

# 麦洼牦牛 *PRL* 基因多态与产奶性状的关联分析

李铸<sup>1</sup>, 何世明<sup>1\*</sup>, 吴锦波<sup>1</sup>, 艾鷲<sup>2</sup>, 蹇尚林<sup>3</sup>, 刘建<sup>1</sup>, 雍军<sup>1</sup> (1. 阿坝藏族羌族自治州畜牧科学技术研究所, 四川红原 624402; 2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川成都 610041; 3. 阿坝藏族羌族自治州畜牧工作站, 四川马尔康 624099)

**摘要** 研究旨在了解麦洼牦牛催乳素(*PRL*)基因的单核苷酸多态性(SNP), 探究与牦牛产奶性能相关的分子标记。通过对 PCR 产物进行直接测序筛选麦洼牦牛 *PRL* 基因的 SNP 位点, 运用 DNAMAN 和 SPSS 等软件对 *PRL* 基因型与产奶性状进行了统计分析。结果表明, 位于 *PRL* 基因 996 bp 处发现一个疑似 SNP 位点, 该位点 T 碱基缺失突变; 对比麦洼牦牛不同 *PRL* 基因型的产奶性状, 突变型个体的 153 d 产奶量、乳蛋白质量、乳糖率和乳中的体细胞数均下降 ( $P>0.05$ ), 而乳脂率则显著升高 ( $P<0.05$ ), 暗示该处碱基 T 碱基缺失对乳中脂肪含量有显著影响。

**关键词** 牦牛; *PRL* 基因; SNPs; 产奶性状; 关联分析

中图分类号 S823.8<sup>+</sup>5 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)18-0108-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.18.028



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Correlation Analysis on Polymorphism of Prolactin Gene with Milk Performance Traits in Maiwa Yak

LI Zhu, HE Shi-ming, WU Jin-bo et al (Institute of Animal Science and Technology of Aba Tibetan and Qiang Autonomous Prefecture, Hongyuan, Sichuan 624402)

**Abstract** In order to study the single nucleotide polymorphism (SNP) of the Maiwa yak prolactin gene and to explore the molecular markers related to milk performance traits of yak. We used the direct PCR sequencing method to screen the SNPs, and analyzed the correlation between prolactin genotype and milk performance traits by employing statistical softwares such as DNAMAN and SPSS. The results showed that we found one SNP site which located at 996 bp of prolactin gene and it's T-base deletion mutation at this site. By comparing the milk performance traits of different prolactin gene types, the 153 d milk yield, lactoprotein, milk sugar and somatic cell number in milk of mutant individuals were lower than normal genotype individuals ( $P>0.05$ ), while the milk fat increased significantly ( $P<0.05$ ). It was suggested that the absence of T-base had a significant effect on the fat content of Maiwa yak milk.

**Key words** Maiwa yak; Prolactin gene; Single nucleotide polymorphism; Milk performance traits; Correlation analysis

麦洼牦牛属于草地型牦牛, 主产于位于川、甘、青 3 省结合部的四川省红原县麦洼、瓦切乡和若尔盖县包座乡等地区, 中心产区在红原县麦洼地区, 在周边的黑水县、阿坝县、壤塘县、九寨沟县和松潘县等地区也有分布<sup>[1]</sup>。麦洼牦牛是青藏高原的地方优良品种, 具备乳、肉兼用的种质特性, 已被列入《中国牛品种志》和《四川家畜家禽品种志》<sup>[2]</sup>。我国现有饲养量约 170 万头, 占全国牦牛总数的 11%, 具有适应性好、产乳性好、乳脂率高和驮力大等优点, 不仅是我国著名奶肉兼用型地方优良品种, 还是牦牛遗传资源宝库中珍贵的种质资源和基因库<sup>[3]</sup>。

催乳素(prolactin, *PRL*)是由 199 个氨基酸残基组成的一种蛋白质, 由腺垂体分泌, 其主要功能是促进乳腺发育, 引起和维持泌乳。牦牛 *PRL* 基因全长为 9 647 bp, 可转录出 X1、X2 和 X3 三型催乳素, 其中 X1 型和 X2 型催乳素基因均由 5 个外显子组成, 而 X3 型催乳素基因由 4 个外显子组成。*PRL* 通过与靶细胞膜表面的催乳素受体结合, 启动 JAK2/STAT5 信号转导途径, 最终激活反式作用因子 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<sup>[4]</sup>。此外, *PRL* 基因还在个体生殖生理调控、应激反应、免疫活动及渗透压调节、神经系统信号传递等方面具有一定的作用, 被认为是对奶牛泌乳性能具有重要作用的候选基因。

近年来研究发现, 催乳素基因对哺乳动物的乳腺发育和

泌乳具有影响作用, 尤其是与产奶量和乳成分呈正相关, 因此成为学者们的研究热点。例如, 在 *PRL* 基因全序列克隆方面, 有学者采用 Long PCR 等方法克隆得到全长 9 388 bp 的牛催乳素基因组序列<sup>[5]</sup>, 而后利用亚克隆的方法构建该基因组的 pcDNA3.1(+)/bPRL 重组表达载体并转染 COS-7 细胞, 结果通过 RT-PCR 成功扩增到了预期目的片段, 证实了该基因组 DNA 在转录水平上的生物学功能<sup>[6]</sup>; 有学者以 *PRL* 基因外显子为研究对象, 分别对第 2<sup>[7]</sup>、第 3<sup>[8]</sup> 和第 4<sup>[9]</sup> 这 3 个外显子的群体遗传特征进行了相应分析。而对于牛 *PRL* 基因与泌乳性状之间的相关性, 学者们也进行了大量的研究, 有学者综述了 *PRL* 的结构与功能、基因定位及作用机制、*PRL* 上的 SNPs 与产奶性状关系等几个方面的内容<sup>[10]</sup>; 有学者采用 PCR-RFLP 技术检测分析了荷斯坦奶牛催乳素基因的多态性, 结果检测到 AA、AB、BB 这 3 种基因型<sup>[11]</sup>; 国外学者如 Mehmannaavaz 等<sup>[12]</sup>、Alfonso 等<sup>[13]</sup> 研究也证实 *PRL* 基因与产奶性状之间具有很大相关性。

目前已有对麦洼牦牛基因 SNPs 的部分研究, 但对 *PRL* 基因单核苷酸多态性的研究还鲜见报道。近年来, 阿坝州畜牧科学技术研究所与西南民族大学、四川省草原科学研究院、阿坝州畜牧工作站等单位合作, 在红原县开展麦洼牦牛高产奶新品系选育工作。笔者以 PCR 法和测序法研究牦牛催乳素基因单核苷酸多态性, 探讨与牦牛产奶性状之间的相关性, 旨在为麦洼牦牛高产奶品系选育工作提供参考和为进一步确定催乳素基因功能奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 于阿坝州红原县玛莎村、热多村和泽木科 3 个区

**基金项目** 四川省科技厅科技支撑计划项目(2015FZ0024)。

**作者简介** 李铸(1991—), 男, 四川南充人, 助理畜牧师, 硕士, 从事畜禽遗传育种研究。\* 通信作者, 推广研究员, 从事畜禽推广研究。

**收稿日期** 2019-04-22

域随机抽取活泼健康、体形正常的 2~4 胎次母牦牛 49 头,并记录其耳号。于 2017 年 6—10 月清晨牧民挤奶时测定日挤奶量,每 10 d 测定一次,指标测定和记录均分别由专人进行。挤奶量测定期间同时采用无菌注射器采集麦洼牦牛血样,共取得血样 49 份,盛装于无菌 15 mL 离心管中。血样现场暂存于冰盒中,后保存于  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中待用。

**1.2 主要试剂** 血液基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit, 50preps 离心柱型) 产自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 反应体系配制使用的  $2\times\text{Taq}$  PCR Mastermix 购自天根生化科技(北京)有限公司;Trizma base, Biotic acid 和 EDTA 等试剂均产自 VETEC 公司;核酸染料 Goldview 购自博奥拓达科技(北京)有限公司。

**1.3 DNA 提取和检测** 采用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取麦洼牦牛血样 DNA。血样于  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出后放置于水中解冻,再按照 DNA 提取试剂盒中提供的说明书步骤进行操作,提取 DNA 产物放置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。制备 1% 琼脂糖凝胶,用移液枪吸取  $1\text{ }\mu\text{L}$  的  $6\times\text{Loading buffer}$ , 与  $4\text{ }\mu\text{L}$  DNA 产物在 PE 手套上混匀,再吸取混匀后的液体加入琼脂糖凝胶板上的点样孔内,旁边点上 Marker DNA  $4\text{ }\mu\text{L}$ , 121 V 条件下电泳 40 min,再通过照胶仪于紫外光下检测 DNA 纯度,对有杂带或纯度不高的样品重新提取血液 DNA 并进行检测。

**1.4 引物合成和 PCR 扩增** 参考文献[9]中对水牛 *PRL* 基因多态性的研究,设计一对引物序列用于样品中 *PRL* 基因的扩增,引物序列为 F:  $5' - \text{AAGCCTTTTACATTATTTCAACCC} - 3'$ , R:  $5' - \text{AATFCTCTGACCTCA AGCCACTCT} - 3'$ , 引物由上海英潍捷基公司合成。PCR 扩增产物长度为 1 103 bp。

PCR 反应体系  $25\text{ }\mu\text{L}$ ; 包括 DNA 模板  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 上下游 Primer 各  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $2\times\text{Taq}$  PCR Mastermix (含染料)  $12.5\text{ }\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。制备 1% 琼脂糖凝胶,PCR 反应结束后取  $5\text{ }\mu\text{L}$  产物电泳 40 min 后,于紫外灯下观察其扩增结果。合格 PCR 产物保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中,以待测序。

**1.5 SNP 筛选和序列分析** 按照测序要求准备 PCR 产物及引物,直接寄送英潍捷基贸易有限公司(广州实验室)进行双向测序。测序返回的正反向序列,运用 DNAMAN 5.0 对扩增序列的测序结果与 NCBI 上参考目的片段序列进行比对并校正拼接;使用 Chromas 软件对测序峰图进行分析,筛选获得 SNPs 位点。

**1.6 统计分析** 运用 DNAMAN 5.0 对序列进行校正和比对分析,测序峰图采用 Chromas 软件进行分析,利用 SPSS 21.0 软件比较样本类群间 2 种基因型和产奶量之间的关联性,并进行显著性检验 ( $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异)。

## 2 结果与分析

**2.1 麦洼牦牛基因组 DNA 提取与检测** 采用紫外分光光度计对提取的麦洼牦牛血液基因组 DNA 进行纯度检测,浓

度均在  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$  以上, DNA 样品测定的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值均在 1.6~1.8, 符合要求。经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 在紫外灯照射下基因组 DNA 条带明亮单一, 表明所提 DNA 样品浓度质量好, 可以用于展开后续的 PCR 试验。

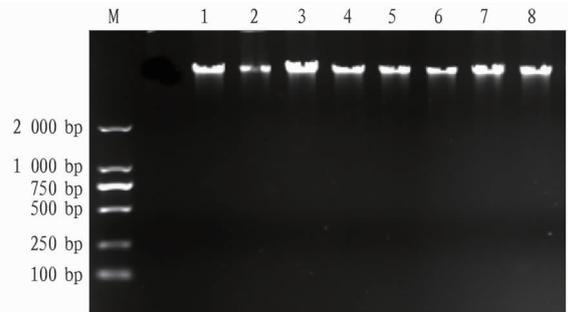


图 1 牦牛基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 The agarose gel electrophoretogram of genome DNA in yak

**2.2 牦牛 *PRL* 基因 PCR 扩增产物检测** 根据设计引物对麦洼牦牛 *PRL* 基因的 5' 侧翼调控区序列进行扩增, 扩增出的麦洼牦牛 *PRL* 基因序列长度为 1 103 bp, 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯照射下结果均和目的片段大小相一致, 条带单一且清晰(图 2), 可用于测序分析。

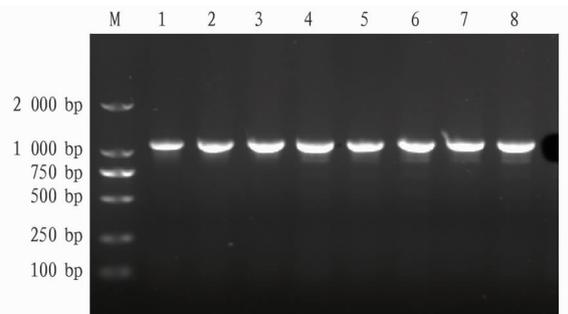


图 2 PCR 克隆产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The agarose gel electrophoretogram of PCR cloning product

**2.3 牦牛 *PRL* 基因 SNPs 的筛查和检测** 扩增产物经胶回收纯化后进行正反双向测序, 均由测序公司完成。采用 DNAMAN 5.0 软件拼接原始序列, 并对测序峰图进行分析, 共筛查到 1 个疑似 SNP 位点, 位于目标基因序列的 998 bp 处, 正常序列为  $5' - \text{ATGAAATG} - 3'$ , 突变序列为  $5' - \text{A}_\text{GAAATG} - 3'$ , 该处碱基 T 缺失。进一步比对全部样本的测序结果, 共计 29 个样本中发现了该位点处 T 碱基缺失, 初步确定为 SNP 位点。

**2.4 *PRL* 基因多态性与牦牛泌乳性状的相关性** 将所有样本按照突变型(T 碱基缺失)和正常型分为 2 组, 对 2 种基因型下牦牛 153 d 产奶量、乳脂、乳蛋白、乳糖和体细胞数等进行相关分析。表 1 显示了 *PRL* 基因不同基因型对麦洼牦牛产奶性状的影响。从表 1 可以看出, 经检验分析, 2 种基因型下牦牛产奶性状存在一些差异, 部分指标差异显著 ( $P < 0.05$ )。具体而言, T 碱基缺失后, 麦洼牦牛 153 d 产奶量、乳蛋白质率、乳糖率和乳中的体细胞数均呈降低趋势, 但经显著性检验后差异并不显著 ( $P > 0.05$ ), 特别的, 乳脂率在 *PRL* 基因 998 bp 处 T 碱基缺失后显著升高了 ( $P < 0.05$ ), 暗示该

处 T 碱基缺失对乳中脂肪含量有显著影响。

表 1 不同 PRL 基因型的牦牛产奶性状比较

Table 1 Comparison of the milk production traits between different PRL genotypes of Maiwa yak

基因型 Genotype	样本数量 Number	153 d 产奶量 153 d milk yield//kg	脂肪 Fat %	乳蛋白质 Lactoprotein %	乳糖 Milk sugar %	体细胞数 Somatic number 万个/mL
T 碱基缺失 T base deletion	29	447.62±70.58 a	6.00±1.39 a	3.42±0.18 a	5.44±0.26 a	38.73±17.85 a
正常 Normal	20	470.77±81.90 a	5.21±1.07 b	3.48±0.13 a	5.56±0.18 a	44.53±18.85 a

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different small letters within the same column mean significant differences( $P<0.05$ )

### 3 讨论

PRL 基因与乳脂等泌乳性状极度相关,也是奶牛产奶性状的主要候选基因,但目前对牦牛催乳素基因 SNPs 的研究还较少。该研究于阿坝州红原县搜集了 49 个麦洼牦牛的血样样本,并提取 DNA 和设计引物,再通过直接测序法筛选 PRL 基因的疑似突变位点,以期找出与麦洼牦牛泌乳性状相关的 SNPs。对测序结果分析后发现 29 个样本于 PRL 基因 996 bp 处 T 碱基突变缺失,且该位点突变对牦牛产奶性状有显著影响,但目前该种基因型的个体数量较少,因此在后续的研究中有必要进一步扩大样本群体来加以验证。经统计分析,这种 T 碱基突变型对乳脂的含量有显著影响,因此有可能作为影响麦洼牦牛产奶性状的一个重要候选基因型进行分子遗传标记,进而应用到麦洼牦牛高产奶群的选育工作中。

### 参考文献

- [1] 李世林, 罗光荣, 肖敏, 等. 不同特征麦洼牦牛生产性能分析[J]. 草业与畜牧, 2014(3): 30-32.
- [2] 钟金城, 陈智华, 赵素君, 等. 牦牛生态类型的分类[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2068-2072.

(上接第 94 页)

- [4] YU H Q, CAI X Q, LIN Z X, et al. Rapid and specific detection of porcine parvovirus using real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) analysis[J]. BMC Veterinary Research, 2015, 11: 1-5.
- [5] SU Q L, LI B, ZHAO W et al. Complete genome sequence of porcine parvovirus N strain isolated from Guangxi, China[J]. Genome announcements, 2015, 3(1): 1359-1364.
- [6] MA X, GUO Z H, SHEN Z Q, et al. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig[J]. Cellular immunology, 2011, 270(1): 13-18.

- [3] 师方, 柴志欣, 罗晓林, 等. 麦洼牦牛的随机扩增多态性 DNA 遗传多样性分析[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(2): 5-10.
- [4] FREEMAN M E, KANYICSKA B, LERANT A, et al. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion[J]. Physiological reviews, 2000, 80(4): 1523-1631.
- [5] 曹新, 王强, 颜景斌, 等. 牛催乳素基因组及其 cDNA 全长序列的分子克隆和分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 768-773.
- [6] 曹新, 曾溢泓. 牛催乳素基因组全序列的克隆及在真核细胞中的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2003, 23(2): 112-115.
- [7] 袁峰, 苗永旺, 王绍卿, 等. 家养水牛催乳素基因外显子 2 多态性及其群体遗传特征[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(6): 5-10.
- [8] 胡修忠, 周木清, 李邦佑, 等. 奶牛催乳素基因多态性与产奶量的关系[J]. 中国奶牛, 2007(S1): 98-100.
- [9] 袁峰, 苗永旺, 李大林, 等. 12 个水牛群体催乳素基因第 4 外显子遗传特征分析[J]. 动物学研究, 2010, 31(6): 575-580.
- [10] 贾祥捷, 李秋玲, 王长法, 等. 牛催乳素基因及其单核苷酸多态性与产奶性状关系的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 148-152.
- [11] 郑新宝, 唐倩, 徐世永, 等. 中国荷斯坦奶牛催乳素基因多态性与泌乳性能关联性分析[J]. 中国牛业科学, 2015, 41(3): 38-41.
- [12] MEHMANNAVAZ Y, AMIRINIA C, BONYADI M, et al. Effects of bovine prolactin gene polymorphism within exon 4 on milk related traits and genetic trends in Iranian Holstein bulls[J]. African journal of biotechnology, 2009, 8(19): 4797-4801.
- [13] ALFONSO E, ROJAS R, HERRERA J C, et al. Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle[J]. African J Biotech, 2012, 11(29): 7338-7343.
- [7] 张超范, 崔尚金, 戚亭, 等. 猪细小病毒细胞适应株的培育及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 362-366.
- [8] 张婉华, 邹勇, 朱永军, 等. 猪细小病毒 HA, HI 微量法试验的优化[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 21-23.
- [9] 张道华, 张雪花, 唐波, 等. 猪细小病毒灭活疫苗 NJ 株毒种分离及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 99-103.
- [10] 石慧颖, 丁志芬, 常振彦. 流行性乙型脑炎病毒在 vero 细胞上传代适应的研究[J]. 中国病毒学, 1995, 10(4): 273-277.
- [11] 徐涤平, 段正赢, 刘泽永, 等. 猪乙型脑炎减毒活疫苗毒株的选育研究[J]. 动物医学进展, 2002, 23(3): 60-63.