

白鹅脂联素基因内含子多态性检测及群体遗传分析

董 彪^{1,2}, 段修军^{1,2}, 王 健², 龚道清³, 孙国波^{1,2}

(1. 国家级水禽基因库, 泰州 225300; 2. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 泰州 225300;

3. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘 要: 以扬州鹅、四川白鹅、皖西白鹅、豁眼鹅和浙东白鹅 5 个鹅品种为试验材料, 每个品种各 60 只, 公母各半, 根据鹅脂联素基因序列设计了 1 对引物扩增部分内含子, 用 PCR-SSCP 方法进行单核苷酸多态性分析, 并对不同品种进行群体遗传学分析。结果表明, 在鹅脂联素基因内含子上发现 2 个单碱基突变位点, 分别为第 16、26 位点的 A-G、T-C。鹅群中表现出 3 种基因型 (AA、AB、BB); 除豁眼鹅与皖西白鹅、浙东白鹅外, 3 种基因型在鹅品种两两之间分布无显著差异 ($P > 0.05$)。群体遗传分析表明, 豁眼鹅杂合度和多态信息含量最高, 皖西白鹅最低, 所有品种均表现为中度多态性。本研究表明鹅脂联素基因在不同品种中具有丰富的单核苷酸多态性, 可以进一步作为候选基因来分析其与脂肪性状的关联性。

关键词: 鹅; 脂联素基因; 单核苷酸多态性; 遗传分析

中图分类号: S835

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0050-05

Identification and genetic analysis of polymorphism in intron of adiponectin gene in White goose

DONG Biao^{1,2}, DUAN Xiu-jun^{1,2}, WANG Jian², GONG Dao-qing³, SUN Guo-bo^{1,2}

(1. National GeneBank of Waterfowl Resources, Taizhou 225300;

2. Jiangsu Animal Science and Veterinary Medicine College, Taizhou 225300;

3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: Five breeds of geese (Yangzhou goose, Sichuan White goose, Wanxi White goose, Huoyan goose and Zhedong White goose) with 30 male and 30 female each were used in this experiment. One pair of primer was designed for amplification of intron fragment based on adiponectin gene sequence of goose, and then single nucleotide polymorphism (SNP) and genetic polymorphism in different breeds were analyzed by PCR-SSCP method. As a result, two single nucleotide polymorphism mutations (A16G and T26C) were found in adiponectin gene and three genotypes (AA, AB, and BB) were detected in the five breeds. Except for that between Huoyan goose and Wanxi White goose, and Huoyan goose and Zhedong White goose, the distribution of three genotypes was not significantly different between every two breeds. The heterozygosity and PIC (polymorphism information content) were highest in Huoyan goose, but lowest in Wanxi White goose. Every breed's PIC was in the middle level. The results showed that the adiponectin gene has high polymorphisms in goose breeds, and could be used as a candidate gene for analyzing the correlation between its polymorphism and adipo traits in goose.

Key words: goose; adiponectin gene; SNPs; genetic analyses

人们在研究脂肪和肌肉形成过程中发现, 动物形成脂肪消耗的能量是形成等量肌肉的 3 倍。在畜禽产品烹调中, 人们又发现适当的皮下脂肪沉积和肌间脂肪有利于烹调加工。如何控制好畜禽适当的

脂肪沉积已受到广大研究者注意。在研究脂肪组织过程中, 科学家发现曾经被认为是能量“仓库”的脂肪组织, 其实也是一个重要的内分泌器官。脂联素 (adiponectin) 就是一种脂肪细胞高度表达分泌

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 江苏畜牧兽医职业技术学院科研基金(QN201031), 江苏省科技创新与成果转化项目 (BE2011465), 江苏省高校科研成果产业化推进项目 (JHB2011-80) 和泰州市科技发展计划 (TN1006) 共同资助。

作者简介: 董 彪, 男, 畜牧师。E-mail: dongbiao8201@126.com

的活性物质, 它以内分泌方式循环于血液中, 参与调节葡萄糖、脂肪酸代谢及抵抗炎症反应等生命活动^[1-3]。

脂联素基因研究开始于人和老鼠, 然后普及到猪、牛、羊、禽类等动物。不同物种脂联素基因的调控区和内含子存在差异, 使其全长不同。人和哺乳动物脂联素基因包括 3 个外显子和 2 个内含子, 而禽类的脂联素基因结构与人和哺乳动物不同, 它包括了 2 个外显子和 1 个内含子^[4-5]。在人类, 脂联素与胰岛素抵抗、动脉粥样硬化之间的相关性已被许多研究者所关注^[6-7]。禽类脂联素基因的研究起步晚, Maddineni 和 Yuan 等分别对鸡的脂联素基因进行了克隆、染色体定位和表达等相关研究^[4,8]。薛茂云等克隆了鸭脂联素全长 cDNA 序列, 并研究了原核表达^[9]。董颺等运用 PCR-SSCP 方法在鸭脂联素基因第 2 外显子上发现了 7 个单碱基突变^[10]。作者还根据其他物种的序列设计引物从鹅基因组 DNA 扩增出鹅脂联素基因的全编码区序列 (GenBank No:EU370686), 并检测了该基因在鹅不同组织中的 mRNA 表达规律^[11]。目前尚未见鹅脂联素基因的单核苷酸多态性研究。

本研究拟根据获得的鹅脂联素基因序列设计引物, 以扬州鹅、四川白鹅、皖西白鹅、豁眼鹅、浙东白鹅为试验素材, 用单链构象多态 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 方法对鹅脂联素基因内含子进行了单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测, 意在分析不同基因型在品种中分布情况和群体遗传参数, 为进一步研究鹅脂联素基因对脂肪沉积的功能奠定基础, 指导鹅的育种工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以国家级水禽基因库中饲养的扬州鹅、四川白鹅、皖西白鹅、豁眼鹅和浙东白鹅为试验材料, 每个品种各 60 只, 公母各半。各品种翅静脉采血, 4% EDTA 抗凝, 离心去血浆后, 采用酚/氯仿法提取基因组 DNA, 于 TE 中溶解, 将 DNA 测定浓度后稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.2 PCR 引物的设计

根据我们克隆、测序得到的鹅脂联素基因的 DNA (GenBank No:EU370686) 序列设计了 1 对引物, 用于扩增部分内含子序列, 引物由上海桑尼生物工程有限公司合成。引物序列为:

F: 5'- GGACGGGAAAGATGGAAAAG-3'

R: 5'- AGGAAAGGCTGGATGACCTC-3'

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系为 $25 \mu\text{L}$, 包括 $10 \times \text{PCR buffer}$ (without Mg^{2+}) $2.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $2 \mu\text{L}$ 、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 $1.5 \mu\text{L}$ 、 $10 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 、 $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 $0.16 \mu\text{L}$ 、 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 $1 \mu\text{L}$ 、加 ddH_2O 至 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为 94°C 变性 5 min ; 94°C 30 s , 56°C 30 s , 72°C 30 s 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min , 4°C 保温。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 结束后用凝胶成像系统检测扩增结果。

1.4 SSCP 分析

SSCP 分析采用 $5 \mu\text{L}$ PCR 产物和 $5 \sim 6 \mu\text{L}$ 上样缓冲液进行混合, 然后 98°C 变性 10 min , 迅速插入冰中, 放置 5 min , 使之保持变性状态。变性后 PCR 产物在 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。 $10 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 $8 \sim 9 \text{ h}$ 后, 银染分析。

1.5 对有多态性片段的克隆和测序

根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取纯合基因型各 1 个, 通过 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收, 与 PMD18-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 *DH5 α* 上, 经 PCR、酶切鉴定后送于上海桑尼生物工程有限公司测序。

1.6 数据统计分析

统计有多态的 PCR 扩增片段 SSCP 出现的每种基因型的数量, 根据统计学公式计算出各种基因型在不同鹅品种间的分布差异、纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 检测结果

用设计的引物扩增鹅脂联素基因内含子, 1.5% 琼脂糖电泳检测, 扩增片段与目的片段大小一致且特异性好, 可以直接进行 SSCP 分析。

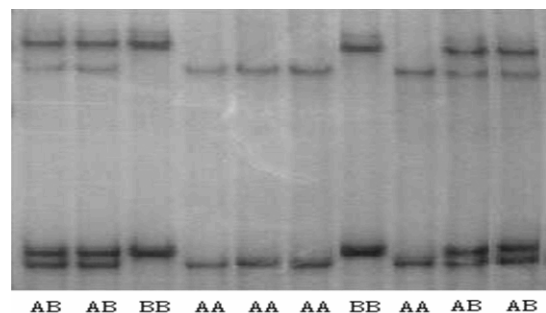


图 1 引物对不同鹅品种扩增片段的 SSCP 分析

Figure 1 SSCP analysis on PCR amplification of the primer on the different goose breeds

对 PCR 扩增产物进行 SSCP 检测, 结果分析出现 3 种基因型, 分别命名为 AA、AB 和 BB (图 1)。

2.2 多态性基因片段的克隆和测序

取 AA、BB 基因型的 PCR 产物进行片段回收、克隆、测序。运用生物学软件 DNAMAN 分析测序结果, 其中 BB 型与 GenBank 中上传的鹅脂联素基因序列一致; AA 型与 BB 型相比, 有 2 个位点发生了单碱基突变, 分别为内含子的第 16 个碱基处的 A-G 突变、26 个碱基处的 T-C 突变 (图 2)。

2.3 不同基因型 (基因) 频率在各鹅群中的分布

对不同品种分别进行基因型检测, 计算了不同鹅品种的基因型频率和基因频率 (表 1)。通过比较可知, 5 个鹅品种均表现为 AA 型比例比其他基因型低, 其中豁眼鹅 AA 型最高, 为 0.233 3; 扬州鹅、豁眼鹅以杂合子 AB 型为主, 其他 3 个鹅品种以 BB 型为主。5 个鹅品种均表现为 B 等位基因频率高于

A 等位基因频率, 其中皖西白鹅差异最大, 豁眼鹅差异最小。

不同基因型在不同鹅群体间分布比较 (χ^2 检验), 结果表明不同基因型在鹅群两两之间分布存在差异不同, 其中豁眼鹅与皖西白鹅、浙东白鹅存在极显著差异, 其他品种两两之间基因型分布无显著差异。

2.4 遗传特性分析

群体遗传分析结果见表 3, 根据脂联素基因内含子多态位点分析皖西白鹅的纯合度最高, 浙东白鹅次之, 豁眼鹅最低。除皖西白鹅和浙东白鹅外, 其他 3 个鹅品种的有效等位基因数都比较接近于 2。5 个鹅品种的多态性信息含量均为中度多态, 以豁眼鹅的 PIC 最高, 为 0.371 6, 扬州鹅次之 (0.358 9), 皖西白鹅最低 (0.293 8)。

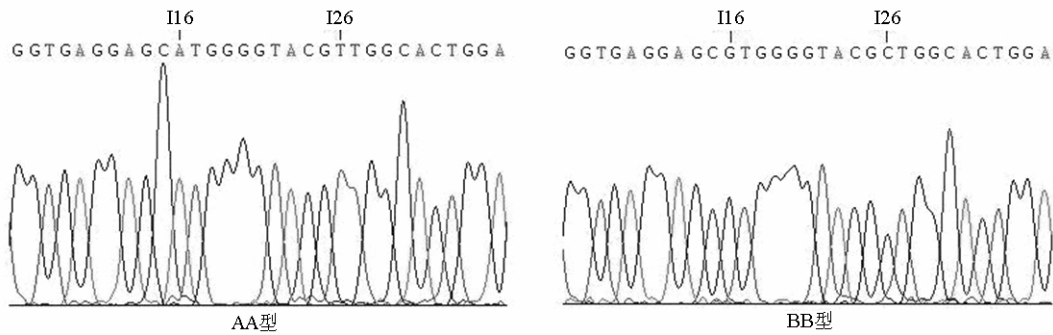


图 2 不同基因型间核苷酸序列比较

Figure 2 Homologous comparison of nucleotide sequence of different genotypes

表 1 不同基因型及等位基因在各鹅品种间的分布

Table 1 Genotype and allele frequent distribution in different goose breeds

| 品种 Breed | 样本量 N | 基因型频率 Genotype frequency | | | 等位基因频率 Allele gene frequency | |
|--------------------------|-------|--------------------------|---------|---------|------------------------------|---------|
| | | AA | AB | BB | A | B |
| 扬州鹅 Yangzhou goose | 60 | 0.133 3 | 0.483 4 | 0.383 3 | 0.375 0 | 0.625 0 |
| 四川白鹅 Sichuan White goose | 60 | 0.116 7 | 0.400 0 | 0.483 3 | 0.316 7 | 0.683 3 |
| 皖西白鹅 Wanxi White goose | 60 | 0.066 7 | 0.333 3 | 0.600 0 | 0.233 3 | 0.766 7 |
| 豁眼鹅 Huoyan goose | 60 | 0.233 3 | 0.416 7 | 0.350 0 | 0.441 7 | 0.558 3 |
| 浙东白鹅 Zhedong White goose | 60 | 0.066 7 | 0.350 0 | 0.583 3 | 0.241 7 | 0.758 3 |

表 2 不同品种间基因型分布卡方检验

Table 2 χ^2 test of genotype distribution in different goose breeds

| 品种 Breed | 四川白鹅 Sichuan White goose | 皖西白鹅 Wanxi White goose | 豁眼鹅 Huoyan goose | 浙东白鹅 Zhedong White goose |
|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------|--------------------------|
| 扬州鹅 Yangzhou goose | 1.23 | 5.85 | 2.02 | 5.10 |
| 四川白鹅 Sichuan White goose | | 1.94 | 3.63 | 1.58 |
| 皖西白鹅 Wanxi White goose | | | 10.06** | 0.04 |
| 豁眼鹅 Huoyan goose | | | | 9.40** |

注: * 表示差异显著, ** 表示差异极显著。

Note: * means significant difference at 0.05 level, ** means significant difference at 0.01 level. $\chi^2_{(2)0.05}=5.991$, $\chi^2_{(2)0.01}=9.21$.

表 3 不同鹅品种脂联素基因遗传参数分析
Table 3 The genetic polymorphic parameters of adiponectin gene in different goose breeds

| 品种 Breed | 纯合度 Homozygosity | 杂合度 Heterozygosity | 有效等位基因数 Effective number of alleles | 多态信息含量 PIC |
|--------------------------|---------------------|-----------------------|--|---------------|
| 扬州鹅 Yangzhou goose | 0.531 3 | 0.468 8 | 1.9 | 0.358 9 |
| 四川白鹅 Sichuan White goose | 0.567 2 | 0.432 8 | 1.8 | 0.339 1 |
| 皖西白鹅 Wanxi White goose | 0.642 2 | 0.357 8 | 1.6 | 0.293 8 |
| 豁眼鹅 Huoyan goose | 0.506 8 | 0.493 2 | 2.0 | 0.371 6 |
| 浙东白鹅 Zhedong White goose | 0.633 5 | 0.366 5 | 1.6 | 0.299 4 |

注: $PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.5 > PIC > 0.25$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。

Note: $PIC > 0.5$ represents high polymorphism, $0.5 > PIC > 0.25$ stands for middle polymorphism, $PIC < 0.25$ means low polymorphism.

3 讨论

脂联素能够影响机体处理糖类和脂肪的能力。除了直接作用于外周组织, 脂联素也通过作用于脑来提高葡萄糖代谢和减轻体重, 能够通过循环进入脑脊髓液而作用于神经元细胞。这些中央释放的脂联素能够提高能量消耗使老鼠的体重减轻, 脂肪减少, 不同于瘦素通过减少食物摄取来达到体重减轻^[12]。Berg 等研究表明, 脂联素未影响葡萄糖吸收、糖酵解及糖原合成速度, 这表明循环中脂联素水平的快速上升可降低肝糖输出而不影响外周葡萄糖吸收。脂联素敲除虽然降低了小鼠肌肉和肝脏中 FFA 的 β -氧化作用, 但是高脂饮食对小鼠的血糖无显著影响^[13]; 脂联素敲除的纯合子小鼠血脂和血糖的代谢是正常的^[14]。生理剂量的脂联素可降低细胞内胆固醇酯的含量, 经脂联素处理后巨噬细胞含很少脂滴^[15]。血浆脂联素浓度与总胆固醇、LDL-C 和甘油三酯水平呈负相关, 与 HDL-C 水平呈正相关^[16]。

脂联素在脂肪代谢中起着如此重要的作用, 但是脂联素基因在个体中均存在, 个体之间该基因的差异表现在某些位点突变、缺失、重复等方面, 因此人们也开展了脂联素基因多态性研究。在人类上已经将脂联素基因突变与导致肥胖和疾病等方面相关联。在禽类上, 已经在鸡和鸭上寻找出多个突变位点, 部分已经与一些生化指标进行了关联性分析。本研究设计了 1 对引物扩增了部分内含子 1, 首次在内含子上发现了 2 个单核苷酸多态, 分别为内含子第 16、26 个碱基的 A-G、T-C 突变, 在 5 个鹅品种中共表现出 3 种基因型, 定义为 AA、AB、BB。不同基因型在品种中分布情况不一, 扬州鹅和豁眼鹅以杂合子 AB 型为主, 其他 3 个品种以纯合子 BB 型为主; 除豁眼鹅 AA 基因型为 0.233 3, 其他 4 个品种 AA 型比率比较低, 尤其是皖西白鹅和浙东白鹅。在所有鹅品种中均表现为 B 等位基因频率高于 A 等位基因频率。

不同基因型在鹅群中分布存在差异, 本研究发现豁眼鹅与皖西白鹅、浙东白鹅存在极显著差异, 其他品种两两之间基因型分布无显著差异, 这是品种在形成过程中, 通过了人类和自然选择的结果, 正是这些品种间的差异, 为水禽育种提供了丰富的育种资源。

Botstein 等提出了衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标 (PIC)。当 $PIC > 0.5$ 时, 该位点为高度多态位点, 当 $0.5 > PIC > 0.25$ 时, 该位点为中度多态位点, 当 $PIC < 0.25$ 时, 该位点为低度多态位点。本试验对脂联素基因的内含子研究中发现, 豁眼鹅杂合度和多元信息含量最高, 说明了豁眼鹅在本试验中发现的多态处选择的遗传潜力最大; 皖西白鹅、浙东白鹅与之相反, 说明了皖西白鹅、浙东白鹅在该突变位点可以选择的范围狭小; 其他品种处于这些品种之间。

本试验结果表明脂联素基因在不同鹅品种中具有丰富的多态性, 这为我们进一步分析其与脂肪等性状的关系, 进而确定能否用于鹅的脂肪沉积的选择标记奠定了基础。

参考文献:

- [1] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 257: 79-83.
- [2] Spiegelman B M, Flier J S. Obesity and the regulation of energy balance[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 531-543.
- [3] Berg A H, Combs T P, Scherer P E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2002, 13(2): 84-89.
- [4] Yuan J, Liu W, Liu Z L, et al. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping and expression analysis of ADIPOQ (adiponectin) in chicken[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2006, 112(1-2): 148-151.
- [5] 徐国庆, 龚道清, 董飏, 等. 鹅脂联素基因的克隆、序列分析及组织表达[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(6): 941-946.
- [6] Stumvoll M, Tschrutter O, Fritsche A, et al. Association of

- the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2002, 51(1): 37-41.
- [7] Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2306-2312.
- [8] Maddineni S, Metzger S, Ocon O, et al. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(10): 4250-4256.
- [9] 薛茂云, 董飏, 顾志良, 等. 鸭脂联素基因全长 cDNA 的克隆和原核表达的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(10): 1232-1239.
- [10] 董飏, 龚道清, 孟和, 等. 鸭脂联素基因单核苷酸多态性检测及群体遗传分析[J]. *遗传*, 2007, 29(8): 995-1000.
- [11] 徐国庆, 龚道清, 董飏, 等. 鹅脂联素基因的克隆、序列分析及组织表达[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(6): 941-946.
- [12] Qi Y, Takahashi N, Hileman S M, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight [J]. *Nat Med*, 2004, 10(5): 524-529.
- [13] Ma K, Cabrero A, Saha P K, et al. Increased beta-oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 34658-34661.
- [14] Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(29): 25863-25866.
- [15] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages [J]. *Circulation*, 2001, 103(8): 1057-1063.
- [16] Tschritter O, Fritsche A, Thamer C, et al. Plasma adiponectin concentration predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism [J]. *Diabetes*, 2003, 52(2): 239-243.

更正

由于发胶片过程少了统一字体的程序, 再加上编辑读片时的疏漏, 纸质印刷版 2011 年 38 卷第 6 期有 4 篇文章出现严重错误, 在此特向相关作者和广大读者表示深深的歉意! 这 4 篇文章正确的版本内容请参见《安徽农业大学学报》在“中国知网”上出版的网络版, 纸质印刷版的错误特此更正如下:

(1) 徐六一, 等: 马尾松抗松材线虫病无性系的抗病性评价方法研究。第 851 页, 表 2 中所有数值之间的符号“-”应为符号“±”。

(2) 刘冰等: 油茶 SSR-PCR 反应体系建立与优化。第 858-862 页, 全文反应体系的体积和浓度单位应该由“L”和“ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ”改为“ μL ”和“ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ”。

(3) 杜庆平等: 扬州地区 2 个芍药品种光合生理生态特性比较。第 935-939 页, 净光合速率等单位应该由“ $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ”改为“ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ”。

(4) 邹文桐等: 氮素水平对宽杆芥菜幼苗生长及酶活性的影响。第 954-955 页, 表 1、表 2、表 3 和表 4 中所有数值之间的符号“-”应为符号“±”。

《安徽农业大学学报》编辑部