

皖西白鹅繁殖周期中垂体 *FSH β* mRNA 的表达规律

姜润深 杜晓东 陈兴勇 耿照玉*

(安徽农业大学 动物科技学院,合肥 230036)

摘要 为探索皖西白鹅繁殖周期中不同状态下垂体 *FSH β* mRNA 的表达特性,选取开产前期(220日龄)、产蛋期、就巢起始期、就巢中后期和就巢后休产期的皖西白鹅母鹅各6只,采用荧光定量PCR方法分别测定了各时期垂体 *FSH β* mRNA 的表达水平。结果显示,产蛋期母鹅垂体 *FSH β* mRNA 表达水平为 $1\ 862.9 \pm 350.5$,极显著高于其他时期($P < 0.01$)。产蛋前、就巢起始、就巢中后期以及就巢后休产期母鹅垂体 *FSH β* mRNA 表达水平分别为 95.5 ± 33.8 、 248.2 ± 40.0 、 122.3 ± 41.3 和 211.6 ± 56.8 ,但各时期间的表达水平差异不显著($P > 0.05$)。由此可见,皖西白鹅垂体 *FSH β* mRNA 表达水平与繁殖周期密切相关,且产蛋期该基因表达水平的大幅度下调与就巢行为起始和维持有关。

关键词 白鹅; 繁殖周期; 就巢; *FSH β* mRNA

中图分类号 S 835; S 835.1

文章编号 1007-4333(2010)06-0084-05

文献标志码 A

Expression of pituitary *FSH β* mRNA during reproduction cycle in Wanxi white goose

JIANG Run-shen, DU Xiao-dong, CHEN Xing-yong, GENG Zhao-yu*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract To investigate the expression of pituitary *FSH β* mRNA at different stages during reproduction cycle in Wanxi white goose, the pituitary *FSH β* mRNA level was tested by FQRT-PCR method in six female geese at stages of pre-laying, laying, onset of incubation, middle or later period of incubation, and laying cessation after incubation, respectively. Results showed that, the level of pituitary *FSH β* mRNA ($1\ 862.9 \pm 350.5$) in laying stage was higher ($P < 0.01$) than which at any of other stages. The average levels of pituitary *FSH β* mRNA were 95.5 ± 33.8 , 248.2 ± 40.0 , 122.3 ± 41.3 , and 211.6 ± 56.8 at pre-laying, onset of incubation, middle or later period of incubation, and laying cessation after incubation, respectively, but there is no significantly differ among them ($P > 0.05$). Therefore, the level of pituitary *FSH β* mRNA is highly associated with the reproduction cycle in Wanxi white goose, and a sharp decrease of pituitary *FSH β* mRNA level in laying period associated with the onset and maintenance of incubation.

Key words white goose; reproduction cycle; incubation; *FSH β* mRNA

动物促卵泡激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 是由垂体前叶分泌的糖蛋白类促性腺激素, 由 α 和 β 亚基组成, 其中 β 亚基决定其生物学功能。 *FSH β* 通过与卵巢上受体基因结合而对卵泡的生长与成熟起着重要的作用^[1]。FSH 能够提高鸡胚卵巢生殖细胞的增殖活性, 显著增加生殖细胞数目, 且存在剂量效应关系, 表明 FSH 可促进禽类生殖细胞

的发育^[2]。禽类产蛋期 FSH 不断刺激卵泡的产生、发育、直至形成成熟卵泡^[3]。动物血浆 *FSH β* 水平与产蛋性能和繁殖周期密切相关^[4-7], 因此 *FSH β* 已被看作动物繁殖性状重要的候选基因。研究表明, 猪 *FSH β* 多态性与母猪产仔性能显著相关^[8]; 山羊 *FSH β* 外显子存在多个单核苷酸变异显著影响产羔数^[9-10]; 鸡 *FSH β* 调控区和编码区的变异与

收稿日期: 2010-04-19

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADC1B03)

第一作者: 姜润深, 副教授, 博士, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: jiangrunshen@ahau.edu.cn

通讯作者: 耿照玉, 教授, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: jrsahpoultry@sina.com

母鸡性成熟和早期产蛋密切相关^[11-12]; 鹅 *FSH β* 外显子 3 存在 1 个单核苷酸多态位点, 但尚未开展该位点对繁殖性状的遗传效应^[13]。

皖西白鹅原产于安徽省西部地区, 是我国优良的羽、肉兼用型鹅种。该鹅种产蛋量低, 年均产蛋不到 30 枚, 母鹅强烈的就巢性是产蛋量低的重要因素。本研究分析了皖西白鹅产蛋与就巢周期中不同阶段垂体 *FSH β* mRNA 表达量水平和变化规律, 旨在为通过生殖调控提升产蛋性能或抑制就巢行为提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

皖西白鹅高产蛋品系扩繁群由安徽省皖西白鹅原种场提供并饲养。试验鹅母鹅 255 只、公鹅 68

只, 共 323 只。210 日龄时, 将试验鹅随机分成 17 个小间饲养, 每间 15 只母鹅, 4 只公鹅, 试验鹅编带脚号。饲喂精料, 适当补充青草等粗饲料, 常规饲养管理。

1.2 样品采集

皖西白鹅母鹅一个完整的生物学产蛋年中一般就巢 2~4 次, 本研究围绕母鹅第 1 个就巢周期设计 5 个采样时间点, 分别为开产前期 (I)、产蛋期 (II)、就巢起始期 (III)、就巢中后期 (IV) 和就巢后休产期 (V)。由于鹅群中不同个体开产和就巢日龄不一致, 因此各采样点的实际取样时间难以统一, 但尽量考虑同一个采样点的取样时间相近。实际采样点母鹅的基本信息见表 1。每个采样点母鹅屠宰后立即取下整个垂体, 液氮保存, 用于 *FSH β* 的基因表达分析。

表 1 试验样本的基本信息

Table 1 Basic information for experimental animals

取样时期	样本量	平均日龄/d	描述
开产前期	6	220	均为 220 日龄取样, 取样 14 d 后整个鹅群见蛋, 31 d 后鹅群产蛋率达 5%
产蛋期	6	272.7 \pm 4.6	每只母鹅产蛋 3 枚, 平均为开产后(8.5 \pm 2.1) d
就巢起始期	6	293.3 \pm 5.4	表现就巢行为时取样, 平均为开产后(29.3 \pm 4.3) d, 平均产蛋 11.6 \pm 2.7 枚
就巢中后期	6	311.0 \pm 6.6	就巢行为起始后平均(16.7 \pm 2.2) d
就巢后休产期	6	336.2 \pm 11.6	均为就巢结束后 7 d

1.3 *FSH β* mRNA 的表达分析

1.3.1 RNA 的提取与 cDNA 合成

对整个垂体利用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 并立即利用 AMLV 反转录酶试剂盒, 将 mRNA 合成 cDNA 第 1 条链。逆转录反应体系为 40 μ L, 包括总 RNA 4 μ L, Oligo dT(18)3.2 μ L, RNA 酶抑制剂 2 μ L, 250 μ mol/L dNTP Mix 3.2 μ L, 5 \times RT Buffer 8 μ L, 灭菌 DEPC 水 17.6 μ L。反转录条件为: 65 $^{\circ}$ C 5 min, 快速冷却后立即加入反转录酶

AMLV(200 U/ μ L)2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温浴 50 min, 75 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 登陆的 *FSH β* (GenBank EU252532)、持家基因 *GAPDH* (GenBank NM204305) 基因序列, 应用 Primer 5.0 软件分别设计引物 P1 和 P2, 用以检测组织中 *FSH β* 基因表达量。引物信息见表 2。引物使用前, 用双蒸水稀释到 10 μ mol/L。

表 2 鹅 *FSH β* 和 *GAPDH* PCR 引物

Table 2 Information of PCR primers for goose *FSH β* and *GAPDH*

引物名称	引物序列	退火温度/ $^{\circ}$ C	产物长度/bp
P1	F: 5'-GTGGTGCTCAGGATACTGCTTCA-3' R: 5'-GTGCAGTTCAGTGCTATCAGTGTC-3'	58	209
P2	F: 5'-GCCATCACAGCCACACAGA-3' R: 5'-TTTCCCCACAGCCTTAGCA-3'	58	180

1.3.3 荧光定量 PCR 最佳反应条件

荧光定量 PCR 在 Bio-Rad 公司 Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行。荧光定量 PCR 反应体系为 12.5 μL , 含模板 cDNA (50 ng/ μL) 1.0 μL , SYBR 6.25 μL , 正向引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μL , 反向引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μL , ddH₂O 4.75 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.4 统计分析

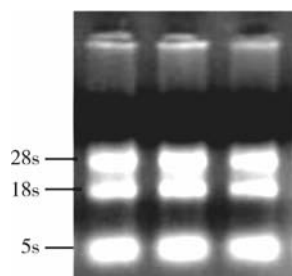
Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪自动分析荧光信号并将其转换为 C_t 值, 根据标准曲线计算 C_0 值, 然后根据目的基因和内标持家基因 C_t 值的比值计算目的基因的相对表达量。各时间点 *FSH β* mRNA 表达量以平均数 \pm 标准误差表示, 各时间点间表达量比较采用单因子方差分析法。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和反转录结果

提取的总 RNA 立即用 15 mg/mL 的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳图谱显示 3 条带, 28S 和 18S 条

带清晰(图 1), 表明总 RNA 质量良好, 可以用于 RT-PCR 分析。

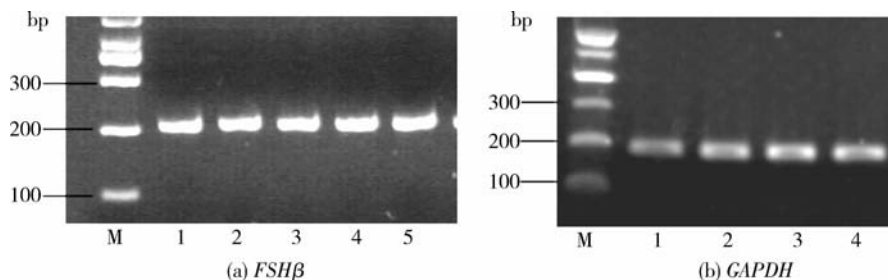


3 条泳道为随机选取的样品

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for total RNA

用设计的引物 P1 和 P2 分别对反转录产物 cDNA 进行 PCR 扩增反应, 扩增产物经 15 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2。 *FSH β* 基因和 *GAPDH* 基因扩增片段与预期片段大小一致且特异性好, 无非特异条带, 说明引物和反转录的产物模板质量良好, 可用于后续的目的基因和看家基因定量 PCR 分析。



M 为 marker; 1~5 为随机选取的样品。

图 2 *FSH β* 和 *GAPDH* cDNA 的 PCR 图谱

Fig. 2 PCR for cDNA of *FSH β* and *GAPDH*

2.2 基因扩增曲线和融解曲线

FSH β 及 *GAPDH* 基因扩增曲线走势正常, 呈典型的 S 型曲线(图 3), 且 2 个基因的融解曲线均呈单一尖峰(图 4), 表明设计的引物特异性好, 无引物二聚体和非特异产物。

2.3 各采样点 *FSH β* mRNA 表达水平

图 5 显示了皖西白鹅母鹅开产前至第 1 个就巢周期结束 5 个阶段的垂体 *FSH β* mRNA 表达水平及其变化趋势。产蛋前期 (220 d) 母鹅垂体 *FSH β* mRNA 表达水平最低 (95.5 \pm 33.8), 产蛋期表达水

平 (1 862.9 \pm 350.5) 显著 ($P < 0.01$) 高于产蛋前期, 且表达量快速增加约 20 倍。就巢中后期, 以及就巢后休产期母鹅垂体 *FSH β* mRNA 表达水平分别为 (248.2 \pm 40.0)、(122.3 \pm 41.3) 和 (211.6 \pm 56.8) 差异不显著 ($P > 0.05$), 但均显著低于产蛋期 ($P < 0.01$), 表明就巢起始伴随垂体 *FSH β* mRNA 表达量的快速回落。统计分析表明, 该基因开产前 (220 d) 与就巢期以及休产期的 mRNA 表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。

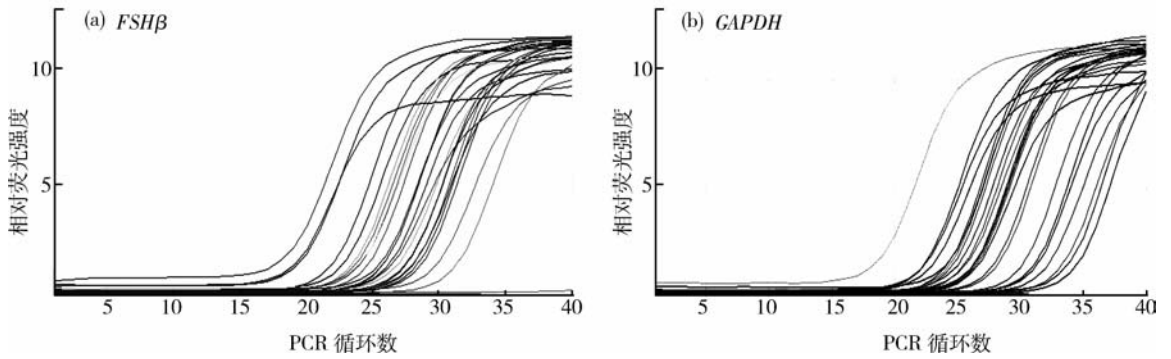


图 3 *FSH β* 及 *GAPDH* 的扩增曲线

Fig. 3 PCR curves for *FSH β* and *GAPDH*

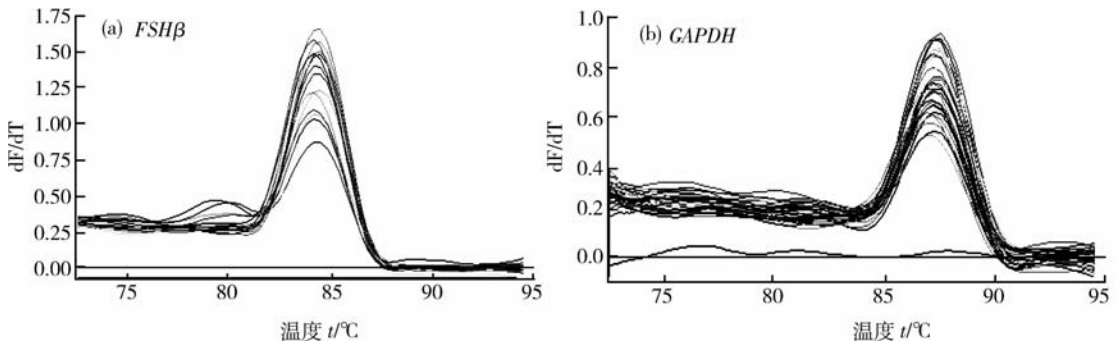
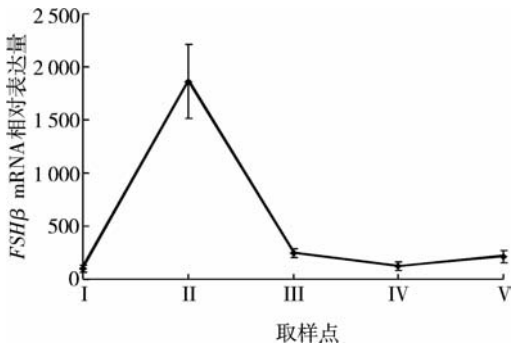


图 4 *FSH β* 及 *GAPDH* 的融解曲线

Fig. 4 Melting curves for *FSH β* and *GAPDH*



I 为开产前期；II 为产蛋期；III 为就巢起始期；
IV 为就巢中后期；V 为就巢后体产期。

图 5 皖西白鹅繁殖周期中 5 个阶段垂体 *FSH β* mRNA 表达水平变化规律

Fig. 5 Expression level of pituitary *FSH β* mRNA at 5 different stages during reproduction cycle in Wanxi white geese

3 讨论

1) FSH 的主要生理作用是刺激卵巢生长, 增加卵巢重量, 刺激卵泡生长、发育, 并在 LH 的协同作

用下, 促进卵泡最后成熟。皖西白鹅性成熟期约为 240 d, 本研究中的试验鹅产蛋日龄为 234 d、5% 的产蛋日龄为 251 d, 而产蛋前采样 (I) 为 220 日龄, 处于卵泡尚未发育成熟的阶段, 因此垂体 *FSH β* mRNA 表达水平较低。产蛋期 *FSH β* mRNA 表达量大幅上调, 高于开产前 (220 日龄) 约 20 倍, 与禽类血浆 FSH 水平在开产期和产蛋高峰期维持较高的水平^[4] 相吻合。对籽鹅促卵泡激素受体基因 (*FSHR*) 表达规律研究发现, *FSHR* mRNA 相对表达量在开产前的 5—8 月龄上升幅度达 50% 左右, 并在产蛋期维持较高的表达水平^[14], 表明了鹅 *FSH β* 与 *FSHR* 在基因表达水平的变化上是同步的, 同时也表明 FSH 在鹅卵泡生长和成熟过程中发挥了重要的生理作用, 与产蛋阶段密切相关。

2) 相对产蛋期而言, 皖西白鹅在就巢起始期、中后期, 以及就巢后的休产期垂体 *FSH β* mRNA 表达水平大幅回落, 表达量约为产蛋期的 10%, 与此期母鹅停产、卵泡发育受抑制而萎缩相一致。家禽就巢期 LH 的分泌量显著减少, 血浆中 LH 水平也明显降低^[15-17], 而由于 FSH 和 LH 的协同作用, 皖西

白鹅母鹅就巢期和休产期垂体 *FSH β* mRNA 低表达符合生物学逻辑。可以推测,产蛋过程中母鹅垂体 *FSH β* mRNA 水平快速大幅度下调是皖西白鹅就巢行为起始和维持的特征之一。

3)本研究表明,皖西白鹅 *FSH β* mRNA 表达水平的变化与繁殖周期密切相关,通过 *FSH β* mRNA 表达的调控有望提升产蛋性能、抑制就巢行为的发生。

参 考 文 献

- [1] 陈雪雁,陈克铨,陈实平. FSH 受体的特性和表达的调控[J]. 解剖学报,1999,30(3):284-287
- [2] 解美娜,张才乔,米玉玲,等. 卵泡雌激素和雌激素对培养的鸡胚卵巢生殖细胞增殖的影响[J]. 动物学研究,2004,25(1):53-56
- [3] Erdost H. Immunohistochemical localization of FSH cells in the pars distalis of the pituitary gland in five-month-old laying hens[J]. Turk J Vet Anim Sci,2005,29:1125-1128
- [4] 耿建军. 不同日龄蛋鸡卵泡发育、血清 FSH 和 E₂ 值变化规律以及转化生长因子 β (*TGF β*) 在卵巢和输卵管表达规律的研究[D]. 太谷:山西农业大学,2003
- [5] Lewis P D, Perry G C, Morris T R, et al. Effect of constant and of changing photoperiod on plasma LH and FSH concentrations and age at first egg in layer strains of domestic pullets [J]. Br Poult Sci,1998,39(5):662-670
- [6] Lewis P D, Ciccone N, Sharp P J, et al. Light intensity can influence plasma FSH and age at sexual maturity in domestic pullets [J]. Br Poult Sci,2005,46(4):506-509
- [7] Lewis P D, Ciacciariello M, Ciccone N A, et al. Lighting regimens and plasma LH and FSH in Broiler Breeders [J]. Br Poult Sci,2005,46(3):349-353
- [8] Zhao Y F, Li N, Xiao L, et al. *FSH β* subunit gene is associated with major gene controlling litter size in commercial pig breeds[J]. Science in China (Series C),1998,41(6):664-668
- [9] 梁琛,储明星,张建海,等. *FSH β* 基因 PCR-SSCP 多态性及其与济宁青山羊高繁殖力关系的研究[J]. 遗传,2006,28(9):1071-1077
- [10] 安小鹏,韩丹,侯金星,等. *FSH β* 基因外显子 2 的多态性及其与两个山羊品种繁殖性能的相关性研究[J]. 中国农业科学,2009,42:4051-4057
- [11] 韩厚明,耿照玉,姜润深,等. 鸡 *FSH β* 基因 5' 调控区单核苷酸多态性分析[J]. 激光生物学报,2008,17(5):633-636
- [12] 洪坤月. 鸡 PRL, PRLR, *FSH β* 和 *ESR α* 基因多态性及其与早期产蛋性能关系的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007
- [13] 牛晓童,姜润深,耿照玉,等. 鹅 *FSH β* 基因外显子 3 单核苷酸多态性分析[J]. 中国家禽,2008,30(9):16-18
- [14] Kang B, Jiang D M, Zhou R J, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) mRNA in the ovary of Zi geese during developmental and egg laying stages [J]. Folia Biologica (Kraków),2010,58(1):61-66
- [15] 王光瑛,王寿昆. 生殖激素对家禽就巢的调控[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(1):82-86
- [16] 李昂,王宏,朱明霞,等. 番鸭就巢期生殖激素水平的变化规律[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(5):522-525
- [17] 施振旦,黄运茂,吴伟. 鹅产蛋周期及其生理学调控机制研究的回顾[J]. 中圈家禽,2008,30(9):1-5