

鸡脂肪酸合成酶基因多态性与生长和体脂性状的相关研究*

冷 丽^{1,2}, 王宇祥^{1,2}, 李 辉^{1,2**}

(1.东北农业大学动物科学技术学院 黑龙江哈尔滨 150030 ;
2.农业部鸡遗传育种重点实验室 黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要 :试验以东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系为试验材料,根据 GenBank 公布的鸡脂肪酸合成酶基因(*FAS* 基因)的序列设计引物,用测序的方法进行多态性检测。结果检测到 2 个多态性位点,一个是位于序列 769 bp 处的 A769T 位点,一个是位于 1418~1424 bp 处的 7 bp 插入/缺失位点。用 PCR-SSCP 和 PCR-LP 的方法对上述 2 个多态性位点进行基因型分型,2 个多态性位点在研究群体中都检测到了 3 种基因型,其中 A769T 位点产生的 3 种基因型分别命名为 AA、AB 和 BB,7 bp 插入/缺失位点产生的 3 种基因型分别命名为 CC、CD 和 DD。根据研究群体的特点,建立合适的统计分析模型进行不同基因型与生长和体脂性状的相关分析。统计分析结果表明,鸡 *FAS* 基因的 A769T 位点对鸡的腹脂重和腹脂率有显著影响($P < 0.05$),AB 基因型个体的腹脂重和腹脂率显著低于 AA 基因型个体,7 bp 插入/缺失位点对 7 周龄体重有一定影响($P < 0.2$),CD 基因型个体的 7 周龄体重显著高于 CC 基因型个体。初步推测 *FAS* 基因可能是控制鸡体重和脂肪沉积的主效基因或与主效基因紧密连锁。

关键词 :脂肪酸合成酶基因;多态性;腹脂;鸡

Polymorphisms of Fatty Acid Synthase Gene Associated with Growth and Fatness Traits in Chickens*

LENG Li^{1,2}, WANG Yuxiang^{1,2}, LI Hui^{1,2**}

(1.College of Animal Science and Technology ,
Northeast Agricultural University ,Harbin ,Heilongjiang 150030 ;
2.Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding ,
Ministry of Agriculture ,Harbin ,Heilongjiang 150030)

Abstract :In this study ,the Northeast Agricultural University high and low fat (NEAUHLF) broiler lines were used as materials. Primers for fatty acid synthase (*FAS*) gene were designed according to the database of chicken genomic sequence. The polymorphisms were detected by DNA sequencing ,and PCR-LP ,PCR-SSCP methods. Two polymorphisms were found ,A769T and 7 bp Insert/Deletion (I/D) at 1418 to 1424 bp. Correlation analysis between the polymorphisms

收稿日期 2012-04-15

修回日期 2012-05-07

* 基金项目 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-42) ;
黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目(2010td02)

** 通讯作者 ,E-mail:lihui@neau.edu.cn

of the *FAS* gene with growth and fatness traits in the population was carried out using the appropriate statistical model. The results showed that the A769T polymorphism was related to abdominal fat traits ,the birds with AB genotype had significant lower ($P<0.01$) abdominal fat weight and abdominal fat percentage than the birds with the AA genotype ($P<0.01$). The 7 bp I/D polymorphism was related to the body weight at 7 weeks of age ($P<0.2$) ,and the birds with the CD genotype had much higher body weight than the birds with the CC genotype. From these results ,it concluded that polymorphisms found in *FAS* gene could be or link to a major gene that affected growth and fatness traits in chickens.

Key words fatty acid synthase gene polymorphism abdominal fat chicken

肉鸡育种工作在过去的几十年中取得了令人瞩目的成就,肉鸡在生长速度、产肉量、饲料转化率等方面都取得了极大的提高。伴随着肉鸡的快速生长,肉鸡体内沉积了大量的脂肪,鸡体内脂肪过多蓄积会降低饲料转化率、影响肉质,并会造成环境污染。因此,控制腹脂在体内的过多蓄积,进一步提高肉鸡的饲料转化率和改善肌肉品质是我国肉鸡业急需解决的重大问题,选育低脂肉鸡品系也是今后世界范围内肉鸡育种的主要目标之一^[1]。

Jayakumar 等^[2]克隆人类大脑脂肪酸合成酶(*FAS*)基因的 cDNA,其序列长 7 512 bp,编码 2 504 个氨基酸,人类的氨基酸序列与小鼠和鸡的同源性分别达 79%和 63%。同时 Northern 杂交结果显示,人类 *FAS* 基因的 mRNA 长约 9.3 kb,并在机体各种组织中均有表达,其中在大脑、肺脏和肝脏中表达量最高。Yuan 等^[3]克隆并测序了鸡肝脏 *FAS* 基因的部分 cDNA(长约 4.18 kb)序列,发现鸡 *FAS* 基因的 3' 端是由 1.87 kb 的非编码区和 2.31 kb 的编码区(编码 769 个氨基酸)组成。经过对包含鸡 *FAS* 基因的 5' 端及其侧翼区的基因片段的分离,Le 等^[4]发现,鸡 *FAS* 基因的第一外显子(大约 129 bp)被定位在第二外显子上游的 5.3 kb 处,并包含起始密码子,在 5' 侧翼区,假定的 TATA 框和 CAAT 框分别被定位在转录起始位点上游的 30 bp 和 92 bp 处,转录起始位点上游最近的 125 bp 处被认为是基本启动子区。Loftus 等^[5]指出,*FAS* 基因是体内合成脂肪途径中一个很重要的酶,他们通过给小鼠腹腔注射 *FAS* 抑制剂 C75,观测到小鼠体重显著减轻。进一步试验表明,C75 诱导小鼠体重减轻的过程和抑制进食有关,因此,Loftus 等^[5]推测 *FAS* 与食欲调控之间可能存在重要联系,可以作为控制体重的一个潜在的治疗靶位。抑制 *FAS* 活性,既能够阻滞生脂通路,减少

脂肪的合成,又能够造成丙二酰辅酶 A 浓度的升高,达到降低食欲的目的。而且由于 *FAS* 有 7 个不同的活性中心和 1 个连接活臂的酰基载体蛋白^[6],使得对它有多个可进行活性控制的位点,因此脂肪酸合成酶很可能是体内调节能量消耗和储存的重要位点之一。

为了研究 *FAS* 基因对鸡生长、脂肪沉积和代谢的作用,本研究以鸡的脂肪酸合成酶基因作为影响鸡生长和体脂性状的候选基因,通过对鸡 *FAS* 基因的多态性进行检测,分析不同基因型与生长和体脂性状的关系,旨在寻找与生长和脂肪性状高度相关标记,为鸡的分子育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验鸡群和性状测定

试验鸡群为东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系的第六、七、八和九世代鸡群。鸡群按照常规方法进行饲养管理。测量出生重以及 1、3、5、7 周龄体重,于 7 周龄时屠宰,测(称)量胸宽、屠体重、肝脏重、心脏重、脾脏重、肌胃重、腺胃重、睾丸重和腹脂重等性状,并计算肝脏率、心脏率、脾脏率、肌胃率、腺胃率、睾丸率及腹脂率。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 中鸡 *FAS* 基因序列(Accession No.J02839)设计引物,进行 *FAS* 基因的多态性检测和基因型分析。具体引物信息见表 1。PCR 扩增体系为 25 μ L,包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ L、10 mmol/L dNTPs 2 μ L、10 pmol/L 上下游引物各 0.5 μ L、Taq 酶 1.0 U、50 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L、ddH₂O 18.3 μ L。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55~58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s 共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.3 PCR-SSCP 分析

1 μ L PCR 产物和 5 μ L 的上样缓冲液(98%甲

表1 引物信息

引物名称	引物序列	扩增长度	用途
FAS1	F 5'-GCTGAAGGCTGCTGACAAG-3' R 5'-ACCACCATACCTCTCCTCT-3'	858 bp	多态性检测
FAS2	5'-GCTGAAGGCTGCTGACAAG-3' 5'-GACCCTCATCAGTCACCA-3'	155 bp	基因型分析
FAS3	5'-TCCTTTTCTGTGTCTGC-3' 5'-ACCACCATACCTCTCCTCT-3'	162 bp	基因型分析

酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯青、10 mmol/L EDTA、10%甘油), A769T 位点的 PCR 产物与上样缓冲液混合后在 16% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis=29: 1) 中电泳。10 V/cm 电泳 12~15 h 后, 银染显色。7 bp 插入/缺失位点的 PCR 产物与上样缓冲液混合后直接在 14% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis=29: 1) 中电泳。10 V/cm 电泳 8~9 h 后, 银染显色。

1.4 统计分析

根据肉鸡高、低脂双向选择品系的特点, 构建如下统计模型:

$$Y = \mu + G + L + Ge + F(L) + D(F, L) + G \times L + G \times Ge + BW7 + e$$

其中: Y 为性状观测值, μ 为群体均值; G 为基因型固定效应; L 为品系固定效应; Ge 为世代固定效应; $F(L)$ 为品系内的家系随机效应; $D(F, L)$ 为家系与品系内母鸡的随机效应; $G \times L$ 为基因型和品系互作效应; $G \times Ge$ 为基因型和世代互作效应; $BW7$ 为协变量; e 为残差效应。统计软件为 JMP 4.0。

2 结果

2.1 多态性检测

将引物 FAS1 扩增得到的 PCR 产物进行克隆测序, 共寻找到了 2 个多态性位点, 一个是位于序列 769 bp 处的 A/T 突变, 命名为 A769T (见图 1), 一个位于基因序列 1418~1424 bp 处的 7 bp 插入/缺失突变, 命名为 7 bp I/D (见图 2)。

2.2 个体基因型分析

针对 2 个多态性位点设计特异性引物, 以东北农业大学高、低脂系肉鸡基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果发现扩增特异性良好, 可以用来进行后续的基因型分析。A769T 位点经 16% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳也检测到 3 种基因型, 分别命名为 AA、AB 和 BB (见图 3)。7 bp I/D 位点

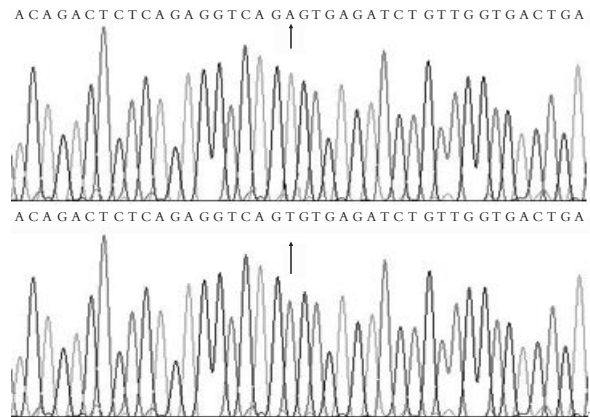


图1 A769T位点的测序峰

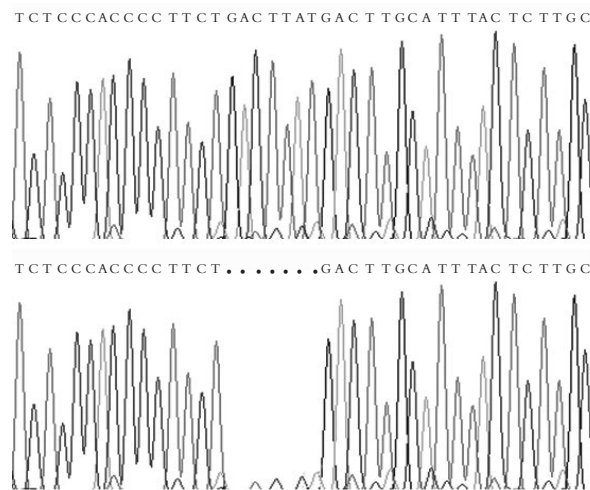


图2 7 bp I/D位点的测序峰

经 14% 聚丙烯酰胺凝胶电泳共检测到 3 种基因型, 分别命名为 CC、CD 和 DD (见图 4)。

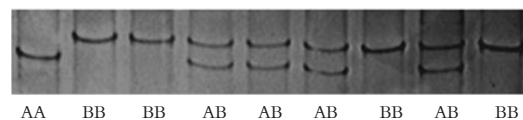


图3 FAS基因A769T位点不同基因型个体 PCR-SSCP分型结果

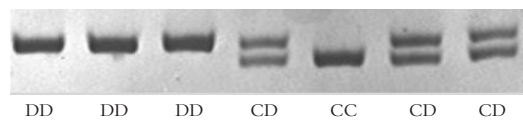


图4 FAS基因7 bp I/D位点不同基因型个体的 PCR-LP分型结果

2.3 鸡 FAS 基因与体脂性状的相关分析

在东北农业大学肉鸡高、低脂系第六、七、八和九世代共 4 个世代的合并群体中对多态性位点与体脂性状进行相关分析。结果表明, A769T 位点

点对鸡的腹脂重和腹脂率有显著影响(见表2),不同基因型的多重比较结果显示AB基因型个体的腹脂重和腹脂率显著的低于AA基因型个体(见表3);7 bp I/D位点对合并群体的7周龄体重有一定影响($P<0.2$)(见表1),不同基因型的多重比较结果显示CD基因型个体的7周龄体重显著高于CC基因型个体(见表3)。

表2 多态性对东北农业大学肉鸡高、低脂系合并群体体脂性状的影响

性状	A769T位点P值	7 bp I/D位点P值
7周龄体重	0.0942	NS
腹脂重(g)	NS	0.0028
腹脂率(%)	NS	0.0034
肝脏重(g)	NS	NS
肝脏比率(%)	NS	NS

注: NS表示 $P<0.05$ 。

表3 不同基因型对东北农业大学肉鸡高、低脂系合并群体体脂性状的影响

A769T位点	AA(768)	AB(358)	BB(63)
腹脂重(g)	56.045±0.71 ^a	52.64±0.99 ^b	56.57±2.86 ^{ab}
腹脂率(%)	2.3±0.03 ^a	2.1±0.04 ^b	2.3±0.11 ^{ab}
7 bp I/D位点	CC(575)	CD(531)	DD(144)
7周龄体重(g)	2 430.91±11.49 ^b	2 458.79±11.34 ^a	2 427.37±21.71 ^{ab}

注: 1. 括号内为该种基因型的个体数; 2. 同行肩标小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

Loftus等^[5]认为FAS基因与食欲调控之间可能存在重要联系,可以作为控制体重的一个潜在的治疗靶位。FAS基因也是影响体脂沉积和肉质性状的重要候选基因。在哺乳动物上已有许多FAS基因与脂肪相关的报道^[7-9]。

本研究以鸡脂肪酸合成酶基因(FAS)作为影响鸡体脂性状的候选基因,采用测序和PCR-LP、PCR-SSCP等法分析了该基因的序列变异,共检测到了2个多态性位点。在东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系共1 100多个个体中进行了基因型与性状间的相关分析,结果表明:A769T位点对鸡的腹脂重和腹脂率有显著影响($P<0.05$);7 bp I/D位点对肉鸡7周龄体重有一定影响($P<0.2$)。推测鸡FAS基因可能与生长和脂肪沉积有关。

在家禽上,关于FAS与脂肪之间的关系也取得了一些重要的研究成果。田维熙等^[10]曾对家

禽的脂肪酸合成酶活性和腹腔脂肪水平进行了研究,发现它们之间有很高的正相关性。对于不同种类的家禽,如肉鸭和蛋鸡之间,肝脏中FAS的活性随着腹腔脂肪重量的增加而增加;而在不同周龄的同种家禽中,随着年龄的增长,腹腔脂肪量和肝脏中FAS的活性也随之同步增长。彭祥伟等^[11]研究表明,不同填饲时期,鹅肥肝中FAS酶活性存在一定差异。

综上所述,我们认为FAS基因与鸡的生长和脂肪沉积有关,推测鸡FAS基因可能与影响鸡的脂肪代谢、能量平衡以及生长的QTL相连锁,但这需要更进一步的分子生物学试验来证实。

参考文献:

- 1 李辉,杨山. 控制鸡体内脂肪沉积的研究进展[C]//中国畜牧兽医学界第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集(畜牧卷),1996.
- 2 Jayakumar A, Tai M H, Huang W Y *et al.* Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(19): 8695-8699.
- 3 Yuan Z Y, Liu W, Hammes G G. Molecular cloning and sequencing of DNA complementary to chicken liver fatty acid synthase mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85(17): 6328-6331.
- 4 Le F N, Khadir-Mounier C, Powell R S *et al.* Characterization of the chicken fatty acid synthase gene 5' part and promoter region [J]. Eur J Biochem, 1996, 240(2): 323-330.
- 5 Loftus T M, Jaworsky D E, Frehywot G L *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors [J]. Science, 2000, 288(5475): 2379-2381.
- 6 田维熙,蒋若帆,吴海斌,等. 鸭肝脂肪酸合成酶的NADPH底物抑制及作用动力学[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1994, 10(4): 413-419.
- 7 熊文中,杨凤,周安国. 猪重组生长激素对不同杂交肥育猪脂肪代谢调控的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(1): 1-4.
- 8 Roy R, Ordovas L, Zaragoza P *et al.* Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content [J]. Anim Genet, 2006, 37(3): 215-218.
- 9 乔永. 湖羊羔羊不同部位肌肉内脂肪沉积相关基因表达的发育性变化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- 10 田维熙,董妍,权晖,等. 不同生长期蛋鸡的体脂水平和肝脏脂肪酸合成酶活性的关系[J]. 生物化学杂志, 1996, 12(2): 234-236.
- 11 彭祥伟,范守城,邢豫川,等. 鹅肥肝的生产及其FAS活性测定[J]. 中国家禽, 2005, 27(S1): 48-54.