

席继锋,袁立岗,杨楠,等.奶牛性别控制试验的效果验证[J].江苏农业科学,2019,47(23):195-197.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.046

奶牛性别控制试验的效果验证

席继锋¹,袁立岗²,杨楠⁴,邓双义¹,贾斌³,张永生³,李超程³,夏欢³,王香祖¹

(1. 新疆农业职业技术学院,新疆昌吉 831100; 2. 新疆生产建设兵团第十二师兽医站,新疆乌鲁木齐 830000;

3. 石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003; 4. 新疆天山畜牧生物工程股份有限公司,新疆昌吉 831100)

摘要:为满足畜牧生产需求,更有效地控制奶牛的后代性别,采用 RNA 干扰技术分别对 2 头成年健康繁殖性能正常的荷斯坦公牛 *Zfy* 基因 mRNA 进行干扰,应用 SPSS 19.0 统计软件进行卡方检验分析方法。结果显示,与对照组相比,干扰组公牛的后代性别比例发生明显的偏移,母犊比例达 75% 以上,而子代的体尺、生长发育及繁殖性能等均无变化。得出结论,干扰 *Zfy* 基因生产奶牛性控精液的方法简单、方便、易操作,在生产中具有一定的推广价值和推广应用前景。

关键词:奶牛;性别控制;试验;效果验证

中图分类号: S823.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)23-0195-02

与 Y 染色体相关的锌指蛋白转录因子(Y chromosome linked Zinc-finger protein transcriptional factor, *Zfy*),是位于 Y 染色体短臂上的能够编码锌指蛋白的基因。*Zfy* 基因参与哺乳动物的单倍体生精细胞的更新分化和发育,对于减数分裂和精子生成至关重要。*Zfy* 与精子的形成与发生相关,作为一个较强的转录激活因子,引导靶基因穿过核膜,定位于精子细胞核内,可能对精子变态过程中的某些基因具有转录激活作用^[1-2]。1986 年,Vergnaud 等通过对 Y 染色体上有不同缺失的患者的 DNA 文库进行分子杂交,首次克隆获得了 *Zfy* 基因^[3]。而睾丸决定因子最佳候选基因 *Sry* 被发现前,*Zfy* 基因曾被认为是睾丸决定因子的候选基因^[4],在雄性睾丸生长发育过程中发挥重要作用^[5-6]。彭强等首次用 RNAi 的方法通过构建 *Zfy* 基因 siRNA 重组表达载体进行小鼠体内 RNAi 的研究,从而研究编码 *Zfy* 基因在精子的生成过程中的作用,其后代出现雄性小鼠比例下降现象^[7]。马军德通过逆转录病毒 RNAi 载体对小鼠进行性别控制产生了显著效果,在小鼠后代性别鉴定中绝大部分窝组的母鼠率都达到了 70% 以上^[8]。本研究就 *Zfy* 基因干扰技术在奶牛性别控制中的应用进行简单的介绍。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与设备 酵母、蛋白胨、氯化钠、氨苄青霉素、无内毒素质粒提取试剂盒(北京天根生化有限公司)、无

水乙醇、异丙醇、双抗(上海英骏生物技术有限公司)。

冷冻离心机、水浴锅、振荡器、摇床、恒温干燥箱。

1.1.2 试验动物 试验公牛来自新疆天山畜牧生物工程股份有限公司种公牛站,随机选择系谱资料完整的健康荷斯坦种公牛 2 头,受配荷斯坦母牛均健康、成年,繁殖性能良好。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒制备 将保存的菌种从 -80 ℃ 超低温冰箱中取出,室温解冻后,超净台中将 200 μL 菌液接种至 200 mL 含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 Luria-Bertani 培养基,摇床内 37 ℃、8 000 r/min 过夜培养。12~16 h 后将处于对数期的菌液取出,按照无内毒素质粒大提试剂盒说明书提取质粒,测定浓度后 -20 ℃ 保存备用。

1.2.2 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平检测 通过实时定量 PCR(RT-PCR)检测重组干扰质粒 pLL3.7-A、pLL3.7-B 对奶牛生精细胞的 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平的干扰效果,结果显示,与对照组(未做任何干扰处理)相比,奶牛生精细胞转染 pLL3.7-A 后 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平显著降低了 50% ($P < 0.05$),转染质粒 pLL3.7-B 后 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平降低了 76%,与对照组差异极显著 ($P < 0.01$) (图 1)。

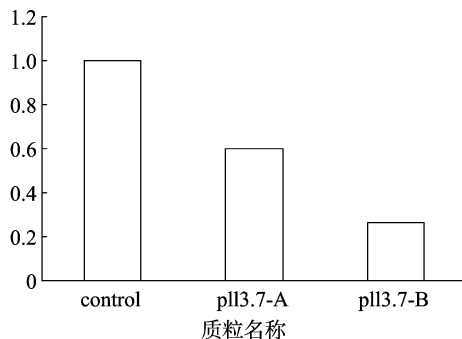


图1 奶牛生精细胞 *Zfy* 基因 mRNA 表达水平

1.2.3 公牛体内干扰试验 选取 1 头荷斯坦种公牛做对照,不做任何处理。选择干扰效果较好的质粒 pLL3.7-B 进行体内试验。将提取好的质粒用灭菌 PBS 滤液稀释,同时加入

收稿日期:2018-09-06

基金项目:2017 年度新疆农业职业技术学院资助课题(编号: XJNZYKJ201704);新疆生产建设兵团第十二师科技专项(编号: NYJH2013010)。

作者简介:席继锋(1978—),男,甘肃人,博士,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: ftf2011@163.com。

通信作者:王香祖,博士,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: 173897302@qq.com。

双抗以防止感染,然后按每管 2.5 mg/5 mL 的量对质粒进行分装。试验组公牛每侧睾丸注射剂量 2.5 mg,沿睾丸纵轴进针,一边注射一边缓慢回抽针头,注射完毕拔出针头,碘酒消毒。试验公牛间隔 7 d 注射 1 次,共注射 3 次。第 3 次注射后第 7 天开始采精,以后每隔 7 d 采精 1 次,连续采精 5 次。收集精液,迅速检测精子活力和密度,然后制作 0.25 mL 的细管冻精,液氮中冻存备用。

1.2.4 奶牛配种 奶牛配种均采用人工授精技术,试验组(注射 pLL3.7-B 干扰质粒)和对照组分别配种母牛 100 头,试验组与对照组奶牛均在同一条件下饲养管理。

1.3 统计分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行 Fisher(卡方检验)检验试验结果的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 奶牛后代性别统计

对照组和试验组奶牛由专人负责管理,记录牛号、年龄、胎次、配种日期、产犊日期等,统计结果见表 1。

表 1 犊牛性别统计

组别	公犊 (头)	母犊 (头)	母犊率 (%)
对照组	46	49	51.58Bb
试验组	24	73	75.26Aa

注:同列数据后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($P<0.01$)。

由表 1 可知,对照组母犊率为 51.58%,公母比例接近 1:1,与生产实际中的正常性别比例相比差异不显著($P>0.05$);试验组母犊率高达 75.26%,与生产实际中的正常性别比例相比差异极显著($P<0.01$)。

2.2 奶牛体尺测量

随机选取试验公牛和普通公牛后代各 5 头进行体尺测量(体高、背高、肩高、十字部高、体斜长、体直长、胸围、管围、坐骨端高、腰角宽、头长、最大额宽、最小额宽、尻长),具体数据见表 2。

表 2 对照组与试验组奶牛体尺测量指标

组别	序号	牛号	月龄	奶牛体尺 (cm)													
				体高	背高	肩高	十字部高	体斜长	体直长	胸围	管围	坐骨端高	腰角宽	头长	最大额宽	最小额宽	尻长
试验组	1	031	13	134	134	131	138	141	106	177	18	131	45.0	46.0	20	18	46.0
	2	021	13	137	134	133	139	153	110	194	18	126	49.0	50.0	22	17	48.0
	3	050	13	126	129	124	132	137	103	163	17	125	41.0	46.0	20	15	43.0
	4	047	13	130	130	128	134	142	102	159	17	130	42.0	45.0	19	17	43.0
	5	026	13	134	134	130	137	145	112	176	17	130	45.0	45.0	19	17	46.0
	平均		13	132	132	129	136	144	107	174	17.4	128	44.4	46.4	20	16.8	45.2
对照组	1	025	13	132	137	127	137	135	113	167	16	139	42.0	47.0	19	17	43.0
	2	045	14	129	129	123	131	138	96	161	16	124	39.0	43.0	19	15	42.0
	3	046	13	120	120	116	125	130	94	151	16	120	37.0	46.0	19	15	38.0
	4	024	13	127	127	126	132	143	108	167	17	126	46.0	47.0	19	18	47.0
	5	052	13	128	128	122	132	138	103	151	16	126	44.0	45.0	18	16	45.0
	平均		13.2	127	128	123	131	137	103	159	16.2	127	41.6	45.6	18.8	16.2	43.0

注:性控奶牛与普通奶牛体尺相比,差异不显著。*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$),无*表示差异不显著($P>0.05$)。

由表 2 可知,试验组奶牛体尺与对照组奶牛体尺对应的各项指标差异不显著($P>0.05$),说明性控奶牛生长发育正常,性控冻精可以进一步在生产中推广。

3 讨论

动物的性别决定机制与众多基因调控通路和机制相关联,人们往往通过研究性别决定的关键基因来调控动物性别和探究调控机制。*Zfy* 基因曾被确定为性别决定候选基因。目前研究表明,尽管它不能直接决定睾丸的发育和原始生殖嵴的分化,但是它对于单倍体 Y 精子的发育起到关键作用。Y 染色体上的特异基因 *Zfy* 对于 Y 精子头部和尾部的发育^[9]、生殖细胞的减数分裂^[10-12]、染色体联会交换的发生及染色体的失活^[13]等起着重要的作用。

Zfy 基因是位于 Y 染色体上的特异性基因,是染色体上编码锌指蛋白的基因,从减数分裂期开始表达,在圆形精子细胞中的含量最高。Page 等明确指出 *Zfy* 基因与性别分化、精子发生有关^[14]。*Zfy* 基因是 Y 染色体短臂上特异性单拷贝

序列,一直以来人们针对 *Zfy* 基因的特异性主要集中在动物性别鉴定方面的研究,而利用该基因进行动物性别控制方面的研究仍为空白,本试验的开展将对家畜的性别控制技术开发提供新的思路和方法。

参考文献:

[1]杨增明,孙青原,夏国良. 生殖生物学[M]. 北京:科学出版社, 2005:53-54.

[2]Reynolds R, Varlaro J. Gender determination of forensic samples using PCR amplification of *ZFY/ZFX* gene sequence[J]. Journal of Forensic Sciences,41(2):276-286.

[3]Vergnaud G,Page D C,Simmler M C,et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization[J]. Am J Human Genet,1986,38(2):109-109.

[4]Ao A,Fricksen R P,Winston R,et al. Transcription of paternal Y linked genes in the human zygote as early as the pronucleate stage [J]. Zygote,1994,2(4):281.

[5]Nagamine C M,Chan K M,Kozak C A,et al. Chromosome mapping

苗 景,何祥波,许锦聪,等. 灵芝多糖对脂多糖诱导的小鼠乳腺炎的保护作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(23):197-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.047

灵芝多糖对脂多糖诱导的小鼠乳腺炎的保护作用

苗 景¹,何祥波¹,许锦聪¹,林仕欣²,梁学武¹

[1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学院),福建福州 350002; 2. 国家菌草工程技术研究中心,福建福州 350002]

摘要:灵芝多糖(GLP)是灵芝中主要功能性活性成分,具有增强免疫力、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖和降血脂等功效。采用大肠杆菌内毒素脂多糖(LPS)诱导小鼠乳腺炎,研究灵芝多糖对小鼠乳腺炎的保护作用。试验选取刚分娩的健康雌性小鼠 75 只,分为空白对照组、LPS 组、LPS + 2% GLP 组、LPS + 4% GLP 组和 LPS + 8% GLP 组,LPS + 2% GLP 组、LPS + 4% GLP 组、LPS + 8% GLP 组分别灌胃 2%、4%、8% 的灵芝多糖溶液,空白对照组和 LPS 组灌胃等量的生理盐水。注射 LPS 后,测量小鼠体温变化,24 h 后取乳腺制作石蜡组织切片,并测定乳腺中的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量和 MPO 活性。结果表明,与空白对照组相比,LPS 组小鼠体温变化显著,乳腺组织切片出现明显的中性细胞浸润现象,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量和 MPO 活性显著上升;LPS + 2% GLP 组、LPS + 4% GLP 组、LPS + 8% GLP 组与 LPS 组相比,小鼠体温变化有显著改善,18 h 后 LPS + 4% GLP 组和 LPS + 8% GLP 组与 LPS 组差异显著($P < 0.05$);与 LPS 组相比,LPS + 2% GLP 组、LPS + 4% GLP 组、LPS + 8% GLP 组小鼠乳腺中性细胞浸润现象明显减轻,LPS + 4% GLP 组和 LPS + 8% GLP 组的 TNF- α 、IL-1 β 含量显著低于 LPS 组($P < 0.05$);LPS + 4% GLP 组和 LPS + 8% GLP 组中 IL-6 含量显著低于 LPS 组($P < 0.05$),LPS + 2% GLP 组与 LPS 组差异不显著($P > 0.05$)。上述结果表明,添加 4%、8% 灵芝多糖可以减轻由 LPS 引起的小鼠乳腺炎反应。

关键词:小鼠;灵芝多糖;脂多糖;乳腺炎

中图分类号: S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)23-0197-04

奶牛乳房炎是奶牛场常见的疾病之一,是奶牛健康养殖

收稿日期:2019-10-10

基金项目:福建省教育厅中青年教育科研项目(编号:JAT160145);福建省教育厅菌草生态产业协同创新中心项目(编号:K80ND800213);福建农林大学科技发展资金(编号:KF2015094)。

作者简介:苗 景(1994—),男,河南南阳人,硕士,从事反刍动物营养研究。E-mail:hnmiaojing@126.com。

通信作者:林仕欣,博士,助理研究员,主要从事反刍动物营养学研究,E-mail:linshixin@fafu.edu.cn;梁学武,教授,主要从事反刍动物营养与生产研究,E-mail:faulxw2000@163.com。

中极具挑战性的难题。乳腺炎是由病原微生物感染、理化因素刺激等引起的一种炎症反应。其中病原微生物感染是导致乳房炎的主要因素,研究发现,大肠杆菌是引发乳腺炎的主要环境性致病菌。脂多糖(LPS)是大肠杆菌细胞壁外膜主要成分,可通过细胞信号转导系统激活单核巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等合成和释放多种细胞因子和炎性介质,诱导乳腺炎^[1-2]。奶牛乳腺炎是生产中普遍存在的问题,可造成巨大的经济损失。使用奶牛进行试验成本高,且操作复杂,小鼠具有成本低、操作简单、重复性好和易于管理等优点,因此国内外常使用小鼠作为乳腺炎研究的动物模型^[3-6]。

临床上多采用抗生素方法治疗乳腺炎,但存在细菌产生

and expression of a putative testis - determining gene in mouse [J]. Science,1989,2434(4887):80-83.

[6] Mardon G, Page D C. The sex - determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers [J]. Cell,1989,s6(5):765-770.

[7] 彭 强,班 谦,贾 斌,等. siRNA 介导小鼠 Zfy 基因干扰的定量分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2011,29(4):448-451.

[8] Page D C, Mosher R, Simpson E M, et al. The sex - determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein [J]. Cell,1987. 51(6):1091-1104.

[9] Vernet N, Mahadevaiah S K, Decarpentrie F A, et al. Mouse Y - encoded transcription factor Zfy2 is essential for sperm head remodelling and sperm tail development [J]. PLoS One,2016,11(1):1-15.

[10] Vernet N, Mahadevaiah S K, Ojarikre O A, et al. The Y - Encoded gene Zfy2 zets to remove cells with unpaired chromosomes at the first

meiotic metaphase in male mice [J]. Current Biology,2011,21(9):787-793.

[11] Vernet N, Mahadevaiah S K, Yamauchi Y A, et al. Mouse Y - Linked Zfy1 and Zfy2 are expressed during the Male - Specific interphase between meiosis I and meiosis II and promote the 2nd meiotic division [J]. PLoS Genetics,2014,10(6):1-15.

[12] Vernet N, Szot M, Mahadevaiah S K, et al. The expression of Y - linked Zfy2 in XY mouse oocytes leads to frequent meiosis 2 defects, a high incidence of subsequent early cleavage stage arrest and infertility [J]. Development,2014,141(4):855-866.

[13] Vernet N, Mahadevaiah S K, de Rooij D G, et al. Zfy genes are required for efficient meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) in spermatocytes [J]. Human Molecular Genetics,2016,25(24):5300-5310.

[14] 申立山,贺业春,杨春林,等. 小白鼠生精上皮周期的形成[J]. 哈尔滨医科大学学报,1991,25(4):241-243.