

dw 基因 mRNA 在矮小型优质肉鸡 S2 系 不同组织的表达差异分析

李春苗, 黄华云, 黎寿丰*, 赵振华, 薛龙岗

(中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125)

摘要: 以矮小型优质肉鸡品系 (S2 系) 为素材, 采用 RT-PCR 技术分析 *dw* 基因在 12 周龄 S2 鸡肝脏、胸肌、腿肌和骨膜中等组织中的表达情况。结果表明, *dw* 基因在肝脏、胸肌、腿肌和骨膜中均有表达, 但在不同组织中的表达量不同。公母鸡在肝脏的 mRNA 水平 (公鸡拷贝数为 11.2 ± 1.11 , 母鸡拷贝数为 10.4 ± 0.51) 均显著高于胸肌、腿肌和骨膜 ($P < 0.05$); 公母鸡在骨膜中的 mRNA 表达量 (公鸡拷贝数 1.8 ± 0.37 , 母鸡拷贝数 1.6 ± 0.4) 最低, 且显著低于肝脏、胸肌和腿肌 ($P < 0.05$); 母鸡在腿肌中的表达量 (拷贝数为 8.0 ± 0.32) 显著高于胸肌中的表达量 (拷贝数为 4.0 ± 0.32) ($P < 0.05$); 公鸡在腿肌和胸肌中的表达量差异不显著。*dw* 基因 mRNA 在肝脏和骨膜中的表达无性别效应, 在胸肌和腿肌中的表达有明显的性别效应。

关键词: 矮小型优质肉鸡 (S2 系); *dw* 基因; 表达; RT-PCR

中图分类号: S831.92

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)02-0199-04

Expression of sex-linked *dw* gene and regulation for the growth in different tissues of S2 line of dwarf chicken

LI Chun-miao, HUANG Hua-yun, LI Shou-feng, ZHAO Zhen-hua, XUE Long-gang

(Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125)

Abstract: S2 line of dwarf chicken, as quality broiler, was caused by the sex-linked dwarfing (SLD) gene. In order to illustrate the influence of *dw* gene on the growth performance, the expression patterns of *dw* mRNA were examined in four growth related tissues (liver, breast muscle, thigh muscle, periosteum) at 12-week-old female and male of S2 line of SLD chicken. Results of the real time-PCR showed that *dw* gene was expressed in liver, breast muscle, thigh muscle and periosteum, but its expression abundance in different tissues was different. *dw* gene mRNA for highest level expression was in the liver of male chicken and female chicken (copy number of male chicken was 11.2 ± 1.11 and female chicken was 10.4 ± 0.51), and was significantly higher than that in its breast, thigh muscle and periosteum ($P < 0.05$). The mRNA level of *dw* gene in the periosteum of S2 line of SLD chicken (copy number of male chicken was 1.8 ± 0.37 and female chicken was 1.6 ± 0.4) was significantly lower than that in liver, breast and thigh muscles ($P < 0.05$). *dw* gene mRNA for highest level expression in thigh muscle was significant than that in female chicken ($P < 0.05$). There is no obvious different between the mRNA level of *dw* gene in breast and thigh muscles of male chicken ($P > 0.05$). The expression level of *dw* gene mRNA in liver and periosteum of female chicken has no obvious sex effects, but in breast and thigh muscles has extremely significant sex effects.

Key words: S2 line of dwarf chicken; *dw* gene; expression; RT-PCR

性连锁矮小基因 (dwarf gene, *dw*) 是位于鸡性染色体上的一个有利隐性基因^[1], 携带纯合 *dw* 基因的矮小型鸡具有个体小、耗料少、基础代谢低、产蛋率高、饲养密度大、饲料报酬高及节约成本等

收稿日期: 2012-10-15

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-42-Z06), 江苏省农业三项工程 (SXGC (2012) 276) 和扬州市农业科技攻关项目 (YZ20102050)。

作者简介: 李春苗, 女, 助理研究员。E-mail: cherrylcm@163.com

* 通信作者: 黎寿丰, 男, 研究员。E-mail: yzlsf3333@126.com

优点。1949年 Hutt 等^[2]开始对矮小型莱航鸡进行研究,并在1959年将 *dw* 定位在鸡的 Z 染色体上。1994年, Agarwal 对 CT (Connecticut)品系的矮小鸡 *dw* 突变进行了精确定位^[4]。矮小基因 (*dw*) 是生长激素受体 (*GHR*) 基因缺陷型^[3]。Burnside 等^[5]克隆了鸡 *GHR* 的 cDNA 序列,并以此为探针针对正常型鸡和矮小型鸡的 *GHR* 基因进行限制性内切酶片段长度多态性(RFLPs)分析,发现二者 *GHR* 的带型存在显著差异,从而推测矮小型鸡的 *GHR* 基因存在缺失突变,而且突变可能发生在基因跨膜区或胞区内。戴茹娟等^[6]通过构建鸡的染色体文库分离得到鸡 *GHR* 基因,并利用探针进行 RFLPs 分析,证实了矮小型鸡 *GHR* 缺失突变的存在。肖璐等^[7]根据正常型鸡的 *GHR* 基因的 DNA 序列设计了 1 对引物,对 *DWDW* 基因型农大褐蛋鸡扩增片段为 2 026 bp,而对 *dwdw* 基因型鸡相同区域的基因组 DNA 扩增片段为 255 bp。通过与国外的 CT 品系矮小型鸡相比较,认为不同品种的矮小型鸡尽管 *GHR* 基因缺失突变的碱基数不同,但它们缺失的起始位点都相同,推测这也是导致矮小的主要原因。在比较正常鸡和性连锁矮小鸡 *GHR* 的表达时, Burnside 等发现性连锁矮小鸡 *GHR* 的转录产物小于正常的转录产物,从而认为性连锁矮小鸡的生长激素受体基因存在缺失突变,且突变位置可能在基因的 3'端^[5]。Hull 等对来航鸡性连锁矮小鸡 mRNA 表达分析时,并没有发现缺失现象,矮小鸡与正常品系 *GHR* 的 mRNA 具有相同的丰度和大小,并进一步通过 Northern 杂交分析和 cDNA-Southern 杂交分析,认为来航鸡的矮小可能是由于 *GHR* 的点突变造成^[12]。

dw 基因对生长性状的影响表现为一个渐进的过程,对孵化期的胚胎生长发育并无影响,8~10 周龄后才开始显现^[13]。本试验以 12 周龄 S2 鸡为研究对象,采用实时荧光定量 PCR (Real time quantitative PCR) 技术,分析 S2 鸡 *dw* 基因在肝脏、胸肌、腿肌和骨膜等组织中的 mRNA 表达差异,以期为进一步阐明 *dw* 基因对鸡的生长性状调控的分子机制积累理论资料。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及组织

在完全相同的饲养管理条件下采用个体笼养方式饲养。于 12 周龄时记录体重并进行屠宰(公、母鸡各 5 只),屠宰后立即采集其肝脏、胸肌、腿肌和骨膜等组织放入冻存管内并放入液氮罐内备用。

1.2 主要试剂

TRNzol-A+总 RNA 提取试剂盒、Quant cDNA 第一链合成试剂盒、PCR MasterMix 试剂盒、RealMasterMix(SYBR Green)荧光定量 PCR 试剂盒、质粒中抽试剂盒均购自北京天根生物技术有限公司, pEASY-T1 克隆试剂盒、EasyTaq DNA 合成酶、感受态细胞 (Trans5 α) 均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

各组织总 RNA 的提取按照 TRNzol-A+试剂盒操作说明进行,0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计测量 A_{260}/A_{280} 值。用无 RNase 去离子水将所有组织的 RNA 沉淀稀释到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,然后将 RNA 稀释液按照反转录试剂盒反转录成 cDNA 第一链, -20°C 保存。

1.4 PCR 引物设计

根据 GenBank 公布的原鸡(*Gallus gallus*)的 *GHR* 基因的 DNA 序列 (GenBank 登录号: NC_006127.3)。用 Primer5.0 引物设计软件跨 *dw* 基因在 *GHR* 基因的缺失部分设计 1 对长 110 bp 的引物,由上海生工生物技术有限公司合成。

上游引物:

5'-ATGAGACAAAATGGAAGGAGTTAG-3';

下游引物:

5'-ATCGGACTCGGATCTCATAAT-3'。

1.5 RT-PCR 反应

1.5.1 RT 反应 按照 Quant cDNA 第一链合成试剂盒要求的条件进行 RT-PCR 反应,反应体系为 $20 \mu\text{L}$: 总 RNA $2.0 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Super Pure dNTP $2.0 \mu\text{L}$, $10 \times \text{RTmix}$ $2 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Oligo-dT₁₅ $2.0 \mu\text{L}$, $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Quant Reverse Transcriptase $1.0 \mu\text{L}$, 加无 RNase 水至 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 37°C 孵育 60 min。

1.5.2 PCR 反应 按照 PCR MasterMix 试剂盒要求的条件进行 PCR 反应,反应体系为 $20 \mu\text{L}$: $10 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Mix $10 \mu\text{L}$, $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA $2.0 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $1.0 \mu\text{L}$, 加无 RNase 水至 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 然后 95°C 变性 1 min, 60°C 复性 15 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

1.5.3 标准品制备 将 PCR 产物纯化后导入 pEASY-T1 克隆载体,在 LB/AMP⁺固体培养基上过夜培养后,挑选白色克隆接种于 LB/AMP⁺液体培养基中过夜培养 (12~16 h)。取 $1 \mu\text{L}$ 培养好的菌液送至上海英俊生物技术有限公司测序。确定目的片段导入载体后,按照质粒中抽试剂盒的步骤提取质

粒 DNA。质粒 DNA 做系列浓度稀释（稀释浓度为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ）做为标准品。

1.5.4 荧光定量 PCR 反应 按照 RealMasterMix (SYBR Green) 荧光定量 PCR 试剂盒的反应体系 (25 μL): 2.5 \times Real MasterMix/20 \times SYBR solution 11.25 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL , 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cDNA 2.0 μL , 加无 RNase 水至 25 μL 。每个样品 3 次重复, 标准品质粒 DNA 做为阴性对照组, 每个浓度样品 3 次重复。所有样品荧光定量 PCR 反应在 Bio-Rad 公司 Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。溶解曲线程序为: 65~95 $^{\circ}\text{C}$, 升温速度为 0.5 $^{\circ}\text{C}/10$ s。

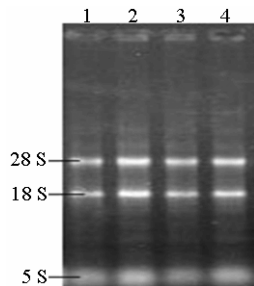
1.6 数据分析

各组织 mRNA 表达量以平均值 \pm 标准误 ($X\pm$ SEM) 表示, 各组织间的表达量比较用 SPSS13.0 统计软件进行单因子方差分析 (One-way ANOVA), 以 Duncan 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及其目的片段扩增结果

从试验鸡的肝脏、胸肌、腿肌和骨膜分别提取总 RNA, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见

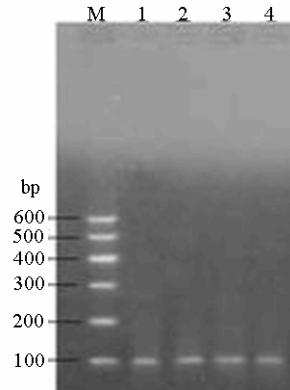


1. 骨膜; 2. 肝脏; 3. 腿肌; 4. 胸肌
1. periosteum; 2. liver; 3. thigh muscle; 4. breast muscle

图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose electrophoresis of total RNA

图 1。从图 1 中可见清晰的 18S 和 28S 条带, 且无弥散; 用紫外分光光度计检测, 结果 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.1 之间, 表明提取的 RNA 纯度和完整性均较高, 可用于后续的 RT-PCR 分析。用引物对反转录的 cDNA 第一链进行 PCR 扩增 (见图 2), 目的条带清晰, 与预期的结果一致且无非特异性条带。



M. marker I; 1. 骨膜; 2. 肝脏; 3. 腿肌; 4. 胸肌
1. periosteum; 2. liver; 3. thigh muscle; 4. breast muscle

图 2 不同组织 cDNA PCR 扩增产物特异性条带

Figure 2 The electrophoregram of RT-PCR amplification products tested in 1.5% agarose gels

2.2 S2 鸡 *dw* 基因的绝对定量分析

由荧光定量反应得出的 Ct 值带入标准曲线, 得出公母鸡各组织在 12 周龄的拷贝数, 经 SPSS13.0 统计得到的结果见表 1。从组织表达差异可见, S2 鸡公鸡 12 周龄 *dw* 基因在肝脏中的表达量最高且显著高于胸肌、腿肌和骨膜 ($P<0.05$), 其次为胸肌和腿肌, 但胸肌和腿肌之间的表达量差异不显著 ($P>0.05$), 在骨膜中的表达量最低, 且显著低于肝脏、胸肌和腿肌 ($P<0.05$)。S2 鸡母鸡 12 周龄 *dw* 基因在肝脏中的表达量最高, 且显著高于胸肌和腿肌 ($P<0.05$), 其次为腿肌, 且腿肌的表达量显著高于胸肌和骨膜的表达量 ($P<0.05$), 胸肌的表达量显著高于骨膜的表达量 ($P<0.05$), 骨膜的表达量最低。

表 1 12 周龄不同组织 *dw* 基因拷贝数

Table 1 The copy number of *dw* gene in different tissues at 12 weeks old

组织 Tissue	肝脏 Liver	胸肌 Breast muscle	腿肌 Thigh muscle	骨膜 Periosteum
公鸡拷贝数 Copy number in male chicken	11.2 \pm 1.11 ^a	6.0 \pm 1.09 ^b	5.6 \pm 0.60 ^b	1.8 \pm 0.37 ^c
母鸡拷贝数 Copy number in female chicken	10.4 \pm 0.51 ^A	4.0 \pm 0.32 ^C	8.0 \pm 0.32 ^B	1.6 \pm 0.40 ^D

注: 不同英文字母表示差异显著, 大写字母表示母鸡不同组织的差异性, 小写字母表示公鸡不同组织的差异性。

Note: Different letters indicated significant difference ($P<0.05$), capital letters indicated significant difference in different tissues for hen ($P<0.05$) and lower case letters for cock.

3 讨论

动物的生长离不开神经内分泌的调节, 其中起

决定性作用的是生长激素 (growth hormone, GH), GH 与靶器官细胞膜上 GHR 相结合, 从而激发一系列细胞内机制。GH 调节组织器官生长发育的途径

是多方面的：(1) 通过与肝脏组织中 GHR 相结合，介导产生 IGF-1, IGF-1 以内分泌的形式促进各组织器官的生长发育；(2) GH 直接作用于肝外组织，与 GHR 相结合，介导产生 IGF-1, IGF-1 以旁分泌和自分泌的形式促进组织的生长发育；(3) GH 直接作用于肝外组织，与 GHR 结合促进组织的生长发育^[8]。肝脏是 *GHR* 基因表达量最高的组织，除肝脏外，*GHR* 基因或多或少地在几乎所有研究过的其他组织中均有表达，如皮肤、心脏、肌肉、肺、肾、睾丸、卵巢、肾上腺、脑和淋巴组织等^[9]。Burnside 等研究发现鸡在不同发育阶段，*GHR* 的表达量不同，且 GH 水平与肝脏 *GHR* 基因的表达呈负相关^[5]。赵茹茜等通过对肉鸡和蛋鸡 *GHR* 基因在肝脏和肌肉中的表达分析，认为不同鸡种 *GHR* 表达量不同：肉鸡肝脏 *GHR* 的表达比蛋鸡早且快，而 *GHR* 在肌肉中的表达却呈现出完全不同的规律，5 日龄时肌肉 *GHR* 的 mRNA 含量最高，且蛋鸡高于肉鸡^[10]。Mao 等对不同品系的肉鸡研究发现，虽然体重和生长速度不同，但肝脏和肌肉中 *GHR* 的 mRNA 含量却没有差异^[11]。

本试验以 *dw* 基因作为影响鸡生长发育的候选基因，通过分析 12 周龄 S2 公、母鸡 *dw* 基因在肝脏、胸肌、腿肌和骨膜等组织中的表达规律，结果发现 *dw* 基因在 S2 公、母鸡肝脏、胸肌、腿肌、骨膜中均有表达，此结果证实了 *dw* 基因作为鸡的负调控因子，在对 S2 鸡生长发育中起了重要的调控作用。此外，*dw* 基因高表达于肝脏，低表达于骨膜中，这表明了其以肝脏为代谢中心，参与了机体生理代谢过程，调控生长激素的体内分泌，从而影响机体的生长发育；通过研究还发现 *dw* 基因在 S2 公鸡胸肌与腿肌的表达量差异不显著，而在 S2 母鸡胸肌与腿肌的表达量差异显著。此结果表明了 *dw* 基因的表达对鸡骨骼肌的生长发育影响有显著的性别差异。此差异还可能与一系列其他生长因子的表达调控有关，因此今后仍需做进一步分子机理的研究。

参考文献：

- [1] Guillaume J. The dwarfing gene *dw*: Its effects on anatomy, physiology, nutrition, management. Its application in poultry industry[J]. World's Poultry Science Journal, 1976, 32(4): 285-304.
- [2] Hutt F B. Sex-linked dwarfism in the fowl[J]. Heredity, 1960, 50: 209-220.
- [3] Leung F C, Styles W J, Rosenblum C I, et al. Diminished hepatic growth hormone receptor binding in sex-linked dwarf broiler and leghorn chickens[J]. Experimental Biology and Medicine, 1987, 184(2): 234-238.
- [4] Agarwal S K, Cogburn L A and Burnside J. Dysfunctional growth hormone receptor in a strain of sex-linked dwarf chicken: evidence for a mutation the intracellular domain[J]. Journal of Endocrinology, 1994, 142: 427-434.
- [5] Burnside J, Liou S S, Cogburn L A. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens[J]. Endocrinology, 1991, 128(6): 3183-3192.
- [6] 戴茹娟, 吴常信, 李宁. 性连锁矮小鸡生长激素受体基因位点多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(4): 315-318.
- [7] 肖璐, 李宁, 戴茹娟, 等. 性连锁矮小鸡(*dw*)生长激素受体(*cGHR*)基因突变的精确定位[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 174-177.
- [8] Lupu F, Terwilliger J D, Lee K, et al. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse post-natal growth[J]. Developmental Biology, 2001, 229(1): 141-162.
- [9] 欧阳建华. 鸡生长轴基因的 SNPs 分析及 *cGHR* 基因第八、九内含子的克隆测序研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [10] 赵茹茜, 李四桂. 禽类生长轴的发育及其对生长的调节[J]. 畜牧与兽医, 1999, 31(4): 35-37.
- [11] Mao J N, Burnside J, Postel-Vinay M C, et al. Ontogeny of growth hormone receptor gene of growth-selected stains of broiler chicken[J]. Endocrinology, 1998, 156: 67-75.
- [12] Hull K L, Fraser R A, Marsh J A, et al. Growth hormone receptor gene expression in sex-linked dwarf leghorn chickens: evidence against a gene deletion[J]. Endocrinology, 1993, 137: 91-98.
- [13] 郭宝林, 杨宁. 鸡矮小基因的研究进展及应用[J]. 中国家禽, 1997(9): 31-33.