

张欣, 张小丽, 马小军, 等. 甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因遗传多态性及其与乳房炎相关性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1357-1361.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.025

## 甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因遗传多态性及其与乳房炎相关性

张欣<sup>1</sup>, 张小丽<sup>1</sup>, 马小军<sup>1</sup>, 李发弟<sup>2,3</sup>, 张晨<sup>1</sup>, 陈富强<sup>1</sup>, 宋晓育<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省肉羊繁育生物技术工程实验室, 甘肃 民勤 733300)

**摘要:** 以 286 只甘肃高山细毛羊为研究对象, 利用 PCR-SSCP 方法结合测序的方法进行 *TLR2* 基因多态位点检测, 并通过构建一般线性模型分析其多态性与体细胞评分(SCS)的相关性, 以期为甘肃高山细毛羊乳房炎抗性选育提供参考。结果显示, 试验群体发现 2 种等位基因控制的 3 种基因型(AA、AB、BB), 其中 B 等位基因为优势等位基因, 等位基因频率为 0.71, 而 A 等位基因频率则为 0.29。经 $\chi^2$ 适合性检验, 突变达到 Hardy-weinberg 平衡状态( $P>0.05$ )。测序结果与 GenBank 中绵羊 *TLR2* 基因序列比对显示, 扩增片段分有 5 处核苷酸多态位点, 并导致了 3 处发生氨基酸改变。AA 型个体的 SCS 均值显著低于 AB、BB 型( $P<0.05$ ), A 等位基因基因型可作为乳房炎抗性的优良基因。因此, 可将 *TLR2* 基因作为甘肃高山细毛羊乳房炎抗感性候选基因应用于乳房炎抗性筛选。

**关键词:** 甘肃高山细毛羊; *TLR2* 基因; 乳房炎; PCR-SSCP; 体细胞评分

**中图分类号:** S821.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1357-05

## Genetic polymorphism of *TLR2* gene and its correlation with mastitis in Gansu fine-wool sheep

ZHANG Xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-li<sup>1</sup>, MA Xiao-jun<sup>1</sup>, LI Fa-di<sup>2,3</sup>, ZHANG Chen<sup>1</sup>, CHEN Fu-qiang<sup>1</sup>,  
SONG Xiao-yu<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. Mutton Sheep Breeding Biotechnology Engineering Laboratory of Gansu province, Minqin 733300, China)

**Abstract:** To improve mastitis resistance breeding in Gansu alpine fine-wool sheep, the polymorphic loci of *TLR2* gene in 286 Gansu fine-wool sheep were detected by PCR-SSCP and sequencing, and the correlation between polymorphism and somatic cell score (SCS) was analyzed. The results showed that two alleles, A and B, controlled three genotypes AA, AB, and BB. Allele B was dominant allele, with the allele frequency of 0.71. Chi-square test revealed the mutations reached Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ). Five polymorphism loci were detected in *TLR2* gene, leading to amino acid changes in three sites. The somatic cell score (SCS) of AA was significantly lower than those of AB and BB ( $P<0.05$ ), indicating allele A could be used as a dominant genotype for mastitis resistance. In conclusion, *TLR2* could be regarded as candidate gene of Gansu alpine fine-wool sheep for mastitis resistance selection.

**Key words:** Gansu alpine fine-wool sheep; *TLR2* gene; mastitis; PCR-SSCP; somatic cell score

收稿日期: 2015-03-19

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); 甘肃省高等学校基本科研业务费项目

作者简介: 张欣 (1988-), 女, 山东诸城人, 硕士研究生, 研究方向为动物免疫与抗病。(E-mail) zhangxinfreedom@163.com

通讯作者: 张小丽, (E-mail) zhxl228@163.com

甘肃高山细毛羊 (Gansu alpine fine-wool sheep) 是中国育成的第一个高山型毛肉兼用细毛羊品种, 它是以新疆细毛羊、高加索细毛羊为父本, 当地蒙古羊、西藏羊为母本, 经过杂交改良、横交固定、选育提高 3 个育种阶段培育而成的。甘肃高山细毛羊主要分布

在祁连山高寒牧区,有优良的高原抗逆性,在高寒草原有着重要的生态学地位和社会经济意义<sup>[1-2]</sup>。品种育成后,为提高生产性能及羊毛品质开展了大量的选育工作并取得很大成效,但在选育过程中也出现一些常见的控制难度大的疾病,乳房炎就是其中之一,严重阻碍养羊业迅速发展。乳房炎是母羊在哺乳期及羔羊断乳前后常见的疾病,而且隐性乳房炎发病率高,病程长,给养羊业造成严重的经济损失<sup>[3-4]</sup>。链球菌与葡萄球菌是引起乳房炎的主要病原菌<sup>[5-6]</sup>,但是由于细菌的耐药性,仅利用抗生素治疗很难达到理想的效果。随着动物育种向分子水平发展,对乳房炎抗性候选基因的研究成为控制乳房炎的一个新切入点。Toll 样受体(TLR)属于 I 型跨膜蛋白受体,该受体在病原体入侵机体的早期即启动天然免疫<sup>[7]</sup>,在抗感染中起重要作用。基因多态性影响机体对疾病的遗传易感性,基因 *TLR* 位点多态性与炎性应答损伤和感染性疾病的遗传易感性相关<sup>[8-10]</sup>。*TLR2* 基因为 *TLR* 大家族中第 2 个成员,*TLR2* 基因编码的蛋白质分布很广泛,在脾脏、外周血白细胞和乳腺组织均高度表达<sup>[11-12]</sup>,它能够识别多种病原体相关分子模式,可对 G+菌的胞壁成分肽聚糖和脂磷壁酸、G-的类脂 A、细菌 DNA 等进行模式识别,还可识别完整 G+菌,从而激活细胞内信号传导机制。因此,*TLR2* 是研究羊乳房炎抗病性的重要候选基因。

研究表明,乳房炎和体细胞评分(SCS)的遗传力系数大约为 0.30~0.98,并认为能够根据 SCS 对抗乳房炎性状进行间接选择,因此 SCS 是目前对乳房炎进行监测最可靠的方法<sup>[13]</sup>。乳样中体细胞数(SCC)直接计数所得的数值差距范围太宽,且为偏态的分布频率,为避免分析中的不足,呈现较理想的统计学特征,可通过公式  $SCS = \lg_2(SCC/100\ 000) + 3$ <sup>[14-16]</sup>将 SCC 转换成 SCS。

为探索甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因多态性与乳房炎抗性之间的关系,本试验采用 PCR-SSCP 技术检测 *TLR2* 基因多态位点,并分析其多态性与体细胞评分(Somatic cell score, SCS)的相关性,为进一步研究标记辅助选择育种、培育乳房炎抗性新品系提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 血样 286 份甘肃高山细毛羊血液样品采自

甘肃省天祝县某规模化养殖场。

1.1.2 乳样 286 份乳样采自甘肃省天祝县某规模化养殖场,每只羊采集常乳 10 ml 左右。

### 1.2 方法

1.2.1 采血 每只羊于颈静脉采血 10 ml,柠檬酸葡萄糖(ACD)抗凝,-20℃冷冻保存备用。

1.2.2 乳样的处理 采用 Fossomatic Minor 仪器测得细胞数(SCC),通过公式  $SCS = \lg_2(SCC/100\ 000) + 3$  换算成体细胞评分(SCS)。

1.2.3 基因组 DNA 提取 采取常规酚氯仿抽提法从全血中提取基因组 DNA,经 1%琼脂糖电泳检测后-20℃冷冻保存。

1.2.4 引物设计与合成 根据 GenBank 发表的绵羊基因序列(登录号:NM-001048231)并参考相关文献,利用 PrimerPremier5.0 软件对羊 *TLR2* 基因可能存在突变位点的基因片段设计 1 对引物(表 1)。引物由上海生工生物有限公司合成。

表 1 引物名称、位置及序列

Table 1 The name, position and sequence of primers

引物	位置(bp)	序列(5'→3')
TLR2-1	11~31	CTTGTGGACAGCGTGGGTCT
TLR2-2	202~222	CCTCTGCAGGTCTCTGTGGCC

1.2.5 基因的扩增 采用 25 μl 反应体系:上下引物各 1 μl,模板 DNA 2 μl,灭菌双蒸水 8.5 μl, DNA-TAQ 预混酶 12.5 μl。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃延伸 15 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 PCR 产物的 SSCP 分析 取 2 μl PCR 产物,8 μl 变性剂(98%去离子甲酰胺、0.03%二甲苯青、0.025%溴酚蓝、0.5 mol/L 混合而成),经 98℃变性 10 min,迅速放置于冰上 10 min,以保持变性状态。在 14%非变性聚丙烯酰胺凝胶上,4℃、150 V,电泳 17 h,银染法显色。

1.2.7 克隆测序 PCR 产物经 SSCP 分析后,纯合基因型个体的 PCR 扩增产物进行凝胶纯化后送至北京金唯智生物科技有限公司进行双向测序。杂合基因需进行克隆再进行测序。

1.2.8 数据统计分析 用 DNASTAR 中的 Megalign、Clustal 对所测的甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基

因序列进行同源序列比对分析。通过 POPGEN32 计算 *TLR2* 基因的基因型频率、等位基因频率以及杂合度、卡方值等。体细胞计数(*SCC*) 高于  $6.40 \times 10^6$  或低于 5 000 均为异常, 在分析时剔除, 采用 SPSS19.0 统计软件一般线性模型, 对乳房炎性状受 *TLR2* 基因各基因型影响做显著性检验。采用下列公式进行最小二乘分析, 分析基因型效应:  $y_{jkl} = \mu + G_l + H_j + P_k + e_{jkl}$  其中:  $y_{jkl}$  为体细胞评分值;  $\mu$  为群体均值;  $G_l$  为第  $l$  种基因型的固定效应;  $H_j$  为第  $j$  个羊场的固定效应,  $j = 1, 2$ ;  $P_k$  为第  $k$  个胎次的固定效应,  $k = 1, 2, 3$ ;  $e_{jkl}$  为随机误差效应。

2 结 果

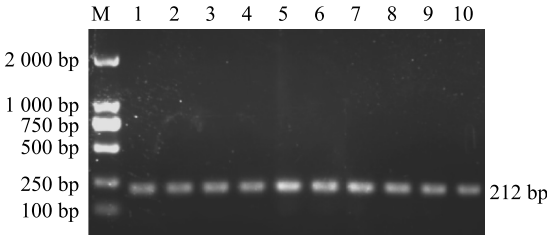
2.1 *TLR2* 基因的 PCR 扩增

应用特异性引物以提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增出 212 bp 的特异性目的条带(图 1), 与预期片段大小一致。

2.2 SSCP 分型及测序分析

PCR 产物经 SSCP 电泳, 在扩增片段中发现多态性, 根据条带不同分为 3 种基因型(图 2): AA、AB、BB。将不同基因型的 PCR 产物测序, 以 GenBank 中羊的 *TLR2* 基因序列(登录号 NM-001048231)为参考进行序列比对分析(图 3), 共发现 5 个突变位点, 分别为 62 bp 处 G→A, 72 bp 处 C→T, 92 bp 处

T→G, 120 bp 处 A→G, 179 bp 处 G→A。突变引起 3 处氨基酸的改变(图 4), 62 bp 处和 179 bp 处核苷酸的颠换导致精氨酸( Arg) 变为赖氨酸( Lys), 92 bp 处的核苷酸颠换导致缬氨酸( Val) 变为甘氨酸( Gly)。



M: DL2000 DNA Marker ; 1~10: PCR 产物。

图 1 *TLR2* 基因目的片段的扩增  
Fig.1 Amplification of *TLR2* gene

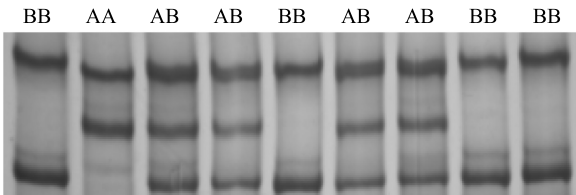


图 2 *TLR2* 基因的 PCR-SSCP 检测  
Fig.2 Electrophoresis profile of *TLR2* gene by PCR-SSCP

Majority	CTTTGTGGACAGCGTGGGTCTGGGCTGTAATCAGCGTGTTCACGGAAGGAGCCCTCTGATCAGGCTTCTTCTCTGTCTTGT	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
TLR 2-l.seq	.....	80
A.seq	.....	80
B.seq	.....A.....T.....	80
Majority	GACCCAACTGGTGTCTGCGATGGCCATTCAGATCTTTAACTCCATCCCTCTGGTCTCACGGCAAGTGTGAAAAGCCT	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
TLR 2-l.seq	.....	160
A.seq	.....	160
B.seq	.....G.....G.....	160
Majority	TGACCTGTCCGACAACGAGATCACCTATGTGCGCAACAGAGACCTGCAGAGG	
	170 180 190 200 210	
TLR 2-l.seq	.....	212
A.seq	.....	212
B.seq	.....A.....	212

图 3 *TLR2* 基因等位基因核苷酸比对结果  
Fig.3 Nucleotide sequences alignment of alleles of *TLR2*

2.3 基因型频率与等位基因频率

根据 PCR-SSCP 结果, 通过遗传学统计方法对

286 头甘肃高山细毛羊进行基因型频率和等位基因频率的统计分析, 结果见表 2。

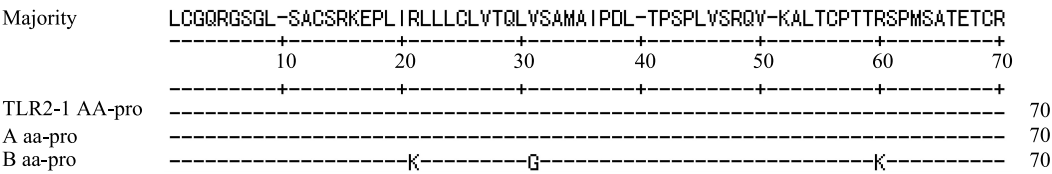


图 4 *TLR2* 基因等位基因氨基酸序列比对结果  
Fig.4 Amino acid sequences alignment of alleles of *TLR2*

表 2 基因型频率和等位基因频率  
Table 2 Genotype frequency and allele frequency

基因型频率			等位基因频率	
AA	AB	BB	A	B
0.09	0.41	0.51	0.29	0.71

2.4 遗传多态性分析

群体的多态信息含量(*PIC*)、纯合度( $H_o$ )、杂合度( $H_e$ )、有效等位基因数( $N_e$ )和 Hardy-Weinberg 平衡分析结果见表 3,由表 3 可以看出多态信息含量(*PIC*)为 0.25~0.50,处于中度多态。经 $\chi^2$ 适合性检验, $\chi^2$ 值为 0.085 ( $P>0.05$ ),该突变达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 3 *TLR2* 基因的遗传多态性指标  
Table 3 *PIC*,  $H_o$ ,  $H_e$ ,  $N_e$  and  $\chi^2$  of *TLR2* gene

多态信息含量	杂合度	纯合度	有效等位基因数	卡方
0.327	0.594	0.406	1.701	0.085

2.5 基因型与 SCS 相关性分析

应用 SPSS19.0 软件中的一般线性模型分析基因型对乳房炎性状的效应,结果(表 4)表明,AB 和 BB 基因型个体的 SCS 显著高于 AA 型个体,表明 A 等位基因可能是甘肃高山细毛羊乳房炎抗性的优势基因。

表 4 *TLR2* 基因不同基因型在群体中 SCS 的最小二乘均值及标准误  
Table 4 Group least squares mean value and standard error of *TLR2* gene of different genotypes

项目	基因型		
	AA	AB	BB
LSM±SE	2.32±0.40a	3.28±0.16b	3.24±0.15b

同一行数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

3 讨论

3.1 *TLR2* 基因遗传多态性分析

本试验对甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因的多态性进行了分析, $\chi^2$ 检验结果显示,试验群体遗传突变处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,说明所选甘肃高山细毛羊群体 *TLR2* 基因处于遗传平衡状态。对于一个群体来说, $H_e$  与 *PIC* 数值越大,反映此群体基因的一致性越差、变异性越大,选择潜力越大;反之,数值越小,反映群体变异越小,选择潜力也就越小<sup>[17]</sup>。本试验中 *PIC* 达到 0.327 ( $0.25<P<0.50$ ),为中度多态,遗传变异大。因此,在甘肃高山细毛羊选育过程中应该加强人工选择的强度。就基因频率而言,A、B 等位基因在试验羊群中均有分布,等位基因频率分别为 0.29 和 0.71,B 等位基因在群体中占优势,可能是因为核苷酸的颠换导致蛋白质氨基酸的改变,从而改变了基因的部分功能;另外,甘肃高山细毛羊是毛肉兼用细毛羊品种,在对其选育过程中可能过于注重产毛量与产肉率的提高,忽视了抗病性的选育,从而增加了 B 等位基因频率,相对降低了 A 等位基因频率。

3.2 *TLR2* 基因多态性与甘肃细毛羊乳房炎的关系

相关研究结果表明,*TLR2* 基因多态性与某些疾病的发生有相关性,*TLR2* 基因参与猪链球菌诱导的自噬作用,其多态性与蛋鸭免疫细胞因子 TL-2 显著相关,Asp299Gly(表示 299 位点突变导致氨基酸突变,使天冬氨酸突变为甘氨酸)与病情的严重程度有较大相关性<sup>[18]</sup>,Arg667Trp(表示 667 位点突变导致氨基酸突变,使精氨酸突变为色氨酸)多态性与结核的易感性相关<sup>[19]</sup>。*TLR2* 基因能够识别完整的 G+菌,比如引起羊乳房炎的主要致病菌金黄色葡萄球菌和链球菌<sup>[20]</sup>。本试验发现甘肃高山细毛羊



*TLR2* 基因存在多态位点,其中 179 bp 处发生突变,存在多态性,这与马腾壑等<sup>[21]</sup>的研究结果相近,表明此处突变可能对乳房炎抗性有极大影响。*SCS* 与乳房炎的遗传力约为 0.30~0.98,因此,本试验将 *SCC* 转换为 *SCS*,并将其作为乳房炎的表征数据进行相关性分析,结果显示不同基因型对 *SCS* 影响有显著差异,AA 基因型个体 *SCS* 显著低于 AB 型和 BB 型个体( $P<0.05$ ),说明 AA 基因型与乳房炎抗病性有关,所以 A 等位基因可能为抗乳房炎的优势基因。

甘肃高山细毛羊 *TLR2* 基因有遗传多态性,属中度多态。*TLR2* 基因多态性对乳房炎有较大调控作用,*TLR2* 基因可作为甘肃细毛羊乳房炎抗性的候选基因,培育甘肃高山细毛羊乳房炎抗性品种。

#### 参考文献:

- [1] 李 伟. 甘肃高山细毛羊的品种选育与利用[J]. 中国牧业通讯, 2009(24): 33-34.
- [2] 刘 秀,安清明,胡 江,等. 甘肃高山细毛羊瘦素基因 *Leptin* 第 3 外显子多态性与生长速度相关性分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(4): 470-475.
- [3] CHEW B P, HOLLEN L L, HILLERS J K, et al. Relationship between Vitamin A and  $\beta$ -carotens in blood plasma and milk and mastitis in lactating Holsteins [J]. Dairy Sci, 1982, 65: 2111-2118.
- [4] MENZIES P I, RAMANOON S Z. Mastitis of sheep and goats[J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2001, 17(2): 333-358.
- [5] 王晓兰,孙庆华. 奶牛隐性乳房炎病原菌的分离鉴定与药物敏感性试验[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(10): 43-44.
- [6] 刘长彬,钟发刚,卢春霞,等. 新疆石河子地区隐性乳房炎致病菌调查及分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 181-184.
- [7] 吴 双,朱善元,王永娟,等. 鸡 Toll 样受体 2 的克隆表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 586-589.
- [8] SZOMOLANYI-TSUDA E, LIANG X, WELSH R M, et al. Role for *TLR2* in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus *in vivo* [J]. J Virol, 2006, 80: 4286-4291.
- [9] DING K, SHIBUI A, WANG Y, et al. Impaired recognition by Toll-like receptor 4 is responsible for exacerbated murine *Pneumocystis pneumonia* [J]. Microbes Infect, 2005, 7: 195-203.
- [10] ZHANG C, WANG S H, LASBURY M E, et al. Toll-like receptor 2 mediates alveolar macrophage response to *Pneumocystis murina* [J]. Infect Immun, 2006, 74: 1857-1864.
- [11] FLOTH, H ALAAS O, LIEN E. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide [J]. Immunol, 2000, 164(4): 2064-2069.
- [12] GOLDAMMER T, ZERBE H. Mastitis increases mammary mRNA abundance of  $\beta$ -defensin 5, toll-like-receptor 2 (*TLR2*), and *TLR4* but not *TLR9* in cattle [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(1): 174-185.
- [13] MRODE R A, SWANSON J T. Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle [J]. Animal Breeding Abstracts, 1996, 64(11): 847-857.
- [14] SCHUKKEN Y H, WILSON D J, WELCOMEF, et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts [J]. Vet Res, 2003, 34(5): 579-596.
- [15] CARLEN E, STRANDBERG E, ROTH A. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish holstein cows [J]. J Dairy Sci, 2004, 87(9): 3062-3070.
- [16] ODEGARD J, JENSEN J, MADSEN P, et al. Detection of mastitis in dairy cattle by use of mixture models for repeated somatic cell scores, a Bayesian approach via gibbs sampling [J]. J Dairy Sci, 2003, 86(1): 3694-3703.
- [17] 孔晶晶,滚双宝.猪 *SLA-DQA* 基因外显子 4 多态性分析[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 86-90.
- [18] YANG I A, BARTON S J, RORKE S, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics [J]. Genes Immun, 2004, 11: 41-45.
- [19] BEN-ALI M, BARBOUCHE M R, BOUSNINA S, et al. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004, 11(3): 625-626.
- [20] HEBERT A, SAYASITH K, SENECHAL S, et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovinemastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193: 57-62.
- [21] 马腾壑,许尚忠,王兴平,等.奶牛 *TLR2* 基因遗传变异与乳腺炎细胞评分的相关研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(4): 332-336.

(责任编辑:陈海霞)