

猪 *ACSM3* 基因过表达/敲减质粒的构建

张冬杰^{1,2}, 柳樱子³, 汪亮^{1,2}, 杨秀芹³, 刘娣^{1,2*}

(1. 黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 哈尔滨 150086; 2. 农业农村部种养殖结合重点实验室, 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150006)

摘要: 脂肪主要由甘油和脂肪酸组成, 酰基辅酶 A 合成酶中链家族成员 3 (Acyl-CoA medium-chain synthetase 3, *ACSM3*) 是脂肪酸代谢第一步反应中的关键酶。为了深入研究 *ACSM3* 基因的生物学功能, 采用克隆、测序、双酶切、连接等分子生物学技术, 将 *ACSM3* 基因的完整编码区连入 pcDNA3.1(+) 载体内, 构建该基因的过表达质粒; 通过生物合成技术, 构建该基因的敲减质粒。然后利用体外培养的猪前体脂肪细胞, 检测 *ACSM3* 基因的过表达/敲减质粒的作用效果。结果表明, 成功构建了 *ACSM3* 基因的过表达质粒, 该质粒的过表达效果可一直持续到转染后的第 8 天。从 3 条特异性干扰序列中筛选出 1 条具有显著敲减效果的序列, 敲减作用可持续到转染后的第 2 天。本研究所构建的过表达/敲减质粒, 可为后续的 *ACSM3* 基因的功能研究提供有力的技术支持。

关键词: 猪; *ACSM3* 基因; 脂肪细胞; 过表达; 敲减

中图分类号: S828.2; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)04-0574-04

Construction of pig *ACSM3* gene overexpression / knockdown plasmid

ZHANG Dongjie^{1,2}, LIU Yingzi³, WANG Liang^{1,2}, YANG Xiuqin³, LIU Di^{1,2}

(1. Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

2. Key Laboratory of Combining Farming and Animal Husbandry, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150086;

3. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150006)

Abstract: Adipose is mainly composed of glycerol and fatty acids. Acyl-CoA medium-chain synthetase 3 is a key enzyme in the first step of fatty acid metabolism. In order to further study the biological function of *ACSM3* gene, the complete coding region of *ACSM3* gene was connected into pcDNA3.1(+) vector by molecular biological techniques such as cloning, sequencing, double enzyme digestion and ligation. The knockdown plasmid of this gene was constructed by biosynthesis technology. Then, the effect of overexpression / knockdown plasmid of *ACSM3* gene was detected in porcine preadipocytes cultured in vitro. The results showed that the overexpression plasmid of *ACSM3* gene was successfully constructed, and the overexpression effect of the plasmid could last eight days after transfection. One sequence with significant knockdown effect was selected from three specific interference sequences, and the knockdown effect lasted two days after transfection. The overexpression / knockdown plasmid constructed in this study can provide strong technical support for the further functional research of *ACSM3* gene.

Key words: porcine; *ACSM3* gene; adipocyte; overexpression; knockdown

过去几十年, 养猪业主要把提高生产效率和瘦肉率作为优先考虑因素, 导致胴体和肌肉中储存的脂肪量持续下降^[1]。肌内脂肪的数量和组成是决定肉质和消费者接受程度的重要因素, 因为适当的肌内脂肪含量可增加猪肉的风味、嫩度和多汁性等感

官特性。已知饲料和饲养方式可改善肌肉品质和肌内脂肪分布^[2-3], 品种和基因也会影响动物的脂肪分布和脂肪酸组成^[4], 同一个体不同部位的脂肪酸含量也会存在显著不同^[5]。民猪是我国著名的地方品种之一, 肌内脂肪含量可达 3%~4%, 远高于引进

收稿日期: 2021-12-12

基金项目: 国家自然科学基金 (32172696), 国家现代农业产业技术体系 (CARS-36) 和黑龙江省科研业务费 (CZKYF2020A004) 共同资助。

作者简介: 张冬杰, 博士, 研究员。E-mail: djzhang8109@163.com

* 通信作者: 刘娣, 研究员, 博士生导师。E-mail: liudi1963@163.com

的大白猪^[6]。本课题组在前期研究中发现, 酰基辅酶 A 合成酶中链家族成员 3 (Acyl-CoA medium-chain synthetase 3, *ACSM3*) 高表达于民猪的背最长肌内 (与腿肌相比)^[7]。*ACSM3* 是一种酰基辅酶 A 合成酶, 直接参与脂肪酸的代谢, 负责油脂分解产生的脂肪酸和脂肪族一元羧酸的化学反应和代谢途径。在内洛尔牛的背最长肌内, *ACSM3* 基因高表达于脂肪酸含量偏低个体的多不饱和脂肪酸 (PUFA)、饱和脂肪酸 (SFA) 和 ω -3 多不饱和脂肪酸内, 低表达于单不饱和脂肪酸 (MUFA) 内^[8]。因此, 本研究拟通过分子生物学技术, 人为构建 *ACSM3* 基因的过表达和敲减质粒, 为后续该基因的生物功能研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

20 日龄仔猪 1 头, 由黑龙江省农科院畜牧研究所民猪保种场提供, *Kpn* I 和 *Eco*R I 内切酶、pcDNA3.1(+)载体、荧光定量试剂等主要购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 反转录试剂盒 (AT341-01) 购自全式金, siRNA 干扰序列由金开瑞公司设计并合成, 脂质体 2000、PBS、DMEM/F12 培养基等主要购自 Invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 猪 *ACSM3* 基因完整编码区的扩增 根据 NCBI 网站上已提交的猪 *ACSM3* 基因序列 (XM_021086514.1) 设计 1 对引物 (F/R) 用于扩增其完整编码区序列, 并在上游引物 5'端引入 *Kpn* I 酶切位点, 下游引物 5'端引入 *Eco*R I 酶切位点, 引物序列信息如下, F: 5'-GGTACCTTAAATTTTTTTC CATTCCTTCTTC-3', R: 5'-GAATTCCTACCATGCAGATATTACTTTG-3', 划线部分为引入的酶切位点。以猪脂肪组织的 cDNA 为模板, F/R 为特异性引物进行常规 PCR 反应。反应结束后, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 利用胶回收试剂盒回收目的片段, 连入 pMD-18T 载体后送交吉林库美生物科技有限公司测序。

1.2.2 pcDNA3.1-*ACSM3* 真核表达载体的构建 将测序正确的 pMD-18T-*ACSM3* 质粒利用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 两种内切酶将插入的片段切下, 通过胶回收纯化后连入 pcDNA3.1(+)载体, 构建 pcDNA3.1-*ACSM3* 重组质粒, 再次送交吉林库美生物科技有限公司测序, 以保证插入序列的准确性。

1.2.3 猪 *ACSM3* 基因干扰序列设计与合成 本研究共设计特异性干扰序列 3 条, 分别为 p-siRNA-1:

5'-CCAUGAAACAGAACUUCAATT-3', p-siRNA-2: 5'-CCAAGGAGCAUGUGUAUUUTT-3', p-siRNA-3: 5'-GCAUUCGAGUUUCACCUA ATT-3', 用于敲减脂肪细胞内 *ACSM3* 的表达。

1.2.4 猪前脂肪细胞的体外培养与诱导分化 无菌采集 20 d 仔猪颈背部脂肪组织, 去掉多余的结缔组织后转移到 37 °C 预热的 D-PBS 中 (含有 2 倍培养浓度的双抗), 用手术剪将脂肪组织剪成大小约 2 cm³ 的小块, 转入 75%酒精中浸泡 40 s, 再用 D-PBS 冲洗 2 次去除残余酒精。将冲洗干净的脂肪组织放入 5 mL 无菌离心管中, 剪成糜状后转入 50 mL 无菌离心管中, 加入 2 倍体积的消化液 (DMEM/F12 培养基, 含终浓度 0.1% 的 I 型胶原酶、终浓度 2% 的牛血清白蛋白及终浓度 10 mmol·L⁻¹ CaCl₂), 37 °C 消化摇床中 130 r·min⁻¹, 消化 1 h。消化后加入等体积的完全培养基 (10% FBS 的 DMEM/F12 培养基) 终止消化, 150 目细胞筛过滤, 滤液经 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清。将沉淀用完全培养基重悬, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清, 再清洗 1 次后, 用 4 mL 完全培养基重悬沉淀, 然后均匀地铺于 60 mm 细胞培养皿中, 放入含终浓度 5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养。待细胞密度达到 80% 后传代培养。

前脂肪细胞的诱导分化: 待细胞密度达到 90% 以上, 更换为成脂分化培养基 (完全培养基中含终浓度 10 μg/mL 胰岛素、1 μmol·L⁻¹ 地塞米松、0.125 mmol·L⁻¹ 吡哆美辛、0.5 mmol·L⁻¹ 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、1 nmol·L⁻¹ 三碘甲状腺原氨酸、1 μmol·L⁻¹ 罗格列酮)。成脂分化培养 2 d 后, 更换为只含胰岛素、罗格列酮和三碘甲状腺原氨酸的完全培养基, 继续培养 4~6 d, 每 2 天换 1 次培养液。

1.2.5 转染 转染前将脂肪细胞接种到 6 孔细胞培养板中, 待细胞密度达到 80%~90% 的汇合度时开始转染。将 2.5 μg 的质粒、10 μL 的脂质体 2000 分别加入到 100 μL DMEM/F12 培养基中, 充分混匀, 再将二者混在一起室温孵育 5 min。弃掉待转染细胞的培养基, D-PBS 清洗 1 次, 每孔补加 DMEM 培养基 1.8 mL, 将孵育好的质粒-转染试剂复合物加入到细胞培养板中, 轻轻摇晃, 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。4~6 h 后更换为含血清的完全培养基, 继续培养以备后续实验。转染质粒 pcDNA3.1-*ACSM3* 时, 以转染空载体 pcDNA3.1(+) 的细胞为对照。转染 p-siRNA-*ACSM3* 时, 以转染 siRNA-NC 的细胞为对照组。siRNA 的转染参照金开瑞 (武汉) siRNA 使用说明操作。

1.2.6 细胞 RNA 的提取与反转录 分别在前脂肪细胞诱导分化的第 2 天和第 8 天提取细胞总 RNA。采用常规 Trizol 法提取总 RNA。

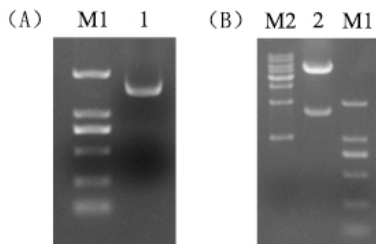
按照反转录试剂盒说明书操作，反应体系为总 RNA 1 μg, All-in-One SuperMix 4 μL, gDNA Remover 1 μL, RNase-free H₂O 补至 20 μL。反应条件为 42 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 1 min, 将所提取的 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.2.7 实时定量 PCR 利用 LightCycler480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche) 对目的基因进行定量检测, 反应体系为 cDNA 0.5 μL, 2×SYBR Green PCR Mixture 10 μL, 引物各 0.5 μL, 灭菌水补充至 20 μL。反应程序为 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。每组试验重复 3 次, 测定结果根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算各模板中目的基因相对于内参基因 *GAPDH* 的表达量, 利用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析及 LSD 检验。

2 结果与分析

2.1 猪 *ACSM3* 基因真核表达载体的构建

以民猪脂肪组织的 cDNA 为模板, 扩增得到猪 *ACSM3* 基因完整编码区序列, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 在 1 000~2 000 bp 间出现单一条带, 与预期的 1 746 bp 大小相符 (图 1(A)), 测序结果也证明该片段长 1 746 bp。构建的 pMD18-T-*ACSM3* 质粒经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 将目的片段连入 pcDNA3.1(+) 真核表达载体, 对重组质粒 pcDNA3.1-*ACSM3* 进行双酶切鉴定后, 发现所切下片段大小与目的片段大小一致, 说明目的片段实现了正确插入 (图 1(B))。



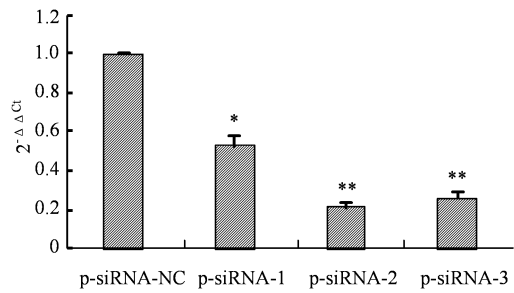
(A)为 *ACSM3* 基因完整编码区的 PCR 扩增结果; (B)为 pcDNA3.1-*ACSM3* 的双酶切鉴定结果。M1: DL2000 Marker; M2: DL10000 Marker。

图 1 *ACSM3* 基因的 PCR 扩增及双酶切鉴定结果
Figure 1 PCR amplification and double enzyme digestion of *ACSM3* gene

2.2 猪 *ACSM3* 基因干扰序列的筛选结果

以转染随机序列的 p-siRNA-NC 的细胞为对照, 与转染了 3 条特异序列的细胞进行比较, 筛选

有效敲减 *ACSM3* 的干扰序列。结果发现, 与对照组相比, 干扰序列 2 的敲减效果最显著, 故选择 p-siRNA-2 进行后续实验, 并命名为 p-siRNA-*ACSM3*。



*和**分别为 0.05 及 0.01 水平上的显著性差异。下同。

图 2 *ACSM3* 基因的 siRNA 筛选结果

Figure 2 siRNA screening results of *ACSM3* gene

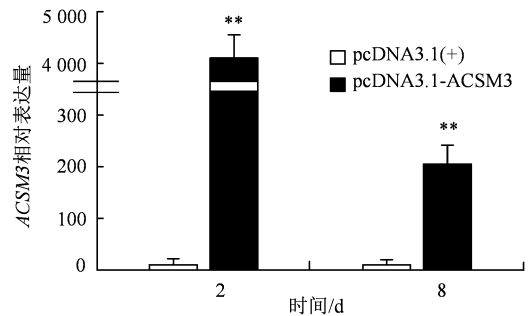


图 3 脂肪细胞内转染 pcDNA3.1-*ACSM3* 质粒后 *ACSM3* 基因的表达变化结果

Figure 3 Expression of *ACSM3* gene after transfection pcDNA3.1-*ACSM3* plasmid in adipocytes

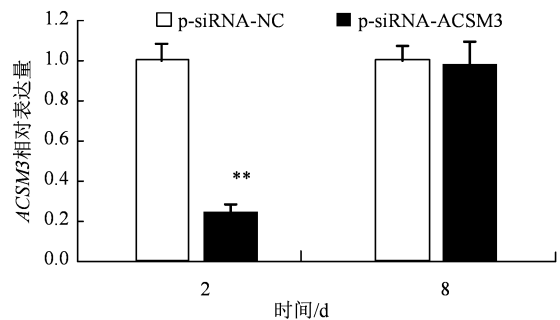


图 4 脂肪细胞内转染 p-siRNA-*ACSM3* 质粒后 *ACSM3* 基因的表达变化结果

Figure 4 Expression of *ACSM3* gene after transfection p-siRNA-*ACSM3* plasmid in adipocytes

2.3 猪 *ACSM3* 基因的过表达检测结果

将真核表达载体 pcDNA3.1(+) 和重组质粒 pcDNA3.1-*ACSM3* 分别转染到猪前脂肪细胞中, 在转染后的第 2 天和第 8 天收集细胞, 检测细胞中 *ACSM3* 基因表达情况, 以 *GAPDH* 为内参。结果 (图 3) 显示, 重组质粒在转染 2 d 后, 脂肪细胞内 *ACSM3* 的表达量显著升高, 转染 8 d 后的表达量与 2 d 后的表达量比较, 发生了显著下降, 但仍显著高于对照组。

2.4 猪 *ACSM3* 基因的敲减效果检测结果

以转染 p-siRNA-NC 的细胞为对照, 分别在转染后的第 2 天和第 8 天收集细胞, 检测转染 p-siRNA-*ACSM3* 敲减质粒后 *ACSM3* 基因的表达变化情况。结果发现, 转染 2 d 后, *ACSM3* 基因的表达量出现了显著下降; 但在转染 8 d 后, *ACSM3* 基因的表达量与对照组相比已无明显差异 (图 4)。

3 讨论

脂肪的沉积包括脂肪细胞的增殖、分化和凋亡等过程, 该过程受到多种转录因子和脂肪分泌因子的级联调控, 研究这些因子对肌内前体脂肪细胞增殖分化的作用及其机制对猪肉的品质改良具有重要的现实意义。本课题组在对民猪背最长肌和腿肌差异表达基因的筛选中, 发现了一个在背最长肌内高表达的 *ACSM3* 基因, 该基因具有酰基辅酶 A 合成酶活性, 可以通过与线粒体外膜上的中链脂肪酸相互作用产生酰基辅酶 A, 这是脂肪酸代谢的第一步^[9]。据此推测, 该基因的高表达会促进脂肪组织的脂解作用。

已有研究表明, *ACSM3* 的过度表达会抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 负调控整合素 b1/AKT 信号通路 (Integrin b1/AKT pathway)^[10]; 当 *ACSM3* 下调表达时, TGF β 、WNT、AKT 和 MYC 信号通路会被激活^[11]。丁酸可以显著上调 *ACSM3* 基因的表达^[12]; 而 *PPAR γ* 则会抑制其表达。*ACSM3* 在南极磷虾油调节脂代谢中起着重要的调控作用^[13]。该基因通过线粒体脂肪酸 β 氧化参与脂质代谢, 同时也是 *PPAR α* 信号通路的一部分^[14]。

本研究构建的 *ACSM3* 基因过表达载体, 虽然是瞬时转染, 靶基因并没有整合到基因组中, 但通过检测发现, 即使到第 8 天, *ACSM3* 基因的过表达效果依旧显著存在。但敲减质粒的作用效果远不如过表达质粒持续的时间久, 干扰质粒转染后的第 2 天, *ACSM3* 基因敲减效果显著, 此时前脂肪细胞的增殖期基本结束, 开始进入分化期。但在转染的第 8 天检测时, 基因的敲减效果与对照组相比, 已经无显著差异了, 这说明干扰质粒的作用时间有限, 如果想对分化期 *ACSM3* 基因的生物功能进行分析, 需要考虑使用 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术, 以实现持久的基因功能缺失。

参考文献:

- [1] ZAPPATERA M, CATILLO G, BELMONTE A M, et al. Genetic parameters of muscle fatty acid profile in a purebred Large White heavy pig population[J]. Meat Sci, 2020, 163: 108057.
- [2] 马秀花, 扈志强, 齐明江, 等. 多不饱和脂肪酸组合对滩羊肉品质、血清抗氧化指标及共轭亚油酸含量的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(4): 2514-2523.
- [3] 火苗, 李娅楠, 杨思瑞, 等. 饲养方式对滩羊羔羊肌肉及脂肪组织中脂肪酸组成的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(6): 2020-2032.
- [4] 要铎, 张月, 郭月英, 等. 脂肪代谢重要基因网络对呼伦贝尔羊脂肪分布和脂肪酸组成的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 88-96.
- [5] 张娅俐, 洪晶, 张棚, 等. 肃南牦牛不同部位脂肪中脂肪酸组成分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(18): 7168-7174.
- [6] 刘娣. 民猪优良种质特性研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(17): 26-29.
- [7] LIU Y Z, YANG X Q, JING X Y, et al. Transcriptomics analysis on excellent meat quality traits of skeletal muscles of the Chinese indigenous Min pig compared with the large white breed[J]. Int J Mol Sci, 2017, 19(1): 21.
- [8] BERTON M P, FONSECA L F S, GIMENEZ D F J, et al. Gene expression profile of intramuscular muscle in Nellore cattle with extreme values of fatty acid[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 972.
- [9] BURGERING B M, COFFER P J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction[J]. Nature, 1995, 376(6541): 599-602.
- [10] YAN L M, HE Z P, LI W, et al. The overexpression of acyl-CoA medium-chain synthetase-3 (*ACSM3*) suppresses the ovarian cancer progression via the inhibition of integrin β 1/AKT signaling pathway[J]. Front Oncol, 2021, 11: 644840.
- [11] GOPAL R, SELVARASU K, PANDIAN P P, et al. Integrative transcriptome analysis of liver cancer profiles identifies upstream regulators and clinical significance of *ACSM3* gene expression[J]. Cell Oncol (Dordr), 2017, 40(3): 219-233.
- [12] WANG D, LIU C D, LI H F, et al. LSD1 mediates microbial metabolite butyrate-induced thermogenesis in brown and white adipose tissue[J]. Metabolism, 2020, 102: 154011.
- [13] 张迪雅, 崔晨茜, 何晓倩, 等. 基于 Label-free 组学研究南极磷虾油对脂代谢的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(8): 1575-1583.
- [14] HAMADNEH L A, SABBAAH D A, HIKMAT S J, et al. Hypolipidemic effect of novel 2, 5-bis(4-hydroxybenzylidenamino)-1, 3, 4-thiadiazole as potential peroxisome proliferation-activated receptor- α agonist in acute hyperlipidemic rat model[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 458(1/2): 39-47.