

学校_____

参赛类别_____

第十一届“挑战杯”全国大学生课外学术科技作品竞赛
作品申报论文

鸡 FATP1 基因多态性与屠体性状的相关分析

**Correlation analysis between FATP1 gene
polymorphism and carcass traits in chicken**

张龙 兰茜 吕荣平

指导老师：朱 庆（教 授）

刘益平（教 授）

2009 年 4 月

鸡 FATP1 基因多态性与屠体性状的相关分析

张龙 兰茜 吕荣平

(四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

中文摘要: 研究 FATP1 基因多态性与优质肉鸡屠体性状的相关性, 为进一步加快育种进程提供参考依据。利用 PCR-SSCP 技术对 381 只大恒优质鸡的 FATP1 基因的部分外显子部分进行群体遗传学检测, 计算其基因频率和基因型频率, 并对多态性与屠体性状进行相关分析。结果发现在 FATP1 P3 和 P4 两个位点上分别存在 3 种多态以及 9 种单倍型组合。P3 位点的不同基因型对活重, 屠体重, 半净膛, 全净膛, 胸肌重和腿肌重有显著影响, P4 位点的不同基因型对腿肌重和腹脂率有显著影响。9 种单倍型组合 AAMM、AAMN、AGMM、AGMN、AANN、AGNN、GGMM、GGMN 和 GGNN 的频率分别为 0.538、0.052、0.265、0.029、0.045、0.037、0.024、0.005 和 0.005, 不同单倍型与腹脂重、胸肌重和胸肌率存在相关性。FATP1 基因不同基因型和单倍型组合与鸡的部分屠体性状和腹脂率存在相关性。

关键词: 鸡; FATP1 基因; 多态性; 单倍型; PCR-SSCP

Correlation analysis between FATP1 gene polymorphism and carcass traits in chicken

Long Zhang, Xi Lan, RongPing Lv

(College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University,
Ya'an 625014)

Abstract: The polymorphisms of FATP1 and their correlation to carcass traits in Chicken were investigated for purpose of providing molecular marker information to facilitate the breeding efficiency. PCR-SSCP was applied to analyze the polymorphisms of partial exons loci in FATP1 gene in 381 Chinese chickens from Dahan breeding company. Genotype frequencies, allelic frequencies, correlation analysis between the polymorphisms and carcass traits were estimated. The result showed that three genotypes and nine haplotypes combinations were found at the two loci. The genotypes of P3 loci had significant effect on live weight, carcass weight, semi-eviscerated weight, eviscerated weight, breast weight and leg muscle weight. Different genotypes had remarkable influence on leg muscle weight and abdominal fat percent in the P4 location. In addition, the frequencies of nine haplotypes combinations were 0.538、0.052、0.265、0.029、0.045、0.037、0.024、0.005 and 0.005, and different haplotypes combinations affect the breast muscle weight, breast muscle percent and abdominal fat percent. The correlation was detected between different genotypes and haplotypes combinations and partial carcass traits and abdominal fat percent at these two loci.

Keywords: Chicken; FATP1 gene; Polymorphism; Haplotype; PCR-SSCP

目 录

1 文献综述	1
1.1 鸡肉质性状研究现状.....	1
1.2 鸡脂肪的沉积	1
1.3 脂肪酸转运蛋白家族及功能.....	2
1.4 本研究的目的意义	3
2 材料和方法.....	3
2.1 试验材料与设备	3
2.1.1 试验群来源及采样.....	3
2.1.2 试验所需试剂药品及来源.....	4
2.1.3 主要仪器与设备.....	5
2.1.4 主要生物学软件.....	6
2.2 试验方法	6
2.2.1 基因组提取和检测.....	6
2.2.2 屠体性状数据测定.....	8
2.2.3 <i>FATP1</i> 基因引物设计.....	8
2.2.4 PCR 扩增	9
2.2.5 PCR 产物的检测	9
2.2.6 数据统计分析.....	10
3 结果与分析.....	10
3.1 PCR-SSCP 分析结果.....	10
3.2 基因频率和基因型频率与单倍型频率.....	11
3.3 <i>FATP1</i> 基因位点基因型与屠宰性状的关系.....	14
3.4 <i>FATP1</i> 基因单倍型组合与屠宰性状的关系.....	15
4 讨论	16
4.1 <i>FATP1</i> 基因单碱基突变的研究.....	16
4.2 <i>FATP1</i> 基因单位点多态性与屠体性状的相关性.....	17
4.3 <i>FATP1</i> 基因单倍型与屠体性状的相关性.....	18
5 结论	19
参考文献	19
致谢	22

1. 文献综述

1.1 鸡肉质性状研究现状

自 1989 年以来，我国的家禽育种工作者就致力于发展优质肉鸡生产，利用我国地方优秀鸡种进行纯繁或者杂交育种，培育出口味，风味优良的品种。我国许多地方品种中蕴藏着丰富的有益基因，其中一些与繁殖性能、肉品品质等相关的基因是目前最受国际关注的研究热点。

传统的家禽选育主要集中在生长速度和体组织中的肌肉含量这两方面，然而随着快速生长过程中骨骼肌异常，肉质变得粗老，风味变差，腹脂沉积增多等诸多问题的出现以及消费者对肉的品质和风味要求的不断提高^[27]，肉质越来越受到人们的重视。肉质性状往往是由多基因控制的，并且是早期难以活体度量的，传统的育种方法无法对这些重要的基因座进行度量，这就极大地限制了育种进程。同时由于性状间往往存在复杂的相关性，在对某一性状进行选择时，不可避免的引起另一性状的变化。目前鸡的生长速度虽然有了很大的提高，但其肌肉的品质却大大下降，如鸡体内脂肪的过多沉积，尤其是腹部脂肪的沉积。脂肪过多沉积带来很多不利：在肉产品加工中降低了分割肉的产量；这些沉积的脂肪在进行产品加工时被丢弃，不但会带来污染，也造成了很大的浪费；同时也明显地降低了饲料利用率。

因此，我们将与肉质性状密切相关的基因FATP1作为影响家禽屠体性状的候选基因加以研究。将传统和现代分子遗传学方法结合起来运用于畜禽育种实践必将极大地提高选择效率及进一步提高家禽生产性能。

1.2 鸡脂肪的沉积

脂肪是机体的主要组成成分，不仅对维持动物机体的生理功能具有重要意义，而且其沉积量和沉积部位也成为了影响胴体组成和肉品品质的关键因素。脂肪组织在不同部位的沉积量主要取决于两个因素：一是脂肪细胞的数量；另一个是脂肪细胞的体积^[10]。鸡不同部位脂肪组织的沉积量主要依赖于脂肪细胞体积的增大——即细胞聚脂的增加。研究表明，禽类脂肪组织合成甘油三酯所需的脂肪酸主要来自肝脏的合成和肠道的吸收。血液中的脂肪酸以乳糜微粒或极低密度脂蛋白形式运输，经脂蛋白脂酶分解为游离脂肪酸后通过跨膜转运机制进入细胞内，合成甘油三酯。

1.3 脂肪酸转运蛋白家族及功能

脂肪酸转运蛋白(FATPs)是由 646 个氨基酸组成的跨膜蛋白家族，是一种膜结合蛋白，由 6 个不同的成员组成，在不同的脂肪酸代谢组织中分别具有各自的表达特点。FATP1 则是其中的主要成员之一，主要在脂肪组织和骨骼肌表达，在心脏也有少量表达^[5,9]。FATP2 主要在肝脏和肾脏皮质表达；FATP3 的 mRNA 和蛋白广泛存在于各种组织，其中肺组织的表达水平相对较高。FATP4 是该家族中唯一一个在小肠上皮细胞刷状缘面表达的成员；FATP5 只在肝脏组织表达；FATP6 主要在心脏组织表达。目前，人(NM_198580)、牛(NM_001033625)、和猪(NM_00108393)等的 FATP1cDNA 序列已公布，禽 FATP1 也被宋予震^[10,32]等克隆出来，其开放阅读框为 1941bp，编码 646 个氨基酸。研究还发现 FATPs 在脂肪酸代谢调控过程中也具有重要作用。FATPs 主要参与脂肪酸的跨膜转运，且在脂肪酸代谢调控过程中也具有重要作用。Meirhaeghe 等^[11]报道，人 FATP1 基因内含子多态性对细胞内甘油三酯浓度有显著影响。同时，FATP1 能

引导外源性脂肪酸进入细胞，对细胞内甘油三酯的合成有重要的作用。Lobo 等^[12]也报道，小鼠的 FATP1 被敲除后，脂肪细胞中甘油三酯的含量显著降低。Meirhaeghe 等^[8]通过对 1144 个法国人 FATP1 基因的研究，发现了位于内含子 8 和 9 的 3 个单核苷酸多态性。这个研究结果首次揭示了 FATP 基因多态性和人类脂质内环境变更间的直接联系。Gertow 等^[13]通过对 856 个瑞典人进行研究，也分析了内含子 8 中相同的 A/G 多态现象。与 Meirhaeghe 以前的研究结果相比较，Gertow^[14]在研究中发现禁食后血浆中 TG 含量与 FATP1 多态间不存在显著的相关性。尽管目前有关人和鼠 FATP1 的结构和功能已有资料报道，但对鸡 FATP1 的研究报道却很少。到目前为止，禽 FATP1 基因多态性的研究也尚未见报道。

1.4 本研究的目的意义

本实验所用 S01、S02、S03、S05、S06 和 D99，6 个品系的优质鸡是四川大恒家禽育种有限公司利用不同的地方品种经过精心选育而成的。这 6 个品系的鸡具有明显不同的生产性能，且肉质鲜美，风味独特。采用 PCR-SSCP 技术检测 FATP1 基因部分外显子区序列的单核苷酸多态性，建立合适的统计模型，分析不同基因型与脂肪和肉质性状的相关性，进而探讨 FATP1 基因能否作为分子标记对鸡的脂肪沉积与肉质性状进行标记辅助选择。

2 材料和方法

2.1 试验材料与设备

2.1.1 试验群来源及采样

本试验采用 6 个品系共 381 只鸡作为试验材料，包括 S01（67 只），S02（60 只），S03（56 只），S05（69 只），S06（65 只）和 D99（64 只）六个纯系，均采自四川省畜牧科学研究院家禽所、四川大恒家禽育种有限公司。S01 系：青脚白皮，体型高大，公鸡红羽或红麻羽，母鸡羽毛麻色。生长快，产蛋量高，抗病力强，肌苷酸和肌肉脂含量高，肌纤维密度高，肉质鲜嫩风味佳；S02 系：黑脚乌皮，体型较大，公鸡红黑羽，母鸡深麻色羽，体型外貌整齐。生长速度较快，产蛋量较高，肌纤维密度高，肉质鲜嫩；S03 系：黄脚白皮，体型大呈方形，公鸡红羽，母鸡黄麻羽。生长速度快，产蛋量较高，抗病力强；S05 系：青脚白皮，体型较大，公鸡羽毛棕红色，母鸡麻羽。生长速度较快，产蛋量较高，肌纤维密度高，鸡肉低脂细嫩；D99 系：青脚白皮，体型较大，公鸡黄羽，母鸡黄麻羽，羽毛紧凑，体型外貌整齐。生长速度较快，产蛋量高，抗逆性强。饲养全阶段由专人管理，单笼饲养，管理和营养水平一致，自由采食，各品系的生长速度不同，以 70 日龄采集样品。翅下静脉采集血样，血样中加入 EDTA 抗凝于-20℃保存。屠宰后，测定屠宰性能，用于生长性状相关基因研究。

2.1.2 试验所需试剂药品及来源

三羟甲基氨基甲烷（Tris）：上海生物工程有限公司

硼酸（Boric Acid）：上海生物工程有限公司

十二烷基硫酸钠（SDS）：上海生物；工程技术有限公司

蛋白酶 K（Proteinase K）：大连宝生物（Takara）有限公司

Tris-饱和酚：北京天为时代生物技术有限公司

琼脂糖 (Agarose): 北京天为时代生物技术有限公司

Taq Master-Mix 扩增酶: 北京天为时代生物技术有限公司

丙烯酰胺 (Acrylamide): 大连宝生物 (Takara) 技术有限公司

甲叉双丙烯酰胺 (Bis-Acrylamide): 大连宝生物 (Takara) 技术有限公司

硅氧烷化剂: 上海生物工程技术有限公司

N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED): 瑞士 Sigma Chemicals Co. 分装

DNA Marker (DL2000): 大连宝生物 (Takara) 技术有限公司

其它常规试剂购自四川农业大学物资供应科

2.1.3 主要仪器与设备

超纯水仪: Water Pro PS, LABCONCO; Milli-Q, Millipore, Inc.

超低温冰箱: -80℃, HARRIS, Inc.

低温冰箱: -20℃, SANYO, Inc.

低速离心机: Minispin, Eppendorf, Inc.

高速冷冻离心机: Centrifuge 5415R, Eppendorf, Inc;

Centrifuge 5804R, Eppendorf, Inc.

PCR 扩增仪: PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc; PCR Express, Thermo Hybaid, Inc.

自动灭菌锅: Autoclave SS-325, Tomy, Inc.

凝胶成像系统: BTS-20.M, UVItec, Inc.

电泳变压稳压器: Model 1000/500 Power Supply, BIO-RAD, Inc;

DYY-2C 型，北京六一仪器厂；Power PAC 3000，
BIO-RAD， Inc.

垂直电泳槽：Protean™ 型，BIO-RAD， Inc；

Squi-Gen™ Sequencing Cell， BIO-RAD， Inc.

水平电泳槽：DYY-III 型水平电泳槽，北京六一仪器厂。

循环水控制系统：Model E4860 Refrigerated Recirculator，
BIO-RAD， Inc.

自动双重蒸馏水器：上海玻璃仪器一厂。

电子天平：0.0001g，BP211D；0.01g，BL610，Sartorius， Inc.

多功能暗箱式紫外透射仪：ZF-90 型，上海顾村电光仪器厂。

鼓风干燥箱：101A 型数显鼓风干燥箱，上海实验仪器总厂。

普通家用微波炉：光波型，青岛海尔公司。

漩涡混合仪：G-560E Vortex-2， Scientific Industries， Inc.

恒温培养箱：General Purpose Incubators， Sheldon Manufacturing，
Inc.

PH 仪；德国 PH-STAR 肉质测定仪。

2.1.4 主要生物学软件

Primer Primer 5.0， Oligo 6.0， DNASTar， DNAMAN， Cluster Chromas，
BIOEDIT

2.2 试验方法

2.2.1 基因组提取和检测

(1) 血细胞 DNA 的提取

- ①冷冻血液在室温融化以后，取 10ul 移至离心管中，加入 500ul STE 缓冲液，10ul SDS, 加入 10ul 蛋白酶 K（浓度为 10ug/ul），混合，上下充分摇动，37℃ 摇床水浴 2 小时，然后 55℃ 水浴过夜。
- ②将溶液冷却至室温，加入等体积苯酚，轻摇离心管 20 分钟，直至两相混合形成乳浊液，4℃，12000r/min 离心 10 分钟。
- ③取上清，再加入等体积苯酚，轻摇离心管 10 分钟，4℃，12000r/min 离心 10 分钟。
- ④取上清，加入等体积酚：氯仿：异戊醇混合液（24：23：1），缓慢颠倒离心管 10 分钟，4℃，12000r/min 离心 10 分钟。
- ⑤取上清，加入等体积氯仿，缓慢颠倒离心管 10 分钟，4℃，12000r/min 离心 10 分钟。
- ⑥取上清，加入 2 倍体积的预冷 -20℃ 冰乙醇沉淀 DNA，缓慢的转动离心管，可见白色 DNA 沉淀。
- ⑦ 4℃，12000r/min 离心 10 分钟，去上清，然后加 4℃ 预冷的 70% 乙醇快速冲洗两次，12000r/min 离心 10 分钟，去上清。
- ⑧将 DNA 干燥（注意不能太干燥），加适量 TE 溶解，冷冻保存。
注意在抽吸上清液时，尽量小心勿将中间的蛋白质层抽出。

(2) DNA 浓度和纯度的检测

- ①取 2-10ul 待测 DNA 溶液置入一新的微量离心管中，用蒸馏水稀释 100-500 倍
- ②在紫外分光光度计 260nm，测定 OD 值
- ③同上仪器，在 280nm 测定 OD 值

DNA 浓度 (ug/ml) =OD value × 50 × dilution time;

DNA 纯度=OD₂₆₀ value/ OD₂₈₀ value。DNA 和 RAN 的纯品 OD260 / OD280 比值分别为 1.8 和 2.0，如果污染了蛋白质或苯酚，其值明显低于纯品比值。

④取 DNA 样 5ul 加入 1ul 6x Loading Buffer，混匀。

⑤用 1%琼脂糖凝胶（预加入溴乙锭）电泳，电泳缓冲液 1xTBE，20 分钟。

⑥观察电泳条带，无明显拖尾，条带集中明亮则符合实验要求。

2.2.2 屠宰性状数据测定

大恒家禽育种有限公司的试验群体在相同环境条件下饲养，达适宜体重时（2kg）进行屠宰。屠宰按照国家家禽育种委员会制订的《家禽生产指标名称和计算方法》进行，同时记录屠宰性状，屠宰性状包括：活重、屠体重、全净膛重、半净膛重、胸肌重、腿肌重和腹脂重。

2.2.3 *FATP1* 基因引物设计

根据 NCBI 已发表的鸡 *FATP1* 基因 DNA 序列（GenBank 登陆号：NW_001488613）与鸡的全基因组序列相比对，采用 Primer Primer 5.0 和 Oligo 6.0 引物设计软件，对 *FATP1* 基因部分外显子设计引物，由上海英俊生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物核苷酸序列
Table 1 The sequence of primer

引物名称 Primer name	序列 Primer sequence(5-3)	产物大小 Length of fragment(bp)	退火温度 Annealing temperature(℃)
P1	F:CGGAACAAAGCCTAAAAG	331	55
	R:GCGGAAGGCAGTTGTAGAG		
P2	F:CGGTGCTGTTACGAGTGAAG	261	55
	R:ACCAGAGGCCGACGAACT		
P3	F:CGCTGCCTTTGGGTACTA	148	56

R: TTGGCTTGGGGTCGT			
P4	F: CGGCTTCAACAGTCGGATCT	204	55
	R: CCACAAACCCCTTAAACCTA		

2.2.4 PCR 扩增

PCR反应体系为10 μ l，其中包括：灭菌去离子水3.6 μ l，100 ng/ μ l的DNA模板0.8 μ L，2 $\times$ Master mix（包含了dNTP，Mgcl₂，10 $\times$ buffer）5 μ l，10pmol/ μ l的上下游引物各0.3 μ l。反应程序为：94℃ 预变性5min，35个循环(94℃ 变性30s，退火温度见表(1)45s，72℃ 延伸40s)，72℃后延伸8 min。反应完成后用1%琼脂糖凝胶(含EB) 电泳抽检扩增产物是否在所需的长度范围，以及是否有扩增产物。

2.2.5 PCR 产物的检测

(1)聚丙烯酰胺凝胶制备及上样

- ①清洗玻板、胶条，烘干，用 0.5%琼脂糖封闭玻璃板和胶条间的缝隙
- ②在 100 毫升小烧杯内加入相应 30%丙烯酰胺，10 $\times$ TBE 3ml，10%过硫酸胺 180ul，TEMED10ul，加 ddH₂O 至 30ml，混匀后迅速灌胶。
- ③当胶灌至离玻璃板上沿 1 厘米时停止灌胶，插入梳子，室温聚合，多余的丙烯酰胺 4℃保存，随时观察凝胶聚合情况并补加聚丙烯酰胺。
- ④胶聚合后，向电泳槽加入 1 $\times$ TBE，用注射器冲洗点样孔预电泳 10min。
- ⑤ 取 2 μ L PCR 产物和 1 μ L 的 Loading buffer （98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯青、10mmol/L EDTA (pH 8.0)、10%甘油）混匀，99.9℃变性 10 min，然后冰浴 5 min，使之保持变性状态，点样。
- ⑥ 120 V 电泳 10~13h

注：聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12%（Acr:Bis=29:1）

(2) 聚丙烯酰胺凝胶银染

- ①电泳结束后关闭电泳仪，放出电泳液，取出凝胶置于 10%的乙醇溶液中固定 10~15 分钟→去离子水洗胶 3 次→1%的硝酸氧化 3 分钟→去离子水洗胶 2~3 次→0.1%AgNO₃ 染色液染色 30 分钟→去离子水漂洗凝胶 3 次。
- ②用显色液进行显影，当凝胶上显出清晰的 DNA 条带时，适时倒掉显色液，加入 4 %的冰醋酸溶液，中止显色反应。用去离子水漂洗凝胶 2~3 次。
- ③用凝胶成像系统仪观察电泳结果并拍照。

2.2.6 数据统计分析

根据固定效应模型，调用 SAS 8.0 软件包 GLM 过程分析基因型效应对性状测定值的影响, 分别采用 LSMEAN 进行最小二乘分析，MEANS 进行 Duncan 多重比较。统计分析模型为：

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + L_j + S_k + (GL)_{ij} + E_{ijk}$$

其中：Y_{ijk}=性状测定值，μ=群体均值，G_i=基因型效应，L_j=鸡群效应，S_k=性别效应（k=1, 2），(GL)_{ij}=基因型与鸡群的交互效应，E_{ij}=随机残差效应^[28]。

3 结果与分析

3.1 PCR-SSCP 分析结果

用所设计的引物以基因组 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增获得了较好的结果，片段长度与预期大小一致，且没有非特异性条带，可以进行 SSCP 分析。将 4 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析，结果在 P3 和 P4 引物扩增的片段中发现了多态。对各样本的测序结果用 DNASTAR 与

GenBank 序列 NW_001471503 和鸡基因组序列 NW_001471503 比对分析发现，P3 位点的 PCR 扩增片段包含 FATP1 第 5 外显子和部分第 5 内含子，在 48195 处存在一个 G→A 的点突变，位于内含子区域（图 1A）。P4 位点的 PCR 扩增片段长度为 204bp，包含 FATP1 第 8 外显子，在 46555 处发现有 A→G 点突变（图 1B），位于外显子区域。这两个突变位点都是沉默突变，未引起氨基酸序列的改变。图左侧序列图中的基因序列同 NW_001488613 和鸡基因组序列 NW_001471503 一致，而右侧图中存在一个 G→A 和 A→G 的突变。

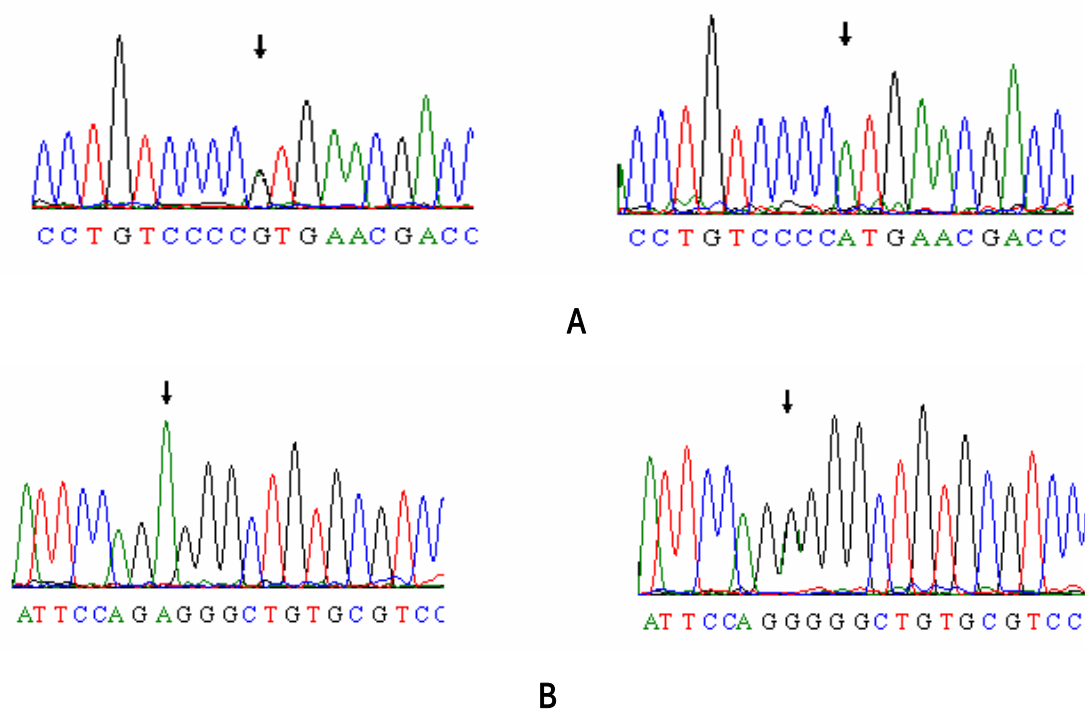


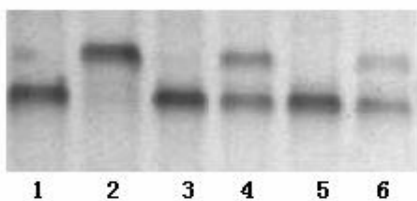
图 1 FATP1 扩增片段基因测序结果
A: P3 扩增片段测序结果；B: P4 扩增片段测序结果

3.2 基因频率和基因型频率与单倍型频率

SSCP 分析结果显示（图 2），鸡 FATP1 基因 SNP3 位点含 2 个等位基因（A 和 G），3 种基因型（AA、GG 和 AG 型）。由表 2 可知，对该位点而

言, A 等位基因的频率在 S01、S02、S03、S05 和 S06 群体中显著高于 G 等位基因的频率, AA 型的基因型频率高于 AG 和 GG 型的基因型频率。而 D99 群体中 AG 型的基因频率高于 AA 型的基因型频率, 且 A 等位基因与 G 等位基因的频率相差也大, 分别为 0.703 和 0.297。经卡方检验, 该位点除 D99 和 S05 显著地偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$) 外, 其余的所有群体都处于 Hardy-Weinberg 平衡。由图 3 可知, FATP1 基因 SNP4 位点含有 2 个等位基因 (M 和 N), 3 种基因型 (MM、MN 和 NN 型)。其基因频率和基因型频率见表 2。由表可知, 在检测的 6 个不同品系的鸡群中, M 等位基因频率显著高于 N 等位基因频率, MM 基因型频率高于 MN 和 NN 型的基因型频率, 经卡方检验, 该位点除 S02 和 D99 处于 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$) 外, 其余所有群体显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$)。

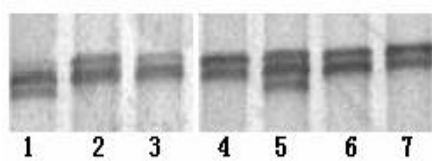
2 个多态位点单倍型分析结果见表 3, 共出现 9 种单倍型组合, 分别是 AAMM、AAMN、AGMM、AGMN、AANN、AGNN、GGMM、GGMN 和 GGNN, 它们的频率分别为 0.538、0.052、0.265、0.029、0.045、0.037、0.024、0.005 和 0.005, 最高单倍型组合 AAMM 的频率与最低单倍型组合 GGNN 和 GGMM 的频率相差 107 倍。分析可知, 这 8 种组合是由 A+M、A+N、G+M 和 G+N 这种单倍型组合组合而成的, 它们的频率分别为 0.704、0.096、0.166 和 0.034。单倍型 G+N 频率最低, 而单倍型 A+M 频率最高, 两者相差 21 倍。



1,3 和 5: AA 型; 2: GG 型; 4 和 6: AG 型

1, 3 and 5:AA genotype;2:GG genotype;

4 and 6: AG genotype



1: NN 型; 2, 3, 4, 6 和 7: MM; 5: MN 型

1: NN genotype; 2,3,4,6 and 7:MM genotype; 5: MN

genotype

图 2 FATP1 P3 扩增片段的 SSCP 分析

Fig 2 SSCP analysis of PCR amplification
Of FATP1 P3

图 3 FATP1 P4 扩增片段的 SSCP 分析

Fig3 SSCP analysis of PCR amplification
Of FATP1 P4

表 2 基因频率和基因型频率在不同鸡品系的分布

Table 2 The distribution of genotype and gene frequencies in different chicken breeds

位点 Locus	品系 Lines	检测个 数 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		适合性检验 Chi-square	
			AA	AG	GG	A	G	× 2 值	P
SNP3	S01	67	0.657(44)	0.313 (21)	0.029 (2)	0.813	0.187	0.071	0.789
	S02	60	0.767(46)	0.233 (14)	0.000 (0)	0.883	0.117	1.047	0.306
	S03	56	0.500(28)	0.446 (25)	0.054 (3)	0.723	0.277	0.742	0.389
	S05	69	0.855(59)	0.116 (8)	0.029 (2)	0.913	0.087	5.024	P<0.01
	S06	65	0.569(37)	0.338 (22)	0.092 (6)	0.738	0.262	0.995	0.318
	D99	64	0.422(27)	0.563 (36)	0.016 (1)	0.703	0.297	7.723	P<0.01
SNP4			MM	MN	NN	M	N	× 2 值	P
	S01	67	0.746(50)	0.119 (8)	0.134 (9)	0.806	0.194	25.608	P<0.01
	S02	60	0.983(59)	0.0167 (1)	0.000 (0)	0.992	0.008	0.004	0.948
	S03	56	0.839(47)	0.000 (0)	0.161 (9)	0.839	0.161	56.000	P<0.01
	S05	69	0.768(53)	0.174 (12)	0.058 (4)	0.856	0.144	6.140	P<0.01
	S06	65	0.877(57)	0.0615 (4)	0.062 (4)	0.908	0.092	26.026	P<0.01
	D99	64	0.906(58)	0.094 (6)	0.000 (0)	0.953	0.047	0.155	0.694

表 3 FATP1 基因单倍型组合频率

Table3 Frequencies of haplotypes combinations of FATP1			
单倍型组合	Haplotype combination	频率	Frequencies
	AAMM	0.538	(205)
	AAMN	0.052	(20)
	AGMM	0.265	(101)
	AGMN	0.029	(11)
	AANN	0.045	(17)
	AGNN	0.037	(14)
	GGMM	0.024	(9)
	GGMN	0.005	(2)
	GGNN	0.005	(2)

3.3 FATP1 基因位点基因型与屠宰性状的关系

对 FATP1 基因 SNP3 和 SNP4 位点基因型与屠宰性状进行最小二乘分析, 结果见表 4。可以看出, 在 SNP3 位点上, 三种基因型只对活重(LW)、屠体重(CW)、半净膛(SEW)、全净膛(EW)、胸肌重(BMW)和腿肌重(LMW)有显著影响 ($P<0.05$), 而对其它屠宰性状均无显著影响 ($P>0.05$)。对活重(LW)、屠体重(CW)、半净膛(SEW)、全净膛(EW)、胸肌重(BMW)和腿肌重(LMW)而言, GG 基因型均达到了最高值, 分别为 2220.48, 2008.53, 1890.91, 1594.35, 128.65 和 177.09。除在活重、屠体重、半净膛、全净膛、胸肌重和腿肌重中, GG 基因型与 AA 基因型和 AG 基因型有显著差异 ($P<0.05$)外, 其它性状中的 GG 基因型与 AG 和 AA 基因型均无显著差异 ($P>0.05$)。就 SNP4 位点而言, 三种基因型只对腿肌重(LMW)和腹脂率(AP)有显著影响 ($P<0.05$), 对其它屠宰性状均无显著影响 ($P>0.05$)。NN 基因型在活重(LW)、屠体重(CW)、半净膛(SEW)、全净膛(EW)、胸肌重(BMW)和腿肌重(LMW)中也达到了最高值, 分别为 2102.36, 1901.84, 1783.92, 1501.43, 117.03 和 171.05。

表 4 鸡 FATP1 基因 SNP3 和 SNP4 位点不同基因型对屠宰性状的影响

Table 4 Effect of different genotypes of FATP4 P3 and P4 site on slaughter traits

性状	基因型/SNP3 位点			基因型/SNP4 位点		
	AA	AG	GG	MM	MN	NN
活重/g	1958.98±75.54 ^B	1877.55±80.63 ^B	2220.48±144.15 ^A	1946.87±77.01	1970.50±107.74	2102.36±107.67
屠体重/g	1745.23±70.23 ^B	1680.25±74.56 ^B	2008.53±136.07 ^A	1737.31±72.51	1757.71±101.85	1901.84±99.10
半净膛/g	1635.38±68.39 ^B	1565.09±72.61 ^B	1890.91±132.50 ^A	1628.47±70.61	1635.31±99.19	1783.92±96.51
全净膛/g	1367.52±57.50 ^B	1315.45±61.06 ^B	1594.35±111.42 ^A	1364.71±59.38	1370.72±83.42	1501.43±81.16
胸肌重/g	111.29±4.99 ^B	104.80±5.30 ^B	128.65±9.68 ^A	109.14±5.17	112.09±7.26	117.03±7.06
腿肌重/g	151.04±7.67 ^B	144.28±8.15 ^B	177.09±14.87 ^A	149.59±7.92 ^{AB}	147.86±11.12 ^B	171.05±10.82 ^A
腹脂重/g	39.35±5.21	37.39±5.55	37.31±10.08	38.95±5.36	49.75±7.52	37.00±7.40
胸肌率/%	8.12±0.14	7.93±0.15	8.12±0.28	8.03±0.15	8.19±0.21	7.79±0.20
腿肌率/%	10.94±0.17	10.87±0.18	10.96±0.33	10.83±0.17	10.76±0.25	11.26±0.24
腹脂率/%	2.01±0.23	1.84±0.24	1.74±0.45	2.02±0.24 ^{AB}	2.49±0.33 ^A	1.71±0.32 ^B

注：同一行中不同的大写字母表示差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

Note: Values with different letter with the same row differ significantly; the capital letters show the level of 0.05.

3.4 FATP1 基因单倍型组合与屠宰性状的关系

经最小二乘分析，鸡 FATP1 基因不同单倍型组合与胸肌重、胸肌率和腹脂重存在显著差异 ($P<0.05$)，而与其它性状则无显著差异 ($P>0.05$)。由表 5 可知，在胸肌重上的高低排序为：GGMN>GGMM>AANN>AAMN>AAMM>AGMM>GGNN>AGNN>AGMN；在胸肌率上的高低排序为：GGMN>GGNN>AAMN>AAMM>AGMM>AANN>GGMM>AGNN>AGMN；在腹脂重上的高低为：GGMN>AAMN>AGMM>AAMM>AANN>GGNN>AGMN>AGNN。从上面的比较中，我们发现 GGMN 在胸肌重、胸肌率和腹脂重中都达到了最大值，分别为 169.40，9.41 和 92.10；相反，AGMN 单倍型在胸肌重和胸肌率中达到了最小值。

表 5 FATP1 基因单倍型组合的屠宰性状的最小二乘均值及标准误

Table 5 Least squares mean (LSM) and standard error (SE) for carcass traits of different FATP1 haplotype combinations

性状	单倍型组合								
	AAMM	AAMN	AGMM	AGMN	AANN	AGNN	GGMM	GGMN	GGNN
活重/g	2011.06	1978.00	1950.49	1826.36	2060.00	1909.29	2398.89	2395.00	1780.00
	±34.52	±110.25	±49.06	±148.67	±119.59	±131.78	±164.36	±348.65	±348.65
屠体重/g	1790.69	1762.50	1746.03	1629.54	1855.88	1716.07	2161.11	2275.00	1600.00
	±31.79	±101.03	±44.96	±136.23	±109.58	±120.76	±150.61	±451.83	±319.49
半净膛/g	1675.69	1628.75	1621.88	1518.18	1742.65	1596.43	2041.67	2125.00	1487.50
	±30.92	±98.28	±43.73	±132.52	±106.59	±117.46	±146.50	±439.50	±310.78
全净膛/g	1400.19	1365.00	1365.09	1261.36	1461.76	1342.86	1722.22	1800.00	1250.00
	±26.01	±82.66	±36.78	±111.46	±89.66	±98.80	±123.23	±369.68	±261.40
胸肌重/g	112.43	112.59	108.04	95.27	113.81	103.16	132.37	169.40	103.35
	±2.25 ^B	±7.17 ^B	±3.19 ^B	±9.67 ^B	±7.78 ^B	±8.57 ^B	±10.69 ^{AB}	±32.06 ^A	±22.67 ^B
腿肌重/g	155.45	150.13	151.80	139.23	172.11	144.64	199.69	182.50	133.15
	±3.46	±11.01	±4.89	±14.85	±11.94	±13.16	±16.41	±49.24	±34.82
腹脂重/g	46.25	61.21	47.02	34.10	39.93	33.86	41.86	92.10	34.65
	±2.32 ^{AB}	±7.38 ^{AB}	±3.33 ^{AB}	±9.95 ^B	±8.01 ^B	±9.15 ^B	±11.00 ^B	±33.01 ^A	±23.34 ^B
胸肌率/%	8.02	8.23	7.91	7.46	7.78	7.62	7.74	9.41	8.24
	±0.06 ^B	±0.20 ^{AB}	±0.09 ^B	±0.27 ^B	±0.22 ^B	±0.24 ^B	±0.30 ^B	±0.91 ^A	±0.65 ^{AB}
腿肌率/%	10.99	11.03	11.02	10.92	11.66	10.62	11.45	10.14	10.68
	±0.07	±0.24	±0.11	±0.33	±0.26	±0.29	±0.36	±1.08	±0.76
腹脂率/%	2.30	2.94	2.22	1.85	1.90	1.63	1.85	3.68	1.92
	±0.10	±0.33	±0.15	±0.44	±0.35	±0.39	±0.48	±1.46	±1.03

4 讨论

4.1 FATP1 基因单碱基突变的研究

目前研究发现，FATP1 的功能主要表现在 3 个方面：1) 胰岛素抵抗^[15]；2) 调节脂肪组织和肌肉中的脂肪酸摄取^[16]；3) 在非战栗性产热中发挥着作用。另外，在人上对 FATP1 基因与一些血脂障碍相关疾病已经有了较多的研究^[11,17]。Wu 等^[18]发现 FATP1 缺失的小鼠能完全抵抗饮食诱导的肥胖、胰岛素脱敏作用和其他一些代谢综合症。因此，FATP1 的缺失能改变脂肪组织和骨骼肌中脂肪酸的摄取和 TG 的代谢，Scaffer 等^[19]也报道说稳定转染 FATP1 的鼠 3T3-L1 脂肪前体细胞对 [¹⁴C] 油酸的转运速度是对照组的 4-5 倍。而且，Kim 等^[20]发现缺失了 FATP1 的小鼠饲喂高脂肪食物时，不仅会影响它的体脂肪含量还会影响葡萄糖，胰岛素，脂肪

酸和甘油三酯的浓度。然而，迄今为止，在畜禽中尚没有发现从分子水平上研究 FATP1 基因的变异与生产性状的关系，鉴于 FATP1 对脂肪酸有一定的作用，本文利用 PCR-SSCP 技术和 DNA 测序寻找鸡 FATP1 基因多态位点，来探讨 FATP1 可能存在的 SNP 是否与某些经济性状相关。

本研究得到的突变位点在鸡 FATP1 基因第 5 内含子和第 8 外显子内，这两个位点分别为 48195 位 G→A(SNP3)和 46555 位 A→G(SNP4)。然而，目前 NCBI 上已有一个鸡的变异位点被报道，它的 SNP ID 是 rs14729179，位于第 10 外显子内。大家发现的 SNP 位点不同的原因可能有一下两方面：1) 扫描的 FATP1 基因的区域不同；2) 实验动物的品种不同，不同品种具有不同的驯养背景。为此，我们认为本研究中得到的两个突变位点是新发现的变异位点。令我们感到有趣的是虽然这两个位点的突变没有造成鸡 FATP1 基因的氨基酸序列改变，但它们仍然对某些性状具有显著的影响作用，究其原因，我们认为可能这两个同义变异对蛋白质高级结构和蛋白质的功能还是产生了一定影响，其具体的作用机制还有待我们进一步的探讨和研究。

4.2 FATP1基因单位点多态性与屠体性状的相关性

制约数量性状的表型值的遗传机制通常认为有两种，一种是微效多基因的作用，另一种则是主基因和微效多基因的共同作用^[21-23]。本研究中，2个基因位点的基因和基因型频率在6个优质鸡品种中的分布表现出的趋势相同，均以AA型和MM型为优势基因型，A等位和M等位基因为优势等位基因，究其原因，可能是由于这几个品种的鸡都属于肉用鸡品种造成的。本研究还将这两个变异位点与鸡的屠体性状进行了相关分析，结

果发现G4499A对活重(LW)、屠体重(CW)、半净膛(SEW)、全净膛(EW)、胸肌重(BMW)和腿肌重(LMW)有显著影响($P<0.05$),而对其它屠宰性状均无显著影响($P>0.05$),而A6139G中三种基因型只对腿肌重(LMW)和腹脂率(AP)有显著影响($P<0.05$)。为此我们认为FATP1对于脂肪组织的沉积和肌肉的发育还是有一定的影响作用。对FATP1的两个位点进行单倍型组合研究中,单倍型A+M频率最高,这与单位点分析中的A、M基因为优势基因完全一致。本研究得到的这些结论是初步的,尽管FATP1对畜禽经济性状相关性的研究还尚未见报道,但我们可以得出FATP1基因与畜禽脂肪组织和肌肉生长发育还是相关的,因此,有必要对该基因作为与畜禽脂肪和肉质性状相关的候选基因进行更深入的研究。

4.3 FATP1 基因单倍型与屠体性状的相关性

目前,对于单个位点与性状的关联分析和单倍型与性状的关联分析可靠性孰高孰低的问题存在一些争议。传统分析遗传标记和性状的相关性或标记与性状的连锁不平衡时,通常都是采用单个位点的分析方法,而往往单个位点与性状的相关性分析常常会造成很多问题,掩饰了一些重要的信息^[24-25]。而单倍型或单倍型块分析则提供了一个切实可行的方法,从而解决了这些不利的因素。为此,研究者认为单倍型分析考虑了非等位基因之间的互作,以及 SNP 位点间的连锁不平衡,因此,单倍型分析更具有统计效力。但 Clark 等^[26]认为,如果 SNP 与表型性状之间的关联确实是由单个 SNP 位点所造成的,那么单倍型关联分析的方法可靠性更低。本试验关联分析结果显示,单个 SNP 位点与屠宰性状的关联分析结果包含了由两个 SNP 所构建的单倍型与屠宰性状之间的关联分析结

果，后一结果极可能是两个位点非等位基因之间的交互作用所造成的。因此，本文同样支持 Morris 和 Horne 等人的观点，认为在本试验的研究群体中单倍型与屠宰性状之间的关联分析结果更可靠。结果表明，单倍型 GGMN 对胸肌重、胸肌率和腹脂重起着重要的积极作用，而 AGMN 单倍型对胸肌重和胸肌率起着负面的作用。

5 结论

FATP1 是由 10 个外显子组成，本研究运用 PCR-SSCP 及序列测定技术发现在大恒优质鸡的 FATP1 基因存在两个多态位点（G48195A 和 A46555G），分别位于内含子 5 和外显子 8 内，虽然这两个突变位点都是沉默突变，未引起氨基酸序列的改变，但其多态与部分屠体性状和腹脂率相关。尽管 P3 位点位于内含子区域，但内含子序列可能在基因的转录中起一定的重要作用，因此，这一多态对屠体性状和腹脂率的影响需要进一步的研究。

本研究中，FATP1 基因的单倍型组合与鸡的胸肌重，胸肌率和腹脂率相关，这为肉质肉鸡培育过程中开展的肉质性状分子标记辅助育种奠定了一定基础。

参考文献

- [1] Kuniyasu A, Hayashi S, Nakayama H. Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 295: 319-323.
- [2] Mossab A, Lessire M, Guillaumin S, Kouba M, Mourot J, Peiniau P, Hermier D. Effect of dietary fats on hepatic lipid metabolism in the growing turkey. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2002, 132: 473-483.

- [3] Doege H, Stahl A. Protein-Mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology*, 2005, 21: 259-268.
- [4] Stahl A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch*, 2004, 447: 722-727.
- [5] Pohl J, Ring A, Hermann T, Stremmel W. Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1686: 1-6.
- [6] Milger K, Herrmann T, Becker C. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci*, 2006, 119: 4678-4688.
- [7] Gimeno RE. Fatty acid transport proteins. *Current Opinion in Lipidology*, 2007, 18: 271-276.
- [8] Fisher RM, Gertow K. Fatty acid transport proteins and insulin resistance. *Current opinion in Lipidology*, 2005, 16: 173-178.
- [9] Binnert C, Koistinen HA, Martin G, Andreelli F, Beetling P, Koivisto VA, Laville M, Auwerx J, Vidal H. Fatty acid transport protein-1 mRNA expression in skeletal muscle and in adipose tissue in humans. *Am. J. Physiol*, 2000, 279: 1072-1079.
- [10] Song YZ, Feng JY, Zhou LH, Shu G, Zhu XT, Gao P, Zhang YL, Jiang QY. Molecular cloning and ontogenesis expression of fatty acid transport protein-1 in yellow feathered broilers. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 327-333.
- [11] Meirhaeghe A, Martin G, Nemoto M, Deeb S, Cotel D, Auwerx J, Amouyel P, and Helbecque N. Intronic polymorphism in the fatty acid transport protein 1 gene is associated with increased plasma triglyceride levels in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 1330-1334.
- [12] Lobo ED, Balthasar JP. Application of anti-methotrexate Fab fragments for the optimization of intraperitoneal methotrexate therapy in a murine model of peritoneal cancer. *J Pharm Sci*, 2005, 94 (9): 1957-1964.
- [13] Gertow K, Skoglund-Andersson C, Eriksson P, Boquist S, Orth-Gomer K, Schenck-Gustafsson K, Hamsten A, and Fisher RM. A common polymorphism in the fatty acid transport protein-1 gene associated with elevated post-prandial lipaemia and alterations in LDL particle size distribution. *Atherosclerosis*, 2003, 167: 265-273.
- [14] Gertow K, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H, Kaprio J, Rissanen A, Eriksson P, Hamsten A, and Fisher RM. Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance. *Diabetologia*, 2004, 47: 1118-1125.
- [15] Fisher RM, Gertow K. Fatty acid transport proteins and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, 2005, 6: 173-178.
- [16] Maeda N, Shimomura I, Kishida K. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*, 2002, 8: 731-737.
- [17] Merhaeghe A, Cotel D, Amouyel P, Dallongeville J. Lack of association between certain candidate gene polymorphisms and the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab*, 2005, 86:

293-299.

- [18] Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, and Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 3455-3467.
- [19] Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, 1994, 79 (3): 427-436.
- [20] Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest*, 2004, 113: 756-763.
- [21] 盛志廉, 陈瑶生. 数量遗传学. 北京: 科学出版社, 1999.
- Sheng ZL, Cen YS. Quantity Genetics. Beijing: Science Press, 1999. in Chinese)
- [22] 耿社民. 禽数量性状主效基因及基因集团的检测. 黄牛杂志, 1998, (6): 4-6.
- Geng SM. The detection of main gene for livestock and poultry. *Scalper Magazine*, 1998, (6): 4-6. (in china).
- [23] 肖静, 胡治球, 汤在祥, 隋炯明, 李欣, 徐辰武. 多个相关数量性状主基因的联合分析方法. 中国农业科学, 2005, 38: 1717-1724.
- Xiao J, Hu ZQ, Tang ZX, Sui JM, Li X, Xu CW. Joint analysis method for major genes controlling multiple correlated quantitative traits. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38, 717-1724. in Chinese)
- [24] Morris RW and Kaplan NL. The advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. *Genetic epidemiology*, 2002, 23: 221-233.
- [25] Horne BD and Camp NJ. Principal component analysis for selection of optimal SNP-sets that capture intragenic genetic variation. *Genetic Epidemiology*, 2004, 26: 11-21.
- [26] Clark AG. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genetic Epidemiology*, 2004, 7: 321-333.
- [27] 吴常信. 优质鸡育种特点及遗传标记辅助选择(MAS)的应用[J]. 第三届优良肉鸡的改良、生产及发展研讨会论集(台湾), 1994
- [28] 明道绪. 生物统计: 附实验设计(第三版). 北京: 中国农业出版社. 2001.
- [29] 罗永富, 王云厦. 脂肪酸结合蛋白的结构与功能特征. 生命的化学, 1992, 12(6): 22-25
- [30] 罗桂芬, 陈继兰, 文杰等. 鸡A-FABP基因多态性分析及其与脂肪性状的相关研究. 遗传. 2006, 28(1): 39-42
- [31] 李静. 黄羽肉鸡腹脂率及肌肉脂肪含量的H-FABP基因辅助选择研究. 四川农业大学. 2007
- [32] 宋予震. 黄羽肉鸡FATP1的分子克隆与表达. 华南农业大学. 2007

致 谢

该论文是在朱庆教授和刘益平教授悉心关怀和指导下完成的，在此，我们团队所有成员向朱庆教授、刘益平教授表示感谢，是你们提供给我们这次难得的学习与动手实践的机会。