

hspA9 基因 5'侧翼区 SNPs 对矮脚黄羽肉鸡耐热性的影响

张文武^{1,2}, 甘建伉^{1,2}, 张细权^{1,2}, 张德祥^{1,2}, 罗庆斌^{1,2*}

(1.华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 2.农业部鸡遗传育种与繁殖重点实验室(广州), 广东 广州 510642)

摘 要: 对矮脚黄羽肉鸡纯系 *hspA9* 基因 5'侧翼区进行 PCR 测序和 PCR-RFLP 检测, 将检测到的突变位点与矮脚黄羽肉鸡纯系 5 个耐热性状(T3、皮质酮、异嗜性粒细胞与淋巴细胞比率(H/L)、CD3⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞)进行关联分析。结果表明: 矮脚黄羽肉鸡纯系 *hspA9* 基因 5'侧翼区有 3 个单核苷酸多态性(SNP)位点(C.-85C>A、C.-485G>A 和 C.-568G>A), 根据 C.-85C>A 的酶切位点, 这个基因可分为 AA、AC、CC 型; 根据 C.-485G>A 的酶切位点, 这个基因可分为 GG、GA、AA 型; 根据 C.-568G>A 的酶切位点, 这个基因可分为 GG、GA、AA 型; 热应激状态下, C.-485G>A 位点与皮质酮极显著相关($P < 0.01$), GG 基因型个体的皮质酮值极显著高于 GA 基因型个体; 常温状态下, C.-485G>A 位点与 T3 显著相关($P < 0.05$), GA 基因型个体的 T3 值显著高于 AA 基因型个体, C.-568G>A 位点与 T3 显著相关($P < 0.05$), GG 基因型个体 T3 值显著高于 GA 和 AA 基因型个体, C.-568G>A 位点与 CD4⁺ T 细胞极显著相关($P < 0.01$), GG 基因型个体 CD4⁺ T 细胞值显著高于 AA 基因型个体。C.-485G>A 位点和 C.-568G>A 位点对鸡热耐受性有较大的影响, 可望用于鸡抗逆性的分子标记辅助选择。

关 键 词: 矮脚黄羽肉鸡; *hspA9* 基因; 热应激; 耐热性

中图分类号: S831.2; Q75

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)02-0183-05

Effect of SNPs of *hspA9* gene 5' flanking region with thermal tolerance traits in yellow feather dwarf broiler

ZHANG Wen-wu^{1,2}, GAN Jian-kang^{1,2}, ZHANG Xi-quan^{1,2}, ZHANG De-xiang^{1,2}, LUO Qing-bin^{1,2*}

(1.College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2.Key Laboratory of Chicken Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Agriculture(Guangzhou), Guangzhou 510642, China)

Abstract: To observe the role of *hspA9* of domestic chicken in tolerance of heat stress, *hspA9* gene 5' flanking region of yellow feather dwarf broiler pure line was amplified by PCR and sequenced, and then analyzed by PCR-RFLP. The relationships between the mutation sites detected in *hspA9* gene and the five heat resistant traits (triiodothyronine (T3), corticosterone, heterophil/lymphocyte ratio (H/L), CD3⁺ and CD4⁺ T cell) were analyzed. The results indicated that three SNP sites (C.-85C>A, C.-485G>A and C.-568G>A) were found. According to the C.-85C>A specific enzyme sites, *hspA9* gene is divided into AA, AC and CC genotypes; according to the C.-485G>A specific enzyme sites, this gene is divided into GG, GA and AA genotypes; according to the C.-568G>A specific enzyme sites, this gene is divided into GG, GA and AA genotypes. Under high temperature, C.-485G>A site was highly significantly associated with corticosterone ($P < 0.01$), corticosterone value in individual of GG genotype was highly significantly higher than that of AA genotype. At room temperature, C.-485G>A site was significantly associated with T3 ($P < 0.05$), the content of T3 in individual of GA genotype was significantly higher than that of AA genotype; C.-568G>A site was significantly associated with T3 ($P < 0.05$), the content of T3 in individual of GG genotype was significantly higher than that of AA T3 genotype; C.-568G>A site was significantly associated with CD4⁺ T cell ($P < 0.01$), the percentage of CD4⁺ T cell in individual of GG genotype was significantly higher than that of AA genotype. Both C.+258A>G and C.+276C>G sites play an

收稿日期: 2013-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972093)

作者简介: 张文武(1985—), 男, 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事动物分子遗传与育种的研究, 125714992@qq.com; *通信作者, qbluo

@scau.edu.cn

important role in thermal stress resistance, indicating their potential in marker-assisted selection of chicken.

Key words: yellow feather dwarf broiler; *hspA9* gene; thermal stress; thermal stress resistance

热应激蛋白(heat shock protein, HSP)是机体受到应激源(如高温等)刺激后合成的一组蛋白质^[1]。这些热应激蛋白在细胞生长、发育及分化,基因转录,蛋白质合成、折叠、运输及分解,维持细胞骨架功能,膜功能等方面具有重要作用,且能保护机体免受外界刺激的损害^[2]。HSP70是热应激蛋白家族中的重要成员,作为主要的分子伴侣参与机体耐受性的形成^[3]。

*hspA9*基因属于*hsp70*基因家族。研究表明,*hspA9*在患皮肤癌^[4]和食管鳞癌^[5]的动物中表达上调,可能与抗癌有关。*hspA9*基因的过表达还能抑制apoptin诱导的HepG2细胞的凋亡^[6]。另外,*hspA9*基因可能与老鼠上颌发育有关^[7],因其mRNA在老鼠上颌中高表达。而*hspA9*基因敲除的老鼠,其造血细胞减少,表明*hspA9*基因还与造血有关^[8]。迄今为止,关于鸡*hspA9*基因的研究较少。本研究选择矮脚黄鸡纯系为试验材料,对其*hspA9*基因进行PCR-RFLP检测,以分析*hspA9*基因的位点多态性与热应激指标的相关性,旨在为利用分子标记辅助选择来改良家鸡的热适应性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试鸡

333只矮脚黄羽肉鸡纯系(N301系)母鸡选自广东温氏南方家禽育种有限公司。

1.2 外周血采集

在35℃(20周龄)、15℃(32周龄)条件下采集母鸡的外周血1.5 mL,分装到1.5 mL抗凝管和1.5 mL非抗凝管中,备用。

1.3 鸡基因组DNA的提取

取每只鸡的抗凝血30 μL,采用苯酚-氯仿抽提法^[9]分别提取基因组DNA。DNA样品分别溶于300 μL ddH₂O中,-20℃冰箱保存。

1.4 耐热性状相关指标的测定

将非抗凝血直接离心吸取血清,送中山大学广州达瑞抗体中心检测三碘甲状腺氨酸(triiodothyronine, T3)和皮质酮;用瑞氏和吉姆萨复合染色法^[10]对抗

凝血的血涂板染色、镜检,按Alfred等^[11]的白细胞分类方法进行细胞分类,并按Campo和Davila方法^[12]进行计数和计算,之后送解放军458医院免疫细胞实验室检测H/L;将抗凝血直接送解放军458医院免疫缺陷病研究与特殊实验中心检测CD3⁺T细胞和CD4⁺T细胞。

1.5 *hspA9*基因的PCR-RFLP分析

1) 引物设计与PCR扩增。根据GenBank中收录的鸡*HspA9*基因的cDNA序列,通过Primer5.0设计扩增*hspA9*5'侧翼区的引物F1(5'-GCACCACGCTGTTCCATCA-3')和R1(5'-AGGGCGATTGCAGCGAGCT-3')。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

随机选取10份DNA进行PCR扩增。用PCR试剂盒(GenStar公司)配置PCR反应体系(20 μL): Mix 10 μL、20 μmol/L上、下游引物各0.2 μL、10 U/μL *Taq*酶0.15 μL、鸡基因组DNA 1.5 μL(35℃时提取的血液DNA), ddH₂O 7.95 μL。PCR反应程序: 94℃预变性3 min, 32个循环(94℃变性30 s, 59.7℃退火30 s, 72℃延伸30 s), 72℃终延伸5 min, 16℃保存。PCR产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后送华大公司测序。

2) PCR-RFLP分析。对PCR产物测序结果进行分析,获得多态性位点及特异性限制性内切酶识别位点,设计引物,对提取的666份DNA样品进行PCR及RFLP检测。PCR反应体系为10 μL: Mix 5 μL、20 μmol/L上、下游引物各0.1 μL、10 U/μL *Taq*酶0.1 μL、鸡基因组DNA 1 μL, ddH₂O 3.7 μL。PCR反应程序同上。根据引物改变退火温度。对PCR产物进行酶切,酶切体系为10 μL: ddH₂O 2.1 μL、内切酶(TaKaRa公司)0.3 μL、Buffer缓冲液0.6 μL、PCR产物7 μL。37℃过夜。用2%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,根据电泳条带判定个体的基因型。

1.6 关联分析

采用SAS 9.0软件的广义线性模型(General Linear Model, GLM)程序进行计算,对矮脚黄羽肉

鸡的热耐受指标与 *hspA9* 基因多态位点进行关联分析。所用模型为 $y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$ 。其中, y_{ij} 为性状表型值, μ 为该性状的总体均值, g_i 为基因型效应值, e_{ij} 为残差效应, i 表示线性方程的行, j 表示线性方程的列。

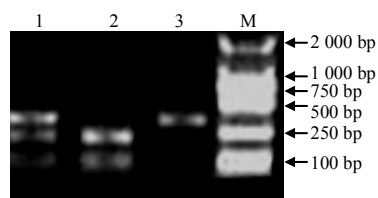
2 结果与分析

2.1 *hspA9* 基因 5'侧翼区的 PCR 结果

对 PCR 产物的测序结果进行分析,发现矮脚黄羽肉鸡纯系的 *hspA9* 基因 5'侧翼区有 3 个 SNP 位点: C.-85C>A、C.-485G>A 和 C.-568G>A。C.-85C>A 为 5'侧翼区第 85 位出现碱基 C A 的突变,可用 *Hae* II 酶(识别序列为 GGCGCC)进行区分; C.-485G>A 为 5'侧翼区第 485 位出现碱基 G A 的突变,可用 *Sml* I 酶(识别序列为 CTTGAG)进行区分; C.-568G>A 为 5'侧翼区第 568 位出现碱基 G A 的突变,可用 *Ban* II 酶(识别序列为 GAGCTC)进行区分。

2.2 *hspA9* 基因 3 个 SNP 的分型

根据 C.-85C>A 位点的特征,设计引物 F2(5'-ATGGGGGTGCTCGGAAAAC-3')和 R2(5'-AGGGCGATTGCAGCGAGCT-3')对鸡的 DNA 进行 PCR 扩增,退火温度为 59.7 °C,产物大小为 267 bp。用 *Hae* II 对 PCR 产物分别进行酶切,结果(图 1)证实矮脚黄鸡 *hspA9* 可以分为 CC、AC 和 AA 型: CC 型 *hspA9* 片段可被 *Hae* II 酶切成 2 条带,长度分别为 175、92 bp; AC 型 *hspA9* 片段可被酶切成 3 条带,长度分别为 267、175、92 bp; AA 型 *hspA9* 片段不可以被酶切,为 1 条带,长度为 267 bp。根据 C.-485G>A、C.-568G>A 位点的特征,用 F1 和 R1 引物对鸡的 DNA 进行 PCR 扩增,产物分别用 *Sml* I

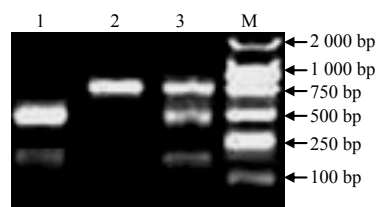


1 AC 基因型; 2 CC 基因型; 3 AA 基因型;
M DL 2000 DNA marker.

图 1 *hspA9* 基因 C.-85C>A 位点特异酶切结果

Fig.1 Digestion of *hspA9* gene by *Hae* II specific for C.-85C>A site

和 *Ban* II 进行酶切分型。根据 C.-485G>A 位点的酶切结果(图 2),矮脚黄鸡 *hspA9* 可以分为 GG、GA 和 AA 型: GG 型 *hspA9* 片段可被 *Sml* I 酶切成 2 条带,长度分别为 493、229 bp; GA 型 *hspA9* 片段可被酶切成 3 条带,长度分别为 722、493、229 bp; AA 型 *hspA9* 片段不可以被酶切,为 1 条带,长度为 722 bp。根据 C.-568G>A 位点的酶切结果(图 3),矮脚黄鸡 *hspA9* 可以分为 GG、GA 和 AA 型: GG 型 *hspA9* 片段可被 *Ban* II 酶切成 2 条带,长度分别为 561、161 bp; GA 型 *hspA9* 片段可被酶切成 3 条带,长度分别为 722、561、161 bp; AA 型 *hspA9* 片段不可以被酶切,为 1 条带,长度为 722 bp。

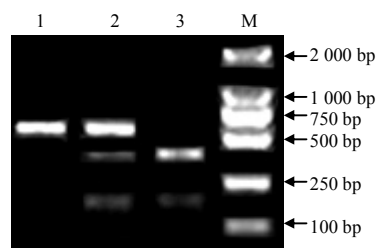


1 GG 基因型; 2 AA 基因型; 3 GA 基因型;

M DL 2000 DNA marker.

图 2 *hspA9* 基因 C.-485G>A 位点特异酶切结果

Fig.2 Digestion of *hspA9* gene by *Sml* I specific for C.-485G>A site



1 AA 基因型; 2 GA 基因型; 3 GG 基因型;

M DL 2000 DNA marker.

图 3 *hspA9* 基因 C.-568G>A 位点特异酶切结果

Fig.3 Digestion of *hspA9* gene by *Ban* II specific for C.-568G>A site

2.3 *hspA9* 基因多态位点与耐热性状的相关性

热耐受指标与 *hspA9* 基因 3 个多态位点的关联分析表明,在 35 °C 热应激状态下, C.-485G>A 与皮质酮浓度极显著相关($P < 0.01$), GG 基因型个体的皮质酮浓度极显著高于 GA 基因型个体($P < 0.01$),但 GG 与 AA, GA 与 AA 基因型之间无显著差异($P > 0.05$); C.-85C>A 和 C.-568G>A 和耐热性状的关联均不显著(表 1)。

表 1 热应激状态下 3 个 SNP 与耐热性状的关联分析

Table 1 Association analysis between 3 SNPs and thermal tolerance traits at high temperature							
位点	基因型	CD3 ⁺ T 细胞 含量/%	CD4 ⁺ T 细胞 含量/%	H/L	皮质酮浓度/ (nmol L ⁻¹)	T3 浓度/ (nmol L ⁻¹)	χ^2 值
C.-85C>A	CC	(1.51±0.08)(207)	(40.70±0.73)(207)	(0.42±0.01)(181)	(4.17±0.65)(187)	(18.21±2.77)(193)	2.688 4
	AA	(1.71±0.41)(7)	(44.60±3.97)(7)	(0.36±0.07)(6)	(7.94±3.65)(6)	(25.80±14.56)(7)	
	CA	(1.41±0.15)(52)	(41.16±1.46)(52)	(0.39±0.02)(44)	(6.96±1.23)(49)	(28.84±5.56)(48)	
C.-485G>A	GG	(1.54±0.19)(45)	(40.58±1.82)(33)	(0.43±0.03)(28)	(9.40±1.52)(33)A	(24.18±4.59)(34)	31.972 9
	AA	(1.41±0.16)(55)	(42.36±1.59)(43)	(0.38±0.02)(36)	(5.82±1.32)(44)AE	(20.48±4.03)(44)	
	GA	(1.47±0.08)(197)	(40.82±0.74)(197)	(0.41±0.01)(175)	(3.64±0.66)(174)B	(17.69±2.02)(176)	
C.-568G>A	GG	(1.54±0.16)(47)	(41.25±1.51)(47)	(0.42±0.02)(41)	(4.50±1.33)(45)	(22.14±5.68)(46)	7.854 8
	AA	(1.39±0.10)(117)	(40.97±0.96)(117)	(0.39±0.02)(102)	(4.77±0.87)(105)	(24.06±3.67)(110)	
	GA	(1.57±0.11)(103)	(40.37±1.02)(103)	(0.42±0.02)(93)	(4.42±0.93)(91)	(16.50±3.97)(94)	

表中前括号内数值为耐热性状数值,后括号内数值为个体数; χ^2 值为对品种内基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验值。下同。

在 15 ℃的常温状态下,矮脚黄羽肉鸡 *hspA9* 基因 C.-485G>A 与 T3 的浓度显著相关($P < 0.05$), GA 基因型个体的 T3 的浓度显著高于 AA 基因型个体($P < 0.05$),但 GG 与 AA,GG 与 GA 基因型之间无显著差异($P > 0.05$);C.-568G>A 与 T3 浓度显著相关($P < 0.05$),GG 基因型个体的 T3 浓度显著高于 AA 和 GA 基因型个体($P < 0.05$),但 GA 与 AA 基

因型之间无显著差异($P > 0.05$);C.-568G>A 与 CD4⁺ T 细胞含量极显著相关($P < 0.01$),GG 基因型个体的 CD4⁺ T 细胞含量极显著高于 AA 基因型个体($P < 0.01$),但 GG 与 GA、GA 与 AA 基因型之间无显著差异($P > 0.05$);C.-85C>A 位点在常温状态下和耐热性状关联不显著(表 2)。

表 2 常温状态下 3 个 SNP 与耐热性状的关联分析

Table 2 Association analysis between 3 SNPs and thermal tolerance traits at room temperature							
位点	基因型	CD3 ⁺ T 细胞 含量/%	CD4 ⁺ T 细胞 含量/%	H/L	皮质酮浓度/ (nmol L ⁻¹)	T3 浓度/ (nmol L ⁻¹)	χ^2 值
C.-85C>A	CC	(3.41±0.15)(161)	(35.01±0.78)(161)	(0.56±0.03)(82)	(7.53±0.74)(146)	(9.37±0.64)(286)	2.688 4
	AA	(4.12±0.78)(6)	(38.97±4.05)(6)	(0.64±0.14)(4)	(6.18±4.01)(5)	(11.48±3.41)(10)	
	CA	(3.08±0.30)(42)	(33.60±1.53)(42)	(0.55±0.06)(18)	(6.77±1.45)(38)	(7.99±1.23)(72)	
C.-485G>A	GG	(3.13±0.38)(24)	(35.00±2.10)(24)	(0.46±0.09)(8)	(9.12±1.82)(24)	(11.38±2.03)(27)ab	31.972 9
	AA	(3.18±0.31)(35)	(33.03±1.74)(35)	(0.47±0.07)(15)	(7.45±1.57)(32)	(7.81±0.79)(177)a	
	GA	(3.41±0.14)(162)	(34.99±0.81)(162)	(0.58±0.03)(89)	(7.18±0.74)(144)	(10.03±0.80)(175)b	
C.-568G>A	GG	(3.69±0.28)(42)	(38.23±1.60)(75)A	(0.53±0.05)(27)	(6.67±1.16)(36)	(12.82±1.68)(40)a	7.854 8
	AA	(3.17±0.19)(99)	(32.74±1.04)(99)B	(0.60±0.04)(42)	(6.70±0.75)(87)	(9.01±0.70)(230)b	
	GA	(3.39±0.21)(75)	(35.15±1.19)(75)AB	(0.57±0.04)(41)	(7.28±0.83)(71)	(8.10±1.05)(102)b	

3 讨论

T3 是动物体维持基础代谢的重要激素,是敏感的热应激指标。Koluman 等^[13]报道羊在热应激时,T3 含量的变化差异显著,暗示 T3 可以作为热应激指标。杨琳等^[14]报道鸡的血浆中 T3 浓度会随环境温度的升高而下降,表明 T3 能作为鸡耐热性的指标。Maak 等^[15]研究长时间中等强度热刺激会使蛋鸡血浆的 T3 浓度显著下降,也暗示鸡血浆中 T3 能作为热应激指标。本试验对 T3 与 *hspA9* 基因多态性位点的关联分析发现,在常温状态下,*hspA9* 基因 C.-485G>A 为 GA 基因型的矮脚黄羽肉鸡个体耐

热性较好,*hspA9* 基因 C.-568G>A 为 GG 基因型的个体耐热性也较好。

皮质酮由禽类肾上腺分泌,是应激时刺激垂体-下丘脑-肾上腺轴分泌的最终产物^[12]。许多研究^[16-17]表明,应激会引起皮质酮的大量分泌,皮质酮能作为准确评价家禽急性应激的生理指标。Zulkifli 等^[18]报道,高温应激使鸡血浆中皮质酮浓度明显提高,暗示皮质酮可以作为鸡耐热性的指标。本研究对皮质酮与 *hspA9* 基因多态性位点的关联分析表明,热应激状态下 *hspA9* 基因 C.-485G>A 的 GG 基因型的矮小型黄羽肉鸡个体耐热性较好。

在抗原识别过程中,CD4⁺ T 细胞具有辅助细胞

免疫和体液免疫应答的作用。研究显示,热应激可使鸡外周血 $CD4^+$ T 细胞显著减少^[19-20]。高温对鸡各免疫器官中 $CD4^+$ T 细胞具有明显抑制作用,导致机体细胞免疫能力降低^[21]。 $CD4^+$ T 细胞含量可以作为耐热性的免疫指标^[22]。本研究对 $CD4^+$ T 细胞与 *hspA9* 基因多态性位点的关联分析表明,常温状态下,C.-568G>A 的 GG 基因型的矮脚黄羽肉鸡个体耐热性较好。

综上所述,鸡 *hspA9* 基因的 C.-485G>A 和 C.-568G>A 两个 SNP 位点对鸡耐热性有影响,是潜在的鸡耐热性分子标记。

参考文献:

- [1] Gray C C , Amrani M , Yacoub M H . Heat stress proteins and myocardial protection : Experimental model or potential clinical tool[J] . The International Journal of Biochemistry and Cell Biology , 1999 , 31(5) : 559-573 .
- [2] Kaldis A , Atkinson B G , Heikkila J J . Molecular chaperone function of the *Rana catesbeiana* small heat shock protein , *hsp30*[J] . Comparative Biochemistry and Physiology , 2004 , 139(2) : 175-182 .
- [3] Hartl F U . Molecular chaperones in cellular protein folding[J] . Nature , 1996 , 381(6583) : 571-580 .
- [4] Schlieben P , Meyer A , Weise C , et al . Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours[J] . Veterinary Journal , 2012 , 194(2) : 210-214 .
- [5] Pawar H , Kashyap M K , Sahasrabudhe N A , et al . Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery[J] . Cancer Biology and Therapy , 2011 , 12(6) : 510-522 .
- [6] Peng C , Yang P , Cui Y , et al . *HspA9* overexpression inhibits apoptin-induced apoptosis in the HepG2 cell line[J] . Oncology Reports , 2013 , 29(6) : 2431-2437 .
- [7] Zhu Y , Ren C , Wan X , et al . Gene expression of *Hsp70* , *Hsp90* and *Hsp110* families in normal palate and cleft palate during mouse embryogenesis[J] . Toxicology and Industrial Health , 2012 , 10(8) : 1177-1180 .
- [8] Chen T H , Kambal A , Krysiak K , et al . Knockdown of *HspA9* , a del(5q31.2) gene , results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice[J] . Blood , 2011 , 117(5) : 1530-1539 .
- [9] 奥斯伯 F , 布伦特 R , 金斯敦 R E , 等 . 精编分子生物学实验指南[M] . 颜子颖 , 王海林 , 译 . 北京 : 科学出版社 , 1998 .
- [10] 董书魁 , 贾天宠 . 改良的 MGG 染色液[J] . 北京军区医药 , 1996 , 8(1) : 77 .
- [11] Alfred M L , Casimir J . Atlas of Avian Hematology[M] . Washington : United States Department of Agriculture , 1961 .
- [12] Campo J L , Davila S G . Estimation of heritability for heterophil : Lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood effects of age , sex , and crossing[J] . Poultry Science , 2002 , 81(10) : 1448-1453 .
- [13] Koluman N , Daskiran I . Effects of ventilation of the sheep house on heat stress , growth and thyroid hormones of lambs[J] . Tropical Animal Health and Production , 2011 , 43(6) : 1123-1127 .
- [14] 杨琳 , 杜荣 , 张子仪 . 环境温度对鸡饲料代谢能测值及血浆中甲状腺激素浓度的影响[J] . 畜牧兽医学报 , 1993 , 24(6) : 494-499 .
- [15] Makk S , Melesse A , Schmidt R , et al . Effect of long-term heat exposure on peripheral concentrations of heat shock protein 70 (Hsp70) and hormones in laying hens with different genotypes[J] . British Poultry Science , 2003 , 44(1) : 133-138 .
- [16] Post J , Rebel J M , Ter Huurne A A . Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens : An alternative means by which to assess the physiological effects of stress[J] . Poultry Science , 2003 , 82(8) : 1313-1318 .
- [17] Star L , Nieuwland M G , Kemp B , et al . Effect of single or combined climatic and hygienic stress on natural and specific humoral immune competence in four layer lines[J] . Poultry Science , 2007 , 86(9) : 1894-1903 .
- [18] Zulkifli I , Al-Aqil A , Omar A R , et al . Crating and heat stress influence blood parameters and heat shock protein 70 expression in broiler chickens showing short or long tonic immobility reactions[J] . Poultry Science , 2009 , 88(3) : 471-476 .
- [19] Trout J M , Mashaly M M . The effects of adrenocorticotrophic hormone and heat stress on the distribution of lymphocyte populations in immature male chickens[J] . Poultry Science , 1994 , 73(11) : 1694-1698 .
- [20] Hammami M M , Bouchama A , Shail E , et al . Lymphocyte subsets and adhesion molecules expression in heatstroke and heat stress[J] . Journal of Applied Physiology , 1998 , 84(5) : 1615-1621 .
- [21] 李新国 , 王自力 , 朱晓宇 , 等 . 高温下清凉冲剂对鸡免疫器官中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞数量的影响[J] . 中兽医医药杂志 , 2006 , 6(6) : 5-7 .
- [22] Chen Z Y , Gan J K , Xiao X , et al . The association of SNPs in *Hsp90 β* gene 5' flanking region with thermo tolerance traits and tissue mRNA expression in two chicken breeds[J] . Molecular Biology Reports , 2013 , 40(9) : 5295-5306 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维