

雪山草鸡 *PRL* 基因的表达差异及其对繁殖性能的影响

汪峰¹, 何宗亮¹, 贾晓旭¹, 虞德兵¹, 张康宁², 杜文兴^{1*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; 2. 常州利华畜禽有限公司, 常州 213161)

摘要: 从 880 只 250 日龄雪山草鸡中选取处于产蛋期、就巢期和恢复期的鸡各 20 只, 屠宰采集下丘脑、垂体、输卵管和卵巢, 用荧光实时定量 PCR 法检测其中催乳素基因 mRNA 的表达水平, 并与繁殖性能进行相关分析, 结果表明: *PRL* 基因在 4 个组织中都有表达, 但在垂体中的表达极显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 而且在其他 3 个组织之间 *PRL* 的表达差异并不显著 ($P > 0.05$); 就巢期鸡 *PRL* 基因在垂体中的表达量显著高于产蛋期鸡和恢复期鸡 ($P < 0.05$), 而在下丘脑、输卵管和卵巢 3 个组织中 3 组个体 *PRL* 基因的表达量差异不显著 ($P > 0.05$); *PRL* 在垂体的表达与种鸡的繁殖性能呈负相关, 相关系数为 -0.328 ($P < 0.05$)。

关键词: *PRL* 基因; 荧光实时定量 PCR; 繁殖性能; 雪山草鸡

中图分类号: S831.2; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)06-0813-05

The Difference of *PRL* Gene Expression in Xueshan Chickens and Its Effect on Reproductive Performance

WANG Feng¹, HE Zong-liang¹, JIA Xiao-xu¹,
YU De-bing¹, ZHANG Kang-ning², DU Wen-xing^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Changzhou Lihua Domestic Animal and Fowl Limited Company, Changzhou 213161, China)

Abstract: 20 chickens in laying, broodiness and nonovulatory periods, respectively selected from 880 Xueshan chickens aged 250 days, were slaughtered in order to get hypothalamus, pituitary, oviduct and ovarian, in which the mRNA expression level of prolactin gene was detected by real-time PCR. Correlative analysis was carried out between prolactin gene mRNA expression level and the reproductive performance. The results showed that *PRL* gene was expressed in all of four tissues, but the expression in pituitary were significantly higher than that in other tissues. The expression in the other three tissues was not significantly different. In pituitary, *PRL* mRNA expression in broodiness period was significantly higher than that in ovulatory and nonovulatory, while in hypothalamus, oviduct and ovarian, the expression didn't show any significant difference. *PRL* expression in pituitary negatively correlated with reproductive performance of the breeding bird and the correlative coefficient was -0.328 .

Key words: prolactin gene; real-time PCR; reproductive performance; Xueshan chickens

收稿日期: 2007-12-05

基金项目: 江苏省农业三项工程(SX(2003)046)

作者简介: 汪峰(1981-), 男, 江苏徐州人, 硕士, 主要从事家禽遗传育种研究, Tel: 025-84395036, E-mail: flk8024@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 杜文兴, E-mail: duwx66@yahoo.com.cn

我国具有丰富的家禽遗传资源,但大多数鸡和鹅地方品种因为顽固的就巢性繁殖性能普遍较低。这大大制约了我国地方家禽品种遗传资源的开发和利用,因此减少和消除就巢性已成为目前重要的育种目标之一^[1]。

禽类就巢行为的发生和维持是受下丘脑-垂体-性腺轴所调控的^[2],是多种神经内分泌因子共同调控的结果^[3-4]。催乳素(Prolactin, PRL)是垂体前叶嗜酸细胞分泌的多肽类激素, PRL除为产乳和繁殖等功能所必需外^[5],还具有调节体内渗透压平衡,生长发育,内分泌与代谢;脑与行为;繁殖、免疫调节和保护等功能^[6]。研究表明,禽类的就巢性与血浆PRL水平上升有关。高水平的PRL可以直接抑制卵巢卵泡的发育和垂体促性腺激素的分泌,导致血液LH水平下降^[7];下丘脑促性腺激素释放激素GnRH(I及II型)的合成减少,使得卵巢萎缩,排卵停止,最终产蛋停止^[8]。因为PRL对就巢的发生和维持有重要的作用并可导致母禽产蛋停止,前人对PRL的激素水平和基因结构与繁殖性能的关系做了大量的研究^[9-10]。本研究以常州立华公司的雪山草鸡为研究对象,利用荧光实时定量PCR技术检测下丘脑-垂体-性腺轴各组织中PRL基因表达的发育性变化情况,以及其对繁殖性能的影响,为地方鸡种的选育提供参考资料。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

试验动物是由常州立华畜禽有限公司利用我国优质地方良种藏鸡、茶花鸡为主要素材,经多种杂交选育而成的草鸡新品种—雪山草鸡,该品种不但拥有优良的肉质还保留了地方品种的强就巢性。取产蛋期鸡、就巢期鸡和恢复期鸡各20只,屠宰取下丘脑、垂体、卵巢和输卵管,立即置于液氮中速冻, -70℃保存,用于RT-PCR。

1.2 繁殖性能测定

对试验鸡群采用正常的营养和光照标准,单只笼养,记录每天每只的产蛋量。每天下午观察就巢表现,记录鸡的卧息情况。如果鸡在卧息,说明其有就巢倾向,对于连续卧息,产蛋停止、卧息持续时间长、有攻击行为、采食量下降、体质量下降、以及发出特别的叫声的为典型就巢个体;就巢行为消失,但产蛋还没完全恢复的为恢复期个体;无就巢行为,产蛋正常的为生产型个体。

1.3 主要试剂和仪器

MMLV反转录酶购自美国Promega公司, Taq DNA聚合酶、EX Taq HS DNA聚合酶和pMD18-T Simple Vector购自大连TaKaRa公司, Opticon荧光实时定量PCR仪为美国MJ公司产品。

1.4 引物设计与合成

以 β actin为内参。从GenBank检索鸡的PRL mRNA序列,用Primer Premier 5.0软件设计引物(表1),由大连宝生物公司合成。

1.5 RNA提取和反转录

用硫氰酸胍-酚-氯仿RNA一步法提取总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度和纯度($OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$)。

用随机引物对总RNA进行反转录(reverse transcription, RT),反应体系为25 μ L: 2 μ g总RNA, 1 μ g随机引物, 0.4 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 20 U Rnasin, 200 U MMLV反转录酶, 5 μ L 5 \times RT Buffer(含250 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 250 mmol \cdot L⁻¹ KCl, 50 mmol \cdot L⁻¹ DTT, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ Spermidine)。反应程序:先加RNA模板, dNTP和随机引物, 70℃变性5 min后立即放冰上冷却,再加其余试剂,混匀后37℃反应60 min, 95℃灭活5 min。RT产物保存于-20℃备用。

1.6 PCR反应

反应体系为10 μ L: 0.5 μ L RT产物, 1 U Taq DNA聚合酶, 1 μ L 10 \times PCR Buffer, 0.25 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 1.25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.5 μ mol \cdot L⁻¹上下游引物。反应程序:94℃预变性3 min; 94℃ 30 s, 退火30 s, 72℃ 30 s, 40个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染后用凝胶成像系统照相。

1.7 PCR产物回收及克隆测序

PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下割取目的片段,用V-gene DNA凝胶回收试剂盒纯化。回收的DNA片段与pMD18-T Simple Vector载体连接,并转化JM109菌株。挑取阳性克隆,用V-gene质粒DNA提取试剂盒提取质粒,PCR鉴定后,送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.8 荧光实时定量PCR

每个样品做2个重复,用克隆有目的片段的质粒梯度稀释后作为标准品,制作标准曲线。反应体系为20 μ L: 1 μ L RT产物, 1 U EX Taq HS DNA

表 1 扩增 *PRL* 和 β -*actin* 基因的引物参数Table 1 Parameters of oligo-nucleotide primer pairs used for amplification of the *PRL* and β -*actin*

目的基因 Target gene	mRNA 参考序列 mRNA sequence	引物序列(5'-3') Primer sequence	预期产物大小 Expected size of PCR products/bp	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>PRL</i>	X68308	F: TGGTAGAGCAAGTCATCACACAGA R: CCAGAAGAACC GCCAGAAAC	85 (7-91)	60
β - <i>actin</i>	L08165	F: ACTTTGGCATCGTGGAGG R: GAAGAGTGAGTGTCGCTGTTG	332 (864-1 195)	56

聚合酶, 4 μ L 5 \times PCR Buffer, 0.3 mmol \cdot L⁻¹ dNTP, 3.75 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 0.5 μ mol \cdot L⁻¹ 目的基因上下游引物, 1 μ L 20 \times SYBR green I。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 读板(Plate Read), 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 进行熔解曲线分析: 65~94 $^{\circ}$ C, 每隔 0.2 $^{\circ}$ C 读板 1 次, 温度恒定 1 s 后读板; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.9 数据分析

试验结果表示为 $\bar{x} \pm SD$, 用 SPSS11.5 For Windows 软件进行数据分析。其中同一品种不同生长时期 IMF 及基因表达量的差异用 One-way ANOVA 进行分析; 基因的表达量与产蛋量的相关用 Bivariate Correlations 进行分析。

表 2 3 组草鸡的前期产蛋量

Table 2 Earlier period production in three groups chicken

分组 Group	产蛋期 Laying period	就巢期 Broodiness period	恢复期 Nonovulatory
产蛋量 Production	101.15 \pm 13.94 ^A	49.30 \pm 21.47 ^B	50.53 \pm 16.12 ^B

2.2 *PRL* 基因表达谱分析

性腺轴的下丘脑、垂体、输卵管、卵巢 4 个组织 *PRL* 基因表达谱分析结果见图 1, 可以看出: *PRL* 基因在下丘脑、垂体、卵巢、输卵管中均有表达, 其中在垂体中表达量最高。

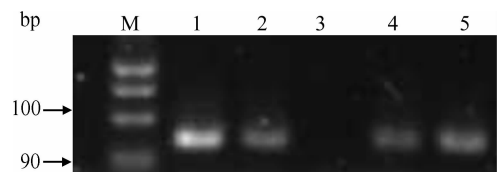
2.3 *PRL* 基因在不同组织中的表达变化

用荧光实时定量 PCR 法对 3 组草鸡性腺轴上的下丘脑、垂体、输卵管、卵巢 4 个组织 *PRL* 基因的表达进行了定量。结果表明: *PRL* 在这 4 个组织中都有表达, 但在垂体的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.01$), 而且在其他 3 个组织之间 *PRL*

2 结果

2.1 3 组种鸡的产蛋量

通过产蛋性能记录发现, 250 日龄正处在雪山草鸡的产蛋高峰期, 产蛋期鸡群保持着较高的产蛋率, 而就巢期鸡群则出现了停产现象; 有些个体甚至在产蛋期出现多次停产抱窝现象; 而恢复期个体则是出现停产抱窝现象一段时间后抱窝行为消失, 行为恢复正常, 但基本没有恢复正常产蛋。而 3 组试验对象的产蛋量之间差异也比较明显(表 1), 其中产蛋期鸡的产蛋量明显高于就巢期鸡和恢复期鸡, 差异极显著 ($P < 0.01$), 而就巢期鸡和恢复期鸡之间差异不显著 ($P > 0.05$)。



M. DNA marker; 1. 垂体; 2. 下丘脑; 3. 阴性对照; 4. 输卵管; 5. 卵巢

M. DNA marker; 1. Pituitary; 2. Hypothalamus; 3. Control; 4. Oviduct; 5. Ovary

图 1 *PRL* 基因表达谱Fig. 1 Expression of *PRL*

的表达差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 不同组织 *PRL* 基因的表达量Table 3 Abundance of *PRL* mRNA in various tissues

	下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	输卵管 Oviduct	卵巢 Ovarian
<i>PRL</i> / β -actin ($\bar{x} \pm SD$)	0.784 \pm 1.665 ^B	327.369 \pm 347.258 ^A	0.022 \pm 0.148 ^B	0.026 \pm 0.080 ^B

2.4 *PRL* 基因在垂体中的表达和繁殖性能的相关分析

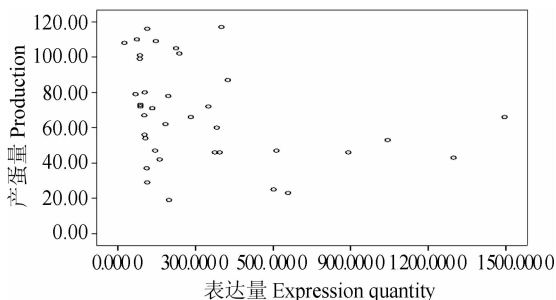
利用荧光实时定量 PCR 对 3 组草鸡 *PRL* 基因在下丘脑、垂体、输卵管、卵巢 4 个组织中的表达进行定量。结果表明就巢期鸡垂体 *PRL* 的表达量显著高于产蛋期鸡和恢复期鸡 ($P < 0.05$), 而产蛋期鸡和恢复期鸡之间无显著差异 ($P > 0.05$)。在下丘

脑、输卵管和卵巢 3 个组织中 3 组个体之间的表达量差异不显著 ($P > 0.05$) (表 4)。

对雪山草鸡垂体 *PRL* 基因的表达与繁殖性能的相关分析表明: *PRL* 基因的表达量与产蛋量呈负相关, 相关系数为 -0.328 (图 2), 说明表达量越高产蛋量越低。

表 4 3 组草鸡在 4 个组织中 *PRL* 基因的表达量Table 4 Abundance of *PRL* mRNA in various tissues

	产蛋期 Laying period	就巢期 Broodiness period	恢复期鸡 Nonovulatory period
下丘脑 Hypothalamus	0.421 5 \pm 0.477 9 ^a	0.924 1 \pm 2.281 9 ^a	0.928 7 \pm 1.331 3 ^a
垂体 Pituitary	225.011 5 \pm 212.569 9 ^b	532.965 7 \pm 427.1211 ^a	216.820 7 \pm 278.816 3 ^b
输卵管 Oviduct	0.001 9 \pm 0.004 9 ^a	0.054 6 \pm 0.235 4 ^a	0.000 3 \pm 0.000 6 ^a
卵巢 Ovarian	0.007 0 \pm 0.018 7 ^a	0.038 7 \pm 0.107 8 ^a	0.029 8 \pm 0.080 0 ^a

图 2 *PRL* 基因表达量与繁殖性能相关分析散点图Fig. 2 *PRL* gene expression quantity and reproduction performance correlation analysis scatter diagram

3 讨论

家禽发生就巢会导致家禽卵巢和输卵管的退化, 使产蛋率下降。就巢结束后需要很长时间才能恢复体质并重新恢复产蛋, 有的母禽甚至丧失繁殖能力, 严重的影响了产蛋性能。通过本试验的前期饲养观察发现有少数就巢母鸡在结束就巢行为后相当长的时间内仍没有恢复产蛋, 已丧失繁殖能力。而从 3 组试验个体的产蛋情况来看, 产蛋期的产蛋量远大于出现就巢的就巢期和恢复期, 差异极显著

($P < 0.01$)。姜润深^[1]研究发现母鸡就巢 1 次其年产蛋量平均下降 10% 左右。有的禽类在一个产蛋期内多次就巢, 对产蛋量的影响更大。

禽类就巢行为的发生和维持是受下丘脑-垂体-性腺轴所调控的, 施振旦等^[11]认为禽类就巢发生控制的神经内分泌和内分泌理论是: 产蛋期卵泡分泌大量雌激素 (ESTR) 和孕酮 (PROD), 这些激素使下丘脑 5-羟色胺 (5-HT) 和多巴胺 (DA) 活性增强, 促进下丘脑合成并释放血管活性肠肽 (VIP), 后者促进垂体前叶分泌催乳素 (PRL)。催乳素使母禽表现出就巢行为同时抑制促性腺激素 (FSH 和 LH) 的分泌和直接抑制卵巢活动, 使就巢时卵巢萎缩产蛋停止。通过本试验我们对性腺轴上 4 个器官 *PRL* 表达量的定量分析结果来看, 垂体中 *PRL* 的表达量极显著的高于其它 3 个器官 ($P < 0.01$)。这说明作为 *PRL* 最主要的分泌器官的垂体其中 *PRL* 的表达分泌对就巢的发生起主要的作用。而在下丘脑、卵巢和输卵管上虽然都有 *PRL* 的表达, 但其表达量极显著低于垂体的表达量, 而且在这 3 个组织中 3 组个体之间的表达差异也并不显著 ($P > 0.05$), 结合它们在性腺轴上的作用来看, 这 3 个器官 *PRL* 的表达对就巢的发生不起主要作用。

Wong 和 Karatazs 等^[12-13]研究发现火鸡在就巢期间垂体中 PRL mRNA 的表达量保持在一个较高的水平,一直到就巢结束;Talbot 和 Shimada 等^[14-15]在矮脚鸡上的研究也得到了相同的结果。本试验通过对我国地方品种雪山草鸡的研究发现就巢期鸡垂体中 PRL 基因的表达量显著高于产蛋期和恢复期个体($P < 0.05$)。而且通过垂体 PRL 的表达与繁殖性能的相关分析来看:PRL 基因的表达量与产蛋量呈负相关,相关系数为 -0.328 ,表明 PRL 表达量越高产蛋量越低。姜润深^[1]通过检测绿壳蛋鸡就巢和生产个体间血浆中 PRL 的水平并将其与繁殖性能作相关分析也得到了相似的结果。林福忠^[16]研究番鸭就巢及生殖激素变化规律发现:番鸭就巢期血浆 PRL 的浓度水平($0.68 \pm 0.11 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)极显著高于恢复期浓度水平($0.33 \pm 0.04 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($P < 0.01$),恢复期血浆 PRL 的浓度水平虽然在短时期内仍有一些轻微的波动,但基本维持一个较低水平。本研究发现就巢期鸡在恢复期以后虽然还没有恢复正常产蛋,但其垂体 PRL mRNA 的表达量已经快速降低,和正常生产个体间无显著差异($P > 0.05$),其变化趋势和林福忠^[16]的研究结果比较相似。

就巢性的遗传机制长期以来一直困惑着研究者,影响就巢性状的基因有多少,它们分别是什么基因更是一直存在争议。催乳素是就巢关键因素的结论来自对就巢禽 PRL 的变化规律以及外源 PRL 的注射诱导就巢的研究。本试验从 mRNA 角度进一步证实了催乳素对抱性的发生和维持有重要的作用,而且 PRL 基因可以作为影响抱性的重要候选基因。

参考文献:

- [1] 姜润深. 鸡 PRL、PRLR 和 POU1F1 基因变异对繁殖及 POU1F1 对生长性状的遗传效应[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [2] 章孝荣, 程茂基. 禽类生殖调控特点[M]// 动物生殖调控. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 169-174.
- [3] 施振旦, 陈 峰, 毕英佐. 禽类就巢发生和调控研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖, 2000, (3): 37-41.
- [4] 施振旦, 梁少东, 毕英佐. 下丘脑 5-羟色胺和多巴胺调控鸡就巢机理的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 31 (6): 487-492.
- [5] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, et al. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptorknockout mice[J]. *Endocrinology Review*, 1998, 19:225-268.
- [6] VINCENT G, NADINE B, PHILIPPE T, et al. Prolactin: The new biology of an old hormone[J]. *Annual Review of Physiology*, 2002, 64:47-67.
- [7] 李莹辉, 汪琳仙, 杨传任. 催乳素调节鸡卵泡膜细胞功能的机理[J]. 中国兽医学报, 1998, 18:77-80.
- [8] PETER J S, DOMINIQUE B. A neuroendocrine model for prolactin as the key mediator of seasonal breeding in birds under long-and short-day photoperiods1,2[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2003, 81(4):350-358.
- [9] YOUNGREN O M, EL HALAWANI M E, SILSBY J L, et al. Intracranial prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens[J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 44:425-431.
- [10] MARCH J B, SHARP P J. Effect of active immunization against recombinant-derived chicken prolactin fusion protein on the onset of broodiness and photoinduced egg laying in bantam hens[J]. *Reproduction and Fertility*, 1994, 101:227-233.
- [11] 施振旦, 朱基美. 血管活性肠肽(VIP)与禽类就巢[J]. 养禽与禽病防治, 1997, 6:43.
- [12] WONG E A, FERRIN N H, SILSBY J L, et al. Cloning of a turkey prolactin cDNA: Expression of prolactin mRNA throughout the reproductive cycle of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 83: 18-26.
- [13] KARATAZS C. Cloning, characterization and expression of the prolactin gene in the domestic Turkey[D]. *Meleagris gallopavo*. Ste Anne de Bellevue, PQ, Canada: McGill University, 1993.
- [14] TALBOT R T, HANKS M C, STERLING R J, et al. Pituitary prolactin messenger ribonucleic acid levels in incubating and laying hens: effects of manipulating plasma levels vasoactive intestinal polypeptide[J]. *Endocrinology*, 1991, 129:496-502.
- [15] SHIMADA K, ISHIDA H, SATO K, et al. Expression of prolactin gene in incubating hens[J]. *Reprod Fertil*, 1991, 91:147-154.
- [16] 林福忠. 番鸭就巢、生殖激素变化规律及 PRL 基因微卫星多态性[D]. 福建: 福建农林大学, 2005.