

石 浩,徐亚欧,梅 寒,等. 米易鸡 *ADSL* 基因第 2 和第 9 外显子多态性与肌苷酸含量的关联[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):29-32.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.008

# 米易鸡 *ADSL* 基因第 2 和第 9 外显子多态性与肌苷酸含量的关联

石 浩,徐亚欧,梅 寒,王 海,刘红丽,左 斌,聂晓庆,胡卫民

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

**摘要:**为了检测米易鸡 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子的单核苷酸多态性并分析该多态性与胸肌肌苷酸含量的关联性,以四川省优质地方鸡种米易鸡为研究对象,采用高效液相色谱测定米易鸡胸肌肌肉肌苷酸的含量,并运用测序技术测定了 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子的单核苷酸多态性。结果表明:*ADSL* 基因在外显子 2 (A3713G、C3797T),外显子 9 (C10191T) 处出现 3 个 SNP 位点,变异引起相应的氨基酸均为同义变异,第 2 外显子 A3713G 位点的基因型为 AA、GG、AG 型;C3797T 位点的基因型为 CC、CT、TT 型;第 9 外显子的 C10191T 位点的基因型为 CC、CT 型。经独立性检验,*ADSL* 基因 A3713G、C10191T 位点变异处于 Hardy - Weinberg 平衡状态;应用最小二乘法对基因型与肌苷酸含量进行分析,说明 *ADSL* 第 9 外显子 C10191T SNP 位点与 IMP 含量存在显著相关性 ( $P < 0.05$ ),CT 型个体的胸肌肌苷酸含量高于 CC 型个体,初步推测米易鸡中 *ADSL* 基因第 9 外显子 C10151T SNP 位点 CT 型为优势基因型。

**关键词:**米易鸡;肉质风味;育种改良;肌苷酸(IMP);*ADSL* 基因;SNP;外显子 2;外显子 9;多态性;相关性

**中图分类号:** S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0029-03

目前国内外的大量研究表明,鸡肉内的肌苷酸含量在很大程度上影响其肉质风味及性状<sup>[1-2]</sup>,但是肌苷酸含量又受多种因素的影响,常规选育进展较慢,因此利用与肌苷酸含量相关的候选基因,应用分子标记辅助选择加快遗传研究进展是当前较为有效的手段,可以在分子水平对肉鸡的肉质风味进行育种改良。肌苷酸(inosine monophosphate, IMP)是衡量肌肉肉质风味性状的重要指标之一,在体内肌苷酸从头合成过程涉及 10 种关键酶,这 10 种关键酶由 5 个基因编码<sup>[3-5]</sup>,即 *GPAT* 基因、*AIRC* 基因、*ADSL* 基因、*GARS - AIRS - GART* 基因、*PURH* 基因。其中 *ADSL* 基因是嘌呤核苷酸合成过程中的关键酶之一,催化 2 个重要反应:(1)由氨基咪唑琥珀基氨甲酰核苷酸(SACIAR)生成氨基咪唑氨甲酰核苷酸(AICAR)的反应;(2)由腺苷酸琥珀酸生成腺苷酸单磷酸的反应,这 2 个反应对于最终的肌肉肌苷酸含量具有重要的影响。Aimi 等克隆了鸡 *ADSL* 基因的 cDNA 全长序列并将其定位于 1 号染色体上,长 15 593 bp,包含 13 个外显子和 12 个内含子,转录为长 1 520 bp 的 mRNA (NM-205529.1),翻译成含有 459 个氨基酸的蛋白质序列(NP-990860.1)<sup>[6]</sup>。季从亮以 *ADSL* 基因作为 IMP 含量的候选基因,对 5'侧翼序列、所有外显子和部分内含子单核苷酸多态位点进行检测,共检测到 5 个 SNP

位点,并发现部分突变位点与胸肌肌苷酸含量相关<sup>[7]</sup>。

“米易鸡”是四川省的优良地方鸡种之一,其体型较大,具有早期生长速度快、肉用性能较好、性情温顺、便于饲养管理、肉质风味佳等优点。为研究米易鸡肉质风味好的特点,本研究拟采用测序技术检测米易鸡 *ADSL* 基因外显子 9 的单核苷酸多态性,并与米易鸡肌苷酸含量间进行关联研究,以探讨在米易鸡内 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子的多态性与肌苷酸含量间的关系,为米易鸡的优良肉质风味选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

于四川省攀枝花市米易鸡专业养殖户购入脱温鸡苗 64 羽(公母各半),全阶段由专人管理,单笼饲养,管理和营养水平一致,自由饮食。分别在 81、119、153、210 d 进行屠宰性能测定,真空采血管(EDTA·K2 抗凝,江苏康健医疗用品有限公司生产)翅下静脉采血,每羽采血约 2 mL,置于 -20℃ 冷冻保存备用。屠宰时同时采集胸肌和腿肌, -80℃ 保存备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 血液中 DNA 提取和检测** 用 AXYGEN 血液基因组(Axygen 公司生产)DNA 提取试剂盒提取血样中的基因组 DNA,经 PCR 仪(型号:AG22331 Hamburg,德国 Eppendorf 公司生产)扩增、琼脂糖凝胶电泳(电泳仪型号:DYCP-31DN 型,北京六一仪器厂生产)和紫外-可见分光光度计(型号:Cary 50,美国 Varian 公司生产)检测纯度, -20℃ 保存备用。

**1.2.2 引物设计、PCR 扩增及测序** 根据笔者所在实验室对 *ADSL* 基因的研究结果<sup>[8-9]</sup>及 *ADSL* 基因信息(GenBank 登录号:AY665559),用 Primer5.0 设计特异性引物,由上海英骏生物技术有限公司合成,扩增该基因含有 SNP 位点的第 2、第 9 外显子特异性序列,引物序列及产物片段长度见表 1。

收稿日期:2014-12-13

基金项目:四川省应用基础项目(编号:2013JY0044);四川省畜禽育种攻关项目(编号:2011NZ0099-6);西南民族地区主要地方鸡种遗传资源研究项目(编号:2012NFW001);西南民族大学研究生创新型科研项目(编号:CX2014SZ106)。

作者简介:石 浩(1989—),男,山东泰安人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:sgb649132061@163.com。

通信作者:徐亚欧,硕士,教授,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:xuyaou@163.com。

表 1 ADSL 引物序列及产物大小

基因座	SNP 位点	引物序列	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
ADSL (AY66555)	3797	5'-CTTTCTCCTCCGCAGTCAC-3'; 5'-AGCACCTACGTCTTCGTTTT-3'	279	52
	10191	5'-CTATGCCTTACAAGAGGAATC-3'; 5'-TTTCATCAAGACGGTAACC-3'	255	57

PCR 扩增体系 (25 μL) 为: 9.5 μL 超纯水 (超纯水系统型号: 艾柯 AKHL-III-24, 成都康宁实验专用纯水设备厂生产)、各 1 μL 上下游引物 (10 μL, 浓度 10 μmol/L, 上海英骏生物技术有限公司合成)、1 μL DNA 模板 (100 μg/μL)、12.5 μL Master Mix [天根生化科技 (北京) 有限公司]。

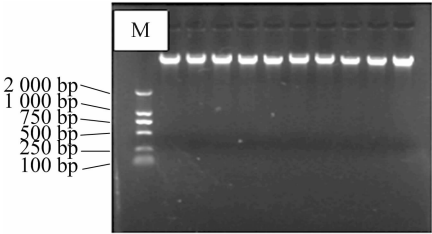
PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃/57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的亮度和纯度。根据琼脂糖凝胶电泳检测结果, 将所有 PCR 产物送至上海英骏生物技术有限公司进行双向序列测定。

1.2.3 肌苷酸含量的测定 参照陈国宏等的高效液相色谱法<sup>[10]</sup>测定肌肉肌苷酸含量。

2 结果与分析

2.1 鸡基因组 DNA 抽提结果

从试验鸡群血液中提取基因组 DNA, 使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 与相同上样量的 DL2000 marker [天根生化科技 (北京) 有限公司] 比较。图 1 结果显示, 条带清晰明亮, 大约 40 kb, 且无扫尾现象, 浓度较均匀, 表明所提取 DNA 质量较好, 含杂质较少, 完全符合 PCR 试验要求。

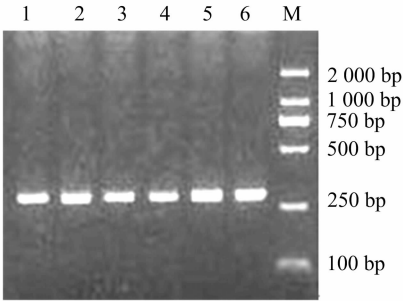


M 为 DL2000 DNA marker

图 1 米易鸡基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

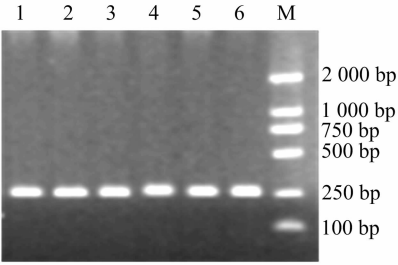
2.2 PCR 扩增结果

利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分别对 ADSL 基因第 2、第 9 外显子扩增片段进行检测, 由图 2、图 3 可见, 在 279、255 bp 处分别呈现出 1 条特异性的条带, 表明引物特异性较好。



M—DNA marker 2000; 1~6—米易鸡 ADSL 基因外显子 2 的 PCR 结果

图 2 ADSL 基因外显子 2 PCR 产物电泳结果



M—DNA marker 2000; 1~6—米易鸡 ADSL 基因外显子 9 PCR 结果

图 3 ADSL 基因外显子 9 PCR 产物电泳结果

2.3 测序结果

将 PCR 扩增的特异片段进行测序, 通过测序反应检测到米易鸡 ADSL 基因第 2 外显子存在 A3713G、C3797T 变异, 第 9 外显子存在 C10191T 变异, 但都未引起相应氨基酸的变异。由图 4、图 5、图 6 的测序结果可知, 米易鸡 ADSL 基因第 2 外显子 A3713G 位点的基因型为 AA、GG、AG 型; C3797T 位点的基因型为 CC、CT、TT 型; 第 9 外显子的 C10191T 位点的基因型为 CC、CT 型。

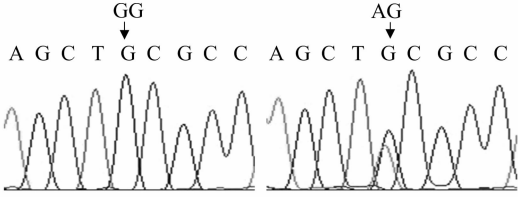


图 4 ADSL 基因第 2 外显子 A3713G 中 AA、GG 型测序峰

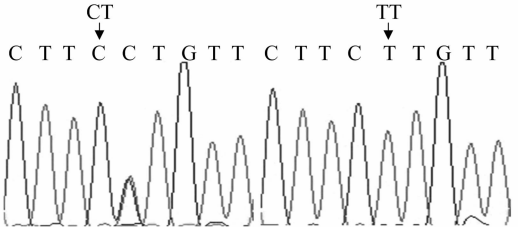


图 5 ADSL 基因第 2 外显子 C3797T 中 CT、TT 型测序峰

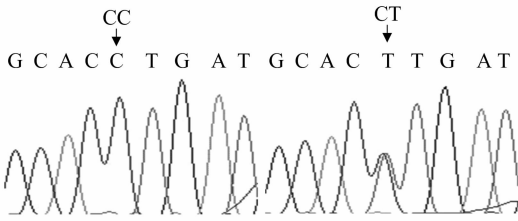


图 6 ADSL 基因第 9 外显子 C10191T 中 CC、CT 型测序峰

2.4 ADSL 基因第 2、第 9 外显子突变位点的基因和基因型频率分析

统计 ADSL 基因第 2、第 9 外显子的变异在米易鸡中的基

因频率、基因型频率及检验分析结果。由表 2 结果可见:米易鸡中 *ADSL* 基因第 2 外显子 A3713G、第 9 外显子 C10191T 的 SNP 位点在试验群体中均处于 Hardy – Weinberg 平衡状态

( $P>0.05$ ),而 C3797T 则偏离 Hardy – Weinberg 平衡状态( $P<0.05$ )。

表 2 *ADSL* 基因不同位点的基因型和基因频率

SNP 位点	样本数 (个)	基因型频率						基因频率				$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
		AA	GG	AG	CC	TT	CT	A	G	C	T		
A3713G	64	0.469 (30)	0.125 (8)	0.406 (26)				0.672	0.328			0.481	0.488
C3797T	64				0.266 (17)	0.359 (23)	0.375 (24)			0.450	0.550	4.417	0.036
C10191T	64				0.656 (42)	0 (0)	0.344 (22)			0.828	0.172	2.620	0.106

2.5 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子的 SNP 位点的基因型与胸肌 IMP 含量的相关性分析

对 *ADSL* 基因第 2 外显子 A3713G、C3797T 和第 9 外显子 C10191T SNP 位点的基因型和 IMP 含量进行差异显著性检验<sup>[11]</sup>。表 3 结果表明:*ADSL* 基因第 2 外显子中的各基因型与胸肌 IMP 含量差异都不显著;*ADSL* 基因外显子 9 (C10191T)中 CT 杂合子个体胸肌的 IMP 含量最高,显著高于 CC 型个体胸肌的 IMP 含量( $P<0.05$ )。

表 3 不同位点基因型的个体胸肌肌苷酸含量

SNP 位点	基因型	样本数 (个)	胸肌肌苷酸含量 (mg/g)
A3713G	AA	30	2.889 ± 1.026b
	GG	8	2.909 ± 1.159b
	AG	26	2.751 ± 1.319b
C3797T	CC	17	3.087 ± 0.536b
	TT	23	2.611 ± 1.489b
	CT	24	2.871 ± 1.124b
C10191T	CC	42	2.651 ± 1.228b
	CT	22	3.430 ± 0.354a

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

3 讨论与结论

3.1 *ADSL* 基因的多态位点

季从亮扫描了 *ADSL* 基因含 5'侧翼序列在内的所有的 13 个外显子以及部分内含子序列,并进行了 SNP 位点检测,结果共检测出 5 个 SNP 位点,其中 2 个位于外显子区域,3 个位于内含子区域,结果仅有外显子 9 处存在 C9839A 突变为非同义突变,导致了甘氨酸酰胺核苷酸合成酶氨基酸序列的第 173 处发生氨基酸的变异:脯氨酸 (Pro) 变异为苏氨酸 (Thr)<sup>[7]</sup>。张学余等对隐性白羽鸡、丝羽乌骨鸡、萧山鸡、白耳鸡、藏鸡 *ADSL* 基因的外显子 9 的研究发现了相同突变位点,并发现可引起氨基酸变异<sup>[12]</sup>。而本研究通过对米易鸡的 *ADSL* 基因外显子 9 的检测发现,在 C10191T 处发生突变,翻译氨基酸序列后比对发现第 286 处的亮氨酸 (Leu) 发生变异,表明该突变为同义突变。龚琳琳对皋鸡、安卡鸡、文昌鸡、隐性白羽肉鸡 4 个群体的 *ADSL* 基因外显子 9 的检测中也得到了同样的结果<sup>[13]</sup>。

束婧婷等发现,在 *ADSL* 基因外显子 2 的 A3713G、C3484T 处发生了突变,但 2 个突变位点都没有引起相应的氨基酸发生改变<sup>[14-15]</sup>。本研究也是在外显子 2 的 A3713G、C3797T 处检测到突变位点,分别翻译甘氨酸酰胺核苷酸合成酶

氨基酸序列后比对发现,在第 59 处的亮氨酸 (Leu) 和第 87 处的丝氨酸 (Ser) 都未发生变化,表明 2 种突变都是同义突变,都没有引起相应的氨基酸变异。

3.2 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子 SNP 位点的基因型和胸肌 IMP 含量的相关性

张学余等在 *ADSL* 基因外显子 9 的 C9839A 处发现突变,通过对 5 个鸡种该突变位点的基因型与肌苷酸含量的相关性分析表明:在 5 个鸡群体中的基因型分布差异显著,除了萧山鸡与丝羽乌骨鸡之间基因型分布差异不显著之外,其余各鸡种两两之间均存在显著或极显著的基因型分布差异( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),初步推测该位点的基因型频率分布与品种有关,但进一步方差分析并没有显示出该位点的多态性与胸肌的 IMP 含量之间存在关联<sup>[12]</sup>。束婧婷等通过对 *ADSL* 外显子 2 的 C3484T 突变位点与肌苷酸含量的相关性分析,表明 *ADSL* 基因中 TT 型个体胸肌 IMP 含量较 CC 型高出 0.880 mg/g,达到极显著水平( $P<0.01$ ),TT 型个体 IMP 含量较 CT 型高出 0.758 mg/g,达到显著水平( $P<0.05$ ),CT 型个体 IMP 含量稍高于 CC 型,但二者之间差异不显著<sup>[14]</sup>。

而本研究对米易鸡 *ADSL* 基因第 2、第 9 外显子 SNP 位点研究结果表明,虽然 3 个突变位点都没有引起相应的氨基酸变异,但其中外显子 9 的 C10191T 突变位点中的 CT 杂合子个体胸肌的 IMP 含量最高且都高于其他基因型个体胸肌的 IMP 含量,达到显著水平( $P<0.05$ ),说明该位点的变异对胸肌的 IMP 含量变化有较显著的影响。米易鸡中 *ADSL* 基因第 9 外显子 C/T(C10191T)SNP 位点 CT 型为优势基因型,虽然未检测到 TT 型,但是可以推测 TT 型是 C 基因突变为 T 的结果。

由此可见,*ADSL* 基因外显子 9 处的基因突变对胸肌 IMP 含量的影响在不同的鸡种之间的表现不完全一致。鸡 *ADSL* 基因不同外显子的不同变异,在不同鸡种中的变异不尽相同,且与鸡胸肌 IMP 含量之间的调控模式关系也还不清楚;因此,今后有必要选择具有代表性的鸡种,大大增加测定样本,对 *ADSL* 基因的全部变异位点进行扫描,方可弄清 *ADSL* 基因对鸡胸肌 IMP 含量之间的调控模式。

参考文献:

[1] 张海艳,于太永,关伟军. 肌苷酸形成机理及其含量影响因素浅析[J]. 中国农业科技导报,2004,6(3):17-21.  
[2] 武书庚,齐广海. 肉品风味的形成及其影响因素[J]. 中国畜牧杂志,2001,37(3):53-55.  
[3] 束婧婷. 鸡肌苷酸相关候选基因遗传效应及表达规律研究[D]. 扬州:扬州大学,2008.

马俊红,李军营,马二登,等. 烤烟不同生育期蔗糖代谢关键酶基因的表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):32-34.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.009

# 烤烟不同生育期蔗糖代谢关键酶基因的表达

马俊红,李军营,马二登,卢秀萍

(云南省烟草农业科学研究院,昆明云南 650031)

**摘要:**为了研究烤烟不同生育期蔗糖代谢的分子特点,采用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 法对云烟 87 在不同生育期的 3 种蔗糖代谢关键酶基因——转化酶(invertase,Inv)、蔗糖合成酶(sucrose synthase,SuSy)和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,SPS)基因的表达水平进行分析。结果表明:在烟叶发育前期(团棵期、旺长期)Inv 酶基因的表达量较高;SuSy 酶基因的在烤烟不同生育期的表达量变化呈单峰曲线,在打顶后表达量最高,之后又降低。SPS 酶基因的表达量在烤烟生长发育后期较高,说明烤烟蔗糖的累积主要在发育后期进行。

**关键词:**烤烟;生育期;蔗糖代谢;转化酶;蔗糖合成酶;蔗糖磷酸合成酶;基因表达

**中图分类号:**S572.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0032-03

烤烟是世界上一种重要的经济作物,烟叶的品质与其糖含量密切相关,水溶性糖与氨基酸发生梅拉德反应可以产生多种香气物质<sup>[1-2]</sup>。蔗糖是主要的水溶性糖之一,也是烟草光合作用的主要产物,可以为烟草的生长提供碳源和能量<sup>[3-5]</sup>,同时也是细胞代谢的调控因子,可调节转运蛋白、贮藏蛋白和编码酶的基因的表达<sup>[6-7]</sup>。与蔗糖代谢密切相关的酶主要有转化酶(invertase,Inv)、蔗糖合成酶(sucrose synthase,SuSy)和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase,SPS)。SPS 是调控植物蔗糖合成的关键酶之一,其活力直接

影响光合产物的分配,研究表明其与蔗糖形成呈正相关<sup>[8-10]</sup>。SuSy 是一种可逆酶,既可催化蔗糖的合成,又可催化蔗糖的分解,通常认为,它主要起分解蔗糖的作用,能为细胞壁提供合成底物和合成淀粉<sup>[11-12]</sup>。Inv 酶与植物体内形成蔗糖梯度相关<sup>[12-13]</sup>,Bachelier 等研究表明,处在细胞壁中的转化酶能调节蔗糖从韧皮部卸出,并且控制蔗糖吸收速度,而在液泡中的转化酶则可以调节蔗糖和己糖的贮存<sup>[14]</sup>。

本研究通过对烤烟品种云 87 在团棵期、旺长期、现蕾期、打顶后、成熟期 5 个生育期的蔗糖含量,Inv 酶、SuSy 酶、SPS 酶活性以及 3 个酶基因的表达情况进行测定,从而明确不同生育期蔗糖代谢主要酶活性及酶基因的变化特点,揭示烤烟不同生育期蔗糖代谢的分子特点,并为改善烤烟品质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验地点设在云南省玉溪研和基地,在移栽后第 20 天(团

收稿日期:2014-05-27

基金项目:中国烟草总公司云南省公司资助项目“云南清香型特色优质烟叶开发项目”(编号:2011YN02);中国烟草总公司资助项目“清香型特色优质烟叶开发项目”[编号:110201101003(TS-03)]。

作者简介:马俊红(1976—),女,山西晋中人,博士,副教授,主要从事特色优质烟叶开发和烟草病害分子诊断等研究。Tel:(0871)65106539;E-mail:majunhong.china@gmail.com。

[4]徐善金,虞德兵,杜文兴. 肌苷酸及其相关酶的研究进展[J]. 生物技术通报,2011(3):44-53.

[5]余春林. 鸡肌苷酸合成酶系相关基因表达水平变化与肌苷酸含量的关联性研究[D]. 成都:西南民族大学,2010.

[6]Aimi J, Qiu H, Williams J, et al. De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycinamide ribonucleotide synthetase - aminoimidazole ribonucleotide synthetase - glycinamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in *E. coli* [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6665-6672.

[7]季从亮. 鸡肉 IMP 含量相关候选基因 SNP 筛查及其用于地方鸡种群体遗传结构分析的研究[D]. 扬州:扬州大学,2005.

[8]金红. 优质肉鸡肌苷酸与肌内脂肪含量相关基因聚合效应研究[D]. 成都:西南民族大学,2012.

[9]常山,李小成,徐亚欧,等. 优质肉鸡腺苷琥珀酸裂解酶基因第 2 和第 9 外显子单核苷酸多态性分析[J]. 四川畜牧兽医,2008,35(6):25-28.

[10]陈国宏,侯水生,吴信生,等. 中国部分地方鸡肌肉肌苷酸含量研究[J]. 畜牧兽医学报,2000,31(3):211-215.

[11]陈继兰. 鸡肉肌苷酸和肌内脂肪含量遗传规律及相关候选基因的研究[D]. 北京:中国农业大学,2004.

[12]张学余,束婧婷,季从亮,等. 鸡 *ADSL* 基因外显子 9 单核苷酸多态性及其与鸡肉肌苷酸含量的相关分析[C]//中国畜牧兽医学. 第十次全国畜禽遗传标记研讨会论文集. 北京:中国畜牧兽医学,2006:116-200.

[13]龚琳琳. 鸡 *ADSL* 和 *GARS-AIRS-GART* 基因遗传变异、表达及其与肌苷酸的相关分析[D]. 扬州:扬州大学,2011.

[14]束婧婷,吉文林,包文斌,等. 鸡 *ADSL* 基因和 *GARS-AIRS-GART* 基因对鸡肉肌苷酸(IMP)含量的影响[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(8):786-791.

[15]韩威,张学余,李慧芳,等. *ADSL* 和 *GARS-AIRS-GART* 基因多态位点及聚合基因型对白耳鸡胸肌肌苷酸(IMP)含量的效应分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(4):577-581.