

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00153

A-FABP 基因多态性与肉鸡生长和体组成性状的关联

王启贵, 关天竹, 王守志, 张慧, 王志鹏, 李辉

东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030

摘要: 为探讨 *A-FABP* 基因多态性对肉鸡生长和体组成性状的影响, 文章选用肉鸡高、低脂双向选择品系第十世代肉仔鸡为实验材料, 采用测序、PCR-RFLP、PCR-LP、DHPLC 方法进行基因多态性检测和个体基因型分析, 通过对 8 个 SNPs 进行连锁不平衡分析并选择 5 个标签 SNPs 构建单倍型, 进而利用单位点和单倍型分别与鸡生长和体组成性状进行关联分析。结果表明, 7 个 SNPs(除 SNP 5 以外)及单倍型同时对鸡肌胃重、肌胃率有显著影响($P<0.05$), 而对生长和其他体组成性状无显著影响($P>0.05$)。鉴于不同物种 *A-FABP* 基因现有的功能研究均没有发现其对消化系统有重要作用, 因此该基因是否为影响肉鸡肌胃重和肌胃率的主效基因还有待于进一步研究。

关键词: *A-FABP* 基因; 鸡; 单倍型; 生长; 体组成性状

Association between chicken *A-FABP* gene polymorphisms and growth and body composition traits

WANG Qi-Gui, GUAN Tian-Zhu, WANG Shou-Zhi, ZHANG Hui, WANG Zhi-Peng, LI Hui

College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: This experiment was designed to study the effects of polymorphism of *A-FABP* gene on growth and body composition traits in chicken. The 10th generation broiler population, derived from the Northeast Agricultural University broiler lines divergently selected for abdominal fat content (NEAUHLF) was used. Polymorphism among individuals was detected by DNA sequencing, PCR-RFLP, PCR-LP, and DHPLC. Linkage disequilibrium analysis for eight SNPs was performed, and five htSNPs were selected to construct haplotypes. The association analysis between the individual SNPs and haplotypes and growth and body composition traits were investigated, respectively. The results showed that there were consistently significant effects on muscle stomach weight (MSW) and percentage of muscle stomach (MSW/BW) ($P<0.05$) in the seven SNPs (except for SNP 5) and haplotypes, but no significant effect on any other trait ($P>0.05$). Due to no evidence on effects of *A-FABP* for digestion system in other species, future experiments need to be developed to confirm whether *A-FABP* could be a major gene of MSW and MSW/BW traits in broiler chicken.

Keywords: *A-FABP* gene; chicken; haplotype; growth; body composition traits

经过几十年的家禽育种工作, 肉鸡的生长速度和产肉量水平都已得到显著的提高。然而, 伴随着快速生长, 一些负面效应也随之出现, 如腹水综合症、机体免疫功能下降以及一些腿部疾病, 特别是

收稿日期: 2010-04-01; 修回日期: 2010-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30771542), “十一五”国家科技支撑计划重点项目(编号: 2008BADB2B01)和黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(编号: 1152G005)资助

作者简介: 王启贵, 博士, 副教授, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: wangqigui@hotmail.com

关天竹, 硕士研究生, 专业方向: 家禽遗传育种。E-mail: gtz1983@sina.com

王启贵与关天竹同为第一作者。

通讯作者: 李辉, 教授, 研究方向: 家禽遗传育种。E-mail: lihui@neau.edu.cn

肉鸡腹脂沉积过多已是突出问题^[1]。腹脂沉积过多会造成不必要的经济损失,又会严重影响产蛋率、受精率和孵化率,还可诱导脂肪肝综合症的发生,从而加大了产蛋期的死淘率。因此,在进行传统育种的同时,在分子水平上研究参与脂肪代谢的基因,寻找相关分子遗传标记并进行分子标记辅助选择,是有效解决这类问题的手段之一^[2]。

A-FABP (Adipocyte fatty acid binding protein, 也称 aP2)即脂肪型脂肪酸结合蛋白与心脏型(H-)、脑型(B-)、髓磷脂型(M-)、表皮型(E-)、回肠型(IL-)、肝脏型(L-)、睾丸型(T-)、小肠型(I-)脂肪酸结合蛋白共同组成了脂肪酸结合蛋白家族(Fatty acid binding proteins, *FABPs*),该家族参与细胞内脂肪酸的摄取,并将其转运至 β -氧化场所以及甘油三酯和磷脂合成部位^[3],并且通过调节脂肪酸浓度来调控机体内脂类代谢的过程^[4]。近年来,*FABPs* 基因敲除小鼠模型的建立为我们进一步了解 *FABPs* 的生物学功能提供了直接的证据,即通过研究野生型小鼠与 *A-FABP* 敲除型小鼠在脂肪酸的摄取情况、脂质代谢、营养性肥胖诱导的胰岛素抗性等方面的差异来揭示该基因的生物学功能。与野生型小鼠相比,*A-FABP* 基因敲除的小鼠脂肪组织内的脂肪酸流速或脂化作用没有发生变化^[5];基础脂解作用降低了大约 40%^[5,6];敲除肥胖小鼠的 *A-FABP* 基因后,不仅可以改善其外围胰岛素抵抗,还可以维护胰腺 β -细胞的正常功能^[7]。鸡的 *A-FABP* 基因编码一种小分子细胞内蛋白质,该基因位于鸡 2 号染色体上,由 4 个外显子和 3 个内含子构成,编码 132 个氨基酸残基。与哺乳动物 *A-FABP* 基因相似,鸡的 *A-FABP* 也特异性在脂肪组织中表达^[8,9],Shi 等^[9]发现 mRNA 和蛋白表达水平均是在高脂系肉鸡中低于低脂系肉鸡中的表达,推测 *A-FABP* 高表达水平可诱导高的脂解率,从而导致腹部脂肪块的减少。Li 等^[10]在北京油鸡和京星鸡中发现,*A-FABP* 基因 mRNA 水平在北京油鸡中显著高于京星鸡,公鸡中显著高于母鸡,并推测在这两个品种中 *A-FABP* 基因对肌肉脂肪含量有显著影响。

A-FABP 基因作为脂肪代谢的重要候选基因一直受到人们的密切关注,王启贵等^[11]首次克隆出了鸡的 *A-FABP* 基因,随后 Wang 等^[12]、叶满红等^[13]、陈宽维等^[14]、罗桂芬等^[15]、屠云洁等^[16]对该基因进行了多态性检测,并且与不同品种鸡的重要经济性

状进行了关联分析,分析结果表明 *A-FABP* 多态性位点与脂肪等性状显著相关。刘琛等^[17]对 *A-FABP* 与 *AMPD 1*(Adenosine monophosphate deaminase 1) 基因 SNP 位点进行组合,并与北京油鸡部分肉质性状进行效应分析,结果发现合并基因型可以显著的提高肌肉脂肪与肌苷酸的含量。

上述研究均是在 *A-FABP* 基因的外显子或内含子区展开的多态性分析,本研究在对外显子检测的同时,把检测区域扩展到 5'调控区以及 3'调控区,并且首次选择肉鸡(东北农业大学特有的肉鸡高、低脂双向选择品系)为实验材料,共检测了 8 个 SNP 位点,进而与鸡生长和体组成性状进行关联分析。同时还分析了不同多态位点之间的连锁不平衡程度,选择标签 SNPs,利用标签 SNPs 构建单倍型,并用单倍型与鸡生长和体组成性状进行关联分析。本研究试图进一步寻找 *A-FABP* 基因与鸡生长和体组成性状相关或紧密连锁的 SNPs,为分子标记辅助选择在肉鸡育种中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究以东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系第十世代肉仔鸡为实验材料,共计 627 只个体。鸡群按常规方法饲养管理。称量其出生重,1、3、5、7 周龄体重,于 7 周龄时翅静脉采血,EDTA- Na_2 抗凝,酚-氯仿抽提 DNA 后,TE 溶解-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取上清液,测定极低密度脂蛋白含量。7 周龄屠宰后测定屠体重、腹脂重、大胸肌重、小胸肌重、腿肌重、心脏重、肝脏重、脾脏重、肌胃重、腺胃重、睾丸重、跖爪重、股骨重,并除以 7 周龄活重计算出相应的比率。测量 7 周龄跖骨长、跖骨围、龙骨长、胸宽、胫骨长、股骨长。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据鸡 *A-FABP* 基因序列(GenBank 登录号: AF432507)和鸡基因组测序结果(www.genome.ucsc.edu, UCSC),设计引物扩增 *A-FABP* 基因 5'调控区序列(表 1),扩增片段预期大小为 2 016 bp。分别以两只高脂肉鸡、两只低脂肉鸡、两只白耳黄鸡的基因

组为模板, 进行上述 PCR 扩增, 并克隆测序。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对, 针对发现的多态性位点利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计引物 SNP 1-5; 同时对第一外显子^[8]、第三外显子^[18]和 3'调控区^[19]已知的 3 个 SNPs 位点分别合成引物 SNP 6-8(表 1)。上述引物均由英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 多态性检测分析

PCR 扩增体系为: 50 ng/ μ L 基因组 DNA 1 μ L、10 \times PCR Buffer 1.25 μ L、10 mmol/L dNTP 1 μ L、10 mol/L 上下游引物各 0.25 μ L、5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μ L、去离子灭菌水 9 μ L。PCR 扩增程序: 94 7 min; 94 30 s, (45 ~59.1)30 s, 72 30 s, 共 35 个循环; 72 7 min。复性温度见表 1。

根据 SNPs 的突变类型, 分为 3 种分型方式: SNP 1、SNP 2、SNP 6 突变位点可被限制性内切酶切割, 选用限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 分型方法; SNP 3、SNP 4、SNP 5 为插入缺失型突变, 选用长度多态性 (Length polymorphisms, LP) 分型方法; SNP 7、SNP 8 突变位点没有可识别的限制性内切酶, 选

用高效液相色谱仪 (Denatured high performance liquid chromatography, DHPLC) 进行分型。

RFLP 分型体系: 5 μ L 的 PCR 产物, 内切酶分别为 2 U *Bse*L 内切酶、3 U *Bmg*T 120 I 内切酶、3 U *Taq* 内切酶, 2 μ L Buffer 和 12.9 μ L 的去离子灭菌水混合, 分别于 55、37、65 度酶切过夜。酶切产物均经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测观察结果。

LP 分型体系: 0.5 μ L 的 PCR 产物、5 μ L 的非变性上样缓冲液, 利用 14% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测观察结果。

DHPLC 分型: 变性温度分别为 57.3、56.5, 仪器自动吸取 PCR 产物 5 μ L, 以变性温度将样本在 DNA 分离柱中洗脱。洗脱液由缓冲液 A 和 B 组成, 缓冲液 A 配方为 0.1 mol/L 乙酸三乙基胺 (Triethylammonium acetate, TEAA), 0.025% 乙腈 (Acetonitrile, ACN); 缓冲液 B 配方为 0.1 mol/L TEAA, 25% ACN。仪器通过改变缓冲液 A 和 B 的浓度来增加洗脱液中乙腈的浓度, 每次运行后用缓冲液 D (75% ACN) 清洗分离柱。洗脱曲线通过紫外线 (260 nm) 探测器检测获得。样本第一次检测可分出纯合型和杂合型, 杂合型可直接记录, 纯合型再与已知纯合型 (测序得知) 等量混合变性、复性后再检测一

表 1 鸡 *A-FABP* 基因 SNPs 引物序列

位点	引物序列(5' 3')	扩增长度(bp)	复性温度()
<i>A-FABP</i> 5'调控区	GGGGTACCTCCAAAGAAGTGAAT TTGTCAAGCTTGGTAGCAGTC	2 016	50.2
SNP 1	AGGGTAACTAATCATAACCTA ACTTCTATCCTTTGGCTTT	195	45
SNP 2	GAGATGAGGCAACTCTTTC CATTCTTCTTAGGTGGATT	296	45
SNP 3	AAA AGTATGTTGAAGAAATC TCA TGA AGA ACTGAGGCA	138/128	47.1
SNP 4	ACAGCCAGAAGGAACATC TATCAGTCCACTGAAGGT	199/177	48.4
SNP 5	GCCAAGGAAGTAGGATATA TTTCAGTCTCCATATTGTAT	174/167	55
SNP 6	AGACTGCTACCTGGCCTGACA CATCCTACTGGAATACGG	702	58
SNP 7	GGTCCA AAGCACCTGATGA CCATCCACCACTTTCCTCTT	141	56.4
SNP 8	CGA AAGAGCATGAGGAAG GCCACAACAAATTAGGC	166	59.1

次即可得之基因型。

命名方式为: 突变型用突变前后碱基命名, 例如 A 到 G 的突变, 则基因型表示为: *AA*、*GG*、*AG* 型; 插入缺失型用 *D*(Delete)、*I*(Insert)表示, 即基因型表示为: *DD*、*II*、*ID* 型。

1.2.3 统计分析

根据肉鸡高、低脂双向选择品系资源群体的特点, 构建基因型效应统计模型(1)~(3):

$$(1) Y = \mu + G + L + G \times L + F(L) + D(F, L) + BW_0 + e;$$

$$(2) Y = \mu + G + L + G \times L + F(L) + D(F, L) + BW_7 + e;$$

$$(3) Y = \mu + G + L + G \times L + F(L) + D(F, L) + e;$$

利用多态位点基因型信息构建单倍型, 分析软件使用 SAS 9.1.3。

其中, Y 为性状观测值, μ 为群体均值, G 为基因型固定效应(计算单倍型时为单倍型固定效应), L 为品系固定效应, $G \times L$ 为基因型和品系互作效应, $F(L)$ 为品系内家系的随机效应, $D(F, L)$ 为家系与品系内母鸡的随机效应, BW_0 、 BW_7 作为协方差变量, e 为剩余值效应。体重性状用 BW_0 作为协变量, 用模型(1); 体组成性状用 BW_7 作为协变量, 用模型(2); 率性状不用协变量校正, 用模型(3)。模型(1)~(3)使用统计软件 JMP 4.0 检验基因型与性状间的相关程度, 并估计性状的最小二乘均值。显著水平为 $P < 0.05$, 极显著水平为 $P < 0.01$ 。

1.2.4 连锁不平衡程度分析及标签 SNP(haplotype tag SNP, htSNP)的选择

利用 Haploview 4.2^[20]软件, 分析连锁不平衡程度。运行 Tagger 工具, 根据 SNP 之间 $r^2 > 0.8$ 的原则选择标签 SNP^[21]。单倍型块的划分采用 D' 值的 95% 置信区间在 0.70~0.98 的相邻 SNP 被归入同一个单

倍型块^[22]。

2 结果与分析

2.1 SNPs 发现及命名

以两只高脂肉鸡、两只低脂肉鸡、两只白耳黄鸡的基因组为模板, 利用 *A-FABP* 5'调控区引物进行 PCR 扩增, 扩增片段回收、克隆到 pMD18-T 中然后进行测序, 扩增产物长度为 2 016 bp。利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对, 结果在 5'调控区首次发现 5 个 SNP 位点。另外对已知的第一外显子、第三外显子和 3'调控区的 SNP 位点在该群体中也检测出多态性, 参照命名系统(www.hgvs.org/mutnomen)对这 8 个 SNP 位点进行统一命名, 详见表 2。

2.2 多态性检测及基因频率分析

针对上述 8 个 SNP 位点用相应引物(表 1)对肉鸡高、低脂系第十世代基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增片段与目的片段大小一致且特异性较好。采用各自分型方法进行个体基因型分析, 分别产生 3 种基因型(表 3)。SNPs 多态位点在两系中的基因型频率和等位基因频率见表 3 所示。

对 SNP 1~SNP 8 变异位点产生的不同基因型在高、低脂系第十世代进行基因型和等位基因频率分析, 并对等位基因频率进行卡方独立性检验(χ^2)。从基因型频率可以看出, 无论是高脂系还是低脂系, 总有一种基因型频率是非常低的, 尤其是 SNP 5 位点, 在低脂系中仅有 *DD* 基因型, 在高脂系中 *II* 基因型也仅为 9 个。等位基因频率结果表明除 SNP 2、SNP 3 外, 其它 6 个 SNP 在十世代两系间等位基因频率存在极显著差异($P < 0.01$)。

表 2 鸡 *A-FABP* 基因 SNP 位置及命名

位点	位置	变异类型	命名
SNP 1	5'调控区	单点突变: G/A	g.-1376 G>A
SNP 2	5'调控区	单点突变: C/T	g.-1117 C>T
SNP 3	5'调控区	10 bp 缺失(CATGTAATAG)	g.-972_-963 del 10
SNP 4	5'调控区	22 bp 插入(TAGCATTAGAGAATTGGTCAGG)	g.-846_-845 ins 22
SNP 5	5'调控区	7 bp 缺失(TCCCAAG)	g.-439_-433 del 7
SNP 6	第一外显子	单点突变: C/T	g.51 C>T
SNP 7	第三外显子	单点突变: G/A	g.1729 G>A
SNP 8	3'调控区	单点突变: C/T	g.3265 C>T

表 3 SNPs 多态位点基因型频率及等位基因频率在第 10 世代两系间的比较

SNP 位点	品系	个体数	基因型频率(频数) ¹			等位基因频率		χ^2 值(<i>P</i> 值)
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	
SNP 1	低脂系	290	0.031(9)	0.293(85)	0.676(196)	0.178	0.822	$\chi^2=92.54$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	333	0.147(49)	0.568(189)	0.285(95)	0.431	0.569	
SNP 2	低脂系	290	0.676(196)	0.290(84)	0.034(10)	0.821	0.179	$\chi^2=1.44$ (<i>P</i> =0.2848)
	高脂系	332	0.696(231)	0.295(98)	0.009(3)	0.843	0.157	
SNP 3	低脂系	287	0.035(10)	0.296(85)	0.669(192)	0.183	0.817	$\chi^2=2.16$ (<i>P</i> =0.1420)
	高脂系	317	0.006(2)	0.290(92)	0.703(223)	0.151	0.849	
SNP 4	低脂系	287	0.679(195)	0.279(80)	0.042(12)	0.819	0.181	$\chi^2=95.16$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	330	0.294(97)	0.530(175)	0.176(58)	0.559	0.441	
SNP 5	低脂系	281	0(0)	0(0)	1(281)	0	1	$\chi^2=156.61$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	304	0.030(9)	0.427(130)	0.543(165)	0.243	0.757	
SNP 6	低脂系	283	0.668(189)	0.297(84)	0.035(10)	0.816	0.184	$\chi^2=91.41$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	326	0.267(87)	0.586(191)	0.147(48)	0.560	0.440	
SNP 7	低脂系	290	0.665(193)	0.307(89)	0.028(8)	0.819	0.181	$\chi^2=97.36$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	323	0.276(89)	0.560(181)	0.164(53)	0.556	0.444	
SNP 8	低脂系	280	0.825(231)	0.150(42)	0.025(7)	0.900	0.100	$\chi^2=96.18$ (<i>P</i> <0.0001)
	高脂系	303	0.416(126)	0.488(148)	0.096(29)	0.660	0.340	

注: ¹ 括号内是个体数。

2.3 单位点 SNP 与鸡生长和体组成性状的相关分析

利用 JMP 4.0 软件进行单位点基因型与鸡生长和体组成性状的相关分析, 结果可以看出: SNP 1 变异位点对鸡肝脏重、肝脏比率有显著影响(*P*<0.05), SNP 2 对肌胃重、股骨重有显著影响(*P*<0.05), SNP 3 对鸡胸宽、肌胃比率有显著影响(*P*<0.05), SNP 4 对肌胃重、肌胃比率、腿肌重、腿肌比率有显著影响(*P*<0.05), SNP 5 对心脏重、心脏比率、腺胃比率有显著影响(*P*<0.05), SNP 6 对肌胃重、肌胃比率有显著影响(*P*<0.05), SNP 7 对肌胃重有显著影响(*P*<0.05), SNP 8 对所有性状均无显著影响(表 4)。从表 4 中还可以看出, 只有肌胃性状的 *P* 值比较一致, 除 SNP 5 外, 其他 SNPs 均与该性状有显著影响或接近显著影响。而其他性状的 *P* 值则没有这种一致性,

所以从单位点与鸡生长和体组成性状的结果可以得出: *A-FABP* 只对肌胃重和肌胃率有显著影响, 其他显著影响有待于进一步分析。

对差异显著的肌胃重和肌胃率进行多重比较分析, 结果表明: SNP 2 变异位点 *CC* 基因型个体的肌胃重和肌胃比率显著高于 *CT* 基因型个体; SNP 3 变异位点 *II* 基因型个体肌胃重和肌胃比率显著高于 *ID* 基因型个体 (*P*<0.05); SNP 4 变异位点 *DD* 基因型个体的肌胃重显著高于 *ID*、*II* 基因型个体 (*P*<0.05), *DD* 基因型个体的肌胃率显著高于 *ID* 基因型个体(*P*<0.05); SNP 6 变异位点 *CC* 基因型个体的肌胃重、肌胃比率显著高于 *TT* 基因型个体 (*P*<0.05); SNP 7 变异位点 *AA*、*AG* 基因型个体的肌胃重和肌胃比率显著高于 *GG* 基因型个体 (*P*<0.05)(表 5)。

表 4 单位点及单倍型对鸡生长和体组成性状的影响(P 值)

性状	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	单倍型
胸宽	0.9366	0.4797	<u>0.0251</u>	0.4269	0.7762	0.9360	0.9984	0.5445	0.3641
肝脏重	<u>0.0450</u>	0.3075	0.7737	0.1343	0.7855	0.1580	0.8470	0.8680	0.9303
肝脏比率	<u>0.0196</u>	0.3830	0.8221	0.1126	0.9155	0.0890	0.8855	0.8838	0.7994
心脏重	0.7649	0.1590	0.2336	0.8338	<u>0.0014</u>	0.6536	0.8550	0.3853	0.5737
心脏比率	0.9605	0.1397	0.2469	0.9713	<u>0.0016</u>	0.7909	0.9524	0.5215	0.8220
肌胃重	0.0781	<u>0.0408</u>	0.0648	<u>0.0420</u>	0.6633	<u>0.0248</u>	<u>0.0488</u>	0.0599	<u>0.0112</u>
肌胃比率	0.0801	0.0684	<u>0.0358</u>	<u>0.0388</u>	0.3831	<u>0.0481</u>	0.0700	0.1378	<u>0.0248</u>
腺胃比率	0.4447	0.5710	0.3918	0.2101	<u>0.0311</u>	0.3213	0.4809	0.1127	0.2712
腿肌重	0.3019	0.0880	0.3825	<u>0.0332</u>	0.3743	0.4380	0.1272	0.9749	0.7718
腿肌比率	0.3734	0.1748	0.5335	<u>0.0452</u>	0.2045	0.4766	0.1766	0.9607	0.4698
股骨重	0.1016	<u>0.0460</u>	0.0596	0.0762	0.4660	0.3360	0.2081	0.3981	0.7080

注: 带下划线数字为差异显著性状 P 值, 无显著影响的性状及 P 值没有列出。

表 5 不同 SNP 位点的不同基因型对鸡肌胃重和肌胃比率的影响(最小二乘均值±标准误)

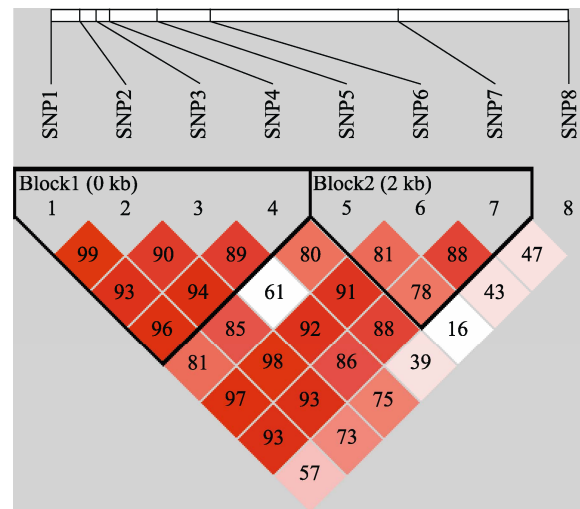
SNP 位点	基因型	肌胃重	肌胃比率
SNP 2	CC	23.80±0.28 ^a	0.0095±0.00012 ^a
	CT	23.00±0.34 ^b	0.0092±0.00015 ^b
	TT	22.58±1.16 ^{ab}	0.0090±0.00053 ^{ab}
SNP 3	DD	23.18±1.36 ^{ab}	0.0092±0.00062 ^{ab}
	ID	23.06±0.34 ^b	0.0092±0.00015 ^b
	II	23.81±0.27 ^a	0.0096±0.00012 ^a
SNP 4	DD	23.92±0.30 ^a	0.0096±0.00014 ^a
	ID	23.26±0.31 ^b	0.0093±0.00014 ^b
	II	22.56±0.64 ^b	0.0091±0.00029 ^{ab}
SNP 6	CC	23.83±0.31 ^a	0.0096±0.00014 ^a
	CT	23.23±0.31 ^{ab}	0.0093±0.00014 ^{ab}
	TT	22.14±0.66 ^b	0.0089±0.00030 ^b
SNP 7	AA	23.66±0.31 ^a	0.0095±0.00014 ^a
	AG	23.42±0.31 ^a	0.0094±0.00014 ^a
	GG	21.85±0.72 ^b	0.0088±0.00033 ^b

注: 同一 SNP 位点内同列数据含有不同肩标字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 含有相同肩标字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 连锁不平衡程度分析及标签 SNP(Haplotype tag SNP, htSNP)的选择

由 Haploview 中的 LD Plot 结果可知, SNP 1 与 SNP 2、SNP 3、SNP 4 处于强连锁状态, 位于一个单倍型块中, SNP 5 与 SNP 6、SNP 7 处于第二个单倍型块中, SNP 8 与其它 SNPs 连锁程度均较低, 不处于单倍型块中。颜色越深的方格表示连锁程度越高(图 1)。运行 Tagger 结果显示 SNP 1、SNP 2、SNP 3、

SNP 5、SNP 8 为选择的标签 SNPs, SNP 1 与 SNP 4、SNP 6、SNP 7 之间的 r^2 值均大于 0.8, SNP 1 即可代替其他 SNPs 效应, 由这 5 个标签 SNPs 构建的单倍型可反映整个 *A-FABP* 基因的单倍型信息。

图 1 *A-FABP* 基因 SNPs 连锁不平衡图谱

2.5 单倍型构建及与鸡生长和体组成性状的相关分析

利用上述得到的 5 个 htSNPs 构建鸡 *A-FABP* 基因单倍型, 共得到 32 种单倍型, 将频率小于 0.01 的单倍型去除, 得到 4 种主要单倍型: *ATDDC*、*ATIDC*、*GCIDC*、*GCIDT*。用 JMP 4.0 软件在肉鸡高、低脂系中进行单倍型与鸡生长和体组成性状的相关分析。相关分析结果表明单倍型仅对肌胃重和肌胃比

率有显著影响($P<0.05$), 对其他性状无显著影响($P>0.05$)(表 4)。对肌胃重和肌胃比率做多重比较分析, 结果表明: *GCIDC* 单倍型个体肌胃重显著高于 *ATDDC*、*GCIDT* 单倍型个体($P<0.05$); *GCIDC* 单倍型个体肌胃比率显著高于 *ATDDC* 单倍型个体($P<0.05$)(表 6)。

表 6 不同单倍型对鸡肌胃重和肌胃比率的影响(最小二乘均值±标准误)

单倍型	肌胃重	肌胃比率
<i>ATDDC</i>	23.159±0.420 ^b	0.00926±0.000151 ^b
<i>ATIDC</i>	23.270±0.858 ^{ab}	0.00973±0.000372 ^{ab}
<i>GCIDC</i>	23.904±0.374 ^a	0.00958±0.000124 ^a
<i>GCIDT</i>	23.216±0.429 ^b	0.00933±0.000156 ^{ab}

注: 同列数据后含有肩标字母相异表示差异显著($P<0.05$), 肩标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

近年来, 对 *A-FABP* 基因在人的肥胖症及代谢类疾病包括胰岛素抵抗、血脂障碍、2 型糖尿病、脂肪肝和动脉粥样硬化等疾病有着越来越广泛的研究^[23-28]。*A-FABP* 基因在代谢和炎症路径上发挥关键作用, Tuncman 等^[29]检验了 *A-FABP* 位点的变异序列, 发现在人类群体中高甘油三酯症, 2 型糖尿病和心血管疾病 3 个性状是紧密连锁的。Miyoshi 等^[30]发现测量血清中的 *A-FABP* 含量可以直接得到冠状动脉粥样硬化的程度。

鸡 *A-FABP* 基因 SNP 1~SNP 8 基因型和等位基因频率分析表明, 除 SNP 2、SNP 3 外, 其他 6 个 SNPs 在第十世代高、低脂系间等位基因频率存在极显著差异($P<0.01$)。东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系是以 *AA* 肉鸡作为共同祖先, 针对腹脂性状向两个相反的方向进行选择的群体, 理论上随着选择世代增加, 腹脂性状分离, 影响腹脂性状的等位基因频率在两系间也会逐渐分离。两系间等位基因和基因型频率的差异可能是由于我们对腹脂性状选择而引起的。除了可能是受选择的影响外, 也可能是我们选育的核心群体规模有限, 由于遗传漂变而引起的基因频率在两系间的差异, 这需要对原始群体和选育群体的各世代进行进一步研究来证明。

本研究选择的 8 个 SNP 位点, 共跨越近 4 700 bp 的物理距离, 包括部分 5'调控区、外显子区及部分 3'调控区, 其中 5'调控区内有 5 个 SNP 位点, 即 SNP 1~SNP 5。结果发现其中 4 个 SNP 位点仅对肌胃重等性状有显著($P<0.05$)或接近显著的影响, 对生长和其他体组成性状无显著影响。外显子 1、外显子 3 和 3'调控区各选择一个 SNP 位点, 分别为 SNP 6、SNP 7 和 SNP 8, 结果发现这 3 个 SNP 也对肌胃重、肌胃率有显著($P<0.05$)或接近显著的影响, 对生长和其他体组成性状无显著影响。Wang 等^[8]发现 g.51 C>T 多态位点(即文中的 SNP 6)在中国农大 F₂ 资源群体中与 2、3、5、6、8、9、10、11、12 周龄体重、屠体重、腿肌重和腹脂重有显著或极显著影响($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。罗桂芬等^[15]在北京油鸡群体中也发现了该突变位点 g.51 C>T, 基因型与体脂性状的关联分析显示该位点对腹脂率、皮脂厚、肌内脂肪含量有极显著的影响($P<0.01$)。Wang 等^[18]在比较肉鸡和白耳黄鸡的 *A-FABP* 基因序列时发现外显子 3 中存在一个导致氨基酸替代的突变位点 g.1729 G>A(即文中的 SNP 7), 该位点 G 到 A 的突变可引起丝氨酸转变为天冬酰胺, 该突变位点可能会通过改变 *A-FABP* 配基结合活性来影响脂肪酸的沉积作用。叶满红等^[13, 31]在矮脚鸡上研究表明, *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。本研究结果显示无论是先前发现的 SNP 还是本研究新发现 SNP 均对肌胃重和肌胃率有显著影响, 没有发现该基因对鸡体脂性状(腹脂重和腹脂率)有显著影响, 这些结果与先前其他学者的研究结果并不一致。分析其主要原因可能有两个方面: 一是由于本研究所使用的实验群体(肉鸡腹脂双向选择系)与其他学者使用的实验群体(北京油鸡、矮脚鸡等)的遗传背景不同而导致的。Sherman 等研究表明品种、生长环境等差异导致其全基因组 SNP 关联分析结果与其他人研究结果不一致^[32]。不同群体的遗传背景差异可能会导致基因多态性与目标 QTL 处于不同的连锁不平衡状态中, 进而导致基因多态性与性状的关联在不同世代、不同群体中不能够完全一致^[33, 34]。另外, 实验群体的样本含量以及等位基因的频率也是影响基因多态性与性状关联可靠性的一个重要因素, 群体中某种等位基因频率过低将导致该等位基因纯

合型个体数偏少, 进而影响了基因型与性状关联的准确性^[35~38]。本研究样本含量为 627 个个体, 并且每个 SNP 位点总有一种很低的等位基因频率出现, 这样势必会影响 SNP 与目标性状关联的准确性。因此为了提高实验的统计效力, 阐明 *A-FABP* 基因的变异是否对肉鸡腹脂双向选择品系的生长和体组成性状有显著影响, 增加样本含量展开进一步的研究是十分必要的。

Phyllips 等^[39]研究表明, 与单点分析相比, 单倍型分析具有计算统计量小、检测效率高、以及可以进行大范围的染色体区段分析等优点。本研究利用 htSNPs 构建单倍型并将单倍型与鸡生长和体组成性状进行关联分析, 分析结果仅对肌胃重和肌胃率有显著影响 ($P < 0.05$), 对生长和其他体组成性状无显著影响, 这与单位点关联分析结果似乎有些不一致。单位点与性状关联分析时, 这些 SNP 不仅对肌胃重、肌胃率有显著影响, 还对肝脏等其他性状有显著影响。但是从表 4 及连锁不平衡程度分析结果中可以看出, 高度连锁的多态位点对性状的影响是不一致的。例如 SNP 1 与 SNP 4、SNP 6、SNP 7 处于强连锁状态 ($r^2 > 0.8$), 根据 Carlson 等^[21]研究表明, SNP 之间 $r^2 > 0.8$ 是选择标签 SNP 的依据, 这些标签 SNPs 的效应基本上是可以相互替代的。由此可知, SNP 1、SNP 4、SNP 6 和 SNP 7 的效应是可以互相替代的。本研究发现 SNP 1 位点对肝脏重和肝脏率有显著影响, 但 SNP 4、SNP 6、SNP 7 均对其无显著影响。同样, SNP 4 位点除了对肌胃重、肌胃率有显著影响外, 还对腿肌重和腿肌率有显著影响, 但是其他 3 个 SNPs 对腿肌重和腿肌率也无显著影响。从上述结果中可以看出, 这些高度连锁的 SNPs 除了对肌胃重和肌胃率有一致的显著效应外, 对其他性状均无一致的显著影响, 所以本研究推测这些 SNPs 位点仅对肌胃重和肌胃率有显著影响, 而对其他性状的显著性影响应该是假阳性的。因此在剔除掉这些假阳性结果后发现单位点的关联分析与单倍型的关联分析结果是高度一致的, 均对肌胃重和肌胃率有显著影响。这两种分析方法起到了相互验证的作用, 而且也说明了单倍型分析方法比单点分析更加准确、有效。

综合单位点和单倍型与鸡生长和体组成性状关联分析结果可知, *A-FABP* 基因仅对肉鸡高、低脂双

向选择品系肌胃重和肌胃率具有显著影响, 本课题组在东北农业大学 F_2 资源群体(肉鸡与白耳黄鸡为亲本)中也发现 *A-FABP* 基因对肌胃重、肌胃率有显著影响^[40], 但只是单个 SNP 位点(即 SNP 3)与鸡生长和体组成性状关联分析的初步结论。肌胃是鸡消化系统的一个重要的器官, 它的大小及发育程度势必会影响到鸡的消化能力, 然而到目前为止还没有关于 *A-FABP* 功能与消化系统有关的报道, 因此关于 *A-FABP* 基因是否为影响肉鸡肌胃重的主效基因还有待于进一步扩大样本含量和用其他生物学实验进行验证。

参考文献(References):

- [1] Li H, Deeb N, Zhou H, Mitchell AD, Ashwell CM, Lamont SJ. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor- β genes. *Poul Sci*, 2003, 82(3): 347-356.
- [2] Li H, Deeb N, Zhou H, Ashwell CM, Lamont SJ. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with the very low density apolipoprotein-II gene. *Poult Sci*, 2005, 84(5): 697-703.
- [3] Veerkamp JH, Maatman RG. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res*, 1995, 34(1): 17-52.
- [4] Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1081(1): 1-24.
- [5] Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*, 1999, 40(5): 967-972.
- [6] Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in *aP2*, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*, 1996, 274(5291): 1377-1379.
- [7] Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Hotamisligil. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*, 2000, 141(9): 3388-3396.
- [8] Wang QG, Li H, Li N, Gu ZL, Wang YX. Cloning and characterization of chicken adipocyte fatty acid binding protein gene. *Anim Biotechnol*, 2004, 15(2): 121-132.

- [9] Shi H, Wang Q, Zhang Q, Leng L, Li H. Tissue expression characterization of chicken adipocyte fatty acid-binding protein and its expression difference between fat and lean birds in abdominal fat tissue. *Poult Sci*, 2010, 89(2): 197–202.
- [10] Li WJ, Li HB, Chen JL, Zhao GP, Zheng MQ, Wen J. Gene expression of heart-and adipocyte-fatty acid-binding protein and correlation with intramuscular fat in Chinese chickens. *Anim Biotechnol*, 2008, 19(3): 190–194.
- [11] 王启贵, 李宁, 邓学梅, 顾志良, 刘兆良, 李辉, 陈志强, 连正兴, 吴常信. 鸡脂肪酸结合蛋白基因的克隆和测序分析. *遗传学报*, 2002, 29(2): 115–118.
- [12] Wang Q, Li H, Li N, Leng L, Wang Y, Tang Z. Identification of single nucleotide polymorphism of adipocyte fatty acid-binding protein gene and its association with fatness traits in the chicken. *Pouly Sci*, 2006, 85(3): 429–434.
- [13] 叶满红, 曹红鹤, 文杰, 李宏滨, 陈继兰, 赵桂萍. 北京油鸡和矮脚鸡心脏型、脂肪型脂肪酸结合蛋白基因多态性的研究. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(5): 422–426.
- [14] 陈宽维, 章双杰, 屠云洁, 汤青萍, 高玉时, 李慧芳. *A-FABP* 在不同鸡种中遗传多态性分析. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(11): 1114–1117.
- [15] 罗桂芬, 陈继兰, 文杰, 赵桂苹, 郑麦青, 孙世铎. 鸡 *A-FABP* 基因多态性分析及其与脂肪性状的相关研究. *遗传*, 2006, 28(1): 39–42.
- [16] 屠云洁, 陈宽维, 章双杰, 汤清萍, 高玉时, 李慧芳, 苏一军. 3个鸡种 *A-FABP* 基因单核苷酸多态性的研究. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 25(4): 53–55.
- [17] 刘琛, 文杰, 赵桂苹, 郑麦青, 陈继兰. *A-FABP* 与 *AMPD 1* 基因 SNP 位点对北京油鸡部分肉质性状的组合效应分析. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(10): 1555–1559.
- [18] Wang QG, Guan TZ, Li H, Bernlohr DA. A novel polymorphism in the chicken adipocyte fatty acid-binding protein gene (*FABP4*) that alters ligand-binding and correlates with fatness. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2009, 154(3): 298–302.
- [19] 初丽丽. 鸡 *FABPs* 基因多态性与生长和体组成性状的相关研究[学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [20] Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 263–265.
- [21] Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(1): 106–120.
- [22] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 2002, 296(5576): 2225–2229.
- [23] Tso AWK, Xu AM, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CHY, Cheung BMY, Janus ED, Lam KSL. Serum adipocyte fatty acid-binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: A 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*, 2007, 30(10): 2667–2672.
- [24] Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanera JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res*, 2008, 49(8): 1746–1751.
- [25] Furuhashi M, Fucho R, Görgün CZ, Tuncman G, Cao HM, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2640–2650.
- [26] Choi KM, Kim TN, Yoo HJ, Lee KW, Cho GJ, Hwang TG, Baik SH, Choi DS, Kim SM. Effect of exercise training on *A-FABP*, lipocalin-2, and *RBP4* levels in obese women. *Clin Endocrinol*, 2009, 70(4): 569–574.
- [27] Kazemi MR, McDonald CM, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6): 1220–1224.
- [28] Yeung DCY, Xu A, Cheung CWS, Wat NMS, Yau MH, Fong CHY, Chau MT, Lam KSL. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(8): 1796–1802.
- [29] Tuncman G, Erbay E, Hom X, Vivo ID, Campos H, Rimm EB, Hotamisligil GS. A genetic variant at the fatty acid-binding protein *aP2* locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 6970–6975.
- [30] Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, Kawamura H, Doi M, Kusano KF, Kusachi S, Nino-miya Y. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis*,

- 2010, 211(1): 164–169.
- [31] 叶满红, 文杰, 曹红鹤, 李宏滨, 陈继兰, 赵桂苹, 郑麦青. 脂肪型脂肪酸结合蛋白基因多态性与鸡肉品质性状的关系研究. 畜牧兽医学报, 2007, 38(6): 526–532.
- [32] Sherman EL, Nkrumah JD, Moore SS. Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. *J Anim Sci*, 2010, 88(1): 16–22.
- [33] Tu IP, Whittemore AS. Power of association and linkage tests when the disease alleles are unobserved. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(2): 641–649.
- [34] Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(5): 391–397.
- [35] Long AD, Langley CH. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res*, 1999, 9(8): 720–731.
- [36] Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 306–309.
- [37] Lalouel JM, Rohrwasser A. Power and replication in case-control studies. *Am J Hypertens*, 2002, 15(2): 201–205.
- [38] 姜润深, 李俊英, 杨宁. 孟德尔分离群体验证候选基因遗传效应的策略. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 989–992.
- [39] Phillips MS, Lawrence R, Sachidanandam R, Morris AP, Balding DJ, Donaldson MA, Studebaker JF, Ankenner WM, Alfisi SV, Kuo FS, Camisa AL, Pazorov V, Scott KE, Carey BJ, Faith J, Katari G, Bhatti HA, Cyr JM, Derohannessian V, Elosua C, Forman AM, Grecco NM, Hock CR, Kuebler JM, Lathrop JA, Mockler MA, Nachtman EP, Restine SL, Varde SA, Hozza MJ, Gelfand CA, Broxholme J, Abecasis GR, Boyce-Jacino MT, Cardon LR. Chromosome-wide distribution of haplotype blocks and the role of recombination hot spots. *Nat Genet*, 2003, 33(3): 382–387.
- [40] 关天竹, 王启贵, 王守志, 李辉. 鸡 A-FABP 基因 5'-调控区序列 10bp 插入缺失位点与生长和体组成性状的相关研究. 见: 第十四次全国家禽学术讨论会论文集, 2009, 163–166.

• 科学新闻 •

病毒通过泛素化调控寄主 *de novo* 甲基化的奥秘

双生病毒(Geminivirus)是一组具有双生颗粒形态的单链环状植物 DNA 病毒。由于双生病毒主要依赖于植物宿主系统来完成生活史, 能够通过自身编码的少数几个蛋白来调控植物的若干重要生命过程, 因此, 对双生病毒展开深入研究, 有助于揭示植物自身若干重要生命过程的分子机制。另外双生病毒侵染广泛的农作物, 造成农作物的严重减产, 因此研究植物与双生病毒的相互作用机制能够为基因工程水平改良农作物、提高农作物抗病毒能力提供有力的理论依据。植物能够通过多种手段抵御病毒的侵染, 例如基因沉默信号途径、水杨酸信号途径以及代谢调控途径等; 病毒也在与植物的协同进化过程中, 通过编码的少数几个蛋白调节植物的相应生命过程来与植物宿主相抗衡。

中国科学院遗传发育所谢旗实验室采用反向遗传学策略, 结合分子生物学和生物化学等方法, 发现双生病毒甜菜严重曲顶病毒(Beet Severe Curly Top Virus, BSCTV)能够通过编码的 C2 蛋白与植物宿主蛋白腺苷甲硫氨酸脱羧酶 1(S-adenosyl-methionine decarboxylase 1, SAMDC1)相互作用并抑制 26S 蛋白酶体介导的 SAMDC1 蛋白降解。功能研究发现 C2 蛋白对植物宿主蛋白 SAMDC1 的这一正调控过程能够影响植物宿主对自身基因以及病毒基因组的从头甲基化过程, 进而影响植物宿主基因沉默介导的抗病毒防御反应和病毒 DNA 在植物宿主中的积累。该研究结果反映了病毒与植物寄主在长期协同进化过程中的其中一种博弈场面, 也揭示了 SAMDC1 在甲基化介导的基因沉默途径中的重要作用, 对诠释 26S 蛋白酶体介导的蛋白降解途径调节通过调控寄主 *de novo* 甲基化介导的基因沉默信号过程具有重要意义。为植物抗病毒提供了新理论和新策略。

该研究在线发表于 2011 年 1 月的 *Plant Cell* 杂志上, 并得到了杂志的推荐导读(In Brief)。谢旗实验室的博士生张钟徽为该论文的第一作者。该项目得到了国家自然科学基金和蛋白重大专项项目的资助。

转自中国科学院遗传发育所网站 <http://www.genetics.ac.cn/>