

张 蕾,任 嵩,杨娴婧,等. 基于 RNA-Seq 挖掘玫瑰冠鸡与科宝鸡胚胎期胸肌组织差异表达基因[J].江苏农业学报,2020,36(5):1237-1246.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.022

基于 RNA-Seq 挖掘玫瑰冠鸡与科宝鸡胚胎期胸肌组织差异表达基因

张 蕾, 任 嵩, 杨娴婧, 孙 杰, 廖和荣

(石河子大学动物科技学院,新疆 石河子 832000)

摘要: 本研究旨在挖掘玫瑰冠鸡与科宝鸡胚胎期胸肌组织中差异表达基因,探讨 2 种鸡肌肉发育及肌内脂肪(IMF)沉积的分子遗传机理。本研究利用 RNA-Seq 技术对玫瑰冠鸡和科宝鸡胚胎期胸肌组织中差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)进行筛选,通过 GO 富集和 KEGG 数据库对 DEGs 的功能进行注释与分析。结果显示:4 个文库共鉴定到 4 643 个差异表达基因,其中玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌中有 1 909 个显著表达的基因,以科宝鸡为参照,929 个上调,980 个下调;玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌中有 2 734 个显著表达的基因,其中 1 444 个上调,1 290 个下调。经荧光定量 PCR 验证,选取的 12 个差异基因的表达趋势与测序结果一致。GO 富集结果表明,MYL2 调控骨骼肌的生长发育,MYOG 参与肌细胞的形成与分化;ACACA、ACOX2 和 ACOX3 参与脂肪酸代谢过程;Notch1 参与了胚胎发育及脂肪分化相关过程。此外,KEGG 通路分析结果显示,能量代谢相关的信号通路(mTOR)与肌肉发育相关的信号通路相互作用影响肌纤维的发育。细胞连接相关通路(局部粘附、ECM-受体互作)参与了肌肉脂肪代谢过程。本研究结果为进一步解析鸡优质肉质性状相关的遗传机制奠定了基础。

关键词: 玫瑰冠鸡; 科宝鸡; 胚胎期; 胸肌; 差异表达基因; RNA-Seq

中图分类号: S831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)05-1237-10

Identification of differentially expressed genes in embryonic breast muscle tissue of Rose-crowned chicken and Cobb broilers based on RNA-Seq

ZHANG Lei, REN Song, YANG Xian-jing, SUN Jie, LIAO He-rong

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: This study aimed to identify differentially expressed genes (DEGs) in the embryonic breast muscle tissue of Rose-crowned chicken and Cobb broilers, and to explore the molecular genetic mechanism in muscle development and intramuscular fat (IMF) deposition. RNA-Seq technology was used to screen differentially expressed genes in the embryonic breast muscle tissues of Rose-crowned chicken and Cobb broilers. GO enrichment and KEGG database were used to annotate the functions of DEGs. The results showed that a total of 4 643 differentially expressed genes were identified in the four libraries. Among them, 1 909 genes were significantly expressed in the breast muscle of Rose-crowned cocks and Cobb cocks. Taking Cobb broilers as reference, 929 genes were up-regulated and 980 genes were down-regulated. There were

2 734 significantly expressed genes in the breast muscle of Rose-crowned hens and Cobb hens, 1 444 genes were up-regulated and 1 290 genes were down-regulated. The results of real-time PCR indicated that the expression trend of 12 differential genes was consistent with the sequencing results. Go enrichment analysis results showed that MYL2

收稿日期:2020-03-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31660654、31860641)

作者简介:张 蕾(1994-),女,新疆昌吉人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种。(E-mail)595173387@qq.com

通讯作者:孙 杰,(E-mail)sunjie_shzu@126.com

regulated the growth and development of skeletal muscle. *MYOG* was involved in the formation and differentiation of muscle cells. *ACACA*, *ACOX2* and *ACOX3* were involved in the fatty acid metabolism. *Notch1* was involved in embryo development and adipogenesis-related processes. In addition, KEGG pathway analysis results indicated that the interaction between the energy metabolism-related signaling pathway (mTOR) and muscle development-related signaling pathways affected the development of muscle fibers. Cell junction-related pathways (focal adhesion, ECM-receptor interaction) were involved in IMF metabolism. The results of this study lay the foundation for further analysis of genetic mechanisms associated with high-quality meat quality traits in chickens.

Key words: Rose-crowned chicken; Cobb broilers; embryonic period; breast muscle; differentially expressed genes; RNA-Seq

鸡是具有重要经济意义的食用动物,同时广泛用作胚胎发育研究的模式动物。肌肉中的肌纤维直径和横截面积与肉品质呈负相关,肌纤维密度与肉品质呈正相关,而肌肉脂肪(IMF)含量影响鸡肉的风味、多汁性和嫩度^[1-3]。肌肉的发育取决于肌细胞的发生,在某种程度上还取决于脂肪的形成^[4]。肌肉质量和肌肉脂肪含量均由细胞数量和单位细胞大小决定,胚胎期是肌肉和脂肪组织发育的关键时期,而肌肉中肌纤维和脂肪细胞的数目在胚胎期及发育早期就被确定,在生长后期仅表现为细胞的增大和质量的增加^[5-6]。有研究结果表明,在鸡胚胎发育的 7~10 d,脂肪细胞成脂标志基因 *PPAR α* 表达水平逐渐增加,此时肌肉脂肪快速沉积^[7]。*Pax* 基因家族与肌纤维生长发育密切相关,廖菁等^[8]研究发现 *Pax-3* 在胸肌中的表达高峰期出现在胚胎期 8~20 d,此后迅速下降并保持稳定。本课题组前期研究结果表明,玫瑰冠鸡与科宝鸡腿肌均在 7 胚龄开始出现脂肪沉积,胸肌则在 8 胚龄开始出现脂肪沉积^[9]。也有研究结果表明胚胎期肌肉发育和肌肉脂肪沉积对出雏后家禽产肉量和肉品质具有决定性作用^[10]。Velleman 研究发现火鸡在 25 胚龄时胸肌肌纤维已存在品种和性别的差异,表明胚胎期肌纤维发育对出生后肌肉发育潜力有极大影响^[11]。Charrin 等研究了麻鸭 1~98 d IMF 的沉积规律,发现第 1 d 胸肌组织中总脂肪含量较高,表明胚胎期脂肪沉积对早期阶段的生长和能量需求是必要的^[12]。

玫瑰冠鸡具有地方鸡种良好的肉品质及独特的风味,其桑葚状冠型巨大鲜艳,肉质细嫩,香气浓郁,极具食用和观赏价值^[13],科宝鸡具有生长速度快、饲料转化率高、屠宰率高等优点,尤其是其胸肌肌肉产量,在 28 d 后可达到活体质量的 20% 以上,但两者在生长速度、肌肉品质等方面存在显著差异^[14]。因此,这 2 个品种是研究鸡肌肉生长发育及肉品质

遗传机理的理想动物模型。

鸡胚胎期肌肉发育及脂肪形成受多种基因的影响和调控,但其潜在的分子机制仍不明确。本研究采用 RNA-Seq 技术挖掘和筛选影响玫瑰冠鸡、科宝鸡胚胎期肌肉发育及脂肪形成的候选基因和信号通路,以期阐明鸡肉品质性状差异的遗传机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

玫瑰冠鸡种蛋由石河子大学动物科技学院实验站提供,科宝鸡种蛋由新疆泰昆种鸡场提供。所有种蛋均按常规程序进行孵化,胚胎期第 8 d 分别采集玫瑰冠鸡(M)、科宝鸡(K)的胸肌组织(X),置于 Trizol 试剂中,并迅速放入液氮中保存。将采集的样品分为 4 组:玫瑰冠公鸡(MGX)、科宝公鸡(KGX)、玫瑰冠母鸡(MMX)、科宝母鸡(KMX),每组 3 个生物学重复。

1.2 RNA 提取、转录组文库构建与测序

使用 Trizol 法提取玫瑰冠鸡和科宝鸡胸肌组织的总 RNA,接着采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,然后纳米分光光度计、Qubit 和 Bioanalyzer 2 100 分别检测 RNA 的质量、浓度以及完整性。样品检测合格后,使用 NEBNext[®] Ultra[™] Directional RNA Library Prep Kit 构建文库。最后,使用 Agilent Bioanalyzer 2100 对文库质量进行评估,库检验合格后,使用 Illumina HiSeq 4000 平台对文库进行 RNA-Seq。

1.3 测序数据处理与分析

原始序列(Raw reads)中去除低质量、带接头的序列,获得高质量序列(Clean reads),同时计算 Clean reads 的 Q_{20} 、 Q_{30} (分别表示 Phred 数值大于 20、30 的碱基占总碱基的百分比)和 C+G 含量。使用 Bowtie2 和 HISAT2 将过滤后的序列定位到鸡的参考基因组(http://asia.ensembl.org/Gallus_gallus/In-

fo/Index)上,比对过程中不容许错配,后续分析都基于比对结果进行。

1.4 SNP 及可变性剪切分析

通过 Samtools 和 Picard-tools 等工具对比对结果进行染色体坐标排序、序列去重复等处理,然后通过变异检测软件 GATK2 统计每个样品的单核苷酸多态性位点 (SNP) 和插入缺失突变 (Indel)。使用 rMATS (<http://rnaseq-mats.sourceforge.net/index.html>) 对样品中的可变剪切事件 (外显子跳跃、第一个外显子可变剪切、最后一个外显子可变剪切、外显子选择性跳跃、内含子滞留) 进行分类和差异分析。

1.5 差异表达基因分析

使用 Cuffdiff (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/cuffdiff/index.html>) 软件进行定量分析,以 *FPKM* (Fragments per Kilobase Million) 来表示基因的表达量。通过计算皮尔逊相关系数 (Pearson product-moment correlation coefficient) 评估品种内重复样品的相关性。以差异倍数 (Fold change) 及 $P < 0.05$ 进行差异基因筛选。

1.6 差异表达基因 GO 和 KEGG 分析

基于非中心超几何分布算法,采用 GOseq 对差异表达基因进行 GO 注释。采用 Kobas 2.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/help.do>) 找出差异基因参与的显著性富集的通路。GO 注释及 KEGG 通路分析均以 $P < 0.05$ 为差异显著判断标准。

1.7 测序结果的实时荧光定量 PCR 验证

随机挑选了 12 个差异表达基因进行荧光定量 PCR,使用 primer5 设计特异性引物,选择 *U6* 作为相对定量的内参基因,委托上海生工生物工程有限公司合成,引物信息见表 1。反应体系 (20 μ l): 染料 10 μ l, ddH₂O 7 μ l, 上下游引物各 1 μ l, cDNA 1 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 最佳退火温度 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 45 个循环; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 97 $^{\circ}$ C 1 s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对基因的表达量进行标准化计算。差异性分析使用 SPSS 22 软件,以 $P < 0.05$ 为差异显著判断标准。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量

测序结果显示,每个样品产生的原始序列数量均在 91 374 036 以上,所得高质量的序列所占比例均在 95.27% 以上。 Q_{20} 和 Q_{30} 是衡量测序准确率的

一个重要指标, Q_{20} 的含量均在 96.9% 以上, Q_{30} 的含量均在 92.11% 以上,所有样品中 G+C 含量集中分布在 45.25% ~ 52.02%。Total mapped 是比对到参考基因组的高质量序列的数量,所有样品比对到鸡基因组上的高质量序列数量均在 92.62% 以上,统计结果见表 2。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 qRT-PCR primer information

基因	引物序列 (5'→3')	扩增产物长度 (bp)
MYOG	F: GAAACGGGTGGGATGCTGA	117
	R: TTGGAGAGGACTGGGAAAGGA	
HBE	F: GTAACCCCAAGGTCCGTGC	86
	R: GGTGTTCTTGATGTTGTCCAGG	
RPS25	F: AACTACAACTCATCACACCAGC	195
	R: ACCTTCCTATGCGTCCTCC	
FABP3	F: GAGGTGGATGGCGACAAGGT	230
	R: ATGGTGAGGGTCAGAATCAACTT	
CCNYL1	F: TTCCCTGTTTGGCTACTGA	79
	R: GGATTCCTTCCTGCTGTGC	
COL9A1	F: ATGGGCAACGCAAAAGTC	306
	R: GGTAAAGTATGTTCAAGGGA	
RAD51AP1	F: TGTGAAAGGATTTGAACG	135
	R: CCATTGCCTACAGCCATTC	
RPL32	F: GCCTCTCGTAAGCCTAAAT	134
	R: TGAACCTCCTGCGAACTCTG	
MYL2	F: GGCAAAGGGCTGAAATCTG	276
	R: GGCTGTTATCCCGTTGAAGA	
METRNL	F: GGTCTACCTCCGCTGTTCC	292
	R: TGTGATCTTCCTGCTAATGTCC	
Notch1	F: GACAGCATCGCCGCCTTCAC	187
	R: CGTCCAGGTTGATCTCGCAGTTG	
ID3	F: CGCAGCAGCAACAACAAGAG	309
	R: CTGATGGAGGAGCGTTAGTGA	
U6	F: CAAATTGGCTAAGCGGGCCT	139
	R: CTAACAGCGTCGAGACTGCG	

2.2 SNP 及其可变剪接

所有样品中检测到的 SNP 数量为 993 778 ~ 1 619 033 个,从理论上来看,每一个 SNP 位点都可以有 4 种不同的变异形式,但实际上发生的只有 2

种,即转换和颠换,二者之比为1:2。SNP 在 CG 序列上出现最为频繁,而且多是 C 转换为 T。所有样

品中发生插入缺失突变事件的数目为 84 008~138 470个,且均位于染色体上。

表 2 测序数据输出情况

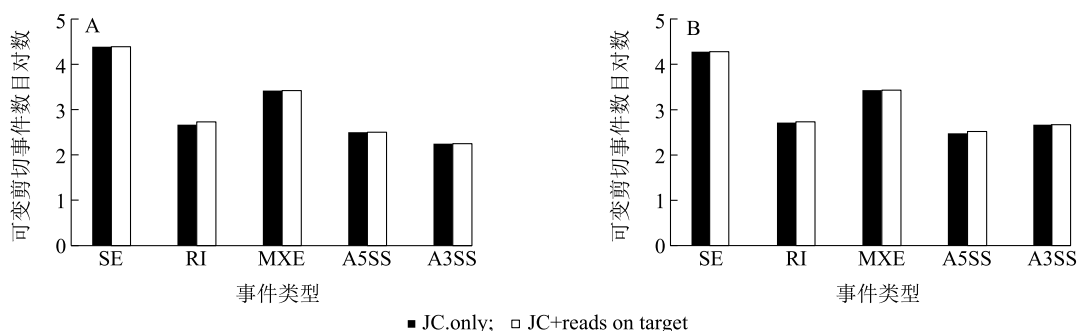
Table 2 Output of sequencing data

样品名称	原始序列数量	高质量序列所占比例(%)	Q_{20} (%)	Q_{30} (%)	G+C 含量(%)	比对到基因组上的序列所占比例(%)
MGX1	125 622 606	95.99	97.64	94.00	48.72	93.39
MGX2	109 998 770	96.08	97.19	92.90	48.64	92.94
MGX3	110 739 544	96.22	97.14	92.81	47.94	93.11
KGX1	102 163 540	96.50	97.63	93.65	47.30	93.14
KGX2	103 960 970	95.27	97.69	94.00	45.25	94.96
KGX3	91 374 036	96.02	96.90	92.11	50.17	92.86
MMX1	115 594 416	96.09	98.04	93.12	49.28	94.82
MMX2	10 5661 996	95.94	98.17	95.09	47.05	95.06
MMX3	113 937 504	96.27	97.29	94.83	46.96	92.82
KMX1	93 795 192	96.81	97.92	94.47	49.83	93.87
KMX2	105 277 906	96.98	97.94	94.48	50.06	94.14
KMX3	92 305 970	96.89	97.60	93.51	52.02	93.69

MGX:玫瑰冠公鸡;KGX:科宝公鸡;MMX:玫瑰冠母鸡;KMX:科宝母鸡。 Q_{20} 、 Q_{30} 分别表示 Phred 数值大于 20、30 的碱基占总碱基的百分比。

由图 1 可知,2 个比较组合中均包含了 5 类可变剪切事件,且 2 种方法检测的结果相似,均是外显

子跳跃(SE)和外显子选择性跳跃(MXE)最多。



A:玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌;B:玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌;SE:外显子跳跃;A5SS:第一个外显子可变剪切;A3SS:最后一个外显子可变剪切;MXE:外显子选择性跳跃;RI:内含子滞留;JC.only:只使用 Junction Counts 进行可变剪切事件检测;JC+reads on target:同时使用 Junction Counts 和 reads on target 进行可变剪切事件检测。

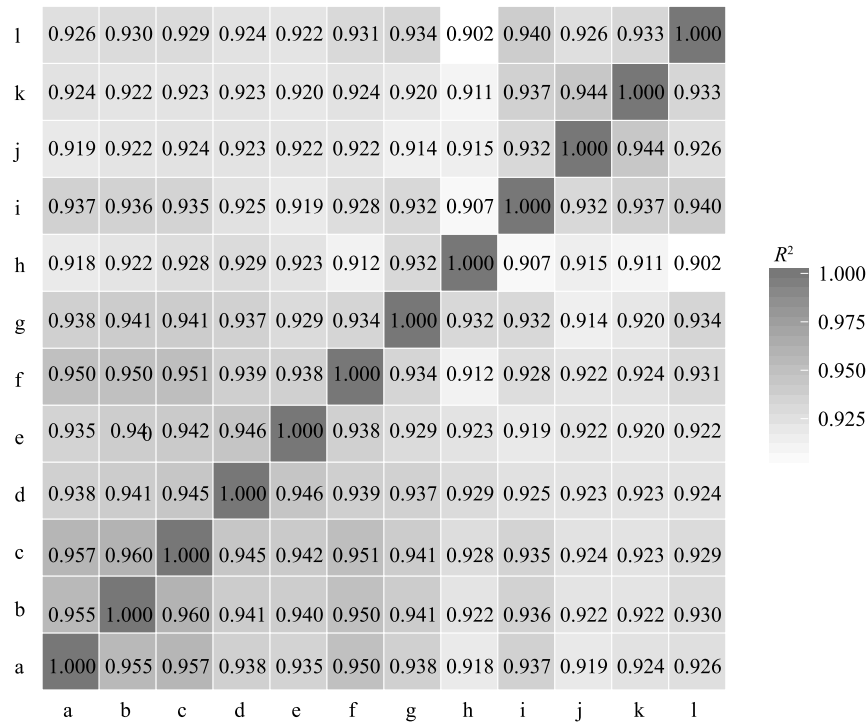
图 1 可变剪切类型及数目

Fig.1 Types and numbers of variable shear

2.3 差异表达基因

Pearson 相关分析结果表明,样本间相关系数均在 0.902 以上(图 2),相关性高,说明样品表达模式相似度高。通过与参考基因组序列进行比对,4 个文库共鉴定到 4 643 个差异表达基因,其中,玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌中有 1 909 个显著表达基因,以科宝鸡为参照,其中 929 个上调,980 个下调

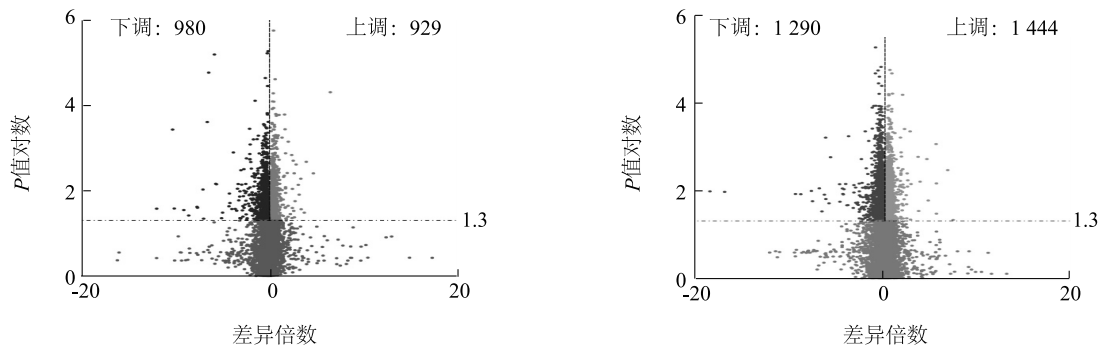
(图 3A);玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌中有 2 734 个显著表达基因,其中 1 444 个上调,1 290 个下调(图 3B)。通过对差异表达基因分析,其中有 367 个基因在 4 个文库中共表达(图 4A),对其进行聚类分析,显示玫瑰冠鸡与科宝鸡表达的基因分别聚类到 2 个不同的类群,表明 2 个品种鸡表达的基因存在一定的差别(图 4B)。



MGX:玫瑰冠公鸡胸肌;KGX:科宝公鸡胸肌;MMX:玫瑰冠母鸡胸肌;KMX:科宝母鸡胸肌。a:MGX1;b:MGX2;c:MGX3;d:MMX1;e:MMX2;f:MMX3;g:KGX1;h:KGX2;i:KGX3;j:KMX1;k:KMX2;l:KMX3。

图2 样品间相关性分析

Fig.2 Correlation analysis among samples



A:玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌;B:玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌。

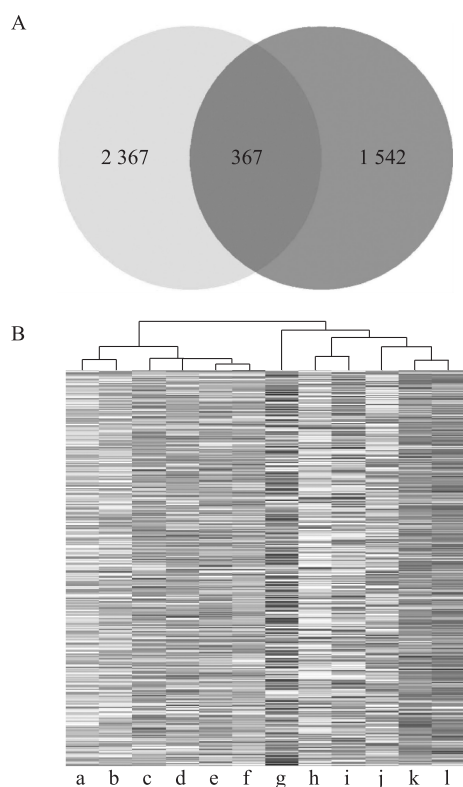
图3 差异表达基因火山图

Fig.3 Volcanic map of differentially expressed genes

2.4 差异表达基因 GO 富集

利用 GOseq 对两品种鸡胸肌组织中差异表达基因进行富集分析,结果显示在玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌中共显著 ($P < 0.05$) 富集到 1 016 个 GO 条目,包括 675 个生物过程 (Biological process, BP), 171 个细胞组分 (Cellular component, CC) 和 170 个分子功能 (Molecular function,

MF)。在玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌中共显著 ($P < 0.05$) 富集到 813 个 GO 条目,包括 498 个 BP, 185 个 CC 和 128 个 MF。主要涉及到生物代谢过程、细胞组分、生物合成过程、细胞增殖和分化及骨骼肌发育等过程的调控,其中显著富集到脂肪酸代谢过程的差异表达基因包括 *ACOX2*、*ACOX3*、*ACSL1*、*ACACA* 等; *MSC*、*SIX1*、*MYOG*、



A: 差异表达基因维恩图; B: 差异表达基因聚类图。a: MMX1; b: MMX2; c: MMX3; d: MGX3; e: MGX1; f: MGX2; g: KMX3; h: KGX1; i: KGX2; j: KGX3; k: KMX1; l: KMX2。MGX、KGX、MMX、KMX 见图 2 注。

图 4 差异表达基因维恩图及聚类图

Fig. 4 Venn diagram and cluster map of differentially expressed genes

MYL2、*MYF6* 等被显著富集到骨骼肌发育相关的生物学过程中; *TWIST1*、*NOTCH1*、*WNT3* 等差异表达基因被显著富集到胚胎发育相关的生物学过程中(表 3)。这些差异表达基因在两品种鸡胚胎期细胞的增殖分化、肌肉发育及脂肪形成过程中存在一定差异,是造成鸡肉品质性状差异的重要影响因素。

2.5 差异表达基因的 KEGG 通路

在 GO 注释分类的基础上,对差异表达基因进行通路显著性富集分析,KEGG 通路分析是可以更清楚地了解基因间相互作用,共同行使生物学功能的途径。结果显示,玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌中差异表达基因显著富集到 10 条信号通路,包括 ECM-受体互作、核糖体、mTOR 信号通路、RNA 降解、RNA 转运和 mRNA 监测途径等。玫瑰冠母鸡胸

肌和科宝母鸡胸肌中差异表达基因显著富集到 11 个信号通路,包括核糖体、碳代谢、氧化磷酸化、RNA 转运和 mRNA 监测途径等。KEGG 富集结果与 GO 富集结果相似(图 5),这些差异表达基因显著富集的信号通路多与细胞器、RNA 加工和修饰及细胞的生物学过程相关。

2.6 实时荧光定量 PCR 验证结果

选取 12 个差异表达基因进行荧光定量 PCR,结果显示,差异表达基因荧光定量结果与 RNA-Seq 结果的差异倍数存在偏差,但两者在上调和下调的表达趋势相同(图 6),表明 RNA-Seq 所得数据较为准确,可进行后续分析。

3 讨论

RNA-Seq 转录组学研究方法,可用于快速生长肉鸡与优质肉鸡在肉质性状基因差异表达、调控等方面的研究。Zhang 等^[15]对固始鸡肌内脂肪细胞和腹部脂肪细胞进行了转录组测序,分别获得了 4 403 和 4 693 个差异基因,并显著富集到 PPAR、ECM-受体相互作用、局部粘附及 Ca^{2+} 等信号通路。束婧婷^[16]等利用基因芯片技术对清远麻鸡和科宝肉鸡的比目鱼肌进行分析,筛选到 20 个可能影响肌纤维生长发育及分化的候选基因。本试验采取玫瑰冠鸡和科宝鸡胚胎期第 8 d 的胸肌组织,使用 RNA-Seq 技术探讨了 2 个品种的鸡胸肌组织在转录组水平上的差异,筛选到多个差异表达基因,并被富集到骨骼肌发育、脂肪酸代谢过程、细胞增殖和分化等过程中,这些差异表达基因可能在胚胎期的发育过程中发挥关键作用。

肌肉发育过程中,大量基因的特异性表达形成了复杂的调控网络和信号转导通路。本研究筛选到部分与肌肉发育相关的差异表达基因,其中快肌肌球蛋白轻链 2 基因(*MYL2*)在动物心肌和骨骼肌的生长和发育过程中发挥重要作用,可能是调节骨骼肌发育和影响家畜肉品质的候选基因^[17-18]。肌细胞生成素(MYOG)是成肌调节因子(MRFs)家族的成员之一,在肌肉细胞的形成与分化过程中有重要的调控作用^[19-20]。本研究显著富集到在骨骼肌代谢中发挥关键作用的 mTOR 信号转导通路,mTOR 是动物生长的重要调控因子,在细胞的增殖、生长和分化过程起到重要的调控作用^[21]。研究结果表明,能量代谢相关的信号通路与肌肉发育相关的信号通

路相互作用从而调控肌肉的生长发育,这与束婧婷等^[16]的研究结果相似。

表 3 部分 GO 富集分析信息

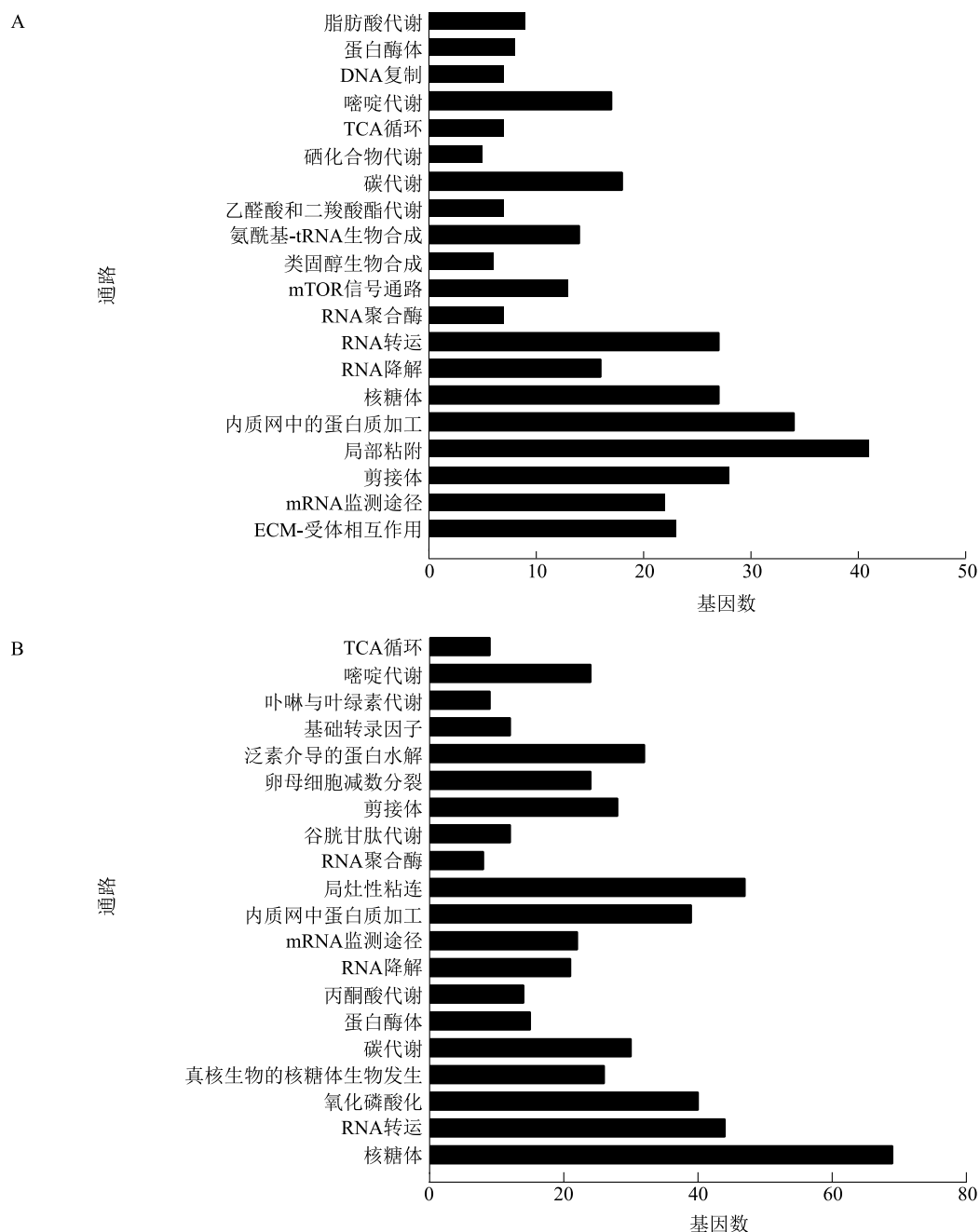
Table 3 Partial GO enrichment analysis information

GO 条目	功能描述	P 值	基因
GO:0048743	骨骼肌纤维发育正调控	0.011 2	<i>MYF6</i> 、 <i>BCL2</i> 、 <i>MYOG</i>
GO:0008152	代谢过程	0.000 1	<i>FOXO1</i> 、 <i>ACOX1</i> 、 <i>IGFBP3</i> 、 <i>ACOX3</i> 、 <i>ACACA</i> 、 <i>MAPK1</i> 、 <i>MYL4</i> 、 <i>Six1</i>
GO:0035116	胚胎后肢形态发生	0.001 7	<i>OSR1</i> 、 <i>WNT3</i> 、 <i>RSPO2</i> 、 <i>MED1</i> 、 <i>TWIST1</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>WNT7A</i> 、 <i>RARB</i>
GO:0003009	骨骼肌收缩	0.008 5	<i>TNNT1</i> 、 <i>C12orf57</i> 、 <i>TNNI1</i> 、 <i>CHRNA1</i> 、 <i>KCNJ2</i> 、 <i>TNNI2</i>
GO:0048745	平滑肌组织发育	0.012 9	<i>MYLK</i> 、 <i>OSR1</i> 、 <i>FOXP2</i> 、 <i>Six1</i> 、 <i>NF1</i> 、 <i>IHH</i> 、 <i>COL3A1</i>
GO:0060537	肌肉组织发育	0.017 9	<i>ACTN2</i> 、 <i>SOX6</i> 、 <i>PPP3CA</i> 、 <i>GPCPD1</i> 、 <i>TPM1</i> 、 <i>TWIST1</i> 、 <i>TNC</i> 、 <i>GREM1</i> 、 <i>MAML1</i> 、 <i>Six1</i> 、 <i>MAP3K5</i> 、 <i>MYF6</i> 、 <i>NF1</i> 、 <i>CAPN2</i> 、 <i>MYL2</i> 、 <i>MYL3</i> 、 <i>MED1</i> 、 <i>APP</i> 、 <i>EYA2</i> 、 <i>IGFBP3</i> 、 <i>LEMD2</i> 、 <i>FOXP2</i> 、 <i>CBY1</i> 、 <i>MYOG</i> 、 <i>TNNI1</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>MYOF</i> 、 <i>MSC</i> 、 <i>ATG5</i> 、 <i>MYLK</i> 、 <i>PRKAR1A</i> 、 <i>BCL2</i> 、 <i>CHRNA1</i> 、 <i>COL3A1</i> 、 <i>THRA</i>
GO:0033540	使用酰基辅酶 A 氧化酶进行脂肪酸 β -氧化	0.018 0	<i>ACOX2</i> 、 <i>ACOX1</i>
GO:0033539	使用酰基辅酶 A 脱氢酶进行脂肪酸 β -氧化	0.019 5	<i>ACOX3</i> 、 <i>ACOX1</i> 、 <i>ACOX2</i>
GO:0000062	脂肪酰基辅酶 A 结合	0.019 6	<i>SOAT1</i> 、 <i>ACBD7</i>
GO:0060560	发育参与形态发生	0.023 6	<i>TMEM108</i> 、 <i>OSTN</i> 、 <i>SLIT3</i> 、 <i>APP</i> 、 <i>EPB41L5</i> 、 <i>MED12</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>SPRY2</i> 、 <i>COL27A1</i> 、 <i>DCX</i> 、 <i>EPHA7</i> 、 <i>WNT3</i> 、 <i>CRABP2</i> 、 <i>NTRK3</i> 、 <i>RARB</i> 、 <i>IHH</i> 、 <i>Six1</i> 、 <i>LLPH</i> 、 <i>RTN4</i> 、 <i>MATN1</i> 、 <i>ESR1</i> 、 <i>FN1</i> 、 <i>PTPRS</i> 、 <i>COMP</i> 、 <i>ABL1</i>
GO:0030326	胚胎肢体形态发生	0.024 5	<i>GREM1</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>TWIST1</i> 、 <i>HAND2</i> 、 <i>WNT3</i> 、 <i>WNT9A</i> 、 <i>ECE-1</i> 、 <i>PBX1</i> 、 <i>IFT122</i> 、 <i>MED1</i> 、 <i>WDR19</i> 、 <i>OSR1</i> 、 <i>LMBR1</i> 、 <i>RSPO2</i> 、 <i>RARB</i> 、 <i>WNT7A</i> 、 <i>CRABP2</i> 、 <i>IHH</i>
GO:0051149	肌细胞分化正调控	0.025 2	<i>MYOG</i> 、 <i>GREM1</i> 、 <i>MAML1</i> 、 <i>MAP3K5</i> 、 <i>BCL2</i> 、 <i>MYF6</i> 、 <i>BOC</i> 、 <i>THRA</i> 、 <i>IGFBP3</i>
GO:0035113	胚胎附件形态发生	0.027 4	<i>MED1</i> 、 <i>LMBR1</i> 、 <i>RSPO2</i> 、 <i>OSR1</i> 、 <i>WDR19</i> 、 <i>WNT7A</i> 、 <i>CRABP2</i> 、 <i>RARB</i> 、 <i>IHH</i> 、 <i>HAND2</i> 、 <i>TWIST1</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>GREM1</i> 、 <i>WNT9A</i> 、 <i>WNT3</i> 、 <i>PBX1</i> 、 <i>IFT122</i> 、 <i>ECE-1</i>
GO:0014706	横纹肌组织发育	0.031 7	<i>MAML1</i> 、 <i>Six1</i> 、 <i>MAP3K5</i> 、 <i>MYF6</i> 、 <i>CAPN2</i> 、 <i>NF1</i> 、 <i>MYL2</i> 、 <i>MYL3</i> 、 <i>LUC7L2</i>
GO:0014891	横纹肌萎缩	0.041 4	<i>GSN</i> 、 <i>MYOG</i>
GO:0060415	肌肉组织形态发生	0.045 9	<i>MYLK</i> 、 <i>COL3A1</i> 、 <i>MYF6</i> 、 <i>MYL3</i> 、 <i>MYL2ANKRD1</i> 、 <i>MED1</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>TNNI1</i> 、 <i>TPM1</i>
GO:0014733	骨骼肌适应调节	0.047 8	<i>TNNI1</i> 、 <i>TNNT1</i> 、 <i>PPP3CA</i>
GO:0001727	脂质激酶活性	0.048 5	<i>AGK</i> 、 <i>CERK</i>
GO:0060414	动脉平滑肌组织形态发生	0.491 1	<i>COL3A1</i> 、 <i>MYLK</i>

肌内脂肪是决定肉质的重要因素^[22-24],它的沉积和分化受到众多的基因调控。本研究发现大量的差异表达基因参与了 PPAR 信号转导通路,如乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACACA*)基因通过促进脂肪酸生物合成在脂质代谢中发挥重要作用^[25]。脂酰辅酶 A 氧化酶 2(*ACOX2*)基因催化支链、长链脂肪酸和胆汁酸的前体分子,并参与脂肪酸代谢、脂蛋白代谢和胆汁酸合成以及过氧化物脂类代谢等过程。脂酰辅酶 A 氧化酶 3(*ACOX3*)基因则催化 2-甲基支链脂肪酸脱氢氧化生成烯脂酰辅酶 A 和降植烷酸,它们对脂肪酸氧化均具有正调节作用^[26-27]。此外,有研究结果表明,*Notch1* 在成脂过程中表达量持续降低,在

成熟脂肪细胞分化末期的表达量显著低于分化前^[28],表明 *Notch1* 可能抑制脂肪细胞的分化。GO 富集结果表明,*Notch1* 基因被显著注释到多个与胚胎发育相关的生物学过程中,提示其在胚胎期脂肪分化过程中可能发挥重要作用。KEGG 通路分析结果表明,鸡胚胎期 IMF 的沉积不仅受到脂质代谢相关基因和通路的调节,还受到维持组织和细胞信号转导完整性相关通路(局部粘附、ECM-受体互作)的调节和介导,这与 Cui 等^[29]的研究结果一致。

综上所述,本研究采用 RNA-Seq 技术挖掘了玫瑰冠鸡与科宝鸡胚胎期胸肌组织中大量差异表达的基因,其中 *MYL2* 调控骨骼肌的生长发育,*MYOG* 参



A:玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌;B:玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌。

图5 差异表达基因富集 KEGG 通路

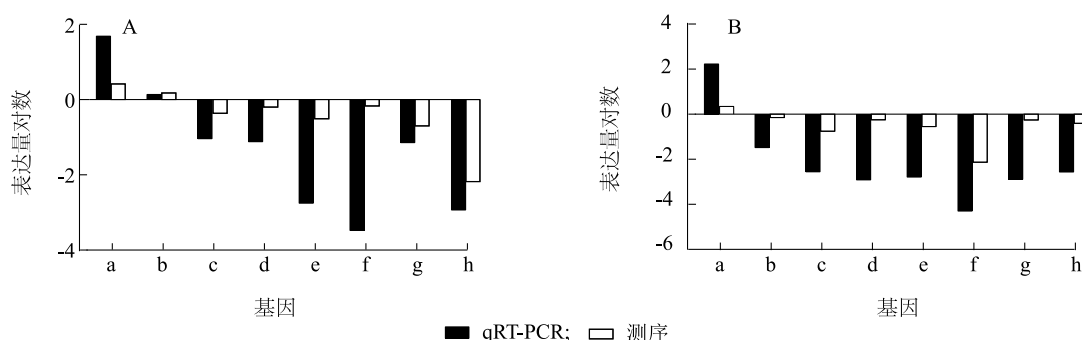
Fig.5 KEGG pathway of differentially expressed genes

与肌细胞的形成与分化;*ACACA*、*ACOX2* 和 *ACOX3* 参与脂肪酸代谢过程;*Notch1* 可能参与了与胚胎期脂肪分化相关的生物学过程。KEGG 分析结果表明,mTOR 信号通路与肌肉发育相关信号通路相互作用从而影响肌纤维的发育,细胞连接相关通路(局部粘附、ECM-受体互作)参与了 IMF 代谢过程,这些信号通路形成了一个调控网络,影响鸡胚胎期

肌肉组织的发育及脂肪的沉积。本研究初步揭示了影响玫瑰冠鸡与科宝鸡肌肉发育和脂肪代谢的差异表达基因及信号通路,为家禽肉品质性状的改善奠定了基础。

参考文献:

- [1] WANG Y, HUI X, WANG H, et al. Association of H-FABP gene



A:玫瑰冠公鸡胸肌和科宝公鸡胸肌;B:玫瑰冠母鸡胸肌和科宝母鸡胸肌。图A中,a:肌细胞生成素基因;b:脂肪酸结合蛋白3基因;c:肌球蛋白轻链2基因;d:镍纹样蛋白基因;e:NOTCH1基因;f:分化抑制因子3基因;g:核糖体蛋白L32基因;h:IX型胶原A1基因。图B中,a:肌细胞生成素基因;b:Y型周期蛋白基因;c:DNA修复相关蛋白51连接蛋白基因;d:核糖体蛋白S25基因;e:核糖体蛋白L32基因;f:血红蛋白E基因;g:脂肪酸结合蛋白3基因;h:IX型胶原A1基因。

图6 荧光定量PCR验证结果

Fig.6 Real-time PCR verification results

- polymorphisms with intramuscular fat content in Three-yellow chickens and Hetian-black chickens [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2016, 7(1): 9.
- [2] WU G, SHI X, ZHOU J, et al. Differential expression of meat quality and intramuscular fat deposition related genes in Hanjiang black pigs [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2014, 46(12): 1087-1090.
- [3] BONNY S P, HOCQUETTE J F, PETHICK D W, et al. The variation in the eating quality of beef from different sexes and breed classes cannot be completely explained by carcass measurements [J]. Animal, 2016, 10(6): 987-995.
- [4] LIU R, WANG H, LIU J, et al. Uncovering the embryonic development-related proteome and metabolome signatures in breast muscle and intramuscular fat of fast-and slow-growing chickens [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 816.
- [5] SMITH J H. Relation of body size to muscle cell size and number in the chicken [J]. Poultry Science, 1963, 42(2): 283-290.
- [6] SPORER K R B, TEMPELMAN R J, ERNST C W, et al. Transcriptional profiling identifies differentially expressed genes in developing turkey skeletal muscle [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 143.
- [7] AL-MUSAWI S L, STICKLAND N C, BAYOL S A M. *In ovo* temperature manipulation differentially influences limb musculoskeletal development in two lines of chick embryos selected for divergent growth rates [J]. Journal of Experimental Biology, 2012, 215(9): 1594-1604.
- [8] 廖 菁. 鸡肌纤维生长发育规律及 Pax 基因遗传效应的研究 [D]. 扬州:扬州大学, 2010.
- [9] 任 嵩, 张 蕾, 杨娟娟, 等. 鸡胚发育早期肌肉中脂肪沉积规律的研究 [J]. 中国家禽, 2019(23): 9-14.
- [10] YAN X, ZHU M J, DODSON M V, et al. Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development [J]. Journal of Genomics, 2013, 1: 29.
- [11] VELLEMAN S G. Muscle development in the embryo and hatchling [J]. Poultry Science, 2007, 86(5): 1050-1054.
- [12] CHARTRIN P, BERNADET M D, GUY G, et al. Do age and feeding levels have comparable effects on fat deposition in breast muscle of mule ducks? [J]. Animal, 2007, 1(1): 113-123.
- [13] 秦玉梅, 任 嵩, 李佳玉, 等. 鸡 FSHB、ESRα 基因多态性及其合并基因型与产蛋性能的关联性分析 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 854-862.
- [14] 杨娟娟, 韩雨轩, 王海亮, 等. 不同品种鸡肌肉营养价值及风味研究 [J]. 中国家禽, 2018(2): 9-14.
- [15] ZHANG M, LI F, MA X, et al. Identification of differentially expressed genes and pathways between intramuscular and abdominal fat-derived preadipocyte differentiation of chickens *in vitro* [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-15.
- [16] 束婧婷, 章 明, 宋 迟, 等. 基于表达谱芯片挖掘清远麻鸡和科宝肉鸡比目鱼肌差异表达基因 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(1): 25-33.
- [17] 刘瑞莉, 吴 磊, 袁 玮, 等. MYL2 基因在肌肉生长过程中的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(3): 10-14.
- [18] CUI H X, LIU R R, ZHAO G P, et al. Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat deposition in pectoralis major tissues of fast-and slow-growing chickens [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 213.
- [19] WRIGHT W E, SASSOON D A, LIN V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD [J]. Cell, 1989, 56(4): 607-617.
- [20] BERGSTROM D A, TAPSCOTT S J. Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(7): 2404-2412.
- [21] 宫克城. mTOR 信号转导通路在运动后骨骼肌的生长代谢中

- 的作用[J]. 首都体育学院学报, 2009 (4): 449-453.
- [22] 肖俊, 华国洪, 李华, 等. 海康鸡屠宰性能及肉质特性分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 196-200.
- [23] 陆宇哲, 潘红平, 王帅, 等. 3种不同来源中华乌塘鳢成鱼肉质比较分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 2047-2054.
- [24] 邝良德, 谢晓红, 郭志强, 等. 鲜喂饲用苕麻对肉兔生产性能、肉质及经济效益的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(19): 174-176.
- [25] BARBER M C, PRICE N T, TRAVERS M T. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2005, 1733(1): 1-28.
- [26] JOHANSSON Å, CURRAN J E, JOHNSON M P, et al. Identification of *ACOX2* as a shared genetic risk factor for preeclampsia and cardiovascular disease[J]. European Journal of Human Genetics, 2011, 19(7): 796.
- [27] VAN VELDHoven P P, VANHOVE G, ASSSELBERGHS S, et al. Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(28): 20065-20074.
- [28] 袁伟, 李作农, 曾瑞霞, 等. Notch 信号在人脂肪源间充质干细胞成脂中的作用[J]. 解剖科学进展, 2017, 23(6): 626-629.
- [29] CUI H, ZHENG M, ZHAO G, et al. Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat metabolism between breast and thigh tissues of chickens[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 55.

(责任编辑: 陈海霞)