

家畜遗传标记研究

余桂馨 陈守筠 编著

一九八九年九月

编 者 的 话

近20年来,国内、外畜禽育种工作者都期望根据与生产性能有关的遗传标记对畜禽进行选择以提高选择效果和缩短选择进程。80年代以来由于分子遗传技术不断改进,使遗传标记的研究进入一个新的发展阶段。

虽然我国对畜禽遗传标记的研究起步较晚,但在多方面的努力下已逐步追赶上来,目前已在红细胞血型、白细胞型、血液蛋白多态性、酶多态性、畜种内品种间的遗传差异、遗传距离,以及牛、猪品种间染色体核型的差异和染色体易位等方面进行了大量的研究,为应用遗传标记对畜禽各种性状进行选择打下巩固基础。

近10年来,我们结合我省少数民族地区牛、羊地方优种的血液蛋白多态性、血清各种酶多态性、染色体显带进行分析,并对与生产性能有关的遗传标记进行了探索性的研究。现将这些资料提供给家畜育种工作者们参考,但由于研究家畜遗传标记的技术在日新月异的发展,加之我们的水平有限,不免有错误之处,敬请批评指正。

编者 1989年9月

目 录

1. 川西北牛、羊和黑白花奶牛遗传标记研究的综合报告.....	(1)
2. 黑白花奶牛血液蛋白遗传分析.....	(7)
3. 麦洼牦牛血清运铁蛋白多态性测定.....	(12)
4. 德昌水牛血红蛋白和血清运铁蛋白的测定.....	(18)
5. 山谷型藏系黑绵羊血液蛋白多态性初析.....	(21)
6. 牦牛、奶牛、水牛血清蛋白扫描测定.....	(27)
7. 德昌水牛、麦洼牦牛和黑白花奶牛LDH同工酶的分析 研究.....	(31)
8. 黑白花奶牛血清LDH同工酶活力与其产奶性能的相 关分 析.....	(39)
9. 牦牛、奶牛、水牛和藏绵羊血清碱性磷酸酶同工酶的研究.....	(48)
10. 麦洼牦牛、德昌水牛血清酯酶同工酶的研究.....	(53)
11. 麦洼牦牛, 德昌水牛血清淀粉酶同工酶的研究.....	(58)
12. 黑白花奶牛染色体的研究.....	(61)
13. 牦牛(Bos grunniens)染色体的研究.....	(65)
14. 德昌水牛染色体显带研究.....	(69)
15. 山谷型藏系黑绵羊染色体显带研究.....	(79)
16. 藏系山羊染色体显带研究.....	(82)

川西北牛羊和黑白花奶牛遗传标记研究的 综 合 报 告

我省西北少数民族地区，生态环境复杂多样，家畜品种资源丰富，特别是草食家畜牛和羊所占比重最大，过去对畜群遗传有关的资料研究甚少，特别是综合应用细胞遗传，生化遗传和数量遗传的理论和新技术研究畜群的遗传结构和特性方面的工作还未开展过。在四川省科委、西南民族学院科研处及有关部门的大力支持和配合下，我们于1986年7月至1989年3月，对我省黑白花奶牛川西北麦洼牦牛，德昌水牛和山谷型藏系绵、山羊五个地方优种，444头成年健康牛、羊的血液血清进行了与遗传有关的血液蛋白多态性和各种同工酶：包括乳酸脱氢酶（LDH），硷性磷酸酶（AKP），酯酶（Es）和淀粉酶（Am）等同工酶活力以及染色体显带等较全面系统的研究。

（一）当前国内外同类先进技术概况

当前国内外多数学者认为，家畜的遗传标记应该包括生化遗传标记和细胞遗传标记两个方面，它们是研究品种内和品种间差异的遗传，选择优秀家畜个体或群体，查清地方品种的遗传潜力的一种有效方法，其主要用途是在家畜育种中，可作为标记基因来充实常规的选种方法，特别在种畜的早期选择中，具有重大的经济效益。

近20年来，国内外的畜禽育种工作者都期望根据与生产性能有关的遗传标记进行辅助选择以提高选种效果，并用遗传标记研究物种间、品种间及个体间的差异，亲子鉴定，抗病育种等工作。当前已在血型，血液蛋白多态性，酶多态性和活力以及染色体畸变等方面进行了大量的研究，并已取得很大成绩，某些成果已试验性在生产中应用，现仍不断地深入研究，尤其在八十年代国外已发现限制性内切酶酶切片段长度多态性（RFLPS）与畜禽数量性状间有密切关系。这就使家畜育种工作者对遗传标记的研究和应用跃进一个新的发展阶段，因此，家畜的遗传标记是各边缘学科研究的活跃领域。

我国在这一领域内的研究，虽然起步较晚，但在多方面的努力下，已经逐渐追赶上来，目前已在家畜红细胞血型，白细胞型以及血液蛋白多态性，酶多态性，畜种内品种间的遗传差异，遗传距离等方面以及牛、猪的品种间染色体核型的差异和染色体易位等进行了大量的研究，为应用遗传标记对数量性状的选择打下了巩固基础。

（二）项目的详细内容

1. 对血液蛋白多态性的测定和分析

首先对成都市神仙树乳牛场103头一、二胎泌乳母牛血液中的血红蛋白(Hb),血清运铁蛋白(Tf)分别用醋酸纤维薄膜电泳和聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳法(不连续缓冲系统)进行测定,还用生物学统计方法将Hb和Tf多态性与品种特点,产奶量及繁殖性状进行了分析研究,结果证明黑白花奶牛的Hb均为AA型(即一条慢带),Tf基因型频率:AA型为19.4175,AD型为33.0097,DD型为42.7184,AE型为1.9417,DE型为2.9121,无EE型,Tf基因频率 Tf^A 为36.8932, Tf^D 为60.6796, Tf^E 为2.4272。305天平均产奶量,DD型母牛比AA型母牛多769公斤,差异极显著($P<0.01$),AD型比AA型多406公斤,差异显著($P<0.05$),与一、二胎产犊间隔期进行分析,AA型,AD型和DD型间的差异均不显著。对Hb测定结果证明,成都黑白花奶牛为纯种荷兰牛品种,进一步表明Hb可作为鉴定品种的遗传标记,从Tf的结果认为 Tf^D 基因对泌乳牛的产奶量贡献最大,可作为选种的辅助遗传标记。

对110头麦洼牦牛血清Tf采用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳法进行测定并对Tf各类型进行了扫描测定,发现Tf位点由A,D,E和G4个等位基因所决定,其频率分别为0.227,0.386,0.282和0.105,其中G等位基因是在牦牛Tf位点上发现的一个新的等位基因,麦洼牦牛的Tf基因型共有十种,即AA,AD,AE,AG,DD,DE,DG,EE,EG和GG型,其频率分别为0.091,0.227,0.036,0.01,0.155,0.218,0.018,0.145,0.018和0.082。对同一基因型不同个体的Tf进行扫描,发现AA,DD,AD,EE和GG各基因型的带谱存在着量的多态性,这种多态性可能与个体间差异和生产性能有关,为今后麦洼牦牛的本品种选育和杂交改良提供参考。

关于德昌水牛的Hb和Tf多态性的测定采用与麦洼牦牛相同的电泳法测得102头水牛Hb的表型有二种,即AB型和BB型,二者占的比例分别为99%和1%。Tf的基因型有三种AD,DD和DE,其频率分别为0.225,0.716和0.059,与其它沼泽水牛比较,德昌水牛的基因频率 Tf^A , Tf^D 和 Tf^E 分别为0.113,0.858和0.029,只有 Tf^E 的频率较高。比较三种牛的Hb带型,发现黑白花奶牛只有AA型,水牛有AB型和BB型,而绝大多数为AB型,牦牛也有AB型和AC三种类型,但大多数为AB型,但水牛的AB型与牦牛的AB型存在很大的差别水牛Hb的AB型其两条带间的距离较窄,而且慢带的染色也较快带浅,认为Hb带型可作为不同牛种间的遗传标记。

用以上电泳法对125头成年健康的山谷型藏系黑绵羊的血液蛋白多态性进行初步分析,发现其Hb位点的等位基因为A和B,基因频率分别为0.5733和0.4267,并证实了绵羊 Hb^A 基因频率随海拔高度的上升而增高,而 Hb^B 频率则下降的论断。分析血红蛋白与生态环境,生产性能的关系。初步认为 Hb^B 基因为优势基因。山谷型藏系绵羊的Tf多态性,表型较为复杂,至少有17种,还对血清蛋白各成分含量进行了扫描测定,以上结果可为山谷型藏系黑绵羊的选种和改良提供科学依据。

对牦牛、奶牛、水牛血清蛋白扫描测定:

血清蛋白的组成和含量比较恒定,它的合成又是受基因控制的,这些基因在生物合成中不断出现突变,以致该种蛋白质在质和量上发生变化,引起遗传多态现象。同时,血清蛋白的种类多,功能复杂,其代谢与各器官组织的关系密切,当机体发生病变时,必然引起血清蛋白浓度的变化。为此,测定其正常值可作生化遗传的标记,亦可为临床诊断提供参考指标。因此本实验采用醋酸纤维薄膜电泳,对四川的三种类型牛进行分离测定,并进行比较和

初步分析。

测定健康41头理县麦洼牦牛, 61头成都神仙树黑白花奶牛, 90头德昌水牛的血清蛋白。以醋酸纤维薄膜为支持物, 巴比妥钠为缓冲液, 电泳50~60分钟, 染色5分钟, 透明3~5分钟后, 用CDS—200型计算机控光密度仪扫描, 自动绘出血清蛋白各组份曲线图, 同时计算出各组份的百分含量。结果测出41头牦牛相对百分含量分别为白蛋白 39.93 ± 3.70 ; α_1 —球蛋白 14.43 ± 1.29 ; α_2 —球蛋白 13.51 ± 1.17 ; β —球蛋白 7.49 ± 1.35 ; γ —球蛋白 24.66 ± 2.70 。奶牛61头, 相对百分含量分别为白蛋白 38.38 ± 2.62 ; α_1 —球蛋白 12.14 ± 0.76 ; α_2 —球蛋白 11.70 ± 0.66 ; β —球蛋白 16.25 ± 1.48 ; γ —球蛋白 21.51 ± 1.80 。水牛90头(其中♂18头, ♀72头)相对百分含量分别为白蛋白 30.76 ± 2.85 ; α_1 —球蛋白 24.25 ± 1.04 ; α_2 —球蛋白 11.97 ± 0.62 ; β —球蛋白 17.67 ± 0.96 ; γ —球蛋白 15.93 ± 1.03 。

三种牛血清蛋白质的均值比较, 其中 γ —球蛋白作“t”检验分析, 三者差异都非常显著, 牦牛>奶牛>水牛, 表现了种牛的特异性。 α_1 —球蛋白水牛均值大大高于牦牛和奶牛, 因德昌水牛是挽力强的役用耕牛, 它的含量可能与役用性能有密切关系。♀、♂水牛的蛋白均值除 γ —球蛋白外均存在极显著差异。♂性的白蛋白显著高于♀性, 而♀性的 α_1 , α_2 , β —球蛋白又显著高于♂性, 是性别间差异的特殊表现。

2. 对牛羊血清中同工酶的研究: 当前同工酶分析法之所以成为遗传学中一项重要的实验技术, 因为每一种同工酶亚基型都是不同基因的产物。因此, 任何地方如能找到同工酶的亚单位型, 就说明不仅存在着为其编码的基因, 而且这种基因还处于表达状态, 故同工酶即是自身基因的标志物。理论上这种提法不仅限于酶类, 任何多肽都是编码基因的标志物, 但实际上, 鉴于酶具有催化活性能被特异地检验, 致使酶的变种比非酶蛋白质的遗传变种更易检出, 并且人们认为, 有遗传多样性的同工酶才有重要意义, 现代生化遗传学中使用同工酶作为遗传标志物是比较普遍的, 目前我国也正在开展, 但运用于家畜的生产性能、遗传育种、品种的鉴定的研究甚少, 在很多方面还是空白。为了对我国丰富的家畜遗传资源进行开发利用, 促进畜牧业的发展, 提高人民生活水平, 特对我省五个地方牛羊优种进行了与遗传有关的四种同工酶, 包括乳酸脱氢酶(LDH)同工酶, 硷性磷酸酶(AKP)同工酶, 酯酶(ES)同工酶和淀粉酶(Am)同工酶的分析研究。

黑白花奶牛血清LDH同工酶活力与其产奶性能的相关分析。采用琼脂糖凝胶电泳分析, 并用计算机控光密度仪(CDS—200型)以波长600nm扫描测定同工酶的活力, 经过数理统计分析, 首次发现血清中LDH1的活力与产奶量呈正相关, 相关系数 $\gamma = 0.5749 (P < 0.01)$, 经过多次生产检验和统计分析LDH1活力与产奶量呈正相关的结论都得到了证实。建议将LDH1作为对乳牛产奶量的辅助指标进行选种, 在生产试验中继续应用和验证。

德昌水牛和麦洼牦牛血清中LDH同工酶的分析, 所用方法与上面相同, 研究结果如下:

同工酶 种 类	LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5
德昌水牛	55.64±0.98	28.66±0.66	6.63±0.37	5.03±0.33	4.22±0.32
麦洼牦牛	48.78±0.88	33.13±0.79	14.08±0.66	2.77±0.26	1.36±0.18
黑白花奶牛	52.22±0.80	28.64±0.47	12.62±0.56	4.12±0.32	1.70±0.18

发现牦牛血清中LDH1和LDH3的活力,在公母间有显著差异($P<0.05$),德昌水牛LDH3和LDH5活力在公、母间有极显著差异($P<0.01$)。同时还发现德昌公水牛LDH同工酶谱活力分配比例与其它牛不同,其它三种牛(除德昌公水牛外),均为LDH1>LDH2>LDH3>LDH4>LDH5,而德昌公水牛为LDH1>LDH2>LDH3>LDH5>LDH4,对LDH同工酶的生理功能有待进一步研究。比较三种牛的LDH同工酶(LDH1~LDH5)活力均值,德昌水牛与麦洼牦牛相比LDH1~LDH5的活力均存在极显著差异($P<0.01$);德昌水牛与黑白花奶牛相比LDH1, LDH3, LDH4, LDH5, 存在显著或极显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);麦洼牦牛与奶牛相比仅有LDH1, LDH2, 和LDH4 的活力存在显著或极显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。对于家畜血清LDH同工酶活力分析能为不同畜种、繁殖育种提供遗传标记的依据,而且还为兽医临床诊断提供重要的生化指标,而测定LDH同工酶的方法稳定可靠,定量准确,易于推广。

对牛羊血清中AKP同工酶的测定是采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,在PH9.0, 0.05M的硼砂缓冲液中进行电泳,电压300V,电流3mA/管,电泳40分钟。显色液用 萘一酚磷酸钠 固兰B盐加柠檬酸缓冲液(PH8.5, 0.1M)和10% MgCl₂配制而成。显色后测得各牛羊的AKP同工酶的迁移率($\bar{x} \pm S\bar{x}$)见下表

同工酶 种 类	AKP I	AKP II	AKP III	AKP IV	AKP V	AKP VI
德昌水牛 n=59	0.74 ±0.025	0.64 ±0.09	0.37 ±0.013	0.20 ±0.07	0.06 ±0.007	0.03 ±0.005
麦洼牦牛 n=64	0.94 ±0.042	0.52 ±0.01	0.19 ±0.04	0.04 ±0.006	0.02 ±0.001	
黑白花奶 n=72	0.98 ±0.032	0.80 ±0.029	0.51 ±0.026	0.17 ±0.007	0.07 ±0.008	
山谷型藏绵羊 n=42	0.96 ±0.002	0.80 ±0.005	0.68 ±0.007	0.20 ±0.003	0.04 ±0.002	

对AKP同工酶的迁移率的分析结果表明,不同种之间,同一品种不同个体之间均有差异。还发现德昌水牛血清AKP同工酶谱在靠近原点多一带(AKPVI)对以上几种牛羊血清AKP同工酶测定在国内还属首次,填补了空白,为进一步分析血清AKP同工酶与家畜的品种鉴定,生产性能的相关关系初步提供了理论根据。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳快速分离法,对麦洼牦牛德昌水牛血清脂酶(Es)同工酶进行分析。本实验在pH9.0, 0.05M的硼酸缓冲液中电泳,电压300V,电流3mA/管,电泳时间为40分钟。显色用的显色液是由1%乙酸- α -萘酯和2%乙酸- β -萘酯加0.2M磷酸盐缓冲液,再加坚牢兰RR盐配制而成。显色后得到清晰的Es同工酶谱,各酶的迁移率($\bar{x} \pm S\bar{x}$)即Es-1为 0.88 ± 0.07 Es-2为 0.76 ± 0.017 , Es-3为 0.51 ± 0.11 , Es-4为 0.36 ± 0.11 , Es-5为 0.27 ± 0.0 , Es-6为 0.15 ± 0.07 , Es-7为 0.01 ± 0.006 ,在不同个体中各酶出现的频率不同,但Es-1、Es-3、Es-6和Es-7出现的比例均为100%,其他的Es同工酶出现的比例在各个体之间有大的差异。在两种牛之间各酶的迁移率也不同德昌水牛以Es-2和Es-9比例为100%。其酶谱的显带数目,在不同个体中也不同,麦洼牦牛表现有4带、5带、6带、7带的,其中以5带出现的频率最高,其次是4带。德昌水牛各个体中显带有5带、6带、7带、8带和9带的,以6带出现的比例最高,并且比牦牛多两条带即Es-8和Es-9。这一研究在国内也属首次,该同工酶的遗传多态性很复杂,需进一步研究。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳快速法分离麦洼牦牛和德昌水牛血清Am同工酶的迁移率($\bar{x} \pm S\bar{x}$),方法同前,显色采用碘液,分析结果见下表

麦洼牦牛和德昌水牛Am同工酶迁移率($\bar{x}$)

麦洼牦牛 n-75	Am															
	同工酶	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	P ₁	S ₅	P ₂	S ₆	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	S ₇	
	迁移率	0.04	0.05	0.08	0.10	0.11	0.14	0.22	0.27	0.34	0.37	0.42	0.58	0.77	0.95	
德昌水牛 n-99	Am															
	同工酶	S ₁		P ₁		S ₂		S ₃	P ₂		P ₃		S ₄			
	迁移率	0.06		0.09		0.12		0.16	0.18		0.33		0.83			

发现麦洼牦牛的血清淀粉酶同工酶个体差异很大,Am同工酶带谱有2、3、4、5、6、7条带六种类型,并发现Am同工酶不仅受Am^A, Am^B, Am^C三个等位基因控制,还受Am^D和Am^G二个等位基因控制,表现出16种类型。同时发现德昌水牛血清中Am同工酶谱有3、4、5条带三种类型,多数个体(97%)为3条带,以上发现填补了我省地方优种生化遗传标记的空白。

3.对三种牛和二种羊染色体显带研究,(包括德昌水羊,牦牛,山谷型藏绵羊,藏山羊

染色体显带研究和黑白花奶牛的染色体分析)

在德昌水牛染色体显带研究中,共分析了染色体七种显带内容,其中包括G带,R带,C带,CMA₃/DA/DAPI三重染色荧光显带,限制酶Hae III,ALu I处理显带以及Ag-NORs染色,还绘制出德昌水牛染色体G带核型分区、分带模式图。以上研究在国内外尚未见报导。研究结果表明,德昌水牛 $2n=48$,XX/XY属沼泽水牛型,染色体类型为 $2sm+2st+6m+38t$,NF=58,C带有其品种的特征性,并对Ag-NORs的多态性进行了详细描述。CMA₃能使染色体着丝粒区发出明亮的荧光,而DA/DAPI则不能,还发现限制酶Hae III处理染色体不易发肿胀且带纹较细小,能提高对染色体带纹的分辨力。

还采用染色体显带技术对牦牛、山谷型藏系绵、山羊染色体核型的G带,C带,R带和Ag-NORs进行了分析,并绘制了G带模式图,并发现不同品种的绵羊染色体核型的C带和Ag-NORs在一些染色体上出现多态现象。在培养过程中认为,培养“适应高原环境的家畜”的染色体采用CoA比用PHA为好。

本课题紧密结合与遗传学有关的边缘学科和先进技术,对与牛、羊种类,品种,生产性能,杂交育种等有关的细胞遗传和生化遗传标记进行了较大规模、全面系统的研究,在国内还属首次,这项研究成果具有重要的理论意义和重大的社会效益。

在研究过程中,将所测得的数据进行处理分析、撰写成文、陆续在有关杂志上发表,其中有八篇先后在西南民族学院学报、“中国牦牛”杂志上发表,其中“四川麦洼牦牛血清运铁蛋白多态型测定”一文,在一九八八年十二月全国畜禽遗传标记研讨会上进行交流,受到同行专家重视,“水牛、牦牛和奶牛血清中LDH同工酶活力的分析和研究”一文,一九八九年九月决定在杭州召开的中国生化学会第二届农业生化学术会议上发言,其它文章也正在联系登载。

本课题所研究五个牛羊地方优种的遗传标记,共跨成都地区、阿坝州和凉山州方圆几百公里范围,涉及单位,包括大专院校、行政部门和生产单位等十多个、涉及人员有百人以上,研究内容涉及遗传学几个边缘学科,这样较大规模,较全面地分析研究牛、羊、地方优种的遗传标记,在全国来说也是少有的,在此,我们向支持本课题的各有关单位及同志们表示衷心的感谢。

(三) 问题和建设:

1. 研究结果需要进一步深入:本课题研究的牛羊地方优种,由于饲养管理比较粗放又缺乏科学管理、特别缺少生产性能的各种详细记录,如何将测得的遗传标记应用于生产还要作大量的具体工作,希望各级领导给予重视和支持。

2. 我们深刻地体会到,教学、生产、科研三结合是推动畜牧业发展的最好方式,希望今后继续用这种方式,作出更大的成绩来。

3. 本课题已决定在鉴定的基础上,根据同行专家、教授提出的意见,建议,将测定和分析研究的资料汇编成册,供有关的、教学、生产和科研单位参考。起到“抛砖引玉”的作用,为进一步开发我国畜牧业丰富的遗传资源作出更大的贡献。

黑白花奶牛血液蛋白遗传分析

余桂馨 陈守筠 徐小波 庞安全 付树琼 谢光媛

摘 要

对成都市神仙树乳牛场103头一、二胎泌乳母牛血液中的血红蛋白(Hb)运铁蛋白(Tf)的遗传变异及其与生产性能,繁殖性状的关系作了初步分析,证明其血红蛋白型均为AA型(即纯种)。Tf基因型频率AA型为19.4175%,AD型为33.0097%,DD型为42.7184%,AE型为1.9417%,DE型为2.9126%,未发现EE型,Tf基因频率 Tf^A , Tf^D , 和 Tf^E 分别为36.8932%, 60.6799%和2.4272%。DD型母牛305天平均产奶量极显著高于AA型母牛769kg ($P<0.01$); AD型显著高于AA型406kg ($P<0.05$), DD型与AD型之间差异不显著,对一、二胎产犊间隔期进行比较AA、AD、DD间的差异均不显著。本试验对Hb的分析,证明成都黑白花奶牛为纯种荷兰牛,Hb可作为鉴定品种的标记;从Tf的结果初步证明 Tf^D 基因对泌乳牛的产奶性能贡献最大,Tf类型可作为选种的辅助性遗传标记。

前 言

研究家畜的经济性状一般多采用群体遗传学及统计遗传学的原理和方法对遗传规律进行研究和分析。近四十年来,随着畜禽生理生化免疫及细胞遗传学技术的改进和发展,使人们对家畜许多经济性状,特别是生命早期不能表现的性状,进行测定研究,增加人们对具有优秀基因个体的认识,为选种提供遗传标记。

自从1955年Cabannes等发现牛的Hb有A与B两种变异类型以来,各国学者对牛Hb的品种特点、地区差异及与生产性能、繁殖性状之间的关系以及疫病发生、生态环境适应性等进行多方面的研究。有些学者认为大部分欧洲血统牛如荷兰牛、海福特、短角牛、安格斯、爱尔夏等品种牛,只有HbA型,而没有HbB型。

Hb型与牛繁殖性能之间的关系,各国学者研究的结果不一,部分学者认为,Hb型与母牛的初产年龄,产犊间隔期等无显著差异,而另一部分学者则认为Hb型与繁育力有关。Sengupta (1975)发现HbAA型母牛的产犊年龄显著早于AB和BB型母牛。Velhankar等(1977)发现HbAA型AB型小母牛性成熟年龄显著早于HbBB型,Berovides (1978)发现HbAA型母牛产犊间隔显著短于HbAB型母牛。

关于Hb型与生产性能的关系报导较多,Lyagin、F、F, (1971), Gurjjanova A. S等(1969), Piljko、V. V (1968)认为Hb型与母牛乳脂率高低有关,通常认为HbAB型高于AA和BB; Lyagin (1971)指出,AA型母牛的泌乳期显著比AB型长等等。

六十年代以来,许多学者对牛血液中运铁蛋白(Tf)的多态型进行研究,通过电泳方法

在血清中检测出多种变异体。一般认为Tf是由三个常染色体等显性基因(Tf^A 、 Tf^D 、 Tf^E)所决定。并有各种基因型(AA、DD、AD、EE、AE和DE)。

许多奶牛育种者认为,Tf类型与产奶性状有关。我国秦志锐(1979,1981)发现DD型个体产奶量最高。Kiddy(1975)研究认为种公牛在各Tf类型间的产奶量预期差存在着显著差异,DD型公牛最高。关于产奶量与运铁蛋白类型间的关系,许多学者的研究曾出现各种不同的结果,有些研究者发现Tf基因型间的产奶效应差异不显著。还有报导 Tf^{AA} 型产奶量最高。但总的趋势是E基因的效应最低、D基因效应最高。此外,Gahne(1967)和Hingrove(1980)曾报导Tf与家畜的繁殖性能有关、高兴兰(1984)报导Tf的代谢和DNA的合成有关。

本研究主要对103头成都黑白花奶牛血液蛋白中Hb类型和Tf类型进行了生化测定和分析,结果认为Hb类型与Tf类型具有品种特点并对Tf类型间产奶性能、繁殖能力进行了初步分析。

材料方法

一、材料:本研究所用血液样品来自成都市神仙树乳牛场的103头一胎和二胎黑白花奶牛。在颈静脉部采血15毫升,其中10毫升吸取血清,5毫升加抗凝剂后制备红蛋白样品。每个体采血时间均在早上饲喂六小时以后。全部研究在3个月内(1988年2月至5月)完成。

二、方法:

1.血液处理:将未加抗凝剂的血样在室内静置半小时后分离血清或用离心机离心(2000转/分)5分钟后分离出血清,放入冰箱待用。将加过抗凝剂血样离心(2000转/分)5~10分钟后将下层积压的红细胞吸出0.5毫升,按1:10的生理盐水洗涤、离心。吸去上清液共3~4次,洗去血浆蛋白,最后留下下层的红血球加入5毫升的巴比妥缓冲液(pH8.6,离子强度0.06)混匀,放入冰箱的冰格中过液。次日取出,待融化后,离心(2000转/分)10分钟,吸出上层透明的血红蛋白,吸入清洁的小瓶中,放入冰箱内待用。

2.测定方法:

①血红蛋白的区带分离,用醋酸纤维薄膜电泳法对每头牛的Hb进行测定,即用巴比妥缓冲液(pH8.6,0.07M,离子强度0.06),中压电泳仪,在电压150V,电流12mA左右,电泳约1~2小时,最后用丽春红S染色液染色,漂洗,透明,分析。

②运铁蛋白区带的分离:用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳方法测定,凝胶由两部分组成,上面为隔层胶(pH6.7,浓度2.5%),下面为分离胶(pH8.9,浓度7.5%)。电极缓冲液由三羟甲基氨基甲烷(Tris)和甘氨酸配制pH8.3。开始电泳:电压500V,电流25mA,当样品进入分离胶时电压为750V,电流33mA,电泳过程共需2~3小时,电泳完毕,取出凝胶进行染色、脱色和保存。

结果与分析

1.血红蛋白(Hb)类型

用以上方法对103头供试奶牛Hb电泳结果分析，全部牛奶的Hb型均为A型（即A型带）该结果与Grimes等（1957），Salisbury等（1959）所测荷兰牛的类型一致，与我们去年对成都市鱼场饲养的30头奶牛（随机抽样）的Hb类型（AA型:AB型=29:1）相比略有差异。这个数据也可说明鱼场的奶牛中Hb有变异型，可能不全属于荷兰牛品种。

2. 运铁蛋白（Tf）的类型以及基因频率和基因型频率。

本研究测出成都市神仙树乳牛场黑白花奶牛运铁蛋白基因频率 Tf^A 、 Tf^D 和 Tf^E 分别为36.8932%，60.6796%和2.4272%。发现该场奶牛的Tf有五种类型，AA，AD，DD，DE和AE，见图1比例分别为19.4175%，33.9097%，42.7184，2.9126%和1.9417%，未发现EE型，见表1。Tf各类型的观察值与理论值经 χ^2 检验，实际与理论符合（ $P>0.05$ ）（见表2）。即Tf各类型的分布与Hardy-Weinberg定律完全符合，从而也证明了Tf的遗传方式符合孟德尔遗传规律。

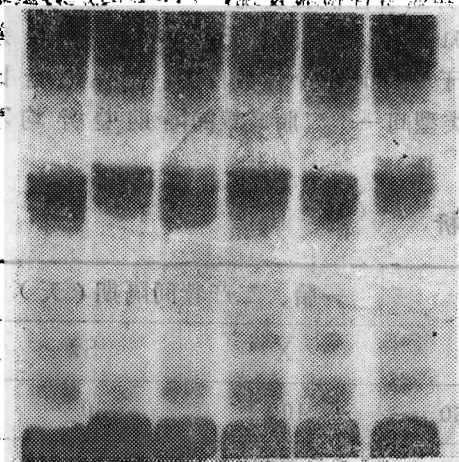


图1 黑白花奶牛运铁蛋白电泳图

AA DD AD DD DD DE

表1 成都市神仙树乳牛场奶牛 Tf^A 、 Tf^D 、 Tf^E 频率

基因型	含 Tf^A 的类型			含 Tf^D 的类型			含 Tf^E 的类型		
	AA	AD	AE	AD	DD	DE	AE	DE	EE
观察数	2×20	34	2	34	2×44	3	2	3	2×10
频率%	36.8932			60.6796			2.4272		

3. Tf 各基因型间生产性能和繁殖能力的差异性

为了反映Tf各类型间305天产奶量的真实差异，对第二胎产奶量进行了校正，具体做法是以第一胎产奶量为基准将第二胎的值校正为第一胎的值，公式为

$$Y_1 = Y_2 \times 0.8925$$

表2 运乳蛋白各类型的观察值、理论值及 χ^2 检验

基 因 型	AA	AD	DD	DE	AE	EE
观 察 值	20	34	44	3	2	0
(O)	19.4175%	33.0097%	42.7184%	2.9126%	1.9417%	0.0000%
理 论 值	14.0194	46.1165	37.9247	3.0340	1.8446	0.0606
(E)	13.61%	44.77%	36.82%	2.94%	1.79%	0.05%
$(O-E)^2/E$	2.5513	3.1835	0.9732	0.0049	0.0051	0.0606
	$\chi^2 = 6.7786 \quad df = 5 \quad P > 0.05$					

通过对Tf基因型间生产性能及产犊间隔期进行差异显著性检验发现，TfDD的产奶量最高，AA最低，差值为769公斤，差异极显著 ($P < 0.01$)，AD型也高于AA型406公斤，差异显著 ($P < 0.05$) DD型与AD型间差异不显著。由于AE和DE个体数目少，没有进行比较。总的趋势是Tf^D基因对产奶量有大的贡献。Tf各类型间一、二胎产犊间隔期差异均不显著。(见表3、表4)

表3 Tf各基因型产奶量和繁殖性能分析

基 因 型	N	305天产奶量 (kg)		一胎、二产犊间隔期 (天)	
		$\bar{X}$	Sx	$\bar{X}$	Sx
AA	11	4154	231.7850	409	50
DD	15	4863	718.3042	438	117
AD	20	4560	599.1902	459	89

注：AE、DE型头数太少未作统计分析。

表4 Tf各基因型间差异显著性检验

基 因 型	自 由 度	305天产奶量		一、二胎产犊间隔期	
		差 值 (公斤)	t值	差值(天)	t值
DD-AA	24	769	3.4063**	1	0.0261
AD-AA	29	406	2.1544*	34	1.1002
DD-AD	33	303	1.3600	35	1.0260

注：其它组合的差值因头数太少未进行比较检验

**：表示极显著 ($P < 0.01$)

*：表示显著 ($P < 0.05$)

讨 论

1. 关于血红蛋白多态现象

目前已知家畜血红蛋白有许多多态性特性, 并有其遗传学基础。染色体组 DNA 的一部分是为蛋白质编码的。分子遗传学对多态性的研究主要集中在蛋白质分子上, 因此, 蛋白质的多态性可以部分地代表 DNA 的多态性。蛋白质多态性有遗传基础, 可用于表示群体内遗传变异, 可适当作为遗传标记使用。

随着研究的深入广泛, 研究者们也发现牛的血红蛋白有不少多态性, 他们对牛 Hb 的品种特点, 地区差异及其与生产性能, 繁殖性状之间的关系作了许多研究, 这些资料对牛的改良育种, 疫病防治以及生态环境适应性等方面的研究均有重要的参考价值。

成都1900年已有少数回民利用本地黄牛挤奶。1916年自开封引入荷兰黑白花奶牛三头, 1935年引入加拿大黑白花公牛一头和娟姗公牛一头; 抗日战争时期, 先后由遗族学校及中央大学运来美国黑白花奶牛20余头, 1942年开始试行人工授精, 杂交牛群逐步增多。1957年开始对乳牛业进行合营, 在市郊建奶牛场五个, 1975年以后相继由上海、南京、铁岭、北京等地引入黑白花种公牛50多头, 在级进杂交为主的繁育情况下, 基本形成一定规模的成都黑白花奶牛群。

为了消灭奶牛结核病, 市属各场逐步健化, 1979年11月首先将成都市各奶牛场陆续调进健康合格的5~7天初生犊到神仙树乳牛场进行“健化”培育, 逐步形成该场现有牛群规模。因此该场的牛群是成都黑白花奶牛群的缩影, 具有一定的代表性, 但由于饲养水平不高, 对成都市黑白花奶牛的表型值仍有影响。

从测定牛只的Hb类型看来, 只有一种AA型, 说明成都市黑白花奶牛通过许多年的级进杂交培育与选育已属于荷兰牛品种, 鱼场所测30头奶牛的Hb, 其中有1/30的变异型(A B型), 说明该场的奶牛群还未全部为荷兰牛种。

2. 运铁蛋白的基因频率和基因型频率:

本研究所得Tf基因频率和基因型频率的结果与其它研究者(Kiddy等, 秦志锐等)的结果, 即 $Tf^A = 42 \pm 4\%$, $Tf^D = 54 \pm 3\%$; $Tf^E = 2 \pm 0.2\%$, $Tf^{AA} = 17 \pm 2\%$, $Tf^{AD} = 45 \pm 2\%$, $Tf^{DD} = 35 \pm 0.2\%$, $Tf^{DE} = 4.5 \pm 0.3\%$, $Tf^{AE} = 2.5 \pm 0.03\%$, $Tf^{EE} = 0 \pm 0.01\%$ 相类似。但 Tf^A 频率偏低、 Tf^D 频率偏高, 可能这就是成都黑白花奶牛与荷斯坦奶牛基因频率间存在的差异, 这对鑑定培育品种特点, 是有价值的, 有待今后进一步研究。不少学者(Kiddy等, Jain等)发现品种间和种间的Tf都存在着显著差异。

3. 运铁蛋白类型间生产性能的差异

通过对运铁蛋白类型间生产性能的统计分析发现, 运铁蛋白类型间的生产性能存在着差异(表3, 表4), DD型极显著高于AA型($P < 0.01$) AD型显著高于AA型($P < 0.05$) 说明运铁蛋白D基因对生产性能的贡献最大, 同时许多学者(Ashton 等和秦志锐等)均认

(下转第17页)

麦洼牦牛血清运铁蛋白多态性测定

余桂馨 陈宇筠

摘 要

本文对110头四川麦洼牦牛血清运铁蛋白(Tf)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳测定,发现Tf位点由A, D, E, 和G4个等显性基因所决定,其频率分别为0.227, 0.386, 0.282和0.105。共具有AA, AD, AE, AG, DD, DE, DG, EE, EG和GG10种基因型,其频率分别为:0.091, 0.227, 0.036, 0.01, 0.155, 0.218, 0.018, 0.145, 0.018和0.082,并对同一基因型不同个体的Tf进行扫描,发现AA, DD, AD, EE和GG各基因型内的带谱都存在着量的多态性,这些多态性可能与牦牛种群间的差异有关,与牦牛所处的生态条件和生产性能有关,为今后牦牛本品种选育和杂交改良提供参考。

前 言

牦牛是我省少数民族地区特有的牛种,由于它能适应高寒地区的生态条件并提供大量的肉、奶、毛、皮,深受少数民族地区人民的喜爱,是他们生活中不可缺少的畜产品来源。我省牦牛共有300万头。分布在阿坝州理县高山区的属四川麦洼牦牛,其特点是个体较小,成熟晚,饲养周期长。五岁以上成年牦牛体重为201—275公斤,体高106—114公分,生产性能低,六岁开始产奶,每年正常泌乳4~5个月,每头平均日挤奶1~3公斤,屠宰率为47.72%,每年剪毛一次,平均每头剪毛0.6~3公斤;其繁殖性能,公牦牛的适配年龄为4~5岁,母牦牛为3.5~4岁,每年5~11月为发情季节,7~9月为发情高峰,多数母牦牛三年产两胎,多为单胎,极少双胎,牦牛能适应高海拔(3600~4200m)空气稀薄,气压低(710.15~720.75 mmHg),气候恶劣(年平均温度7.2—-3°C)的自然条件。牦牛善于攀登高山峻岭,性情警觉灵敏,常沿山奔跑并能与野兽搏斗。由于牦牛的上唇薄,舌长灵活,适于在牧草低矮稀疏的草地上放牧,适应性强,很少有疾病发生。

运铁蛋白(Transferrin)简称Tf是一种能转运Fe的铁结合蛋白,广泛分布在脊椎动物的体液和细胞中,共有三类Tf,即血清Tf,卵Tf和乳Tf,在三类Tf中血清Tf的含量最高,人们对它的了解也最多。因Tf在动物体内具有重要的代谢作用,如它有运铁、保铁、缓冲解毒、抑制细菌等作用。因此与动物的健康疾病有密切关系。更重要的是Tf具有遗传多态性。不同群体,不同地区的动物具有特异的变异型,因此,动物的Tf是一个十分有用的遗传标记。

早在1955年,Smithies首先用淀粉凝胶电泳法对牛的Tf进行研究,1958年发现欧洲牛

的Tf受三种等位基因(Tf^A , Tf^D , Tf^E)所支配。继后Poulik(1957)电泳中配备不连续缓冲系能检出更多的变异型, 目前已知牛的Tf至少受八种等位基因所支配。根据运铁蛋白电泳时移动快慢顺序定名为 Tf^{A1} 、 Tf^{A2} 、 Tf^{D1} 、 Tf^{D2} 、 Tf^E 、 Tf^F 、 Tf^G 。

关于牦牛血清运铁蛋白, Лозовая(1957)对帕米尔牦牛, Жаниив(1980)对蒙古杭爱山脉高山区牦牛, 我国李孔亮等(1985)对青海牦牛、犏牛血清Tf型进行过研究, 都认为牦牛的血清Tf多态性由 Tf^A 、 Tf^D 、 Tf^E 3个等位基因所构成, 出现4~6种基因型并认为 Tf^D 基因及 Tf^{DD} 基因型占优势。杭爱山脉高山区Tf位点的纯合度为88.1%, 阿尔泰山区为90.6%。而Хубецв等(1975)对阿尔泰山区和蒙古牦牛的研究发现它们的Tf多态性由4个等位基因所决定, 出现7~8种基因型。此外, 国内外许多学者还认为牛类的血清Tf多态性, 与产奶量, 繁殖能力有一定的关系。因此, 分析血清Tf的多态性, 对牛群早期选择鉴定, 有效地提高牛群的生产性能及繁殖能力具有重要意义。

材 料 和 方 法

1. 材料: 随机采集110头四川阿坝州理县国营牧场成年健康牦牛颈静脉血10毫升, 在试管中静止半小时, 待凝固后吸出血清或用离心机以2000转/分转速, 离心10分钟后取出血清, 放在冰箱中备用。

2. 方法: 采用聚丙烯酰胺圆盘凝胶电泳法, 凝胶浓度为7.5%, 凝胶缓冲液为 Tris-EDTA, pH=8.8。电极缓冲液为硼酸缓冲液, pH=9.0。运铁蛋白的带谱分类是参照 Jamieson(1965)等的牛血清运铁蛋白的基本电泳模式确定。对运铁蛋白各类型扫描是用日本岛津CS-910双波色谱扫描仪测定的。整个试验于1988年7~9月完成。

结 果

1. 关于四川麦洼牦牛运铁蛋白的多态型分析结果, 从表1中可知运铁蛋白的位点具有四个等位基因即 Tf^A 、 Tf^D 、 Tf^E , 和 Tf^G 基因频率分别为0.227, 0.386, 0.282和 0.105; 各等位基因间频率高低顺序为: $Tf^D > Tf^E > Tf^A > Tf^G$, Tf^D 基因占优势。

2. 麦洼牦牛的运铁蛋白基因型共有10种, 即AA、AD、AE、AG、DD、DE、DG、EE、EG、GG, 其频率分别为0.091、0.227、0.036、0.01、0.115、0.218、0.018、0.145、0.018、0.082; 群体杂合度为0.708。纯合度0.292(见表1)

3. 麦洼牦牛运铁蛋白位点出现新的变异型 Tf^G , 其频率为0.105, 它是运铁蛋白位点中泳率最慢的带谱, 一般为二条染色深的宽带, 有时也能见到频率较快的一条窄而淡的细带(图1)

4. 同一基因型的带谱存在着量的差异: 在分析各基因型带谱中, 发现同一种基因型不同个体的带谱中各条带的染色深、浅均有差异, 一般是随着泳率的加快、带的宽度越来越细, 着色越来越淡, 但也有三条带染色深浅一致或一淡一深一淡等各种带谱, 通过扫描可以清楚见到(见图2)这种多态性代表着运铁蛋白含量的多态性。

表1 麦拉耗牛运铁蛋白类型测定结果

基 因 型	基因型频率 (n=110)	等 位 基 因	等位基因频率	基因位点的 杂合度
AA	0.091	Tf ^A	0.227	$\Sigma P_i^2 = 0.282$ $h = 0.718$
AD	0.227	Tf ^D	0.386	
AE	0.036	Tf ^E	0.282	
AG	0.010	Tf ^G	0.106	
DD	0.155			
DE	0.218			
DG	0.018			
EE	0.145			
EG	0.018			
GG	0.082			

注：1. 杂合度：各等位基因频率平方之和 (ΣP_i^2)。2. 杂合度： $h = 1 - \Sigma P_i^2$ 。

图1 麦拉耗牛血清运铁蛋白电泳图谱

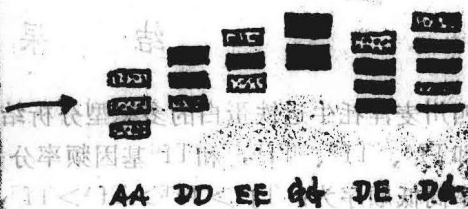
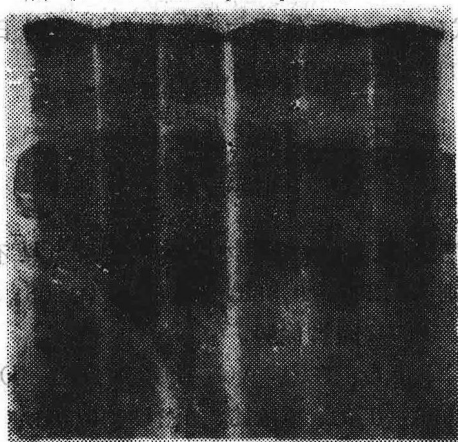


图2 麦拉耗牛血清蛋白运铁蛋白类型的扫描图形

