

苏钟猪 *FTO* 基因的 mRNA 表达、克隆测序及其生物信息学分析

付言峰¹ 李 兰^{2,3} 王学敏¹ 李碧侠¹ 方晓敏¹ 赵 芳¹ 任守文¹

(1. 江苏省农业科学院 畜牧研究所 江苏 南京 210014; 2. 中国农业大学 动物医学院 北京 100193;

3. 国家兽用生物制品工程技术研究中心 江苏 南京 210014)

摘要: 脂肪肥胖相关基因(*FTO*) 在控制食欲和能量消耗方面具有重要作用。为进一步了解猪 *FTO* 基因的结构和功能,以苏钟猪为试验对象,利用 RT-PCR 方法,分析该基因在苏钟猪 5 种不同组织(肺脏、肝脏、心脏、背膘和背最长肌) RNA 水平的表达谱信息;对苏钟猪 *FTO* 基因的编码序列(CDS)进行了克隆测序,并用生物信息学方法分析了苏钟猪 *FTO* 蛋白的结构和不同物种间的同源性。结果表明,*FTO* 基因在苏钟猪各组织中的 mRNA 表达丰度表现为:背膘>心脏>肺脏>肝脏>背最长肌,其中背膘中的表达量显著高于其他组织($P<0.05$)。苏钟猪 *FTO* 的 CDS 区发现了 8 个 SNPs,分别为 G52A、C523T、G628A、A655G、A810G、A886G、G1002A 和 A1344G。苏钟猪 *FTO* 基因编码一个含 505 个氨基酸的蛋白,理论等电点为 5.23,具有亲水性,不存在信号肽,是非分泌型蛋白,与牛、绵羊、狗等物种的亲缘关系最近。*FTO* 的 mRNA 表达对苏钟猪的皮下脂肪、心脏、肌肉等组织的脂肪沉积有一定影响,其编码序列中丰富的 SNPs 可成为苏钟猪肉质改良育种中的重要分子标记。

关键词: 苏钟猪; 脂肪肥胖相关基因; 克隆测序; 遗传变异; 生物信息学

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0128-07

The mRNA Expression, Cloning and Sequencing of *FTO* gene and Bioinformatics Analysis in Suzhong Pig

FU Yan-feng¹ LI Lan^{2,3} WANG Xue-min¹ LI Bi-xia¹ FANG Xiao-min¹ ZHAO Fang¹ REN Shou-wen¹

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. National Research Center of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: Fat mass and obesity associated gene (*FTO*) plays an important role in the control of appetite and energy expenditure. In order to understand the structure and function of porcine *FTO* gene, the mRNA expression profile of porcine *FTO* in five tissues (lung, liver, heart, backfat and longissimus dorsi muscle) were examined in Suzhong pigs by RT-PCR. Besides, the coding sequences (CDS) of *FTO* were cloned and sequenced in Suzhong pigs, molecular structure and homology among different species of *FTO* were analyzed by bioinformatics methods. The results showed that mRNA expression intensity of *FTO* in different tissues tended to be backfat > heart > lung > liver > longissimus dorsi muscle. Among these tissues, *FTO* expression in backfat was significantly higher than that in any other tissue ($P<0.05$). There were eight SNPs detected in coding sequences (CDS) of *FTO* in Suzhong pigs, including G52A, C523T, G628A, A655G, A810G, A886G, G1002A and A1344G. Bioinformatic analysis revealed that porcine *FTO* gene encode a protein of 505 amino acid, and its theoretical isoelectric point was 5.23. *FTO* protein was a hydrophilic and non-secreted protein without a signal peptide. In addition, Suzhong pig was closed to cattle, sheep and dog in phylogenetic tree. These findings suggest that the mRNA expression of *FTO* may have certain influence in regulating fat deposition in some tissues of Suzhong pigs, such as subcutaneous fat, heart and muscle etc, and these abundant SNPs in coding sequence of *FTO* could become important molecular markers for im-

收稿日期: 2012-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(31201767); 江苏省博士后科研资助计划经费; 江苏省农业科学院博士后基金(No. 026056511104); 国家生猪现代产业技术体系南京综合试验站(nycyt-x-009)

作者简介: 付言峰(1982-), 男, 山东聊城人, 助理研究员, 博士, 主要从事猪遗传育种与繁殖的研究。

通讯作者: 任守文(1962-), 男, 安徽霍邱人, 研究员, 主要从事猪育种与生产的研究。

proving meat quality in Suzhong pigs.

Key words: Suzhong pig; Fat mass and obesity associated gene; Cloning and sequencing; Genetic variation; Bioinformatics

随着猪肉产量的提高和人民生活水平的提高,消费者对猪肉品质要求逐渐提升,所以肉质也越来越被养猪企业所关注^[1-2]。肉质性状涉及到胴体的眼肌面积、背膘厚、瘦肉率、肌间脂肪含量、肌肉纤维粗细等性状,这会直接影响熟肉的口感、味道、香气和营养价值等,其中影响猪肉品质的一个关键因素是脂肪和肌肉组织中的脂肪沉积^[3],脂肪沉积非常复杂,每一种类型的脂肪沉积都对应一种不同的沉积过程^[4-5]。另外,人类肥胖正成为一个日益严重的全球性的问题,猪作为一个良好的动物模型,在研究肥胖候选基因的研究中发挥重要的作用^[6]。因此,开展猪的脂肪代谢分子机制研究显得尤为迫切。

脂肪肥胖相关基因(Fat mass and obesity associated gene *FTO*)是2007年新发现的与人类肥胖相关的基因^[7],在人类和小鼠上的研究表明,该基因在控制食欲和能量消耗方面具有重要作用^[8-9]。*FTO*基因可以通过调控脂肪细胞成脂功能,从而调节人类肥胖的发生^[10]。随着*FTO*基因研究的进一步深入,其调节脂肪细胞成脂功能的分子机制及其对胰岛素抵抗调节的分子基础,将会被更清楚地阐述^[11]。猪*FTO*基因研究起步较晚,其定位在6号染色体上^[12],这一染色体区域被认为是调控许多脂肪性状的数量性状位点的区域^[13]。在猪的多个组织器官包括肌肉、大脑、小脑、海马、肝、肾、心等均检测到了较高的*FTO* mRNA 丰度^[6]。国外对猪*FTO*基因的遗传变异与其肌肉脂肪、肌间脂肪的沉积、大理石评分、滴水损失及瘦肉率等猪肉品质的关系研究已有零星报道^[14],国内对猪*FTO*基因的遗传变异在不同品种猪群中的多态性分布也有一些报道^[15]。

因此,鉴于*FTO*在脂类代谢过程中的生物学功能,本研究采用RT-PCR方法分析了*FTO*在苏钟猪不同组织的mRNA表达水平,克隆了苏钟猪*FTO*基因的全长编码序列(CDS),并预测了编码蛋白的等电点、疏水性、信号肽等参数,建立不同哺乳动物*FTO*蛋白上的进化图谱,为了解*FTO*在猪生物体内的功能,不同哺乳动物*FTO*的演化关系提供了资料,且促进了人类肥胖等疾病的防治研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验动物来自于江苏洪泽鑫象猪业有限公司,

以5头半同胞苏钟母猪为研究对象,按猪场常规进行饲养和管理,同时在自由采食及饮水条件下,注意进行疾病的防治和行为体况的观察。在同场、相同管理条件下进行单圈饲养,体况基本一致,在其6月龄,体质量达到 (95 ± 2) kg时统一屠宰。每头猪采集5种组织:心脏、肝脏、肾脏、背最长肌和皮下脂肪,组织样用液氮冷冻保存。

1.2 引物设计

猪*FTO*基因的cDNA序列(GenBank: NM_001112692)全长1 542 bp,其中15~1 532 bp处为CDS区域。*FTO*和*GAPDH*(持家基因)的引物均由Oligo 6软件设计,其中*FTO*引物为一对跨外显子序列,由上海英潍捷基(Invitrogen)生物公司合成(表1)。

表1 猪*FTO*基因RT-PCR分析用引物序列及反应条件

Tab.1 Primer pairs and PCR conditions used in RT-PCR analysis of porcine *FTO* gene

引物 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')	退火温度/℃ Anneal temperature	产物长度/bp Product size
<i>FTO</i>	AGCAGCAGCATGAAGCGAAC GTGAGATCAAACGGCAGAGG	62	1 478
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	62	452

1.3 主要试剂与仪器

主要试剂有上海生工的琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨, Takara的pMD18-T载体和感受态细胞, Trizol (Invitrogen, America)、cDNA第一链合成试剂盒 (Fermentas, Canada)、*Taq* DNA聚合酶 (Fermentas, Lithuania)、琼脂糖 (Biowest, Spain)、DEPC (Key-Gen, 中国)、乙醇、异戊醇、氯仿均为南京化学试剂有限公司生产。1 × TAE缓冲液、1 × TBE缓冲液、75%乙醇、EDTA、超纯水均为自配。

主要仪器有梯度PCR仪 (Eppendorf, Germany)、高速冷冻离心机 (Sorvall, Germany)、超净工作台 (苏州净化, 中国)、恒温培养箱 (Yamato, Japan)、凝胶成像仪 (Bio-rad, America)、自动灭菌锅 (SANYO)、空气恒温摇床 (湘仪, 中国)。

1.4 RNA提取与检测

RNA提取分6步完成。①匀浆: 取50~100 mg液氮保存的组织样于研钵中加入液氮迅速研磨后加入1 mL的Trizol试剂中, 快速振摇混匀。②抽提: 室温放置5 min, 使核蛋白复合物完全溶解; 加入0.2 mL氯仿并强烈振摇15 s, 冰上放置2~3 min后

置于 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min。③RNA 沉淀: 把上层水相转移至干净的 Eppendorf 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇; 室温放置 10 min 后于 4℃, 12 000 r/min 离心 15 分钟。④RNA 洗涤: 弃上清, 加入 1 mL 用 DEPC 水配制的 75% 乙醇, 柔和旋转离心管数次, 置于 4℃, 7 000 r/min 离心 5 min。⑤RNA 溶解: 沉淀于室温干燥 5~10 min, 加入 20~35 μ L DEPC 水溶解, 待完全溶解后置于 -70℃ 保存。⑥RNA 检测: 取 RNA 样品用 1 \times TE Buffer 稀释 100 倍, 测定样品在 260、280 nm 的吸收值, 确定 RNA 的质量。

1.5 RT-PCR

RT-PCR (反转录 PCR) 是先将提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 再以此 cDNA 为模板, PCR 扩增 *FTO* 和 *GAPDH* 基因的目的片段。cDNA 第一链合成: PCR 采用 25 μ L 反应体系, RNA 4 μ g, Oligo dT₍₁₈₎ (10 μ mol/L) 2 μ L, DEPC 水至 15 μ L; 75℃ 保温 5 min, 然后冰浴 5 min; 再依次加入: RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times M-MLV Reaction Buffer 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.5 μ L, DTT (200 mmol/L) 1 μ L, 反转录酶 (M-MLV) 1 μ L, 最后添加 DEPC 水至总体积 25 μ L。轻轻混匀后 2 000 r/min 离心 20 s; 42℃ 保温 1 h, 然后 85℃ 保温 10 min, 最后置于冰上 5 min。合成的 cDNA 作为下面 PCR 反应的模板, -20℃ 保存。

PCR 采用 25 μ L 反应体系, 即: ddH₂O 17.3 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs Mix 2.0 μ L, 上下游引物 (10 pmol/ μ L) 各 0.6 μ L, cDNA 模板 1.5 μ L, *Taq* 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应条件: 97℃ 预变性 5 min 后进行 30 次循环 (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min), 再 72℃ 延伸 10 min, 降温至 4℃ 停止反应, 并于 -20℃ 保存。

1.6 克隆测序

克隆测序的步骤如下: PCR 产物的回收纯化: 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) (上海生工) 进行回收, 按说明书上步骤进行操作。连接反应: 将回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上。10 μ L 连接反应体系如下: Solution I 5.0 μ L, pMD18-T Vector 0.5 μ L, 纯化的 PCR 产物 80 ng, 加双蒸水至 10 μ L。混匀, 微离心, 16℃ 连接过夜。转化: 从 -70℃ 取出感受态细胞 100 μ L, 置于冰上解冻。向感受态细胞中加入 10 μ L 连接产物, 轻柔混匀, 冰浴 30 min。在 42℃ 水浴中热激 90 s, 立即置于冰浴中静放 2 min。加 800 μ L 液体 LB, 于 37℃, 200 r/min 振荡复活 50 min。涂 100~200 μ L

于含 X-gal (40 μ L/平板) 和 IPTG (7 μ L/平板) 的 Amp⁺ (氨苄) 平板。于 37℃ 恒温培养箱中正放 1 h 后, 倒置培养 9~16 h。重组质粒的筛选: 将平板中培养 9~16 h 的细菌, 选单个菌落挑至玻璃管中的 10 mL 液体培养基中 (含 6 μ L 氨苄), 260 r/min, 36.5℃ 培养 12~36 h, 之后进行菌体 PCR, 用琼脂糖凝胶中电泳检测, 合格的菌液选 1 mL 送 Invitrogen 公司测序。

1.7 数据统计

不同组织间 mRNA 表达量的差异性显著水平通过 SAS 8.2 统计软件包进行 GLM 分析, 结果以最小二乘均数 \pm 标准误 (LSmeans \pm se) 表示。

生物信息学分析时, 采用 DNAMAN 6.0 软件分析氨基酸组成和蛋白序列的同源性, 利用 ExPASy 网站的在线分析软件 Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析蛋白质分子量和等电点, 用 ExPASy 的 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 计算蛋白质的疏水性, 应用 SignalP 4.0 在线软件对该蛋白进行信号肽分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 并利用 MEGA 4.0 软件构建分子进化树^[16]。灰度值分析采用软件 Image J (Image Processing and Analysis in Java, 网址: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取结果

组织样中提取的总 RNA 利用分光光度计测定出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 结果大都处于 1.8~2.1 的区间, 说明提取的 RNA 浓度很高, 质量很好, 可以进行后续的反转录和 Real-time PCR 试验 (表 2)。

2.2 *FTO* 的组织表达谱

对猪、人和小鼠的 *FTO* 基因的 cDNA 序列做同源性比较, 猪 (GenBank: NM_001112692) 与人 (GenBank: NM_001080432) 的同源性为 88%, 与小鼠 (GenBank: NM_011936) 的同源性为 83%。在猪不同组织的总 RNA 序列上进行 *FTO* 基因的 RT-PCR 扩增, 其扩增产物与持家基因 *GAPDH* 的进行比较, 进行 Semi-quantitative RT-PCR 分析。

以 *GAPDH* 为内标, 对猪肺脏、肝脏、心脏、背膘、背最长肌 5 种组织样中 *FTO* 基因的组织表达特异性进行了 RT-PCR 半定量分析, 凝胶电泳图结果见图 1-A、B。对 *FTO* 基因的表达量做相对于内标基因 *GAPDH* 的对比分析, 以确定目的基因在各组织样中相对于持家基因表达量的相对值, 如图 1-C 所示, *FTO* 基因的 mRNA 在背膘和心脏的表达量最

高,其次为肺脏和肝脏的,背最长肌上的表达量最低,且3类组织之间的表达差异显著($P < 0.05$)。*FTO* 在背膘中有较高的表达,但背最长肌上表达量却很低,可能与该基因的作用靶器官有关,但需进一步验证,这提示 *FTO* 与猪的脂肪沉积性能相关。

2.3 *FTO* 的克隆测序结果

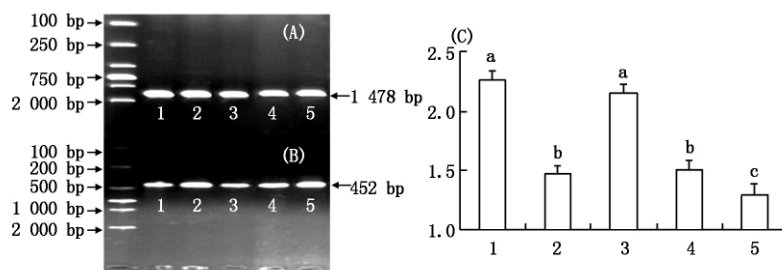
猪 *FTO* (GenBank: NM_001112692) 的 cDNA 全长 1 542 bp,其编码序列 (Coding sequence, CDS) 区域范围为 15 ~ 1 532 bp。本试验以苏钟猪的脂肪组织样为研究对象,提取总 RNA,反转录为 cDNA,设计引物扩增 CDS 区域片段,又经过克隆测序,最终得到了苏钟猪 *FTO* 的 cDNA 区域范围 15 ~ 1 532 bp

的编码序列,此序列已提交至 NCBI 数据库,得到的 GenBank 登录号为: JX873956,如图 2。经 DNAMAN 软件比对,本试验克隆得到的苏钟猪 *FTO* 基因编码序列 (CDS) 与 NCBI 报道的猪 *FTO* 基因 (NM_001112692) CDS 间的相似度为 99.47%,其中共发现 8 个 SNPs,分别为 *FTO* 的 cDNA 序列第 52 位的 G→A (G52A),第 523 位的 C→T (C523T),第 628 位的 G→A (G628A),第 655 位的 A→G (A655G),第 810 位的 A→G (A810G),第 886 位的 A→G (A886G),第 1002 位的 G→A (G1002A) 和第 1344 位的 A→G (A1344G)。

表 2 猪不同组织中抽取的总 RNA 的 OD 值

Fig. 2 Results of OD value for total RNA of different tissues in pigs

序号 Order	组织样 Tissue	性别 Gender	OD 比值 OD value ratio			RNA 含量/($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) RNA content
			OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	
1	心脏	母	0.463	0.225	2.06	1.85
2	肝脏	母	0.554	0.276	2.01	2.22
3	肾脏	母	0.304	0.155	1.96	1.22
4	皮下脂肪	母	0.151	0.080	1.89	0.60
5	背最长肌	母	0.412	0.203	2.03	1.65
6	背最长肌	公	0.238	0.117	2.03	0.95



GAPDH 为阳性对照。(A). *FTO*; (B). *GAPDH*; (C). 灰度值比值 *FTO*/*GAPDH*。1. 背膘; 2. 肝; 3. 心; 4. 肺; 5. 眼肌。

柱形图上不同的字母标注代表两两间的差异性水平 ($P < 0.05$)。

GAPDH gene is as positive control. (A). *FTO*; (B). *GAPDH*; (C). Gray values of *FTO*/*GAPDH*. 1. Backfat; 2. Liver; 3. Heart; 4. Lung; 5. Eye-muscle.

Values with different superscripts show significant levels within columns ($P < 0.05$).

图 1 *FTO* 基因在苏钟猪不同组织中的 mRNA 表达量的 1.5% 琼脂糖检测结果的条带灰度值对比结果

Fig. 1 The 1.5% agarose electrophoresis atlas for the mRNA expression of swine *FTO* gene in different tissues of Suzhong pigs and gray values of scanned agarose lane images by LabImage software

ATGAAGCGAACCCCAACCGCGAGGAACGAGAGCGCGAAGCTAAGAACTGAGGCTTCTTGAAGAGCTGGAAGACACTTGGCTTCCTTATCTGACCC
CCAAAGATGATGAATTCTATCAGCAGTGGCAGCTGAAATACCTAAGCTAATCTCCGAGAAGCAGCGCAGCGTCCCTGAGGACTCCACAAAGAGGTT
CAAGAAGCCTTCCTCGCACTGCACAAGCATGGCTGCTTATTTGCGGACCTGGTCAGGATCCAAGGCAAAGATTGCTCACGCCAGTATCTCGCCTCCTC
ATTGGTAACCCCGCTGCACCTACAAGTACCTGAACACCAGGCTCTTACCGTCCCTGGCCAGTGAAGGGCTCTGATGCAAAGTACAATGAGGCCGA
GATAGGCGCCGCTGCCAGACCTTCTCAAGCTCAACGACTACCTGCAGATTGAGACCATCCAGGCGCTGGAGGAACTCGCTGCCAAGGAGAAAGCC
AATATCGACACCGTGCCGGTGTGTATAGTCCAGATTTCCTCCAGGCTGGCATGGGGTTCATCTTTGACGGCCATGACGAGGTGGACAGGAAGAGCAG
AGCCGCCTACAACCTAACTTTGTGAACCTTCATGGATCCCGAGAAATGCCGTGCTGAAAGAGGAGCCCTACTTTGGCATGGGGAAGATGGCTGTGA
GCTGGCATCACGATGAAATCTGGTGACAGGTCAGCGGTGGCAGTGTACAATTATAGCTGTGAAGGCCCTGAAGAGGAAAGCGAGGATGATCCCCA
GCTCGAAGGCAGAGATCCCGATGTGTGGCATGTTGGCTTTAAGATCTCATGGGACATAGAGACCCCTGTTTGGCGATACCCCTTCCCGAGGAGACT
GCTACTTTATGCTGGATGATCTCAATGCCACCCACCAACACTGTGTTTGGCTGTTTACCACCCCGGTTTATGTTCCACCCACCGAGTGCCCGAGTGCT
CGACGGGAACCTTGGATTACATCTTACAGCGCTGCCAGTTGGCCCTGCAGAAATGTCCTGTGATGAGGCGGACAGTGGTGAAGTCTCTTTGAAATCCTTG
GAGCCTGCGGTTTTGAAACAAGGAGAAGAAATCCACAACGAGGTGCGAGTTTGAAGTGGCTGAGACAGTTTGGTTTCAAGGCAATCGATACAAAAAGT
GCACCGATTGTGGTGTCAACCCATGACTCAGCTGGAAGAGCTTTGGAAGAAGATGGAAGGTGCGACCCATGCTGTGCTTCGTGAAGTTAGAAGAGA
GGGGGCCCTGTGGAACAGAGCAGTGACATCTGACTGCCATCTGACCGTGTCTACCGCTCGCCAGAACCTGAGGAGGGAGTGGCATGCCAGGTGC
CAGTCCCGAATTGCCGAACCTGTCCTGTGGACAGAGCCAGAAATGCCGCGGTATTGGGAAAAGGATGATCCCTCCATGCTCTGCCGTTTGATCT
CACAGACACTGTGGCTGAACCTCAGAGTCTGCTTCTGGAAGCCAAACCTAG

图 2 苏钟猪 *FTO* 基因的 CDS 区域克隆测序结果

Fig. 2 Coding sequence of *FTO* gene in Suzhong pigs by cloning and sequencing
the GenBank accession number obtained is JX873956 in NCBI website

2.4 生物信息学分析

2.4.1 氨基酸组成、分子量和等电点分析 利用 DNAMAN 软件分析显示,苏钟猪 *FTO* 基因 CDS 区 (GenBank: JX873956) 共有 1 518 个核苷酸组成,编码 505 个氨基酸,用 ExPASy 网站的在线软件 Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析表明,该基因编码蛋白的分子量为 581 ku,理论等电点为 5.23,推测该蛋白为酸性蛋白。

2.4.2 蛋白质疏水性分析 疏水性是 20 种氨基酸固有的特性,是决定蛋白质最终三维空间构象的重要因素之一。用 ExPASy 网站的 ProtScale 程序 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 计算苏钟猪 *FTO* 蛋白的疏水性图谱(图 3)。纵坐标 0 值以上为疏水区,0 值以下为亲水区。纵坐标代表疏水性的分值,分值越高,疏水性越强;相反,分值越低,亲水性越强。横坐标代表氨基酸的位置,如图 3 所示。多肽链第 438 位的异亮氨酸(Ile)具有最高的分值 3.056,疏水性最强;第 12 位的精氨酸(Arg)具有最低的分值 -3.222,亲水性最强。苏钟猪 *FTO* 基因共编码 505 个氨基酸,其中 153 个氨基酸的分值为 ≥ 0 ,352 个氨基酸的分值 < 0 ,说明亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,且均匀分布在整条肽链中。因此,整个多肽链表现为亲水性,可认为该基因编码蛋白为亲水性蛋白。

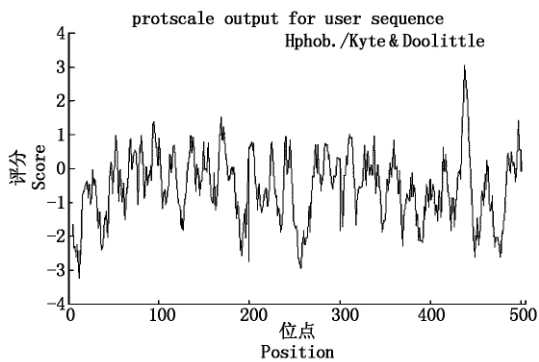


图 3 ProtScale 程序分析的苏钟猪 *FTO* 蛋白疏水性图谱

Fig.3 The hydrophobicity profile of *FTO* protein analysed by ProtScale program in Suzhong pigs

2.4.3 蛋白质信号肽预测 用 SignalP 4.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析,结果为: Y-Score 曲线没有出现峰值, S-Score mean = 0.156 < 0.5 ,说明苏钟猪 *FTO* 蛋白很可能不存在信号肽, D-Score = 0.145 < 0.5 ,说明它是非分泌型蛋白(图 4)。

2.4.4 氨基酸同源性和系统发育分析 应用 DNAMAN 对苏钟猪 *FTO* 编码的氨基酸序列进行同源性比对,结果表明,苏钟猪与其他物种的氨基酸同源性有所不同,按相似性从高到低的顺序依次为:牛

(96.24%)、绵羊(96.04%)、狗(96.04%)、人(95.25%)、家兔(95.05%)、黑猩猩(95.05%)、小鼠(93.47%)、猕猴(91.84%)、马(90.62%)、火鸡(82.40%)、原鸡(81.87%)、斑马鱼(56.39%)。根据上述各物种间氨基酸同源性,构建了哺乳动物 *FTO* 蛋白的系统发育树,结果表明,与苏钟猪亲缘关系由近及远分别为:牛、绵羊、狗、人、家兔、黑猩猩、小鼠、猕猴、马、火鸡、原鸡、斑马鱼,符合物种进化规律(图 5)。

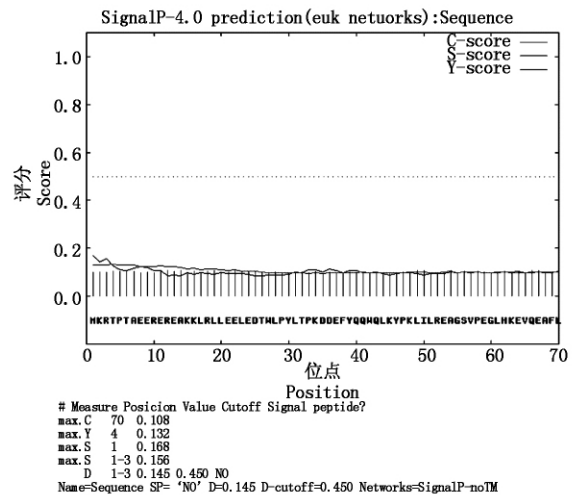


图 4 苏钟猪 *FTO* 蛋白的信号肽分析

Fig.4 Signal peptide prediction of *FTO* protein in Suzhong pigs

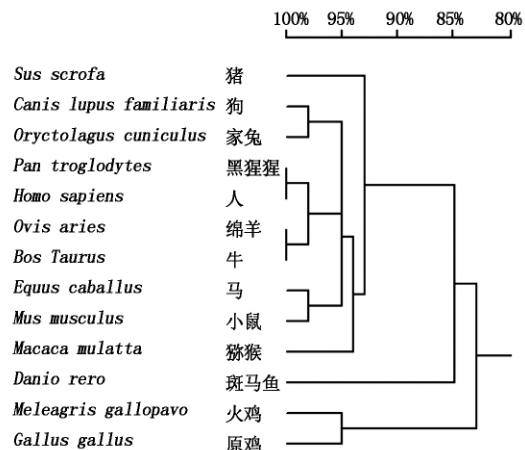


图 5 哺乳动物 *FTO* 蛋白的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of mammals' *FTO*

3 讨论与结论

随着定位克隆、物理作图和候选基因等分子生物学技术的发展,研究人员已成功发现许多影响猪脂肪性状的主效基因,如过氧化物酶体增殖物活化受体(PPARs)^[17]、瘦素受体基因^[18-19]、脂蛋白脂肪酶基因(*LPL*)^[20]等。目前的研究表明,脂肪肥胖相关基因 *FTO* 在人类和小鼠上的研究表明该基因在控制食欲和能量消耗方面具有重要作用^[8-9],会影响机体的脂肪沉积。此外,结合 *FTO* 基因的生理

功能和已有的研究结果,可在金华猪等特定的猪群中将其作为影响猪肉品质性状的候选基因^[15]。

本研究中,RT-PCR 的结果表明,*FTO* 的 mRNA 在苏钟猪不同组织中有不同的表达量,按大小排序为:背膘 > 心脏 > 肺脏 > 肝脏 > 背最长肌,表明 *FTO* 对脂肪的影响大于对肌肉的影响,而其中对皮下脂肪的影响最大,这与 Madsen^[6] 的研究结果一致。作者以哥廷根小型猪为研究对象,在猪的多个组织器官包括肌肉、肝、肾、心等均检测到了较高的 *FTO* mRNA 丰度。本研究所用试验动物为 6 月龄的 (95 ± 2) kg 的苏钟猪,此时 *FTO* 的 mRNA 表达水平仍保持较高水平,说明 *FTO* 活性与猪背膘形成有关。这与 Klötting^[9] 的研究结果一致,他以人为研究对象,发现 *FTO* 的 mRNA 在皮下脂肪的表达量是内脏脂肪的 3 倍。本研究通过克隆测序苏钟猪 *FTO* 的 cDNA 序列,发现了 8 个 SNPs,这些突变可能与猪的肌内/间脂肪含量等脂肪沉积性状相关,当然这还需要下一步的验证。有报道表明,在意系杜洛克和巴克夏 × 约克夏二元杂交猪群中,猪 *FTO* 基因的第 3 外显子和第 4 内含子的 2 个多态位点与肌内脂肪 (IMF) 和肌间脂肪的沉积存在相关关系^[21]。

猪 *FTO* 基因编码蛋白的分子量为 581 ku,理论等电点为 5.23;而人 *FTO* 基因编码蛋白的分子量为 583 kDa,理论等电点为 5.10。据报道,人 *FTO* 基因编码的蛋白由具有催化活性的 N 末端 (NTD) 以及可以与 NTD 关联造成 *FTO* 低表达或催化作用降低的 C 末端 (CTD) 组成,并证实 367 位氨基酸位于 CTD,它可能参与调控了 *FTO* 的表达或催化活性^[22]。*FTO* 肽链中的亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,且均匀分布在整個肽链中,可认为 *FTO* 蛋白为亲水性蛋白。本研究比较不同物种的 *FTO* 氨基酸一级结构,发现 *FTO* 在进化的过程中存在同源性且高度保守,猪与其他哺乳动物的 *FTO* 氨基酸有 90.62% ~ 96.24% 的相似性,其中与牛、绵羊、狗的相似性分别为 96.24%、96.04%、96.04%,与禽类也有 82% 的相似性,Harbitz^[23] 推导出的猪脂肪沉积相关基因 LPL 的氨基酸序列与牛、人和鼠的相似性分别为 93.1%、91.2% 和 88.7%。对猪、人和小鼠的 *FTO* 基因的 cDNA 序列做同源性比较,猪 (GenBank: NM_001112692) 与人 (GenBank: NM_001080432) 的同源性为 88%,与小鼠 (GenBank: NM_011936) 的同源性为 83%。这与陶新^[15] 的报道一致。本研究从 *FTO* 氨基酸序列的进化关系发现,猪与牛、绵羊、狗、人、家兔、黑猩猩、小鼠、猕猴、马的亲缘关系最近,与火鸡、原鸡的亲缘关系较近,

与斑马鱼的亲缘关系最近。这与 Frayling 等^[7] 和 Fan 等^[14] 的研究结果一致,二人通过对比不同物种的核苷酸和氨基酸序列,证明 *FTO* 基因在人、鼠、猪以及其他哺乳动物中高度保守。

总之,*FTO* 在苏钟猪各组织中不同的 mRNA 表达丰度说明其对猪的皮下脂肪、心脏脂肪、肌内脂肪含量有着不同程度影响;在 *FTO* 编码序列 (CDS) 中检测到 8 个 SNPs,这些遗传变异可能与苏钟猪的脂肪沉积性状相关;生物信息学分析结果表明 *FTO* 基因在人、鼠、猪以及其他哺乳动物中高度保守。这些结果表明 *FTO* 可以成为潜在的猪脂肪沉积性状的候选基因用于分子育种。对于 *FTO* 蛋白水平的表达、细胞水平的功能验证和遗传变异与肉质性状的关联分析等方面需要做进一步研究,以便深入揭示 *FTO* 对脂肪沉积的影响。

参考文献:

- [1] Van Wijk H, Arts D, Matthews J *et al.* Genetic parameters for carcass composition and pork quality estimated in a commercial production chain [J]. *Journal of Animal Science* 2005 83: 324 - 333.
- [2] Van Wijk H, Dibbits B, Baron E *et al.* Identification of quantitative trait loci for carcass composition and pork quality traits in a commercial finishing cross [J]. *Journal of Animal Science* 2006 84: 789 - 799.
- [3] Wood J, Enser M, Fisher A *et al.* Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review [J]. *Meat Science* 2008 78: 343 - 358.
- [4] Kouba M, Bonneau M, Noblet J. Relative development of subcutaneous, intermuscular, and kidney fat in growing pigs with different body compositions [J]. *Journal of Animal Science* 1999 77: 622 - 629.
- [5] Hausman G, Poulos S. Recruitment and differentiation of intramuscular preadipocytes in stromal-vascular cell cultures derived from neonatal pig semitendinosus muscles [J]. *Journal of Animal Science* 2004 82: 429 - 437.
- [6] Madsen M B, Birck M M, Fredholm M *et al.* Expression studies of the obesity candidate gene *FTO* in pig [J]. *Animal Biotechnology* 2009 21: 51 - 63.
- [7] Frayling T M, Timpson N J, Weedon M N *et al.* A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity [J]. *Science* 2007 316: 889 - 894.
- [8] Fischer J, Koch L, Emmerling C *et al.* Inactivation of the *Fto* gene protects from obesity [J]. *Nature* 2009 458: 894 - 898.
- [9] Klötting N, Schleinitz D, Ruschke K *et al.* Inverse relationship between obesity and *FTO* gene expression in visceral

- adipose tissue in humans [J]. *Diabetologia*, 2008, 51: 641–647.
- [10] Liu Y, Liu Z, Song Y, *et al.* Meta-analysis added power to identify variants in *FTO* associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population [J]. *Obesity*, 2010, 18: 1619–1624.
- [11] 卢 坤. 肥胖相关基因 *FTO* 的作用及其分子机制 [J]. *中华高血压杂志*, 2010, 18: 518–521.
- [12] Du Z Q, Fan B, Zhao X, *et al.* Association analyses between type 2 diabetes genes and obesity traits in pigs [J]. *Obesity*, 2008, 17: 323–329.
- [13] Hu Z L, Reecy J M. Animal QTLdb: beyond a repository [J]. *Mammalian Genome*, 2007, 18: 1–4.
- [14] Fan B, Du Z Q, Rothschild M F. The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig [J]. *Animal Biotechnology*, 2009, 20: 58–70.
- [15] 陶 新, 邓 波, 门小明, 等. 不同猪种肉质相关基因 *Hal RN* 和 *FTO* 的多态性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43: 676–683.
- [16] 钱 源. 莱芜猪 *PID1* 基因的功能分析及表达谱研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42: 621–628.
- [17] Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor a target genes [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61: 393–416.
- [18] 付言峰, 方晓敏, 李碧侠, 等. 瘦素受体表达量在苏钟猪脂肪沉积调控中的作用 [J]. *中国兽医学报*, 2012, 32: 1266–1271.
- [19] Li Y, Geng J, Wang Y, *et al.* The role of leptin receptor gene polymorphisms in determining the susceptibility and prognosis of NSCLC in Chinese patients [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2011, 138: 311–316.
- [20] Shen Y, Lookene A, Zhang L, *et al.* Site-directed mutagenesis of apolipoprotein CII to probe the role of its secondary structure for activation of lipoprotein lipase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285: 7484–7492.
- [21] Fontanesi L, Scotti E, Buttazzoni L, *et al.* Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the *FTO* gene and obesity-related traits in heavy pigs [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37: 461–466.
- [22] Jia G, Yang C G, Yang S, *et al.* Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human *FTO* [J]. *FEBS Letters*, 2008, 582: 3313–3319.
- [23] Harbitz I, Kristensen T, Kran S, *et al.* Isolation and sequencing of porcine lipoprotein lipase cDNA and its use in multiallelic restriction fragment length polymorphism detection [J]. *Animal Genetics*, 1992, 23: 517–522.