

# 内蒙古地方品种绵羊朊蛋白基因多态性分析

王伊琴<sup>1,2</sup>, 秦贞奎<sup>3\*</sup>, 包勇敢<sup>2</sup>, 寇福军<sup>2</sup>, 荆文奎<sup>2</sup>, 乔俊文<sup>1</sup>, 赵德明<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学动物医学院国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100193;

2. 内蒙古二连浩特出入境检验检疫局, 二连浩特 011100; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

**摘要:** 对中国内蒙古的乌珠穆沁羊(46)、苏尼特羊(34)和蒙古羊(22)进行朊蛋白基因的克隆和多态性分析。结果表明, 发现了 8 个朊蛋白基因多态性位点, 其中 M157I、Q220H、R223K 为未见报道的朊蛋白基因多态性位点; 痒病中度易感的朊蛋白基因 ARQ/ARQ 占 74.5%, 具有痒病抗性朊蛋白基因 ARR/ARR 占 7.9%, 未检出对痒病高度易感的朊蛋白基因 VRQ/VRQ。从基因水平上推论, 乌珠穆沁羊携带的羊痒病抗性的 ARR/ARR 基因频率较高(15.2%), 占 ARR/ARR 基因型的 87.5%, 发生羊痒病风险较低。该研究结果在中国活羊的出口贸易和品种选育方面有重要的意义, 为出入境动物检疫中羊痒病的风险分析和风险评估提供重要的基础理论资料。

**关键词:** 朊蛋白基因; 基因多态性; 易感性; 抗性; 朊病; 羊痒病

中图分类号: S852.659.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0780-05

## Analysis on Polymorphisms of the Prion Protein Gene in Local Sheep Species of Inner Mongolia, China

WANG Yi-qin<sup>1,2</sup>, QIN Zhen-kui<sup>3\*</sup>, BAO Yong-gan<sup>2</sup>, KOU Fu-jun<sup>2</sup>,  
JING Wen-kui<sup>2</sup>, QIAO Jun-wen<sup>1</sup>, ZHAO De-ming<sup>1\*</sup>

(1. National Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies Laboratory, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;  
2. Erlianhot Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Erlianhot 011100, China;  
3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

**Abstract:** We investigated prion protein gene (PRNP) polymorphisms in three sheep breeds in Inner Mongolia, China. Blood samples were collected from 46 Ujumqin, 34 Sunite and 22 Mongolian sheep. The genetic DNA of PRNP of each sheep was extracted, amplified, and sequenced, and amino acid alignment was determined. Polymorphism was detected at 8 codons, among which M157I, Q220H and R223K have not been previously reported. The frequency of the amino acid residues ARQ/ARQ at codons 136, 154 and 171, which is associated with medium-high susceptibility to scrapie, was 74.5%, and the frequency of scrapie-resistant amino acid residues ARR/ARR was 7.9%. The highly susceptible amino acid residues VRQ/VRQ at these codons were not detected from the tested sheep. Of the 3 sheep breeds, Ujumqin sheep had the highest frequency (15.2%) of scrapie-resistant amino acid sequence, ARR/ARR at codons 136, 154 and 171, accounting for 87.5% sheep that carry these polymorphisms. Our findings are of special importance for both live sheep export and sheep breeding.

**Key words:** PRNP; gene polymorphisms; susceptibility; resistance; prion disease; scrapie

朊蛋白病(prion protein disease)又称为传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSE),是由致病性朊蛋白引起的一种致死性神经退行性疾病。该病可感染多种属动物,其中疯牛病、羊痒病和人克雅氏病是最常见的海绵状脑病。Prusiner“唯蛋白”理论表明,海绵状脑病的致病因子是一种编码宿主蛋白的 PrP<sup>C</sup>转变为异常的具有致病性的 PrP<sup>Sc</sup>,二者都具有相同的氨基酸序列,只是空间结构发生变化,由正常的以 $\alpha$ 螺旋为主的结构(PrP<sup>C</sup>)转变为以 $\beta$ 折叠为主的结构(PrP<sup>Sc</sup>),在脑部沉积而产生致病性。绵羊朊蛋白由单拷贝的朊蛋白基因编码,整个开放阅读框(open reading frame, ORF)在一个外显子内。绵羊的朊蛋白的全序列包含 771bp 核苷酸,编码 256 个氨基酸的前体蛋白<sup>[1]</sup>。

绵羊朊蛋白基因单核苷酸的多态性与羊痒病潜伏期、易感性、种间屏障有关<sup>[2-5]</sup>。绵羊朊蛋白基因(prion protein gene, PRNP)有 10 多个基因具有多态性,主要出现在等位基因 M112T、A136V、G127V/S、M137T、S138N、L141F、R151C、R154H、Q171R/H/K、N176K、H180Y、T195S、T196S 和 R211Q<sup>[6-9]</sup>。在这些等位基因中,136、154、171 三个位点的等位基因编码的氨基酸对羊痒病易感性影响最大<sup>[2,8,10-13]</sup>。在 136、154、171 的 3 个位点编码的氨基酸分别是 V、R、Q(VRQ)时,对羊痒病非常易感,其多态性与羊痒病的潜伏期、易感性有关;在 136、154、171 密码子分别是 A、R、R(ARR)时,在自然或实验室的条件下,与羊痒病的抗性有关<sup>[14-16]</sup>。而在 136、154、171 密码子分别是 A、R 和 Q/H(ARQ 或 ARH)时,对该病有中度易感性(medium-high susceptibility)<sup>[2,5-7, 11]</sup>。

中国内蒙古自治区羊种质资源较丰富,蒙古羊是中国绵羊业的主要基础品种,尤其是乌珠穆沁羊,是经过长期的自然选择和人工选育而成的特色品种,很受中东国家的欢迎。本研究的主要目的是对中国内蒙古 3 个绵羊品种朊蛋白基因多态性进行研究,并对与羊痒病的易感性或抗性有关的基因型进行分析讨论。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 基因组 DNA 提取试剂盒购于 BioDev-Tech 公司, DNA 凝胶回收试剂盒及 pGEM-T

Easy 载体购于 Promega 公司; Taq plus DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoRI* 及 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品; 大肠杆菌感受态细胞购于 TransGen Biotech 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 样品 在无菌条件下采取健康绵羊的 EDTA 抗凝血。3 个绵羊品种共 102 份血样。试验研究的 46 只乌珠穆沁羊、34 只苏尼特羊、22 只蒙古羊均健康, 2~3 岁, 来自内蒙古自治区出口中东的隔离牧场。

### 1.2 方法

1.2.1 引物 根据 GenBank 中已发表序列 (AY585240), 应用 Primer premier 5.0 设计特异性引物, 由上海生工合成。上游引物: 5'-GGTCAAGTGGTAGCCACAGTCAGTGGAAC-3'; 下游引物: 5'-AGCCTGGGATTCTCTCTGGTACTGGGTGAT-3'。

1.2.2 PRNP 的扩增 该引物扩增了绵羊朊蛋白开放阅读框 ORF(280-681)中的 402 bp 核苷酸, 共编码 134 个氨基酸。基因组总 DNA 的提取按试剂盒方法进行。PCR 反应在 25  $\mu$ L 体系中进行, 其中含有: 基因组 DNAs 200 ng, 引物 0.5  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; dNTP 200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>; Taq plus DNA Polymerase (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L; 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 10 $\times$  Ammonium Buffer; 去离子水 17  $\mu$ L。PCR 条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共循环 36 次; 最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.2.3 PCR 产物的克隆 扩增产物纯化按试剂盒纯化, 纯化后 PCR 扩增产物与 pGEM-T easy vector 进行连接, 4  $^{\circ}$ C 水浴过夜。将上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布于含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板, 于 37  $^{\circ}$ C 温箱中倒置培养 20 h, 随机挑取白色菌落进行筛选。挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。利用质粒提取试剂盒制备质粒, 然后对其进行酶切和 PCR 鉴定。

1.2.4 序列测定及分析 纯化后 PCR 扩增产物直接测序或克隆至 pGEM-T easy vector 后, 每个样品挑取 3~4 个克隆进行测序。并利用 DNAMAN 软件 (Version 5.2.2) 进行序列比较和同源性分析。

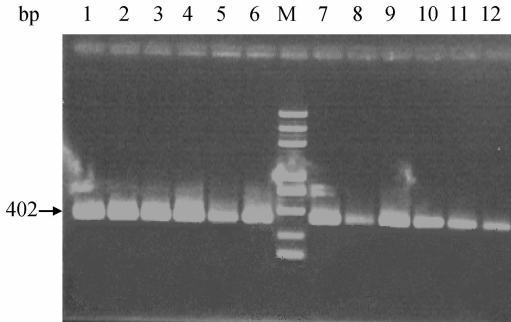
## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增、克隆和酶切鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 条带大小与预期扩增片段基本一致, 约为 402 bp (图

1), 初步证实为绵羊 PRNP 基因。

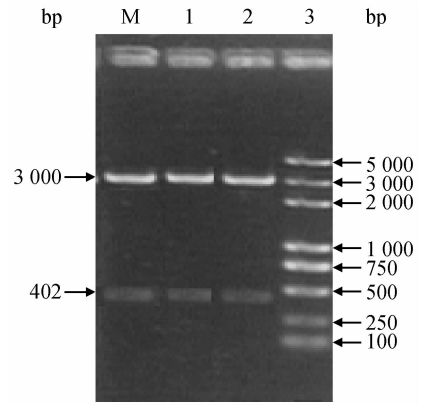
PCR 产物纯化后克隆到载体中, 转化后挑取阳性菌落, 经 *EcoR* I 酶切可获得 3 000 和 402 bp 左右的 2 个条带(pGEM-T Easy 载体两端分别存在 1 个 *EcoR* I 酶切位点), 这与载体和插入目的片段大小正好相符(图 2); 同时应用上、下游引物在重组质粒中 PCR 扩增出大小约为 402 bp 的条带, 结果表明扩增片段已经插入载体中(图略)。



1—12. 不同样品 PCR 产物; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1—12. PCR products from different samples; M. DL2000 plus DNA marker

图 1 PRNP 的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis result of PRNP PCR products



1—3. 不同样品重组质粒 *EcoR* I 酶切鉴定结果; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1—3. Products from different recombinant plasmids digested by *EcoR* I; M. DL2000 plus DNA marker

图 2 阳性克隆质粒的酶切鉴定  
Fig. 2 Analysis of plasmids digested by *EcoR* I

### 2.2 PRNP 基因的序列分析及其多态性

内蒙古 3 个绵羊品种的朊蛋白序列提交于 GenBank, 序列号为 AB307632 和 AB373758 到 AB373810。并对序列进行分析, PRNP 多态性除新发现的 157、220、223 位点外, 主要发生在 127、141、143、171、189 位点, 基因型分别为 G127V/S、L141F、H143R、M157I、R171H/Q/K、Q189L、Q220H、R223K(见表 1)。

表 1 3 个品种的绵羊朊蛋白基因多态性

Table 1 Polymorphisms of the prion protein gene in three sheep breeds

位点 Codon	乌珠穆沁羊 Ujumqin sheep		苏尼特羊 Sunite sheep		蒙古羊 Mongolian sheep	
	PrP allele	n	PrP allele	n	PrP allele	n
127	G→V	1	G→S	1	G→V	1
141					L→F	1
143	H→R	1				
157*			M→I	1		
171	Q→R	12	Q→R	1	Q→R	2
	Q→K	2			Q→K	1
	Q→H	2	Q→H	5	Q→H	1
189	Q→L	1	Q→L	2	Q→L	1
220*	Q→H	3				
223*	R→K	5			R→K	2

\*. 为未见报道的朊蛋白基因多态性位点

\*. Newly reported polymorphism codon of PRNP

研究表明, 分别位于 136、154 和 171 位点的氨基酸 ARQ/ARQ 基因型为 74.5%, 是对痒病中度

易感基因型; 具有痒病抗性 ARR/ARR 基因型占 7.9%, 未检出痒病高度易感的 VRQ 型(见表 2)。

表 2 3 个品种的绵羊朊蛋白在与羊痒病的易感性、抗性有关的 136、154、171 位点的等位基因的基因型和基因频率

Table 2 Frequencies of different types at codons 136, 154, and 171 of the prion protein gene in three sheep breeds

基因型 Genotype	乌珠穆沁羊 Ujumqin sheep	苏尼特羊 Sunite sheep	蒙古羊 Mongolian sheep	合计 Total
ARQ/ARQ <sup>a</sup>	30 (65.3%)	28 (82.4%)	18 (81.9%)	76 (74.5%)
ARQ/ARH <sup>a</sup>	2 (4.3%)	4 (11.8%)	1 (4.5%)	7 (6.9%)
ARH/ARH <sup>a</sup>	0 (0.0%)	1 (2.9%)	0 (0.0%)	1 (1.0%)
ARQ/ARK <sup>b</sup>	2 (4.3%)	0 (0.0%)	1 (4.5%)	3 (2.9%)
ARQ/ARR <sup>c</sup>	5 (10.9%)	1 (2.9%)	1 (4.5%)	7 (6.9%)
ARR/ARR <sup>d</sup>	7 (15.2%)	0 (0.0%)	1 (4.5%)	8 (7.9%)

a. 中度易感;b. 不明确;c. 部分抗性;d. 抗性

a. Medium-highly susceptible to scapie; b. Ambiguous; c. Partially resistant; d. Resistant

### 3 讨论

克隆测序得到中国 3 个内蒙古地方绵羊品种的朊蛋白基因序列,推导出的氨基酸序列表明,不同羊品种间的 PrP 氨基酸序列间高度同源。

研究发现 8 个位点的氨基酸存在 PRNP 多态性,特别是 157、220、223 为未见报道的 PRNP 多态性位点<sup>[6,8,17-18]</sup>,它们对羊痒病的易感性等方面的影响,在今后的 TSE 研究中尚需进一步的探讨。

136 位点的等位基因 V 与痒病高度相关,本试验中所有样品在 136 位点的等位基因均为有痒病抗性的基因型 A<sup>[9,12,14-15]</sup>;尽管 154 位点的密码子对痒病的影响不是很清楚,但有证据表明,有些品种在 154 位点为 H,增加了对羊痒病的抗性<sup>[9,15]</sup>。尽管本研究中 3 个绵羊品种在 136 位点氨基酸均为 A、154 位点的氨基酸均为 R,然而在 171 位点有 4 种多态性,分别是 Q、R、H 和 K,等位基因出现频率分别为 82.8%、11.3%、4.4%、1.5%。171Q 出现的频率高,171K 出现的频率低,与绵羊 PRNP 多态性的其他相关报道基本一致<sup>[8,17-18]</sup>。对 136、154 和 171 位点氨基酸本试验中未检测到痒病的高度易感基因型;中度易感的 ARQ/ARQ 基因型为 74.5%;痒病抗性 ARR/ARR 基因型占 7.9%。尤其是中国出口中东国家的主要绵羊品种 Ujumqin sheep,痒病抗性基因型 ARR/ARR 占 15.2%,与其他品种相比

(Sunite sheep 0.0%, Mongolian sheep 4.5%),发生羊痒病的风险较低,是具有痒病抗性的优良地方品种,在活羊出口贸易和品种选育方面有重要的意义。

目前,世界许多国家已经实施了一系列的措施来预防和控制动物 TSE 的发生<sup>[6,8,19-21]</sup>。为保护人类健康,欧盟国家应用遗传学方法和技术,选择对 TSE 有抗性的动物品种,以达到控制该病发生的目的<sup>[6,21]</sup>。该研究结果有利于我国实施选择痒病抗性基因型的品种育种计划,降低 TSE 的传播风险。

**致谢:**本试验得到内蒙古出入境检验检疫局屈海民、二连浩特出入境检验检疫局冯永胜、银泉等同志的帮助和支持,在此表示感谢。

### 参考文献:

- [1] PRUSINER S B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21 (12): 482-487.
- [2] GOLDMANN W, HUNTER N, FOSTER J D, et al. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87 (7): 2476-2480.
- [3] HUNTER N, GOLDMANN W, MARSHALL E, et al. Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease[J]. *Arch Virol Suppl*, 2000, (16): 181-188.
- [4] BOSSERS A, SCHREUDER B E, MUILEMAN I H, et al. PrP genotype contributes to determining

- survival times of sheep with natural scrapie[J]. *J Gen Virol*, 1996,77 (10): 2669-2673.
- [5] BAYLIS M, GOLDMANN W, HOUSTON F, et al. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(11): 2907-2914.
- [6] BILLINIS C, PSYCHAS V, LEONTIDES L, et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece [J]. *J Gen Virol*, 2004,85(Pt 2): 547-554.
- [7] DIAZ C, VITEZICA Z G, RUPP R, et al. Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock [J]. *J Gen Virol*, 200,86(3): 849-857.
- [8] DESILVA U, GUO X, PILLAI A T, et al. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003,102(1-4): 89-94.
- [9] THORGEIRSDOTTIR S, SIGURDARSON S, THORISSON H M, et al. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80 (9): 2527-2534.
- [10] HOUSTON F, GOLDMANN W, CHONG A, et al. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection [J]. *Nature*, 2003, 423(6939): 498.
- [11] MCCUTCHEON S, HUNTER N, HOUSTON F, et al. Use of a new immunoassay to measure PrP Sc levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences [J]. *J Immunol Methods*, 2005,298(1-2): 119-128.
- [12] BELT P B, MUILEMAN I H, SCHREUDER B E, et al. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie [J]. *J Gen Virol*, 1995,76 (3): 509-517.
- [13] HUNTER N, MOORE L, HOSIE B D, et al. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland [J]. *Vet Rec*, 1997, 140(3): 59-63.
- [14] HUNTER N, GOLDMANN W, SMITH G, et al. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie [J]. *Arch Virol*, 1994,137(1-2): 171-177.
- [15] ELSEN J M, AMIGUES Y, SCHELCHER F, et al. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov [J]. *Arch Virol*, 1999, 144 (3): 431-445.
- [16] KUTZER T, PFEIFFER I, BRENIG B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene [J]. *J Anim Breed Genet*, 2002,119:201-208.
- [17] LAN Z, WANG Z L, LIU Y, et al. Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in China [J]. *Arch Virol*, 2006, 151 (10): 2095-2101.
- [18] ACIN C, MARTIN-BURRIEL I, GOLDMANN W, et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep [J]. *J Gen Virol*, 2004,85(Pt 7): 2103-2110.
- [19] GOMBOJAV A, ISHIGURO N, HORIUCHI M, et al. Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds [J]. *J Vet Med Sci*, 2004,66 (10): 1293-1295.
- [20] ZHANG L, LI N, FAN B, et al. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds [J]. *Anim Genet*, 2004, 35(6): 457-461.
- [21] ALVAREZ L, ARRANZ J J, SAN PRIMITIVO F, et al. Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep [J]. *J Anim Sci*, 2006,84(2): 259-265.