

# 鸡 Perilipin1 抗血清制备及组织表达特性分析

王彦博,王 宁,王 丽,王宇祥,李玉茂,李 辉\*

(东北农业大学动物科技学院,哈尔滨 150030)

**摘要:** 通过制备鸡脂滴包被蛋白(Perilipin1)的抗血清,分析鸡 Perilipin1 的组织表达特性并推测其在脂肪组织脂类代谢过程中发挥的功能。利用 RT-PCR 的方法扩增鸡 *Perilipin1* 基因,并将其构建到含有 His 标签的表达载体 pET-28a 上。将阳性重组表达质粒 pET-28a/Perilipin1 导入大肠杆菌 BL21,在 IPTG 诱导下产生 His/Perilipin1 融合蛋白,对产生的 His/Perilipin1 蛋白包涵体进行复性处理,复性后以其为免疫原制备鸡 Perilipin1 多克隆抗血清。通过 ELISA 和 Western blot 的方法检测抗血清的效价及特异性,并利用此抗血清分析鸡 Perilipin1 在各种组织中的表达特性以及比较其在高、低脂系公鸡间的表达差异。ELISA 和 Western blot 结果表明,本试验获得了效价高、特异性强的鸡 Perilipin1 抗血清,同时 Western blot 检测 Perilipin1 的组织表达特性结果表明,Perilipin1 仅在鸡脂肪组织中表达,而在肝脏、十二指肠、胸肌、腿肌、肌胃、心脏、脾脏、肾脏等组织中未检测到表达信号;Perilipin1 在肉鸡高脂系脂肪组织中的表达量显著高于低脂系中的表达量( $P < 0.05$ )。结果表明,Perilipin1 的表达与肉鸡腹部脂肪的沉积具有密切的关系。

**关键词:** 鸡;脂滴包被蛋白;抗血清;表达特性

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)03-0349-07

## Preparation of Antiserums against Chicken Perilipin1 and Tissue Expression Analyses of Perilipin1

WANG Yan-bo, WANG Ning, WANG Li, WANG Yu-xiang, LI Yu-mao, LI Hui\*

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

**Abstract:** The aim of this study was to analyze the expression characteristics of chicken Perilipin1 in different tissues and the function of Perilipin1 in lipid metabolism by preparing the antiserum against chicken Perilipin1. Chicken *Perilipin1* gene was amplified by RT-PCR and inserted into pET-28a vector. The recombinant His/Perilipin1 was expressed in *E. coli* with IPTG induction and renatured by Protein Refolding Kit. The renatured His/Perilipin1 was used as immunogen to immunize the rabbit for preparing polyclonal antibody. The titer and specificity of this antibody were detected by ELISA and Western blot, and the expression characteristics of chicken Perilipin1 in different tissues was analyzed by Western blot. ELISA and Western blot results showed that the high titer and specificity of the antiserum against Perilipin1 was obtained. The tissue expression characterization analysis by Western blot showed that Perilipin1 only expressed in chicken adipose tissue, but no signal was detected in liver, duodenum, breast muscle, leg muscle, gizzard, heart, spleen and kidney. Furthermore, the Perilipin1 expression characteristics between fat and lean broiler lines were also detected, and the results showed that Perilipin1 expressed significantly higher in fat line broilers adipose tissue than that in lean ones ( $P < 0.05$ ). These results

收稿日期:2010-03-22

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2006CB102105);国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10A120);国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB941604)

作者简介:王彦博(1984-),男,黑龙江佳木斯人,硕士生,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:tiancaiywb1984@yahoo.com.cn

\*通讯作者:李 辉,教授,E-mail:lihui@neau.edu.cn

of this study suggest that there is a close relationship between the expression of Perilipin1 and the deposition of abdomen adipose in fat and lean broiler lines.

**Key words:** chicken; Perilipin1; antiserum; expression characteristics

PAT 蛋白家族是一类包被在中性脂滴表面的结构蛋白,该蛋白家族主要由 Perilipin1、ADRP 和 TIP47 三个具有高度保守氨基末端的蛋白质组成<sup>[1]</sup>,PAT 蛋白家族与脂肪细胞中脂滴的代谢具有密切的关系<sup>[2]</sup>。

脂滴包被蛋白(Perilipin1)作为 PAT 蛋白家族的核心成员之一,于 1990 年在大鼠脂肪细胞中被发现,它是一种可以被蛋白激酶 A(PKA)磷酸化的蛋白质<sup>[3]</sup>,特异性的分布于脂肪细胞中脂滴的表面<sup>[4-5]</sup>。Perilipin1 在脂肪细胞脂解过程中发挥着双重调控作用:一方面,在基础状态下,Perilipin1 包被在脂肪细胞中脂滴的表面,通过阻止脂肪细胞中甘油三酯水解酶接近脂滴来调控脂肪细胞的代谢<sup>[6]</sup>。Perilipin1 敲除小鼠与野生型相比,基础脂解率明显升高,虽食入等量的食物但脂肪组织质量却减少 30%,另外有 62% 的白色脂肪细胞的体积变小<sup>[7-8]</sup>;另一方面,在儿茶酚胺的刺激下,Perilipin1 可被蛋白激酶 A(PKA)高度磷酸化而有利于脂解酶接近脂滴表面,从而促进并激活脂解作用<sup>[4,9-10]</sup>。

近年来对 Perilipin1 在禽类上的功能研究也取得了一定的进展。赵小玲等人利用定量 PCR 法分析了 *Perilipin1* 基因发育性变化对家禽脂肪性状发育的作用,发现 *Perilipin1* 基因的优势表达组织为脂肪组织,并推测该基因极可能在脂肪性状形成中具有重要的调控作用<sup>[11]</sup>;另外,本实验室在前期利用鸡全基因组芯片,筛选东北农业大学高、低脂系 7 周龄肉鸡脂肪组织中特异表达基因的过程中发现,*Perilipin1* 基因不仅在鸡脂肪组织中特异性表达,同时参与了影响鸡脂类代谢的重要调控通路——PPAR 信号通路<sup>[12]</sup>,然而,由于缺少高特异性的抗体,导致目前针对鸡 *Perilipin1* 基因的研究仅限于 mRNA 水平。

随着蛋白质组学时代的到来,研究某一基因的生物学功能需要从转录水平延伸到蛋白水平,因此,为了在蛋白水平验证本课题组前期鸡全基因组芯片的结果,本研究通过原核表达鸡 Perilipin1 蛋白并免疫家兔的方法,制备了高特异性的鸡 Perilipin1 抗血清,并利用半定量 RT-PCR 和 Western blot 法分析了鸡 Perilipin1 的组织表达特性;同时,为了深

入探讨 Perilipin1 在鸡脂肪组织脂解过程中发挥的作用,本研究选取了 2 个腹脂含量差异极显著的肉鸡品系作为实验材料,在蛋白水平检测了 Perilipin1 在肉鸡高、低腹脂品系间脂肪组织中的表达差异。这些研究为进一步开展鸡 Perilipin1 的功能研究奠定了坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和实验动物

大肠杆菌 DH5a、BL21、原核表达载体 pET-28a 为本实验室保存,成年雄性新西兰大白兔购自哈尔滨医科大学第二附属医院。高低脂系肉鸡:东北农业大学选育的肉鸡高、低腹脂双向选择品系,高脂系腹脂率是低脂系的 3.7 倍,差异极显著( $P < 0.01$ ),本研究以第 11 世代公鸡为试验材料(高脂系 5 只,低脂系 5 只)。

### 1.2 主要试剂

Ex-Taq 酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶、pMD18-T 载体、M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 片段纯化试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司;Protein Refolding Kit 购自 Novagen 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;GAPDH 抗体和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自碧云天生物技术有限公司;增强型 ECL 显色液和 RIPA 细胞裂解液购自哈尔滨海基生物技术有限公司;TMB 底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司;TRIzol Reagent 购自 Ivtrogen 公司。

### 1.3 鸡 *Perilipin1* 基因重组质粒的构建与鉴定

根据 GenBank 鸡 *Perilipin1* 基因的 mRNA 序列(EU620701)设计 1 对引物 F:5' AATGAATTCATGACGGCGAAGAAGAATCAG 3', R: 5' AATCTCAGAGGTAGAGGTTGGCGTAGTAGGC 3',上游引物引入 EcoR I 酶切位点,下游引物引入 Xho I 酶切位点。

从鸡的脂肪组织中提取总 RNA,以 Oligo

(dT)<sub>18</sub> 为引物进行逆转录获得 cDNA, 以此 cDNA 为模板进行目的基因的 PCR 扩增, 将 *Perilipin1* 基因的 PCR 扩增产物进行胶回收并与 pMD18-T 克隆载体连接, 然后利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 2 种酶对该重组质粒进行双酶切反应, 回收经双酶切后的 *Perilipin1* 基因并与 pET-28a 表达载体进行连接, 构建 pET-28a/*Perilipin1* 重组质粒, 重组质粒经酶切鉴定正确后送往北京华大测序公司进行序列的鉴定。

#### 1.4 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达和纯化

将重组表达质粒 pET-28a/*Perilipin1* 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 37 °C 培养过夜。挑取 pET-28a/*Perilipin1* 阳性克隆单菌落, 接种于 30 mL 含 KNa 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜。取 2 mL 过夜培养物以 1 : 100 的比例分别接种于 5 瓶 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 3~4 h, 使其 OD<sub>600</sub> 值在 0.4~0.6。向其中加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol · L<sup>-1</sup>, 28 °C 继续培养。

取诱导培养 6 h 的菌液进行超声处理后, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分别取上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳鉴定融合蛋白的可溶性。包涵体蛋白经 Novagen 公司复性试剂复性后 (具体步骤参照说明书), 采用 BCA 方法进行蛋白定量。

#### 1.5 鸡 Perilipin1 抗血清的制备

将 His/*Perilipin1* 融合蛋白与弗式完全佐剂混合后, 对新西兰白兔进行皮下多点免疫, 用量为 100 μg · 只<sup>-1</sup>。每间隔 2 周取 1 mL 蛋白溶液与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化, 进行加强免疫, 共免疫 3 次, 三免 1 周后对新西兰白兔进行心脏采血, 同时分离血清, -20 °C 冻存。

#### 1.6 间接 ELISA 法检测抗血清效价

酶标板用纯化蛋白以 1 mg · L<sup>-1</sup> 的浓度包被, 每孔 100 μL, 4 °C 孵育过夜后, 用 5% 的脱脂乳封闭, 每孔 200 μL, 37 °C 孵育 2 h, 洗涤后每孔按梯度加入稀释的抗血清 100 μL (对照组为正常兔血清), 37 °C 孵育 2 h, 洗涤后每孔加入 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 100 μL, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后进行 TMB 显色, 终止反应后, 用酶标仪测定样品吸光度 (A<sub>450</sub>) 值。

#### 1.7 鸡 Perilipin1 组织表达特性分析

1.7.1 组织总 RNA 的提取和反转录 组织总 RNA 通过 TRIzol (Ivotrogen) 法进行分离, RT-PCR 采用 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit, 取 7 周

龄肉鸡的心脏、肝脏、腹脂、胸肌、腿肌、肌胃、脾脏、十二指肠和肾脏 9 种组织样分别提取总 RNA, 取总 RNA 1 μg, 用 Oligo dt adapter 引物分别进行反转录。

1.7.2 半定量 RT-PCR 根据 GenBank 鸡 *Perilipin1* 基因的 mRNA 序列 (GenBank Accession No. EU620701) 设计引物: F1: 5' GTCCATCCGTGGTTGAGG3', R1: 5' CAACAAGCAGCAGGTG-GC3'。根据 GenBank 鸡 *GAPDH* 基因 (GenBank Accession No. K01458) 设计引物: F2: 5' AGAA-CATCATCCCAGCGT3', R2: 5' AGCCTTCAC-TACCCTCTTG3'。

PCR 反应体系为 25 μL: 其中含 10 × PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 2 μL, 10 pmol · L<sup>-1</sup> 上下游引物各 0.25 μL, *Taq* 酶 1.0 mol · L<sup>-1</sup>, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.8 μL。PCR 程序为 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 24 个循环; 72 °C 延伸 7 min。用 F1/R1 对 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增片段为 248 bp; F2/R2 扩增 *GAPDH* 基因, 扩增片段为 182 bp。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测, 用 UVP 凝胶成像系统分析扩增结果。

1.7.3 组织及细胞蛋白的制备 取 7 周龄肉鸡的心脏、肝脏、腹脂、胸肌、腿肌、肌胃、脾、十二指肠和肾 9 种组织, 以及高低脂系第 11 世代公鸡脂肪组织 (高脂 5 只, 低脂 5 只), 在细胞裂解液中匀浆, 室温静置 30 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 取上清。

取 12 日龄 AA 肉仔鸡, 无菌采取腹部脂肪组织, 经消化、过滤和红细胞裂解液裂解血细胞后, 用完全培养基培养细胞。待传代后汇合度达到 80%~90%, 换为诱导分化的培养基 (完全培养基中加入油酸) 诱导其分化, 48 h 后, 收集细胞。将收集的脂肪细胞在细胞裂解液中重悬, 室温静置 30 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 取上清。

1.7.4 Western blot 按每种组织约 60 μg 上样。经 120 g · L<sup>-1</sup> SDS-PAGE 电泳分离并电转至 PVDF 膜上, 然后用免疫获得的抗血清和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 进行 Western blot 分析。

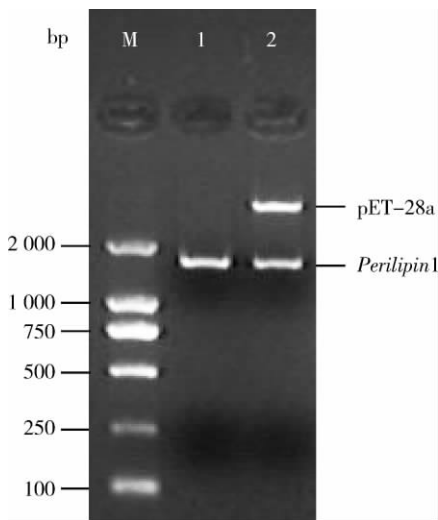
#### 1.8 统计分析

利用 LabWork 3.0 软件测定电泳条带的 IOD 值, 利用 JMP4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) 软件对试验数据进行 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 鸡 *Perilipin1* 基因原核质粒的构建和鉴定

以鸡的脂肪组织 cDNA 为模板,利用 *Perilipin1* 基因特异性引物进行 RT-PCR 反应,扩增片段大小为 1 527 bp,与预期大小一致。将经 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切后的 *Perilipin1* 基因和 pET-28a 载体连接构建重组质粒 pET-28a/*Perilipin1*。对该阳性重组质粒 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切鉴定后进行琼脂糖凝胶电泳,载体带和目的基因带大小均与理论值相符(图 1)。同时测序结果证实,鸡 *Perilipin1* 基因以正确方向插入到 pET-28a 载体中,没有发生移码突变,且氨基酸序列与 GenBank 中的序列相同。



M. DNA 相对分子质量标准;1. 目的基因 PCR 产物;2. 重组质粒双酶切产物

M. DNA marker; 1. PCR product; 2. pET-28a/*Perilipin1* digested by *EcoR* I/*Xho* I

图 1 重组质粒 pET-28a/*Perilipin1* 的酶切鉴定

Fig 1 The recombinant pET-28a/*Perilipin1* digested by restriction endonucleases

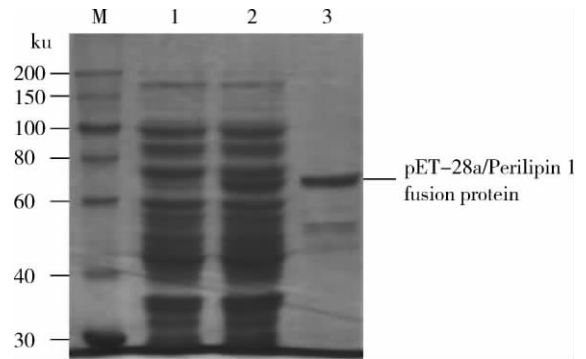
### 2.2 *Perilipin1* 重组蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pET-28a/*Perilipin1* 转化大肠杆菌 BL21(DE3),将诱导表达后的菌体进行超声破碎,SDS-PAGE 电泳检测表明,His/*Perilipin1* 融合蛋白主要以包涵体的形式存在。将包涵体经 Novagen 公司复性试剂盒处理后获得纯度较高的外源重组蛋白(62 ku,图 2)。

### 2.3 间接 ELISA 法检测鸡 *Perilipin1* 抗血清效价

利用间接 ELISA 法检测获得的抗血清效价,以样品的吸光光度值大于或等于 2.1 倍阴性对照的吸光光度值即判定为阳性结果( $S/N: Sample/Blank \geq$

2.1)。结果表明抗血清浓度稀释至 1 : 102 400 时仍然对抗原具有较高的亲和作用(表 1)。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 未诱导的大肠杆菌裂解物;2. IPTG 诱导 6 h 的大肠杆菌裂解物;3. 复性纯化的目的蛋白

M. Protein marker; 1. Inclusion bodies extracted from the BL21 (DE3) without induction; 2. Inclusion bodies extracted from the BL21 (DE3) induced by IPTG for 6 h; 3. Renatured and purified recombinant pET-28a/*Perilipin1* fusion protein

图 2 重组 *Perilipin1* 蛋白的 SDS-PAGE 表达分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of recombinant *Perilipin1*

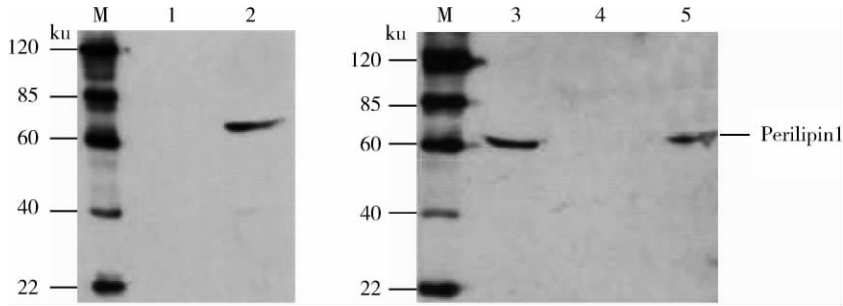
表 1 间接 ELISA 法检测鸡 *Perilipin1* 抗血清效价

Table 1 Detection of antibody titer of *Perilipin1* by indirect ELISA

稀释度 Dilution	OD 值( $A_{450 \text{ nm}}$ , 兔子 A)	OD 值( $A_{450 \text{ nm}}$ , 兔子 B)
	OD value( $A_{450 \text{ nm}}$ , rabbit A)	OD value( $A_{450 \text{ nm}}$ , rabbit B)
1 : 800	2.740	2.761
1 : 1 600	2.734	2.737
1 : 3 200	2.620	2.637
1 : 6 400	2.604	2.562
1 : 12 800	2.488	2.359
1 : 25 600	2.273	2.105
1 : 51 200	1.689	1.762
1 : 102 400	1.554	1.334
Blank	0.073	0.072
Blank	0.071	0.074
Titer	1 : 102 400	1 : 102 400

### 2.4 鸡 *Perilipin1* 抗血清的特异性检测

利用 Western blot 的方法检测了抗血清的特异性。结果表明,抗血清与 His/*Perilipin1* 纯化蛋白在 63 ku 处获得特异性杂交信号(His 标签约 1 ku, *Perilipin1* 蛋白约 62 ku);与肉鸡脂肪组织,成熟脂肪细胞在 62 ku 处均杂交出特异性条带,位置与 *Perilipin1* 蛋白大小相符,而未诱导的菌液和肝脏组织未出现杂交信号(图 3)。表明本研究获得的兔抗鸡血清可以特异识别鸡 *Perilipin1* 蛋白。



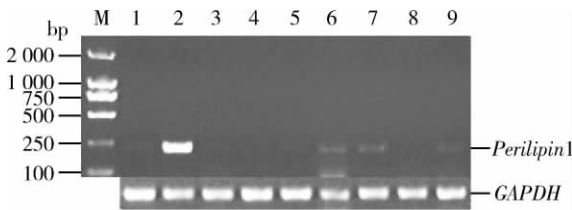
M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 未诱导的菌液;2. 纯化后的融合蛋白 His/Perilipin1;3. 脂肪组织;4. 肝脏组织;5. 脂肪细胞  
M. Protein marker; 1. Inclusion bodies extracted from the BL21(DE3) without induction; 2. Purified recombinant His/Perilipin1 fusion protein; 3. Adipose; 4. Liver; 5. Adipocyte

图 3 抗体的特异性检测

Fig 3 The specificity analysis of antiserum

2.5 鸡 Perilipin1 基因组织表达特性分析

本研究利用半定量 RT-PCR 的方法,以 GAPDH 基因为内参,在 mRNA 水平对鸡 Perilipin1 基因的组织表达特性进行了检测。分析结果表明,鸡 Perilipin1 基因在脂肪组织中表达且表达量较高,在肝脏、十二指肠、胸肌、腿肌、肌胃、心脏、脾脏、肾脏 8 种组织中不表达或表达量极低(图 4)。

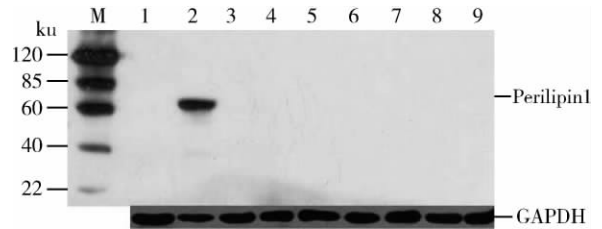


M. DNA 相对分子质量标准;1. 肝脏;2. 脂肪;3. 十二指肠;4. 胸肌;5. 腿肌;6. 肌胃;7. 心脏;8. 脾脏;9. 肾脏  
M. DNA marker; 1. Liver; 2. Adipose; 3. Duodenum; 4. Breast muscle; 5. Leg muscle; 6. Gizzard; 7. Heart; 8. Spleen; 9. Kidney

图 4 Perilipin1 基因在鸡不同组织中的表达特性(RT-PCR)  
Fig 4 RT-PCR analysis of Perilipin1 in different chicken tissues

2.6 鸡 Perilipin1 组织表达特性分析

鸡 Perilipin1 在蛋白水平上不同组织中的表达结果表明,鸡 Perilipin1 在脂肪组织中特异性表达且表达量较高,在肝脏、十二指肠、胸肌、腿肌、肌胃、心脏、脾、肾 8 种组织中不表达(图 5)。



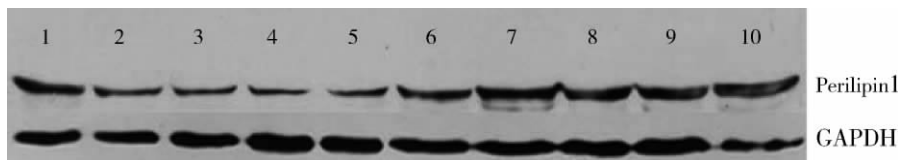
M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 肝脏;2. 脂肪;3. 十二指肠;4. 胸肌;5. 腿肌;6. 肌胃;7. 心脏;8. 脾脏;9. 肾脏  
M. Protein marker; 1. Liver; 2. Adipose; 3. Duodenum; 4. Breast muscle; 5. Leg muscle; 6. Gizzard; 7. Heart; 8. Spleen; 9. Kidney

图 5 Perilipin1 在鸡不同组织中的表达特性(Western blot)

Fig 5 Western blot analysis of Perilipin1 in different chicken tissues

2.7 鸡 Perilipin1 在高、低脂系公鸡脂肪组织中的表达差异分析

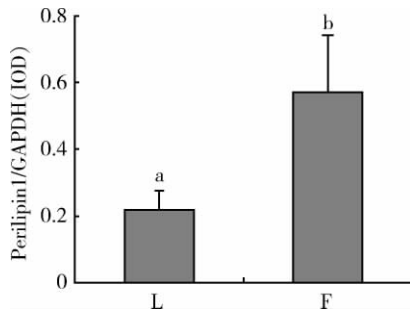
以鸡 GAPDH 基因为内参,利用 Western blot 的方法分析了鸡 Perilipin1 在东北农业大学高、低脂品系间公鸡脂肪组织中的表达差异,结果显示鸡 Perilipin1 在高脂系公鸡脂肪组织中蛋白表达丰度显著高于低脂系公鸡脂肪组织中的表达丰度( $P < 0.05$ ,图 6、图 7)。



1~5. 低脂系公鸡脂肪组织蛋白;6~10. 高脂系公鸡脂肪组织蛋白  
1-5. Adipose proteins of lean line broilers; 6-10. Adipose proteins of fat line broilers

图 6 鸡 Perilipin1 在高、低脂系公鸡脂肪组织中的差异表达

Fig 6 The differential expression of Perilipin1 in adipose between fat and lean broiler lines



L. Perilipin1 在低脂系公鸡腹部脂肪组织中的表达水平; F. Perilipin1 在高脂系公鸡腹部脂肪组织中的表达水平。字母不同表示差异显著( $^{a,b}P<0.05$ )

L. Expression levels of Perilipin1 in abdominal adipose tissue of lean roosters; F. Expression levels of Perilipin1 in abdominal adipose tissue of fat roosters. Different letters mean significant difference( $^{a,b}P<0.05$ )

图7 鸡 Perilipin1 在高、低脂系公鸡脂肪组织中的差异表达 (IOD 值)

Fig 7 The differential expression of Perilipin1 in adipose between fat and lean broiler lines (IOD value)

### 3 讨论

近年来,由于肥胖而引发的Ⅱ型糖尿病、心血管疾病、高血压、代谢综合症、癌症等疾病的发病率逐年攀升<sup>[13]</sup>,因此,深入研究与脂类代谢相关基因的功能显得尤为重要。脂滴包被蛋白(Perilipin1)作为特异性的包被于脂滴表面的蛋白<sup>[5]</sup>,已被广泛研究。在人和模式动物小鼠中,Perilipin1 在脂肪组织中特异性表达<sup>[4,14]</sup>,并且在脂类代谢过程中发挥重要的调控作用<sup>[7-8]</sup>。鸡 *Perilipin1* 基因表达的优势组织为脂肪组织,同时,其在不同组织中的发育性变化与脂肪性状及肌肉脂肪的发育性变化呈极显著的正相关<sup>[11]</sup>。目前对鸡 *Perilipin1* 基因的研究还主要集中在 mRNA 水平,本研究已经成功获得鸡 Perilipin1 抗血清,对进一步揭示禽类脂类代谢的分子机理具有重要的意义。

本实验室前期已利用鸡全基因组芯片,筛选出东北农业大学高、低脂系肉鸡脂肪组织中特异表达的基因,结果表明 *Perilipin1* 基因在鸡脂肪组织中特异性表达,同时 Northern blot 的验证结果也表明,*Perilipin1* 基因在脂肪组织中高表达<sup>[12]</sup>。本研究中,对 mRNA 和蛋白质水平的研究同时表明 Perilipin1 在鸡脂肪组织中高表达。与在鼠中的研究一致,Greenberg 等人利用 Western blot 的方法检测脂滴包被蛋白(Perilipin1)在小鼠多种组织中的表达规律,结果表明 Perilipin1 仅在脂肪组织中

表达,同时在 mRNA 水平也得到了相同的结论<sup>[4,14]</sup>。在哺乳动物中,Perilipin1 作为脂肪细胞中与脂滴相关的主要蛋白之一,分布于脂肪细胞及甾体生成细胞<sup>[3]</sup>,并且在脂类代谢及胆固醇合成等方面都起到了非常重要的作用<sup>[1]</sup>,因此推测 Perilipin1 可能与鸡的脂类代谢具有密切的关系。

Perilipin1 作为磷蛋白家族的主要成员之一,特异性的包被于脂肪细胞中脂滴的表面<sup>[5]</sup>,在基础状态下对脂肪细胞中的脂解起抑制作用<sup>[6]</sup>;当 Perilipin1 被蛋白激酶 A 磷酸化后,有利于 HSL 接近脂滴表面,从而增加脂解作用<sup>[4,15]</sup>。Kern 等人利用 Northern blot 及 Western blot 的方法分析了瘦人和胖人 Perilipin1 的表达情况,结果表明,Perilipin1 的 mRNA 和蛋白表达水平具有较强的相关性;同时,*Perilipin1* 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达量都与胖人具有显著的正相关<sup>[16]</sup>。本研究发现鸡 Perilipin1 在高脂系鸡脂肪组织中蛋白表达量显著高于低脂系中的表达量,与在人中的研究结果相一致。在哺乳动物的研究中发现,脂肪细胞中过量表达 Perilipin1 会引起脂解作用的下降<sup>[9]</sup>;另外对小鼠进行 *Perilipin1* 基因敲除研究,发现敲除小鼠的基础脂解水平显著升高,导致小鼠变瘦<sup>[8]</sup>。本研究所选用的高、低脂系肉鸡腹部脂肪差异的形成可能与 Perilipin1 的表达有关,其可能为 Perilipin1 在鸡脂肪组织中的高量表达,增加了其对脂滴的保护作用,并降低了基础状态下鸡脂肪组织的脂解速率,从而导致了 2 个肉鸡品系间脂肪沉积的明显差异。

### 4 结论

本研究发现 Perilipin1 在鸡脂肪组织中特异性表达;同时,Perilipin1 在高脂系公鸡脂肪组织中的蛋白表达量显著高于低脂系中的表达量。这些结果表明 Perilipin1 在鸡脂肪组织代谢过程中可能发挥重要的调控作用。

### 参考文献:

- [1] LU X, GRUIA-GRAY J, COPELAND N G, et al The murine perilipin gene; the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin [J]. *Mamm Genome*, 2001, 12: 741-749.
- [2] LONDOS C, SZTALRYD C, TANSEY J T, et al Role of PAT proteins in lipid metabolism [J]. *Bio-*

- chimie*, 2005, 87(1):45-49.
- [ 3 ] 徐 冲,何金汗,徐国恒. 脂滴包被蛋白(perilipin)调控脂肪分解[J]. 生理科学进展, 2006, 37(3): 221-224.
- [ 4 ] GREENBERG A S, EGAN J J, WEK S A, et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 11341-11346.
- [ 5 ] BLANCHETTE-MACKIE E J, DWYER N K, BARBER T, et al. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes [J]. *J Lipid Res*, 1995, 36:1211-1226.
- [ 6 ] BRASAEMLE D L, RUBIN B, HARTEN I A, et al. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38486-38493.
- [ 7 ] MARTINEZ-BOTAS J, ANDERSON J B, TESSIER D, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice [J]. *Nat Genet*, 2000, 26:474-479.
- [ 8 ] TANSEY J T, SZTALRYD C, GRUIA-GRAY J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:6494-6499.
- [ 9 ] SOUZA S C, DE VARGAS L M, YAMAMOTO M T, et al. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(38):24665-24669.
- [10] SOUZA S C, MULIRO K V, LISCUM L, et al. Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10):8267-8272.
- [11] 赵小玲,刘益平,罗 轶,等. 鸡多个组织 Perilipin 基因表达的发育性变化与脂肪性状的相关研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2): 149-154.
- [12] 王洪宝. 影响鸡脂类代谢重要基因的筛选及调控通路分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [13] 韩昌洪. 脂肪组织功能的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2007, 23(6): 927-928.
- [14] GREENBERG A S, EGAN J J, WEK S A, et al. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 12035-12039.
- [15] CLIFFORD G M, LONDOS C, KRAEMER F B, et al. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:5011-5015.
- [16] KERN P A, DI GREGORIO G, LU T, et al. Perilipin expression in human adipose tissue is elevated with obesity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(3): 1352-1358.

(编辑 郭云雁)