牦牛 κ-酪蛋白新遗传变异体及进化分析

崔艳华[1]，曲晓军[2]，董爱军[1]，马 莺[1]

（1. 哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院，150090 哈尔滨，maying@hit.edu.cn；2. 黑龙江省科学院微生物研究所，150010 哈尔滨）

摘 要： 为明确牦牛乳中 κ-酪蛋白中遗传多样性，以 κ-酪蛋白基因（*CSN*3）的 IV 外显子为研究对象，采用 PCR-RFLP 方法对麦洼牦牛的 *CSN*3 进行分析，旨在从分子水平揭示 κ-酪蛋白在牦牛乳中遗传多样性分布. 并以 *CSN*3 的 IV 外显子序列建立牛属 κ-酪蛋白的系统发育树，从而分析进化关系. 结果表明，牦牛乳中 κ-酪蛋白多数以纯合体形式存在，并发现了一个新的变异体 GU441771. 牛属 *CSN*3 的系统发育树分析表明，κ-酪蛋白在进化上存在一定的物种特异性.

关键词： 牦牛乳；κ-酪蛋白；遗传多样性；聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性

中图分类号： Q52 **文献标志码：** A **文章编号：** 0367－6234(2012)02－0120－04

The new variant and phylogenetic analysis of the κ-Casein Gene (*CSN*3) in yak

CUI Yan-hua[1], QU Xiao-jun[2], DONG Ai-jun[1], MA Ying[1]

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, maying@hit.edu.cn; 2. Institute of Microbiology, Heilongjiang Science Academy, 150010 Harbin, China)

Abstract: A polymorphism of κ-casein gene *CSN*3 exon IV was identified in Chinese Maiwa Yak by PCR-restriction fragment length polymorphism protocol to reveal the distribution of diversity of κ-casein in Maiwa Yak at the DNA sequence level. The sequences corresponding to the coding region of κ-casein gene exon IV were used for phylogenetic analysis to establish the phylogenetic relationship of *CSN*3 variants in the Bos genus. Experimental results indicated that most yak milks were with κ-casein BB genotype. A new variant was identified in Maiwa yak breed by analysis and entered into GenBank with accession number GU441771. The phylogenetic analysis presented κ-casein evolution was consistent with species at a degree.

Key words: yak milk; κ-Casein; polymorphism; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

酪蛋白是乳蛋白的主要成分，约占总蛋白的76%～86%，主要包括 α_{s1}-酪蛋白（α_{s1}-CN）、α_{s2}-酪蛋白（α_{s2}-CN）、β-酪蛋白（β-CN）和 κ-酪蛋白（κ-CN）[1-2]. 由于氨基酸的置换或缺失、磷酸化位点不同、糖基化差异等造成牛乳酪蛋白存在着遗传变异体，呈现不同的遗传多态性. 研究表明，某些乳蛋白遗传变异体与产乳量、乳组成、干酪产量等重要性状密切相关，因此，酪蛋白多样性的研究引起广泛关注[1-3].

κ-CN 决定酪蛋白胶束的形成和稳定，并决定其大小和功能[4]，同时具有抗菌活性、增加消化率等重要的生理学功能[5]. 至今已在家牛乳蛋白中发现了 15 个变异体，其中包括 A、B、C、E、F^1、F^2、G^1、G^2、H、I、A^1、J 等 12 个已命名变异体和 3 个未命名的变异体（AJ619772, EU595507, EU595512）[1-2]. 同时，在牦牛和大额牛中分别发现了 4 个和 1 个变异体[6-9]. κ-CN 基因（*CSN*3）全长 13 kb，包括 5 个外显子和 4 个内含子，变异

收稿日期： 2011－02－12.
基金项目： 国家自然科学基金资助项目(30871953;31071571).
作者简介： 崔艳华(1978—)，女，博士，副教授；
马 莺(1961—)，女，教授，博士生导师.

体之间的差异主要分布于外显子Ⅳ中. 本研究以 *CSN*3 的 IV 外显子和部分 IV 内含子区域为扩增对象，采用 PCR-RELP（Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism）方法分析了牦牛乳 *CSN*3 的遗传多样性，发现了一个新变异体. 采用生物信息学方法对现有 κ-CN 变异体进行分析，建立系统发育树，旨在揭示其多样性的分布及进化.

1　试　验

1.1　牦牛乳

38 份牦牛乳取自四川麦洼牦牛，取样后加入叠氮化钠（NaN_3，0.4 g/L）防止蛋白沉淀，存于 −20 ℃.

1.2　试剂

蔗糖、Tris 碱、盐酸、氯化镁、Triton-X-100、氯化钠、乙二胺四乙酸二钠盐、异丙醇、无水乙醇等均为分析纯，购自北京试剂公司. 蛋白酶 K 购自 TAKARA 公司. KOD-Plus-DNA 聚合酶、Target clone™-plus kit 购自东洋纺（上海）生物科技有限公司. 引物由上海生工合成. 限制性内切酶购自 MBI Fermentas 公司.

1.3　主要仪器

高速冷冻离心机（Biofuge Stratos，Heraeus）、电泳仪（BioRad）、凝胶成像系统（BioRad）、PCR 仪（TAKARA 公司）.

1.4　牦牛乳 DNA 的提取

采用常规离心法提取牦牛乳中体细胞. 以乳体细胞为材料，提取牦牛基因组 DNA，方法见文献[10].

1.5　引物以及 PCR－RFLP

根据牛 κ-酪蛋白的 IV 外显子和部分 IV 内含子区域设计引物 κ-F（5′-CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTC-3′）和 κ-R（5′-GATTCAAGGAGTATACCAATTGTTG-3′），预期产物片段大小为780 bp，对应位置为 *CSN*3 基因的 4930 至 5708 区域（NCBI 序列号 X14908）[7, 11].

以提取的牦牛基因组 DNA 为模板，以 κ-F 和 κ-R 为引物扩增 κ-酪蛋白的 IV 外显子和部分 IV 内含子区域. PCR 反应程序为 94 ℃ 2 min 预变性，然后以 94 ℃ 15 s、53 ℃ 30 s、68 ℃ 45 s 为一个循环，共进行 30 个循环，之后 68 ℃延伸7 min，4 ℃保存. PCR 反应体系为：10 × PCR buffer 2 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）2 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）0.8 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，KOD-Plus-DNA 聚合酶 2 U，DNA 10 ~ 50 ng，用双蒸水补足体积至 20 μL.

5 μL 的 PCR 产物用于 PCR-RFLP 分析. 将 PCR 产物分别与 5 U 限制性内切酶 *Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ和 *Pst* Ⅰ反应，反应条件参照说明书（MBI Fermentas）. 酶切产物以 2.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测.

1.6　克隆与测序

采用 Target clone™-plus kit 将 PCR 产物克隆到 pTA2 载体上. 将筛选获得阳性克隆进行测序，正反向同时测序. 获得的序列信息提交至 GenBank，序列号为 GU441771.

1.7　牛属酪蛋白序列与序列分析

κ-CN 基因核酸序列来自 NCBI 数据库（www.ncbi-nlm-nih.gov），其中包括家牛（*Bos taurus*，*Bos indicus*）变异体 A（X14908）、B（X14908）、E（AF041482）、F^{22}（AF123250）、G^{1}（AF123251）、H（AF105260）、I（AF121023）、A^{I}（AF092513）、AJ619772、EU595506、EU595507、EU595512，5 个牦牛（*Bos grunniens*）κ-CN 变异体（AF194989、EF565131、AY095311、AY095312 和 GU441771）和一个来源于大额牛（*Bos frontalis*）κ-酪蛋白变异体（EU595506）. 变异体 C 和 J 是以 *CSN*3 ∗ *B* 为基础根据 Prinzenberg 等[6]的方法重新构建. 变异体 F^{1} 和 G^{2} 序列信息来自前人研究结果[2, 12-13]. κ-CN 外显子 IV 的序列用于构建系统进化分析. 采用 CLUSTAL X 软件进行多重序列比对[14]. 采用 TREECON 软件计算遗传距离，并建立系统发育树[15].

2　结果与分析

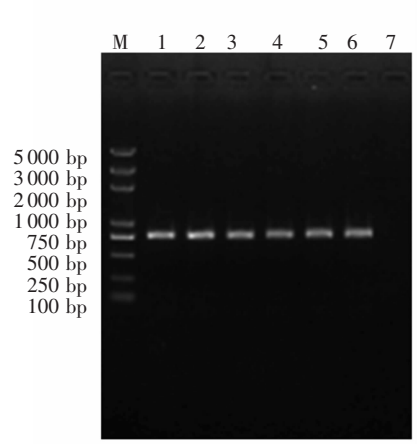
2.1　牦牛乳 κ-CN 遗传多样性分析

2.1.1　PCR 扩增

以牦牛乳基因组 DNA 为模板，以引物 κ-F 和 κ-R 扩增 κ-酪蛋白基因的 IV 外显子和部分 IV 内含子区域，获得了约 780 bp 大小的片段（图 1），与预期相符.

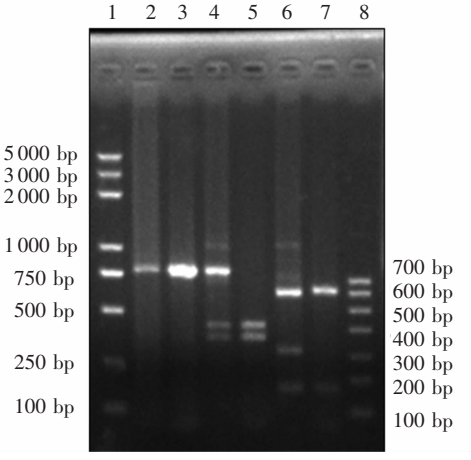
2.1.2　PCR-RFLP 分析

对变异体 A、B（X14908）、AF194989、EF565131、AF030326、AF030327、AY095311 和 AY095312 序列进行限制性酶切位点分析. 限制性酶切位点 *Hind* Ⅲ、*Pst* Ⅰ和 *Hpa* Ⅰ用于 PCR-RFLP 分析. PCR-RFLP 分析结果见图 2. *Hind* Ⅲ、*Pst* Ⅰ和 *Hpa* Ⅰ酶切分析揭示牦牛乳样品呈现两种截然不同的带型，分别命名为 AB 和 BB. 利用 *Hind* Ⅲ酶切后，AB 型含有 3 条带，即 780、400、360 bp；BB 型含有两条带，即 350 和 400 bp. 以 *Pst* Ⅰ和 *Hpa* Ⅰ酶切后也呈现两种带型（见图 2）.



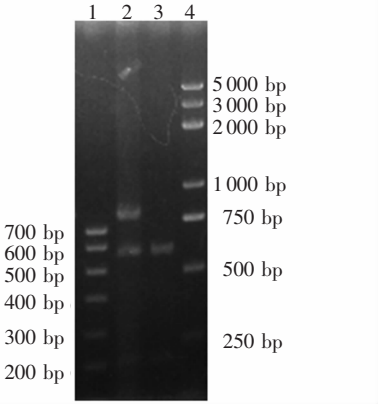
1—Marker DL2000 plus; 2 ~6—1 –5 牦牛乳样品 PCR 产物; 7—水空白对照.

图 1 牦牛 κ – 酪蛋白基因的 IV 外显子和部分 IV 内含子区域 PCR 分析



1—Marker; 2, 3—PCR 产物; 4, 5—PCR 产物/ *Hind* Ⅲ; 6, 7—PCR 产物/ *Pst* Ⅰ; 8—Marker. 2, 4, 6—AB 型; 3, 5, 7—BB 型.

(a) 牦牛 κ-酪蛋白的 PCR 产物 *Hind* Ⅲ 与 *Pst* Ⅰ 酶切分析



1—Marker; 2—AB 型 PCR 产物/ *Hpa* Ⅰ;3—BB 型 PCR 产物/ *Hpa* Ⅰ; 4—Marker.

(b)牦牛 κ-酪蛋白的 PCR 产物 *Hpa* Ⅰ 酶切分析

1—Marker DL2000 plus; 2 ~6—1 –5 牦牛乳样品 PCR 产物; 7—Marker.

图 2 牦牛 κ-酪蛋白的 PCR-RFLP 分析

在 38 个牦牛乳样品中,仅有一个样品为 AB 型,其余为 BB 型,出现的频率分别为 2.63% 和 97.37%. 杂合样品的频率很低,这些结果与前人结果一致[7, 9]. Bai 等[9]在对九龙、麦洼、大龙牦牛研究中未发现杂合的 κ-CN. Fan 等[9]对来自青海的 60 个牦牛乳样品研究中,仅仅发现了 1 个杂合型 κ-CN 乳样. 前人研究表明,κ-CN BB 型牛乳与 AA 和 AB 型相比,因为含有较小的酪蛋白胶束,凝乳时间短,形成的凝块更均一,可提高干酪的产量,更适合用于乳品生产[16-17]. 在牦牛乳中,κ-CN BB 型占优势,可能有利于牦牛乳的加工.

2.1.3 克隆与测序

将上述通过 PCR-RFLP 方法获得的两种类型 PCR 产物分别克隆到载体 pTA2 上,筛选阳性质粒,进行测序. BB 型序列与 AY095311 一致,这种变异体曾在来自甘肃省的甘南牦牛中检测到[6]. Prinzenberg 等[6]也报道了另一个 *CN*3 外显子 IV 序列 AY095312,但在本研究未获得该序列.

AB 型的 12 个阳性克隆被测序. 该样品为杂合,获得两种序列,一个等同于 AY095311,而另一个序列不同于任何一个已知牛属 *CSN*3 变异体. 其序列提交至 NCBI,获得序列编号为 GU441771. 该变异体在九龙、大龙、天祝白、甘南和青海品种牦牛中未发现[6-7, 9].

2.2 牛属 κ-CN 遗传多样性和进化分析

对来自牛属包括 *Bos taurus*、*Bos indicus*、*Bos frontalis* 和 *Bos grunniens* 的 κ-CN 外显子 IV 的序列进行聚类分析,建立系统发育树,以来自山羊的 κ-CN 基因 (*CSN*3) 外显子 IV 的序列 (AY090465)作为参比. 研究表明,可划分为 5 个分支,其中包括 1 个山羊 κ-CN 基因序列(即 Ⅴ 组)和 4 个主要序列分支(Ⅰ-Ⅳ组)(见图 3). 第 Ⅰ 组包括变异体 *CSN*3 * *A*、*E*、F^1、F^2、G^1、G^2、*H*、A^1 和 AJ619772. 其中 *CSN*3 * *E*、F^1、F^2、G^2、*H*、A^1 和 AJ619772 与变异体 *CSN*3 * *A* 仅仅相差 1 个碱基. 因此,推测以上变异体直接由 *CSN*3 * *A* 进化而来. *CSN*3 * G^1 与 *CSN*3 * *A* 相差两个碱基,而与 *CSN*3 * *H* 仅仅相差 1 个碱基. 因此,推测 *CSN*3 * G^1 是由 *CSN*3 * *H* 进化而来的.

Ⅱ 组可分为 3 个亚组. Ⅱ-1 组包括 4 个家牛的序列, 即 *CSN*3 * *B*、*C*、*J* 和 EU595512. *CSN*3 * *C*、*J* 和 EU595512 与 *CSN*3 * *B* 相差 1 个碱基,推测上述变异体由 *CSN*3 * *B* 进化而来. Ⅱ-2 组由 4 个来自牦牛的序列组成,即 AY095312、EF565131、AF194989 和 GU441771. 这组序列与 Ⅱ-1 组序列相比,具有一个显著的差异,即以 TGA 为终止密码子. 这也显示了牦牛与家牛存在一定的差异. 由于这个独特密码子的存在,尽管本

研究发现的新变异体 GU441771 与 *CSN*3 * *A* 的蛋白质序列相同，但是在核酸序列上 477 位置存在差异. EU595507 独立构成Ⅱ-3.

来自牦牛的 AY095311 和大额牛（*Bos frontalis*）的 EU595506 均独立各成一组. AY095311 含有 12 bp 的特有序列 CTTCTCCAGAAG.

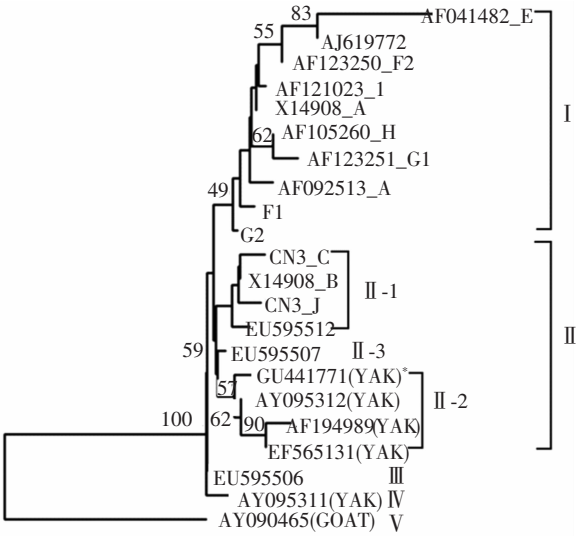


图 3　牛属 *CSN*3 Ⅳ 外显子序列的聚类图

3　结　语

采用 PCR-RFLP 方法，以 κ-酪蛋白基因（*CSN*3）的Ⅳ外显子为研究对象，对麦洼牦牛的 κ-酪蛋白基因进行分析. 结果发现，牦牛乳中 κ-酪蛋白呈现两种截然不同的带型，多数以纯合体形式存在. 并发现了一个新的变异体 GU441771，该变异体与 *CSN*3 * *A* 在蛋白水平上完全相同，但在核酸水平上存在一个碱基差异. 来自牛属包括 *Bos taurus*、*Bos indicus*、*Bos frontalis* 和 *Bos grunniens* 的 κ-酪蛋白基因的Ⅳ外显子序列系统发育分析表明，κ-酪蛋白在进化上存在一定的物种特异性.

参考文献：

[1] FARRELL H M, JIMENEZ-FLORES JR R, BLECK G T, *et al.* Nomenclature of the proteins of cows´milk-sixth revision [J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 1641 – 1674.

[2] CAROLI A M, CHESSA S, ERHARDT G J. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition [J]. J Dairy Sci, 2009, 92: 5335 – 5352.

[3] 崔艳华，马莺，何胜华，等. 牛乳酪蛋白多态性研究[J]. 中国乳品工业，2010, 38(5):32 – 37.

[4] CREAMER L K, PLOWMAN J E, LIDDELL M J, *et al.* Micelle stability: kappa-casein structure and function [J]. J Dairy Sci, 1998, 81(11):3004 – 3012.

[5] MALKOSKI M, DASHPER S G, O'BRIEN-SIMPSON N M, *et al.* Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45: 2309 – 2315.

[6] PRINZENBERG E M, HAN J L, ERHARDT G. Genetic variation in the κ-casein gene (CSN3) of Chinese yak (Bos grunniens) and phylogenetic analysis of CSN3 sequences in the genus Bos [J]. J Dairy Sci, 2008, 91: 1198 – 1203.

[7] FAN B, LI N, HU X X, *et al.* Cloning, sequencing and polymorphism analyzing of the exon 4 of the kappa-casein gene in yak [J]. Prog Nat Sci, 2000, 10:769 – 773.

[8] CHEN S Y, COSTA V, AZEVEDO M, *et al.* New alleles of the bovine kappa-casein gene revealed by resequencing and haplotype inference analysis [J]. J Dairy Sci, 2008, 91 (9):3682 – 3686.

[9] BAI W L, YIN R H, ZHAO S J, *et al.* Characterization of a κ-Casein genetic variant in the Chinese yak, Bos grunniens [J]. J Dairy Sci, 2008, 91:1204 – 1208.

[10] 崔艳华，马莺，曲晓军，等. 牦牛乳中 DNA 提取方法的建立与优化[J]. 哈尔滨工业大学学报，2011, 43(2): 1892 – 1895.

[11] ALEXANDER L J, STEWART A F, MACKINLAY A G, *et al.* Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene [J]. Eur J Biochem, 1988, 178 (2): 395 – 401.

[12] SULIMOVA G E, SOKOLOVA S S, SEMIKOZOVA O P, *et al.* Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) [J]. Tsitologiiai Genetika, 1992, 26:18 – 26.

[13] SULIMOVA G E, BADAGUEVA I N, UDINA I G. Polymorphism of the κ-casein gene in subfamilies of the Bovidae [J]. Genetika (Moskva), 1996, 32:1576 – 1582.

[14] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, *et al.* 1997 The clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucl Acids Res, 1997, 24:4876 – 4882.

[15] PEER van der Y, WACHTER de R. TREECON for windows: a software package for construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment [J]. Comput Appl Biosci, 1994, 10:569 – 570.

[16] DI STASIO L, MARIANI P. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production [J]. Zootecnica Nutrizione Animale, 2000, 26: 69 – 90.

[17] GASTALDI E, TRIAL N, GUILLAUME C, *et al.* Effect of controlled κ-casein hydrolysis on rheological properties of acid milk gels[J]. J Dairy Sci, 2003, 86: 704 – 711.

（编辑　刘　彤）