

奚衍洋,赵云蛟,钱爱东. 猪 *SLA - DRB* 基因第二外显子多态性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):28-32,43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.006

猪 *SLA - DRB* 基因第二外显子多态性分析

奚衍洋, 赵云蛟, 钱爱东

(吉林农业大学动物科学与技术学院, 吉林长春 130118)

摘要:对猪 *SLA II - DRB1* 第二外显子的多态性进行了研究。对采自长春某猪场 20 头不同长白猪个体的血液样本进行 PCR 扩增后,利用直接测序分型法将得到的基因序列进行有效的等位基因分型。分析整理后共得到 45 种基因型,分布频率最高的等位基因型在 19 个个体中出现,还有多数等位基因只分布在一个个体中,且通过遗传多态性分析可以看出猪的 *DRB1* 基因是具有高度多态性的。

关键词:长白猪;主要组织相容性复合体(MHC);白细胞抗原(SLA);多态性

中图分类号: S858.282.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0028-05

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, 简称 MHC)是一类细胞表面糖蛋白,它能够在细胞内通过蛋白水解作用结合源自宿主和病原体蛋白质的小肽片段。之后,MHC 分子会将这些抗原表位呈递到细胞表面,在那里它们被 T 细胞识别,这可以帮助免疫系统识别和应对外来抗原^[1-2]。MHC 由 I、II、III 等 3 类分子组成,前 2 类分子对抗原肽起到递呈作用,而第 III 类分子与免疫反应相关^[3]。

按照 MHC 基因国际命名原则,除了小鼠(H-2)、大鼠(RT1)和鸡(B),剩余动物 MHC 的命名即在白细胞抗原(LA)前加上本物种英文名称的首字母或是前 2 个字母,例如人、马、牛、绵羊、狗的 MHC 分别为 HLA、ELA、BoLA、OLA、DLA,因此猪的 MHC 亦称为 SLA。MHC 分子的发现及提出源于距今 60 多年前有关小鼠的免疫试验^[4],之后 Jean Dausset 发现第一个能够抗人类白细胞表达抗原的同种抗体,成为了人类 HLA 基因的研究开端^[5-7]。猪 SLA 基因是由 Vaiman 等^[8]首次提出其具有编码抗体、调控免疫的作用,随后由 Lunney 等^[9]同 Mallard 等^[10]经试验论证了该结论,且证实了 SLA 分子对机体免疫应答反应及抗原呈递等方面均起到较大作用。

SLA 基因多态性对于免疫反应的研究是至关重要的^[11]。SLA II 类基因能够调控外来病原和疫苗的免疫应答反应^[12],即控制传染病的反应及影响疫苗的特异性和有效性^[13]。据证实 SLA II 类基因的匹配度是实体器官同种异体移植和骨髓细胞移植成功与否的重要条件^[14]。本研究通过直接测序法从 DNA 水平对 *SLA II - DRB1* 座位第二外显子的多态性进行了分析,且从多方面解析猪的 *SLA II* 类分子基因特征,为抗

猪病原体的相关免疫研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采自吉林长春某猪场共计 20 头成年长白猪血液。将采集的猪血置于抗凝管并混匀,低温冻存以备试验。

1.2 基因组的提取及 PCR 扩增

利用 Axyprep 血基因组提取试剂盒,从猪的血液样本中提取基因组。大约 1 μL 基因组 DNA 模板,各 0.2 μL 猪 P1 和猪 P2 引物^[15](猪 P1:5'-GTGTCTGCAGTACGTGTCCA-3',猪 P2:5'-TAGGATCCCTCACAGCGCATTTCTT-3'),10 μL Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)加 ddH₂O 至 20 μL 反应体系。PCR 扩增体系为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,64.5 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,40 个循环;72 ℃ 7 min 终止延伸,4 ℃ 保存。

1.3 目的基因的克隆测序

PCR 结束后,取 5 μL 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。将纯化后的产物与 T 克隆载体相连[pMD18-T vector,宝生物工程(大连)有限公司],4 ℃ 过夜连接,将重组质粒转化入 DH5α 感受态细胞中进行扩增。每个个体选取 8~16 个阳性克隆,送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 数据分析

将测序得到的 DNA 序列利用 Bioedit V7.0.1 和 Clustal_X 进行编辑和对齐,切除完全相同的引物序列,把重复序列和假阳性序列剔除,从而确定等位基因类型及推导出等位基因型的氨基酸序列。将整理得到的 DNA 等位基因型用 DNAsp 5.10.01 分析其核苷酸多态性水平。登录 GenBank 选取人、鼠相关物种的 MHC 基因序列与本试验得到猪的等位基因序列用 Mega 6.0 进行建树分析。

2 结果与分析

2.1 血液基因组 DNA

由图 1 可见,提取得到的电泳图条带清晰,无明显拖带,可用作后续扩增模板。

收稿日期:2017-01-13

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(编号:2014ZX0800946B003);吉林省现代生猪产业体系项目(编号:201524)。

作者简介:奚衍洋(1992—),女,辽宁瓦房店人,硕士,主要从事基础兽医学研究。E-mail:1624400490@qq.com。

通信作者:赵云蛟,博士,教授,主要从事基础兽医学研究。E-mail:zhyl1970@aliyun.com。

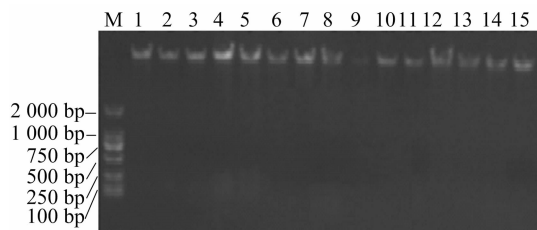


图1 猪血液基因组提取结果

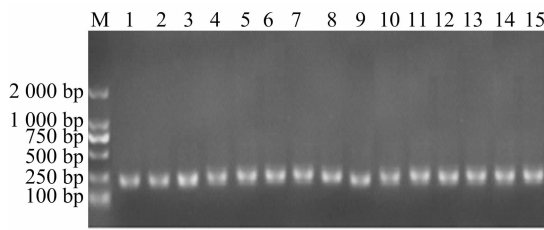


图2 *SLA II-DRB* 第二外显子扩增结果

2.2 猪 *SLA II-DRB* 第二外显子的扩增

扩增结果如图 2 所示:条带清晰,特异性强,片段大小接近 245 bp。

2.3 测序结果分析

采取猪的样本量共计 20 个个体,每个个体测序分别送样 15 个阳性克隆,共得到 300 条序列,经编辑整理合并重复序

列后得到上下游引物完整的 DNA 序列共计 133 条(包含 3 条假基因序列)其中 132 条长度为 245 bp,1 条为 246 bp。将所测得的序列在线 Blast 比对,图 3 是其在 NCBI 中与其他猪 *SLA II-DRB1* 基因第二外显子的比对结果。经检测得到的序列与某猪(序列号:FJ169434.1)*SLA II-DRB1* 基因第二外显子高度相似,证明所得序列是本试验需要的目的片段。

Sus scrofa isolate Ned3 MHC class II antigen (SLA-DRB1) gene, exon 2 and partial cds
Sequence ID: FJ169434.1 Length: 270 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 212		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Pri
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
388 bits(210)	2e-104	210/210(100%)	0/210(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAITTCITGCACCTGTTGAAATTCGAGTGTCAITTCITCAATGGGACCGAGCGGGTGAGG	80		
Sbjct 3	CAITTCITGCACCTGTTGAAATTCGAGTGTCAITTCITCAATGGGACCGAGCGGGTGAGG	82		
Query 61	TTATTGGAGAGGCAATACTATAACGGAGAGGAGTTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGC	120		
Sbjct 63	TTATTGGAGAGGCAATACTATAACGGAGAGGAGTTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGC	122		
Query 121	GAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACGCCAAGGACTGGAACAGCCAGAAG	180		
Sbjct 123	GAGTACCGGGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACGCCAAGGACTGGAACAGCCAGAAG	182		
Query 181	GACCTCTGGAGCAGAGGCGGGCGGAGGTG	210		
Sbjct 183	GACCTCTGGAGCAGAGGCGGGCGGAGGTG	212		

图3 猪 *SLA II-DRB1* 第二外显子在 NCBI 中的 Blast 结果

2.4 等位基因分析

参照惯例将得到的等位基因型命名为 *SLA-DRB1* *01 至 *SLA-DRB1* *45。如表 1 所示猪 20 个个体(标号 A1、A2、B3 等)的 DNA 等位基因型共整理得到 45 种。其中,标号为 *SLA-DRB1* *08 的等位基因分布范围最广,在 19 个个体中存在,其次为 *SLA-DRB1* *07,分布在 16 个个体中,还有大部分基因型是分布在单个个体中。在 A1 和 A4 个体检测到等位基因型最多,为 10 种。

2.5 核苷酸和氨基酸多态性

本试验分析的 45 条等位基因序列,每条核苷酸序列 198 个位点,分析得到核苷酸多态位点共有 102 个,核苷酸多样性水平为 0.107 12,序列间的平均遗传距离为 0.118。经翻译得到相应的 DNA 等位基因氨基酸序列,经编辑整理后得到猪 45 条 DNA 等位基因序列的推导氨基酸序列(图 4),每条序列均为 66 个氨基酸。

2.6 系统进化分析

在 GenBank 选取人(GenBank 登录号:NM_001243965.1)与小鼠(GenBank 登录号:NM_207105.3) *MHC* 基因序列同本试验得到的 45 条猪 *SLA II-DRB1* 第二外显子等位基因序列基于 Kimura 双参数模型构建 N-J(Neighbor-Joining)系统进化树(图 5)。可见,猪 *SLA-DRB1* 基因同人 *HLA-DRB1* 的亲缘关系要比同小鼠 *H2-Ab1* 更近一些。

3 讨论

SLA 基因能够影响 MHC 介导的免疫反应^[16]以及动物的

生产性状^[17]。目前,关于猪能够作为生物研究的理想大型动物模型的相关理论依据越来越多^[18-20],并且猪对于人的异种器官移植是一个良好的潜在供体^[21]。考虑到以上多种的发展可能,寻求一种快速、准确、方便的方法以评估 *SLA* 多态性是很有必要的。有关 *SLA* 等位基因的分型方法多种多样,目前主要包括 PCR-直接测序分型法(PCR-SBT)、PCR-序列特异性引物(PCR-SSP)、PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)及微卫星标记(MS)等。人们已经使用这些方法从不同猪种和猪细胞系中鉴定了许多 *SLA* I 类和 II 等位基因和单倍型^[22]。其中,PCR-SBT 方法是 PCR 扩增得到的特定产物直接或克隆后进行测序从而直观地获取碱基突变位置及突变类型,是当前用来定义 *SLA* 特异性和多样性的最直接和准确的手段。

本研究采集同一种群的 20 头成年长白猪,对其血液 DNA 的 *SLA II-DRB1* 第二外显子进行 PCR 克隆测序。在 DNA 测序结果中,存在 1 个特殊长度的序列(246 bp),且得到的全部 DNA 序列共存在 3 条假基因序列。说明 DNA 序列在 PCR 过程中可能存在缺失、插入、突变、移码等过度修饰^[23]。经各种软件编辑分析得到的 DNA 等位基因序列为 45 条,其中等位基因在个体分布范围为 1~19 个不等,单个个体为 1 个基因型占 66.7%,所占比例较高。这种情况的出现可能与样本量有关,也可能是稀有等位基因的广泛分布^[24]。通过在线 Blast 与猪的 *SLA II-DRB* 座位第二外显子参考基因序列(GenBank 登录号:EU918422.1)进行对照,可知得到的氨基酸序列是 *SLA II-DRB* 第二外显子编码区的第 4~69

表 1 猪 20 个个体的等位基因分布

基因名称	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	B1	B3	B4	B6	B7	C3	C4	C5	C9	D2	D7
<i>DRB1</i> *01	•	•		•		•			•	•			•	•				•		
<i>DRB1</i> *02	•																			
<i>DRB1</i> *03	•	•	•	•					•	•	•	•	•	•			•	•	•	
<i>DRB1</i> *04	•																			
<i>DRB1</i> *05	•																			
<i>DRB1</i> *06	•											•	•		•					
<i>DRB1</i> *07	•	•	•	•		•			•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•
<i>DRB1</i> *08	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>DRB1</i> *09	•																			
<i>DRB1</i> *10		•																		
<i>DRB1</i> *11	•	•	•	•			•					•	•	•	•	•	•	•	•	
<i>DRB1</i> *12		•															•			
<i>DRB1</i> *13		•																•		
<i>DRB1</i> *14		•																•		•
<i>DRB1</i> *15			•																	
<i>DRB1</i> *16			•																	
<i>DRB1</i> *17			•																	
<i>DRB1</i> *18			•																	
<i>DRB1</i> *19			•	•		•				•			•		•	•	•			•
<i>DRB1</i> *20				•																
<i>DRB1</i> *21				•																
<i>DRB1</i> *22				•	•															
<i>DRB1</i> *23				•																
<i>DRB1</i> *24					•															
<i>DRB1</i> *25								•												
<i>DRB1</i> *26									•											
<i>DRB1</i> *27									•											
<i>DRB1</i> *28											•									
<i>DRB1</i> *29											•									
<i>DRB1</i> *30												•								
<i>DRB1</i> *31												•					•			
<i>DRB1</i> *32												•							•	
<i>DRB1</i> *33													•					•		
<i>DRB1</i> *34														•						
<i>DRB1</i> *35														•						•
<i>DRB1</i> *36														•						
<i>DRB1</i> *37															•					
<i>DRB1</i> *38															•					
<i>DRB1</i> *39																•				
<i>DRB1</i> *40																•				
<i>DRB1</i> *41																	•			
<i>DRB1</i> *42																			•	
<i>DRB1</i> *43																			•	
<i>DRB1</i> *44																			•	
<i>DRB1</i> *45																				•

注：• 表示个体存在该等位基因。

位。在对遗传多态性分析中,得到多态性位点及多态性水平均体现了猪 *SLA – DRB* 第二外显子具有高度多态性。同人与小鼠 *MHC* 基因建立的系统进化树中,可以发现与小鼠基因相比,人的基因貌似同猪 *SLA – DRB* 基因亲缘关系更近,但它们同猪均属于不同分支,猪同其他物种 *MHC* 基因的亲缘关系仍需进一步探究。

目前,MHC 分子在人类免疫调节、器官移植和自身免疫

疾病中起到的作用已经受到广泛关注。随着实验动物模型的不开发能够推进有关 MHC 各个方面的生物学研究。有关猪 MHC 的研究显示 *SLA* 分子对于部分免疫疾病具有一定的指导意义,比如猪腹泻^[25–26]、口蹄疫病毒^[27]、皮肤恶性黑色素瘤^[28]、猪繁殖与呼吸综合征病毒^[29]、猪伪狂犬病病毒等^[30]。本研究旨在对猪的 *SLA II – DRB1* 座位第二外显子进行多态性分析,从多个方面阐述了该基因的高度多态性特征,

0000001111	1111112222	2222223333	3333334444	4444445555	5555556666	666666
4567890123	4561890123	456890123	4567890123	4567890123	4567890123	456789
#DRB1*01 HLLKFECHFF	NGTERVRLLE	RQYYNGEEFL	RFDSVDGEYR	AVTELGRPDA	KDWSQKDLL	EQRRAE
#DRB1*02 FME. . K. . . .	S. D	. H. I. NY.
#DRB1*03 F. V. D. Q	K. HV Y. M. . A
#DRB1*04 F. VRD. Q	E. R. . HV V. Y. M. . A
#DRB1*05 F. G. L. L. D	. YF. YV F.	E. . . F. . . E.	. Y. FM	. K. . .
#DRB1*06 F. V. L D	. H. I.	. . . G. E. R. . I.
#DRB1*07 L. V. S. FM.	. H. HA S.	. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*08 FME. D	. H. I. E. R. . I.	G.
#DRB1*09 LM. YPQ	KYL. V L. . F. Y. M	. K. . V
#DRB1*10 F. V. D. Q	K. D. YV F.	E. . . F. Y. FM	. K. . .
#DRB1*11 FMG. S. A. . . . Y.	QKYL. V L. . F. Y. M	. K. . V
#DRB1*12 F. V. D. Q	K. HV G.	. Y. FM	. K. . .
#DRB1*13 F. G. A. D	. YF. D. YV	V. Y. M. . A
#DRB1*14 F. G. A. D	. YF. D. YV F.	E. . . F. Y. FM	. K. . .
#DRB1*15 F. V. D. Q	K. HV	. . . G. A. SE. R. . I.
#DRB1*16 L. V. S. HV M. Y. M. . .
#DRB1*17 FME. D	. H. P.
#DRB1*18 FME. D	. H. I. S.	. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*19 F. R. A. . R. D	. YF. D. YV F.	E. . . F. Y. L. . F. TA
#DRB1*20 F. G. A. D	. YF. D. YV L. . L. Y. R. . I.
#DRB1*21 FME. I. D	GH. I. Y. R. . I.
#DRB1*22 FME. Y. Q	KYL. V L. . F.	. . A. Y. M	. K. . V
#DRB1*23 F. V. D. Q	K. HV S.	. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*24 FME. S. D	. H. IF	. S. E R. . I.
#DRB1*25 FME. M	. H. HV S.	. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*26 Y. YV V.
#DRB1*27 FMG. S. Y. Q	KYL. V L. . F. V.
#DRB1*28 F. V. D. Q	K. . N. . . . HV Y. R. . I.
#DRB1*29 F. V. D. Q	K. HV M. S.	. Y. M. . A
#DRB1*30 F. V. D. Q	K. QV E.	. G. R. . I.
#DRB1*31 L. V. S. FM.	. H. HV C. Y. M. . A
#DRB1*32 FMG. S. Y. Q	KYL. V L. . F. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*33 FME. D	. H. I. Y. M	. K. . .
#DRB1*34 FMG. S. Q	K. HV Y. M. . A
#DRB1*35 L. V. S. D	. H. I. E. R. . I.
#DRB1*36 F. V. D. FM.	. H. HV KP. . . S.	MY. I.	. EK. . .
#DRB1*37 F. G. A. . . L D	. CF. D. YV F.	E. . . F. Y. M. . A
#DRB1*38 FME. Y. Q	KYL. HV Y. M. . A
#DRB1*39 FME. Q	K. H. . . . HV Y. TG.
#DRB1*40 F. R. A. . R. D	. YF. D. YV F.	E. . . F. Y. L. . I.	. EK. . .
#DRB1*41 F. V. D. G. . . FM.	. H. HV S.	. Y. I.	. EK. . .
#DRB1*42 FME. Q	K. HV Y. I.	. EK. . .
#DRB1*43 F. VED. Q	K. HV Y. G.
#DRB1*44 F. V. D. Q	K. I. E.	. Y. R. . I.
#DRB1*45 FME. H	. H. IV E. R. . I. D

图4 猪 20 个个体的等位基因推导氨基酸序列

为后期的猪血液微生物多态性分析试验做铺垫以探索新的抗猪病原体等位基因,从而为 SLA 分子相关免疫研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] Jorgensen J L, Reay P A, Ehrich E W, et al. Molecular components of T - cell recognition [J]. Annual Review of Immunology, 1992, 10 (1): 835 - 873.
- [2] Germain R N, Margulies D H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation [J]. Annual Review of Immunology, 1993, 11 (1): 403 - 450.
- [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] Thorsby E. A short history of HLA [J]. Tissue Antigens, 2009, 74 (2): 101 - 116.
- [5] Dausset J. Iso - leuko - antibodies [J]. Acta Haematologica, 1958, 3 (20): 156 - 166.
- [6] van Rood J J, Leeuwen A, Eernisse J G. Leucocyte antibodies in sera of pregnant women [J]. Vox Sanguinis, 1959, 4 (6): 427 - 444.
- [7] Blattner R J. Fetomaternal leukocyte incompatibility [J]. Journal of Pediatrics, 1959, 54 (5): 717 - 719.
- [8] Vaiman M, Metzger J J, Renard C, et al. Immune response gene (s) controlling the humoral antilysozyme response (Ir - Lys) linked to the major histocompatibility complex SLA, in the pig [J]. Immunogenetics, 1978, 7 (1): 231 - 238.
- [9] Lunney J K, Ho C S, Wysocki M, et al. Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33 (3): 362 - 374.
- [10] Mallard B A, Wilkie B N, Kennedy B W. Genetic and other effects on antibody and cell mediated immune response in swine leucocyte antigen (SLA) - defined miniature pigs [J]. Animal Genetics, 1989, 20 (3): 167 - 178.
- [11] Essler S E, Ertl W, Deutsch J, et al. Molecular characterization of swine leukocyte antigen gene diversity in purebred Pietrain pigs [J]. Animal Genetics, 2013, 44 (2): 202 - 205.

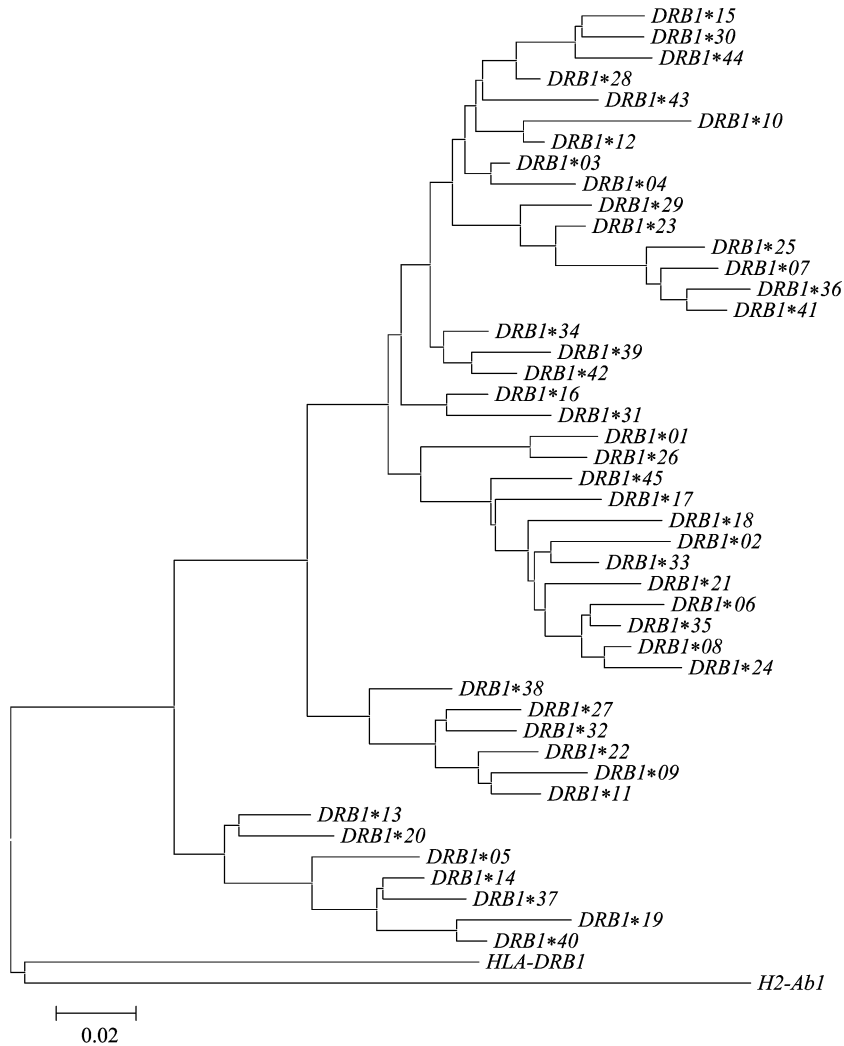


图5 N-J 法构建的 45 种不同序列的系统进化树

- [12] Summerfield A, Guzylack - Piriou L, Schaub A, et al. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon - producing cells. [J]. Immunology, 2003, 110(4): 440 - 449.
- [13] Fuertes L L, Doménech N, Alvarez B, et al. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection[J]. Virus Research, 1999, 64(1): 33 - 42.
- [14] Sumitranholgersson S, Brevig T, Widner H, et al. Activated porcine embryonic brain endothelial cells induce a proliferative human T - lymphocyte response [J]. Cell Transplantation, 2003, 12 (6) : 637 - 646.
- [15] Shia Y C, Bradshaw M, Rutherford M S, et al. Polymerase chain reaction based genotyping for characterization of *SLA - DQB* and *SLA - DRB* alleles in domestic pigs[J]. Animal Genetics, 1995, 26 (2) : 91 - 100.
- [16] Lumsden J S, Kennedy B W, Mallard B A, et al. The influence of the swine major histocompatibility genes on antibody and cell - mediated immune responses to immunization with an aromatic - dependent mutant of *Salmonella typhimurium* [J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 1993, 57(1): 14 - 18.
- [17] Gautschi C, Gaillard C. Influence of major histocompatibility complex on reproduction and production traits in swine[J]. Animal Genetics, 1990, 21(2): 161 - 170.
- [18] Vodicka P, Jr S K, Dvoránková B, et al. The miniature pig as an animal model in biomedical research[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, 1049(1): 161 - 171.
- [19] Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. The pig: a model for human infectious diseases [J]. Trends in Microbiology, 2012, 20 (1) : 50 - 57.
- [20] Lee K, Kwon D N, Ezashi T, et al. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(20): 7260 - 7265.
- [21] Mezrich J D, Haller G W, Arn J S, et al. Histocompatible miniature swine: an inbred large - animal model[J]. Transplantation, 2003, 75 (6) : 904 - 907.
- [22] 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]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 45(1): 87 - 96.
- [23] 许 亮, 卢向阳, 易 克, 等. 假基因的研究进展[J]. 生命的化学, 2003, 23(6): 406 - 409.

6.0、亚硝酸盐浓度 0.75 mg/L 时,斑马鱼的致死率最高。斑马鱼在 pH 值为 6.0 时死亡率高,因为低 pH 值对鱼的感官和呼吸器官有毒害作用,使其摄食能力下降、耗氧量升高、生存能力减弱。此外,过低 pH 值会导致渗透压调节机制失调,打破血液酸碱平衡,从而阻碍鱼体生理生化机制的正常运作^[20]。亚硝酸盐的毒性作用是由于亚硝酸盐进入血液后,将血红蛋白分子的 Fe^{2+} 氧化成为 Fe^{3+} ,抑制血液的载氧能力,从而造成组织缺氧、神经麻痹甚至窒息死亡^[21-22],加速鱼类死亡。本试验虽然显示环境胁迫因子对斑马鱼的致死率没有显著影响,但是在正交试验条件下环境胁迫因子对 *Bc* 毒力基因表达起支持作用,为预测实际养殖池塘中发病率的大小和其发病的危险程度提供相关参考,以便于早做调节,减少损失。

参考文献:

- [1] 陆湘华,崔 昌,王远萍,等. 蜡样芽孢杆菌食物中毒的研究进展[J]. 传染病信息,2015,28(4):251-254.
- [2] 赵振宇,戴荣四,刘东友,等. 一株猪源致病性蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2014,6(3):311-315.
- [3] 陈亚明. 奶牛乳房炎致病菌分离鉴定及快速诊断试剂盒的研发与应用[D]. 南宁:广西大学,2014.
- [4] 谭爱萍,赵 飞,姜 兰,等. 中华鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与特性分析[J]. 广东农业科学,2011,38(20):115-119.
- [5] 骆艺文,郝志凯,王印庚,等. 一株引起刺参“腐皮综合征”的蜡样芽孢杆菌[J]. 水产科技情报,2009,36(2):60-63.
- [6] 陈红莲,王永杰,陈 宇,等. 患爆发性败血症斑点叉尾鲷病原的分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(1):24-29.
- [7] 胡宗云,宋文华,张 涛,等. 黄颡鱼“红头病”病原菌蜡状芽孢杆菌分离鉴定及药敏分析[J]. 水产学杂志,2016,29(4):33-37.
- [8] 周幅萍,袁志明. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学,2007,28(3):357-361.
- [9] 王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J].

(上接第 32 页)

- [24] 赵云蛟,李 丹,徐玉璋,等. 中华菊头蝠 *MHC II - DRB* 基因遗传多态性及进化[J]. 兽类学报,2014,34(3):262-269.
- [25] Yang Q L, Huang X Y, Yuan J H, et al. Polymorphisms in the *SLA - DQA* and *DRA* gene exon 2 and their association with piglet diarrhea in Chinese Yantai black pig[J]. Philippine Agriculturist, 2015,98(3):253-261.
- [26] Huang X Y, Yang Q L, Yuan J H, 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]. Genetics & Molecular Research, 2015, 14(3):10461-10472.
- [27] Bautista E M, Ferman G S, Gregg D, et al. Constitutive expression of alpha interferon by skin dendritic cells confers resistance to infection

水产学报,2002,26(4):368-374.

- [10] 许友卿,陈 哲,丁兆坤. 低温对鱼类的影响及其预防[J]. 广东农业科学,2012,39(15):132-136.
- [11] 张甫英,李辛夫. 低 pH 对鱼类胚胎发育、鱼苗生长及鳃组织损伤影响的研究[J]. 水生生物学报,1992,16(2):175-182,196.
- [12] 李 波,樊启学,张 磊,等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究[J]. 淡水渔业,2009,39(3):31-35.
- [13] 周光正. 氨和亚硝酸盐对于对虾幼虫的毒性[J]. 海洋湖沼通报,1991(2):95-98.
- [14] 王明学,雷和江,卢 光,等. 亚硝酸盐对团头鲂鱼种血红蛋白和耗氧率的影响[J]. 淡水渔业,1997,27(1):14-16.
- [15] 刘 勇. 对大米中呕吐型蜡样芽孢杆菌的多位点序列分型和毒力评价研究[D]. 武汉:武汉轻工业大学,2014.
- [16] 吴 亚,金翠霞. 环境胁迫与生物防御反应[J]. 生态学杂志,1990,9(5):46-49.
- [17] 李亚南,陈全震,邵健忠,等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究,1995,16(1):83-94.
- [18] Wilson M R, Marcuz A, van Ginkel F, et al. The immunoglobulin M heavy chain constant region gene of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: an unusual mRNA splice pattern produces the membrane form of the molecule[J]. Nucleic Acids Research, 1990,18(17):5227-5233.
- [19] Stoner A W, Ottmar M L, Copeman L A. Temperature effects on the molting, growth, and lipid composition of the newly-settled red king crab[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010,393(1/2):138-147.
- [20] 叶诗尧. 嗜水气单胞菌分离鉴定、分型及环境因子影响的研究[D]. 上海:上海海洋大学,2014.
- [21] Alderson R. The effect of ammonia on the growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. Aquaculture, 1979,17(4):291-309.
- [22] 王明学,吴卫东,刘福军,等. Cl^- 在 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 对鲢毒性实验中的拮抗作用初探[J]. 淡水渔业,1995,25(6):3-5.
- [23] by Foot - and - Mouth disease virus[J]. Journal of Virology, 2005, 79(8):4838-4847.
- [24] Tissot R G, Beattie C W, Jr A M, et al. Common swine leukocyte antigen (*SLA*) haplotypes in NIH and Sinclair miniature swine have similar effects on the expression of an inherited melanoma [J]. Animal Genetics, 1993,24(3):191-193.
- [25] Molina R M, Cha S H, Chittick W, et al. Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013,126(3/4):283-292.
- [26] Wimmers K, Schellander K, Ponsuksili S. *BF*, *HP*, *DQB* and *DRB* are associated with haemolytic complement activity, acute phase protein reaction and antibody response in the pig[J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2004,99(3/4):215-228.