

# 我国巴马小型猪 *SLA-2* 基因克隆及分子特征

高凤山<sup>1</sup> 姜 平<sup>1</sup> 李新生<sup>2</sup> 李云岗<sup>2</sup> 夏 春<sup>2\*</sup>

(大连大学生物工程学院 生物化学和分子生物学实验室 大连 116622)

(中国农业大学动物医学院 农业部预防兽医学重点实验室 北京 100094)

**摘要** :为研究我国巴马小型猪 *SLA-1* 分子特征,设计引物克隆了 *SLA-1* 类分子 *SLA-2* 基因(*SLA-2 \* bm*),并通过分子生物学软件分析其分子特征。经克隆及序列测定分析,*SLA-2 \* bm* 为 1119bp,其中 3~1097 为 ORF 区,共编码 364 个氨基酸,分别在第 125、188、227 和 283 位置出现半胱氨酸残基,含有两对链内二硫键。氨基酸同源性分析显示 *SLA-2 \* bm* 与其它 *SLA-2*、*SLA-3* 和 *SLA-1* 序列的同源率分别为 88.4%~96.4%、88.3%~90.5% 和 87.7%~92.7%。系统进化树显示 *SLA-2 \* bm* 与其它 *SLA-2* 等位基因在遗传关系上相对独立,进化程度较低;各功能区分析,*SLA-2 \* bm* 与人 *HLA-A2* 和小鼠 *H-2K* 分子结构相似,且保留了人 *HLA-A2* 基因的部分功能位点。结果表明,*SLA-2 \* bm* 属于一个新的等位基因,巴马小型猪是保留原始基因特征的品种。

**关键词** :巴马小型猪,等位基因,分子特征

中图分类号 :Q785 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)04-0686-05

## Cloning and Molecular Characterization of the *SLA-2* from Bama Miniature Pig

GAO Feng-Shan<sup>1</sup> JIANG Ping<sup>1</sup> LI Xin-Sheng<sup>2</sup> LI Yun-Gang<sup>2</sup> XIA Chun<sup>2\*</sup>

(Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian University Bioengineering College, Dalian 116622)

(Key Laboratory for Preventive Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** :In order to study the *SLA-1* molecular characterization of the Bama miniature pig which is an eugenic chinese breed, a pair of primers were designed to amplify the *SLA-2* (*SLA-2 \* bm*) and then the molecular characterization of the interest gene was analyzed by computer. After cloning, sequencing and analyzing by computer, *SLA-2 \* bm* was 1119bp and the ORF frame from 3 to 1097 coded 364 amino acids with two sets of disulfide bond in intro-chain constituted by four cysteines situated in 125, 188, 227 and 283 sites. The amino acid identical ratios between *SLA-2 \* bm* and other *SLA-2*, *SLA-3* and *SLA-1* alleles were 88.4%~96.4%, 88.3%~90.5% and 87.7%~92.7%, respectively. The phylogenetic tree of the *SLA-2 \* bm* demonstrated that it was relatively independent to other *SLA-2* genes and evolved at low extent. Besides, the *SLA-2 \* bm* was similar to the *HLA-A2* and *H-2K* in functional domains and it preserved some functional sites of *HLA-A2*. The results indicated that *SLA-2 \* bm* was a new allele of *SLA-2* and the Bama miniature pig might keep down the archaic genetic characterization in China.

**Key words** :Bama miniature pig, Allele, Molecular characterization

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是脊椎动物体内重要的免疫应答基因,同时也是遗传进化的标志。哺乳动物中,MHC 分为 I、II 和 III 三部分,其中 I 类基因区在进化过程中变异最大,II 和 III 类区相对保守<sup>[1]</sup>。迄今为止,人、鼠及许多脊椎动物 MHC 的基因结构、分子特征及功能已经清楚。

猪的 MHC 又称猪白细胞抗原(swine leukocyte

antigen, SLA)由 Vaiman 等在 1970 年发现<sup>[2]</sup>。SLA 分为 3 个主要的连锁基因群,分别称为 SLA-I, SLA-II 和 SLA-III。猪 SLA-I 有 3 个功能基因座,分别称为 *SLA-1C* (*PD1*),*SLA-1X* (*PD14*)和 *SLA-1Y* (*PD7*),也分别称为 *SLA-C*、*SLA-B* 和 *SLA-A*。其中,*SLA-2* 在信号肽的起始部位比 *SLA-1* 和 *SLA-3* 多 3 个氨基酸残基<sup>[3,4]</sup>。

巴马小型猪是我国培育的特有优质品种,因采

\* 通讯作者 Tel 010-62733372, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

收稿日期:2006-11-07,修回日期:2007-01-04

用近交繁育,致使遗传基因稳定,加之体形小,是进行科学研究十分理想的动物模型。然而,目前国内外还未报道其 *SLA-I* 类分子特征,也不清楚其遗传背景。为了阐明我国巴马小型猪 *SLA-I* 类分子主要等位基因的分子特征,本研究采用 RT-PCR 方法克隆了巴马小型猪 *SLA-2* 基因,并分析了其在整个脊椎动物谱系中的系统进化树,解析了其分子特征,为进一步研究其遗传特征提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 猪品种、载体及菌株

巴马小型猪自交九代取自某小型猪养殖示范场。

pGEM-T Easy vector, *E. coli* JM109 菌株,购自 Promega 公司。总 RNA 提取试剂盒 TRIzol (Invitrogen)。反转录试剂盒 AMV Reverse Transcriptase、IPTG 和 X-gal、 $T_4$  DNA 连接酶及 *EcoR* I 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。GENECLEAN 试剂盒 (BIO101 公司)。其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 引物设计

扩增猪 *SLA-2* 所用引物:参照 DDBJ/EMBL/GenBank 基因库中猪 *SLA-2* 基因序列(AF464049),采用 Oligo6.0 软件设计引物。引物 S1:5'-AGATGCGGGTCAGGGGCCCTCAAG-3', S2:5'-CAGTCCCCACAAGGCAGCTGTCTC-3'。

### 1.3 RT-PCR 扩增猪 *SLA-2* 基因

称取约 100mg 猪脾脏组织,剪碎放入 1.5mL 的 Eppendorf 管中,加入 300 $\mu$ L 的 TRIzol,用研棒研磨直至形成匀浆,再补加 TRIzol 700 $\mu$ L。然后按照试剂盒说明进行总 mRNA 的提取。最后分离的沉淀加入 20 $\mu$ L 0.1% DEPC 水溶解,在 60 $^{\circ}$ C 下孵育 5min, -80 $^{\circ}$ C 保存。

取 2 $\mu$ L 猪脾脏总 mRNA,分别加入 2 $\mu$ L 的 Oligo (dT) (15T) (100mol/L), 2 $\mu$ L AMV buffer, 4 $\mu$ L dNTP (2.5mol/L), 1 $\mu$ L AMV (10U),最后用 0.1% DEPC 水补充至 20 $\mu$ L, 42 $^{\circ}$ C 作用 1h 进行反转录。

反转录后,取反转录第一链 cDNA 2 $\mu$ L (约 0.5 $\mu$ g),加入 50 $\mu$ L PCR 体系中,PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5min 预变性,然后 94 $^{\circ}$ C 1min, 65 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

### 1.4 基因克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 DNA 回收试剂盒将扩增片段纯化后连接到 pGEM-T Easy 载体,4 $^{\circ}$ C 过夜,然后转化到感受态细胞 *E. coli* JM109 涂布于含有 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,蓝白斑筛选及酶切鉴定阳性克隆。

### 1.5 基因序列测定与分析

将鉴定的阳性克隆送上海生工(公司)测序,序列通过 SAKURA 系统登录入 DDBJ/GenBank。核苷酸及氨基酸的序列比对采用 CLUSTALW 法外加手动调整;氨基酸序列的推导、比对采用 GENETYX version 9.0 (Software Development Co., Ltd, Tokyo, Japan)及 DNAMAN Version 5.2.2 (Lynnon BioSoft Co., Ltd),分子进化树采用 DNAMAN 和 Mega2 软件 (Mega software Co., Ltd)的 neighbor-joining 法绘制。

## 2 结果

### 2.1 *SLA-2* 基因的克隆

经过 RT-PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外凝胶成像仪下显示约 1100bp 的条带,产物命名为 *SLA-2 \* bm*。*SLA-2 \* bm* 的序列经克隆、鉴定后测序,序列通过 GENETYX 9.0 分析,长度为 1119bp, 3~1097 为 ORF 区,共编码 364 个氨基酸,分别在第 125、188、227 和 283 位置出现半胱氨酸残基,整个序列中未发现糖基化位点。序列录入 DDBJ/EMBL/GenBank (AB231907)。

### 2.2 *SLA-2 \* bm* 与 *SLA-I* 类分子序列比较

将 *SLA-2 \* bm* 的序列与 DDBJ/EMBL/GenBank 上所有 *SLA-2* (*SLA-B*) 的序列进行比较,发现 *SLA-2 \* bm* 有特征性的氨基酸变异有 3 处,分别在 290 (L/P) 294 (L/R) 和 305 (V/I) 位。*SLA-2 \* bm* 的序列与 DDBJ/EMBL/GenBank 上 *SLA-3* (*SLA-A*) 和 *SLA-1* (*SLA-C*) 基因序列进行比较,发现 *SLA-2 \* bm* 比 *SLA-3* 和 *SLA-1* 等位基因群在起始密码子处多 3 个氨基酸。同源性关系分析揭示,*SLA-2 \* bm* 与其它 *SLA-2*、*SLA-3* 及 *SLA-1* 等位基因群的氨基酸同源率分别为 88.4%~96.4%、88.3%~90.5% 和 87.7%~92.7%。

### 2.3 *SLA-2* 等位基因系统进化树

根据猪 *SLA-2* 各等位基因、部分 *SLA-3* 和 *SLA-1* 的代表性等位基因,以及代表主要脊椎动物分类的动物全长 MHC I 类分子氨基酸序列(鹅 MHC I 为

含完整成熟肽的部分序列),用 DNAMAN 和 Mega2 软件绘制 *SLA-2 \* bm* 的分子进化树(图 1)。结果显示, *SLA-2 \* bm*(AB231907)位于整个系统进化树的最远端,与其它 *SLA-2* 具有相对较远的遗传距离和亲缘关系,属于 *SLA-2* 等位基因的一个远系成员。与其它动物 MHC I 类基因相比, *SLA-2 \* bm* 在系统进化关系上与牛最接近,其次为兔、马、猴、黑猩猩、人、鼠、禽类(鸡、鹅)、两栖类(蛙)、鱼类(斑马鱼、虹鳟鱼)。

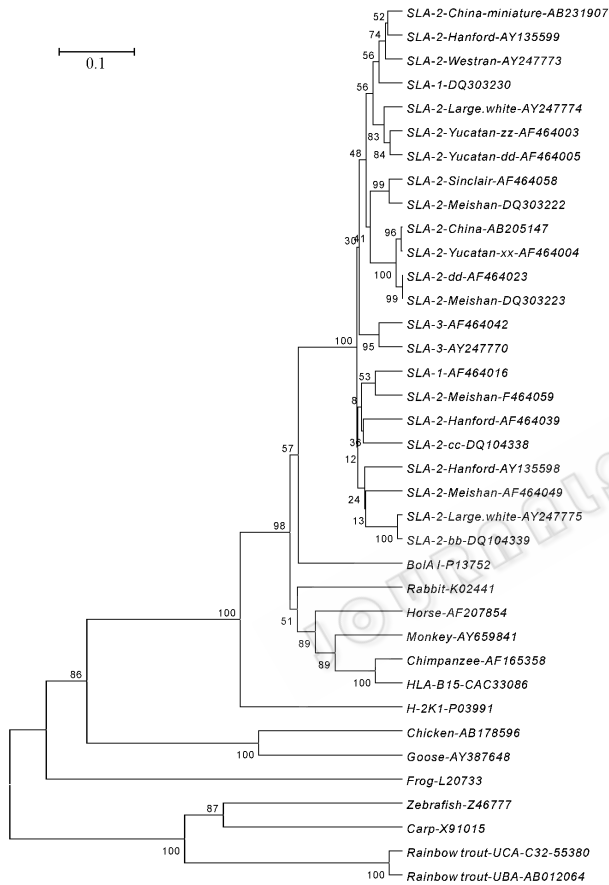


图 1 *SLA-2 \* bm* 系统进化树

注:猪 *SLA-2*, *SLA-1*, *SLA-3* 各等位基因的命名为基因名称加“-”族系/-单倍型-“基因登录号表示;其它动物的命名用动物的名称加“-”加基因登录号表示

## 2.4 *SLA-2 \* bm* 各功能区主要功能位点推测分析

*SLA-2 \* bm* 与 DDBJ/EMBL/GenBank 上有代表性的鼠、人相应 MHC I 类等位基因进行比较,分析各功能区的主要氨基酸的变化,见图 2。在信号肽区, *SLA-2 \* bm* 基因编码氨基酸与 *H-2K1*、*HLA-B15* 及 *HLA-A2* 的氨基酸差异很大,其差异氨基酸分别达到了 11、7、9。 $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区是抗原多肽结合的主要区域,比较发现, *SLA-2 \* bm* 保留了人 *HLA-A2* 与抗

原多肽结合的所有 8 个关键性氨基酸,即 Y7、Y59、Y84、T143、K146、W147、Y159、Y171<sup>[5]</sup>。在  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区 *HLA-A* 与  $\beta 2m$  结合的 19 个氨基酸中, *SLA-2 \* bm* 保留了其中的 16 个;在 3 个关系到 *HLA-A2* 与 CD8 分子结合的关键性氨基酸,即 Gln<sup>115</sup>(Q) Asp<sup>122</sup>(D) 和 Glu<sup>128</sup>(E)<sup>[6]</sup>, *SLA-2 \* bm* 在相应位置保持了一致。 $\alpha 3$  区,199~223 位氨基酸为 *HLA-A2* 与 CD8 分子结合的主要区域,该区域的 25 个氨基酸中, *SLA-2 \* bm* 保留了其中的 19 个氨基酸,有 6 个氨基酸发生了变异,分别在 199(V/A) 207(G/S) 211(K/A) 214(S/T) 220(E/D) 和 223(Q/E),与 *H-2K1* 及 *HLA-B15* 相比,这一区域分别有 7 个和 5 个氨基酸发生了变异,其中,199~205、211 和 221 位是 MHC I 类分子与 CD8 分子结合的必需氨基酸<sup>[7,8]</sup>, *SLA-2 \* bm* 发生了两个必需氨基酸的变异,在 199(V/A) 和 211(K/A);相对于 *H-2K1*, *SLA-2 \* bm* 的变异位点为 211(K/A);相对于 *HLA-B15*,变异位点为 199(V/A) 和 211(K/A)。在  $\alpha 3$  区 *HLA-A2* 与  $\beta 2m$  结合的氨基酸中, *SLA-2 \* bm* 几乎保留了其中所有的氨基酸残基。在细胞质区和穿膜区, *SLA-2 \* bm* 与 *HLA-A2*、*H-2K1* 和 *HLA-B15* 的氨基酸变异程度要大于其它区域。

## 3 讨论

*SLA-2* 为猪 *SLA-I* 的一个基因座,它与 *SLA-3* 和 *SLA-1* 共同构成 *SLA-I* 类分子的 3 个功能基因座,其中, *SLA-2* 在基因特征上与 *SLA-3* 和 *SLA-1* 相比有明显的特征,即在信号肽起始密码子处比后两者多 3 个氨基酸<sup>[4]</sup>,目前国内对猪 *SLA-2* 等位基因分子结构特征方面的研究报道并不多。本研究以我国特色品种巴马小型猪自交 9 代为研究对象,从脾脏克隆了其 *SLA-2* 等位基因,即 *SLA-2 \* bm*。作者前文曾报道过用 *SLA-2 \* bm* 构建猪 *SLA-I* 类复合体及多肽结合性研究,但未详细阐明其分子特征<sup>[9]</sup>。序列测定证实,该克隆基因全长为 1119bp,其中 3~1097 为编码区,编码 364 个氨基酸; *SLA-2 \* bm* 推导的氨基酸序列在 125、188、227 和 283 处有 4 个半胱氨酸残基,推测其含有 2 对链内二硫键。经氨基酸序列比较, *SLA-2 \* bm* 与 *SLA-2*、*SLA-3* 和 *SLA-1* 等位基因群的氨基酸同源率分别为 88.4%~96.4%、88.3%~90.5% 和 87.7%~92.7%,而且该基因在信号肽起始密码子处比 *SLA-3* 和 *SLA-1* 多 3

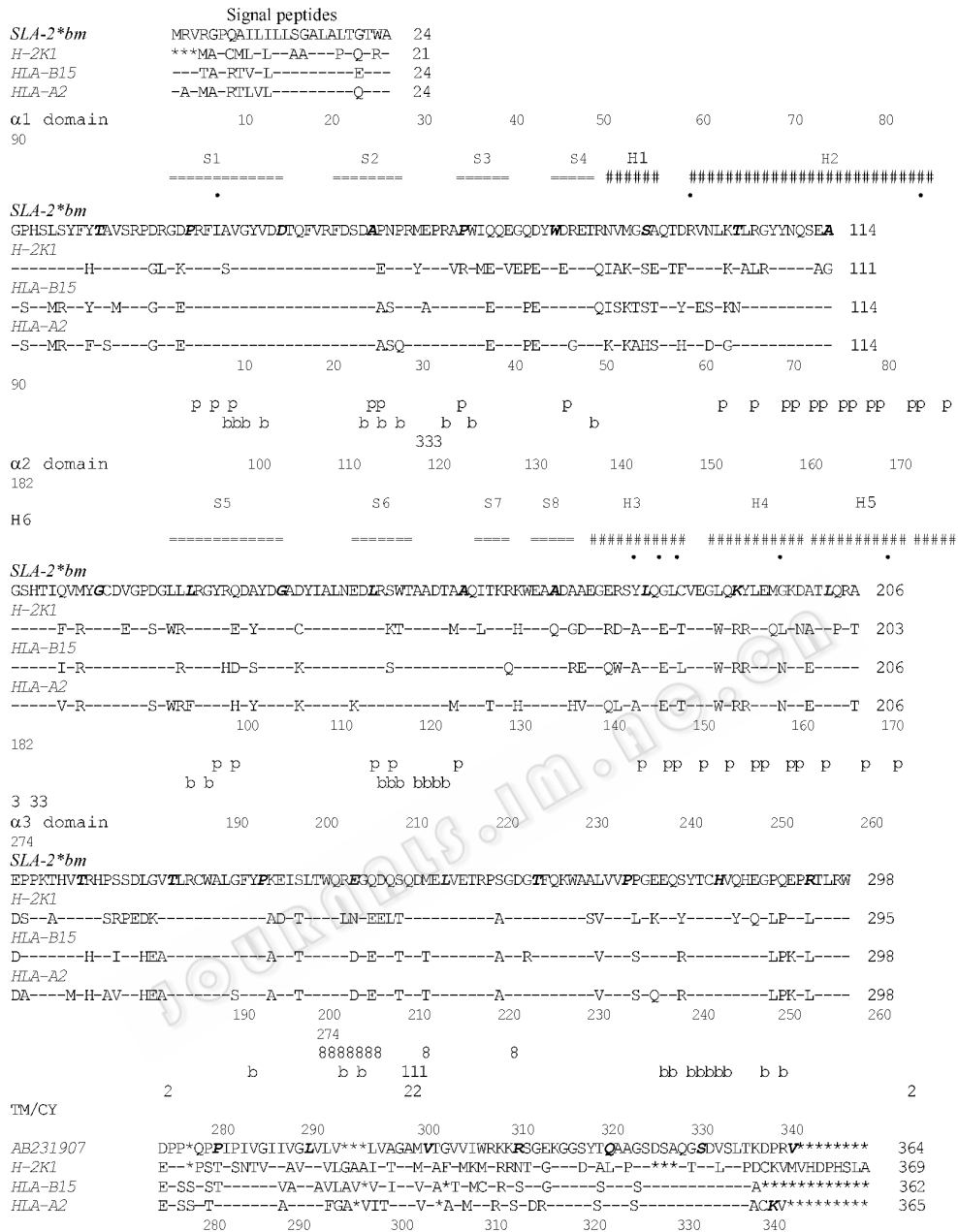


图 2 猪 *SLA-2 \* bm* (AB231907) 等位基因各功能区与鼠 *H-2K* 及人 *HLA-A2*、*HLA-B15* 的比较

注 左侧为 4 个比较的氨基酸序列 :*SLA-2 \* bm* (AB231907) \ *H-2K1* (P04223) \ *HLA-B15* (CAC33086) \ *HLA-A2* (K02883) , 序列上面和下面数字分别显示 *SLA-2 \* bm* 及其他各序列氨基酸从  $\alpha 1$  区开始计算 , 序列右边的数字表示各序列从信号肽开始计算 , \* 缺失 , - 相同的氨基酸 , ● 与抗原多肽结合的 8 个关键性氨基酸残基 , p ( *HLA-A2* ) 与抗原多肽结合的相关氨基酸残基 , b *HLA-A2* 与  $\beta 2m$  结合的氨基酸残基 , =  $\beta$  片层 , #  $\alpha$  螺旋 , *HLA-A2* 下面的数字 1 2 3 8 表示人 *HLA-A2* 的链间结构 ( 1 与  $\alpha 1$  接触 , 2 与  $\alpha 2$  接触 , 3 与  $\alpha 3$  接触 , 8 与 CD8 接触 )

个氨基酸 , 因此 *SLA-2 \* bm* 属于典型的 *SLA-2* 基因。根据 *SLA-2 \* bm* 在所有 *SLA-2* 等位基因中的同源率 88.4% ~ 96.4% , 及其分子进化树关系 , 参照 Yan 等<sup>[10]</sup> 划分新等位基因的标准 , *SLA-2 \* bm* 属于一新的 *SLA-2* 等位基因。

经过与 18 类 *SLA-2* 等位基因、2 类有代表性的

*SLA-3*、2 类有代表性的 *SLA-1* 及其它脊椎动物包括哺乳动物 ( 牛、兔、马等 ) 、灵长类动物 ( 猴、黑猩猩 ) 、人、两栖动物 ( 蛙 ) 及鱼类 *MHC I* 等位基因氨基酸比较 , 绘制系统进化树 , 发现 *SLA-2 \* bm* 在遗传关系上与其它 *SLA-2* 等位基因相距较远 , 属于 *SLA-2* 基因家族的一个远系成员。与其它动物 *MHC I* 基

因相比, *SLA-2 \* bm* 在分子遗传上与牛最接近, 其次为兔、马、猴、黑猩猩、人、鼠、禽类(鸡、鹅)、两栖类(蛙)、鱼类(斑马鱼、虹鳟鱼)。从系统进化树看出, *SLA-2 \* bm* 相对于其它 *SLA-2* 进化程度最低, 最古老。该结果也符合巴马小型猪长期自交繁育, 从而保持其 *SLA* 基因稳定的特点。MHC 分子是脊椎动物进化的标志性基因<sup>[11]</sup>, *SLA-2 \* bm* 相对于其它 *SLA-2* 等位基因的这种稳定、低等进化的特点, 揭示巴马小型猪是一种保持比较原始基因特征的品种。

目前, 关于猪的 *SLA-I* 类分子的晶体结构还未报道, 其详细的蛋白分子二级结构及三级结构(3D)数据缺乏。本实验参照人的 *HLA-A2* 分子解析的晶体结构数据, 将 *SLA-2 \* bm* 基因与人的 *HLA-A2*、*HLA-B15* 和小鼠 *H-2K1* 进行比较(图2), 推测其可能的功能位点。比较发现, 在  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  区, *SLA-2 \* bm* 保留了 *HLA-A2* 与抗原多肽结合的所有 8 个保守氨基酸残基, 在 *HLA-A2* 与  $\beta 2m$  结合的 19 个氨基酸中, *SLA-2 \* bm* 保留了其中的 16 个, 在与 *HLA-A2* 相应的  $\alpha$  螺旋区, 推测的  $\alpha$  螺旋含有 72 个氨基酸残基, *SLA-2 \* bm* 保留了其中大约 50 个氨基酸;  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  结构域  $\beta$  折叠区, *SLA-2 \* bm* 也保留了 62 个推测的氨基酸其中的约 50 个残基。根据分子结构比较分析, *SLA-2 \* bm* 基因保留有人 *HLA-A2* 分子的部分功能。这方面, Chardon 已证实人的  $CD8^+$  细胞可以

直接识别猪的 *SLA-I* 类分子<sup>[4]</sup>。*SLA-2 \* bm* 基因还具有 *HLA-A2* 识别  $CD8$  分子的关键位点, 并且和鼠的相应位点高度同源, 推测猪和人及鼠的 TCR 可以进行交叉识别<sup>[6]</sup>。

## 参考文献

- [1] Trowsdale J, Campbell R D. Eur J Immunogenet, 1994, **19**(1-2): 45 ~ 55.
- [2] Vaiman M, Amoux A, Filleul X, et al. Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1970, **271**(19): 1724 ~ 1727.
- [3] Chardon P, Renard C, Gaillard C R, et al. Genet Sel Evol, 2000, **33**(2): 109 ~ 128.
- [4] Chardon P, Renard C, Vaiman M. Immunol Rev, 1999, **167**: 179 ~ 192.
- [5] Matsumura M, Fremont D H, Peterson P A, et al. Science, 1992, **257**(5072): 927 ~ 934.
- [6] Sullivan J A O H, Sachs D H, Edge A S. J Immunol, 1997, **159**(5): 2318 ~ 2326.
- [7] Salter R D, Benjamin R J, Wesley P K, et al. Nature, 1990, **345**(6270): 41 ~ 46.
- [8] Sun J, Leahy D J, Kavathas P B. J Exp Med, 1995, **182**(5): 1275 ~ 1280.
- [9] Gao F S, Fang Q M, Li Y G, et al. Vet Immunol Immunopathol, 2006, **113**(3-4): 328 ~ 338.
- [10] Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Vet Immunol Immunopathol, 2005, **108**(3-4): 417 ~ 425.
- [11] 韩红星. 国外医学输血及血液学分册, 2000, **23**(5): 305 ~ 307.