

李忠秋,刘春龙,吴赛辉,等. 民猪丙酮酸脱氢酶激酶 4 基因在寒冷环境下的表达变化[J]. 黑龙江农业科学,2020(12):61-63.

民猪丙酮酸脱氢酶激酶 4 基因在寒冷环境下的表达变化

李忠秋¹,刘春龙²,吴赛辉¹,张冬杰¹,孙金艳¹,彭福刚¹,王文涛¹,刘 娣¹

(1. 黑龙江省农业科学院 畜牧研究所/农业部种养殖结合重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150086;
2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土生态重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:为了进一步了解寒冷环境下民猪抗寒的分子机制,本试验采用 Real-time PCR 方法检测寒冷环境下 PDK4 mRNA 在民猪背最长肌中的表达变化情况。结果表明:寒冷环境下 36 h 和 21 d 民猪背最长肌中 PDK4 mRNA 表达量均显著高于常温组。

关键词:民猪;PDK4;寒冷环境;荧光定量 PCR

民猪是长期在东北寒冷环境条件下形成的一个古老的地方品种,具有体质强健、抗寒能力强、脂肪沉积能力强、产仔多和肉质好等优点,适合于北方放牧和粗放管理模式。在-28℃严寒的冬季条件下,民猪可在室外可长时间逗留而不表现颤抖和鸣叫。只要有简易的保温措施,母猪在-20℃的寒冷环境下,就可以保证正常生产和繁殖。与其他地方猪种相比,民猪超强的抗寒能力为进行畜禽的抗寒试验提供良好的素材。丙酮酸脱氢酶激酶 4(pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4)是丙酮酸脱氢酶激酶 4 个亚型中的一种,是腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatase, ATPase)家族成员之一。PDK4 基因通过磷酸化丙酮酸脱氢酶复合体(puruvate dehydrogenase complex, PDC)抑制丙酮酸脱羧转变成乙酰辅酶 A,从而在三羧酸循环、脂肪代谢、糖酵解、ATP 的形成等生理过程中发挥核心作用^[1-3]。PDK4 主要在骨骼肌和心肌中表达,PDK4 能够调节糖酵解过程中的限速酶,故在骨骼肌的能量代谢中起到重要作用^[4]。寒冷环境下骨骼肌对能量需求发生变化,推断 PDK4 基因调节骨骼肌的能量代谢,从而改变机体的抗寒能力。本文通过定量分析寒冷环境下民猪 PDK4 基因的表达变化情况,

明确寒冷诱导 PDK4 合成的机制,为进一步揭示其生物学功能提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试民猪体重 95 kg 左右,共 18 头,选自黑龙江省农业科学院畜牧研究所民猪养殖基地,TRI Pure RNA Isolation Reagent(11667165001)RNA 提取试剂盒购自 Roche 公司,Easy-Script One-Step g DNA Removal 和 cDNA Synthesis Snper Mix(AE311-02 反转录试剂盒购自 TRANSGEN BIOTECH 公司,UltraSYBR Mixture(CW0957M)荧光定量试剂盒购自 CWBIO 公司。

1.2 方 法

1.2.1 试验设计 供试民猪按照饲养温度和时间分为 3 组,每组 6 头,常温组(舍内 15~25℃)、低温 36 h 组和低温 21 d 组(冬季舍外半敞式大棚内-25~-15℃)。试验结束后屠宰猪只,立即在第 13 肋和第 14 肋间的背最长肌处采取 1 g 左右肌肉样品,放入冻存管中用液氮保存。试验样品于 2014 年 12 月-2015 年 1 月保存于液氮中。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 合成 按照 TRI Pure RNA Isolation Reagent 试剂盒说明提取肌肉样品的总 RNA,提取总 RNA 的完整性鉴定方法为琼脂糖凝胶电泳,总 RNA 浓度测定的方法为分光光度计测定 OD 值,通过公式计算并调整总 RNA 浓度为 1 μg·μL⁻¹,储存于-80℃冰箱待用。

cDNA 合成严格按照 Easy-Script One-Step g DNA Removal 和 cDNA Synthesis Snper Mix 试剂盒的要求进行。6 μL RNA 加 1 μL Oligo dT

收稿日期:2020-08-07

基金项目:黑龙江省农业科学院院级课题(2018KYJL005);黑龙江省自然科学基金(LH2019C064);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-36)。

第一作者:李忠秋(1974-),女,博士,副研究员,从事动物遗传育种研究。E-mail:lizhongqiu1974@163.com。

通信作者:刘娣(1963-),女,博士,教授,从事动物遗传育种研究。E-mail:liudi1963@163.com。

Primer, 4 μL Random Primer, 4 μL 5 \times Prime-Script Buffer, 1 μL PrimeScript RT Enzyme MixI, 4 μL Rnase free H₂O, 总体积 20 μL 。反应步骤为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表 1 *PDK4* 和 *GAPDH* 的引物序列

Table 1 The primer sequence of *PDK4* and *GAPDH*

基因 Gene	登录号 Accession No.	引物序列 Primer sequence	扩增长度 Length/bp
<i>PDK4</i>	NM_001159306.1	F: 5'-GAGCTGTTCTCCGCTACAG-3'	120
		R: 5'-AGTTCTCTCACAGGCATTTTCTG-3'	
<i>GAPDH</i>	XM_003126534.1	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	245
		R: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'	

1.2.4 荧光定量 PCR 测定 荧光定量 PCR 反应体系: 2 \times Ultra SYBR Mixture 10 μL , 上下游引物各 0.5 μL , cDNA 产物 0.5 μL , 去离子水 8.5 μL , 总体积 20 μL 。荧光定量反应在 Roche Light Cycler480 II 仪器上进行, 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 每个样品 3 次重复。以 *GAPDH* 基因进行校正, 目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法来计算。

1.2.5 数据分析 试验数据的计算是应用 SPSS v17.0 软件的 One-Way ANOVA 或 T-Test 进行数据统计和分析。

2 结果与分析

2.1 民猪背最长肌总 RNA 鉴定

利用高纯度 Tri Pure RNA Isolation Reagent 试剂盒提取的总 RNA, 分别在 260 和 280 nm 处测定其吸光度值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0, 甲醛变性凝胶电泳检测各总 RNA 样本均得到了清晰、致密的 28S 和 18S 条带(图 1), 说明所提取的 RNA 无降解, 无 DNA 污染, 完整性较好, 纯度较好。

2.2 民猪 *PDK4* 基因在寒冷环境下的表达变化

以相对表达水平的差异倍数为纵坐标, 将常温组民猪 *PDK4* mRNA 表达量设定为 1, 测得寒冷环境下 36 h 和 21 d 民猪 *PDK4* mRNA 表达量(图 2)。结果显示在寒冷环境下 36 h 和 21 d 民猪 *PDK4* mRNA 表达量均显著升高, 说明 *PDK4* mRNA 表达受到寒冷环境的诱导而增加, 据此推测在民猪的抗寒机制中 *PDK4* 基因可能具有一定的作用。

1.2.3 荧光定量引物的设计和合成 根据 NCBI 上提交的猪 *PDK4* 序列设计荧光定量引物, 以 *GAPDH* 为内参, 引物序列及扩增片段长度详见表 1。

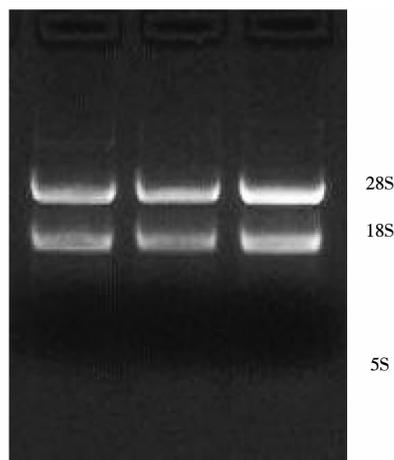
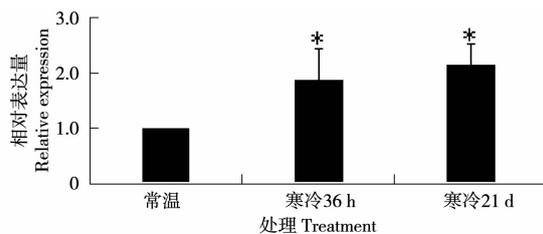


图 1 总 RNA 甲醛变性凝胶电泳图

Fig. 1 Formaldehyde-denaturing gel electrophoresis of total RNA



* 表示差异显著性水平 ($P < 0.05$)。

* indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 2 寒冷环境下民猪 *PDK4* 的表达变化

Fig. 2 *PDK4* expression changes under cold environment

3 讨论

在哺乳动物中发现 PDK 有 4 种同工酶, 分别是 *PDK1*、*PDK2*、*PDK3* 和 *PDK4*^[5-6]。4 种同工酶在各组织器官中的表达有所不同, *PDK1* 在心脏和胰岛中有表达, *PDK2* 在心脏、肝脏和肾脏中高表达, *PDK3* 在睾丸、肾脏和脑中有表达, *PDK4* 在骨骼肌、心脏、肝脏和肾脏中高表达^[7-8]。Lan

等^[9]在研究梅山猪 *PDK4* 基因组织表达谱时发现,*PDK4* 基因在骨骼肌表达量高于其它组织器官。*PDK* 是催化 *PDC* 磷酸化过程的一个高度特异性的催化酶,通过磷酸化 *PDC* 抑制其活性,从而调节哺乳动物体内的碳水化合物代谢平衡^[10-11]。*PDK4* 基因对骨骼肌中 *PDC* 的抑制作用最强^[12]。Rowles 等^[5]研究发现在运动过程中、糖尿病病人体内和饥饿状况下,*PDK4* 基因的活性在机体的大部分组织中会显著升高,特别是在心脏和骨骼肌中其表达量高于其它组织器官。运动过程中机体能量需求发生改变,其能量代谢途径也做出相适应的改变,研究发现在短时间的单腿运动后,在人的骨骼肌中 *PDK4* 基因的表达量显著升高,*PDK4* 通过磷酸化 *PDC* 的 *E1a* 亚基限制 *PDC* 的酶活性,以调节葡萄糖代谢^[13-14],这说明 *PDK4* 基因的表达对骨骼肌的能量代谢起到重要作用。寒冷环境下民猪背最长肌中 *PDK4* 表达水平显著升高,*PDK4* 是否能够调节寒冷环境下骨骼肌的能量代谢及调控途径还有待进一步的研究。

4 结论

本试验结果表明寒冷环境下民猪背最长肌中 *PDK4* 表达水平显著升高 ($P < 0.05$),为进一步研究 *PDK4* 在民猪抗寒机制中的作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Sugden M C, Holness M J. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases[J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2006, 112(3): 139-149.
- [2] Dixit D, Ahmad F, Ghildiyal R, et al. CK2 inhibition induced *PDK4*-AMPK axis regulates metabolic adaptation and survival responses in glioma[J]. Experimental Cell Research, 2016, 344(1): 132-142.
- [3] Aminizadeh S, Habibi A, Marefati H, et al. The role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*PDK4*) on the expression of citrate synthase in the skeletal muscle after 4 weeks of

- endurance training in male wistar rats[J]. Rafsanjan University of Medical Sciences, 2017, 16(3): 191-202.
- [4] 管记涌. *PDK4* 基因在骨骼肌发育中功能的初步探讨[D]. 北京:中国协和医科大学, 2004.
- [5] Rowles J, Sxherer S W, Majer M, et al. Cloning and characterization of *PDK4* on 7p21. 3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(37): 22376-22382.
- [6] Gudi R, Melissa B K, Kedishvili N Y, et al. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(48): 28989-28994.
- [7] Bowker-Kinley M M, Davis W I, Wu P, et al. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex[J]. The Biochemical journal, 1998, 329(1): 191-196.
- [8] Sugden M C, Bulmer K, Augustine D, et al. Selective modification of pyruvate dehydrogenase kinase isoform expression in rat pancreatic islets elicited by starvation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α : implications for glucose-stimulated insulin secretion[J]. Diabetes, 2001, 50(12): 2729-2736.
- [9] Lan J, Lei M G, Zhang Y B, et al. Characterization of the porcine differentially expressed *PDK4* gene and association with meat quality[J]. Molecular biology reports, 2009, 36(7): 2003-2010.
- [10] Regatieri I C, Pereira G L, Neto A R T, et al. Polymorphisms MCT1, CD147, *PDK4* and *DMRT3* genes in Srabian and Quarter horses[J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2017, 48: 161-165.
- [11] Behal R H, Buxton D B, Robertson J G, et al. Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex[J]. Annual Review of Nutrition, 1993, 13(1): 487-520.
- [12] 田家伟. 猪 *PDK4* 基因启动子的克隆及其活性分析[D]. 重庆:西南大学, 2012.
- [13] Wu P, Inskip K, Bowker-Kinley M M, et al. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes[J]. Diabetes, 1999, 48(8): 1593-1599.
- [14] Enos J L. Transfer of technology[J]. Asian Pacific Economic Literature, 1993, 3(1): 2-36.

Expression of *PDK4* in Min Pigs Under Cold Environment

LI Zhong-qiu¹, LIU Chun-long², ZHANG Dong-jie¹, SUN Jin-yan¹, PENG Fu-gang¹, MA Hong¹, WANG Wen-tao¹, LIU Di¹

(1. Animal Husbandry Research Centre of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Combining Farming and Animal Husbandry, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Harbin 150086, China; 2. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Key Laboratory of Black Soil Ecology, Harbin 150081, China)

Abstract: To study the molecular mechanism of cold resistance of Min pig under cold environment, the real-time PCR was applied to analyze of *PDK4* in Min longissimus dorsi muscles (LM) under cold environment. Under cold conditions 36 h and 21 d *PDK4* expression were increased significantly than that of normal group.

Keywords: Min pigs; *PDK4*; cold environment; real-time PCR