

金水乌鸡 PRL 基因多态性研究

潘爱璠, 皮劲松*, 杜金平, 梁振华, 申杰, 蒲跃进 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430209)

摘要 [目的]研究金水乌鸡 PRL 基因多态性, 为金水乌鸡的保种和持续选育与提高积累分子基础数据。[方法]采用 PCR-RFLP 方法研究金水乌鸡白羽丝毛系 165 只乌鸡 PRL 基因多态性, 分别采用 Hae III 和 Hha I 2 种内切酶对各 DNA 样品的 PCR 产物进行单酶切, 分析基因型与产蛋数的相关。[结果]金水乌鸡 PRL 基因的 PCR 产物的 Hha I 酶切片段未出现多态性。金水乌鸡 PRL 基因的 PCR 产物的 Hae III 酶切片段呈现 RFLP 多态性, 有 AA、AB、BB 3 种基因型, A 基因频率较高。相关分析结果表明, 不同基因型的产蛋数差异不显著。[结论]A 基因可能是影响产蛋数的优势基因。

关键词 金水乌鸡; PRL 基因; 多态性

中图分类号 S831 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)11-04457-02

Study on the PRL Gene Polymorphism of Jinshui Silk Fowl

PAN Ai-luan et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, HAAS, Wuhan, Hubei 430209)

Abstract [Objective] The study aimed to analyze the PRL gene polymorphism of Jinshui silk fowl, and accumulating molecule basic data for protecting genetic resources and breeding afterwards and improving performance. [Method] The Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLPs) of PRL gene in 165 Jinshui silk fowls were investigated. Two restrictions of Hha I, Hae III were used to digest the production of PCR respectively. [Result] It was demonstrated that 3 different genotypes of AA, AB, BB had been detected for Hae III site. The frequency of A gene was greatly higher than that of B gene. The result of relation test showed that there was no significant difference for laying performance between the chicken of different genotypes. [Conclusion] A gene could be the superiority gene of effecting the laying performance.

Key words Jinshui silk fowl; PRL gene; Polymorphism

催乳素(Prolactin, PRL)是由腺垂体及其他组织和细胞所分泌的肽类激素, 在所有的脊椎动物中都存在, 其作用广泛而复杂。在啮齿类、反刍类及灵长类动物的雌性妊娠、泌乳和胎儿的生长发育以及雄性哺乳动物的生殖调节等过程中有重要的作用^[1-2]。对于禽类, PRL 主要就在巢(抱窝)性的建立和维持中起主导作用, 环境因素(如成堆的蛋)及内分泌因子能刺激和诱导 PRL 的分泌^[3]。鸡前体催乳素(chicken PRL, cPRL)由 30 个氨基酸残基的信号肽和 199 个氨基酸残基的成熟肽组成, cPRL 基因全长为 9 536 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子。Freeman 等利用与该基因紧密连锁的 RAPD 标记(MSU0020)把 PRL 基因定位于鸡 2 号染色体上^[4]。周敏等在粤黄鸡、丝毛乌骨鸡及伊莎蛋鸡 PRL 基因 cDNA 的序列中发现了改变信号肽裂解位点的 cDNA 碱基突变(C-T)^[5]。詹慧琴等研究了鸡 PRL 基因第 2 内含子的多态性^[6]。额尔和花等检测了鸡 RPL 基因外显子的单核苷酸多态性 SNP^[7]。

金水乌鸡由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所培育而成, 有黑羽丝毛系和白羽丝毛系。在白羽丝毛系中, 采用家系闭锁群内继代选育法对就巢性进行控制, 经过 10 余年的选育, 使就巢比例由基础群的 60.30% 下降到 5.21%^[8]。借鉴前述研究, 笔者分析了金水乌鸡白羽丝毛系群体中 PRL 基因的多态性及其与产蛋数间的关联, 旨在为金水乌鸡的品种保存和持续选育与提高积累分子基础数据。

1 材料与方法

1.1 供试鸡 金水乌鸡白羽丝毛系产蛋母鸡 165 只, 选自湖北省农业科学院畜牧兽医研究所家禽试验基地。将 165 只母鸡固定笼位并编号, 进行个体产蛋记录, 共观测 120 d 的

产蛋数。

1.2 采血 每只鸡翅静脉采血 0.5~1.0 ml, EDTANa₂ 溶液抗凝, 0.8 mg EDTANa₂ 可抗凝 1 ml 血液, 对应于产蛋记录编号, -20 °C 冻存备用。

1.3 DNA 提取 鸡血基因组总 DNA 提取参照孟安明等^[9]的方法, 并稍有改动。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.4 PCR 扩增 根据 NCBI 数据库中的 cPRL 的全长 DNA 序列(登陆号: AF288715), 应用 Primer5.0 引物设计软件设计出 1 对特异引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成。预计扩增片段长度约 500 bp。

上游引物序列: 5'-TCGGGCAGTTAACTTTTCAC-3'

下游引物序列: 5'-GATCAGCAAGGAGAGGTATG-3'

Taq DNA 聚合酶购自北京百泰克生物技术有限公司, PCR 反应体系参照该公司提供的方法。反应体系总体积 50 μl, 反应组分如下: Taq DNA 聚合酶(5 U/μl), 0.5 μl; 10×PCR Buffer(Mg²⁺plus), 5 μl; dNTP Mixtrue(各 2.5 mmol/L), 1 μl; 模板 DNA, 2 μl; 上游引物, 2 μl; 下游引物, 2 μl; ddH₂O, 37.5 μl; 加矿物油 15 μl 覆盖。

反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 59.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 31 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

电泳检测: 采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 所用的 DNA Marker1 购自广州东盛科技有限公司; 参照片段由小到大依次是 100、200、300、400、500、600 bp; Marker1 的点样量是 3 μl, PCR 产物的点样量是 2 μl; UVP 紫外透射仪凝胶成像系统观察电泳结果并照相。

1.5 PCR-RFLP 分析 选用 Hae III 和 Hha I 2 种内切酶对各样品的 PCR 产物进行单酶切, 均为 50 μl 反应体系。内切酶购自北京纽英伦生物技术有限公司。按照下列组分配制反应液。

将表 1 各组分混匀, 37 °C 酶切 7 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳

基金项目 湖北省自然科学基金项目(2005ABA194); 湖北省动物胚胎工程及分子育种重点实验室项目(2007A0701)。

作者简介 潘爱璠(1972-), 女, 瑶族, 湖南江华人, 硕士, 助理研究员, 从事家禽育种方面的研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-01-28

表 1 Hae III 与 Hha I 内切酶酶切反应体系
Table 1 Reaction system of Hae III and Hha I digestion μl

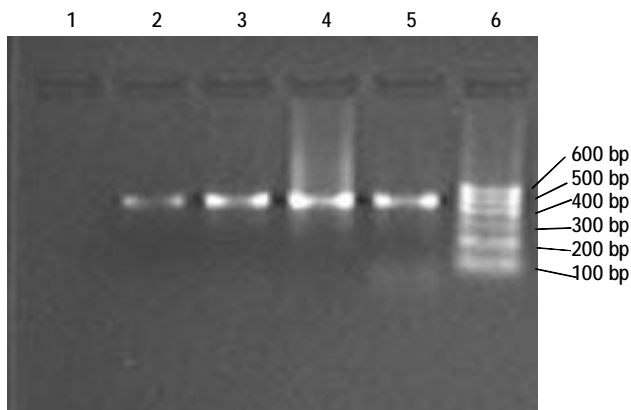
组分 Components	Hae III 酶切反应中的用量 Added amount of Hae III endonuclease reaction	Hha I 酶切反应中的用量 Added amount of Hha I endonuclease reaction
10 \times NEB Buffer	5	5
PCR 扩增产物 $\leq 2 \mu\text{g}$ PCR amplification products $\leq 2 \mu\text{g}$	8	8
内切酶 Restriction enzyme	1	1
100 \times BSA		0.5
ddH ₂ O	36	35.5

检测酶切反应物, UVP 紫外透射仪凝胶成像系统观察电泳结果并照相。

1.6 数据处理 采用 SPSS11.0 统计分析软件分析 RFLP 基因型与产蛋数的关系。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果 由图 1 可知, 2~5 泳道 PCR 扩增产物特异性较好, 扩增片段大小约为 500 bp。这表明获得了目的片段。



注: 1 泳道是对照; 2~5 泳道是 PCR 扩增产物, 大小约 500 bp; 6 泳道是 DNA Maker 1。

Note: Lane 1. Control; Lane 2-5. PCR amplification products about 500 bp; Lane 6. DNA Maker 1.

图 1 金水乌鸡 PRL 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of PRL gene in Jinshui silky fowl

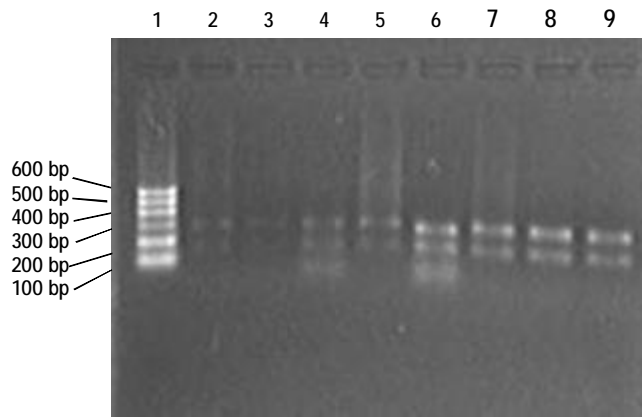
2.2 PCR-RFLP 分析 采用 Hha I 内切酶对 PCR 产物进行单酶切, 未发现多态性。采用 Hae III 内切酶对 PCR 产物进行单酶切, 出现了 PCR-RFLP 多态性, 有 AA、AB、BB 3 种基因型(图 2)。3 种基因型及基因频率见表 2。

2.3 RFLP 基因型与产蛋数的关系分析 由表 3 可知, AA、AB 2 种含 A 基因的基因型个体产蛋数均大于不含 A 基因的 BB 型个体, 但不同基因型的产蛋数差异不显著。

3 结论与讨论

在金水乌鸡白羽丝毛系中检测到了 PRL 基因的多态性, 有 AA、AB、BB 3 种基因型, 其中 A 基因频率较高。詹慧琴等研究发现, 在青脚麻鸡、乌鸡、土乌鸡 3 个群体中 PRL 基因的 A 基因频率较高, 推测 A 基因可能是影响产蛋数的优势基因^[6]。该试验结果与此相似, 这可能与供试鸡群有较高的选育程度有关, 金水乌鸡白羽丝毛系已经经过了 10 多年的选育。

采用 SPSS11.0 软件分析基因型与产蛋数相关性, 结果表明, 虽然不同基因型间产蛋数差异不显著, 但产蛋数统计



注: 1 泳道是 DNA Maker 1; 2~5、7 泳道是 AA 型; 6、8 泳道是 AB 型; 9 泳道是 BB 型。

Note: Lane 1. DNA Maker 1; Lane 2-5 and 7. AA genotype; Lane 6, 8. AB genotype; Lane 9. BB genotype.

图 2 金水乌鸡 PRL 基因 Hae III-RFLP

Fig. 2 PRL gene Hae III-RFLP in Jinshui silky fowl

表 2 金水乌鸡 PRL 基因型与基因频率

Table 2 PRL genotype and gene frequency of Jinshui silky fowl %

基因或基因型 Gene or genotype	频率 Frequency
A	83.73
B	16.27
AA	74.70(124)
AB	18.07(30)
BB	7.23(12)

注: 括号内的数据是实测数。

Note: Data in the brackets are measured value.

表 3 RFLP 基因型与产蛋数的关系

Table 3 Relationship between RFLP genotype and egg number 枚

基因型 Genotype	产蛋数 Egg number
AA	79.92 \pm 14.46
AB	75.82 \pm 21.32
BB	74.92 \pm 21.69

结果表明, AA、AB 2 种含 A 基因的基因型个体产蛋数均大于不含 A 基因的 BB 型个体。这为 A 基因是影响产蛋数的优势基因的推测提出了佐证。

据资料显示, 采用 Hae III 内切酶对鸡 PRL 基因的 PCR 产物进行酶切, DNA 测序表明, 在酶解大片段中, 由于 1 个 T \rightarrow C 突变产生了 1 个新的 Hae III 位点, 切去了 27 bp, AA 与 BB 基因型在片段大小上只差 27 个 bp^[7]; 在琼脂糖凝胶上电泳, 其结果不易分辨, 用聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳可以获得分辨率较高的电泳图谱。

参考文献

- [1] 李昆明. 催乳素对生殖生理的调控作用[J]. 生殖与避孕, 2001, 22(1): 13-14.
- [2] 滕春波, 杨增明. 催乳素家族与哺乳动物妊娠[J]. 生理科学进展, 2002, 33(4): 355-358.
- [3] 李莹辉, 汪林仙, 杨传任. 催乳素调节鸡卵泡膜功能的机理[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 77-80.
- [4] FREEMAN M E, KANYICKSKA B, LERANT A, et al. Prolactin: structure function and regulation of secretion [J]. Physiology Rev, 2000, 80: 1523-1531.
- [5] 周敏, 张细权. 三个品种家鸡催乳素基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 遗传学报, 2001, 28(7): 614-620.
- [6] 詹慧琴, 额尔和花, 张淑君, 等. 鸡催乳素基因内含子 2 RFLP 检测及与产蛋性关系的初步研究[C]// 吴常信. 家禽研究最新进展—第十一次全国家禽学术研讨会论文集. 青岛, 2003.
- [7] 额尔各花, 詹慧琴, 张淑君, 等. 鸡催乳素基因外显子中的 SNP 检测[C]// 吴常信. 家禽研究最新进展—第十一次全国家禽学术研讨会 (下转第 4597 页)

(2)根据混合战略纳什均衡,分别对地方守规的概率 q 求 A 和 C 的偏导,有:

$$\left(\frac{q}{A}\right)' = -\frac{J}{(A+S+C)^2} > 0, \left(\frac{q}{S}\right)' = -\frac{J}{(A+S+C)^2} > 0$$

如果中央在土地出让中收益越大,即 A 越大,或者地方违规造成的社会损害越大,即 S 越大,则 q 越大,即地方守规的概率越大。当中央从土地出让、开发过程中的收益增大时,就会更有动力去监督,目前因为土地出让金的 30%以及相关的税金上交中央,所以中央有强烈的检查动力。另外,地方必须守规完成大型的土地出让项目,才能减少对社会的危害。若大型的土地出让项目出现了违规,则会给社会带来较大的负面影响,损害中央的形象,扰乱正常的建设秩序,所以大型的土地出让项目检查的概率大,违规的概率小。

(3)由混合策略纳什均衡(q, p)分别对 C 求偏导,可得

$$\left(\frac{q}{C}\right)' = -\frac{J}{(A+S+C)^2} > 0, \left(\frac{p}{C}\right)' = -\frac{1}{(a+C)^2} < 0$$

上式中,如果 C 减小, q 将减小, p 就增大,表示中央的处罚力度降低,对地方的威慑力就越小,地方违规的可能性大大增加,此时中央的检查概率必须大大提高。

当 C 增大, q 将增大, p 就减小,即可以降低检查的必要性,同时提高地方的守规概率。可理解为:如果 C 增大,可以节约中央用于检查的人力、物力,提高社会的福利。但是如果 C 过大,会打压地方出让土地的积极性,影响地方的经济建设。

(4)根据混合策略纳什均衡,中央检查的概率对地方的守规成本 a 求导,得:

$$\left(\frac{p}{a}\right)' = \frac{C}{(a+C)^2} > 0$$

上式中,如果 a 越大, p 也就越大,即地方的守规成本越高,越需要中央的检查。由于土地资源的有限性以及对农村土地流转的严格控制,造成土地价格越来越高,地方从中谋利的动力越来越大,即守规成本变大,所以需要中央加大检查的概率。从 2004 年的“8.31”土地大限到最近出台的《土地储备管理办法》、《全国土地执法百日行动查处纠正工作的若干处理意见》、《国务院关于加强土地调控有关问题的通知》、《关于规范国有土地使用权出让收支管理的通知》等相关规定,可以看出,由于这些相关政策的出台,规范了土地出让的程序,土地出让金的用项被严格监管,使地方政府的违规收益变小,从另一方面来说,即守规的成本变小,同时加大了对地方政府的惩罚,这样中央检查的概率将会变小。

3 应用“监督博弈”模型提出的治理对策

在城市化加速发展阶段,地价上升有其合理性和必然性,但很多地方政府在“经营城市”的口号下,把土地储备作为提高地价、增加政府财政收入的捷径。土地是继劳动力之

后的第二大生产投入,地方政府通过低价征地、高价出售土地来获得丰厚的收入,同时作为土地唯一的供应方会牟取垄断利润,进一步造成土地价格的逐年攀高。有关学者也指出:高地价是导致通货膨胀的主要渠道,易造成社会的不和谐^[9]。因此,科学分析中央、地方的博弈行为,制定正确的土地开发战略和策略有着十分重要的现实意义。

3.1 制定统一的土地法律,改变土地政策二元分割格局 我国土地分为国有土地和集体土地,只有国有土地才能够市场上交易,而集体土地必须要经地方政府征收,由地方政府出让并从中牟取巨额的价差,所以地方有违规的强烈动力。发展集体建设用地的流转和交易,打破对农地转用的国家垄断,改变政府对集体土地的用途管制,让地权所有者直接参与市场交易过程,主导土地要素的定价权,这是中国土地制度改革和政策调整的基本方向,也是中国工业化和城市化的必由之路。

3.2 建立地方政府举债制度的政策 和世界上大多数国家相比,中国把更多的支出责任下放给省以下的地方政府。我国公共财政中所存在的“中央财政占总收入的 55%,支出只占 30%左右;而地方政府财政总体收入占不到 50%,却承担着近 70%的支出”的突出矛盾,导致了地方政府财力拮据问题凸现,财政收支缺口日益扩大。此外,地方政府为了出政绩,也需要大规模进行城市建设,这 2 种因素共同导致了地方政府的卖地行为。所以应完善公债立法,确保地方政府的建设资金,但要明确公债的发债额度,严格控制公债的支出范围。

3.3 保障土地利益的相关方有监督、参与管理的权利 中央与地方之间的利益关系已经由政策调整进入到了制度创新阶段。任何一种机制的设置,不能只简单考虑到委托和代理,他们之间的权力和义务往往是不对称的,很难构成有效的均衡。土地出让过程涉及到中央、地方、开发商、征地农民、拆迁户、购房者,不同的主体在土地上的权力和利益是不同的,甚至是对立的,各个利益主体都应有主张自己权力和利益的机会,从而约束每个利益主体并实现最优均衡。如果不考虑群体利益的均衡,单从中央和地方之间的关系寻找突破口,则中央要花费巨大的人力、物力去监督地方,而地方的违规操作带有隐蔽性,中央难以监督,这样往往很难找到有效的机制以贯彻中央的政策。如果让相关的利益群体来监督地方政府,维护自己的利益,则中央的监督成本将会大大降低,地方的违规行为也会随之减少。

参考文献

- [1] 王美涵.土地出让金的财政学分析[J].财政研究,2007(3):1-6.
- [2] 吴芳,库莹.拓宽城市地方财政收入来源渠道的思考[J].理论月刊,2006(11):89-91.
- [3] 谢国忠.地价硬着陆与经济软着陆[EB/OL].(2007-12-28)[2008-02-13]<http://xieguozhong.vip.bokee.com/>.
- [4] 学术研讨会论文集,深圳,2001.
- [9] 孟安明,齐顺章,宫桂芬.四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱[J].生物化学与生物物理进展,1993.20(2):139-142.

(上接第 4458 页)

论文集.青岛,2003.

[8] 杜金平.金水乌鸡就巢性的育种控制[C]//吴常信.第十次全国禽