

中国荷斯坦奶牛 κ -酪蛋白基因第四外显子的多态性与产奶性状的关联分析

鞠志花^{1,2}, 李秋玲¹, 王洪梅¹, 李建斌¹, 安利国², 杨桂文², 仲跻峰¹, 王长法¹

1.山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100;

2.山东师范大学生命科学学院, 济南 250014

摘要: 以 544 头中国荷斯坦奶牛为研究对象, 以 κ -酪蛋白基因为产奶性状的候选基因, 扩增 779 bp 的片段, 结合测序结果采用 PCR-RFLP 方法来检测 κ -酪蛋白基因 3 个位点的多态性。结果: 在 exon4 的第 10 891 bp、10 927 bp 和 10 988 bp 处分别发生了 T/C、C/A 错义突变和 G/A 同义突变, 据此分别选择了 *TaqI*、*HindIII*、*PstI* 等 3 种限制性内切酶检测了其多态性。结果发现: 3 个位点的 A、B 等位基因在群体中都有分布, 且处于低度多态; A 和 B 等位基因的频率分别为 86.03% 和 13.97%; AA、AB 和 BB 基因型频率分别为 73.71%、24.63% 和 1.66%; χ^2 适合性检验表明, 该群体在这 3 个位点的突变达到 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$); BB 和 AB 基因型个体乳脂率显著高于 AA 基因型个体 ($P < 0.05$), AB 基因型个体脂蛋白比显著高于 AA 基因型个体 ($P < 0.05$), 但不同基因型对产奶量和乳蛋白率没有显著影响; 3 个位点的酶切多态性在所研究群体中是紧密连锁的。结论: 在中国荷斯坦奶牛群体中, κ -酪蛋白 B 等位基因可作为改良奶牛乳脂率性状的分子遗传标记。

关键词: 荷斯坦奶牛; κ -酪蛋白基因; 多态性; PCR-RFLP; 产奶性状

Genetic polymorphism of κ -casein gene exon4 and its correlation with milk production traits in Chinese Holsteins

JU Zhi-Hua^{1,2}, LI Qiu-Ling¹, WANG Hong-Mei¹, LI Jian-Bin¹, AN Li-Guo², YANG Gui-Wen², ZHONG Ji-Feng¹, WANG Chang-Fa¹

1.Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

2.Life Science College, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract : Kappa-casein gene was regarded as a candidate gene for milk production traits of cows. In this study, a 779 bp fragment of κ -casein gene of Chinese Holstein was amplified by polymerase chain reaction (PCR), the polymorphisms of three loci of κ -casein gene were detected by PCR-RFLP with restriction endonuclease *TaqI*, *HindIII*, *PstI*. After sequencing, T/C single nucleotide polymorphism (SNP) was identified at nucleotide 10 891 and C/A SNP was identified at nucleotide 10 927 and G/A SNP was identified at nucleotide 10 988 in exon4 of

收稿日期: 2008-02-16; 修回日期: 2008-02-26

基金项目: 科技部“863”项目(编号:2007AA10Z169), 山东省良种工程项目(编号:2006LZ10-04), 山东省农业科学院高新技术自主创新基金(编号:2007YCX019)项目资助[Supported by “863” Project of the Ministry of Science and Technology(No.2007AA10Z169) and Grants of Well-bred Project from Shandong government(No.2006LZ10-04) and High Technology Independent Innovation Project from Shandong Academy of Agriculture Science (No.2007YCX019)]

作者简介: 鞠志花(1982-), 女, 汉族, 山东日照人, 硕士, 专业: 细胞生物学。E-mail: juzhihua283@163.com

通讯作者: 王长法(1967-), 男, 博士, 研究方向: 遗传育种。Tel: 13153027328, E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn

κ -casein gene. Both alleles (*A* and *B*) of three loci were found in the population that showed low polymorphism. The gene frequencies of *A* and *B* were 86.03% and 13.97% separately. The genotype frequencies of *AA*, *AB*, *BB* were 73.71%, 24.63% and 1.66% respectively. Statistical results of χ^2 test indicated that three polymorphism sites in the population fitted with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Meanwhile, the effect of polymorphism of κ -casein gene on milk production traits was analyzed, the results indicated that in the three loci, the different genotype of κ -casein gene had no significant influence on milk yield and milk protein percent ($P > 0.05$). The cows with genotype *BB* and *AB* showed higher milk fat percent than those with genotypes *AA* ($P < 0.05$); with genotype *AB* showed higher fat protein ratio than those with genotypes *AA* ($P < 0.05$). The polymorphism of the three loci in the experimental population is closely linked. The conclusion is that κ -casein *B* allele can be used as the molecular genetic markers of modifying milk fat percent in Chinese Holsteins.

Keywords : Holstein; κ -casein gene; polymorphism; PCR-RFLP; milk production traits

乳蛋白是牛乳中最重要的功能营养物质, 牛乳中乳蛋白含量的高低也是牛乳质量优劣的最重要的参数。酪蛋白占牛乳中乳蛋白总量的80%, 主要由 α -、 β -、 γ -酪蛋白和 κ -酪蛋白(κ -Casein, 以下简称为 κ -CN)等成分组成^[1]。其中 κ -CN是牛乳腺分泌的一种含有少量磷酸基的磷蛋白之一, 对牛乳中蛋白质合成和酪蛋白微胶粒的稳定起着重要作用, 在奶酪制作中也有重要意义, 在牛乳中含量约占总酪蛋白的12%, 是凝乳酶的天然底物^[2, 3]。由于 κ -CN编码基因在不同种动物间、甚至同种动物的不同个体间存在不同程度的变异等原因, κ -CN表现出多态现象。应用碱性尿素-PAGE、SDS-PAGE、高效液相色谱(HPLC)和快速蛋白液相色谱(FPLC)等技术, 可对各种乳蛋白的遗传变异体进行分离。结合产奶牛的生产性状, 可初步确定牛的遗传性能。然而, 乳蛋白水平的研究受性别、年龄和泌乳季节等因素的影响, 限制了其在动物育种中的应用^[4]。

近年来随着分子生物学技术的发展, 发现牛 κ -CN基因位于6号染色体上, 共有5个外显子和4个内含子。Stewart等(1984)^[5]、Corodetsky和Kaledin(1987)^[6]先后发现了牛 κ -CN具有*A*、*B*基因, 携带*B*基因的乳牛乳酪产量高且具有凝乳快、凝块硬度适中等特点, 更适合生产乳酪。Van Eenennaam等^[7](1991), Bovenhuis等^[8](1992)研究认为 κ -CN的*B*等位基因对乳蛋白率有显著影响, κ -CN *BB*型表现较其他基因型好。林福玉^[9]等发现, κ -CN *BB*型第一胎产奶量高于*AA*型, 第二胎次及总胎次产奶量低于*AA*型。赵春江^[10]等则认为 κ -CN位点对于产奶量没有影响。罗军^[11]等研究证实 κ -CN *B*基因在乳腺中的表达量多于*A*基因。Hallen^[12]等(2007)研究发现 κ -CN基因的多态性还与牛奶的凝乳时间有关, 携带 κ -CN *B*基因的乳中牛奶的凝乳时间短, κ -CN *BB*基因型牛奶的乳酪产量高于*AB*基因型。随着奶牛重要经济性状功能基因的不断被克隆和定位, 奶牛的育种已开始步入常规育种和分子育种相结合的时代。对于产奶量、乳蛋白、乳脂率等发育后期才能表现的性状, 分子育种技术可打破性别、年龄等条件的限制, 具有明显的优势。

本实验采用PCR-RFLP和DNA测序技术, 系统研究了中国荷斯坦奶牛群体中 κ -CN外显子4基因, 发现存在T10891C、C10927A和G10988A等3处突变, 据此选择了*TaqI*、*HindIII*、*PstI*等3种限制性内切酶检测了其多态性, 确定了其单倍型, 初步分析了不同基因型与产奶性能之间的关系, 旨在寻找中国荷斯坦奶牛与产奶性能有关的分子标记位点, 为标记辅助育种、提高荷斯坦奶牛的产奶性能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样本来源

从参加生产性能测定（Dairy Herd Improvement, DHI）的天津、济南、泰安、东营的7个规模化奶牛场，随机选取544头中国荷斯坦奶牛，颈静脉采集全血(10 mL/头),ACD 抗凝，-20℃保存。牛群的DHI记录由牛场的育种资料库中获得。

1.1.2 主要试剂

Taq DNA聚合酶、dNTP混合物、蛋白酶K、PCR回收试剂盒、Maker DL2000购自上海生工生物工程技术有限公司;*TaqI*、*HindIII*、*PstI*限制性内切酶购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取

用酚-氯仿抽提法从牛血中提取基因组DNA。

1.2.2 引物设计

引物序列为 F1: 5'-CGCTGTGAGAAAGATGAAAGATTC -3', R1: 5'-AGATTCAAGGAGTATACCAATTGTTG -3'。扩增序列从10 512 bp到11 290 bp范围(扩增位置以GenBank上的序列NC_007304为参照)，包括该基因的第4外显子和部分内含子4序列，扩增片段长度为779 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成，灭菌三蒸水溶解至浓度为10 μmol/L, 4℃保存。

1.2.3 PCR扩增

PCR反应体系为: 10×buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺1.8 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 10 μmol/L上、下游引物各0.7 μL, 模板DNA 1.5 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶0.4 μL, 加三蒸水至25 μL。PCR反应条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 58℃复性45 s, 72℃延伸45 s, 35个循环, 最后72℃延伸7 min。PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 目的片段克隆测序

将PCR产物用试剂盒回收，将回收PCR产物与PMD-18T载体连接，蓝白斑筛选出重组子，取阳性克隆送上海生物工程公司测序。共检测9头中国荷斯坦奶牛的κ-CN基因片段。

1.2.5 PCR产物酶切及基因分型

根据测序结果，分别选择*TaqI*、*HindIII*和*PstI*限制性内切酶，酶切PCR产物，反应温度分别为65℃、37℃、37℃。酶切体系如表1所示，酶切产物用2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测, 120 V 30 min, 照像, 统计基因型。

表 1 PCR产物的酶切体系

Table1 Restriction enzyme digesting system for PCR products

酶名称	酶量	酶切缓冲液	牛血清白蛋白	PCR产物	水
Enzyme name	Enzyme volume	10×Buffer	0.1%BSA	PCR product	H ₂ O
<i>TaqI</i> (10 U / μL)	0.8 μL	1.0 μL	1.0 μL	5 μL	2.2 μL
<i>HindIII</i> (10 U / μL)	1.2 μL	1.6 μL	—	7 μL	6.2 μL
<i>PstI</i> (15 U / μL)	1.2 μL	1.6 μL	—	7 μL	6.2 μL

2 结果与分析

2.1 PCR产物检测结果

对所采集的样品进行PCR扩增，产物经琼脂糖凝胶电泳，结果显示，可扩增出稍大于750 bp的条带，与理论预计值（779 bp）相符(图1)。

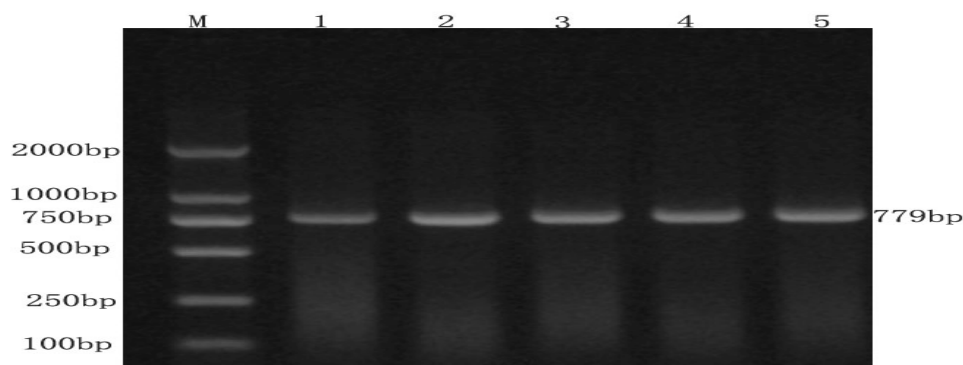


图1 κ -CN基因扩增产物

M为DNA Marker DL2000；1~5为PCR产物。

Fig.1 PCR product of κ -CN gene

M: DNA Marker DL2000；1—5: PCR products.

2.2 测序结果

中国荷斯坦奶牛 κ -CN基因扩增片段测序图（图2）。结果显示，多态性是由该段序列中的3个核苷酸的点突变造成的，第10 891 bp处发生T/C置换突变，导致136位异亮氨酸到苏氨酸的改变。第10 927 bp处发生C/A置换突变，导致148位丙氨酸到天冬氨酸的改变。第10 988 bp处发生G/A置换突变，但仍编码丙氨酸，属于同义突变。

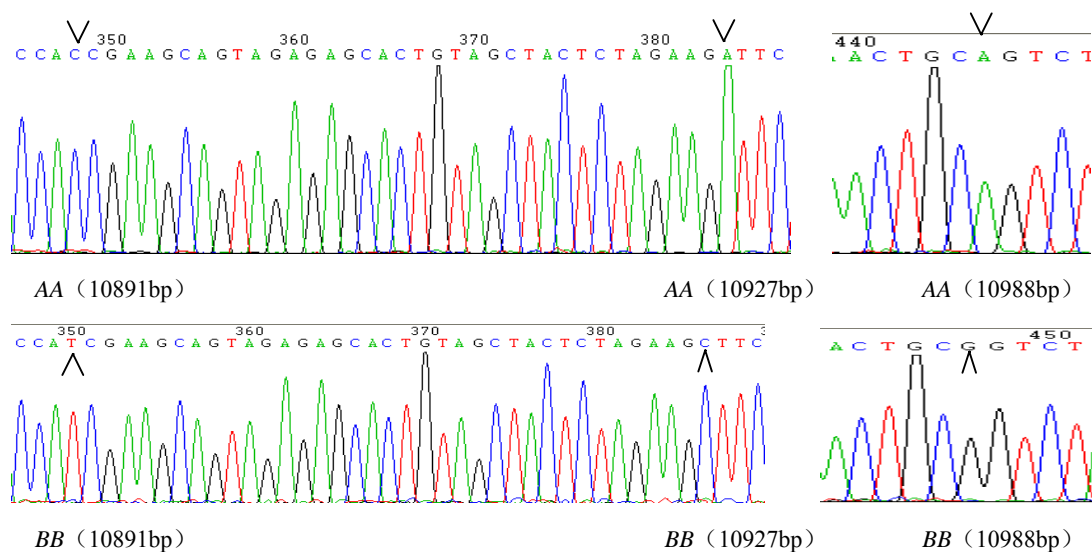


图 2 κ -CN基因SNP序列分析（箭头处表示发生碱基替代的位置）

Fig.2 Sequence analysis on the isolated genotype of κ -CN gene (Arrow denotes substitution)

2.3 酶切检测结果

*TaqI*酶切：A/A得到779 bp的片段；A/B得到779 bp、399 bp、380 bp的片段；B/B得到399 bp、380 bp的片段（图3）。*HindIII*酶切：A/A得到779 bp的片段；A/B得到779 bp、413 bp、366 bp的片段；B/B得到413 bp、366 bp的片段（图4）。*PstI*酶切：A/A得到306 bp、302 bp、171 bp的片段；A/B得到608 bp、306 bp、302 bp、171 bp的片段；B/B得到608 bp、171 bp的片段（图5）。3种酶切的多态性表现为紧密连锁，而且3个多态标记表现为高度的一致。

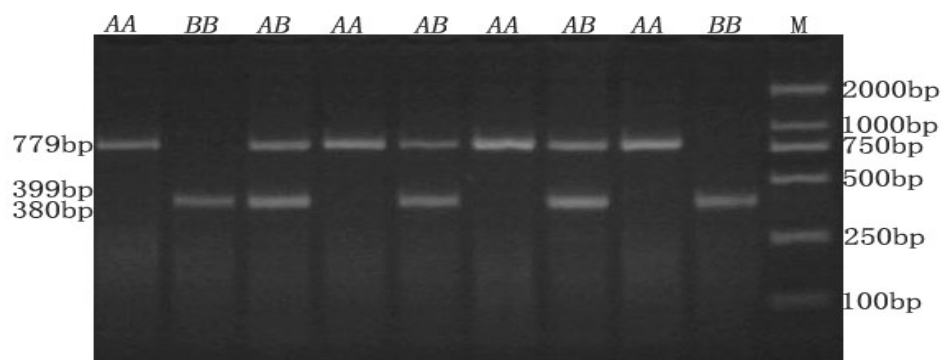


图 3 κ -CN基因的*TaqI*酶切结果

Fig.3 PCR product of κ -CN gene digested by *TaqI*

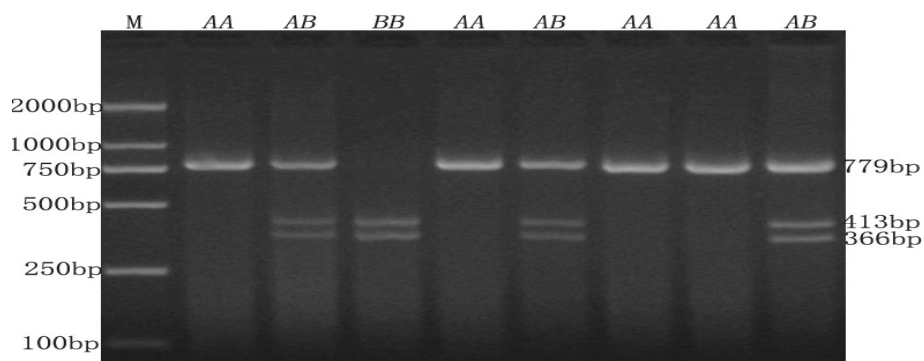


图 4 κ -CN基因的*HindIII*酶切结果

Fig.4 PCR product of κ -CN gene digested by *HindIII*

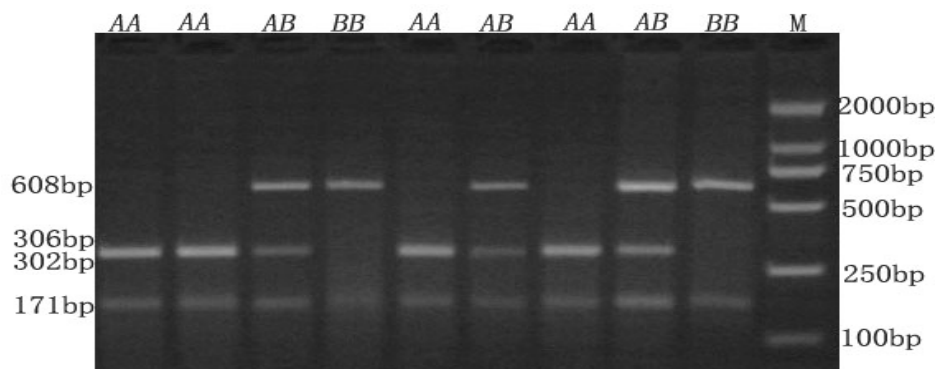


图 5 κ -CN基因的*PstI*酶切结果

Fig.5 PCR product of κ -CN gene digested by *PstI*

2.4 奶牛 κ -CN基因基因型频率、基因频率

3个位点的各种基因型频率及等位基因频率见表2。在检测的544头中国荷斯坦奶牛个体中, 401头为AA 基因型, 134头为AB 基因型, 9头为BB 基因型, A 和B 等位基因的频率分别为86.03% 和13.97% ,AA,AB和BB基因型频率分别为73.71% , 24.63%和1.66%。 κ -CN基因在荷斯坦奶牛群体中的优势基因是A 等位基因; AA 基因型频率最大, BB 基因型频率最小, AB 在两者之间。

表 2 κ -CN基因型和基因频率

Table 2 Genotypic and allelic frequencies of κ -CN gene

位点 Loci	个体数 Number	基因型分布			基因型频率			等位基因频率	
		Genotype distribution			Genotypic frequencies			Allelic frequencies	
		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>TaqI/HindIII</i> /PstI酶切多态 位点	544	401	134	9	0.7371	0.2463	0.0166	0.8603	0.1397

2.5 荷斯坦奶牛 κ -CN基因的3个座位的群体遗传特性

κ -CN基因的3个位点在群体中的杂合度、多态信息含量、有效等位基因数及 χ^2 检验结果见表3。由表3看出，在κ -CN的3个位点上，荷斯坦牛群体的多态信息含量小于0.25，杂合度值很小，说明该群体在这3个基因座位的多态性低，遗传变异小。经过 χ^2 适合性检验，荷斯坦奶牛群体在这3个位点的 χ^2 值为0.3326 ($P>0.05$)，说明该群体在这3个位点的突变已达到Hardy-Weinberg平衡状态。

表 3 基因座位在荷斯坦牛群体中的多态信息含量、杂合度、有效等位基因数及 χ^2 检验

Table3 Data of polymorphism information contents (PIC), heterozygosities (He),effective number of allele(Ne),
 χ^2

位点 Loci	多态信息含量 PIC	杂合度 He	有效等位基因数 Ne	卡方 χ^2
<i>TaqI/HindIII/PstI</i> 酶切				
多态位点				
	0.2115	0.2404	1.3166	0.3326

2.6 κ -CN基因多态性与荷斯坦牛产奶性状的关联分析

表4显示了κ -CN基因不同基因型对中国荷斯坦奶牛产奶性状的影响。可以看出，就乳脂率而言，BB基因型个体的乳脂率显著大于AA基因型个体 ($P<0.01$)，AB基因型个体的乳脂率大于AA基因型个体 ($P<0.05$)，但BB基因型个体与AB基因型个体间差异不显著 ($P>0.05$)。就脂蛋白比而言，AB基因型个体脂蛋白比显著高于AA基因型个体 ($P<0.05$)，表明B基因对中国荷斯坦奶牛乳脂率有显著影响。但各基因型个体间乳蛋白率和产奶量差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 κ -CN基因的多态性

基因的单核苷酸多态性 (SNP) 是第3代遗传标记，具有共显性、不受环境和发育阶段的影响等优点，其在亲权鉴定、疾病诊断、目标性状的选择等方面显示着广阔的应用前景，PCR-RFLP是分析SNP的常用手段^[13]。关于κ -CN基因的PCR-RFLP，在普通牛中研究的相对较多。通常根据κ -CN基因第4外显子序列和部分内含子设计引物，扩增的片段常见的为780 bp和350 bp，国内多研究HindIII和PstI两个位点的酶切多态性,且样本量均少于200头牛^[9,10,14]。本实验中以7个规模化牛场544头中国荷斯坦奶牛作为研究对象，同时研究了TaqI、

表 4 κ -CN基因不同基因型的奶牛产奶性状的最小二乘均值及标准误

Table4 Least squares means and standard errors for milk production traits in cows with different κ -CN genotypes

性状 Traits	基因型 Genotypes		
	AA	AB	BB
乳脂率/% Fat percent	3.599±0.1020 ^a	3.813±0.1107 ^b	4.015±0.2277 ^b
乳蛋白率/% Protein percent	3.223±0.05101	3.271±0.05534	3.352±0.1139
脂蛋白比/% Fat protein ratio	1.172 ±0.03382 ^a	1.228±0.04025 ^b	1.244±0.08423 ^{ab}
产奶量(kg) Milk yield	5439±271.5	5529±296.8	5454±597.4

注:上标字母a和b表示差异显著($P<0.05$)。

Notes: Different letters(a,b) mean significant difference at 0.05 level.

HindIII、*PstI* 3个位点的酶切多态性。κ -CN基因PCR产物经3种酶酶切分别产生A、B两个等位基因, 基因频率分别为86.03% 和13.97%, AA型占大多数, BB型个体很少, 这与赵春江等^[10]的研究结果较为一致。但也存在一定的差异, 例如本研究中的AA个体数及优势基因A 频率偏高, 这可能与地域上的差异以及与种公牛的不同来源有关。

本研究中还发现中国荷斯坦奶牛 κ -CN基因exon4的这3个SNP位点多态标记表现高度的一致, 并且3种多态共同存在于一个仅779 bp的片段内, 因而我们推测此3种酶切的多态标记是紧密连锁的。至于在其他荷斯坦牛群体或其他品种牛中是否也有此结论, 尚需做进一步的深入研究。

3.2 κ -CN基因的多态性与产奶性状的关系

目前, 对荷斯坦奶牛 κ -CN 基因多态性与产奶性状之间关系的研究报道较多, 但研究结果不尽一致。我们研究发现在 κ -CN 基因 3 个位点上, BB 和 AB 基因型个体乳脂率显著高于 AA 基因型个体($P<0.05$) ; AB 基因型个体脂蛋白比显著高于 AA 基因型个体($P<0.05$), 表明 B 基因对中国荷斯坦奶牛乳脂率有显著影响。我们的研究还发现: 在乳蛋白率比较上, BB>AB>AA 基因型个体; 在产奶量比较上, BB>AA>AB 基因型个体。上述结果显示在我们所研究的中国荷斯坦奶牛群体中, B 等位基因在产奶量、乳蛋白率、乳脂率和脂蛋白比方面均为有利等位基因, 因此推测 κ -CN B 等位基因可能是影响乳成分的主效基因, 或者与影响乳蛋白率的主效基因连锁。即 B 基因可作为改良奶牛产奶性状的分子遗传标记, 就是说具有 B 等位基因的奶牛或种公牛更可能繁殖出相应高乳乳成分的后代, 所产牛奶更适用于做乳酪。将来我们可根据不同的生产目的选择相应的基因型标记进行标记辅助育种。

但我们结果也显示: 不同基因型对产奶量和乳蛋白率没有明显影响, 此与Tsiaras等^[15]的研究结果明显不一致。Tsiaras等的研究表明, 在荷斯坦奶牛上, κ -CN基因AB基因型较AA基因型个体的乳蛋白含量和乳蛋白率高; 对乳脂量和乳脂率没有显著影响。上述结果的不一致, 我们认为可能存在以下一些原因: 一方面经过长期的对产奶量的选择, 使得和产奶量相关的许多连锁基因位点已达到固定, 而经过长期选择仍未固定的位点, 则是与产奶量相关较小的; 其次, 可能存在选择统计模型的不同、样本量差异以及品种的地域差异、进化选择等因素, 影响结果差异。最后, 由于本研究的样本数量还不足够大, 研究 κ -CN基因exon4的多态性与产奶性状的关系只是初步的, 还需要对 κ -CN基因外显子与内含子甚至整个基因进

行深入分析,重点筛选能提高牛奶中乳蛋白率的基因型,扩大样本含量,力求得出更准确的结论。

多态信息含量(PIC)和杂合度(He) 是群体内遗传变异大小的评定指标,数值越高,遗传变异越大。本研究发现,中国荷斯坦奶牛 κ -CN基因第4外显子表现为低度多态,说明群体的遗传变异较小。中国荷斯坦奶牛群在这3个位点的突变处于Hardy-Weinberg平衡状态,说明在该群体中对这3个位点的选择压力还不强,因此通过人工干预,如何及早在中国荷斯坦奶牛群体中扩大B等位基因的频率,组建选育高乳脂率中国荷斯坦奶牛群是亟待解决的问题。

3.3 κ -CN基因的单倍型分析

本研究在中国荷斯坦奶牛的群体中,从不同个体扩增的PCR产物经TaqI酶切后可产生3个大小不同的片段,即779 bp(等位基因TA),380 bp和399 bp(等位基因TB)。经HindIII酶切后可产生3个大小不同的片段,即779 bp(等位基因HA),413 bp和366 bp(等位基因HB)。经PstI酶切后可产生4个大小不同的片段,即171 bp、302 bp和306 bp(等位基因PA)或608 bp和171 bp(等位基因PB)。参照樊宝良等方法^[16],在无其他因素的影响时理论上可出现8种单倍体型,即TAHAPA、TAHAPB、TAHBPA、TAHBPB、TBHAPA、TBHAPB、TBHBPA、TBHBPB,但实际在我们所研究的群体中只发现了两种单倍体型TAHAPA和TBHBPB。为何其他单倍体型未被发现,究其原因,或许是与携带未被发现的几种单倍体型的个体很难适应环境而无法存活有关。

参考文献(References):

- [1] QIN Yi-De,ZOU Si-Xiang.Main proteins in milk and its research advances.*Journal of Biology*, 2003,20(2):5-7.
秦宜德,邹思湘.乳蛋白的主要组分及其研究现状.生物学杂志, 2003,20(2):5-7.
- [2] Malik S, Sidhu NS, Kumar S, Rani R.Kappa—casein alleles in Zebu and cross-bred(1/2 Friesian,1/4 Jersey,1/4 Hariana) cattle from India using polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP).*Biomolecular Engineering*,1997,14:61-63.
- [3] Lara MAC,Gama LT,Bufarah G,Sereno JRB,Celegato EML,Abreu UP.Genetic polymorphisms at the k-casein locus in Pantaneiro cattle.*Arch Zootec*,2002,51(193):99-105.
- [4] LIU Wen-Jing,ZHENG Yu-Cai,ZHONG Guang-Hui.Research on k-casein: A review.*Journal of Southwest Nationalities College*,2001,27(1):96-98.
刘文静,郑玉才,钟光辉. κ -酪蛋白研究进展.西南民族学院学报,2001,27(1):96-98.
- [5] Stewart AF, Willis IM, Mackinlay AG.Nucleotide sequences of bovine alpha S1- and kappa-casein cDNAs.*Nucleic Acids Res*,1984,12(9):3895-3907.
- [6] Gorodetskii SI, Kaledin AS. Nucleotide sequence of the cDNA of kappa casein in cows.*Genetika*, 1987,23(4):596-604.
- [7] Van EenennamAL,Medrano JF.Milk Protein Polymorphisms in California dairy cattle.*J Dairy Sci*,1991,74:1730-1742.
- [8] Bovenhuis H.Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits.*J Dairy Sci*,1992,75:2549-2559.
- [9] LIN Fu-Yu,LI Ning,CHEN Yong-Fu.Analysis of relationship between genotype of bovine k-casein and milk yield.*Chinese Journal of Animal Science*,1999,35(1):8-9.
林福玉,李宁,陈永福.中国荷斯坦牛k-酪蛋白基因多态性与产奶量的相关分析.中国畜牧杂志,1999, 35(1): 8-9.
- [10] ZHAO Chun-Jiang,ZHANG Yuan,LI Ning.Research on the relationship between molecular genetic polymorphism milk protein and dairy traits in Chinese Holsteins.*Journal of Yellow Cattle Science* , 1999,25(1):13-16.

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的研究.黄牛杂志,1999,25(1):13-16.

- [11] LUO Jun, QIU Huai, WANG Shuang-He. Study on the characteristics of allelic expression at milk protein loci of dairy cattle. *Hereditas(Beijing)*, 1996, 18(3): 12-14.

罗军,邱怀,王双合.乳蛋白位点等位基因表达特点的研究.遗传,1996,18(3):12-14.

- [12] Hallen E, Allmere T, Naslund J, Andren A, Lunden A. Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. *International Dairy Journal*, 2007, 17: 791 - 799.

- [13] ZENG Yan-Ru, HUANG Min-Ren, WANG Ming-Xiu. Single nucleotide polymorphisms, a new molecular marker. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition)*, 2003, 27(3): 84-88.

曾燕如,黄敏仁,王明麻.一种新的分子标记-单核苷酸多态(SNP).南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(3): 84-88.

- [14] MA Xiao-Lan, WANG Xiao-Long, HU Guo-Shun, MA Guo-Long, ZHAO Jian, PENG Chun-Yan, CHANG Guo-Bin. Analysis of genetic polymorphisms at K-CN exon 4 and exon 5 in Southern Chinese Holstein Cattle. *China Dairy Cattle*, 2007(2): 5-8.

马晓兰,王小龙,胡国顺,马国龙,赵荐,彭春燕,常国斌.中国南方荷斯坦奶牛K—CN基因第四、第五外显子的多态性研究.中国奶牛,2007(2):5-8.

- [15] Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscors CM. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of holstein cows. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 327-334.

- [16] FAN Bao-Liang, LI Ning, HU Xiao-Xiang, WU Chang-Xin. Yak Kappa-casein gene exon4 cloning sequencing and polymorphism research. *Progress in Natural Science*, 2000, 10(9): 853-857.

樊宝良,李宁,胡晓湘,吴常信.牦牛kappa—酪蛋白基因第四外显子的克隆测序及多态性研究.自然科学进展,2000,10(9):853-857.