

王海,王康环,蒋小松,等. 优质肉鸡硫胺素含量以及 *TPK1* 基因的多态性分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):237-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.078

优质肉鸡硫胺素含量以及 *TPK1* 基因的多态性分析

王海¹,王康环¹,蒋小松²,徐亚欧¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041;2. 四川省畜牧科学研究院,四川成都 610066)

摘要:为研究大恒优质肉鸡硫胺素沉积规律及大恒肉鸡不同家系间硫胺素的差异,选取大恒优质肉鸡的 4 个品系 (S08、S07 × S01、D2、D1) 为试验材料,采用高效液相色谱法对硫胺素含量进行测定,并对其相关基因 *TPK1* 进行多态性分析。结果显示:10 周龄时,S08 品系胸肌中硫胺素含量极显著高于品系 D1、D2 ($P < 0.01$),4 个品系中公鸡胸肌中的硫胺素含量均高于母鸡,差异不明显;10 周龄时,公鸡、母鸡中腿肌的硫胺素含量极显著高于胸肌 ($P < 0.01$),公鸡中的腿肌、胸肌硫胺素含量均分别高于母鸡的腿肌、胸肌,但都差异不明显。对大恒肉鸡 5 个品系 (S07 × S05、S07、S08、S07 × 01、S08 × 01) *TPK1* 基因的所有外显子及部分 3' 非编码区进行了多态性位点的检测,在 3' 非编码区发现了 1 个 G878A 单碱基突变,该 SNP 位点对腹脂质量具有显著影响 ($P < 0.05$),该基因座上的基因型 NN 个体的腹脂质量显著高于基因型 MN 个体的腹脂质量,但与大恒优质肉鸡 2 个品系鸡肉中硫胺素含量差异不显著。

关键词:优质肉鸡;硫胺素;*TPK1* 基因;基因多态性

中图分类号:S831.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0237-03

硫胺素 (Thiamine) 即维生素 B₁, 不仅是维持机体代谢的重要物质, 而且是肉产品产生芳香物质的关键前体物质。热降解硫胺素可以产生许多含硫化物, 包括硫醇、硫化物、二硫化物等芳香化合物^[1-2], 其中 2-甲基-3-巯基咪唑、2/3-巯基-3/2-戊酮是重要的挥发性化合物, 5-羟基-3-巯基-2-戊酮不仅是硫胺素降解过程中的重要中间产物, 而且是一类芳香化合物。因此, 硫胺素及其衍生物的含量已经成为了肉食品品质的重要指标。本研究以 4 个优质肉鸡品系为样本, 研究硫胺素的含量差异, 同时对硫胺素合成代谢

关键酶中硫胺焦磷酸激酶 (TPK1) 基因进行多态性分析^[3], 以期优质肉鸡的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验材料为四川大恒家禽有限公司培育的 S08、S07 × S01、D2、D1、S07 × 05、S07、S08 × S01 共 7 个品系总, 试验鸡有专人饲养, 饲养条件及营养水平一致, 统一在 70 日龄屠宰, 屠宰前翅下静脉采血保存于真空采血管中, 4℃ 保存用于 DNA 的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 肌肉中硫胺素含量的测定 采用高效液相色谱法 (荧光检测)。准确称取 4~6 g 肉样, 使用电动匀浆器匀质后置于 250 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液混匀, 于高压灭菌锅中 121℃ 处理 30 min, 室温冷却。用 2 mol/L 乙酸钠溶液调节水解液使 pH 值为 4.0~4.5, 加入高峰氏淀粉酶, 置于水浴锅中 45~50℃ 酶解 3 h, 冷却后全部移至 100 mL 容量瓶中, 用水定容至 100 mL, 混匀后用滤纸过

收稿日期:2015-03-10

基金项目:四川省应用基础项目 (编号:2013JY0044); 四川省肉鸡现代产业链关键技术集成研究与产业化示范项目 (编号:2012NZ0037); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (编号: CX2013SZ59); 西南民族大学项目 (编号:2012NFW001)。

作者简介:王海 (1987—), 男, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向为遗传育种。E-mail: biohwang@163.com。

通信作者:徐亚欧, 教授, 研究方向为动物遗传资源。E-mail: xuyaou@163.com。

[2] Díaz - Apancio E, Marin C, Alonso - Urmeneta B, et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* in fection of goats [J]. Clin Microbiol, 2004, 32(5): 1159 - 1165.

[3] 邓小红, 曾政, 王希良. 布鲁氏菌 pcDNA3.1 - omp17.3 基因疫苗的研制[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(6): 505 - 509.

[4] 陈伟业, 胡森, 黄克和, 等. IS711 和 omp2 作为布氏杆菌种属及种株间分子鉴别诊断标记的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(6): 676 - 680.

[5] 郑锦玲, 蒋成观, 董仲生, 等. 布氏杆菌病检测技术的研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 25 - 28.

[6] 曲勐, 王玉飞, 乔风, 等. Omp25c 基因对马耳他布鲁菌疫苗株 M5 的毒力及免疫保护性的影响[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(5): 639 - 642.

[7] Caro H P, Fernandez L L, de Miguel M J, et al. Role of the omp25/omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis* [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(8): 4050 - 4061.

[8] 李玲, 闫晶华, 闫昊, 等. 新疆畜间布鲁氏菌病流行情况及防控技术研究[J]. 草食家畜, 2012, 156(3): 19 - 22.

[9] 石琴, 袁立岗, 蒲敬伟, 等. 山区牧场牛羊布鲁氏菌病感染情况调查与分析[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(2): 40 - 41.

[10] 张鲁安, 苏贵成, 李杰, 等. 新疆生产建设兵团畜间布病监测分析及防控对策[J]. 新疆农垦科技, 2012(4): 26 - 28.

[11] 曾鹏武, 李灵, 陈胜文. 天山马鹿布氏菌病的检疫和防控[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(1): 73 - 75.

[12] 孟庆玲, 杨奋东, 贾桂珍, 等. 昌吉地区天山马鹿布氏杆菌病血清学调查[J]. 塔里木大学学报, 2006, 18(3): 32 - 33.

滤,将滤液放置于 4 ℃ 冰箱中保存。吸取 5 mL 试样加入到 50 mL EP 管中,再加入 1.5 g 氯化钠、3 mL 氧化剂混匀,然后加入 10 mL 异丁醇萃取,静置分层后取上清液过 0.45 μm 滤膜,即可上样检测。

高效液相色谱仪为安捷伦高效液相色谱仪(配有 1200 荧光检测器)。流动相:乙酸钠(0.05 mol/L,pH 值 4.5):甲醇(35%:65%);流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:激发波长 365 nm;发射波长:435 nm;进样量:15 μL。

1.2.2 鸡基因组的提取 采用 Axygen 公司 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒来提取鸡血样中的基因组 DNA。获得的 DNA 样品分为 2 份,1 份用于试验,放置于 4 ℃ 条件;另一份放在 -70 ℃ 中长期保存,用以单链构象多态性(SSCP)分析。

1.3 数据处理

10 周龄大恒优质肉鸡肌肉中不同品系间硫胺素含量的差异显著性比较采用 SPSS 17.0 软件包中广义线性模型(general linear model, GLM)进行最小显著差异(least significant difference, LSD)分析,采用 Correlate 程序进行体质量与硫胺素含量的相关性分析。

2 结果与分析

2.1 硫胺素含量的变化

2.1.1 10 周龄肉鸡不同品系肌肉中硫胺素含量 10 周龄大恒优质肉鸡 S08、S07×S01、D2、D1 等 4 个品系的硫胺素含量如表 1 所示。可以看出,在母鸡中 S08 品系胸肌中的硫胺素含量最高,D1 品系胸肌中的硫胺素含量最低;S08、S07×S01 品系间差异不显著,但与 D2、D1 差异极显著($P<0.01$),D2、D1 品系间差异不显著。在公鸡中 S08、S07×S01 品系间差异不显著,但分别与 D2、D1 差异极显著($P<0.01$),D2、D1 品系间差异不显著。在 4 个品系中所有公鸡胸肌中的硫胺素与

表 1 大恒优质肉鸡不同品系胸肌中硫胺素的含量

品系	母鸡		公鸡	
	数量 (羽)	硫胺素含量 (mg/kg)	数量 (羽)	硫胺素含量 (mg/kg)
S08	13	0.812 ± 0.240A	8	1.258 ± 0.546A
S07 × S01	14	0.597 ± 0.130A	9	0.809 ± 0.208A
D2	31	0.388 ± 0.208B	20	0.394 ± 0.142B
D1	8	0.347 ± 0.048B	8	0.421 ± 0.094B
平均		0.511 ± 0.254		0.636 ± 0.421

注:同列数据后标有不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

所有母鸡中的硫胺素间差异不明显。

2.1.2 10 周龄不同组织及性别的硫胺素含量 在 10 周龄时,公鸡中腿肌的硫胺素含量高于胸肌,并且达到极显著水平($P<0.01$);母鸡中腿肌的硫胺素含量高于胸肌,也达到了极显著水平;公鸡中的胸肌、腿肌的硫胺素含量分别高于母鸡(表 2)。

表 2 不同组织及性别硫胺素的含量

组织	公鸡		母鸡	
	硫胺素含量 (mg/kg)	数量 (羽)	硫胺素含量 (mg/kg)	数量 (羽)
胸肌	1.021 ± 0.453B	27	0.701 ± 0.217B	17
腿肌	1.483 ± 0.267A	29	1.231 ± 0.346A	15

注:同列数据后标有不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

2.2 *TPK1* 基因多态性分析

2.2.1 样品 DNA 的提取及引物的设计合成 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计(表 3),设计的结果经 NCBI 数据库的 Primer-BLAST 对引物进行在线比对验证,鉴定合格后由上海 Invitrogen 公司合成,所有引物均为变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯度。

表 3 *TPK1* 基因所有外显子及部分非编码区的扩增引物

区域	引物序列	目的片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
<i>TPK1</i> EXON 1	5'-CTTTATATTCGTATTTGTGATGTCC-3';5'-TTTGTATATCACTTCTAGGGCTTC-3'	269	52.2
<i>TPK1</i> EXON 2	5'-AAGAAGCAAGAAAAAAGAGGAG-3';5'-ACAATGCAATTCAACAGACACTA-3'	276	48.9
<i>TPK1</i> EXON 3	5'-CACAGGAAACAGAACTGGTTAGGA-3';5'-ATCCCATCCGCAACATTTTACTT-3'	216	50.4
<i>TPK1</i> EXON 4	5'-AGCTTCTTGCCTGATTACATC-3';5'-ACATCTGAAGACCTAAAGACACC-3'	198	58.9
<i>TPK1</i> EXON 5	5'-GCTGTTTATTTACTAGGGATGT-3';5'-TATGTTGAGATGAAGACTAGATGC-3'	166	48.5
<i>TPK1</i> EXON 6	5'-TTTCTTATCAAAGTGTTTCAGTT-3';5'-AAGGTCAGATGTTCAAAGCAC-3'	275	49.7
<i>TPK1</i> EXON 7	5'-GCCCATGTCTTCCCTCCCTCTTC-3';5'-AGTGAGGCTGGCGTGGATGCTC-3'	250	59.0
<i>TPK1</i> EXON 8	5'-GGCTGAAGTGGATCATCTCTGTTG-3';5'-AACTCGCCTTCTCTTCTCTCTTGC-3'	294	53.1
<i>TPK1</i> 3'UTR	5'-CACTTCTCCCTAGAAATGTTGATG-3';5'-AACTAAAGGCATGTTTACCTACCA-3'	236	50.8

本研究总共设计了 9 对引物,对 *TPK1* 基因所有外显子及部分非编码区进行了扫描,以大恒肉鸡 5 个品系(S07×S05、S07、S08、S07×01、S08×01)为研究材料。结果显示,所有 9 对引物的 PCR 扩增效果都很好,目的片段与所设计的片段大小一致,无非特异性扩增产生,都可以用于 SSCP 研究。PCR-SSCP 研究结果显示,*TPK1*3'UTR 引物在大恒肉鸡 5 个品系内存在多态性,3'UTR 引物所扩增的片段存在 3 种基因型,分别定义为 MN、MM、NN(图 1)。

2.2.2 序列分析结果 取 MN、NN、MM 3 种基因型的 PCR 产物进行纯化测序,结果显示 MM 基因型与数据库 Ensembl

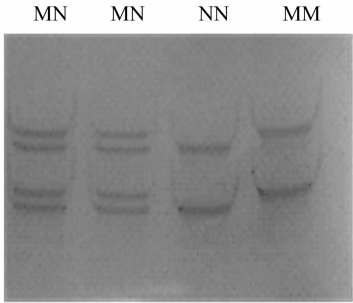


图1 *TPK1* SNP位点PCR扩增产物的PCR-SSCP分析

(登录号: ENSGALT00000020200) 中的序列一致, 将其定义为野生型。MM 型与 NN 型相比存在 1 个 G878A 单碱基突变, 将其定义为突变型。测序结果如图 2 所示。

2.2.3 5 个品系 *TPKI* 不同基因型差异检验 根据 PCR - SSCP 的检测结果, 对 *TPKI* 各种基因型在 5 个品系中的分布进行 χ^2 检验, 以检验各个群体是否处于 Hardy - Weinberg 平衡。由表 4 可知, 大恒肉鸡 5 个品系都符合 Hardy - Weinberg 平衡。S07 × S05 品系以 MM 基因型偏多, S07 × S01 品系以 MN 基因型偏多, 所有 5 个品系都以等位基因 M 为主。对 5 个品系的基因杂合度及多态信息含量分析显示, 5 个品系多态性均属于高度多态。

3 结论与讨论

3.1 硫胺素含量分析

对大恒优质肉鸡 S08、S07 × S01、D2、D1 4 个品系的硫胺

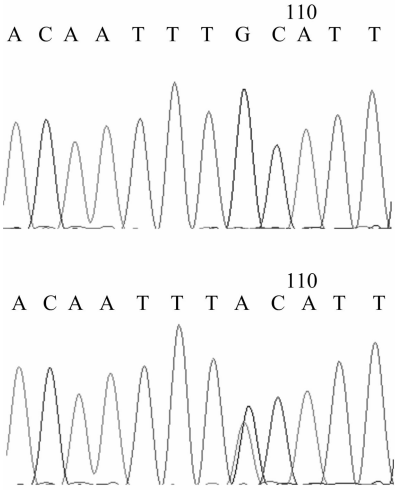


图2 MM型(上)及MN型(下)测序峰

表 4 5 个品系 *TPKI* 基因 SNP 位点基因型及基因频率

品系	样本数 (羽)	<i>TPKI</i> 位点的基因型频率			等位基因频率		$\chi^2(P)$
		MM	MN	NN	M	N	
S07 × S05	23	0.565 (13)	0.391 (9)	0.040 (1)	0.760 9	0.239 1	0.067 2 (0.795 4)
S07 × S01	15	0.400 (6)	0.533 (8)	0.060 (1)	0.666 7	0.333 3	0.419 1 (0.517 3)
S07	16	0.375 (6)	0.625 (10)	0.000 (0)	0.687 5	0.312 5	2.922 1 (0.0874)
S08	24	0.458 (11)	0.458 (11)	0.080 (2)	0.687 5	0.312 5	0.050 2 (0.8227)
S08 × S01	21	0.428 (9)	0.428 (9)	0.142 (3)	0.642 9	0.357 1	0.175 8 (0.675 0)

注: 基因频率中的括号中的数字表示样品数量(羽)。

素的含量进行检测及比较结果显示, 在 10 周龄时 S08 品系公鸡、母鸡胸肌中的硫胺素含量都是最高的, D1 品系中硫胺素的含量较低, 4 个品系中公鸡胸肌中的硫胺素含量都高于母鸡, 这与陈国宏等研究的结果一致^[4-6]。在相同的饲养条件及营养水平下, 大恒优质肉鸡腿肌中的硫胺素含量都比胸肌高, 这与陈国宏等的研究结果^[4]基本一致。在大恒优质肉鸡中各个品系的胸肌、腿肌的平均硫胺素含量分别为 0.816、1.357 mg/kg, 比陈国宏等所研究的地方鸡在 12 周龄时的平均硫胺素含量 0.44mg/kg 还要高^[4], 这可能是检测方法不一样或饲养条件、营养水平不同导致的, 但也表明了大恒优质肉鸡肌肉中的硫胺素含量还是相对较高的。

3.2 *TPKI* 基因多态性分析

本研究对大恒鸡 5 个品系 *TPKI* 基因的所有外显子及部分 3'非编码区进行了多态性位点的检测, 在 3'非编码区发现了 1 个 G878A 单碱基突变, 对 *TPKI* 各种基因型在 5 个品系中的分布进行 χ^2 检验及 SNP 位点基因型、基因频率研究。结果显示, 大恒鸡 5 个品系都符合 Hardy - Weinberg 平衡, 表明这 5 个品系在该位点受到的选择作用比较微弱, 或是在经过选择后又重新达到了平衡。S07 × S05 品系以 MM 基因型偏多, S07 × S01 品系以 MN 基因型偏多, 所有的 5 个品系都以等位基因 M 为主。在所有的 5 个品系中 NN 基因型只占总

基因型的 16%, 这可能是由于群体数量相对来说还比较少。

综上所述可见大恒优质肉鸡不同品系肌肉中硫胺素在肌肉中的沉积规律及大恒鸡不同家系间硫胺素的差异, *TPKI* 3' UTR 发现了 1 个 G878A 单碱基突变, 但与大恒优质肉鸡鸡肉中硫胺素含量差异不显著。这些结果对于今后从育种角度开发利用地方优质鸡种资源有重要意义。

参考文献:

[1] Resconi V C, Escudero A, Campo M M. The development of aromas in ruminant meat[J]. *Molecules*, 2013, 18(6): 6748 - 6781.

[2] Cerny C, Guntz - Dubini R. Identification of 5 - hydroxy - 3 - mercapto - 2 - pentanone in the maillard reaction of thiamine, cysteine, and xylose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(22): 10679 - 10682.

[3] 孟春玲. 鸡肌肉硫胺素相关候选基因遗传多样性及其与硫胺素含量相关性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.

[4] 陈国宏, 罗方妮, 吴信生, 等. 地方鸡种肌肉硫胺素的含量比较研究[J]. *肉类工业*, 2001(增刊 1): 50 - 52.

[5] 王克华, 窦套存, 曲亮, 等. 硫胺素在鸡肌肉中的沉积规律研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(11): 198 - 200.

[6] 谢恺舟, 戴国俊, 王金玉, 等. 京海黄鸡肉用性能及肉品质的研究[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2008, 29(1): 45 - 48.