

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00083

中外两品种鸡胸肌组织差异表达基因的研究

冯浩咏^{1,2}, 苗向阳¹, 王希彪², 胡婕^{1,2}

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;
2. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030

摘要: 运用 mRNA 差异显示技术对北京油鸡和 AA 肉鸡胸肌组织基因的差异表达进行研究, 从分子水平分析导致两品种肌肉组织基因差异表达的机制。通过反向 Northern dot blot 技术验证共筛选出差表达基因 7 条, 经与 GenBank 数据库进行相似性比对, S1 与 *HMGN3* 基因有较高同源性; S3 与 *ChEST294a8* 有很高同源性, 但功能未知; S4 和 S5 与鸡的磷酸葡萄糖变位酶 I 同源性很高; S6 和 S2 与已有核酸数据库中的基因克隆或 EST 具有较高同源性, 为已知的 EST, 但功能未知; 序列 S7 未在数据中发现同源序列, 可以确定其在 AA 肉鸡中特异表达, 确定为新发现的 EST (GenBank 登录号: EU594549)。为进一步研究中外两品种鸡胸肌组织基因差异表达机制奠定了基础。

关键词: 鸡; mRNA 差异显示; 胸肌

Screening and identification of differentially expressed genes in Beijing fatty and broiler breast muscles

FENG Hao-Yong^{1,2}, MIAO Xiang-Yang¹, WANG Xi-Biao², HU Jie^{1,2}

1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: mRNA differential display reverse-transcriptase PCR (DDRT-PCR) was applied to identify differentially expressed genes in Arbor Acres broiler (AA) and Beijing fatty chicken breast muscles in order to find the mechanism which induces the differential gene expression at the molecular level. A total of 7 ESTs were found using reverse Northern dot blot, and all of them were compared with the nucleotide sequences in GenBank database using BLAST. S1 was highly similar to *HMGN3*; S3 was highly similar to *ChEST294a8* with unknown functions; S4 and S5 were highly similar to *PGM I*; S6 and S2 had highly similar nucleotide sequences with unknown functions in nucleotide databases; S7 had no significant similarity with existing genes or ESTs and was regarded as a new EST. The new EST was submitted to GenBank (Accession number: EU594549). This lays a foundation for further study on the mechanism of differential gene expression in Beijing fatty and AA breast muscles.

Keywords: chicken; DDRT-PCR; breast muscle

收稿日期: 2008-03-14; 修回日期: 2008-05-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (编号: 2008AA10Z140), “十一五”国家科技支撑计划资助项目 (编号: 2006BDA13B08), 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所科技创新团队资助项目 (编号: ywf-td-1)

作者简介: 冯浩咏 (1982-), 女, 硕士, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: fhyong82@163.com

通讯作者: 苗向阳 (1968-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 基因工程与功能基因组学及转基因动物。Tel: 010-62895663; E-mail: mxy32@sohu.com

分子生物学技术的发展使研究者能够从不同角度、不同层次上探讨物种间或同一物种不同群体间的差异,研究这些差异形成的过程和物质基础。而在基因组水平上研究遗传物质的差异表达对于了解性状形成的遗传基础和调控机理是很有必要的,可为育种手段的改进提供理论和实践依据。

肉鸡生产中,鸡肉品质和生长效率一般呈负相关,鸡的生长发育快,肌纤维变粗,导致肌肉的品质下降。如何在生长效率与肉质品质之间找到平衡点,在保证肌肉品质的同时提高生长性能是值得研究的问题。不同品种或不同日龄肉鸡的肌肉品质存在很大差异,快大型肉鸡的生长速度快,但抗应激能力较差,肉质和风味也很差;地方品种虽生长速度慢,但肉味鲜美、抗逆性强、品质优良^[1]。

DDRT-PCR(Differential display reverse transcription polymerase chain reaction)技术能灵敏地用于检测在组织或细胞中表达量丰度极低的 mRNA 样品的差异表达,能够检测那些彼此相关的 RNA 分子之间的表达差异。mRNA 差异显示技术具有简便、灵敏、高效率和省时等优点,自创立以来,在动物、植物的基因克隆、发现新基因以及对动植物生长发育机理的研究当中广泛应用^[2-6]。

本实验以北京油鸡(Beijing Chicken, *Gallus gallus*)和 AA 肉鸡(Arbor Acres Broiler, *Gallus gallus*)为研究素材,利用 mRNA 差异显示技术对其胸肌组织差异表达基因进行研究,讨论两品种间胸肌组织分子遗传水平上表达的差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

北京油鸡及 AA 肉鸡均来自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所养鸡场,每个品种随机抽取 4 只,公母各 2 只,屠宰后取胸肌组织样,液氮中速冻, -80 保存。

1.1.2 主要试剂

RNA 酶抑制剂和不含 RNA 酶的 DNA- 均购自 TaKaRa(大连)公司;反转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司,总 RNA 提取试剂盒及总 RNA 纯化试剂盒购

自天根公司。

1.1.3 引物

引物由北京奥科公司合成。锚定引物序列为: 5'-AAGCTTTTTTTTTTGG-3'; 5'-AAGCTTTTTTTTTTAA-3'; 5'-AAGCTTTTTTTTTTTC-3'。随机引物序列为: 5'-TACAACGAGG-3'; 5'-TGGTAAAGGG-3'; 5'-GGTACATTGG-3'; 5'-CTGCTTGATG-3'; 5'-GATCTAACCG-3'; 5'-GATCAAGTCC-3'; 5'-CTTTCTACCC-3'; 5'-TGGATTGGTC-3'; 5'-TTTTGGCTCC-3'; 5'-GGAACCAATC-3'。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的抽提及 mRNA 的纯化

按照天根公司总 RNA 提取试剂盒及 RNA 纯化试剂盒提供的方法抽提胸肌组织总 RNA 并纯化,经紫外分光光度计和 1% 变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA。计算 OD_{260}/OD_{280} , 准确定量总 RNA 的浓度和纯度,每个品种中每个样品取 10 μ L RNA 混匀,分别组建 RNA 池。

1.2.2 RT-PCR

反转录操作按照 Promega M-MLV Reverse Transcriptase 使用说明进行。PCR 反应采用低严谨循环与高严谨循环相结合的方法,以降低假阳性,具体操作如下: 94 2 min; 94 30 s, 40 1 min, 72 30 s, 5 个循环; 94 30 s, 45 1 min, 72 30 s, 35 个循环; 72 10 min。同时以 β -actin 基因为阳性对照,并设立了阴性对照。

1.2.3 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染

RT-PCR 反应产物进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V 电压下电泳 7 h, 电泳后采用硝酸银染色法, 染色方法按 Echt 等^[7]方法进行。

1.2.4 差异条带的回收重扩增和反向 Northern dot blot 验证

差异条带用煮沸法进行回收。二次 PCR 反应条件与第一次 PCR 条件略有不同,具体操作如下: 94 2 min; 94 30 s, 40 1 min, 72 30 s, 10 个循环; 94 30 s, 50 1 min, 72 30 s, 30 个循环; 72 10 min。

使用地高辛标记试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit)标记 6 个组合的 cDNA 作为探针。将差异条带的二次 PCR 产物、阴性对照和阳性对照分别与结合地高辛的 cDNA 探针进行反向 Northern dot blot, 取 50 ng 二次扩增的 PCR 产物点于带有正电荷的尼龙膜上, 阴性对照、阳性对照和差异条带的二次 PCR 产物各重复点样两次。后续的反向 Northern dot blot 操作按照试剂盒说明进行。

1.2.5 差异条带的克隆和测序

按照 EZ-T Ligation Kit(康润诚业, 北京)说明书操作, 将经过反向 Northern dot blot 验证的阳性克隆到载体中, 测序由北京奥科生物技术公司完成, 测序引物使用 T7 Promoter Primer, 测序仪用 3730 型。每条差异片段挑取 2 个阳性克隆测序, 测序结果用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 去掉载体序列。

2 结果与分析

2.1 DDRT-PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

经检测, 所提取的 RNA 样品较为完整, 经反转录后, 每组样品分别采用 30 对引物扩增, 每对引物扩增 2 管。反应产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行银染染色。银染结果显示, 每条泳道上约有 10~30 条带, 条带较清晰, 最长条带超过 1 000 bp, 条带主要分布在 100~1 200 bp 之间。部分结果如图 1。

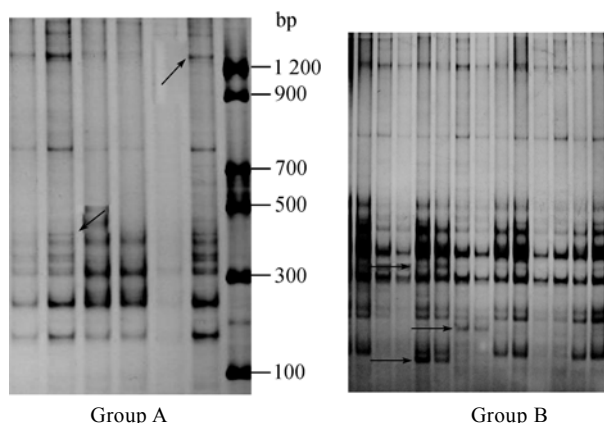


图 1 部分 DDRT-PCR 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 每对引物每组有 2 个重复, 箭头所指为差异条带。

2.3 差异片段的回收和二次 PCR 扩增

实验共回收差异条带 30 条, 二次 PCR 扩增后发

现回收的差异表达条带中有 24 条可以重复扩增, 并且扩增片段大小与差异表达条带一致。经琼脂糖凝胶回收后效果较好, 可以用于下一步反向 Northern dot blot 实验。

2.4 反向 Northern dot blot 验证

为鉴定片段是否为阳性, 采用反向 Northern dot blot 技术验证。通过比较同一片段在 A、B 两组中的杂交信号的有无, 确定是否为阳性差异表达条带。反向 Northern dot blot 结果表明: 共有 7 条差异条带显示为阳性表达, 其中差异条带 S1、S2、S3 仅在北京油鸡(A 组)中表达, 差异条带 S4、S5、S6、S7 仅在 AA 肉鸡(B 组)中表达。杂交结果如图 2。

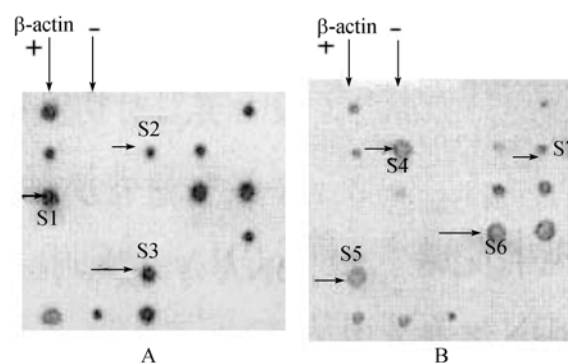


图 2 A 组、B 组探针的反向 Northern dot blot 鉴定结果

A: 北京油鸡胸肌; B: AA 肉鸡胸肌。+: 阳性对照; -: 阴性对照。

2.5 测序及序列比对

将得到的 7 条 ESTs 用 BLASTn 工具对核酸数据库 nr 中所有序列进行了同源性分析。分析结果见表 1。其中 6 条差异条带均找到同源性较高的同源基因。而序列 S7 是一条仅 169 bp 的 cDNA 片段, 无 polyA 尾, 与 GenBank 的 nr 库比对结果表明, 该序列未找到同源基因, 可以确定其在 AA 肉鸡中特异表达, 确定为新发现的 EST(向 NCBI 提交该序列获得登录号: EU594549)。

3 讨论

mRNA 差异显示技术是筛选差异表达基因的有效方法, 样品间的差异越小越有利于相关功能基因的筛选, 因此, 应尽量选择同物种的不同品种或者选取同一品种的不同生长发育时期作为研究对象^[8]。

表 1 差异表达序列与数据库 nr 的核酸序列同源性比较结果

序列	长度 (bp)	同源基因序列号	同源基因	分值	期望值	同源性 (%)
S1	382	NM_001006412.1	原鸡高迁移率族蛋白结合蛋白 3	658	0	98
S2	320	AM071341	原鸡免疫器官 cDNA 克隆片段 C0001608N4_T7	592	5e-166	82
S3	383	CR386625.1	原鸡全序列 cDNA 克隆片段 ChEST294a8	647	0	99
S4	358	NM_001038693.1	原鸡葡萄糖磷酸变位酶 I	601	7e-169	98
S5	308	NM_001038693.1	原鸡葡萄糖磷酸变位酶 I	507	1e-140	97
S6	209	XM_418857.2	预测: 与原鸡富含亮氨酸片段相似影响蛋白质 2 的转录变体 2	385	5e-104	99
S7	169	-	无同源序列	-	-	-

本结果表明, 序列 S1 与高迁移率族蛋白(High mobility group protein, HMGN3)基因有较高的同源性, HMGN3 是 Caldwell 等^[9]在鸡的腔上囊淋巴细胞中发现的 cDNA 全序列, 该序列的发现有助于对 β -细胞特性的深入认识, 有益于研究鸡 β -细胞的分裂对看家基因功能的影响。

HMG 蛋白广泛存在于真核生物细胞中。HMG 蛋白是真核细胞内组蛋白之后含量最为丰富的一组染色质蛋白质, 也是真核细胞基因调控的动力体现者。HMG 蛋白家族可分为 HMGA、HMGB 和 HMGN 三类亚家族, 在染色质的结构与功能及基因表达调控过程中均发挥着重要作用^[10]。

HMGN 在核内快速的运动, 不断和核小体发生碰撞, 与特异性位点结合后对染色质进行修饰, 从而使调节蛋白发生聚集。目前对 HMG 蛋白的结构特征及识别位点的特异性虽有一定了解, 但对其具体的作用机制及其信号通路并不清楚。有研究表明, HMGN 蛋白还参与 DNA 损伤的修复过程, 但是其分子机制目前还不清楚。HMGN 蛋白的定位和分布还和细胞的新陈代谢以及细胞周期有关, 最新研究表明, 细胞分裂间期, HMGN 与核小体特异性位点的结合效率较高, 形成一些复合物, 而在细胞分裂中期, HMGN 结合能力降低, 以单体形式出现。这说明 HMGN 与染色质的结合模式依据细胞分裂周期而不断变化^[11]。目前已发现 HMG 框、AT 环等结构域还存在于许多其他蛋白质中。

在鸡的全基因组数据库中并未找到序列 S2 的同源基因, 但通过与 nr 库的序列比对发现, 该序列与 Chicken immune 5-CSEQRBN30 基因有 82% 的相似性, 目前尚无该序列的相关功能信息。而序列 S3 与已知基因 ChEST294a8(CR386625.1)同源性高达 99%, 可以认为是该基因的同源基因, 该基因是从莱航鸡

ChEST294a8 基因的 cDNA 序列克隆得来的, 其功能及其他信息尚未见报道, 仍需要作进一步的研究。

对序列 S4 和 S5 的研究发现, 二者与鸡的磷酸葡萄糖变位酶 均有较高的相似性。磷酸葡萄糖变位酶

可促进糖原分解, 糖原分解过程中被释放出来的葡萄糖-1-磷酸在磷酸葡萄糖变位酶的作用下转变为葡萄糖 6-磷酸, 并进入机体组织的能量循环当中。

比对结果显示, 序列 S6 与 GenBank 中登录号 (XM_418857.2) 的基因序列同源性高达 99%, 可以认为序列 S6 是该基因的同源基因。而该已知基因是依据 GenBank 数据库提供的另一段基因序列 (NW_001471633) 通过计算机基因预测方式得到的, 定位在第 2 号染色体上, 研究表明, 该基因和 LRR FLI-I 基因功能相似, 在体内与肌动蛋白相互影响^[12, 13]。本实验所得的 EST 信息也验证了该段序列确实存在于鸡的基因中, 这也说明利用现有数据库通过假设方法可以得到一些未知的新基因。

LRR 为富含亮氨酸重复片段(Leucine-rich repeats, LRRs), 参加蛋白-蛋白互作, 在分子识别过程中发挥重要的作用^[14, 15]。根据胞外区 LRRs 组成方式的不同, 判断 LRR FLI-I 可能是 LRRs 的一个亚族 (LRR ~)^[16]。有研究表明, LRR 结构域具有抑制细胞异常增生的功能以及能够使机体对某些药物产生耐药性的特性^[17, 18]。而序列 S7 在数据库中未找到同源基因, 该序列在 AA 肉鸡中特异表达, 相关功能及特性仍需进一步研究。

本实验过程中, 由 DDRT-PCR 产生差异显示条带的过程相当快捷, 然而差异显示 EST 的鉴定是研究者面临的一大挑战。Poirier 等^[19]认为, 差显的主要障碍不在于其技术本身, 而在于差显后如何区分假阳性与真正差异表达的 mRNA。据 Sompayrac 等^[20]报道, 差异显示技术产生的片段长度较短(100~500

bp)且假阳性会高达 50%~70%, 以及引物复性温度过低, 不利于扩增等问题。鉴于此, 许多研究者都对差异显示 EST 的鉴定进行了各种探讨, 并提出了行之有效的办法^[21], 包括李子银等^[22]提出的反向 Northern dot blot 等方法。mRNA 差异显示技术的建立为新基因的发现及特定生理或病理过程机制的研究提供了方便, 已被广泛地应用于动物生理学、病理学和动物遗传育种研究中, 并取得了较大的进展。本实验利用 mRNA 差异显示技术所筛选的差异表达基因, 约有一半以上其功能未知, 这需要研究者继续从基因的转录水平着手研究基因的表达, 解开基因表达调控的奥秘, 探讨差异表达基因间的内在联系与规律, 研究造成不同品种鸡肌肉组织表达差异的遗传机理。

参考文献(References):

- [1] 刘华贵, 徐淑芳. 北京油鸡及其开发利用. 家畜生态, 2001, 22(4): 50-52.
- [2] Goossens K, Van Soom A, Van Poucke M, Vandaele L, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman LJ. Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 64. [\[DOI\]](#)
- [3] Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Ono Y, Uno KD, Yamada RG, Ueda HR, Saitou M. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): e42. [\[DOI\]](#)
- [4] Bogacka I, Przyla J, Siawrys G, Kaminski T, Smolinska N. The expression of short form of leptin receptor gene during early pregnancy in the pig examined by quantitative real time RT-PCR. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57(3): 479-489.
- [5] Holding C, Bolton V, Monk M. Detection of human novel developmental genes in cDNA derived from replicate individual preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(9): 801-809. [\[DOI\]](#)
- [6] Zhang J, Turley RB, Stewart JM. Stewart. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(3): 553-561. [\[DOI\]](#)
- [7] Echt CS, May MP, Hsieh M, Zahorchak R. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, 1996, 39(6): 1102-1108. [\[DOI\]](#)
- [8] Hwang KC, Lee HY, Cui XS, Kim JH, Kim NH. Identification of maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: a comparison with the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev*, 2005, 70(3): 314-323. [\[DOI\]](#)
- [9] Caldwell RB, Kierzek AM, Arakawa H, Bezzubov Y, Zaim J, Fiedler P, Kutter S, Blagodatski A, Kostovska D, Koter M, Plachy J, Carninci P, Hayashizaki Y, Buerstedde JM. Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biol*, 2005, 6(1): R6. [\[DOI\]](#)
- [10] 肖湘文, 周建林, 周畅. 高迁移率族蛋白. 细胞生物学杂志, 2006, 28: 501-506.
- [11] Cherukuri S, Hock R, Ueda T, Catez F, Rochman M, Bustin M. Cell cycle dependent binding of HMGN proteins to chromatin. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 1816-1824. [\[DOI\]](#)
- [12] Fong KS, de Couet HG. Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics*, 1999, 58(2): 146-157. [\[DOI\]](#)
- [13] Wilson SA, Brown EC, Kingsman AJ, Kingsman SM. TRIP: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(15): 3460-3467. [\[DOI\]](#)
- [14] Walker JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(5): 1599-1609. [\[DOI\]](#)
- [15] Lee YH, Stallcup MR. Interplay of Fli-I and FLAP1 for regulation of beta-catenin dependent transcription. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(18): 5052-5059. [\[DOI\]](#)
- [16] Shiu SH, Bleecker AB. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 530-543. [\[DOI\]](#)
- [17] Vourc'h P, Moreau T, Arbion F, Marouillat-Védrine S, Müh JP, Andres C. Oligodendrocyte myelin glycoprotein growth inhibition function requires its conserved leucine-rich repeat domain, not its glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Neurochem*, 2003, 85(4): 889-897.
- [18] Genest PA, Haimeur A, Légaré D, Sereno D, Roy G, Messier N, Papadopoulou B, Ouellette M. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in Leishmania infantum amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 2008, 158(1): 95-99. [\[DOI\]](#)
- [19] Poirier GM, Pyati J, Wan JS, Erlander MG. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(4): 913-914. [\[DOI\]](#)
- [20] Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG, Danna KJ. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(22): 4738-4739. [\[DOI\]](#)
- [21] Kim TW, Kim HJ, Lee C, Kim HY, Baek SH, Kim JH, Kwon KS, Kim JR. Identification of replicative senescence-associated genes in human umbilical vein endothelial cells by an annealing control primer system. *Exp Gerontol*, 2008, 43(4): 286-295. [\[DOI\]](#)
- [22] 李子银, 陈受宜. mRNA 差异显示阳性 cDNA 克隆的快速筛选与鉴定. 高技术通讯, 1999, 8: 44-48.