

分类号：
学号：20202113050

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学



硕士学位论文

NLRP3 基因非编码区多态性与绵羊肺炎支原体 易感性的相关性研究

学位申请人

崔庆贤

指导教师

蒋松 副教授

魏勇 高级兽医师

申请学位类别

专业硕士

专业名称

兽医

研究领域

动物临床疾病诊断与防控技术

所在学院

动物科技学院

中国·新疆·石河子

2022年6月

分类号:
学号: 20202113050

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学



硕士学位论文

NLRP3 基因非编码区多态性与绵羊肺炎支原体 易感性的相关性研究

学位申请人	崔庆贤
指导教师	蒋松 副教授 魏勇 高级兽医师
申请学位类别	专业硕士
专业名称	兽医
研究领域	动物临床疾病诊断与防控技术
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2022年6月

**Correlation between *NLRP3* gene non-coding region polymorphism
and susceptibility to mycoplasma pneumonia in sheep**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agriculture

By

Qing-xian Cui

(Clinical veterinary medicine)

Dissertation Supervisor: Prof. Song Jiang

June, 2022

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：崔友贤

时间：2022年6月1日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：崔友贤

时间：2022年6月1日

导师签名：蒋松

时间：2022年6月1日

本论文受

动物疾病防控兵团重点实验室开放课题（2020BTDJ07）

项目资助。

摘要

目的：（1）通过绵羊肺炎支原体感染的临床表现和病理变化，再结合血清学检测方法分别对新疆伊犁地区哈萨克羊和萨福克羊支原体肺炎的流行情况进行鉴定，计算不同品种的绵羊群体中支原体肺炎的感染率。（2）采用 PCR 检测方法对 *NLRP3* 基因非编码区 SNP 位点进行筛选，并对不同 SNP 位点的基因型进行分析，探究 *NLRP3* 炎性小体相关基因在不同绵羊品种中的遗传多态性与绵羊肺炎支原体易感性的相关性。

方法：（1）本研究采集新疆伊犁地区部分规模化羊场的两个绵羊品种（哈萨克羊与萨福克羊）共计 800 份血清样本，使用绵羊肺炎支原体酶联免疫吸附实验（ELISA）检测试剂盒，进行绵羊肺炎支原体抗原和抗体血清学检测。（2）以此为基础，采用直接测序法检测候选基因 *NLRP3* 基因非编码区单核苷酸变异位点，根据 DNAMAN 软件和 Chromas 软件的序列比对结果对哈萨克羊与萨福克羊的遗传多态性进行研究分析，总结基因型分布规律，对相关突变位点进行绵羊肺炎支原体感染性的相关性分析。

结果：（1）通过对新疆伊犁地区部分规模化羊场绵羊肺炎支原体血清学调查发现，新疆伊犁地区不同绵羊品种之间均存在不同程度的绵羊肺炎支原体（*Mycoplasma ovipneumoniae*, MO）感染。伊犁地区部分规模化羊场的 MO-Ab 阳性率为 14.88%，MO-Ag 阳性率为 21.00%，其中哈萨克羊 MO-Ab 阳性率 26.00%，MO-Ag 阳性率 22.91%；萨福克羊 MO-Ab 阳性率 7.34%，MO-Ag 阳性率 19.71%。（2）分析 *NLRP3* 基因非编码区 SNP 位点，筛选出 C38233659T、C38233866T、T38233881C、A38188131C、G38188003A、T38188153C、A38188237C 共 7 个非编码区 SNP 位点，其中 3'UTR 的 C38233659T 位点检测到碱基突变 C→T，两个绵羊品种均检测到 CC、CT、TT 三种基因型，其中萨福克羊的优势基因型为 CC，优势等位基因为 C；同样在 3'UTR 的 C38233866T 位点检测到碱基突变 C→T，两个绵羊品种均检测到 CC、CT、TT 三种基因型，哈萨克羊与萨福克羊的优势基因型均为 CC，优势等位基因均为 C；但 3'UTR 的 T38233881C 位点只在哈萨克羊群体中发现碱基突变 T→C，优势基因型为 TT，优势等位基因为 T。在 5'UTR 的 A38188131C 位点检测到碱基突变 A→C，两个绵羊品种均检测到 AA、AC、CC 三种基因型，哈萨克羊与萨福克羊的优势基因型均为 AA，优势等位基因均为 A；在 5'UTR 的 G38188003A 位点检测到碱基突变 G→A，两个绵羊品种均检测到 GG、GA、AA 三种基因型，哈萨克羊与萨福克羊的优势基因型均为 GG，优势等位基因均为 G。另外在 5'UTR 的 T38188153C 位点检测到碱基突变 T→C，优势基因型为 TT，优势等位基因为 T；在 5'UTR 的 A38188237C 位点检测到碱基突变 A→C，优势基因型为 AA，优势等位基因为 A，以上两个位点的突变只出现在萨福克羊群体中，在哈萨克羊群体中并未发现。在 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点上哈萨克羊 MO-Ag 阳性和 MO-Ag 阴性的基因型频率存在显著性差异（ $P < 0.05$ ）。

结论：绵羊肺炎支原体的感染存在于新疆伊犁地区部分规模化羊场的不同绵羊品种之间，且哈萨克羊的感染性高于萨福克羊，该试验结果显示本地品种的感染性高于外来引进品种。*NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点可能与哈萨克羊 MO 易感性有相关性，因此可以将该位点作为绵羊肺炎支原体易感性的分子遗传标记位点，这为抗绵羊肺炎支原体新品系的选育提供理论支撑。

关键词：绵羊支原体肺炎；绵羊肺炎支原体；*NLRP3* 基因；非编码区 SNP 位点；血清学调查

Abstract

Objective: (1) The prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in Kazakh sheep and Suffolk sheep in Ili area of Xinjiang was identified through the clinical manifestations and pathological changes of *Mycoplasma ovine pneumoniae* infection, combined with serological detection methods, and the number of *Mycoplasma pneumoniae* in sheep populations of different breeds was calculated. infection rate. (2) The SNP loci in the non-coding region of the NLRP3 gene were screened by PCR detection method, and the genotypes of different SNP loci were analyzed to explore the genetic polymorphism of NLRP3 inflammasome-related genes in different sheep breeds. Correlations of susceptibility to *Mycoplasma ovine pneumoniae*.

Methods: (1) In this study, a total of 800 serum samples of two sheep breeds (Kazakh sheep and Suffolk sheep) were collected from some large-scale sheep farms in Yili, Xinjiang, and the *Mycoplasma ovine pneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection kit was used. *M. ovine pneumoniae* antigen and antibody serological testing was performed. (2) On this basis, the direct sequencing method was used to detect the single nucleotide variation in the non-coding region of the candidate gene NLRP3 gene, and the genetic diversity of Kazakh sheep and Suffolk sheep was compared according to the sequence comparison results of DNAMAN software and Chromas software. The genotype distribution was summarized, and the correlation analysis of the infectivity of *Mycoplasma ovine pneumoniae* was carried out on the relevant mutation sites.

Result: (1) The serological investigation of *Mycoplasma ovine pneumoniae* in some large-scale sheep farms in Ili area of Xinjiang found that there were different degrees of *Mycoplasma ovine pneumoniae* (MO) infection among different sheep breeds in Ili area of Xinjiang. The positive rate of MO-Ab in some large-scale sheep farms in Yili area was 14.88%, the positive rate of MO-Ag was 21.00%, of which the positive rate of MO-Ab in Kazakh sheep was 26.00%, and the positive rate of MO-Ag was 22.91%; MO-Ab positive rate was 7.34%, MO-Ag positive rate was 19.71%. (2) Analyze the SNP sites in the non-coding region of the NLRP3 gene, and screen out C38233659T, C38233866T, T38233881C, A38188131C, G38188003A, T38188153C, A38188237C, a total of 7 non-coding region SNP sites, of which the base C38233659T of the 3'UTR was detected. Mutation C→T, three genotypes of CC, CT and TT were detected in both sheep breeds. Among them, the dominant genotype of Suffolk sheep was CC, and the dominant allele was C; also in the C38233866T site of 3'UTR The base mutation C→T was detected, and three genotypes of CC, CT and TT were detected in both sheep breeds. The dominant genotypes of Kazakh sheep and Suffolk sheep were both CC, and the dominant alleles were C; but The T38233881C locus of the 3'UTR was found only in the Kazakh sheep population with the base mutation T→C, the dominant genotype was TT, and the dominant allele was T. A base mutation A→C was detected at the A38188131C

site of the 5'UTR, and three genotypes of AA, AC and CC were detected in both sheep breeds. The dominant genotypes of Kazakh sheep and Suffolk sheep were both AA. All alleles are A; base mutation G→A was detected at the G38188003A site of 5'UTR, and three genotypes of GG, GA and AA were detected in both sheep breeds. The advantages of Kazakh sheep and Suffolk sheep The genotypes were all GG, and the dominant alleles were all G. In addition, the base mutation T→C was detected at the T38188153C site of the 5'UTR, the dominant genotype was TT, and the dominant allele was T; the base mutation A→C was detected at the A38188237C site of the 5'UTR, and the dominant gene was The type is AA, and the dominant allele is A. The mutation of the above two loci only appears in the Suffolk sheep population, but not in the Kazakh sheep population. There was a significant difference between the genotype frequencies of MO-Ag positive and MO-Ag negative in Kazakh sheep at the A38188131C site of the 5'UTR of NLRP3 gene ($P<0.05$).

Conclusion: The infection of *Mycoplasma ovine pneumonia* exists among different sheep breeds in some large-scale sheep farms in Yili, Xinjiang, and the infectivity of Kazakh sheep is higher than that of Suffolk sheep. The test results show that the infectivity of local breeds is higher than that of imported breeds. The A38188131C locus of the 5'UTR of NLRP3 gene may be related to the susceptibility of Kazakh sheep to MPS, so this locus can be used as a molecular genetic marker locus for the susceptibility of *M. ovine pneumonia*, which is the breeding of new lines against *M. ovine pneumonia*. Provide theoretical support.

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*; *Mycoplasma pneumonia* of sheep; *NLRP3* gene; SNP in non-coding region; serology

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
英汉缩略语名词对照.....	VIII
第1章 绪论.....	1
1.1 研究目的及意义.....	1
1.2 文献综述.....	2
1.2.1 绵羊支原体肺炎研究概况.....	2
1.2.1.1 病原学特点.....	2
1.2.1.2 流行病学.....	2
1.2.1.3 临床症状.....	3
1.2.1.4 剖检变化.....	4
1.2.1.5 致病机制.....	4
1.2.1.6 诊断方法.....	4
1.2.1.7 治疗方法.....	6
1.2.1.8 预防.....	6
1.2.2 <i>NLRP3</i> 炎性小体研究进展.....	7
1.2.2.1 炎性小体概述.....	7
1.2.2.2 <i>NLRP3</i> 炎性小体的结构与功能.....	7
1.2.2.3 <i>NLRP3</i> 炎性小体的活化.....	8
1.2.2.4 <i>NLRP3</i> 炎性小体与相关疾病的关系.....	9
1.2.3 非编码区与相关疾病的研究.....	10
1.3 研究内容及技术路线.....	12
1.3.1 研究内容.....	12
1.3.2 技术路线.....	13
第2章 新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊感染肺炎支原体血清学调查与分析.....	14
2.1 材料与方法.....	14
2.1.1 试验材料.....	14
2.1.1.1 样品的采集与处理.....	14
2.1.1.2 主要试剂与仪器.....	15
2.1.2 试验方法.....	15
2.1.2.1 绵羊肺炎支原体抗体的检测.....	15

2.1.2.2 绵羊肺炎支原体抗原的检测	15
2.1.3 数据分析	15
2.2 试验结果	15
2.2.1 样品收集	15
2.2.2 新疆伊犁地区不同品种绵羊血清中 MO-Ab ELISA 检测结果	16
2.2.3 新疆伊犁地区不同品种绵羊血清中 MO-Ag ELISA 检测结果	16
2.3 讨论	16
2.4 小结	17
第 3 章 <i>NLRP3</i> 基因非编码区多态性与绵羊肺炎支原体易感性的相关性研究	18
3.1 材料与试剂	19
3.1.1 样品来源	19
3.1.2 试验试剂与设备	19
3.2 试验方法	20
3.2.1 血液 DNA 提取	20
3.2.2 制备 1.0% 琼脂糖凝胶	20
3.2.3 引物设计	20
3.2.4 PCR 扩增	20
3.2.5 琼脂糖凝胶电泳	21
3.2.6 数据分析	21
3.3 结果分析	22
3.3.1 <i>NLRP3</i> 基因非编码区 SNP 位点的筛选	22
3.3.2 <i>NLRP3</i> 基因 SNP 位点的遗传变异分析	23
3.3.2.1 不同绵羊品种 <i>NLRP3</i> 基因 3'UTR C38233659T 位点分析	23
3.3.2.2 不同绵羊品种 <i>NLRP3</i> 基因 5'UTR G38188003A 位点分析	24
3.3.2.3 不同绵羊品种 <i>NLRP3</i> 基因 5'UTR A38188131C 位点分析	26
3.3.3 <i>NLRP3</i> 基因 SNP 位点与绵羊肺炎支原体易感性的分析	27
3.3.3.1 <i>NLRP3</i> 基因 5'UTR A38188131C 位点与哈萨克羊肺炎支原体感染率 的相关性分析	27
3.3.3.2 <i>NLRP3</i> 基因 5'UTR A38188131C 位点与萨福克羊肺炎支原体感染率 的相关性分析	27
3.4 讨论	28
3.4.1 非编码区的遗传信息学分析	28
3.4.2 不同绵羊品种 <i>NLRP3</i> 基因非编码区 SNP 位点的筛选	28
3.4.3 <i>NLRP3</i> 基因在 5'端非编码区的 A38188131C 位点与绵羊肺炎支原体感染性	

的相关性分析	29
3.5 小结	30
第 4 章 全文结论	31
参考文献	32
致谢	40
附录	42
作者简介	47

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
MO	<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	绵羊肺炎支原体
MPS	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> of sheep	绵羊支原体肺炎
PCR	Polymerase Chain Peaction	聚合酶链式反应
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification	环介导等温扩增技术
LFD	Lateral flow dipstick	侧向流动试纸法
IHA	IHA	间接血凝试验
ELISA	ELISA	酶联免疫吸附实验
IHC	Immuno histo chemistry	免疫组织化学
IL-1 β	interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
IL-18	interleukin-18	白细胞介素-18
<i>NLRP3</i>	NOD-like receptor protein 3	NOD 样受体蛋白 3
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein	凋亡相关斑点样蛋白
Caspase-1	cysteinyl aspartate-specific proteases-1	天冬氨酸蛋白水解酶-1 蛋白
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns	病原相关分子模式
DAMPs	Damage associated molecular patterns	损伤相关分子模式
PRRs	Pattern recognition receptor	模式识别受体
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll 样受体 4
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
LTA	lipoteichoic acid	脂磷壁酸
16HBECs	human bronchial epithelial cell line	人支气管上皮细胞
ROS	reactive oxygen species	线粒体活性氧簇
AD	Alzheimer's disease	阿尔茨海默病
PD	Parkinson's disease	帕金森病
MS	multiple sclerosis	多发性硬化症
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	肌萎缩性侧索硬化症
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
Ab	Antibody	抗体
Ag	Antigen	抗原
CDS	Sequence coding for aminoacids in protein	蛋白质编码区
3'UTR	3'untranslated region	3'端非编码区

5'UTR	5'untranslated region	5'端非编码区
MPP	Mycoplasma pneumoniae pneumonia	肺炎支原体肺炎
IBD	Investment Banking Division	炎症性肠病

第 1 章 绪论

1.1 研究目的及意义

绵羊支原体肺炎（*Mycoplasma pneumoniae* of sheep, MPS）是由肺炎支原体（*Mycoplasma ovipneumoniae*, MO）感染所导致的发生在绵羊群体中的一种高度接触性传染病。MO 在世界范围内对绵羊养殖业造成了严重损失，一直以来也影响着我国绵羊养殖业的发展，对绵羊的生长发育危害巨大。不同程度的病羊表现的临床症状不相同，主要是出现食欲减退，咳嗽，流鼻涕，腰背弓起，消瘦等临床症状。该病一年四季均有流行，接触传染性强，发病率与死亡率高。该病的病原体有可能是一种重要的野生病原体，因为最近在其他野生有蹄类动物中也有报道^[1-3]。新疆可以说是我国的养殖业大省，总面积约占我国国土面积的六分之一。据 2018 年相关统计报道称，中国绵羊总数为 3000 万只，大多数羊都来自于新疆。新疆的气候具有独特的差异性，南疆较北疆相比气候干燥，北疆一带气候较为湿润，南疆与北疆的各大规模化养殖场中绵羊的饲养数量不容小觑。根据研究发现不论是在新疆的南疆还是北疆，绵羊支原体肺炎都普遍存在于各大规模化养殖场中。这给新疆绵羊养殖业带来了很大的威胁与挑战。加强对该病的防治与防控已变得刻不容缓。

近年来，为了积极响应国家的号召，我国多个省市实行退牧还草等促进畜牧业发展的优良政策，该项政策的实行极大地促进了我国绵羊养殖业的发展。然而绵羊支原体肺炎的流行，给我国畜牧业发展带来了巨大损失，该病的流行引起了畜牧主和科研工作者的极大关注。据报道，*NLRP3* 炎症小体在多种炎症性疾病的发生和进展中发挥着关键作用^[4-6]。已有文献证实抑制 *NLRP3* 炎症小体信号可以有效减轻感染性休克^[7-8]、腹膜炎^[9-10]、阿尔茨海默病^[11]、动脉粥样硬化^[12]、多发性硬化^[13-14]等疾病的发生。在过去的几十年里，许多学者对于疾病基因组学的研究进展主要集中在编码区，这在很大程度上是因为全基因组测序的成本高得令人望而却步。然而，癌症基因组中绝大多数的体细胞变异发生在非编码区。在 2015 年 Tak Y G^[15]等人通过结合调控元件的功能注释，优先考虑位于基因组非编码区的疾病风险相关 SNP 位点，以进行后续研究；并且使用各种计算工具，帮助识别由非编码区疾病相关 SNP 位点引起的基因表达变化。

关于非编码区疾病的相关报道在人类疾病中较为多见，在动物疾病中相对少见，本文通过对新疆伊犁地区部分绵羊群体中爆发的肺炎支原体为研究对象，根据绵羊 *NLRP3* 基因非编码区对不同绵羊品种易感性的差异，筛选易感位点，为抗绵羊支原体肺炎新品系的选育奠定基础。

1.2 文献综述

1.2.1 绵羊支原体肺炎研究概况

1.2.1.1 病原学特点

绵羊支原体肺炎的病原为绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovine pneumoniae*, MO), 支原体是一种最小的病原微生物, 并且在其生长周期中能够完成自我复制。支原体无细胞壁, 是支原体科、支原体属的一名成员^[16]。它们的繁殖形式和生长方式多种多样, 在其生长的过程中会长成芽状、丝状、杆状及其分枝状或螺旋状长丝等形态^[17]。绵羊肺炎支原体与绵羊和山羊的慢性非进行性肺炎相关, 绵羊肺炎支原体除了自身致病外, 还使动物容易受到更严重的呼吸道病原体的入侵, 如溶血性曼海姆氏菌、巴氏杆菌和副流感病毒等。MO 基因组为双股 DNA, 不同株的编码序列不相同, 产羔肺炎支原体 SC01 基因组长度为 1020601 bp, GC 含量为 28.85%, 该基因组包含 864 个编码序列 (CDSs)。Y98 标准株则包含了 819 个编码序列 (CDSs), NM2010 株包含了 748 个编码序列 (CDSs) ^[18-19]。MO 的基因多态性与来自不同的地域有关, 也与不同的宿主源有关^[20]。

1.2.1.2 流行病学

绵羊支原体肺炎最为盛行的季节是每年的春季和冬季, 但在夏季与秋季绵羊支原体肺炎也时有发生。该病在羊群中发展迅速, 对绵羊的危害性要明显高于山羊, 且不同绵羊品种对该疾病的敏感性及其影响因素有着很大的差异性, 其中对湖羊的易感性要高于哈萨克羊、麦兰奴种绵羊和中国新疆多浪羊^[21]。Jones GE ^[22]等从健康的绵羊、感染肺炎的绵羊和感染肺腺瘤病的绵羊呼吸道中, 分离得到 9 株糖酵解支原体与昆士兰株(Y98)绵羊肺炎支原体。Brogden^[23]等随机检测了 558 只绵羊, 通过一系列的实验方法从这群羊中的 293 只绵羊体内分离到绵羊肺炎支原体, 而这几乎占据了羊群数量的一半。Robin A J Nicholas^[24]等人 2015 年在位于英格兰北部的一个丘陵农场, 从大多数羊和母羊的鼻拭子中检测到绵羊肺炎支原体, 同时从许多羊和母羊的血清中也检测到绵羊肺炎支原体, 并对其中一只感染严重且血清为阳性的母羊尸体进行剖检, 发现组织中存在病理学病变, 并从其病变组织中分离得到绵羊肺炎支原体和一些继发细菌。

方畴鑫^[25]等人对我国甘肃省陇东地区的 32.2 万只绵羊和山羊肺炎病进行流行病学调查, 发现在该地区羊传染性肺炎的感染率高达 80%~100%。刘聚祥^[26]等人对分布在河北省永清县、临西、邯郸和唐县这四个地方的羊群进行绵羊支原体肺炎血清学检测, 结果显示 955 份羊血清中共有 382 份阳性血清。其中最易感的年龄段是 1 岁的羔羊及 12 月龄内的幼羊。逯忠新^[27]等人对西北某个地区 3 个县 10 个牧场的羊群进行了抽查,

共收到采集的血清样本 673 份，检测其中阳性有 101 份，阳性率为 16%。解慧梅^[28]等人在 2015 年对位于江苏省泰州地区的 36 家不同规模化羊场展开 MO 流行病学调查，结果显示在所收集到的 207 份样品中均分离到支原体。该地区的绵羊与山羊均出现肺炎支原体感染现象，其中绵羊的发病率明显高于山羊的发病率。王华^[29]等人于 2011 年对四川省部分山羊群体中感染支原体肺炎的情况开展流行病学调查工作，调查结果显示，该团队对来自 7 个不同地区的 135 份样品进行分离鉴定，共得到 42 株支原体，其中绵羊肺炎支原体占据 36 株，丝状支原体占据 6 株。张轩^[30]等人于 2013 年发现我国甘肃省某规模化羊场发生的疑似绵羊肺炎支原体感染病例，通过对菌落形态进行观察结合生化试验以及特异性 PCR 检测的方法对病原体进行分离鉴定。鉴定结果发现，该规模化羊场所爆发的疑似病例确实为支原体感染所致。王占金^[31]等人于 2015 年九月至十月份，对位于河北省的一家绵羊育肥饲养场所爆发的绵羊疫情进行调查检测，结果发现该羊场存在肺炎支原体与埃希氏大肠杆菌双重感染的情况。对所采集的 55 份血清样品做 ELISA 血清学检测，结果发现该羊场的绵羊群体中感染率为 25.5%，感染平均值为 30%。检验结果一经确认，王占金等人立即对该羊场进行紧急防疫消毒措施。祁君^[32]等人于 2017 年对新疆莎车县塔孜尔其镇绵羊支原体肺炎进行流行病学调查，结果表明羊群的绵羊支原体肺炎发病率为 8.64%；引进绵羊的发病率为 9.95%，本地舍饲绵羊的发病率为 4.94%。区外引进绵羊的发病率高于本地舍饲绵羊的发病率，并且主要发生在引进后不久，这表明该病的发生与外调引进羊只有密切的相关性。吴翠兰^[33]等人对 2018 年 9 月位于广西省的一个养殖场内部绵羊群体中所爆发的疾病进行研究。探究引起该病的病因以及针对病因制定合理的治疗方案，该团队通过对病原进行分离鉴定以及 PCR 扩增技术，发现该养殖场所爆发的疾病病原是 D 型多杀性巴氏杆菌和绵羊肺炎支原体。确诊后并结合该羊场的饲养管理情况，吴翠兰等科研工作者立即对该羊场的患病羊只制定详细的治疗方案，防止该病的传播进一步扩大，威胁广西省羊养殖业的发展。

综上所述，绵羊肺炎支原体感染的情况，不论是在国外还是国内都时常有报道。尤其是在中国，基本上各个省份的羊养殖场都发生过绵羊支原体肺炎感染。这对我国羊养殖业危害巨大，同时也给广大兽医工作者与科研人员带来了威胁与挑战。针对该病的预防与治疗，早已变得刻不容缓，为壮大我国畜牧业发展，带动我国畜牧业经济飞速提高，广大兽医工作者与科研人员肩负着重要职责和使命。

1.2.1.3 临床症状

绵羊肺炎支原体感染的最急性病例主要表现是：患病羊发病突然，体温高达 41℃~42℃，食欲不佳，无精打采，出现不同程度的呼吸系统表现体征。患病羊只可视黏膜出现瘀血、发绀的症状。该病发病过程较短通常不超过 4~5d，有的病羊仅发

病 1~2d 就致其死亡。此时可见身体多个部位有大片紫绀。

绵羊肺炎支原体感染的急性病例主要表现是：采食减少，体温上升，精神沉郁。在患病羊只的嘴唇周围以及乳房等其他部位可见部分丘疹；鼻腔分泌物呈浆液性、脓液性；眼部肿胀，并伴有大量眼分泌物；嘴巴不闭合，时不时流一些泡沫样口水；头颈前伸，背腰拱起。怀孕母羊发生流产。有的可同时发生腹部膨胀和急性腹泻；在死前不久病羊常常表现为体温下降，甚至低于正常体温。

慢性病例多见于夏季。患病羊临床症状主要表现为间歇性剧烈咳嗽和腹泻，肺部听诊有摩擦音；有的患病羊只还表现出慢性眼结膜炎和轻微瘤胃臌气的症状，慢性型病例的临床表现，较最急性病例和急性病例来说，大多数不具有明显的临床症状表现，不易被畜牧主发现，且整个病程的发病时间相对较长。

1.2.1.4 剖检变化

绵羊支原体肺炎的病理变化主要出现在胸腔器官，对病死尸体进行剖检可见胸腔内部存在大量黄色液体，病程稍微严重的则出现血红色液体，液体在遇到空气后凝结成纤维蛋白块；胸膜表面有一层黄色的纤维蛋白薄层，膈叶表面有肋骨印记，脓肿部分含有无味的脓性液体^[34]。肺小叶坏死并发生钙化，肺的尾叶部分观察到不规则实变，呈小叶状、大叶状至弥漫状。病变区域的颜色表现为从深红色到灰粉色或灰色。肺脏发生肿胀，肺体积增大，剖检可见肺内出现脓性泡沫样稠液。镜检可看到在肺泡和支气管内观察到纤维蛋白脓性渗出物的积聚。心肌松弛，心包内出现淡黄色液体；支气管扩张，支气管淋巴结表面有淤血斑块^[35]。

1.2.1.5 致病机制

绵羊早期肺炎支原体细胞可直接吸附在气管绒毛和肺泡细胞的表面，避免被机体清除。经过定植以后，支原体能充分利用宿主细胞的各种成分，自然地向外分泌一些有毒物质，支原体大部分为黄素终端的呼吸通路，机体内的宿主细胞被形成的过氧化物杀伤。绵羊肺炎支原体在宿主体内所产生的过氧化氢可抑制纤毛运动^[36]，并且阻碍宿主细胞的清除工作以及排泄机体所产生的炎症性渗出物，进而导致机体出现呼吸道感染等症状。除此之外还能与宿主细胞膜发生融合，干扰细胞与细胞之间各种物质信息的传递与交换，造成免疫“意外伤害”^[37]。其中，呼吸道黏膜上皮细胞可作为免疫应答的桥梁，以启动子、中介子和调节子的形式存在，这些充分说明了它们参与了MO感染的炎症反应^[38]。

1.2.1.6 诊断方法

在绵羊肺炎支原体感染的发病早期，可先通过临床症状表现和病死羊只的尸体剖

检变化等进行初步的临床诊断。随着科技的不断发展, 研究者们对于该病的诊断方法也有着日新月异的更新。首先, 病原菌分离鉴定法是目前检测 MO 的标准方法。由于支原体是一种无细胞壁且能够在无活细胞培养基中进行生长繁殖的病原微生物, 因此大多数的 MO 培养基都是根据支原体的生物学特性等要求采用改良的 Thiaucourt's 培养基^[39]、改良的 Hayflick 培养基^[40]或者是改良的支原体肉汤培养基^[41]来培养 MO。在临床试验中, MO 的培养条件要求较高, 因此分离率很低, 并且该方法所用时间较长, 不太适合该病的早期快速诊断。

DNA 探针技术、LAMP 方法、PCR 方法是目前常用的分子生物学方法^[42]。Kılıc A^[43]等人在 2013 年使用培养物聚合酶链式反应 (PCR) 和免疫过氧化物酶来检查肉眼可见的肺炎病变绵羊和羔羊 216 个肺部样本中是否存在支原体。结果表明, PCR 方法可以成功地用于诊断支原体感染, 作为培养方法的替代方法, 并在物种水平上识别这种病原体。目前, 由于多种因素导致的不同病原体混合感染的报道时有发生, 为了能够同时检测出多种病原体, 林裕胜^[44]等人在 2018 年选择了绵羊肺炎支原体的 *P80* 基因, 丝状支原体丝状支原体山羊亚种的 *MCL_1760* 基因以及山羊支原体山羊肺炎亚种的 *arcA* 基因, 通过不同基因的核苷酸序列分别设计不同的引物, 使用 PCR 检测的方法, 最终成功建立了不同病原体的多重 PCR 检测方法。Zhang J^[45]等人在 2019 年采用环介导等温扩增 (LAMP) 技术, 通过侧向流动试纸 (LFD) 法进行核酸扩增和色谱可视化, 建立一种快速检测肺炎支原体的方法, 并测试了该方法的特异性、灵敏度和临床应用, 对临床上 50 只疑似感染绵羊肺炎支原体的羊肺组织进行检测, 结果显示 MO 的检出率为 86%。Dae AA^[34]等人在 2020 年使用组织病理学观察培养支原体和聚合酶链式反应 (PCR) 检测 50 只伊朗东北部自然感染支原体的绵羊肺组织样本, 50 个肺样本中有 3 个(6%)肺样本中观察到支原体生长。通过 PCR 在 12(24%)个样本中检测到属特异性支原体 DNA。这 12 个样本中有 9 例 (18%) 样本与支原体特异性引物反应呈阳性, 并且 PCR 检测支原体的效果要优于培养基。

除此之外, 免疫学方法包括免疫组化及间接免疫荧光的方法、ELISA 方法、以及间接血凝的方法。Rong G^[46]等人在 2012~2013 年使用间接血凝试验 (IHA) 方法检测中国海南省山羊血清肺炎支原体感染的血清阳性率并进行遗传鉴定, 结果显示中国热带地区不同地区绵羊肺炎支原体阳性率为 26.8% (95% CI 20.8 ~ 32.9) ~ 39% (95% CI 30.8 ~ 47.2), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Giangaspero M^[47]等人在 2012 年通过 ELISA 检测方法对来自日本北部北海道、岩手县和青森县这三个县的羊群进行了绵羊肺炎支原体和无乳支原体抗体的筛选。结果显示, 在 246 只动物中有 64 只(26%)对绵羊肺炎支原体呈血清反应阳性, 所有三个县都获得了阳性结果。所检测的血清均为无乳分枝杆菌。Handeland K^[48]等对挪威麝牛种群间爆发的支原体肺炎病原学进行调查, 研究发现免疫组化(IHC)检查结果显示肺病灶内有大量绵羊肺炎支原体抗原, 中性粒细胞染色

特别强烈。在 2006 年流行期间检查的动物存档肺组织块中观察到类似的 IHC 结果。患病麝牛种群感染支原体肺炎的感染途径很有可能是与 2006 年间共同放牧的绵羊共享舔盐而被传染。

1.2.1.7 治疗方法

针对绵羊支原体肺炎的治疗，王金明^[49]于 2018 年通过试验发现使用头孢类药物或青霉素类药物对该病进行治疗，治疗效果并不理想。建议使用替米考星或者泰乐菌素等药物对该病进行治疗。温伟^[50]等人于 2013 年使用中药灌服方法治疗该病，结果发现该方法大大提高了支原体肺炎的治愈率，使用麻杏甘石汤加味，此方可起到宣肺、平喘的功效，同时有利水消肿，改善肺部血液微循环的功效。通过此方法，绵羊支原体肺炎的治疗得到了显著成效。对于绵羊支原体肺炎不同发病时期的治疗方法不同，针对该病在发病初期选用药物进行治疗的方法，曲悦^[51]于 2010 年使用青霉素、链霉素并结合 10%磺胺嘧啶钠等药物对患病初期的羊群进行治疗，但所得到的治疗效果并不乐观。杨冬梅^[52]于 2014 年对不同的临床症状采取了不同的辅助措施进一步促进病羊的康复。根据临床症状对症治疗，针对体温高的病羊采取降温的治疗方法，对于食欲降低的病羊则采取恢复胃肠功能的方法。徐昊亮^[53]等人对来自新疆阿克苏地区的萨福克（黑头）羊进行绵羊支原体肺炎治疗试验，结果表明使用阿奇霉素和鱼腥草搭配治疗绵羊支原体肺炎有明显的疗效，起到标本兼治的作用。秦占科^[54]等科研人员于 2014 年上半年，在位于新疆乌鲁木齐米东区的一家养殖场内发现 200 余只羔羊和 60 余只母羊同时间出现精神沉郁、体温升高、伴有咳嗽症状。采食量大幅度下降，后期病羊极度衰弱死亡。经养殖场兽医确诊，患羊为支原体肺炎感染，且病死率高达 70%。治疗结果发现使用泰乐菌素等药物的治疗效果不明显；使用新砷凡钠明进行治疗，发现疗效较好，作用较强；治疗效果最好的是使用头孢曲松钠，但由于该药价格高，相对来说治疗成本比较大。

1.2.1.8 预防

目前针对绵羊支原体肺炎的预防措施，大部分规模化养殖场采用疫苗免疫的方法。各大规模化养殖场所使用的疫苗是由中国农科院兰州兽医研究所研发的绵羊肺炎支原体灭活苗^[55]。另外，还有一种是绵羊与山羊均可使用的疫苗为“山羊传染性胸膜肺炎氢氧化铝疫苗”，该疫苗每年免疫一次能有效地预防疾病的发生^[56]。各大规模化养殖场在日常饲养管理过程中要保持圈舍的清洁，每日严格消毒，勤通风，注重圈舍内的空气质量，始终保持圈舍处于干燥的环境。饲养员及兽医工作者应做好该养殖场的预防接种工作，结合养殖场自身的条件制定科学的疫苗接种程序。对于养殖场新引进的羊只，要严格把控各种传染性疾病的检疫，并且隔离饲养 30 天以上，保证没有传染性疾病方

可混群。

对于已经发病的羊群，要实施封锁，以免污染圈舍、饲草、饮水等，造成更加惨重的经济损失。对病死羊只的尸体以及粪便进行无害化处理后深埋。对于养殖场内羊群的日常饮水，要确保水源干净、无污染，饲草也要保证干净无污染^[57]。

对于生活在牧区的羊群，在平时放牧时，要避免去到一些被污染的草场，以免发生绵羊支原体肺炎感染的现象。

相关饲养人员在进行日常消毒工作时，可使用来苏儿进行圈舍的消毒；在清理完圈舍后，可使用紫外灯进行照射^[58]。相关饲养人员应合理工作，科学饲养。不断加强自身的防疫意识，积极大力宣传并学习防疫知识，从根本上健全羊养殖场支原体肺炎疾病的防治体系。

1.2.2 *NLRP3* 炎性小体研究进展

1.2.2.1 炎性小体概述

炎性小体是机体自身的先天免疫系统中重要的组成元件，能够参与体内多种细胞的免疫应答过程，并在细胞内完成对不同受体的特异性识别。在哺乳动物细胞中，已鉴定出了几种类型的炎症小体，但目前研究最广泛的还是含有吡喃结构域3 (*NLRP3*) 的 NOD 样受体的炎症小体。许多激活剂或危险因素通过激活 *NLRP3* 炎症小体来发挥其作用，在不同细胞中产生各种功能变化。有几种分子信号通路已被证实参与介导 *NLRP3* 炎症小体的激活，并且它们与 K^+ 流出的修饰、溶酶体泄漏增加以及组织蛋白酶 B 的活化有关。据有关报道称，在肾脏疾病中炎症被认为是介导或促进肾小球发生硬化病变的关键，最终导致终末期肾病 (ESRD) 的发生。这种炎症小体活化不仅发生在免疫细胞中，还发生在住宅细胞中，例如肾小球中的内皮细胞和足细胞^[59]。有研究表明，巨噬细胞可以利用特殊的 NLRs 来感知环境中的高渗透压，从而介导一系列的炎症反应。例如，Caspase-1 的激活我们只能在巨噬细胞当中观察得到，而在其他类型的细胞如成纤维细胞或者是上皮细胞中则观察不到。这可能与 *NLRP3* 和 *NLRC4* 在巨噬细胞中特异性表达有关^[60]。

NLRP3 炎性小体是由多种大分子蛋白复合而成，其中包含 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, *NLRP3*)、凋亡相关斑点样蛋白 (Apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 以及天冬氨酸蛋白水解酶-1 蛋白 (cysteiny l aspartate-specific proteases-1, Caspase-1)，每个大分子蛋白在参与机体的免疫应答中都起到至关重要的作用^[61]。

1.2.2.2 *NLRP3* 炎性小体的结构与功能

由于多种炎症小体的参与诱导，导致机体发生一系列的炎症反应。根据结构与功

能划分, 可将 *NLRP3* 基因分成 PYD、NACHT 和 LRR 三部分^[62]。其中 PYD 可以和其他蛋白的 PYD 相结合, 形成复合物, 从而起到募集和连接的作用^[63]。

NLRP3 炎性小体是机体自身先天的免疫系统中重要的组成元件, 其功能对于机体的免疫应答起到十分关键的作用。*NLRP3* 炎性小体可以识别相关的内源性或者外源性受体, 并受到不同的刺激, 激活相关的信号通路, 引起机体发生炎症性反应或参与机体的免疫表达。适当的炎症反应是有利于机体自身发展的, 机体通过一系列炎症反应使免疫系统清除有害物质或病原体, 使机体维持在一个健康的平衡状态^[64]。加强对 *NLRP3* 炎性小体在不同信号通路中的作用与机理, 对于疾病的治疗与药物的研发有着十分重要的意义。

1.2.2.3 *NLRP3* 炎性小体的活化

大量 *NLRP3* 炎症小体的已知激活剂, 无论是生物来源还是非生物来源, 都不能使 *NLRP3* 炎症小体直接被激活。现在人们普遍认为 *NLRP3* 炎症小体的激活主要是由于这些刺激引起的常见形式的细胞应激事件而发生的。最近的研究证实了这一观点, 在内质网应激和氧化应激条件下, *NLRP3* 炎症小体可触发先天免疫应答而被激活。这些炎症反应通常作用于促进防御和适应压力的条件下, 但在慢性环境中可能变得对机体有害, 从而导致各种炎症性疾病的发生。炎症反应的发生是通过炎性小体激活 caspase-1 而触发的。有趣的是, 与大多数通过特定 NLR 激活炎症小体的已知刺激不同, 高渗应激则是通过 *NLRP3* 和 NLRC4 来激活炎症小体。更有研究表明, 在低渗透条件下, *NLRP3* 炎症小体通过细胞内 K^+ 外流而被激活, 而 K^+ 是由瞬时受体电位 (TRP) 通道控制的。*NLRP3* 的过度激活与全身和关节性炎症有着直接的关系。相关报道发现, *NLRP3* 的激活与 *NLRP3* - NEK7 相互作用有关, 但是目前对于 *NLRP3*-NEK7 相互作用的分子机制尚不清楚^[65]。

有重要的文献表明^[66-67]NOD 样受体家族、含有 Pyrin 结构域的 *NLRP3* 炎性小体、细胞因子释放综合征或细胞因子风暴在其发病机制中起着至关重要的作用。并且 *NLRP3* 炎症小体是激活先天免疫系统识别病原体(包括病毒感染)的重要原因^[68-69]。炎症小体的激活是由一个两步过程高度调节和介导的, 首先是启动, 然后是激活。启动还可诱导 *NLRP3* 炎症小体的翻译后修饰, 包括泛素化、磷酸化和 sumo 化, 使 *NLRP3* 炎症小体处在一个自抑制的非激活、信号敏感的状态^[70]。启动后, *NLRP3* 炎症小体可被一系列病原体或内源性 DAMPs 激活。*NLRP3* 激活可导致细胞凋亡, 这是在 T 淋巴细胞中发生的炎症性程序性细胞死亡途径^[71]。已有研究证实, 抗氧化剂添加或 TXNIP 可阻断高糖暴露的 HRMECs 中 IL-1 β 和 IL-18 的分泌, 表明 ROS-TXNIP 途径参与介导 *NLRP3* 炎症小体的激活^[72]。另外, *NLRP3* 炎症小体是一种多蛋白平台, 在细胞感染或应激时被激活。它的激活导致 caspase-1 依赖的促炎细胞因子如白介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-

18的分泌,因此 caspase-1 和 IL-18 的分泌是调控 *NLRP3* 基因活化的关键因素^[73]。

toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是宿主细胞的表面受体,是机体先天免疫系统中的一个极其重要的组成成分,它检测组织损伤或细胞应激后释放的内源性配体,如 ATP、组蛋白、热休克蛋白、mRNA、高迁移率族 box-1 蛋白(HMGB1)和线粒体蛋白。相关研究表明, toll 样受体 4 能够直接识别包含 LPS, 脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA), dsRNA 等在内的病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP),并在激活机体天然的免疫应答中起到十分重要的作用。脂多糖(LPS)是细菌病原体相关的分子模式,促进 caspase-11 激活。细胞质内 LPS 可以独立于 toll 样受体 4 (TLR4)直接结合和激活 caspase-11。但 caspase-11 是如何执行凋亡和非规范的 *NLRP3* 炎症小体的激活仍是未知的^[74]。

1.2.2.4 *NLRP3* 炎症小体与相关疾病的关系

Li C^[75]等研究者对 *NLRP3* 炎症小体和 caspase-1 在慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者和人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cell line, 16HBECs)中的表达进行了试验研究,发现在 16HBECs 的损伤和凋亡的整个过程中 *NLRP3* 炎症小体都起到了十分关键的作用。Shahzad K^[76]等科研工作者发现慢性肾脏疾病(CKD)患者的数量在世界范围内不断增加,而 CKD 的存在加重了发病率和死亡率。*NLRP3* 炎症小体也有助于促进肾脏炎症和 CKD 进展,并与蛋白质超载诱导的肾小管间质损伤有关。与上述研究类似,BSA 超载促进了肾脏 *NLRP3* 炎症小体的激活,并通过限制食用铁受到抑制。关于铁对炎症小体的作用,细胞不稳定铁是激活 *NLRP3* 炎症的触发器^[77]。关于特殊的病原体,例如肺炎支原体的感染等疾病,早期的诊断工作十分艰难,一旦确诊,积极配合治疗对于该病的临床工作有着非常重要的现实意义。相关研究表明,肺炎支原体产生的呼吸窘迫综合征毒素可以激活 *NLRP3* 炎症小体,促进机体 IL-1 β 的分泌^[78]。在目前的研究中,相关学者发现并建立了 *NLRP3* 炎症小体在体外和体内肺炎支原体感染中的关键功能。在小鼠骨髓源性巨噬细胞(BMDMs)中,肺炎支原体感染通过 *NLRP3*/ASC 炎症小体依赖机制触发 caspase-1 激活和 IL-1 β 分泌。接下来,确定了 *NLRP3* 在肺炎支原体体内感染中的作用。数据表明,在肺炎支原体感染期间,肺部 IL-1 β 分泌需要 *NLRP3*, IL-1 β 分泌的缺失导致细菌清除减少。

房有福^[79]等人研究发现,患有肺炎支原体肺炎的儿童体内的 caspase-1 表达与 ASC 表达, IL-1 β 、IL-18 的分泌水平明显高于健康儿童。有研究已被证实,多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)等疾病的发生与 *NLRP3* 炎症小体的过度活化有着密切的相关性^[80-81]。*NLRP3* 炎症小体的激活因子包括由于缺血导致的心肌坏死所释放出的大量 ATP 和氧化应激产物。这些都能激活 *NLRP3*

炎症小体，促进机体的免疫应答反应^[82]。Dai X^[83]等研究报道 *NLRP3* 炎症小体可作为表皮角化细胞中 dsRNA 的传感器，在皮肤固有免疫防御病毒感染和皮肤炎症反应中发挥重要作用。

炎症性肠病 (IBD) 的发病机制目前尚不明确，但能确定的是，IBD 是一种肠道免疫性疾病，由于 *NLRP3* 炎症小体是先天性免疫系统的重要组成部分。有研究已被证实^[84]，MCC950、CY-09 等多种 *NLRP3* 炎症小体抑制剂在治疗炎症性肠病的小鼠模型中取得了明显的治疗效果，这为 IBD 的研究提供了重要的参考依据。MO 感染可以导致促炎细胞因子，肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和趋化因子，进而造成肺部损伤。相关重要研究报道，在肺炎支原体肺炎 (MPP) 发病的过程中免疫功能的紊乱和相关炎症因子的紊乱，是导致 MPP 发病的重要原因。据有关研究发现，MO 与 *NLRP3* 基因之间有着密不可分的关系，因为 MO 激活 *NLRP3* 炎症小体中的相关蛋白，通过信号传导，因此使得下游的炎症因子含量水平升高^[85-87]。

1.2.3 非编码区与相关疾病的研究

基因的遗传变异在部分疾病的易感性方面有着十分重要的意义。与编码序列多态性相比，非同义变异的后果可以在蛋白质表型水平上得到解决，定义特定的功能调控多态性被有关学者证明是存在问题的。出现这种现象的原因有很多，包括连锁不平衡导致的精细定位困难，以及缺乏实验工具来解决非编码序列变异对基因表达的影响。基因的非编码区虽然不能编码蛋白质，但同样具有遗传效应。

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)根据其在基因中的位置，可分为基因编码区、基因非编码区和基因间隔区的 SNP 位点^[88]。最常见的是单核苷酸多态性(SNPs)，即 DNA 序列中四个可能的核苷酸中的一个被另一个取代，在整个基因组中平均每 800 个核苷酸出现一次。大部分的 DNA 序列多态性在功能上都不重要，尽管有些会通过改变氨基酸等方式改变最终肽的结构。5'UTR 通过调控特异性结合位点的方式来完成相关目的基因的调控。3'UTR 则可以与 miRNA 相互结合，然后进行翻译抑制^[89-90]。

基因非编码区在动物相关疾病中的研究应用较少见，但在人类疾病中，基因非编码区已有较广泛的研究，裴青青^[91]对我国青海地区汉族人民患有子痫疾病的研究中发现，*HLA-G* 基因 5'UTR 的-289 位点多态性可能与青海地区汉族子痫前期的易感性有关；卢春燕^[92]等人的研究也确认了 *SMAD7* 基因非编码区的遗传变异与云南汉族人群结直肠癌的风险有显著关联性。关于非编码区相关疾病的研究报道称，人的冠心病的易感位点大多数都位于基因的非编码区。这使对该病的研究变得相对困难，目前仅有一小部分易感位点得到阐述。

目前 *NLRP3* 基因对动物疾病的研究报道相对较少，随着我国养羊业的不断发展，

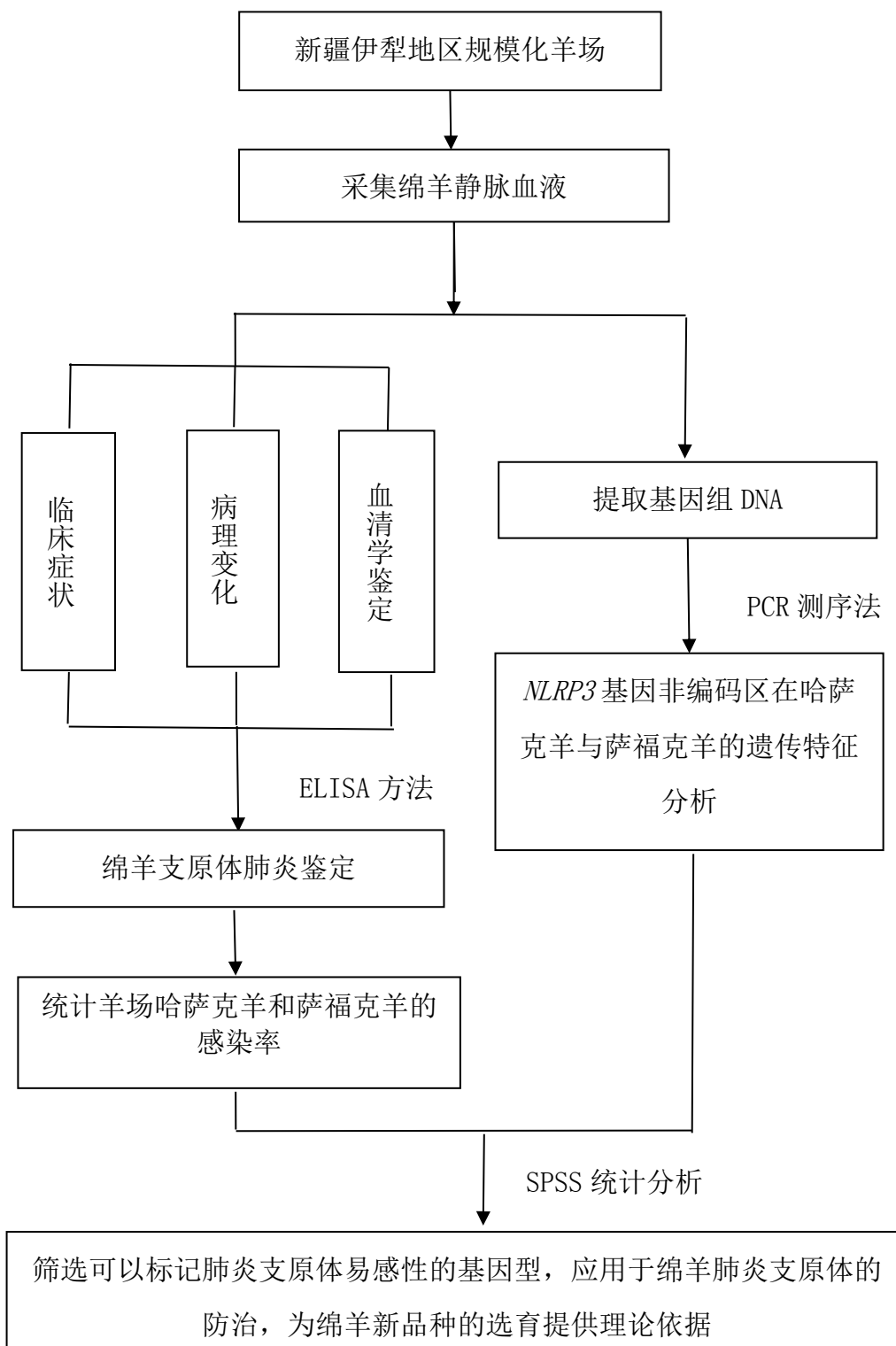
畜牧经济的快速提高，寻找有效调控 *NLRP3* 炎症小体的相关信号分子与 SNP 位点为绵羊支原体肺炎的防治与新品系的选育提供有效指导。

1.3 研究内容及技术路线

1.3.1 研究内容

对新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊感染肺炎支原体状况进行流行病学调查分析。在此基础上,利用 PCR 测序法对新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊 *NLRP3* 基因非编码区进行多态性分析。结合各品种对绵羊肺炎支原体易感性的差异,开展 *NLRP3* 炎性小体相关基因多态性与肺炎支原体易感/抗性的相关性研究。并进一步分析 *NLRP3* 炎性小体相关基因不同基因型个体的肺炎支原体感染情况,寻找可以标记肺炎支原体易感性的 *NLRP3* 炎性小体的相关基因型,为选育抗绵羊肺炎支原体新品种奠定基础。

1.3.2 技术路线



第2章 新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊感染肺炎支原体血清学调查与分析

【摘要】目的：为调查新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊感染肺炎支原体的情况。方法：使用绵羊肺炎支原体(MO) ELISA 抗原和抗体检测试剂盒，对新疆伊犁地区部分规模化羊场的哈萨克羊和萨福克羊两个绵羊品种随机抽查共 800 份血清样本进行绵羊肺炎支原体抗原和抗体的检测。结果：新疆伊犁地区的哈萨克羊和萨福克羊两个绵羊品种之间均存在绵羊肺炎支原体感染的现象。哈萨克羊 MO-Ab 阳性率 26.00%，MO-Ag 阳性率 22.91%；萨福克羊 MO-Ab 阳性率 7.34%，MO-Ag 阳性率 19.71%。结论：伊犁地区哈萨克羊的抗体阳性率显著高于萨福克羊；不同绵羊品种抗原检测阳性率无显著性差异。

绵羊支原体肺炎 (MPS)是由支原体引起的一种在绵羊、山羊群中普遍流行，并具有高度传染性的疾病。它是形态多样的原核类微生物，包括杆状、梨状、分枝状等^[95]。在 1963 年首次从苏格兰绵羊体内分离得到^[93]，后由 Carmichael^[94]将其正式命名。该病在我国的新疆地区普遍高发，感染后病羊临床表现为高热、咳嗽、贫血、流浆液性鼻涕，纤维素性炎症。病理变化集中在肺和胸腔内部，胸膜发生纤维素性和浆液性炎症，肺脏出现严重的浸润^[96]。目前，病原分离鉴定法、分子生物学方法以及免疫学检测方法是检测绵羊肺炎支原体的主要方法。由此可知，绵羊肺炎支原体 (MO) 因其广泛的分布及较高的易感性，给我国养羊业造成极大威胁，严重阻碍了养羊业的健康可持续发展。本研究通过调查绵羊肺炎支原体在我国新疆伊犁地区的流行情况并结合当地的实际饲养管理水平，为做好科学防疫工作，确保伊犁地区羊养殖业健康可持续发展提供理论依据。

2.1 材料与方法

2.1.1 试验材料

2.1.1.1 样品的采集与处理

2021 年 4 月至 5 月在新疆伊犁地区部分规模化羊场，随机采集年龄为 2~3 岁的绵羊的静脉血液，共 800 份。将采集好的绵羊静脉血液静置于室温，待其自然析出血清，收集上清液。其中出现溶血现象的血液样品进行低温离心，3000r/min,5min,仔细收集上清液，并进行标记、记录羊号，之后放于-80℃冰箱保存备用。

2.1.1.2 主要试剂与仪器

表 2-1 主要试剂与仪器表

Table1-1 Main reagents and instruments

主要试剂与仪器	生产厂家
绵羊肺炎支原体(MO) Ab ELISA 检测试剂盒	美国 TSZ 公司
绵羊肺炎支原体(MO) Ag ELISA 检测试剂盒	美国 TSZ 公司
电子恒温箱	德国 MEMMERT 公司
3001-1311 型酶标仪	赛默飞世尔科技有限公司

2.1.2 试验方法

2.1.2.1 绵羊肺炎支原体抗体的检测

绵羊肺炎支原体抗体的检测采用美国 TSZ 公司生产的绵羊肺炎支原体(MO) Ab ELISA 检测试剂盒，根据说明书中具体操作步骤进行试验操作。

2.1.2.2 绵羊肺炎支原体抗原的检测

绵羊肺炎支原体抗原的检测采用美国 TSZ 公司生产的绵羊肺炎支原体(MO) Ag ELISA 检测试剂盒，根据说明书中具体操作步骤进行试验操作。

2.1.3 数据分析

本试验所得数据使用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析，用卡方检验的方法进行差异显著性比较，以 $P < 0.05$ 表示差异显著，用不同小写字母表示；以 $P < 0.01$ 表示差异极显著，用不同大写字母表示。

2.2 试验结果

2.2.1 样品收集

采集的新疆伊犁地区规模化羊场绵羊血清共 800 份。结果见表 2-2 所示。

表 2-2 血清样品收集情况

Table2-2 Collection of serum samples

绵羊品种	伊犁地区 (800 份)	
	哈萨克羊	萨福克羊
血清样本数	323	477

2.2.2 新疆伊犁地区不同品种绵羊血清中 MO-Ab ELISA 检测结果

从表 2-3 可以看出, 新疆伊犁地区哈萨克羊的 MO-Ab 阳性率为 26.00%, 萨福克羊的 MO-Ab 阳性率为 7.34%, 两个绵羊品种的 MO-Ab 阳性率存在差异极显著 ($P<0.01$)。

2.2.3 新疆伊犁地区不同品种绵羊血清中 MO-Ag ELISA 检测结果

同样从表 2-3 可知, 新疆伊犁地区哈萨克羊的 MO-Ag 为阳性率 22.91%, 萨福克羊的 MO-Ag 阳性率为 19.71%。该结果表明同一地区不同品种之间的 MO-Ag 阳性率差异显著 ($P<0.05$)。

表 2-3 新疆伊犁地区不同品种绵羊血清中 MO-Ab 和 MO-Ag 检测结果表

Table 2-3 Detection results of MO-Ab and MO-Ag in serum of different breeds of sheep in Yili region of Xinjiang

品种	MO-Ab		MO-Ag	
	数量 (阳性数/总数)	阳性率	数量 (阳性数/总数)	阳性率
哈萨克羊	84/323	26.00% ^A	74/323	22.91% ^a
萨福克羊	35/477	7.34% ^B	94/477	19.71% ^b

注: 同一列数值中上标含不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: in the same column of values, different superscripts with lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$), while different uppercase letters mean extremely significant difference ($P<0.01$).

2.3 讨论

绵羊支原体肺炎是由肺炎支原体引起的一种羊的高度接触性传染病。该病主要是患病羊经呼吸道排出的分泌物携带大量病原体导致羊群感染发病。该病一旦在羊群中流行, 其传染速度相当快, 患病羊只表现出不同程度的临床症状。绵羊支原体肺炎的流行往往给养殖场带来严重的经济损失。

近年来, 有大量学者对该病的流行情况展开调查研究。吴挺^[97]等人在 2015 年对新疆第六师羊传染性疾病进行血清学调查, 其中绵羊支原体肺炎感染阳性率为 15%。刘文亮^[98]等人在 2017 年对新疆奇台、玛纳斯、五家渠、石河子、喀什地区的 5 个规模化羊场绵羊支原体肺炎的感染情况进行血清学调查, 结果发现各羊场均存在支原体肺炎感染的情况。冯业攀^[99]等人在 2018 年对河南省清丰县绵羊支原体肺炎感染情况进行血清学调查, 结果发现该地区的支原体肺炎感染阳性率为 57.14%, 说明绵羊肺炎支原体在清丰县的绵羊群体中广泛流行。郭慧瑜^[100]等人在 2019 年对福清市绵羊支原体肺炎在山羊群体中的流行情况进行血清学调查, 结果显示山羊血清中的 MO 阳性率高达

88.3%。

每年的冬季 11 月份到次年的 3 月份是该病的高发季节，也最容易在羊的呼吸道中检测到肺炎支原体，而且从 3 月至 4 月该病呈阶段性高发^[101]。在新疆各个地区的规模化羊场中普遍存在绵羊支原体肺炎感染的现象，并且呈高势态水平流行^[102]。对于该病发病率的高低通常因地域不同、饲养模式不同等因素而有所差异，不同年龄段的绵羊、不同品种的绵羊对绵羊支原体肺炎的易感性也有所不同^[103]。倪文浩^[104]等人在 2019 年对新疆北疆伊犁地区和南疆巴州地区的 1628 只绵羊开展绵羊肺炎支原体血清学调查，结果发现新疆伊犁地区和巴州地区均存在绵羊支原体肺炎感染的现象。并且本地绵羊品种的阳性率高于同一地区外来引进的绵羊。本试验研究发现本地的绵羊品种（哈萨克羊）所检测出的阳性率要高于外来引进品种（萨福克羊），这与倪文浩等人的研究结果一致。

大多数外来引进的绵羊品种感染绵羊肺炎支原体的几率要高于本地品种，但该试验结果是本地品种（哈萨克羊）的感染率高于外来引进品种（萨福克羊）。对于该试验现象可能是由于该养殖场外来引进品种对绵羊肺炎支原体易感，再加上羊群逐渐被养殖场净化而导致的结果。也有可能是本地品种（哈萨克羊）自身具有抗性，即便感染了支原体肺炎，由于死亡率低没有被畜牧主淘汰而是选择保留下来，所以本试验检测到的本地品种（哈萨克羊）的感染率要高于外来引进品种（萨福克羊）。

由此可见，绵羊支原体肺炎在新疆伊犁地区的羊群中存在感染的现象，近年来的有关报道显示，新疆其他地区的规模化羊场感染绵羊支原体肺炎的现象也频繁发生，且群体感染率与个体感染率每年都以不同的程度上升，此现象反映了新疆羊养殖业发展的状况，这对相关养殖人员与科研工作者来说不仅仅是机遇也是一项严峻的挑战。为了更加健康持续地发展养羊业，推动新疆畜牧业经济发展，必须加强对该病的重视，科学饲养，加强防控。

2.4小结

(1) 本试验通过对新疆伊犁地区不同绵羊品种绵羊肺炎支原体感染情况进行血清学调查，结果显示，伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊的 MO-Ab 的阳性检出率为 14.88%，MO-Ag 的阳性检出率为 21.00%。证实了在新疆伊犁地区部分规模化养殖场中存在绵羊支原体肺炎感染的现象。

(2) 伊犁地区哈萨克羊 MO-Ab 阳性检出率 26.00%和萨福克羊 MO-Ab 阳性检出率 7.34%存在差异极显著 ($P < 0.01$)，伊犁地区哈萨克羊 MO-Ag 阳性检出率 22.91%和萨福克羊 MO-Ag 阳性检出率 19.71%存在差异显著 ($P < 0.05$)。哈萨克羊对肺炎支原体的感染率高于萨福克羊。

第3章 *NLRP3* 基因非编码区多态性与绵羊肺炎支原体易感性的相关性研究

【摘要】目的：试验旨在筛选出与绵羊肺炎支原体易感性相关的单核苷酸多态性位点，为绵羊新品系的选择和育种提供新思路。方法：本研究以*NLRP3* 基因为候选基因，选取哈萨克羊与萨福克羊两个绵羊品种共计 800 份血液样品为试验材料，利用PCR直接测序法检测两个绵羊品种*NLRP3* 基因 5'端非编码区(5'UTR)和 3'端非编码区(3'UTR)序列的单核苷酸多态性(SNPs)，并分析不同SNP位点与绵羊支原体肺炎感染率的相关性。结果：分析得到*NLRP3* 基因非编码区SNP位点，筛选出C38233659T、C38233866T、T38233881C、A38188131C、G38188003A、T38188153C、A38188237C共7个非编码区SNP位点；在*NLRP3* 基因 5'UTR的A38188131C位点上哈萨克羊MP-Ag阳性和MP-Ag阴性的不同基因型频率之间存在显著性差异($P < 0.05$)。结论：*NLRP3* 基因 5'端非编码区(5'UTR)的A38188131C位点与哈萨克羊MO-Ag阴性与MO-Ag阳性感染性之间存在一定的相关性，因此可作为抗绵羊肺炎支原体易感性的分子遗传标记位点。

近年来，为推进新疆羊养殖业的快速发展，从国内外引进湖羊、萨福克羊等优良绵羊品种，开展了杂交改良工作，但由于不同绵羊品种间遗传因素、环境适应性及在绵羊引进过程中对疾病控制不严等问题，导致新疆羊养殖产区一些疾病的集中爆发。其中绵羊支原体肺炎就是影响新疆绵羊产业比较严重的传染性疾病之一。绵羊肺炎支原体可感染绵羊，山羊及野生动物如麝香牛、白尾鹿等，相比之下绵羊的易感性更高。该病导致出栏率下降，造成饲料和人力的大量浪费，还可造成其他病原的继发或混合感染如布氏杆菌、精氨酸支原体等，这给羊养殖业带来了巨大的经济损失。*NLRP3* 炎症小体是近年来研究最广泛的炎症小体，表达于多种免疫细胞，并参与各种炎症性疾病的发生及发展，是先天性免疫系统的重要组成部分。目前 *NLRP3* 基因已在慢性胃炎、胃腺癌^[105]、男性下肢动脉硬化闭塞症^[106]、骨髓增生异常综合征^[107]、痛风^[108]等疾病研究中被证明与易感性有关。目前有研究证实^[104]，在 *NLRP3* 基因的编码区存在部分SNP位点与绵羊支原体肺炎的易感性有关，但我们知道基因的非编码区对于疾病的遗传信息表达同样是不可或缺的一部分，位于非编码区的核苷酸序列同样具有遗传相应。因此，本试验选取哈萨克羊和萨福克羊为研究对象，根据 *NLRP3* 基因非编码区的测序结果，分析并筛选 *NLRP3* 基因在两个绵羊品种上的单核苷酸多态性(single nucleotide

polymorphism, SNP)位点, 并对筛选出的 SNP 位点进行分析, 以期筛选出与绵羊肺炎支原体易感性相关的遗传标记位点, 为绵羊品种的选育奠定基础。

3.1 材料与试剂

3.1.1 样品来源

2021年4月至5月在新疆伊犁地区部分规模化羊场, 使用EDTA抗凝真空采血管随机采集年龄为2~3岁的绵羊静脉血液, 共800份(详细信息参见表3-1)。抗原阴性样本与抗原阳性样本经第2章试验ELISA检测结果已区分开, 对应样本编号, 血清样本与血液样本均来自同一只羊, 以备后续试验。

表 3-1 绵羊静脉血液样品收集情况

Table2-1 Collection of venous blood samples from sheep

绵羊品种	伊犁地区 (800 份)	
	哈萨克羊	萨福克羊
血液样本数	323	477

3.1.2 试验试剂与设备

表 3-2 试验试剂与设备表

Table 3-2 Test reagents and equipment table

试验试剂与设备	生产厂家
血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒	北京天根生物工程技术服务有限公司
2×TransTaq-T PCR SuperMix	北京全式金生物技术有限公司
Trans DNA Marker II	北京全式金生物技术有限公司
ddH ₂ O	生工生物工程(上海)股份有限公司
琼脂糖	北京索莱宝科技有限公司
Gel Green 核酸染料	北京索莱宝科技有限公司
琼脂糖凝胶电泳上样缓冲液	宝生物大连有限公司
电子天平	美国 Optast 公司
SW-CJ-2F 型净化工作台	上海博讯实业有限公司
XMTP 2045 型三孔三温水浴锅	上海博讯实业有限公司
离心机	德国艾本德公司
DYY 12 型电泳仪	北京市六一仪器厂
冰箱和冰柜	青岛海尔公司
Tanon-1600 凝胶成像仪	上海天能科技有限公司
PCR 仪	Bio-Rad(中国)有限公司

3.2 试验方法

3.2.1 血液 DNA 提取

采用北京天根生物工程技术有限公司生产的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒。

3.2.2 制备 1.0%琼脂糖凝胶

利用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测，可用于后续基因型检测。

1.0%琼脂糖凝胶的制备：

- (1) 称量 1.0g 琼脂糖溶于 100ml 1×TAE Buffer 中。
- (2) 微波炉加热 3min,直至溶液完全清澈透明无沉淀。
- (3) 选择合适大小的齿梳和胶板，组装好后备用。
- (4) 在 1.0%琼脂糖凝胶中加入 3μL Gel Green 核酸染料，充分混匀。
- (5) 倒入组装好的胶板中，确保凝胶中无气泡或异物，等待约 30min 凝固后拔出齿梳。

3.2.3 引物设计

根据 GenBank 提供的绵羊 *NLRP3* 基因 mRNA 序列利用 Primer5.0 在线设计 4 对引物（详细信息见表 3-3），引物由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。

表 3-3 *NLRP3* 基因 5'UTR 和 3'UTR 引物设计

Table 3-3 Primer design of *NLRP3* gene 5'UTR and 3'UTR

引物名称	Forword (5'-3')	Reverse (5'-3')	退火温度(°C)	片段大小
<i>NLRP3</i> 5'UTR (1)	TGGCTCAGACGGTTAAGAATC	TGAGATGGAACCTGGGGTGAT	56	578 bp
<i>NLRP3</i> 5'UTR (2)	TCTACTTCCATACCACGGAAC	CTGCTTCCTGATGCTATCTTG	55	553 bp
<i>NLRP3</i> 3'UTR (1)	GTGAGGTTAAGAGAGGAGACG	CATCCTCTGACTGAGACACTG	56	429 bp
<i>NLRP3</i> 3'UTR (2)	CAGCATTAAGATCATCCCTGC	AAGTTGCTGCCACAAAATTGC	55	381 bp

3.2.4 PCR 扩增

将反应物加入离心管中，标记好顺序，放入离心机，2000rpm 离心 30 秒，取出后

放入 PCR 仪器，按照反应程序进行 PCR 扩增。

表 3-4 PCR 反应体系

Table 3-4 PCR reaction system

反应物成分	50 (μL)
2×TransTaq-T PCR SuperMix	25
上游引物	1
下游引物	1
DNA 模板	2
ddH ₂ O	21

表 3-5 PCR 扩增程序

Table 3-5 PCR amplification procedures

温度	时间	循环
95℃	3 min	1
95℃	30 s	35
55/56℃	30 s	35
72℃	1 min	35
72℃	5 min	1
4℃	10 min	1

3.2.5 琼脂糖凝胶电泳

- (1) 将琼脂糖胶板放入电泳槽加入 1×TAE Buffer 浸过胶板；
- (2) 取 5μL DNA Marker 加入第一孔，作为标记；
- (3) 取 PCR 产物 5μL，依次加入到胶板上的点样孔中；
- (4) 连接电源正负极，调节电压 120V 电泳 20min；
- (5) 电泳结束后，在凝胶成像仪上成像并观察结果。

3.2.6 数据分析

测序结果采用 DNAMAN 和 Chromas 软件分析其序列和峰图。利用 SPSS 20.0 软件进行卡方独立性检验基因型分布差异，用卡方检验进行感染率的关联分析。

3.3 结果分析

3.3.1 *NLRP3* 基因非编码区 SNP 位点的筛选

采用直接测序法分别对 *NLRP3* 基因的 3'UTR 和 5'UTR 进行 SNP 位点筛选。PCR 产物如图 3-1、图 3-2、图 3-3、图 3-4 所示，条带明亮清晰，没有引物二聚体，可送去测序，部分 SNP 位点的测序峰图如图 3-5、图 3-6、图 3-7 可见。测序结果与 NCBI 数据库上发布的 *NLRP3* 基因非编码区序列，使用 DNAMAN 软件进行分析比对，测序峰图使用 Chromas 软件进行比对。共筛选出 7 个非编码区 SNP 位点。其中分布在 3'UTR 上的 SNP 位点有 3 个，分别为 C38233659T、C38233866T、T38233881C；分布在 5'UTR 上的 SNP 位点有 4 个，分别为 A38188131C、G38188003A、T38188153C、A38188237C。

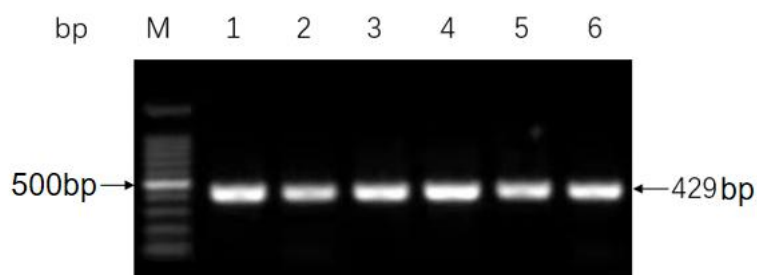


图 3-1 *NLRP3* 基因 3'UTR(1) PCR 扩增检测

Figure 3-1 3 'UTR(1) PCR amplification of *NLRP3* gene

注：M：DL1000 DNA Marker；1-6： *NLRP3* 基因 3'UTR(1) PCR 扩增产物

Note: M: DL1000 DNA Marker; 1-6: 3 'UTR(1) PCR amplification of *NLRP3* gene

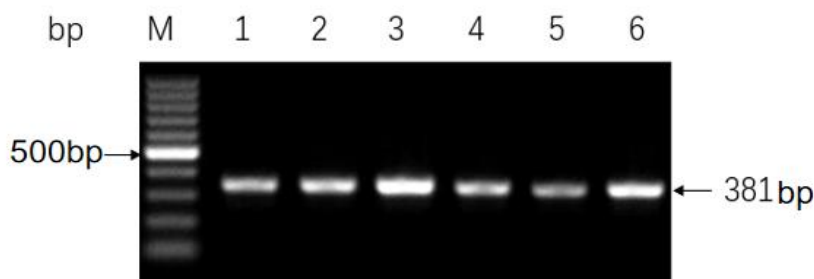
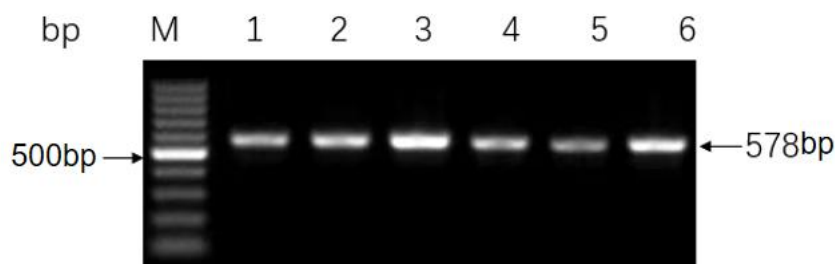


图 3-2 *NLRP3* 基因 3'UTR(2) PCR 扩增检测

Figure 3-2 3 'UTR(2) PCR amplification of *NLRP3* gene

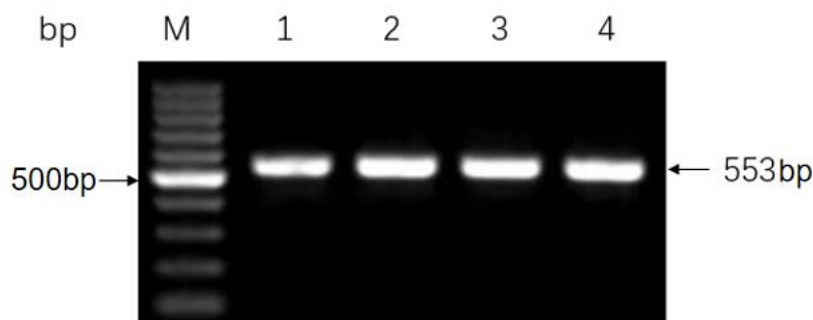
注：M：DL1000 DNA Marker；1-6： *NLRP3* 基因 3'UTR(2) PCR 扩增产物

Note: M: DL1000 DNA Marker; 1-6: 3 'UTR(2) PCR amplification of *NLRP3* gene

图 3-3 *NLRP3* 基因 5'UTR(1) PCR 扩增检测Figure 3-3 5'UTR(1) PCR amplification of *NLRP3* gene

注：M：DL1000 DNA Marker；1-6：*NLRP3* 基因 5'UTR(1) PCR 扩增产物

Note: M: DL1000 DNA Marker; 1-6: 5'UTR(1) PCR amplification of *NLRP3* gene

图 3-4 *NLRP3* 基因 5'UTR(2) PCR 扩增检测Figure 3-4 5'UTR(2) PCR amplification of *NLRP3* gene

注：M：DL1000 DNA Marker；1-6：*NLRP3* 基因 5'UTR(2) PCR 扩增产物

Note: M: DL1000 DNA Marker; 1-6: 5'UTR(2) PCR amplification of *NLRP3* gene

3.3.2 *NLRP3* 基因 SNP 位点的遗传变异分析

3.3.2.1 不同绵羊品种 *NLRP3* 基因 3'UTR C38233659T 位点分析

为验证试验的准确性，PCR 产物测序后，以 GenBank 中绵羊的 *NLRP3* 基因 mRNA 序列（GenBank 登录号：NC 019474.1）为标准序列，利用 DNAMAN 软件和 Chromas 软件分别将哈萨克羊与萨福克羊两个绵羊品种 3'UTR 的 C38233659T 位点进行序列分析（图 3-5），对两个绵羊品种在该位点的基因型频率、等位基因频率进行统计，统计结果如表 3-6 所示，在哈萨克羊与萨福克羊群体中，*NLRP3* 基因 3'UTR 的 C38233659T 位点检测到三种基因型：CC、CT、TT，其中哈萨克羊的优势基因型为 CT，萨福克羊的优势基因型为 CC，优势等位基因为 C。

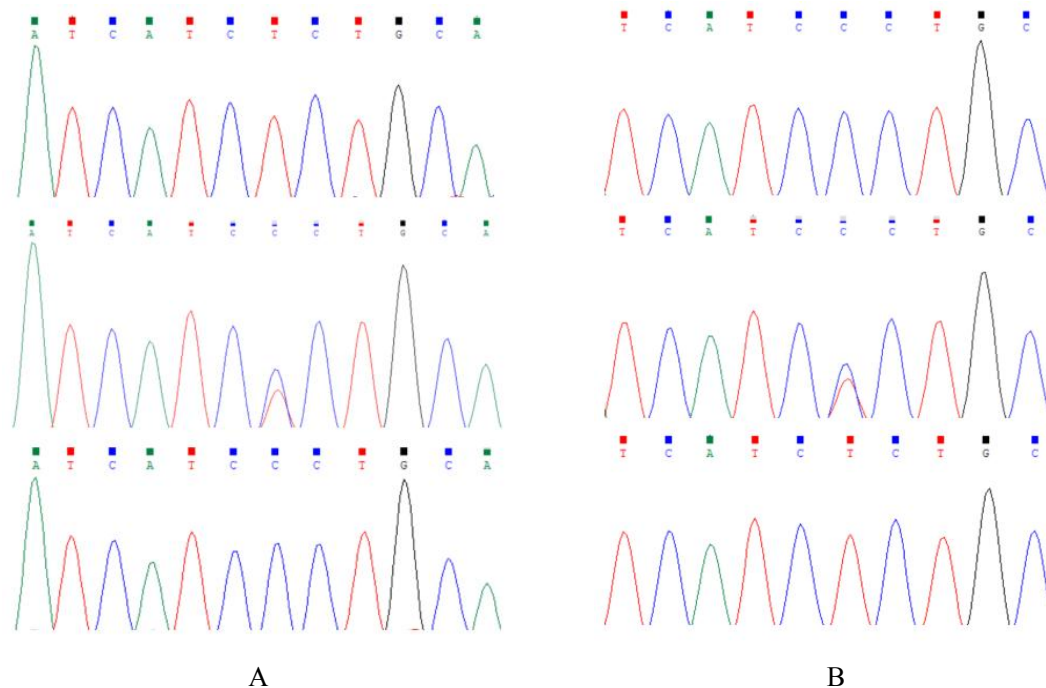


图 3-5 3'UTR 的 C38233659T 位点 PCR 测序峰图

Figure3-5 PCR sequencing peak of C38233659T at 3'UTR

注：A 为哈萨克羊；B 为萨福克羊

Note:A is Kazakh sheep;B is Suffolk sheep.

表 3-6 *NLRP3* 基因 3'UTR 的 C38233659T 位点基因型频率与等位基因频率Table3-6 Genotype frequency and allele frequency of *NLRP3* gene 3'UTR C38233659T locus

品种	样本总量	基因型个数			基因型频率			等位基因频率		$\chi^2 (P)$
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	C	T	
哈萨克羊	323	86	151	86	0.2663	0.4674	0.2663	0.5	0.5	58.986
萨福克羊	477	254	159	64	0.5325	0.3333	0.1342	0.6992	0.3008	(0.001)

对哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因 3'UTR 的 C38233659T 位点的基因型频率与等位基因频率进行分析，发现在该位点哈萨克羊与萨福克羊的基因型分布存在差异极显著的现象 ($P < 0.01$)。

3.3.2.2 不同绵羊品种 *NLRP3* 基因 5'UTR G38188003A 位点分析

利用 DNAMAN 软件和 Chromas 软件对哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 G38188003A 位点进行序列分析 (图 3-6)。哈萨克羊与萨福克羊在该位点的基因型

频率、等位基因频率进行统计，结果如表 3-7 所示在两个绵羊品种中 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 G38188003A 位点检测到三种基因型：AA、AG、GG，其中优势基因型均为 GG，优势等位基因均为 G。

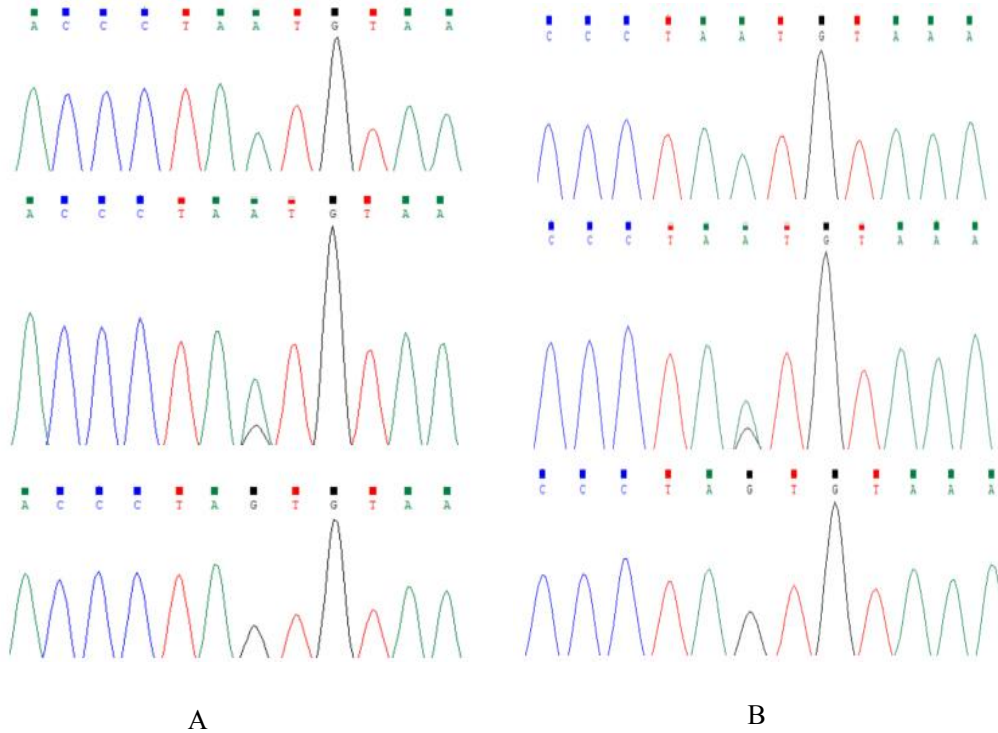


图 3-6 5'UTR G38188003A 位点 PCR 测序峰图

Figure 3-6 PCR sequencing peak of G38188003A at 5'UTR

注：A 为哈萨克羊；B 为萨福克羊

Note:A is Kazakh sheep;B is Suffolk sheep.

表 3-7 *NLRP3* 基因 5'UTR G38188003A 位点基因型频率与等位基因频率

Table3-7 Genotype frequency and allele frequency of *NLRP3* gene 5'UTR G38188003A locus

品种	样本总量	基因型个数			基因型频率			等位基因频率		$\chi^2 (P)$
		AA	AG	GG	AA	AG	GG	A	G	
哈萨克羊	323	11	56	256	0.034	0.1734	0.7926	0.1207	0.8793	46.171
萨福克羊	477	16	16	445	0.0335	0.0335	0.933	0.0503	0.9497	(0.001)

对哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 G38188003A 位点的基因型频率与等位基因频率进行分析，发现在该位点哈萨克羊与萨福克羊的基因型分布存在差异极显著的现象 ($P < 0.01$)。

3.3.2.3 不同绵羊品种 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点分析

利用 DNAMAN 软件和 Chromas 软件对哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点进行序列分析 (图 3-7)。哈萨克羊与萨福克羊在该位点的基因型频率、等位基因频率进行统计, 结果如表 3-8 所示在两个绵羊品种中 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点检测到三种基因型: AA、AC、CC, 其中优势基因型均为 AA, 优势等位基因均为 A。

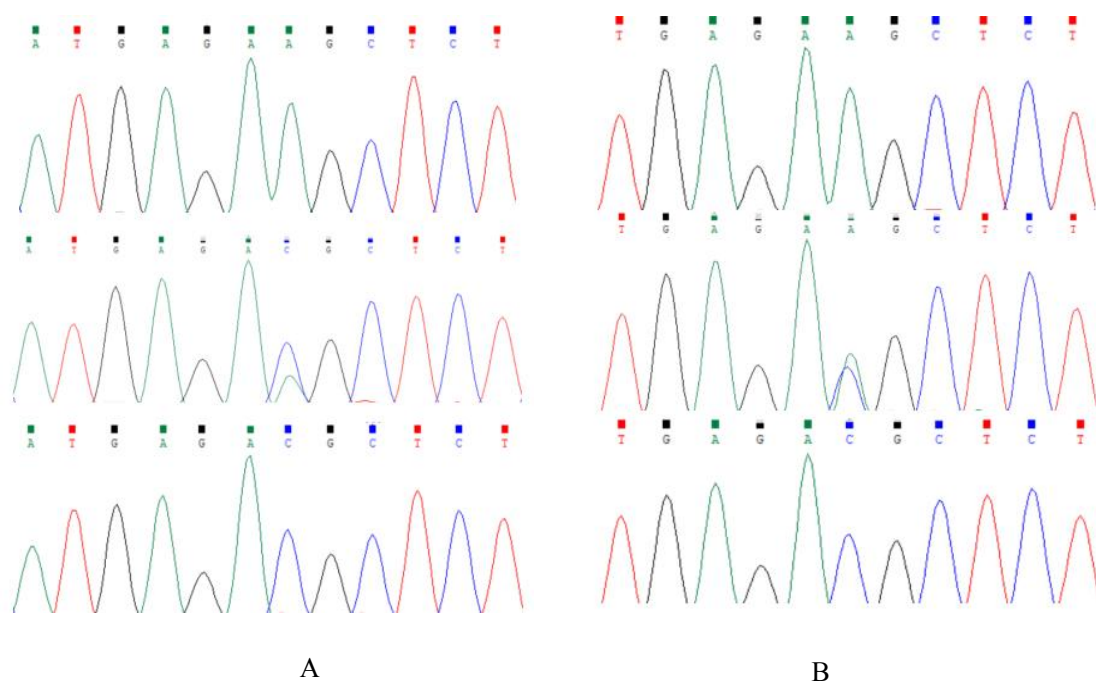


图 3-7 5'UTR A38188131C 位点 PCR 测序峰图

Figure 3-7 PCR sequencing peak of A38188131C at 5'UTR

注: A 为哈萨克羊; B 为萨福克羊

Note: A is Kazakh sheep; B is Suffolk sheep.

表 3-8 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点基因型频率与等位基因频率Table 3-8 Genotype frequency and allele frequency of *NLRP3* gene 5'UTR A38188131C locus

品种	样本总量	基因型个数			基因型频率			等位基因频率		$\chi^2 (P)$
		AA	AC	CC	AA	AC	CC	A	C	
哈萨克羊	323	279	22	22	0.8638	0.0681	0.0681	0.8978	0.1022	40.369
萨福克羊	477	350	111	16	0.7338	0.2327	0.0335	0.8501	0.1499	(0.001)

对哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点的基因型频率与等位基因频率进行分析, 发现在该位点哈萨克羊与萨福克羊的基因型分布存在差异极

显著的现象 ($P < 0.01$)。

3.3.3 *NLRP3* 基因 SNP 位点与绵羊肺炎支原体易感性的分析

3.3.3.1 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点与哈萨克羊肺炎支原体感染率的相关性分析

MO-Ag 阳性哈萨克羊与 MO-Ag 阴性哈萨克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点的基因型频率见表 3-9 所示, 经卡方检验得出 MO-Ag 阳性与 MO-Ag 阴性哈萨克羊的基因型频率之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。A 等位基因频率与 C 等位基因频率之间差异不显著 ($P > 0.05$)。哈萨克羊的 MO-Ag (+) 与 MO-Ag (-) 样本来自第 2 章试验所得出的结果。

表 3-9 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点基因型频率和等位基因频率与哈萨克羊 MO-Ag 的相关分析

Table 3-9 Correlation analysis of genotype frequency and allele frequency of *NLRP3* gene at 5'UTR A38188131C and MO-Ag in Kazakh sheep

		MO-Ag (+)	MO-Ag (-)	χ^2	P
基因型频率	AA	0.5000 (37)	0.6265 (156)	6.2922	0.0430
	AC	0.2970 (22)	0.1687 (42)		
	CC	0.2030 (15)	0.2048 (51)		
等位基因频率	A	0.6486 (62)	0.7108 (70)	0.2456	0.6202
	C	0.3514 (30)	0.2892 (29)		

3.3.3.2 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点与萨福克羊肺炎支原体感染率的相关性分析

MO-Ag 阳性萨福克羊与 MO-Ag 阴性萨福克羊在 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点的基因型频率见表 3-10 所示, 经卡方检验得出 MO-Ag 阳性与 MO-Ag 阴性萨福克羊的基因型频率差异不显著 ($P > 0.05$)。同样 A 等位基因频率与 C 等位基因频率差异

不显著 ($P > 0.05$)。萨福克羊的 MO-Ag (+) 与 MO-Ag (-) 样本来自第 2 章试验所得出的结果。

表 3-10 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点基因型频率和等位基因频率与萨福克羊 MO-Ag 的相关分析

Table 3-10 Correlation analysis of genotype frequency and allele frequency of *NLRP3* gene at 5'UTR A38188131C and MO-Ag in Suffolk sheep

		MO-Ag (+)	MO-Ag (-)	χ^2	P
基因型频率	AA	0.4043 (38)	0.3838 (147)	1.3351	0.5129
	AC	0.4468 (42)	0.4151 (159)		
	CC	0.1489 (14)	0.2011 (77)		
等位基因频率	A	0.6270 (62)	0.5914 (64)	0.0273	0.8686
	C	0.3732 (36)	0.4086 (39)		

3.4 讨论

3.4.1 非编码区的遗传信息学分析

基因的核苷酸序列不同,在基因表达的过程中所起到的作用也不相同。位于编码区的基因核苷酸序列能够转录为相应的 RNA,从而进行蛋白质的合成。位于非编码区的基因核苷酸序列虽然不能进行蛋白质的合成,但在基因调控方面同样具有重要的作用。研究发现,基因型和亚型的确定在临床管理和流行病学调查中具有重要意义。遗传变异,包括单核苷酸多态性(SNPs)和结构变异,这些都广泛分布在基因组中^[109-110]。

其实在非编码区存在着相当多的非编码 DNA 序列及非编码 RNA 序列,这些序列都在生物的生长发育中起着不可忽视的作用。基因非编码区在动物相关疾病中的研究应用较少见,但在人类疾病中,基因非编码区已有较广泛的研究,大部分关于遗传信息的研究发现,有些基因编码区的单核苷酸多态性与人的眼科疾病有相关性,但有关非编码区的单核苷酸多态性遗传信息的研究报道相对较少^[111]。

3.4.2 不同绵羊品种 *NLRP3* 基因非编码区 SNP 位点的筛选

倪文浩^[104]在 *NLRP3* 基因的编码区共筛选出 14 个 SNP 位点,本试验为探究在 *NLRP3* 基因的非编码区是否存在与绵羊支原体肺炎易感性相关的 SNP 位点,结果发现

在随机抽取新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊的 800 份 DNA 样本中, 使用 PCR 扩增技术获取目的片段, 通过直接测序的方法, 在 *NLRP3* 基因的非编码区共得到 7 个 SNP 位点, 其中 3'UTR 上发现 3 个 SNP 位点(C38233659T、C38288866T、T38233881C); 在 5'UTR 上发现 4 个 SNP 位点 (A38188131C、G38188003A、T38188153C、A38188237C)。对比所检测到的 7 个 SNP 位点所编码的氨基酸, 发现在 3'UTR C38233659T 位点共检测到三种基因型: CC、CT、TT, 其中哈萨克羊的优势基因型为 CT, 萨福克羊的优势基因型为 CC, 优势等位基因为 C。对测序结果进行比对发现哈萨克羊与萨福克羊在该位点均发生碱基突变, 由 C 突变为 T。卡方检验结果显示, 对该位点的基因型分布进行分析, 发现哈萨克羊在该位点的基因型分布与萨福克羊在该位点的基因型分布存在差异极显著 ($P < 0.01$)。另外, *NLRP3* 基因 5'UTR G38188003A 位点在哈萨克羊与萨福克羊群体中检测到三种基因型: AA、AG、GG, 哈萨克羊与萨福克羊的优势基因型均为 GG, 优势等位基因均为 G。对 *NLRP3* 基因 5'UTR G38188003A 位点基因型分布进行卡方检验分析, 发现哈萨克羊与萨福克羊在该位点的基因型分布存在差异极显著 ($P < 0.01$)。 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点在哈萨克羊与萨福克羊群体中检测到三种基因型: AA、AC、CC, 哈萨克羊与萨福克羊的优势基因型均为 AA, 优势等位基因均为 A。对 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188131C 位点基因型分布进行卡方检验分析, 发现哈萨克羊与萨福克羊在该位点的基因型分布存在差异极显著 ($P < 0.01$)。

在 *NLRP3* 基因 3'UTR T38233881C 位点, 只在哈萨克羊群体中检测到 TT、CT、CC 三种基因型, 哈萨克羊的优势基因型是 TT, 优势等位基因为 T; 在 *NLRP3* 基因 5'UTR A38188237C 位点, 只在萨福克羊群体中检测到 AA、AC、CC 三种基因型, 萨福克羊的优势基因型为 AA, 优势等位基因为 A; 在 *NLRP3* 基因 5'UTR T38188153C 位点, 同样只在萨福克羊群体中检测到三种基因型: TT、CT、CC, 萨福克羊的优势基因型是 TT, 优势等位基因为 T; 这表明 *NLRP3* 基因 3'UTR T38233881C 位点、5'UTR A38188237C 位点、5'UTR T38188153C 位点的基因型分布可能与绵羊的不同品种有关。研究表明, 某个位点的突变性主要受焦点碱基对其紧邻的侧翼核苷酸的影响, 并且突变模式是由碱基序列的非随机分布导致的^[112]。

3.4.3 *NLRP3* 基因在 5'端非编码区的 A38188131C 位点与绵羊肺炎支原体感染性的相关性分析

针对该病在我国的流行情况调查显示, 我国新疆、四川、黑龙江、内蒙古等多地均有该病的相关报道。凤英^[113]等人 2013 年在内蒙古克什克腾旗羊群体内成功分离出绵羊肺炎支原体。王雅雯^[114]等人 2021 年对新疆南疆地区 5 个规模化羊场支原体感染情

况进行调查, 结果发现绵羊支原体肺炎的阳性率为 14%-73.8%。绵羊支原体肺炎感染的相关报道不仅在我国常见, 在国外也有相关研究报道。Dae AA^[34] 等人 2020 年在伊朗东北部自然感染肺炎的 50 只绵羊肺样本中分离得到支原体。Mousa W S^[115] 等人在 2017-2018 年对埃及梅努菲亚省的 234 个山羊和绵羊个体进行 PCR 检测结果显示在肺炎病变的 104 份肺组织样本中, 56 份 (53.84%) 的支原体分离呈阳性。目前 *NLRP3* 基因在人类的疾病中研究非常广泛, 在许多疾病中都发挥重要作用, 如肿瘤^[116]、帕金森病^[117]、心血管疾病^[118] 等人类疾病, *NLRP3* 基因起着至关重要的调控作用。本研究通过 ELISA 血清学检测的方法, 分出 MO-Ag 阴性和 MO-Ag 阳性的血清, 对应样本编号, 选择同一只羊的血液样本, 并提取出哈萨克羊与萨福克羊 MO-Ag 阴性和 MO-Ag 阳性 DNA, 分析两个绵羊品种在 5'端非编码区的 A38188131C 位点的基因型频率与等位基因频率, 结果发现 MO-Ag 阴性哈萨克羊的基因型频率与 MO-Ag 阳性哈萨克羊的基因型频率存在显著性差异 ($P < 0.05$), 说明该位点与哈萨克羊支原体肺炎的易感性有一定的相关性。探究 5'端非编码区的 A38188131C 位点与萨福克羊支原体肺炎易感性的相关性, 发现在该位点萨福克羊的基因型频率与易感性之间差异不显著 ($P > 0.05$), 说明该位点与萨福克羊支原体肺炎的感染性不具有相关性。

本研究中所筛选的 SNP 位点是否与绵羊支原体肺炎的易感性相关, 还需要收集大量的绵羊支原体病历记录, 并根据 *NLRP3* 基因在不同绵羊品种间的遗传效应进行更加深入的分析。本研究为 *NLRP3* 基因与绵羊支原体肺炎易感性的相关性研究提供了基本思路, 在今后培育抗绵羊支原体肺炎的新品系的研究中提供参考价值。

3.5 小结

(1) 本研究在 *NLRP3* 基因非编码区共发现 7 个 SNP 位点, 其中 3'UTR 的 C38233659T 位点、C38233866T 位点; 5'UTR 的 A38188131C 位点、G38188003A 位点在两个绵羊品种中均存在碱基突变。

(2) *NLRP3* 基因 3'UTR 的 T38233881C 位点与 5'UTR 的 T38188153C 位点、A38188237C 位点的基因型分布与绵羊品种有关。

(3) *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点可能与哈萨克羊绵羊肺炎支原体易感性有相关性。

第4章 全文结论

1.伊犁地区哈萨克羊 MO-Ab 阳性检出率 26.00%和萨福克羊 MO-Ab 阳性检出率 7.34%存在差异极显著 ($P<0.01$)，伊犁地区哈萨克羊 MO-Ag 阳性检出率 22.91%和萨福克羊 MO-Ag 阳性检出率 19.71%存在差异显著 ($P<0.05$)。

2.哈萨克羊与萨福克羊在 *NLRP3* 基因的 3'UTR 的 C38233659T 位点、C38233866T 位点；5'UTR 的 A38188131C 位点、G38188003A 位点上均存在碱基突变。

3.*NLRP3* 基因 3'UTR 的 T38233881C 位点，5'UTR 的 T38188153C 位点、A38188237C 位点的碱基突变可能与绵羊的不同品种有关。

4. *NLRP3* 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点可能与哈萨克羊 MO 易感性有相关性，因此可以将该位点作为绵羊肺炎支原体易感性的分子遗传标记位点，这为抗绵羊肺炎支原体新品系的选育提供理论支撑。

参考文献

- [1]Highland M A, Herndon D R, Bender S C, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae* in wildlife species beyond subfamily Caprinae[J]. *Emerging infectious diseases*, 2018, 24(12): 2384.
- [2]Rovani E R, Beckmen K B, Highland M A. *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with polymicrobial pneumonia in a free-ranging yearling barren ground caribou (*Rangifer tarandus granti*) from Alaska, USA[J]. *Journal of wildlife diseases*, 2019, 55(3): 733-736.
- [3]Wolff P L, Schroeder C, McAdoo C, et al. Evidence of bovine viral diarrhea virus infection in three species of sympatric wild ungulates in Nevada: life history strategies may maintain endemic infections in wild populations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 292.
- [4]Davis B K, Wen H, Ting J P Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases[J]. *Annual review of immunology*, 2011, 29: 707-735.
- [5]De Nardo D, Latz E. *NLRP3* inflammasomes link inflammation and metabolic disease[J]. *Trends in immunology*, 2011, 32(8): 373-379.
- [6]Guo H, Callaway J B, Ting J P Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics[J]. *Nature medicine*, 2015, 21(7): 677-687.
- [7]Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of *NLRP3* inflammasome[J]. *Cell*, 2015, 160(1-2): 62-73.
- [8]Jin L, Batra S, Jeyaseelan S. Deletion of *NLRP3* augments survival during polymicrobial sepsis by decreasing autophagy and enhancing phagocytosis[J]. *The Journal of Immunology*, 2017, 198(3): 1253-1262.
- [9]Tang T, Lang X, Xu C, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for *NLRP3* inflammasome activation[J]. *Nature communications*, 2017, 8(1): 1-12.
- [10]Youm Y H, Nguyen K Y, Grant R W, et al. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks *NLRP3* inflammasome-mediated inflammatory disease[J]. *Nature medicine*, 2015, 21(3): 263-269.
- [11]Heneka M T, Kummer M P, Stutz A, et al. *NLRP3* is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-678.
- [12]Duewell P, Kono H, Rayner K J, et al. *NLRP3* inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [13]Inoue M, Williams K L, Gunn M D, et al. *NLRP3* inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(26): 10480-10485.
- [14]Coll R C, Robertson A A B, Chae J J, et al. A small-molecule inhibitor of the *NLRP3*

- inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nature medicine*, 2015, 21(3): 248-255.
- [15] Tak Y G, Farnham P J. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome[J]. *Epigenetics & chromatin*, 2015, 8(1): 1-18.
- [16] 袁婷, 吴娅琴, 郝华芳, 等. 免疫途径对绵羊支原体肺炎灭活疫苗安全性和抗体水平的影响[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(11): 1422-1426.
- [17] 郭海英. 重组 BPI 蛋白对感染绵羊支原体肺炎的盘羊杂交羊的免疫调节及治疗效果研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2015.
- [18] Yang Falong et al. Genome sequence of *Mycoplasma ovipneumoniae* strain SC01[J]. *Journal of bacteriology*, 2011, 193(18): 5018.
- [19] 张斯民. 绵羊肺炎支原体甘油-3-磷酸氧化酶基因的克隆、表达及重组产物的纯化[D]. 宁夏: 宁夏大学, 2013.
- [20] 许健, 储岳峰, 赵萍, 等. 中国部分地区绵羊肺炎支原体的基因多态性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(09): 1295-1301.
- [21] Chen Cheng et al. Serological and molecular survey of sheep infected with *Mycoplasma ovipneumoniae* in Xinjiang, China[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2015, 47(8): 1641-1647.
- [22] Jones G E, Foggie A, Mould D L, et al. The comparison and characterisation of glycolytic mycoplasmas isolated from the respiratory tract of sheep[J]. *Journal of medical microbiology*, 1976, 9(1): 39-52.
- [23] Brogden K A, Rose D, Cutlip R C, et al. Isolation and identification of mycoplasmas from the nasal cavity of sheep[J]. *American journal of veterinary research*, 1988, 49(10): 1669-1672.
- [24] Nicholas R A J, Ayling R D, Rosales R S, et al. Investigation of severe coughing and ill thrift in adult hill sheep associated with *Mycoplasma ovipneumoniae*[J]. *Veterinary Record Case Reports*, 2015, 3(1): 000255.
- [25] 方畴鑫, 李志杰, 邓光明, 等. 甘肃陇东地区羊肺炎病的流行病学调查[J]. *中国兽医杂志*, 1998, 24(3): 1-19.
- [26] 刘聚祥, 张利, 孙继国, 等. 河北省部分地区羊肺炎霉形体的分离和鉴定[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(9): 36-40.
- [27] 逯忠新, 邓光明, 梁桂香, 等. 羊肺炎霉形体病调查[J]. *中国兽医科技*, 1993, 23(9): 15-16.
- [28] 解慧梅, 苏志国, 任宝波. 泰州地区羊支原体肺炎流行病学调查[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(03): 194-195.
- [29] 王华, 杨发龙, 王永, 等. 山羊支原体性肺炎流行病学调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2011(1): 210-214.
- [30] 张轩, 赵萍, 贺英, 等. 绵羊肺炎支原体的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2013(6): 193-195.

- [31]王占金,程福,田振祥.绵羊支原体肺炎和埃希氏大肠杆菌混合感染的诊断及防治[J].今日畜牧兽医,2016(07):56-58.
- [32]祁君,王丽,阿布都热孜克·艾海提.绵羊支原体肺炎流行调查及综合防控推广应用[J].中国畜禽种业,2021,17(12):6-9.
- [33]吴翠兰,刘琰,李军,等.D型多杀性巴氏杆菌和绵羊肺炎支原体引起山羊的混合感染[J].动物医学进展,2020,41(03):57-61.
- [34]Dae A A, Khodakaram-Tafti A, Derakhshandeh A, et al. Identification of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in sheep with pneumonia in North East of Iran[J]. Iranian Journal of Veterinary Research, 2020, 21(1): 15.
- [35]张永康.舍饲绵羊支原体肺炎的诊断与防治[J].山东畜牧兽医,2020,41(09):43-44.
- [36]Lin Y C, Miles R J, Nicholas R A J, et al. Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginini*[J]. Research in Veterinary Science, 2008, 84(3): 367-373.
- [37]孙继国,袁万哲,景翠,等.绵羊支原体肺炎的研究概况[J].中国兽医杂志,2009,45(07):66-68.
- [38]翟梦婷.miR-509-5p靶向NF- κ B通路调控抗绵羊支原体肺炎分子机制的研究[D].新疆:石河子大学,2019.
- [39]储岳峰.我国山羊(接触)传染性胸膜肺炎病原学、流行病学研究及灭活疫苗的研制[D].北京:中国农业科学院,2011.
- [40]史晓娜,王晓晖,高媛,等.基于转录组测序结果对绵羊肺炎支原体培养基优化的初步研究[J].中国兽医科学,2018,48(01):62-68.
- [41]张双翔,程振涛,周碧君,等.应用荧光定量PCR筛选绵羊肺炎支原体最适生长培养基[J].畜牧与兽医,2013,45(01):9-14.
- [42]江锦秀,林裕胜,张靖鹏,等.绵羊肺炎支原体感染的诊断和防治技术研究进展[J].福建农业学报,2019,34(12):1463-1470.
- [43]Kilic A, Kalender H, Eroksuz H, et al. Identification by culture, PCR, and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Eastern Turkey[J]. Tropical animal health and production, 2013, 45(7): 1525-1531.
- [44]林裕胜,江锦秀,江斌,等.绵羊肺炎支原体、丝状支原体山羊亚种和山羊支原体山羊肺炎亚种多重PCR检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2018,40(09):812-817.
- [45]Zhang J, Cao J, Zhu M, et al. Loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow dipstick (LAMP-LFD) to detect *Mycoplasma ovipneumoniae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(2): 1-10.
- [46]Rong G, Zhao J M, Hou G Y, et al. Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in tropical China[J]. Tropical animal health and production, 2014, 46(8): 1491-1495.

- [47]Giangaspero M, Nicholas R A J, Hlusek M, et al. Seroepidemiological survey of sheep flocks from Northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae*[J]. *Tropical animal health and production*, 2012, 44(3): 395-398.
- [48]Handeland K, Tengs T, Kokotovic B, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae*-a primary cause of severe pneumonia epizootics in the Norwegian Muskox (*Ovibos moschatus*) population[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): 106116.
- [49]王金明.绵羊支原体肺炎的防治[J]. *当代畜禽养殖业*,2018(06):26.
- [50]温伟,晓慧,王玉福,等.麻杏石甘汤加味配合西药治疗绵羊支原体肺炎[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(1): 85-86.
- [51]曲悦.绵羊支原体肺炎的诊断与防治[J]. *畜牧与兽医*,2010,42(02):105-106.
- [52]杨冬梅.羊传染性胸膜肺炎的防治[J]. *新疆畜牧业*,2014(03):52-54.
- [53]徐昊亮,何宗霖.绵羊支原体肺炎治疗试验方案[J]. *当代畜牧*,2014(08):79-80.
- [54]秦占科,许芸.绵羊支原体肺炎的诊治[J]. *中国畜禽种业*,2015,11(08):63-64.
- [55]姚燕,马金萍,宋德荣.贵州省绵羊支原体肺炎研究进展[J]. *现代农业科技*,2015(05):294-296.
- [56]刘耀东.绵羊支原体肺炎的防治措施[J]. *中国畜禽种业*,2010,6(11):113.
- [57]阿依古丽·吐鲁甫.绵羊支原体肺炎的诊治[J]. *农民致富之友*,2016(24):278.
- [58]蒋艳君,王燕军,涂永强,蓝岚,邓清培.绵羊支原体肺炎的诊治[J]. *畜牧与饲料科学*,2017,38(02):105-106.
- [59]M Conley S, M Abais J, M Boini K, et al. Inflammasome activation in chronic glomerular diseases[J]. *Current drug targets*, 2017, 18(9): 1019-1029.
- [60]Ip W K, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through *NLRP3* and *NLRC4* inflammasome activation[J]. *Nature communications*, 2015, 6(1): 1-11.
- [61]Kayagaki N, Stowe I B, Lee B L, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666-671.
- [62]穆瑞旭,勾文峰,魏会强,等.炎症小体 *NLRP3* 信号通路调控机制及其小分子靶点抑制剂的研究进展[J]. *现代药物与临床*,2020,35(11):2283-2287.
- [63]Sharif H, Wang L, Wang W L, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of *NLRP3* inflammasome [J]. *Nature*, 2019, 570(7761): 338-343.
- [64]张娜,晏旒,周蒙恩,等.*NLRP3* 炎症小体在急慢性肝脏疾病发生和治疗中的研究进展[J]. *辽宁中医杂志*,2020,47(05):217-220.
- [65]Lin L, Xu L, Lv W, et al. An *NLRP3* inflammasome-triggered cytokine storm contributes to Streptococcal toxic shock-like syndrome (STSLs)[J]. *PLoS pathogens*, 2019, 15(6): 1007795.
- [66]Sendler M, van den Brandt C, Glaubitz J, et al. *NLRP3* inflammasome regulates

- development of systemic inflammatory response and compensatory anti-inflammatory response syndromes in mice with acute pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(1): 253-269.
- [67]Chousterman B G, Swirski F K, Weber G F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis[C]. *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2017, 39(5): 517-528.
- [68]Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(5): 765-783.
- [69]Zhao C, Zhao W. *NLRP3* inflammasome—a key player in antiviral responses[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 211.
- [70]Shim D W, Lee K H. Posttranslational regulation of the NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1054.
- [71]de Gassart A, Martinon F. Pyroptosis: caspase-11 unlocks the gates of death[J]. *Immunity*, 2015, 43(5): 835-837.
- [72]Wu LY, Ye ZN, Zhou CH, et al. Roles of Pannexin-1 Channels in Inflammatory Response through the TLRs/NF-Kappa B Signaling Pathway Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 175.
- [73]Chen W, Zhao M, Zhao S, et al. Activation of the TXNIP/*NLRP3* inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(2): 157-166.
- [74]Liu Q, Zhang D, Hu D, et al. The role of mitochondria in *NLRP3* inflammasome activation [J]. *Mol Immunol*, 2018, 103: 115-124.
- [75]Li C, Zhihong H, Wenlong L, et al. The Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Family Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome Regulates Bronchial Epithelial Cell Injury and Pro-apoptosis after Exposure to Biomass Fuel Smoke [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(6): 815-824.
- [76]Shahzad K, Bock F, Dong W, et al. Dietary iron restriction alleviates renal tubulointerstitial injury induced by protein overload in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10621.
- [77]林凯玲,薛艳,余惠珍.*NLRP3* 炎性小体与慢性炎症相关疾病的研究进展[J]. *中国临床新医学*,2020,13(7):733—737.
- [78]Segovia J A, Chang T H, Winter V T, et al. *NLRP3* is a critical regulator of inflammation and innate immune cell response during *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *Infection and immunity*, 2018, 86(1): 17.
- [79]房有福,李娜.肺炎支原体肺炎 *NLRP3* 炎症小体通路的表达及意义[J]. *中国当代儿科杂志*,2018,20(9):742-745.
- [80]王宸,邓慧玲,张玉凤,等.*NLRP3* 炎症小体在感染性疾病中的研究进展[J]. *热带医学杂志*,2021,21(01):120-123.

- [81]王伟龙,张跃辉,刘琳琳,等.*NLRP3* 炎症小体在神经退行性疾病中的研究进展[J]. 生命的化学,2020,40(06):846-854.
- [82]王涵桐.*NLRP3* 炎症小体在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(19):69.
- [83]Dai X, Tohyama M, Murakami M, et al. Epidermal keratinocytes sense ds RNA via the NLRP 3 inflammasome, mediating interleukin (IL) - 1 β and IL - 18 release[J]. *Experimental dermatology*, 2017, 26(10): 904-911.
- [84]吴金坤,吴莺.*NLRP3* 炎症小体在炎症性肠病中的研究进展[J]. 热带医学杂志,2020,20(09):1251-1253.
- [85]Lin Y, Tan D, Kan Q, et al. The protective effect of naringenin on airway remodeling after *Mycoplasma Pneumoniae* infection by inhibiting autophagy-mediated lung inflammation and fibrosis[J]. *Mediators of inflammation*, 2018, 1-10.
- [86]Shimizu T, Kimura Y, Kida Y, et al. Cytadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4[J]. *Infection and immunity*, 2014, 82(7): 3076-3086.
- [87]Kebaier C, Chamberland R R, Allen I C, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the *NLRP3* inflammasome[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2012, 205(5): 807-817.
- [88]汪龙.TRIB1、SLC22A3 基因非编码区遗传变异与中国汉族人群冠心病的关联及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学,2016.
- [89]Knight JC. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(2): 97-109.
- [90]Tuccoli A, Poliseno L, Rainaldi G. miRNAs regulate miRNAs: coordinated transcriptional and post-transcriptional regulation[J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(21): 2473-2476.
- [91]裴青青.青海地区藏汉民族子痫前期与 HLA-G 基因非编码区多态性的相关性研究[D]. 青海: 青海大学,2017.
- [92]卢春燕.SMAD7 基因非编码区遗传多态对云南汉族人群结直肠癌患病的影响[D]. 云南: 云南大学,2015.
- [93]Mackay J M K, Nisbet D I, Foggie A. Isolation of pleuropneumonia-like organisms (Genus *Mycoplasma*) from case of sheep pulmonary adenomatosis (SPA)[J]. *Vet Rec*, 1963, 75(21): 550-551.
- [94]Carmichael L E, St George T D, Sullivan N D, et al. Isolation, propagation, and characterization studies of an ovine *Mycoplasma* responsible for proliferative interstitial pneumonia[J]. *The Cornell Veterinarian*, 1972, 62(4): 654-679.
- [95]鲍兴智,严军.绵羊肺炎支原体的研究进展[J]. 青海畜牧兽医杂志,2009,39(06):45-46.
- [96]党斌,潘玉坤,吴禹熹.山羊主要支原体感染的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(01):155-158.
- [97]吴挺.规模养殖场羊传染病的血清学调查分析[J]. 农业工程技术,2017,37(08):61.

- [98] 剡文亮,冯广云,凌晨,等.新疆部分规模化羊场绵羊肺炎支原体血清学调查[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(6): 83-84.
- [99] 冯业攀.河南省清丰县绵羊肺炎支原体血清学调查与分析[J]. 中国草食动物科学,2020,40(03):89-91.
- [100] 郭慧瑜,林裕胜,毛坤明,等.福清市福清山羊绵羊肺炎支原体血清学调查[J]. 福建畜牧兽医,2019,41(06):10-11.
- [101] 李劫,杨增岐,剡根强,等.新疆石河子地区绵羊支原体肺炎流行病学调查[J]. 动物医学进展,2005(12):109-110.
- [102] 王雅雯,李仕林,姜水兵,等.规模化羊场支原体感染的流行病学调查[J]. 现代畜牧兽医,2021(02):70-72.
- [103] 张莉,魏殿华,齐亚银.北疆某规模化羊场绵羊肺炎支原体感染的血清流行病学调查[J]. 中国动物保健,2019,21(11):46-47.
- [104] 倪文浩. 新疆地区不同绵羊品种绵羊支原体肺炎感染率的比较研究[D]. 新疆: 石河子大学,2019.
- [105] 檀润先. *NLRP3* 基因多态性与慢性胃炎、胃腺癌的遗传易感性研究[D]. 广西: 广西医科大学,2019.
- [106] 张鲲. *NLRP3* 和 *CARD8* 基因多态性与男性下肢动脉硬化闭塞症遗传易感性的相关性研究[D]. 山东: 山东大学,2018.
- [107] 尹聪聪. *NLRP3* 炎症小体信号通路基因多态性与骨髓增生异常综合征易感性的关联研究[D]. 山东: 山东大学,2016.
- [108] 李瑞,苗蕾,陈邬锦,冀琨,张蓓,孙玉萍.痛风患者 *NLRP3* 基因多态性观察[J]. 山东医药,2020,60(33):67-69.
- [109] Luo J, Chen R. Genetic variations associated with long noncoding RNAs[J]. Essays in biochemistry, 2020, 64(6): 867-873.
- [110] 刘蕾,杨易,徐金瑞.结核分枝杆菌感染对 *NLRP3* 炎症小体活化的调控作用研究进展[J]. 微生物学杂志,2021,41(04):91-97.
- [111] 戎晗,顾珊珊,张国伟,等.非编码区单核苷酸多态性与眼部疾病关系的研究进展[J]. 眼科新进展,2016,36(04):380-385.
- [112] Konrad A, Brady M J, Bergthorsson U, et al. Mutational landscape of spontaneous base substitutions and small indels in experimental *Caenorhabditis elegans* populations of differing size[J]. Genetics, 2019, 212(3): 837-854.
- [113] 凤英,高娃,赵世华,等.绵羊肺炎支原体内蒙古毒株的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2014,50(10):22-24+50.
- [114] 王雅雯.规模化羊场肺炎支原体流行病学调查及分离鉴定[D]. 新疆: 塔里木大学,2021.
- [115] Mousa W S, Zaghawa A A, Elsify A M, et al. Clinical, histopathological, and molecular characterization of *Mycoplasma* species in sheep and goats in Egypt[J]. Veterinary World,

2021, 14(9): 2561.

[116]Hamarshah S, Zeiser R. *NLRP3* inflammasome activation in cancer: a double-edged sword[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 1444.

[117]Yan Y Q, Fang Y, Zheng R, et al. *NLRP3* Inflammasomes in Parkinson's disease and their Regulation by Parkin[J]. *Neuroscience*, 2020, 446: 323-334.

[118]Wang Y, Liu X, Shi H, et al. *NLRP3* inflammasome, an immune - inflammatory target in pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2020, 10(1): 91-106.

致谢

白驹过隙，时光荏苒。不知不觉间，两年的硕士生涯已接近尾声。在这短暂的两年里，每一天的生活都格外精彩、充实，值得我在今后的日子里细细回味。与此同时，在这段时间里我收获了人生中的宝贵财富：无私奉献的良师、不离不弃的益友、默默付出的父母、难以忘怀的经历。在完成硕士论文之际，衷心的感谢给予我帮助、关心与支持的所有人！

首先，我要感谢我的导师——蒋松老师。感谢您，让我成为了您的学生，我又何其幸运，作为您的学生，我引以为豪；感谢您在学习中对我的指导与帮助，感谢您在生活中对我的关心与支持。您不仅教导我们要加强临床动手能力与专业知识技能，更教育我们为人处世的人生哲理。您严谨的治学态度，尽职尽责的担当精神，潇洒幽默的生活态度是我一辈子学习的榜样！吾有恩师，授业进香，师所擅者，定位导航，绵绵师恩，永志不忘，愿吾恩师，桃李芬芳！

感谢石河子大学动物科技学院的陈磊老师。您在试验和论文写作等方面给予我极大的帮助，在此期间不厌其烦的、耐心热情的悉心指导，使我有信心去面对科研工作。

感谢石河子大学生命科学学院的李鑫老师，感谢您在实验室给予我的帮助与指导，您热情的支持与鼓励给了我莫大的动力！我才能在试验中突破一个个难关，最终顺利完成了自己的试验。

感谢石河子大学教学动物医院的王建梅老师、黄晓星老师、史新怀老师和乔彦杰老师，各位老师平易近人，在老师们热情的指导与帮助下，我能够学习到更多的专业知识和实践技能，在动物医院实习期间我收获良多，不光收获了知识与技能，还收获了与各位老师亦师亦友的情谊！

感谢我的母校——石河子大学，从本科到研究生，在校的六年时间里，母校对每个学生的爱与关怀体现在日常的校园生活中！疫情期间，母校是每个学生坚强的后盾，许多温暖感人的瞬间让我难以忘怀，永远铭记我的母校！

感谢石河子大学动物科技学院的所有老师！六年的求学生涯我学到了许多专业知识，当然，这都离不开动物科技学院所有老师的培养和教育。各位老师严谨细致、不拘一格的教学风格，崇尚健康、热情积极的生活态度深深影响着我！在未来，我也将满怀希望、充满斗志的踏上新的征程。

感谢我身边的朋友们对我的包容、支持与陪伴，因为他们的存在，我的生活总是充满欢乐！花开花落万物道，聚散离别终有时。希望大家在以后的日子里都能平安健

康！生活美满！

最后，我要特别感谢我的家人，在我的成长过程中一直以来对我的无限支持与包容。回首往昔，漫漫求学路，无论我身处何境，身在何处，家人永远是最坚实的精神支柱，最理想的感情寄托！家人的力量与爱，是我一直以来无畏前行、勇往直前的动力！

路漫漫其修远兮，吾将上下而求索。在石河子大学的求学经历将凝聚成光阴的故事融进我的生命，伴我前行！在未来的工作和生活中，我会严格要求自己，并将“明德正行，博学多能”的校训时刻铭记于心！

附录

绵羊肺炎支原体 MO (Ab) ELISA 检测试剂盒说明书

(1) 编号：将试验样品对应相应的微孔进行编号，并设置 2 个阴性对照孔和 2 个阳性对照孔。

(2) 加样：将阴性标准对照和阳性标准对照各 50 μ L 分别加入阴性对照孔和阳性对照孔。将 40 μ L 样品稀释液和 10 μ L 待测血清样品依次加入到待测样品孔中。

(3) 孵育：盖上密封膜摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养温箱中孵育 30min。

(4) 洗涤：剥离密封膜，将板中液体甩干，使用 30 倍稀释的洗涤液重复洗涤 5 次。

(5) 加入酶标二抗 50 μ L。

(6) 孵育：盖上密封膜摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养温箱中孵育 30min。

(7) 洗涤：将板中液体甩干，使用 30 倍稀释的洗涤液重复洗涤 5 次。

(8) 显色：每孔加入 50 μ L 显色剂 A，再加入 50 μ L 显色剂 B，轻轻摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光显色 15min。

(9) 终止：每孔加入终止液 50 μ L，终止反应。

(10) 测定：将酶标板置于波长为 450nm 的酶标仪中测定 OD_{450nm} 值。

Sheep MP Ab ELISA 检测结果判定：试验的有效性为设置阳性对照孔平均值 \geq 1.00，设置阴性对照平均值 \leq 0.10；临界值=设置阴性对照孔平均值+0.15。其中，样品 OD 值 $<$ 临界值(CUT OFF)者为绵羊肺炎支原体阴性，样品 OD 值 \geq 临界值(CUT OFF)者为绵羊肺炎支原体阳性。

绵羊肺炎支原体 (MO) Ag ELISA 检测试剂盒说明书

采用双抗体夹心 ELISA 法，使用 MO 抗体包被板。

(1) 编号：将试验样品对应相应的微孔进行编号，并设置 2 个阴性对照孔和 2 个阳性对照孔。

(2) 加样：将阴性标准对照和阳性标准对照各 50 μ L 分别加入阴性对照孔和阳性对照孔。将 40 μ L 样品稀释液和 10 μ L 测试（抗原）血清样品依次加入到待测样品孔中。

(3) 孵育：盖上密封膜摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养温箱中孵育 30min。

(4) 洗涤：剥离密封膜，将板中液体甩干，使用 30 倍稀释的洗涤液重复洗涤 5 次。

(5) 加入酶标抗体 50 μ L。

(6) 孵育：盖上密封膜摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养温箱中孵育 30min。

(7) 洗涤：将板中液体甩干，使用 30 倍稀释的洗涤液重复洗涤 5 次。

(8) 显色：每孔加入 50 μ L 显色剂 A，再加入 50 μ L 显色剂 B，轻轻摇匀，在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光显色 15min。

(9) 终止：每孔加入终止液 50 μ L，终止反应。

(10) 测定：将酶标板置于波长为 450nm 的酶标仪中测定 OD_{450nm} 值。

Sheep MP Ag ELISA 检测结果判定：试验的有效性为设置阳性对照孔平均值 \geq 1.00，设置阴性对照平均值 \leq 0.10；临界值=设置阴性对照孔平均值+0.15。其中，样品 OD 值 $<$ 临界值(CUT OFF)者为绵羊肺炎支原体阴性，样品 OD 值 \geq 临界值(CUT OFF)者为绵羊肺炎支原体阳性。

新疆伊犁地区哈萨克羊部分绵羊肺炎支原体抗原、抗体 ELISA 检测结果

表 1 新疆伊犁地区哈萨克羊部分绵羊肺炎支原体抗原、抗体 ELISA 检测结果

Table 1 Detection results of some Sheep MP antigen and antibody by ELISA of Kazakh Sheep in Yili

品种 编号	哈萨克羊			
	MO-Ab		MO-Ag	
1	0.076	(-)	0.033	(-)
2	0.094	(-)	0.09	(-)
3	0.091	(-)	0.125	(-)
4	0.122	(-)	0.046	(-)
5	0.243	(+)	0.378	(+)
6	0.056	(-)	0.247	(+)
7	0.058	(-)	0.155	(-)
8	0.114	(-)	0.097	(-)
9	0.175	(-)	0.082	(-)
10	0.131	(-)	0.173	(-)
11	0.151	(-)	0.132	(-)
12	0.140	(-)	0.162	(-)
13	0.665	(+)	0.220	(+)
14	0.226	(+)	0.105	(-)
15	0.365	(+)	0.085	(-)
16	0.132	(-)	0.074	(-)
17	0.149	(-)	0.167	(-)
18	0.067	(-)	0.124	(-)
19	0.102	(-)	0.178	(-)
20	0.097	(-)	0.035	(-)
21	0.442	(+)	0.067	(-)
22	0.215	(+)	0.205	(-)
23	0.073	(-)	0.355	(+)
24	0.070	(-)	0.310	(+)
317	0.122	(-)	0.069	(-)
318	0.132	(-)	0.182	(-)
319	0.295	(+)	0.103	(-)
320	0.412	(+)	0.077	(-)
321	0.083	(-)	0.061	(-)
322	0.056	(-)	0.085	(-)
323	0.035	(-)	0.073	(-)

新疆伊犁地区萨福克羊部分绵羊肺炎支原体抗原、抗体 ELISA 检测结果

表 2 新疆伊犁地区萨福克羊部分绵羊肺炎支原体抗原、抗体 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA results of some Sheep MP antigen and antibody of Suffolk Sheep in Yili Region of Xinjiang

品种 编号	萨福克羊			
	MO-Ab		MO-Ag	
1	0.127	(-)	0.086	(-)
2	0.199	(-)	0.225	(+)
3	0.204	(+)	0.092	(-)
4	0.099	(-)	0.061	(-)
5	0.080	(-)	0.079	(-)
6	0.086	(-)	0.168	(-)
7	0.338	(+)	0.107	(-)
8	0.258	(+)	0.235	(+)
9	0.039	(-)	0.189	(-)
10	0.027	(-)	0.157	(-)
11	0.037	(-)	0.248	(+)
12	0.088	(-)	0.090	(-)
13	0.080	(-)	0.093	(-)
14	0.037	(-)	0.103	(-)
15	0.206	(+)	0.086	(-)
16	0.388	(+)	0.111	(-)
17	0.178	(-)	0.064	(-)
18	0.147	(-)	0.107	(-)
19	0.157	(-)	0.189	(-)
20	0.056	(-)	0.205	(+)
21	0.096	(-)	0.267	(+)
22	0.027	(-)	0.134	(-)
23	0.077	(-)	0.120	(-)
24	0.146	(-)	0.320	(+)
25	0.178	(-)	0.111	(-)
.				
.				
471	0.228	(+)	0.058	(-)
472	0.367	(+)	0.178	(-)
473	0.383	(+)	0.186	(-)
474	0.381	(+)	0.134	(-)
475	0.291	(+)	0.338	(+)
476	0.097	(-)	0.176	(-)
477	0.124	(-)	0.079	(-)

北京天根生物工程技术有限公司生产的 DNA 提取试剂盒说明书

- (1) 绵羊血液从-20℃冰箱中取出，于室温融化。
 - (2) 无酶 EP 管编号备用，取 200 μ L 绵羊血液加入到 EP 管中。
 - (3) 加入 20 μ L Proteinase K 溶液，混匀。
 - (4) 加入 200 μ L Buffer GB，充分颠倒混匀，70℃放置 10min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
 - (5) 加入 200 μ L 无水乙醇，充分震荡混匀 15 秒，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。
 - (6) 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入到一个吸附柱 CB3 中（吸附柱放入收集管中），12000rpm 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。
 - (7) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ L Buffer GD（已加入无水乙醇），12000rpm 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。
 - (8) 向吸附柱 CB3 中加入 600 μ L Buffer PW（已加入无水乙醇），12000rpm 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。
 - (9) 重复操作步骤（8）。
 - (10) 将吸附柱 CB3 放回收集管中，12000rpm 离心 2min，倒掉废液，将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的 Buffer PW。
- 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50-200 μ L Buffer TE，室温放置 2-5min，12000rpm 离心 2min，将溶液收集到离心管中。

作者简介

崔庆贤，女，生于1998年01月，籍贯河北省廊坊市。2020年6月毕业于石河子大学动物科技学院，动物医学专业，获农学学士学位，2020年9月起在石河子大学动物科技学院兽医专业攻读硕士学位。研究方向为动物疾病诊断与防控技术。

在学期间主要参与的研究项目：

动物疾病防控兵团重点实验室开放课题（2020BTDJ07）

在学期间发表的文章：

1.崔庆贤,张志东,王志魁,李俊潢,史新怀,乔彦杰,黄晓星,蒋松.犬乳腺肿瘤的病理学观察及治疗效果分析[J].当代畜牧,2021(07):24-27.


2.崔庆贤,张鹏博,乔彦杰,张志东,陈磊,蒋松.新疆伊犁地区哈萨克羊与萨福克羊感染支原体肺炎血清学调查与分析[J].当代畜牧,2022(03):25-28.

获奖情况：

2021年获学业奖学金二等奖。

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	崔庆贤	学制	两年
专业	兽医	研究方向	动物临床疾病诊断 与防控技术
<p>学术评语:</p> <p>论文以绵羊肺炎支原体为研究对象,通过对新疆伊犁地区哈萨克羊和萨福克羊肺炎支原体血清流行病学调查,明确了哈萨克羊肺炎支原体抗原抗体阳性率均显著高于萨福克羊;针对该现象,利用 PCR 扩增和直接测序分析方法分析了 NLRP3 基因非编码区 7 个 SNP 位点,结果表明, NLRP3 基因 5'UTR 的 A38188131C 位点可能与哈萨克羊肺炎支原体易感性有相关性,该研究结果为抗绵羊支原体肺炎新品系的选育提供了新的分子生物学信息。</p> <p>该同学在研究中认真细致,掌握了操作方法,技巧和研究方法,论文研究设计科学合理,技术路线正确,数据真实可靠,分析合理,查阅文献资料面广,外文文献占 50% 以上,达到了兽医专业硕士毕业的要求,该同学具备了一定的科研能力和临床操作能力,提高了自己的文字表达能力,为今后工作奠定了良好基础。</p> <p>综上所述,本人认为该同学基础知识扎实,动手能力较强,熟悉研究内容,了解国内外研究动态,具备了一定的独立从事科研和临床工作的能力。达到了专业硕士学位论文毕业论文的水平。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字:  2022年5月31日</p>			