

解偶联蛋白 1、2 和 3 基因在中国西门塔尔牛组织器官中的表达水平及其与胴体品质关系分析

孙国权¹,高树新^{2,3},吴慧光^{3,4},李俊雅⁵,丽春^{2,3},王景山⁶,王玉泉⁷,王国富^{2,3}

(1. 内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028042; 2. 内蒙古民族大学 动物科学技术学院, 内蒙古 通辽 028042;

3. 内蒙古民族大学 黄牛遗传繁育研究所, 内蒙古 通辽 028042; 4. 内蒙古民族大学 生命科学学院, 内蒙古 通辽 028042;

5. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 6. 内蒙古通辽市家畜繁育指导站, 内蒙古 通辽 028000;

7. 内蒙古通辽市畜牧研究所, 内蒙古 通辽 028000)

摘要:为获得中国西门塔尔牛解偶联蛋白(Uncoupling proteins, UCPs) *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因的组织表达谱, 揭示该基因与能量代谢的关系, 探索调控肉牛脂肪沉积的关键基因表达规律, 筛选影响肉牛肥育性状的候选基因。以 20 头中国西门塔尔牛为试验材料, 提取其 15 种组织(肝脏、淋巴、肋间肉、肩肉、脾脏、肾脏、背最长肌、肺、心脏、肠脂、网脂、睾丸、小肠、胰脏、背膘)总 RNA, 设计合成 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因的引物, 以牛 β -actin 基因为内参, 利用实时荧光定量 PCR 技术, 检测 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因的 mRNA 在以上各组织中的表达。结果表明, *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在睾丸、小肠、心脏、胰腺等组织、器官中均有不同程度的表达, *ucp1* 在背膘中高表达, 胰脏、小肠、睾丸、网脂、肠脂、心脏中度表达, 在其他组织中低表达; *ucp2* 在睾丸中高表达, 肺脏、肝脏、背膘中度表达, 在其他组织中低表达; *ucp3* 在背最长肌、肋间肉、肩肉中高表达, 肺脏中度表达, 在其他组织中低表达。经相关分析表明: 眼肉中 *ucp3* 基因的表达量与肌肉脂肪和背膘厚度关系不大, 而与眼肌面积呈正相关($r=0.788$)。结论: 中国西门塔尔牛 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因的表达, 具有组织特异性; *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 在不同组织的表达差异, 可能与其在不同组织中的功能有关; *ucp3* 基因可作为与胴体性状相关的候选基因。

关键词:解偶联蛋白; 组织器官; 基因表达; 胴体品质

中图分类号: S823 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)04-0116-05

Analyze the *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* Genes Expression Level in Tissues/Organs and the Relationship with the Carcass Traits in Chinese Simmental Cattle

SUN Guo-quan¹, GAO Shu-xin^{2,3}, WU Hui-guang^{3,4}, LI Jun-ya⁵,
LI Chun^{2,3}, WANG Jing-shan⁶, WANG Yu-quan⁷, WANG Guo-fu^{2,3}

(1. Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao 028042, China; 2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao 028042, China; 3. Institute of Cattle Genetics and Breeding, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao 028042, China; 4. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao 028042, China; 5. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China; 6. Livestock Breeding Station of Tongliao of Inner Mongolia, Tongliao 028000, China; 7. Institute of Animal Science of Tongliao of Inner Mongolia, Tongliao 028000, China)

Abstract: The objective is to obtain expression profile of Chinese Simmental cattle *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes, to reveals the relationship between the *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* gene and energy metabolism, to explore the expression rule of key gene of fat deposition, and to screen the candidate gene affecting fat deposition. Total RNA were extracted from fifteen tissues (liver, lymph, intercostals muscle, shoulder muscle, spleen, kidney, rib eye muscle, lung, heart, gut fat, greater omental fat, testicle, small intestine, pancreas and backfat) of twenty animals from Chinese Simmental cattle. The primers of *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes were designed and synthesized, and the data were normalized using the β -ac-

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B03); 国家自然科学基金项目(30860186); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2011MS0409; 2012MS0403); 市校合作重点科研项目(SXZD2012003)

作者简介: 孙国权(1967-), 男, 内蒙古乌兰浩特人, 副教授, 博士, 主要从事畜禽健康养殖技术的研究。

通讯作者: 王国富(1963-), 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 主要从事牛羊健康养殖研究。

tin gene as internal control. The specific expression of *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes in different tissues were investigated by real-time quantitative PCR. There were different degree expression of *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes mRNA in the tissues and organs of testicle, small intestine, heart, pancreas and so on. The expression of *ucp1* was highest in the backfat, middle in the pancreas, small intestine, testicle, greater omental fat, gut fat, and heart, and lowest in the other tissues. The highest level expression of *ucp2* was detected in Testicle, and there were also higher expression of *ucp2* in the lung, liver, and backfat than in other tissues. The highest level expression of *ucp3* was in rib eye muscle, Inter-costal muscle, and shoulder muscle, middle in the lung, and the lowest in other tissues. Correlation analyses showed that the expression level of *ucp3* gene in rib eye had no significant relation with intramuscular fat and backfat thickness, but had positive relation to eye lean area ($r = 0.788$). It is concluded that the expression level of *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes had tissue specific might be related to the various functions on different tissues of cattle. The *ucp3* gene can be used as a candidate gene related to carcass traits.

Key words: Uncoupling proteins (UCPs); Tissue and organs; Gene expression; Carcass traits

解偶联蛋白 (Uncoupling proteins, UCPs) 属线粒体内膜载体蛋白, 广泛分布于动物各组织中, 在维持体温、机体产热、能量平衡、代谢和体重调节等方面都有重要作用^[1-2]。

迄今为止, 在哺乳动物体内已发现 5 种 UCP; UCP1 主要分布在褐色脂肪组织中^[3]; UCP2 能在白色脂肪组织、骨骼肌和免疫系统等多种组织中出现^[4]; UCP3 主要存在于骨骼肌和脂肪组织里^[5]。牛的 *ucp1* 基因定位于 17 号染色体; *ucp2*、*ucp3* 基因紧密连锁, 以基因簇的形式存在于 15 号染色体上^[6]。目前, *ucp* 基因在人和啮齿类动物上的研究报道很多; 研究的热点, 主要集中在 *ucp* 基因与糖尿病和肥胖的关系上^[7]。在畜牧业生产中, *ucp* 基因在鸡、猪上的研究要比在牛上的研究深入。Raimbault 等^[8]研究发现, 鸡 UCP 仅表达在骨骼肌里, 具有调节机体调热作用及维持体温的功能。Damon 等^[9]研究显示, 猪 *ucp2*、*ucp3* 基因可能参与猪能量代谢的调控。Lin 等^[10]研究发现, 牦牛肌肉中 *ucp3* 的 mRNA 水平, 显著低于黄牛; Zhang 等^[11]研究发现 *ucp3* 基因多态性与南阳牛生长发育性能相关; 刘永峰等^[12]研究发现, *ucp2* 基因的 5 个 SNPs, 与秦川牛、鲁西牛等地方黄牛及其杂种牛总群体的体尺性

状无显著相关, *ucp2* 基因的 SNP64 基因型与牛总群体腰角宽和胸围显著相关。

目前, 关于 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在牛各组织器官中表达情况, 及其表达量与牛胴体组成和肉质性状关系方面的研究少见报道。本研究旨在应用荧光定量 PCR 技术 SYBR Green 1, 研究中国西门塔尔牛 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因, 在背膘、背最长肌、肝脏和睾丸等不同组织器官中的表达差异特点, 分析这些表达差异是否与牛的胴体品质有关, 为牛肉品质改良的标记辅助选种提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物及处理

挑选年龄和体重相近的中国西门塔尔牛 137 头, 进行屠宰。屠宰线上快速采集 10 g 左右的心脏、肝脏、睾丸、背膘、背最长肌等样品, 迅速在液氮中冷冻, -70°C 保存, 用于提取总 RNA, 并测定胴体的背膘厚、眼肌面积和肌内脂肪含量。

1.2 PCR 反应体系及反应条件

ucp1、*ucp2*、*ucp3* 和内参 β -actin 引物, 均由上海英骏生物技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 和 β -actin 基因引物序列

Tab. 1 The sequences of PCR primers for *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* and β -actin genes

基因 Genes	GenBank 序号 GenBank No.	片段大小/bp Size	引物序列 Sequences of primer
牛 <i>ucp1</i> -P1	XM-616977	226	PL: 5'-ATCTCCACGGTCCCAAAC-3'
Cattle <i>ucp1</i> -P1			PR: 5'-ACAACAGCGGACACGAAG-3'
牛 <i>ucp2</i> -P2	NM-001033611	249	PL: 5'-CTCAGCGTGGGACCTAAC-3'
Cattle <i>ucp2</i> -P2			PR: 5'-TGTAGCCGGACTTTAGCAG-3'
牛 <i>ucp3</i> -P3	NM-174210	188	PL: 5'-ACAGGACCATCGCCAGAG-3'
Cattle <i>ucp3</i> -P3			PR: 5'-GGGAAGTTGTCGGTGAGC-3'
β -actin	NM_173979	170	PL: 5'-GCCGACTGTTAGCTGCGTTAC-3'
			PR: 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

1.3 基因表达定量分析

采用 TRIzol 试剂抽提各组织器官中的总 RNA, 参照说明书对总 RNA 采用无 RNA 酶的 DNase 处理。利用凝胶电泳检测总 RNA 完整性, 通过测定其 260, 280 nm 处的 OD 值, 检测其纯度。然后将总 RNA 反转录成 cDNA, 并用特异引物(表 1)进行荧光定量 PCR。

反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ (2 ×) 10 μL, 上、下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L), ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 加 DEPC 水至 20 μL。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 15 s (变性), 3 个基因退火温度分别为 55, 60, 56 °C, 时间是 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环后进入融解曲线程序: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

以持家基因 β -actin 为内参, 进行 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* mRNA 表达水平实时荧光定量分析。每个样品 3 个重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法^[13] 计算基因的相对表达量。

1.4 数据处理与分析

应用 SPSS 16.0 软件对试验结果进行方差分析和相关分析。

目的基因相对表达量用 $-\Delta\Delta C_t$ 方法^[13] 计算:

ucp 基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中 $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{样品}}} - \Delta C_{t_{\text{对比样品}}}$, $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}}$

2 结果与分析

2.1 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因的 RT-PCR 扩增

以总 RNA 为模板, 经 RT-PCR 获得 cDNA, 对 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 和 β -actin 内参基因进行扩增(图 1)。

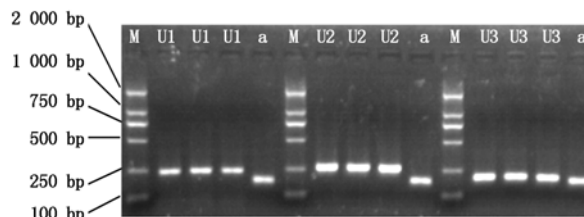


图 1 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 和 β -actin 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 The RT-PCR amplification of *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* and β -actin

通过测序和 Blast 比对发现, 目的基因的 RT-PCR 扩增产物片段大小与预期一致, 同源性在 99% 以上, β -actin 基因同源性达到 100%。

2.2 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在不同组织器官中的表达差异

利用实时荧光定量 PCR 技术, 对试验动物的睾丸、肾脏、肋间肉、心脏、胰脏、背膘、肩肉、肝脏、网脂、肠脂、脾脏、肺、背最长肌和淋巴中 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因表达情况进行检测(图 2), *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在上述组织的表达量见表 2。结果发现, *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在上述组织中几乎都表达, 但 *ucp1* 在背膘中高表达, 胰脏、小肠、睾丸、网脂、肠脂、心脏中度表达, 在其他组织中低表达; *ucp2* 在睾丸中高表达, 脾脏、肝脏、背膘中度表达, 在其他组织中低表达; *ucp3* 在背最长肌、肋间肉、肩肉中高表达, 脾脏中度表达, 在其他组织中低表达。

2.3 背最长肌中 *ucp3* 基因相对表达量与胴体品质之间的关系

对试验牛背最长肌中 *ucp3* 相对表达量与胴体品质进行分析, 发现其表达量与眼肌面积呈显著正相关 ($r=0.788$), 而与肌肉脂肪、背膘厚相关性不大(表 3)。

表 2 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在各组织器官中的表达量

Tab. 2 The *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes expression profiles in different tissues and organs

组织 Tissue	<i>ucp1</i>	<i>ucp2</i>	<i>ucp3</i>
肝脏 Liver	0.01	0.05	0.02
淋巴 Lymph	0.01	0.02	0.02
肋间肉 Intercostal muscle	0.01	0.01	2.01
肩肉 Shoulder muscle	0.01	0.01	1.99
脾脏 Spleen	0.01	0.01	0.02
肾脏 Kidney	0.02	0.01	0.01
背最长肌 Rib eye muscle	0.03	0.02	3.20
肺 Lung	0.03	0.15	1.55
心脏 Heart	0.22	0.02	0.01
肠脂 Gut fat	0.25	0.01	0.01
网脂 Greater omental fat	0.31	0.00	0.03
睾丸 Testicle	0.45	1.34	0.07
小肠 Small intestine	0.77	0.01	0.07
胰脏 Pancreas	0.88	0.01	0.50
背膘 Backfat	2.00	0.05	0.01

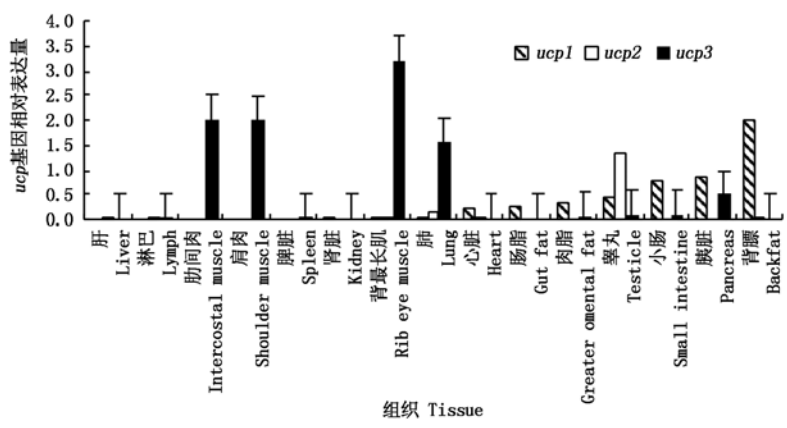


图 2 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在各组织器官中的表达

Backfat represents control tissue; Error bars indicates standard deviation.

图 2 *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在各组织器官中的表达

Fig. 2 The *ucp1*, *ucp2*, *ucp3* genes expression profiles in different tissues and organs

表 3 *ucp3* 基因表达量与部分胴体性状的相关系数

Tab. 3 Correlation coefficients among <i>ucp3</i> gene expression and carcass measurements				
性状 Trait	<i>ucp3</i> 表达量 Gene expression	肌内脂肪 Intramuscular fat	眼肌面积 Eye lean area	背膘厚 Backfat thickness
<i>ucp3</i> 表达量 Gene expression	1	-0.017	0.788 *	0.035
肌内脂肪 Intramuscular fat	-0.017	1	0.268	0.134
眼肌面积 Eye lean area	0.788 *	0.268	1	-0.422
背膘厚 Backfat thickness	0.035	0.134	-0.422	1

注：* . 相关系数在 0.05 水平上显著。

Note: * . Denotes correlation is significant at the 0.05 level.

3 讨论与分析

本研究发现, *ucp1*、*ucp2*、*ucp3* 基因在睾丸、肾脏、肋间肉、心脏、胰脏、背膘、肩肉、肝脏、网脂、肠脂、脾脏、肺、背最长肌和淋巴等很多组织中均有表达, 但 3 个基因的组织表达谱存在较大差异, *ucp1* 在背膘中高度表达, *ucp2* 在睾丸中表达水平最高, 而 *ucp3* 则主要在肌肉组织中高度表达。这与 Band、Winter、McFie PJ 等的研究结果基本相同。结合本研究结果, 笔者认为, UCP1 主要与产生热量、维持体温有关, 而 UCP2 和 UCP3 的功能较 UCP1 更广泛, 除了产生热量、维持体温外, 还参与脂肪代谢和能量代谢。

另外, 有研究表明, *ucp* 基因表达水平与动物肌内脂肪 (Intramuscular fat, IMF) 有关。乔永^[14] 研究发现, 在湖羊羔羊背最长肌、股二头肌和腰大肌肌肉中, *ucp3* 基因 mRNA 的表达水平, 在 2 月龄后, 均与 IMF 呈负相关关系 ($r = -0.211$, $P = 0.262$; $r = -0.209$, $P = 0.328$; $r = -0.286$, $P = 0.266$) ; 王宏博等^[15] 研究发现, 欧拉型藏羊羔羊背最长肌中 *ucp3* 基因表达量, 与其肌肉中 IMF 的含量呈负相关 ($r = -0.326$, $P = 0.368$) , 股二头肌肌肉中 *ucp3* 基因表达量与其肌肉中 IMF 的含量呈负相关 ($r = -0.312$,

$P = 0.269$) ; 彭广南^[16] 研究发现, *ucp3* 基因的表达量与广西三黄鸡 IMF 值呈显著正相关 ($R^2 > 0.7$, $P < 0.01$) 。

本研究表明, 西门塔尔牛背最长肌中 *ucp3* 相对表达量与眼肌面积呈显著正相关 ($r = 0.788$) , 与 IMF 呈负相关 ($r = -0.017$) , 但未达到显著水平; 这与乔永、王宏博的研究结果相似, 与彭广南的研究结果相反; 表明 *ucp3* 基因在牛、羊肌肉中的表达, 对 IMF 的沉积可能起着负向调控的作用, 可作为与胴体性状相关的候选基因。

参考文献:

- [1] Aysan E, Sahin F, Telci D, et al. Mechanism of body weight reducing effect of oral boric Acid intake [J]. International Journal of Endocrinology, 2013, 3: 914651.
- [2] Yonezawa T, Sanosaka M, Haga S, et al. Regulation of uncoupling protein 2 expression by long-chain fatty acids and hormones in bovine mammary epithelial cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2008, 375(2): 280 - 285.
- [3] Band M R, Larson J H, Rebeiz M, et al. An ordered comparative map of the cattle and human genomes [J]. Genome Research, 2000, 10(9): 1359 - 1368.
- [4] Winter A, van Eckvel M, Bininda-Emonds O R, et al.

- Genomic organization of the DGAT2/MOGAT gene family in cattle (*Bos taurus*) and other mammals [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2003, 102(1-4): 42-47.
- [5] Boss O, Samec S, Paolini-Giacobino A. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. [J]. FEBS Letters, 1997, 408(1): 39-42.
- [6] Stone R T, Rexroad C E, Smith T P. Bovine UCP2 and UCP3 map to BTA15 [J]. Animal Genetics, 1999, 30(5): 378-381.
- [7] Liu J, Li J, Li W J, et al. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus [J]. Journal of Diabetes Research, 2013: 585-597.
- [8] Raimbault S, Dridi S, Denjean F, et al. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds [J]. The Biochemical Journal, 2001, 353(Pt3): 441-444.
- [9] Damon M, Vincent A, Lombardi A, et al. First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue [J]. Gene, 2000, 246(1/2): 133-141.
- [10] Lin Y Q, Xu Y O, Yue Y, et al. Differences in mitochondrial gene expression profiles, enzyme activities and myosin heavy chain types in yak versus bovine skeletal muscles [J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2012, 11(3): 2871-2877.
- [11] Zhang R, Li X. Association between IGF-IR, m-calpain and UCP-3 gene polymorphisms and growth traits in Nanyang cattle [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(3): 2179-2184.
- [12] 刘永峰. 牛 13 个体尺性状相关基因的克隆表达、序列特征及遗传效应分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] 乔永. 湖羊羔羊不同部位肌肉肌肉内脂肪沉积相关基因表达的发育性变化研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [15] 王宏博, 梁春年, 郭宪, 等. 欧拉型藏羊羔羊肌肉 UCP3 基因表达的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(2): 8-12, 16.
- [16] 彭广南. 广西三黄鸡 PPAR γ 和 UCP3 基因表达水平与脂肪性状的相关研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2013.

《天津农业科学》征订启事

《天津农业科学》是天津市农业科学院信息研究所主办的综合性学术期刊, 创刊于 1974 年。国际刊号: ISSN 1006-6500, 国内刊号: CN: 12-1256/S。本刊为月刊, 大 16 开, 130 页, 每期定价 5 元, 全年 60 元。

本刊为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊, 中国学术期刊综合评价数据统计源期刊, 全国优秀农业期刊。

开设栏目有: 植物生理与生物技术、作物栽培与设施园艺、植物保护、土壤肥料与节水灌溉、畜牧兽医与水产养殖、园林绿化、贮藏加工、农产品安全、行业标准、新品种选育、植物生理、农业经济与信息技术、农业科研管理、新品种保护、三农问题研究、农业区划等。

适合各级农业科技人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生参阅。

欢迎订阅, 欢迎投稿!

地址: 天津市南开区白堤路 268 号农科大厦 1905 室

邮编: 300192

电话/传真: 022-23678601

E-mail: tjnykx@163.com

开户行: 建设银行南开新技术产业园区支行

账号: 1200 1650 4720 5000 1435

户名: 天津市农业科学院信息研究所