

吴松成,韩 雪,陈 林,等. 百宜黑鸡 *PRLR* 基因多态性对产蛋性能的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):172–174.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2018.21.043

# 百宜黑鸡 *PRLR* 基因多态性对产蛋性能的影响

吴松成<sup>1</sup>, 韩 雪<sup>1</sup>, 陈 林<sup>2</sup>, 伍革民<sup>1</sup>, 粟朝芝<sup>1</sup>, 朱丽莉<sup>1</sup>, 陶宇航<sup>1</sup>

(1. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳贵州 550025)

**摘要:**以催乳素受体(*PRLR*)基因作为候选基因,对 95 羽相同饲养管理水平的百宜黑鸡 *PRLR* 基因外显子 3 和外显子 6 序列进行 PCR 扩增,采用 PCR 扩增产物直接测序方法对该基因的 SNP 位点进行筛选,同时对不同基因型与产蛋性能进行关联分析。结果表明,在百宜黑鸡 *PRLR* 基因的序列中只发现 1 个 SNP 位点,位于第 3 外显子 36 bp 位置发生了 C/T 突变,将该突变位点所对应的纯合子和杂合子分别定义为 CC 型和 CT 型,其中 CC 型为优势基因型个体,等位基因 C 为优势等位基因,该基因座不处于 Hardy–Weinberg 平衡状态,遗传参数分析发现该位点属于低度多态; 36C/T 位点与百宜黑鸡产蛋性能关联分析结果表明,任何一种基因型与产蛋性能间均不显著( $P>0.05$ )。

**关键词:***PRLR* 基因;多态性;产蛋性能;百宜黑鸡;基因型;PCR 扩增;关联分析;突变位点

**中图分类号:**S831.2      **文献标志码:**A      **文章编号:**1002–1302(2018)21–0172–02

催乳素(prolactin,PRL)是由腺垂体催乳素细胞合成和分泌的一种肽类激素,主要作用于动物的性腺和乳腺,催乳素与其受体(prolactin receptor,PRLR)结合后作用于靶细胞,调节繁殖相关激素的分泌,促进基因表达<sup>[1–3]</sup>。利用 *PRLR* 基因的作用机制,将其作为影响动物繁殖性能的候选基因有着重要意义。近年来,越来越多的研究者对催乳素受体基因进行大量报道,刘远等报道,*PRLR* 基因的优势基因型个体能够显著提高大白猪的窝产仔数<sup>[4]</sup>;张陈华等研究指出,*PRLR* 基因的多态性对圩猪和定远猪的产仔数有一定影响<sup>[5]</sup>;Tomas 等发现,*PRLR* 基因外显子突变能够显著影响猪的排卵率和仔猪存活率<sup>[6]</sup>;Chu 等认为,*PRLR* 基因与羊的产羔数相关<sup>[7–8]</sup>。但是以上的研究均是对家畜的研究报道,对于家禽的研究甚少。洪坤月报道,*PRLR* 基因多态性对鸡的早期平均蛋质量有一定的影响,而对开产日龄、蛋型指数、早期产蛋量等影响不显著( $P>0.05$ )<sup>[9]</sup>。百宜黑鸡是贵州省的优良地方品种,但由于近年来外来品种的引进,加之农户的粗放型饲养,人为因素过强地干预选育,百宜黑鸡品种资源岌岌可危。本试验以百宜黑鸡为研究对象,以期寻找有效的分子遗传标记,为该品种进一步的开发利用、保种等提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

百宜黑鸡由贵州省贵阳市乌当区百宜乡贵州农农生态农业开发有限公司的种鸡场提供。随机抽取同一日龄、相同饲养管理水平的 95 羽百宜黑鸡鸡翅静脉采血 5 mL/羽,EDTA 抗凝,放冰盒带回实验室,–20 ℃冰箱保存备用,用于

收稿日期:2017–07–19

基金项目:贵州省农业科学院专项(编号:黔农科院院专项[2014]038号)。

作者简介:吴松成(1966—),男,贵州荔波人,畜牧师,研究方向为家禽遗传育种。E–mail:13885151440@163.com。

通信作者:韩 雪,硕士,助理研究员,研究方向为动物遗传育种。E–mail:hanxue8855601@126.com。

基因组 DNA 提取。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 试验采用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]分别对 95 羽百宜黑鸡血液中基因组 DNA 抽提,并用 Thermo Fisher 微量紫外分光光度计对所获得的 DNA 进行浓度和纯度测定,1.0% 琼脂糖凝胶检测其完整性。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 根据 GenBank 发布的家鸡 *PRLR* 基因序列(登录号:NC\_006127.4),利用引物设计软件 Primer 5.0 对鸡 *PRLR* 基因设计 2 对特异性引物,分别对外显子 3(*PRLR*–1)和外显子 6(*PRLR*–2)进行扩增,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物信息见表 1。PCR 扩增反应采用 30 μL 体系:上、下游引物各 2 μL,DNA 模板 3 μL,2 × *Taq* PCR Master Mix 14 μL,双蒸水 9 μL。反应程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 40 s,退火 35 s(退火温度详见表 1),72 ℃延伸 40 s,32 个循环;72 ℃终延伸 10 min。

表 1 百宜黑鸡 *PRLR* 基因扩增引物详细信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>PRLR</i> –1	F:GCTGAACGCTACATCCCTTT R:ACCTAGTTTCTACCCCCCTG	310	61.0
<i>PRLR</i> –2	F:TCCCTCTTTCTTTCTGG R:CTGTTTTGGCTTCTTTCC	362	55.6

### 1.3 数据处理

利用 Excel 2007 对数据进行分类统计,DNAstar 进行序列分析比对,用 SPSS 18.0 中 GLM 模型对不同基因型与产蛋性能间的关联性进行相关分析,结果以“平均值 ± 标准差”体现。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物检测

以百宜黑鸡基因组 DNA 为模板,分别对 2 对引物进行 PCR 扩增,产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测,结果发现,目的条

带与预期结果一致,且引物特异性良好,PCR 产物无须纯化可直接用于测序(图 1)。

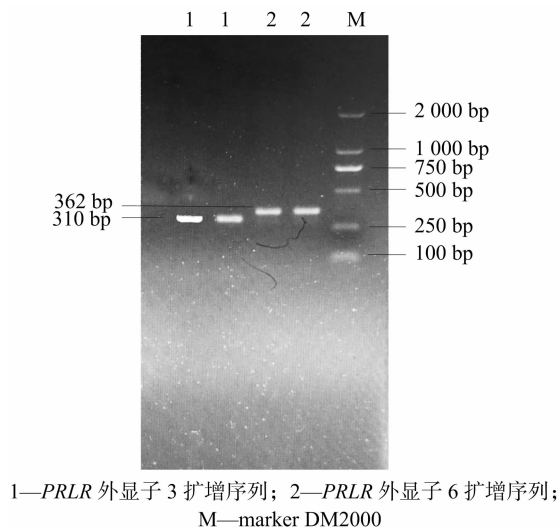


图1 *PRLR* 基因电泳检测

## 2.2 PCR 产物测序及序列分析

根据目的片段扩增结果,将 PCR 产物全部送往北京诺赛基因组研究中心有限公司进行直接测序。测序结果经 DNASTar 拼接并与 GenBank 发布的家鸡 *PRLR* 基因序列进行校正、比对,结果在试验群体的 *PRLR* 基因中发现只存在 1 个 SNP 位点(图 2),在百宜黑鸡 *PRLR* 基因外显子 3 的 36 bp 位

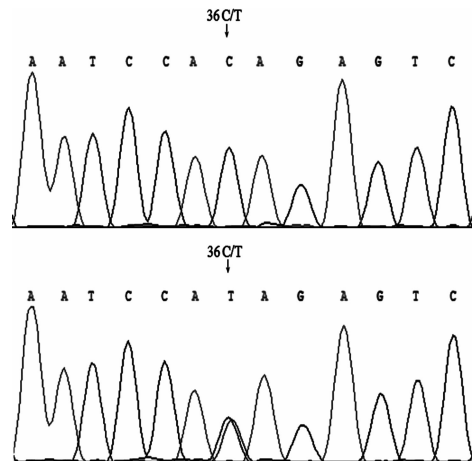


图2 百宜黑鸡 *PRLR* 基因突变位点测序

置发生了 C/T 突变(36C/T),然而外显子 6 区域并未找到突变位点。

## 2.3 百宜黑鸡 *PRLR* 基因遗传特性分析

测序结果经序列对比发现,在试验群体的 *PRLR* 基因中找到了 1 个 SNP,根据这个 SNP 位点将其对应的纯合子和杂合子命名为 CC 型和 CT 型。根据表 2 统计的结果可知,该位点对应的基因型 CC 基因型为优势基因型(0.957 9),等位基因 C 为优势等位基因(0.978 9)。 $\chi^2$  适合性检验表明,该基因座的位点不处于 Hardy - Weinberg 平衡状态( $P < 0.05$ );  $PIC = 0.041 7 < 0.25$ ,属于低度多态。

表 2 百宜黑鸡 *PRLR* 基因多态位点基因型频率及等位基因频率

SNP	基因型频率(个数)			等位基因频率		PIC	$\chi^2(P$ 值)
	CC	CT	TT	C	T		
36C/T	0.957 9(91)	0.042 1(4)	0.000 0(0)	0.978 9	0.021 1	0.041 7	21.704 5(0.000 0)

注: $\chi^2_{0.05}(1) = 3.84$ , $\chi^2$  值为不同基因型分布 Hardy - Weinberg 平衡检验值;基因型括号中数字为个体数; $PIC < 0.25$  为低度多态,0.25 <  $PIC < 0.5$  为中度多态, $PIC > 0.5$  为高度多态。下表同。

## 2.4 *PRLR* 基因与产蛋性能关联分析

根据 SNP 分型的结果,对不同基因型与产蛋性能间的关联性进行分析,百宜黑鸡 *PRLR* 基因 36C/T 位点与产蛋性能的显著性关系分析结果如表 3 所示,由表 3 可知,任何一种基因型与总蛋个数以及蛋均质量之间均不呈显著关系( $P > 0.05$ )。

表 3 *PRLR* 基因多态位点与肉质性状关联分析

基因型	总蛋个数(枚)	蛋均质量(g)
CC(91)	80.846 2 $\pm$ 33.441 5	50.533 0 $\pm$ 4.304 3
CT(4)	90.500 0 $\pm$ 18.430 0	52.305 0 $\pm$ 3.010 1
TT	—	—

## 3 讨论与结论

由于生产性能直接决定着经济效益,因此对养殖户或者育种家来说,在追求动物快速增长的同时更加注重其生产性能。王健等研究表明,鹅 *PRLR* 基因的表达受 *PRL* 基因的调控<sup>[10]</sup>;高天等研究表明,*PRLR* 基因多态性极显著影响嘉兴黑猪的总产仔数、产活仔数、死胎数和初生均质量( $P < 0.01$ )<sup>[11]</sup>;孙延晓等研究发现,*PRLR* 基因对猪的平均窝产数有影响<sup>[12]</sup>;洪月坤报道,*PRLR* 基因外显子 3 多态性对鸡的产蛋性能无影响<sup>[9]</sup>。由此可见,不同的物种或品种得出的结论

是不一致的。本研究以百宜黑鸡为研究对象,在试验群体的 *PRLR* 基因的外显子 3 发现了 1 个 SNP, $\chi^2$  适合性检验表明,该基因座的位点不处于 Hardy - Weinberg 平衡状态( $P < 0.05$ ),这可能是抽样误差、样本数较少造成的,也有可能是人工过度选育结果所致。将该突变位点与总蛋数和平均蛋质量进行显著性分析发现,该位点的任何一种基因型对这 2 项生产数据均不显著,这一结果与前人研究结果<sup>[9]</sup>有一定的相似之处,但尚不清楚是品种原因还是基因特性,因此,笔者所在课题组今后将会加大样本数量和鸡品种进行进一步验证。本试验结果为后期原核或真核表达载体的构建提供了理论依据,对百宜黑鸡品种的开发利用、保种选育提供了理论资料。

## 参考文献:

- [1] Dalrymple A, Edery M, Jabbour H N. Sequence and functional characterisation of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) prolactin receptor; comparative homology with the human long - form prolactin receptor [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2000, 167 (1/2): 89 - 97.
- [2] Kelly P A, Binart N, Lucas B, et al. Implications of multiple phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice [J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2001, 22 (2): 140 - 145.

蔡丙严,田其真,戴建华,等. 13 种中药体外抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌试验[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):174-176.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.044

# 13 种中药体外抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌试验

蔡丙严, 田其真, 戴建华, 刘 莉, 郝福星, 李 雅

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

**摘要:**研究 13 种具有清热解毒功效的中药对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的体外抑菌效果,采用煎煮法制备药液,对部分临床分离的猪传染性胸膜肺炎放线杆菌致病菌株进行单味及部分复方药的体外抑菌试验,测量各药液对胸膜肺炎放线杆菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, 简称 MIC)及最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, 简称 MBC)。结果表明,单味中药水煎液具有显著体外抑菌活性的为五倍子,其抑菌圈直径为 15 mm, MIC 为 7.80 mg/mL, MBC 为 15.60 mg/mL;五倍子与野拔子复方药液的抑菌效果优于五倍子单味药,其抑菌圈直径为 18 mm, MIC 为 3.90 mg/mL, MBC 为 7.80 mg/mL。试验结果为进一步研发以五倍子与野拔子为主要成分的抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌复方中药制剂奠定基础。

**关键词:**中药;体外抑制;猪胸膜肺炎放线杆菌;五倍子;野拔子

**中图分类号:**S852.61;S853.74

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2018)21-0174-03

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌极易感染 2~4 月龄的猪,临床上称为猪传染性胸膜肺炎,其临床症状主要表现为出血性纤维素性胸膜肺炎,可造成猪的突然死亡,给规模化猪场造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。该病现已在世界上许多国家和地区普遍存在<sup>[2]</sup>,近年来我国中小规模的养猪场,尤其是商品猪育肥的中后期多发<sup>[3]</sup>,同时,猪传染性胸膜肺炎放线杆菌对现有抗生素极易产生耐药性<sup>[4]</sup>,而现有疫苗多为针对某种血清型的单价或多价苗,不能满足对所有血清型的免疫<sup>[5]</sup>。伴随市场对绿色无公害猪肉产品的需求,寻求开发具有显著治疗效果的药物具有重要的临床意义。我国中药资源丰富,中医药文化博大精深,而中兽药制剂对猪病的防控已成为当今兽医临床上研究的热点<sup>[6]</sup>。现代中药药理研究结果表明,部分清热解毒功效的中药具有抑制多种病原微生物的作用<sup>[7]</sup>。

为了筛选临床上具有显著抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌活性的中药并进行组方,笔者所在项目组收集了 13 种具有清热解毒功效的中药,采用水提法制备中药药液,对临床上分离得到的有致病性的猪传染性胸膜肺炎杆菌进行体外药敏试验,筛选出有显著抑菌活性的五倍子、野拔子、大黄连等 3 种单味中药和五倍子与野拔子的 1 个中药复方,以期为后期研制抑制猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的复方中药制剂、探索中药防治猪传染性胸膜肺炎奠定试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以江苏省某猪场提供的病猪肺脏作为病样,经江苏农牧科技职业学院猪病检测中心分离鉴定为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌致病菌株, -70℃ 冰箱保存备用。

翻白草、野拔子、虎杖、透骨草、癞蛤蟆草、小黄连等 13 种中药,采自海拔约 1 700 m 处的云南禄劝彝族苗族自治县,为当地野生药材,经当地药检部门鉴定为地道中药材。

胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, 简称 TSA)培养基、

收稿日期:2017-07-17

基金项目:江苏省农业三新工程项目(编号: SXGC[2017]251)。

作者简介:蔡丙严(1980—),男,河南濮阳人,硕士,讲师,主要从事猪病防治研究。E-mail: caibingyan20@qq.com。

[3] 黄 贺,狄生伟,田亚光,等. 民猪 *PRLR* 基因 PCR-SSCP 多态性与产仔数关联分析[J]. 中国农业科学,2011,44(11):2341-2346.

[4] 刘 远,李良良,莫小雨,等. *PRLR*、*RBP4* 基因多态性分布及其对大白猪产仔数的影响[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(7):120-123.

[5] 张陈华,丁月云,王 阳,等. 圩猪和定远猪 *PRLR* 基因多态性与产仔数的关联分析[J]. 中国农业大学学报,2011,16(3):117-121.

[6] Tomas A, Casellas J, Ramirez O, et al. High amino acid variation in the intracellular domain of the pig prolactin receptor (*PRLR*) and its relation to ovulation rate and piglet survival traits[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(8):1991-1998.

[7] Chu M X, Wang X C, Jin M, et al. DNA polymorphism of 5' flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep

[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2009, 126(1):63-68.

[8] 张 珂. 山羊 *PRLR* 基因多态性及其与产羔数相关性分析[D]. 雅安:四川农业大学,2009.

[9] 洪坤月. 鸡 *PRL*、*PRLR*、*FSHβ* 和 *ESRα* 基因多态性及其与早期产蛋性能关系的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.

[10] 王 健,张宜辉,张 蕊,等. 反季节调控对鹅 *PRL* 和 *PRLR* 基因表达的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2014,35(4):23-26.

[11] 高 天,鄞忠斌,王晓杜,等. 嘉兴黑猪 *ESR2* 和 *FSHβ* 及 *PRLR* 基因多态性与繁殖性状相关性分析[J]. 中国畜牧杂志,2016,52(5):9-15.

[12] 孙延晓,曾勇庆,唐 辉,等. 猪 *PRLR* 和 *RBP4* 基因多态性与产仔性能的关系[J]. 遗传,2009,31(1):63-68.