网络出版时间:2026-02-04　　DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.08.001

牦牛*FGF6*基因克隆及组织表达特异性研究

刘毅程[1,2],杨焱[3],洛桑顿珠[4],马晓明[1,4],卓玛次仁[5],
尼玛加措[5],平措占堆[4],梁春年[1,4],

(1中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所,甘肃省牦牛繁育工程重点实验室,农业农村部青藏高原畜禽遗传育种重点实验室,甘肃 兰州 730050;2甘肃农业大学 动物科学技术学院,甘肃 兰州 730050;3肃南县农业农村局,甘肃 肃南 734400;4西藏自治区农牧科学院 畜牧兽医研究所,西藏 拉萨 850004;5日喀则市昂仁县农业农村局,西藏 日喀则 857001)

[摘　要] 【目的】克隆牦牛成纤维细胞生长因子6(FGF6)基因,对其进行生物信息学分析及组织表达分析,初步揭示该基因的结构和功能,为*FGF6*基因在牦牛中的功能研究提供理论依据。【方法】选取3头桑桑牦牛公牛,屠宰后采集脂肪、心脏、肝脏、肌肉、肺脏、肾脏及脾脏组织,提取脂肪组织总RNA,反转录获得cDNA。利用RT-PCR技术克隆牦牛*FGF6*基因的CDS区序列,使用多种软件对该基因进行生物信息学分析。使用RT-qPCR技术检测*FGF6*基因在桑桑牦牛脂肪、心脏、肝脏、肌肉、肺脏、肾脏及脾脏组织中的表达情况。【结果】牦牛*FGF6*基因的CDS区全长为627 bp,共编码208个氨基酸。牦牛FGF6蛋白分子式为$C_{1010}H_{1619}N_{291}O_{285}S_7$,分子质量为22 623.16 u,理论等电点为10.24,脂肪系数(AI)为89.04,总平均亲水指数(GRAVY)为−0.083,不稳定指数为36.86,表明该蛋白为稳定型亲水性蛋白;FGF6蛋白在第44～45位氨基酸处存在一个信号肽,在氨基酸序列的20～42位处存在一个跨膜螺旋;该蛋白存在1个N-糖基化位点和22个磷酸化位点。亚细胞定位结果显示,牦牛FGF6蛋白分布于线粒体、细胞质、高尔基体、内质网、囊泡、细胞外,其氨基酸组成中甘氨酸含量最高(12%),蛋白二级结构主要以无规则卷曲为主(占64.9%)。同源性比对发现,桑桑牦牛与野牦牛的亲缘关系最近(100%),其次为瘤牛(99.9%),与马鹿的亲缘关系最远(72.8%);*FGF6*基因与FGFR1、FGFR2、FGFR4等相关蛋白存在相互作用。RT-qPCR结果显示,*FGF6*基因在桑桑牦牛不同组织中均有表达,其中在肌肉组织中表达量最高,极显著高于其他组织($P<0.01$),在心脏的表达量极显著高于脂肪、肝脏、肺脏、肾脏、脾脏($P<0.01$)。【结论】获得了牦牛*FGF6*基因完整的CDS区,发现其在不同物种间保守性较高。

[关键词] 牦牛;*FGF6*基因;生物信息学分析

[中图分类号] S823.8+5　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1671-9387(2026)08-0001-09

Cloning of yak *FGF6* gene and study on its tissue expression specificity

LIU Yicheng[1,2], YANG Yan[3], Lobsang Dunzhu[4], MA Xiaoming[1,4], ZhuomaTsering[5], Nima Gyatso[5], Phuntsok Zhandui[4], LIANG Chunnian[1,4]

(1 *Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Gansu Provincial Key Laboratory of Yak Breeding Engineering, Key Laboratory of Livestock and Poultry Genetics and Breeding on Qinghai-Tibet Plateau, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu* 730050, *China*; 2 *College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730050, *China*; 3 *Agriculture and Rural Affairs Bureau of Sunan County, Sunan, Gansu* 734400, *China*; 4 *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xizang Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Xizang* 850004, *China*;

[收稿日期] 2025-06-06　　[修回日期] 2025-07-29
[基金项目] 中央引导地方科技发展资金项目(25ZYJA008);西藏自治区重点研发计划项目(XZ202402ZY0012);现代肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37)
[作者简介] 刘毅程(2002－),男,甘肃定西人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:1279930301@qq.com
[通信作者] 平措占堆(1974－),男(藏族),西藏拉萨人,副研究员,主要从事牦牛遗传育种研究。E-mail:pingcuo.1975@126.com
梁春年(1973－),男,甘肃武威人,研究员,博士,博士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:chunnian2006@163.com

5 *Agriculture and Rural Affairs Bureau of Angren County, Shigatse, Xizang* 857001, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aims to clone the yak fibroblast growth factor 6 (FGF6) gene, conduct bioinformatic analysis and tissue expression analysis, and initially reveal the structure and function of the gene, so as to provide a theoretical basis for the functional study of *FGF6* gene in yak. 【Method】 Three Sangsang yak bulls were selected, and their adipose, heart, liver, muscle, lung, kidney and spleen tissues were collected after slaughter. Total RNA of adipose tissue was extracted, and the cDNA was obtained through reverse transcription. The sequence of the CDS region of the *FGF6* gene of yaks was cloned by using RT-PCR, and multiple tools were employed to conduct bioinformatic analysis on the *FGF6* gene. RT-qPCR was used to detect the expression level of the *FGF6* gene in adipose, heart, liver, muscle, lung, kidney and spleen tissue of Sangsang yaks. 【Result】 The CDS region of the yak *FGF6* gene was 627 bp in length, encoding a total of 208 amino acids. The yak FGF6 protein molecular composition was $C_{1010}H_{1619}N_{291}O_{285}S_7$, molecular mass was 22 623.16 u, theoretical isoelectric point was 10.24, aliphaticity coefficient (AI) was 89.04, total average hydrophilicity index (GRAVY) was −0.083, and instability index was 36.86, which indicated that the protein was a stable hydrophilic protein. A signal peptide was observed at amino acid position 44−45 in FGF6 protein, and a transmembrane helix at amino acid position 20−42. One N-glycosylation site and 22 phosphorylation sites were identified in the protein. The results of subcellular localization showed that the yak FGF6 protein was distributed in mitochondria, cytoplasm, Golgi, endoplasmic reticulum, vesicles, and extracellular part. Among the amino acids of the encoded protein, glycine showed the highest proportion (12%), and the secondary structure of the protein was predominantly irregular coiling (64.9%). Homology comparison revealed that the Sangsang yak was most closely related to the wild yak (100%), followed by the Bos indicus (99.9%) and least closely related to the horse deer (72.8%). Interaction was observed between the *FGF6* gene and its related proteins, such as FGFR1, FGFR2, FGFR4, etc. The results of RT-qPCR showed that the *FGF6* gene was expressed in different tissues of the Sangsang yak, with the highest expression level observed in the muscle tissue, which was highly significantly higher than those in other tissues ($P<0.01$). And the expression level in heart tissue was highly significantly higher than those in adipose, liver, lung, kidney and spleen tissues ($P<0.01$). 【Conclusion】 The complete CDS region of yak *FGF6* gene was obtained and found to be highly conserved among different species.

Key words: yak; *FGF6* gene; bioinformatics analysis

牦牛(*Bos grunniens*)属于哺乳纲、牛科,是生活在青藏高原及其周边地区的大型哺乳动物,被称为“高原之舟”。牦牛生活在海拔高、空气稀薄、昼夜温差大、寒冷、牧草资源匮乏的恶劣环境条件下,经过长期的自然选择具有很强的耐粗饲、耐饥饿以及耐寒能力,牦牛较强的抗逆性使其成为一个极其宝贵的遗传资源[1]。自古以来,牦牛为高海拔地区藏民和其他游牧民族提供必要的生活物资,如肉、奶、皮、供燃烧的粪便,并可作为交通工具。由于牦牛长期生活在高海拔严寒地区,生长环境恶劣,研究资源匮乏,饲养管理方式落后,这严重制约了牦牛产业的发展,使得这一珍贵畜种所蕴含的经济价值难以得到充分开发和利用[2]。

成纤维细胞生长因子6(fibroblast growth factor 6, FGF6)是成纤维细胞生长因子家族(FGFs)的成员之一。成纤维细胞生长因子又称肝素结合因子,其主要通过与成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)1和4结合发挥生物学活性,在促进血管形成、组织形成与修复、胚胎发育以及某些病理过程中有重要作用[3]。李乐乐等[4]研究发现,FGF可以同时对成纤维细胞、内皮细胞产生直接和间接作用,从而促进新血管的形成。前人将脂质体介导的PIRES2-DsRed2-FGF6重组载体转染大鼠H9C2心肌细胞系,发现转染组*FGF6* mRNA表达水平显著上调,表明*FGF6*基因的过表达可以显著增强心肌细胞的增殖活性,且在血清饥饿条件下,转染组细胞的凋亡率较对照组降低约60%($P<0.01$),*FGF6*可能通过抑制细胞凋亡通路来维持心肌细胞的稳态[5]。沉默*FGF6*基因可以阻断磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)和

丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路的激活，从而抑制膀胱癌组织中血管的生成[6]。*FGF6* 在骨骼肌再生过程中起重要作用，前人通过一次性下坡跑运动发现，在腓肠肌损伤修复过程中 FGF6 蛋白表达量整体呈先上升后下降的趋势，致使 *FGF6* mRNA 表达量整体上调[7]。有研究表明，*FGF6* 与肿瘤细胞的生长发育密切相关，在其发育、凋亡过程中起重要作用[8]。LIANG 等[9]通过构建 *FGF6* 过表达的 IOMM-LEE 和 CH157MN 恶性脑膜瘤细胞系，在小鼠体内和体外开展试验，结果表明，过表达 *FGF6* 可促进恶性脑膜瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。上述研究表明，*FGF6* 基因可能在促进哺乳动物的血管生成、肌肉的再生与修复、骨骼肌的再生以及肿瘤细胞的增殖与迁徙过程中具有重要作用，但目前尚鲜见 *FGF6* 基因与牦牛生长关系的相关报道。因此，本试验对牦牛 *FGF6* 基因的编码区进行克隆与生物信息学分析，并应用 RT-qPCR 方法检测分析 *FGF6* 基因在桑桑牦牛各组织器官中的表达规律，旨在为进一步研究 *FGF6* 基因的生物学功能及其作用机制提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材　料

在西藏自治区日喀则市桑桑镇地区，随机选取 3 头体况健康、发育正常的成年桑桑牦牛公牛作为试验对象，屠宰后，采集脂肪、心脏、肝脏、肌肉、脾脏、肺脏、肾脏等组织样本，并立即分装于无菌冻存管中，液氮保存，运回实验室后转到－80 ℃冰箱保存备用，用于后续研究。

试验仪器包括超微量分光光度计 NanoDrop2000C 和 PCR 仪 Pro Flex™PCR（Thermo，中国北京）、电泳仪 DYY-6C（六一，中国北京）、凝胶成像系统 Tanon 2500（Tanon，中国上海）。试剂包括 Evo M-MLV 反转录试剂盒Ⅱ（Accurate，中国长沙）、金属浴（RUICHENG，中国杭州）、Trizol up 试剂盒（Thermo，中国北京）、D2000 DNA Ladder（Solarbio，中国北京）、Premix *Taq* DNA 聚合酶（Takara，中国北京）。

1.2　总 RNA 的提取及反转录

从－80 ℃超低温冰箱中取出冻存的组织样本，置于干冰上短暂平衡，防止过度解冻。使用精密分析天平（精度 0.1 mg）准确称取适量组织（通常 50～100 mg），迅速转移至经液氮预冷的研钵中，以减少 RNA 降解风险。在持续液氮冷却条件下，采用高强度研磨仪研磨至组织完全破碎，形成均匀细粉，将研磨后的组织粉末迅速转移至 1.5 mL 无酶离心管中，采用 Trizol 法提取总 RNA。使用 NanoDrop 2000C 测定 RNA 在 260、280 nm 处吸光度并计算其比值（A_{260}/A_{280}），记录 RNA 质量浓度（ng/μL），通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 28S/18S rRNA 条带比例排除降解样本。采用反转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA，将制备的组织样 cDNA 用无菌无酶水稀释后，置于－20 ℃冰箱中保存备用。

1.3　牦牛 *FGF6* 基因的克隆与测序

参考 NCBI 网站公布的野牦牛 *FGF6* 基因序列（XM_005897938.2）作为参考序列，利用 Primer Premier 5.0 在线软件设计其 CDS 区序列引物及实时荧光定量（RT-qPCR）引物，具体引物序列见表 1，引物由上海生工生物科技有限责任公司合成。

表 1　*FGF6* 基因引物序列信息

Table 1　Primer sequence information of *FGF6* gene

基因 Genes	引物序列（5′→3′） Primer sequences（5′→3′）	产物长度/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Application
FGF6	F：GAGAAAAACAAGAAGGGCGGT R：CCTAGGGAGGAAGTGCGTGA	689	62	*FGF6* 基因 PCR 扩增 PCR amplification of *FGF6* gene
FGF6	F：CCCACGAGGAGAACCCCTAC R：AGGCATTGTAGTTGTTGGGCA	186	60	*FGF6* 基因 RT-qPCR 检测 RT-qPCR assay of *FGF6* gene
GAPDH	F：GGCATCGTGGAGGGACTTATG R：CCCAGTGAGCTTCCCGTTGAG	186	60	内参基因 Reference gene

以桑桑牦牛脂肪组织 cDNA 作为模板对 *FGF6* 基因进行扩增。PCR 反应体系总体积为 25 μL，其中包括 ddH_2O 8.5 μL，TaKaRa *Taq*™ Version 2.0 plus dye 12.5 μL，cDNA 2 μL，引物 F/R 各 1 μL。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 30 s，62 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 20 s，共 35 个循环；72 ℃延伸 5 min；4 ℃恒温保存。PCR 扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳（电压 130 V，电泳 30 min）检测后，用凝胶成像系统观察条带，将 PCR 产物与上、下游引物包装后送至上海生工生物技术有限公司测序。

1.4　牦牛 *FGF6* 基因的生物信息学分析

将测序结果使用 NCBI BLAST 在线工具进行

比对,验证测序结果。再利用ORF Finder软件(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)进行开放阅读框分析;使用BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.Cgi)对牦牛*FGF6*基因与其他物种进行同源性比对;使用ProtParam软件(https://web.expasy.org/protparam)进行蛋白质理化性质分析;用ProtScale软件(https://web.expasy.org/protscale)进行蛋白质亲疏水性分析;使用SignalP 5.0软件(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? SignalP-5.0)与TMHMM 2.0软件(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0)进行信号肽分析与跨膜结构预测;用NetPhos 3.1软件(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? NetPhos-3.1)与NetNGlyc软件(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? NetNGlyc-1.0)进行蛋白质的磷酸化与糖基化位点的预测;用STRING 11.5软件(https://string-db.Org)进行蛋白互作网络预测;使用SOPMA软件(https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=npsa_sopma.html)与SWISS-MODEL软件(https://swissmodel.expasy.org/interactive)进行蛋白质二、三级结构预测;使用PSORT Ⅱ软件(https://www.genscript.com/psort.Html)进行蛋白质亚细胞定位预测。参考牦牛及其他物种的*FGF6*基因序列,应用MEGA 12软件进行同源性比较,并构建系统进化树,以阐明其进化关系。

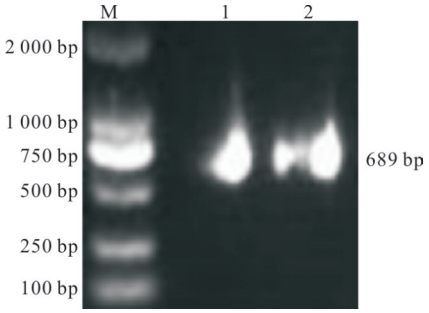
1.5 牦牛*FGF6*基因的组织表达分析

以1.1节中桑桑牦牛各组织的cDNA为模板,以*GAPDH*为内参基因(引物见表1),采用RT-qPCR方法分析*FGF6*基因在各组织中的表达情况。反应体系为20 μL:SYBR Green Pro *Taq* 10 μL,无菌无酶水8.2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,cDNA 1 μL。PCR扩增程序:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,59 ℃ 30 s,65 ℃ 5 s,40个循环;95 ℃ 5 min。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$对数据进行归一化处理,并运用SPSS 27.0软件进行单因素方差分析及数据显著性分析。所得数据使用GraphPad Prism 8.0软件绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 牦牛*FGF6*基因的PCR扩增

PCR扩增得到桑桑牦牛*FGF6*基因片段长度大约在689 bp,条带单一且明显,无其他杂带(图1),与预期目的片段大小一致。测序结果证明,桑桑牦牛*FGF6*基因编码区长度为689 bp,表明扩增结果正确,可用于后续的生物信息学分析。



1,2. 桑桑牦牛*FGF6*基因PCR扩增产物;
M. DL2000 DNA marker;
1,2. PCR amplification products of *FGF6* gene of Sangsang yak;
M. DL2000 DNA marker

图1 牦牛*FGF6*基因PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *FGF6* gene in yak

2.2 牦牛*FGF6*基因生物信息学分析

2.2.1 牦牛*FGF6*基因CDS区序列分析 将测序返回的桑桑牦牛*FGF6*基因序列与NCBI中发布的野牦牛*FGF6*基因(登录号:XM_005897938.2)CDS区进行序列比对,结果表明,桑桑牦牛与野牦牛CDS区序列相似度为100%,长度为627 bp。通过在线网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)对测序结果进行开放阅读框分析,结果显示*FGF6*基因存在3个开放阅读框,其中OFR3与其完整的CDS区重合,编码208个氨基酸(图2)。

```
MARGQTPLIT  MSRGAGRPQG  TLRALVFLGV  LVGMVVPSPA  GTRANGTLLA  SRGWGTLLSR  60
SRAGLAGEIA  GVNWESGYLV  GIKRQRRLYC  NVGIGFHLQV  PPDGRISGTH  EENPYSLLEI  120
STVERGVVSL  FGVKSALFVA  MNSKGKLYAT  PSFQEECKFR  ETLLPNNYNA  YESDLYRGAY  180
IALSKYGRVK  RGSKVSPTMT  VTHFLPRI  208
```

图2 牦牛*FGF6*基因的氨基酸序列

Fig. 2 Amino acid sequence of *FGF6* gene in yak

2.2.2 牦牛*FGF6*基因同源性分析及系统进化树构建 使用NCBI在线工具下载野牦牛(XM_005897938.2)、牛(NM_001192400.1)、瘤牛(XM_019961677.2)、印度水牛(XM_006069004.4)、山羊(XM_005680984.3)、绵羊(XM_004006920.6)、林麝(XM_055396287.1)、狮子(XM_04294839.1)、羊

驼（XM_006210838.4）、大鼠（NM_131908.1）、马鹿（XM_043882503.1）等 11 个物种的 *FGF6* 基因编码序列，再使用 MegAlign pro 依次将上述序列进行核苷酸序列的同源性比对，结果（表 2）表明，桑桑牦牛 *FGF6* 基因与野牦牛、牛、瘤牛、印度水牛、山羊、绵羊、林麝、狮子、羊驼、大鼠、马鹿这些物种的相似性分别为 100%，99.7%，99.9%，98.5%，96.5%，96.4%，97.0%，90.4%，89.1%，87.1% 和 72.8%。在 MEGA12.0 软件中采用邻接法构建系统进化树，结果（图 3）表明，桑桑牦牛与野牦牛之间的亲缘关系最近，其次是瘤牛和牛，与马鹿的亲缘关系最远。

表 2　不同物种 *FGF6* 基因核苷酸序列同源性分析

Table 2　Nucleotide sequence homology analysis of *FGF6* gene among different species　　%

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		100.0	99.7	99.9	98.5	96.5	96.4	97.0	90.4	89.1	87.1	72.8
2	0.0		99.7	99.0	97.7	94.6	94.5	94.0	90.4	89.1	87.1	72.8
3	0.3	0.3		99.5	98.2	96.0	95.9	96.7	90.1	88.4	86.8	0.0
4	0.1	1.0	0.5		97.8	94.6	94.4	94.1	90.3	88.9	86.9	72.9
5	1.5	2.3	1.8	2.3		94.7	94.7	94.1	90.9	88.6	87.2	73.2
6	3.6	5.6	4.1	5.6	5.5		98.0	93.4	90.9	88.1	87.2	73.1
7	3.7	5.7	4.3	5.8	5.6	2.0		93.3	91.1	88.6	87.2	72.8
8	3.1	6.3	3.4	6.2	6.2	6.9	7.0		90.4	88.2	87.4	72.5
9	10.3	10.3	10.7	10.5	9.8	9.8	9.6	10.4		89.2	91.2	0.0
10	12.0	12.0	12.8	12.1	12.5	13.2	12.5	13.0	11.9		86.6	0.0
11	14.3	14.3	14.8	14.5	14.2	14.2	14.2	14.0	9.4	14.9		0.0
12	3.1	34.1	0.0	33.9	33.4	33.6	33.2	34.6	0.0	0.0	0.0	

注：1～12 分别为桑桑牦牛、野牦牛、牛、瘤牛、印度水牛、山羊、绵羊、林麝、狮子、羊驼、大鼠和马鹿。

Note：1－12 represent Sangsang yak，*Bos mutus*，*Bos taurus*，*Bos indicus*，*Bubalus bubalis*，*Capra hircus*，*Ovis aries*，forest musk deer，*Puma concolor*，*Vicugna pacos*，*Rattus norvegicus*，*Cervus canadensis*.

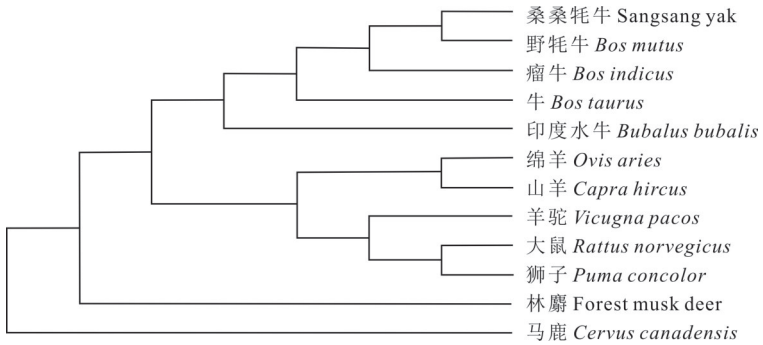


图 3　基于 *FGF6* 基因核苷酸序列的桑桑牦牛与其他物种的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of Sangsang yak with other species based on the nucleotide sequence of *FGF6* gene

2.2.3　牦牛 FGF6 蛋白质理化性质分析　使用 ProtParam 网站工具对牦牛 FGF6 蛋白理化性质进行分析，结果表明其分子式为 $C_{1010}H_{1619}N_{291}O_{285}S_7$，分子质量为 22 623.16 u，理论等电点为 10.24。*FGF6* 基因编码蛋白的原子总数为 3 212，FGF6 蛋白阴（Asp＋Glu）、阳（Arg＋Lys）离子残基总数分别为 12 和 26 个。在氨基酸组成中（表 3），甘氨酸含量最高（占 12%），天冬氨酸、半胱氨酸和色氨酸含量最低（均占 1%）。此外，牦牛 FGF6 蛋白脂肪系数（AI）为 89.04，体外半衰期为 30 h，总平均亲水指数（GRAVY）为－0.083；不稳定指数为 36.86，表明该蛋白是稳定型蛋白。使用 ProtScale 在线工具对牦牛 FGF6 蛋白的亲疏水性进行分析，结果表明 FGF6 蛋白氨基酸亲水区残基多于疏水区残基，且 FGF6 蛋白的疏水性最大值为 3.133，位于第 27 位，最小值为－2.156，位于第 86 位。整体而言，该蛋白可归为稳定型的亲水性蛋白。

2.2.4　牦牛 FGF6 蛋白信号肽、跨膜结构域预测　使用 SignalP 在线工具对牦牛 FGF6 蛋白进行信号肽预测，结果表明，牦牛的 FGF6 蛋白存在信号肽，且信号肽剪切位点位于第 44～45 位氨基酸处。使用在线软件 TMHMM2.0 预测其跨膜结构域，结果（图 4）表明，牦牛 *FGF6* 基因编码蛋白在氨基酸序列的 20～42 位处有跨膜螺旋。

表3 牦牛FGF6蛋白的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of yak FGF6 protein

氨基酸种类 Amino acid	数量 Amount	含量/% Content	氨基酸种类 Amino acid	数量 Amount	含量/% Content
丙氨酸 Ala	15	7.2	亮氨酸 Leu	23	11.1
精氨酸 Arg	18	8.7	赖氨酸 Lys	8	3.8
天冬酰胺 Asn	8	3.8	甲硫氨酸 Met	5	2.4
天冬氨酸 Asp	2	1.0	苯丙氨酸 Phe	7	3.4
半胱氨酸 Cys	2	1.0	脯氨酸 Pro	11	5.3
谷氨酰胺 Gln	5	2.4	丝氨酸 Ser	17	8.2
谷氨酸 Glu	10	4.8	苏氨酸 Thr	13	6.2
甘氨酸 Gly	25	12.0	色氨酸 Trp	2	1.0
组氨酸 His	3	1.4	苏氨酸 Tyr	9	4.3
异亮氨酸 Ile	8	3.8	缬氨酸 Val	17	8.2

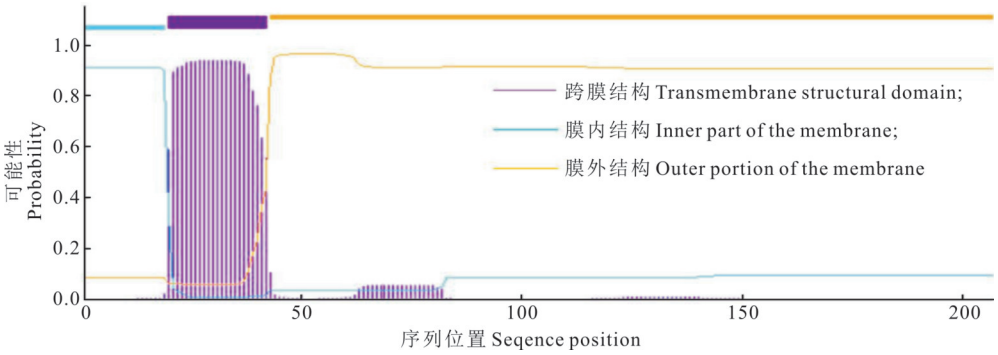


图4 牦牛FGF6蛋白跨膜结构预测

Fig. 4 Prediction of the transmembrane structure of yak FGF6 protein

2.2.5 FGF6亚细胞定位 使用在线软件PSORT Ⅱ对FGF6蛋白进行亚细胞定位分析,该蛋白在线粒体中含量为39.1%,在细胞质中含量为30.4%,在高尔基体、内质网中含量均为8.7%,在细胞外、囊泡含量最低(4.3%)。

2.2.6 FGF6蛋白糖基化位点、磷酸化位点预测 利用在线软件NetNGlyc1.0预测FGF6蛋白的糖基化位点,结果发现FGF6蛋白在第45位氨基酸位点处存在一个超越设定阈值的N-糖基化潜在位点,其N-糖基化势能为0.685 7。牦牛FGF6蛋白磷酸化位点预测结果(图5)显示,*FGF6*基因编码的蛋白存在22个磷酸化位点,其中丝氨酸有11个,酪氨酸有5个,苏氨酸有6个。

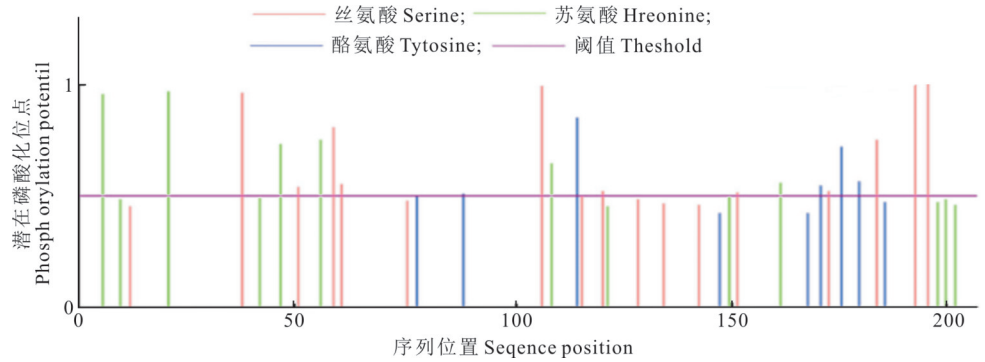
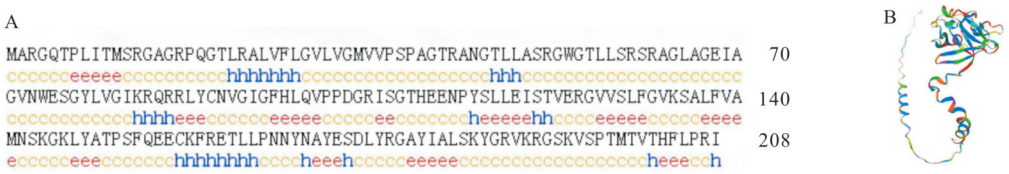


图5 牦牛FGF6蛋白潜在磷酸化位点预测

Fig. 5 Prediction of potential phosphorylation sites of yak FGF6 protein

2.2.7 FGF6蛋白二、三级结构预测 预测结果(图6)显示,牦牛*FGF6*基因编码的蛋白二级结构以无规则卷曲为主,占比64.9%,包含135个氨基酸;延伸链占比21.15%,包含44个氨基酸;α-螺旋占比13.94%,包含29个氨基酸;无β-转角。利用在线软件SWISS-MODEL对FGF6蛋白三级结构进行预测,全局模型质量估计值(global model quality estimation,GMQE)为0.79,与模板相似度达92.79%。



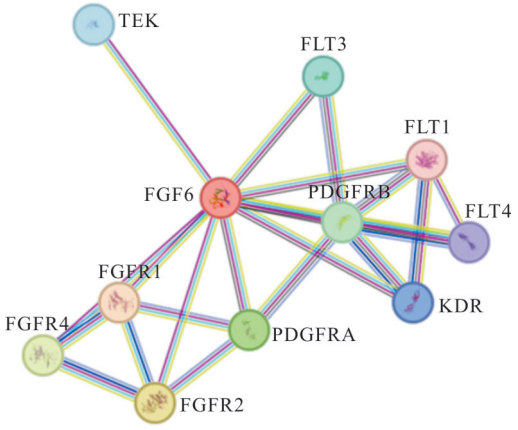
A. 蛋白二级结构位点图，h. α-螺旋，c. 无规则卷曲，e. 延伸；B. 蛋白质三级结构预测图。

A. Protein secondary structure site diagram，h. α-helix，c. Random coiling，e. Elongation；B. Protein tertiary structure prediction diagram.

图 6　牦牛 FGF6 蛋白二、三级结构预测

Fig. 6　Prediction of secondary and tertiary structure of yak FGF6 protein

2.2.8　FGF6 蛋白互作网络预测　利用在线软件 STRING 构建牦牛 FGF6 蛋白互作网络图，结果如图 7 所示，该网络包含 11 个节点和 22 条边，其中每个节点的平均度为 4，平均局部聚类系数为 0.809。牦牛 FGF6 的互作蛋白共有 10 个，包括与 FGF6 为同一家族的成纤维细胞生长因子受体 1（Fibroblast Growth Factor Receptor 1，FGFR1）、FGFR2、FGFR4，以及其他家族的 fms 相关受体酪氨酸激酶 1（fms related receptor tyrosine kinase 1，FLT1）、FLT3、FLT4 和血小板衍生生长因子受体 A（platelet-derived growth factor receptor A，PDGFRA）、PDGFRB，还包括激酶插入区受体（kinase insert domain receptor，KDR）和酪氨酸磷酸化激活受体（tyrosine kinase，TEK）。



FGFR1，FGFR2，FGFR4 分别为成纤维细胞生长因子受体 1，2，4；FLT1，FLT3，FLT4 分别为 fms 相关受体酪氨酸激酶 1，3，4；PDGFRA，PDGFRB 分别为血小板衍生生长因子受体 A，B；KDR. 激酶插入区受体；TEK. 酪氨酸磷酸化激活受体。

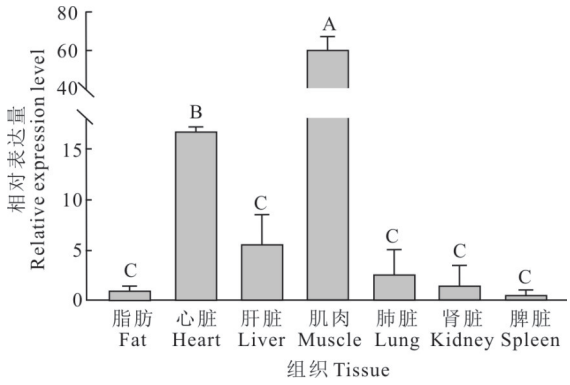
FGFR1，FGFR2，FGFR4 represent fibroblast growth factor receptor 1，2，4，respectively；FLT1，FLT3，FLT4 represent fms related receptor tyrosine kinase1，3，4，respectively；PDGFRA，PDGFRB represent platelet-derived growth factor receptor A，B，respectively；KDR. Kinase insert domain receptor；TEK. Tyrosine kinase.

图 7　牦牛 FGF6 蛋白互作网络分析

Fig. 7　Analysis of FGF6 protein interaction network in yak

2.3　*FGF6* 基因在桑桑牦牛不同组织中的表达

采用 RT-qPCR 检测 *FGF6* 基因在桑桑牦牛不同组织中的表达水平，以桑桑牦牛脂肪组织中的表达量为对照（相对表达量为 1），结果如图 8 所示。由图 8 可知，*FGF6* 基因在桑桑牦牛 7 个组织中均有表达，其中在肌肉组织中表达量最高，极显著高于其他组织；其次是心脏组织，表达量极显著高于脂肪、肝脏、肺脏、肾脏和脾脏组织；在脾脏组织中表达量最低。



图柱上标有不同大写字母表示各组织间差异极显著（$P<0.01$）。

Different uppercase letters indicate significant differences among tissues（$P<0.01$）.

图 8　*FGF6* 基因在桑桑牦牛不同组织中的相对表达量

Fig. 8　Relative expression levels of *FGF6* gene in different tissues of Sangsang yak

3　讨　论

FGFs 在促进动物组织生成与修复、胚胎发育、血管形成、肿瘤细胞的增殖与迁移等生理病理过程中有重要的作用[3]。*FGF6* 作为 FGFs 的一员，可促进肌肉生成，主要在骨骼肌组织中表达，*FGF6* 基因能促进肌肉再生，加速肌细胞的增殖与分化，对家畜的肉质与生长等经济性状有一定的促进作用[10]。曹玉珠等[11]研究表明，*FGF6* 基因中的 5 个 SNP 位点与鸡群体的体质量、体型、胴体性状和血液生化指标具有显著相关性，表明 *FGF6* 基因可能在鸡的生长发育中发挥重要作用。同为 FGFs 家族的成员 FGF2 也对家畜的肉质与生长性状具有一定影响。

刘嫣然等[12]研究发现,位于*FGF2*基因第3外显子上的SV2、SV4 SNP突变位点会改善秦川肉牛的眼肌面积性状,SV1位点突变会改善肌间脂肪性状,SV2、SV3、SV4位点突变会改善体高、胸深、胸围等性状,SV3和SV4位点突变也会改善坐骨端宽性状。

本试验成功克隆出桑桑牦牛脂肪组织*FGF6*基因完整的CDS区,其序列全长627 bp,编码208个氨基酸;通过同源性比对与系统进化分析发现,桑桑牦牛与野牦牛的相似度最高(100%),其次是瘤牛(99.9%),与马鹿的相似度最低(72.8%)。这表明桑桑牦牛*FGF6*在不同物种间具有较高的相似性,进化过程中变异程度较小,提示*FGF6*基因以及该家族其他基因在不同动物间的生物学功能可能具有相似性。FGF6蛋白信号肽与跨膜结构预测结果表明,FGF6蛋白存在信号肽,且信号肽剪切位点位于第44~45位氨基酸处;FGF6蛋白存在跨膜结构,在氨基酸序列的20~42位处有跨膜螺旋结构域。这与曹玉珠[11]的研究结果一致。FGF6蛋白在线粒体中含量最高(39.1%),推测该蛋白可能在肌肉合成中提供较多能量。有研究表明,当小鼠再生比目鱼肌损伤后,肌肉注射高剂量重组FGF6(rhFGF6)可以刺激肌源性干细胞的增殖,肌肉注射低剂量rh-FGF6可通过钙调神经磷酸酶信号通路调节肌肉分化和肌肉表型[13]。FGF6在肌肉再生过程中发挥着双重调控作用:一方面可以刺激肌细胞增殖与迁移,另一方面则能够诱导肌细胞分化和肌纤维生长。蛋白质翻译后的主要修饰作用产生糖基化与磷酸化位点,本研究发现,桑桑牦牛FGF6蛋白存在一个超越设定阈值的N-糖基化潜在位点和22个磷酸化位点,推测这些位点可能与蛋白的翻译后修饰相关[14],其中磷酸化位点对细胞信号转导发挥重要作用[15],糖基化位点通过影响蛋白质的功能来调节各种生物过程[16]。与FGF6蛋白互作的蛋白有10个,其中包括与FGF6为同一家族的FGFR1、FGFR2、FGFR4等蛋白。程杰[17]研究表明,*FGFR1*对牛成肌细胞增殖有显著的促进作用,这为后续肉牛肌肉发育相关基因的研究提供了新的思路和研究基础。ZINGG等[18]研究表明,截短的FGFR2第18号外显子(FGFR2$^{\Delta E18}$)是小鼠和人类的一种强效驱动突变,对于FGFR2$^{\Delta E18}$变异的癌症患者,可以考虑使用FGFR靶向疗法。BRINGUIER等[19]评估基因治疗对成年小鼠脊髓损伤后成熟星形胶质细胞*FGFR4*过表达的治疗潜力,得出受伤后星形胶质细胞中*FGFR4*过表达基因治疗是改善脊髓创伤的可行方法。与FGFR2、FGFR4类似,FGF1也在多种不同的生理和病理过程中发挥着重要作用[20]。

采用RT-qPCR技术检测*FGF6*基因在桑桑牦牛不同组织中的表达量,结果显示,*FGF6*在肌肉组织中的表达量最高,且极显著高于其他组织;其次是心脏组织,表达量极显著高于其他组织;在脾脏中表达量最低。XU等[21]对草鱼的研究表明,*FGF6*基因在大脑和肌肉中的表达量极显著高于其他组织,在心脏和肠道组织中中度表达,在其他组织中表达量较低。已有研究表明,*FGF6*基因在小鼠和小鸡的口腔[22]、舌头[23]等肌肉组织中均有表达。这些研究提示,*FGF6*基因可能参与调控生肌细胞系的增殖与分化过程。本研究发现,*FGF6*基因在桑桑牦牛肌肉组织中表达量最高,结合该基因具有促进动物组织生成和修复的功能,推测*FGF6*基因可能在牦牛肌肉组织的生长发育过程中发挥重要作用。HU等[24]研究表明,FGF6蛋白可以治疗并改善心脏功能,减少心脏梗死面积,促进心脏修复。杨德业等[25]研究发现,*FGF6*基因能提高心肌细胞的增殖能力。本研究中,*FGF6*在牦牛心脏组织中表达量也较高,因此推测该基因可能参与牦牛心脏的发育。

综上所述,*FGF6*基因在促进肌肉的再生与修复、组织的形成、肿瘤细胞的增殖等过程中有着不可或缺的作用。本研究为进一步探究*FGF6*基因在牦牛体内的生物学功能奠定了基础。

4 结 论

成功克隆了桑桑牦牛*FGF6*基因CDS区,其长度为627 bp,编码208个氨基酸。FGF6蛋白存在一个信号肽和跨膜螺旋,有1个N-糖基化位点和22个磷酸化位点。FGF6蛋白主要存在于细胞内,在线粒体中含量最高(39.1%),属于稳定型亲水性蛋白。桑桑牦牛*FGF6*与野牦牛的同源性达100%。*FGF6*基因在桑桑牦牛脂肪、心脏、肝脏、肌肉、脾脏、肺脏、肾脏中均有表达,其中在肌肉中表达量最高。

[参考文献]

[1] BAO Q, ZHANG X L, BAO P J, et al. Using weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) to identify the hub

genes related to hypoxic adaptation in yak (*Bos grunniens*)[J]. Genes & Genomics, 2021, 43(10): 1231-1246.

[2] SHI F Y, WANG H C, DEGEN A A, et al. Rumen parameters of yaks (*Bos grunniens*) and indigenous cattle (*Bos taurus*) grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2019, 103(4): 969-976.

[3] BEENKEN A, MOHAMMADI M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2009, 8(3): 235-253.

[4] 李乐乐，朱曼辉，邱昭娴，等. 成纤维细胞生长因子与脉络膜新生血管关系的研究进展[J]. 眼科学报，2020，35(2)：99-105.
LI L L, ZHU M H, QIU Z X, et al. Research progress on the relationship between fibroblast growth factor and choroidal neovascularization[J]. Eye Science, 2020, 35(2): 99-105.

[5] 林素，黄晓燕，王本极，等. *FGF6* 基因高表达对鼠心肌细胞凋亡和增殖的影响[J]. 温州医学院学报，2013，43(1)：9-14.
LIN S, HUANG X Y, WANG B J, et al. Effect of over-expressed *FGF6* gene on myocardial cells apoptosis and proliferation[J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2013, 43(1): 9-14.

[6] ZHI Y L, CAI C K, XU T X, et al. Silencing of FGF6 hampers aerobic glycolysis and angiogenesis in bladder cancer by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2023, 37(8): e23399.

[7] 姜瑞丽. 运动性骨骼肌损伤后再生修复过程中 FGF6 的变化研究[D]. 上海：上海体育学院，2011.
JIANG R L. Study on the changes of FGF6 in the process of regeneration and repair after exercise-induced skeletal muscle injury[D]. Shanghai: Shanghai University of Sport, 2011.

[8] HERRMANN A, HAAKE A, AMMERPOHL O, et al. Pipeline for large-scale microdroplet bisulfite PCR-based sequencing allows the tracking of hepitype evolution in tumors[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21332.

[9] LIANG R H, TAN B H, LEI K, et al. The FGF6 amplification mutation plays an important role in the progression and treatment of malignant meningioma[J]. Translational Oncology, 2024, 45: 101974.

[10] CHAKKALAKAL J V, JONES K M, BASSON M A, et al. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence[J]. Nature, 2012, 490(7420): 355-360.

[11] 曹玉珠，邢雨欣，马乘霖，等. 鸡 *FGF6* 基因生物学特性及其多态性与经济性状的关联分析[J]. 畜牧兽医学报，2024，55(4)：1536-1550.
CAO Y Z, XING Y X, MA C L, et al. Biological characterization of chicken *FGF6* gene and association of its polymorphisms with economic traits[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2024, 55(4): 1536-1550.

[12] 刘嫣然，吴森，王晓宇，等. 秦川肉牛 *FGF2* 基因多态性与其生长和肉质性状的关联分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2017，45(6)：16-22.
LIU Y R, WU S, WANG X Y, et al. Association analysis of *FGF2* gene polymorphisms in Qinchuan beef cattle with their growth and meat quality traits[J]. Journal of Northwest A&F University(Nat Sci Ed), 2017, 45(6): 16-22.

[13] ARMAND A S, PARISET C, LAZIZ I, et al. FGF6 regulates muscle differentiation through a calcineurin-dependent pathway in regenerating soleus of adult mice[J]. Journal of Cellular Physiology, 2005, 204(1): 297-308.

[14] QUALMANN B, KESSELS M M. The role of protein arginine methylation as post-translational modification on actin cytoskeletal components in neuronal structure and function[J]. Cells, 2021, 10(5): 1079.

[15] ZHU C, ZHU J R, DUAN Q Y, et al. Exploration of the lactation function of protein phosphorylation sites in goat mammary tissues by phosphoproteome analysis[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 703.

[16] ZHOU F N, MA J, ZHU Y F, et al. The role and potential mechanism of O-Glycosylation in gastrointestinal tumors[J]. Pharmacological Research, 2022, 184: 106420.

[17] 程杰. 牛 *FGFR1* 基因启动子甲基化对转录的调控及其对成肌细胞增殖分化的影响[D]. 陕西杨凌：西北农林科技大学，2019.
CHENG J. Effects of promoter methylation on transcription regulation of bovine *FGFR1* gene and its effect on myoblast proliferation and differentiation[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.

[18] ZINGG D, BHIN J, YEMELYANENKO J, et al. Truncated FGFR2 is a clinically actionable oncogene in multiple cancers[J]. Nature, 2022, 608(7923): 609-617.

[19] BRINGUIER C M, NORISTANI H N, PEREZ J C, et al. Up-regulation of astrocytic Fgfr4 expression in adult mice after spinal cord injury[J]. Cells, 2023, 12(4): 528.

[20] 江中良，胡建宏，史怀平，等. FGF1 对牛卵巢颗粒细胞 Spry 基因表达的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2011，39(2)：23-27.
JIANG Z L, HU J H, SHI H P, et al. FGF1 induced sprouty genes expression by RTK/ERK in bovine ovarian granulosa cells[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2011, 39(2): 23-27.

[21] XU Y Y, TAN Q S, HU P C, et al. Characterization and expression analysis of *FGF6* (fibroblast growth factor 6) genes of grass carp (*Ctenopharyngodon* idellus) reveal their regulation on muscle growth[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(5): 1649-1662.

[22] KUMAR M, CHAPMAN S C. Cloning and expression analysis of *Fgf*5, 6 and 7 during early chick development[J]. Gene Expression Patterns, 2012, 12(7/8): 245-253.

[23] HAN A, ZHAO H, LI J Y, et al. ALK5-mediated transforming growth factor β signaling in neural crest cells controls craniofacial muscle development *via* tissue-tissue interactions[J]. Molecular and Cellular Biology, 2014, 34(16): 3120-3131.

(下转第 37 页)