

肉鸡肌肉与脂肪组织基因组差异剪接基因分析

张敏^{1,3}, 王杰², 孙艳发^{1,3*}, 钟礼鹏^{1,3}, 李焰^{1,3},
许卫华^{1,3}, 李虹仪^{1,3}, 张茂^{1,3}, 黄其春^{1,3}

(1. 龙岩学院生命科学学院, 龙岩 364000; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;
3. 福建省家畜传染病防治与生物技术重点实验室, 龙岩 364000)

摘要: 旨在鉴定和分析肉鸡肌肉和脂肪组织基因组差异剪接基因(differential splicing gene, DSG)。本研究采用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对 AA 肉鸡胸肌和腹部脂肪组织各 3 个样品进行转录组测序, 使用 rMATS 软件检测样品中可变剪接事件(alternative splicing, AS)和组织间的 DSG, 并对 DSG 进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。结果表明, 在肉鸡肌肉和脂肪组织中分别检测到(5 966.00±111.66)和(6 757.00±156.51)个可变剪接事件($P=0.002$)。5 种可变剪接类型中以外显子跳跃(skipped exon, SE)为主, 分别占肌肉和脂肪组织中可变剪接事件总数的 54.92%和 52.67%。肌肉和脂肪组织基因组间检测到 513 个显著的 DSGs。GO 基因富集分析发现, 93 个 DSGs 显著富集于细胞组分和分子功能中。信号通路分析发现, 31 个 DSGs 富集在肌动蛋白细胞骨架调节、焦点粘连、丙酮酸代谢和细胞内吞作用信号通路中, 其中 14 个 DSGs 在肌肉和脂肪组织基因组中的表达水平未发生显著变化。本研究通过对肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 DSG 的鉴定与分析, 为研究可变剪接及其调控机制、组织间差异剪接的多样性提供理论依据。

关键词: 肉鸡; 可变剪接; 差异剪接基因; RNA-seq

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2124-09

Differential Splicing Gene Analysis between Muscle and Fat Tissues in Broilers

ZHANG Min^{1,3}, WANG Jie², SUN Yan-fa^{1,3*}, ZHONG Li-peng^{1,3},
LI Yan^{1,3}, XU Wei-hua^{1,3}, LI Hong-yi^{1,3}, ZHANG Mao^{1,3}, HUANG Qi-chun^{1,3}

(1. College of Life Science, Longyan University, Longyan 364000, China; 2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
3. Key Laboratory of Fujian Province for Livestock Epidemic Prevention and Control and Biological Technology, Longyan 364000, China)

Abstract: The objective of this study was to identify and analyze the differential splicing gene (DSG) between muscle and fat tissues genome in AA broilers. The transcriptomic profiling of breast muscle and abdominal fat tissues ($n=3$) in AA broilers were sequenced using Illumina HiSeq 2500 technology. The alternative splicing event (AS) and DSG between muscle and fat tissues genome in AA broilers were identified using rMATS software. The GO function enrichment and KEGG pathway analysis were performed for DSG. The results showed that (5 966.00±111.66) and (6 757.00±156.51) ($P=0.002$) alternative splicing events (AS) were identified in genome of muscle and fat tissues, respectively in AA broilers. Skipped exon (SE) was the main events with the highest frequency of 54.92% and 52.67% of the total number of AS in muscle and fat

收稿日期: 2017-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(31501970); 福建省自然科学基金(2017J01640); 福建省高校杰出青年科研人才培育计划; 杨胜先生门生社群项目(C2016046); 龙岩学院动物营养科研创新团队

作者简介: 张敏(1983-), 女, 黑龙江尚志人, 博士, 讲师, 主要从事动物传染病病原检测研究, E-mail: zhangminshiwo@163.com

* 通信作者: 孙艳发, 博士, 副教授, 主要从事家禽营养与遗传育种研究, E-mail: boysun2010@163.com

tissues, respectively; A total of 513 significant DSGs were identified between muscle and fat tissues genome. The GO enrichment analysis indicated that 93 DSGs were significantly enriched in cellular component and molecular function. A total of 31 DSGs were significantly enriched in the regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion, pyruvate metabolism and endocytosis pathways; The mRNA expression levels of 14 DSGs were not significantly different between muscle and fat tissues. Through the genome-wide identification and analysis of DSG in muscle and fat in AA broilers, the results of this study will provide insight into the mechanisms of alternative splicing and diversity of differential splicing.

Key words: broiler; alternative splicing; differential splicing gene; RNA-seq

可变剪接(alternative splicing, AS)是 mRNA 通过不同的方式产生多种不同剪接 RNA 转录产物的过程^[1],是高等真核生物蛋白质多样性的重要基因调控机制之一^[2]。人基因组中有约 95% 的多外显子基因通过 100 000 多种不同的 AS 事件产生转录产物^[3]。新一代 RNA 测序(RNA-seq)技术已经证实 RNA 转录产物的可变剪接是人基因组中编码蛋白质多样性的重要机制^[4]。通过对基因组中 AS 事件的鉴定,已经发现一些基因的异常 AS 可导致人类多种疾病^[5-7]。

畜禽基因和基因组中一些 AS 事件逐渐被发现和证实。研究人员通过设计跨越 *Lmbr 1* 基因外显子 4 的引物,发现与丝羽乌骨鸡趾型呈现显著相关的 *Lmbr 1* 基因中 *Lmbr 1- α* 为其主要转录产物,而 *Lmbr 1- β* 为次要转录产物^[8]。经重叠延伸 RT-PCR 结合巢式 PCR 法扩增,在东北民猪中发现 *TLR4* 基因的 3 个可变剪接体^[9],鸭 *TLR4* 基因中也发现了两种不同的剪接体^[10]。研究人员通过 PCR 扩增和 5'RACE 方法获得白色和黑色山羊皮肤组织 *Agouti* 基因部分基因组序列及 mRNA 序列,经过拼接比对,在白色山羊中发现 5 种 *Agouti* 基因可变剪接体,而黑色山羊中发现 2 种可变剪接体^[11]。运用 RNA-seq 技术,畜禽基因组的 AS 事件得到了全面的鉴定和分析。通过对绒山羊肌内脂肪细胞在成熟前后 RNA-seq 数据分析发现,绒山羊肌内脂肪细胞中存在 A3SS、A5SS、SE 和 RI 4 种主要可变剪接类型,其中 A3SS 最为普遍^[12]。牛基因组的 21 755 个基因中 4 567(21%)个基因发生了可变剪接^[13]。猪睾丸基因组中存在 92 738 个 AS 事件,以 TSS、TTS、SE 和 AE 4 种类型为主;通过分析发现,与睾丸素代谢相关的基因中 63 个基因发生了可变剪接,以 TSS 和 TTS 为主^[14]。这些 AS 事件的鉴定与分析有利于全面研究基因组中 AS 事件和蛋白质的多

样性。由于 AS 事件大多数表现出组织特异性变异,其中 10%~30% 的 AS 事件易受细胞、组织和条件特异性调节的影响^[3]。上述的研究并未对组织间差异剪接,特别是差异剪接基因(differential splicing gene, DSG)进行深入的分析。差异剪接分析描述了两个样本间 AS 位点使用情况和剪接异构体的差异,这对基因组中 AS 及其调控机制的研究至关重要,同时揭示了差异基因表达分析错过的功能多样性^[15]。DSG 指不同组织样品间因差异剪接而导致基因亚型的相对丰度有差异的基因。因此,DSG 分析对于研究组织间 AS 及其调控机制具有重要的意义。

本研究以 AA 肉鸡 RNA-seq 测序数据为基础,通过分析鉴定肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 DSG,分析这些 DSG 功能和其信号通路,为进一步解析肉鸡基因组中组织间 AS 事件及组织间基因表达的特异性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验样品

AA 肉鸡母鸡苗由福建正大股份有限公司提供,于龙岩学院动物饲养房饲养至 42 日龄。肉鸡饲养管理和屠宰参考肉鸡生产技术规范(DB11/T 328-2005)与肉鸡屠宰质量管理规范(NY/T 1174-2006)。3 只肉鸡禁食 12 h 后进行屠宰,取胸肌和腹脂组织样品转入 2 mL RNase-free 离心管中,标记后迅速置于液氮中保存备用。

1.2 组织总 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, 美国)提取组织样品总 RNA,使用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 是否降解和受污染,并通过 Agilent 2100 生物分析仪使用 RNA 6000 Nano 试剂盒(Agilent Technologies, 美国)检测总 RNA 的浓度、完整

度(RIN)、28S/18S 比值和片段大小。用于构建 RNA-seq 文库和测序的总 RNA 均满足以下条件: 总 RNA 量 $\geq 6 \mu\text{g}$, RIN ≥ 8.0 , 28S/18S ≥ 1.0 。

1.3 肉鸡胸肌和腹部脂肪组织 RNA-seq 文库的构建和测序

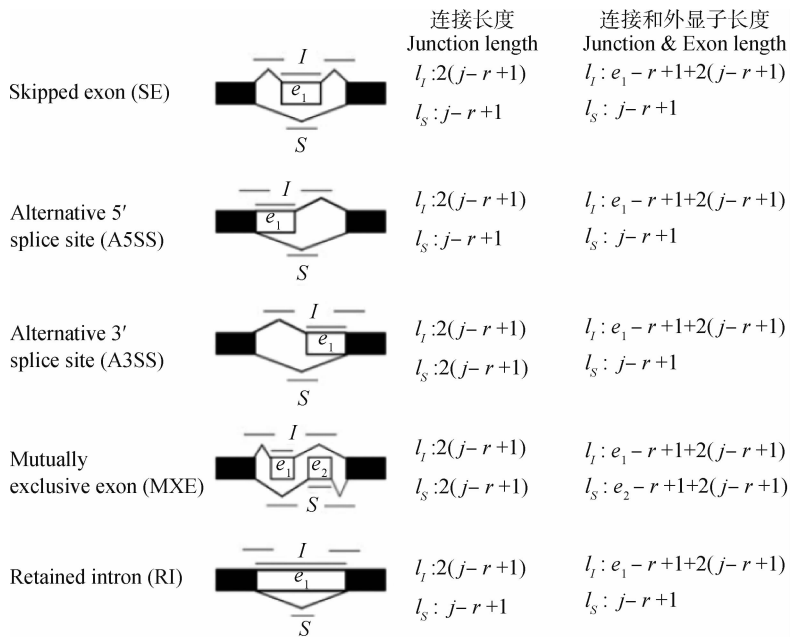
RNA-seq 文库构建和测序均由深圳华大基因科技有限公司完成。分别取 3 只肉鸡的胸肌和腹脂组织 RNA 样品各 3 份, 构建 6 个文库, 使用 Illumina HiSeq 2500 测序平台进行测序, 测序获得长度为 150 bp 的序列 (reads)。去除带头的 reads、未知碱基 N 含量大于 5% 的 reads、去除低质量的 reads (质量值低于 15 的碱基占该 reads 总碱基数的比例大于 20% 的 reads 为低质量的 reads), 得到 clean reads。

1.4 肉鸡胸肌和腹部脂肪组织参考基因组比对及 AS 事件和 DSG 检测

得到 clean reads 之后, 使用 HISAT 软件^[16]将

clean reads 比对到鸡参考基因组序列。使用 StringTie 软件^[17]对每个样品进行转录本重构, 然后用 Cuffmerge 软件^[18]将所有样品的重构信息整合在一起, 再使用 Cuffcompare 软件将整合后的转录本与参考注释信息进行比较, 计算转录本数量。

使用 rMATS 软件^[19]检测样品中 5 种 AS 事件, 分别为外显子跳跃 (skipped exon, SE)、可变供体位点 (alternative 5' splicing site, A5SS)、可变受体位点 (alternative 3' splicing site, A3SS)、互斥外显子 (mutually exclusive exons, MXE) 和单内含子保留 (retained intron, RI), 并检测肌肉和脂肪组织样品间的 DSG。rMATS 软件是一款用于 RNA-seq 数据检测 DSG 的软件, 它可以计算 inclusion 亚型和 skipping 亚型的相对丰度 (图 1), 同时计算相应的 *P*-value 和 FDR 值来衡量样品间剪接差异的显著性。本研究中使用 $\text{FDR} \leq 0.05$ 为判断标准, 小于该阈值的 DSG 定义为显著差异的 DSG。



I. 内含子异构体读长; *S.* 跳跃异构体读长; *j.* 连接长度; $e_1, e_2.$ 外显子长度; *r.* 读长; $l_j.$ 内含子有效长度; $l_s.$ 外显子异构体有效长度

I. Reads of the inclusion isoform; *S.* Reads of the skipping isoform; *j.* Junction length; $e_1, e_2.$ Exon length; *r.* Read length; $l_j.$ Effective length of the inclusion isoform; $l_s.$ Effective length of the skipping exon isoform

图 1 AS 事件中各种剪接类型的相对丰度计算

Fig. 1 Calculation of relative abundance of different splicing types in AS

1.5 肉鸡胸肌和腹部脂肪组织 DSG 的 GO 功能富集和 KEGG 分析

使用 KOBAS 3.0 软件^[20-21]进行 DSG 的注释、GO 功能富集分析、信号通路 (pathway) 分析, 并对

相关信号通路和基因进行进一步分析。进行 GO 功能富集分析时, 以基因组为背景, 统计每个 GO 分析中基因与背景基因之间的差异, 对 *P* 值进行校正, 定义校正后的 $P < 0.05$ 为这些基因的功能在该 GO

类别中显著富集。进行 KEGG 分析时,以基因组为背景,根据注释结果以及功能分类,将 DSG 进行生物通路分类,校正后的 $P < 0.05$ 时,表明 DSG 富集在一条通路中。同时对通路中 DSG 的表达量进行检测。具体方法为:与参考基因组比对之后,使用 RSEM 软件^[22] 计算基因和转录本的表达水平,采用校正的 $P \leq 0.05$ 来筛选肌肉和脂肪组织基因的差异表达基因。

1.6 数据统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)对肌肉和脂肪组织基因组中的可变剪接数量进行独立样本 T 检验和多重比较(SLD 法),数据结果以“平均数±标准差”表示。

2 结 果

2.1 肉鸡肌肉和脂肪组织 AS 事件鉴定

测序原始数据经过质量控制后,肉鸡胸肌 3 个

组织样分别获得 6.69、6.71 和 6.75 G, 腹脂 3 个组织样分别获得 6.68、6.69、6.73 G 可用于注释分析的序列片段(clean reads)。得到 clean reads 之后,使用 HISAT 软件^[16] 将 clean reads 比对到鸡参考基因组序列。肌肉组织样品对比率分别为 69.18%、69.49% 和 68.47%, 脂肪组织样品对比率分别为 74.60%、73.10% 和 73.75%。相同组织样品间均匀的对比率表明样品之间的数据具有可比性。

肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 AS 事件鉴定结果见表 1。由表 1 可知,肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中分别检测到(5 966.00±111.66)和(6 757.00±156.51)个 AS,脂肪组织中 AS 数量比肌肉组织中高 13.26% ($P < 0.05$)。共检测到的 5 种 AS 类型中,除 MXE 外,脂肪组织中 4 种类型剪接事件(SE、A5SS、A3SS 和 RI)的数量均显著高于肌肉组织 ($P < 0.05$);且以 SE 为主,分别占肌肉和脂肪组织中总 AS 事件数量的 54.92% 和 52.67%。

表 1 肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 AS 事件鉴定

Table 1 The result of alternative splicing (AS) events identified in muscle and fat tissues genome in broilers

项目 Item	肌肉组织 Muscle tissue	脂肪组织 Fat tissue	P 值 P -value
AS 事件总数 Total number of AS	5 966.00±111.66	6 757.00±156.51	0.002
AS 类型 AS type			
SE	3 276.33±65.62	3 558.67±72.11	0.008
A5SS	579.67±20.23	700.67±15.95	0.001
A3SS	989.00±13.86	1 205.33±39.46	0.001
MXE	276.33±11.06	265.67±18.23	0.435
RI	844.67±22.50	1 026.67±35.30	0.002

2.2 肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 鉴定

经 rMATS 软件^[19] 检测分析发现,AA 肉鸡肌肉和脂肪组织中检测到 513 个显著的 DSGs,其中 SE、A5SS、A3SS、MXE 和 RI 5 种类型的 DSG 数量分别为 314、34、17、54 和 94 个(图 2)。DSG 中发生 SE 可变剪接的基因数量最多;其次为 RI 和 MEX;发生这 3 种类型的 DSG 占总 AS 事件数量的 90.06%。

2.3 肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 的 GO 注释

为了进一步了解肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 的功能,使用 KOBAS 3.0 在线软件^[20-21] 对所有 DSG 基因进行了基因注释、基因本体(gene ontology, GO)注释和功能分析。选取校正 $P \leq 0.05$ 的 DSG

作为 GO 富集分析结果(图 3)。通过 GO 富集分析发现,肉鸡肌肉和脂肪组织中 513 个 DSGs 中的 93 个 DSGs 显著富集在细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)类别中的 11 个 GO 项内,同一基因多富集在多个 GO 项中。影响肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 涉及的细胞组分包括细胞(GO:0005623)、细胞部分(GO:0044464)、细胞内(GO:0005622)、细胞外(GO:0044424)、细胞器(GO:0043226)、胞内细胞器(GO:0043229)、细胞质(GO:0005737)、胞浆部分(GO:0044444)8 个 GO 项;还有少量 DSG 分类到分子功能中,包括蛋白质结合(GO:0005515)、磷蛋白结合(GO:0051219)和蛋白质磷酸化氨基酸结合(GO:0045309)3 个 GO 项。

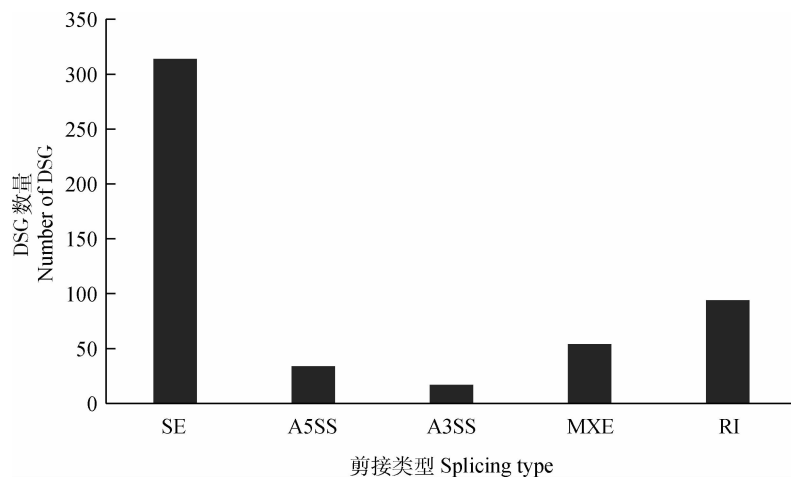


图 2 肉鸡肌肉和脂肪组织差异可变剪接基因数量

Fig. 2 The number of DSG between muscle and fat tissues in broilers

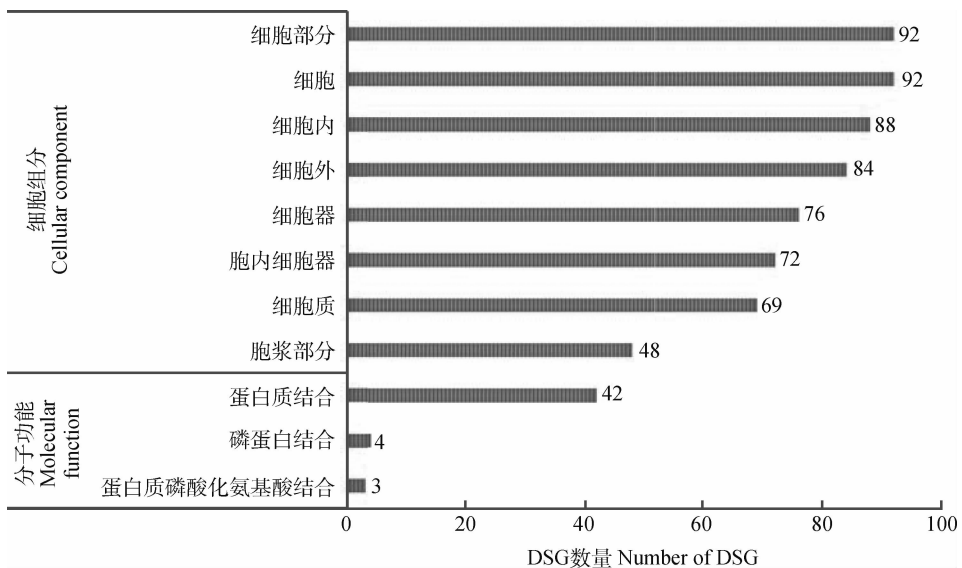


图 3 肉鸡肌肉和脂肪组织基因组 DSG 的 GO 富集结果

Fig. 3 The result of GO analysis for DSG in genome between muscle and fat tissues in broilers

2.4 肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 的通路和相关基因分析

以鸡基因组为参照,使用 KOBAS 3.0 在线软件^[20-21]对肉鸡肌肉和脂肪组织 DSG 进行了通路分析。分析发现,31 个 DSGs 富集在肌动蛋白细胞骨架调节、焦点粘连、丙酮酸代谢和细胞内吞作用 4 条信号通路中。肌动蛋白细胞骨架调节与焦点粘连两条信号通路关系密切,其中 10 个基因均在两条信号通路之中(表 2)。肌动蛋白细胞骨架在维持细胞形状、调控细胞粘连等方面具有重要功能;焦点粘连则

参与细胞膜受体和肌动蛋白骨架之间的结构连接;丙酮酸代谢作为三羧酸循环的重要组成部分,在调解物质代谢中具有重要作用;细胞内吞作用在分子运输转运方面具有重要作用。

为了验证 DSG 在肌肉和脂肪组织中的表达情况,以脂肪组织为参照,经 RSEM 软件^[22]分析,信号通路中的 31 个 DSGs 有 13 个在肌肉组织中上调表达,4 个下调表达;其中 14 个 DSGs(占信号通路基因中 48.39%)表达量在肌肉和脂肪组织中未发生显著的表达量变化(表 3)。

表 2 肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 DSGs 的通路分析结果

Table 2 The result of pathway analysis for DSGs in genome between muscle and fat tissues in broilers

代谢通路 Pathway	DSG 数量 Number of DSGs	KEGG ID	校正的 <i>P</i> 值 Corrected <i>P</i> -value	DSG 名称 DSG name
肌动蛋白细胞骨架调节 Regulation of actin cytoskeleton	13	04810	0.00	<i>CRK, ENAH, FGFR1, ITGA3, ITGA7, ITGB1, MRAS, MYL9, P38C-CRK, PPP1R12A, PPP1R12B, PXN, ROCK2</i>
焦点粘连 Focal adhesion	11	04510	0.02	<i>CCND3, CRK, ITGA3, ITGA7, ITGB1, MYL9, P38C-CRK, PPP1R12A, PPP1R12B, PXN, ROCK2</i>
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	5	00620	0.03	<i>ACSS2, HAGH, LDHD, PDHA1, PKM</i>
细胞内吞作用 Endocytosis	12	04144	0.04	<i>AP2B1, CAPZB, CCDC53, CLTCL1, CYTH1, EPN3, FAM21A, GIT2, H3KBP1, SPG21, USP8, VPS29</i>

表 3 肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 DSGs 差异表达结果

Table 3 The result of differential expression levels for DSGs in genome between muscle and fat tissues in broilers

序号 N	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	差异表达倍数 Fold change	校正的 <i>P</i> 值 Corrected <i>P</i> -value	上/下调 Up/Down-regulation
1	<i>ACSS2</i>	419158	-0.41	1.59×10^{-38}	Down
2	<i>AP2B1</i>	417525	-2.42	0.01	*
3	<i>CAPZB</i>	396418	0.53	5.78×10^{-28}	Up
4	<i>CCDC53</i>	418094	-5.21	0.42	*
5	<i>CCND3</i>	419928	0.86	2.26×10^{-13}	Up
6	<i>CLTCL1</i>	416765	0.36	4.86×10^{-53}	Up
7	<i>CRK</i>	107054794	-2.37	0.08	*
8	<i>CYTH1</i>	422085	-1.13	2.78×10^{-9}	*
9	<i>ENAH</i>	374180	-246.06	0.99	*
10	<i>EPN3</i>	100859290	0.30	4.38×10^{-46}	Up
11	<i>FAM21A</i>	423772	-0.73	9.97×10^{-14}	Down
12	<i>FGFR1</i>	396516	-61.85	0.96	*
13	<i>GIT2</i>	374035	0.99	2.78×10^{-5}	Up
14	<i>HAGH</i>	416537	0.45	6.14×10^{-37}	Up
15	<i>ITGA3</i>	373946	-0.50	1.69×10^{-21}	Down
16	<i>ITGA7</i>	101749098	0.41	4.32×10^{-21}	Up
17	<i>ITGB1</i>	374058	-0.99	4.90×10^{-8}	Down
18	<i>LDHD</i>	415689	0.47	3.38×10^{-10}	Up
19	<i>MRAS</i>	395149	0.72	0.00	Up
20	<i>MYL9</i>	396215	-1.10	3.46×10^{-6}	*
21	<i>P38C-CRK</i>	417553	-1.58	0.60	*

(续表 3 Continued)

序号 N	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	差异表达倍数 Fold change	校正的 P 值 Corrected P-value	上/下调 Up/Down-regulation
22	<i>PDHA1</i>	418610	1.89	0.01	*
23	<i>PKM</i>	396456	0.15	9.17×10^{-165}	Up
24	<i>PPP1R12A</i>	396020	35.11	0.93	*
25	<i>PPP1R12B</i>	395478	0.33	2.40×10^{-41}	Up
26	<i>PXN</i>	395832	0.89	0.01	Up
27	<i>ROCK2</i>	374182	0.66	1.15×10^{-7}	Up
28	<i>SH3KBP1</i>	418608	-1.81	0.11	*
29	<i>SPG21</i>	415526	-3.43	0.18	*
30	<i>USP8</i>	415451	-2.09	0.01	*
31	<i>VPS29</i>	416867	-3.39	0.22	*

使用 RSEM 软件计算基因和转录本的表达水平,采用校正的 $P \leq 0.05$ 来筛选肌肉和脂肪组织的差异表达基因;Up 表示基因在肌肉组织中上调,脂肪组织中下调,Down 表示基因在肌肉组织中下调,在脂肪组织中上调; * 表示基因表达量差异不显著。The expression level of genes and transcripts were calculated using RSEM software. Genes with corrected P -value ≤ 0.05 were considered DEGs. Up indicted gene was up-regulated expression in muscle tissue and down-regulated expression in fat tissue; Down indicted gene was down-regulated expression in muscle tissue and up-regulated expression in fat tissue; * indicted the genes expression level were not different between muscle and fat tissues

3 讨论

自 1978 年 Gilbert^[23] 发现 AS 现象以来,Ensembl 数据库^[24] 已经收录了人、小鼠、斑马鱼、鸡、鸭、猪、牛、羊等 80 多种生物的可变剪接事件。基于高通量 RNA-seq 技术挖掘基因组 AS 的应用^[25],使得人、小鼠、猪、牛、果蝇等多个物种基因组的可变剪接事件得到了全面的鉴定和分析^[14]。冉茂良等^[14] 研究发现,AS 事件具有发育时期特异性。徐铁山等^[26] 在北京鸭肌肉和皮脂中分别发现了 5 958.00 和 7 528.67 个 AS。本研究中,在肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中分别检测到 5 966.00 和 6 757.00 个 AS,其中脂肪组织中 AS 数量显著高于肌肉组织。由此可见,可变剪接事情具有组织特异性,脂肪组织发生 AS 事件的频率远远高于肌肉组织。本研究发现,肌肉和脂肪组织中 DSG 发生 SE 可变剪接的基因数量最多。SE 是选择性剪接最简单和最普遍存在的一种方式,这与 Li 等^[27] 对猪肌肉组织中差异剪接类型的研究相一致,说明 SE 可变剪接类型在肉鸡肌肉和脂肪组织中发生频率较高。

差异剪接分析对于理解细胞和器官的生理过程十分重要^[28]。为了探索肌肉和脂肪组织生理过程的差异,本研究进行了肉鸡肌肉和脂肪组织间差异

剪接分析。肉鸡肌肉和腹脂组织基本组成差异较大,前者由肌纤维构成,后者则属于白色脂肪,由脂肪细胞构成^[29]。本研究肌肉和脂肪组织间的 DSG 的功能大部分与细胞基本结构相关。由此可见,差异剪接在调控肌肉和脂肪组织细胞的基本组成上具有重要作用。信号通路分析发现,DSG 富集在肌动蛋白细胞骨架调节、焦点粘连、丙酮酸代谢和细胞内吞作用 4 条信号通路中,这些通路与肌肉组成、脂肪代谢等密切相关。由此可见,肌肉和脂肪组织细胞组成和行使功能的差异,部分源于基因组中差异可变剪接。可变剪接调控的基因通常不同于差异表达所调控的基因。因此,在基因组水平描述基因调控时,差异剪接与差异基因表达通常互相补充^[15]。本研究发现,约 50% 的 DSG 在肌肉和脂肪组织中的表达水平未发生显著变化,说明肌肉和脂肪组织中 DSG 和差异表达基因发挥各自的功能,共同调控肌肉和脂肪组织的基本组成、生理功能等。

对于 DSG 可以通过剪接因子对整个基因组的可变剪接进行研究,也可以针对某一基因进行具体的结构和功能的研究。剪接因子在 mRNA 前体剪接过程中发挥重要作用。研究发现,可以通过剪接因子 SRSF10 对鸡基因组的剪接作用来研究整个基因组中的可变剪接^[30]。在与本试验相关的研究中

发现,对脂肪代谢具有重要调控功能的 Apelin 信号通路对肉鸡腹脂的沉积具有重要的调控作用(未发表)。其中 Apelin 前体由 77 个氨基酸组成,编码基因通过可变剪接可指导合成多种成熟的 Apelin 活性多肽片段: Apelin-36、Apelin-17、Pyr-apelin-13、Apelin-13 和 Apelin-12 等^[31]。因此,对 *Apelin* 基因的可变剪接、时空表达规律以及功能验证等研究,能够加深对肉鸡中该基因 DSG、基因功能的深入理解。

4 结 论

4.1 本研究在肉鸡肌肉和脂肪组织中分别检测到(5 966.00±111.66)和(6 757.00±156.51)个可变剪接事件,脂肪组织发生可变剪接的频率显著高于肌肉组织($P=0.002$)。

4.2 本研究鉴定的 5 种可变剪接类型中以外显子跳跃为主,分别占肌肉和脂肪组织中可变剪接事件的 54.92%和 52.67%。

4.3 本研究在肌肉和脂肪组织基因组中检测到 513 个显著的 DSGs,其中 93 个 DSGs 显著富集于细胞组分和分子功能中;31 个 DSGs 富集在肌动蛋白细胞骨架调节、焦点粘连、丙酮酸代谢和细胞内吞作用信号通路中,14 个 DSGs 在肌肉和脂肪组织基因组中的表达水平未发生显著变化。

4.4 本研究对肉鸡肌肉和脂肪组织基因组中 DSG 的鉴定与分析,为研究可变剪接及其调控的机制、组织间差异剪接的多样性提供理论依据。

注:DSGs 的详细信息需要者可向作者索取。

参考文献(References):

- [1] TRESS M L, ABASCAL F, VALENCIA A. Alternative splicing may not be the key to proteome complexity[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(2): 98-110.
- [2] KELEMEN O, CONVERTINI P, ZHANG Z Y, et al. Function of alternative splicing [J]. *Gene*, 2013, 514(1): 1-30.
- [3] BLENCOWE B J. The relationship between alternative splicing and proteomic complexity [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(6): 407-408.
- [4] LIU Y S, GONZÁLEZ-PORTA M, SANTOS S, et al. Impact of alternative splicing on the human proteome[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(5): 1229-1241.
- [5] DE MIGUEL F J, PAJARES M J, MARTÍNEZ-TERROBA E, et al. A large-scale analysis of alternative

splicing reveals a key role of QKI in lung cancer[J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(9): 1437-1449.

- [6] LI Y, YUAN Y. Alternative RNA splicing and gastric cancer[J]. *Mutat Res*, 2017, 773: 263-273.
- [7] LI H, WANG Z Y, MA T Y, et al. Alternative splicing in aging and age-related diseases[J]. *Transl Med Aging*, 2017, 1: 32-40.
- [8] 黄艳群, 陈文, 李宁, 等. 鸡 *Lmbr1* 基因一种异常可变剪接的克隆和表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(5): 518-523.
- HUANG Y Q, CHEN W, LI N, et al. The cloning and expression analysis of one abnormal alternative splice in chicken *Lmbr1*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(5): 518-523. (in Chinese)
- [9] 杨秀芹, 翟春媛, 李海涛, 等. 猪 *TLR4* 基因可变剪接体的鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8): 1051-1056.
- YANG X Q, ZHAI C Y, LI H T, et al. Identification of alternative splicing isoforms of pig *TLR4* mRNA [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(8): 1051-1056. (in Chinese)
- [10] 黄正洋, 陈阳, 李欣钰, 等. 鸭 *TLR4* 基因可变剪接体的克隆、鉴定及组织表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(5): 697-702.
- HUANG Z Y, CHEN Y, LI X Y, et al. Identification and expression analysis of alternative splicing of *TLR4* in duck [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(5): 697-702. (in Chinese)
- [11] 张天, 李祥龙, 周荣艳, 等. 不同毛色山羊皮肤组织 *Agouti* 基因剪接体类型研究[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(11): 1934-1943.
- ZHANG T, LI X L, ZHOU R Y, et al. Study on *Agouti* spliceosome types in goat skin with different coat color [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(11): 1934-1943. (in Chinese)
- [12] 杜琛, 付绍印, 高鸿雁, 等. 绒山羊肌肉脂肪细胞成熟前后比较转录组分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(5): 714-721.
- DU C, FU S Y, GAO H Y, et al. Transcriptome analysis of intramuscular preadipocytes and mature adipocyte in cashmere goats [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(5): 714-721. (in Chinese)
- [13] CHACKO E, RANGANATHAN S. Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: Implications in bovine as a model for human diseases [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(S3): S11.

- [14] 冉茂良,陈 斌,李 智,等. 基于 RNA-seq 测序数据鉴定和分析猪基因组可变剪接事件[J]. 中国科学:生命科学,2016,46(3):274-284.
RAN M L, CHEN B, LI Z, et al. Identification and analysis of alternative splicing events in *Sus Scrofa* using RNA-seq data[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46(3):274-284. (in Chinese)
- [15] HOOPER J E. A survey of software for genome-wide discovery of differential splicing in RNA-Seq data[J]. *Hum Genomics*, 2014, 8:3.
- [16] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4):357-360.
- [17] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(3):290-295.
- [18] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(3):562-578.
- [19] SHEN S, PARK J W, LU Z X, et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(51):E5593-E5601.
- [20] WU J M, MAO X Z, CAI T, et al. KOBAS server: A web-based platform for automated annotation and pathway identification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(S2):W720-W724.
- [21] XIE C, MAO X Z, HUANG J J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(S2):W316-W322.
- [22] LI B, DEWEY C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12:323.
- [23] GILBERT W. Why genes in pieces? [J]. *Nature*, 1978, 271(5645):501.
- [24] STALKER J, GIBBINS B, MEIDL P, et al. The Ensembl Web site: Mechanics of a genome browser[J]. *Genome Res*, 2004, 14(5):951-955.
- [25] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1):57-63.
- [26] 徐铁山, 顾丽红, 侯水生, 等. 应用 RNA-seq 数据开展鸭基因组可变剪接的鉴定与分析 [J]. 中国家禽, 2016, 38(17):10-16.
XU T S, GU L H, HOU S S, et al. Identification and analysis of alternative splicing in duck genome using RNA-seq data[J]. *China Poultry*, 2016, 38(17):10-16. (in Chinese)
- [27] LI B J, DONG C, LI P H, et al. Identification of candidate genes associated with porcine meat color traits by genome-wide transcriptome analysis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35224.
- [28] ZIMMERMANN K, JENTSCH M, RASCHE A, et al. Algorithms for differential splicing detection using exon arrays: A comparative assessment[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):136.
- [29] ZHANG S, MCMILLAN R P, HULVER M W, et al. Chickens from lines selected for high and low body weight show differences in fatty acid oxidation efficiency and metabolic flexibility in skeletal muscle and white adipose tissue[J]. *Int J Obesity*, 2014, 38(10):1374-1382.
- [30] ZHOU X X, WU W W, WEI N, et al. Genome-wide analysis of SRSF10-regulated alternative splicing by deep sequencing of chicken transcriptome[J]. *Genom Data*, 2014, 2:20-23.
- [31] BOUCHER J, MASRI B, DAVIAUD D, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(4):1764-1771.

(编辑 郭云雁)