

母猪 *FcRn* 基因多态性及其对初乳中 IgG 含量的影响

王炳艳^{1,2}, 王立贤³, 王 婷⁴, 翟丽维^{1,2}, 王楚端^{1,2*}, 李振宽⁴, 周伟良⁴

(1. 农业部畜禽遗传育种重点开放实验室, 北京 100094;

2. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094;

3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;

4. 天津市宁河原种猪场, 天津 301504)

摘要: 对猪 IgG C 片段受体基因 (*FcRn*) 的单链构象多态性进行分析, 在 *FcRn* 基因 Site1 位点即第 3 外显子的 147 处碱基发现 T 突变为 C 和在 Site6 位点即第 6 外显子的 1 040 处碱基发现 C 突变为 G, 其中外显子 6 的碱基突变使苏氨酸变为精氨酸。在 3 个品种 207 头母猪样本中检验多态位点和初乳中 IgG 含量的相关性, 建立固定效应模型进行最小二乘分析, 对不同基因型的初乳中 IgG 含量进行差异显著性检验。结果表明: 试验群体中 Site1 位点的突变对初乳中 IgG 含量没有显著影响 ($P>0.05$), Site6 位点的突变对初乳中 IgG 含量有显著影响 ($P<0.05$), 多重 *t* 检验结果表明 Site6 位点不同基因型的初乳中 IgG 含量差异显著 ($P<0.05$); CC 型的初乳中 IgG 含量最高, DD 型的初乳中 IgG 含量最低, 说明 *FcRn* 基因可以作为猪初乳中 IgG 含量的候选基因之一。

关键词: 猪; *FcRn* 基因; 单核苷酸多态; 初乳; IgG

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)08-0765-04

Polymorphism of *FcRn* Gene and Its Effects on the Sow Colostrum IgG Concentration

WANG Bing-yan^{1,2}, WANG Li-xian³, WANG Ting⁴, ZHAI Li-wei^{1,2}, WANG Chu-duan^{1,2*},
LI Zhen-kuan⁴, ZHOU Wei-liang⁴

(1. Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 4. Tianjin Ninghe Pig Breeding Farm, Tianjin 301504, China)

Abstract: The polymorphism of the *FcRn* gene was analyzed, and two SNPs were found by the technique of single strand conformation polymorphism (SSCP) and finally confirmed by sequencing. The frequencies of different genotypes in 207 sows of the three breeds were calculated and the relationship between three genotypes and IgG Concentration in Colostrum of the Sow were analyzed based on liner model. The results showed that the mutation in the Site1 did not have effect on IgG concentration in colostrum of the sows ($P>0.05$), the mutation in the Site6 had effect on IgG concentration in colostrum of the sows ($P<0.05$); Multiple *t* comparisons in site6 indicated that IgG concentration in colostrum of the sows between CC, CD and DD genotype were significant ($P<0.05$); IgG concentration in colostrum of the sows of CC is the highest, while that of the sows of DD is the lowest. The result indicated *FcRn* gene could be a candidate gene of IgG concentration in colostrum of the sows.

Key words: pig; *FcRn* gene; single nucleotide polymorphism; colostrum; IgG

收稿日期: 2006-08-30

基金项目: 国家科技支撑计划高繁殖力瘦肉型猪新品种选育(2006BAD01A08)

作者简介: 王炳艳(1977-), 女, 硕士, 主要从事猪遗传育种学研究, E-mail: wby1204@sohu.com

* 通讯作者: 王楚端, 教授, 博士生导师, Tel: 010-62732731, E-mail: cdwang@cau.edu.cn

断奶前仔猪的死亡给养猪业造成了巨大损失,英国肉品和牲畜管理委员会数据统计显示:多于10%的仔猪在断奶前死亡^[1]。猪初乳中的免疫球蛋白主要是IgG,占总免疫球蛋白的70%~80%^[2]。初乳中IgG含量与由肠道、呼吸道造成的疾病感染仔猪死亡之间有很强的关联^[3,4]。猪的胎盘是上皮绒毛膜型的,这种胎盘阻止母源抗体IgG直接通过胎盘传递给胎儿^[5],因此刚出生仔猪体内的抗体水平基本为零;初生仔猪的肠道在24h内能吸收完整大分子IgG,此后肠道关闭^[6];仔猪自身的免疫系统要在出生后7~8d才开始启动^[7],这3方面的因素决定了仔猪出生后及时的从初乳中获得足够量的IgG是保证其成活、健康生长的必要条件,这不仅影响到断奶前仔猪的成活率、生长发育,而且还影响到断奶后仔猪的生长。利用单链构象多态性(SSCP)分析的方法,对影响初乳中IgG含量的主效基因进行检测,找到对猪初乳中IgG含量有较大影响的单核苷酸突变位点,再结合传统的选育方法进行标记辅助选择,是实现初乳中IgG含量性状选育的有效手段之一。

新生动物IgG C片段受体基因(The neonatal Fc receptor, *FcRn* 基因)为新生动物IgG的Fc片段受体基因,它属于MHC I类分子蛋白家族中的一员。乳腺、肠道中*FcRn*基因直接与IgG的Fc片段结合,运输IgG,并维持IgG的动态平衡,延长IgG的半衰期,在IgG的循环过程中*FcRn*基因起着重

要作用^[8,9]。分娩前后*FcRn*基因在腺泡和导管中表达量的差异与分娩后初乳中IgG的含量变化、肠道关闭时间是一致的,说明了*FcRn*基因对IgG含量起了关键作用^[10]。本研究以瘦肉纯种母猪为试验对象,研究不同猪种*FcRn*基因的多态性及其对母猪初乳IgG含量的效应,为探索该基因作为初乳中IgG含量的候选基因提供参考依据。

1 材料与方法研究

1.1 试验动物

选用天津宁河种猪场长白、大白、杜洛克3个品种的207头母猪为试验材料。在母猪分娩后1h内从第3或4对乳头共采集3~5mL初乳,-20℃保存,实验室中用ELISA方法测定初乳中IgG含量;每头母猪前腔静脉采血2mL,ACD抗凝,酚氯法提取DNA,-20℃保存备用。

1.2 PCR扩增

由于SSCP要求最佳的PCR产物长度小于300bp,故将外显子3、5分成两段扩增。根据GenBank中猪的*FcRn*外显子序列AY135635及*FcRn*的核酸序列AY999998和AY999999的信息,用Oligo6.0软件设计了7对引物以完整扩增外显子3、4、5、6、7,扩增片段分别定义为Site1、Site2、Site3、Site4、Site5、Site6、Site7。扩增各个位点所用引物、PCR反应退火温度、扩增片段长度见表1。

表1 扩增*FcRn*基因外显子的引物序列

Table 1 Primer sequences of extending exons in *FcRn* gene

位点 Sites	引物序列 Sequences of primers	引物退火温度/℃ Anneal temperature	产物长度/bp Length
Site1: Exon3	F: 5'- CCA CCG TTC CCT CCT GTA CC-3' R: 5'- GCC CAC CTC CTT CCT CCA-3'	57.5	251
Site2: Exon3	F: 5'- GAC CGC AGA CCT GAG GAA C-3' R: 5'- TTC ATA AAC TCC TCG CCA T-3'	53.8	165
Site3: Exon4	F: 5'- CTG AAT GGC GAG GAG TTT-3' R: 5'- CTT CCA CTC CAG GTT G-3'	51.5	198
Site4: Exon5	F: 5'- CCC TTC AGC CCT GGA CTC-3' R: 5'- GTG CTC GTC GCC GCT CTT-3'	61.8	294
Site5: Exon5	F: 5'- CTA ACA GTC AAG AGC GG-3' R: 5'- AGC AGA GGG GAA AAA GG-3'	52.7	147
Site6: Exon6	F: 5'- CTC ACA ACC TCT CTG GCT-3' R: 5'- CAC TTC CCT CTC CCC GTC-3'	60.2	164
Site7: Exon7	F: 5'- CAA GAT TCT GAC GAC CTC-3' R: 5'- TGA AGA GGA CCT GAC TAC-3'	53	200

F. 代表正向引物;R. 代表反向引物 F is forwards primer;R is reverse primer

1.3 SSCP 分析

取 1.5 μL PCR 产物与 7 μL 上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚兰、0.025% 二甲苯青、2% 甘油、0.01 mol/mL EDTA(pH8.0))混和。在 PCR 仪上 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 迅速置于冰上冷却 10 min。7 对引物 PCR 样品分别用 12%、16%、14%、12%、16%、16%、14% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 12~18 h, 电压为 8 V/cm, 电泳结束后, 银染显带, 摄像, 保存。

1.4 PCR 产物的克隆与测序

采用天为时代试剂盒回收纯化不同基因型纯合个体的 PCR 扩增产物, 纯化的 PCR 产物用 T 载体连接转化 DH5 α 菌株, 提取重组质粒进行测序。

1.5 分析方法

建立线性固定效应模型, $y = \mu + b + f + g + e$ 用 SAS(ver. 8.0) 分析不同基因座基因型对初乳中 IgG 含量性状的效应:

其中: y 为初乳中 IgG 含量性状观察值; μ 为群体均值; b 为品种; g 为胎次; f 为基因型效应; e 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 猪 *FcRn* 基因的 PCR-SSCP 分析

对引物在表 2 所列的退火温度下, 均有较好的扩增产物, 没有非特异性扩增带, 可直接进行 SSCP 电泳分析。

SSCP 检测结果表明引物 1、5、6 扩增产物内有突变, 而引物 2、3、4、7 扩增产物没有发现突变位点。将在 SSCP 中呈现多态性的 PCR 产物用玻璃奶试剂盒回收, 直接测序进一步证实多态位点的存在。将引物 1、5、6 各自扩增出的两个纯合子测序结果与 GenBank 中已知序列进行比对发现, 以引物 1、6 扩增获得片段即外显子 3、6 在本研究群体中有 2 个突变位点, 与 Schnulle 的 AY135635 的序列相比, 突变位点分别是: 147 nt 处 T \rightarrow C(BB 型), 该处突变属于同义突变, 没有引起氨基酸的变化; 1 040 nt 处 G \rightarrow C(CC 型), 该处突变位点导致苏氨酸 \rightarrow 精氨酸。

根据 PCR-SSCP 检测结果, 统计全部猪 *FcRn* 基因型与等位基因的频率分布, 结果如表 2 所示。3

表 2 不同品种中 Site1 和 Site6 的基因型和等位基因频率

Table 2 Gene frequency and genotype frequency of Site1 and Site6 in different breeds

品种 Breeds	Site1			Site6						
	基因型 Genotype	个体数 No.	频率	等位 基因 Allele	频率 Frequency	基因型 Genotype	个体数 No.	频率 Frequency	等位 基因 Allele	频率 Frequency
杜洛克 Duroc	AA	6	0.125	A	0.24	CC	36	0.75	C	0.833
	AB	11	0.229			CD	8	0.167		
	BB	31	0.646	B	0.76	DD	4	0.083	D	0.167
长白 Landrace	AA	14	0.173	A	0.284	CC	63	0.778	C	0.846
	AB	18	0.222			CD	11	0.136		
	BB	49	0.605	B	0.716	DD	7	0.086	D	0.154
大白 Large White	AA	8	0.103	A	0.192	CC	57	0.731	C	0.795
	AB	14	0.179			CD	10	0.128		
	BB	56	0.718	B	0.808	DD	11	0.141	D	0.205

个品种中 Site1 和 Site6 这 2 个位点基因型和基因频率的分布基本一致, Site1 位点中以 BB 型的主, Site6 位点中以 CC 型的主。

2.2 基因型效应分析

根据线性固定效应模型分析 *FcRn* 外显子 Site1 和 Site6 位点的基因型效应。Site1 位点的基

因型效应不显著($P > 0.05$), Site6 位点的基因型效应显著($P < 0.05$), 说明 Site6 位点的突变对初乳中 IgG 含量有影响。对 Site6 位点的基因型效应在方差分析的基础上进行了多重 t 检验, 表 3 列出了不同基因型的最小二乘均值及标准误。

表 3 Site6 基因型的最小二乘均值和多重 t 检验Table 3 Least square means of Site6 genotype and t 's multiple range test

基因型 Genotype	CC	CD	DD
初乳中 IgG 含量/(mg/mL)	103.755±7.687 ^a	98.424±8.267 ^b	94.253±8.713 ^c

含不同字母表示两组之间差异显著($P<0.05$)

Different letter means different is significant in two group ($P<0.05$)

从表 3 的分析结果可以看出:Site6 位点基因型 CC、CD、DD 的初乳中 IgG 含量差异显著($P<0.05$),CC 型的初乳中 IgG 含量最高,DD 型的初乳中 IgG 含量最低。

3 讨论

初乳中 IgG 含量是影响断奶前仔猪发病率的一个重要因素,随着养猪业的发展和饲养成本的提高,初乳中 IgG 含量越来越受到重视,但初乳中 IgG 含量受品种、日粮、胎次、泌乳时期、乳头位置、季节等多种因素的影响^[2],是一个较为复杂的数量性状。Varley 研究表明,仔猪初生 6 h 内摄入初乳的 IgG 含量与其 3 周内仔猪成活率密切相关^[11]。Rooke 报道不同窝仔猪之间吸收 IgG 含量的差异是由初乳中 IgG 含量的差异引起的,并指出第 28 天仔猪血清中 IgG 的含量与第 7 天血清中 IgG 的(7 d 前血清中的 IgG 全部来源于母源抗体 IgG)含量成正相关,获得足够母源抗体 IgG 的仔猪感染肠道、呼吸道疾病的机率小,死亡率低^[12]。

William 等对牛 *FcRn* 基因进行了单核苷酸多态性分析,发现单倍型 3 和单倍型 2 与初乳中 IgG 含量的相关性,其中单倍型 3 母牛初乳中 IgG 含量低的可能性是对照组的 4 倍,单倍型 2 犊牛血清中 IgG 含量高的可能性是对照组的 6 倍^[13]。本研究对猪 *FcRn* 基因第 3、4、5、6、7 外显子的 PCR 扩增片段进行了单链构象多态性检测,发现了两个突变位点,Site1 位点突变的基因型效应对初乳中 IgG 含量的影响差异不显著($P>0.05$);Site6 位点突变的基因型效应对初乳中 IgG 含量的影响差异显著($P<0.05$),对 Site6 位点基因型效应在方差分析的基础上又进行多重 t 检验分析,发现基因型 CC、CD、DD 的初乳中 IgG 含量差异显著($P<0.05$),这表明 Site6 位点的突变对初乳中 IgG 含量有一定影响,但影响的大小还需要在扩大样品的基础上进一步验证。Site6 位点是 *FcRn* 基因的第 6 外显子,该外显子是 *FcRn* 基因的跨膜区,该区域的具体功能目前

还不清楚,有待进一步从生物学方面进行研究。

参考文献:

- [1] Commission Meat and Livestock Commission, Milton Keynes, UK. 2001.
- [2] 秦宜德. 猪乳中蛋白质的动态变化及一组高分子量蛋白质的多态性和鉴定[D]. 南京:南京农业大学,2000.
- [3] Drew M D, Owens B D. The provision of passive immunity to colostrums-deprived piglet by bovine or porcine serum immunoglobulins [J]. Can J Anim Sci, 1988, 68: 1 277~1 284.
- [4] Hendrix W F, Kelley K W, Gaskins C T. Porcine neonate survival and serum gamma globulins [J]. J Anim Sci, 1976, 47: 1 281~1 286.
- [5] Watson D L. Immunological functions of the mammary gland and its secretion-comparative review [J]. Aust J Biol Sci, 1980, 33: 403~422.
- [6] Speer V C, Quinn L Y. Antibody absorption in the baby pig [J]. J Anim Sci, 1957, 16: 1 046.
- [7] Klobasa F, Butler J E. Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers [J]. Am J Vet Res, 1987, 48(2): 176~182.
- [8] Brambell F W R. The transfer of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins [J]. Proc Nutr Sci, 1966, 1 087~1 093.
- [9] Derry D C, Gregory J C, Thomas J S, et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs [J]. J Immun, 2003, 170: 3 528~3 533.
- [10] Anna Z, Veronika J. Localization of the sheep *FcRn* in the mammary gland [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 87: 327~330.
- [11] Varley M. Colostrum: survival kit for piglets [J]. Pig Farming, 1984, 6: 40~41.
- [12] Rooke J A, Bland I M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet [J]. Livestock Production Science, 2002, 78: 13~23.
- [13] William W L, Michael P H. Association of bovine neonatal Fc receptor α -chain gene (*FCGRT*) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves [J]. Mammalian Genome, 2002, 13: 704~710.