

## 鸡 *Apo-AI* 基因 g. -163 A > T 单核苷酸多态性的功能性分析

乔书培, 王维世, 荣恩光, 于莹莹, 闫晓红, 李辉, 王宁\*

(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, 哈尔滨 150030)

**摘要** 鸡 *Apo-AI* 基因 g. -163 A > T 单核苷酸多态性(SNP)与鸡腹脂重和腹脂率显著相关。生物信息分析显示,该 SNP 位于鸡 *Apo-AI* 基因转录起始位点,提示它可能是一个功能性 SNP。为确定该 SNP 的功能性,本研究分别构建了含该 SNP 位点 A 和 T 等位基因的启动子报告基因载体,分别在 DF1 细胞和 HepG2 细胞中比较这 2 个等位基因对鸡 *Apo-AI* 基因启动子活性的影响。研究发现,T 等位基因的启动子报告基因活性及报告基因 mRNA 表达水平均显著高于 A 等位基因( $P < 0.05$ ),表明该 SNP 影响基因表达,是 1 个功能性 SNP。本研究结果提示,鸡 *Apo-AI* 基因 g. -163 A > T 有望作为优质鸡育种的功能性分子标记。

**关键词** 鸡; *Apo-AI* 基因; 启动子; 功能性单核苷酸多态性

中图分类号 Q341

### Functional Analysis of Chicken *Apo-AI* g. -163 A > T SNP

QIAO Shu-Pei, WANG Wei-Shi, RONG En-Guang, YU Ying-Ying,  
YAN Xiao-Hong, LI Hui, WANG Ning\*

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** The single nucleotide polymorphism (SNP) of g. -163 A > T in chicken *Apo-AI* gene associated with the weight and percentage of chicken abdominal fat. This SNP site is located at the transcription start site of the belonged gene. To test whether this SNP is functional, we constructed a reporter plasmid of alleles A and T of g. -163 A > T, and compared the promoter activity in DF1 and HepG2 cells. The results showed that allele T had higher reporter activities and mRNA levels in both two cell lines. The results indicated that chicken SNP of *Apo-AI* g. -163 A > T could be considered as a functional marker for broiler chicken breeding.

**Key words** chicken; *Apo-AI* gene; promoter; functional single nucleotide polymorphism (SNP)

*Apo-AI* 是血浆高密度脂蛋白(HDL)的主要脱辅基蛋白质成分,也是与高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)颗粒相关的重要蛋白质<sup>[1]</sup>。*Apo-AI* 对于胆固醇的动态平衡和心血管疾病的发生发展至关重要。*Apo-AI* 能与外周组织细胞膜上的 ATP-结合盒式转运蛋白 1(ATP-binding cassette transporter 1, ABC1)结合,促进细胞内的胆固醇流出。*Apo-AI* 还能激活血浆中的卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin: cholesterol acyltransferase, LCAT),LCAT 负责胆固醇的脂化<sup>[2-4]</sup>。对基因敲除小鼠研究表明,*Apo-AI* 基因的缺失会引起血浆 HDL 水平明显降低,增大动脉粥样硬化发生的风险<sup>[5-7]</sup>。过表达 *Apo-AI* 基因可提高小鼠血

收稿日期: 2014-02-05; 接受日期: 2014-03-22

国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2009CB941604),黑龙江省高校青年学术骨干支持计划(No. 1253G009),黑龙江省高等学校科技创新团队建设资助项目(No. 2010td02)

\* 联系人 Tel: 0451-55191770; E-mail: wangning@neau.edu.cn

Received: February 5, 2014; Accepted: March 22, 2014

Supported by National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2009CB941604), Program for University Young Core of Disciplines from Heilongjiang Province (No. 1253G009) and Program for Innovation Research Team in University of Heilongjiang Province (No. 2010td02)

\* Corresponding author Tel: 0451-55191770;

E-mail: wangning@neau.edu.cn

清 HDL 水平,抑制鼠动脉粥样硬化的进展,甚至可以使动脉粥样硬化斑块重塑到稳定的表型<sup>[8-11]</sup>。Pastore 等<sup>[12]</sup>将携带人载脂蛋白 A 基因的腺病毒,通过静脉注射给载脂蛋白 E 的敲除小鼠,发现过表达载脂蛋白 A 显著抑制动脉粥样硬化的进展。

多态性研究发现,人 *Apo-AI* 基因多态性与 II 型糖尿病、代谢综合征、心血管疾病的发生以及血浆中 HDL-C 的水平相关<sup>[13-18]</sup>。对巴西老年人群 *Apo-AI* 基因的多态性研究发现, *Apo-AI* 基因第 1 内含子区 rs5 069 (C > T) 多态性位点 C 的等位基因,与肥胖症的发生相关;单倍型分析发现,GT 单倍型与 GC 单倍型相比,GT 单倍型能降低肥胖症的发生率<sup>[19]</sup>。对我国糖尿病人的 *Apo-AI* 基因多态性分析发现,rs5 069 位点 T 等位基因与低体重指数相关<sup>[20]</sup>。对巴西老年人群心血管疾病的研究表明, *Apo-AI* 基因 3' UTR 区 rs1 2721 026 位点虽然与心血管疾病的发生不相关,但是,其 G 等位基因与肥胖症的发生呈现显著相关的趋势<sup>[21]</sup>。另外,对印度人和白种人的心血管疾病的研究发现, *Apo-AI* 与瘦素、脂联素等脂肪因子的水平相关<sup>[22]</sup>。上述结果预示, *Apo-AI* 基因与肥胖症的发生有关。

对禽类的研究发现,禽类脂肪的运转主要是通过血浆 VLDL 途径实现,血浆 VLDL 的变化与鸡腹部脂肪沉积量显著相关<sup>[23]</sup>。 *Apo-AI* 作为血 HDL 的主要成分,调节胆固醇的动态平衡,也少量存在于鸡的血浆 VLDL 中,对血浆 VLDL 的合成具有调节作用<sup>[24]</sup>。Douaire 等<sup>[25]</sup>研究发现,鸡 *Apo-AI* 基因在高脂系鸡肝中的表达显著高于低脂系,并且其 mRNA 的含量与腹脂量高度相关 ( $r = 0.58, P < 0.05$ )。本室在前期高、低脂鸡脂肪组织的蛋白组学研究中发现, *Apo-AI* 在高、低脂系鸡脂肪组织存在差异表达 ( $P < 0.05$ )<sup>[26]</sup>。这些数据都表明, *Apo-AI* 基因在禽类脂肪生长发育以及脂类代谢中发挥重要作用。

本室王启贵等<sup>[27]</sup>在鸡 *Apo-AI* 基因启动子区发现了 1 个多态性位点 g. -463 A > T,该位点与鸡腹脂重和腹脂率显著相关。最新的生物信息学分析显示, g. -463 A > T 位于 *Apo-AI* 基因转录起始位点,推测该 SNP 是 1 个功能性 SNP,它可能影响 *Apo-AI* 基因表达,进而影响鸡的脂肪性状。为此,本文开展了该 SNP 位点的功能性鉴定和分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

克隆载体 pEasy-T1 vector、pEasy-T1 simple

vector、菌株 Top10 均购自北京全式金公司;荧光素酶报告基因载体 pGL3 basic vector 和对照载体 pRL-TK 均为美国 Promega 公司产品;鸡胚胎成纤维细胞系 (DF1) 购自上海生命科学研究院细胞资源中心;人肝癌细胞系 (HepG2) 为本室保存;鸡基因组为本室保存的东北农业大学高、低脂系第 6 世代肉仔鸡基因组 DNA。

Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System、RQ1 RNase-Free DNase、ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcription System 均购自美国 Promega 公司;限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶为 New England Biolabs 公司产品;DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量制备试剂盒均购自 Axygen (杭州) 有限公司;PureLink<sup>™</sup> RNA Micro Kit、Opti-MEM<sup>®</sup>、DMEM、DMEM/F-12、Trizol Reagent、Lipofectamine 2000 为美国 Invitrogen 公司产品;胰酶、抗生素均购自 Sigma 公司;FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 购自 Roche 公司。

### 1.2 引物设计及合成

参照 GenBank 鸡 *Apo-AI* 基因 (M96012.1) 序列为模板,设计 1 对引物 *APOA-F/APOA-R* (Table 1),用于扩增包含 g. -463 A > T 位点的 *Apo-AI* 基因启动子区,上下游引物分别携带 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点,引物具体位置见 Fig. 2。为了检测报告基因的表达水平,根据 pGL3 basic 载体序列 (U47295.2) 设计萤火虫荧光素酶基因的表达检测引物 luc-F/luc-R (Table 1),以 pRL-TK 载体序列 (AF025846) 为模板,设计海肾荧光素酶基因的表达检测引物 Rluc-F/Rluc-R (Table 1)。所有引物利用 Primer Premier 5.0 软件进行设计,引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.3 鸡 *Apo-AI* 基因启动子区的 PCR 扩增和测序分型

以东北农业大学高、低腹脂系第 6 世代肉仔鸡基因组 DNA 为模板,利用 2 × Pfumastermix DNA 聚合酶扩增鸡 *Apo-AI* 基因启动子区 403 bp (包含 g. -163 A > T 位点 Fig. 3 所示),PCR 扩增反应体系:上下游引物 *APOA-F/APOA-R* 各 1 μL (10 μmol/L),10 × PCR 缓冲液 5 μL,dNTPs 5 μL (2.5 mmol/L),2 × Pfuastermix DNA 聚合酶 0.5 μL,DNA 模板 5 μL (50 mg/L),无菌水 32.5 μL。最佳反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,64.5℃ 30 s,72℃ 40 s,32 个循环,72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。PCR 产物直接测序,根据测序峰图进行个体基因型分型。

**Table1 The primer sequences , annealing temperatures and product size**

Primer	Primer sequences (5'-3')	Product size/bp	Annealing temperature/°C
<i>APOA-F</i>	<u>G</u> GTACCGGGCCGGAATTTGGGTCA	403	64.5
<i>APOA-R</i>	AAGCTT <u>G</u> AGGGCAGAGCGAGAAGTTGG		
luc-F	TACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCG	137	60
luc-R	AACCGTGATGGAATGGAACAAC		
Rluc-F	GCGGAGAAAATGCTGCTTGAG	113	60
Rluc-R	TCCTGAATGGCTCCAGGTAGG		

#### 1.4 鸡 *Apo-AI* 基因启动子报告基因载体的构建

挑选不同等位基因纯合个体基因组 DNA ,利用引物 *APOA-F/APOA-R* ,PCR 扩增获得两端带有 *Kpn* I 和 *Hind* III 的 *Apo-AI-T* 和 *Apo-AI-A* 片段( A 和 T 分别代表不同等位基因型启动子片段) ,分别克隆到 T-simple 载体. 菌落经 PCR 鉴定和质粒 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定无误 ,送上海英骏生物公司测序. 阳性重组质粒分别命名为 T-*Apo-AI-T* 和 T-*Apo-AI-A*. 利用 *Kpn* I 和 *Hind* III 分别双酶切 T-*Apo-AI-T* 和 T-*Apo-AI-A* ,琼脂糖凝胶电泳纯化 ,分别获得 403 bp 的 *Apo-AI-T* 和 *Apo-AI-A* 启动子片段. 采用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切 pGL3 basic vector ,纯化后分别与 *Apo-AI-T* 和 *Apo-AI-A* 启动子片段连接 ,获得不同等位基因启动子报告基因载体. 将测序无误的报告载体分别命名为 pGL3-*Apo-AI-T* 和 pGL3-*Apo-AI-A*.

#### 1.5 细胞培养

细胞置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 90% 相对湿度的培养箱中培养 ,其中 DF1 细胞培养于含 10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基; HepG2 细胞在含 10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 中培养.

#### 1.6 双荧光素酶报告基因载体的转染及活性分析

将细胞计数后接种 12 孔板中 ,待细胞汇合度达 80% ~ 90% ,使用 Lipofectamine 2000 ,将 1 μg 等位基因( A 或 T) 荧光素酶报告载体 ,以及空报告基因载体分别与 50 ng 的 pRL-TK 质粒转染细胞 ,细胞培养于 Opti-MEM1 培养基中. 细胞培养 4 ~ 6 h 后换为正常生长培养基. 转染 48 h ,收集细胞裂解液 ,并按 Promega 公司双荧光素酶检测试剂盒说明书操作 ,采用化学单管检测仪 ,分别测定各组的海肾( 内参) 和萤火虫荧光素酶活性.

#### 1.7 细胞 RNA 提取及实时定量 PCR 检测

用 6 孔板培养鸡胚胎成纤维细胞系( DF1) 或人肝癌细胞系( HepG2) ,当细胞汇合度达 80% ~ 90%

时 ,利用 Lipofectamine 2000 将等量 pGL3-*Apo-AI-T*、pGL3-*Apo-AI-A* 质粒 7.5 μg 分别与 0.375 μg pRL-TK 质粒 50 ng 共转染 DF1 或 HepG2 细胞 ,48 h 收集细胞 ,按 Trizol 法提取细胞的总 RNA ,经 0.9% ~ 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测细胞总 RNA ,将 RNA 统一调至 200 μg/mL ,按照 RQ1 RNase-free DNase、PureLink™ RNA Micro Kit 和 ImProm-II™ Reverse Transcription System 试剂盒说明书进行 RNA 纯化和反转录. 采用实时定量 PCR 检测萤火虫荧光素酶 mRNA 的表达 ,以海肾荧光素酶表达为内参.

#### 1.8 统计学分析

运用 SAS 9.2 软件( SAS Institute Inc) 分析实验数据 ,数据结果表示为  $\bar{x} \pm s$  ,\*  $P < 0.05$  为差异显著 ,\*\*  $P < 0.01$  为差异极显著.

## 2 结果

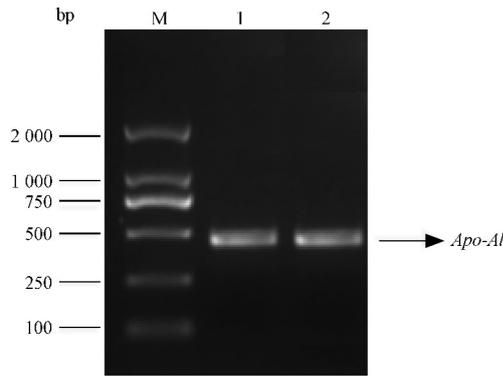
### 2.1 鸡 *Apo-AI* 基因启动子片段的克隆及不同等位基因的分型鉴定

利用引物 *APOA-F/APOA-R* ,PCR 扩增高、低脂系第 6 世代肉仔鸡基因组 DNA ,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测 ,获得 1 个 403 bp 特异性条带 ,实验结果与预期相符( Fig. 1) . 该扩增产物包含 *Apo-AI* 基因 g. -463 A > T 位点.

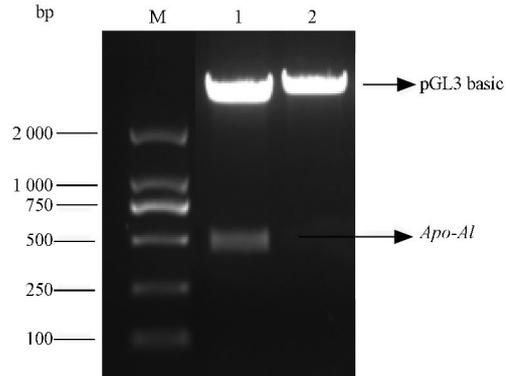
为获得该位点不同基因型个体 ,PCR 产物经纯化后测序. 结果发现 ,该 SNP 存在 3 种基因型( AA、TT、AT) ,与我们前期结果一致<sup>[27]</sup> ( Fig. 2A) . 与 NCBI 和 UCSC 数据库的序列比对发现 ,*Apo-AI* 基因的 g. -463 A > T 位点恰好是 *Apo-AI* 基因转录起始位点( TSS) ( Fig. 2B) ,这与前研究报道不同. 以前认为 ,该 SNP 位点位于 TSS 下游 4 bp 处 ,翻译起始密码子 ATG 上游的 163 bp 处<sup>[27]</sup>.

### 2.2 鸡 *Apo-AI* 不同等位基因报告基因载体的构建

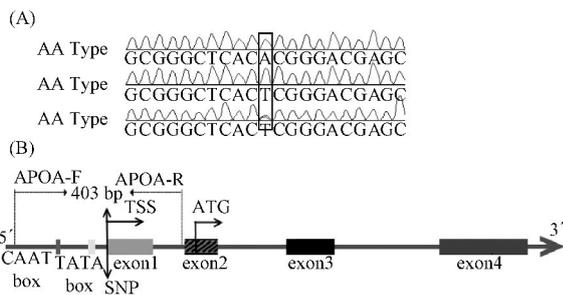
转录起始位点是 RNA 聚合酶转录合成 RNA 时 DNA 链上的 1 个核苷酸 ,通常为 1 个嘌呤核苷酸. 转录起始位点发生突变或者缺失会影响基因的转录



**Fig. 1** PCR amplification of chicken *Apo-AI* promoter region with g. -163 A > T SNP M: DL2000 marker; 1, 2: PCR products of chicken *Apo-AI* promoter region from two genomic samples



**Fig. 3** Identification of pGL3-*Apo-AI-T* and pGL3-*Apo-AI-A* plasmids by restriction enzyme digestion M: DL2000 marker; 1: pGL3-*Apo-AI-T* plasmid digested by *Kpn* I and *Hind* III; 2: pGL3-*Apo-AI-T* plasmid digested by *Kpn* I



**Fig. 2** The three genotypes of g. -163 A > T of chicken *Apo-AI* promoter and the genomic structure of chicken *Apo-AI* gene

(A) AA, AT and TT represent the three different genotypes of *Apo-AI* g. -163 A > T; (B) Schematic representation of chicken *Apo-AI* gene structure. Chicken *Apo-AI* gene contains four exons and three introns. APOA-F and APOA-R are the primers used for amplification of *Apo-AI* gene promoter. TSS, the transcriptional start site of *Apo-AI* gene; ATG, the translational start codon of *Apo-AI* gene. The g. -163 A > T SNP is located at the transcription start site of chicken *Apo-AI* gene

和表达<sup>[28]</sup>. 为了验证 g. -163 A > T 位点是否影响 *Apo-AI* 基因的表达, 即是否为功能性 SNP, 本文以不同等位基因的纯合个体基因组 DNA 作为模板, 扩增 *Apo-AI* 基因启动子区片段(包含 g. -163 A > T 位点), 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化, 利用 T 载体克隆, 获得不同等位基因的 *Apo-AI* 基因启动子片段, 将其插入报告基因载体 pGL3-basic vector, 获得报告基因载体 pGL3-*Apo-AI-T* 和 pGL3-*Apo-AI-A*, 经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切、*Kpn* I 单酶切验证以及测序验证无误后用于后续研究(Fig. 3).

### 2.3 双荧光素酶报告系统检测及分析

为了使实验的结果更加准确可信, 在人 HepG2

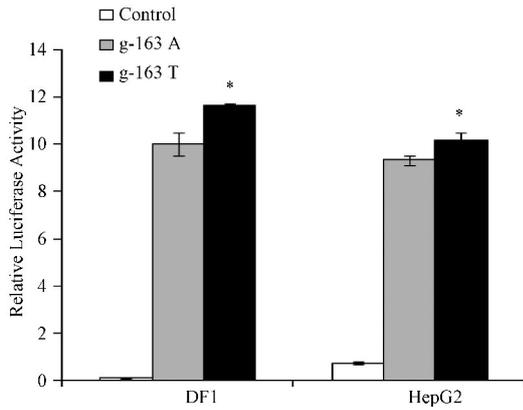
和鸡 DF1 的 2 个不同细胞株中, 分析了 g. -163 A > T 对启动子报告基因活性(报告基因蛋白表达)的影响. 结果发现, 在人 HepG2 和鸡 DF1 细胞中, 不同等位基因(A 和 T)启动子报告基因活性均存在显著差异( $P < 0.05$ ), 均表现为 T 等位基因的报告基因活性是 A 等位基因的 1.16 和 1.1 倍.

### 2.4 g. -163 A > T 位点变异对鸡 *Apo-AI* 基因转录的影响

报告基因活性检测显示, 不同等位基因型的 *Apo-AI* 启动子报告基因活性存在显著差异( $P < 0.05$ ), 说明不同等位基因的 *Apo-AI* 启动子, 对报告基因蛋白质表达的作用存在显著差异. 为进一步确定该 SNP 是作用于转录水平还是翻译水平, 利用 qRT-PCR 方法, 以海肾报告基因作为内参, 检测了 *Apo-AI* 不同等位基因的萤火虫荧光素酶报告基因在 mRNA 水平上的差异. 结果表明, 在 HepG2 细胞中, T 等位基因型报告基因的转录活性显著高于 A 等位基因型( $P < 0.05$ ); 在 DF1 细胞中, T 等位基因型的转录活性极显著高于 A 等位基因型( $P < 0.01$ ). 由此可见该 SNP 在转录水平影响 *Apo-AI* 基因的表达.

## 3 讨论

本研究证实, 鸡 *Apo-AI* 基因的 g. -163 A > T 是功能性 SNP. 该 SNP 影响基因启动子的转录活性, 从而影响基因表达. 生物信息学分析显示, 该 SNP 位点恰好位于 *Apo-AI* 基因的转录起始位点. 启动子是真核生物转录起始所必须的一段 DNA 序列, 是基因表达调控的上游顺式作用元件之一<sup>[29]</sup>. 真核生物基因启动子的典型核心结构(core promoter)大约在转录起点 -40 ~ +50 之间, 在转录起始前复合物

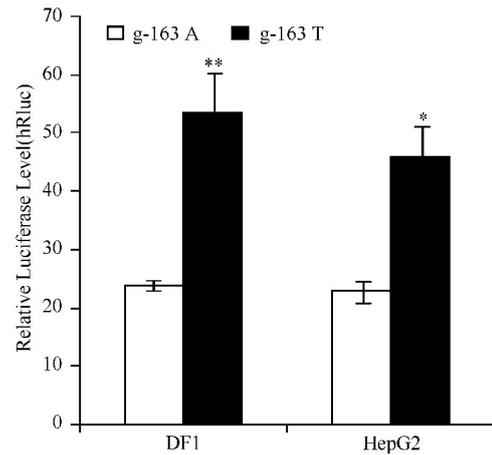


**Fig. 4 Relative luciferase activities of *Apo-AI* promoter reporters with g. -163 A > T SNP in two cell lines**

Relative luciferase activity was calculated as the ratio of firefly to renilla luciferase activity. Both of HepG2 or DF1 cells were co-transfected with 1  $\mu$ g of the firefly luciferase plasmids (pGL3-*Apo-AI-T*, pGL3-*Apo-AI-A* and pGL3 basic vector) and 50 ng of pRL-TK vector as internal control. At 80% confluence in 12-well plates, cells were harvested after transfection for 48 hours, and the activities of firefly and renilla luciferases were measured, respectively. Each measurement represented the average of three independent assays for using independent plasmid preparations. Data are shown as mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significant difference in activities between the two allele-promoter reporters in two cell lines, \*  $P < 0.05$  (Student's t-test)

的装配、转录起始位点的定位,以及转录方向的控制中均发挥重要作用<sup>[30]</sup>。基因的转录起始点 TSS 是核心启动子的重要顺式元件之一,转录的准确性取决于有特异的转录起始位点,转录起始位点的改变,会造成转录起始前复合物不能正确地起始转录,或者影响转录前起始复合物的形成和效率,从而影响基因的转录。转录起始位点的改变,也可影响某些转录因子的结合,从而影响基因转录<sup>[28, 31, 32]</sup>。本研究表明,鸡 *Apo-AI* 基因转录起始位点的多态性(g. -163 A > T)影响 *Apo-AI* 基因启动子的转录活性,从而影响其基因表达。

*Apo-AI* 基因在鸟类和哺乳动物组织中的表达谱不同,*Apo-AI* 在鸡小肠、肝、肾、卵巢/睾丸、大脑、肺、骨骼肌和心肌中均有表达;但在哺乳动物中,*Apo-AI* 只在肝和小肠中表达。凝胶阻滞实验已经证明,鸡 *Apo-AI* 基因启动子区 -20 ~ -10 (5'-GGGCGCGCG-3') 存在 1 个特有的 SP1 结合位点,但哺乳类动物的 *Apo-AI* 基因启动子区却没有这一结构。SP1 是组织广泛表达的转录因子,推测 SP1



**Fig. 5 Transcriptional activity of chicken *Apo-AI* promoter with g. -163 A > T SNP**

Two cell lines (HepG2 and DF1) were co-transfected with 7.5  $\mu$ g of the firefly luciferase plasmids (pGL3-*Apo-AI-T*, pGL3-*Apo-AI-A*) and 0.375  $\mu$ g of pRL-TK plasmids as internal control, at 80% confluence in 6-well plates. Cells were harvested after cotransfection for 48 hours and total RNA was extracted by using the PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen). The expression of firefly luciferase and renilla luciferase mRNA were detected by real-time RT-PCR and the renilla luciferase was used as an internal control. This figure depicts the relative firefly luciferase mRNA expression of the two different allele-promoter reporters in two different cell lines. Error bars represent the standard deviations of three replicates. Asterisks indicate the significant difference in the transcriptional activities between AA and TT genotypes of g. -163 A > T in two cell lines, \*  $P < 0.05$  (Student's t-test), \*\*  $P < 0.05$  (Student's t-test)

的结合能促使 *Apo-AI* 在鸡各组织以基础水平表达<sup>[1]</sup>。利用在线软件 Gene Regulation (<http://www.gene-regulation.com>) 分析发现,A 突变 T 可以使鸡 *Apo-AI* 基因启动子区 -20 ~ -10 的 SP1 结合位点消失。由此推测,该 SNP 位点可能通过影响 SP1 与鸡 *Apo-AI* 基因启动子区的结合,从而影响鸡组织的 *Apo-AI* 表达。

本室前期研究<sup>[27]</sup>发现,鸡 *Apo-AI* 基因启动子区 g. -163 A > T 与鸡腹脂重和腹脂率显著相关,且鸡 *Apo-AI* 蛋白在东北农业大学高、低脂鸡脂肪组织间差异表达<sup>[26]</sup>。本研究证实,鸡 *Apo-AI* 基因 g. -163 A > T 位点为功能性 SNP,它影响 *Apo-AI* 基因表达。基于这些数据推测,g. -163 A > T 是鸡脂肪性状差异的原因之一。

鸡肉是我国居民膳食中蛋白质的重要来源之

一,目前鸡脂肪尤其腹部脂肪的过度蓄积是肉鸡生产中亟待解决的问题,脂肪过度蓄积不仅严重影响肉鸡的健康和生产,还间接导致了人类肥胖症及相关疾病发病率的升高。g. -163 A > T 是一个功能性 SNP,且鸡腹脂重和腹脂率显著相关。因此,g. -163 A > T 有望作为优质鸡育种的功能性分子标记,加速育种进程;同时,本研究的结果也将为进一步研究鸡 *Apo-AI* 基因在鸡脂肪生长发育中的功能和调控研究奠定基础。

### 参考文献(References)

- [1] Lamon-Fava S, Sastry R, Ferrari S, et al. Evolutionary distinct mechanisms regulate apolipoprotein AI gene expression: differences between avian and mammalian apoA-I gene transcription control regions [J]. *J Lipid Res*, 1992, **33**(6): 831-842
- [2] Rothblat G H, Phillips M C. Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration [J]. *J Biol Chem*, 1982, **257**(9): 4775-4782
- [3] Zannis V I, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2006, **84**(4): 276-294
- [4] Silva R A, Huang R, Morris J, et al. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(34): 12176-12181
- [5] Rader D J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies [J]. *J Clin Invest*, 2006, **116**(12): 3090-3100
- [6] Castellani L W, Lusis A J. ApoA-II versus ApoA-I: two for one is not always a good deal [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**(12): 1870-1872
- [7] Williamson R, Lee D, Hagaman J, et al. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein AI [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(15): 7134-7138
- [8] Plump A S, Scott C J, Breslow J L. Human apolipoprotein AI gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(20): 9607-9611
- [9] Rubin E M, Krauss R M, Spangler E A, et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI [J]. *Nature*, 1991, **353**(6341): 265-267
- [10] Schaefer E J, Heaton W H, Wetzel M G, et al. Plasma apolipoprotein A-I absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease [J]. *Arteriosclerosis*, 1982, **2**(1): 16-26
- [11] Tangirala R K, Tsukamoto K, Chun S H, et al. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein AI in mice [J]. *Circulation*, 1999, **100**(17): 1816-1822
- [12] Pastore L, Belalcázar L M, Oka K, et al. Helper-dependent adenoviral vector-mediated long-term expression of human apolipoprotein AI reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *Gene*, 2004, **327**(2): 153-160
- [13] Morcillo S, Cardona F, Rojo Martínez G, et al. Association between MspI polymorphism of the APO AI gene and type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabet Med*, 2005, **22**(6): 782-788
- [14] Ordovas J M, Corella D, Cupples L A, et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOAI G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, **75**(1): 38-46
- [15] Phillips C M, Goumidi L, Bertrais S, et al. Gene-nutrient interactions and gender may modulate the association between ApoA1 and ApoB gene polymorphisms and metabolic syndrome risk [J]. *Atherosclerosis*, 2011, **214**(2): 408-414
- [16] Ramella N A, Rimoldi O J, Prieto E D, et al. Human apolipoprotein AI-derived amyloid: its association with atherosclerosis [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(7): e22532
- [17] Salomon R G, Subbanagounder G, Singh U, et al. Oxidation of low-density lipoproteins produces leuglandin-protein adducts [J]. *Chem Res Toxicol*, 1997, **10**(7): 750-759
- [18] Vollbach H, Heun R, Morris C M, et al. APOA1 polymorphism influences risk for early onset nonfamilial AD [J]. *Ann Neurol*, 2005, **58**(3): 436-441
- [19] Chen E S, Mazzotti D R, Furuya T K, et al. Apolipoprotein AI gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity [J]. *Clin Exp Med*, 2009, **9**(4): 319-325
- [20] Ma Y Q, Thomas G N, Ng M C, et al. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, **59**(4): 442-449
- [21] Chen E S, Furuya T K, Mazzotti D R, et al. APOA1/A5 variants and haplotypes as a risk factor for obesity and better lipid profiles in a Brazilian Elderly Cohort [J]. *Lipids*, 2010, **45**(6): 511-517
- [22] Smith J, Al-Amri M, Sniderman A, et al. Leptin and adiponectin in relation to body fat percentage, waist to hip ratio and the apoB/apoA1 ratio in Asian Indian and Caucasian men and women [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2006, **3**(1): 18
- [23] Whitehead C C, Griffin H D. Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broilers: effect of age and diet [J]. *Br Poult Sci*, 1982, **23**(4): 299-305
- [24] Hermier D, Chapman M J. Plasma lipoproteins and fattening: description of a model in the domestic chicken, *Gallus domesticus* [J]. *Reprod Nutr Dev*, 1985, **25**(1B): 235-241
- [25] Douaire M, Le Fur N, el Khadir-Mounier C, et al. Identifying genes involved in the variability of genetic fatness in the growing chicken [J]. *Poult Sci*, 1992, **71**(11): 1911-1920
- [26] Wang D, Wang N, Li N, et al. Identification of differentially expressed proteins in adipose tissue of divergently selected

- broilers[J]. *Poult Sci* ,2009 ,**88**( 11) : 2285-2292
- [27] 王启贵 李辉 李宁 等. *Apo-AI* 基因多态性与鸡生长和体组成性状的相关研究[J]. 畜牧兽医学报( Wang Q G ,Li H ,Li N ,*et al.* Polymorphisms of *Apo-AI* gene associated with growth and body composition traits in chicken [J]. *Acta Vet Zootechnol Sin*) ,2005 ,**36**( 8) : 751-754
- [28] Lewin B. *Gene VI* [M]. Oxford: Oxford University Press ,1997
- [29] 魏桂民 张金文 王蒂 等. 马铃薯 *Sgt1* 基因启动子的结构及功能分析[J]. 中国生物化学与分子生物学( Wei G M ,Zhang J W ,Wang D ,*et al.* Promoter analysis of potato *Sgt1* gene [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* ) ,2013 ,**29**( 10) : 969-977
- [30] Carey M , Smale S T. *Transcriptional regulation in eukaryotes* [M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 2000
- [31] Hashimoto S , Suzuki Y , Kasai Y , *et al.* 5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites [J]. *Nat Biotechnol* , 2004 , **22**( 9) : 1146-1149
- [32] Suzuki Y , Taira H , Tsunoda T , *et al.* Diverse transcriptional initiation revealed by fine , large-scale mapping of mRNA start sites [J]. *EMBO Rep* , 2001 , **2**( 5) : 388-393