

# 5个山羊品种 $\beta$ lg 5侧翼区多态性研究<sup>\*</sup>

蓝贤勇<sup>1</sup>, 陈宏<sup>1,2</sup>, 雷初朝<sup>1</sup>, 李瑞彪<sup>1</sup>, 张润锋<sup>1</sup>, 罗军<sup>1</sup>, 胡沈荣<sup>1</sup>

(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 生物技术研究, 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、陕南白山羊、安哥拉山羊和波尔山羊等5个品种162个个体的 $\beta$ lg 5侧翼区进行了多态性分析。结果表明, PCR扩增产物大小为710 bp, 被 $Sma$  I酶消化后表现多态性。西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南白山羊、安哥拉山羊和波尔山羊的A/B等位基因频率分别为0.911/0.089, 0.871/0.129, 1.000/0.000, 0.933/0.067, 0.944/0.056, 且它们的基因杂合度/有效等位基因数/Shannon信息熵/ $PIC$ 值分别为0.163/1.194/0.301/0.150, 0.225/1.290/0.385/0.200, 0.000/1.000/0.000/0.000, 0.125/1.142/0.245/0.117, 0.105/1.117/0.215/0.100。由此可见, 关中奶山羊的遗传多态性最丰富, 其次是西农萨能奶山羊, 而安哥拉山羊和波尔山羊的遗传多态性较低, 陕南白山羊未表现出多态性。

**[关键词]** 山羊;  $\beta$ lg; PCR-RFLP; 遗传多态性

**[中图分类号]** S827.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)02-0019-04

西农萨能奶山羊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; 关中奶山羊是以陕西关中平原的山羊为基础, 主要利用西农萨能奶山羊改良、经过长期选育而成的乳用品种; 陕南白山羊产于陕西南部的汉江两岸, 其肉用性能好; 安哥拉山羊是世界上著名的毛用山羊品种; 波尔山羊原产于南非共和国, 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<sup>[1]</sup>。

乳清蛋白和酪蛋白是牛、羊乳蛋白中的两类主要蛋白,  $\beta$ 乳球蛋白( $\beta$ lg)是乳清蛋白的主要成分。目前, 有关乳蛋白基因多态性研究的报道较多, 但多集中在中国荷斯坦牛上<sup>[2,3]</sup>, 而对山羊 $\beta$ 乳球蛋白基因5侧翼区多态性的研究报道不多<sup>[4]</sup>。本研究首次利用PCR-RFLP技术, 分析了陕西境内西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南白山羊、安哥拉山羊和波尔山羊等5个品种共162个个体 $\beta$ 乳球蛋白基因5侧翼区多态性, 为奶山羊、肉用山羊和毛用山羊的育种及畜牧业的发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南

白山羊、安哥拉山羊和波尔山羊等5个山羊品种共计162个个体。其中, 无血缘关系的西农萨能奶山羊血样56份, 来自陕西千阳县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62份(包括18份血样、5份成年羊肝脏组织样、39份羔羊脾脏组织样), 分别来自西北农林科技大学动物实验中心、陕西省丹凤县种羊场和关中地区屠宰场; 无血缘关系的陕南白山羊血样11份, 来自陕西丹凤县种羊场; 无血缘关系的安哥拉山羊血样15份, 来自西北农林科技大学动物实验中心; 无血缘关系的波尔山羊血样18份, 分别来自西北农林科技大学动物实验中心和陕西丹凤县种羊场。颈静脉采血, 加0.2%肝素抗凝, 低温带回实验室并置于-80℃保存备用; 肝脏组织和脾脏组织采样后立即置于冰盒中带回实验室, 并置于-80℃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 $Sma$  I等购自MBI公司(Fermentas)。

### 1.3 基因组DNA的提取

血样DNA的提取参照Chen等<sup>[5]</sup>的方法; 组织样DNA的提取参照文献[6]的方法。

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2004-04-02

[基金项目] 教育部留学人员启动基金项目(1999-12D); 陕西省自然科学基金项目(99SM06); 杨凌生物技术育种工程技术中心基金项目(1999-6)

[作者简介] 蓝贤勇(1979-), 男, 江西南康人, 在读博士, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。

[通讯作者] 陈宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chen hong1212@263.net

#### 1.4 PCR 引物

所用引物由上海生物工程公司合成。引物序列<sup>[7]</sup>如下。

上游引物:

5'-GTCACTTCCGTCCTGGGG-3';

下游引物:

5'-GGCCTTTCA TGGTCTGGGTGA-3'。

#### 1.5 PCR 反应条件

25  $\mu\text{L}$  反应体系包括 1 U Taq DNA 聚合酶, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10  $\times$  buffer, 100  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 100 ng 基因组DNA, 上下游引物各 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应程序为: 95 预变性 5 min; 97 15 s, 63 1 min, 72 90 s (10 个循环); 95 30 s, 63 1 min, 72 90 s (25 个循环); 最后, 72 延伸 5 min。



图1 5个山羊 $\beta 1g$ 基因5侧翼区PCR产物电泳  
泳道10 阴性对照;M: SD004;泳道1~9, 11 1~9及10号  
个体 $\beta 1g$ 基因的PCR扩增产物

Fig 1 Electrophoresis patterns of  $\beta 1g$  gene  
PCR product in five goats breeds

Lane 10 Negative control; M: SD004; Lane 1-9 and 11 PCR  
amplified product of  $\beta 1g$  gene for No. 1-9  
individual and No. 10 individual

#### 2.2 PCR 产物酶切多态性

山羊 $\beta$ 乳球蛋白基因5侧翼区710 bp PCR产物经 $Sma$  I 酶切后表现出多态性,如图2所示。A等位基因大小分别为472, 181, 50和7 bp; B等位基因大小分别为472, 231和7 bp。AA基因型由472, 181, 50和7 bp组成; AB基因型由472, 231, 181, 50和7 bp组成; BB基因型由472, 231和7 bp组成。其中, 50和7 bp条带在电泳图上不易被观察到,但是依据电泳图上很清晰的带纹231和181 bp可以准确判定基因型。

#### 2.3 $\beta 1g$ 基因座的遗传多态性指标

5个山羊品种 $\beta 1g$ 基因座的遗传多态性指标见

#### 1.6 PCR 产物的酶切与电泳

PCR产物消化反应体系为: 10  $\times$  缓冲液(含BSA)4  $\mu\text{L}$ ,  $Sma$  I (1 U/ $\mu\text{L}$ ) 6  $\mu\text{L}$ , PCR产物10  $\mu\text{L}$ , 合计20  $\mu\text{L}$ ; PCR产物于37 消化过夜,最后用2%琼脂糖电泳并照像。

#### 1.7 数据统计与分析

基因频率、抽样误差及 $\chi^2$ 检验和遗传多态性指标的计算参考文献[8]。

## 2 结果与分析

#### 2.1 PCR 扩增结果

5个山羊品种162个个体均能扩增出预期大小为710 bp的PCR产物(图1),扩增结果理想,可直接用 $Sma$  I 限制性内切酶消化,进行RFLP分析。

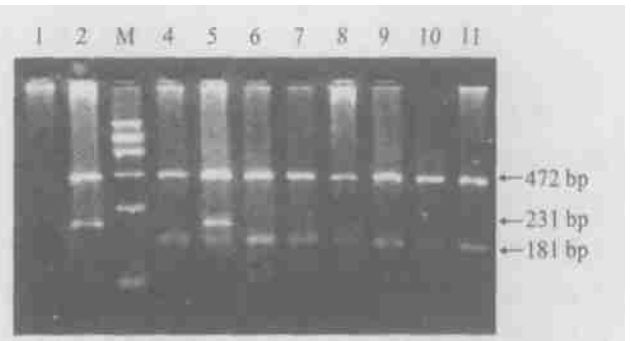


图2  $\beta 1g$ 基因5侧翼区PCR产物 $Sma$  I 酶切电泳  
泳道1 阴性对照;泳道2 BB型;泳道5 AB型;  
泳道4, 6~11 AA型;M: SD004 marker

Fig 2 Electrophoresis patterns of digesting  
PCR products with  $Sma$  I

Lane 1 Negative control; Lane 2 Genotype BB;  
Lane 5 Genotype AB; Lane 4, 6-11 Genotype AA;  
M: SD004 marker

表1。由表1可知,4个品种的 $\beta 1g$ 基因座经 $Sma$  I 酶切后表现多态性,而陕南山羊未表现多态性;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,陕南山羊>波尔山羊>安哥拉山羊>西农萨能奶山羊>关中奶山羊,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信息熵( $S$ )和位点间多态信息含量( $PI$ )来看,关中奶山羊>西农萨能奶山羊>安哥拉山羊>波尔山羊>陕南山羊。

表1 5个山羊品种  $\beta$ 1g 5侧翼区基因座的遗传多态性指标

Table 1 Genetic diversity of  $\beta$ 1g 5 flanking gene in five goat breeds

| 品种<br>Breed        | 西农萨能奶山羊<br>Xinong Saanen<br>dairy goat | 关中奶山羊<br>Guanzhong dairy<br>goat | 陕南白山羊<br>Shaannan white<br>goat | 安哥拉山羊<br>Angora<br>goat       | 波尔山羊<br>Boer<br>goat          |
|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 样本量(N)             | 56                                     | 62                               | 11                              | 15                            | 18                            |
| $N_{AA}(P_{AA})$   | 46(0.821)                              | 48(0.774)                        | 11(1.000)                       | 13(0.867)                     | 16(0.889)                     |
| $N_{AB}(P_{AB})$   | 10(0.179)                              | 12(0.194)                        | 0.000                           | 2(0.133)                      | 2(0.112)                      |
| $N_{BB}(P_{BB})$   | 0(0.000)                               | 2(0.032)                         | 0(0.000)                        | 0(0.000)                      | 0(0.000)                      |
| A 基因频率( $P_A$ )    | 0.911                                  | 0.871                            | 1.000                           | 0.933                         | 0.944                         |
| B 基因频率( $P_B$ )    | 0.089                                  | 0.129                            | 0.000                           | 0.067                         | 0.056                         |
| 纯合度( $J_k$ )       | 0.837                                  | 0.775                            | 1.000                           | 0.876                         | 0.895                         |
| 杂合度( $H_k$ )       | 0.163                                  | 0.225                            | 0.000                           | 0.125                         | 0.105                         |
| 有效等位基因数( $N_e$ )   | 1.194                                  | 1.290                            | 1.000                           | 1.142                         | 1.117                         |
| Shannon 信息熵(S)     | 0.301                                  | 0.385                            | 0.000                           | 0.245                         | 0.215                         |
| 多态信息含量(PIC)        | 0.150                                  | 0.2000                           | 0.000                           | 0.117                         | 0.100                         |
| 位点是否平衡( $\chi^2$ ) | 平衡<br>Balance<br>( $P>0.05$ )          | 平衡<br>Balance<br>( $P>0.05$ )    | 平衡<br>Balance<br>( $P>0.05$ )   | 平衡<br>Balance<br>( $P>0.05$ ) | 平衡<br>Balance<br>( $P>0.05$ ) |
| 抽样误差( $V_B$ )      | $2.759 \times 10^{-4}$                 | $3.793 \times 10^{-4}$           | 0                               | $1.809 \times 10^{-4}$        | $1.291 \times 10^{-4}$        |
| 片段共享度(BSR)         | 0.983                                  | 0.962                            | 1.000                           | 0.986                         | 0.988                         |
| 基因多态度( $\pi$ )     | $2.759 \times 10^{-4}$                 | $3.793 \times 10^{-4}$           | 0.000                           | $1.809 \times 10^{-4}$        | $1.291 \times 10^{-4}$        |

注: 西农萨能奶山羊的基因频率数据引自文献[4]。

Note: Gene frequencies of Xinong Saanen dairy goat were from reference [4].

3 讨论

3.1 5个山羊品种  $\beta$ 1g 基因座的基因频率及基因型频率

本研究首次发现, 5个山羊品种中有4个品种的  $\beta$ 1g 基因座表现多态性, 而陕南白山羊未表现多态性; 西农萨能奶山羊、关中奶山羊、陕南白山羊、安哥拉山羊以及波尔山羊的等位基因A/B 频率分别为 0.911/0.089, 0.871/0.129, 1.000/0.000, 0.933/0.067, 0.944/0.056, 表明在以上5个群体中B 等位基因为非优势基因, 相应地BB 基因型为非优势基因型。本研究分析的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  $\beta$ 1g 5侧翼区基因座处于动态平衡中。

3.2 5个山羊品种遗传多态性探讨

一般地, 衡量品种遗传多态性的指标是平衡群体的基因杂合度, 但是, 遗传变异是基因型之间的差异, 因而基因多态性仅用基因杂合度来衡量忽略了纯合度的存在。因此, 有学者认为<sup>[8]</sup>, 用Shannon 信息熵更能准确反映遗传多态性, 同时, 郭满才<sup>[9]</sup>认为, PIC 值能更清楚地反映遗传多态性; 此外还有一些指标, 如有效等位基因数和片段共享度等, 也能反映遗传多态性。本研究结果表明, 关中奶山羊的基因

杂合度最高(0.225), 其次是西农萨能奶山羊, 引入品种安哥拉山羊及波尔山羊的基因杂合度较低, 陕南白山羊的基因杂合度最低。表明陕南白山羊和引入的外国山羊品种遗传纯合度高于关中奶山羊和西农萨能奶山羊, 它们均一性较好, 这一点从有效等位基因数、Shannon 信息熵和PIC 值得到反映。然而, 这与刘长国等<sup>[10]</sup>的研究结果不尽一致, 刘长国等利用RAPD 技术研究陕西境内的5个山羊品种认为, 西农萨能奶山羊的遗传变异程度最低, 而安哥拉山羊和陕南白山羊的遗传多态性指数偏高, 其中以波尔山羊最高。2个结果不尽一致, 这主要可能是由所采用的标记方法不同及样本的来源和含量造成的。因此, 有必要增加位点数和样本含量, 对其遗传多态性作进一步的研究。

本研究还表明, 关中奶山羊的PIC 值最高为0.200, 该基因座位为低度多态; 其余4个品种的PIC 值也表现为低度多态, 这可能与PCR-RFLP 标记本身的PIC 值不高(一般为0.200左右)有关。尽管如此, 从PIC 等指标来分析依然反映了5个山羊品种中关中奶山羊的遗传多态性最丰富, 其次为西农萨能奶山羊, 最低的是陕南白山羊。本研究未发现陕南白山羊在该基因座表现出多态性, 这可能与样本量有关, 也可能与分析所选择的基因座有关。

## [参考文献]

- [1] 郑丕留. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科技出版社, 1988: 125-126
- [2] Yahyaoui M H, Angiolillo A, Pilla F, et al. Characterization and genotyping of the caprine K-casein variants[J]. J Dairy Sci, 2003, 86: 2715-2720
- [3] 赵春江, 张 沅, 李 宁. 中国荷斯坦牛乳蛋白分子遗传多态性和产奶性状相关性研究[J]. 黄牛杂志, 1999: 25(1): 13-16
- [4] 李瑞彪, 陈 宏, 雷初朝, 等. 西农萨能奶山羊  $\beta$  乳球蛋白基因 5' 侧翼区多态性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(1): 74-76
- [5] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus* Gibelio) [J]. Biochem Genet, 1995, 33: 297-306
- [6] 萨姆布鲁克 J, 里奇 E F, 曼尼阿佛斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 侯云德, 校. 北京: 科学出版社, 1999
- [7] Yahyaoui M H, Pena R N, Sanchez A, et al. Rapid communication: polymorphism in the goat  $\beta$  lactoglobulin proximal promoter region[J]. J Animal Science, 2000, 78: 1100-1101
- [8] 袁志发, 周静芋, 郭满才, 等. 基因多样性与 Shannon 信息熵[J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2002, 8(1): 353-358
- [9] 郭满才. 群体遗传变异的信息学模型研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2002
- [10] 刘长国, 罗 军, 杨公社, 等. 陕西境内五个山羊品种遗传背景的 RAPD 分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(3): 19-24

Polymorphisms of  $\beta$  lactoglobulin 5' flanking region in five goat breeds

LAN Xian-yong<sup>1</sup>, CHEN Hong<sup>1,2</sup>, LEI Chu-zhao<sup>1</sup>, LI Rui-biao<sup>1</sup>,  
ZHANG Run-feng<sup>1</sup>, LUO Jun<sup>1</sup>, HU Shen-rong<sup>1</sup>

(1 Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, College of Animal Science and Technology,  
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 210029, China)

**Abstract:** PCR-RFLP was applied to analyze the polymorphisms of  $\beta$  lactoglobulin 5' flanking region in 162 goats of five breeds, namely, Xinong saanen dairy goat, Guanzhong dairy goat, Shaanan white goat, Angora goat and Boer goat. It showed that 710 bp PCR products digested with SmaI demonstrated polymorphisms. The frequencies of allele A/B of Xinong saanen, Guanzhong, Shaanan, Angora and Boer were 0.911/0.089, 0.871/0.129, 1.000/0.000, 0.933/0.067 and 0.944/0.056, and their gene heterozygosity/effective allele gene number/Shannon information entropy/Polymorphism information content were listed for 0.163/1.194/0.301/0.150, 0.225/1.290/0.385/0.200, 0.000/1.000/0.000/0.000, 0.125/1.142/0.245/0.117, 0.105/1.117/0.215/0.100, respectively. As far as above heredity indexes were considered, Guanzhong dairy goat showed most abundant in genetic polymorphism, then Xinong saanen dairy goat, and Angora and Boer goat lower, while Shaanan white goat demonstrated no polymorphism.

**Key words:** goat;  $\beta$  lactoglobulin gene; PCR-RFLP; genetic polymorphism