

蛋鸡与肉鸡卵巢组织基因差异表达与产蛋数 杂种优势的相关性研究

王 慧^{1,2}, 张 沅^{1*}, 孙东晓¹, 俞 英¹

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要: 以白莱航蛋鸡(AA)、农大褐蛋鸡(DD)和白洛克肉鸡(EE) 3个纯系及其正反杂交产生的6个杂交系为试验材料,应用mRNA差异显示技术,研究了产蛋高峰期(32周龄)纯种鸡与正反杂交种群卵巢组织的基因差异表达,及其差异表达模式与32周龄产蛋数的杂种优势率的相关性。结果:24种引物组合共扩增出1572条带,其中能够重现的有1126条,重现率为71.63%。在6个正反杂交群中检测到7类基因差异表达模式:P1杂种超强表达(22.29%);P2杂种特异表达(9.84%);P3杂种减弱表达(9.85%);P4杂种沉默(3.42%);P5单亲特异表达(22.91%);P6单亲显性表达(25.74%);P7共显性表达(5.95%)。相关性分析表明:32周龄产蛋数的杂种优势率与杂种特异型表达模式(P2)呈显著的负相关($P < 0.05$);而与杂种减弱型表达模式呈显著的正相关($P < 0.05$)。这一研究结果为探索鸡的产蛋性状杂种优势的分子遗传机理奠定了基础,同时探讨了差异表达基因与杂种优势的关系。

关键词: 鸡;产蛋性能;杂种优势;卵巢组织;mRNA差异显示;基因差异表达模式

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)02-0111-05

杂种优势现象实际上是亲本基因系统在杂合子内相互作用的结果,是杂合子内基因表达调控的外在表现形式。近年来,通过分子手段的大量运用,得出了一些重要结论^[1-5]。如Chen等^[6,7]在玉米和水稻中发现杂种与亲本在RNA含量和种类上存在显著差异。Xiong等^[8]报道单亲特异表达片段与杂种优势存在正相关。然而,有关基因差异表达模式与动物杂种优势的相关性研究目前还较为少见。

差异显示反转录PCR技术(DDRT-PCR)是在基因转录水平上研究杂种优势遗传机理的一种有效方法^[5]。本研究选用白洛克肉鸡(White Plymouth Rock)、农大褐蛋鸡(CAU-Brown)和白莱航蛋鸡(White Leghorn)3个纯系,专门组建了3×3全双列杂交组合试验,采用mRNA差异显示技术,系统地研究了6个杂种组合与3个纯种组合鸡群在产蛋高峰期卵巢组织的mRNA差异表达,以及差异表达模式与鸡产蛋性状杂种优势率的相关关系,旨在从

转录水平上揭示出一些与鸡的产蛋性能杂种优势形成有关的分子信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以白洛克肉鸡(EE)、农大褐蛋鸡(DD)和白莱航蛋鸡(AA)3个纯系构建的3×3全双列杂交组合的9个试验鸡群。每个组合约200只鸡,公母各半。均饲养于中国农业大学国家家禽性能测定中心试验站,饲养管理条件一致。准确记录各组合鸡群的产蛋成绩;32周龄时,随机抽取每个组合各8只健康母鸡,采集卵巢等组织样,液氮中保存。

1.2 引物

5'端引物8种:P1: 5'-TGCCGAAGCTTTGG-TATG-3'; P2: 5'-GCTTCAGTGACTC CGAGAT-3'; P3: 5'-TCAGACATCAGCTCTACC-3'; P4: 5'-TCA-GACATCAGCTCTCCC-3'; P5: 5'-TGCCGAAGC TTTGGTAGC-3'; P6: 5'-GAGTCCTCCACGTG-3'; P7: 5'-GACTGTTACCATAGTAGTG-3'; P8: 5'-TGAAGTGGAGCTTGACTAG-3'。与3'端锚定引物: HT11G: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3', HT11C: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'和 HT11A: 5'-AAGCTTTT TTTTTTTA-3'配成24种引物组合。

收稿日期: 2004-01-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(TG2000016105)

作者简介: 王 慧(1963-),女,山东济南人,副教授,博士生,研究方向: 分子生物学研究

* 通讯作者: E-mail: changy@cau.edu.cn

1.3 总 RNA 的提取和纯化

按 TRIZOL kit (Invitrogen 公司) 的方法提取总 RNA, 参照 Liang^[5] 的方法除去 RNA 中的 DNA。将每组合 8 个个体的 RNA 等量混合, 构成 16 个试验鸡群的 RNA 池。

1.4 差异显示反转录 PCR (DDRT-PCR)

40 μ L 反转录体系中, 含有 0.4 μ g 池 RNA, 50 mmol/mL Tris-HCl (pH 8.3), 40 mmol/mL KCl, 7 mmol/mL MgCl₂, 10 mmol/mL DTT, 20 mmol dNTP, 200 pmol/mL 的 3' 端锚定引物。反转录程序: 65 $^{\circ}$ C 5 min 后冰上加入 100 U 的 M-MLV 反转录酶 (Promega), 37 $^{\circ}$ C 1 h, 75 $^{\circ}$ C 5 min。

反转录产物 cDNA 冻存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱, 或接着进行 mRNA 差异显示反应。20 μ L PCR 体系中含有: 10 mmol/mL Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/mL KCl, 1.5 mmol/mL MgCl₂, 20 mmol/mL dNTPs, 200 pmol/mL 3' 端锚定引物, 200 pmol/mL 5' 端引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶 (Promega)。2 μ L cDNA。反应程序: 1 个预扩增: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 42 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。RT-PCR 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (39:1) 电泳分离后, 银染法显色。

1.5 数据分析

记录差异显示片段的有无和强弱, 只统计分析那些能够重现的、分子量在 100~1400 bp 之间、清晰可辨的条带。利用 SAS 软件 (8.12 版), 分别将每种差异表达类型在 9 个杂种组合中检测到的次数

作为变量, 与相应组合 32 周龄产蛋数的杂种优势率 (H%) 进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 mRNA 差异显示结果

引物组合 P₁\HT₁₁G 在 9 个鸡群 32 周龄卵巢组织中的 mRNA 差异显示结果列于图 1。对 24 种引物组合的差异显示图谱进行统计分析。结果发现, 在 9 个组合鸡群 32 周龄的卵巢组织中, 24 种引物组合共扩增出 1572 条 cDNA 片段, 能够重现的有 1126 条, 重现率为 71.63%, 6 个杂交组合的差异表达片段数平均为 169.67 (15.07%)。每一组引物组合平均能显示出 7.07 条差异带。24 种引物组合在 6 个杂交组合中所显示出的差异带统计分析结果列于表 1。扩增出最多 cDNA 条带的引物组合并没有得到最高的差异率, 即引物的扩增带数与差异率之间没有相关性。

2.2 杂种与亲本纯种间的基因差异表达模式

从 24 种引物组合的差异显示结果中可见: 在纯种与杂种间存在显著的质和量的基因表达差异。根据差异显示条带的“强与弱”或“有与无”的差别, 将其分为 7 种基因差异表达模式:

(1) 杂种超亲表达型 (P₁=22.29%), 即在杂种中的表达量超过 2 个亲本纯种中的表达; (2) 杂种特异表达型 (P₂=9.84%), 基因仅在杂种中表达而 2 个亲本纯种均不表达; (3) 杂种减弱表达型 (P₃=9.85%), 即在杂种中的表达量弱于 2 个亲本纯种; (4) 杂种沉默表达型 (P₄=3.42%), 即在杂种中不

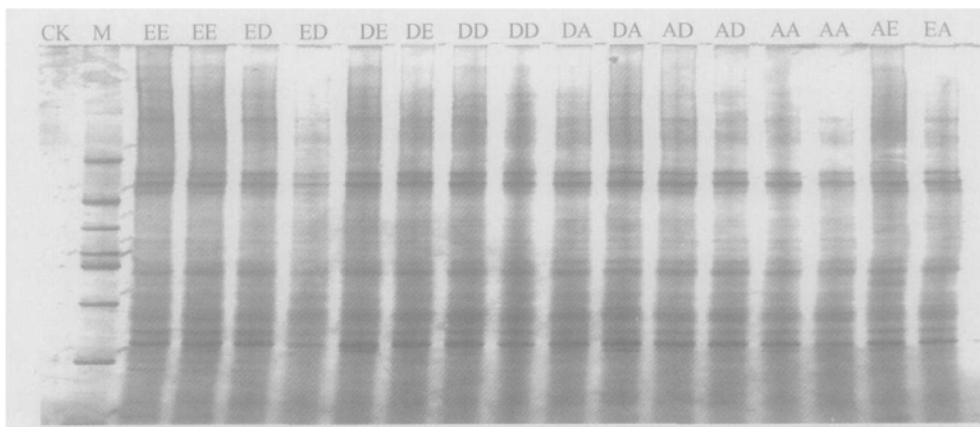


图 1 引物组合 P₁\HT₁₁G 对各组合鸡群 32 周龄卵巢组织的 mRNA 差异显示电泳图谱

Fig. 1 mRNA differential display profiles in ovary from 6 cross combinations of 32 week-old chicken

M. 100 bp 分子量 ladder; CK. 阴性对照;

Primers. P₁\HT₁₁G; M. 100 bp molecular ladder; CK. Negative control

表 1 32 周龄鸡卵巢组织的基因差异表达模式及其差异带百分率

Table 1 Percentage and patterns of gene expression between crossbreed and purebred in 32 week old ovary tissue of chicken %

杂交组合	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	H
AE	23.16	6.21	12.43	3.95	24.29	23.73	6.21	24.7
EA	20.69	19.31	6.90	2.76	19.31	25.52	5.52	13.4
DE	24.00	4.19	13.09	4.71	21.47	23.56	8.90	31.9
ED	23.66	5.91	12.37	2.15	23.66	28.49	3.76	27.5
AD	24.36	16.67	4.49	3.85	21.15	23.08	6.41	15.6
DA	17.79	6.75	9.82	3.07	27.61	30.06	4.91	17.2
平均	22.29	9.84	9.85	3.42	22.91	25.74	5.95	21.7

表中 P1~7 表示 7 类差异表达模式; H 表示杂种优势率; AE~DA 分别表示 6 个杂交组合

表达,而在 2 个亲本纯种中均表达; (5) 单亲特异表达型(P5= 22.91%), 即仅在 1 个亲本纯种中表达,而杂种及另 1 个亲本纯种均不表达; (6) 单亲显性表达型(P6= 25.74%), 即在杂种及 1 个亲本纯种中均表达,而另 1 个亲本纯种不表达; (7) 共显性表达型(P7= 5.95%), 即杂种中的表达量弱于强的亲本,强于弱的亲本。其中, P1、P3 和 P7 属于量的表达差异,表现为条带的强与弱的差别; P2、P4、P5 和 P6 属于质的表达差异,表现为有或无的差别。

2.3 杂种与亲本纯种差异表达片段和杂种优势的统计结果比较

24 种引物组合在 6 个杂种鸡群卵巢组织中检测出的 7 类差异表达模式所拥有的差异带比例见表 1。从表 1 可以看出, 7 类差异表达模式中, 杂种沉默表达型(P4) 所占比例最少, 平均为 3.42%; 其次为共显性表达模式(P7) 平均为 5.95%; 而单亲显性表达模式(P6) 最多, 平均为 25.74%, 其次为单亲特异表达模式, 平均为 22.91%。6 个杂交组合的 32 周龄产蛋数的杂种优势率有较大差异, 以 DE、ED 和 AE 杂交组合最高, 分别为 31.9%、27.5% 和 24.7% (见表 1), 说明 2 个有较大差异的鸡品种之间杂交, 对于鸡的产蛋性状等低遗传力性状的杂种优势的产生极为有利。

2.4 差异表达模式与鸡产蛋数杂种优势率的相关性分析

利用 SAS 软件包(8.12 版), 对 7 类差异表达模式与 32 周龄产蛋数杂种优势率的相关性进行统

计分析, 相关分析结果如表 2 所示。

表 2 32 周龄鸡卵巢组织的 7 类差异表达模式与产蛋数杂种优势率的相关分析

Table 2 Correlation analysis results between heterosis percentage of egg number and differential expression patterns in 32 week old ovary tissue of chicken

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
0.52467	-0.83262	0.87396	0.34681	0.12230	-0.12710	0.36952
0.2852	0.0397	0.0228	0.5006	0.8175	0.8104	0.4705

从表 2 可以看出, 32 周龄鸡产蛋量的杂种优势率(H) 与 32 周龄鸡卵巢组织的杂种基因特异表达模式(P2) 呈显著负相关($P < 0.05$); 而与杂种减弱表达模式 P3($P < 0.05$) 呈显著正相关; 与其它 5 种差异表达模式的相关不显著。

3 讨论

3.1 鸡产蛋数的杂种优势率与差异表达基因

为探索杂种优势的遗传机理, 本研究专门设计组建了 3×3 全双列杂交组合试验, 对 9 个组合鸡群的产蛋数记录结果的统计分析发现: 6 个杂交组合都表现出了较高的杂种优势率, 尤其是农大褐(DD) 与白洛克肉鸡(EE) 的杂交组合 DE 和白莱航(AA) 与 EE 的杂交组合 AE, 其 32 周龄产蛋数的杂种优势率高达 31.9% 和 24.7%。

本研究通过使用筛选出的 24 种引物组合对 9 个组合试验鸡群的差异显示研究发现, 在 1572 条 cDNA 片段中能够重现的有 1126 条, 重现率为 71.63%, 说明我们的 DDRT-PCR 扩增条件是较为严谨的, 结果是可靠的。6 个杂交组合的差异表达片段数平均为 169.67, 占总条带数的比例为 15.07%。说明杂种一代的基因无论是在质上还是在量上, 都发生了不同于亲本的变化。

对于杂种来说, 其全部基因都来自于双亲, 在基因组成上并没有任何超越其杂交亲本的新基因引入, 但是杂种鸡在产蛋数上却明显地不同于其亲本, 表现出较高的杂种优势率。任何性状的表达都是受相关基因控制的, 鸡的产蛋性能杂种优势的形成必然与杂种中发生了表达变化的基因有关。虽然目前的研究还不能直观地确定这些在表达上发生了变化的基因与杂种表型变化的直接关系, 但有一点是肯定的, 即杂种优势的产生必然与这些在杂种子一代

体内发生了表达变化的基因存在着某种内在的联系^[9,10],深入研究这些发生了表达变化的基因则有望揭示出一些与杂种优势的遗传机理有关的信息^[11,12]。目前,我们正在对这些差异表达的基因进行回收、克隆、测序和进一步深入研究。

3.2 鸡产蛋数的杂种优势率与基因的差异表达模式

通过对3个纯种鸡群和6个正反杂交试验鸡群产蛋高峰期(32周龄)卵巢组织的差异显示研究发现:与亲本相比,杂种一代的基因存在着超亲表达、特异表达、减弱表达、沉默表达等多种明显的质和量的差异表达模式,这说明2个亲本基因系统在杂种体内这一新的遗传背景下,表达调控方式发生了明显的变化。

通过对杂种超亲表达、杂种特异表达、杂种减弱表达、杂种沉默表达、单亲特异表达、杂种与单亲一致型表达和共显性表达这7种差异表达模式与鸡的产蛋性状杂种优势率的相关性分析发现,32周龄产蛋量的杂种优势率与32周龄卵巢组织的杂种特异表达模式呈显著的负相关性($P < 0.05$);与杂种减弱表达模式存在显著的正相关性($P < 0.05$);而与其余5种表达模式都没有显著的相关性。这一结果说明了一种趋势,即在杂种中特异表达的基因对鸡的32周龄产蛋数的杂种优势率有负向作用,即杂种中特异表达的基因愈少,杂种优势率愈高;在杂种中减弱表达的基因对鸡的32周龄产蛋数的杂种优势率有正向作用,亦即杂种中减弱表达的基因愈多,杂种优势率愈高。分析其中的原因,可能是由于杂种中特异表达的基因对产蛋性状的杂种优势有下调作用;而杂种中减弱表达的基因对产蛋性状杂种优势的形成有上调作用。

对于杂种超亲表达、沉默表达、单亲特异表达、单亲显性表达和共显性表达模式,在总体上看与鸡的产蛋性能间没有显著相关性,它们可能只影响产蛋性能之外的其它性状表现;或者,从表面上看它们似乎对鸡的32周龄产蛋数的杂种优势率没有显著作用,但实际上却不能排除这些模式中某些特殊基因的表达变化会对杂种优势有重大影响;另一方面,在杂种优势的形成过程中可能要涉及到一些基因表达的增强而同时另一些基因的表达要受到抑制。也就是说,增强表达的基因和受抑制的基因要同时存在才能促使杂种优势的形成。由此推断,不同表达

模式彼此之间对杂种优势的形成可能有正协同作用,也可能有负协同作用,如果两种作用相互抵消,那么在总体上就可能表现不出相关性。

参考文献:

- [1] Haberfeld A, Dunnington E A, Siegel P B, et al. Heterosis and DNA fingerprinting in chickens [J]. *Poult Sci*, 1996, 75 (8) : 951~ 953.
- [2] Tian Zeng-Yuan, Dai Jing-Rui. Relationship between differential gene expression patterns in functional leaves of maize inbreds & hybrids at spikelet differentiation stage and heterosis [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30 (2) : 154~ 162.
- [3] Zhu Yingguo. *Biology of Cytoplasmic male sterility in rice* [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2000, 485.
- [4] Tsafaris S A. Molecular aspects of heterosis in plants [J]. *Physiol Plant*, 1995, 94: 362~ 370.
- [5] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, 257: 967~ 971.
- [6] Cheng Ninghui, Yang Jinshui, Gao Yanping, et al. Alteration of gene expression in maize hybrid F₁ and its parents [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41: 451~ 454.
- [7] 程宁辉, 高燕萍, 杨金水, 等. 水稻杂种一代与亲本幼苗基因差异表达的分析 [J]. *植物学报*, 1997, 39(4) : 379 ~ 382.
- [8] Xiong L Z, Yang G P, Xu C G, et al. Relationships of differential gene expression in leaves with heterosis and heterozygosity in a rice diallel cross [J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 129~ 136.
- [9] Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers [J]. *Genetics*, 1992, 312: 823~ 839.
- [10] Romagnoli S, Maddaloni M, Livini C, et al. Relationship between gene expression and hybrid vigor in primary root tips of young maize (*Zea mays* L.) plantlets [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 767~ 775.
- [11] Damerat C, Hebert Y, de Vienne D. Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 552~ 560.
- [12] 吴利民, 倪中福, 孙其信, 等. 小麦杂种及其亲本苗期叶片家族基因差异表达及其与杂种优势关系的初步研究 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(3) : 256~ 266.

Relationship between Differential Gene Expression Patterns in Chicken Ovary and Heterosis of Egg Number in a Chicken Diallel Cross

WANG Hui^{1,2}, ZHANG Yuan^{1*}, SUN Dong-Xiao¹, YU Ying¹

(1. College of Animal Science & Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science & Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: In order to understand the molecular basis of chicken heterosis, mRNA differential display method was used to analyze the differential gene expression of ovary tissue between hybrids and their parental lines in a 3×3 diallel cross involving 3 chicken breeds, which were White Plymouth Rock (EE), CAU Brown (DD) and White Leghorn (AA). Only bands that can be repeated in duplicate DDRT-PCR amplification were used for statistic analysis. Our results showed that differences of gene expression between hybrids and their parent lines were very obvious both in quantitative and qualitative. By using 24 pairs of primer combination, a total of 1 572 bands were displayed, and 71.63% (1 126 out of 1 572) can be repeated. The average differential expression band of 6 hybrids is 169.67 (15.07%), which were grouped into seven types of differential expression patterns: Over-expression of parental fragments in hybrids (P1= 22.29%), hybrid-specific expressed fragments (P2= 9.84%), Under-expression of parental fragments in hybrids (P3= 9.85%), hybrid-absence expressed fragments (P4= 3.42%), parent-specific expressed fragments (P5= 22.91%), Dominant expression fragments of single parent in hybrids (P6= 25.74%), Co-dominance expressed fragments (P7= 5.95%). Correlation analysis indicated that there are significant negative correlation or significant correlation between the pattern of P2 or the pattern of P3 and heterosis percentage of 32 week-old egg number, which indicates that hybrid-specific expressed fragments or Under-expression of parental fragments in hybrids are likely to restrain or strengthen the heterosis forming of 32 week-old egg number.

Key words: chicken; production performance; heterosis; ovary; mRNA differential display; differential expression patterns

* Corresponding author

会 讯

中国畜牧兽医学会中兽医学分会 2005 年学术年会暨全国会员代表大会定于 2005 年 8 月 13-16 日在兰州市召开。

中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第六次学术研讨会将于 2005 年 5 月在南京市召开。

中国畜牧兽医学会口蹄疫学分会第十次学术研讨会定于 2005 年 9 月 15-18 日在成都市召开。