

李红伟, 陈圆, 鲍森, 等. 惠阳胡须鸡 LPL、FASN 基因多态性的研究 [J]. 福建农业学报, 2016, 31 (7): 690—693.
LI H-W, CHEN Y, BAO M, et al. Restriction Fragment Length Polymorphism of LPL and FASN Genes in Huiyang Bearded Chicken [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31 (7): 690—693.

惠阳胡须鸡 LPL、FASN 基因多态性的研究

李红伟¹, 陈圆¹, 鲍森¹, 田庆庆¹, 贺扬¹, 苏耀辉², 邹志冠²

(1. 惠州学院生命科学系, 广东 惠州 516007; 2. 广东金种农牧科技股份有限公司, 广东 惠州 516007)

摘要: 以惠阳胡须鸡为研究对象, 分别以 LPL、FASN 基因为脂肪性状相关的候选基因, 采用限制片段长度多态性 (RFLP) 检测这 2 个候选基因在惠阳胡须鸡中的多态性。研究结果表明, (1) 用限制性内切酶 Hinf I 对 LPL 基因第 8 内含子进行 RFLP 分析, 发现 76.3% 为已报道的 BB 型, 另发现了两种新的基因型, 分别占 1.7% 和 22%, 无 AA 型; (2) 用限制性内切酶 Hae III 对 FASN 基因进行 RFLP 分析, 发现 BB 基因型比例为 64.8%, BC 型 12.24%, CC 型基因型比例 23.4%。B 等位基因频率为 0.7041, C 等位基因频率为 0.2959, B 等位基因频率明显高于 C 等位基因频率。

关键词: 惠阳胡须鸡; LPL 基因; FASN 基因; 限制片段长度多态性

中图分类号: S 831

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2016) 07—690—04

Restriction Fragment Length Polymorphism of LPL and FASN Genes in Huiyang Bearded Chicken

LI Hong-wei¹, CHEN Yuan¹, BAO Miao¹, TIAN Qing-qing¹, HE Yang¹, SU Yao-hui², ZOU Zhi-guan²

(1. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou, Guangdong 516007, China;

2. Guangdong Jinzhong Animal Husbandry CO., Ltd, Huizhou, Guangdong 516021, China)

Abstract: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of LPL and fatty acid synthetase (FASN) genes in Huiyang bearded chickens was obtained to facilitate the selection for dominant genotypes associated with the high-quality meat and fast-growing characteristics in chicken. Genomic DNA was extracted from the chicken blood. The two genes of interest were amplified by PCR. The amplified product of LPL gene was digested by Hinf I, and FASN gene by Hae III, for RFLP analysis. The results showed that (1) in LPL gene, the genotype BB was 76.3%, while the two newly discovered genotypes were 1.7% and 22%, with no AA type detected; (2) in FASN gene, genotype BB, CC, and BC were 64.8%, 23.4%, and 12.24%, respectively, while the frequencies of B and C genes were 0.7041 and 0.2959, respectively.

Key words: Huiyang bearded chickens; LPL gene; FASN gene; restriction fragment length polymorphism;

惠阳胡须鸡, 又名三黄胡须鸡、龙岗鸡、龙门鸡、惠州鸡, 具有胸肌发达、肉质佳但生长速度慢等特点。研究表明, 脂肪酸合成酶 (FASN) 与脂肪性状紧密相关, 在很大程度上决定肉的嫩度、风味和多汁性^[1]。Graciela 等^[2]在 Campero 肉鸡品系群体中对 FASN 基因进行测序、PCR-RFLP 分析, 提出 FASN 是脂肪性状的候选基因。欧阳建华等^[3]研究了 FASN 基因单核苷酸多态性与鸡体重、脂肪沉积性状的关系, 表明 2 个多态性位点与鸡体重、脂肪沉积性状存在一定的相关性。

脂蛋白酯酶 (Lipoprotein Lipase, LPL) 是参与脂肪代谢的关键酶^[4]。已有研究表明, 肌内脂肪含量与肉的嫩度和风味密切相关, 是影响鸡肉质一个重要因素^[5]。LPL 在脂类代谢过程中有着重要的生理和生物学功能, 可能是影响肌内脂肪含量的候选基因。

本研究旨在通过研究胡须鸡中 LPL、FASN 基因多态性, 为今后基因型选择以及提高胡须鸡的养殖经济效益奠定理论基础。

收稿日期: 2015—12—18 初稿; 2016—06—02 修改稿

作者简介: 李红伟 (1972—), 男, 博士, 讲师, 主要从事家禽遗传育种研究 (E-mail: lhwcau@163.com)

基金项目: 广东省普通高校特色创新项目 (自然科学类) (2014KTSCX178); 惠州学院博士启动基金 (156020021)

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸡血样采自广东金种农牧科技股份有限公司惠阳胡须鸡保种场。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 采用北京汇天东方科技有限公司小量全血基因组 DNA 快速提取试剂盒提取, 提取步骤按试剂盒说明。

1.2.2 电泳检测 用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 样品及 PCR 产物进行检测, 电泳体系如下: 琼脂糖凝胶浓度 1.2% (1.2 g 琼脂糖, 100 mL 1×TBE, 2 μL Goldview 染料), 电泳液 1×TBE (108 g Tris, 55 g 硼酸, 0.5 mol·L⁻¹ EDTA (pH8.0) 40 mL 加蒸馏水至 1 000 mL 后稀释 10 倍), 6× Loading buffer 1 μL 与 DNA 样品 1 μL 混匀点样, 电压 100 V, 电泳 80 min 后, 在 WD-9413A 凝胶成像分析仪下观察电泳条带。

1.2.3 PCR 反应 采用北京鼎国生物技术有限责任公司的 2×Taq PCR Green Mix 试剂盒进行 PCR, PCR 反应体系: 2×Taq PCR Green Mix 12.5 μL; DNA 模板 0.5 μL; 上游引物 0.25 μL; 下游引物 0.25 μL; Nuclease-Free 水 11.5 μL。

LPL 基因扩增程序: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 经 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。FASN 基因扩增程序: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 经 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 LPL 基因 PCR 扩增产物的 Hinf I 酶切 酶切体系为 12 μL, 包括以下成分: 8 μL PCR 产物, 1.2 μL 10×Buffer, 2.3 μL 灭菌水, 0.5 μL Hinf I 酶。37℃ 恒温水浴锅 40 min, 80℃ 10 min 灭活酶。酶切产物用 1.2% 凝胶琼脂糖电泳检测, 观察结果。

1.2.5 FASN 基因 PCR 产物的 Hae III 酶切 酶切体系为 20 μL, 包括以下成分: 10.0 μL PCR 扩增产物, 2 μL 10×Buffer, 1 μL Hae III 酶, 7 μL 灭菌水。37℃ 恒温消化 3 h, 用 2% 凝胶琼脂糖电泳检测酶切产物。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

采用北京汇天东方科技有限公司小量全血基因组 DNA 快速提取试剂盒, 取 20 μL 血样提取基因组 DNA。如图 1 所示, 电泳条带较为清晰, 说明

本试验提取的 DNA 完整性较好, 纯度和浓度都较高, 可用于后续的 PCR 扩增。



图 1 胡须鸡基因组 DNA 检测结果

Fig. 1 Genomic DNA extracted from blood of Huiyang bearded chickens

2.2 PCR 扩增结果

从图 2 可知, LPL 基因 PCR 扩增目的片段约为 1.5 kb, 与潘爱銮等^[4] 研究报道一致。并且每一个胶孔的 DNA 荧光带都很明显, 说明 PCR 效果比较理想, 所得到的 PCR 产物可用于下一步酶切试验。由图 3 可以看出, FASN 基因片段, 扩增片段较清晰, 可以确定本次 PCR 扩增结果, 长度与预期结果一致, 产物无杂带, 可以做下一步的酶切反应。

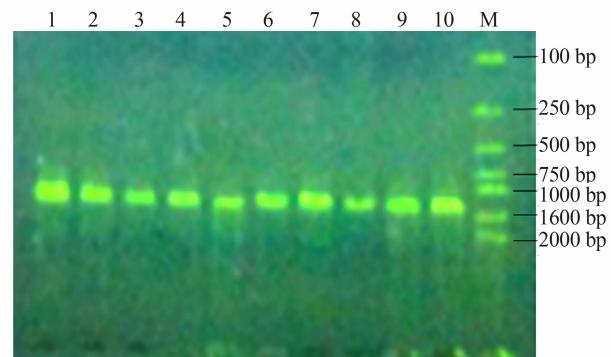


图 2 LPL 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR product amplified from LPL gene

注: ①用 1.2% 凝胶琼脂糖电泳。②M 为 DNA Marker, 1~10 泳道为扩增产物。

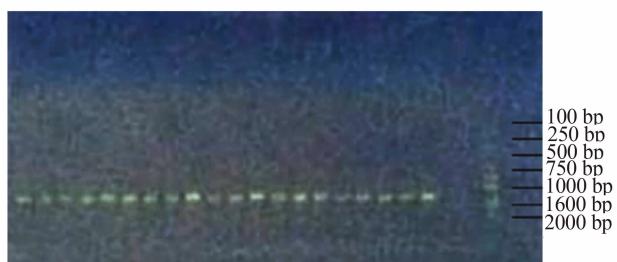


图 3 FASN 基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR product amplified from FASN gene

2.3 酶切结果分析

用 Hinf I 的酶对 LPL 基因 PCR 扩增产物进行酶切结果如图 4。在 59 个样品中有 45 个样品为已

知基因型种类 BB 型，分别是 1~20、22~54 以及 44，共占 76.3%。并未发现 AA 型。

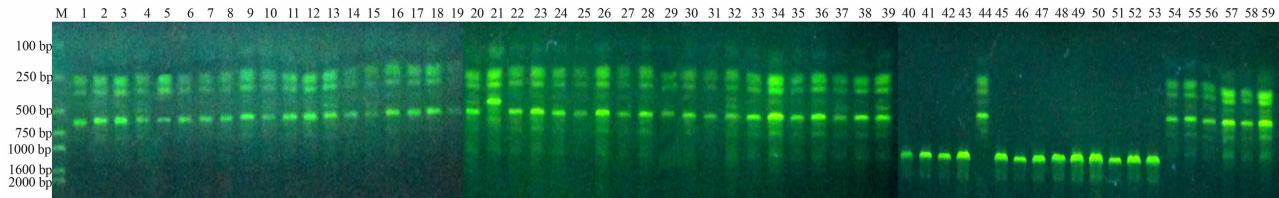


图 4 惠州胡须鸡 LPL 基因 Hinf I -RFLP 结果

Fig. 4 Amplified product of LPL gene digested by Hinf I

注：琼胶凝脂糖浓度浓度为 1.2%，M 为 Marker，1~20、22~39、44、54、55、56、57、58、59 泳道为已报道的 BB 型，21 泳道为新发现的第一种基因型，40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53 泳道为新发现的第二种基因型。

Hae III 酶切结果电泳图，如图 5 所示，FASN 基因有 3 种基因型。参照欧阳建华等的鉴定方法^[3] BB 基因型具有 780、340、305 bp 3 条带；CC 基因型具有 780、340、240、65 bp 4 条带；BC 基因型具有 780、340、305、240、65 bp 5 条带，其中 65 bp 条带在凝胶上不可见。

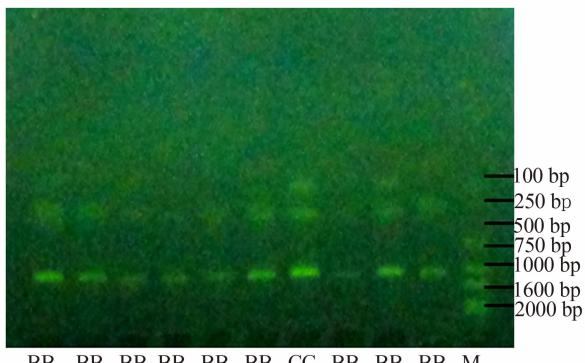


图 5 FASN 基因 Hae III 酶切结果电泳

Fig. 5 Amplified product of FASN gene digested by Hae III

2.4 LPL 基因型频率分析

LPL 的基因型存在 3 种基因型，其中已知 BB 型，新发现 2 种基因型，因此，表明惠州胡须鸡中 LPL 基因不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

2.5 FASN 基因型频率分析

惠州胡须鸡的 FASN 的基因型应用 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验方法，结果如表 1 所示，按自由度=2，查 χ^2 界值表得 $P < 0.05$ ，表明惠州胡须鸡群体中的 FASN 基因不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 1 FASN 基因型的卡方检验

Table 1 Verification table χ^2 of FASN gene

基因型	观测值	预测值	χ^2
BB	63	48.6	48.9
BC	12	40.8	
CC	23	8.6	

3 讨 论

在本研究中，通过 LPL 基因的 RCR-RFLP 分析发现，主要为 BB 型个体，共占 76.3%，并未发现 AA 型个体。而在潘爱銮等^[4] 6 个品种鸡 LPL 基因的 RCR-RFLP 分析发现 A 基因频率占优势，并且与其他品种间的基因型分布差异达到了极显著水平。说明了本次试验结果和潘爱銮等研究结果不一致。这可能是遗传背景不同造成，说明在该公司惠州胡须鸡保种群体 B 基因频率占优势。第 21 号样品出现未知基因型一，其基因频率占 1.7%；这可能是突变导致的新基因型，这与 AA、AB、BB 型都不一样，需要进一步测序检测分析，才能了解该基因型。第 40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53 号样品呈现未知基因型二，其基因频率占 22%，从电泳结果表明这些个体的 DNA 的 PCR 产物用 Hinf I 酶切不开，这可能是新的突变导致酶切位点的改变，需要进一步深入研究。

FASN 基因型和等位基因频率统计结果表明，惠州胡须鸡以 BB 基因型和 B 等位基因占明显优势，频率分布分别为 0.642 8 和 0.704 1。魏伍川等^[6] 研究了湛江三黄鸡 FASN 不同基因型与腹脂

肪性状的相关性, 结果表明 FASN 基因位点为 CC 基因型个体的腹脂率低于 BB 和 BC 基因型鸡的。而以往的研究报道^[2]表明, BB 基因型脂肪沉积能力强且增重快, 所以在进一步的研究中, 需要做不同基因型与胡须鸡生长性状之间的关联分析, 找出增重较快的优势基因型, 应用于基因型选择。

参考文献:

- [1] 魏伍川, 刘欣, 陈耀玲. 湛江三黄鸡 2 个脂肪性状相关基因的多态性及其与屠宰腹脂性状的相关分析 [J]. 广州农业科学, 2013, (2): 95—98.
- [2] GRACIELA M, FELISAROZEN, GABRIEL B D, et al. New polymorphism of FASN gene in chicken [J]. J Appl Genet, 2004, 45: 453—455.
- [3] 欧阳建华, 谢亮, 刘杰, 等. 鸡 FASN 基因 2 个位点的多样性及其与体重、脂肪沉积性状的相关性 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38 (1): 25—30.
- [4] 潘爱銮, 6 个品种鸡 LPL 基因的 RCR-RFLP 分析 [J], 中国家禽, 2004, 8 (1): 152—154.
- [5] 李俊英, 李慧峰, 姜润深, 等. 优质鸡肌内脂肪含量与屠体及肉质性状间的关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40 (12): 12—15.
- [6] 魏伍川, 林丽清, 杨清莲. 鸽 FASN 基因的部分序列测定及其与家鸡同源序列的比较 [J]. 湛江师范学院学报, 2013, 3: 103—108.

(责任编辑: 林海清)