

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00085

绵羊发情周期不同组织 *Cry1* mRNA 转录水平相对定量研究

高磊^{1,2}, 甘尚权^{1,2}, 杨井泉^{1,2}, 杨剑波^{1,2}, 梁耀伟^{1,2}, 阿不都艾尼·努拉洪³, 沈敏^{1,2}

1. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000;
2. 新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000;
3. 新疆兵团农三师四十四团兽医站, 图木舒克市 843900;

摘要: 研究表明, 时钟基因 *Cry1* 在哺乳动物季节性繁殖内分泌过程中可能发挥了重要作用。文章以多浪羊(非季节性繁殖)和中国美利奴羊(季节性繁殖)为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 技术对下丘脑-垂体-性腺轴主要组织 *Cry1* 在发情周期不同阶段的表达变化情况进行了跟踪检测。结果表明: 绵羊 *Cry1* 在所检测组织中均有表达, 其中松果体和甲状腺 *Cry1* 的表达水平较高; 不同绵羊品种 *Cry1* 在发情周期不同阶段的组织表达谱基本一致, 除下丘脑外, 卵巢、子宫、松果体、垂体和甲状腺中 *Cry1* 的表达水平均是在发情前期达到峰值; 卵巢、子宫、垂体和松果体 *Cry1* 在发情前期和发情期的表达变化幅度存在显著的品种间差异。研究结果表明: *Cry1* 可能具有启动发情和季节性繁殖的重要作用。

关键词: *Cry1* 基因; 发情周期; 下丘脑-垂体-性腺轴; 绵羊

Relative quantification of mRNA transcription of *Cry1* in different tissues of sheep in oestrous cycle by real-time quantitative PCR

GAO Lei^{1,2}, GAN Shang-Quan^{1,2}, YANG Jin-Quan^{1,2}, YANG Jian-Bo^{1,2}, LIANG Yao-Wei^{1,2}, Abdulla Aini-Nula Hong³, SHEN Min^{1,2}

1. Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China;
2. Key Laboratory of sheep Breeding and Development Technology of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi 832000, China;
3. Agriculture Third Division forty-four regiment Veterinary Station of Xinjiang Production and Construction Corps, Tumushuke City 843900, China

Abstract: Studies have shown that clock gene *Cry1* may have important roles in the endocrine process of seasonal reproduction in mammals. In this study, Duolang sheep (non-seasonal reproduction sheep breed) and Chinese Merino (seasonal reproduction sheep breed) were used to determine the expression change of *Cry1* in hypothalamus-pituitary-ovary

收稿日期: 2012-07-06; 修回日期: 2012-09-27

基金项目: 973 计划前期研究专项(编号: 2009CB125907), 国家自然科学基金项目(编号: 30960249)和兵团种质资源创新与功能基因发掘及利用专项(编号: 2012BB044)资助

作者简介: 高磊, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传与繁殖。Tel: 13779201799; E-mail: w.n007@163.com

通讯作者: 沈敏, 博士, 研究员, 研究方向: 动物分子遗传。E-mail: shenmin0993@sina.com

网络出版时间: 2012-12-19 10:06:36

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121219.1006.004.html>

axis in different stage of estrous cycle by quantitative real-time PCR. The results showed that the *Cry1* mRNA was expressed in all tested tissues, in which the expression levels in pineal gland and thyroid gland were higher than in other tissues. As far as different sheep breeds were concerned, the tissue expression profiles of *Cry1* at different stage of estrous cycle were broadly similar. Besides hypothalamus, the expression levels of *Cry1* in ovary, uterus, pineal gland, pituitary gland, and thyroid gland were all reached to peak in proestrus. The differences of expression change extent for *Cry1* in vary, uterus, pineal gland, and pituitary gland in proestrus and oestrus were significant between different sheep breeds. The results suggested that *Cry1* may play roles in switching on the estrus and seasonal reproduction.

Keywords: *Cry1* gene; estrous cycle; hypothalamus-pituitary-ovary axis; sheep

昼夜节律生物钟是动物机体内在的时间测量系统, 能够使机体许多生理生化和行为过程维持一种近似 24 h 的昼夜节律。目前, 已在哺乳动物中陆续识别了 8 个时钟基因(*Clock*、*Bmal1*、*Timeless*、*Cry1*、*Cry2*、*Per1*、*Per2*、*Per3*), 研究表明这些时钟基因对于维持哺乳动物生物节律具有重要作用^[1]。时钟基因碱基突变能够对金黄地鼠(*Cricetidae*)和小鼠(*Mus musculus*)的 24 h 昼夜节律周期和繁殖模式产生干扰^[2]。绵羊(*Ovis aries*)是一种季节性繁殖动物, 通过视网膜-下丘脑-垂体通道感知并传递白昼时间长短的季节性变化信息, 从而维持或调整个体的繁殖和激素分泌节律。对绵羊时钟基因表达的初步研究表明, 有 7 个时钟基因(*Clock*、*Bmal1*、*Timeless*、*Cry1*、*Cry2*、*Per1*、*Per2*)在垂体结节部(PT)和下丘脑视交叉上核(SCN)表达, 而且垂体结节部时钟基因的表达受到褪黑激素的调控而呈现节律性变化^[3]。提示这些时钟基因在将褪黑激素信号转化为生理性应答、维持年周期节律的过程中发挥了一定作用, 时钟基因可能是参与调控季节性繁殖行为的重要候选基因。

隐花色素 1(Cryptochrome 1, *Cry 1*)是已知的哺乳动物时钟基因之一, 属于植物蓝光受体和光解酶家族的成员。研究表明, 哺乳动物 *Cry1* 基因一方面在神经节细胞和小鼠视网膜的内核层特异表达^[4,5], 起到昼夜节律感光受体的作用; 另一方面, *Cry1* 基因的活化与褪黑激素的表达启动密切相关, 可能在解码褪黑激素分泌的昼夜节律信号、维持昼夜节律和周期长短方面起到关键作用^[6,7]。Hazleriqq 等^[8]研究显示, 季节性繁殖的 Soay 绵羊在从短日照向长日照环境过渡的过程中, 随着褪黑激素分泌发生改变, *Cry1* 表达高峰持续时间也发生了明显的变化, 提示

Cry1 可能通过日节律的光导引途经调控绵羊季节性繁殖活动。Martha 等^[9]、Sheanm 等^[10]研究发现, *Cry1* 基因缺失小鼠在全黑暗条件下, 日节律周期明显地缩短, 而在光-暗周期条件下则表现为正常的 24h 节律, 表明 *Cry1* 在哺乳动物中央时钟振荡器的光依赖中具有重要的功能, 同时给予新的提示: 日节律光导引可能并非介导 *Cry1* 调控哺乳动物季节性繁殖活动的唯一途径。

上述研究结果表明, *Cry1* 在动物季节性繁殖内分泌过程中可能发挥了重要作用, 但是对于其具体作用及相关机理尚有待进一步研究证实。目前针对该基因在季节性繁殖动物组织表达及其在发情启动和发情周期中的表达变化情况尚未有相关研究报告。本研究以非季节性繁殖的新疆地方绵羊品种多浪羊和季节性繁殖的中国美利奴为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 分析 *Cry1* 在这两个绵羊品种在发情周期不同阶段不同组织中的差异变化规律, 为了解绵羊的发情机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3~4 岁健康的多浪羊母羊(购于新疆兵团农三师小海子种羊场)与中国美利奴母羊(购于新疆兵团紫泥泉种羊场)各 12 只, 在新疆农垦科学院种羊场统一进行饲养。饲养过程中给予充足的饲料及饮水。分别于每天早、晚 8:00 进行公羊试情并结合阴道细胞类型分析^[11], 观察确定发情及其持续时间。跟踪 1~2 个发情周期, 待其发情周期稳定后进行实验。分别在发情前期(12~15 d)、发情期(0~1.5 d)、发情后期(3~4 d)及发情间情(7~10 d)宰杀多浪羊和中国美利

奴各 3 只, 迅速采集甲状腺、卵巢、子宫、下丘脑、松果体、垂体等组织样品, 置液氮保存备用。

1.2 引物设计及合成

根据 GenBank 发布的绵羊 *Cry1* 基因序列 (NM_001129735), 利用 Olig 6.0 软件设计特异引物。内参基因 *GAPDH* 引物序列参考文献 [12]。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物信息见表 1。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

采用 Trizol (Invitrogen) 一步法分别提取绵羊不同组织总 RNA。利用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性, 通过核酸蛋白分析仪 (Implen) 检测 RNA 浓度及纯度。参照 M-MLV first strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) 说明书合成 cDNA 第一链。

1.4 绵羊 *Cry1* 及 *GAPDH* 基因的扩增、质粒构建及序列测定

PCR 反应体系为 20 μ L, 其中: cDNA 1 μ L, Premix *Taq* Version 2.0 (Loading dye mix) (TaKaRa) 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, ddH₂O 7.4 μ L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共计 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 切胶回收。将回收的目的片段连接入 pMD19-T 载体, 经转化 *E.coli*. DH5 α 感受态细胞、重组子筛选及 PCR 鉴定, 获得阳性重组质粒并由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。测序结果与 GenBank 所发布的绵羊 *Cry1* 与 *GAPDH* 基因序列进行序列相似性比对。

1.5 绵羊 *Cry1* 基因的实时定量 PCR 检测

1.5.1 标准曲线绘制

以经 PCR 鉴定和测序正确的 *Cry1* 和 *GAPDH* 重组质粒作为标准质粒, 经浓度测定和拷贝数计算

后, 分别进行 10 倍递进稀释, 以此为模板制作标准曲线, 进行实时荧光定量 PCR 扩增效率分析。

1.5.2 实时定量 PCR 检测

分别以各组织样品的 cDNA 为模板, 对 *Cry1* 与 *GAPDH* 进行实时荧光定量 PCR 分析, 其中内参基因 *GAPDH* 和目的基因 *Cry1* 在同一个内环境中进行扩增, 每个样品设置 3 个重复。PCR 反应体系为 20 μ L, 其中: cDNA 1 μ L, Mix [1a (FastStart Enzyme) 10 μ L + 1b (Reaction Mix SYBR Green I, 10 \times conc)] (Roche) 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, H₂O 12.6 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 45 个循环。扩增反应结束后, 按 0.5 $^{\circ}$ C 增值进行溶解曲线分析, 判定 PCR 反应的特异性。

1.5.3 数据分析

根据 Ct 法 ($Q_r = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) 分析不同组织中基因的相对表达量, 首先计算出每只羊各组织样品中目的基因 3 次重复的平均值, 再计算出相对应的每个组织的目的基因与内参基因的 Ct 差值。以甲状腺组织为对照, 用其他组织 Ct 差值减去甲状腺组织 Ct 差值, 即为比较的 $\Delta\Delta C_t$, 然后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来计算不同组织的基因表达相对含量, 并采用 SPSS (18.0) 软件进行单因素方差分析, 以比较同一品种及不同品种各组织之间表达差异情况。

2 结果与分析

2.1 不同组织总 RNA 的提取及基因的克隆测序

由 0.7% 变性琼脂糖凝胶电泳检测结果可以看出, 从不同组织中提取的总 RNA 均具有较好的完整性, 28S、18S、5S 条带清晰。经核酸蛋白仪检测, 各组织样品总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值均介于 1.8~2.0 之间, 符合反转录要求。分别以不同组织总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链。

以绵羊垂体组织 cDNA 为模板, 利用 *Cry1* 和

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
<i>Cry1</i>	F: TTCGTCAGGAGGGTTGGATT	473
	R: TGGCACTGAAGCAAGAAGAC	
<i>GAPDH</i>	F: CTGACCTGCCGCTGGAGAAA	149
	R: GTAGAAGAGTGAGTGTGCTGTT	

GAPDH 特异引物进行扩增, 获得一条与预期大小相符的特异性片段, 经克隆、测序, 并与 GenBank 公布的绵羊 *Cry1*、*GAPDH* 基因序列比对, 序列相似性均在 99% 以上。结果表明, 引物的特异性较好, 所构建的重组质粒正确, 可以开展后续的 RT-PCR 和实时定量 PCR 检测。

2.2 绵羊 *Cry1* 基因的组织表达谱

以绵羊 *GAPDH* 为内参基因, 采用半定量 RT-PCR 方法初步检测了 *Cry1* 在绵羊甲状腺、卵巢、子宫、垂体、松果体及下丘脑等性腺轴组织的表达情况。结果表明: *Cry1* 在多浪羊的甲状腺、卵巢、子宫、下丘脑、松果体、垂体组织中均有表达, 其中松果体、垂体和甲状腺 *Cry1* 表达水平较高, 下丘脑表达水平最低(图 1)。

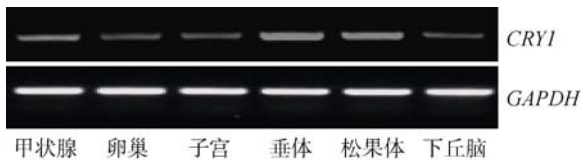


图 1 *Cry1* 在绵羊不同组织的半定量 RT-PCR 结果

2.3 绵羊 *Cry1* 的实时荧光定量 PCR 检测

为了进一步了解 *Cry1* 对绵羊发情周期的影响, 本研究对 *Cry1* 在发情周期不同阶段不同组织(卵巢、子宫、松果体、垂体、甲状腺、下丘脑)中的表达变化情况进行了实时荧光定量 PCR 检测。经标准曲线分析, *Cry1* 和 *GAPDH* 的扩增效率(Amplification efficiency, E values)分别为 0.996 和 0.998, 满足实时荧光定量 PCR 的要求。

2.3.1 *Cry1* 在不同品种绵羊发情周期不同阶段的组织表达谱变化

以 *GAPDH* 作为内参, 同时将甲状腺组织 *Cry1* 的表达水平定义为 1, 以便于定量其他组织中 *Cry1* 的表达量。图 2 所示为 *Cry1* 在不同绵羊品种发情周期不同阶段的组织表达情况。

在发情前期(图 2A), 多浪羊 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 松果体(2.49)>垂体(1.01)、甲状腺(1.00)、卵巢(1.00)>子宫(0.75)>下丘脑(0.26)。其中松果体 *Cry1* 为高丰度表达, 其表达水平与垂体、甲状腺、卵巢、子宫、下丘脑之间存在极显著差异

($P<0.01$); 垂体、甲状腺、卵巢和子宫 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与下丘脑之间亦存在显著差异($P<0.05$)。中国美利奴羊 *Cry1* 基因表达水平由高到低依次为: 松果体(2.69)>甲状腺(1.00)>子宫(0.61)>卵巢(0.38)、垂体(0.37)>下丘脑(0.25)。其中松果体 *Cry1* 为高丰度表达, 其表达水平与垂体、甲状腺、卵巢、下丘脑、子宫相比差异极显著($P<0.01$); 甲状腺 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与子宫、卵巢、垂体和下丘脑之间存在显著差异($P<0.05$)。

在发情期(图 2B), 多浪羊 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 松果体(1.07)、甲状腺(1.00)、垂体(0.84)>卵巢(0.70)、子宫(0.52)>下丘脑(0.30)。其中松果体、甲状腺和垂体 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与卵巢($P<0.05$)、子宫($P<0.05$)和下丘脑($P<0.01$)之间存在显著差异; 卵巢和子宫 *Cry1* 表达水平显著高于下丘脑($P<0.05$)。中国美利奴 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 松果体(1.22)、甲状腺(1.00)>卵巢(0.38)、子宫(0.30)、下丘脑(0.29)、垂体(0.24)。其中松果体、甲状腺 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与卵巢、子宫、下丘脑和垂体之间存在极显著差异($P<0.01$)。

在发情后期(图 2C), 多浪羊 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 甲状腺(1.00)、松果体(0.95)>垂体(0.48)>卵巢(0.26)、子宫(0.25)、下丘脑(0.22)。其中甲状腺和松果体 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与垂体之间存在显著差异($P<0.05$), 而与卵巢、子宫、下丘脑之间存在极显著差异($P<0.01$)。中国美利奴 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 甲状腺(1.00)、松果体(0.79)>卵巢(0.25)、子宫(0.23)、垂体(0.22)、下丘脑(0.13)。其中甲状腺和松果体 *Cry1* 表达水平与卵巢、子宫、下丘脑相比存在极显著差异($P<0.01$)。

在发情间期(图 2D), 多浪羊 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 甲状腺(1.00)、松果体(0.80)>卵巢(0.26)、下丘脑(0.18)、子宫(0.17)、垂体(0.09)。其中甲状腺和松果体 *Cry1* 为中度表达, 其表达水平与卵巢、下丘脑、子宫、垂体之间均存在极显著差异($P<0.01$)。中国美利奴 *Cry1* 表达水平由高到低依次为: 甲状腺(1.00)>松果体(0.58)>卵巢(0.22)、子宫(0.17)、下丘脑(0.15)、垂体(0.10)。其中甲状腺 *Cry1* 表达水平显著高于松果体($P<0.05$), 并与卵巢、下丘脑、子宫、垂体之间均存在极显著差异($P<0.01$); 松果体 *Cry1* 表达水平亦显著高于卵巢、下丘脑、子宫

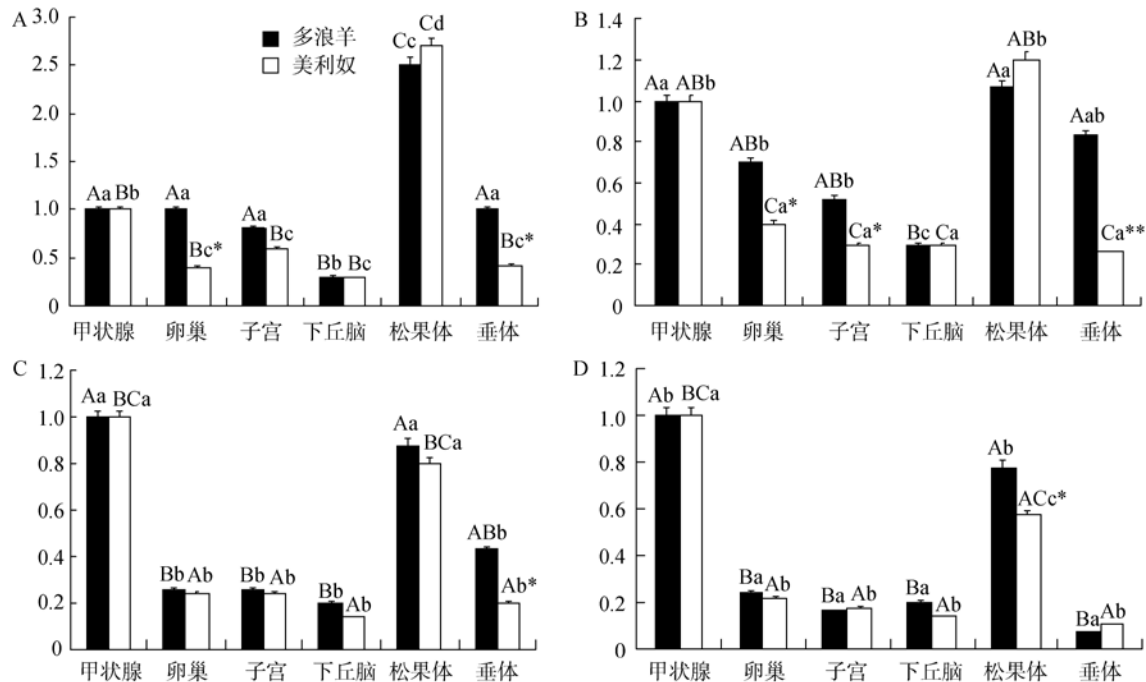


图 2 *Cry1* 在不同绵羊品种发情周期不同阶段的组织表达变化

A: 发情前期; B: 发情期; C: 发情后期; D: 发情间期。同一品种不同组织不同大写字母之间表示差异极显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$); *和**分别表示同一组织不同品种间差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)。

和垂体 ($P < 0.05$)。

2.3.2 不同绵羊品种不同组织 *Cry1* 基因在发情周期不同阶段的表达变化

以同一品种相同组织发情间期 *Cry1* 的表达水平为对照, 对不同组织在发情周期不同阶段的相对表达变化进行了分析。如图 3 所示, 在所检测的 6 个组织中, 卵巢、子宫、松果体、垂体和甲状腺 *Cry1* 在不同品种绵羊发情周期不同阶段的表达趋势基本一致: *Cry1* 相对表达水平都是在发情前期达到最高, 随后开始逐渐下降, 一直到发情间期达到最低值。而在下丘脑则有所不同, *Cry1* 相对表达水平在发情前期开始升高, 到发情期达到峰值, 进入发情后期表达开始下调并一直持续到发情间期。另外, 对于不同绵羊品种的相同组织来说, *Cry1* 在发情周期不同阶段的表达水平和表达变化幅度存在一定差异。

如图 3A 所示, 多浪羊卵巢 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 3.83 倍 ($P < 0.01$)、2.69 倍 ($P < 0.01$) 和 1.02 倍; 中国美利奴卵巢 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平

分别为发情间期的 1.75 倍 ($P < 0.01$)、1.74 倍 ($P < 0.01$) 和 1.14 倍。多浪羊卵巢 *Cry1* 在发情前期与发情期的表达变化幅度要显著大于中国美利奴 ($P < 0.01$), 而在发情后期和发情间期两个品种之间没有明显差异。

如图 3B 所示, 多浪羊子宫 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 4.54 倍 ($P < 0.01$)、3.13 倍 ($P < 0.01$) 和 1.54 倍; 中国美利奴子宫 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 3.06 倍 ($P < 0.01$)、1.71 倍和 1.32 倍。多浪羊子宫 *Cry1* 在发情前期和发情期的表达变化幅度要显著大于中国美利奴 ($P < 0.01$), 而在发情后期和间期两个品种之间没有明显差异。

如图 3C 所示, 多浪羊松果体 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 3.10 倍 ($P < 0.01$)、1.33 倍和 1.18 倍; 中国美利奴松果体 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 4.62 倍 ($P < 0.01$)、2.08 倍 ($P < 0.01$) 和 1.35 倍。中国美利奴松果体 *Cry1* 在发情前期和发情期的表达变化幅度要显著大于多浪羊 ($P < 0.01$), 而在发情后期和间期两个品种之间没有明显差异。

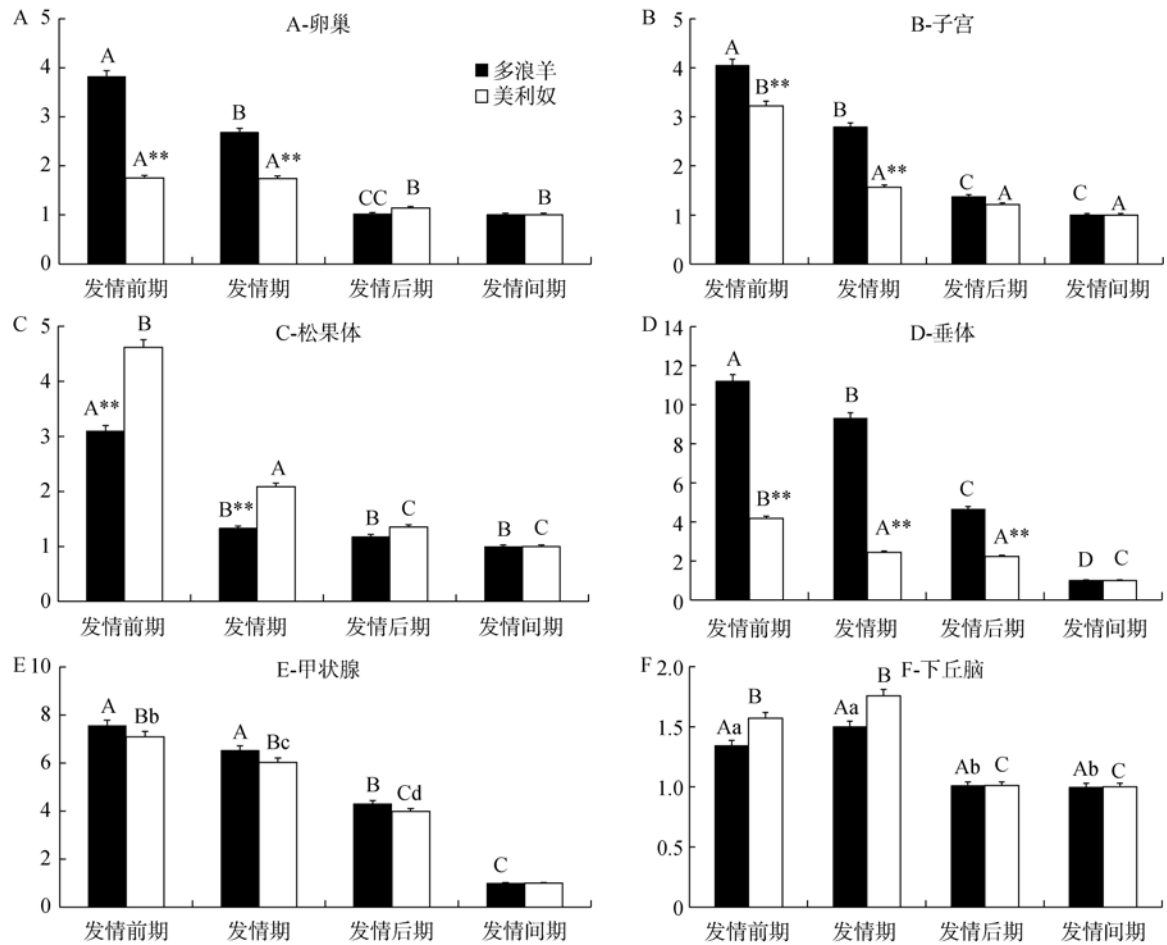


图 3 不同组织 *Cry1* 在发情周期不同阶段的表达变化

A: 卵巢; B: 子宫; C: 松果体; D: 垂体; E: 甲状腺; F: 下丘脑。同一品种不同组织不同大写字母之间表示差异极显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母之间表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$); * 和 ** 分别表示同一组织不同品种间差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)。

如图 3D 所示, 多浪羊垂体 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 11.49 倍 ($P < 0.01$)、9.32 倍 ($P < 0.01$) 和 4.76 倍 ($P < 0.01$); 中国美利奴垂体 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 3.77 倍 ($P < 0.01$)、2.43 倍 ($P < 0.01$) 和 2.23 倍 ($P < 0.01$)。多浪羊垂体 *Cry1* 在发情前期、发情期和发情后期的表达变化幅度显著大于中国美利奴 ($P < 0.01$), 而在发情间期两个品种之间没有明显差异。

如图 3E 所示, 多浪羊甲状腺 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期的表达水平分别为发情间期的 7.86 倍 ($P < 0.01$)、6.52 倍 ($P < 0.01$) 和 4.27 倍 ($P < 0.01$); 中国美利奴甲状腺 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 7.01 倍 ($P < 0.01$)、

5.99 倍 ($P < 0.01$) 和 3.99 倍 ($P < 0.01$)。不同绵羊品种之间甲状腺 *Cry1* 在整个发情周期的表达变化幅度没有明显差异。

如图 3F 所示, 多浪羊下丘脑 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期的表达水平分别为发情间期的 1.42 倍 ($P < 0.05$)、1.58 倍 ($P < 0.05$) 和 1.17 倍; 中国美利奴下丘脑 *Cry1* 在发情前期、发情期、发情后期表达水平分别为发情间期的 1.46 倍 ($P < 0.01$)、1.73 倍 ($P < 0.01$) 和 0.87 倍。不同绵羊品种之间下丘脑 *Cry1* 在整个发情周期的表达变化幅度没有明显差异。

3 讨论

3.1 关于 *Cry1* 的组织表达

已有研究表明, 哺乳动物 *Cry1* 与其他时钟基因

一样,不仅在视网膜和下丘脑视交叉上核(SCN)表达,而且在人和小鼠的心脏、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰腺、脾脏、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠、白细胞以及皮肤组织中均有表达,且在脑部、肝脏、睾丸表达水平较高^[4,13,14]。另外,Rataiczak等^[15]在妊娠晚期大鼠的子宫、胎盘和胎膜中也检测到*Cry1*的表达,其中子宫*Cry1*表达量明显升高。本研究通过RT-PCR检测结果表明,*Cry1*在绵羊的甲状腺、卵巢、子宫、下丘脑、松果体、垂体等组织中均有表达。另外本研究还在多浪羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、小肠、淋巴结等组织中也检测到了*Cry1* mRNA的存在(数据未公布)。这些研究结果一致表明,作为哺乳动物的重要时钟基因,*Cry1*广泛存在于哺乳动物的各个组织器官中,对各种生理生化 and 行为节律的形成和维持可能起到了重要作用。

3.2 *Cry1* 在下丘脑-垂体-性腺轴组织的表达谱变化

为了有针对性地了解*Cry1*对绵羊发情周期和季节性繁殖性能的影响,本研究重点围绕涉及繁殖活动的下丘脑-垂体-性腺轴中的下丘脑、松果体、垂体、甲状腺、卵巢和子宫等组织,对其在发情周期不同阶段*Cry1*的基因表达变化进行了跟踪检测。结果表明,*Cry1*在整个发情周期不同阶段的组织表达谱趋于一致,其中松果体和甲状腺*Cry1*在整个发情周期均呈较高水平表达。已有研究表明,哺乳动物垂体结节部时钟基因的表达受到松果体所分泌褪黑激素的调控而呈现昼夜节律性变化^[16,17],因此推测松果体可能间接作用于垂体结节部介导*Cry1*表达。甲状腺作为一个重要的内分泌器官,其所分泌的甲状腺激素T₃、T₄在调节动物生长发育、基础代谢及繁殖活动等方面发挥了重要作用。已有研究表明,T₄分泌水平升高会加剧繁殖状态的终止而进入休情期,而T₃则具有启动动物季节性繁殖和维持繁殖状态的作用^[18,19]。本研究中*Cry1*在整个发情周期的高水平表达提示,甲状腺组织与时钟基因的表达存在一定的相关性,但到底是以何种途径、何种方式调控,目前尚未定论。

3.3 *Cry1* 对绵羊季节性繁殖影响的推测

从整个发情周期来说,发情前期处于卵泡发育的准备时期,在启动发情周期过程中起到关键性作

用,期间可能涉及包括性腺轴组织在内的大量分子事件。在本研究所检测组织中,除下丘脑外,卵巢、子宫、松果体、垂体和甲状腺中*Cry1*表达水平均是在发情前期达到峰值。另外通过对不同品种绵羊的定量PCR分析结果表明,在所检测组织中,卵巢、子宫、垂体和松果体*Cry1*在发情前期和发情期的表达变化幅度存在显著的品种间差异。其中对于卵巢、子宫、垂体组织而言,多浪羊(非季节性繁殖绵羊品种)*Cry1*的表达变化幅度要显著高于中国美利奴(季节性繁殖绵羊品种),在松果体则正好相反。提示这些组织可能直接或间接参与了绵羊的发情启动过程,*Cry1*可能具有启动发情周期和季节性繁殖的重要作用。

参考文献(References):

- [1] King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 2000, 23(1): 713–742. DOI
- [2] Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 1988, 241(4870): 1225–1227. DOI
- [3] Lincoln G, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg D. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(21): 13890–13895. DOI
- [4] Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B₂-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6097–102. DOI
- [5] Lincoln GA, Andersson H, Loudon A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *J Endocrinol*, 2003, 179(1): 1–13. DOI
- [6] van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 1999, 398(6728): 627–630. DOI
- [7] Park K, Kang HM. Cloning and circadian expression of rat *Cry1*. *Mol Cells*, 2004, 18(2): 256–260. DOI
- [8] Hazlerigg DG, Andersson H, Johnston JD, Lincoln G. Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Curr Biol*, 2004, 14(4): 334–339. DOI

- [9] Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 12114–12119. [DOI](#)
- [10] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng BH, Kume K, Lee CC, van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013–1019. [DOI](#)
- [11] 高磊, 甘尚权, 杨井泉, 沈敏. 多浪羊发情周期不同阶段阴道细胞变化观察. 黑龙江畜牧兽医, 2012, (21): 35–37.
- [12] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognié Y, Chitour N, Elsen JM. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(9): 5104–5109. [DOI](#)
- [13] van der Spek PJ, Kobayashi K, Bootsma D, Takao M, Eker APM, Yasui A. Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics*, 1996, 37(2): 177–182. [DOI](#)
- [14] Kobayashi K, Kanno SI, Takao M, Yasui A, Smit B, van der Horst GTJ. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(22): 5086–5092. [DOI](#)
- [15] Rataiczak CK, Herzoq ED, Muqlia LJ. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reprod Fertil Dev*, 2010, 22(5): 743–750. [DOI](#)
- [16] Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg D. Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15(4): 390–397. [DOI](#)
- [17] Johnston JD, Tournier BB, Andersson H, Masson-Pévet M, Lincoln GA, Hazlerigg DG. Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology*, 2006, 147(2): 959–965. [DOI](#)
- [18] Barrett P, Ebling FJP, Schuhler S, Wilson D, Ross AW, Warner A, Jethwa P, Boelen A, Visser TJ, Ozanne DM, Archer ZA, Mercer JG, Mrgan PJ. Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology*, 2007, 148(8): 3608–3617. [DOI](#)
- [19] 黄冬维, 储明星. 动物季节性繁殖分子调控机理研究进展. 遗传, 2011, 33(7): 695–706. [DOI](#)

• 综合信息 •

《遗传学学习指导与题解》

佟向军 张 博 (北京大学)

书 号: 978-7-04-026325-1 出版日期: 2009 年 6 月

定 价: 19.80 字 数: 34 万

本书是与戴灼华等主编的《遗传学》(第 2 版)教材相配套的学习指导书。本书的章节安排与主教材一致, 由内容摘要、重要名词释义、典型例题、自测习题及部分参考答案组成。

内容摘要由主教材的各位编者分别撰写, 言简意赅地概括了每章的主要内容和知识要点; 重要名词释义由中文名、英文名和简明释义组成, 这两部分是对遗传学的基本原理的凝练。典型例题和自测习题力求体现各章的重点和难点, 具有典型性和综合性, 偏重于分析计算和实验设计, 以培养学生进行遗传分析的能力, 加深对遗传学概念的理解和知识的融会贯通。为方便自学, 对大部分分析计算题和实验设计题给出了参考答案。

本书涉及内容广泛, 不仅可作为广大读者学习遗传学的指导书, 也可作为考试的辅导书。