

# 绵羊 *PRKAG3* 基因的序列克隆和差异表达

卢亚洲<sup>1,2</sup>, 赵倩君<sup>1,2</sup>, 凌英会<sup>1,2</sup>, 乔海云<sup>1,2</sup>, 姚娜<sup>2,3</sup>, 马月辉<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;

2. 农业部畜禽遗传资源与利用重点实验室, 北京 100193;

3. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南昆明 650201)

**摘要:** 研究以无角陶赛特绵羊为实验材料, 对绵羊 *PRKAG3* 基因 CDS 序列进行克隆测序, 获得 1 395 bp 序列。同源建模表明, *PRKAG3* 基因编码蛋白 C 端由 4 个保守的 CBS 结构域组成, 为  $\beta$  折叠结构且主要为疏水性氨基酸, 在调节 AMPK 活性方面起着重要作用。BLAST 软件分析表明, 绵羊 *PRKAG3* 基因与牛的同源性最高, 其次是人, 与猪和小鼠相对较远, 同源性分别为 96%、84%、82% 和 81%。利用 RT-PCR 半定量技术对 *PRKAG3* 基因在无角陶赛特绵羊不同组织中的表达进行分析, 结果表明: *PRKAG3* 基因在不同组织中表达差异显著, 主要在绵羊肌肉组织表达, 其次是心脏, 在肝脏、脾脏和肾脏中则表达量较少。该结果为绵羊肉质风味的研究提供了分子依据。

**关键词:** *PRKAG3* 基因; RT-PCR; 绵羊

中图分类号: S826.2

文献标识码: B

文章编号: 0258-7033(2010)15-0018-04

AMPK (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种异源三聚体酶, 在从酵母菌到哺乳动物进化中具有高度保守性, 是激酶复合物的重要组分。AMPK 在真核生物中扮演着“能量调节器”的角色, 在调节能量平衡过程中起了关键作用<sup>[1]</sup>。AMPK 由催化亚基  $\alpha$  ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ )<sup>[2]</sup>、调节亚基  $\beta$  ( $\beta 1$ 、 $\beta 2$ )<sup>[3,4]</sup> 和  $\gamma$  ( $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ )<sup>[5]</sup> 组成, 因此 AMPK 有 12 种可能的三聚体形式, 在不同的细胞中有不同的亚型复合物。*PRKAG3* 是编码一磷酸腺苷激活蛋白激酶 AMPK $\gamma$  亚基  $\gamma 3$  基因, 通过编码  $\gamma$  亚基来调节 AMPK 的活性进而调节骨骼肌中糖原含量。*PRKAG3* 具有组织表达特异性, 主要在骨骼肌中表达<sup>[6]</sup>, 在影响肉质性状方面起着重要作用, 被确定为猪肉酸肉基因 (rendement napole, RN) 的候选基因<sup>[7]</sup>, 也被认为是影响牛肉质风味的一个重要基因<sup>[8]</sup>。近年来对 *PRKAG3* 基因的研究主要集

中在猪、人和小鼠上, 但是在羊上关于 *PRKAG3* 基因研究鲜有报道。因此, 从分子水平研究绵羊 *PRKAG3* 基因对绵羊肉质性状及风味的改善具有重要意义。

## 1 材料与方法

**1.1 总 RNA 的提取与处理** 采集 2 只无角陶赛特绵羊心脏、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉新鲜组织样, 迅速放入液氮中保存, 利用 TRIzol (Invitrogen) 法提取总 RNA, 并用无 RNase 的 DNase (Life Technologies) 处理所有总 RNA 样品以去除样品中的 DNA。经 1.0% 变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和纯度后, 用分光光度计检测 RNA 浓度。最后调整各组织样总 RNA 浓度至 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  后分装, 保存于  $-80^\circ\text{C}$  备用。

**1.2 引物设计** 根据牛的 *PRKAG3* 基因序列 (GenBank 登录号: NC\_007300), 设计引物对绵羊 *PRKAG3* 基因 CDS 区进行 PCR 扩增, F: 5' -CCCCACAACA-GAGCGAGA-3', R: 5' -TGTAGCATGGTGTCAAAGAT-GAC-3'。跨内含子设计引物。片段大小为 311 bp, F: 5' -CCCTCATCAAGAACCGTATCC-3', R: 5' -AATCA-CATCAAAGCGGGAGT-3';  $\beta$ -actin 内参片段大小为

收稿日期: 2009-03-30; 修回日期: 2010-03-26

资助项目: “十一五”科技支撑 (2006BAD13B08); 国家高技术研究与发展计划 (863) (2006AA10Z198)

作者简介: 卢亚洲 (1982-), 硕士

\* 通讯作者

[11] Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, et al. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis [J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17(3): 258-262.

[12] Agerholm J S, Bendixen C, Arnbjerg J, et al. Morphological variation of “complex vertebral malformation” in Holstein calves [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16: 548-553.

[13] Windsor P A, Agerholm J S. Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle [J]. Aust Vet J, 2009, 87(5): 193-199.

[14] 马春生. 荷斯坦脊椎畸形综合征 (CVM) 被确认为不良隐性基因中国荷斯坦牛 CVM 现状和对策的研究 [A]. 第二届中国乳业科技大会食品科技论文集. 北京: 中国乳业科技大会组委会, 2004: 305-331.

310 bp 左右,引物为 F:5'-CCCAAGGCCAACCGTGA-GAAGATGA-3', R:5'-CGAAGTCCAGGGCCA CGTAGC AGAG-3'。

1.3 cDNA 的合成 在 PCR 管中加入 4  $\mu$ L (500 ng/ $\mu$ L) RNA、1  $\mu$ L Olig(dt)<sub>18</sub>, 68 $^{\circ}$ C 预热 5 min 后,冰浴 2 min,向管中加入 5  $\mu$ L (25 mmol/ $\mu$ L) dNTP、M-MLV (10  $\times$  Buffer) 5  $\mu$ L、RNasin 0.7  $\mu$ L、MLV 1  $\mu$ L、DEPC H<sub>2</sub>O 8.3  $\mu$ L。42 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 8 min, 冰浴后 -80 $^{\circ}$ C 冻存。

1.4 PCR 反应和克隆分析 以 cDNA 为模板,对 *PRKAG3* 基因的 CDS 区进行 PCR 扩增,克隆步骤按 pMD18-T 载体系统方法进行。在 1% 的琼脂糖凝胶上分离 PCR 扩增产物,回收产物与 pMD18-T Vector 连接,16 $^{\circ}$ C 连接反应 30 min。感受态细胞转化 *E.coli* DH5 $\alpha$ , LB(Amp<sup>+</sup>) 培养板上培养 12 h。挑取阳性克隆于 LB(Amp<sup>+</sup>) 液体培养基中培养 12 h,提取质粒进行 PCR 鉴定,对阳性克隆菌液测序。利用 MEGA4 软件 GenBank 中牛、人、猪、和小鼠的 *PRKAG3* 基因序列进行同源性分析。并利用生物信息学软件预测 *PRKAG3* 基因编码蛋白的三维空间结构,分析其理化性质和生物学功能。

1.5 RT-PCR 定量反应体系 目的基因和内参基因分开扩增,10  $\mu$ L 反应体系中含 50 ng 基因组 cDNA, 200  $\mu$ mol/L 10  $\times$  PCR Buffer, 0.5 U dNTPs, 3 pmol/ $\mu$ L 引物 F/R, 0.24  $\mu$ L 2.5 U *Taq* DNA 酶。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6 定量表达分析  $\beta$ -actin 作为内参对 *PRKAG3* 基因进行组织表达分析。取  $\beta$ -actin 和 *PRKAG3* 基因的 PCR 产物各 5  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。应用 Scion Image 软件对 *PRKAG3* 基因和  $\beta$ -actin 的 RT-PCR 结果进行比较分析,确定目的基因在各组织样品中相对于持家基因表达量的相对值,确定在不同组织样中目的基因表达量的相对含量。利用 SAS6.12 统计软件单因素方差分析模型对 *PRKAG3* 基因在不同组织中相对表达量的差异性进行分析。每个组织样品采取 3 次重复,以减少误差。

## 2 结果分析

2.1 总 RNA 的提取结果 样品中的总 RNA 显示出 2 条清晰和 1 条较浅的条带,分别为 28 S、18 S 和 5 S rRNA(图 1),其中 28 S rRNA 条带的亮度为 18 S rRNA

的 2 倍,且没有 DNA 及其他明显的杂带,表明 RNA 纯度较高且完整性较好,可以用于反转录和定量分析。

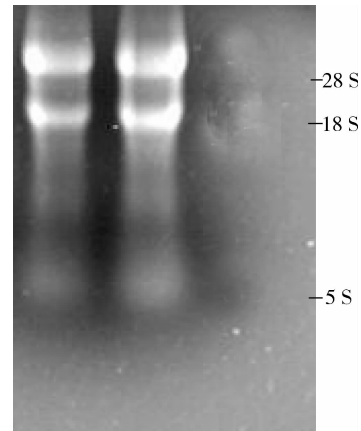


图 1 组织样品总 RNA

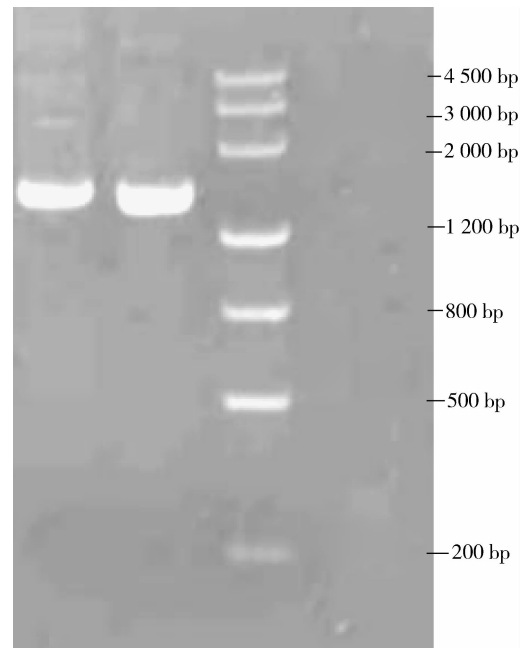


图 2 *PRKAG3* 基因 cDNA 电泳图

2.2 *PRKAG3* 基因的序列分析 克隆测序获得绵羊 *PRKAG3* 基因 CDS 区 1 395 bp(图 2),编码 464 个氨基酸。利用 BLAST 软件分析绵羊 *PRKAG3* 基因与牛、人、猪和小鼠的同源性分别为 96%、84%、82%和 81%。

利用 MEGA4 软件构建 *PRKAG3* 基因氨基酸序列在不同物种中的系统发育树,发现绵羊 *PRKAG3* 基因与牛的遗传关系最近,其次是人,与鼠和猪相对较远(图 5)。对 *PRKAG3* 基因编码  $\gamma$ 3 蛋白进行氨基酸分析,可知 N 端变异较大,主要为亲水性氨基酸;C 端比较保守,含有 4 个串联重复的胱硫醚  $\beta$ -合酶(cystathionine  $\beta$ -synthase, CBS)区域(图 3),对

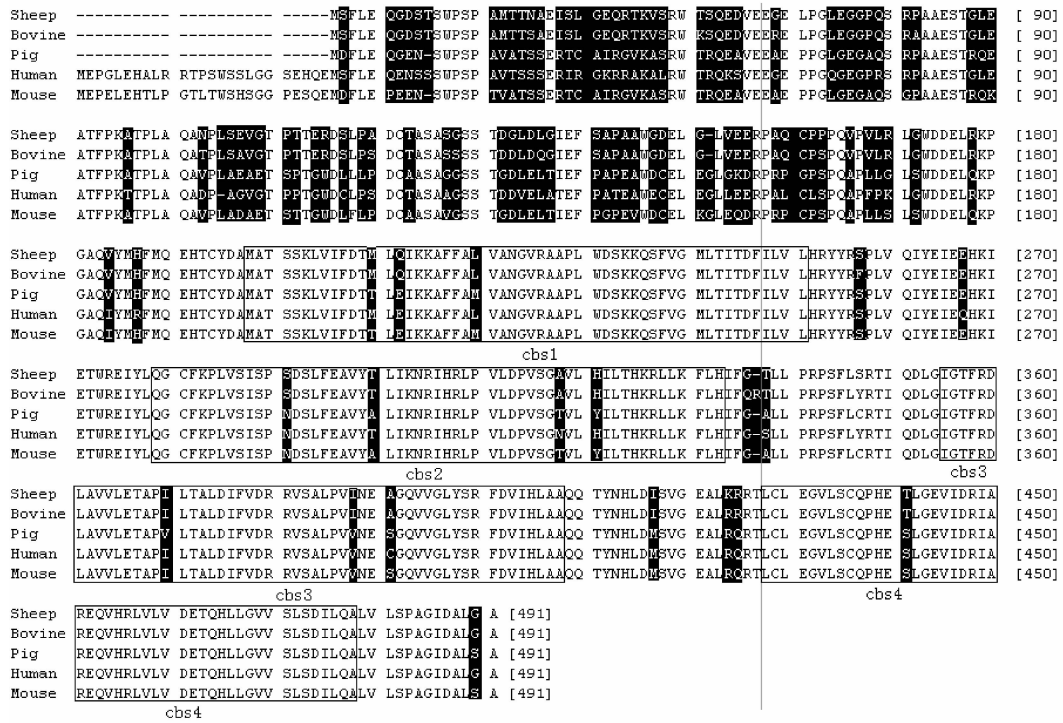


图3 PRKAG3 基因氨基酸同源比对序列

PRKAG3 基因氨基酸序列进行同源建模获得 PRKAG3 基因编码  $\gamma$  蛋白的三维结构,发现 4 个 CBS 保守区域为  $\mu$  折叠结构且主要为疏水性氨基酸(图 3 和图 4)。

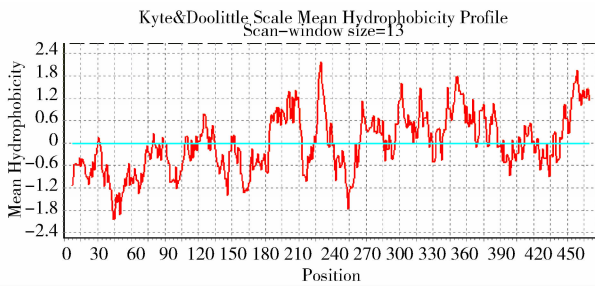


图4  $\gamma$  蛋白疏水值

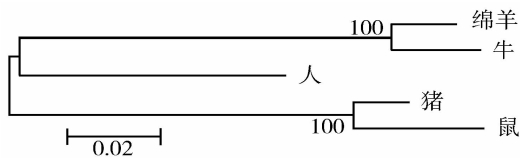
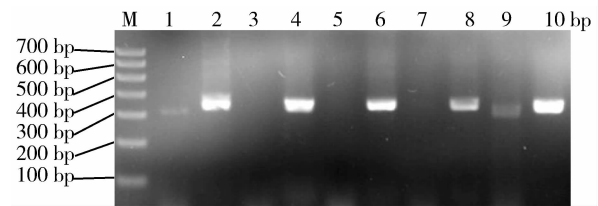


图5 基于 PRKAG3 基因氨基酸序列构建系统发生树

2.3 PRKAG3 在绵羊不同组织的差异性表达 应用软件 Scion Image 对 PRKAG3 基因在绵羊不同组

织中的表达进行半定量分析,对同一组织进行 3 次重复实验,PRKAG3 基因在各组织样中相对于  $\beta$ -actin 表达量的相对值见表 1。利用 SAS 方差统计分析表明,PRKAG3 基因主要在绵羊骨骼肌中表达,其次是心脏,而在其他组织中表达量则较少(图 6)。



注:M 代表 Mark,1、3、5、7、9 分别代表心、肝、脾、肾和肌肉中的 PRKAG3 基因的 PCR 产物,2、4、6、8、10 分别代表心、肝、脾、肾和肌肉中  $\beta$ -actin 基因的 PCR 产物

图6 PRKAG3 在不同组织中的表达结果

### 3 讨论

AMPK 不仅可以在细胞水平作为能量的感受器,还可以通过激素和细胞因子,如瘦素、脂联素等来参与调节机体的能量平衡。 $\gamma$ 3 作为 AMPK 调节亚

表1 PRKAG3 基因在不同组织中的表达量相对值

基因	心脏	肝脏	脾脏	肾脏	肌肉
PRKAG3	0.1665±0.0004 <sup>Ba</sup>	0.0261±0.0023 <sup>Ac</sup>	0.0402±0.0015 <sup>Ad</sup>	0.0497±0.0034 <sup>Ad</sup>	0.2393±0.0052 <sup>Bb</sup>

注:数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

基,在糖原代谢和脂肪酸合成方面起着重要作用。*PRKAG3*基因在人和小鼠上的研究主要集中在营养代谢和某些疾病方面<sup>[9,10]</sup>,在动物上被认为是影响肉质风味的一个重要基因。

本实验以无角陶赛特绵羊组织 RNA 为模板,根据牛的 *PRKAG3* 基因设计引物,克隆测序获得绵羊 *PRKAG3* 基因 CDS 区全长 1 395 bp, 编码 462 个氨基酸,已提交。氨基酸同源比对发现在不同物种中 N 端变异较多,主要由亲水性氨基酸组成;而 C 端相对保守,包含 4 个串联重复的 CBS 区域组成。利用同源建模对  $\gamma 3$  蛋白进行结构分析,4 个 CBS 区域为  $\mu$  折叠结构且主要为疏水性氨基酸,在参与细胞质的导向、蛋白与蛋白的相互作用和蛋白质活性的调节方面起着重要作用<sup>[7]</sup>。BLAST 比对发现,绵羊 *PRKAG3* 基因与牛的遗传距离最近,其次是人、猪和小鼠,同源性分别为 96%、84%、82%和 81%。

据报道,猪的 *PRKAG3* 基因主要在骨骼肌中表达<sup>[6]</sup>。对小鼠的研究表明 *PRKAG3* 基因不同肌肉纤维中表达量不同,其中在含有快肌纤维的白肌中表达较高,红肌中表达量则较少<sup>[11]</sup>。本研究对 *PRKAG3* 基因在绵羊不同组织中的半定量分析表明,*PRKAG3* 基因主要在绵羊肌肉和心脏中表达,而在肝脏、脾脏和肾脏中表达则较少。*PRKAG3* 基因的组织表达特异性表明其在脂肪代谢和糖原合成过程中起了重要作用。关于  $\gamma 3$  的具体作用机理及调控机制目前还没有相关报道,因此开展 *PRKAG3* 基因的进一步研究对绵羊肉质风味的改善和一些疾病的治疗具有重要意义。

#### 参考文献:

[1] Kahn B B, Alquier T, Carling D, *et al.* AMP-activated protein kinase:

Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism[J]. *Cell Metab*, 2005,1(1):15-25.

- [2] Gao G, Fernandez C S, Stapleton D, *et al.* Non-catalytic  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunit isoforms of the 5' -AMP-activated protein kinase[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 8675-8681.
- [3] Stapleton D, Mitchelhill K I, Gao G, *et al.* Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 611-614.
- [4] Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill K I, *et al.* AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location[J]. *FEBS Lett*, 1997, 409(3):452-456.
- [5] Milan D, Jeon J T, Looft C, *et al.* A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle [J]. *Science*, 2000, 288(5469): 1248-1251.
- [6] Cheung PC, Salt IP, Davies SP, *et al.* Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding [J]. *Biochem J*, 2000, 346(3): 659-669.
- [7] Ciobanu D, Bastiaansen J, Malek M, *et al.* Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality [J]. *Genetics*, 2001, 159(3):1151-1162.
- [8] Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, *et al.* New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(13):5229-5237.
- [9] Costford S R, Kavaslar N, Ahituv N, *et al.* Gain-of-function R225W mutation in human AMPK  $\gamma 3$  causing increased glycogen and decreased triglyceride in skeletal muscle [J]. *PLoS ONE*, 2007, 2(9):903.
- [10] Weyrich P, Machicao F, Staiger H, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase gamma 3 genetic variability in glucose and lipid metabolism in non-diabetic whites [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(10):2097-2106.
- [11] Yu H, Fujii N, Hirshman M F, *et al.* Cloning and characterization of mouse 5'-AMP-activated protein kinase 3-subunit [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(2):283-292.

## 《Journal of Animal Science and Biotechnology》征稿启事

经新闻出版总署批准(新出审字[2009]481号文件),由中国科学技术协会主管、中国畜牧兽医学会主办、李德发教授主编的英文期刊《Journal of Animal Science and Biotechnology》(CN11-5906/S)正式创刊。

本刊从2010年6月开始出版,现面向国、内外畜牧科技领域征集英文原创论文,征稿范围包括遗传育种、动物繁殖、动物营养、饲料资源与饲料加工、生理生化、肉品科学、综述与评述。欢迎大家踊跃投稿!

邮箱: xmzz@cau.edu.cn(请注明“投稿”)

电话: 010-62732723 010-62734403