

杨家大. 山羊心脏型脂肪酸结合蛋白基因 mRNA 的组织表达谱分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 24–27.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.006

山羊心脏型脂肪酸结合蛋白基因 mRNA 的组织表达谱分析

杨家大

(凯里学院环境与生命科学学院, 贵州凯里 556011)

摘要:以黔东南小香羊、贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、南江黄羊为研究对象,采用实时荧光定量技术对肝、肾、心、肺、背最长肌、半膜肌、皮下脂肪中 *H-FABP* 基因的表达水平进行测定。结果表明,心内 *H-FABP* 基因的表达水平最高,半膜肌、背最长肌次之,再次为肾、肺、皮下脂肪、肝较低,可见心、半膜肌、背最长肌是山羊 *H-FABP* 基因 mRNA 分布的主要组织。

关键词:山羊; *H-FABP*; 基因表达; 组织

中图分类号:Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0024-04

随着经济的发展,人们对肉类的追求已不再片面强调数量,而是将目光投向质量,生长速度慢、饲料报酬低、经济效益不明显但肉质好的地方畜禽品种资源重新受到人们的重视。贵州省地方山羊品种丰富,包括贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、黔东南小香羊等。这些品种具有可常年放牧、适应性强、繁殖力高、育肥性能好、肉质细嫩、板皮质优等特点^[1]。羊肉与其他肉品一样,肌内脂肪含量是影响肉质性状的重要因素,决定肌肉的嫩度、多汁性、风味等^[2]。肌内脂肪含量又与机体脂肪的合成、转运、分解等代谢全过程密切相关。作为细胞内特异性地结合并运输脂肪酸的主要载体,脂肪酸结合蛋白是同源性较高的细胞内小分子蛋白质,属于胞内脂质结合蛋白超家族成员,在调控体内脂类代谢方面起重要作用^[3-4]。脂肪酸结合蛋白有多种特异性亚型,其中心脏型脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid-binding protein, H-FABP)别称 FABP3,是 FABP 家族中最普遍的 1 种,相对分子质量约 14 000,可将脂肪酸从细胞膜上运到脂肪酸氧化部位进入能量代谢循环,或运送到酯化部位进行甘油三酯及磷脂合成^[5-6]。此外, H-FABP 通过在细胞内与脂肪酸结合,使细胞内外保持一定的浓度差,促进细胞摄取脂肪酸^[7]。 *H-FABP* 基因与畜禽肌内脂肪含量相关,是肉质性状的重要候选基因^[8-14]。本研究以黔东南小香羊、贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、南江黄羊为研究对象,应用实时荧光定量 PCR (real-time-PCR) 法对肝、肾、心、肺、背最长肌、半膜肌、皮下脂肪中 *H-FABP* 基因的 mRNA 水平进行检测,摸清山羊 *H-FABP*

mRNA 的组织表达谱,筛选主要的分布组织,旨在为寻找山羊肉质性状相关候选基因更丰富的遗传信息、开展肉质性状的分子标记辅助选择奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 山羊组织样品来源

5~7 月龄的黔东南小香羊、贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、南江黄羊各 4 只(公母各 2 只),体质量 14~17 kg,购自贵州省雷公山山区农户。将山羊放血处死后,迅速提取心、肝、肺、肾、背最长肌、半膜肌、皮下脂肪等组织,用锡箔纸包裹后投入液氮中冻存。

1.2 引物及探针

PCR 引物及探针根据山羊 *H-FABP* 及 β -actin 基因 mRNA 序列设计(表 1),并由上海捷瑞生物工程有限公司合成及修饰。探针的 5'端、3'端分别由 FAM(6-carboxy-fluorescein)、TAMRA(6-carboxy-tetramethylrhodamine)修饰。

1.3 总 RNA 提取

采用 Trizol (Invitrogen 公司)提取各组织总 RNA,按照说明书进行操作。

1.4 逆转录反应

采用 TOYOBO ReverTra Ace qPCR RT Kit 进行逆转录反应。0.1~2.0 μ g 总 RNA 加 RNase-free H_2O 至 14 μ L, 65 $^{\circ}C$ 变性 5 min, 冷却;再加入 5 \times RT buffer 4 μ L、Enzyme mix 1 μ L、RT primer 1 μ L, 42 $^{\circ}C$ 逆转录 18 min, 98 $^{\circ}C$ 灭活逆转录酶 5 min, -20 $^{\circ}C$ 保存。

1.5 实时荧光定量标准品的制备

采用 GeneSolution 2 \times Taq Master Mix (上海硕盟生物科技有限公司)进行 PCR 反应,反应体系总体积为 20 μ L。向 0.2 mL PCR 管中依次加入 RNase-free H_2O 7.2 μ L、2 \times Taq Master Mix 10 μ L、10 μ mol/L S-forward primer 0.4 μ L、10 μ mol/L S-reverse primer 0.4 μ L、cDNA 2 μ L 混匀。热循环参数为:94 $^{\circ}C$ 预变性 90 s;进入 40 个循环,每循环包括 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s、60 $^{\circ}C$ 退火 30 s、72 $^{\circ}C$ 延伸 60 s;72 $^{\circ}C$ 延伸

收稿日期:2015-02-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460572);凯里学院规划课题(编号:Z1304);凯里学院获得博士学位(引进教授)教师专项(编号:BS201303);贵州省普通本科高校自然科学研究项目[编号:黔教合 KY 字(2014)236];贵州省科技联合基金[编号:黔科合 J 字 LKK(2013)14]。

作者简介:杨家大(1975—),男,贵州天柱人,博士,副教授,主要从事动物分子遗传学研究。Tel: (0855) 8511625; E-mail: yangjiada2@163.com。

表 1 *H-FABP*、*β-actin* 基因引物及探针序列

基因	NCBI 登录号	引物/探针	核苷酸位置	核苷酸序列(5'→3')	<i>T_m</i> (℃)	扩增子大小 (bp)
<i>H-FABP</i>	NM_001285701.1	S-forward primer	32~53	TTACTGGACAGCAAGAATTTTCG	63.0	544
		S-reverse primer	555~575	AGACACAATGAGAACGGAAC	63.5	
		Forward primer	61~81	CATGAAGTCACTCGGTGTCGG	69.3	175
		Reverse primer	215~235	GTCATCTGCCGTGGTCTCATC	69.2	
		Probe	89~114	ACCAGGCAGGTGCCAATATGACCAA	75.4	
<i>β-actin</i>	XM_005694067.1	S-forward primer	26~44	AGAAGAAATTGCCGCCCTC	64.6	992
		S-reverse primer	1 000~1 017	AGCATTTGCGGTGGACAA	64.5	
		Forward primer	518~539	TGTGCGTGACATCAAGGAGAAG	69.1	177
		Reverse primer	675~694	AGGAAGGACGGCTGGAAGAG	70.1	
		Probe	574~600	TGGCTACTGCTGCGTCTCTCTCTCT	79.2	

注:S-forward primer 为扩增标准品的前引物,S-reverse primer 为扩增标准品的反引物,Forward primer 为实时荧光定量扩增的前引物,Reverse primer 为实时荧光定量扩增的反引物。

5 min,4℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]回收纯化后,计算胶回收产物的目的基因拷贝数浓度^[15],计算公式如下:

$$N = \frac{C \times 10^{-9}}{M \times 660} \times 6.02 \times 10^{23} \quad (1)$$

式中:*N* 为胶回收产物的拷贝数浓度(copies/μL);*C* 为质量浓度(ng/μL);*M* 为扩增片段的碱基对数。获得 *H-FABP* 基因的拷贝数浓度为 1.03×10¹¹ copies/μL,*β-actin* 基因的拷贝数浓度为 3.53×10⁷ copies/μL。

胶回收产物按 4 倍比例进行 5 次梯度稀释,稀释后,再次测定浓度,得到 *H-FABP* 基因拷贝数浓度分别为 1.03×10¹¹、2.60×10¹⁰、6.30×10⁹、1.58×10⁹、3.94×10⁸、9.85×10⁷ copies/μL 的连续梯度定量标准品,以及 *β-actin* 基因拷贝数浓度分别为 3.53×10⁷、8.82×10⁶、2.21×10⁶、5.51×10⁵、1.38×10⁵、3.45×10⁴ copies/μL 的连续梯度定量标准品。

1.6 实时荧光定量 PCR 反应

实时荧光定量 PCR 采用 *TaqMan* 探针法。反应在 Funglyn FTC-3000 实时荧光定量 PCR 仪(Funglyn Biotech,INC,Canada)上进行,每个样品设置 3 个重复,同时对空白对照及 4 倍连续梯度标准品进行检测。反应体系为 20 μL,其中含 2×Realtime PCR Master Mix 10.0 μL、10 μmol/L Forward primer 0.8 μL、10 μmol/L Reverse primer 0.8 μL、10 μmol/L Probe 0.4 μL、RNase-free H₂O 6.0 μL、cDNA 模板 2.0 μL。热循环参数为:95℃预变性 10 min;40 个循环,每个循环包括 95℃变性 15 s、61℃退火及延伸 60 s。

1.7 统计分析

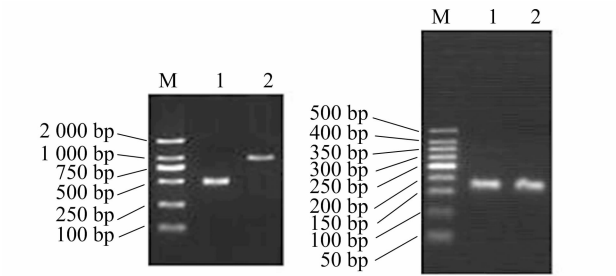
根据 *H-FABP* 及 *β-actin* 基因标准品拷贝数的对数(以 4 为底)对相应循环阈值(*C_T* 值)作图,得 *H-FABP*、*β-actin* 基因的定量标准曲线及回归方程,再结合检测样品的 *C_T* 值即可计算出待测样品 *H-FABP*、*β-actin* 基因的拷贝数。山羊个体 *H-FABP* 基因的表达水平以其拷贝数与 *β-actin* 拷贝数之比表示,平均表达水平以个体表达水平的中位数表示。

2 结果与分析

2.1 标准品及实时荧光定量 PCR 产物的检测结果

山羊 *H-FABP*、*β-actin* 基因的定量标准品电泳结果以

及实时荧光定量扩增产物的电泳结果见图 1。由图 1 可知,*H-FABP*、*β-actin* 基因定量标准品以及实时荧光定量扩增结果与预期目的片段相符。



左图为标准品电泳图谱,M为DNA Marker,1为*H-FABP*基因,2为*β-actin*基因;右图为实时荧光定量扩增产物电泳图谱,M为DNA Marker,1为*β-actin*基因,2为*H-FABP*基因。

图1 山羊*H-FABP*、*β-actin* 基因的标准品扩增产物电泳图谱以及实时荧光定量扩增产物电泳图谱

2.2 标准曲线及扩增曲线

山羊 *H-FABP* 基因实时荧光定量的标准曲线及扩增曲线见图 2,*β-actin* 基因实时荧光定量的标准曲线及扩增曲线见图 3。

由图 2、图 3 可知,*H-FABP*、*β-actin* 基因实时荧光定量的标准曲线回归方程分别为 $y = -0.5388x + 23.629$ 、 $y = -0.371x + 17.109$,数据变化与标准曲线之间的拟合度 r^2 分别为 0.988 4、0.996 7,标准曲线线性关系良好,扩增曲线呈“S”形,线形光滑,扩增过程有指数期、平台期。

2.3 *H-FABP* 基因的表达水平

黔东南小香羊、贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、南江黄羊心、肝、肺、肾、背最长肌、半膜肌、皮下脂肪组织中 *H-FABP* 基因的表达水平见表 2,可以看出:黔东南小香羊 *H-FABP* 基因表达水平在心中最高,半膜肌、背最长肌、肾中也较高,肝、肺、皮下脂肪中较低,其表达模式为:心>半膜肌>背最长肌>肾>肺>肝>皮下脂肪。黔北麻羊 *H-FABP* 基因表达水平在心中最高,半膜肌、背最长肌、肾中较高,肝、肺、皮下脂肪中较低,其表达模式为:心>半膜肌>背最长肌>肾>肺>肝>皮下脂肪。南江黄羊 *H-FABP* 基因表达水平在心中最高,半膜肌、背最长肌中较高,肾中也较高,肝、肺、皮下脂肪

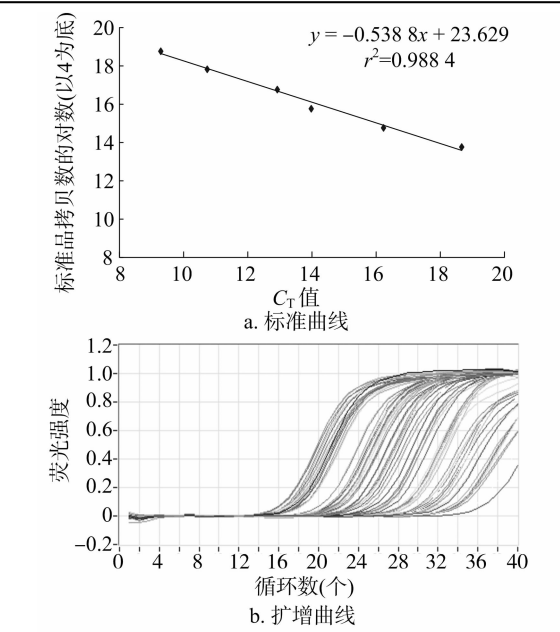


图2 *H-FABP* 基因实时荧光定量的标准曲线及扩增曲线

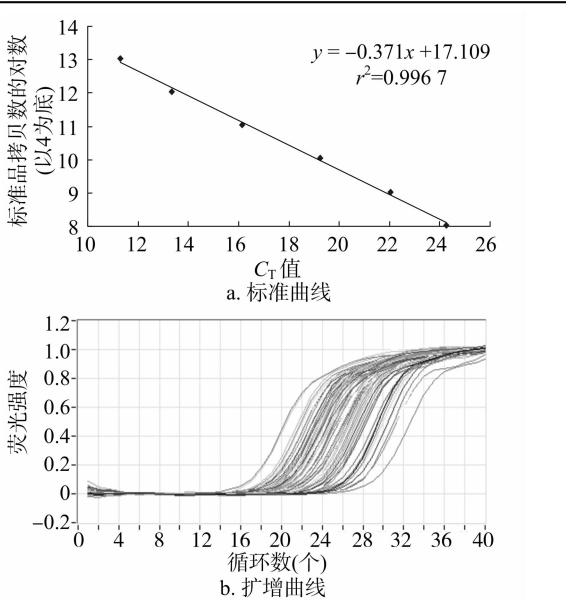


图3 β -*actin* 基因实时荧光定量的标准曲线及扩增曲线

表 2 5 个山羊品种 *H-FABP* 基因的表达水平

品种	编号	心	肝	肺	肾	背最长肌	半膜肌	皮下脂肪
黔东南小香羊	01(♂)	647.805 2	0.117 5	0.559 9	6.071 4	158.544 4	137.013 6	0.127 2
	02(♀)	1 505.493 1	0.266 1	2.335 7	4.811 4	140.692 4	708.924 2	3.393 0
	03(♀)	1 227.990 5	0.222 4	0.763 6	1.295 5	49.327 5	255.575 3	0.013 9
	04(♂)	1 098.402 7	0.0307	0.033 9	25.788 6	91.014 5	36.057 4	0.097 6
	中位数	1 163.196 6	0.170 0	0.661 8	5.441 4	115.853 5	196.294 5	0.112 4
黔北麻羊	05(♀)	641.617 7	0.003 6	1.877 2	35.791 0	34.112 3	33.454 3	0.025 7
	06(♀)	357.813 5	0.004 8	0.094 0	12.050 1	41.971 9	142.945 4	0.015 7
	07(♂)	670.416 2	0.009 0	0.189 8	11.762 0	25.146 8	48.608 2	1.092 3
	08(♂)	1 146.650 9	0.057 0	0.632 8	13.519 1	126.868 4	40.548 3	0.021 0
	中位数	656.017 0	0.069 0	0.411 3	12.784 6	38.042 1	44.578 3	0.023 4
南江黄羊	09(♀)	1 010.427 4	0.045 9	0.016 3	50.016 8	76.694 5	38.494 5	0.046 3
	10(♀)	662.998 7	0.025 6	0.021 2	11.438 9	30.443 3	30.325 0	0.065 4
	11(♂)	692.894 9	0.021 8	0.444 1	1.310 5	0.417 8	60.231 8	1.198 1
	12(♂)	500.302 9	0.006 7	0.280 7	2.601 3	17.771 6	4.965 3	0.440 4
	中位数	677.946 8	0.023 7	0.151 0	7.020 1	24.107 5	34.409 8	0.252 9
贵州黑山羊	13(♀)	312.106 3	0.088 2	1.062 2	33.236 6	20.167 8	746.345 6	0.175 4
	14(♀)	1 723.409 1	0.635 2	0.961 9	19.193 0	205.523 6	452.523 8	0.906 4
	15(♂)	184.901 3	0.054 3	1.102 1	6.051 0	71.554 9	221.986 3	0.007 1
	16(♂)	2 321.444 3	0.341 6	1.240 0	5.155 3	228.646 0	363.794 6	0.013 1
	中位数	1 017.757 7	0.214 9	1.082 2	12.622 0	138.539 3	408.159 2	0.094 3
贵州白山羊	17(♀)	14.140 8	0.031 9	0.006 8	0.043 8	1.730 4	1.164 9	0.053 2
	18(♂)	8.589 1	0.008 8	0.002 6	0.112 6	6.891 8	3.964 9	0.013 7
	19(♂)	37.833 2	0.027 4	0.042 0	0.028 0	6.372 3	5.807 9	0.004 5
	20(♀)	41.127 7	1.716 1	0.046 5	1.190 8	3.637 0	0.007 3	0.018 4
	中位数	25.987 0	0.029 7	0.024 4	0.078 2	5.004 7	2.564 9	0.016 1

中较低,其表达模式为:心>半膜肌>背最长肌>肾>皮下脂肪>肺>肝。贵州黑山羊*H-FABP* 基因表达水平以心中最高,半膜肌、背最长肌中较高,肾中也较高,肝、肺、皮下脂肪中较低,其表达模式为:心>半膜肌>背最长肌>肾>肺>肝>皮下脂肪。贵州白山羊*H-FABP* 基因表达水平在心中最高,背最长肌、半膜肌中较高,肝、肺、肾、皮下脂肪中较低,其表达模式为:心>背最长肌>半膜肌>肾>肝>肺>皮下脂肪。

3 结论与讨论

脂肪酸在脂类代谢途径中处于非常重要的位置,既可以作为合成脂肪和类脂的原料,又可以分解供能,但是这一切都必须借助于脂肪酸结合蛋白的运输才得以实现,即脂肪酸以简单扩散方式通过各种细胞质膜,随之结合到细胞质 FABPs 上,然后运输到细胞器中,或者沿着细胞内膜继续移动,因此, FABPs 在组织器官的能量供应、脂肪合成等过程中具有十分

重要的作用^[16]。本研究对黔东南小香羊、贵州白山羊、贵州黑山羊、黔北麻羊、南江黄羊 5 个品种山羊肝、肾、心、肺、背最长肌、半膜肌、皮下脂肪共 7 个组织中 *H-FABP* 基因的 mRNA 水平进行检测,结果表明,*H-FABP* 基因 mRNA 的组织分布规律十分相似,表现为心中表达最高,远远高于其他组织,半膜肌、背最长肌次之,再次为肾、肺、皮下脂肪、肝内最低,说明心是 *H-FABP* 基因分布的最主要组织器官。郑程莉利用 SYBR-Green 实时荧光定量 PCR 方法对 12 月龄天府肉羊心、肝、脾、肺、肾、眼肌等 6 个组织中 *H-FABP* 基因的表达进行检测,结果表明,*H-FABP* 基因在心脏中表达量最高,其次是眼肌、肝、脾、肺、肾的表达量都相对较低^[17]。本研究结果与此报道相似。罗献梅等对体质量约 100 kg 的 DLY 杂交猪、雅南猪进行研究,结果表明,*H-FABP* 基因在心肌中的表达量极显著高于骨骼肌^[18]。*H-FABP* 基因的表达具有组织特异性,主要在心脏中特异性表达,在脑、骨骼肌、肾、肾上腺、小肠等组织器官中也有少量表达,在肝中低表达^[19]。除心脏以外,对脂肪酸有高度需求的组织,如骨骼肌、脂肪细胞、泌乳的乳腺也是 *H-FABP* 基因的主要分布组织^[20-23]。

山羊 *H-FABP* 基因最主要在心中表达,半膜肌和背最长肌中较高表达。这为开展 *H-FABP* 基因与山羊肉质性状相关性的研究以及山羊肉质性状的分子标记辅助选择育种奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 陈祥,廖正录,李国红,等. 贵州地方山羊品种的 RAPD 分析[J]. 动物学研究,2004,25(2):141-146.
- [2] 王兰萍,耿荣庆,冀德君,等. 江苏地方山羊品种 *H-FABP* 基因的 SNPs 检测及群体遗传学分析[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(3):159-162.
- [3] 高红,彭静,沈一飞,等. 不同物种 *FABP3* 基因编码区及蛋白生物信息学分析[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2014,35(1):31-36.
- [4] 赵旭庭,段修军,董飏,等. 鸭 *A-FABP* 基因单核苷酸多态性分析及其与体脂性状相关的研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2009,30(1):38-41.
- [5] Pelsers M M, Hermens W T, Glatz J F. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury[J]. Clinica Chimica Acta,2005,352(1/2):15-35.
- [6] Veerkamp J H, Maatman R G. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins; their structure and genes[J]. Progress in Lipid Research, 1995,34(1):17-52.
- [7] 游小燕,杨飞云,谢跃伟. *H-FABP* 基因在脂肪沉积中作用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(11):115-118.
- [8] 呼红梅,王继英,郭建凤,等. 莱芜猪和杜洛克猪肌肉 *H-FABP* 基因表达量与肌肉脂肪和脂肪酸含量关联分析[J]. 华北农学报,2010,25(4):64-68.
- [9] 向春和,范丽娜,耿鹏瑞,等. 不同冠型鸡 *H-FABP* 基因单核苷酸多态性与脂肪性状的关联分析[J]. 西北农业学报,2012,21(9):1-5.
- [10] 赵衍铜,马倩,柏明娜,等. *H-FABP* 基因在芦花鸡等 3 种优质肉鸡胸肌中的差异表达[J]. 中国兽医学报,2012,32(8):1227-1230.
- [11] Tyra M, Ropka-Molik K, Eckert R, et al. *H-FABP* and *LEPR* gene expression profile in skeletal muscles and liver during ontogenesis in various breeds of pigs[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2011,40(3):147-154.
- [12] Han X L, Jiang T F, Yang H W, et al. Investigation of four porcine candidate genes (*H-FABP*, *MYOD1*, *UCP3* and *MASTR*) for meat quality traits in Large White pigs[J]. Molecular Biology Reports, 2012,39(6):6599-6605.
- [13] Gerbens F, Verburg F J, Van Moerkerk H T, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs[J]. Journal of Animal Science, 2001,79(2):347-354.
- [14] Chao Z, Wang F, Deng C Y, et al. Distribution and linkage disequilibrium analysis of polymorphisms of *MC4R*, *LEP*, *H-FABP* genes in the different populations of pigs, associated with economic traits in DIV2 line[J]. Molecular Biology Reports, 2012,39(5):6329-6335.
- [15] 杨家大. 应用实时荧光定量方法研究实验用小型猪细胞色素 P450 的表达[D]. 雅安:四川农业大学,2007.
- [16] 徐红伟,柏家林,冯玉兰,等. 兰州大尾羊心脏型脂肪酸结合蛋白(*H-FABP*)基因克隆及其同源性比较[J]. 中国农业科学,2013,46(3):639-646.
- [17] 郑程莉. 天府肉羊 *H-FABP*、*L-FABP* 和 *LPL* 基因生物信息学与组织表达分析[D]. 雅安:四川农业大学,2012.
- [18] 罗献梅,陈代文,张克英. 不同品种猪肌肉组织心型脂肪酸结合蛋白基因的表达差异[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(7):727-730.
- [19] 季鹏,顾春荣,卞智萍,等. 人心脏型脂肪酸结合蛋白的纯化与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(27):5387-5390.
- [20] Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism[J]. Journal of Applied Genetics,2006,47(1):39-48.
- [21] 徐红伟,臧荣鑫,杨具田,等. 兰州大尾羊 *H-FABP* 基因荧光定量 PCR 检测方法的研究[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(6):84-88.
- [22] 乔海云,赵倩君,姚娜,等. 绵羊 *H-FABP* 基因单核苷酸多态性的研究[J]. 遗传,2009,31(7):725-731.
- [23] 赵雪,曹阳,金海国,等. 不同绵羊群体间心脏型脂肪酸结合蛋白基因第 2 外显子单核苷酸多态性的研究[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(4):32-35.