

韩 雪,朱丽莉,栗朝芝,等. 长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因的克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):82-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.021

长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因的克隆及序列分析

韩 雪,朱丽莉,栗朝芝,吴松成,陶宇航
(贵州省畜牧兽医研究所,贵州贵阳 550005)

摘要:采用特异性引物 PCR 技术获得长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因,将其克隆至 pGM-T 载体,并对该序列进行测序分析。结果表明,长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因全序列长度为 690 bp,包含 5 个外显子和 4 个内含子,编码 229 个氨基酸。将长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因与 GenBank 已公布的鸡、鸭、鹅、鱼等动物的 *PRL* 基因序列进行同源性比较,发现亲缘关系越远则同源性越低。

关键词:长顺绿壳蛋鸡;催乳素基因;克隆;序列分析

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0082-03

催乳素 (prolactin, PRL) 是动物垂体前叶嗜酸细胞分泌的一种多肽类激素,对哺乳动物的乳腺发育、泌乳、卵巢功能、维持妊娠、机体免疫等具有重要的生物学效应^[1]。在家禽中, PRL 是促进母禽就巢孵卵行为和调控生殖活动的关键激素^[2],就巢期间 PRL 表达量升高可抑制垂体促性腺激素的分泌,致使卵巢萎缩,排卵泡停止,最终终止产蛋^[3]。很多物种 *PRL* 基因的 cDNA 或基因全序列已被测定,其转录产物在不同物种中高度保守。对人、鸡、鸭、鹅等动物的研究表明, *PRL* 基因由 5 个外显子和 4 个内含子构成。禽类 PRL 前体含 229 个氨基酸,其中包括 30 个氨基酸的信号肽序列和 199 个氨基酸的 PRL 成熟蛋白^[4]。

长顺绿壳蛋鸡因其产地地处贵州省长顺县而得名,是中国稀有的珍禽品种。长顺绿壳蛋鸡是在贵州省特定自然生态环境下,经长期自然选择和人工选择而形成的品种,具有耐粗饲、抗病力强、觅食能力强等特点。然而,长顺绿壳蛋鸡产蛋量低、就巢性强,严重限制了其产业化发展。以长顺绿壳蛋鸡为研究对象,克隆其催乳素基因并进行测序分析,为长顺绿壳蛋鸡品种资源的保护利用及其产蛋性能的提高提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

血样采自贵州省长顺县长寨镇新民村长顺绿壳蛋鸡纯种繁殖场,翅静脉采血,共采取 30 羽长顺绿壳蛋鸡的血样。所有母鸡均在相同环境下单笼饲养,采取的血样经 EDTA 抗凝

剂抗凝,送至实验室于 -20 ℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取血样中的 DNA。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 已公布的禽、鼠等 *PRL* 基因序列,采用 Primer 5.0 软件在序列保守区设计引物,引物序列见表 1,由北京鼎国生物技术有限公司合成。

| 表 1 引物序列 | |
|----------|-----------------------------------|
| 引物编号 | 引物序列 |
| PRLexon1 | F:5'-TCITTTCTGTTAGAGCAAGTCATC-3' |
| | R:5'-CTGGTGTGTGGGTAGTGGA-3' |
| PRLexon2 | F:5'-AGTCAGCACATCGGGTACT-3' |
| | R:5'-CTTGACCCCTGGAGACATTCA-3' |
| PRLexon3 | F:5'-GTCTCCAGGGGTCAAGCAAT-3' |
| | R:5'-TGATGCTTTCCTCTTCTCTGGC-3' |
| PRLexon4 | F:5'-TAAGATAGGGCTGTAGGGAGCA-3' |
| | R:5'-AAATAGAGAGATCCAGTCCCTTCAC-3' |
| PRLexon5 | F:5'-CACTTTGCAGAACAAAGGGAGAC-3' |
| | R:5'-CACACAAGCATGCCTGAAAGT-3' |

1.2.3 PCR 扩增与测序 50 μL PCR 反应体系为 10 × PCR Buffer 5 μL、dNTP (10 μm) 1 μL、Template 1 μL、primer - F (10 μm) 1 μL、primer - R (10 μm) 1 μL、rTaqDNA 聚合酶 (2 U/μL) 0.5 μL,最后采用 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,52~47 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 50 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。PCR 产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至北京鼎国生物技术有限公司进行克隆和测序。

1.3 数据处理

将 *PRL* 基因 5 个外显子片段进行拼接,并采用 GenBank 数据库进行 BLAST 分析。同时,将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列,确定正确的开放阅读框 (open reading frame, ORF);采用 DNAMAN 软件 (www.dnastar.com) 对长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因序列与 GenBank 数据库公布的其他动物 *PRL* 基因序列进行核苷酸、氨基酸序列同源性比较及生物信息学分析。

收稿日期:2015-10-13
基金项目:贵州省科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2011]2174);贵州省农业科学院研究生创新基金(编号:黔农科合[创新基金]2010011);贵州省动植物育种专项(编号:黔农育专字[2011]027);贵州省农业科学院专项(编号:黔农科院院专项[2014]006号)。
作者简介:韩 雪(1982—),女,江苏徐州人,硕士,助理研究员,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:hanxue8855601@126.com。
通信作者:陶宇航,副研究员,主要从事家禽养殖研究。E-mail:1043694421@qq.com。

2 结果与分析

2.1 长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因的 PCR 扩增

以长顺绿壳蛋鸡血总 DNA 为模板,利用 5 对特异引物分别进行 PCR 扩增,扩增产物与预期片段大小吻合,引物扩增结果见图 1。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

将重组质粒导入大肠杆菌,经过蓝白斑和抗性筛选,提取

阳性大肠杆菌并进行质粒提取,然后对质粒进行 *EcoR* I 酶切鉴定。结果表明,重组质粒构建成功,将阳性克隆送至北京鼎国生物技术有限公司测序,最后对其外显子序列进行拼接。

2.3 长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因的序列测定

序列测定结果(图 2)表明,长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因 cDNA 片段长 690 bp,共编码 229 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA。

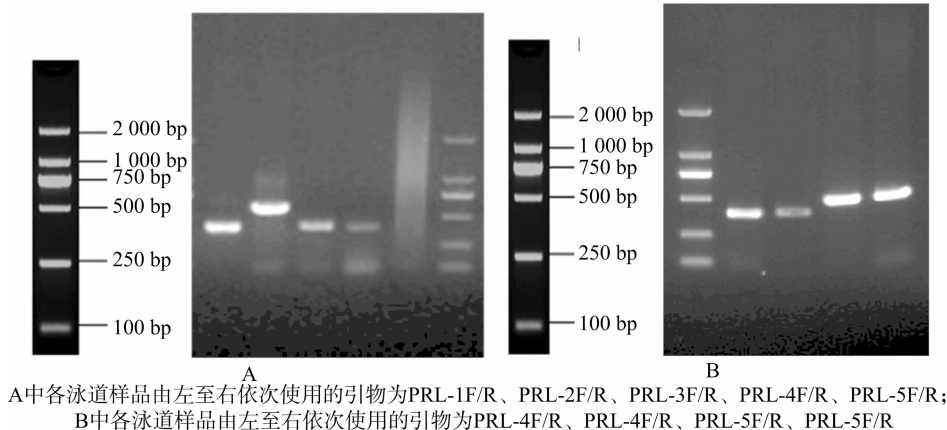


图1 PCR产物电泳结果

| | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | ATGAGCAACAGAGGGGCTTCATTGAAAGGTTTGTCTTCTGGCGGTTCTTCTGGTGTCCAACACACTTCTGACCAAG |
| 1 | M S N R G A S L K G L F L A V L L V S N T L L T K |
| 76 | GAAGGAGTGACTTCCCTGCCAATCTGCCCATTTGGATCAGTCAACTGCCAAGTTTCCCTTGGGGAACTTTTTGAT |
| 26 | E G V T S L P I C P I G S V N C Q V S L G E L F D |
| 151 | CGGGCAGTTAACTTTACACTACATACACTACCTCTCTTCAGAAATATTCAATGAATTTGATGAACGTTATGCT |
| 51 | R A V K L S H Y I H Y L S S E I F N E F D E R Y A |
| 226 | CAGGGTCGGGGTTTTCATTACAAAAGCTGTTAATGGCTGCCACACTTCCTCCTTAACCACTCCTGAAGATAAGGAG |
| 76 | Q G R G F I T K A V N G C H T S S L T T P E D K E |
| 301 | CAAGCTCAGCAGATTCATCATGAAGACCTACTGAATTTAGTAGTGGGAGTGCTGCGTTCTGGAATGATCCCCTG |
| 101 | Q A Q Q I H H E D L L N L V V G V L R S W N D P L |
| 376 | ATCCATCTGGCCTCTGAAGTGCAAAGAATCAAAGAAGCTCCAGATACCATTCTCTGGAAGGCTGTAGAGATTGAG |
| 126 | I H L A S E V Q R I K E A P D T I L W K A V E I E |
| 451 | GAGCAAAACAAGAGGCTTCTAGAAGGAATGGAGAAAATAGTTGGGCGGGTTTCATTCTGGTGATGCTGGAAATGAA |
| 151 | E Q N K R L L E G M E K I V G R V H S G D A G N E |
| 526 | ATTTACTCTCACTGGGACGGCCTTCCATCCCTGCAACTCGCTGATGAGGACTCCAGACTCTTTGCTTTTTATAAC |
| 176 | I Y S H W D G L P S L Q L A D E D S R L F A F Y N |
| 601 | CTGCTGCATTGCCTCCGAGAGATTCCCACAAAATCGACAACATATCTTAAAGTTTTGAAGTGCCGCCTAATCCAT |
| 201 | L L H C L R R D S H K I D N Y L K V L K C R L I H |
| 676 | GATAGCAATTGCTAA |
| 226 | D S N C * |

图2 长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因测序结果及其推导的氨基酸序列

2.4 *PRL* 基因核苷酸和氨基酸序列同源性比较

将长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因序列与 GenBank 数据库上获取的鸡、鸭、鹅、鱼等动物的 *PRL* 基因序列(表 2)进行同源性分析。由表 3 可知,禽类 *PRL* 基因编码区序列具有高度的保守性。其中,长顺绿壳蛋鸡与白来航、太和丝羽乌骨鸡、隐性白洛克的核苷酸序列同源性最高,为 99.9%;与尖嘴鲈的同源性最低,仅为 47.3%。氨基酸序列同源性比较可得到与核苷酸序列相似的结果。

2.5 系统发育分析

将 *PRL* 基因序列绘制进化树(图 3)。遗传进化分析表明,长顺绿壳蛋鸡与杨山鸡、太和丝羽乌骨鸡、白来航的亲缘关系较近,与人、鲤鱼、尖嘴鲈的亲缘关系较远。

3 结论与讨论

大多数研究者认为,*PRL* 是促进母禽就巢孵卵行为和调控生殖活动的关键激素^[5],过高和过低的催乳素均对卵泡发

表 2 不同物种的 *PRL* 基因序列号

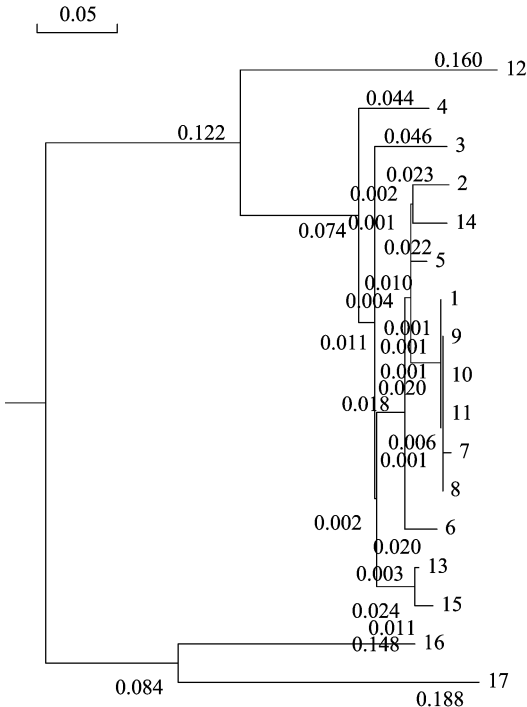
| 物种 | 登录号 |
|-----------------------------------------|------------|
| 原鸡 (<i>Gallus gallus</i>) | AF288765.2 |
| 白来航 (White leghorns) | AH013783.2 |
| 隐性白洛克 (White recessive rock) | AH013786.2 |
| 太和丝羽乌骨鸡 (Silkies) | AH013785.2 |
| 杨山鸡 (Yang pheasant) | AH013784.2 |
| 印度孔雀 (<i>Pavo cristatus</i>) | AB451556.1 |
| 鹌鹑 (<i>Coturnix coturnix</i>) | AB162003.1 |
| 火鸡 (<i>Meleagris gallopavo</i>) | U05952.1 |
| 中国鹅 (<i>Anser cygnoides</i>) | GQ856665.1 |
| 绿头鸭 (<i>Anas platyrhynchos</i>) | AB158610.1 |
| 虎皮鹦鹉 (<i>Melopsittacus undulatus</i>) | AB362879.1 |
| 珠鸡 (<i>Numida meleagris</i>) | AB451557.1 |
| 鸵鸟 (<i>Struthio camelus</i>) | AB362880.1 |
| 人 (<i>Homo sapiens</i>) | BC088370.1 |
| 鲤鱼 (<i>Cyprinus carpio</i>) | X52881 |
| 尖嘴鲈 (<i>Lates calcarifer</i>) | GU556216 |

表 3 长顺绿壳蛋鸡与其他动物 *PRL* 基因同源性比较

| 物种 | 核苷酸同源性 (%) | 氨基酸同源性 (%) |
|-----------------------------------------|------------|------------|
| 长顺绿壳蛋鸡 (Changshun blue - egg chicken) | 100.0 | 100.0 |
| 鹌鹑 (<i>Coturnix coturnix</i>) | 95.4 | 95.8 |
| 虎皮鹦鹉 (<i>Melopsittacus undulatus</i>) | 91.3 | 94.6 |
| 鸵鸟 (<i>Struthio camelus</i>) | 90.2 | 91.9 |
| 印度孔雀 (<i>Pavo cristatus</i>) | 96.9 | 96.9 |
| 珠鸡 (<i>Numida meleagris</i>) | 95.6 | 96.2 |
| 原鸡 (<i>Gallus gallus</i>) | 99.4 | 98.8 |
| 白来航 (White leghorns) | 99.9 | 100.0 |
| 杨山鸡 (Yang pheasant) | 99.6 | 100.0 |
| 太和丝羽乌骨鸡 (Silkies) | 99.9 | 100.0 |
| 隐性白洛克 (White recessive rock) | 99.9 | 100.0 |
| 人 (<i>Homo sapiens</i>) | 71.6 | 71.6 |
| 中国鹅 (<i>Anser cygnoides</i>) | 93.2 | 94.1 |
| 火鸡 (<i>Meleagris gallopavo</i>) | 95.4 | 92.8 |
| 绿头鸭 (<i>Anas platyrhynchos</i>) | 92.3 | 93.6 |
| 鲤鱼 (<i>Cyprinus carpio</i>) | 52.4 | 33.5 |
| 尖嘴鲈 (<i>Lates calcarifer</i>) | 47.3 | 33.3 |

育不利^[6]。Dawson 等研究发现,火鸡和鸽刚就巢时,PRL 显著升高以维持正常的孵化期^[7]。Reddy 等研究发现,催乳素水平与鸡的产蛋量呈负相关^[8-9]。PRL 必须通过受体作用于靶细胞,从而产生各种生理效应。目前,关于催乳素受体基因 (prolactin receptor, PRLR) 与家禽就巢性之间的相关性研究表明,二者间相关不显著^[10]。雌激素受体基因 (estrogen receptor, ER)、VIP、垂体特异转录因子 (pituitary - specific transcription factor, POU1F1) 基因等也会影响家禽就巢性,因此这些基因也是就巢性候选基因^[11]。虽然学者已对这些基因开展了大量研究,但均侧重于单基因研究,为揭示其就巢性机理,必须从 PRL 表达调控信号通道进行更系统的研究。

本研究表明,长顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因编码区序列全长为 690 bp,共编码 229 个氨基酸,基因推导的蛋白分子量为 29.122 ku,理论等电点 pI 为 5.94,表明编码肽链偏酸性。PRL 氨基酸残基二级结构由 41.58% α - 螺旋、14.34% β - 折叠、44.07% 无规卷曲 3 种结构组成。将克隆获得的长



1—长顺绿壳蛋鸡; 2—鹌鹑; 3—虎皮鹦鹉; 4—鸵鸟; 5—印度孔雀; 6—珠鸡; 7—原鸡; 8—白来航; 9—杨山鸡; 10—太和丝羽乌骨鸡; 11—隐性白洛克; 12—人; 13—中国鹅; 14—火鸡; 15—绿头鸭; 16—鲤鱼; 17—尖嘴鲈

图 3 *PRL* 基因核苷酸的系统进化树

顺绿壳蛋鸡 *PRL* 基因与 GenBank 数据库公布的鸡、鸭、鹅、鱼等动物的 *PRL* 基因序列进行同源性比较,发现长顺绿壳蛋鸡与禽类的同源性均高于 90%,氨基酸序列同源性高于 90%。与其他动物 *PRL* 基因相比较,发现亲缘关系越远则同源性越低。同源分析结果表明,禽类 *PRL* 基因编码区序列高度保守,可见物种分化以后,作为影响哺乳动物产乳性状的 PRL 发生了较大变异,这为 PRL 特性和作用机理的进一步研究以及哺乳动物产乳和繁殖性能的改良提供依据。

在禽类进化的过程中,家鸡、火鸡、鹌鹑首先发生分支,而鹅与鸭的分支则较晚,这与序列分析结果一致。由于起源与进化不同,长顺绿壳蛋鸡与原鸡、白来航、杨山鸡、太和丝羽乌骨鸡、隐性白洛克聚为一类,再与鹌鹑、火鸡、印度孔雀聚为一类,分支最外侧的为人、鲤鱼、尖嘴鲈。长顺绿壳蛋鸡、原鸡、白来航、杨山鸡等禽类与鱼类的亲缘关系相对较远,这与古生物学、形态学、生化遗传学、细胞遗传学以及其他 DNA 分子水平上的分类结果基本一致,这也佐证了 *PRL* 基因全序列适合用于研究动物种间系统进化关系。

参考文献:

[1] 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]. Endocrine Reviews, 1998, 19(3): 225 - 268.

[2] Elkins P A, Christinger H W, Sandowski Y, et al. Ternary complex between placental lactogen and the extracellular domain of the prolactin receptor [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2000, 7

徐志伟,赵杰,刘伟忠,等. 利用 hAPOA1 原核蛋白生产兔多克隆抗体[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):85-87.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.022

利用 hAPOA1 原核蛋白生产兔多克隆抗体

徐志伟¹, 赵杰², 刘伟忠¹, 刘照亭¹, 王期²

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212420; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘要:将 hAPOA1 的阅读框连接到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 构建成正确的 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒, 然后将其转入宿主菌 BL21, 经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后, 宿主菌表达出与预期分子量大小相符的 55.4 ku 的融合蛋白; 将纯化后的包涵体融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备抗 hAPOA1 血清并检测抗体效价。结果表明, 经间接酶联免疫吸附测定 (ID-ELISA) 及蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 方法证实, 获得的融合蛋白免疫新西兰大白兔得到了特异性的多克隆抗体, 抗体效价为 1:40 000, 经济效益可观。

关键词:hAPOA1; 原核表达; 新西兰大白兔; 融合表达; 多克隆抗体

中图分类号:S852.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0085-03

载脂蛋白 A1 (ApoA1) 是 apoA 族最多的一种组分, apoA1 为单一多肽链, 由 243 个氨基酸残基组成, 是高密度脂蛋白 (HDL) 的主要载脂蛋白, 不仅是生物试剂的重要原料, 也是抗动脉粥样硬化的指标^[1]。目前, apoA1 的检测多采用免疫比浊法^[2], 现有的抗载脂蛋白 A1 抗体的生产采用传统的免疫方式 (免疫原从高密度脂蛋白纯化得到, 免疫动物受限等), 产量、效价及特异性较差, 已无法满足日益增长的使用需求。本研究构建了 hAPOA1 的原核表达载体, 通过大肠杆菌原核表达系统进行 hAPOA1 的蛋白表达与纯化, 并通过免疫新西兰大白兔获得了抗血清, 为自主大规模生产抗 hAPOA1 抗体及后续的免疫检测试剂盒研发奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种和质粒 *E. coli* DH5 α 、表达载体 pGEX-4T-1、

收稿日期:2016-08-11

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1326]。

作者简介:徐志伟(1965—), 男, 江苏常州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽养殖研究。E-mail: xzw1729@sina.com。

通信作者:王期, 博士, 主要从事生物技术研究。E-mail: swwq0401@163.com。

(9):808-815。

[3] Chaiseha Y, Mohamed E, Halawani E L. Neuroendocrinology of the female turkey reproductive cycle[J]. Journal of Poultry Science, 2005, 42(2):87-100.

[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] Yen C F, Lin H W, Hsu J C, et al. The expression of pituitary gland genes in laying geese[J]. Poultry Science, 2006, 85(12):2265-2269.

[6] Larsen C M, Grattan D R. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors[J]. Brain Behavior and Immunity, 2012, 26(2):201-209.

[7] Dawson A, Sharp P J. The role of prolactin in the development of reproductive photorefractoriness and postnuptial molt in the European

E. coli BL21 (DE3) 均由笔者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Not* I、*Eco*R I 为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、核酸标准相对分子质量购自 TaKaRa 公司; 蛋白质分子量标准购自 MBI 公司; 蛋白胨和酵母粉购自英国 OXOID 公司; 氨苄青霉素购自 Ameresco 公司; IPTG 购自 Merck 公司; 丙烯酰胺 (Acr) 及甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 购自 Promega 公司; 四甲基乙二胺 (TEMED) 购自 BioRad 公司; 考马斯亮蓝 R-250 购自 Sanland 公司; 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 公司产品; Goat-Rabbit IgG-HRP 购自 Bioworld; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试验动物 本研究所用动物为健康的新西兰大白兔。

1.2 试验方法

1.2.1 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒的构建 根据人源的 hAPOA1 基因序列 (Gene ID:335) 设计引物, 5' 和 3' 端分别加入 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点。上游引物: 5'-CCG-GAATTCATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTT-3'; 下游引物: 5'-AAAGCGCCGCTCACTGGGTGTTGAGCTTCTTAGT-3'。以 hAPOA1 的全长 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增, 反应程序: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体分别经

starling (*Sturnus vulgaris*) [J]. Endocrinology, 1998, 139(2):485-490.

[8] Reddy I J, David C G, Sarma P V, et al. The possible role of prolactin in laying performance and steroid hormone secretion in domestic hen (*Gallus domesticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 127(3):249-255.

[9] 陈兴勇, 何艳, 时丹, 等. 皖西白鹅催乳素基因克隆、表达及主动免疫后就巢行为分析[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2014, 35(2):33-37.

[10] Jiang R, Xu G. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens[J]. Poultry Science, 2005, 84(6):839-845.

[11] 姜润深, 杨宁. 家禽垂体特异转录因子 POU1F1 研究进展[J]. 遗传学, 2004, 26(6):957-961.