

白羽番鸭脂联素基因外显子 1 与肉质、TC 和 TG 的关联分析

张依裕^{1,2}, 徐琪¹, 段修军³, 张海波¹, 赵文明¹, 孙国波³, 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学 动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009; 2. 贵州大学 动物科学学院 贵州 贵阳 550025; 3. 江苏省畜牧兽医职业技术学院 江苏 泰州 225300)

摘要:采用 PCR-SSCP 法对白羽番鸭脂联素基因外显子 1 进行 SNP 检测,并分析 SNP 对肉质、血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)的遗传效应。结果表明 检测到 3 种基因型(AA、AB 和 BB)和 2 个等位基因(A 和 B), AA 和 A 分别为优势基因型和优势等位基因,序列比对发现在外显子 1 存在 1 个 SNP 位点:A167G,为沉默突变,该位点在白羽番鸭群体中表现为中度多态,处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$);最小二乘法分析表明,AA 基因型个体的肌内脂肪(IMF)和血清总胆固醇(TC)显著高于 BB 基因型个体($P < 0.05$),而失水率则显著低于 BB 基因型个体($P < 0.05$)。结果揭示,A167G 位点对脂肪沉积、失水率和胆固醇浓度可能有显著的遗传效应。

关键词:白羽番鸭;脂联素基因;PCR-SSCP;关联分析

中图分类号:S834 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0115-04

Polymorphism in Exon - 1 of Adiponectin Gene and Its Association with Meat Quality and TC and TG in White Muscovy

ZHANG Yi-yu^{1,2}, XU Qi¹, DUAN Xiu-jun³, ZHANG Hai-bo¹, ZHAO Wen-ming¹, SUN Guo-bo³, CHEN Guo-hong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract:The 230 bp fragment of adiponectin gene exon 1 of White Muscovy was amplified with the primer designed from *Cairina moschata* DNA sequence (GQ873067) and its polymorphism was detected by PCR-SSCP method and then its association with meat quality and serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were analyzed. 2 alleles (A and B) and 3 genotypes (AA, AB and BB) were observed, in which A and AA were predominant. One SNP (A167G) was found in exon 1 of adiponectin gene, which belonged to silent mutation. The A167G loci belonged to medium polymorphism, and it was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The birds of genotype AA had significantly higher IMF and TC than those of genotype BB ($P < 0.05$). The birds of genotype AA had significantly lower percentage of chest muscle loss water than those of genotype BB ($P < 0.05$). The study suggested that the A167G loci has significant genetic

收稿日期:2009-10-13 修回日期:2009-11-12

基金项目:国家科技支撑计划重大专项(2006BDA01A09)、国家科技支撑计划重点项目(2006BDA14B06)和现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-45-04)联合资助

作者简介:张依裕(1976-),男,讲师,博士生,主要从事动物遗传资源保护与利用研究, E-mail: zyy8yyc@163.com;

* 通讯作者:陈国宏 教授 博导 E-mail: ghchen@yzu.edu.cn.

effect on fatty deposition, percentage of chest muscle loss water and TC concentration.

Key words: White Muscovy; adiponectin gene; PCR - SSCP; association analysis

脂联素是脂肪细胞特异性分泌的一种激素,参与调节生物体的能量稳态、葡萄糖代谢、脂肪代谢及抵抗炎症反应等生命活动中起着重要作用,是至今发现的唯一与肥胖呈负相关的脂肪细胞特异性蛋白^[1]。因此,脂联素基因引起了人们的广泛关注,并成为研究脂肪代谢的重要候选基因。脂联素基因又称为 *ACRP30*、*AdipoQ*、*APM1* 和 *GBP28*, 是 1 个单拷贝基因。人和哺乳动物脂联素基因包括 3 个外显子和 2 个内含子,而禽类由 2 个外显子和 1 个内含子组成^[2]。目前,已对人和哺乳动物脂联素基因的结构功能和基因突变及其对肥胖和疾病的相关性等开展了大量的研究工作,已发现该基因在人上至少存在 11 个突变位点,该基因启动子和内含子的 C/EBP 转录因子在脂肪细胞分化和调控脂联素基因的表达起着重要作用^[3]。同时,该基因的启动子区的 PPAR 应答元件(PPRE)与过氧化物酶增生物激活受体 γ (PPAR γ) 结合后,增强启动子的转录活性^[4]。但是,对禽类脂联素基因的研究较晚,其发挥作用的功能结构元件至今尚未确定,而且相关的研究报道较少。因此,本研究对白羽番鸭脂联素基因外显子 1 进行 SNP 检测,探讨 SNP 位点与肉质和血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量的关系,为进一步研究该基因的功能及开展番鸭的标记辅助选择提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用白羽番鸭来自江苏畜牧兽医职业技术学院中国水禽基因库,同批出雏,饲养管理一致。随机抽取 10 周龄的白羽番鸭 58 只(♂ 30, ♀ 28)进行翅静脉采血和性状测定。试验鸭屠宰前禁食 12 h,自由饮水。血样被分为 2 份,1 份采用 ACD 抗凝, -20 °C 保存;另 1 份用于分离血清,血清也在 -20 °C 保存。胸肌常规肉质指标:肉色、pH、嫩度和失水率按包文斌等^[5]所述方法进行测定,胸肌肌内脂肪(IMF)按索氏抽提法进行测定,血清甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)采用 RA-1000 型全自动生化分析仪进行测定,不饱和脂肪酸(UFA)采用 GC-14C 型气相色谱仪进行测定。*Taq* 酶、dNTP、引物及其它常用试剂均购自上海生工。

1.2 基因组 DNA 提取

采用酚-氯仿法对基因组 DNA 进行提取,6 g/L 琼脂糖检测,核酸蛋白测定仪测定其浓度,稀释成终浓度为 100 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据番鸭脂联素基因序列(GQ873067)设计引物扩增白羽番鸭脂联素基因外显子 1, F:5' - CACT-TCAGGAACGCACCATG - 3'; R:5' - ACCTTGCTCTCCTTTCTCTC - 3', 预扩增片段约 230 bp。PCR 反应总体积 20 μ L: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.4 μ L, 10 μ mol/ μ L 引物各 1.0 μ L, 25 mmol/mL Mg²⁺ 1.5 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L, 100 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 12.9 μ L。PCR 程序为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 10 °C 保存。

1.4 SSCP 分型

在 5 μ L PCR 产物中加入 7 μ L 上样缓冲液 [(980 mL/L 甲酰胺、0.25 mL/L 溴酚蓝、0.25 mL/L 二甲苯青、10 mmol/L EDTA、 φ (甘油) = 2%] 98 °C 变性 12 min, -20 °C 放置 15 min, 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr: Bis = 39:1)电泳,银染显色,判型。选取不同基因型个体的 PCR 产物切胶回收,由上海生工进行双向测序。

1.5 数据统计与分析

运用 DNASTar 对序列进行比对,寻找 SNP 位点;对检测到的基因型进行计数,分别统计等位基因频率、基因型频率、多态信息含量(PIC)、有效等位基因数(*N_e*)、位点杂合度(*h*)以及多态位点的基因型频率分布的 Hardy - Weinberg 平衡检验。利用 SPSS11.5 软件的广义线性模型(general linear model, GLM)对各性状值与基因型间的关系进行最小二乘法估计及差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 白羽番鸭脂联素基因外显子 1 的 PCR - SSCP 检测

用设计的引物扩增白羽番鸭脂联素基因外显子 1, 15 g/L 琼脂糖电泳检测, 扩增片段长度与预期片段 230 bp 相符, 且特异性较好, 可进行 SSCP 分析。结果表明, 共检测到 3 种基因型, 分别命名为 AA、AB 和 BB, 2 个等位基因 A 和 B (图 1)。对纯合子 AA 和 BB 进行双向测序, 序列比对发现, BB 基因型与 GenBank 上的序列相同 (GQ873067), 在外显子 1 存在 1 个 SNP, 位于 167 bp 处, 处于编码区内, 发生 A→G 突变 (图 2), 该突变没有导致氨基酸的变化, 为沉默突变。

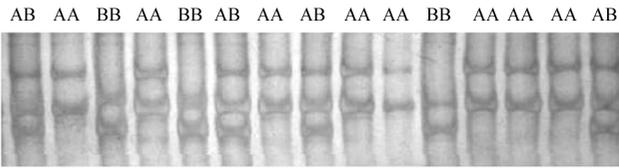


图 1 PCR - SSCP 图谱

Fig.1 PCR - SSCP band pattern on a 12% non - denaturing polyacrylamide gel

2.2 白羽番鸭脂联素基因第 1 外显子 A167G 位点的遗传特性

对发现的 A167G 位点在白羽番鸭群体中的遗传参数进行统计, 结果见表 1。由表 1 可知 3 种基因型分布: AA > AB > BB, 其频率分别为 0.431 0、0.413 8 和 0.155 2, 等位基因 A 为优势等位基因, 其频率为 0.637 9, 该座位的基因杂合度 (h) 为 0.486 8, 多态信息含量 (PIC) 为 0.400 3, 表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$), χ^2 检验结果表明, 该基因座在白羽番鸭群体中处于 Hardy - Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)。

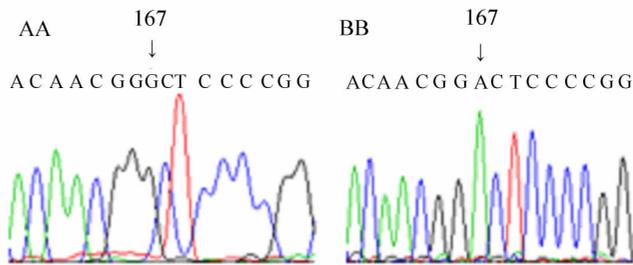


图 2 AA 和 BB 基因型序列比对结果

Fig.2 Sequence alignment result of AA and BB genotypes

表 1 白羽番鸭脂联素基因外显子 A167G 位点的遗传特性

Tab.1 Characteristics of A167G loci of adiponectin gene in White Muscovy

位点/bp Loci	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies		h	N_e	PIC	χ^2
	AA	AB	BB	A	B				
A167G	0.431 0(25)	0.413 8(24)	0.155 2(9)	0.637 9	0.362 1	0.486 8	1.948 6	0.400 3	0.45

$\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$ $\chi^2_{0.05(2)} = 5.99$ 。

2.3 白羽番鸭脂联素基因多态座位与肉质和脂肪性状的最小二乘分析

在白羽番鸭脂联素基因中发现的 A167G 位点对脂肪性状间的最小二乘分析结果见表 2。结果显示, AA 基因型个体的肌内脂肪 (IMF) 和血清总胆固醇 (TC) 显著高于 BB 基因型个体 ($P < 0.05$), 而失水率则显著低于 BB 基因型个体 ($P < 0.05$), 其它各性状各基因型间未达到显著性差异 ($P > 0.05$), 表明 167 位的 SNP 对脂肪沉积、失水率和胆固醇浓度可能有显著性的影响。

3 讨论

3.1 番鸭脂联素基因多态性研究

目前, 对人和哺乳动物脂联素基因功能的研究较为深入 [6-7]。而对禽类脂联素基因的研究较晚, 主要见于该基因组织表达研究上的报道 [2, 8-9], 而关于该基因多态性研究的报道较少。刘大林等 [10] 在京海黄鸡脂联素基因内含子发现 C1251T 突变 (AY786316), 该位点对腹脂重有显著的遗传效应; 董隧等 [11] 发现鸭脂联素基因存在 7 个单碱基突变, 其中 G430A、A457G、T525C 突变导致 144、153 和 175 位氨基酸发生改变, 而 C507T、T540C、C576T 和 C597T 突变为沉默突变 (DQ452618)。本研究对白羽番鸭

脂联素基因外显子 1 进行扩增和 SSCP 分析,产生 3 种基因型和 2 个等位基因,AA 为优势基因型,A 为优势等位基因,基因型分布处于 Hardy - Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$),在外显子 1 存在 1 个 SNP: A167G,该突变为沉默突变,该位点在白羽番鸭群体中表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$),说明该群体没有对脂联素基因外显子 1 中的突变位点进行直接或间接选择或虽经过选择,又重新达到平衡状态。本研究首次发现在白羽番鸭群体中脂联素基因外显子 1 存在多态,丰富了前人的研究成果,但它的突变对脂联素基因的表达及其遗传效应和其它番鸭品种中是否也存在多态现象还有待进一步研究。

表 2 A167G 位点与肉质、TC 和 TG 间的最小二乘法分析 ($M \pm Se$)

Tab.2 Least square analysis between A167G loci and meat quality and TC and TG in White Muscovy population ($M \pm Se$)

性状 Traits	A167G 位点 A167G loci		
	AA (25)	AB (24)	BB (9)
肌内脂肪 /% Intramuscular fat (IMF)	6.18 ± 0.32 ^a	5.87 ± 0.33 ^{ab}	4.89 ± 0.52 ^b
不饱和脂肪酸 /% Unsaturated fatty acids (UFA)	55.20 ± 0.74	56.19 ± 0.72	56.35 ± 1.22
pH 值 pH - value	5.80 ± 0.02	5.79 ± 0.02	5.81 ± 0.04
肉色 /OD ₅₄₀ Meat color	0.79 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.82 ± 0.08
嫩度 /kg Shear value	2.42 ± 0.13	2.25 ± 0.12	2.39 ± 0.23
失水率 /% Percentage of chest muscle loss water	16.55 ± 1.76 ^a	18.58 ± 0.99 ^{ab}	20.91 ± 1.04 ^b
血清甘油三酯 / (mmol · L ⁻¹) Serum triglyceride (TG)	1.12 ± 0.04	1.13 ± 0.06	1.15 ± 0.04
血清总胆固醇 / (mmol · L ⁻¹) Serum total cholesterol (TC)	3.77 ± 0.15 ^a	3.52 ± 0.09 ^{ab}	3.40 ± 0.09 ^b

同行肩标小写字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Small letters (a, b) denoted significant difference ($P < 0.05$).

3.2 番鸭脂联素基因多态及其对生产性状的影响

在人、小鼠、鸡、鸭、鹅脂联素基因的研究表明,该基因在脂肪组织中高度表达,揭示该基因在脂肪沉积中扮演着重要作用。目前,大多研究报道都集中在脂联素基因 SNP 与人类肥胖和疾病的相关性研究^[12],而关于禽类脂联素基因 SNP 对生产性能及疾病的相关性尚无报道。本研究首次对白羽番鸭脂联素基因第 1 外显子 A167G 位点与肉质和血清总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 的关联性进行分析,表明该位点与 IMF、失水率和 TC 浓度有显著相关 ($P < 0.05$)。Chambers 等^[13]研究发现,IMF 对肉的风味、多汁性和嫩度有显著的影响,它们之间呈正相关关系;贾金秋等^[14]报道,TC 和 TG 含量与脂肪沉积特别是与脂肪肝发生率成正相关;IMF 含量与肌肉水份和烹调损失存在负相关,提高 IMF 含量,降低皮下脂肪和腹脂是当今乃至今后禽类育种的主攻目标之一,这是商业育种者追求利益最大化的根本之路。本研究结果揭示 A167G 位点可能对白羽番鸭肉质和脂肪代谢有显著性影响,AA 基因型是肉质和脂代谢的有利基因型,且该位点表现中度多态,适合作为分子育种标记。但有待于扩大样本数、正反交试验和其它番鸭品种中进一步验证。同时,还应筛查番鸭脂联素基因编码区及其两翼序列特别是启动子区的多态性是否对肉质和其他生产性状也存在显著效应,最终获得真实可靠的分子遗传标记,以期用于番鸭性状标记辅助选择的育种实践。

参考文献:

[1] Kubota N, Tetauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin cause insulin resistance and neointimal formation [J]. J Biol Chem 2002 277(29):25863 - 25866.

[2] Sreenivasa Maddineni, Shana Metzger, Olga Ocon, et al. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: Food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression [J]. Endocrinology 2005 146(10):4250 - 4256.

[3] Saito K, Tobe T, Yoda M, et al. Regulation of gelatin - binding protein 28 (GBP28) gene expression by C/EBP [J]. Biol Pharm Bull, 1999 22(11):1158 - 1162.

[4] Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, et al. Induction of adiponectin a fat - derived antidiabetic and antiatherogenic factor by nuclear receptors [J]. Diabetes 2003 52(7):1655 - 1663.

[5] 包文斌, 周群兰, 吴信生, 等. 藏鸡和萧山鸡体尺及屠宰性能的比较分析 [J]. 中国家禽 2005 27(7):17 - 19.

(下转第 134 页)

- [8] Malmlof K. Amino acid in farm animal nutrition metabolism partition and consequences of imbalance [J]. Swedish Journal of Agriculture Research, 1988, 18(4):191-193.
- [9] Coma J, Carrion D, Zimmerman D R. Use of plasma urea nitrogen as a rapid response criterion to determine the lysine requirement of pigs [J]. Animal Science, 1995, 73:472-481.
- [10] Rosebrough R W. Effect of protein level and supplemental lysine on growth and urea cycle enzyme activity in the pig [J]. Growth, 1983, 47(4):348-360.
- [11] Maccacchini Maria, Luisia. Promoting animal growth using antibody against somatostatin [P]. U S Patent 4,599,299, Jul 8, 1986.
- [12] Sun Y X, Drane G L, Currey S D, et al. Immunization against somatotropin release inhibiting factor improves digestibility of food, growth and wool production of crossbred lambs [J]. Aust J Agric Res, 1990, 41:401-411.
- [13] 舒邓群, 陈荣达, 茆达干, 等. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与生长抑素融合表达基因疫苗的免疫对断奶仔猪某些代谢物浓度的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(4):693-696.
- [14] 王子荣, 任明强, 胥清富, 等. 生长抑素基因工程苗对绵羊外周血液某些代谢物浓度和激素水平的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(4):404-408.
- [15] 李霞, 王金龙. 生长抑素的免疫调节作用 [J]. 国外医学:免疫学分册, 2004, 27(3):154-157.
- [16] 刘贵莲. 植物提取物和半胱胺对肥育猪营养饲养效应研究 [D]. 成都:四川农业大学, 2007.

(上接第 118 页)

- [6] Senay A, Mithat B, Alpaslan T, et al. Serum resistin and adiponectin levels in young non-obese women with polycystic ovary syndrome [J]. Gynecol Endocrinol, 2009, 15(9):1-6.
- [7] Bonnard C, Durand A, Vidal H, et al. Changes in adiponectin, its receptors and AMPK activity in tissues of diet-induced diabetic mice [J]. Diabetes & Metabolism, 2008, 34(1):52-61.
- [8] 朱枫桥, 周杰, 郑智勇, 等. 皖西白鹅与朗德鹅脂肪基因表达的比较 [J]. 中国草食动物, 2009, 29(3):5-8.
- [9] 徐国庆, 龚道清, 储冬生, 等. 鹅脂联素基因的克隆、序列分析及组织表达 [J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(6):941-946.
- [10] 刘大林, 俞亚波, 魏岳, 等. 脂联素基因对京海黄鸡体重及屠体性状的遗传效应 [J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2009, 30(1):31-34.
- [11] 董颀, 龚道清, 孟和, 等. 鸭脂联素基因单核苷酸多态性检测及群体遗传分析 [J]. 遗传, 2007, 29(8):995-1000.
- [12] Qi Y, Takahashi N, Hileman S M, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight [J]. Nature Medicine, 2004, 10(5):524-529.
- [13] Chambers J R, Fortin A, Mackie D A, et al. Comparison of sensory properties of meat from broilers of modern stocks and experimental strains differing in growth and fatness [J]. Canad Instit Food Sci Technol J, 1989, 22(4):353-358.
- [14] 贾金秋, 谢彦军. 脂肪肝与血清胆固醇、甘油三酯关系的研究 [J]. 中华现代临床医学杂志, 2004, 2(9):1396.