



## 鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 单核苷酸多态性的功能性鉴定与分析

陈耀峰 谢可嘉 张长超 王宁 李辉\* 王守志\*

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

\*通讯作者, [shouzhiwang@neau.edu.cn](mailto:shouzhiwang@neau.edu.cn); [lihui@neau.edu.cn](mailto:lihui@neau.edu.cn)

**摘要** 载脂蛋白 B (apolipoprotein B, ApoB) 在极低密度脂蛋白 (very low density lipoproteins, VLDL) 组装、转运以及脂类代谢中都具有重要作用。本课题组前期研究发现鸡 (*Gallus gallus*) *ApoB* 基因 g.-112A>G 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与鸡腹脂重和腹脂率显著相关。生物信息学分析显示, 该 SNP 位于鸡 *ApoB* 基因的启动子区, 可能是功能性 SNP。为确定该 SNP 的功能性, 本研究开展了该位点不同基因型与血清生化指标的相关分析; 比较了 *ApoB* 基因 3 种基因型在鸡肝脏和小肠中的表达水平; 构建了含该 SNP 位点 A 和 G 等位基因的启动子报告基因载体, 并利用双荧光素酶报告系统分析候选转录因子 TATA-box binding protein (TBP) 和 CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) 对该 SNP 位点不同等位基因荧光素酶活性的影响。关联分析结果显示, 携带 GG 基因型的公鸡高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)/低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 显著高于 AA 型个体 ( $P < 0.05$ ); qRT-PCR 结果显示, 在鸡肝脏和小肠组织, AG 基因型的 *ApoB* 基因表达量显著低于 AA 和 GG 基因型 ( $P < 0.05$ ); 报告基因检测结果显示, A 等位基因荧光素酶活性显著高于 G 等位基因 ( $P < 0.05$ )。此外, 转录因子 TBP 和 C/EBP $\alpha$  对 A 等位基因荧光素酶活性的促进作用强于 G 等位基因 ( $P < 0.05$ )。上述结果提示, *ApoB* 基因 g.-112A>G 可能是功能性 SNP 位点, 可初步确定其为优质鸡育种的功能性分子标记。本研究为深入探讨 *ApoB* 基因在脂肪生长发育中的功能提供了实验数据。

**关键词** 鸡 (*Gallus gallus*), 载脂蛋白 B 基因 (*ApoB*), 启动子, 功能性 SNP

中图分类号 S831 文献标识码 A

## Functional Identification and Analysis of *ApoB* gene SNP g.-112A>G in Chickens (*Gallus gallus*)

CHEN Yao-Feng XIE Ke-Jia ZHANG Chang-Chao WANG Ning LI Hui\* WANG Shou-Zhi\*

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

\* Corresponding authors, [shouzhiwang@neau.edu.cn](mailto:shouzhiwang@neau.edu.cn); [lihui@neau.edu.cn](mailto:lihui@neau.edu.cn)

**Abstract** The apolipoprotein family plays an important role in the transport and metabolism of lipids and cholesterol in the body. The apolipoprotein B (*ApoB*) plays an important role in lipid metabolism. Previously it was found that the genotypes of chicken (*Gallus gallus*) *ApoB* g.-112A>G (single nucleotide polymorphism, SNP) were significantly associated with abdominal fat weight and abdominal fat percentage in chickens. To

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 31572394)、东农学者计划学术骨干项目 (No. 15XG13)、现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-41) 和国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2011AA100301)

收稿日期: 2018-03-14 接受日期: 2018-04-04

determine whether the *ApoB* gene g.-112A>G is a functional SNP, we conducted the following research work: Association analysis between different genotypes and plasma biochemical markers, body weight and abdominal fat traits; The mRNA expression levels of the 3 *ApoB* genotypes in the liver and small intestine of chickens were detected and compared; The luciferase reporter gene vector containing different alleles in the promoter region of chicken *ApoB* gene was constructed and transfected into chicken fibroblast cell (DF1) and human hepatoma (HepG2) cells respectively; The possible mechanism of action of the *ApoB* gene g.-112A>G was predicted and analyzed by on-line bioinformatics software. It was found that the A allele could change the TBP and C/EBP $\alpha$  transcription factor binding sites in the chicken *ApoB* gene promoter region. It could be assumed that the g.-112A>G could influence the promoter activity of *ApoB* gene, which in turn affected gene expression. To confirm this hypothesis, the effect of pCMV-TBP and pCMV-C/EBP $\alpha$  on the activity of the dual-luciferase reporter gene of different alleles was analyzed in DF1 and HepG2 cells. The major results as follows: (1) Association analysis showed that genotypes of g.-112A>G in *ApoB* gene were significantly associated with high-density lipoprotein (HDL) ( $P<0.01$ ), and significantly associated with HDL/low-density lipoprotein (LDL) and Body Weight (BW) ( $P<0.05$ ), and closely associated with Triglyceride (TG) ( $P=0.0549$ ), Total Cholesterol (TC) ( $P=0.0926$ ) and Abdominal Fat Weight (AFW) ( $P=0.0805$ ). Multiple comparisons showed that HDL, HDL / LDL, and BW were significantly higher in individuals with GG genotype than those with AG and AA genotypes ( $P<0.05$ ). (2) qRT-PCR results showed that the *ApoB* gene expression level of AG genotype was significantly lower than that of AA genotype and GG genotype in both chicken liver and small intestine ( $P<0.05$ ). (3) Bioinformatics predictions revealed that the A allele could change the TATA-box binding protein (TBP) and CCAAT / enhancer binding protein alpha (C / EBP $\alpha$ ) transcription factor binding sites in chicken *ApoB* gene promoter region. (4) The study successfully constructed reporter gene vectors containing different alleles of the chicken *ApoB* gene g.-112A>G, and reporter gene activity analysis indicated that there were significant differences in the reporter gene activity of the A and G alleles ( $P<0.05$ ), and the reporter gene activity of the A allele was significantly higher than the G allele. (5) TBP eukaryotic expression vector pCMV-TBP was successfully constructed. pCMV-TBP and pCMV-C/EBP $\alpha$  (kept in the lab) were co-transfected with reporter vectors of different alleles. The results showed that transcription factors TBP and C/EBP $\alpha$  promoted luciferase activity of the A allele more strongly than that of the G allele ( $P<0.05$ ). The above results suggested that *ApoB* gene g.-112A>G might be a functional SNP locus, and it could be preliminarily identified as a functional molecular marker for quality chicken breeding. The present study provides experimental data for further exploration of the function of *ApoB* gene in fat development.

**Keywords** Chicken, Apolipoprotein B gene (*ApoB*), Promoter, Functional SNP

快大型肉鸡(*Gallus gallus*)体脂(尤其是腹脂)蓄积过多的问题日益突出。畜禽体内沉积过多脂肪不仅会降低饲料转化率和分割肉的产量,还降低了畜禽的商品价格。利用遗传手段解决体脂沉积是有效途径之一。

载脂蛋白B (apolipoprotein B, ApoB)是血清脂蛋白的主要蛋白质组分,参与很多重要的生物过程,如脂质运输、酶活性调节和受体识别(Wang et al., 2003)。有研究表明,哺乳动物中小肠和肝脏是 ApoB 的主要表达场所,在甘油三酯组装与分泌中

具有重要作用(Glickman et al., 1986)。ApoB是极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)、中间密度脂蛋白(intermediated-density lipoprotein, IDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)的组成成分,作为LDL受体的配体,负责LDL在体内的清理,调节LDL与其受体的结合与代谢(Bava et al., 2001)。

目前,国内外有关*ApoB*基因的研究多见于人类(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*),在家禽上鲜有报道。鉴于*ApoB*基因的重要功能,本实验室前

期以东北农业大学肉鸡高、低脂系为研究材料,采用测序和 PCR-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)等方法检测了鸡 *ApoB* 基因的多态性,并进行了基因型与鸡生长和屠体性状的相关分析。发现鸡 *ApoB* 基因启动子区存在 1 个多态位点 g.-112A>G,该位点与鸡腹脂重和腹脂率显著相关 ( $P < 0.05$ ) (张森, 2006)。生物信息学分析显示 g.-112A>G 位于 *ApoB* 基因的核心启动子区,预示该位点可能为功能性 SNP。为此,本研究开展了该 SNP 位点的功能性鉴定和分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

pEasy-T1 simple vector 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 Trans1-T1 购自全式金公司(北京);鸡胚胎成纤维细胞系 DF1 购自生命科学研究院细胞资源中心(上海);人肝癌细胞系 HepG2 为本室保存;荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic vector 和对照载体 pRL-TK 购自 Promega 公司(美国)。鸡 (*Gallus gallus*) 基因组为本室保存的东北农业大学第 21 世代高脂系公鸡基因组 DNA。实验动物为东北农业大学第 21 世代高脂系群体随机挑选的 105 只公鸡。

限制性内切酶和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 Takara 公司(日本)、TransStart® *Taq* 和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自全式金公司(北京);DNA 纯化回收试剂盒和质粒小量制备试剂盒

购自 Axygen 公司(美国);FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 购自 Roche 公司(美国);Dual-Luciferase® Reporter Assay System 购自 Promega 公司(美国);Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司(美国);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养基和 Opti-MEM1 培养基购自 Gibco 公司(美国);胰酶、青霉素和链霉素购自 Sigma 公司(美国)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 引物、*ApoB* 启动子片段设计及合成

以 Primer Premier 5.0 软件进行引物序列设计,由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成(表 1)。参照鸡 *ApoB* 基因(GenBank No. NM\_001044633)序列,由全式金生物公司合成包含 g.-112A>G 位点的启动子片段 510 bp (合成序列插入 pUC57-Kan 载体,分别命名为:pUC-ApoB-AA 和 pUC-ApoB-GG),合成片段上下游分别添加 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点。

#### 1.2.2 鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 不同基因型的鉴定及测序

以东北农业大学第 21 世代高腹脂系和低腹脂系肉仔鸡基因组 DNA 为模板,利用引物 ApoB-FX-F 和 ApoB-FX-R,扩增包含 g.-112A>G 位点的 *ApoB* 基因启动子区序列(207 bp)。PCR 反应体系:上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 10×Transtar® *Taq* buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, Transtar® *Taq* DNA 聚合酶 1 μL, DNA 模板(50 μg/mL) 5 μL, 无

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in the study

登录号 GenBank No.	引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	用途 Application	扩增片段 大小/bp Amplicon size	<i>T<sub>m</sub></i> /°C
NC_006090	ApoB-FX-F	AACCCAACAACCTGGGATA	基因型鉴定	207	56
	ApoB-FX-R	TGACTTGGACCTTCATTTGTA	Genotype identification		
NM_205103.1	TBP-F	CTCGAGTCATGGATCAGAACAACAGCTT	构建 TBP 真核表达载体	923	60
	TBP-R	GCGGCCGCATGTAGAAACTGTTACGTTGTCT	Construction of TBP eukaryotic expression vector		
NM_001044633	ApoB-qRT-B5F	GACTTGGTTACACGCCTCA	检测 <i>ApoB</i> 表达水平	196	60
	ApoB-qRT-B5R	TAAGTGCCTGTTATGCTC	Detection the level of <i>ApoB</i>		
NM_205518.1	β-actinF	TAGAAGCATTGCGGTGG	gene expression	331	60
	β-actinR	GGCAGTACCGCAATGTGC	内参基因		
			Reference gene		



菌 ddH<sub>2</sub>O 33 μL。最佳反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,32 个循环;72 °C 终延伸 7 min,4 °C 保存。

对 PCR 扩增产物进行强制酶切鉴定分型,反应体系: *Bsp* 1407 I 1 μL, 10×T Buffer 2 μL, 0.1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 2 μL, PCR 产物 2 μL, 无菌 ddH<sub>2</sub>O 13 μL。37 °C 酶切 1 h 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

### 1.2.3 鸡 *ApoB* 基因启动子报告基因载体的构建

以限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 对 pUC-*ApoB*-AA 和 pUC-*ApoB*-GG 进行双酶切,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳纯化,获得 *ApoB*-AA 和 *ApoB*-GG 启动子片段(510 bp)。以限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 对 pGL3-basic vector 进行双酶切,纯化后分别与 *ApoB*-AA 和 *ApoB*-GG 启动子片段连接,获得不同等位基因的启动子报告基因载体,分别命名为 pGL3-AA 和 pGL3-GG。

### 1.2.4 构建转录因子 TBP 表达载体

提取鸡肝脏组织总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,PCR 扩增获得两端带有 *Xho* I 和 *Not* I 的 TATA-box binding protein (*TBP*) 基因 CDS 区片段。将该片段克隆到 T-simple 载体,生长菌落经 PCR 鉴定和质粒 *Xho* I /*Not* I 双酶切鉴定无误,送哈尔滨博仕生物公司测序。对于阳性重组质粒进行 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳纯化,获得 923 bp 的 *TBP* 基因 CDS 片段。采用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切 pCMV-HA,纯化后与 *TBP* 基因 CDS 片段连接,获得表达载体。将测序无误的真核表达载体命名为 pCMV-*TBP*。

### 1.2.5 细胞培养

DF1 和 HepG2 细胞培养于 DMEM 培养基,含 10% FBS、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素。培养箱设定条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和 90% 相对湿度。

### 1.2.6 双荧光素酶报告基因载体转染及活性分析

将细胞接种至 12 孔板,待汇合度达 80%~90% 取等位基因(A 或 G)的荧光素酶报告载体和对照载体(1 μg),分别与 pRL-TK 质粒(50 ng)转染细胞。初始为无血清的 Opti-MEM1 培养基,培养 6 h 后更换为正常培养基。转染 48 h 后收集细胞并裂解,按照双荧光素酶检测试剂盒说明书操作,利用化学单

管发光仪分别测定海肾荧光素酶(内参照)和萤火虫荧光素酶的活性。

### 1.2.7 血清采集和处理

记录 105 只东北农业大学第 21 世代高脂系公鸡的腹脂重(abdominal fat weight, AFW)和体重(body weight, BW),然后采集颈部血液,静置 1 h 后吸取上层血清;并迅速采集 48 只鸡(根据 g.-112A>G 不同基因型选择鸡只)的小肠和肝脏组织,液氮速冻并保存于 -80 °C,用于总 RNA 提取。上述血清存放于装有干冰的保温箱送至哈尔滨医科大学第四附属医院检验科,通过全自动生化分析仪对血清生化指标进行测定,包括总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和甘油三酯(triglyceride, TG)。

### 1.2.8 组织 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

以 Trizol 法提取肝脏和小肠组织 RNA,经 0.9%~1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,将 RNA 浓度调整为 200 μg/mL。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书进行 RNA 纯化和反转录。采用 qRT-PCR 检测 *ApoB* 和  $\beta$ -actin 的 mRNA 在不同基因型个体肝脏和小肠中的表达。PCR 反应体系:cDNA 模板(50 ng/μL) 1.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.2 μL, FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (2×) 5 μL,用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL。PCR 反应条件:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 60 s,共 40 个循环。采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国)进行 qRT-PCR 检测分析,以  $\beta$ -actin 作为内参基因,上、下游引物分别为 *ApoB*-qRT-B5F/*ApoB*-qRT-B5R 和  $\beta$ -actinF/ $\beta$ -actinR(表 1)。

### 1.2.9 数据分析

根据数据类型和群体特点,建立以下统计模型进行 *ApoB* 不同基因型与各性状间的关联分析:

$$Y = \mu + Sire + Dam(Sire) + G + e$$

其中  $Y$  是性状均值,  $\mu$  是总体均数, *Sire* 是父亲随机效应, *Dam(Sire)* 是嵌套在公鸡中的母鸡随机效应,  $G$  是基因型固定效应,  $e$  是残差。

运用 JMP7.0 软件分析实验数据,数据结果表示为  $\bar{X} \pm SE$ , 0.05 设置为显著水平, 0.01 设置为极显著水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ApoB* 基因多态性与血清生化指标、腹脂性状及体重之间的关联分析

针对 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位点不同基因型与血清生化指标、腹脂性状和体重之间的关联进行分析,结果如表 2 所示,鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位点与 HDL 极显著相关( $P<0.01$ ),与 HDL/LDL、BW 显著相关( $P<0.05$ ),与 TG ( $P=0.0549$ )、TC( $P=0.0926$ )、AFW( $P=0.0805$ )不相关。多重比较结果显示,GG 基因型个体的 HDL、HDL/LDL 和 BW 显著高于 AG 和 AA 基因型个体( $P<0.05$ )。

### 2.2 鸡 *ApoB* g.-112A>G 位点不同基因型体内差异表达检测

以  $\beta$ -actin 为内参、ApoB-qRT-B5F/ApoB-qRT-

B5R 为引物,检测 48 只 49 日龄鸡只的肝脏和小肠组织中 *ApoB* 基因 mRNA 水平,并比较 *ApoB* g.-112A>G 位点不同基因型的表达。结果表明,在小肠和肝脏组织中,*ApoB* 基因 GG 基因型个体的表达量高于 AA 基因型个体,但差异不显著;而 AG 基因型个体 *ApoB* 基因 mRNA 水平显著低于 GG、AA 基因型个体( $P<0.05$ ,图 1)。

### 2.3 鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 不同基因型的鉴定

利用引物 ApoB-FX-F/ApoB-FX-R 扩增东北农业大学第 21 世代高脂系肉鸡基因组 DNA,扩增产物经 *Bsp* 1407 I 强制酶切分型,发现 g.-112A>G 存在 3 种基因型(AA, GG, AG)(图 2)。

### 2.4 *ApoB* 基因启动子分析及生物信息学预测

鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位于基因启动子区,利

表 2 鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位点多态性与血清生化指标、腹脂性状及体重的关联分析

Table 2 Association analysis of *ApoB* g.-112A>G polymorphism with plasma biochemical indexes, abdominal fat trait and body weight

基因型 (个体数) Genotype (n)	性状 Trait					
	AFW/g	BW/g	TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL/(mmol·L <sup>-1</sup> )	TG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	HDL/LDL
AA (18)	100.04±5.76	1897.61±52.16 <sup>b</sup>	3.23±0.11	2.46±0.09 <sup>b</sup>	0.40±0.03	3.75±0.25 <sup>b</sup>
AG (51)	113.93±3.55	2032.72±31.91 <sup>a</sup>	3.38±0.07	2.63±0.05 <sup>a</sup>	0.31±0.01	3.93±0.15 <sup>b</sup>
GG (36)	114.14±4.25	2050.11±39.51 <sup>a</sup>	3.51±0.08	2.78±0.06 <sup>a</sup>	0.32±0.02	4.49±0.17 <sup>a</sup>
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.0805	0.0495 <sup>*</sup>	0.0926	0.0092 <sup>**</sup>	0.0549	0.0276 <sup>*</sup>

\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; 同一列的不同字母(a,b)表示统计学差异显著( $P<0.05$ ); AFW: 腹脂重; BW: 体重; TC: 总胆固醇; HDL: 高密度脂蛋白; TG: 甘油三酯; LDL: 低密度脂蛋白

\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; Different letters (a,b) in the same column indicate statistically significant differences ( $P<0.05$ ); AFW: Abdominal fat weight; BW: Body weight; TC: Total cholesterol; HDL: High-density lipoprotein; TG: Triglyceride; LDL: Low density lipoprotein

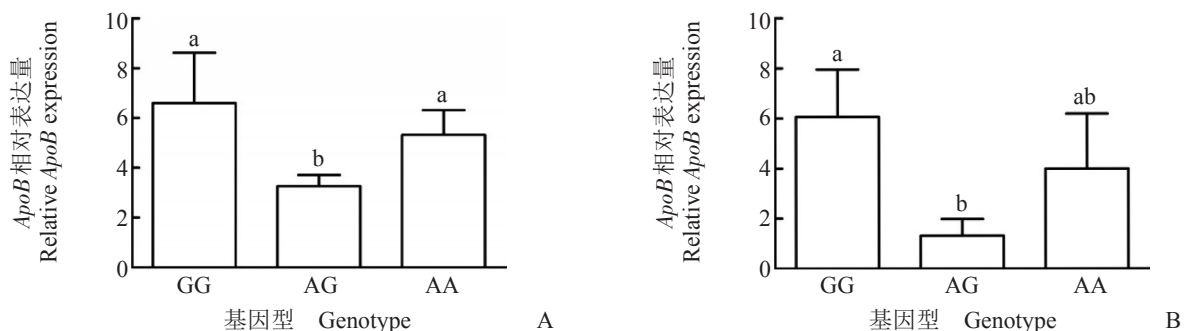


图 1 *ApoB* g.-112A>G 不同基因型在肝脏(A)和小肠(B)的表达分析

Figure 1 Relative expression levels of *ApoB* g.-112A>G genotypes in liver (A) and small intestine (B)

n(GG)=15, n(AG)=17, n(AA)=16; 不同字母表示统计学差异显著( $P<0.05$ ); 内参基因:  $\beta$ -actin; 下同  
 Different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ); Reference gene:  $\beta$ -actin; The same below

用 Mulan (<https://mulan.dcode.org/>)在线软件分析发现,A突变G可以使鸡*ApoB*基因启动子区的TBP结合位点消失; Motif search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>)在线软件分析发现,A突变G产生了1个C/EBP $\alpha$ 转录因子结合位点。

### 2.5 *ApoB* 不同等位基因的报告基因载体构建及活性检测分析

为明确鸡*ApoB*基因g.-112A>G位点是否为功能性SNP,本研究首先构建了该位点不同等位基因的报告基因载体:A等位基因的报告基因载体pGL3-AA和G等位基因的报告基因载体pGL3-GG,双酶切和测序验证载体构建正确(图3),可用于后续研究。将构建好的报告基因载体分别转染鸡DF1细胞和人HepG2细胞,转染48h后收集细胞检测荧光素酶活性。报告基因结果显示,在鸡DF1细胞和人HepG2细胞中,A等位基因的荧光素

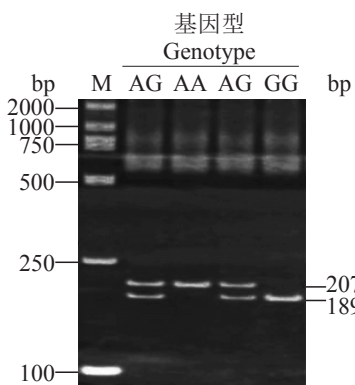


图2 鸡*ApoB*基因g.-112A>G不同基因型的酶切鉴定

Figure 2 Identification of *ApoB* g.-112A>G genotypes by restriction enzyme digestion in chickens

M: DL2000 marker; 下同

M: DL2000 marker; The same below

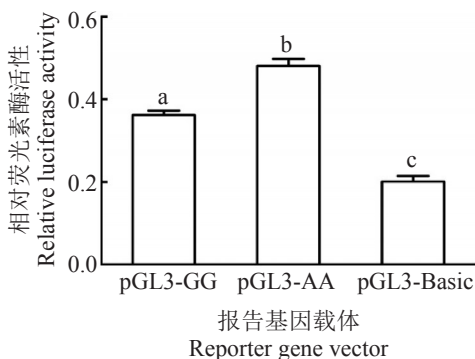


图4 *ApoB* g.-112A>G 不同等位基因在DF1细胞(A)和HepG2细胞(B)中的报告基因活性分析

Figure 4 Relative luciferase activities of *ApoB* g.-112A>G genotype reporters in DF1 cells (A) and HepG2 cells (B)

酶活性均显著高于G等位基因( $P < 0.05$ , 图4)。

### 2.6 转录因子TBP真核表达载体的构建

以鸡肝脏组织cDNA为模板,克隆构建鸡TBP基因真核表达载体pCMV-TBP, *Xho* I和*Not* I双酶切获得923 bp的目的条带(图5),测序验证序列正确。将pCMV-TBP、pCMV-C/EBP $\alpha$ (实验室前期构建)和pCMV-HA空载体分别转染鸡DF1细胞,48h后提取细胞总蛋白,利用HA标签抗体检测TBP和C/EBP $\alpha$ 融合蛋白表达,可见两条特异性蛋白条带(图6)。

### 2.7 转录因子TBP、C/EBP $\alpha$ 对*ApoB*不同等位基因表达的调控作用

生物信息学预测表明,*ApoB* g.-112A>G改变了转录因子TBP和C/EBP $\alpha$ 的结合位点。为研究这些候选转录因子对*ApoB* g.-112A>G不同等位基因表

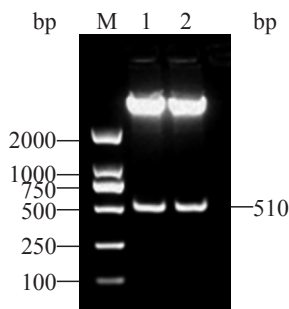
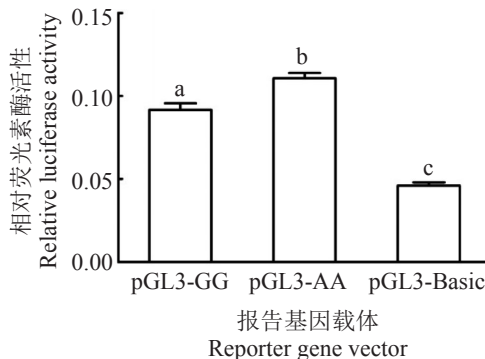


图3 不同等位基因的报告基因载体酶切鉴定

Figure 3 Identification of reporter gene vectors of different alleles by restriction enzyme digestion

1: *Kpn* I和*Xho* I双酶切质粒pGL3-AA; 2: *Kpn* I和*Xho* I双酶切质粒pGL3-GG

1: pGL3-AA plasmid digested by *Kpn* I and *Xho* I; 2: pGL3-GG plasmid digested by *Kpn* I and *Xho* I



达的调控作用,本实验将不同等位基因的报告基因质粒与海肾荧光素酶表达质粒、TBP 或 C/EBP $\alpha$  转录因子表达质粒共转染 DF1 和 HepG2 细胞系,48 h 后检测报告基因活性,分析转录因子对不同等位基因的报告基因活性的影响。

双荧光素酶报告基因活性分析结果显示,在 DF1 和 HepG2 细胞中,转录因子 TBP(图 7)和 C/EBP $\alpha$ (图 8)对报告基因活性的促进作用有所不同,二者对 A 等位基因的促进作用显著高于 G 等位基因( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

家禽体内脂肪组织的发育、脂肪沉积以及蛋黄

形成与血清中甘油三酯的水平密切相关。文献报道达到上市体重肉仔鸡的脂肪组织中,沉积的 80%~85% 脂肪酸来源于血液中甘油三酯,脂肪沉积速度受血液甘油三酯浓度的影响(Griffin, Whitehead, 1982)。VLDL 和 HDL 是由肝脏合成和分泌的两类主要脂蛋白颗粒。这些脂蛋白颗粒的特定蛋白质部分—载脂蛋白也在肝脏合成。在禽类中,VLDL 是甘油三酯的主要转运蛋白,可调控家禽的过度肥胖(Hermier, 1997)。血清 HDL 具有促进外周胆固醇向肝脏转运的能力,而 LDL 起到相反的作用(Greeve et al., 1993)。在人类研究中已证实血清中的甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白水平与肥胖显著相关(Lamb et al., 2011)。研究显示,*ApoB* 基因 *Xba* I 酶切位点的 X2 等位基

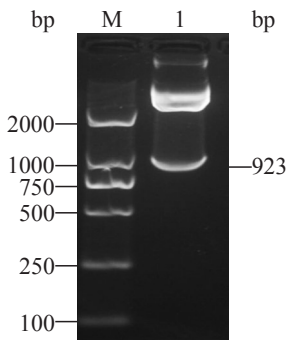


图5 pCMV-TBP 的双酶切鉴定

Figure 5 Identification of pCMV-TBP plasmids by restriction enzyme digestion

1: *Xho* I 和 *Not* I 双酶切质粒 pCMV-TBP

1: pCMV-TBP plasmid digested by *Xho* I and *Not* I

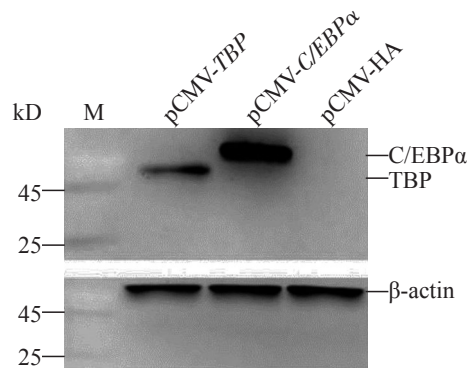


图6 转录因子 TBP 和 C/EBP $\alpha$  的 Western blot 检测

Figure 6 Western blot detection of transcription factor TBP and C/EBP $\alpha$

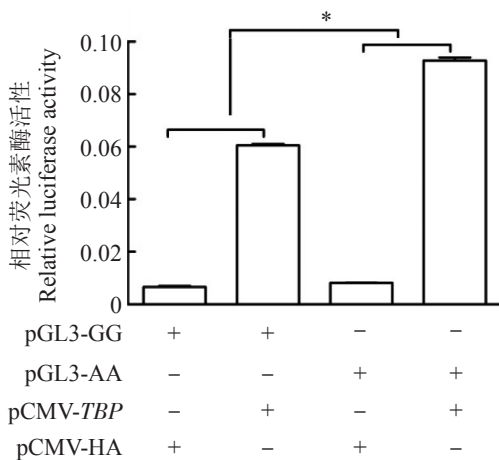
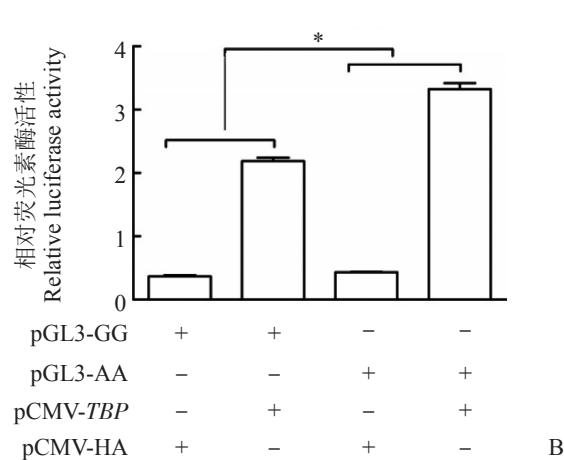


图7 TBP 在 DF1 细胞(A)和 HepG2 细胞(B)中对 *ApoB* g.-112A>G 不同等位基因活性的影响

Figure 7 The influence of TBP on expression of different alleles of *ApoB* g.-112A>G in DF1 cells (A) and HepG2 cells (B)

\*:  $P<0.05$ ; 下同

\*:  $P<0.05$ ; The same below





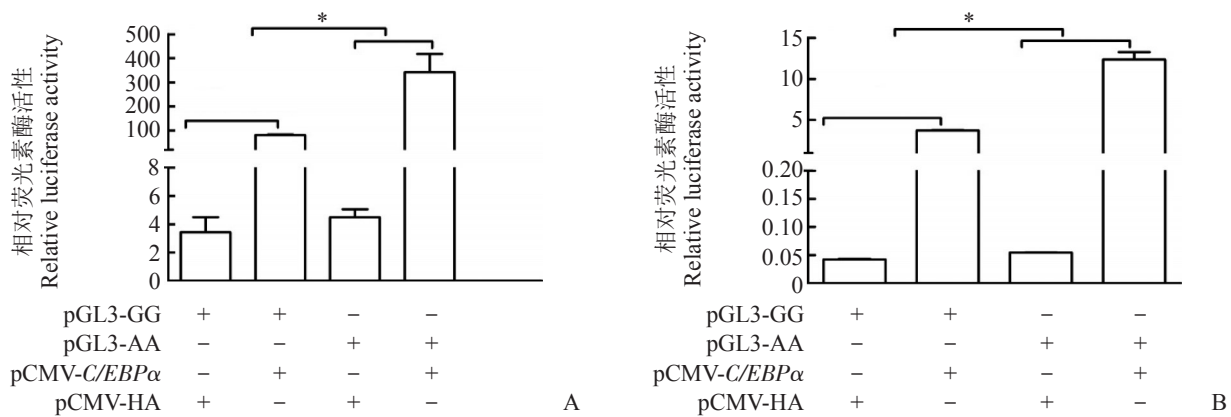


图8 C/EBP $\alpha$ 在DF1细胞(A)和HepG2细胞(B)中对ApoB g.-112A>G不同等位基因活性的影响

Figure 8 The influence of TBP on expression of different alleles of ApoB g.-112A>G in DF1 cells (A) and HepG2 cells (B)

因和EcoR I酶切位点的E1等位基因与脂质代谢紊乱有关:与具有X1等位基因者相比,具有X2等位基因的个体血清HDL水平较低,LDL和TC水平较高,LDL分解速度减慢;相关研究发现,携带E1等位基因的个体具有较高的TC、TG和LDL(张培珍,田野,2015)。Doo等在朝鲜人群中研究了ApoB rs1469513多态性位点对血脂的影响,发现携带有A等位基因和携带有G等位基因的个体在TC、LDL、BW和BMI(body mass index)上显著不同(Doo et al., 2015)。Niu等(2017)发现ApoB基因rs693多态性与TG、TC、LDL和HDL显著相关,rs17240441多态性与TC和LDL显著相关。本实验室前期研究指出,与低脂系肉鸡相比,高脂系肉鸡有较高的血清HDL水平和显著降低的血清LDL水平(Dong et al., 2015)。本研究开展了ApoB基因g.-112A>G位点与血清生化指标、腹脂性状及体重的关联分析,发现该位点多态性与HDL、HDL/LDL、BW显著相关,而与TG、TC和AFW未达到统计学显著差异,其原因可能是本研究中的样本含量较小所致。综上所述,本研究中ApoB基因g.-112A>G位点与鸡血清生化指标相关分析结果,与人类中的研究结果相似,表明该位点可能是影响鸡脂类代谢的重要分子标记。

启动子作为基因表达调控的上游顺式作用元件(魏桂民等,2013),在调控基因转录中具有十分重要的作用,可调节基因的表达丰度(胡慧艳等,2017)。动物核心启动子一般包含两类,即具有典型TATA框和不含典型TATA框但富含转录因子Sp1(specificity protein 1)结合位点的高GC区域(Saxonov et al., 2006)。核心启动子在转录起始以

及基因表达的调节中发挥作用,该区域中的核苷酸多态性可能影响基因活性。鸡ApoB基因g.-112A>G位于ApoB基因启动子区,因此推测该SNP位点可能影响了鸡ApoB基因表达。为此,本研究开展了g.-112A>G不同基因型体内差异表达检测和不同等位基因报告基因活性检测。该位点不同基因型体内差异表达检测结果表明,ApoB基因g.-112A>G位点不同基因型在肝脏和小肠组织中的表达存在差异,其中AG基因型个体ApoB基因的表达量显著低于GG和AA基因型的个体,而在GG和AA基因型个体间没有显著差异(图1)。不同等位基因报告基因活性检测研究显示,在鸡DF1细胞和人HepG2细胞中,A等位基因的荧光素酶活性均显著高于G等位基因。两者研究结果明显不同。究其原因有如下几点:1)qRT-PCR检测的是ApoB基因在鸡肝脏和小肠中的表达,而报告基因载体转染的是DF1细胞和HepG2细胞,ApoB基因的表达或者启动子活性具有物种或细胞特异性;2)报告基因载体在细胞中受到多种内源性转录因子的影响而导致差异出现;3)qRT-PCR检测的是基因mRNA水平,而报告基因活性检测反映的是蛋白质水平。

基因启动子区发生碱基突变可能影响该基因启动子的活性。Masotti等(2005)报道,人TCOF1(treacle ribosome biogenesis factor 1)基因启动子区的SNP突变,影响了YY1转录因子的结合效率,从而降低基因的启动子活性。本研究通过生物信息学软件对ApoB基因启动子区进行了预测,发现g.-112A>G位点位于转录因子TBP和C/EBP $\alpha$ 的结合序列中,预示该位点可能影响转录因子与靶基因结合,致使启动子活性改变。报告基因结果显示,转



录因子 TBP 和 C/EBP $\alpha$  对 *ApoB* 基因不同等位基因序列的启动子活性影响存在差异,与预测结果相吻合。此外,需要指出的是,转录因子 TBP 和 C/EBP $\alpha$  是否直接结合鸡 *ApoB* 基因启动子序列而发挥其作用,还需要 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 和 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 等实验的进一步验证。

#### 4 结论

鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位点与血清生化指标 (HDL 和 HDL/LDL) 和 BW 性状显著相关,同时 GG 基因型 *ApoB* 基因的表达量高于 AA 基因型,转录因子 TBP 和 C/EBP $\alpha$  对于 A 等位基因启动子活性的促进作用显著高于 G 等位基因。上述结果表明,鸡 *ApoB* 基因 g.-112A>G 位点可能是功能性 SNP 位点。本研究结果为进一步研究 *ApoB* 基因在脂肪生长发育中的功能提供了实验数据。

#### 参考文献

胡慧艳, 贾青, 侯胜奎, 等. 2017. 猪 *DKK1* 基因启动子区的克隆及其活性分析[J]. 畜牧兽医学报, 48(6): 1150-1157. (Hu H Y, Jia Q, Hou S K, et al. 2017. Cloning and activity analysis of the promoter region of swine *DKK1* gene[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 48(6): 1150-1157.)

魏桂民, 张金文, 王蒂, 等. 2013. 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, 29(10): 969-977. (Wei G M, Zhang J W, Wang D, et al. 2013. Promoter analysis of potato *Sgt1* gene[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 29(10): 969-977.)

张培珍, 田野. 2015. 载脂蛋白 B 基因多态性对运动调脂的影响[J]. 体育科学, 35(5): 38-47. (Zhang P Z, Tian Y. 2015. Influence of *apolipoprotein B* gene polymorphisms over effect of exercise on blood lipid[J]. China Sport Science, 35(5): 38-47.)

张森. 2006. 鸡 *ApoB* 基因与生长和体组成性状关系的遗传学研究[D]. 硕士学位论文, 东北农业大学, 导师: 李辉, pp. 46-47. (Zhang S. 2006. Chicken *ApoB* gene are genetically associated with growth & body composition traits[D]. Thesis for M. S., Northeast Agricultural University, Supervisor: Li H, pp. 46-47.)

Bava L, Rapetti L, Crovetto G M, et al. 2001. Effects of a non-forage diet on milk production, energy, and nitrogen me-

tabolism in dairy goats throughout lactation[J]. Journal of Dairy Science, 84(11): 2450-2459.

Dong J Q, Zhang H, Jiang X F, et al. 2015. Comparison of serum biochemical parameters between two broiler chicken lines divergently selected for abdominal fat content [J]. Journal of Animal Science, 93(7): 3278-3286.

Doo M, Won S, Kim Y, et al. 2015. Association between the *ApoB* rs1469513 polymorphism and obesity is modified by dietary fat intake in Koreans[J]. Nutrition, 31(5): 653-658.

Glickman R M, Rogers M, Glickman J N, et al. 1986. Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine *in vitro*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83(14): 5296-5300.

Greeve J, Altkemper I, Dieterich J H, et al. 1993. *Apolipoprotein B* mRNA editing in 12 different mammalian species: Hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins[J]. Journal of Lipid Research, 34(8): 1367-1383.

Griffin H D, Whitehead C C. 1982. Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broilers: Development and use of a simple assay for plasma very low density lipoproteins[J]. British Poultry Science, 23(4): 307-313.

Hermier D. 1997. Lipoprotein metabolism and fattening in poultry[J]. Journal of Nutrition, 127(5 Suppl): 805S.

Lamb M M, Ogden C L, Carroll M D, et al. 2011. Association of body fat percentage with lipid concentrations in children and adolescents: United States, 1999-2004[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 94(3): 877-883.

Masotti C, Armelin-Correa L M, Splendore A, et al. 2005. A functional SNP in the promoter region of *TCOF1* is associated with reduced gene expression and YY1 DNA-protein interaction[J]. Gene, 359(1): 44-52.

Niu C, Luo Z, Yu L, et al. 2017. Associations of the *ApoB* rs693 and rs17240441 polymorphisms with plasma ApoB and lipid levels: A meta-analysis[J]. Lipids in Health and Disease, 16(1): 166-186.

Saxonov S, Berg P, Brutlag D L, et al. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(5): 1412-1417.

Wang A B, Liu D P, Liang C C, et al. 2003. Regulation of human *apolipoprotein B* gene expression at multiple levels [J]. Experimental Cell Research, 290(1): 1-12.

(责任编辑 杨 芬)