritsen C L, et al. Messenger ribonucleic acid expression of the *MyoD* gene family in muscle tissue at slaughter in relation to selection for porcine growth rate[J]. J Anim Sci, 2000, 78: 69–77.
- [10] Wang Q, Liu Y P, Jiang X S, et al. Correlation analysis of relationships between polymorphisms of high quality chicken myogenin gene and slaughter and meat quality traits[J]. Hereditas, 2007, 29(9): 1089–1096. [王琼, 刘益平, 蒋小松, 等. *MyoG* 基因多态性与优质肉鸡屠宰性状和肉质性状的相关性分析[J]. 遗传, 2007, 29(9): 1089–1096.]
- [11] Yin H D, Zhang Z C, Lan X, et al. Association of *MyF5*, *MyF6* and *MyoG* gene polymorphisms with carcass traits in Chinese meat type quality chicken populations[J]. J Anim Vet Adv, 2011, 10(6): 704–708.
- [12] Bhuiyan M S A, Kim N K, Cho Y M, et al. Identification of SNPs in *MYOD* gene family and their associations with carcass traits in cattle[J]. Livest Sci, 2009, 126(1–3): 292–297.
- [13] Kim J M, Choi B D, Kim B C, et al. Associations of the variation in the porcine myogenin gene with muscle fibre characteristics, lean meat production and meat quality traits[J]. J Anim Breed Genet, 2009, 126(2): 134–141.
- [14] Xue M, Zan L S, Wang H B, et al. Single nucleotide polymorphism of *MyoG* gene in six cattle populations and its association with body measurement trait[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2011, 39(7): 35–42. [薛梅, 咎林森, 王洪宝, 等. 6 个黄牛群体 *MyoG* 基因单核苷酸多态性及其与体尺性状的相关性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(7): 35–42.]
- [15] Zhang Z T, Xu F, Zhang Y N, et al. Cloning and expression of *MyoG* gene from Hu sheep and identification of its myogenic specificity[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(2): 1003–1013.
- [16] Zhu K C, Chen L P, Zhao J K, et al. Molecular characterization and expression patterns of *myogenin* in compensatory growth of *Megalobrama amblycephala*[J]. Comp Biochem Physiol B, 2014, 170: 10–17.
- [17] Yang L, Li F M, Cai B P, et al. cDNA cloning and sequence analysis of *MyoG* gene in *Trachidermus fasciatus*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(1): 16–21. [杨磊, 李凤鸣, 蔡保平, 等. 松江鲈 *MyoG* 基因 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 16–21.]
- [18] Zhang Y P, Shao F, Zhou F, et al. Molecular cloning and tissue expression analysis of *MyoG* gene in *Squaliobarbus crriculus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(5): 117–122. [张燕萍, 邵芳, 周峰, 等. 赤眼鲮 *MyoG* 基因的克隆与组织表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(5): 117–122.]
- [19] Liu H Q, Cui S Q, Hou C C, et al. YY supermale generated gynogenetically from XY female in *Pelteobagrus fulvidrco* (Richardson)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(5): 718–725. [刘汉勤, 崔书勤, 侯昌春, 等. 从 XY 雌鱼雌核发育产生 YY 超雄黄颡鱼[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 718–725.]
- [20] Xu F. Studies on flounder muscle regulatory factors: Myogenin and MRF4[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2007. [徐梵. 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.]
- [21] Shi J, Chu W Y, Zhang J S. Muscle growth, differentiation and gene expression regulation in fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(6): 1145–1152. [石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控[J]. 水生生物学报, 2013, 37(6): 1145–1152.]
- [22] Gong J Q, Li R W, Lv Y H, et al. Cloning and expression profiling of *MyoG* gene of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(29): 125–130. [宫佳琦, 李瑞文, 吕彦红, 等. 草鱼 *MyoG* 基因的克隆及其组织表达谱分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 125–130.]
- [23] Gregory D J, Waldbieser G C, Bosworth B G. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species[J]. Anim Genet, 2004, 35(6): 425–430.
- [24] Chu W Y, Li Y L, Wu P, et al. Characterization and expression analysis of Myogenin gene in white muscle of Chinese mandarin fish, *Siniperca chuatsi*[J]. J Proteomics Bioinform, 2014, 7(3): 71–76.

- [25] Aguiar D H, Bock C, Padovani C R, et al. MyoD, myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)[J]. Aquac Res, 2008, 39(15): 1673–1679.
- [26] Venuti J M, Morris J H, Vivian J L, et al. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development[J]. J Cell Biol, 1995, 128(4): 563–576.
- [27] Knapp J R, Davie J K, Myer A, et al. Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size[J]. Development, 2006, 133: 601–610.
- [28] Cao T, Zhang L L, Shi L G, et al. Expression of Myogenin protein in skeletal muscle of Wuzhishan pig and Landrace pig[J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(2): 170–176. [曹婷, 张立岭, 施力光, 等. Myogenin 蛋白在五指山猪和长白猪骨骼肌中的表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(2): 170–176.]
- [29] Wang Q. Study on the Relationships between polymorphisms of chicken *MyoG* *MyoD* gene and slaughter and meat quality traits[D]. Chongqing: Sichuan Agricultural University, 2007. [王琼. MyoD、MyoG 基因的多态性及其与鸡屠宰性状和肉质性状的相关性研究[D]. 重庆: 四川农业大学, 2007.]
- [30] Mei J, Gui J F. Genetic basis and biotechnological manipulation of sexual dimorphism and sex determination in fish[J]. Science of China: Life Science, 2015, 58(2): 124–136. [梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异性和性别决定的遗传基础及其生物技术操作[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1198–1212.]
- [31] Gao Z X, Wang H P, Rapp D, et al. Gonadal sex differentiation in the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* and its relation to fish size and age[J]. Aquaculture, 2009, 294(1–2): 138–146.

Cloning and expression analysis of the *MyoG* gene in male and female yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*

LIANG Hongwei^{1,2}, LI Zhong¹, ZOU Guiwei¹

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract: Myogenin (MyoG) is a vital member of the myogenic regulatory factors (MRFs), and plays an essential role in regulating myocyte development and maturity. *Pelteobagrus fulvidraco*, one of the most economically important fish in China, displays sexual dimorphism in both size and growth. To characterize the *MyoG* gene and its expression in male and female *P. fulvidraco*, we cloned the full-length *MyoG* cDNA of this species with reverse transcription-PCR and the rapid amplification of cDNA ends. The *MyoG* cDNA included a 63-bp complete 5' untranslated region (5'-UTR), a 521-bp 3'-UTR, and a 762-bp open reading frame encoding a 253-amino-acid peptide containing a basic arginine-rich domain and the helix-loop-helix structural domain typical of MRFs. The amino acid sequence was more similar to that of *Ictalurus furcatus* (94.1%) than to those of other species. A phylogenetic analysis based on amino acid sequences showed that *P. fulvidraco* MyoG clustered with those of *I. punctatus*, *I. furcatus*, and *Ameiurus catus* of the Siluriformes. These results indicate a high degree of conservation during *MyoG* gene evolution. An expression analysis of *MyoG* in the heart, brain, liver, kidney, muscle, stomach, intestine, and gill showed that it is only significantly highly expressed in muscle tissue ($P < 0.05$). Western blot analysis demonstrated that MyoG protein expression was higher in males than in females. We infer that MyoG plays an important role in the muscle development and growth of male and female *P. fulvidraco* based on its expression characteristics at the gene and protein levels. These results extend our understanding of MyoG function, clarify the growth and differentiation of male and female *P. fulvidraco*, and provide a reference for the selective breeding of new *P. fulvidraco* strains.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; Myogenin (*MyoG*); gene cloning; expression analysis; gender differences

Corresponding author: ZOU Guiwei. E-mail: zougw@yfi.ac.cn