

甘肃河西地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因 第4外显子的遗传变异研究

梁春花^{1,3}, 刘霞^{2,3}, 罗玉柱³, 孙雪婧^{1,3}, 高雪晋², 杨阳¹, 曾国敏², 杜晓华^{1,3}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 甘肃省草食动物生物技术重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为研究甘肃河西的临泽、甘州、凉州、金昌、高台5个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第4外显子的遗传多态性及其变异特征, 采用PCR-SSCP方法检测了283头西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第4外显子和部分内含子的多态性, 并对群体内各等位基因进行了测序。结果显示: 5个地区西门塔尔杂交类群共检测出5个等位基因(A、B、C、D、E), 表现为6种基因型(AA、BB、AB、AC、AD、AE)。5个地区西门塔尔杂交类群均能检测到AA、BB、AB 3种基因型, 且甘州、凉州、高台西门塔尔杂交类群还分别检测到AC、AD、AE 3种基因型。A等位基因频率在5个群体中最高, 为优势等位基因。对不同SSCP带型的对应片段进行测序分析, 共发现5个核苷酸突变位点(31 bp C→T, 68 bp G→C 和 G→A, 129 bp A→G, 207 bp C→T), 5处突变中仅第207 bp处单核苷酸突变落在外显子区域, 其余均落在内含子区域, 但均未导致氨基酸发生改变。 χ^2 检验结果显示, 5个地区西门塔尔杂交类群在第207 bp处单核苷酸突变位点上仅凉州、金昌西门塔尔杂交类群处于Hardy-Weinberg平衡状态($P>0.05$)。群体遗传学分析结果表明, 临泽、甘州、凉州、金昌、高台西门塔尔杂交类群的多态信息含量(PIC)分别为0.358 2, 0.383 9, 0.427 9, 0.368 2, 0.394 7, 均属于中度多态($0.25<PIC<0.5$)。

关键词:西门塔尔杂交类群; *NGB* 基因; 外显子; 遗传变异

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)02-0022-06

doi: 10.7668/hbxb.2015.02.005

Genetic Variation Study of *NGB* Gene Exon 4 of Simmental Cattle Hybrid Taxon in Gansu Hexi Regions

LIANG Chun-hua^{1,3}, LIU Xia^{2,3}, LUO Yu-zhu³, SUN Xue-jing^{1,3}, GAO Xue-jin²,
YANG Yang¹, ZENG Guo-min², DU Xiao-hua^{1,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
2. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
3. Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The study was designed to analyze the genetic polymorphism and variability of *NGB* gene exon 4 of Simmental cattle hybrid taxon in Gansu Linze, Ganzhou, Liangzhou, Jinchang, and Gaotai five regions. DNA fragment containing the exon 4 and part of intron of *NGB* gene were amplified and genotyped using PCR single-strand conformational polymorphism (SSCP) method. Representative alleles were sequenced for verification of their variations in DNA sequences. The results displayed that there were 5 alleles (A, B, C, D and E) detected, combined six genotypes as AA, BB, AB, AC, AD and AE. Among them, AA, BB and AB genotypes were all detected in the five regions. AC, AD and AE genotypes was detected in Ganzhou, Liangzhou and Gaotai respectively. Allele A was the predominant genotype in five regions. Sequence of the SSCP showed 5 mutations in the DNA fragment (31 bp C→T, 68 bp G→C and G→A, 129 bp A→G, 207 bp C→T). In which, C→T at 207 bp was located in exon, while the other mutations were located in intron. But all had not led to amino acid changed. Chi-square testing indicated that in the 207 bp single nucleotide mutation sites, only Liangzhou, Jinchang Simmental cattle hybrid taxon among the five

收稿日期: 2015-01-26

基金项目: 甘肃省高等学校基本科研业务费资助项目(2013); 甘肃省教育厅研究生导师项目(1102-04)

作者简介: 梁春花(1989-), 女, 河北衡水人, 硕士, 主要从事基础兽医学与动物发育生物学研究。

通讯作者: 杜晓华(1977-), 男, 陕西米脂人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事基础兽医学和动物发育生物学的教学与研究。

regions were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Population genetics analysis showed the polymorphism information content were 0.358 2, 0.383 9, 0.427 9, 0.368 2 and 0.394 7 in Linze, Ganzhou, Liangzhou, Jinchang, Gaotai, respectively, which were all at a moderate level of polymorphism ($0.25 < PIC < 0.5$).

Key words: Simmental cattle hybrid taxon; *NGB* gene; Exon; Genetic variation

脑红蛋白 (Neuroglobin, *NGB*) 是由德国科学家 Burmester 等^[1]于 2000 年发现的存在于人和小鼠中枢神经系统的特异性携氧球蛋白。此后, 科学家们逐渐发现 *NGB* 存在于各种哺乳动物、鸟类、爬虫类、两栖类、鱼类等。*NGB* 主要在脑组织中表达, 能够可逆地结合氧, 从而特异性地向脑组织供氧。近年来, 因 *NGB* 在神经系统缺氧/缺血损伤中具有重要的神经保护功能, 已成为国内外学者研究的热点^[2-5], 但有关 *NGB* 在神经系统缺氧/缺血损伤中发挥作用的生理机制仍不明确。目前, 国内外对 *NGB* 基因的研究多见于人和大鼠, 在牦牛、藏羚羊、高原兔、藏鸡等也都有相关的研究^[6-12], 但有关甘肃河西地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因的研究尚未见报道。西门塔尔牛原产于瑞士西门山谷地带, 其属大型乳、肉、役兼用品种, 是世界第二大牛种。甘肃河西地区自 1980 年开始引用西门塔尔牛冻精进行杂交改良本地黄牛的产肉产奶性能^[13], 通过 30 多年持续不断的级进改良和导入选育, 基本形成了适应甘肃河西地区的西门塔尔杂交类群。本试验以甘肃河西 5 个地区西门塔尔杂交类群为对象, 对其 *NGB* 基因第 4 外显子的遗传变异规律进行了研究, 其结果能够为进一步了解西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因的遗传特性提供有价值的理论依据, 对于探讨 *NGB* 基因在缺氧/缺血状态下的保护性生理机制也具有一定的理论与实践意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物血样 随机选取甘肃河西 5 个地区共 283 头西门塔尔杂交类群。其中, 临泽地区 50 头 (临泽县位于甘肃省河西走廊中部, 是张掖盆地的重要组成部分, 平均海拔 1 829 m, 年均气温为 7.7 °C)、甘州地区 50 头 (甘州区位于甘肃省河西走廊中部, 平均海拔 1 482 m, 年均气温 8.1 °C)、凉州地区 60 头 (凉州区位于武威市中部, 甘肃省河西走廊东端, 祁连山北麓, 平均海拔 2 352 m, 年均气温 7.8 °C)、金昌地区 61 头 (金昌市位于甘肃省河西走廊东端, 祁连山北麓, 平均海拔 1 500 m, 年均气温 7 °C)、高台地区 62 头 (高台县位于甘肃省河西走廊中部, 黑河终段下游, 平均海拔 2 200 m, 年均气温

7.4 °C), 颈静脉采血 10 mL, ACD (酸性柠檬酸葡萄糖) 法抗凝, -70 °C 冻存。

1.1.2 试剂与仪器 蛋白酶 K、Tris 平衡酚购自大连宝生物工程有限公司; 硼酸、乙二胺四乙酸 (EDTA) 购自 Amersco 公司; 过硫酸铵购自烟台市双双化工有限公司; 去离子甲酰胺、TEMED 购自 Sigma 公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自上海生工生物工程股份有限公司; 2 × Power Taq PCR Master Mix 购自北京百泰克生物技术公司; Accurate Run 100 bp-I DNA Ladder 购自上海捷瑞生物工程有限公司; 其他常规试剂均为进口或国产分析纯级产品。

移液枪购自德国 Eppendorf 公司; 梯度 PCR 仪购自美国 ABI 公司; DYY-11 电泳仪、DYCP-31DN 水平电泳槽购自北京六一仪器厂; A-6030 凝胶成像分析系统购自韩国 BIONEER 公司; PROTEAN II xi Cell 双垂直电泳槽、042BR10095 PowerPac Universal 电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司; F12 加热/制冷循环仪购自德国 JULABO 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用常规酚-氯仿抽提法从冻存血样中提取基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 参考 GenBank 中普通牛 *NGB* 基因序列 (登录号: AC_000167.1), 用 Primer 3.0 引物设计软件设计西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的引物, 上游引物: 5'-GAATCC TGCTCAGGAAGCAT-3'、下游引物: 5'-TGGGCTAC AATGGACACAGA-3', 预扩增片段大小约为 367 bp, 包括两端的部分内含子区域, 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

PCR 反应体系为 20 μL: ddH₂O 7.4 μL, 上游和下游引物各 0.4 μL, 2 × Power Taq PCR Master Mix 11 μL, 模板 DNA 0.8 μL。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 7 min, -4 °C 保存。PCR 产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR-SSCP 分析 取 2 μL 的 PCR 产物加入 8 μL 的上样缓冲液 (95% 去离子甲酰胺, 0.25 g/L 溴酚蓝, 0.25 g/L 二甲苯青, 0.5 mol/L EDTA 调节至 pH 值 8.0), 105 °C 变性 10 min, 迅速冰浴 5 min 后上样于浓度为 10% (Acr: Bis 的质量比为 39:1)

的非变性聚丙烯酰胺凝胶,18 ℃、380 V 电泳 20 h,银染法显色后拍照。

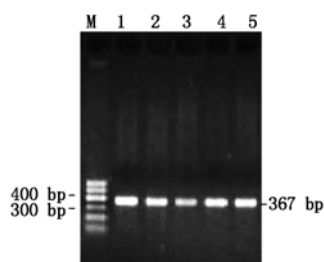
观察电泳结果,选取条带不同的 PCR 产物送往北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.2.4 统计分析 运用 Popgene 1.32 软件计算基因型频率 (Genotype frequency)、基因频率 (Allele frequency)、基因杂合度 (Heterozygosity, H_e)、有效等位基因数 (Effective number of alleles, N_e) 以及进行 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 检验等;用 PIC_Calc 0.6 软件计算多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC);使用 Lasergene 7.1 软件包中的 MegAlign 软件进行相似性分析及系统进化树构建^[14]。

2 结果与分析

2.1 *NGB* 基因第 4 外显子的 PCR 扩增

甘肃河西 5 个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1),结果与预扩增片段大小一致且条带清晰明亮,可直接用于 SSCP 分析。



M. Accurate run 100 bp-I DNA Ladder;1~5. 第 4 外显子的产物。
M. Accurate run 100 bp-I DNA Ladder;1~5. PCR products of exon 4.

图 1 西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of exon 4 of *NGB* gene in Simmental cattle hybrid taxon

2.2 SSCP 检测

SSCP 检测结果显示,甘肃河西 5 个地区的 283 头西门塔尔杂交类群中共发现 AA、BB、AB、AC、AD、AE 6 种基因型,受 A、B、C、D、E 5 个等位基因控制 (图 2)。

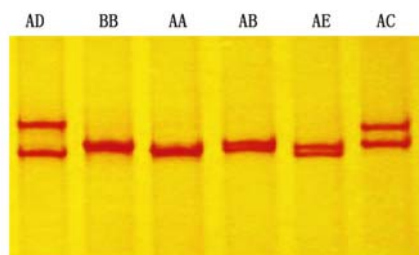


图 2 西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子 PCR-SSCP 检测

Fig. 2 Detection of exon 4 of *NGB* gene in Simmental cattle hybrid taxon by PCR-SSCP

对具有多态性的 PCR 产物进行测序,得到西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子 367 bp 的核苷

酸序列,其中 A 等位基因序列与普通牛 (登录号:AC_000167.1) 的相应序列一致。将不同等位基因的测序结果进行比对 (图 3),发现与 A 等位基因相比,B 和 C 等位基因在第 68 bp 处分别发生了 G→C 突变和 G→A 突变;D 等位基因共发生了 2 处单核苷酸突变,即第 31 bp 和 207 bp 均发生了 C→T 突变;E 等位基因在第 129 bp 发生了 A→G 突变。上述的 5 处突变中仅第 207 bp 处单核苷酸突变落在外显子区域,其余均落在内含子区域。但均未导致氨基酸发生改变。

2.3 遗传多样性分析

5 个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子等位基因的基因型频率和基因频率分布见表 1。由表 1 可知,共发现 AA、BB、AB、AC、AD、AE 6 种基因型,受 A、B、C、D、E 5 个等位基因控制。5 个地区的西门塔尔杂交类群均能检测到 AA、BB、AB 这 3 种基因型,而在甘州、凉州、高台地区还分别检测到 AC、AD、AE 基因型,共发现 AA、BB 2 种纯合基因型,其余均为杂合基因型。AB 基因型为临泽、甘州、金昌、高台 4 个地区的优势基因型,AA 基因型为凉州地区的优势基因型,5 个地区的 A 等位基因频率明显高于 B、C、D 和 E,为优势等位基因。5 个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子多态性群体遗传结构分布见表 2。遗传杂合度 (H_e)、有效等位基因数 (N_e) 和多态信息含量 (PIC) 是评价群体遗传变异的重要指标,不同的遗传参数体现各群体的遗传差异性。由表 2 可知,甘州西门塔尔杂交类群的群体杂合度最大,表示其遗传多样性最丰富,遗传变异程度最高;凉州和金昌西门塔尔杂交类群的群体杂合度最低,其遗传变异程度最小。多态信息含量 (PIC) 是衡量标记多态性较好的指标。5 个地区西门塔尔杂交类群群体的 PIC 值为 0.358 2 ~ 0.427 9,均表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$)。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示,凉州、金昌西门塔尔杂交类群均处于平衡状态 ($P > 0.05$),而临泽、甘州、高台西门塔尔杂交类群均不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P < 0.05$)。

2.4 西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因编码区核苷酸序列相似性及系统发育分析

利用 MegAlign 软件分析了 9 个物种的 *NGB* 序列相似性并构建系统发育树,结果表明 (表 3),西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因编码区核苷酸序列与牦牛、绵羊等物种具有较高的相似性,在系统发育树中距离最近 (图 4)。以上结果表明,*NGB* 发育树与生物进化的物种树基本一致,说明 *NGB* 基因编码区在物种间比较保守,而且具有非常相近的生物学功能。

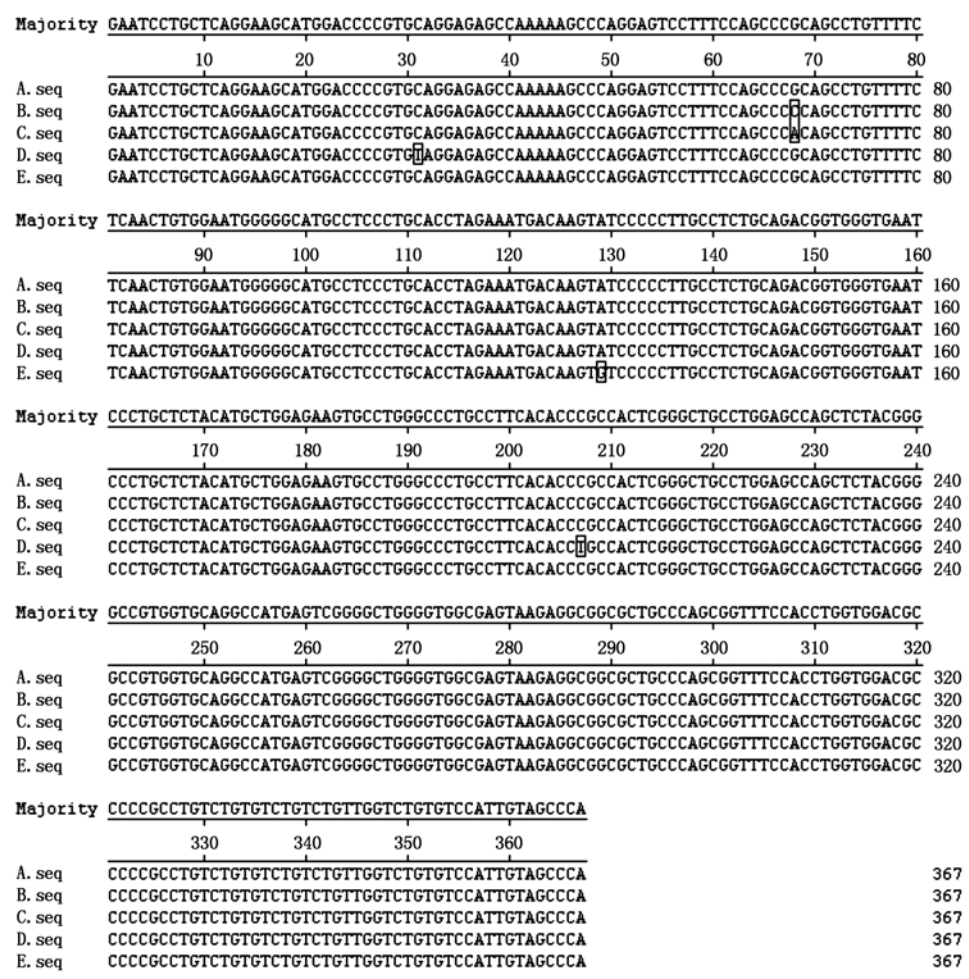


图 3 西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子等位基因的核苷酸序列比对

Fig. 3 Nucleotide sequences alignment of exon 4 alleles of *NGB* gene in Simmental cattle hybrid taxon

表 1 五个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的基因型频率和基因频率

Tab. 1 Genotype and allele frequency of *NGB* gene exon 4 in Simmental cattle hybrid taxon of five regions

地区 Region	样本数 Sample	基因型频率 Genotype frequency					基因频率 Alleles frequency				
		AA	BB	AB	AC	AD	A	B	C	D	E
临泽 Linze	50	0.300 0(15)	0.060 0(3)	0.640 0(32)			0.627 5	0.372 5			
甘州 Ganzhou	50	0.200 0(10)	0.060 0(3)	0.720 0(36)	0.020 0(1)		0.570 0	0.420 0	0.010 0		
凉州 Liangzhou	60	0.400 0(24)	0.133 4(8)	0.333 4(20)		0.133 4(8)	0.631 1	0.303 3		0.065 6	
金昌 Jinchang	61	0.344 3(21)	0.180 3(11)	0.475 4(29)			0.582 0	0.418 0			
高台 Gaotai	62	0.274 1(17)	0.064 5(4)	0.612 9(38)			0.604 8	0.371 0			0.024 2

注：括号内数字表示出现相对应基因型的西门塔尔牛杂交类群的头数。
Note: The number in parentheses indicate the corresponding genotypes of Simmental cattle hybrid taxon.

表 2 *NGB* 基因第 4 外显子多态性群体遗传结构

Tab. 2 Population genetic structure of *NGB* gene exon 4

地区 Region	纯合度 Ho	杂合度 He	有效等位基因数 Ne	多态信息含量 PIC	χ^2 值 χ^2 value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
临泽 Linze	0.372 5	0.627 5	1.878 0	0.358 2	5.644 7	0.017 5
甘州 Ganzhou	0.260 0	0.740 0	1.994 4	0.383 9	12.568 7	0.005 7
凉州 Liangzhou	0.524 6	0.475 4	2.021 7	0.427 9	5.748 3	0.124 5
金昌 Jinchang	0.524 6	0.475 4	1.947 7	0.368 2	0.059 4	0.807 5
高台 Gaotai	0.338 7	0.661 3	1.984 0	0.394 7	9.112 9	0.027 8

表 3 西门塔尔杂交类群与 8 个物种 *NGB* 基因编码区核苷酸序列相似性
Tab.3 Similarity comparing of nucleotide acid sequence of *NGB* gene coding
region between Simmental cattle hybrid taxon and other 8 species

物种 Species	西门塔尔杂交类群 Simmental cattle hybrid taxon	牦牛 <i>Bos</i> <i>grunniens</i>	绵羊 <i>Ovis</i> <i>aries</i>	黑猩猩 <i>Pan</i> <i>troglodytes</i>	兔 <i>Oryctolagus</i> <i>cuniculus</i>	猴 <i>Macaca</i> <i>mulatta</i>	人 <i>Homo</i> <i>sapiens</i>	鸡 <i>Gallus</i> <i>gallus</i>	野猪 <i>Sus</i> <i>scrofa</i>
西门塔尔杂交类群 Simmental cattle hybrid taxon	100								
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	100	100							
绵羊 <i>Ovis aries</i>	99.3	99.3	100						
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	92.6	92.6	92.6	100					
兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	91.9	91.9	92.6	91.9	100				
猴 <i>Macaca mulatta</i>	91.9	91.9	91.9	94.8	92.6	100			
人 <i>Homo sapiens</i>	92.6	92.6	92.6	100	91.9	94.8	100		
鸡 <i>Gallus gallus</i>	71.1	71.1	71.9	72.6	74.1	71.1	72.6	100	
野猪 <i>Sus scrofa</i>	91.1	91.1	91.1	89.6	90.4	88.9	89.6	68.9	100

注:西门塔尔杂交类群(AC_000167.1);牦牛(JQ896306.1);绵羊(NC_019464.1);黑猩猩(NC_006481.3);兔(NC_013688.1);猴(NC_007864.1);人(NC_000014.9);鸡(NC_006092.3);野猪(NC_010449.4)。

Note:Simmental cattle hybrid taxon (AC_000167.1);*Bos grunniens* (JQ896306.1);*Ovis aries* (NC_019464.1);*Pan troglodytes* (NC_006481.3);*Oryctolagus cuniculus* (NC_013688.1);*Macaca mulatta* (NC_007864.1);*Homo sapiens* (NC_000014.9);*Gallus gallus* (NC_006092.3);*Sus scrofa* (NC_010449.4)。

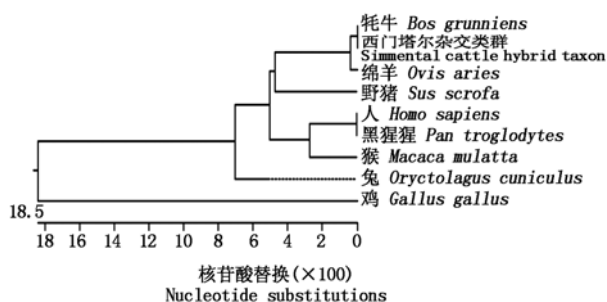


图 4 九个物种 *NGB* 基因编码区核苷酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on *NGB* gene
nucleotide sequences of species

3 讨论与结论

本研究采用 PCR-SSCP 方法分析了甘肃河西 5 个地区 283 头西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子的遗传多态性,研究结果显示:河西不同地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子及部分内含子共发现 5 个核苷酸突变位点(31 bp C→T、68 bp G→C 和 G→A、129 bp A→G、207 bp C→T),5 处突变中仅第 207 bp 处单核苷酸突变落在外显子区域,但未导致氨基酸发生改变,其余 4 处单核苷酸突变均落在内含子区域,可能会对 *NGB* 基因的表达调控产生一定的影响。这些单核苷酸突变形成的原因可能与河西各地区的地理条件、生态环境和选育方法等的差异有关。

根据核苷酸突变位点的不同,形成了 AA、BB、AB、AC、AD、AE 6 种基因型,受 A、B、C、D、E 5 个等位基因的控制。在发现的 6 种基因型中,AA、BB、AB 基因型为 5 个地区所共有的基因型,且在甘州、凉州、高台地区还分别检测到 AC、AD、AE 3 种基因

型。在第 68 bp 位点只有甘州西门塔尔杂交类群发现了 C 等位基因,第 31 bp 和第 207 bp 位点仅凉州西门塔尔杂交类群发现了 D 等位基因,第 129 bp 位点仅高台西门塔尔杂交类群发现了 E 等位基因。原因可能与这 3 个地区西门塔尔杂交类群的育成历史有关,甘州西门塔尔杂交类群中的 C 等位基因,凉州西门塔尔杂交类群中的 D 等位基因和高台西门塔尔杂交类群中的 E 等位基因是杂交培育过程中固定下来的,而其他地区的西门塔尔杂交类群中并未检测到 C、D、E 等位基因,说明甘州、凉州和高台西门塔尔杂交类群与其他地区西门塔尔杂交类群之间的基因交流很少,属于封闭群体。甘肃河西 5 个地区西门塔尔杂交类群中共发现 AA 和 BB 基因型 2 种纯合体,除凉州地区的 AA 基因型频率最高外,其他 4 个地区西门塔尔杂交类群的 AB 基因型频率远高于 AA、BB、AC、AD 和 AE 基因型。这可能是由于等位基因 C、D 和 E 在进化及群体遗传过程中受到一定的选择压力,其纯合个体因某种原因被自然选择或人工选择所淘汰,导致其纯合型在群体遗传过程中被稀释或消失,闫永红等^[15]推测,该过程可能是一种完全淘汰隐性基因的选择效应。而 A、B 等位基因在长期的人工选育过程中则受到正向选择,处于优势地位。A 等位基因的基因频率最高,范围为 0.570 0~0.631 1,属于优势等位基因。其余 3 个等位基因的基因频率范围为 0.010 0~0.065 6,其等位基因频率极低,原因可能是甘肃河西地区西门塔尔杂交类群不断地进行杂交改良,随着代数的增加而导致等位基因 C、D、E 逐渐被稀释。在甘肃河西地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4

外显子区域仅发现了第 207 bp 处 C/T 的转换,说明其突变类型比较保守,有利于保持其群体的遗传稳定性。

多态信息含量(PIC)、杂合度(He)和有效等位基因数(Ne)都可用来衡量群体内遗传变异的程度,其值的高低反映了群体内个体的均质度,数值越高,说明遗传变异性就越大,对环境的适应能力越强,具有较大的选择潜力,应用于遗传育种效果越好。一般认为 $PIC > 0.5$ 为高度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 则为中度多态^[16]。本研究中,甘肃河西 5 个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子基因座位均呈现中度多态($0.25 < PIC < 0.5$),说明 5 个地区西门塔尔杂交类群在此基因座位的遗传多样性一般,这可能是由于甘肃河西地区引进西门塔尔牛时间较短,繁育次数和代数不多,导致基因多样性不够丰富。甘州地区西门塔尔杂交类群的群体杂合度最大,遗传多样性最丰富,遗传变异程度最高,遗传潜力大;凉州和金昌地区西门塔尔杂交类群的群体杂合度最低,其遗传变异程度最小,说明该地区的西门塔尔杂交类群遗传一致性较好。 χ^2 检验结果显示,凉州和金昌西门塔尔杂交类群在该基因座位均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$),可能是由于这 2 个地区的西门塔尔杂交类群经过长期的杂交改良,选择压力相对趋于稳定,因此,在人工选择、迁徙和遗传漂变等各种因素的作用下该基因座位处于动态平衡状态。而临泽、甘州、高台地区的西门塔尔杂交类群未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态($P < 0.05$),究其原因,一方面可能与这 3 个地区西门塔尔杂交类群的育成历史短、基因纯合度低有关,另一方面可能与引进的西门塔尔牛群体较小,在育种过程中发生了基因的遗传漂变有关。这 3 个地区还可能受人工选择的影响较大,从而造成基因型分布不均衡。

本研究结果显示,西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因编码区核苷酸序列与牦牛、绵羊等物种具有较高的相似性,在系统发育树中距离最近。这一结果与动物分类学的观点相一致,这种相似性在一定程度上反映了物种间亲缘关系的远近,进而说明 *NGB* 在生物进化上是比较保守的,但同时表明 *NGB* 基因编码区在长期的生物进化过程中存在一定的差异性,可能会导致 *NGB* 基因发生遗传变异。

本试验运用 PCR-SSCP 方法对甘肃河西 5 个地区西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因第 4 外显子进行了多态性分析。结果表明,该基因座位共发现 5 个核苷酸突变位点,受 A、B、C、D、E 5 个等位基因控制,存在 AA、BB、AB、AC、AD、AE 6 种基因型。A 等位

基因为优势基因,除凉州西门塔尔杂交类群以 AA 基因型为优势基因型外,其余 4 个地区的优势基因型均为 AB 基因型。该基因座位在 5 个地区的西门塔尔杂交类群群体中 PIC 值均呈中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。*NGB* 基因编码区在长期的生物进化过程中存在一定的差异性,可能会导致 *NGB* 基因发生遗传变异,本研究为进一步探讨西门塔尔杂交类群 *NGB* 基因的遗传特性提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, *et al.* A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407 (6803): 520 - 523.
- [2] Sun Y, Jin K, Mao X O, *et al.* Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98 (26): 15306 - 15311.
- [3] Li R C, Pouranfar F, Lee S K, *et al.* Neuroglobin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced cell injury [J]. *Neurobiology of Aging*, 2008, 29 (12): 1815 - 1822.
- [4] Greenberg D A, Jin K, Khaw A A. Neuroglobin: an endogenous neuroprotectant [J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8 (1): 20 - 24.
- [5] 赵守财, 储照虎, 马领松, 等. 脑红蛋白在大鼠局灶性脑组织中的保护作用 [J]. *医药论坛杂志*, 2009, 30 (22): 7 - 9.
- [6] 牛建章, 田 侠, 赵 慧, 等. 中国人神经珠蛋白 (*NGB*) 基因克隆与序列分析 [J]. *河北大学学报: 自然科学版*, 2005, 25 (4): 412 - 417.
- [7] 张成岗, 李 林, 邓美玉, 等. 大鼠脑红蛋白基因编码区的克隆、多态性分析及该基因组织表达谱研究 [J]. *遗传学报*, 2001, 28 (11): 997 - 1001.
- [8] 李盛杰, 杜晓华, 罗玉柱, 等. 天祝白牦牛 *NGB* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44 (3): 395 - 398.
- [9] 石宁宁, 杜晓华, 罗玉柱, 等. 甘南牦牛 *NGB* 基因的克隆及序列分析 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2013, 41 (4): 14 - 20.
- [10] 张立凡, 刘 翀, 连林生, 等. 低氧适应藏鸡神经珠蛋白的突变研究 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18 (1): 39 - 44.
- [11] 马 兰, 白振忠, 靳国恩, 等. 藏羚羊脑红蛋白基因的组织表达谱分析 [J]. *青海医学院学报*, 2012, 33 (1): 12 - 15.
- [12] 段文娟, 燕振国, 林丽霞, 等. 高原环境下兔眼球挫伤后视网膜脑红蛋白的表达调控研究 [J]. *眼外伤职业眼病杂志*, 2010, 32 (2): 87 - 91.
- [13] 张 忠, 张生魁, 李学标, 等. 应用西门塔尔牛冻精改良河西黄牛的效果 [J]. *中国畜牧杂志*, 1990, 26 (4): 52 - 53.
- [14] 孙雪婧, 杜晓华, 杨孝朴, 等. 牦牛 *CYGB* 基因 CDS 区克隆与生物信息学分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47 (13): 2690 - 2698.
- [15] 闫永红, 刘 霞, 刘 英, 等. 天祝白牦牛 *MSTN* 基因第 3 外显子的多态性分析 [J]. *中国兽医科学*, 2011, 41 (9): 945 - 949.
- [16] Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, *et al.* A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism [J]. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 1994, 5 (5): 288 - 297.