

山羊 *PHKG1* 基因克隆及其表达特性分析

李 鑫^{1,2}, 何小芳^{1,2}, 张 浩^{1,2}, 郑建莹^{1,2}, 王雨雪^{1,2}, 林亚秋^{1,2}, 王 永¹, 朱江江¹

(1. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部, 四川省重点实验室, 四川 成都 610041;

2. 西南民族大学 生命科学与技术学院, 四川 成都 610041)

摘要:为获得山羊 *PHKG1* 基因序列, 明确其生物学特征, 阐明其在山羊各组织及诱导分化不同阶段皮下和肌内脂肪细胞中的表达特性, 以简州大耳羊为试验动物, 屠宰后采集心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、背最长肌、皮下脂肪等组织样品, 提取组织中总 RNA, 利用 RT-PCR 方法克隆山羊 *PHKG1* 基因序列, 利用各种在线工具分析其生物学特性, 利用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 技术检测其在各个组织及不同分化阶段的前体脂肪细胞中的表达水平。结果显示, 克隆得到的山羊 *PHKG1* 基因序列 1 233 bp, 其中 CDS 区 1 164 bp, 共编码 387 个氨基酸, 形成无信号肽的不稳定亲水酸性非跨膜蛋白, 亚细胞定位显示其主要存在细胞质中; 山羊 *PHKG1* 氨基酸序列与绵羊、牛、猪、马、人的相似性均在 90% 以上, 说明该基因在不同物种中具有较高保守性; 构建进化树显示, 山羊和绵羊在同一分支, 符合物种进化规律; 组织表达谱显示, *PHKG1* 基因在山羊心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、背最长肌、皮下脂肪中广泛表达, 且在背最长肌中表达水平最高 ($P < 0.01$), 时序表达谱显示, *PHKG1* 基因在成脂诱导分化 60 h 的肌内脂肪细胞和 96 h 的皮下脂肪细胞中的表达水平分别显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 高于前体脂肪细胞中的表达水平。结果可为进一步研究 *PHKG1* 在山羊脂肪细胞分化过程中的作用奠定基础。

关键词:山羊; *PHKG1*; 基因克隆; 组织表达; 时序表达

中图分类号: Q78; S826 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2020)04-0195-08

doi: 10.7668/hbxb.20190880



Cloning and Expression Analysis of *PHKG1* Gene in Goat

LI Xin^{1,2}, HE Xiaofang^{1,2}, ZHANG Hao^{1,2}, ZHENG Jianying^{1,2},
WANG Yuxue^{1,2}, LIN Yaqiu^{1,2}, WANG Yong¹, ZHU Jiangjiang¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education, Sichuan Province for Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation, Chengdu 610041, China; 2. College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this experiment was to obtain the sequence of goat *PHKG1*, to clarify its biological characteristics, and to elucidate the tissue expression level and cell expression profiles of subcutaneous and intramuscular adipocytes. Jianzhou Big-eared goats were selected as experimental materials, the heart, liver, spleen, kidney, lung, longissimus muscle, subcutaneous fat were harvested after slaughtering, and the total RNA was extracted from these tissues. The sequence of *PHKG1* gene was cloned by Real-time PCR (RT-PCR), the biological characteristics were analyzed by online tools, and the tissue and cell temporal expression of *PHKG1* was detected by Real-time quantitative PCR (qPCR). The results showed that the cloned *PHKG1* gene sequence was 1 233 bp in length, of which the CDS region was 1 164 bp. The *PHKG1* gene encoded 387 amino acids, forming an unstable hydrophilic acidic nontransmembrane protein with no signal peptide, and subcellular localization indicated that it was mainly present in the cytoplasm. The amino acid sequence similarity between goats and sheep, cattle, pigs, horses and humans was above 90%, indicating that *PHKG1* was highly conserved in different species. Constructing phylogenetic tree showed that goats and sheep were in the same branch, in line with the evolu-

收稿日期: 2020-05-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0502002); 四川省应用基础研究计划重点项目(2018JY0036); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(2020PTJS15004)

作者简介: 李 鑫(1997-), 女, 湖南张家界人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 林亚秋(1976-), 女, 内蒙古海拉尔人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

tionary laws of species. The *PHKG1* gene was widely expressed in goat-tissues and was the highest in the longissimus muscle ($P < 0.01$) and the expression levels in intramuscular adipocytes at 60 h and subcutaneous adipocytes at 96 h of adipogenic differentiation were significantly ($P < 0.05$) and extremely significantly ($P < 0.01$) higher than those in the preadipocytes. This study laid the foundation for further study of the role of *PHKG1* in the differentiation of goat adipocytes.

Key words: Goat; *PHKG1*; Gene cloning; Tissues expression; Temporal expression

人们对肉产品的质量要求随着生活水平的提高而越来越高,山羊肉因其低胆固醇,富含人体必需的各种氨基酸和脂肪酸等特点而深受消费者青睐^[1]。肌肉 pH 值、肉色、系水力、肌肉嫩度等肉质性状直接受动物体内糖原的含量影响^[2]。磷酸化酶激酶 (Phosphorylase kinase, PHK) 参与糖原分解,是催化分解的限速酶,其活性受到 Ca^{2+} 的调节, Ca^{2+} 通过其内源性钙调蛋白亚基 (δ) 导致变构活化,而外源性钙调蛋白 (δ') 依赖于 Ca^{2+} 的结合进一步激活。磷酸化激活糖原磷酸化酶 (Glycogen phosphorylase) 将糖原降解,在肝脏中可以维持血糖,而在肌肉中维持肌肉收缩^[3-4]。PHK 是由 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种亚基组成的全酶 ($\alpha\beta\gamma\delta$)^[5],其中 α 、 β 、 δ 为调控亚基, γ 为催化亚基 (包括 γ_1 和 γ_2), γ_1 和 γ_2 亚基分别由磷酸化酶激酶 γ_1 (Phosphorylase kinase γ_1 , *PHKG1*) 基因和磷酸化酶激酶 γ_2 (Phosphorylase kinase γ_2 , *PHKG2*) 基因编码^[6-7]。

研究表明,*PHKG1* 基因在糖原分解的级联激活中发挥调控作用^[8],通过磷酸化激活糖原磷酸化酶,从而介导糖原分解的神经和激素调节。Winchester 等^[4]提出 *PHKG1* 基因存在弱的多聚腺苷酸化和第 6 内含子切割位点,因此,将 *PHKG1* 的第 6 外显子鉴定为 3' 复合末端外显子。Camus 等^[9]确定 PHK 为激酶抑制剂化合物的靶标,且发现 *PHKG1* 在人类肿瘤样品中上调,证实其参与血管生成和作为抗肿瘤治疗的潜在靶点的价值。Ma 等^[8]对猪 *PHKG1* 进行深度测序,发现其第 9 内含子剪接受体位点发生一个点突变 ($C > A$),异常转录物导致动物体内蛋白质水平下降和酶活性减弱,且使猪肉持水量减少 $> 20\%$ 。Zappaterra 等^[10]表示 *PHKG1* 剪接受体突变 (g. 8283C $> A$) 对大白猪的猪肉持水力呈累加效应且对肉色呈显性影响。Liu 等^[11]证明杜洛克 \times 陆川杂交猪的 PSE 肉是由 *PHKG1* 的剪接受体突变引起的,该研究结果进一步支持了 *PHKG1* 致病突变对肉质的影响。Xue 等^[12]发现 *PHKG1* 在鸡生长发育 3 个阶段存在差异表达,可作为鸡生长差异的潜在候选基因。以上研究说明 *PHKG1* 参与机体内许多生物学过程,对动物肉质具有重要影响,但尚未见羊方面的报道。

因此,本研究以简州大耳羊为研究对象,拟通过克隆获得山羊 *PHKG1* 基因的序列并进行生物信息学分析,利用实时荧光定量 PCR 技术 (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 检测该基因在不同组织及不同分化阶段脂肪细胞中的表达变化,为进一步研究该基因在脂肪沉积中发挥的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物与样品采集 以成年 (1 周岁) 健康简州大耳羊为试验动物 ($n = 8$, 购自四川省简阳市大哥大牧业有限公司)。屠宰后收集羊的心、肝、脾、肾、肺、皮下脂肪、背最长肌等组织样品,使用 DEPC 水清洗样品后迅速装入 RNase free 冻存管中,置于液氮中保存。

1.1.2 试验试剂 TRIzol、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times) 试剂盒、pMD-19T Vector 购自 TaKaRa 公司, DNA 回收试剂盒、DNA 聚合酶、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技有限公司,反转录试剂盒购自 Thermo 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 山羊 *PHKG1* 基因克隆 根据 GenBank 上山羊 *PHKG1* 基因预测序列 (XM_018040602.1), 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物 (表 1)。

PCR 反应体系为: *Taq* 酶 12.5 μ L, 背最长肌 cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的上、下游引物各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 反应总体系为 25 μ L。PCR 扩增程序: 预变性 (94 $^{\circ}$ C, 4 min); 变性 (94 $^{\circ}$ C, 30 s), 退火 (58 $^{\circ}$ C, 45 s), 延伸 (72 $^{\circ}$ C, 2 min), 38 个循环; 延伸 (72 $^{\circ}$ C, 10 min), 4 $^{\circ}$ C 保温。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 使用 DNA 回收试剂盒对目的片段进行回收和纯化, 将纯化产物连接至 pMD-19T 载体, 转化至热激后的 DH5 α 感受态细胞, 随后接种到含有 Amp 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 对阳性菌落进行菌落 PCR 鉴定后送至成都擎科生物技术有限公司测序。

1.2.2 山羊 *PHKG1* 基因生物学特性 山羊 *PHKG1* 基因生物学特性分析及方法参见表 2。

表 1 PCR 和荧光定量 PCR (qPCR) 引物信息

Tab. 1 Primers information for PCR and quantitative real-time PCR (qPCR)

基因名称 Gene name	序列 (5' - 3') Sequence	用途 Purpose	产物长度/bp Products length	退火温度/°C TM
<i>PHKG1</i>	S: ATGACCCAGGACAAGTCGCT A: TCTCACCCCTTTTCGGTG	RT-PCR	1 233	58
<i>PHKG1</i>	S: AACATCAGCATCTGCTTGCGGT A: TTACCTGGCCCTGAGATCATC	qPCR	150	60
<i>TBP</i>	S: AACAGCCTCCACCTTATGC A: TGCTGCTCCTCCAAAATAGAC	qPCR	155	60
<i>UXT</i>	S: GCAAGTGGATTTGGGCTGTAAC A: ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	qPCR	173	60

注: S. 正义链引物; A. 反义链引物。

Note: S. Sense primer; A. Antisense primer.

表 2 分析内容及相应分析工具

Tab. 2 Analytical contents and the corresponding analysis tools

分析内容 Analytical contents	运用软件或在线工具 Applied software or online tools
开放阅读框预测、氨基酸序列翻译 Open reading frame prediction and amino acid sequence translation	ORF Finder
蛋白质理化性质分析 Analysis of physicochemical properties of protein	ExPASy ProtParam
蛋白质二级结构预测 Prediction of protein secondary structure	ExPASy
蛋白质三级结构预测 Prediction of protein tertiary structure	SWISS-MODEL
信号肽分析 Signal peptide analysis	SignalP 4.1 Server
蛋白质磷酸化、糖基化位点预测 Prediction of protein phosphorylation and glycosylation sites	Net Phos 3.1、NetOGlyc 1.0、NetNGly 3.1
跨膜结构域预测 Prediction of transmembrane domain	TMHMM
亚细胞定位 Subcellular localization	PSORTII
蛋白相互作用分析 Protein interaction analysis	STRING 交互式数据库
同源性比对分析 Homology comparison analysis	Blast
系统进化树构建 Construction of phylogenetic tree	MEGA 5.0

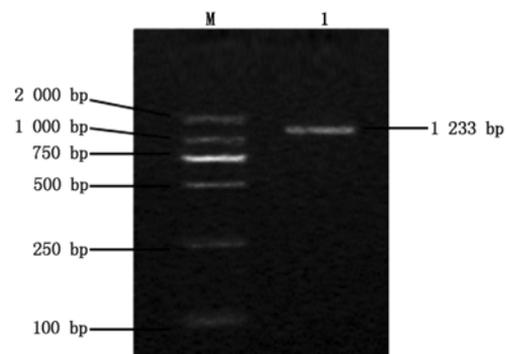
1.2.3 山羊 *PHKG1* 基因组织表达差异分析 根据克隆获得的 *PHKG1* 基因设计 qPCR 引物(表 1)。利用 qPCR 技术检测 *PHKG1* 在各个组织中表达的差异, *TBP* 为内参基因以矫正基因的相对表达水平。qPCR 反应体系: 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL , SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2 \times) 10 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 7 μL , 总体系为 20 μL , 每个组织样本设置 3 个重复。反应条件: 预变性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min); 变性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s), 退火 (60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s), 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s), 共 38 个循环。

1.2.4 *PHKG1* 基因在山羊不同部位前体脂肪细胞分化过程中的表达差异分析 复苏青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部, 四川省重点实验室前期保存的山羊肌内和皮下前体脂肪细胞, 待长至 F₃ 80% 时进行诱导分化, 分别收集不同阶段 (0, 12, 24, 36, 48, 60, 96 h) 的细胞提取 RNA 并反转录成 cDNA, 以 *UXT* 基因为内参基因, 利用 qPCR 检测 *PHKG1* 基因在各个阶段的表达水平。反应体系和程序与 1.2.3 相同。

2 结果与分析

2.1 山羊 *PHKG1* 基因的克隆

以简州大耳羊背最长肌 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增获得与预期目的产物大小相符的片段(图 1), 测序得到 *PHKG1* 基因片段长度 1 233 bp, 其中 CDS 区 1 164 bp, 无 5'UTR 序列, 3'UTR 69 bp, 共编码 387 个氨基酸。

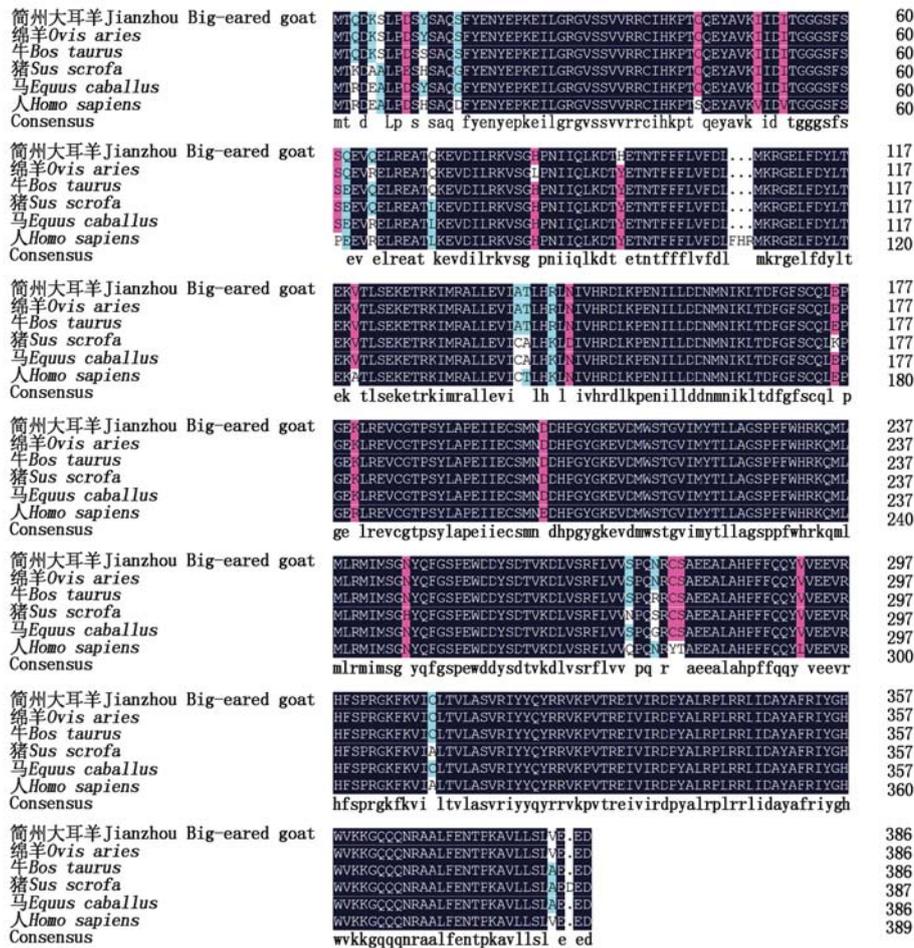
M. DL2000 DNA Marker; 1. *PHKG1* 目的条带。M. DL2000 DNA Marker; 1. *PHKG1* target strip.图 1 山羊 *PHKG1* 基因扩增结果Fig. 1 Amplification of *PHKG1* gene in goat

2.2 山羊 *PHKG1* 基因序列分析

2.2.1 氨基酸序列同源性 利用 DNAMAN 对不同物种 *PHKG1* 基因所编码的氨基酸序列进行比对,显示简州大耳羊与绵羊 (XP_027817635.1)、牛 (NP_001039951.1)、猪 (NP_001280073.1)、马 (XP_001493403.2)、人 (AAH69655.1) 的 *PHKG1* 氨基酸序列相似性依次为 99%, 98%, 94%, 96% 和 93%, 说明该基因在不同的物种间具有较高的保守性 (图 2)。

2.2.2 蛋白理化性质分析 用 ExPASy 在线工具对山羊 *PHKG1* 氨基酸序列进行分析,其预测蛋白分子式为 $C_{2016}H_{3156}N_{544}O_{580}S_{18}$, 分子质量为 44.87 ku; 在氨基酸组成中,亮氨酸 (Leu) 含量为 9.6%, 是占比最高的氨基酸残基; 带正电荷 (Arg + Lys) 和带负电荷

(Asp + Lys) 的氨基酸残基总数分别为 50 和 51, 表明山羊 *PHKG1* 蛋白可能带负电荷; 理论等电点 (Protein isoelectric point, pI) 为 6.81, 亲水性总平均值为 -0.330, 不稳定指数为 45.83, 因此, 预测 *PHKG1* 蛋白属于酸性亲水不稳定蛋白。磷酸化位点预测显示, 山羊 *PHKG1* 蛋白有 31 个磷酸化位点, 其中包括丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点 18 个, 苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点 10 个, 酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点 3 个。糖基化位点预测显示, 该蛋白有 4 个 O 糖基化位点, 分别位于 2, 6, 12 和 329 位点; 无 N 糖基化位点。山羊 *PHKG1* 蛋白没有跨膜结构域且无信号肽; 亚细胞定位表明其主要存在于细胞质 (73.9%) 中, 其次为细胞核 (13.0%) 和线粒体 (13.0%)。



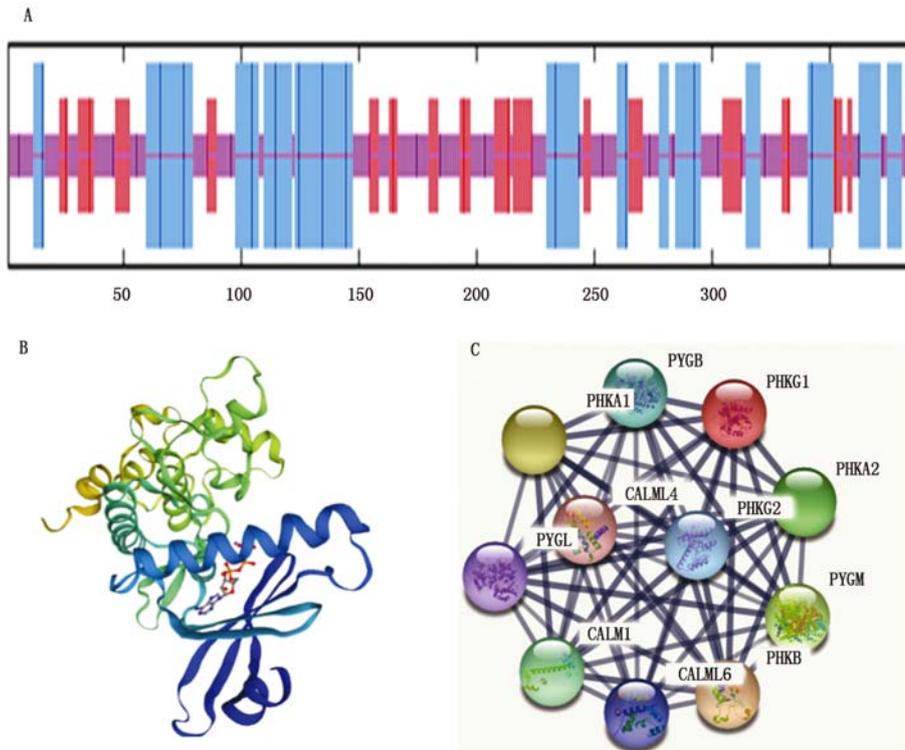
黑色. 同源性 = 100%; 粉色. 同源性 > 75%; 蓝色. 同源性 > 50%; 白色. 同源性 < 50%.
Black. Homology = 100%; Pink. Homology > 75%; Blue. Homology > 50%; White. Homology < 50%.

图 2 山羊和其他物种间 *PHKG1* 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequence of *PHKG1* between goat and other species

2.2.3 蛋白质二级结构及蛋白相互作用预测 用 ExPASy 预测蛋白二级结构, 显示 *PHKG1* 蛋白有 138 个 (35.66%) 氨基酸可能形成 α -螺旋 (Alpha helix), 167 个 (43.15%) 氨基酸可能形成无规则卷曲 (Random coil), 82 个 (21.19%) 氨基酸可能形成

延伸链 (Extended strand) (图 3-A)。蛋白质三级结构的预测结果与二级结构预测结果基本一致 (图 3-B)。相互作用分析显示, *PHKG1* 蛋白可能与 CALM1、PHKA1、PYGM、PHKB、PHKG2、PHKA2 和 PYGL 等蛋白存在相互作用 (图 3-C)。



A. PHKG1 蛋白质二级结构预测, 其中蓝色竖线表示 α 螺旋, 红色竖线表示延伸链, 紫色竖线表示无规卷曲;

B. PHKG1 蛋白质三级结构预测; C. PHKG1 蛋白质相互作用网络。

A. The second-order structure prediction of PHKG1 protein, α -helix indicated with the blue, extended strand indicated with the red, random coil indicated with the purple; B. PHKG1 protein tertiary structure prediction; C. PHKG1 protein interaction network.

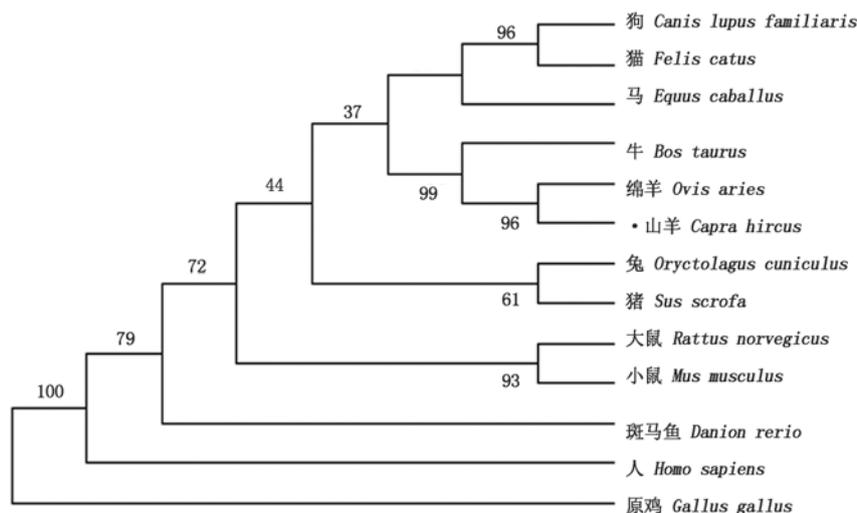
图 3 山羊 *PHKG1* 蛋白质结构及相互作用预测

Fig. 3 Prediction of protein structure and interaction of goat *PHKG1*

2.3 山羊 *PHKG1* 的系统进化树分析

为了研究山羊 *PHKG1* 蛋白的进化过程, 用 MEGA 5.0 构建进化树。结果(图 4)显示, 山羊与

绵羊首先聚为一类, 亲缘关系最近, 因与牛同属反刍动物聚类在同一分支, 与原鸡的亲缘关系最远, 符合物种的进化规律。



GenBank 登录号: 小鼠. NP_035209.1; 大鼠. NP_113761.1; 兔. NP_001095175.1; 猪. NP_001280073.1; 狗. XP_0222275227.1; 猫. XP_023102031.1; 牛. NP_001039951.1; 山羊. XP_017896091.1; 斑马鱼. NP_001018868.1; 绵羊. XP_027817635.1; 马. XP_001493403.2; 人. AAH69655.1; 原鸡. XP_015151218.1。

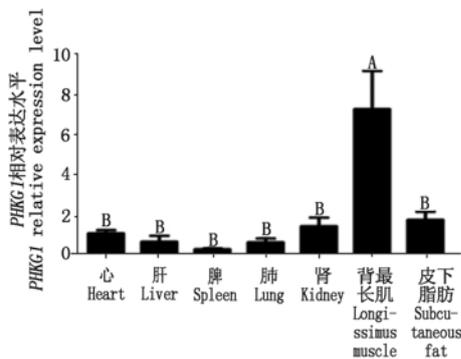
GenBank accession number: *Mus musculus*. NP_035209.1; *Rattus norvegicus*. NP_113761.1; *Oryctolagus cuniculus*. NP_001095175.1; *Sus scrofa*. NP_001280073.1; *Canis lupus familiaris*. XP_0222275227.1; *Felis catus*. XP_023102031.1; *Bos taurus*. NP_001039951.1; *Capra hircus*. XP_017896091.1; *Danio rerio*. NP_001018868.1; *Ovis aries*. XP_027817635.1; *Equus caballus*. XP_001493403.2; *Homo sapiens*. AAH69655; *Gallus gallus*. XP_015151218.1。

图 4 *PHKG1* 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *PHKG1* protein sequence

2.4 山羊 *PHKG1* 基因组织表达分析

利用 qPCR 方法检测 *PHKG1* 基因在山羊各个组织中的表达水平,结果表明,*PHKG1* 基因在所检测的 7 个组织中均有表达,以背最长肌中的表达最高,极显著高于其他的组织 ($P < 0.01$),在皮下脂肪、肾、心、肝、肺和脾组织表达量相对较低,组织间差异不显著(图 5)。

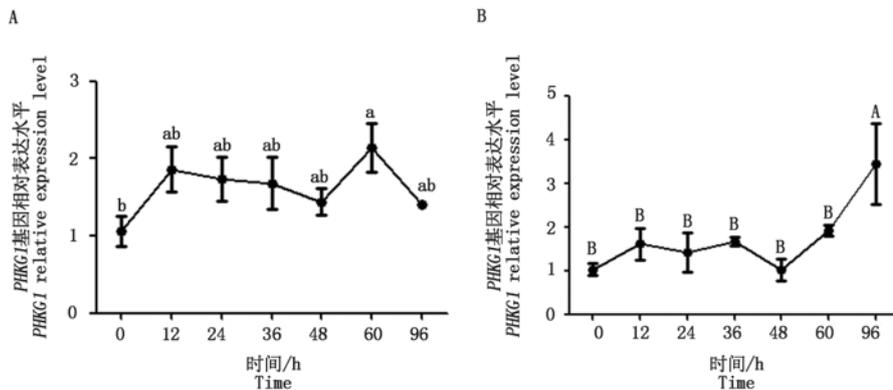


不同大写字母表示数据间差异极显著 ($P < 0.01$); 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 6 同。

Different capital letters in the superscript indicate that the difference is extremely significant difference between the data ($P < 0.01$); Different lower-case letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same as Fig. 6.

图 5 *PHKG1* 基因在山羊不同组织中的相对表达水平

Fig. 5 Relative expression level of *PHKG1* in different tissues of goat



A. *PHKG1* 在山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中的相对表达量; B. *PHKG1* 在山羊皮下前体脂肪细胞分化过程中的相对表达量。

A. The relative expression of *PHKG1* during the differentiation of intramuscular preadipocytes in goat;

B. The relative expression of *PHKG1* during the differentiation of subcutaneous preadipocytes in goat.

图 6 *PHKG1* 基因在山羊肌内和皮下脂肪细胞分化过程中的相对表达水平

Fig. 6 Relative expression level of *PHKG1* during the differentiation of intramuscular and subcutaneous preadipocytes in goat

激酶 $\alpha 1$ (Phosphorylase kinase $\alpha 1$, *PHKA1*) 基因编码肌肉组织特异表达的 α_M 型, *PHKA2* 基因编码肝脏特异表达的 α_L 型; *PHKB* 基因编码其 β 亚基; *CALM1*、*CALM2* 和 *CALM3* 3 个基因共同编码的 δ 亚基为钙调节蛋白,可以在不同 Ca^{2+} 浓度的条件下调节酶活性^[14-16]。Bali 等^[17]报道,由 *PHKA2*、*PHKB* 和 *PHKG2* 基因的突变引起的 PHK 缺乏是糖原贮积病(糖原贮积病 IX 型)最常见的原因之一。糖原磷酸化酶(PYGM)通常以去磷酸化状态存在而不具活性,在 PHK 和钙离子存在时,被磷酸化而获得活

2.5 山羊 *PHKG1* 基因时序表达分析

qPCR 检测 *PHKG1* 基因在山羊肌内和皮下前体脂肪细胞分化不同阶段的相对表达水平。结果表明,在肌内前体脂肪细胞分化过程中该基因的相对表达水平呈上升-下降-上升-下降的趋势,在 60 h 时达最高,显著高于 0 h ($P < 0.05$) (图 6-A); 在皮下前体脂肪细胞的时序表达中,该基因的相对表达水平先维持稳定且均处于较低水平,在 48 ~ 96 h 相对表达量升高,96 h 时表达量极显著高于前期表达量 ($P < 0.01$) (图 6-B)。

3 讨论与结论

研究发现与糖原分解有关的 *PHKG1* 基因功能丧失,导致糖原分解酶的缺乏,从而导致猪的糖原累积病(Glycogen storage disease, GSD),而消除该基因的不良突变将大大降低 GSD 的发病率并改善猪肉质量^[13],因此,该基因在动物肉质研究中被引起重视。为了阐明山羊 *PHKG1* 基因特性,本研究克隆获得包括完整 CDS 的 *PHKG1* 基因序列,经蛋白质相互作用预测发现,其与 *CALM1*、*PHKA1*、*PYGM*、*PHKB*、*PHKG2*、*PHKA2* 和 *PYGL* 等蛋白可能存在相互作用。PHK 的 α 亚基具有调控作用,其中磷酸化酶

性^[18-19]。而 *PYGM* 基因缺陷可引起人类 X 型糖原贮积病^[20]。对 *PHKG1* 超表达后,检测到 *PHKG2* 和磷酸甘油酸变位酶基因(*PGAM2*)表达量亦上调^[21]。综上所述,本试验预测的蛋白质互作的结果辅证了 *PHKG1* 参与糖原代谢。

前人对多个物种间 PHK 家族基因进行了研究,结果表明,其家族成员在多种动物以及人的组织中存在广泛表达^[8,22]。为探究该基因是否在山羊各组织中广泛表达,本试验构建了山羊 *PHKG1* 基因组织表达图谱,结果表明,*PHKG1* 在山羊的心、肝、脾、

肾、肺、背最长肌、皮下脂肪组织中均有表达,并且在背最长肌中相对表达量最高,其次为皮下脂肪,说明 *PHKG1* 在山羊的各组织中广泛表达且具有组织特异性。糖原主要集中于肝脏和肌肉^[23],肌肉对维持机体运动时的血糖平衡起着重要作用^[24],运动时肌浆网释放的钙离子可变构激活 PHK,使磷酸化酶 b 转变为有活性的磷酸化酶 a^[25-26]。王圆圆^[21]发现, *PHKG1* 在从江香猪和大白猪背最长肌组织中的表达量最高,在脂肪中的表达量较高,在其他组织中表达水平较低,与本研究结果类似。综合以上推测 *PHKG1* 基因在动物肌肉组织糖原代谢中发挥重要作用。同时本研究发现, *PHKG1* 在肌内和皮下前体脂肪细胞分化过程中的表达模式有区别,可能是由于皮下脂肪位于真皮之下,肌内脂肪位于肌纤维之间,二者所处的部位和发育环境不同^[27],且皮下脂肪为储能组织,而肌内脂肪多与肉质性状相关^[28],属功能性组织,另外在猪中的研究证明,不同部位脂肪沉积具有明显的时序性和组织特异性,肌内脂肪的沉积晚于皮下脂肪^[29]。本研究还发现, *PHKG1* 基因在诱导分化后第 60 小时的肌内脂肪细胞和诱导分化后第 96 小时的皮下脂肪细胞内表达水平分别显著和极显著高于分化前表达水平,推测该基因可能具有促进分化的作用。随着前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,糖代谢水平也发生改变,细胞会摄取利用葡萄糖为维持正常生命活动提供能量,亦通过转化作用生成甘油三酯的合成底物^[30]如丙酮酸、乙酰辅酶 A (CoA) 和 3-磷酸甘油等。因此, *PHKG1* 基因可能通过对糖原代谢的调控而在山羊脂肪细胞分化过程起重要作用,但如果要全面深入的阐明 *PHKG1* 基因对山羊脂肪细胞分化的调控作用则需要进一步进行功能研究。

本试验克隆得到山羊 *PHKG1* 基因 CDS 全长 1 164 bp,编码 387 个氨基酸,无跨膜结构、无信号肽且主要在细胞质中发挥作用。 *PHKG1* 基因在山羊背最长肌中表达最高,在分化后的脂肪细胞中的表达水平显著高于未分化的前体脂肪细胞。

参考文献:

- [1] 朱武政,林亚秋,江明锋,王永,廖红海,李倩,朱江江. 肉用山羊脂代谢相关基因与肌内脂肪含量的相关性分析[J]. 畜牧兽医学报,2016,47(7):1333-1341. doi:10.11843/j.issn.0366-6964.2016.07.005. Zhu W Z, Lin Y Q, Jiang M F, Wang Y, Liao H H, Li Q, Zhu J J. Association analysis of intramuscular fat content and the expression of genes related to lipid metabolism in meat goat[J]. *Acta Veterinaria Zootechnica Sinica*, 2016, 47(7):1333-1341.
- [2] 王林杰. 猪糖原合成酶(GS)与糖原合成酶激酶(GSK3)基因的分离克隆、表达分析及其功能研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010. Wang L J. Molecular characterization, expression patterns and functional study of the porcine GS and GSK3 genes [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [3] Nadeau O W, Sacks D B, Carlson G M. The structural effects of endogenous and exogenous Ca^{2+} /calmodulin on phosphorylase kinase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(42):26202-26209. doi:10.1074/jbc.272.42.26202.
- [4] Winchester J S, Rouchka E C, Rowland N S, Rice N A. *In Silico* characterization of phosphorylase kinase: Evidence for an alternate intronic polyadenylation site in PHKG1[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007, 92(3):234-242. doi:10.1016/j.ymgme.2007.06.015.
- [5] Brushia R J, Walsh D A. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure[J]. *Frontiers in Bioscience A Journal & Virtual Library*, 1999, 4(1-3):618-641. doi:10.2741/Brushia.
- [6] Hancock J M, Rice N A. Characterization of the human PHKG2 promoter[J]. *FASEB Journal*, 1989, 20: A957. doi:10.1096/fasebj.20.5.A957-a.
- [7] Priddy T S, Price E S, Johnson C K, Carlson G M. Single molecule analyses of the conformational substates of calmodulin bound to the phosphorylase kinase complex[J]. *Protein Science*, 2007, 16(6):1017-1023. doi:10.1110/ps.062747407.
- [8] Ma J W, Yang J, Zhou L S, Ren J, Liu X X, Zhang H, Yang B, Zhang Z Y, Ma H B, Xie X H, Xing Y Y, Guo Y M, Huang L S. A splice mutation in the *PHKG1* gene causes high glycogen content and low meat quality in pig skeletal muscle [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004710. doi:10.1371/journal.pgen.1004710.
- [9] Camus S, Quevedo C, Menéndez S, Paramonov I, Stouten P F W, Janssen R A J, Rueb S, He S, Snaar-Jagalska B E, Laricchia-Robbio L, Belmonte J C I. Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish [J]. *Oncogene*, 2012, 31(39):4333-4342. doi:10.1038/onc.2011.594.
- [10] Zappaterra M, Sami D, Davoli R. Association between the splice mutation g.8283C > A of the *PHKG1* gene and meat quality traits in Large White pigs [J]. *Meat Science*, 2019, 148:38-40. doi:10.1016/j.meatsci.2018.10.003.
- [11] Liu Y, Liu Y, Ma T, Long H, Niu L, Zhang X, Lei Y, Wang L, Chen Y, Wang Q, Zheng Z, Xu X W. A splicing mutation in *PHKG1* decreased its expression in skeletal muscle and caused PSE meat in Duroc × Luchuan crossbred pigs [J]. *Animal Genetics*, 2019, 50(4):395-398. doi:10.1111/age.12807.
- [12] Xue Q, Zhang G X, Li T T, Ling J J, Zhang X Q, Wang J Y. Transcriptomic profile of leg muscle during early growth in chicken [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173824. doi:10.1371/journal.pone.0173824.
- [13] Liu X X, Xiong X W, Yang J, Zhou L S, Yang B, Ai H S, Ma H B, Xie X H, Huang Y X, Fang S M, Xiao S J, Ren J, Ma J W, Huang L S. Genome-wide association analyses for meat quality traits in Chinese Erhualian pigs and a Western Duroc × (Landrace × Yorkshire) com-

- mercial population [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2015, 47(1):44. doi:10.1186/s12711-015-0120-x.
- [14] Wehner M, Kilimann M W. Human cDNA encoding the muscle isoform of the phosphorylase kinase gamma subunit (PHKG1) [J]. *Human Genetics*, 1995, 96(5):616-618. doi:10.1007/bf00197422.
- [15] Wolfsdorf J I, Holm I A, Weinstein D A. Glycogen storage diseases. Phenotypic, genetic, and biochemical characteristics, and therapy [J]. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1999, 28(4):801-823. doi:10.1016/s0889-8529(05)70103-1.
- [16] Burwinkel B, Hu B, Schroers A, Clemens P R, Moses S W, Shin Y S, Pongratz D, Vorgerd M, Kilimann M W. Muscle glycogenesis with low phosphorylase kinase activity: mutations in *PHKA1*, *PHKG1* or six other candidate genes explain only a minority of cases [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2003, 11(7):516-526. doi:10.1038/sj.ejhg.5200996.
- [17] Bali D S, Goldstein J L, Fredrickson K, Rehder C, Boney A, Austin S, Weinstein D A, Lutz R, Boneh A, Kishnani P S. Variability of disease spectrum in children with liver phosphorylase kinase deficiency caused by mutations in the *PHKG2* gene [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2014, 111(3):309-313. doi:10.1016/j.ymgme.2013.12.008.
- [18] 杨军, 张小莉, 莫新民. 从蛋白质组学研究壮骨止痛方治疗骨质疏松症作用机理 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(11):35-37.
Yang J, Zhang X L, Mo X M. Study of proteomics mechanism of Zhuanggu Zhitong formula on osteoporosis [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 15(11):35-37.
- [19] Levitan B I. Modulation of ION channels by protein phosphorylation and dephosphorylation [J]. *Annual Review of Physiology*, 1994, 56(1):193-212. doi:10.1146/annurev.ph.56.030194.001205.
- [20] Naini A, Toscano A, Musumeci O, Vissing J, Akman H O, DiMauro S. Muscle phosphoglycerate mutase deficiency revisited [J]. *Archives of Neurology*, 2009, 66(3):394-398. doi:10.1001/archneurol.2008.584.
- [21] 王圆圆. 贵州从江香猪 *PHKG1*、*PHKG2* 基因的克隆表达及功能研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
Wang Y Y. Cloning expression and function analysis of the *PHKG1* and *PHKG2* genes in Guizhou congjiang Pig [D]. Guiyang: Guizhou University, 2018.
- [22] 王圆圆, 许厚强, 陈伟, 周迪, 孙成娟, 张青青, 赵焕平, 张鸣, 杨洋. 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. doi:10.3969/j.issn.1674-7968.2017.10.010.
Wang Y Y, Xu H Q, Chen W, Zhou D, Sun C J, Zhang Q Q, Zhao H P, Zhang M, Yang Y. Cloning of *PHKG1* and *PHKG2* genes in Congjiang pigs (*Sus scrofa*) and their mRNA expression in tissue [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(10):1643-1652.
- [23] 邓斌. 动物肝糖原分子结构及糖原分子生长中链终止机制初步研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
Deng B. Studies on the molecular structure of animal liver glycogen and the chain stoppage mechanism in glycogen molecule growth [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016.
- [24] Stanford K I, Goodyear L J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle [J]. *Advances in Physiology Education*, 2014, 38(4):308-314. doi:10.1152/advan.00080.2014.
- [25] Hems D A, Whitton P D. Control of hepatic glycogenolysis [J]. *Physiological Reviews*, 1980, 60(1):1-50. doi:10.1152/physrev.1980.60.1.1.
- [26] Chrisman T D, Jordan J E, Exton J H. Purification of rat liver phosphorylase kinase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(18):10798-10804.
- [27] Fox K E, Fankell D M, Erickson P F, Majka S M, Crossno J T, Klemm D J. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta or PPAR gamma 2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52):40341-40353. doi:10.1074/jbc.M605077200.
- [28] Jeremiah L E, Dugan M E R, Aalhus J L, Gibson L L. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups [J]. *Meat Science*, 2003, 65(3):1013-1019. doi:10.1016/S0309-1740(02)00309-1.
- [29] Kouba M, Bonneau M, Noblet J. Relative development of subcutaneous, intermuscular, and kidney fat in growing pigs with different body compositions [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(3):622-629. doi:10.2527/1999.773622x.
- [30] 姜藻航, 贺丹丹, 夏梦圆, 李振, 陈杰. *AdipoR2* 介导 C2C12 肌管细胞促进 3T3-L1 前体脂肪细胞的糖代谢能力 [J]. *南京农业大学学报*, 2018, 41(5):911-916. doi:10.7685/jnau.201709012.
Jiang Z H, He D D, Xia M Y, Li Z, Chen J. Mediation of *AdipoR2* in 3T3-L1 preadipocytes co-cultured with C2C12 myotubes for glucose absorption and consumption [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41(5):911-916.