

牦牛 kappa-酪蛋白基因第4外显子的克隆测序及多态性研究*

樊宝良^① 李 宁^{②**} 胡晓湘^③ 吴常信^③

(①河北邯郸农业专科学校, 邯郸 057150; ② 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ③中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要 依据普通牛的 kappa-酪蛋白基因序列设计引物进行 PCR 扩增, 测定了牦牛 kappa-酪蛋白基因第4外显子全序列及部分第4内含子序列, 用 *Hind* III 和 *Pst* I 切割 PCR 产物发现, 在牦牛群体中具有和普通牛相同的单倍体型。进一步对 60 个牦牛个体进行群体分析后发现, 牦牛群体中的基因频率和基因型频率与普通牛的群体有着很大的差异。

关键词 牦牛 Kappa-酪蛋白 DNA 序列测定 多态性 第4外显子

牦牛 (*Bos grunniens*) 是牛亚科牛属牛亚属中的一个物种, 主要分布在中亚高原地区, 一般认为它是由野牦牛驯化而来, 是高寒地区的一种主要驮运工具, 其品质优良的肉和奶是高原地区人民的主要食品来源, 皮毛又是抵御风寒的极品。然而目前牦牛数量正以惊人的速度下降且有最终绝迹的危险^[1]。因此, 为了加强我国牦牛资源的保护和开发利用, 对牦牛进行广泛深入的研究已势在必行。

作为反刍动物, 产乳性状是一个重要的经济性状, 牦牛的乳汁具有一些普通牛所不及的特点, 如其乳汁具有较高的抗菌活性^[2], 而且蛋白含量要比普通牛乳高^[3], 但牦牛的产奶量却很低, 因此提高其奶产量同时又保持优良的奶品质是牦牛育种的一个重要课题。据文献报道, 在普通牛群体中 kappa-酪蛋白基因第4外显子存在 *Hind* III 和 *Pst* I 的 PCR-RFLPs 多态^[4], 而且该多态标记与普通牛的产奶量和奶品质密切相关。为了研究牦牛 kappa-酪蛋白基因的结构并寻找与牦牛产奶性能有关的遗传标记, 我们依据普通牛的 kappa-酪蛋白基因^[5]设计合成了一对引物, 用这对引物进行 PCR 扩增, 克隆测定了牦牛的 kappa-酪蛋白基因第4外显子全序列和部分第4内含子序列。并对牦牛的群体进行了分析, 为牦牛的育种工作提供了一个很好的分子遗传标记。

1 材料与amp;方法

牦牛肌肉组织标本由青海海北畜牧科学研究所和青海畜牧兽医研究所提供。

1999-12-06 收稿, 2000-02-17 收修改稿

* 国家“八六三”高科技发展计划(批准号: Z21-04-01)

** 联系人

PCR 引物序列: FKC₁ 5'-CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTC-3'; FKC₂ 5'-AGATTCAAGGAG-TATACCAATTGTTG-3'. 扩增相当于普通牛序列中从 10 530 nt 到 11 310 nt 范围的序列, 包括该基因的第 4 外显子和部分第 4 内含子序列, 扩增片段长度为 780 bp.

PCR 反应条件如下: PCR 反应体系为 2.5 μ L 10 \times Taq 酶缓冲液 (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-Cl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.01 % 明胶), 2 μ L dNTPs (2.5 mmol/ μ L), 0.5 μ L FKC₁ (50 pmol/ μ L), 0.5 μ L FKC₂ (50 pmol/ μ L), 1 U Taq DNA 聚合酶, 100 ng 模板 DNA (提取自牦牛肌肉组织). 加水至 25 μ L. PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进入 PCR 循环, 每个循环为 94 $^{\circ}$ C 1min, 61 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存待用.

PCR 产物的克隆测序方法如下: 将 PCR 产物连接到 PCRTMII T-载体上并转入 *E. coli* XL₁-Blue 菌株中, 用碱裂解法制备测序模板, 使用 ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer 进行 DNA 序列测定.

PCR 产物的酶切电泳方法如下: 25 μ L PCR 产物中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.4) 和等体积异丙醇, 于室温放置 15 min, 12 000 g 离心 15 min, 用 150 μ L 70% 的乙醇洗沉淀一次, 真空抽干. 将沉淀溶于原体积的水中. 取 8 μ L DNA 溶液加入 1 μ L 10 \times 限制性内切酶缓冲液, 10 U 相应的限制性内切酶, 混匀后在酶反应最适当的温度下保温 3 h, 再用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检查.

2 结果与讨论

2.1 测序结果及普通牛相应序列的比较

牦牛 kappa-酪蛋白基因第 4 外显子及其编码的氨基酸序列和部分第 4 内含子序列见图 1. 该序列与普通牛的相应序列的比较 (图 2) 表明两者该序列同源性高达 99%, 其内含子区 (297

1	CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTCTTCAGTGACAAAATAGCCAAATATATCCCAATTCAGTATGTGCTGAGTAGG
1	ArgCysGluLysAspGluArgPhePheSerAspLysIleAlaLysTyrIleProIleGlnTyrValLeuSerArg
76	TATCTTAGTTATGGACTCAATTACTACCAACAGAAACCAGTTGCACAAATTAATAATCAATTTCTGCCATACCCA
26	TyrLeuSerTyrGlyLeuAsnTyrTyrGlnGlnLysProValAlaLeuIleAsnAsnGlnPheLeuProTyrPro
151	TATTATGCAAAGCCAGCTGCAGTTAGGTCACCTGCCAAATCTTCAATGGCAAGTTTTGTCAAATACTGTGCCT
51	TyrTyrAlaLysProAlaAlaValArgSerProAlaGlnIleLeuGlnTrpGlnValLeuSerAsnThrValPro
226	GCCAAAGTCTGCCAAGCCAGCCAACTACCATGGCAGTCACCCACACCCACATTTATCATTATGGCCATTCCA
76	AlaLysSerCysGlnAlaGlnProThrThrMETAlaArgHisProHisProHisLeuSerPheMETAlaIlePro
301	CCAAAGAAAAATCAGGATAAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAGCGTACAAGTACACCT
101	ProLysLysAsnGlnAspLysThrGluIleProThrIleAsnThrIleAlaSerGlyGluArgThrSerThrPro
376	ACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGTACTCTAGAAGCTTCTCCAGAAGTTATTGAGAGCCACCTGAGATC
126	ThrThrGluAlaValGluSerThrValAlaThrLeuGluAlaSerProGluValIleGluSerProProGluIle
451	AACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGCGGTCTGAAAACCTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACCGCAGGTAATAAA
151	AsnThrValGlnValThrSerThrAlaVal
526	GCAAAATGAATAACAGCCAAGATTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAAACTAGCGTAGATGGATAAA
601	TAAATCTGTTACAGAGAAGGCGAAATGGGCTAATATAACTTACATTTGCTGGTCTTTATCATGTATATACTA
676	GATTCCTTCCCAACAGGAAAGTTTAAAATATTTTACAAAATGAGTAAAAATTCGAGATTTTATTACTAAACCTT
751	TTTCAACAATTGGTATACTCCTTGAATCT

图 1 牦牛 kappa-酪蛋白基因第 4 外显子及部分第 4 内含子序列
及所编码的氨基酸序列

牦牛	1	CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTCTTCAGTGACAAAATAGCCAAATATATCCCAATTCAG
普通牛	1	CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTCTTCAGTGACAAAATAGCCAAATATATCCCAATTCAG
牦牛	61	TATGTGCTGAGTAGGTATCTTAGTTATGGACTCAATTACTACCAACAGAAACCAGTTGCA
普通牛	61	TATGTGCTGAGTAGGTATCTTAGTTATGGACTCAATTACTACCAACAGAAACCAGTTGCA
牦牛	121	CTAATTAATAATCAATTTCTGCCATACCCATATTATGCAAAGCCAGCTGCAGTTAGGTCA
普通牛	121	CTAATTAATAATCAATTTCTGCCATACCCATATTATGCAAAGCCAGCTGCAGTTAGGTCA
牦牛	181	CCTGCCCAAATTCCTCAATGGCAAGTTTGTCAAATACTGTGCCTGCCAAGTCTGCCAA
普通牛	181	CCTGCCCAAATTCCTCAATGGCAAGTTTGTCAAATACTGTGCCTGCCAAGTCTGCCAA
牦牛	241	GCCCAGCCAACTACCATGGCAGTCACCCACACCCACATTTATCATTTATGGCCATTCCA
普通牛	241	GCCCAGCCAACTACCATGGCAGTCACCCACACCCACATTTATCATTTATGGCCATTCCA
牦牛	301	CCAAAGAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAG
普通牛	301	CCAAAGAAAAATCAGGATAAAACAGAAATCCCTACCATCAATACCATTGCTAGTGGTGAG
牦牛	361	CGTACAAGTACACCTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGCTTCT
普通牛	361	CCTACAAGTACACCTACCACCGAAGCAGTAGAGAGCACTGTAGCTACTCTAGAAGATTCT
牦牛	421	CCAGAAGTTATTGAGAGCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGCGGTC
普通牛	421	CCAGAAGTTATTGAGAGCCACCTGAGATCAACACAGTCCAAGTTACTTCAACTGCGGTC
牦牛	481	TGAAAACCTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAAATAA. GCAAAATGAATAAC
普通牛	481	TAAAAACTCTAAGGAGACATCAAAGAAGACAACGCAGGTAAATAAGGCAAAATGAATAAC
牦牛	540	AGCCAAGATTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAAACTAGCGTAGATGGATAA
普通牛	540	AGCCAAGATTCATGGACTTATTAATAAAAATCGTAACATCTAAACTAGCGTAGATGGATAA
牦牛	600	ATTAATCTGTTACAGAGAAGGCCGAAATGGGCTAATTATAACTTACATTTGCTGGTTCTT
普通牛	600	ATTAATCTGTTACAGAGAAGGCCGAAATGGGCTAATTATAACTTACATTTGCTGGTTCTT
牦牛	660	TATCATGTATATACTAGATTCTTCCCAACAGGAAAGTTTTAAAATATTTACAAAATGA
普通牛	660	TATCATGTATATACTAGATTCTTCCCAACAAGAAAGTTTTAAAATATTTACAAAATGA
牦牛	720	GTAAAAATTGCAGATTTTATTACTAAACCTTTTTCAACAATTGGTATACTCCTTGAATCT
普通牛	720	GTAAAAATTGCAGATTTTATTATTAAACCTTTTTCAACAATTGGTATACTCCTTGAATCT

图 2 牦牛 kappa-酪蛋白基因第 4 外显子序列与普通牛的相应序列的比较

bp, 有 3 个碱基不同)和外显子区(483 bp, 有 5 个碱基不同)表现了同样的变异率, 约为 1%, 这与一般内含子变异比较高相悖, 可能与该序列所包含的内含子太短而不能显示其高变异有关。将牦牛的第 4 外显子序列翻译成氨基酸序列与牛的相应序列进行比较后显示其同源性的

100%,这说明牦牛和普通牛相比在 kappa-酪蛋白基因第 4 外显子上的差异属同义突变,这些变异并没有引起氨基酸的变异. 本室克隆的其他乳蛋白基因序列,与普通牛的相应序列相比也同样显示了很高的同源性,一般都在 90% 以上¹⁾,说明牦牛和普通牛之间的亲源关系非常近. 牦牛和普通牛杂交雌性可育的这种不完全生殖隔离现象与它们的亲源关系较近有着直接关系.

2.2 牦牛 kappa-酪蛋白基因第 4 外显子的多态性

在普通牛的群体中,从不同个体扩增的 PCR 产物经 *Hind* III 酶切后可产生 3 个大小不同的片段,即 780 bp (等位基因 HA), 413 bp 和 367 bp (等位基因 HB). *Pst* I 可产生 4 个大小不同的片段,即 306 bp, 303 bp 和 171 bp (等位基因 PA) 或 609 bp 和 171 bp (等位基因 PB). 两种酶切的多态性表现为紧密连锁,而且两个多态标记表现高度的一致,虽然在无其他任何因素影响的情况下应有 4 种单倍体型,即 HAPA, HAPB, HBPA 和 HBPB,但实际上,人们只找到了前两种单倍体型^[4]. 对于两个多态标记表现紧密连锁比较好理解,因为两种多态共同存在于一个仅 780 bp 的片段内,他们之间紧密连锁是极其可能的. 而对于为什么只发现了两种单倍体型的问题,很难有一个非常明确的解释,这也许与携带未被发现的两种单倍体型的个体很难适应环境而无法存活有关.

牦牛不同个体 PCR 产物及酶切后的电泳结果见图 3,结果显示牦牛群体和普通牛的群体具有相同的单倍体型. 因此我们可以用这两个标记将牦牛分为 AA, AB 和 BB 3 种基因型,这与普通牛的分型相同. 然而在基因频率和基因型频率上牦牛群体和普通牛群体相比有着很大差异.

在我们分析的 60 个牦牛个体中, *Hind* III 和 *Pst* I 两个标记仅一个个体是 AB 杂合子,其余个体均为 BB 纯合子,因此我们可以计算出 A 等位基因的基因频率为 0.83%, 而 B 等位基因的基因频率为 99.17%, 其基因型频率分别为 $P_{AA} = 0%$, $P_{AB} = 1.67%$ 和 $P_{BB} = 98.33%$, 而在普通牛的群体中 A 等位基因的基因频率很高,约为 87%, B 等位基因的基因频率仅为 13%, 基因型频率中 $P_{AA} = 73%$, $P_{AB} = 27%$, 而 P_{BB} 几乎为零²⁾, 这与牦牛和普通牛的产奶量和奶成分含量的差异相一致. 有文献报道, kappa-酪蛋白 AA 型乳脂率较高, BB 型个体的奶蛋白含量较高^[6], 而且 kappa-酪蛋白 BB 型牛奶的凝乳时间短,凝块硬度大,奶酪产量高^[7]. 牦牛的产奶量很低,一头母牦牛所产的奶大部分要用于犊牛的饲养,在这一点上无法与普通牛相比,但其奶蛋白含量约为 5% 左右,而牛奶的奶蛋白含量仅为 3.6%^[3],与普通牛相比牦牛奶更适合于制奶酪. 牦牛群体和普通牛群体在 kappa-酪蛋白基因的等位基因频率和基因型频率上的这一明显差异可能与牦牛长期以来偏重于役用而普通牛则主要偏重于奶用有关.

我们似乎可以从这一结果中得到如下启示:和普通牛一样在牦牛的群体中 kappa-酪蛋白 AA 型个体具有更高的奶产量,但役用性能和抗逆性相对较差. 而 BB 型个体则相反,其奶产量低,但奶蛋白含量比较高,奶品质比较好,而且役用性能和抗逆性好. AB 型个体的各性状表型居于两者之间. 从我们的实验结果看在牦牛的群体中 BB 型个体已趋于固定, A 等位基因已很少,再经过一段时间随着遗传漂变的发生 A 等位基因很有可能在牦牛的群体中消失,因此,

1) 结果待发表

2) 林福玉. 人红细胞生成素表达载体和人干扰素转基因小鼠模型的初步构建. 中国农业大学硕士论文, 1997

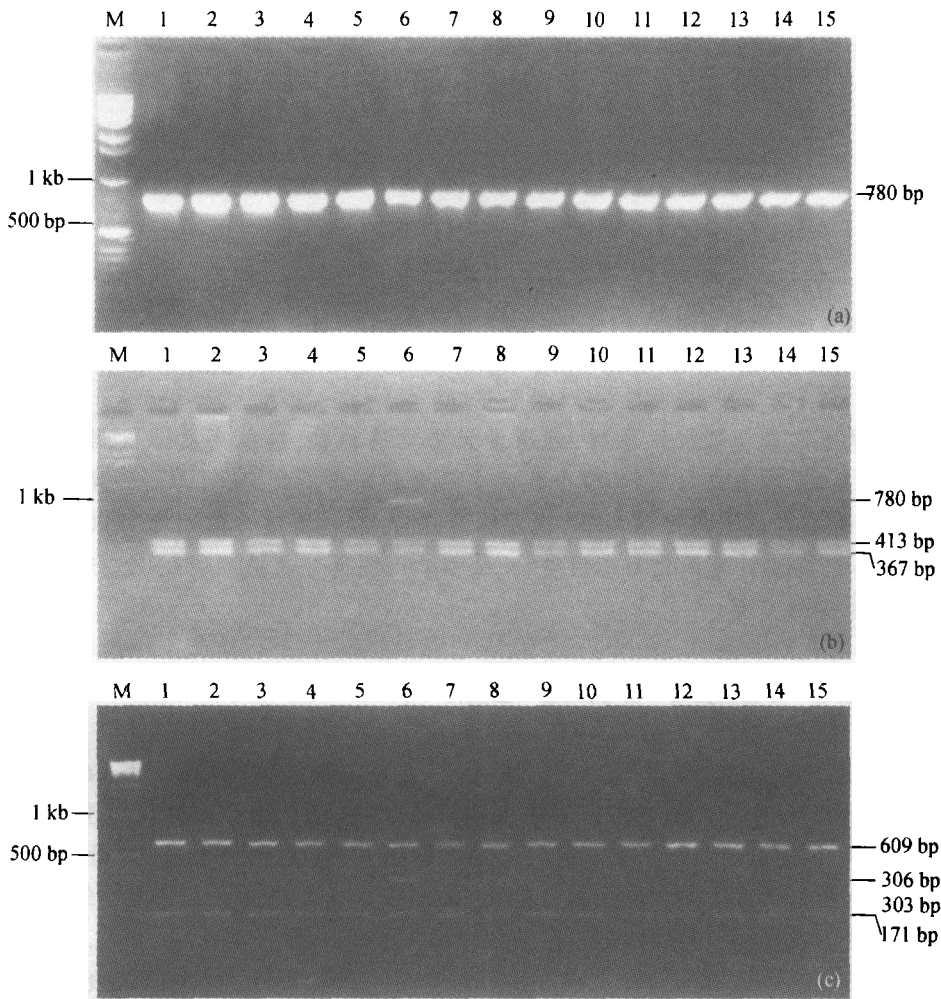


图3 不同牦牛个体 kappa-酪蛋白基因第4外显子的多态性
 (a) 未经酶切的 PCR 产物; (b) 经 *Hind*III 酶切后的 PCR 产物; (c) 经 *Pst*I 酶切后的 PCR 产物,
 M 为分子量标志, 1~15 为不同的牦牛个体

如何及早在牦牛群体中扩大 A 等位基因的频率, 并最终应用于牦牛高产奶性状的选种选育是亟待解决的课题。

参 考 文 献

- 1 Masao Sasaki. Yak: Hardy multi-purpose animal of asia highland. Proceeding of the First International Congress on Yak, China, Lan Zhou, 1994, 1~5
- 2 Katsina. Lactation, biologic properties of milk of yaks. Sel's shokhozyaistvennaya Biologiya (in Russian), 1993, 2: 108
- 3 汪玉松. 乳品生物化学. 长春: 吉林科技出版社, 1997. 1~10
- 4 Osamu Nakayama, Mistsyji Onoderea, Ken Nakabayashi, et al. Effect of casein genotype on milk performance in Japanese shorthorn cows. Animal Science and Technology, 1995, 66(8): 693
- 5 Alexander L.J, Stewart A F, Mackinlay A G, et al. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. Eur J Biochem, 1988, 178(2): 395
- 6 李 竞, 陆曼妹. 黑白花奶牛乳蛋白的遗传多态性及其生产性能的关系. 畜牧兽医学报, 1992, 23(2): 112
- 7 Bovenhuis H. The potential contribution of milk protein loci to improvement of dairy cattle. Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 1994, 311~318