

影响猪免疫性状的单倍型关联分析

罗维真^{1,2}, 陈少康³, 张龙超^{1*}, 程笃学¹, 颜 华¹, 李 勇¹, 王立刚¹, 宋 欣⁴,
马小军¹, 刘 欣¹, 李 稳¹, 梁 晶¹, 赵克斌¹, 王立贤^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 三元种业畜牧研究院, 北京 100192; 3. 北京市畜牧兽医总站, 北京 100107; 4. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘 要: 旨在缩小课题组前期全基因组关联分析(Genome-wide Association Study, GWAS)结果区间范围, 为下一步大规模群体验证提供有效候选基因。应用 GWAS 检验出的显著 SNP 标记构建单倍型, 在大白猪×民猪 F₂ 设计资源群体内开展其与 4 个血常规指标(红细胞压积(Haematocrit, HCT)、血红蛋白(Hemoglobin, HGB)、平均红细胞血红蛋白量(Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH)、平均红细胞体积(Mean Corpuscular Volume, MCV))和 3 个 T 细胞亚群指标(CD4+CD8-CD3+, CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+) 合计 7 个免疫性状指标的关联分析, 寻找显著单倍型区段中的候选基因。分析结果表明: 7 号染色体上的 3 个单倍型区段均与 T 细胞亚群指标关联极显著, 单倍型区段 3(block7-3)与 HGB 及 HCT 关联极显著; 8 号染色体上 3 个单倍型区段均与 MCH 和 MCV 关联极显著, 并由此定位 5 个候选基因: 影响 T 细胞亚群指标的 *ABCF1* 和 *PPP1R10* 基因, 影响 HGB 及 HCT 的 *GRM4* 基因, 影响 MCH 及 MCV 的 *ALB* 和 *AFP* 基因。结合上述结果及基因功能, 定位的 5 个基因可作为候选基因开展下一步研究。

关键词: 免疫性状; 单倍型; 关联分析; 猪

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)06-0843-10

Haplotype Association Study for Immune Traits in Swine

LUO Wei-zhen^{1,2}, CHEN Shao-kang³, ZHANG Long-chao^{1*}, CHENG Du-xue¹, YAN Hua¹,
LI Yong¹, WANG Li-gang¹, SONG Xin⁴, MA Xiao-jun¹, LIU Xin¹, LI Wen¹, LIANG Jing¹,
ZHAO Ke-bin¹, WANG Li-xian^{1*}

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*; 2. *Beijing Sanyuan Breeding Technology Co., Ltd Animal Husbandry Research, Beijing 100192, China*; 3. *Beijing General Station of Animal Husbandry and Veterinary Service, Beijing 100107, China*; 4. *College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China*)

Abstract: The aim of the present study was to narrow down the range of previous genome wide association study (GWAS), and to provide valid candidate genes for the large-scale group validation. Seven immune traits including four blood parameters (hematocrit (HCT), hemoglobin (HGB), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean cell volume (MCV)) and three T lymphocyte subpopulation parameters (CD4 + CD8-CD3+, CD4-CD8 + CD3+ and CD4 + CD8-CD3+ / CD4-CD8 + CD3+) were measured in a porcine intercross population (Large White × Min zhu). Six haplotype blocks were built using the significant SNPs tested in the previous GWAS. Associ-

收稿日期: 2012-07-04

基金项目: 国家十二五科技支撑计划项目(2011BAD28B01); 现代农业产业技术体系; 中国农业科学院基本科研业务增项(2012ZL069)

作者简介: 罗维真(1980-), 女, 广东云浮人, 博士, 主要从事动物遗传育种方面的研究, E-mail: daisy8098@126.com; 陈少康(1978-), 男, 吉林扶余人, 博士, 主要从事猪遗传育种方面的研究, E-mail: chenshaokang-21@126.com。二者并列为第一作者

* 通信作者: 张龙超, E-mail: lc Zhang@iascaas.net.cn; 王立贤, E-mail: iaswlx@263.net

ation studies between the haplotype blocks and the immune traits were performed. The result showed that the three blocks on SSC7 were significantly associated with the three T lymphocyte subpopulation parameters, the block7-3 on SSC7 was significantly associated with HGB and HCT, and the three blocks on SSC8 were significantly associated with MCH and MCV. The six blocks contained five genes *ABCF1*, *PPP1R10*, *GRM4*, *ALB* and *AFP*. Combination of these results, the five genes could be used as potential candidate genes for the study on immune traits.

Key words: immune traits; haplotype; association study; pig

现代养猪生产中,疾病越来越成为制约养殖效益的关键因素。常规的免疫接种、药物防治等措施虽然可以取得一定效果,但仍不能完全控制或消灭疫病的蔓延。由于药物和疫苗的大量使用致使病原微生物变异加快,导致病菌产生耐药性,使生产过程中疫病控制更加困难。同时药物残留也给畜产品带来重大的安全隐患。在此背景下,借助现代分子遗传育种的手段,培育抗病力强的新品种,将成为控制疫病的有效途径。

动物机体对疾病的抗性受遗传基础控制并可借助一些相对容易度量的免疫指标进行间接衡量。在抗病育种研究中,血常规和 T 淋巴细胞亚群指标被作为衡量机体健康状态及免疫状态的重要指标^[1]。随着分子生物学技术的发展,应用覆盖全基因组 SNP 芯片通过全基因组关联分析 (Genome-wide association study, GWAS) 的方法在定位影响畜禽经济性状领域取得了巨大的研究进展,目前已在奶牛产奶量性状^[2]、繁殖性状^[3]、肉牛生产性能性状^[4]、鸡腹脂性状^[5]、猪胴体组成性状和肢蹄结构性状^[6]及肉质性状^[7]等方面定位了大量候选基因,但对于猪免疫性状相关研究少有报道。本研究组前期应用构建的大白猪×东北民猪 F₂ 资源群体,利用 Illumina 公司 60k 猪全基因组 SNP 芯片在免疫性状的 GWAS 研究中定位到影响免疫性状 7 个指标的合计 77 个 SNPs 位点^[8]。由于显著性位点位于 7 号及 8 号染色体,SNPs 密度相对较低,定位区间范围较大,对后期查找候选基因进行功能验证存在一定困难。

本研究通过对课题组前期所得到的 GWAS 全基因组显著位点进行单倍型构建及关联分析,进一步缩小定位区间范围,为下一步大规模群体验证及功能分析提供更加合理的候选基因。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本研究采用的试验动物为课题组 2007-2011 年

构建的大白猪×东北民猪 F₂ 设计资源群体。群体的 F₀ 代由 4 头大白猪(父本)和 16 头东北民猪(母本)构成。在杂交产生的 F₁ 代群体中选择 9 头公猪和 46 头母猪交配(避免全同胞交配)产生 F₂ 代资源群体共计 437 头。所有试验个体饲养于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平基地实验猪场,个体健康状况良好,生长环境一致。

1.2 样品采集及应用数据

本研究对 F₂ 试验个体血液采集在(240±7)日龄进行。每个试验个体采集 2 mL 前腔静脉血。血液采集后立即送往中国中医科学院西苑医院进行免疫性状血常规及 T 淋巴细胞亚群各项指标的测定。所有血液指标测定在样品采集后 24 h 内完成。本研究应用数据为课题组第一阶段对测定血常规及细胞因子指标进行全基因组关联分析(GWAS)后达到全基因组水平显著的免疫性状,包括红细胞压积(HCT)、血红蛋白(HGB)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)和平均红细胞体积(MCV) 4 个血常规性状及 CD4+CD8-CD3+, CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 3 个 T 淋巴细胞亚群性状,合计共 7 个免疫性状指标^[8]。

1.3 应用数据及分析方法

应用 haploview 软件^[9]对与免疫指标显著关联的 SNPs 位点进行连锁不平衡分析,构建单倍型区段,随后应用 R 语言环境下的 haplo.stats 软件包^[10]进行单倍型关联分析,寻找与免疫性状关联显著的单倍型,并在此单倍型区段中搜索候选基因,为 GWAS 后续研究提供另一途径。

2 结果

2.1 7 号染色体单倍型分析

应用 haploview 软件对 7 号染色体上的 22 个与 HCT、HGB、CD4+CD8-CD3+, CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 5 个免疫性状显著关联的 SNPs 进行连锁不平衡分析,参数设置为

$r^2 \geq 0.8, D' = 1, LOD \text{ 值} \geq 3$, 分析结果如图 1。

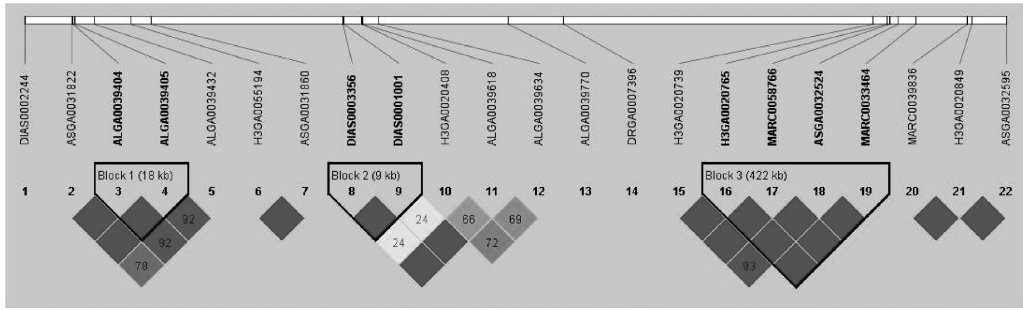


图 1 7 号染色体上各 SNPs 位点之间的连锁不平衡分析

Fig. 1 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC7

图 1 中, 方格中数字表明 r^2 或 D' 的数值, 颜色越深, 表明 SNPs 之间连锁不平衡强度越大。单倍型区段由软件自动生成, 一般表明完全连锁。从图

1 可看出在 7 号染色体上存在 3 个单倍型区段, 大小分别为 18、9 和 422 kb, SNPs 数目分别为 2、2 和 4, 分析结果见表 1。

表 1 7 号染色体上各 SNPs 位点间连锁不平衡分析

Table 1 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC7

单倍型 Haplotype	大小/kb Size	SNP 名称 Name	SNP 位置 ¹ Location	最近基因 ² Gene	距离/bp ³ Distance
BLOCK7-1	18	ALGA0039404	22869345	LOC100154935	24 059
		ALGA0039405	22888270	LOC100155322	9 492
BLOCK7-2	9	DIAS0003356	26812706	ABCF1	within
		DIAS0001001	26822610	PPP1R10	within
BLOCK7-3	422	H3GA0020765	34755602	ENSSSCP00000001643	47 403
		MARC0058766	34803564	GRM4	35 680
		ASGA0032524	34925816	GRM4	within
		MARC0033464	35177641	ENSSSCP00000001654	47 720

¹. 此处指 SNP 位点在 *Sus Scrofa* Build 9 数据库中染色体上的位置;². Gene 以 ENSSSCG 作为开头的基因是 Ensembl 数据库中的基因, 其他基因与 GenBank 中的基因命名相同;³. 此处指在 *Sus Scrofa* Build 9 数据库中 SNP 位点在基因内的位置或距基因的距离。表 5 同

¹. SNP position derived from *Sus Scrofa* Build 9 assembly; ². Gene location on the *Sus Scrofa* Build 9 assembly, gene name start with ENSSSCG as in Ensembl while other gene symbol as in GenBank; ³. SNP designated as in a gene or distance from a gene coding region in *Sus Scrofa* Build 9 assembly. The same as Table5

应用 haplo. stats 软件包对得到的 3 个单倍型区段分别进行单倍型频率及显著性检验。在 7 号染色体单倍型区段 1(block7-1)中共有 2 种单倍型, 与免疫性状 CD4+CD8-CD3+, CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 关联显著。其中单倍型 GC 对免疫性状 CD4+CD8-CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 具有极显著正效应 ($P < 0.01$), 对免疫性状 CD4-CD8+CD3+

具有极显著负效应 ($P < 0.01$), 与 HCT、HGB、MCH 和 MCV 免疫性状关联不显著 ($P > 0.05$); 单倍型 AA 对免疫性状 CD4+CD8-CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 具有极显著负效应 ($P < 0.01$), 对免疫性状 CD4-CD8+CD3+ 具有极显著正效应 ($P < 0.01$)。与 HCT、HGB、MCH 和 MCV 性状关联不显著 ($P > 0.05$), 分析结果见表 2。

表 2 单倍型区段 7-1 关联分析

Table 2 Results of haplotype association analysis of block7-1

性状 Trait	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	单倍型效应评分 Haplotype score	P 值 P value	总体 P 值 Total P value
HCT	GC	0.572 26	-0.035 77	0.971 46	$P=0.971 46$
	AA	0.427 74	0.035 77	0.971 46	
HGB	AA	0.427 74	-0.097 33	0.922 46	$P=0.922 46$
	GC	0.552 26	0.097 33	0.922 46	
MCH	GC	0.572 43	-0.133 76	0.893 59	$P=0.893 59$
	AA	0.427 57	0.133 76	0.893 59	
MCV	GC	0.572 43	-0.305 98	0.759 62	$P=0.759 62$
	AA	0.427 57	0.305 98	0.759 62	
CD4+CD8-CD3+	AA	0.427 74	-3.649 12	0.000 26	$P=0.000 26$
	GC	0.572 26	3.649 12	0.000 26	
CD4-CD8+CD3+	GC	0.572 26	-5.170 26	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AA	0.427 74	5.170 26	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	AA	0.427 74	-5.250 85	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GC	0.572 26	5.250 85	$\leq 10^{-5}$	

在 7 号染色体单倍型区段 2(block7-2)中共有 2 种单倍型,均与 CD4+CD8-CD3+、CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+ / CD4-CD8+CD3+ 关联显著。其中单倍型 AA 对免疫性状 CD4+CD8-CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+ / CD4-CD8+CD3+ 具有极显著正效应 ($P < 0.01$), 对免疫性状 CD4-CD8+CD3+ 具有极显著负效应 ($P < 0.01$), 与 HCT、HGB、

MCH 和 MCV 关联不显著 ($P > 0.05$); 单倍型 GG 对免疫性状 CD4+CD8-CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+ / CD4-CD8+CD3+ 具有极显著负效应 ($P < 0.01$), 对免疫性状 CD4-CD8+CD3+ 具有极显著正效应 ($P < 0.01$), 与 HCT、HGB、MCH 和 MCV 关联不显著 ($P > 0.05$), 分析结果见表 3。

表 3 单倍型区段 7-2 关联分析

Table 3 Results of haplotype association analysis of block7-2

性状 Trait	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	单倍型效应评分 Haplotype score	P 值 P value	总体 P 值 Total P value
HCT	AA	0.389 28	-1.110 92	0.266 60	$P=0.266 60$
	GG	0.610 72	1.110 92	0.266 60	
HGB	AA	0.389 28	-1.138 59	0.254 87	$P=0.254 87$
	GG	0.610 72	1.138 59	0.254 87	
MCH	AA	0.389 02	-0.926 91	0.353 97	$P=0.353 97$
	GG	0.610 98	0.926 91	0.353 97	
MCV	AA	0.389 02	-0.861 94	0.388 72	$P=0.388 72$
	GG	0.610 98	0.861 94	0.388 72	
CD4+CD8-CD3+	GG	0.610 72	-3.742 50	0.000 18	$P=0.000 18$
	AA	0.389 28	3.742 50	0.000 18	
CD4-CD8+CD3+	AA	0.389 28	-5.190 30	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GG	0.610 72	5.190 30	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	GG	0.610 72	-5.093 06	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AA	0.389 28	5.093 06	$\leq 10^{-5}$	

在 7 号染色体单倍型区段 3(block7-3)中共有 4 种单倍型,其中单倍型 AAGA 与 HCT、HGB 关联极显著($P < 0.01$),且对 2 个性状均有负效应,与其他性状无显著关联;单倍型 CGGG 与 HCT、HGB、CD4-CD8+CD3+ 和 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 关联显著,其中对 HCT、HGB 具有极显著正效应($P < 0.01$)。对 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 具有显著正效应($P < 0.05$)。对

CD4-CD8+CD3+ 具有极显著负效应($P < 0.01$);单倍型 CGAG 对 HCT 和 HGB 有显著正效应($P < 0.05$),对 CD4-CD8+CD3+ 有极显著正效应($P < 0.01$)。对 CD4+CD8-CD3+ 有极显著负效应($P < 0.01$),对 CD4+CD8-CD3+/CD4-CD8+CD3+ 有显著负效应($P < 0.05$)。单倍型 AAGG 与 7 个免疫性状无显著关联,分析结果见表 4。

表 4 单倍型区段 7-3 关联分析

Table 4 Results of haplotype association analysis of block7-3

性状	单倍型	单倍型频率	单倍型效应评分	P 值	总体 P 值
HCT	AAGA	0.308 86	-6.464 89	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AAGG	0.013 99	0.299 29	0.764 72	
	CGGG	0.407 93	2.915 20	0.003 55	
	CGAG	0.269 23	3.994 69	0.040 43	
HGB	AAGA	0.308 86	-6.502 03	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AAGG	0.013 99	0.691 61	0.489 18	
	CGGG	0.407 93	2.675 94	0.007 45	
	CGAG	0.269 23	4.183 83	0.020 21	
MCH	AAGA	0.307 24	-4.096 97	0.053 42	$P = 0.085 20$
	AAGG	0.014 02	0.221 60	0.824 62	
	CGGG	0.408 88	1.752 38	0.079 71	
	CGAG	0.269 86	0.269 86	0.091 24	
MCV	AAGA	0.307 24	-3.430 12	0.061 25	$P = 0.052 80$
	AAGG	0.014 02	-0.078 43	0.937 48	
	CGGG	0.269 86	1.840 67	0.065 67	
	CGAG	0.048 88	1.855 93	0.063 46	
CD4+CD8-CD3+	CGAG	0.269 23	-2.841 72	0.004 49	$P_f = 0.033 10$
	AAGG	0.013 99	-0.643 09	0.520 16	
	CGGG	0.407 93	1.283 91	0.199 17	
	AAGA	0.308 86	1.480 45	0.138 75	
CD4-CD8+CD3+	CGGG	0.407 93	-2.995 81	0.002 74	$P \leq 10^{-5}$
	AAGA	0.308 86	-1.870 27	0.061 45	
	AAGG	0.013 99	0.742 07	0.458 04	
	CGAG	0.269 23	5.076 93	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	CGAG	0.269 23	-4.026 49	0.040 43	$P = 0.128 21$
	AAGG	0.013 99	-0.404 68	0.685 71	
	AAGA	0.308 86	1.468 27	0.142 03	
	CGGG	0.407 93	2.344 34	0.019 06	

2.2 8 号染色体单倍型分析

应用 haploview 软件并使用相同的设置参数对 8 号染色体上的 55 个与 MCH 和 MCV 显著关联的 SNPs 进行连锁不平衡分析,分析结果见图 2、图 3 及图 4。

从图 2-图 4 中,我们可以看到在 8 号染色体存在 3 个单倍体区段,区段大小分别为 423、13 和 497 kb, SNPs 的个数分别为 4、2 和 5。具体 SNPs 及其位置等信息详见表 5。

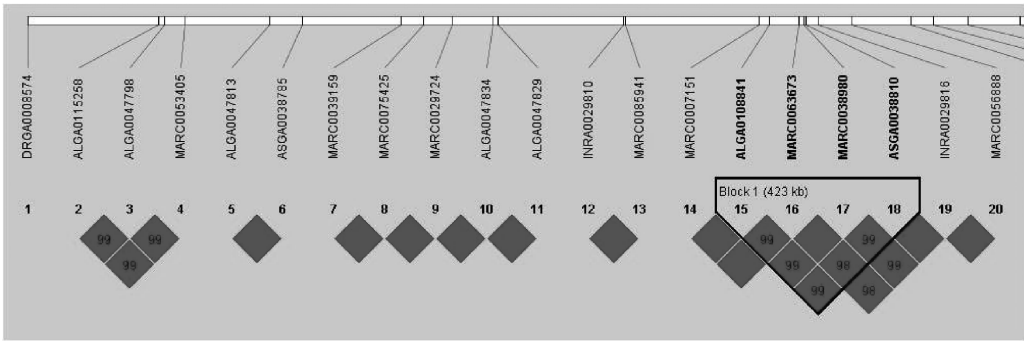


图 2 8 号染色体各 SNPs 位点之间的连锁不平衡分析(1~20)
 Fig. 2 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC (1-20)

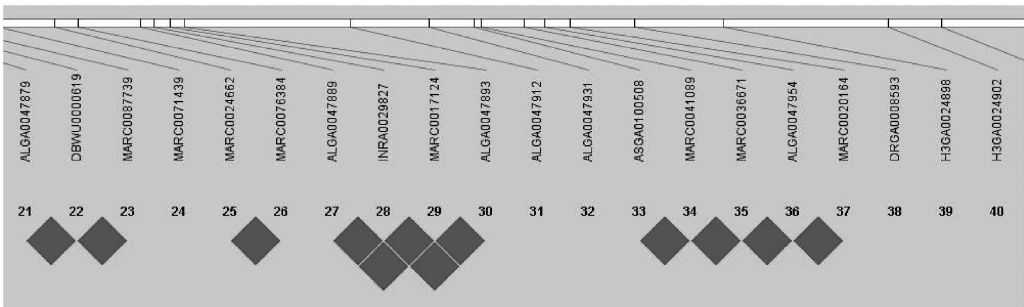


图 3 8 号染色体各 SNPs 位点之间的连锁不平衡分析(21~40)
 Fig. 3 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC (21-40)

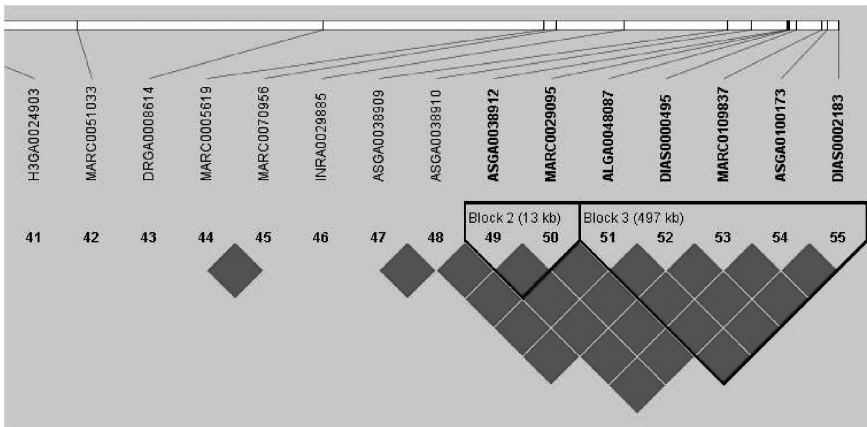


图 4 8 号染色体各 SNPs 位点之间的连锁不平衡分析(41~55)
 Fig. 4 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC (41-55)

应用 haplo. stats 软件包对获得的 8 号染色体上 3 个单倍型区段分别进行单倍型频率及显著性检验。在 8 号染色体单倍型区段 1(block8-1)中,单倍型 AAAG 与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),且对 2 个性状均有负效应;单倍型 GGCA 与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),对 2 个性状具有正效应。2 种单倍型同其他性状关联不显著,分析结果

见表 6。

在 8 号染色体单倍型区段 2(block8-2)中,单倍型 AA 与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),且对 2 个性状均有负效应;单倍型 GG 与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),对 2 个性状具有正效应。2 种单倍型与其他性状关联不显著,分析结果见表 7。

表 5 8 号染色体上各 SNP 位点间连锁不平衡分析

Table 5 Linkage disequilibrium analysis of SNPs on SSC8

单倍型 Haplotype	大小/kb Size	SNP 名称 Name	SNP 位置 ¹ Location	最近基因 ² Gene	距离/bp ³ Distance
BLOCK8-1	423	ALGA0108841	50670176	LOC100517409	within
		MARC0063673	51018121	ENSSSCP00000009476	148 401
		MARC0038980	51070662	LOC100517409	388 568
BLOCK8-2	13	ASGA0038810	51093615	ENSSSCP00000009476	223 895
		ASGA0038912	73265823	LOC100520317	77 758
		MARC0029095	73279054	LOC100520317	64 527
		ALGA0048087	73286056	LOC100520317	57 525
BLOCK8-3	497	DIAS0000495	73355105	LOC100520317	within
		MARC0109837	73611944	ALB	903
		ASGA0100173	73675216	ALB	45 136
		DIAS0002183	73783363	AFP	Within

表 6 单倍型区段 8-1 关联分析

Table 6 Results of haplotype association analysis of block8-1

性状 Trait	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	单倍型效应评分 Haplotype score	P 值 P value	总体 P 值 Total P value
HCT	GGCA	0.520 98	0.011 28	0.991 00	$P=0.985\ 84$
	AAAG	0.468 53	0.022 63	0.981 94	
HGB	GGCA	0.520 98	-0.252 81	0.800 42	$P=0.941\ 13$
	AAAG	0.468 53	0.199 81	0.841 63	
MCH	AAAG	0.469 63	-6.845 87	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GGCA	0.519 86	6.729 98	$\leq 10^{-5}$	
MCV	AAAG	0.469 63	-7.604 20	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GGCA	0.519 86	7.619 64	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+	AAAG	0.468 53	-1.708 05	0.087 63	$P=0.142\ 98$
	GGCA	0.520 98	1.476 50	0.139 81	
CD4-CD8+CD3+	AAAG	0.468 53	-1.797 43	0.072 27	$P=0.166\ 97$
	GGCA	0.520 98	1.879 26	0.060 21	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	AAAG	0.468 53	-0.791 42	0.428 70	$P=0.373\ 10$
	GGCA	0.520 98	0.543 65	0.586 68	

在 8 号染色体单倍型区段 3(block8-3)中,单倍型 GAGAA 与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),且对 2 个性状均有负效应;单倍型 AGACG

与 MCH、MCV 关联极显著 ($P < 0.01$),对 2 个性状具有正效应。2 种单倍型同其他性状关联不显著,分析结果见表 8。

表 7 单倍型区段 8-2 关联分析

Table 7 Results of haplotype association analysis of block8-2

性状 Trait	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	单倍型效应评分 Haplotype score	P 值 P value	总体 P 值 Total P value
HCT	AA	0.554 78	-1.273 62	0.202 80	$P=0.202\ 80$
	GG	0.445 22	1.273 62	0.202 80	
HGB	AA	0.554 78	-0.901 42	0.367 37	$P=0.367\ 37$
	GG	0.445 22	0.901 42	0.367 37	
MCH	AA	0.556 07	-6.420 99	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GG	0.443 93	6.420 99	$\leq 10^{-5}$	
MCV	AA	0.556 07	-7.516 85	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	GG	0.443 93	7.516 85	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+	AA	0.554 78	-0.413 79	0.679 03	$P=0.679\ 03$
	GG	0.445 22	0.413 79	0.679 03	
CD4-CD8+CD3+	AA	0.554 78	-1.563 70	0.117 89	$P=0.117\ 89$
	GG	0.445 22	1.563 70	0.117 89	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	GG	0.445 22	-0.020 97	0.983 27	$P=0.983\ 27$
	AA	0.554 78	0.020 97	0.983 27	

表 8 单倍型区块 8-3 单倍型关联分析

Table 8 Results of haplotype association analysis of block8-3

性状 Trait	单倍型 Haplotype	单倍型频率 Haplotype frequency	单倍型效应评分 Haplotype score	P 值 P value	总体 P 值 Total P value
HCT	GAGAA	0.554 78	-1.273 62	0.202 80	$P=0.202\ 80$
	AGACG	0.445 22	1.273 62	0.202 80	
HGB	GAGAA	0.554 78	-0.901 42	0.367 37	$P=0.367\ 37$
	AGACG	0.445 22	0.901 42	0.367 37	
MCH	GAGAA	0.556 07	-6.420 99	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AGACG	0.443 93	6.420 99	$\leq 10^{-5}$	
MCV	GAGAA	0.556 07	-7.516 85	$\leq 10^{-5}$	$P \leq 10^{-5}$
	AGACG	0.443 93	7.516 85	$\leq 10^{-5}$	
CD4+CD8-CD3+	GAGAA	0.554 78	-0.413 79	0.679 03	$P=0.679\ 03$
	AGACG	0.445 22	0.413 79	0.679 03	
CD4-CD8+CD3+	GAGAA	0.554 78	-1.563 70	0.117 89	$P=0.117\ 89$
	AGACG	0.445 22	1.563 70	0.117 89	
CD4+CD8-CD3+/ CD4-CD8+CD3+	AGACG	0.445 22	-0.020 97	0.983 27	$P=0.983\ 27$
	GAGAA	0.554 78	0.020 97	0.983 27	

3 讨论

本研究的检测指标涉及血常规及 T 淋巴细胞

亚群。血常规检测主要包括白细胞、红细胞和血小板等性状的测定,是临床判断机体是否处于健康状态的基本指标,主要表现为白细胞、红细胞、血小板等性状数量的增加或减少,以及形态学的变化,属于

机体非特异性免疫范畴。T 淋巴细胞是机体免疫系统内功能最重要的一群细胞,在正常机体内各淋巴细胞亚群相互作用,维持着机体正常免疫功能,当不同淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时,可导致机体免疫功能紊乱并发生一系列病理变化,因此 T 淋巴细胞亚群的免疫分型能够提供有关患者免疫状态的重要信息^[11]。

本研究在课题组前期全基因组关联分析结果的基础之上,对显著性位点通过构建单倍型区段并进行关联分析。大量研究表明,在研究多个处于连锁不平衡的位点与性状的关联性时,单倍型的关联性分析比单位点分析更加有效^[12-13]。本研究应用中 Haploview 软件和 R 统计环境下的 Haplo. Stats 软件包进行单倍型分析。Haploview 是一款利用已有的基因型数据来计算连锁不平衡统计量并推断人群单倍型模型的公用软件,可以便捷的分析 HapMap 上的阶段性基因型数据,为单倍型研究中标签 SNP 的选择提供参考^[9]。Haplo. Stats 的算法是基于 GLMs 中得分方程(Score equations)而开发的,与其他分析性状和单倍型间关联的方法相比最明显的优势在于该方法很少受到性状类型的限制,可以对二元、泊松计数、排序和数量性状等多种性状类型进行评估,关联显著性检验 *P* 值能使用一种高效的方法计算,同时能够较容易的对非遗传方差进行有效校正^[10]。

本研究通过位置比对,在显著单倍型附近找到功能注释基因 5 个,其中位于 7 号染色体的为 *ABCF1*、*PPP1R10* 和 *GRM4*,位于 8 号染色体的为 *ALB* 及 *AFP*,这些基因对免疫性状的影响在国内外学者的研究中已有报道。本研究中,定位影响 T 淋巴细胞亚群 3 个性状(*CD4 + CD8-CD3 +*, *CD4-CD8 + CD3 +* 及 *CD4 + CD8-CD3 +/CD4-CD8 + CD3 +*)的基因为 *ABCF1* 和 *PPP1R10*。*ABCF1* 是一个 ABC(ATP 结合域)转运蛋白,但其缺乏跨膜域。*ABCF1* 基因的表达已被证实能够刺激肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的增加^[14]、巨噬细胞和 T 细胞产生,并具有多项功能的免疫反应^[15]。*PPP1R10* 基因编码蛋白磷酸酶 1 调节亚基 10,以前被称为 P99 或 FB19^[16],在大鼠上称之为 PNUTS^[17],通过缺乏 *PPP1R10* 基因功能的小鼠来证明野生型 *PPP1R10* 基因的功能,数据初步表明,完全丧失 *PPP1R10* 基因功能将导致小鼠胚胎致死^[18]。影响 HCT 和 HGB 的基因为 *GRM4*,编码 III 组代谢型谷

氨酸受体 4(mGluR4),定名为青少年肌阵挛癫痫的易感基因,如果 *GRM4* 的变化赋予到 IGE 的易感性,*GRM4* 序列变异可能导致以皮肤为主的免疫缺陷综合征的发生,表现为 B 和 T 细胞免疫的细微缺陷以及组织和血内嗜酸粒细胞增多,免疫调节性 T 细胞异常可能是本病的基本缺陷,所以可以通过检测 *GRM4* 序列变异来间接的判断该病的发生^[19]。影响 MCH 和 MCV 的基因为 *ALB* 和 *AFP*。*ALB* 基因又称外周血白蛋白基因,由于白蛋白为肝细胞表达和分泌,因此白蛋白基因被认为是肝细胞一种特异性标志物,该基因与肝炎及肝硬化有密切关系^[20-21]。有研究表明 *ALB*-mRNA 阳性率与疾病严重程度有关,其表达量在晚期伴有肝内转移者明显高于早期不伴有肝内转移者,提示在肝细胞发生癌变时肝细胞中 *ALB* 表达量也随之发生改变,*ALB*-mRNA 与肝癌转移和复发可能有一定关系^[22]。*AFP* 基因(甲胎蛋白基因)是一种重要的胚胎期及肝癌相关蛋白基因,人类疾病学研究表明,正常情况下新生儿出生后,*AFP* 表达即被关闭,但当肝细胞发生癌变或发生化学或物理损伤时,*AFP* 基因又可重新表达,目前已成为重要的肝癌临床检测标准之一^[23]。

4 结 论

本研究应用高密度 SNP 芯片,通过构建的大白猪 \times 东北民猪 F_2 资源群体,对前期获得的与猪免疫性状显著关联 SNP 位点进行连锁不平衡分析和单倍型关联分析,获得与性状显著关联的单倍型区段,在此基础上初步选定显著单倍型区段内的 *ABCF1*、*PPP1R10*、*GRM4*、*ALB* 及 *AFP* 基因作为免疫性状的候选基因。本研究为对免疫性状单倍型关联分析的初步研究,尚需在此基础上对显著性结果进行更大群体规模的重复验证,为下一步功能研究及标记辅助选择等工作提供理论依据。

参考文献:

- [1] MÜLLER M, BREM G. Disease resistance in farm animals [J]. *Experientia*, 1991, 47(9):923-934.
- [2] JIANG L, LIU J F, SUN D X, et al. Genome wide association studies for milk production traits in chinese holstein population [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (10): e13661.
- [3] SAHANA G, GULDBRANDTSEN B, BENDIXEN

- C, et al. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle [J]. *Anim Genet*, 2010, 41(6):579-588.
- [4] BOLORMAA S, HAYES B J, SAVIN K, et al. Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle [J]. *Anim Sci*, 2011, 89(6):1684-1697.
- [5] GU X, FENG C, MA L, et al. Genome-wide association study of body weight in chicken F2 resource population [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e21872.
- [6] FAN B, ONTERU S K, DU Z Q, et al. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6:e14726.
- [7] LUO W Z, CHENG D X, CHEN S K, et al. Genome-wide association study of meat quality traits in a Large White \times Minzhu F2 resource population [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(4):561-579.
- [8] LUO W Z, CHEN S K, CHENG D X, et al. Genome-wide association study for porcine haematological parameters in a Large White \times Minzhu F2 resource population [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(6): 870-881.
- [9] BARRETT J C, FRY B, MALLER J, et al. HAPLOVIEW: analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21:263-265.
- [10] SCHAID D J, ROWLAND C M, TINES D E, et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(2):425-434.
- [11] 杨汉春. 动物免疫学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [12] MORRIS R W, KAPLAN N L. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles [J]. *Genet Epidemiol*, 2002, 23(3):221-233.
- [13] MARTIN E R, MONKS S A, WARREN L L, et al. A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(1):146-154.
- [14] PAYTUBI S, MORRICE N A, BOUDEAU J, et al. The N-terminal region of ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor eIF2 and is a target for regulatory phosphorylation by CK2 [J]. *Biochem J*, 2008, 409(1):223-231.
- [15] PAYTUBI S, WANG X, LAM Y W, et al. ABC50 promotes translation initiation in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(36):24061-24073.
- [16] KREIVI J P, TRINKLE-MULCAHY L, LYON C E, et al. Purification and characterisation of p99, a nuclear modulator of protein phosphatase 1 activity [J]. *FEBS Lett*, 1997, 420(1): 57-62.
- [17] ALLEN P B, KWON Y G, NAIRN A C, et al. Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit [J]. *Biol Chem*, 1998, 273: 4089-4095.
- [18] WALRAT H, JESSICA C. Characterization of the genes at the Epi-2 locus and their potential roles in Neurofibromatosis 1-dependent myeloid leukemia [M]. University of Florida, 2005.
- [19] MUHLE H, VON SPICZAK S, GAUS V, et al. Role of GRM4 in idiopathic generalized epilepsies analysed by genetic association and sequence analysis [J]. *Epilepsy Res*, 2010, 89(2-3):319-326.
- [20] 韦 麒, 苏明华, 江建宁, 等. 血清白蛋白、球蛋白与慢性乙型病毒性肝炎病理的相关性研究 [J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(3):385-387.
- [21] 陈叶青, 周国华, 周红宇, 等. 肝硬化患者血清球蛋白与 Child Turcotte Pugh 分级的相关性研究 [J]. 疑难病杂志, 2008, 7(2):95-96.
- [22] 朱云松, 杨大明, 姚登福, 等. 原发性肝癌外周血白蛋白基因片段扩增的临床意义 [J]. 南通大学学报(医学版), 2008, 28(4):261-263.
- [23] 董天皞. ShRNA 介导的 AFP 基因沉默对肝癌细胞增殖的影响[D]. 天津: 南开大学, 2006.

(编辑 郭云雁)