

鸭 *A-FABP* 基因的克隆及其组织表达

张 军¹, 董 彪², 张 红¹, 储冬生¹, 徐国庆¹,

龚道清^{1*}, 段修军², 赵旭庭², 顾志良³

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009;

2. 国家级水禽种质资源基因库, 泰州 225300; 3. 常熟理工学院生物系, 常熟 215500)

摘 要: 本文采用 RT-PCR 方法从 35 周龄母鸭脂肪组织中克隆了 *A-FABP* 基因的 cDNA 序列, 其长度为 422 bp, 包含了 1 个 399 bp 的完整 CDS, 编码 132 个氨基酸。该序列与家禽(鹅、鸡)和哺乳动物(人、小鼠、猪、牛)的 *A-FABP* 基因序列约有 94% 和 73.4%~75.7% 的同源性, 而相应氨基酸序列的同源性为 92.4% 和 72.0%~77.3%。半定量 RT-PCR 研究结果为 *A-FABP* 基因在间脑、肺和肾组织中不表达, 在脂肪组织中的表达明显高于其他组织($P < 0.5$)。表明 *A-FABP* 基因在动物进化中具有高度保守性, 该基因的表达具有组织特异性。

关键词: 鸭; *A-FABP* 基因; 克隆; 组织表达

中图分类号: S834.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)06-0819-04

Cloning and Tissue Specific Expression of Duck *A-FABP* Gene

ZHANG Jun¹, DONG Biao², ZHANG Hong¹, CHU Dong-sheng¹, XU Guo-qing¹

GONG Dao-qing^{1*}, DUAN Xiu-jun², ZHAO Xu-ting², GU Zhi-liang³

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. National Waterfowl Germplasm Resource Pool, Taizhou 225300, China; 3. Department of Biology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: A 422 bp cDNA of *A-FABP* gene was cloned and sequenced from the adipose tissue of a 35-week-old female duck, it contains a complete 399 bp CDS, encoding 132 amino acids. The duck *A-FABP* gene shared about 94% homology with that of poultry (goose and chicken), and 73.4%-75.7% homology with that of mammal (human, mouse, pig and cattle), while the corresponding protein shared more than 92.4% and 72.0%-77.3% homology with the above animals' *A-FABP* protein, respectively. The results of the semi-quantity RT-PCR indicated that duck *A-FABP* mRNA did not expressed in diencephalons, lung and kidney, and its mRNA expression level of adipose tissue was higher than that of other tissues ($P < 0.5$). *A-FABP* gene is of high conservation in the course of animal evolution. The expression level of *A-FABP* mRNA is particular to tissues.

Key words: duck; *A-FABP* gene; cloning; tissue expression

脂肪酸结合蛋白(Fatty acid binding protein, FABP)是一类小分子细胞内蛋白质,参与细胞内脂肪酸的运输,可将脂肪酸从细胞膜上运送到脂肪酸氧化和甘油三酯及磷脂的合成位置。除细胞外液以

及特定的细胞类型外,这些蛋白几乎存在于哺乳动物的所有组织中^[1]。1972年, Ockner 首先在大鼠的小肠黏膜中发现了 *FABP* 基因^[2], 随后又在动物肠、心、脑、脂肪等组织中发现了 *FABP* 基因。这些

收稿日期: 2007-07-10

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004055); 江苏省高校自然科学基金资助项目(06KJB230130)

作者简介: 张 军(1969-), 男, 江苏盐城人, 副教授, 硕士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: zhangjun@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 龚道清, 教授, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: yzggong@163.com

基因是以第 1 次被分离和鉴定的组织来命名,目前已经发现 11 种以上的类型。脂肪型脂肪酸结合蛋白(A-FABP)基因就是其中之一,该蛋白分子量为 14.1 ku,只在脂肪细胞中表达^[3]。鸡、猪、人和小鼠的 A-FABP 基因分别被定位于第 2、4、8、3 号染色体上^[4]。鸡和哺乳动物均含有 4 个外显子和 3 个内含子,外显子高度同源,内含子的长度在物种间存在较大差异。在脂肪细胞的分化过程中伴随着有关脂类代谢酶类以及 A-FABP 表达与活性的显著增强^[5]。哺乳动物的 A-FABP 是甘油三酯的贮存库,在甘油三酯的形成以及脂溶解的过程中 A-FABP 储存或释放出大量的脂肪酸,从而参与调控生成及溶解的生化循环^[6]。猪^[7]和鸡^[8-9]的 A-FABP 基因被作为肌内脂肪(IMF)含量的候选基因。本实验室用单链构象多态(SSCP)方法对 A-FABP 基因的第 2、3 外显子及第 2 内含子进行了单核苷酸多态性(SNP)检测,发现了 4 个单核苷酸突变,在所测群体中产生 3 种基因型,且基因型在鸭群中的分布存在明显差异^[10]。本文采用 RT-PCR 技术从鸭脂肪组织中克隆 A-FABP 基因序列,并检测该基因在鸭不同组织中的表达规律,为该基因的功能以及能否作为肉鸭体脂等性状的标记辅助选择奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物及总 RNA 提取

取 3 只 35 周龄母鸭(昆山麻鸭)脂肪、肝、骨骼肌、心、脾、小肠、腺胃、肌胃、间脑、卵巢、肺和肾 12 个组织,迅速置于液氮中。用 Trizol (Invitrogen, USA)提取总 RNA,用 DNaseI(TaKaRa, Japan)对总 RNA 进行消化,调整浓度后(1 μg/μL)分装保存于 -70℃ 冰箱中。

1.2 分子克隆及测序

反转录按 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0. (TaKaRa, Japan)反转录试剂盒的要求进行。反转录反应液组成为:4 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μL 10× RT Buffer, 7.5 μL RNase Free dH₂O, 2 μL dNTP Mixture (10 mmol/L each), 0.5 μL RNase Inhibitor (40 U/μL), 1 μL AMV Reverse Transcriptase (5 U/μL), 1 μL Oligo dT-Adaptor Primer (2.5 pmol/L), 2 μL sample RNA (总 RNA ≤ 2 μg)。反转录反应条件:42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。

根据 GenBank 发表的鹅、鸡、人和鼠等物种的

A-FABP 基因保守区域,设计引物用于以鸭脂肪组织 cDNA 为模板的 PCR 扩增,以获得鸭 A-FABP 基因 cDNA 序列。引物序列如下:AF1: 5'-AGACTGCTACCTGGCCTGACA-3', AR1: 5'-GTTCCCATCCACCACTTTTC-3'; AF2: 5'-TTT-GCTACCAGGAAGATGGC-3', AR2: 5'-TCAT-GCTCTTTCGTAAACTCT-3'。引物由上海桑尼生物公司合成。

PCR 扩增在 25 μL 反应体系中进行:0.2 μL rTaq 聚合酶(5 U/μL, TaKaRa Tokyo, Japan), 2.5 μL 10× PCR Buffer (without Mg²⁺), 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L each), 1.5 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 上、下游引物各 1 μL (10 pmol/L), 1 μL RT 产物,加灭菌水至 25 μL。PCR 扩增条件:95℃ 变性 5 min;95℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 进行 30 次循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。

将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,用上海华舜小量胶回收试剂盒回收目的片段,将回收片段同 T 载体连接并转化到感受态细胞中,挑取阳性菌落进行 PCR 鉴定并于液体培养基中摇菌培养,回收质粒,经酶切鉴定后送于上海桑尼生物公司测序。

1.3 不同组织 mRNA 半定量表达

本研究同时提取 12 个组织的总 RNA,用半定量 RT-PCR 的方法来检测 A-FABP 基因在组织中的特异性表达。半定量 RT-PCR 以鸭持家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参,引物序列为 GF: 5'-ACTGTCAAGGCTGAGAATGG-3', GR: 5'-TAAGACCCTCCACAATGCC-3'; 目标基因引物为 AF1/AR1, 2 个基因引物的设计均跨内含子。RT-PCR 条件基本同 1.2。本研究采用多次重复来减少误差,确保得到可信的试验结果。

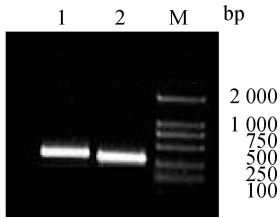
1.4 统计分析软件

采用 Primer 5.0 软件设计引物,获得的序列用 DNAMAN 软件进行拼接及同源性分析。半定量 PCR 结果用 Ultra-Violet Products Ltd 中的软件分析,并用 SPSS12.0 求得平均数、标准差,并用 Excel 作出柱状图。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 分析

以鸭脂肪组织总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测 PCR 产物(图 1)。



1. The RT-PCR product of primer AF1/AR1;
2. The RT-PCR product of primer AF2/AR2;
M. DL-2000

图 1 鸭 *A-FABP* 基因 RT-PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 1% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of duck *A-FABP* gene

2.2 序列分析

通过克隆、测序,获得 2 个 cDNA 片段,用 DNAMAN 软件进行拼接,得到 422 bp 的 cDNA,含有 1 个 399 bp 的开放阅读框和 23 bp 的 5' 非编码区,开放阅读框编码了 132 个氨基酸 (Accession

No: DQ358123)。

用 DNAMAN 软件进行同源性分析,本研究所获核苷酸序列与鹅、鸡 *A-FABP* 基因序列同源性较高,约为 94%,与人、小鼠、牛和猪等物种 *A-FABP* 基因序列同源性较低,在 73.4%~75.7% 之间。进一步进行氨基酸序列同源性比较可知,鸭与鹅、鸡的 *A-FABP* 基因氨基酸序列同源性在 92.4% 以上,而与哺乳动物该基因的氨基酸序列的同源性在 72.0%~77.3% 之间(表 1)。

2.3 不同组织 mRNA 表达的结果

半定量 PCR 过程中所用的持家基因 *GAPDH* 经过克隆、测序、同源性比较 (Accession No: AY436595),确认是鸭的 *GAPDH* 的一部分,长为 349 bp; *A-FABP* 基因用引物 AF1/AR1 扩增。经过预试验可知,在 RT-PCR 过程中 *A-FABP* 和 *GAPDH* 在第 32 次循环时均未达到平台期。在本试验半定量 PCR 中, *A-FABP* 基因采用 29 个循环,

表 1 鸭 *A-FABP* 基因与其他物种 *A-FABP* 基因的核苷酸及氨基酸序列同源性比较

Table 1 Homologous comparison of nucleotide and amino acid sequences of encoding *A-FABP* gene between duck and other species

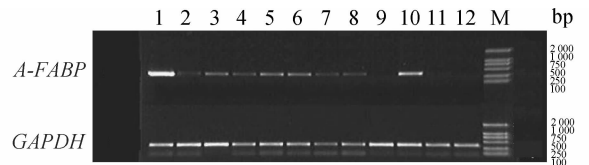
物种 Specie	登录号 Accession Number	核苷酸同源性/% Nucleotide identity	氨基酸同源性/% Amino acid identity
鹅 Goose	AF472610	94.0	92.4
鸡 Chicken	NM-204290	93.5	93.2
人 Human	BC003672	75.2	77.3
小鼠 Mouse	NM-024406	73.4	75.8
猪 Pig	Y16039	75.4	74.2
牛 Cattle	X89244	75.7	72.0

GAPDH 基因采用 30 个循环,均处于指数生长期。

半定量 RT-PCR 研究表明,除间脑、肺和肾组织外, *A-FABP* 基因在鸭其他组织中均表达; *A-FABP* 基因在脂肪组织中的表达量明显高于其他组织 ($P < 0.5$); 除肌胃外, *A-FABP* 基因在肝脏组织中的表达量明显低于其他组织; *A-FABP* 基因在卵巢组织中的表达量明显高于肌胃组织; *A-FABP* 基因在其他组织两两之间表达差异不明显(图 2、3)。

3 讨论

在哺乳动物中,人、鼠、猪等物种的 *A-FABP* 基因已经被克隆出来,这些物种的 *A-FABP* 基因在基因长度、外显子数目和大小、内含子大小、碱基组成、

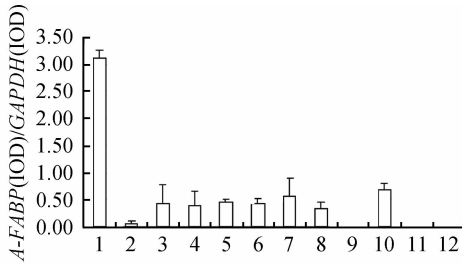


1. Adipose; 2. Liver; 3. Skeletal muscle; 4. Heart; 5. Spleen; 6. Small intestine; 7. Glandular stomach; 8. Muscular stomach; 9. Diencephalon; 10. Ovary; 11. Lung; 12. Kidney. The same as below

图 2 鸭 *A-FABP* 基因在不同组织中表达的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 1% agarose gel electrophoresis of duck *A-FABP* gene mRNA expression in various tissues

5' 和 3' 端非编码区序列、局部碱基序列等方面存在着很强的同源性。本研究通过克隆、测序得到鸭 *A-*



纵坐标表示 A-FABP 与 GAPDH mRNA IOD 比值;横坐标表示不同组织

The vertical axis indicates the value of the A-FABP mRNA quantity relative to GAPDH mRNA quantity, whereas the horizontal axis indicates the various tissues

图 3 鸭 A-FABP mRNA 在不同组织中的半定量表达柱状图

Fig. 3 The histogram of the expression of duck A-FABP gene mRNA in various tissues by the semi-quantitative PCR

FABP 基因的 cDNA 序列 (Accession No: DQ358123),并通过同源性比较加以确认。由该序列与鹅、鸡、人和鼠等物种的 A-FABP 基因核苷酸及氨基酸序列的同源性可知,鸭与同属于家禽的鸡、鹅同源性最高,与哺乳动物的同源性相对较低,这与动物在分化过程中向不同方向分化的结果相一致。同源性分析结果同时也揭示了 A-FABP 基因在物种进化中是高度保守的,有相似的生物学功能,并在动物进化过程中起着重要的作用。

基因的表达分为 mRNA 水平和蛋白质水平。mRNA 的表达较好地反映着遗传基础(DNA)与功能(蛋白质)间的联系,因此,人们常常通过研究 mRNA 表达来了解基因的作用规律。本研究采用半定量 RT-PCR 法对 A-FABP 基因在 35 周龄昆山麻鸭的各个组织中的表达特异性进行了研究,鸭 A-FABP 基因在脂肪组织中表达量最高,这与鸡^[8]和猪^[11]的研究报道一致;鹅 A-FABP 在脾、小肠组织中不存在表达,在心和肾中存在高度表达^[12],这与本实验鸭的 A-FABP 基因表达结果存在差异。由此可见,A-FABP 基因在组织中的表达因物种而存在差异,这是否与物种各自的脂肪沉积形式及部位存在相关,还需进一步研究。

参考文献:

[1] HAUNERLAND N H, CHISHOLM J M. Fatty acid binding protein in flight muscle of the locust, *Schis-*

tocerca gregaria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1 047(3): 233-238.

- [2] OCKNER R K, MANNING J A, POPPENHAUSEN R B, et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues[J]. *Science*, 1972, 177(43): 56-58.
- [3] FISHER R M, ERIKSSON P, HOFFSTEDT J, et al. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(10): 1 268-1 273.
- [4] GERBENS F, RETTENBERGER G, LENSTRA J A, et al. Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene[J]. *Mammalian Genome*, 1997, 8(5): 328-332.
- [5] FISHER R M, THORNE A, HAMSTEN A, et al. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 239 (1-2): 95-100.
- [6] BENNAARS-EIDEN A, HIGGINS L, HERTZEL A V, et al. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (52): 50 693-50 702.
- [7] 王存芳. 猪 H-FABP 和 A-FABP 基因的多态性及其与肌内脂肪性状关系的研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2002.
- [8] 王启贵. 鸡 FABP 基因克隆、表达特性及功能研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004.
- [9] 李文娟, 李宏宾, 文杰, 等. 鸡 H-FABP 和 A-FABP 基因表达与肌内脂肪含量相关研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(5): 417-423.
- [10] 龚道清, 张红, 顾志良, 等. 鸭脂肪酸结合蛋白基因的克隆和序列多态型分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(3): 232-236.
- [11] ARMSTRONG M K, BERNLOHR D A, STORCH J, et al. The purification and characterization of a fatty acid binding protein specific to pig (*Sus domesticus*) adipose tissue [J]. *The Biochemical Journal*, 1990, 267(2): 373-378.
- [12] 敖金霞. 鹅 GH 和 A-FABP 基因的克隆及其与生长和体组成性状的相关研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.