

苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 多态性及其与繁殖性能的关联分析

包文斌¹, 吴圣龙¹, 陈国宏^{1*}, 鞠慧萍¹, 华金第², 黄雪根²

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江苏省苏州市苏太猪育种中心, 苏州 215128)

摘要: 采用 PCR-RFLP 法对苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 的 PCR 产物进行分析, 结果显示, *SLA-DQB* 基因外显子 2 经 *Rsa* I 酶切后, 共分出 4 种基因型; 经 *Hae* III 酶切, 共分出 3 种基因型。χ² 适合性检验结果表明, 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 在 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切位点都已经达到了 Hardy-Weinberg 平衡状态。在 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切后分出的 4 种组合带型中, 组合带型为 BBEE 的种母猪第 3 胎总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶仔猪数和断奶窝重均显著高于组合带型为 AADD 的个体 ($P < 0.05$), 也高于组合带型为 ABDE 和 ACDE 的个体, 但是差异不显著 ($P > 0.05$)。

关键词: 猪; *SLA-DQB*; PCR-RFLP

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)07-0636-05

Polymorphism of the Exon2 of *SLA-DQB* Gene and Its Relationship with Reproductive Performance in Sutai Pigs

BAO Wen-bin¹, WU Sheng-long¹, CHEN Guo-hong^{1*},

JU Hui-ping¹, HUA Jin-di², HUANG Xue-gen²

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Center of Sutai Pig Breeding, Suzhou 215128, China)

Abstract: The exon 2 of *SLA-DQB* gene in Sutai pigs was analyzed by PCR-RFLP method, the results showed that the exon 2 of *SLA-DQB* gene digested by restriction endonuclease *Rsa* I and *Hae* III could be divided into four kinds of genotypes and three kinds of genotypes in Sutai pigs respectively. The results of χ² indicated that the frequencies of patterns digested by *Rsa* I and *Hae* III fit with Hardy-Weinberg equilibrium in Sutai population. Four kinds of combined patterns were observed in Sutai pigs. The correlation between these combined patterns and the reproductive performances of Sutai pigs was analyzed, the results showed that reproductive performances (the total litter, number of viable pigs, litter weight at birth, number of ablactation pigs and litter weight after ablactation in the third litter) of Sutai pigs with BBEE combined pattern were significant higher than those with AADD combined pattern, also higher than the pigs with ABDE combined pattern and ACDE combined pattern, but were no significant difference in reproductive performances between pigs with AADD combined pattern and the pigs with ABDE and ACDE combined patterns.

Key words: pig; *SLA-DQB*; PCR-RFLP

收稿日期: 2006-07-06

基金项目: 江苏省高技术研究(农业)(BG2006302)

作者简介: 包文斌(1974-), 男, 安徽贵池人, 副教授, 博士生, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: wbbao1974@163.com

* 通讯作者: 陈国宏, 教授, 博士生导师, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

主要组织相容性复合物(MHC)是由紧密连锁、高度多态的基因座所组成的染色体上的一个遗传区域,编码细胞表面特异性蛋白。在猪中 MHC 称 SLA(Swine leukocyte antigen)复合体,定位于 7p¹²-q¹²[1,2]。目前,猪 SLA 主要分为 3 大类,即通常所说的 I 类、II 类和 III 类基因,其中 II 类基因控制机体免疫应答,与猪的抗病能力密切相关,在众多 II 类基因中,研究发现编码 $\beta 1$ 结构域的 *SLA-DQB* 基因的外显子 2 存在高度多态性,这种多态性与 II 类抗原的生物学特性有着密切的关系,近年来这一区域已成为人们研究猪 SLA-II 类基因的热点,并且发现了一些新的等位基因[3~6]。

苏太猪是历经 15 年培育成功的中国瘦肉型猪新品种,具有生产性能优良、肉质鲜美等优点。目前尚有关于苏太猪 SLA 研究的报道,本研究利用 PCR-RFLP 方法对苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 进行了多态性分析,并探讨其与繁殖性能之间的相关性,旨在为进一步研究猪 SLA 复合体的抗性和易感性提供理论依据,并寻求有效改良苏太猪繁殖性能的新方法,为更好地保存和利用苏太猪这一瘦肉型猪种遗传资源奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苏太猪种母猪 136 头采自苏州市苏太猪育种中心,每个个体采耳组织块约 1.0 g,放入 1.5 mL 的 Eppendorf 管内于冰盒中取回实验室,采用常规的苯酚/氯仿抽提方法提取基因组 DNA,并将 DNA 样品稀释至 100 ng/ μ L 备用。

1.2 引物设计

SLA-DQB 基因引物设计参照文献[7],由上海基康生物技术有限公司合成,引物序列为 F:5'-CG-GAATTCCCCGCAGAGATTTCGTGTACC-3', R:5'-CCGTCGTGCCTTCCTCTAT-3'

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系(15 μ L):DNA 模板(100 ng/ μ L) 1.5 μ L, 10 \times Buffer(含 Mg²⁺) 1.5 μ L, dNTPs 混合物(各 2.5 mmol/L) 1 μ L, 引物(5 pmol/L)各 1.2 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.12 μ L, 加灭菌蒸馏水补足至 15 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,61.4 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共进行 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min;4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 RFLP 分析

SLA-DQB 基因分别采用限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切 PCR 产物,酶切反应总体积为 10 μ L,其中 PCR 扩增产物 3 μ L,限制性内切酶 0.2 μ L(10 U/ μ L),10 \times Buffer 1 μ L,ddH₂O 5.8 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 2 h 后经 8% 的 PAGE 于 150 V 恒压 5 h,银染并判定基因型。

1.5 繁殖性能的测定及统计分析

基因及基因型频率根据 Hardy-Weinberg 平衡定律进行计算, $p = P + H/2$, $q = Q + H/2$, $\chi^2 = \Sigma d^2/e$,其中 $d = e - o$ 是期望值与观测值之差, p, q 表示给定位点上的等位基因的频率。测定种母猪第 3 胎次总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶仔猪数、断奶窝重,利用 SPSS11.5 软件的广义线性模型(General Linear Model, GLM)对各性状值与两种酶切后产生的组合基因型间的关系进行最小二乘法估计。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

经 PCR 扩增后, *SLA-DQB* 基因外显子 2 的 PCR 产物经电泳检测得到一条 273 bp 的特异性条带。PCR 产物电泳图谱见图 1。

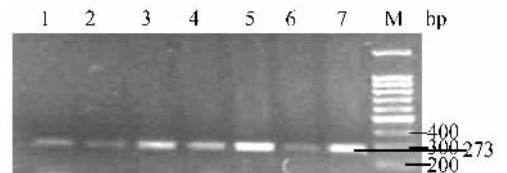


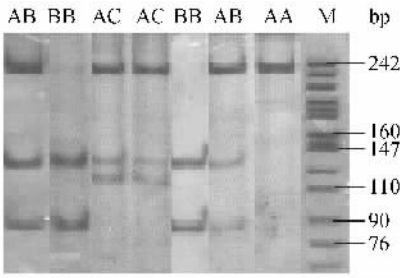
图 1 *SLA-DQB* 基因外显子 2 PCR 产物电泳
Fig. 1 Image of PCR products of the exon 2 of *SLA-DQB* gene

2.2 PCR-RFLP 结果

SLA-DQB 基因外显子 2 的 PCR 产物经过限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切后,分出了不同的 RFLP 带型,经 *Rsa* I 酶切后(图 2),共分出 4 种基因型:

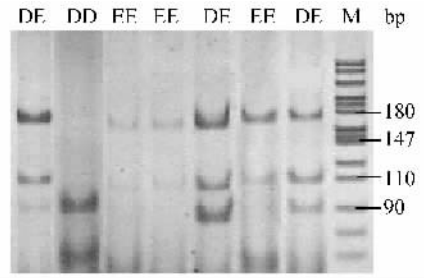
AA:27 bp/246 bp;BB:27 bp/84 bp/30 bp/133 bp;AB:27 bp/84 bp/30 bp/133 bp/246 bp;AC:27 bp/114 bp/133 bp/246 bp

SLA-DQB 基因外显子 2 的 PCR 产物经过限制性内切酶 *Hae* III 酶切后(图 3),共分出 3 种基因型:



M. pBR322 marker

图2 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子2 *Rsa* I 酶切结果
Fig. 2 Band patterns of the exon2 of *SLA-DQB* gene digested with *Rsa* I



M. pBR322 marker

图3 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子2 *Hae* III 酶切结果
Fig. 3 Band patterns of the exon2 of *SLA-DQB* gene digested with *Hae* III

DD: 84 bp/83 bp/23 bp/29 bp/54 bp; EE: 167 bp/4 bp/102 bp; DE: 167 bp/84 bp/83 bp/4 bp/23 bp/29 bp/54 bp/102 bp。

2.3 PCR-RFLP 带型分析

对苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子2的 PCR-RFLP 带型进行统计,根据 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切同一样本的不同 PCR-RFLP 带型来分析组合带型,并进行基因型和相应基因频率的计算(表1)。

表1 苏太猪 *SLA-DQB* 基因 PCR-RFLP 基因型频率及等位基因频率 (n = 136)

Table 1 Genotype and allele frequencies of *SLA-DQB* gene by PCR-RFLP in Sutai pig

酶切分型 Pattern	基因型频率 Genotype frequency				等位基因频率 Allele frequency			χ^2 值 χ^2 value
	AA	AB	AC	BB	A	B	C	
<i>Rsa</i> I	0.324(44)	0.396(54)	0.059(8)	0.221(30)	0.551	0.419	0.030	2.08 ^{ns}
<i>Hae</i> III	DD	DE	EE		D	E		0.40 ^{ns}
	0.324(44)	0.455(62)	0.221(30)		0.551	0.449		
<i>Rsa</i> I — <i>Hae</i> III	AADD	ABDE	ACDE	BBEE				
	0.324(44)	0.396(54)	0.059(8)	0.221(30)				

χ^2 值为对不同基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验值;上标 ns 表示没有达到显著水平 ($P > 0.05$)

χ^2 values means the test values of different genotype to Hardy-Weinberg balance; Means with ns in column are no significant difference ($P > 0.05$)

由表1可见,苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子2的 PCR 产物经 *Rsa* I 酶切后,AB 基因型出现频率较高(0.396),AC 基因型出现频率很低(0.059);*SLA-DQB* 基因外显子2的 PCR 产物经 *Hae* III 酶切后,DE 基因型出现频率较高(0.455),但没有明显的优势基因型和等位基因;两种酶切产生4种组合带型,其中 ACDE 的频率很低,仅 0.059,其余3种中也没有显著的优势带型。

经 χ^2 适合性检验,*SLA-DQB* 基因外显子2 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切位点的 χ^2 分别为 2.08 和 0.40,均低于显著水平 ($P > 0.05$),说明苏太猪在 *Rsa* I 和

Hae III 酶切位点都已经达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。

2.4 *SLA-DQB* 基因外显子2 多态性与繁殖性能的关联分析

由表2可见,组合基因型为 BBEE 的种母猪第3胎总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶仔猪数和断奶窝重均显著高于组合基因型为 AADD 的个体 ($P < 0.05$),也高于组合基因型为 ABDE 和 ACDE 的个体,但是差异不显著 ($P > 0.05$),就繁殖性能而言, BBEE 为有利组合基因型。

表 2 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 与第 3 胎繁殖性能关系Table 2 The relationship between exon2 of *SLA-DQB* gene and productive performance

组合基因型 Composite genotypes	个体数 No.	总产仔数/头 Total litter size	产活仔数/头 Number of viable pigs	初生窝重/kg Litter weight at birth	断奶仔猪数/头 Number of weaning pigs	断奶窝重/kg Litter weight weaning
AADD	44	11.95±3.23 ^a	10.68±2.75 ^a	12.41±3.11 ^a	9.59±2.67 ^a	67.19±15.67 ^a
ABDE	54	13.30±3.26 ^{ab}	11.78±2.58 ^{ab}	13.19±2.38 ^{ab}	10.44±2.29 ^{ab}	72.37±13.68 ^{ab}
ACDE	8	12.75±2.36 ^{ab}	11.75±1.50 ^{ab}	13.25±1.26 ^{ab}	10.75±1.87 ^{ab}	73.75±6.65 ^{ab}
BBEE	30	14.33±2.69 ^b	12.87±2.03 ^b	14.27±2.67 ^b	12.07±1.87 ^b	77.20±15.45 ^b

字母相同为差异不显著,字母不同差异显著

Different letters mean significant

3 讨论

3.1 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 的多态性

苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 经 *Rsa* I 酶切后出现 4 种带型,经 *Hae* III 酶切后出现 3 种带型。方美英等^[8]采用限制性内切酶 *Rsa* I 对中国地方猪种小梅山、中梅山和国外猪种大约克夏 *SLA-DQB* 基因外显子 2 进行多态性分析发现,小梅山酶切后出现两种基因型,中梅山酶切后出现 4 种基因型,大约克夏酶切后产生 5 种基因型。在这 3 个猪种中共检测到控制 *Rsa* I 酶切位点的 4 种复等位基因,其中 3 种与本试验所检测到的 A、B、C 复等位基因是一致的。周波等^[9]对五指山猪、二花脸和皮特兰猪的 *SLA-DQB* 基因外显子 2 进行 *Rsa* I 和 *Hae* III 酶切分析,五指山猪、二花脸和皮特兰猪经 *Rsa* I 酶切后分别产生 1 种、3 种和 5 种基因型,经 *Hae* III 酶切后分别产生 3 种、3 种和 4 种基因型,3 个猪种分别出现 3 种、4 种和 7 种 RFLP 带型。可见,苏太猪和其他一些中国地方猪种相比,RFLP 带型较多,但没有国外猪种丰富,这可能是因为一些中国地方猪种长期近交,血统比较单一,导致纯合度较高所致,而苏太猪在培育过程中含有杜洛克的血统。

SLA 基因与抗病力和免疫应答密切相关,采用 PCR-RFLP 技术检测 *SLA* 多态性是目前比较理想的方法,研究表明,*SLA-DQB* 基因外显子 2 的 PCR-RFLP 带型在品种之间的差别较大,具有不同的 RFLP 优势带型,一些在遗传上具有同源性的猪种如二花脸、小梅山、中梅山等中国太湖猪种具有相同的 RFLP 优势带型^[8,9]。不同 *SLA-DQB* 基因外显子 2 基因型与不同品种猪抗病力间的相关性究竟如何,还有待今后的进一步研究。

χ^2 适合性检验表明,苏太猪 *SLA-DQB* 基因外

显子 2 的 PCR-RFLP 带型达到了 Hardy-weinberg 平衡状态,这说明长期的人工选择对该猪种 *SLA* II 类基因没有造成影响。

值得注意的是,苏太猪两个酶切位点上杂合子的比例都比较高,均为 0.455,说明目前苏太猪的纯度还需要进一步提高,对苏太猪进行系统保种和选育已势在必行。

3.2 苏太猪 *SLA-DQB* 基因外显子 2 多态性与繁殖性能的关系

国内外已经广泛运用血清学和细胞学的方法,对 *SLA* 进行分型,并发现 *SLA* 单倍型与猪排卵数以及胚胎成活存在着某种联系^[10]。Renard 等^[11]认为寡产仔猪品种可能是某种 *SLA* 单倍型亲本间交配的结果。大量对兰德瑞斯以及 NIH 小型猪的研究表明,含 H12 单倍型的母猪产仔数比群体均值明显要高^[12,13]。王林云等^[14]也认为,不同 *SLA* 单倍型对中国猪种二花脸的产活仔数的影响有明显的差异,H10 单倍型在中国猪种中分布广泛,特别是在太湖猪中分布频率超过 10%,并对产仔数有明显的正效应。季海峰等^[15]对中国经产瘦肉猪新品系母猪 *SLA* 的研究表明,D 型母猪的产仔性能显著高于其他类型。但是从分子遗传的角度研究 *SLA* 单倍型与繁殖性能关系的报道较少。本研究中,苏太猪组合带型为 BBEE 的种母猪第 3 胎总产仔数、产活仔数、初生窝重、断奶仔猪数和断奶窝重均显著高于组合带型为 AADD 的个体 ($P < 0.05$),猪的繁殖性能在第 3 胎次比较稳定,因此第 3 胎次繁殖性能在猪的选育中是非常重要的指标之一,在苏太猪的选育工作中,要尽可能保留组合带型为 BBEE 的个体,剔除组合带型为 AADD 的个体,特别是公猪,则有可能提高苏太猪的繁殖性能,本研究的结果对苏太猪的选育是十分有利的,也为今后其他地方猪种

SLA 单倍型与繁殖性能关系的研究提供了一定的参考和启示。

参考文献:

- [1] Rabin M, Fries R, Singer D, *et al.* Assignment of the porcine major histocompatibility complex to chromosome 7 by *in situ* hybridization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1985, 39(3): 206~209.
- [2] Geffrotin C, Renard C, Chardon P, *et al.* Marked genetic polymorphism of the swine steroid 21-hydroxylase gene, and its location between the SLA class I and class II regions[J]. *Animal Genetics*, 1991, 21:311~314.
- [3] Omi T, Fukui E, Kajii E. New alleles of SLA-DQB isolated from mininature pigs [J]. *Animal Genetics*, 1999, 30(3): 230~230.
- [4] Komatsu M, Nomure T, Maruno H, *et al.* DNA typing for SLA class II genes in several pigbreeds using RT-PCR-RFLP method [J]. *Animal Science Journal*, 2000, 71(7): 1~11.
- [5] 周波. *SLA-DQB* 和 *DRB* 基因外显子 2 的 PCR-RFLP 分析及一个新 *SLA-DQB* 等位基因的发现 [D]. 南京:南京农业大学, 2003.
- [6] 李华, 张亚平, 邱祥聘. 中国部分猪种 *SLA-DQB* 外显子 2 遗传多样性[J]. *遗传*, 2005, 27(2): 173~180.
- [7] Sina Y-C, Bradshaw M, Rutherford M S, *et al.* PCR-based genotyping for characterization of *SLA-DQB* and *SLA-DRB* alleles in domestic pigs[J]. *Animal Genetics*, 1995, 26: 91~99.
- [8] 方美英, 胡晓湘, 李宁, 等. 小梅山、中梅山及大约克猪的 *SLA-DQB* 基因外显子 2 PCR-RFLP 多态性分析[J]. *遗传学报*, 2002, 29(8): 685~687.
- [9] 周波, 谈永松, 刘红林, 等. 五指山、二花脸和皮特兰猪的 *SLA-DQB* 基因外显子 2 的 PCR-RFLP 多态性分析[J]. *上海农业学报*, 2005, 21(4): 1~4.
- [10] Conley A J. Influence of SLA haplotype on ovulation rate and litter size in miniature pigs[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1988, 82(2): 595~601.
- [11] Renard C, Vaiman M. Possible relationships between *SLA* and porcine reproduction [J]. *Reproduction, Nutrition, Development*, 1989, 29(5): 569~576.
- [12] Mallard B A. The effect of swine leukocyte antigen haplotype on birth and weaning weights in miniature pigs and the role of statistical analysis in this estimation [J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69(1): 559~564.
- [13] Gautschi C. Influence of major histocompatibility complex on reproduction and production traits in swine[J]. *Animal Genetics*, 1990, 21(2): 161~170.
- [14] 王林云, 刘根桃, 李汝敏. 猪白细胞抗原与产仔性能的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 1995, 26(4): 308~312.
- [15] 季海峰, 刘彦, 莫余忠, 等. 猪白细胞抗原和生殖激素水平对产仔性能的影响[J]. *华北农学报*, 2000, 333(2): 82~85.