

# BCL10、Nramp1 基因多态性与大白仔猪断奶前腹泻关联分析

罗兴<sup>1</sup> 尹立林<sup>1</sup> 刘飞<sup>1</sup> 张维旭<sup>1</sup> 李新云<sup>1</sup> 赵书红<sup>1</sup> 王海燕<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/农业部猪遗传育种重点开放实验室/  
生猪健康养殖协同创新中心, 武汉 430070;  
2. 华中农业大学信息学院, 武汉 430070

**摘要** 为研究大白猪 *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因的单核苷酸多态性, 并寻找与大白仔猪断奶前腹泻相关的分子标记, 构建 490 头大白仔猪群体, 对仔猪断奶前腹泻情况进行统计, 利用 PCR-RFLP 法检测 *BCL10* 基因 3' 端 1149T/C 位点和 *Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 酶切位点多态性, 同时与腹泻频率、腹泻指数和部分生长性状进行关联分析。结果显示: 大白仔猪断奶前腹泻率为 32.0%, 重度腹泻个体的 21 日龄平均断奶重比正常个体低 13.0%, 日增重低 16.2%, 而且大白仔猪在 7~11 日龄和 17~21 日龄存在 2 个断奶前腹泻小高峰。仔猪腹泻粪便病原检测结果表明, 22.5% 的样本检出为沙门氏菌感染, 17.5% 的样本检出为致病性大肠杆菌感染。关联分析结果表明: *BCL10* 基因多态性与初生重相关联 ( $P < 0.05$ ), TT 型个体初生重大于 TC 型个体, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); *BCL10* 基因多态性与腹泻频率、腹泻指数相关联, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 个体腹泻频率、腹泻指数均表现为 TT > TC > CC, CC 与 TC 之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), CC 与 TT 之间差异极显著 ( $P < 0.01$ ); *Nramp1* 基因多态性与腹泻频率、腹泻指数相关联, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 个体腹泻频率、腹泻指数均为 AA、AB 型大于 BB 型, 且 AA 型与 BB 型差异显著 ( $P < 0.05$ ), AB 型与 BB 型差异极显著 ( $P < 0.01$ )。研究结果表明, *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因不同基因型对大白仔猪断奶前腹泻有显著影响, *Nramp1* 基因与猪沙门氏菌感染导致的腹泻有关, *BCL10* 基因 3' 端 1149T/C 位点和 *Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 酶切位点可以作为大白仔猪断奶前抗腹泻育种分子标记。

**关键词** *BCL10* 基因; *Nramp1* 基因; 仔猪; 腹泻; 抗病育种

**中图分类号** S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0083-07

目前, 与仔猪腹泻相关的候选基因及分子标记的发掘仍是抗病育种一个重要的研究内容。B 细胞淋巴瘤-10 基因 (B-cell CLL/lymphoma 10, 简称 *BCL10*) 最早是在研究 MALT 淋巴瘤染色体易位时发现, 并在 t(1;4)(p22;q32) 易位断裂点被首次克隆到<sup>[1]</sup>。*BCL10* 基因通过参与对细胞因子和基因的表达调控, 从而在淋巴细胞的增殖、分化、成熟与凋亡及先天免疫中发挥作用<sup>[2]</sup>。*BCL10* 对所有成熟 B 细胞亚群的形成起着重要作用, 包括滤泡、边缘区和 B1 型 B 细胞<sup>[3]</sup>, 同时与 T 细胞的形成有关<sup>[4]</sup>。可遗传的 *BCL10* 基因缺陷会损害机体先天性免疫能力<sup>[5]</sup>, *BCL10* 基因多态位点与猪免疫力有关<sup>[6]</sup>, 因此可以作为猪抗病育种的候选基因。

天然抗性相关巨噬蛋白基因 (natural resistance associated macrophage protein gene, 简称 *NRAMP1*, 也被称为 *SLC11A1* 基因) 最早在鼠中发现<sup>[7]</sup>, 编码一种具有离子通道和转膜作用的糖蛋白<sup>[8]</sup>。*Nramp1* 编码的磷酸糖蛋白主要存在于网状内皮细胞和器官中, 如: 外周血白细胞、脾和肺中, 可以抵抗多种病原微生物<sup>[9]</sup>。

*Nramp1* 基因不仅对先天免疫力有影响, 并且与细胞内寄生病原菌和非特定致病性病原菌的抵抗力有关。Wu 等<sup>[10]</sup>通过研究发现猪中性粒细胞和单核巨噬细胞的功能与 *Nramp1* 基因的多态性有关。Ding 等<sup>[11]</sup>研究表明猪 *Nramp1* 基因 SNP 位点多态性与白细胞百分比 (white blood cell percent-

收稿日期: 2017-02-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31501922); 国际重大合作项目 (31361140365); 国家高技术研究发展计划项目 (2013AA102502)

罗兴, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传与育种, E-mail: 1351972821@qq.com

通信作者: 王海燕, 博士, 讲师, 研究方向: 生物信息学和猪免疫基因组学, E-mail: wanghaiyan@mail.hzau.edu.cn

age)、单核细胞百分比(monocyte percentage)和 CD4<sup>-</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞相关。同时, Kommadath 等<sup>[12]</sup>通过基因共表达网络分析发现猪 *Nramp1* 基因与沙门氏菌抵抗力相关。赵生国等<sup>[13]</sup>研究表明 *Nramp1* 基因多态性与仔猪腹泻有关。

上述研究均说明 *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因与个体抗病力有关,但关于其多态性与仔猪断奶前腹泻的关系研究较少。本研究以某场美系大白仔猪为研究对象,采用 PCR-RFLP 技术对 *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因进行多态性检测,并对不同基因型间部分生长性状进行差异性比较及其与仔猪生长性状和断奶前腹泻进行关联分析,以揭示 *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因多态与仔猪断奶前腹泻抗病力的关系,为利用分子辅助标记选择进行仔猪断奶前腹泻抗病育种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

本试验于 2015 年 9 月至 2016 年 1 月期间,在湖北省某猪场进行,试验动物包含 490 头大白仔猪,来自同一养殖场的 54 窝,饲养于同一栋的全封闭式猪舍(内设自动温控设施),饲养管理条件均相同。

### 1.2 试验样品采集及仔猪表型数据收集

1)组织样品采集。用剪尾钳剪取仔猪尾组织样品,将组织样品置于装有 1.5 mL 无水乙醇的 2 mL EP 管中, -20℃ 保存。

2)仔猪腹泻粪便样品采集。随机抽取不同日龄、不同栏舍的腹泻程度不同的仔猪,用注射器吸取仔猪粪便 40 份,分别置于 2 mL EP 管中, -20℃ 冻存,并在 30 d 内将样品送至华中农业大学动物疫病检验中心进行腹泻主要病原和病菌检测。

3)仔猪表型数据收集。首先整理搜集齐所有试验仔猪的系谱信息,同时记录试验仔猪从出生到 21 日龄断奶期间的腹泻情况及重要发病事件,称量仔猪初生重、21 日龄断奶重,计算仔猪的日增重、计算腹泻率、腹泻频率、腹泻指数,统计各个体的腹泻次数及腹泻程度,判定标准如下:

腹泻率 = 腹泻总头数 / 仔猪总头数 × 100%;

腹泻频率 = 仔猪腹泻天数 / 正式试验天数 × 100%;

腹泻指数 = 试验期内仔猪粪便评分之和

(腹泻指数越高表示腹泻越严重)。

个体单次腹泻的判定与评分:每天上、下午分别

检查每头试验大白仔猪的腹泻情况,对腹泻情况进行评分记录,腹泻的判定主要依据仔猪肛门的红肿和粪便残留,具体腹泻粪便评分标准是:粪便外观为条形或粒形,被认为是正常,评分为 0;粪便是软粪、但能成形,被认为是轻度腹泻,评分为 1;粪便为稠状、不成形、粪水未分离,被认为是中度腹泻,评分为 2;粪便为液状、不成形、粪水分离,被认为是重度腹泻,评分为 3。

个体在初生至 21 日龄断奶整个阶段腹泻程度的判定标准:健康个体是指记录到腹泻 0 次的个体;轻度腹泻个体是指记录到腹泻 1 次的个体;重度个体是指记录到腹泻 2 次及以上的个体。

### 1.3 方法

1)基因组 DNA 提取。用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA,试剂盒购买于天根生化科技(北京)有限公司。

2)引物设计和 PCR-RFLP 分析。根据文献[6,10]设计 *BCL10* 基因和 *Nramp1* 基因扩增引物(表 1),引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

PCR 扩增反应体系(10 μL):Premix Taq™ 5 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.6 μL,上下游引物(10 pmol/μL)均加 0.2 μL,模板 DNA(50 ng/μL)1 μL;PCR 反应条件:94℃ 5 min,35 个循环(94℃ 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 50 s),72℃ 10 min,15℃ 2 min;扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

酶切反应体系(10 μL):PCR 产物 3 μL, ddH<sub>2</sub>O 5.8 μL, Buffer 1 μL,限制内切酶 0.2 μL(限制内切酶均购于赛默飞生物公司),反应体系置于 37℃ 恒温箱消化过夜,酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 数据分析

运用 Excel 软件计算基因型频率、等位基因频率,并进行品种内的哈代温伯格(Hardy-Weinberg)平衡性检验。采用 SPSS 20 软件对表型进行统计,并对不同基因型间表型差异进行显著性检验。用 SAS 软件建立模型对候选基因与仔猪部分生长性状及腹泻指数、腹泻频率进行关联分析。包括:(1)运用 MLM(mixed linear model,混合线性模型)来统计分析候选基因的基因型效应,及其与初生重、断奶重、断奶前平均日增重性状的关系,其中固定效应包括群体均值、性别效应、候选基因的基因型效应,随机效应包括公畜效应、公畜内母畜效应;(2)运

表 1 PCR 引物列表  
Table 1 The list of PCR primers

基因名称 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	退火温度/℃ Temperature	片段长度/bp Size	位点 Site
<i>Nramp1</i>	GCCAGCTTCCACAGTCTCCAG	63	483	<i>Nde</i> I
	GGGGGTACAAAGGGGAAGAAG			
<i>BCL10</i>	GAATAGTCGTGGCTGGGAAGAG	64	635	<i>Hin</i> p1 I
	AGACAGATGGCAGGAAATAGGC			

用 GLM (generalized linear model, 广义线性模型) 来统计分析候选基因的基因型效应与腹泻频率和腹泻指数性状的关系。由于季节因素可能影响仔猪腹泻, 因此, 本研究首先利用单因素方差分析对季节因素进行显著性检验, 统计结果不显著, 故关联分析模型中固定效应仅包括群体均值、栋舍效应和候选基因的基因型效应, 并进行最小二乘均数估计以及基因型间的多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白仔猪断奶前腹泻率

根据仔猪个体从出生到 21 日龄期间每次腹泻记录的评分, 综合统计大白仔猪在断奶前的腹泻情况, 结果表明, 全群的总腹泻率为 32.0%, 其中轻度

腹泻个体数占群体总数的 13.8%, 重度腹泻个体占 19.1%, 健康个体占 67.1%。

### 2.2 大白仔猪不同腹泻程度个体表型统计

使用 SPSS 软件对每组各性状进行显著性检验, 结果(表 2)表明正常、轻度腹泻组的断奶重和平均日增重差与重度腹泻组差异均显著 ( $P < 0.05$ ), 且重度腹泻个体比正常个体平均断奶重低 13.0%、日增重低 16.2%。

### 2.3 大白仔猪断奶前腹泻分布特征

对仔猪从初生到 21 d 断奶腹泻记录的统计结果(图 1)表明: 发现仔猪出生后在 7~11 日龄、17~21 日龄均存在腹泻集中发生的小高峰, 仔猪总腹泻头数和轻度腹泻头数均在这 2 个时间段有明显上升。

表 2 大白仔猪群体不同腹泻程度个体表型统计

Table 2 Individual phenotype statistics of different diarrhea degree in Large White pigs

程度 Level	个体数 Number	初生重/kg Birth weight	断奶重/kg Weaning weight	平均日增重/kg Average daily gain	腹泻指数/% Diarrhea index	腹泻频率 Frequency of diarrhea
正常 Normal	329	1.56±0.32	6.69±1.13a	0.024±0.004a	0a	0a
轻度腹泻 MD	68	1.56±0.31	6.64±1.27a	0.024±0.005a	1.22±0.41b	0.048b
重度腹泻 SD	93	1.50±0.30	5.92±1.47b	0.021±0.006b	4.34±3.30c	0.16±0.10c

注: 表中性状数值为均值±标准差, 同列数据中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Values of traits were mean±standard deviation, and values with same superscripts are not significantly different, with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

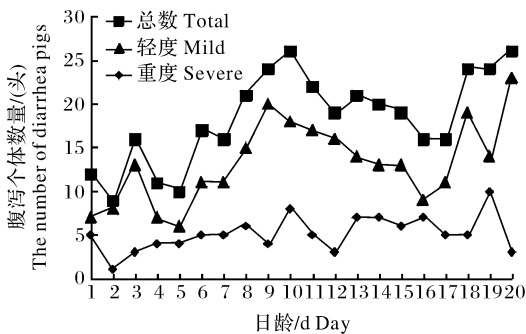


图 1 大白仔猪断奶前腹泻分布

Fig.1 Distribution of diarrhea before weaning in Large White pig

### 2.4 大白仔猪腹泻粪便检测结果

1) 大白仔猪腹泻粪便病原检测结果。将收集到的 40 份粪便样品分成 4 组, 每组进行混合并分 2 份

进行病原检测。检测结果表明该腹泻仔猪群体不存在流行性腹泻、传染性胃肠炎和轮状病毒 3 种导致腹泻主要病原的感染。

2) 大白仔猪腹泻粪便细菌检测结果。对收集到的 40 份粪便样品每份单独进行细菌检测, 结果表明, 沙门氏菌感染检出 8 个阳性样本, 占比 22.5%; 致病性大肠杆菌感染检出 7 个阳性样本, 占比 17.5%; 而副猪嗜血杆菌、链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌和波氏杆菌没有检出阳性样本。

### 2.5 *BCL10* 基因多态性与性状关联分析

1) *BCL10* 基因多态性检测结果。对 *BCL10* 基因 3-UTR 端 T1149C 位点多态性进行检测, *BCL10* 基因 PCR 扩增产物长度为 635 bp, 经限制性内切酶 *Hin*p1 I 酶切后得到 TT、TC、CC 3 种基因型, TT

基因型有 635 bp 1 条带,TC 基因型有 635 bp、492 bp 和 143 bp 3 条带,CC 基因型有 492 bp 和 143 bp 2 条带,各基因型的酶切带型如图 2 所示。

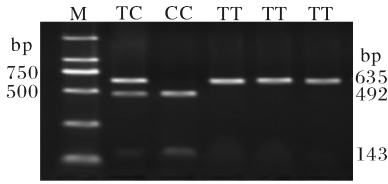


图 2 猪 *BCL10* 基因酶切判型结果

Fig.2 The genotyping results of porcine *BCL10* gene

2) 哈代温伯格平衡检验。群体通过 RLFP-PCR 方法进行分型,对 *BCL10* 基因多态位点进行哈代温伯格定律检测,结果(表 3)显示:*BCL10* 基因中 C 为优势等位基因,处于哈代温伯格平衡状态。

3) *BCL10* 基因多态性与性状关联分析。利用 SAS 软件对 *BCL10* 基因多态性与性状进行关联分析,结果(表 4)表明:*BCL10* 基因多态性与初生重相关联( $P < 0.05$ ),TT 型个体初生重大于 TC 型个体,差异显著( $P < 0.05$ );*BCL10* 基因多态性与腹泻

表 3 *BCL10* 基因多态性分布和哈代温伯格定律检测

Table 3 *BCL10* gene polymorphism distribution and Hardy-Weinberg law detection

基因 Gene	数量 Number	基因型 Genotype			等位基因频率 Allele frequency		$\chi^2$ 值 $\chi^2$ value	P 值 P-value
		TT	TC	CC	T	C		
<i>BCL10</i>	342	0.17(58)	0.45(154)	0.38(130)	0.40(270)	0.60(414)	1.13	0.29

注:表中数值为对应基因型/等位基因频率(实际观测值)。Note: Values represent the genotype frequency/allele frequency(actual observed values).

表 4 *BCL10* 基因片段 1149T/C 多态性与腹泻频率、腹泻指数及部分生长性状的关联分析

Table 4 Association analysis of the 1149T/C SNP for porcine *BCL10* gene fragment in the diarrhea index, frequency of diarrhea, growth traits

<i>BCL10</i>	个体数 Number	初生重/kg Birth weight	断奶重/kg Weaning weight	平均日增重/kg Average daily gain	腹泻指数/% Diarrhea index	腹泻频率 Frequency of diarrhea
CC	130	1.62±0.02	6.67±0.12	0.024±0.001	2.20±0.60	0.56±0.17
TC	154	1.57±0.02	6.58±0.10	0.023±0.001	4.11±0.61	1.06±0.16
TT	58	1.70±0.04	6.59±0.22	0.023±0.001	5.93±1.04	1.55±0.27
P-value		0.021*	0.847	0.848	0.007**	0.006**
CC-TC		0.151	0.565	0.737	0.036*	0.036*
CC-TT		0.165	0.774	0.569	0.002**	0.002**
TC-TT		0.010*	0.942	0.679	0.120	0.108

注:“\*”表示  $P < 0.05$ ,”\*\*”表示  $P < 0.01$ ;表中的性状均值为最小二乘均值±标准误。Note:“\*” means  $P < 0.05$ ,”\*\*” means  $P < 0.01$ ; Values of traits were LSM±SE.

频率、腹泻指数相关联,差异极显著( $P < 0.01$ ),个体腹泻频率、腹泻指数均表现为  $TT > TC > CC$ ,CC 与 TC 之间差异显著( $P < 0.05$ ),CC 与 TT 之间差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 2.6 *Nramp1* 基因多态性与性状关联分析

1) *Nramp1* 基因多态性检测结果。对 *Nramp1* 基因第六内含子存在 1 个 *Nde* I 酶切位点多态性进行检测,*Nramp1* 基因 PCR 扩增片段长度为 483 bp,经限制性内切酶 *Nde* I 酶切后得到 AA、AB、BB 3 种基因型,AA 基因型有 483 bp 1 条带,AB 基因型有 483 bp、373 bp 和 110 bp 3 条带,BB 基因型有 373 bp 和 110 bp 2 条带,各基因型的酶切带型如图 3 所示。

2) 哈代温伯格平衡检验。群体通过 PCR-RLFP 方法进行分型,对 *Nramp1* 基因多态位点进

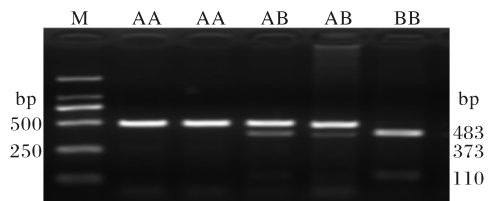


图 3 猪 *Nramp1* 基因酶切判型结果

行哈代温伯格定律检测,结果(表 5)表明,*Nramp1* 基因中 B 为优势等位基因,严重偏离哈代温伯格平衡状态( $P < 0.01$ )。

3) *Nramp1* 基因多态性与性状关联分析。使用 SAS 软件对 *Nramp1* 基因该位点多态性与性状进行关联分析,结果(表 6)表明:*Nramp1* 基因多态性与腹泻频率、腹泻指数相关联,差异极显著( $P < 0.01$ ),个体腹泻频率、腹泻指数均为 AA、AB、



表 5 *Nramp1* 基因多态性分布和哈代温伯格定律检测

Table 5 *Nramp1* gene polymorphism distribution and Hardy-Weinberg law detection

基因 Gene	数量 Number	基因型 Genotype			等位基因频率 Allele frequency		$\chi^2$ 值 $\chi^2$ value	P 值 P-value
		AA	AB	BB	A	B		
<i>Nramp1</i>	407	0.07(27)	0.07(28)	0.86(352)	0.10(55)	0.90(380)	156	6.28E-36

注:表中数值为对应基因型/等位基因频率(实际观测值)。Note: Values represent the genotype frequency/allele frequency(actual observed values).

表 6 *Nramp1* 基因 SNP 位点多态性与腹泻频率、腹泻指数及部分生长性状的关联分析

Table 6 Association analysis of the SNP for porcine *Nramp1* gene in the diarrhea index, frequency of diarrhea, growth traits

NRAMP1	个体数 Number	初生重/kg Birth weight	断奶重/kg Weaning weight	平均日增重/kg Average daily gain	腹泻指数/% Diarrhea index	腹泻频率 Frequency of diarrhea
AA	22	1.55±0.09	6.19±0.45	0.022±0.002	7.81±1.82	1.93±0.54
AB	30	1.57±0.06	6.29±0.29	0.022±0.001	8.42±1.42	2.55±0.41
BB	354	1.62±0.21	6.60±0.10	0.024±0.000	3.22±0.45	0.85±0.12
P-value		0.715	0.606	0.671	0.000**	0.000**
AA-AB		0.736	0.769	0.811	0.779	0.344
AA-BB		0.452	0.389	0.449	0.017*	0.050*
AB-BB		0.455	0.339	0.389	0.001**	0.000**

注:“\*”表示  $P < 0.05$ , “\*\*”表示  $P < 0.01$ ; 表中的性状均值为最小二乘均数±标准误。Note: “\*” means  $P < 0.05$ , “\*\*” means  $P < 0.01$ ; Values of traits were LSM±SE.

型大于 BB 型,且 AA 型与 BB 型差异显著 ( $P < 0.05$ ),AB 型与 BB 型差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨 论

#### 3.1 大白仔猪断奶前腹泻特点

仔猪腹泻的高发导致大白仔猪断奶前生长严重阻滞,本研究结果表明大白仔猪断奶前腹泻率为 32.0%,大白仔猪重度腹泻个体比正常个体 21 日龄平均断奶重低 13.0%,日增重低 16.2%,差异均显著 ( $P < 0.05$ ),与王红宁<sup>[14]</sup>观察结果一致。

本研究发现大白仔猪在 7~11 日龄和 17~21 日龄存在 2 个断奶前腹泻小高峰。王希彪等<sup>[15]</sup>研究发现民猪在 12~17 日龄存在仔猪腹泻小高峰,长白猪在 9~18 日龄存在仔猪腹泻小高峰,指出由于品种不一致,存在腹泻高峰的时间段存在差异,与本研究结果相符。仔猪 7~8 日龄才开始逐步建立自身免疫系统,可能由此导致仔猪腹泻主要集中在 7~21 日龄期间。仔猪从母源获得的免疫力逐步降低,10~18 日龄为仔猪自身免疫低水平期,较易受到病原感染,导致腹泻<sup>[16]</sup>。在饲养环节中,9~14 日龄给仔猪补料进行教槽,导致的营养性腹泻可能也是 7~11 日龄腹泻小高峰的一个重要原因;仔猪断奶前母猪奶水不足,仔猪从母体获得的母源抗体减少,逐步过渡到采食颗粒料,也可能是导致仔猪 17~21 日龄腹泻上升的一个重要原因。

#### 3.2 *BCL10* 基因多态性与性状间关联分析

*BCL10* 基因通过参与对细胞因子和基因的表达调控,从而在淋巴细胞的增殖、分化、成熟与凋亡及先天免疫中发挥作用<sup>[2]</sup>。*BCL10* 基因在先天免疫的过程中发挥的作用与动物个体抗病能力存在一定的联系。本研究结果表明 *BCL10* 基因片段 1149T/C 多态性与大白仔猪断奶前腹泻频率和腹泻指数显著相关 ( $P < 0.01$ ),因此,*BCL10* 基因 3'端 1149T/C 位点可以作为大白仔猪断奶前抗腹泻育种的分子标记。个体腹泻频率和腹泻指数均表现为  $TT > TC > CC$ ,CC 与 TC 之间均差异显著 ( $P < 0.05$ ),CC 与 TT 之间差异极显著 ( $P < 0.01$ );由此可知,C 等位基因为仔猪断奶前腹泻抗性基因,CC 基因型为抗性基因型。该位点多态性与初生重显著相关 ( $P < 0.01$ ),TT 型个体初生重大于 TC、CC 型个体,且 TT 与 TC 差异显著 ( $P < 0.05$ ),但各基因型断奶重差异不显著,由此我们可以推断含 C 等位基因个体具有更快生长速度。研究结果表明 C 等位基因频率为 0.60,为优势等位基因,T 等位基因频率为 0.40,处于哈代温伯格平衡状态中。Huang 等<sup>[6]</sup>研究表明猪 *BCL10* 基因多态位点与平均红细胞体积(mean corpuscular volume,MCV)(0 日龄)、红细胞数(red blood cell,RBC)(17 日龄、32 日龄)显著相关,C 等位基因在大白猪、长白猪、通城猪、二花脸猪、大花白猪中均具有较高基因频率,与本研究

一致。综上所述,C 等位基因为仔猪断奶前腹泻的抗性基因,CC 基因型个体表现更加优异的生长与抗病能力,可以通过对 CC 基因型纯合个体的选留,提高群体 C 等位基因及 CC 基因型个体的比例,从而提高群体抗病力,降低群体腹泻率。

### 3.3 *Nramp1* 基因多态性与性状间关联分析

*Nramp1* 蛋白主要存在于网状内皮细胞和器官中,如:外周血白细胞、脾和肺中,可以抵抗多种病原微生物<sup>[9]</sup>。Smit 等<sup>[17]</sup>研究发现 *Nramp1* 基因与小鼠对沙门伤寒杆菌、分歧杆菌等病原体的抗病力有关;Hu 等<sup>[18]</sup>研究发现 *Nramp1* 基因 mRNA 表达上调可以增强鸡对肠炎沙门氏菌的免疫能力。

本研究结果表明 *Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 酶切位点多态性与大白仔猪断奶前腹泻频率和腹泻指数显著相关( $P < 0.01$ ),因此,*Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 酶切位点也可以作为大白仔猪断奶前抗腹泻育种的分子标记。大白仔猪个体腹泻频率与腹泻指数表现为 AA、AB 基因型大于 BB 基因型,且 AA 型与 BB 型差异显著( $P < 0.05$ ),AB 型与 BB 型差异极显著( $P < 0.01$ )。由此表明:BB 基因型为断奶前仔猪腹泻抗性基因型。赵生国等<sup>[13]</sup>研究表明 *Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 多态性与仔猪腹泻相关,AA 基因型个体腹泻评分值显著高于 AB 基因型个体( $P < 0.05$ ),Wu 等<sup>[10]</sup>通过研究发现该位点 BB 型个体比 AB 型个体具有更强的免疫力,这均与本文结果一致。研究结果中 AB 型基因个体腹泻频率和腹泻指数高于 AA 型基因个体且差异显著( $P < 0.05$ ),可能是由于 AA 型和 AB 型个体均较少造成的。Kommadath 等<sup>[12]</sup>通过基因共表达网络分析发现猪 *Nramp1* 基因与沙门氏菌抵抗力相关。结合本文病菌检测结果(沙门氏菌感染比占 22.5%),我们推断 *Nramp1* 基因第六内含子 *Nde* I 酶切位点多态性与猪沙门氏菌感染相关。研究结果表明 B 等位基因频率为 0.90,A 等位基因频率为 0.10,严重偏离哈代温伯格平衡状态( $P < 0.01$ )。吴宏梅等<sup>[19]</sup>研究指出 AA 基因型频率很低,出现这种基因型分布极不平衡的原因可能是 AA 基因型是一种有害基因型,所以在选育过程中没有被选留。因此,可以通过对 AA 基因型个体进行淘汰,选育出 *Nramp1*B 等位基因纯合大白猪群进行抗腹泻育种。

### 参 考 文 献

[1] WILLIS T G, JADAYEL D M, DU M Q, et al. Bcl10 is involved

in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types[J]. Cell, 1999, 96(1): 35-45.

- [2] LUCAS P C, MCALLISTER-LUCAS L M, NUNEZ G. NF-kappaB signaling in lymphocytes: a new cast of characters[J]. J Cell Sci, 2004, 117(1): 31-39.
- [3] XUE L, MORRIS S W, ORIHUELA C, et al. Defective development and function of Bcl10-deficient follicular, marginal zone and B1 B cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(9): 857-865.
- [4] YE H, DOGAN A, KARRAN L, et al. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma[J]. Am J Pathol, 2000, 157(4): 1147-1154.
- [5] TORRES J M, MARTINEZ-BARRICARTE R, GARCIA-GOMEZ S, et al. Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity[J]. J Clin Invest, 2014, 124(12): 5239-5248.
- [6] HUANG J, MA G J, SUN N N, et al. BCL10 as a new candidate gene for immune response in pigs: cloning, expression and association analysis[J]. Int J Immunogenet, 2010, 37(2): 103-110.
- [7] BELOUCHI A, CELLIER M, KWAN T, et al. The macrophage-specific membrane protein *Nramp* controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants[J]. Plant Mol Biol, 1995, 29(6): 1181-1196.
- [8] VIDAL S M, PINNER E, LEPAGE P, et al. Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1* D169) mouse strains[J]. J Immunol, 1996, 157(8): 3559-3568.
- [9] BLACKWELL J M. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (*Nramp1*), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility [J]. Mol Med Today, 1996, 2(5): 205-211.
- [10] WU H, CHENG D, WANG L. Association of polymorphisms of *Nramp1* gene with immune function and production performance of Large White pig[J]. J Genet Genomics, 2008, 35(2): 91-95.
- [11] DING X, ZHANG X, YANG Y, et al. Polymorphism, expression of natural resistance-associated macrophage protein 1 encoding gene (*NRAMP1*) and its association with immune traits in pigs[J]. Asian Australas J Anim Sci, 2014, 27(8): 1189-1195.
- [12] KOMMADATH A, BAO H, ARANTES A S, et al. Gene co-expression network analysis identifies porcine genes associated with variation in Salmonella shedding [J]. BMC genomics, 2014, 15(1): 452-467.
- [13] 赵生国, 蔡原, 滚双宝, 等. 猪天然抗性相关巨噬细胞蛋白基因 (*Nramp1*) 多态性及其与仔猪腹泻相关性分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1351-1357.
- [14] 王红宁. 仔猪腹泻成因及综合防治技术措施[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(6): 58-60.
- [15] 王希彪, 黄宣凯, 崔世泉, 等. 民猪与长白猪哺乳仔猪腹泻程度

的差异及其对生产性能的影响[J].东北农业大学学报,2014,45(7):79-82.

[16] 王宗芳.仔猪早期断奶后腹泻病因与防治对策[J].安徽农学通报,2008,14(22):85-86.

[17] SMIT J J, VAN LOVEREN H, HOEKSTRA M O, et al. The *Slc11a1* (*Nramp1*) gene controls efficacy of mycobacterial treatment of allergic asthma[J]. *J Immunol*, 2003, 171(2): 754-

760.

[18] HU Y, SHAN Y J, ZHU C H, et al. Upregulation of *NRAMP1* mRNA confirms its role in enhanced host immunity in post-artificial infections of *Salmonella enteritidis* in chicks[J]. *Br Poult Sci*, 2015, 56(4): 408-415.

[19] 吴宏梅, 王立贤, 程笃学, 等. 猪 *Nramp1* 基因多态性与免疫功能的相关性[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 215-220.

## Association between polymorphism of *BCL10*, *Nramp1* gene and diarrhea traits in Large White piglets before weaning

LUO Xing<sup>1</sup> YIN Lilin<sup>1</sup> LIU Fei<sup>1</sup> ZHANG Weixu<sup>1</sup>  
LI Xinyun<sup>1</sup> ZHAO Shuhong<sup>1</sup> WANG Haiyan<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture/the Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Informatics, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** To explore the association between diarrhea of Large White piglets and polymorphism of *BCL10* and *Nramp1* gene, a population of 490 Large White piglets before weaning was established and PCR-RFLP was carried out to examine the polymorphism of 3' 1149T/C locus of *BCL10* gene and the *Nde* I restriction site in the 6th intron of *Nramp1* gene. Subsequently, correlation analysis of gene polymorphism with diarrhea rate (DR), diarrhea index (DI) and several growth characteristics were performed. The results showed that DR of Large White piglets before weaning was 32.0%, average weaning weight and average daily gain of severe diarrhea individuals decreased by 13.0% and 16.2%, respectively. According to the results, piglets were easy to get diarrhea during two periods (7-11 and 17-21 days of age). Pathogen was detected from diarrhea piglets and 22.5% of them were caused by salmonella and 17.5% by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). The polymorphism of *BCL10* gene was extremely significantly correlated with BW ( $P < 0.01$ ). Specifically, DR and DI of individuals with different genotypes were  $TT > TC > CC$ , with difference between CC and TC was significant ( $P < 0.05$ ) and between CC and TT was extremely significant ( $P < 0.01$ ). The polymorphism of *Nde* I restriction sites in the 6th intron of *Nramp1* gene was extremely significantly correlated with DR and DI ( $P < 0.01$ ). The DR and DI level of piglets with AA and AB genotypes were much higher than that of BB genotype. The difference between AA and BB genotypes was significant ( $P < 0.05$ ), and between AB and BB genotypes was extremely significant ( $P < 0.01$ ). In summary, the result illustrated that polymorphism of *BCL10* and *Nramp1* gene was significantly related to diarrhea degree in Large White piglets, and the 3' 1149T/C locus of *BCL10* gene and the SNP of the *Nde* I restriction site in the 6th intron of *Nramp1* gene could be used as molecular markers for genetic selection in pig breeding.

**Keywords** *BCL10* gene; *Nramp1* gene; piglets; diarrhea; breeding for disease resistance

(责任编辑:边书京)