

牛ACAS2基因的克隆、序列分析及染色体物理定位^{*}

马云^{1,2}, 许尚忠², 高雪², 张英汉¹, 辛亚平¹, 高树新³, 任红艳²

(1 中国农业科学院 畜牧研究所, 北京 100094;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 内蒙古民族大学 动物科技学院, 内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 以中国西门塔尔牛肝脏组织为材料, 运用同源序列克隆技术并结合RT-PCR技术, 对牛ACAS2基因的部分cDNA进行了克隆与序列分析, 应用SUNbRH 7000型辐射杂种板对分离的牛ACAS2基因进行了染色体定位。结果显示, 本研究所获得的长为1 535 bp的cDNA序列为牛ACAS2基因的部分编码序列, 该段序列与人(GenBank 登录号: NM-139274)和小鼠(GenBank 登录号: NM-019811)的ACAS2基因mRNA序列的相似性分别为91%和88%; 牛ACAS2基因被定位于牛的13号染色体上, 与该染色体上的标记D1K 4350的距离为1.51 cR。

[关键词] 牛; 乙酰辅酶A合成酶2基因; 基因克隆; 辐射杂种板; 染色体定位

[中图分类号] S823.2; Q343.1⁺7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)10-0021-06

乙酰辅酶A合成酶2(acetyl-Coenzyme A synthetase 2, ACAS2)基因是乙酰辅酶A合成酶短链家族的成员之一, 也称乙酰辅酶A合成酶短链家族成员2(acyl-CoA synthetase short-chain family member 2, ACS2), 它可以为催化乙酸盐活化为乙酸提供脂肪合成的原料, 同时产生能量物质。该基因的表达受固醇调控元件结合蛋白的调节, 而固醇调控元件结合蛋白是激活胆固醇和不饱和脂肪酸合成所需的转录因子^[1]。Jerez等^[2]研究发现, 在小鼠2号染色体上存在一个对小鼠体重、体脂、瘦肉率、骨灰分浓度、肝重等指标有显著影响的数量性状位点(Quantitative trait loci, QTL)。而小鼠的ACAS2基因恰好也被定位于2号染色体上。因此, 将ACAS2基因作为影响动物生长和脂质性状的候选基因加以研究, 有着非常重要的意义。

在人上, ACAS2基因定位于20号染色体上, 该基因翻译的产物乙酰辅酶A合成酶蛋白的相对分子质量为59 347 ku, 包含有701个氨基酸^[1]。但到目前为止, 尚无该基因分离及cDNA的信息, 在家畜上也未见其核苷酸全序列的报道, 在牛上仅有少量EST和电子预测的mRNA部分序列信息。

本研究采用电脑克隆与分子生物学技术相结合的方法, 对牛ACAS2基因的cDNA进行分离、克隆、鉴定、序列分析, 并对分离的牛ACAS2基因进行染色体物理定位, 以期牛的基因组学研究增加新资料, 同时为进一步研究该基因及相关基因家族的功能奠定基础, 并为牛生产性能的改良提供新的基因素材。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样 中国西门塔尔牛肝脏组织, 采自内蒙古自治区通辽市科左中旗新三维肉牛养殖有限公司肉牛育肥场。

1.1.2 主要试剂及菌株 TRIzol 试剂盒购自美国GBCO公司; TaKaRa RNA PCR 试剂盒(AMV) Ver. 3.0, TaKaRa LA Taq聚合酶购自大连宝生物工程公司; RNA酶抑制剂 PGEM-T-Easy载体购自Promega公司; DNA分子质量Marker IV (500~7 000 bp)、DNA快速纯化回收试剂盒购自北京天为时代公司; Taq DNA聚合酶购自北京博大泰克生物公司; T₄DNA连接酶、IPTG和DNA分子

^{*} [收稿日期] 2006-06-15

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(863计划)“优质鲁西黄牛新品系选育技术研究”(2002AA242011)

[作者简介] 马云(1974-), 男, 宁夏平罗人, 在读博士, 主要从事分子遗传与动物育种研究。E-mail: mayun666@yahoo.com.cn

[通讯作者] 许尚忠(1950-), 男, 河北尚义人, 研究员, 博士生导师, 主要从事牛的遗传育种研究。

质量M marker(100~ 600, 100~ 1 500 bp)购自Sigma公司; 其他试剂均为国产分析纯; 大肠杆菌DH5 α 由中国农业科学院畜牧研究所牛遗传育种研究室保存。

1.1.3 用于新基因染色体定位的DNA 样品 所用辐射杂种板(Rdiation hybrid panel, RH)是92个杂种细胞系的SUN bRH 型辐射杂种板^[3], 使用的辐射剂量是7 000 rad。该辐射杂种板包括92个牛 $\times$ 仓鼠辐射杂种细胞系以及仓鼠和牛基因组DNA 阳性对照。92个杂种细胞系和仓鼠DNA 样品分别由美国内达华大学柳万生教授和中国农业科学院畜牧研究

所猪分子育种实验室提供。

1.1.4 引物设计 参照文献[4]的方法, 用A CAS 2 基因 cDNA (GeneBank 登录号为: NM-139274)为信息探针设计引物。用于牛A CAS 2 基因分离和定位的引物序列如表1所示, 其中RT-1PL、RT-1PR 分别为反转录扩增A CAS 2 基因cDNA 序列的上游和下游引物; 1PL、1PR 和2PL、2PR 分别为依据已得到的A CAS 2 基因cDNA 序列设计的用于扩增该基因DNA 序列的两对引物; M PL 和M PR 分别为定位A CAS 2 基因的上游和下游引物。以上引物均由北京赛百盛生物技术有限公司合成。

表1 用于分离和定位牛A CAS 2 基因的引物及其序列

Table 1 Primers used for isolation and physical mapping of theA CAS 2 gene and their sequencing

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	引物位置 Binding region	退火温度/ Annealing temperature	预期片段 长度/bp Predicted length
RT-1PL	5'ACA CAC AGT TGG GGG CTA CA-3'		51.5	1 535
RT-1PR	5'ACA AAC AGG CAT TTC TCG GG-3'			
1PL	5'GCT CAG AAT GAC CAC GAC C-3'	EXON 18	62.5	422
1PR	5'CTT CCC TGT TTC AGT CCA T-3'	EXON 18		
2PL	5'CAC CTG GAT TGC CTA AAA-3'	EXON 17	52.0	222
2PR	5'CCA GGT CGT GGT CAT TCT-3'	EXON 18		
M PL	5'CCG GAT TAC ATC CAG AAT GC-3'	N TRON 17	56.0	495
M PR	5'CTG GTG GTC GCA GGA AGT TG-3'	EXON 18		

1.2 牛总RNA 的提取

利用TRIzol 试剂盒从西门塔尔牛肝脏组织中提取总RNA, 具体操作依照试剂盒说明书进行。提取的总RNA 用12 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 质量完好的RNA 用于反转录第一链cDNA 的合成。

1.3 牛A CAS 2 基因的RT-PCR

RT-PCR 第一链 cDNA 的合成按照 TaKaRa RNA PCR 试剂盒(AMV)Ver. 3.0的说明书进行; 第一链cDNA 合成后进行反转录扩增, 扩增反应体系为TaKaRa LA Taq 聚合酶0.25 μ L (5 U/ μ L), GC Buffer I (TaKaRa LA Taq 试剂盒自带)12.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L; 上、下游引物RT-1PL, RT-1PR 各1 μ L (20 μ mol/L), RT cDNA 1.5 μ L, 灭菌水3.75 μ L, 总体积为25 μ L, PCR 扩增程序为: 94 3 min, 94 30 s, 51.5 退火45 s, 72 1 min, 循环35次; 最后72 延伸5 min。PCR 反应产物用12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 牛A CAS 2 基因的普通PCR 扩增

以试验牛基因组DNA 为模板进行PCR 扩增, PCR 反应总体积为20 μ L, 其中模板DNA 为100 ng, 引物终浓度为0.3 μ mol/L, dNTPs 终浓度为150

μ mol/L, TaqDNA 聚合酶0.5 μ L (5 U/ μ L)。扩增程序为94 3 min; 94 30 s, 退火30 s, 72 2 min, 循环35次; 最后72 延伸10 min。每对引物的退火温度见表1。PCR 反应产物用20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并在紫外灯下拍照。

1.5 牛A CAS 2 基因PCR 产物的测序

对以上分离的cDNA 片段及基因组DNA 片段采用克隆方法测序。将纯化回收的PCR 产物与PGEM-T-Easy 载体连接后, 转化大肠杆菌DH5 α , 蓝白斑筛选挑取单个阳性克隆子由上海英骏生物技术公司测序, 每个基因片段至少测2个克隆子。

1.6 牛A CAS 2 基因cDNA 序列及基因组DNA 序列同源性分析

用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCB I)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)提供的BLAST (Basic local alignment search tool)软件, 将本研究测序获得的牛A CAS 2 基因cDNA 序列及基因组DNA 序列与GenBank 数据库中公布的人和小鼠的A CAS 2 基因(GenBank 登录号依次为NM-139274和NM-019811)进行序列同源性分析, 以鉴定所获

得的序列是否为目的序列。

1.7 定位扩增结果的分型

(1)首先用上述的特异性PCR定位引物在仓鼠、小鼠和牛基因组中进行扩增,并重复2次,电泳检测为如下两种结果之一时方能用上述引物在杂种细胞系DNA中扩增:只在牛基因组DNA中扩增得到特异的目的产物,而在仓鼠和小鼠基因组中的扩增结果为阴性;在牛、仓鼠和(或)小鼠基因组DNA中均得到特异的扩增片段,但牛基因组DNA扩增得到的片段能够与仓鼠和(或)小鼠基因组DNA中扩增得到的片段通过电泳分离,并能够清晰地判定这3(或2)个不同长度的片段是在不同基因组DNA模板中扩增得到的。

(2)在SUNbRH中进行扩增,PCR反应总体积为15 μ L,其中模板DNA为25 ng, dNTP终浓度为250 μ mol/L,引物终浓度为4 μ mol/L, InmolaseTM DNA聚合酶(Bioline, London, UK) 0.3 μ L (1 U/ μ L)。PCR扩增程序是:95 7 min, 循环37~40次;94 1 min, 退火1 min, 然后72 2 min;最后72 延伸5 min。PCR反应产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,重复2次。每次扩增结果分别由两个观测者判定,在SUNbRH中,“1”和“0”分别表示阳性和阴性扩增结果。

1.8 定位扩增结果的数据分析

将PCR分型数据提交SUNbRH统计分析网站(<http://www.animalgenome.org/cattle/maps>),运用RHMAPPER程序进行统计分析以获得SUNbRH克隆板的定位结果^[3]。

2 结果与分析

2.1 牛ACA S 2基因cDNA的克隆与测序鉴定

牛ACA S 2基因RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果见图1。由图1可知,ACA S 2基因RT-PCR扩增产物电泳条带A位于Marker指示的1500 bp条带上方附近,预计牛ACA S 2基因的RT-PCR产物长度在1500~1700 bp,与预期结果基本一致。将RT-PCR产物回收纯化,克隆测序后,得到1535 bp的cDNA序列。将其递交至GenBank数据库进行同源性分析,结果表明,该段序列与人(NM-139274)和小鼠(NM-019811)的ACA S 2基因mRNA序列的相似性分别为91%和88%。由此可以初步判定,该序列为牛ACA S 2基因的部分cDNA序列。

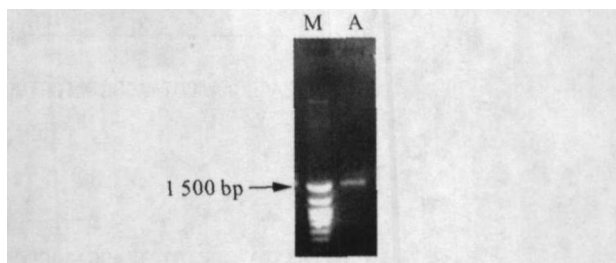


图1 ACA S 2基因的RT-PCR电泳结果

M. M marker (100~1500 bp); A. RT-PCR产物

Fig 1 Electrophoresis result of RT-PCR

product purified from agarose

gel for ACA S 2 gene

M. DNA Marker (100~1500 bp); A. RT-PCR product

2.2 牛ACA S 2基因编码序列的分析与同源鉴定

利用Editseq程序,对牛ACA S 2基因cDNA的起始密码子及开放阅读框(ORF)进行搜索,结果并未找到最大开放阅读框与起始密码子。用在线(由<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>提供)多序列比对软件Clustalw对所获得的牛ACA S 2基因cDNA序列与人(NM-139274)和小鼠(NM-019811)的mRNA序列进行比对,其结果见图2。由图2可见,人ACA S 2基因mRNA 904~2437 bp的序列及小鼠该基因mRNA的1046~2535 bp序列,与本试验得到的牛cDNA序列的全部碱基(2~1535 bp)吻合程度很高。3个cDNA序列两两比对,相似性得分均在80%以上。故可以判定,本研究获得的牛cDNA序列为包含部分CDS的牛ACA S 2基因的中间部分cDNA序列。将这段序列递交GenBank,获得的登录号为DQ-489534。

2.3 与定位有关的ACA S 2基因DNA序列的克隆和分析

对表1的2对牛ACA S 2基因引物同样以中国西门塔尔牛基因组DNA为模板进行扩增,扩增的PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,结果在2对引物中得到了特异性的扩增片段(图3)。

将这些片段回收纯化并克隆测序。结果表明,引物1PL和1PR的扩增产物大小为422 bp,引物2PL和2PR的扩增产物大小为222 bp。

2.4 牛ACA S 2基因的物理定位

用表1所列的3个基因的定位引物,以仓鼠基因组DNA为阴性对照,以牛基因组DNA为阳性对照,分别在牛×仓鼠92个杂种细胞系中进行PCR扩增,其结果见图4。

```

1  CACAGGCAAACCAAGGGTGTGGTTCACACAGTTGGGGCTACATGCTCTATGTAGCCAC 938
2  -----ACACACAGTTGGGGCTACATGCTCTATGTGGCCAC 36
3  CACAGGCAAACCTAAGGGTGTGGTGCACACAATTGGAGGCTATATGCTCTATGTGGCTAC 1 080

          *****
          :
          :

1  CTATGTCAGCTCTCTTAGGAAGCCCCAGTACTTATATTGGGCATGCACTTGCCCTTAAAA 2 425
2  CTATGTCATCTCTCTCAGGAAGCACCAGTACTTATCTTGGGACTGCACTTGCCCCGAGAA 1 523
3  CTTC--CAGCTCTCTCCTCAAAGCACCAGTTCTTATCTTGGGCTGCACTAGGCTTTAGAA 2 523

**  ** *****
1  ACAATGATTGTGAGTCCAGGAACAATTTACTATTTTTAAATATTTTGTGCTCTCTGTT 2 485
2  ATGCCTGTTTGT----- 1 535
3  ATGACAGTTGTGAGTCTATGAATAATT--ATTTTTTTAAAACTTTGTGTCTCTGTT 2 580

*      ****

```

图2 人、牛、小鼠 ACAS2 基因 mRNA 序列的同源性比对

1,2,3 分别表示人、牛、小鼠 ACAS2 基因 mRNA 序列; * 表示 3 个序列完全符合的部分;

---. 碱基缺失部分; ... 省略的中间序列

Fig. 2 Comparison result of mRNA sequences in human, cattle and mouse for ACAS2 gene

1,2,3 represent mRNA sequence of human, cattle and mouse, respectively; *, completely identical part of these sequences; ---, absent bases; ..., omitted middle sequence

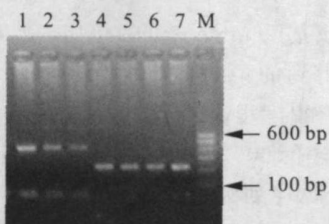


图3 牛 ACAS2 基因 2 对引物的 PCR 产物电泳结果

M. DNA Marker; 1~3, 4~7. 引物对 1PL, 1PR 和 2PL, 2PR 的 PCR 凝胶电泳结果

Fig. 3 PCR products from bovine genomic DNA

using 2 pairs of primers of ACAS2 gene

M. DNA Marker; 1-3, 4-7. PCR product of primer 1PL, 1PR and 2PL, 2PR

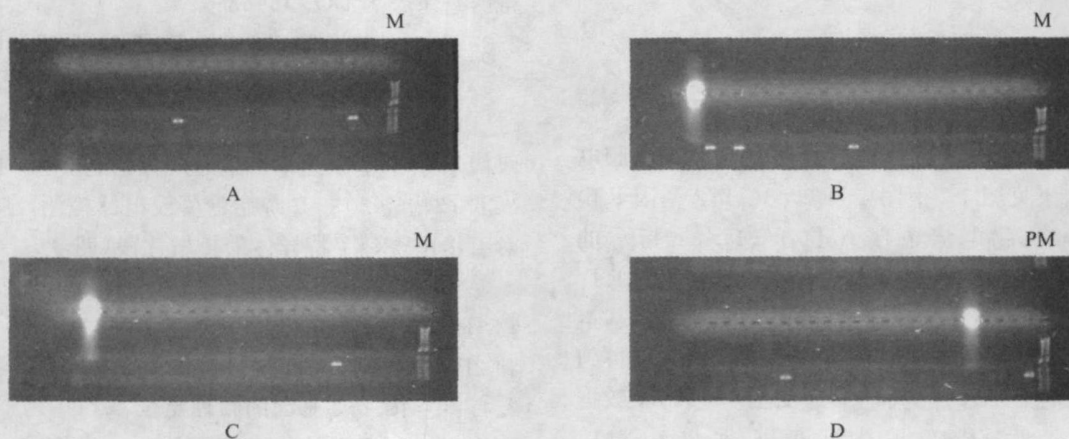


图4 ACAS2 基因定位引物扩增牛×仓鼠体细胞辐射杂种克隆板的电泳结果

A, B, C, D 分别代表定位引物扩增杂种克隆板第 1~24, 25~48, 49~72, 73~92 个细胞系的电泳结果; M 为 DNA Marker; P 为阳性对照

Fig. 4 PCR results of somatic hybrid panel for the ACAS2 gene

A, B, C and D represent 1-24 hybrids, 25-48 hybrids, 49-72 hybrids and 73-92 hybrids, respectively; P, positive control; M. DNA Marker

由图 4 可以看出, *A CAS 2* 基因的定位引物只在牛基因组 DNA 阳性对照中能扩增到特异性的目的条带, 同样引物在仓鼠和小鼠基因组 DNA 对照中均无特异性扩增条带产生。统计在牛 × 仓鼠体细胞辐射杂种板第 9, 22, 26, 28, 36, 67, 79 个杂种系上得到的目的片段, 将分型结果提交 SUN bRH 统计分析网站 (<http://www.animalgenome.org/cattle/>

map s), 运用 RHMAPPER 程序进行统计分析以获得 SUN bRH 克隆板的定位结果, 其结果见表 2。

由表 2 结果知, *A CAS 2* 基因与牛 13 号染色体上的标记 D IK4350 紧密连锁, 其与标记 D IK4350 和 BL 1071 的遗传距离分别为 1.51 和 21.7 cR, 两点分析结果 LOD 值为 36.44。因此, *A CAS 2* 基因被定位于牛 13 号染色体上。

表 2 牛 *A CAS 2* 基因的 RH 定位结果

Table 2 RH mapping results of bovine *A CAS 2* gene

基因 Gene	定位引物 Primer	标记 2 Locus 2	人染色体 定位 Location in human	牛染色体定位 Assignment in bovine chromosome			
				LOD	标记 1 Marker 1	图距/cR Interval from marker	牛染色体 Bovine chromosome
<i>A CAS 2</i>	PF: CTG GTG GTC GCA GGA AGT TG PR: CCG GAT TAC ATC CAG AAT GC	BL 1071	20q11.22	36.44	D IK4350	1.51	13

注: 人相应基因的定位结果来自于网站: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
Note: Location of genes in human is obtained from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

3 讨 论

3.1 牛 *A CAS 2* 基因的快速克隆

分离基因常用的方法包括差异表达基因显示技术、转座子标签技术、图位克隆技术、同源序列技术以及表达序列标签 (expressed sequence tagging, EST) 等。本研究根据比较基因定位信息, 以人 *A CAS 2* 基因的 cDNA 为信息探针, 通过搜索公共数据库中同源的牛的 ESTs, 根据 ESTs 连接群构成的一致序列 (Consensus) 设计引物, 分离、定位牛的 *A - CAS 2* 基因。它实际上是同源序列法与表达序列标签法的结合, 因而同时具有同源序列法目的性强和表达序列法准确性高的优点。本研究根据 EST 设计的引物是牛 *A CAS 2* 基因的特异性引物, 因而 PCR 扩增成功率高; 获得的序列经过了同源性比较分析与鉴定, 因而结果较为可靠。

3.2 牛 *A CAS 2* 基因的染色体辐射杂种定位

与其他物理定位技术相比, 基于 PCR 分型检测技术的体细胞杂种细胞系技术具有更为简便、快捷的优势, 特别是现在研究者倾向的由 92 个杂种细胞系组成的辐射杂种板, 在引物设计合理、扩增条件稳定、检测技术快速的前提下, 用 96 孔的 PCR 仪在 1 d 内就可得到结果。此外用辐射杂种板定位的 DNA 标记具有累加性, 能够综合一批 DNA 标记分型数据进行分析, 而且其结果也便于不同实验室间的比较, 极大地推进了牛、猪基因物理定位的进程。体细胞杂种细胞系技术的原理是染色体上两个标记位置相距越远, 则辐射使染色体在这两个标记间断裂, 从而造成

这两个标记分离的可能性就越大, 所以极有可能在某个杂种细胞系中只存留其中 1 个标记, 因此根据任意 2 个标记在各杂种细胞系中的存留模式, 利用统计学方法计算染色体间断裂频率可以推算出 2 个标记间的距离及其在染色体上的排列顺序, 从而达到染色体精细定位的目的。

本研究采用辐射杂种板对新分离的 *A CAS 2* 基因进行了定位研究。研究所采用的 SUN bRH 辐射杂种板是经过 7 000 rad 辐射后得到的, 与以往的 3 000 和 5 000 rad 杂种板相比, 杂种细胞系中存留的染色体片段更短, 定位的区域更为精细。

基因定位中最常用的方法为优势对数计分法, 即 LOD 法。LOD 值反映的是两个位点在一定的遗传学距离上连锁在同一染色体上的可能性与不连锁在同一染色体上的可能性之比的对数值, LOD 值越大, 待定基因与已知标记之间连锁的可能性就越大。LOD 值大于 3, 一般就认为存在连锁, 从而就可以确定该基因在染色体上的粗略位置。在此基础上, 再在该染色体区域使用覆盖程度更高的标记物做深入的连锁分析, 就可以将基因确定在较小的区域内。在本研究中, *A CAS 2* 基因与牛 13 号染色体上的标记 D IK4350 紧密连锁, 其 LOD 值为 36.44。由两点分析结果看, LOD 值远大于 3 这个连锁与否的判断标准, 表明了连锁结果的可靠性, 说明本研究定位这个基因是成功的。

最近公布的牛-人全基因组比较定位图谱^[5]显示, 牛 13 号染色体存在与人 10 号及 20 号染色体上序列相似程度很高的保守序列。牛 13 号染色体包含

ACA S 2 基因及邻近标记区域的序列与人 20 号染色体 17~ 63 Mb 区域的序列一致性非常高, 而人的 ACA S 2 基因则被定位于 20 号染色体的 32 Mb, 此结果也对本研究把牛 ACA S 2 基因定位于牛 13 号染色体上给予了有利的支持, 进一步表明本研究对牛 ACA S 2 基因定位结果的可靠性。

本研究是对牛 ACA S 2 基因的初步探索, 其结果将有利于对牛 ACA S 2 基因及其编码的 ACA S 2 蛋白功能进行更为深入的研究, 对进一步了解 ACA S 2 基因对牛脂肪蓄积、肌肉生长的基因效应以及利用该基因改良牛肉品质性状、繁殖性状及生长性状具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Luong A, Hannah V C, Brown M S, et al Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins[J]. J Biol Chem, 2000, 275(34): 26458-26466
- [2] Jerez-Tinajero N C, Eisen E J, Pomp D. Fine mapping of a QTL region with large effects on growth and fatness on mouse chromosome 2 [J]. Physiol Genomics, 2005, 21(3): 411-422
- [3] Itoh T, Watanabe T, Ihara N, et al A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci[J]. Genomics, 2005, 85: 413-424
- [4] 马云, 许尚忠, 高雪, 等. 牛 FABGL 基因 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(6): 13-18
- [5] Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, et al A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates[J]. Genome Res, 2004, 14(7): 1424-1437.

Study on the cloning, sequence analysis and chromosome mapping of bovine ACA S 2 gene

MA Yun^{1,2}, XU Shang-zhong², GAO Xue², ZHANG Ying-han¹,
XIN Ya-ping¹, GAO Shu-xin³, REN Hong-yan²

(1 Institute of Animal Science (IAS), The Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100094, China;

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

3 College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract The liver tissue from Chinese Simmental cattle was collected to extract RNA and the cDNA of the bovine ACA S 2 gene was determined and analyzed by homology cloning approach combined with RT-PCR in this study. Sequence analysis and bioinformatics study showed that this partial cDNA contained 1 535 nucleotides and its basic composition showed 91% and 88% identity with mRNA sequence, ACA S 2 gene of the human NM - 13274 and mouse NM - 019811 respectively. The SUNBRH panel was employed to determine the precise location of both three genes. Statistical analysis revealed that, the bovine ACA S 2 gene was mapped to the bovine chromosome (BTA) 13 and was closely linked to a framework marker DIK4350 at a 2-point LOD score of 36.4

Key words: cattle; ACA S 2; gene cloning; RH; chromosome mapping