

鸡 *NCOA1* 基因发育性表达模式的研究

赵振华 黎寿丰* 黄华云 李春苗 张 静 薛龙岗 丁余荣

(中国农业科学院 家禽研究所 江苏 扬州 225003)

摘要:应用实时荧光定量 PCR 技术,以不同繁殖性能的母亲(S_3 系)、父系(Y、F、D系)为研究对象,研究了鸡 *NCOA1* 基因不同发育时期在下丘脑、垂体、卵巢、肝脏和血液中的相对表达量及表达模式。结果表明, *NCOA1* 基因在鸡性腺组织中高水平表达, *NCOA1* 基因在组织中的表达量与鸡性腺发育和产蛋性能呈相似的变化规律。随着生长发育的变化 *NCOA1* 基因表达量也呈波动性增加,14 周龄前其表达量较少,性成熟后 *NCOA1* 基因表达量快速增加,28 周龄时表达量达到峰值,之后表达量下降。产蛋性能较好的母系鸡 *NCOA1* 基因的相对表达量比产蛋性能较差的父系鸡较早地开始增加,并在 14 周龄后表达量显著高于父系鸡 ($P < 0.05$)。本研究初步揭示了鸡生长发育过程中 *NCOA1* 基因表达的发育性变化模式和品系差异,为进一步研究 *NCOA1* 基因对鸡繁殖性状的影响提供了基础数据。

关键词:鸡; 实时荧光定量 PCR; *NCOA1* 基因; 表达模式

中图分类号:S831.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0564-04

Developmental Expression Patterns of *NCOA1* Gene in Chicken

ZHAO Zhen-hua, LI Shou-feng*, HUANG Hua-yun,
LI Chun-miao, ZHANG Jing, XUE Long-gang, DING Yu-rong

(Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China)

Abstract: The paper studied the populations with different reproduction performance including female line (S_3), male line (F, D, Y) for identification of the relative expression levels and expression patterns of *NCOA1* gene changes in hypothalamus, pituitary, ovary, blood and liver in different development periods by using real-time quantitative PCR. The results indicated that the *NCOA1* gene expression level in gonad tissues was higher than that in other tissues. The mRNA expression regulation of *NCOA1* gene was similar to the growth regulation of chicken gonad tissues and egg-laying. *NCOA1* gene expression increased along with growth with undulatory property, and there was little expression before 14 weeks. *NCOA1* gene expression rapidly increased along with sex maturation, and high expression was found at 28 weeks then decreased. *NCOA1* expression level of the female line was earlier than that of the male line and had significantly higher mRNA expression after 14 weeks ($P < 0.05$). *NCOA1* genes may be playing an important role in reproductive process. These results suggested that the mRNA level of *NCOA1* gene in gonad tissues was different in postnatal developmental stages among lines, which provided some data for further study on the *NCOA1* gene for elucidating the molecular mechanism of reproduction traits.

Key words: chicken; real-time quantitative PCR; *NCOA1* gene; expression pattern

收稿日期:2011-01-08 修回日期:2011-03-15

基金项目:江苏省“333”工程培养资金项目(BRA2010162) 现代农业产业技术体系建设专项资金,中国农业科学院博士基金(JQ2009002)

作者简介:赵振华(1972—),男,助理研究员,博士,主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: zzh0514@163.com; * 通讯作者:黎寿丰,研究员, E-mail: yzlsf3333@126.com。

肉鸡生产的主要目标是使鸡的生长潜力最大化,从而可以获得较大的体重和较高的胸部肌肉产量,然而这两个目标都与其繁殖力成负相关。对母鸡的研究显示,选择大体重会导致不规则排卵比例升高,并且畸形蛋综合症会导致可孵化蛋比例下降。我国优质肉鸡的饲养量每年以 10%~15% 的比例增长,优质肉鸡繁殖力低已成为制约优质肉鸡产业向高效化发展的主要因素。因此,肉鸡育种方案不仅要重点放在生长速度和生产性能上,还要放在种鸡的繁殖性能上,如合格种蛋数、繁殖力和孵化率,如何维持和提高肉种鸡的繁殖力已经成为我们必须面临的一项挑战。

随着分子生物技术的高速发展,从分子水平了解动物固有的繁殖规律逐渐成为可能。核受体辅激活蛋白基因(Nuclear receptor co-activator gene, *NCOA1*)是与类固醇激素受体同源的一类配体依赖性转录因子超家族中的一员^[1]。核受体辅激活蛋白通过与结合到 DNA 上的核受体相互作用增强转录活性^[2],受到影响的雌激素受体、雄激素受体等受体在动物的生长发育和繁殖等生理过程起到重要作用^[3]。Razeto^[4]还提出了 *NCOA1* 是生殖激素“开关”的观点,认为生殖激素长时间打开是导致动物繁殖性能增加的原因。

本试验采用 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术研究优质肉鸡 *NCOA1* 基因 mRNA 丰度在不同组织、不同品系、不同生长发育阶段表达量的动态变化,对阐明鸡卵巢发育和产蛋性能的分子调控机制具有重要意义,为鸡性腺轴组织中 *NCOA1* 基因调控机理的研究奠定了基础。进而为优质肉鸡繁殖性状的选育,提高肉鸡的繁殖力和生产性能提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试鸡与样品的采集

试验用鸡选自中国农业科学院家禽研究所选育的优质肉用型父系(F系、Y系、D系)、母系(S₃)共4个品系。各品系鸡同期留种蛋同批入孵,出雏后每个品系随机选取300只健雏戴翅号后在相同饲养管理条件下饲养。各品系分别于第10、16、20、28、43周龄随机选取20只屠宰,采集下丘脑、垂体、卵巢、肝脏、血液等组织样;于第4、10、14、16、18、20、28、43、52周龄时翅静脉采血,将样品放入液氮速冻,转入-70℃低温冰箱冷冻保存备用。

1.2 主要试剂

Trizol RNA 提取试剂盒购自博大泰克生物有限公司; Two step RT-PCR 试剂盒购自百泰克生物有限公司; 荧光定量 2×SYBR Green I 反转录 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成

根据内参基因 β -action 的序列,用 DNASTar 软件设计特异性引物(表1)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表1 实时荧光定量 PCR 的检测基因和内参基因的引物

Tab.1 Primer pairs for real-time fluorescent quantitative PCR to detect transcriptions of target and internal reference genes

基因 Gene	正向引物 Forward Primers	反向引物 Reverse Primers	退火温度/℃ Annealing
<i>Ncoa-3</i>	AACATGGCATTTCATTGGTG	ACCTTGCTCCAACCTCTTCA	54
<i>Ncoa-12</i>	GAGCCCCCTTTGAGTTCTG	TACCTGTGCAGGTGGGAAG	60
β -action	ACGTGCGACTGGATTCGAG	TGTCAGCAATGC CAG GGT AC	54
β -action	ACTTTG GCA TCG TGGAGG	GAAGAGGTGAGTGTGCGCTGTTG	60

1.4 RNA 提取和 cDNA 的合成

Trizol 法提取各组织中的总 RNA,核酸蛋白质定量仪测定总 RNA 浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。按照 RT-PCR Kit 操作说明书进行 cDNA 的合成。

1.5 实时荧光定量 PCR

合成的 cDNA 同时对目的基因和内参基因进行定量 PCR。25 μL 反应体系: 2 \times SYBR Premix 12.5 μL , 正、反向引物各 0.5 μL 模板 3.0 μL , Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 灭菌去离子水补充至 25 μL 。

反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ / 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 45 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 结束时采集荧光信号。

1.6 数据统计与分析

博日公司荧光定量 PCR 仪配套的 Line - Gene K 软件测定 Ct 值, NCOA1 基因的相对表达量 $X = 2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{NCOA1 基因 Ct} - \beta\text{-action 基因 Ct}$)。SPSS 13.0 软件进行统计学处理。统计数据用 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 采用单因素方差分析对实验结果进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 细胞总 RNA 的提取

RNA 提取试剂盒提细胞总 RNA 经核酸蛋白质定量仪检测, A260/280 的比值在 1.8 ~ 2.0 之间, 琼脂糖电泳分析 28 S、18 S、5 S 条带清晰可见, 无 DNA 污染(图 1)。

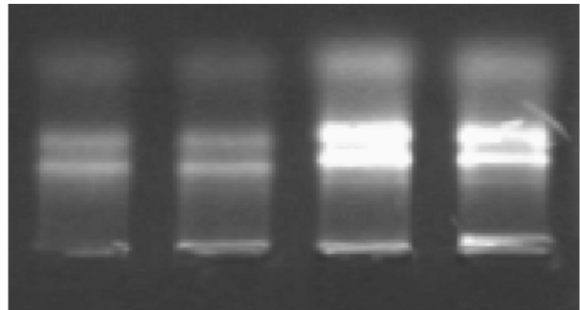


图 1 总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Result of agarose gel electrophoresis of total RNA

2.2 NCOA1 基因在不同时期、不同组织中的表达量变化

不同品系 NCOA1 基因 mRNA 相对表达量的平均值检测结果见表 2。NCOA1 基因 mRNA 不同时期在垂体中的相对表达量均最高。垂体、下丘脑、卵巢是 NCOA1 基因 mRNA 表达的主要组织, NCOA1 mRNA 在血液中表达量较低, 在肝脏中极少表达。随着周龄的增长表达量呈波动性变化, 10 周龄前各组织中 NCOA1 基因 mRNA 的相对表达量差异不显著 ($P > 0.05$), 16 周龄后垂体的表达量均极显著高于其他组织的表达量 ($P < 0.01$)。

表 2 NCOA1 基因在不同阶段、不同组织中的相对表达量

Tab. 2 Relative quantity of different tissues in different development stages of NCOA1 gene

组织 Tissues	10 周 10 week	16 周 16 week	20 周 20 week	28 周 20 week	43 周 20 week
血液 Blood	0.30 \pm 0.25	1.01 \pm 0.52Aa	3.73 \pm 3.26A	22.34 \pm 16.28Aa	5.60 \pm 4.39A
下丘脑 Hypothalamus	0.33 \pm 0.24	3.68 \pm 1.91Bb	15.22 \pm 5.69B	76.5468 \pm 68.84B	17.87 \pm 9.56B
垂体 Pituitary	0.34 \pm 0.21	34.69 \pm 2.64C	52.39 \pm 4.16C	324.37 \pm 161.4C	163.30 \pm 5.65C
卵巢 Ovary	0.33 \pm 0.82	1.40 \pm 0.45Aa	4.43 \pm 3.55A	36.77 \pm 11.09e	7.73 \pm 4.18A
肝脏 Liver	0.25 \pm 0.12	0.51 \pm 0.36Dd	0.87 \pm 0.58D	1.22 \pm 0.52D	0.78 \pm 0.42D

同列数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$), 所标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters in the same column means significant difference between the treatments ($P < 0.05$), same letter in the same row means not significant difference between treatments ($P > 0.05$).

2.3 NCOA1 基因在不同品系、不同生长阶段的表达变化

母系 (S_3 系) 及父系 (Y、F、D 系) 鸡 NCOA1 基因不同发育阶段在血液中相对表达量见表 3。各品系鸡 NCOA1 基因表达量随着日龄增加而增高, 28 周龄时其表达量在不同品系间均达到峰值, 随后开始下降。10 周龄前 NCOA1 基因表达量在不同品系间差异均不显著 ($P > 0.05$); 14 周龄时母系 (S_3 系) NCOA1 基因表达量上升并显著高于父系 (Y、F、D 系) ($P < 0.05$), 父系在 16 周龄时 NCOA1 基因的表达量开始上升。

表3 *NCOA1* 基因在不同品系、不同生长阶段的发育性变化
 Tab. 3 Developmental expression patterns of *NCOA1* gene in different lines

品系 Line	4周 4 week	10周 10 week	14周 14 week	16周 16 week	18周 18 week	20周 20 week	28周 28 week	43周 43 week	52周 52 week
S ₃	0.31 ± 0.18A	0.35 ± 0.12A	1.88 ± 0.65A	3.50 ± 2.13A	5.05 ± 1.03A	5.29 ± 2.07Aa	32.75 ± 16.33A	6.49 ± 2.12F	3.50 ± 2.06C
Y	0.30 ± 0.16A	0.30 ± 0.13A	0.44 ± 0.12B	0.98 ± 0.64B	1.47 ± 0.99C	3.76 ± 1.15Ab	21.39 ± 13.04A	5.637 ± 1.86F	2.26 ± 1.26C
F	0.27 ± 0.17A	0.27 ± 0.12A	0.37 ± 0.15B	0.65 ± 0.41B	1.37 ± 0.84C	2.803 ± 1.17b	19.72 ± 12.15A	5.77 ± 2.16F	2.68 ± 1.15C
D	0.27 ± 0.15A	0.28 ± 0.15A	0.35 ± 0.17B	0.73 ± 0.56B	1.25 ± 0.82C	3.1 ± 1.24Ab	23.51 ± 15.02A	4.92 ± 1.92F	1.54 ± 1.27C

同行数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$) , 所标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$) 。

Different letters in the same line means significant difference between the treatments ($P < 0.05$) , same letter in the same row means not significant difference between treatments ($P > 0.05$) .

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术已广泛用于检测基因的表达水平, 实时荧光定量 PCR 技术可以非常可靠、高灵敏的对 mRNA 的表达进行定量分析^[5-8]。核受体是在生物体内含量最丰富的几大类转录因子超家族之一, 机体的生长发育、细胞分化, 以及体内许多生理、代谢过程都可归因于核受体与相应配体及众多共调节因子相互作用所调控的基因网络的协调表达^[9-11]。黎寿丰等^[12]研究发现在 *NCOA1* 基因不同基因型个体在连产天数、300 日龄产蛋量上有显著差异。本试验采用实时定量 PCR 法首次测定了 *NCOA1* 基因在优质肉鸡不同品系中 5 个组织在发育期、开产期、产蛋高峰期、淘汰期相对表达量的动态表达规律, 结果表明: *NCOA1* 基因在各阶段均有表达, 且表达具有组织差异性, 其中垂体 > 下丘脑 > 卵巢 > 血液 > 肝脏, 性腺轴组织为优势组织, 在血液中有较高水平的表达, 肝脏中基本不表达。基因在各组织中的表达量与鸡性成熟及性腺的生长发育呈相似的变化规律, 证实了该基因可能是影响鸡产蛋性状的主效基因或与主效基因连锁。

本研究显示从 4 周龄至 52 周龄(即从出雏、性成熟、开产、产蛋高峰期直至产蛋后期淘汰) 鸡血液中 *NCOA1* 基因的表达量呈现波形增加, 表达水平变化结果呈现低—高一—较低的趋势, 这与鸡性腺发育、产蛋曲线的变化趋势相一致。*NCOA1* 基因 mRNA 在 10 周龄前表达量差异不显著, 10 ~ 14 周龄时 *NCOA1* 基因的表达量显著增加, 16 周龄后 *NCOA1* 基因的表达量快速增加, 28 周龄后 *NCOA1* 基因的表达量开始缓慢的下降, 这说明 *NCOA1* 基因对鸡生殖器官的发育及性成熟均有重要作用。母系鸡 *NCOA1* 基因表达量显著增加的时间约比父系鸡早 2 周, 这也是母系鸡性成熟早的原因之一。在鸡发育、生长和整个产蛋周期内, *NCOA1* 基因可能对介导生殖激素的功能起到重要的调控作用, 此外, *NCOA1* 基因对鸡生殖器官的发育和功能发挥也起到重要的调控作用。

NCOA1 基因不同基因型与产蛋性能有显著的关联性, 且在各组织中的表达量与鸡性成熟及性腺的生长发育呈相似的变化规律, 证实了该基因可能是影响鸡产蛋性状的主效基因或与主效基因连锁。母系鸡 *NCOA1* 基因表达量较早的显著增加, 且与父系鸡相比其表达量维持在一个较高水平, 证实了 Raze-to 提出的 *NCOA1* 是生殖激素“开关”的观点, 是母系鸡具有较高产蛋量的原因之一。本研究为进一步研究鸡繁殖性状发生机制, 更好地阐明鸡繁殖性状调控的分子机制提供了参考。

参考文献:

- [1] Wang H, Huang Z Q, Xia L, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor [J]. Science 2001 293: 853-857.
- [2] Kmaei Y. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors [J]. Cell, 1996 85: 403-414.
- [3] Glass C K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers [J]. Endocrinol Rev, 1994, 15: 1503-1519.
- [4] Raze-to A, Ramakrishnan V, Litterst C M, et al. Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain [J]. Journal of Molecular Biology 2004 336(2): 319-329.

(下转第 588 页)

- [2]胡莹,杨凌,杨胜利. 糖苷酶序列分类法和作用机理的研究进展[J]. 药物生物技术, 2006, 13(1): 66-70.
- [3]Henrissat B. A classification and mechanisms of glycosidaese[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2006, 13(1): 66-70.
- [4]Arnold K, Bor doli L, Kopp J, et al. The SWISS – MODEL Workspace: A web – based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(1): 195-201
- [5]Kopp J, Schwede T. The SWISS – MODEL repository of annotated three – dimensional protein structure homology models [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(4): 230-234.
- [6]Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS – MODEL: an automated protein homology – modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(3): 3381-3385.
- [7]Guex N, Peitsch M C. SWISS – MODEL and the Swiss – PdbViewer: An environment for comparative protein modelling[J]. Electrophoresis, 1997, 18(2): 2714-2723.
- [8]Lo Leggio L, Larsen S. The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5[J]. FEBS Lett, 2002, 523(1-3): 103-108.
- [9]Qin Y Q, Wei X M, Song X, et al. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 135(2): 190-195.
- [10]Michael B, Howard, Nathan A, et al. Identification and analysis of polyserine linker domains in prokaryotic proteins with emphasis on the marine bacterium *Microbulbifer degradans* [J]. Protein Sci, 2004, 13(5): 1422-1425.
- [11]江华,于兆海. 里氏木霉纤维素酶系的分离及其酶学性质[J]. 南京林业大学学报, 2007, 31(6): 48-52.
- [12]Wu S F, Ding S J, Zhou R, et al. Comparative characterization of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase I (EG1) with its truncated catalytic core (EG1 – CM), and their impact on the bio – treatment of cellulose – based fabrics [J]. J Biotechnol, 2007, 130(4): 364-369.
- [13]Nozaki K, Seki T, Matsui K, et al. Structure and characteristics of an endo – beta – 1,4 – glucanase, isolated from *Trametes hirsuta*, with high degradation to crystalline cellulose [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(10): 2375-2382.
- [14]Dashtban M, Maki M, Leung K T, et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison [J]. Crit Rev Biotechnol, 2010.

(上接第 567 页)

- [5]Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2 – Delta Delta C (T) method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [6]Higuchir, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real – time monitoring of DNA amplification reactions [J]. Biotechnology, 1993, 11(9): 1026-1030.
- [7]Kel D, Chen Z, Yung W K. A reliability test of standard based quantitative PCR: exogenous standards [J]. Mol Cell Probes, 2000, 14(2): 27-135.
- [8]Becker K, Pan D, Whitel Y C B. Real – time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10: 2559-2566.
- [9]Shim W S, Dlirenzo J, Decaprio J A, et al. Segregation of steroid receptor coactivator – 1 from steroid receptors in mammary epithelium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 208-213.
- [10]Meijer O C, Steenbergen P J, Kloet E R. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC – 1 and SRC – 2 in brain and pituitary [J]. Endocrinology, 2000, 141: 2192-2192.
- [11]Ogawa H, Nishi M, Kawata M. Localization of nuclear coactivators p300 and steroid receptor coactivator 1 in the rat hippocampus [J]. Brain Res, 2001, 890: 197-202.
- [12]黎寿丰,赵振华,黄华云,等. *NCOA1* 基因多态性与邵伯鸡母系产蛋性状的相关性分析 [J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(2): 215-219.