

文章编号: 1674-7054(2012)04-0314-04

文昌鸡 *MHC B-G* 基因第2外显子序列多态性分析

廖承红^{1,2,3}, 郑继平^{1,2,3}, 伍剑鸿¹, 梁浩¹, 张建行¹

(1. 海南大学 农学院 海南 海口 570228; 2. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/省部共建国家重点实验培育基地 海南 海口 570228; 3. 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室 海南 海口 570228)

摘要: 根据 GeneBank 上红色原鸡的 *MHC B-G* 序列设计特异性引物, 利用 PCR-SSCP 和测序方法对文昌鸡 18 个个体的 *MHC B-G* 基因第2外显子序列 332 bp 区域进行序列多态性分析。通过 PCR-SSCP 分型得到 16 种基因型; 测序检测到 21 个变异位点, 其中 20 个位点导致 16 个氨基酸位点发生变异。结果表明: 所有序列均未发生长度变化; 文昌鸡群体内 *MHC B-G* 的多态性较丰富, 主要体现在氨基酸多态性上, 与其抗原多样性有密切关系。

关键词: 文昌鸡; *MHC B-G*; 第2外显子; 多态性

中图分类号: S 831.8+9

文献标志码: A

禽类主要组织相容性复合体(Major Histocompatibility Complex, MHC)在抗原识别、免疫应答与调控、破坏外来抗原靶细胞方面起重要作用, 它与许多疾病的抗性、易感性和生产性能有着密切关系^[1-2]。而且, MHC 分子在不同遗传背景的个体中存在的差异都会导致个体对疾病的抗性和易感性存在差异^[3]。因此, 分析、鉴定并克隆出与疾病相关的 *MHC* 基因, 并开展功能等方面的研究, 成为从遗传上控制家禽疾病的重要途径之一^[4-7]。

鸡(*Gallus domestica*)的 *MHC* 基因(也称为 B 复合体)具有高度多态性和稳定性, 包含 *B* 基因座和 *Rfp-Y* 基因座, 两者在遗传上不连锁, 在每个基因座上具有大量的等位基因。其中 *B* 基因座全长 92 kb, 含 19 个基因, 是人类 *MHC*(也称为 *HLA*) 长度的 1/20^[8], 主要包括 3 个高度多态的基因座: *B-F*(Class I)、*B-L*(Class II) 和 *B-G*(Class IV), 其中的 *B-F* 和 *B-L* 在结构和分布上类似于哺乳动物的 I 类和 II 类基因, 而 *B-G* 是禽类所特有的基因位点^[9]。编码的 *B-G* 抗原称为鸡 MHC IV 类抗原, 又称 *B-G* 分子, 是免疫球蛋白超家族的一个特别成员, 参与细胞免疫和体液免疫^[10], 具有较高的遗传多样性, 但在哺乳动物细胞中未发现结构与其类似的抗原。文昌鸡是海南重要的经济地方鸡种, 其体型短小、单位体质量和体表面积相对较大, 对高温具有较强的耐受力, 能适应炎热气候, 尤其具有较强的抗病性^[11], 是我国家禽品种资源基因库中的宝贵财富。笔者以文昌鸡为实验材料, 利用 PCR-SSCP 对其 *MHC B-G* 基因第2外显子分型进行多态性分析, 揭示文昌鸡群体内遗传多样性, 旨在为文昌鸡的抗病性状研究及其抗病遗传育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 DNA 的提取 从 18 只文昌鸡的翅静脉分别无菌采血, 每只鸡采血约 2~3 mL, EDTA 抗凝, 采用常规酚-氯仿抽提基因组 DNA。用紫外分光光度法检测 DNA 的浓度和纯度, 并稀释成工作液, 4℃ 贮存备用。

1.2 引物设计 根据 GenBank 已知 *MHC* 基因 *B-G* 区域的 DNA 片段(登录号: NC_006103), 利用 Premier primer 5.0 软件设计引物, 引物序列 F: 5'-CACCGAGCCTCCGTGTCACTGCC-3', R: 5'-CCACTGACCT-GACACC TCCA-3', 扩增片段长度为 332 bp。

收稿日期: 2012-10-16

基金项目: 海南省自然科学基金项目(310036); 海南省教育厅高等学校科学研究项目(Hjkj2011-11); 海南大学青年基金项目(qnjj1017); 海南大学科研启动项目(Kyqd1116)

作者简介: 廖承红(1977-), 女, 贵州盘县人, 海南大学农学院讲师, 博士。

1.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 25 μL , 含 DNA 模板 (50 ng) 1 μL , $10\times$ Buffer 2.5 μL (Mg^{2+} 1.5 mmol $\cdot$ L^{-1}), dNTP 1 μL , 正反向引物各 0.5 μL (10 mmol $\cdot$ L^{-1}), *Taq* 聚合酶 1 U。反应程序为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 SSCP 分析 每管 PCR 产物加 8 μL 的 Loading buffer (溴酚蓝 0.139 g, 二甲苯菁 0.139 g, 去离子甲酰胺 50 mL, 甘油 5.6 mL) 混匀, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min, 冰浴 10 min, 经 $w = 10\%$ 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 ($m_{\text{Acr}}:m_{\text{Bis}} = 39:1$) 电泳 (120 V, 12 h) 后, 银染拍照。

1.5 多态片段的序列测定 根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取不同带型个体的 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 序列分析 将所测 DNA 序列用 DNASTAR 软件包进行编辑, 并以 GenBank 上已发表的红原鸡序列 NC_006103 为参考序列, 用 Bioedit 和 DNASP5.0 软件进行序列比对和分析, 人工正反链核对; 利用 DNA-MAN 对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果 从实验材料血样中提取的基因组 DNA 经 $w = 1\%$ 的琼脂糖电泳检测, 目的条带清晰可见, 完整性较好, 完全符合 PCR 实验要求 (图 1)。

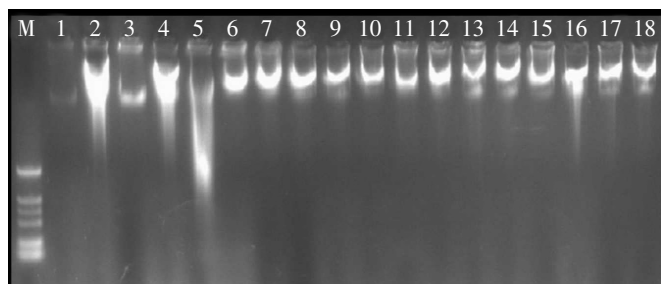


图1 文昌鸡基因组 DNA 提取

M 为 DL2000 标准相对分子质量; 1~18 为 18 个个体

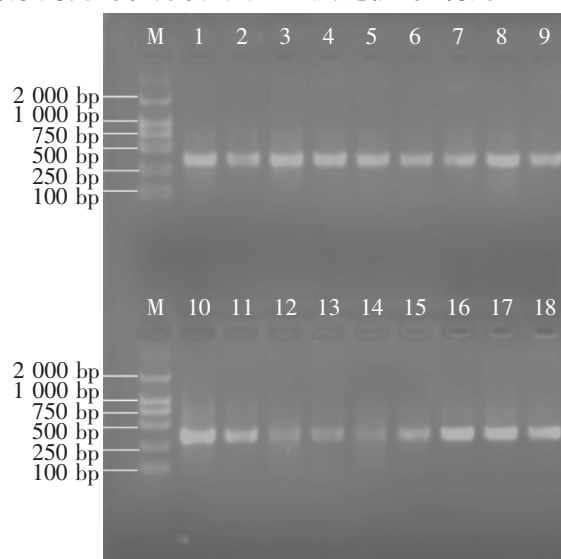


图2 PCR 产物琼脂糖检测结果

M 为 DL2000 标准相对分子质量; 1~18

为 18 个样品的 PCR 扩增产物

2.2 *MHC B-G* 第2外显子 PCR 扩增和 SSCP 分析 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖电泳检测, 扩增片段与预期大小 (332 bp) 一致, 特异性好, 无杂带 (图 2), SSCP 分析结果出现了 16 种基因型, 表明文昌鸡 *MHC B-G* 具有丰富的多态性。

2.3 *MHC B-G* 第2外显子序列分析

2.3.1 *MHC B-G* 第2外显子序列的碱基组成 选取 18 只文昌鸡的 *MHC B-G* 第2外显子长度为 332 bp 的区域进行测序分析, 结果发现, 所有序列均未发生长度变异。碱基 A, G, T, C 的平均含量分别为 22.6% (22.2% ~ 23.4%), 24.9% (24.2% ~ 29.8%), 23% (22.6% ~ 23.5%), 29.5% (24.1% ~ 30.6%), T + A 含量为 45.6%, G + C 含量为 55.4%, G + C 含量高于 T + A 含量。

2.3.2 序列核苷酸位点变化分析 以 NC_006103 为参考序列, 分别对 18 只文昌鸡的核苷酸变异位点进行分析, 在该区域共检测到 21 个变异位点, 约占分析位点的 6.3%。用 Bioedit 和 DnaSP5.0 软件进行序列比对和分析, 未发现序列长度的变化, 变异位点均为碱基替代, 无插入或缺失等现象, 其中有些位点出现 2 种以上的碱基变化。测序结果发现, 该片段中有 12 个突变位点在个体间存在多态性, 9 个突变位点变化相同。16 种不同基因型序列的 12 个不同碱基变化位点见表 1 所示。测序结果表明, 扩增片段确属 *MHC B-G* 基因第2外显子的序列片段, 所测文昌鸡 *MHC B-G* 基因第2外显子的 DNA 序列共有 332 个碱基, 编码 110 个氨基酸残基。从表 2 可知, 该序列所编码的 110 个氨基酸序列中, 有 16 个残基发生改变, DNA 序列的同源性 (311/332) 高于氨基酸序列 (94/110) 的同源性, 说明 *MHC B-G* 序列多态性更多地表现在氨基酸水平上。

表1 不同基因型碱基变化比较

基因型	突变位点												不同带型 个体数
	23	40	42	86	88	200	201	205	207	211	242	245	
1	TC	TA	CG	AA	CT	AA	TT	AA	AG	CT	AG	AA	1
2	TC	TA	CC	AA	CC	AG	TC	AG	AG	CT	AA	AG	1
3	TC	TA	CG	AA	CC	AG	TC	AG	AG	CT	AA	AG	1
4	TT	TA	CC	AC	CT	AT	TC	AG	AG	CT	AA	AG	2
5	TC	TA	CC	AC	CT	AT	TC	AG	AG	TT	AA	AG	1
6	TC	TA	CG	AC	CT	AT	TC	AG	AG	CC	AG	AG	1
7	TC	TA	CG	AC	CT	AG	TC	AG	GG	CC	AG	AG	1
8	TC	TA	CG	AC	CT	GG	TC	AA	AG	CT	AG	AG	1
9	TT	TA	CC	AA	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	1
10	TT	TA	CG	AA	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	1
11	TC	TA	CG	AA	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	1
12	TT	TA	CC	AC	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	1
13	TT	TA	CG	AC	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	2
14	TC	TA	CG	AC	CT	AG	TC	AG	AG	CT	AG	AG	1
15	TT	TA	CG	AC	CT	AG	TC	AG	GG	TC	AG	AG	1
16	TC	TA	CC	AC	CT	GT	TC	AG	AG	TT	AG	AG	1

表2 MHC B-G 第2 外显子序列的位点变异及引起的氨基酸变化情况

变异位点	SNP	氨基酸突变	变异位点	SNP	氨基酸突变
5	C/T	Pro/Leu	172	T/A	Ser/Thr
23	T/C	Met/Thr	176	G/C	Glu/Gln
40	A/T	Arg/Ser/Trp/Cys	200	G/A/T	Ser/Asn/Ile
42	G/C	Arg/Ser/Trp/Cys	201	C/T	Ser/Asn/Ile
86	A/C	His/Pro	205	A/G	Glu/Arg
88	C/T	Pro/Ser	207	A/G	Glu/Arg
104	C/T	Phe/Ser	211	C/T	Pro/Ser
138	A/T	Pro/ -	227	G/C	Val/Leu
148	C/T	Leu/Phe	242	A/G	Asn/Asp
163	T/A/	Ala/Ser//Asp/Tyr/	245	A/G	Ile/Val
164	C/A	Ala/Ser/Thr/Asp/Tyr/Asp			

注 “-”表示氨基酸残基没有发生改变

3 讨 论

3.1 文昌鸡 *MHC B-G* 基因第2 外显子的多态性 本研究测定了 18 只文昌鸡的 *MHC B-G* 基因第2 外显子长度为 332 bp 区域的核苷酸序列。这些个体的序列均未发生长度变异,共检测到 21 个核苷酸变异位点,约占分析位点的 6.3%,其中 1 个位点为同义突变,其余 20 个位点导致 16 个氨基酸变异,从分子水平说明了该序列具有高度多态性。在分析的 332 bp 片段中,文昌鸡多态简约性信息位点有 1 个。多态位点的分布不均匀,如 20~48 bp,104~166 bp,200~245 bp 多态位点较多,48~128 bp,167~200 bp,246~332 bp 比较保守,这些保守区域可能是重要的功能区,其生物学功能尚待进一步研究。*MHC B-G* 基因第2 外显子核苷酸序列的同源性比氨基酸的同源性低,说明了文昌鸡 *MHC B-G* 基因第2 外显子作为抗原分子结合区,氨基酸水平的多态性更突出,体现了 *MHC B-G* 极大的抗原多态性,这基本符合 *MHC B-G* 免疫多样性的特点^[12]。

3.2 文昌鸡 *MHC B-G* 基因与抗病育种的关系 目前, *MHC* 的变异水平被认为是生物体识别外来寄生物(细菌、病毒、原生动物以及其他寄生虫和噬菌体)能力的重要部分^[13]。*MHC B-G* 抗原是禽类特有的,可能在 B 细胞选择中起作用。近年来,相对于 *MHC B-LB* 基因的研究较少。本研究发现,文昌鸡 *MHC B-*

G 基因具有丰富的多态性,证明其序列多态性更多地表现在氨基酸上,这与 *MHC B-LB* 的多态性变化基本一致^[14],因此,也证明了免疫系统的抗原多样性。文昌鸡属于我国南方热带地区鸡种,抗病性较强,笔者通过对文昌鸡 *MHC B-G* 基因分型和序列分析,其结果可为鸡的抗病育种工作提供理论依据,具有重要的生产指导意义。

参考文献:

- [1] CLARE R A, STROUT R G, TAYLOR R L et al. Major histocompatibility (B) complex effects of acquired immunity to cecal coccidiosis [J]. Immunogenetics, 1985, 22: 593.
- [2] LAMONT S J. Immunogenetics and the major histocompatibility complex veterinary [J]. Immunology and Immunopathology, 1991, 30: 121 - 127.
- [3] APANIUS V, PENN D, SLEV P et al. The nature of selection on the major histocompatibility complex [J]. Critical Reviews in Immunology, 1997, 17: 179 - 224.
- [4] 李国勤, 王得前, 沈军达, 等. 鸡 *MHC* 基因多态性与抗病性状的相关性研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(1): 122 - 127.
- [5] 磨美兰, 左天荣, 赵子轶, 等. 鸡主要组织相容性复合体的研究进展 [J]. 广西畜牧兽医, 2006, 22(3): 137 - 140.
- [6] 邱莫寒, 朱庆. 家禽 *MHC* 概况及其在抗病育种中的应用 [J]. 畜禽业, 2006(22): 6 - 8.
- [7] 魏笑笑, 杨志刚, 王雷. 家禽 *MHC* 的结构与遗传效应 [J]. 家畜生态学报, 2006, 27(6): 194 - 196.
- [8] KAUFMAN J, MILNE S, GOBEL T W et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex [J]. Nature, 1999, 401: 923 - 925.
- [9] CHAUSSE A, COUDERT M F, DAMBRINE G et al. Molecular genotyping of four chicken B complex haplotypes with B-L, B-F and B-G probes [J]. Immunogenetics, 1989, 29(1): 129 - 130.
- [10] 马吉飞, 陈万芳, 陈萍. 鸡主要组织相容性复合体的研究进展 [J]. 动物医学进展, 1998, 19(4): 4 - 7.
- [11] 王存波, 常国斌, 雷黎, 等. 不同鸡种对新城疫和禽流感的免疫性能差异分析 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26(2): 54 - 58.
- [12] SALOMONSEN J, DUNON D, SKJODT K et al. Chicken major histocompatibility complex encoded B-G antigens are found on many cell types that are important for the immune system [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(4): 1359 - 1363.
- [13] PLACHY J, PINK J, HALA K. Biology of the chicken *MHC* (B complex) [J]. Critical Reviews in Immunology, 1992, 12(12): 47 - 79.
- [14] 李尚民, 原新廷, 戴国俊, 等. 京海黄鸡 *MHC B-LB II* 基因序列多态性研究 [J]. 江苏农业科学, 2008(3): 67 - 69.

Sequence Polymorphism of Second Exon of *MHC B-G* Gene in Wenchang Chicken

LIAO Cheng-hong^{1,2,3}, ZHENG Ji-ping^{1,2,3}, WU Jian-hong¹, LIANG Hao¹, ZHANG Jian-xing¹

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources-State Key Laboratory Breeding Base, Haikou 570228, China;

3. Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Haikou 570228, China)

Abstract: The sequence polymorphisms of the second exon of major histocompatibility complex (*MHC*) B-G of 18 individuals in Hainan Wenchang Chicken were detected by the method of PCR-SSCP and direct sequencing with primers which were designed based on the sequence of *Gallus gallus* in GenBank. These chickens were grouped into 16 genotypes by PCR-SSCP. Sequencing detected 21 polymorphic sites, 20 sites of which cause 16 amino acids sites to mutate among the individuals. The results indicated that the length of *MHC B-G* sequences in these individuals has no variation. Wenchang Chicken population has rich polymorphisms mainly in the amino acids, which are closely related with the diversity of *MHC B-G* antigen.

Key words: Wenchang chicken; major histocompatibility complex; second exon; polymorphism