

雞泌乳素接受體基因點突變多態性基因型 檢測技術平臺開發與應用⁽¹⁾

朱家德⁽²⁾ 林德育⁽²⁾⁽⁸⁾ 賴永裕⁽²⁾ 梁筱梅⁽⁴⁾ 楊深玄⁽⁵⁾ 劉宗霖⁽⁷⁾
張秀鑾⁽⁶⁾ 吳明哲⁽³⁾ 蕭振文⁽²⁾

收件日期：110 年 6 月 22 日；接受日期：111 年 3 月 30 日

摘 要

賴抱行為是禽類經天擇與演化之繁殖生理反應結果之一，此牽涉遺傳與環境等因素。泌乳素接受體 (prolactin receptor, *PRLR*) 基因被認為與雞隻賴抱行為具顯著關聯性。本研究旨在應用六種臺灣本地雞種，包括畜試土雞高畜 7 號、9 號、11 號、12 號、花畜土雞及鬥雞，共 90 隻，建立螢光引子標記之競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (kompetitive allele specific polymerase chain reaction, KASP) 檢測平臺，進行雞隻 *PRLR* 基因點突變多態性基因型鑑定。比較 KASP、單股結構多態性檢測技術 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 與 DNA 序列定序結果顯示，三種檢測法分析 *PRLR* 基因 PP、PR 及 RR 基因型之結果完全對應吻合，顯示三種技術可相互替代應用，KASP 可效縮短基因型檢測時間，僅需 PCR-SSCP 的 1/3 時間，並具備基因型鑑別準確度高之優勢，未來可推薦供作種雞單位點 SNP (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因型鑑定平臺之檢測模式。

關鍵詞：臺灣土雞、賴抱、泌乳素接受體基因、競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應。

緒 言

賴抱 (broodiness) 行為是禽類經天擇與演化之繁衍行為之一，賴抱期間母禽會有採食與飲水減少、反應遲鈍、體溫升高、羽毛蓬鬆、翅膀下垂、叫聲奇特、防衛行為增強、臥巢頻繁、體重大幅度減輕及免疫力下降等情形。家禽一般在產蛋高峰期以後就有表現賴抱的傾向，世界上眾多的家禽品種中除純種白色來亨雞 (White Leghorn) 與北京鴨 (Pekin duck) 等少數品種外，大多數品種都具有一定程度的賴抱性，尤其以地方雞種表現的賴抱性較強 (Yang and Jiang, 2005)。賴抱會導致家禽卵巢與輸卵管退化使產蛋率下降，賴抱結束後需要很長時間才能重新恢復產蛋，有的母禽甚至喪失繁殖力而嚴重影響了產蛋性能 (Jiang *et al.*, 2005)。研究顯示，母雞賴抱一次預估導致年平均產蛋量下降 10%，有的禽類在一個產蛋期內多次賴抱，對產蛋量的影響更大 (姜, 2005)。由於賴抱性與家禽的生產性能密切相關，所以培育出無賴抱性或低賴抱性的家禽品種品系有其必要的商業價值 (Jiang *et al.*, 2005)。

泌乳素接受體 (prolactin receptor, *PRLR*) 是一種跨膜醣蛋白，屬於第一型細胞激素受體 (type I cytokine receptor)，廣泛存在於哺乳動物的腦、卵巢、胎盤和子宮在內的各種組織中，藉由與泌乳素 (prolactin, *PRL*) 在不同組織中的協同作用以發揮不同功能，包括內分泌代謝、繁殖調節、生長發育、免疫調節、行為調節、細胞增殖及分化等 (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2000; Tan and Peng, 2012)。在雞的 *PRLR* 基因研究上，Duun *et al.* (1998) 最早將 *PRLR* 基因定位於 Z 染色體上的 45 cM 處，緊鄰位於 49 cM 處的生長激素受體基因 (growth hormone receptor, *GHR*)，*PRLR* 基因是由 14 個外顯子 (exon) 和 13 個內含子 (intron) 所組成，各外顯子分別被命名為外顯子 1、2、

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2700 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組退休。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(5) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(6) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(7) 國立成功大學生物科技與產業科學系。

(8) 通訊作者，E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw。

3、4a、5a、6a、7a、4、5、6、7、8、9 及 10，並認為 *PRLR* 基因為影響雞隻賴捲性之候選基因。雞 *PRLR* 基因表現對母雞賴捲行為與產蛋量影響的研究顯示，賴捲行為母雞較無賴捲行為者有顯著較高卵巢組織 *PRLR* 基因 mRNA 表現量 ($P < 0.01$) 與顯著較低產蛋期產蛋量 (101.15 ± 13.94 枚 vs. 49.30 ± 21.47 枚, $P < 0.01$) (汪, 2007)。

林等 (2007) 依據美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 公開雞 *PRLR* 基因序列 (GenBank AJ011128) 利用 PCR-SSCP，針對畜試土雞近親品系 9 (LRI-L9) 與來亨雞進行 *PRLR* 基因型頻率分析，結果顯示 LRI-L9 雞隻 *PRLR* 基因 PP、PR 及 RR 基因型頻率分別為 27.3、48.5 及 24.2%，而來亨雞皆為 100.0% PP 基因型，經序列分析發現交替基因 *P* 為 C (cytosine)，交替基因 *R* 為 T (thymine)，後續將 LRI-L9 與來亨雞品系雜交 F2 代無賴捲行為的母雞當作無賴捲性組，賴捲天數達 3 天以上的母雞則為有賴捲性組，進行 *PRLR* 基因型與賴捲性組之關聯性分析，結果顯示在此兩個品種母雞中，存在顯著的關聯性 ($P < 0.001$)。

PCR-SSCP 是一種具有操作簡單與成本低廉優勢的單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 檢測技術，其原理基於 DNA 序列發生 SNP、缺失或插入時所造成單股 DNA 有結構上的差異，可在非變性聚丙烯醯胺凝膠電泳過程中產生不同程度的泳動位移，藉此差異作為基因型判定的依據，然基因型檢測時間較長 (6 – 7 小時) 且易受電泳溫度、電泳緩衝液濃度、凝膠濃度、甘油濃度等外在因素影響 (Konstantinos *et al.*, 2008)。

KASP 是由 LGC 公司 (Laboratory of the Government Chemist, LGC, UK) 開發之新一代 SNP 檢測技術，其基本程序是藉由兩股 5' 端各自帶有 FAM/HEX-labelled 標記螢光與 3' 端分別能辨識突變點鹼基之引子和一股反向引子所構成之 primer mix，並利用帶有兩種不同螢光訊號的兩條 quencher 抑制螢光探針 master mix，對 SNP 位點進行 PCR 擴增反應，達到一定程度的 PCR 擴增反應後，再利用 Real-time PCR 吸光值測定相對應 PCR 擴增螢光強度，以判定基因型 (Semagn *et al.*, 2013)。此技術具有高通量、低錯誤率、低成本及基因型檢測效率高等優點，被廣泛應用在玉米 (Nair *et al.*, 2015)、小麥 (Rasheed *et al.*, 2016; Qureshi *et al.*, 2018) 及大豆 (Shi *et al.*, 2015) 等作物的基因表現研究與分子標識輔助選拔等方面。

本研究旨在運用 KASP 基因型檢測技術，建置影響雞隻賴捲性候選基因 *PRLR* 之基因型檢測平臺，以 KASP 具備的高準確性與基因型鑑定時程短之優勢，提升種禽分子標識輔助育種效率。

材料與方法

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組執行試驗動物 *PRLR* 基因基因型檢測與分析。試驗動物分別飼養於花蓮種畜繁殖場與高雄種畜繁殖場，試驗動物之使用、飼養及試驗內容皆依據畜產試驗所實驗動物管理小組批准之文件與試驗準則進行 (花蓮種畜繁殖場 109-03 號、花蓮種畜繁殖場 109-04 號及高雄種畜繁殖場 109-3 號申請核准在案)。

I. 試驗動物

應用畜試土雞高畜 7 號 (TLKT-07, 4 公 8 母)、畜試土雞高畜 9 號 (TLKT-09, 4 公 8 母)、畜試土雞高畜 11 號 (TLKT-11, 4 公 7 母)、畜試土雞高畜 12 號 (TLKT-12, 4 公 8 母)、花畜土雞 (Hualien LRI, 18 公 20 母，自 TLKT-09 與 TLKT-12 雜交選育之品種) 及鬥雞 (Fighting Chicken, 5 公，自彰化民間種雞場取得種蛋後由花蓮種畜繁殖場自行選育) 等雞隻為試驗動物，共計 90 隻。

II. 採血及基因體 DNA 萃取

- 本研究使用 90 隻雞，以翼下靜脈採集血液約 0.5 – 1.0 mL，置入含抗凝血劑 EDTA-K3 之採血管中混合後供基因體 DNA (gDNA) 萃取用。
- 以 gDNA 快速萃取套組 (EasyPure Genomic DNA mini Kit, TransGen Biotech, Beijing) 分別萃取 90 隻雞 gDNA 後，經乾燥並加入適量 T.E. 緩衝液溶解，再利用微量分光光譜儀 (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, USA) 測定 gDNA 濃度，並調整濃度為 20×30 ng/ μ L，供作 PCR 反應之模板。

III. 以 PCR-SSCP 進行雞隻 *PRLR* 基因型檢測

以林等 (2007) 根據 NCBI 公開雞 *PRLR* 基因序列 (GenBank AJ011128) 設計之 PCR 引子序列，分別為：正向引子 5'-AGACTTTCTGCAGAGTGAC-3' 與反向引子 5'-ATCCTGCAGCTACCCCAGTTC-3'，取上述試驗動物 gDNA 進行 PCR 反應擴增 252 bp 目標片段產物後，應用 GenePhor 電泳設備 (GenePhor Electrophoresis Unit from GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 進行 PCR-SSCP 基因型鑑定，可判讀 *PRLR* 基因 PP、PR 及 RR 基因型 (圖 1)。

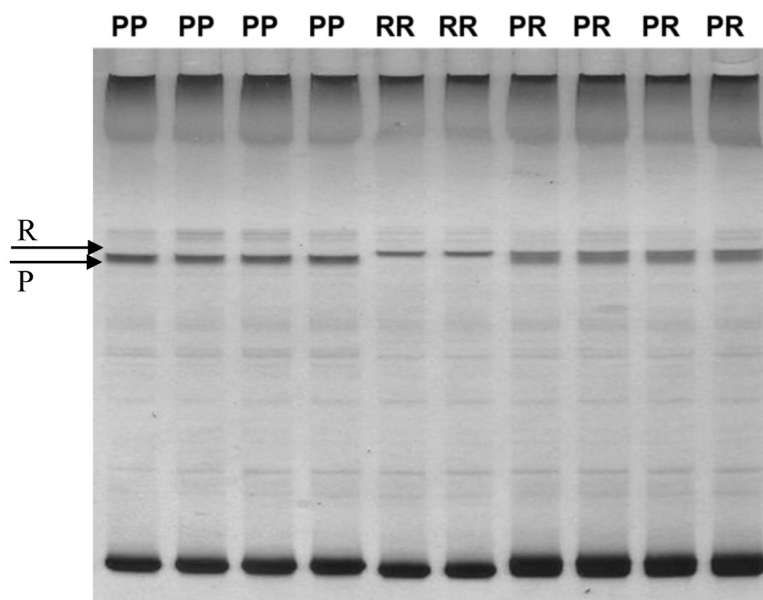


圖 1. 以 PCR-SSCP 檢測技術分析畜試土雞近親品系 9 之 *PRLR* 基因電泳圖。其中可區分為 PP、PR 及 RR 三種基因型。

Fig. 1. Genotyping result of LRI-L9 chicken *PRLR* gene by PCR-SSCP. The samples are classified into three different genotypes (PP, PR, and RR).

IV. 以 KASP 進行雞隻 *PRLR* 基因型檢測

依 NCBI 公開雞 *PRLR* 基因序列 (GenBank AJ011128) 設計之 PCR 引子，序列分別為 FAM 藍色螢光標記 P 交替基因 cytosine 正向引子 5'-CAAATAATGATCTTTCTATCA AGGATGTATC-3'、HEX 紅色螢光標記 R 交替基因 thymine 正向引子 5'-GCAAATAATGATCTTT CTATCAAGGATGTATT-3' 及反向引子 5'-GTAGTCAGGGCATAGAGGTG-3'，並以即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Applied Biosystems StepOne™ System, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行 KASP 基因型檢測。KASP 反應綜合液包括 DNA (50 ng/μL) 1.5 μL、2X master mix 5 μL、ddH₂O 3.3 μL 與 assay mix 0.2 μL。KASP 反應依序為 (A) 95°C 預變性 15 分鐘；(B) 10 個循環的 95°C 變性 20 秒與 61 – 55°C 黏合 60 秒 (每個循環降低 0.6°C)；(C) 26 個循環的 95°C 變性 20 秒與 55°C 黏合 60 秒。前述反應條件擴增 105 bp 目標片段產物，結果判讀以儀器內建 StepOne Software v2.3 軟體進行基因型鑑定。

V. 雞隻 *PRLR* 基因 DNA 序列定序

本研究依雞 *PRLR* 基因序列 (GenBank NC_006127.5) 設計之 PCR 引子序列分別為正向引子 5'-GGAAGTAACAGCTCTGATCCTC-3' 與反向引子 5'-ACAACCTCTCC CCTCAGTC-3'，運用 PCR 擴增 880 bp 目標片段產物後，以核苷酸自動定序儀 (Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行定序。

結 果

應用本研究開發建立之 KASP 基因型檢測平臺技術進行 *PRLR* 基因型鑑定，結果如圖 2。圖 2 中，KASP 螢光標記可明確地區分三種基因型，其中近 X 軸 (HEX 螢光強度) 為 *PRLR*-RR 基因型，近 Y 軸 (FAM 螢光強度) 為 *PRLR*-PP 基因型，中間綠點 (FAM/HEX 混合螢光強度) 為 *PRLR*-PR 雜合基因型，方塊黑點則為空白對照。然為進一步驗證 KASP 基因型檢測技術之準確性，依 NCBI 公開 *PRLR* 基因序列 (GenBank NC_006127.5) 設計引子，並經 PCR 擴增長度為 880 bp 產物後，以核苷酸自動定序儀進行雙向定序，將定序結果與 GenBank AJ011128 公開資料做序列比對，結果顯示 PP 基因型者第 617 鹼基為 C (cytosine)，第 608-623 bp 之 DNA 序列為 AGGATGTATCTGCTCA；RR 基因型者第 617 鹼基為 T (thymine)，第 608-623 bp 之 DNA 序列為 AGGATGTATTTGCTCA (圖 3)。同時，應用 KASP、PCR-SSCP 與 DNA 序列定序等不同檢測技術，比對六個臺灣在地雞種共 90 個試驗樣本之 *PRLR* 基因型鑑定結果，如表 1 所示；該三種檢測法判定基因型之結果均一致。

表 1. 應用 PCR-SSCP、KASP 及 DNA 序列定序檢測技術分析 6 個臺灣在地雞種泌乳素接受體基因之基因型頻率與檢測效率
Table 1. The genotypic frequency and genotyping efficiency of prolactin receptor gene using PCR-SSCP, KASP, and DNA sequencing genotyping platform among six breeds of Taiwan indigenous chickens

Breed	Number of individuals genotyped	PCR-SSCP				KASP			DNA sequencing		
		Genotypic frequency, %				Genotypic frequency, %			Genotypic frequency, %		
		PP	PR	RR		CC	CT	TT	CC	CT	TT
TLKT-07	12	100.0 (12)*	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (12)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (12)	0.0 (0)	0.0 (0)
TLKT-09	12	91.6 (11)	0.0 (0)	8.4 (1)	91.6(11)	0.0 (0)	0.0 (0)	8.4 (1)	91.6 (11)	0.0 (0)	8.4 (1)
TLKT-11	11	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (12)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (12)	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (12)
TLKT-12	12	33.3 (4)	8.4 (1)	58.3 (7)	33.3(4)	8.4 (1)	58.3 (7)	8.4 (1)	33.3 (4)	8.4 (1)	58.3 (7)
Hualien LRI	38	8.0 (3)	57.8 (22)	34.2 (13)	8.0 (3)	57.8 (22)	34.2 (13)	57.8 (22)	8.0 (3)	57.8 (22)	34.2 (13)
Fighting Chicken	5	0.0 (0)	100.0 (5)	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (5)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	100.0 (5)	0.0 (0)
Turnaround time, hours		6 – 7				1 – 2			6 – 8		

* (): sample size.

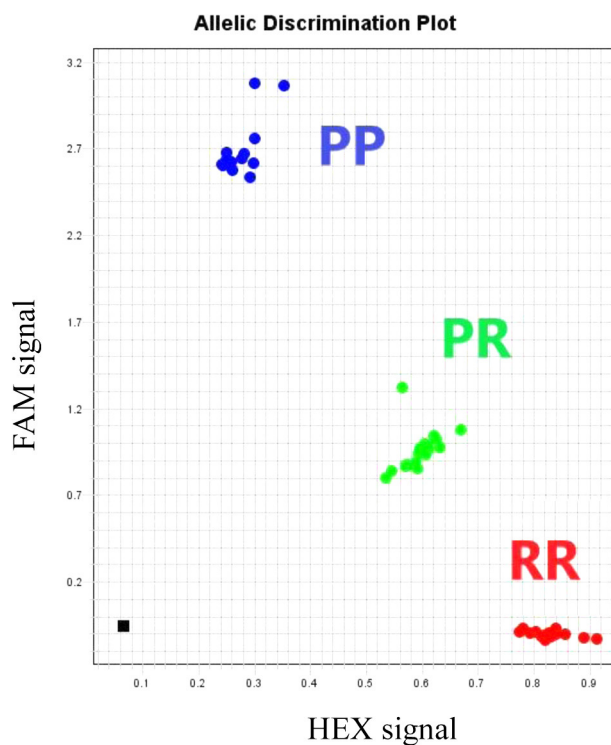


圖 2. 以 KASP 基因型檢測技術分析雞泌乳素接受體基因之基因型。PP 基因型呈現藍色螢光，RR 基因型呈現紅色螢光，PR 基因型呈現綠色螢光，空白樣本為黑點。

Fig. 2. Genotyping cluster plots of prolactin receptor gene by the kompetitive allele specific PCR (KASP) assay. The genotyped samples marked blue are PP homozygotes; those marked red are RR homozygotes; those marked green are PR heterozygous. Black is the control sample.

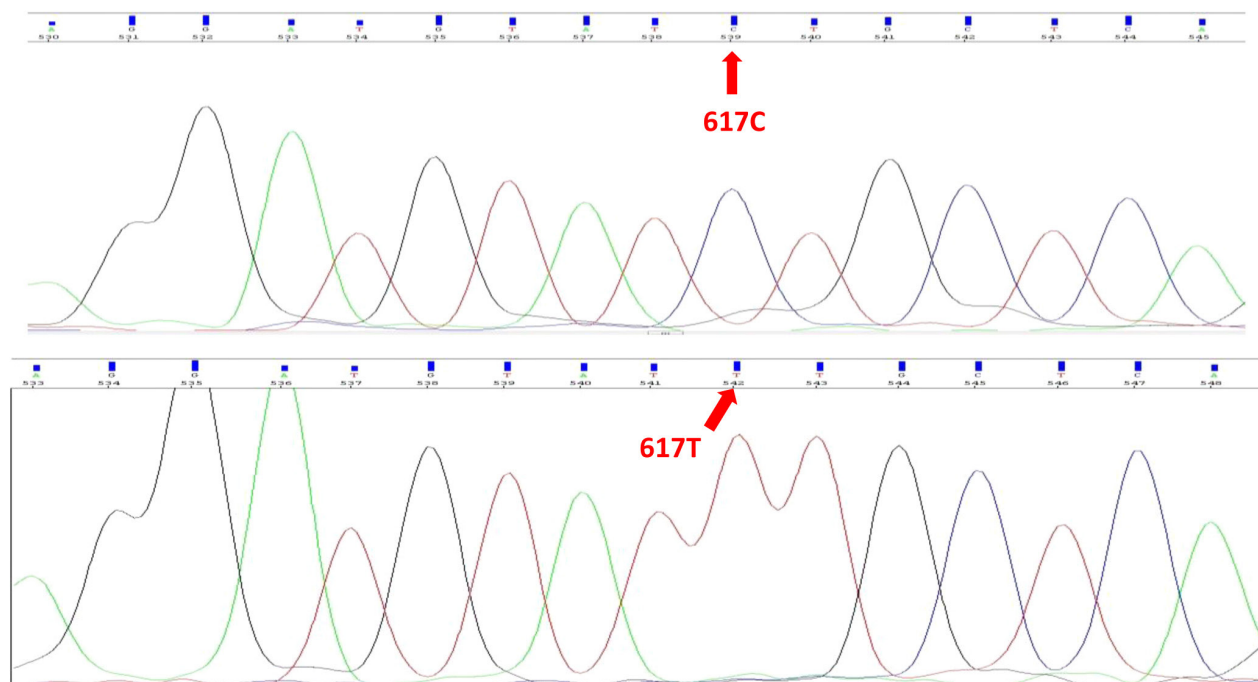


圖 3. 雞泌乳素接受體基因 PP (*PRLR*-617C) 與 RR (*PRLR*-617T) 基因型之定序圖。

Fig. 3. Sequencing profile of PP (*PRLR*-617C) and RR (*PRLR*-617T) homozygotes of chicken prolactin receptor gene.

討 論

隨著大量分子標識開發和多種檢測技術之發展，應用分子標識輔助選拔已獲快速發展與應用，並成為低遺傳力

性狀遺傳改進策略之一。目前在家禽分子標識輔助選拔研究進展上，陸續已有影響家禽生長、肉質及產蛋等重要經濟性狀之關鍵基因或分子標記發表，如生長激素 (growth hormone, *GH*) 基因 (Lei *et al.*, 2007)、脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein, *A-FABP*) 基因 (Ye *et al.*, 2009)、心臟型脂肪酸結合蛋白 (heart-type fatty acid binding protein, *H-FABP*) 基因 (Ye *et al.*, 2009)、*PRL* 基因及 *PRLR* 基因等 (Vinh *et al.*, 2021)。SNP 分子標識為基因組中單核苷酸變異多態性，因具數量多、分布廣泛與穩定性佳等特性，廣泛應用於生物遺傳育種領域 (Semagn *et al.*, 2013)。目前常用 SNP 檢測法主要有直接辨識單核苷酸之聚合酶鏈鎖反應 - 限制酵素片段多態性 (PCR-RFLP)、單股結構多態性檢測技術 (PCR-SSCP)、突變點折離式聚合酶鏈鎖反應 (MS-PCR)、即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)、競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (KASP)、核酸質譜分析 (Sequenom MassARRAY)、快速與高通量自動化檢測之直接定序法 (next generation sequencing, NGS) 和全基因組 SNP 晶片 (genome-wide SNP chip) 等 (Zhang *et al.*, 2004; Clavijo *et al.*, 2010; Rashidi *et al.*, 2012; Viale *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2021; Vinh *et al.*, 2021)。全基因組 SNP 晶片技術是一種以少量 DNA，進行高通量 SNP 基因型鑑定與基因分型之方法，但該方法對大量樣本進行 SNP 檢測所需成本較高 (Schröder *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011)。Boichard *et al.* (2016) 報告指出，因大多物種之育種計畫無法同時承擔使用生物晶片所需維持基礎族群樣本數與基因晶片檢測費用，故高成本基因晶片檢測為 SNPs 分子標記實際應用於物種研究之主要限制。相較於其他 SNP 檢測模式，KASP 技術具準確性高、位點適應性強、成本低及適合檢測大量樣本單一 SNP 位點等優勢，在生物遺傳多樣性分析與圖譜構建等方面具有高的應用價值 (Suo *et al.*, 2020; Alvarez-Fernandez *et al.*, 2021)。

朱等 (2019; 2020a) 曾以螢光標記 KASP 基因型檢測技術，鑑定與區分努比亞山羊黏多醣症之正常型與有病型個體；其中正常純合型個體顯現 FAM 藍色螢光，有病純合型者則顯示 HEX 紅色螢光，而正常雜合型者會顯現 FAM/HEX 綠色螢光；意即該檢測技術可作為鑑別努比亞山羊黏多醣症三種基因型之檢測法。為確認 KASP 法與 PCR-RFLP 和 DNA 定序檢測結果一致性與否，乃隨機採集臺灣地區五家羊場 94 頭努比亞種山羊血液樣本，鑑定結果顯示，三種檢測法基因型判定結果均相符；KASP 較 PCR-RFLP 技術節省 40% 基因型檢測時間，減少 30% 試劑與耗材成本，顯示 KASP 法具提升檢測效率與降低成本之產業應用優勢。隨後，朱等 (2020b; 2020c) 持續以 KASP 基因型檢測平臺，進行雞隻肌肉脂肪相關候選基因 *A-FABP* 與 *H-FABP* 分析，結果與應用 gDNA 定序之結果相同；其中凱馨桂丁土雞、黑羽土雞及烏骨雞 *A-FABP* 基因之 C 交替基因頻率分別為 0.85、0.38 及 0.85，而 *H-FABP* 基因之 C 交替基因頻率分別為 0.54、0.33 及 0.23。未來擬進一步進行前述 SNP 位點基因型與重要經濟性狀之關聯分析，並評估產業應用之可行性。

禽類賴菴性為多基因遺傳之低遺傳率性狀，分別受環境、內分泌與遺傳等因素影響，其中遺傳因素可經由關連性分子標識之輔助與適當選拔策略之應用，達到持續與累積改進族群性能之產業目標。因賴菴行為會經由繁殖激素誘導而產生，其中 FSH β (follicle-stimulating hormone β)、FSHR (follicle-stimulating hormone receptor)、LH、LHR (luteinizing hormone receptor)、ESR (estrogen receptor)、VIP (vasoactive intestinal polypeptide) 及 DRD1/2 (dopamine receptor D1/2)，均可藉由調控 *PRL* 和 *PRLR* 基因表現量，調控禽類賴菴行為產生和維持，故 *PRL* 和 *PRLR* 被列為調控禽類賴菴性之繁殖相關激素主要候選基因 (Yin *et al.*, 2019)。本研究應用 KASP 技術已成功建立雞隻 *PRLR* 基因單位點 SNP 之 KASP 基因型檢測平臺，經實際比較 KASP 與 PCR-SSCP 基因型檢測時間，發現 KASP 僅需要 PCR-SSCP 的 1/3 時間即可完成基因型鑑定工作，並以 DNA 序列定序 *PRLR* 基因 PP、PR 及 RR 基因型後，證實 KASP、PCR-SSCP 及 DNA 序列定序等三種檢測法判定基因型之結果均一致；並經 2019 – 2020 年間建立之山羊與臺灣土雞 KASP 檢測技術與驗證結果為 KASP 技術佐證，顯示此 KASP 基因型檢測平臺具高正確度與高效率之特性，應可符合我國種畜禽動物單位點 SNP 分子標識輔助選拔之需。

誌 謝

研究團隊感謝行政院農業委員會科技計畫 (110 農科 -2.5.3- 畜 -L2) 經費支持，民間牧場、本所飼養場域與遺傳育種組同仁協助採樣、資料處理與實驗技術等，特此誌謝。

參考文獻

朱家德、林德育、賴永裕、陳若菁、吳明哲、張秀鑾。2019。努比亞山羊黏多醣症基因型之即時聚合酶連鎖反應檢測方法應用。中畜會誌 (增刊) 48: 209。

- 朱家德、林德育、賴永裕、陳若菁、吳明哲、張秀鑾。2020a。即時聚合酶鏈鎖反應檢測努比亞山羊黏多醣症之基因型分析。中畜會誌(增刊) 49: 157。
- 朱家德、林德育、賴永裕、陳若菁、吳明哲、張秀鑾。2020b。即時聚合酶鏈鎖反應檢測土雞 A-FABP 基因 Exon1 點突變多態性之基因型分析。中畜會誌(增刊) 49: 158。
- 朱家德、林德育、賴永裕、陳若菁、吳明哲、張秀鑾。2020c。即時聚合酶鏈鎖反應檢測土雞 H-FABP 基因 Intron2 點突變多態性之基因型分析。中畜會誌(增刊) 49: 159。
- 汪峰。2007。雞 *PRL*、*PRLR* 基因表達及其與繁殖性能的關係。南京農業大學，碩士學位論文，中國。
- 林德育、黃鈺嘉、陳若菁、鍾秀枝、黃祥吉、賴永裕、張秀鑾、吳明哲。2007。雞隻賴菴性與性染色體上的泌乳素接受體基因之關聯性探討。中畜會誌(增刊) 36: 130。
- 姜潤深。2005。雞 *PRL*、*PRLR* 和 *POU1F1* 基因變異對繁殖及 *POU1F1* 對生長性狀的遺傳效應。中國農業大學動物科技學院，博士論文，中國。
- Alvarez-Fernandez, A., M. J. Bernal, I. Fradejas, A. M. Ramirez, N. A. M. Yusuf, M. Lanza, S. Hisam, A. Pérez de Ayala, and J. M. Rubio. 2021. KASP: a genotyping method to rapid identification of resistance in *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 20: 16-24.
- Boichard, D., V. Ducrocq, P. Croiseau, and S. Fritz. 2016. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. *C. R. Biol.* 339: 274-277.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, and P. A. Kelly. 1998. Prolactin (*PRL*) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in *PRL* receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19: 225-268.
- Clavijo, A., F. Sun, and L. Sneed. 2010. Diagnosis of caprine mucopolysaccharidosis type IIID by real-time polymerase chain reaction-based genotyping. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 622-627.
- Dunn, I. C., G. McEwan, T. Okhubo, P. J. Sharp, I. R. Paton, and D. W. Burt. 1998. Genetic mapping of the chicken prolactin receptor gene: a candidate gene for the control of broodiness. *Br. Poult. Sci.* 39: S1, 23-24.
- Jiang, R. S., G. Y. Xu, X. Q. Zhang, and N. Yang. 2005. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. *Poult. Sci.* 84: 839-845.
- Konstantinos, K. V., P. Panagiotis, V. T. Antonios, P. Agelos, and N. V. Argiris. 2008. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol. Biotechnol.* 38: 155-163.
- Lei, M., C. Luo, X. Peng, M. Fang, Q. Nie, D. Zhang, G. Yang, and X. Zhang. 2007. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chickens. *Poult. Sci.* 86: 835-842.
- Li, J. J., L. Zhang, P. Ren, Y. Wang, L. Q. Yin, J. S. Ran, X. X. Zhang, and Y. P. Liu. 2020. Genotype frequency distributions of 28 SNP markers in two commercial lines and five Chinese native chicken populations. *BMC Genet.* 21: 12-22.
- Nair, S. K., R. Babu, C. Magorokosho, G. Mahuku, K. Semagn, Y. Beyene, B. Das, D. Makumbi, P. L. Kumar, M. Olsen, and P. M. Boddupalli. 2015. Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1839-1854.
- Qureshi, N., P. Kandiah, M. K. Gessese, V. Nsabiya, V. Wells, P. Babu, D. Wong, M. Hayden, H. Bariana, and U. Bansal. 2018. Development of co-dominant KASP markers co-segregating with Ug99 effective stem rust resistance gene Sr26 in wheat. *Mol. Breed.* 38: 97.
- Rasheed, A., W. Wen, F. M. Gao, S. N. Zhai, H. Jin, J. D. Liu, Q. Guo, Y. J. Zhang, S. Dreisigacker, X. C. Xia, and Z. G. He. 2016. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 129: 1843-1860.
- Rashidi, H., G. Rahimi-Mianji, A. Farhadi, and M. Gholizadeh. 2012. Short Communication: Association of prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms with economic traits in breeder hens of indigenous chickens of Mazandaran province. *Iran. J. Biotechnol.* 10: 129-135.
- Schröder, J., H. Schröder, S. J. Puglisi, R. Sinha, and B. Schmidt. 2009. SHREC: a short-read error correction method. *Bioinf.* 25: 2157-2163.
- Semagn, K., R. Babu, S. Hearne, and M. Olsen. 2013. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breeding* 33: 1-14.
- Shi, Z., S. Liu, J. Noe, P. Arelli, K. Meksem, and Z. Li. 2015. SNP identification and marker assay development or high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics* 16: 314.
- Suo, W., X. Shi, S. Xu, X. Li, and Y. Lin. 2020. Towards low cost, multiplex clinical genotyping: 4-fluorescent Kompetitive

- Allele-Specific PCR and its application on pharmacogenetics. PLOS ONE 15: e0230445.
- Tan, D. Y. and X. P. Peng. 2012. Progress in prolactin receptor research. Prog. Physiol. Sci. 43: 17-23.
- Tanaka, M., I. Yamamoto, Y. Hayashida, N. Nakao, T. Ohkubo, M. Wakita, and K. Nakashima. 2000. Two novel first exons in the prolactin receptor gene are transcribed in a tissue-specific and sexual maturation-dependent manner to encode multiple 5'-truncated transcripts in the testis of the chicken. Biochim. Biophys. Acta 1491: 279-284.
- Viale, E., E. Zanetti, D. Özdemir, C. Broccanello, A. Dalmaso, M. De Marchi, and M. Cassandro. 2017. Development and validation of a novel SNP panel for the genetic characterization of Italian chicken breeds by next-generation sequencing discovery and array genotyping. Poult. Sci. 96: 3858-3866.
- Vinh, N. T., N. T. P. Giang, N. V. Linh, P. K. Dang, N. X. Cahn, N. T. C. Giang, B. H. Doan, N. T. Anh, and N. H. Thinh. 2021. Single nucleotide polymorphisms of candidate genes related to egg production traits in Vietnamese indigenous chickens. Braz. J. Poult. Sci. 23: 72-80.
- Wang, X., H. Wang, and J. Wang. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nat. Genet. 43: 1035-1039.
- Yang, N. and R. S. Jiang. 2005. Recent advances in breeding for quality chickens. Worlds Poult. Sci. J. 61: 373-381.
- Ye, M. H., J. L. Chen, G. P. Zhao, M. Q. Zheng, and J. Wen. 2010. Associations of *A-FABP* and *H-FABP* markers with the content of intramuscular fat in Beijing-You chicken. Anim. Biotechnol. 21: 14-24.
- Yin, L. Q., J. S. Ran, J. J. Li, P. Ren, X. X. Zhang, and Y. P. Liu. 2019. Genetic regulation of broodiness in poultry. Yi Chuan 41: 391-403.
- Zhang, B., H. Tanaka, and K. Sakua. 2004. Simple and rapid detection of uncoupling protein-2 866G/A polymorphism by mutagenically separated polymerase chain reaction. Clin. Chim. Acta 344: 205-210.
- Zhang, J., C. Nie, X. Li, Z. Ning, Y. Chen, Y. Jia, J. Han, L. Wang, X. Lv, W. Yang, and L. Qu. 2020. Genome-wide population genetic analysis of commercial, indigenous, game, and wild chickens using 600K SNP microarray data. Front. Genet. 11: 54329433.

The development of genotyping platform on *PRLR* gene in indigenous chicken by kompetitive allele specific PCR ⁽¹⁾

Chai-Te Chu ⁽²⁾ Der-Yuh Lin ⁽²⁾⁽⁸⁾ Yung-Yu Lai ⁽²⁾ Hsiao-Mei Liang ⁽⁴⁾ Shen-Shyuan Yang ⁽⁵⁾
Tsung-Lin Liu ⁽⁷⁾ Hsiu-Luan Chang ⁽⁶⁾ Ming-Che Wu ⁽³⁾ and Jen-Wen Shiau ⁽²⁾

Received: Jun. 22, 2021; Accepted: Mar. 30, 2022

Abstract

Broodiness is one of the reproductive physiological reactions of poultry due to natural selection and evolution, which involves genetics and environmental factors. Therefore, this behavior tends to result in a 10% decrease of the average annual egg production due to the degeneration of the ovary and reproductive tract. The prolactin receptor gene is significantly related to the broodiness in chickens. The objective of this study is to optimize a fluorescent primer-labeled KASP (kompetitive allele specific polymerase chain reaction) genotyping platform for SNP detection in prolactin receptor gene using six chicken breeds, including TLKT-07, TLKT-09, TLKT-11, TLKT-12, Hualien LRI, and Fighting Chicken. A total of 90 chickens were genotyped. Results with KASP, polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing analysis showed complete consistence, implying that the three techniques can be substituted with each other. However, KASP method not only showed a high accuracy as others, but also had the advantage of high efficiency for the process of identifying the genotype, and thereby is recommended as the SNP genotyping platform at a specific locus for breeding chicken.

Key words: Taiwan country chicken, Broodiness, Prolactin receptor gene, Kompetitive allele specific PCR.

(1) Contribution No. 2700 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Retired from Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 91247, Taiwan, R. O. C.

(5) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien 97362, Taiwan, R. O. C.

(6) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 91201, Taiwan, R. O. C.

(7) Department of Biotechnology and Bioindustry Sciences, National Cheng Kung University, Tainan 70101, Taiwan, R. O. C.

(8) Corresponding author, E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw.