

## 鸡胚公母性腺差异表达基因的基因芯片杂交筛选

高宏巍<sup>1</sup>, 王胜军<sup>2</sup>, 李慧锋<sup>3</sup>, 孟和<sup>1</sup>

1 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

2 河北飞龙家禽育种公司, 石家庄 050091

3 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801

**摘要:** 采用 Affymetrix 公司鸡基因组芯片对 9 日龄鸡胚公母性腺总 RNA 进行了芯片杂交, 并对基因表达谱进行了分析。统计结果显示, 9 日龄母鸡性腺表达基因数 19 368 个, 公鸡性腺表达基因数 19 493 个; 公母性腺绝对差异表达基因, 即公鸡性腺表达而母鸡性腺不表达基因 145 个, 母鸡性腺表达而公鸡性腺不表达基因 189 个。绝对差异表达基因功能分类结果显示, 参与细胞组成、细胞加工和分子结合基因占多数, 部分基因参与细胞器组成、代谢加工、生物学调控以及催化反应和细胞信号转导等。值得注意的是, 本研究发现了一些已经报道同性别决定和分化有一定关联的基因, 如 ASW、CHD1 和 SOX9 等, 同时也发现了一些未知其同性腺分化和发育有关联的基因和编码假想蛋白的表达序列。进一步分析这些基因和表达序列的生物学功能和表达模式, 将对鸟类性别决定和分化机制的了解提供有益参考。

**关键词:** 鸡, 性腺, 差异表达基因, 基因芯片

## Screening of sexual differentially expressed genes in the chicken early embryonic gonads using DNA microarray

Hongwei Gao<sup>1</sup>, Shengjun Wang<sup>2</sup>, Huifeng Li<sup>3</sup>, and He Meng<sup>1</sup>

1 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

2 Hebei Feilong Poultry Breeding Company, Shijiazhuang 050091, China

3 College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

**Abstract:** Using Affymetrix's Chicken Genome Array, we used total RNA isolated from the gonads of male and female chicks at embryonic day 9 to identify the genes differentially expressed between male and female. Statistical results show 19 493 genes expressed in male chick's embryonic gonads and 19 368 genes expressed in female. There were 145 genes specificity expressed in male and 189 genes in female. The gene ontology classification (GOC) indicated these differentially expressed genes were mainly involved in cellular component, cell process and molecular banding, a part of genes were involved in organelle component, metabolic process, biologic process, catalytic activity and signal transducer activity. Some genes had reported for sex determination and differentiation in birds, such as avian sex-specific avian sex-specific W-linked, chomodomain-helicase-DNA-binding protein 1 and sex determining region Y-box 9. In addition, we also found several genes or hypothetical proteins were unknown function for the

**Received:** September 17, 2008; **Accepted:** December 1, 2008

**Supported by:** Shanghai Municipal Natural Science Foundation (No. 08ZR1410800).

**Corresponding author:** He Meng. Tel: +86-21-3420-6145; Fax: +86-21-3420-4538; E-mail: menghe@sjtu.edu.cn

上海市自然科学基金项目(No. 08ZR1410800)资助。

gonad differentiation and development, focus to their biological function and expression pattern in further works would provide a beneficial reference for understand the mechanism of sex differentiation and determination in birds.

**Keywords:** chicken, gonad, differentially expressed genes, microarray

性别决定和分化现象普遍存在于生物体中。对脊椎动物而言, 性别决定受遗传和环境因素所控制, 其中哺乳动物和鸟类的性别决定受遗传因素所决定。同哺乳动物所具有的 XX:XY 雄异型性染色体系统不同, 鸟类具有 ZZ:ZW 性染色体系统, 性染色体组成呈雌异型<sup>[1]</sup>。而在许多低等脊椎动物中, 基因组中缺少异型性染色体, 性别极易变化, 甚至直接受到环境因素如胚胎发育温度的控制。

近年来哺乳类性别决定机制取得了明显的进步, 特别是 Sinclair 等<sup>[2]</sup>克隆到人 Y 染色体上的性别决定区基因(Sex-determining region Y gene, SRY)之后, 已有大量的研究证实 SRY 基因是胚胎发育过程中诱导睾丸分化重要的发育开关, 是性别决定和分化的关键基因。在家禽上人们也希望能够找到类似于哺乳动物的 SRY 基因, 但迄今为止没有发现在同源性和功能上相近的基因。虽然鸟类性别决定同哺乳动物一样受遗传因素决定, 但鸟类性腺发育是易变的, 更容易受到环境因素如性激素尤其是雌激素的调控<sup>[3]</sup>。目前人类参考哺乳类等其他物种研究结果, 获得并分析了部分可能与鸟类性别决定和分化相关基因, 但这些基因在结构、表达模式乃至生物学功能上有许多不同。尽管人们提出了一些假说和推测, 但迄今为止鸟类性别决定和分化的基本机理还不清楚<sup>[4]</sup>。

本实验采用基因芯片杂交技术, 检测胚胎发育早期公母性腺中基因表达谱, 重点检测分析差异表达基因, 试图了解在性腺分化过程中基因表达的特点和规律, 从中筛选同性腺分化和性别决定可能有重要关联的候选基因, 为了解鸡性腺分化和性别决定积累了基础研究素材和数据。

## 1 材料方法

### 1.1 实验动物

种蛋采自上海浦东鸡原种场纯种浦东鸡。取种蛋甲醛熏蒸消毒后, 在温度 38°C、相对湿度 60%条件下孵化。选取 9 日龄鸡胚, 解剖后在显微镜下用镊子摘取鸡胚性腺, 每个性别采集 4~8 只鸡胚性腺

建为一池。同时每个鸡胚采 500 mg 肝脏用于性别鉴定。所摘取性腺组织材料迅速放入液氮速冻, 用于直接提取总 RNA, 或-80°C 中保存备用。

### 1.2 鸡胚性别鉴定

鸡胚肝脏 DNA 采用常规酚/氯仿抽提法。鸡胚性别鉴定按照 Kodama H 等通过 PCR 法<sup>[5]</sup>进行。引物序列为 *Xho* I: 5'-AACTACCACTTTTCTCACGG-3'和 *Xho* II: 5'-TTCAGAGTGATAACGCATGG-3'。该引物可扩增母鸡(ZW)W 染色体上一段特异性片段, 产物在 2%琼脂糖凝胶上分离、鉴定。

### 1.3 基因芯片杂交

基因芯片采用 Affymetrix 公司鸡基因组芯片(GeneChip chicken genome array)。芯片杂交及数据处理由上海晶泰生物技术有限公司完成。其中性腺总 RNA 提取采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen), 总 RNA 纯化采用 RNeasy Mini Kit (Qiagen), cDNA 制备采用 Affymetrix one-cycle cDNA Synthesis Kit (Qiagen), cRNA 合成采用 GeneChip IVT Labeling Kit (Qiagen)。杂交结果应用 GCOS(GeneChip® Operating Software) 软件进行数据分析。以上实验操作均按试剂盒说明和 Affymetrix 表达谱芯片实验操作和分析手册进行。

### 1.4 差异表达基因功能分类

根据差异表达基因探针代码, 在 Affymetrix 分析中心获得基因注释(www.affymetrix.com)。并进行基因分类分析 GO (Gene ontology)(http://www.geneontology.org)。

## 2 结果与分析

### 2.1 芯片杂交结果

从鸡胚公母性腺基因芯片杂交信号散点图(图 1)可以看出, 芯片整体杂交效果很好, 符合进行基因表达分析的要求。公母鸡胚性腺基因共同显著表达基因(红色)占多数; 有部分基因在公母鸡胚性腺表达不显著或杂交信号不确定(黄色); 值得注意的是, 在公母鸡胚性腺差异表达基因(蓝色)在图上得到清晰体现。

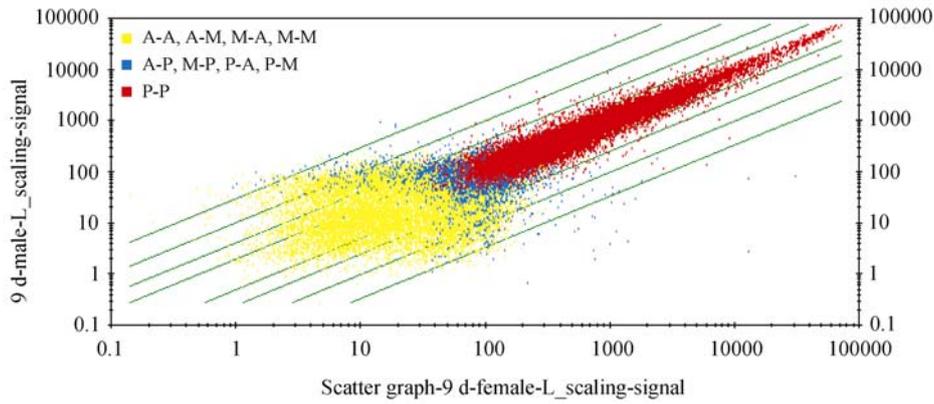


图 1 9 日龄鸡胚公母性腺基因芯片杂交信号散点图

Fig. 1 Scatter graph of expression genes in gonads of chick at embryonic day 9. “P” indicated the hybridization signal was “Present”; “M” indicated the hybridization signal was “Marginal”; A indicated the hybridization signal was “Absent”. Abscissa represented the scaling signal in gonads of female chick. Ordinate represented the scaling signal in gonads of male chick.

2.2 差异表达基因

对 9 日龄鸡胚公母性腺基因芯片杂交信号数据统计分析显示(表 1), 在公母性腺有较多的基因表达, 其中公鸡 19 493 个, 母鸡 19 368 个; 部分基因在公母性腺呈现上调差异表达, 其中公鸡 1254 个, 母鸡 1710 个; 少数基因呈现 2 倍以上上调差异表达, 其中公鸡 463, 母鸡 434; 极少数基因在公母性腺中呈现绝对差异表达, 其中公鸡 145 个, 母鸡 189 个。

表 1 9 日龄鸡胚公母性腺表达基因数量

Table 1 Number of expression genes in gonad of chick at embryonic day 9

Kind of genes	Male	Female
Total expression genes	19493	19368
Up-regulated expression genes	1254	1710
> 2 fold up-regulated expression genes	463	434
absolute differentially expression genes	145	189

2.3 差异表达基因分析

为了进一步分析鸡胚性腺基因表达特点, 本实验采用对公母性腺绝对差异表达基因按生物学加工、细胞组成和分子功能进行了 GO (GO ontology) 功能分类。从图 2 可以看出, 在细胞组成中, 绝大部分基因参与细胞组成(85.48%~89.29%), 部分基因参与细胞器组成(28.57%~33.87%); 在生物学加工中, 绝大部分基因参与细胞加工(77.05%~89.66%), 半数基因参与代谢加工(50%~57.38%); 部分基因参与生物学调控 (8.03%~31.03%) 和发育加工 (9.84%~

13.79%)。在分子功能方面, 许多基因参与 (67.95%~79.01%) 分子结合, 部分基因参与催化 (28.21%~36.05%) 和信号转导(10.47%~19.23%)。

为了进一步了解公母性腺绝对差异表达基因, 实验根据 Affymetrix 基因芯片探针, 利用 Affymetrix 网上资源和相关生物数据库, 对这些基因进行了注释和分析。根据基因差异表达量获得的部分基因 (差异表达量排序在 20 位以前)见表 2。

表 2 部分 9 日龄鸡胚公母性腺差异高表达基因

Table 2 The top20 differentially expressed genes in the gonads of male and female chick at embryonic day 9

Male chick		Female chick	
Gene Symbol	Entrez Gene ID	Gene Symbol	Entrez Gene ID
CLDN11	424990 Entrez gene	CYP19A1	414854 Entrez gene
ERBB2IP	431583 Entrez gene	ASW	395423 Entrez gene
WAC	428414 Entrez gene	CHD1	374195 Entrez gene
TACR3	768993 Entrez gene	17βHSD	395641 Entrez gene
NR2E1	396082 Entrez gene	HNRPK	426516 Entrez gene
FBN2	374203 Entrez gene	NPPC	419487 Entrez gene
VPS53	417622 Entrez gene	DNAJC21	427434 Entrez gene
SOX9	374148 Entrez gene	PPFIA2	417877 Entrez gene
AEBP2	418184 Entrez gene	MYL1	396470 Entrez gene
GCNT2	420861 Entrez gene	ZP3	378906 Entrez gene

3 讨论

鸡胚性腺早期分化和发育伴随着非常复杂的生理生化过程。从对 9 日龄鸡胚公母性腺基因芯片杂交信号数据统计分析来看, 这个时期公母性腺有较

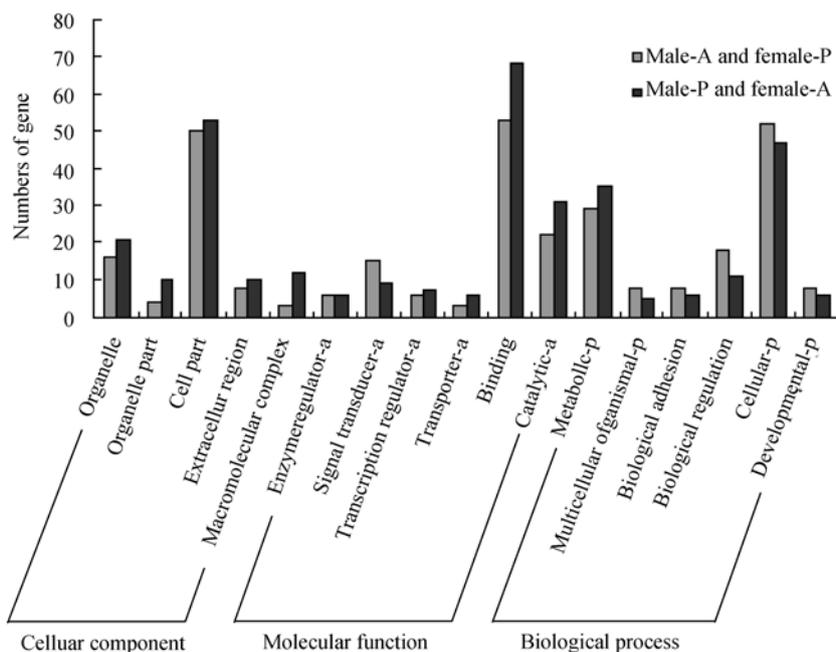


图 2 9 日龄鸡胚公母性腺差异表达基因 GO 功能分类图

Fig. 2 GO classification of genes differentially expressed in the gonads of male and female Chick at embryonic day 9. The blue bars represent the genes of only expressed in gonads of female chick and the maroon bars represent the genes of only expressed in gonads of male chick. The letter “A” is the abbreviation for “activity” and the letter “P” is the abbreviation for “process”.

多的基因表达, 参照 affymetrix 统计和基因芯片定制的基因组 28 416 个基因 (www.affymetrix.com), 这个时期在鸡胚性腺有近 70%(公鸡 68.60%, 母鸡 68.16%)基因表达, 同鸡胚性腺早期强烈的分化和发育是相吻合的。公母性腺差异表达基因统计显示, 上调差异表达基因占总表达基因不到 10%(公鸡 6.43%, 母鸡 8.83%), 其中 2 倍以上上调差异表达基因占总表达基因不到 3%(公鸡 2.38%, 母鸡 2.24%), 而公母性腺绝对差异表达基因占总表达基因不到 1%(公鸡 0.74%, 母鸡 0.98%)。由此可以推断, 公母性腺的分化是少数基因发挥关键性决定作用, 其他更多的基因只是在表达程度上有所差异而已, 其结果也就实现了公母性腺分化和性别决定。对公母性腺差异表达基因的 GO 功能分类结果显示, 公母性腺差异表达基因数量在细胞组成、生物学加工和分子功能 3 大方面表现相同规律和分布, 其中在细胞组成、细胞和代谢加工、催化活性几个方面动用了较多基因。其中尤其明显的是在生物结合方面, 包括离子结合、核酸结合和蛋白结合等动用的基因最多, 一定程度上反映了这个时期基因表达调控占主导地位, 这与性腺分化发育复杂性相对应。

为了寻找可能的关键基因, 实验对公母性腺绝

对差异表达基因进行了注释和分析。在根据差异表达量排队的前 20 位基因中, 看到了一些已知性别特异表达基因, 如 ASW<sup>[6]</sup>、CHD<sup>[7]</sup>、17 $\beta$ HSD<sup>[8]</sup>和 SOX9<sup>[9]</sup>等, 这些基因的表达特征同相关研究结果基本一致, 证实和反映了它们在鸡性腺中表达和在性别分化中存在的可能作用。另外, 令人惊喜的是, 本研究也得到了一些过去在性腺分化上没有研究过的基因、编码未知功能的假想蛋白和表达序列。深入了解他们的组成、结构和功能, 将对鸟类性别分化和决定研究提供十分有益的参考。

## REFERENCES

- [1] Schmid W. DNA replication patterns of the heterochromosomes in *Gallus domesticus*. *Cytogenetics*, 1962, 1: 344–352.
- [2] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, *et al*. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, 346: 240–224.
- [3] Scheib D. Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation*, 1983, 23: 87–92.
- [4] Smith C A, Sinclair AH. Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays*, 2004, 26: 120–132.
- [5] Kodama H, Saitoh H, Tone M, *et al*. Nucleotide sequences

- and unusual electrophoretic behavior of the W chromosome-specific repeating DNA units of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Chromosoma*, 1987, **96**: 18–25.
- [6] O'Neill M, Binder M, Smith C, *et al*. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev Genes Evol*, 2000, **210**: 243–249.
- [7] Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing non-ratite birds. *Proc Biol Sci*, 1996, **263**(1377): 1635–1641.
- [8] Yukiko W, Tadashi F, Shimako K, *et al*. The cDNA cloning and transient expression of an ovary-specific 17 b-hydroxysteroid dehydrogenase of chickens. *Gene*, 1999, **233**: 75–82.
- [9] Oreal E, Pieau C, Mattei MG, *et al*. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn*, 1999, **212**: 522–532.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### Brock 微生物生物学 (上下册, 含光盘) (译)

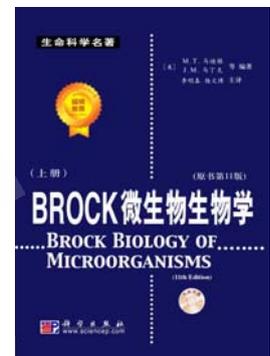
(美) M.T.马迪根 J.M.马丁克 等编著  
李明春 杨文博 主译

978-7-03-021262-7 ¥ 248.00 2008年12月出版

《Brock Biology of Microorganisms》是美国优秀的微生物学教材。该书自1970年第1版到2006年已修改至第11版,具有36年的历史。它以新颖、先进、严谨的内容、丰富精美的图片、启发式的知识结构和巧妙的构思,赢得了广大师生的青睐。

本书知识内容博大精深,从微生物学基础,进化微生物学和微生物多样性,代谢多样性和微生物生态学,免疫学、致病性和宿主反应,微生物疾病,工业微生物学等六部分入手,详尽地介绍了微生物的结构、营养、代谢、遗传、生长和调控、主要的微生物疾病、微生物多样性、微生物生态、微生物进化等内容。

本书具有全面性、系统性和广泛性等特点,内容丰富、阐述清晰、简明易懂,条理性强、可读性强。可作为综合性大学、医学院校、农林院校、轻工业院校等生命科学、医学、药学等各专业教师和学生及相关研究人员学习微生物学时的参考用书。



### 精编人类遗传学实验指南 (精装) (译)

N.C. 德拉科波利 J.L.海恩斯 B.R.科夫 C.C.莫顿 A.罗森茨威格 C.E.塞德曼 J.G. 塞德曼 D.R.史密斯 编著  
夏家辉 夏昆 主译

978-7-03-022540-5 ¥ 168.00 2008年12月出版

本书包括十三章和相关附录,详细介绍了遗传作图、基因分型、体细胞杂交、细胞遗传学、分子克隆、致病或易感基因定位克隆、临床遗传学与临床分子遗传学、肿瘤遗传学、转录组学、基因治疗载体、基因治疗策略等内容的相关基础知识、科学原理、实验方法等。

本书可供从事遗传学及相关专业教学和研究的科研人员、研究生、教师等的理论及实验参考书籍。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>