

基于 RNA-seq 筛选不同饲养模式下肉鸡肌肉发育代谢相关差异基因

王佳洁, 沈中浩, 周晓龙, 杨松柏, 赵阿勇, 汪涵*

(浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江临安 311300)

摘要: 为发掘饲养模式影响肌肉发育代谢的相关关键基因, 本研究分别在笼养和地面平养 2 种饲养模式中随机选取 5 只 42 日龄 Ross 308 肉鸡进行屠宰, 提取腿肌 RNA, 通过 RNA-seq 技术筛选出与肌肉发育代谢相关的差异基因, 并利用 qPCR 进行验证。随后分离、鉴定并构建了鸡骨骼肌卫星细胞增殖分化模型, 对关键差异基因 *PHGDH* 在鸡骨骼肌细胞中的表达模式进行检测。结果显示: 在 2 种饲养模式中筛选出 3 个差异表达基因 (*ASNS*、*JPH2*、*PHGDH*), qPCR 验证结果与 RNA-Seq 测序结果一致, 差异基因均在平养模式鸡腿肌肌肉中高表达; 在鸡骨骼肌细胞增殖期间, *PHGDH* 表达逐渐上调, 但在分化第 2 天至第 6 天, 表达水平逐渐下降; EdU 细胞增殖检测结果显示, 抑制 *PHGDH* 的表达可显著抑制鸡骨骼肌细胞的增殖。以上结果表明, *PHGDH* 可能在鸡骨骼肌形成过程中发挥重要作用。

关键词: 肉鸡; 饲养模式; 差异表达基因; 肌肉发育代谢; RNA-seq

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20190812-02

目前, 地面平养和笼养是世界范围内肉鸡最主要的饲养方式。Castellini 等^[1]研究发现, 平养模式更有利于鸡肌肉发育, 该模式饲养的鸡肌肉能量和脂肪含量较低, 水分含量高, 腿肌肌肉氧化性强, 饱和脂肪酸含量高, 单不饱和脂肪酸水平低。鸡肌肉中脂肪酸含量不仅在肌肉代谢中发挥着十分重要的生理作用, 而且与鸡肉风味密切相关^[2]。有研究发现, 平养模式下, 鸡增重速度快, 具有较大的运动量, 更有利于肌肉发育, 但肌肉中营养成分(水分、蛋白质、脂肪)、持水能力、剪切力、pH 等无显著改变^[3]。然而, 关于不同饲养模式影响肉鸡肌肉发育及代谢的分子机制仍有待进一步研究。

当前, 转录组测序技术(RNA-seq)已成为生物学、

收稿日期: 2019-08-12; 修回日期: 2019-11-09

资助项目: 浙江农林大学学生科研训练项目(KX20180238); 浙江农林大学校科研发展基金项目(W20180043); 国家自然科学基金(31802030); 浙江省重点实验室科研项目(KLGEH011)
作者简介: 王佳洁(1999-), 女, 本科生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 532255951@qq.com; 并列第一作者: 沈中浩(1995-), 男, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 201882061005@stu.zafu.edu.cn

* 通讯作者: 汪涵(1990-), 男, 博士, 讲师, 主要从事动物遗传育种、肌肉发育相关研究, E-mail: wanghan1990@zafu.edu.cn

医学、临床等各领域研究中最常用的技术手段^[4]; RNA-seq 技术也为筛选畜禽肌肉相关性状差异关键基因及探究肌肉相关基因功能提供了至关重要的研究途径^[5-6]。因此, 本实验以不同饲养模式下的肉鸡为研究对象, 通过 RNA-seq 技术对 2 种饲养模式下的肉鸡腿肌进行测序分析, 筛选出与肌肉发育代谢相关的差异基因, 为今后通过科学的饲养管理提高肉鸡肌肉品质提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 RNA 提取 TRIzol Reagent 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 反转录试剂盒 5X All-In-One RT Master Mix、定量试剂盒 EvaGreen 2X Qpcr Master Mix 均购自苏州爱必梦生物科技有限公司; Pax7 抗体(ab187339)、Desmin 抗体(ab6322)均购自 abcam 公司; Myhc 抗体(sc-20641)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)、马血清、DMEM 培养基均购自于 HyClone 公司; 青链霉素混合液、胶原酶、抗荧光衰减封片剂均购自于 Solarbio 公司; 胰酶(0.25% Trypsin-EDTA 1X)、荧光二抗(Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG 和 Alexa Fluor® 488

goat anti-rabbit IgG) 均购自于 Thermo Fisher 公司; Lipofectamine 3000 脂质体购自于 Invitrogen 公司; OPTI-MEM 培养基购自于 Gibco 公司; 普通 siRNA、阴性对照 siRNA、EdU 检测试剂盒 (Cell-Light EdU Apollo567 In Vitro Kit) 均购自于广州锐博生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物 选取 210 只体重相近的 1 日龄 Ross308 肉鸡, 随机分为 2 组, 笼养组 10 个鸡笼, 每个鸡笼 6 只肉鸡 (n=10); 地面栏养组 10 个围栏, 每个围栏 15 只鸡, 地面上铺设 10 cm 的新木屑 (n=10)。2 组肉鸡饲料相同, 均根据不同阶段 (雏鸡阶段、中期阶段和肉大鸡阶段) 所需的营养进行科学配比, 均自由采食和饮水。在笼养和地面平养鸡中各随机选取 5 只 42 日龄肉鸡母鸡进行称重, 计算 2 组肉鸡的平均日增重, 随后进行屠宰。

10 日龄鸡胚由本实验室取种蛋孵化 10 d 后所得, 种蛋购自浙江某种禽有限公司。

1.2 转录组测序及数据分析

1.2.1 样本采集及处理 使用 Trizol 法提取肉鸡腿肌 RNA, 通过北京百迈客样品检测中心进行质量检测, 保证样品质量满足建库要求。以 RNA 为模板反转录得到 cDNA。

1.2.2 测序文库构建与序列测序 基于边合成边测序 (Sequencing By Synthesis, SBS) 技术, 通过 Illumina 高通量测序平台对样品进行测序并构建文库。本研究将平养模式和笼养模式下的腿肌组织分别编号为 C1T-C5T 和 P1T-P5T, 以便后续进行结果分析。

1.2.3 差异基因筛选 在差异表达基因检测过程中, 将 Fold Change ≥ 2 且 FDR <0.05 作为筛选标准。差异倍数 (Fold Change) 表示两样品 (组) 间表达量的比值。错误发现率 (False Discovery Rate, FDR) 是通过对比差异显著性 P 值 (p-value) 进行校正得到的。并最终采用 FDR 作为差异表达基因筛选的关键指标。

1.3 荧光定量 PCR 验证 根据 NCBI 中的基因序列, 通过 Primer Premier.5 软件对不同饲养模式下的差异基因 PHGDH、ASNS、JPH2 以及随机选取的 2 个任意基因 LDHA、BLOC1S4 以及内参基因 GAPDH 进行引物设计, 引物由杭州有康生物技术有限公司合成, 具体序列如表 1。将反转录合成的 cDNA 模板, 加入已验证好的引物进行 10 μ L 体系的荧光定量 PCR 反应分析, 反应体系: Eva

Green 2x qPCR Master Mix 5 μ L, Forward Primer 0.3 μ L, Reverse Primer 0.3 μ L, cDNA 3.5 μ L, ddH₂O 0.9 μ L; qPCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 39 个循环, 每个样本 3 个重复。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相关基因的相对表达水平。

表 1 用于荧光定量的引物序列

基因	序列 (5' → 3')	产物长度, bp
GAPDH	F: CGATCTGAACTACATGGTTTAC	153
	R: TCTGCCCATTTGATGTTGC	
PHGDH	F: AGCCAAAGCATCGGAGACA	151
	R: AGCGAGGTCAGACAGTGGG	
ASNS	F: AGTTGCAGGAGCAGTTTGGGA	235
	R: GCCTCAGAACAGACACCCAA	
JPH2	F: GGCTGAAGTACGAGGGTGAG	105
	R: GGACGTTGTGGCGGTATTG	
BLOC1S4	F: TGGCTGGAATGGAAGAACGG	151
	R: ACAGGAGGCTCATAGGCAGT	
LDHA	F: AGACTGGGCATCCATCCTCT	160
	R: CCTCCTTCCAGTGCTCCTTG	

1.4 肉鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定

1.4.1 肉鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养 将 10 日龄种蛋用酒精消毒后, 置于蛋托上, 用镊子轻轻敲破蛋壳, 将气室上部蛋壳剔除, 用另一把镊子撕开气室薄膜, 注意不要污染蛋清。使用一把新镊子将鸡胚夹出, 置于细胞培养皿上, 剔除鸡胚腿部肌肉皮肤后将鸡胚腿部肌肉剪下, 置于一个新的培养皿中, 用含双抗的 PBS 洗涤 3 次, 剔除皮、血管、脂肪、结缔组织。将鸡胚腿部肌肉剪至肉糜状, 将肉糜吸入移至 15 mL 离心管中, 加入 0.25% 的胰酶 37 $^{\circ}$ C 消化 10 min。加入含 10% FBS 的 DMEM 全培养基终止消化, 用 70 μ m 的滤网过滤到另一新的细胞培养皿中。将细胞滤液移至新的 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清, 用含 15% FBS 的 DMEM 培养液重悬细胞, 将细胞悬液加入新的培养皿中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 1 h 后, 吸取细胞悬液至新的培养瓶, 进行连续平板培养以富集肌卫星细胞并消除成纤维细胞, 用 2% 马血清替换 15% 胎牛血清诱导细胞分化。

1.4.2 肉鸡骨骼肌卫星细胞的鉴定 取分离的鸡骨骼肌卫星进行培养, 待细胞长至 70%~80% 融合度时, 参考 Luo 等^[7] 采用的免疫荧光检测方法, 将培养的细胞用爬片处理后, 对骨骼肌卫星细胞标志基因 Pax7 及 Desmin

进行免疫荧光染色。取另一批分离的鸡骨骼肌卫星细胞，待细胞长至70%~80%融合度时，更换为分化培养基培养，分化4 d后对骨骼肌细胞分化标志基因 *Myhc* 进行免疫荧光染色。随后，用荧光倒置显微镜拍照。

1.5 肉鸡骨骼肌卫星细胞体外培养不同时期的 RNA 提取 取分离的鸡骨骼肌卫星进行培养，待细胞分裂、增殖至70%~80%细胞融合度时，更换成分化培养基继续培养2、4、6 d，70%~80%细胞融合度的时间记为0 d。收集提取处于增殖期30%细胞融合度、50%细胞融合度、70%~80%细胞融合度(0 d)以及处于分化期2、4、6 d的骨骼肌细胞 RNA，反转录后置于-20℃冻存。以 *GAPDH* 作为内参基因，对关键差异基因 *PHGDH* 进行荧光定量 PCR 检测分析。

1.6 细胞的转染 取培养的鸡骨骼肌卫星细胞铺于6孔板中，待细胞分裂、增殖至70%~80%细胞融合度时，更换无血清无双抗培养基。将合成的 *PHGDH* 特异性的 siRNA 试剂及阴性对照 (NC) 按照 Lipofectamine™ 3000 脂质体转染说明书转染至鸡骨骼肌细胞中。将细胞放入37℃、5% CO₂ 培养箱中培养4~6 h后换液。

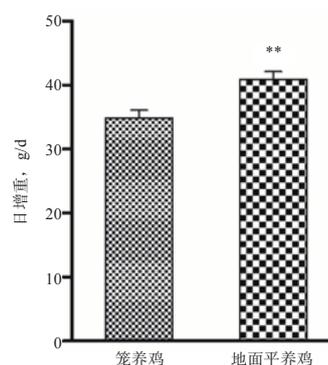
1.7 EdU 细胞增殖检测 转染4~6 h后，将鸡骨骼肌卫星细胞在含有10 mmol/L EdU的新鲜生长培养基中继续培养。培养24 h后，每5 min用PBS清洗细胞2次，随后在每孔中加入4%多聚甲醛进行固定，室温静置30 min后吸去细胞固定液。随后加入2 mg/mL的甘氨酸，置于脱色摇床孵育5 min，吸去溶液。在脱色摇床上用PBS清洗细胞5 min，加入配制好的渗透剂，置于脱色摇床孵育10 min，再用PBS清洗5 min。避光加入 Apollo 染色反应液，室温下置于脱色摇床上30 min后吸去染色反应液。再次加入渗透剂清洗2~3次，每次均置于脱色摇床上10 min，后弃去渗透液。每5 min加入甲醇清洗1~2次，再用PBS清洗5 min。避光加入1×Hoechst 33342 反应液，在室温下置于脱色摇床30 min，后弃去染色反应液。PBS清洗3次后封片拍照，也可避光置于4℃湿润保存待测。

2 结果与分析

2.1 日增重数据分析 由图1可知，地面平养肉鸡的日增重极显著高于笼养肉鸡。

2.2 测序质量评估 对10个样本进行质量检测，从表2中可以看出其中Q20和Q30均在90%以上，GC含

量在49%~53%，说明测序碱基识别时出错的概率较低，碱基含量接近，样本组成情况良好。



**表示两组之间差异极显著 ($P < 0.01$), $n=5$ 。

图1 2种饲养模式下肉鸡日增重

表2 测序数据质量评估

样本名称	Clean reads	Clean bases	GC,%	Q20,%	Q30,%
C1T	25595499	7645125484	50.88	97.41	92.97
C2T	25167237	7505586660	51.16	97.70	93.67
C3T	25578273	7634485720	51.67	97.73	93.68
C4T	26678680	7964274806	49.78	97.68	93.50
C5T	25726515	7659936546	50.87	97.62	93.39
P1T	29135911	8705716622	51.03	97.65	93.63
P2T	32518744	9699863244	51.19	97.74	93.87
P3T	32658211	9752147744	51.27	97.73	93.85
P4T	37753032	11278877720	52.40	97.92	94.24
P5T	34146017	10159903756	52.05	97.86	94.13

将测序获得的数据与参考基因组进行 Map (表3)，结果发现比对到参考基因组上的 Reads 数目均大于75%，比对到参考基因组唯一位置的 Reads 数目在74%~92%，从比对结果统计来看，各样品的 Reads 与参考基因组的比对效率在78.29%~91.18%，这表明样本的可利用率较高。综上分析，测序数据良好，可以进行下一步数据分析。

与此同时，对测序数据进行了基因表达相关性散点图分析，偏离对角线的点越少，则说明样本间相关性越高，样品的重复性越好(图2)。

2.3 差异表达基因筛选 根据差异表达的基因构建火山图，以 $-\lg(\text{FDR})$ 为纵坐标， $\log_2(\text{FC})$ 为横坐标(图3)，横坐标表示某一个基因在两样品中表达量差异倍数的对数值，结果表明差异基因在两组样品间的差异表达倍数较大。纵坐标表示差异表达显著性，结果表明差异基因显著性较高，筛选得到的差异表达基因较为可靠。

表3 与参考基因组比对统计结果

样品名称	总测序量	比对数据量	比对效率,%	唯一比对数据	唯一比对效率,%
C1T	51190998	44340111	86.62	42136703	82.31
C2T	50334474	44231956	87.88	42128863	83.7
C3T	51156546	44406515	86.81	42267797	82.62
C4T	53357360	48651988	91.18	46941096	87.97
C5T	51453030	44798840	87.07	42563510	82.72
P1T	58271822	51290093	88.02	48720157	83.61
P2T	65037488	55445945	85.25	52738564	81.09
P3T	65316422	56957569	87.2	54089388	82.81
P4T	75506064	64269152	85.12	61021292	80.82
P5T	68292034	53465050	78.29	50826310	74.42

将 $FDR < 0.05$ 作为差异表达基因筛选条件, 筛选 2 组样品中的差异表达基因, 最终筛选出 3 个上调基因, 分别为亲联蛋白 2 基因 (*JPH2*)、3-磷酸甘油酸脱氢酶基因 (*PHGDH*)、天冬酰胺合成酶基因 (*ASNS*) (表 4)。

2.4 荧光定量 PCR 验证 图 4 显示, 3 个差异表达基因在不同饲养模式下的表达水平均存在显著或极显著的差

异, 而随机选取的 2 个任意基因差异不显著。表明荧光定量 PCR 验证的结果与 RNA-Seq 中基因表达检测的结果一致。

表4 差异表达基因统计表

基因	FPKM 值		FDR	Log ₂ FC
	笼养模式	平养模式		
<i>JPH2</i>	1.09979	6.079916	0.013602	2.439174
<i>PHGDH</i>	0.554001	3.895487	0.027282	2.909656
<i>ASNS</i>	3.180113	9.6196132	0.013602	1.5462

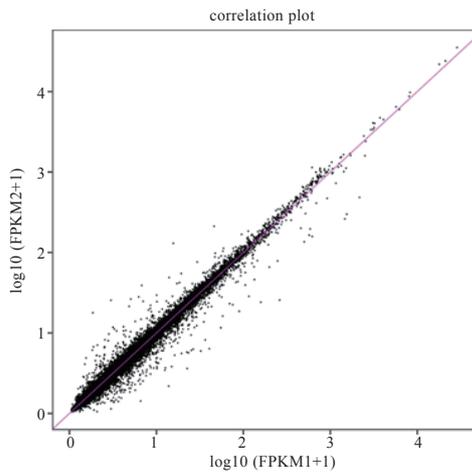


图2 基因表达量相关性散点图

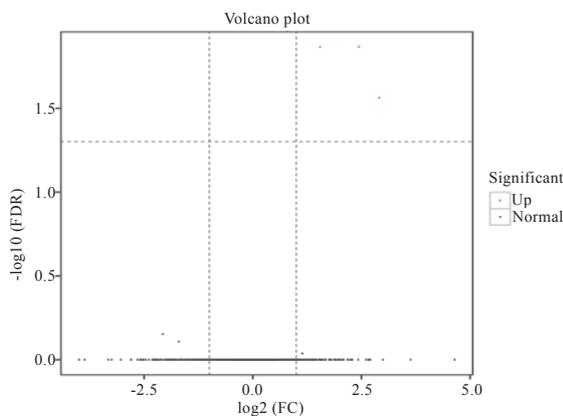
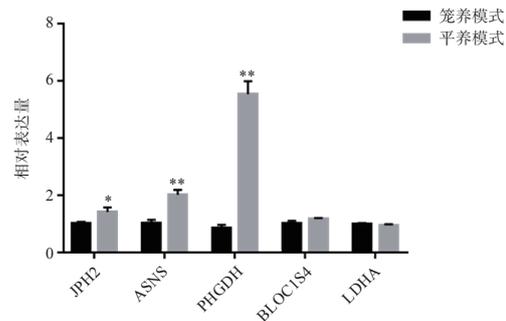


图3 差异基因表达火山图

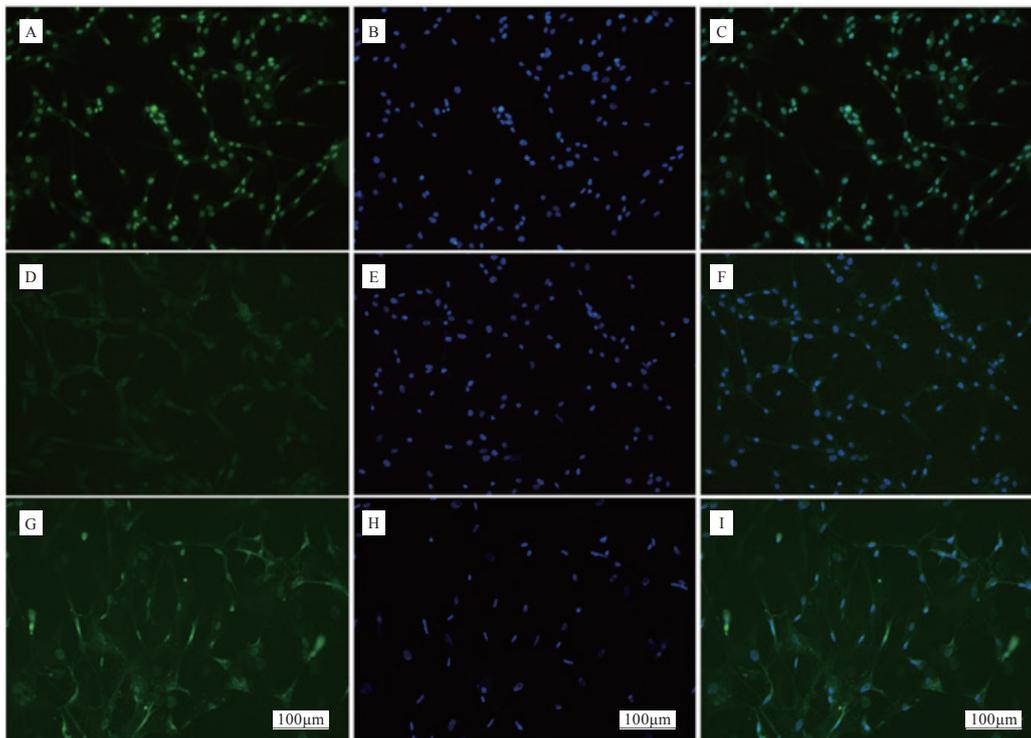


**表示两组之间差异极显著 ($P < 0.01$), *表示两组之间差异显著 ($P < 0.05$), $n = 5$ 。

图4 不同饲养模式下差异表达基因及任选基因 qPCR 分析

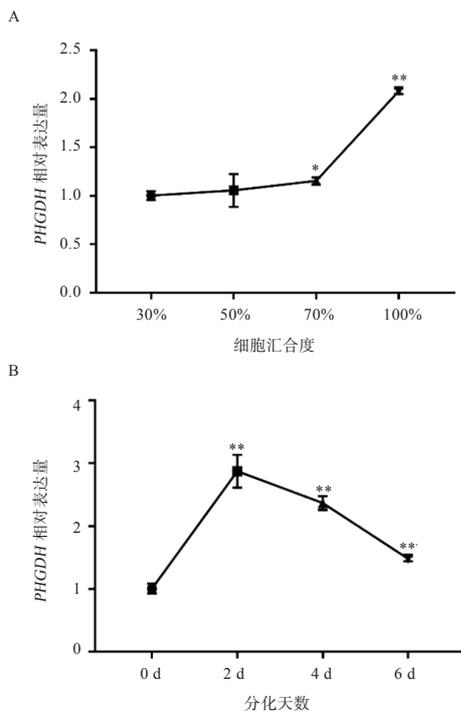
2.5 肉鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养与鉴定 结果显示, *Pax7* 在细胞核中呈阳性表达 (图 5-A), *Desmin* 和 *Myhc* 在细胞质中呈阳性表达 (图 5-D 和图 5-G)。表明本实验所分离的细胞是肉鸡骨骼肌卫星细胞。

2.6 *PHGDH* 在肉鸡骨骼肌卫星细胞体外培养不同时期的表达谱检测 如图 6 所示, *PHGDH* 基因的表达水平在细胞增殖期逐渐升高。在细胞分化第 2~6 天逐渐降低, 但在分化第 2 天 *PHGDH* 基因的表达量显著高于第 0 天。表明 *PHGDH* 可能在不同饲养模式肉鸡的骨骼肌形成过程中发挥重要作用。



A: Pax7 细胞免疫荧光染色; B: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; C: A 与 B 叠加图片; D: Desmin 细胞免疫荧光染色; E: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; F: D 与 E 叠加图片; G: MyHC 细胞免疫荧光染色; H: 应用 DAPI 对细胞核进行染色; I: G 与 H 叠加图片。

图 5 肉鸡骨骼肌卫星细胞鉴定



A: PHGDH 在鸡骨骼肌卫星细胞增殖过程 (30%、50%、70%、100%) 中的表达水平; B: PHGDH 在鸡骨骼肌卫星细胞分化 0、2、4、6 d 时的 mRNA 表达水平; * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), $n = 3$ 。

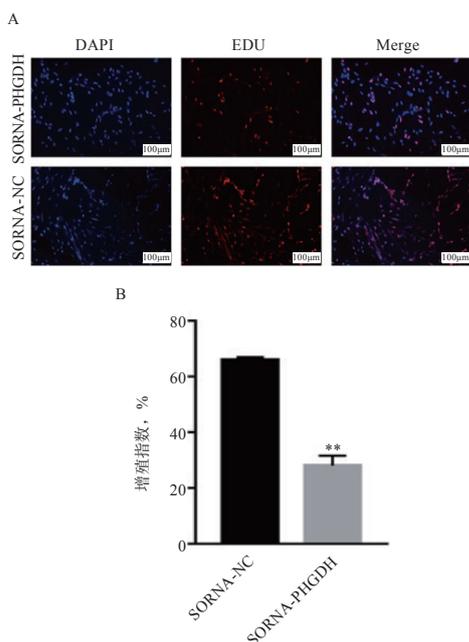
图 6 PHGDH 在鸡骨骼肌卫星细胞增殖及分化过程中的表达

2.7 抑制 PHGDH 对肉鸡骨骼肌卫星细胞增殖的影响如图 7 所示, siRNA-PHGDH 组细胞与 NC 对照组相比, EdU 阳性细胞的比例极显著减少, 表明处于增殖状态下的细胞比例减少。

3 讨论

饲养模式是影响肉鸡肌肉发育代谢的一个重要因素, 已有研究表明饲养方式能够很大程度上影响肉鸡肌肉发育, 同时也与鸡肉肉质品质变化密切相关^[8]。分析不同饲养模式下肉鸡肌肉中差异表达的基因, 对进一步科学地利用适宜的饲养方式改良肉鸡生长与肉质性状具有重要的推动作用。

本实验通过对平养和笼养 2 种饲养模式下的肉鸡肌肉组织进行转录组测序, 共筛选出 3 个与肌肉发育代谢相关的重要差异表达基因, 分别为 ASNS、JPH2 和 PHGDH 基因, 且差异基因均在平养模式鸡腿肌中高表达, 在笼养模式中低表达。ASNS 与天冬酰胺的合成密切相关, 是氨基转移酶家族成员之一^[9]。研究发现在仔猪日粮中添加天冬酰胺能够有效促进肌肉中蛋白质的合成^[10], 而在之前的一项研究中发现平养鸡肌肉中总



A: 用 siRNA-PHGDH 及 NC 转染鸡骨骼肌卫星细胞 24 h 后, 进行 EdU 增殖细胞检测 (红色); B: 计算 EdU 阳性细胞的比例, n=3。

图 7 抑制 PHGDH 表达对肉鸡骨骼肌卫星细胞增殖的影响

蛋白含量要显著高于笼养鸡^[11]。因此, 本研究中发现的 ASNS 基因在平养鸡肌肉中高表达的结果, 可能正是阐明饲养模式影响肌肉总蛋白含量变化的关键所在。JPH2 是肌肉横管和肌质网缝隙连接中的重要功能蛋白, 它在维持横管结构和调节钙离子稳态方面发挥着关键作用。在肌肉中, JPH2 的表达可以加快钙离子释放, 促进肌肉兴奋-收缩耦联机制, 更有利于肌肉的运动^[12]。有研究发现 JPH2 的表达对小鼠肌肉发育至关重要^[13]。平养模式下的肉鸡运动量往往高于笼养鸡, 运动强度的增加势必需要进一步加快骨骼肌兴奋收缩机制, 因此 JPH2 基因的表达就显得尤为重要。本研究发现 JPH2 基因在平养鸡肌肉中高表达, 这进一步说明 JPH2 基因可能是影响平养肉鸡肌肉发育代谢的关键基因之一。PHGDH 是丝氨酸合成途径中的限速酶, 在该合成途径中会产生许多代谢中间产物, 如丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸和磷脂等, 这些产物对于蛋白质合成和细胞生长是不可或缺的^[14]。尽管目前 PHGDH 在肌肉细胞中发挥作用的具体机制还未可知, 但已有研究表明 PHGDH 是调控细胞生长的一个基本调节因子, 过表达 PHGDH 能够显著促进细胞的增殖^[15]。本研究发现, PHGDH 基因在平养鸡肌肉中高表达, 这表明在该饲养方式下肌肉中丝氨酸的合成速率可能较快。

对目的基因进行表达谱检测, 通常是初步探究其生理功能的重要手段之一。鉴于 PHGDH 在肌肉生长发育中可能发挥的关键作用, 本研究成功分离、鉴定并构建了鸡骨骼肌卫星细胞增殖分化模型, 发现 PHGDH 基因在鸡骨骼肌细胞增殖期间的表达量逐渐上调, 表明 PHGDH 基因可能在鸡骨骼肌细胞增殖过程中起到正调控作用。而已有研究发现, 抑制 PHGDH 表达可显著抑制癌细胞的增殖^[16]。此外, 本研究通过 EdU 细胞增殖检测发现, 抑制 PHGDH 表达可显著减少处在增殖期的肉鸡骨骼肌卫星细胞比例。由此推测, PHGDH 基因可能对鸡肌肉细胞的增殖起正调控作用, 可能是不同饲养模式影响肌肉生长发育的一个关键基因。

本研究还发现在骨骼肌细胞分化期间, PHGDH 的表达量逐渐降低, 这表明 PHGDH 可能在鸡骨骼肌细胞分化过程中起到负调控作用。而 PHGDH 在分化第 2 天出现的高表达现象可能是由于在本分化模型前期大部分鸡骨骼肌细胞仍短时处于增殖状态。综上, 本研究下一步将主要侧重于对 PHGDH 在鸡骨骼肌卫星细胞增殖分化过程中的调控机制进行探究。

4 结论

本研究基于 RNA-seq 技术, 对不同饲养模式下的肉鸡腿肌进行高通量转录组测序和分析, 发现了 3 个与肌肉发育代谢相关的关键差异基因 (ASNS、JPH2、PHGDH), 且均在平养模式鸡腿肌肌肉中高表达; 对 PHGDH 基因在肉鸡骨骼肌卫星细胞体外培养的不同时期进行表达谱检测分析, 以及结合抑制 PHGDH 表达的 EdU 细胞增殖检测结果中发现 PHGDH 基因可能在肉鸡骨骼肌卫星细胞的增殖过程中发挥正向调控作用, PHGDH 基因可能是饲养模式影响肉鸡肌肉发育的一个关键基因。

参考文献:

- Castellini C, Mugnai C, Dal Bosco A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality[J]. Meat Sci, 2002, 60(3): 219-225.
- Haug A, Nyquist N F, Thomassen M, et al. N-3 fatty acid intake altered fat content and fatty acid distribution in chicken breast muscle, but did not influence mRNA expression of lipid-related enzymes[J]. Lipids Health Dis, 2014, 13(1): 92.
- Wang K, Shi S, Dou T, et al. Effect of a free-range raising system on growth performance, carcass yield, and meat quality of slow-growing chicken[J]. Poult Sci, 2009, 88(10): 2219-2223.

- [4] Lockhart D J, Winzler E A. Genomics, gene expression and DNA arrays[J]. Nature, 2000, 405(6788): 827.
- [5] Sodhi S S, Song K-D, Ghosh M, *et al.* Comparative transcriptomic analysis by RNA-seq to discern differential expression of genes in liver and muscle tissues of adult Berkshire and Jeju Native Pig[J]. Gene, 2014, 546(2): 233-242.
- [6] Piorkowska K, Zukowski K, Nowak J, *et al.* Genome-wide RNA-Seq analysis of breast muscles of two broiler chicken groups differing in shear force[J]. Anim Genet, 2016, 47(1): 68-80.
- [7] Luo W, Wu H, Ye Y, *et al.* The transient expression of miR-203 and its inhibiting effects on skeletal muscle cell proliferation and differentiation[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1347.
- [8] Sogunle O M, Egbeyale L T, Bajomo T T, *et al.* Comparison of the performance, carcass characteristics and haematological parameters of broiler chicks reared in cage and floor[J]. Pak J Biol Sci, 2008, 11(3): 480-483.
- [9] Tesson A R, Soper T S, Ciustea M, *et al.* Revisiting the steady state kinetic mechanism of glutamine-dependent asparagine synthetase from *Escherichia coli*[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 413(1): 23-31.
- [10] 王秀英, 皮定安, 冷炜博, 等. 天冬酰胺对脂多糖诱导的仔猪肌肉蛋白质合成和降解的调控作用 [A]. 中国畜牧兽医学动物营养学会第十二次动物营养学术研讨会论文集 [C]. 武汉: 中国畜牧兽医学动物营养学会, 2016.
- [11] Zhao X, Ren W, Siegel P B, *et al.* Meat quality characteristics of chickens as influenced by housing system, sex, and genetic line interactions[J]. Ital J Anim Sci, 2018, 17(2): 462-468.
- [12] Lucia G, Christophe C, Christine B, *et al.* Junctophilin 1 and 2 proteins interact with the L-type Ca²⁺ channel dihydropyridine receptors (DHPRs) in skeletal muscle[J]. J Biol Chem, 2011, 286(51): 43717.
- [13] Komazaki S, Ito K, Takeshima H, *et al.* Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1[J]. Febs Lett, 2002, 524(1): 225-229.
- [14] Brown D M, Williams H, Ryan K J, *et al.* Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and serine biosynthetic pathway genes are co-ordinately increased during anabolic agent-induced skeletal muscle growth[J]. Sci Rep, 2016, 6(1): 28693.
- [15] Richard P, Marks K M, Shaul Y D, *et al.* Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer[J]. Nature, 2011, 476(7360): 346-350.
- [16] Song Z, Feng C, Lu Y, *et al.* PHGDH is an independent prognosis marker and contributes cell proliferation, migration and invasion in human pancreatic cancer[J]. Gene, 2017, 642: 43-50.

Application of RNA-Seq Technology for Screening Differentially Expressed Genes Related to Muscle Development and Metabolism of Broilers in Different Rearing Modes

WANG Jiajie, SHEN Zhonghao, ZHOU Xiaolong, YANG Songbai, ZHAO Ayong, WANG Han*

(College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Zhejiang Lin'an 311300, China)

Abstract: In order to explore the key genes related to muscle development and metabolism of broilers in different rearing modes, this study used Ross 308 broiler as the research object, five broilers aged 42 days were randomly selected for slaughter in two rearing modes: cage and floor rearing, respectively, then extracted leg muscle RNA. Differentially expressed genes related to muscle development and metabolism were screened by RNA-Seq and verified by qPCR. Subsequently, a proliferation and differentiation model of chicken skeletal muscle satellite cells was isolated, identified and constructed. The expression pattern of *PHGDH* was detected. The results showed that there were three differentially expressed genes (*ASNS*, *JPH2*, *PHGDH*) between these two rearing modes. The mRNA expression levels which were verified by qPCR were in line with that identified by RNA-Seq technology. All the differentially expressed genes were highly expressed in the floor rearing mode. In addition, during the proliferation of chicken skeletal muscle cells, the expression of *PHGDH* was gradually increased. However, during the 2 to 6 day of cell differentiation, *PHGDH* expression level gradually decreased. The results of EdU cell proliferation test showed that inhibiting the expression of *PHGDH* could significantly inhibit the proliferation of chicken skeletal muscle cells. These results suggest that *PHGDH* might be a key gene in the formation of chicken skeletal muscle.

Keywords: Broiler; Rearing modes; Differentially expressed genes; Muscle development and metabolism; RNA-seq

(责任编辑: 周会会)