

## 猪 SLA-DQA 一个新 SNP 的发现及其遗传效应的研究

彭勇波<sup>1</sup>, 李奎<sup>2</sup>, 樊斌<sup>1</sup>, 余梅<sup>1</sup>, 朱猛进<sup>1</sup>, 熊统安<sup>1</sup>, 彭中镇<sup>1</sup>, 刘榜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学动物科技学院动物分子生物学与育种实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

**摘要:** 采用 PCR-RFLP 方法对新发现的一引起氨基酸改变的 SNP 位点(读码框第 722 位碱基)进行了检测, 初步探讨了 DQA 基因作为影响经济性状候选基因的可能性。经在 6 个中国地方猪种及大白猪中 PCR-RFLP 检测, 发现除小梅山和大白猪外, 其它几个猪种均存在多态性, 同时对 6 个地方猪种间的基因型频率的差异进行了  $\chi^2$  检验。在通城猪、长白猪、大白猪及其三元杂种猪长大通和达长通猪中检测了该位点的基因型, 并运用 GLM 进行基因型与生长、胴体性状间关联分析, 发现该 SNP 位点与平均背膘厚、6-7 肋间背膘厚存在显著相关 ( $P < 0.05$ ), 与胸腰椎间背膘厚也接近显著性水平 ( $P = 0.06$ ), 与内脂率、眼肌高、肌肉失水率亦存在显著相关 ( $P < 0.05$ ), 但未发现与生长性状间的相关。

**关键词:** 猪; SLA-DQA; 第四外显; SNP; PCR-RFLP; 关联分析

## Characterization of a Novel SNP of SLA-DQA and Its Effects on Carcass Traits

PENG Yong-bo<sup>1</sup>, LI Kui<sup>2</sup>, FAN Bin<sup>1</sup>, YU Mei<sup>1</sup>, ZHU Meng-jin<sup>1</sup>, XIONG Tong-an<sup>1</sup>,  
PENG Zhong-zhen<sup>1</sup>, LIU Bang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

<sup>2</sup>Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

**Abstract:** A novel SNP at the nucleotide 722 of coding sequence, which caused shift mutation, were detected using PCR-RFLP. This study was designed to investigate the effect of DQA on pig economic traits. The results of genotypes in six Chinese indigenous breeds and Large White showed that there exist polymorphism excepting Xiaomeishan Pigs and Large White. The differences in genotype frequency were scored using the  $\chi^2$  value among the 6 indigenous breeds. The genotype distributions were also analyzed in Large White, Landrace, Tongcheng, Landrace×(Large White×Tongcheng) and Large White×(Landrace×Tongcheng), and the association analysis between genotype and traits was performed by GLM. The results showed that the genotypes have significant correlations with average backfat thickness, backfat thickness between 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> ribs, percentage of leaf and caul and eye muscle width ( $P < 0.05$ ), and nearly significant correlation levels with backfat at the loin ( $P = 0.06$ ). However, there were no significant associations between DQA genotype and growth traits.

**Key words:** Pig; SLA-DQA; Exon 4; SNP; PCR-RFLP; Association analysis

猪主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)又称猪白细胞抗原(swine leukocyte antigen, SLA)复合体。SLA 复合体分为 I、II、III 3 类, 其中 I 类和 III 类位于 7 号染色体的短臂(7p1.1), II 类位于 7 号染色体的长臂(7q1.1), 目前已发现 SLA I 类基因包含 SLA-1、-2、-3、-4、-5、-6、

-7、-8 和 -9 等基因, II 类有 DPA、DPB、DMA、DMB、DOA、DOB、DQA、DQB、DRA 和 DRB 共 10 个基因, III 类区主要是补体基因、TNF 及 HSP70 等基因家族<sup>[1-4]</sup>。SLA 基因与疾病抗性、生长、胴体品质及肉质等性状有关, 在 SLA 区域已发现有影响猪背膘厚度 QTL 存在<sup>[5-7]</sup>。但 SLA 中究竟哪些基因影响哪些性状

收稿日期: 2005-01-12

基金项目: 国家自然科学基金(30371029)、湖北省科技攻关项目(2005AA206B03)、国家“863”计划(2004AA222170)、教育部重点项目(01121)和学校创新基金项目资助

作者简介: 彭勇波(1980-), 男, 湖北仙桃人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学与动物育种研究。Tel: 027-87822680; E-mail: pyb1980@hotmail.com。刘榜为通讯作者, Tel: 027-87281306; E-mail: liubang@public.wh.hb.cn



尚不清楚, 因此对 SLA 中单个基因的研究, 弄清每个基因与猪经济性状的关系, 进一步对其功能进行鉴定, 对于猪育种工作具有重要意义。

SLA 区域的 II 类基因中, 目前发现在蛋白水平表达的有 DRA、DRB、DQA 和 DQB 4 个重要的功能基因。对 SLA II 类基因 DQB 和 DRB 外显子 2 的多态的研究显示两基因外显子 2 具有高度多态性<sup>[3, 8]</sup>, DQA 的 2~3 外显子亦具有相对丰富的多态<sup>[9]</sup>, 但是有关 DRA、DRB、DQA 和 DQB 4 个基因其它几个外显子多态的研究报道较少。

本研究通过克隆获得的 SLA-DQA 的全长编码序列与 GenBank 中的序列比对来寻找新的 SNP, 进一步在中外猪种中进行检测, 并与生产性状进行关联分析来发现新的遗传标记, 为对 SLA-DQA 基因功能鉴定及标记辅助选择奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

总 RNA 从屠宰成年通城猪脾脏组织中提取; 用于分析 DQA 基因 SNP 的猪群包括蓝塘猪、清平猪、藏猪、民猪、小梅山猪、鄂西黑猪及通城猪、大白猪、长白猪和三者的杂种猪大长通、长大通; 用于性状关联分析的猪群 (包括大白猪、长白猪、通城猪、大长通和长大通猪) 为华中农业大学动物科技学院动物分子生物学与育种实验室与湖北省通城县种畜场合作建立。所测的性状包括: 达屠宰体重日龄 (age at 90 or 75 kg)、试验期平均日增重 (ADG within experiment) 两个生长性状; 屠宰率 (dressing percent)、板油率 (percentage of leaf fat)、内脂率 (percentage of leaf and caul fat)、眼肌高 (longissimus dorsi height)、眼肌宽 (longissimus dorsi width)、眼肌面积 (longissimus dorsi area)、肩部膘厚 (backfat thickness at the shoulder)、6-7 肋间背膘厚 (backfat thickness depth between 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> ribs)、胸腰膘厚 (10<sup>th</sup> rib backfat thickness)、三点平均背膘厚 (avg. backfat at 3 points)、腿臀比率 (percent of ham) 11 个胴体性状; 背最长肌肉色 (muscle colour score)、背最长肌大理石纹 (loin marbling)、失水率 (water losing percentage)、滴水损失 (loin muscle drip loss)、肌肉剪切力 (muscle shear force) 及肌肉脂肪含量 (intramuscular fat) 6 个肉质性状。

### 1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂盒 Trizol 购自美国 invitrogen 公

司; dNTPs 购自上海博亚公司; Taq DNA 聚合酶, 核酸纯化回收试剂盒购自大连宝生物有限公司; 质粒 pGEM®-T Vector、M-MLV 反转录酶为 Promega 公司产品; 大肠杆菌 DH5  $\alpha$  为本室保存菌种, 限制内切酶 Taq I 为 MBI 公司产品; 梯度 PCR 扩增仪为德国 Eppendorf 公司产品。

### 1.3 PCR 引物设计与基因组扩增

根据在 DQA 基因编码区两端设计引物扩增通城猪的 cDNA 得到的序列用 Blast 方法在 NCBI 中进行比对发现外显子 4 存在一新的 SNP 位点。根据猪 SLA-DQA 基因的 DNA 序列 (AY303988) 设计扩增猪 SLA-DQA 基因外显子 4 的特异性引物, 引物序列如下:

DQA-5047: 5'-CTC CTC ACC CCA TCC CAC TTA-3'

DQA-5356: 5'-AGC CTC CTC CCA CTT TCC TTC-3'

PCR 的反应总体积均为 20  $\mu$ l, 体系如下: 12.5 ng 的基因组 DNA 1  $\mu$ l, 1 $\times$ Buffer, 2 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 150  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 正反向引物各 0.3  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 1U Taq DNA 聚合酶。PCR 的反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 60.5  $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖进行电泳检测。

### 1.4 基因组扩增产物的酶切反应

经过电泳检测的 PCR 产物取 5  $\mu$ l 加入 5U 的限制性内切酶, 10 $\times$ buffer 1  $\mu$ l, 加水补至 10  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3~4 h 后琼脂糖电泳检测, 紫外灯下拍照并判断基因型。

### 1.5 统计分析

基因型的适合度检验用  $\chi^2$  检验。运用 SAS Version8.2 软件中 GLM 程序按以下模型进行基因型与性状间的关联分析:  $Y_{ijkl} = \mu + G_i + B_j + T_k + S_l + e_{ijkl}$ , 式中  $Y_{ijkl}$  为性状观测值,  $\mu$  表示均值,  $G_i$  表示基因型效应,  $B_j$  表示组合效应,  $T_k$  表示屠宰的批次效应,  $S_l$  表示性别效应,  $e_{ijkl}$  表示残差。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

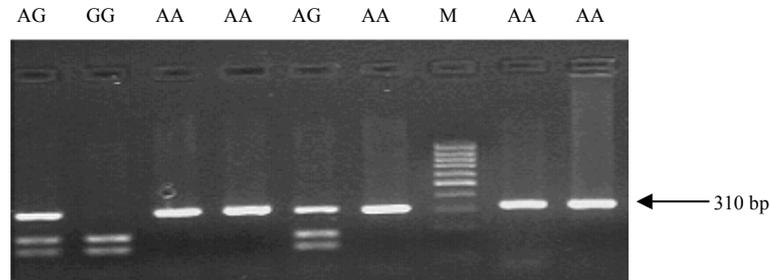
利用引物 DQA-5047 和 DQA-5356 特异性的扩增得到一 310 bp 的片段, 包含了完整的第 4 外显子和部分的第 3 和 4 内含子。

### 2.2 PCR-RFLP 结果

DQA 基因长度为 310 bp 的 PCR 产物对应开放读

码框第 722 个碱基发生了 A 和 G 之间的转换从而引起氨基酸从 Gly 到 Arg 转变, 并产生了 *Taq*I 酶切位点, 酶切后, 有 GG 型 (178+132 bp)、AA 型 (310 bp) 及 AG 型 (310+178+132 bp) 3 种基因型, 如图所示。

3 种基因型在蓝塘、清平和藏猪都有出现, 但 GG 型偏少; 而在民猪、小梅山及大白、长白、通城、大长通和长大通猪中只有 AA 和 AG 两种基因型。3 种基因型在几个中国地方猪群中的分布如表 1 所示。



M. 100 bp DNA 分子量标记 M. 100 bp DNA Marker

图 猪 DQA 基因扩增产物的酶切判型结果

Fig. The result of DQA PCR product digested with *Taq*I enzyme

表 1 DQA 基因 PCR 产物基因型频率及基因频率

Table 1 Genotype frequency and allele frequency of PCR product in different breeds

猪品种 Pig breeds		蓝塘猪 Lantang	清平猪 Qingping	藏猪 Tibet pigs	民猪 Min pigs	小梅山 Xiaomeishan	鄂西黑猪 E'xi black	大白 Large white
基因型 Genotype	AA	14 (0.35)	29 (0.56)	17 (0.68)	13 (0.35)	36 (1)	44 (0.76)	28(1)
	AG	24 (0.60)	21 (0.40)	7(0.28)	24 (0.65)	0	14 (0.24)	0
	GG	2 (0.05)	2 (0.04)	1 (0.04)	0	0	0	0
基因频率 Allele frequency	A	0.65	0.76	0.82	0.68	1	0.88	1
	G	0.35	0.24	0.18	0.32	0	0.12	0

括号内是检测出基因型频率 Numbers in parenthesis indicate the genotype frequency

### 2.3 不同猪群基因型频率的检测结果

利用 PCR-TaqI-RFLP 检测了蓝塘猪、清平猪、藏猪、民猪、小梅山猪、鄂西黑猪等 6 个中国地方猪种及通城猪、大白猪、长白猪和三元杂种猪大长通、长大通 DQA 基因外显子 4 的 *Taq*I-RFLP 多态, 各猪种的基因频率如表 1 所示。几个品种间基因型频率的卡

方检验结果如表 2。 $\chi^2$  检验 6 个地方猪种间基因型频率发现藏猪和民猪、藏猪和蓝塘猪、鄂西黑猪和清平猪之间基因型频率差异显著 ( $P<0.05$ ), 鄂西黑猪与民猪、鄂西黑猪与蓝塘猪间差异极显著 ( $P<0.01$ )、而小梅山与其它 5 个地方猪种间差异均存在极显著差异 ( $P<0.01$ )。

表 2 几个不同地方猪种间 DQA 基因型频率卡方检验

Table 2 Genotype frequency  $\chi^2$  test among different indigenous breeds

	清平猪 Qingping	藏猪 Tibet pigs	民猪 Min pigs	小梅山 Xiaomeishan	鄂西黑猪 E'xi black
蓝塘猪 Lantang	3.934	6.849*	1.923	35.568**	17.431**
清平猪 Qingping		1.136	5.936	21.557**	6.173*
藏猪 Tibet pigs			8.865*	13.259**	2.570
民猪 Min pigs				34.789**	15.612**
小梅山 Xiaomeishan					10.210**

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

## 2.4 基因型与生产性状间的关联分析

检测 135 头猪(包括 27 头长白猪, 28 头大白猪, 32 头通城猪, 23 头长大通猪和 25 头大长通猪) 该位点多态, 并分析多态与生长性状和肉质性状间相关性,

结果表明该基因与 6-7 背膘厚、三点平均背膘厚、眼肌高及背最长肌失水率间存在显著相关, 与胸腰膘厚、内脂率间亦存在显著或接近显著水平的相关(表 3), 而与其它几个性状间未发现显著相关。

表 3 DQA 基因不同基因型对性状的影响

Table 3 Effect of different DQA genotypes on production traits

性状 Traits		基因型 Genotype		P 值
		AA (106)	AG (29)	P value
胴体性状 Carcass traits	内脂率 Percentage of leaf and caul fat	5.63±0.14	6.25±0.29	0.0514
	胸腰椎间背膘厚 Backfat at the loin	2.46±0.05	2.68±0.11	0.0555
	平均背膘厚 Average backfat thickness	3.01±0.05	3.2397±0.10	0.0385
	6-7 肋间背膘厚 Backfat thickness between 6 <sup>th</sup> and 7 <sup>th</sup> ribs	2.89±0.06	3.20±0.12	0.0218
	眼肌高 Loin eye height	9.15±0.06	8.84±0.13	0.0248
	臀腿率 Percentage of ham	30.58±0.18	29.84±0.38	0.0719
肉质性状 Meat quality traits	失水率 Water losing percentage	13.45±0.29	14.96±0.60	0.023

括号表示每种基因型的个数 The number of each genotype was indicated into brackets

## 3 讨论

### 3.1 关于 DQA 基因外显子 4 多态检测

以往对 SLA 多态的研究多集中于血清单倍型与生产性状和抗病性状的关联研究, 但标准血清的开发存在困难。PCR-RFLP 技术的诞生为研究 SLA 基因的多态提供了新的方法<sup>[9]</sup>, Shia 等利用该方法检测 DQB 和 DRB 两基因外显子 2 的 *Hae*III、*Rsa* I 和 *Msp* I、*Rsa* I 限制性内切酶的等位基因型<sup>[7]</sup>。研究表明 DQA 基因外显子二具有较丰富的多态<sup>[10]</sup>, 而笔者通过比较 DQA 不同等位基因发现 DQA 基因外显子 4 亦有丰富的多态。本研究选定第 4 外显子中一改变氨基酸的多态位点进行了 PCR-RFLP 多态检测, 此法能方便快捷地检测该位点的基因型。

### 3.2 关于不同猪群间基因型的差异

通过在用于检测遗传规律的 7 个猪种中检测该位点基因型发现: 在蓝塘猪、清平猪和藏猪中三种基因型(AA、AG 和 GG) 均有出现, 而民猪、小梅山猪、鄂西黑猪只出现了 AA 和 AG 两种基因型, 大白猪只检测到了 AA 型, 但 7 个品种中 A 等位基因为优势等位基因的趋势却是一致的。卡方检验 6 个地方品种之间基因型频率的差异表明: 基因型频率的分布与品种有关, 尤其是小梅山猪与其它几个猪种差异达到极显著水平( $P<0.01$ ), 其次是鄂西黑猪与多个品种之间的基因型频率的差异也达到了极显著的水平( $P<0.01$ )。

### 3.3 关于 DQA 基因型与肉质性状间的关联

研究者利用不同的资源群体在 7 号染色体的 SLA 区域检测到了与生长及脂肪沉积相关性状的 QTL<sup>[5-7]</sup>。SLA-DQA 基因又是 SLA 区域的主要表达的基因之一, 所以 DQA 基因有可能是影响猪肉质的一个遗传标记甚至是候选基因。已有研究表明动物机体的脂肪细胞也是一个激素分泌比较活跃的组织, 同时也与机体的免疫功能相关<sup>[11,12]</sup>。SLA 区域基因与免疫应答之间的关系也预示了 SLA-DQA 基因与脂肪沉积之间可能存在某种联系, 本研究的部分结果初步证实了这一点。

在对 DQA 基因外显子 4 多态与性状的关联分析中, 发现 SLA-DQA 的基因型与三点平均背膘厚、6-7 肋间背膘厚、胸腰接合处背膘厚及内脂率等性状间存在显著( $P<0.05$ ) 或接近显著的关联, 而与眼肌高度也有显著的影响( $P<0.05$ )。另外在与肉质性状的关联分析中发现 DQA 的基因型与背最长肌失水率也存在显著相关。比较 SLA-DQA 基因不同基因型间表型值之间的差异发现: 在胴体性状上, AG 基因型比 AA 基因型在 3 点平均及 6-7 肋间背膘厚分别厚 6.97% 和 9.64%, 而 AG 型个体的内脂率也比 AA 型个体要高 9.81%, 这与膘厚的结果也是比较一致的。在其它胴体相关的性状上, AA 型个体在眼肌高度上要比 AG 型个体高 3.42%。Vaiman<sup>[13]</sup>等的研究发现 SLA 的某些单倍型与生长性状存在某些相关, 且不同品种出现不同结果, 但在研究结果中未发现 DQA 基因多态与生长性状相关。推测 SLA-DQA 基因可能是一个影响膘

厚的主效基因或与主效基因紧密连锁的基因, 且该基因能运用于对背膘厚和屠宰率等性状的选择, 该位点可能是一个具有实践意义的标记。

## 4 结 论

本研究发现并检测了 SLA-DQA 基因外显子 4 中一个引起氨基酸改变的新 SNP, 发现该位点与 6-7 肋间背膘厚度显著相关 ( $P < 0.05$ )。推测该基因可能是一个影响背膘厚的基因, 有可能作为背膘厚的一个候选基因用于标记辅助选择。

## References

- [1] Echarid G, Yerle M, Gellin J, Dalens M, Gillois M. Assignment of the major histocompatibility complex to the p1.4-q1.2 region of chromosome 7 in the pig (*Sus scrofa domestica* L.) by *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1986, 41: 126-128.
- [2] Rabin M, Fries R, Singer D, Ruddle F H. Assignment of the porcine major histocompatibility complex to chromosome 7 by *in situ* hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1985, 39: 206-209.
- [3] Chardon P, Renard C, Vaiman M. The major histocompatibility complex in swine. *Immunological Reviews*, 1999, 167: 179-192.
- [4] Lunney J K, Butler J E. Immunogenetics. In: Rothschild M F, Ruvinsky A. (eds). *The Genetics of the Pig*. CAB International, Wallingford, 1998: 165-166.
- [5] Wang L, Yu T P, Tuggle C K, Liu H C, Rothschild M F. A directed search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *Journal of Animal Science*, 1998, 76: 2560-2567.
- [6] Dirk J de Koning, Janss L L G, Rattink A P, Pieter A M, van Oers, Beja J. de Vries, Martien A M Groenen, Jan J van der Poel, Piet N. de Groot, Brascamp E W (Pim), Johan A M van Arendonk. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 1999, 152: 1679-1690.
- [7] Yoshitaka N, Haley C S, Sewalem A, Visscher P M. Quantitative trait loci variation for growth and obesity between and within lines of pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 2003, 164: 629-635.
- [8] Shia Y C, Bradshaw M, Rutherford M S, Lewin H A, Schook L B. Polymerase chain reaction based genotyping for characterization of SLA-DQB and SLA-DRB alleles in domestic pigs. *Animal Genetics*, 1995, 26: 91-100.
- [9] 周 波, 王林云, 谈永松, 张似青. 猪白细胞 II 类抗原基因多态性研究进展. *遗传*, 2003, 25: 611-614.  
Zhou B, Wang L Y, Tan Y S, Zhang S Q. Advances in allelic polymorphism at class II of the pig MHC(SLA). *Heredity*, 2003, 25: 611-614. (in Chinese)
- [10] 刘 榜, 朱正茂, 余 梅, 曹建华, 林 丽, 熊统安, 朱猛进, 彭中镇, 李 奎. 猪 MHC-II 类区 DQA 新等位基因及新突变位点的发现. *遗传学报*, 2003, 30: 955-960.  
Liu B, Zhu Z M, Yu M, Cao J H, Lin L, Xiong T A, Zhu M J, Peng Z Z, Li K. Characterization of novel alleles and new mutation sites of porcine MHC class II DQA. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30: 955-960. (in Chinese)
- [11] Caroline M P, Christine A M. The source of fatty acids incorporated into proliferating lymphoid cells in immune-stimulated lymph nodes. *British Journal of Nutrition*, 2003, 89: 375-382.
- [12] Anders H B, Ying L, Michael P L, Philipp E S. Adipocyte differentiation induces dynamic changes in NF  $\kappa$  B expression and activity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2004, 287: E1178-E1188.
- [13] Vaiman M, Renard C, Bourgeaux N. In: *Proceedings of International Symposium on the Molecular Biology of The Major Histocompatibility Complex of Domestic Animal Species*. Iowa State University Press, Iowa, USA, 1988: 23-38.

(责任编辑 林鉴非)