

# 信阳水牛 *PRL* 基因单核苷酸多态性与生长性状的相关性

马云<sup>1</sup>, 王伍<sup>1,2</sup>, 梁小娟<sup>1</sup>, 王璐<sup>1,3</sup>, 李芬<sup>1</sup>, 徐源<sup>1</sup>, 姚瑾<sup>1</sup>

(1.信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000; 2.华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631; 3.长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434023)

**摘 要:**以 50 头信阳水牛为材料, 以 GenBank 公布的牛 *PRL* 基因序列(NC\_007324)作为参照序列, 设计 PCR 引物, 对 *PRL* 基因的第 2、4、5 外显子进行变异检测, 并将其多态性与部分生长性状进行相关分析。结果表明: 试验牛群体中, 每一外显子的 PCR 扩增产物经 SSCP 分析均出现不同带型; 试验牛 *PRL* 基因第 2、4、5 外显子各存在 1 处 SNP(2974G>A, 7581 G>A, 8558 G>-)。 *PRL* 基因第 2 外显子 BB 型个体坐骨端宽显著宽于 AA 型个体 ( $P<0.05$ )。

**关 键 词:** 信阳水牛; 催乳素基因; 单核苷酸多态性(SNPs); 生长性状

中图分类号: S813.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)06-0645-05

## Associations between single nucleotide polymorphisms in *PRL* gene and growth traits in Xinyang buffalo

MA Yun<sup>1</sup>, WANG Wu<sup>1,2</sup>, LIANG Xiao-juan<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1,3</sup>, LI Fen<sup>1</sup>, XU Yuan<sup>1</sup>, YAO Jin<sup>1</sup>

(1.College of Life Science, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China; 2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 3. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

**Abstract:** Blood samples from fifty xinyang buffalos were extracted for genomic DNA and the primers for *PRL* gene (NC-007324) were designed to detect the polymorphisms in the second, fourth and fifth exons of this gene by PCR-SSCP and DNA sequencing, then the correlations between the polymorphisms and the growth traits of the buffalos were analyzed. The PCR-SSCP and DNA sequencing showed that in the tested buffalos each exon had shifted SSCP band and there was one SNP in each exon (2974G>A, 7581G>A, 8558 G>-). The correlation analysis showed that the hucklebone widths in the buffalos genotyped AA were significantly ( $P<0.05$ ) greater than those in the buffalos genotyped BB based on the second exon polymorphisms.

**Key words:** Xinyang buffalo; *PRL* gene; single nucleotide polymorphisms (SNPs); growth traits

信阳水牛主产于河南省信阳市, 是中国水牛地方优良品种之一, 1983 年被列入《河南省地方优良畜禽品种志》, 2003 年被列入《中国畜禽遗传资源名录》, 是豫南地区的优势畜种。随着人们对优质牛奶、牛肉消费需求量的增加, 为选育乳肉兼用的新型水牛, 对信阳水牛进行遗传改良, 使其由使役型向产肉、产奶型转变, 尤其是向产奶型转变具有重要意义。

催乳素(prolactin, PRL)主要由垂体的催乳素细胞分泌<sup>[1]</sup>, 广泛分布于垂体以外的很多组织器官<sup>[2]</sup>。牛的 *PRL* 基因被定位在 23 号染色体上<sup>[3]</sup>, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成<sup>[4]</sup>。*PRL* 基因对水牛的乳腺发育、泌乳和乳蛋白基因的表达有明显的调控功能, 且具有促进泌乳、维持黄体、分泌孕酮、促进前列腺及精囊的生长等作用。近年来, 经济性状功能基

收稿日期: 2011-10-09

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(102102110106); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划(85)

作者简介: 马云(1974—), 男, 宁夏平罗人, 博士, 副教授, 主要从事动物生物技术研究, tmlf74@126.com

因的多态性研究已经成为动物遗传育种研究的热点之一,但对信阳水牛 *PRL* 基因及其与生长性状的相关性研究尚少见报道。笔者研究信阳水牛 *PRL* 基因单核苷酸多态性与其生长性状的相关性,旨在为信阳水牛的分子育种提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本

血样采自河南省信阳市光山、商城等地。供试信阳水牛 50 头,对每头水牛颈静脉采血 20 mL,ACD 抗凝(血液 ACD=6~1)于 -20℃ 保存。

#### 1.1.2 主要试剂及试验设备

Tris 饱和酚、蛋白酶 K 购于郑州久是生物技术

有限责任公司;10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> free)、dNTP 混合物、MgCl<sub>2</sub>、DNA *Taq* 酶购于 TaKaRa 宝生物工程有限公司;其他试剂均为国产,主要购于郑州久是生物技术有限责任公司。PCR 仪、凝胶成像系统均为美国生产;紫外分析仪、电泳仪、水平电泳槽、垂直电泳槽均购于北京六一公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的制备、引物设计及合成

常用溶液与试剂的配制及全血基因组 DNA 的提取参照分子克隆指南进行。

参照 GenBank 中提供的牛 *PRL* 基因序列(NC\_007324),利用 Primer 5.0 软件设计 *PRL* 基因第 2、4、5 外显子的 PCR 引物 3 对(表 1)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 用于信阳水牛 *PRL* 基因不同位点的引物序列信息

Table 1 Primers for PCR of the *PRL* loci

位点	引物序列	引物长度/bp	产物长度/bp	退火温度/℃
exon 2	5'-TGCTAACCTTGGGCTAAT-3'; 5'-TTGAAGTTTGCTGATGC-3'	18	339	61
exon 4	5'-GTCAATCACTCTGAGCAAAA-3'; 5'-TCCTCATTACAGAAATCACC-3'	20	333	63
exon 5	5'-TTATTCTGGAGCCAAAGAG-3'; 5'-AGATGAAACCCATTAGAGCC-3'	20	304	55

#### 1.2.2 PCR 反应体系及扩增程序

PCR 反应体系 15 μL,其中,2.5 mmol/L 10×Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 混合物 1.1 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.7 μL,10 pmol/L 上游引物 0.3 μL,10 pmol/L 下游引物 0.3 μL,5 U/μL *Taq* 酶 0.075 μL,模板 1.0 μL,灭菌水 10.325 μL。PCR 扩增程序:95℃ 预变性 10 min;94℃ 变性 30 s,退火 40 s,退火温度见表 1,72℃ 延伸 40 s,33 个循环;72℃ 延伸 10 min。4℃ 保存。

#### 1.2.3 PCR 产物检测及 SSCP 分析

取 5 μL PCR 产物与 1 μL 加样缓冲液混匀后,上样于 2% 琼脂糖凝胶,60 V 电压电泳约 30 min,EB 染色,于紫外灯下观察并拍照。

2 μL PCR 产物和 8 μL 的 Loading Buffer,95℃ 变性 10 min,迅速置于冰上 5 min,电泳缓冲液为 1×TBE,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件如下。

(1) exon2:250 V 预电泳 20 min;250 V 电泳 30 min;110 V 电泳 10 h;

(2) exon 4:250 V 预电泳 5 min;250 V 电泳 15 min;160 V 电泳 4 h;

(3) exon 5:250 V 预电泳 20 min;250 V 电泳 40 min;130 V 电泳 6.5 h。

#### 1.2.4 *PRL* 基因扩增产物的回收、纯化及序列测定

为确定突变位点在序列中的位置,对每个位点不同基因型的 PCR 产物进行回收、纯化、测序,以进一步论证其多态位点的存在。选取有多态位点的个体,收集其 PCR 产物约 120 μL,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,50 V 电泳约 1 h 后,用试剂盒进行纯化。经 SSCP 初步分型后,选取不同基因型个体并将其 PCR 扩增产物送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

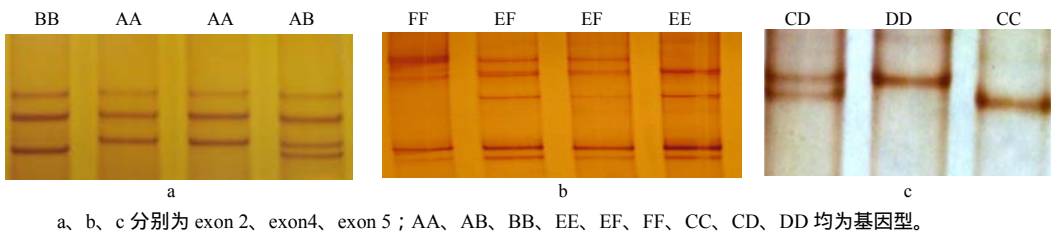
1.3  测定指标及数据分析

测定体高、体斜长、胸围、腹围、十字部高、腰角宽、坐骨端宽等体尺指标，并用 SPSS 软件进行显著性检验。用 DNA Star 软件进行序列比对分析。

2  结果与分析

2.1  PCR 产物的 SSCP 检测结果

*PRL* 基因不同位点的 PAGE 电泳分型结果见图



a、b、c 分别为 exon 2、exon4、exon 5；AA、AB、BB、EE、EF、FF、CC、CD、DD 均为基因型。

图 1  信阳水牛 *PRL* 基因的 PCR-SSCP 凝胶电泳图谱

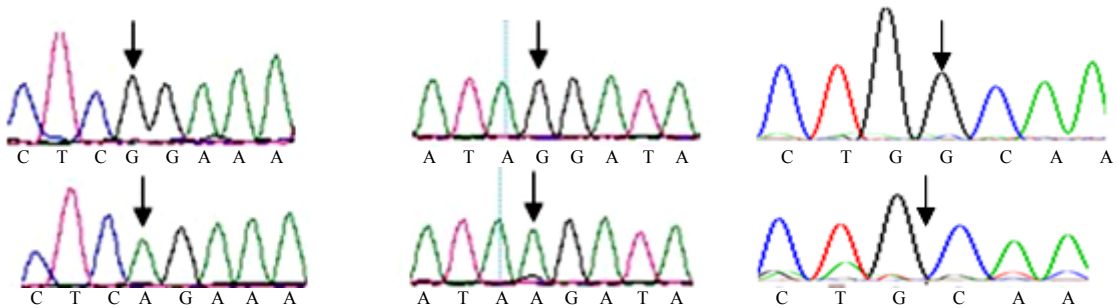
Fig.1  SSCP patterns of PCR products of *PRL* gene in xinyang buffalos by electrophoresis

2.2  *PRL* 基因的 SNPs 检测结果

与 GenBank 中的序列 NC\_007324 相比，*PRL* 基因第 2、4、5 外显子上分别出现 1 个 SNP(2974

1。由图 1 看出：exon 2、exon 4 和 exon 5 均出现了 3 种带型。对 exon 2 SSCP 检测结果进行统计，有 AA 型 32 个、AB 型 15 个、BB 型 3 个；对 exon4 SSCP 检测结果进行统计，有 EE 型 39 个、EF 型 2 个、FF 型 9 个；对 exon 5 SSCP 检测结果进行统计，有 CC 型 20 个、CD 型 27 个、DD 型 3 个。据此可初步判断信阳水牛 *PRL* 基因以上 3 个位点存在多态性。

G>A ,7581 G>A ,8558 G>-)。这些突变导致了 SSCP 分析结果的带型变化，测序结果见图 2。



、 、 分别为 exon 2、exon 4、exon 5。

图 2  信阳水牛 *PRL* 基因的 SNPs 检测结果

Fig.2  Results of DNA sequencing for *PRL* gene in xinyang buffalos

2.3  *PRL* 基因多态位点的遗传学分析

信阳水牛 *PRL* 基因多态位点的基因频率和遗传多态性指标见表 2。 $PIC>0.5$  为高度多态， $0.25<PIC<0.5$  为中度多态， $PIC<0.25$  为低度多态。由表 2 可知，*PRL* 基因的第 2、4、5 外显子均为中度多态，遗传变异较大。

2.4  *PRL* 基因多态性与体尺性状的相关分析

对 50 头信阳水牛进行基因型与体尺性状的相

关性分析(表 3)。由表 3 可以看出，*PRL* 基因第 2 外显子 BB 型个体的坐骨端宽显著宽于 AA 型个体。

表 2  *PRL* 基因不同位点的遗传学指标

Table 2  Genetic indexes for different *PRL* loci

位点	多态信息含量(PIC)	杂合度	纯合度	有效等位基因数
exon 2	0.276 8	0.331 8	0.668 2	1.496 6
exon 4	0.268 8	0.320 0	0.680 0	1.470 6
exon 5	0.344 4	0.442 2	0.557 8	1.792 8

表 3 信阳水牛 *PRL* 基因不同位点的多态性与体尺性状的关联分析

Table 3 Association between polymorphisms in <i>PRL</i> gene and growth traits in Xinyang buffalo									cm
位点	基因型	体高	体斜长	胸围	腹围	十字部高	腰角宽	坐骨端宽	
exon 2	AA	123.586±1.265	134.517±2.345	185.448±3.015	219.948±3.611	124.414±1.029	50.483±0.956	(27.552±0.785)a	
	AB	124.367±1.759	140.067±3.260	185.733±4.192	221.800±5.020	124.467±1.431	50.867±1.329	(30.000±1.091)ab	
	BB	126.000±3.932	144.000±7.291	188.000±9.373	230.333±11.226	125.000±3.199	54.000±2.971	(33.667±2.440)b	
exon 4	EE	123.944±1.140	135.861±2.315	186.028±2.700	222.375±3.249	124.472±0.910	50.778±0.859	28.306±0.751	
	EF	125.000±4.836	134.000±9.059	189.000±11.457	218.500±13.784	128.500±3.861	54.500±3.644	29.000±3.187	
	FF	123.944±2.280	141.667±4.271	183.667±5.401	217.111±6.498	123.556±1.820	50.222±1.718	30.333±5.196 2	
exon 5	CC	122.444±1.583	137.111±3.065	182.333±3.759	219.278±4.570	123.000±1.276	49.500±1.203	28.167±1.502	
	CD	124.788±1.317	136.346±2.550	187.192±3.128	221.327±3.802	125.346±1.061	51.692±1.001	28.846±0.888	
	DD	126.333±3.877	140.333±7.507	193.000±9.208	231.667±11.194	125.667±3.214	51.333±2.947	31.000±2.614	

### 3 讨论与结论

催乳素在促进哺乳动物个体的乳腺发育、乳汁生成、发动和维持泌乳方面发挥重要作用,国内外学者对 *PRL* 基因的多态性进行了大量研究。Lazebnaia 等<sup>[5]</sup>发现 *bPRL* 基因第 3 外显子的 Rsa I 位点杂合度为 0.36。Staiger 等<sup>[6]</sup>的研究表明, *PRL* 基因的不同基因型对产奶率有重大影响,可作为提高奶羊产奶量的一个潜在标记。周国利等<sup>[7]</sup>对 543 头北京荷斯坦奶牛 *PRL* 基因的多态性与产奶性状进行关联分析,结果表明不同基因型牛在产奶量、乳脂量、乳蛋白量及乳脂率等方面存在显著差异。李吉涛等<sup>[8]</sup>在 99 头中国荷斯坦牛中检测到催乳素基因 3 种基因型,这 3 种基因型奶牛的平均产奶量差异显著, BB 型高于 AB 型, AB 型高于 AA 型,乳蛋白率差异极显著。Brym 等<sup>[9]</sup>在 *PRL* 基因中检测到了 6 个多态位点,该基因型与产奶性状的相关性表现为: AG 基因型奶牛的产奶量高, GG 基因型奶牛所产的奶乳脂率高。Khatami 等<sup>[10]</sup>发现雅罗斯拉黄牛和荷斯坦奶牛由于催乳素的突变而出现了不同基因型, *bPRL* 的 Rsa I 多态型 BB 基因型与牛乳中的脂肪含量呈负相关。Sodhi 等<sup>[11]</sup>对印度本地牛 *PRL* 基因第 3 外显子的研究表明,一个大群体印度本地牛 *PRL* 基因的 Rsa I 位点与其他国家的牛不同。王丽娟等<sup>[12]</sup>对中国荷斯坦牛 *PRL* 基因第 4 外显子 8377 位点和第 4 内含子 8510 位点进行研究,结果表明 GG 基因型个体乳产量显著高于 CC 基因型, GC 基因型个体乳蛋白率显著高于 CC 基因型。周美菊<sup>[13]</sup>以荷斯坦种公牛的 98 个子代(雌性)为材料,

研究与泌乳性状相关联的 *PRL* 基因,结果表明 *PRL* 基因对产奶量的影响显著。张剑<sup>[14]</sup>以中国荷斯坦牛为材料,研究了 *PRL* 基因与产奶性状的关系,结果表明在外显子 2 和 4 上分别有 1 个 SNPs,在 bPL4 位点上, BB 基因型个体的乳脂量显著高于 AA 和 AB 基因型个体。以上研究结果表明,催乳素基因的多态性与家畜乳用性状显著相关,而乳用性能高低与生长发育有密切关系。

本研究中信阳水牛 *PRL* 基因第 2、4、5 外显子的多态性有 3 个 SNP 位点,这 3 个位点中第 2 外显子与坐骨端宽显著相关。在奶牛 *PRL* 基因上的研究已证明其多态与荷斯坦奶牛产奶性状显著相关,而生长性状指标与产奶性状存在强正相关关系<sup>[15-19]</sup>。本研究结果与上述研究结果一致,因此,本研究结果可为进一步研究信阳水牛提供参考,也可水牛经济性状的选育提供潜在的遗传标记。

### 参考文献:

- [1] Christian H C, Chapman L P, Morris J F. Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat[J]. J Neuroendocrin, 2007, 19(8): 605-613.
- [2] Astola A, Ortiz M, Calduch-Giner J A, et al. Isolation of sparus auratus prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 134(1): 57-61.
- [3] Hallerman E M, Theilmann J L, Beckmann J S, et al. Mapping of bovine prolactin and rhodopsin genes in hybrid somatic cells[J]. Anim Genet, 1988, 19(2):

- 123–131 .
- [4] Camper S A , Luck D N , Yao Y , et al . Characterization of the bovine prolactin gene[J] . DNA , 1984 , 3(3) : 237–249 .
- [5] Lazebnaia I V , Lazebnyi O E , Sulimova G E . Study of genetic variation in Yakutian cattle (*Bos taurus* L.) using the prolactin bPRL , growth hormone bGH , and transcription factor bPit-1 genes[J] . Genetika , 2010 , 46(3) : 425–428 .
- [6] Staiger E A , Thonney M L , Buchanan J W , et al . Effect of prolactin , beta-lactoglobulin , and kappa-casein genotype on milk yield in East Friesian sheep[J] . J Dairy Sci , 2010 , 93(4) : 1736–1742 .
- [7] 周国利 , 朱奇 , 吴玉厚 , 等 . 奶牛催乳素基因多态性与产奶性状的关系[J] . 吉林农业大学学报 , 2006 , 28(1) : 80–83 .
- [8] 李吉涛 , 杜立新 . 中国荷斯坦牛催乳素基因型与产奶性状的相关分析[J] . 山东农业大学学报 , 2004 , 35(4) : 553–559 .
- [9] Brym P , Kamiński S , Wójcik E . Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits [J] . J Appl Genet , 2005 , 46(2) : 179–185 .
- [10] Khatami S R , Lazebnyi O E , Maksimenko V F , et al . Association of DNA polymorphisms of the growth hormone and prolactin genes with milk productivity in Yaroslavl and black-and-white cattle[J] . Genetika , 2005 , 41(2) : 229–236 .
- [11] Sodhi M , Mukesh M , Mishra B P , et al . Analysis of genetic variation at the prolactin-rsaI (PRL-RsaI) locus in Indian native cattle breeds (*Bos indicus*)[J] . Biochem Genet , 2011 , 49 (1/2) : 39–45 .
- [12] 王丽娟 , 李秋玲 , 王长法 , 等 . 奶牛 *PRL* 基因 CRS-PCR 多态性与产奶性状的关联分析[J] . 畜牧兽医学报 , 2009 , 40(3) : 303–308 .
- [13] 周美菊 . 荷斯坦种公牛催乳素基因和  $\alpha$ -乳球蛋白基因与泌乳性状相关性的研究[D] . 银川 : 宁夏大学 , 2009 .
- [14] 张剑 . 中国荷斯坦牛 PL 和  $\alpha$ -LA 多态性、RH 定位及其与产奶性状关联分析[D] . 北京 : 中国农业大学 , 2007 .
- [15] 孙晓玉 , 韩广文 , 于孟虎 , 等 . 荷斯坦牛体尺、体重性状遗传参数的估测及与产奶性能的相关分析[J] . 中国奶牛 , 1999(3) : 39–40 .
- [16] 刘舜才 , 许文博 , 姚祥友 , 等 . 黑白花奶牛体尺性状与产奶量之间的多元分析[J] . 云南农业大学学报 , 1990 , 5(1) : 27–29 .
- [17] 王建民 , 李福昌 , 王中华 . 崂山奶山羊主要性状遗传参数的估测[J] . 山东农业大学学报 , 1998 , 29(1) : 41–45 .
- [18] 潘和平 , 阎萍 . 奶牛后躯主要体尺与其产奶性能的相关性[J] . 甘肃农业大学学报 , 1999(4) : 392–396 .
- [19] 尼满 , 刘武军 , 朱勇 . 新疆褐牛的体尺、体重对产奶量的影响[J] . 中国牛业科学 , 2008 , 34(4) : 44–47 .

责任编辑: 王赛群