

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01219

延边黄牛背最长肌差异表达基因的筛选、克隆及序列分析

田万年¹, 张守发², 李香子², 高青山², 金鑫², 严昌国²

1. 吉林农业科技学院动物科学学院, 吉林 132101;

2. 延边大学农学院, 延吉 133002

摘要: 应用引物复性控制技术筛选肌肉脂肪含量差异极显著的延边黄牛背最长肌组织差异表达基因, 寻找与肌肉脂肪沉积的相关候选基因。文章选取 30 头 28 月龄延边黄牛阉牛的背最长肌组织测定肌肉脂肪含量, 选取肌肉脂肪含量差异极显著的最高和最低各 3 头组成 RNA 池, 采用引物复性控制技术, 分析了两组个体背最长肌组织差异表达基因。利用 20 对随机引物差异显示扩增下, 共获得 12 条 ESTs(片段大小为 200~890 bp), 其中 8 个为已知的 ESTs 分别与细胞骨架形成、细胞因子信号转导、蛋白质合成、能量代谢和其他功能的差异基因, 4 个未知的 ESTs。结果表明, 应用引物复性控制技术筛选得到了 12 个可能参与了肌肉脂肪沉积调控的 ESTs, 为进一步筛选肌肉脂肪沉积相关的基因奠定了基础。

关键词: 延边黄牛; 背最长肌; 肌肉脂肪; 引物复性控制技术; 差异表达基因

Screening, cloning and sequence analysis of the differential expression genes in *Longissimus dorsi* of Yanbian Yellow Cattle

TIAN Wan-Nian¹, ZHANG Shou-Fa², LI Xiang-Zi², GAO Qing-Shan², JIN Xin²,
YAN Chang-Guo²

1. College of Animal Science, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China;

2. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, China

Abstract: Annealing control primer (ACP) system was applied to find candidate genes related to lipidosis in muscle of Yanbian yellow cattle by screening differentially expressed genes (DEGs) in *Longissimus dorsi*, which had significant difference on intramuscular fat (IMF) content. Thirty steers, aged at 28 month-bullocks were selected to measure the IMF content in *L. dorsi*. Two groups of bullocks (three heads per group) with the highest and the lowest contents of IMF were selected to build a RNA pool, and DEGs of two groups were analyzed by ACP system. Twelve DEGs were identified and sequenced by amplification with 20 arbitrary primers (fragment sizes were 200–890 bp). In these genes, eight were already known as functional groups of cytoskeleton, cytokine signal transduction, protein synthesis, energy metabolism, and others, four were unknown. All the 12 ESTs were screened by ACP system, which may participated in regulating on lipidosis in muscle. This study established a foundation for further screening of lipidosis related genes.

收稿日期: 2010-12-30; 修回日期: 2011-03-22

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2008BADB2B01)资助

作者简介: 田万年, 博士研究生, 专业方向: 黄牛育种。E-mail: wannian2000@hotmail.com

通讯作者: 严昌国, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: ycg@ybu.edu.cn

网络出版时间: 2011-8-5 10:51:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110805.1051.001.html>

Keywords: Yanbian yellow cattle; *Longissimus dorsi*; intramuscular fat; annealing control primer (ACP) system; differential expression genes(DEGs)

肌内脂肪(Intramuscular fat, IMF)是形成牛肉大理石花纹的物质基础,也是影响肉质风味的重要因素。IMF含量影响着肉质的嫩度、风味和多汁性^[1]。10%左右肌内脂肪含量,可产生理想的大理石花纹,可形成优质高档牛肉。IMF含量属于数量性状,其遗传基础受多基因控制,通过对IMF含量进行遗传改良,可提高牛肉品质。由于IMF含量在活体中的测定有一定难度,故常规育种的方法选育肌内脂肪进展缓慢。筛选影响肌内脂肪沉积调控相关的基因,为牛育种中的辅助标记选择提供候选基因。目前,对牛肌内脂肪沉积主效基因的研究还处于初始阶段,对影响肌内脂肪含量的主效基因尚未完全确定,有些候选基因研究还不够透彻。2007年,Seung等^[2,3]研究了韩牛在12月龄和27月龄背最长肌中差异表达基因进行了鉴定;并筛选了高、低大理石花纹肉的肝脏中差异表达的基因。不同肌内脂肪含量个体肌肉组织基因的表达模式存在差异,这种差异的存在使得通过mRNA差异显示技术鉴定肌内脂肪关键调控基因成为可能。本试验采用引物复性控制技术鉴定筛选延边黄牛肌内脂肪含量差异极显著的两组个体背最长肌组织差异表达基因,并进行序列分析,为进一步筛选肌内脂肪沉积调控相关的候选基因提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选用吉林省珲春天一牧场30头28月龄延边黄牛阉牛。屠宰后采取背最长肌,每次采样的部位保持一致,一部分置于液氮中速冻,−70℃保存;一部分保存于−20℃,用于测定IMF含量。从30个实验样本中选取肌内脂肪含量最高和最低的个体各3个组成两组,用于引物复性控制技术的两组个体肌内脂肪平均值为17.58%±0.14%和5.16%±0.32%($P<0.01$)。

1.2 方法

1.2.1 背最长肌组织总RNA提取及纯化

用Trizol提取(Invitrogen公司)肌肉总RNA。将

所提取RNA用紫外分光光度计检测RNA量和纯度,所用RNA的 A_{260}/A_{280} 均在1.8~2.0之间。使用不含RNase的处理,常规方法再次提纯,溶于DEPC处理水中。

1.2.2 引物复性控制技术PCR

cDNA第1链合成:纯化后的总RNA,以oligo(dT15)ACP为3'端引物逆转录合成cDNA第1链。总反应体系为20 μL:总RNA 2 μg, 10×buffer 4 μL, dNTP(2.5 mmol/L), dT-ACP1 2 μL, RNase Inhibitor 0.5 μL, superscript 反转录酶 1 μL。置42 60 min, 94 5 min, 冰上 5 min 终止反应。逆转录产物用灭菌去离子水5倍稀释,−70 保存待用。

Gene Fishing PCR:分别以随机引物ACP₁₋₂₀同dT-ACP2组合进行PCR反应。总反应体系为50 μL: dT-ACP2(1 μmol/L), 随机引物(1 μmol/L), dNTP (200 μmol/L), 10×PCR buffer, Taq酶(2.5 U), cDNA模板(5 μL)。反应条件:94 1 min, 50 3 min, 72 1 min, 1个循环;94 40 s, 65 40 s, 72 1 min, 40个循环,72 5 min, 4 保存。PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳,凝胶分析系统照相。

1.2.3 差异片段回收及克隆测序

紫外灯下切割差异条带, QIA quiet Gel extraction kit (Invitrogen公司)回收纯化,克隆入pCR[®]2.1-TOPO[®]载体(Invitrogen公司),转化DH5感受态细胞(TaKaRa公司),进行经典的蓝白斑筛选,阳性克隆质粒送往上海英俊公司进行测序。测序结果去除载体序列后与NCBI的NR库和ESTs库进行同源性比对。

1.2.4 实时定量PCR检测部分差异基因

为了进一步验证差异基因表达水平,从30个实验样本中选取肌内脂肪含量最高和最低的个体各3个组成两组,以β-actin为内参,对其中的4个基因进行实时定量分析,根据荧光定量PCR引物设计原则应用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1)。提取总RNA后,采用Prime Script[™] RT-PCR试剂盒

表 1 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
肌联蛋白(Titin , <i>TTN</i>)	F: TGATGAAAGTCAGTGCTGAAAGT R: GCAGAAACAAACCTCCCATAC	129
α -肌动蛋白 1 (Actin, alpha 1, <i>ACTA1</i>)	F: CTGCCGCAAACTGACACACTG R: ACGCAGCAAAACAGAACGGC	133
细胞因子信号负调控因子-12(Ankyrin repeat and SOCS box-containing 12, <i>ASB12</i>)	F: ACATCTACCTTCCATCTCTCTG R: TCTGCGGATAACTAAACGAG	125
谷氨酰 tRNA 合成酶(Glutamyl tRNA Synthetase, <i>GtS</i>)	F: ACACCTTGTTTCGGTCGTagT R: AAATTGTCTCTATCTGGGAAGA	110
β -actin	F: ATTTCTGTCTTGGCCGGTCT R: TCAAGGCAAGTAACCAGAACAC	113

(TaKaRa 公司)制备 cDNA, 然后用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™]试剂盒(TaKaRa 公司)在 Mx3000P PCR 仪上进行实时定量 PCR 反应, 每个样品重复测定 3 次。通过计算各个样品目的基因的 C_t 值和各自内参 β -actin 的 C_t 值的差值(C_t), 以 2^{-C_t} 计算各个目的基因相对于内标基因的比值, 分析各个样品中目的基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 肌内脂肪差异显著的两组延边黄牛阉牛背最长肌差异表达的基因

使用 20 条随机引物和 2 条 oligo(dT)锚定引物组合进行引物复性技术 PCR, 比较了肌内脂肪含量差异极显著的两组个体差异表达基因。根据引物复性控制技术 PCR 凝胶电泳结果, 筛选出 12 条差异表达片段进行回收、克隆和测序, 片段长度在 200 ~ 890 bp, 其中 4 个基因在高肌内脂肪含量组表达上调, 8 个基因表达下调(图 1)。

2.2 阳性克隆测序及 EST 序列分析

对 12 个克隆测序结果进行序列分析, 结果显示其中 4 个基因在高肌内脂肪含量组中表达水平被上调, 8 个基因在低肌内脂肪含量组中表达被下调(表 2)。按已知功能将其分为 5 类:(1)核糖体蛋白 S14、S26 和 RPLP1 参与核糖体构建, 与蛋白质合成密切相关;(2)细胞色素氧化酶亚单位 4 参与线粒体呼吸链电子传递, 与细胞能量代谢密切相关;(3)TTN、ACTA1 为细胞骨架形成相关基因;(4)ASB12 参与细胞信号转导; 5)GtS 为未知功能蛋白。

2.3 实时定量 PCR 检测部分差异基因

实时定量 PCR 检测结果显示, 两组间肌内脂肪

含量分别为 13.26%±0.28%和 4.65%±0.18%($P<0.05$)。*ASB12* 和 *TTN* 在高肌内脂肪含量组中的 mRNA 表达丰度分别较低肌内脂肪含量组提高了 3.4 和 2.6 倍, 而 *GtS* 和 *ACTA1* 在低肌内脂肪含量组中的 mRNA 表达丰度分别较高肌内脂肪含量组提高了 1.5 和 1.9 倍。所验证的 4 个基因的差异倍数经 t 检验均达到显著水平($P<0.05$), 结果见图 2。

3 讨论

DDRT-PCR 技术是 Liang 等^[4]1992 年提出的一种检测基因转录模式的方法, 该方法假阳性高和重复性低的缺陷又使得此项技术的应用受到一定程度的局限。引物复性控制技术具有快速、高效、重复性好的特点, 成为研究基因差异表达的重要手段^[5]。引物复性控制技术复性控制引物由独特的 3 部分组成, 3'端和 5'端部分由中间的调节部分连接。5'端部分是核心部分, 能与模板完全互补; 中间部分为多聚脱氧次黄苷[poly(dI)], 一般由 5 个脱氧次黄苷(dI)组成, 在控制引物的复性温度起着关键的作用。由于引物中间的 poly(dI)部分可阻止 5'端的通用引物序列与模板的非特异性结合, 使试验结果具有较高的重复性^[6,7]。

本试验在同一饲养水平的条件下, 应用引物复性控制技术在肌内脂肪含量差异极显著的两组个体延边黄牛阉牛背最长肌中共获得 12 条表达序列标签。实时定量 PCR(Fluorescent quantity PCR, FQ-PCR)是近年来的对模板 DNA 进行定量研究的方法, 具有可实时监测、高特异性、高灵敏性和高精确性的特点, 是目前用于检测基因差异表达的一种快速有效的方法^[8]。本试验应用 FQ-PCR 技术检验了 4 个差异表达基因与肌内脂肪含量之间的关系, 结果表明

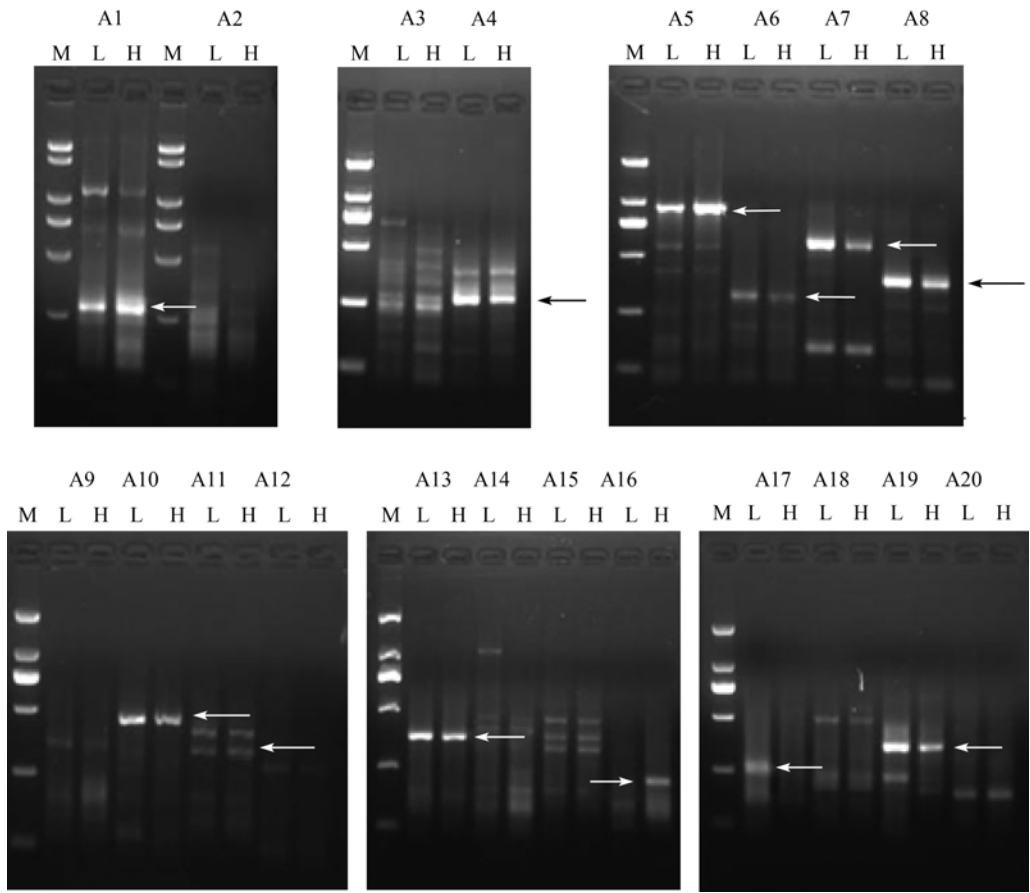


图 1 不同肌内脂肪含量延边黄牛背最长肌 mRNA 差异表达琼脂糖凝胶电泳结果
M : DL2000 Marker; A1~A20 : 随机引物; L : 低肌内脂肪含量组; H : 高肌内脂肪含量组。图中箭头表示不同肌内脂肪含量背最长肌中差异表达的片段。

表 2 差异表达基因的序列相似性及特征分析

克隆代号	GenBank 登录号	同源基因	同源性(%)	表达模式
A1	BC122821	<i>Bos taurus ASB12</i>	218/218(100%)	上调
A4	NM_174225	<i>Bos taurus ACTA1</i>	204/204(100%)	下调
A5	XM_002685260	<i>Bos taurus TTN</i>	894/894(100%)	上调
A7	NM_001003902	<i>Bos taurus RPS14</i>	583/585(99%)	下调
A8	BC102695	<i>Bos taurus RPLP1</i>	339/339(100%)	下调
A10	NM_001015561	<i>Bos taurus RPS26</i>	405/407(99%)	下调
A13	NM_001001439	<i>Bos taurus COX4</i>	345/345(100%)	下调
A19	XR_082942	<i>Bos taurus GtS</i>	295/297(99%)	下调
A11			193	上调
A6			285	下调
A16			61	上调
A17			166	下调

注：上调、下调指高肌内脂肪含量组。

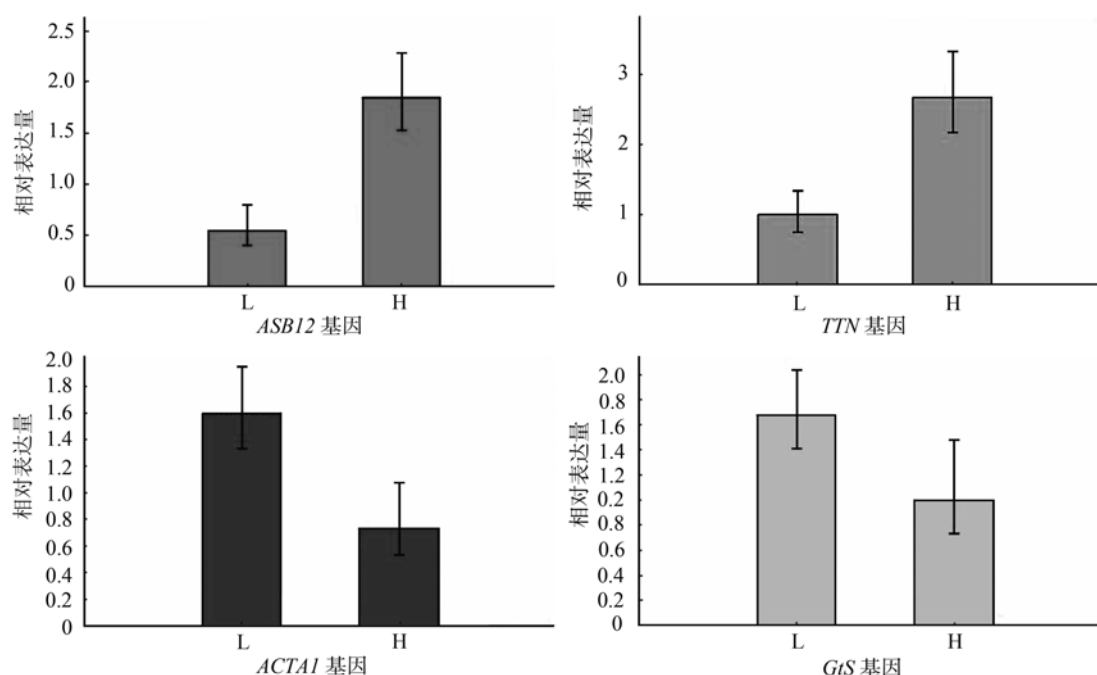


图 2 4 个基因的实时定量 PCR 结果

M: DL2000 Marker; L: 低肌内脂肪含量组; H: 高肌内脂肪含量组。

其表达差异均在 1.5 ~ 3.5 之间, 鉴定的 4 个基因可作为牛肌内脂肪沉积的候选基因, 做进一步的分析研究。

在筛选到的差异基因中, *TTN* 和 *ACTA1* 基因与肌纤维的结构密切相关。*TTN* 是已知最大的脊椎动物蛋白, 该蛋白可促进肌纤维的延伸。*TTN* 具有复杂的分子折叠的功能, 主要参与糖代谢、蛋白氨基酸磷酸化、肌收缩、调控横纹肌收缩、蛋白氨基酸自磷酸化等能影响骨骼肌正常的生理功能^[9-10]。Wimmers 等^[11] 研究, 发现 *TTN* 基因与猪肉肉色、pH 等肉质性状相关。Seung^[12] 等报道 *TTN* 基因在高、低大理石花纹等级牛肉中差异表达。本试验进一步揭示 *TTN* 基因参与了牛肌内脂肪沉积的调控, 建议将该基因作为影响牛 IMF 含量的候选基因进行研究。*ACTA1* 主要分布于骨骼肌细胞内, 是构成骨骼肌肌原纤维细丝的主要蛋白质, 其球形区域上的高度亲和位点与肌球蛋白相结合, 维持肌纤维的结构和功能。在肌细胞内 *ACTA1* 除参与肌球蛋白介导的肌肉收缩, 还参与细胞黏附、信号转导、离子通道调控等复杂的生命活动^[13,14]。Seung 等^[2] 报道 *ACTA1* 在韩牛生长早期、后期阶段背最长肌中差异表达。Huang 等^[15] 研究表明, *ACTA2* 基因与猪生产性状(背膘厚、

瘦肉率、肌内脂肪等)有关, 有关 *ACTA1* 对牛肉肉质性状影响的研究还尚未见报道。本试验中延边黄牛背最长肌 *TTN* 的表达水平与肌内脂肪含量存在显著的正相关关系, 而 *ACTA1* 的表达水平与肌内脂肪含量存在显著的负相关关系, 提示以上两个基因表达水平的变化可能影响了肌纤维的生长发育, 从而影响牛肉的品质。

SOCS 家族是 1997 年发现的一类参与细胞因子信号传导途径中的负调控因子^[16]。SOCS 分子主要通过抑制 JAK/STAT 通路抑制信号转导, 从而调控细胞因子、激素、生长因子作用强度和持续时间^[17], *ASB12* 是该家族的主要成员之一。目前, 有关 ASB 蛋白家族相关研究主要集中在医学领域的肿瘤方面。Wu 等^[18] 报道 *SOCS-3* 基因的 mRNA 表达水平在瘦肉型和和脂肪型猪存在差异, 推测 *SOCS-3* 基因可能影响猪体脂沉积, 有关 *ASB12* 基因对牛肌内脂肪含量影响还尚未见报道。本研究中 *ASB12* 与肌内脂肪含量之间存在正相关关系, 提示 *ASB12* 的表达与牛肌内脂肪沉积性状存在一定的关系, 该基因有望成为肌内脂肪标记辅助选育新的候选基因。*GtS* 是一种催化谷氨酰胺与对应的 tRNA 发生酯化反应形成谷氨酰 tRNA 的蛋白酶。*GtS* 最重要的功能是将谷氨

酸转移到tRNA合成酶上^[19,20]。本研究首次报道了*GtS*与肌肉脂肪含量之间存在负相关关系,然而该基因是否在牛肌肉脂肪沉积调控中发挥着重要的作用,有待于进一步研究证实。另外,有4个未知的ESTs在肌肉脂肪含量高、低组背最长肌中差异表达,这些基因或许在肌肉脂肪调控中发挥着重要的作用。在筛选到的差异基因中,没能筛选到与脂质代谢密切相关的差异基因,其原因可能是只用了20对引物组合进行差异表达研究,所检测的差异片段只是部分与肌肉脂肪沉积相关基因,下一步研究应加大随机引物数量进行筛选。

参考文献(References):

- [1] Hovenier R, Brascamp EW, Kanis E, van der Werf JH, Wassenberg AP. Economic values of optimum traits: The example of meat quality in pigs. *J Anim Sci*, 1993, 71(6): 1429–1433. [DOI](#)
- [2] Lee SH, Park EW, Cho YM, Kim SK, Lee JH, Jeon JT, Lee CS, Im SK, Oh SJ, Thompson JM, Yoon DH. Identification of differentially expressed genes related to intramuscular fat development in the early and late fattening stages of Hanwoo Steers. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(5): 757–764. [DOI](#)
- [3] Lee SH, Park EW, Cho YM, Yoon D, Park JH, Hong SK, Im SK, Thompson JM, Oh SJ. Identification of functional and *in silico* positional differentially expressed genes in the livers of high- and low-marbled Hanwoo Steers. *Asian-Aust J Anim*, 2007, 20(9): 1334–1341. [DOI](#)
- [4] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257(5072): 967–971. [DOI](#)
- [5] Kim YJ, Kwak CI, Gu YY, Hwang IT, Chun JY. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques*, 2004, 36(3): 424–428. [DOI](#)
- [6] Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak CL, Gu YY, Chun JY. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques*, 2003, 35(6): 1180–1184. [DOI](#)
- [7] 谢芳靖, 张子平, 林鹏, 王艺磊. 引物复性技术在差异表达基因克隆中的应用. *海洋科学*, 2007, 31(5): 70–75. [DOI](#)
- [8] 王梁燕, 洪奇华, 张耀洲. 实时定量PCR技术及其应用. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(1): 62–66. [DOI](#)
- [9] Walker JS, de Tombe PP. Titin and the developing heart. *Circ Res*, 2004, 94(7): 860–862. [DOI](#)
- [10] Fukuda N, Granzier HL, Ishiwata S, Kurihara S. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci*, 2008, 58(3): 151–159. [DOI](#)
- [11] Lee SH, Cho YM, Lee SH, Kim NK, Choy YH, Kim KH, Yoon D, Im SK, Oh SJ, Park EW. Identification of marbling-related candidate genes in *M. longissimus dorsi* of high- and low marbled Hanwoo (Korean Native Cattle) steers. *BMB Rep*, 2008, 41(12): 846–851. [DOI](#)
- [12] Wimmers K, Murani E, Te Pas MFW, Chang KC, Davoli R, Merks JWM, Henne H, Muraniová M, da Costa N, Harlizius B, Schellander K, Böll I, Braglia S, de Wit AAC, Cagnazzo M, Fontananesi L, Prins D, Ponsuksili S. Associations of functional candidate genes derived from gene-expression profiles of prenatal porcine muscle tissue with meat quality and muscle deposition. *Anim Genet*, 2007, 38(5): 474–484. [DOI](#)
- [13] Sheterline P, Sparrow JC. Actin. *Protein Profile*, 1994, 1(1): 1–121.
- [14] Luo L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, 18(4): 601–635. [DOI](#)
- [15] 黄京书, 熊远著. 猪*ACTA2*基因的克隆、表达分析及其与生产性状的关联. *遗传*, 2009, 31(5): 489–494. [DOI](#)
- [16] Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 1997, 387(6636): 917–921. [DOI](#)
- [17] 应用真, 王雅杰. 细胞因子信号转导抑制分子与肿瘤关系的研究进展. *癌变·畸变·突变*, 2007, 19(6): 505–507. [DOI](#)
- [18] Wu JW, Wang B, Zhang HW, Yu TY, Yang GS. Different transcription profiles of *SOCS-3*, *ob* and *IGF-I* genes and their possible correlations in obese and lean pigs. *Acta Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(4): 305–310. [DOI](#)
- [19] Freist W, Gauss DH, Ibba M, Söll D. Glutamyl tRNA synthetase. *Biol Chem*, 1997, 378(10): 1103–1117. [DOI](#)
- [20] Martinis SA, Plateau P, Cavarelli J, Florentz C. Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J*, 1999, 18(17): 4591–4596. [DOI](#)