

北京油鸡和矮脚鸡心脏型、脂肪型脂肪酸结合蛋白基因多态性的研究

叶满红, 曹红鹤, 文杰, 李宏滨, 陈继兰, 赵桂萍

(中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

摘要: 根据不同物种间同一基因核苷酸序列的保守性及相似性, 设计特异性引物, 利用聚合酶链式反应技术(PCR), 扩增鸡心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)基因第二内含子序列; 根据已经发表的鸡脂肪型脂肪酸结合蛋白(A-FABP)基因 mRNA 序列, 设计特异性引物, 扩增鸡 A-FABP 基因第三内含子序列。选用 *Hha* I、*Hae* III、*Hinf* I、*Bam* H I、*Eco* R I、*Pst* I、*Xmn* I 和 *Hind* III 种限制性内切酶对扩增产物分别进行单酶切, 发现 H-FABP 基因第二内含子 *Hha* I PCR-RFLP 及 A-FABP 基因第三内含子 *Hinf* I PCR-RFLP。

关键词: H-FABP; A-FABP; PCR-RFLP; 鸡

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)05-0422-05

沉积在肌肉内的脂肪是影响肉品质量和风味的一项重要经济性状。肌内脂肪的含量不仅与肉的嫩度有着直接的关系, 还与肉品的多汁性以及风味相关。脂肪酸结合蛋白(Fatty Acid-Binding Proteins, FABPs)是一些小的、存在于细胞内的蛋白质, 包括至少 10 种结构各异的类型。在机体中 FABPs 参与细胞内脂肪酸的摄取, 协助将脂肪酸运至进行 β 氧化的场所以及甘油三酯和磷脂的合成部位^[1]; 同时 FABPs 还使细胞得以拥有一个细胞内脂肪酸及其 CoA 酯的贮存库, 能够在较大范围内以调节脂肪酸浓度的方式来调控机体内多种生化过程, 尤其是脂类代谢的过程^[2]。心脏脂肪酸结合蛋白(Heart-FABP, H-FABP)主要在对脂肪酸有高度需求的组织(如心肌、骨骼肌和泌乳的乳腺)中表达; 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(Adipocyte-FABP, A-FABP, 也称为 aP2 或 ALBP), 全部在脂肪细胞中表达。由于 H-FABP、A-FABP 能在心肌和脂肪细胞中沉积甘油三酯, 从而增加肌内脂肪, 因此, 把它们作为影响肌内脂肪含量的候选基因而加以研究。

在猪上已进行了 H-FABP 及 A-FABP 基因变异与肌内脂肪含量关系的研究^[3-7], 结果表明, 不同等位基因的基因型间 IMF 含量差异显著。本实验

室也已对 H-FABP 和 A-FABP 基因在中国地方猪种中的等位基因组成的变化进行了研究^[8,9]。但有关鸡 H-FABP 与 A-FABP 基因作为肉鸡重要经济性状候选基因的研究至今尚未见报道。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 北京油鸡 315 只血液样品、矮脚鸡 267 只血液样品, 采自中国农业科学院畜牧研究所保种鸡场。

1.2 基因组 DNA 的制备 基因组 DNA 的提取根据孟安明的方法^[10], 即取 30 μ l 鸡全血加入 470 μ l 1 \times SET、12.5 μ l 20% SDS 以及 0.01 mg 蛋白酶 K, 充分混匀后于 56 $^{\circ}$ C 恒温水浴, 消化过夜。经酚仿抽提与乙醇沉淀后, 获得基因组 DNA, 干燥后加 50~100 μ l TE(pH8.0) 于 55 $^{\circ}$ C 水浴溶解过夜。最终提取的基因组 DNA 样品分成两份, 一份于 4 $^{\circ}$ C 备用, 一份于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 PCR 扩增反应 试验所用引物采用 Primer 3.0 软件设计, 由北京赛百盛生物工程公司合成。引物序列、PCR 产物大小及所在的位置见表 1。

应用 P₁、P₂ 这两对引物对所提取的北京油鸡及矮脚鸡基因组 DNA 进行扩增。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C(P₁)、63 $^{\circ}$ C(P₂) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 经 34 个循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。12 μ l 反应体系中各组分的终浓度分别为: dNTPs 0.2 mmol/L、Mg²⁺ 1.5 mmol/L、混合上下游引物 0.5 μ mol/L、Taq 酶 5U/ μ l、DNA

收稿日期: 2002-08-12

基金项目: 国家自然科学基金(30170677)及国家重点基础研究发展规划项目“973”(TC2000016104)资助

作者简介: 叶满红(1974-), 女, 浙江松阳人, 博士, 主要从事鸡肉品质分子标记的研究。

表 1 PCR 扩增所用的引物序列、产物大小及位置
Table 1 Primer sequence, corresponding PCR product size and position

引物 Primer	产物大小产物位置	
	Product Size(bp)	Product position
P ₁ : 5'-AGCACCTTCAAGAACACAGAGA-3' 5'-GACCAGCTTGCCTCCATCTA-3'	约 2 kb	H-FABP Intron2
P ₂ : 5'-CCAAAGCACCCCT GATGAAAT-3' 5'-TGCTCTTTCGTAAACTCTTTTGC-3'	约 1.5 kb	A-FABP Exon3 Intron3

模板 1 μl (约 60 ng/μl)。PCR 扩增产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 扩增产物的 PCR-RFLP 分析 选用 *Hha* I、*Hae* III、*Hinf* I、*Bam*H I、*Eco*R I、*Pst* I、*Hind* III、*Xmn* I 8 种限制性内切酶对鸡 H-FABP 基因第二内含子以及 A-FABP 基因第三内含子 PCR 扩增产物分别进行单酶切。酶切反应体系为 12 μl, 其中含 8 μl PCR 产物、1.2 μl 限制性内切酶 10 × Buffer、2.4 μl 高压灭菌双蒸水、4~5 U 限制性内切酶, 于 37 °C 消化过夜。酶切产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 扩增产物的转化与测序 对于发现 PCR-RFLP 多态位点的 PCR 扩增样品, 选取各纯和基因型的扩增产物, 分别采用玻璃奶吸附的方法进行纯化后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下与载体 (T-easy 载体, Promega 产品) 相连接, 之后转化大肠杆菌 (JM109), 经选择性平板培养后进行蓝白斑筛选。鉴

定转化成功的白斑阳性克隆送交北京华大公司测序。

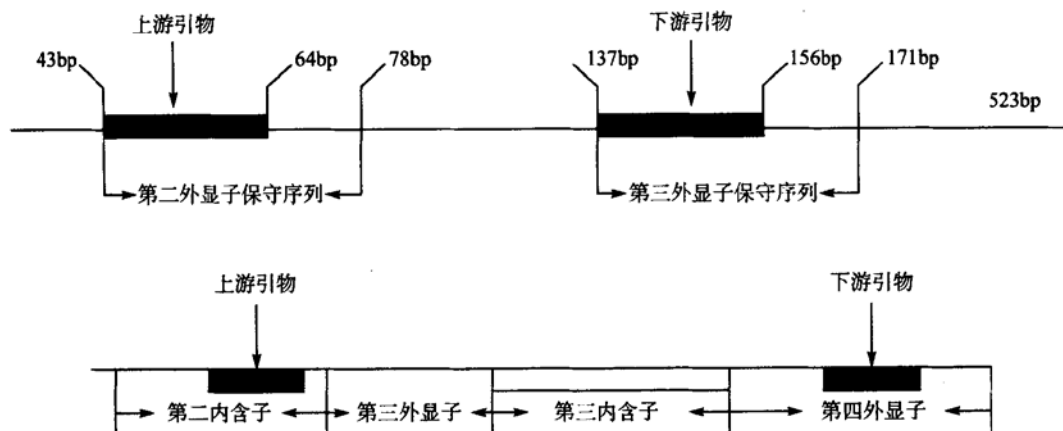
2 结果

2.1 PCR 所用引物的设计

由于不同物种间、同型脂肪酸结合蛋白基因的核苷酸序列具有较高的相似性与同源性, 都是 4 个外显子和 3 个内含子的结构, 因此拟根据其相应保守区设计特异性扩增引物。

到目前为止, 猪、鼠心脏型脂肪型结合蛋白 (H-FABP) 基因的全序列, 人、牛 H-FABP 基因的 cDNA 序列已经发表; 猪脂肪型脂肪酸结合蛋白 (A-FABP) 基因的全序列、鸡 A-FABP 基因的 mRNA 以及第 1~2 内含子序列也已经发表。而有关鸡的 H-FABP 基因序列的信息几乎是空白, 其 mRNA 序列或基因全序列均未见报道, 仅只在 GeneBank 上查到一段在鸡脂肪 cDNA 文库中发现的、与大鼠 H-FABP 基因部分 mRNA 序列有较高相似性的 523bp 序列 (BI067866)。比较发现: 在 GeneBank 上已经发表的鼠、人、牛、猪 H-FABP 基因第 2 外显子以及第 3 外显子碱基序列与这一段 523bp 序列之间有数十个碱基相当保守。在此保守区设计引物 P₁ 用于扩增鸡 H-FABP 基因第二内含子。

鸡 A-FABP 基因的 mRNA 序列已经发表 (GeneBank AF432506), 其第一内含子、部分第二内含子的序列也已知 (GeneBank AF432507)。用于扩增该基因第三内含子的引物 P₂ 根据该基因第二内含子和第四外显子的序列而设计。



2.2 PCR 扩增结果

2.2.1 引物 P₁ 对鸡 H-FABP 基因第二内含子的扩增结果: P₁ 被设计用于扩增鸡 H-FABP 基因第二内含子, 其上游位于该基因的第二外显子保守区, 下游

位于该基因第三外显子保守区。根据 GeneBank 上已经发表的有关 H-FABP 基因序列信息得知 H-FABP 基因第二内含子的大小分别为: 大鼠 147bp、猪 2079bp, 因此, 推测鸡 H-FABP 基因第二内含子

大小在 2kb 左右。由电泳图谱可见, 扩增的特异性较好, 条带的位置在预期的 2kb 范围内。

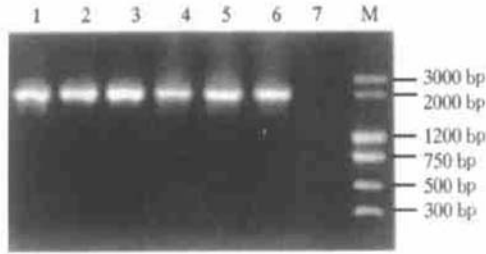


图 1 鸡 H-FABP 基因第二内含子 PCR 扩增产物 (0.8% 琼脂糖凝胶电泳) 1-6 为不同个体的 PCR 扩增产物, 7 为空白对照

Fig.1 PCR product of gallus H-FABP gene intron2
Lane 1-6: Individual PCR product
Lane 7: Negative control

2.2.2 引物 P₂ 对鸡 A-FABP 基因第三内含子的扩增结果: P₂ 被设计用于扩增鸡 A-FABP 基因第三内含子, 其上游位于该基因的第二内含子, 下游位于该基因第四外显子。由电泳图谱可见, 扩增的特异性较好。GeneBank 上发表的猪 A-FABP 基因 (Y16039) 第三内含子大小为 471bp, 第三外显子的大小为 102bp; 鸡第三外显子的大小也为 102bp, 鸡 H-FABP 基因第三内含子大小在 1.4kb 左右, 可见不同物种间同一基因的内含子大小存在较大变异。

2.3 PCR 产物的酶切结果

2.3.1 鸡 H-FABP 基因第二内含子 PCR 产物的 PCR-RFLP 分析: 在所检测的北京油鸡、矮脚鸡群体中 H-FABP 基因第二内含子 *Hha* I-RFLP 的基因型及等位基因频率的分布情况见表 2。

在所分析的 315 只北京油鸡中没有发现 *Hha*I-RFLP CC 基因型, 在所分析的 235 只矮脚鸡中没有发现 *Hha*I-RFLP BB 基因型, 这很有可能是因为在所检

测的群体中此两类基因型的频率比较低。

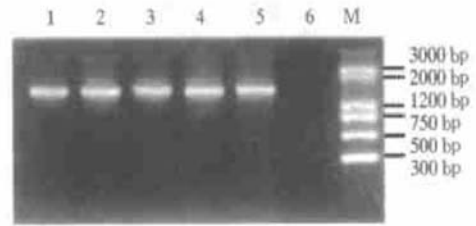


图 2 鸡 A-FABP 基因第三内含子的 PCR 扩增产物 (0.8% 琼脂糖凝胶电泳) 1-5 为不同个体的扩增产物, 6 为空白对照

Fig.2 PCR product of gallus A-FABP gene intron3
Lane 1-5: Individual PCR product
Lane 6: Negative control

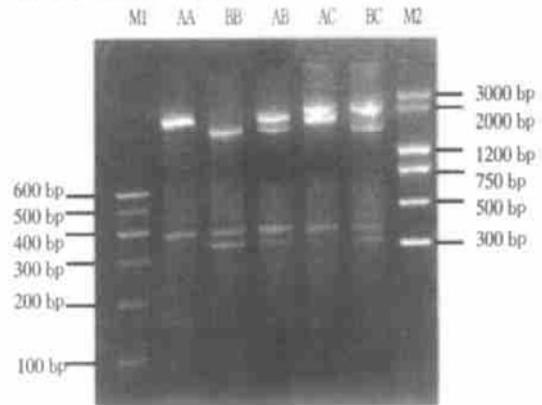


图 3 鸡 H-FABP 基因第二内含子 2kb PCR 产物 *Hha* I 酶切图谱

Fig.3 Separation of 2kb PCR product of gallus H-FABP gene intron 2 following digestion with *Hha* I

2.3.2 鸡 A-FABP 基因第三内含子 PCR 产物的 PCR-RFLP 分析: 在所检测的北京油鸡、矮脚鸡群体中 A-FABP 基因第三内含子 *Hinf* I-RFLP 的各基因型及等位基因频率的情况见表 3。

由于琼脂糖凝胶电泳的分辨率有限, 103bp 和 105bp 两酶切条带在凝胶图谱中重合。

表 2 H-FABP 基因第二内含子 *Hha* I-RFLP 的基因型频率、等位基因频率及相应的酶切片段长度

Table 2 Genotypes and allele frequencies of different alleles of *Hha* I-RFLPs of gallus H-FABP gene intron 2 and their corresponding fragment lengths

基因型 Genotype	片段大小 Fragment length (bp)	基因型频率 Genotype frequency		等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency	
		北京油鸡	矮脚鸡		北京油鸡	矮脚鸡
AA	386、1668	0.610 (192/315)	0.919 (216/235)	A	0.792	0.953
BB	386、337、1331	0.019 (6/315)	0	B	0.170	0.013
CC	2054	0	0.009 (2/235)	C	0.038	0.034
AB	386、337、1331、1668	0.295 (93/315)	0.021 (5/235)			
AC	386、1668、2054	0.070 (22/315)	0.047 (11/235)			
BC	386、337、1331、2054	0.006 (2/315)	0.004 (1/235)			

表 3 H-FABP 基因第三内含子 *Hinf* I-RFLP 各基因型及等位基因频率
Table 3 Genotypes and allele frequencies of different alleles of *Hinf* I-RFLPs of gallus A-FABP gene intron 3 and their corresponding fragment lengths

基因型 Genotype	片段大小 Fragment length(bp)	基因型频率 Genotype frequency		等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency	
		北京油鸡	矮脚鸡		北京油鸡	矮脚鸡
AA	584 318 258 221 103	0.77(194/251)	0.888(237/267)	A	0.88	0.94
BB	479 318 258 221 105 103	0.02(5/251)	0.007(2/267)	B	0.12	0.06
AB	584 479 318 258 221 105 103	0.21(52/251)	0.105(28/267)			

表 4 两个 PCR-RFLPs 的 Hardy-Weinberg 平衡状态的检验
Table 4 Equilibrium analysis of Hardy-Weinberg for two PCR-RFLPs in H-FABP and A-FABP gene

品种 Breed	Chr square ²		Chr square ²	
	<i>Hha</i> I-RFLP	<i>Hinf</i> I-RFLP	<i>Hha</i> I-RFLP	<i>Hinf</i> I-RFLP
北京油鸡	2.2476	$\chi^2_{0.05}(df=2) = 5.99$	0.0672	$\chi^2_{0.05}(df=1) = 3.84$
矮脚鸡	15.3812**	$\chi^2_{0.01}(df=2) = 9.21$	0.6594	$\chi^2_{0.01}(df=1) = 6.63$

** 表示差异极显著($P < 0.01$) Value with* * differ significantly at $P < 0.01$.

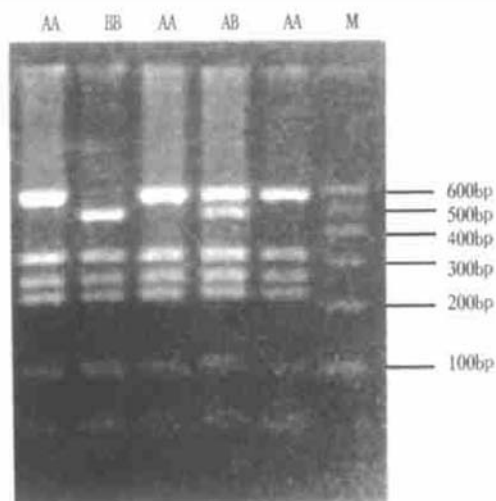


图 4 鸡 A-FABP 基因第三内含子 PCR 产物 *Hinf* I 酶切电泳图谱

Fig.4 Separation of 1.5kb PCR product of A-FABP gene intron 3 following digestion with *Hinf* I

经 χ^2 检验表明, A-FABP 基因 *Hinf* I-PCR-RFLP 在北京油鸡及矮脚鸡中均达到 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$); H-FABP 基因 *Hha* I-PCR-RFLP 在北京油鸡中达到 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$), 在矮脚鸡中未达到平衡($P < 0.01$)。

2.4 测序结果

鸡 H-FABP 基因第二内含子 2kb PCR 扩增产物经测序, 与 Genebank 上已经发表的鼠、人、牛、猪 H-FABP 基因序列比较, 发现有 81 个碱基与各物种 H-FABP 基因第二外显子的保守区域完全吻合, 有 35 个碱基与各物种 H-FABP 基因第三外显子的保

守区域完全吻合, 因此扩增产物为目的片段。

用 *Hha* I 酶切鸡 H-FABP 基因第二内含子 2kb PCR 产物出现多态性。 *Hha* I-RFLP 三种纯和基因型 PCR 产物经测序分析, 结果表明: 碱基 T 与 C 的替换导致多态位点的产生。在所扩增的片段中有两个 *Hha* I 酶切位点, *Hha* I / 386 和 *Hha* I / 723。当两个多态切点都存在时, 扩增产物被分解为 386bp 337bp 和 1331bp 三个片段(定为 BB 型); 当 *Hha* I / 723 多态位点由 GCG ↓ C 变为 GTGC 时(定为 AA 型), *Hha* I / 723 酶切位点消失, 扩增产物仅被分解为 386bp、1668bp(337bp 与 1331bp 之和) 两个片段; 当 *Hha* I / 386 多态位点也由 GCG ↓ C 变为 GTGC 时(定为 CC 型), 扩增片段不被 *Hha* I 酶切, 长为 2054bp。

鸡 A-FABP 基因第三内含子 1.5kb PCR 产物经测序, 发现与 Genebank 上已经发表的鸡 A-FABP 基因序列的第二内含子、第三外显子以及第四外显子的相应区域完全吻合, 因此扩增产物为目的片段。

用 *Hinf* I 酶切鸡 A-FABP 基因第三内含子 1.5kb PCR 产物出现多态性。 *Hinf* I-RFLP 两种纯和基因型 PCR 产物经测序分析, 结果表明: 碱基 G 与 A 的替换导致多态位点的产生。在所扩增的片段中有 5 个 *Hinf* I 酶切位点, *Hinf* I / 221 *Hinf* I / 700、*Hinf* I / 805、*Hinf* I / 1063 和 *Hinf* I / 1381。当 *Hinf* I / 700 多态位点存在时(定为 BB 型), 扩增产物被分解为 221bp、479bp、105bp、258bp 318bp、103bp 6 个片段; 当 *Hinf* I / 700 多态

位点由 G ↓ ACTC 变为 GGCTC 时(定为 AA 型), *Hinf* I /700 酶切位点消失, 扩增产物被分解为 221bp、584bp、258bp、318bp、103bp 5 个片段。

3 讨论

肌肉脂肪是影响鸡肉风味的一个重要因素, 与肉仔鸡相比, 我国的地方鸡品种肌肉脂肪含量较高, 脂肪分布均匀, 因此鸡肉的风味较好。由于肌肉脂肪在活体动物上很难直接测定, 常规育种进展较慢, 如果能够挖掘地方鸡种风味优势的遗传学机理, 在育种计划中纳入更多的分子标记信息, 将极大地推动优质肉鸡的育种工作。

本研究选定与肌肉脂肪性状生理生化机能相关的两个候选基因 H-FABP 和 A-FABP 基因, 目的是要寻找候选基因内潜在的多态位点, 以进一步对不同鸡品种间鸡肉肌肉脂肪沉积量差异与它们的关系进行相关研究或连锁分析。

本试验扩增出鸡 H-FABP 基因第二内含子以及鸡 A-FABP 基因第三内含子片段, 并进行了序列测定。它们可被用作探针, 通过构建鸡基因组 DNA 文库, 筛选鸡 H-FABP 基因的全序列以及 A-FABP 基因调控区的序列信息, 为进一步寻找两候选基因内的遗传学变异提供了基础。

参考文献:

[1] Veerkamp J H, Maatman R G H J. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes[J]. *Prog Lipid*

Res, 1995, 34: 17~ 52.

- [2] Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R G H J. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1991, 1081: 1~ 24.
- [3] Frans Gerbens, et al. Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene[J]. *Mamm Genome*, 1997, 8 (5): 328~ 332.
- [4] Frans Gerbens, et al. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs[J]. *Mamm Genome*, 1998, 9: 1022~ 1026.
- [5] Gerbens F, et al. Association of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs[J]. *J Anim Sci*, 2001, 79: 347~ 354.
- [6] Gerbens F, et al. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and back-fat content in Meishan crossbred pigs[J]. *J Anim Sci*, 2000, 78: 552~ 559.
- [7] Gerbens F, et al. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs[J]. *J Anim Sci*, 1999, 77: 846~ 852.
- [8] 张桂香, 曹红鹤, 等. 九个猪种 H-FABP 基因 5'-上游区和第二内含子的遗传变异[J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33 (4): 340~ 343.
- [9] 李楨, 等. 中外十一个猪种 H-FABP 基因 PCR-RFLP 的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, (34) 4: 313~ 317.
- [10] 孟安明, 等. 用四个探针产生的家禽 DNA 指纹图[J]. *生物化学与生物物理进展*[J]. 1993, 20(2): 139~ 142.

RFLPs at Heart and Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Genes in Beijing Oil Chick and Aijiao Chick

YE Man-hong, CAO Hong-he, WEN Jie, LI Hong-bin, CHEN Ji-lan, ZHAO Gu-ping
(*Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, 100094 Beijing*)

Abstract: Specific primer was designed to amplify the second intron of H-FABP gene in Beijing Oil Chick according to the conservative sequences of H-FABP genes from different species. We also designed another specific primer to amplify the third intron of A-FABP gene in Beijing Oil Chick. *Hha* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Pst* I, *Xmn* I and *Hind* III were used to digest PCR products respectively. Two Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms(PCR-RFLPs) were found, polymorphic *Hha* I site in H-FABP and polymorphic *Hinf* I site in A-FABP.

Key words: H-FABP gene; A-FABP gene; PCR-RFLP; Chick