

12 个水牛群体催乳素基因第 4 外显子遗传特征分析

袁 峰¹, 苗永旺^{1,2,*}, 李太林³, 汤守昆⁴, 许 政⁵, 霍金龙¹, 祁 宏¹

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南大学 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091;
3. 云南水牛科学技术研究所, 云南 昆明 650021; 4. 云南省德宏州潞西市畜牧站, 云南 潞西 678400;
5. 广西畜牧总站, 广西 南宁 530022)

摘要: 催乳素对水牛乳腺发育、泌乳和乳蛋白基因的表达有明显的调控作用。该研究采用直接测序并结合 PCR-SSCP 技术, 分析沼泽型水牛和河流型水牛 12 个群体 385 个个体的催乳素基因(*PRL*)第 4 外显子(exon 4)的遗传特征。结果表明: 水牛 *PRL* exon 4 由 180 个核苷酸组成, 在不同物种中具有高度保守性。序列分析发现水牛中该外显子的第 109 位碱基处有 C>T 替换, 为沉默突变, 与泌乳性状之间无显著相关性。在 9 个沼泽型水牛群体中均检测到该突变位点, 其中 PB^A 基因在 7 个沼泽型水牛群体中为优势基因, PB^B 基因在德宏和富钟群体中为优势基因, 沼泽型水牛群体中 PB^A 基因频率在 0.400~0.917 之间, 群体平均值为 0.629 ± 0.049 , 具有地域分布特征。在 3 个河流型水牛群体中, 第 109 位核苷酸处均为 C, 未检测到多态。提示河流型水牛与沼泽型水牛已有较大的遗传分化。

关键词: 河流型水牛; 沼泽型水牛; 催乳素; Exon 4; 测序; PCR-SSCP

中图分类号: Q959.842; Q347 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2010)06-0575-06

Genetic characteristics on exon 4 of prolactin gene in 12 water buffalo populations

YUAN Feng¹, MIAO Yong-Wang^{1,2,*}, LI Da-Lin³, TANG Shou-Kun⁴,
XÜ Zheng⁵, HUO Jin-Long¹, QI Hong¹

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China;
3. Yunnan Institute of Buffalo Science and Technology, Kunming 650021, China;
4. Animal Husbandry and Veterinary Station of Luxi City, Luxi 678400, China;
5. Animal Husbandry Station of Guangxi Province, Nanning 530022, China)

Abstract: The prolactin exerts obvious adjustment and control function for mammary gland development, lactation and milk protein gene expression in water buffalo. In this study the sequence features and polymorphisms of the exon 4 in prolactin gene were examined in 385 individuals which came from 12 river and swamp type buffalo populations using DNA direct sequencing and PCR-SSCP methods. The results showed that the sequence of exon 4 in prolactin gene was consists of 180 nucleotides, the fragment had high conservative character in different species. The e4. 109 C>T substitution was detected in nine swamp buffalo populations, and it was a silent mutation and was not associated with the traits of milk yield in buffalo. The PB^A gene was the predominant gene in seven swamp type buffalo populations, while PB^B gene was the dominant gene in Dehong and Fuzhong populations. The frequencies of PB^A in swamp type buffalo was 0.400 – 0.917 and the average value was 0.629 ± 0.049 . The polymorphism wasn't found in river buffalo, all the samples from river buffalo were holding nucleotides e4.109 C. The results indicate that there is distinct genetic differentiation between swamp and river type buffalo.

Key words: River buffalo; Swamp buffalo; Prolactin; Exon 4; Sequencing; PCR-SSCP

收稿日期: 2010-03-09; 接受日期: 2010-10-08

基金项目: 云南省应用基础研究重点项目(2007C0003Z); 国家自然科学基金项目(30660024); 云南省应用基础研究计划面上项目(2006C0034M); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2008AA101001); 云南省教育厅科学研究基金项目(2010Y344); 云南省应用基础研究计划面上项目(2010ZC243)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: yongwangmiao999@yahoo.com.cn

第一作者简介: 袁 峰(1971—), 男, 硕士, 讲师, 专业方向: 动物分子遗传学。E-mail: yfsas@163.com

水牛(*Bubalis bubalis*)是亚热带和热带地区饲养的大型家养哺乳动物,在当地农业生产中发挥重要作用。家养水牛分为河流型和沼泽型两种类型,两者在外貌形态、分布、核型组成及泌乳性状上差异显著,其中河流型水牛具有优良的乳用性能,未经选育的河流型水牛其年产奶量一般为 1 800~2 300 kg,而沼泽型水牛主要为役用,其年产奶量仅为 300~600 kg (Miao et al, 2008)。两者泌乳性状相差很大,但还未见有学者对控制水牛泌乳性状的相关基因进行研究。中国水牛主要为沼泽型,共分成 18 个类群,主要分布于南方水稻种植区,用于稻田耕作。随着近年我国城市化进程加快和农业机械化水平提高,水牛役用的价值逐渐减少,很多地方已开始对本地水牛进行改良以提高其产奶性能。近年在云南省腾冲县发现的我国第一个本地河流型水牛群体——槟榔江水牛具有较高的产奶量,其泌乳性状的遗传基础如何,还未见报道。因此,在这一背景下,需要开展与水牛泌乳性状相关的基因研究,为水牛保种和奶水牛选育工作提供背景资料。

在水牛上,近年各国已开展了水牛群体遗传特征的描述、遗传图谱和基因定位的研究工作,我国从常染色体微卫星双亲遗传和 mtDNA 母系遗传等角度开展了一些研究工作(Ma et al, 1991; Yang et al, 2007)。催乳素(prolactin, PRL)对哺乳动物乳腺发育、泌乳和乳蛋白基因的表达有明显的调控功能(Michael, 2004)。在黄牛(*Bos taurus*)中,PRL 基因位于 23 号染色体,长约 10 kb,由 5 个外显子和 4 个内含子、5'端 854 bp 的上游调控区和 3'端 69 bp 的 UTR 组成,其编码的蛋白质由 229 个氨基酸残基组成,1~30 位氨基酸残基为信号肽序列,成熟的多肽含有 199 个氨基酸残基。对黄牛 PRL 基因的研究已涉及到 PRL 基因的各个组成部分,特别是在黄牛(奶牛)PRL 第 4 外显子(exon 4)的 8398 位点,研究发现 AG 基因型在黑白花奶牛里具有高产奶量,GG 基因型具有高乳脂含量(Brym et al, 2005); Li & Du (2004)分析了 99 头中国荷斯坦牛 PRL exon 4 的 g 8398 位点,检测到不同基因型对乳蛋白率有显著影响; Chrenek et al (1999)对瑞士褐牛进行研究时未检测到不同基因型对产奶性状有显著性影响; Zhu et al(2008)分析了广西本地沼泽型水牛催乳素受体(PRLR)基因部分保守序列,结果表明序列较保守。PRL 基因位于水牛 2 号染色体上,该基因群体遗传特征及其与水牛产奶性状是否有遗传关联目前还

不是很清楚。

本研究采用 DNA 直接测序并结合 PCR-SSCP 技术,对河流型和沼泽型水牛共 12 个群体的 PRL exon 4 进行了检测分析,旨在弄清水牛 PRL exon 4 的序列特征及其与其他牛科物种的催乳素基因同源序列的遗传差异,揭示水牛不同群体中 PRL exon 4 的遗传组成,阐明其与水牛泌乳性状间的遗传关系。

1 材料与方法

1.1 材料

385 头水牛样品分别采自 12 个水牛群体,其中包括 144 头河流型水牛和 241 头沼泽型水牛。采样个体间无直接的血缘关系,每头牛静脉采血 10 mL,与等体积 DNA 保存液混合,低温带回实验室,-20℃冻存。各群体样本信息见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取

参照《分子克隆(第三版)》(Joseph & David, 2002)的方法提取基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测其纯度和浓度,TE 缓冲液稀释为 50 ng/μL 的浓度,保存于 4℃备用。

1.3 测序引物设计与 PCR 扩增

参考黄牛 PRL 序列(GenBank 登录号 AF426315)(Cao et al, 2002)和水牛 PRL mRNA 基因部分序列(GenBank 登录号 EF054878、EU340420、EU352822 和 DQ287249)设计 PCR 引物,其序列为: PRL1_F (5'-CAA AGT ATA AAC CGA TAG-3')与 PRL1_R (5'-GCT GGT GGA ATT CTA AT-3'),由上海生工生物工程公司合成,缓冲液溶解至浓度为 10 μmol/L,4℃保存。该 PCR 引物扩增片段长 554 bp,包括 PRL 基因 exon 4 (180 bp)和内含子 3(intron 3)(174 bp)、内含子 4(intron 4)(200 bp)部分序列。

PCR 反应体系为 25 μL,含 10 × buffer 2.5 μL,上下游引物各 0.1 μmol/L, dNTPs 20 μmol/L, Taq 酶 1.2 U,模板 DNA 80 ng。扩增条件为: 94℃预变性 4 min; 94℃ 35 s, 51℃ 35 s, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃后延伸 5 min, 4℃保存。

每个群体选择 3 个样本共 36 个样本送上海生工生物工程公司进行双向测序,测序结果用 DNASTAR 软件包进行序列核对和突变位点输出。

1.4 SSCP 引物设计和分析

根据测序结果,选取突变位点前后 60 bp 的保守区域设计 SSCP 引物,为 PRL2_F(5'-GCT CCT GGA ATG ACC CTC-3')和 PRL2_R(5'-TGC CTT

牛科物种 Bovidae species	核苷酸位置 Location of nucleotide												等位基因 Allele
	111	444	555	777	777	999	000	011	111	112	777		
沼泽型水牛 Swamp buffalo	345	012	567	012	678	456	678	901	234	890	234		PB ^A
沼泽型水牛 Swamp buffalo	ATG	TCC	CTG	ACA	GTG	GCC	ATC	CTA	TCG	GCC	TTT		PB ^B
沼泽型水牛 Swamp buffalo								T..					PB ^C
河流型水牛 River buffalo									C..				PB ^A
黄牛 Bos		..T		..C	..A								A
黄牛 Bos				..C	..A								A
黄牛 Bos			..C	..C									G
山羊 Capra hircus						..T							
山羊 Capra hircus	..A					..T					..G		
山羊 Capra hircus						..T					..G		
绵羊 Ovine						..T							
绵羊 Ovine						..T	..T			..T			

图 1 水牛及其近缘种 *PRL* exon 4 基因核苷酸变异特征
Fig.1 Nucleotide variation characteristics of *PRL* exon 4 in buffalo and its related species

CCA GAA GTC GTT-3’), 由上海生工生物工程公司合成, 缓冲液溶解至浓度为 10 μmol/L, 4℃保存, 预期扩增片段长 123 bp。PCR 反应体系和扩增条件同 1.3。

取 4 μL PCR 扩增产物, 加 8 μL 变性剂(含 98% 去离子甲酰胺, 0.025%二甲苯青, 0.025%溴酚蓝, 5 mmol/L EDTA), 98℃变性 8 min, 冰浴 5 min 后上样。用丙烯酰胺和 N, N-甲叉双丙烯酰胺(Acr/Bis) 按质量比为 29:1 配成质量分数为 12%的凝胶进行电泳, 1×TBE, 3~5 V/cm 电压室温电泳 14 h 后, 银染染色, 数码相机拍照记录结果。

1.5 数据统计和分析

采用 PopGene1.31 软件(Yeh et al, 1999)计算等位基因频率、期望杂合度、表观杂合度、香农指数和进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 水牛 *PRL* exon 4 结构特征分析

采用 *PRL*1 引物扩增并测序后获得长度为 554 bp 的片段, 根据内含子和外显子交界顺序的 GT-AG 法则, 并对比黄牛 *PRL* 基因序列 (GenBank 登录号: AF426315), 得到河流型与沼泽型水牛 *PRL* exon 4 序列长度相同, 由 180 个核苷酸组成。在沼泽型水牛中, *PRL* exon 4 第 109 位核苷酸 (SNP109) 发现 C>T 碱基替换, 但在河流型水牛中未发现多态, 该位置的核苷酸均为 C。该位点对应于 AF426315 序列的第 8429 nt。水牛中检测到的第 109 位碱基替换为同义替换, 均编码 Leu, 不引起蛋白质水平氨基酸的改变。根据该位点的核苷酸组成, SNP109 为 C 核苷酸的等位基因命名为 PB^A, 为 T 核苷酸的等位基因命名为 PB^B。由此, 在所分析的水牛群体中, 若 SNP109 位点为 C/C 纯合子的个体

基因型为 PB^{AA}; 若该位点为 T/T 纯合子的个体基因型为 PB^{BB}; 若该位点为 C/T 杂合子的个体基因型为 PB^{AB}。

为进一步揭示水牛 *PRL* exon 4 遗传特征, 选取 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上已发表的牛科物种同源序列进行了比较分析, 结果见图 1 和图 2。在 NCBI 数据库中共有 4 条水牛 *PRL* 基因序列(EF054878、EU340420、EU352822 和 DQ287249)。经比对, 在这些序列中一条沼泽型水牛序列(EF054878)出现了一个新的 SNP 位点, 即 SNP112, 该位点核苷酸出现了 T>C 碱基替换, 该替换为非同义替换, 引起其编码产物由 Ser 变为 Pro, 将该种类型替换命名为等位基因 PB^C (Du et al, 2009)。对牛科物种的 *PRL* exon 4 序列比对后发现, 水牛、黄牛(奶牛)、绵羊和山羊 *PRL* exon 4 序列长度均为 180 bp, 同源率为 99%。在黄牛中, 该外显子第 42 nt 处有 C>T 突变(注: 该突变表示为 e4. 42(C>T), 以下同), e4. 57(G>C)和 e4. 78(G>A), 均为同义替换; 绵羊中有 e4. 108(C>T)和 e4. 120(C

牛科物种 Bovidae species	氨基酸位置 Location of amino acid
	1122333345
沼泽型水牛 Swamp buffalo	54946267808
沼泽型水牛 Swamp buffalo	MSLTVAISAF
沼泽型水牛 Swamp buffalo	
沼泽型水牛 Swamp buffalo	 P ..
河流型水牛 River buffalo	
黄牛 Bos	
黄牛 Bos	
黄牛 Bos	
山羊 Capra hircus	V.....
山羊 Capra hircus	K.....V.....L
山羊 Capra hircus	V.....L
绵羊 Ovine	V.....
绵羊 Ovine	V.....

图 2 水牛及其近缘种 *PRL* exon 4 基因氨基酸变异特征 (对应图 1 中相应核苷酸)

Fig.2 Amino acid variation characteristics of *PRL* exon 4 in buffalo and its related species (Corresponding to the nucleotide site in Fig.1)

表 1 385 头水牛 *PRL* exon 4 遗传变异
Tab. 1 The genetic variations of *PRL* exon 4 assayed in 385 buffaloes

类型 Type	水牛群体 Buffalo population	样本量 Sample size	基因型个体数 No. of genotype				基因频率 Gene frequencies		表观杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	香农指数 Shannon's index	Hardy-Weinberg 平衡检测 HW test	
			PB ^{AA}	PB ^{AB}	PB ^{BB}	PB ^A	PB ^B	卡平方 χ^2 Chi-square				P 值 P value	
河流型 River type	槟榔江 Binlangjiang	112	112	0	0	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—
	尼里-拉菲 Nili-Ravi	21	21	0	0	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—
	摩拉 Murrah	11	11	0	0	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—
沼泽型 Swamp type	盐津 Yanjin	32	14	14	4	0.656	0.344	0.438	0.438	0.458	0.644	0.069	0.793
	滇东南 Diandongnan	30	12	16	2	0.667	0.333	0.533	0.533	0.452	0.637	1.014	0.314
	德宏 Dehong	35	6	16	13	0.400	0.600	0.457	0.457	0.487	0.673	0.135	0.713
	德昌 Dechang	29	8	20	1	0.621	0.379	0.690	0.690	0.520	0.664	5.825	0.016
	东流 Dongliu	31	14	10	7	0.613	0.387	0.323	0.323	0.482	0.667	3.525	0.060
	福安 Fuan	27	9	13	5	0.574	0.462	0.482	0.482	0.498	0.682	0.032	0.858
	贵州 Guizhou	12	10	2	0	0.917	0.083	0.167	0.167	0.159	0.287	0.048	0.827
	西林 Xilin	15	8	6	1	0.733	0.267	0.400	0.400	0.405	0.580	0.002	0.963
	富钟 Fuzhong	30	8	13	9	0.483	0.517	0.433	0.433	0.508	0.693	0.669	0.413
	Mean±SD					0.629±0.049	0.375±0.050	0.436±0.048	0.441±0.037	0.614±0.042	—	—	—

>T), 均为同义替换; 山羊中有 e4. 14(T>A), e4. 174(T>G), 为非同义替换, 导致其编码的第 5 位氨基酸由 Met 变为 Lys, 第 58 位氨基酸由 Phe 变为 Leu。

在 NCBI 数据库进行沼泽型水牛与非牛科哺乳类和鸟类的 *PRL* exon 4 同源性比对, 结果显示, 水牛与野猪、人、黑长臂猿、褐家鼠的同源性分别为 86%、81%、82%和 76%; 与鸿雁、绿头鸭的同源性均为 74%。

2.2 群体遗传特征分析

在序列分析的基础上, 采用 SSCP 检测技术对 *PRL* exon 4 群体变异进行了检测, 基因型分型见图 3。为了进一步确定 SSCP 检测的变异是否存在, 对每一种变异类型选取了 4 个样本进行了正反双向序列测定。385 头水牛检测分析结果见表 1。在所检测的水牛个体中未发现 PB^C 等位基因。河流型水牛 3 个群体中全部为基因型 PB^{AA} 型个体。而沼泽型水牛群体中存在 PB^{AA} 、 PB^{BB} 和 PB^{AB} 三种基因型。 PB^A 基因频率平均值为 0.629 ± 0.049 , PB^A 基因频率最低的是德宏水牛群体, 为 0.400, 最高的是贵州水牛群体, 为 0.917。各群体该位点期望杂合度在 0.159~0.520 之间, 各群体平均值为 0.441 ± 0.037 ; 各群体香农多样性指数(Shannon's index)在 0.287~0.693 之间, 各群体平均值为 0.614 ± 0.042 。

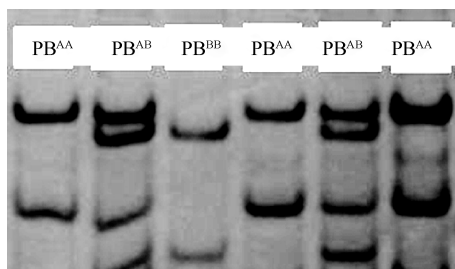


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳对 *PRL* exon 4 的基因型分型
Fig.3 The genotyping image of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis for *PRL* exon 4

3 讨 论

对比水牛与其近缘种 *PRL* exon 4 的结构特征, 在黄牛(奶牛)中发现 3 个 SNP 位点, 均为同义替换; 绵羊中发现 2 个 SNP 位点, 均为同义替换, 表明 *PRL* exon 4 在水牛、黄牛和绵羊中同义替换率大于异义替换率, 提示其高度保守性。然而, 在山羊中发现的 2 个 SNP 位点, 导致其编码的氨基酸发生了改变, 这和其他牛科物种的情况不一致, 这种改变是否引起泌乳性状或生长性状的改变值得进一步研究。比较水牛与非牛科哺乳类和鸟类的 *PRL*

exon 4 的同源性, 与几种哺乳动物的同源性在 76% 以上, 与雁形目两种鸟类比较为 74%, 也说明 *PRL* exon 4 在进化上的保守性。

我们所测序列与 NCBI 数据库中已发表的 4 条水牛 *PRL* 基因序列相比, 在序列号为 EF054878 序列中出现了一个新的 SNP 位点, 即 SNP112, 其导致了非同义替换, 将该种类型替换命名为等位基因 PB^C (Du et al, 2009)。然而, 在进行包括水牛在内的牛科物种的 *PRL* exon 4 序列比较中, 该外显子除了 EF054878 序列以外, 均为未发生替换(图 1), 提示该位点在牛科物种中高度保守; 另外, 本研究所检测的 385 头不同水牛群体中均未检测到此突变位点, 因此, e4.SNP112(即等位基因 PB^C)是否真实存在, 建议原作者重新进行检测核对原始数据。

已有多名学者研究 *PRL* exon 4 多态与奶牛泌乳性状之间的关系。有报道 *PRL* exon 4 及两侧内含子在黑白花奶牛(Black-and-White, $n=15$)、娟珊牛(Jersey, $n=6$)、波兰红牛(Polish Red, $n=6$)、西门塔尔牛(Simmental, $n=3$)、利木赞牛(Limousine, $n=3$)和夏洛来牛(Charolaise, $n=3$)中有 6 个 SNP 位点, 分别是第 3 内含子 g. 8307(T>C)、g. 8314(C>T)、第 4 外显子 g. 8362 (T>C)、g. 8377(G>C)、g. 8398(A>G)和第 4 内含子 g. 8510(T>C)。通过 PCR-RFLP 检测 g. 8398(A>G)位点(对应于 *PRL* exon 4 的第 78 核苷酸, 为同义替换, 见图 1), 发现 AG 基因型在黑白花奶牛(Black-and-White, $n=186$)具有高产奶量, GG 基因型具有高乳脂含量(Brym et al, 2005)。Li & Du (2004)采用 PCR-RFLP 技术对 99 头中国荷斯坦牛 *PRL* g. 8398 位点进行分析, 检测到 AA、AB 和 BB 基因型, 不同基因型对乳蛋白率有显著影响 ($P<0.05$)。Chrenek et al (1999)对瑞士褐牛进行研究时未检测到不同基因型对产奶性状有显著性影响。以上对黄牛 g. 8398 位点的研究结果不尽相同, 从图 1、图 2 可知黄牛 *PRL* exon 4 的 3 个 SNP 位点均为沉默突变, 并未引起其所编码蛋白质一级结构发生改变, g. 8398 位点与产奶性状显著相关可能是该突变位点与影响产奶性状的某个突变基因连锁导致的, 这需要进一步验证。从本研究来看, 黄牛 *PRL* exon 4 中的 3 个突变位点在本研究所分析的沼泽型和河流型水牛样品中均未检测到, 表明水牛与黄牛有较大的遗传差异, 这与它们之间的物种分类地位是吻合的。由于水牛中 *PRL* exon 4 的第 109 nt 位点 C>T 为沉默突变, 均编码 Leu, 据此推测该突变位

点与泌乳性状之间没有直接的相关性。值得注意的是,黄牛 *PRL* 中的 g. 8398 位点,对应于本研究水牛 *PRL* exon 4 序列的第 78 nt,在沼泽型和河流型水牛中该处核苷酸均为 G。根据在黑白花奶牛中对该位点的基因分型标准(Brym et al, 2005),该位点在两类水牛群体中均已达到纯合,为 GG 基因型的纯合子。水牛奶中乳脂含量较高,一般为 6%~11% (Zhang et al, 2004)。而在黑白花奶牛中 GG 基因型个体具有高乳脂含量(Brym et al, 2005),这与水牛奶具有高乳脂含量相一致。提示该位点可能与控制乳脂含量的基因紧密连锁,值得进一步深入研究。

等位基因频率是群体遗传结构和遗传组成的重要特征,根据 385 头水牛 *PRL* exon 4 检测结果,在所检测的 3 个河流型水牛群体中未发现 PB^B 基因。在 9 个沼泽型水牛群体中均检测到 PB^B 基因,除了德宏水牛和富钟水牛群体外,其余群体都是 PB^A 基因占优势(PB^A 基因频率>0.500),沼泽型水牛群体中 PB^A 基因频率在 0.400~0.917 之间,群体平均值为 0.629 ± 0.049 ,从各个群体 PB^A 基因频率值来看,该位点在沼泽型水牛群体中具有地域分布特征。

参考文献:

- Brym P, Kaminski S, Wojcik E. 2005. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits[J]. *Appl Genet*, **45**(2): 179-185.
- Cao X, Wang Q, Yan JB, Yang FK, Huang SZ, Zeng YT. 2002. Molecular cloning and analysis of bovine prolactin full-long genomic as well as cDNA sequences[J]. *Acta Genet Sin*, **29**(9): 768-773. [曹新, 王强, 颜景斌, 阳飞昆, 黄淑帆, 曾溢滔. 2002. 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, **29**(9): 768-773.]
- Chrensek P, Huba J, Oravcovs M. 1999. Genotype of bGH and bPRL genes in relationships to milk production[C]. JAM van Arendonk. Proceedings of the 50th Annual Meeting of the EAAP, Zurich: **40**: 79-84.
- Du TY, Lu KH, Yang H, Niu JT, Wei F. 2009. Cloning and sequence analysis of the pituitary prolactin cDNA of buffalo[J]. *Guangxi Agricult Sci*, **40**(8): 1074-1078. [杜挺媛, 卢克焕, 杨华, 牛金涛, 魏凤. 2009. 水牛垂体催乳素 cDNA 的克隆与序列分析. 广西农业科学, **40**(8): 1074-1078.]
- Joseph S, David WR. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 483-485.
- Li JT, Du LX. 2004. Correlation analysis of PRL genotype with milk yield and milk contents in Holstein cattle[J]. *J Shandong Agricult Univ: Nat Sci ed*, **35**(4): 553-555. [李吉涛, 杜立新. 2004. 中国荷斯坦牛催乳素基因型与产奶性状的相关分析. 山东农业大学学报: 自然科学版, **35**(4): 553-555.]
- Ma CX, Ma K, Shi LM, Yu GX, Gong SH, Peng CH, Yang XP. 1991. Analysis of synaptonemal complexes in spermatocytes of the hybrid F_1 between swamp and murrah buffalo[J]. *Zool Res*, **12**(3): 305-308. [马彩霞, 马昆, 施立明, 余桂馨, 龚世和, 彭长芬, 杨向平. 1991. 沼泽水牛与摩拉水牛杂种一代精母细胞联合复合体分析. 动物学研究, **12**(3): 305-308.]
- Miao YW, Li DL, Huo JL, Zhang CX. 2008. A review on genetic diversity and origin of Chinese buffalos[J]. *Chn Cattle Sci*, **34**(4): 16-20. [苗永旺, 李大林, 霍金龙, 章纯熙. 2008. 中国水牛的遗传多样性与起源分化. 中国牛业科学, **34**(4): 16-20.]
- Michael JS. 2004. The prolactin and growth hormone families: Pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface[J]. *Reprod Biol Endocrin*, **2**: 51-66.
- Yang ZY, Miao YW, Li DL, Huo JL, Cheng T, He CY, Chuang XH, Tang SK. 2007. Unfolding of population structure in Dehong buffalo using microsatellite DNA markers[J]. *Zool Res*, **28**(6): 659-663. [杨泽宇, 苗永旺, 李大林, 霍金龙, 陈涛, 何朝阳, 创向辉, 汤守银. 2007. 德宏水牛微卫星标记分析的群体遗传变异. 动物学研究, **28**(6): 659-663.]
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1999. POPGENE Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis Release 1.31[M]. Edmonton: University of Alberta.
- Zhang CX, Yang BY, Zhang J, Zhu GY. 2004. The sustainable development of Chinese buffalo dairy industry [J]. *Chn Dairy*, **11**: 11-15. [章纯熙, 杨白云, 覃静, 诸葛莹. 2004. 中国水牛乳业的可持续发展. 中国乳业, **11**: 11-15.]
- Zhu JJ, He JZ, Wang XP, Jing QY, Feng XP, Guo YF, Lan GQ, Wei YM, Jiang HS. 2008. Cloning and sequence analysis of swamp buffalo prolactin receptor partial cDNA[J]. *J Guangxi Agricult Biol Sci*, **27**(4): 327-324. [朱佳杰, 何荆洲, 王新平, 蒋钦杨, 冯雪萍, 郭亚芬, 兰干球, 韦英明, 蒋和生. 2008. 水牛催乳素受体基因克隆及序列分析. 广西农业生物科学, **27**(4): 327-324.]