

# 秦川牛 *CD36* 基因多态性检测及其与肉用性状的相关性研究

张松<sup>1</sup>, 咎林森<sup>1,2\*</sup>, 王洪宝<sup>1,2</sup>, 王国庆<sup>1</sup>, 付常振<sup>1</sup>, 张亚冉<sup>1</sup>, 梅楚刚<sup>1</sup>, 邓冠群<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 国家肉牛改良中心, 杨凌 712100)

**摘要:** 旨在研究秦川牛脂肪酸转位酶基因(Cluster of differentiation 36, *CD36*)的多态性及其对秦川牛肉用性状的影响,以探索改善秦川牛肉用性状的分子育种方法。本研究选取 288 头同等饲养条件下的 24 月龄健康秦川牛母牛,采用 DNA 测序技术检测了 *CD36* 基因的多态性,并结合 PCR-RFLP 技术对所发现的多态位点进行基因型分型,然后将不同基因型与秦川牛肉用性状(背膘厚、眼肌面积、眼肌深度和肌内脂肪含量)进行关联性分析。结果表明,在 *CD36* 基因上发现 4 个多态位点,分别命名为 SV1、SV2、SV3 和 SV4。连锁不平衡和单倍型分析表明,SV1-SV2 为连锁位点,与 SV3 为强连锁,SV4 与其他 3 个位点均为弱连锁,单倍型 ITA 属于优势单倍型(频率为 60.4%)。关联分析结果表明,除 SV4 在眼肌深度指标中存在显著性差异外,单个多态位点的基因型之间和不同多态位点的组合基因型之间均在肌内脂肪含量指标中存在显著性或极显著性差异。其中,IITAG 型个体在肌内脂肪含量指标中显著低于 IWTCOA 型个体( $P < 0.05$ ),极显著低于 WWCCOA 型个体( $P < 0.01$ )。结果提示,*CD36* 基因对秦川牛肉用性状有显著的影响,可通过人工选择降低群体中 IITAG 型个体的比例以改善肉用性状。

**关键词:** 秦川牛; *CD36*; PCR-RFLP; 多态性; 单倍型; 肉用性状

中图分类号: S813

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)07-1060-08

## Association of *CD36* Gene Polymorphism with Meat Traits in Qinchuan Cattle

ZHANG Song<sup>1</sup>, ZAN Lin-sen<sup>1,2\*</sup>, WANG Hong-bao<sup>1,2</sup>, WANG Guo-qing<sup>1</sup>, FU Chang-zhen<sup>1</sup>,  
ZHANG Ya-ran<sup>1</sup>, MEI Chu-gang<sup>1</sup>, DENG Guan-qun<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;  
2. National Beef Cattle Improvement Centre, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The aim of the study was to research polymorphism of fatty acid translocase gene (Cluster of differentiation 36, *CD36*) and analyze its effect on meat traits, then find molecular breeding methods of improving meat traits in Qinchuan cattle. In this study, 288 24-month-old Qinchuan heifers under similar feeding conditions were randomly selected. Direct DNA sequencing and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods were used to genotype the polymorphisms of *CD36* gene. The polymorphisms of bovine *CD36* gene and its associations with meat traits (back fat thickness, eye muscle area, eye muscle depth and intramuscular fatty content) were analyzed. Four mutation sites were detected, named SV1, SV2, SV3, and SV4, respectively. Further, the linkage disequilibrium and haplotypes were analyzed among the four loci, suggested that SV1 and SV2 were complete linkage, SV1-SV2 and SV3 were strong linked, and SV4 was little linked with SV1-SV2 and SV3, respectively. Haplotype of

收稿日期: 2014-01-25

基金项目: 国家 863 计划(2013AA102505; 2011AA100307-02); 国家科技支撑计划(2011BAD2804-03); 国家自然科学基金(31272411); 国家转基因育种专项(2011ZX08007-002); 国家现代农业产业技术体系(CARS-38); 陕西省科技统筹创新工程计划(2014KTZB02-02)

作者简介: 张松(1987-), 男, 河南许昌人, 硕士生, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: zhangsong0001@163.com

\* 通信作者: 咎林森, E-mail: zanlinsen@163.com

ITA was dominant (with frequency of 60.4%). Except differentiation of eye muscle depth at SV4, the result of association analysis showed significant or extremely significant difference between different genotypes of single and combined sites in intramuscular fatty content in Qinchuan cattle, and the individuals with combined genotype IITTAG had a lower intramuscular fatty content than that of the individuals with combined genotype IITTAG ( $P < 0.05$ ) and combined genotype WWCAA ( $P < 0.01$ ). As the result showed, *CD36* gene had a significant effect on meat traits in Qinchuan cattle, and reducing the ratio of individuals with combined genotype IITTAG may be a method to improve meat traits.

**Key words:** Qinchuan cattle; *CD36*; PCR-RFLP; polymorphism; haplotype; meat traits

*CD36* 是一种广泛表达于骨骼肌、心肌、脂肪等多种组织细胞膜的跨膜糖蛋白,属于 B 类清道夫受体,它参与到机体的新陈代谢、动脉粥样硬化、血管生成以及免疫反应等生理生化活动<sup>[1-2]</sup>。先前的研究发现,大鼠脂肪细胞对脂肪酸的吸收途径能够被磺基-N-琥珀酰亚胺酯油酸 (Sulfo-N-succinimidyl oleate, SSO) 阻断<sup>[3]</sup>,进一步的研究发现,SSO 特异结合细胞膜上一个分子量约为 88 ku 的蛋白,其很可能参与脂肪酸的跨膜转运,由此将该蛋白命名为脂肪酸转位酶 (Fatty acid translocase, FAT)<sup>[4]</sup>。因该蛋白与人类白细胞分化抗原 *CD36* 相同,也常被称为 FAT/*CD36*<sup>[5-7]</sup>。

*CD36* 在体内长链脂肪酸 (LCFA) 的摄取中起着主导作用,它能够介导组织对脂肪酸的摄取,促进它们进入细胞,参与肌肉脂质利用,脂肪组织能量储存,内脏脂肪吸收,进而在代谢紊乱,如糖尿病和肥胖的发病机理上起到重要作用<sup>[2,8-10]</sup>。*CD36* 能够促进脂肪细胞的分化和脂肪生成,研究显示,3T3-F442A 前脂肪细胞分化成熟脂肪细胞期间,经过油红 O 染色和生脂基因表达的检测发现,*CD36* 的表达量上调,并且 *CD36* 基因沉默能够造成分化损伤<sup>[11]</sup>。另外,成肌分化期间,*CD36* 在细胞融合过程中发挥着重要作用,其表达量显著上调并定位于多核肌管,并且内源性 *CD36* 的敲除显著降低生肌标记的表达和肌管的形成<sup>[12]</sup>。*CD36* 作为脂肪酸的受体行使跨膜转运脂肪酸的功能逐步成为时下研究 *CD36* 的热点,近年来有关 *CD36* 与肥胖和 2 型糖尿病 (T2DM) 的课题一直备受关注。S. Bokor 等鉴定了 4 个与肥胖性状相关的 *CD36* SNPs (rs3211867、rs3211883、rs3211908 和 rs1527483)<sup>[13]</sup>。M. Heni 等的研究显示,在具有潜在患 T2DM 风险的欧洲人群中,*CD36* 的 SNP 与腰围和体重指数 (Body mass index, BMI) 相关<sup>[14]</sup>。大量的研究证实了

*CD36* 在脂肪摄取过程中发挥的重要作用<sup>[15]</sup>。

鉴于 *CD36* 在机体脂质代谢和肥胖相关表型方面发挥的重要作用,本研究把该基因作为影响秦川牛肉用性状的一个候选基因。本研究采用 DNA 测序结合 PCR-RFLP 的方法,研究秦川牛 *CD36* 基因的多态性,并结合表型数据进行 *CD36* 基因多态性与秦川牛肉用性状的相关性研究,为加快秦川牛肉用性状的改善提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 血样的采集及供试动物肉用性状的测量

随机选择相近饲养条件下的 288 头 24 月龄秦川牛母牛,每头颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝 ( $v(\text{血液}) : v(\text{ACD}) = 6 : 1$ ),轻微震荡混匀后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。使用兽用 B 超仪活体测定 4 项肉用性状:背膘厚 (Back fat thickness, BFT)、眼肌面积 (Eye muscle area, EMA)、眼肌深度 (Eye muscle depth, EMD) 和肌内脂肪含量 (Intramuscular fatty content, IFC)。供试秦川牛母牛源于西北农林科技大学肉牛良种繁育场、陕西省秦川牛良种繁育中心和陕西省秦川牛保种场 3 个场区。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶 K 购自德国默克公司, Tris 饱和酚、EDTA、Tris、硼酸、甲醛、N、N'-亚甲基双丙烯酰胺 (Bis)、二甲基亚砜 (DMSO)、N,N,N,N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、含染料 Reaction MIX、DNA Marker、琼脂糖等均购自天根生化科技 (北京) 有限公司,十二烷基磺酸钠 (SDS)、去离子甲酰胺购自北京鼎国昌盛生物科技有限公司, *Xba* I、*Xsp* I 和 *Taq* I 限制性内切酶均购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司。

PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国), 冷冻高速离心机 (CENTURION, 英国), 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公

司,美国),电泳槽和稳流稳压电泳仪(北京市六一仪器厂,北京),恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司,上海)。

## 1.2 基因组 DNA 制备

采用传统的酚氯仿抽取法对牛的血样基因组 DNA 进行提取<sup>[16]</sup>,DNA 用 TE 缓冲液溶解后,用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳对其纯度进行检测,同时用紫

外分光光度计测定其浓度并调整到  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

## 1.3 秦川牛 CD36 基因 PCR-RFLP 分析

1.3.1 引物设计与合成 参考 GenBank 中提供的牛 CD36 基因的序列(AC\_000161.1),利用 Primer 5.0 软件设计编码区引物,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,突变区域引物信息见表 1。

表 1 秦川牛 CD36 基因突变区域引物信息

Table 1 Primer information of mutation region for Qinchuan cattle CD36 gene

突变位点 Mutation site	引物序列(5'-3') Primer	所在位置 Location	片段大小/bp Fragment size	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Tm
SV1-SV2	F:GGGTTTGTACCTATTCTGTCT	Intron 5	684	60.9
	R:GCATTATCAGGTGGATTCTTTA	Intron 6		
SV3	F:AGTGATATTGCAGTTGGT R:TAGGAGTGAACTTGAT	Intron 7	477	55.0
SV4	F:TTGTTCACCTCTCGCCTCACCC R:TGACACACACTTTGCCTGGA	Exon 8	456	64.5

1.3.2 CD36 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系为  $15 \mu\text{L}$ :含核酸染料的 dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、 $10 \times$  Buffer(含  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ )的 Mix  $7.5 \mu\text{L}$ ,  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  混合引物(上游引物和下游引物浓度均为  $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.6 \mu\text{L}$ , DNA ( $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $5.9 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$ , 退火  $30 \text{ s}$ (退火温度见表 4),  $72 \text{ }^\circ\text{C}$   $35 \text{ s}$ , 37 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 PCR 产物纯化与测序 随机选取 72 个 DNA 质量浓度相等个体,每 9 个 1 组吸取等量 DNA 组成 8 个混合 DNA 样本。将该 8 个混合 DNA 样本进行 PCR 扩增,PCR 产物使用凝胶回收试剂盒回收纯化,并送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。使用 Lasergene 软件将测序结果与 AC\_000161.1 序列进行比对以寻找突变位点。

1.3.4 PCR-RFLP 分析 采用 PCR-RFLP 技术对所发现的 SNP 位点进行基因型分型判定。按照 1.3.2 中的 PCR 反应条件和反应体系进行扩增。扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测正确后进行酶切鉴定,酶切总体积为  $10 \mu\text{L}$ ,其中 PCR 产物  $5 \mu\text{L}$ ,限制性内切酶(*TaKaRa*,  $15 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ ,

剩余体积按说明书指定试剂补上,混匀。根据说明书规定的条件进行酶切,酶切结束后用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测分型。

## 1.4 统计分析

对不同基因型进行统计。运用 SPSS 18.0 软件中的最小二乘法拟合线性模型对 CD36 基因的基因型和肉用性状的相关性进行分析,建立了以下分析模型:

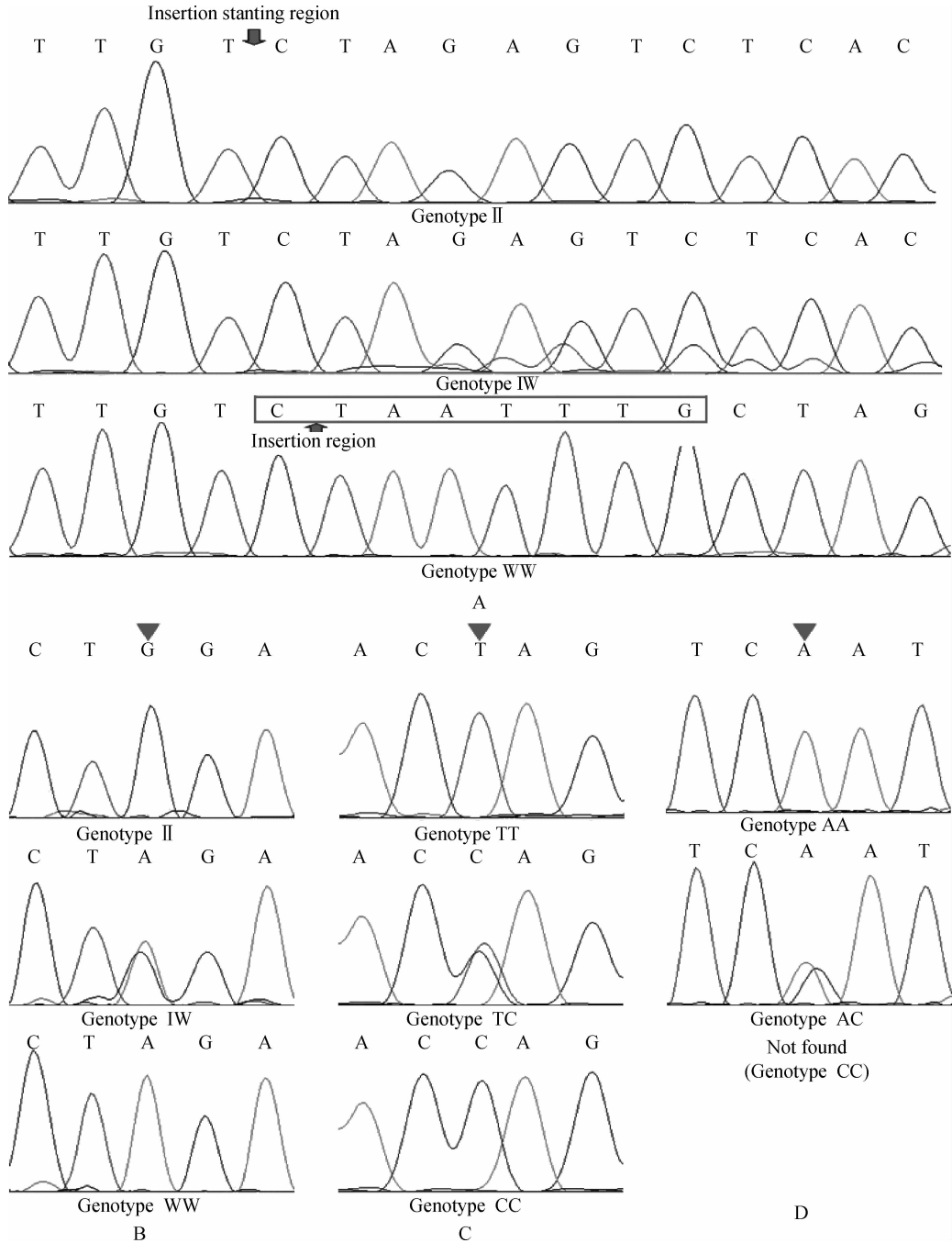
$$Y_{ij} = \mu + G_i + F_j + e_{ij}$$

式中: $Y_{ij}$  为个体表型值, $\mu$  为群体均值, $G_i$  为标记基因型效应, $F_j$  为牧场种群效应, $e_{ij}$  为随机误差。

## 2 结果

### 2.1 秦川牛 CD36 基因多态性检测

用表 1 中合成的引物扩增秦川牛基因组 DNA,扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测与目的片段大小一致,特异性良好,然后测序。使用 Lasergene 软件将测序结果与 AC\_000161.1 序列比对,发现了 4 个多态位点,包括 1 个插入突变 g.90356indelCTAATTG(第 5 内含子)和 3 个 SNPs g.90702C>T(第 6 内含子),g.91837A>G(第 7 内含子)和 g.92968A>G(第 8 外显子,aa. Asn>Asp),依次命名为:SV1、SV2、SV3 和 SV4(图 1)。



A. SV1:g. 90356indelCTAATTTG;B. SV2:g. 90702C>T(反向);C. SV3:g. 91837A>G(反向);D. SV4:g. 92968A>G  
 A. SV1:g. 90356indelCTAATTTG;B. SV2:g. 90702C>T (reverse);C. SV3:g. 91837A>G (reverse);D. SV4:g. 92968A>G

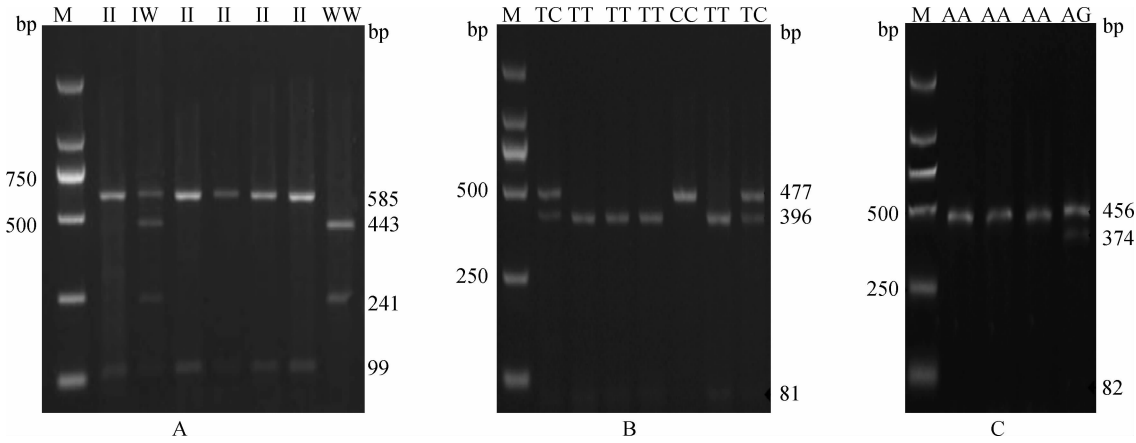
图 1 秦川牛 *CD36* 基因 1 个插入突变和 3 个 SNPs 的测序图  
 Fig. 1 The sequencing maps of one insertion mutation and three SNPs in *CD36* gene in Qinchuan cattle

对 SV1、SV2、SV3 和 SV4 位点进行 PCR-RFLP 分析。扩增包括这 4 个突变位点在内的基因序列。在获得相应的扩增产物后,分别经 *Xba* I (SV1-SV2, 2 个位点酶切序列相同且位于同一扩增片段内)、*Xsp* I(SV3)和 *Taq* I(SV4)限制性内切酶

进行酶切鉴定。其中,根据测序结果和酶切鉴定结果发现 SV1 g. 90356indelCTAATTTG 和 SV2 g. 90702C>T 呈现一致性,即 SV1 和 SV2 完全连锁,故用同一等位基因表示。酶切结果显示(图 2), SV1-SV2 连锁位点存在 3 种基因型(II 基因型;585

和 99 bp, IW 基因型: 585、443、241 和 99 bp, WW 基因型: 443 和 241 bp)。SV3 位点存在 3 种基因型 (TT 基因型: 396 和 81 bp, TC 基因型: 477、396 和

81 bp, CC 基因型: 477 bp)。SV4 位点存在 2 种基因型 (AA 基因型: 456 bp, AG 基因型: 456、374 和 82 bp)。



A. SV1-SV2 位点 RFLP 酶切; B. SV3 位点 RFLP 酶切; C. SV4 位点 RFLP 酶切  
A. RFLP patterns of SV1-SV2 locus; B. RFLP patterns of SV3 locus; C. RFLP patterns of SV4 locus

图 2 各位点 RFLP 酶切结果  
Fig. 2 RFLP patterns of sites

2.2 连锁不平衡和单倍型分析

如表 2 所示, 秦川牛 CD36 基因 SV1 和 SV2 的连锁不平衡系数  $D'$  和连锁不平衡相关系数  $\gamma^2$  均为 1.000 为完全连锁, SV3 和连锁位点 SV1-SV2 为强

连锁, SV4 和其他位点均为弱连锁。单倍型分析发现 8 种不同的单倍型, 且 ITA 单倍型属于优势单倍型 (频率为 60.4%)。

表 2 秦川牛 CD36 基因 4 个多态位点的连锁不平衡和单倍型频率分析

Table 2 Linkage disequilibrium tests and haplotypic frequencies among four loci within CD36 gene in Qinchuan cattle

突变位点 Mutation site	连锁不平衡系数 $D'$			连锁不平衡相关系数 $\gamma^2$			
	SV2	SV3	SV4	SV2	SV3	SV4	
SV1	1.000	0.869	0.037	1.000	0.738	0.000	
SV2	—	0.869	0.037	—	0.738	0.000	
SV3	0.869	—	0.056	0.738	—	0.000	
单倍型 Haplotype	ICA	ICG	ITA	ITG	WCA	WCG	WTA
单倍型频率 Haplotype frequency	0.032	0.002	0.604	0.030	0.289	0.014	0.025
							0.004

2.3 单个多态位点与秦川牛肉用性状的关联性分析

以 288 头 24 月龄秦川牛母牛为对象, 对秦川牛 CD36 基因的多态位点进行基因型分型。肉用性状关联性分析结果见表 3。其中 SV1-SV2 连锁位点 II 型个体共 126 头, IW 型个体共 133 头, WW 型个体最少, 共 29 头。在肌肉脂肪含量指标中 WW 型个体显著高于 II 型个体 ( $P < 0.05$ )。SV3 位点 TT 型个体共 123 头, TC 型个体共 136 头, CC 型个体最少, 共 29 头。在肌肉脂肪含量指标中 TC 和 CC 型个体显著高于 TT 型个体 ( $P < 0.05$ )。SV4 位点

AA 型个体共 259 头, AG 型个体共 29 头。在眼肌深度指标中 AG 型个体显著高于 AA 型个体 ( $P < 0.05$ )。在肌肉脂肪含量指标中 AA 型个体极显著高于 AG 型个体 ( $P < 0.01$ )。

2.4 不同多态位点的组合与秦川牛肉用性状的关联性分析

如表 4 所示, *Xba* I-*Xsp* I-*Taq* I 组合位点上, IITTAA 型个体共 102 头, IITTAG 型个体共 11 头, IWTC AA 型个体共 107 头, WWCC AA 型个体共 20 头, 其余组合基因型少于 11 头, 未列在表中。

表 3 秦川牛 *CD36* 基因各突变位点不同基因型与肉用性状关联性分析Table 3 Associations of different mutation site genotypes of the *CD36* gene with meat traits in Qinchuan cattle

突变位点 Mutation site	基因型 Genotype	肉用性状 Meat trait(Mean±SE)			
		背膘厚/cm BFT	眼肌面积/cm <sup>2</sup> EMA	眼肌深度/cm EMD	肌内脂肪含量/% IFC
SV1-SV2	II(126)	0.848±0.023	44.932±1.423	4.211±0.088	7.383±0.088 <sup>b</sup>
	IW(133)	0.867±0.025	45.370±1.129	4.344±0.096	7.624±0.073
	WW(29)	0.831±0.057	42.263±2.346	3.958±0.188	7.878±0.078 <sup>a</sup>
SV3	TT(123)	0.847±0.023	45.155±1.442	4.238±0.086	7.373±0.088 <sup>b</sup>
	TC(136)	0.854±0.024	45.449±1.116	4.291±0.099	7.639±0.069 <sup>a</sup>
	CC(29)	0.891±0.069	40.905±2.320	4.074±0.176	7.822±0.148 <sup>a</sup>
SV4	AA(259)	0.853±0.017	44.909±0.916	4.292±0.064 <sup>a</sup>	7.598±0.053 <sup>A</sup>
	AG(29)	0.870±0.064	44.478±1.888	3.843±0.225 <sup>b</sup>	7.056±0.203 <sup>B</sup>

同列右上角小写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ),大写字母不同表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同

Data marked with different superscripts within the same row differ significantly (Capital letters,  $P<0.01$ ; Small letters,  $P<0.05$ ). The same as below

表 4 秦川牛 *CD36* 基因组合基因型与肉用性状关联性分析Table 4 Associations of combined genotypes of the *CD36* gene with meat traits in Qinchuan cattle

组合位点 Combined site	组合基因型 Combined genotype	肉用性状 Meat trait(Mean ± SE)			
		背膘厚/cm BFT	眼肌面积/cm <sup>2</sup> LMA	眼肌深度/cm LMD	肌内脂肪含量/% IFC
<i>Xba</i> I- <i>Xsp</i> I- <i>Taq</i> I	IITTAA(102)	0.848±0.025	45.988±1.658	4.329±0.092	7.443±0.095
	IITTAG(11)	0.856±0.107	42.490±3.095	3.714±0.339	6.840±0.354 <sup>Bb</sup>
	IWTCAA(107)	0.861±0.026	46.023±1.284	4.402±0.110	7.715±0.070 <sup>a</sup>
	WWCCAA(20)	0.866±0.078	41.641±2.840	4.077±0.230	7.979±0.060 <sup>A</sup>

在肌内脂肪含量指标中 IITTAG 型个体显著低于 IWTCAA 型个体( $P<0.05$ ),极显著低于 WWC-CAA 型个体( $P<0.01$ )。这个结果和单个多态位点与秦川牛肉用性状的关联分析结果呈现一致性。

### 3 讨论

L. Love-Gregory 等通过在老鼠和人体中的遗传学研究,证实了常见 *CD36* 变体能够影响脂质水平和有氧代谢表型<sup>[17]</sup>。这些遗传学研究提供了人们对 *CD36* 在人体中潜在生理作用的进一步认识。先前的研究显示,*CD36* 基因突变与胰岛素耐受性、低脂联素水平和 2 型糖尿病相关<sup>[18]</sup>。使用数量性状基因座图谱发现 *CD36* 基因区域(~300 kb)与脂质浓度的变化相关<sup>[19-21]</sup>。在 *CD36* 基因早期的 SNP 相关性研究中,X. Ma 等对 *CD36* 突变型做了深入分析<sup>[22]</sup>,为后续研究提供了参考。目前,关于 *CD36* 基因的遗传学研究得到了更多的关注。

针对 *CD36* 的研究集中于老鼠和人,尚未发现关于牛 *CD36* 基因多态分析的报道。本研究发现了秦川牛 *CD36* 基因 4 个多态位点,SV1-SV2 连锁位点和 SV3 均位于内含子区,SV4 则位于基因编码区,为错义突变,引起了第 216 位氨基酸由 Asn 到 Asp 的突变。单倍型分析表明,8 种单倍型中 ITA 型(野生型)属于优势单倍型。物种的表型不仅受单个多态位点的影响,而且多态位点之间的组合效应也对物种的生长性状产生重大影响。*CD36* 基因 4 个多态位点与秦川牛肉用性状密切相关,除 SV4 位点在眼肌深度指标中存在显著性差异外,单个多态位点的不同基因型之间以及多态位点的组合基因型之间均在肌内脂肪含量指标中存在显著或极显著差异。肌内脂肪含量是决定牛肉大理石花纹的主要因素,当肌内脂肪达到一定比例且分布比较均匀时即呈现出高档的大理石花纹牛肉<sup>[23]</sup>。因此,在肉牛育种实践中,可通过人工选择,降低群体中劣势基因型 IITTAG 型个体的比例以提高肌内脂肪含量,改善

肉用性状。

相对于编码区域的突变,越来越多的证据显示非编码区域的突变能够对性状产生更大的影响<sup>[24]</sup>。内含子突变能够影响附近的剪切供体和调节元件<sup>[25]</sup>。例如,牛的 CSN1S1 第 4 外显子剪切供体末端(+6)的 1 个碱基突变引起了前体 mRNA 加工过程中上游外显子的跳读,导致了奶牛  $\alpha$ S1-casein A 蛋白表达量的下降<sup>[26]</sup>。而 CD36 基因存在多个剪切体,在骨骼肌、心、肝、脂肪组织、胎盘、脊髓、大脑和单核细胞中,它们的表达模式是高度变化的<sup>[27]</sup>。SV1、SV2 和 SV3 很可能就是通过影响 CD36 基因可变剪切体,进而调节 CD36 基因表达模式,对秦川牛肉用性状产生影响。SV4 则可能是直接改变编码蛋白的组成和结构,通过影响配体结合的特异性和效率,起到改变性状的作用。为了确定各位点的遗传学功能和作用,尚需进一步对可变剪切体和蛋白水平进行研究。

蛋白的功能是由其结构决定的,CD36 是 1 个发卡状结构,有 2 个跨膜区,胞外为 1 段较长的环状糖基修饰结构域,C 端和 N 端则分别跨膜延伸到胞内<sup>[28]</sup>。胞外部分形成 1 个疏水袋状结构,有利于脂肪酸的结合,而胞内羧基末端与蛋白定位和吸收油酸的能力有关<sup>[9]</sup>。这些结构特点直接决定了 CD36 在机体脂质代谢疾病方面起到的重要作用。对人类的研究显示,CD36 与胰岛素敏感性下降有关<sup>[29-31]</sup>。啮齿动物模型中,CD36 与脂肪酸的结合在代谢紊乱如胰岛素抵抗和非酒精性脂肪肝的形成过程中起到一定的作用<sup>[32-33]</sup>。另外,作为 CD36 的配体,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)能够通过激活核转录因子 PPAR $\gamma$  促进 CD36 的表达<sup>[34-35]</sup>。巨噬细胞摄入 ox-LDL 导致胞内胆固醇的积累,促进了向泡沫细胞的转化,过度转化则会导致动脉粥样硬化斑块和动脉粥样硬化的形成,存在于巨噬细胞表面的清道夫受体 CD36 负责巨噬细胞 50% 的脂质摄入,在动脉粥样硬化的形成过程中发挥着极其重要的作用<sup>[36]</sup>。因此,CD36 是极具潜力应用于治疗人类脂质代谢疾病的药物靶点,本研究的结果也为人类脂质代谢疾病的研究提供了参考依据。

#### 4 结 论

CD36 基因对秦川牛部分肉用性状特别是肌内脂肪含量性状有显著的影响,通过人工选择降低群体中 IITTAG 型个体的比例是一条改善秦川牛肉

用性状的有效途径。因此,可考虑将 CD36 基因作为秦川牛肉用选育的候选基因,以指导秦川牛肉的选育工作。

#### 参考文献:

- [1] FEBBRAIO M, HAJJAR D P, SILVERSTEIN R L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(6): 785-791.
- [2] SILVERSTEIN R L, FEBBRAIO M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior[J]. *Sci Signaling*, 2009, 2(72): re3.
- [3] ABUMRAD N, HARMON C, IBRAHIMI A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39(12): 2309-2318.
- [4] HARMON C M, ABUMRAD N A. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: Isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids[J]. *J Membrane Biol*, 1993, 133(1): 43-49.
- [5] 周丽华, 束刚, 朱晓彤, 等. 肌肉脂肪酸转运膜蛋白及其相互关系[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(11): 992-1000.
- [6] KOONEN D P Y, GLATZ J F C, BONEN A, et al. Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle[J]. *Mol Cell Biol Lipids*, 2005, 1736(3): 163-180.
- [7] YANG Y, CHEN M, LOUX T J, et al. Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells[J]. *Pediatric Surgery Int*, 2007, 23(7): 675-683.
- [8] AITMAN T J, GLAZIER A M, WALLACE C A, et al. Identification of CD36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1): 76-83.
- [9] FEBBRAIO M, ABUMRAD N A, HAJJAR D P, et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(27): 19055-19062.
- [10] FEBBRAIO M, HAJJAR D P, SILVERSTEIN R L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(6): 785-791.
- [11] CHRISTIAENS V, VAN HUL M, LIJNEN H R, et al. CD36 promotes adipocyte differentiation and adipogenesis[J]. *General Subjects*, 2012, 1820(7): 949-956.
- [12] PARK S Y, YUN Y, KIM I S. CD36 is required for myo-

- blast fusion during myogenic differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(4):705-710.
- [13] BOKOR S, LEGRY V, MEIRHAEGHE A, et al. Single-nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents [J]. *Obesity*, 2009, 18(7):1398-1403.
- [14] HENI M, MÜSSIG K, MACHICAO F, et al. Variants in the CD36 gene locus determine whole-body adiposity, but have no independent effect on insulin sensitivity[J]. *Obesity*, 2010, 19(5):1004-1009.
- [15] CHEN C S Y, BENCH E M, ALLERTON T D, et al. Preference for linoleic acid in obesity-prone and obesity-resistant rats is attenuated by the reduction of CD36 on the tongue[J]. *Am J Physiol-Regulat, Int Comp Physiol*, 2013, 305(11):R1346-R1355.
- [16] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(上、下册)[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] LOVE-GREGORY L, ABUMRAD N A. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity[J]. *Current Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14(6):527.
- [18] LEPRETRE F, LINTON K J, LACQUEMANT C, et al. Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population [J]. *Diabetes Metab*, 2004, 30(5):459-463.
- [19] ARYA R, BLANGERO J, WILLIAMS K, et al. Factors of insulin resistance syndrome-related phenotypes are linked to genetic locations on chromosomes 6 and 7 in nondiabetic Mexican-Americans[J]. *Diabetes*, 2002, 51(3):841-847.
- [20] LEHMAN D M, ARYA R, BLANGERO J, et al. Bivariate linkage analysis of the insulin resistance syndrome phenotypes on chromosome 7q[J]. *Hum Biol*, 2005, 77(2):231-246.
- [21] MALHOTRA A, ELBEIN S C, NG M C Y, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of quantitative lipid traits in families ascertained for type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2007, 56(3):890-896.
- [22] MA X, BACCI S, MLYNARSKI W, et al. A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(19):2197-2205.
- [23] 刘正柱, 董 辉. 影响牛肉品质的因素及牛肉嫩度的改善方法[J]. *山东畜牧兽医*, 2013, 34(8):19-20.
- [24] IBEAGHA-AWEMU E M, KGWATALALA P, ZHAO X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig[J]. *Mamm Genome*, 2008, 19(9):591-617.
- [25] CHEONG H, YOON D H, KIM L, et al. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle [J]. *BMC Genet*, 2006, 7(1):35.
- [26] MOHR U, KOCZAN D, LINDER D, et al. A single point mutation results in A allele-specific exon skipping in the bovine  $\alpha$  casein mRNA[J]. *Gene*, 1994, 143(2):187-192.
- [27] ANDERSEN M, LENHARD B, WHATLING C, et al. Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7(1):8.
- [28] TARHDA Z, SEMRALI O, KETTANI A, et al. Three dimensional structure prediction of fatty acid binding site on human transmembrane receptor CD36 [J]. *Bioinform Biol Insights*, 2013, 7:369.
- [29] AN P, FREEDMAN B I, HANIS C L, et al. Genome-wide linkage scans for fasting glucose, insulin, and insulin resistance in the national heart, lung, and blood institute family blood pressure program evidence of linkages to chromosome 7q36 and 19q13 from meta-analysis[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3):909-914.
- [30] LOVE-GREGORY L, SHERVA R, SUN L, et al. Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol [J]. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(11):1695-1704.
- [31] BONEN A, TANDON N N, GLATZ J F C, et al. The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Obes*, 2006, 30(6):877-883.
- [32] GOUDRIAAN J R, DAHLMANS V E H, TEUSINK B, et al. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice[J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(12):2270-2277.
- [33] KOONEN D P Y, JACOBS R L, FEBBRAIO M, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity[J]. *Diabetes*, 2007, 56(12):2863-2871.
- [34] HU Y F, YE H I, TSAO H M, et al. Impact of circulating monocyte CD36 level on atrial fibrillation and subsequent catheter ablation [J]. *Heart Rhythm*, 2011, 8(5):650-656.
- [35] GAUTAM S, BANERJEE M. The macrophage OxLDL receptor, CD36 and its association with type II diabetes mellitus[J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 102(4):389-398.
- [36] REZAEI H B, DOOSTI M, AMINIAN M, et al. Compare the effect of eicosapentaenoic acid and oxidized low-density lipoprotein on the expression of CD36 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *Iranian Biomed J*, 2013, 17(2):84.