

牛催乳素受体(PRLR)基因 *Hinf* I 多态性与奶牛生产性能相关性研究

张佳兰^{1,2}, 咎林森^{1*}, 申光磊¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 长江大学动物科学学院, 荆州 434025)

摘要: 采用 PCR-RFLP 方法检测了牛催乳素受体(PRLR)基因 intron 8 多态性。结果表明: 中国荷斯坦牛、加拿大荷斯坦和澳洲荷斯坦牛群体中 *Hinf* I 酶切后均有 A 和 B 两个等位基因存在。利用最小二乘分析研究了该多态位点对奶牛 305 d 产奶成年当量、乳脂肪率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄的影响。结果表明: 不同基因型个体的乳脂率、初次配种日龄和初次产犊日龄的差异均未达到显著水平, 但呈现出 AA>AB>BB 的趋势。BB 型个体的 305 d 成年当量与 AA 型、AB 型个体有显著差异 ($P<0.05$), BB 型个体的乳蛋白率与 AA 型、AB 型个体有极显著差异 ($P<0.01$)。对 305 d 成年当量、乳脂肪率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄 A 基因的加性效应分别为 296.00 kg/胎次、0.08%、-0.14%、4.55 d/头、15.10 d/头, A 等位基因的显性效应为 259.80 kg/胎次、0.07%、-0.10%、0.95 d/头和 4.90 d/头。

关键词: 奶牛; PRLR 基因; 生产性能

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0336-6964(2007)09-0888-05

Association between *Hinf* I Polymorphism of Prolactin Receptor (PRLR) Gene and Performance of Dairy Cows

ZHANG Jia-lan^{1,2}, ZAN Lin-sen^{1*}, SHEN Guang-lei¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: The polymorphism of intron 8 in prolactin receptor (PRLR) gene was detected by PCR-RFLP. A *Hinf*-I RFLP was detected in intron 8 and the polymorphic locus is common in all detected lines. Association between the founded *Hinf*-I RFLP in intron 8 and 305 days matured equivalency (ME), fat percent (F%), protein percent (P%), the first mating days (FMD) and the first calving days (FCD) was tested by least square analysis. No significant difference between *Hinf*-I RFLP and F%, FMD and FCD were founded in present study, but regular effects was showed. Individuals with BB genotype had lower ME ($P<0.05$) and higher P% ($P<0.01$). The additive effects of allele A was 296.00 kg/parity, 0.08, -0.14%, 4.55 d/cow, 15.10 d/cow for ME, F%, P%, FMD and FCD respectively. The dominant effects of allele A was 259.80 kg/parity, 0.07, -0.10%, 0.95 d/cow and 4.90 d/cow respectively.

Key words: dairy cow; PRLR gene; performance

催乳素(Prolactin, PRL)是脊椎动物腺垂体分泌的单链多肽类激素,属于生长激素/催乳素家族。

催乳素通过与靶细胞膜表面的催乳素受体结合,启动 JAK2/STAT5 信号传导途径,最终激活反式作

收稿日期: 2006-08-23

基金项目: 陕西省科技重点研究发展计划项目(2006KZ07-G1); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划资助

作者简介: 张佳兰(1971-),女,陕西武功人,博士生,主要从事生物技术与动物遗传育种方面的研究, E-mail: zjlgpy88@sohu.com

* 通讯作者: 咎林森, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生长发育调控及牛的遗传育种与繁殖研究, E-mail: Zanls@yahoo.com.cn

用因子 STAT5,使其作用于乳蛋白基因启动子区的靶序列,启动或增强以乳蛋白基因启动子为作用元件的靶基因的表达^[1~4]。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。催乳素要行使其生物学功能,必须与它的受体相结合。对小鼠的研究表明,Prhr^{+/-}小鼠 PRLR 受体数量下降,导致 PRL 信号传导水平下降,从而使 Prhr^{+/-}小鼠泌乳受阻^[5,6]。Prhr^{+/-}小鼠乳腺的发育及腺泡分化减弱,导致 STAT5 磷酸化下降,从而降低了乳蛋白基因的表达^[7]。因此,催乳素受体(Prolactin Receptor, PRLR)基因可被视为对奶牛生产性能具有重要作用的候选基因。

本研究拟采用 PCR-RFLP 方法研究 PRLR 基因第 8 内含子不同等位基因在不同奶牛群体中的分布情况,并研究了 PRLR 基因对奶牛的生产性能的影响,为 PRLR 基因在标记辅助选择中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验选取陕西省内几个大型奶牛场,散放型饲养、机器挤奶并进行 DHI 测定。试验牛有完整的泌乳期且有 DHI 记录。其中中国荷斯坦牛血样分别采自西安现代农业综合开发总公司第一奶牛场(50 头)、第二奶牛场(50 头)和宝鸡得力康乳业公司(46 头);加拿大荷斯坦牛血样采自上海光明西安奶牛繁育中心(50 头);澳洲荷斯坦牛血样采自陕西杨陵良种奶牛繁育中心(60 头),颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝,-20℃ 保存。

试验所用主要试剂 Taq DNA 聚合酶、*Hinf* I 购自美国 Fermentas 公司,dNTPs、Marker 购自广东东盛生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照文献[8],采用酚/氯仿抽提法提取,溶于 TE 中,-20℃ 保存,用紫外分光光度计检测 DNA 纯度,然后稀释成 50 ng/ μ L 备用。

1.2.2 PCR 扩增 根据牛 PRLR 基因(序列号 GI:84618406)intron 8 的序列,利用 Primer5.0 进行引物设计,序列为:Forward primer:5' CCTCGCTTTAGCCATTAG3',Reverse primer:5' GCACTTACCTCCAGCAGA3',由上海生工合成。

PCR 反应总体积 15 μ L,包括 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.0 μ L,20 pmol/L 的引物混合液 0.5 μ L,10 \times Buffer 1.5 μ L,25 mmol/L 的 Mg²⁺ 1.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 1.5 μ L (0.5 U/ μ L),模板 1.0 μ L,ddH₂O 8.0 μ L。

反应程序为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 30 s,55℃ 90 s,72℃ 90 s,32 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 反应完成后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,EB 染色,UVP 凝胶成像系统进行凝胶成像。

1.2.3 RFLP 检测 PCR 产物用 *Hinf* I 酶切,以检测多态性。酶切反应总体积 10 μ L,包括 PCR 产物 3.0 μ L,*Hinf* I (10 U/uL)0.5 μ L,10 \times Buffer 1.0 μ L,ddH₂O 5.5 μ L,37℃ 酶切 8 h,酶切产物在 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶检测,硝酸银染色。电泳条件是室温 120 V 3 h。

1.2.4 统计数据 根据影响奶牛生产性能性状的因素,采用以下固定模型分析基因型效应:

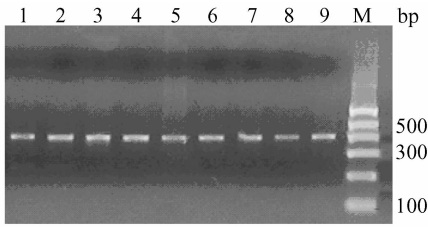
$Y_{ij} = \mu + L_i + M_j + e_{ij}$ 其中 μ 为群体均数, L_i 为品系效应, M_j 为基因型效应, e_{ij} 为随机残差效应。加性效应(a): $a = (AA - BB) / 2$;显性效应(d): $d = AB - (AA + BB) / 2$;显性度(D): $D = d / a$ 。应用 SPSS 软件分析遗传因素和品系因素对奶牛 305 d 成年当量、乳脂率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄等生产性能的效应值(Y_{ij}),并分析 PRLR 基因型对奶牛 305 d 成年当量、乳脂率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄等生产性能的影响。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果及 RFLP 检测

引物 PCR 扩增产物见图 1,扩增产物 *Hinf* I 酶切结果电泳图谱见图 2。PCR 扩增片段长 678 bp,用 *Hinf* I 酶切后,酶切产物出现多态性。分析牛的基因序列可知,在扩增片段内共有 6 个 *Hinf* I 酶切位点,其中位于 PCR 产物 378 bp 为多态酶切位点,将该酶切位点存在时产生的片段定义为等位基因 A,该酶切位点不存在时产生的片段定义为等位基因 B。A 等位基因的片段大小为 74、100、65、139、10、111、199 bp,B 等位基因的片段大小为 74、100、65、149、111、199 bp。AA 型个体的酶切结果为 74、100、65、139、10、111、199 bp,BB 型个体的酶切结果为 74、100、65、149、111、199 bp,AB 型个体的酶切结果为 74、100、65、139、10、149、111、199

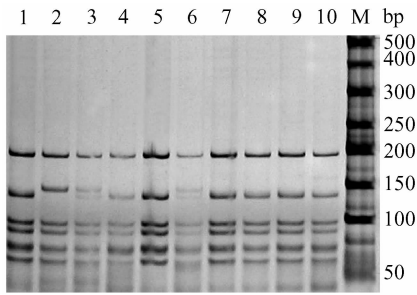
bp, 见图 2, 其中酶切产物 10 bp 在图中看不见。



1~9 为不同个体的扩增产物; 10 为 marker
1-9. Individual PCR product; 10. Marker

图 1 *PRLR*-PI8 PCR 扩增产物

Fig. 1 Detection of PCR product of intron 8 in *PRLR* gene



1, 4, 5, 7, 8, 9, 10. AA 基因型; 2. BB 基因型; 3, 6. AB 基因型; M. 50 bp marker

1, 4, 5, 7, 8, 9, 10. AA genotype; 2. BB genotype; 3, 6. AB genotype; M. 50 bp marker

图 2 PCR 产物 *Hinf* I 酶切

Fig. 2 The results of PCR products digested with *Hinf* I

2.2 *PRLR* 基因的基因频率和基因型频率

基因频率和基因型频率在不同奶牛群体中的分布见表 1。由表 1 可知, 在不同奶牛群体中均检测到 A、B 两个等位基因, 并且 A 基因频率相对较高, 分别为 0.83、0.78 和 0.85。

2.3 *PRLR* 基因对奶牛生产性能的影响

试验分析遗传因素和品系因素对荷斯坦牛生产性能的影响程度, 并探究 *PRLR* 基因不同基因型与奶牛生产性能的关系。表 2 列出了 *PRLR* 品系和基因型对荷斯坦奶牛生产性能的影响。由表 2 可见, 基因型对 305 d 产奶成年当量和乳蛋白率有显著的影响, 品系对 305 d 产奶成年当量有极显著的影响。二者互作对奶牛生产性能的影响不大, 即没有达到显著水平。

PRLR 不同基因型 305 d 产奶成年当量、乳脂肪率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄的最小二乘均数和标准误结果见表 3。由表 3 可知, AA、AB、BB 3 种基因型个体之间的乳脂率、初次配种日龄和初次产犊日龄没有差异, 但呈现出 AA > AB > BB 的趋势。BB 型个体 305 d 产奶成年当量与 AA 型、AB 型有显著差异, BB 型个体乳蛋白率与 AA 型、AB 型有极显著差异。这表明等位基因 B 对产奶量的提高不利, 而有利于提高乳蛋白率。对 305 d 产奶成年当量、乳脂肪率、乳蛋白率、初次配种日龄和初次产犊日龄 A 基因的加性效应分别为 296.00 kg/胎次、0.08%、-0.14%、4.55 d/头、15.10 d/头, A 基因的显性效应为 259.80 kg/胎次、0.07%、-0.10%、0.95 d/头和 4.90 d/头。

3 讨论与结论

催乳素及其受体与哺乳动物的乳腺发育、泌乳及繁殖密切相关。国内外研究证明, *PRL* 基因的遗传变异对奶牛产奶量有显著的影响^[9~13]。*PRL* 及 *PRLR* 基因的遗传变异与人类家族性乳腺癌的发生有关^[14,15]; *PRLR* 基因与猪的排卵率及窝产仔数相关^[16~18]。目前, 对牛催乳素受体基因的研究较少,

表 1 不同奶牛群体 *PRLR* 基因 PCR-RFLP 基因型频率和等位基因频率分布

Table 1 Genotype distribution and allele frequencies of *PRLR* gene PCR-RFLP in different dairy population

群体 Populations	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		AA	BB	AB	A	B
中国荷斯坦牛 Chinese Holstein	146	0.72(105)	0.07(10)	0.21(31)	0.83	0.17
澳洲荷斯坦牛 Australia Holstein	60	0.63(38)	0.08(5)	0.28(17)	0.78	0.22
加拿大荷斯坦牛 Canadian Holstein	50	0.76(38)	0.06(3)	0.18(9)	0.85	0.15

括号内是不同基因型的个体数

Bracket means the number of different genotypes

表 2 遗传因素对荷斯坦牛生产性能的影响

Table 2 Effect of different factors on performance of Holstein

F 值 <i>F</i> value	305 d 产奶成年 当量(ME)/kg 305 d matured equivalency	平均乳脂肪率(F)/% Average milk fat percentage	平均乳蛋白率(P)/% Average milk protein percentage	初次配种日龄/d The first mating days(FMD)	初次产犊日龄/d The first calving days(FCD)
基因型 Genotypes	5.71*	1.04	24.70**	1.47	0.41
品系效应 Line effect	12.72**	2.01	1.03	2.29	0.99
二者互作效应 Interaction effect	0.77	0.48	1.14	1.80	0.69

* .0.01<*P*<0.05; ** .*P*<0.01表 3 *PRLR* 基因不同基因型对荷斯坦牛生产性能的影响

Table 3 Effect of different genotypes on production of Holstein cows

基因型 Genotypes	305 d 产奶成年 当量/kg 305 d matured equivalency(ME)	平均乳脂肪率(F)/% Average milk fat percentage	平均乳蛋白率(P)/% Average milk protein percentage	初次配种日龄/d The first mating days (FMD)	初次产犊日龄/d The first calving days (FCD)
AA	8 466.54±162.10 ^a	3.97±0.06	3.10±0.11 ^b	513.71±7.20	796.63±11.10
AB	8 430.32±190.70 ^a	3.83±0.05	3.14±0.10 ^b	510.13±6.90	786.42±9.10
BB	7 874.43±221.20 ^b	3.82±0.08	3.38±0.28 ^a	504.64±10.80	766.46±11.00
<i>a</i>	296.00	0.08	-0.14	4.55	15.10
<i>d</i>	259.80	0.07	-0.10	0.95	4.90
<i>D</i>	0.88	0.87	0.71	0.21	0.33

同列不同小写字母表示差异极显著(*P*<0.05),同列不同大写字母表示差异极显著(*P*<0.01)Means in a column with different lowercase superscripts are different at *P*<0.05, means in a column with different capital superscripts are different at *P*<0.01

尤其是涉及到催乳素受体基因与奶牛生产性能的相关研究还未见报道。催乳素受体基因是催乳素行使功能的必需成分,因此研究催乳素受体基因多态性及其与荷斯坦牛生产性能的关系,对于奶牛的早期选育有重要意义。

虽然牛的催乳素受体基因的定位和测序研究已有报道^[19,20],但探讨 *PRLR* 基因与奶牛的产奶性状关系的研究相对较少。本试验结果显示,AA 基因型个体的 305 d 产奶成年当量明显优于 BB 基因型个体,而 BB 基因型个体的乳蛋白率明显优于 AA 基因型个体,AB 基因型个体处于中间状态。AA 基因型个体比 BB 基因型个体产奶量高出 592 kg,而 BB 基因型个体比 BB 基因型个体乳蛋白率高 0.28%,差异极显著(*P*<0.01)。目前正扩大样本含量验证该基因效应,以期为奶牛早期选育提供可靠依据。

Blot 等研究证明牛 20 号染色体上存在影响产

奶量的 QTL^[21],Viitala 等精确定位了此区域并证明 *PRLR* 的 S18N 替代对乳蛋白产量和乳脂肪产量有显著影响^[20]。本试验结果也表明,*PRLR* 基因对奶牛生产性能有一定影响,A 等位基因有利于产奶量的提高,B 等位基因有利于乳蛋白率的增加。对小鼠的研究表明 PRL 受体数量影响 STAT5 磷酸化进一步影响乳蛋白基因的表达^[7]。因此推测牛 *PRLR* 基因 intron 8 *Hinf* I 多态影响 *PRLR* 基因表达,从而提高乳蛋白基因的表达,提高了乳蛋白率。

参考文献:

- [1] Bole-Feysot C, Goffin V, Edey M, et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice[J]. *Endocrine Reviews*, 1998, 19(3): 225~268.

- [2] Goupille O, Daniel N, Bignon C, *et al.* Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxy-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for Jak2 and Stat5 activation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 127: 155~169.
- [3] Han Y, Watling D, Rogers N C, *et al.* Jak2 and Stat5, but not Jak1 and Stat1, are required for prolactin induced lactoglobulin transcription[J]. *Mol Endocrinol*, 1997, 11: 180~188.
- [4] Amit T, Dibner C, Barkey R J. Characterization of prolactin and growth hormone-binding proteins in milk and their diversity among species[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, 130: 167~180.
- [5] Matthew J N, Samantha R O, Garden M G, *et al.* Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development [J]. *Molecular Endocrinology*, 2005, 19 (7): 1868~1883.
- [6] Binart N, Bollor P I, Baran N, *et al.* A short form of the prolactin (PRL) receptor is able to rescue mammapoiesis in heterozygous PRL receptor mice [J]. *Molecular Endocrinology*, 2003, 17 (6): 1066~1074.
- [7] Gallego M I, Binart N, Robinson G W, *et al.* Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects[J]. *Developmental Biology*, 2001, 229: 163~175.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. Second edition[M]. New York: Celd Spring Harbor, 1989. 463~469.
- [9] Udina I G, Turkova S O, Kostiuhenko M V, *et al.* Polymorphism of cattle prolactin gene: microsatellites, PSR-RFLP[J]. *Genetika*, 2001, 37(4): 511~516.
- [10] Ojala M, Thomas R, Famula, *et al.* Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California [J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 1776~1785.
- [11] Bobe G, Beitz D C, Freeman A E, *et al.* Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates [J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(9): 3296~3305.
- [12] 赵春江. 牛乳蛋白基因多态性分子遗传学基础研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1998.
- [13] 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(自然科学版)*, 2004, 35(4): 553~555.
- [14] Vaclavicek A, Hemminki K, Bartram C R, *et al.* Association of prolactin and its receptor gene regions with familial breast cancer[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 91: 1513~1519.
- [15] Bhatavdekar J M, Patel D D, Shah N G, *et al.* Prolactin as a local growth promoter in patients with breast cancer: GCRI experience[J]. *European Journal of Surgical Oncology*, 2000, 26(6): 540~547.
- [16] Tomás A, Casellas J, Ramirez O, *et al.* High amino acid variation in the intracellular domain of the pig prolactin receptor (PRLR) and its relation to ovulation rate and piglet survival traits[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84: 1991~1998.
- [17] 徐宁迎, 章胜乔, 彭淑红. 金华猪 3 个繁殖性状主基因的分布及其效应的研究[J]. *遗传学报*, 2003, 30(12): 1090~1096.
- [18] Birgitte T M, Gary J E, Lende T. Components of litter size in gilts with different prolactin receptor genotypes[J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 915~926.
- [19] Hayes H, Chalonye C L, Goubin G, *et al.* Localization of ZNF164, ZNF146, GGTA1, SOX2, PRLR and EEF2 on homoeologous cattle, sheep and goat chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization and comparison with the human gene map[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 72(4): 342~346.
- [20] Viitala S, Szyska J, Blot S, *et al.* The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle [J]. *Genetics*, 2006, 173: 2151~2164.
- [21] Blot S, Kim J J, Moisisio S, *et al.* Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition[J]. *Genetics*, 2003, 163: 253~266.