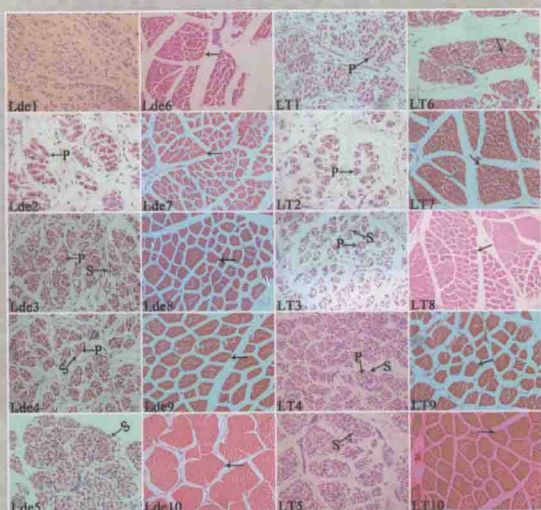


猪、鸡重要经济性状 遗传的分子机制

李 宁 等 著



科学出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

猪、鸡重要经济性状遗传的分子机制

李 宁 等 著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书介绍了 973 计划项目“猪、鸡重要经济性状遗传的分子机制”的研究成果。内容包括：猪、鸡生长发育的功能基因组，猪、鸡品质性状形成的分子机制，繁殖性状形成的遗传机制，抗病和抗逆基因的克隆分析，重要复杂性状的比较基因组，表观遗传和 miRNA 影响性状形成的机制，以及猪、鸡重要经济性状的分子改良。这些重大科学问题的阐释和相关功能基因组学等技术的建立，将为我国农业动物的高产、优质、高效发展提供遗传理论和高新技术。

本书可作为农业院校动物遗传育种专业和综合性大学动物科学相关专业研究生的参考用书，也可供以动物为研究对象的科研院所的研究人员参考阅读。

图书在版编目 (CIP) 数据

猪、鸡重要经济性状遗传的分子机制 / 李宁等著. —北京：科学出版社，2013.9

ISBN 978-7-03-038189-7

I. ①猪… II. ①李… III. ①猪-分子遗传学-研究 ②鸡-分子遗传学-研究 IV. ①S828.2 ②S831

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 168533 号

责任编辑：夏 梁 贺窑青 / 责任校对：郭瑞芝

责任印制：钱玉芬 / 封面设计：王 浩

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 9 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2013 年 9 月第一次印刷 印张：26 1/2 插页：6

字数：614 000

定价：150.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

编写委员会

(按姓氏汉语拼音排序)

陈瑶生	中山大学
黄路生	江西农业大学
李 辉	东北农业大学
李 奎	中国农业科学院北京畜牧兽医研究所
李 宁	中国农业大学
潘玉春	上海交通大学
庞峻峰	中国科学院昆明动物研究所
吴常信	中国农业大学
熊远著	华中农业大学
杨 宁	中国农业大学
张 勤	中国农业大学
张细权	华南农业大学
张 沅	中国农业大学
赵兴波	中国农业大学
周荣家	武汉大学

前 言

畜牧业是农业的支柱产业，生产的肉、蛋、奶等是人民生活水平进入“小康”必不可少的物质基础。发展优质高产畜牧业是我国 21 世纪农业结构调整的重要组成部分，是从根本上改变我国人民食品结构、全面建成小康社会的基本前提。在我国，养猪业和养鸡业产值构成了我国畜牧业的主体，猪肉、鸡肉和鸡蛋是我国人民食品中最主要的动物蛋白来源。目前，我国养猪业和养鸡业的生产效益与发达国家相比存在较大差距，其主要制约原因之一就是缺乏良种，而要对猪、鸡品种进行高效持续的改良就必须科学阐明其重要经济性状形成的遗传机制。

973 计划项目“猪、鸡重要经济性状遗传的分子机制”通过功能基因组学、比较基因组学、生物信息学和表观遗传学等研究方法，针对猪、鸡品质，遗传抗性，生长，繁殖等典型的复杂性状，定位、鉴定和克隆影响这些复杂经济性状的基因和基因网络，搭建了高通量基因型诊断技术平台，发展了优质基因的平衡集成方法，提出了系统平衡育种理论，初步阐明了这些复杂经济性状表型形成和调控的分子遗传机制。

项目组成员在国内外学术杂志上共发表 SCI 论文 308 篇，获得了具有我国自主知识产权的成果 32 项，并培养了一批掌握现代畜禽遗传改良理论和专业技术的高素质梯队人才。这些研究成果中不乏刊登在 *Nature*、*PNAS* 等国际顶尖学术期刊上的论文，以及国家级和省部级的科技奖励，在国内外同行中引起了广泛关注，使我国在世界动物遗传育种研究领域占据了一席之地。同时，这些科研成果无疑也将为我国动物农业的高产、优质、高效发展提供遗传理论和高新技术。

本书即是这些研究成果的汇编和总结，全书包括 7 部分内容：猪、鸡生长发育的功能基因组，猪、鸡品质性状形成的分子机制，繁殖性状形成的遗传机制，抗病和抗逆基因的克隆分析，重要复杂性状的比较基因组，表观遗传和 miRNA 影响性状形成的机制，猪、鸡重要经济性状的分子改良。这些内容分别从猪、鸡重要经济性状的功能性基因组、表观遗传及小分子 RNA 等调控性状形成和遗传的分子机制及系统平衡分子育种的角度研究和探索了猪、鸡重要经济性状的遗传调控机制和畜禽分子育种的技术途径。

希望本书的出版成为助推我国动物遗传育种研究领域发展和壮大的加速器。

李 宁

中国工程院院士

2013 年 6 月 13 日

目 录

前言

第一章 猪、鸡生长发育的功能基因组	1
第一节 猪、鸡肌肉生长发育相关机制的研究	1
一、采用组学方法对猪、鸡肌肉生长发育分子机制的研究	1
二、采用候选基因方法对猪、鸡肌肉生长发育性状的研究	16
第二节 猪、鸡脂肪生长发育的功能基因研究	21
一、猪的 <i>Caveolin</i> 基因家族	21
二、猪 Wnt 信号通路和 microRNA 在调控脂肪生成中的作用	24
三、脂蛋白脂肪酶基因多态性与脂肪性状关联分析	25
第三节 猪、鸡性腺对生长发育调控的研究	28
一、雄性性腺对猪肌肉和脂肪组织生长发育调控的研究	29
二、性腺对公鸡生长发育影响的研究	35
第四节 藏鸡低氧适应机制的研究	39
一、采用组学方法对藏鸡低氧适应机制的研究	40
二、采用候选基因法对藏鸡低氧适应性机制的研究	52
参考文献	59
第二章 猪、鸡品质性状形成的分子机制	60
第一节 猪品质性状形成的分子机制	60
一、部分地方品种和引进品种肉质性状测定	60
二、品质差异品种和不同生长发育阶段组织中基因表达差异研究	65
三、猪肌肉组织差异蛋白质组学研究	91
四、猪品质性状的候选基因和分子标记研究	98
五、猪品质性状相关印记基因的研究	110
六、猪肌肉细胞系的建立以及品质性状相关基因的 RNA 干扰研究	113
七、复杂性状与基因组多位点的关联分析方法研究	116
第二节 鸡品质性状形成的分子机制	116
一、蛋品质性状测定与遗传参数估计	116
二、应用高通量的检测方法筛选蛋品质性状候选基因	119
三、鸡蛋鱼腥味易感基因 <i>FMO3</i> 的研究	125
四、鸡脂肪代谢功能基因的研究	127
五、鸡肌纤维发育的分子机制研究	134

参考文献	139
第三章 繁殖性状形成的遗传机制	143
第一节 家猪繁殖性状基因位点的遗传解析	143
一、大规模“白色杜洛克猪×二花脸猪” F_2/F_3 资源群体的构建及繁殖性状表型测定	143
二、遗传图谱的构建和 QTL 定位统计分析	153
三、繁殖性状 QTL 定位	159
四、繁殖性状 QTL 精细定位和候选基因研究	169
五、母猪杀婴行为表型极端个体下丘脑差异表达基因的分离	184
六、候选基因影响母猪杀婴行为的表观遗传机制研究	184
第二节 性别决定、分化及生殖细胞的发育	184
一、性别决定和分化的机制	185
二、雄性生殖细胞的发育	201
三、雌性生殖细胞的发育	216
小结	231
参考文献	231
第四章 抗病和抗逆基因的克隆分析	246
第一节 猪免疫性状的 QTL 精细定位	246
一、猪资源群体的构建	246
二、资源群体免疫性状的测定与分析	246
三、猪免疫指标 QTL 全基因组扫描分析	247
四、后续研究：基于高密度 SNP 芯片的全基因组关联分析	250
第二节 猪腹泻抗性基因的克隆分析	252
一、F4 体外黏附表型	252
二、SSH 差异表达基因分析	253
三、腹泻候选基因 <i>Muc4</i> 关联分析	254
四、F4 受体基因精细定位	255
五、大肠杆菌 K88ad 受体全基因组扫描	256
六、大肠杆菌 F18 受体候选基因 $\alpha 1$ -岩藻糖转移酶基因分析	256
七、K88ac 受体候选基因 <i>Muc4</i> 突变与表达的关系	256
八、差异蛋白质组学方法，筛选腹泻候选基因	256
九、后续研究：大肠杆菌 F4 和 F18 受体候选基因 <i>Muc4</i> 、 <i>FUT1</i> 基因功能验证	257
第三节 猪抗病、抗逆候选基因的克隆分析	257
一、 <i>CD14</i> 基因的克隆、定位、组织表达	257
二、 <i>TLR4</i> 基因的定位、组织表达	257
三、 <i>SLC11A</i> 和 <i>BPI</i> 基因的组织表达及与免疫性状关联分析	259
四、低分子质量多肽 2、低分子质量多肽 7 (<i>LMP2</i> 、 <i>LMP7</i>) 基因的克隆分析	260
五、 <i>MECL-1</i> 的克隆分析	263
六、猪能量代谢功能基因的克隆分析	264

第四节 鸡抗逆基因的分子遗传基础和克隆分析	267
一、蛋壳膜抑菌作用的分子机制	267
二、不同品种鸡蛋清抗菌性研究	267
三、鸡色素性状的分子遗传学基础及其抗逆保护作用	269
参考文献	273
第五章 重要复杂性状的比较基因组	275
第一节 猪重要复杂性状基因功能及调控网络的研究	275
一、猪比较基因组学和比较转录组学研究	276
二、基因网络分析	278
三、比较蛋白质组学研究	280
四、复杂性状重要基因、通路及调控规律的功能分析	281
第二节 猪肌肉及胎盘发育相关的功能基因及 microRNA 研究	295
一、猪肌肉发育相关重要功能基因研究	295
二、猪肌肉发育相关 microRNA 克隆与表达研究	297
第三节 鸡脂肪组织生长发育重要基因的筛选及其功能研究	306
一、影响鸡脂肪组织生长发育的重要基因的筛选	307
二、重要基因的功能研究	311
第四节 绵羊和山羊高繁殖力候选基因研究及应用	316
一、绵羊和山羊 <i>BMPR-IB</i> 基因的研究	318
二、绵羊和山羊 <i>BMP15</i> 基因的研究	322
三、绵羊和山羊 <i>GDF9</i> 基因的研究	325
四、小尾寒羊 <i>BMPR-IB</i> 和 <i>BMP15</i> 基因协同作用的研究	327
小结	328
参考文献	329
第六章 表观遗传和 miRNA 影响性状形成的机制	332
第一节 表观遗传、miRNA 及 siRNA 研究	332
一、在全基因组范围内研究并论证了 G4 DNA 与基因表达调控的关系	332
二、红色原鸡和 AA 鸡全基因组甲基化模式及基因表达研究	333
三、鸡 miRNA 调控表达机制的研究	335
四、miR-15a、miR-144 参与鸡胚肺通气调控及低氧胁迫应答的研究	336
五、利用 RNA 干扰对鸡黑色素沉积相关基因 <i>Slc24a5</i> 的功能研究	338
六、miR-122 与肝脏功能的关系	339
七、CLB 处理的香猪肌肉组织中 microRNA 的差异表达	339
八、miRNA 在猪卵母细胞成熟过程中的作用	340
九、双肌羊与湖羊 miRNA 表达差异分析	341
十、鸡中一种新的非编码 RNA 的研究	341
第二节 重要功能基因的定位及解析	343

一、精确定位并系统揭示了鸡类胰岛素生长因子-I 单碱基突变是影响鸡生长和屠体性状的重要主效基因	343
二、影响乌骨鸡“十全”性状的基因定位	343
三、通过位置候选克隆的分析策略, 进一步研究揭示了鸡类胰岛素生长因子-I 单碱基突变是影响鸡生长和屠体性状的主效基因	343
四、藏鸡低氧适应遗传与生理机制的研究	343
第三节 利用 DNA 芯片技术对重要基因表达调控的研究	345
一、利用 DNA 芯片技术研究了猪卵泡不同发育时期的基因表达谱, 为揭示卵泡发育的分子调控机制奠定基础	345
二、利用 DNA 芯片开展盐酸克伦特罗减少猪脂肪积累分子机制的研究	346
三、建立利用 DNA 芯片进行高通量和大规模的、依赖于全基因组图谱选择 (map-based selection) 方法, 分析重要经济性状基因的表达调控规律	346
四、建立利用 DNA 芯片进行高通量和大规模的、依赖于全基因组图谱选择方法, 分析家鸡起源研究	347
参考文献	348
第七章 鸡、猪重要经济性状的分子改良	349
第一节 北京油鸡和乌鸡选择试验及候选基因研究	349
一、试验鸡群选择试验	349
二、鸡生长和繁殖性状候选基因的寻找及确定	353
三、生长和繁殖性状候选基因关联分析	353
四、候选基因 SNP 的功能验证	358
第二节 杏花鸡生长、肉质与繁殖性状的标记辅助选择试验	359
一、杏花鸡选择试验	360
二、杏花鸡重要经济性状的遗传基础研究	365
第三节 鸡抗病性状研究	370
一、单核细胞吞噬指数与鸡的抗病力	370
二、单核细胞高吞噬力交配组合获得的 G1 代抗病能力显著提高	377
三、单核细胞高吞噬力组合对 G1 代繁殖及生长性能的影响	378
四、单核细胞高吞噬特性影响抗病力初探	379
第四节 猪重要经济性状候选基因分离克隆与功能分析	380
一、猪重要经济性状候选基因分离与克隆	380
二、抗素降低肝细胞葡萄糖耐受和增强胰岛素抵抗功能研究	382
三、ChREBP 和 ACC1 在肝细胞糖/脂代谢调控中的作用	392
四、脂联素介导的脂肪积累调控研究	400
五、成熟脂肪细胞中脂联素基因表达的脂肪酸应答调控	408
参考文献	413

第一章 猪、鸡生长发育的功能基因组

猪、鸡是人类肉类食品的主要来源，关于猪、鸡生长发育的研究一直是畜牧生产、遗传育种研究领域的热点。随着分子生物学的发展，尤其近年来猪、鸡基因组测序工作的完成，猪、鸡生长发育性状的遗传机制的研究深入到了分子水平和基因组学水平。本章所述内容主要总结了在 973 计划项目“猪、鸡重要经济性状遗传的分子机制”子课题“生长发育性状的功能基因组”资助下所取得的研究成果，其中主要包括猪、鸡肌肉组织和脂肪组织生长发育功能基因，性腺对畜禽生长发育影响的分子生物学机制，藏鸡低氧适应遗传机制等方面。这些研究成果在一定程度上反映了本领域最新的研究进展。

第一节 猪、鸡肌肉生长发育相关机制的研究

除了头部和眼外肌外，脊椎动物的骨骼肌都是由体节中胚层前体细胞发育而来的。这些细胞在体节成熟时分化成两部分。一部分为腹侧生骨节（ventral sclerotome），之后发育成脊椎和肋骨；另一部分为背侧生皮肤肌节（dorsal dermomyotome），之后发育成骨骼肌、远端肋骨和背部真皮结构。而这些分化过程都受到肌细胞特异的生肌调节因子的调控（Borycki and Emerson, 2000; Tajbakhsh and Buckingham, 2000）。通过深入研究，在肌肉发生过程中所涉及的主要转录因子、增强因子、抑制因子等方面已取得了许多成果，并在过去的几年里在对小鼠、禽、鱼类和蛙等的胚胎遗传学研究发现了一些在肌肉发生过程中起调控作用的基因间的信号转导通路（包括对体节发育时启动肌肉发生过程的调控信号网络），但是由于肌肉发育过程是一个复杂的、涉及众多基因或蛋白质的过程，迄今为止，人们对肌肉发育过程的认识仍然有限。在已有研究成果的基础上，我们结合猪、鸡生长发育方面的重要经济性状，以在肌肉生长性状上存在显著差异的猪、鸡品种为研究对象，通过组学和候选基因的研究方法，对猪、鸡肌肉生长发育所涉及的基因及调控通路进行了深入研究。

一、采用组学方法对猪、鸡肌肉生长发育分子机制的研究

（一）采用全基因组表达芯片对猪肌肉生长发育性状的研究

1. 大白猪双肌臀性状的分析

加系双肌臀大白猪与国内其他猪种相比，具有生长快、瘦肉率高等优点。但是其双肌性状不像双肌牛、美臀羊那样可以稳定遗传。猪双肌性状的遗传不稳定。父、母代同为双肌性状的个体，子代却表现出不同的肌肉发达程度。因此，本研究选取全同胞肌肉差异最显著的猪作为研究对象，利用全基因组表达谱芯片和蛋白质组学的方法探索猪的

双肌性状遗传机制，寻找影响猪双肌性状的主效基因或在猪的肌肉肥大过程中起重要作用的基因或蛋白质。

(1) 双肌臀和非双肌臀个体表型值的测定

利用表型数据和肌纤维组织切片进行分析，从 6 对全同胞猪中选出 3 对表型差异最大的猪，并选其背最长肌作为实验材料进行研究。实验猪体尺参数统计显示（表 1-1），在选定的 6 对全同胞大白猪中，背最长肌眼肌面积平均值在双肌臀组中明显高于非双肌臀组（ $P<0.01$ ）；腿臀围平均值在双肌臀组中高于非双肌臀组（ $P<0.05$ ）。背最长肌重和半腱肌重在双肌臀组中高于非双肌臀组（ $P<0.05$ ）。骨骼肌组织切片结果表明，背最长肌纤维直径在双肌臀组和非双肌臀组中的差异极显著（ $P<0.01$ ）（图 1-1）。

表 1-1 双肌臀组和非双肌臀组大白猪体尺参数统计结果（平均值±标准误）

项目	双肌臀组均值（ $n=6$ ）	非双肌臀组均值（ $n=6$ ）
体重/kg	50.48±2.82	46.32±2.05
体长/cm	81.22±1.93	79.39±2.10
体高/cm	69.17±7.92	65.16±6.02
胸围/cm	80.43±2.84	76.43±2.90
腿臀围/cm	75.50±3.27 ^a	68.83±3.25 ^b
眼肌面积/cm ²	19.56±2.34 ^A	13.82±1.26 ^B
眼肌重/g	887.87±119.18 ^a	836.43±114.58 ^b
半腱肌重/g	193.15±37.73 ^a	145.35±32.21 ^b
股二头肌重/g	504.23±76.00	393.35±60.38
臀三头肌重/g	91.00±19.76	69.47±16.93

注：数据后上标小写字母表示 0.05 水平下的差异；大写字母表示 0.01 水平下的差异

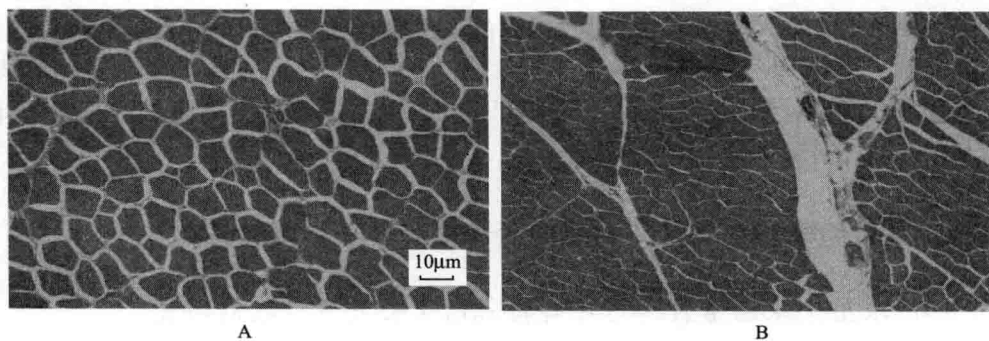


图 1-1 双肌臀组 (A) 与非双肌臀组 (B) 大白猪背最长肌切片图

(2) 双肌臀和非双肌臀个体肌肉组织的全基因组芯片分析

选择 6 对实验动物中双肌臀性状差异最显著的 3 对个体，利用全基因组表达谱芯片，对所选猪的背最长肌的基因转录水平进行分析研究。结果通过贝叶斯统计和 SAM 筛选，从 3 对个体中分别得到 57 个、260 个和 147 个差异表达基因（ $P<0.05$ 、

$Q < 0.05$ 、 $\text{fold} > 2$)。对这些差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释和通路 (pathway) 分析。分析结果表明, 这些差异表达基因参与的生物学过程共有 1358 类、细胞组成共有 210 类、分子功能共有 311 类。这些 GO 类别中, $P < 0.05$ 水平的生物学过程有 423 类、细胞组成有 43 类、分子功能有 68 类。而这些差异表达基因所参与的通路有 28 条 (表 1-2)。利用差异表达基因进行基因调控网络构建 (图 1-2), 得到与其他基因或蛋白质联系较多的节点, 如 EGF、PPARG、FN1、SERPINE1、CDH1、MYC、JUN 等, 它们与一些重要的信号通路, 如 Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、TGF- β 信号通路相互联系, 参与细胞分化、增殖过程。这为从整体水平上认识及探索相关基因和蛋白质的功能以及其作用机制提供了参考。

表 1-2 差异表达基因相关的通路

通路	P 值	Q 值
Wnt 信号通路	1.37E-05	2.74E-05
MAPK 信号通路	5.55E-05	5.55E-05
B 细胞受体信号通路	2.02E-04	1.16E-04
轴突导向	2.02E-04	1.16E-04
补体及凝血级联反应	0.002 169 7	7.89E-04
T 细胞受体信号通路	0.002 169 7	7.89E-04
苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸生物合成	0.006 603 1	0.001 886 59
γ -六氯环己烷降解	0.009 89	0.002 327 068
半胱氨酸代谢	0.009 89	0.002 327 068
生物碱生物合成 I	0.013 167 3	0.002 508 065
长时程增强	0.013 167 3	0.002 508 065
碳固定	0.016 435	0.002 739 167
丙氨酸及天冬氨酸代谢	0.019 693	0.002 908 927
亚油酸代谢	0.022 941 5	0.002 908 927
谷氨酸代谢	0.022 941 5	0.002 908 927
VEGF 信号通路	0.022 941 5	0.002 908 927
精氨酸及脯氨酸代谢	0.026 180 3	0.002 908 927
酪氨酸代谢	0.026 180 3	0.002 908 927
苯丙氨酸代谢	0.026 180 3	0.002 908 927
通过细胞色素 P450 的异源物代谢	0.042 232	0.004 223 197
TGF- β 信号通路	0.048 586 5	0.004 627 284
Toll-样受体信号通路	0.051 749 7	0.004 704 514
肌动蛋白骨架调控	0.061 183 2	0.005 320 276
细胞凋亡	0.064 309 1	0.005 359 091
黏着斑	0.079 800 3	0.006 384 026
钙信号通路	0.095 063 2	0.007 312 551
Jak-STAT 信号通路	0.136 609	0.010 119 188
细胞因子-受体互作	0.173 660 1	0.012 404 293

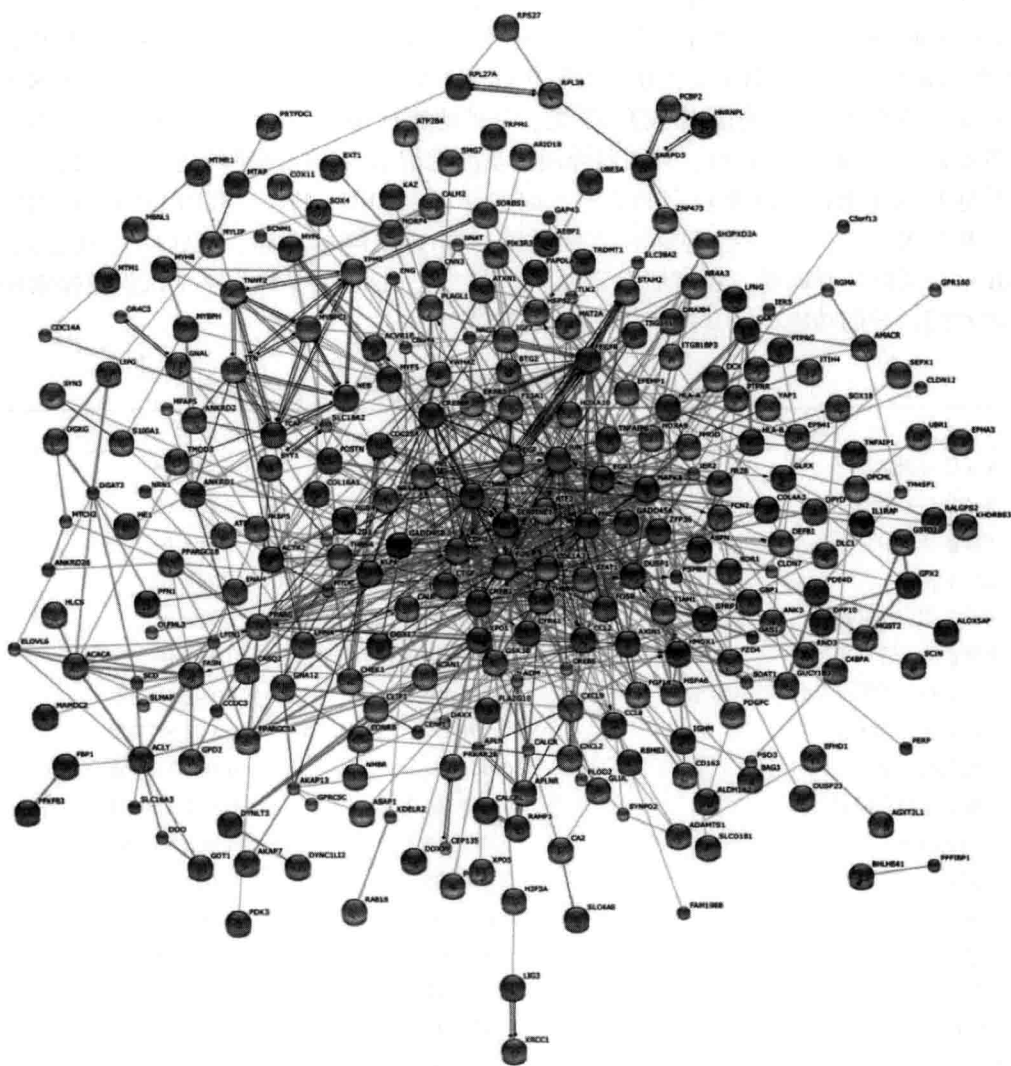


图 1-2 3 组生物学重复中差异表达基因的相互作用图 (见图版)

(3) 双肌臀和非双肌臀个体肌肉组织蛋白质组学分析研究

利用蛋白质组学 (采用双向电泳技术) 对所选 3 对双肌臀性状差异最显著的个体的背最长肌蛋白质表达水平进行分析研究 (图 1-3)。比对分析双肌臀组和非双肌臀组之间的蛋白质表达差异, 从中选取了 50 个差异蛋白质点进行质谱鉴定, 并且最终获得了 41 个差异蛋白质点的质谱鉴定结果。将这些蛋白质点的质谱结果在数据库中进行蛋白质搜索、注释, 共得到 33 个蛋白质点的注释结果。将所得到的差异蛋白质进行 GO 功能注释分析, 共得到生物学过程 191 类、细胞构成 39 类、分子功能 37 类。并发现这些差异蛋白质点主要参与能量代谢和肌纤维结构形成等调控通路 (表 1-3, 图 1-4)。

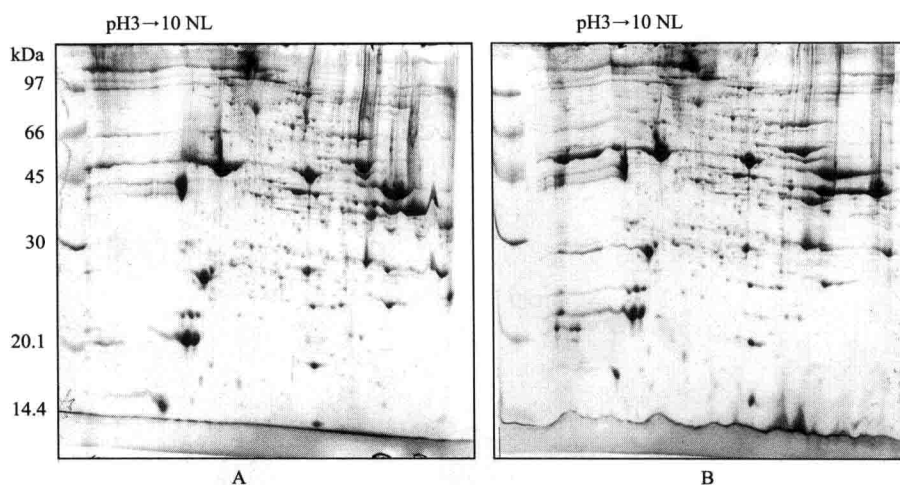


图 1-3 双肌组与非双肌组大白猪背最长肌组织总蛋白双向电泳图谱

A. 双肌组个体；B. 非双肌组个体。上样量为 1.2mg。第一向电泳采用 pH3~10 非线性 17cm IPG 胶条；第二向电泳采用 12% 浓度的 SDS-PAGE 分离。结果胶体采用考马斯亮蓝染色

表 1-3 双肌组和非双肌组大白猪背最长肌差异蛋白质点 GO 分析结果——分子功能

分子功能	计数	P 值	P 值_ FDR
原肌球蛋白结合	2	8.91E-05	2.31E-01
细胞骨架蛋白结合	5	1.34E-04	2.31E-01
催化活性	12	8.00E-04	9.24E-01
NAD 结合	2	1.13E-03	9.76E-01
辅因子结合	3	2.04E-03	1.00E+00
异构酶活性	2	7.89E-03	1.00E+00
马达活性	2	9.20E-03	1.00E+00
镁离子结合	2	1.22E-02	1.00E+00
辅酶结合	2	1.43E-02	1.00E+00
相同蛋白质结合	24	3.26E-02	1.00E+00
三磷酸核苷活性结合	7	3.78E-02	1.00E+00
	263	4.14E-02	1.00E+00
焦磷酸酶活性	3	4.16E-02	1.00E+00
肌动蛋白结合	2	4.31E-02	1.00E+00

(4) 基因表达芯片和双向电泳结果的验证

利用实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 对芯片质量和蛋白质结果进行验证。结果显示，在所选取的 6 个基因中，除了 *ABCF2* 之外，所有基因定量结果与芯片结果趋势一致。在定量结果与蛋白质双向电泳结果对比中，除 *MRLC2* 和 *HSPB1* 外，其他 6 个基因定量结果与蛋白质双向电泳结果趋势一致。Western Blot 结果显示，所选取的 5 个蛋白质 Western Blot 结果与蛋白质双向电泳结果趋势一致。

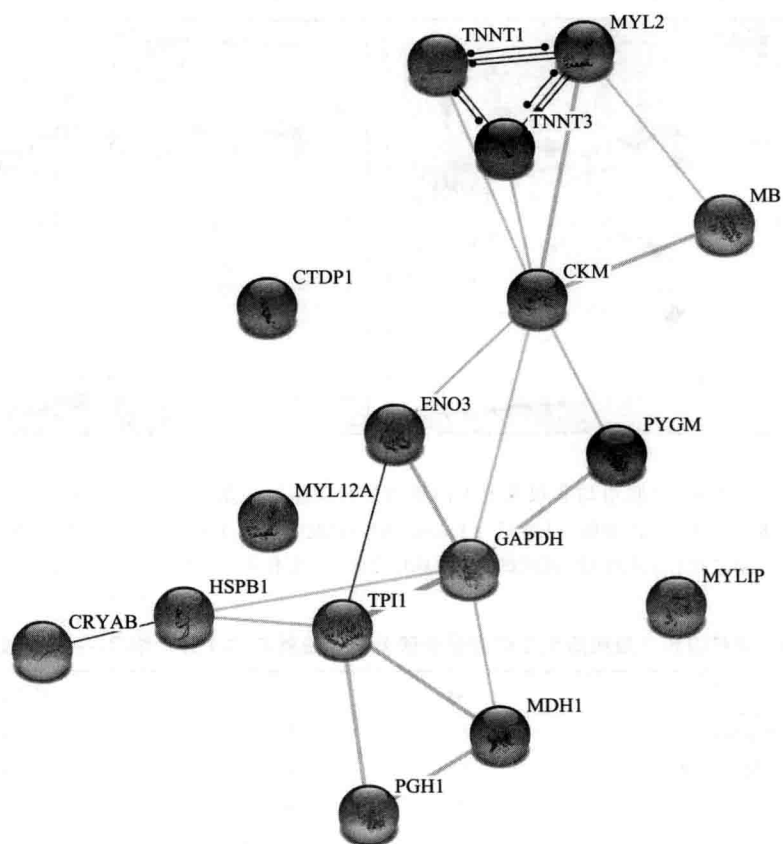


图 1-4 双肌组和非双肌组大白猪差异蛋白质点的网络调控图（见图版）

本研究从基因转录水平和蛋白质表达水平探讨了影响猪双肌性状遗传的分子机制，并获得一些差异表达基因和蛋白质，同时根据这些差异表达基因和蛋白质的功能构建了网络调控图，这为深入研究这些差异表达基因和蛋白质之间的关系，挖掘猪肌肉生长发育过程中的相关模式，分析这些候选基因和蛋白质的分子作用机制等方面打下了基础，并为指导分子育种实践提供了依据。

2. 蓝塘猪和长白猪肌肉生长发育差异的遗传分析

为了对猪的肌肉组织生长或抑制生长的功能基因及其网络调控进行研究，共配种了 14 头长白母猪和 15 头蓝塘母猪，其中在妊娠期解剖了 10 头长白母猪和 11 头蓝塘母猪，采集两个品种各组织（包括背最长肌、股二头肌、肝脏等）共计 3300 多份样品进行后续实验，并已取得阶段性研究成果。

通过两个品种猪胚胎期石蜡切片证实，在胚胎发育过程中，30~60 天为初级肌纤维形成时期，50~90 天为次级肌纤维形成时期；出生后，主要是肌纤维变大增粗的过程，肌细胞呈五边形或六边形分布。此外，通过对瘦肉型长白猪与脂肪型蓝塘猪相同时

期猪背最长肌组织石蜡切片的分析,我们发现两者在相同发育时期的肌纤维均存在明显差别:胚胎期,在肌纤维形成方面,脂肪型蓝塘猪发育整体滞后于瘦肉型长白猪;出生后,在肌纤维直径方面,同一时期脂肪型蓝塘猪小于瘦肉型长白猪;在肌内脂肪沉积方面,同一时期脂肪型蓝塘猪明显多于瘦肉型长白猪(图 1-5)。

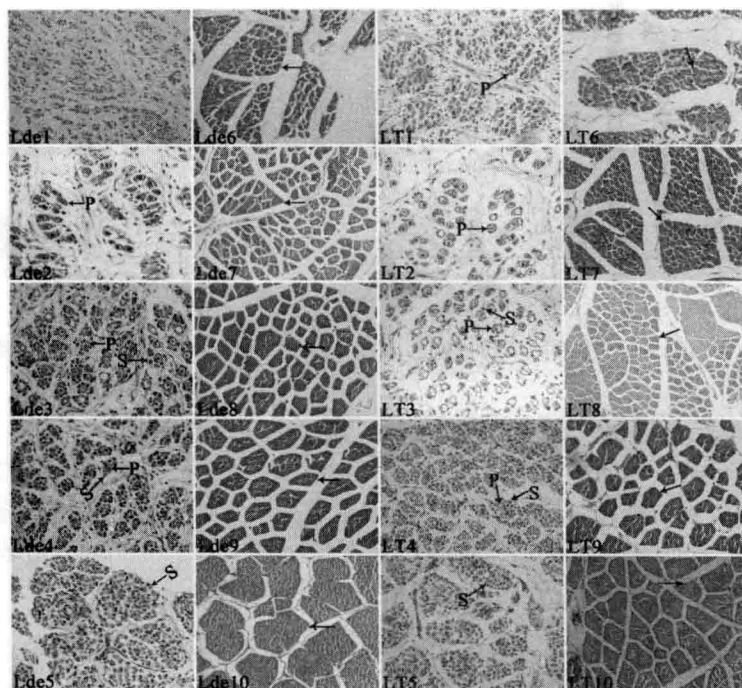


图 1-5 长白猪(Lde)与蓝塘猪(LT)各时期肌肉组织切片图(见图版)

两个品种猪肌肉组织差异主要表现在同一时期两个品种猪骨骼肌表达基因的种类及丰度上,它们并不总是呈现出一一对应的关系。例如,长白猪出生后第 28 天、90 天、120 天、180 天基因的表达情况与蓝塘猪第 120 天基因的表达情况相关系数最高。从这一现象可以做出如下分析,即蓝塘猪虽然生长发育缓慢,但体成熟相对较早。

相似之处主要体现在两个品种猪在各自的生长发育过程中所表现出来的规律。长白猪与蓝塘猪都是在胚胎期 35 天与胚胎期 49 天之间、胚胎期 91 天与出生后 2 天之间以及出生后 2 天与出生后 28 天之间有较为显著的差异,也就是说,在这几个时段,基因表达的变化非常显著,这也告诉我们这几个时段对于猪的生长发育来说可能是非常关键的时期。对不同时期差异基因进行相互作用关系网络的构建(图 1-6A、B),分析发现,在两个品种猪中,若干个影响肌肉生长发育的基因,如 *Smad3*、*Smad4*、*TGFB1*、*BMP4*、*LEF1*、*EGF*、*MET* 等,以及影响脂肪沉积的基因,如 *GSK3B*、*TCF7L2*、*CAVI*、*CAV2* 均位于其中,而奇怪的是影响肌肉生长发育的 *myoD* 基因家族却并未出现,但在肌肉生长发育不同时期差异表达的基因中确实有该基因家族的成员。后经分析发现,*myoD* 基因家族,尤其是 *myoD* 和 *myf5* 主要影响由间充质干细胞到成肌细胞的过程,而

这一过程一般处于胚胎早期发育时期,很难得到其样品,因此在 signal flow 数据库中没

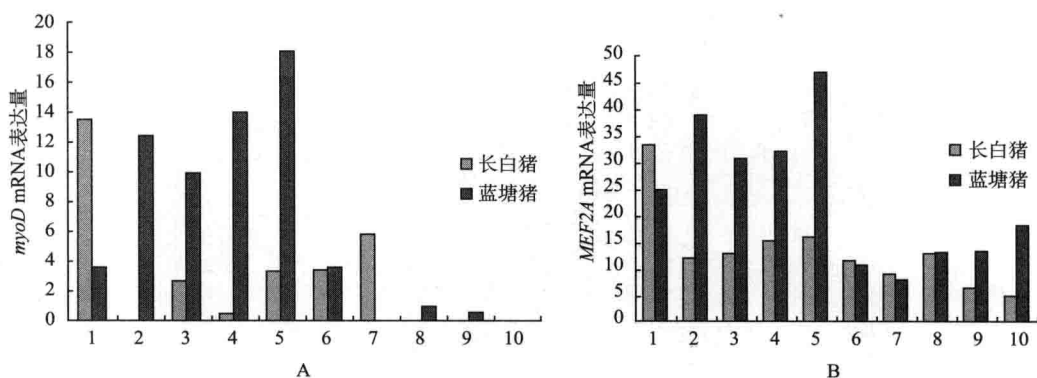


图 1-6 *myoD* 基因 (A) 和 *MEF2A* 基因 (B) 在两个品种 10 个时期的表达 (见图版)

通过对肌肉发育相关因子的表达谱分析,发现除了胚胎早期(35天)外,从胚胎期49天至180日龄,脂肪型蓝塘猪的 *myoD* 和 *MEF2A* 表达量总是高于长白猪。说明在胚胎35天之前,长白猪的 *myoD* 和 *MEF2A* 表达量高于蓝塘猪,促进了间充质干细胞向成肌细胞的转化,而胚胎35天后,这一过程在长白猪中基本已完成,但蓝塘猪还未完成,继续表达这两个基因,促使间充质干细胞向成肌细胞的转化。

(二) 采用组学方法对鸡胸肌生长发育的基因表达谱研究

以雄性的隐性白洛克鸡和鲁西斗鸡为材料,利用 Affymetrix 公司鸡的全基因组芯片,分析胚胎期(孵化至7.5天)和出生后生长期4个时间点(第4、8、15周龄)鸡胸部肌肉组织生长发育的基因表达谱,以期筛选出与鸡的肌肉发育差异有关的重要候选基因,探讨其中基因调控的网络。具体工作分为3个部分。

1. 生长曲线和屠体性状的比较

利用3个常用的生长曲线模型拟合了每周的体重生长数据,鲁西斗鸡的生长拐点约在第8.5周,白洛克鸡的生长拐点约在第6周。

两个品种间比较,第4周龄和第8周龄分别在胸肌重、腿肌重、皮脂厚和胸肌重、腿肌重、半净膛重、全净膛重、全净膛率、胸肌率、腿肌率等指标达到极显著差异 ($P < 0.01$),第8周龄和第15周龄分别在屠体重、胸角宽、单侧胸肌肌内脂肪含量和屠体重、胸肌重、皮脂厚等指标达显著差异 ($P < 0.05$)。同一品种内不同时间点比较,全净膛率、胸肌率和腿肌率均达极显著差异 ($P < 0.01$); 半净膛率仅在第4周龄与第8周龄、第4周龄与第15周龄差异极显著 ($P < 0.01$) (表 1-4)。