

荷斯坦牛 *BoLA-DRB₃* 基因多态性及其与乳房炎抗性关系分析

张夫千, 郑小敏, 唐大伟, 赵 鹏, 史远刚*

(宁夏大学农学院 四正生物工程研究中心, 银川 750021)

摘要: 以 PCR-RFLP 方法检测了 *BoLA-DRB₃* 基因在荷斯坦奶牛中的多态性, 并统计分析了产犊年季和 *BoLA-DRB₃* 基因分别被 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切后的不同基因型对 SCS 及其它产乳性状的影响。结果表明: *Rsa* I AD 型的 SCS 显著高于 *Rsa* I EG 型 ($P < 0.05$)。另外, 年季和 *BoLA-DRB₃* 被 *Rsa* I 酶切后的不同基因型对蛋白率和乳脂率的影响均达到了显著水平 ($P < 0.05$)。 *Hae* III AB 型个体的蛋白率显著高于 *Hae* III AA 型 ($P < 0.05$)。

关键词: 奶牛乳房炎; 抗性; MHC; *BoLA-DRB₃*; SCS

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)02-0115-05

Research on Polymorphism of *BoLA-DRB₃* Gene in Holstein and the Relationship between Different Genotypes and Resistance to Dairy Mastitis

ZHANG Fu-qian, ZHENG Xiao-min, TANG Da-wei, ZHAO Peng, SHI Yuan-gang*

(Agriculture School, Ningxia University, Syngen Bio-tech Search Center, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In this study, the restriction polymorphism of *BoLA-DRB₃* loci in Holstein was investigated by PCR-RFLP, and the effect of year-season of calving and different genotypes of *BoLA-DRB₃* loci respectively digested by *Rsa* I and *Hae* III was analysed. The results suggested that SCS in individuals of *Rsa* I AD genotype were significantly higher than that in individuals of *Rsa* I EG genotype ($P < 0.05$); and that season of calving and different genotypes digested by *Rsa* I had significant effects on protein and fat percentage at level of $P < 0.05$; and that protein percentage in individuals of *Hae* III AB genotype were significantly higher than that in individuals of *Hae* III AA genotype ($P < 0.05$).

Key words: dairy mastitis; resistance; MHC; *BoLA-DRB₃*; SCS

奶牛乳房炎(mastitis)是极其复杂的疾病,目前仍是奶牛场的常发病和难以防治的疾病之一,多年来一直困扰着世界奶牛业的发展。长期以来大量学者对它进行了详尽的研究,并且从病因、发病表现、发病规律、检测诊断和预防治疗方面入手,结合各种方法,如酶检验法和基因治疗等^[1],来减少由于乳房炎造成的经济损失,并取得了一定效果。但是,其造成的经济损失在奶牛业中仍然占主要地位,并且从遗传育种的角度来看,这样发展最终会阻碍或干扰

遗传选育。所以用遗传育种的方法来选育对乳房炎有高抗性的奶牛群,降低乳房炎的发生率,成为控制乳房炎的一个新的切入点。

MHC 是主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex)的简称,是由紧密连锁的高度多态的基因位点组成的染色体上的一个遗传区域。它广泛存在于脊椎动物中,最早由 Snell 等在小鼠的皮肤移植试验中发现。MHC 的表达产物称为 MHC 抗原,在动物机体的免疫系统中发挥着非常重

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 宁夏重大科技攻关项目——高产奶牛综合配套技术; 国家星火计划——牛、羊繁育新技术商业化开发

作者简介: 张夫千(1979-),男,浙江宁海人,硕士生,主要从事动物分子育种研究

* 通讯作者: 史远刚,教授,主要从事胚胎工程研究, E-mail: shyga818@126.com

要的抗原递呈作用,与家畜的抗病性和易感性密切相关,目前已证实 MHC 与人类和家畜的多种疾病之间存在着强相关^[2,3]。BoLA 是牛 MHC 的简称,位于牛的第 23 号染色体上,其 I 类基因仅含有一个位点 A; II 类基因含有 DR、DQ、DY、DO、DN、DI、DM、TAP、LM 等亚区^[2~5]。研究表明 DR 亚区的 DRB₃ 所编码的 MHC 抗原在免疫系统中发挥着最主要的作用,其第 2 外显子编码抗原的功能区(抗原结合区)^[4]。本研究采用 PCR-RFLP 方法对宁夏某牛场奶牛的 BoLA-DRB₃ 基因的第 2 外显子的遗传多态性进行了初步分析,并统计分析了其乳房炎抗性和易感性的关系,为选择高抗病性和高生产性能的荷斯坦奶牛组建 MOET 核心群提供辅助手段。

1 材料与方法

1.1 试验动物

奶牛血样(60 只)采自四正奶牛场,颈静脉采血 5 mL,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^[6]。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

引物设计参照文献^[7],由上海生工合成:DRB3R (5'-CTCCACACTGGCCGTCAC-3') and DRB3F (5'-TCCCGCATTGGTGGGTGT-3')。反应体系组成为:10 × PCR 缓冲液(20 mmol/L MgCl₂) 3.7 μL、上下游引物(25 pmol/μL)各 0.5 μL、dNTPs(10 mmol/L) 1 μL、Taq DNA 聚合酶(2 U/μL)1 μL、模板 DNA 1 μL,加超纯水至终体积 25 μL。反应条件:95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 64 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环;72 °C 5 min。

1.4 PCR 产物的酶切与电泳

将 15 μL PCR 产物、3 μL 10 × 酶切缓冲液、2 μL 限制性内切酶(10 U/μL)和 15 μL 灭菌双蒸水混合,37 °C 恒温消化 12 h。消化产物以 2 倍无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 的 NaCA 沉淀,再以 70%乙醇洗涤沉淀 2 次,空气干燥后,以 10 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。最后用 4%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

根据 Ledwidge 等^[7]设计的快速测定 DRB₃ 等位基因的引物序列分别对中国荷斯坦牛的基因组 DNA 进行扩增,得到 1 条 395 bp 的特异性带,由于

扩增前没有测定样品 DNA 的浓度,所以扩增产物不一样所致(见图 1)。

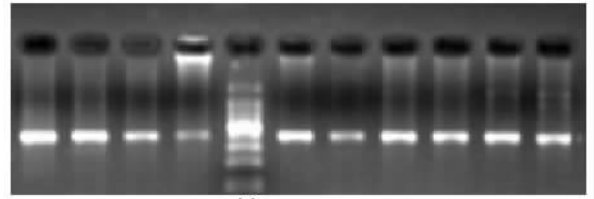


图 1 BoLA-DRB₃ 基因的扩增

Fig. 1 PCR product of the gene of BoLA-DRB₃ locus

2.2 BoLA-DRB₃ 基因的 PCR-RFLP 结果

BoLA-DRB₃ 基因的多态性较高,仅用一种内切酶不足以揭示其所有的多态位点。本研究分别以 Rsa I 和 Hae III 2 种限制性内切酶分别对其 PCR 产物进行消化,从而分别揭示不同碱基的多态性。

Rsa I 酶切结果出现了 11 种基因型,其中 6 种基因型如下图所示:259/220/136/39bp(AD), 395/259/136bp(AE), 395/220/136/39bp(DE), 395/220/82/54/39bp(EG), 259/175/136/.. bp(AC), 220/175/136/39/.. bp(CD)。其中 395、259、220、175 和 136 bp 5 条带纹清晰可见,因此可根据它们来判断不同个体的基因型;等位基因 C 由 175 bp 和其它小于 100 bp 的条带组成,不能从国际 BoLA 命名委员会公布的等位基因中找到相同的酶切类型,可能为一个新的等位基因(见图 2)。

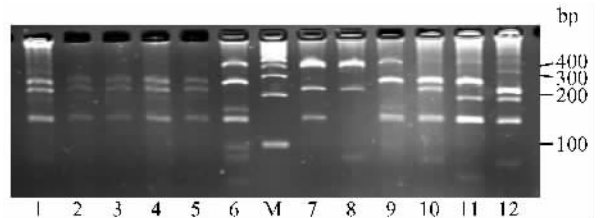


图 2 BoLA-DRB₃ 基因第 2 外显子的 Rsa I 酶切

Fig. 2 Bind patterns of the gene of BoLA-DRB₃ locus digested with Rsa I

Hae III 酶切结果出现了 3 种基因型:298/86/11bp(AA), 246/86/52/11bp(BB), 298/246/86/52/11bp(AB)。因此所测牛群的 BoLA-DRB₃ 基因的 Hae III 酶切位点由 2 个复等位基因 A 和 B 控制(见图 3)。

2.3 BoLA-DRB₃ 的基因型频率和基因频率的统计分析

统计结果表明:各酶切位点的基因型频率和基

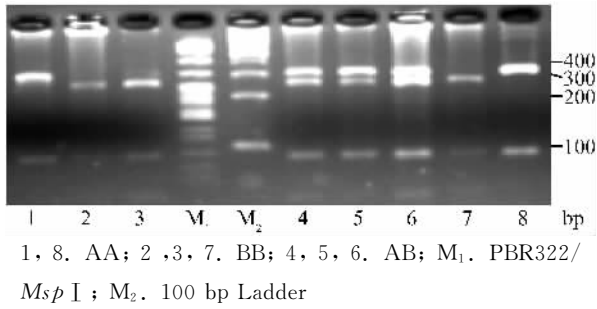


图3 *BoLA-DRB₃* 基因第2外显子的 *Hae* III 酶切

Fig.3 Bind patterns of the gene of *BoLA-DRB₃* locus digested with *Hae* III

因频率分布并不均匀。其中 *Rsa* I AA、AD 和 *Hae* III AA、AB 为优势基因型, *Rsa* I A、D 和 *Hae* III A 为优势基因(见表1)。

经过 χ^2 适合性检验, *BoLA-DRB₃* 基因的 *Rsa* I 酶切位点的 χ^2 值为 38.196, 达到了显著水平 ($P < 0.05$); *Hae* III 酶切位点的 χ^2 值为 0.187, 低于显著水平 ($P > 0.05$)。说明 *BoLA-DRB₃* 基因的 *Hae* III 酶切位点已经达到了 Hardy-Weinberg 平衡状态, 而 *Rsa* I 酶切位点未达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表1 *BOLA-DRB₃* 基因的基因型频率和基因频率

Table1 Gene and genotypic frequencies of *BOLA-DRB₃* gene

内切类型 Restriction pattern	基因型 Genotypes	个体数 Number	基因型频率 Frequencies	等位基因 Alleles	基因频率 Frequencies
<i>Rsa</i> I	AA	12	0.200	A	0.458
	AB	3	0.050	B	0.025
	AC	5	0.083	C	0.050
	AD	19	0.317	D	0.283
	AE	4	0.067	E	0.092
	CD	1	0.017	G	0.075
	DD	6	0.100	H	0.017
	DE	2	0.033		
	EG	3	0.050		
	EH	2	0.033		
	GG	3	0.050		
<i>Hae</i> III	AA	23	0.383	A	0.608
	BB	10	0.167	B	0.392
	AB	27	0.450		

2.4 *BoLA-DRB₃* 基因的不同基因型与奶牛各经济指标的相关性分析

2.4.1 换算与校正 ①产奶量校正到 305 d 产奶量。②产犊月份的季节划分: 宁夏地区未有针对奶牛生产方面的划分报道, 暂用传统划分方法: 1—3 月为第 1 季度, 4—6 月为第 2 季度, 7—9 月为第 3 季度, 10—12 月为第 4 季度。③由于体细胞记数是计量性状, 其分布频率是偏态的, 在统计上不能应用正态分布的许多统计学特性。因此在实际生产中往往将 SCC 转换为线性评分 SCS 的形式, 来克服其在统计分析中的不足 (Shook), SCS 遵循正态分布。1982 年, 美国奶牛改良计划委员会确定公式: $SCS = \log_2(SCC/100) + 3$ (Shook)^[11] 为统一的 SCC 转换为 SCS 的方法 (Shook)^[12]。

2.4.2 统计分析 全部数据用 SPSS11.5 软件进行多因素方差分析和多重比较。

2.4.3 分析各变因对 DHI 测定指标的影响 利用多因素方差分析法分析年季和 *BoLA-DRB₃* 不同基因型对各产奶性状的影响, 从表 2 分析结果得出, 年季和 *BoLA-DRB₃* 被 *Rsa* I 酶切后的不同基因型对蛋白率和乳脂率的影响均达到了显著水平 ($P < 0.05$)。但是, 各因素对 SCS 和产奶量 (305 d) 的影响均未达到显著水平, 这可能与本试验样本量少所造成的抽样误差和某些基因型的样本过少有关。

通过多重比较得出不同基因型的各产奶性状的均值和标准误 (见表 3)。从表 3 分析结果得出: *Rsa* I AD 型的 SCS 显著高于 *Rsa* I EG 型 ($P < 0.05$)。另外, *Rsa* I AB、AC、AE、AD、DD、EH 型的乳脂率

均显著高于 *Rsa* I EG 型 ($P < 0.05$); *Rsa* I AC、AE、DD 型的乳脂率均显著高于 *Rsa* I DE 型 ($P < 0.05$); *Rsa* I AE 型的乳脂率显著高于 *Rsa* I AA、AD 型 ($P < 0.05$)。 *Rsa* I EG 型的蛋白率显著低于其它 *Rsa* I 型 ($P < 0.05$); *Rsa* I AA、DD、GG 型的

蛋白率显著高于 *Rsa* I AB、AE 型 ($P < 0.05$); *Rsa* I DD 型的蛋白率显著高于 *Rsa* I AD 型 ($P < 0.05$); *Hae* III AB 型的蛋白率显著高于 *Hae* III AA 型 ($P < 0.05$)。

表 2 各变因对 DHI 测定指标影响的方差分析

Table 2 Variance analysis of the source of variation effected on DHI

变因 Various factor	自由度 df	F			
		乳脂率 Fat percentage	蛋白率 Protein percentage	SCS SCS	305 d 奶 Milk(305d)
年季	8	4.183 *	3.915 *	0.890	0.558
DRB ₃ (R)	9	4.330 *	3.164 *	0.551	1.028
DRB ₃ (H)	2	0.064	1.535	0.452	1.258

* 表示差异显著 $P < 0.05$; DRB₃ (R) 表示被 *Rsa* I 酶切, DRB₃ (H) 表示被 *Hae* III 酶切

* $P < 0.05$; DRB₃ (R). Digested with the restriction enzyme *Rsa* I; DRB₃ (H). Digested with the restriction enzyme *Hae* III

表 3 *BoLA-DRB₃* 不同基因型 DHI 测定项的均值及标准误

Table 3 Means and standard errors for DHI items of different genotypes of *BoLA-DRB₃* gene

酶切类型 Restriction pattern	基因型 Genotypes	乳脂率 Fat percentage		蛋白率 Protein percentage		SCS SCS		305 d 奶 Milk(305 d)	
		均值 Means	SE SE	均值 Means	SE SE	均值 Means	SE SE	均值 Means	SE SE
		DRB ₃ (R)	AA	4.141 ^{alk}	0.087	3.111 ^{ab}	0.026	3.118 ^{ab}	0.493
AB	4.537 ^{bekm}		0.155	2.933 ^c	0.046	3.387 ^{ab}	0.883	7 727.667	574.319
AC	4.635 ^{ckm}		0.135	3.040 ^{acd}	0.040	3.890 ^{ab}	0.764	7 249.500	497.375
AD	4.549 ^{ek}		0.071	3.039 ^{ac}	0.021	3.837 ^a	0.401	7 584.000	261.054
AE	4.832 ^m		0.142	2.978 ^c	0.042	2.927 ^{ab}	0.806	7 002.667	524.279
DD	4.615 ^{ckm}		0.114	3.132 ^{bd}	0.034	3.476 ^{ab}	0.649	7 103.400	422.037
DE	4.110 ^{de}		0.190	3.070 ^{acd}	0.056	3.910 ^{ab}	1.081	6 245.000	703.394
EG	4.030 ^d		0.155	2.680 ^e	0.046	1.620 ^b	0.883	6 968.000	574.319
EH	4.635 ^{bekm}		0.190	3.050 ^{acd}	0.056	2.460 ^{ab}	1.081	8 058.500	703.394
GG	4.450 ^{dkm}		0.155	3.140 ^{ab}	0.046	2.840 ^{ab}	0.883	6 770.000	574.319
DRB ₃ (H)	AA	4.551	0.061	3.010 ^a	0.018	3.228	0.344	7 245.118	224.094
	AB	4.428	0.061	3.083 ^b	0.018	3.706	0.347	7 365.125	225.596
	BB	4.381	0.093	3.062 ^{ab}	0.027	3.152	0.527	7 044.33	343.221

含相同字母的表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Means with the same words in superscripts were not different significantly ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 MHC 在家畜机体免疫系统中的作用, 已经使其成为家畜抗病育种的研究热点, 高度多态性是其最显著的特点。国外有关 *BoLA-DRB₃* 基因多态性的报道已有很多^[3,5], 国内只有孙东晓报道了 *BoLA* 分子在蒙古牛的遗传多态性^[8]。本研究在国内首次对宁夏地区奶牛的 *BoLA-DRB₃* 基因的多态

性进行了初步研究, 结果表明该基因含有丰富的多态性, 而且为多碱基突变, 其中的 *Rsa* I C 可能为新的等位基因, 需要进一步通过测序验证。

3.2 对于 MHC 与奶牛乳房炎的关系, 国外报道较多, 国内还没找到相关文献。Dietz 等发现 *BoLA-DRB₃. 2 11* 与高 SCS 显著相关, 也发现 *BoLA-DRB₃. 2* 16* 对高的 SCC 是一个危险因素^[9]。Sharif 等研究了 *BoLA-DRB₃* 和疾病、SCS 的关系,

结果表明: 在娟姗牛中, *BoLA* 等位基因对 SCS 没有显著影响, 但在荷斯坦牛中, *BoLA-DRB₃*. 2*16 和低 SCS 显著相关, 并且在荷斯坦牛中, *BoLA-DRB₃*. 2*23 和乳房炎的高发病率显著相关 ($P < 0.05$)^[10]。但是本研究中对等位基因的命名没有采用国际统一命名方式, 因为国际 *BoLA* 命名委员会是根据核苷酸序列命名或用 3 种内切酶 (*Rsa* I、*Bst*YI 和 *Hae* III) 消化后的不同类型进行组合命名, 所以不能与国外资料进行比较。

3.3 通过多重比较分析得出: *Rsa* I AD 型的 SCS 显著高于 *Rsa* I EG 型 ($P < 0.05$), 这说明 *Rsa* I EG 型与低 SCS 显著相关。但是, 本研究只检测到 3 个 EG 型个体, 这也增加了抽样误差的可能性。另外, 由于本试验检测到稀有等位基因, 以后要加大样本量, 使每个基因型都有一定量的个体数。

参考文献:

- [1] 孙怀昌, 于 锋, 苏建华, 等. 人溶菌酶基因治疗奶牛乳腺炎的初步研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(2): 227~232.
- [2] Andersson L, Bohme J, Peterson P A, *et al.* Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility genes 2. polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region [J]. *Animal Genetics*, 1986, 17: 295~304.
- [3] Xu A. Polymorphism of bovine MHC class II genes: Association with persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus [D]. University of Illinois at Urbana-Champaign, 1992.
- [4] Davies C J, Andersson L, Mikko S, *et al.* Nomenclature for factors of the *BoLA* system, 1996. Report of the ISAG *BoLA* Nomenclature Committee [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28(3): 159~168.
- [5] Scott P C, Maddox J F. The nucleotide sequence and evolution of bovine MHC class II genes; DQB and DRB [J]. *Immunogenetics*, 1991a, 34: 80~87.
- [6] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林等译. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Ledwidge S A, Mallard B A, Gibson J P, *et al.* Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine *DRB3* alleles [J]. *Animal Genetics*, 1991, 32: 219~221.
- [8] 孙东晓, 张 沅, 李 宁. 蒙古牛 *MHC-DRB₃* 和 *DQB* 基因的 PCR-RFLP 多态性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 342~345.
- [9] Dietz A B, Cohen, N D, Timms L, *et al.* Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows [J]. *Dairy Sci*, 1997, 80: 406~412.
- [10] Sharif S, Mallard B A, Wilkie B N, *et al.* Association of the bovine MHC *DRB3* alleles with occurrence of disease and mild somatic cell score in Canadian dairy cattle [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29: 185~193.
- [11] Shook G E. Approaches to summarizing somatic cell counts which improve interpretability [A]. *Proc Natl Mastitis Council* [C]. Arlington VA, 1982, 150~166.
- [12] Shook G E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count [J]. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 1993, 9(3): 563~581.