

章 明,单艳菊,姬改革,等. *PRKAG3* 基因在鸡不同部位肌肉中的表达及其与肌纤维类型的相关性[J]. 江苏农业科学,2021,49(16):144-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.16.026

PRKAG3 基因在鸡不同部位肌肉中的表达及其与肌纤维类型的相关性

章 明,单艳菊,姬改革,巨晓军,刘一帆,屠云洁,邹剑敏,束婧婷

(江苏省家禽科学研究所/江苏省家禽遗传育种重点实验室,江苏扬州 225125)

摘要:*PRKAG3* 是影响畜禽肉品质的关键基因。为研究 *PRKAG3* 基因在鸡不同部位肌肉中的表达及其与肌纤维类型的相关性,以隐性白羽肉鸡为研究对象,用 ATPase 碱孵育法对不同部位肌肉肌纤维类型进行分析,采用实时荧光定量 PCR 法检测 *PRKAG3* 基因在这些肌肉组织中的表达并将其与肌纤维类型进行关联分析。结果表明,*PRKAG3* 基因在 I 型肌纤维比例相对较高的比目鱼肌和缝匠肌中表达较低,在 II a 型比例较高的髂胫外侧肌、腓骨长肌以及只含有 II b 型肌纤维的胸大肌、胸小肌中表达较高,且差异显著 ($P < 0.05$)。相关性分析结果显示,肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达与 I 型肌纤维比例呈显著负相关 ($P < 0.05$),与 II a 型和 II b 型肌纤维比例均呈正相关,但差异不显著 ($P > 0.05$)。提示,在鸡骨骼肌中 *PRKAG3* 很可能是 AMPK 在白肌中发挥作用的主要 γ 调节亚基。

关键词:*PRKAG3* 基因;鸡;肌纤维类型;表达;相关性;肌肉;AMPK

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)16-0144-04

一磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种对能量敏感的蛋白激酶,是由一个催化亚基 α 、2 个调节亚基 β 和 γ 构成的异源三聚体。其中催化亚基 α 存在 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 2 个亚型,调节亚基 β 存在 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 2 个亚型,调节亚基 γ 存在 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 这 3 个亚型^[1]。*PRKAG3* (protein kinase adenosine monophosphate-activated $\gamma 3$ -subunit) 是编码调节亚基 $\gamma 3$ 的基因,又称 *AMPK $\gamma 3$* 。在人、大鼠和小鼠等哺乳动物中的研究表明,不同于 *AMPK* 调节亚基 γ 的另外 2 个亚型 ($\gamma 1$ 和 $\gamma 2$) 在体内广泛分布,*PRKAG3* 在骨骼肌中高度特异性表达^[1]。*AMPK $\gamma 3$* 基因敲除小鼠 (*Prkg3* -/-) 易疲劳,AMPK 激活剂和低血糖浓度等诱导的特异 AMPK 应答和功能均消失,表示 AMPK 其他三聚体

不能补偿包含有 $\gamma 3$ 的 AMPK 三聚体在体内的作用^[2-3]。自从 2000 年 Milan 等报道 *PRKAG3* 的第 200 个密码子 Arg 突变为 Gln 是引起汉普夏猪酸肉效应的根本原因^[4]后,*PRKAG3* 作为影响畜禽肉品质的重要候选基因,其多态性常被用于与畜禽肉品质、屠宰性状等经济性性状进行关联研究^[5-9]。然而值得注意的是,*PRKAG3* 基因的这种突变主要影响白肌纤维占很大比例的骨骼肌中 AMPK 的酶活性^[1,10]。另有研究表明,*PRKAG3* 基因 R200Q 突变猪慢肌肌球蛋白重链亚型比例增加^[11]。可见,*PRKAG3* 在骨骼肌肌纤维类型组成上也发挥着重要作用。

骨骼肌的肌纤维类型是影响肉品质的重要因素。根据肌纤维的形态、功能和生理生化特性,禽类将肌纤维分为慢肌纤维 (红肌纤维、I 型、氧化型肌纤维)、快红肌纤维 (II a 型、快速氧化型纤维) 和快白肌纤维 (快速酵解型纤维、II b 型)^[12-13]。总体上,慢肌纤维含量多的肌肉肉色红、嫩度高、风味好,而快白肌纤维含量多的肌肉肉色苍白、屠宰后容易产生“水猪肉”^[14-15]。目前,在鸡上还未见有关 *PRKAG3* 基因表达与肌纤维类型相关的研究报道。本研究以成年隐性白羽肉鸡为试验对象,研究不同部位肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达情况并将其与肌纤维类型进行关联分析,研究结果将为揭示 *PRKAG3* 在鸡骨骼肌中的作用以及鸡的肉品质研究提供理论依据。

收稿日期:2020-11-06

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项 (编号:CARS-41);江苏现代农业 (肉鸡) 产业技术体系集成创新中心 (编号:JATS[2020]356);江苏省农业重大新品种创制项目 (编号:PZCZ201728);江苏省属公益类科研院所自主科研经费 (编号:BM2018026);江苏省农业科技自主创新资金 [编号:CX(20)3003、CX(18)3003]。

作者简介:章 明 (1978—),男,江苏泰州人,硕士,副研究员,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:zm@jips.com;共同第一作者:单艳菊 (1982—),女,江苏盐城人,硕士,副研究员,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:shanyanjusyj@163.com。

通信作者:束婧婷,博士,副研究员,主要从事家禽遗传育种研究。E-mail:shujingting@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验动物

120 日龄隐性白羽肉鸡由江苏省家禽科学研究所国家地方鸡种资源基因库提供。选取体质量变异系数在 5% 以内的隐性白羽肉鸡母鸡 10 只。每个个体分别采集胸大肌、胸小肌、缝匠肌、髂胫外侧肌、腓骨长肌和比目鱼肌等样品,置于液氮速冻后,转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

按照 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂 [DP424, 天根生化科技(北京)有限公司] 说明书提取肌肉样品 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 纯度和完整性后, 核酸定量仪 (Thermo NanoDrop One, 美国) 测定其浓度。按照 HiScript III RT SuperMix for qPCR (R323-01, 南京诺唯赞生物科技有限公司) 说明书进行 cDNA 合成, 合成产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 引物设计

根据 GenBank 中鸡 *PRKAG3* mRNA 序列 (登录号: NM_001031258.2) 和 DNA 序列 (登录号: NC_006094.5) 以及鸡 *GAPDH* mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_204305.1) 和 DNA 序列 (GenBank 登录号: NC_006088.5), 运用在线 Primer 3, 跨基因内含子设计引物, 送生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*PRKAG3* 基因上游引物序列为 $5'-\text{GGATGCTCACCATCACTG}-3'$, 下游引物序列为 $5'-\text{TCTCCACGTCTCAATCTTGT}-3'$, 片段大小为 104 bp; *GAPDH* 基因上游引物序列为 $5'-\text{CGATCTGAACTACATGGTTTAC}-3'$, 下游引物序列为 $5'-\text{TCTGCCCATTGATGTTGC}-3'$, 片段大小为 153 bp。

1.4 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法, 优化退火温度、引物浓度、模板浓度等。反应体系为 $2\times\text{ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix } 10\mu\text{L}$, $50\times\text{ROX Reference Dye2 } 0.4\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\mu\text{mol/L}$) 各 $0.4\mu\text{L}$, 模板 $2\mu\text{L}$, 加 ddH_2O 至 $20\mu\text{L}$ 。反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C } 10\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$, 40 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 60\text{ s}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$ 。每个样品设 3 个重复, 每次反应均设空白样品为阴性对照。

1.5 冰冻切片制作与肌纤维类型分析

在恒温冷冻切片机 (Leica CM1850, 德国) 内进行肌肉样品冰冻切片的制作, 每个样品垂直于肌纤

维延展方向做横切切片, 切片厚度 $12\mu\text{m}$ 。切片在室温下干燥 5 min 后, 参考文献 [13] 的方法进行肌球蛋白 ATPase 碱孵育法染色, 染好的切片置于正置显微镜 (Leica DM1000, 德国) 下观察并拍照, 每个个体随机抽取 5 个完整肌束用 Imag-Pro Plus 6.0 软件分析肌纤维类型。

1.6 统计分析

实时荧光定量 PCR 的结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行处理, 将腓骨长肌设为对照组, 计算不同肌肉组织中 *PRKAG3* 基因的相对表达量, 用 SPSS 20.0 统计软件中 One-way Anova 分析组织对 *PRKAG3* 基因表达量和肌纤维类型比例的影响, 并用 Bivariate Correlation 分析 *PRKAG3* 基因表达量与肌纤维类型比例的相关性。所有数据以平均值 \pm 标准误表示, $P < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与分析

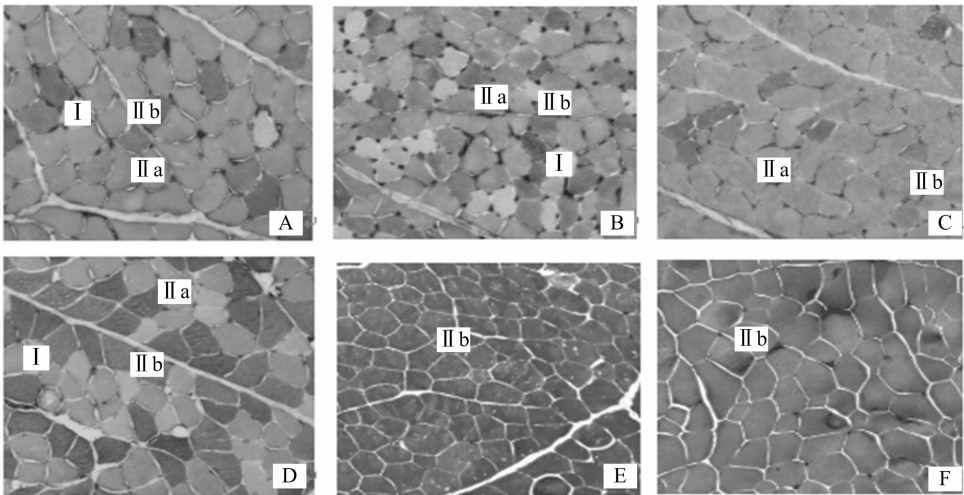
2.1 不同部位肌肉的肌纤维类型组成

隐性白羽肉鸡腓骨长肌、缝匠肌、髂胫外侧肌、比目鱼肌、胸大肌和胸小肌等肌肉肌纤维 ATPase 碱孵育法染色结果见图 1, 染色浅的是 ATPase 活性弱的慢肌纤维 (I 型), 染色深的是 ATPase 活性强的快白肌纤维 (IIb 型), 染色效果居中的是 ATPase 活性居中的快红肌纤维 (IIa 型)。由图 1 可见, 胸大肌和胸小肌中只有 IIb 型一种肌纤维类型, 髂胫外侧肌中有 IIa 和 IIb2 种肌纤维类型, 腓骨长肌、缝匠肌和比目鱼肌中可以区分出 I、IIa 和 IIb 等 3 种肌纤维类型。

对髂胫外侧肌、腓骨长肌、缝匠肌和比目鱼肌这 4 个部位肌肉肌纤维类型组成比例进行分析, 结果见表 1。由表 1 可见, 比目鱼肌的 I 型肌纤维比例最高, 显著高于缝匠肌和腓骨长肌 ($P < 0.05$), 缝匠肌的 I 型肌纤维比例又显著高于腓骨长肌 ($P < 0.05$); 髂胫外侧肌的 IIa 型肌纤维比例最高, 显著高于腓骨长肌、缝匠肌和比目鱼肌 ($P < 0.05$), 腓骨长肌的 IIa 型肌纤维比例又显著高于缝匠肌和比目鱼肌 ($P < 0.05$), 而缝匠肌和比目鱼肌的 IIa 型肌纤维比例差异不显著 ($P > 0.05$); IIb 型肌纤维比例在缝匠肌中最高, 在髂胫外侧肌中最低, 除缝匠肌与髂胫外侧肌的 IIb 型肌纤维比例差异达显著水平外 ($P < 0.05$), 其余肌肉的 IIb 型肌纤维比例差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 *PRKAG3* 基因在不同部位肌肉中的表达

由图 2 可见, *PRKAG3* 基因在髂胫外侧肌中表



A—腓骨长肌；B—缝匠肌；C—髂胫外侧肌；D—比目鱼肌；E—胸大肌；F—胸小肌；I—慢肌纤维，染色浅；II a—快红肌纤维，染色效果居中；II b—快白肌纤维，染色深

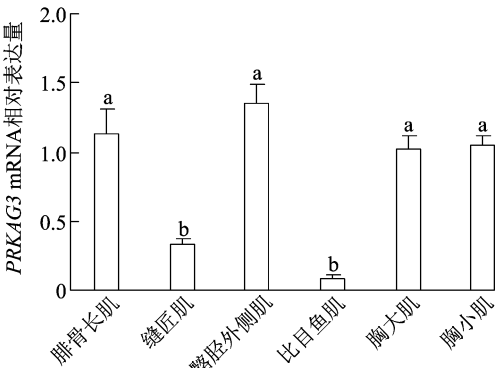
图1 隐性白羽肉鸡不同部位肌肉 ATPase 碱孵育法染色

表 1 隐性白羽肉鸡不同部位肌肉肌纤维类型组成

肌肉组织	I 型比例	II a 型比例	II b 型比例
髂胫外侧肌	—	79.81 ± 1.26a	20.19 ± 1.26b
腓骨长肌	6.93 ± 0.59c	67.54 ± 2.04b	25.53 ± 2.38ab
缝匠肌	16.48 ± 2.27b	56.75 ± 4.56c	26.77 ± 2.43a
比目鱼肌	26.83 ± 1.84a	48.03 ± 1.53c	25.14 ± 1.71ab

注：—代表没有数值。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

达水平最高,在比目鱼肌中表达水平最低;*PRKAG3* 基因在髂胫外侧肌、腓骨长肌、胸大肌和胸小肌中的表达差异不显著 ($P > 0.05$),但均显著高于缝匠肌和比目鱼肌 ($P < 0.05$);*PRKAG3* 基因在缝匠肌和比目鱼肌中的表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。



柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

图2 *PRKAG3* 基因在隐性白羽肉鸡不同部位肌肉中的表达水平

2.3 不同部位肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达与肌纤维类型相关分析

由表 2 可见,肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达与 I 型肌纤维比例呈显著负相关 ($P < 0.05$),与 II a 型

和 II b 型肌纤维比例均呈正相关,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 不同部位肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达与肌纤维类型相关分析

参数	I 型比例 (%)	II a 型比例 (%)	II b 型比例 (%)
相关系数	-0.679	0.541	0.013
<i>P</i> 值	0.045	0.069	0.969

3 讨论与结论

肌纤维是肌肉的构成单位,肌纤维类型不仅与肉色、pH 值、系水力、嫩度、肌内脂肪和风味物质含量等肉质指标密切相关,还直接影响骨骼肌的代谢^[16-20]。了解肌肉肌纤维类型分布规律对研究动物生长、代谢和肉质均具有重要意义。不同部位的肌肉,其肌纤维类型组成往往不同^[21]。本研究用 ATPase 碱孵育法对成年隐性白羽肉鸡不同部位肌肉肌纤维类型组成进行分析,结果在位于小腿部位的腓骨长肌和比目鱼肌以及位于大腿部位的缝匠肌中检测到 I、II a 和 II b 3 种肌纤维类型,在位于大腿部位的髂胫外侧肌中检测到 II a 和 II b 2 种肌纤维类型,而在躯干肌肉胸大肌和胸小肌中均仅检测到 II b 型纤维。这与 Zhang 等在 AA 肉鸡^[22]以及 Oshima 等在丝羽、蛋用和肉用 3 个品种鸡^[23]的胸大肌中均仅检测到 II b 型纤维的结果一致。

越来越多的研究表明,AMPK 在控制骨骼肌葡萄糖摄取、脂肪酸氧化和基因表达方面发挥着重要作用。AMPK 不同亚单位在不同类型肌纤维中的独

特表达模式,很可能与 AMPK 发挥作用有关^[24]。在大鼠和小鼠骨骼肌中,*PRKAG3* 基因的表达与肌肉中白肌 II b 型比例呈强正相关,强烈暗示 *PRKAG3* 基因在该组织中的作用^[1]。束婧婷等用表达谱芯片挖掘鸡骨骼肌不同类型肌纤维差异表达基因时发现,*PRKAG3* 可能是调控鸡肌纤维类型组成基因网络中的重要节点基因^[25]。本研究表明,*PRKAG3* 基因在 I 型肌纤维比例相对较高的比目鱼肌和缝匠肌中表达较低,在 II a 型比例较高的髂胫外侧肌、腓骨长肌以及只含有 II b 型肌纤维的胸大肌、胸小肌中表达较高,且差异达显著水平 ($P < 0.05$)。相关性分析结果显示,肌肉中 *PRKAG3* 基因的表达与 I 型肌纤维比例呈显著负相关 ($P < 0.05$),与 II a 型和 II b 型肌纤维比例均呈正相关,但差异不显著 ($P > 0.05$)。提示,在鸡骨骼肌中 *PRKAG3* 很可能是 AMPK 在白肌中发挥作用的主要 γ 调节亚基。

参考文献:

- [1] Mahlapuu M, Johansson C, Lindgren K, et al. Expression profiling of the gamma - subunit isoforms of AMP - activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle [J]. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2004, 286(2): E194 - E200.
- [2] Barnes B R, Glund S, Yc L, et al. 5' - AMP - activated protein kinase regulates skeletal muscle glycogen content and ergogenics [J]. Faseb Journal, 2005, 19(7): 773 - 779.
- [3] Barnes B R, Marklund S, Steiler T L, et al. The 5' - AMP - activated protein kinase $\gamma 3$ isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(37): 38441 - 38447.
- [4] 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.
- [5] Ryan M T, Hamill R M, O'Halloran A M, et al. SNP variation in the promoter of the *PRKAG3* gene and association with meat quality traits in pig [J]. BMC Genetics, 2012, 13(1): 66.
- [6] Dall'Olio S, Scotti E, Costa L N, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of the protein kinase AMP - activated non - catalytic subunit gamma 3 (*PRKAG3*) gene on production, meat quality and carcass traits in Italian Large White pigs [J]. Meat Science, 2018, 136: 44 - 49.
- [7] 焦 斐. 牦牛 *PRKAG3*、*FAS* 基因多态性与肉质相关性研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [8] 王 华, 魏玉兵, 童建伟, 等. 绵羊 *PRKAG3* 基因 SNPs 与肉质性状的相关性分析 [J]. 华北农学报, 2016, 31(1): 134 - 140.
- [9] 周娜娜. 优质鸡 *PRKAG3* 基因单核苷酸多态性与屠宰性状和肉质性状的相关研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2008: 44 - 48.
- [10] Lebret B, Le Roy P, Monin G, et al. Influence of the three RN genotypes on chemical composition, enzyme activities, and myofiber characteristics of porcine skeletal muscle [J]. Journal of Animal Science, 1999, 77(6): 1482 - 1489.
- [11] Park S K, Gunawan A M, Scheffler T L, et al. Myosin heavy chain isoform content and energy metabolism can be uncoupled in pig skeletal muscle [J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(2): 522 - 531.
- [12] Bandman E, Rosser B W. Evolutionary significance of myosin heavy chain heterogeneity in birds [J]. Microscopy Research and Technique, 2000, 50(6): 473 - 491.
- [13] 单艳菊, 束婧婷, 胡 艳, 等. 不同鸭种肌纤维早期发育特性及其与骨骼肌生长发育的相关性研究 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 225 - 231.
- [14] 李伯江, 李平华, 吴望军, 等. 骨骼肌肌纤维形成机制的研究进展 [J]. 中国农业科学, 2014, 47(6): 1200 - 1207.
- [15] Wang X F, Li J L, Cong J H, et al. Preslaughter transport effect on broiler meat quality and post - mortem glycolysis metabolism of muscles with different fiber types [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(47): 10310 - 10316.
- [16] Klont R E, Brocks L, Eikelenboom G. Muscle fibre and meat quality [J]. Meat Science, 1998, 49(S1): S219 - S229.
- [17] Lee S H, Joo S T, Yc R. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality [J]. Meat Science, 2010, 86(1): 166 - 170.
- [18] Lee S H, Choe J H, Choi Y M, et al. The influence of pork quality traits and muscle fiber characteristics on the eating quality of pork from various breeds [J]. Meat Science, 2012, 90(2): 284 - 291.
- [19] Kim G D, Yc R, Jy J, et al. Relationship between pork quality and characteristics of muscle fibers classified by the distribution of myosin heavy chain isoforms [J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(11): 5525 - 5534.
- [20] 刘 冰. 不同品种鸡的肌纤维发育规律及其与肉质的关系 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 7 - 8.
- [21] Ariano M, Armstrong R B, Edgerton V R. Hindlimb muscle fiber populations of five mammals [J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1973, 21(1): 51 - 55.
- [22] Zhang L, Yue H Y, Zhang H J, et al. Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality [J]. Poultry Science, 2009, 88(10): 2033 - 2041.
- [23] Oshima I, Iwamoto H, Tabata S, et al. Comparative observations on the growth changes of the histochemical property and collagen architecture of the musculus puboischio - femoralis pars medialis from silky, layer - type and meat - type cockerels [J]. Animal Science Journal, 2008, 79(2): 255 - 269.
- [24] Winder W W, Hardie D G, Mustard K J, et al. Long - term regulation of AMP - activated protein kinase and acetyl - CoA carboxylase in skeletal muscle [J]. Biochemical Society Transactions, 2003, 31(1): 182 - 185.
- [25] 束婧婷, 姬改革, 单艳菊, 等. 基于表达谱芯片挖掘鸡骨骼肌不同类型肌纤维的差异表达基因 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2826 - 2836.