

GPAT/AIRC 基因对白耳鸡群体 肌肉肌苷酸含量的遗传效应分析

张学余¹, 束婧婷¹, 韩威¹, 陈国宏²

(1. 中国农业科学院 家禽研究所, 江苏 扬州 225003; 2. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 以 GPAT/AIRC 基因为候选基因, 以白耳鸡为试验材料, 采用 PCR-SSCP 方法对 GPAT 基因外显子 2, AIRC 基因外显子 8 进行 SNPs 检测。结果各发现了一个单核苷酸多态性位点。各种基因型与胸肌 IMP 含量的方差分析结果表明: GPAT 基因外显子 2 中 AA 型个体的肌肉肌苷酸含量显著地高于 AB 型和 BB 型个体, AB 型个体也稍高于 BB 型, 但差异不显著; AIRC 基因外显子 8 中 CG 型个体的肌肉肌苷酸含量显著地高于 GG 型和 CC 型个体, GG 型个体的胸肌肌苷酸含量也显著地高于 CC 型。两个基因的单倍型对 IMP 含量也有显著的影响: 单倍型为 AACG 的个体比单倍型为 BBCC 的个体高 1.006 mg/g, 单倍型的遗传效应大于最优秀的单个基因型效应。因此, 可以利用该单倍型对鸡的肉质风味性状进行标记辅助选择。

关键词: GPAT 基因; AIRC 基因; 单核苷酸多态性; 肌苷酸; 单倍型; 白耳鸡

中图分类号: S 831.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2009) 04-0557-05

Analysis of the Genetic Effects of GPAT/AIRC Genes on IMP Content in Baier Chicken

ZHANG Xue-yu¹, SHU Jing-ting¹, HAN Wei¹, CHEN Guo-hong²

(1. Institute of Poultry Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003 China;
2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009 China)

Abstract: This study was designed to investigate the effect of GPAT/AIRC gene on muscle IMP content in Baier chickens. The primers for the exon2 in GPAT gene and exon8 in AIRC gene were designed and the SNPs were detected by PCR-SSCP and DNA sequencing. One SNP were detected in exon2 of GPAT gene and exon8 of AIRC gene, respectively. The least square analysis showed that AA genotype birds had significant higher IMP content than AB and BB genotype birds, AB genotype birds also had a little higher IMP content than BB genotype birds, but the difference was not significant in GPAT gene exon 2. In AIRC gene exon 8, CG was the excellent genotype, individuals with CG genotype had significantly higher IMP content than GG and CC genotype birds, GG genotype birds also had significantly higher IMP content than CC genotype birds. The haplotypes of GPAT gene exon 2 and AIRC gene exon 8 also had significant genetic effect on IMP content. The IMP Content of the individuals with AACG haplotype was 1.006 mg/g higher than the individuals with BBCC haplotype. The genetic effect of the haplotype was larger than the excellent single genotype effect. Therefore we putatively drew the conclusion that the haplotypes could be used as the molecular genetic marker to select the chicken for meat quality trait.

收稿日期: 2008-08-12 修回日期: 2008-12-09

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (863-2006A10Z1D8)。

作者简介: 张学余 (1954-), 男, 江苏扬州人, 研究员, 主要从事地方鸡种遗传育种研究。

E-mail: zhangxueyu5697@sina.com

Key words: GPAT gene; AIRC gene; SNPs; inosine monophosphate; haplotype; Baier chicken

大量研究表明, 鸡肉质鲜味特性的主要物质基础是由肌苷酸 (inosine monophosphate, IMP) 所决定的^[1]。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。刘望夷^[2]、苏淑贞^[3]、DAVIDEK^[4] 等人用薄层层析法、陈国宏等^[5] 用液相色谱法分别对鸡和其它禽类肌肉中 IMP 的含量进行了分析研究, 结果表明: 因物种、品种、性别及日龄不同, IMP 含量存在明显的差异, 这表明肌苷酸含量与遗传因素有关, 可能与肌苷酸代谢酶基因的多样性密切相关。

肌苷酸 (IMP) 在体内的合成代谢过程十分复杂, 从头合成涉及 10 种关键酶。谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶 (GPAT) 作为催化次黄嘌呤核苷酸合成过程的一种限速酶, 催化次黄嘌呤合成的第一步反应, 由 GPAT 基因编码其基因结构及表达^[6]。AIRC 基因编码次黄嘌呤核苷酸合成过程中的两种酶: 5-氨基咪唑核苷酸羧化酶 (AIRC) 和 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀酰胺) 核苷酸合成酶 (SAICARs), 它们分别催化次黄嘌呤合成的第六和七步反应。研究表明, 大鼠^[7]、人^[8]、鸡^[9] 的 GPAT 基因与 AIRC 基因紧密连锁, 并且由一个启动子方向转录。通过放射杂交细胞板将鸡的 GPAT/AIRC 基因座定位于 6 号染色体^[10]。根据本实验室已有的研究结果, GPAT 基因外显子 2 中的 29 777 处碱基 A 缺失突变、AIRC 基因外显子 8 中 C5406G 突变跟鸡胸肌肌苷酸含量具有一定的关联 (笔者在不同品种的小样本群体中对该两个基因进行了多态性研究, 发现这两个位

点对 IMP 含量有效应, 但研究结果尚未发表), 为了探讨这两个标记作为肌苷酸含量辅助选择标记的可行性, 本研究在较大规模的白耳鸡群体中进一步对这两个位点的遗传效应进行分析, 同时分析其单倍型对白耳鸡肌肉肌苷酸含量的遗传效应, 为今后深入广泛开展肉品质的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从中国农业科学院家禽研究所国家地方禽种资源基因库白耳鸡保种群中, 抽取 12 周龄白耳鸡 403 只, 取胸肌肌肉 2 g 左右, 进行肌苷酸含量的测定。翅静脉采血 0.5 mL, 肝素钠抗凝, 加裂解液 5 mL, 用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 中, 4 °C 冷藏备用。

1.2 引物序列及 PCR 扩增

根据 GPAT/AIRC 基因已有的研究结果, 选取 GPAT 基因外显子 2 和 AIRC 外显子 8 的引物在白耳鸡群体中进行扩增, 引物序列及相关信息见表 1。扩增反应总体积为 25 μ L, 其中包括: 10 \times buffer 缓冲液, 200 μ mol/L each dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 引物浓度为 1.0 μ mol/L, 1 U Taq DNA 聚合酶, 50 ng 基因组 DNA。反应条件为 94 °C 热变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 或 58 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保温。用 2% 琼脂糖检测 PCR 扩增产物。

表 1 候选基因在染色体上的位置、引物序列和 PCR 产物长度

Tab. 1 Position of candidate gene on chromosome, primer sequences and corresponding PCR product size

基因座 loci	引物序列 primer sequences	片段 /bp fragment	染色体 chromosome	退火温度/°C annealing temperature
GPAT	F 5'AGCATTTCCTCCTTTAT3'	186	6	55.0
	R 5'TCCCTATTCTGATTATTT3' F 5'GGGAGGAAACAAGATGGA3'			
AIRC	R 5'AATTGCACAGGCTGAAGA3'	217	6	58.0
	R5'CTGCTGGTGAGACTGTGAG3'			

1.3 SSCP 分析及多态片段的序列测定

1.5 μL PCR 产物与 6 μL Loading buffer (98 % 去离子甲酰胺, 0.01 mol/L EDTA (pH 8.0), 0.025% 溴酚兰, 0.025% 二甲苯氰 FF, 10 % 甘油) 混合, 98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min, 冰浴 5 min, 经 10 % 中性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis = 39:1) 电泳 (10 V/cm, 10 ~ 12 h) 后, 银染, 拍照。根据 PCR-SSCP 的结果, 选取不同基因型的纯合子各 2 个进行序列测定。PCR 产物经电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒 (BBI, Canada) 回收目标片段、纯化后, 由上海生工生物工程技术有限公司 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪完成序列测定。

1.4 肌苷酸含量测定

参照陈国宏等^[5]方法测定肌肉肌苷酸含量。

1.5 统计分析

线性模型 (linear model) 用于分析 GPAT, AIRC 单个位点基因型、不同位点之间的交互效应

以及单倍型影响肌肉 IMP 含量的遗传效应。模型 A 用于分析 GPAT, AIRC 基因效应以及它们之间的交互效应; 模型 B 用于分析两基因之间的单倍型效应。当交互效应显著时, 使用模型 A; 当交互效应不显著时, 使用模型 B。全部计算用 SAS 软件进行。

模型 A: $Y = \mu + \text{GPAT 基因型效应} + \text{AIRC 基因型效应} + \text{不同基因型间的交互效应} + \text{残差}$

模型 B: $Y = \mu + \text{单倍型效应} + \text{残差}$

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析结果

试验选取的 2 对引物的扩增产物在白耳鸡群体中均表现出了多态性。测序结果跟已有的结果一致: 多态性是由 GPAT 基因外显子 2 中 29 777 处碱基 A 缺失突变和 AIRC 基因外显子 8 中 C5406G 突变引起的。SSCP 图谱、基因型及测序峰图见图 1, 2。

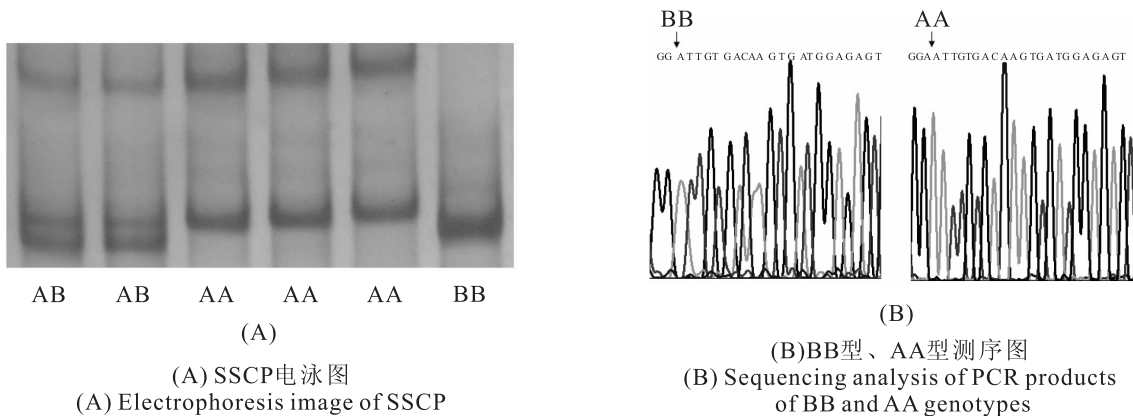


图 1 GPAT 基因外显子 2 中 29777 处 A 缺失多态性
Fig. 1 A29777 deletion polymorphism in the Exon 2 of GPAT gene

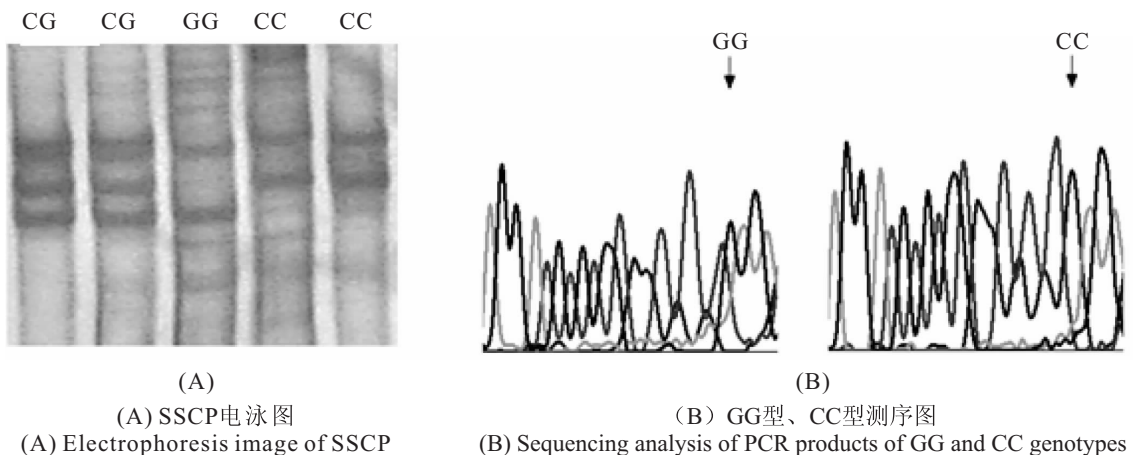


图 2 AIRC 基因外显子 8 中 C5406G 多态性
Fig. 2 C5406G polymorphism in the Exon 8 of AIRC gene

2.2 两个基因位点在白耳鸡群体中的基因频率和基因型频率

分析了 2 个位点在白耳鸡群体中的基因频率和基因型频率，并对各基因的基因型分布进行 χ^2 适合性检验，结果见表 2。由表 2 可以看出，在 GPAT 基因中以 A 为优势等位基因，AIRC 基因中 C 为优势等位基因。白耳鸡在 2 个位点上均处于 Hardy - Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)，说明白耳鸡群体在这两个位点上未曾受到过选育措施的影响。

表 2 2 个候选基因在白耳鸡群体中的基因和基因型频率 (n = 403)

Tab. 2 Genotype and allele frequencies of the PCR-SSCP detection in Baier chickens (n = 403)

候选基因	等位基因	频率	基因型	频率	χ^2
candidate gene	allele	frequency	genotype	frequency	
GPAT	A	0.548	AA(111)	0.275	2.03
	B	0.452	AB(220)	0.546	
			BB(72)	0.179	
AIRC	C	0.519	CC(125)	0.310	5.13
	G	0.481	CG(169)	0.419	
			GG(109)	0.271	

Note: $\chi^2_{0.05(2)} = 5.99$, $\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$

2.3 两个基因位点对白耳鸡胸肌肌苷酸含量的单基因效应

分别对 2 个基因各自 3 种基因型对白耳鸡胸肌 IMP 含量的效应作最小二乘分析，结果见表 3。

表 3 2 个基因不同基因型 IMP 含量比较

Tab. 3 Association between different genotypes in 2 genes and muscle IMP content

基因	基因型	样本数	胸肌肌苷酸含量
gene	genotype	sample size	IMP content
GPAT	AA	111	2.656 ± 0.048 ^a
	AB	220	1.770 ± 0.034 ^b
	BB	72	1.657 ± 0.059 ^b
AIRC	CC	125	1.700 ± 0.055 ^a
	CG	169	2.158 ± 0.048 ^b
	GG	109	2.077 ± 0.059 ^b

注：不同小写字母表示平均数间差异显著 ($P < 0.05$)，下同。

Note: Different lowercase mean significant difference ($P < 0.05$), the same as below.

对于 GPAT 基因来说，AA 型个体的 IMP 含量最高，显著地高于 AB 和 BB 型个体的 IMP 值，分别高出 0.886 mg/g 和 0.999 mg/g，AB 型个体的 IMP 值也略高于 BB 型个体，但两者之间差异不显著；对于 AIRC 基因，CG 和 GG 型个体的胸肌 IMP 含量均显著地高于 CC 型个体，分别高出 0.458 mg/g 和 0.377 mg/g，CG 型个体的 IMP 值略高于 GG 型个体，但差异不显著。

2.4 两个基因位点对白耳鸡胸肌肌苷酸含量的单倍型效应

由于模型 A 统计表明 GPAT 基因与 AIRC 基因间的互作效应不显著 ($P > 0.05$)，因此依据模型 B 分析 GPAT 基因与 AIRC 基因的单倍型效应，结果见表 4。

表 4 GPAT/AIRC 基因单倍型个体胸肌肌苷酸含量

Tab. 4 IMP content in breast muscle of the different haplotypes

基因型	样本数	胸肌 IMP 含量 / (mg · g ⁻¹)
genotype	sample size	IMP content
AACC	18	2.219 ± 0.115 ^a
ABCC	74	1.621 ± 0.057 ^b
BBCC	33	1.593 ± 0.085 ^b
AACG	58	2.826 ± 0.064 ^c
ABCG	87	1.844 ± 0.052 ^{de}
BBCG	24	1.679 ± 0.099 ^{bg}
AAGG	35	2.599 ± 0.082 ^e
GGAB	59	1.848 ± 0.063 ^{fg}
GGBB	15	1.760 ± 0.126 ^{bg}

由表 4 可以看出，单个基因最优的基因型合并后为最优的单倍型，单个基因最劣基因型合并后仍为最劣单倍型，即 AACG 为最优的单倍型，其个体肌苷酸含量显著地高于其它 8 种单倍型个体；BBCC 为最劣单倍型，BBCC 型个体的胸肌肌苷酸含量比 AACG 型个体低 1.006 mg/g。

3 讨论

3.1 GPAT/AIRC 基因单核苷酸多态性与胸肌 IMP 含量的关联分析

本研究在已有的研究基础上，选择与鸡肌肉肌苷酸含量有关联的 GPAT 基因外显子 2 和 AIRC 基因外显子 8 的 2 个多态位点，在白耳鸡保种群体更大规模的基础上进一步进行基因型效应的验证。结果在白耳鸡群体中 2 个位点均

表现了与已有研究相似的多态, 对其遗传效应进行分析后发现, GPAT 基因中 AA 型是优异基因型, 其个体的 IMP 含量显著地高于 AB 和 BB 型个体的 IMP 值; 在 AIRC 基因中, CG 和 GG 型个体的胸肌 IMP 含量均显著地高于 CC 型个体, CG 型个体的 IMP 值略高于 GG 型个体, 但差异不显著。该结果进一步验证了 GPAT/AIRC 基因的 SNPs 位点对肌肉 IMP 含量的差异产生影响, 与鸡肌肉 IMP 含量有关联, GPAT/AIRC 基因应是肌肉肌苷酸含量的主效 QTL 或与其主效 QTL 紧密连锁, 可以作为肌肉肌苷酸含量的辅助选择标记。

3.2 GPAT/AIRC 基因单倍型对胸肌 IMP 含量的遗传效应

肉质性状是由多基因控制的数量性状, 表型值是由内在的多基因和外在的环境共同作用的结果, 仅仅从单基因入手进行分子辅助育种, 往往不能达到全面改良肉品质, 最终培育优质鸡的目的。肌肉 IMP 的合成涉及到 6 个合成酶系基因, 目前的研究结果表明, 有多个基因位点影响鸡肌肉中的肌苷酸含量。束婧婷等^[11]以鸡 ADSL 基因, GARS-AIRS-GART 基因为候选基因, 对两个基因的多态位点进行了合并基因型的研究, 发现合并基因型纯合子之间存在加性效应, 能够稳定地遗传给下一代, 可以利用合并基因型对鸡的风味性状进行标记辅助选择。

本研究对 GPAT/AIRC 基因的 2 个多态位点的单倍型进行了研究。GPAT 基因外显子 2 的 AA 型个体比 BB 型个体 IMP 含量 0.999 mg/g; AIRC 基因外显子 8 的 CG 型个体比 CC 型个体 IMP 含量高 0.458 mg/g; 而单倍型为 AACG 的个体 IMP 含量比 BBCC 型个体高 1.006 mg/g, 说明单倍型的效应不是各自基因型效应的简单相加, 却要高于最好的单个基因型效应。这一结果也提示, 当分析多基因控制的数量性状时, 需要同时对多个位点组成的合并基因型(单倍型)进行分析, 这样才能得到基因与性状之间的真实相关性。这个结论对于利用 DNA 进行标记辅助选择特别有意义, 表明评估品种或种群的遗传改良以合并基因型的影响效应为标准, 在利用 DNA 标记进行辅助选择时可能会获得更大的遗传进展。

[参考文献]

- [1] 武书庚, 齐广海. 肉品风味的形成及其影响因素 [J]. 中国畜牧杂志, 2001, (3): 53-55.
- [2] 刘望夷, 竺来发, 翁志发, 等. 肉用鸡肌肉中肌苷酸含量的比较 [J]. 中国农业科学, 1980, (4): 79-83.
- [3] 苏淑贞, 朱汉炎, 刘建梁, 等. 鹌鹑、鸡、鸽子肌肉中的肌苷酸含量的比较 [J]. 家禽, 1987, (2): 32-33.
- [4] DAVIDEK J, KHAN A W. Estimation of Inosinic Acid in Chicken Muscle and Its Formation and Degradation During Post-mortem Aging [J]. Journal of Food Science, 1967, 32 (2): 155-157.
- [5] 陈国宏, 李慧芳, 吴信生, 等. 泰和乌骨鸡肌肉肌苷酸含量变化规律及其遗传力估测 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2002, 23 (2): 29-32.
- [6] ZHOU G C, DIXON J E, ZALKIN H. Cloning and Expression of Avian Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase. Conservation of a Bacterial Propeptide Sequence Supports a Role for Posttranslational Processing [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265 (34): 21152-21159.
- [7] IWAHANA H, YAMAOKA T, MIZUTANI M, et al. Molecular Cloning of Rat Amidophosphoribosyltransferase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268 (10): 7225-7237.
- [8] BRAYTON K A, CHEN Z, ZHOU G, et al. Two Genes for de Novo Purine Nucleotide Synthesis on Human Chromosome 4 are Closely Linked and Divergently Transcribed [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269 (7): 5313-5321.
- [9] GAVALAS A, ZALKIN H. Analysis of the Chicken GPAT/AIRC Bidirectional Promoter for de Novo Purine Nucleotide Synthesis [J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270 (5): 2403-2410.
- [10] PALMER D K, JONES C. Genes Mapping in Chicken-Chinese hamster Somatic Cell Hybrids, Serum Albumin and Phosphoglucomutase-2 Structural Genes on Chicken Chromosome 6 [J]. Journal of Heredity, 1986, 77 (2): 106-108.
- [11] 束婧婷, 吉文林, 包文斌, 等. 鸡 ADSL 基因和 GARS-AIRS-GART 基因对鸡肉肌苷酸 (IMP) 含量的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38 (8): 786-791.