

# 牦牛心脏脂肪酸结合蛋白 (*H-FABP*) 基因的克隆及序列分析

钟金城<sup>1</sup>, 马志杰<sup>2,3</sup>, 陈智华<sup>2</sup>, 字向东<sup>2</sup>, 常怀普<sup>2</sup>, 刘盛纲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>电子科技大学, 成都 610054; <sup>2</sup>西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; <sup>3</sup>青海省畜牧兽医科学院畜牧研究所, 西宁 810016)

**摘要:** 【目的】对牦牛 *H-FABP* 基因进行克隆和序列分析, 以期为进一步开展牦牛该基因与其肉质性状的相关分析, 进行分子标记辅助选择以及基因定位、表达等研究提供理论基础。【方法】用特定引物对牦牛 *H-FABP* 基因进行 PCR 扩增并进行 T-A 克隆和测序, 在此基础上使用 RepeatMasker、DNAMAN4.0、BioEdit4.8.10、Clustal W1.81 等生物信息学软件进行序列分析。【结果】牦牛 *H-FABP* 基因(已在 NCBI 上登录, 登录号为 DQ026674)由 4 个外显子和 3 个内含子组成, CDS 序列全长为 402 bp, 前体氨基酸数为 133 个。4 个外显子大小分别为 73 bp、173 bp、102 bp 和 54 bp; 3 个内含子大小分别为 3 460 bp、1 892 bp 和 1 495 bp; 外显子与内含子的连接区序列遵循通常的基因组成规律。外显子和内含子个数与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种相同。牦牛 *H-FABP* 基因序列中, 重复序列所占比例为 13.07%。内含子 I 含有 5 个重复元件, 包括 1 个 SINE/Artiodactyls 元件、1 个 SINE/MIR3 元件、1 个 SINE/Bov-tA1 元件和 2 个 SINE/MIR 元件; 内含子 II 无重复元件; 内含子 III 有 3 个重复元件, 其中 SINE/MIR 元件、LINE/L2 元件、SINE/Artiodactyls 元件各 1 个。SINEs 短重复序列所占比例为 11.85%, 哺乳动物分散性重复序列 MIRs 比率为 6.44%。LINEs 所占比例为 1.22%, 小于 SINEs 元件。其中, LINE1、BovB/Art2、L3/CR1 重复元件以及 LTR 类反转录元件和 DNA 转座子元件在牦牛该基因区域中不存在。不同物种间在该基因编码区核苷酸序列和氨基酸序列上有较高的保守性。牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种在 *H-FABP* 基因编码区核苷酸序列上同源性大小分别为 99.8%、97.8%、97.0%、92.8%、88.8%、83.3%、83.1%、76.4%、68.7%; 相应的氨基酸序列间同源性大小为 100%、96.9%、96.9%、92.4%、88.7%、85.7%、85.7%、77.4%、69.9%。【结论】牦牛 *H-FABP* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 其中外显子 I、外显子 II、外显子 III 和外显子 IV 大小分别为 73 bp、173 bp、102 bp 和 54 bp, 内含子 I、内含子 II 和内含子 III 大小分别为 3 460 bp、1 892 bp 和 1 495 bp。牦牛该基因区域含有较为丰富的重复序列元件且外显子与内含子的连接区序列遵循通常的基因组成规律。牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种在 *H-FABP* 基因编码区核苷酸及氨基酸序列上具有较高的保守性。

**关键词:** 牦牛; *H-FABP* 基因; 克隆; 序列分析

## Cloning and Sequence Analysis of Yak Heart Fatty Acid-Binding Protein (*H-FABP*) Gene

ZHONG Jin-cheng<sup>1</sup>, MA Zhi-jie<sup>2,3</sup>, CHEN Zhi-hua<sup>2</sup>, ZI Xiang-dong<sup>2</sup>, CHANG Huai-pu<sup>2</sup>, LIU Sheng-gang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054; <sup>2</sup>College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041; <sup>3</sup>Institute of Animal Science, Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining 810016)

**Abstract:** 【Objective】The yak heart fatty acid-binding protein (*H-FABP*) gene was cloned and sequenced. This was then compared to the deduced amino acid sequence with the homologous *H-FABP* gene. It was also compared with the protein sequence of the *H-FABPs* in other species (including cow, sheep, goats, pigs, human, rats, mice, chicks and zebra-fish) retrieved from the

收稿日期: 2005-09-21; 接受日期: 2005-12-09

基金项目: 四川省应用基础研究项目资助 (03JY029-034)

作者简介: 钟金城 (1963-), 男, 云南绿春人, 哈尼族, 教授, 博士, 研究方向为动物遗传学。Tel: 028-85522528; E-mail: zhongjincheng518@sohu.com

GenBank . These comparisons were performed in order to provide a theoretical foundation for further research of the correlation of yak *H-FABP* gene and meat quality, molecular breeding, location and expression. 【Method】 The yak *H-FABP* gene was amplified using particular primers, cloned by T-A method and sequenced, based on this the nucleotide and amino acid sequences among different species were compared and analyzed by RepeatMasker、DNAMAN4.0、BioEdit4.8.10、Clustal W1.81 i.e, bio-softs.【Result】 The number of exons and introns of yak *H-FABP* gene (GenBank Accession No: DQ026674) were as same as those in cow, sheep, goats, pigs, human, rats, mice, chicks and zebra-fish. They had 4 exons and 3 introns. The size of CDS sequence of the yak *H-FABP* gene, encoding 133 amino acid, was 402 bp. The size of exon I, exon II, exonIII and exonIV was 73 bp, 173 bp, 102 bp and 54 bp respectively; while the size of intron I, intronII and intronIII was 3 460 bp, 1 892 bp and 1 495 bp respectively. The junction sequence of exons and introns of yak *H-FABP* gene was in accordance with the law of gene composition. The rate of the repetitive sequence was 13.07% in the nucleotide sequence of yak *H-FABP* gene. Five repetitive elements were found in the intron I , including a SINE/Artiodactyls element, a SINE/MIR3 element, a SINE/Bov-tA1 element and two SINE/MIR elements. No repetitive element was found in intron II . Three repetitive elements were found in intron3, including a SINE/MIR element, a LINE/L2 element and a SINE/Artiodactyls element. The rate of the repetitive sequence was 11.85% for SINEs, 6.44% for MIRs and 1.22% for LINEs respectively. In addition, LINE1, BovB/Art2, L3/CR1 repetitive elements, LTR anti-transcription element and DNA transposing element were not found in this sequence. The nucleotide sequence of the coding region and deduced amino-acid sequences among different species were quite conservative. The homology rates of nucleotide sequences of the coding region of *H-FABP* gene between the yak and cow, sheep, goat, pig, human, rat, mouse, chick and zebra-fish were 99.8%, 97.8%, 97.0%, 92.8%, 88.8%, 83.3%, 83.1%, 76.4%, 68.7% respectively, while the homology rates of amino-acid sequences were 100%, 96.9%, 96.9%, 92.4%, 88.7%, 85.7%, 85.7%, 77.4%, 69.9% respectively. 【Conclusion】 The yak *H-FABP* gene had 4 exons and 3 introns. The size of CDS sequence of the yak *H-FABP* gene, encoding 133 amino-acid, was 402 bp. The size of exon I, exon II, exonIII and exonIV was 73 bp, 173 bp, 102 bp and 54 bp respectively; while the size of intron I, intron II and intronIII was 3 460 bp, 1 892 bp and 1 495 bp respectively. There were many repetitive elements in the nucleotide sequence of yak *H-FABP* gene, and the junction sequence of exons and introns was accordance with the law of gene composition. The nucleotide sequences of the coding region and deduced amino acid sequences between yak and cow, sheep, goats, pigs, human, rats, mice, chicks and zebra-fish were quite conservative.

Key words: Yak; *H-FABP* gene; Cloning; Sequence analysis

## 0 引言

【本研究的重要意义】心脏脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid-binding protein, H-FABP)是一种低分子量胞浆蛋白,由 *H-FABP* 基因所编码,主要在畜禽的心肌、骨骼肌和乳腺中表达。目前,对多种畜禽的研究表明, *H-FABP* 基因可作为影响畜禽肌肉脂肪含量和肉质性状的候选基因<sup>[1-6]</sup>。牦牛作为青藏高原及其毗邻的高山、亚高山地区的“特有”牛种,是一种“全能”家畜<sup>[7]</sup>,品种间和品种内具有丰富的遗传多样性,是进行肉产品开发的优良畜种<sup>[8,9]</sup>。牦牛肉质性状是其主要的经济性状之一。通过对其肉质性状功能基因的研究,可为进一步开展牦牛该基因与其肉质性状的相关分析,进行分子育种以及基因定位、表达等研究提供理论基础。【前人研究进展】当前,已有多种畜禽的 *H-FABP* 基因被相继克隆和定位,并进行了多态性与肌肉脂肪含量的相关分析。Gerbens 等<sup>[1]</sup>通过与人 *H-FABP* cDNA 噬菌斑杂交,分离出了含猪 *H-FABP* 基因的  $\lambda$  噬菌体,确定了猪 *H-FABP* 基因的结构特征并

将其定位在猪 6 号染色体上。在此基础上,他还对 983 头杜洛克猪各基因型与肌肉脂肪含量(IMF)和背膘厚(BFT)的作用进行了相关分析,表明不同基因型组合其肌肉脂肪含量(IMF)可相差 15%,其中单倍体 aa/dd/HH 与高肌肉脂肪含量(IMF)有关<sup>[2]</sup>。Zhang 等<sup>[3]</sup>对大鼠 *H-FABP* 基因进行了克隆和序列结构分析,表明大鼠 *H-FABP* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,共编码 133 个氨基酸,通过荧光原位杂交(FISH)技术将其定位于 5q36。Calvo 等<sup>[4]</sup>采用基因组步移技术对绵羊 *H-FABP* 基因进行了克隆并将其定位于 2 号染色体遗传标记 CSR2115 与 BM2113 之间,在对 4 个绵羊品种(*Ovis aries*)和欧洲摩弗伦(*Mouflon*)羊的 *H-FABP* 基因外显子 II 和内含子 III 各发现一 SNPs 多态位点。王启贵<sup>[5]</sup>等对鸡 *H-FABP* 基因外显子 II 163 bp 序列进行了克隆和序列比较分析,表明鸡与猪该基因序列同源性达 68%,Northern 杂交表明鸡该基因只在脂肪组织中表达。武峰等<sup>[6]</sup>对牛 *H-FABP* 基因内含子 II 进行了 PCR-RFLP 分析,发现一个 HaeIII-RFLP 多态位点。在利用最小二乘法拟合线性模型对不同分

子标记基因型效应值间肉品质大理石花纹和嫩度性状差异显著性检验中, 发现牛 *H-FABP* 基因中的 h 等位基因, 尤其是 hh 纯合基因型对牛肉嫩度剪切力值有较大的影响。【本研究切入点】普通牛肉质性状的基因效应分析研究已有一些报道<sup>[10,11]</sup>。但对牦牛肉质性状的研究, 目前还局限于对其组织学和生化水平的研究<sup>[12~16]</sup>, 对其肉质性状相关功能基因的研究国内外尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究在对九龙牦牛 *H-FABP* 基因克隆、测序的基础上, 结合 GenBank 中刊登的普通牛、绵羊、山羊、人、猪、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼等物种相应基因序列进行了序列比对分析。以期为进一步开展牦牛 *H-FABP* 基因与其肉质性状的相关分析, 进行分子标记辅助选择、基因定位、表达以及牦牛与其它物种间系统进化研究提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及血样采集

选取健康成年的九龙牦牛(2 头), 颈静脉采血置于冰瓶带回实验室, -20℃保存备用。

### 1.2 酶和试剂

饱和酚、氯仿、酒精、蛋白酶 K、EDTA、Tris-Base、

硼酸、IPTG、X-gal、氨卞青霉素、DNA Marker 2000、 $\lambda$ -EcoT14I digest、琼脂粉、ExTaq DNA 聚合酶(250U)等均购自大连宝(TakaRa)生物工程有限公司; 小量胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 小量质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。

### 1.3 菌株和质粒载体

*E.coli* JM109 由成都天泰生命科技有限公司提供; pMD18-T Vector (T-载体, 50  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 购自大连宝(TakaRa)生物工程有限公司。

### 1.4 基因组 DNA 的提取

牦牛血液基因组 DNA 的提取采用酚-氯仿提取法提取<sup>[17]</sup>。

### 1.5 引物的设计、合成及稀释

参考普通牛 *H-FABP* 基因 cDNA 序列(GenBank Accession No:X12710)及绵羊 *H-FABP* 基因部分序列(GenBank Accession No:AY157617 和 AY156516), 应用引物设计软件 primer premier 5.0、Oligo 6.0 设计 3 对引物(表 1), 使 3 对引物扩增的片段间不但有重叠, 且尽可能使引物序列分布于普通牛和绵羊该基因保守区内, 从而保证测序后能完全拼接得到牦牛 *H-FABP* 基因预期片段。

表 1 牦牛 *H-FABP* 基因扩增引物及扩增范围

Table1 Primers and the respective size of amplified DNA fragment of the *H-FABP* gene in the yak

代号 Number	引物 Primers	扩增范围(以普通牛 cDNA 序列为参照) Amplified DNA fragment size (take the cDNA sequence of cow <i>H-FABP</i> gene as reference)
1 号 No.1	上游引物 (PF) : 5' TCTCTGTCGTCTTCCCAACC3' Forward primer : 5' TCTCTGTCGTCTTCCCAACC3' 下游引物 (PR) : 5' CATCTGCTGTGGTCTCATCG3' Reverse primer : 5' CATCTGCTGTGGTCTCATCG3'	从 11nt 到 278nt(包括该基因 5'-侧翼区部分序列、第一外显子、第一内含子和第二外显子部分序列) From 11nt to 278nt(include the partial 5'-flanking region, exonI, intronI and partial exon II sequence)
2 号 No.2	上游引物 (PF) : 5'GGTTTTGCTACCAGGCAGGT3' Forward primer : 5' GGTTTTGCTACCAGGCAGGT3' 下游引物 (PR) : 5' GTCCATTCCACTTCTGCAC3' Reverse primer : 5' GTCCATTCCACTTCTGCAC3'	从 125nt 到 347nt(包括第二外显子部分序列、第二内含子和第三外显子部分序列) From 125nt to 347nt(include partial exon II, intron II and partial exon III sequence)
3 号 No.3	上游引物 (PF) : 5' GTGCAGAAGTGGAATGGACA3' Forward primer : 5' GTGCAGAAGTGGAATGGACA3' 下游引物 (PR) : 5' AAAATGAGGCAATCTGGTGC3' Reverse primer : 5' AAAATGAGGCAATCTGGTGC3'	从 329nt 到 523nt(包括第三外显子部分序列、第三内含子、第四外显子和 3'-侧翼区部分序列) From 329nt to 523nt(include partial exon III, intron III, exon IV and partial 3'-flanking region sequence)

引物稀释前对其进行瞬间离心, 后加入一定量的超纯水, 使其终浓度为 20 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 。充分涡悬 1~2 min, -20℃保存备用。

### 1.6 牦牛 *H-FABP* 基因的 PCR 扩增

引物 1: PCR 反应在 25  $\mu\text{l}$  体系中进行: 10 $\times$ ExTaq Buffer (Mg<sup>2+</sup>Free) 2.5  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> (25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{l}$ , dNTP (2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{l}$ , 上游引物 (10  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1

$\mu\text{l}$ , 下游引物 (10  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , 模板 DNA (25  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , ExTaq 酶 (5U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) 0.6  $\mu\text{l}$ , 超纯水 15.4  $\mu\text{l}$ 。

PCR 扩增按以下程序进行: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 57.5℃退火 1 min, 72℃延伸 4 min, 35 个循环; 最后 72℃延伸 5 min; 4℃保存。产物用 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并用凝胶成像系统检测。

引物 2: PCR 反应在 25  $\mu\text{l}$  体系中进行: 10 $\times$ ExTaq

Buffer ( $Mg^{2+}$ Free) 2.5  $\mu$ l,  $MgCl_2$  (25  $mmol \cdot L^{-1}$ ) 1.5  $\mu$ l, dNTP (2.5  $mmol \cdot L^{-1}$ ) 2  $\mu$ l, 上游引物 (10  $pmol \cdot L^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, 下游引物 (10  $pmol \cdot L^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, 模板 DNA (25  $ng \cdot \mu$ l $^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, Ex Taq 酶 (5U $\cdot\mu$ l $^{-1}$ ) 0.5  $\mu$ l, 超纯水 15.5  $\mu$ l。

PCR 扩增按以下程序进行: 94 $^{\circ}C$  预变性 4 min; 94 $^{\circ}C$  变性 1 min, 54 $^{\circ}C$  退火 1 min, 72 $^{\circ}C$  延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$  延伸 5 min; 4 $^{\circ}C$  保存。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并用凝胶成像系统检测。

引物 3: PCR 反应在 25  $\mu$ l 体系中进行: 10 $\times$ ExTaq Buffer ( $Mg^{2+}$ Free) 2.5  $\mu$ l,  $MgCl_2$  (25  $mmol \cdot L^{-1}$ ) 1.4  $\mu$ l, dNTP (2.5  $mmol \cdot L^{-1}$ ) 2  $\mu$ l, 上游引物 (10  $pmol \cdot L^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, 下游引物 (10  $pmol \cdot L^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, 模板 DNA (25  $ng \cdot \mu$ l $^{-1}$ ) 1  $\mu$ l, ExTaq 酶 (5U $\cdot\mu$ l $^{-1}$ ) 0.6  $\mu$ l, 超纯水 15.5  $\mu$ l。

PCR 扩增按以下程序进行: 94 $^{\circ}C$  预变性 4 min; 94 $^{\circ}C$  变性 1 min, 56.5 $^{\circ}C$  退火 1 min, 72 $^{\circ}C$  延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$  延伸 5 min; 4 $^{\circ}C$  保存。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并用凝胶成像系统检测。

### 1.7 牦牛 *H-FABP* 基因 PCR 产物的克隆

对牦牛 *H-FABP* 基因 PCR 产物参照小量胶回收试剂盒说明书进行胶回收纯化, 回收的目的片段与 pMD18-T 载体于 16 $^{\circ}C$  恒温金属浴中反应连接 10 h; 将连接产物转化到 *E.coli* JM109 感受态宿主菌中培养; 再将菌液涂布在含有 X-Gal 底物、IPTG 诱导物和氨苄青霉素 ( $Amp^r$ ) 的固体 LB 平板上, 利用蓝白斑遗传学筛选法筛选; 用灭菌牙签挑取白色单一菌落, 在含氨苄青霉素 ( $Amp^r$ ) 的 LB 液体培养基中培养并提取质粒, 将构建的重组质粒通过 PCR 法转化子鉴定, 以确保克隆成功。

### 1.8 测序、序列结构分析

将纯化后的阳性重组质粒用 ABI-100 型全自动 DNA 测序仪使用 M13 通用引物以及合成引物进行测序, 测序结果用 DNAMAN4.0 生物软件进行拼接得到目的序列。牦牛 *H-FABP* 基因的序列结构主要通过与 GenBank 中普通牛、绵羊、猪等物种相应基因序列的比对分析进行确定; 重复序列的分析通过 RepeatMasker (<http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/>) 在线分析软件完成; 与 GenBank 中其它物种的序列比较分析由 DNAMAN4.0、BioEdit4.8.10、Clustal W1.81 等生物软件及序列处理在线工具包 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 综合运用完成。

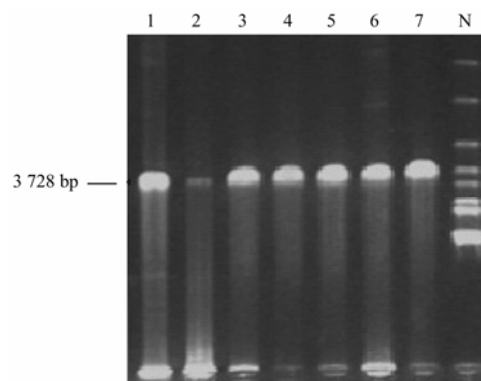
## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛 *H-FABP* 基因的 PCR 扩增

参照 DNA 分子量标准、普通牛 *H-FABP* 基因 cDNA 序列 (GenBank Accession No:X12710)、绵羊 *H-FABP* 基因部分序列 (GenBank Accession No:AY156516、AY157617) 及测序结果, 得知: (1) 引物 1 PCR 扩增产物大小为 3 728 bp (图 1), 包括牦牛 *H-FABP* 基因 5'-侧翼区部分序列 (36 bp)、第 1 外显子 (73 bp)、第 1 内含子 (3 460 bp) 和第 2 外显子部分序列 (159 bp); (2) 引物 2 PCR 扩增产物大小为 2 115 bp (图 2), 包括牦牛 *H-FABP* 基因第 2 外显子部分序列 (168 bp)、第 2 内含子 (1 892 bp) 和第 3 外显子部分序列 (55 bp); (3) 引物 3 PCR 扩增产物大小为 1 690 bp (图 3), 包括牦牛 *H-FABP* 基因第 3 外显子部分序列 (66 bp)、第 3 内含子 (1 495 bp)、第四外显子 (54 bp) 和 3'-侧翼区部分序列 (75 bp)。

### 2.2 牦牛 *H-FABP* 基因重组子的鉴定

利用蓝白斑遗传学筛选法用灭菌牙签从含有 X-Gal 底物、IPTG 诱导物和氨苄青霉素 ( $Amp^r$ ) 的固体 LB 平板上挑取白色单一菌落, 在含氨苄青霉素 ( $Amp^r$ ) 的 LB 液体培养基中培养并提取质粒, 将提取的重组质粒及培养菌液通过 PCR 法重组子鉴定 (图 4)。使用特异引物 1、2、3 对含有质粒的阳性菌液进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 均出现目的片段。结合测序结果进一步证明目的片段已克隆成功。



N 泳道为  $\lambda$ -EcoT14I digest; 1~7 泳道为引物 1 PCR 产物, 大小均为 3 728 bp

N. Molecular weight standard  $\lambda$ -EcoT14I digest; 1-7. PCR products with primer 1, the size is 3 728 bp

图 1 引物 1 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 PCR products with primer 1 on 1% agarose gel

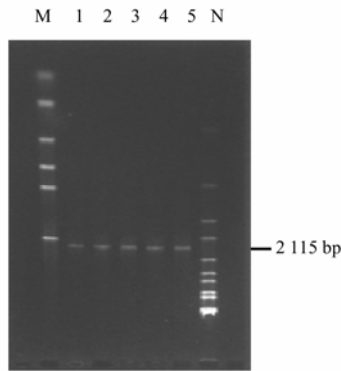


图 2 引物 2 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig. 2 PCR products with primer 2 on 1% agarose gel

图 2 引物 2 PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 PCR products with primer 2 on 1% agarose gel

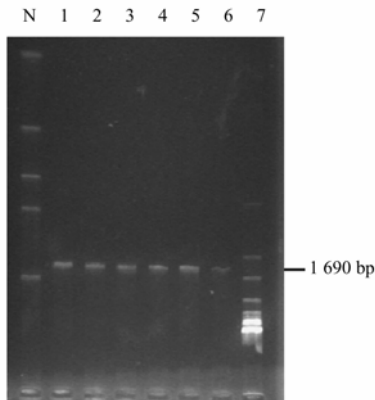


图 3 引物 3 PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig. 3 PCR products with primer 3 on 1.5% agarose gel

图 3 引物 3 PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 PCR products with primer 3 on 1.5% agarose gel

### 2.3 牦牛 *H-FABP* 基因的结构

通过将牦牛 *H-FABP* 基因 3 个克隆片段拼接后与普通牛 *H-FABP* 基因 cDNA 序列、绵羊 *H-FABP* 基因部分序列以及猪 *H-FABP* 基因部分序列 (GenBank Accession No:Y16180) 的比对分析确定了牦牛 *H-FABP* 基因外显子和内含子序列及其大小, 结果显

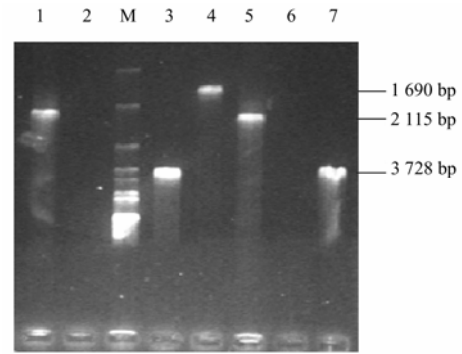


图 4 牦牛 *H-FABP* 基因 3 片段重组子鉴定  
Fig. 4 Identification of recombinant plasmids on the three amplified fragments of yak *H-FABP* gene by PCR

图 4 牦牛 *H-FABP* 基因 3 片段重组子鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant plasmids on the three amplified fragments of yak *H-FABP* gene by PCR

示, 在拼接的牦牛 *H-FABP* 基因 7 360 bp 序列 (GenBank Accession No:DQ026674) 中, 包括牦牛该基因的全部外显子和内含子序列以及部分 5'-侧翼区、3'-侧翼区序列。牦牛该基因外显子和内含子数与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种相同, 都是由 4 个外显子和 3 个内含子组成。其中, 4 个外显子大小分别为 73 bp、173 bp、102 bp 和 54 bp, 外显子 I 包含起始密码子 ATG, 外显子 IV 含有终止密码子 TGA; 内含子 I、内含子 II 和内含子 III 大小分别为 3 460 bp、1 892 bp 和 1 495 bp。使用 BioEdit 生物软件对牦牛 *H-FABP* 基因 mRNA 序列进行推导, 发现起始密码子 AUG 上游 (即 5'-方向) 的第 3 个核苷酸是腺嘌呤 (即-3A), 紧跟在 AUG 后面的核苷酸序列是鸟嘌呤 (即+4G), 这不仅与“Kozak 序列” (即 A/GNNAUGG) 特征一致, 也与大多数真核生物起始密码子所具有的结构特征 (即 ANNAUGN 和 GNNAUGPu) 一致。结合这一特征以及与其它多个物种基因序列的比较分析, 推测牦牛 *H-FABP* 基因 CDS 序列全长为 402 bp, 前体氨基酸数为 133 个氨基酸。

通过对牦牛、绵羊、猪 3 个物种该基因外显子和内含子连接处序列进行比较分析, 结果显示, 牦牛与绵羊两物种外显子与内含子的连接处序列完全相同,

而与猪稍有差异, 但均表现出较高的保守性, 3 个物种外显子与内含子的连接处序列都基本上与通常的规

律相一致<sup>[18]</sup>, 即: 外显子/GTPuAG 内含子和内含子 PyPyPyNCAG/N (表 2)。

表 2 牦牛、绵羊、猪 *H-FABP* 基因外显子和内含子连接处序列分析

Table 2 Comparison of junction sequences of exons and introns of the *H-FABP* gene between yak and sheep, pig

外显子 Exon	牦牛 Yak		绵羊 Sheep		猪 Pig	
	5'-拼接供点 5'-splicing donor site	3'-拼接受点 3'-splicing acceptor site	5'-拼接供点 5'-splicing donor site	3'-拼接受点 3'-splicing acceptor site	5'-拼接供点 5'-splicing donor site	3'-拼接受点 3'-splicing acceptor site
	1	TTCACC/atggtg	cactcg/GTGAGG	TTCACC/atggtg	cactcg/GTGAGG	CTCACC/atggtg
2	CCTCAG/gtgtcg	gtcaag/GTGAGT	CCTCAG/gtgtcg	gtcaag/GTGAGT	CCTCAG/gtgtgg	gtcaag/GTGAGT
3	CCACAG/tccatc	attctg/GTAAGA	CCACAG/tccatc	attctg/GTAAGA	CCACAG/tccatt	atcctg/GTAAGA
4	TTCCAG/acactc	gcatga/CCTGCC	TTCCAG/acactc	gcatga/CCTGCC	TTCCAG/acactc	gcatga/CCTGCC

使用 RepeatMasker 在线分析软件对牦牛该基因序列进行重复序列分析, 结果表明, 在该基因序列中, 重复序列所占比率为 13.07%。内含子 I 含有 5 个重复元件, 包括 1 个 SINE/Artiodactyls 元件、1 个 SINE/MIR3 元件、1 个 SINE/Bov-tA1 元件和 2 个 SINE/MIR 元件; 在内含子 II 中未发现重复元件的存在; 内含子 III 有 3 个重复元件, 即 SINE/MIR 元件、LINE/L2 元件、SINE/Artiodactyls 元件各 1 个。总体而言, SINEs 短重复序列所占比率为 11.85%, 哺乳动物分散性重复序列 MIRs 比率为 6.44%; LINEs 包括 LINE1、LINE2、BovB/Art2 以及 L3/CR1 家族, 它所占比率远小于 SINEs 元件, 为 1.22%; 但在牦牛该基因区域中没有发现 LINE1、BovB/Art2、L3/CR1 重

元件以及 LTR 类反转录元件和 DNA 转座子元件。

### 2.4 牦牛与其它物种间 *H-FABP* 基因编码区核苷酸序列比较分析

用 DNAMAN 生物软件, 将牦牛 *H-FABP* 基因全编码区核苷酸序列与 GenBank 中普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种相应基因序列进行序列比对 (图 5), 计算不同物种核苷酸序列间的同源性大小 (表 3)。各物种 *H-FABP* 基因编码区核苷酸序列比较结果表明, 牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种间同源性大小分别为 99.8%、97.8%、97.0%、92.8%、88.8%、83.3%、83.1%、76.4%、68.7%。

牦牛 Yak	ATGGTGGACGCCTTCGTGGGTACCTGGAAGTTAGTGGACAGCAAGAATTCGATGACTAC	60
普通牛 Cow	-----	60
绵羊 Sheep	-----	60
山羊 Goat	-----	60
猪 Pig	-----c--c-----c-----	60
人 Human	-----t-c--c-----c-----	60
大鼠 Rat	---c-----t-c-----c-----t-----	60
小鼠 Mouse	---c-----t-c-----c-----t-----	60
鸡 Chick	-----a-g-----c-----c-g---t-cggcc-----g---	60
斑马鱼 Zebra-fish	---ca---t-ta-c-c-g---c-gaa-g-----g---	60
*****		
牦牛 Yak	ATGAAGTCACTCGGTGTCGGTTTTGCTACCAGGCAGGTGGGCAATATGACCAAGCCTACC	120
普通牛 Cow	-----	120
绵羊 Sheep	-----c-----	120
山羊 Goat	-----c-----a-----	120
猪 Pig	-----a-t---g-----c-----c-----	120
人 Human	-----g-----c-gc-----	120
大鼠 Rat	-----g-c---c---a---c-ct-gc-----g---	120
小鼠 Mouse	-----g-c---c-----ct-gc-----t	120
鸡 Chick	---g-gt-g-g-g-c---c-----a-c-ggcc-----a-c---	120
斑马鱼 Zebra-fish	---agg-a-t---t-c---c-gc-t-a-t-c-----a-c-a	120
*****		
牦牛 Yak	ACAATCATCGAAGTGAATGGGGACACAGTCATCAAAAACACAAGCACCTTCAAGAAC	180

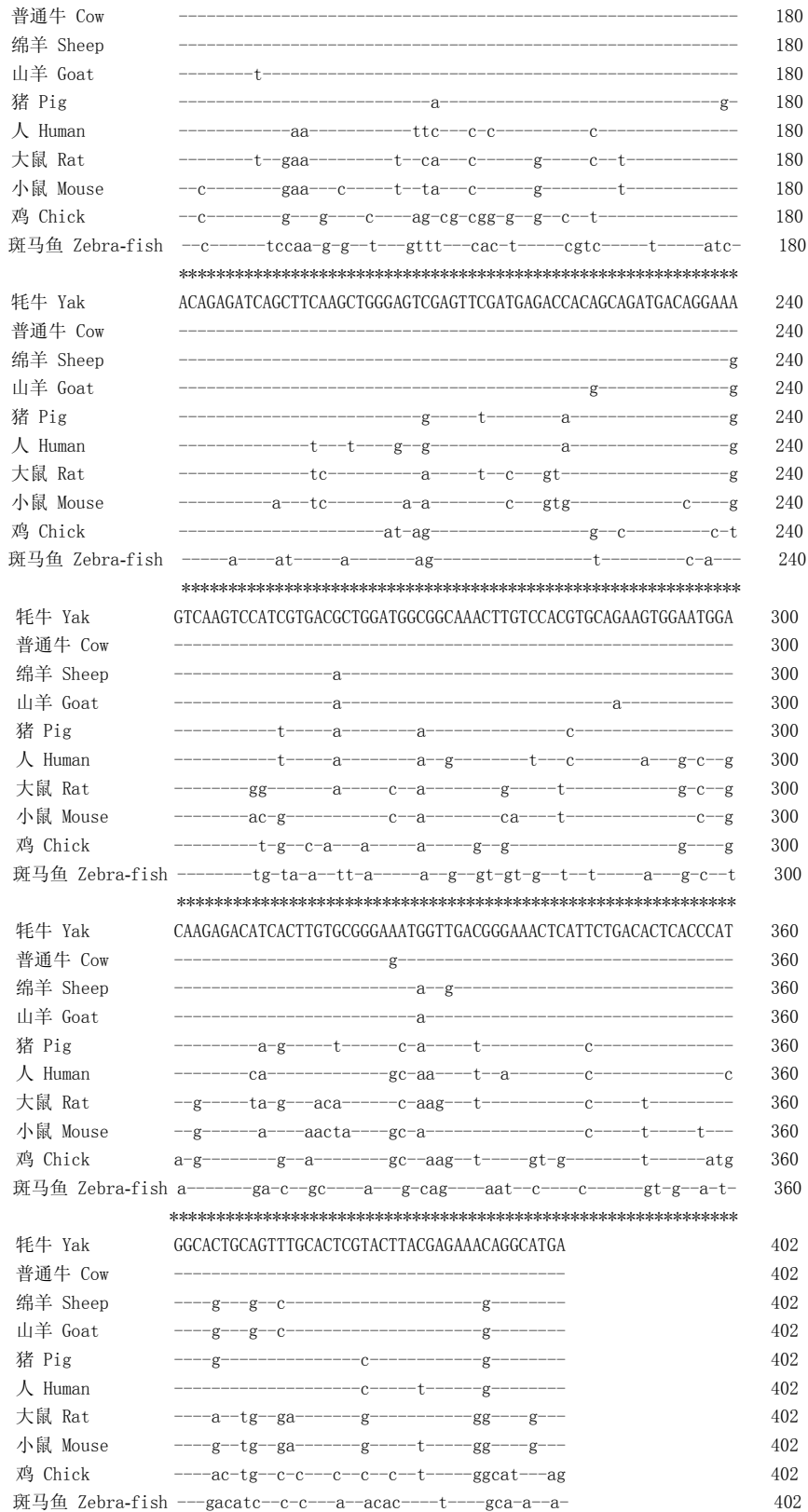


图 5 牦牛与 9 个物种 *H-FABP* 基因核苷酸序列编码区多序列对位排列

Fig. 5 Alignment of nucleotide sequences of encoding region of *H-FABP* gene between yaks and 9 species





表 4 牦牛与 9 个物种 *H-FABP* 氨基酸序列间同源性 (%)Table 4 Alignment of amino-acid sequences of *H-FABP* between yaks and 9 species (%)

物种 Species	牦牛 Yak	普通牛 Cow	绵羊 Sheep	山羊 Goat	猪 Pig	人 Human	大鼠 Rat	小鼠 Mouse	鸡 Chick	斑马鱼 Zebra-fish
牦牛 Yak	100.0									
普通牛 Cow	100.0	100.0								
绵羊 Sheep	96.9	96.9	100.0							
山羊 Goat	96.9	96.9	100.0	100.0						
猪 Pig	92.4	92.4	94.7	94.7	100.0					
人 Human	88.7	88.7	89.4	89.4	90.2	100.0				
大鼠 Rat	85.7	85.7	87.2	87.2	86.4	89.4	100.0			
小鼠 Mouse	85.7	85.7	87.9	87.9	87.2	85.7	93.9	100.0		
鸡 Chick	77.4	77.4	78.1	78.1	75.1	78.1	78.9	75.9	100.0	
斑马鱼 Zebra-fish	69.9	69.9	70.6	70.6	72.1	72.9	74.4	72.9	69.1	100.0

### 3 讨论

#### 3.1 牦牛 *H-FABP* 基因的结构特征

本研究通过对牦牛 *H-FABP* 基因 3 个克隆片段的拼接得到了全长为 7 360 bp 的基因序列, 结果表明, 牦牛的 *H-FABP* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成。其中, 外显子 I、外显子 II、外显子 III 和外显子 IV 大小分别为 73 bp、173 bp、102 bp 和 54 bp, 内含子 I、内含子 II 和内含子 III 大小分别为 3 460 bp、1 892 bp 和 1 495 bp。外显子和内含子数以及外显子的大小与其它物种一致, 但内含子大小同其它物种差异较大。进一步分析表明, 牦牛 *H-FABP* 基因的起始密码子 AUG 上游(即 5'-方向)的第 3 个核苷酸是腺嘌呤(即 -3A), 紧跟在 AUG 后面的核苷酸是鸟嘌呤(即 +4G), 这与“Kozak 序列”(即 A/GNNAUGG)特征一致, 也符合大多数真核生物起始密码子所具有的结构特征(即 ANNAUGN 和 GNNAUGPu)。该基因的外显子和内含子连接区序列也同绵羊的连接区序列完全相同, 外显子与内含子的连接区序列遵循通常的基因组成规律, 即: 外显子 /GTPuAG... 内含子和内含子...PyPyPyNCAG/N<sup>[18]</sup>。这些结果说明本研究得到的牦牛 *H-FABP* 基因的结构是正确可靠的。

前人研究表明, 所有哺乳动物基本有 4 种不同的重复序列: (1) SINEs 短重复序列; (2) LINEs 长重复序列; (3) LTR 类反转录元件的重复序列; (4) DNA 转座子。Calvo 等<sup>[2]</sup>在对绵羊 *H-FABP* 基因进行遗传变异分析中, 发现在其内含子 I 有 2 个 SINE/MIR 元件, 而在内含子 III 发现有 2 个 SINE/MIR 元件、1 个 LINE/L2 元件和 1 个 SINE/Artiodactyls 元件, 且这些重复元件在绵羊中高度保守。同时, 他还发现在 SINE/Artiodactyls 元件后含有一 19 个 A 碱基组成的

PolyA 区域。Kaukinen 等<sup>[19]</sup>研究发现 SINE/Artiodactyls 元件与 Poly(AC)微卫星标记有一定关联。在对人相应基因的研究中发现, LINE/L2 元件保守, 4 个 SINE/MIR 元件部分保守, 而不存在 SINE/Artiodactyls 元件, 有 SINE/Alu 重复元件的存在。本研究在对牦牛该基因序列的重复序列元件分析中, 发现在内含子 I 中有 5 个重复元件, 内含子 II 没有重复元件, 内含子 III 有 3 个重复元件。通过牦牛与绵羊、人该基因内含子内重复序列的比较分析可以发现, 尽管牦牛与绵羊、人 3 物种在该基因内含子内(除内含子 II)均含有多个 SINEs 短重复序列和 LINEs 重复序列, 不存在 LTR 类反转录元件重复序列和 DNA 转座子元件, 但 3 物种所含重复序列元件的数目和类型还是有一定差异, 如牦牛与绵羊都含有 SINE/Artiodactyls 元件, 而在人该基因内含子中无该元件的存在, 取而代之的是 Alu 重复元件。同时, 牦牛在内含子 I 比绵羊多 3 个 SINE 重复元件(包括 1 个 SINE/Artiodactyls 元件、1 个 SINE/MIR3 元件和 1 个 SINE/Bov-tA1 元件), 内含子 III 比绵羊少 1 个 SINE/MIR 元件。这在一定程度上说明, 牦牛该基因区域含有比绵羊、人更丰富的 SINEs 短重复序列。这种差异是否具有种属特异性, 有待进一步验证。

#### 3.2 牦牛 *H-FABP* 基因编码区核苷酸序列与其它物种的比较

在牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种间 *H-FABP* 基因编码区核苷酸序列比对中, 发现牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼的编码区核苷酸序列间同源性达 68.7%~99.8%。其中, 牦牛与普通牛间的同源性最高, 达 99.8%; 与绵羊、山羊、猪相应序列间同源性都超过了 92%。这表明牦牛与 9 个物种间特别是与普通牛、绵羊、山羊、猪间在该基因编码区

核苷酸序列间具有较高的保守性。尽管如此,牦牛与各物种间在该基因编码区也有一定差异。在牦牛与普通牛的 *H-FABP* 基因编码区序列比对中,在 324 位发生一次碱基转换(A $\leftarrow$ →G)。与绵羊对应序列相比共发生了 5 次碱基转换和 4 次碱基颠换。与山羊序列相比,共有 9 次碱基转换和 3 次碱基颠换。与猪相应序列比较,共发生 17 次转换和 12 次颠换。与人相应序列比较,共发生 28 次转换和 17 次颠换。与大鼠相比,共发生 44 次转换和 23 次颠换。与小鼠相比,共发生 43 次转换和 25 次颠换。与鸡相比,共发生 48 次转换和 47 次颠换。与斑马鱼相比,共发生 59 次转换和 67 次颠换。从上述分析可以看出,随着牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种编码区核苷酸序列间同源性水平的降低,牦牛与各物种间碱基变异数也随之增加。牦牛与各物种序列间碱基变异类型均表现为碱基转换和颠换,未发生碱基插入和缺失以及倒位现象。在碱基颠换类型中,主要表现为 A 与 C、G 与 C 的碱基颠换方式,而 A 与 T、G 与 T 两种颠换方式相对较少。同时,牦牛与各物种间的碱基变异多发生在密码子第 3 位,其次是第 1 位,最少发生在第 2 位,符合分子进化的中性学说。牦牛与各物种在该基因核苷酸序列上的这些差异说明,牦牛与各物种虽然在 *H-FABP* 基因核苷酸水平上具有较高的保守性,但由于各物种起源、进化历史和选育程度的不同,造就了它们在 DNA 水平上的差异,这为从 DNA 水平上研究牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种间起源、进化关系提供了一定的理论基础。

### 3.3 牦牛 *H-FABP* 氨基酸序列与其它物种的比较

牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种 *H-FABP* 氨基酸序列比较结果显示,牦牛与各物种间同源性大小分别为 100%、96.9%、96.9%、92.4%、88.7%、85.7%、85.7%、77.4%、69.9%。总体看来,牦牛与各物种 *H-FABP* 氨基酸序列间保守性水平都较高。

牦牛与普通牛虽然在核苷酸水平上同源性为 99.8%,但氨基酸水平上的同源性达 100%,这说明发生在牦牛与普通牛该基因编码区序列 324 位点的碱基转换(A $\leftarrow$ →G)为同义突变,也进一步说明牦牛与普通牛作为亲缘关系较近的两个牛种,虽然在该基因核苷酸水平上有一定差异,但在氨基酸水平上无差异,其核苷酸序列上的差异不影响编码蛋白的结构组成。这提示,既然牦牛与普通牛该基因蛋白质序列组成相同,

那么该基因在两个物种间的基因表达调控方式也有可能相同。可以利用两物种中任一物种在该基因方面取得的研究成果,而运用于另一物种该基因的表达调控研究当中,来加速其研究进程。樊宝良等<sup>[20]</sup>在对牦牛与普通牛  $\kappa$ -酪蛋白基因第 IV 外显子序列的比较分析中发现,牦牛与普通牛虽然在核苷酸水平上同源性达 99%,但在氨基酸水平上无差异,这与本研究结果一致。而欧江涛等<sup>[21]</sup>在对牦牛与普通牛 *GH* 基因的序列比较研究中发现,牦牛与普通牛在 *GH* 基因的核苷酸和氨基酸水平上均有一定差异,同源性都为 99%。这也说明,牦牛与普通牛这两个物种在不同的功能基因核苷酸水平上的差异并非与其氨基酸水平上的差异相一致。这也许不仅与牦牛和普通牛的起源、进化历史相关,也可能与不同的功能基因在牦牛与普通牛中的进化速率有关。

牦牛与绵羊、山羊氨基酸序列间的同源性均为 96.9%。其中在 34、109、122、132 位牦牛为 G、M、T、Q,而绵羊与山羊分别为 A、I、S、E。与猪氨基酸序列相比,在 6、24、34、50、60、95、104、109、121、132 位牦牛分别为 V、L、G、V、N、V、S、M、T、Q,而猪依次为 A、I、A、I、S、L、T、L、S、E。与此同时,牦牛与大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼各物种氨基酸序列间的同源性依次变小,呈现出与其相应核苷酸水平上差异的一致性。这说明,除普通牛之外,牦牛与其它各物种间不仅在该基因的核苷酸水平上有差异,而且在相应的蛋白水平上亦有一定差异。同时,这种不同水平上的差异,与其亲缘关系的远近基本表现出一致性。基于牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪在基因的核苷酸水平和蛋白水平上有很高的同源性这一基础,作者认为,可以利用人类基因组计划和动物基因组计划的研究资料,来开展牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪等近缘物种间的比较基因组学研究。充分利用在其它物种研究方面所取得的理论研究成果来加速牦牛这一物种的科学研究进展是一种行之有效的捷径。

## 4 结论

4.1 牦牛 *H-FABP* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,其中外显子 I、外显子 II、外显子 III 和外显子 IV 大小分别为 73 bp、173 bp、102 bp 和 54 bp,内含子 I、内含子 II 和内含子 III 大小分别为 3 460 bp、1 892 bp 和 1 495 bp。外显子与内含子的连接区序列遵循通常的基因组成规律,即:外显子/GTPuAG...内含子和内

含子...PyPyPyNCAG/N。牦牛该基因区域含有较为丰富的重复序列元件。

4.2 牦牛与普通牛、绵羊、山羊、猪、人、大鼠、小鼠、鸡、斑马鱼 9 个物种在 *H-FABP* 基因编码区核苷酸及氨基酸序列上具有较高的保守性, 但也存在一定差异。

## References

- [1] Gerbens F, Rettenberger G, Lenstra J A, Veerkamp J H, te Pas M F. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mamm Genome*, 1997, 8: 328-332.
- [2] Gerbens F, van Erp A J, Harders F L, Verburg F J, Meuwissen T H, Veerkamp J H, te Pas M F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 1999, 77: 846-852.
- [3] Zhang J, Rickers-Haunerland J, Dawe I, Haunerland NH. Structure and chromosomal location of the rat gene encoding the heart fatty acid-binding protein. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266: 347-351.
- [4] Calvo J H, Vaiman D, Saýdi-Mehtar N. Characterization, genetic variation and chromosomal assignment to sheep chromosome 2 of the ovine heart fatty acid-binding protein gene (FABP3). *Cytogenet Genome Research*, 2002, 98: 270-273.
- [5] 王启贵, 李 宁, 邓学梅, 顾志良, 刘兆良, 李 辉, 陈志强, 连正兴, 吴常信. 鸡脂肪酸结合蛋白基因的克隆和测序分析. *遗传学报*, 2002, 29: 115-118.
- Wang Q G, Li N, Deng X M, Gu Z L, Liu Z L, Li H, Chen Z Q, Lian Z X, Wu C X. Cloning and sequencing of fatty acid-binding proteins gene in chicken. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29: 115-118. (in Chinese)
- [6] 武 峰, 许尚忠, 曹红鹤, 李宏滨. 3 个杂交牛种 *H-FABP* 基因第二内含子的遗传变异与肉品质性状的相关分析. *畜牧兽医学报*, 2004, 35: 252-255.
- Wu F, Xu S Z, Cao H H, Li H B. Genetic variation in intron2 of *H-FABP* gene in three bovine hybrids and the relationships with meat quality traits. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35: 252-255. (in Chinese)
- [7] Cai L. *The Yak*. Thailand: The Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995.
- [8] 钟金城, 赵素君, 陈智华, 马志杰. 牦牛品种的遗传多样性及其分类研究. *中国农业科学*, 2006, 39: 389-397.
- Zhong J C, Zhao S J, Chen Z H, Ma Z J. Study on genetic diversity and classification of the yak. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 389-397. (in Chinese)
- [9] 毛永江, 钟光辉, 郑玉才, 彭先文, 杨章平, 王 永, 江明峰. 中国牦牛乳蛋白遗传多态性及其与泌乳性能相关性研究. *中国农业科学*, 2004, 37: 291-295.
- Mao Y J, Zhong G H, Zheng Y C, Peng X W, Yang Z P, Wang Y, Jiang M F. Genetic polymorphisms of milk protein and their relationships with milking performances in Chinese yak. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 291-295. (in Chinese)
- [10] 高 雪, 徐秀容, 许尚忠, 张英汉. 影响牛生长发育性状的 GH 基因遗传效应分析. *中国农业科学*, 2006, 39: 606-611
- Gao X, Xu X R, Xu S Z, Zhang Y H. Study on genetic effect on growth and development traits in beef cattle. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39: 606-611. (in Chinese)
- [11] 刘 波, 陈 宏, 蓝贤勇, 雷初朝, 张志清, 张润锋. 秦川牛及其杂种牛 POU1F1 基因多态与生长性能相关性. *中国农业科学*, 2005, 38: 2520-2525
- Liu B, Chen H, Lan X Y, Lei C Z, Zhang Z Q, Zhang R F. Correlation of polymorphisms of POU1F1 gene and growth traits in qinchuan cattle and its hybrid cattle. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 2520-2525. (in Chinese)
- [12] Mkrtchyan S A, Umansky M S, Kmet A M. Meat amino acid composition of yak different ecotype. *Journal the Report of Russian Academy Agricultural Science*, 1993:57-63.
- [13] 钟光辉. 九龙牦牛选育研究. 成都: 四川民族出版社, 1995.
- Zhong G H. *The Study of Selection and Breeding of Jiulong Yak*. Chengdu: Sichuan National Press, 1995. (in Chinese)
- [14] 冶成君. 优质牦牛肉肉质的综合评价. *青海畜牧兽医杂志*, 2004, 34(4): 18-19.
- Ye C J. Comprehensive evaluation of meat quality of fine-quality yak meat. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2004, 34(4):18-19. (in Chinese)
- [15] Xie R Q, Yang P G. Meat quality test and analysis for different-age yak. Proceedings of the Fourth International Congress on Yak. 2004: 37-41.
- [16] Luo X L, Tong Z B, Wei Y P, Zhao X Q. Study on the meat characteristics of Qinghai yak and semi-wild yak, *Animal Science Journal*, 2006, 77: 230-234
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D.W. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 2002.
- Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [18] Mount S M. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids*

- Research*, 1982, 10: 459-472.
- [19] Kaukinen J, Varvio S L. Artiodactyl retroposons: association with microsatellites and use in SINEmorph detection by PCR. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 2955-2958.
- [20] 樊宝良, 李 宁, 吴常信. 依据乳蛋白基因序列构建反刍动物种系发生树的研究. *遗传学报*, 2000, 27(6): 485-497.
- Fan B L, Li N, Wu C X. Research on construction phylogenetics trees of ruminants basing on the database of milk protein gene sequences. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27: 485-497. (in Chinese)
- [21] 欧江涛. 牦牛多个功能基因的克隆测序和多态性研究. 硕士学位论文, 成都: 西南民族大学, 2003.
- Ou J T. Cloning, Sequencing and polymorphism research on several function gene of *Bos grunniens*. Chengdu: Master's Dissertation of Southwest University for Nationalities, 2003. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)