

利用转录组测序筛选鸡蛋褐壳性状相关基因

李光奇^{1,2}, 孙从佼¹, 吴桂琴², 石凤英², 刘爱巧², 孙皓², 杨宁¹

1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193;
2. 北京市华都峪口禽业有限责任公司, 北京 101206

摘要: 褐壳鸡蛋在许多国家深受消费者喜爱, 消费者通常把蛋壳褐色深浅作为评价鸡蛋品质的重要指标。褐壳鸡蛋蛋壳颜色形成受多基因共同调控, 但是具体候选基因及调控机理尚未明确。因此, 本研究以纯系褐壳鸡蛋为实验材料, 筛选调控褐壳鸡蛋颜色深浅的候选基因。采用转录组测序技术对产深褐壳鸡蛋和浅褐壳鸡蛋的母鸡蛋壳腺组织进行分析, 结果显示, 共计有 8461 个基因在蛋壳腺组织表达, 其中 34 个基因在两组之间差异表达。功能分析发现, 卵转铁蛋白(ovotransferrin, *TF*)基因、热休克蛋白 70 (heat shock protein, *HSP70*)基因以及氧化磷酸化通路均与原卟啉IX合成通路相关, 可能影响褐壳鸡蛋蛋壳色素原卟啉IX的合成和积累。

关键词: 鸡蛋; 褐壳性状; 转录组

Transcriptome sequencing identifies potential regulatory genes involved in chicken eggshell brownness

Guangqi Li^{1,2}, Congjiao Sun¹, Guiqin Wu², Fengying Shi², Aiqiao Liu², Hao Sun², Ning Yang¹

1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
2. Beijing Huadu Yukou Poultry Industry Co. Ltd., Beijing 101206, China

Abstract: Brown eggs are popular in many countries, and consumers regard eggshell brownness as an important indicator of egg quality. Brown eggshell color is controlled by polygene. However, the responsible genes and detailed molecular mechanisms regulating eggshell brownness have not been defined. In the present study, we applied the RNA-seq technology to analyze the transcriptome data of the shell gland epithelium of hens and investigated the candidate genes associated with eggshell brownness. The results indicated that 8461 genes were expressed in the shell gland epithelium, of which 34 genes were differentially expressed in hens laying dark vs. light brown eggs. Functional analysis revealed that two genes, *ovotransferrin (TF)* and *heat-shock protein 70 (HSP70)*, as well as the oxidative

收稿日期: 2017-03-28; 修回日期: 2017-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31501915), 中央高校基本科研业务费专项资金项目(编号: 2017QC009, 2017DK001), 国家蛋鸡产业技术体系项目(编号: CARS-41)和长江学者和创新团队发展计划项目(编号: IRT1191)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31501915), Chinese Universities Scientific Fund (Nos.2017QC009, 2017DK001), National Agricultural Technology System (Layer)(No.CARS-41), and Programs for Changjiang Scholars and Innovative Research in University(No.IRT1191)]

作者简介: 李光奇, 博士, 博士后, 研究方向: 家禽分子遗传育种。E-mail: lgq717535@126.com

孙从佼, 博士, 讲师, 研究方向: 家禽分子遗传育种。E-mail: cjsun@cau.edu.cn

李光奇和孙从佼为并列第一作者。

通讯作者: 杨宁, 博士, 教授, 研究方向: 家禽分子遗传育种。E-mail: nyang@cau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-111

网络出版时间: 2017/10/24 10:13:23

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20171024.1013.002.html>

phosphorylation pathway were involved in the synthesis and transport of protoporphyrin IX, which might influence the formation of eggshell brownness and result in different shades of brown.

Keywords: chicken eggs; eggshell brownness; transcriptome

褐壳鸡蛋在中国、法国、英国、意大利和葡萄牙等许多国家占据主流消费市场。然而,褐壳鸡蛋的褐色程度变异较大,即使同一只母鸡所产的鸡蛋也会随着周龄的增加而变浅^[1]。尽管蛋壳褐色深浅与蛋品质没有直接联系^[2],但是消费者仍然把蛋壳褐色深浅作为衡量鸡蛋品质最直接的参考指标之一。所以,蛋壳褐色深浅在一定程度上决定消费者的选择,影响鸡蛋的价格和销售,进而影响生产者和经营者的经济效益。

早在 19 世纪 70 年代,鸟类科学工作者发现蛋壳褐色主要由原卟啉导致^[3,4]。原卟啉是血红素的直接前体物质,具有高度共价的四吡咯结^[5],在可见区具有吸光带,从而使沉积了这种色素的蛋壳具有褐色。研究表明,连产母鸡在上一个蛋产出后约 6 h,下一个鸡蛋进入蛋壳腺开始新的蛋壳矿化过程。此时蛋壳腺上皮顶端细胞中的阳性粒细胞和色素颗粒逐渐增多^[6],蛋壳腺中积累的原卟啉的含量也随着蛋壳的形成呈增加状态^[7]。从鸡蛋进入子宫直到产蛋前 4 h,蛋壳均表现为白色,大约在产蛋前 3~4 h,在蛋壳腺上皮细胞积累的色素快速转移至子宫液中,然后沉积到蛋壳表面,产蛋前 1~2 h 沉积速率最快^[8],所以原卟啉主要存在于蛋壳表面即胶护膜上,蛋壳胶护膜上沉积的原卟啉含量决定蛋壳颜色的深浅^[9]。

研究表明,蛋壳褐色程度受多基因调控^[10],但是具体调控机理尚未明确。因此,探索影响蛋壳褐色深浅的遗传因素具有重要的生物学意义和经济价值。本研究以褐壳蛋鸡纯系为研究对象,采用 RNA-seq 技术对产深褐壳鸡蛋和浅褐壳鸡蛋母鸡的蛋壳腺组织进行转录组测序,分析两组之间的差异表达基因,通过功能分析挖掘影响蛋壳褐色程度的候选基因,为阐明蛋壳褐色形成的分子机理提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验鸡群和样品采集

本研究以 281 只洛岛红纯系蛋鸡作为试验群体,

由北京市华都峪口禽业有限责任公司提供。鸡只单笼饲养。采用 14 L 10 D 的光照条件。自由采食。

母鸡 28 周龄时连续收集 3 d 鸡蛋,当天测定蛋壳颜色、蛋壳重、蛋壳强度、蛋壳厚度和蛋形指数。蛋壳颜色采用 CM-2600D 型分光测色计(柯尼卡美能达公司,日本)测定,测定时以 L 值的大小代表蛋壳颜色的深浅^[1]。L 值反映的是蛋壳颜色的反光值,L 值越小代表蛋壳颜色越深,反之,L 值越大代表蛋壳颜色越浅,蛋壳重量使用精度为 0.1 g 的电子称(梅特勒-托利多,苏黎世,瑞士)进行称量;蛋壳强度采用蛋壳测力计(EFG-0502, Robotmation 公司,日本)测定;采用 FHK 蛋形指数测定仪(FHK,日本,1 mm)测定鸡蛋的长径和短径,计算蛋形指数。统计每只母鸡所产鸡蛋各观测性状的平均值。

根据蛋壳颜色和其他蛋壳性状,选取蛋壳颜色差异显著,蛋壳重、蛋壳强度、蛋壳厚度和蛋形指数差异不显著的母鸡各 15 只,分别作为深褐壳组和浅褐壳组。连续两周记录 30 只候选母鸡的产蛋时间,记录方法为早上 6 点至下午 2 点,每小时观察一次,记录每只母鸡的产蛋情况,并从两组中选取产蛋时间规律的母鸡各 8 只,于产蛋后 6 h 屠宰,采取全部蛋壳腺上皮组织,立即投放至液氮中保存。在深褐壳组和浅褐壳组中分别随机选取 4 只鸡的蛋壳腺上皮组织用于转录组测序分析。转录组测序后,每组 8 个个体全部用于后续 qRT-PCR 验证实验。

1.2 总 RNA 提取和质检

采用 TRIzol 法提取蛋壳腺上皮组织总 RNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳初步检测总 RNA 的完整性以及有无 DNA 污染,采用 Nanodrop、Agilent Bioanalyzer 检测总 RNA 的浓度和质量,保证样品浓度 500 ng/ μ L, 28S:18S>1.0, RIN 8。

1.3 RNA 高通量测序

将总 RNA 样品置于冰上融化,采用 DNase I (Invitrogen, 美国)消化后,用 Oligod (T)磁珠分离富集纯

化 mRNA; 吸取 16 μL mRNA 加入 PCR 管内, 并加入 4 μL 片段化缓冲液(Illumina, 美国)混匀, 94 条件下孵育 5 min。随后在 PCR 管内加入 2 μL 醋酸钠 (3 mol/L, pH 5.2)、2 μL 糖原和 60 μL 无水乙醇(北京化学试剂公司), -80 条件下孵育 30 min 得到打断成短片段的 mRNA; 以打断后的 mRNA 为模板逆转录合成一链 cDNA, 然后加入二链合成反应混合液 (62.8 μL 超纯水, 10 μL 二链缓冲液, 1.2 μL dNTP (25 mmol/L), 1 μL 核糖核酸酶和 5 μL DNA 聚合酶) 合成第二链 cDNA。cDNA 双链合成后按照 Illumina 公司的操作手册构建双末端测序文库。构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 质检合格后, 使用 Illumina HiSeqTM 2000 测序仪进行测序。

1.4 测序数据分析

使用 FASTQC 软件对原始数据进行质量控制, 剔除只含有测序接头序列的 reads、含 N 比例大于 10% 的 reads 以及低质量 reads (质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整条 read 50% 以上), 由此得到高质量序列数据 (clean reads)。使用短 reads 比对软件 SOAPaligner/SOAP2 将 clean reads 分别比对到鸡的参考基因组和参考基因 (Gallus_gallus-5.0/galGal5) 中, 每个 reads 最多错配 5 个碱基, 统计 reads 在参考基因组和参考

基因的覆盖度。使用 RPKM 法 (Reads per kilobase Transcriptome per million mapped reads) 计算基因表达量, 采用 NOIseq 软件对 RPKM > 1 的转录本进行处理, 筛选差异表达基因。参考 NOIseq 使用说明^[11], 定义 $P > 0.8$ (即一对基因差异表达的概率是非差异表达概率的 4 倍以上) 且差异倍数在 2 倍以上的基因为差异表达基因。使用 Blast2GO 软件对差异表达基因进行功能富集分析。

1.5 差异表达基因验证

随机选取 7 个差异表达基因, 采用 qRT-PCR 的方法进行验证, 以检测测序结果及数据分析的准确性。以 GAPDH 为内参基因, 采用比较 C_t 值法即 $2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = \text{目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{内参基因 } C_t \text{ 值}$) 表示目的基因的相对表达量。具体基因和引物信息见表 1。采用 ABI 公司 SYBR Green Mix 进行定量表达检测。反应体系及反应程序参照 SYBR Green Master Mix 说明书, 在 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。

2 结果与分析

2.1 深褐壳组与浅褐壳组蛋壳品质比较分析

以 281 只洛岛红纯系蛋鸡作为试验群体, 3 d 共

表 1 qRT-PCR 法验证差异表达基因的引物信息

Table 1 qRT-PCR primers of seven selected genes that are differentially expressed

序号	基因 ID	引物序列 (5' 3')	扩增长度 (bp)	复性温度 (°C)
1	ENSGALG000000021142	F: GGGAGTAGTGGCAGCTATG R: GAGAATCGTGAAGGGATGT	110	60
2	ENSGALG000000016667	F: GAGGAGCTGATTGTGATGG R: TAGGCTGGAATAGGTGGC	197	60
3	ENSGALG000000006453	F: AGATGCCATTAGCTTGGAC R: GGTTGTGGAGCCCTTCAGTA	109	60
4	ENSGALG000000011715	F: AAGTGCCAGGAGGTGATC R: AATCGGGTTGCAGAGTTT	102	60
5	ENSGALG000000023622	F: CATAGACAGGAACGGGAAGG R: TGGGAGGAATATCACAAGCA	199	60
6	ENSGALG000000015079	F: CAGGCTCCTTAAAGACCA R: CACATCCCAATGACCACA	193	60
7	ENSGALG000000008661	F: ATCTACCAGAACGGCGAAAG R: GAAGCGTCCAGACCAAACCTC	242	60

计收集 765 个鸡蛋，当天测定蛋壳颜色、蛋壳重、蛋壳强度、蛋壳厚度和蛋形指数。正态分析显示蛋壳颜色测定值符合正态分布($W=0.9938$, $P\text{-value}=0.3077$)。根据 L 值从两尾选择观察期内连续产均匀的深褐壳鸡蛋和浅褐壳鸡蛋的母鸡各 15 只,选取产蛋时间规律的产深褐壳鸡蛋和浅褐壳鸡蛋的母鸡各 8 只屠宰采取全部蛋壳腺上皮组织。在两组中各随机选取 4 只鸡的蛋壳腺上皮组织用于转录组测序分析。结果显示两组母鸡所产鸡蛋蛋壳颜色差异显著,蛋壳重、蛋壳强度、蛋壳厚度和蛋形指数无显著差异(表 2)。

2.2 蛋壳腺组织转录组分析

2.2.1 Reads 比对到参考基因组及参考基因结果

本研究采用 Illumina HiSeqTM 2000 测序仪对深褐壳组和浅褐壳组鸡蛋蛋壳腺上皮组织 mRNA 进行测序,结果显示所有样品测序质量良好,Q20 在 97.34%~98.11%之间,Q30 在 90.76%~93.15%之间,满足后续分析需要。对原始数据质量控制后,平均每个样本得到 59 726 276 条 clean reads ,使用短 reads 比对软件 SOAPaligener/SOAP2 将得到的 clean reads 比对到鸡的参考基因组和参考基因(*Gallus_gallus-5.0/galGal5*),平均每个样本得到 53 603 423 条比对 reads ,其中 85.06%~85.70%的 mapped reads 可以

比对到基因组唯一位置,能够成对比对到基因组上的 reads 比例达到 70.97%~84.65% ,比对到外显子区域的 reads 占总 clean reads 的 55.73%~57.91% ,具体结果如表 3 所示。各项数据显示测序产量和数据质量较好,可以进行下一步分析。

2.2.2 差异表达基因筛选和验证

使用 RPKM(Reads per kilobase Transcriptome per million mapped reads)法计算基因表达量 ,结果显示共计 8461 个基因在蛋壳腺组织表达。经差异表达分析发现,34 个基因在两组之间差异表达,相对于深褐壳组,在浅褐壳组中表达上调的基因有 24 个,

表 2 深褐壳组和浅褐壳组鸡蛋蛋品质性状分析比较
Table 2 Comparison of the egg quality between dark and light groups

蛋壳品质	深褐壳组($n=4$)	浅褐壳组($n=4$)	群体($n=281$)
蛋壳颜色(L)	55.47±0.65 ^C	69.82±0.43 ^A	62.83±3.43 ^B
蛋壳重(g)	5.54±0.34	5.46±0.38	5.75±0.51
蛋壳强度(kg/cm ²)	3.623±0.701	3.629±1.029	3.752±0.75
蛋壳厚度(mm)	0.316±0.015	0.311±0.009	0.313±0.023
蛋形指数	1.28±0.05	1.28±0.02	1.27±0.07

注：同一行标有不同字母代表差异极显著($P<0.01$)。

表 3 8 个样本序列质量和比对信息统计

Table 3 Statistical analysis for sequence quality and alignment information of eight RNA-seq libraries

统计项	分组							
	D1	D2	D3	D4	L1	L2	L3	L4
Clean reads	60257704	60273550	58638156	58994468	60089014	60018234	59460176	60078908
Q20	97.61%	97.62%	98.06%	98.11%	97.55%	97.55%	97.34%	97.52%
Q30	91.43%	91.45%	93.04%	93.15%	91.25%	91.28%	90.76%	91.19%
对 reads (比例)	53837757 (89.35%)	54034154 (89.65%)	52583837 (89.68%)	53302610 (90.35%)	53833994 (89.59%)	53332757 (88.86%)	53557357 (90.07%)	54344920 (90.46%)
唯一比对 reads (比例)	51432053 (85.35%)	51362838 (85.22%)	49880117 (85.06%)	50439986 (85.50%)	51493952 (85.70%)	51065940 (85.08%)	50622551 (85.14%)	51737914 (86.12%)
比对到外显子 reads(比例)	34479437 (57.22%)	33592535 (55.73%)	33273642 (56.74%)	33574887 (56.91%)	34740565 (57.82%)	34097940 (56.81%)	34433822 (57.91%)	34493615 (57.41%)
比对到内含子 reads(比例)	6024755 (10.00%)	6564483 (10.89%)	5396515 (9.20%)	5775790 (9.79%)	5424119 (9.03%)	5768515 (9.61%)	5364764 (9.02%)	6014128 (10.01%)
比对到基因间 区 reads(比例)	13333565 (22.13%)	13877136 (23.02%)	13913680 (23.73%)	13951933 (23.65%)	13669310 (22.75%)	13466302 (22.44%)	13758771 (23.14%)	13837177 (23.03%)
成对比对 reads(比例)	43826624 (81.40%)	44614744 (82.57%)	42052106 (79.97%)	43308944 (81.25%)	45571712 (84.65%)	44666982 (83.75%)	43218160 (80.70%)	44910454 (82.64%)

注：D1~D4 代表深褐壳组 4 个样本；L1~L4 代表浅褐壳组 4 个样本。

表达下调的基因有 10 个(图 1, 表 4)。通过对 NCBI 数据库和相关文献检索发现, 在 34 个差异基因中只有 *TF* 基因和 *HSP70* 基因与蛋壳褐色素原卟啉的合成和沉积直接相关, 这两个基因均在深褐壳组显著上调, 可能是影响蛋壳褐色深浅的候选基因。

为验证基于 RNA-seq 方法检测的结果是否准确, 随机选取 7 个差异表达基因(表 5)进行验证。以 *GAPDH* 为内参基因, 采用 qRT-PCR 方法检测这些差异表达基因在两组之间的表达趋势。将 RNA-seq 方法预测的差异倍数和 qRT-PCR 方法检测的差异倍数进行比较, 发现除了血管诱导生成因子基因(ENSGALG00000008661)在两者中相反之外, 其余 6 个基因的表达趋势均一致, 如图 2 所示。

2.2.3 差异表达基因功能分析

为了解 34 个差异表达基因涉及的生物学功能, 使用 Blast2GO 软件对差异表达基因进行 GO 条目的功能富集分析。经过在水平 2(level 2)上的分类, 差异表达基因的功能包括 28 个主要的 GO 条目, 集中分布在生物学过程、分子功能和细胞组成三大类, 如图 3 所示。生物学过程中, 主要的类别是生物调节, 占 12.24%, 另外两种主要的类别是细胞过程和刺激反应过程, 均占 10.20%; 在分子功能类别中最主要的类别是结合功能, 占 59.50%; 而对于细胞组成方面, 代表性的类别分别为细胞部分(15.50%)、细胞(15.50%)、细胞器(14.17%)和细胞外部分(14.17%)。

使用 Blast2GO 软件对差异基因进行通路分析(KEGG pathway database), 没有富集到代谢通路, 可能是由于本研究差异基因数目偏少, 也可能是由于目前鸡基因注释信息尚不完全的原因。因此, 为了挖掘潜在的代谢通路, 对差异倍数在 1.5 倍以上且 $P > 0.8$ 的 189 个差异基因进行生物学通路富集分析, 结果发现只有氧化磷酸化通路被显著富集到(表 6)。

3 讨论

蛋壳颜色是重要的经济性状, 目前绿壳性状形成机理已经明确^[19], 但是蛋壳褐色形成的分子机理尚不明确, 相关研究较少。近年来, 基于 Illumina 测序平台的 RNA-seq 转录组测序技术被广泛应

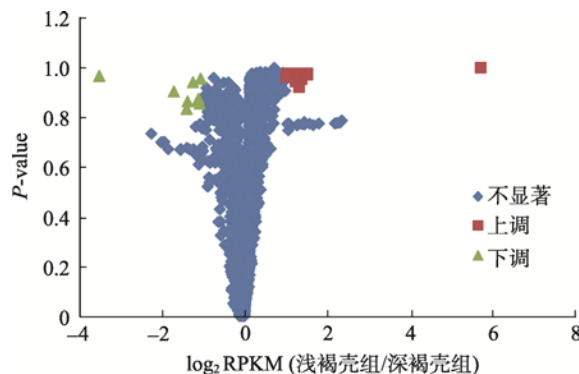


图 1 基因表达火山图

Fig. 1 The volcano plot of differentially expressed genes between dark and light groups

差异表达基因筛选条件为 $P > 0.8$ 且差异倍数在 2 倍以上, 绿色点代表显著表达下调基因, 红色点代表显著表达上调基因。

用^[20,21], 为快速而高效地挖掘鸡蛋蛋壳颜色性状相关调控基因提供了便捷的途径。

研究表明, 原卟啉的合成、转运、积累和沉积伴随着蛋壳矿化过程进行。连产母鸡产蛋 6 h 后, 下一个鸡蛋到达其输卵管的蛋壳腺部位, 进行长达 19~20 h 的蛋壳矿化过程; 同时, 蛋壳腺上皮细胞中原卟啉颗粒开始合成和积累^[22], 说明此时蛋壳腺上皮细胞中与原卟啉合成和转运相关的基因表达活跃。因此, 本研究在纯系褐壳蛋鸡中选取产深褐壳鸡蛋和浅褐壳鸡蛋的连产母鸡, 于产蛋后 6 h 屠宰, 取蛋壳腺上皮组织提取 RNA 进行测序, 共计获得 8461 个表达基因。进一步通过 NOISeq 软件筛选到在浅褐壳组显著上调基因 24 个, 显著下调基因 10 个。对差异表达基因进行 GO 功能分析和信号通路分析, 并结合原卟啉的合成转运过程, 筛选到 *TF* 基因、*HSP70* 基因以及氧化磷酸化通路可能与蛋壳褐色的形成相关。

目前研究蛋壳褐色形成机理的文献较少。郑传威^[23]以白壳蛋鸡(白来航)、粉壳蛋鸡(北京油鸡)和褐壳蛋鸡(洛岛白)作为试验材料, 利用鸡全基因组表达芯片检测不同颜色组蛋鸡在蛋壳腺部位的差异表达基因, 发现 40 个逐步表达下调的基因和 33 个逐步表达上调的基因, 推测 *LOC424261* 基因、*PLDN* 基因和 *TRPV1* 基因可能与色素代谢相关。而上述 3 个基因在本研究中未检测到在两组间表达量的差异。此外, 本实验与上述研究相比发现的差异表达基因

表 4 浅褐壳组和深褐壳组间差异表达基因

Table 4 Summary of differentially expressed genes between dark and light groups

基因 ID	基因名称	RPKM (浅褐壳组)	RPKM (深褐壳组)	log ₂ RPKM(浅褐 壳组/深褐壳组)	P
ENSGALG00000001136	—	2.37	0.87	1.44	0.97
ENSGALG00000002988	磷酸脱氢酶基因(<i>PHGDH</i>)	2.22	1.11	1.00	0.96
ENSGALG00000005903	核受体相互作用蛋白基因(<i>NRIP3</i>)	0.87	1.90	-1.14	0.87
ENSGALG00000006453	卵转铁蛋白基因(<i>TF</i>)	10.18	33.83	-1.73	0.90
ENSGALG00000007226	骨织素基因(<i>OSTN</i>)	10.47	4.47	1.23	0.94
ENSGALG00000007374	锌指结合蛋白基因(<i>YPEL4</i>)	2.16	1.07	1.02	0.97
ENSGALG00000008661	血管诱导生成因子基因(<i>CYR61</i>)	1.68	0.66	1.35	0.97
ENSGALG00000008713	生存素基因亚型(<i>BIRC5</i>)	4.00	1.90	1.08	0.98
ENSGALG00000011551	免疫球蛋白基因(<i>IGJ</i>)	25.88	11.16	1.21	0.97
ENSGALG00000011715	热休克蛋白 70 基因(<i>hsp70</i>)	212.15	568.41	-1.42	0.83
ENSGALG00000013575	干扰素刺激基因 12(<i>ISG12(2)</i>)	2.26	0.98	1.21	0.97
ENSGALG00000014616	金属硫蛋白(<i>MTI</i>)	1.32	0.65	1.03	0.97
ENSGALG00000014900	—	1.35	0.55	1.30	0.95
ENSGALG00000014955	家族序列相似性 26, 成员 D(<i>FAM26D</i>)	0.54	1.42	-1.40	0.86
ENSGALG00000015079	跨膜蛋白(<i>UPK1B</i>)	0.41	4.69	-3.53	0.97
ENSGALG00000015914	钙结合蛋白基因(<i>CALB1</i>)	3.21	1.39	1.21	0.96
ENSGALG00000016667	鸡 β -防御素基因(<i>GAL10</i>)	12.15	5.79	1.07	0.98
ENSGALG00000017052	细胞周期蛋白 A1(<i>CCNA1</i>)	1.22	0.59	1.04	0.97
ENSGALG00000019061	—	5.43	2.17	1.32	0.97
ENSGALG00000019470	肌蛋白(<i>MSC</i>)	1.94	0.78	1.31	0.98
ENSGALG00000019793	—	11.62	4.71	1.30	0.98
ENSGALG00000021142	—	2.28	0.89	1.36	0.96
ENSGALG00000021404	葡萄糖胺(N-乙酰基转移酶 3), 粘蛋白型 (<i>GCNT3</i>)	1.06	0.38	1.48	0.97
ENSGALG00000021627	干扰素 α 诱导蛋白 27 样蛋白 2(<i>IFI27L2</i>)	15.69	6.40	1.29	0.92
ENSGALG00000022234	—	1.23	0.02	5.68	1.00
ENSGALG00000023622	卵白素(<i>AVD</i>)	15.72	6.84	1.20	0.97
ENSGALG00000024372	MHC I 类前体(<i>BFIV21</i>)	25.26	56.32	-1.16	0.87
ENSGALG00000026666	—	1.44	3.10	-1.11	0.86
ENSGALG00000027133	<i>CD83</i>	1.93	0.85	1.18	0.97
ENSGALG00000027427	—	142.99	60.03	1.25	0.97
ENSGALG00000027587	亮氨酸 α -2-糖蛋白 1(<i>LRG1</i>)	1.65	3.98	-1.27	0.94
ENSGALG00000027594	<i>HIST1H2B7</i>	4.03	8.55	-1.09	0.96
ENSGALG00000027887	—	17.28	8.43	1.03	0.97
ENSGALG00000029149	—	5.63	12.42	-1.14	0.87

表 5 用于 qRT-PCR 7 个差异表达基因信息
Table 5 The list of genes selected for qRT-PCR validation

序号	基因 ID	基因名称	功能描述
1	ENSGALG00000021142	新基因	无描述
2	ENSGALG00000016667	鸡 β -防御素基因(<i>GALI0</i>)	鸡抗菌蛋白 ^[12]
3	ENSGALG00000006453	卵转铁蛋白基因(<i>TF</i>)	转运铁离子 ^[13, 14]
4	ENSGALG00000011715	热休克蛋白 70 基因(<i>HSP70</i>)	抗氧化功能, 参与细胞保护 ^[15]
5	ENSGALG00000023622	卵白素(<i>AVD</i>)	抗生物素蛋白 ^[16]
6	ENSGALG00000015079	跨膜蛋白(<i>UPK1B</i>)	参与信号转导 ^[17]
7	ENSGALG00000008661	血管诱导生成因子基因(<i>CYR61</i>)	诱导血管新生 ^[18]

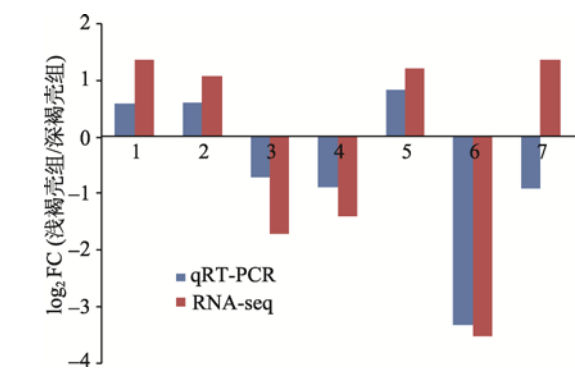


图 2 qRT-PCR 验证差异表达基因
Fig. 2 qRT-PCR validation of seven selected genes that are differentially expressed
1~7 参见表 5 内容。

相对较少, 是因为本研究中试验鸡来自同一纯系品种, 具有相同的来源和遗传背景, 从而导致深褐壳组和浅褐壳组母鸡大部分基因表达水平较为一致。同时, 两组鸡蛋除蛋壳颜色差异显著外, 其余蛋品质均无显著差异, 在一定程度上避免了其他蛋品质性状的干扰, 所得到的差异基因与褐色性状的关联更加紧密。

TF 基因编码卵转铁蛋白, 是铁结合蛋白家族的一员, 参与铁离子的转运和平衡^[13, 14]。与哺乳动物不同, 鸟类只有一个卵转铁蛋白, 并且只在肝脏和输卵管表达^[24]。鸡 *TF* 基因于 1994 年首次被发现, 全长 10.5 kb, 包含 17 个外显子和 16 个内含子^[25]。卵转铁蛋白作为鸡红细胞血红素的刺激因子^[26], 可以将铁离子从吸收的地方转运至红细胞以合成血红蛋白。氧化的卵转铁蛋白可以向胚胎传递铁离子用于胚胎血红素的合成^[27]。研究表明, 原卟啉是血红素的直接前体物质, 血红素合成的最后一步即是铁离子嵌入原卟啉的大环^[28, 29]。因此, 输卵管中

的卵转铁蛋白可能通过铁离子转运参与血红素合成, 进而调控原卟啉的合成和积累, 影响其在蛋壳腺上皮细胞中积累以及向蛋壳中的沉积。

HSP70 是热休克蛋白家族中的一员, 具有高度保守性并在细胞中广泛表达^[30]。热休克蛋白具有抗氧化的功能, 参与细胞保护^[15]。当处于高温环境^[31]、紫外线照射^[32]、炎症反应^[33]以及氧化应激^[34]条件下, 细胞内 *HSP70* 基因的表达水平将会上升。前人研究表明, 原卟啉是一种助氧化剂, 可以引起细胞内的氧化应激^[35, 36], 蛋壳上原卟啉的含量可以反映母鸡的氧化状态^[37]。对鸟类细胞中热休克蛋白的表达水平与蛋壳中原卟啉含量关系的研究发现, 蓝冠山雀(*Cyanistes caeruleus* Linn.)蛋壳中原卟啉斑点越多, 细胞内 *HSP70* 浓度越高, 作者推测此结果是由于原卟啉具有感应细胞内氧化应激的作用^[38]。本研究发现深褐壳组鸡蛋壳腺上皮组织中 *HSP70* 基因的表达水平显著高于浅褐壳组。我们前期研究发现产深褐壳鸡蛋的母鸡其蛋壳腺上皮组织和蛋壳中原卟啉的含量高于产浅褐壳鸡蛋的母鸡^[9]。这些研究结果表明 *HSP70* 基因会通过某种机制影响原卟啉的含量。

哺乳动物细胞中原卟啉是由原卟啉原氧化酶催化原卟啉原形成的, 然而目前为止在鸟类中尚未发现原卟啉原氧化酶, 在鸟类中只要有氧气存在的条件下, 原卟啉原可自动转化生成原卟啉^[39]。并且, 在正常氧气浓度范围内(20%, v/v)原卟啉的合成效率随氧气浓度增加而上升^[40]。Spaks^[41]推测蛋壳腺固有膜内管状腺合成无色的原卟啉原, 转移至上皮细胞后在氧气的催化作用下发生自动氧化转化为原卟啉并积累在蛋壳腺上皮细胞内。因此,

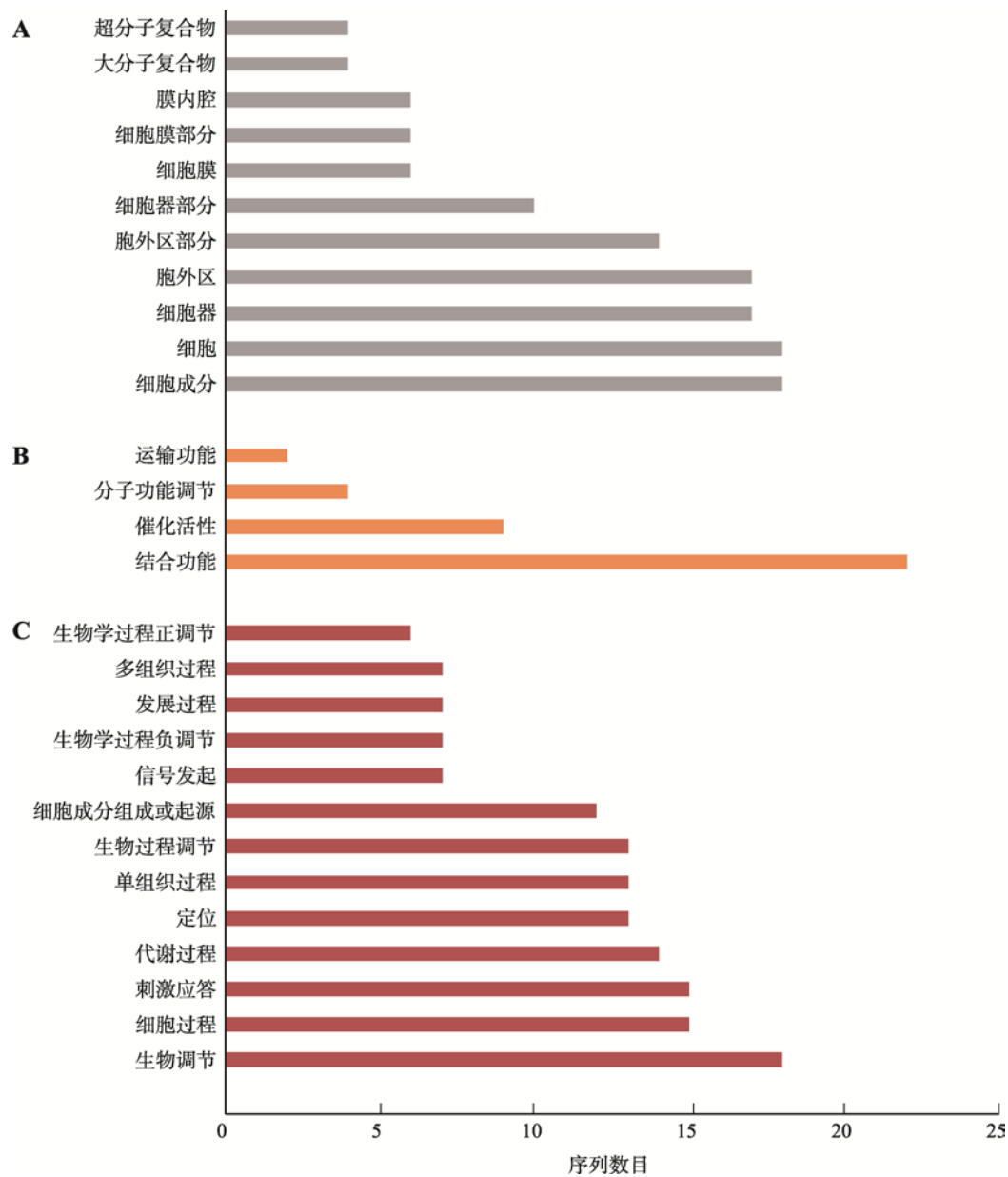


图 3 深褐壳组与浅褐壳组差异表达基因所属 GO 条目(水平 2)

Fig. 3 Gene Ontology (GO) distribution(level two) of differentially expressed genes between dark and light group

A：细胞组分；B：分子功能；C：生物学过程。

表 6 差异表达基因显著富集到的通路信息

Table 6 Pathways that are enriched by differentially expressed genes				
通路 ID	描述	参与的基因	log ₂ RPKM(浅褐壳组/深褐壳组)	P
map00190	氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)	细胞色素 C 氧化酶亚基 7A2(COX7A2)	0.62	0.98
		细胞色素 C 氧化酶铜伴侣(COX17)	0.69	0.97
		细胞色素 C 氧化酶亚基 VII C(COX7C)	0.68	0.97
		泛醌细胞色素 C 还原酶(UQCR10)	0.70	0.97

氧气的存在是蛋壳腺上皮细胞原卟啉形成的关键。氧化磷酸化是一个消耗氧气生成 ATP 的生物学通路。适当放宽筛选条件后, 本研究发现深褐壳组和浅褐壳组母鸡蛋壳腺上皮组织中差异表达的基因被富集到氧化磷酸化通路, 其中共涉及 4 个基因, 即细胞色素 C 氧化酶亚基 7A2(COX7A2)、细胞色素 C 氧化酶铜伴侣(COX17)、细胞色素 C 氧化酶亚基 C(COX7C)和泛醌细胞色素 C 还原酶(UQCRI0)基因。细胞色素 C 氧化酶是含血红素/铜终端氧化酶家族成员之一, 作为线粒体内膜上的终端酶, 催化细胞色素 C 到氧分子(O_2)的电子传递而直接参与 ATP 合成^[42, 43]。泛醌细胞色素 C 还原酶位于线粒体内膜呼吸链, 催化电子从辅酶 Q 传给细胞色素 C, 在电子传递过程中偶联 ATP 的生成^[44]。这 4 个基因在浅褐壳组均有表达上调趋势, 说明产浅褐壳鸡蛋的母鸡其蛋壳腺内氧化磷酸化水平相对较高, 从而会消耗更多的氧气, 降低原卟啉的合成效率, 进而使蛋壳褐色程度变浅。

本研究通过 RNA-seq 技术分析了产不同蛋壳褐色程度的母鸡在蛋壳腺上皮细胞表达基因的种类和数量, 筛选出调控蛋壳色素原卟啉合成的相关候选基因和通路, 为揭示褐色蛋壳形成的调控机制提供了理论基础。

参考文献(References):

- [1] Odabaşı AZ, Miles RD, Balaban MO, Portier KM. Changes in brown eggshell color as the hen ages. *Poult Sci*, 2007, 86(2): 356–363. [DOI]
- [2] Zhang LC, Ning ZH, Xu GY, Hou ZC, Yang N. Heritabilities and genetic and phenotypic correlations of egg quality traits in brown-egg dwarf layers. *Poult Sci*, 2005, 84(8): 1209–1213. [DOI]
- [3] Kennedy GY, Vevers HG. A survey of avian eggshell pigments. *Comp Biochem Physiol B*, 1976, 55(1): 117–123. [DOI]
- [4] Lang MR, Wells JW. A review of eggshell pigmentation. *World's Poult Sci*, 1988, 43(3): 238–246. [DOI]
- [5] Bhosale SV, Bhosale SV, Shitre GV, Bobe SR, Gupta A. Supramolecular chemistry of protoporphyrin IX and its derivatives. *Eur J Org Chem*, 2013, 2013(19): 3939–3954. [DOI]
- [6] Soh T, Koga O. The effects of sex steroid hormones on the pigment accumulation in the shell gland of Japanese quail. *Poult Sci*, 1994, 73(1): 179–185. [DOI]
- [7] Wang XT, Deng XM, Zhao CJ, Li JY, Xu GY, Lian LS, Wu CX. Study of the deposition process of eggshell pigments using an improved dissolution method. *Poult Sci*, 2007, 86(10): 2236–2238. [DOI]
- [8] Nys Y, Zawadzki J, Gautron J, Mills AD. Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poult Sci*, 1991, 70(5): 1236–1245. [DOI]
- [9] Li GQ, Chen SR, Duan ZY, Qu LJ, Xu GY, Yang N. Comparison of protoporphyrin IX content and related gene expression in the tissues of chickens laying brown-shelled eggs. *Poult Sci*, 2013, 92(12): 3120–3124. [DOI]
- [10] Punnett RC, Bailey PG. Genetic studies in poultry. *J Genet*, 1920, 10(4): 277–292. [DOI]
- [11] Tarazona S, García-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res*, 2011, 21(12): 2213–2223. [DOI]
- [12] Chen YS, Xie QM, Qin JP, Zhou QF, Cao YC. Avian important immune factors--chicken β defensin. *Chem Life*, 2005, 25(6): 501–504.
陈燕珊, 谢青梅, 覃健萍, 周庆丰, 曹永长. 禽类的重要免疫因子—鸡 β 防御素. *生命的化学*, 2005, 25(6): 501–504. [DOI]
- [13] Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem*, 1980, 49: 357–393. [DOI]
- [14] Williams J. A comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. *Biochem J*, 1968, 108(1): 57–67. [DOI]
- [15] Morimoto RI. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells*, 1991, 3(8): 295–301. [DOI]
- [16] Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*, 1975, 29: 85–133. [DOI]
- [17] Carpenter AR, Becknell MB, Ching CB, Cuaresma EJ, Chen X, Hains DS, McHugh KM. *Uroplakin 1b* is critical in urinary tract development and urothelial differentiation and homeostasis. *Kidney Int*, 2016, 89(3): 612–624. [DOI]
- [18] Lee HY, Chung JW, Youn SW, Kim JY, Park KW, Koo BK, Oh BH, Park YB, Chaqour B, Walsh K, Kim HS. Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res*, 2007, 100(3): 372–380. [DOI]
- [19] Wang ZP, Qu LJ, Yao JF, Yang XL, Li GQ, Zhang YY, Li

- JY, Wang XT, Bai JR, Xu GY, Deng XM, Yang N, Wu CX. An *EAV-HP* insertion in 5'flanking region of *SLC-OIB3* causes blue eggshell in the chicken. *PLoS Genet*, 2013, 9(1): e1003183. [DOI]
- [20] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57–63. [DOI]
- [21] Qi YX, Liu YB, Rong WH. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(11): 1191–1202.
祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用. *遗传*, 2011, 33(11): 1191–1202. [DOI]
- [22] Tamura T, Fujii S. Histological observations on the quail oviduct; On the secretions in the mucous epithelium of the uterus. *J Fac Fish Anim Husb*, 1966, 6: 357–371. [DOI]
- [23] Zheng CW. Gene expression analysis of brown eggshell pigment formation process and global expression profile microarray analysis[Dissertation]. China Agricultural University, 2013.
郑传威. 鸡褐壳色素形成过程的基因表达及表达谱芯片分析[学位论文]. 中国农业大学, 2013. [DOI]
- [24] Giansanti F, Leboffe L, Pitari G, Ippoliti R, Antonini G. Physiological roles of ovotransferrin. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(3): 218–225. [DOI]
- [25] Schaeffer E, Lucero MA, Jeltsch JM, Py MC, Levin MJ, Chambon P, Cohen GN, Zakin MM. Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. *Gene*, 1987, 56(1): 109–116. [DOI]
- [26] Coll J, Ingram VM. Identification of ovotransferrin as a heme-, colony- and burst-stimulating factor in chick erythroid cell cultures. *Exp Cell Res*, 1981, 131(1): 173–184. [DOI]
- [27] Keung WM, Azari P, Phillips JL. Structure and function of ovotransferrin. I. Production of iron-binding fragments from iron-ovotransferrin by the action of immobilized subtilisin. Purification and characterization of the fragments. *J Biol Chem*, 1982, 257(3): 1177–1183. [DOI]
- [28] Jordan PM. Highlights in haem biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, 4(6): 902–911. [DOI]
- [29] Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(7): 723–736. [DOI]
- [30] Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 781–791. [DOI]
- [31] Urban-Chmiel R, Puchalski A, Wernicki A, Dec M, Paluch E. Characterization of Hsp70 proteins in bovine leukocytes induced by the temperature 41 degrees C. *Pol J Vet Sci*, 2009, 12(3): 323–328. [DOI]
- [32] Semenov VF, Michalski AI, Sapozhnikov AM. Heating and ultraviolet light activate anti-stress gene functions in humans. *Front Genet*, 2015, 6: 245. [DOI]
- [33] Tanaka T, Shibasaki A, Ono R, Kaisho T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor kappaB to inhibit inflammatory signaling. *Sci Signal*, 2014, 7(356): ra119. [DOI]
- [34] Aggarwal A, Ashutosh, Chandra G, Singh AK. Heat shock protein 70, oxidative stress, and antioxidant status in periparturient crossbred cows supplemented with -tocopherol acetate. *Trop Anim Health Prod*, 2013, 45(1): 239–245. [DOI]
- [35] Afonso S, Vanore G, Batlle A. Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radic Res*, 1999, 31(3): 161–170. [DOI]
- [36] Shan Y, Pepe J, Lu TH, Elbirt KK, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Induction of the heme oxygenase-1 gene by metalloporphyrins. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 380(2): 219–227. [DOI]
- [37] Moreno J, Osorno JL. Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecol Lett*, 2003, 6(9): 803–806. [DOI]
- [38] Martínez-de la Puente J, Merino S, Moreno J, Tomás G, Morales J, Lobato E, García-Fraile S, Martínez J. Are eggshell spottiness and colour indicators of health and condition in blue tits *Cyanistes caeruleus*? *J Avian Biol*, 2007, 38(3): 377–384. [DOI]
- [39] Brenner DA, Bloomer JR. The enzymatic defect in variegated porphyria. *N Engl J Med*, 1980, 302(14): 765–769. [DOI]
- [40] Porra RJ, Falk JE. The enzymic conversion of coproporphyrinogen III into protoporphyrin IX. *Biochem J*, 1964, 90(1): 69–75. [DOI]
- [41] Sparks NHC. Eggshell pigments - from formation to deposition. *Avian Biol Res*, 2011, 4(4): 162–167. [DOI]
- [42] Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(8): 325–330. [DOI]
- [43] Michel H, Behr J, Harrenga A, Kannt A. CYTOCHROME C OXIDASE: structure and spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1998, 27: 329–356. [DOI]
- [44] Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 1015–1069. [DOI]