

# 松辽黑猪肌内脂肪沉积相关基因的筛选

于永生, 李兆华, 罗晓彤, 张树敏\*

(吉林省农业科学院畜牧科学分院, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:** 为了了解松辽黑猪肌内脂肪沉积的分子遗传学机理, 利用基因芯片技术对松辽黑猪群体内背最长肌肌内脂肪含量高和低的个体进行了转录分析, 利用实时定量 PCR 对部分转录差异基因进行了检测。差异表达分析显示, 共有 153 个基因显著变化; 差异基因经 GO 分类显示, 主要参与细胞生长与死亡、信号分子及互作、信号传导、氨基酸代谢、脂类代谢等生物学过程; 所验证的 IGF2、PRKAG3、UCP3 基因与芯片结果基本一致。本研究为深入了解松辽黑猪肌内脂肪沉积的机理奠定了基础。

**关键词:** 松辽黑猪; 肌内脂肪; 基因芯片

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)01-0091-04

## Screening Differentially Expressed Genes Related to Intramuscular Fat Deposition of Songliao Black Swine

YU Yongsheng, LI Zhaohua, LUO Xiaotong, ZHANG Shumin\*

(Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** In order to investigate the molecular mechanisms underlying porcine intramuscular fat deposition, the transcriptional profile of longissimus dorsi muscle between lower intramuscular fat content individuals and higher individuals were compared by microarrays in Songliao Black Swine, and the differentially expressed genes were verified by real-time PCR. The results showed that 153 differentially expressed genes were found between the two groups. Differentially expressed genes classified by GO (Gene Ontology) analysis mainly involved in cell growth and death, signaling molecules and interaction, signal transduction, metabolism of amino acids, lipid metabolism etc. In addition, the Real-time-PCR results of IGF2、PRKAG3、UCP3 were consistent with that of gene chip. These results would offer the basic data for the further study on the molecule genetic mechanism of intramuscular fat deposition in Songliao Black Swine.

**Key words:** Songliao Black Swine; Intramuscular fat; Microarray

肌内脂肪是肌肉品质的重要指标之一, 显著影响肌肉嫩度和多汁性, 是肉用畜禽重要的经济性性状<sup>[1]</sup>。目前已经发现多种与脂肪代谢相关的蛋白与肌内脂肪含量的密切相关<sup>[2-4]</sup>。肌内脂肪沉积是一个复杂的过程, 目前对其分子网络研究还不透彻, 仅发现磷酸腺苷活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)信号转导通路在调控肌内脂肪合成方面具有重要作用<sup>[5]</sup>。

高通量表达谱芯片和测序技术的发展, 为深入了解猪肌内脂肪沉积的分子遗传学机理提供了技术保障。

松辽黑猪是我国北方培育的第一个瘦肉型新品种, 目前主要用于优质黑猪肉生产以及作为母本应用于黑猪配套系生产<sup>[6]</sup>。本研究以松辽黑猪为研究对象, 在测定背最长肌肌内脂肪含量的基础上, 采用 Agilent porcine (V2) gene expression microarray 比较了高肌内脂肪和低肌内脂肪含量个体背最长肌基因表达的差异, 利用实时定量 PCR 对部分差异基因进行了转录验证, 为深入了解松辽黑猪肌内脂肪沉积的机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

收稿日期: 2015-07-05

基金项目: 国家自然科学基金(31101681); 吉林省科技厅项目(20121817)

作者简介: 于永生(1976-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事猪经济性状遗传机理的研究。

通讯作者: 张树敏, 男, 研究员, E-mail: shumin1961@126.com

试验于2012年8月~2013年10月在吉林省农业科学院畜牧科学分院肉质分析实验室和分子生物学实验室完成。

### 1.1 试验群体

分别选取体重为95 kg的松辽黑猪12头,由畜牧分院试验猪场提供,屠宰后采集6~8肋骨间的背最长肌,选取深部肌肉组织,剪碎后置于无RNA酶的冷冻管中,投入液氮,用于芯片分析,剩下的肌肉带回实验室进行肌内脂肪测定。

### 1.2 肌内脂肪测定

除尽样品外周筋膜、外周脂肪,切碎,按照《猪肌肉品质测定规范》(NY/T821-2004)有关肌内脂肪测定的方法进行<sup>[7]</sup>。选取肌内脂肪含量显著差异的各2头个体进行芯片分析。

### 1.3 芯片制作

试验所用芯片为猪表达谱芯片,由上海伯豪生物公司提供,芯片为Agilent porcine(V2) gene expression microarray(4×44K),代表了超过42 034个基因和转录本,序列信息源于RefSeq、Unigene和TIGR等知名数据库。

### 1.4 RNA抽提和纯化

采用TRIZOL Reagent提取样品总RNA抽提,利用1%琼脂糖凝胶电泳进行质检,送上海伯豪生物公司进行芯片分析。

### 1.5 芯片数据结果

将归一化处理的芯片读取数据以Fold change>2或<0.5为标准进行差异表达基因筛选。利用SAS在线系统对差异基因进行注释。

### 1.6 Real-time PCR验证

随机选取3个芯片结果中的差异表达基因,以β2-微球蛋白(beta-2-microglobulin, B2M)作为内参基因,利用SYBR Green I染料法对候选基因进行实时定量PCR验证。候选基因及引物信息见表1。采用Transcriptor First Strand cDNA Synthe-

sis Kit(Roche公司)对RNA进行反转录,梯度稀释反转录产物建立标准曲线,在Roche 480荧光定量PCR仪上进行转录验证。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因相对表达量进行计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 松辽黑猪背最长肌肌内脂肪含量的测定

随机选取12头松辽黑猪进行背最长肌肌内脂肪含量的测定,检测结果表明,该群体中背最长肌肌内脂肪含量为(3.17±0.89)%,其中高肌内脂肪组含量为(4.31±0.13)%,低肌内脂肪组仅为(2.34±0.14)%,两组间差异极显著( $P<0.01$ )。该结果与金鑫等的测定结果一致<sup>[8]</sup>。

### 2.2 基因的差异表达分析

筛选肌内脂肪含量高低不同组中差异倍数大于2或小于0.5的基因,最终得到差异基因153个,差异基因表达量的算术平均数经过对数转换后,利用SAS在线系统分别作聚类分析图(图1),其中上调基因68个,下调基因85个(表2)。

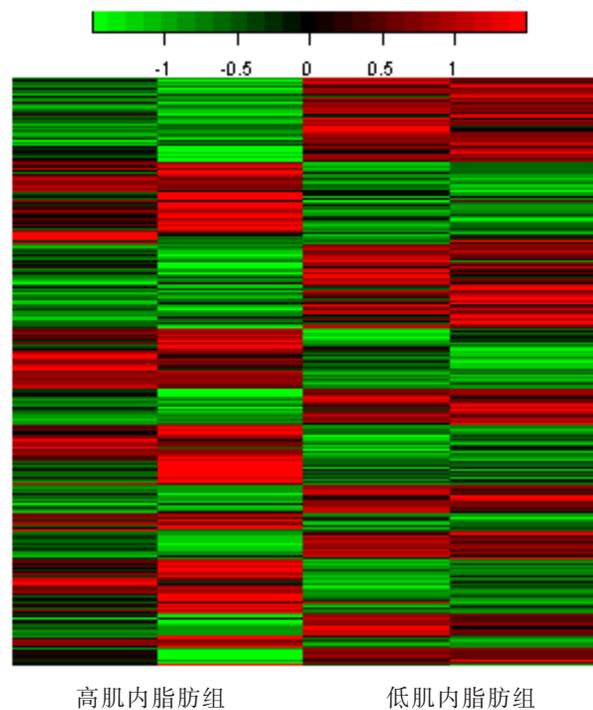


图1 差异表达基因的聚类分析图

肌内脂肪沉积是由多基因控制,涉及很多基因的差异表达。本试验中筛选到的差异基因经过GO(<http://www.geneontology.org/>)进行简单的功能分类。分析显示大部分差异表达基因主要参与细胞生长与死亡、信号分子及互作、信号传导、氨基酸代谢、脂类代谢等多种生物学过程。对这些基因进行染色体定位,发现主要集中在2、4、6、7号

表1 候选基因和引物

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)	GeneBank号
B2M	F:AAACGGAAAGCCAAATTACC R:ATCCACAGCGTTAGGAGTGA	159	NM_213978
IGF2	F:TATGATGTCACCACTGGCAAA R:ACACCCTCCACTTTGTCTGC	186	EF601160
PRKAG3	F:GGGATATCTGGGAAGTTGT R:TCTGCAGCTCATCATCCAGC	213	X56094
UCP3	F:GATTCACACCTTCTTTTGGCC R:GTTGTGTAATCCGGGTGGC	207	NM_214049.1

染色体上。

表2 部分候选脂肪沉积相关基因

基因名称	差异倍数(FC)	GO分类
SERPINE1	0.42	细胞生长与死亡
PRKAG3	3.09	内分泌调节
UCP3	2.30	无注释
LIPE	5.01	脂类代谢
IGF2	0.25	无注释
SERCA2	2.04	信号传导
CXCL10	0.45	信号分子及互作
CYP51	0.45	脂质代谢
DDC	3.39	氨基酸代谢
SMAD3	2.14	细胞生长与死亡
FGF9	3.42	信号传导

注: Fold change(FC)>2为表达上调基因; Fold change(FC)<0.5为表达下调基因

### 2.3 实时荧光定量PCR结果

为验证芯片结果的可靠性,本研究从芯片杂交结果中选取胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)、一磷酸腺苷激活蛋白激酶 $\gamma$ 3亚基(AMP-activated protein kinase $\gamma$ 3, PRKAG3)、解耦联蛋白基因3(uncoupling protein 3, UCP3)进行Real-time PCR验证。结果表明,所验证的3个基因的差异倍数结果T检验均达显著水平( $P<0.05$ ),其中IGF2基因达到极显著水平( $P<0.01$ )。芯片和实时定量PCR的结果比较见表3。2个试验所得的表达倍数虽然不同,但二者的表达趋势是相同的,因此认为芯片的筛选结果是可靠的。

表3 候选基因的实时定量验证

基因	高脂肪组	低脂肪组	P值
IGF2	0.3068±0.0920	1.1350±0.1369	0.000002
PRKAG3	3.7167±0.8136	1.4502±0.4063	0.0125
UCP3	2.4633±0.4225	1.3631±0.3235	0.0232

## 3 讨论

动物机体脂肪的沉积受营养、性别、阉割和遗传基础的影响<sup>[9]</sup>。由于肌肉内部是生长过程中最后的脂肪沉积部位,营养调控很难显著地提高肌内脂肪的含量而不影响瘦肉率<sup>[10]</sup>。因此需要从分子机理角度考虑在不降低瘦肉率的前提下如何提高肌内脂肪含量。

松辽黑猪是我国北方培育的第一个瘦肉型新品种,于2009年11月通过国家畜禽遗传资源委员会的审定(农01新品种证字第17号),具有繁殖

性能好、泌乳力强,生长发育快,饲料报酬高,肉质风味好,抗逆性强等特点,屠宰后肌内脂肪含量可达3.52以上<sup>[11]</sup>。本研究选取了核心场的12头松辽黑猪进行屠宰,测定了背最长肌肌内脂肪含量,发现尽管整体肌内脂肪仍保持在3%以上,但群体内个体间肌内脂肪含量差异极显著,因此在群体内针对肌内脂肪这一经济性状仍需要进行进一步选择。

基因芯片技术是随着“人类基因组计划”发展起来的一项新技术,可以同时检测生物样本成千上万个基因的表达水平,从而得到基因组水平的基因表达谱数据。通过对这些数据的分析,可以获得潜在的差异表达基因,为高通量筛选目的基因提供了技术手段。目前在猪遗传繁育领域中,基因表达谱芯片技术已广泛应用<sup>[12-14]</sup>。

本研究利用Agilent猪表达谱芯片对松辽黑猪群体内肌内脂肪含量显著差异的个体进行了差异基因筛选,发现了一系列候选基因,对这些候选基因进行GO分类,发现这些基因参与了细胞生长与死亡、信号分子及互作、信号传导、氨基酸代谢、脂类代谢等多种生物学过程,说明肌内脂肪沉积是一个复杂的生理过程,需要大量的基因参与。差异基因染色体定位结果与张树敏等的报道结果一致<sup>[15]</sup>。

IGF2基因多态性与猪脂肪含量和肌肉品质相关性研究已有很多报道<sup>[16-17]</sup>,也有研究者对不同日龄阶段的大白、长白、杜洛克、皮特兰等猪种IGF2的表达量进行了研究<sup>[18]</sup>,但其表达量与肌内脂肪沉积的相关性目前研究不多。本研究利用基因芯片筛选到IGF2转录水平与肌内脂肪沉积呈负相关,通过定量PCR进行了群体验证,发现结果与芯片显示一致,说明该基因可以作为进一步研究表达调控网络的候选基因。

AMPK在调节机体脂类和糖代谢起着重要作用,而PRKAG3基因是编码AMPK调节亚基 $\gamma$ 3的基因,通过调节糖代谢,进而对肉质有一定作用<sup>[19]</sup>。李梦云在雅南猪和杜长达白猪群体中发现PRKAG3基因的表达量与屠宰率、眼肌面积和背膘厚相关性不大,而与肌内脂肪含量成正相关( $r=0.832$ )<sup>[20]</sup>,本研究也证明在松辽黑猪群体中也存在类似的结果,PRKAG3转录上调,肌内脂肪含量显著提高。

UCP3蛋白存在于线粒体内膜,是线粒体内的重要转运蛋白,在动物的脂肪酸代谢和基础代谢中起着重要作用<sup>[21]</sup>。有研究表明在金华猪和皮

特兰猪杂交群体中发现UCP3的3'非翻译区多态性与6~7肋间背膘厚度显著相关<sup>[22]</sup>,本研究发现在肌内脂肪含量高的松辽黑猪个体中UCP3转录水平也显著提高,因此推测UCP可能与脂肪沉积相关,具体机制值得进一步研究。

本研究在松辽黑猪群体内利用猪表达谱芯片对肌内脂肪沉积的相关基因进行了筛选,发现了一批候选基因,选择了IGF2、PRKAG3、UCP3进行了转录验证,为深入了解肌内脂肪沉积的机制奠定了基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 马现永,林映才,蒋宗勇.猪肌内脂肪调控研究进展[J].畜牧与兽医,2010,42(增刊):18-23.
- [ 2 ] Chen J N, Jiang Y Z, Cen W M, et al. Distribution of H-FABP and ACSL4 gene polymorphisms and their associations with intramuscular fat content and backfat thickness in different pig populations[J].Genet Mol Res, 2014, 13(3): 6759-6772.
- [ 3 ] Jeong J, Kwon E G, Im S K, et al. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers[J].J Anim Sci, 2012, 90(6): 2044-2053.
- [ 4 ] Ren Z Q, Wu W J, Liu W H, et al. Differential expression and effect of the porcine ANGPTL4 gene on intramuscular fat[J].Genet Mol Res,2014,13(2): 2949-2958.
- [ 5 ] Underwood K R, Tong J, Zhu M J, et al. Relationship between kinase phosphorylation, muscle fiber typing, and glycogen accumulation in longissimus muscle of beef cattle with high and low intramuscular fat[J].J Agric Food Chem, 2007, 55(23): 9698-9703.
- [ 6 ] 李娜,李兆华,赵晓东,等.吉松配套系选育研究初报[J].吉林农业科学,2010,35(5):41-42,45.
- [ 7 ] 倪德斌,熊远著,邓昌彦,等.NY/T821-2004,猪肌肉品质测定规范[S].北京:中国标准出版社,2005.
- [ 8 ] 金鑫,胡铁军,张树敏,等.优质安全肉猪生长肥育和胴体肉品质的测定与分析[J].吉林农业科学,2004,29(2):41-44.
- [ 9 ] Kouba M, Sellier P. A review of the factors influencing the development of intermuscular adipose tissue in the growing pig[J]. Meat Sci, 2011, 88(2): 213-220.
- [ 10 ] Szabo C, Jansman A J, Babinszky L, et al. Effect of dietary protein source and lysine: DE ratio on growth performance, meat quality, and body composition of growing-finishing pigs[J]. J Anim Sci, 2001, 79(11): 2857-2865.
- [ 11 ] 张树敏.松辽黑猪种质特性的研究[D].长春:吉林大学,2007.
- [ 12 ] Murgiano L, Alessandro A, Egidio M G, et al. Proteomics and transcriptomics investigation on longissimus muscles in Large White and Casertana pig breeds[J]. J Proteome Res,2010, 9(12): 6450-6466.
- [ 13 ] Zhang J, He Q, Liu Q Y, et al. Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated *with/without* clenbuterol[J]. BMC Genomics, 2007(8): 433.
- [ 14 ] Zhou B, Liu H L, Shi F X, et al. MicroRNA expression profiles of porcine skeletal muscle[J].Anim Genet, 2010, 41(5): 499-508.
- [ 15 ] 张树敏,李娜,金鑫,等.猪QTL的最新研究进展[J].吉林农业科学,2006,31(2):50-53.
- [ 16 ] Clark D L, Bohrer B M, Tavárez M A, et al. Effects of the porcine IGF2 intron 3-G3072A mutation on carcass cutability, meat quality, and bacon processing[J].J Anim Sci,2014, 92(12): 5778-5788.
- [ 17 ] Fontanesi L, Speroni C, Buttazzoni L, et al. The insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene intron3-g.3072G>A polymorphism is not the only *Sus scrofa* chromosome 2p mutation affecting meat production and carcass traits in pigs: evidence from the effects of a cathepsin D (CTSD) gene polymorphism[J]. J Anim Sci, 2010, 88(7): 2235-2245.
- [ 18 ] Pierzchała M, Pareek C S, Urbański P, et al. Study of the differential transcription in liver of growth hormone receptor (GHR), insulin-like growth factors (IGF1, IGF2) and insulin-like growth factor receptor (IGF1R) genes at different postnatal developmental ages in pig breeds[J].Mol Biol Rep, 2012, 39(3):3055-3066.
- [ 19 ] Uimari P, Sironen A. A combination of two variants in PRKAG3 is needed for a positive effect on meat quality in pigs[J]. BMC Genet, 2014(15): 29.
- [ 20 ] 李梦云.猪PRKAG3基因表达规律及其与肉质关系的研究[D].雅安:四川农业大学,2006.
- [ 21 ] Costford S R, Chaudhry S N, Crawford S A, et al. Long-term high-fat feeding induces greater fat storage in mice lacking UCP3 [J]. AJP- Endocrinology and Metabolism, 2008, 295(5): 1018-1024.
- [ 22 ] Li H, Brahi O H, Zhao X, et al. Association of pig UCP3 gene mutations and back fat thickness in the sixth and seventh rib[J]. Mol Biol Rep, 2012,39(2): 1823-1829.

(责任编辑:范杰英)