

5 个山羊品种 *GoLA-DQA1* 基因的多态性分析

李俊营¹, 陈 宏^{1,2}, 蓝贤勇¹, 闵令江³, 雷初朝¹, 胡沈荣¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
2 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116; 3 莱阳农学院 动物科技学院, 山东 莱阳 265200)

【摘 要】 【目的】比较和揭示崂山奶山羊、西农萨能奶山羊、关中奶山羊、板角山羊和贵州白山羊 5 个地方山羊品种 *GoLA-DQA1* 基因的遗传多态性。【方法】采用 PCR-RFLP 技术对 5 个山羊品种 231 个样本的 *GoLA-DQA1* 基因部分内含子 1、外显子 2 和部分内含子 2 的 385 bp 片段进行了多态性分析, 运用 Popgen32 软件计算了相应的遗传参数。【结果】在 *Taq* I-RFLP 位点上, 5 个山羊品种 A、B 等位基因频率的平均值分别为 0.846 和 0.154, A 为优势等位基因; 除了关中奶山羊和崂山奶山羊外, 其他品种在该位点上均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。在 *Hae* III-RFLP 位点上, 5 个山羊品种 M、N 等位基因频率的平均值分别为 0.819 和 0.181, M 为优势等位基因, 5 个山羊品种在该位点上均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。经双酶切分析, 共发现 9 种组合基因型, 其中 AAMM、ABMM 和 AAMN 3 种组合基因型存在于 5 个品种中。遗传参数分析表明, *GoLA-DQA1* 基因外显子 2 的 2 个酶切位点在西农萨能奶山羊表现为中度多态, 而在其他品种表现为低度多态。【结论】5 个山羊品种 *GoLA-DQA1* 基因外显子 2 在 *Taq* I 和 *Hae* III 2 个酶切位点具有较低的遗传多样性。

【关键词】 山羊; *GoLA-DQA1* 基因; PCR-RFLP; 基因多态性

【中图分类号】 S827.2; Q78 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)01-0033-05

Polymorphism of *GoLA-DQA1* gene in five goat breeds

LI Jun-ying¹, CHEN Hong^{1,2}, LAN Xian-yong¹, MIN Ling-jiang³,
LEI Chu-zhao¹, HU Shen-rong¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 3 Department of Animal Science and Technology, Laiyang Agricultural College, Laiyang, Shandong 265200, China)

Abstract: 【Objective】The study was conducted to compare and reveal the genetic polymorphisms of *GoLA-DQA1* gene in five native goat breeds. 【Method】Polymorphism of 385 bp of the partial intron1, complete exon2 and partial intron2 of *GoLA-DQA1* gene were analyzed in 231 samples of five goat breeds (Laoshan (LS), Sannen (SN), Guanzhong dairy goat (GZ), Banjiao (BJ) and Guizhou White goat (GW)) by PCR-RFLP and software Popgen32 was employed to calculate the relative genetic parameters. 【Result】After PCR products were digested by *Taq* I (*Taq* I-RFLP locus), the results showed that the average frequency of allele A and B was 0.846 and 0.154 in five goat breeds respectively. By comparing with the allelic frequency, the predominant allele was A, while the inferior allele was B. SN, BJ and GW fit Hardy-Weinberg equilibrium except LS and GZ breeds in this locus. To the *Hae* III-RFLP locus, the average allelic fre-

* 【收稿日期】 2006-12-31
 【基金项目】 陕西省自然科学基金项目(99SM06); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目和西北农林科技大学研究生教育创新基金项目(05YCH018)
 【作者简介】 李俊营(1980—), 男, 河南南阳人, 在读硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: lijunyong2007@163.com.
 【通讯作者】 陈 宏(1955—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物技术与动物遗传育种研究。
 E-mail: chen hong1212@263.net

quencies of allele M and N were 0.819 and 0.181 in five breeds respectively. The predominant allele was M, while the inferior allele was N by comparing with the allelic frequency. Five breeds fit Hardy-Weinberg equilibrium. There were nine composite genotypes of *GoLA-DQA1* gene in five goat breeds by *Taq* I and *Hae* III digestion. Among them, AAMM, ABMM and AAMN genotypes were found in five goat breeds. The results of genetic parameters showed that there were low polymorphic in *exon2* of *GoLA-DQA1* gene at the two sites in LS, GZ, BJ and GW, while it was moderate polymorphic in SN goat. 【Conclusion】 There were low genetic diversity in *exon2* of *GoLA-DQA1* gene at *Taq* I -RFLP locus and *Hae* III -RFLP locus in the five goat breeds.

Key words: goat; *GoLA-DQA1* gene; PCR-RFLP; gene polymorphism

我国幅员辽阔,自然条件多种多样,山羊品种资源十分丰富。得益于其强大的免疫系统,这些优良的地方山羊品种对各地的自然条件表现出极好的适应性。在动物免疫系统中,主要组织相容复合物(Major histocompatibility complex, MHC)起着十分重要的作用,是动物抗病性候选标记基因研究中最活跃的部分^[1]。因此,了解中国地方山羊品种 MHC 的遗传多样性是进行山羊抗病性育种的基础。

主要组织相容复合物(MHC)是由紧密连锁的高度多态基因座位所组成的染色体上的一个遗传区域,其表达产物称为 MHC 抗原,是一类分布在细胞表面的转膜蛋白,其主要功能是抗原递呈,即与外来抗原相结合为复合体,从而被 T 淋巴细胞识别并将外来抗原递呈给 T 淋巴细胞使之激活,进而激发免疫反应,其与动物的抗病性有较强的相关性^[2]。山羊的 MHC 称为 GoLA(Goat lymphocyte antigen),即山羊白细胞抗原。山羊 MHC 的结构和功能与牛、绵羊非常相似,同源性非常高,具有高度多态性和连锁不平衡的特点。山羊 MHC 包括 MHC I 和 MHC II 两类编码基因^[3],其中 MHC II 包括具有高度多态性的 DQ 区和 DR 区,与动物的免疫反应密切相关^[4]。在牛和绵羊上,DQ 区都包括 DQA 和 DQB 基因,DR 区包括 DRA 和 DRB 基因^[5-6]。其中绵羊的 DQ 区长达 130 kb,包括 11 kb 的 DQA1-DQB1 和 25 kb 的 DQA2-DQB2 两个亚区^[7]。目前,在家养的反刍动物中,只确定了牛和绵羊 DQA 基因的数目和结构特征。在西门塔尔牛上发现的 3 个 DQA 基因和道赛特绵羊上发现的 2 个 DQA 基因,均具有高度的多态性^[8-9],但尚不清楚绵羊和牛的 DQA 基因抵抗动物传染性疾病的作用机制。另外,与牛和绵羊相比,迄今在山羊的 MHC 基因结构及其多态性方面,所进行的研究工作主要集中在 MHC-DRB 基因上^[10-11],而对 DQ 区基因的研究较少。

关于牛和绵羊 DQA 和 DRB 的研究结果已经

证实,其第 2 外显子存在着高度多态性,但是尚未见针对我国优良地方山羊品种 DQA 基因的研究报道。在已有资料的基础上,对我国优良的地方山羊品种 DQA 基因进行研究不但很有必要,而且有助于山羊抗病育种工作的开展和对这些山羊品种的合理开发与利用。

为此,本试验采用 PCR-RFLP 技术,对 5 个山羊品种 MHC II 类 DQ 区 DQA1 基因的多态性进行了初步分析,旨在为山羊的抗病育种研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 血样来源与基因组 DNA 的提取

采用随机抽样法收集山羊的样品,其中包括 74 份崂山奶山羊(LS)组织样、60 份西农萨能奶山羊(SN)血样、42 份关中奶山羊(GZ)组织样、25 份板角山羊(BJ)组织样和 30 份贵州白山羊(GW)组织样,分别来自山东、陕西、四川和贵州省。血样用 ACD 抗凝,低温带回实验室后于 -80°C 保存;组织样用体积分数 75%乙醇保存,置于冰盒中带回实验室。基因组 DNA 的提取参考文献^[12]进行。

1.2 引物及 PCR 扩增

引物设计参考文献^[13]。上游引物序列为 5'-GAA GCC CACAATGTT TGA TAG TCA-3',下游引物序列为 5'-GGG GAA GAA CAA CAA AGA GAG GCA G-3'。PCR 反应总体积 30 μL ,其他成分的终浓度为 Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTPs 0.1 mmol/L,上、下游混合引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$,模板 DNA 100 ng/ μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;变性 45 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 产物酶切

分别采用 *Taq* I 和 *Hae* III 限制性内切酶分析

PCR 扩增产物。酶切体系:取 PCR 产物 10 μ L,加内切酶 5 U,10 $\times$ Buffer(含 BSA)2 μ L,加超纯水至总体积为 20 μ L,过夜消化(*Taq* I 和 *Hae* III 的酶切反应温度分别为 65 和 37 $^{\circ}$ C),20g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 统计分析

利用 POPGEN(Version1.31)计算酶切基因型及其等位基因频率、杂合度(*He*)、有效等位基因数(*Ne*)、多态信息含量 (*PIC*) 和基因多样性(*I*)^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 限制性酶切多态性分析

对 5 个山羊品种的 *GoLA-DQA1* 基因进行 PCR 扩增,均得到了 1 条片段大小为 385 bp 的特异性条带(包括 95 bp intron 1,249 bp exon 2 和 41

bp intron 2)。

(1) *Taq* I-RFLP: 用 *Taq* I 对山羊 *GoLA-DQA1* 基因的 PCR 产物进行酶切分析,共检测到 3 种基因型(图 1),分别是 AA (385 bp)、AB (385 bp/193 bp/192 bp) 和 BB (193 bp/192 bp)。

(2) *Hae* III-RFLP: 用 *Hae* III 对山羊 *GoLA-DQA1* 基因的 PCR 产物进行酶切分析,共检测到 3 种基因型(图 2),即 MM (385 bp)、MN (151 bp/234 bp/385 bp)、NN (151 bp/234 bp)。

上述 2 种酶切结果表明,5 个山羊群体的 *GoLA-DQA1* 基因第 2 外显子存在多态。序列分析表明,*GoLA-DQA1* 基因第 2 外显子第 57 bp 发生了 T $\rightarrow$ C 转换,出现了 N 等位基因,导致了 Tyr $\rightarrow$ His 氨基酸的转变;第 98 bp 发生了 G $\rightarrow$ C 颠换,出现了 B 等位基因,但是该突变未产生氨基酸改变,只是一个同义突变。

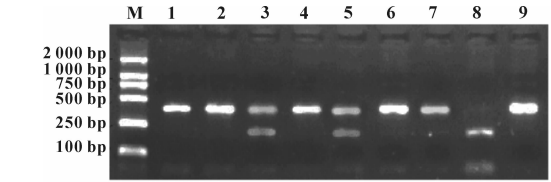


图 1 *GoLA-DQA1* 基因的 *Taq* I 酶切分析
M. DNA Marker;1,2,4,6,7,9. AA;3,5. AB;8. BB

Fig. 1 *Taq* I-RFLP patterns of *GoLA-DQA1*
M. DNA Marker;1,2,4,6,7,9. AA;3,5. AB;8. BB

2.2 5 个山羊品种 *GoLA-DQA1* 基因的 PCR-RFLP 统计分析

2.2.1 *GoLA-DQA1* 基因频率的分布 根据 *GoLA-DQA1* 酶切结果,分别计算 5 个山羊品种各等位基因的遗传参数(见表 1)。表 1 表明,在 *Taq* I-RFLP 位点上,即第 152 bp 的碱基突变除了在关中奶山羊和崂山奶山羊未达到平衡状态外,在萨能奶山羊、板角山羊和贵州白山羊上均达到了 Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$)。在 5 个山羊品种中,A 等位基因具有较高的基因频率(0.658~0.953,平均为 0.846),说明 A 为优势等位基因。在 *Hae* III-RFLP 位点上,即第 193 bp 的碱基突变在 5 个山羊群体中均达到了 Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$)。在该位点上,M 等位基因具有较高的基因频率(0.583~0.917,平均为 0.819),说明 M 为优势等位基因。

双酶切的结果见表 2。由表 2 可见,在 5 个山羊品种中共有 9 种组合基因型,其中 AAMM 是优

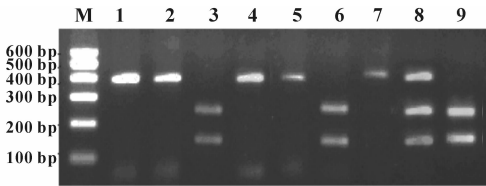


图 2 *GoLA-DQA1* 基因的 *Hae* III 酶切分析
M. DNA Marker;1,2,4,5,7. MM;3,6,9. NN;8. MN

Fig. 2 *Hae* III-RFLP patterns of *GoLA-DQA1*
M. DNA Marker;1,2,4,5,7. MM;3,6,9. NN;8. MN

势组合基因型,其他的组合基因型依次为 AAMN、ABMM、ABMN、BBNN、ABNN、AANN 和 BBMN, BBMM 型的出现频率最低。在萨能奶山羊中检测到了 9 种基因型组合,而在其他 4 个山羊品种只能检测到 4 种不同的组合基因型,其中 AAMM、ABMM、AAMN 和 ABMN 存在于关中奶山羊、板角山羊和贵州白山羊,AAMM、ABMM、AAMN 和 BBNN 存在于崂山奶山羊。

2.2.2 *GoLA-DQA1* 基因的遗传特性分析 由表 1 可知,在所研究的 5 个山羊群体中,在 *Taq* I 和 *Hae* III 2 个酶切位点上均显示遗传纯合度高于杂合度。但是对多态信息含量(*PIC*)、有效等位基因数(*Ne*)和基因多样性(*I*)等指标,除关中奶山羊外,其余 4 个品种的 *Taq* I-RFLP 位点均高于 *Hae* III-RFLP 位点。5 个山羊品种中,萨能奶山羊在 2 个酶切位点上的多态信息含量(*PIC*)、有效等位基因数(*Ne*)和基因多样性(*I*)均为最高。

表 1 *GoLA-DQA1* 基因的 PCR-RFLP 遗传参数

Table 1 Genetic parameters of PCR-RFLP about <i>GoLA-DQA1</i> gene in five populations							
RFLP	参数 Parameters	崂山奶山羊 LS	萨能奶山羊 SN	关中奶山羊 GZ	板角山羊 BJ	贵州白山羊 GW	合计 Total
<i>Taq</i> I -RFLP	A	0.953	0.658	0.750	0.920	0.950	0.846
	B	0.047	0.342	0.250	0.080	0.050	0.154
	χ^2	26.249	1.471	4.409	0.139	0.055	6.465
	He	0.090	0.450	0.375	0.147	0.095	0.239
	Ne	1.099	1.818	1.600	1.173	1.105	1.362
	PIC	0.086	0.349	0.205	0.136	0.091	0.193
	I	0.191	0.642	0.562	0.279	0.199	0.387
<i>Hae</i> III -RFLP	M	0.872	0.583	0.845	0.880	0.917	0.819
	N	0.128	0.417	0.155	0.120	0.083	0.181
	χ^2	0.782	0.822	1.287	0.381	0.195	0.693
	He	0.224	0.486	0.262	0.211	0.153	0.276
	Ne	1.288	1.946	1.354	1.268	1.180	1.418
	PIC	0.199	0.368	0.227	0.189	0.141	0.225
	I	0.383	0.679	0.431	0.367	0.287	0.445

表 2 *GoLA-DQA1* 基因双酶切基因型在不同山羊品种中的分布频率

Table 2 Genotypic frequencies about <i>Taq</i> I and <i>Hae</i> III of <i>GoLA-DQA1</i> gene in five goat populations					
组合基因型 Composite genotype	崂山奶山羊 LS	萨能奶山羊 SN	关中奶山羊 GZ	板角山羊 BJ	贵州白山羊 GW
AAMM	54(0.730)	17(0.283)	15(0.357)	16(0.640)	23(0.767)
ABMM	3(0.041)	4(0.067)	14(0.333)	3(0.120)	2(0.067)
BBMM	0(0.000)	1(0.017)	0(0.000)	0(0.000)	0(0.000)
AANN	0(0.000)	2(0.033)	0(0.000)	0(0.000)	0(0.000)
ABNN	0(0.000)	4(0.067)	0(0.000)	0(0.000)	0(0.000)
BBNN	2(0.027)	6(0.100)	0(0.000)	0(0.000)	0(0.000)
AAMN	15(0.203)	9(0.150)	6(0.143)	5(0.200)	4(0.133)
ABMN	0(0.000)	15(0.250)	7(0.167)	1(0.040)	1(0.033)
BBMN	0(0.000)	2(0.033)	0(0.000)	0(0.000)	0(0.000)

注:整数表示该组合基因型在各个品种出现的观察值,括号中的小数则为组合基因型的频率。
Note:The integer was the observed number of composite genotype and decimal fraction was frequency of composite genotype detected in each breed.

3 讨 论

3.1 *DQA* 基因多态性的研究

对人类、小鼠的研究结果表明,哺乳动物 MHC 具有多态程度高和多碱基突变的特点,国内外有关绵羊和山羊 MHC 基因的研究也得到了相同的结果^[4,10,16]。目前,对家畜 *MHC-DQA* 的研究主要集中在牛、绵羊和猪上,使用的分子分型技术主要有 PCR-RFLP^[7,9]、PCR-SSCP^[16]、SNP^[17] 和克隆测序^[18]等。在牛上发现了 39 个 *DQA* 基因,在绵羊上发现了 8 个 *DQA1* 基因和 16 个 *DQA2* 基因,在猪上也发现 *DQA* 基因具有丰富的多态性^[18],而对山羊 *GoLA-DQA* 基因的研究很少,A mills 等^[13]发现了 7 个 *DQA1* 等位基因,Zhou 等^[19]发现了 11 个 *DQA2* 基因。本研究首次使用 PCR-RFLP 技术,对我国 5 个山羊品种 231 个个体的 *DQA1* 基因第 2 外显子的分子遗传多态性进行了检测,共发现 9 种组

合基因型,其中 AAMM、AAMN、ABMM 和 ABMN 为优势组合,初步预测西农萨能奶山羊中基于 PCR-RFLP 分型技术至少可以分离出 4 种不同于崂山奶山羊和关中奶山羊的组合基因型(表 2),这为奶山羊的抗病性研究提供了理论依据。

GoLA-DQA1 基因包含 4 个外显子,编码 255 个氨基酸。*DQA1* 分子包括前导肽、 α_1 、 α_2 、连接肽、转膜片段和胞质片段,其中第 2 外显子编码 α_1 结构域,包含 83 个氨基酸^[13]。本研究采用 PCR-RFLP 技术,初步分析了 5 个山羊品种 *GoLA-DQA1* 基因第 2 外显子的多态性,发现在第 57 和 98 bp 处存在多态,并产生了氨基酸的转变。*DQA1* 第 2 外显子丰富的多态性与其功能密切相关,该区域是抗原结合区,决定肽结合槽的化学表面特性,这是肽结合特异性和亲和性及 T 细胞识别的主要决定因素。对其与 *DQA1* 基因的关系及其与其他 MHC II 类基因和山羊传染性疾病(Arthrhritis-encephalitis 和 cow-

driosis)的关系进行深入研究,有助于揭示山羊的抗病机理。

3.2 5 个山羊品种的遗传多样性

在萨能、关中、崂山奶山羊和贵州白山羊、板角山羊 5 个山羊品种中,西农萨能奶山羊的有效等位基因数、多态信息含量、杂合度和基因多样性等指标均最高,表明该品种在 *GoLA-DQA1* 基因位点上的遗传变异程度较高,抗病力较强,这与蓝贤勇等^[20]在 *CSN1S2* 基因上的研究结果一致。在 *Taq* I-RFLP 和 *Hae*Ⅲ-RFLP 位点上,除了萨能奶山羊为中度多态外,其他均为低度多态,说明这 2 个酶切位点在长期选择过程中所受的选择压力较小。5 个山羊品种在这 2 个酶切位点上的纯合子比例都比较高,说明这些山羊群体均已达到了较高纯度,这可能与这些品种受外来血缘的影响较小及长期的品种选育有关。相对而言,崂山奶山羊和关中奶山羊在 *Taq* I-RFLP 位点上处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态,这可能与其为提高产奶量而导入了外血有关。

[参考文献]

[1] 刘云芳,剡根强,王新峰.家畜 MHC 的研究进展及其在遗传育种中的应用[J].黄牛杂志,2004,30(2):44-47.
Liu Y F,Shan G Q,Wang X F. Research advance on animal major histocompatibility complex and its application in animal breeding and genetics[J]. Journal of Yellow Cattle Science, 2004,30(2):44-47. (in Chinese)

[2] 孙东晓,张 沅.反当家畜主组织相容复合物的研究进展[J].中国畜牧杂志,2002,38(5):46-47.
Sun D X,Zhang Y. Progress of MHC in ruminant[J]. Chinese Journal of Animal Science,2002,38(5):46-47. (in Chinese)

[3] Cameron P V,Tabarias H T,Pulendra B,et al. Conservation of the central MHC genome;PGFE mapping and RFLP analysis of complement,HSP70 and TNF in the goat[J]. Immunogenetics,1990,31:253-264.

[4] Amills M,Francino O,Sanchez A. A PCR-RFLP typing method for the caprine class II *DRB* gene[J]. Veterinary immunology and immunopathology,1996,55:255-260.

[5] 高树新,许尚忠,李金泉,等.奶牛 MHC 及其免疫学研究进展[J].中国农学通报,2005,21(1):8-11.
Gao S X,Xu S Z,Li J Q,et al. MHC of dairy cattle smd its immunological progress[J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2005,21(1):8-11. (in Chinese)

[6] 余智勇,彭林泽,申 红,等.绵羊 MHC 基因的研究现状[J].贵州畜牧兽医,2006,30(4):12-14.
Yu Z Y,Peng L Z,Shen H,et al. Research progress on major histocompatability complex gene in ovine[J]. Guizhou Animal Scienceand Veterinary Medicine, 2006, 30(4): 12-14. (in Chinese)

[7] Wright H,Ballingall K T. Mapping and characterization of the

DQ subregion of the ovine MHC[J]. Animal Genetics,1994, 25:243-249.

[8] Andersson L,Rask L. Characterization of the MHC class II region in cattle,the number of *DQ* genes varies between haplotypes[J]. Immunogenetics,1988,27:110-120.

[9] Scott P C,Gogolin-Ewens K J,Adams T E,et al. Nucleotide sequence, polymorphism and evolution of ovine MHC class II *DQA* genes[J]. Immunogenetics,1991,34:69-79.

[10] Amills M,Francino O,Sanchez A. Nest PCR allows the characterization of *Taq* I and *Pst* I RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II *DRB* gene[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology,1995,48:313-321.

[11] 孙东晓,张 沅,李 宁.蒙古山羊和哈萨克山羊 *GOLA-DRB3* 基因的 *Hae* Ⅲ 酶切多态性分析[J]. 遗传,2004,26(1):55-58.
Sun D X,Zhang Y,Li N. Polymorphism analysis of the *GO-LA-DRB3* gene digested with *Hae* Ⅲ in Mongolian goat and Kazakh goat[J]. Hereditas,2004,26(1):55-58. (in Chinese)

[12] Chen H,Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*carassius auratus gibelio*) [J]. Biochem Genet,1995,33:297-306.

[13] Amills M,Sulas C,Sanchez A,et al. Nucleotide sequence and polymorphism of the caprine major histocompatibility complex class II *DQA1* (Cahi-*DQA1*) gene[J]. Molecular Immunology, 2005,42:375-379.

[14] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. Proc Natl Acad Sci,1973,70:3321-3323.

[15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics,1978, 89:583-590.

[16] Xu A, Van Eijk M J, Park C, et al. Polymorphism in *BoLA-DRB3* exon2 correlated with resistance to persistent lymphocytosis caused by Bovine leukemia virus[J]. Journal of Immunology,1993,15(12):6977-6985.

[17] 刘 榜.15 个猪品种 MHC II 类区 4 个基因的 SNPs 分析及免疫性状的关联[D]. 武汉:华中农业大学,2003.
Liu B. SNPs analysis of four genes in MHC class II and its correlations to immunal traits in fifteen swine breeds[D]. Wuhan:Huazhong Agricultural University,2003.

[18] 刘 榜,朱正茂,余 梅,等.猪 MHC-II 类区 *DQA* 新等位基因及新突变位点的发现[J]. 遗传学报,2003,30(10):955-960.
Liu B,Zhu Z M,Yu M,et al. Characterization of novel alleles and new mutation sites of porcine MHC class II *DQA* [J]. Acta Genetica Sinica,2003,30(10):955-960. (in Chinese)

[19] Zhou H, Hickford J G H, Fang Q. Polymorphysim of the *DQA2* gene in goats[J]. J Anim Sci,2005,83:963-968.

[20] 蓝贤勇,陈 宏,张润峰,等.5 个山羊品种 *CSN1S2* 基因的 *Alw26* I 酶切多态性分析[J]. 遗传,2005,27(3):363-366.
Lan X Y,Chen H,Zhang R F,et al. Polymorphism analysis of the *CSN1S2* gene digested with *Alw26* I in five Goat Breeds [J]. Hereditas,2005,27(3):363-366. (in Chinese)