

# 鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因 cDNA 克隆及组织表达分析

张龙婷<sup>#</sup>, 郑 智, 王 尧, 高煜杰<sup>\*</sup>

(海南大学 海洋生物与水产学院, 海南 海口 570228 中国)

**摘要:** 生肌调节因子(MRFs)在动物体骨骼肌生长发育过程中发挥着重要作用。本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子(MRFs)cDNA 全长序列, 包括 *MyoD1*(1 962 bp)、*MyoD2*(1 466 bp)、*MyoG*(926 bp)、*MRF4*(1 052 bp)和 *Myf5*(1 133 bp), 分别编码 297、270、251、238 和 242 个氨基酸。通过氨基酸序列比对分析发现, 5 种 MRFs 均含有由 60 个氨基酸组成的碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)保守结构域。进化树分析显示, MRFs 分为两支, 其中 *MyoD*(*MyoD1* 和 *MyoD2*)与 *Myf5* 聚为一支, *MRF4* 与 *MyoG* 聚为另一支, 且各基因均与鲈形目鱼类聚为一支。实时荧光定量 PCR 结果显示, 5 种 MRFs 在骨骼肌中表达量较高, 而在肝脏、心脏和肠道等组织中表达较低。该研究为揭示 MRFs 在鞍带石斑鱼骨骼肌生长发育中的作用机制奠定了基础。

**关键词:** 鞍带石斑鱼; 生肌调节因子; cDNA 克隆; 基因表达

**中图分类号:** S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2026)03-0508-15

张龙婷, 郑智, 王尧, 等. 鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因 cDNA 克隆及组织表达分析[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(3): 508–522. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250030 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20250030



鱼类骨骼肌生长发育是一个由多种转录因子参与调控的复杂过程, 其中生肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)发挥至关重要的调控作用<sup>[1]</sup>。MRFs 基因家族主要包括 *MyoD*、*MyoG*、*Myf5* 和 *MRF4*(*Myf6*)<sup>[2]</sup>, 其均编码一个高度保守的碱性螺旋-环-螺旋结构域(basic helix-loop-helix, bHLH)。bHLH 结构域中 Helix I 和 Helix II 与由 E2A 基因编码的 E12 或 E47 蛋白结合形成异二聚体复合物, 而 basic 碱性区域识别 E-box(一种包含 CANNTG 的 DNA 序列)中的启动子进而与其特异性结合, 从而激活骨骼肌特异性的基因表达<sup>[3-4]</sup>。因此, MRFs 基因家族调控着动物体骨骼肌发育整个过程, 包括肌细胞的增殖、分化及肌纤维的形成, 以及个体出生后骨骼肌功能的完善<sup>[5-6]</sup>。

Chen 等<sup>[7]</sup>在斑马鱼(*Danio rerio*)的研究中发现, *Myf5* 在准体节中胚层(presomitic mesoderm, PSM)检测到表达, 同时在 PSM 中未检测到其他

生肌调节因子的表达, 表明 *Myf5* 是肌发生的关键调控因子。同样的结果也出现在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[8]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[9]</sup>中。研究显示, 在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)的胚胎发育过程中, *MyoD* 基因在体节出现到原肠胚中期均检测到表达, 说明 *MyoD* 在肌肉发生过程中起着重要作用<sup>[10-11]</sup>。Ganassi 等<sup>[12]</sup>研究表明, *MyoG* 基因敲除可显著抑制斑马鱼胚胎期单核肌纤维生成及肌节发育, 表明其在胚胎发生过程中对肌肉分化的关键调控作用。Hinits 等<sup>[13]</sup>在斑马鱼中分离到的 *MRF4* 基因亚型, 并在终末分化的肌肉纤维中大量表达, 表明 *MRF4* 参与肌纤维分化过程。Schnapp 等<sup>[14]</sup>通过基因敲除实验发现, *MRF4* 能够在 *MyoD* 和 *Myf5* 基因敲除的斑马鱼中激活 *MyoD* 促进骨骼肌的形成。目前, 生肌调节因子已在部分鱼类中被克隆。例如, 鳊鱼(*siniperca chuatsi*)和达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)中发现 4 种 MRFs 因子<sup>[15-16]</sup>;



收稿日期: 2025-02-12

修回日期: 2025-03-14

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(32260919)

<sup>#</sup>第一作者: 张龙婷(2000—), 女, 海南大学海洋生物与水产学院 2022 级研究生。E-mail: 2594037894@qq.com<sup>\*</sup>通信作者: 高煜杰(1985—), 男, 副教授。研究方向: 水产动物营养与饲料。E-mail: yujiegao@hainanu.edu.cn

*MyoD* 在牙鲆、黄尾鲷 (*Seriola lalandi*)、金头鲷 (*Sparus aurata*) 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 中被克隆<sup>[17-20]</sup>; *MyoG* 分别在赤眼鲟 (*Squaliobarbus curriculus*)、刀鲚 (*Coilia nasus*) 等中被克隆<sup>[21-22]</sup>; *MRF4* 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中被克隆<sup>[23]</sup>。

鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*) 俗称龙趸、龙胆石斑鱼, 隶属鲈形目 (Perciformes)、鲷科 (Serranidae)、石斑鱼属 (*Epinephelus*), 最大体长可达 2 m, 体质量可达 400 kg, 为体型最大的珊瑚礁鱼类<sup>[24]</sup>。鞍带石斑鱼是中国海南省重要的海水养殖品种, 由于其生长迅速的特点, 常用于与其他石斑鱼如棕点石斑鱼<sup>[25]</sup>、云纹石斑鱼<sup>[26]</sup>、驼背鲈<sup>[27]</sup> 等进行杂交。本研究通过克隆鞍带石斑鱼生肌调节因子, 获得其基因序列, 并对其氨基酸序列进行同源性对比及进化树分析, 为进一步探究生肌调节因子对骨骼肌生长发育的调控提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 鞍带石斑鱼 [(20.00±0.07) g, 3 月龄] 购自海南省万宁市一养殖场。在实验开始前, 将鱼置于室温 (28 °C) 下的循环水槽中驯化两周。随后, 挑选 4 尾健康的鞍带石斑鱼, 用间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸 (MS-222) 对其进行麻醉, 在无菌操作下解剖取出鞍带石斑鱼 7 种不同的器官式组织, 包括骨骼肌、肝脏、肾脏、肠道、胃、心脏和脂肪组织, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱中保存。

GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒购自美国 Promega 公司; FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DH5α 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司; Gold ViewI 型核酸染色剂购自北京索莱宝科技有限公司; RNAiso Plus、GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒、SMARTer® RACE5'/3'kit 试剂盒、pMD19-T Vector、PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。

**1.2 引物设计** NCBI 数据库获得斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、斑马鱼、鲤鱼生肌调节因子 cDNA 序列, 根据序列保守区域设计简并引物来扩增鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因家族中间片段。根据中间片段序列设计用于扩增 3'RACE (3'-F1、3'-F2) 和 5'RACE (5'-R1、5'-R1) 的特异性引物。将中间片段、3'RACE 和 5'RACE 的 cDNA 序列拼接, 设计用于验证鞍带石斑鱼生肌调节因子 ORF 框的特异性引物 (表 1), 并根据克隆得到的鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子基因序列, 设计用于组织分布的荧光定量 PCR 引物 (表 2)。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

**1.3 RNA 提取和 cDNA 单链的合成** 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取总 RNA, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 并在 NanoDrop ND-1000 分光光度计 (NanoDrop, 威尔

表 1 基因克隆所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences for gene cloning

引物 Primer	序列 (3'-5') Sequence
<i>MyoD1</i> F1	ATGCACTTCTTCGAGGAC
<i>MyoD1</i> R1	TGTTGTCGGTGGAGATTC
<i>MyoD2</i> F1	CTCTGCTGACGACCTCTA
<i>MyoD2</i> R1	TTACTGCTGCTGGAATCG
中间片段引物序列 (5'-3') Middle fragment primer sequences (5'-3')	<i>MyoG</i> F1 TACGACCAATCCACCTATCA
	<i>MyoG</i> R1 TCCGCTGCTGTAGAGAT
	<i>MRF4</i> F1 CGCTATCTGGAAGAAGGG
	<i>MRF4</i> R1 CTCTCTGGTTTGTCATTGC
	<i>Myf5</i> F1 ACGTCTTCTCACCATCCCAG
	<i>Myf5</i> R1 AGAAGGTGGCCATGTCTCTC

续表 1 Tab. 1 Continued

引物 Primer	序列(3'—5') Sequence
<i>MyoD1</i> 3'-F1	GTCCTCCCTCCTGCACCTCCATCAC
<i>MyoD1</i> 3'-F2	GAGCACTACAGCGGGGACTCAGACG
<i>MyoD2</i> 3'-F1	CCCCGCTCCAAGTCTCCGATGG
<i>MyoD2</i> 3'-F2	GCAGCCACACAGACGATTCCAGCAGC
3'RACE所用引物序列 (5'—3')	
<i>MyoG</i> 3'-F1	CCCAACCCGACCAACCCAGAGTGT
3'RACE primer sequences (5'—3')	
<i>MyoG</i> 3'-F2	CATGCGTGCCCTGACCTCCATCGTG
<i>MRF4</i> 3'-F1	CCAACCCCAACCAGAGGCTACCCAA
<i>MRF4</i> 3'-F2	CGACCTCTGCCGACCATTCCACTGC
<i>Myf5</i> 3'-F1	CGCAACGCCATCCAGTACATCGAGAGC
<i>Myf5</i> 3'-F2	TCTGAATGCAAACCTACAGCGGCGGAT
<i>MyoD1</i> 5'-R1	CGTGGTGATGGAGGTGCAGGAGGGA
<i>MyoD1</i> 5'-R2	ATGGAGGTGCAGGAGGGAGG
<i>MyoD2</i> 5'-R1	CTTACCAAGCCGCCCTTTCTCGC
<i>MyoD2</i> 5'-R2	CTTTCTCGCATCGTCGCTGCTTCC
5'RACE所用引物序列 (5'—3')	
<i>MyoG</i> 5'-R1	CTTGGGCAGCCTCTGGTTTGGGTTC
5'RACE primer sequences (5'—3')	
<i>MyoG</i> 5'-R2	GACGCCTCTTCTCCCTCATCGTGGC
<i>MRF4</i> 5'-R1	TGGGCGCCGACTTCTCTTGCAGAT
<i>MRF4</i> 5'-R2	CATGAGGCACTGGCCGTCGCAG
<i>Myf5</i> 5'-R1	TGCAGGCTCTCGATGTACTGGATGGCG
<i>Myf5</i> 5'-R2	CTGGCTGGGGTTGGCTGAGGTGC
<i>MyoD1</i> Full—F	ACGTTTCTGTCTCTGTCACTGGAT
<i>MyoD1</i> Full-R	ATGGTAAAGTCCCAGGTGTGAAGG
<i>MyoD2</i> Full-F	CCCCGCTCCAAGTCTCCGATGG
<i>MyoD2</i> Full-R	GCAGCCACACAGACGATTCCAGCAGC
全长验证引物序列(5'—3')	
Full-length validation primer sequences (5'—3')	
<i>MyoG</i> Full-F	CCGAACACCACATACAGTAGAGC
<i>MyoG</i> Full-R	TGGAGGGTCTACTTGGGAAT
<i>MRF4</i> Full-F	GGGCGCAACAATATGATGGACCTTT
<i>MRF4</i> Full-R	GAATATAGTGAAATAATTTAGGGA
<i>Myf5</i> Full-F	ATGGAYGTCTTYTCVCCVTCCA
<i>Myf5</i> Full-R	TGGCGTTCGGTAAAAGCAG
3' CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
5' CDS	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
接头引物序列(5'—3')	
Adapter primer sequences (5'—3')	
NUPA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPMA-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPMA-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGGTATCAACGCAGAGT

表 2 实时荧光定量 PCR 检测 5 种基因组织分布所用引物序列

Tab. 2 Nucleotide sequences of the primers used for Real-time PCR

引物 Primer	序列3'-5' Sequence
<i>MyoD1</i> RT-F	GGCATGACGGATTTCAACGG
<i>MyoD1</i> RT-R	CTGCTGTTGTCTGGTGGAGAT
<i>MyoD2</i> RT-F	ATCATCACCACCACCACGTC
<i>MyoD2</i> RT-R	TTCAGGGTCTCAAAGGCGTC
<i>MyoG</i> RT-F	CACGATGAGGGAGAAGAGGC
<i>MyoG</i> RT-R	TGCTGGTTGAGGGAAGACAC
<i>MRF4</i> RT-F	CAGTGTGGCCAGTCATGAGT
<i>MRF4</i> RT-R	TCTTCGGTGGTGATGCTGTC
<i>Myf5</i> RT-F	GAGGAGGACGAGCATGTGAG
<i>Myf5</i> RT-R	CTCGATGTACTGGATGGCGT
<i>EFl-<math>\alpha</math></i> RT-F	AGGGATGGAAGATTGAGCGC
<i>EFl-<math>\alpha</math></i> RT-R	CGTACCGGGCTTCAGGATAC

明顿, 特拉华州)上进行产率测定。RNA 经脱氧核糖核酸去除酶(Takara, 日本)去除 DNA 后, 中间片段 cDNA 模板制备和 3'端 cDNA 模板制备通过 GoScript™ Reverse Transcription System 试剂盒 (Promega, 美国)进行反转录; 5'端 cDNA 模板制备采用 SMARTer® RACE5'/3'kit(Takara, 日本)试剂盒反转录合成; 不同组织分布 cDNA 模板制备采用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)(Takara, 日本)试剂盒进行反转录合成。

#### 1.4 PCR 产物的扩增、转化和测序

**1.4.1 中间片段克隆** 以所获得中间片段 cDNA 为模板, 以引物 F1 和 R1 进行第 1 轮 PCR 扩增, PCR 反应条件如下: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, TM 值 30 s, 72 °C 60 s, 35 循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保持。

**1.4.2 *MRFs* 3'端片段克隆** 以 3'端 cDNA 为模板, 分别以鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因家族基因正义引物 3'-F1 和反义接头引物 UPMA(UPMA-L:UPMA-S 为 1:5 混合使用)进行第 1 轮 PCR 扩增; 将第 1 轮 PCR 产物稀释 100 倍, 并取 2  $\mu$ L 作为第 2 轮 PCR 扩增模板, 以正义引物 3'-F2 和反义接头引物 NUPA 进行第 2 轮嵌套 PCR 扩增, 第 1 轮 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, TM 值+

5 °C(每循环降落 0.5 °C) 30 s, 72 °C 60 s, 20 循环; 94 °C 30 s, TM 值 30 s, 72 °C 60 s, 20 循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保持。第 2 轮 PCR: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, TM 值 30 s, 72 °C 60 s, 40 循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保持。

**1.4.3 *MRFs* 5'端片段克隆** 以 5'端 cDNA 为模板, 分别以鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因家族基因正义引物 5'-R1 和反义接头引物 UPMA 进行第 1 轮 PCR 扩增; 将第 1 轮 PCR 产物稀释 10 倍, 并分别取 2  $\mu$ L 作为第 2 轮 PCR 扩增模板, 分别以鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因家族的正义引物 3'-R2 和反义接头引物 NUPA 进行第 2 轮嵌套 PCR 扩增, PCR 反应条件同 1.4.2。

**1.4.4 PCR 扩增产物回收与纯化** PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并根据 FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit(诺唯赞, 中国)说明书切取含有目的片段凝胶, 胶回收纯化 PCR 产物。

**1.4.5 PCR 转化及测序** 回收产物连接于 pMD19-T Vector, 转化到大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )感受态细胞中, 涂在含氨苄青霉素 LA 平板上, 挑取白色单菌落培养, 进行 PCR 阳性克隆检测, 分别取 100  $\mu$ L 菌液送至广州天一辉远公司测序。

**1.5 *MRFs* cDNA 全序列拼接及验证** 根据测序结果, 将 *MRFs* 基因家族 cDNA 序列拼接以获得

基因全长序列,利用在线 ORF Finder 对 5 个基因 ORF 进行预测,并在其序列两端非编码区设计特异性引物(*MyoD1* Full-F, *MyoD1* Full-R; *MyoD2* Full-F, *MyoD2* Full-R; *MyoG* Full-F, *MyoG* Full-R; *MRF4* Full-F, *MRF4* Full-R; *Myf5* Full-F, *Myf5* Full-R)进行 PCR 全长扩增反应,以进行全长验证。

**1.6 MRFs cDNA 全长序列分析** 鞍带石斑鱼 *MyoD1*、*MyoD2*、*MyoG*、*MRF4*、*Myf5* 5 个基因 cDNA 序列使用 ORF Finder([http://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html))预测基因编码区;核苷酸和氨基酸序列同源性比对使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)blast 程序进行;核酸序列翻译成氨基酸序列通过 ExPasy(<https://web.expasy.org/translate/>)完成;采用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)对蛋白质三级结构进行预测分析;多重氨基酸序列比对图谱使用 Clustal X 和 ESPript v3.0 构建;在 NCBI 数据库上进行比对,获得 MRFs 基因同源序列。利用 MEGA v7.0 软件中的 ClustalW 算法对 MRFs 基因的氨基酸序列进行多重序列比对,并采用 Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树,通过自引导检验(bootstrap)获得系统分支的置信度(重复次数为 1 000)。

**1.7 MRFs 基因组织表达** 鞍带石斑鱼骨骼肌、脑、心脏、脂肪、胃等组织 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应,根据 TB Green® Premix Ex Tag™ II (Takara, 日本)试剂盒说明书进行操作。实时荧光定量在定量热循环仪(Roche LightCycler® 480,瑞士)中进行。扩增体系为 20  $\mu$ L,其中包含 10  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR MasterMix II 反应混合液,0.5  $\mu$ L 的正反引物,7  $\mu$ L 无核酶水和 2  $\mu$ L cDNA 模板,反应程序为 95  $^{\circ}$ C 30 s 预变性,95  $^{\circ}$ C 5 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 循环,95  $^{\circ}$ C 5 s,65  $^{\circ}$ C 60 s 绘制溶解曲线;50  $^{\circ}$ C 30 s 冷却。以 *EF1- $\alpha$*  作为内参基

因。用 5 种浓度稀释不同倍数的 cDNA 样品制作标准曲线(每个 cDNA 样品设置 3 次重复试验),根据公式  $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$  分析扩增效率。目的基因的相对表达水平采用  $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算<sup>[28]</sup>。

**1.8 数据获取** 本研究将克隆得到的基因序列上传已上传至 GenBank,登录号分别为 MW762676、MW762677、MW762678、MW762679、MW762680。

**1.9 数据统计分析** 实验数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示,并进行了方差齐性检验和正态性检验。使用 SPSS v22.0 软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),使用 Duncan's 进行多重比较分析,以  $P<0.05$  作为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

**2.1 鞍带石斑鱼 MRFs 基因 cDNA 克隆与序列分析** 克隆获得鞍带石斑鱼 *MyoD1*、*MyoD2*、*MyoG*、*MRF4* 和 *Myf5* cDNA 序列长度分别为 1 962、1 466、926、1 052 和 1 133 bp,开放阅读框(ORF)分别为 891、810、753、714 和 726 bp,分别编码 297、270、251、238 和 242 个氨基酸。GenBank 登录号分别为 MW762676、MW762677、MW762678、MW762679 和 MW762680。结构分析表明,鞍带石斑鱼 MRFs 家族 5 个基因均由编码区(CDS)和非翻译区(UTR)组成(图 1)。采用 Garnier-Gibrat-Robson 方法预测其二级结构,结果显示 *MyoD1*、*MyoD2*、*MyoG*、*MRF4* 和 *Myf5* 均包含多个  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠结构域(图 2)。三级结构预测进一步表明其均呈现典型的螺旋-环-螺旋(HLH)结构(图 3)。

**2.2 鞍带石斑鱼 MRFs 氨基酸序列比对** 采用 DNAMAN 软件对鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子氨基酸序列进行比对,结果表明其具有 60 个左右氨基酸组成的保守碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域(图 4)。

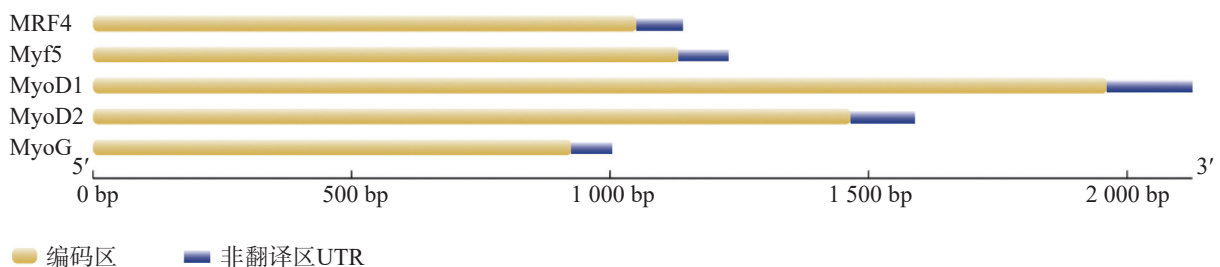


图 1 鞍带石斑鱼 MRFs 家族基因的结构

Fig. 1 Gene structure of the *Epinephelus lanceolatus* MRFs family genes

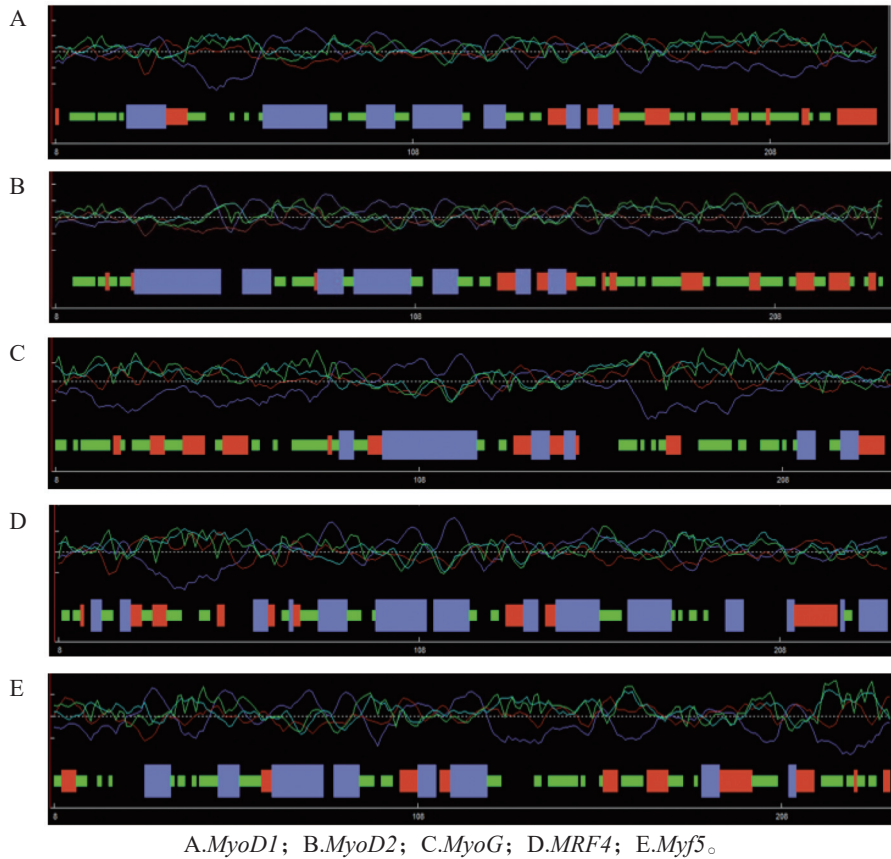


图 2 鞍带石斑鱼 MRFs 家族蛋白二级结构预测

Fig. 2 Prediction of the secondary structure of MRFs protein in *Epinephelus lanceolatus*

注: 蓝色代表  $\alpha$ -螺旋区域, 红色代表  $\beta$ -折叠区域, 绿色代表转角区域, 空缺代表无规则卷曲区域。

Note: Blue indicate  $\alpha$ -helix area; red indicate  $\beta$ -sheet area; green indicate  $\beta$ -turn area; vacancy indicate random coil area.

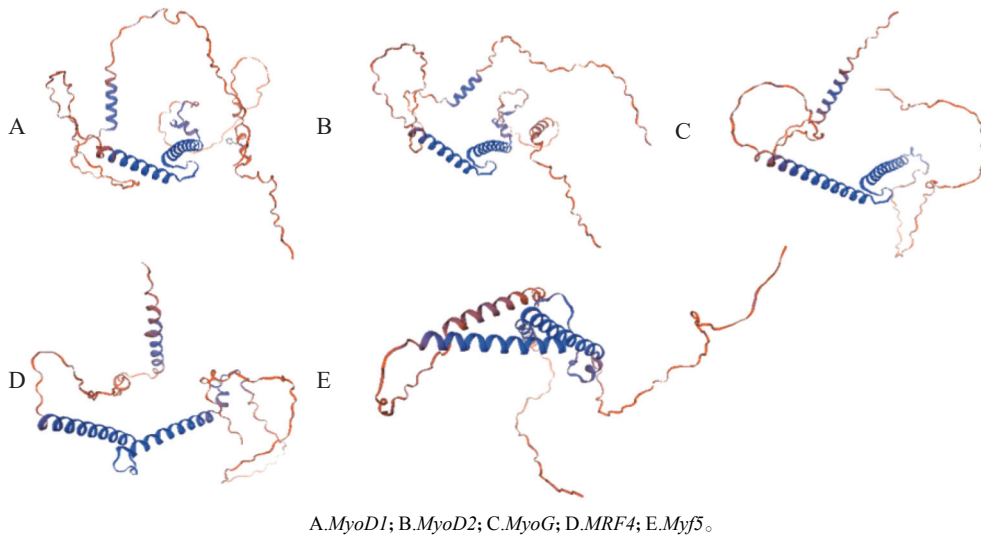


图 3 鞍带石斑鱼 MRFs 家族蛋白质的三级结构

Fig. 3 Tertiary structure of MRFs family proteins in *Epinephelus lanceolatus*

### 2.3 鞍带石斑鱼与其他物种 MRFs 基因编码区同源性对比

**2.3.1 鞍带石斑鱼与其他物种 *MyoD1* 基因编码区同源性对比** 多重序列比对结果表明, 鞍带石斑鱼 *MyoD1* 与金头鲷同源性最高, 为 92.93%, 其

次是草鱼(68.54%), 与哺乳类同源性在 54.49% ~ 56.12%, 与鸟类为 64.47%(图 5)。

**2.3.2 鞍带石斑鱼 *MyoD2* 与其他鱼类 *MyoD2* 基因编码区同源性对比** 多重序列比对结果表明, 鞍带石斑鱼 *MyoD2* 与斜带石斑鱼同源性最高

MyoD1	MELSDISFPIPAADDFYDDPCFNSTDMHFFEDLPRLVHVGLLKPDDSSSSPSPSSSS
MyoD2	MDFPDLFPPLSSADDLYDDPCFNSTDMNFDDLSRLMHAGLLKTEDHLHHH-----
MyoG	-----MELFETNPYFFPDQRFYEGGDSYFSPRLPGGYDQSTYQDRNSMMGLC
MRF4	-----MMDLFETNPYLFNDRYLEEGDHGPLQLHDMGVSPLYNGNDSPLSPG
Myf5	-----MDVFSQVYVYDRACASSPDSLEFGP-----
MyoD1	SSSPSSLLHLHHHAIVEDDEHVRAPS-----GHHQAG-RCLLWACKACKRKTNADRRK
MyoD2	-----HHHHVPTTEDEHVRAPG-----GLHQGTGGHLLWACKACKRKTSHEDRRK
MyoG	G-----SLGGVGVGTGTEDKPSPLSPHSETHCPG-QCLPWACKLCKRKTVMDRRR
MRF4	QD-----NVPSETGGESSGEEHVLAP-----PGLRAHCDG-QCLMWACKLCKRKSAPTDRRK
Myf5	-----GVELDGSEDEHVRVPG-----APHQPG-HCLQWACKACKRKSNFVDRRR
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
	<b><i>BHLH domain</i></b>
MyoD1	AATLRERRRLSKVNDAFETLKRCTTANPNQRLPKVEILRNAISYIESLQALLRGGQDDGF
MyoD2	AATMRERRRLGKVNDAFETLKRCTAANPNQRLPKVEILRNAISYIESLQALLRTRSDDSF
MyoG	AATMRERRLKKVNEAFDALKRSTLMNPQRLPKVEILRSAIQYIERLQALVSSLNQQDT
MRF4	AATLRERRRLKKINEAFDALKRKTVANPNQRLPKVEILRSAISYIERLQDLQLDEQEK
Myf5	AATMRERRRLKVNHAFAEALRRCTSANPSQRLPKVEILRNAIQYIESLQELLEQVEN-Y
	***. ** .*** * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MyoD1	YPVLEHYSGSDASSPRSNCSGMDTFNGPTCQSNRRGSYDSSYFSETPNGGVKSARSSV
MyoD2	YPQLEHYSGSDASSPRSNCSGMDVFISP-CST-RSENSDGSYCSHTDSDS-SSSKPSP
MyoG	ETGQQGLHYRPNPTQPRVSSSESPSSGTCSSPESWSTPEQCTQSYSEDLLSAADSPE
MRF4	NGSCHNLKQSVASHEYHKKSSSE-----WPTSADHSTAAMTNQ-REGTSESSA
Myf5	YGLPGESS-SEPGSPLSSCSGMDNSPWWQH-LNANYSGGYSAKNES-LGDKAPG
MyoD1	VSSLDCLSSIVERISTDNSSLLPADAPGSPQTDPAGEAAAPGVQVPSPTTSTRPDLIY
MyoD2	ISSLDCLSSIVERISTDP-AVAPPGDS--VVPQGGPSPQSSP-----AGSSPPAEPNSIF
MyoG	QQNMALTSIVGISTAGGAVFPVDLPK-----
MRF4	STSLRLSSIVDSITTED-KVNFSEDSVEN-----
Myf5	ASSLECLSSIVDRSSVDTSCGGPAALRDMATFSPSSSDSQP---CTPESGSRP--VY
	. * .***. ...
MyoD1	QVL
MyoD2	EPL
MyoG	---
MRF4	---
Myf5	HVL

图 4 鞍带石斑鱼 5 种 MRFs 氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple alignments of the five MRFs amino acid sequences

注: bHLH 结构域用下划线标记并字体加粗注明; “-”代表插入缺失; “\*”代表氨基酸完全一致; “.”代表有 2 种氨基酸。

Note: The bHLH domain is underlined and bold typed; “-” represents indel; “\*” means identical amino acids; “.” means two amino acids.

(98.51%), 其次是金头鲷(85.14%), 与红鳍东方鲀(70.00%)最低(图 6)。

**2.3.3 鞍带石斑鱼 *MyoG* 与其他物种 *MyoG* 基因编码区同源性对比** 多重序列比对结果表明, 鞍带石斑鱼 *MyoG* 与斜带石斑鱼和金头鲷同源性最高, 同源性分别为 98.80%、94.40%。与哺乳类(50.20%~51.39%)和鸟类(56.18%)同源性较低(图 7)。

**2.3.4 鞍带石斑鱼 *MRF4* 与其他物种 *MRF4* 基因编码区同源性对比** 多重序列比对结果表明, 鞍带石斑鱼 *MRF4* 与斜带石斑鱼同源性最高, 为 97.47%, 其次是金头鲷(82.92%)和红鳍东方鲀(81.40%), 与哺乳类(50.20%~51.39%)和鸟类(56.18%)同源性最低(图 8)。

**2.3.5 鞍带石斑鱼 *Myf5* 与其他物种 *Myf5* 基因编码区同源性对比** 多重序列比对结果表明,

鞍带石斑鱼 *Myf5* 与斜带石斑鱼同源性最高, 为 99.59%, 其次是金头鲷(91.29%), 与红鳍东方鲀、虹鳟及草鱼同源性分别为 87.97%、81.82% 和 75.21%, 与哺乳类(56.20%~56.59%)和鸟类(57.09%)同源性较低(图 9)。

**2.4 鞍带石斑鱼 MRFs 进化树分析** 采用软件 MEGA v7.0 基于 Neighbor-Joining(N-J)法构建了包括鞍带石斑鱼、人、小鼠、红原鸡、草鱼、斑马鱼等 11 种物种的系统进化树。结果显示, 5 种生肌调节因子(MRFs)明显分为两支, 其中 MyoD1、MyoD2 与 Myf5 聚为一支, MRF4 与 MyoG 聚为另一支。在系统进化过程中, 每个基因均明显划分为鱼类、哺乳类和鸟类 3 大分支。在鱼类分支中, 鞍带石斑鱼 MRFs 与斜带石斑鱼亲缘关系最近, 二者聚成簇后与金头鲷聚在一起, 再与红鳍

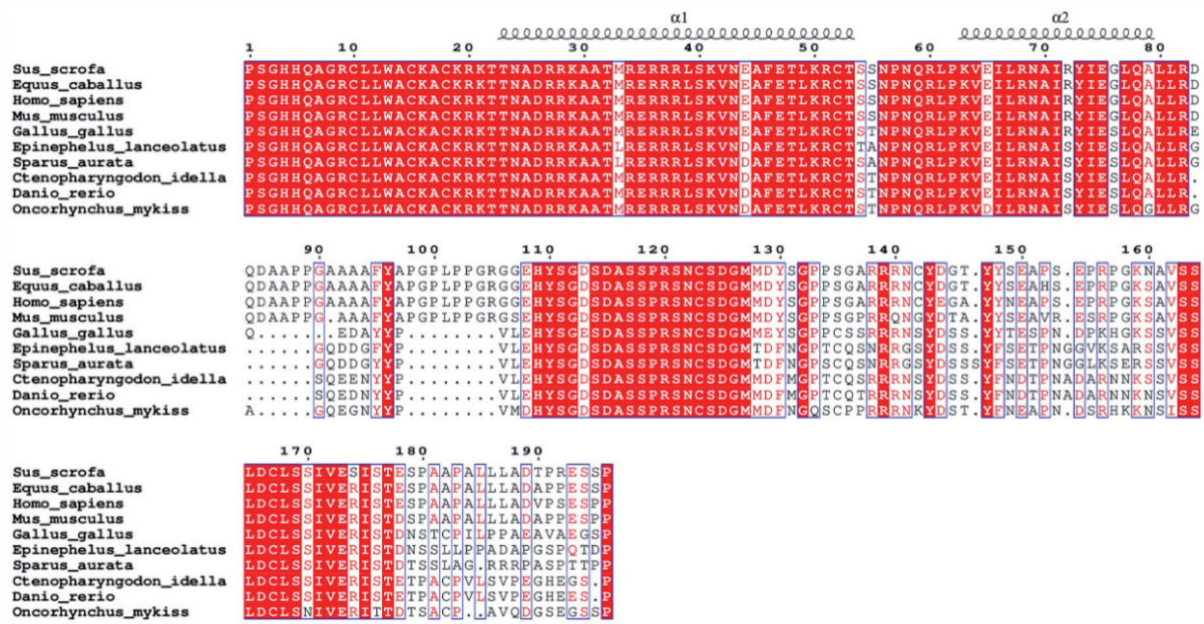


图 5 鞍带石斑鱼 *MyoD1* 与其他物种的 *MyoD1* 编码区氨基酸序列之间的多重序列比对图  
 Fig. 5 Multiple sequence alignment of the *MyoD1* amino acid sequences between *Epinephelus lanceolatus* and other species

注: *MyoD1* 的二级结构元素显示在排列上方;  $\alpha$ -螺旋表示为螺旋。  
 Note: The secondary structural elements of *MyoD1* are showed above the arrangement,  $\alpha$ -helix is represented as a helix.

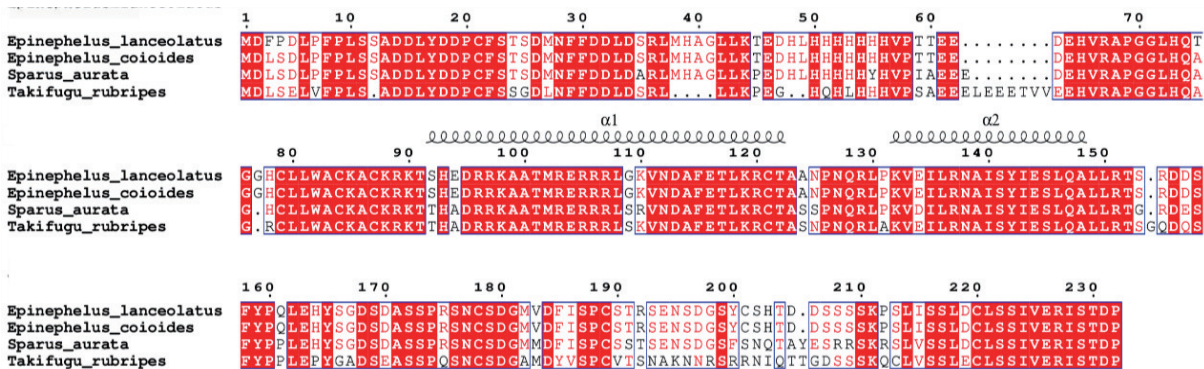


图 6 鞍带石斑鱼 *MyoD2* 与其他物种的 *MyoD2* 编码区氨基酸序列之间的多重序列比对图  
 Fig. 6 Multiple sequence alignment of the *MyoD2* amino acid sequences between *Epinephelus lanceolatus* and other species

注: *MyoD2* 的二级结构元素显示在排列上方;  $\alpha$ -螺旋表示为螺旋。  
 Note: The secondary structural elements of *MyoD2* are showed above the arrangement;  $\alpha$ -helix is represented as a helix.

东方鲀形成一小支,且各节点具有较高的自展值支持;与草鱼、斑马鱼、虹鳟的进化关系较远(图 10)。

**2.5 鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因 mRNA 组织表达分析** 如图 11-A 所示, *MyoD1* 基因在肠道、胃、肝脏和骨骼肌中均有表达,其中骨骼肌表达量最高,且尾肌表达量略高于肋肌,但两者无显著性差异 ( $P>0.05$ );在心脏和脂肪组织中几乎检测不到 *MyoD1* 表达。 *MyoD2* 基因在以上 6 种器官式组织中均有表达,骨骼肌中表达量最高,且尾肌表达量显著高于肋肌 ( $P<0.05$ ),心脏中表达量最低

(图 11-B)。 *MyoG* 基因在 6 种组织中均有表达,骨骼肌中表达量最高,肋肌表达量略高于尾肌,但两者无显著性差异 ( $P>0.05$ )(图 11-C)。 *MRF4* 基因在肠道、胃、心脏、骨骼肌和脂肪中均有表达,骨骼肌中表达量最高,且肋肌表达量显著高于尾肌 ( $P<0.05$ ),而在肝脏中几乎检测不到 *MRF4* 表达(图 11-D)。 *Myf5* 基因在除肝脏外的 5 种组织中均有表达,骨骼肌中表达量最高,且肋肌与尾肌表达差异与 *MyoD2* 结果一致(图 11-E)。总体而言,5 种生肌调节因子 mRNA 在骨骼肌表达量均显著高于其他组织 ( $P<0.0001$ )。

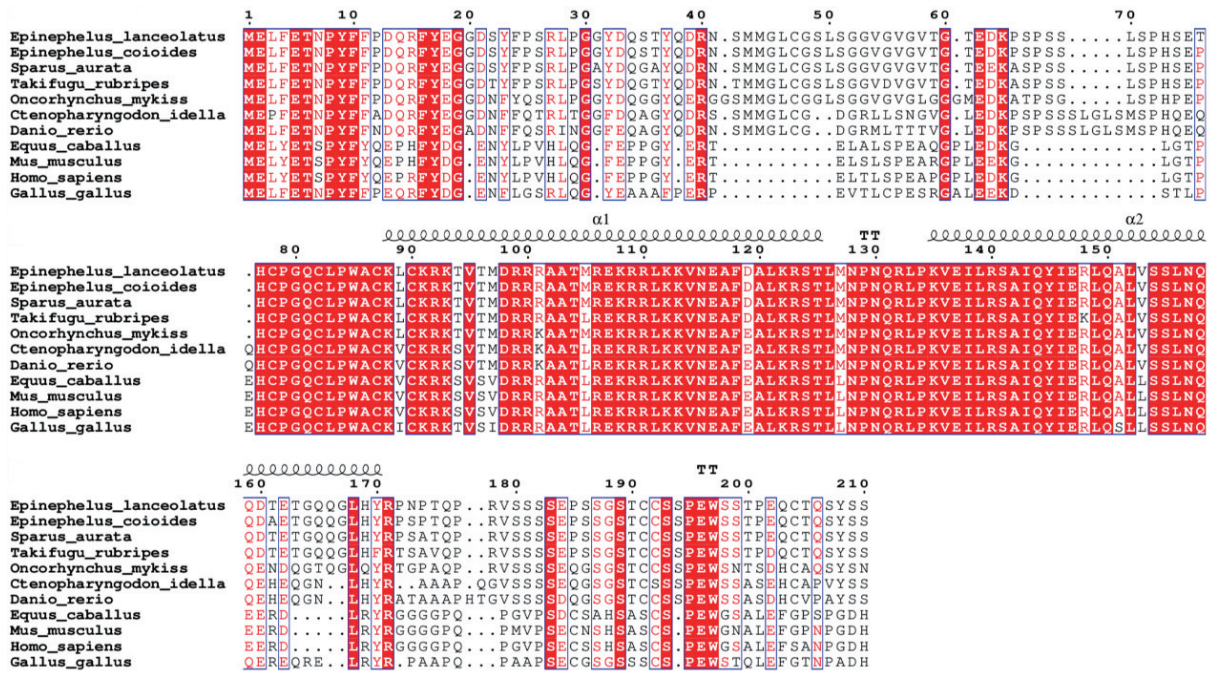


图 7 鞍带石斑鱼 *MyoG* 与其他物种的 *MyoG* 编码区氨基酸序列之间的多重序列比对图

Fig. 7 Multiple sequence alignment of the *MyoG* amino acid sequences between *Epinephelus lanceolatus* and other species

注: *MyoG* 的二级结构元素显示在排列上方;  $\alpha$ -螺旋表示为螺旋;  $\beta$ -转角表示为 TT。

Note: The secondary structural elements of *MyoG* are showed above the arrangement;  $\alpha$ -helix is represented as a helix;  $\beta$ -turn is denoted as TT.

### 3 讨论

*MyoD2*、*MyoG*、*MRF4* 和 *Myf5* cDNA 序列, 其长度分别为 1 962、1 466、926、1 052 和 1 133 bp, 本研究成功克隆了鞍带石斑鱼 *MyoD1*、

分别编码 297、270、251、238 和 242 个氨基酸。蛋

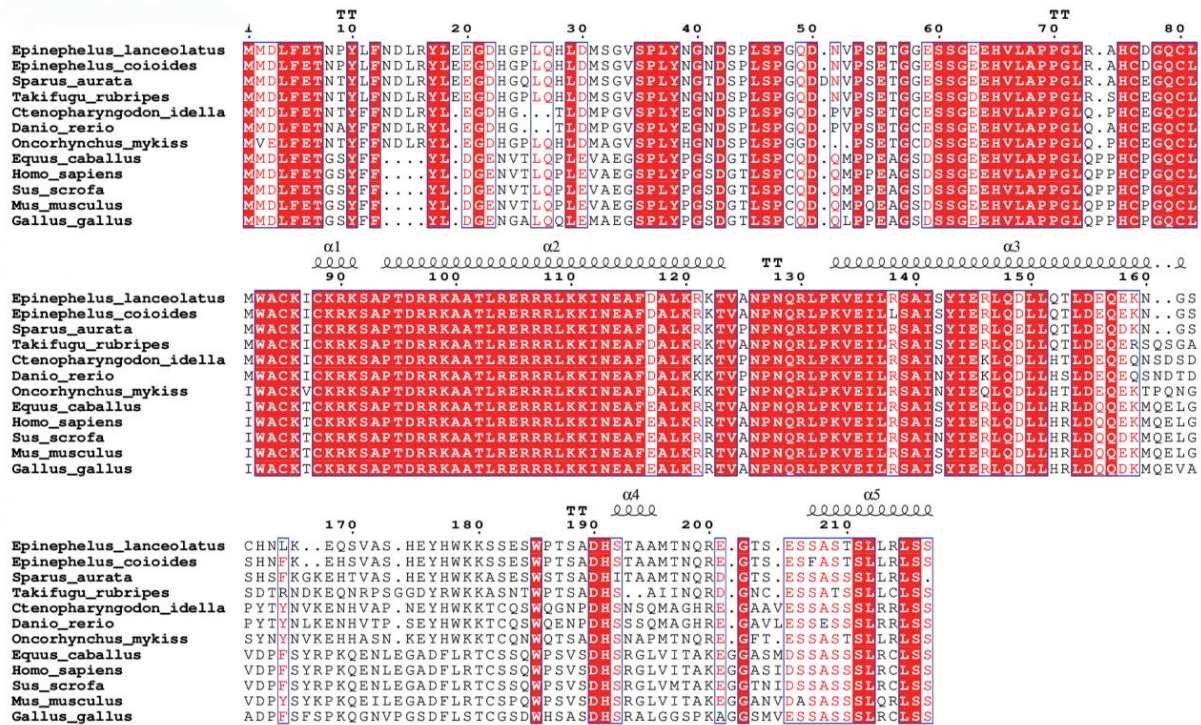


图 8 鞍带石斑鱼 *MRF4* 与其他物种的 *MRF4* 编码区氨基酸序列之间的多重序列比对图

Fig. 8 Multiple sequence alignment of the *MRF4* amino acid sequences between *Epinephelus lanceolatus* and other species

注: *MRF4* 的二级结构元素显示在排列上方;  $\alpha$ -螺旋表示为螺旋;  $\beta$ -转角表示为 TT。

Note: The secondary structural elements of *MRF4* are showed above the arrangement;  $\alpha$ -helix is represented as a helix;  $\beta$ -turn is denoted as TT.

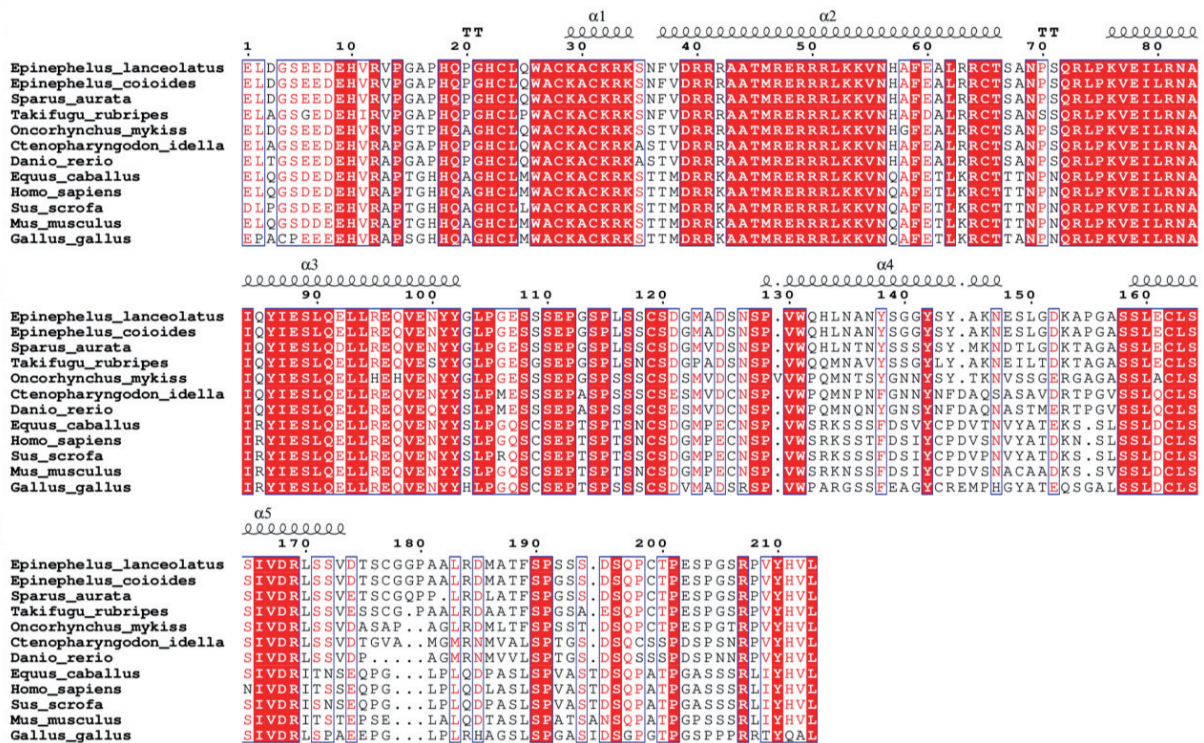


图 9 鞍带石斑鱼 *Myf5* 与其他物种的 *Myf5* 编码区氨基酸序列之间的多重序列比对图

Fig. 9 Multiple sequence alignment of the *Myf5* amino acid sequences between *Epinephelus lanceolatus* and other species

注: *Myf5* 的二级结构元素显示在排列上方;  $\alpha$ -螺旋表示为螺旋;  $\beta$ -转角表示为 TT。

Note: The secondary structural elements of *Myf5* are showed above the arrangement;  $\alpha$ -helix is represented as a helix;  $\beta$ -turn is denoted as TT.

白结构预测分析表明, 鞍带石斑鱼 5 种 MRFs 均具有高度保守的碱性螺旋-环-螺旋结构域 (bHLH), 该区域由 60 个左右的氨基酸残基组成, 其中碱性区域 (basic) 识别并结合 E-box 启动子, 而 HLH 区域与 E 蛋白形成异二聚体复合物, 从而激活肌肉特异性基因转录<sup>[3]</sup>。蛋白结构预测还显示, *Myf5*、*MyoD1* 和 *MyoD2* 均属于 *Myf5* 基因超家族, 且 *Myf5* 与 *MyoD* 在功能上具有相似性, 均参与肌卫星细胞增殖及肌纤维增生调控。Kassar-Duchossoy 等<sup>[29]</sup> 研究发现, *Myf5* 或 *MyoD* 单基因敲除小鼠的骨骼肌发育基本正常, 但双基因敲除小鼠则完全丧失成肌能力, 表明二者在肌生成中具有功能互补性。Relaix 等<sup>[30]</sup> 证实, Pax3 和 Pax7 通过结合 *Myf5* 和 *MyoD* 启动子中的保守 E-box 和 Pax 结合位点, 直接激活其表达。*MyoD* 作为“主调控因子”的功能依赖于其启动子中的 E-box 元件 (CANNTG), 这一特征在 *Myf5* 中同样保守。Tapscott 等<sup>[31]</sup> 首次提出, E-box 是肌源性分化的核心调控模块, 且 *Myf5* 与 *MyoD* 共享这一元件的结合特性。这些研究表明, *Myf5* 与 *MyoD* 在肌卫星细胞增殖中的冗余功能及调控机制的保守性, 进一步支持了二者由同一个祖先基因复制进化而来

的假说。

同源性分析结果表明, 鞍带石斑鱼 MRFs 氨基酸序列与其他鱼类的同源性较高, 为 68.54% ~ 99.59%。特别是与鲈形目的同源性最高, 为 82.92% ~ 99.59%; 而与鸟类和哺乳类的同源性相对较低, 为 50.20% ~ 64.47%, 这证明本研究所得, 鞍带石斑鱼 MRFs 序列所编码的蛋白质与各物种的基因编码的蛋白质具有相似的功能, 在鱼类中的高保守性同时也揭示了该蛋白质功能的高度保守性。结合系统进化树结果, 鞍带石斑鱼与同属石斑鱼属的斜带石斑鱼聚在同一分支, 并与鲈形目鱼类形成一簇, 说明亲缘关系最近; 而与哺乳类、鸟类的距离较远, 说明与陆生动物亲缘性较远。与 Chen 等<sup>[32]</sup> 基于线粒体构建的进化树结果相符。鱼类 MRFs 与鸟类和哺乳动物的同源性存在较大差异, 推测与物种进化、亲缘关系以及所含的氨基酸残基数目不同有关。

根据结构和功能的不同, MRFs 基因家族可分为初级 MRFs (*Myf5* 和 *MyoD*) 和次级 MRFs (*MyoG* 和 *Myf6*)。初级 MRFs 同源性较高, 功能互补, 主要调控体节细胞向生肌细胞系的定向分化; 次级 MRFs 则促进成肌细胞增殖并分化为肌细胞, 最终

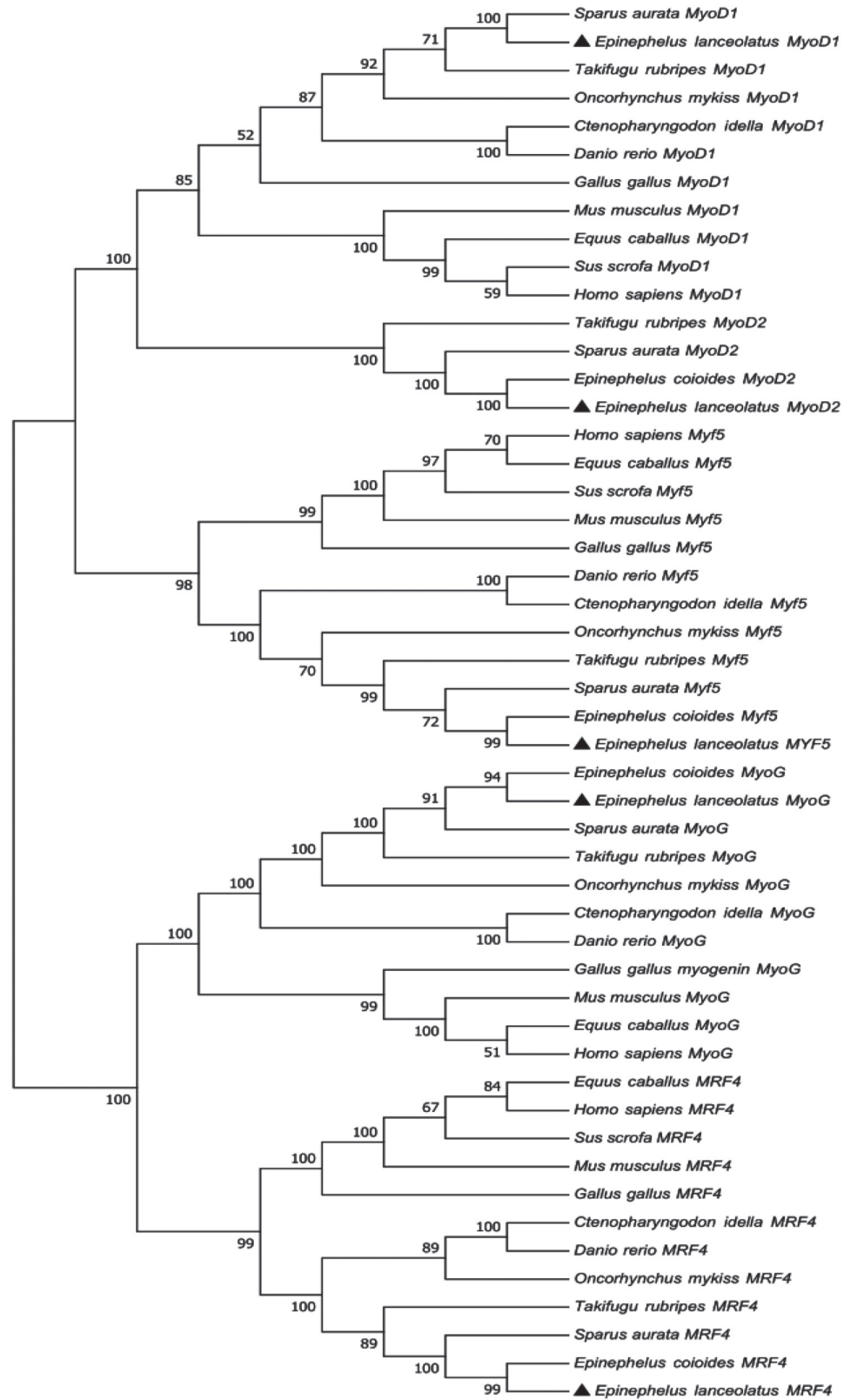
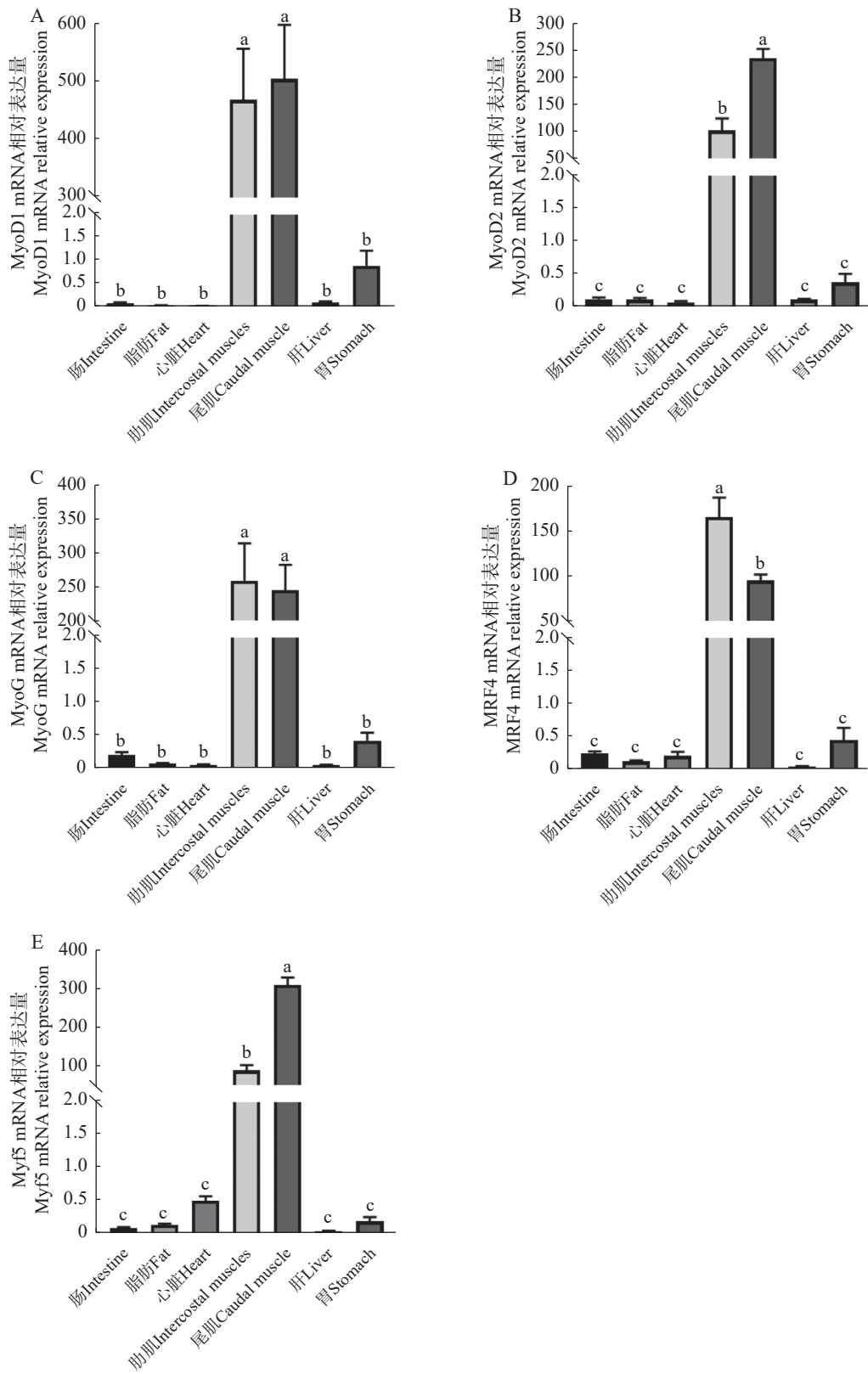


图 10 基于不同物种 MRFs 氨基酸序列构建的系统发育进化树(NJ 法)

Fig. 10 Phylogenetic tree based on MRFs amino acid sequences of different species (Neighbor-Joining method)

形成肌纤维<sup>[33]</sup>。在鱼类胚胎发育中, *MyoD* 和 *Myf5* 表达通常早于 *MyoG* 和 *MRF4*。例如, 在牙鲆胚胎发育过程中, *Myf5* 和 *MyoD* 在受精 26 h 后

即可检测到, 而 *MyoG* 的表达则首次出现在受精 32.5 h 后<sup>[34]</sup>。类似结果在鲤鱼<sup>[8]</sup> 和虹鳟<sup>[35]</sup> 中也有报道。然而, 不同鱼类间 MRFs 表达模式也存在



A. *MyoD1*; B. *MyoD2*; C. *MyoG*; D. *MRF4*; E. *Myf5*。

图 11 鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子在不同组织的相对表达情况

Fig. 11 Relative expression levels of 5 MRFs in different tissues of *Epinephelus lanceolatus*

注: *EF1-α* 作为内参基因。数值以平均值±标准差( $n=6$ )表示; 不同字母表示 5 种生肌调节因子在不同组织间具有显著性差异。

Note: *EF1-α* serves as the reference gene. Values are expressed as mean ± SE ( $n=6$ ); different letters indicate significant differences in the five MRFs among different tissues.

差异。例如,牙鲆 *MyoG* 在胚胎发育形成 3 个体节时首次表达,其表达水平持续上调至 30 个体节后逐渐下调<sup>[34]</sup>;而大西洋鲱 (*Clupea harengus*) *MyoG* 在胚胎发育形成 34 个体节前仅短暂表达,并在 *MyoD* 开始表达前从体节中消失<sup>[36]</sup>。这些研究表明, *MRFs* 基因表达时序在鱼类中具有保守性,但也存在物种特异性差异。而进化分析结果同样显示,鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因家族明显分为两支,其中 *MyoD* 与 *Myf5* 聚成一支,而 *MyoG* 与 *MRF4* 聚成另一支,说明 *MyoD* 与 *Myf5* 同源性较高,可能与其在肌肉生长发育调控中的功能一致。

本研究发现,鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因在骨骼肌中呈现高表达,这与在其他鱼类中的研究结果一致。例如, *MyoD* 在斑马鱼胚胎体节及成体骨骼肌卫星细胞中特异性高表达,其敲除可导致体节肌细胞分化完全停滞,证实 *MyoD* 是斑马鱼骨骼肌发育的核心调控因子<sup>[37]</sup>。在鲶鱼 (*Silurus asotus*) 中, *MyoG* 在骨骼肌快肌纤维分化阶段特异性高表达,通过激活肌球蛋白重链(MyHC)及肌钙蛋白编码基因,直接驱动肌纤维增粗<sup>[38]</sup>。松江鲈 (*Trachidermus fasciatus*) 的 *MRF4* 在骨骼肌中高表达, *MRF4* 不仅维持成熟肌纤维功能稳态,还在肌肉再生过程中被激活,参与修复调控<sup>[39]</sup>。此外,虹鳟的 *Myf5* 主要在骨骼肌中表达, *Myf5* 在肌肉前体细胞分化和胚胎肌肉发育中发挥主导作用<sup>[40]</sup>。这些结果表明, *MRFs* 家族基因在鱼类骨骼肌中的高表达与其在肌肉生成和分化中的核心功能密切相关。此外,鞍带石斑鱼 *MRFs* 基因在其他器官是式组织中也检测到微量表达,推测其可能不仅参与肌肉分化,还在其他器官组织中发挥潜在作用。类似现象在其他鱼类中也有报道,如虹鳟 *Myf5* 在肝脏、肠、心脏、鳃和脑中有少量表达<sup>[40]</sup>,达氏鲟的 *MRFs* 基因在心脏、脑、肝、脾和肾中也有表达<sup>[16]</sup>。这些发现进一步支持了 *MRFs* 基因在鱼类多种器官式组织中的多功能性。研究表明,鱼类早期生长发育的各个阶段均受到 *MRFs* 基因表达的影响。例如,在牙鲆中, *MyoD* 在胚胎发生的初始阶段即在前体肌肉细胞中检测到表达<sup>[19]</sup>;在鳊鱼中, *Myf5* 基因在原肠胚期这一早期发育阶段即开始表达<sup>[41]</sup>;此外, Johansen 等<sup>[42]</sup> 研究发现,虹鳟在不同生长阶段中,骨骼肌内的 *MyoD*、*Myf5*、*MyoG* 和

*MRF4* 表达水平存在显著差异。基于上述研究结果可以推断, *MRFs* 在不同发育阶段的差异性表达可能与其调控肌肉生长的分子机制密切相关。

综上所述,本研究成功克隆得到鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子 *MyoD*(*MyoD1* 和 *MyoD2*)、*MyoG*、*MRF4*、*Myf5* cDNA 全长序列,并通过生物信息学软件对 5 种生肌调节因子 CDS 区、氨基酸序列、蛋白结构、进化地位、亲缘关系以及不同组织中相对表达等进行了分析。鞍带石斑鱼 5 种生肌调节因子都具有高度保守的碱性螺旋-环-螺旋结构域(basic helix-loop-helix, bHLH),同时每个基因均与鲈形目鱼类分为一支,且 5 种生肌调节因子皆在骨骼肌中表达丰度较高,而在肝脏、心脏、肠道等其他组织中表达量较低。研究结果为进一步探究生肌调节因子在鞍带石斑鱼骨骼肌生长发育的作用机制奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Rajesh M, Kamalam B S, Ciji A, et al. Molecular characterisation and transcriptional regulation of muscle growth regulatory factors myogenin and myogenic factor 6 in the Trans-Himalayan cyprinid fish *Schizothorax richardsonii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019, 231: 188–200.
- [2] Zammit P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017, 72: 19–32.
- [3] Tapscott S J. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription [J]. *Development*, 2005, 132(12): 2685–2695. <https://doi.org/10.1242/dev.01874>
- [4] Buckingham M. Molecular biology of muscle development [J]. *Cell*, 1994, 78(1): 15–21. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90568-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90568-1)
- [5] Pas M F, Visscher A H. Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation - a review [J]. *Zeitschrift Fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie*, 1994, 111(1/2/3/4/5/6): 404–412.
- [6] Watabe S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish [J]. *Journal of Fish Biology*, 2005, 55: 1–18.
- [7] Chen Y H, Lee W C, Liu C F, et al. Molecular structure, dynamic expression, and promoter analysis of zebrafish (*Danio rerio*) *myf-5* gene [J]. *Genesis*, 2001, 29(1): 22–35.
- [8] Cole N J, Hall T E, Martin C I, et al. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. *Journal of Ex-*

- perimental Biology, 2004, 207(Pt 24): 4239–4248.
- [9] Tan X, Zhang Y, Zhang P J, et al. Molecular structure and expression patterns of flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Myf-5*, a myogenic regulatory factor [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 145(2): 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.07.008>
- [10] Delalande J M, Rescan P Y. Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Development Genes and Evolution*, 1999, 209(7): 432–437. <https://doi.org/10.1007/s004270050274>
- [11] Hall T E, Cole N J, Johnston I A. Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua* L. [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 18): 3187–3200.
- [12] Ganassi M, Badodi S, Quiroga H P O, et al. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 4232. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06583-6>
- [13] Hinitis Y, Osborn D P S, Carvajal J J, et al. *Mrf4* (*myf6*) is dynamically expressed in differentiated zebrafish skeletal muscle [J]. *Gene Expression Patterns*, 2007, 7(7): 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2007.06.003>
- [14] 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]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(Pt 4): 481–488.
- [15] 李虹辉. 翘嘴鲮 (*Siniperca chuatsi*) 生肌调节因子 MRF4 和 Myf5 的克隆及其表达研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- [16] Wu X Y, Lai J S, Chen Y Y, et al. Characterization of *MRF* genes and their tissue distributions and analysis of the effects of starvation and refeeding on the expression of these genes in *Acipenser dabryanus* muscle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 256: 110648.
- [17] Fernandes J M O, Kinghorn J R, Johnston I A. Differential regulation of multiple alternatively spliced transcripts of MyoD [J]. *Gene*, 2007, 391(1/2): 178–185.
- [18] Tan X, Du S J. Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Development Genes and Evolution*, 2002, 212(5): 207–217. <https://doi.org/10.1007/s00427-002-0224-5>
- [19] Zhang Y, Tan X, Zhang P J, et al. Characterization of muscle-regulatory gene, *MyoD*, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(2): 139–148.
- [20] Shi B, Sun R, Liu X, et al. Cloning, phylogenetic and expression analysis of two MyoDs in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2024, 347: 114422.
- [21] 张燕萍, 邵芳, 周峰, 等. 赤眼鲟 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. <https://doi.org/10.7685/j.issn.1000-230.2014.05.019>
- [22] 朱春月, 杨培民, 刘忠航, 等. 刀鲚 MyoG 基因克隆和组织表达分析 [J]. *天津农业科学*, 2024, 30(10): 33–39. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-6500.2024.10.006>
- [23] Sukhan Z P, Cho Y, Hossen S, et al. Molecular characterization, expression analysis, and CRISPR/Cas9 mediated gene disruption of myogenic regulatory factor 4 (MRF4) in Nile *Tilapia* [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(12): 13725–13745.
- [24] Palma P, Takemura A, Libunao G X, et al. Reproductive development of the threatened giant grouper *Epinephelus lanceolatus* [J]. *Aquaculture*, 2019, 509: 1–7.
- [25] 陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼 (♀)×鞍带石斑鱼 (♂) 杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察 [J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(5): 135–144. <https://doi.org/10.11758/yykxjz.20140520>
- [26] 吴水清, 郑乐云, 黄种持, 等. 云纹石斑鱼 (♀)×鞍带石斑鱼 (♂) 杂交子代胚胎发育及仔稚幼鱼形态观察 [J]. *渔业研究*, 2016, 38(1): 27–35.
- [27] 刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期温度胁迫对驼背鲈 (♀)×鞍带石斑鱼 (♂) 杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 59–66.
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [29] Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomès D, et al. *Mrf4* determines skeletal muscle identity in *Myf5*: *Myod* double-mutant mice [J]. *Nature*, 2004, 431(7007): 466–471. <https://doi.org/10.1038/nature02876>
- [30] Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, et al. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 948–953. <https://doi.org/10.1038/nature03594>
- [31] Tapscott S J, Davis R L, Thayer M J, et al. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts [J]. *Science*, 1988, 242(4877): 405–411. <https://doi.org/10.1126/science.3175662>
- [32] Chen D X, Chu W Y, Liu X L, et al. Phylogenetic studies of three siniperid fishes (Perciformes: Siniperidae) based on complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, 23(2): 70–76. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.653799>
- [33] Perry R L, Rudnick M A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2000, 5: D750–D767. <https://doi.org/10.2741/Perry>
- [34] Xu P, Tan X, Zhang Y, et al. Cloning and expression

- analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 147(1): 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.01.012>
- [35] Xie S Q, Mason P S, Stickland N C, et al. Lower environmental temperature delays and prolongs myogenic regulatory factor expression and muscle differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos [J]. *Differentiation*, 2001, 68(2/3): 106–114.
- [36] Temple G K, Cole N J, Johnston I A. Embryonic temperature and the relative timing of muscle-specific genes during development in herring (*Clupea harengus* L.) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(Pt 21): 3629–3637.
- [37] Hinits Y, Williams V C, Sweetman D, et al. Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2011, 358(1): 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.015>
- [38] Gregory D J, Waldbieser G C, Bosworth B G. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species [J]. *Animal Genetics*, 2004, 35(6): 425–430. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01193.x>
- [39] 杨磊, 李风鸣, 蔡宝平, 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. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1302.2013.01.005>
- [40] Johansen K A, Overturf K. Sequence, conservation, and quantitative expression of rainbow trout Myf5 [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(4): 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.11.016>
- [41] Zhu X, Li Y L, Liu L, et al. Molecular characterization of Myf5 and comparative expression patterns of myogenic regulatory factors in *Siniperca chuatsi* [J]. *Gene Expression Patterns*, 2016, 20(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2015.10.003>
- [42] Johansen K A, Overturf K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(6): 576–587. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-5133-3>

## Gene cloning and expression analysis of *MRFs* gene cDNA in the tissues of giant grouper *Epinephelus lanceolatus*

Zhang Longting<sup>#</sup>, Zheng Zhi, Wang Yao, Gao Yujie\*

(School of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Myogenic regulatory factors (MRFs) are critical regulators of skeletal muscle growth and development in animals. The full-length cDNA sequences of five MRFs from the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) were cloned using RT-PCR and RAC, including *MyoD1* (1,962 bp), *MyoD2* (1,466 bp), *MyoG* (926 bp), *MRF4* (1,052 bp), and *Myf5* (1,133 bp), encoding 297, 270, 251, 238, and 242 amino acids, respectively. Amino acid sequence alignment revealed that all five MRFs contain a conserved basic helix-loop-helix (bHLH) domain consisting of 60 amino acids. Phylogenetic analysis demonstrated that the MRF genes are clustered into two distinct branches: *MyoD* (*MyoD1* and *MyoD2*) groups with *Myf5* in one clade, while *MRF4* and *MyoG* form the other. All genes showed closest evolutionary relationships with Perciformes homologs. Real-time quantitative PCR analysis revealed predominant expression of these MRFs in skeletal muscle, with significantly lower expression levels in the liver, heart, and intestine. These findings provide foundation for elucidating the regulatory mechanisms of MRFs in skeletal muscle development of the giant grouper.

**Keywords:** *Epinephelus lanceolatus*; myogenic regulatory factors; cDNA cloning; gene expression

(责任编辑:钟云芳)