

牦牛和普通牛 *BoLA-DRA*^{*} Exon2-intron2 多态性分析

李彦清¹,牛晓亮¹,胡江¹,闫伟¹,罗玉柱¹,王文彪²,才让闹日²

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,甘肃省草食动物生物技术重点实验室,甘肃 兰州 730070;2. 甘南州畜牧科学研究所,甘肃 合作 747000)

摘要: *DRA* 基因属 *BoLA* 家族 II 类基因,编码 II 类抗原分子的 α 链,其第 2 外显子编码的抗原结合区在抗原呈递中发挥重要作用。以天祝白牦牛、大通牦牛、甘南牦牛和普通牛为研究对象,利用 PCR-SSCP 的方法对 *BoLA-DRA* 基因第 2 外显子及第 2 内含子多态性进行了检测。结果表明,*DRA* 基因第 2 外显子区检测到 197 位 T>C 和 116 位 G>A 突变,对应 A、B 和 C 3 种等位基因,PIC 值为 0.249~0.424,为中度多态。第 2 内含子区发现 1 个 A>G、1 个 T>C 突变和 1 个 C>T 突变,对应 a、b、c 和 d 4 种等位基因,PIC 值为 0.389~0.515,为中度及高度多态。聚类分析表明,牦牛 *DRA* 基因第 2 外显子区碱基序列与普通牛以及山羊的同源性最高,系统进化情况与它们亲缘关系远近一致。

关键词: 牦牛;普通牛;*DRA* 基因;PCR-SSCP;多态性

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2015)04-0072-06

doi: 10.7668/hbxb.2015.04.013

Polymorphism of *BoLA-DRA*^{*} Exon2-intron2 in Yak and Bovine

LI Yan-qing¹, NIU Xiao-liang¹, HU Jiang¹, YAN Wei¹,
LUO Yu-zhu¹, WANG Wen-biao², CAIRANG Nao-ri²

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Animal Husbandry Science of Gannan Prefecture, Hezuo 747000, China)

Abstract: *DRA* gene, coding α chain of II antigen molecules, belongs to the family of *BoLA* II genes. The antigen-binding region coded by exon2 of *DRA* gene plays an important role in antigen presentation. This study detected the genetic polymorphisms in exon2 and intron2 of *BoLA-DRA* gene in Tianzhu White yak, Datong yak, Gannan yak and cattle by PCR single-strand conformational polymorphism (SSCP). The results showed that two SNPs, T>C at 197th and G>A at 116th, corresponding to alleles A, B and C were detected, and the polymorphism was moderate level with PIC in the range of 0.249-0.424 in the exon2 of *BoLA-DRA*. Four mutations, including one T>C, one C>T and one A>G, corresponding to alleles a-d were identified, and moderate or high polymorphism with PIC in the range of 0.389-0.515 was observed in the intron2 of *BoLA-DRA* in yak and cattle. Deduced nucleotide sequences of *BoLA-DRA*^{*} exon2 between yak, bovine and goat were the highest on homology and the phylogenetic distance consistent with their genetic relationship.

Key words: Yak; Bovine; *DRA* gene; PCR-SSCP; Polymorphism

MHC 即主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC), 是一类细胞表面转膜蛋白, 在抗原识别与呈递、免疫应答与调控等方面起重要作用。MHC 具有高度多态性、紧密不平衡连锁以及单体型遗传等特征^[1], 其基因编码产物为 MHC 抗原分子。研究表明, MHC 与人类和家畜的一些疾

病存在强相关^[2]。Acosta-Rodriguez 等^[3] 1978 年首次报道了牛 MHC 并将其命名为牛白细胞抗原系统 (Bovine lymphocyte antigen, BoLA)。BoLA 位于牛的第 23 号染色体上, 根据其编码产物、表达方式、组织分布及功能等的不同可分为 I 类、II 类和 III 类基因。其中 II 类基因 a 区包括有表达功能的 *DR* 和 *DQ* 基因家族, b

收稿日期: 2015-05-07

基金项目: 甘肃省杰出青年科学基金项目 (1210RJDA008); 甘肃省国际科技合作专项 (1304WCGA178); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目 (GNSW-2013-9)

作者简介: 李彦清 (1988-), 男, 甘肃通渭人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与生产研究。

通讯作者: 胡江 (1975-), 男, 甘肃秦安人, 副教授, 博士, 主要从事牛遗传育种与生产研究。

区包括一些未知功能的基因,如 *DYA*、*DIB* 和 *DOB*。

DRA 基因属 BoLA 家族 II 类基因,普通牛 *DRA* 基因全长 4 702 bp,由 5 个外显子和 4 个内含子组成。*DRA* 基因编码 II 类抗原分子的 α 链,其第 2 外显子编码的抗原结合区在抗原呈递中发挥着重要作用^[4]。楚秋霞等^[5]预测了南阳牛 BoLA-*DRA* 基因编码区的理化性质和结构特征,结果表明 BoLA-*DRA* 编码蛋白是由 7 个功能结构域构成的疏水性膜蛋白。蒲兰屏等^[6]对犏牛 *DRA* 基因分析发现,其在所有动物尤其是反刍动物中表现高度保守性。

牦牛是主要分布于中国青藏高原及毗邻高寒地区的特有牛种,对当地牧民的衣食住行有重要影响。牦牛选育程度较低,生产性能不高,但抗病、耐寒性能强,对青藏高原寒冷、少氧的严酷环境有较强适应性。目前对牦牛 MHC 的研究报道很少。本研究采用 PCR-SSCP 方法,检测和分析不同牦牛类群及普通牛的 BoLA-*DRA* 基因第 2 外显子及第 2 内含子 SNPs,分析各群体该基因检测区域的遗传特征,以期为揭示牦牛抗病、抗逆性能积累更多的分子遗传学数据。

1 材料和方法

1.1 试验动物及血样采集

试验动物为天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛及普通牛(秦川牛及其杂种牛),其中天祝白牦牛 117 头,甘南牦牛 554 头,青海大通牦牛 37 头,普通牛 45 头。颈静脉采集血样,酸性柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)抗凝,-20℃冻存,部分血样用 FTA 卡保存。

1.2 基因组 DNA 提取

FTA 卡保存血样的基因组 DNA 提取参考 Zhou 等^[7]两步法。冻存的血样用常规苯酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

参照 GenBank 中 BoLA-*DRA* 基因序列(登录号:AC_000180),用 DNAMAN 软件设计特异性引物 P1 和 P2,分别扩增该基因第 2 外显子及第 2 内含子区域,扩增产物长度分别 272,226 bp。引物序列为:P1(F):5'-CCTGACCCCCTTTCTTGCT-3',P1(R):5'-ATTGGTGTGGGGTGTGT-3';P2(F):5'-CCTGACCCCCTTTCTTGCT-3',P2(R):5'-ATTGGTGTGGGGTGTGT-3'。引物由北京六合华大生物科技有限公司合成。

PCR 反应总体积 20 μ L,各成分用量(终浓度):基因组 DNA(50 ng/ μ L)0.8 μ L(或 1.2 mm FTA 卡小圆片 1 个),*Taq* 预混酶(北京百泰克生物技术有

限公司)11 μ L,上下游引物(0.25 μ mol/L)各 0.4 μ L,ddH₂O 为 7.4 μ L(若用 FTA 卡血样时,ddH₂O 为 8.2 μ L)。

PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,61℃退火 30 s(P1 和 P2 引物退火温度相同),72℃延伸 30 s,共循环 35 次;72℃延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,4℃保存。

1.4 PCR-SSCP 检测

PCR 管内加入 PCR 产物 3 μ L,变性上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺、0.025% 二甲苯氰、0.025% 溴酚蓝、10 mmol/L EDTA)8 μ L,98℃变性 10 min,迅速冰浴 5 min,上样于 12%(P1 引物 PCR 产物)或 10%(P2 引物 PCR 产物)非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=39:1),电压 280 V、电泳槽水循环温度 10℃、电泳 20 h。待电泳完成,用银染法^[8]染色,判定基因型。

1.5 等位基因序列测定

依据染色判型结果,将等位基因中纯合基因型的个体,应用其 PCR 扩增产物直接测序;对于检测到的等位基因仅存在于杂合子的个体,参考 Hu 等^[9]方法切胶测序。序列测定由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.6 数据统计分析

等位基因核苷酸序列的比对应应用 DNAMAN 软件完成,基因型频率、等位基因频率、纯合度(H_o)、有效等位基因数(N_e)和杂合度(H_e)采用 Popgen 软件计算^[10]。PIC 利用软件计算多态信息含量(PIC)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

用 P1 和 P2 引物分别扩增天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛及普通牛 *DRA* 基因第 2 外显子和第 2 内含子区域,扩增产物琼脂糖凝胶检测结果见图 1。2 对引物均获得较好扩增效果,产物片段大小为 200~300 bp,没有出现非特异扩增条带,可以进行 SSCP 分析。

2.2 BoLA-*DRA* 基因 PCR-SSCP 分析

各类群牦牛及普通牛 *DRA* 基因 P1 和 P2 引物 PCR-SSCP 检测结果见图 2。从 SSCP 图谱可以看出,P1、P2 两引物均有多态性,其中 P1 引物扩增片段出现由 A、B 和 C 3 种等位基因控制的 AA、AB、AC、BB、BC 和 CC 6 种基因型(图 2-A)。P2 引物扩增片段出现由 a、b、c 和 d 4 种等位基因控制的 aa、ab、ac、bb、bc、bd 和 cc 7 种基因型,其中等位基因 d 仅检测出杂合子个体(图 2-B)。

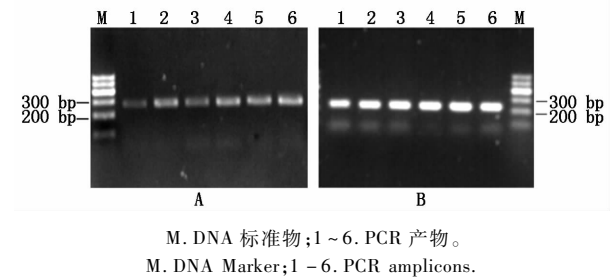


图 1 *DRA* 基因 P1 (A) 和 P2 (B) 引物 PCR 产物琼脂糖检测

Fig. 1 Agarose gel check of the PCR amplicons of *DRA* gene with P1 (A) and P2 (B) primers

2.3 *DRA* 基因不同等位基因序列比对

以普通牛 *DRA* 基因序列 (AC_000180. 1) 为模板,应用 DNAMAN 软件对 *DRA* 基因 P1 引物和 P2 引物所扩增区域的各等位基因进行比对 (图 3,4)。结果表明,*DRA* 基因 P1 引物扩增区域等位基因 B 序列与普通牛 AC_000180. 1 序列相同,等位基因

```
B: CCTGACCCCCCTTTCTTGCTCTTTTCAGAGAATCATGTGATCATCCAAGCTGAGTTCATCTGAAACCTGAGGAATCAGCCGAGTTTATGTTT
A: -----
C: -----

B: GACTTTGATGGTGATGAGATTTTCCACGTGGATATGGGGAAGAAGGAGACGGTGTGGCGGCTTCAGAAATTTGGACATTTTGCCAGCTTTG
A: -----
C: -----A-----

B: AGGCTCAGGTGCCCTGGCCAATATGGCTGTGATGAAAGCTAACCTGGACATCATGATAAAGCGCTCCAACAACCCCCAACACCAAT
A: -----C-----
C: -----C-----
```

图 3 牦牛及普通牛 *DRA* 基因 P1 引物扩增区域等位基因核苷酸序列比对

Fig. 3 Nucleotide sequences alignment for P1 amplicons of *DRA* gene in yak and bovine

```
c: ACAACCCCCAACCAATGGTAACCTCTGCTCCAGTCTCTAGACTTGGGAATTGTAGCTTTAAACAGATGCTTGAGCTCTTTGTGTTTGTACTGAGACTTTCOCTCAG
a: -----
b: -----C-----
d: -----

c: GACCTATTATGTGATGCAAAACCAATTTCTTATGCCACAGGCCAAGAACTTCAGGAGTTTCTCTTTCTGTGATGTCTAAGATCTGTCTTTGGCAACCAACAGTCTG
a: G-----
b: G-----
d: G-----T-----
```

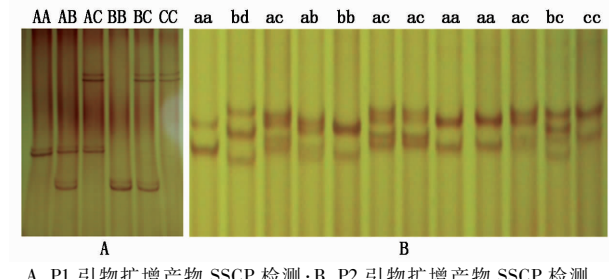
图 4 牦牛及普通牛 *DRA* 基因 P2 引物扩增区域等位基因核苷酸序列比对

Fig. 4 Nucleotide sequences alignment for P2 amplicons of *DRA* gene in yak and bovine

2.4 *DRA* 基因遗传多态性

2.4.1 基因型频率和基因频率 牦牛和普通牛群体 *DRA* 基因 P1 引物 (第 2 外显子) 和 P2 引物 (第 2 内含子) 扩增区域的基因型频率和基因频率见表 1,2。

P1 引物扩增区域在牦牛和普通牛群体中均检测到 A、B 和 C 3 种等位基因,其中等位基因 A 频率



A. P1 引物扩增产物 SSCP 检测;B. P2 引物扩增产物 SSCP 检测。

A. SSCP analysis for PCR amplicons of P1 primers;

B. SSCP analysis for PCR amplicons of P2 primers.

图 2 *DRA* 基因 PCR-SSCP 检测

Fig. 2 PCR-SSCP analysis of *DRA* gene

A、C 均检测到 197 位 T > C 的转换,而等位基因 C 也检测到 116 位 G > A 的转换。*DRA* 基因 P2 引物扩增区域等位基因 C 与普通牛 AC_000180. 1 序列相同,另外 3 个等位基因检测到 3 个 SNPs,包括 1 个 A > G 转换、1 个 T > C 转换和 1 个 C > T 转换。

类群 Populations	数量 Quantity	基因型频率/% Genotype frequency						基因频率/% Allelic frequency		
		AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
天祝白牦牛 Tianzhu white yak	448	0.694	0.261	0.009	0.031	0.002	0.002	0.830	0.162	0.008
大通牦牛 Datong yak	39	0.538	0.410	—	0.026	0.026	—	0.737	0.250	0.013
甘南牦牛 Gannan yak	143	0.678	0.203	0.070	0.021	0.028	—	0.810	0.137	0.053
普通牛 Bovine	50	0.480	0.240	0.140	0.100	0.020	0.020	0.674	0.235	0.092

表 2 四类群牛 *DRA* 基因第 2 内含子的基因型频率和等位基因频率

Tab.2 Genotype and allelic frequency of *DRA* intron2 in yak and bovine populations

类群 Populations	数量 Quantity	基因型频率/% Genotype frequency							基因频率/% Allelic frequency			
		aa	ab	ac	bb	bc	bd	cc	a	b	c	d
天祝白牦牛 Tianzhu white yak	117	0.496	0.120	0.325	–	0.051	–	0.009	0.720	0.086	0.194	–
大通牦牛 Datong yak	37	0.189	0.135	0.432	–	0.162	–	0.081	0.486	0.129	0.386	–
甘南牦牛 Gannan yak	554	0.404	0.224	0.202	0.065	0.063	0.005	0.036	0.615	0.212	0.170	0.004
普通牛 Bovine	45	0.467	0.111	0.311	0.044	0.022	–	0.044	0.671	0.114	0.216	–

P2 引物扩增区域检测到的等位基因在牦牛及普通牛群体间分布不均衡,其中甘南牦牛检测到 4 种等位基因 a、b、c 和 d,而天祝白牦牛、大通牦牛及普通牛仅检测到等位基因 a、b 和 c,各群体中等位基因 a 频率 0.486~0.720,为优势等位基因。甘南牦牛检测到 aa、ab、ac、bb、bc、bd 和 cc 6 种基因型,而其他三类群牛均未检测到 bd 基因型,天祝白牦牛、大通牦牛也未检测到 bb 基因型;甘南牦牛、天祝白牦牛及普通牛 aa 型为优势基因型,而大通牦牛 ac 型为优势基因型。

2.4.2 *DRA* 基因纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量 通常用遗传杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)来评价群体的遗传变异,遗传参数不同,相应的群体遗传也会有差别。各类群牦牛及普通牛 *DRA* 基因在 P1 及 P2 引

物扩增区域的遗传参数见表 3。P1 引物扩增区域天祝白牦牛、大通牦牛、甘南牦牛及普通牛遗传杂合度为 0.271~0.447,PIC 值为 0.249~0.424,均表现为中度多态;P2 引物扩增区域牦牛和普通牛群体遗传杂合度为 0.455~0.686,大通牦牛 PIC=0.515,为高度多态,而其他群体 PIC 值为 0.389~0.491,均表现为中度多态。

2.5 不同物种 *DRA* 基因第 2 外显子核苷酸序列同源性及系统发育分析

牦牛、普通牛、山羊等 6 个物种 *DRA* 基因编码区核苷酸序列同源性分析见表 4。牦牛与普通牛、山羊的同源性最高,分别为 99.6% 和 95.9%,而与马、野猪、大猩猩和人同源性依次为 90.2%,89.8%,87.8%,87.0%。7 个物种 *DRA* 基因编码区核苷酸序列的系统进化树见图 5,牦牛与普通牛和山羊亲

表 3 牦牛及普通牛 *DRA* 基因多态信息量、纯合度、杂合度和等位基因数

Tab.3 PIC, Ho, He and Ne of the yak and bovine *DRA* gene

多态位点 Polymorphism	遗传多态参数 Genetic polymorphism parameters	天祝白牦牛 Tianzhu white yak	大通牦牛 Datong yak	甘南牦牛 Gannan yak	普通牛 Bovine
P1	等位基因数	3	3	3	3
	纯合度	0.729	0.553	0.690	0.612
	杂合度	0.271	0.447	0.310	0.388
	有效等位基因数	0.285	0.394	0.323	0.483
	多态信息含量	0.249	0.326	0.294	0.424
P2	等位基因数	3	3	4	3
	纯合度	0.509	0.314	0.503	0.546
	杂合度	0.491	0.686	0.497	0.455
	有效等位基因数	0.437	0.599	0.548	0.491
	多态信息含量	0.389	0.515	0.491	0.437

表 4 牦牛与 6 个物种 *DRA* 基因第 2 外显子核苷酸序列同源性

Tab.4 Similarity of nucleotide acid sequence of *DRA* exon2 between yak and other 6 species

物种 Species	牦牛 <i>Bos grunniens</i>	普通牛 <i>Bos taurus</i>	山羊 <i>Capra hircus</i>	野猪 <i>Sus scrofa</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	大猩猩 <i>Gorilla</i>	马 <i>Equus caballus</i>
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	100						
普通牛 <i>Bos taurus</i>	99.6	100					
山羊 <i>Capra hircus</i>	95.9	95.5	100				
野猪 <i>Sus scrofa</i>	89.8	89.4	89.4	100			
人 <i>Homo sapiens</i>	87.0	86.6	88.2	90.2	100		
大猩猩 <i>Gorilla</i>	87.8	87.4	89.0	91.1	99.2	100	
马 <i>Equus caballus</i>	90.2	89.8	89.0	91.1	89.0	89.8	100

注:各物种基因序列:牦牛. AC_000180;普通牛. AC_000180;山羊. AB008755. 1;野猪. AY303990. 1;人. NC_000006. 12;大猩猩. AF200221. 1;马. JN035631. 1。
Note: Nucleotide sequences No.: *Bos grunniens*. AC_000180; *Bos taurus*. AC_000180; *Capra hircus*. AB008755. 1; *Sus scrofa*. AY303990. 1; *Homo sapien*. NC_000006. 12; *Gorilla*. AF200221. 1; *Equus caballus*. JN035631. 1.

缘关系最近,而与马、野猪、大猩猩和人亲缘关系依次渐远。不同物种 *DRA* 基因编码区核苷酸序列的

系统发育树、生物进化的物种树与动物分类学一致。

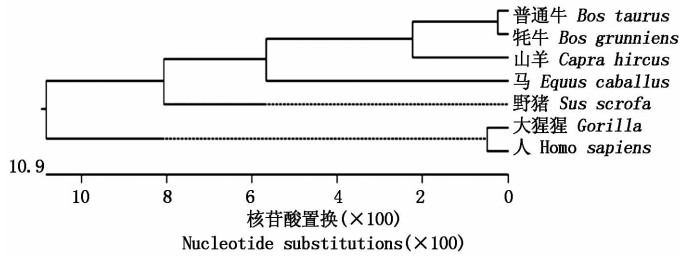


图5 七个物种 *DRA* 基因编码区核苷酸序列系统进化树

Fig.5 Phylogenetic trees of nucleotide sequences of *DRA* gene among 7 species

3 讨论

BoLA-*DRA* 基因编码 MHC-II 类抗原分子的 α 链,主要功能是抗原的识别与呈递以及免疫应答与调控等。本研究在天祝白牦牛、大通牦牛、甘南牦牛和普通牛 4 个群体中,*DRA* 基因第 2 外显子发现 3 种等位基因,检测到 116 位的 $G > A$ 和 197 位的 $T > C$ 同义突变;第 2 内含子区检测到 3 个 SNPs 位点,包括 1 个 $A > G$ 转换、1 个 $T > C$ 转换和 1 个 $C > T$ 转换。王兴平等^[11]从秦川牛、鲁西牛、南阳牛和晋南牛 4 个品种的 *DRA* 基因第 2 外显子检测到 A、B、C、D 和 E 共 5 个等位基因,其中第 116 位和 197 位分别检测到 $G > A$ 和 $T > C$ 的突变与本研究结果相同。另外,王兴平等^[11]在中国黄牛群体中发现的 D 和 E 等位基因,以及高树新等^[12]在西门塔尔牛和三河牛 *DRA* 基因第 2 外显子检测到 166 位 $G > T$ 和 247 位 $C > T$ 突变并形成 A、B 和 C 3 个等位基因,与本研究牦牛及普通牛相应区域突变位点不同,这可能是检测的牛品种(或牛种)不同所致。

不同物种或品种动物的 *DRA* 基因多态性报道并不一致。大多数 MHC 家族的基因具有高度的多态性,但 *DRA* 基因序列却比较保守^[13],刘榜^[14]检测猪 MHC-II 类区 DRB、DQB、DQA 及 *DRA* 4 个功能基因第 2 外显子多态性,发现 *DRA* 基因在该区域 SNPs 频率最低仅为 1.3%;高树新^[15]对中国荷斯坦牛、中国西门塔尔牛和三河牛 4 个品种 MHC-II 基因的 4 个功能基因第 2 外显子 SSCP 分析证实 *DRA* 基因第 2 外显子多态性最不丰富。而本研究发现牦牛及普通牛 *DRA* 基因第 2 外显子 PIC 为 0.249 ~ 0.424,表现为中度多态,第 2 内含子区 PIC 为 0.389 ~ 0.515,表现为中度及高度多态,研究结果的差异可能与检测的物种及品种不同有关。

DRA 基因第 2 外显子编码抗原结合位点,影响动物对疾病的免疫力。因此,大多数哺乳动物该基因研究均集中于第 2 外显子多态性,而未见内含子

突变的报道。内含子是真核生物基因内的间插序列,比外显子长,占基因的大部分比例,因此,随机突变大多发生在内含子序列中。内含子不编码序列,但它在选择性剪接中表现重要功能,因此可能影响基因的表达调控^[16]。本研究在 3 个牦牛群体和普通牛群体 *DRA* 基因第 2 内含子区检测到的 3 个 SNPs,其是否影响基因的功能,仍有待进一步研究。

系统发育分析表明,牦牛与普通牛、山羊在 *DRA* 基因第 2 外显子区域相似性最高,分别为 99.6% 和 95.9%,而与马、野猪、大猩猩和人亲缘关系依次渐远。刘榜等^[17]构建了猪、牛、绵羊和人等 13 个物种 *DRA* 基因第 2 外显子的进化树,结果发现猪和犬间、人和猕猴间、绵羊与牛间的同源性最高。楚秋霞等^[5]利用人、猫、马、野猪、黑猩猩、兔、牛和羊等 9 个物种的 BoLA-*DRA* 基因氨基酸序列构建进化树,结果显示 *DRA* 的氨基酸序列与羊的同源性最高。上述研究结果均与本研究一致,符合郭松长等^[18]将牦牛归为牛属中的一个亚属或一个种的结论。

DRA 基因与人或动物某些疾病呈相关性。陈莉莉等^[19]在对我国苗族人群 I 型糖尿病患者与 HLA-*DR* 基因频率的相关性研究时发现 DR_3 、 DR_9 与 I 型糖尿病呈正相关; DR_2 与 I 型糖尿病呈负相关。杨巧丽等^[20]的研究证实 SLA-*DRA* 基因不同基因型对仔猪腹泻有重要的影响。而牛 BoLA II 类分子也与许多疾病有强相关性^[21]。高树新等^[12]研究显示 BoLA-*DRA* 基因第 2 外显子突变与中国西门塔尔牛、三河牛的乳房炎易感性有关。本研究虽然检测到牦牛 *DRA* 基因第 2 外显及第 2 内含子突变,但因缺乏疾病表型数据,因此,该突变对牦牛相应性状的影响仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙东晓.牛 BoLA-*DRB3* 基因的多态性与乳房炎相关性初探[D].北京:中国农业大学,1999.
- [2] Andersson L,Bohme J,Rask L,et al. Genomic hybridiza-

- tion of bovine class II MHC genes: Extensive polymorphisms of DQB and *DQB* genes [J]. *Animal Genetics*, 1986, 17(2): 95 – 112.
- [3] Acosta-Rodriguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, *et al.* Analysis of BoLA class microsatellites in cattle infected with *Boophilus microplus* ticks: Class II is probably associated with susceptibility [J]. *Veterinary Parasitology*, 2005, 127(3/4): 313 – 321.
- [4] Shook G E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count [J]. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 1993, 9(3): 563 – 581.
- [5] 楚秋霞, 陈付英, 王志方, 等. 南阳牛 BoLA-*DRA* 基因编码区生物信息学分析 [J]. *中国牛业科学*, 2013, 39(6): 28 – 31.
- [6] 蒲兰屏, 席冬梅, 樊月园, 等. 犏牛主要组织相容性复合体 DRA 基因 (MHC-Class II-DRA) 的分子特征分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(9): 12 – 17.
- [7] Zhou H, Hickford J G H, Fang Q. A two-step procedure for extracting genomic DNA from dried blood spots on filter paper for PCR amplification [J]. *Anal Biochem*, 2006, 354: 159 – 161.
- [8] Byun S O, Fang Q, Zhou H, *et al.* An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 385(1): 174 – 175.
- [9] Hu J, Zhou H T, Smyth A, *et al.* Polymorphism of the bovine *ADRB3* gene [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3389 – 3392.
- [10] 张润锋, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 西安荷斯坦奶牛群 5 个基因座位遗传多态性的 PCR-RFLP 分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 545 – 549.
- [11] 王兴平, 许尚忠, 咎林森, 等. 牛 BoLA-*DRA* 基因 EXON2 遗传多态性及序列分析 [C]//中国畜牧兽医学
- 会畜禽遗传标记学分会. 第十次全国畜禽遗传标记研讨会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学会畜禽遗传标记学分会, 2006: 1.
- [12] 高树新, 许尚忠, 高雪, 等. 两种兼用型牛 BoLA-*DRA** exon2 多态性及其与乳房炎的关联分析 [J]. *华北农学报*, 2008, 23(1): 211 – 213.
- [13] Sena L, Schneider M P C, Brenig B, *et al.* Polymorphism in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles [J]. *Anim Genet*, 2003, 34: 1 – 10.
- [14] 刘榜. 15 个猪品种 MHC II 类区 4 个基因的 SNPs 分析及与免疫性状的关联 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2003.
- [15] 高树新. *BoLA* 基因多态性及其与奶牛乳房炎的关联研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [16] Mallet J, Houhou L, Pajak F, *et al.* The cholinergic locus; *ChAT* and *VACHT* genes [J]. *J Physiology Paris*, 1998, 92(2): 145 – 147.
- [17] 刘榜, 杨金娥, 樊斌, 等. 一个新的猪 SLA-*DRA* 等位基因的分离与分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(2): 228 – 229.
- [18] 郭松长, 刘建全, 祁得林, 等. 牦牛的分类学地位及起源研究: mtDNA D-loop 序列的分析 [J]. *兽类学报*, 2006, 26(4): 325 – 330.
- [19] 陈莉莉, 伍汉文, 文格波, 等. 我国苗族人群 1 型糖尿病患者与 HLA-*DR* 基因频率的相关性研究 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2005, 13(1): 31 – 33.
- [20] 杨巧丽, 孔晶晶, 赵生国, 等. 猪 SLA-*DRA* 基因外显子 2 多态性及其与仔猪腹泻的关联分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(7): 1020 – 1027.
- [21] Diaz S, Echeverria M G, Pena N L, *et al.* Development of an ELA-*DRA* gene typing method based on pyrosequencing technology [J]. *Tissue Antigens*, 2008, 72(5): 464 – 468.