

利用基因芯片技术研究两品种鸡脂肪组织差异表达基因 cDNA Microarray on Differentially Expressed Genes of Adipose Tissue in Two Breeds Chicken

王洪宝, 王启贵, 李 辉*

WANG Hong-Bao, WANG Qi-Gui and LI Hui*

东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030

The College of Animal Science and Technology, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

摘 要 应用包含 9024 条鸡 cDNA 的表达谱芯片, 对从两品种鸡脂肪组织抽提及纯化的 mRNA 进行芯片杂交, 并对基因表达谱进行分析, 旨在筛选高脂肉鸡和白耳蛋鸡脂肪组织差异表达的基因, 探讨造成两品种体脂性状差异的分子生物学机理。结果按差异显著阳性标准分析, 共筛选出差异表达基因 67 条, 主要涉及脂类代谢、能量代谢、细胞骨架构成、转录和剪接因子以及蛋白质合成与分解等相关基因, 此外, 还筛选出一些尚未在 GenBank 上登陆的序列, 推测可能是未知的新基因, 它们在鸡脂类代谢的过程所起到的作用还需进一步实验证明。

关键词 鸡, 基因芯片, 脂肪, 基因表达谱

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0979-04

Abstract cDNA microarray containing 9024 cDNAs was used to construct gene expression profile in order to screen differentially expressed genes of adipose tissue between broiler and Bai'er and investigate the molecular mechanism related with body fatness traits between the two breeds. Sixty seven differentially expressed genes, being involved in fat metabolism, energy metabolism, cytoskeleton, transcription and splicing factor, protein synthesis and degradation, were screened out. Furthermore, some genes that had no annotation in GenBank were screened out, they were presumed to be unknown new genes. The roles that they may play in chicken fat metabolism need clarify later.

Key words chicken, cDNA microarray, adipose tissue, gene expression profile

鸡不仅是价值很高的经济动物, 同时也是一种很好的模式动物, 因此, 它被广泛地应用于基础理论研究和实际生产研究。对鸡脂类代谢的研究是当前的热点, 解决因腹脂沉积过多而造成的诸多不利, 是世界范围内肉鸡业面临和亟需研究解决的重大问题之一。揭示鸡脂肪的合成与分解, 转运与沉积的分子机理, 既是有效解决这一问题的途径, 也有助于深入阐明肥胖的发病机制, 为肥胖的控制和治疗提供理论依

据。因此, 从分子水平上研究鸡的脂类代谢具有很高的研究价值和应用价值。

然而, 脂肪代谢和能量消耗是十分复杂的生命活动, 必将是涉及多基因、多途径、多阶段的过程。当前的研究以候选基因法和全基因组扫描法为主要方法, 但是这两种方法因各自具有其局限性而不能彻底解决这一问题, 解决的方法则是从整体上研究影响脂肪代谢和能量消耗的调控基因及

Received: May 23, 2005; Accepted: August 12, 2005.

This work was supported by the grants from the National High-Tech Research & Development Project(863 X No. 2002AA211021) and Excellent Young Teacher Granted Program of Education Ministry of China(No. 1985).

* Corresponding author. Tel: 86-451-55191416, E-mail: lihui@neau.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 项目(No. 2002AA211021) 教育部优秀青年教师资助计划项目(No. 1985)

其作用机制,为此,寻求一种高通量的差异表达基因筛选方法尤为重要,基因芯片的出现和应用为实现这一目标开辟了道路。基因芯片技术具有快速、高效、高通量、平行性等特点,如今已被广泛应用于生命科学领域的各项研究中。其中表达谱芯片技术在分析全基因组范围内基因表达的变化中起到了重要的作用,显示了巨大的优势,它使得后续研究目标明确,证据有力^[1]。

本研究系利用表达谱芯片技术,对10周龄高脂肉鸡和白耳蛋鸡脂肪组织的差异表达基因进行筛选,探讨两品种间脂肪组织表达谱的差异及其可能的分子生物学内在联系与规律,以期为进一步研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要的试剂和仪器

Trizol RNA 抽提试剂,购自 Invitrogen 公司;Oligotex mRNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司;CyScribe GFX Purification Kit 购自 Amersham Biosciences 公司;扫描仪为 Axon4100A 型,由哈尔滨基太生物芯片有限公司提供。

1.2 芯片

每张芯片包含 27648 个点,每 3 个点为同一基因的 3 次重复,除去阴性对照、管家基因后,共有 9024 条鸡 cDNA 序列,购自北京华大基因研究中心。

1.3 实验动物

高脂系肉鸡(来源于商用快大型品系)和白耳蛋鸡(中国地方品种)均来自东北农业大学育种基地,于10周龄时采取腹部脂肪组织样,液氮中速冻,-80℃保存备用。

1.4 RNA 的抽提及 mRNA 的纯化

Trizol 试剂抽提脂肪组织总 RNA,经紫外分光光度计和 1% 变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA。按照 Qiagen 公司的说明书,经 Oligotex mRNA Mini Kit 纯化得到 mRNA。

1.5 cDNA 探针制备和荧光素标记

mRNA 的反转录、cDNA 的纯化和标记完全遵照 Amersham Biosciences 公司的试剂盒说明书进行。其中用 Cy3 标记白耳鸡,用 Cy5 标记高脂鸡,标记反应结束后,经紫外分光光度计在 OD_{260nm} 下检测 cDNA 的浓度,550nm 和 650nm 分别检测 Cy3 和 Cy5 浓度,并计算二者的掺入率。

1.6 杂交

取等量 cDNA 合并成一管,避光蒸干,溶于 $6\mu L$ 无核酸酶的水中,95℃ 变性 2min,冰上冷却 30s,加入 PloyA 封闭 polyT 尾巴,然后加入杂交 buffer 和甲酰胺,混匀,铺片,42℃ 湿盒中避光杂交 16h~18h。

1.7 洗片

按如下步骤进行洗片:

- ① 在 250mL 预热至 55℃ 的($1 \times SSC + 0.1\%$ SDS)中洗 5min;
- ② 在预热至 55℃ 的($0.1 \times SSC + 0.1\%$ SDS)中洗 2 次,每次 10min;
- ③ 在预热至 55℃ 的($0.01 \times SSC + 0.1\%$ SDS)中洗 5min;

- ④ 室温下 $0.1 \times SSC$ 中洗 4 次,每次 1min;
- ⑤ $0.01 \times SSC$ 中浸一下;
- ⑥ 短暂离心干燥。

1.8 扫描和分析

Axon4100A 扫描仪进行扫描;GenePix Pro 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 荧光强度,标准化处理后计算 $Cy3/Cy5$ 值。差异显著的判定标准为 $\log_2(Cy3/Cy5)$ 大于 1 或小于 -1;Cy3 和 Cy5 任一荧光强度大于 600。

2 结果

2.1 RNA 质量监控结果

总 RNA 经紫外分光光度计检测, $OD_{260}/OD_{280} > 1.9$,18s 和 28s 电泳条带清晰(图 1)。

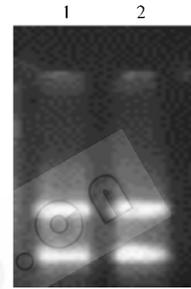


图 1 高脂(泳道 1)和白耳(泳道 2)脂肪组织总 RNA

Fig. 1 Adipose tissue total RNA of broiler (lane 1) and Bai'er (lane 2)

2.2 芯片杂交结果

在得到的芯片结果扫描图中,黄点表示该基因在两品种间的表达无明显差异,绿点表示该基因在白耳蛋鸡中的表达高于高脂肉鸡中,红点反映该基因在高脂肉鸡中的表达高于白耳肉鸡中。扫描后经背景均一化,扣除本地,得到的扫描图像(局部放大)见图 2,左图中的 3 个绿点对应载脂蛋白 AI 基因,右图中的 3 个红点对应脂蛋白脂酶基因。以 Cy3 荧光信号相对强度为 Y 轴和以 Cy5 荧光信号相对强度为 X 轴,芯片上的每一个点相对应于第一象限一个点,这样便形成了高脂-白耳脂肪组织基因表达谱的散点图,如图 3。夹在两条

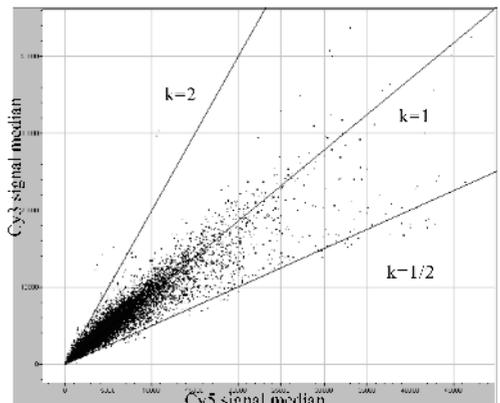


图 3 基因表达谱的散点图

Fig. 3 Scatter plots of hybridizing signals on gene chip

斜率分别是 2 和 1/2 的直线之间的点被认为是表达水平无明显差异,而偏离这两条直线的点则是表达量存在显著差异的基因。从基因表达谱的散点图可以看出大部分点集中在比值为 1 的直线两侧,为无明显差异的点。本研究共筛选出 67 条

表达量存在明显差异的序列。经分析得知,在已知功能的基因中,这些差异表达的基因涉及脂肪酸代谢,能量代谢,细胞骨架,转录和剪接因子以及蛋白质合成与分解等,详见表 1。

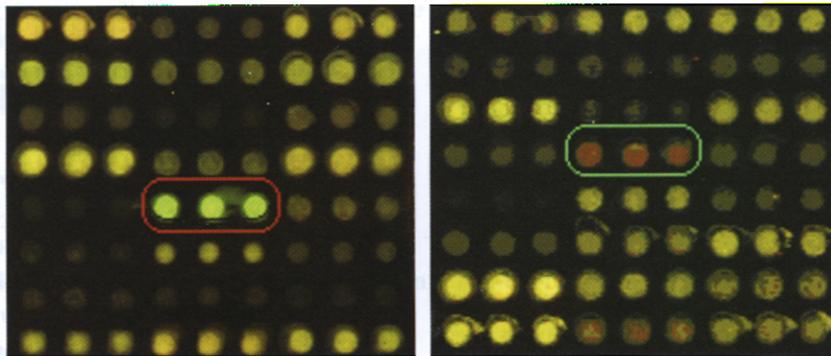


图 2 芯片扫描结果(局部放大)

Fig. 2 The result of scanning (partly magnified)

表 1 芯片筛选出的高脂-白耳脂肪组织部分差异表达基因

Table 1 Part of differentially expressed genes between Brioler and Bai'er

Category	GenBank ID	Definition	Average ratio(Log)
Fat metabolism	M18746.1	Chicken apolipoprotein AI (Apo-AI)	- 1.78
	X60547.1	Chicken lipoprotein lipase gene	1.17
Energy metabolism	X00954.1	Chicken mRNA for creatine kinase-M (CK-M)	- 1.45
	U19926.1	Gallus gallus troponin I (tmi)	- 1.57
Transcription and splicing factor	AB052717.1	Gallus gallus skTimod mRNA for skeletal muscle type tropomodulin	- 1.06
	BC008062.1	Homo sapiens, basic transcription factor 3	- 1.68
	BC001954.1	Homo sapiens, U4/U6-associated RNA splicing factor	- 1.35
Protein synthesis and degradation	AF330008.1	Gallus gallus eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase	- 1.15
	NM_021447.1	Mus musculus ring finger protein 30	- 1.04
Cytoskeleton	NM_022899.1	Homo sapiens likely ortholog of mouse actin-related protein 8	- 1.64
Intracellular trafficking	XM_037726.4	Homo sapiens brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange	1.11
Cell defence	J02579.1	Chicken 70 kd heat shock protein	1.15
Others	BC007738.1	Homo sapiens, chromosome 11 open reading frame 23	- 1.33
	XM_415017	Gallus gallus similar to chromosome 20 open reading frame 72	1.42
	NM_015196.1	Homo sapiens KIAA0922 protein	- 1.51
	NM_015023.1	Homo sapiens KIAA1037 protein	- 1.27
	XM_053574.2	Homo sapiens hypothetical gene	- 1.41

Note: Ratio < - 1 means the gene expresses higher in bai'er than in brioler, Ratio > 1 means the gene expresses higher in brioler than in bai'er.

3 讨论

肥胖是指因体内脂肪过量沉积导致体重的过度增加及代谢的紊乱,发病过程涉及多因素,十分复杂。由于其与脂类代谢和能量代谢关系密切,因此目前的研究主要集中在这两个过程。所选用的研究策略通常为设置正常-肥胖组或肥胖-反义治疗组,然后利用不同的分子生物学手段研究两者的差异及其原因。

本实验研究的两个品种,高脂肉鸡和白耳蛋鸡在生长和体内脂肪沉积量上有明显的差异,高脂系肉鸡体重在 2、4、6、8、10、12 周龄时分别是白耳鸡体重的 4.03、5.41、4.36、4.92、4.48 和 2.6 倍;高脂系肉鸡 12 周龄时的腹脂重为 150.3g,而白耳蛋鸡仅为 8.6g,前者是后者的 17.5 倍;12 周龄时高脂系肉鸡腹脂率是白耳鸡的 4.2 倍。可见它们是研究脂肪沉积和能量代谢很好的动物模型。

从本实验的研究结果分析,筛选到的差异表达基因中,

脂蛋白脂酶基因和载脂蛋白 AI 基因都是直接参与脂类代谢的基因。

脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)是影响动物脂肪沉积的关键酶^[2]。它的主要功能是将血液中乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)所携带的甘油三酯分解成甘油和脂肪酸,进而向脂肪组织提供合成甘油三酯所需的原料。Friedlander 等 2000 年报道 LPL 基因突变可导致 LPL 活性降低,引起血脂水平增高,加快动脉粥样硬化的形成和发展^[3]。Kern 等人已将脂蛋白脂酶基因列为是引起肥胖发生的一个重要候选基因^[4]。2004 年王宇祥以 RT-PCR 的方法检测了 LPL 基因在 2、10、12 周龄 AA 肉鸡和蛋鸡脂肪组织中的表达情况,结果发现这几周龄 LPL 基因在肉鸡中的表达量均高于蛋鸡^[5]。我们的芯片结果与之前的研究有一致的结论。

载脂蛋白 AI(Apolipoprotein AI, Apo-AI)是血浆高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)的主要成分,对胆固醇的动态平衡起到重要的作用^[6]。Dionyssiou 等 2002 年的研究发

现 Apo-AI 在血浆中的含量与人类动脉粥样硬化、糖尿病等脂类代谢紊乱疾病有重要的联系。糖尿病患者血清中 Apo-AI 的含量显著低于正常人血清中的含量^[7]。2003 年王启贵等利用 PCR-SSCP 的方法,在鸡 Apo-AI 基因的 5'侧翼区检测到一个突变,该突变点对腹脂重和腹脂率有显著的影响,推测 Apo-AI 基因可能是影响鸡体脂性状的主效基因或与控制该性状的主效基因连锁^[8]。

能量消耗与体重之间的密切关系已为公认的事实^[9]。本研究筛选到的基因中,肌酸激酶基因、肌钙蛋白 I 基因和骨骼肌原肌球蛋白调节蛋白基因都是参与能量代谢的重要基因。它们在白耳鸡中的表达量均高于在高脂肉鸡中。肌酸激酶(creatine kinase-M,CK-M)是催化高能磷酸键从 ATP 到肌酸,产生 ADP 和磷酸肌酸这一可逆过程的关键酶^[10]。肌钙蛋白(troponin,Tn)和原肌球蛋白(Tropomyosin)是调节骨骼肌活性的两种关键蛋白^[11]。在肌肉的收缩过程中起关键作用。骨骼肌原肌球蛋白调节蛋白(skeletal muscle type tropomodulin,SK-Tomd)结合在原肌球蛋白末端,它可以维持细肌丝的长度,保证肌肉正常收缩^{[12][13]}。肌肉收缩是一个耗能的过程,骨骼肌借助氧化能源物质而获得的能量完成收缩,调节多项生理活动。

细胞骨架重构是脂肪细胞增殖和分化过程中的一个重要现象^[14]。在脂肪细胞分化早期,细胞由不规则形变为圆形的过程中,肌动蛋白(actin)、微管蛋白(tubulin)和波形蛋白(vimentin)等骨架相关蛋白的表达成明显下降趋势,其中肌动蛋白表达下调 90% 以上^[15]。本研究发现与鼠同源的肌动蛋白相关蛋白(actin-related protein 8)在高脂系肉鸡中的表达量要远远低于白耳蛋鸡中,这也证实了上述研究结果。

此外,U4/U6-associated RNA splicing factor 是剪接过程中的关键因子^[16],Basic Transcription Factor 3(BTF3)参与转录过程,还有一些蛋白质代谢相关基因,它们在高脂系肉鸡中的表达均成下降趋势,提示在高脂系内,蛋白质的合成并不活跃,其机理有待进一步阐明。

本研究还筛选出一些未在 GeneBank 上登陆的序列,将这些序列与鸡的全基因组数据库进行比对后,发现其序列定位信息均可知,但对应的基因没有足够的信息,而且这些序列在人或鼠上也只是一种假设的基因(hypothetical gene),推测他们可能是鸡基因组中未知的新基因,这还需要进一步的研究证实。

总之,利用基因芯片技术筛选脂肪组织差异表达基因是一种快速、高效和比较可靠的方法。它从基因组水平分析基因的表达,探讨差异表达基因间的内在联系与规律,研究造成不同品种鸡体脂性状差异的分子生物学机理,是研究脂类代谢的有力工具。

REFERENCES (参考文献)

[1] Morgan RW, Sofer L, Anderson AS *et al.* Induction of host gene expression following infection of chicken embryo fibroblasts with oncogenic Marek's disease virus. *J Virol.* 2001, **75**(1): 533 - 539

[2] Keith N, Fragn S, Coppock W. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue *in*

vivo implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Advan Enzyme Regul.* 1995, **35**: 163 - 178

- [3] Friedlander Y, Talmud PJ, Edwards KL *et al.* Sib-pair linkage analysis of longitudinal changes in lipoprotein risk factors and lipase genes in women twins. *Lipid Research* 2000, **41**(8): 1302 - 1309
- [4] Wang YX(王宇祥). The SNPs of chicken FAS, LPL gene are genetically associated with growth and fatness traits. Dissertation of the master degree of northeast agriculture university(东北农业大学硕士论文). 2004. Jun
- [5] Kern PA. Potential role of TNF α and lipoprotein in lipase as candidate genes for obesity. *Nutr.* 1997, **127**(9): 1917s
- [6] Bhattacharyya N, Chattapadhyay R, Oddoux C *et al.* Characterization of the chicken apolipoprotein A-I gene 5'-flanking region. *DNA Cell Biol.* 1993, **12**(7): 597 - 604
- [7] Dionysiou-Asteriou A, Papastamatiou M, Vatalas IA *et al.* Serum apolipoprotein AI levels in atherosclerotic and diabetic patients. *Eur J Vasc Endovase Surg* 2002, **24**(2): 161 - 165
- [8] Wang QQ(王启贵), Wang GH(王桂华), Leng I(冷丽) *et al.* Polymorphisms of Apo-AI Gene Associated with Body Composition Traits in Chicken. Proceeding of 11th poultry academic symposium in china(第十一次全国禽学术讨论会论文集). Jilin: Jilin Science Technology Press 2003, pp.7 - 10
- [9] Eric Doucet, Angelo Tremblay, Jean-Aimé Simoneau *et al.* Skeletal muscle enzymes as predictors of 24-h energy metabolism in reduced-obese persons. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, **78**(3): 430 - 435
- [10] Gustafson LA, Van Beek JH. Activation time of myocardial oxidative phosphorylation in creatine kinase and adenylate kinase knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **282**(6): H2259 - H2264
- [11] Ward DG, Ashton PR, Trayer HR *et al.* Additional PKA phosphorylation sites in human cardiac troponin I. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(1): 179 - 185
- [12] Sussman MA, Ito M, Daniels MP *et al.* Chicken skeletal muscle tropomodulin: novel localization and characterization. *Cell Tissue Res*, 1996, **285**(2): 287 - 296
- [13] Almenar-Queralt A, Lee A, Conley CA *et al.* Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle. *J Biol Chem*, 1999, **274**(40): 28466 - 28475. Erratum in: *J Biol Chem*, 2000, **275**(17): 13164
- [14] Spiegelman BM, Farmer SR. Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell*, 1982, **29**(1): 53 - 60
- [15] Guo XM(郭学敏), Liao K(廖侃). Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* 2000, **251**(1): 45 - 53
- [16] Chakarova CF, Hims MM, Bolz H *et al.* Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**(1): 87 - 92