

利用抑制消减杂交技术筛选 鹅就巢行为相关基因

郭 军¹, 汤青萍¹, 章双杰¹, 马月辉², 陆火林³, 苏建东³, 邹剑敏¹, 陈宽维¹, 李慧芳^{1*}

(1. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;

3. 江苏省苏州市乡韵太湖鹅有限公司, 苏州 215111)

摘 要: 旨在利用抑制消减杂交技术构建鹅就巢与产蛋 cDNA 基因文库, 筛选就巢母鹅上调与下调表达的基因。以就巢期和产蛋期鹅卵巢组织互为检测子和驱动子, 进行正反双向消减杂交, 获得鹅卵巢差异表达基因文库。从双向文库随机挑选单菌落进行 PCR 验证, 结果表明文库质量良好。选取 654 个阳性克隆进行测序分析, 获得 641 条表达序列标签(ESTs)。对 ESTs 进行去除载体序列、质量检测、聚类及拼接, 经 BLASTn 比对, 有 166 条 ESTs 找到与之匹配的同源序列, 其中 92 个是功能基因。比较就巢与产蛋 SSH 文库, 发现就巢 SSH 库中参与细胞凋亡、信号转导及细胞结构的基因出现频率较高; 产蛋特异性基因文库中参与物质能量代谢、细胞防御的基因较多; 尚有许多差异片段属于未知功能蛋白或理论推定蛋白。结果提示, 催乳素受体、抗苗勒管激素以及雌激素受体基因在就巢期上调表达可能与鹅就巢行为的启动与维持有关。该结果为进一步研究鹅就巢行为分子调控机制奠定基础。

关键词: 鹅; 就巢行为; 卵巢; 抑制消减杂交技术; 表达序列标签

中图分类号: S835; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1477-08

Identification of Broodiness-Related Geese Genes by Suppression Subtractive Hybridization

GUO Jun¹, TANG Qing-ping¹, ZHANG Shuang-jie¹, MA Yue-hui²,

LU Huo-lin³, SU Jian-dong³, ZOU Jian-min¹, CHEN Kuan-wei¹, LI Hui-fang^{1*}

(1. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

3. Xiangyun Taihue Ltd., Suzhou 215111, China)

Abstract: The aim of this study was to construct broodiness and laying geese cDNA libraries with SSH, and to identify differentially expressed genes between laying and broody phases. Ovary in broody and laying phases was ascribed to tester and driver for reciprocal SSH procedures. cDNA libraries of specifically or highly expressed genes in broodiness and laying were obtained after two-step hybridization. Positive clones from libraries were randomly selected to validate with PCR. Sequently, 654 positive clones were selected to sequence, qualify, cluster, assemble and compare in GenBank using BLASTn. 166 differentially expressed gene fragments from two libraries showed homology to other known sequences, including 92 functional genes. The expression profiles showed some broodiness-specified genes involved in apoptosis, cell component, hormones-related signal transduction, and some genes involved in metabolism and cell defense in the laying-specified genes library; some ESTs belonged to unknown or hypothetical protein. The result indicate that three genes (prolactin receptor, estrogen receptor α and anti-mullerian hormone

收稿日期: 2010-08-05

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B08); 江苏支撑计划(BE2010370); 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-42-G1)

作者简介: 郭 军(1971-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种研究, Tel: 0514-85202419, E-mail: guojun71@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 李慧芳, 副研究员, Tel: 0514-87233488, E-mail: feixiong@yzu.edu.cn

receptor II) in broodiness-specified library are associated to trigger or maintain broodiness in geese based on biological function and signal transduction. The result provide the basis for future revealing the mechanism on broody behavior.

Key words: geese; broodiness; ovary; SSH; ESTs

禽类就巢行为受内分泌系统调控,卵巢在其间发挥重要作用。早在 1935 年 Riddle 等^[1]曾做出总结:(1) 就巢行为仅出现在母禽开产之后;(2) 母禽只有在卵巢完全萎缩、卵泡停止发育之后,才能进入完整持久的就巢状态。去除卵巢之后,雌性火鸡不再就巢或恋巢,血液催乳素浓度也不再升高。El Halawani 等^[2]用雌二醇、孕酮处理切除卵巢的火鸡,成功诱导出恋巢行为。然而,卵巢激素,包括雌二醇、孕酮以及睾酮,在就巢前后并没有像催乳素一样表现出急剧升高。因而,笔者认为可能存在非生殖激素依赖途径启动禽类就巢行为,分析卵巢组织差异表达谱可能为正确解析母鹅就巢行为调控机制提供新的信息。

本研究以皖西白鹅卵巢组织作为试验材料,用抑制性消减杂交技术构建了就巢期与产蛋期卵巢组织差异表达基因的 cDNA 文库,为从分子水平研究就巢行为发生机制提供线索。研究结果显示,雌激素受体 α 、催乳素受体以及 II 型抗苗勒管激素受体在就巢期间高水平表达。

1 材料与方法

1.1 试验材料

皖西白鹅由苏州乡韵太湖鹅有限公司提供。所有个体均同期出雏,采用常规饲养管理方式。产蛋鹅的确定:连续观察 1 周,母鹅无恋巢、就巢行为,有产蛋记录;指压母鹅阴道附近有蛋感;解剖后卵巢正常发育,有排卵前卵泡。就巢鹅的确定:母鹅胸腹部有孵育斑,母鹅进食减少,体质量减轻,长期驻留巢内,解剖后卵巢萎缩。选取就巢期及产蛋期母鹅各 3 只,屠宰后去除卵黄及卵泡液,DEPC 处理水冲洗后存储于百泰克 RNAfixer 溶液中, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 mRNA 的分离和提取

总 RNA 的提取使用 Invitrogen 公司 Trizol 试剂。取 50~100 mg 组织,按照 Trizol 说明书操作,最后一步用 50 μL TE 缓冲液溶解 RNA;使用 TaKaRa 公司 DNaseI 进行 DNA 消化,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量,最后得到的总 RNA 保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 SSH cDNA 文库的构建

依照 Clontech 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 说明进行 SSH 建库操作。以就巢鹅的卵巢组织为检测子(Tester)、产蛋鹅的卵巢组织为驱动子(Driver)构建就巢期特异表达基因的 cDNA 文库,以下称为正向库;以产蛋鹅的卵巢组织为检测子、就巢鹅的卵巢组织为驱动子,构建产蛋期特异表达基因的 cDNA 文库,以下称为反向库。将分离、纯化后的 mRNA 进行反转录,得到双链 cDNA,用 *Rsa* I 对双链 cDNA 进行酶切,在 Tester 两端加上接头 1 和接头 2R,进行 2 次消减和 2 次 PCR 扩增,富集差异表达基因。SSH 产物与 pMD18-T 载体连接,然后转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,涂于含有 X-gal/IPTG 的 LB 培养基上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,随机挑取白色克隆,利用 M13 引物检测目的片段的插入情况,构成相应的 SSH 菌落文库。

1.4 差异表达基因的测序及序列分析

1.4.1 序列前处理和聚类拼接 将测序后的数据进行前处理。首先利用 BioEdit 软件多重比对后去除载体和巢式 PCR 引物序列,再利用 RepBase (<http://www.girinst.org>) 去除重复和低质量序列。将前处理后的序列进行 EST Cluster 分析。

1.4.2 序列分析 将所有序列在 NCBI 上进行 BLASTn 同源性比对,并且利用 KEGG 和 uniProt 进行功能分类。经查询 GenBank,将差异表达基因转换成人类基因标准名称或登录号,然后在 GeneMANIA 网站进行调控网络分析^[3]。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

经纯度、浓度检测,RNA 的质量符合试验标准。就巢样品 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.88,产蛋样品 RNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.84,两者均在 1.8~2.0 之间。1% 琼脂糖凝胶电泳检测表明 RNA 完整性较好,带形清晰,28S rRNA 与 18S rRNA 的亮度比值约为 2:1,表明所提 RNA 基本没有被降解,符合文库构建要求(图略)。

2.2 抑制性消减杂交结果分析

将抑制性消减杂交产物进行 2 次 PCR 扩增。第 1 次 PCR 以 Primer-1 为引物。第 2 次 PCR 以 Nest PCR Primer-1 和 Nest PCR Primer-2R 为引物。第 2 次扩增产物进行纯化回收和消减效果验证。如图 1 所示,正向文库和反向文库的 cDNA 条带弥散程度差距较大,证明消减的效果较好。

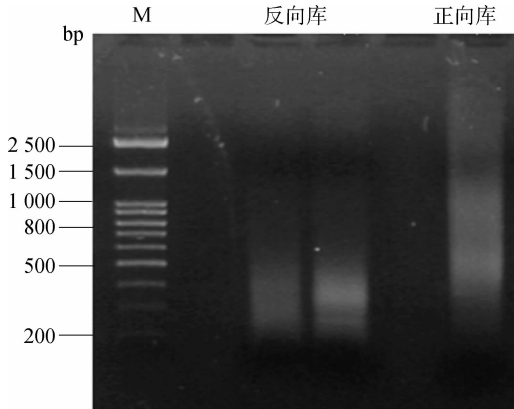


图 1 消减后第 2 次扩增

Fig. 1 Products of the second selected-PCR

2.3 差异表达 cDNA 文库的 PCR 检验

随机挑取阳性克隆进行 PCR 检测。图 2 为正向消减文库部分克隆 PCR 产物电泳图,其扩增片段为 200~800 bp,且多数在 300 bp 以上;图 3 为反向消减文库部分克隆 PCR 产物电泳图,其扩增片段为 100~400 bp,且多数在 200 bp 左右。

2.4 ESTs 序列分析

从正、反向文库各随机选择 352 和 302 个阳性克隆,进行测序。去除长度小于 100 bp 的 ESTs,再去掉低质量及重复序列后,利用 NCBI 数据库进行 BLASTn 比对。当筛选到 E 值小于 $1E-5$ 的片段视为功能已知基因。结果从正向文库获得 62 条功能基因片段,反向文库获得 30 条(表 1)。然后,进行功能注释和聚类分析。从已定位 ESTs 数目看,正向库上调表达的基因要多于反向库(图 4)。依据注释结果与相关研究,初步推断抗苗勒管激素受体 2、催乳素受体以及雌激素受体 1 与鹅就巢行为相关。

2.5 差异表达基因调控网络分析

应用全局网络距离方法,构建了就巢特异性差异表达基因产物调控网络(图 6)。据生物软件预测,绝大多数差异表达基因存在物理相互作用。一些基因(如白色圆圈显示)本应出现在网络中,但由于系统误差或偶然误差,没有在检测结果显现,生物

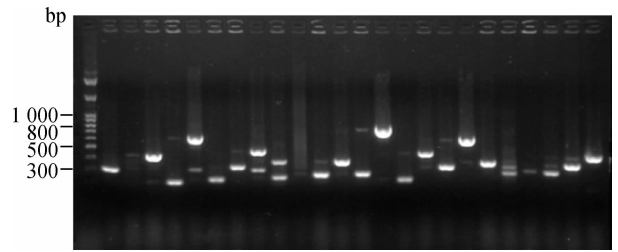


图 2 正向消减文库部分克隆的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of positive clones from the forward cDNA library

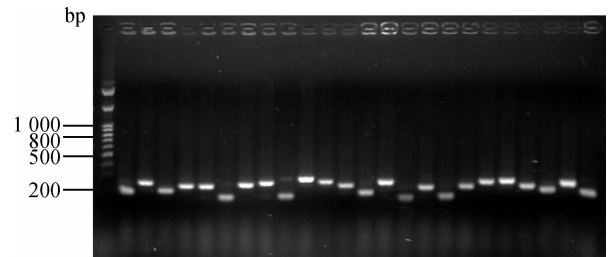


图 3 反向消减文库部分克隆的 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of positive clones from the reverse cDNA library

软件依据数据库统计结果将这些基因产物补齐。位于调控网络中心的是一些转录因子或者转录辅助因子,如 MED 家族、核受体家族,或许是因为这些蛋白质参与多种生理调控。许多与细胞凋亡、骨架构建有关的基因也出现网络中心,这与就巢母鹅卵巢出现萎缩相符。

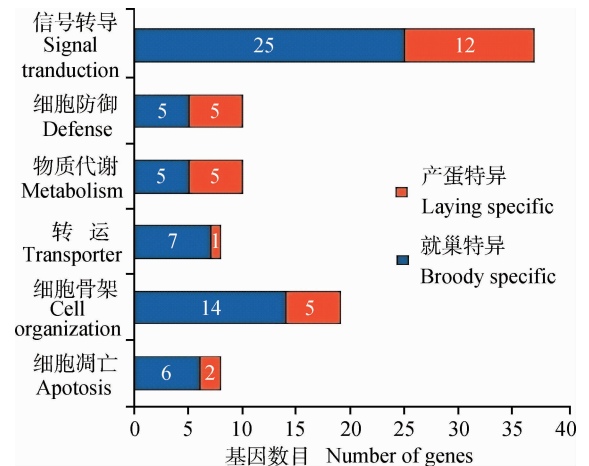


图 4 抑制性消减杂交筛选的 ESTs 功能分类

Fig. 4 Functional clusters of ESTs from cDNA libraries

表 1 产蛋特异性文库中的 EST 与 GenBank 功能已知基因相似性比较

Table 1 Similarity analysis between SSH ESTs in laying phase and the function identified genes in GenBank

功能 Function	GenBank 登录号 Accession No.	可能基因 Potential gene	种属 Species	E 值 E-value
细胞防御	DQ888644.1	Toll 样受体 7 (TLR7)	<i>Anas platyrhynchos</i>	1E-22
	AM931037.1	白介素 7 (IL7)	<i>Gallus gallus</i>	5E-06
	AB078925.1	白介素 1 受体(IL1RL1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-15
	DQ917574.1	树枝状细胞免疫受体(DCIR)	<i>Anas platyrhynchos</i>	2E-48
	AY333299	Pema-cathepsin S(CTSS)	<i>Petromyzon marinus</i>	4E-06
转运蛋白	S73733	乙酰辅酶 A 结合蛋白(DBI)	<i>Anas platyrhynchos</i>	4E-19
细胞凋亡	NG_011698.1	WW domain containing oxidoreductase (WWOX)	<i>Homo sapiens</i>	3E-21
物质代谢	AF469049.1	半胱氨酸蛋白酶 6 (CASP6)	<i>Gallus gallus</i>	1E-30
	XM_418973.2	NADH 脱氢酶(NQO2)	<i>Gallus gallus</i>	6E-40
	NM_001039303.1	Methylenetetrahydrofolate 脱氢酶 (MTHFD1)	<i>Gallus gallus</i>	2E-50
	NC_011196	线粒体基因组 (mtDNA)	<i>Anser anser</i>	0E+00
	XM_002721825	细胞色素酶 C 亚基 Vic(COX6C)	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1E-05
	AY255690.1	芳乙酰胺 N-乙酰转移酶(AANAT)	<i>Nyctidromus albigollis</i>	2E-06
信号转导	XM_001234939.1	Putative Listeria-induced protein (TNIP3)	<i>Gallus gallus</i>	3E-35
	BC017340.2	丝氨酸/苏氨酸激酶 35 (STK35)	<i>Homo sapiens</i>	1E-05
	XM_414907.2	PI-3-激酶相关激酶类似物(Smg1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-81
	NM_205139.1	SWI/SNF related (SMARCA2)	<i>Gallus gallus</i>	3E-81
	AF355752.1	逆转录酶 (rt)	<i>Chelonia mydas</i>	6E-29
	NM_001128622.1	RAN 结合蛋白 9 (RANBP9)	<i>Xenopus laevis</i>	1E-05
	NM_021366.3	Krueppel 类似因子 13 (KLF13)	<i>Mus musculus</i>	1E-05
	XM_001084640.2	Krueppel 类似因子 12 (KLF12)	<i>Macaca mulatta</i>	1E-06
	EU739365.1	纤维蛋白原 beta 链(FGB)	<i>Anser erythropus</i>	3E-101
	AY519500.1	CNR /Pcdh-alpha gene cluster (CNR)	<i>Gallus gallus</i>	6E-23
	AY035224.1	心肌因子 1 (CENPF)	<i>Gallus gallus</i>	6E-17
	NM_001004859.1	钙离子结合蛋白 P22 (CHP)	<i>Xenopus tropicalis</i>	1E-05
细胞骨架	XM_419708.2	过氧化物生成因子 3 (PEX3)	<i>Gallus gallus</i>	3E-36
	L22148.1	Pol 样蛋白(Nynrin)	<i>Gallus gallus</i>	1E-19
	XM_002198172.1	Mucin5B (MUC5B)	<i>Taeniopygia guttata</i>	5E-18
	BC058355.1	MAP/微管蛋白亲和调节激酶 4 (MARK4)	<i>Mus musculus</i>	1E-05
	XM_418282	中心体关联蛋白 1 类似物 (CSPP1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-17

表 2 就巢特异性文库中的 EST 与 GenBank 功能已知基因相似性比较

Table 2 Similarity analysis between SSH ESTs in broody phase and the function identified genes in GenBank

功能 Function	GenBank 登录号 Accession No.	可能基因 Potential gene	种属 Species	E 值 E-value
细胞防御	NM_001012938.1	锌指 CCCH 型抗病毒蛋白 1 (ZC3HAV1)	<i>Gallus gallus</i>	1E-16
	AF378702.1	T 细胞受体 gamma (TRG)	<i>Anas platyrhynchos</i>	1E-11
	FJ477859.1	Toll 样受体 1 beta 型 (TLR1)	<i>Anas platyrhynchos</i>	4E-7
	AF405540.1	溶菌酶 (LYZ)	<i>Gallus gallus</i>	2E-17
	NM_001039599.1	Collectin 家族成员 12 (COLEC12)	<i>Gallus gallus</i>	3E-97
转运蛋白	AL033522.1	Vps20-associated 1 homolog (VTA1)	<i>Human</i>	3E-111
	NG_008489.1	水溶载体家族 26(SLC26A4)	<i>Homo sapiens</i>	3E-29
	XM_418937	核孔蛋白 153 (NUP153)	<i>Gallus gallus</i>	9E-80
	NM_204970.1	IGF2 受体 (IGF2R)	<i>Gallus gallus</i>	4E-46
	NM_001030615.1	网格蛋白相关因子 1 (CLINT1)	<i>Gallus gallus</i>	4E-39
	XM_422754.2	ABC 转运蛋白 C5 (ABCC5)	<i>Gallus gallus</i>	4E-134
	AY207008.1	ABC 转运蛋白 C5 (ABCC4)	<i>Homo sapiens</i>	3E-118
细胞凋亡	NM_001162372.1	p21-激活激酶 1 (PAK1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-15
	AF325340.1	Macrophin 1 isoforms (MACF1)	<i>Homo sapiens</i>	1E-38
	AF311289.1	Apoptosis inhibitor (ch-API1)	<i>Gallus gallus</i>	1E-32
	HM015593.1	碱性成纤维细胞生长因子 (FGF2)	<i>Homo sapiens</i>	5E-42
	NG_007497.1	半胱氨酸蛋白酶 8 (CASP8)	<i>Homo sapiens</i>	5E-125
	AY589040.1	Breast cancer type 1 factor (BRCA1)	<i>Pongo pygmaeus</i>	2E-40
物质代谢	XM_002199620.1	RNA binding motif protein 26 (RBM26)	<i>Taeniopygia guttata</i>	1E-103
	DQ888644.1	磷酸核糖焦磷酸合酶 2 (PRPS2)	<i>Anas platyrhynchos</i>	5E-58
	L21171.1	Malonyl CoA decarboxylase (MLYCD)	<i>Anser anser</i>	4E-51
	NM_001006556.1	GMP 合成酶(GMPS)	<i>Gallus gallus</i>	6E-59
	NM_204322.1	甘氨酸脱氢酶 (GLDC)	<i>Gallus gallus</i>	7E-50
信号转导	BC028136.1	锌指蛋白 34 (ZNF34)	<i>Homo sapiens</i>	1E-7
	NG_011835.1	硫氧还蛋白还原酶 2 (TXNRD2)	<i>Homo sapiens</i>	3E-39
	XM_422763.2	Sentrin 特异性肽酶 5 (SENP5)	<i>Gallus gallus</i>	1E-172
	XM_422162.2	RAP1 interacting factor homolog(RIF1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-15
	AY547323.1	催乳素受体 (PRLR)	<i>Gallus gallus</i>	3E-20
	XM_416460.2	Similar to gamma-parvin (PARVG)	<i>Gallus gallus</i>	9E-28
	NG_008288.1	p21-激活激酶 3 (PAK3)	<i>Homo sapiens</i>	3E-9
	XM_423839.2	Nucleoredoxin (NXN)	<i>Nallus gallus</i>	2E-9

(转下页 Carried forward)

(续表 2 Continued)

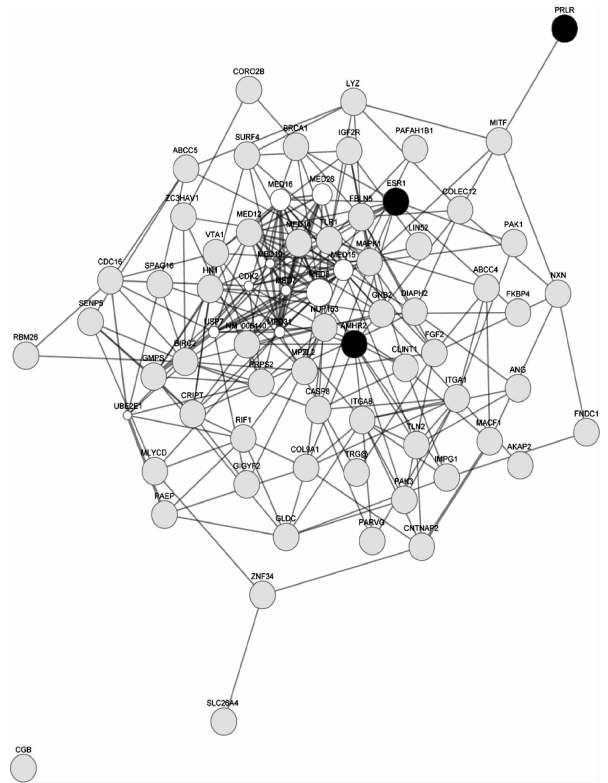
功能 Function	GenBank 登录号 Accession No.	可能基因 Potential gene	种属 Species	E 值 E-value
	NG_011631.1	小眼畸形相关转录因子 (MITF)	<i>Homo sapiens</i>	1E-54
	NG_016325.1	Mediator complex subunit 14 (MED14)	<i>Homo sapiens</i>	4E-7
	NG_012808.1	Mediator complex subunit 12 (MED12)	<i>Homo sapiens</i>	1E-11
	NG_023054.1	丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)	<i>Homo sapiens</i>	5E-42
	NM_001007937.1	Lin-52 homolog (LIN52)	<i>Gallus gallus</i>	7E-39
	NM_001204217	激酶 A 锚定蛋白 2 (AKAP2)	<i>Gallus gallus</i>	3E-8
	AY371697.2	整合素 alpha 8 (ITGA8)	<i>Homo sapiens</i>	9E-10
	AB000471.1	整合素 alpha 1 (ITGA1)	<i>Gallus gallus</i>	3E-54
信号转导	AF266847.1	雄激素调节蛋白 2 (HN1 or ARM2)	<i>Homo sapiens</i>	4E-43
	NM_031037.2	G 蛋白 β (Gnb2)	<i>Rattus norvegicus</i>	1E-5
	BC008072.2	GRB10 interacting GYF protein 2 (GIGYF2)	<i>Homo sapiens</i>	1E-6
	XM_419627.2	纤维连接蛋白 III (FNDC1)	<i>Allus gallus</i>	1E-6
	AB307713.1	雌激素受体 1 (ESR1)	<i>Homo sapiens</i>	4E-113
	NG_008433.1	Diaphanous homolog 2 (DIAPH2)	<i>Homo sapiens</i>	3E-13
	NM_001193337.1	Contactin 相关蛋白 2 (CNTNAP2)	<i>Taeniopygia guttata</i>	5E-52
	AY599074.1	Cell division cycle 16 homolog (CDC16)	<i>Homo sapiens</i>	1E-10
	NG_015981.1	II 型抗苗勒管激素受体 (AMHR2)	<i>Homo sapiens</i>	4E-57
	XR_026959.1	踝蛋白 2 (TLN2)	<i>Gallus gallus</i>	6E-134
	NM_204355.1	Surfeit 4 (SURF4)	<i>Gallus gallus</i>	1E-100
	XM_421865.2	精子相关抗原 16 (SPAG16)	<i>Gallus gallus</i>	2E-22
	NG_009799.1	脂蛋白相关磷脂 A1b (PAFAH1B1)	<i>Homo sapiens</i>	1E-38
	NM_002571.2	孕激素相关子宫内膜蛋白 (PAEP)	<i>Homo sapiens</i>	5E-125
	XM_002189519.1	Myelin protein zero-like protein 2 (MPZL2)	<i>Taeniopygia guttata</i>	4E-31
细胞骨架	NM_204241.1	Interphotoreceptor matrix(IMP1)	<i>Gallus gallus</i>	4E-54
	NM_002014.3	FK506 binding protein 4 (FKBP4)	<i>Homo sapiens</i>	4E-99
	AF112153.1	EGF 样蛋白 (FBLN5)	<i>Rattus norvegicus</i>	2E-10
	XM_002196836.1	Cysteine-rich PDZ-binding protein (CRIPT)	<i>Taeniopygia guttata</i>	4E-19
	XR_026909.1	Actin 结合蛋白 2B (CORO2B)	<i>Gallus gallus</i>	3E-10
	NM_001100911.1	9 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 亚基 (COL9A1)	<i>Gallus gallus</i>	9E-6
	NM_001173671.1	促性腺激素 beta2 亚基(Gthb2)	<i>Salmo salar</i>	5E-6
	X61192.1	核酶 A (ANG)	<i>Gallus gallus</i>	3E-15

3 讨 论

雌激素受体在就巢期间上调表达,推测雌激素受体可能参与鹅就巢行为的调控过程。Bailey 等发现随着雌激素浓度升高孵育斑开始形成,而孵育斑是禽类启动就巢的特征之一^[3-4]。Cogger 等发现火鸡就巢期间孕激素及雌激素都逐渐升高^[5]。雌激素通过其受体发挥生物学功能,雌激素受体是调控催乳素(Prolactin, PRL)分泌的重要因子,而催乳素是影响家禽就巢行为的关键因素。雌激素可以刺激垂体催乳素细胞(Lactotroph)增殖、生长^[6]。在雌性动物上这种作用表现更显著,孕期及滤泡期雌性动物分泌较多的雌激素,此时催乳素细胞瞬时增加^[7]。催乳素基因调控区只有 1 个 ERE,位于远端增强子区域内,紧邻 Pit-1 位点,在转录起始位点上游 1.5 kb 处。雌激素与 Pit-1 协同作用,促使催乳素基因瞬时高水平表达^[8-9]。雌激素可以部分抵消下丘脑对催乳素的抑制作用。雌激素可以降低下丘脑-垂体门脉血中多巴胺的浓度,雌性动物排卵前门脉中的多巴胺也减少,这 2 种情况下都会观察到催乳素升高。

笔者在就巢母鹅卵巢发现催乳素受体特异性上调表达,进一步证明催乳素是维持禽类就巢的关键因素。研究发现,大多数禽类,如企鹅、信天翁、塘鹅、天鹅、黑鸡鸕、鹑、澳洲鸚鵡、金丝雀、八哥、麻雀、松鸦等,在表现就巢行为时体内催乳素含量显著升高^[10]。一些环境因素,如巢、卵以及同伴的刺激,诱导母禽提高血液催乳素浓度。移除这些就巢刺激因素,将导致就巢母禽血液催乳素降低,继而终止就巢^[11-13]。Wong 等人发现,就巢时的催乳素升高和注射外源性的催乳素均可导致机体血液中黄体刺激素(LH)、睾酮(T)和雌二醇(E₂)含量显著下降,催乳素及其 mRNA 含量分别为正常时的 50 和 3 倍^[14]。催乳素可能在下丘脑和垂体多层环节调节性腺功能,迄今为止,人们仍没有发现诱导就巢禽类催乳素骤然上升的调控机制。

在就巢特异性表达基因文库中,发现抗苗勒管激素(AMH)受体 II 在就巢期高水平表达,表明 AMH 可能参与鹅就巢行为调控。抗苗勒管激素是 TGF-β 超家族成员之一,是一种只在性腺表达的水溶性糖蛋白。主要参与性别分化、睾丸沉降、颗粒细胞分化及卵泡募集的调控过程。研究表明,抗苗勒管激素在卵巢的颗粒细胞表达,可以抑制卵泡募集



白色圆圈代表预测的可能参与调控网络的 20 个基因,圆圈大小与参与网络的可能性成正比。据软件预测,62 个差异表达基因中,95% 存在物理互作关系,1.9% 呈现共表达关系,1.7% 在同一信号通路,1.5% 存在蛋白质直接相互作用,0.2% 存在遗传上的互作

Open circles stands for 20 candidate genes predicted by software. The size of these circles correspond to their probability of belonging to the networks assigned by the program. Of these genes, 95% of their products are predicted to have physical interaction, 1.9% are co-expressed, 1.7% belong to the same pathway, 1.5% are predicted to have direct interaction by small-scale datasets and 0.2% are predicted to have genetic interaction

图 5 就巢特异性表达基因网络分析结果

Fig. 5 Network analysis on broodiness-related genes

活动,具有控制初级卵泡形成的功能^[15]。本研究在就巢特异性文库中检测到抗苗勒管激素上调表达,表明就巢启动之后原始卵泡受抗苗勒管激素抑制,卵泡不再进入等级发育行列。雌性禽类孵化之后至青春期之前不表达抗苗勒管激素,这一时段恰好与就巢行为的窗口期重合。

综上所述,本研究推测雌激素受体、催乳素受体以及抗苗勒管激素信号通路与家鹅的就巢行为调控有关。试验中还扫描到一些 ESTs,虽然定位到一些物种的染色体上,但功能未知。这些差异表达的 ESTs 在就巢发生、调控、终结过程中可能发挥着重要作用,需要进一步排查、分析、验证。本研究初步发现

了与鹅就巢行为调控过程的相关基因,为进一步在分子方面研究鹅的就巢性提供了新的线索和切入点。

4 结 论

利用 SSH 技术成功构建鹅就巢期和产蛋期特异表达的消减 cDNA 文库。经序列测定和生物信息学分析,有 92 个 UniESTs 找到了与之匹配的同源蛋白质。研究发现,一些就巢特异性表达基因参与了细胞凋亡、细胞结构组建及甾醇激素代谢、信号传导,其中 PRLR、ESR 以及 AMHR II 可能参与了鹅就巢行为的调控过程。

参 考 文 献:

- [1] RIDDLE O, BATES R W, LAHR E L. Prolactin induces broodiness in fowl [J]. *Amer J Physiol*, 1935, 111(2): 352-360.
- [2] EL HALAWANI M E, SILSBY J L, BEHNKE E J, et al. Hormonal induction of incubation behavior in ovariectomized female turkeys (*Meleagris gallopavo*) [J]. *Biol Reprod*, 1986, 35(1): 59-67.
- [3] WARDE-FARLEY D, DONALDSON S L, COMES O, et al. The Genemania prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 (suppl 2): W214.
- [4] BAILEY R E. The incubation patch of passerine birds [J]. *The Condor*, 1952, 54(3): 121-136.
- [5] COGGER E A, BURKE W H, OGREN L A. Serum luteinizing hormone, progesterone, and estradiol levels in relation to broodiness in the turkey (*Meleagris gallapavo*) [J]. *Poult Sci*, 1979, 58(5): 1355-1360.
- [6] ZARATE S, SEILICOVICH A. Estrogen receptors and signaling pathways in lactotropes and somatotropes [J]. *Neuroendocrinology*, 2010, 92(4): 215-223.
- [7] KNOBIL E, NEILL J D. Knobil and Neill's physiology of reproduction [M]. Amsterdam: Academic Press, 2006.
- [8] CHO B N, SUH Y H, YOON Y D, et al. Progesterone inhibits the estrogen-induced prolactin gene expression in the rat pituitary [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1993, 93(1): 47-52.
- [9] TONG Y, SIMARD J, LABRIE C, et al. Inhibitory effect of androgen on estrogen-induced prolactin messenger ribonucleic acid accumulation in the male rat anterior pituitary gland [J]. *Endocrinology*, 1989, 125(4): 1821-1828.
- [10] SCHRADIN C, ANZENBERGER G. Prolactin, the hormone of paternity [J]. *News Physiol Sci*, 1999, 14: 223-231.
- [11] BUNTIN J D. Role of prolactin in avian incubation behavior and care of young: is there a causal relationship? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1986, 474: 252-267.
- [12] HALL M R, GOLDSMITH A R. Factors affecting prolactin secretion during breeding and incubation in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 49(2): 270-276.
- [13] RAMSEY S M, GOLDSMITH A R, SILVER R. Stimulus requirements for prolactin and LH secretion in incubating ring doves [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1985, 59(2): 246-256.
- [14] WONG E A, SILSBY J L, ISHII S, et al. Pituitary luteinizing hormone and prolactin messenger ribonucleic acid levels are inversely related in laying and incubating turkey hens [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47(4): 598-602.
- [15] WEENEN C, LAVEN J S, VON BERGH A R, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(2): 77-83.

(编辑 郭云雁)