

严 国,王元元,罗 成,等. 绵羊 *MHC-DQB2* exon3 单倍型的构建及其与布鲁氏菌病易感性相关性[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):154-159. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.039

绵羊 *MHC-DQB2* exon3 单倍型的构建 及其与布鲁氏菌病易感性相关性

严 国,王元元,罗 成,齐江姣,牟 云,高剑峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:为探究绵羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 单核苷酸多态性及其单倍型与布鲁氏菌病易感性的相关性,对 145 只哈萨克绵羊进行了布鲁氏菌虎红平板检测(RBPT),并通过 PCR-SSCP 试验选取不同基因型个体进行扩增测序,对测序结果进行统计分析。结果发现,在 exon3 282 bp 内共有 22 个单核苷酸多态性位点,其中 140A/C/T/G 位点、155T/C 位点在病例和正常组间存在显著差异($P < 0.05$);在 22 个单核苷酸多态位点中,有 18 个符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,最终构建得到 21 个单倍型,其中有 2 个单倍型(Hap6、Hap9)在病例和正常组间存在显著差异($P < 0.05$),一个单倍型(Hap4)存在极显著差异($P < 0.01$)。由此表明,绵羊 *MHC-DQB2* exon3 单核苷酸多态性与布鲁氏菌病存在显著相关性。

关键词:哈萨克绵羊;布鲁氏菌病;*MHC-DQB2* exon3;单核苷酸多态性;单倍型

中图分类号: S855.99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0154-05

布鲁氏菌病简称布病,是由布鲁氏杆菌引起的严重危害人民健康和农牧业发展的人畜共患传染病,是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,羊为该病最主要的传染源^[1]。调查显示,2012—2014 年新疆牛羊布病阳性率呈逐年上升趋势^[2]。因此,这一疾病对新疆这一畜牧业主产区所造成的损失也逐年增长,遏制该疾病的传播已成为亟待解决的重大问题。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是脊椎动物的高度多态性基因群^[3]。MHC 蛋白的主要功能是抗原递呈,在机体的免疫系统中发挥着至关重要的作用,与许多疾病的抗病性和易感性密切相关,*MHC* 作为相关性研究的候选基因,受各研究领域的密切关注,已经成为现代分子遗传研究的焦点。绵羊的 *MHC* 位于 20 号染色体, *MHC* II 区与人的相似,区域内的 DQ 和 DR 2 个基因家族表现丰富的多态性^[4],而绵羊的多态性更集中在 DQ 家族^[5-7]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),是指由单个碱基的变化引起 DNA 序列发生改变的多态性,是基因组序列内最为常见的变异形式。SNP 作为第三代分子遗传标记,本身具有显著特点,如数量多、分布广泛、且稳定遗传等^[8]。这些特点在疾病相关基因的研究中发挥着尤为重要的作用,尤其是那些位于基因编码区的 SNPs,可能会使基因编码的蛋白质的产量或质量发生改变,使其与某种疾病的发

生直接相关,因而备受各研究领域的关注^[9]。由于单个 SNP 在复杂疾病中所起到的作用微小^[10-11],而由 SNPs 构建的单倍型提供的遗传信息却比单个的 SNP 更多、更准确、更符合多基因疾病的遗传性,所以单倍型分析越来越成为复杂疾病关联研究的有效工具,这为相关免疫性状的关联研究及抗病分子标记辅助选择奠定了一定的基础。因此,本研究通过 PCR-SSCP 技术结合测序的方法检测哈萨克羊的 *MHC-DQB2* exon3 的多态位点,探讨 SNPs 与布鲁氏菌病易感性相关性,此外构建其单倍型,并初步推测与布鲁氏菌病易感性相关的单倍型,为今后开展布鲁氏菌抗性分子标记辅助选择研究提供了一定的依据,为进一步定位具有易感性的遗传位点而最终进行抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样本来源 本试验所用血液样本部分(45 支)来自于新疆维吾尔自治区畜牧兽医站,全部为布鲁氏菌病阳性;部分(100 支)采自新疆乌苏市 3 个羊场,以颈静脉采血法采血 5 mL 于肝素钠抗凝管,4 ℃ 保存,以备基因组 DNA 提取。

1.1.2 主要试剂 布鲁氏菌检测试剂盒购自哈药集团生物疫苗有限公司;Tris 平衡酚购自北京索莱宝科技有限公司;引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成;琼脂糖为西班牙琼脂糖(Biowest Agarose);2 × *Taq* PCR Master Mix 和 DL 2000 marker 购自北京天根公司;过硫酸铵购自美国 Sigma 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED 购自美国 Promega 公司;亲和硅烷、剥离硅烷购自北京鼎国生物技术中心。

1.2 试验方法

1.2.1 布鲁氏菌阳性检测 采用虎红平板检测法对 100 只哈萨克绵羊进行布鲁氏菌检测,在干净载玻片上取 30 μL 被检绵羊血清与等量的虎红平板抗原混合均匀,在 5 min 内以

收稿日期:2016-12-14

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(编号:2010CB530200)。

作者简介:严 国(1990—),男,甘肃武威人,硕士,主要从事动物功能基因与分子免疫方面研究。E-mail: guoyan19900818@163.com。

通信作者:高剑峰,博士,教授。Tel: (0993) 2057928; E-mail: jianfeng@shzu.edu.cn。

阳性血清反应为对照,观察并记录结果,被检血清出现较为明显的颗粒状或絮状凝集则判定为布鲁氏菌阳性,否则判定为阴性。以同样的方法对所有样品重复检测 2 次,以确保检测结果准确。

1.2.2 基因组 DNA 的提取与检测 基因组 DNA 的提取:取 2 mL 无明显血凝块的新鲜血液,采用酚-氯仿法对其进行基因组 DNA 提取。

DNA 纯度与浓度的检测:采用生物光谱计检测 DNA 纯度和浓度,用 Plate assay 法和琼脂糖凝胶电泳法对 DNA 验证的浓度及纯度进行验证,并对高浓度样品进行适当稀释,于 -18°C 保存备用。

1.2.3 引物设计 参照绵羊 *MHC-DQB2* 的基因序列 (GenBank 登录号: EU176819), 利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计该基因 exon3 的特异引物。引物序列为: F: 5' - CCTCAGTGGAACCTACAGTGACC - 3'; R: 5' - TGCCC TTACTCCACTCCACCG - 3'。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 扩增体系为: 上下游引物各 0.75 μL , 模板 3.5 μL , 无菌双蒸水 7 μL , $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ 8 μL , 总体积 20 μL 。PCR 扩增程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 复性 30 s, 72°C 延伸 40 s, 35 个循环; 72°C 延伸 8 min; 4°C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,经凝胶成像系统拍照保存。

1.2.5 SSCP 电泳 取 3 μL 的 PCR 产物与 10 μL 的变性上样缓冲液 (去离子甲酰胺 9.5 mL; 0.3% 二甲苯青 0.1 mL; 0.5 mol/L EDTA 0.4 mL, pH 值 8.0) 充分混匀,于 PCR 仪 98°C 变性 10 min,立即冰浴骤冷至少 3 min,低温恒温循环系统温度恒定至 9°C ,取 10 μL 变性产物上样于 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr : Bis = 39 : 1), 300 V 预电泳 15 min,而后 3 W 恒定功率过夜电泳 10 h。次日电泳结束后,银染显色并在 X 光片观片灯上分析带型并拍照保存。

1.2.6 PCR 扩增及测序 经 PCR - SSCP 分析之后,选取不同基因型样本,重新进行 PCR 扩增并电泳检测后,送至北京六合华大基因公司进行测序。测序结果用 DNASTAR 软件进行比对分析。

1.2.7 数据统计及分析 利用 Excel 整理统计数据,采用 χ^2 适合性检验法分别分析病例组与正常组哈萨克羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 多态位点的基因频率和基因型频率是否符合 Hardy - Weinberg (HWE) 平衡定律, $P > 0.001$ 表示无统计学差异,符合 Hardy - Weinberg 平衡定律,反之 $P < 0.001$ 则说明不符合 Hardy - Weinberg 平衡定律。所有统计学分析均采

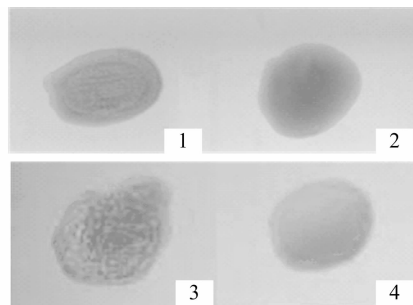
用 SPSS 17.0 统计软件包,通过比较分析每个 SNP 的基因频率或基因型频率分别在病例组和正常组中的差异性,从而分析其与布鲁氏菌易感性的相关性。

1.2.8 单倍型构建 去除等位基因频率 < 0.05 以及不符合 Hardy - Weinberg 平衡定律的 SNPs 位点,选择同时符合以上 2 个条件的位点,用 SHEsis 在线软件进行单倍型的构建,取连锁不平衡系数 (D' 值) 作为连锁不平衡指标。

2 结果与分析

2.1 布鲁氏菌检测

采用虎红平板凝集试验检测绵羊种布鲁氏菌阳性,结果在 100 个哈萨克羊个体中检出布鲁氏菌阴性个体 84 个,阳性个体为 16 个,布鲁氏菌阳性检出率为 16%,检测结果如图 1 所示。



1—阳性对照; 2—阴性对照; 3—阳性样本; 4—阴性样本

图1 布鲁氏菌阳性检测结果

2.2 基因组 DNA 的提取电泳检测

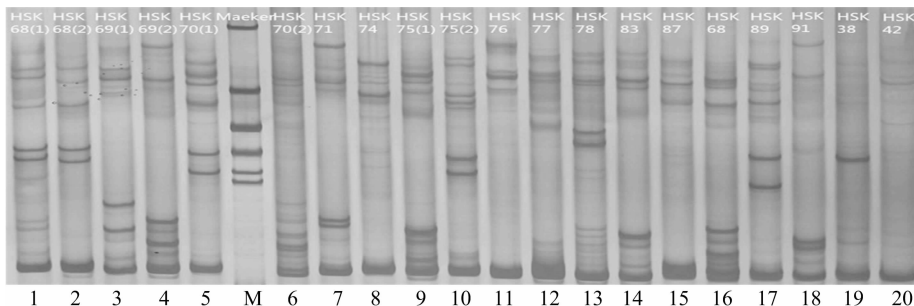
哈萨克羊全血中提取的基因组 DNA 经生物光谱计和 Plate assay 法检测,发现基因组 DNA 浓度在 $40 \sim 1\,000 \mu\text{g/mL}$ 。纯度经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,出现整齐、清晰的单一条带,符合后期试验要求。

2.3 *MHC-DQB2* 基因的 PCR 扩增结果检测

将哈萨克羊 *MHC-DQB2* exon3 PCR 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶检测,检测结果与 DL 2000 marker 比较与预期的相符,因而判断为目的片段。

2.4 SSCP 分析

分别对病例、正常组哈萨克羊个体 *MHC-DQB2* exon3 的 PCR 扩增产物进行 SSCP 电泳,部分电泳结果见图 2。由于本试验应用 PCR - SSCP 方法具有高度灵敏性,所以出现的基因型比较多,是否还有一些其他未检测出的基因型,还有待于扩大样本数量以进一步研究。



Marker—DL2000 DNA marker; 1~20—不同绵羊个体 *MHC-DQB2* exon3 基因型

图2 哈萨克羊 *MHC-DQB2* exon3 SSCP 部分电泳结果

2.5 哈萨克羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 SNPs 分析

通过 PCR-SSCP 技术及测序的序列比对结果分析,哈萨克羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 在 282 bp 内共发现 22 个多态位点,经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验无差异统计学意义,表明具有群体代表性。这些位点中不存在插入和缺失位点,有 1 个位点属于四态性,1 个位点属于三态性,其余 20 个位点属于二态性。这些二态性位点中转换位点有 16 个,包括 8 个 A/G 转换位点和 8 个 C/T 转换位点;颠换位点有 4 个,包括 A/T 颠换位点 2 个,A/C、G/C 颠换位点各 1 个。相比而言,转换率为颠换率的 4 倍,这可能是因为 CpG(碱基 C、G 以及连接两者的磷酸酯键 p) 结构上的胞嘧啶残基是基因组中最易发生突变的位置,大多数是甲基化的,可自发地脱去氨基形成碱基 T,因此导致了 C→T(互补链上 G→C) 的突变增多,从而导致了转换位点远高于颠换位点^[12]。

2.6 哈萨克羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 的单氨基酸多态性 (SAP) 分析

对哈萨克羊 *DQB2* exon3 氨基酸序列进行分析,在 93 个氨基酸位点中,有 20 个属于氨基酸多态位点,占总氨基酸位点数的 21.5%。其中,有 6 个氨基酸突变为有义突变,其余均为无义突变(表 1)。

2.7 哈萨克羊 *MHC-DQB2* exon3 多态性与布鲁氏菌病易感性的关系

许多疾病的抗性和易感性都与 *MHC* 有关联,作为针对某些疾病的抗性和易感性的候选基因的 *MHC*,已经成为现代分

表 1 哈萨克羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 的 SNPs 位点及氨基酸变异位点

编号	SNP 类型	氨基酸改变	编号	SNP 类型	氨基酸改变
1	18A/G	Ile/Val	12	140A/C/T/G	Gly
2	20C/T	Val	13	152A/C	Thr
3	25C/T	Pro/Leu	14	155T/C	Pro
4	26A/G	Pro	15	167C/T	Asn
5	35A/T	Thr	16	191C/T	Leu
6	71G/A/C	Ser	17	203A/G	Glu
7	77A/G	Thr	18	206G/A	Met
8	94A/G	Gln/Arg	19	227C/G	Val
9	106G/A	Arg/Gln	20	230T/C	Tyr
10	124A/G	Gln/Arg	21	232C/T	Thr
11	137C/T	Ala	22	270T/A	Ser/Thr

子免疫遗传的研究热点之一。本研究对 *MHC-DQB2* 基因的多态性与布鲁氏菌病易感性进行关联分析发现,*MHC-DQB2* 可能是与布鲁氏菌病易感性相关的基因之一。哈萨克羊 *MHC-DQB2* exon3 每个 SNP 的等位基因及基因型频率在病例组和正常组中的分布差异见表 2、表 3,其中 140 A/C/T/G 位点、155T/C 的等位基因在病例和正常样本中的分布存在显著差异($P<0.05$),初步分析认为 *MHC-DQB2* exon3 的 140 A/C/T/G、155T/C 与绵羊布鲁氏菌病易感性相关,相关的研究内容目前尚未见报道。针对该基因每个多态位点的基因型进行关联分析,发现位点 AA/Aa/aa 基因型在病例和正常样本中的分布无显著差异($P>0.05$)。

表 2 中国美利奴羊 *MHC-DQB2* 基因 exon3 基因频率

位点	SNP 类型	病例组基因频率	正常组基因频率	<i>P</i> 值
18	A/G	0.615/0.385	0.625/0.375	0.935 087
20	C/T	0.846/0.154	0.917/0.083	0.351 042
25	C/T	0.769/0.231	0.729/0.271	0.706 460
26	A/G	0.769/0.231	0.688/0.312	0.456 588
35	A/T	0.115/0.885	0.188/0.812	0.421 713
71	G/A/C	0.571/0.214/0.214	0.808/0.115/0.077	0.069 413
77	A/G	0.769/0.231	0.646/0.354	0.273 536
94	A/G	0.962/0.038	0.896/0.104	0.322 878
106	G/A	0.846/0.154	0.938/0.062	0.199 886
124	A/G	0.577/0.423	0.500/0.500	0.526 934
137	C/T	0.692/0.308	0.625/0.375	0.562 609
140	A/C/T/G	0.539/0.231/0.231/0.077	0.539/0.385/0.077/0.000	0.043 253 *
152	A/C	0.615/0.385	0.625/0.375	0.935 087
155	T/C	0.731/0.269	0.917/0.083	0.031 894 *
167	C/T	0.500/0.500	0.562/0.438	0.606 554
191	C/T	0.769/0.231	0.729/0.271	0.706 460
203	A/G	0.577/0.423	0.521/0.479	0.643 954
206	G/A	0.846/0.154	0.792/0.208	0.567 807
227	C/G	0.615/0.385	0.458/0.542	0.196 895
230	T/C	0.808/0.192	0.875/0.125	0.437 166
232	C/T	0.962/0.038	0.979/0.021	0.655 310
270	T/A	0.615/0.385	0.708/0.292	0.414 841

注:“*”表示病例组与正常对照组中国美利奴羊 *MHC-DQB2* 相同等位基因间差异显著($P<0.05$)。

2.8 病例和正常组 *MHC-DQB2* exon3 的连锁不平衡分析及单倍型的构建

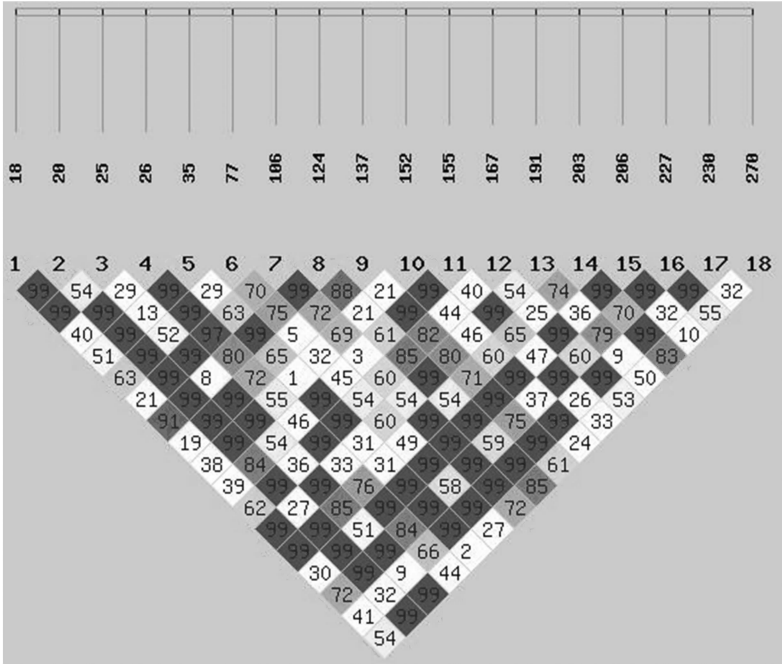
对符合 Hardy-Weinberg 平衡定律的 SNPs 位点进行连锁不平衡分析,通过 SHSsis 在线软件^[13] 计算连锁不平衡系数 D' 值,观察各位点之间的连锁不平衡程度,判断是否存在连锁

不平衡。在 *MHC-DQB2* exon3 的 22 个 SNPs 位点中,最终筛选出符合条件的 18 个位点进行单倍型的构建,连锁不平衡图见图 3。方格内数字就是连锁不平衡系数 D' 值乘以 100 譬如 99 表示 $D'=0.99$ 。 D' 值越大,意味着相关联的 2 个 SNPs 间连锁不平衡程度越强。通常认为 $D'>0.9$ 为高度连锁,

表 3 中国美利奴羊 *MHC-DQB2* 基因 *exon3* 基因型频率

位点	AL	AH	病例组基因型频率	正常组基因型频率	<i>P</i> 值
18	A	G	0.231/0.769/0.000	0.292/0.667/0.042	0.675 838
20	C	T	0.692/0.0.308/0.000	0.833/0.167/0.000	0.319 825
25	C	T	0.538/0.462/0.000	0.500/0.458/0.042	0.753 465
26	A	G	0.538/0.462/0.000	0.375/0.0.625/0.000	0.337 988
35	T	A	0.846/0.077/0.077	0.625/0.375/0.000	0.074 082
77	A	G	0.538/0.462/0.000	0.333/0.625/0.042	0.403 762
94	A	G	0.923/0.077/0.000	0.792/0.208/0.000	0.300 530
106	G	A	0.769/0.154/0.077	0.875/0.125/0.000	0.365 922
124	A	G	0.231/0.692/0.077	0.125/0.750/0.125	0.670 159
137	C	T	0.462/0.462/0.077	0.292/0.667/0.042	0.476 403
152	A	C	0.462/0.308/0.231	0.458/0.333/0.208	0.981 712
155	T	C	0.538/0.385/0.077	0.833/0.167/0.000	0.105 524
167	C	T	0.231/0.538/0.231	0.208/0.708/0.083	0.416 617
191	C	T	0.538/0.462/0.000	0.500/0.458/0.042	0.753 465
203	A	G	0.154/0.846/0.000	0.208/0.625/0.167	0.236 230
206	G	A	0.692/0.000/0.308	0.583/0.000/0.417	0.514 103
227	C	G	0.308/0.615/0.077	0.125/0.667/0.208	0.298 228
230	C	T	0.615/0.385/0.000	0.750/0.250/0.000	0.392 416
232	C	T	0.923/0.077/0.000	0.958/0.042/0.000	0.650 743
270	T	A	0.231/0.769/0.000	0.458/0.500/0.042	0.256 185

注:基因型表示为 AA/Aa/aa(其中 A 代表高频率等位基因;a 代表低频率等位基因); AH 代表高频率基因名称;AL 代表低频率基因名称。



第一行数字代表SNPs所在位置;第二行数字表示 SNPs 数量,总共18个。图中方格里的数字代表连锁不平衡值 $D' \times 100$, 方格颜色越深, D' 值就越大, 表示连锁不平衡程度越高。反之, 方格颜色越浅, D' 值就越小, 表示连锁不平衡程度越低

图3 *MHC-DQB2* exon3 18 个位点的连锁不平衡图

$D' > 0.7$ 认为 2 个 SNPs 位点位于同一个 Block 区域, 可以进行单倍型分析。图 3 中各个方块的颜色由浅至深, 表示连锁程度由低到高。经连锁不平衡分析发现整个 *MHC-DQB2* exon3 存在 7 个 LD Block (表 4), 将其依次命名为 Block1 ~ Block7。

由于一个群体中单倍型的频率不能 < 0.03 , 因此单倍型频率未达到 0.03 的未参与统计, 对应的单倍型组合也应忽

略, SHEsis 在线软件在单倍型分析过程中, 系统会自动删除不符合条件的单倍型组合, 因而哈萨克羊 *MHC-DQB2* exon3 最终分析了 21 种单倍型组合 (表 3、表 4), 经分析发现在病例组中 Hap4、Hap6 频率都显著低于正常组 ($P < 0.05$), 这表明这 2 个单倍型可能与布鲁氏菌病抗性有关, 或者说具有这 2 个单倍型的个体对布鲁氏菌病不易感, 其中, Hap6 频率在病例和正常组中存在极显著差异 ($P < 0.01$); 病例组 Hap9 频

表 4 每个连锁不平衡 block 中 SNPs 组成

LD block	SNPs
Block1	A18G、C20T
Block2	A26G、T35A
Block3	G106A、G124A、C137T
Block4	A152C、T155C
Block5	C191T、A203G
Block6	A203G、G206A、G227C
Block7	G227C、C238T

表 5 病例和正常组 *MHC - DQB2* exon3 单倍型分析

单倍型组合	序列	病例组频率	正常组频率	卡方	<i>P</i> 值
Hap1	ACCAAAGACATTCAGGCT	0	0.063	3.068	0.079 861
Hap2	ACCAAAGGCATCCAGGCT	0	0.063	3.068	0.079 861
Hap3	ACCATAGATCTCTGGCCA	0	0.042	2.002	0.157 105
Hap4	ACCATAGGCATCCAGGCT	0	0.167	9.179	0.002 458 **
Hap5	ACCATAGGCCTCCAGGCT	0.192	0.021	2.835	0.092 212
Hap6	ACTATGGGCATCCGGCCT	0	0.083	4.181	0.040 891 *
Hap7	GCCATAGGCCTCCAGGCT	0.038	0.083	1.871	0.171 315
Hap8	ACCAAAAATCTTCAGCCT	0.077	0	2.172	0.140 533
Hap9	ACCATAGACATTCAGGCT	0.154	0	4.537	0.033 190 *
Hap10	ACCATAGACATTCGGCTA	0.038	0	1.063	0.302 424
Hap11	ACCATGGGCATCCAGCCT	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap12	ATTGTAGATACCTGACCT	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap13	ATTGTAGATACTTGACTA	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap14	GCCAAGAATCTTTAGCCA	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap15	GCCATAGATCTCTGGCCA	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap16	GCCGTAGACATTTGGCTA	0.038	0	1.063	0.302 443
Hap17	GCTATGGACACTCGGCCT	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap18	GCTATGGGCATCTGGCCA	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap19	GCTGTGGGCATCCGGCTA	0.038	0	1.063	0.302 443
Hap20	GTCGTAGATACTCGACTA	0.038	0	1.063	0.302 431
Hap21	GTCGTAGGTACTCGACCA	0.038	0	1.063	0.302 431

态性分析,最终发现了 22 个 SNPs 位点,而其中只有 2 个位点在病例和正常组间存在显著差异;在 22 个 SNPs 位点中只有 6 个位点为单氨基酸多态位点(SAPs),其他位点均为无义突变,且都是由密码子的简并性引起的。对比发现,本研究有义突变率较之其他研究成果^[14-15]低,这可能是由 exon3 与 exon2 所编码的氨基酸链在 MHC 蛋白上所处的位置及其所发挥的功能不同引起的,也有可能是因为绵羊品种的不同造成的。MHC 蛋白的主要功能是抗原递呈,在机体的免疫系统中发挥着非常重要的作用,与家畜的抗病性和易感性有着密切的关系。本研究通过对 *MHC - DQB2* exon3 多态性与绵羊布鲁氏菌病易感性相关性研究,初步筛选了与布鲁氏菌病易感性相关的 SNPs 位点,但由于 *MHC* 是一组紧密连锁的基因群,在一条染色体上的等位基因很少发生同源染色体间的交换,构成了一个单体型(单倍型),在遗传过程中 *MHC* 单体型是以一个完整的遗传单位由亲代传给子代^[16]。因此,本研究对符合要求的 SNPs 位点构建了单倍型,得到了 3 种与布鲁氏菌病易感性相关的单倍型,其中有 2 个单倍型在病例和正常组间达到了显著差异水平($P < 0.05$),1 个达到了极显著差异水平($P < 0.01$)。这为今后开展布鲁氏菌抗性分子标记辅助选择研究提供了一定依据,为进一步寻找具有易感性遗传位点而最终进行抗病育种奠定了基础,但 *MHC - DQB2* exon3

率显著高于正常组($P < 0.05$),表明具有这一单倍型的个体可能更易感布鲁氏菌病。综合推测,这 2 种单倍型可能与布鲁氏菌病易感性具有相关性。

3 讨论

MHC Class II 区段是一段具有高度多态性的基因,相对于人而言,绵羊的基因多态性在 DQ 区较之 DR 区更为丰富。因此,本研究选取了 *DQB2* exon3 作为研究对象,通过 PCR - SSCP 技术结合测序技术,对哈萨克羊 *DQB2* exon3 进行了多

的 2 个 SNP 位点及 3 个单倍型能否作为抗布鲁氏菌病的遗传标记,还需要对这些哈萨克羊个体进行攻毒试验以进一步验证以及其如何参与绵羊布鲁氏菌病的发生和发展的机制仍需进一步研究探讨。

参考文献:

[1]李振宪. 家畜布鲁氏菌病防控现状及应对策略[J]. 中国畜牧兽医学文摘,2016,32(9):108.
[2]马晓菁,库尔班·居麦,舒展,等. 2012—2014 年新疆动物布鲁氏菌病流行病学调查与分析[J]. 畜牧与兽医,2016,48(5):111-114.
[3]陈芳芳,潘玲,耿照玉,等. MHC 分子多态性的起源、演变与抗病机理[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(9):1061-1067.
[4]Hickford J,Zhou H,Fang Q. Haplotype analysis of the DQA genes in sheep: Evidence supporting recombination between the loci [J]. Journal of Animal Science,2007,85(3):577-582.
[5]Herrmann - Hoessing L M,White S N,Kappmeyer L S,et al. Genomic analysis of *Ovis aries* (Ovar) MHC class IIa loci [J]. Immunogenetics,2008,60(3/4):167-176.
[6]Kenter M,Otting N,Anhols J,et al. Evolutionary relationships among the Primate Mhc - DQA1 and DQA2 alleles [J]. Immunogenetics,1992,36(2):71-78.

胡秀彩, 陆梦莹, 孙敬锋, 等. 鲇源异嗜糖气单胞菌的分离鉴定及药敏特性[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 159–162.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.040

鲇源异嗜糖气单胞菌的分离鉴定及药敏特性

胡秀彩, 陆梦莹, 孙敬锋, 吕爱军, 陈成勋, 王晓梅

(天津市水产生态及养殖重点实验室/天津农学院水产学院, 天津 300384)

摘要:从发病鲇鱼体内分离出 1 株革兰氏阴性细菌 SJ-2, 通过细菌形态学观察、理化特性、16S rDNA 测序以及构建系统发育进化树分析, 表明 SJ-2 菌株葡萄糖产气、氧化酶、硝酸盐还原为阳性, 鸟氨酸脱羧酶、硫化氢为阴性等; 进一步采用 PCR 方法扩增 16S rDNA 序列, 测序获得片段大小为 1 401 bp, 与 *Aeromonas allosaccharophila* 模式菌株 ATCC 51208 序列相似性达 99.64%; 构建系统发育树分析显示分离菌与 *Aeromonas allosaccharophila* 自然聚为一支, 最终判定 SJ-2 菌株为异嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*)。人工腹腔注射斑马鱼死亡率达 100%, 病鱼呈现体色变白、腹水等症状。药敏试验结果显示对头孢克肟、头孢哌酮、头孢噻肟、诺氟沙星、左氟沙星、氟苯尼考等药物敏感, 对阿莫西林、氨苄西林、磺胺异噁唑、复方新诺明等耐药。首次报道鲇源异嗜糖气单胞菌的分子鉴定与药敏特性, 旨在为该病防治提供参考。

关键词:鲇; 异嗜糖气单胞菌; 16S rDNA; 系统发育树; 药敏试验

中图分类号: S941.42+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0159-04

气单胞菌属(*Aeromonas*)细菌广泛分布于淡水、海水等水生环境, 正常条件下在养殖水体及水产动物体内均存在, 多为条件致病菌^[1-2]。气单胞菌组成与分类较为复杂, 目前在水产动物中发现杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)、维氏气单胞菌(*A. veronii*)和异嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*)等多个种^[3]。近年来, 国内外有关异嗜糖气单胞菌的研究主要集中在人类和哺乳动物方面^[4-5]。Lee 等最早从美国腹泻患者体内分离获得异嗜糖气单胞菌, 即

ATCC35942 模式菌株^[4]。Saavedra 等分离到猪源气单胞菌菌株, 经 *gyrB* 和 16S rRNA 基因鉴定为异嗜糖气单胞菌^[5]。最近, 李欣悦等对气单胞菌分类研究发现 *gyrA* 基因在异嗜糖气单胞菌鉴定中更加准确^[6]。

关于鱼源异嗜糖气单胞菌的分离鉴定, 目前鲜有报道^[3,7-8]。刘双凤等从史氏鲟(*Acipenser schrencki*)体内分离到 1 株致病菌, 经 16S rRNA 序列分析鉴定为异嗜糖气单胞菌^[7]。Martinezmurcia 等对欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*) CECT4199 菌株进行理化特性、16S rRNA 分子鉴定研究, 确定为异嗜糖气单胞菌^[3]。杨求华等从发病鳗鲡(*A. japonica*)脏器中分离到异嗜糖气单胞菌, 动物感染试验验证该菌对鳗鲡具有致病性^[8]。本研究首次从自然发病鲇鱼(*Silurus sp.*)腹水等组织中分离出 1 株细菌, 病鱼主要表现为体表出血、肛门红肿突出、腹部膨大等临床症状, 采用理化特性结合 16S rDNA 用基因序列分子鉴定及其药物敏感性, 这不仅为异嗜糖气单胞菌的致病机理奠定基础, 而且为该病的预防治疗提供科学参考。

收稿日期: 2016-12-15

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(编号: 16JCZDJC33500、15JCZDJC34000、15JCZDJC33500); 国家自然科学基金(编号: 31272692)。

作者简介: 胡秀彩(1976—), 女, 江苏徐州人, 实验师, 主要从事水产微生物学研究, E-mail: huxiucui@126.com。

通信作者: 吕爱军, 教授, 主要从事水产动物微生物与免疫学方面研究。

[7] Oorschot R V, Maddox J F, Adams L A, et al. Characterization and evolution of ovine MHC class II DQB sequence polymorphism[J]. *Animal Genetics*, 1994, 25(6): 417–424.

[8] 唐一通, 肖娜, 李智山, 等. 单核苷酸多态性检测方法研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(27): 5393–5397.

[9] 马超. 单核苷酸多态性与广州汉族人群前列腺癌的相关性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.

[10] 杨俊. 上位作用特征基因的选择与分类方法研究[D]. 长沙: 国防科学技术大学, 2011.

[11] Jakobsdottir J, Gorin M B, Conley Y P, et al. Interpretation of genetic association studies: markers with replicated highly significant odds ratios may be poor classifiers[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(2): e1000337.

[12] 尚军亮. 全基因组单核苷酸多态性交互作用研究[D]. 西安: 西

安电子科技大学, 2013.

[13] Shi Y Y, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. *Cell Research*, 2005, 15(2): 97–98.

[14] 陈月娥, 李建华, 苟亚峰, 等. 中国美利奴羊 *MHC-DRB1* exon2 单倍型构建及与布鲁氏菌病易感性关联分析[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(5): 495–501.

[15] 王文文, 许万云, 胡梦薇, 等. 中国美利奴羊 *OLA-DQB1* 基因 exon2 遗传多态性与布鲁氏菌病易感性的关联分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(6): 1495–1503.

[16] 亢孝珍, 额尔敦木图, 姜建强, 等. 主要组织相容性复合体(MHC)基因研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(5): 28–33.