

从江香猪 *PHKG2* 基因超表达载体和 RNA 干扰载体的构建及其表达

王圆圆^{1,2,3}, 许厚强^{1,2,3,4*}, 陈伟^{1,2,4}, 周迪^{1,2,4}, 张鸣^{1,2,3}, 杨涛^{1,2,3}

(1. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025;

2. 贵州大学贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025;

3. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 4. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 旨在克隆从江香猪磷酸化酶激酶 $\gamma 2$ (phosphorylase kinase gamma 2, *PHKG2*) 基因编码区, 并对 *PHKG2* 基因功能进行初步探究。本研究利用 RT-PCR 法扩增从江香猪 *PHKG2* 基因完整 CDS 区。通过构建 pEGFP-N3-*PHKG2* 超表达载体, 设计并合成 4 对针对从江香猪 *PHKG2* 基因的 RNAi 表达载体, 瞬时转染至 C2C12 细胞株和从江香猪肾细胞中, 以正常生长的细胞为空白对照, 24 h 后检测各个重组载体的绿色荧光蛋白的表达情况。48 h 后提取细胞总 RNA, 利用 qRT-PCR 方法检测目的基因 *PHKG2* 和糖原代谢相关基因糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, muscle form, *PYGM*)、肌肉糖原合成酶 (glycogen synthase 1 (muscle), *GYS1*)、磷酸甘油酸变位酶 (Phosphoglycerate mutase, *PGAM2*) 基因 mRNA 的表达情况, 并且测定各组细胞中的糖原含量。结果表明, 经过双酶切、测序检测以及脂质体瞬时转染至 C2C12 细胞中, 验证超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 和 4 对 RNAi 表达载体均构建成功。转染至从江香猪肾细胞后, 相对于空白对照 (Blank) 和阴性对照 (pEGFP-N3), 超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 能极显著提高 *PHKG2* 基因的表达量 ($P < 0.01$), 同时显著上调 *PGAM2*、*PYGM* 基因的表达量 ($P < 0.05$), 并且显著降低细胞中糖原的含量 ($P < 0.05$)。各 RNAi 载体中, 相对于空白对照 (Blank) 和阴性对照 (NC), shRNA-1 的干扰效率较高, 极显著下调 *PHKG2* 基因的表达量 ($P < 0.01$), 显著下调 *PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因的表达量 ($P < 0.05$), 并且显著升高细胞中糖原含量 ($P < 0.05$)。shRNA-2 极显著下调 *PHKG2* 基因的表达量 ($P < 0.01$); shRNA-3 对 *PHKG2* 基因的表达也能起到显著的干扰作用 ($P < 0.05$); shRNA-4 对于所检测的 4 个基因干扰效果不明显; shRNA-2、shRNA-3、shRNA-4 转染细胞后, 细胞中糖原含量升高水平不明显。*PHKG2* 基因超表达和 RNAi 后可分别明显上调和抑制 *PHKG2*、*PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 基因的表达, 并且分别降低和提高糖原含量, 可能是影响从江香猪肉品质的重要候选基因, 为进一步研究 *PHKG2* 基因在细胞糖原代谢通路中的作用机制奠定基础。

关键词: 从江香猪; *PHKG2* 基因; 超表达; RNA 干扰

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)09-1818-12

Construction and Expression of *PHKG2* Gene Overexpression Vector and RNA Interference Vector in Congjiang Pig

WANG Yuan-yuan^{1,2,3}, XU Hou-qiang^{1,2,3,4*}, CHEN Wei^{1,2,4},
ZHOU Di^{1,2,4}, ZHANG Ming^{1,2,3}, YANG Tao^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region of Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in Guizhou, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. College of Animal Science, Guizhou University,

Guiyang 550025, China; 4. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

收稿日期: 2018-02-02

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAD03B02-3); 黔科合重大专项 (黔科合 NY 字 [2013] 6008 号)

作者简介: 王圆圆 (1991-), 女, 安徽池州人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与种质资源创新研究, E-mail: yywang0829@163.com

* 通信作者: 许厚强, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞分子生物学研究, E-mail: gzdxxhq@163.com

Abstract: The aim of this study was to clone the coding region of phosphorylase kinase gamma 2 (*PHKG2*) gene in Congjiang pig and to explore the function of *PHKG2* gene. In this study, the complete CDS region of *PHKG2* gene in Congjiang pig was amplified by RT-PCR. By constructing the overexpression vector pEGFP-N3-*PHKG2*, four pairs of RNAi expression vectors targeting the Congjiang pig *PHKG2* gene were designed and synthesized, and transiently transfected into C2C12 cell line and Congjiang pig kidney cells with normal growing cells as a blank control, the expression of green fluorescent protein of each recombinant vector was detected after 24 h. RNA was extracted from cells after 48 h. The expression levels of *PHKG2* and glycogen metabolism related genes (glycogen phosphorylase (*PYGM*), glycogen synthase 1 (muscle) (*GYS1*), phosphoglyce rate mutase (*PGAM2*)) were detected by qRT-PCR, and the glycogen content of each group in cells was determined. The results showed that, after double enzyme digestion, sequencing detection and transient transfection of liposomes into C2C12 cells, it was verified that the overexpression vectors pEGFP-N3-*PHKG2* and 4 RNAi expression vectors were successfully constructed. After transfecting into Congjiang pig kidney cells, compared with the blank and negative control (pEGFP-N3), the overexpression vector pEGFP-N3-*PHKG2* transfected into cells extremely significantly increased the expression level of *PHKG2* gene ($P < 0.01$), and *PGAM2* and *PYGM* genes expression were significantly up-regulated ($P < 0.05$), and the glycogen content in cells was significantly reduced ($P < 0.05$). In each RNAi vector, the interference efficiency of shRNA-1 was higher than that of the blank and negative control (NC). The expression levels of *PHKG2* gene was extremely significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the expression levels of *PGAM2*, *PYGM* and *GYS1* genes were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and significantly increased the glycogen content in the cells ($P < 0.05$). shRNA-2 extremely significantly down-regulated the expression of *PHKG2* gene ($P < 0.01$); shRNA-3 also significantly interfered with the expression of *PHKG2* ($P < 0.05$); shRNA-4 did not interfere with the expression of the 4 genes detected obviously. The glycogen contents in cells didn't significantly increase after shRNA-2, shRNA-3, shRNA-4 transfected into the cells. In this study, the overexpression vectors and RNAi vectors of *PHKG2* gene of Congjiang pig were successfully constructed. The expression of *PHKG2*, *PYGM*, *PGAM2* and *GYS1* genes and glycogen content were significantly affected. *PHKG2* gene may be an important candidate gene affecting meat quality of Congjiang pig and to lay the foundation for further studying the role of *PHKG2* gene in glycogen metabolism pathway.

Key words: Congjiang pig; *PHKG2* gene; overexpression; RNAi

磷酸化酶激酶(phosphorylase kinase, PHK)是糖原分解过程和糖原代谢途径中的一个关键调节酶,其分解糖原为机体肌肉收缩提供能量以及维持血糖平衡。PHK是由 α 、 β 、 δ 、 γ 4个不同的亚基组成的全酶($\alpha\beta\gamma\delta$)₄,其中 α 、 β 、 δ 3个亚基均为调节亚基, γ 亚基为催化亚基,并且 γ 亚基含有一个激酶活性域和一个C-末端钙调节蛋白结合域^[1-2]。磷酸化酶激酶 γ 2(phosphorylase kinase gamma 2, *PHKG2*)基因是*PHK*基因家族中 γ 亚基中的一个亚型,在全酶中起着催化作用,受到 α 、 β 、 δ 3个亚基的调节,同时也是神经元传递通路、代谢通路和激素

信号通路激活剂的目标^[3]。近年来,多个研究结果表明,*PHKG2*基因的突变可能会导致肝硬化、糖原代谢病、复发性低血糖、肝纤维化等其他糖代谢相关疾病^[4-8]。在家畜相关研究中,王艳^[9]筛选出梅山猪和大白猪的候选差异基因*PHKG2*,并且发现,该基因G785A位点多态性与瘦肉率呈极显著相关。Wang等^[10]克隆出巴马小型香猪*PHKG2*基因CDS区1221bp,本课题组前期克隆了从江香猪和大白猪*PHKG2*基因,并将从江香猪、大白猪、GenBank猪序列(NM_001166317)、巴马香猪(KJ186785)的*PHKG2*基因序列分析比较发现,从江

香猪存在 A614G 特殊的突变位点,并且引起了第 205 位谷氨酸变成了丙氨酸^[11]。

研究发现,动物机体内肌肉糖原含量过高会导致屠宰后猪肉最终的 pH 过低,使蛋白质对水的结合能力降低,从而对猪肌肉的系水力、剪切力、肉色等肉质性状有影响^[12-13]。所以,近年来对动物机体中糖原合成和分解代谢过程的研究一直备受关注,以期通过研究猪肌肉糖原代谢的过程探讨影响猪肉品质性状的分子机理^[14]。本课题组前期通过重测序方法,筛选出了从江香猪和大白猪的差异表达基因 *PHKG2*、*FoxO4* 等^[15]。综上所述,*PHKG2* 基因可能对猪的肉质具有一定的影响。

本试验通过将 *PHKG2* 基因导入真核表达载体和 RNAi 技术使 *PHKG2* 基因超表达和沉默,从两方面来探究 *PHKG2* 基因的功能,这将对猪肉品质改善,挖掘肉质性状特色基因具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取 6 月龄贵州从江香猪 (*Sus scrofa*) 背最长肌组织样;真核表达载体 pEGFP-N3; pGPU6/GFP/Neo-; C2C12 细胞株; 3 日龄从江香猪幼崽。

1.2 主要试剂

AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(康宁生命科学有限公司,苏州); RI-PA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、糖原含量检测试剂盒(索莱宝科技有限公司,北京); Endo-free Plasmid Mini Kit II (OMEGA); SsoFast TM EvaGreen@ Supermix (BIO-RAD, Singapore); Trans 2K Plus II DNA Marker (北京全式金生物公司); 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*Kpn* I、*BamH* I、Opti-MEM 培养基、转染试剂 LIPOFECTAMINE 3000、T4 DNA Ligase、TRIzol Regent、Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA); 胎牛血清 (Gibco, US Origin) 等。

1.3 试验方法

1.3.1 pEGFP-N3-*PHKG2* 表达载体的构建

1.3.1.1 总 RNA 提取以及 cDNA 第一条链合成: 选取 6 月龄贵州从江香猪, 采取背最长肌组织样。利用 TRIzol 试剂对总 RNA 进行抽提, 超微量紫外分光光度计测定其浓度和 OD 值, RT-PCR 合成 cDNA 第一条链。

1.3.1.2 *PHKG2* 基因 CDS 区克隆: 根据 Gen-

Bank 公布的猪 *PHKG2* 基因序列 (登录号: NM_001166317), 在上游引物引入 *Kpn* I 酶切位点, 下游引物引入 *Xho* I 酶切位点, 合成引物如表 1。以 cDNA 为模板, PCR 扩增 *PHKG2* 基因, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 回收纯化 PCR 产物。

1.3.1.3 *PHKG2* 基因与 pEGFP-N3 连接、转化和鉴定: 将纯化的 PCR 产物和 pEGFP-N3 载体同时进行双酶切, 37 °C 水浴 3 h, 然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切效果, 进行产物回收。将双酶切产物用 T₄ DNA 连接酶于 16 °C 金属浴过夜连接。取 10 μL 过夜连接产物转化 100 μL TOP10 感受态细胞, 将连接产物与感受态细胞混匀后冰浴 30 min, 42 °C 热激 90 s, 立即置冰上放置 10 min, 加入预热至室温的 400 μL LB 培养基, 200 r · min⁻¹, 37 °C 恒温摇床培养 1 h, 4000 r · min⁻¹ 离心 1 min, 弃去 400 μL 培养上清, 剩余 100 μL 用移液器混匀后均匀涂布于含 100 μg · mL⁻¹ Kanamycin 抗性的 LB 平板上, 倒置, 37 °C 恒温培养箱培养过夜。分别挑取单菌落接种于含 5 mL, 100 μg · mL⁻¹ Kanamycin 抗性的 LB 培养液中, 250 r · min⁻¹, 37 °C 恒温摇床培养过夜, 用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 并分别用 *Kpn* I 和 *Xho* I 做双酶切鉴定, 酶切鉴定成功的重组质粒由上海英骏公司测序。

1.3.2 shRNA 载体 pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus 的构建

1.3.2.1 shRNA 序列设计合成: 根据 NCBI 上 *PHKG2* 基因 (NM_001166317) 的靶序列, 按照 shRNA 的设计原则, 由上海吉玛公司设计合成 4 条针对 *PHKG2* 基因的 DNA 模板, 其序列: *Bbs* I 酶切位点、21 nt 正义链、9 nt 成环结构、21 nt 反义链、RNA 酶 III 转录终止位点 (6 个 T)、*BamH* I 酶切位点。阴性对照序列: *BamH* I 酶切位点、21 nt 打乱顺序正义链、9 nt 成环结构、21 nt 打乱顺序反义链、RNA 酶 III 转录终止位点 (6 个 T)、*EcoR* I 酶切位点序列见表 2。

1.3.2.2 shDNA 模板的退火: DNA oligo 分别用浓度为 100 μmol · L⁻¹ 的 TE (pH 8.0) 溶液溶解, 取相应的正义链和反义链 oligo 溶液, 按照如下配比配置退火反应体系: 10 × shDNA Annealing Buffer 5 μL, sense strand (100 μmol · L⁻¹) 5 μL, antisense strand (100 μmol · L⁻¹) 5 μL, ddH₂O 5 μL。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 85 °C 5 min; 75 °C 5 min; 70 °C 5 min; 4 °C 保存。

表 1 引物序列、退火温度及产物长度

Table 1 Primer sequence, annealing temperature and product size

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	T _m /°C	产物长度/ bp Products length
<i>PHKG2</i>	Sense: <u>CCGCTCGAGCT</u> ATGACCAAGGACGCGGCAC Anti-sense: GGGGTACCGTAGTCCCTCGTCCTCAGCC	63	1 221
<i>qPHKG2</i>	Sense: GTTCCTGGTGTGGTACCTGA Anti-sense: GATAAAGCTCACTGCCTCCA	59	124
<i>GAPDH</i>	Sense: TTGTGATGGGCGTGAACC Anti-sense: GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	59	169
<i>PYGM</i>	Sense: TGGCGGAGGTCATTGCTG Anti-sense: TGGGGTTGATGTGGACTTTGTAT	59	183
<i>GYS1</i>	Sense: GCCGACAGGGTCAAGGTAAT Anti-sense: AGATGCCGTAAGCCGAGGG	59	244
<i>PGAM2</i>	Sense: CTTCTGCGGCTGGTTT Anti-sense: AGAGGGTGCGTATGGC	59	140

下划线部分为限制性内切酶识别位点,阴影部分为加入的保护碱基

The underlines and shaded areas represent recognition sites of restriction enzyme and protective bases, respectively

表 2 shRNA 及阴性对照序列

Table 2 shRNA and negative control sequences

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence
shRNA-1	CACCGACCAGAAGTACGACCCTAAGGTTCAAGAGACCTTAGGGTCGTA ^{TT} CTTCTGGTTTTTTTTG
shRNA-2	CACCGAGCTACTGGCTGTGAGTTTGTTC ^{AA} AGAGACAAACTCACAGCCAGTAGCTCTTTTTTTTTG
shRNA-3	CACCGCCCGAGAATATTCTCCTAGATTCAAGAGATCTAGGAGAATATTCTCGGGCTTTTTTTTTG
shRNA-4	CACCGGTGATCTTGTTACGCTCCTTTCAAGAGAAGGAGCGTGAACAAGATCACCTTTTTTTTTG
NC	CACCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTTTTG

TTCAAGAGA 为 loop 结构

TTCAAGAGA is the loop structure

1.3.2.3 pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus 载体连接转化:将 pGPU6/GFP/Neo 载体用 *Bbs* I + *Bam* H I 进行双酶切处理,22 °C 水浴 3 h,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测双酶切效果,进行产物回收。将载体双酶切线性化产物与 shDNA 模板用 *T₄* DNA 连接酶于 16 °C 金属浴过夜连接,连接产物转化到 Top10 感受态细胞中,涂板过夜培养,并挑取单菌落进行培养,提取质粒进行酶切鉴定。方法同过表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 连接转化过程,通过 DNA 测序来确定阳性克隆。

1.3.3 真核表达载体转染至 C2C12 细胞 将 C2C12 细胞按 1×10^5 个 · 孔⁻¹ 的密度转种于 6 孔

细胞培养板中,添加 DMEM/F12 培养液(含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素、100 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄霉素),37 °C、5% CO₂ 培养细胞密度至 80% 左右,分别用 pEGFP-N3、pEGFP-N3-*PHKG2*、pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus-1(命名为 shRNA-1)、pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus-2(命名为 shRNA-2)、pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus-3(命名为 shRNA-3)、pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus-4(命名为 shRNA-4)、pGPU6/GFP/Neo-NC(命名为 NC)转染 C2C12 细胞,以未转染重组载体的 C2C12 细胞为空白对照组。各转染组每孔重组质粒用量为 3 μg ,Opti-MEM 用量为 250 μL ,脂质体用量为 10 μL ,加完样

后按十字方向轻轻摇匀,每个转染组 3 个重复。置于 37 °C、5% CO₂ 培养细胞箱中培养,24 h 后于荧光倒置显微镜下观察转染效率。

1.3.4 从江香猪肾细胞培养 选取健康 3 日龄从江香猪幼崽,无菌条件下迅速分离肾细胞,用 D-Hanks 液清洗,去除结缔组织以及表层膜,将漂洗、修剪干净的组织剪成 1~2 mm³ 小块,转移至无菌的锥形瓶,并加入 IV 型胶原酶溶液,37 °C 水浴中消化 30 min,期间每隔 10 min 摇晃 1 次。200 目细胞筛过滤除去未消化大组织块,保留含细胞的液体。1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 去除上清液,4 °C 冰箱中取出红细胞裂解液,按 1:3 的比例加入细胞沉淀中,轻轻吹打混匀,离心去除上层红色液体,收集沉淀。用 DMEM 培养液离心漂洗 1~2 次,去除上清,加含 10% 胎牛血清(FBS)+100 μL·mL⁻¹ 卡那霉素+100 μL·mL⁻¹ 氨基霉素的 DMEM/F12 培养液制成细胞悬液,接种细胞培养瓶,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养,6 h 后观察细胞形态,12 h 后更换培养基,去除未贴壁细胞,以后每隔 24 h 观察细胞形态,并进行传代试验。

1.3.5 真核表达载体转染至从江香猪肾细胞 将生长状况良好的从江香猪肾细胞按 1×10⁵ 个·孔⁻¹ 的密度转种于 6 孔细胞培养板中,待培养细胞密度至 80% 左右,分别用 pEGFP-N3、pEGFP-N3-PHKG2、shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3、shRNA-4、NC 转染从江香猪肾细胞,以未转染重组载体的细胞空白对照组。各转染组每孔重组质粒用量为 3 μg,Opti-MEM 用量为 250 μL,脂质体用量为 10 μL,加完样后按十字方向轻轻摇匀,每个转染组 3 个重复。置于 37 °C、5% CO₂ 培养细胞箱中培养,24 h 后于荧光倒置显微镜下观察转染效率。

1.3.6 qRT-PCR 检测 mRNA 水平 转染 48 h 后用 Trizol 法提取各组 C2C12 细胞和肾细胞中总 RNA,并测定其浓度和 OD 值,将 RNA 定量稀释到同一个水平。RT-PCR 合成 cDNA 第一条链。逆转录后的 cDNA 置于 -80 °C 冰箱保存。采用 SYBR Green 荧光染料法进行实时荧光定量。反应条件为 95 °C 30 s;95 °C 7 s,59 °C 5 s,循环 40 次后进行熔解曲线分析,以每 5 s 上升 0.5 °C 的速率从 65 °C 升高到 95 °C,每个样品检测做 3 个重复。

1.3.7 细胞中糖原含量测定 将转染 48 h 后的各组细胞去除培养液,用 PBS 清洗一遍。每孔加入 200 μL RIPA 裂解液(提前加入蛋白酶抑制剂),用

枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触,再利用 BCA 法测定各组蛋白浓度。收集转染 48 h 后的各 6 孔板细胞到离心管内,离心后弃上清;加入 0.75 mL 提取液超声波破碎细胞(功率 20% 或 200 W,超声 3 s,间隔 10 s,重复 30 次);转移至 10 mL 试管中,置于沸水浴中煮沸 20 min(盖紧,防止水分散失),隔 5 min 振摇试管 1 次,使充分混匀;取出试管冷却后,用蒸馏水定容到 5 mL,混匀,待测。酶标仪预热 30 min 以上,调节波长至 620 nm,蒸馏水调零,调节水浴锅至 95 °C。按比例加样后置沸水浴 10 min(盖紧,防止水分散失),冷却,于 620 nm 波长处,分别读取空白管、标准管和测定管吸光度,分别记为 A1、A2 和 A3。按照公式计算糖原含量:糖原(mg·(mg prot)⁻¹)=1.11×(C 标准×V1)×(A3-A1)÷(A2-A1)÷(V1×Cpr)=0.111×(A3-A1)÷(A2-A1)÷Cpr。其中,1.11 是此法测得葡萄糖含量换算为糖原含量的常数,即 111 μg 糖原用蒽酮试剂显色相当于 100 μg 葡萄糖用蒽酮试剂显示的颜色;C 标准为标准管浓度(0.1 mg·mL⁻¹);V1 为加入反应体系中糖原提取液体积(0.25 mL);Cpr 为样本蛋白质浓度(mg·mL⁻¹)。

1.3.8 数据分析 实时荧光定量 PCR 得出的基因原始表达量利用 2^{-ΔΔCT} 方法计算,2^{-ΔΔCT} 表示目的基因的相对表达量。通过 SPSS Statistics 19.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,结果用“mean±SD”表示。

2 结果

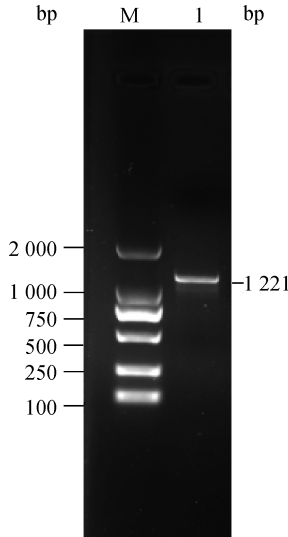
2.1 pEGFP-N3-PHKG2 表达载体的构建及鉴定

从江香猪背最长肌 RT-PCR 扩增产物经检测,出现单一条带,与预期大小一致(图 1)。再将产物纯化后与 pEGFP-N3 载体连接、转化,pEGFP-N3-PHKG2 重组质粒经 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果在 4 700 和 1 221 bp 出现 2 条带(图 2),将重组质粒测序验证,经 DNASTAR 序列拼接分析,与 GenBank 发布的猪 *PHKG2* 基因完整 CDS 区序列进行比对,同源性达到 99%,即获得贵州从江香猪 *PHKG2* 基因长度为 1 221 bp 的 ORF 序列,表明 pEGFP-N3-PHKG2 重组质粒构建成功。

2.2 shRNA 载体 pGPU6/GFP/Neo-ShRNA-sus 的构建及鉴定

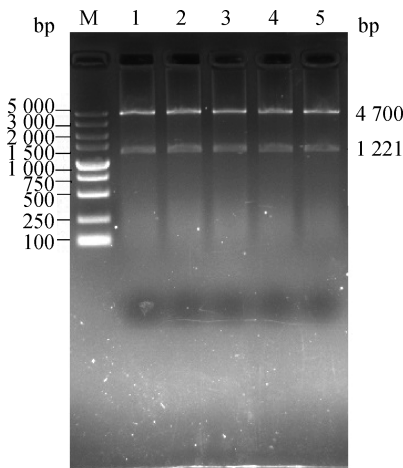
将 shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3、shRNA-4

和 NC 重组质粒经 *Bbs* I 和 *Bam*H I 双酶切后,再进行胶回收、连接、转化。将鉴定为阳性的克隆菌液进行测序, DNA 测序结果显示, 所构建的 4 个干扰载体及一条阴性对照均含有所设计的目的片段, 其序列与设计的靶向寡核苷酸序列完全一致(图 3), 进一步证实目的片段已正确插入载体, *PHKG2* 基因 shRNA 干扰重组载体构建成功。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 扩增的 *PHKG2* 基因
M. DL 2000 marker; 1. The PCR amplification of *PHKG2* gene

图 1 从江香猪 *PHKG2* 基因 PCR 凝胶电泳图
Fig. 1 The PCR electropherogram of *PHKG2* gene of Congjiang pig



M. DNA 相对分子质量标准; 1~5. 重组质粒 pEGFP-N3-*PHKG2* 的双酶切

M. DL 5000 marker; 1-5. Double enzyme digestion of recombinant plasmid pEGFP-N3-*PHKG2*

图 2 pEGFP-N3-*PHKG2* 重组质粒双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of double enzyme digestion of recombinant plasmid pEGFP-N3-*PHKG2*

2.3 各重组载体转染 C2C12 细胞效率检测

重组载体、阴性对照及空载体转染 C2C12 细胞后 24 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞发光情况, 发现被转染后的细胞发出绿色荧光(图 4), 表明构建的重组载体成功转入 C2C12 细胞中。

2.4 各重组载体转染从江香猪肾细胞效率检测

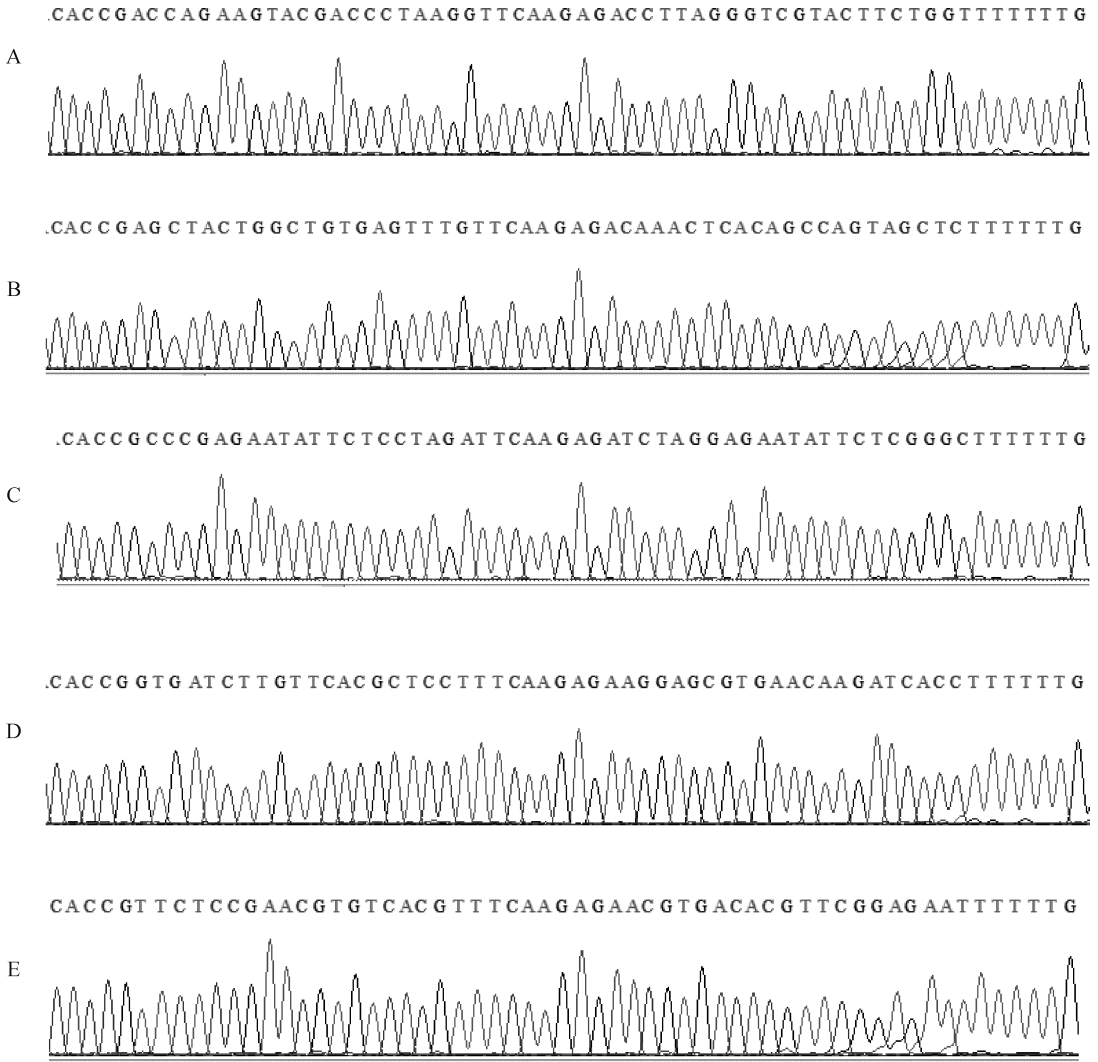
重组载体、阴性对照及空载体转染从江香猪肾细胞后 24 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞发光情况, 发现被转染后的细胞发出绿色荧光(图 5), 表明构建的重组载体成功转入从江香猪肾细胞中。

2.5 qRT-PCR 检测各重组载体在 C2C12 细胞中对 *PHKG2* mRNA 表达的影响

各重组质粒转染 C2C12 细胞 48 h 后, 提取细胞总 RNA, 逆转录后进行 qRT-PCR 检测各组内参基因(*GAPDH*)和目的基因(*PHKG2*)mRNA 的表达量。结果见表 3, 相对于空白对照和阴性对照, 超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 能极显著提高 *PHKG2* 基因的表达量($P < 0.01$), RNA 干扰载体干扰 *PHKG2* 基因 mRNA 的表达量, 其中 shRNA-1 能极显著下调 *PHKG2* 的表达量($P < 0.01$), shRNA-2、shRNA-3 均能显著降低 *PHKG2* mRNA 的表达量($P < 0.05$), shRNA-4 载体相对于空白对照和阴性对照, 降低 *PHKG2* 基因的表达效果不明显。

2.6 qRT-PCR 检测各重组载体在从江香猪肾细胞中对相关基因 mRNA 表达的影响

各重组质粒转染从江香猪肾细胞 48 h 后, 提取细胞总 RNA, 逆转录后利用 qRT-PCR 检测各组内参基因(*GAPDH*)、目的基因(*PHKG2*)、糖原代谢相关基因(*PGAM2*、*PYGM*、*GYS1*)mRNA 的表达量。结果如图 6 所示, 相对于空白对照(Blank)和阴性对照(pEGFP-N3), 超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 转染至细胞后, 能极显著提高 *PHKG2* 基因的表达量($P < 0.01$), 同时, 对于 *PGAM2*、*PYGM* 基因的表达量显著上调($P < 0.05$)。各 RNAi 载体中, 相对于空白对照(Blank)和阴性对照(NC), shRNA-1 的干扰效率较高, 其极显著下调 *PHKG2* 基因的表达量($P < 0.01$), 显著下调 *PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因的表达量($P < 0.05$)。shRNA-2 极显著下调 *PHKG2* 基因的表达量($P < 0.01$), shRNA-3 对 *PHKG2* 基因的表达也能起到显著的干扰作用($P < 0.05$), shRNA-4 对于所检测的 4 个基因干扰效果不明显。



A. shRNA-1; B. shRNA-2; C. shRNA-3; D. shRNA-4; E. NC

图3 重组载体测序结果

Fig. 3 The sequencing results of the recombinant vectors

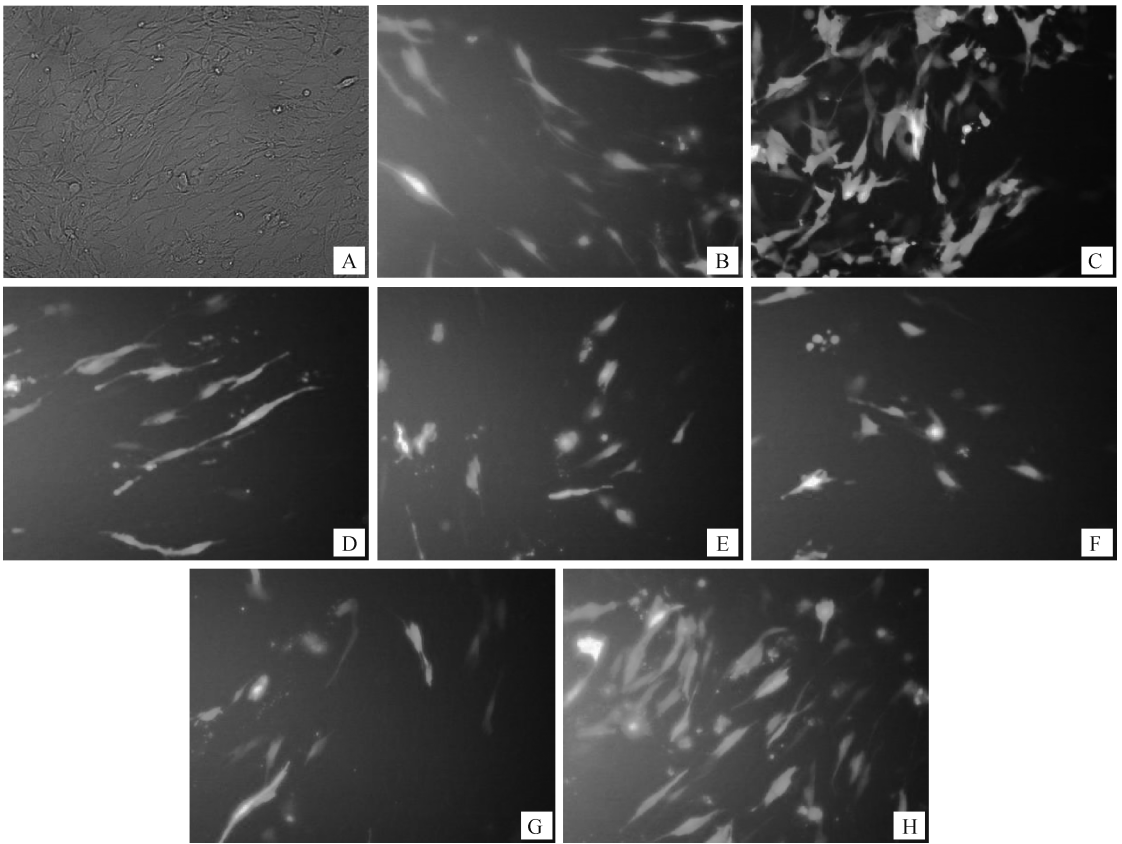
2.7 细胞中糖原含量测定

转染 48 h 后的各组细胞提取细胞总蛋白, 利用 BCA 法测得各组细胞中的蛋白浓度, 拟合的回归方程为: $Y=1.07X+0.123$ ($R^2=0.995$), 从而计算出各组细胞的蛋白浓度。再测定各组细胞中的糖原含量, 结果如图 7 所示, 超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 转染至细胞后, 细胞中的糖原含量达到 $(0.055 \pm 0.0048) \text{ mg} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$, 即每毫克蛋白中含有 $(0.055 \pm 0.0048) \text{ mg}$ 糖原, 与空白组和阴性对照相比, 显著降低糖原的含量 ($P < 0.05$), 4 个 RNAi 载体转染至细胞后, 与空白组和阴性对照相比, 其中 shRNA-1 显著升高糖原含量 ($P < 0.05$), shRNA-2、shRNA-3、shRNA-4 转染细胞后, 糖原含量升高水平不明显。

3 讨论

本研究通过构建 pEGFP-N3-*PHKG2* 重组载体, 使得 *PHKG2* 基因超表达, 相对于空白对照和阴性对照 pEGFP-N3 空载体, pEGFP-N3-*PHKG2* 转染细胞后, 在 C2C12 细胞中, *PHKG2* 基因表达量极显著上调; 在从江香猪肾细胞中, *PHKG2* 基因表达量也极显著提高, 相关基因 *PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 的表达量也随之提高, 进一步证明, 该超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 构建成功, 为后续转染试验奠定了基础。

RNAi 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象, 它是转录后水平的



A. 空白对照; B. pEGFP-N3 空载体; C. pEGFP-N3-*PHKG2* 重组质粒; D. shRNA-1; E. shRNA-2; F. shRNA-3; G. shRNA-4; H. 阴性对照 NC

A. Blank control; B. Blank vector pEGFP-N3; C. Recombinant plasmid pEGFP-N3-*PHKG2*; D. shRNA-1; E. shRNA-2; F. shRNA-3; G. shRNA-4; H. Negative control

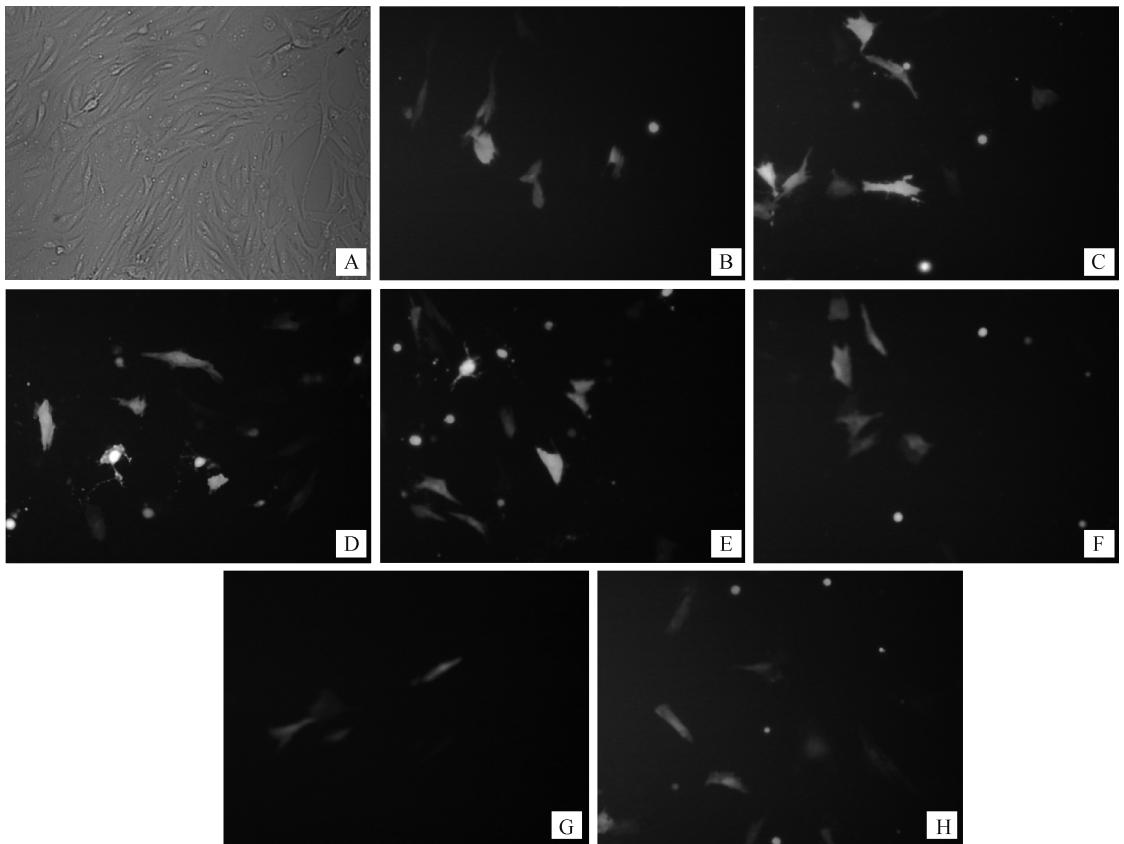
图 4 各重组质粒转染 C2C12 细胞荧光图(200×)

Fig. 4 The results of recombinant plasmids transfected into C2C12 cells(200×)

基因沉默现象^[16-17]。本研究在 RNAi 基础上设计合成 4 条针对从江香猪 *PHKG2* 基因的 shRNA 序列和 1 条阴性对照序列,瞬时转染至 C2C12 细胞和从江香猪肾细胞中,48 h 后检测 *PHKG2* 和 *PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 基因 mRNA 的表达量,发现 shRNA-1 对 *PHKG2* 基因干扰效率最高,shRNA-4 的干扰效率却不明显。

糖原的代谢是根据机体的需要来调节的,通过磷酸化和去磷酸化,糖原的代谢才得以进行。磷酸化酶激酶(PHK)激活糖原磷酸化酶将糖原降解为葡萄糖-1-磷酸,一方面为肌肉收缩提供能量,另一方面为维持肝血糖含量^[18]。糖原磷酸化酶(*PYGM*)通常是以去磷酸化状态存在,此状态下没有活性。在 PHK 和 Ca^{2+} 存在时,*PYGM* 被磷酸化获得生物活性,催化糖原降解为 1-磷酸葡萄糖,然后转化为 6-磷酸葡萄糖^[19]。研究表明,糖原磷酸化酶的磷酸化位点在第 14 位的丝氨酸上,此位点的磷

酸化和去磷酸化精确地调节着酶的活性。磷酸甘油酸变位酶(*PGAM2*)基因编码一种磷酸甘油酸盐(或酯)变位酶,该基因特异性地在肌肉中高表达,是糖酵解/糖质新生通路中的重要基因之一,具有磷酸甘油酸盐变位酶活性的分子功能,其编码的蛋白参与糖酵解过程^[20]。肌肉糖原合成酶(*GYS1*)是糖原合成过程的限速酶,关键调控位点,在动物的肌肉和肝的糖原的合成过程中起着重要的作用^[21]。研究表明,*GYS1* 基因在控制组织的糖原代谢方面具有重要的作用^[22-23]。研究显示,*PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因缺陷分别引起人类 X 型、V 型/McArdle 氏病,1 型多糖贮积性肌病(PSSM1)等糖原贮积病^[24-27]。综上所述,*PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因在机体内糖原代谢中起着重要作用。因此本研究将重组质粒 pEGFP-N3-*PHKG2* 和 4 条 RNAi 载体瞬时转染至从江香猪肾细胞后,检测糖原代谢相关基因 *PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 的 mRNA 表达情况和细



A. 空白对照; B. pEGFP-N3 空载体; C. pEGFP-N3-*PHKG2* 重组质粒; D. shRNA-1; E. shRNA-2; F. shRNA-3; G. shRNA-4; H. 阴性对照 NC

A. Blank control; B. Blank vector pEGFP-N3; C. Recombinant plasmid pEGFP-N3-*PHKG2*; D. shRNA-1; E. shRNA-2; F. shRNA-3; G. shRNA-4; H. Negative control

图 5 各重组质粒转染从江香猪肾细胞荧光图(200×)

Fig. 5 The results of recombinant plasmids transfected into kidney cells of Congjiang pig(200×)

表 3 各重组载体在 C2C12 细胞中对 *PHKG2* 基因 mRNA 表达的影响($n=3$)

Table 3 mRNA expression of *PHKG2* gene in each recombinant vector in C2C12 cells ($n=3$)

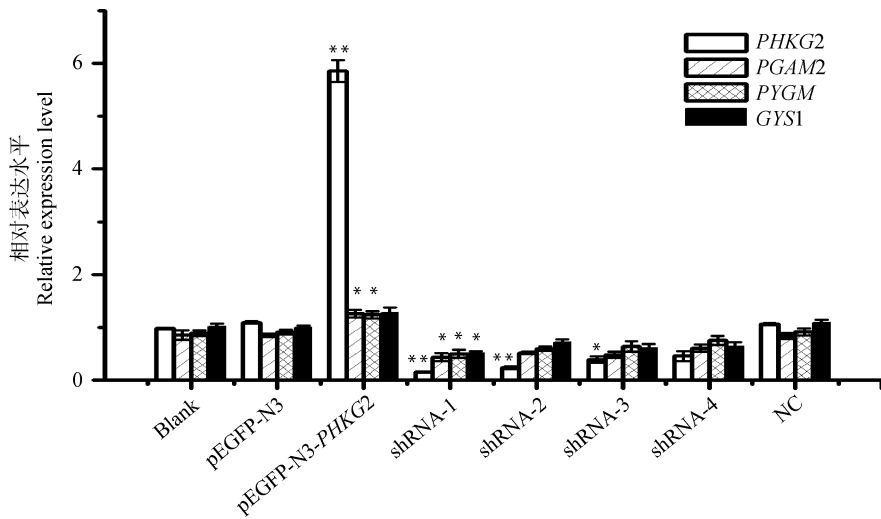
空白对照 Blank control	pEGFP-N3	pEGFP-N3- <i>PHKG2</i>	shRNA-1	shRNA-2	shRNA-3	shRNA-4	NC
1.016± 0.023	1.017± 0.082	6.576± 0.339**	0.131± 0.082**	0.302± 0.082*	0.346± 0.062*	0.600± 0.071	0.874± 0.109

各组间,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)

* mean significant difference ($P<0.05$), ** mean extremely significant difference($P<0.01$) among the groups

胞中糖原含量,实现了对 *PHKG2* 基因的初步研究。本研究发现,超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 转染至细胞后,对于 *PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因的表达量均有上调,RNAi 载体中 shRNA-1 转染至细胞后,对于 *PGAM2*、*PYGM*、*GYS1* 基因的表达量均有明显干扰作用。经过测定各组细胞中糖原含量发现,超表达载体 pEGFP-N3-*PHKG2* 转染至细胞后,

与空白组和阴性对照相比,显著降低糖原的含量,而对于 *PHKG2* 基因进行干扰后,发现 shRNA-1 转染细胞后,糖原含量显著提高,可能因为 *PHKG2* 是属于糖原代谢中的一种重要酶,pEGFP-N3-*PHKG2* 转染至细胞后,使得糖原得以分解成单糖,所以细胞中的糖原含量降低;而对 *PHKG2* 干扰后,使得 *PHKG2* 不能正常表达,并最终影响由代谢引起的糖



不同组间, ** 表示差异极显著($P < 0.01$), * 表示差异显著($P < 0.05$), 下同

** mean extremely significant difference($P < 0.01$), * mean significant difference($P < 0.05$) among the groups, the same as the following figure

图 6 相关基因在从江香猪肾细胞中的表达

Fig. 6 Expression of related genes in kidney cells of Congjiang pig

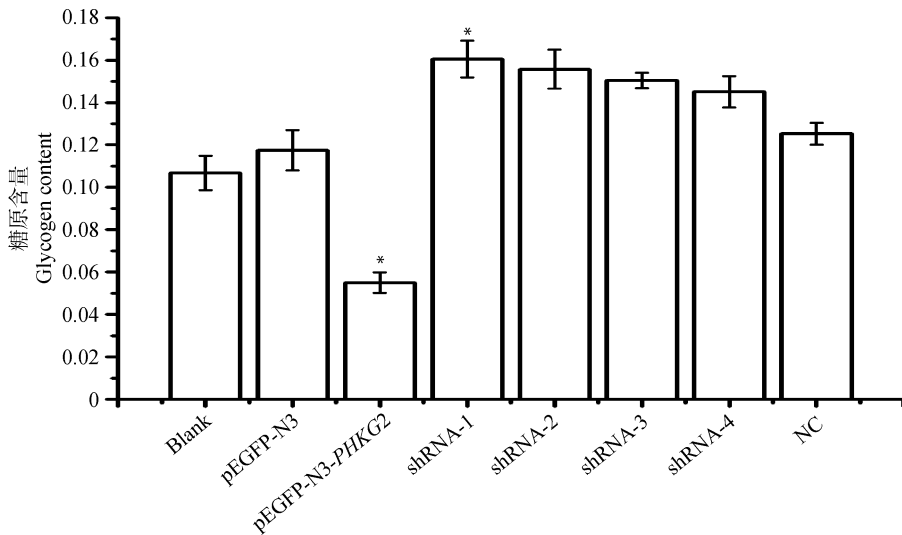


图 7 不同重组质粒转染后从江香猪肾细胞中的糖原含量

Fig. 7 Glycogen content after different recombinant plasmid transfected into kidney cells of Congjiang pig

原水平积累,这与 *PHKG2* 基因突变后会引起患者体内糖原水平积累的说法一致^[8]。

本研究将重组质粒 pEGFP-N3-*PHKG2* 和 4 条 RNAi 载体瞬时转染从江香猪肾细胞后,各糖原代谢相关基因 *PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 的表达分别上调和下调,从正反两方面研究 *PHKG2* 基因的生物学功能,实现了对 *PHKG2* 基因功能的初步探究,推测该基因可能是影响从江香猪肉品质的重要候选基因,可为后续转基因小鼠模型构建提供分

子学依据。

4 结论

本研究成功构建了 pEGFP-N3-*PHKG2* 载体和 4 条 RNAi 载体,在从江香猪肾细胞中超表达和干扰 *PHKG2* 基因表达后,发现各糖原代谢相关基因 *PYGM*、*PGAM2*、*GYS1* 的表达分别上调和下调,从正反两方面研究了 *PHKG2* 基因的生物学功能,推测 *PHKG2* 基因在猪糖原代谢过程中发挥着重

要作用,同时对提高猪肉的营养价值及糖原代谢,调控基因网络的构建均具有重要意义。

参考文献 (References):

- [1] BRUSHIA R J, WALSH D A. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure[J]. *Front Biosci*, 1999, 4: D618-D641.
- [2] HANCOCK J M, RICE N A. Characterization of the human *PHKG2* promoter [J]. *FASEB J*, 2006, 20: A957.
- [3] LAU C K, HUI J, FONG F N Y, et al. Novel mutations in *PHKA2* gene in glycogen storage disease type IX patients from Hong Kong, China [J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 102(2): 222-225.
- [4] MAICHELE A J, BURWINKEL B, MAIRE I, et al. Mutations in the testis/liver isoform of the phosphorylase kinase γ subunit (*PHKG2*) cause autosomal liver glycogenosis in the *gsd* rat and in humans [J]. *Nat Genet*, 1996, 14(3): 337-340.
- [5] BURWINKEL B, SHIOMI S, AL ZABEN A, et al. Liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency: *PHKG2* gene structure and mutations associated with cirrhosis [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(1): 149-154.
- [6] BURWINKEL B, ROOTWELT T, KVITTINGEN E A, et al. Severe phenotype of phosphorylase Kinase-deficient liver glycogenosis with mutations in the *PHKG2* gene [J]. *Pediatr Res*, 2003, 54(6): 834-839.
- [7] ALBASH B, IMTIAZ F, AL-ZAIDAN H. Novel *PHKG2* mutation causing GSD IX with prominent liver disease: report of three cases and review of literature [J]. *Eur J Pediatr*, 2014, 173(5): 647-653.
- [8] 周迪禹, 房迪, 邱文娟, 等. 5例糖原贮积症 IXc型患儿临床和 *PHKG2* 基因突变分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2017, 35(8): 609-612.
- ZHOU D Y, FANG D, QIU W J, et al. Clinical features and *PHKG2* gene mutation analysis of 5 Chinese patients with glycogen storage disease IXc [J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2017, 35(8): 609-612. (in Chinese)
- [9] 王艳. 大白猪与梅山猪肝脏组织差异表达基因的分离以及基因功能的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 88-97.
- WANG Y. Isolation and functional analysis of differentially expressed genes in liver tissue between Large White and Meishan pigs [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 88-97. (in Chinese)
- [10] WANG P, WANG S Q, QIN C, et al. Characterization and expression of *PGK2* and *PHKG2* in testis tissues from fertile and sterile Banna Mini-pig inbred line (BMD) [J]. *Res J Biotechnol*, 2015, 10(2): 28-35.
- [11] 王圆圆, 许厚强, 陈伟, 等. 从江香猪 *PHKG1* 和 *PHKG2* 基因克隆及其 mRNA 在组织中表达水平 [J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(10): 1643-1652.
- WANG Y Y, XU H Q, CHEN W, et al. Cloning of *PHKG1* and *PHKG2* genes in Congjiang pigs (*Sus scrofa*) and their mRNA expression in tissues [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(10): 1643-1652. (in Chinese)
- [12] GRANLUND A, JENSEN-WAERN M, ESSÉN-GUSTAVSSON B. The influence of the *PRKAG3* mutation on glycogen, enzyme activities and fibre types in different skeletal muscles of exercise trained pigs [J]. *Acta Vet Scand*, 2011, 53: 20.
- [13] 马现永, 胡友军, 王丽, 等. 肌肉糖原代谢调控对猪肉品质的影响 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2017, 42(2): 1-4.
- MA X Y, HU Y J, WANG L, et al. Effects of muscle glycogen metabolism regulation on pork quality [J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2017, 42(2): 1-4. (in Chinese)
- [14] MA J W, YANG J, ZHOU L S, et al. A splice mutation in the *PHKG1* gene causes high glycogen content and low meat quality in pig skeletal muscle [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(10): e1004710.
- [15] 孙成娟, 许厚强, 段志强, 等. 从江香猪 *FoxO4* 基因真核表达载体的构建及其在皮下脂肪前体细胞中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(12): 2268-2276.
- SUN C J, XU H Q, DUAN Z Q, et al. Construction of recombinant eukaryotic expression vector of *FoxO4* gene from Congjiang xiang pig and its expression in subcutaneous preadipocytes [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(12): 2268-2276. (in Chinese)
- [16] XIA H B, MAO Q W, PAULSON H L, et al. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(10): 1006-1010.
- [17] WILSON R C, DOUDNA J A. Molecular mechanisms of RNA interference [J]. *Ann Rev Biophys*, 2013, 42: 217-239.
- [18] WINCHESTER J S, ROUCHKA E C, ROWLAND N S, et al. *In Silico* characterization of phosphorylase kinase: evidence for an alternate intronic polyadenyla-

- tion site in PHKG1 [J]. *Mol Genet Metab*, 2007, 92(3):234-242.
- [19] LEVITAN I B. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation[J]. *Ann Rev Physiol*, 1994, 56:193-212.
- [20] KAWASHIMA N, MISHIMA M, SHINDO R, et al. Partial deficiency of phosphoglycerate mutase with diabetic poly neuropathy: the first Japanese patient [J]. *Intern Med*, 1996, 35(10):799-802.
- [21] KASLOW H R, LESIKAR D D. Isozymes of glycogen synthase[J]. *FEBS Lett*, 1984, 172(2):294-298.
- [22] YANG S P, LI X, LIU X F, et al. Parallel comparative proteomics and phosphoproteomics reveal that cattle myostatin regulates phosphorylation of key enzymes in glycogen metabolism and glycolysis pathway[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(13):11352-11370.
- [23] PEDERSON B A, CHEN H Y, SCHROEDER J M, et al. Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(16):7179-7187.
- [24] NAINI A, TOSCANO A, MUSUMECI O, et al. Muscle phosphoglycerate mutase deficiency revisited. [J]. *Arch Neurol*. 2009, 66(3):394-398.
- [25] QUINLIVAN R, BUCKLEY J, JAMES M, et al. McArdle disease; a clinical review[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(11):1182-1188.
- [26] SUKIGARA S, LIANG W C, KOMAKI H, et al. Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia[J]. *Neuromuscul Disord*, 2012, 22(2):162-165.
- [27] MAILE C A, HINGST J R, MAHALINGAN K K, et al. A highly prevalent equine glycogen storage disease is explained by constitutive activation of a mutant glycogen synthase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(1 Pt A):3388-3398.

(编辑 郭云雁)