

# 北京油鸡 *AMPD1* 基因多态性及其与肌苷酸含量关系的研究

柴丽娟<sup>1</sup>, 储明星<sup>2\*</sup>, 文杰<sup>2</sup>, 陈继兰<sup>2</sup>,  
赵桂苹<sup>2</sup>, 郑麦青<sup>2</sup>, 刘文忠<sup>1</sup>, 周忠孝<sup>1</sup>

(1. 山西农业大学动物科学技术学院, 太谷 030801;  
2. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

**摘要:** 根据人和大鼠的腺苷一磷酸脱氨酶 1(*AMPD1*) 基因序列设计引物, 采用 PCR-RF-SSCP 技术检测了 130 只北京油鸡 *AMPD1* 基因多态性, 并分析了 *AMPD1* 的不同基因型与北京油鸡肌苷酸含量的关系。结果表明: 在北京油鸡中检测到 *AMPD1* 基因的 A、B、C 3 个等位基因, 基因频率分别为 0.180 8、0.661 5、0.157 7; 产生 AA、AB、AC、BB、BC、CC 6 种基因型, 基因型频率分别为 0.076 9、0.176 9、0.030 8、0.461 5、0.223 1、0.030 8。最小二乘分析表明基因型 AC、BB 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值显著高于基因型 AA 所对应的最小二乘均值 ( $P < 0.05$ ), 肌苷酸含量在 *AMPD1* 其余基因型之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 北京油鸡; *AMPD1* 基因; 肌苷酸含量; PCR-RF-SSCP

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1117-04

肌苷酸(Inosine monophosphate, IMP)是重要的风味物质,对肌肉的鲜味程度起着巨大作用,它是由腺苷一磷酸(AMP)在腺苷一磷酸脱氨酶的作用下经脱氨作用形成的。腺苷一磷酸脱氨酶(Adenosine monophosphate deaminase, AMPD)是只在真核生物中发现的一种酶,由多基因家族所编码,AMPD 作为嘌呤代谢过程中的一种重要的酶,其基因在人和鼠上的研究较为深入<sup>[1,2]</sup>。

目前世界上已有不少国家以肌苷酸的含量作为肉类新鲜程度的指标之一<sup>[3]</sup>。北京油鸡是我国一个重要的地方鸡种,国内的一些研究表明北京油鸡肌肉肌苷酸含量高于其它一些鸡种<sup>[4-8]</sup>。本研究以肌肉肌苷酸含量较高的北京油鸡为试验材料,采用限制性酶切片段-单链构象多态(Restriction fragment-single strand conformation polymorphism, RF-SSCP)方法对在肌肉呈味中起重要作用的 *AMPD1* 基因进行单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)检测,并分析 *AMPD1* 的不同基因型与北京油鸡 IMP 含量的关系,以期对鸡高肌苷酸含量的标记辅助选择提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

北京油鸡 130 只母鸡全部来自中国农业科学院畜牧研究所鸡场。于 70 日龄翅静脉采血,1 mL/只,用 ACD 抗凝, -20 °C 冻存。采血后的 130 只母鸡全部屠宰,在 5 min 内取下右边胸肌以测定肌苷酸含量。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE 中,4 °C 保存。

### 1.2 肌苷酸含量测定方法

用绞肉机绞碎右边胸肌后,称取 5 g,放于 50 mL 烧杯中加 5% 过氯酸 5 mL,用高速组织分散机在 15 000 r/min 下打成浆状,再加 5% 过氯酸 15 mL,匀浆 3 × 20 s,提取肌苷酸。将提取物转至 50 mL 离心管中,用 5% 过氯酸 5 mL 洗涤烧杯,倒入离心管。在 3 500 r/min 下离心 5 min,上清过滤于 100 mL 三角瓶中,沉淀再用 5% 过氯酸 10 mL 振荡 5 min 后再离心,上清过滤与前次合并。上清液用 5 mol/L 和 0.5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 6.5,转至 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀后用 0.5 μm 滤膜过滤后,上清液用于高效液相色谱法进行分析。肌苷酸含量以 mg/g 肉表示。

### 1.3 主要试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 购于北京鼎国生物技术有限公司。

收稿日期: 2004-10-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2004CB117506)资助; 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助(2001AA243081)

作者简介: 柴丽娟(1976-),女,山西夏县人,硕士,主要从事分子遗传学研究。Tel: 0354-6289295; E-mail: cljuan1258@163.com

\* 通讯作者: 储明星, Tel: 010-62816001; E-mail: mxchu@263.net

1.4 引物设计

本试验首先根据人与大鼠 *AMPD1* 基因序列设计退化引物<sup>[1]</sup>, 进行亚克隆测序, 然后再根据测序结果设计鸡 *AMPD1* 基因确切引物, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。确切引物序列为: Forward: 5'-GTTCTCTCTCTAGCCAAGC-3'; Reverse: 5'-GTTTGGTCTCTCTCTCGTCCA-3'。

1.5 PCR 扩增

反应总体积为 25 μL。10 × 缓冲液成分为: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 200 μmol/L each dNTP, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 引物浓度为 1.0 μmol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 50 ng 基因组 DNA。反应条件: 95 °C 热变性 5 min; 然后 95 °C 45 s, 58 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.6 PCR-RF-SSCP 分析

先用限制性内切酶 *Hind* III 将 PCR 产物酶切成 2 个较小片段, 而后在非变性聚丙烯胶上对酶切片段进行 SSCP 多态性分析。

1.7 *AMPD1* 基因型与北京油鸡 IMP 含量的关联分析

配合下列模型进行最小二乘方差分析, 比较北京油鸡 IMP 含量在 *AMPD1* 基因型之间的差异:

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

其中:  $y_{ij}$  为肌苷酸含量测定值;  $\mu$  为群体平均值;  $G_i$  为第  $i$  种基因型的固定效应;  $e_{ij}$  为随机残差效应。用 SAS(6.12 版本) 的 GLM (General Linear Model) 过程完成。

2 结果

2.1 PCR 扩增

利用合成的引物对北京油鸡 *AMPD1* 基因进行 PCR 扩增, 结果得到一条 522 bp 的特异性条带。2% 的琼脂糖凝胶电泳, 分子量标准 (M) 为 100 bp DNA Ladder, 检测结果见图 1。

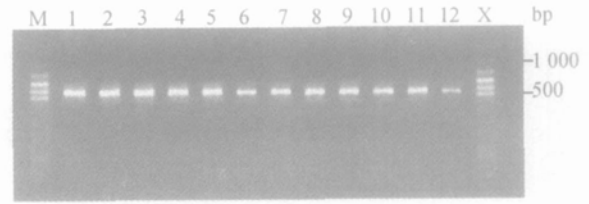
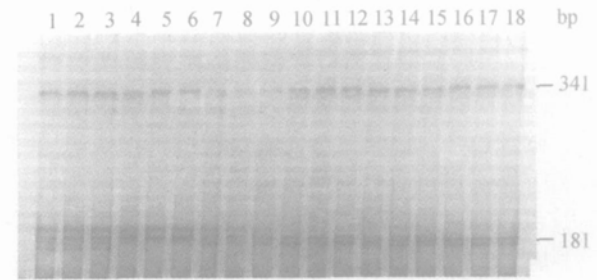


图 1 北京油鸡 *AMPD1* 基因 PCR 扩增  
Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of *AMPD1* gene in Beijing fatty chickens

2.2 *AMPD1* 基因 PCR-RF-SSCP 结果

因 PCR-SSCP 不适合太长片段的分析, 故本研究先用内切酶 *Hind* III 将 PCR 产物切割成 341 bp 和 181 bp 的 2 个小片段, 然后对酶切片段进行 SSCP 多态性分析, 结果见图 2。



1~ 3. AC genotype; 4~ 6. CC genotype; 7~ 9. BC genotype; 10~ 12. BB genotype; 13~ 15. AB genotype; 16~ 18. AA genotype

图 2 *AMPD1* 基因的 PAGE 电泳图  
Fig. 2 PAGE image of *AMPD1* gene

由图 2 可见, 在所检测的 2 个片段中, 181 bp 的片段存在多态性, 而 341 bp 的片段不存在多态性 (只有 1 种基因型)。 *AMPD1* 基因在北京油鸡中存在 A、B、C 3 个等位基因, 产生 AA、BB、CC、AB、AC、BC 6 种基因型。

2.3 *AMPD1* 基因的基因频率和基因型频率分析

计算了 130 只北京油鸡 *AMPD1* 基因的基因型频率和基因频率, 统计结果见表 1。

表 1 北京油鸡 *AMPD1* 基因的 PCR-RF-SSCP 的基因频率和基因型频率

Table 1 Gene frequency and genotype frequency of *AMPD1* gene in Beijing fatty chickens

样本数 No.	基因型频率 Genotype frequency						基因频率 Gene frequency		
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
130	0.076 9 (10)	0.176 9 (23)	0.030 8 (4)	0.461 5 (60)	0.223 1 (29)	0.030 8 (4)	0.180 8	0.661 5	0.157 7

括号内的数字是基因型的个体数

The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes

由表 1 可见, 北京油鸡 *AMPD1* 基因有 *A*、*B*、*C* 3 个等位基因, 产生 *AA*、*AB*、*AC*、*BB*、*BC*、*CC* 6 种基因型。其中 *B* 为优势等位基因, *BB* 为优势基因型。

#### 2.4 *AMPD1* 不同基因型与北京油鸡肌苷酸含量的关联分析

不同基因型肌苷酸含量的最小二乘分析结果见表 2。

表 2 *AMPD1* 不同基因型的北京油鸡肌苷酸含量的最小二乘均值及标准误

Table 2 Least squares mean (LSM) and standard error (SE) for IMP content of different genotypes of *AMPD1* gene in Beijing fatty chickens

基因型 Genotype	样本数 No.	最小二乘均值 ± 标准误 LSM ± SE
<i>AA</i>	10	2.41 ± 0.35 <sup>b</sup>
<i>AB</i>	23	3.07 ± 0.23 <sup>ab</sup>
<i>AC</i>	4	3.75 ± 0.55 <sup>a</sup>
<i>BB</i>	60	3.17 ± 0.14 <sup>a</sup>
<i>BC</i>	29	2.91 ± 0.20 <sup>ab</sup>
<i>CC</i>	4	3.00 ± 0.55 <sup>ab</sup>

同列中具有不同字母肩标的平均值间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 肌苷酸含量单位为 mg/g

Means with the different superscripts within the same column differ significantly ( $P < 0.05$ ); Unit of IMP content: mg/g

由表 2 可见, 基因型 *AC* 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值最高 (3.75), 基因型 *BB* 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值次之 (3.17), 基因型 *AA* 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值最低 (2.41); 并且基因型 *AC*、*BB* 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值显著高于基因型 *AA* 所对应的最小二乘均值 ( $P < 0.05$ ), 肌苷酸含量在 *AMPD1* 其余基因型之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 北京油鸡的肌苷酸含量

陈国宏等<sup>[4]</sup>报道, 北京油鸡的肌苷酸含量为 2.67 mg/g。黄梅南等<sup>[5]</sup>报道肌苷酸含量在不同鸡品种间差异显著, 北京油鸡等优质黄羽肉鸡肌苷酸含量比 *AA* 白羽肉鸡高 20%~52%; 陈继兰等<sup>[6]</sup>也报道, 北京油鸡肌苷酸含量显著高于 *AA* 白羽肉鸡。

李建凡等<sup>[7]</sup>报道北京油鸡的肌苷酸含量为 4.75 mg/g, 母鸡的肌苷酸含量高于公鸡。张学余等<sup>[8]</sup>报道 20 只北京油鸡的肌苷酸含量为 3.18 mg/g。本研究检测到 130 只北京油鸡母鸡的肌苷酸含量为 3.05 mg/g。报道的北京油鸡肌苷酸含量的差异可能与测定的个体数不同、性别不同有关, 同时也提示北京油鸡肌苷酸含量具有很大的选择余地。

#### 3.2 *AMPD1* 基因与 IMP 含量的关系

张学余等<sup>[8]</sup>报道肌苷酸含量较高的丝羽乌骨鸡、北京油鸡、茶花鸡 *AMPD1* 基因序列的 120 处和 355 处碱基均为 *G*, 而肌苷酸含量较低的白耳鸡、萧山鸡、隐性白羽肉鸡这两处碱基均为 *A*, 推测这两个位点可能与肌苷酸含量有关。本研究结果初步表明北京油鸡 *AMPD1* 基因型 *AC*、*BB* 所对应的肌苷酸含量最小二乘均值显著高于基因型 *AA* 所对应的最小二乘均值 ( $P < 0.05$ ), 为鸡高肌苷酸含量的标记辅助选择提供了科学依据。当然, 由于本研究样本量较小, *AMPD1* 基因片段也短, 还需要增加鸡品种数、扩大样本数、扩大 *AMPD1* 基因研究区域, 对 *AMPD1* 基因与肌苷酸含量关联作深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Sabina R L, Morisaki T, Clarke P, et al. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes[J]. J Biol Chem, 1990, 265(16): 9423~9433.
- [2] Mahnkær Zizelman D K, D'cunha J, Wojnar J M, et al. Regulation of rat AMP deaminase 3 (isoform C) by development and skeletal muscle fibre type[J]. Biochem J, 1997, 326(Pt2): 521~529.
- [3] Awrie R A. Chemical changes in meat due to processing—a review[J]. J Sci Food Agric, 1968, 19(5): 233~240.
- [4] 陈国宏, 侯水生, 吴信生, 等. 中国鸡品种肌肉肌苷酸含量研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(3): 211~215.
- [5] 黄梅南, 孙树侠, 郭丹滨, 等. 我国优质黄羽鸡风味理化特性研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 198~206.
- [6] 陈继兰, 赵桂苹, 郑麦青, 等. 快速与慢速肉鸡脂肪生长与肌苷酸含量比较[J]. 中国家禽, 2002, (8): 16~18.
- [7] 李建凡, 黄梅南. 不同品种鸡胸肌肉中肌苷酸含量比较[A]. 中国农业科学院畜牧研究所. 优质黄羽鸡鸡品种系选育和配套研究论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 287~296.
- [8] 张学余, 黄兆明, 苏一军, 等. 丝羽乌骨鸡腺苷单磷酸

脱氨酶 1(*AMPD1*) 基因多态性及其与肌苷酸含量相

关研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(6): 605~ 607.

### Study on Polymorphism of *AMPD1* Gene and Its Association with Inosine Monophosphate Content in Beijing Fatty Chickens

CHAI Li-juan<sup>1</sup>, CHU Ming-xing<sup>2\*</sup>, WEN Jie<sup>2</sup>, CHEN Ji-lan<sup>2</sup>, ZHAO Gu-ping<sup>2</sup>,  
ZHENG Ma-qing<sup>2</sup>, LIU Wen-zhong<sup>1</sup>, ZHOU Zhong-xiao<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;  
2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Adenosine monophosphate deaminase 1 (*AMPD1*) gene was studied as a candidate gene of inosine monophosphate (IMP) content of Beijing fatty chickens. According to the sequence of *AMPD1* gene of human and rat, primers were designed to amplify the *AMPD1* gene of chicken. Based on the clone sequencing, single nucleotide polymorphism of *AMPD1* gene was detected in 130 Beijing fatty chickens by PCR-RF-SSCP. The results showed that three alleles (*A*, *B*, *C*) and six genotypes (*AA*, *AB*, *AC*, *BB*, *BC*, *CC*) were found in Beijing fatty chickens. Frequencies of alleles *A*, *B*, *C* were 0.180 8, 0.661 5, 0.157 7, respectively. Frequencies of genotypes *AA*, *AB*, *AC*, *BB*, *BC*, *CC* were 0.076 9, 0.176 9, 0.030 8, 0.461 5, 0.223 1, 0.030 8, respectively. The least squares means of IMP content for *AC* and *BB* were higher than that for *AA* ( $P < 0.05$ ), and there were no significant differences between other genotypes ( $P > 0.05$ ).

**Key words:** Beijing fatty chicken; *AMPD1* gene; inosine monophosphate content; PCR-RF-SSCP

\* Corresponding author

## 动物疫情速递

### 1. 新加坡发生锦鲤疱疹病毒病

2005年9月23日新加坡向OIE报告了锦鲤疱疹病毒病疫情。事件起于2005年9月22日,并于同日得到确认,疫情涉及30尾自马来西亚进口的鲤鱼,疑似30尾,患鱼1尾,未发现临床症状。整个该批鲤鱼送往实验室进行锦鲤疱疹病毒PCR检验。诊断试验均在新加坡农粮兽医局动植物安全实验室进行。

已采取的控制措施:检疫、追溯以及容器和(或)缓冲带监测,并将对容器及缓冲带以外范围进行监测。未对鱼群进行治疗,整批鱼已销毁。

### 2. 刚果民主共和国发生口蹄疫

2005年9月14日OIE收到刚果(金)疫情信息,报告日期是2005年8月26日,在乌维拉的鲁齐齐地区暴发两起口蹄疫。诊断在南非Onderstepoort兽医研究所进行,血清学试验于2005年5月进行,129份牛血清中有97份呈阳性。病原是SAT1、SAT2、SAT3和A型口蹄疫病毒。已采取的控制措施:部分扑杀、国内限制移动和区域化。

### 3. 罗马尼亚发生禽流感

2005年10月7日罗马尼亚向OIE报告该国东部地区Tulcea县Ceamurlia-de-Jos暴发禽流感。本次疫情始于2005年10月4日,于10月7日确认,但病原的详细情况仍然未知。诊断包括临床诊断、尸体剖检和实验室检验(血清学)。疫情涉及疑似动物100只,包括58只蛋鸡和42只鸭,其中病例36只,死亡36只,扑杀64只。感染来源为接触野鸟。采取的措施:扑杀、检疫、国内限制移动、筛选、消毒、浸洗和喷雾。拟对野生动物保护区进行控制。

罗马尼亚最近一次暴发高致病力禽流感是在1942年。

摘译自OIE网