

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01021

## 浙东白鹅催乳素基因表达特点

褚晓红<sup>1,2</sup>, 徐宁迎<sup>1</sup>, 胡锦涛<sup>2</sup>, 卢立志<sup>2</sup>, 陈维虎<sup>3</sup>, 王亚琴<sup>3</sup>

1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029;
2. 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021;
3. 浙江省宁波市象山农林局, 宁波 315700

**摘要:** 克隆了浙东白鹅催乳素基因(Prolactin, *PRL*)的全序列, 并应用荧光定量 PCR 技术研究了浙东白鹅在产蛋期、就巢期和恢复期时催乳素基因在下丘脑、垂体和卵巢中的表达特点。结果表明, 浙东白鹅催乳素基因在就巢期、产蛋期和恢复期的表达量差异显著( $P < 0.05$ ), 在就巢期表达量最高, 产蛋期次之, 恢复期表达量最低。对不同组织 *PRL* 的表达量分析, 发现在垂体与卵巢中的表达量、卵巢与下丘脑的表达量均有极显著的差异( $P < 0.01$ ), 但在垂体与下丘脑中的表达量差异不显著( $P > 0.05$ ), 在垂体表达量最多, 其次是下丘脑, 卵巢中的表达量最低。因此, 浙东白鹅 *PRL* 基因在不同繁殖时期体内表达差异较大。

**关键词:** 催乳素基因; 浙东白鹅; 荧光定量 PCR; 表达量

## Expression characteristics of prolactin gene in Eastern Zhejiang white geese

CHU Xiao-Hong<sup>1,2</sup>, XU Ning-Ying<sup>1</sup>, HU Jin-Ping<sup>2</sup>, LU Li-Zhi<sup>2</sup>, CHEN Wei-Hu<sup>3</sup>, WANG Ya-Qin<sup>3</sup>

1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. Institute of Animal Science and Veterinary, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;
3. Xiangshan Bureau of Agriculture and Forestry, Ningbo 315700, China

**Abstract:** This study was conducted to clone the prolactin gene (*PRL*) in Eastern Zhejiang White Geese and to investigate the *PRL* gene expression characteristics during egg-laying, out-of-lay and incubating periods by real time PCR. Comparisons were made respectively of concentration of prolactin mRNA in the hypothalamus, pituitary gland and ovary of the adult female geese at different reproductive periods. The result indicated that there were significant differences ( $P < 0.05$ ) in *PRL* mRNA expression between different reproductive periods of the geese. The lowest level of *PRL* expression was found in out-of-lay geese, higher in the egg-laying geese, and the highest in incubating geese. Furthermore, the analysis of *PRL* expression in different tissues indicated that the highest levels of *PRL* was expressed in the pituitary gland, followed in hypothalamus, and the least in ovary of the geese. There were significant difference ( $P < 0.01$ ) expression of *PRL* between the pituitary gland/hypothalamus and ovary of the geese, whereas no any difference was observed between the pituitary gland and hypothalamus ( $P > 0.05$ ). In summary, the *PRL* mRNA expression had varianced in different reproductive periods of the geese.

收稿日期: 2007-11-30; 修回日期: 2008-02-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2006CB102100)和浙江省科技重大项目(编号: 2005C12005-2, 2006C12004-1)资助  
[Supported by National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2006CB102100) and the Key Program of Science and Technology, Zhejiang, China (No. 2005C12005-2, 2006C12004-1)]

作者简介: 褚晓红(1968-), 女, 博士, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: chuxh@yahoo.cn

通讯作者: 徐宁迎(1956-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: nyxu@zju.edu.cn

**Keywords:** prolactin gene; Eastern Zhejiang white geese; real time PCR; expression levels

催乳素(Prolactin, *PRL*)影响动物的繁殖、生长发育、新陈代谢、渗透调节、免疫以及行为等生理过程<sup>[1]</sup>。研究表明,血浆中催乳素诱导和维持家禽的就巢习性<sup>[2-6]</sup>,它通过下丘脑-垂体-性腺轴诱导就巢的发生<sup>[7]</sup>。本研究旨在应用荧光定量PCR技术SYBR Green I,研究浙东白鹅处于产蛋期、就巢期和恢复期时*PRL*基因在下丘脑、垂体和卵巢中的表达差异特点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和主要试剂

浙东白鹅母鹅 35 只由浙江省宁波市象山农林局种鹅场提供,其中就巢鹅 12 只,产蛋鹅 12 只,恢复期鹅 11 只,采血后宰杀,立即取出下丘脑、垂体和卵巢(去除卵子)冻入液氮中带回实验室。

Trizol 购自 Invitrogen 公司, cDNA 第一链合成

试剂盒和荧光定量 iQ SYBR Green Supermix 购自 Bio-Rad 公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 浙东白鹅基因组 DNA 和 RNA 的提取及反转录

50 μL 抗凝血用生理盐水洗二次后用文献<sup>[9]</sup>方法提取基因组 DNA,溶于 TE 中备用。

浙东白鹅下丘脑、垂体和卵巢在液氮中快速研磨,取 50~100 mg,加入 Trizol,按照试剂盒说明书提取,最后用 Dnase 处理去除残留的基因组 DNA 后立即进行反转录。

cDNA 第一链合成按照试剂盒说明书进行,反转录产物用无 RNase 的水 2 倍稀释备用。

### 1.3 引物设计、PCR 和荧光定量 PCR

根据鸭的催乳素基因(*PRL*)序列(GenBank 序列号: AB158611),跨外显子,产物两两重叠,设计了 4 对引物 P1~P4,序列见表 1。

表 1 浙东白鹅 *PRL* 基因 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers for prolactin gene in geese

引物 Primer	位点 Site	片段大小 Size(bp)	正向序列 Forward primer	反向序列 Reverse primer
P1	223~1790	1 568	CATCCTACAGGGTCTCTACCATGAG	GACCACCAGCAACAAACCTGTT
P2	1765~2467	703	CCTGAACAGGTTTGTGCTGG	CATGGATCTGCTGAGCTTGCT
P3	2351~3933	1 583	ATCTGCAGGATGAACGCTATGC	CCCGCCCAACTATTTTCTCC
P4	3842~6055	2 214	AGAAGCTCCAGACCATCCTC	GCGATGAAGCCCAGGAGTACT
P5		180	CTCTCACACTACATCCACTTCCTC	GGGACTATCACTGCCTGTGC

根据所获得的 *PRL* 基因序列在其外显子中设计了一条扩增产物为 180 bp 的用于荧光定量 PCR 分析的引物 P5,序列见表 1。内参基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶 180 bp 扩增片段参照文献<sup>[10]</sup>。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR反应总体积为 50 μL,其中 10×buffer 5.0 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4.0 μL, 10 mmol/L dNTP 1.0 μL, 上、下游引物(10 pmol/L)各 1.0 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.50 μL, 模板DNA 0.6 μL (25 ng), 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50.0 μL。PCR扩增程序: 94 3 min, 94 30 s, 57 30 s, 72 1 min, 34 个循环后再 72 延伸 10 min。

荧光定量 PCR 在 Bio-Rad 公司 ICycler IQ 荧光定量 PCR 仪上进行,反应体系为 SYBR Green Su-

permix 12.5 μL, 800 nmol/L 引物, 1.0 μL cDNA 模板,加水至 25 μL。反应程序: 95 1 min, 94 30 s, 64 20 s, 72 30 s, 40 个循环后进入融解曲线程序 64~94 升温速度 0.5 /10 s。

### 1.4 PCR 产物的序列测定

PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收后送上海生物工程公司测序。

### 1.5 数据分析

应用 SPSS13.0 软件对荧光定量 PCR 数据进行分析,采用线性模型

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i \beta_j + e_{ij},$$

其中  $\alpha_i$  为生理时期效应(产蛋期、就巢期、恢复期),  $\beta_j$  为组织效应(下丘脑、垂体、卵巢),  $\alpha_i \beta_j$  为二者

的交互作用,  $e_{ij}$  为随机误差。

目的基因相对表达量用  $-\Delta\Delta Ct$  方法<sup>[11]</sup> 计算:

$$PRL \text{ 基因的相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

其中  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样品}} - \Delta Ct_{\text{对比样品}}$ ,  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$

## 2 结果与分析

### 2.1 PRL 基因的 PCR 扩增

以浙东白鹅的基因组 DNA 为模板, 用所设计的 4 对引物进行 PCR 扩增, 所得扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 根据 100 bp marker (3 000, 2 000, 1 500, 1 031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp) 的标示, 扩增片段与目的片段大小一致且特异性好 (图 1), 可用于序列测定分析。

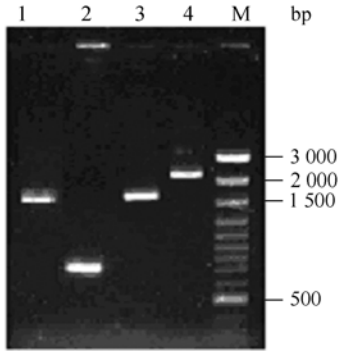


图 1 浙东白鹅催乳素基因的 PCR 扩增结果

1~4: 引物 P1~P4 的扩增产物; M: 100 bp DNA ladder。

Fig. 1 Amplification of the Eastern Zhejiang white geese prolactin gene

1~4: PCR products of primer P1~P4; M: 100 bp DNA ladder.

PCR 产物的两端直接测序, 将 4 段测序结果拼接后得到浙东白鹅 PRL 基因的全序列为 5 917 bp, 它含有 5 个外显子, 分别为 27 bp、181 bp、107 bp、179 bp、191 bp, 处于 21~48, 1557~1738, 2135~2242, 3631~3810, 5706~5897。这 5 个外显子与鸭 PRL 基因序列 (AY547323) 的同源性分别为 89%、98%、98%、100%、98%。其 4 段内含子与鸭 PRL 的内含子序列同源性分别为 88%、94%、80%、94%, 可以判定其为目的基因序列。该序列已提交 GenBank, 序列号为 DQ660983。

### 2.2 浙东白鹅在不同生理时期的 PRL 基因表达特点

用恢复期浙东白鹅卵巢的 PRL 的  $\Delta Ct$  均值作为相对定量的标准, 计算处于产蛋期、就巢期、恢复期的每只鹅 PRL 基因在下丘脑、垂体和卵巢中的相对表达量, 用 SPSS13.0 软件, 以生理时期和组织器

官作为因素变量, 分析观测变量 PRL 基因表达量的差异, 发现浙东白鹅 PRL 基因在就巢期、产蛋期、恢复期的表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。就巢期鹅的 PRL 基因表达量最高, 其次为产蛋期鹅, 恢复期鹅的 PRL 基因表达量最低 (图 2)。

对不同生理时期相同组织 PRL 的表达量分析, 发现在下丘脑、垂体中就巢期 PRL 表达量与恢复期鹅相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 但产蛋期 PRL 在下丘脑和垂体中的表达量与就巢期鹅或恢复期鹅相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 而在卵巢中的表达量与就巢期鹅和恢复期鹅相比差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

生理时期 (产蛋期、就巢期和恢复期) 和组织 (下丘脑、垂体和卵巢) 的交互作用差异不显著 ( $P < 0.05$ )。

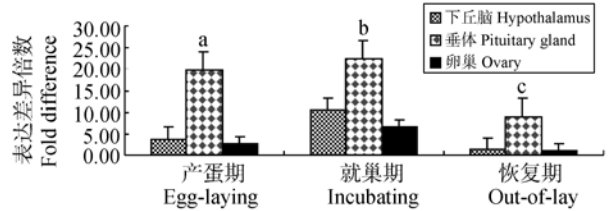


图 2 浙东白鹅不同生理时期的 PRL 相对表达量

不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Relative expression of the prolactin gene of Eastern Zhejiang White Geese at different physiological stages

Significant difference ( $P < 0.05$ ) was indicated by different small letters.

### 2.3 浙东白鹅不同组织 PRL 基因的表达特点

同理, 对不同组织 PRL 的表达量分析, 发现其在垂体中的表达量与下丘脑、卵巢中的表达量有极显著的差异 ( $P < 0.01$ ), 卵巢与下丘脑的表达量差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。在垂体中 PRL 基因表达量最高, 其次为下丘脑, 卵巢中的表达量最低。

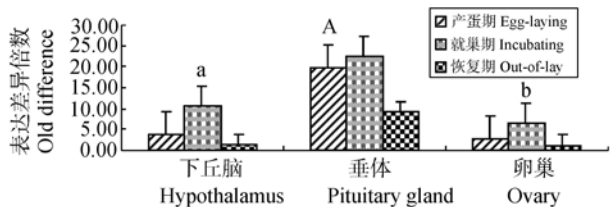


图 3 浙东白鹅不同组织的 PRL 相对表达量

大写和小写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 3 Relative expression of the prolactin gene of Eastern Zhejiang White Geese in different tissues

Extremely significant difference was indicated by different capital letters, whereas significant difference ( $P < 0.05$ ) was indicated by different small letters.

### 3 讨论

Kurima 等<sup>[12]</sup>、Ohkubo 等<sup>[13]</sup>、周敏<sup>[14]</sup>、曹新等<sup>[15]</sup>和崔建勋等<sup>[16]</sup>分别克隆了火鸡、鸡和牛的 *PRL* 基因以及老鼠的 *PRL* 受体基因<sup>[17,18]</sup>，并对其表达的调控进行了研究<sup>[19,20]</sup>，Kansakua 等<sup>[21]</sup>克隆了鸭的 *PRL* cDNA 和 DNA 序列，比对分析发现 *PRL* 基因在动物中具有高度的同源性。

用荧光定量 PCR 技术，在 mRNA 水平，研究 *PRL* 基因在浙东白鹅产蛋期、就巢期和恢复期的表达量，结果显示其变化较大，这一结果与 Buntin 等对禽类催乳素<sup>[22-25]</sup>和 Chaiseha 等对火鸡的催乳素调节因子 *VIP*<sup>[26-28]</sup>的研究结果一致，*PRL* 的表达与浙东白鹅的繁殖生理时期密切相关。浙东白鹅 *PRL* 基因在下丘脑、垂体和卵巢中的表达量与在火鸡<sup>[7]</sup>、来航鸡、矮脚鸡<sup>[29,30]</sup>的研究结果一致。垂体是催乳素的分泌器官，*PRL* 的表达量最高，催乳素是通过抑制下丘脑分泌促性腺激素释放激素而实现对繁殖的抑制作用的，下丘脑 *PRL* 表达的发现说明在脑中有一个微循环反馈调节系统，存在反馈调节催乳素的自分泌或旁分泌机制，催乳素在就巢期达到其分泌的最高值，亦说明在下丘脑-垂体-性腺轴催乳素和催乳素受体相互作用抑制了促性腺激素的分泌而诱导家禽就巢的发生，就具体的作用机制而言仍需要更进一步从转录调控和蛋白质水平进行研究。

### 参考文献(References):

- [1] Zhou JF, Zadworny D, Guemene D, Kuhnlein U. Molecular cloning tissue distribution, and expression of the prolactin receptor during various reproductive states in *Meleagris gallopavo*. *Biol Rep*, 1996, 55: 1081-1090. [\[DOI\]](#)
- [2] Lea RW, Dods AS, Sharp PJ, Chadwick A. The possible role of prolactin in the regulation of nesting behaviour and the secretion of luteinizing hormone in broody bantams. *J Endocrinol*, 1981, 91: 89-97.
- [3] El Halawani ME, Silsby JL, Behnke EJ, Fehrer SC. Hormonal induction of incubation in ovariectomized female turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Biol Reprod*, 1986, 35: 59-67. [\[DOI\]](#)
- [4] Youngren OM, El Halawani ME, Silsby JL, Phillips RE. Intracranial prolactin perfusion induces incubation behavior in turkey hens. *Biol Reprod*, 1991, 44: 425-443. [\[DOI\]](#)
- [5] March JB, Sharp PJ, Wilson PW, Sang HM. Effect of active immunization against recombinant-derived chicken prolactin fusion protein on the onset of broodiness and photoinduced egg laying in bantam hens. *J Reprod Fertil*, 1994, 101: 227-233.
- [6] Sharp PJ. Neurobiology of the onset of incubation behaviour in birds. In: Maitra SK, ed. *Frontiers in Environmental and Metabolic Endocrinology*. West Bengal: Burdwan University Press, 1997: 193-202.
- [7] Buntin JD, Ruzycki E, Witebsky J. Prolactin receptors in dove brain: Autoradiographic analysis of binding characteristics in discrete brain regions and accessibility to blood-borne prolactin. *Neuroendocrinology*, 1993, 57: 738-750. [\[DOI\]](#)
- [8] Tanaka M, Maeda K, Okubo T, Nakashima K. Double antenna structure of chicken prolactin receptor deduced from the cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 198: 490.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 467-467.
- [10] Carraro G, Albertin G, Forneris M, Nussdorfer GG. Similar sequence-free amplification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for real time RT-PCR applications. *Molecular and Cellular Probes*, 2005, 19: 181-186. [\[DOI\]](#)
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$  method. *Methods*, 2001, 25: 402-408. [\[DOI\]](#)
- [12] Kurima K, Proudman JA, El Halawani ME, Wong EA. The turkey prolactin-encoding gene and its regulatory region. *Gene*, 1995, 156, 309-310.
- [13] Ohkubo T, Tanaka M, Nakashima K. Molecular cloning of the chicken prolactin gene and activation by Pit-1 and cAMP-induced factor in GH3 cells. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 119, 208-216. [\[DOI\]](#)
- [14] ZHOU Min, ZHANG Xi-Quan, SHI Zhen-Dan, CAO Yong-Chang. Cloning and sequencing of prolactin gene cDNA in three chicken breeds. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(7): 614-620.  
周敏, 张细权, 施振旦, 曹永长. 三个品种家鸡催乳素基因 cDNA 的克隆及序列分析. *遗传学报*, 2001, 28(7): 614-620.
- [15] CAO Xin, WANG Qiang, YAN Jing-Bing, YANG Fei-Kun, HUANG Shu-Zhen, ZENG Yi-Tao. Molecular cloning and analysis of bovine prolactin full-long genomic as well as cDNA sequences. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(9): 768-773.  
曹新, 王强, 颜景斌, 阳飞昆, 黄淑贞, 曾溢滔. 牛催乳素基因组及其 cDNA 全长序列的分子克隆和分析. *遗传学报*, 2002, 29(9): 768-773.
- [16] CUI Jian-Xun, DU Hong-Li, ZHANG Xi-Quan. Polymorphisms and bioinformatics analysis of chicken prolactin gene. *Hereditas(Beijing)*, 2005, 27(2): 208-214.

- 崔建勋, 杜红丽, 张细权. 鸡催乳素基因序列多态及生物信息学分析. *遗传*, 2005, 27(2): 208–214.
- [17] Moore RC, Oka T. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the murine mammary gland long-form prolactin receptor. *Gene*, 1993, 134: 263–265. [\[DOI\]](#)
- [18] Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/ prolactin receptor gene family. *Cell*, 1988, 53: 69–77. [\[DOI\]](#)
- [19] Kang SW, Youngren OM, El Halawani ME. Influence of VIP on prolactinemia in turkey anterior pituitary cells, role of cAMP second messenger in VIP-induced prolactin gene expression. *Regul Pep*, 2002, 109, 39–44. [\[DOI\]](#)
- [20] Shirota M, Banville D, Ali S. Expression of two forms of PRL receptor in rat ovary and liver. *Mol Endocrinol*, 1990, 4: 1136–1143.
- [21] Kansaku N, Ohkubo T, Okabayashia H, Gu é men é c D, Kuhnleind U, Zadwornyd D, Shimadae K. Cloning of duck PRL cDNA and genomic DNA. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 141: 39–47. [\[DOI\]](#)
- [22] Buntin JD. Neural and hormonal regulation of parental behavior in birds. *Adv Stud Behav*, 1996, 25: 161–213. [\[DOI\]](#)
- [23] Pitts GR, Youngren OM, Silsby JL, Rozenboim I, Chaishea Y, Philips RE, Foster DN, El Halawani ME. Role of vasoactive intestinal peptide in the control of prolactin-induced turkey incubation behavior. II. Chronic infusion of vasoactive intestinal peptide. *Biol Reprod*, 1994, 50: 1350–1356. [\[DOI\]](#)
- [24] Kansaku N, Shimada K, Suzuki T, Matsuda Y, Kuhnlein U, Zadworny D. Genetic variation in the chicken prolactin promoter. *Biol Reprod*, 1999, 60 (Suppl.): 253–254.
- [25] Sharp PJ, Dawson A, Lea RW. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. *Comp Biochem Physiol*, 1998, C119: 275–282.
- [26] Chaiseha Y, Youngren OM, El Halawani ME. Expression of vasoactive intestinal peptide receptor messenger RNA in the hypothalamus and pituitary throughout the turkey reproductive cycle. *Biol Reprod*, 2004, 70: 593–599. [\[DOI\]](#)
- [27] Kahtane AA, Kannan M, Kang SW, El Halawani ME. Regulation of prolactin gene expression by vasoactive intestinal peptide and dopamine in the turkey: role of  $Ca^{2+}$  signalling. *J Neuroendocrinol*, 2005, 17: 649–655. [\[DOI\]](#)
- [28] Kang SW, Youngren OM, El Halawani ME. Influence of VIP on prolactinemia in turkey anterior pituitary cells: role of cAMP second messenger in VIP-induced prolactin gene expression. *Regul Pepts*, 2002, 109: 39–44. [\[DOI\]](#)
- [29] Ohkubo T, Tanaka M, Nakashima K, Talbot RT, Sharp PJ. Prolactin receptor gene expression in the brain and peripheral tissues in broody and nonbroody breeds of domestic hen. *Gen Comp Endocrino*, 1998, 109: 60–68. [\[DOI\]](#)
- [30] Ohkubo T, Tanaka M, Nakashima K. Molecular cloning of the chicken prolactin gene and activation by Pit-1 and cAMP-induced factor in GH3 cells. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 119: 208–216. [\[DOI\]](#)