

北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡精液品质比较及 *C2CD2* 和 *RYR2* 基因的差异表达分析冯宇航¹, 齐晓龙², 邢凯², 王相国², 倪和民², 郭勇^{2*}, 盛熙晖^{2*}

(1. 北京市通州区农业农村局, 北京 101100; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

摘要 [目的]比较北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精液品质和性腺发育情况,并分析2品种间 *C2CD2* 和 *RYR2* 基因的表达差异。[方法]试验选取33周龄北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡各32只,从35周龄开始进行为期10周的精液品质检测。从2品种的每个重复中随机挑选1只种公鸡进行屠宰,记录其活体重、左右睾丸重以及鸡冠重并分析睾丸指数等,应用荧光定量PCR方法检测 *C2CD2* 和 *RYR2* 基因在2品种睾丸组织中的表达水平。[结果]海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精子密度、精子总数和性腺发育情况均优于北京油鸡。*C2CD2* 基因在北京油鸡中的表达量高于海兰褐壳蛋鸡,而 *RYR2* 基因在北京油鸡中的表达量显著低于海兰褐壳蛋鸡($P < 0.05$)。[结论]海兰褐壳蛋鸡的精子密度、精子总数和性腺发育情况均优于北京油鸡,*RYR2* 基因可作为提高鸡精子总数的候选基因。

关键词 精液品质;精子总数;北京油鸡;海兰褐壳蛋鸡;*C2CD2* 基因;*RYR2* 基因

中图分类号 S831.5 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)09-0100-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.09.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparison of Semen Quality in Cock Bred between Beijing-You Chicken and Hyline Brown Laying Hens and Differential Expression Analysis of *C2CD2* and *RYR2* GenesFENG Yu-hang¹, QI Xiao-long², XING Kai² et al (1. Agricultural and Rural Bureau in Tongzhou District of Beijing, Beijing 101100; 2. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract [Objective] To compare the semen quality, gonadal development status of cock bred between Beijing-You chicken and Hyline brown laying hens, and analyze the differential expression of *C2CD2* and *RYR2* genes between the two breeds. [Method] 32 33-week-old cock breeds of Beijing-You chicken and Hyline brown laying hens were selected. The semen quality testing was carried out for 10 weeks from 35-week-age. One cock bred was randomly selected for slaughter from each repeat of two breeds, and the live weight, left and right testis weight and comb weight were recorded and the testicle index was analyzed. The expression level of *C2CD2* and *RYR2* genes in testicular tissue of two breeds was detected by Real-time PCR. [Result] The sperm density, total sperm count and gonad development of Hyline Brown laying hens were better than those of Beijing-You chicken. The expression amount of *C2CD2* gene in Beijing-You chicken was higher than that of Hyline Brown laying hens, and the expression amount of *RYR2* gene in Beijing-You chicken was significantly lower than that of Hyline Brown laying hens ($P < 0.05$). [Conclusion] The sperm density, total sperm count and gonad development of Hyline Brown laying hens were better than that of Beijing-You chicken. *RYR2* genes can be used as candidate genes for total sperm count of chicken.

Key words Semen quality; Total sperm count; Beijing-You chicken; Hyline brown laying hens; *C2CD2* gene; *RYR2* gene

随着现代集约化高效养禽业的发展,人工授精技术在实际生产中已经普遍应用。在大规模种鸡生产中,种蛋受精率会影响种蛋和雏鸡的质量,也会影响孵化率,从而影响育成期的产蛋性能,最终影响蛋鸡养殖场的经济效益^[1-3]。精液品质是决定种蛋受精率的重要因素之一。北京油鸡是我国的优良地方品种,肉蛋品质兼优,但产蛋量较低。海兰褐壳蛋鸡是美国海兰国际公司培育的四系配套优良蛋鸡品种,饲料报酬、产蛋量和成活率均较高^[4-5]。笔者选取这2个有代表性的品种进行精液品质和性腺发育情况的比较。

C2CD2 (C2 domain-containing 2) 和 *RYR2* (ryanodine receptor 2) 基因均在维持细胞内钙稳态过程中发挥生物学作用,而细胞内钙稳态以及 Ca^{2+} 浓度在生精细胞分化成熟、精子顶体反应和获能过程中均发挥着重要的作用。因此,研究 *C2CD2* 基因和 *RYR2* 基因在北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡中的

表达差异,可为鸡精液品质的候选基因挖掘奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物 试验选取33周龄、体况一致的北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡各32只。将每个品种进行随机分组,每个品种4个重复,每个重复8只鸡。试验鸡饲养与管理条件相同。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 人工采精和精液品质的测定。 试验群体由33周龄饲养至45周龄,从35周龄起进行每周2次定时定员的人工采精。将集精杯提前预热,经腹部按摩法采集精液后,直接在集精杯上读数,确定其精液量。将采集的精液以1:400的比例稀释,吸取1滴精液滴入计数池,置于显微镜下,采用伟力鸡精子分析系统对精子活率、精子活力以及精子密度进行检测。每个样品至少选取5个不同视野进行分析。

1.2.2 性腺发育相关性状的测定。 45周龄时,从每个品种的每个重复中随机选取1只鸡,称量活体重后屠宰。宰前禁食12h,自由饮水。屠宰时采用颈外放血法,切断鸡颈动脉或颈静脉,放血致死。采集睾丸和鸡冠组织,称重后置于液氮中保存。

1.2.3 荧光定量PCR检测基因表达水平。 采集2个品种的左睾丸组织,应用Trizol法提取样本总RNA,测定浓度后按

基金项目 北京市家禽产业创新团队项目(BAIC04-2018)。

作者简介 冯宇航(1994—),女,北京人,硕士研究生,研究方向:家禽营养调控与繁殖;齐晓龙(1985—),男,辽宁锦州人,讲师,博士,从事家禽营养调控与繁殖方面的研究。冯宇航和齐晓龙为共同第一作者。*通信作者,郭勇,教授,博士,从事动物育种及胚胎工程方面的研究;盛熙晖,副教授,博士,从事动物分子育种方面的研究。

收稿日期 2018-11-07

体系用 Thermo First cDNA Synthesis Kit SinoGene 试剂盒进行反转录,然后应用 StepOnePLUS, Applied Biosystems PCR 仪进行定量反转录,每个样品每个基因设置 3 个平行进行 PCR 检测。以 β -actin 作为内参基因,采用荧光定量 PCR 方法检测

C2CD2 和 *RYR2* 基因在 2 品种睾丸组织中的表达量。根据 GenBank 中的基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物(引物序列见表 1)。相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer	产物大小 Product length/bp
<i>C2CD2</i>	ACCTGCTGGAGAGGAAGTGA	TCTCTAAAGCCCAAGCCGTA	122
<i>RYR2</i>	CGCGTTGGAGATGACCTTAT	AGTTTGCTGGAAAGCTGCAT	105
β -actin	AACACCCACACCCCTGTGAT	TGACTCAAGCGCCAAAAGAA	100

1.3 数据统计与分析 试验结果均以平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS 22.0 统计软件的独立样本 *t* 检验进行差异显著性分析,其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精液品质比较 对北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精液品质进行比较,结果

表明北京油鸡的精液量极显著高于海兰褐壳蛋鸡($P < 0.01$),北京油鸡的精子活率和精子活力均显著高于海兰褐壳蛋鸡($P < 0.05$);但海兰褐壳蛋鸡的精子密度极显著高于北京油鸡($P < 0.01$),故海兰褐壳蛋鸡的精子总数极显著高于北京油鸡($P < 0.01$)(表 2)。

表 2 北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡精液品质的比较

Table 2 Comparison of semen quality between Beijing-You chicken and Hyline brown laying hens

品种 Variety	精液量 Semen volume mL	精子活率 Sperm viability %	精子活力 Sperm motility %	精子密度 Sperm density $\times 10^8$ /mL	精子总数 Total sperm count $\times 10^8$
北京油鸡 Beijing-You chicken	0.45 \pm 0.08 A	82.43 \pm 1.10 a	69.45 \pm 1.86 a	15.02 \pm 0.13 B	6.83 \pm 0.10 B
海兰褐壳蛋鸡 Hyline brown laying hens	0.26 \pm 0.07 B	80.43 \pm 1.55 b	66.45 \pm 1.39 b	88.61 \pm 0.82 A	23.02 \pm 0.24 A

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$); different capital letters in the same column indicated extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.2 北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡的性腺发育情况比较 对北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡的性腺发育情况进行比较,结果表明海兰褐壳蛋鸡的活体重和鸡冠重均极显著高于北京

油鸡($P < 0.01$);海兰褐壳蛋鸡的平均睾丸重以及睾丸指数亦高于北京油鸡,但差异不显著($P > 0.05$)(表 3)。

表 3 北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡性腺发育性状的比较

Table 3 Comparison of gonadal development traits between Beijing-You chicken and Hyline brown laying hens

品种 Variety	活体重 Live body weight/kg	鸡冠重 Comb weight/g	平均睾丸重 Average testis weight/g	睾丸指数 Testicular index
北京油鸡 Beijing-You chicken	2.16 \pm 0.11 B	22.58 \pm 2.76 B	7.16 \pm 2.08	0.60 \pm 0.18
海兰褐壳蛋鸡 Hyline brown laying hens	2.62 \pm 0.08 A	43.93 \pm 2.28 A	9.09 \pm 0.95	0.67 \pm 0.08

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$); different capital letters in the same column indicated extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.3 北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡 *C2CD2* 和 *RYR2* 基因的表达水平比较 应用荧光定量 PCR 方法检测北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡 *C2CD2* 和 *RYR2* 基因的表达水平,结果表明 *C2CD2* 基因在 2 品种公鸡间表达量无显著差异,但其在北京油鸡中的表达量高于海兰褐壳蛋鸡,而 *RYR2* 基因在海兰褐壳蛋鸡中的表达量显著高于北京油鸡($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 精液品质差异 该研究分别对北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡精液品质进行了测定,结果表明北京油鸡种公鸡的精子活力和活率显著高于海兰褐壳蛋鸡,与王竹伟等^[6]、史好赞等^[7]和胡娟^[8]的试验结果基本一致。

该研究结果表明北京油鸡种公鸡的精液量极显著高于

海兰褐壳蛋鸡,但海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精子密度远高于北京油鸡,这与前人的研究结果^[9-14]基本一致。Kamar^[15]研究发现精液量与繁殖力呈正相关;Boone^[16]研究表明精液量与繁殖力呈负相关。但他们同时认为精子密度与繁殖力存在显著正相关,相关系数分别为 0.821 和 0.481。Nestor 等^[17]研究表明火鸡在生产前期精子密度与繁殖力的相关性不显著,但在后期存在强的正相关。因此,为更好地反映精液品质,常将精液量和精子密度综合为精子总数进行考虑。该试验结果表明海兰褐壳蛋鸡的精子总数极显著高于北京油鸡。

北京油鸡作为肉蛋兼用品种,繁殖力相对较低,这妨碍了其产业发展,因此改善其繁殖性能十分重要。该试验结果表明,北京油鸡种公鸡的精子活力和精子活率较高,但在精

子密度和精子总数上仍需进一步选育提高。

3.2 性腺发育情况比较 该试验在45周龄时对北京油鸡和海兰褐壳蛋鸡种公鸡进行屠宰,测定其性腺发育相关性状,结果表明海兰褐壳蛋鸡的活体重和鸡冠重均极显著高于北京油鸡,而北京油鸡与海兰褐壳蛋鸡种公鸡的平均睾丸重以及睾丸指数虽然无显著差异,但海兰褐壳蛋鸡的这2项指标均高于北京油鸡,海兰褐壳蛋鸡种公鸡的睾丸发育情况优于北京油鸡。睾丸作为精子发生的场所,其发育情况与精液品质息息相关。Hassanin等^[18]研究表明睾丸指数以及睾丸发育情况是衡量性腺发育的重要参数,在一定范围内公鸡的繁殖能力与睾丸指数呈正相关。

3.3 C2CD2和RYR2基因的表达分析 C2CD2基因主要的分子功能是与蛋白结合,是存在于膜上的单通道蛋白。Petrie等^[19]研究表明C2结构域可调节囊泡胞吐作用。董干^[20]研究发现C2CD2基因在精索静脉曲张不育患者(生精功能受损)精浆中的表达量显著高于正常人,C2CD2基因的异常表达与精索静脉曲张不育具有显著相关性,可作为精索静脉曲张患者的不育标记物。该试验中C2CD2基因在北京油鸡睾丸组织中的表达量高于海兰褐壳蛋鸡,可能是因为它影响了胞吐作用,从而降低了蛋白间的结合能力,进而影响生精过程。RYR2基因编码了一种赖氨酸受体,这种编码蛋白质是细胞内钙释放通道的组成部分,在保持胞内钙平衡功能中起着重要作用。Cheung等^[21]和Zhao等^[22]研究表明,当RYR2磷酸化水平增高时,其对Ca²⁺通透性增高;反之,则其对Ca²⁺通透性下降。细胞内钙稳态以及Ca²⁺浓度在生精细胞分化成熟、精子顶体反应和获能过程中均发挥着重要作用。Chiarella等^[23]研究表明,RYR2基因在小鼠的精原细胞中表达,并通过调节Ca²⁺浓度促进精原细胞分化。该试验结果表明RYR2基因在海兰褐壳蛋鸡睾丸组织中的表达量显著高于北京油鸡,可能其高表达量有利于精子生成过程。因此,RYR2基因可作为提高鸡精子总数的候选基因,但其在睾丸组织中的具体调控机理仍有待进一步研究。

4 结论

海兰褐壳蛋鸡种公鸡的精子密度、精子总数和性腺发育情况均优于北京油鸡,RYR2基因可作为提高鸡精子总数的候选基因。

参考文献

- [1] 刘龙. 蛋鸡输卵管膨大部在自然发育过程中各阶段转录组变化情况研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [2] REN S C, PENG Z Y, MAO J H, et al. RNA-seq analysis of prostate cancer

- in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings[J]. Cell research, 2012, 22(5): 806-821.
- [3] CONG F, LIU X L, HAN Z X, et al. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 1-13.
- [4] 王志刚, 周永刚, 钱成济, 等. 地方优质鸡品种资源的推广模式研究[J]. 云南农业大学学报, 2014, 8(1): 15-19.
- [5] 雷秋霞, 逯岩, 韩海霞, 等. 山东地方鸡与海兰褐壳蛋鸡品质的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17327-17329.
- [6] 王竹伟, 陈继兰, 胡娟, 等. 日粮能量、蛋白质水平对种公鸡繁殖性能的影响[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(5): 96-103.
- [7] 史好赞, 王建林, 刘歧. 日粮中锰水平对海兰褐壳种公鸡精液品质的影响[J]. 国外畜牧学-猪与禽, 2010, 30(3): 63-64.
- [8] 胡娟. 北京油鸡精液品质遗传参数估计及相关候选基因的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [9] 薛夫光. 利用iTRAQ蛋白质组学技术筛选与种公鸡繁殖力相关的候选蛋白[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [10] 毕喻林. 北京油鸡种公鸡精液品质相关候选基因的SNPs分析及转录研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [11] 姚会, 王晓霞, 沙尔山, 等. 能量水平对海兰褐壳种公鸡生长发育及精液品质的影响[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(2): 33-36.
- [12] 刘虹红, 王晓霞, 余雄, 等. 蜂花粉对海兰褐壳种公鸡精液品质及血浆生殖激素的影响[J]. 北京农学院学报, 2009, 24(2): 35-39.
- [13] 刘伟平, 文杰, 陈国宏, 等. 短期热应激对北京油鸡种公鸡繁殖性能的影响[C]//全球肉鸡产业论坛暨第二届中国白羽肉鸡产业发展大会会刊. 扬州: 《中国家禽》编辑部, 2010: 141-144.
- [14] 许晨光, 于曦, 许运岑, 等. 复合饲料添加剂对海兰褐壳父母代种公鸡繁殖性能的影响[J]. 中国家禽, 2017, 39(21): 28-31.
- [15] KAMAR G. The semen of fayomi cockerels[J]. Indian journal of animal science, 1960, 52: 45-52.
- [16] BOONE M A. Family differences in semen quality in one strain of White Plymouth Rocks[J]. Poultry science, 1968, 47(4): 1049-1051.
- [17] NESTOR K E, BROWN K I. Persistence of semen quality during the reproductive period in two strains of turkeys differing in semen yield[J]. Poultry science, 1976, 55(6): 2470-2472.
- [18] HASSANIN A, KUWAHARA S, NURHIDAYAT, et al. Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals[J]. Journal of veterinary medical science, 2002, 64(10): 921-926.
- [19] PETRIE M, ESQUIBEL J, KABACHINSKI G, et al. The vesicle priming factor CAPS functions as a homodimer via C2 domain interactions to promote regulated vesicle exocytosis[J]. J Biol Chem, 2016, 291(40): 21257-21270.
- [20] 董干. 精索静脉曲张患者不育标记物的蛋白质组学筛选及验证[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [21] CHEUNG J W, MELI A C, XIE W J, et al. Short-coupled polymorphic ventricular tachycardia at rest linked to a novel ryanodine receptor (RYR2) mutation: Leaky RYR2 channels under non-stress conditions[J]. Int J Cardiol, 2015, 180(2): 228-236.
- [22] ZHAO Y T, VALDIVIA C R, GURROLA G B, et al. Arrhythmogenesis in a polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(13): 1669-1677.
- [23] CHIARELLA P, PUGLISI R, SORRENTINO V, et al. Ryanodine receptors are expressed and functionally active in mouse spermatogenic cells and their inhibition interferes with spermatogonial differentiation[J]. Journal of cell science, 2004, 117(18): 4127-4134.