



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101971023 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200980108734.9

(22) 申请日 2009.03.04

(30) 优先权数据

2008-100138 2008.04.08 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/054045 2009.03.04

(87) PCT申请的公布数据

W02009/125637 JA 2009.10.15

(71) 申请人 学校法人近畿大学

地址 日本大阪府

申请人 独立行政法人科学技术振兴机构

(72) 发明人 松本和也 森本康一 池上春香

永井宏平

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

72003

代理人 菅兴成 吴小琪

(51) Int. Cl.

G01N 33/48(2006.01)

G07K 16/18(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

G01N 33/12(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 序列表 3 页

附图 2 页

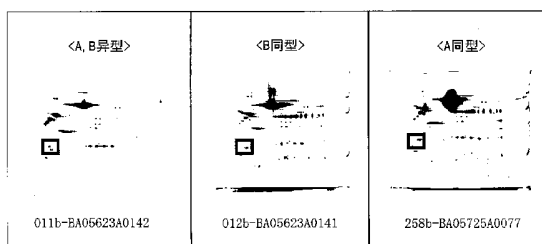
(54) 发明名称

牛的辨别方法、所辨别的牛和辨别牛用试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种通过蛋白组学分析对参与肉牛的经济性状的蛋白质进行鉴定,并将这些蛋白质作为生物标记来对具备有用经济性状的牛个体进行辨别的牛个体的辨别方法和所使用的牛个体辨别用试剂盒。本发明牛个体的辨别方法,包括:

(1) 采集牛的体组织的采集工序;(2) 从所采集的体组织提取全蛋白质的提取工序;(3) 检测所提取的全蛋白质中所含的膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质的检测工序;以及 (4) 基于所检测的膜联蛋白 A5 的种类,对牛的平均分割胴体重量是否变大进行辨别的辨别工序。此外,在膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、其同工型以及它们的修饰蛋白质的检测中,利用了双向电泳和抗原抗体反应。



1. 一种牛的辨别方法,包括:

(1) 采集牛的体组织的采集工序;

(2) 从所采集的体组织提取全蛋白质的提取工序;

(3) 检测所提取的全蛋白质中所含的膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质的检测工序;以及

(4) 根据在检测工序中仅检测出膜联蛋白 A5 蛋白质的野生型蛋白质、其同工型以及来自它们的修饰蛋白质中的任一者,或者检测出 A5 蛋白质的野生型蛋白质、其同工型以及来自它们的修饰蛋白质中的两者,来对采集了体组织的牛的平均分割胴体重量是否变大进行辨别的辨别工序。

2. 如权利要求 1 所述的牛的辨别方法,其中,在检测工序中,通过电泳来检测膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质。

3. 如权利要求 1 所述的牛的辨别方法,其中,在检测工序中,通过抗原抗体反应来检测膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质。

4. 一种牛,其是通过权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的牛的辨别方法所辨别的牛。

5. 一种牛,其是权利要求 4 所述的牛的后代、克隆牛。

6. 一种牛的分割胴体,其是权利要求 4 或 5 所述的牛的分割胴体。

7. 一种辨别牛用试剂盒,包含:

与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质及其修饰蛋白质中的任一种进行特异性结合的抗体,以及

与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型及其修饰蛋白质中的任一种进行特异性结合的抗体。

牛的辨别方法、所辨别的牛和辨别牛用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及对分割胴体重量 (Carcass weight) 等经济性状优良的牛进行辨别的牛的辨别方法、所辨别的牛和用于该方法的辨别牛用试剂盒。

背景技术

[0002] 目前,对于肉牛、特别是作为日本特有的专门肉食种类的黑毛和种牛的育种改良,是基于统计遗传学的育种改良方法来进行的,所述统计遗传学育种改良方法,是以基于迄今为止所积累的表现型信息和血统信息的统计遗传学分析为平台,针对牛的遗传能力进行推测的方法。并且,所述育种改良方法的确立,对黑毛和种的遗传能力的提高有极大的贡献。

[0003] 但是,该统计遗传学的育种改良方法,是针对肉牛群体所具有的优良基因型为后代群体所继承的概率 (probability :p 值) 进行推测的方法,并不能掌握各个肉牛所具有的脂肪混杂肉质、分割胴体重量、里脊肉面积 (rib-eyearea)、五花肉厚度等与经济性状相关的遗传性信息。

[0004] 此外,经济性状不仅受遗传因素的影响,多数情况下还受环境的影响,因此,根据遗传因素难以严格地选拔优良的个体。进而,基于统计遗传学方法的育种改良方法,必须经过牛的交配、催肥等过程,因此,育种耗费极大的成本和时间。

[0005] 因此,从 20 世纪 80 年代后半期开始,采用利用基因的育种方法,具体而言,进行数量性状基因座 (QTL) 分析,所述数量性状基因座 (QTL) 分析是明确参与肉牛的经济性状等数量性状的基因数以及它们在连锁图上的位置。人们期待该分析方法在鉴定与肉牛经济性状有关的责任基因 (responsible gene, 责任遗传子) 方面带来划时代的成果,并着眼于利用牛 DNA 标记的育种方法的开发推进其研究 (参照非专利文献 1 和 2)。

[0006] 但是,迄今为止,该方法虽然有助于 claudin-16 缺乏症 (クローデイン 16 欠損症) 等恶性遗传病的病因基因 (原因遗传子) 的鉴定方法,但尚没有达到确立对参与经济性状的责任基因进行鉴定、并利用所述基因的肉牛育种改良方法的程度。

[0007] 此外,最近,在经济性状的表现型中,不仅涉及责任基因,而且对其它基因的表达进行调节的基因、DNA 的甲基化等的表观遗传修饰也参与在其中,因此,在进行分析时,也必须考虑到这方面。进而,对于 QTL 分析而言,难以选择适宜的交配亲本,必须经过品系选育的过程,因此,育种与统计遗传学方法相同地,需要耗费极大的成本和时间。

[0008] 另一方面,目前的生命科学整体的研究潮流,关注点集中在基因组研究的下一个阶段的研究 (后基因组研究) 上,具体而言,集中在利用转录组学分析、蛋白组学分析、代谢组分析等分析方法的研究中,其中,针对网罗性 / 系统性地分析蛋白质功能及其关联性的蛋白组学分析令人瞩目,其研究开发得到推进。

[0009] 作为该理由,可以举出:作为基因的最终产物的蛋白质是直接发挥生理学功能的分子,根据其表达量和分子修饰改变的蛋白质,以细胞、组织、个体的等级直接参与在生理功能中。此外,作为其它理由,可列举:根据蛋白组学分析,不需要交配 / 饲养和品系选育等

需要时间和成本的过程。

[0010] 蛋白组学分析广泛应用于各领域中,尤其在医学领域中的研究得以推进。例如,在与基因的变异和病态之间的因果关系较少的基因病患以外的病患方面,细胞内流程的蛋白质功能的变化是引起发病的直接导火索,因此,目前正在活跃地进行通过蛋白组学分析捕捉因病患而变化的蛋白质,并用于诊断有无病患和病态的生物标记的鉴定和开发(参照专利文献 1~4 和非专利文献 3)。

[0011] 但是,蛋白组学分析在畜产领域方面的应用是非常落后,目前尚未实现参与肉牛经济性状的蛋白质的鉴定,以及利用这些蛋白质对具有有用的经济性状的牛进行辨别。

[0012] 现有技术文献

[0013] 专利文献 1:日本特开 2006-308533 号公报

[0014] 专利文献 2:日本特开 2007-93597 号公报

[0015] 专利文献 3:日本特开 2007-139742 号公报

[0016] 专利文献 4:日本特开 2007-523346 号公报

[0017] 非专利文献 1:动物遗传研究所年报(第 11 号)、社团法人畜产技术协会附属动物遗传研究所发行、2004 年

[0018] 非专利文献 2:肉用牛遗传资源活用体制整備事业报告书、社团法人畜产技术协会发行、2005 年

[0019] 非专利文献 3:《病患蛋白组学的最前线(疾患プロテオミクスの最前線)》、メイカルドウ株式会社发行、2005 年

发明内容

[0020] 因此,本发明的课题在于,提供:根据蛋白组学分析对参与肉牛的经济性状的蛋白质进行鉴定,并将这些蛋白质作为生物标记对具有有用经济性状的牛进行个别辨别的方法,根据该方法所辨别的牛以及所使用的辨别牛用试剂盒。

[0021] 发明人等,为了寻找能够作为与牛的经济性状相关的生物标记利用的蛋白质,合并使用了基于双向电泳、质量分析、统计学方法的数据分析,对牛的白色脂肪组织所含的蛋白质和牛的经济性状之间的相关性进行了网罗性的调查。其结果,发现了特定蛋白质的表达与分割胴体重量之间存在显著的相关性,由此完成了本发明。

[0022] 即本发明第 1 实施方式的牛的辨别方法,包括:(1)采集牛的体组织的采集工序;(2)从所采集的体组织提取全蛋白质的提取工序;(3)检测所提取的全蛋白质中所含的膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质的检测工序;以及(4)根据在检测工序中仅检测出膜联蛋白 A5 蛋白质的野生型蛋白质、其同工型以及来自它们的修饰蛋白质中的任一者,或者检测出 A5 蛋白质的野生型蛋白质、其同工型以及来自它们的修饰蛋白质中的两者,对采集了体组织的牛的平均分割胴体重量是否变大进行辨别的辨别工序。

[0023] 在此,所谓膜联蛋白 A5(也称作 Annexin A5、AnnexinV 或 ANX5),属于作为钙/磷脂结合蛋白质的膜联蛋白家族,已知是一种与细胞伸展促进作用、性腺刺激激素产生促进作用、细胞凋亡抑制作用等多种生理现象相关的蛋白质。

[0024] 此外,所谓膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质,是一种由序列号 1 所述的氨基酸序列所

构成的蛋白质 (CaBP33)。另外,所谓膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型,与野生型蛋白质相比,并不是在功能上完全相同,在氨基酸类序列上也稍有不同,具体而言,是由序列号 2 所述的氨基酸序列所构成的蛋白质 (CaBP37)。另外,所谓修饰蛋白质,是指接受糖链修饰、磷酸化、乙酰化、甲基化等的化学修饰的蛋白质。

[0025] 本发明的第 2 实施方式的牛的辨别方法,是在上述第 1 实施方式所述的牛的辨别方法中的检测工序中,通过电泳检测膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质。

[0026] 本发明的第 3 实施方式的牛的辨别方法,是在上述第 1 实施方式所述的牛的辨别方法的检测工序中,通过抗原抗体反应检测膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质或其同工型的修饰蛋白质。

[0027] 本发明的第 4 实施方式涉及一种牛和分割胴体,是根据上述第 1~第 3 实施方式所述的牛的辨别方法所辨别的牛。此外,第 5 实施方式涉及一种牛,是上述第 4 实施方式所述的牛的后代或其克隆牛。另外,第 6 实施方式涉及一种分割胴体,是第 4 实施方式或第 5 实施方式中任一项所述的牛的分割胴体。

[0028] 本发明的第 7 实施方式涉及一种辨别牛用试剂盒,其包含:与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质及其修饰蛋白质的任一种进行特异性结合的抗体;以及与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型及其修饰蛋白质中的任一种进行特异性结合的抗体。

[0029] 通过利用本发明的牛的辨别方法和辨别用试剂盒,能够轻易地辨别出分割胴体重量较大的牛个体。根据该牛的辨别方法判定为分割胴体重量较大的牛和较小的牛之间的分割胴体重量之差约为 20~36kg,如果以分割胴体的单价为平均 2000 日元/kg 来考虑的话,每头产生 4 万日元~7 万日元的经济效益,对普通的饲养农家(50~100 头)而言,有望提高 200~700 万日元的经济收入。基于此,能够在畜产方面提高生产效率,使从业农家的生活进一步提高和稳定。

附图说明

[0030] 图 1 是表示对牛的白色脂肪组织的全蛋白质进行双向电泳的结果的图。

[0031] 图 2 是图 1 的局部放大图。

[0032] 图 3 是表示牛的白色脂肪组织所含膜联蛋白 A5 的类型与其分割胴体重量之间的关系散布图。

具体实施方式

[0033] 1. 辨别方法

[0034] 本发明的牛的辨别方法,包括:(1) 采集牛的体组织的采集工序;(2) 从所采集的体组织中提取全蛋白质的提取工序;(3) 检测所提取的全蛋白质中所含的与膜联蛋白 A5 相关的蛋白质的检测工序;以及(4) 基于所检测的膜联蛋白 A5 的种类,对牛的平均分割胴体重量是否变大进行辨别的辨别工序。在此,说明各工序详细内容。

[0035] (1) 采集工序

[0036] 采集工序,是采集体组织的工序,作为采集的体组织,只要是表达膜联蛋白 A5 的体组织即可,具体而言,可列举白色脂肪组织、肌肉组织、皮肤组织、血液等。其中,优选采集

时对检测体侵染少的血清。

[0037] 体组织的采集方法可使用公知的方法,没有特别的限定。具体而言,可列举通过注射进行的抽吸、局部麻醉下的外科手术、脂肪抽吸法。此外,所谓脂肪抽吸法,是指通常在美容整形外科等中所施行的方法,具体而言,可以例举基于超声波脂肪吸引、采用插管等的动力脂肪抽吸(パワードリポサクション)、注射器抽吸等进行的方法。

[0038] (2) 提取工序

[0039] 提取工序是从体组织提取全蛋白质的工序,只要是可提取后述的检测工序中能够使用的量和质的全蛋白质的公知方法,即可使用,没有特别限定。具体而言,可列举下述方法等:将体组织放入具有适当 pH 值的缓冲液中,采用均质器对组织、细胞进行破碎,并进行离心分离后获得上清液。此外,按照需要,可施加酶处理或基于有机溶剂的处理。

[0040] (3) 检测工序

[0041] 检测工序,是指对所提取的全蛋白质中所含的膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的修饰蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型的修饰蛋白质,采用 1) 电泳、2) 抗原抗体反应等,进行检测的工序。下面,详细说明检测工序。

[0042] 1) 采用电泳的检测

[0043] 采用电泳的检测,只要是利用蛋白质的电荷和等电点的差异分离蛋白质后,对膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质等进行检测的公知的方法即可。具体而言,可列举下述 (a) 采用单向电泳进行的检测、和 (b) 采用双向电泳进行的检测。

[0044] (a) 采用单向电泳的检测

[0045] 采用单向电泳的检测,例如,通过利用非变性凝胶、SDS 聚丙烯酰胺凝胶的电泳,对蛋白进行分离,将分离的蛋白质转录于硝基纤维膜等上后,使用抗体对蛋白质进行检测的蛋白质印迹法来进行。

[0046] 此外,作为前述抗体,可以例举如:单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体、能够同时识别 2 个抗原决定簇的双功能性抗体等。此外,这些抗体,可通过采用杂交瘤细胞法等惯用的医疗方案,将膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、其同工型、其修饰蛋白质、它们的片段,对人以外的动物进行投药而产生。

[0047] 此外,前述抗体,可通过 FITC(异硫氰酸荧光素)或四甲基异硫氰酸罗丹明等的荧光物质、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 或 ^3H 等的放射性同位元素、碱性磷酸酶、过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶或藻红蛋白等的酶进行标识,也可使前述抗体和绿色荧光蛋白质(GFP)等的荧光发光蛋白质等进行融合。

[0048] (b) 采用双向电泳的检测

[0049] 采用双向电泳的检测,是通过双向电泳及其电泳图谱的分析来进行。本发明中使用的双向电泳法,只要是利用蛋白质所具有的两个被称作等电点和分子量的物理性质进行分离的公知的方法,即可使用,没有特别限制。具体而言,可列举通过下述操作进行电泳的方法:使用毛细管凝胶或胶条等进行第一向的等电点电泳,将电泳之后的凝胶置于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)或琼脂糖凝胶上,并在等电点电泳的展开方向的垂直方向上进行电泳。

[0050] 双向电泳图谱的分析,是按照考马斯亮蓝(Coomassie brilliant blue, CBB)、

SYPRO Ruby(注册商标)、银染色法等公知的方法对凝胶进行染色,采用扫描器和 CCD 照相机将染色的凝胶图像读取至电脑中,并对读取的图像进行噪音降低和背景的调整后,检测在 pH 为 4.0 ~ 5.0、分子量为 30 ~ 40KDa 附近出现的膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型以及这些蛋白质的修饰蛋白质的蛋白质斑点,基于此来进行。

[0051] 2) 采用抗原抗体反应的检测

[0052] 采用抗原抗体反应的检测,只要是使用与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质进行特异性结合的抗体、与膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型以及这些蛋白质的修饰蛋白质进行特异性结合的抗体的公知的免疫学检测方法即可。具体而言,可以举出 ELISA 法、RIA 法、荧光抗体法、免疫组织化学法等。此外,其中所使用的抗体与前述单向电泳中所使用的抗体是相同的。

[0053] (4) 辨别工序

[0054] 辨别工序,是基于检测工序所检测的膜联蛋白 A5 的种类,对所采集的牛的经济性状进行辨别的工序。具体而言,当仅检测出膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质(CaBP33)、其同工型(CaBP37)以及来自它们的修饰蛋白质中的任一者的情况下(同型情况下),辨别为所采集的牛的平均分割胴体重量变大。相反,当检测出膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质及其同工型的两者、以及来自它们的修饰蛋白质的两者的情况下(异型情况下),辨别为牛的平均分割胴体重量变小。

[0055] 2. 牛

[0056] 本发明的牛,是指通过本发明的辨别方法所辨别的牛、其后代、其克隆牛。此外,所述后代、克隆牛可通过有性生殖和无性生殖,例如通过下述等公知的方法来获得:将 1 个受精卵进行 2 ~ 4 分裂并移植于代孕母牛进行产生的“分裂受精卵的方法”,将受精卵、体细胞的细胞核移植于未受精卵中制备的“克隆卵”再移植于代孕母牛中进行产生的“基于核移植的方法”等。

[0057] 3. 牛的分割胴体

[0058] 本发明的牛的分割胴体,是指采用本发明的辨别方法所辨别的牛、其后代、其克隆牛的分割胴体。

[0059] 4. 辨别用试剂盒

[0060] 采用抗原抗体反应对膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质、膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质的同工型以及这些蛋白质的修饰蛋白质进行检测所需要的抗体和缓冲液等,可以分别购入市售的而使用。但是,如果备有将它们预先加以组合的试剂盒,可以节省分别购入各组成成分的劳力和时间,可容易地进行基于抗原抗体反应进行的检测。此外,如果将提取蛋白质所需要的缓冲液等也一并进行试剂盒化,则能够更容易地进行牛个体经济性状的辨别。

[0061] 下面,通过实施例对本发明进行详细说明,但本发明权利要求的范围并不受下述实施例的任何限定。

[0062] 实施例 1

[0063] 1. 作为生物标记可利用的蛋白质的探索

[0064] 从已经了解血统、肉质的多个牛白色脂肪组织试样中,提取全蛋白质(蛋白质组),通过对各个体的肉质等性状和蛋白质组进行相关分析,寻找可用作生物标记的蛋白

质。其详细情况如下所示。此外,如果没有特别记载,以下的“%”就是指“体积%”。

[0065] (1) 蛋白质提取

[0066] 作为牛白色脂肪组织的试样,使用从已经判明血统、分割胴体重量、里脊肉面积、五花肉厚度等的经济性状的日本飞弹牛个体采集的、冷冻保存于日本岐阜县畜产试验场中的白色脂肪组织试样大约 150 个样品材料。

[0067] 按如下所述提取全蛋白质。首先,在 1g 脂肪组织中,加入 1ml 提取溶液(将蛋白质水解酶抑制剂(Complete Mini,Roche 社制造)按销售方所供说明书的表述,添加到含有下述成分的溶液中而形成的溶液:420mg/ml 的尿素、140.3mg/ml 的硫脲、40mg/ml 的 CHAPS、0.5% 的 IPG 缓冲液(IPG Buffer pH3-11NL、GE ヘルステア(GE Healthcare:通用电气医疗集团)株式会社制造)、0.05% 的三丁基膦(Tributylphosphin,下面略写为 TBP)、0.1mg/ml 的溴酚蓝(Bromophenol blue,下面略写为 BPB)),并进行均质化。

[0068] 接下来,对均质化后的悬浮液进行离心分离,去除沉淀,将其上清液回收作为试样。最后,采用蛋白浓度测定计(Protein Assay、プロテインアッセイ)(バイオラド社制)和吸光光度计(UV mini 1240,岛津制作所社制造),按照 Bradford-HCl 改良法(参照 Electrophoresis 1985,6,559-563。)检测全蛋白质浓度。根据检测的结果可知,从 1g 脂肪组织中平均提取了 3.5mg 的蛋白质。此外,在检测中,作为标准蛋白质使用了牛 γ 球蛋白,检测了 595nm 处的吸光度。

[0069] (2) 双向电泳

[0070] 1) 第一向(等电点电泳)

[0071] 将(1)中所得到的试样混和、稀释于膨润液(含有 420mg/ml 的尿素、140.3mg/ml 的硫脲、40mg/ml 的 CHAPS、0.5% 的 IPG 缓冲液(IPG Buffer pH3-11 NL(GE ヘルステア株式会社制造)、0.05% 的 TBP、0.1mg/ml 的 BPB)中,以使蛋白质浓度达到 0.375mg/ml。将 400 μ l 含有试样的膨润液(150 μ g 蛋白质)注入膨润托盘(GE ヘルステア株式会社制造)中,采用干胶条(DryStrip)凝胶(Immobiline DryStrip pH3-11 NL 18cm,GE ヘルステア株式会社制造)从其上侧覆盖。

[0072] 为防止干胶条的干燥,在干胶条上面形成矿物质油(Immobiline DryStripCover Fluid,GE ヘルステア株式会社制造)层的同时,遮盖膨润托盘而静置 6 小时以上,使干胶条膨润。将干胶条装配于 Multiphor II(GE ヘルステア株式会社制造),以 15°C、26.8kVh 进行等电点电泳。

[0073] 2) 第二向(SDS-PAGE)

[0074] 将等电点电泳结束后的干胶条在 SDS 平衡化缓冲液(a)(含有 6.057mg/ml 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH8.8)、360.4mg/ml 的尿素(Urea)、30% 的丙三醇、20mg/ml 的 SDS、10mg/ml 的 DTT)中浸透 15 分钟,将 SDS 平衡化缓冲液(a)舍弃掉,在 SDS 平衡化缓冲液(b)(含有 6.057mg/ml 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸(pH8.8)、360.4mg/ml 的尿素、30% 的丙三醇、20mg/ml 的 SDS、25mg/ml 的碘乙酰胺)中浸透 15 分钟进行平衡化。将平衡化后的干胶条置于 SDS-PAGE 凝胶(凝胶浓度为 10%)的上部。

[0075] 将凝胶放置于平板电泳群(スラブ電気泳動叢)装置(Tetra-200、アナテック株式会社制造)上,装满电泳缓冲溶液(3mg/mg 三羟甲基氨基甲烷、14.4mg/ml 的甘氨酸、1mg/ml 的 SDS),对一片凝胶以 30mA 进行 4 小时电泳直至从凝胶下端可见到 BPB 条带。

[0076] 3) 染色

[0077] 将电泳结束后的凝胶移入塑料容器中,加入使凝胶充分浸泡的量的固定液(10%的甲醇、7%的乙酸水溶液),在室温下平稳地振荡约30分钟。用新的固定液替换掉原固定液,再次在室温下平稳地振荡约30分钟。

[0078] 将固定液从塑料容器中舍弃,添加 SYPRO Ruby 染色液(注册商标、Molecular Probes 社制造),并为了对容器整体遮光,采用铝箔进行覆盖。在室温下,将塑料容器平稳地振荡约12小时。

[0079] 将染色液从塑料容器中去除,添加使凝胶充分浸泡的量的脱色液(10%的乙醇),并为了对塑料容器整体进行遮光,采用铝箔进行覆盖。在室温下,将塑料容器平稳地振荡约30分钟,将脱色液替换成新的脱色剂。此外,在用于后述的图像分析前,将染色后的凝胶一直保存在脱色液中。

[0080] (3) 图像分析

[0081] 采用凝胶图像摄影装置(アルファイメージャー、アルファイノテック社制造),从染色后的凝胶中读取电泳图像。将读取的电泳图像的一部分表示于图1中,同时将对图1中的矩形所包围的部分进行放大的部分表示于图2中。此外,电泳图像下面记载的英文字母和数字是各个体的识别符号。

[0082] 采用图像分析软件(Progenesis TT900、PerkinElmer 社制),对读取的图像进行图像偏差(ゆがみ)修改,采用其它图像分析软件(Progenesis PG220、PerkinElmer 社制),进行蛋白质斑点的检测、凝胶间(个体间)的蛋白质斑点的匹配、各斑点的定量、凝胶间的定量值比较。

[0083] 实施例2

[0084] 2. 蛋白质的鉴定

[0085] 对于包括图2的圆圈所包围的蛋白质斑点在内的多个蛋白质斑点(约350斑点),从进行双向电泳而染色后的凝胶中进行提取,采用质谱分析法进行鉴定。具体而言,按照下述步骤进行。

[0086] (1) 从凝胶中进行提取

[0087] 用小镊子将含有特定蛋白质的斑点从凝胶中切取出来,将切取的凝胶放入96孔MTP板的孔中,在0.1ml的脱色液A(用甲醇和100mM的碳酸氢铵水溶液进行等量混合的溶液)中进行3次20分钟的浸泡。将脱色液A去除,在0.1ml的100%乙腈中浸泡5分钟。蒸发乙腈,使凝胶进行完全干燥。在干燥后的凝胶中,加入30 μ l胰蛋白酶溶液(0.83 μ g/ml胰蛋白酶(测序级胰蛋白酶(Sequencing grade Trypsin),Promega社制造)、25mM碳酸氢铵),在30 $^{\circ}$ C下反应一晚,获得提取液。

[0088] (2) 脱盐

[0089] 在微量移液器的前端安装 ZipTip μ C18 移液器吸头(ピペットチップ、pipet Tip)(注册商标,日本ミリポア社制造),吸几次90%乙腈水溶液而洗净移液器吸头之后,吸几次0.1%三氟乙酸(下面略写为TFA)水溶液,使移液器吸头得到平衡化。用洗净、平衡化后的移液器吸头,吸几次提取液,从而使提取液所含的蛋白质与移液器吸头中的树脂相结合。用该移液器吸头吸几次清洗液(0.1%的TFA水溶液),对残留在移液器吸头上的盐分进行冲洗。最后,用1 μ l基质溶液(含有2mg/ml CHCA、0.1% TFA、70%乙腈的溶液)将

蛋白质从该移液器吸头中洗脱。

[0090] (3) 质谱分析

[0091] 将 1 μ l 含有蛋白质的洗脱液添加于 MALDI-TOF/TOF 型质谱仪 (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer, アプライドバイオシステムズ社制) 的目标盘中, 在常温下静置以使其结晶化, 检测 MS 光谱和 MS/MS 光谱。

[0092] 实施例 3

[0093] 3. 数据分析

[0094] 对于由双向电泳结果所获得的蛋白质斑点的定量值, 采用蛋白组学分析用实验室信息管理系统 (BIOPRISM、日本电气株式会社制造) 进行管理之后, 与各性状数据 (个体数据、血统数据等 7 个项目, 肉质数据 22 项目) 共同进行数据库化, 对各数据间的相关性进行分析。

[0095] 此外, 将通过质谱分析所获得的 MS 光谱和 MS/MS 光谱的数据输入 MASCOT (Matrix Science 社) 中, 针对 Swiss Prot (<http://au.expasy.org/sprot/>) 和 NCBI nr (<http://au.expasy.org/sprot/>) 等公共蛋白质序列数据库, 进行肽质量指纹谱 (PMF) 分析、MS/MS 离子检索 (IonSearch) 分析, 对蛋白质的鉴定进行尝试。并且, 将所得到的结果输入前述的数据库中。

[0096] 数据库的数据分析结果可知, pH 为 4.0 ~ 5.0、分子量为 30 ~ 40kDa 附近的蛋白质斑点, 具体而言, 包括图 2 的圆圈包围的 2 个蛋白质斑点 A、B 在内的多个蛋白质斑点, 与作为有用性状之一的分割胴体重量有相关性。

[0097] 此外可知, 前述 pH 为 4.0 ~ 5.0、分子量为 30 ~ 40kDa 附近的蛋白质斑点, 是膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质 (CaBP33) 及其同工型 (CaBP37)。进而, 可知在图 2 的圆圈所包围的蛋白质斑点中, 蛋白质斑点 A 是膜联蛋白 A5 的野生型蛋白质 (CaBP33) 的同工型 (CaBP37), 蛋白质斑点 B 是野生型蛋白质 (CaBP33)。基于以上的结果, 膜联蛋白 A5 和分割胴体重量之间的相关性如表 1 和图 3 所示。

[0098] 表 1

[0099]

膜联蛋白 A5 的种类	A、B 异型	B 同型	A 同型	合计
犍牛和雌牛的混合 (头数)	91	81	14	186
仅犍牛 (头数)	70	69	11	150
犍牛的平均分割胴体重量 (kg)	421.47	441.08	457.96	438.17 (整体平均)

[0100] 根据表 1 和图 3, 将仅具有膜联蛋白 A5 的野生型 (CaBP33 :B) 及其同工型 A (CaBP37 :A) 中的任一者的个体 (表 1 中的 A 同型、B 同型), 与具有野生型及同工型的两者的个体 (表 1 中的 A、B 异型) 进行比较时, 在犍牛的平均分割胴体重量方面, 存在约 20 ~ 36kg 的统计学上的显著差异 (t 检验, $p < 0.05$)。

[0101] 所述情况, 说明通过调查脂肪组织所含的膜联蛋白 A5 的种类, 能够检测牛的分割胴体重量的可能性。即, 说明检测牛的分割胴体重量时, 膜联蛋白 A5 能够用作生物标记。

[0001]

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 独立行政法人科学技术振兴机构 (Japan Science and Technology Agency)
学校法人近畿大学 (Kinki University)

<120> 牛的辨别方法、所辨别的牛和辨别牛用试剂盒
(Method and kit for screening of cows, and screened cows)

<130> RJ009P38US(PCT)

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 320

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Ala Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu
1 5 10 15

Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr
20 25 30

Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln
35 40 45

Arg Gln Glu Ile Ala Val Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu
50 55 60

Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile
65 70 75 80

Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys
85 90 95

His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile
100 105 110

Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr
115 120 125

Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr
130 135 140

Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg
145 150 155 160

Asp Pro Asp Ala Arg Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln
165 170 175

Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys
180 185 190

Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg Val
195 200 205

Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile
210 215 220

[0002]

Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val
 225 230 235 240

Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Val
 260 265 270

Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg
 275 280 285

Lys Asn Phe Gly Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser
 290 295 300

Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp
 305 310 315 320

<210> 2
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 2

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Ala Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu
 1 5 10 15

Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr
 20 25 30

Asp Glu Glu Thr Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln
 35 40 45

Arg Gln Glu Ile Ala Val Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu
 50 55 60

Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile
 65 70 75 80

Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys
 85 90 95

His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile
 100 105 110

Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Glu Gln Val Tyr
 115 120 125

Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr
 130 135 140

Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg
 145 150 155 160

Asp Pro Asp Ala Arg Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln
 165 170 175

[0003]

Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys
 180 185 190

Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg Val
 195 200 205

Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile
 210 215 220

Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val
 225 230 235 240

Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Val
 260 265 270

Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg
 275 280 285

Lys Asn Phe Gly Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser
 290 295 300

Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp
 305 310 315 320

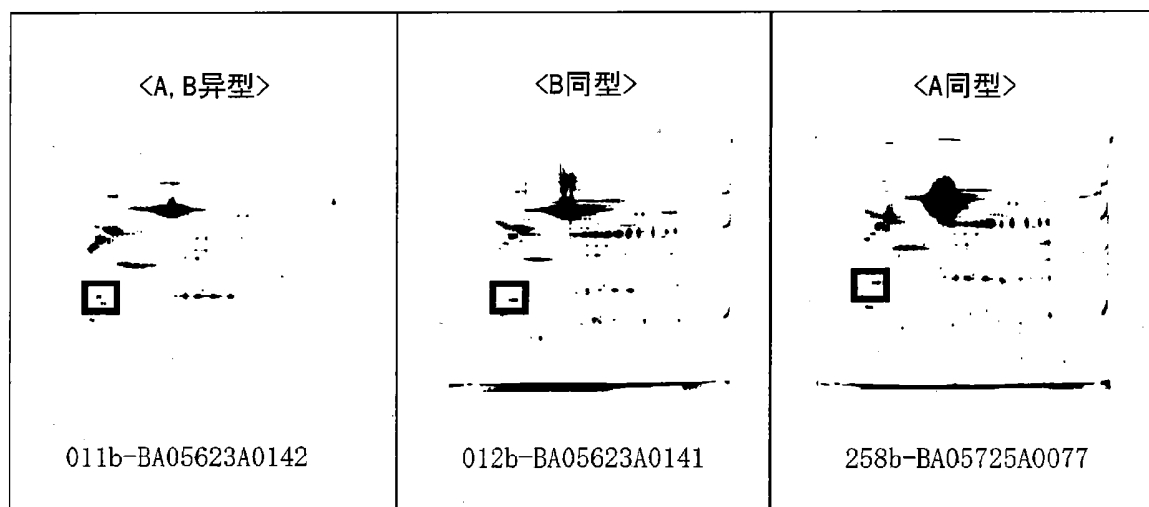


图 1

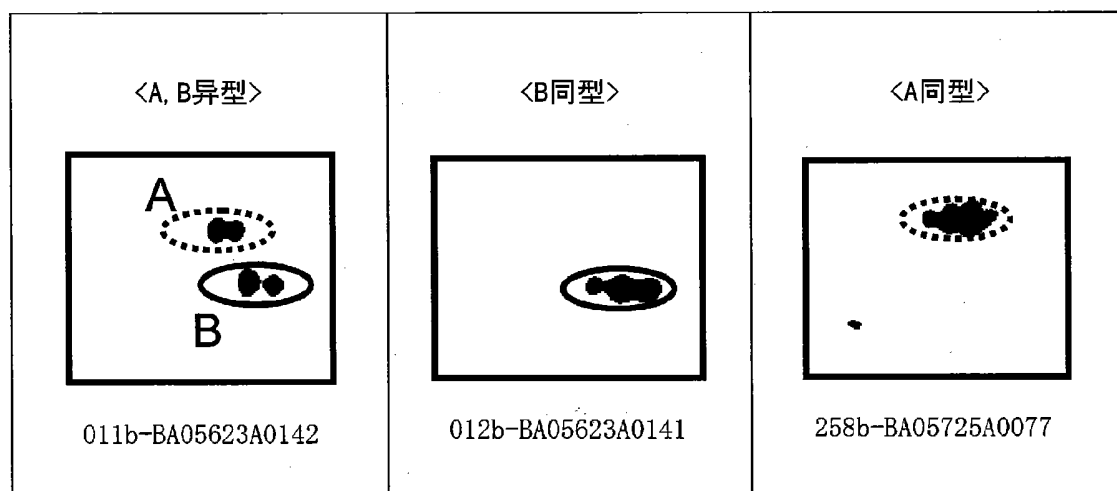
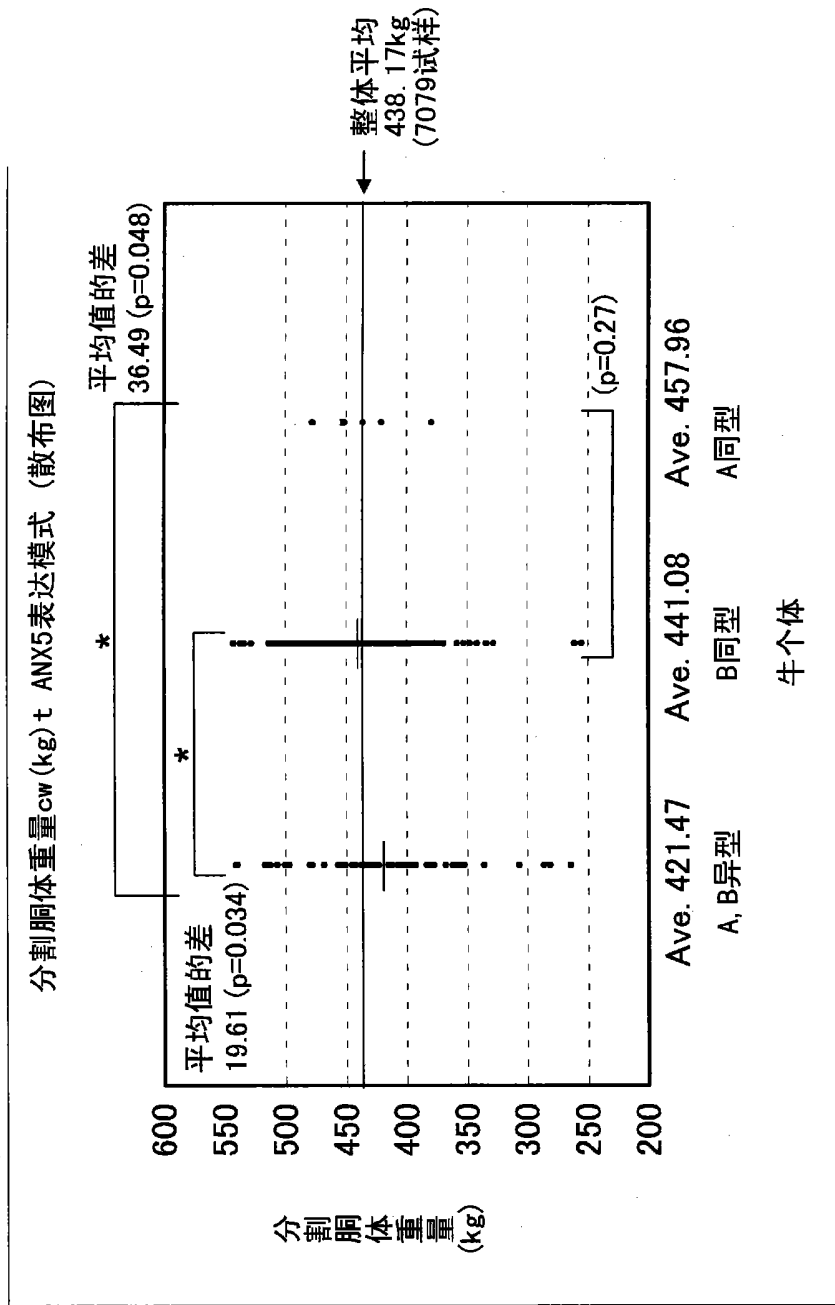


图 2



p --- 显著性概率 ($p < 0.05$, 存在5%水平的显著差异)
 * --- 存在5%水平的显著差异

图 3