

网络出版时间:2013-08-26 17:51

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1751.012.html>

SLCO1C1 基因与鸡绿壳蛋形成的关系

王哲鹏¹, 刘瑞芳¹, 王安如², 闵育娜¹, 高玉鹏¹, 刘福柱¹, 邓学梅³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 大北农集团公司, 北京 100080;

3 中国农业大学 动物科技学院, 北京 100193)

【摘要】 【目的】分析位置候选基因 *SLCO1C1* 与绿壳蛋形成的关系, 为绿壳蛋鸡提纯提供参考。【方法】以江西东乡绿壳蛋鸡为研究对象, 以同群体的褐壳蛋鸡为对照, 检测 *SLCO1C1* 基因上游 6.5 kb 区域内的序列变异情况; 采用 Real-time PCR 法检测 *SLCO1C1* 在蛋鸡脑、肝、脾、蛋壳腺中的表达情况, 用 3' RACE 法克隆 *SLCO1C1* 3' UTR, 用 PCR-RFLP 法检测 Ala528Glu 错义突变基因型。【结果】在 *SLCO1C1* 基因上游 6.5 kb 区域内共发现了 33 个单核苷酸变异(SNP), 这些 SNP 与绿壳性状显著关联($P < 0.05$)。表达结果显示, *SLCO1C1* 基因只在蛋鸡脑中表达, 且在绿壳蛋鸡($n=5$)与褐壳蛋鸡($n=5$)间的表达无显著差异($P > 0.05$)。序列比对结果显示, 绿壳蛋鸡与褐壳蛋鸡的 *SLCO1C1* 3' UTR 同源性为 100%。在 *SLCO1C1* 基因 11 号外显子上发现了一个错义突变 Ala528Glu, Glu 突变与绿壳性状显著关联($P < 0.05$), 且 Glu 突变在其他产绿壳蛋的鸟类中也存在。【结论】*SLCO1C1* 可能通过间接途径影响胆绿素的转运, 从而影响绿壳蛋的形成。*SLCO1C1* 基因内存在大量的与绿壳性状显著关联的 SNP, 表明控制绿壳性状的 *O* 基因很可能就在 *SLCO1C1* 附近。

【关键词】 鸡; 绿壳蛋; 位置候选基因; *SLCO1C1*

【中图分类号】 S831.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)09-0021-06

Relationship of *SLCO1C1* gene and formation of chicken blue-shelled egg

WANG Zhe-peng¹, LIU Rui-fang¹, WANG An-ru², MIN Yu-na¹,
GAO Yu-peng¹, LIU Fu-zhu¹, DENG Xue-mei³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Dabeinong Group, Beijing 100080, China; 3 College of Animal Science and Technology, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】Relationship of a position candidate gene *SLCO1C1* and blue egg gene (*O*) was analyzed in this study to improve breeding of blue-shelled chicken. 【Method】Dongxiang blue-shelled chickens were selected as study material and brown-shelled chicken from the same group were used as control. Sequence variants in upstream 6.5 kb of *SLCO1C1* were detected by DNA sequencing. Expression characters of *SLCO1C1* in brain, liver, spleen and shell gland were analyzed by Real-time PCR. 3' UTR was cloned by 3' RACE. Genotype of a missense mutation in exon 11 of *SLCO1C1* was detected by PCR-RFLP. 【Result】A total of 33 SNPs were found in upstream 6.5 kb of *SLCO1C1*. All SNPs showed strong association with blue-shelled egg ($P < 0.05$). Real-time PCR showed that the gene was uniquely expressed in brain and there was no significant difference between blue-shelled chickens ($n=5$) and brown-shelled chickens ($n=5$). 3' UTR of *SLCO1C1* was firstly cloned and showed 100% sequence identity. A missense

【收稿日期】 2012-11-14

【基金项目】 西北农林科技大学博士科研启动基金项目(Z109021112); 西北农林科技大学动物育种专项(Z109021127)

【作者简介】 王哲鹏(1980-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 讲师, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究。E-mail: wangzhp@nwsuaf.edu.cn

【通信作者】 邓学梅(1971-), 女, 吉林四平人, 教授, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究。E-mail: deng@cau.edu.cn

mutation Ala528Glu in exon 11 also showed strong association ($P < 0.05$) with blue-shelled egg and high conservation among birds laying blue-shelled egg. 【Conclusion】 *SLCO1C1* may indirectly influence formation of blue-shelled egg. A large amount of SNPs associated with blue-shelled egg in *SLCO1C1* implied that the *O* gene was most likely in vicinity of *SLCO1C1*.

Key words: chicken; blue egg; position candidate gene; *SLCO1C1*

白壳、褐壳和绿壳是 3 种常见的蛋壳颜色。绿壳蛋虽然在我国禽蛋市场中所占的份额不及白壳和褐壳蛋,但这种禽蛋以其独特的蛋壳颜色和较高的营养价值而深受消费者的喜爱。但是,在生产中人们注意到,某些绿壳群体选育纯度明显不够,蛋壳颜色变异较大,这对绿壳蛋的品质和销售均造成了一定的负面影响。

鸡蛋的绿壳性状是由一个显性单基因(*O* 基因)决定的质量性状^[1],即显性纯合子(*O/O*)和杂合子(*O/o*)个体均产绿壳蛋,这意味着通过表型选择很难鉴定杂合子,提纯绿壳蛋鸡群体。为了克隆 *O* 基因,并将其应用于绿壳蛋鸡的育种,有研究者曾对 *O* 基因进行了定位。Bitgood 等^[2]通过连锁分析将 *O* 基因定位于鸡 1 号染色体短臂上,并发现 *O* 基因与鸡豆冠基因紧密连锁。在最近的一项研究中,Wright 等^[3]证实,豆冠是由 *SOX5* 基因第 1 内含子变异所引起的,而 *O* 基因的身份至今仍不明确。Wang 等^[4]曾利用一个 F_2 资源群体,将 *O* 基因定位于 1 号染色体上一个 1.8 Mb 的区段内。在该区段内,Zhao 等^[5]发现了 2 个 SNP(rs15297163 和 rs15297165)与绿壳性状显著关联。笔者通过检索 UCSC 数据库(<http://genome.ucsc.edu>)发现,rs15297163 和 rs15297165 位于 *SLCO1C1* 基因内,这使得 *SLCO1C1* 成为研究鸡绿壳蛋性状的一个重要的位置候选基因,然而有关 *SLCO1C1* 与绿壳性状的关系目前还未见报道。为此,本研究分析了 *SLCO1C1* 基因组序列变异与绿壳性状的关联性,并检测了 *SLCO1C1* 在绿壳蛋鸡和褐壳蛋鸡脑、肝、脾及蛋壳腺组织中的表达情况,旨在探索鸡绿壳蛋形成的分子机理,并通过标记辅助选择提高绿壳蛋鸡群体选育的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 东乡绿壳蛋鸡是我国比较有代表性的一个产绿壳蛋的地方原始品种。虽然人们对绿壳表型进行过选育,但是这个性状尚未固定,即东乡绿壳蛋鸡群体中依然有少部分产褐壳蛋的个体存

在。本研究以产绿壳蛋的东乡鸡为对象,以同群体产褐壳蛋的东乡鸡为对照,所有东乡鸡均由江西东乡华绿种禽公司提供。选用 10 只东乡绿壳蛋鸡和 10 只东乡褐壳蛋鸡做序列变异分析,其中 5 只绿壳蛋鸡和 5 只褐壳蛋鸡用于 *SLCO1C1* 表达检测,另选 110 只东乡褐壳蛋鸡和 107 只东乡绿壳蛋鸡用于错义突变 Ala528Glu 基因频率的检测。所有个体均为 50 周龄,舍饲笼养,自然光照。

1.1.2 主要试剂与仪器 dNTP、*Taq* 酶、M-MLV 反转录酶,均购自汇天东方公司(北京);3' RACE 试剂盒、pMD-18T 质粒、*Hinf* I 内切酶,均购自 Takara 公司(大连);Trizol、RealMaster Mix (SYBR Green)定量 PCR 试剂盒,均购自天根公司(北京)。

主要仪器有低温冷冻离心机(Eppendorf)、匀浆机(Axygen)、梯度 PCR 仪(Bio-Rad)、ABI PRISM 7900 荧光定量 PCR 仪(ABI 公司)、DropNano 1000 分光光度计(Thermo 公司)、水平电泳槽和电泳仪(北京六一)。

1.2 方法

1.2.1 *SLCO1C1* 基因上游 6.5 kb 序列变异的检测 于翅下静脉采集试鸡血液,ACD 抗凝,按照标准酚仿法提取基因组 DNA,即向 30 μ L 鸡血中加入 300 μ L PBS、300 μ L 裂解液和 20 μ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K,55 $^{\circ}$ C 消化 4 h,酚仿抽提去除蛋白,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加无水乙醇沉淀 DNA,7 500 r/min 离心 5 min,去除乙醇,晾干,加 ddH₂O 溶解备用。

本研究主要对 *SLCO1C1* 上游 6.5 kb (chr1: 67292063—67298563)区域内的变异进行了检测。这段序列覆盖了该基因的启动子区和前 3 个外显子,可通过查询 UCSC 数据库获得。PCR 扩增体系 50 μ L:1 μ L (50 ng/ μ L) DNA,正链引物和负链引物(20 μ mol/L)0.5 μ L,4 μ L dNTP (2.5 mmol/L),1 μ L *Taq* 酶(5 U/ μ L),5 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液,38 μ L ddH₂O。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增所用引物用 Primer 5.0 软件设计,由生工生物工程(上海)股份

有限公司合成,引物序列和退火温度见表 1。PCR 产物由北京华大基因进行测序。用 DNAMAN 6.0 比对测序结果,序列变异与绿壳性状的关联性用卡方检验进行分析,序列变异对转录调控因子的影响用 TF search (<http://www.cbrc.jp/research/db/>

TFSEARCH)在线预测软件进行分析。SNP 位点间连锁不平衡(LD)性用 Haploview 4.2 软件进行分析,分别计算 D' 值和 LOD 值,用以描述 LD 程度和显著性。

表 1 用于检测 SLCO1C1 基因上游 6.5 kb 区域内变异的引物序列及 PCR 扩增条件

Table 1 Primers used to sequence upstream 6.5 kb sequence of SLCO1C1 and PCR amplification condition

引物名称 Name	正链引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	反链引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')	片段长度/bp Fragment length	退火温度/℃ Annealing temperature
P1	TATGGGCTATCTGTCCTC	GTTTAGCTCCCTTTACCA	1 283	57
P2	ACATCAGGCGATTAGAGC	CTGTGGGTACTGGGAATG	1 163	57
P3	CATTCCCAGTACCCACAG	ATGCCAGTTCTCACGTCAAG	1 356	60
P4	AGGCAAACCTGTGGTTTC	ATTATCTTGGCCTGTGC	1 346	58
P5	GCAGTTAGGAGTTTGTGTGC	TCGCCTGATGTTAGCTAATGAG	1 555	58
P6	CGAAAGTCACAAATACGAGTGG	GGCAATGGTCTGAGGTATAG	1 669	59
P7	GAGCAGAGTATAAGAAGCCC	CTCTTGTCCTCACTCCTTAGGTC	1 699	59
P8	ACTAGATGCTGTTCGTTTACAC	GATTGAGTATCCACATCTGT	1 915	60

1.2.2 SLCO1C1 在蛋鸡脑、肝、脾和蛋壳腺中表达的检测 剖取试鸡脑、肝、脾和蛋壳腺组织,置液氮中保存备用。各组织经匀浆后,加入 Trizol 振荡混匀,加等体积氯仿振荡混匀,12 000 r/min 离心 15 min 取上清,乙醇沉淀 RNA,备用。

取 2 μ g RNA,反转录为 cDNA,反转录体系为:1 μ L 20 μ mol/L Oligo (dT) 15 引物,5 μ L 5 $\times$ first-strand buffer,5 μ L 10 mmol/L dNTP,1 μ L 25 U Recombinant RNasin[®] RNA 酶抑制剂,1 μ L 200 U/ μ L M-MLV 反转录酶(Promega),加 RNase-free ddH₂O 至终体积为 25 μ L。在 PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 反转录 1 h,70 $^{\circ}$ C 下加热 15 min 灭活反转录酶,终止反应。

以 GAPDH 为内参基因,采用 Real-time PCR 法检测 SLCO1C1 基因在鸡脑、肝、脾和蛋壳腺等组织中的表达情况。检测 SLCO1C1 表达量所用引物序列为 F:5'-TAGATACTACTTGCCTGAAATG-3'和 R:5'-AGAACCCACAGGACAGCA-3',检测 GAPDH 表达所用引物为 F:5'-ATACACAGAG GACCAGGTTG-3'和 R:5'-AAACTCATTGTTCAT ACCAGG-3'。所有引物均用 Primer 5.0 软件跨内含子设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系为:RealMaster Mix 9 μ L,正链引物 (4 pmol/ μ L) 0.3 μ L,反链引物 (4 pmol/ μ L) 0.3 μ L,cDNA 模板 1 μ L,RNase free ddH₂O 7.4 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,57 $^{\circ}$ C 退火 10 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,40 个循环。每个样本重复 3 次,以减小上样误差。以褐壳蛋鸡组的表达量为对照,数据用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法统计^[6]。绿壳蛋鸡组

的表达量以相对于对照组表达量的倍数表示。组间差异显著性用 t 检验法检验。

1.2.3 SLCO1C1 基因 3'UTR 的克隆 SLCO1C1 3'UTR 用 3' RACE 试剂盒克隆,基因特异性引物序列为 5'-GCACTCAGATACGTGTAC-3'。引物用 Primer 5.0 软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将 3' RACE 产物克隆到 pMD-18T 质粒上,双向测序。

1.2.4 Ala528Glu 错义突变基因型的检测 Ala528Glu 错义突变基因型用 PCR-RFLP 法检测,PCR 扩增所用引物序列为:F:5'-TAGCAATCT GCCACCCAC-3';R:5'-TGCCACCTACTGACAAA G-3'。引物用 Primer 5.0 软件设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增体系和反应程序均与 1.2.1 同。酶切体系为:PCR 产物 2 μ L,Hinf I 1 U,Buffer 1 μ L,加 ddH₂O 至 10 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,用 20 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 SLCO1C1 基因上游 6.5 kb 区域内的变异情况

表 2 表明,本研究在 SLCO1C1 基因上游 6.5 kb 区域内共发现 33 个单核苷酸变异(SNP),这些 SNP 与绿壳性状均显示出较强的关联性($P < 0.05$)。LD 分析发现,33 个 SNP 处于完全连锁状态($D' = 1, LOD \geq 2$)。通过转录因子在线预测发现,一些与绿壳显著关联的 SNP 能够影响转录因子的结合(表 2),以 1C1_3# 位点为例,当与褐壳关联的 A 等位基因突变为与绿壳关联的 G 等位基因时,

会使 v-Myb 结合位点消失。

表 2 *SLCO1C1* 基因上游 6.5 kb 区域与绿壳性状显著关联的 33 个 SNP 的信息

Table 2 Information of 33 SNPs found in upstream 6.5 kb of *SLCO1C1* by sequencing

名称 Name	描述 Description	dbSNP 登录号 dbSNP accession No.	绿壳关联 等位基因 Allele associated with blue egg	位置 Position	对转录因子的影响 Effect of SNP on transcription factor
1C1_1#	g. 67292439 C→T	ss539003457	T	启动子 Promoter	—
1C1_2#	g. 67292448 A→G	ss539003458	G	启动子 Promoter	—
1C1_3#	g. 67292513 A→G	ss539003459	G	启动子 Promoter	v-Myb (—)
1C1_4#	g. 67292548_67292549ins	ss539003460	TTCATGGCAA	启动子 Promoter	C/EBPb (+)
1C1_5#	g. 67292750 T→C	ss539003461	C	启动子 Promoter	AML-1a (—),SRY (—)
1C1_6#	g. 67293248 A→G	rs13879268	G	启动子 Promoter	Nkx-2 (+)
1C1_7#	g. 67293295 A→C	ss539003462	C	启动子 Promoter	Tst-1 (—),CdxA (—)
1C1_8#	g. 67293408 C→A	ss539003463	T	启动子 Promoter	—
1C1_9#	g. 67293426 C→T	ss539003464	T	启动子 Promoter	—
1C1_10#	g. 67293501 A→G	ss539003465	G	启动子 Promoter	CdxA (—)
1C1_11#	g. 67293622 T→C	ss539003466	T	启动子 Promoter	GATA-1 (—),HFH-2 (—)
1C1_12#	g. 67293783 G→T	ss539003467	T	启动子 Promoter	—
1C1_13#	g. 67293879 C→T	ss539003468	T	启动子 Promoter	Nkx-2 (+)
1C1_14#	g. 67293969 G→A	ss539003469	A	启动子 Promoter	HFH-2 (—)
1C1_15#	g. 67294009 G→A	ss539003470	A	启动子 Promoter	CdxA (+)
1C1_16#	g. 67294044 G→A	ss539003471	A	启动子 Promoter	—
1C1_17#	g. 67294295 C→T	ss539003472	C	启动子 Promoter	AML-1a (—)
1C1_18#	g. 67294565 C→T	ss539003473	C	内含子 1 Intron 1	—
1C1_19#	g. 67294625 C→G	ss539003474	G	内含子 1 Intron 1	SRY (—)
1C1_20#	g. 67294714 C→G	ss539003475	G	内含子 1 Intron 1	—
1C1_21#	g. 67294872 C→T	rs15297158	C	内含子 1 Intron 1	XFD-1 (—),Oct-1 (—)
1C1_22#	g. 67294880 A→G	rs15297158	G	内含子 1 Intron 1	HFH-1 (—),GATA-1 (—)
1C1_23#	g. 67294887 G→T	rs15297159	G	内含子 1 Intron 1	GATA-X (—),HNF-3b (+)
1C1_24#	g. 67295169 A→G	rs15297161	G	内含子 1 Intron 1	HLF (—)
1C1_25#	g. 67295937 G→A	ss539003476	G	内含子 1 Intron 1	IRF-2 (—),IRF-1 (—)
1C1_26#	g. 67296035 C→G	ss539003477	G	内含子 1 Intron 1	c-Ets (—)
1C1_27#	g. 67296597 A→G	ss539003478	A	内含子 1 Intron 1	—
1C1_28#	g. 67296772 C→T	ss539003479	C	内含子 1 Intron 1	—
1C1_29#	g. 67296991 A→T	rs15297163	T	内含子 1 Intron 1	—
1C1_30#	g. 67297097 T→A	rs15297165	A	外显子 2 Exon 2	同义突变 Synonymous mutation
1C1_31#	g. 67297501 T→C	ss539003480	T	内含子 2 Intron 2	—
1C1_32#	g. 67297558 G→A	ss539003481	G	内含子 2 Intron 2	—
1C1_33#	g. 67297885 C→T	ss539003482	T	外显子 3 Extron 3	同义突变 Synonymous mutation

注:SNP 的位置根据 UCSC 数据库 2006-05 公告的 v2.1 版鸡基因组确定;(+)表示创造了一个转录因子结合位点;(—)表示使一个转录因子结合位点消失;SNP 对转录因子的影响通过在线预测程序 TF search 进行。

Note:Positions of SNPs were defined by UCSC chicken genome v2.1,May 2006 assembly;(+) indicates creation of a binding site;accordingly (—) indicates disappearance of a binding site;Change of binding sites was predicted by online TF search process.

2.2 *SLCO1C1* 在蛋鸡脑、肝、脾和蛋壳腺中的表达

为了了解 *SLCO1C1* 序列中的等位基因突变是否影响其表达,本研究检测了 *SLCO1C1* 在蛋鸡各组织中的表达情况,结果显示,*SLCO1C1* 只在脑组织中表达,且表达量在绿壳蛋鸡和褐壳蛋鸡间无显著差异($P>0.05$)。

2.3 *SLCO1C1* 3' UTR 的克隆及序列比对

3' UTR 在基因的翻译调控中起着重要的作用^[7]。本研究用 3' RACE 克隆了 *SLCO1C1* 3' UTR 序列(GenBank 登录号:HM625837),长度为

843 bp(图 1)。序列比对结果表明,绿壳蛋鸡与褐壳蛋鸡 *SLCO1C1* 3' UTR 序列同源性为 100%。

2.4 Ala528Glu 错义突变与绿壳性状的关联性

通过检索 Ensembl 数据库(<http://asia.ensembl.org/>)发现,在 *SLCO1C1* 基因的第 11 号外显子上存在一个 SNP(c. 1583C→A),可引起错义突变,当 C 碱基突变为 A 时,528 位的 Ala 将变异为 Glu。群体基因频率检测结果显示,A 等位基因与绿壳性状显著关联(绿壳蛋和褐壳蛋鸡的基因频率分别为 0.93 和 0.45; $P<0.05$)。为了进一步了解发

生错义突变的氨基酸在物种间的保守性,本试验对不同物种的 OATP1C1 蛋白序列进行了比对,结果显示,在人、大鼠、小鼠、鸡、蜥蜴中,528 位氨基酸均

为 Ala,但在白领姬鹀(*Ficedula albicouis*)、鸭中为 Glu(图 2)。



图 1 绿壳蛋鸡和褐壳蛋鸡 *SLCO1C1* 3' UTR 序列的克隆

灰色字体表示 CDS 序列,虚线标示的是终止密码子,黑色方框标示的是多聚腺苷酸信号,下划线标示的是 poly A 尾巴

Fig. 1 3' UTR sequence of *SLCO1C1* of blue-shelled and brown-shelled chicken

Grey letters represent CDS,sequence indicated by dash line represents stop codon,sequences indicated by black box are polyadenylation signal,underlined sequences are poly A tail

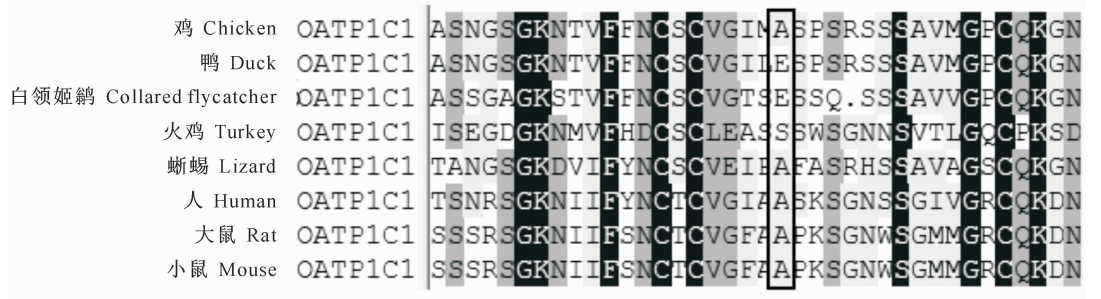


图 2 不同物种 OATP1C1 蛋白序列的比较

黑色方框标示的是错义突变 Ala528Glu 的位置

Fig. 2 Multispecies alignment of OATP1C1 protein sequence

Missense of Ala528Glu is indicated by black box

3 讨 论

蛋壳颜色是由沉积于蛋壳中的蛋壳色素所引起的,原卟啉和胆绿素是 2 种主要的蛋壳色素^[8]。这 2 种蛋壳色素与血红素均有密切的联系,原卟啉是血红素合成的前体物(与 Fe²⁺ 整合即可形成血红素),而胆绿素是血红素氧化分解的产物。绿壳蛋色泽主要由胆绿素引起,这些色素由蛋壳腺分泌到蛋壳上^[8-9]。

鉴于绿壳蛋与胆绿素的关系,笔者推测 *O* 基因可能与胆绿素的合成和运输有关。在之前的研究

中,笔者曾分析了一个与胆绿素合成有关的基因——血红素加氧酶 1(*HMOX1*),结果在该基因内并未发现与绿壳性状显著关联的突变,从而排除了该基因为 *O* 基因的可能性^[10]。*SLCO1C1* 是定位区段内一个非常重要的位置候选基因,其表达产物 OATP1C1 作为一种膜蛋白,主要在脑和睾丸组织中参与甲状腺激素的运输^[11]。尽管目前尚不清楚 OATP1C1 是否与胆绿素的运输和合成代谢有关,但已有研究证实,其同一家族的成员 OATP1A2、OATP1B1、OATP1B3 可以介导胆绿素在肝脏基底外侧膜上(Basolateral membrane)的运输^[12]。

为了阐明 *SLCO1C1* 是否与鸡绿壳蛋的形成有关,本研究首先分析了该基因调控区变异与绿壳性状的关联性,并证实在这些区域确实存在大量与绿壳显著关联的 SNP,而且一些 SNP 可能会影响转录因子的结合。但对 *SLCO1C1* 的表达分析结果显示,该基因在绿壳蛋鸡和褐壳蛋鸡间表达并无显著差异。综合上述结果笔者认为,这些 SNP 并不具有表达调控功能,它们与绿壳性状的关联性很可能与其和 *O* 基因的连锁有关。此外,本研究还发现,*SLCO1C1* 只在脑组织中表达,而在蛋壳色素分泌的关键部位——蛋壳腺中并不表达。如果 *SLCO1C1* 是通过直接参与胆绿素的转运来影响绿壳蛋的形成,则 *SLCO1C1* 应该在蛋壳腺中表达,并通过在绿壳蛋鸡和褐壳蛋鸡间的不同表达量或是功能上的差异影响胆绿素的转运效率,从而引起不同的蛋壳颜色。但是本研究结果并不支持这种推测,这表明即使 *SLCO1C1* 与鸡绿壳蛋的形成有关,它也只能是通过间接的途径影响绿壳蛋的形成。

为了进一步阐明绿壳性状的形成是否与 *SLCO1C1* 功能突变有关,本研究分析了 *SLCO1C1* CDS 区变异,并在 11 号外显子上发现了一个与绿壳性状显著关联的错义突变,即 Ala528Glu。OATP 蛋白具有 12 个跨膜结构域^[12],结构预测表明,这些结构域通过围成一个带正电荷的孔洞来对带负电荷的底物进行运输^[11]。Ala528Glu 位于跨膜结构 10(Leu⁵⁵²—Ile⁵⁷⁴)附近,当非极性 Ala 突变为极性带负电荷的 Glu 时,可能阻碍阴离子两性有机复合物的运输。本研究不同物种 OATP1C1 蛋白序列比对结果显示,与绿壳关联的 Glu 在鸭和白领姬鹀中也存在,值得注意的是鸭和白领姬鹀也产绿壳蛋^[13-14],这种关联是巧合还是 Ala528Glu 确实与胆绿素的合成或运输有关,还有待进一步研究证实。

综上所述,*SLCO1C1* 不直接参与胆绿素的转运影响绿壳的形成;其中大量存在与绿壳显著关联的 SNP,表明 *O* 基因可能就在 *SLCO1C1* 附近,这些 SNP 可用于绿壳蛋鸡群体的标记辅助选择。

[参考文献]

[1] Punnett R C. Genetic study in poultry: IX. The blue egg [J].

Genetics,1933,27:465-470.

[2] Bitgood J J,Shoffner R N,Otis J S,et al. Mapping of the genes for pea comb,blue egg,barring,silver,and blood groups A,E,H,and P in the domestic fowl [J]. Poultry Science,1980,59(8):1686-1693.

[3] Wright D,Boije H,Meadows J R,et al. Copy number variation in intron 1 of SOX5 causes the pea-comb phenotype in chickens [J]. PLoS Genetics,2009,5(6):e1000512.

[4] Wang X T,Bai J R,Zhao C J,et al. Localization of the genomic sequence interval for the blue eggshell gene using an F₂ resource population of Dongxiang chickens [J]. British Poultry Science,2010,51(4):507-509.

[5] Zhao R,Liu Z Z,Xu G Y,et al. Analysis of SNP markers for chicken blue-shelled gene using PCR-SSCP [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology,2007,4(1):53-56.

[6] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-ΔΔC_T) method [J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[7] Mazumder B,Seshadri V,Fox P L. Translational control by the 3'-UTR:The ends specify the means [J]. Trends in Biochemical Science,2003,28(2):91-98.

[8] Lang M R,Wells J W. A review of eggshell pigmentation [J]. Worlds Poultry Science,1987,43(3):238-245.

[9] Wang X T,Zhao C J,Li J Y,et al. Comparison of the total amount of eggshell pigments in Dongxiang brown-shelled eggs and Dongxiang blue-shelled eggs [J]. Poultry Science,2009,88(8):1735-1739.

[10] Wang Z P,Liu R F,Wang A R. Expression and activity analysis reveal that heme oxygenase (decycling) 1 is associated with blue egg formation [J]. Poultry Science,2011,90(4):836-841.

[11] Meier-Abt F,Mokrab Y,Mizuguchi K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily:Identification of new members in nonmammalian species,comparative modeling and a potential transport mode [J]. Journal of Membrane Biology,2005,208(3):213-227.

[12] Hagenbuch B,Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family [J]. Xenobiotica,2008,38(7/8):778-801.

[13] Liu H C,Hsiao M C,Hu Y H,et al. Eggshell pigment study in blue-shelled and white-shelled ducks [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2010,23(2):162-168.

[14] Krist M,Grim T. Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers:A cross-fostering experiment [J]. Behavioral Ecology and Sociobiology,2007,61(6):863-876.