

# 绵羊催乳素受体基因 PCR-SSCP 分析

牟玉莲<sup>1</sup>, 储明星<sup>1\*</sup>, 孙少华<sup>2</sup>, 方 丽<sup>1</sup>, 叶素成<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 2. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001)

**摘要:** 采用 PCR-SSCP 技术分析了催乳素受体基因 (*PRLR*) 在小尾寒羊、萨福克羊、多赛特羊、多赛特公羊 × 小尾寒羊母羊 F<sub>1</sub> 代杂种羊 4 个绵羊群体中的多态性。结果表明: *PRLR* 基因在 3 对引物扩增片段中均存在 PCR-SSCP 多态性。对于引物 1, 4 个绵羊群体均检测到 AA 基因型, AB 基因型只出现在小尾寒羊、多赛特羊和萨福克羊中, 仅在多赛特羊中检测到 BB 基因型。对于引物 2, 4 个绵羊群体均检测到 AA 和 AB 基因型, 只有萨福克羊没有 BB 型。对于引物 3, 4 个绵羊群体均检测到 AA、AB 和 BB 基因型。在 4 个绵羊群体中, A 等位基因频率均明显高于 B 等位基因频率。

**关键词:** 绵羊; 催乳素受体基因; PCR-SSCP

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-0956-05

## PCR-SSCP Analysis on Prolactin Receptor Gene in Sheep

MU Yu-lian<sup>1</sup>, CHU Ming-xing<sup>1\*</sup>, SUN Shao-hua<sup>2</sup>, FANG Li<sup>1</sup>, YE Su-cheng<sup>1</sup>

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China*)

**Abstract:** The polymorphisms of prolactin receptor (*PRLR*) gene in four sheep populations (Small Tailed Han, Suffolk, Dorset, F<sub>1</sub> of Dorset ♂ crossed with Small Tailed Han ♀) were analyzed by PCR-SSCP. The results indicated that there were three genotypes (AA, AB and BB) detected by three primer pairs. For primer 1, AA genotype was detected in four sheep populations, AB genotype was detected in Small Tailed Han, Suffolk and Dorset sheep, BB genotype was only detected in Dorset sheep. For primer 2, both AA and AB genotypes were detected in four sheep populations, BB genotype was not detected in Suffolk sheep. For primer 3, three genotypes (AA, AB and BB) were detected in four sheep populations. For three primer pairs, frequency of allele A was obviously higher than frequency of allele B in four sheep populations.

**Key words:** sheep; prolactin receptor gene; PCR-SSCP

催乳素是一种垂体前叶肽类激素。在几个哺乳动物物种包括脑、卵巢、胎盘和子宫在内的各种组织中都检测到它的受体<sup>[1~3]</sup>。Jenkins 等将绵羊催乳素受体 (prolactin receptor, *PRLR*) 基因定位于第 16 号染色体<sup>[4]</sup>。国外研究证明, *PRLR* 基因是生长与分化的一个重要调控基因, 可以作为繁殖性状一个强有力的候选基因<sup>[5~17]</sup>。

据《中国羊品种志》记载, 山东小尾寒羊平均产活羔数为 2.61<sup>[18]</sup>。Freetly 等报道多赛特成年母羊 231 窝的平均产活羔数为 1.77<sup>[19]</sup>。Abdulkhaliq 等<sup>[20]</sup>报道 2 082 只萨福克母羊平均产活羔数为 1.41。本研究以繁殖力各不相同的小尾寒羊、多赛特羊、萨福克羊、多赛特公羊 × 小尾寒羊母羊杂交一代为试验材料, 采用单链构象多态 (Single Strand

收稿日期: 2005-08-03

基金项目: 科技部科技基础条件平台工作项目 (2004DKA30450)

作者简介: 牟玉莲 (1975-), 女, 河北保定人, 硕士, 主要从事分子遗传学研究。Tel: 010-62815893, E-mail: muyulian76@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 储明星, 博士, 研究员, 博导, Tel: 010-62816001, E-mail: mxchu@263.net

Conformation Polymorphism, SSCP) 方法对 *PRLR* 基因进行单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 检测, 以期对绵羊催乳素受体基因的分子遗传研究积累基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

小尾寒羊 54 只母羊、多赛特羊 48 只母羊、萨福克羊 50 只母羊、多赛特公羊与小尾寒羊母羊杂交一代 64 只母羊的血样均采自北京市兴绿原农牧发展有限责任公司种羊场 (北京市顺义区杨镇)。颈静脉采血, 10 mL/只, 用 ACD 抗凝,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保

存。

### 1.2 引物设计

根据发表的绵羊 *PRLR* 基因部分序列 (GenBank 登录号 AF042358)<sup>[21]</sup>, 针对内含子 I 设计两对特异性引物 (分别记为引物 1 和引物 2); 将绵羊 *PRLR* mRNA 序列 (GenBank 登录号 AF041257)<sup>[21]</sup> 与人 *PRLR* 基因 (含有两个可选择的第 1 外显子、非编码的外显子 2 以及由外显子 3 到外显子 10 组成的编码区, 其中外显子 10 编码大部分的胞内域) 序列<sup>[22]</sup> 进行比较, 发现绵羊 *PRLR* mRNA 序列与人 *PRLR* 基因外显子 10 序列 (GenBank 登录号 AF091870) 具有较高同源性, 据此设计第 3 对引物 (记为引物 3), 详见表 1。

表 1 绵羊催乳素受体基因 PCR-SSCP 分析选用的引物

Table 1 Primers of ovine *PRLR* gene designed for PCR-SSCP analysis

引物 Primer	片段大小 Size/bp	上游引物 Upstream primer (5'→3')	下游引物 Downstream primer (5'→3')
Primer 1	215	CATCTGCTGGAGGTAAGTGC	TTCATTGCCCTCTGACGCTT
Primer 2	176	TGTCAGTAAGCGTCAGAGGGC	GGCTGGTGGAAGGTCCTT
Primer 3	267	ACACATGGAGCAAGGCGTG	GGGAAAGGCCATGTGGAAG

### 1.3 PCR 扩增

引物 1: PCR 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中  $10\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 20 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  2.5  $\mu\text{L}$ , 2 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物 2.5  $\mu\text{L}$ , 2 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 11.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $66\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 34 个循环,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

引物 2 和引物 3: PCR 反应总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中  $10\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 20 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  1.875  $\mu\text{L}$ , 2 mmol/L dNTPs 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物 2.5  $\mu\text{L}$ , 2 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , 50 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 12.125  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性 1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环 (引物 2) 或 29 个循环 (引物 3),  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

PCR 产物均用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 SSCP 分析

取 2  $\mu\text{L}$  PCR 产物和 5  $\mu\text{L}$  的上样缓冲液 [98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10

mmol/L EDTA (pH 8.0)、10% 甘油] 置于 PCR 管中, 离心混匀,  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 迅速插入冰中, 放置 10 min, 使之保持变性状态。样品用最佳胶浓度为 29:1 (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺) 的 8%~15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。电泳结束后, 进行银染显带。用 AlphaImager™ 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照和分析。

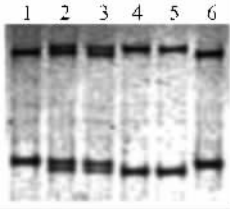
## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增

利用 3 对 *PRLR* 基因引物扩增绵羊基因组 DNA, 所得 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分别得到 215、176、267 bp 3 条特异性条带, 可直接进行 SSCP 分析。

### 2.2 SSCP 检测

对 3 对引物的扩增产物进行 SSCP 检测, 在 3 对引物中都发现 3 种基因型 (见图 1、2、3)。

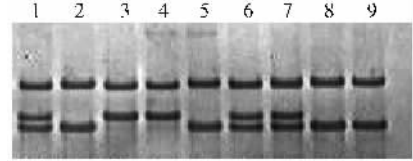


1、6. AA 型(小尾寒羊); 4、5. BB 型(多赛特羊); 2、3. AB 型(萨福克羊)

1、6. AA genotype(Small Tailed Han sheep); 4、5. BB genotype(Dorset); 2、3. AB genotype(Suffolk)

图 1 引物 1 对不同绵羊群体扩增片段的 SSCP 检测

Fig. 1 SSCP detection of PCR amplification using primer 1 in different sheep populations

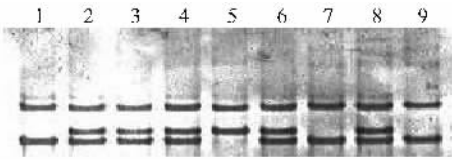


1、6、7. AB 型(多赛特羊); 3、4. BB 型(小尾寒羊); 2、5、8、9. AA 型(萨福克羊)

1、6、7. AB genotype(Dorset); 2、5、8、9. AA genotype(Suffolk); 3、4. BB genotype(Small Tailed Han sheep)

图 3 引物 3 对不同绵羊群体扩增片段的 SSCP 检测

Fig. 3 SSCP detection of PCR amplification using primer 3 in different sheep populations



1、7、9. AA 型(小尾寒羊); 2、3、4、6、8. AB 型(萨福克羊); 5. BB 型(多赛特羊)

1、7、9. AA genotype(Small Tailed Han sheep); 2、3、4、6、8. AB genotype(Suffolk); 5. BB genotype(Dorset)

图 2 引物 2 对不同绵羊群体扩增片段的 SSCP 检测

Fig. 2 SSCP detection of PCR amplification using primer 2 in different sheep populations

### 2.3 不同绵羊群体 PRLR 基因频率和基因型频率分析

对小尾寒羊、多赛特羊、萨福克羊和杂交一代进行了 PRLR 基因型检测, 计算了不同绵羊群体的基因频率和基因型频率, 统计结果见表 2。

由表 2 可见, 对于引物 1 扩增片段, 在 4 个绵羊群体中, A 等位基因频率均明显高于 B 等位基因频率, 尤其是杂交群体 A 等位基因的频率达到 1.0; 4 个绵羊群体均检测到 AA 基因型, 且 AA 型都是优势基因型, AB 基因型只出现在小尾寒羊、多赛特羊和萨福克羊中, 仅在多赛特羊中检测到 BB 基因型。

表 2 4 个绵羊群体 PRLR 基因的基因频率和基因型频率

Table 2 Gene and genotype frequencies of PRLR gene in four sheep populations

群体		小尾寒羊	多赛特羊	萨福克羊	杂交一代	
Population		Small Tailed Han sheep	Dorset sheep	Suffolk sheep	First filial generation	
引物 1 Primer 1	数量 No.	54	48	50	64	
	基因频率 Gene frequency	A	0.95	0.92	0.94	1.00
		B	0.05	0.08	0.06	0
	基因型频率 Genotype frequency	AA	0.91(49)	0.88(42)	0.88(44)	1.00(64)
		AB	0.09(5)	0.08(4)	0.12(6)	0(0)
BB		0(0)	0.04(2)	0(0)	0(0)	
引物 2 Primer 2	数量 No.	54	48	50	64	
	基因频率 Gene frequency	A	0.63	0.61	0.92	0.66
		B	0.37	0.39	0.08	0.34
	基因型频率 Genotype frequency	AA	0.48(26)	0.35(17)	0.84(42)	0.50(32)
		AB	0.30(16)	0.52(25)	0.16(8)	0.33(21)
BB		0.22(12)	0.13(6)	0(0)	0.17(11)	
引物 3 Primer 3	数量 No.	54	48	50	64	
	基因频率 Gene frequency	A	0.73	0.64	0.92	0.77
		B	0.27	0.36	0.08	0.23
	基因型频率 Genotype frequency	AA	0.59(32)	0.38(18)	0.88(44)	0.62(40)
		AB	0.28(15)	0.52(25)	0.08(4)	0.30(19)
BB		0.13(7)	0.10(5)	0.04(2)	0.08(5)	

括号内的数字表示不同基因型的个体数

The numbers in the brackets are the genotype individuals

对于引物 2 扩增片段,在 4 个绵羊群体中,A 等位基因频率均明显高于 B 等位基因频率;4 个绵羊群体均检测到 AA 和 AB 基因型;多赛特羊中 AB 基因型频率要高于 AA 和 BB 基因型频率,即杂合子是优势基因型,其余 3 个群体都是 AA 型是优势基因型;在 4 个绵羊群体中,萨福克羊 A 等位基因频率最高,AA 基因型频率也最高,并且没有发现 BB 型个体,其余 3 个绵羊群体都存在 BB 型。对于引物 3 扩增片段,在 4 个绵羊群体中,A 等位基因频率均明

显高于 B 等位基因频率;4 个绵羊群体均检测到 AA、AB 和 BB 基因型;多赛特羊中 AB 基因型频率要高于 AA 和 BB 基因型频率,即杂合子是优势基因型,其余 3 个群体都是 AA 型是优势基因型;在 4 个绵羊群体中,萨福克羊 A 等位基因频率最高,AA 基因型频率也最高。

#### 2.4 不同绵羊群体 PRLR 基因型分布差异检验

不同绵羊群体 PRLR 基因型分布差异检验的结果见表 3。

表 3 4 个绵羊群体 PRLR 基因型分布差异检验

Table 3 Test of difference for PRLR genotype distribution in four sheep populations

引物 Primer	群体 Population	多赛特羊 Dorset sheep	萨福克羊 Suffolk sheep	杂交一代 First filial generation
引物 1 Primer 1	小尾寒羊 Small Tailed Han sheep	2.305	2.062	6.188*
	多赛特羊 Dorset sheep		2.407	8.453*
	萨福克羊 Suffolk sheep			8.107*
引物 2 Primer 2	小尾寒羊 Small Tailed Han sheep	5.526	18.305***	0.496
	多赛特羊 Dorset sheep		25.321***	4.210
	萨福克羊 Suffolk sheep			16.712***
引物 3 Primer 3	小尾寒羊 Small Tailed Han sheep	6.423*	10.903**	0.851
	多赛特羊 Dorset sheep		27.366***	7.021*
	萨福克羊 Suffolk sheep			9.686**

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

由表 3 可知,对于引物 1,PRLR 基因型分布在纯种绵羊之间没有显著差异( $P > 0.05$ ),在纯种绵羊和杂交群体之间都存在显著差异( $P < 0.05$ )。对于引物 2,基因型分布在萨福克羊与小尾寒羊、多赛特羊以及杂交群体之间都存在极显著差异( $P < 0.001$ )。对于引物 3,基因型分布在萨福克羊与小尾寒羊、多赛特羊以及杂交群体之间都存在极显著差异( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),多赛特羊与小尾寒羊、杂交群体之间的基因型分布都存在显著差异( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

PRLR 基因由于它在繁殖途径中的综合作用而被作为繁殖性状的一个候选基因<sup>[5]</sup>。Rothschild 等<sup>[14]</sup>、Vincent 等<sup>[17]</sup>、Drogemuller 等<sup>[8]</sup>、Linville 等<sup>[10]</sup>、Putnova 等<sup>[13]</sup>、van Rens 等<sup>[15,16]</sup> 报道 PRLR 基因型显著影响猪总产仔数和产活仔数,但不影响妊娠期长度、仔猪出生重、断奶前生长速度;在纯合基因型之间,加性效应大小是每窝增加 0.66 头到 2

头以上的仔猪,随遗传背景而变化。

本研究中,对于引物 1 扩增片段,在小尾寒羊和萨福克羊中都没有检测到 BB 基因型,其原因可能是 B 等位基因频率太低或在检测的群体中确实没有 BB 基因型;在杂交一代中没有检测到 AB 和 BB 基因型,其原因可能是亲本 B 等位基因频率太低。对于引物 2 扩增片段,在萨福克羊中没有检测到 BB 基因型,其原因可能是 B 等位基因频率太低或在萨福克羊中确实没有 BB 基因型。建议增加绵羊品种数和扩大样本数作进一步分析。

#### 参考文献:

- [1] Cassy S, Charlier M, Belair L, *et al.* Developmental expression and localization of the prolactin receptor (PRLR) gene in ewe mammary gland during pregnancy and lactation: estimation of the ratio of the two forms of PRLR messenger ribonucleic acid[J]. Biol Reprod, 1998, 58(5):1 290~1 296.
- [2] Shirota M, Banville D, Ali S, *et al.* Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver[J].

- Mol Endocrinol, 1990, 4(8):1 136~1 143.
- [3] Tzeng S J, Linzer D I. Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 48(1):45~52.
- [4] Jenkins Z A, Henry H M, Sise J A, *et al.* Follistatin (FST), growth hormone receptor (GHR) and prolactin receptor (PRLR) genes map to the same region of sheep chromosome 16[J]. Anim Genet, 2000, 31(4): 280.
- [5] 储明星. 猪产仔数性状候选基因的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2001, 33(1):36~37.
- [6] Baran N, Kelly P A, Binart N. Characterization of a prolactin-regulated gene in reproductive tissues using the prolactin receptor knockout mouse model[J]. Biol Reprod, 2002, 66(4):1 210~1 218.
- [7] Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, *et al.* Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice[J]. Endocr Rev, 1998, 19(3):225~268.
- [8] Drogemuller C, Hamann H, Distl O. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines [J]. J Anim Sci, 2001, 79(10):2 565~2 570.
- [9] Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, *et al.* Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2003, 1(1):12.
- [10] Linville R C, Pomp D, Johnson R K, *et al.* Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine[J]. J Anim Sci, 2001,79(1):60~67.
- [11] Lucas B K, Ormandy C J, Binart N, *et al.* Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior [J]. Endocrinology, 1998, 139(10):4 102~4 107.
- [12] Ormandy C J, Camus A, Barra J, *et al.* Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse[J]. Genes Dev, 1997, 11(2):167~178.
- [13] Putnova L, Knoll A, Dvorak J, *et al.* A new Hpa II PCR-RFLP within the porcine prolactin receptor (PRLR) gene and study of its effect on litter size and number of teats[J]. J Anim Breed Genet, 2002,119(1):57~63.
- [14] Rothschild M F, Vincent A L, Tuggle C K, *et al.* A mutation in the prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs[J]. Animal Genetics, 1998,29(Suppl. 1):69.
- [15] van Rens B T, Evans G J, van der Lende T. Components of litter size in gilts with different prolactin receptor genotypes[J]. Theriogenology, 2003, 59(3-4):915~926.
- [16] van Rens B T, van der Lende T. Litter size and piglet traits of gilts with different prolactin receptor genotypes[J]. Theriogenology, 2002, 57(2):883~893.
- [17] Vincent A L, Evans G, Short T H, *et al.* The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs[A]. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production[C], Armidale, Australia. 1998,27:15~18.
- [18] 郑丕留. 中国羊品种志[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989,50~52.
- [19] Freetly H C, Leymaster K A. Relationship between litter birth weight and litter size in six breeds of sheep [J]. J Anim Sci, 2004,82(2):612~618.
- [20] Abdulkhalik A M, Harvey W R, Parker C F. Genetic parameters for ewe productivity traits in the Columbia, Suffolk and Targhee breeds[J]. J Anim Sci, 1989, 67(12):3 250~3 257.
- [21] Bignon C, Binart N, Ormandy C, *et al.* Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents[J]. J Mol Endocrinol, 1997, 19(2):109~120.
- [22] Hu Z Z, Zhuang L, Meng J, *et al.* The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hP<sub>III</sub> and a novel human promoter hP<sub>N</sub>[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(3):1 153~1 156.