

利用基因芯片分析鸡法氏囊差异表达基因

杭柏林^{1,2#}, 桑建君^{1#}, 钱琨¹, 叶建强¹, 邵红霞¹, 金文杰¹, 梅梅¹, 缪佶¹, 秦爱建^{1*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003)

摘要: 为了解鸡法氏囊发育过程中转录组的变化, 应用鸡基因表达谱芯片对从 18 胚龄、10 和 30 日龄 SPF 鸡法氏囊组织抽提和纯化的 mRNA 进行芯片杂交, 对差异表达基因进行了 GO 功能分类和 KEGG 信号通路分析, 并利用荧光定量 PCR 验证了部分差异表达基因。结果表明, 法氏囊总 RNA 的基因检出率在 79%~85%, 30 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚相比、10 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚相比和 30 与 10 日龄雏鸡相比分别筛选到 5 043、2 368 和 1 874 条差异表达基因, 主要涉及到结合功能、细胞组成、代谢过程、细胞加工、生物学调节等功能, 一些差异表达基因参与细胞因子及其受体相互作用通路、Toll 样受体 (TLR) 信号通路、核苷酸寡聚化域样受体 (NLR) 信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路等。结果表明在法氏囊发育过程中, 基因表达谱发生了很大变化, 表明法氏囊发育是多基因参与的复杂的生物学过程, 但这些差异表达基因在法氏囊的发育过程中的作用及其对法氏囊的功能的影响还有待于深入研究。

关键词: 鸡; 基因表达谱; 法氏囊; 差异表达基因

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)07-1162-08

Analysis of Differential Expression Genes in Chicken Bursa of Fabricius with Gene Expression Array

HANG Bo-lin^{1,2#}, SANG Jian-jun^{1#}, QIAN Kun¹, YE Jian-qiang¹, SHAO Hong-xia¹,
JIN Wen-jie¹, MEI Mei¹, MIAO Ji¹, QIN Ai-jian^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Institution of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To investigate the dynamic changes of gene expression in chicken bursa, the total mRNA extracted from SPF chicken bursa at 18 embryo-days, 10 and 30 days-old were hybridized using Agilent Chicken Genome Array. The differentially expressed genes were analyzed with gene ontology (GO) and KEGG to screen the significant signaling pathway. Several differentially expressed genes were verified with real time quantitative PCR. The results showed that the gene detection rate were 79%~85%, and 5 043, 2 368 and 1 874 differential expression genes were identified when comparing chicken of 30 days-old with embryo of 18 embryos-days, chicken of 10 days-old compared with embryo of 18 embryos-days, and chicken of 30 days-old compared with chicken of 10 days-old, respectively. Differentially expressed genes were involved in binding functions, cell component, metabolic progress, cell progress, biological regulation, etc. Additionally, cytokine signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, and mTOR signaling pathway were also included. Gene expression profile of chicken bursa of Fabricius was successfully analyzed, and the function of differentially expressed genes need further study to understand the molecular mechanism of the development in chicken bursa of Fabricius.

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 江苏省优势学科 (PAPD); 教育部创新团队项目 (IRT0978); 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心项目

作者简介: 杭柏林 (1978-), 男, 江苏南通人, 讲师, 博士生, 主要从事动物微生物学研究, E-mail: yzhl001@yahoo.com.cn; 桑建君 (1990-), 女, 江苏扬州人, 硕士生, 主要从事动物病原生物学研究, E-mail: 287273449@qq.com。二人共为第一作者

* 通信作者: 秦爱建, 教授, E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Key words: chicken; gene expression profile; bursa of Fabricius; differentially expressed gene

法氏囊(bursa of Fabricius, BF),又名腔上囊,由意大利解剖学家 Fabricius 于 1621 年发现,位于肠道末端泄殖腔背侧,是禽类特有的中枢免疫器官^[1]。法氏囊中有淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞等重要免疫功能的细胞。法氏囊是 B 淋巴细胞分化、增殖和成熟的重要场所,参与机体的体液免疫应答。许多学者对法氏囊的生长指数^[2]、组织形态学^[3]、B 细胞发育^[4]、蛋白质组学^[4-5]、部分蛋白或肽的表达^[6-7]及其对病原微生物的反应^[8-9]等方面进行了较为深入的研究,但关于鸡法氏囊发育过程中基因变化的报道较少。

法氏囊的发育与代谢及其对病原微生物等生物学反应十分复杂。通过候选基因的方法很难彻底解决这个问题,而利用全基因组基因芯片可以从整体上来研究法氏囊发育与代谢的分子机制。基因芯片(gene chip, DNA microarray)是基于核苷酸互补原理、以基因为分析对象的 DNA 芯片,具有高通量、微量化、自动化等特点。目前,基因芯片技术在鸡的脂肪发育^[10]、肌肉发育^[11]和性腺发育^[12]中已得到应用,同时利用该技术对病原与宿主之间相互作用的研究也已成为禽病研究的热点^[9,13-14]。但在法氏囊发育过程中,基因表达谱的时空变化和关键作用的信号通路等调控机制尚不清楚。

本研究通过 Agilent 鸡表达谱芯片技术对 18 胚龄、10 和 30 日龄鸡法氏囊中差异表达基因进行筛选和分析,探讨法氏囊组织表达谱的差异,利用 GO(Gene Ontology)进行差异表达基因的生物学术功能分类,并对其信号通路进行了分析,以期为深入研究鸡法氏囊的功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及样品采集

SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。鸡胚按常规方法在智能温湿度孵化控制器(WSC-7 型,南京万盛孵化设备有限公司)中孵化并出壳^[15],出壳后鸡饲养于 SPF 鸡隔离器(苏州冯氏实验动物设备有限公司)中,自由采食和饮水。SPF 级鸡颗粒饲料购自南京青龙山动物繁殖场,水为高压灭菌(121 °C 15 min)的蒸馏水。在孵化的第 18 天(胚龄)、出壳后的 10 和 30 日龄,分别采集 3 只鸡胚或鸡的法氏囊组织,用冷的生理盐水去除血迹,用镊子去除表面包膜,置冻存管中,并立即放入液氮速冻保存,用于总 RNA 提取。

1.2 芯片

基因表达谱芯片采用 Agilent 公司的鸡全基因组 4×44K 芯片(Design ID:026441)。

1.3 RNA 的提取、质量监测及纯化

采用 TRIzol 试剂盒(Life technologies, US)提取法氏囊总 RNA,用 Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent)对总 RNA 进行质量监测,合格后使用 RNeasy mini kit(QIAGEN)和 RNase-Free DNase Set(QIAGEN)纯化总 RNA。

1.4 基因芯片杂交

芯片杂交及数据处理由上海伯豪生物技术有限公司完成。其中,Low Input Quick Amp Labeling Kit,One-Color 试剂盒(Agilent)对总 RNA 进行放大和标记;用 RNeasy mini 试剂盒(QIAGEN)纯化标记后的 cRNA;芯片杂交采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒;采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描;用 Feature Extraction software 10.7(Agilent)读取数据;用 Gene Spring Software 11.0(Agilent)进行归一化处理,算法为 Quantile。所有操作均按试剂盒说明和 Agilent 表达谱芯片实验操作和分析手册进行。

1.5 差异表达基因的 GO 功能分类和通路分析

利用上海伯豪生物技术有限公司的在线 SAS(SBC Analysis system)分析系统(<http://sas.ebio-service.com>)对差异表达基因进行基因注解(基因基本信息来源于 NCBI Entrez Gene 数据库,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)、GO 功能分类分析(Gene Ontology 数据库, <http://www.geneontology.org/>)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia Of Genes & Genomes)通路分析(KEGG 数据库, <http://www.genome.jp/kegg/>; Biocarta 数据库, <http://www.biocarta.com>)。

1.6 荧光定量 PCR

为验证芯片的结果,本研究选择了 6 个差异表达基因,根据 GenBank 中的基因序列,通过网络在线软件 Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)设计了几对特异性引物(引物序列见表 1),进行荧光定量 PCR,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算。引物由上海 Invitrogen 公司合成。

RNA 样本中基因组 DNA 的去除和 cDNA 合成按照试剂盒(TaKaRa, China)说明书进行操作。荧光定量 PCR 按照试剂盒(TaKaRa, China)说明书在 7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI, Singapore)上进行。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 基因作为内参基因进行数据的标准化处理。反应体系 (20 μ L): SYBR Green II (2 \times) 10 μ L, 上下游引物各 2 μ L,

ROX II (50 \times) 0.4 μ L, 超纯水 4.5 μ L, 模板 (cDNA) 1.1 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for Fluorescence Quantitative PCR (FQ PCR)

基因名称 Name of gene	登录号 Accession number	引物序列 Sequence of primers	产物大小/bp Product size
<i>APOA1</i>	NM_205525	F: 5'-CGCATTTCGGGATATGGTGGGA-3' R: 5'-CAGCAGAGGACTCGAACTGG-3'	85
<i>TLR15</i>	NM_001037835	F: 5'-TGAGAACCTGCTCAGCCTTG-3' R: 5'-AAATCTGTGAAGCCCCGAG-3'	125
<i>LY86</i>	NM_001004399	F: 5'-GAGGGACCAATCACACTGGG-3' R: 5'-CCGAGTGCCTTGTGTTTGTCTT-3'	150
<i>BCL2</i>	NM_205339	F: 5'-CTTCCGTGATGGGGTCAACT-3' R: 5'-GGTCATCCAGGTGGCAATGT-3'	124
<i>TRIM39</i>	NM_001006196	F: 5'-CGCCGTCGCTATGGATGAA-3' R: 5'-TTGGAAGAACCCCAAGCAGA-3'	82
<i>CD3E</i>	NM_206904	F: 5'-TCGCTGCGGATCTTCTCATC-3' R: 5'-GCTCTCGATTGCCCTTCTT-3'	82
<i>GAPDH</i>	NM_204305	F: 5'-AGGGTGGTGCTAAGCGTGTTA-3' R: 5'-TCTCATGGTTGACACCCATCA-3'	78

通过 Spearman 检验对基因芯片和 Real time PCR 2 种方法的结果进行相关性分析。

2 结果

2.1 法氏囊组织 RNA 提取质量

鸡胚或鸡法氏囊组织样本 ($n=3$) 的总 RNA 经试剂盒提取后, 经检测, 所有的总 RNA 质量均较好 ($RIN \geq 7.0$, 且 $28S/18S \geq 0.7$, 为合格^[16]), 纯度较高。

2.2 不同时间点法氏囊组织中基因的检出率及检测的变异系数

在鸡胚 18 日龄时, 基因的检出率比较高, 而 10 和 30 日龄时稍低; 变异系数 (CV) 虽然随着日龄增加, 其数值在增加, 但其均值均低于 10% (表 2)。

2.3 不同时间点法氏囊组织差异表达基因数

差异倍数在 2 倍及以上且 $P < 0.05$ 的基因为差异表达基因。比较不同日龄之间鸡法氏囊差异表达的基因数目结果见表 3。从表 3 中可以看出, 随着日龄的增加, 或者说随着鸡法氏囊发育的完善, 差异表达基因数目逐渐减少, 如 30 日龄雏鸡与 18 日龄鸡胚之间比较, 有 5 043 个差异基因, 10 日龄雏鸡与 18 日龄鸡胚之间比较, 有 2 368 个差异基因, 而 30 与 10 日龄雏鸡之间比较, 有 1 874 个差异基因。其中, 在日龄差距比较大时 (30 日龄雏鸡与 18 日龄

表 2 基因的检出率及其变异系数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Detection rate and coefficient variation of genes ($\bar{x} \pm s$) %

	E18	C10	C30
检出率 Detection rate	84.61 \pm 0.48	79.59 \pm 2.71	79.36 \pm 0.94
CV 值 Value of CV	4.76 \pm 1.09	5.05 \pm 0.70	5.49 \pm 0.72

E18. 18 日龄鸡胚; C10. 10 日龄雏鸡; C30. 30 日龄雏鸡; 下表同
检出率 = 检出探针总数 / 全部探针数 $\times 100\%$
E18. Embryo of 18 embryo-days; C10. Chicken of 10 days-old; C30. Chicken of 30 days-old; The same as below
Detection rate = the total number of detected probe / the ratio of the probe $\times 100\%$

表 3 差异表达基因数目

Table 3 Number of differential expression genes

	上调基因数 Number of up-regulated genes	下调基因数 Number of down-regulated genes	差异基因数 Number of differential expression genes
C30 vs E18	1 923	3 120	5 043
C10 vs E18	1 035	1 333	2 368
C30 vs C10	544	1 330	1 874

判断差异基因的参数为 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$, $Fold\ Change > 2$ 或 < 0.5
If $P < 0.05$, $FDR < 0.05$ and $Fold\ Change > 2$ or < 0.5 , it is considered as differential expression genes

鸡胚之间),下调基因数目比较多,约 3 120 个,而日龄差距较小时,下调基因数目基本没有变化,约在 1 330个左右;而上调基因数目有一些减少,从 1 923 个(30 日龄雏鸡~18 胚龄鸡胚)降低到 1 035 个(10 日龄雏鸡~18 胚龄鸡胚),再降到 544 个(30~10 日龄雏鸡)。

2.4 差异表达基因 GO 功能分类分析

对差异表达基因进行 GO(GO ontology)功能分类,如图 1 所示。在分子功能方面,有 9.97%(236/2 368)~10.07%(508/5 043)的差异基因参与结合功能,有 3.73%(188/5 043)~4.6%(109/

2 368)的差异基因参与催化功能,而仅在 30 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚比较时有 0.02%(1/5 043)~1.84%(93/5 043)的差异基因参与了抗氧化活性、转录调节、酶调节、分子转导等的功能。在细胞组成方面,有 7.59%(383/5 043)~8.75%(164/1 874)的差异基因参与细胞组成,3.51%(177/5 043)~4.11%(77/1 874)的差异基因参与细胞器组成,1.81%(34/1 874)~2.54%(60/2 368)的差异基因参与胞外区组成,而仅在 30 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚比较时约有 0.2%(10/5 043)的差异基因参与了突触的功能。在生物学加工方面,有 5.02%(94/

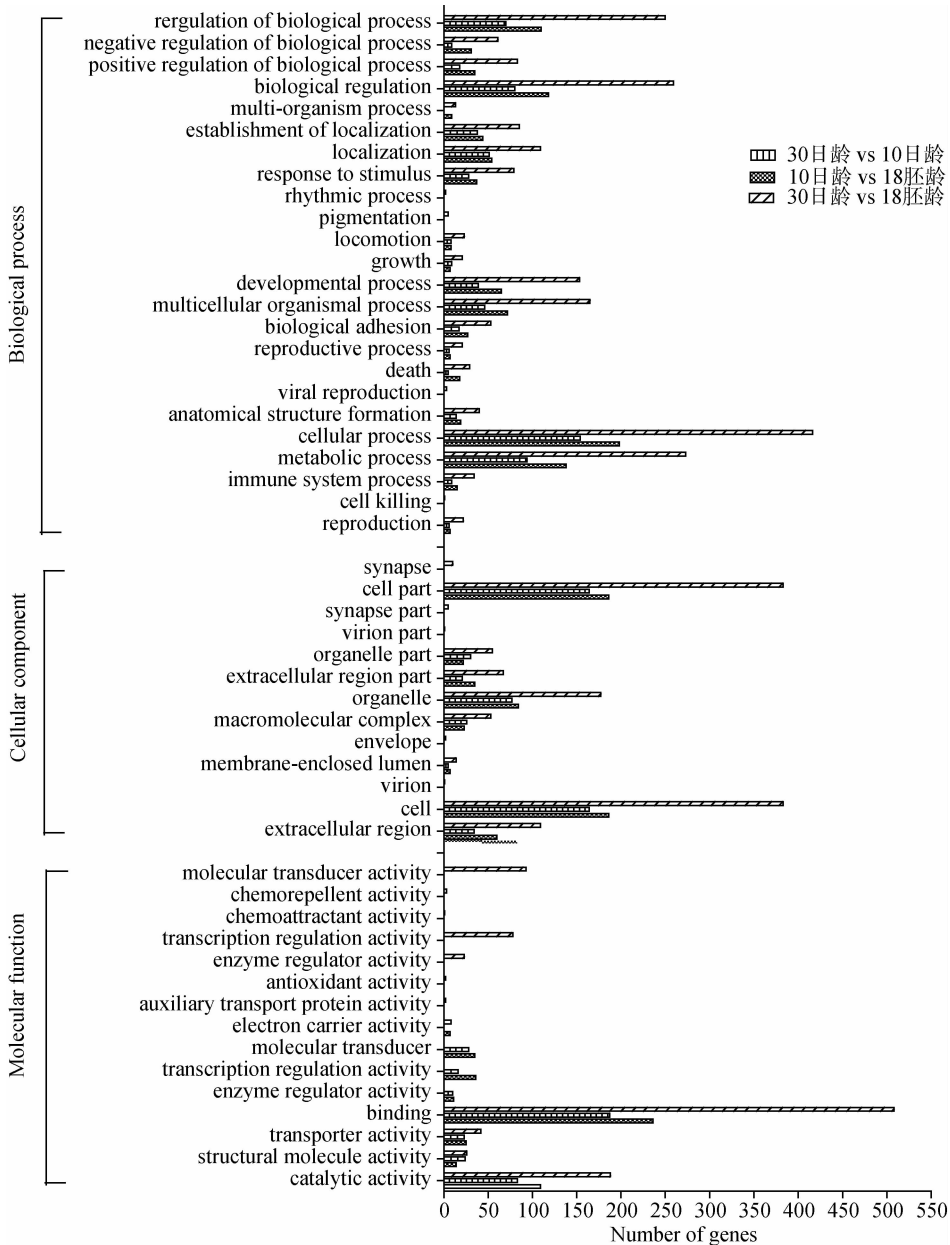


图 1 差异表达基因的 GO 功能分类

Fig.1 GO functional classification of differentially expressed genes

1 874)~5.83%(138/2 368)的差异基因参与代谢过程,8.22%(154/1 874)~8.36%(198/2 368)的差异基因参与细胞加工,2.08%(39/1 874)~3.03%(153/5 043)的差异基因参与发育加工过程,4.27%(80/1 874)~5.14%(259/5 043)的差异基因参与生物学调节过程,0.48%(9/1 974)~0.67%(34/5 043)的差异基因参与免疫系统加工过程,而仅在 10 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚比较时约有 0.38%的

差异基因参与多个生物过程,而仅在 30 日龄与 18 胚龄比较时有 0.02%(1/5 043)~0.1%(5/5 043)的差异基因参与了细胞杀伤、色素沉积等功能。

2.5 差异表达基因的信号通路分析

对差异表达基因通过 KEGG 数据库进行信号通路分析,富集检测的 $P < 0.05$ 的信号通路总共有 36 条(表 4)。其中 10 日龄雏鸡与 18 胚龄鸡胚之间的差异基因涉及到 21 条信号通路,独有的信号通路

表 4 差异表达基因的信号通路分析

Table 4 Signaling pathway analysis of differentially expressed gene

信号通路名称 Name of signaling pathway	C10 vs E18		C30 vs C10		C30 vs E18	
	基因数目 Number of genes	<i>P</i> 值 <i>P</i> values	基因数目 Number of genes	<i>P</i> 值 <i>P</i> values	基因数目 Number of genes	<i>P</i> 值 <i>P</i> values
ABC transporters					7	0.002
Adherens junction			7	0.000 6	8	0.023
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3	0.031				
Arachidonic acid metabolism	3	0.044			5	0.025
Cell adhesion molecules(CAMs)	9	0.001			19	0
Cysteine and methionine metabolism	4	0.010				
Cytokine-cytokine receptor interaction	10	0.011	9	0.009	29	0
Drug metabolism-cytochrome P450	3	0.034				
Drug metabolism-other enzymes	3	0.041				
ECM-receptor interaction	8	0.000 6	6	0.004	18	0
Endocytosis			8	0.032	15	0.044
Focal adhesion	11	0.005	11	0.001	30	0
Gap junction					9	0.021
Glutathione metabolism			3	0.034		
GnRH signaling pathway					9	0.023
Hedgehog signaling pathway					9	0.000 8
Intestinal immune network for IgA production	4	0.009	3	0.027	6	0.007
MAPK signaling pathway					19	0.015
Melanogenesis	6	0.023			16	0
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3	0.034				
Mtor signaling pathway	4	0.025				
Neuroactive ligand-receptor interaction					23	0.016
NOD-like receptor signaling pathway	4	0.020			6	0.020
Primary bile acid biosynthesis					4	0.008
Purine metabolism			7	0.014		
Pyrimidine metabolism			5	0.025		
Regulation of actin cytoskeleton			11	0.001	18	0.005
Renin-angiotensin system			2	0.037		
Retinol metabolism	3	0.034				
Steroid hormone biosynthesis	3	0.034				
Taurine and hypotaurine metabolism	2	0.016				
TGF-beta signaling pathway	6	0.010			18	0
Tight junction	7	0.024	11	0	13	0.006
Toll-like receptor signaling pathway	6	0.015			9	0.023
Vascular smooth muscle contraction	6	0.038			16	0.000 1
Wnt signaling pathway					17	0.000 5

判断显著性信号通路的参数为 $P < 0.05$

If $P < 0.05$, it is considered as significant signaling pathway

有 9 条;30 与 10 日龄雏鸡之间的差异基因涉及到 12 条信号通路,独有的信号通路有 4 条;30 日龄雏鸡与 18 日龄鸡胚之间的差异基因涉及到 23 条信号通路,独有的信号通路有 8 条;差异基因涉及到共同的信号通路有 5 条。

2.6 差异基因的荧光定量 PCR 验证

为验证基因芯片所筛选的差异表达基因,随机选取了 6 个基因(30 日龄雏鸡~18 日龄鸡胚),以 *GAPDH* 为参照基因,用荧光定量 PCR 的方法进行了验证。2 种检测方法的结果通过 Spearman 检验进行相关分析,结果 Spearman 相关系数 $r = 0.9429$, $P = 0.0167$,说明基因芯片中差异表达基因的表达变化情况与荧光定量 PCR 验证的结果是一致的(表 5)。

表 5 荧光定量 PCR 验证差异表达基因

Table 5 Validation of differential expression genes by real time quantitative PCR

基因名称 Name of gene	倍数变化 Fold change	
	MicroArray	Real time PCR
<i>APOA1</i>	9.210	13.181
<i>TLR15</i>	2.385	2.973
<i>LY86</i>	0.157	0.165
<i>BCL2</i>	0.392	0.665
<i>TRIM39</i>	3.307	3.919
<i>CD3E</i>	0.475	0.612

3 讨论

法氏囊在胚胎时期就开始发育,在雏鸡出壳后发育迅速,免疫性能逐步完善^[1]。在这个过程中,基因组的序列并没有发生变化,但其表达呈有序的时空变化,这种变化在转录组水平上得到体现。转录组的有序变化调控着机体的生命活动。因此,对转录组进行研究,有望为组织的发育与功能研究进行理论和方法学的探索。本研究通过基因表达谱芯片技术探讨了鸡法氏囊发育过程中转录组的变化,得到了法氏囊发育相关的大量的基础信息,为深入研究法氏囊发育的分子机制提供了依据。

白细胞介素(interleukin, IL)调节免疫细胞的活化、分化和增殖,与其受体结合后调节免疫反应^[1]。在本研究中, *IL1B*、*IL6*、*IL7*、*IL8*、*IL15* 和

IL17D 等被鉴定为差异表达基因。*IL6* 是一种具有抗炎作用的细胞因子^[17], *IL7* 有利于 B 细胞的增殖^[18]。*IL8* 是一种趋化因子,可以趋化中性粒细胞和嗜碱性粒细胞,进而引发炎症反应和过敏反应^[19]。在本研究中, *IL6*、*IL7* 和 *IL8* 呈下调表达。这表明,随着法氏囊发育成熟, *IL6* 的抗炎作用、*IL8* 引发炎症的能力和 *IL7* 调节 B 细胞增殖的作用逐渐下降。*IL1B* 可以促进 T 和 B 细胞的生长与分化^[20], 本研究中 *IL1B* 早期呈上调表达,表明 *IL1B* 是在法氏囊发育早期促进淋巴细胞的发育。

信号通路通过受体结合将细胞外信号传递到细胞内引发一系列的生理或病理反应。在本研究中, TLR 信号通路和 NLR 信号通路被富集为显著的信号通路。差异表达基因如 *CCL5* (chemokine (C-C motif) ligand 5)、*CD80*、*IL1B*、*MAP2K4* (mitogen-activated protein kinase kinase 4)、*MAPK11* (mitogen-activated protein kinase 11) 和 *SPP1* (secreted phosphoprotein 1) 等可能通过 Toll 样受体信号通路参与了法氏囊的发育,差异表达基因如 *CCL5*、*IL1B*、*IL6*、*MAPK11*、*PSTPIP1* (proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1) 和 *TRAF6* (TNF receptor-associated factor 6) 等涉及到了核苷酸寡聚化域样受体信号通路。而 NLR^[21] 和 TLR^[22] 是机体重要的病原识别的信号通路,引起抗微生物感染的天然免疫应答。在本研究中,法氏囊发育早期,有差异基因涉及到这 2 个信号通路,而到法氏囊发育后期,没有差异基因涉及到这 2 个信号通路。鸡在免疫系统尚未发育完善时受到病原感染后,宿主的先天免疫功能来不及发挥作用,进而发展为疾病。

共黏连信号通路(focal adhesion signaling pathway)在维持正常细胞结构中具有重要功能^[23]。在本研究中,一些编码胶原成分的差异表达基因如 *Col1A2* (collagen, type I, alpha 2)、*Col3A1*、*Col4A1*、*Col4A2*、*Col5A1*、*Col5A2*、*Col6A1*、和 *Col6A3* 等涉及到共黏连信号通路。胶原是细胞外基质的主要结构成分。4 型胶原(由 *Col4A1* 和 *Col4A2* 组成)是基底膜(包括血管壁)的重要成分, *Col4A1* 在胚胎发育过程中基底膜形成时为其其他整合成分提供支架^[24]。*Col5A1* 是许多结缔组织中 I 型富含胶原纤维的成分,可以调节由 I 和 V 型胶原组成的其他类型纤维的直径^[25]。*Col6A1* 是微型纤维的结构成分,参与了细胞迁移、分化和胚胎发

育^[26]。其它一些参与共黏连信号通路的差异表达基因在法氏囊发育方面可能也发挥了一些作用,如ITGA9(integrin, alpha 9)对淋巴管瓣形成是必须的^[27],ITGB5(integrin, beta 5)参与了细胞黏附和整合信号的传导^[28],LAMA1(laminin, alpha 1)是层黏连蛋白 111 的主要成分,而层黏连蛋白 111 在基底膜形成中有重要作用^[29]。

鸡法氏囊的发育是一个复杂的过程,很多的基因和蛋白参与了这个过程。本研究初步探讨了法氏囊发育过程中基因表达的变化,为研究相关基因在法氏囊发育过程中所起的作用提供了理论依据,相关差异基因的蛋白质水平变化还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] DAVISON F, KASPERS B, SCHAT K A. Avian Immunology[M]. Elsevier Ltd., 2008.
- [2] 刘福堂, 黄景凤, 顾庆云, 等. 亚慢性铝中毒对雏鸡脾脏、法氏囊生长发育和形态结构的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2): 261-265.
- [3] 鲍恩东, 张春兰, 张书霞. 鸡胚法氏囊组织发育的电镜和组织学比较观察[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 57-59.
- [4] KORTE J, FRÖHLICH T, KOHN M, et al. 2D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development[J]. *Proteomics*, 2013, 13(1): 119-133.
- [5] 卢占军, 秦爱建, 陈欣虹, 等. 雏鸡法氏囊蛋白质组学双向电泳技术的建立及其初步分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(6): 944-951.
- [6] OTSUBO Y, CHEN N, KAJIWARA E, et al. Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius[J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(5-6): 485-493.
- [7] 袁源, 刘树强. 早期鸡胚发育过程中增殖细胞核抗原在法氏囊的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(11): 1610-1614.
- [8] CHEN C Y, XIE Q M, XUE Y, et al. Characterization of cytotoxicity-related gene expression in response to virulent Marek's disease virus infection in the bursa of Fabricius[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(3): 496-503.
- [9] GUO X, WANG L, CUI D, et al. Differential expression of the Toll-like receptor pathway and related genes of chicken bursa after experimental infection with infectious bursa disease virus[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(11): 2189-2199.
- [10] 王洪宝, 王启贵, 李辉. 利用基因芯片技术研究两品种鸡脂肪组织差异表达基因[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 979-982.
- [11] 栾德琴, 常国斌, 龚琳琳, 等. 利用基因芯片技术研究隐性白鸡不同时期肌肉组织相关差异表达基因[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 83-88.
- [12] 高宏巍, 王胜军, 李慧锋, 等. 鸡胚母性腺差异表达基因的基因芯片杂交筛选[J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 230-234.
- [13] CAMERON C M, CAMERON M J, BERMEJO-MARTIN J F, et al. Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets[J]. *J Virol*, 2008, 82(22): 11308-11317.
- [14] DAR A, MUNIR S, VISHWANATHAN S, et al. Transcriptional analysis of avian embryonic tissues following infection with avian infectious bronchitis virus[J]. *Virus Res*, 2005, 110(1-2): 41-55.
- [15] 杨宁. 家禽生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002, 59-61.
- [16] SCHROEDER A, MUELLER O, STOCKER S, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements[J/OL]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7: 3. [2014-5-27]. <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2199-7-3.pdf>
- [17] SORTICA V A, CUNHA M G, OHNISHI M D, et al. Role of IL6, IL12B and VDR gene polymorphisms in Plasmodium vivax malaria severity, parasitemia and gametocytemia levels in an Amazonian Brazilian population[J]. *Cytokine*, 2014, 65(1): 42-47.
- [18] PASCHE N, WOYTSCHAK J, WULHFARD S, et al. Cloning and characterization of novel tumor-targeting immunocytokines based on murine IL7[J]. *J Biotechnol*, 2011, 154(1): 84-92.
- [19] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] DINARELLO C A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery[J]. *FASEB J*, 1994, 8(15): 1314-1325.
- [21] ANAND P K, MALIREDDI R K, LUKENS J R, et al. NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 389-393.
- [22] LI P, XIA P, WEN J, et al. Up-regulation of the MyD88-dependent pathway of TLR signaling in spleen and caecum of young chickens infected with *Salmonella* serovar Pullorum[J]. *Vet Microbiol*,

- 2010,143(2-4):346-351.
- [23] MITRA S K, HANSON D A, SCHLAEPFER D D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 56-68.
- [24] KUTUK M S, BALTA B, KODERA H, et al. Is there relation between COL4A1/A2 mutations and antenatally detected fetal intraventricular hemorrhage? [J]. *Childs Nerv Syst*, 2014, 30(3): 419-424.
- [25] LI X, BYKHOVSKAYA Y, CANEDO A L, et al. Genetic association of COL5A1 variants in keratoconus patients suggests a complex connection between corneal thinning and keratoconus[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(4): 2696-2704.
- [26] FUJITA A, SATO J R, FESTA F, et al. Identification of COL6A1 as a differentially expressed gene in human astrocytomas[J]. *Genet Mol Res*, 2008, 7(2): 371-378.
- [27] BAZIGOU E, XIE S, CHEN C, et al. Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(2): 175-186.
- [28] HIMES B E, QIU W, KLANDERMAN B, et al. ITGB5 and AGFG1 variants are associated with severity of airway responsiveness[J/OL]. *BMC Med Genet*, 2013, 14: 86. [2014-5-27]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/14/86>.
- [29] MINER J H, YURCHENCO P D. Laminin functions in tissue morphogenesis[J/OL]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 255-284. [2014-5-27]. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.094555>.

(编辑 白永平)