

山羊 *RPL29* 基因克隆和序列分析及其对肌内脂肪细胞脂质生成的影响

龚成思^{1,2}, 林亚秋^{1,2}, 胡婷婷^{1,2}, 王永^{1,2}, 李艳艳^{1,2}, 王友利^{1,2*}

1 西南民族大学 畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 西南民族大学 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

龚成思, 林亚秋, 胡婷婷, 王永, 李艳艳, 王友利. 山羊 *RPL29* 基因克隆和序列分析及其对肌内脂肪细胞脂质生成的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2695-2705.

GONG Chengsi, LIN Yaqiu, HU Tingting, WANG Yong, LI Yanyan, WANG Youli. Gene cloning and sequence analysis of the *RPL29* gene and its effect on lipogenesis in goat intramuscular adipocytes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2695-2705.

摘要: 本研究旨在克隆简州大耳羊 *RPL29* 基因并分析其分子特性及对肌内脂肪细胞脂质生成的影响。利用反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法克隆山羊 *RPL29* 基因序列, 用生物信息学方法分析该基因序列特征, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)法检测其在山羊各种组织和不同分化阶段肌内脂肪细胞中的 mRNA 表达水平。利用基因重组法构建的 pEGFP-N1-*RPL29* 过表达载体转染进山羊肌内前体脂肪细胞并诱导分化, 用油红 O 和 Bodipy 染色方法从形态学上揭示过表达 *RPL29* 对脂滴积聚的影响, 用 qRT-PCR 检测脂代谢相关基因表达水平的变化。结果显示, 山羊 *RPL29* 长为 507 bp, 其中氨基酸编码区(coding sequence, CDS)为 471 bp, 编码 156 个氨基酸, 是一种主要分布在细胞核、带正电荷且较稳定的亲水性蛋白质。组织表达谱表明该基因在山羊皮下脂肪组织及腹部脂肪组织中的表达水平显著高于其他组织($P<0.05$)。时序表达谱表明该基因在山羊肌内脂肪细胞分化第 84 小时表达水平最高, 极显著高于未分化时期($P<0.01$)。过表达 *RPL29* 促进山羊肌内脂肪细胞中的脂质积聚, 且油红 O 染色后 OD 值显著增加($P<0.05$)。此外, 过表达 *RPL29* 基因后 *ATGL* 和 *ACC* 基因表达量极显著增加($P<0.01$), *FASN* 基因的表达量显著增加($P<0.05$)。总之, 山羊 *RPL29* 基因可能通过上调 *FASN*、*ACC* 和 *ATGL* 来促进山羊肌内脂肪细胞脂质沉积。

关键词: 山羊; *RPL29*; 基因克隆; 表达谱分析; 肌内前体脂肪细胞

资助项目: 四川省青年科技创新研究团队(2022JDTD0030); 西南民族大学研究生创新型科研项目(ZD2022156)

This work was supported by the Sichuan Youth Science and Technology Innovation Research Team (2022JDTD0030) and the Innovative Research Projects for Graduate Students at Southwest Minzu University (ZD2022156).

*Corresponding author. E-mail: 80300209@swun.edu.cn

Received: 2022-11-03; Accepted: 2023-03-20

Gene cloning and sequence analysis of the *RPL29* gene and its effect on lipogenesis in goat intramuscular adipocytes

GONG Chengsi^{1,2}, LIN Yaqiu^{1,2}, HU Tingting^{1,2}, WANG Yong^{1,2}, LI Yanyan^{1,2}, WANG Youli^{1,2*}

1 College of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Protection and Utilization of Ministry of Education, Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: The aim of this study was to clone the goat *RPL29* gene and analyze its effect on lipogenesis in intramuscular adipocytes. Using Jianzhou big-eared goats as the object, the goat *RPL29* gene was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the gene structure and expressed protein sequence were analyzed by bioinformatics, and the mRNA expression levels of *RPL29* in various tissues and different differentiation stages of intramuscular adipocytes of goats were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The *RPL29* overexpression vector pEGFP-N1-*RPL29* constructed by gene recombination was used to transfect into goat intramuscular preadipocytes and induce differentiation. Subsequently, the effect of overexpression of *RPL29* on fat droplet accumulation was revealed morphologically by oil red O and Bodipy staining, and changes in the expression levels of genes related to lipid metabolism were detected by qRT-PCR. The results showed that the length of the goat *RPL29* was 507 bp, including a coding sequence (CDS) region of 471 bp which encodes 156 amino acid residues. It is a positively charged and stable hydrophilic protein mainly distributed in the nucleus of cells. Tissue expression profiling showed that the expression level of this gene was much higher in subcutaneous adipose tissue and inter-abdominal adipose tissue of goats than in other tissues ($P<0.05$). The temporal expression profile showed that the gene was expressed at the highest level at 84 h of differentiation in goat intramuscular adipocytes, which was highly significantly higher than that in the undifferentiated period ($P<0.01$). Overexpression of *RPL29* promoted lipid accumulation in intramuscular adipocytes, and the optical density values of oil red O staining were significantly increased ($P<0.05$). In addition, overexpression of *RPL29* was followed by a highly significant increase in *ATGL* and *ACC* gene expression ($P<0.01$) and a significant increase in *FASN* gene expression ($P<0.05$). In conclusion, the goat *RPL29* may promote intra-muscular adipocyte deposition in goats by up-regulating *FASN*, *ACC* and *ATGL*.

Keywords: goat; *RPL29*; gene cloning; analysis of expression profiling; intramuscular precursor adipocytes

随着经济水平的提高,目前羊肉生产企业不仅面临着人们对羊肉需求的日益增加,而且面临人们对羊肉的高品质需求增加的挑战^[1]。简州大耳羊是由非洲努比亚山羊与简阳地区山羊杂交而成的肉羊新品种,具有体型大、生长速度快、

产肉性能优良、遗传性能稳定和产肉量大等特点^[2],作为我国西南地区重要的肉用山羊品种,是研究肉品质的理想模型。肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)影响肉的嫩度、风味和多汁性,是决定羊肉品质的重要因素^[3]。因此,明

确影响 IMF 形成的分子机制对揭示山羊优良肉质性状形成机理具有重要意义。

核糖体蛋白 L29 (ribosomal protein L29, RPL29)是核糖体 60S 亚基的结构成分,其通过提高核糖体翻译机制的效率来扩增蛋白质合成速率,并在细胞周期控制、细胞增殖、细胞分化和血管生成等各种生物学过程中发挥关键作用^[4-8]。研究表明,*RPL29* 基因的表达对细胞增殖、迁移、分化以及脂肪的形成有重要作用^[9-11]。以往研究发现,在脂肪生成的最初几个小时内核糖体蛋白表达量大幅上调^[12]。许多核糖体蛋白对分化过程所需的基因和 mRNA 表达起着一定调控作用。此外,RPL 家族成员 *RPL8* 可以通过调节参与乳脂合成的相关基因 *Pax6* 的 mRNA 表达来影响牛乳腺上皮细胞中的脂质的合成^[13]。对通城猪和约克夏猪进行的甲基化测序发现 *RPL29* 基因的表达可能与肉质性状有关^[14]。对小鼠的研究表明,*RPL29* 基因通过调节蛋白质合成速率来影响小鼠的生长发育^[15]。此外,*RPL29* 还可以通过调控细胞增殖和细胞凋亡来影响人胰腺癌细胞的生长发育^[16]。综上可见,目前关于 *RPL29* 的研究主要集中于小鼠、牛和猪,尚未见对山羊肌内脂肪细胞脂质生成影响的报道。本课题组前期高通量测序发现,*RPL29* 基因是山羊肌内脂肪细胞分化前后的差异基因,提示 *RPL29* 基因可能参与山羊肌内前体脂肪细胞的脂肪沉积。

因此,本研究以简州大耳羊为试验对象,采用反转录 PCR 方法克隆 *RPL29* 基因并对其序列进行生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测 *RPL29* 在山羊不同组织和不同分化阶段肌内脂肪细胞中 *RPL29* 的表达情况。通过构建 *RPL29* 过表达模型阐明 *RPL29* 对肌内脂肪细胞代谢的影响,为最终阐明 *RPL29* 在山羊肌内脂肪细胞代谢中的生物学功能及其构建分子调控网络提

供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

动物研究获得西南民族大学实验动物伦理委员会的批准(No. 2020086)。挑选 3 只体重接近成年(1 岁)的雄性简州大耳羊(购于四川天地羊生物工程有限公司),空腹 24 h 后通过颈动脉放血方式进行屠宰。取心脏、肝脏、脾脏、肾脏、大肠、小肠、背最长肌、臂三头肌、股二头肌、皮下脂肪和腹部脂肪等组织及器官,用 0.1% 的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水在无菌条件下冲洗干净,放入 2 mL 冷冻管中,放入液氮速冻,−80 °C 保存。

1.2 RNA 的提取与 cDNA 的合成

使用 TRIzol 法,从简州大耳羊组织样品中提取 RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行反转录得到 cDNA,置于−20 °C 备用。

1.3 山羊 *RPL29* 基因的克隆和生物信息学分析

参考牛的 *RPL29* 基因序列(GenBank 登录号: NM_001014862.2),使用 Primer Premier 5 软件设计上游和下游引物(表 1)。以山羊背最长肌组织 cDNA 为模板,反应体系为 25 μ L (背最长肌组织 cDNA 1 μ L、上下游引物各 1 μ L、2 \times Taq PCR Master MixII 12.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L)。反应条件为:94 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环。使用凝胶电泳分离 *RPL29* 的目的条带,用 DNA 回收试剂盒纯化,得到的凝胶回收产物与 pMD-19T 载体在 16 °C 下连接 2 h,然后将 10 μ L 产物转至 50 μ L 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞中,添加 100 mg/mL 氨苄青霉素至培养基中,凝固后,将菌液均匀涂抹在培养皿上。将培养皿置于 37 °C 过夜培养后,从培养

皿中挑取小且圆的单克隆菌落，在 37 °C 摇床中扩大培养 3–6 h。经 PCR 鉴定无误后，将菌液送

往成都擎科生物科技有限公司测序。测序结果使用在线分析工具进行生物信息学数据分析(表 2)。

表 1 本研究所用 RT-PCR 及 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primers used for RT-PCR and qRT-PCR in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>RPL29</i> -F	GACATGGCCAAGTCCAAGAAC	495
<i>RPL29</i> -R	TCCTTCTGTCCTCACACTGGC	
<i>RPL29</i> -F	CCAAGTCCAAGAACCACACCA	251
<i>RPL29</i> -R	CATCTTGGGCTTGACCTCCTT	
<i>UXT</i>	GCAAGTGGATTTGGGCTGTAAC	173
<i>RPL29</i> -R	ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	
<i>RPL29</i>	CCGCTCGAGATGGCCAAGTCCAAGAACC	489
<i>RPL29</i> -R	CGGAATTCTGCGACTCCGGAGCTTTGGTG	
<i>FSAN</i>	CGTGTGGTTCATGGCTGTTG	129
<i>RPL29</i> -R	ATGGGGGACGTGCTGTTAAG	
<i>SCD</i>	TCGTGCCGTGGTATCTATGG	152
<i>RPL29</i> -R	GGGGTTGATGGTCTTGTCGT	
<i>ACC</i>	TCCTGGAGTGACGGAATCTGT	174
<i>RPL29</i> -R	GACAGCCAGTCCACCACGAT	
<i>LPL</i>	TCCTGGAGTGACGGAATCTGT	174
<i>RPL29</i> -R	GACAGCCAGTCCACCACGAT	
<i>ATGL</i>	GGAGCTTATCCAGGCCAATG	180
<i>RPL29</i> -R	TGCGGGCAGATGTCACTCT	
<i>HSL</i>	ATGTCACGCTACACAAAGGC	184
<i>RPL29</i> -R	ACCGGTAAAGAGGGAAGTGG	
<i>ACOX</i>	GAAAGGAGATCGAGGCCTTAGTG	280
<i>RPL29</i> -R	GGCATGAAGAAGCGATCCTG	
<i>GLUT4</i>	GCCGGGACACTATACCCTATT	211
<i>RPL29</i> -R	TTCTGTGGGGCGTTGATGAC	

表 2 本研究序列分析所使用程序

Table 2 Sequence analysis software packages used in this study

Analyzed items	Used tools
Open reading box	ORF Finder (http://www.detaibio.com/sms2/orf_find.html)
Sequence similarity analysis	NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
Physicochemical properties	ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)
Secondary structure	Predictpro (https://www.predictprotein.org/home)
Tertiary structure	SWISSMODEL (https://swissmodel.expasy.org/)
Hydrophilicity	ProtScale (US.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl)
Amino acid phosphorylation sites	NetPhos 3.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
Subcellular localization	PsortII (https://psort.hgc.jp/form2.html)
Instability index	EXPASY (https://www.expasy.org/)
Average hydrophilic coefficient	EXPASY (https://www.expasy.org/)
Interaction analysis	STRING (https://string-db.org/)

1.4 山羊 *RPL29* 组织和时序表达

以 *UXT* 基因作为内参(表 1), 用 qRT-PCR 方法检测 *RPL29* 基因在 12 种组织及器官(心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、背最长肌、臂三头肌、股二头肌、大肠、小肠、皮下脂肪和腹间脂肪)中的 mRNA 表达量。复苏实验室前期保存的山羊肌内前体脂肪细胞, 待 F3 长至 80% 时在含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 油酸的完全培养基中诱导分化, 以 *UXT* 基因为内参基因, 分别收集不同分化阶段(0、12、24、36、48、60、72、84、96、108 和 120 h)的细胞提取 RNA, 然后反转录成 cDNA, 每个样本收取 3 个生物学重复, 进行 2 次技术重复。用 qRT-PCR 方法检测不同分化阶段的山羊肌内前体脂肪细胞 *RPL29* 基因表达水平。

1.5 重组质粒 pEGFP-N1-*RPL29* 的构建

用 Primer Premier 5 软件在山羊 *RPL29* 的编码区(coding sequence, CDS)区 3'端和 5'端设计引物, 再引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 识别位点, 以 pMD-19T-*RPL29* 为模板, 经过 PCR 扩增后回收片段, 进行双酶切, 产物经 DNA 回收试剂盒纯化, 用 T4 DNA 连接酶与真核表达载体 pEGFP-N1 进行连接后, 转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行培养(参照 1.3)。

1.6 细胞培养与转染

复苏山羊肌内前体脂肪细胞, 进行体外培养, 当 F3 代融合度 90% 时转染重组质粒。按照试剂盒说明将 1 μg 质粒、4 μL 的转染试剂和 200 μL 的减血清培养基(Opti-MEM)混匀, 室温孵育 20 min 后分别加入每孔(试验组加入 pEGFP-N1-*RPL29* 质粒, 对照组加入 pEGFP-N1 空载体, 每组 3 个重复)。转染 16 h 后, 弃掉培养液, 置于浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 油酸的完全培养基中诱导分化 2 d 后将细胞收集至管中, -80°C 保

存备用。

1.7 油红 O 染色

使用 24 孔板培养山羊肌内脂肪细胞, 转染诱导分化后, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 遍后, 每孔加 50 μL 4%多聚甲醛固定 12 h。然后, 每孔加 50 μL 油红染色 30 min, 用显微镜(奥林巴斯, ix73)观察脂滴聚集情况并拍照^[17]。用 PBS 清洗后, 每孔加入 200 μL 异丙醇(冰浴上操作), 摇 10 min 后加入 96 孔板 4 个孔中, 于 490 nm 波长测 OD 值。

1.8 qRT-PCR

用 Primer Premier 5 软件设计定量引物(表 1)。以 *UXT* 基因为内参, 使用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测脂肪合成代谢相关基因 *FASN*、*SCD* 和 *ACC*, 脂肪分解代谢相关基因 *LPL*、*ATGL*、*HSL* 和 *ACOX* 以及脂肪转运相关基因 *GLUT4* 的表达。

1.9 统计学分析

组织和时序表达结果采用 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)法, 对过表达的 NC 组和 OE-*RPL29* 组进行双样本 *t* 检验分析。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示相关基因的表达量。以平均 C_t 值 \pm 标准差表示 qRT-PCR 数据。 $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 山羊 *RPL29* 基因的序列

通过 RT-PCR 体外扩增目的片段, 得到山羊 *RPL29* 的基因序列。结果表明, 克隆所得山羊 *RPL29* 基因序列长度为 507 bp (图 1), 其中包含 471 bp 的 CDS 区, 共编码 156 个氨基酸残基, 5'-UTR 区域 3 bp, 3'-UTR 区域 33 bp。

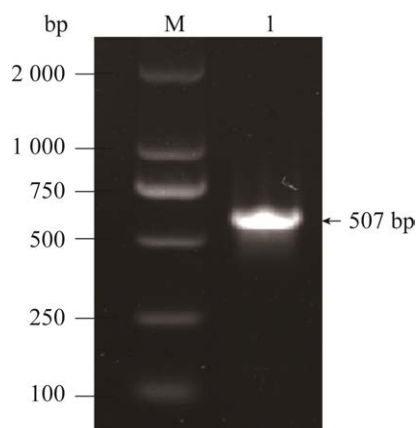


图 1 山羊 *RPL29* 基因扩增结果 M: DL2000 marker; 1: *RPL29* 基因

Figure 1 Amplification of the goat *RPL29* gene. M: DL2000 marker; 1: *RPL29* gene.

2.2 山羊 *RPL29* 蛋白的理化性质

预测结果(表 3)显示,山羊 *RPL29* 蛋白质分子式为 $C_{751}H_{1279}N_{253}O_{193}S_6$, 分子数为 2 482, 分子质量是 17 133.36, 在氨基酸组成中, 丙氨酸和赖氨酸含量最多(为 18.6%); 带正电荷的氨基酸残基比带负电荷的氨基酸残基多; 此外, *RPL29* 的理论等电点为 11.87, 不稳定指数为

47.77, 脂肪指数为 56.03, 一般亲水系数为 -1.026。

使用 EXPASY 软件预测结果(图 2)显示, 山羊 *RPL29* 蛋白结构主要有 86 个(55.13%)氨基酸形成 α -螺旋, 有 64 个(41.03%)氨基酸形成无规卷曲, 有 6 个(3.85%)氨基酸形成延伸链。蛋白质三级结构的组成与二级结构组成基本一致。相互作用分析结果显示山羊 *RPL29* 蛋白可能与 RPS20、RPS19、RPS16、RPL8 和 RPS18 蛋白存在相互作用。

2.3 山羊 *RPL29* 组织表达谱和肌肉脂肪细胞时序表达谱

RPL29 基因广泛表达于山羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、背最长肌、臂三头肌、股二头肌、大肠、小肠、皮下脂肪和腹部脂肪等组织或器官, 且在皮下脂肪及腹部脂肪组织中的表达水平显著高于其他组织 ($P < 0.05$, 图 3A)。山羊 *RPL29* 基因在诱导分化后 84 h 的肌肉脂肪细胞中表达量达到顶峰, 显著高于前体脂肪细胞 ($P < 0.01$, 图 3B)。

表 3 *RPL29* 基本理化性质

Table 3 Basic physical and chemical properties of *RPL29*

Basic physicochemical properties	Predicted results
Positive charge residuals	Arg+Lys=44
Negative charge residue number	Asp+Glu=5
Isoelectric point	11.87
Instability index	47.77
Threonine phosphorylation sites	2
Tyrosine phosphorylation sites	2
Serine phosphorylation sites	8
O-glycosylation site	None
N-glycosylation site	2
subcellular localization	Cell nucleus (56.5%), mitochondrion (13.0%), cytoplasm (13.0%), cytoskeleton (8.7%), cell membrane (4.3%), ER (4.3%)
Fat coefficient	56.03
Total mean hydrophilic value	-1.026

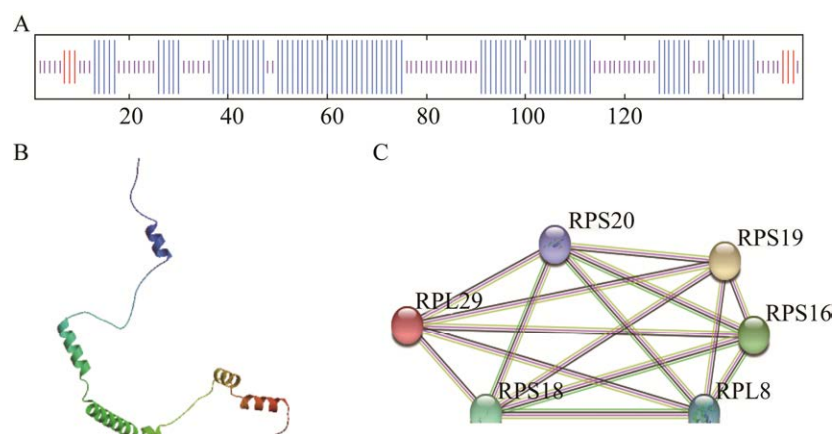


图2 山羊 *RPL29* 蛋白结构分析 A: 山羊 *RPL29* 蛋白二级结构预测. B: 山羊 *RPL29* 蛋白三级结构. C: 山羊 *RPL29* 蛋白互作分析

Figure 2 Structural analysis of the goat *RPL29* protein. A: Prediction of secondary structure. B: Tertiary structure analysis. C: Analysis of proteins that are interactive with goat *RPL29*.

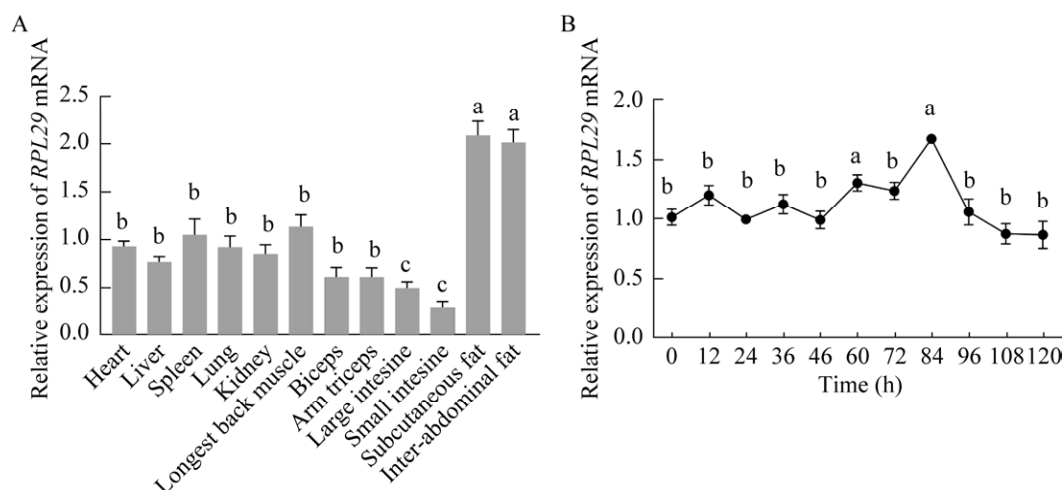


图3 山羊 *RPL29* 基因及肌内脂肪细胞在不同分化阶段的相对表达水平 A: 以 0 h 表达水平作为对照, *UXT* 作为内参基因. B: 以心脏表达水平作为对照, *UXT* 作为内参基因. 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 3 Relative expression levels of goat *RPL29* gene and different differentiation stages of intramuscular adipocytes. A: The expression level at 0 h was used as the control, and *UXT* was used as the internal reference gene. B: The expression level of the heart was used as the control, and *UXT* was used as the internal reference gene. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.4 过表达山羊 *RPL29* 对肌内脂肪细胞脂质生成的影响

以 pEGFP-N1 作为对照组, qRT-PCR 结果显示, OE-*RPL29* 组的基因表达量增加 11.06 倍

($P < 0.01$, 图 4A); 光学显微镜下观察油红 O 染色后的脂滴(图 4C), 放大 200 倍后的 OE-*RPL29* 试验组比 NC 对照组脂滴大、数量多, 且 OD_{490} 显著升高($P < 0.05$)。

在山羊肌内脂肪细胞中过表达 *RPL29* 后, 脂肪细胞代谢相关基因 *FASN*、*ACC*、*ATGL* 的

表达水平极显著上升($P<0.01$), *SCD*、*LPL*、*HSL*、*ACOX* 和 *GLUT4* 的表达水平无明显变化(图 5)。

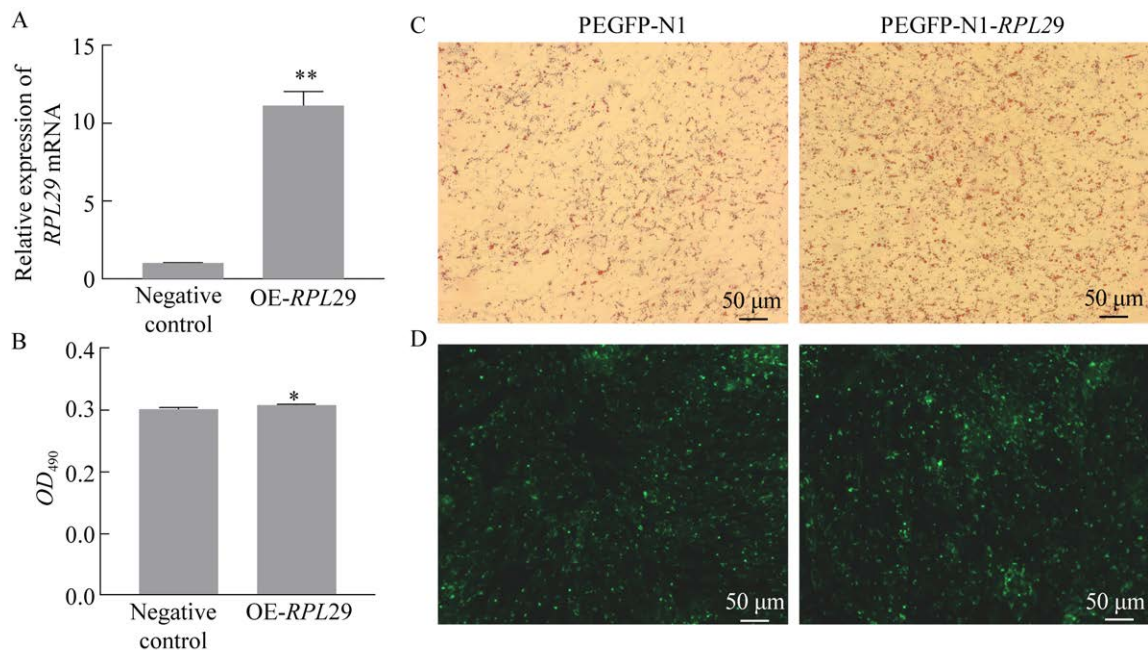


图 4 山羊 *RPL29* 过表达效率及细胞形态学观察

A: *RPL29* 过表达效率. B: 油红 O 染色检测 OD 值. C:

油红 O 染色图. D: Bodipy 染色图

Figure 4 Overexpression efficiency and cell morphology of *RPL29* in goats. A: *RPL29* overexpression efficiency. B: Oil red O staining to detect optical density value (OD). C: Oil red O staining. D: Bodipy staining. * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates highly significant difference ($P<0.01$).

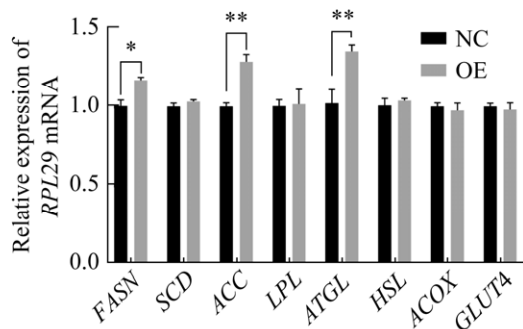


图 5 过表达山羊 *RPL29* 后脂肪代谢相关基因的相对表达量

Figure 5 Relative expression of genes related to lipid metabolism upon overexpression of *RPL29* in goats. * indicates significant difference ($P<0.05$); ** indicates highly significant difference ($P<0.01$).

3 讨论

本研究利用 RT-PCR 方法扩增并克隆获得简州大耳羊 *RPL29* 基因序列, 大小为 507 bp, 共编码 156 个氨基酸残基(GenBank 登录号: OP265186)。与 NCBI 上预测序列对比后显示山羊 *RPL29* 序列存在 1 个无义突变位点, 即第 490 位核苷酸由鸟嘌呤突变成胸腺嘧啶。从磷酸结果预测可知其分别有 8 个丝氨酸磷酸化位点、2 个苏氨酸磷酸化位点、2 个酪氨酸磷酸化位点和 2 个 *N*-糖基化位点, 无 *O*-糖基化位点。亚细胞定位显示 *RPL29* 基因主要在细胞核内发挥作用, 佐证了核膜表面附有核糖体的说法。二级结构预测结果表明, *RPL29* 主要以 α -螺旋、无规卷曲及

延伸链的形式存在,三级结构预测结果基本一致,这与曹广英等^[18]在花生中预测的结果相似。

为了明确 *RPL29* 基因的表达特征,本试验利用 qRT-PCR 方法检测 *RPL29* 在山羊各组织中的表达情况。结果发现,山羊 *RPL29* 基因在各组织中均有不同程度的表达,且高表达于皮下脂肪组织及腹部脂肪组织中。这与前人的研究结果^[19-20]存在相似及不同之处。同时研究发现山羊 *RPL29* 基因在诱导分化 84 h 的肌内脂肪细胞中表达水平最高,极显著高于前体脂肪细胞,推测 *RPL29* 可能是山羊肌内脂肪细胞沉积的正调控因子。

为了阐明 *RPL29* 在山羊脂肪细胞沉积中发挥的具体作用,本试验过表达山羊 *RPL29* 发现肌内脂肪细胞内脂滴明显增多和变大,并且脂肪细胞代谢相关基因 *FASN*、*ACC* 和 *ATGL* 的表达水平极显著上升。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FASN*)作为一种基础代谢酶,负责合成棕榈酸脂和硬脂酸的所有催化步骤,在丙二酰辅酶 A 存在的条件下产生长链脂肪酸,是脂肪合成中的一个关键酶。魏伍川等^[21]发现, *FASN* 与鸡肉脂肪性状紧密相关,在很大程度上决定鸡肉的风味、嫩度及多汁性。以往研究发现, *FASN* 表达量与猪的脂肪含量呈极显著的正相关^[22]。因此, *FASN* 表达量升高暗示肌内脂肪细胞中脂肪合成增加。乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase, *ACC*)作为一种生物素依赖酶,其对长链脂肪酸的合成起到催化作用,在脂肪合成中具有重要作用。结合杨玲等^[23]研究报道的 *ACC* mRNA 表达量增加可以促进脂肪生成的结果,推测过表达 *RPL29* 可能通过提高 *ACC* 的 mRNA 表达量来促进脂肪合成。脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triacylglyceride lipase, *ATGL*)是脂肪细胞脂肪分解的限速酶,催化甘油三酯水解为二酰基甘油和脂肪酸的第一步,之前研究表明, *ATGL*

除了在甘油三酯分解代谢中的作用外,还能对甘油三酯过度积累起保护作用以及在维持全身胆固醇代谢平衡中起关键作用^[24-26]。推测可能是通过 *ATGL* 的表达量提高来维持机体稳态,防止过度肥胖。结合油红 O 和 Bodipy 染色观察结果和脂肪代谢相关基因的 mRNA 表达水平,表明过表达 *RPL29* 促进山羊肌内脂肪细胞代谢,促进脂质积累。

4 结论

本研究克隆获得简州大耳羊 *RPL29* 基因序列长度为 507 bp,其中 CDS 为 471 bp,共编码 156 个氨基酸残基; *RPL29* 基因高表达于山羊皮下脂肪组织及腹间脂肪组织,在山羊肌内脂肪细胞成脂诱导分化的第 84 小时后呈现最高表达水平;山羊 *RPL29* 是脂代谢相关基因 *FASN*、*ACC* 和 *ATGL* 的潜在正调控因子。

REFERENCES

- [1] 周佳萍,刁有江,陶庆树,李淑青,董传河. 山羊肉质特征及其评价方法[J]. 山东畜牧兽医, 2021, 42(2): 52-55.
ZHOU JP, DIAO YJ, TAO QS, LI SQ, DONG CH. Characteristics of goat meat quality and its evaluation method[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2021, 42(2): 52-55 (in Chinese).
- [2] 李静,张仲友,王志全,郑水明,张孝杰,王陈根,夏丹. 简州大耳羊生产性能测定报告[J]. 四川畜牧兽医, 2020, 47(8): 27-28.
LI J, ZHANG ZY, WANG ZQ, ZHENG SM, ZHANG XJ, WANG CG, XIA D. Report on production performance of Jianzhou big ear sheep[J]. Sichuan Animal & Veterinary Sciences, 2020, 47(8): 27-28 (in Chinese).
- [3] 齐婧,谭娅,王婧,张静,赵春萍,张正群,史开志. 非编码 RNA 调控畜禽肌内脂肪沉积的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(9): 114-121.
QI J, TAN Y, WANG J, ZHANG J, ZHAO CP, ZHANG ZQ, SHI KZ. Research progress of non-coding RNAs regulation of intramuscular fat deposition in livestock and poultry[J]. Chinese Journal of Animal Science,

- 2022, 58(9): 114-121 (in Chinese).
- [4] LAURE DELABRE M, KESSL J, KARAMANOU S, TRUMPOWER BL. RPL29 codes for a non-essential protein of the 60S ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae* and exhibits synthetic lethality with mutations in genes for proteins required for subunit coupling[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2002, 1574(3): 255-261.
- [5] LI J, PENG YJ. Knockdown *RPL29* gene can inhibit the proliferation, invasion of squamous cell carcinomas[J]. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 2019, 49(6): 763-769.
- [6] ALI MI, LI L, AZMAL SA, YAO L, LIU J, GU W, HUANG S, WANG B, DAI H, LIU G. Differential expression of Toll-like receptor 13 and ribosomal protein L29 in inflammatory lung and brain[J]. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2019, 33(4): 1023-1040.
- [7] HAMIDI T, SINGH AK, VELAND N, VEMULAPALLI V, CHEN JJ, HARDIKAR S, BAO JQ, FRY CJ, YANG V, LEE KA, GUO AL, ARROWSMITH CH, BEDFORD MT, CHEN TP. Identification of Rpl29 as a major substrate of the lysine methyltransferase Set7/9[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(33): 12770-12780.
- [8] MILLER SA, BROWN AJ, FARACH-CARSON MC, KIRN-SAFRAN CB. HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation[J]. *Differentiation*, 2003, 71(6): 322-336.
- [9] LIU JJ, ZHANG JQ, RAMANAN S, JULIAN J, CARSON DD, HOOI SC. Heparin/heparan sulfate interacting protein plays a role in apoptosis induced by anticancer drugs[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(6): 873-879.
- [10] SAHIN F, QIU WL, WILENTZ RE, IACOBUZIO-DONAHUE CA, GROSMARK A, SU GH. RPL38, FOSL1, and UPP₁ are predominantly expressed in the pancreatic ductal epithelium[J]. *Pancreas*, 2005, 30(2): 158-167.
- [11] FROMM-DORNIEDEN C, von der HEYDE S, LYTOVCHENKO O, SALINAS-RIESTER G, BREINIG B, BEISSBARTH T, BAUMGARTNER BG. Novel polysome messages and changes in translational activity appear after induction of adipogenesis in 3T3-L1 cells[J]. *BMC Molecular Biology*, 2012, 13(1): 1-12.
- [12] 吕小青, 杨宇泽, 赵凤, 焦洋, 李艳华, 杨超, 路永强, 孙东晓, 麻柱, 刘林. 中国荷斯坦奶牛 RPL23A、ACACB 基因 3 个 SNPs 检测及其与产奶性状的关联分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(10): 3712-3720.
- LU XQ, YANG YZ, ZHAO F, JIAO Y, LI YH, YANG C, LU YQ, SUN DX, MA Z, LIU L. Detection of 3 SNPs of RPL23A, *ACACB* genes and their association with milk production traits in Chinese Holstein cows[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(10): 3712-3720 (in Chinese).
- [13] ZHENG XR, JIANG L, NING C, HU ZZ, ZHOU L, YU Y, ZHANG SL, LIU JF. A novel mutation in the promoter region of RPL8 regulates milk fat traits in dairy cattle by binding transcription factor Pax6[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(12): 158528.
- [14] 刘会敬. 中外猪种胚胎不同发育时期骨骼肌转录组和全基因组甲基化分析[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2018.
- LIU HJ. Integration of DNA methylome and transcriptome analysis of prenatal skeletal muscles between Tongcheng and Yorkshire pigs[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [15] KIRN-SAFRAN CB, ORISTIAN DS, FOCHT RJ, PARKER SG, VIVIAN JL, CARSON DD. Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29[J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(2): 447-460.
- [16] LI CD, GE M, YIN Y, LUO MY, CHEN DJ. Silencing expression of ribosomal protein L26 and L29 by RNA interfering inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 370(1/2): 127-139.
- [17] 陈侃, 王长谦, 范虞琪, 韩志华, 汪月, 高霖, 曾华甦. 油红 O 染色在斑马鱼体内脂质染色中的应用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2016, 25(4): 358-360.
- CHEN K, WANG CQ, FAN YQ, HAN ZH, WANG Y, GAO L, ZENG HS. Application of oil red O in the staining of lipids in zebrafish[J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2016, 25(4): 358-360 (in Chinese).
- [18] 曹广英, 吴琪, 唐月异, 王秀贞, 孙全喜, 关淑艳, 王传堂. 花生核糖体蛋白 L29-1(RPL29-1)基因克隆表达分析及载体构建[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(7): 1730-1736.
- CAO GY, WU Q, TANG YY, WANG XZ, SUN QX, GUAN SY, WANG CT. Cloning expression analysis and expression vectors construction of 60S ribosomal

- protein L29-1 (*RPL29-1*) gene from peanut[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(7): 1730-1736 (in Chinese).
- [19] CAI Y, ZHANG C, HAO L, CHEN J, XIE P, CHEN ZD. Systematic identification of seven ribosomal protein genes in bighead carp and their expression in response to microcystin-LR[J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2016, 41(2): 293-302.
- [20] MEYER-HOFFERT U, HORNEF M, HENRIQUES-NORMARK B, NORMARK S, ANDERSSON M, PÜTSEP K. Identification of heparin/heparan sulfate interacting protein as a major broad-spectrum antimicrobial protein in lung and small intestine[J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(7): 2427-2434.
- [21] 魏伍川, 刘欣, 陈耀玲. 湛江三黄鸡 2 个脂肪性状相关基因的多态性及其与屠宰腹脂性状的相关分析[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(2): 95-98.
- WEI WC, LIU X, CHEN YL. Polymorphisms of 2 genes associated with fat traits of Zhanjiang Sanhuang Chicken and its correlation with slaughter and abdominal fat traits[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(2): 95-98 (in Chinese).
- [22] 熊文中, 杨凤, 周安国. 猪重组生长激素对不同杂交肥育猪脂肪代谢调控的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(1): 1-4.
- XIONG WZ, YANG F, ZHOU AG. Study of regulation of exogenous recombinant somatotropin on fat metabolism in different cross-finishing pigs[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2001, 32(1): 1-4 (in Chinese).
- [23] 杨玲, 杨汶菱, 张绘艳, 卞建春, 刘宗平, 袁燕, 邹辉, 顾建红, 刘学忠. 棕榈酸通过上调 ACC/FAS/DGAT2 通路表达诱导 BRL 3A 细胞脂肪变性[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(12): 2537-2544.
- YANG L, YANG WL, ZHANG HY, BIAN JC, LIU ZP, YUAN Y, ZOU H, GU JH, LIU XZ. Palmitic acid induced steatosis in BRL 3A cells by up-regulating the expression of ACC/FAS/DGAT2 pathway[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2019, 50(12): 2537-2544 (in Chinese).
- [24] ZHAO NQ, TAN HW, WANG L, HAN L, CHENG YL, FENG Y, LI T, LIU XL. Palmitate induces fat accumulation *via* repressing FoxO1-mediated ATGL-dependent lipolysis in HepG2 hepatocytes[J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0243938.
- [25] KORBELIUS M, VUJIĆ N, KUENTZEL KB, OBROWSKY S, RAINER S, HAEMMERLE G, RÜLICHE T, KRATKY D. Enterocyte-specific ATGL overexpression affects intestinal and systemic cholesterol homeostasis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2022, 1867(4): 159121.
- [26] FERREIRA AM, TUOMINEN I, van DIJK-BOS K, SANJABI B, van der SLUIS T, van der ZEE AG, HOLLEMA H, ZAZULA M, SIJMONS RH, AALTONEN LA, WESTERS H, HOFSTRA RMW. High frequency of *RPL22* mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors[J]. *Human Mutation*, 2014, 35(12): 1442-1445.

(本文责编 陈宏宇)