

仿刺参 *cytb* 和 β -*actin* 基因表达稳定性比较

杨爱馥, 周遵春, 董颖, 姜北, 汪笑宇,
陈仲, 关晓燕, 王摆, 孙大鹏

(辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:基因表达分析需要采用内参基因来校正目的基因的表达量。采用半定量 RT-PCR 的方法分析了 *cytb* 和 β -*actin* 基因在仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 未受精卵、受精卵、多细胞期、囊胚期、原肠期、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体、五触手幼体、稚参 11 个发育阶段和幼参的体壁、体腔细胞、肠道和呼吸树中的表达情况。结果表明:*cytb* 在不同发育阶段和不同组织中稳定表达; β -*actin* 基因在稚参之前不同发育阶段中表达水平有显著差异,在幼参的体壁、肠道和呼吸树中稳定表达。此外,*cytb* 在 lipopolysaccharides (LPS) 刺激前后的原肠胚、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体、稚参和幼参四种组织中表达量无显著差异; β -*actin* 基因在 LPS 刺激前后的幼参体腔细胞、肠道和呼吸树中表达量无显著差异。本研究为仿刺参功能基因表达分析中,*cytb* 与 β -*actin* 基因作为内参基因的可行性提供了依据。

关键词:仿刺参;*cytb* 基因; β -*actin* 基因;LPS 刺激;内参基因

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.01.14

中图分类号:S917

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2010)01-0079-06

Stability Comparison of *cytb* and β -*actin* Genes Expression in Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*)

YANG Ai-fu, ZHOU Zun-chun, DONG Ying, JIANG Bei, WANG Xiao-yu,
CHEN Zhong, GUAN Xiao-yan, WANG Bai, SUN Da-peng

(Liaoning Key Lab of Marine Fishery Molecular Biology,

Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China)

Abstract: Analysis of gene expression commonly uses internal control gene for normalization. The mRNA levels for *cytb* and β -*actin* genes were detected by using RT-PCR at 11 larval development stages of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) including unfertilized egg, fertilized egg, cellulous stages, blastula, gastrula, early auricularia, auricularia, late auricularia, doliolaria, pentactula, juvenile and in different tissues of young sea cucumbers including body walls, coelomocytes, intestines and respiratory trees. The results showed that *cytb* gene expression was stable at all development stages and in the four tissues. The mRNA levels for β -*actin* gene showed significant differences at different development stages, but were stable in the tissues of body walls, intestines and respiratory trees. Moreover, *cytb* mRNA showed no significant changes in expression after a LPS challenge at the stages of gastrula, early auricularia, auricularia, late auricularia, doliolaria and juvenile or in the four tissues of young sea cucumbers. The expression of β -*actin* gene was also stable in the tissues of coelomocytes, intestines and respiratory trees after a LPS challenge. This study provides information for the selection of *cytb* gene and β -*actin* gene as suitable internal control gene in target genes expressions research of sea cucumber.

Key words: sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); *cytb* gene; β -*actin* gene; LPS challenge; internal control gene

分布于我国北方沿海的仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 是我国现有海参中最主要的经济种类, 不仅营养价值高, 而且药用价值广泛。目前, 有关仿刺参分子生物学领域的研究已受到诸多学者的

收稿日期:2009-11-10; 修回日期:2009-12-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30972272); 国家 863 计划项目(2006AA10A411); 国家海洋公益性行业科研专项(200705007); 辽宁省科技计划项目(2008203002)资助。

作者简介:杨爱馥, 博士, 研究方向为海洋生物技术。E-mail: yangaifu@yahoo.com.cn。通讯作者:周遵春, 研究员, 博士, 研究方向为海洋生物技术。Tel:0411-84691884; E-mail: zunchunz@hotmail.com

重视。基因表达分析对于了解基因表达方式、揭示基因功能、阐明基因在生物体发育过程中的调控机制起着至关重要的作用。基因表达分析方法主要包括 RT-PCR、Northern blot 和 real-time PCR, 这些方法均需要采用内参基因来确定目的基因的相对表达量。

最广泛使用的内参基因有:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)基因、 β -肌动蛋白(*β -actin*)基因和核糖体 18S rRNA 基因。此外,细胞色素 b(*cytochrome b*, *cytb*)基因也被用作海参基因表达研究中的内参基因^[1,2]。在藻类研究中,*cytb* 基因在不同生长条件和不同生长阶段表达稳定,因此也常被用作内参基因^[3-6]。本文采用半定量 RT-PCR 方法,分析了 *cytb* 和 *β -actin* 基因在仿刺参不同发育阶段、不同组织及 LPS 刺激条件下的表达情况,探讨其作为内参基因的可行性,为仿刺参功能基因的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用健康仿刺参(*Apostichopus japonicus*)种参和幼参捕获于大连广鹿岛海域,于人工育苗池常规条件下饲养。

1.2 方法

1.2.1 仿刺参产卵、授精和幼体培养 采用温差法刺激种参产卵,有产卵、排精迹象的种参(平均体重 336.0 g)分别置于不同产卵箱内,按比例将精子、卵子混合进行人工授精。将受精卵移入培育池进行孵化,幼体按常规条件培养。不同发育时期的胚胎和幼体,包括未受精卵、受精卵、多细胞期、囊胚期、原肠期、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体、五触手幼体和稚参(体长 1 mm 左右),分别用 300 目筛绢收集于 1.5 mL 离心管内,短暂离心去除多余海水,投入液氮中迅速冷冻,于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 LPS 刺激 收集原肠胚、小耳状幼体、中耳状幼体、大耳状幼体、樽型幼体和稚参分别置于 2 L 烧杯中充气培养,处理组加入终浓度为 10 μ g/mL 的 LPS,培养 20 h 后收集到 1.5 mL 离心管内,投入液氮中迅速冷冻,于 -80℃ 冰箱保存备用。

健康仿刺参幼参(平均体重 10.2 g)饲养于

水族箱内,2 d 之内不投放任何饵料,排空消化道内食物,注射浓度为 1 μ g/ μ L 的 LPS(Sigma)500 μ L,16 h 后第二次注射,对照组注射 500 μ L 过滤(0.22 μ m 滤膜)海水,第二次注射 4 h 后用饱和 $MgSO_4$ 麻醉,过滤海水冲洗后取体壁、体腔细胞、肠道和呼吸树,各种组织分别取 3 个个体的混合样,直接用于 RNA 提取。

1.2.3 总 RNA 提取 用 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒(Sangon)提取仿刺参不同发育阶段和不同组织的总 RNA,电泳检测 RNA 的完整性。用 Implen NanoPhotometer 核酸蛋白分析仪(德国)检测 RNA 的纯度和浓度。

1.2.4 RT-PCR 取每个样品的总 RNA 900 ng 用 PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa)进行反转录。20 μ L 反应体系包括:25 pmol oligo dT primer, 50 pmol random 6 mers, 1 \times PrimeScript™ buffer, 0.5 μ L PrimeScript™ RT enzyme Mix I。反应条件为:37℃,15 min; 85℃,5 s。反应产物 2 倍稀释后于 -80℃ 冰箱保存备用。

通过构建仿刺参 cDNA 文库^[7]获得 *cytb* 和 *β -actin* 基因全序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列分别为: CytS: 5'-TGAGCCG-CAACAGTAATC-3', CytA: 5'-AAGGGAAAAGGA-AGTGAAAG-3', 扩增片段长度为 139 bp; ActS: 5'-TTCCTCAGCTATCCTTG-3', ActA: 5'-CGTAGT-TCAGTTTCTCCTTG -3', 扩增片段长度为 144 bp,引物均由大连 TaKaRa Biotechnology 公司合成。PCR 反应体系(25 μ L)为:1 μ L cDNA 模板,1 U *Taq* polymerase (TaKaRa), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 1 \times PCR buffer, 正、反向引物各 5 pmol。反应条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环(PCR 扩增处于指数增长期); 72℃ 延伸 7 min; 4℃ 终止反应。

1.2.5 数据分析 对每个样品进行 3 次 RT-PCR 扩增,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,用凝胶成像分析系统(UVP BioImaging Systems)扫描、拍照,利用 Lab works 5.0 软件进行分析。并对分析结果进行显著性检验(*t* 检验)。

2 结果与分析

2.1 仿刺参总 RNA 提取

提取完整性好、纯度高的 RNA 是检测基因表

达情况的关键。凝胶电泳显示仿刺参不同发育时期和不同组织的 28S RNA 和 18S RNA 条带清晰,并且 28S 条带的亮度大于 18S(图 1),说明 RNA 的完整性好。核酸蛋白分析仪检测 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的比值均在 2.0 左右,说明 RNA 的纯度高。

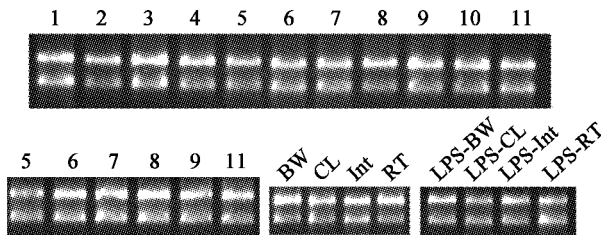


图 1 仿刺参不同发育时期和不同组织总 RNA 检测

Fig. 1 Total RNA of different development stages and different tissues.

1: 未受精卵; 2: 受精卵; 3: 多细胞期; 4: 囊胚期; 5: 原肠期; 6: 小耳状幼体; 7: 中耳状幼体; 8: 大耳状幼体; 9: 樽型幼体; 10: 五触手幼体; 11: 稚参; BW: 体壁; CL: 体腔液细胞; Int: 肠道; RT: 呼吸树

1: Unfertilized egg; 2: Fertilized egg; 3: Cellulose stages; 4: Blastula; 5: Gastrula; 6: Early auricularia; 7: Auricularia; 8: Late auricularia; 9: Doliolaria; 10: Pentactula; 11: Juvenile; BW: Body wall; CL: Coelomocyte; Int: Intestine; RT: Respiratory tree

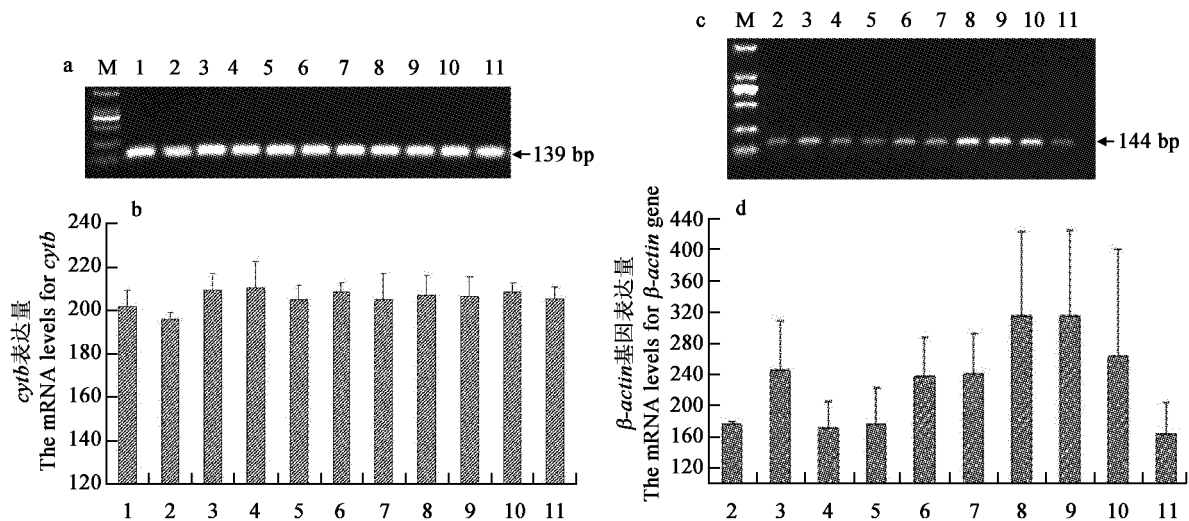


图 2 仿刺参不同发育时期 *cytb* 和 β -*actin* 基因的表达情况

Fig. 2 The mRNA levels for *cytb* and β -*actin* gene at different development stages of sea cucumber.

a. *cytb* 基因 PCR 产物电泳结果; b. *cytb* 的表达量; c. β -*actin* 基因 PCR 产物电泳结果; d. β -*actin* 的表达量

1: 未受精卵; 2: 受精卵; 3: 多细胞期; 4: 囊胚期; 5: 原肠期; 6: 小耳状幼体; 7: 中耳状幼体; 8: 大耳状幼体; 9: 樽型幼体; 10: 五触手幼体; 11: 稚参

a. Agarose gels electrophoresis of *cytb* gene PCR products; b. The mRNA levels for *cytb*; c. Agarose gels electrophoresis of β -*actin* gene PCR products; d. The mRNA levels for β -*actin*.

1: Unfertilized egg; 2: Fertilized egg; 3: Cellulose stages; 4: Blastula; 5: Gastrula; 6: Early auricularia; 7: Auricularia; 8: Late auricularia; 9: Doliolaria; 10: Pentactula; 11: Juvenile

2.2 仿刺参不同发育时期和不同组织中 *cytb* 和 β -*actin* 基因表达情况

cytb 在仿刺参未受精卵到稚参 11 个发育阶段和幼参的体壁、体腔液细胞、肠道和呼吸树 4 种组织中的表达情况如图 2a、图 3a 所示,以各发育时期和不同组织的 cDNA 为模板,以 CytS/CytA 为引物,均扩增出 139 bp 特异条带,说明 *cytb* 在仿刺参幼体各个发育阶段和幼参不同组织中均有表达。通过图像分析处理系统对电泳结果进行扫描分析,计算 *cytb* 在仿刺参各个发育阶段和不同组织中的表达量,*t* 检验结果表明 *cytb* 在仿刺参各个发育阶段和不同组织中的表达量无显著差别 ($P > 0.05$) (图 2b、图 3b)。

相同的方法分析了 β -*actin* 基因在仿刺参受精卵到稚参 10 个发育阶段和 4 种组织中的表达情况,电泳结果显示 β -*actin* 基因在仿刺参幼体各个发育阶段和幼参不同组织中均有表达(图 2c、图 3c)。*t* 检验结果表明 β -*actin* 基因在仿刺参幼体的各个发育阶段的表达不稳定,表达量差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2d),在幼参体壁、肠道和呼吸树中的表达量无显著差别 ($P > 0.05$) (图 3d)。

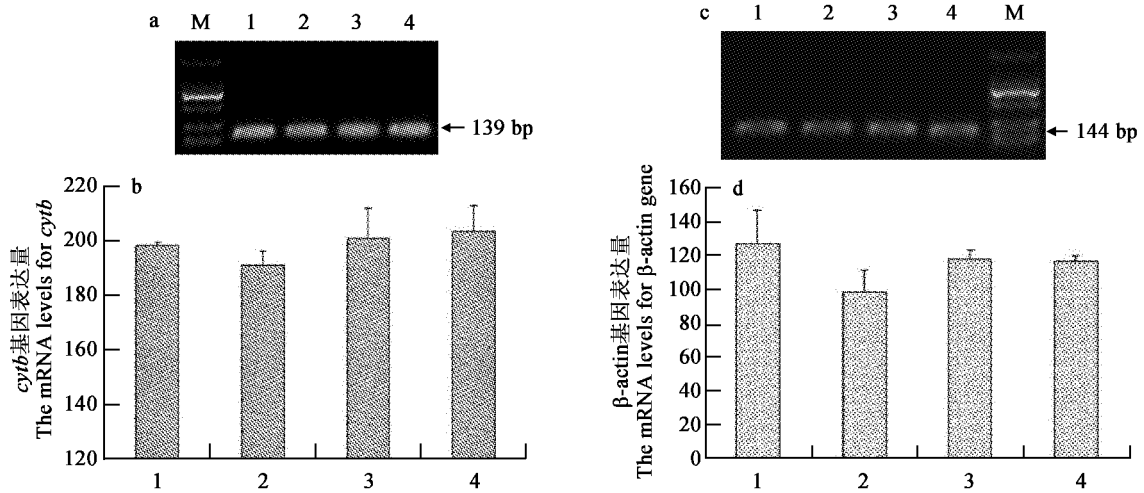


图3 仿刺参不同组织中 *cytb* 和 β -*actin* 基因的表达情况

Fig. 3 The mRNA levels for *cytb* and β -*actin* gene in different tissues of sea cucumber.

a. *cytb* 基因 PCR 产物电泳结果; b. *cytb* 的表达量; c. β -*actin* 基因 PCR 产物电泳结果; d. β -*actin* 的表达量

1: 体壁; 2: 体腔液细胞; 3: 肠道; 4: 呼吸树

a. Agarose gels electrophoresis of *cytb* gene PCR products; b. The mRNA levels for *cytb*; c. Agarose gels electrophoresis of β -*actin* gene PCR products; d. The mRNA levels for β -*actin*.

1: Body wall (BW); 2: Coelomocyte (CL); 3: Intestine (Int); 4: Respiratory tree (RT)

2.3 LPS 刺激后 *cytb* 和 β -*actin* 基因表达情况

对 LPS 刺激后 *cytb* 在仿刺参不同发育阶段和不同组织中的表达情况进行分析。t 检验结果表明 *cytb* 的表达不受 LPS 刺激的影响, 不同发育时期和不同组织中的 *cytb* 在 LPS 刺激前后表达量无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4、图 5a)。 β -*actin* 基因在 LPS 刺激前后的体腔液细胞、肠道和呼吸树中的表达量无显著差异 ($P > 0.05$) (图 5b)。

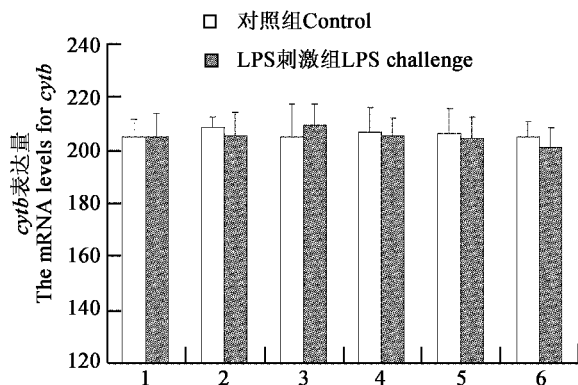


图4 LPS 刺激后 *cytb* 在不同发育时期的表达情况
Fig. 4 The mRNA levels for *cytb* in different development stages after a LPS challenge.

1: 原肠期; 2: 小耳状幼体; 3: 中耳状幼体; 4: 大耳状幼体; 5: 樽型幼体; 6: 稚参

1: Gastrula; 2: Early auricularia; 3: Auricularia; 4: Late auricularia; 5: Doliolaria; 6: Juvenile

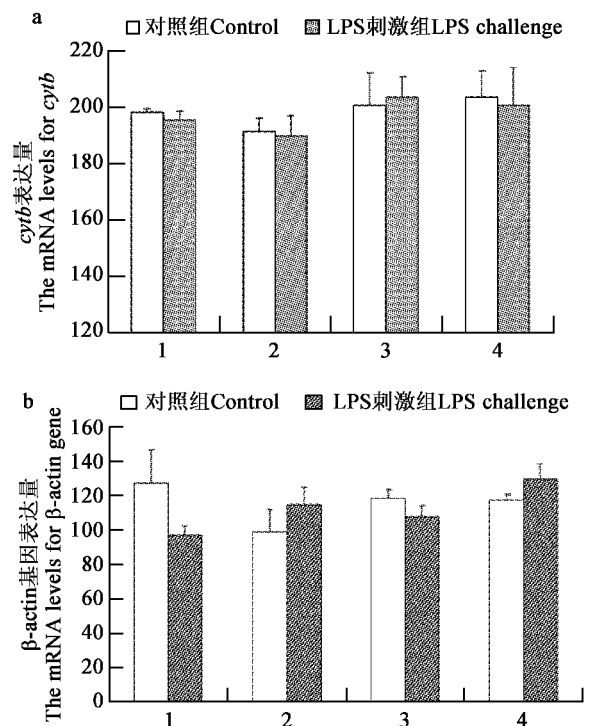


图5 LPS 刺激后 *cytb* (a) 和 β -*actin* 基因 (b) 在不同组织中的表达情况

Fig. 5 The mRNA levels for *cytb* (a) and β -*actin* gene (b) in different tissues after a LPS challenge.

1: 体壁; 2: 体腔液细胞; 3: 肠道; 4: 呼吸树

1: Body wall (BW); 2: Coelomocyte (CL); 3: Intestine (Int); 4: Respiratory tree (RT)

3 讨论

半定量 RT-PCR 具有操作简单、快速、特异性强、灵敏度高、成本低等优点,而且采用多重 RT-PCR 技术还可以同时分析几个基因的表达情况。通常认为半定量 RT-PCR 过程中的反转录效率是恒定的,在 PCR 扩增产物的指数增长期,若各实验组在相同循环数下,扩增效率相同,则扩增后的目的基因拷贝数与内参基因拷贝数的比值直接反映了它们起始拷贝数的比值^[8]。本研究通过预实验确定所扩增模板的 *cytb* 和 β -*actin* 基因在 30 个循环均处于指数增长期,所得结果能反应出在 LPS 刺激前后的仿刺参不同发育时期和组织中两个基因表达量的相对变化。

理想的内参基因应该稳定表达于不同类型的细胞和组织中,表达量无显著差别,且表达水平不受任何试验处理措施的影响。但近年来的一些研究表明,最常用的管家基因 *GAPDH* 和 β -*actin* 基因的表达水平并不稳定,利用它们作为内参基因来定量并不准确^[9~11]。我们分析了 β -*actin* 基因在仿刺参稚参期之前的 10 个发育阶段和幼参的体壁、体腔细胞、肠道和呼吸树 4 种组织中的表达情况,发现 β -*actin* 基因在从受精卵到稚参期的一些发育阶段中的表达水平有显著差异。相关研究也表明 β -*actin* 基因在棘皮动物海胆的未受精卵到长腕幼体 17 个发育阶段中的表达水平也有显著差异^[12]。此外, β -*actin* 基因在仿刺参体壁、肠道和呼吸树中的表达水平基本一致,在 LPS 刺激前后的体腔细胞、肠道和呼吸树中表达量无显著差异,这些结果表明 β -*actin* 基因可作为内参分析某种组织免疫刺激后目的基因的表达情况。

Cyt b 是线粒体自身编码的功能蛋白之一。在线粒体 DNA(mtDNA)的 13 个蛋白质编码基因中,*cytb* 的结构功能最为清楚^[13,14]。*cytb* 所提供的系统发育信息和遗传分化水平适用于分析种间或属间差异,被认为是解决分类及系统进化问题最可信的分子标记之一^[15]。

Ramírez-Gómez 等^[1]报道 *cytb* 在 LPS 刺激前后的海参(*Holothuria glaberrima*)体腔细胞中表达稳定,可作为 RT-PCR 的内参基因研究免疫基因的表达情况。Rojas-Cartagena 等^[2]报道 *cytb* 在海参(*Holothuria glaberrima*)肠再生过程中稳定表

达,可作为内参基因研究海参肠再生相关基因的表达情况。赵丽媛等^[4]采用实时荧光定量 RT-PCR 方法证明 *cytb* 在东海原甲藻整个培养周期中稳定表达。本文研究结果初步表明 *cytb* 在仿刺参不同发育时期和不同组织中及 LPS 刺激前后表达稳定,可作为内参基因用于该物种的分子生物学和生理生态学研究。*Cytb* 位于线粒体内膜磷脂双层中,其转录和翻译均在线粒体中进行,并参与氧化磷酸化合成 ATP 过程电子传递链过程^[14]。而在仿刺参的不同发育阶段或肠再生过程中,应该有足够的 ATP 合成以保证细胞正常的新陈代谢等活动,这可能是 *cytb* 在不同发育阶段、不同组织或肠再生过程中表达相对稳定的主要原因。

在进行仿刺参某种组织中功能基因定量分析的研究中,可根据研究的发育期及组织的不同,选择 *cytb* 或 β -*actin* 做内参基因,也可同时选择 *cytb* 和 β -*actin* 基因作为内参,使基因表达的相对定量更加准确。

参 考 文 献

- [1] Ramírez-Gómez F, Ortiz-Pineda P A, Rojas-Cartagena C, et al. Immune-related genes associated with intestinal tissue in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. Immunogenetics, 2008, 60(1): 57-71.
- [2] Rojas-Cartagena C, Ortiz-Pineda P, Ramírez-Gómez F, et al. Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. Physiol. Genomics, 2007, 31(2): 203-215.
- [3] Lin S, Zhang H. Mitogen-activated protein kinase in *Pfisteria piscicida* and its growth rate-related expression [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(1): 343-349.
- [4] 赵丽媛,于志刚,甄毓,等.东海原甲藻线粒体细胞色素 b (*Cytb*) 基因的定量检测[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(3): 448-452.
- [5] 何闪英,于志刚,米铁柱.增殖细胞核抗原基因表达量与中肋骨条藻生长的关系[J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 111-120.
- [6] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time quantitative RT-PCR [J]. J. Biochem. Biophys. Methods, 2000, 46(1-2): 69-81.
- [7] Yang A F, Zhou Z C, He C B, et al. Analysis of expressed sequence tags from body wall, intestine and respiratory tree of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Aquaculture, 2009, 296(3-4): 193-199.
- [8] Halford W P. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR [J]. Nat. Biotechnol., 1999, 17(9): 835.
- [9] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as

- internal standards; use and limits[J]. *J. Biotechnol.*, 1999, 75(2-3):291-295.
- [10] Goidin D, Mamessier A, Staquet M I, *et al.*. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations[J]. *Anal. Biochem.*, 2001, 295(1):17-21.
- [11] 杨桂梅, 鲍宝龙, 任大明. 3-磷酸甘油醛脱氢酶、 β -肌动蛋白和 18S rRNA 作为相对定量的内标在牙鲆发育阶段的稳定性比较[J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14(1):84-88.
- [12] Shah M, Brown K M, Smith L C. The gene encoding the sea urchin complement protein, SpC3, is expressed in embryos and can be upregulated by bacteria[J]. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27(6-7):529-538.
- [13] Irwin D M, Koehler T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals[J]. *J. Mol. Evol.*, 1991, 32(2):128-144.
- [14] Schoepp B, Breton J, Parot P, *et al.*. Relative orientation of the hemes of the cytochrome bc(1) complexes from *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, and beef heart mitochondria; a linear dichroism study[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(8):5284-5290.
- [15] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates[J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1996, 13(7):933-942.

【863 课题介绍】

课题名称:蛋白质基可食性生物聚合膜智能结构的研究

课题编号:2008AA10Z308

课题内容、目标:

以蛋白质为基质,采用纳米技术,添加具有形状记忆功能的聚合物、对蛋白质进行改性和交联,并添加适当的辅助剂,经不同的工艺制备成膜。从研究蛋白膜的微观结构出发,揭示所添加的纳米级微粒和辅助剂对所成蛋白膜微观结构及智能性质的影响规律,以及蛋白膜对环

境刺激的响应规律,设计和研究具有选择透气性和温敏型形状记忆性的智能型蛋白膜。

课题进展:

目前已完成添加纳米颗粒可食膜的选择透气性研究和具有形状记忆可食膜的制备及性能测定工作。课题按计划进行,进展顺利。

【863 课题介绍】

课题名称:奶牛高乳蛋白性状多基因聚合育种研究

课题编号:2007AA10Z169

课题目标、内容:

通过分子育种与常规育种相结合的方式,运用分子生物学技术产奶性状候选基因单核苷酸多态性,并对各基因进行单倍型分析,再与奶牛的产奶性状包括乳蛋白含量及浓度进行相关分析,进而筛选出高乳蛋白的优良基因组合,建立奶牛高乳蛋白多基因聚合辅助育种技术体系。

开发出 3~5 个具有自主知识产权的 SNP 分子标记。建立奶牛高乳蛋白多基因聚合技术平台。组建含有上述优良基因组合,且乳蛋白率 >3.4%、产奶量 >8 000 kg 的高产高乳蛋白奶牛核心群 200 头。筛选出具有高乳蛋白遗传性状的后备公牛 30~50 头,并通过后裔测定,培育出高乳蛋白的验证公牛 6 头。

课题进展:

研究了与奶牛高乳蛋白性状相关的候选基因 7 个,共发现 45 个 SNPs,其中新 SNPs 26 个。统计分析发现,显著影响乳蛋白性状的 SNPs 为 5 个,显著影响产奶量性状的 SNPs 为 4 个,显著影响乳脂性状的 SNPs 为 6 个。分别构建了 κ -CN、Src、GHR、STAT4 基因多个位点的单倍型,发现了对乳蛋白有显著影响的单倍型 6 个。组建了佳宝、元荣奶牛场两个种子母牛群。在良种核心母牛群中筛选出高乳蛋白奶牛 122 头作为种子母牛。2009 年上半年推荐 9 头后备公牛参加全国后裔测定,已发放冻精 3 589 剂,已配妊 400 头。已有女儿的公牛 40 头,参加 DHI 测定女儿数 1 256 头,已对女儿牛进行遗传标记检测,平均每头公牛女儿数 31.4 头。得到 10 头后测公牛。