

中国荷斯坦奶牛CSN 1S2 基因第二外显子 SSCP 多态性与产奶性状的关系*

付小波, 咎林森, 张佳兰, 王 英, 王均辉

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 利用PCR-SSCP 分子标记技术, 研究了我国荷斯坦奶牛 α_2 -酪蛋白基因(CSN 1S2 基因)第二外显子的多态性, 并分析了其与产奶性状之间的相关性。结果表明, 中国荷斯坦奶牛CSN 1S2 基因第二外显子存在A 和B 2 个等位基因, 有AA、BB 和AB 3 种基因型, A 和B 的等位基因频率分别为36.54% 和63.46%, AA、BB、AB 基因型的频率分别为19.2%、46.1% 和34.6%, 群体中多态信息含量为0.3563, 达中度多态性, 遗传变异较大; CSN 1S2 基因第二外显子对产奶量和乳脂含量没有明显影响, 但AA 基因型个体乳蛋白含量显著高于BB 和AB 基因型个体($P < 0.05$), 表明A 基因对中国荷斯坦奶牛乳蛋白含量有明显影响。

[关键词] 中国荷斯坦奶牛; 产奶量; CSN 1S2; PCR-SSCP

[中图分类号] S823.9⁺12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0021-04

α_2 -酪蛋白(CSN 1S2) 基因是酪蛋白基因家族中的一员, 其与 α_1 -酪蛋白(CSN 1S1) 和 β 酪蛋白统称为钙敏感蛋白, 可与钙、磷形成稳定的微胶粒而提高乳中的钙、磷含量。牛的CSN 1S2 基因全长21 246 bp, 含有18 个外显子和17 个内含子, 其外显子长度为21~266 bp, 其中长度为44 bp 的外显子I 不编码肽链, 63 bp 的外显子II 编码保守的信号肽。自从1995 年A schaffenburg 等^[1]发现牛乳中 β 乳球蛋白(β lactoglobulin) 存在2 个变异体A 和B 以来, 人们对乳蛋白的类型及乳蛋白基因的多态性进行了广泛研究, 发现各种乳蛋白基因在牛群中出现的频率因品种而异, 且乳蛋白基因类型与生产性状之间的关系在各品种之间也不一致^[2-4]。目前, 对乳蛋白基因的研究报道很多, 但对CSN 1S2 基因多态性与产奶性状关系的研究较少。本研究旨在利用PCR-SSCP 分子标记对中国荷斯坦奶牛CSN 1S2 基因第二外显子进行多态性分析, 以为奶牛的良种选育提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中国荷斯坦奶牛血样 中国荷斯坦奶牛血样采自西安现代农业综合开发总公司和宝鸡得力康

公司饲养的78 头中国荷斯坦奶牛, 静脉采血, 10 mL/头, ACD (将柠檬酸0.48 g, 柠檬酸钠1.32 g 和葡萄糖1.47 g 溶于100 mL 超纯水中, 高压灭菌) 抗凝, -80 保存备用, ACD 用量为 $V(ACD) : V(血液) = 1 : 6$ 。

1.1.2 引物 根据GenBank 中牛CSN 1S2 基因(登录号为gi: 162795) 第二外显子的序列, 利用Primer 5.0 软件设计1 对引物。

上游: 5'-CCC AAA TGA GCC TCC ACA -3';

下游: 5'-CCT GCT GTC TAC CCC TGA -3。

引物由上海生物工程公司合成, 预期扩增片段长度为410 bp。

1.1.3 试剂 蛋白酶K、Tris-饱和酚、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖、100 bp Marker、丙烯酰胺、去离子甲酰胺、EDTA 等, 均购自西安沃尔森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 中国荷斯坦奶牛基因组DNA 的提取 参照文献[5]介绍的方法, 从中国荷斯坦奶牛血样中提取其基因组DNA。

1.2.2 CSN 1S2 基因第二外显子的PCR 扩增

* [收稿日期] 2006-02-14

[基金项目] 国家“十五”奶业重大专项(2002BA S18A 17); 陕西省科技攻关计划项目(2004K01-G1)

[作者简介] 付小波(1980-), 男, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: fuxb_fxb@163.com

[通讯作者] 咎林森(1963-), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖及动物生长发育调控研究。E-mail: zanls@yahoo.com.cn

PCR 反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶(0.5 U/ μ L) 1.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 1.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, 上下游引物 (20 pmol/ μ L) 各 0.25 μ L, DNA 模板 (100 ng/ μ L) 1.0 μ L, 超纯水 8.0 μ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61.4 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物于 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.2.3 扩增产物的电泳检测 取扩增产物 2 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。电泳条件: 琼脂糖凝胶的浓度为 1.5 g/L, 0.5 \times TBE, 电压 5~7 V/cm, 室温下电泳 20 min。

1.2.4 *CSN 1S2* 基因第二外显子多态性的 SSCP 检测 取 3 μ L PCR 扩增产物, 加入 8 μ L 变性剂 (去离子甲酰胺 9.9 mL + 5 mol/L EDTA 100 μ L + 二甲苯青 0.0125 g + 溴酚蓝 0.0125 g), 于 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 接着冰浴 5 min 后全部上样进行电泳。电泳条件为: 10 g/L 的 PAGE, 1 \times TBE, 5~7 V/cm 电压, 室温下电泳 10 h。电泳结束后用硝酸银进行染色。

1.2.5 数据统计处理 (1) 等位基因频率和基因型频率的计算。设某一基因位点有 A 和 B 2 个等位基因, 其基因频率分别为 p 和 q , 则:

$$p = (2X + Z)/2N, q = (2Y + Z)/2N$$

式中, X 为 AA 基因型个体数, Z 为 AB 基因型个体数, N 为个体总数, Y 为 BB 基因型个体数。

基因型频率 = 基因型个体数 / 测定群体总数。

(2) 遗传杂合度 (H_e) 的计算。

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 \quad (1)$$

式中, p_i 为第 i 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

(3) 多态信息含量 (PIC) 的计算。按文献 [6] 的公式计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2p_i p_j^2 \quad (2)$$

式中, p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, m 为等位基因数。

(4) 产奶性状分析。本研究中产奶量、乳脂率和乳蛋白含量均为奶牛场 DHI (Dairy Herd Improvement) 生产记录数据。根据最小二乘法建立下列模型:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + L_k + e_{ijk}$$

式中, Y_{ijk} 为第 i 个个体表型的记录值; μ 为群体平均

值; G_i 为第 i 个个体的基因效应值; E_j 为环境效应; L_k 为第 k 个胎次的固定效应; e_{ijk} 为随机误差。根据以上线性模型, 利用 SAS (8.01) 软件对产奶性能数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 中国荷斯坦牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子的 PCR 扩增结果

由图 1 可知, 中国荷斯坦牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子 PCR 扩增产物长度为 410 bp, 与预期大小一致。

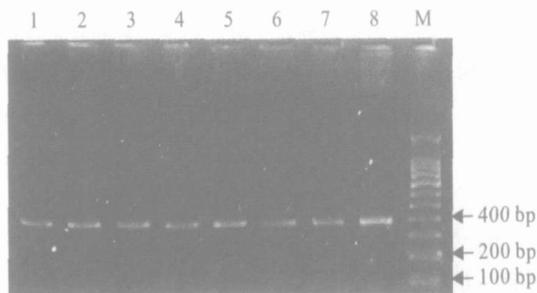


图 1 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子 PCR 扩增产物电泳结果

1~8 不同个体的扩增产物; M: DNA Marker

Fig 1 Detection of PCR product of exon 2 of *CSN 1S2* gene in China Holstein

1~8 Individual PCR product; M: DNA Marker

2.2 中国荷斯坦牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子的 SSCP 多态性

由图 2 可知, 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子含有 2 个等位基因 (A 和 B), 3 种基因型 (AA、BB 和 AB 型)。

由表 1 可知, 在检测的 78 头中国荷斯坦奶牛个体中, 15 头为 AA 基因型, 36 头为 BB 基因型, 27 头为 AB 基因型, A 和 B 等位基因的频率分别为 36.54% 和 63.46%, AA、BB 和 AB 基因型频率分别为 19.2%, 46.1% 和 34.6%。 H_e 和 PIC 计算结果显示, 中国荷斯坦奶牛群体 *CSN 1S2* 基因遗传杂合度为 0.4638, 多态信息含量为 0.3563 ($0.25 < PIC < 0.5$), 达到中度多态, 群体中多态性高, 遗传变异大。

2.3 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子多态性与产奶性状的相关分析

由表 2 可知, 中国荷斯坦奶牛 AA 基因型个体乳脂含量高于 BB 和 AB 基因型, 但差异不显著; 第三胎产奶量 AB 基因型个体高于 AA 和 BB 基因型, 但差异不显著; AA 基因型个体乳蛋白含量显著高于

BB 和 AB 基因型 ($P < 0.05$)。

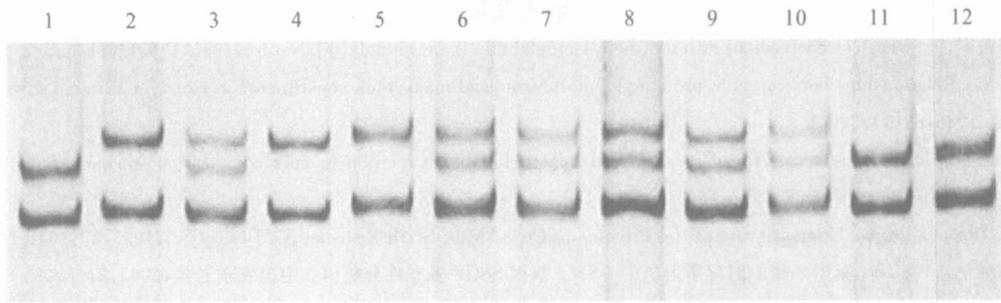


图2 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子多态性的 SSCP 检测结果

1, 11, 12 AA 型; 2, 4, 5 BB 型; 3, 6~ 10 AB 型

Fig 2 Inspecting results of PCR-SSCP of *CSN 1S2* exon 2 in China Holstein

1, 11, 12 genotypes AA; 2, 4, 5 genotypes BB; 3, 6- 10 genotypes AB

表1 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子的基因型频率和等位基因频率

Table 1 Genotype frequencies, A allele frequencies of *CSN 1S2* exon 2 in China Holstein

| 项目 Item | 基因型 Genotype | | | 等位基因 A llele | |
|------------------|--------------|------|------|--------------|-------|
| | AA | BB | AB | A | B |
| 个体数量 Number | 15 | 36 | 27 | | |
| 频率/% Frequencies | 19.2 | 46.1 | 34.6 | 36.54 | 63.46 |

表2 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子多态性与产奶性状之间的相关性

Table 2 Relationship between gene polymorphism and character of milk yield of *CSN 1S2* exon 2 in China Holstein

| 基因型 Genotype | 第3胎产奶量/kg 3rd lactation milk yield | 乳脂含量/(g · kg ⁻¹) Content of fat | 乳蛋白含量/(g · kg ⁻¹) Content of lactoprotein |
|-----------------|---------------------------------------|--|--|
| AA | 8 431.78 ± 1 172.64 a | 37.7 ± 0.53 a | 32.8 ± 0.49 a |
| BB | 8 581.22 ± 1 103.22 a | 34.3 ± 0.52 a | 29.3 ± 0.17 b |
| AB | 8 713.46 ± 842.18 a | 35.3 ± 0.57 a | 29.9 ± 0.18 b |

注: 表中同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) in the same column.

3 讨论

目前, 对 *CSN 1S2* 基因多态性的研究报道较多, 但对其与生产性状之间关系的研究报道较少, 且研究结果不尽一致。陈宏等^[7]和 Ramunno 等^[8]的研究表明, 奶山羊 *CSN 1S2* 基因的 F 等位基因存在多态性, 但张润峰等^[9]在荷斯坦奶牛上没有发现 *CSN 1S2* 基因的 F 等位基因, 说明 *CSN 1S2* 基因可能存在种属差异, 这需进一步研究。本研究在中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子中发现 A 和 B 2 个等位基因, 及 AA、BB 和 AB 3 种基因型, 群体多态信息含量为 0.3563, 达到中度多态。说明中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子在遗传上存在着较高变异, 群体遗传变异较大。

Leandri 等^[10]研究认为, 荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因 BC 基因型较 BB 基因型个体的乳蛋白含量高; Bovendais 等^[11]则认为, CC 基因型个体的乳蛋白含量较高; 本研究结果表明, 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子对产奶量和乳脂含量没有显著影响, 但其 AA 基因型个体的乳蛋白含量显著高于 BB 和 AB 基因型个体, 说明 A 基因对中国荷斯坦牛乳蛋白含量有明显影响。

多态信息含量 (PIC) 和杂合度 (H_e) 均是群体内遗传变异大小的评定指标, 数值越高, 遗传变异越大。本研究发现, 中国荷斯坦奶牛 *CSN 1S2* 基因第二外显子表现为中度多态, 适合作为分子育种标记, 进一步对荷斯坦牛的遗传多态性与生产性状的关系进行研究。

[参考文献]

- [1] A schaffenburg R, D rewry J. Occurrence of different β -lactoglobulin in cow's milk[J]. Nature, 1995, 176: 128-135
- [2] N G-Kw ai-Hang. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(1): 22-26
- [3] Berg G, Van Den. Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties[J]. Netherlands Milk and Dairy Journal, 1992, 46(3/4): 145-168
- [4] Farrell H M, Jimenez-Flores. Nomenclature of the Proteins of Cow's Milk-Sixth Revision[J]. J Dairy Sci, 1995, 87: 1641-1674
- [5] 梁宏伟, 咎林森, 孟彦, 等. 秦川牛和中国荷斯坦奶牛 *FSH* β 基因 SSCP 多态性分析[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 81-83
- [6] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89: 483-490
- [7] 陈宏, 蓝贤勇, 李瑞彪, 等. *CSN 1S2*, *CSN 3* 和 β -*Ig* 基因对西农萨能奶山羊产奶性能的影响[J]. 遗传学报, 2005, 32(8): 804-810
- [8] Ramunno L, Cosenza G, Pappalardo M, et al. Characterization of two new alleles at the goat *CSN 1S2* locus[J]. Anim Genet, 2001, 32: 264-268
- [9] 张润峰, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 西安荷斯坦奶牛群 5 个基因座位遗传多态性的 PCR-RLFP 分析[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(6): 545-549
- [10] Leandri A R, Buttazzoni L G, Schneider J C, et al. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability[J]. Dairy Science, 1990, 73: 241-244
- [11] Bovendais H, Ojala F M. Associations between casein haplotypes and first lactation milk production trait in Finnish Ayrshire cows[J]. Dairy Science, 1997, 80: 1776-1785

Study on the *CSN 1S2* gene's exon2 of the China Holstein by PCR-SSCP

FU Xiao-bo, ZAN Lin-sen, ZHANG Jia-lan, WANG Ying, WANG Jun-hui

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The polymorphism of *CSN 1S2* gene exon2 of the China Holstein were studied through PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) in this research. The result showed: there were two alleles A and B, three genotypes AA, BB and AB of the exon2 of *CSN 1S2* gene. The gene frequencies of A and B were 36.54% and 63.46% separately. The genotype frequencies were 19.2%, 46.1% and 34.6% respectively. The *PIC* (polymorphism information content) was 0.3563, indicating the exon2 of *CSN 1S2* gene of the China Holstein had high polymorphism and large variation. The exon2 of *CSN 1S2* gene had no significant influence on milk yield and creaminess. The cow with genotype AA had more lactoprotein than the cow with genotype BB and AB ($P < 0.05$). So gene A has significant influence on lactoprotein of the China Holstein.

Key words: China Holstein; milk yield; *CSN 1S2* gene; PCR-SSCP