

# 莱芜猪和杜洛克猪不同部位肌肉 *H-FABP* 基因差异表达

朱荣生<sup>1,2</sup>, 呼红梅<sup>1,2</sup>, 王怀中<sup>1,2</sup>, 张 印<sup>1,2</sup>

(1 山东省农业科学院 畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100; 2 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:** 为研究不同品种猪不同部位肌肉 *H-FABP* 基因表达差异, 探讨莱芜猪肌内脂肪沉积的分子机理, 本试验选择体重 100 kg 莱芜猪 10 头、杜洛克 5 头, 采用荧光定量 RT-PCR 法测定 *H-FABP* 基因在莱芜猪和杜洛克猪背最长肌和半膜肌中的表达量。品种间背最长肌和半膜肌 *H-FABP* 基因 mRNA 的表达差异虽未达到显著水平, 但莱芜猪背最长肌和半膜肌 *H-FABP* 基因的表达水平均高于杜洛克猪。莱芜猪和杜洛克猪背最长肌与半膜肌间 *H-FABP* 基因表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。莱芜猪和杜洛克猪 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量与肌内脂肪含量显著相关。

**关键词:** 莱芜猪; 荧光定量 RT-PCR; *H-FABP* 基因; 肌肉

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0009-04

## Differential Expression of *H-FABP* Gene of Different Part Muscles in Laiwu Pigs and Duroc

ZHU Rong-sheng<sup>1,2</sup>, HU Hong-mei<sup>1,2</sup>, WANG Hua-zhong<sup>1,2</sup>, ZHANG Yin<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agriculture Sciences, Jinan 250100 China; 2 Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100 China)

**Abstract** This experiment was conducted to study the differential expression of *H-FABP* gene in differential muscles between Laiwu pigs and Duroc, for making clear development of fat in Laiwu pigs. Ten Laiwu pigs and seven Duroc weighting approximately 100 kg were chosen for the experiment. Expression of *H-FABP* at mRNA in LM and semimembranous muscle of Laiwu pigs and Duroc were measured by real time fluorescence RT-PCR. MF content were measured. The result indicated that compared with Duroc, *H-FABP* gene expression of longissimus muscle and semimembranous muscle in Laiwu pigs was appreciably increased ( $P > 0.05$ ). *H-FABP* gene expression of LM was markedly lower than semimembranous muscle in Laiwu pigs and Duroc ( $P < 0.05$ ). Correlation between *H-FABP* gene expression of LM and MF content in Laiwu pigs Duroc was prominent.

**Key words** Laiwu pigs; Real-time fluorescence RT-PCR; *H-FABP* gene expression; Muscle

心脏型脂肪酸结合蛋白 (*H-FABP*) 基因是影响肌内脂肪 (MF) 的候选基因<sup>[1-3]</sup>, 编码一类低分子量 (约 15 ku) 的胞浆蛋白, 主要作用是将脂肪酸从细胞膜运送到  $\beta$  氧化和三酰甘油及磷脂合成的部位, *H-FABP* 在细胞内与脂肪酸结合, 使细胞内外保持一定的浓度差, 促进细胞摄取脂肪酸<sup>[4,5]</sup>。 *H-FABP* 基因主要在心脏、骨骼肌、乳腺等组织中表达<sup>[6]</sup>。研究表明, 同一猪种 *H-FABP* 基因在骨骼肌、心肌、肝脏、脂肪等不同组织中的表达差异显著, 不同猪种间差异不显著, 但是地方猪种高于外来猪

种<sup>[7,8]</sup>, 而且营养水平影响肌肉中 *H-FABP* 基因的表达<sup>[9]</sup>。

国内外有关猪 *H-FABP* 的研究主要集中在该基因 cDNA 克隆和多态性等, 对该基因在不同猪种不同组织表达差异的研究较少。本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 分析肌内脂肪含量较高的地方品种莱芜猪<sup>[10-12]</sup>和引进品种杜洛克猪 *H-FABP* 基因种间表达差异以及种内不同部位肌肉的表达差异, 探索丰富地方猪种肉质性状相关候选基因的遗传信息。

收稿日期: 2009-10-28

基金项目: 山东省农业良种工程 (2007LZ013); 山东省农业科学院青年基金 (2007YQN019)

作者简介: 朱荣生 (1976-), 男, 山东阳谷人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物营养研究。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验动物及试验设计

选取体重 100 kg 莱芜猪 10 头, 杜洛克 5 头。屠宰时取最后肋骨处背最长肌和半膜肌置于液氮中速冻后, 保存于 - 84℃ 冰箱中备用。

## 1.2 仪器和材料

SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (DRR063S)、TaKaRa RNA iso Reagent (D312)、Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver 2.0 (D301)、pMD20-T 载体 (D107A)、DNase I (RNase Free D2215)、SmaI (D1085A)、Easy dilution (D9160) 和 SP6 RNA 逆转录酶 (D2520) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒提取试剂盒 (D6944-01) 购自 Promega BD-TEK, ABI Prism 7000 荧光实时 PCR 检测系统, 美国 BM 公司产品, 紫外分光光度计 (3100) 美国 Amersham Biosciences 公司产品。

## 1.3 Real-time 荧光定量 PCR 试验方法

1.3.1 RNA 的提取及纯化 利用 TaKaRa RNA iso Reagent 提取试验猪背最长肌和半膜肌的总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 的质量及浓度。将所提取的总 RNA - 84℃ 低温冰箱保存备用。

1.3.2 引物设计及 H-FABP 扩增 根据美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 公布的猪的心脏脂肪酸结合蛋白 (H-FABP) cDNA 序列 (GenBank 上注册的 AJ16019 序列), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 上游引物序列为: F5-CACCTTCAAGAGCA-CAGAGA-3', 位于 cDNA 的 168~187 bp 处; 下游引物序列为: F5-AGAGGAAAAAATGAGGCAAT-3', 位于 cDNA 的 459~478 bp 处, 预期扩增长度为 311 bp。取猪 RNA 2 μL, 逆转录成 cDNA, PCR 扩增后用 2% 的琼脂糖电泳鉴定。

1.3.3 标准曲线的制作 RT-PCR 扩增结束后, 利用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver 2.0 回收纯化 PCR 产物, 连接于 pMD20-T 载体, 转化至 DH5α 感受态细胞, 涂 LB 培养基 (含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal) 平板, AMP+ 抗性及蓝白斑筛选阳性克隆, 阳性单菌落震荡培养过夜, 用 Plasmid Mini Kit 提取质粒, PCR 鉴定; SmaI 内切酶线性化质粒, 用 SP6 RNA 逆转录酶体外转录, DNaseI 消化质粒模板, 氯仿、氯仿/异戊醇抽提, 用紫外分光光度计测定 RNA 的质量和浓度, 并将质量单位转换为分子数。用 Easy dilution 将以上体外转录的 RNA 稀释成  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^2$  拷贝/μL 的梯度浓度, 它们将作为荧光定

量 RT-PCR 检测 H-FABP 的阳性标准模板。利用 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit 进行二步法实时荧光定量 PCR 检测, 每个样品 3 个重复, 根据 Ct 值以及稀释梯度制作标准曲线。

1.3.4 二步法实时荧光定量 PCR 检测 逆转录反应。反应体系为 10 μL: 5 × PrimeScript Buffer 2.0 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, Total RNA 2 μL, RNase Free dH<sub>2</sub>O 5 μL; 逆转录反应条件: 42℃ 反转录 10 min, 95℃ 预变性 1 min。

实时荧光定量 PCR。反转录产物 10 倍稀释后, 取 1.5 μL, 依次加入 SYBR Remix Ex Taq (2 ×) 10.0 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL, dH<sub>2</sub>O 7.3 μL, 体系为 20 μL。在 Prism 7000 荧光 PCR 仪上进行扩增。反应条件: 94℃ 变性 10 s, 94℃ 5 s, 60℃ 40 s, 40 个循环。反应结束, 由熔点曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线计算定量结果。

1.3.5 肌肉脂肪含量测定 肌肉脂肪按“食品中脂肪的测定” (GB/T 5009.6-2003) 标准测定。

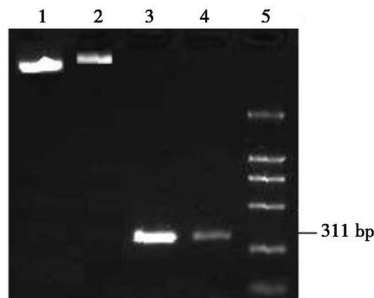
## 1.4 数据分析

使用 SPSS 13.0 统计软件对结果数据进行相关的统计学分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 H-FABP 扩增及标准品的制备

肌肉总 RNA 经 RT-PCR 扩增后, 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察, 可看到与目的片段大小一致的 311 bp 的电泳条带 (图 1), 且无任何杂带, 说明该引物特异性好。



1. H-FABP 重组质粒; 2. pMD20-T 质粒载体;  
3. 4. RT-PCR 扩增产物; 5. DL2000

1. H-FABP recombinant plasmid; 2. pMD20-T plasmid;  
3. 4. pMD20-T plasmid vector; 5. DL2000

图 1 RT-PCR 法扩增 H-FABP 基因电泳图

Fig 1 Electrophoresis of H-FABP amplification product by RT-PCR

将 H-FABP 扩增产物连接于 pMD20-T 载体, 转

化至感受态细胞,提取质粒后,电泳结果显示有基因片段插入 pMD20-T载体,PCR 鉴定有 311 bp 的 *H-FABP* 基因插入。逆转录酶体外转录产物的 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间,这表明标准品的纯度符合要求。

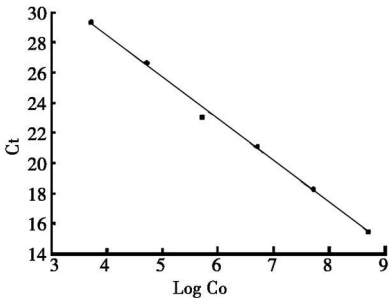


图 2 标准曲线

Fig 2 Standard curve graph

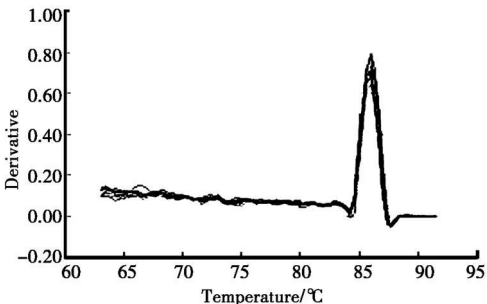


图 3 熔解曲线

Fig 3 Melt curve graph

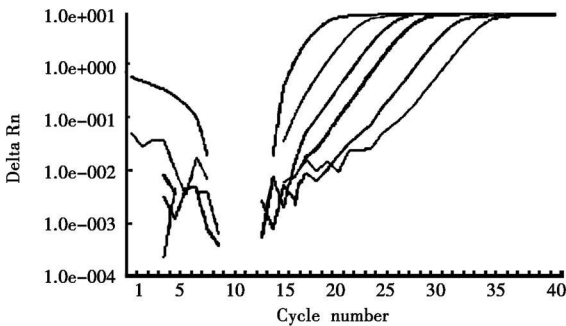


图 4 荧光曲线

Fig 4 *H-FABP* AMP/Cycle graph

2.2 标准曲线

将体外转录 RNA 标准品稀释成  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$  拷贝 /mL 的梯度浓度,作为标准模板同时进行荧光定量 PCR,将检测的临界点定在 PCR 产物进入指数增长期的起始点即阈值循环数 (Threshold cycle, *Ct*) 值处,将 *Ct* 值与不同浓度的定量模板的对数拟合作图,即得一条定量标准曲线 (图 2):  $y = -2.76x + 39.43$  两者成负相关,相关系数  $r = -0.9963$ ,其中  $y$  代表 *Ct* 值,  $x$  代表模板量的对数值。同时从熔点曲线 (图 3) 和荧光曲线 (图 4) 可以看出,扩增产物特异性非常好,荧光曲线能够准确地反映目的产

物的扩增。

2.3 莱芜猪和杜洛克猪肌肉 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量

表 1 可知, *H-FABP* 基因在莱芜猪和杜洛克猪的背最长肌和半膜肌中均有表达,但表达量不一样。与杜洛克猪相比,莱芜猪背最长肌和半膜肌 *H-FABP* 基因 mRNA 的表达量分别提高 36.16% 和 12.38%,但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。莱芜猪和杜洛克猪背最长肌 *H-FABP* 基因 mRNA 的表达量显著低于半膜肌 ( $P < 0.05$ ),分别降低 72.04% 和 76.93%。

表 1 莱芜猪和杜洛克猪 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量

Tab 1 mRNA expressions of Laivu pigs and Duroc

| 品种  | copies /mg    |                 |       |
|-----|---------------|-----------------|-------|
|     | 背最长肌          | 半膜肌             | P 值   |
| 莱芜猪 | 30 174 ± 3.05 | 107 933 ± 35.97 | 0.019 |
| 杜洛克 | 22 161 ± 2.92 | 96 042 ± 7.82   | 0.000 |
| P 值 | 0.086         | 0.841           | -     |

2.4 莱芜猪和杜洛克猪背最长肌脂肪含量及其与 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量相关系数

由表 2 可知,莱芜猪与杜洛克猪间背最长肌肌肉脂肪含量差异显著 ( $P < 0.01$ ),莱芜猪背最长肌肌肉脂肪含量是杜洛克猪的 4.12 倍。杜洛克猪肌肉肌肉脂肪含量与 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量相关显著 ( $P < 0.05$ ),莱芜猪肌肉肌肉脂肪含量与 *H-FABP* 基因 mRNA 表达量相关极显著 ( $P < 0.01$ ),相关系数均高于 0.950。

表 2 莱芜猪和杜洛克猪肌肉脂肪含量及其与

*H-FABP* 基因 mRNA 表达量相关系数

Tab 2 MF content and correlation coefficient of mRNA expressions with MF content in Laivu pigs and Duroc

| 品种  | 肌肉脂肪含量 /%   | 肌肉脂肪含量与 <i>H-FABP</i> 基因 mRNA 表达量相关系数 |
|-----|-------------|---------------------------------------|
| 莱芜猪 | 7.78 ± 0.79 | 0.995*                                |
| 杜洛克 | 1.89 ± 0.14 | 0.952*                                |
| P 值 | 0.000       | -                                     |

注: \* . 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* . 差异极显著 ( $P < 0.01$ ).  
Note: \* . Significant at  $P < 0.05$ ; \*\* . Significant at  $P < 0.01$ .

3 讨论与结论

本试验制备的 RNA 标准品的扩增曲线呈典型的“S”型,扩增平台期几乎重合,而且标准品 RT-PCR 扩增产物溶解曲线在 83~88°C 之间出现一明显的峰,而其他位置未出现,表明标准品的重复性及其扩增产物特异性良好,即荧光曲线能够准确反应目的产物的扩增,由标准曲线计算得到的样本 mRNA 表达量准确性高。

试验结果表明,莱芜猪背最长肌和半膜肌*H-FABP*基因 mRNA 表达量高于杜洛克猪,但差异不显著( $P > 0.05$ )。这与罗献梅等<sup>[7]</sup>的报道一致,他们认为地方品种雅南猪心肌和骨骼肌中*H-FABP*基因表达量均高于 DLY 杂交猪。莱芜猪和杜洛克猪背最长肌*H-FABP*基因 mRNA 表达量显著低于半膜肌( $P < 0.05$ ),表现出组织表达差异性。雅南猪和 DLY 杂交猪心肌*H-FABP*基因表达量显著高于骨骼肌( $P < 0.01$ )<sup>[7]</sup>,藏猪*H-FABP*基因组织表达差异性显著,脂肪组织表达量高于其他组织( $P < 0.01$ ),心肌表达量高于背最长肌( $P < 0.05$ ),背最长肌表达量高于肝脏( $P < 0.01$ )<sup>[8]</sup>。莱芜猪和杜洛克猪半膜肌*H-FABP*基因表达量显著高于背最长肌,这可能与半膜肌中脂肪含量较高有关。研究表明, DLY 杂交猪半膜肌肌内脂肪含量高于背最长肌,提高 5.72%<sup>[13]</sup>。

本试验结果表明,莱芜猪和杜洛克猪背最长肌*H-FABP*基因 mRNA 表达量与肌内脂肪含量显著相关,这与 Gerbens 等<sup>[3]</sup>、黄治国等<sup>[8]</sup>和李文娟等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。Gerbens 等<sup>[3]</sup>认为杜洛克猪背最长肌*H-FABP*基因 mRNA 表达量与肌内脂肪含量显著相关。黄治国等<sup>[8]</sup>研究了绵羊肌肉*H-FABP*基因表达的发育性变化及其对肌内脂肪含量的影响,结果表明:哈萨克羊*H-FABP*基因在 30~90 日龄间的表达量与 MF 含量的相关系数为 0.737( $P < 0.01$ )。李文娟等<sup>[14]</sup>认为北京油鸡、白菜航鸡和 AA 鸡群体的*H-FABP*基因 mRNA 表达水平与 MF 含量显著负相关,*H-FABP*基因 mRNA 水平与胸肌 MF 含量、腿肌 MF 含量、腹脂相关系数分别为 -0.38( $P < 0.01$ )、-0.24( $P < 0.05$ )和 -0.29( $P < 0.01$ )。

莱芜猪和杜洛克猪背最长肌与半膜肌间*H-FABP*基因 mRNA 表达水平差异显著,表现出显著的组织表达差异性。

莱芜猪和杜洛克猪背最长肌*H-FABP*基因 mRNA 表达量与肌内脂肪含量相关显著,*H-FABP*基因可作为肌内脂肪选育的候选基因。

## 参考文献:

[1] Gerbens F, Jansen A, Van Erp A J *et al*. The adipocyte fatty acid binding protein locus: Characterization and asso-

ciation with intramuscular fat content in pigs [J]. *Mamm Genome* 1998, 9: 1022-1026

- [2] Gerbens F, De Koning D J, Henders F L, *et al*. The effect of adipocyte and heart fatty acid binding protein gene on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs [J]. *J Anim Sci* 2000, 78: 552-559.
- [3] Gerbens F, Verburg F J, Van Moerkerk H T, *et al*. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs [J]. *J Anim Sci* 2001, 79: 347-354.
- [4] Flower D R. The lipocalin protein family: structure and function [J]. *Biochem J* 1996, 318: 1-114.
- [5] Veerkamp J H, Peeters R A, Maatman R H J. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins [J]. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1081: 1-24.
- [6] Kevin P, Claffey D J. Cloning and tissue distribution of rat heart fatty acid-binding protein mRNA: Identical forms in heart and skeletal muscle [J]. *Biochemistry* 1987, 26(24): 7900-7904.
- [7] 罗献梅,陈代文,张克英.不同品种猪肌肉组织心型脂肪酸结合蛋白基因的表达差异 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(7): 727-730.
- [8] 黄治国,熊俐,刘振山,等.绵羊肌肉 H-FABP 和 PPAR $\gamma$  基因表达的发育性变化及其对肌内脂肪含量的影响 [J]. *遗传学报*, 2006, 33(6): 507-514.
- [9] 罗献梅,陈代文,余冰,等.营养水平对 DLY 杂交猪肉质性状及 H-FABP 基因表达的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2008, 44(19): 26-29.
- [10] 魏述东,曹洪防,徐云华,等.莱芜猪的选育 [J]. *中国畜牧杂志*, 2001, 37(6): 30-31.
- [11] 呼红梅,郭建凤,朱荣生,等.莱芜猪肉质特性研究 [J]. *家畜生态学报*, 2008a, 29(2): 6-9.
- [12] 呼红梅,王继英,朱荣生,等.莱芜猪和杜洛克猪肌肉肌球蛋白重链组成对肉质性状的影响 [J]. *中国科学: C 辑生命科学*, 2008b, 38(1): 60-65.
- [13] 韩剑众,顾振宇,吴劲松,等.一水肌酸对肥育猪胴体组成和肉质的影响及机理研究 [J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(3): 101-106.
- [14] 李文娟,李宏宾,文杰,等.鸡 H-FABP 和 A-FABP 基因表达与肌内脂肪含量相关研究 [J]. 2006, 37(5): 417-423.