

鸡与鹌鹑杂交种早期胚胎与性分化相关的 *ER* 等基因的表达

刘贤侠, 冯欣璐, 赵宗胜*, 李大全*, 高 树

(石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

摘 要: 本研究旨在对影响鸡与鹌鹑杂交早期胚胎发育及性分化 4 个基因的表达进行检测, 初步判定其对杂交种胚胎性别分化和早期死亡可能起到的作用。研究选取杂交早期胚胎发育不同时间点(72、78、84、90、96、102、108、114、120、144、168 和 192 h)活胚全胚, 在鉴定杂交种早期胚胎性别的基础上, 采用 Real-time PCR 方法检测雌雄杂交早期胚胎发育过程中不同时间点性分化相关基因的表达。结果表明, 鸡与鹌鹑杂交胚胎中 3β HSD 和 *ER* 基因雌性的表达量总体显著高于雄性。 3β HSD 表达量雄性胚胎在 72 h 最低, 雌性和雄性杂交胚胎 96 h 表达量最高。在 90 h 内雌、雄性杂交胚胎 *P-450c17* 基因表达水平较高, 在 78 h 达到最高峰, 在 90 h 内的各个时间点雌性与雄性比较差异极显著($P < 0.01$)。杂交胚胎 *P-450arom* 基因在雌性可以检测到表达, 但是雄性不能检测到表达。在杂交胚胎发育早期 *ER* 的表达有 2 个时间点是高峰, 分别在 72 和 108 h。

关键词: 鸡与鹌鹑杂交种早期胚胎; *ER* 基因; 表达分析

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0320-07

Expression Analysis of Genes Related to Sexual Differentiation during the Early Development of Chicken-Quail Hybrid Embryos

LIU Xian-xia, FENG Xin-lu, ZHAO Zong-sheng*, LI Da-quan*, GAO Shu

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: This study aimed to detect expression of genes related to early embryonic development and sexual differentiation in the chicken-quail hybrids. First, the whole embryos were collected during the hybrid early embryonic development at different times(72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 144, 168 and 192 h). Then, based on the identification of early hybrid embryo sexes, Real-time PCR method was used to detect the expressions of sex differentiation associated genes (3β HSD, *P-450c17*, *P-450arom* and *ER*) during the embryonic development of male and female hybrids at different times. The results showed that in chicken-quail hybrid embryos, both of 3β HSD and *ER* genes expression in females were generally significantly higher than that in males. The lowest expression of 3β HSD occurred at 72 h in male, while the highest expression occurred at 96 h in female and male embryos. Within 90 h, the gene expression level of the male and female hybrid embryos *P-450c17* was higher, peaking at 78 h, and there were significantly differences($P < 0.01$) in females and males at each time point within 90 h. *P-450arom* hybrid embryo gene expression could be detected in females, but the expression of the males could not be detected. There were two peaks, respectively, at 72 and 108 h expression of *ER* gene in early hybrid embryonic develop-

收稿日期: 2013-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660125)

作者简介: 刘贤侠(1970-), 男, 新疆博乐人, 博士生, 副教授, 主要从事动物遗传资源利用与绵羊育种研究, E-mail: lxx@shzu.edu.cn

* 通信作者: 赵宗胜, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: zhaozongsh@shzu.edu.cn; 李大全, 教授, 博士生导师, E-mail: lidaquan37@163.com

ment.

Key words: chicken-quail hybrids early embryo; ER gene; expressive analysis

鸡与鹌鹑的杂交是禽类中典型的远缘杂交,杂交存在着不亲和现象,在出壳前雌性全部死亡,杂交后代在早期死亡率很高并且处于性分化前后阶段,因此鸡与鹌鹑的杂交其孵化率很低,尚不能在生产中应用。禽类胚胎的性分化在早期受到性激素的影响,而雌激素在禽类性分化中起十分关键的作用^[1],鸡与鹌鹑属间杂交胚胎的早期胚胎死亡,可能是由于性分化中性激素表达异常造成,从雄激素转变成雌激素的途径中各个反应步骤的酶基因表达异常,可能是杂交胚胎死亡的主要原因,在雄激素转变成雌激素途径中,只要有其中一个或多个基因表达异常,就会导致此途径出现问题,而雌激素最终发挥生理功能需要与受体结合才能起作用。ER 在调控家鸡胚胎性分化中起着重要作用,但是否也在导致杂交种胚胎早期死亡中起了关键作用,其调控机制如何,目前仍然不清楚。因此,研究不同性别鸡与鹌鹑杂交早期胚胎性激素转化路径上相关调控酶基因的表达,可以为其提供一定依据。从现有研究成果来看,鸟类性别决定既受到相关性别决定基因的控制,又和激素调控紧密关联。曹体婷^[2]对鸡与鹌鹑杂交种胚胎在性别早期分化过程中的部分基因表达进行了分析,但未对其进行性别鉴定。廖和荣等^[3]和李岩等^[4]在对杂交种胚胎性别鉴定的基础上研究了 ER mRNA 的表达。家禽体内雌激素一般由性腺类固醇转化产生,此转化过程需要多种酶来参与完成,除芳香化酶(P-450arom)外,如 3 β -羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD)、17 β -羟基类固醇脱氢酶(17 β -HSD)、17 α 羟化酶(P-450c17)等^[5-6]。

本研究以鸡(♂)与鹌鹑(♀)杂交胚胎为研究对象,在性别鉴定的基础上,采用实时荧光定量 PCR 技术,对 ER 及雄激素转化成雌激素路径上的相关酶基因的表达规律进行研究分析,以便通过鸡与鹌鹑杂交种早期胚胎与性分化相关的 ER 等基因的表达变化规律和趋势的了解,为解释杂交种早期胚胎死亡的可能原因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石河子大学试验站成年种公鸡采集精液后,对 200 只朝鲜雌鹌鹑人工授精,获得鸡与鹌鹑杂交蛋

孵化,随机采集胚龄分别为 72、78、84、90、96、102、108、114、120、144、168 和 192 h 活胚全胚(每个时间点至少 20 枚),置于液氮冷冻,后转入 -80 °C 保存。

1.2 试验方法

1.2.1 样品总 RNA 提取及反转录(RT) 用 Trizol 试剂提取总 RNA,方法参考文献[5]。提取后采用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后用凝胶成像观察 RNA 条带完整性或用核酸蛋白仪检测 RNA 纯度在 1.8~2.0。采用反转录体系及试剂盒说明书进行操作,反转录后 cDNA 标本放入 -20 °C 中保存。

1.2.2 引物设计和反应条件的优化 *Wpkci*、 *β -actin*、*ER*、*P-450c17*、*3 β HSD* 和 *P-450arom* cDNA 序列来源于 GenBank, *Wpkci* 性别鉴定方法参照文献[7],由上海生工合成,引物见表 1。然后对各基因片段的反应条件进行优化,结果见表 1。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

1.2.3.1 标准曲线绘制:阳性标准品按文献[8]的方法计算重组质粒的拷贝数,然后 10 倍梯度稀释,制作标准曲线。

1.2.3.2 实时荧光定量 PCR:反应体系 20 μ L: SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L。反应条件:94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环。溶解曲线绘制:95 °C 1 min, 35 °C 30 s, 95 °C 30 s。每个样本重复 3 次。

1.2.4 数据处理与分析 根据双标准曲线法计算目的基因相对表达量,定量结果用 SPSS11.0 进行方差分析,Duncan 法进行平均值多重比较。

2 结果

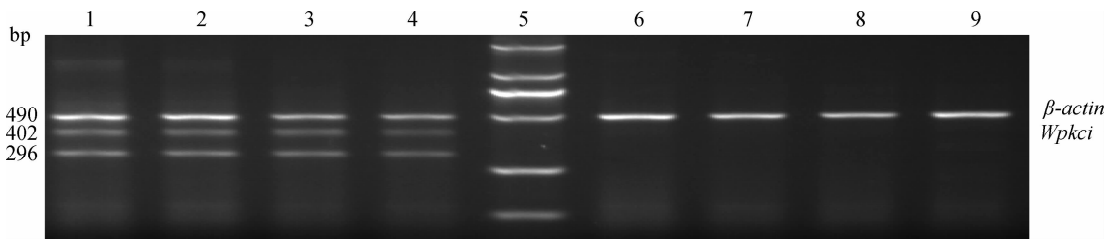
2.1 多重 PCR 鉴定早期胚胎性别

图 1 所示是用 *Wpkci* 和内标 *β -actin* 双基因对鸡与鹌鹑杂交胚胎 cDNA 进行扩增,Marker 左侧样本为雌性,扩增得到了 490 (*β -actin*)、402 和 296 bp 3 条特异条带,而右边样本为雄性,扩增只得到 490 bp (*β -actin*) 1 条带,即 *Wpkci* 不能被检测到。

表 1 基因引物序列及 PCR 条件

Table 1 Conditions of PCR and parameters of oligo-nucleotide primer pairs

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Sequence	扩增步骤 Amplification steps	条件 Conditions of PCR
<i>Wpkci</i>	F: ATGGCCGGCGGGATCGTTAGGT R: GCAAACGTCTTATCCAGGAGGCTGG	Three steps	94 °C 30 s, (95 °C 5 s, 59 °C 45 s, 72 °C 60 s) × 40 个循环
<i>β-actin</i>	F: TGAACCCCAAAGCCAACAG R: CCACAGGACTCCATACCCAAG	Three steps	95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 58 °C 10 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环
<i>3β-HSD</i>	F: CTGGGGAAACAGCAACAGCAG R: TTATTTTGGTTCTGGGGATGA	Three steps	95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 58 °C 10 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环
<i>P-450c17</i>	F: GGCACGTCACCCACCTCAG R: TTATCCCACTCCTTCTCATCG	Three steps	95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 58 °C 10 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环
<i>P-450arom</i>	F: GAATTCTTCCCAAACCGAATGAG R: GCACCGTCTCAGAAGAGTCACCAG	Three steps	95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 60 °C 10 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环
<i>ER</i>	F: TAC GGC TCT ACT ACA CTC AG R: GGC TCC CTT TCT CAT TGG TA	Three steps	95 °C 30 s, (95 °C 5 s, 59 °C 10 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环



1~4. 雌性杂交胚胎扩增; 5. DNA 相对分子质量标准 pUC19; 6~9. 雄性杂交胚胎扩增

1-4. The amplified results of female quails; 5. DNA molecular marker pUC19; 6-9. The amplified results of male quails

图 1 鸡与鹌鹑杂交胚胎 *Wpkci* 和 *β-actin* 基因进行多重 PCR 鉴定性别电泳图Fig. 1 Results of sex identification by multiply PCR with *Wpkci* and *β-actin*

2.2 ER 相关基因表达分析

2.2.1 不同性别杂交胚胎 *3β-HSD* 基因的表达分析 *3β-HSD* 基因不同时间点的表达分析见表 2, 总体上雌性杂交种胚胎 *3β-HSD* 基因表达量在同一时间点极显著高于雄性胚胎 ($P < 0.01$)。雄性杂交种胚胎 *3β-HSD* 基因表达整体水平极低, 雄性胚胎在 72 h 最低, 雌性和雄性杂交胚胎 96 h 表达量最高, 在 72~144 h 有所波动, 雄性胚胎 168 和 192 h 不能检测到表达。雌性杂交胚胎在早期发育 72~192 h 表达具有一定的波动性。

2.2.2 不同性别杂交胚胎 *P-450c17* 基因的表达分析 *P-450c17* 基因不同时间点的表达见表 2, 在 90 h 内雌、雄性杂交胚胎 *P-450c17* 基因表达水平较高, 此后下降到较低水平, 在 78 h 达到最高峰, 在 90 h 内雌性杂交胚胎表达水平波动较雄性大。雌性杂交胚胎 *P-450c17* 基因在 90 h 内的表达较雄性明显高, 在 90 h 内的时间点与雄性比较差异极显著

($P < 0.01$)。96 h 后雌性与雄性比较差异不显著, 表达都在很低水平。

2.2.3 不同性别杂交胚胎 *P-450arom* 基因的表达分析 *P-450arom* 基因不同时间点表达分析见表 3, 雄性杂交胚胎不能检测出其表达, 仅雌性胚胎有表达, 且其表达呈现波动性, 出现 3 次较高的峰值, 分别是在 72、96 和 120 h, 但其表达量逐步下降。在 168 和 192 h 表达极低。

2.2.4 不同性别杂交胚胎 *ER* 基因的表达分析

ER 基因在不同时间点的表达分析见表 3, 雄性与雌性胚胎比较, 在 72~120 h 时间点表达雌性高于雄性。在杂交胚胎发育的 72 和 78 h *ER* 基因表达雄性与雌性胚胎之间差异显著 ($P < 0.05$), 在 96、102、108、114 和 120 h *ER* 基因表达差异极其显著 ($P < 0.01$), 并且雌性表达水平远高于雄性。在杂交胚胎发育的 144、168 和 192 h 不同性别杂交胚胎 *ER* 基因表达水平均很低。

表 2 不同性别杂交胚胎 *3β-HSD* 和 *P-450c17* 基因在不同时间点的表达Table 2 The relative expression quantity of *3β-HSD* and *P-450c17* gene of different gender of hybrid embryos at different time points

早期胚胎发育时间/h Early embryonic development stage	<i>3β-HSD</i>		<i>P-450c17</i>	
	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female
72	0.001±0.000 ^{Ab}	18.674±0.001 ^{Bab}	5.243±1.643 ^{Aa}	65.121±4.356 ^{Bc}
78	0.002±0.000 ^{Ab}	21.383±2.645 ^{Bab}	6.785±1.554 ^{Aa}	71.117±5.621 ^{Bd}
84	0.005±0.001 ^{Ab}	10.345±3.667 ^{Ba}	2.337±0.902 ^{Aa}	25.337±2.902 ^{Be}
90	0.017±0.002 ^{Ac}	8.221±1.093 ^{Ba}	4.151±0.223 ^{Aa}	10.549±4.563 ^{CbF}
96	0.306±0.001 ^{Bc}	32.332±3.112 ^{Ad}	2.562±0.461 ^{ABa}	3.023±1.239 ^{Cd}
102	0.048±0.013 ^{Cb}	19.063±6.928 ^{Bab}	0.145±0.003 ^{ABb}	2.058±0.013 ^{Cd}
108	0.052±0.007 ^{Cb}	8.039±4.974 ^{Ba}	0.784±0.005 ^{ABb}	1.337±0.502 ^{Cd}
114	0.037±0.003 ^{Cb}	2.114±1.237 ^{Db}	1.654±0.065 ^{ABa}	1.549±0.003 ^{Cd}
120	0.011±0.002 ^{Ac}	13.114±4.116 ^{Ba}	0.234±0.005 ^{ABb}	1.023±0.321 ^{Cd}
144	0.005±0.001 ^{Ac}	5.273±2.104 ^{Bb}	0.136±0.008 ^{ABb}	0.456±0.011 ^{ACb}
168	—	1.442±0.632 ^{Db}	—	0.867±0.012 ^{ACb}
192	—	1.566±0.701 ^{Db}	—	0.123±0.009 ^{ACb}

经性别鉴定后实际每个时间点样品数不少于 10 枚,不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),—,未能检测出。下同

The actual samples number of the each time point after sex identification are not less than 10, different capital letters means significant difference ($P < 0.01$), different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$), —, Failing to detect. The same as below

表 3 不同性别杂交胚胎 *P-450arom* 和 *ER* 基因在不同时间点的基因表达Table 3 The relative expression quantity of *P-450arom* and *ER* gene of different gender of hybrid embryos at different time points

早期胚胎发育时间/h Early embryonic development stage	<i>P-450arom</i>		<i>ER</i>	
	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female
72	—	60.672±1.049 ^{aA}	13.224±0.678 ^{aB}	15.153±1.554 ^{bB}
78	—	23.561±2.334 ^{aB}	10.117±0.693 ^{aB}	13.148±1.552 ^{bE}
84	—	37.275±2.675 ^{bB}	4.093±0.342 ^{cdB}	5.231±0.665 ^{cB}
90	—	18.238±1.568 ^E	2.131±0.127 ^{ceB}	2.058±0.226 ^{cB}
96	—	52.812±1.442 ^{aA}	0.019±0.003 ^A	1.332±0.077 ^{Cd}
102	—	15.332±2.566 ^E	3.551±0.434 ^{AC}	11.284±1.754 ^{Eb}
108	—	10.842±1.046 ^E	4.323±0.782 ^A	15.171±1.998 ^{Bb}
114	—	8.117±0.143 ^E	2.776±0.232 ^{AC}	8.646±1.039 ^{Be}
120	—	47.932±1.382 ^{aA}	0.008±0.002 ^{CD}	1.126±0.026 ^{BCd}
144	—	17.474±1.412 ^E	0.017±0.003 ^{cD}	0.013±0.003 ^{cD}
168	—	0.023±0.001 ^F	0.022±0.005 ^{cD}	0.018±0.004 ^{cD}
192	—	0.087±0.002 ^F	0.011±0.002 ^{aD}	0.023±0.007 ^{cD}

—,未能检测出

—, Failing to detect

3 讨论

3.1 3β HSD 基因在不同性别杂交胚胎发育早期的表达

类固醇脱氢酶是性激素合成过程中关键步骤的催化酶,它催化性激素 C17 位上的酮基和醇基之间的还原和氧化反应,使低生物活性的雌酮、雄烯二酮与高生物活性的雌二醇、睾酮之间相互转化。其中, 3β HSD 是类固醇脱氢酶类的一种主要酶,它的缺少会导致皮质醇和醛固酮合成减少,同时睾酮和雌激素的合成也会减少。O. Nakabayashi 等^[9]采用原位杂交的方法检测鸡早期胚胎 3β HSD 的表达,发现 3β HSD 在孵育 7 d 的雌雄鸡胚左右性腺中都有表达,且一直持续到第 14 天。O. Nomura 等^[10]采用半定量的方法检测鸡雌雄胚胎发育过程中 2~9 d 3β HSD 基因的表达,发现早在 2 d 就可以在雌雄胚胎中检测到 3β HSD 的表达,之后其表达量均呈递增趋势。2008 年 N. Aste 等^[11]对孵化 7~15 个时期的鹌鹑胚胎进行了报道,发现 3β HSD 基因在第 9 个孵化时期表达量较高。曹体婷^[2]利用原位杂交技术研究表明, 3β HSD 基因在雌性杂交种 96、102 和 108 h 的胚胎中表达, 3β HSD 在雌性胚胎中表达信号较强,同时雄性胚胎在 66~132 h 也有表达。刘贤侠等^[12]研究表明,鹌鹑胚胎 3β HSD 基因表达最早可在 72 h 检测到,在胚胎发育 120 h 表达量最高,且雌性显著高于雄性,提示鹌鹑胚胎发育到第 5 天时, 3β HSD 在其性别分化过程中起重要作用。本研究表明,鸡与鹌鹑杂交胚胎中 3β HSD 基因表达总体上雌性表达量极显著高于雄性,雄性杂交种胚 3β HSD 基因表达整体水平极低,雄性胚胎在 72 h 最低,雌性和雄性杂交胚胎 96 h 表达量最高,在 72~144 h 之间有所波动,168 和 192 h 不能检测到表达。雄性杂交胚胎在早期发育 72~192 h 表达具有一定的波动性。这与鸡大体一致,只是表达水平不同。同现有的鸡与鹌鹑报道相比, 3β HSD 在雌性胚胎中出现较亲本表达提前的现象,这种现象同曹体婷^[2]的报道类似。

3.2 $P-450c17$ 基因在不同性别杂交胚胎发育早期的表达

$P-450c17$ -羟化酶是雄激素合成的限速酶,催化孕烯醇和孕酮分别转化为羟孕烯醇酮和羟孕酮,均为睾酮合成的重要步骤。H. Nishikimi 等^[13]采用原位杂交方法检测鸡早期胚胎 $P-450c17$ 基因的表达,

发现 $P-450c17$ mRNA 在雄性胚胎孵化 6 d 时迅速增加,之后下降。与雄性胚胎的短暂时升高相比,雌性胚胎 $P-450c17$ mRNA 的表达呈缓慢上升趋势。O. Nakabayashi 等^[9]采用原位杂交方法检测鸡胚胎 $P-450c17$ 基因的表达,发现其在雄性鸡胚性腺中表达,而在雌性鸡胚中却检测不到。O. Nomura 等^[10]采用半定量方法检测鸡胚胎 2~9 d $P-450c17$ 基因的表达,发现在孵化 2~9 d 时雌雄胚胎均有表达,但表达量较少,在胚胎发育第 6 天,表达量有所增加,之后下降。刘贤侠等^[12]研究表明, $P-450c17$ 基因在鹌鹑雌雄胚胎孵化 3~7 d 均有表达,在胚胎发育 4 d 时表达量增加,之后出现波动趋势。

本研究表明,在杂交胚胎性别鉴定的基础上,发现在 90 h 内雌、雄性杂交胚胎 $P-450c17$ 基因表达水平较高,在 78 h 达到最高峰,在 96 h 内雌性杂交胚胎表达水平波动较雄性大。雌性杂交胚胎 $P-450c17$ 基因在 90 h 内的表达较雄性高,在 90 h 内的时间点与雄性比较差异极显著($P < 0.01$)。96 h 后雌性与雄性比较差异不显著,表达都在很低水平。这说明杂交胚胎的 $P-450c17$ 基因表达高峰也提前。

3.3 $P-450arom$ 基因在不同性别杂交胚胎发育早期的表达

在鸟类中, $P-450arom$ 是雌激素合成的关键酶,如果该酶的活性被抑制,雌激素对性腺性别分化的影响就会被阻断。鸡 $P-450arom$ 表达开始于性分化,此性分化在形态上能够被观察到^[9,13-14],因此, $P-450arom$ 在鸡和鸟类的性分化中起到了重要作用。O. Nakabayashi 等^[9]和 C. A. Smith 等^[15]采用原位杂交方法检测鸡胚性腺中 $P-450arom$ 基因的表达,结果表明其在雌性胚胎中表达,而雄性胚胎中不表达。O. Nomura 等^[10]采用半定量方法检测早期鸡胚发育过程中(2~9 d) $P-450arom$ 基因的表达,结果发现, $P-450arom$ mRNA 在孵化 5~9 d 的雌性鸡胚中有表达,然而,在整个孵化期,雄性鸡胚中都检测不到其表达。 $P-450arom$ 基因表达的开始时间在胚胎孵化第 5 天,这与性分化阶段一致。C. A. Smith 等^[15]研究表明, $P-450arom$ 基因在鸡早期胚胎发育过程中 6.5 d 在性腺中雌性可以检测到,而雄性不能检测到。鹌鹑早期胚胎发育过程中,雌性胚胎发育第 3 天就可检测到 $P-450arom$ 基因的表达,且在发育的第 4 天达到高峰,随后下降^[12]。

本研究表明,杂交胚胎的 $P-450arom$ 基因在雌性可以检测到表达,但是雄性不能检测到,表明, $P-$

450*arom* 基因为雌性杂交胚胎所特有。在杂交雌性胚胎发育的 72~144 h *P-450arom* 基因也呈现波动性的变化,但是雌性杂交胚胎在 168 h 之后出现很低的表达,实际解剖在此期的杂交胚胎发现大部分为雄性。通过本试验也验证了杂交胚胎在性分化之后,由于大部分是雄性,因此该基因的表达即使是雌性在 7 d 之后也出现了异常。

3.4 *ER* 基因在不同性别杂交胚胎发育早期的表达

雌激素通过与其受体结合,作用于靶细胞而发挥作用。C. A. Smith 等^[15]通过 RT-PCR 发现,*ER* 首先出现在孵化第 4.5 天的性腺中,在性腺开始分化时(孵化 7.5 d)在左侧性腺比右侧性腺表达量更多,并且一直持续到孵化第 12.5 天。J. E. Andrews 等^[16]应用原位杂交方法也得到相同的结果。免疫组织化学研究表明,在孵化第 7.5 天的雌性鸡胚左侧性腺的皮质中检测到大量的 *ER* 蛋白,在髓质中仅检测到少量 *ER* 蛋白,而在雄性性腺中没有检测到 *ER* 蛋白。乔爱君^[17]采用半定量研究表明,*ER* 表达高峰期在 66~84 h,且性分化大致在该时期,*ER* 基因的变化很可能是导致杂交早期胚胎大量死亡的主要原因。M. Anna 等^[18]采用实时定量对受外源雌激素物质影响的鹌鹑早期胚胎 *ER* 基因的表达进行研究,结果发现,*ER* 在胚胎发育第 7 天在雌雄胚胎中均有表达,雄性鹌鹑胚表达量明显高于雌性鹌鹑胚。廖和荣等^[3]采用 RT-PCR 对杂交种胚胎 *ER* 表达的研究表明,在 66~84 h 雌性的表达量极显著高于雄性,由此推测杂交种的性分化时间大致在胚胎发育的 66~84 h。李岩等^[4]采用同样方法研究雌、雄胚胎发现,2.75~3.75 d 二者呈现波动性变化,不同日龄间比较,2.75~3.50 d 雌性 *ER* 表达极显著高于雄性,推测杂交胚胎性分化时间大致在胚胎发育的 2.75~3.50 d。本研究表明,雌性杂交胚胎的 *ER* 在不同时间点的表达量总体比雄性高,杂交胚胎 72~192 h 雌性和雄性都有表达,在杂交胚胎发育早期 *ER* 的表达有 2 个时间点是高峰,分别在 72 和 108 h,在 144 h 后表达量非常低,推测 *ER* 基因表达异常可能对杂交胚胎的死亡有密切关系。

4 结 论

总体上 3β -HSD 和 *P-450c17* 基因表达都有提前表达趋势,而 *P-450arom* 基因为雌性杂交胚胎所

特有。雌性杂交胚胎的 *ER* 表达有高峰,分别在 72 和 108 h,在 144 h 后表达量非常低,和鸡与鹌鹑相比,*ER* 基因也出现表达提前的现象。杂交种作为属间杂交的特殊物种,其染色体一半源于鸡,一半源于鹌鹑,其 *ER* 及相关通路基因表达模式却较二者均出现一定的提前趋势,出现这种现象的原因还需要进一步探索,这种独特的基因表达模式是否在其他细胞通路中也出现还需要试验证实,目前的结果提示,这种不同于双亲的基因表达可能是造成杂交种胚胎早期死亡的原因之一。

参考文献:

- [1] 孟 和,潘玉春. 鸡性别决定机制及相关基因研究进展[J]. 动物学杂志,2005,40(2):106-111.
- [2] 曹体婷. 引起鸡与鹌鹑属间杂交种性分化异常相关基因的研究[D]. 石河子:石河子大学,2009:32-33.
- [3] 廖和荣,李 岩,郭晓令,等. *ER*、*bcl-2* 和 *p53* 在鸡与鹌鹑属间杂交种早期胚胎中的 mRNA 表达[J]. 遗传,2008,30(7):907-912.
- [4] 李 岩,乔爱君,马文霞,等. 雌激素受体在鸡与鹌鹑属间杂交早期胚胎中的差异表达及其作用[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(12):1311-1315.
- [5] ONO H, IWASAKI M, SAKAMOTO N, et al. cDNA cloning and sequence analysis of a chicken gene expressed during the gonadal development and homologous to mammalian cytochrome P-450c17[J]. *Gene*, 1988,66:77-85.
- [6] RYO K, SHINJI T, MASATOSHI M. Expression of sex-determining factors and steroidogenic enzymes in the chicken embryo: influence of xenoestrogens[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004,138:148-156.
- [7] 乔爱君,马文霞,李大全,等. *Wpkci* 基因用于鸡与鹌鹑属间杂交早期胚胎性别鉴定[J]. 中国农业科学,2008,41(3):841-845.
- [8] YOSHIDA K, SHIMADA N, SAITO N. Expression of *P-45017a* hydroxylase and *P-450 aromatase* genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1996, 102: 233-240.
- [9] NAKABAYASHI O, KIKUCHI H, KIKUCHI T, et al. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos [J]. *J Mol Endocrinol*, 1998, 20: 193-202.
- [10] NOMURA O, NAKABAYASHI O, NISHIMORI K, et al. Expression of five steroidogenic genes including

- aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999, 71:103-109.
- [11] ASTE N, WATANABE Y, SHIMADA K, et al. Sex- and age-related variation in neurosteroidogenic enzyme mRNA levels during quail embryonic development [J]. *Brain Res*, 2008, 1201(27):15-22.
- [12] 刘贤侠, 冯欣璐, 赵宗胜, 等. 鹌鹑早期胚胎生成过程中性别分化相关基因的表达分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(3):419-426.
- [13] NISHIKIMI H, KANSAKU N, SAITO N, et al. Sex differentiation and mRNA expression of *P450c17*, *P450arom* and *AMH* in gonads of the chicken [J]. *Male Reprod Dev*, 2000, 5(5):20-30.
- [14] TEREBA A, MCPHAUL M J, WILSON J D. The gene for aromatase (*P450arom*) in the chicken is located on the long arm of chromosome [J]. *Heredity*, 1991, 82(1):80-91.
- [15] SMITH C A, ANDREWS J E, SINCLAIR A H. Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes [J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 1997, 60:295-302.
- [16] ANDREWS J E, SMITH C A, SINCLAIR A H. Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 108:182-190.
- [17] 乔爱君. 鸡与鹌鹑属间杂交早期胚胎中 *bcl-2*、*P53*、*ER* 的发育性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2007: 33.
- [18] ANNA M, JAN O, BJORN B. Selective estrogen receptor activation disrupts sex organ differentiation and induces expression of vitellogenin II and very low-density apolipoprotein II in Japanese quail embryos [J]. *Reproduction*, 2008, 136:175-186.

(编辑 郭云雁)