

实验用 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类基因多态性研究

江新杰^{1,2}, 权金强³, 李昌文², 路小野², 陈洪岩², 杨春文^{1*}, 高彩霞^{2*}

(1. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江省牡丹江 157012; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150069; 3. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070.)

【摘要】 目的 研究实验用 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类基因的多态性。方法 分别采集 15 头 SPF 大白猪和 22 头长白猪抗凝血, 分离外周血淋巴细胞, 提取总 RNA, 反转录后 RT-PCR 扩增 *DQB1*、*DRB1* 和 *DQA* 基因并进行测序, 分析获得的 SLA II 类等位基因序列多态性。结果 3 个基因共获得 25 个等位基因, 包括 8 个 *DQB1*, 10 个 *DRB1* 和 7 个 *DQA*, 全部获得 ISAG SLA 命名委员会的官方命名, 其中 3 个等位基因首次提交完整序列, 命名为 *DQB1**02:12 (KU754590)、*DQB1**02:03 (KU754591) 和 *DRB1**06:07 (KU754601), 3 个 *DQA* 等位基因为新发现等位基因。SPF 大白猪和长白猪 *DQB1* 等位基因与外源性抗原结合的 15 个氨基酸中, 共有 5 个氨基酸具有高度保守性; *DRB1* 等位基因的 16 个外源性抗原识别位点中, 仅 1 个位点高度保守; *DQA* 等位基因 19 个抗原结合位点中, 有 11 个高度保守。SLA II 类基因氨基酸序列分子进化树表明, 3 个基因分别聚为两大类, 与国外 Yucatan 小型猪具有较近的亲缘关系, 而与其他猪种未表现明显遗传距离相隔。结论 成功鉴定了大白猪和长白猪的 25 个 SLA II 类等位基因, 发现其具有较为丰富的多态性, 所获得 SLA II 类等位基因在其他品种猪也广泛分布, 具有多样性, 这一研究结果对大白猪和长白猪发展为经典实验动物模型具有重要作用。

【关键词】 猪白细胞抗原; SPF 大白猪; SPF 长白猪; SLA II 类等位基因; 多态性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0404-10

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.011

Polymorphism research on SLA class II genes in Canadian SPF Yorkshire and Landrace pigs

JIANG Xin-jie^{1,2}, QUAN Jin-qiang³, LI Chang-wen², LU Xiao-ye², CHEN Hong-yan², YANG Chun-wen^{1*}, GAO Cai-xia^{2*}

(1. College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, China; 2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150069; 3. College of Animal Science and Technology of Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the polymorphism of SLA class II genes in Canadian SPF Yorkshire and Landrace pigs. **Methods** Blood samples were obtained from 15 SPF Yorkshire and 22 Landrace pigs for isolation of peripheral blood mononuclear cells respectively, and the *DQB1*, *DRB1* and *DQA* genes were amplified by PCR after reverse transcription. SLA class II genes were obtained by analyzing the direct and cloning result. The polymorphism of alleles was analyzed using the DNAsp 5.0 software. **Results** A total of 25 alleles were identified at three

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:31502039)。

【作者简介】 江新杰(1989 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物学。E-mail: jiangxinjie777@163.com

【通讯作者】 杨春文(1959 -), 男, 教授, 研究方向: 动物生态学。E-mail: yangchunwen@sina.com;

高彩霞(1982 -), 女, 助理研究员, 研究方向: 动物免疫遗传学, E-mail: gaocx78@163.com

* 共同通讯作者

genes, including eight *DQB1*, ten *DRB1* and seven *DQA*, and three alleles were submitted the complete sequences for the first time. The official allele names were assigned as *SLA-DQB1* * 0212 (KU754590), *SLA-DQB1* * 0203 (KU754591) and *DRB1* * 06:07 (KU754601) by the SLA Nomenclature Committee. Three novel *DQA* alleles were discovered. Five of the 15 amino acids, one of the 16 amino acids and 11 of the 19 amino acids, which bind processing antigens, showed well conserved among the alleles of *DQB1*, *DRB1* and *DQA* genes in the SPF Yorkshire and Landrace pigs, respectively. Neighbor-joining tree showed that the three genes were divided into two clusters, respectively. There was a close relationship between SPF Yorkshire and Landrace pigs and foreign Yucatan miniature pigs, and it showed no obvious genetic distance with other pigs. **Conclusions** A total of 25 SLA class II alleles have been identified successfully in this study, and there are more abundant polymorphism for them. There is a widely distribution for SLA class II alleles identified in this study in other pig breeds. It is critical for the eventual future use of SPF Yorkshire and Landrace pigs as classical laboratory animal models.

[Key words] Swine leukocyte antigen; SLA; SPF Yorkshire; SPF Landrace; SLA class II alleles; Polymorphism
Corresponding author: YANG Chun-wen. E-mail: victorzheng@sina.com; GAO Cai-xia. E-mail: gaocx78@163.com.

猪主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 又称猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigen, SLA), 位于猪第 7 号染色体^[1], 属于猪重要的免疫应答基因群。自 1970 年首次发现 SLA 以来, SLA 的研究地位仅次于鼠和人类 MHC 研究^[2,3]。在免疫多态性 (immune-polymorphism database, IPD)-MHC 数据库^[4] (Release 1.2.0 16/05/2008) 中, 已提交了 164 个 SLA II 类等位基因, 包括 38 个 α 链等位基因 (13*DRA*、20*DQA* 和 5*DMA*) 和 126 个 β 链等位基因 (44*DQB1* 和 82*DRB1*), 到目前尚未更新。SLA II 类基因成员众多, 只有 *SLA-DQ* 及 *SLA-DR* 基因在蛋白质水平表达, 被证明存在丰富的多态性, 而且这种多态性与 SLA II 类抗原的生物学特性密切相关。关于 *DQB1*、*DRB1*、*DQA* 基因的研究主要集中在第 2 外显子^[5-8]。近年来研究表明, SLA 不同基因型的猪群对疾病的抵抗能力不同^[9,10]。因此, 研究 SLA 基因型与多态性, 对猪的抗病育种具有重要的意义。

大白猪 (Yorkshire) 和长白猪 (Landrace) 是世界上分布最广的主导瘦肉型猪^[11-13]。2014 年, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所从加拿大引进 100 头无猪瘟、无猪繁殖与呼吸综合征、无猪传染性胃肠炎和猪流感等疫病的 SPF 猪, 其中大白猪和长白猪各 50 头, 包含 32 窝大白猪和 28 窝长白猪。贺希文等^[14,15]从群体遗传学角度对其进行分析, 发现引进的 SPF 大白猪和长白猪遗传结构比国内部分大白猪和长白猪更为稳定, 可作为实验动物模型来研究病原体感染机制和疫苗评价等科学试验, 分析这两猪群的 SLA 基因及其多态性可减少遗传背景差异对试验结果的干扰, 提高精确性。本研究旨在通过 SBT 方法获得 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类基因,

并对其多态性进行研究, 为更好利用 SPF 猪的优良遗传资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

37 份抗凝血样品分别采自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所从加拿大引进的 SPF 大白猪和长白猪, 其中大白猪 15 头 (4 δ , 11 η), 长白猪 22 头 (6 δ , 16 η); 猪外周血淋巴细胞分离液购自中国天津瀚洋生物制品科技有限责任公司; 大肠埃希菌 DH5 α 购自中国北京天根生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒、质粒小量抽提试剂盒和 DNA 胶回收纯化试剂盒均为中国爱思进生物技术 (杭州) 有限公司产品; pMD18-T、La. Taq 酶、PCR Taq Mix、DL 2000 DNA Marker 以及反转录试剂盒购自中国宝生物 (大连) 有限公司; 琼脂糖购自中国北京全式金生物技术有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物均为英国 OX-OID 公司产品; 琼脂粉购自中国北京奥博星生物技术有限责任公司。引物由中国吉林库美生物科技有限公司合成。

1.2 RT-PCR

对抗凝血分离外周血淋巴细胞, RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板, 扩增 SLA II 类基因。PCR 反应体系为 30 μ L: cDNA 3 μ L, 上下游引物 (25 μ mol/L) 各 1.2 μ L, 2 \times PCR GC buffer 15.0 μ L, Taq 酶 0.3 μ L, dNTP 5 μ L, ddH₂O 4.3 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。终产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。引物设计参照文献^[16], 见表 1。

表 1 SLA II 类基因的扩增引物

Tab. 1 PCR primers of the SLA class II genes

基因 Genes	引物名称 Primer names	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	片段大小/bp Number of bases
<i>SLA-DQB1</i>	DQB-F	TGACTACCATTACTTCTTCGT	1103
	DQB-R	TCTTGCACAGTCTGTTGAGG	
<i>SLA-DRB1</i>	DRB-F	TGTCCTCTCCTGTTCTCCA	907
	DRB-R	AGGAGGCAGAGCATAGCAG	
<i>SLA-DQA</i>	DQA-F	AACTCCGAAGCAACAGC	830
	DQA-R	ACCTTCCCTTCTGGACTGTG	

1.3 PCR 产物直接测序和克隆测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶鉴定后,送北京六合华大基因有限公司测序。分析测序结果,将杂合序列通过 DNA 胶回收试剂盒回收并纯化 PCR 产物,连接 pMD18-T 载体,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 扩大培养,约 3 h 后对菌液进行 PCR 鉴定,阳性菌液继续培养直到菌液浓度达到测序要求,取 1 mL 送至哈尔滨博仕生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 序列分析方法

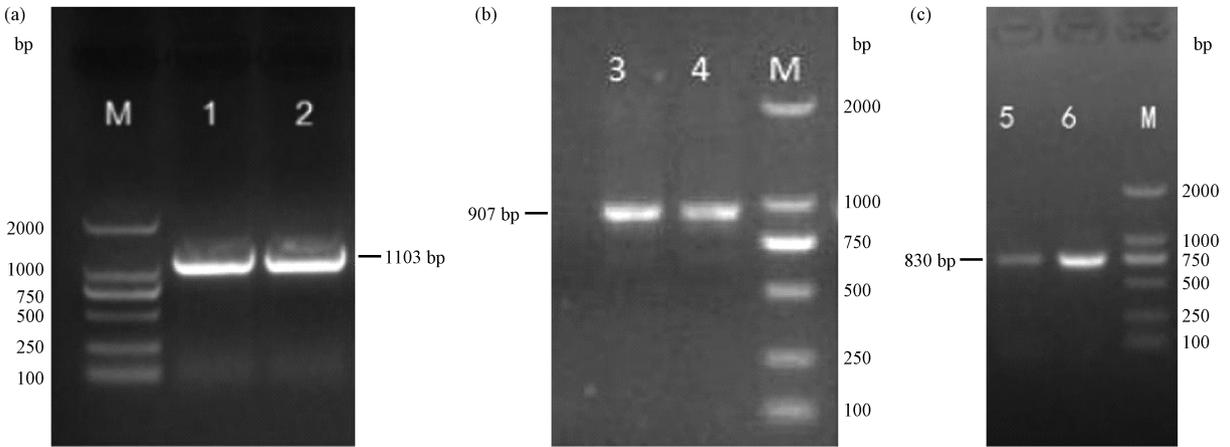
获得的序列使用 Chromas 2.5 进行人工校对,其他引用序列引自 IPD-MHC 数据库,利用 MEGA

7.0 软件进行序列分型、氨基酸多态性分析和遗传距离分析。使用 DNAsp 5.0 软件分析核苷酸多态性及计算核苷酸多样性(Pi)。根据序列比对和进化树分析,将新等位基因提交 ISAG SLA 命名委员会给予官方命名。

2 结果

2.1 SLA II 类基因的扩增

RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,*DQB1*、*DRB1* 和 *DQA* 均有清晰的特异性条带,片段大小与预期结果一致(图 1),表明成功获得 SLA II 类 3 个基因。



注:M:DL 2000 DNA marker;1~2:*DQB1* 基因扩增产物;3~4:*DRB1* 基因扩增产物;5~6:*DQA* 基因扩增产物。

图 1 SLA II 类基因的 PCR 扩增结果

Note. M:DL 2000 DNA marker; 1~2:The amplification products of *DQB1* gene; 3~4:The amplification products of *DRB1* gene; 5~6:The amplification products of *DQA* gene.

Fig. 1 Amplification results of SLA class II genes

2.2 SLA II 类等位基因序列分析

分析 22 头 SPF 长白猪和 15 头大白猪 *DQB1*、*DRB1* 和 *DQA* 序列,共获得 25 个等位基因,包括 8 个 *DQB1*,10 个 *DRB1* 和 7 个 *DQA*(表 2),*DQB1* * 02:01、*DQB1* * 06:01、*DRB1* * 10:01、*DQA* * 01:01 和 *DQA* * 02:02:02 等位基因为大白猪和长白猪共享等位基因。所有等位基因序列提交 GenBank 数

据库获得登录号,同时提交到 ISAG SLA 命名委员会获得官方命名(表 3)。其中,*DQB1* * 02:12 和 *DRB1* * 06:07 为未确定的等位基因,*DQA* * ys01、*DQA* * ys02 和 *DQA* * lr03 为新发现的等位基因,此外,3 个等位基因首次提交 CDS 全长序列,ISAG SLA 命名委员将其命名为:*DQB1* * 02:12 (KU754590),*DQB1* * 02:03 (KU754591) 和 *DRB1* *

06:07(KU754601)。每个等位基因均包含一个完整的开放阅读框。

SLA II 类等位基因在大白猪和长白猪中的分布频率如图 2。大白猪中出现频率最高的 SLAII 类等位基因分别为 *DQB1* * 06:01、*DRB1* * 10:01 和 *DQA* * 01:01, 等位基因频率分别为 46.67%、46.67% 和 43.33%。长白猪中出现频率最高的为 *DQB1* * 07:

01、*DRB1* * 10:01 和 *DQA* * 1r03, 等位基因频率分别为 43.18%、40.91% 和 43.18%。尽管 *DQB1* * 06:01 在长白猪中不是频率最高基因型, 但它是大白猪和长白猪中分布最广的基因型。同样, *DRB1* * 10:01 和 *DQA* * 01:01 也是在大白猪和长白猪中分布广泛的 SLA II 类等位基因。

表 2 实验用 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类等位基因

Tab.2 SLA class II alleles of the experimental SPF Yorkshire and Landrace pigs

猪编号 Pig No.	性别 sex	SLAII 等位基因 SLA class II alleles		
		<i>SLA-DQB1</i>	<i>SLA-DRB1</i>	<i>SLA-DQA</i>
长白猪 Landrace				
2906	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
2922	♀	06:01	10:01	01:01
2959	♀	06:01	10:01	01:01
2995	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:02	01:01, 1r03
3037	♂	07:01	06:01	1r03
3065	♂	06:01, 07:01	10:01, 06:02	01:01, 1r03
3093	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
3100	♂	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
3111	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
3112	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
3141	♀	07:01	06:02	1r03
3216	♀	06:01, 07:01	10:01, 06:02	01:01, 1r03
3219	♀	02:03, 06:01	08:01, 10:01	02:02, 02:01, 01
3220	♀	06:01	10:01	01:01
3222	♀	06:01	10:01	01:01
3231	♂	07:01, 02:03	06:01, 08:01	1r03, 02:02, 02
3241	♂	06:01, 07:01	10:01, 06:01	01:01, 1r03
3242	♂	02:01, 07:01	05:01, 06:01	02:03, 1r03
3253	♀	02:03, 07:01	08:01, 06:01	02:02, 02, 1r03
3255	♀	02:03, 02:01	08:01, 05:01	02:02, 02, 02, 03
3257	♀	07:01, 02:03	06:01, 08:01	1r03, 02:02, 02
3313	♀	07:01	06:02	1r03
大白猪 Yorkshire				
4975	♀	06:01	10:01	01:01
5045	♀	06:01, 04:01, 01	10:01, 02:01	01:01, 02:02, 01
5075	♂	06:01, 04:01, 01	10:01, 02:01	01:01, 02:02, 01
5076	♂	04:01, 01, 06:01	02:01, 10:01	02:02, 01, ys01
5187	♀	02:02, 06:01	04:02, 10:01	02:02, 02, 01, 01
5194	♂	06:01, 04:01, 01	10:01, 02:01	01:01, 02:02, 01
5208	♀	09:01, 06:01	09:01, 10:01	ys02, 01, 01
5227	♀	09:01, 06:01	09:01, 10:01	ys02, 01, 01
5238	♀	02:01, 04:01, 01	02:01	02:02, 01
5247	♀	02:01, 06:01	07:01, 10:01	02:02, 01, 01, 01
5327	♂	02:12, 04:01, 01	06:07, 02:01	01:01, 02:02, 01
5341	♀	09:01, 06:01	09:01, 10:01	ys02, 01, 01
5343	♀	09:01, 06:01,	09:01, 10:01	ys02, 01, 01
5344	♀	02:02, 06:01	04:02, 10:01	02:02, 02, 01, 01
5346	♀	02:02, 06:01	04:02, 10:01	02:02, 02, 01, 01

表 3 SLA II 类等位基因 ISAG 命名和 GenBank 登录号

Tab. 3 Official ISAG SLA class II alleles designation and GenBank accession numbers

基因名称 Allele names	登录号 Accession No.	本研究品种 In this study	IPD-MHC 数据库中其他品种 Breed of IPD-MHC Database
<i>DQB1</i> * 02 :01	KU754584	Yorkshire, Landrace	Yucatan; NIH; Hanford; Sinclair; Meishan; Gettingen; Crossbred; Cell line "MPK\PK15\PK13";
<i>DQB1</i> * 02 :02	KU754585	Yorkshire	Yucatan; Banna; Large White; Crossbred;
<i>DQB1</i> * 0401 : 01	KU754586	Yorkshire	NIH; Large white; Chinese Bama;
<i>DQB1</i> * 06 :01	KU754587	Yorkshire, Landrace	Yucatan; Clawn; Korean native pig; Crossbred;
<i>DQB1</i> * 07 :01	KU754588	Landrace	Sinclair; Cell line "ESK-4";
<i>DQB1</i> * 09 :01	KU754589	Yorkshire	Cell line "LLC-PK1";
<i>DQB1</i> * 02 :12	KU754590	Yorkshire	
<i>DQB1</i> * 02 :03	KU754591	Landrace	Landrace × Duroc;
<i>DRB1</i> * 02 :01	KU754592	Yorkshire	Hanford; Sinclair; Westran; Large white; Landrace; Cell line "NIH/MGH";
<i>DRB1</i> * 04 :02	KU754593	Yorkshire	Banna; Swedish Yorkshire; Large White
<i>DRB1</i> * 05 :01	KU754594	Landrace	Yucatan; Chinese Bama;
<i>DRB1</i> * 06 :01	KU754595	Landrace	Cell line "PK15\PK13\SK-RST";
<i>DRB1</i> * 06 :02	KU754596	Landrace	Yucatan;
<i>DRB1</i> * 07 :01	KU754597	Yorkshire	Sinclair; Large white; Shaziling
<i>DRB1</i> * 08 :01	KU754598	Landrace	Canadian Yorkshire; Chinese Bama;
<i>DRB1</i> * 09 :01	KU754599	Yorkshire	Claw; Duroc; Yucatan; Crossbred;
<i>DRB1</i> * 10 :01	KU754600	Yorkshire, Landrace	Meishan; Large White; Chinese Bama; Cell line "MPK\ST"
<i>DRB1</i> * 06 :07	KU754601	Yorkshire	Landrace;
<i>DQA</i> * 02 :02 :01	KX786942	Yorkshire	Yucatan; NIH;
<i>DQA</i> * ys01	KX786943	Yorkshire	
<i>DQA</i> * ys02	KX786944	Yorkshire	
<i>DQA</i> * 02 :02 :02	KX786938	Yorkshire; Landrace	Yucatan; Banna; Large white;
<i>DQA</i> * 01 :01	KX786939	Yorkshire; Landrace	Large white; Korean native pig;
<i>DQA</i> * 02 :03	KX786940	Landrace	Yucatan;
<i>DQA</i> * lr03	KX786941	Landrace	

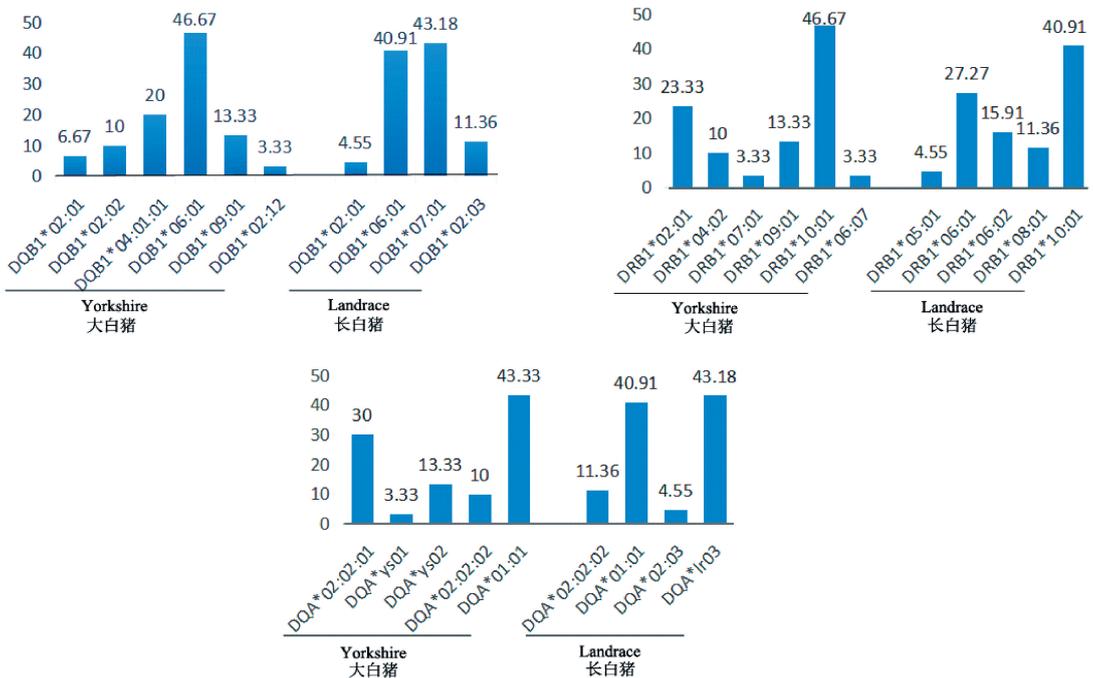


图 2 SLAII 类等位基因在大白和长白猪中的分布频率

Fig. 2 The frequency distribution of SLA class II alleles in Yorkshire and Landrace pigs

2.3 SLA II 类基因序列多态性分析

对获得的 SLA II 类等位基因序列进行多态性分析(表 4),发现在所有的序列中,DRB1 序列的多样性($P_i = 0.051$)明显高于 DQB1 和 DQA 序列;DQB1 具有最高的 G + C 含量($G + C = 60.5\%$)。由于 II 类等位基因多态性集中在第 2 外显子,因此,

比较获得的 SLA II 类等位基因与 IPD-MHC 数据库中已提交的 SLA II 类等位基因第 2 外显子(表 5),发现非同义突变位点数明显高于同义突变位点数,此外,DQB1 第 2 外显子的多样性高达 0.0578,在 3 个 SLA II 类基因中最高。

表 4 SLAII 类等位基因序列多态性分析

Tab. 4 Polymorphism analysis of SLA class II allele sequences

等位基因 Alleles	核苷酸总数 Total number of nucleotides	核苷酸变 异位点数 Variable sites	单态位点 Singleton variable sites	简约信息位点 Parsimony informative sites	氨基酸变 异位点 Amino acid variable site	同义突变 Synonymous mutation	非同义突变 Nonsynonymous mutations	G + C 比 G + C ratio
SLA-DQB1	786	56	19	37	27	13	14	60.5
SLA-DRB1	801	109	46	63	53	19	34	59.2
SLA-DQA	768	29	6	23	18	3	15	51.7

表 5 SLAII 类等位基因第 2 外显子序列多态性分析

Tab. 5 Polymorphism analysis of SLA class II exon 2 gene sequences

等位基因 Alleles	核苷酸 总数 Total number of nucleotides	核苷酸变 异位点数 Variable sites	单态位点 Singleton variable sites	简约信 息位点 Parsimony informative sites	氨基酸 变异位点 Amino acid variable site	同义 突变 Synony- mous mutation	非同义 突变 Nonsy- nonymo us mutations	G + C 比 G + C ratio	多样性 Diversity	等位基 因总数 The number of alleles	数据来 源 Data sources
SLA-DQB1	270	37	17	20	24	11	13	62.7	0.0578	8	本研究
	—	47	11	36	27	5	22	62.2	0.0584	20	NCBI
SLA-DRB1	270	81	37	44	39	17	22	57.9	0.1105	10	本研究
	—	92	11	81	42	3	39	57.7	0.1145	27	NCBI
SLA-DQA	249	23	8	15	13	5	8	47.8	0.0397	7	本研究
	—	33	7	26	19	4	15	47.6	0.0437	22	NCBI

比较大白猪和长白猪 SLA II 类等位基因与 IPD-MHC 数据库中具有 CDS 全长的 SLA II 类等位基因(图 3),发现在 $\beta 1$ 功能区,DQB1 分子与外源性抗原结合的 15 个关键氨基酸中^[17],有 5 个氨基酸在大白猪和长白猪中具有高度的保守性,即 7(F)、66(Q)、70(E)、74(V)和 79(Y)。DRB1 基因与 DQB1 基因结构类似,然而在 16 个抗原识别位点中^[17],仅有一个氨基酸 78(N)在所有的 DRB1 等位基因中完全保守。19 个 DQA 抗原结合位点中^[18],有 11 个氨基酸在大白猪和长白猪中具有高度的保守性,分别为 7(Y)、10(N)、23(H)、31(F)、42(W)、52(S)、53(F)、57(Q)、58(A)、61(N)和 75(R)。

2.4 SLA II 类等位基因系统进化树分析

将大白猪和长白猪获得的 SLA II 类等位基因与 IPD-MHC 数据库中提交的具有 CDS 全长的 SLA II 类等位基因氨基酸序列绘制分子进化树。根据其结果,将新等位基因进行等位基因组归类,由 ISAG

SLA 命名委员会给予官方命名。除去 DQB1 * 05:03 等位基因,其余 DQB1 等位基因主要聚为两大类,一个分支中大白猪和长白猪 DQB1 * 02XX 与 Yucatan 小型猪的同源性更高,共享两个等位基因(DQB1 * 02:01 和 02:02);两猪群分布最广的 DQB1 * 06:01 等位基因在 Yucatan、Clawn 和韩国本地猪中也存在。另一个分支中 DQB1 * 09:01 与 Yucatan 小型猪遗传距离更为接近(图 4-A)。DRB1 等位基因同样聚为两支,DRB1 * 09:01 基因在 Meishan 猪和其他系大白猪中同样存在,与中国太湖猪具有较近的亲缘关系;DRB1 * 05:01 和 DRB1 * 06:01 在 Yucatan 小型猪中存在;两猪群分布最广的等位基因 DRB1 * 10:01 仅在其他系长白猪中获得(图 4-B)。此外,一些猪源细胞系和长白猪、大白猪共享 DQB1 和 DRB1 等位基因较为普遍。DQA 基因同样明显聚为两大类,DQA * 02XX 单独聚成一个分支,新发现的等位基因 DQA * ys01 与其他系长白猪获得的 DQA * 0204 等位基因具有很高的同源性,表

(A)	1	11	21	31	41	51	61	71	81
<i>DQB1*02:01</i>	QDFVYQFKFE	CYFFNGTQRV	RGVARWVYNQ	EEHVRFDSDV	GEFRAVTFPLG	RPTADYWNQG	KDWLEQKRAE	VDTWCKHNYQ	IEEGTTLQRR
<i>DQB1*02:02</i>Y.....L.....RD.....E.....L.....
<i>DQB1*04:01:01</i>V.....G.....Y.....WS.D.YI.....FL.....M.....Y.....D.....L.....EA.....L.....
<i>DQB1*06:01</i>G.....H.T.YI.....D.....F.....T.....L.....
<i>DQB1*07:01</i>LLT.YI.....N.....Y.....D.....T.....L.....
<i>DQB1*09:01</i>V.....G.....L.T.FI.....YA.....Y.....D.....S.....I.....T.....L.....
<i>DQB1*02:12</i>V.....G.....Y.....Y.....D.....E.....L.....
<i>DQB1*02:03</i>G.....Y.....Y.....L.....M.....R.....
<i>DQB1*01:01</i>F.....L.....YI.....LL.....Y.....E.....S.....T.....L.....
<i>DQB1*03:01</i>F.....G.....Y.....L.....YI.....L.....E.....S.....S.....M.....R.....
<i>DQB1*03:03</i>V.....G.....Y.....L.....YI.....L.....E.....S.....S.....L.....
<i>DQB1*04:01:02</i>V.....G.....Y.....WS.D.YI.....FL.....M.....Y.....D.....L.....EA.....L.....
<i>DQB1*04:02:we01</i>F.....G.....Y.....WS.D.YI.....FL.....M.....Y.....D.....L.....EA.....L.....
<i>DQB1*04sk51</i>F.....G.....Y.....WS.D.YI.....Y.....M.....Y.....S.....EA.....L.....S.....
<i>DQB1*05:01</i>V.....Y.....LL.YI.....YA.....Y.....D.....E.....T.....L.....
<i>DQB1*05:02</i>F.....G.....LLT.YI.....YA.....D.....E.....T.....L.....
<i>DQB1*05:03</i>F.....G.....LLT.YI.....YA.....M.....Y.....A.....S.....T.....L.....A.....
<i>DQB1*08:01</i>L.T.YI.....YA.....Y.....A.....S.....I.....T.....L.....
<i>DQB1*08ch01</i>L.T.YI.....YA.....Y.....A.....S.....I.....T.....L.....
<i>DQB1*es51</i>V.....G.....Y.....S.D.YI.....YA.....Y.....D.....S.....T.....L.....

(B)	1	11	21	31	41	51	61	71	81
<i>DRB1*01:01</i>	PHFLFLVKDE	CHFFNGTQERV	RLLRQKQYNG	EEHVRFDSDV	GEYRAVTELG	RPDAKYWNSQ	KDLLEGMRRAA	VDTYCRHNYR	ILDFTLVPRR
<i>DRB1*04:02</i>G.....A.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....S.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....S.....E.....
<i>DRB1*05:01</i>H.....H.....R.....L.....DRYF.....F.....F.....F.....E.....F.....S.....I.....D.....S.....S.....I.....
<i>DRB1*06:01</i>F.....M.....G.....S.....Y.....L.....YL.....F.....L.....E.....R.....E.....K.....E.....G.....V.....S.....S.....
<i>DRB1*06:02</i>	Q.....F.....M.....G.....S.....Y.....YL.....F.....L.....F.....M.....K.....V.....
<i>DRB1*07:01</i>L.....S.....FMERH.....S.....I.....E.....K.....E.....TS.....
<i>DRB1*08:01</i>Y.....L.....F.....ER.....Y.....V.....D.....R.....E.....TS.....
<i>DRB1*09:01</i>G.....F.....Q.....ER.....F.....NY.....R.....E.....TS.....
<i>DRB1*10:01</i>F.....M.....E.....F.....DRH.....IL.....E.....D.....R.....I.....R.....E.....S.....
<i>DRB1*ys01</i>	Q.....F.....M.....G.....F.....Y.....YL.....F.....L.....F.....M.....K.....V.....
<i>DRB1*01:02</i>TS.....
<i>DRB1*02:01</i>H.....L.....F.....ER.....FL.....D.....R.....E.....
<i>DRB1*03:01</i>H.....Q.....L.....F.....R.....N.....C.....Y.....R.....R.....E.....
<i>DRB1*04:01</i>G.....A.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....E.....
<i>DRB1*04:03</i>R.....A.....F.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....E.....
<i>DRB1*04:04</i>G.....A.....F.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....E.....
<i>DRB1*04ga01</i>G.....A.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....S.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....S.....E.....
<i>DRB1*04ta01</i>G.....A.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....E.....
<i>DRB1*05:02</i>H.....H.....R.....L.....DRYF.....Y.....F.....I.....D.....S.....S.....I.....
<i>DRB1*05ch01</i>H.....H.....R.....L.....DRYF.....F.....F.....I.....D.....S.....S.....I.....
<i>DRB1*06:05Q</i>	Q.....F.....M.....G.....S.....Y.....YL.....F.....L.....F.....M.....K.....V.....
<i>DRB1*09ta01</i>G.....F.....Q.....ER.....F.....NY.....R.....E.....TS.....
<i>DRB1*10jh01</i>F.....M.....E.....F.....F.....DRYF.....IL.....E.....D.....R.....I.....R.....E.....S.....
<i>DRB1*11:01</i>	T.....H.....S.....R.....F.....DRYF.....F.....F.....E.....F.....E.....L.....F.....S.....T.....Y.....G.....V.....F.....G.....S.....
<i>DRB1*11:02</i>R.....A.....R.....DRYF.....D.....Y.....F.....E.....F.....L.....F.....R.....T.....G.....V.....S.....G.....S.....
<i>DRB1*13:01</i>ER.....I.....K.....E.....V.....
<i>DRB1*14:01</i>H.....S.....R.....F.....DRYF.....F.....F.....E.....F.....M.....K.....E.....V.....E.....S.....E.....

(C)	1	11	21	31	41	51	61	71	81
<i>DQA*02:02:01</i>	ADHVASYGLN	VYQSYGPGSY	YTHEFDGDEE	FYVDLGGKET	VWQLPLFSKF	RSFDPQGALR	NIATAKHLN	ILIKRSNNTA	AVM
<i>DQA*ys01</i>S.....Q.....E.....T.....
<i>DQA*ys02</i>Q.....E.....T.....
<i>DQA*02:02:02</i>V.....G.....L.....T.....T.....
<i>DQA*01:01</i>F.....E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*02:03</i>E.....T.....
<i>DQA*lr03</i>E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*01:02</i>R.....F.....Q.....E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*01:03</i>R.....Q.....E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*01ch01</i>R.....Q.....E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....C.....
<i>DQA*01my01</i>F.....E.....R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*02:01</i>E.....T.....
<i>DQA*02:04</i>Q.....E.....T.....
<i>DQA*02cs01</i>F.....E.....Y.....
<i>DQA*02jh01</i>Q.....E.....T.....T.....
<i>DQA*02xu01</i>R.....E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*03:01</i>E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*03ta01</i>E.....R.....L.....V.....T.....
<i>DQA*03we01</i>E.....T.....L.....V.....T.....
<i>DQA*04:01</i>S.....Q.....E.....K.....T.....V.....G.....L.....T.....T.....
<i>DQA*04ta01</i>P.....S.....D.....Q.....E.....K.....T.....V.....G.....L.....T.....T.....
<i>DQA*w05ch01</i>E.....R.....V.....G.....L.....T.....T.....

图 3 SLAII 类基因 $\beta 1$ 功能区氨基酸序列比对Fig. 3 Amino acid sequence alignment of SLA class II gene $\beta 1$ functional domain

明 *DQA*ys01* 属于 02 等位基因组; *DQA*ys02* 则与 *DQA*0401* 具有最为接近的遗传距离, 属于 *DQA*04* 等位基因组, 与云南版纳猪亲缘关系较近。 *DQA*lr03* 属于 *DQA*01* 等位基因组, 与 Yucatan 小型猪具有较近的亲缘关系 (图 4-C)。

3 讨论

DQB1、*DRB1* 和 *DQA* 基因是具有功能作用的 SLA II 类基因, 本研究通过对 15 头 SPF 大白猪和 22 头长白猪这 3 个基因进行克隆和测序, 共获得 25 个等位基因 (8 个 *DQB1*, 10 个 *DRB1* 和 7 个 *DQA*),

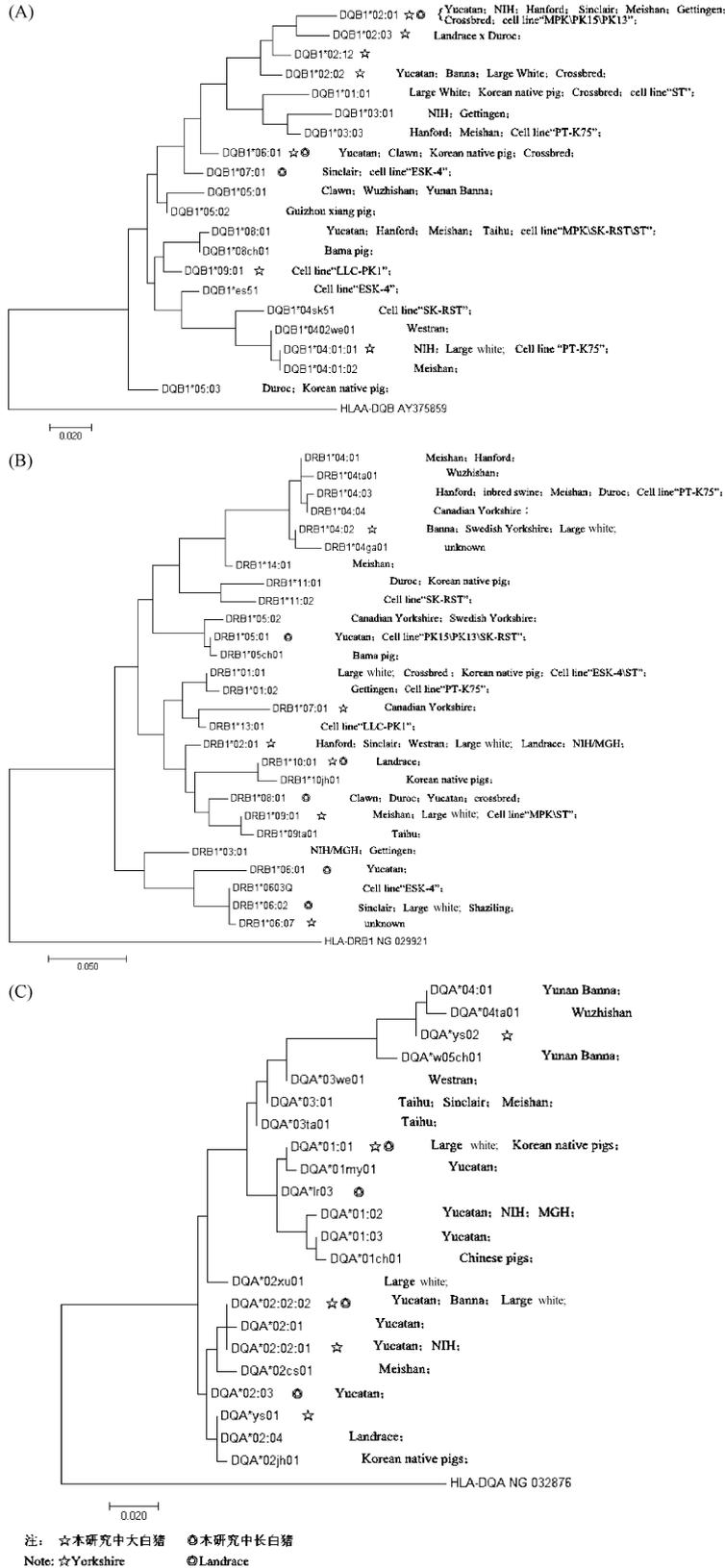


图 4 SLA II 类基因序列亲缘进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of the SLA class II gene sequences

并获得了 ISAG SLA 命名委员会的官方命名, 补充了 IPD-MHC 中的数据资源。由于 SLA 不同等位基

因与疾病具有密切的相关性, 且 CD4 + 辅助性 T 细胞的免疫应答取决于 MHC 经典 II 类分子与抗原的

结合,本研究对实验用 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类等位基因的鉴定,对其发展为经典实验动物模型具有至关重要的作用。

编码 SLA II 类抗原 β 链的基因座 *SLA-DQ* 和 *DR* 存在显著的多态性^[19-23],而这种多态性与 SLA II 类抗原的生物学特性又是密切相关的,因而对 β 链基因研究较多^[24]。其中,*DRB* 和 *DQB* 基因在 SLA II 类 β 链基因中研究较早,发现其多态性主要集中在编码区的第 2 外显子,此编码区参与构成 II 类蛋白抗原肽结合槽,而从本文变异位点统计结果也发现,非同义突变位点数明显高于同义突变位点数,因此意味着可以结合多样的抗原肽表位。早在 1990 年, Gustafson 等^[25]从 NIH 小型猪中获得 *DQB* 等位基因序列,发现猪 *DQB* 基因与人 *DQB1* 基因同源性较高。本研究发现大白猪和长白猪 *DQB1* 基因在 $\beta 1$ 功能区与外源性抗原结合的 15 个氨基酸中,有 5 个氨基酸具有高度的保守性,而在巴马小型猪中同样发现这 5 个氨基酸为高度保守氨基酸^[17];在 *DRB1* 基因的 16 个抗原识别位点中,仅有一个氨基酸 78(N)在所有的等位基因中完全保守,与巴马小型猪和荷包猪的报道一致^[17,26],这可能表明 SPF 大白猪、长白猪和巴马小型猪结合外源性抗原的能力相同。在 SLA II 类抗原 β 链与抗原结合的氨基酸位点中,*DQB1* 等位基因的保守性高于 *DRB1* 等位基因。 $\beta 1$ 功能区是承担 SLA II 类分子抗原多肽结合与递呈的功能区^[27],这些与抗原结合的氨基酸位点可能在进化过程中不断与不同抗原多肽结合,导致氨基酸位点发生突变。

α 链基因的多态性没有 β 链基因明显^[28]。但 *DQA* 等位基因在某些特定的位点处表现出了中等程度的多态性,而这些特定位点与细胞外结构域的起点直接相关^[29]。本研究中 SPF 大白猪和长白猪 *DQA* 与抗原肽结合的 19 个位点中,有 11 个氨基酸具有高度的保守性,8 个氨基酸发生突变,其多态性高于八眉猪 *DQA* 基因,八眉猪仅有 5 个氨基酸发生突变^[18]。此外两猪群也高于广东大白猪和长白猪 *DQA* 基因,这些猪群遗传多样性匮乏可能与长期人工定向选育有关^[30],本研究中 SPF 大白猪和长白猪 *DQA* 基因的遗传多样性较为丰富,可能蕴藏着更多的遗传抗性资源。

针对 *DQB1*、*DRB1* 和 *DQA* 基因中的单个外显子构建遗传进化树的聚类分析已经有较多报道^[30-34],姜力飞等^[31]通过对合作猪 SLA-DQB 基因

第 3 外显子的 NJ 树聚类分析发现,合作猪 *DQB* 基因在进化过程中最初可能是由 2 类主要单倍型演化而来,孙俊丽等^[33]鉴定了五指山猪近交系中 *DRB* 基因呈现高度的同源性,张国华^[34]等发现 *DQA* 第 2 外显子在各个猪品种之间的同源性都较高,本研究不仅分析了单一外显子的遗传距离,并且通过对 SPF 大白猪和长白猪 *DQB1*、*DRB1* 和 *DQA* 等位基因与 IPD-MHC 数据库中所有已提交 CDS 全长的序列构建进化树,综合分析了 SLA II 类基因在各猪种之间的遗传距离与亲缘关系。发现 SPF 大白猪和长白猪 SLA II 类基因与 Yucatan 小型猪具有更为接近的起源。一些猪源细胞系与长白猪、大白猪共享 *DQB1* 和 *DRB1* 等位基因,表明大白猪和长白猪可能参与了细胞系的构建。此外,有研究表明兰州商品猪与其他品种猪遗传距离较远^[32],而 SPF 大白猪和长白猪的 SLA II 类基因在进化树中的分布较为广泛,与其他品种猪未表现明显的遗传距离相隔,因此作为实验动物模型应用更为广泛。

SLA 新等位基因的鉴定对 IPD-MHC 数据库的丰富是非常重要的,可为科学研究提供更多有用的数据。鉴定 SPF 大白猪和长白猪的 SLA II 类抗原的等位基因,对其应用为实验动物模型具有重要意义。此外,病毒的抗原表位具有严格的 SLA 限制性,因此鉴定 SLA 等位基因可用于筛选病毒潜在的 T 细胞表位。

参 考 文 献

- [1] Geffrotin C, Popescu CP. Assignment of MHC in swine to chromosome 7 by in situ hybridization and serological typing [J]. *Ann Génét*, 1984, 27: 213-219.
- [2] 冯磊, 赵德, 高凤山. 猪主要组织相容性复合体研究进展 [J]. *生命科学*, 2012, 24(7): 686-690.
- [3] 潘孝成. 猪 MHC 的分子遗传学研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(10): 95-99.
- [4] Ho CS, Lunney JK, Ando A, et al. Nomenclature for factors of the SLA system, update 2008 [J]. *Tissue Antigens*, 2009, 73: 307-315.
- [5] Huang XY, Yang QL, Yuan JH, et al. Polymorphism and haplotype analyses of swine leukocyte antigen DQA exons 2, 3, 4, and their associations with piglet diarrhea in Chinese native pig [J]. *Genet Mol Res*. 2015, 14(3):10461-10472.
- [6] Fang M, Braunschweig M, Hu X, et al. Genetic variation of exon 2 of SLA-DQB gene in Chinese pigs [J]. *Biochem Genet*, 2005, 43(3-4):119-125.
- [7] Thong LM, Choi H, Kwon OJ, et al. Systematic analysis of swine leukocyte antigen-DRB1 nucleotide polymorphisms using genomic DNA-based high-resolution genotyping and identification of new

- alleles [J]. *Tissue Antigens*, 2011, 77(6): 572–583.
- [8] Yang QL, Huang XY, Zhao SG, et al. Effect of swine leukocyte antigen-DQA gene variation on diarrhea in Large white, Landrace, and Duroc piglets [J]. *Anim Genet*, 2016, 47(6): 691–697.
- [9] 莫斯科, 房永祥, 冯海燕, 等. 猪白细胞抗原复合体 I 类和 II 类研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(6): 895–900.
- [10] 姚金梅, 连林生. 猪 SLAII 类基因多态性及其与抗病性状关联的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(10): 64–66.
- [11] Molina RM, Cha SH, Chittick S, et al. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 126: 283–292.
- [12] Drew TW. The emergence and evolution of swine viral diseases; to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? [J]. *Rev Sci Tech*, 2011, 30(1): 95–106.
- [13] Lunney JK, Ho CS, Wysocki M, et al. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex [J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33: 362–374.
- [14] 贺希文. 加系 SPF 大白和长白猪群体遗传学分析与 SLA 单倍型的初步筛选 [D]. 甘肃农业大学, 2016.
- [15] 贺希文, 高彩霞, 姜骞, 等. 加系 SPF 大白猪和长白猪群体遗传学分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 13(6): 551–556.
- [16] Smith DM, Martens GW, Ho CS, et al. DNA sequence based typing of swine leukocyte antigens in Yucatan miniature pigs [J]. *Xenotransplantation* 2005, 12: 481–488.
- [17] Gao C, Jiang Q, Guo D, et al. Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs [J]. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45(1): 87–96.
- [18] 寸海霞, 谢德琼, 王龙, 等. 八眉猪 SLA-DQA 基因外显子 2 多态性分析 [J]. *中兽医学杂志*, 2016, (总 190 期)3: 10–13
- [19] 杨文平, 张家琦, 曹果清. 4 个猪种 SLA-DQB 基因外显子 2 多态性分析 [J]. *生物技术*, 2014, 24(1): 58–61.
- [20] 陈江伟, 郭亚芬, 兰干球, 等. 广西巴马小型猪 SLA-DQB 基因外显子 2 的多态性研究 [J]. *广西农业科学*, 2010, 41(8): 824–826.
- [21] 母童, 王国梅, 杨启瑞, 等. 烟台黑猪 SLA-DQB 基因外显子 2 多态性及其与仔猪腹泻的关联分析 [J]. *浙江农业学报*, 2016, 28(10): 1671–1677.
- [22] 杨彤彤, 张婷婷, 赵族, 等. 大约克猪和二花脸猪 SLA-DRB 基因外显子 2 的 PCR-RFLP 多态性分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(4): 169–171.
- [23] 包文斌, 叶兰, 鞠慧萍, 等. 野猪和 17 个家猪群体 SLA-DRB 基因外显子 2 的多态性分析 [J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2009, 30(4): 35–39.
- [24] 周波, 王林云, 谈永松, 等. 猪白细胞 II 类抗原基因多态性研究进展 [J]. *遗传*, 2003, 25(5): 611–614.
- [25] Gustafsson K, LeGuern C, Hirsch F, et al. Class II genes of miniature swine. IV. Characterization and expression of two allelic class II DQB cDNA clones [J]. *J Immunol*, 1990, 145: 1946–1951.
- [26] 姜平, 额尔敦木图, 高凤山. 荷包猪 SLA-DRB 基因 cDNA 的克隆及分子进化特征分析 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(1)2: 150–157.
- [27] Chen F, Xie J, Zhou Y, et al. Novel SLA-DR alleles of three Chinese pig strains and the related function in human T cell response [J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(3): 212–218.
- [28] Lunney JK. Current status of the swine leukocyte antigen complex [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, 43: 19–28.
- [29] Chardon P, Renard C, Vaiman M. The major histocompatibility complex in swine [J]. *Immunol Rev*, 1999, 167: 179–192.
- [30] 于辉, 李建东, 赵海全, 等. 三品种外种猪 SLA-DQA 基因的 PCR-RFLP 分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(9): 14–17.
- [31] 姜力飞, 马小军, 李富强, 等. 合作猪 SLA-DQB 基因第 3 外显子多态性分析 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(1): 31–34, 40.
- [32] 叶晶, 蒋能静, 刘丽霞, 等. 兰州不同地区商品猪 SLA-DQB 基因的差异性研究 [J]. *中兽医学杂志*, 2015, (总 197 期)11: 13–15.
- [33] 孙俊丽, 牟玉莲, 顾茂松, 等. 五指山猪近交系群体中 DRA 和 DRB 基因的 SSCP 检测 [J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(8): 1458–1461.
- [34] 张国华, 马小军, 吕伟丽. 合作猪 SLA-DQA 基因外显子 2 多态性分析 [J]. *生物技术通报*, 2014, 30(4): 91–95.