

## 2种兼用型牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的多态性与乳房炎的相关性

高树新<sup>1</sup>,许尚忠<sup>2</sup>,李金泉<sup>3</sup>,任红艳<sup>2</sup>,马云<sup>4</sup>

(1 内蒙古民族大学 动物科学与技术学院,内蒙古 通辽 028042;2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所,北京 100094;

3 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院,内蒙古 呼和浩特 010018;4 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 【目的】探讨牛主要组织相容性复合物基因第二外显子(*BoLA-DQB · exon2*)的多态性与乳房炎发生的关系。【方法】采用 PCR-SSCP 分子标记技术,检测 84 头中国西门塔尔牛和 130 头三河牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的多态性,并用体细胞计数法检测乳房炎的感染情况,应用 GLM 模型分析 *BoLA-DQB · exon2* 的多态性与奶牛乳房炎的相关性。【结果】*BoLA-DQB · exon2* 的基因型及等位基因频率在感染乳房炎牛和健康牛之间分布差异显著( $P<0.05$ )。在感染乳房炎的中国西门塔尔牛中,EE 基因型、E 等位基因频率最高,在健康的中国西门塔尔牛中,AA 基因型、A 等位基因频率最高;在感染乳房炎的三河牛中,DD 基因型、D 等位基因频率最高,而在健康的三河牛中,EE 基因型、E 等位基因频率最高。【结论】*BoLA-DQB · exon2* 多态性与牛乳房炎的发生存在关联,但这种关联在两个品种中的表现不同。

**[关键词]** 牛; *DQB* 基因; 体细胞数; 单倍型; MHC

**[中图分类号]** S823.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2008)03-0008-05

## Analysis of polymorphisms of *BoLA-DQB · exon2* and the association between the gene and mastitis in two dual-purpose cattle

GAO Shu-xin<sup>1</sup>, XU Shang-zhong<sup>2</sup>, LI Jin-quan<sup>3</sup>, REN Hong-yan<sup>2</sup>, MA Yun<sup>4</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationality, Tongliao, Mongolia 028042, China;

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 3 Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Mongolia 010018, China; 4 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】This study is to investigate the association between Bovine Lymphocyte Antigen-*DQB* gene polymorphism and mastitis. 【Method】The genotypes of *DQB* gene polymorphism (*DQB* at exon 2) of 84 Chinese Simmental cattle(13 infected with mastitis, 71 healthy ones) and 130 Sanhe cattle (37 infected with mastitis, 93 healthy ones) were determined by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis to compare if there were any differences between mastitis cattle and healthy ones of the same species as to the frequency distribution of genotypes and alleles. 【Result】The frequencies of *DQB · exon2* genotypes and alleles were different between mastitis cattle and healthy ones ( $P<0.05$ ). The frequencies of EE genotypes and E alleles were the highest in Chinese Simmental infected with mastitis, while the AA genotypes and A alleles were the highest in healthy Chinese Simmental. In addition, the frequencies of DD genotypes and D alleles were the highest in Sanhe cattle with mastitis, while the EE gen-

\* [收稿日期] 2007-09-28

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A16)

[作者简介] 高树新(1967—),女,内蒙古赤峰市人,副教授,博士,主要从事生物技术与动物育种研究。E-mail:shuxingao@126.com  
许尚忠(1950—),男,河北省尚义人,研究员,博士生导师,主要从事牛遗传育种研究。E-mail:simmenta@sina.com

otypes and E alleles were the highest in the healthy Sanhe cattle.【Conclusion】The polymorphism of BoLA-DQB·exon2 is associated with mastitis, but the association is different in the 2 species mentioned above.

**Key words:** Cattle; DQB Gene; SCC; Haplotype; MHC

奶牛乳房炎是奶牛的常发病，也是危害奶牛业生产和乳品质量安全的一种重大疾病。经过多年的研究，目前虽然已在乳房炎的流行病学、临床症状、检测诊断和预防治疗等方面取得了很大进展，但对于奶牛乳房炎发生的生理与遗传机制研究较少。随着分子遗传学的发展，从分子角度探讨乳房炎的发病机理，寻找与乳房炎抗性（或易感性）有关的候选基因，已经成为乳房炎防治与抗病育种研究的热点<sup>[1-3]</sup>。

主要组织相容性复合物（Major hostcompatibility complex, MHC）是一个基因家族<sup>[4]</sup>。有研究表明，所有的哺乳动物都有MHC系统，并且基因的结构和功能有很大的相似性，基因序列也有一定的同源性<sup>[5]</sup>，只是不同动物MHC的定位与名称不同。MHC基因所编码的细胞表面转膜蛋白，在动物机体的免疫系统中发挥着极其重要的作用。现已经证实，MHC（即HLA）与人类许多疑难疾病（如糖尿病、类风湿性关节炎等）相关联；在家畜上，MHC也成为疾病抗性（或易感性）育种研究的潜在候选基因。

牛MHC基因又称牛白细胞抗原基因（Bovine Lymphocyte Antigen, BoLA），包含Ⅰ类和Ⅱ类基因。国外已有大量关于BoLA基因与乳房炎关系的研究报道，但结果不尽相同。在国内，有关BoLA的研究多是关于其Ⅰ类基因的不同等位基因和Ⅱ类基因中DRB3.2基因的多态性与乳房炎发生的关系。BoLA的Ⅱ类基因含有DR和DQ2个基因共8个基因位点（DRA、DRB1、DRB2和DRB3及DQA1、DQA2、DQB1和DQB2），均可高度表达。至今未见有BoLA-DQB多态性与乳房炎关系的研究报道。为此，本试验以中国西门塔尔牛和三河牛为研究对象，利用PCR-SSCP分子标记，对这2种牛的BoLA-DQB基因第2外显子（BoLA-DQB·exon2）的多态性及其与乳房炎的关系进行分析，以期为奶牛的乳房炎抗性育种研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 牛血样 选择3~6岁、1~3胎次的84头中国西门塔尔牛（内蒙古通辽市高林屯种畜场）和

130头三河牛（内蒙古海拉尔市谢尔塔拉种牛场），每头牛颈静脉采血12 mL，分别加入2 mL酸性柠檬酸葡萄糖溶液（ACD）抗凝，-20℃冷冻保存。

1.1.2 试 剂 蛋白酶K、Tris-饱和酚、Taq DNA聚合酶、dNTPs、琼脂糖、100 bp DNA Marker、丙烯酰胺、去离子甲酰胺和EDTA等，购自北京天为时代生物工程有限公司。

### 1.2 牛基因组DNA的提取

用酚-氯仿抽提法提取试牛基因组DNA，溶于TE中，4℃保存。

### 1.3 牛BoLA-DQB·exon2基因的多态性分析

参照文献[6]设计1对引物，上游引物：5'-ACT GGA TCC CCC GCA GAG GAT TTC GT-3'；下游引物：5'-ATA GAA TTC ACC TAG CCG CTG CCA GGT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。采用PCR-SSCP技术对牛基因BoLA-DQB·exon2进行多态性分析。PCR反应体系参照文献[4]配制，反应条件为：95℃预变性5 min；94℃变性30 s，62℃退火30 s，72℃延伸40 s，共34个循环；最后72℃延伸10 min，4℃保存。将PCR产物98℃变性10 min后，进行聚丙烯酰胺（PAGE）凝胶电泳，PAGE的交联度为29:1，浓度为12 g/L，140 V、6 W、室温电泳6.5 h。胶片采用银染法染色。

### 1.4 牛乳房炎的判定

乳中体细胞数量（Somatic Cell Count, SCC）容易测定，体细胞评分（Somatic Cell Score, SCS）与临床型乳房炎的相关性较高（为0.6~0.8）<sup>[7]</sup>，是目前公认的乳房炎诊断指标<sup>[8]</sup>。因此，本试验选用SCC作为奶牛乳房炎的诊断指标，SCC由北京市乳品质量监督检验站检测，所用仪器为FOSSOMATIC-90型体细胞计数仪。SCC的频率分布是高度偏斜的，因此SCC数据在分析之前必须转换为遵循正态分布的体细胞评分（Somatic Cell Score, SCS），转换公式为 $SCS = \log_2(SCC/100) + 3$ <sup>[9]</sup>。当SCS≥5时判定为感染；当SCS<5时判定为健康<sup>[10]</sup>。

### 1.5 数据的统计分析

牛BoLA-DQB·exon2基因频率的计算和 $\chi^2$ 检验均借助SPSS 10.0软件完成。用SPSS 10.0软件里的GLM模型分析BoLA-DQB·exon2基因的多态性与奶牛乳房炎的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的多态分析结果

由图 1 可知,中国西门塔尔牛的 *BoLA-DQB · exon2* 基因有 AA、AM、MM、FM、FF、AF、GG、KL、KK、LL、II、DD、HH、HK、BB 和 EE 等 16 种基因型。由图 2 可知,三河牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因有 KK、BB、AB、AN、BN、AC、AA、CC、CN、HH、

HL、LM、LL、MM、AD、GG、DG、DD、DE AE、EE、EJ、JJ 和 BE 等 24 种基因型。AA、MM、GG、KK、LL、DD、HH、BB 和 EE 等 9 种基因型为 2 个品种牛公有基因型,2 个品种牛的 *BoLA-DQB · exon2* 基因共有 31 种基因型。

由此可见,这 2 种牛的 *BoLA-DQB · exon2* 基因的 SSCP 是由 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M 和 N 等 14 个等位基因控制。

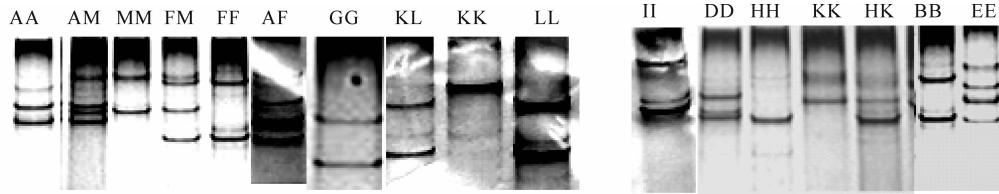


图 1 中国西门塔尔牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的 PCR-SSCP 分析

Fig. 1 PCR-SSCP of *BoLA-DQB · exon2* from Chinese Simmental cattle

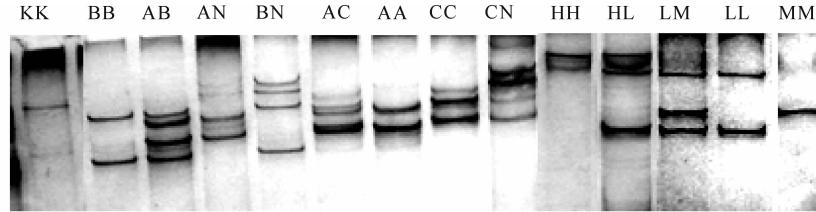


图 2 三河牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的 PCR-SSCP 分析

Fig. 2 PCR-SSCP of *BoLA-DQB · exon2* from Sanhe cattle

### 2.2 牛乳房炎的判定结果

牛乳在进行体细胞记数后,对体细胞进行评分,并根据评分结果把试验牛分为感染牛( $SCS \geq 5$ )和健康牛( $SCS < 5$ ),评分结果见表 1。

表 1 两个品种牛依据体细胞评分分组的结果

Table 1 Result of division for experimental animal according to SCS

品种 Breed	感染牛 Infected cattle	健康牛 Healthy cattle
中国西门塔尔牛 Chinese Simmental	13(15%)	71(85%)
三河牛 Sanhe cattle)	37(28%)	93(72%)

### 2.3 牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因多态性与奶牛乳房炎的相关性分析结果

中国西门塔尔牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的等

位基因频率分布见表 2,基因型频率分布见表 3。由表 2,3 可知,在感染乳房炎的中国西门塔尔牛中, *BoLA-DQB · exon2* 基因的 E 等位基因、EE 基因型的频率最高,而在健康牛中 A 等位基因、AA 基因型频率最高。由表 4 可知,中国西门塔尔牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因型频率在感染牛和健康牛中的分布差异显著( $P < 0.05$ ),而各等位基因频率在感染牛和健康牛中的分布差异极显著( $P < 0.01$ )。

表 2,5 显示,在感染乳房炎的三河牛中, *BoLA-DQB · exon2* 基因的 D 等位基因、DD 基因型频率最高,而在健康牛中 E 等位基因、EE 基因型频率最高。由表 4 可知,三河牛 *BoLA-DQB · exon2* 基因的基因型频率、等位基因频率在感染牛和健康牛中的分布均差异极显著( $P < 0.01$ )。

表2 中国西门塔尔牛和三河牛BoLA-DQB·exon2基因的等位基因频率分布

Table 2 Distribution of BoLA-DQB·exon2 alleles frequency in Chinese Simmental and Sanhe cattle %

等位基因 Allele	中国西门塔尔牛等位基因频率 Allele frequency		三河牛等位基因频率 Allele frequency	
	感染牛 Case	健康牛 Control	感染牛 Case	健康牛 Control
A	0	29.7	A	2.7
B	7.7	2.8	B	2.7
D	0	4.2	C	0
E	76.9	16.9	D	48.6
F	0	7	E	8.1
G	0	8.5	G	10.8
H	0	10.6	H	6.8
I	0	4.2	J	5.4
K	7.7	6.3	K	0
L	7.7	4.2	L	6.8
M	0	5.6	M	5.4
			N	2.7
				3.8

表3 中国西门塔尔牛BoLA-DQB·exon2基因的基因型频率分布

Table 3 Distribution of DQB·exon2 genotypes frequency in Chinese Simmental %

基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency		基因型频率 Genotype frequency	
	感染牛 Case	健康牛 Control	感染牛 Case	健康牛 Control
AA	0(0/13)	26.9(19/71)	GG	0(0/13)
AF	0(0/13)	2.8(2/71)	HH	0(0/13)
AM	0(0/13)	2.8(2/71)	HK	0(0/13)
BB	7.7(1/13)	2.8(2/71)	II	0(0/13)
DD	0(0/13)	4.2(3/71)	KK	7.7(1/13)
EE	76.9(10/13)	16.9(12/71)	KL	0(0/13)
FF	0(0/13)	4.2(3/71)	LL	7.7(1/13)
FM	0(0/13)	2.8(2/71)	MM	0(0/13)
				2.8(2/71)

表4 中国西门塔尔牛和三河牛的BoLA-DQB·exon2基因型与等位基因频率的检验

Table 4 Test of BoLA-DQB·exon2 genotypes and alleles frequency in Chinese Simmental and Sanhe cattle

品种 Breed	基因型频率 Genotype Frequency		等位基因频率 Allele Frequency	
	卡方值 $\chi^2$	自由度 df	卡方值 $\chi^2$	自由度 df
中国西门塔尔牛 Chinese Simmental	27.013*	15	50.435**	10
三河牛 Sanhe	62.061**	23	70.056**	11

注:  $X_{0.05}^2(df=15)=25.00$ ,  $X_{0.01}^2(df=10)=23.21$ ,  $X_{0.01}^2(df=23)=41.64$ ,  $X_{0.01}^2(df=11)=24.72$ ; \* 和 \*\* 分别表示差异显著( $P<0.05$ )和极显著( $P<0.01$ )。

Note:  $X_{0.05}^2(df=15)=25.00$ ,  $X_{0.01}^2(df=10)=23.21$ ,  $X_{0.01}^2(df=23)=41.64$ ,  $X_{0.01}^2(df=11)=24.72$ ; Value with \* and \*\* differ significantly at  $P<0.01$  and  $P<0.05$  respectively.

表5 三河牛BoLA-DQB·exon2基因型频率的分布

Table 5 Distribution of BoLA-DQB·exon2 genotypes frequency in Sanhe cattle %

基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency		基因型频率 Genotype frequency	
	感染牛 Case	健康牛 Control	感染牛 Case	健康牛 Control
AA	0(0/37)	16.1(15/93)	EJ	0(0/37)
AB	0(0/37)	2.2(2/93)	BE	0(0/37)
AC	0(0/37)	1.1(1/93)	EE	5.4(2/37)
AD	0(0/37)	3.2(3/93)	GG	8.1(3/37)
AE	0(0/37)	5.4(5/93)	HH	5.4(2/37)
AN	5.4(2/37)	4.3(4/93)	HL	2.7(1/37)
CC	0(0/37)	2.2(2/93)	JJ	5.4(2/37)
DD	43.3(16/37)	9.6(9/93)	LL	5.4(2/37)
KK	0(0/37)	2.2(2/93)	BB	2.7(1/37)
BN	0(0/37)	2.2(2/93)	MM	5.4(2/37)
CN	0(0/37)	1.1(1/93)	DG	5.4(2/37)
LM	0(0/37)	3.2(3/93)	DE	5.4(2/37)
				0(0/93)

### 3 讨论与结论

目前, *BoLA-DQB* 基因与奶牛乳房炎抗性(或易感性)关系的研究,主要集中在其与别的 *BoLA-II* 类基因构成的单倍型与乳房炎抗性(或易感性)的关系方面。Lundén 等<sup>[11]</sup> 对 *BoLA-II* 类 *DQ* 和 *DYA* 基因与瑞典红白花奶牛乳房炎发生的关系进行了研究,结果表明 *DQA1* 单倍型与临床型乳房炎易感性显著相关( $P < 0.05$ ),其他的 *DQ* 单倍型与临床型乳房炎易感性不相关( $P > 0.05$ )。Park 等<sup>[12]</sup> 在研究乳腺分泌物和外周血中的 CD4、CD8 淋巴细胞数量、二者比例以及 *BoLA-II* 类基因 a 区的单倍型与荷斯坦奶牛乳房炎抗性(或易感性)之间的关系时发现,只有 1 条 D 区单倍型(D-region haplotype, DH)——DH24A 与乳房炎的易感性呈强相关关系( $P < 0.05$ ),而且在易感乳房炎群体的 11 个单倍型中, DH24A 的表型频率最高(为 50%)。DH24A 含有 *DRB3.2*\*24、*DQA*\*1A、*DQB*\*1 等位基因。登陆美国国家生物信息中心(NCBI)网站 <http://www.ncbi.nih.nlm.gov>,利用 Blast 软件,将本试验得到的 A、E、D 等基因序列与 *DQB*\*1 等位基因(gi:13159186)进行比对,结果发现这 3 个基因与 *DQB*\*1 基因之间的同源性均达 95%以上。

本研究还发现, *BoLA-DQB · exon2* 基因在中国西门塔尔牛和三河牛群体中均存在多态性,而且同一品种感染牛和健康牛的 *BoLA-DQB · exon2* 等位基因频率和基因型频率分布也存在显著差异( $P < 0.05$ ),这一方面可能是由于中国西门塔尔牛样本数量较少, *DQB* 基因多态信息含量又较高,导致试验存在误差;另一方面,可能是由于品种、饲养方式、气候条件或某些未知因素的差异,导致 *DQB* 基因在 2 个品种感染乳房炎和健康牛中产生了不同的变异。综合上述因素可初步推断, *DQB* 基因可能是奶牛乳房炎抗性(或易感性)的候选基因,但要真正应用于抗病育种实践,还需进一步研究。在今后的工作中,应进一步扩大试验样本(最好是培养一些近交系的家系)、采用更为准确的基因多态性检测技术和单倍型遗传统计方法,深入研究 *DQB* 基因及其单倍型与奶牛乳房炎抗性(或易感性)的关系,为乳房炎抗性(或易感性)的标记辅助选择(MAS)提供可靠的依据。

### [参考文献]

- [1] 叶素成. 奶牛 MHC 多态性及其与牛乳中体细胞数关系的研究 [D]. 扬州:扬州大学,2003.
- [2] Ye S C. Study on polymorphism of MHC and its relationship with somatic cell counts in cow milk [D]. Yangzhou, Yangzhou University, 2003. (in Chinese)
- [3] 曹随忠. 应用 SSH 技术筛选和克隆奶牛乳房炎抗性相关基因 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2005.
- [4] Cao S Z. Identification and cloning of mastitis resistant genes in dairy cows using suppression subtractive hybridization [D]. Lanzhou, Gansu Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [5] 王兴平,许尚忠,马腾壑,等. 牛 TLR4 基因 5'侧翼区的遗传变异与乳房炎的关联[J]. 遗传, 2006, 28(12): 1520-1524.
- [6] Wang X P, Xu S Z, Ma T H, et al. Genetic variation in the 5' flanking region of bovine TLR4 Gene and correlation with mastitis [J]. Genetic, 2006, 28(12): 1520-1524. (in Chinese)
- [7] 孙东晓. 中国部分反刍家畜 MHC 分子遗传多态性及其序列分析 [D]. 北京:中国农业大学,1999.
- [8] Sun D X. Analysis of molecular polymorphisms and sequences of MHC in Chinese ruminant [D]. Beijing: China Agricultural University, 1999. (in Chinese)
- [9] Arriens M A, Hofer A, Obexer-Ruff G, et al. Lack of association of bovine MHC I class alleles with carcass and reproductive traits [J]. Animal Genetics, 1996, 27: 429-431.
- [10] Sigurdardóttir S, Borsch C, Gustafsson K, et al. Gene duplications and sequence of polymorphism of bovine class II DQB genes [J]. Immunogenetics, 1992, 35: 205-213.
- [11] 张增利,贾青. 利用 SCS 进行抗奶牛乳房炎育种概述 [J]. 中国奶牛, 2003(4): 38-41.
- [12] Zhang Z L, Jia Q. Summarize of resistance breeding for cow mastitis with the use of SCS [J]. China Dairy Cattle, 2003(4): 38-41. (in Chinese)
- [13] Barkema H W, Van Der Ploeg J D, Schukken Y H, et al. Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis [J]. J dairy Sci, 1999, 82: 1655-1663.
- [14] Shook G E, Schutz M M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States [J]. J Dairy Sci, 1994, 77: 648-658.
- [15] Shook G E. Approaches to summarizing somatic cell counts which improve interpretability [C]//Proc Natl Mastitis Council, Arlington, 1982: 150-166.
- [16] Lundén A, Sigurdardóttir S, Edfors-Lilja I, et al. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease studied by use of bull breeding values [J]. Animal Genetics, 1990, 21: 221-232.
- [17] Park Y H, Joo Y S, Park J Y, et al. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows [J]. J Vet Sci, 2004, 5(1): 29-39.