

鸡 *A-FABP* 基因不同基因型遗传效应及初步验证

常国斌¹, 周琼¹, 栾德琴¹, 陈蓉¹, 王克华², 窦套存², 胡玉萍², 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125)

摘要: 本研究旨在探讨影响鸡肌内脂肪性状的重要候选基因 *A-FABP* 的不同基因型遗传效应, 并进行初步验证, 为进一步开发利用脂肪性状的有效分子标记提供依据。运用 PCR-SSCP 技术检测如皋鸡 *A-FABP* 基因的单核苷酸多态性 (SNPs), 并分析其与胸肌脂肪含量之间的关系; 同时采用荧光定量 PCR 技术检测后代分离群体不同基因型的时空表达规律, 进行不同基因型遗传效应的初步验证。研究表明, 如皋鸡 *A-FABP* 基因外显子 3 中 1 763 位点存在 A/G 突变, 引起 Ser(AA 型) 突变为 Asn(BB 型); 不同基因型对 12 周龄如皋鸡胸肌脂肪含量的关联分析发现, AA、AB 基因型个体的 IMF 含量显著高于 BB 型个体 ($P < 0.05$), AA 型 IMF 含量最高, 为有利基因型; 经后代分离群体 Q-PCR 证实, *A-FABP* 基因的表达不存在性别差异, 在不同组织中表达量顺序: 腹脂 > 胸肌 > 心脏 > 肝脏; 在不同时间阶段, 肝脏、心脏和胸肌的表达趋势一致, 4 周龄时达到最高值, 6~12 周龄缓慢下降; 而腹脂在 10 周龄时达到最高峰, 12 周龄开始下降。同一组织中不同基因型个体表达水平存在显著差异, BB 基因型在所有组织中的表达量均处在较低水平, 与肌内脂肪含量关联分析结果一致, 从而表明 BB 型与低肌内脂肪含量具有紧密关联性。表明 *A-FABP* 基因外显子 3 中 1 763 位点变异可作为肌内脂肪性状有效的候选标记。

关键词: 鸡; *A-FABP*; 基因型; 遗传效应; 验证

中图分类号: S831.2; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)08-1088-07

Genetic Effect and Preliminary Verification of Different Genotypes in Chicken *A-FABP* Gene

CHANG Guo-bin¹, ZHOU Qiong¹, LUAN De-qin¹, CHEN Rong¹, WANG Ke-hua²,
DOU Tao-cun², HU Yu-ping², CHEN Guo-hong^{1*}

(1. College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125, China)

Abstract: This experiment was designed to analyze and verify the genetic effect of different genotypes in adipocyte fatty acid-binding protein (*A-FABP*) gene. *A-FABP* was one of the important candidate genes for intramuscle fat trait (IMF) in chicken, which provided the base for exploring and utilizing of molecular markers related to this trait. PCR-SSCP technology was used to detect the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *A-FABP*, and association between its SNPs and IMF content of breast muscle was conducted; then fluorescence quantitative real-time PCR was performed to explore the temporal and spatial expression pattern of different genotypes in progeny populations. A SNP (g. 1763 A>G) in exon3 of *A-FABP* gene was found, which resulted in the substitution of amino acid (Ser to Asn). In three genotypes of *A-FABP* gene, IMF contents of individuals with the AA and AB genotypes were significantly higher than that of individuals with the BB genotype ($P < 0.05$), and the AA genotype was the dominant. No significantly different expression was found between male and female. The expression level in different

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: 国家自然科学基金 (30972088); 江苏省自然科学基金 (BK2009190); 江苏省农业科技支撑计划 (BE2008359)

作者简介: 常国斌 (1975-), 男, 江苏泰兴人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物资源和分子遗传研究, Tel: 0514-87979034, E-mail: gbchang@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 陈国宏, 教授, 博士生导师, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

tissues was abdominal fat, breast muscle, heart and liver according to the descending order. At different periods, the *A-FABP* expression had the same trend among muscle, heart and liver, which reached top point at 4 weeks and decreased from 6 weeks. However, *A-FABP* expressed in abdominal fat reached top point at 10 weeks and decreased from 12 weeks. In addition, the expression level had significant differences in the same tissue among the different *A-FABP* genotypes. The expression level of individuals with BB genotype was the lowest in all tissues, which was consistent with the results of association analysis between the detected SNPs and IMF content of breast muscle. Thus, the BB genotype had close association with the low IMF content of breast muscle in chicken. The results indicate that the mutation of g. 1763 A>G in exon 3 of *A-FABP* could be used as an available candidate marker affecting IMF content trait in chicken.

Key words: chicken; *A-FABP*; genotype; genetic effect; verification

脂肪酸结合蛋白(Fatty acid binding protein, FABP)在机体的脂肪代谢过程中起着重要的生理作用,参与细胞内脂肪酸的摄取,协助将脂肪酸运至 β -氧化的场所及甘油三酯与磷脂的合成部位^[1]。肌内脂肪(IMF)是影响肉质性状的主要因素。研究证明,肌内脂肪可以提高肉的嫩度和风味,一般认为,组织中肌内脂肪含量越高,肌肉嫩度、多汁性和香味越好^[2-6]。脂肪型脂肪酸结合蛋白(Adipocyte fatty acid-binding protein, A-FABP)是影响肌内脂肪含量的主要候选基因^[7]。*A-FABP* 定位于鸡的第 2 号染色体,主要包括 4 个外显子,分别编码 24、58、34 和 16 个氨基酸。Ye 等^[8]对矮脚鸡和北京油鸡研究表明,*A-FABP* 基因第一外显子和第一内含子上单碱基变异对脂肪沉积有显著影响。Shi 等^[9]通过高低脂肪资源家系发现 *A-FABP* 的表达水平差异能显著影响腹部脂肪沉积。罗桂芬等^[10]利用 PCR-SSCP 法在北京油鸡 *A-FABP* 基因上发现第一外显子内第 51 位发生了 C→T 转换,未引起氨基酸改变,但不同基因型间在腹脂质量、皮脂厚、肌内脂肪含量等性状上差异极显著,推测这种同义突变可能通过影响基因的表达而影响性状。Li 等^[11]发现不同鸡种胸肌和腿肌组织中 *A-FABP* 基因 mRNA 随日龄的增长表达量显著升高,并表现出显著的品种效应。虽然这些研究均表明了 *A-FABP* 与脂肪性状关联密切,而且基因型效应比较明显,但具体在不同品种、不同基因型中的遗传效应究竟如何? 是否与影响鸡脂肪代谢的主效基因或 QTL 相连锁以及可靠性大小? 有无在生产中进一步开发利用的可能性? 对此,目前的研究缺乏相应的资料和证据来支撑,导致了多标记无法真正应用于生产实践。因此,在关联分析的基础上,需要进一步证实不同标记

的遗传效应,分析其遗传贡献率,从而挖掘出成熟的基因型标记来提高分子辅助选择的效率和应用范围。

本试验以 *A-FABP* 基因为研究对象,利用 PCR-SSCP 技术检测如皋鸡 *A-FABP* 基因的单核苷酸多态性(SNPs),并分析其与胸肌肌内脂肪含量之间的关系;同时采用荧光定量 PCR 技术检测后代分离群体中不同基因型的时空表达规律,进行不同基因型遗传效应的初步验证,旨在进一步证实 *A-FABP* 在表达层次的遗传效应,探讨其作为分子遗传标记进行辅助选择的可靠性,为优质鸡的分子辅助选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从扬州翔龙禽业发展公司保种群中随机抽取 12 周龄如皋鸡(RG)212 只(第一世代),空腹翅静脉采血 0.4 mL,肝素钠抗凝,酚-氯仿提取血液 DNA,于 -20 °C 保存备用。另取胸肌 20 g, -20 °C 保存,用于肌内脂肪含量的测定。按照第一世代 *A-FABP* 基因分型结果,根据基因型留种,公母比例 1:10,相同基因型个体间实行随机交配与各家系等数留种得到第二世代,3 种基因型个体在同一条件下饲养,选取 2、4、6、8、10、12 周龄的每种基因型个体(5 公 5 母)进行屠宰。屠宰后取心脏、肝脏、胸肌、腹脂 4 种组织,立即投入液氮速冻,速冻后样品于 -70 °C 冰箱保存备用。

1.2 引物设计及 PCR-SSCP 分析

根据已经发表的 *A-FABP* 基因(GenBank 登录号:AF432507)设计引物,对第一世代 212 只如皋鸡的基因组扩增所有外显子序列,引物由上海生工

生物工程技术服务有限公司合成,引物序列及 PCR 反应条件见表 1。

表 1 *A-FABP* 引物序列及 PCR 反应条件

Table 1 Primer sequences and PCR conditions of *A-FABP* gene

| 基因位点 Site | 引物序列(5'-3') Primers sequence | 引物位置/bp Location | 产物长度/bp Size | 退火温度/℃ Tm |
|--------------|---------------------------------|---------------------|-----------------|--------------|
| Exon 1 | F: ACTGCTACCTGGCCTGA | 14 | 275 | 59 |
| | R: GGAATGTGACAACGCTAA | 271 | | |
| Exon 2 | F: CCTTGTCTCATCCCATCT | 1 151 | 440 | 54 |
| | R: AACTCTGCCCTCCTTATC | 1 573 | | |
| Exon 3 | F: CGGATAAGGAGGGCAGAG | 1 571 | 268 | 56 |
| | R: AGGTTCCCATCCACCACT | 1 821 | | |
| Exon 4 | F: AATGCTCCTTGGGTGTTC | 2 845 | 344 | 53 |
| | R: CTTCCTCATGCTCTTTTCG | 3 171 | | |

扩增反应总体积为 25 μL ,其中包括:10 \times buffer 缓冲液,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ each dNTP,1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 ,引物浓度为 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,1 U *Taq* DNA 聚合酶,50 ng 基因组 DNA。反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,53~59 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min;10 $^\circ\text{C}$ 保温。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶检测后变性,10%中性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=49:1)电泳(10 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$,10~12 h)后,银染显色,用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

根据 PCR-SSCP 分析结果,回收、纯化目的片段后选取不同基因型的纯合子送交上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。

1.3 肌内脂肪测定

取胸肌 20 g,去除可见脂肪,鲜样粉碎后采用索氏抽提法测定胸肌肌内脂肪含量;每个样做 3 个重复。肌肉中肌内脂肪含量(%)IMF=(提前总质量

一提后总质量)/(提前样品干物质总质量) $\times 100\%$

1.4 荧光定量 PCR 检测

1.4.1 总 RNA 提取和反转录 Trizol 一步法提取 50~100 mg 组织总 RNA,检测 260 和 280 nm 下的吸光度值,将总 RNA 稀释至 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 进行反转录。反转录体系为 40 μL :5 \times PrimeScriptTM Buffer(for Real Time)4 μL ,PrimeScriptTM Enzyme Mix I 1 μL ,Oligo dT Primer(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)1 μL ,Random 6 mers(100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)1 μL ,总 RNA 8 μL ,加 DEPC 处理水至总体积 40 μL 。4 $^\circ\text{C}$ 瞬时离心后,进行 PCR 反应:37 $^\circ\text{C}$ 15 min,85 $^\circ\text{C}$ 5 s,10 $^\circ\text{C}$ 保温。产物置于-20 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.4.2 引物设计 根据 GenBank 中公布的鸡 *β actin* 基因(NM_205518)、*A-FABP* (AF432506) mRNA 序列设计 1 对跨内含子的引物。引物合成由上海生工生物工程有限公司完成,各引物的信息以及反应条件见表 2。

表 2 荧光定量 PCR 引物

Table 2 Primers used for real-time PCR

| 基因 Gene | 序列(5'-3') Primer sequence | 片段长度/bp Size | 退火温度/℃ Tm |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------|
| <i>βactin</i> | F: GAGAAATTGTGCGTGACATCA | 152 | 60 |
| | R: CCTGAACCTCTCATTGCCA | | |
| <i>A-FABP</i> | F: GCCTGACAAAATGTGCGACC | 119 | 60 |
| | R: CCACACCAGCCATCTTCT | | |

1.4.3 *A-FABP* 基因的定量 采用 SYBR Green I 染料法,反应体系(20 μL):10 μL SYBR[®]

Green Real time PCR Master Mix,上下游引物(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.8 μL ,2.0 μL cDNA,加 Rnase

Free 水至总体积为 20 μ L。每个样品设 3 个重复及阴性对照。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 34 s (data collection), 40 个循环; 为分析扩增产物的特异性, PCR 扩增结束后采集多个信息点进行熔解曲线分析, 程序:95 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C 15 s。采用 $-\Delta\Delta C_T$ 方法定量^[7]。采用 Axygen 公司 Plasmid miniprep kit 进行重组质粒的提取, 提取的质粒进行 PCR 和测序鉴定后, 采用 ND-1000 测定其浓度和纯度, 10 倍系列稀释用于定量的标准品, 制作标准曲线。

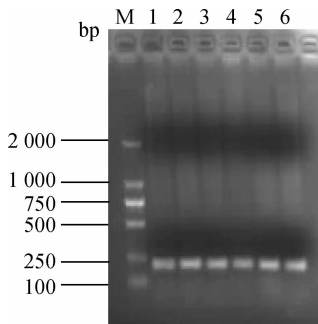
1.5 统计分析

SNP 用 DNASTAR 软件包及 AlignIR2.0 分析, 根据基因型分布情况进行 Hardy-Weinberg 平衡检测, 利用 SPSS 11.5 软件最小二乘法对不同时期各基因型和肌肉脂肪含量进行分析。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 检测结果及测序分析

如皋鸡基因组 DNA 的 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖电泳检测, 结果见图 1。本试验设计了 4 对引物对 *A-FABP* 基因所有外显子进行 SNPs 扫描, 仅检测到 1 个位于外显子 3 的 SNP 位点, 即 1763A/G 突变, 并引起 Ser 转变为 Asn。2 种纯合型分别定义为 AA、BB 基因型, 杂合型定义为 AB 基因型。SSCP 图谱、基因型及测序峰图见图 2。



M. DL2000 marker

图 1 *A-FABP* 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results of *A-FABP* gene

2.2 *A-FABP* 基因型和等位基因频率分析

由表 3 可以看出: *A-FABP* 基因的 2 个等位基因 A、B 的频率分别为 0.538 和 0.462, 基因型频率表现为 AB(0.575) > AA(0.250) > BB(0.175); 杂合度和多态信息含量分别为 0.576 和 0.510 均处于

较高水平 ($PIC > 0.5$); χ^2 检验发现, *A-FABP* 基因的基因型分布处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

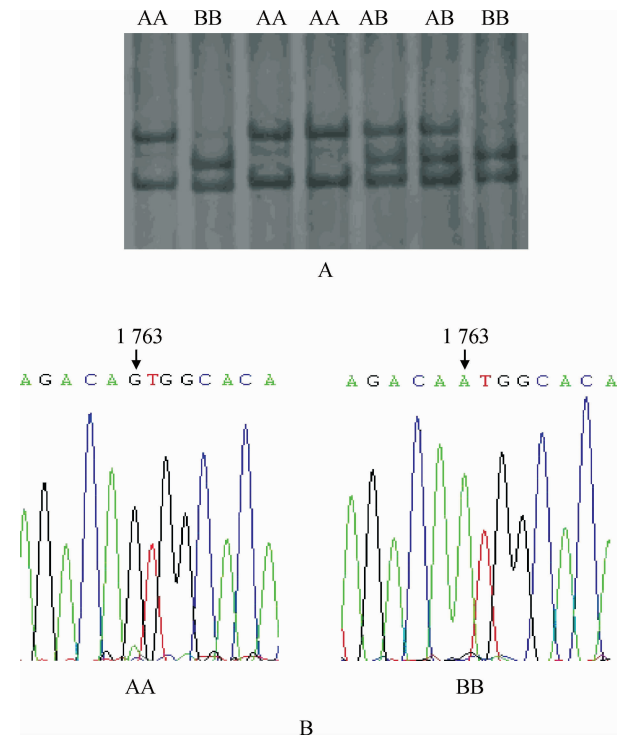


图 2 *A-FABP* 的 SSCP 电泳图谱 (A) 和 AA、BB 基因型测序峰图 (B)

Fig. 2 SSCP electrophoresis image of *A-FABP* (A) and sequencing analysis of PCR products of AA and BB genotypes (B)

2.3 *A-FABP* 基因 12 周龄如皋鸡肌肉脂肪含量分析

本试验共测定了 212 只如皋鸡第一代胸肌肌肉脂肪含量。由表 4 可见, 在如皋鸡中, 公鸡胸肌肌肉脂肪含量没有显著差异 ($P > 0.05$), 但母鸡的肌肉脂肪含量比公鸡要高。

A-FABP 基因 3 种基因型对如皋鸡胸肌 IMF 含量分析结果见表 5。由表 5 可以看出, AA、AB 基因型与 BB 基因型存在显著差异 ($P < 0.05$), AA 与 AB 型之间没有显著差异 ($P > 0.05$), AA 型个体的 IMF 含量最高, 比 BB 型高 0.561, 提高比例为 20.4%。

2.4 *A-FABP* 基因不同组织不同时期的发育变化

第二世代 *A-FABP* 基因不同组织不同时期内的表达见表 6、图 3 (图 3 纵坐标为相对表达量的对数值)。可以看出, *A-FABP* 基因在组织中表达量顺序: 腹脂 > 胸肌 > 心脏 > 肝脏; 存在组织表达差异。在不同时间阶段, 肝脏、心脏和胸肌的表达趋势一致, 2 周龄时表达量均较低, 4 周龄时增加到最高

值,6 周龄至 12 周龄缓慢下降。而腹脂表达最高峰出现稍迟些,在 10 周龄时达到最高峰,12 周龄开始

下降。不同性别间比较发现,公鸡与母鸡的表达趋势基本一致。

表 3 如皋鸡 *A-FABP* 基因外显子 3 多态性分析

Table 3 The polymorphism in exon 3 of *A-FABP* in Rugao chicken

| 样本数 Number | 基因型频率 Genotype frequency | | | 等位基因频率 Allele frequency | | 杂合度 <i>He</i> | 多态信息 含量 <i>PIC</i> | χ^2 |
|---------------|-----------------------------|------------|-----------|----------------------------|-------|------------------|-----------------------|----------|
| | AA | AB | BB | A | B | | | |
| 212 | 0.250(53) | 0.575(122) | 0.175(37) | 0.538 | 0.462 | 0.576 | 0.510 | 2.77 |

$\chi^2_{0.05(2)} = 5.99; \chi^2_{0.01(2)} = 9.21$ 。括号内为个体数

$\chi^2_{0.05(2)} = 5.99; \chi^2_{0.01(2)} = 9.21$ 。The numbers in the brackets mean individual number

表 4 如皋鸡胸肌肌内脂肪含量

Table 4 IMF contents in breast muscle in Rugao chicken

| 性别 Sex | 个体数 Number | IMF 含量/% IMF content |
|--------------|---------------|-------------------------|
| 公鸡(♂) Male | 93 | 3.202±0.135 |
| 母鸡(♀) Female | 119 | 3.342±0.112 |
| 总计 Total | 212 | 3.281±0.104 |

表 5 *A-FABP* 基因各种基因型个体胸肌肌内脂肪含量

Table 5 IMF content in breast muscle for different genotypes of *A-FABP* gene

| 基因型 Genotype | 样本数 Number | IMF 含量/% IMF content |
|-----------------|---------------|--------------------------|
| AA | 53 | 3.313±0.211 ^a |
| AB | 122 | 3.281±0.172 ^a |
| BB | 37 | 2.752±0.121 ^b |

不同字母表示平均数间差异显著($P < 0.05$)。下同

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.5 *A-FABP* 基因 3 种基因型各个组织的表达

第二世代 12 周龄的不同基因型个体在各个组织的表达情况见表 7,由表 7 可知:在肝脏组织中,AB 基因型个体的表达量最高,显著地高于 BB 型,BB 型相对表达量最低。在心脏组织中,AB 基因型个体表达量最高,BB 型最低,AB 与 AA 型显著地高于 BB 型。在胸肌组织中,AA 基因型个体表达量最高,BB 型最低,AA 与 BB 型存在显著差异。在腹脂中,AA 基因型个体表达量最高,BB 型最低,两者之间存在显著差异。BB 型在所有组织中的表达量基本一致,均处于最低水平,表现出降低脂肪水平的遗传效应。这与肌内脂肪含量关联分析结果一致,从而表明 BB 基因型与低肌内脂肪含量具有紧密关联性。

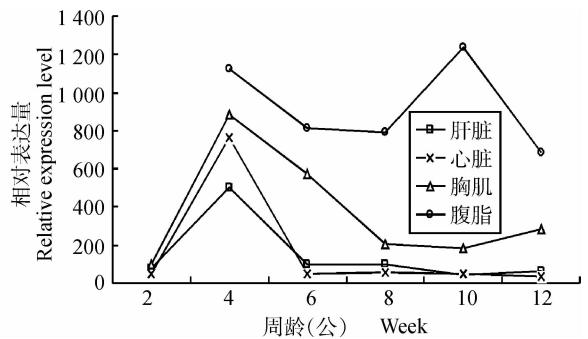
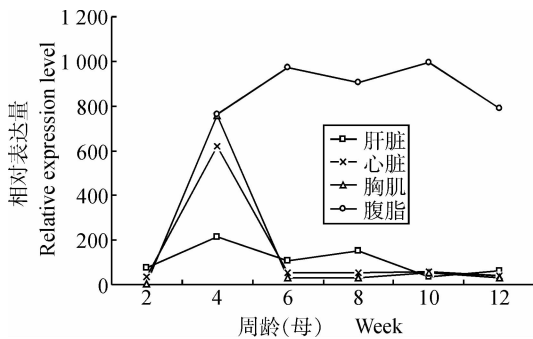


图 3 *A-FABP* 基因不同组织不同时期表达变化比较

Fig. 3 The comparison of *A-FABP* gene expressions in different tissues at different periods

表 6 *A-FABP* 基因在不同组织及不同时期相对表达量Table 6 The relative expression levels of *A-FABP* gene in different tissues at different periods

| 组织 Tissue | 性别 Sex | 周龄 Week | | | | | |
|--------------------------|-----------|-------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
| 肝脏 Liver | 母 | 2.55±0.60 | 7.20±1.37 | 3.54±0.92 | 5.28±2.13 | 1.29±0.14 | 2.13±0.40 |
| | 公 | 3.60±0.55 | 10.36±3.43 621.16± | 3.41±0.94 | 2.34±1.95 | 1.39±0.19 | 2.05±0.37 |
| 心脏 Heart | 母 | 37.26±2.42 | 282.39 | 53.11±6.40 | 52.24±10.01 | 57.57±7.62 | 41.42±11.01 |
| | 公 | 46.86±1.63 | 761.12± 230.73 7 529.45± | 48.21±7.57 | 55.43±15.51 | 48.66±6.26 | 37.33±9.77 |
| 胸肌 Breast muscle | 母 | 88.70±7.97 | 294.93 | 100.92 | 42.77 | 166.35 | 85.24 |
| | 公 | 101.9±23.81 | 1 341.86± 66.36 7 613.75± | 571.07± 294.19 9 735.71± | 208.43± 45.69 9 041.11± | 181.01± 53.19 9 923.40± | 182.17± 76.88 7 881.22± |
| 腹脂 Abdomi- nal fat | 母 | — | 1 357.28 | 2 985.20 | 2 461.22 | 2 156.77 | 532.12 |
| | 公 | — | 11 214.00± 2 326.68 | 8 113.33± 915.90 | 7 886.67± 1 244.01 | 12 384.33± 3 145.67 | 6 894.33± 419.43 |

表 7 *A-FABP* 基因不同基因型个体在不同组织中相对表达量Table 7 The expression levels of *A-FABP* gene in different tissues of individuals with different genotypes

| 基因型 Genotype | 肝脏 Liver | 心脏 Heart | 胸肌 Breast muscle | 腹脂 Abdominal fat |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| AA | 2.02±0.71 ^{ab} | 36.26±8.90 ^a | 376.37±52.31 ^a | 8 418.50±842.13 ^a |
| AB | 2.74±0.65 ^a | 46.13±8.73 ^a | 214.34±75.21 ^{ab} | 7 207.45±915.13 ^{ab} |
| BB | 1.51±0.33 ^b | 22.42±3.25 ^b | 135.69±38.17 ^b | 6 305.64±669.54 ^b |

3 讨论

目前,肉质、风味已成为地方鸡种占据市场的主要优势性状,其中,肌内脂肪作为评判肉质的一个重要指标越来越受到重视,逐渐成为地方品种选育的关键性状。然而,肌内脂肪是一个综合性状,受遗传、营养、环境等诸多因素的影响^[12-14],常规选育方法的遗传进展十分缓慢。因此,国内外学者围绕不同脂肪性状的候选基因做了大量研究工作,以期通过分子辅助选择手段加快遗传进展。近年来发现了多个影响脂肪性状(肌内脂肪性状)的候选基因,关于 *A-FABP* 的研究大都集中在多态性筛选以及与原代群体表型性状的关联分析等方面,忽视了候选基因与 QTL 的真正关联程度的研究。由于基因重组、遗传共适应、遗传力以及群体规模大小等因素,原代群体的关联结果并不能真实遗传给下一代,因而影响了分子标记的实际使用效果,导致能够真正应用于生产实践的分子标记寥寥无几。本研究以当地较少关注的原始地方群体如皋鸡(兼用型)为素材,对第一世代鸡群 *A-FABP* 基因多态性及遗传效

应进行检测,并通过后代群体中不同基因型鸡只的表达水平进行验证,研究发现第 1 763 位存在 A/G 突变,并引起 Ser(AA 型)突变为 Asn(BB 型);BB 基因型个体的 IMF 含量最低,显著地低于 AA 和 AB 型个体,突变型(基因型)为劣势基因型。同时发现公母鸡之间胸肌的肌内脂肪含量差异不显著,不存在性别效应,这与李文娟^[15]、陈继兰^[16]、陈宽维^[17]、屠云洁^[18]、刘琛^[19]等在别的鸡种上的研究结果一致。初步推测 *A-FABP* 基因对肌内脂肪含量有影响,可以尝试作为肌肉肌内脂肪含量的标记辅助选择的候选分子标记。

在第二世代不同基因型的分离群体中,采用实时荧光定量 PCR 技术对如皋鸡的 *A-FABP* 基因的时空表达规律分析发现,*A-FABP* 基因不仅在脂肪组织中表达,在其它组织中也有表达,且不同生命阶段表达趋势基本一致,只是表达量较低。例如,*A-FABP* 基因在 12 周龄母鸡腹脂中的表达量为 7 881,肝脏中表达水平只有 2.13,腹脂表达量是肝脏的 3 700 倍,是心脏的 192 倍,是胸肌的 24 倍。不同组织表达量水平顺序为:腹脂>胸肌>心脏>

肝脏。这与 Wang 等^[20] 研究结果不一致,可能存在两个方面的原因:一是实验仪器检测的灵敏度和标准曲线的最低浓度不同;二是所研究的品种不同。不同 *A-FABP* 基因型个体在不同组织中的比较具有显著差异。在心脏、胸肌和腹脂组织中, BB 基因型个体的表达水平基本相似,均显著地低于其它 2 种基因型,肝脏中 BB 型表达水平亦最低,这与肌肉脂肪含量差异一致。由此可见, *A-FABP* 3 种基因型各组织的 mRNA 表达水平的差异与其相应的肌肉脂肪含量一致,表明 BB 型与低肌肉脂肪含量水平密切相关,进一步从基因组和表达层次上证明了 *A-FABP* 基因与肌肉脂肪含量性状存在着紧密关联性。

本研究在前人研究的基础上,通过对如皋鸡 *A-FABP* 不同基因型遗传效应的检测以及后代分离群体的验证,初步证实了 *A-FABP* 与肌肉脂肪性状密切相关, *A-FABP* 基因可能是影响鸡脂肪代谢的主效基因或与主效基因相连锁。同时发现 BB 基因型在主要的脂肪沉积组织中(心脏、肝脏、胸肌和腹脂)都与低脂肪含量显著相关,这对于研究该基因真实遗传效应提供了参考证据,也为开发、利用成熟的分子标记促进分子标记辅助选择的应用提供了宝贵的资料。当然,至于 *A-FABP* 基因的真正功能以及是否可以根据 *A-FABP* 不同基因型直接对肌肉脂肪性状进行选择,还需要进一步研究和更多的实践证明。

4 结 论

通过如皋鸡第一代不同基因型与肌肉脂肪含量的关联分析以及后代分离群体 Q-PCR 证实, *A-FABP* 3 种基因型的 mRNA 表达水平的差异与其相应的肌肉脂肪含量一致,其中 BB 基因型与低肌肉脂肪含量具有紧密关联性,从而在基因组和表达层次上证明了 *A-FABP* 基因外显子 3 中 1 763 位点变异与肌肉脂肪性状密切相关,可作为肌肉脂肪性状有效的候选标记进行试用。

参考文献:

- [1] 刘 宁,王清义,康相涛,等. 鸡肌肉脂肪性状研究的方法和策略[J]. 中国家禽, 2005, 27(8): 48-51.
- [2] 陈继兰. 肌肉肌苷酸和肌肉脂肪含量遗传规律及相关候选基因的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [3] 陈继兰,文 杰,王述柏,等. 肌肉肌苷酸和肌肉脂肪沉积规律研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(8): 843-845.
- [4] 李建军. 优质肉鸡风味特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2003.
- [5] GRBENS F, JANSEN A, VAN ERP A J, et al. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs[J]. *Mamm Genome*, 1998b, 9(12): 1022-1026.
- [6] 郭亚宁,高 雪,杨公社,等. 肉质性状相关基因的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2006, 5(3): 97-102.
- [7] 杨 焯. 优质鸡肌肉脂肪代谢调控及其与肉质性状关系的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [8] YE M H, CHEN J L, ZHAO G P, et al. Associations of *A-FABP* and *H-FABP* markers with the content of intramuscular fat in Beijing-You chicken[J]. *J Anim Biotechnol*, 2010, 21(1): 14-24.
- [9] SHI H, WANG Q, ZHANG Q, et al. Tissue expression characterization of chicken adipocyte fatty acid-binding protein and its expression difference between fat and lean birds in abdominal fat tissue[J]. *J Poult Sci*, 2010, 89(2): 197-202.
- [10] 罗桂芬,陈继兰,孙世铎,等. 鸡 *A-FABP* 基因多态性分析及其与脂肪性状的相关研究[C]//中国家禽研究论文集, 2005, 9: 142-145.
- [11] LI W J, LI H B, CHEN J L, et al. Gene expression of heart- and adipocyte-fatty acid-binding protein and correlation with intramuscular fat in Chinese chickens [J]. *J Anim Biotechnol*, 2008, 19(3): 189-193.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTHEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] VEERKAMP J H, MAATMAN R. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: Their structure and genes [J]. *Prog Lipid Res*, 1995, 34: 17-52.
- [14] 李俊英,李慧锋,姜润深,等. 优质鸡肌肉脂肪含量与屠体及肉质性状间的关系[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(12): 12-15.
- [15] 李文娟,李宏宾,文 杰. 鸡 *H-FABP* 和 *A-FABP* 基因表达与肌肉脂肪含量相关研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5): 417-423.
- [16] 陈继兰,文 杰,王述柏,等. 肌肉肌苷酸和肌肉脂肪沉积规律研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(8): 843-845.
- [17] 陈宽维,章双杰,屠云洁,等. *A-FABP* 在不同鸡种中遗传多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1114-1117.
- [18] 屠云洁,陈宽维,章双杰,等. 3 个鸡种 *A-FABP* 基因单核苷酸多态性的研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2004, 25(4): 53-55.
- [19] 刘 琛,文 杰,赵桂苹,等. *A-FABP* 与 *AMPD1* 基因 SNP 位点对北京油鸡部分肉质性状的组合效应分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(10): 1555-1559.
- [20] WANG Q, GUAN T, LI H, et al. A novel polymorphism in the chicken adipocyte fatty acid-binding protein gene (*FABP4*) that alters ligand-binding and correlates with fatness [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 154(3): 298-302.