吴清清,刘雯悦,王媛,等.猪繁殖与呼吸综合征抗病指示性状的分子标记筛查及检测[J].华中农业大学学报,2022,41(1):186-193.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.01.018

猪繁殖与呼吸综合征抗病指示性状的分子标记筛查及检测

吴清清[1,2],刘雯悦[1,2],王媛[1,2],官凯锋[1,2],张庆德[1,3],刘榜[1,2,4,5],周翔[1,2,5]

1.华中农业大学动物科学技术学院,武汉 430070;
2.农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室,武汉 430070;
3.华中农业大学实验动物中心,武汉 430070;4.生猪健康养殖省部共建协同创新中心,武汉 430070;
5.湖北省地方猪品种改良工程技术研究中心,武汉 430070

摘要　为鉴定与猪感染猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS)抗病指示性状相关的分子标记,以大白猪×通城猪高代横交群体为研究对象,选用 159 头健康仔猪进行猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)人工感染试验,利用"中芯一号"基因芯片进行全基因组 SNP 分型,与 PRRS 抗病指示性状血液淋巴细胞百分比进行关联分析,筛选抗病指示性状相关分子标记。结果显示,猪 *DDX*17 和 *BTG*1 基因上的 3 个 SNPs 位点(rs81257542,rs329240026 和 rs334594334)与 PRRSV 感染不同时间点的血液淋巴细胞百分比显著关联($P<0.05$)。rs81257542 位点的等位基因 C、rs334594334 位点的等位基因 A 及 *DDX*17-*BTG*1 的合并基因型 CC-AA 为优势等位基因和优势基因型,优势等位基因越多的个体,PRRSV 感染早期淋巴细胞百分比越高,具有更强的抗病力;本研究通过设计 ARMS-PCR 引物,建立 rs81257542 和 rs334594334 位点的 Tetra-primer ARMS-PCR 检测方法,仅需一步 PCR 和电泳即可鉴定个体的基因型。以上结果表明,rs81257542 和 rs334594334 位点可作为 PRRSV 抗病性状血液淋巴细胞百分比的分子标记,其快速检测方法可实现优势基因型快速筛查。

关键词　蓝耳病;猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV);抗病性状;淋巴细胞百分比;抗病育种;分子标记筛查;快速检测

中图分类号　S 858.28　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2022)01-0186-08

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS)俗称蓝耳病,是严重危害全球养猪业的传染病之一,以母猪繁殖障碍和各年龄段猪呼吸道疾病为主要特征[1],每年给我国生猪养殖带来巨大经济损失[2]。猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)通过抑制天然免疫、延迟中和抗体产生等多种途径抑制机体的免疫应答,导致病毒持续性感染,进而引起严重的继发细菌感染,给其他传染病带来可乘之机[3]。由于 PRRSV 基因组具有易变性和免疫逃避能力,导致疫苗免疫效果不佳。通过抗病育种在遗传水平增强宿主对 PRRS 的抗病力,是猪遗传改良工作的重点[4]。近年来在猪 PRRS 抗病遗传研究上取得了一些研究成果,如 Boddicker 等[5]对大白、长白杂交猪进行 PRRSV 人工感染试验,通过猪基因芯片数据在 4 号染色体上发现 1 个影响血液病毒载量和体质量增长的关键 SNP 位点 WUR10000125;Serão 等[6-7]在猪 7 号染色体 MHC 区域发现 3 个 SNPs 可显著影响 PRRSV 感染后的抗体水平。

血液指标具有非常重要的免疫应答指示作用[8]。在 PRRSV 感染早期,PRRSV 对宿主免疫应答具有抑制作用,宿主外周血中的白细胞数、单核细胞数、淋巴细胞数、淋巴细胞百分比均显著下降[9]。在 PRRSV 感染后期,机体通过激活免疫应答清除病毒,各血液参数指标逐渐恢复至正常水平[10-11]。前期研究发现,中国地方品种通城猪和国外品种大白猪感染 PRRSV 后血液淋巴细胞数目均下降,但通城猪血液淋巴细胞百分比显著高于大白猪,说明通城猪具有更强的免疫应答[12]。随后以大白猪×

收稿日期:2021-09-02
基金项目:国家自然科学基金青年项目(31802040);国家自然科学基金重点项目(31930104)
吴清清,E-mail:983295453@qq.com
通信作者:周翔,E-mail:zhouxiang@mail.hzau.edu.cn

通城猪高代横交群体为研究对象，通过 PRRSV 人工感染获取感染不同时间点的血液指标，根据 PRRSV 感染后第 14 天的个体存活情况将群体划分为易感组和抗病组，结果显示易感个体感染后第 7 天的淋巴细胞百分比极显著低于抗病个体，且淋巴细胞百分比与血清中病毒载量显著负相关，因此，血液中的淋巴细胞百分比可以作为 PRRS 抗病性的指示性状[13]。通过检测与血液淋巴细胞百分比显著关联的分子标记可在疾病发生前筛选抗病个体，为猪抗病育种提供新的分子标记。

本研究基于猪全基因组 SNP 芯片分型数据，与 PRRSV 感染前（第 0 天）和感染后第 4、7、11、14、21 天淋巴细胞百分比进行关联分析，筛选与淋巴细胞百分比显著相关的抗病基因和分子标记，同时建立抗病性状相关分子标记的 Tetra-primer ARMS-PCR 快速检测方法，旨在为猪抗病指示性状标记辅助选择提供新的 SNP 分子标记和检测方法。

1　材料与方法

1.1　样品采集及表型性状检测

试验动物为通城县云志生态养殖场的通城猪与大白猪杂交所构建的高代（F7～F9 代）横交群体的 10 周龄健康断奶仔猪，平均体质量 15 kg，共 159 头，分 4 批次进行 PRRSV 人工感染试验。感染试验前通过前腔静脉采血检测猪 PRRSV、圆环病毒和伪狂犬病毒抗原和抗体，所有仔猪抗原抗体均为阴性。经过 7 d 预饲期后，对 159 头健康仔猪按照 1 mL/5 kg的剂量（滴鼻接种1 mL，余量病毒进行肌肉注射）接种 HP-PRRSV 病毒（PRRSV-WUH3 毒株，病毒滴度为 $10^{5.0}$ $TCID_{50}$/mL）进行 PRRSV 人工感染试验。在 PRRSV 感染前（第 0 天）和感染后第 4、7、11、14、21 天采用猪前腔静脉采血的方法采集抗凝血（EDTA-K）和促凝血。使用南京迈瑞公司 BC-2800Vet 兽用全自动血液细胞分析仪对抗凝血进行血常规指标淋巴细胞百分比检测[13]。促凝血用于血清分离，提取血清中病毒 RNA，反转录成 cDNA，通过绝对定量 PCR 方法构建标准曲线，计算血清中病毒载量，具体测定方法参见文献[14]。其中，有 72 头试验猪（2 批次）PRRSV 人工感染试验的血常规数据和病毒载量数据分别来自研究团队中王媛等[13]和高国丽等[14]的报道。

1.2　主要试剂

2× *Taq* MasterMix 购自深圳艾伟迪生物科技有限公司；Biowest DNA 电泳琼脂糖、Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒、DL2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司；抗凝管购自山东奥塞特医疗器械公司；病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司；氯化钠、氯仿、异丙醇、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3　基因分型和质量控制

利用抗凝血样品分离白细胞，采用氯仿苯酚法提取白细胞样品 DNA，通过 Thermo Scientific 公司的 Nanodrop 2000 核酸测定仪检测 DNA 浓度和纯度。将质检合格的 DNA 样品送至北京康普森生物技术有限公司利用“中芯一号” SNP 芯片进行基因分型。通过 PLINK v1.09 软件对基因型数据进行质量控制，剔除检出率小于 95%、个体基因型缺失率大于 0.1、最小等位基因频率小于 0.01 以及哈代温伯格平衡 $P<1\times10^{-6}$ 的 SNPs，保留 37 124 个 SNPs 进行后续分析。

1.4　抗病相关分子标记筛选及统计分析

根据试验影响因素和淋巴细胞百分比进行逐步回归分析，以批次效应、性别效应、初始体质量作为模型协变量，可使模型 AIC 值最小，利用 R 语言的 GLM 软件包中一般线性模型（general linear model，GLM）对质控后的 SNPs 数据与淋巴细胞百分比使用模型（1）进行关联分析。

$$Y_{ihkl}=\mu+G_i+B_h+S_k+W_l+e_{ihkl} \quad (1)$$

式中，Y_{ihkl} 代表性状测定值，μ 代表群体均数，G_i 代表基因型效应（其中 $i=1,2,3$），B_h 代表批次效应（其中 $h=1,2,3,4$），S_k 代表性别效应（其中 $k=1,2$），W_l 代表试验感染 0 d 初始体质量，e_{ihkl} 代表随机误差。

双基因聚合性状关联分析采用模型（2）进行：

$$Y_{ijhkl}=\mu+G_i+G_j+G_i\times G_j+B_h+S_k+W_l+e_{ijhkl} \quad (2)$$

式中，Y_{ijhkl} 代表性状测定值，μ 代表群体均数，G_i 代表第 1 个基因的基因型效应（其中 $i=1,2,3$），G_j 代表第 2 个基因的基因型效应（其中 $j=1,2,3$），$G_i\times G_j$ 为基因型间的互作效应，B_h 代表批次效应（其中 $h=1,2,3,4$），S_k 代表性别效应（其中 $k=1,2$），W_l 代表试验感染 0 d 初始体质量，e_{ijhkl} 代表随机误差。

筛选在 PRRSV 感染前（第 0 天）和感染后（第 4、7、11、14、21 天）6 个时间点中至少有 2 个时间点的淋巴细胞百分比和基因型的一般线性模型显著关

联(模型和基因型效应均显著)的 SNPs 位点。利用 UCSC 数据库对芯片位点在猪参考基因组 Sscrofa 11.1 对应位置进行转换,并对 SNPs 位点所在基因及基因位置进行注释,考虑 SNPs 所在基因的功能和不同基因型间的多重比较显著性,筛选与抗病、免疫性状相关的候选基因及分子标记。

统计候选 SNPs 在 159 头 PRRSV 人工感染个体的基因型分布情况,利用 Kruskal-Wallis 检验方法进行多重比较分析。数据用"最小二乘均值±标准差"表示,显著差异判断标准为:$P<0.10$ 表示差异边缘显著,$P<0.05$ 表示差异显著,$P<0.01$ 表示差异极显著。加性效应:A=(AA−BB)/2;显性效应:D=AB−(AA+BB)/2;AA 为淋巴细胞百分比均值大的纯合基因型,BB 为淋巴细胞百分比均值小的纯合基因型,AB 为杂合基因型。

1.5 引物设计及合成

根据候选 SNP 位点侧翼 500 bp 序列信息,利用 Tetra-primer ARMS-PCR 引物在线设计程序(http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html)进行 ARMS-PCR 引物设计,共设计 2 组引物,产物片段大小控制在 150～600 bp[15]。针对每个 SNP 位点设计 2 条 3′末端分别与 SNP 2 个等位基因碱基配对且延伸方向相反的内引物和 2 条方向相反的外引物,同时在内引物 3′端第 3 位碱基引入错配以增加扩增特异性(表 1)。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

表 1 ARMS-PCR 引物信息

Table 1 Tetra-primer ARMS-PCR

引物 Primers	引物序列 Primer sequence/(5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Product size
*DDX*17-F(inner)	CTACTGTAAATATTTCATATAGT**T**TC	50	C 364
*DDX*17-R(inner)	TCTAAATTAAAACTTTAAGAA**T**TT		A 281
*DDX*17-F(outer)	TAGTTTTACTTAAAAACAGTAATATC		Outer 595
DDX17-R(outer)	CTATTCTTAGAATTATAAACAAACT		
*BTG*1-F(inner)	GCTGTATAAATAAGTCTCCCAAG**A**CA	57	T 321
*BTG*1-R(inner)	TTTGAAATAAATTTCATTTGAGCAA		A 194
*BTG*1-F(outer)	TTTTAGAGCCGAACCTACAT**C**AT		Outer 464
*BTG*1-R(outer)	GCAATAACAATGTCAAATTCTTAACC		

注:加粗字母代表错配碱基。Note:Bold letter represents mismatched base.

1.6 Tetra-primer ARMS-PCR 扩增

PCR 反应体系 20 μL:2×*Taq* Master Mix 10.0 μL,2 条外引物(10 μmol/L)各 0.2 μL,2 条内引物(10 μmol/L)各 0.8 μL,DNA 模板 2.0 μL(30 ng/μL),ddH_2O 6.0 μL。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,退火 30 s,72 ℃延伸 36 s,共 30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃保存。Tetra-primer ARMS-PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察电泳结果并保存,根据扩增片段的大小和条带数目区分不同基因型。

2 结果与分析

2.1 与淋巴细胞百分比显著关联的分子标记筛选

淋巴细胞百分比在 PRRSV 感染后第 4 天极显著降低,并降到最低值,第 4～21 天逐渐回升,存活个体恢复正常水平,而死亡个体在死亡前维持较低水平。通过模型(1)对 159 个个体高质量 SNP 芯片数据与 PRRSV 感染前(第 0 天)和感染后(第 4、7、11、14、21 天)6 个时间点的外周血淋巴细胞百分比进行基因型和性状的关联分析,共筛选得到 3 个抗病相关候选 SNPs 位点(rs81257542、rs334594334、rs329240026),其中 rs334594334 和 rs329240026 位点完全连锁(表 2)。rs81257542 位点位于基因 *DDX*17 的第 3 内含子,rs334594334、rs329240026 位点分别位于基因 *BTG*1 的第 6、7 内含子。

2.2 *DDX*17 和 *BTG*1 单基因 SNP 多态性与淋巴细胞百分比的关联分析

由于 rs334594334 和 rs329240026 位点完全连锁,以 rs334594334(*BTG*1)作为标签 SNP。rs81257542(*DDX*17)、rs334594334(*BTG*1)位点多态性和 PRRSV 感染前(第 0 天)及感染后(第 4、7、11、14、21 天)6 个时间点的淋巴细胞百分比关联分析结果见表 3 和表 4。在感染后第 7 天和第 11 天,rs81257542 位点不同基因型对应的淋巴细胞百分比具有显著差异($P<0.05$),基因型 AA 的表型值显著低于基因型 CA 和 CC 个体,且 3 种基因型在不同时间点的淋巴细胞百分比的最小二乘均值均呈现基因型 AA<CA<CC 的趋势,该位点等位基因

C 对淋巴细胞百分比具有显著的加性效应。在感染前(第 0 天)及感染后第 7 天，rs334594334 位点不同基因型对应的淋巴细胞百分比具有显著差异($P<0.05$)，在感染后第 11 天具有边缘显著的基因型效应($P=0.06$)，淋巴细胞百分比的最小二乘均值均符合基因型 AA＞TA＞TT 的趋势，基因型 AA 对应的表型值显著高于 TA，TA 显著高于 TT，等位基因 A 对淋巴细胞百分比具有显著的加性效应。

表 2　SNP 位点基本信息

Table 2　Information of SNP loci

SNPs	突变位置 Position	等位基因 Alleles	基因 Gene name	基因位置 Gene feature
rs81257542	5:9491168	A/C	*DDX*17	Intron 3
rs334594334	5:91061683	A/T	*BTG*1	Intron 6
rs329240026	5:91076565	A/G	*BTG*1	Intron 7

表 3　*DDX*17 基因 rs81257542 位点多态性与淋巴细胞百分比的关联分析

Table 3　Association analysis of rs81257542 polymorphisms in *DDX*17 gene with lymphocyte percentage

感染时间/d Days post infection	基因型 Genotype			*P* 值 *P* value	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect
	AA (54)	CA (73)	CC (32)			
0	43.11±8.28	45.11±7.48	47.10±8.10	0.53	2.00	0.01
4	29.84±11.90	32.00±10.90	33.68±9.89	0.11	1.92	0.24
7	32.83±11.90b	39.94±11.66a	43.01±7.98a	0.01	5.09	2.02
11	31.11±10.85b	39.44±9.44a	41.79±11.93a	0.01	5.34	3.00
14	45.26±11.75	44.49±10.20	48.89±8.11	0.46	1.82	−2.58
21	46.27±9.66	47.60±9.95	49.39±10.66	0.98	1.56	−0.23

注：*P* 值为基因型效应显著性水平。对 *P* 值小于 0.1 的模型进行多重比较，同行数据标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。表 4、表 6、表 7 同。Note: The *P* value is the significance level of the genotype effect. Multiple comparisons are performed when the *P* value is less than 0.1. In the same row, values with different letter mean significant difference ($P<0.05$). The same as Table 4, Table 6, and Table 7.

表 4　*BTG*1 基因 rs334594334 位点多态性与淋巴细胞百分比的关联分析

Table 4　Association analysis of rs334594334 polymorphisms in *BTG*1 gene with lymphocyte percentage

感染时间/d Days post infection	基因型 Genotype			*P* 值 *P* value	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect
	TT (72)	TA (72)	AA (15)			
0	41.23±8.36b	43.09±8.31b	47.32±6.80a	0.02	3.04	−1.19
4	32.55±12.05	30.14±10.12	32.85±11.70	0.31	0.15	−2.56
7	32.06±10.42b	36.01±12.10b	41.48±10.74a	0.02	4.71	−0.76
11	27.70±10.28b	36.10±10.7ab	40.33±10.85a	0.06	6.32	2.09
14	41.78±4.55	45.22±8.85	46.36±11.15	0.91	2.29	1.15
21	42.72±2.40	47.86±9.64	48.22±10.64	0.62	2.75	2.39

2.3　*DDX*17 和 *BTG*1 双基因聚合后与淋巴细胞百分比的关联分析

通过双基因聚合性状关联分析(模型(2))，*DDX*17 和 *BTG*1 双基因聚合基因型与 PRRSV 感染前(第 0 天)和感染后(4、7、11、14、21 d)6 个时间点的淋巴细胞百分比关联分析结果见表 5。单基因模型结果显示，C 为 *DDX*17 的优势等位基因，A 为 *BTG*1 的优势等位基因。根据优势等位基因数目，含 3 个及以上优势等位基因的基因型为优势合并基因型，包括 CC-AA、CC-TA 和 CA-AA，共计 63 头；含 3 个及以上劣势等位基因的基因型为劣势合并基因型，包括 AA-TT、AA-TA 和 CA-TT，共计 39 头。在感染后第 7 天，双基因聚合基因型与淋巴细胞百分比显著关联($P<0.05$)，其中含 4 个优势等位基因的 CC-AA 基因型对应的淋巴细胞百分比最小二乘均值最高(44.11%)，且与其他 7 种基因型均差异显著($P<0.05$)，CC-AA 在其他时间点对应的淋巴细胞百分比也相对较高。劣势合并基因型 AA-TT 和 AA-TA 对应的淋巴细胞百分比最小二乘均值最低，分别为 31.83%和 29.34%。

2.4　影响淋巴细胞百分比的 SNPs 与病毒载量关联分析

利用本文显著关联的 SNPs 与 PRRSV 感染后各时间点(4、7、11、14、21 d)的病毒载量数据通过模型(1)进行关联分析，结果见表 6 和表 7。rs81257542 位点的不同基因型在 PRRSV 感染后第

4天和第7天对应病毒载量均呈现AA>CA>CC的趋势，该位点等位基因C对病毒载量具有负的加性效应，与淋巴细胞百分比趋势相反，感染后第7天不同基因型对血清中病毒载量具有显著的基因型效应($P<0.05$，表6)。rs334594334位点的不同基因型在PRRSV感染后第4天和第7天对应病毒载量均保持TT>TA>AA的趋势，该位点等位基因A对病毒载量具有负的加性效应，与淋巴细胞百分比趋势相反(表7)。对于感染后第4天和第7天2个时间点，2个位点的3种不同基因型对应的病毒载量表型值呈现的趋势与淋巴细胞百分比趋势相反。

表5 *DDX*17和*BTG*1双基因聚合基因型与淋巴细胞百分比的关联分析

Table 5 Association analysis of *DDX*17-*BTG*1 genotypes with lymphocyte percentage

*DDX*17-*BTG*1	个体数 Count	感染时间/d Days post infection					
		0	4	7	11	14	21
AA-AA	17	47.15±7.23	31.94±14.39	38.46±12.60abc	36.50±9.92	47.21±15.04	48.57±10.12
AA-TA	24	41.07±7.96	27.16±9.30	29.34±11.10c	28.34±10.71	43.43±6.73	45.48±13.28
AA-TT	13	41.58±8.81	32.04±12.52	31.83±10.22bc	27.70±10.28	41.78±4.54	42.72±2.40
CA-AA	31	47.65±5.92	33.52±10.98	41.09±11.30ab	40.26±10.87	44.37±11.51	48.70±10.90
CA-TA	40	43.44±8.09	30.60±10.80	39.36±11.95abc	38.76±8.18	44.62±8.93	46.59±9.12
CA-TT	2	38.97±5.90	35.88±11.28	33.40±16.05abc	—	—	—
CC-AA	24	47.00±7.77	32.62±10.94	44.11±8.02a	42.76±11.14	48.77±7.58	47.46±11.12
CC-TA	8	47.38±9.59	36.86±4.91	39.67±7.30abc	39.01±14.41	49.22±10.27	55.58±6.45
P 值 *P* value		0.69	0.59	0.04	0.45	0.91	0.25

注：*P* 值为基因型效应显著性水平。对 *P* 值小于0.1的模型进行多重比较，同列数据标不同字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: The *P* value is the significance level of the genotype effect. Multiple comparisons are performed when the *P* value is less than 0.1. In the same column, values with different letter mean significant difference ($P<0.05$).

表6 rs81257542位点多态性与血清病毒载量的关联分析

Table 6 Association analysis of rs81257542 polymorphisms with viral load in serum

感染时间/d Days post infection	基因型 Genotype			*P* 值 *P* value	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect
	AA	AC	CC			
4	10.34±0.49	10.17±0.49	10.08±0.40	0.99	−0.13	−0.04
7	10.31±0.57a	10.00±0.75b	9.72±0.58c	0.04	−0.29	−0.02
11	9.65±0.85	9.05±0.97	9.36±1.08	0.28	−0.15	−0.46
14	8.17±1.16	7.97±0.94	8.28±1.06	0.09	0.06	−0.25
21	7.58±0.65	7.50±0.74	7.38±1.01	0.96	−0.10	0.02

表7 rs334594334位点多态性与血清病毒载量的关联分析

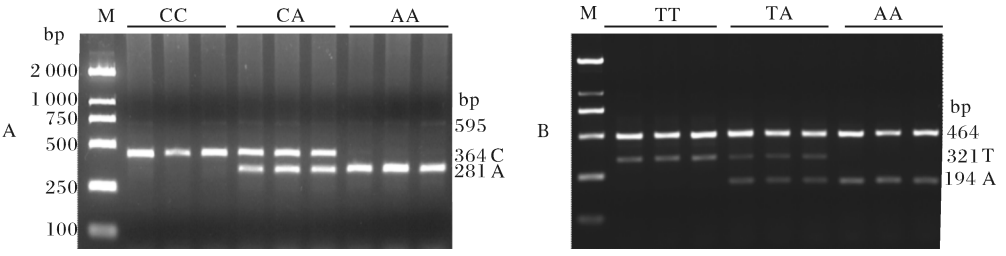
Table 7 Association analysis of rs334594334 polymorphisms with viral load in serum

感染时间/d Days post infection	基因型 Genotype			*P* 值 *P* value	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect
	TT	TA	AA			
4	10.41±0.59	10.21±0.47	10.17±0.47	0.56	−0.12	−0.09
7	10.26±0.46	10.11±0.66	9.94±0.75	0.30	−0.16	0.01
11	9.88±0.92	9.22±1.01	9.28±0.97	0.66	−0.3	−0.36
14	7.21±0.15	8.02±0.94	8.17±1.07	0.29	0.48	0.33
21	8.15±1.15	7.52±0.71	7.40±0.83	0.20	−0.38	−0.25

2.5 SNP的多态性Tetra-primer ARMS-PCR快速检测方法建立

根据Tetra-primer ARMS-PCR琼脂糖凝胶电泳检测结果的条带数目和扩增片段大小可鉴定不同基因型：3种基因型均可扩增外引物目的条带，杂合子有3条目的条带，纯合子有2条目的条带。在rs81257542位点共检测3种基因型：AA基因型(595/281 bp)、CC基因型(595/364 bp)、AC基因型

(595/364/281 bp)；在 rs334594334 位点不同基因型的扩增条带情况：AA 基因型(464/194 bp)、TT 基因型(464/321 bp)、TA 基因型(464/321/194 bp)。扩增条带均符合预期扩增结果，没有非特异扩增条带(图 1)，表明该检测方法可以准确区分 3 种基因型。



A：rs81257542；B：rs334594334.

图 1　rs81257542 和 rs334594334 位点 Tetra-primer ARMS-PCR 分型结果

Fig.1　Genotyping results of rs81257542 and rs334594334 by Tetra-primer ARMS-PCR

3　讨　论

3.1　*DDX*17 基因多态位点与 PRRS 抗病指示性状的关联分析

DDX17 是一种依赖 ATP 的 RNA 解旋酶，参与病毒 mRNA 合成和降解过程，在病毒入侵和复制过程中发挥重要作用[16-17]。本研究通过对 rs81257542 位点的基因型检测及其与 PRRSV 感染前(第 0 天)和感染后(第 4、7、11、14、21 天)6 个时间点的淋巴细胞百分比进行关联分析，证明了该位点多态性与 PRRSV 感染后第 7 天和第 11 天的淋巴细胞百分比具有显著关联性，且基因型效应和加性效应显著，AA 基因型个体的淋巴细胞百分比显著低于 AC 和 CC 基因型个体。3 种基因型个体在感染后第 4 天和第 7 天对应的淋巴细胞百分比和病毒载量呈现淋巴细胞百分比越低病毒载量越高的趋势，这一结果与王媛等[13]的研究结果一致，其中，CC 基因型个体具有最高的淋巴细胞百分比和最低的病毒载量，说明 CC 基因型的个体具有更强的抗病能力，该位点所含等位基因 C 的数目越多，抗病能力越强。

3.2　*BTG*1 基因多态位点与 PRRS 抗病指示性状的关联分析

*BTG*1 是抗增殖基因家族的成员之一，该基因首次在慢性 B 淋巴细胞性白血病上发现[18]，能参与细胞的增殖和分化，其抗增殖性在诱导细胞凋亡过程中具有重要的意义[19]。BTG1 和 BTG2 下调 mRNA 稳定性是 T 细胞静息状态维持的关键机制[20]。有研究表明 B 淋巴细胞的增殖活性下降可能引起 PRRSV 感染后期的免疫抑制和持续感染[21]。本研究中 rs334594334 和 rs329240026 位点多态性与感染前和感染后第 7 天的淋巴细胞百分比具有显著关联性，感染后第 11 天具有边缘显著的基因型效应。标签 SNP rs334594334 的淋巴细胞百分比加性效应值在感染前为 3.04，感染后 7 d 和 11 d 分别高达 4.71 和 6.32，且 AA 基因型的淋巴细胞百分比最小二乘均值均显著高于 TA 和 TT 基因型。AA 基因型个体在 PRRSV 感染后第 4 天和第 7 天，具有最高的淋巴细胞百分比和最低的病毒载量，符合 PRRSV 感染早期淋巴细胞百分比和血清病毒载量负相关的规律[13]。以上结果说明，rs334594334 位点的等位基因 A 为优势等位基因，AA 为优势基因型，该位点所含等位基因 A 的数目越多，抗病能力越强，AA 基因型个体具有更强抗病力。

3.3　*DDX*17-*BTG*1 基因聚合效应

*DDX*17-*BTG*1 基因聚合的合并基因型与 PRRSV 感染后第 7 天的淋巴细胞百分比显著关联，且 2 个 SNP 间的聚合效应显著($P<0.05$)。前期研究表明，PRRSV 感染早期由于机体免疫抑制，会出现短暂的淋巴细胞减少[12-13]。感染后第 7 天的淋巴细胞百分比可以反映抗病和易感个体免疫应答的差异[13]。C 为 *DDX*17 的优势等位基因，A 为 *BTG*1 的优势等位基因，合并基因型 CC-AA 对应的淋巴细胞百分比的最小二乘均值最高(44.11%)，多重比较结果显示，CC-AA 与其他 7 种基因型具有显著差异($P<0.05$)，因此，*DDX*17-*BTG*1 的最优合并基因型为 CC-AA，与单基因效应结果保持一致。劣势等位基因较多的 3 种基因型(AA-TT、

AA-TA 和 CA-TT)对应的淋巴细胞百分比均低于35%,且基因型为 CA-TT 的 2 个个体在 PRRSV 感染后 7～11 d 间陆续死亡。8 种不同基因型保持优势等位基因越少淋巴细胞百分比越低的趋势,优势的合并基因型(CC-AA、CC-TA 和 CA-AA)占总群体的 39.6%(63/159),劣势的合并基因型(AA-TT、AA-TA 和 CA-TT)占总群体的 24.5%(39/159),可通过优势基因型筛选抗病个体,进一步改良群体抗病力。

参考文献 References

[1] ROSSOW K D.Porcine reproductive and respiratory syndrome[J].Veterinary pathology,1998,35(1):1-20.

[2] TIAN K G,YU X L,ZHAO T Z,et al.Emergence of fatal PRRSV variants:unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J/OL].PLoS One,2007,2(6):e526[2021-09-02]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526.

[3] LUNNEY J K,FRITZ E R,REECY J M,et al.Interleukin-8,interleukin-1β,and interferon-γ levels are linked to PRRS virus clearance[J].Viral immunology,2010,23(2):127-134.

[4] LUNNEY J K,CHEN H B.Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection[J].Virus research,2010,154(1/2):161-169.

[5] BODDICKER N,WAIDE E H,ROWLAND R R R,et al.Evidence for a major QTL associated with host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge[J].Journal of animal science,2012,90(6):1733-1746.

[6] SERÃO N V L,MATIKA O,KEMP R A,et al.Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd[J].Journal of animal science,2014,92(7):2905-2921.

[7] SERÃO N V L,KEMP R A,MOTE B E,et al.Genetic and genomic basis of antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in gilts and sows[J].Genetics selection evolution,2016,48(1):1-15.

[8] 宋欣,曹随忠,张龙超,等.猪红细胞生成素受体基因突变与血常规性状关联分析[J].畜牧兽医学报,2012,43(11):1697-1702.SONG X,CAO S Z,ZHANG L C,et al.Association of SNPs in erythropoietin receptor gene with blood parameters[J].Chinese journal of animal and veterinary sciences,2012,43(11):1697-1702(in Chinese with English abstract).

[9] SHI K C,LI H R,GUO X,et al.Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine *Circovirus* type 2[J].Veterinary microbiology,2008,129(3/4):367-377.

[10] LI Z G,HE Y L,XU X Q,et al.Pathological and immunological characteristics of piglets infected experimentally with a HP-PRRSV TJ strain[J].BMC veterinary research,2016,12(1):1-9.

[11] RENSON P,ROSE N,DIMNA M,et al.Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain[J].Veterinary research,2017,48(1):1-14.

[12] LIANG W,LI Z H,WANG P,et al.Differences of immune responses between Tongcheng (Chinese local breed) and Large White pigs after artificial infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J].Virus research,2016,215:84-93.

[13] 王媛,刘榜,官凯锋,等.HP-PRRSV 人工感染后猪 4 种血液指标的变化规律及与病毒载量的关系[J].华中农业大学学报,2020,39(5):62-67.WANG Y,LIU B,GUAN K F,et al.Change of four hematological parameters and relationship with viremia after artificial infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2020,39(5):62-67(in Chinese with English abstract).

[14] 高国丽,官凯锋,孟向阁,等.HP-PRRSV 人工感染后猪血清病毒载量和体重增长的变化规律[J].华中农业大学学报,2020,39(5):56-61.GAO G L,GUAN K F,MENG X G,et al.Changes of viremia and weight gain in pigs after HP-PRRSV artificial infection[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2020,39(5):56-61(in Chinese with English abstract).

[15] 管峰,艾君涛,杨利国.一种 SNP 检测新方法:四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术[J].生命的化学,2004,24(6):514-516.GUAN F,AI J T,YANG L G.A Novel approach of SNP detection: tetra-primer amplification refractory mutation system PCR[J].Chemistry of life,2004,24(6):514-516(in Chinese).

[16] FULLER-PACE F V.The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72):multi-tasking transcriptional regulators[J].Biochimica et biophysica acta (bba)-gene regulatory mechanisms,2013,1829(8):756-763.

[17] GUO X,MA J,SUN J,et al.The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA[J].PNAS,2007,104(1):151-156.

[18] RIMOKH R,ROUAULT J P,WAHBI K,et al.A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia[J].Genes,chromosomes and cancer,1991,3(1):24-36.

[19] LEE H,CHA S,LEE M S,et al.Role of antiproliferative B cell translocation gene-1 as an apoptotic sensitizer in activation-induced cell death of brain microglia[J].Journal of immunology,2003,171(11):5802-5811.

[20] HWANG S S, LIM J, YU Z B, et al. mRNA destabilization by BTG1 and BTG2 maintains T cell quiescence[J]. Science, 2020, 367(6483): 1255-1260.

[21] 廖素环，韦英益，廖承球，等.体内外感染 PRRSV 处理下仔猪脾淋巴细胞增殖活性的变化[J].基因组学与应用生物学，2011，30(4)：288-293. LIAO S H, WEI Y Y, LIAO C Q, et al. The changes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection *in vivo* and *in vitro* on the proliferation of piglets splenic lymphocytes[J]. Genomics and applied biology, 2011, 30(4): 288-293(in Chinese with English abstract).

Screening and detection of molecular markers for porcine reproductive and respiratory syndrome resistance traits

WU Qingqing[1,2], LIU Wenyue[1,2], WANG Yuan[1,2], GUAN Kaifeng[1,2], ZHANG Qingde[1,3], LIU Bang[1,2,4,5], ZHOU Xiang[1,2,5]

1. *College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*;
2. *Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan* 430070, *China*;
3. *Experimental Animal Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070, *China*;
4. *The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan* 430070, *China*;
5. *The Engineering Technology Research Center of Hubei Province Local Pig Breed Improvement, Wuhan* 430070, *China*

Abstract To identify molecular makers related to the disease-resistance traits after the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection, a total of 159 healthy piglets from Large White × Tongcheng advanced generation intercross population were infected with PRRSV and genotyped with the "Zhongxin No.1" SNP chip. The lymphocyte percentages at different days post-infection (dpi) were measured as disease resistance indicator. The results showed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs81257542, rs334594334 and rs329240026 in *DDX*17 and *BTG*1 genes were significantly associated with lymphocyte percentages ($P<0.05$) at different time points post PRRSV infection. Allele C in rs81257542, allele A in rs334594334, and the combined genotype CC-AA were the dominant allele and dominant genotype, the more the dominant allele, the higher lymphocyte percentage and stronger disease resistance. One-step Tetra-primer ARMS-PCR method was further developed to rapidly genotype rs81257542 and rs334594334. In conclusion, the SNPs of rs81257542 and rs334594334 are potential molecular markers for the percentage of blood lymphocyte associated with PRRS resistance, and the detection method can achieve rapid screening of dominant genotypes.

Keywords blue ear disease; porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); disease resistance trait; lymphocyte percentage; breeding for disease resistance; molecular marker screening; rapid detection

（责任编辑：边书京）