

# A-FABP基因与肉鸡生长和体组成性状的相关分析

高广亮<sup>1,2</sup>, 关天竹<sup>1</sup>, 王海威<sup>1,2</sup>, 王守志<sup>1</sup>, 李辉<sup>1\*</sup>, 王启贵<sup>1,2\*</sup>

(1.农业部鸡遗传育种重点实验室, 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2.重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

**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,本研究以东北农业大学建立的F<sub>2</sub>资源群体为实验材料,对A-FABP基因的8个SNPs以及利用滑动窗口的方法构建的单倍型与鸡生长和体组成性状进行关联分析。结果表明:A-FABP基因8个SNPs以及所有单倍型均对龙骨长有极显著影响( $P<0.01$ );SNP1-7以及所有单倍型对6周龄体重显著或极显著影响( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );SNP3、4、6和7以及所有单倍型对均对股骨长、小胸肌重和小胸肌率有显著或极显著的影响( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。本研究结果说明,鸡A-FABP基因多态性对鸡的体重和部分体组成性状有显著或极显著影响。这些结果为深入研究A-FABP基因的功能奠定了基础。

**关键词:**A-FABP基因;单倍型;生长;体组成性状;鸡

中图分类号:S831.2

文献标识码:A

文章编号:0258-7033(2014)15-0028-05

随着杂交育种和重要经济性状杂种优势效应的系统应用,现代肉鸡的增重和饲料转化率显著提高,然而经过高强度选育,随之而来的副作用之一是脂肪沉积过多,这会降低饲料转化率进而影响经济效

益,因此,选育低脂肉鸡是今后世界范围内肉鸡育种的奋斗目标之一<sup>[1]</sup>。脂肪型脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding protein, A-FABP)通过调节脂肪细胞中脂肪酸浓度来调控体内脂类代谢的过程与细胞内脂肪酸的摄取<sup>[2]</sup>,并将其转运至 $\beta$ -氧化场所以及甘油三酯和磷脂合成部位<sup>[3]</sup>。鸡A-FABP基因仅在鸡脂肪组织中表达,其第1外显子上的单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)对鸡的活重、屠体重、胸肌重、腿肌重、肝脏重和腹脂重有显著影响<sup>[4]</sup>,A-FABP基因的多态性与鸡脂肪沉积等脂肪性状显著相关<sup>[5]</sup>,同时有研究表明鸡A-FABP基因的表达量与鸡腹脂沉积有密切的关系<sup>[4]</sup>。A-FABP作为一个影响禽类脂类代谢的重要候选基因,其在脂类代谢过

收稿日期:2013-11-12;修回日期:2013-12-16

资助项目:国家自然科学基金项目(30771542);现代农业产业技术体系建设项目(CARS-42);黑龙江省高等学校科技创新团队建设项目(2010td02)

作者简介:高广亮(1987-),男,吉林白城人,硕士,助理研究员,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:guanglianggao@sina.com

\*通讯作者:王启贵(1974-),男,黑龙江延寿人,博士,教授,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:wangqigui@hotmail.com;李辉(1963-),男,新疆昌吉人,博士,教授,研究方向为家禽遗传育种,E-mail:lihui@neau.edu.cn

of QTL was worked out, too. The results showed that F<sub>0</sub> of the two breed were there significant differences in egg quality traits and all traits in the F<sub>2</sub> separate population are multi-peak distribution. The bias of their means between the F<sub>0</sub> and F<sub>2</sub> generation suggest big major gene effects of these three traits: egg-shape index, Haugh unit, eggshell thickness. Heritability of Eggshell strength and the egg gravity was 0.25 and 0.27, respectively. Heritability of egg shape index, egg shell weight, Haugh unit, eggshell color, egg gravity, eggshell thickness and egg weight were between 0.35 to 0.49. Heritability of egg yolk weight was 0.68. Base on the heritability estimation, population size which needed for conduct a QTL identification reasearch was predicted between 34-324. The number of available individual of this resource family is more than 1000, which is greatly exceeded the minimum requirement to locate the QTL of these relative traits, that means this resource family will provide sufficient information for the QTL identification works.

**Key words:** chicken; resource family; genetic analysis; egg quality traits

程中的功能研究备受瞩目。

本研究以东北农业大学F<sub>2</sub>资源群体为实验材料,在A-FABP基因5'调控区、外显子以及3'调控区近4 700 bp物理距离,共检测8个SNP位点,并对这些位点及构建的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 材料与方 法

1.1 实验材料 肉鸡F<sub>2</sub>(NEAU-F<sub>2</sub>)资源群体来自东北农业大学,共采集1 012个个体信息。该群体F<sub>0</sub>代由是4只东北农业大学肉鸡高脂系公鸡与24只白耳蛋鸡杂交后产生F<sub>1</sub>代;F<sub>1</sub>代个体在避免全同胞与半同胞交配的前提下以1:6的公母比例交配出F<sub>2</sub>代;按照商品肉鸡饲养管理流程饲养管理F<sub>2</sub>代个体。测定F<sub>2</sub>个体出生和1~12周龄体重(BW),测量4、6、8、10、12周龄跖骨长(MeL)和跖骨围(MeC);12周龄时翅静脉采血,EDTA-Na<sub>2</sub>抗凝,酚-氯仿抽提DNA后,TE溶解-20℃保存备用。12周龄屠宰F<sub>2</sub>代个体并测定屠体重(CW)、胸宽(ChWi)、龙骨长(KeL)、股骨长(Fel)、大胸肌重(PMaW)、小胸肌重(PMiW)、腿肌重(LMW)、心脏重(HW)、脾脏重(SW)、脾脏比率(SW/BW)、肌胃重(MSW)、腺胃重(GSW)、肝脏重(LW)、睾丸重(TW)、腹脂重(AFW)、胫骨重(ShW)、跖爪重(MeCW)和股骨重(FeW)。

## 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(UCSC),设计引物扩增该基因5'调控区、外显子以及3'调控区的引物序列。分别以2只白耳黄鸡、2只高脂肉鸡和2只低脂肉鸡的基因组为模板,扩增上述PCR并克隆和测序,比对后发现该基因SNPs位点。针对发现的SNPs设计特异性引物(表1)。由英骏生物技术有限公司合成上述引物。

1.2.2 多态性检测分析 PCR扩增体系:5 U/μL TaqDNA聚合酶0.15 μL, 10×PCR Buffer 1.25 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 10 mol/L上、下游引物各0.25 μL, 50 ng/μL基因组DNA 1 μL, 9 μL的去离子灭菌水。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(表1)。

分别设计3种分型方式分析SNPs:限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分型方法分析SNP 1、SNP 2、SNP 6突变位点;长度多态性(PCR-AFLP)分型方法分析SNP 3、SNP 4、SNP 5突变位点;高效液相色谱仪(DHPLC)分型方法SNP 7、SNP 8突变位点。PCR-RFLP分型体系:2 U的BseLI、3 U的BmgT 120 I和TaqI内切酶,5 μL的PCR产物,2 μL的Buffer和12.9 μL的去离子灭菌水混合,分别于55、37、65℃度酶切过夜。2%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。PCR-AFLP分型体系:5 μL的非变性上样缓冲液、0.5 μL的PCR产物,14%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR产物。

表1 A-FABP基因引物序列

位点	引物序列(5'→3')	扩增长度/bp	复性温度/℃
A-FABP (5'调控区)	GGGGTACCTCCAAAGAAGTGAAT TTGTCAAGCTTGCTAGCACTC	2016	50.2
SNP 1(5'调控区)	AGGGTAACTAATCATAACCTA ACTTCTATCCITTTGGCTTT	195	45
SNP 2(5'调控区)	GAGATGAGGCAACTCTTTC CATTCTTCTTTAGCTGGATT	296	45
SNP 3(5'调控区)	AAA AGTATGTTGAAGAAATC TCA TGA AGA ACTGAGGCA	138/128	47.1
SNP 4(5'调控区)	ACAGCCAGAAGGAACATC TATCAGTCCACTGAAGGT	199/177	48.4
SNP 5(5'调控区)	GCCAAGGAAGTAGGATATA TTTCAGTCTCCATAITGTAT	174/167	55
SNP 6(第1外显子)	AGACTGCTACCTGGCCTGACA CATCCTACTGGAATACGG	702	58
SNP 7(第3外显子)	GGTCCA AAGCACCTGATGA CCATCCACCACCTTTCTCTT	141	56.4
SNP 8(3'调控区)	CGA AAGAGCATGAGGAAG GCCACAACAAATTAGGC	166	59.1

DHPLC分型：吸取5 μL PCR产物，变性温度分别为57.3、56.5℃在DNA分离柱中洗脱。仪器通过改变缓冲液的浓度来增加洗脱液中乙腈的浓度，缓冲液D(75%ACN)清洗运行后用分离柱。通过紫外线(260 nm)探测器检测获得洗脱曲线，样本经过2次检测可分出纯合型和杂合型。

1.2.3 单倍型构建 针对8个SNP位点，利用JMP4.0通过滑动窗口进行单倍型构建，每3个SNPs构成一个窗口，每次向前滑动1个SNP，共构成6个窗口(图1)。

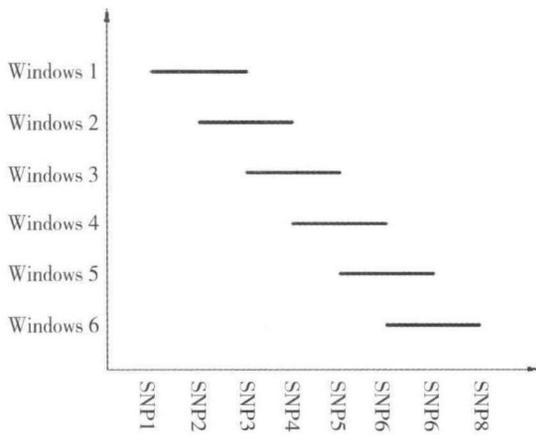


图1 A-FABP基因单倍型构建

1.2.4 统计分析 根据F<sub>2</sub>资源群体的特点，构建基因型效应统计模型：

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

$$Y = \mu + G + L + H + G \times L + G \times H + F(L) + D(F, L) + BW12 + e \quad ②$$

模型①适用于非率的生长和体组成性状；模型②适用于的生长和体组成性状的率性状。其中，Y为性状观测值，μ为群体均值，G为基因型固定效应，H为单倍型固定效应，L为品系固定效应，G×L为基因型和品系互作效应，H×L为单倍型和品系互作效应，F(L)为嵌套在品系内的公鸡家系效应，D(F, L)为嵌套在品系内公鸡家系内的母鸡效应，e为随机效应。使用统计软件JMP 4.0检验基因型和单倍型与性状间的相关程度，并估计性状的最小二乘均值。建议

性显著水平为P<0.2，显著水平为P<0.05，极显著水平为P<0.01。

## 2 结果与分析

2.1 SNPs发现及命名 以2只白耳黄鸡、2只高脂肉鸡的基因组为模板，利用A-FABP 5'调控区、外显子以及3'调控区的引物进行PCR扩增，扩增片段回收、克隆到pMD18-Tsimple载体后进行测序。结果在5(调控区发现5个SNP位点(SNP1-SNP5)，第1外显子发现1个SNP位点(SNP6)，第3外显子发现1个SNP位点(SNP7)，3'调控区发现1个SNP(位点SNP8)。参照命名系统(<http://www.hgvs.org/mutnomen>)对这8个SNP位点进行统一的命名(表2)。

2.2 单位点SNP与鸡生长和体组成性状的相关分析 表3结果显示，SNP3对鸡6、7、8、9、10、11、12周龄体重、屠体重、12周跖骨长、龙骨长、脾脏比率、肌胃重、肌胃比率、龙骨长、股骨长、小胸肌重、小胸肌比率有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)；SNP4对4、6周龄体重、12周跖骨长、龙骨长、脾脏重、脾脏比率、肌胃重、股骨长、小胸肌重、小胸肌比率有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)；SNP6对6周龄体重、12周跖骨长、脾脏重、脾脏比率、股骨长、小胸肌重和小胸肌比率有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)；SNP7对6、8、9、10、11、12周龄体重、屠体重、龙骨长、股骨长、小胸肌重、小胸肌比率有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)。

2.3 单倍型与鸡体组成性状的相关分析 表4结果显示，Window1、2、3、4、5和6对小胸肌重、小胸肌率、龙骨长，股骨长有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)。Window2、3、4、5和6对脾脏重、脾脏率有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)；Window2、3、4和5对6周龄体重有显著或极显著影响(P<0.05或P<0.01)。

表2 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1外显子	单点突变: C/T	g.51 C>T
SNP 7	第3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 突变位点及单倍型对鸡生长和体组成性状的影响(P值)

性状	SNP1 (n=920)	SNP2 (n=933)	SNP3 (n=1001)	SNP4 (n=1006)	SNP5 (n=892)	SNP6 (n=995)	SNP7 (n=968)	SNP8 (n=605)
BW 4	0.0006**	0.0490*	NS	0.0419*	NS	NS	NS	0.0466*
BW 6	0.0001**	0.0153*	0.0116*	0.0092**	0.0468*	0.0208*	0.0362*	NS
BW 7	0.0001**	NS	0.0285*	NS	NS	NS	NS	NS
BW 8	<0.001**	NS	0.0097**	NS	NS	NS	0.0365*	NS
BW 9	0.0001**	0.0238*	0.0036**	NS	NS	NS	0.0227*	NS
BW 10	0.0014**	NS	0.0039**	NS	NS	NS	0.0167*	NS
BW 11	0.0017**	NS	0.0042**	NS	NS	NS	0.0184*	NS
BW 12	0.0032**	NS	0.0141*	NS	NS	NS	0.0298*	NS
Mel12	NS	NS	0.0193*	0.0072**	NS	0.0317*	NS	NS
Kel	<0.0001**	0.0001**	<0.0001**	<0.0001**	0.0014**	<0.0001**	0.0007**	0.0007**
AFW	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AFP	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SW	NS	NS	NS	0.0373*	NS	NS	NS	NS
SW/BW	NS	NS	0.0289*	0.0179*	NS	NS	NS	NS
Fel	NS	NS	0.0142*	0.0004**	NS	0.0020**	0.0386*	NS
Pwiw	0.0121*	NS	0.0003**	<0.0001**	NS	<0.0001**	0.0104*	NS
Pwip	NS	NS	0.0004**	<0.0001**	NS	<0.0001**	0.0218*	NS

注: \*表示显著(P<0.05), \*\*表示极显著(P<0.01)。无显著影响的性状P值没有列出, NS代替。下表同

表4 A-FABP基因单倍型对鸡组成性状的影响(P值)

鸡体组成性状	Window1 (n=1006)	Window2 (n=1012)	Window3 (n=1011)	Window4 (n=1010)	Window5 (n=1008)	Window6 (n=1009)
BW4	0.0115*	NS	NS	NS	0.0389*	0.0030**
BW6	0.0048**	0.0381*	NS	NS	0.0149*	0.0014**
BW7	0.0115*	0.0352*	0.0669	NS	0.0187*	0.0020**
BW8	NS	NS	NS	NS	0.0208*	0.0031**
BW9	0.0499*	NS	NS	NS	0.0458*	0.0058**
BW10	NS	NS	NS	NS	0.0425*	0.0084**
BW11	NS	NS	NS	NS	NS	0.0440*
BW12	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mel12	NS	NS	NS	NS	NS	0.0424*
Kel	0.0003**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**
AFW	NS	NS	NS	0.0434*	0.0159*	0.0059**
AFP	NS	NS	NS	0.0475*	0.0221*	0.0049**
SW	NS	0.0483*	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**
SW/BW	NS	NS	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**
PmaW	NS	NS	0.0239**	NS	0.0277*	NS
Pmap	NS	NS	0.0319*	NS	0.0363*	NS
Pwiw	0.0011**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Pwip	0.0024**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**

### 3 讨论

近年来,对A-FABP基因在畜禽生长和脂类代谢过程中研究越来越广泛,研究发现A-FABP基因影响心血管疾病、肥胖、胰岛素的分泌和胰岛素抵抗等

生物学过程<sup>[6-7]</sup>。与哺乳动物相似,鸡A-FABP基因与鸡体重、脂肪沉积性状、部分肉质性状显著相关<sup>[8]</sup>,因此该基因作为重要的脂类代谢候选基因被深入广泛进行研究。

本研究表明,SNP6对6周龄体重、龙骨长、

股骨长、小胸肌重和小胸肌率有显著或极显著影响。前人研究表明,第1内含子和SNP6上单碱基变异对脂肪沉积有显著影响<sup>[5]</sup>,SNP6与中国农业大学F<sub>2</sub>资源群体、北京油鸡的体重、腹脂重、腹脂率、皮脂厚、肌内脂肪含量等体组成性状有显著或极显著影响<sup>[6]</sup>。本研究 and 实验室前期结果与先前其他学者的研究结果并不一致。导致以上这些差异的原因可能是以下3点:一是本研究所使用的实验群体(东北农业大学F<sub>2</sub>资源群体)与其他学者使用的实验群体(肉鸡腹脂双向选择品系、中国农业大学F<sub>2</sub>群体、北京油鸡)不同、生长环境等差异导致其SNP关联分析结果与其他人研究结果不一致<sup>[9]</sup>;二是SNP位点与鸡生长和体组成性状的相关分析所使用的模型并不相同;三是单倍型构建方法与之前的文献报道也不相同。

本研究发现A-FABP基因中有7个SNP与6周龄体重有显著或极显著相关,有8个SNP与龙骨长有极显著相关,有4个SNP与股骨长、小胸肌重、小胸肌率有显著或极显著相关,其中SNP3、SNP4、SNP6和SNP7均与龙骨长、股骨长、小胸肌重、小胸肌率和6周龄体重呈显著或极显著相关。为了不遗漏一些重要的位点,找到和目标性状相关的区段,本研究以滑动窗口的形式构建单倍型,这种方法能够简单地筛选基因型和目标性状的关联<sup>[10]</sup>,发现Window1、Window2、Window5和Window6均对6周龄体重有极显著影响,Window1-Window6与龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌率有极显著相关,与SNP3、SNP4、SNP6和SNP7的分析结果一致,推测这4个SNPs是影响6周龄体重、龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌率的主要SNP位点。关天竹<sup>[11]</sup>发现,SNP3、SNP4、SNP6和SNP7位于一个单倍型块中,处于强连锁状态,同时也发现该单倍型对龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌率这4个性状有极显著影响。从上述结果中可以看出,A-FABP基因的SNP3、SNP4、SNP6和SNP7高度连锁,且对龙骨长、股骨长、小胸肌重、小胸肌率和6周龄体重显著效果一致。因为这4个SNPs位点高度连锁状态,它们构建的单倍型以较高的遗传频率遗传给下一代,利用这些遗传信息可以间接推测后代的表型性状,这为今后的选育工作提供了参考。

以上分析结果表明,A-FABP基因的多态对肉鸡的体重、龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌率有显

著影响,是影响鸡体重性状和体组成性状的重要候选基因,通过对A-FABP基因与体重、龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌率等性状相关的重要SNP的深入研究,将会进一步阐明肉鸡体重和体组成性状的遗传机理。

#### 4 结 论

综合单位点和单倍型与鸡生长和体组成性状关联分析可知,A-FABP基因的单位点和单倍型对体重、龙骨长、股骨长、小胸肌重和小胸肌比率等性状有显著或极显著相关( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

#### 参 考 文 献:

- [1] Li H, Deeb N, Zhou H, *et al.* Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with the very low density apolipoprotein-II gene[J]. *Poult Sci*, 2005, 84(5): 697-703.
- [2] Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R G, *et al.* Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1081(1): 1-24.
- [3] Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism[J]. *J Appl Genetics*, 2006, 47(1): 39-48.
- [4] 王启贵. 鸡FABP基因克隆、表达特性及功能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004: 75.
- [5] 叶满红, 文杰, 曹红鹤, 等. 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[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(6): 526-532.
- [6] Xu A, Vanhoutte P M. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2012, 302(6): 1231-1240.
- [7] Shu L L, Lee P Z, Zhou M, *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) deficiency promotes diet-induced obesity partially via its regulation on adaptive thermogenesis[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2014, 26(3): 241-247.
- [8] 罗桂芬, 陈继兰, 文杰, 等. A-FABP基因多态性分析及其与脂肪性状的相关研究[J]. *遗传*, 2006, 28(1): 115-118.
- [9] Sherman E L, Nkrumah J D, Moore S, *et al.* Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle[J]. *J Anim Sci*, 2010, 88(1): 1622.
- [10] Mathias R A, Gao P, Goldstein J L, *et al.* A graphical assessment of p-values from sliding window haplotype tests of association to identify asthma susceptibility loci on chromosome 11q[J]. *BMC Genetics*, 2006, 7: 38.
- [11] 关天竹. A-FABP基因多态性与鸡生长和体组成性状的关联研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010: 26-27.