

宋晓育, 张小丽, 马小军, 等. 甘肃高山细毛羊和小尾寒羊 *DQBI* 基因第 2 外显子多态性及其与乳房炎相关性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5):1070-1077.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.020

甘肃高山细毛羊和小尾寒羊 *DQBI* 基因第 2 外显子多态性及其与乳房炎相关性

宋晓育¹, 张小丽¹, 马小军^{1,2}, 李发弟³, 张晨¹, 张欣¹

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

摘要: 为探讨绵羊 *MHC-DQBI* 第 2 外显子基因多态性与乳房炎的抗性, 采用 PCR-SSCP 方法对 200 只甘肃高山细毛羊和 212 只小尾寒羊 *MHC-DQBI* 第 2 外显子基因多态性进行了分析。结果表明, 甘肃高山细毛羊和小尾寒羊的 *MHC-DQBI* 基因第 2 外显子均存在丰富多态性, 2 个绵羊品种共检测出 14 个等位基因, 卡方适合性检验结果显示 2 个绵羊品种的 SSCP 带型均未达到哈德温伯格平衡。甘肃高山细毛羊中等位基因 *B* ($P < 0.01$, $RR = 0.158$) 与乳房炎抗性有较强相关性, 等位基因 *F* ($P < 0.01$, $RR = 3.513$) 和 *L* ($P < 0.01$, $RR = 10.197$) 与乳房炎易感性具有较强相关性; 小尾寒羊等位基因 *A* ($0.01 < P < 0.05$, $RR = 0.878$) 与乳房炎抗性有相关性, 等位基因 *E* ($P < 0.01$, $RR = 3.333$) 和 *M* ($P < 0.01$, $RR = 8.000$) 与乳房炎易感性具有较强相关性。表明 2 个绵羊品种的 *DQBI* 第 2 外显子存在丰富的多态性, 甘肃高山细毛羊的等位基因 *B*、*F*、*L* 和小尾寒羊的等位基因 *A*、*E*、*M* 与乳房炎抗性和易感性相关。

关键词: *MHC-DQBI* 基因第 2 外显子; PCR-SSCP; 乳房炎; 甘肃高山细毛羊; 小尾寒羊

中图分类号: S826.8⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1070-08

Polymorphism of ovine major histocompatibility complex class II *DQBI* gene exon 2 and its correlation with mastitis

SONG Xiao-yu¹, ZHANG Xiao-li¹, MA Xiao-jun^{1,2}, LI Fa-di³, ZHANG Chen¹, ZHANG Xin¹

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

Abstract: To investigate the correlation between polymorphism of ovine major histocompatibility complex II *DQBI* (*MHC-DQBI*) and mastitis, the *DQBI* gene exon 2 in 200 Gansu alpine fine-wool sheep and 212 small tail Han sheep were amplified by PCR and characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique. Abundant polymorphism was detected in the exon 2 of *MHC-DQBI*. Fourteen alleles were found in the *DQBI* gene exon 2. Results of χ^2 test showed that patterns of *MHC-DQBI* were significantly deviant from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$). Allele *B* ($P < 0.01$, $RR = 0.158$) was correlated with mastitis resistance in Gansu alpine fine-wool sheep, while alleles *F* ($P < 0.01$, $RR = 3.513$) and *L* ($P < 0.01$, $RR = 10.197$) were correlated with mastitis susceptibility. Allele *A*

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目 (GNSW-2011-22); 甘肃农业大学动物医学院教研产学研创新基金项目 (GYCX-KX010)

作者简介: 宋晓育 (1989-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为动物微生物免疫与抗病。(Tel) 18894316427; (E-mail) 610116081@qq.com

通讯作者: 张小丽, (E-mail) zhxl228@qq.com

phism was detected in the exon 2 of *MHC-DQBI*. Fourteen alleles were found in the *DQBI* gene exon 2. Results of χ^2 test showed that patterns of *MHC-DQBI* were significantly deviant from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$). Allele *B* ($P < 0.01$, $RR = 0.158$) was correlated with mastitis resistance in Gansu alpine fine-wool sheep, while alleles *F* ($P < 0.01$, $RR = 3.513$) and *L* ($P < 0.01$, $RR = 10.197$) were correlated with mastitis susceptibility. Allele *A*

($0.01 < P < 0.05$, $RR = 0.878$), had strong correlation with mastitis resistance in small tail Han sheep, while alleles *E* ($P < 0.01$, $RR = 3.333$) and *M* ($P < 0.01$, $RR = 8.000$) had strong correlations with mastitis susceptibility. In sum, alleles *B*, *F* and *L* in Gansu alpine fine-wool sheep and alleles *A*, *E* and *M* in small tail Han sheep were relevant to susceptibility and resistance of mastitis.

Key words: *MHC-DQB1* gene exon 2; PCR and single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP); mastitis; Gansu alpine fine-wool sheep; small tail Han sheep

随着甘肃全舍饲养羊模式的推广应用,母羊的乳房炎疾病发生逐渐增多,危害极大^[1]。母羊患有乳房炎不仅影响羔羊的健康发育,导致羔羊死亡率上升,而且大量患病母羊因其失去饲养价值而淘汰,给养殖户造成较大经济损失。

MHC 是能编码、诱导迅速排斥反应抗原的基因群,呈高度多态性紧密连锁不平衡并呈单体型遗传的一种基因^[2]。这些连锁的免疫应答基因编码的 MHC 抗原,调控细胞间的相互识别,控制机体对抗原产生免疫应答的能力^[3]。绵羊的 *MHC* 又称绵羊白细胞抗原基因 (Ovine lymphocyte antigen, *OLA*), 绵羊 *OLA* 基因分为 3 类, 即 *OLA-I*、*OLA-II* 和 *OLA-III*。研究表明,与动物抗病性有着密切关系的是 *OLA-II* 中可以在蛋白质水平上表达的 *DR-B* 和 *DQ-B* 基因,其外显子 2 编码抗原肽的结构功能区,是绵羊 MHC-II 类分子功能的重要组成部分,被作为疾病抗性和易感性研究的重要基因,且其组成、结构以及与疾病之间的关系成为抗病育种研究的一个重要部分^[4]。目前国内外有关绵羊 *OLA* 基因的研究报道多见于对其性状、绵羊白血病、肺腺癌,以及抗包虫病、线虫病等。国内外学者对绵羊 *OLA* 基因与肉羊乳房炎的研究很少。本研究拟以编码 *OLA-II* 类分子主要功能区的 *DQB1* 基因外显子 2 为研究对象,通过对甘肃高山细毛羊和小尾寒羊 *DQB1* 基因外显子 2 多态性以及乳房炎发病情况分析,探究其与肉羊乳房炎间的关联性,建立肉羊乳房炎抗性分子标记检测方法,为筛选乳房炎抗性的肉羊群体提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验采集甘肃地区 412 只绵羊血样,其中甘肃高山细毛羊乳房炎阳性 43 只,阴性 157 只;小尾寒羊乳房炎阳性 48 只,阴性 164 只。颈静脉采集血

液 10 ml,装入含有 1 ml 灭菌 ACD 抗凝剂的离心管,并用冰盒带回实验室置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用常规实验室的酚/氯仿提取法^[5],从血样中提取 DNA 并溶解于 TE 缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 参照文献^[6],根据绵羊 *MHC-DQB1* 基因核苷酸全序列 Z28523 设计第 2 外显子的核苷酸序列引物(上游引物:5'-CCCCG-CAGAGGATTTCGTG-3',下游引物 5'-ACCTCGC-CGCTGCCAGGT-3'),扩增目的片段约为 280 bp,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增采用 25 μl 的优化体系:上、下游引物各 1.0 μl ,模板 DNA 2.0 μl ,灭菌双蒸水 8.5 μl ,2* *TAQ* 预混酶 12.5 μl 。PCR 反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min;变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s,延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s,35 个循环;最后延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物的 SSCP 检测 取 2.0 μl PCR 产物,8.0 μl 变性剂[98% 去离子甲酰胺、0.030% 二甲苯青、0.025% 溴酚蓝、0.5 mol/L EDTA (PH = 8.0)], $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,然后迅速放于冰上 10 min。12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:N,N-亚甲基双丙烯酰胺=39:1), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 V 条件下,电泳 20 h,银染显色法结束后拍照。

1.2.4 *OLA-DQB1* 外显子 2 测序 单链构象采用多态性分析方法(SSCP)分析后,选取不同基因型个体的 PCR 扩增胶回收产物克隆,阳性菌液送至金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.5 乳房炎的判定 采集的乳汁送至中国农业科学院兰州畜牧与兽医研究所,采用小型体细胞自动计数仪检测,以 $1\text{ ml } 4 \times 10^5$ 为阈值,体细胞数大于 $1\text{ ml } 4 \times 10^5$ 的则判定为隐性乳房炎。

1.3 数据统计分析

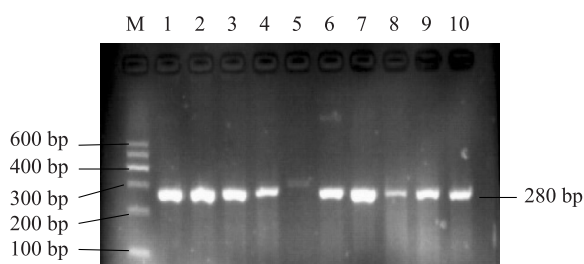
采用 SPSS17.0 计算甘肃地区绵羊各个基因

型的频率、等位基因频率、相对危险值;用 POPGEN 计算纯合度(H_o)、杂合度(H_e)和有效等位基因数(N_e);用 PIC 软件计算多态信息含量(PIC);用 MEGA5.05 软件进行核苷酸序列及氨基酸序列比对;用 DNAMAN 软件进行 NJ 进化树构建;用 Dnasp5.0 进行核苷酸和氨基酸多态位点分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

对采集的 412 只绵羊 *DQB1* 基因外显子 2 进行 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带清晰,无杂带(图 1),片段大小为 280 bp,可以进行下一步 SSCP 检测。



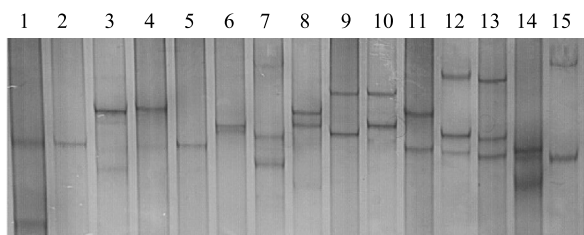
M: DNA maker; 1~10: PCR 产物。

图 1 绵羊 *MHC-DQB1* 外显子 2 的 PCR 结果

Fig. 1 PCR amplification of *MHC-DQB1* gene exon 2 in sheep

2.2 PCR-SSCP 检测结果

PCR 扩增产物进行 SSCP 检测发现,412 头甘肃地区绵羊个体中,共检测到 14 个等位基因,其电泳条带从 1 条到 3 条不等,分别命名为等位基因 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N(图 2)。



1~15: 等位基因 N、C、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L 和 M。

图 2 绵羊 *MHC-DQB1* 第 2 外显子 SSCP 检测结果

Fig. 2 Detection of *MHC-DQB1* gene exon 2 in sheep by PCR-SSCP

2.3 *DQB1* 基因第 2 外显子核苷酸变异类型

通过对 412 只绵羊 *DQB1* 第 2 外显子基因克隆测序,发现了 14 个等位基因(图 3)。除去引物序列对 14 个 *DQB1* 基因第 2 外显子 243 bp 单倍型序列进行比对分析,在分析序列中共有 58 个变异位点,占分析位点的 23.87%。其中转换位点 22 个,占核苷酸变异位点的 37.93%,包括 A/G 转换和 C/T 转换各 11 个;颠换位点 30 个,占变异位点 51.71%,其中 A/C 颠换 6 个、A/T 颠换 8 个、G/C 颠换 13 个、G/T 颠换 3 个;转换和颠换共存位点 6 个,占变异位点 10.35%。还发现 2 个特殊位点,即第 17 和 145 位点出现碱基突变 $T \leftrightarrow C \leftrightarrow G \leftrightarrow A$ 。

核苷酸位点的碱基突变导致氨基酸发生了大量改变(图 4),包括 175 bp 处的 T/A 突变导致等位基因 A、N 所编码的氨基酸由 F(苯丙氨酸) \leftrightarrow I(异亮氨酸);212 bp 处的 C/A 突变和 213 bp 处的 G/C 突变导致等位基因 N 所编码的氨基酸由 S(丝氨酸) \leftrightarrow C(半胱氨酸)等。120 bp 处的 C/G 突变、129 bp 处的 G/C 突变、147 bp 处的 A/C 突变、234 bp 处的 T/A 突变未导致氨基酸发生改变。

2.4 甘肃高山细毛羊和小尾寒羊 *DQB1* 基因第 2 外显子遗传信息

2 个绵羊群体 *DQB1* 基因第 2 外显子的遗传多态性如表 1 所示,其杂合度均大于 0.9,且 $PIC > 0.5$,均为高度多态。

2.5 甘肃高山细毛羊和小尾寒羊 *DQB1* 第二外显子与乳房炎相关性分析

PCR-SSCP 方法共检出 14 个单倍型,分别将乳房炎阴性和阳性的 2 个绵羊品种等位基因频率进行差异显著性分析和相对危险值计算(表 2、表 3)。结果显示,2 个绵羊品种阳性中均没有等位基因 A、D、N,而等位基因 I 仅在甘肃高山细毛羊阳性中存在;等位基因 B ($P < 0.01$, $RR = 0.158$)与甘肃高山细毛羊乳房炎的抗性有较强相关性;等位基因 F ($P < 0.01$, $RR = 3.513$)和 L ($P < 0.01$, $RR = 10.197$)与甘肃高山细毛羊乳房炎易感性具有较强相关性。等位基因 A ($0.01 < P < 0.05$, $RR = 0.878$)与小尾寒羊乳房炎抗性有相关性,等位基因 E ($P < 0.01$, $RR = 3.333$)和 M ($P < 0.01$, $RR = 8.000$)与小尾寒羊乳房炎易感性具有较强相关性。

A.SEQ	CACCAGTTTAAGTGCCTGTGTACTTCACCAACGGGACGGAGCGGGTGCCTGACGTGACCAGATACATCTACAACCGGGAG	81 bp
B.SEQ	TT.....G.....CT.....T.....	81 bp
C.SEQ	T.....TAG...AC.....C.T.....A....	81 bp
D.SEQ	.TT.....T.G...G.....C.T.....	81 bp
E.SEQA.....T.....A....	81 bp
F.SEQG...A.....CT.....A....	81 bp
G.SEQG...A.....CT.....	81 bp
H.SEQG...A.....CT.....	81 bp
I.SEQ	T.....TAG...AC.....C.T.....C.....A....	81 bp
J.SEQG...G.....C.T.....	81 bp
K.SEQG...G.....C.T.....	81 bp
L.SEQ	TTT.T....T.G...AC.....AGT...A.....A....	81 bp
M.SEQ	TT.....A...GC.TC.....CT.....AC.....C.A	81 bp
N.SEQ	T.....TAG...AC.....CT.....C.....A....	81 bp
A.SEQ	GAGTACGCGCGCTTCGACAGCGACTGGGACGAGTACGCGGGGTGACGCCGCCGGGCGAGCGGCAAGCCGAGTACTGGAAC	162 bp
B.SEQG.....G.C.....T....G..C.TCC.....	162 bp
C.SEQ	...T..T.....C...G.C.....C...T....G..C.G.C.....	162 bp
D.SEQT.....G.C.....T....G...AGC.....TC..	162 bp
E.SEQ	...T.....G.C.....C...T....G....C.....TC..	162 bp
F.SEQ	...T..T.....G.C.....C...T....G....C.....TC..	162 bp
G.SEQG.C.....T....G..C.G.C.....	162 bp
H.SEQ	...T..T.....G.C.....T....G..C.G.C.....	162 bp
I.SEQ	...T..T.....A....C...G.C.....C...T....G..C.G.C.....	162 bp
J.SEQG.C.....T....G...AGC.....	162 bp
K.SEQG.C.....T....G...AGC.....	162 bp
L.SEQ	...C..CT.....G.....G.C.....TC..	162 bp
M.SEQ	...GT..T.....G.....C...T....G.....	162 bp
N.SEQ	...T..T.....G....C...G.C.....C...T....G..C.G.C.....	162 bp
A.SEQ	AGCCAGAAGGACTTCCTGGAGCGGACGCGGGCCGAGGTGGACACGGTGTGCGAGAAACAACCTACCGGGTGTATGCCCCCTTC	243 bp
B.SEQA.....A.....GC...C.....A...G.....	243 bp
C.SEQA..A.....GC...C.....A...G.A...G....	243 bp
D.SEQA..A.....GT.....GC.....A.....G.....	243 bp
E.SEQA.....A...A...C.....GC.....G.....	243 bp
F.SEQA.....A.....C.....GC.....A.....G.....	243 bp
G.SEQG.....A..A.....G...GC...C.....	243 bp
H.SEQG.....A..A.....A.....G...GC.....A...G.....	243 bp
I.SEQA..A.....GT.....GC...C.....A...G.A...G....	243 bp
J.SEQA.....G...GC...C.....G.....	243 bp
K.SEQA.....GC...C.....G.....	243 bp
L.SEQA.....C.....GC...C.....A...G.A...G....	243 bp
M.SEQA.....A.....GC...C.....A...G.....	243 bp
N.SEQA..A.....T.....GC...C.....A...G.A...G....	243 bp

斜体大写字母表示等位基因。

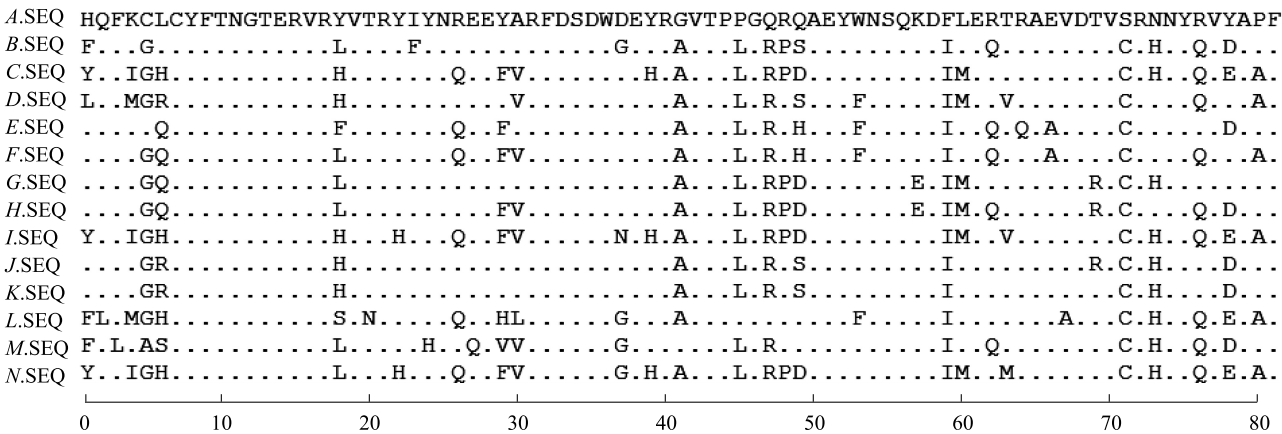
图3 *DQBI* 外显子 2 等位基因核苷酸序列比对结果

Fig. 3 Nucleotide sequences alignment of *DQBI* gene exon 2 alleles

2.6 *DQBI* 第 2 外显子 NJ 进化树的构建

为了研究这 2 个绵羊种群 *DQBI* 基因第 2 外显子的等位基因与其他相应等位基因之间的遗传关系,利用 DNAMAN 软件对其 *DQBI* 第 2 外显子序列进行 NJ 树构建(图 5),所用序列包括本研究的 14 个单倍型,基因库下载的 AH001247、2、AJ238942、Z28422、GU191457、HQ728686、HQ728668、HQ728669、Z28425、

还有 4 条牛的 *DQBI* 第 2 外显子序列:AY444363、EU294404、DQ092798、U62321。图 5 显示,所有 *DQBI* 第 2 外显子的同源性都很高,其中牛和羊的同源性很高且最终汇聚为一支,2 个绵羊品种的等位基因 A、G、C 分别与 HQ728669、HQ728686、AH001247 同源性高达 99% 以上,且等位基因 J 和 K 聚合为一类,遗传距离(同源性)为 100%。



斜体大写字母表示等位基因。
图 4 *OLA-DQB1* 基因第 2 外显子等位基因编码的氨基酸序列比对结果
Fig.4 Amino acid sequences alignment of *DQB1* gene exon 2 alleles

表 1 *DQB1* 基因第 2 外显子遗传多态性分析
Table 1 The genetic polymorphisms of *DQB1* gene exon 2

品 种	纯合度(H_o)	杂合度(H_e)	有效等位基因数(N_e)	多态信息含量(PIC)
甘肃高山细毛羊	0.097 3	0.902 7	10.045 2	0.892 5
小尾寒羊	0.084 8	0.915 2	11.500 5	0.906 4

0.25< PIC <0.50 为中度多态; PIC >0.50 为高度多态; PIC <0.25 为低度多态。

表 2 乳房炎阴性和阳性甘肃高山细毛羊 *DQB1* 基因第 2 外显子等位基因频率
Table 2 Allele frequencies of the *DQB1* gene exon 2 gene in mastitis-infected and healthy Gansu alpine fine-wool sheep

等位基因	乳房炎阴性		乳房炎阳性		相对危险估计值
	数量	等位基因频率	数量	等位基因频率	
A	9	0.057 3	0	0	0.158
B	37	0.235 7 **	2	0.046 5	
C	15	0.095 5	3	0.069 8	
D	6	0.038 2	0	0	
E	11	0.070 1	6	0.139 5	
F	11	0.070 1	9	0.209 3 **	3.513
G	10	0.063 7	5	0.116 3	
H	18	0.114 6	4	0.093 0	
I	4	0.025 5	1	0.023 3	
J	9	0.057 3	3	0.069 8	
K	14	0.089 2	4	0.093 0	10.197
L	2	0.012 7	5	0.116 3 **	
M	3	0.019 1	1	0.023 3	
N	8	0.051 0	0	0	

** :*DQB1* 相同等位基因甘肃高山细毛羊乳房炎阴性与阳性间差异达极显著水平;* :*DQB1* 相同等位基因甘肃高山细毛羊乳房炎阴性与阳性间差异达显著水平。

表 3 乳房炎阴性和阳性小尾寒羊 *DQBI* 基因第 2 外显子等位基因频率

Table 3 Allele frequencies of *DQBI* gene exon 2 gene in mastitis-infected and healthy small tail Han sheep

等位基因	乳房炎阴性		乳房炎阳性		相对危险估计值
	数量	等位基因频率	数量	等位基因频率	
A	20	0.122 0*	0	0	0.878
B	16	0.097 6	6	0.125 0	
C	18	0.109 8	2	0.041 7	
D	7	0.042 7	0	0	
E	12	0.073 2	10	0.208 3**	
F	15	0.091 5	5	0.104 2	3.333
G	11	0.067 1	3	0.062 5	
H	19	0.115 9	4	0.083 3	
I	6	0.036 6	0	0	
J	10	0.061 0	3	0.062 5	
K	14	0.085 4	3	0.062 5	8.000
L	5	0.030 5	4	0.083 3	
M	4	0.024 4	8	0.166 7**	
N	7	0.042 7	0	0	

** :*DQBI* 相同等位基因小尾寒羊乳房炎阴性与阳性间差异达极显著水平; * :*DQBI* 相同等位基因小尾寒羊乳房炎阴性与阳性间差异达显著水平。

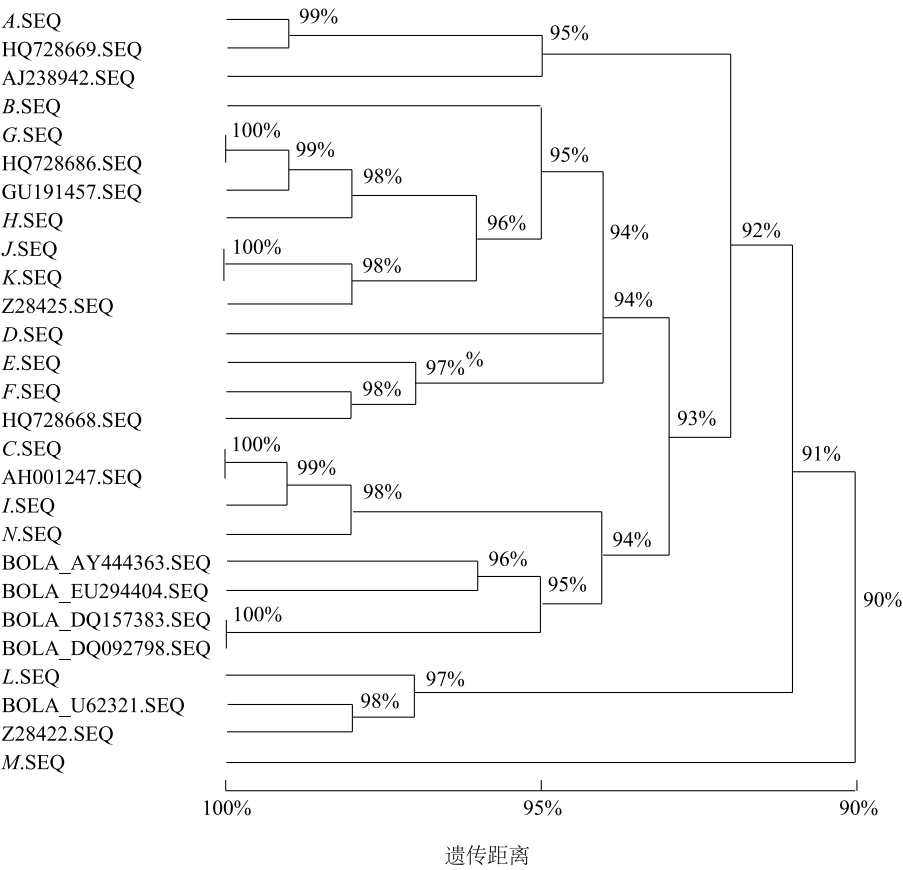


图 5 *OLA-DQBI* 基因第 2 外显子核苷酸序列的 NJ 树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the *OLA-DQBI* gene nucleotide sequences by Neighbor-joining

3 讨论

3.1 *DQB1* 基因第 2 外显子的多态性

核苷酸的变异是形成 *MHC* 基因高度多态性的原因^[7], *MHC-DQB1* 基因外显子 2 作为抗原结合位点, 其多态性和重要性成为近年来家畜抗病育种研究的一个热点。Amills 等^[8]在萨能奶山羊 *DQB1* 基因外显子 2 中发现了 5 个等位基因; 刑凤等^[9]利用 PCR-RFLP 方法从莱芜黑山羊、波尔山羊、鲁波山羊的 *DQB* 基因外显子 2 检测到 4 个等位基因, 7 个基因型。申红等^[10]利用 PCR-RFLP 方法, 在中国美利奴羊 *MHC-DQB1* 基因外显子 2 的酶切检测中, 共检测到了 20 种等位基因。本研究针对甘肃高山细毛羊和小尾寒羊的 *MHC-DQB1* 基因外显子 2 的多态性进行了初步研究, 共发现了 14 个单倍型序列, 具有高度多态性。这可能与甘肃高山细毛羊和小尾寒羊生存的恶劣环境等因素有关。作为评价群体遗传变异的重要指标包括遗传杂合度 (*He*)、有效等位基因数 (*Ne*)、多态信息含量 (*PIC*) 等, 它们的高低反应群体均质度, 其数值越高, 遗传变异越大, 遗传多样性越丰富, 遗传潜力就越大。本研究 2 个绵羊种群的 *PIC* 含量均大于 0.5, 且各等位基因之间存在大量的多态性位点, 表明该基因为多碱基突变, 表现高度多态性, 表明该群体具有丰富的遗传多态性和较高的遗传价值。将检测到的单倍型克隆测序结果与 GenBank 上已有的序列进行比对, 表明为新发现的等位基因。

3.2 *DQB1* 基因第 2 外显子与乳房炎的关联性分析

采用免疫遗传标记开展选育工作, 可以提高畜禽抗病能力^[11-12]。在动物抗病育种中, *MHC* 基因已被证实为重要的候选基因^[13]。国内外学者通过对人类^[14]、牛^[15]、猪^[16-17]、羊^[18]、家禽等 *MHC* 基因的多态性和抗病性研究分析, 确立了与抗病育种相关的遗传位点。Sharif 等^[19]报道 *BoLA-DRB3* 第 2 外显子与牛奶中的体细胞数和奶牛乳房炎的发病率极显著相关。张千夫等^[20]用 PCR-RFLP 方法在对 *BoLA-DRB3* 基因分别被 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切后不同基因型对牛体细胞评分的影响研究中, 发现 *Rsa* I AD 型的体细胞数显著高于 *Rsa* I EG 型。杨冬英等^[21]利用 PCR-RFLP 技术对南阳黄牛、秦川黄牛 *BoLA-DRB3* 基因第 2 外显子多态性进行研究, 结果表明, *BoLA-DRB3* 基因第 2 外显子经限制性内切酶 *Bst*U

I 酶切后表现多态性且奶牛 AA 型个体显著高于黄牛品种, 并认为 *BoLA* 等位基因 A 可能为母牛乳房炎易感性的基因。高树新等^[22]采用 PCR-SSCP 技术, 检测到 2 种兼用型牛 *BoLA-DQB* 基因外显子 2 的多态性与牛乳房炎发生存在关联性, 但其关联因品种不同而不同。目前在绵羊 *MHC-DQB* 与疾病相关性研究中, 大多是其与包虫病相关性的研究^[23]。本研究采用 PCR-SSCP 方法检测了甘肃高山细毛羊和小尾寒羊的 *MHC-DQB1* 基因第 2 外显子多态性, 并与乳房炎的抗病和易感性进行了关联性分析, 发现 2 个绵羊品种 *DQB1* 基因外显子 2 的多态性与乳房炎发生存在关联性。在甘肃高山细毛羊中等位基因 B 在阳性中出现较少, 相对危险估计值 ($RR=0.158<1$) 较低, 初步判断可能为乳房炎的抗性位点; 而等位基因 F 和 L 在甘肃高山细毛羊的阴性中出现较少, 相对危险估计值 ($RR=3.513$, $RR=10.197$) 较高, 提示与甘肃高山细毛羊乳房炎易感性具有较强相关性; 等位基因 A ($0.01<P<0.05$, $RR=0.878<1$) 为小尾寒羊乳房炎抗性位点, 而等位基因 E ($P<0.01$, $RR=3.333$) 和 M ($P<0.01$, $RR=8.000$) 为小尾寒羊乳房炎易感性位点。种群内不同等位基因在乳房炎阴性、阳性间分布存在差异, 可能与不同个体对乳房炎的抗病力或者敏感性上存在差异有关。本研究还发现 2 个绵羊阳性种群中均没有等位基因 A、D、N, 而等位基因 I 仅在阳性小尾寒羊中存在, 这可能是卡方适合性检验该群体偏离哈德温伯格平衡的原因, 也可能与样本含量小以及所选择的群体有相关。

3.3 *DQB1* 基因第 2 外显子基因聚类分析

在 *DQB1* 第 2 外显子的序列系统发育分析中, 这 2 个绵羊群体 *DQB1* 基因序列呈现为明显的两支, 最初可能是由 2 个等位基因分化来的。系统分析发现这 2 个绵羊群体 *DQB1* 基因与下载的牛 *DQB1* 基因序列具有较高的同源性, 表明绵羊和牛的 *DQB1* 基因最早可能来自于分化以前的共同祖先的原始序列。这也证明了源于共同祖先的 *MHC* 基因, 在环境压力下有着不同演变取向。绵羊与牛的 *DQB1* 基因序列有着较高的同源性, 而且绵羊的等位基因与牛的一些等位基因之间的遗传距离比绵羊自身之间的遗传关系还要近, 可能是绵羊 *DQB1* 基因与牛的 *DQB1* 基因在特定抗原的刺激下, 发生的免疫应答反应具有相似性^[24]。

参考文献:

- [1] 白玉光,王永军. 青海高原全舍饲母羊乳房炎治疗和预防措施[J]. 黑龙江畜牧兽医,2012,2(13):91-92.
- [2] 高树新,许尚忠,李金泉,等. *BOLA-DQA,DRB3* * exon2 多态性及其与奶牛乳房炎的关联分析[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(4):317-320.
- [3] BALLINGALL K T, FARDOE K, MCKEEVER D J. Genomic organization and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus[J]. Immunogenetics,2008,60(2):95-103.
- [4] SAYERS G, GOOD B, HANRAHAN J P, et al. Major histocompatibility complex *DRB1* gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds [J]. Parasitology, 2005, 131(3):403-409.
- [5] JESEPH S, DAVID W R. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [6] AMILLS M, SULAS C, SANCHEZ A, et al. Structural characterization of the caprine major histocompatibility complex class II *DQB1* (*Cahi-DQB1*) gene [J]. Molecular Immunology, 2004, 41:843-846.
- [7] 陈芳芳,潘玲,耿照玉,等. MHC 分子多态性的起源、演变与抗病机理[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(9):1061-1067.
- [8] AMILLS M, SULAS C, SANCHEZ A, et al. Structure characterization of caprine major histocompatibility complex class II *DQB1* gene[J]. Molecular Immunology, 2004, 41:843-846.
- [9] 刑凤,李培培,李钰,等. *GOLA-DQB1* 基因外显子 2 多态性与免疫性状的相关分析[J]. 遗传,2008,7(30):870-876.
- [10] 申红,贾斌,陈玉林,等. 中国美利奴羊 *MHC-DQB1* 基因多态性与包虫病的抗性分析[J]. 2008,30(9):682-688.
- [11] KONNAI S, TAKESIMA S, TAJIMA S, et al. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection [J]. Microbial Immunology, 2003, 47:223-232.
- [12] 晏光荣,马海明. 分子标记在动物抗病育种中的研究进展[J]. 国外畜牧科技,2001,28(6):32-34.
- [13] RAADSMA H W. Fleecce rot and body strike in Merino sheep V heritability of liability to body strike in weaner sheep under flywave conditions [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1991,42:279-293.
- [14] 刘辉,苏冠芳,魏世辉,等. Eales 病与人类白细胞抗原 *HLA-DRB, DQB* 基因位点的关联[J]. 中华眼底病杂志,2006,22(2):90-93.
- [15] 高树新,许尚忠,李金泉,等. 中国荷斯坦奶牛 *BOLA-DRA, DQB* 基因外显子 2 多态性及其与乳房炎的关联分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(11):27-28.
- [16] 张国华. 合作猪 *SLA-DQA* 第 2、4 外显子多态性分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [17] 包文斌,吴圣龙,国宏,等. 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 多态性及其与繁殖性能的关联分析[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(7):636-640.
- [18] 刘秀,胡江,罗玉柱. 藏绵羊基因 *OLA-DQA2* 第二外显子多态性分析[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2930-2936.
- [19] SHARIF S, MALLARD B A, WILKIE B N, et al. Associations of the bovine major histocompatibility complex *DRB3* (*BoLA-DRB3*) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle[J]. Animal Genetics, 2002, 29(3):185-193.
- [20] 张千夫,郑小敏,唐大伟,等. 荷斯坦牛 *BOLA-DRB3* 基因多态性及其与乳房炎抗性关系分析[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(2):115-119.
- [21] 杨冬英,陈宏,张良志,等. 牛 *BOLA-DRB3* 基因多态性与乳房炎相关性初探[J]. 中国兽医杂志,2006,42(7):7-9.
- [22] 高树新,许尚忠,李金泉,等. 2 种兼用型牛 *BoLA-DQB* * exon2 基因的多态性与奶牛乳房炎的相关性[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(3):8-12.
- [23] 申红,杜迎春,贾斌,等. 多浪羊 *MHC-DQB1* 基因多态性与包虫病的抗性分析[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(1):17-22.
- [24] 成述儒,罗玉柱,胡江,等. 藏绵羊 *DQAI* 基因多态性分析[J]. 中国农业科学,2011,44(10):2146-2153.

(责任编辑:袁伟)