

5个山羊品种 CSN1S2 基因的 Alw26 I 酶切多态性分析

蓝贤勇^{1,*}, 陈宏^{1,2,*}, 张润锋¹, 田焱¹, 雷初朝¹, 潘传英¹,
罗军¹, 胡沈荣¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100;

2. 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所, 江苏徐州 221116)

摘要: 利用 PCR-RFLP 技术对西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南山羊、安哥拉山羊和波尔山羊 5 个品种的 170 个个体的 α_{s2} 酪蛋白 (CSN1S2) 基因进行多态性分析。结果表明: 扩增大小为 310 bp 的片段经限制性内切酶 Alw26 I 酶切后表现多态, 且 5 个山羊品种该基因座位均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南山羊、安哥拉山羊和波尔山羊的基因杂合度/有效等位基因数/Shannon 信息熵/PIC 值分别为 0.1589/1.1889/0.2955/0.1463, 0.4114/1.6981/0.6017/0.5171, 0.1653/1.1980/0.3046/0.1516, 0.0646/1.0691/0.1463/0.0625, 0.0541/1.0572/0.1270/0.0526。分析结果显示, 关中奶山羊的遗传多样性最丰富, 表现为高度多态; 其次是西农萨能奶山羊和陕南山羊, 而安哥拉山羊和波尔山羊的遗传变异程度最低。

关键词: 山羊; CSN1S2 基因; PCR-RFLP; 多态性

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)03-0363-04

Polymorphism Analysis of the CSN1S2 Gene Digested with Alw26 I in Five Goat Breeds

LAN Xian-Yong^{1,*}, CHEN Hong^{1,2,*}, ZHANG Run-Feng¹, TIAN Yi¹, LEI Chu-Zhao¹,
PAN Chuan-Ying¹, LUO Jun¹, HU Shen-Rong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: PCR-RFLP was applied to analyze the polymorphism of CSN1S2 gene in 170 goats that comprised of five goat breeds, namely Xinong Saanen dairy goat, Guanzhong dairy goat, Shaannan white goat, Angora goat and Boer goat. A 310 bp -long PCR product was digested with Alw26 I and demonstrated polymorphism in five goat populations that were all at Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). For Xinong Saanen dairy goat, Guanzhong dairy goat, Shaannan white goat, Angora goat and Boer goat, gene heterozygosity/effective allele gene number/Shannon information entropy/polymorphism information content were 0.1589/1.1889/0.2955/0.1463, 0.4114/1.6981/0.6017/0.5171, 0.1653/1.1980/0.3046/0.1516, 0.0646/1.0691/0.1463/0.0625, 0.0541/1.0572/0.1270/0.0526, respectively. According to the genetic diversity indexes described above of the five goat breeds, Guanzhong dairy goat had the most

收稿日期: 2004-03-31; 修回日期: 2004-05-19

基金项目: 农业部留学人员活动基金 (编号: 1999-12D) 和陕西省自然科学基金 (编号: 99SM06) [Shaanxi National Science Foundation (No. 99SM06)] 资助

作者简介: 蓝贤勇 (1979—), 男, 畚族, 江西南康人, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传学; E-mail: lan342@163.com

*: 并列第一作者

通讯作者: 陈宏 (1955—), 男, 陕西西安人, 教授、博士生导师, 研究方向: 生物技术与动物遗传育种; E-mail: chen hong1212@263.net

abundant genetic diversity and showed high polymorphism, and Xinong Saanen dairy goat and Shaannan white goat were inferior, while Angora goat and Boer goat had the lowest genetic variability.

Key words: goat; CSN1S2 gene; PCR-RFLP; polymorphism

西农萨能奶山羊 (Xinong Saanen dairy goat) 是我国培育的著名乳用山羊品种, 以体格大、产奶量高、适应性强、遗传性稳定而著称; 关中奶山羊 (Guanzhong dairy goat) 是以陕西关中平原的山羊为基础, 主要利用萨能奶山羊经过长期选育而成的乳用品种; 陕南山羊 (Shaannan white goat) 产于陕西南部的汉江两岸, 其肉用性能好; 安哥拉山羊 (Angora goat) 是世界上著名的毛用山羊品种; 波尔山羊 (Boer goat) 原产于南非共和国, 对热带、亚热带及温带气候有较强的适应能力, 且抗病能力强^[1]。

酪蛋白是乳蛋白中特有的一种磷蛋白, 含有大量的钙和磷, 按其生化性质可分为 5 种: α_{s1} 酪蛋白 (CSN1S1)、 α_{s2} 酪蛋白 (CSN1S2)、 β 酪蛋白 (CSN2)、 γ 酪蛋白和 κ 酪蛋白 (CSN3)。其中, α_{s2} 酪蛋白 (CSN1S2) 作为钙敏感蛋白之一, 可与 κ 酪蛋白形成微粒, 以粒状悬浮于乳液中。由于酪蛋白含有几乎全部的必需氨基酸, 是新生幼仔最具有营养价值的蛋白质, 且能增加新生幼仔对钙磷的吸收^[2], 为此, 对酪蛋白尤其是 CSN1S2 的研究成为当今研究的热点之一。

目前, 酪蛋白基因多态研究多集中在荷斯坦奶牛上^[3~5], 而山羊 CSN1S2 基因 DNA 水平多态研究在国内尚未见报道。因此, 本研究首次利用 PCR-RFLP 技术对西农萨能奶山羊等 5 个山羊品种的 170 个个体的 CSN1S2 基因进行多态研究, 拟通过多态性指标衡量山羊品种群体的遗传变异情况, 为山羊的遗传育种提供基础资料, 同时也为陕西畜牧业的规划提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

实验材料为西农萨能奶山羊 (S)、关中奶山羊 (G)、陕南山羊 (W)、安哥拉山羊 (A) 和波尔山羊 (B) 5 个品种共计 170 个个体。其中, 无血缘关系的西农萨能羊血样 69 份来自陕西千阳西农萨能奶山羊种羊场核心群; 无血缘关系的关中奶山羊样品 57

份 (18 份血样、41 份组织样), 分别来自校动物实验中心、陕西丹凤种羊场和关中地区屠宰场; 无血缘关系的陕南山羊血样 11 份来自陕西丹凤种羊场; 无血缘关系的安哥拉山羊血样 15 份来自校动物实验中心; 无血缘关系的波尔山羊 18 份血样分别来自校动物实验中心和陕西丹凤种羊场。血样采自颈静脉, 加 0.2% 肝素抗凝, 低温带回实验室并置于 -80°C 保存备用; 组织样被采集后置于冰盒中, 低温带回实验室并置于 -80°C 保存备用。

1.2 酶及试剂

蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶 Alw26 I 等购自 MBI 公司 (Fermantas)。

1.3 基因组 DNA 的提取

血样和组织样 DNA 提取参考 Chen 等^[6]、孙维斌等^[7]和孙东晓等^[8]的方法略作调整。

1.4 引物设计和 PCR 扩增

参照 EMBL 提供山羊 CSN1S2 基因序列 (Accession No. AJ238475) 设计引物^[9], 由上海生物工程有限公司合成。引物序列包括上游引物 (5'-TCT CTT GCC ATC AAA ACA -3') 和下游引物 (5'-TGG TCT TTA TTC CTC TCT -3')。PCR 扩增体积为 25 μL , 其中, 10 \times Buffer (含 20 mmol/L Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶 (0.5 U/ μL) 各为 2.5 μL , 上游引物和下游引物 (10 pmol/ μL) 各 0.5 μL , 模板 DNA (50 ng/ μL) 为 1.0 μL 。反应程序: 97 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 53.9 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 30 s, 然后 31 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 53.9 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min 30s), 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5 PCR 产物的酶切与电泳

PCR 产物消化反应体系为: 10 \times Buffer (含 BSA) 4 μL , Alw26 I (1 U/ μL) 6 μL , PCR 产物 10 μL , 合计 20 μL ; PCR 产物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜, 最后用 4% 的琼脂糖凝胶电泳并照像。

1.6 数据统计与分析

基因频率、抽样误差及 χ^2 检验、遗传多态性指标等的计算参考文献^[10]。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物电泳检测及 PCR 产物酶切电泳检测

用 CSN1S2 引物可扩增出 310 bp 的特异性片段,且扩增结果理想(图 1),可直接用 *Alw26* I 酶切分析。PCR 产物酶切后表现多态,其中,等位基因 *F* 仅表现为 310 bp 带纹,等位基因 *N* 表现为 179 bp 和 131 bp 带纹。故此,FF 基因型个体表现为 310 bp 带纹,NF 基因型个体表现为 310 bp,179 bp 和 131 bp 带纹,而 NN 基因型个体则仅有 179 bp 和 131 bp 带纹(图 2)。

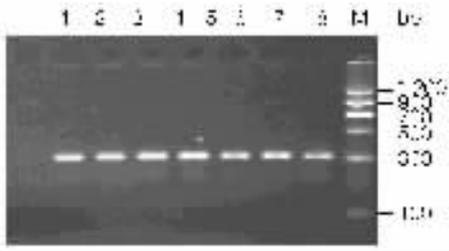


图 1 5 个山羊品种 PCR 扩增产物电泳图
Fig.1 Electrophoresis patterns of PCR product of 5 goat breeds

M: SD004 Marker

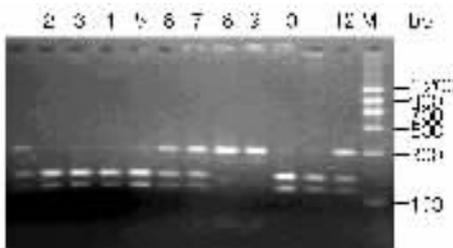


图 2 5 个山羊品种 CSN1S2 基因 PCR 产物的 *Alw26* I 酶切电泳图

(泳道 8,9:FF;泳道 1,6,7,12:NF;泳道 2~5,10,11:NN);
M:SD004.

Fig.2 Electrophoresis patterns of PCR product of CSN1S2 gene digested with *Alw26* I in 5 goat breeds

(lane 8, 9: FF; lane 1, 6, 7, 12: NF;
lane 2~5, 10, 11: NN); M:SD004 Marker.

2.2 CSN1S2 基因座的基因频率和基因型频率

由表 1 可知,5 个山羊品种 CSN1S2 基因座经 *Alw26* I 的酶切后表现多态;5 个山羊品种在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,且该基因座的基

因频率抽样误差在 0.5% 以内;从位点间纯合度 (J_k) 来看, $B > A > S > W > G$, 然而从位点间杂合度 (H_k)、位点间有效等位基因数 (N_e)、位点间 Shannon 和位点间 PIC 来看, $G > W > S > A > B$ 。

表 1 5 个山羊品种 CSN1S2 基因座的遗传多态性指标

Table 1 Genetic polymorphism of CSN1S2 gene loci in five goat breeds

指标 Index	萨能奶 山羊(S) Saanen goat	关中奶 山羊(G) Guanzhong goat	陕南白 山羊(W) Shaannan white goat	安哥拉 山羊(A) Angora goat	波尔山 羊(B) Boer goat
样本含量(N)	69	57	11	15	18
N_{NN} (P_{NN})	59 (0.8551)	31 (0.5439)	9 (0.8182)	14 (0.9333)	17 (0.9444)
N_{NF} (P_{NF})	8 (0.1159)	19 (0.3333)	2 (0.1819)	1 (0.0667)	1 (0.0556)
N_{FF} (P_{FF})	2 (0.0290)	7 (0.1228)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)
<i>N</i> 基因频率 (P_N)	0.9130	0.7150	0.9091	0.9666	0.9722
<i>F</i> 基因频率 (P_F)	0.0870	0.2895	0.0909	0.0334	0.0278
J_k	0.8411	0.5886	0.8347	0.9354	0.9459
H_k	0.1589	0.4114	0.1653	0.0646	0.0541
N_e	1.1889	1.6981	1.1980	1.0691	1.0572
Shannon	0.2955	0.6017	0.3046	0.1463	0.1270
PIC	0.1463	0.5171	0.1516	0.0625	0.0526
χ^2 检验 χ^2 Detection	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
抽样误差(V_B) Sample variation	5.84 $\times 10^{-4}$	1.80 $\times 10^{-3}$	4.3 $\times 10^{-3}$	1.15 $\times 10^{-3}$	7.95 $\times 10^{-4}$

3 讨论

3.1 CSN1S2 基因多态性

α_s 酪蛋白(CSN1S)是乳中主要的酪蛋白之一,又分为 α_{s1} 酪蛋白(CSN1S1)和 α_{s2} 酪蛋白(CSN1S2)两种。由于 CSN1S2 占总 α_s 酪蛋白的 20% 左右,故此,在蛋白质水平上利用 PAGE 电泳检测时,仅能检测到 CSN1S1 基因多态性,而对 CSN1S2 基因多态性则几乎检测不到,可能原因之一是 CSN1S2 基因产物混于 CSN1S1 基因产物之中。为此,对 CSN1S2 基因多态性的研究有必要在 DNA 水平上展开。到目前为止,仅 Ramunno 等^[9] 在意大利的 Naples 省的山羊群体内发现了 CSN1S2 等位基因,这一结论尚未在其他品种中得到证实。

研究表明:该基因片段相当保守,单核苷酸变异几乎很少。本研究利用 PCR-RFLP 方法发现 5 个山羊品种中 CSN1S2^F 基因存在多态性,其机理是 CSN1S2 基因的第三外显子第 13 个核苷酸发生 G→A 转换,出现了 F 等位基因,导致了 Val→Ile 的氨基酸的转变,而该位点的 F 等位基因和 N 等位基因恰好可以通过 Alw26 I 酶切位点的有无来判断。其中,西农萨能奶山羊和关中奶山羊有 3 种基因型,而陕南山羊、安哥拉山羊和波尔山羊则仅有 2 种基因型即 NN 和 NF。

3.2 基因频率及基因型频率

本研究首次证实 5 个山羊品种均具有 CSN1S2^F 位点多态。西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南山羊、安哥拉山羊以及波尔山羊的等位基因 F/N 的频率分别为 0.0870/0.9130、0.2895/0.7105、0.0909/0.9090、0.0334/0.9666 和 0.0278/0.9722,这表明在 5 个群体中 F 等位基因为非优势基因,相应地 FF 基因型为非优势基因型。除关中奶山羊外,4 个山羊品种的 F 等位基因的频率低于意大利 Naples 省山羊群体^[9](F 等位基因的频率为 0.2610,N 等位基因的频率为 0.7390),可能原因是这些品种大部分样本来自保种场,经过人工选育,品种的遗传变异程度较低。然而关中奶山羊 F 等位基因的频率较意大利 Naples 省山羊群体略高,主要原因可能是关中奶山羊的人工选育程度不高。本研究涉及的 5 个群体在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,表明这些品种在突变、迁徙、遗传漂变和选择等因素的作用下基因座 CSN1S2^F 处于动态平衡中。

3.3 5 个山羊品种遗传多态性探讨

由表 1 可知,关中奶山羊的基因杂合度最高(0.4114),其次是陕南山羊和西农萨能奶山羊,引入品种安哥拉山羊以及波尔山羊的基因杂合度最低,表明引入的外国山羊品种遗传纯合度高于国内的地方品种,这一点从有效等位基因数、Shannon 信息熵和 PIC 值可得到反映。此外,关中奶山羊的 PIC 值为 0.5171,该基因座位为高度多态,而其余 4 个品种的 PIC 值均在 0.2 以下,为低度多态。综合遗传多态性指标分析,作者发现关中奶山羊的遗传多态性最丰富,在该基因座位表现高度多态,而其他

品种的遗传多态性较为贫乏,其中,安哥拉山羊和波尔山羊的遗传变异程度最低。

参考文献(References):

- [1] ZHENG Pei-Liu. Goat breeds in China. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1988, 125~126.
郑丕留. 中国羊品种志. 上海: 上海科技出版社, 1988, 125~126.
- [2] Kitts D D, Yuan Y V. Caseinohosphopeptides and calcium bioavailability. *Trend Food Sci and Tech*, 1992, 3: 31~35.
- [3] Olsen H G, Gomez Rayat L, Vage D I, Olsaker I, Klungland H, Svendsen M, Ådnøy T, Sabry A, Klemetsdal G, Schulman N, Krämer W, Thaller G, Rønningen K, Lien S. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 3124~3130.
- [4] Yahyaoui M H, Angiolillo A, Pilla F, Sanchez A, Folch J M. Characterization and genotyping of the caprine K-casein variants. *J Dairy Sci*, 2003, 86: 2715~2720.
- [5] Michel Georges, Dahia Nielsen, Margaret Mackinnon, Mishra A, Okimoto R, Pasquino A T, Sargeant L S, Sorensen A, Steele M R, Zhao X, Womack J E, Hoeschele I. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 1995, 139: 907~920.
- [6] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (carassius auratus gibelio). *Biochem Genet*, 1995, 33: 297~306.
- [7] SUN Wei-Bin, CHEN Hong, LEI Xue-Qin, LEI Chu-Zhao, ZHANG Ying-Han, LI Rui-Biao, ZAN Lin-Sen, HU Shen-Rong. Polymorphism of insulin-like growth hormone factor binding protein 3 gene and its associations with several carcass traits in Qinchuan cattle. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(5): 511~516.
孙维斌, 陈宏, 雷雪芹, 雷初朝, 张英汉, 李瑞彪, 咎林森, 胡沈荣. IGFBP3 基因多态性与秦川牛部分屠宰性状的相关性. 遗传, 2003, 25(5): 511~516.
- [8] SUN Dong-Xiao, ZHANG Yuan, LI Ning. Polymorphism analysis of the GOLA-DRB3 gene digested with Hae III in Mongolian goat and Kazakh goat. *Hereditas (Beijing)*, 2004, 6(1): 55~58.
孙东晓, 张沅, 李宁. 蒙古山羊和哈萨克山羊 GOLA-DRB3 基因的 Hae III 酶切多态性分析. 遗传, 2004, 26(1): 55~58.
- [9] Ramunno L, Cosenza G, Pappalardo M, Longobardi E, Gallo D, Pastore N, Di Gregorio P, Rando A. Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2-F locus. *Animal Genetics*, 2001, 32: 264~268.
- [10] GUO Man-Cai, YUAN Zhi-Fa, CHEN Hong, GENG She-Min. Research of the genetic diversity index system. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2002, 8(1): 359~364.
郭满才, 袁志发, 陈宏, 耿社民. 遗传多样性指标体系研究. 动物生物技术通讯, 2002, 8(1): 359~364.