

多浪羊 *MHC-DRB1* 基因多态性与包虫病抗性分析

余智勇¹, 李海², 贾斌^{1*}, 蒋文生², 彭林泽¹, 申红¹, 曾献存¹, 杜迎春¹

(1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000; 2. 新疆农三师农业局畜牧处, 喀什 844000)

摘要: 通过 PCR 扩增 122 只包虫病(细粒棘球蚴病)阴性和 70 只包虫病阳性多浪羊的 *MHC-DRB1* 第 2 外显子, 产物经 *Sac* I、*Hin* I 和 *Hae* III 3 种限制性内切酶酶切后进行 RFLP 多态性分析。结果表明, 多浪羊 *MHC-DRB1* 基因第 2 外显子在 *Sac* I、*Hin* I 和 *Hae* III 酶切位点存在丰富的多态性, 分别检测出了 2、2 和 6 种等位基因, 出现了 3、3 和 18 种基因型。将包虫病阴性和阳性多浪羊的等位基因频率和基因型频率分别进行比较分析, 发现等位基因 *Hae* III a 对包虫病感染具有一定的易感性($P < 0.05$), *Sac* I ab 和 *Hin* I aa 2 个基因型对包虫病具有一定的抗性($P < 0.05$), *Hae* III be 和 *Hae* III ef 这 2 个基因型对包虫病具有较强的易感性($P < 0.01$)。

关键词: 多浪羊; *MHC-DRB1*; PCR-RFLP; 多态性; 包虫病

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1149-05

Analysis of Polymorphism of *MHC-DRB1* Gene and Resistance of Hydatidosis in Dolang Sheep

YU Zhi-yong¹, LI Hai², JIA Bin^{1*}, JIANG Wen-sheng²,

PENG Lin-ze¹, SHEN Hong¹, ZENG Xian-cun¹, DU Ying-chun¹

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University,

Shihezi 832003, China; 2. Animal Husbandry Department,

Nongsanshi Agricultural Bureau, Kashi 844000, China)

Abstract: The major histocompatibility complex (MHC) *DRB1* exon2 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from 122 healthy and 70 infectious with Dolang sheep. PCR products were characterized by the RFLP technique using three restriction enzymes, *Sac* I, *Hin* I and *Hae* III. The results showed that rich polymorphism was observed in the exon2 of *MHC-DRB1*, which 2, 2 and 6 RFLP patterns were found with enzymes *Sac* I, *Hin* I and *Hae* III, respectively, and 3, 3 and 18 kinds of genotypes were identified in Dolang sheep. By analyzing allele and genotype frequencies of healthy and infectious Dolang sheep, it was found that allele *Hae* III a was associated with susceptibility of hydatidosis ($P < 0.05$), and genotypes *Sac* I ab and *Hin* I aa were resistant to hydatidosis ($P < 0.05$), while the genotypes of *Hae* III be and *Hae* III ef were rather highly susceptible to hydatidosis ($P < 0.01$).

Key words: Dolang sheep; *MHC-DRB1*; PCR-RFLP; polymorphism; hydatidosis

传染病在长期流行与发病过程中, 某些个体和品种相对其它个体和品种而言具有一定的抗性或易感性^[1]。疫苗和抗生素作为广泛使用且能有效阻止和治疗传染病的药物, 已经取得了显著的效果, 但这

两种方法都存在着一定的风险和缺陷。一方面, 疫苗不可能对所有的个体都有效, 也有可能病原发生变异, 恢复毒力而重新威胁宿主, 另一方面, 抗生素的使用可能使病原体产生抗药性。这些都促使人们

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 国家教育部“高等学校博士学科点专项科研基金资助课题”(20050759001)

作者简介: 余智勇(1980-), 男, 四川成都人, 硕士生, 主要从事寄生虫学研究, E-mail: yzy015@163.com

* 通讯作者: 贾斌, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: jiabin@shzu.edu.cn

寻找一种安全的新方法,增加宿主对于病原体的抵抗力。研究遗传抗性、寻找具有抗性的遗传位点从而进行抗病育种,在预防和控制疫病方面具有非常重要的意义^[2]。

研究证明主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)是控制免疫反应的主要基因。MHC 是高度多态的基因区,这些紧密连锁的免疫应答基因控制着机体对抗原产生免疫应答的能力,其主要作用是递呈外源性抗原物质给辅助 T 淋巴细胞(Th, CD4⁺),从而促发免疫反应^[3]。MHC 基因的多态性为研究抗病育种提供了一个很好的遗传标记,许多研究表明 MHC 与寄生虫的感染有密切的关系。Sayers 等^[4]研究了萨福克和陶塞特羊 MHC-DRB1 在抗线虫上的作用,结果表明绵羊 MHC-DRB1 基因在抗线虫感染中具有重要作用。新疆多浪羊是在特殊的地理环境和气候条件下长期进化和适应而形成的地方绵羊品种,没有引入外来绵羊品种的血液,具有抗逆性、抗病力较强的特性,相对于其他引进品种包虫病发病率较低^[5]。本试验对包虫病阳性和阴性的多浪羊 MHC-DRB1 基因多态性和包虫病感染情况进行分析,探讨多浪羊 MHC-DRB1 基因与包虫病抗性的关系,为以后的抗病育种工作提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物

多浪羊来自新疆生产建设兵团农三师 45,50 和 44 团共 192 只,其中包虫病(细粒棘球蚴病)检测阴性绵羊为 122 只,包虫病阳性为 70 只。颈静脉采血 10 mL 分成两管,其中 1 管 6 mL 用 ACD(柠檬酸钠:1.32 g, EDTA:1.32 g)抗凝, -20℃ 保存,另外一管 4 mL 分离血清用于对包虫病(细粒棘球蚴病)的血清学诊断。

1.2 药品与试剂

引物由上海生工合成;限制性内切酶 *Sac* I、*Hin*1 I、*Hae* III 及 dNTPs、Tris 饱和酚、EDTA-Na·2H₂O、PCR markers、琼脂糖购自上海生工;*Taq* 酶购自北京天为时代;蛋白酶 K、EB、SDS 购自北京华美。

1.3 方法

1.3.1 绵羊包虫病的诊断 采用绵羊包虫病专用 ELISA 诊断试剂盒(深圳康百得公司)进行包虫病检测。操作方法参见说明书。

1.3.2 绵羊基因组 DNA 提取 DNA 提取参照刘云芳等^[6]绵羊全血中 DNA 的提取方法。

1.3.3 PCR 扩增 引物参照文献^[7],序列如下:

OLA-ERB1 (GC): 5'-CCG GAA TTC CCG TCT CTG CAG CAC ATT TCT T-3'; HL031: 5'-TTT AAATTC GCG CTC ACC TCG CCG CT-3'; OLA-XRBI: 5'-AGC TCG AGC GCT GCA CAG TGA AAC TC-3'。

以 Konnai 等^[7]的试验条件为基础进行巢式 PCR 反应体系优化。其最终反应体系为:第 1 轮: 10× buffer 2.0 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL; dNTPs (2 mmol/L) 1.2 μL; HL031 (1 μmol/L) 2.0 μL; OLA-ERB1 (1 μmol/L) 2.0 μL; *Taq* 酶 1.5 U; DNA 3 μL, 最后加 ddH₂O 至 20 μL。第 2 轮: OLA-XRBI (1 μmol/L) 4.0 μL; OLA-ERB1 (1 μmol/L) 4.0 μL; 第 1 轮扩增产物 3 μL, 其他条件同第一轮, 最后加 ddH₂O 至 20 μL。

PCR 反应条件为:

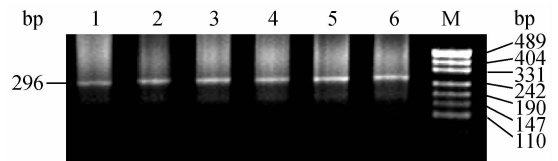
第 1 轮: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 60 s, 15 循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。第 2 轮: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。

1.3.4 酶切反应 总体积为 20 μL, 其中 PCR 产物 10 μL, *Sac* I, *Hin*1 I 和 *Hae* III 限制性内切酶 5U 及 2 μL 的 10× Buffer 然后加入双蒸水至 20 μL, 37℃ 水浴 4 h。产物通过 3% (*Hae* III 酶切产物) 和 1.5% (*Sac* I 和 *Hin*1 I 的酶切产物) 的琼脂糖电泳检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增

应用巢式 PCR 扩增了多浪羊 MHC-DRB1 的第 2 外显子, 得到 1 条 296 bp 的片段, 产物通过 1.5% 的琼脂糖电泳检测, 检测结果见图 1。



1-6. PCR products; M. PUC19 DNA marker

图 1 巢式 PCR 扩增产物的检测

Fig. 1 The PCR-amplified fragments of DNA from the second-round of PCR

2.2 PCR-RFLP 结果

参照 Konnai 等^[7]报道的酶切图谱和等位基因命名方法(图略)对多浪羊 *MHC-DRB1* 基因 PCR-RFLP 后的电泳检测结果进行判型。

内切酶 *Sac* I 的酶切结果出现了 3 种基因型 aa (296 bp), ab(296 bp/208 bp/88 bp)和 bb(208 bp/88 bp)。表明 *DRB1* 基因 *Sac* I 酶切位点由 a、b 两个等位基因控制(见图 2)。

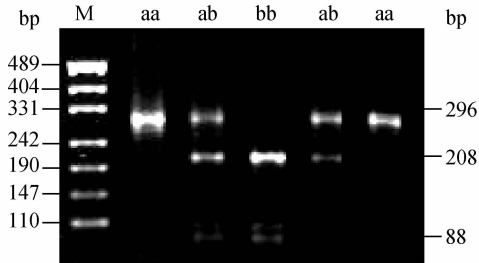


图 2 多浪羊 *MHC-DRB1* 基因第 2 外显子 *Sac* I 酶切的检测

Fig. 2 *Sac* I digestion of the second exon of the Dolang sheep *DRB1* gene

内切酶 *Hin* I 的酶切结果也出现了 3 种基因型 aa (296 bp)、ab(296 bp/178 bp/118 bp)和 bb (178 bp/118 bp)。表明 *DRB1* 基因 *Hin* I 酶切位点由 a 和 b 两个等位基因控制(见图 3)。

在 *Hae* III 的酶切位点上,多浪羊出现了 18 种基因型:aa(173 bp/71 bp/48 bp/4 bp),ab(173 bp/123 bp/71 bp/48 bp/4 bp),ac(173 bp/159 bp/137 bp/71 bp/48 bp/4 bp),ad(173 bp/159 bp/123 bp/71 bp/48 bp/14 bp/4 bp),ae(173 bp/159 bp/71 bp/66 bp/48 bp/4 bp),af(173 bp/159 bp/71 bp/52 bp/48 bp/14 bp/4 bp),bb(173 bp/123 bp),bd(173 bp/159 bp/123 bp/14 bp),be(173 bp/159 bp/123 bp/71 bp/66 bp),cc(159 bp/137 bp),ce(159 bp/137 bp/71 bp/66 bp),cf(159 bp/137 bp/71 bp/52 bp/14 bp),dd(159 bp/123 bp/14 bp),de(159 bp/123 bp/71 bp/66 bp/14 bp),df(159 bp/123 bp/71 bp/52 bp/14 bp),ee(159 bp/71 bp/66 bp),ef(159 bp/71 bp/66 bp/52 bp/14 bp),ff(159 bp/71 bp/52 bp/14 bp)。表明此位点由 a、b、c、d、e

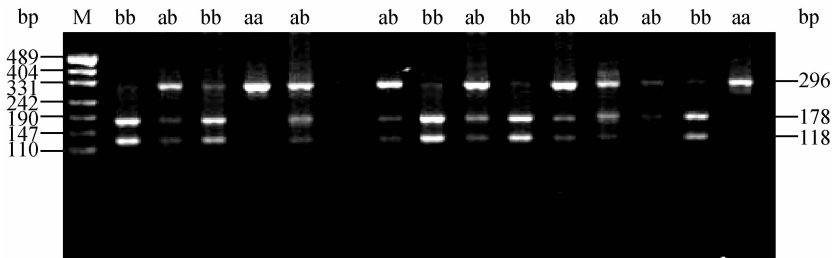


图 3 多浪羊 *MHC-DRB1* 基因第 2 外显子 *Hin* I 酶切检测

Fig. 3 *Hin* I digestion of the second exon of the Dolang sheep *DRB1* gene

和 f 这 6 个等位基因控制(见图 4)。

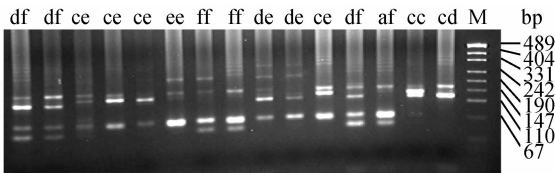


图 4 多浪羊 *MHC-DRB1* 基因 *Hae* III 部分酶切的部分结果

Fig. 4 *Hae* III digestion of the second exon of the Dolang sheep *DRB1* gene

综合 3 种酶切结果,在多浪羊 *DRB1* 基因上检测到了 24 种基因型,以上结果表明,*DRB1* 第 2 外显子的第 208,178,159,173,177,225 位碱基上存在多态性。

2.3 多浪羊 *MHC-DRB1* 基因多态性与包虫病的抗性 or 易感性分析

MHC-DRB1 基因在包虫病阳性和阴性多浪羊具有相同的等位基因类型,将它们的等位基因频率进行差异显著性分析(*t* 检验),结果表明,*Hae* III a 等位基因对包虫病有一定的易感性(见表 1)。

对包虫病阳性和阴性多浪羊 *MHC-DRB1* 基因的基因型分析表明,在 *Hae* III 酶切位点共有 18 种基因型。包虫病阳性多浪羊中出现了 13 种基因型,其中 *Hae* III ae 型只在包虫病阳性多浪羊中发现。包虫病阴性多浪羊中发现了 17 种基因型,其中 *Hae* III ad、bb、bd、dd 和 de 只在健康的多浪羊中发现(见表 2)。

表1 包虫病阴性和阳性多浪羊 *DRB1* 基因的等位基因频率Table 1 Allele frequencies of hydatidosis negative and positive Dolang sheep *DRB1* gene

| 包虫病阴性(122只) | | | 包虫病阳性(70只) | | |
|----------------------------|-----|-----------|---------------------------|----|-----------|
| Hydatidosis negative (122) | | | Hydatidosis positive (70) | | |
| Alleles | N | Frequency | Alleles | N | Frequency |
| <i>Sac</i> I a | 155 | 0.635 2 | <i>Sac</i> I a | 88 | 0.628 6 |
| <i>Sac</i> I b | 89 | 0.364 8 | <i>Sac</i> I b | 52 | 0.371 4 |
| <i>Hin1</i> I a | 151 | 0.618 9 | <i>Hin1</i> I b | 86 | 0.614 3 |
| <i>Hae</i> III a | 36 | 0.147 5 | <i>Hae</i> III a | 32 | 0.228 6* |
| <i>Hae</i> III b | 27 | 0.110 7 | <i>Hae</i> III b | 21 | 0.150 0 |
| <i>Hae</i> III c | 50 | 0.204 9 | <i>Hae</i> III c | 18 | 0.128 6 |
| <i>Hae</i> III d | 18 | 0.073 8 | <i>Hae</i> III d | 4 | 0.028 6 |
| <i>Hae</i> III e | 59 | 0.241 8 | <i>Hae</i> III e | 44 | 0.314 3 |
| <i>Hae</i> III f | 54 | 0.221 3 | <i>Hae</i> III f | 21 | 0.150 0 |

包虫病阴性与阳性相同等位基因间, * . $P < 0.05$

The same alleles between positive and negative hydatidosis, * . $P < 0.05$

表2 包虫病阴性和阳性多浪羊 *DRB1* 基因的基因型频率Table 2 Genotype frequencies of hydatidosis negative and positive Dolang sheep *DRB1* gene

| 包虫病阴性(122只) | | | 包虫病阳性(70只) | | |
|----------------------------|----|-----------|---------------------------|----|-----------|
| Hydatidosis negative (122) | | | Hydatidosis positive (70) | | |
| Genotypes | N | Frequency | Genotypes | N | Frequency |
| <i>Sac</i> I aa | 38 | 0.311 5 | <i>Sac</i> I aa | 27 | 0.385 7 |
| <i>Sac</i> I ab | 79 | 0.647 5* | <i>Sac</i> I ab | 34 | 0.485 7 |
| <i>Sac</i> I bb | 5 | 0.041 0 | <i>Sac</i> I bb | 9 | 0.128 6 |
| <i>Hin1</i> I aa | 13 | 0.106 6* | <i>Hin1</i> I aa | 2 | 0.028 6 |
| <i>Hin1</i> I ab | 67 | 0.549 2 | <i>Hin1</i> I ab | 50 | 0.714 3 |
| <i>Hin1</i> I bb | 42 | 0.344 2 | <i>Hin1</i> I bb | 18 | 0.257 1 |
| <i>Hae</i> III aa | 5 | 0.041 0 | <i>Hae</i> III aa | 9 | 0.128 6 |
| <i>Hae</i> III ab | 15 | 0.123 0 | <i>Hae</i> III ab | 5 | 0.071 4 |
| <i>Hae</i> III ac | 4 | 0.032 8 | <i>Hae</i> III ac | 3 | 0.042 9 |
| <i>Hae</i> III af | 6 | 0.049 2 | <i>Hae</i> III af | 2 | 0.028 6 |
| <i>Hae</i> III be | 1 | 0.008 2 | <i>Hae</i> III be | 16 | 0.228 6** |
| <i>Hae</i> III cc | 9 | 0.073 8 | <i>Hae</i> III cc | 4 | 0.057 1 |
| <i>Hae</i> III ce | 16 | 0.131 1 | <i>Hae</i> III ce | 6 | 0.085 7 |
| <i>Hae</i> III cf | 12 | 0.098 4 | <i>Hae</i> III cf | 1 | 0.014 3 |
| <i>Hae</i> III df | 7 | 0.057 4 | <i>Hae</i> III df | 4 | 0.057 1 |
| <i>Hae</i> III ee | 18 | 0.147 5 | <i>Hae</i> III ee | 5 | 0.071 4 |
| <i>Hae</i> III ef | 1 | 0.008 2 | <i>Hae</i> III ef | 8 | 0.114 3** |
| <i>Hae</i> III ff | 14 | 0.114 8 | <i>Hae</i> III ff | 3 | 0.042 9 |
| <i>Hae</i> III ad | 1 | 0.008 2 | <i>Hae</i> III ae | 4 | 0.057 1 |
| <i>Hae</i> III bb | 4 | 0.032 8 | | | |
| <i>Hae</i> III bd | 3 | 0.024 6 | | | |
| <i>Hae</i> III dd | 1 | 0.008 2 | | | |
| <i>Hae</i> III de | 5 | 0.041 0 | | | |

包虫病阴性与阳性多浪羊 *DRB1* 相同基因型间, * . $P < 0.05$; ** . $P < 0.01$

Hydatidosis negative and positive Dolang sheep *DRB1* with same genotypes, * . $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

包虫病阳性和阴性多浪羊 *DRB1* 基因的基因型频率通过差异显著性检验(t 检验)分析发现, *Sac* I ab 和 *Hin1* I aa 两种基因型对包虫病具有一定的抗性($P < 0.05$), *Hae* III be 和 *Hae* III ef 这 2 个基因型对包虫病具有较强的易感性($P < 0.01$)。

3 讨论

绵羊 *MHC class II* 基因 *DRB* 的表达具有高度的多态性,目前国外对 *MHC-DRB* 基因的多态性研究比较多^[8],在一些绵羊和山羊品种中 *MHC-DRB* 基因发现了丰富的多态^[9~12],迄今为止国内对绵羊 *DRB* 基因多态性的研究不多,刘云芳等^[13]利用 *Taq* I、*Pst* I 和 *Hae* III 内切酶对新疆多浪羊 *DRB* 基因进行 PCR-RFLP 分析,发现了 2、2 和 6 种等位基因,2、3 和 7 种基因型。彭林泽等^[14]利用 *Hin1*I、*Sac*I 和 *Hae* III 种内切酶对中国美利奴羊 *DRB* 基因进行 PCR-RFLP 分析,发现了 2、2 和 6 种等位基因,3、3 和 15 种基因型。本试验利用 *Sac* I、*Hin1* I 和 *Hae* III 酶进行 PCR-RFLP 分析,分别发现了 2、2 和 6 种等位基因,3、3 和 18 种基因型。孙东晓等^[15]通过 *Hae* III 内切酶在对蒙古绵羊和哈萨克绵羊 *DRB3* 基因进行了 PCR-RFLP 分析,检测出了 17 种基因型由 7 个等位基因控制。本试验所用的内切酶和所得等位基因数量结果与 Konnai 等^[7]的结果一致。

MHC 的主要功能是抗原递呈,在家畜机体的免疫系统中发挥着非常重要的作用,与家畜的抗病性和易感性有着密切的关系^[16]。Penn 等^[17]通过对小鼠的 *MHC* 研究发现,*MHC* 的杂合型个体对病原体的抵抗和环境适应性都比纯合型强。本研究发现多浪羊 *DRB1* 基因的杂合型个体较多,而纯合型个体相对较少,这可能是多浪羊对环境适应能力强的一個原因。试验结果表明, *Sac* I ab 和 *Hin1* I aa 基因型在包虫病阳性多浪羊中相对较少($P < 0.05$),提示具有这两种基因型的绵羊对包虫病具有一定的抗性,而 *Hae* III be 和 *Hae* III ef 在包虫病阳性多浪羊中最多($P < 0.01$),提示它们对包虫病易感。多浪羊 *MHC* 的多态性非常丰富,在 *Hae* III 中有 18 个基因型,这就要求试验样本数量更大,同时试验结果还需要进一步对不同基因型绵羊个体进行攻虫来加以验证。

参考文献:

[1] Hutt Frederick B. Genetic resistance to disease in do-

- mestic animals [M]. Ithaca: Cornell University Press, 1958. 1~10.
- [2] Buitkamp J, Filmether P, Michael J, *et al.* Class I and class II major histocompatibility complex alleles are associated with faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection [J]. *Parasitol Res*, 1996, 82: 693~696.
- [3] 刘建欣, 郑昌学. 现代免疫学—免疫的细胞和分子基础[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003. 139~165.
- [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] 李岩, 闫江林, 李静, 等. 新疆绵羊棘球蚴病流行情况调查分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2005, 23(1): 60~63.
- [6] 刘云芳, 高剑峰, 潘晓亮, 等. 绵羊全血中 DNA 的微量提纯[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 1997, 1(2): 136~138.
- [7] Konnai S, Nagaoka Y, Nagaoka S, *et al.* Technical Note: DNA Typing for Ovine *MHC DRB1* Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(10): 3362~3365.
- [8] 徐日福, 李奎, 陈国宏, 等. 鸡 *MHC B-LB II* 新等位基因检测及多态性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12): 1247~1255.
- [9] Escayg A P, Hichford J G, Montgomery G W, *et al.* Polymorphism at the ovine MHC class II loci [J]. *Animal Genetics*, 1996, 27: 305~312.
- [10] Amills M, Francino O, Sanchez A. Nested PCR allows the characterization of *Taq I* and *Pst I* RFLPS in the second of the caprine MHC class II *DRB* gene [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 48: 313~321.
- [11] Amills M, Francino O, Sanchez A. A PCR-RFLP typing method for the caprine MHC class II *DRB* gene [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 55: 255~260.
- [12] Gruszczynska J, Brokowska K, Charon K M, *et al.* Restriction fragment length polymorphism of exon 2 *Ovar-DRB1* gene in polish heath sheep and polish lowland sheep [J]. *J Appl Genet*, 2005, 46(3): 311~314.
- [13] 刘云芳, 刺根强, 王新峰. 多浪羊 *MHC-DRB3* 基因座的 PCR-RFLP 多态性分析[J]. 遗传, 2004, 6(1): 59~62.
- [14] 彭林泽, 申红, 贾斌, 等. 中国美利奴羊 *MHC-DRB1* 基因 PCR-RFLP 多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(10): 1115~1119.
- [15] 孙东晓, 张沅, 李宁. 蒙古绵羊和哈萨克绵羊 *MHC-DRB3* 基因外显子 2 的多态性[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 761~765.
- [16] Hedrick P W, Parker K M, Gustavo A. Gutierrez-Espeleta *et al.* Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx [J]. *Evolution*, 2000, 54(6): 2145~2151.
- [17] Penn D J, Damjanovich K, Potts W K. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections [J]. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2002, 99(17): 11260~11264.