

蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因的 *Hae* III 酶切多态性分析

孙东晓¹, 张 沅¹, 李 宁²

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 采用限制性内切核酸酶 *Hae* III 对蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的 285bp 扩增产物进行了 PCR-RFLP 多态性分析, 共检测到 17 种基因型, 由 A、B、C、D、E、F 和 H 等 7 个复等位基因控制; 通过酶切图谱分析发现蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的 154、168 和 220 位碱基表现出多态性。并对基因型频率和等位基因频率进行了统计分析, 结果表明, *GOLA-DRB3* 基因的部分基因型频率和等位基因频率在两个群体之间差异显著 ($P < 0.10$ 或 $P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$); χ^2 适合性检验结果表明, 蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的 *Hae* III 酶切位点均未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P < 0.01$)。

关键词: 蒙古山羊; 哈萨克山羊; *GOLA-DRB3*; PCR-RFLP

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)01-0055-04

Polymorphism Analysis of the *GOLA-DRB3* Gene Digested with *Hae* III in Mongolian Goat and Kazakh Goat

SUN Dong-Xiao¹, ZHANG Yuan¹, LI Ning²

1. College of Animal Science And Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State Key Laboratory For Agro-Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The exon2 of *GOLA-DRB3* gene was amplified and a uniform fragment of 285bp was obtained in Mongolian Goat and Kazakh Goat. The 285bp PCR product was digested with restriction endonuclease *Hae* III and genetic polymorphism was investigated by PCR-RFLP. Seventeen kinds of genotypes were found in two populations, which were controlled by seven alleles. There are significant differences in some genotypic frequencies and gene frequencies between the two populations ($P < 0.10$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); The results of χ^2 test showed that genotypes of *GOLA-DRB3* gene in two populations did not fit with Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$).

Key words: Mongolian goat; Kazakh goat; *GOLA-DRB3*; PCR-RFLP

主要组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC), 是一组紧密连锁的高度多态的基因座所组成的基因复合体, 广泛存在于脊椎动物中^[1,2]。MHC 的表达产物称为 MHC 抗原, 是一类细胞表面糖蛋白, 主要功能是与外来抗原结合为复合体, 从而被 T 淋巴细胞识别并将外来抗原递呈给 T 淋巴细胞, 使之激活, 触发免疫反应。在动物

机体的免疫系统中发挥着非常重要的抗原递呈作用, 与家畜对疾病的易感性和抗性有关^[3,4]。目前已有 MHC 与牛乳房炎、口蹄疫、慢性后脊椎轻瘫、绵羊的线虫等疾病的抗性和易感性相关的报道^[5,6]。由于在家畜免疫系统的重要作用, MHC 作为抗病性的候选标记基因, 成为家畜抗病育种研究中最为活跃的部分。

收稿日期: 2002-12-20; 修回日期: 2003-03-18

基金项目: 国家自然科学基金 (30170676) 和国家基础研究重点发展规划 (TG2000016105) 项目资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30170676) and the State Key Basic Research and Development Project of China (No. TG2000016105)]

作者简介: 孙东晓 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为动物分子育种。Tel: 010-62893417, E-mail: sundx@cau.edu.cn

通讯作者: 张 沅 (1943-), 男, 教授, 博士生导师。Tel: 010-62893687, E-mail: changy@cau.edu.cn

不同物种的 MHC 的命名不同,山羊的 MHC 称为 GOLA (goat lymphocyte antigen), 即山羊的白细胞抗原^[3,4]。山羊 MHC 的结构和功能与牛、绵羊的 MHC 非常相似, 同源性非常高, 山羊 MHC 的研究是在牛和绵羊 MHC 的研究基础上进行的, 起步稍晚^[7~9]。本研究首次对我国特有的蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因的外显子 2 的分子遗传多态性进行了初步分析, 旨在为山羊的抗病育种研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

蒙古山羊(59 只)和哈萨克山羊(66 只)的血样分别采自内蒙古锡林郭勒盟蒙古羊股份合作牧场和新疆畜牧科学院巩乃斯种羊场, 颈静脉采血, ACD 抗凝, -20°C 冻存。

1.2 基因组 DNA 的提取

常规方法从冻存血样中提取基因组 DNA, TE 溶解^[10], -20°C 冻存。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

引物设计参照文献^[10], 扩增反应体积为 $50\ \mu\text{L}$, 其中 $1.5\ \text{mmol/L}\ \text{MgCl}_2$, dNTPs $200\ \mu\text{mol/L}$, 引物 $0.1\ \mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 约 200 ng。反应条件为 $95^{\circ}\text{C}\ 4\ \text{min}$, 然后 $95^{\circ}\text{C}\ 1\ \text{min}$, $64^{\circ}\text{C}\ 1\ \text{min}$, $72^{\circ}\text{C}\ 1\ \text{min}$, 30 个循环, 72°C 保温 7 min。

1.4 PCR 产物的浓缩与酶切

将 $50\ \mu\text{L}$ PCR 产物, 以 2 倍体积无水乙醇和 1/10 体积 $3\ \text{mol/L}\ \text{NaAc}$ 沉淀, 再以 70% 乙醇洗涤沉淀两次, 真空干燥后以 $6\ \mu\text{L}$ 灭菌双蒸水溶解 DNA。取 $6\ \mu\text{L}$ 浓缩 PCR 产物, 加入 $0.5\ \text{U}\ \text{HaeIII}$, $0.73\ \mu\text{L}\ 10\times$ 酶切缓冲液, 37°C 温育完毕, 酶切产物经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳或者 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

参照 M. Amills 等^[8,9] 所报道的西班牙山羊 *MHC-DRB3* 基因外显子 2 的引物序列合成引物扩增蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2, 均得到了一条 285bp 的特异性条带, 其含有全部的 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的序列以及内含子 1 下游的几个碱基序列。

2.2 PCR-RFLP 结果

采用限制酶 *HaeIII* 对蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的 PCR 扩增产物进行消化, 结果出现了 17 种基因型, 分别命名为 AA、BB、CC、EE、HH、FF、AB、AC、AE、AH、BC、BE、CD、CE、CF、CH、DE; 由 A、B、C、D、E、F 和 H 等 7 个复等位基因控制。基因型和等位基因的酶切片段见表 1、图 1。

根据酶切图谱分析的结果表明: 蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的第 154、168 和 220 位的碱基为多态。

表 1 蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的基因型和等位基因

Table 1 Genotypes and alleles of exon2 of *GOLA-DRB3* gene in Mongolian Goat and Kazakh Goat

基因型 Genotype
<i>HaeIII</i> AA: 168bp/117bp
<i>HaeIII</i> BB: 154bp/117bp/14bp
<i>HaeIII</i> CC: 154bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> EE: 154bp/131bp
<i>HaeIII</i> HH: 220bp/65bp
<i>HaeIII</i> FF: 154bp/66bp/65bp
<i>HaeIII</i> AB: 168bp/154bp/117bp/14bp
<i>HaeIII</i> AC: 168bp/154bp/117bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> AE: 168bp/154bp/131bp/117bp
<i>HaeIII</i> AH: 220bp/168bp/117bp/65bp
<i>HaeIII</i> BC: 154bp/117bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> BE: 154bp/131bp/117bp/14bp
<i>HaeIII</i> CD: 168bp/154bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> CE: 154bp/131bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> CF: 154bp/66bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> CH: 220bp/154bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> DE: 168bp/154bp/131bp/65bp/52bp
等位基因 Allele
<i>HaeIII</i> A: 168bp/117bp
<i>HaeIII</i> B: 154bp/117bp/14bp
<i>HaeIII</i> C: 154bp/65bp/52bp/14bp
<i>HaeIII</i> D: 168bp/65bp/52bp
<i>HaeIII</i> E: 154bp/131bp
<i>HaeIII</i> F: 154bp/66bp/65bp
<i>HaeIII</i> H: 220bp/65bp

2.3 PCR-RFLP 结果的统计分析

统计分析表明: 蒙古山羊和哈萨克山羊之间 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的等位基因 *HaeIII* E 的频率差异极显著 ($P < 0.01$), *HaeIII* B、D、F、H 的频率差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.10$); *HaeIII* BC、CD 的频率差异极显著 ($P < 0.01$), 基因型 *HaeIII* AE 的频率差异显著 ($P < 0.05$)。蒙古山羊的 *HaeIII* AB、AC、BC 和 *HaeIII* A、B、C、E 分别为优势基因型和优势基因; 哈萨克山羊的 *HaeIII* EE、AE、CD 和 *HaeIII* A、B、C、E 分别为优势基因型和优势基因。

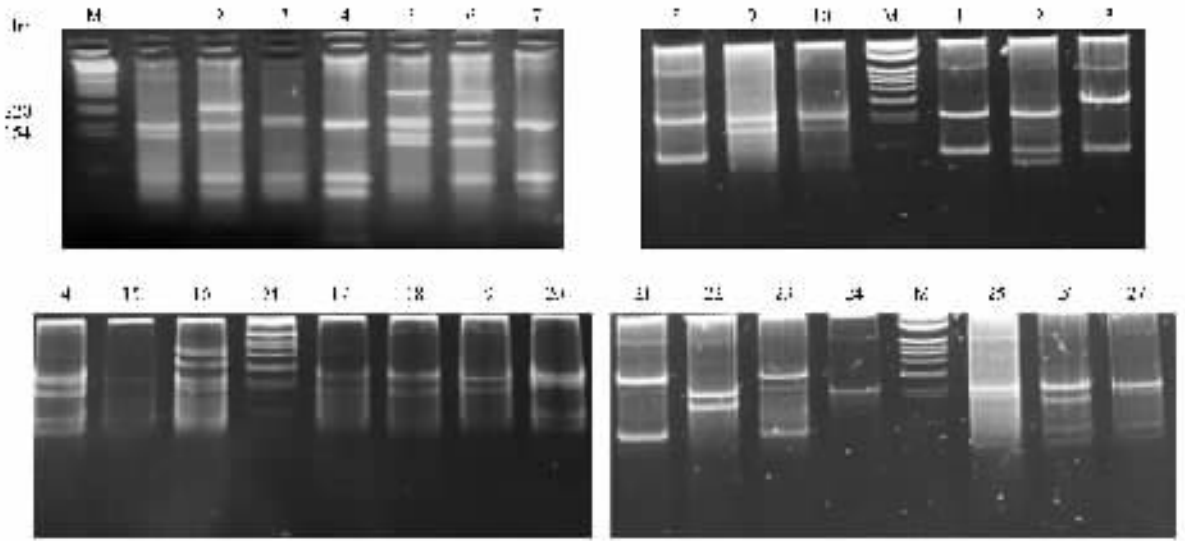


图 1 蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的酶切结果

M:1kb ladder;泳道 18:AA;泳道 9,19,22:BB;泳道 4,12,15:CC;泳道 16,25:EE;泳道 8,11:FF;泳道 13,21,23:HH;泳道 17:AB;泳道 14:AC;泳道 5:AE;泳道 6:AH;泳道 10,26:BC;泳道 24:BE;泳道 1,27:CE;泳道 3:CD;泳道 7:CF;泳道 2:CH;泳道 20:DE。

Fig. 1 Band Pattern of exon2 of *GOLA-DRB3* digested with *Hae* III in Mongolian Goat and Kazakh Goat

M:1kb ladder;lane 18:AA;lane 9,19,22:BB;lane 4,12,15:CC;lane 16,25:EE;lane 8,11:FF;lane 13,21,23:HH;lane 17:AB;lane 14:AC;lane 5:AE;lane 6:AH;lane 10,26:BC;lane 24:BE;lane 1,27:CE;lane 3:CD;lane 7:CF;lane 2:CH;lane 20:DE.

表 2 蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因的基因型频率和基因频率

Table 2 Genotypic frequencies and allelic frequencies of *GOLA-DRB3* in Mongolian Goat and Kazakh Goat

基因型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequency			
	个体数 No.	蒙古山羊 Mongolian Goat	个体数 No.	哈萨克山羊 Kazakh Goat
<i>Hae</i> III AA	2	0.034	2	0.030
<i>Hae</i> III BB	5	0.085	5	0.076
<i>Hae</i> III CC	5	0.085	5	0.076
<i>Hae</i> III EE	4	0.068	10	0.152
<i>Hae</i> III FF	2	0.034	0	0.000
<i>Hae</i> III HH	0	0.000	2	0.030
<i>Hae</i> III AB	8	0.136	4	0.061
<i>Hae</i> III AC	7	0.119	4	0.061
<i>Hae</i> III AE	1	0.017	7	0.106**
<i>Hae</i> III AH	1	0.017	0	0.000
<i>Hae</i> III BC	15	0.254	5	0.076***
<i>Hae</i> III BE	2	0.034	6	0.091
<i>Hae</i> III CD	2	0.034	12	0.182***
<i>Hae</i> III CE	3	0.051	1	0.015
<i>Hae</i> III CF	1	0.017	0	0.000
<i>Hae</i> III CH	0	0.000	2	0.030
<i>Hae</i> III DE	1	0.015	1	0.015
等位基因 Allele	等位基因频率 Allelic frequency			
		蒙古山羊 Mongolian Goat	哈萨克山羊 Kazakh Goat	
<i>Hae</i> III A		0.178	0.144	
<i>Hae</i> III B		0.300	0.189**	
<i>Hae</i> III C		0.322	0.258	
<i>Hae</i> III D		0.025	0.098**	
<i>Hae</i> III E		0.127	0.265***	
<i>Hae</i> III F		0.042	0.000**	
<i>Hae</i> III H		0.008	0.045*	

注: * 表示差异显著, $P < 0.10$; ** 表示差异显著, $P < 0.05$; *** 表示差异极显著, $P < 0.01$ 。
Note: * means significant difference ($P < 0.10$), ** means more significant difference ($P < 0.05$), *** means most significant difference ($P < 0.01$)

2.4 χ^2 适合性检验

采用 χ^2 适合性检验方法分析了蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 是否处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, χ^2 统计结果见表 3。

表 3 蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 3 Test of Hardy-Weinberg equilibrium of *GOLA-DRB3* in Mongolian Goat and Kazakh Goat

基因型 Genotype	蒙古山羊 Mongolian Goat			哈萨克山羊 Kazakh Goat		
	观察值 Observed value	理论值 Expected value	(O-E) ² /E	观察值 Observed value	理论值 Expected value	(O-E) ² /E
	<i>Hae</i> III AA	2	0.869	0.009	2	1.369
<i>Hae</i> III BB	5	5.310	0.018	5	2.358	2.960
<i>Hae</i> III CC	5	6.117	0.204	5	4.393	0.084
<i>Hae</i> III EE	4	0.952	9.759	10	4.635	6.210
<i>Hae</i> III FF	2	0.104	34.560	0	0.000	0.000
<i>Hae</i> III HH	0	0.004	0.000	2	0.137	25.334
<i>Hae</i> III AB	8	6.301	0.458	4	3.593	0.046
<i>Hae</i> III AC	7	6.763	0.008	4	4.904	0.167
<i>Hae</i> III AE	1	2.668	1.043	7	5.037	0.765
<i>Hae</i> III AH	1	0.168	4.120	0	0.855	0.855
<i>Hae</i> III BC	15	11.399	1.138	5	6.437	0.321
<i>Hae</i> III BE	2	4.496	1.386	6	6.611	0.056
<i>Hae</i> III CD	2	0.950	1.161	12	3.337	2.596
<i>Hae</i> III CE	3	4.825	0.690	1	9.024	7.135
<i>Hae</i> III CF	1	1.596	0.223	0	0.000	0.000
<i>Hae</i> III CH	0	0.304	0.304	2	1.533	0.142
<i>Hae</i> III DE	1	0.375	1.042	1	3.428	1.720
总和 Total	59		56.123	66		48.736

χ^2 适合性检验结果表明,蒙古山羊和哈萨克山羊的 χ^2 值分别为 56.123 ($P < 0.10$) 和 48.736 ($P < 0.01$), 说明蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因外显子 2 的 *Hae* III 酶切位点都未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。但是从统计过程中可以看出,蒙古山羊和哈萨克山羊 *Hae* III 酶切位点的非平衡状态主要是因为基因型 *FF* 和 *HH* 的理论值太小所引起的,等位基因 *F* 和 *H* 仅仅反映了其第 154 和第 220 位的碱基的突变,因此蒙古山羊的第 168 位和哈萨克山羊 168、154 位的碱基则是处于 Hardy-Weinberg 平衡状态的。

3 讨 论

多态程度高而且多碱基突变是脊椎动物 MHC 基因的一个非常突出的特点,目前国内外学者对人类、小鼠,以及牛、猪、绵羊、山羊、家禽等的 MHC 研究结果都已经证明了这一点^[1~9]。本研究首次对我国特有的地方山羊品种,蒙古山羊和哈萨克山羊的 *GOLA-DRB3* 基因的外显子 2 的分子遗传多态性进行了检测,共发现了 17 种基因型,受 7 个复等位基因 (*A*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F* 和 *H*) 控制,多态程度也非常高。另外,本研究发现的 *GOLA-DRB3* 的等位基因的个数和种类与 M. Amills 等^[9] 报道的西班牙山羊 *MHC-DRB3* 基因外显子 2 的 *Hae* III 酶切多态性完全一致,但是基因型的种类却多于 M. Amills 等的报道。由于蒙古山羊和哈萨克山羊分别产自我国的内蒙古和新疆地区,是在特殊的地理环境条件和气候条件下长期进化和适应而形成的地方品种,而且没有引入国外品种的基因,具有抗逆性、抗病能力较强的特性。因此,它们与西班牙山羊 *MHC-DRB3* 基因外显子 2 的基因型种类的差异,可能是长期的地理环境条件和气候条件的不同而形成的差异所造成的。遗憾的是,由于 M. Amills 等的报道没有基因型频率的统计结果,因此不能做更细致的比较。

由于 *MHC* 的基因座具有丰富的多态性,经常被用于人类的群体遗传学分析,通过人类 *MHC* (*HLA*) 的多态性研究,对不同种族和不同民族的群体遗传特征进行探讨。本研究通过 *GOLA-DRB3* 的基因型频率和基因频率的统计分析发现了部分的基因型频率和基因频率在蒙古山羊和哈萨克山羊两个品种之间存在显著差异或极显著差异,这可能是因为蒙古山羊和哈萨克山羊的产地不同,属于不同

的种群,也分别具有独特的特性,但是这种差异是否表现在 *GOLA-DRB3* 基因的基因型频率和基因频率的差异,还有待于增加样本含量进行确证。

本研究共检测到 17 种基因型,因为多态程度非常高,因此样本含量就相对较小,使得几种基因型只在一个个体检测到,而且蒙古山羊的 *Hae* III *FF* 基因型和哈萨克山羊的 *Hae* III *HH* 基因型未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态,可能也是由于这个原因造成的,有待于扩大样本含量进行确证。

参 考 文 献 (References):

- [1] Andersson L, Bohme J, Rask L, Peterson P A. Genomic hybridization of bovine class II Major Histocompatibility Complex genes; I. Extensive polymorphisms of DQA and DQB genes. *Animal Genetics*, 1986, 17: 95.
- [2] Andersson L, Rask L. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics*, 1988, 27: 110~120.
- [3] LIN Jian. Immunogenetics. Beijing: Higher Education Publication, 1997.
林 剑. 免疫遗传学. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [4] ZHAO Tong-Mao. Principle and Application of HLA Typing. Shang Hai Science and Technology Publication, 1984.
赵桐茂. HLA 分型原理和应用. 上海: 上海科学技术出版社, 1984.
- [5] Blattman A W, Hulme D J, Kinghorn B P, Woolaston R R, Gray G D, Beh K J. A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistances to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Animal Genetics*, 1993, 24: 277~282.
- [6] Xu A, Van Eijk M J, Park C, Lewin H A. Polymorphism in *BOLA-DRB3* exon 2 correlated with resistance to persistent lymphocytosis caused by Bovine leukemia virus. *Journal of Immunology*, 1993, 15(12): 6977~6985.
- [7] NESSE L L, Larsen H J. Lymphocyte antigens in Norwegian goats; serological and genetics studies. *Animal Genetics*, 1987, 18, 261~268.
- [8] Amills M, Francino O. Nest PCR allows the characterization of *Taq* I and *Pst* I RFLPs in the second exon of the Caprine MHC class II DRB gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 48: 313~321.
- [9] Amills M, Francino O. A PCR-RFLP typing method for the Caprine MHC class II DRB gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 55: 255~260.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (Second edition). New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.