

# 金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因发育性表达特点 及其与肌肉脂肪的关联分析

王国富<sup>1,2</sup> 高树新<sup>1,2</sup> 张立凡<sup>1</sup> 蔡兆伟<sup>1</sup> 吴慧光<sup>3</sup> 徐宁迎<sup>1</sup>

(1. 浙江大学 动物科学学院 浙江 杭州 310029; 2. 内蒙古民族大学 动物科技学院 内蒙古 通辽 028000;

3. 内蒙古民族大学 生命科学学院 内蒙古 通辽 028000)

**摘要:** 二脂酰甘油酰基转移酶是催化甘油三酯合成最后一步反应的关键酶,包括 *DGAT1* 和 *DGAT2* 两种;阐明其在发育过程中的表达规律,对于找到控制猪脂肪沉积能力的基因十分必要。运用实时荧光定量 RT-PCR 的方法,对 60、90、120 日龄金华猪肝脏、皮脂和眼肉中 *DGAT* 的 mRNA 表达量进行了分析,同时分析了 *DGAT* 基因 mRNA 表达量与肌肉脂肪的相关性。结果表明,金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因在不同日龄的表达差异均不显著( $P > 0.05$ );在肝脏、皮脂和眼肉中,*DGAT1* 基因表达差异均极显著( $P < 0.01$ );皮脂与肝脏、眼肉的 *DGAT2* 基因表达差异均极显著( $P < 0.01$ ),而肝脏与眼肉的 *DGAT2* 基因表达差异不显著( $P > 0.05$ );而且各日龄均是皮脂中 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达量最高,肝脏次之,眼肉中最低。提示 *DGAT2* 基因在猪脂肪沉积中发挥着比 *DGAT1* 更重要的作用。研究还发现 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因表达量与肌肉脂肪含量无显著意义的相关( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 金华猪; 二脂酰甘油酰基转移酶; 荧光定量 PCR; 组织表达谱; 肌肉脂肪

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)05-0025-04

## Developmental Expression Characteristics of *DGAT1* and *DGAT2* Gene and Its Association Analysis with Intramuscular Fat in Jinhua Pig

WANG Guo-fu<sup>1,2</sup> GAO Shu-xin<sup>1,2</sup> ZHANG Li-fan<sup>1</sup> CAI Zhao-wei<sup>1</sup> WU Hui-guang<sup>3</sup> XU Ning-ying<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science Zhejiang University Hangzhou 310029, China; 2. College of Animal Science and Technology Inner Mongolia University for Nationality Tongliao 028000, China; 3. College of Life Sciences and Technology Inner Mongolia University for Nationality Tongliao 028000, China)

**Abstract:** The final and critical step in the synthesis of triglycerides is catalyzed by two acyl-coA: diacylglycerol acyltransferase( *DGAT*) enzymes, i. e. *DGAT1* and *DGAT2*. Analysis on the developmental expression of *DGAT1* and *DGAT2* mRNA in three tissues is a prerequisite for the identification of genes underlying fat deposition. The *DGAT1* and *DGAT2* mRNA expression of Jinhua pig 60-day and 90-day and 120-day was investigated by Real-time fluorescent quantitative RT-PCR in this study and analysis correlation of *DGAT* gene expression with IMF( intramuscular fat). The results showed there was not any different( $P > 0.05$ ) expression of *DGAT1* and *DGAT2* in different days of the Jinhua pigs. There was significant difference( $P < 0.01$ ) expression of *DGAT1* in the different tissues. There was significant difference( $P < 0.01$ ) between expression of *DGAT2* in the SF and L/RE, whereas no any difference( $P > 0.05$ ) was observed between the L and RE. The lowest level of expression of *DGAT1* and *DGAT2* was found in the RE, higher in the L and the highest in the SF. These results suggest that *DGAT2* gene play a key important role in pig fat deposition than *DGAT1* gene. Correlation between *DGAT1* and *DGAT2* gene expression with IMF content was not remarkable( $P > 0.05$ ).

**Key words:** Jinhua pig; Diacylglycerol acyltransferase( *DGAT*); Real-time PCR; Tissue expression profile; Intramuscular fat( IMF)

收稿日期: 2011-03-24

基金项目: 国家自然科学基金(30972078); 国家高技术研究发展计划(2007AA10Z158)

作者简介: 王国富(1963-),男,内蒙古赤峰人,副教授,学士,主要从事动物遗传育种研究。

通讯作者: 徐宁迎(1956-),男,浙江杭州人,博士,教授,博士生导师,主要从事动物遗传育种研究。

二脂酰甘油酰基转移酶( *Acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase* ,*DGAT*) 是一种催化三酰甘油( *Triacylglycerol* ,*TAG*) 合成的膜蛋白,有 *DGAT1* 和 *DGAT2* 两种类型;其在肠脂肪吸收、脂蛋白集合、血浆中甘油三酯浓度的调节、脂细胞中脂肪的存储、肌肉中能量的代谢等方面发挥着重要作用<sup>[1-5]</sup>。

肌肉脂肪( *Intramuscular fat* ,*IMF*) 是构成猪肉的主要成分,也是影响肉质性状优劣的重要因素,而且是猪肉滋润多汁的物理因子,也是产生风味化合物的前体物质,是肉质测定中的重点项目之一<sup>[6]</sup>。

金华猪是我国著名的优良地方猪种,一向以肉质优良著称。近年来,国内外学者在金华猪肉质性状分子遗传学方面做了大量的研究工作,发现了许多与肉质相关的基因或候选基因,定位了多种肉质性状 QTL 分子标记。这些研究成果虽然极大地丰富了对肉质性状遗传物质基础的认识,但尚不足以阐明猪脂肪沉积的遗传规律及其遗传机理。另外,由于 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因主要与脂肪沉积和能量代谢有关,所以本试验选择甘油三酯代谢比较旺盛的肝脏和皮脂组织,另外还选择了眼肉,探讨眼肉中 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因的表达与这两种组织有何差异。因此,本研究应用荧光定量 PCR 技术 SYBR Green I,研究金华猪处于不同日龄, *DGAT* 基因在其肝脏、皮下脂肪和眼肉中的表达特点,以及其组织表达谱与肌肉脂肪的关系;旨在寻找金华猪控制脂肪

沉积的候选基因,为今后金华猪保种选育、肉质评定及杂交、冷鲜肉加工贮藏及优质火腿加工等产业化开发提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和主要试剂

金华猪公猪,由浙江大学试验牧场提供。分别在 60、90、120 日龄,各宰杀 6 头金华猪公猪,分割后,迅速采集肝脏( *Liver* ,*L*)、皮下脂肪( *Subcutaneous fat* ,*SF*) 和眼肉( *Rib eye muscle* ,*RE*) 样品冻入液氮中,带回实验室。

Trizol 购自 Invitrogen 公司, *cDNA* 第一链合成试剂盒和荧光定量 IQ SYBR Green Supermix 购自大连宝生物公司( *TAKARA*) 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 RNA 的提取及反转录

本试验所用金华猪 *L*、*SF* 和 *RE* 的 *cDNA* 样品,其 RNA 提取按照 Trizol 试剂盒操作说明进行,经 RT-PCR 获得 *cDNA*,置于 -20℃ 保存。

### 1.3 引物设计

根据猪 *DGAT* 基因序列,跨外显子,产物两两重叠,设计了 2 对荧光定量 PCR 引物 P1、P2,内参基因细胞骨架蛋白( *Beta-actin* , *$\beta$ -actin*) 扩增片段为 140 bp。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因 PCR 引物序列

Tab.1 Sequences of PCR primers for *DGAT1* and *DGAT2* gene in Jinhua pig

引物 Primer	Genbank 序号 Genbank No.	片段大小/bp Size	引物序列(5'-3') Sequences of primer
<i>DGAT1</i> -P1	AY093657.1	176	CTGGCTCATCTTCTTCTACTGG GCTTGTAGAAGTGTCTGAGGC
<i>DGAT2</i> -P2	EU684958	147	CGCTCTACTTCACTTGGCTG TGCTGAGCAGGTTGTGTGTC
<i><math>\beta</math>-actin</i> -P3	DQ845171	140	CACGCCATCCTGCGTCTGGA AGCACCGTGTGGCGTAGAG

### 1.4 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 在 Bio-Rad 公司 ICycler IQ 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系: SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> (2 ×) 10  $\mu$ L,上、下游引物各 0.4  $\mu$ L,ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4  $\mu$ L, *cDNA* 模板 1.0  $\mu$ L,加 DEPC 水至 20  $\mu$ L。反应程序: 95℃ 5 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环后进入融解曲线程序: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。

### 1.5 肌肉内脂肪含量测定

脂肪含量测定,采集位于第 13 肋骨处背最长肌样品并迅速保存至 -70℃ 备用,将冰冻待测样品匀

浆后,利用近红外扫描分析仪( *Thermo Electron*, 美国)测定肌肉脂肪含量,波长为 780 ~ 2 500 nm。

### 1.6 数据分析

目的基因相对表达量用 - $\Delta\Delta C_t$  方法<sup>[7]</sup>计算:

$$DGAT \text{ 基因的相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

其中:  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 样品}} - \Delta C_{t \text{ 对比样品}}$ ,  $\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$

数据以平均数 ± 标准误来表示,采用 SPSS13.0 的 t 检验法,分析不同日龄和组织中 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因的相对表达量数据;采用 Bivariate correlations 分析相对表达量与 IMF、IMP 和 WM 之间的

相关性。

2 结果与分析

2.1 金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因扩增与克隆测序

设计 *DGAT1*、*DGAT2* 与  $\beta$ -*actin* 基因的扩增引物,在金华猪 3 种组织中得到了较好的扩增(图 1),测序发现 *DGAT1*、*DGAT2* 基因扩增片段分别为 176, 147 bp,与 GenBank 已发表的 *DGAT1*、*DGAT2* 的 cDNA 序列同源性为 100%; $\beta$ -*actin* 基因的扩增片段为 140 bp,与引物设计源序列同源性为 100% 表明 PCR 扩增片段为特异的 *DGAT1*、*DGAT2* 和  $\beta$ -*actin* 基因。

2.2 金华猪不同日龄的 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达特点

分别用 60 日龄金华猪肝脏中的 *DGAT1*、*DGAT2* 基因的  $\Delta C_t$  均值作为相对定量的标准,计算处于 60, 90, 120 日龄的每只猪的 *DGAT1*、*DGAT2* 基因,在肝脏、皮脂和眼肉中的相对表达量。用 SPSS13.0 软件,分析 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达量的差异。发现金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因在不同日龄的表达量差异均不显著( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 金华猪肝脏、皮脂与眼肉内 *DGAT1*、*DGAT2* mRNA 表达实时荧光定量检测

Tab. 2 Real time fluorescent quantitative detection of the expression of *DGAT1* and *DGAT2* mRNA in liver, subcutaneous fat and rib eye muscle in Jinhua pig

基因 Genes	发育阶段 Development stage	肝脏 Liver	皮脂 Subcutaneous fat	眼肉 Rib eye muscle
<i>DGAT1</i>	60 日龄	1.17 ± 1.08a	7.09 ± 0.99b	0.06 ± 1.29c
	90 日龄	0.90 ± 1.40a	6.34 ± 1.08b	0.15 ± 1.21c
	120 日龄	0.94 ± 1.30a	3.75 ± 1.21b	0.48 ± 1.29c
<i>DGAT2</i>	60 日龄	3.49 ± 1.41a	70.91 ± 1.29b	1.09 ± 2.23a
	90 日龄	1.40 ± 1.82a	34.10 ± 1.41b	0.53 ± 1.91a
	120 日龄	11.73 ± 1.58a	60.12 ± 1.58b	3.51 ± 1.68a

2.4 金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因相对表达量与肉质性状的相关分析

利用 3 个日龄共计 18 头猪的表达量数据,分析 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达量与肌内脂肪的相关性。结果发现 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因相对表达量与肌内脂肪均无显著意义的相关(表 3)。

表 3 金华猪 *DGAT1*、*DGAT2* 基因 mRNA 表达量与肌内脂肪间的相关系数

Tab. 3 Correlation coefficients of mRNA expression

level of *DGAT1* and *DGAT2* genes with IMF in Jinhua pig

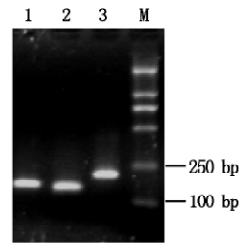
组织 Tissues	相对表达量 Relative expression	肌内脂肪 IMF
眼肉 RE	$2^{\Delta\Delta C_{t1}}_{DGAT1}$	-0.543
眼肉 RE	$2^{\Delta\Delta C_{t1}}_{DGAT2}$	-0.104

注: 不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Note: The different capital superscripts in the same row stand for significance at 0.01 level.

2.3 金华猪不同组织 *DGAT1*、*DGAT2* 基因的表达特点

对相同日龄不同组织 *DGAT1*、*DGAT2* 基因的表达量分析,发现在肝脏、皮脂和眼肉中 *DGAT1* 基因表达量差异均极显著( $P < 0.01$ );皮脂与肝脏、眼肉的 *DGAT2* 基因表达量差异均极显著( $P < 0.01$ ),而肝脏与眼肉的 *DGAT2* 基因表达量差异不显著( $P > 0.05$ );而且各日龄均是皮脂中 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达量最高,肝脏次之,眼肉中最低(表 2)。



1~3. P2、P3 和 P1 的扩增产物; M. 100 bp DNA ladder.  
M. DNA marker DL2000; 1. The RT-PCR product of *DGAT2*;  
2. The RT-PCR product of  $\beta$ -*actin*; 3. The RT-PCR product of *DGAT1*.

图 1 RT-PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR product

3 讨论

本研究对金华猪 60, 90, 120 日龄时的肝脏、皮脂和眼肉的 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达情况以及组织表达谱与肌内脂肪含量进行了相关分析,结果表明,两个基因在三种组织中的发育性表达差异不大,这与胡悦等<sup>[8]</sup>对仔猪和成年猪背膘组织中 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达差异显著的研究结果不同;分析其原因可能是因为:一是猪种不同;二是猪的年龄差距不同。本研究所用的金华猪 3 个日龄两两相差 30 d,低于胡悦等所用的仔猪与成年猪的年龄差异。

在 *DGAT1*、*DGAT2* 基因的组织表达方面, Yu Y H 等<sup>[9, 10]</sup>研究发现 *DGAT2* 在肝脏和脂肪组织中有高水平表达;还有研究<sup>[11]</sup>表明,两种 DGAT 酶在组织中广泛表达,但组织中表达量的高低与甘油三酯

代谢作用相偶联的。本研究也表明, 皮脂中 *DGAT1*、*DGAT2* 基因表达量最高, 肝脏次之, 眼肉最低, 而皮脂和肝脏正是甘油三酯代谢比较旺盛的组织。Meegralla 等<sup>[4]</sup> 比较了小鼠中 *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因表达的差异, 发现 *DGAT2* 比 *DGAT1* 基因在内源性脂肪的合成中的作用更重要。胡悦等<sup>[8]</sup> 的研究也表明, 杜洛克猪和莱芜猪 *DGAT2* 基因成体相对于仔猪的增长倍数均高于 *DGAT1* 基因; 在同一发育阶段, *DGAT2* 的表达水平均高于 *DGAT1*。本研究也发现, 各组织中的 *DGAT2* 基因表达量均高于 *DGAT1* 基因, 特别是皮脂中的 *DGAT2* 基因表达量远远高于其他组织的 *DGAT2* 基因, 更高于 *DGAT1* 基因的表达量。说明在猪的脂肪沉积方面, *DGAT2* 基因发挥着比 *DGAT1* 更重要的作用, 本研究结果与 Meegralla 和胡悦等的研究结果一致。

猪 *DGAT1* 基因定位于 SSC4p15, 在这一区域内存在可能影响猪生长速度、肌内脂肪含量和脂肪酸组成的 QTL<sup>[12-14]</sup>; 而关于 *DGAT2* 基因表达量与猪肝脏、皮脂和眼肉的肌内脂肪、蛋白和水分的研究未见报道。在牛上, Thaller 等<sup>[15]</sup> 的研究表明, 德国荷斯坦牛 *DGAT1* 基因的 K232A 突变与背最长肌和半腱肌的 IMF 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Wu 等<sup>[16]</sup> 研究结果表明, *DGAT1* 基因对牛的皮下脂肪有加性效应。本研究发现, *DGAT1* 和 *DGAT2* 基因的表达与肌内脂肪均无显著意义的相关, 需扩大样本量或在其他品种猪上进行进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] McFie P J, Stone S L, Banman S L *et al.* Topological orientation of Acyl-CoA: Diacylglycerol Acyltransferase-1 (*DGAT1*) and identification of a putative active site histidine and the role of the N terminus in Dimer/Tetramer formation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (48): 37377 - 37387.
- [2] Qi J, Lang W, Giardino E *et al.* High-content assays for evaluating cellular and hepatic diacylglycerol acyltransferase activity [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51 (12): 3559 - 3567.
- [3] Lardizabal K D, Mai J T, Wagner N W *et al.* *DGAT2* is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (42): 38862 - 38869.
- [4] Meegalla R L, Billheimer J T, Cheng D. Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) activity through independent stimulation of mRNAs expression of *DGAT1* and *DGAT2* by carbohydrate and insulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298 (3): 317 - 323.
- [5] Cases S, Smith S J, Zheng Y W *et al.* Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis [J]. *Cell Biol*, 1998, 95 (22): 131018 - 131023.
- [6] 杨 烨. 优质鸡肌内脂肪代谢调控及其与肉质性状关系的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402 - 408.
- [8] 胡 悦, 李 标, 王继英, 等. 猪背膘组织二脂酰甘油酰基转移酶基因 (*DGAT1* 和 *DGAT2*) 的发育性表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18 (5): 905 - 910.
- [9] Yu Y H, Ginsberg H N. The role of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT*) in energy metabolism [J]. *Ann Med*, 2004, 36 (4): 252 - 261.
- [10] Suzuki R, Tobe K, Aoyama M *et al.* Expression of *DGAT2* in white adipose tissue is regulated by central leptin action [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (5): 3331 - 3337.
- [11] Chen H C, Farese R V Jr. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (3): 482 - 486.
- [12] Perez-Enciso M, Clop A, Noguera J L *et al.* A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: evidence from an Iberian by Landrace intercross [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78 (10): 2525 - 2531.
- [13] De Koning D J, Janss L L, Rattink A P *et al.* Detection of quantitative trait loci for back fat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*) [J]. *Genetics*, 1999, 152 (4): 1679 - 1690.
- [14] Paszek A A, Wilkie P J, Flickinger G H *et al.* Interval mapping of growth in divergent swine cross [J]. *Mamm Genome*, 1999, 10 (2): 117 - 122.
- [15] Thaller G, Kuhn C, Winter A *et al.* *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle [J]. *Anim Genet*, 2003, 34 (5): 354 - 357.
- [16] Wu X L, Macneil M D, De S. Evaluation of candidate gene effects for beef back fat via Bayesian model selection [J]. *Genetica*, 2005, 125 (1): 103 - 113.