

武定鸡 FABP6 基因克隆及生物信息学分析

邱文才¹, 苏航¹, 杨明华¹, 赵素梅¹, 潘洪彬¹, 黄英^{1*}, 李永能^{2*}

(1. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南省动物营养与饲料重点实验室, 云南昆明 650201;
2. 云南农业大学组织部, 动物医学院, 云南昆明 650201)

摘要: 本研究旨在克隆武定鸡脂肪酸结合蛋白 6 (FABP6) 基因 CDS 区序列并进行生物信息学分析, 为后续研究 FABP6 基因对武定鸡脂肪代谢与沉积的影响提供参考。以武定鸡为试验对象, 设计 FABP6 引物、提取总 RNA、反转录、PCR 扩增并克隆其编码区序列, 并进行同源性比对及系统进化树构建; 运用生物信息学软件对其编码蛋白的理化性质、亲/疏水性、跨膜区、信号肽、修饰结构、保守结构域及二、三级结构进行预测。结果显示: 武定鸡 FABP6 基因 CDS 序列全长 387 bp, FABP6 蛋白等电点 7.82, 平均疏水指数 -0.566, 为亲水蛋白, 不存在信号肽和跨膜区, 主要定位于细胞质。FABP6 蛋白被 14 个磷酸化位点修饰, 无糖基化位点, 主要由 α -螺旋、延伸链和无规卷曲构成。武定鸡 FABP6 与原鸡、火鸡、珍珠鸡、雪鸡、环颈雉鸡、鹌鹑、鸿雁、棕硬尾鸭、天鹅和绿头鸭基因同源性分别为 99.2%、96.6%、96.4%、96.1%、96.1%、95.9%、90.2%、89.7%、89.7% 和 89.4%。FABP6 蛋白与 FABP2、FABP3、FABP4、FABP5、FABP7、FABP9、NR1H4、RXRA、SLC10A2 和 SNX24 蛋白存在互作关系。本研究明确了 FABP6 基因在武定鸡脂肪代谢与沉积中的核心作用, 为其分子机制的深入解析奠定了理论基础, 也为我国优质地方鸡种的肉质改良与高效新品种培育提供了候选基因。

关键词: 武定鸡; FABP6 基因; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20241219-03

脂肪酸 (Fatty Acid, FA) 不仅是一种基础营养物质, 也是细胞代谢活动的重要调节物之一^[1-2]。脂肪酸由于其高度疏水性, 通常不以游离状态存在和运输, 而细胞内的脂肪酸结合蛋白能够与这些疏水分子结合, 以确保

脂质结合、转运和代谢的顺利进行^[3-4]。脂肪酸结合蛋白家族 (Fatty Acid Binding Proteins, FABPs) 是一种小型且高度保守的细胞质蛋白家族^[5]。它们作为细胞内的脂肪酸载体, 能够与脂肪酸和其他疏水性配体结合, 并负责将这些脂肪酸运输到脂质氧化与合成的特定位置, 对动物体内脂肪酸的代谢和沉积具有重要影响^[6]。脂肪酸结合蛋白 6 (Fatty Acid Binding Protein 6, FABP6) 是 FABPs 的成员之一, 又称为回肠型脂肪酸结合蛋白 (Ileum Fatty Acid Binding Protein, Ileum-FABP, IL-FABP), 在小肠远段被发现和分离, 可以在肠道上皮细胞中与脂肪酸进行结合和转运^[7]。研究表明, FABP6

收稿日期: 2024-01-01; 修回日期: 2025-02-01
资助项目: 国家十四五重点研发计划项目 (2022YFD1601905)
作者简介: 邱文才, 男, 云南昆明人, 硕士, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: qiuqiudx@163.com
* 通信作者: 黄英, 女, 云南陆良人, 高级实验师, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: 410457491@qq.com; 李永能, 男, 云南师宗人, 高级实验师, 主要从事动物营养与健康养殖研究, E-mail: lyn77@vip.sina.com

究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
[17] Tan F, Zhang L, Yin L, et al. Immune synergistic mechanism of recombinant plasmid adjuvant containing chicken IL-4 and IL-2 fusion genes on chicken coccidia live vaccine[J]. Poult Sci, 2024, 103(1): 103204.
[18] Zheng L, Zhang L, Tan F, et al. Prevention and control of chicken coccidiosis construction of recombinant Lactococcus lactis expressing chicken IL-4 and IL-2 fusion protein and its-immune synergistic effect on chicken coccidia live vaccine[J].

Poult Sci, 2023, 102(4): 102530.
[19] Liu W, Dong C, Liu X. The role of IL4I1 in immunoregulation: An update[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2021, 37(1):79-83.
[20] Linehan L A, Warren W D, Thompson P A, et al. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination[J]. J Immunol, 1998, 161(1): 302-310.

(责任编辑: 赵楠)

蛋白对胆汁酸有较高亲和力，可以结合转运胆汁酸，参与胆汁酸的循环。肠道中 *FABP6* 蛋白表达量减少，会使畜禽胆汁酸转运能力降低^[8-10]。此外，*FABP6* 蛋白还可以在肠道上皮细胞内，结合和转运脂肪酸分子，参与肠道和肝脏的交互，在脂肪酸的代谢和沉积过程中起重要作用^[7]。在肉鸡中对脂代谢相关基因进行筛选，发现 *FABP6* 基因对胸肌肌肉脂肪含量有显著影响^[11]。

武定鸡是云南独有的一大特色畜禽资源，主要分布于楚雄彝族自治州武定县，其具有产肉多、体型大、肉嫩脂丰、味鲜质优、耐粗饲、适应性强等特点，是一个宝贵的地方品种资源^[12]。家禽脂质的代谢与沉积会直接影响肌肉脂肪酸的组成和含量，从而影响禽肉产品的营养价值^[13]。目前关于武定鸡脂肪酸代谢与沉积相关基因的研究较少，开展关于武定鸡脂肪酸代谢沉积相关基因的研究具有重要意义。本研究通过基因克隆和生物信息学分析，探究武定鸡 *FABP6* 基因及其编码蛋白的结构和功能，旨在为后续研究武定鸡脂质代谢相关基因提供参考。

1 材料与方法

1.1 RNA 提取与 cDNA 合成 将武定鸡胸肌样在液氮下研磨成粉，参考 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒说明提取武定鸡总 RNA，经超微量紫外可见分光光度计（ND-100C，杭州米欧）检测 RNA 浓度和质量（D260/280 值为 1.8~2.0 合格）。选用相应 RNA 浓度的 TransScript[®] II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒，参考说明书将提取得到的 RNA 反转录为 cDNA。RNA 提取与 PCR 扩增试剂盒均购自北京全式金生物技术（TransGen Biotech）有限公司。

1.2 PCR 扩增 以获得的武定鸡 cDNA 为模板，参考 TransTaq[®] DNA Polymerase High Fidelity（HiFi）试剂盒说明对 *FABP6* 基因进行 PCR 扩增。根据 GenBank 中原鸡 *FABP6* 基因序列（NM_001277701.2），使用 NCBI Primer-BLAST 设计引物，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行合成，PCR 引物信息见表 1。通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物目的条带，亮度、质量和特异性合格后使用 EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit 试剂盒对目的片段 PCR 产物进行胶回收。

本研究的 PCR 反应体系总体积为 50 μL，具体组成如下：5 μL 武定鸡 cDNA 模板，上、下游引物

（10 μmol/L）各 1 μL，10× TransTaq[®] HiFi Buffer II 5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 4 μL，TransTaq[®] HiFi DNA Polymerase 1 μL，最后用 Nuclease-free Water 补足至总反应体积。PCR 反应程序设置如下：94℃ 预变性 4 min；随后进行 35 个循环（94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s）；循环结束后于 72℃ 终延伸 8 min。

表 1 PCR 引物信息

基因名	引物序列（5'→3'）	产物长度，bp
FABP6	F: AGCATCACAGAGGAACAGCA	517
	R: TGAGTGTACCAGAAGACTGGC	

1.3 基因克隆和连接转化 将武定鸡 *FABP6* 基因的纯化 PCR 产物连接到克隆载体（pEASY-T5 Zero Cloning Vector），重组质粒转化入感受态细胞（Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell），适当复苏后涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基（LB/Amp+ 固体）培养过夜。由于该载体携带氨苄青霉素抗性基因，且当连接失败时载体自带的自杀基因会启动表达，最终只有成功连接目的片段的转化细胞能够在培养基上形成菌落。挑取单菌落接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基（LB/Amp+ 液体）中扩大培养，小量提取质粒后使用 *KpnI* 和 *SphI* 限制性内切酶进行双酶切鉴定，确认含有目的条带后进行质粒测序。克隆和连接所用试剂盒均购自日本 Takara 公司。

1.4 同源性分析、序列比对和进化树构建 利用 MegAlign 软件将武定鸡 *FABP6* 基因测序结果与 Gene Bank 中原鸡 *FABP6* 基因（NM_001277701.2）、火鸡（XM_003210281.4）、珍珠鸡（XM_021410817.1）、雪鸡（XM_048961048.1）、环颈雉鸡（XM_031598054.1）、鹌鹑（XM_015876076.2）、鸿雁（XM_066977225.1）、棕硬尾鸭（XR_004754380.1）、天鹅（XM_040573751.1）和绿头鸭（XM_013093975.4）分别进行比对，再用 MEGA7.0 软件构建进化树。

1.5 生物信息学分析 采用生物信息学方法，对武定鸡 *FABP6* 基因编码蛋白的理化性质及结构与功能进行预测与分析，相关分析网址和软件如表 2 所示。

2 结果

2.1 武定鸡 *FABP6* 基因 PCR 扩增结果 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 1A 所示，产物片段大小为 517 bp 左右，符合所设计特异性引物的目

的片段大小。

2.2 武定鸡 *FABP6* 基因克隆双酶切鉴定 将成功连接目的片段的细胞质粒小提，用 *Kpn*I 和 *Sph*I 限制性内切酶双酶切，经琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 1B 所示，酶切目的片段大小为 550 bp 左右。

2.3 武定鸡 *FABP6* 基因序列分析 将上一步经检验含有目的片段的质粒进行测序，使用 NCBI ORF Finder 寻找 *FABP6* 基因的开放阅读框（ORF），结果显示，武定鸡 *FABP6* 基因的 ORF 长度为 387 bp，编码 128 个氨基酸（AA），如图 2 所示。武定鸡 *FABP6* 基因序列

已上传至 GenBank（登录号：PQ492238.1）。

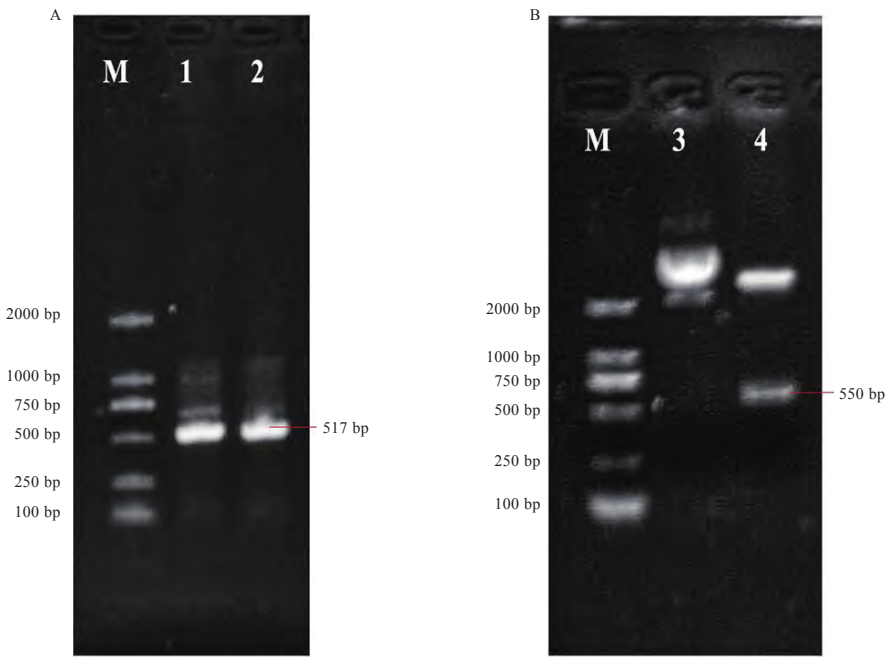
2.4 武定鸡 *FABP6* 基因序列比对 克隆得到的武定鸡 *FABP6* 基因编码序列与 GeneBank 中已发布的原鸡 *FABP6* 基因（Gallus. NM_001277701.2）CDS 区进行比对，共发现 3 处碱基突变，结果如图 3 所示。

2.5 生物信息学分析

2.5.1 同源性分析与系统进化树 如图 4 所示，同源性比对结果显示，武定鸡 *FABP6* 基因与原鸡同源性最高，为 99.2%；与其他禽类同源性较低，分别为火鸡 96.6%、珍珠鸡 96.4%、雪鸡 96.1%、环颈雉鸡

表 2 生物信息学分析网址和软件

工具	功能	网址
ORF Finder	开放阅读框分析	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
Blast	同源性比对分析	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ProtParam	蛋白质理化性质分析	https://web.expasy.org/protparam
ProtScale	蛋白质亲疏水性分析	https://web.expasy.org/protscale
SignalP 4.1	蛋白质信号肽分析	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/
TMHMM 2.0	蛋白质跨膜结构预测	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0
NCBI CDD	蛋白质结构域预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure
NetPhos 3.1	蛋白磷酸化位点预测	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1
NetNGlyc	蛋白糖基化位点预测	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0
PSORT II	蛋白亚细胞定位预测	https://www.genscript.com/psort.html
PSIPRED	蛋白质二级结构预测	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
SWISS-MODEL	蛋白质三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/interactive
STRING	蛋白互作网络预测	STRING: functional protein association networks (string-db.org)



M: DL2000 DNA Marker; 1、2 为 PCR 产物条带; 3 为质粒条带; 4 为双酶切条带。
图 1 武定鸡 *FABP6* 基因 PCR 扩增结果 (A) 和双酶切鉴定 (B)

96.1%、鹌鹑 95.9%、鸿雁 90.2%、棕硬尾鸭 89.7%、天鹅 89.7%、绿头鸭 89.4%。如图 5 所示，武定鸡与原鸡亲缘性近，与珍珠鸡、雪鸡、火鸡和环颈雉鸡形成一个分支，绿头鸭、棕硬尾鸭、鸿雁和天鹅形成另一个分支，与武定鸡亲缘性较远。

2.5.2 蛋白理化性质 利用 ExPASy 平台 ProtParam 工具对测序所得 ORF 所对应编码蛋白进行理化性质预

测，结果表明：武定鸡 FABP6 蛋白分子共编码 128 个氨基酸，分子式为 $C_{626}H_{977}N_{169}O_{195}S_6$ ，理论分子质量为 14.18 KDa，理论等电点为 7.82 (>7)，推测该蛋白为碱性蛋白。280 nm 处的消光系数为 11 460，脂肪指数为 56.33，不稳定系数为 15.18 (<40 阈值)，推测该蛋白为稳定蛋白。武定鸡 FABP6 蛋白的氨基酸组成如表 3 所示，其中甘氨酸和赖氨酸的含量最高都为

```
ATGGCATTACAGGCAAATATGAATTCGAAAGTCGATGAGAACTATGATGACTTTGTG
M A F T G K Y E F E S D E N Y D D F V
AAGAAGATCGGTCTCCCTGCTGACAAGATCGAAATGGGAAGGAATTGCAAAATAGTC
K K I G L P A D K I E M G R N C K I V
ACCGAGGTGGTGCAGAATGGAAATGATTCACCTGGACTCAGCATTTCAGGAGGA
T E V V Q N G N D F T W T Q H F P G G
CGCACCACGACTAATTCATTCACTATAGACAAGGAAGCAGACATGGAGACAATGGGT
R T T T N S F T I D K G A D M E T M G
GGTAGAAAGTTCAAGGCAACAGTCAAAATGGAAGGTGGGAAAATAGTAGCTGATTTT
G R K F K A T V K M E G G K I V A D F
CCCAACTATCATCACTGCAGAGATTTCTGGAGGAAAGCTTGTAGAGATCTCTACT
P N Y H H T A E I S G G K L V E I S T
TCTTCTGGAGTAGTCTACAAGAGAACCAGCAAAAAGATTGCTTAA
S S G V V Y K R T S K K I A *
```

图 2 武定鸡 FABP6 基因 CDS 区序列及编码蛋白序列

NCBI Reference Sequence:	1	ATGGCATTACAGGCAAATATGAATTCGAAAGTCGATGAGAACTATGATGACTTTGTGAAG	60
Sequencing Results ORF:		ATGGCATTACAGGCAAATATGAATTCGAAAGTCGATGAGAACTATGATGACTTTGTGAAG	
NCBI Reference Sequence:	61	AAGATGGTCTCCCTGCTGACAAGATCGAAATGGGAAGGAATTGCAAAATAGTCACCGAG	120
Sequencing Results ORF:		AAGATGGTCTCCCTGCTGACAAGATCGAAATGGGAAGGAATTGCAAAATAGTCACCGAG	
NCBI Reference Sequence:	121	GTGGTGCAGAATGGAAATGATTCACCTGGACTCAGCATTTCAGGAGGACGCCACCACG	180
Sequencing Results ORF:		GTGGTGCAGAATGGAAATGATTCACCTGGACTCAGCATTTCAGGAGGACGCCACCACG	
NCBI Reference Sequence:	181	ACTAATTCATTCACTATAGACAAGGAGCAGACATGGAGACAATGGGTGGTAGAAAGTTC	240
Sequencing Results ORF:		ACTAATTCATTCACTATAGACAAGGAGCAGACATGGAGACAATGGGTGGTAGAAAGTTC	
NCBI Reference Sequence:	241	AAGGCAACAGTCAAAATGGAAGGTGGGAAAATAGTAGCTGATTTCCCAACTATCATCAT	300
Sequencing Results ORF:		AAGGCAACAGTCAAAATGGAAGGTGGGAAAATAGTAGCTGATTTCCCAACTATCATCAT	
NCBI Reference Sequence:	301	ACTGCAGAGATTTCTGGAGGAAAGCTTGTAGAGATCTCTACTTCTCTGGAGTAGTCTAC	360
Sequencing Results ORF:		ACTGCAGAGATTTCTGGAGGAAAGCTTGTAGAGATCTCTACTTCTCTGGAGTAGTCTAC	
NCBI Reference Sequence:	361	AAGAGAACCAGCAAAAAGATTGCTTAA	387
Sequencing Results ORF:		AAGAGAACCAGCAAAAAGATTGCTTAA	

图 3 武定鸡 FABP6 基因 CDS 区序列与原鸡比对

		Percent Identity											Divergence	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1			99.2	96.6	96.4	96.1	96.1	95.9	90.2	89.7	89.7	89.4	1	武定鸡
2	0.8			96.4	96.6	95.9	95.9	95.6	90.4	89.9	89.9	89.7	2	原鸡
3	3.5	3.7			95.1	96.4	96.9	95.1	89.9	89.4	89.9	89.7	3	火鸡
4	3.7	3.4	5.1			94.6	95.3	93.5	92.8	92.2	92.2	91.5	4	珍珠鸡
5	4.0	4.3	3.7	5.6			95.9	93.5	88.9	88.4	88.4	88.6	5	雪鸡
6	4.0	4.3	3.2	4.8	4.3			94.1	90.2	89.7	90.2	89.9	6	环颈雉鸡
7	4.3	4.6	5.1	6.8	6.8	6.3			87.3	86.8	87.3	87.1	7	鹌鹑
8	10.6	10.3	10.9	7.7	12.1	10.6	14.1			99.0	99.5	98.2	8	鸿雁
9	11.2	10.9	11.5	8.2	12.7	11.2	14.7	1.0			99.0	97.7	9	棕硬尾鸭
10	11.2	10.9	10.9	8.2	12.7	10.6	14.1	0.5	1.0			98.2	10	天鹅
11	11.5	11.2	11.2	9.1	12.4	10.9	14.4	1.8	2.4	1.8			11	绿头鸭
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图 4 不同物种 FABP6 基因序列同源性分析

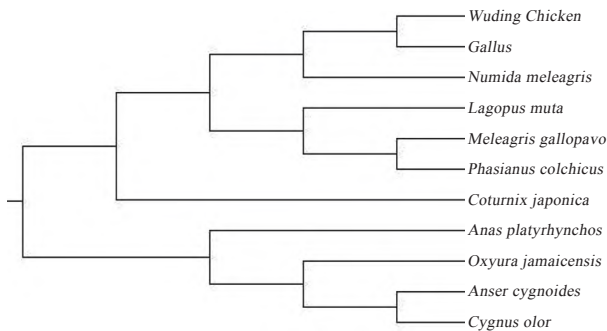


图 5 基于 FABP6 基因 CDS 序列构建的系统进化树

14 个，含量为 10.85%；半胱氨酸和色氨酸的含量最低都为 1 个，含量为 0.78%；蛋白分子带负电荷的残基数（Asp+Glu）为 17，带正电荷的氨基酸残基数（Arg+Lys）为 18；极性氨基酸为 85 个，占 66.41%，非极性氨基酸为 43 个，占 33.59%。

表 3 武定鸡 FABP6 基因编码区序列对应氨基酸组成

氨基酸	数量, 个	含量, %
Ala (A)	7	5.43
Cys (C)	1	0.78
Asp (D)	8	6.20
Glu (E)	9	6.98
Phe (F)	8	6.20
Gly (G)	14	10.85
His (H)	3	2.33
Ile (I)	8	6.20
Lys (K)	14	10.85
负电残基	17	13.28
极性 AA	85	66.41
Met (M)	5	3.88
Asn (N)	6	4.65
Pro (P)	3	2.33
Gln (Q)	2	1.55
Arg (R)	4	3.10
Ser (S)	7	5.43
Thr (T)	13	10.08
Val (V)	9	6.98
Trp (W)	1	0.78
正电残基	18	14.06
非极性 AA	43	33.59

2.5.3 亲疏水预测 如图 6A 所示，在蛋白质氨基酸序列中第 115 位丝氨酸（Ser）处亲水性最强，其亲水指数为 0.9；在第 9 位苯丙氨酸（Phe）处亲水性最弱，其亲水指数为 -2.3；整体蛋白分子亲水指数平均值为 -0.566。

2.5.4 结构域及亚细胞定位 如图 6B 所示，亚细胞定位推测武定鸡 FABP6 蛋白主要分布于细胞质中。如图 6C 所示，武定鸡 FABP6 蛋白第 5 位至 22 位氨基酸残基之间存在胞质脂肪酸结合（Cytosolic Fatty-Acid Binding Protein）结构域。

2.5.5 信号肽及跨膜结构、磷酸化及糖基化位点 如图 7A、B 所示，蛋白不含有信号肽，不存在跨膜区域，不存在 O-糖基化位点和 N-糖基化位点（图 7C）。如图 7D 所示，武定鸡 FABP6 蛋白存在 14 个磷酸化位点，其中丝氨酸（S）4 个、苏氨酸（T）7 个、酪氨酸（Y）3 个磷酸化位点。

2.5.6 二、三级结构和蛋白互作分析 如图 8A 所示，武定鸡 FABP6 蛋白含有 32 个 α -螺旋（Alpha Helix, h）、43 个延伸链（Extended Strand, e）和 53 个无规卷曲（Random Coil, c）分别占比 25.00%、33.59% 和 41.41%。如图 8B 所示，武定鸡 FABP6 蛋白的三级结构主要由无规卷曲及延伸链构成，与二级结构预测结果一致。

如图 8C 所示，FABP6 蛋白与 FABP2（小肠型脂肪酸结合蛋白，I-FABP）、FABP3（心脏型脂肪酸结合蛋白，H-FABP）、FABP4（脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白，A-FABP）、FABP5（上皮型脂肪酸结合蛋白，E-FABP）、FABP7（脑型脂肪酸结合蛋白，B-FABP）、FABP9（睾丸型脂肪酸结合蛋白，T-FABP）、NR1H4（核受体亚家族 1 成员 H4）、RXRA（类视黄醇 X 受体）、SLC10A2（溶质转运蛋白家族 10 二号成员）和 SNX24（分选连接蛋白 24）存在互作关系。其中与同 FABPs 家族的蛋白互作系数都较高，FABP2、FABP3、FABP4、FABP5、FABP7、FABP9 与 FABP6 蛋白的相关系数分别为 0.779、0.837、0.780、0.721、0.725、0.744。FABP6 蛋白与非同族蛋白互作系数较高的有 NR1H4 和 RXRA，相关系数分别为 0.762 和 0.712。其次与 SNX24 相关系数为 0.531，与 SLC10A2 相关系数为 0.588。

3 讨论

FABPs 主要存在于动物细胞质中，在脂肪酸转运过程中发挥着重要作用^[14]。1988 年，Walz 等^[15]首次从猪肠道中分离出一种具有脂肪酸结合与转运功能的活性蛋白，分子量约为 14 kDa，这是 FABP6 蛋白首次被

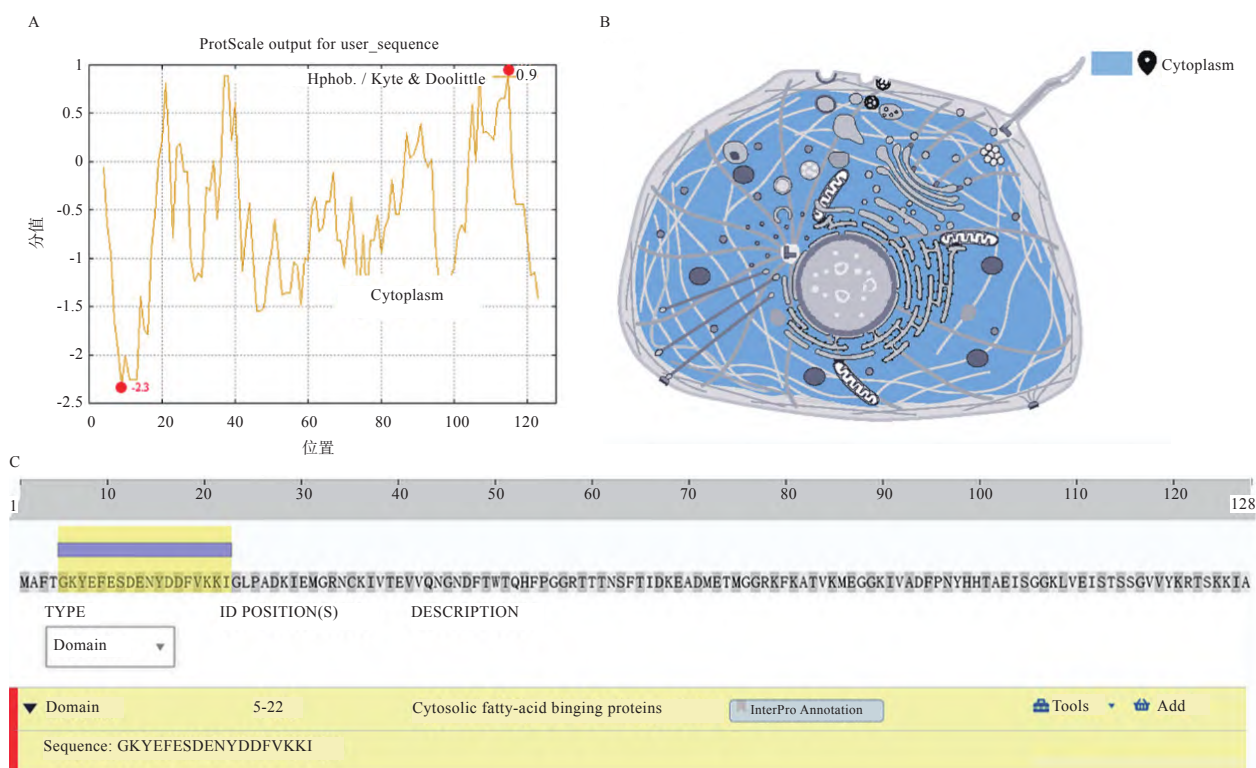


图6 武定鸡 FABP6 蛋白亲/疏水性分析 (A)、亚细胞定位 (B) 和结构域预测 (C)

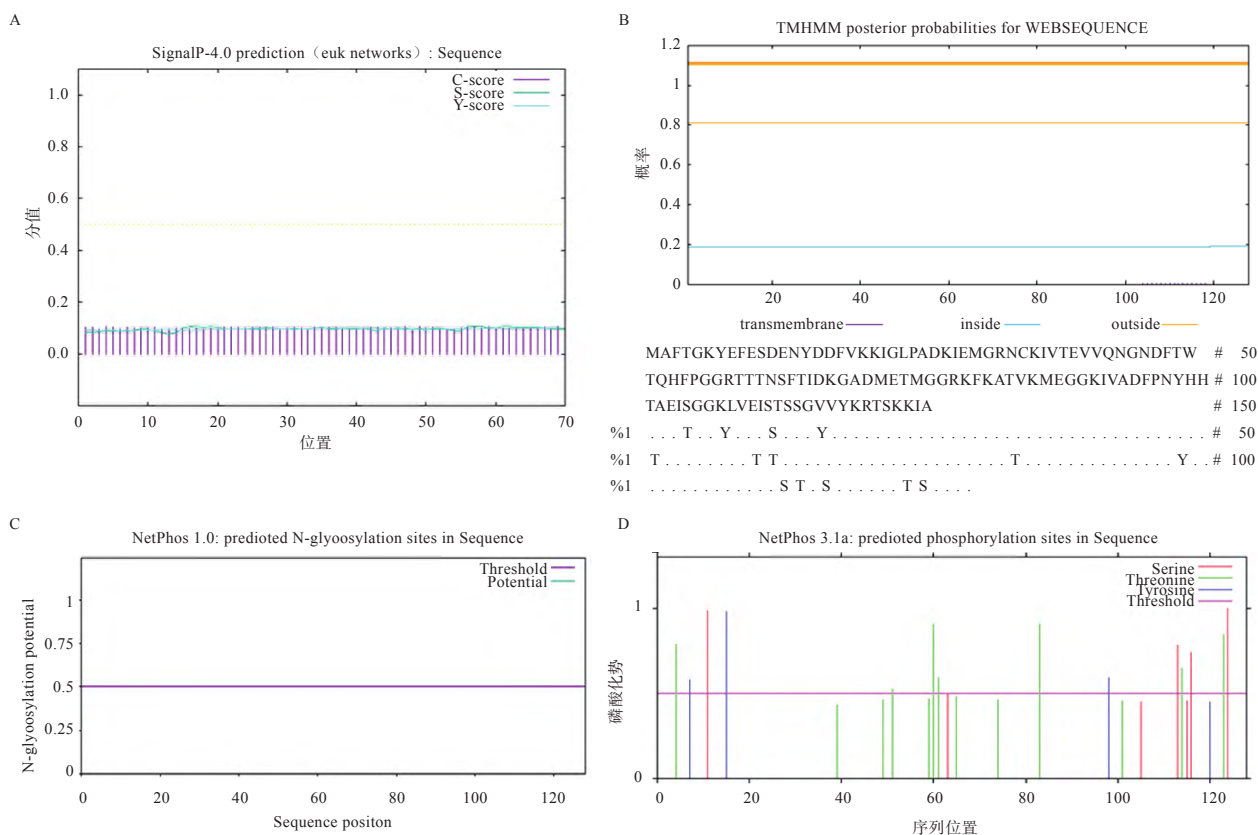


图 7 武定鸡 FABP6 蛋白信号肽 (A)、跨膜结构 (B)、糖基化位点 (C) 和磷酸化位点 (D) 预测

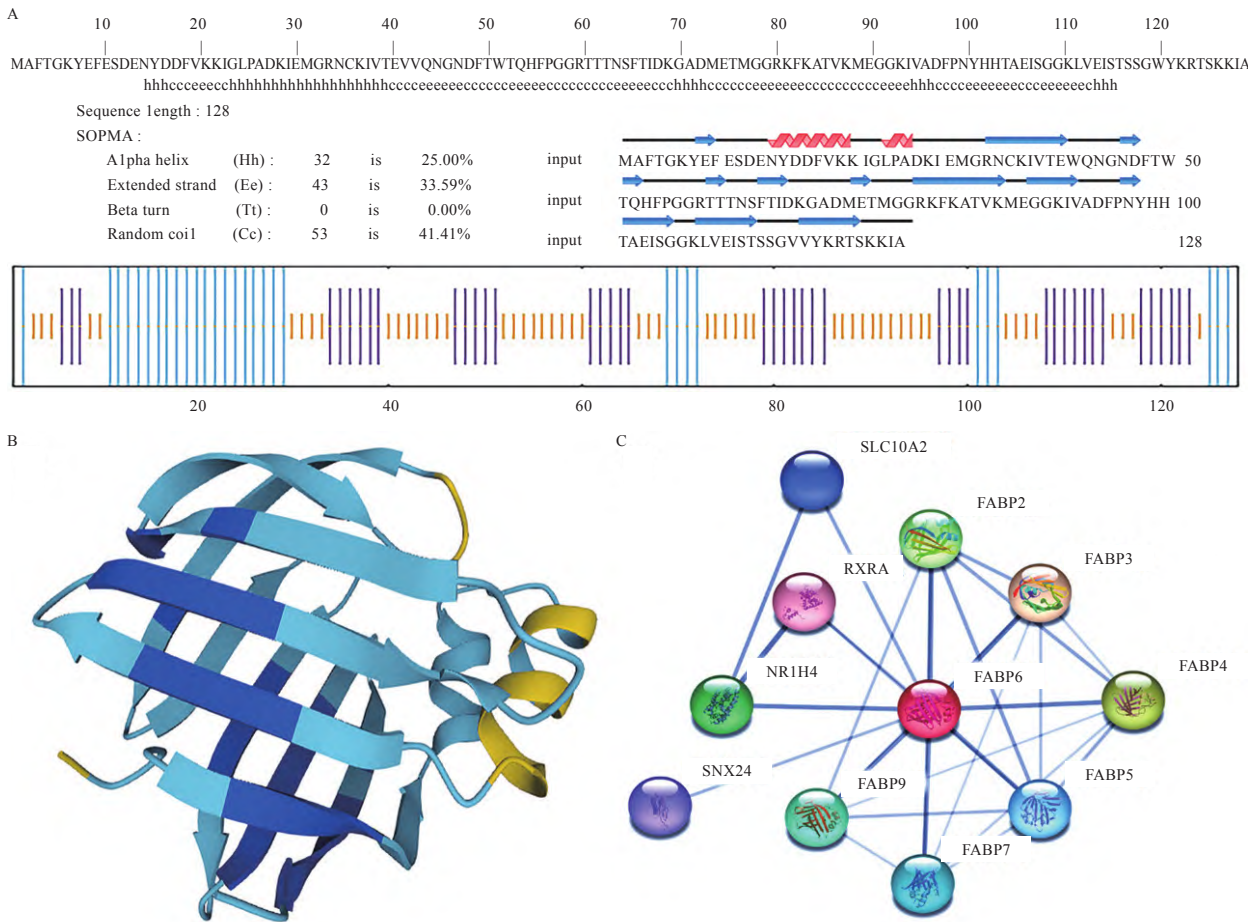


图 8 武定鸡 FABP6 蛋白二级结构预测 (A)、三级结构预测 (B) 和蛋白互作分析 (C)

发现。在功能上，FABP6 蛋白可以促进脂肪酸的结合摄取、运输和代谢，还可以有效地与胆汁酸结合，进行胆汁酸的转运和循环^[16-18]。在结构上，FABP6 蛋白由 128 个氨基酸组成，通过蛋白分子内部的亲水空腔结构结合脂肪酸等疏水配体，在肠道上皮细胞内发挥生物学功能^[19-20]。

本研究成功克隆武定鸡 *FABP6* 基因，全长 387 bp，编码 128 个氨基酸，与前人研究结果相同^[5-6]。系统进化树显示，*FABP6* 在禽类中与珍珠鸡、雪鸡、火鸡和环颈雉鸡等同源性较强，种间差异小，呈现高保守性，但与绿头鸭、棕硬尾鸭、鸿雁和天鹅相比，其同源性相差较大，具有较强的种属特性，推测可能因鸡和鸭在肠道对脂肪酸的转运方式存在较大差异导致^[21]。Young 等^[22] 研究表明 FABP 蛋白的内部充满了水分子，整个蛋白具有亲水特性，且在蛋白分子的表面存在着正电荷集中的区域，推测该区域可能与蛋白的脂类结合功能有关。本研究通过对武定鸡 FABP6 蛋白进行理化性

质分析和亲疏水性分析，结果显示该蛋白分子亲水指数平均值为负值，组成蛋白的氨基酸中极性氨基酸数量多、占比大，且氨基酸残基带正电。以上结果均表明，FABP6 蛋白具有较高的亲水性，与前人研究一致^[5-6]。

蛋白质磷酸化是由蛋白质激酶催化的磷酸基转移反应，是一种蛋白质翻译后修饰方式，在细胞信号转导过程中起重要作用^[23]。武定鸡 FABP6 蛋白有 4 个丝氨酸蛋白激酶磷酸化位点、7 个苏氨酸蛋白激酶磷酸化位点、3 个酪氨酸蛋白激酶磷酸化位点，这些磷酸化位点对于 FABP6 的运输和结合功能可能有着重要意义。研究人员对 FABPs 这类广泛分布于多种生物组织细胞内且可以结合脂质的蛋白进行研究，通过结晶学分析^[24]和核磁共振^[25]技术手段，揭示了 FABPs 家族各成员的三级结构并且发现它们都具有一个相似的结构区域。该结构由 10 条反平行的 β 链和 2 个 α 螺旋构成，其中 10 条反平行的 β 链形成一个 β 折叠桶，疏水配体结合在桶的空洞中心^[26-27]。空洞的内部由极性疏水的氨基酸侧链支撑，

表面有一个开口结构, 脂肪酸分子在此结合, 该结构也被命名为胞质脂肪酸结合结构域。本研究结果表明在武定鸡 FABP6 蛋白的第 5 位至 22 位氨基酸残基之间也存在该结构域。对武定鸡 FABP6 蛋白的二、三级结构进行预测, 结果显示二级结构主要含有 α -螺旋、延伸链和无规卷曲, 三级结构主要由无规卷曲及延伸链构成, 与二级结构预测结果一致, 且为开口结构的形成提供基础条件。

通过蛋白互作发现, FABP6 蛋白与 FABP2、FABP3 和 FABP4 等脂肪酸结合蛋白家族互作关系较强。其中, FABP6 蛋白与 FABP3 蛋白相关系数为 0.837, 相关性最高。石鹏飞等^[28]扩增了关岭牛 *FABP3* 基因 CDS 序列, 测序后进行生物信息学分析也发现 FABP3 与 FABP6 蛋白之间存在较强的互作关系。本研究结果与其一致, 推测 FABP3 与 FABP6 蛋白可以协同作用, 共同调节动物体内的脂肪酸代谢。FABP4 也称脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白, 可以转运脂肪酸, 参与脂肪组织的脂质代谢和脂肪沉积^[29-31]。许多研究表明, *FABP4* 基因与牛背膘厚、肌肉大理石花纹等级、皮下脂肪深度、肉质和胴体性状显著相关^[32-34], 与猪的肌肉脂肪含量有显著关联^[35]。本研究结果表明, FABP6 蛋白与 FABP4 蛋白的互作相关系数较高, 为 0.780, 推测在动物体内可能共同发挥作用, 协同影响畜禽的肌肉脂肪。廖秀冬等^[36]对北京鸭 *FABP2* 基因序列进行分析发现, 该基因与北京鸭的体尺、体重与骨骼生长密切相关。徐松松等^[37]也研究发现, *FABP2* 基因与肉鸡的生长和屠体性状显著相关, 影响鸡的体重和骨骼性状。本研究结果表明, FABP6 蛋白与 FABP2 蛋白的互作相关系数较高, 为 0.779, 推测其可能共同促进畜禽的生长发育, 但具体如何发挥功能还需进一步研究。综上, 本研究结果为进一步了解 *FABP6* 基因及其编码蛋白对畜禽脂质结合、转运和代谢的影响提供了理论基础。

4 结 论

本研究发现, 武定鸡 *FABP6* 基因长 387 bp, 编码 128 个氨基酸; FABP6 蛋白为酸性亲水蛋白, 含有胞质脂肪酸结合结构域, 主要由 α -螺旋、延伸链和无规卷曲构成, 被 14 个磷酸化位点修饰, 无糖基化位点, 与 FABP2、FABP3、FABP4、FABP5、FABP7、FABP9、NR1H4、RXRA、SLC10A2 和 SNX24 蛋白存在互作关系。

参考文献:

- [1] Hotamisligil G S. Inflammation and metabolic disorders[J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867.
- [2] Saltiel A R, Kahn C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Nature, 2001, 414(6865): 799-806.
- [3] Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism[J]. J Appl Genet, 2006, 47(1): 39-48.
- [4] Furuhashi M, Hotamisligil G S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(6): 489-503.
- [5] 田蓂, 张昌军, 刁红录. 脂肪酸结合蛋白研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(2): 164-169.
- [6] 王启贵. 鸡 *FABP* 基因克隆、表达特性及功能研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004.
- [7] Bernlohr D A, Simpson M A, Hertz A V, et al. Intracellular lipid-binding proteins and their genes[J]. Annu Rev Nutr, 1997, 17: 277-303.
- [8] Badiie M, Tochtrop G P. Bile acid recognition by mouse ileal bile acid binding protein[J]. ACS Chem Biol, 2017, 12(12): 3049-3056.
- [9] Praslickova D, Torchia E C, Sugiyama M G, et al. The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50810.
- [10] Zwicker B L, Agellon L B. Transport and biological activities of bile acids[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(7): 1389-1398.
- [11] 崔焕光. 肉鸡肌肉脂肪形成的分子调控网络及相关基因研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [12] 梅凤艳, 陶琳丽, 黄伟, 王珊珊, 张名伟, 周选武, 杨秀娟, 张曦. 不同性别武定鸡腿肌和胸肌脂肪酸含量比较分析 [J]. 中国家禽, 2015, 37(24): 10-13.
- [13] 黄凤洪, 黄庆德, 刘昌盛. 脂肪酸的营养与平衡 [J]. 食品科学, 2004(S1): 262-265.
- [14] Samulin J, Berget I, Lien S, et al. Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008, 151(2): 147-152.
- [15] Walz, D A, Wider, M D, Snow, J W, et al. The complete amino acid sequence of porcine gastrotropin, an ileal protein which stimulates gastric acid and pepsinogen secretion[J]. J Biol Chem, 1988, 263(28): 14189-14195.
- [16] Ricchiuto P, Rocco A G, Gianazza E, et al. Structural and dynamic roles of permanent water molecules in ligand molecular recognition by chicken liver bile acid binding protein[J]. J Mol Recognit, 2010, 21(5): 348-354.
- [17] Eliseo T, Ragona L, Catalano M, et al. Structural and dynamic determinants of ligand binding in the ternary complex of chicken liver bile acid binding protein with two bile salts revealed by NMR[J]. FEBS J, 2007, 283(3): 541-555.
- [18] Nolan V, Perduca M, Monaco H L, et al. Chicken liver bile

- acid-binding protein is in a compact partly folded state at acidic pH. Its relevance to the interaction with lipid membranes[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(23): 8486-8493.
- [19] NICHESOLA D, PERDUCA M, CAPALDI S, *et al.* Crystal structure of chicken liver basic fatty acid-binding protein complexed with cholic acid[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(44): 14072-14079.
- [20] TSAI I T, WU C C, HUNG W C, *et al.* FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(15): 2338-2345.
- [21] ZHANG X, TANG B C, LI J M, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals mechanisms of restriction feeding on lipid metabolism in ducks[J]. *Poult Sci*, 2023, 102(10): 102963.
- [22] YOUNG A C, SCAPIN G, KROMMINGA A, *et al.* Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids[J]. *Structure*, 1994, 2(6): 523-534.
- [23] 梁前进, 王鹏程, 白燕荣. 蛋白质磷酸化修饰研究进展[J]. *科技导报*, 2012, 30(31): 73-79.
- [24] SACCHETTINI J C, GORDON J I, BANASZAK L J. Crystal structure of rat intestinal fatty acid binding protein: refinement and analysis of the Escherichia coli derived protein with bound palmitate[J]. *J Mol Biol*, 1989, 208(2): 327-339.
- [25] LASSEN D, LÜCKE C, KVEDER M, *et al.* Three-dimensional structure of bovine heart fatty acid-binding protein with bound palmitic acid, determined by multidimensional NMR spectroscopy[J]. *Eur J Biochem*, 1995, 230: 266-280.
- [26] BALENDIRAN G K, SCHNÜTGEN F, SCAPIN G, *et al.* Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 27045-27054.
- [27] LÜCKE C, RADMACHER M, ZIMMERMAN A W, *et al.* Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP)[J]. *Biochem J*, 2001, 354: 259-266.
- [28] 石鹏飞, 许家利, 孙金魁, 许厚强. 关岭牛 FABP1 和 FABP2 基因克隆及其组织表达分析[J]. *南方农业学报*, 2023, 54(2): 598-608.
- [29] MASATO F, SHIGEKI S, KAZUAKI S, *et al.* Fatty acid binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases[J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2014, 8(S3): 23-33.
- [30] ARDICLI S, SAMLI H, ALPAY F, *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in the FABP4 gene with carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls[J]. *Ann Anim Sci*, 2017, 17(1): 117-130.
- [31] NIEWOLD T A, MEINEN M, VAND M J. Plasma intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) concentrations increase following intestinal ischemia in pigs[J]. *Res Vet Sci*, 2004, 77(1): 89-91.
- [32] 王卓. 延边牛 FABP5、FABP6、DGAT1、USP43、P2RY10 和 FUBP3 多态性与生长性状关联分析[D]. 延吉: 延边大学, 2023.
- [33] MICHAL J J, ZHANG Z W, GASKINS C T, *et al.* The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu×Limousin F2 crosses[J]. *Anim Genet*, 2006, 37(4): 400-402.
- [34] SHIN S C, HEO J P, CHUNG E R. Genetic variants of the FABP4 gene are associated with marbling scores and meat quality grades in Hanwoo (Korean cattle)[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5323-5330.
- [35] 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(2): 347-354.
- [36] 廖秀冬, 任立明, 王光瑛, 李昂, 黄银花. 北京鸭 FABP2 基因多态性与体尺和屠体性状的相关性研究[J]. *中国家禽*, 2012, 34(17): 23-26.
- [37] 徐松松, 安荣荣, 陈耀峰, 程敏, 李辉, 王守志. 鸡 FABP2 基因单倍型与生长和体组成性状的相关分析[J]. *中国家禽*, 2016, 38(8): 5-9.

(责任编辑: 赵楠)