

五个鸡群中催乳素基因密码子使用频率 与产蛋量的关系分析*

刘华贵^{1,2)} 王小花¹⁾ 刘玉方¹⁾ 赵兴波^{1)**} 李 宁¹⁾ 吴常信¹⁾

¹⁾中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 农业部动物遗传育种重点实验室, 动物科技学院, 北京 100094;

²⁾北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

摘要 通过鸡催乳素基因编码区基因扫描, 发现 3 个 SNP 位点, 分别是外显子 2 的 C1607T、外显子 5 的 C5749T 和 T5821C, 3 个 SNP 均没有改变氨基酸的编码。同时发现不同的单倍型间存在不同的密码子使用频率。对 5 个鸡群共 370 只鸡进行 SSCP 的基因型检测, 共发现 7 种单倍型, 结合 44 周龄产蛋量分析, 发现不同单倍型的平均产蛋量存在显著性差异。结合密码子使用频率分析, 发现使用高频密码子的单倍型个体产蛋量相对高。通过酶联免疫方法检测催乳素表达量, 结果显示, 使用高频密码子的个体, 激素水平较高, 其中使用 2 个高频密码子的单倍型个体和使用 1.5 个密码子的单倍型个体之间存在极显著差异。研究结果表明, 密码子使用频率与产蛋量在一定的范围内呈现正相关趋势。

关键词 鸡, 催乳素基因, 密码子使用频率, 酶联免疫检测, 产蛋量
学科分类号 Q38

繁殖性能是养鸡生产最重要的经济指标之一。科学研究揭示, 鸡的繁殖性能是由一系列激素控制的, 其中由垂体分泌的催乳素 (prolactin, PRL) 对繁殖行为中的就巢行为具有重要的决定作用。催乳素是由腺垂体分泌的多肽激素, 广泛分布在各种脊椎动物中^[1], 对动物的繁殖是必需的^[2]。禽类中, 催乳素具有调节渗透压、促进嗦嚷分泌嗦嚷乳、调节代谢、促进进巢、引起就巢、抗促性腺等功能^[3]。鸡的就巢是受多方面因素影响和控制的, 但最终的环节是通过调节 PRL 的分泌起作用。因此催乳素成为鸡就巢发生和维持的研究热点。

研究发现, 鸡催乳素几乎在鸡的一生中都有表达, 但只有中等水平的催乳素对鸡的产蛋最为有利^[4]。同时, 在不同鸡品种的基因结构分析中发现, PRL 基因及其调控区的一些多态与鸡的产蛋性状相关^[5,6]。

本研究以 5 个鸡群体为实验材料, 通过编码区基因序列测定和酶联免疫法, 检测催乳素表达量方法并结合产蛋记录, 寻找催乳素基因中表达势最强、产蛋性能最高的优势单倍型, 作为选种的分子标记。

1 材料和方法

1.1 实验动物

广西三黄鸡 (G 47 只)、罗曼蛋鸡 (L 50 只)、北京油鸡 (Y 100 只)、罗曼蛋鸡和北京油鸡杂交一代 (文中简称杂交一代, F₁ 93 只)、罗曼蛋鸡和北京油鸡杂交二代 (文中简称杂交二代, F₂ 80 只) 共 370 只鸡由北京市农林科学院畜牧兽医研究所油鸡研究开发中心提供, 所有鸡品种, 个体饲养条件相同; 记录 44 周龄所有个体的产蛋量。

1.2 PCR 扩增引物

根据 GenBank 数据库中鸡催乳素基因 (PRL) 的全长 DNA 序列 (登录号: AF288715) 设计出 5 对引物分别扩增外显子 1、2、3、4、5 序列。PCR 反应体系为: 10 × 缓冲液 2.5 μl, dNTP (10 mol/L) 2 μl, 引物各 0.5 μl (20 μmol/L), 2.5 U Taq 酶, 50 ng 模板 DNA, 用双蒸水补到 25 μl。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 充分延伸 7 min。

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2006CB102100) 和教育
部“新世纪优秀人才支持计划” (NCET-04-0135) 资助项目。

** 通讯联系人。 Tel: 010-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

收稿日期: 2007-03-06, 接受日期: 2007-06-12

Table 1 Sequence of used primer, annealing temperature and predicted length of amplified DNA fragments

Primers	Length of amplified fragment	Position	Annealing temperature/℃	The sequence of primers
P1	289	Exon1	61.0	F 5' cagcacctgctgaatgtatg 3' R 5' gaggcagcttcaccactatt 3'
P2	296	Exon2	60.0	F 5' tgcctctgacagctatttc 3' R 5' ttgcattgtctcactccag 3'
P3	170	Exon3	61.5	F 5' tacctctccttgctgatctg 3' R 5' ctctatctcacagtcattgg 3'
P4	282	Exon4	61.5	F 5' tgcctctaattgctgccaac 3' R 5' caataggctggaaggactgt 3'
P5	277	Exon5	60.0	F 5' ctacaccagacagattgac 3' R 5' ggtttcagtgaatgcag 3'

F: Forward primer, R:Reverse primer.

1.3 PCR 产物的 SSCP 多态性检测和测序分析

测序采用 ABI 公司的 BigDye2.0 测序试剂盒。SNP 及其检测参照 Orita 等^[7]介绍的方法。

1.4 ELISA 检测

实验采用抗原竞争法 ELISA 检测 PRL 的表达水平，试剂盒购美国 RB 公司。

1.5 数据分析

密码频率子使用数据库分析密码子使用频率 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/G.html>)；应用 SAS 统计软件进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和测序分析

5 个鸡群中分别随机抽取 5 个样进行 PCR 扩增测序，发现外显子 1、3、4 没有 SNP，在外显子 2 上发现了 1 个 SNP，在外显子 5 上发现了 3 个 SNPs，其中 3 个 SNPs 位于 PRL 基因的 CDS 片段上(表 2)，且 3 个 SNPs 均不改变氨基酸的编码序列。

Table 2 The SNPs of CDS fragments of chicken prolactin gene

Primers	Position	Mutation sites
P2	Exon2	C1607T
P5	Exon5	C5749T, T5821C

2.2 群体基因型和产蛋量分析

3 个 SNPs 经 PCR-SSCP 扫描，在 5 个鸡群体中发现了 7 种单倍型(图 1 和图 2)。

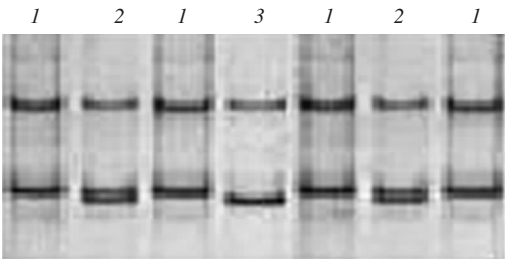


Fig. 1 SSCP results of exon 2 fragment
1: C1607; 2: N1607; 3: T1607.

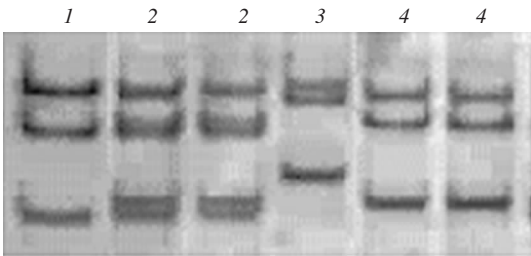


Fig. 2 SSCP results of exon 5 fragment
1: C5749, T5821; 2: C5749, N5821; 3: T5749, C5821; 4: C5749, C5821.

表 3 中显示了 5 个鸡群中各种单倍型所对应的鸡个体数和平均产蛋量。各种单倍型所对应的密码子使用频率和 3 个位点所对应的氨基酸显示在表 4 中，同时对密码子的使用情况进行了单倍型赋值，根据高频密码子的个数，1 个高频密码子代表 1 分，N 相当于半个高频和半个低频其分值为 0.5。

由结果可知，在 7 种单倍型中 CCT、CTC、TCC、NCN 4 种单倍型使用了 2 个高频密码子，TCN 和 NCT 2 种单倍型使用了 1.5 个高频密码子，TCT 单倍型只使用了 1 个高频密码子。

2.3 单倍型频率和产蛋量的统计分析

在 5 个鸡群中，CTC 和 TCC 2 种单倍型仅分布在广西三黄鸡中，CCT、NCN、TCN、NCT 和 TCT 5 种单倍型是主要的单倍型 (表 3)。对 5 种单倍型频率进行差异显著性检验，结果表明，CCT 单倍型频率在罗曼蛋鸡和其他鸡群中有极显著差异。NCN 单倍型频率，广西三黄鸡和罗曼蛋鸡、油鸡、杂交一代、杂交二代都有极显著差异 ($P < 0.01$)。TCN 单倍型频率，杂交二代和罗曼蛋鸡、油鸡、杂交一代之间都有极显著差异。NCT 单倍型频率在中国的 2 个地方品种和罗曼蛋鸡、杂交一代、杂交二代中都有极显著差异。TCT 单倍型频率在油鸡和罗曼蛋鸡、杂交一代、杂交二代、广西

三黄鸡之间都有极显著差异。

在某一特定的鸡群中，对不同的单倍型 44 周龄的平均产蛋量进行差异显著性检验后发现：罗曼蛋鸡的 3 种单倍型平均产蛋量的顺序是：CCT > NCT > TCT，CCT 和 TCT 2 种单倍型的产蛋量之间有极显著差异 ($P < 0.01$)。在油鸡中 TCT 是主要的单倍型 (表 3)，各单倍型平均产蛋量的顺序是：NCN > NCT > TCN > TCT，NCN 和 TCN、NCT、TCT 3 种单倍型之间都有极显著差异 ($P < 0.01$)。杂交一代中的 4 种单倍型平均产蛋量的顺序是 CCT > NCN > NCT > TCT (表 3)，CCT 和 TCT 2 种单倍型之间有极显著差异 ($P < 0.01$)。杂交二代中没有使用 1 个高频密码子的单倍型，各单倍型平均产蛋量的顺序是 CCT > NCN > NCT > TCN (表 3)，其中 CCT 和 TCN，NCN 和 TCN 单倍型之间有极显著差异。在广西三黄鸡中 7 种单倍型产蛋量的顺序是：CCT > CTC > TCC > NCN > NCT > TCN >

Table 3 The number of chicken and individual average eggs of each haplotypes in five populations

Haplotypes	Roman chicken			Fatty chicken			Roman-fatty cross			Roman-fatty cross			Sanhuang		
							F1			F2					
	N	P	A	N	P	A	N	P	A	N	P	A	N	P	A
CCT	22	0.44	148	0	0	0	2	0.02	134	14	0.18	126	3	0.06	121
CTC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.06	117
NCN	0	0	0	10	0.1	100	4	0.04	130	7	0.09	124	20	0.43	115
TCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.15	116
TCN	0	0	0	3	0.03	85	0	0	0	22	0.28	108	5	0.11	108
NCT	16	0.32	142	6	0.06	87	49	0.53	128	37	0.45	122	3	0.06	111
TCT	12	0.24	132	81	0.81	82	38	0.41	124	0	0	0	6	0.13	101
Σ	50	1	142	100	1	84	93	1	126	80	1	119	47	1	113

“N” represents the number of different haplotypes in chicken groups. “P” symbolizes the percentage of haplotype in the group. “A” represents individual average eggs.

Table 4 The haplotypes and their corresponding amino acids, codon usage and frequency in the five populations

Haplotypes	Frequency value	1 607nt		5 749nt		5 821nt	
		Thr		Leu		Ile	
		Codon	Frequency	Codon	Frequency	Codon	Frequency
CCT	2	acC*	16.3	cuC*	16.6	atT	16.9
CTC	2	acC*	16.3	cuT	12.5	atC*	22.0
NCN	2	Can	14.8	cuC*	16.6	atN	19.5
TCC	2	AcT	13.3	cuC*	16.6	atC*	22.0
TCN	1.5	AcT	13.3	cuC*	16.6	atN	19.5
NCT	1.5	Can	14.8	cuC*	16.6	atT	16.9
TCT	1	AcT	13.3	cuC*	16.6	atT	16.9

* Represents the high frequency codon. Frequency value represents the numbers of the high frequency codons, one high frequency codon is 1 in frequency value, and the N (with half high and half low frequency codons) is 0.5.

TCT (表 3), 其中 CCT、NCN 两单倍型和 TCT 单倍型的产蛋量都有极显著差异。

由以上分析得知, 在 5 个鸡群中 44 周龄的平均产蛋量的顺序是: 罗曼蛋鸡 > 杂交一代 > 杂交二代 > 广西三黄鸡 > 油鸡 (表 3)。在同一鸡群中, 使用高频密码子的单倍型的鸡平均产蛋量相对高。CCT 是 7 种单倍型的优势单倍型。

2.4 杂交二代各种单倍型 PRL 表达水平 ELISA 分析

在杂交二代中有 4 种单倍型, 从 4 种单倍型中各随机抽取 5 个样品, 用 ELISA 检测 PRL 的表达量 (表 5), 每个个体 2 个重复。

结果表明, 2 个高频密码子的 CCT 和 NCN 2 种单倍型和使用 1.5 个高频密码子的 NCT 和 TCN 2 种单倍型 PRL 的表达量有极显著差异。

Table 5 The results of ELISA

Haplotypes	Sample 1		Sample 2		Sample 3		Sample 4		Sample 5		Average	
	OD	M	OD	M	OD	M	OD	M	OD	M	OD	M
CCT	0.863	99	0.480	180	0.666	30	0.681	130	0.590	160	0.656	140
NCN	0.512	170	0.693	128	0.736	120	0.805	110	0.654	138	0.680	135
NCT	1.025	71	1.112	60	0.560	155	0.620	140	0.983	75	0.860	100
TCN	1.102	65	0.845	105	0.937	85	0.815	105	0.876	95	0.915	90

M represents the concentration of PRL.

3 讨 论

3.1 密码子使用频率和平均产蛋量的关系

本研究在 PRL 基因的 CDS 片段上发现 3 个 SNP (C1607T, T5821C, C5749T), 3 个突变均为同义突变, 这表明 PRL 基因的编码序列相对保守。尽管 DNA 的突变没有导致氨基酸的改变, 但是不同的密码子使用频率和不同的 tRNA 丰度也会影响

mRNA 翻译成氨基酸的速度, 从而影响蛋白质的合成效率^[8], 而且密码子的使用, tRNA 丰度和基因表达的关系在许多研究中也有一定论述^[9~11]。本研究中发现 3 个 SNP 位点处编码相同氨基酸使用了不同的密码子, 而且在 5 个鸡群中, 随着使用高频密码子数的增加, 平均产蛋量升高 (图 3)。

杂交二代中 ELISA 检测 PRL 的浓度顺序为: CCT > NCN > NCT > TCN, 它与使用高频密码子数的顺序以及平均产蛋量的大小顺序相吻合。统计分析表明, 使用了 2 个高频密码子的 CCT、NCN 单倍型和使用 1.5 个高频密码子的 NCT、TCN 单倍型之间 PRL 的表达量有极显著的差异。这进一步证实了平均产蛋量随着高频密码子使用频率的增加而升高, 在一定的范围内相对高的 PRL 对鸡的产蛋性能是有利的, 密码子使用频率也是影响表型的因素之一。

3.2 选育和单倍型频率之间的关系

罗曼蛋鸡是国际商业品种具有高的产蛋量 (142 枚), 罗曼蛋鸡中发现了 3 种单倍型, 其中具有 2 个和 1.5 个高频密码子的单倍型所占的比例较高 (图 4a), 这是以产蛋量为标准进行选育的结果。油鸡是中国的地方品种, 其选育程度很低, 平均产蛋量在 5 个鸡群中最低 (85 枚), 在油鸡中有 4 种单倍型, 其中使用了 1 个高频密码子的 TCT 单倍型含量却达到了 81% (图 4b)。罗曼蛋鸡和油鸡的杂交一代的平均产蛋量介于罗曼蛋鸡和油鸡之间 (127 枚), 在杂交一代鸡群中也有 4 种单倍型, 但

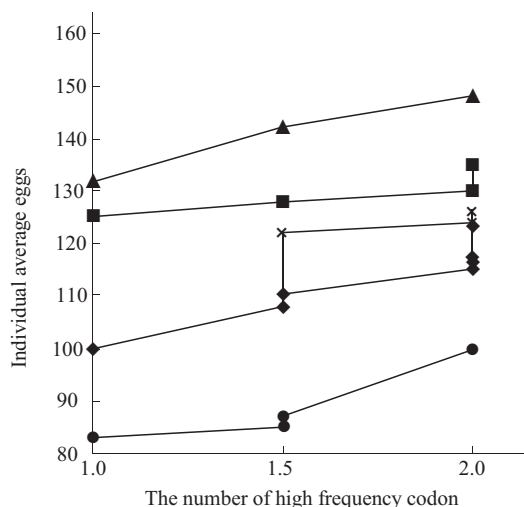


Fig. 3 The relationship between the number of high frequency codon and individual average eggs in the five chicken populations

The result indicates that the individual average eggs would increase as the increase of high frequency codon numbers in the five populations. ▲—▲: Roman; ■—■: F1; ◆—◆: Sanhuang; ●—●: Fatty chicken; ×—×: F2.

是群体基因型结构已经改变，TCT 单倍型频率下降到了 41%，而使用了 2 个和 1.5 高频密码子的单倍型频率增加到了 59% (图 4c)。杂交二代中有 4 种单倍型主要以使用了 1.5 个高频密码子的 TCN 和 NCT 单倍型为主，达到了 73% (图 4d)。广西三黄鸡是中国的商业品种，经过选育，在广西三黄鸡

群体中 7 种单倍型频率复杂而分散，其中主要以使用 2 个和 1.5 个高频密码子的单倍型为主 (图 4e)。

分析结果表明，广西三黄鸡的选育程度和群体基因纯度比国际商业品种罗曼蛋鸡低。在 5 个鸡群体中使用高频密码子个数越多的单倍型，其平均产蛋量越高。

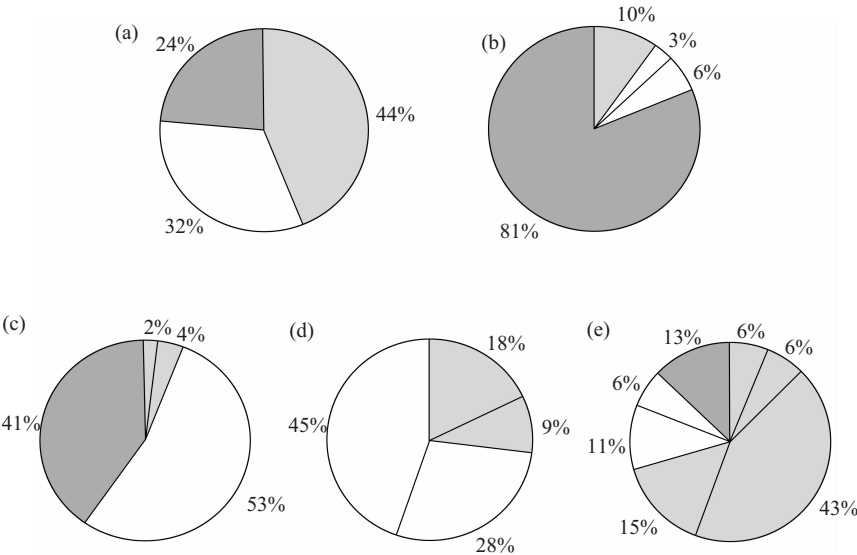


Fig. 4 The ratios of different haplotypes in the five chicken populations

Different colors represent the different high frequency codon numbers: red represents 2 high frequency condons, pink represents 1.5 high frequency condons and blue represents 1 high frequency condon. (a) Roman. (b) Fatty. (c) F1. (d) F2. (e) Sanhuang.

PRL 基因对繁殖成功是必需的，在鸡^[4]、人^[12, 13]、鼠^[14~16]中的研究表明过高和过底的催乳素对卵泡的发育都是不利的。在家禽中过高的催乳素会导致鸡的就巢^[5, 17]，中等水平的催乳素对鸡的产蛋有利。在本研究的 5 个群体中没有发现 TTT 和 CCC 2 种单倍型。原因可能是 TTT 单倍型没有使用高频密码子导致催乳素的水平很低，CCC 单倍型使用了 3 个高频密码子导致催乳素的水平很高，这 2 种极端的单倍型对鸡的产蛋都不利，在以产蛋性能为标准的选育过程中被淘汰。

参 考 文 献

1 Niall H D, Hogan M L, Sauer R, *et al.* Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68** (4): 866~870

2 Vincent A L, Evans T H, Short T H, *et al.* The Prolactin Receptor Gene is Associated with Increased litter size in Pigs. The 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale

Australia, 1998

3 Wong E A, Silsby J L, Ishii S, *et al.* Pituitary luteinizing hormone and prolactin messenger ribonucleic acid levels are inversely related in laying and incubating turkey hens. *Biology of Reproduction*, 1992, **47** (4): 598~602

4 Proudman J A, Wentworth B C. Pulsatile secretion of prolactin in laying and incubating turkey hens. *Domest Anim Endocrinol*, 1996, **13** (3): 277~282

5 Jiang R S, Xu G Y, Zhang X Q, *et al.* Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. *Poult Sci*, 2005, **84** (6): 839~845

6 Cui J X, Du H L, Liang Y, *et al.* Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. *Poult Sci*, 2006, **85** (1): 26~31

7 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphism using polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, **5** (4): 874~879

8 Henry I, Sharp P M. Predicting gene expression level from codon usage bias. *Mol Biol Evol*, 2007, **24** (1): 10~12

9 Charles H, Calevro F, Vinuelas J, *et al.* Codon usage bias and tRNA over-expression in *Buchnera aphidicola* after aromatic amino acid nutritional stress on its host *Acyrtosiphon pisum*. *Nucleic*

- AcidsRes, 2006, **34** (16): 4583~4592
- 10 Barrett J W, Sun Y, Nazarian S H, *et al.* Optimization of codon usage of poxvirus genes allows for improved transient expression in mammalian cells. *Virus Genes*, 2006, **33** (1): 15~26
- 11 Stoletzki N, Eyre-Walker A. Synonymous codon usage in *Escherichia coli*: Selection for translational accuracy. *Mol Biol Evol*, 2006, **24** (2): 374~381
- 12 Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, *et al.* Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, **84** (2): 677~681
- 13 Nemansky M E, Moy C D, Lyons I Y U, *et al.* Human endometrial stromal cells generate uncombined alpha-subunit from human chorionic gonadotropin, which can synergize with progesterone to induce decidualization. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, **83** (2): 575~581
- 14 Escalada J, Cacicdo L, Ortego J, *et al.* Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 1996, **137** (2): 631~637
- 15 Fortune J E, Wisser R N, Vincent S E. Prolactin modulates steroidogenesis by rat granulosa cells: II. Effects on estradiol. *Biol Reprod*, 1986, **35** (1): 92~99
- 16 Yoshimura Y, Jinno M, Oda T, *et al.* Prolactin inhibits ovulation by reducing ovarian plasmin generation. *Biol Reprod*, 1994, **50** (6): 1223~1230
- 17 Ramesh R, Proudman J A, Kuenzel W J. Changes in pituitary somatotroph and lactotroph distribution in laying and incubating turkey hens. *Gen Comp Endocrinol*, 1996, **104** (1): 67~75

Analysis of The Relationship Between Codon Frequency of Prolactin Gene and Laying Performance in Five Chicken Breeds*

LIU Hua-Gui^{1,2}, WANG Xiao-Hua¹, LIU Yu-Fang¹, ZHAO Xing-Bo¹**, LI Ning¹, WU Chang-Xin¹

⁽¹⁾State Key Laboratory for Agrobiotechnology and Ministry of Agriculture Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding,
College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽²⁾Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract After analyzing the coding sequence (CDS) of chicken prolactin gene by DNA sequencing, one point mutation of C1607T in exon2 and two mutations of C5749T and T5821C in exon5 were discovered. Although none of the mutations changes amino acid encoded, they have different codon frequencies in the five populations. The three mutations in 370 individuals of the five populations by single-strand conformation polymorphism (SSCP) were screened, and seven haplotypes in the CDS of prolactin were discovered. Moreover, the seven haplotypes show different high frequency value, which was defined by the number of high frequency codon of the haplotype. Analyzing the laying performance of the five breeds, the positive correlation between the laying performance and high frequencies value was found. After detecting the expression of the prolactin by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), it was found that the higher number of high frequency codon will lead to the more quantity of prolactin. The results demonstrate that the codon frequency is a factor which influence the laying performance, and synonymous mutation might influence phenotype by changing codon frequency.

Key words chicken, prolactin gene, codon usage frequency, ELISA, laying performance

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB102100) and Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-04-0135).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

Received: March 6, 2007 Accepted: June 12, 2007