

猪肠毒素大肠杆菌 F4 受体的微卫星标记筛选

蒋隽^{1,2}, 刘小兰³, 马海明², 柳小春², 何俊², 黄生强², 张细权^{1*}

(1.华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2.湖南农业大学 动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省洞口县成人中等专业学校, 湖南 邵阳 422300)

摘 要: 从猪 13 号染色体选取与肠毒素大肠杆菌 (ETEC) F4 受体基因连锁的 8 个微卫星座位, 研究不同猪种间的遗传特性, 并分析不同基因型与 F4 受体黏附表型的关系。结果表明, 2 个地方猪种(五指山猪和沙子岭猪)和 2 个外来猪种(大约克猪和杜洛克猪)在 8 个基因座均具有高度多态性, 杂合度为 0.611 7~0.750 0, 多态信息含量在 0.574 9 以上。对大约克猪和沙子岭猪的 F4 黏附性和微卫星的关联研究表明, 在微卫星座位 S0223 和 SW207, 2 个猪种不同基因型在 F4ab 和 F4ac 血清型黏附表型上差异显著或极显著, 可能 F4ab 和 F4ac 受体就位于这 2 个位点之间。这 2 个微卫星座位可望作为 ETEC F4 抗性基因的遗传标记。

关 键 词: 肠毒素大肠杆菌; 微卫星座位; 基因频率; 遗传差异; 猪

中图分类号: S828.9⁺9; Q343.1⁺7 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0321-05

Screening of microsatellite markers on enterotoxigenic *Escherichia coli*

F4 (K88) receptor in different swine breeds

JIANG Juan^{1,2}, LIU Xiao-lan³, MA Hai-ming², LIU Xiao-chun², HE Jun², HUANG Sheng-qiang², ZHANG Xi-quan^{1*}

(1.College of Animal Science, SCAU, Guangzhou 510642, China; 2. College of Animal Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 3.Dongkou Adult Specialized Secondary Schools, Shaoyang, Hunan 422300)

Abstract: 8 microsatellite markers linked with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) F4 receptor gene were selected from chromosome 13 of swine to analyze difference in heredity between the genotype and F4 receptor adhesive appearance. Results showed that the 8 microsatellite markers were highly polymorphic and the heterozygosities ranged from 0.611 7 to 0.750 0. The value of *PIC* was over 0.574 9 and the hereditary diversity of Chinese pig breeds was much higher than oversea's. There were significant difference between genotypes and F4ab and F4ac adhesive in microsatellite S0223 and SW207 in the two breeds, which indicated the F4ab and F4ac receptors gene are located in the two loci. S0223 and SW207 can thus be potentially used as a genetic marker for *E. coli* F4 resistive gene.

Key words: enterotoxigenic *Escherichia coli*; microsatellite locus; allele frequency; hereditary difference; pig

仔猪泻痢每年都给养猪业造成巨大的经济损失。肠毒素大肠杆菌(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是导致仔猪腹泻的最主要的病原菌, 它可引发仔猪黄痢、白痢、猪水肿病等多种传染病^[1-2]。ETEC 的致病性决定于它们在小肠上皮细胞的定居能力和产生肠毒素的能力, 而其定居能力是通过菌体表面的宿主特异菌毛介导的, 这种特异菌毛通常

称为黏附素(adhesin)或定居因子(colonization factor)^[3-4]。F4(K88)是最常见的一种黏附素。已知F4 抗原具有ab、ac和ad等3种血清型变异。F4 能否结合到猪的小肠上皮细胞, 决定于猪小肠黏膜有无受体^[5]。无受体的抗性猪即使在受到细菌感染时也不发病^[6], 因此, 筛选和定位F4 受体基因对于猪的抗病育种具有重要意义。微卫星标记目前广泛用于

收稿日期: 2009-11-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(30800607); 全国优秀博士论文作者专项基金(200972)

作者简介: 蒋隽(1973—), 男, 湖南衡阳人, 博士, 湖南农业大学副教授; *通讯作者, xqzhang@scau.edu.cn

畜禽经济性状的定位和关联分析^[7-8]。笔者选择猪 13 号染色体上与 F4 受体连锁的 8 个微卫星标记, 研究中国地方猪种与外来猪种在这 8 个座位的遗传特性, 同时分析不同基因型与小肠受体黏附表型的关系, 以期精细定位 F4 受体, 并探索 F4 受体基因的遗传标记。

1 材料和方法

1.1 材料

供试猪包括 4 个品种/群体, 共 753 头, 其中五指山猪(WZS)165 头、沙子岭猪(SZL)139 头、大约克猪(LW)237 头、杜洛克猪(D)212 头。试验所用 8 对引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

将猪耳尖用酒精消毒后, 用耳号钳剪取一小块组织, 置于已高压灭菌的 Eppendorf 管中, 冰盒保存送回实验室。根据体外黏附测定法^[9]对 1 周龄内沙子岭猪 63 头、大白猪 60 头进行 F4ab、F4ac 血清型菌株黏附测定。

1.2.2 引物合成

根据猪的遗传图谱选择 8 个 13 号染色体上与 F4ab、F4ac 受体连锁的微卫星, 其引物序列见表 1。

表 1 微卫星座位引物及其反应条件

Table 1 Microsatellite primers and their reaction conditions

微卫星座位	染色体位置/cM	序列	退火温度/℃
SW458	31.6	F: TTATGGTTTCCTTTGCTGTGC R: CCGTTTACTGCAGGGTAACC	62.0
SW2458	43.1	F: TGCTCAGGGGGAGGAAAG R: TTCAAGCCACCGTGAAGTC	57.5
S0222	49.9	F: ACCTACACAATTCCTTGTTGGGA R: GCCACAGTGTGCGCATAAA	58.0
SWR1008	53.0	F: ACAGCCACCAACAGTGTGTTG R: GAACTTCCATATGCTGCAAGTG	60.0
SW2448	56.4	F: CTCAGGGACTTATCCTCAGTGG R: GAGGTGGGATTGTTGCCAG	58.0
S0223	59.0	F: GCCTGAGAAATTCATCTGC R: TTTAATCCTCACAACAACCCGTG	57.2
SW207	63.2	F: CGCTTCACAAAATAAGTTGGG R: GTTGTTACTCCCAAAAAGGTGC	59.5
S0283	64.8	F: AGCAGCCCTAGAAATAGCAAGCGC R: CTCCTCTGTTCTGGCACCTGGG	61.0

序列中的 F 示正向; R 示反向。

1.2.3 PCR 扩增

反应总体积为 10 μL PCR 扩增体系组成 50 ng 模板 DNA, 1×Taq Buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L Primers, 1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 扩增程序: 92℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 33 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。退火温度见表 1。

1.2.4 PCR 结果检测和基因型判定

10 μL PCR 产物加 2.5 μL 上样缓冲液, 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染法显色。以 pBR322/Msp I 作为标记, 用 KODAK 公司凝胶成像系统携带的软件分析微卫星大小, 同一泳道 2 个等位基因组成 1 种基因型。

1.2.5 数据分析

根据 Nei 氏公式计算杂合度(heterozygosity, H): $H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ 。式中, P_i 为 i 位点的等位基因频率, n 为等位基因数。

根据 Botstein 公式计算多态信息含量(PIC):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

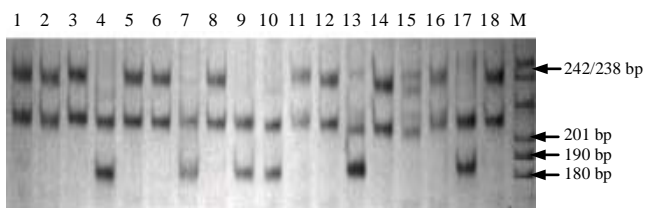
式中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

利用 SAS 软件进行显著性分析, 以判断各类标记基因型之间的差异。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物结果

微卫星座位扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳代表性图谱见图 1。在微卫星 S0222 座位上检测出 3 个等位基因, 通过凝胶成像系统片段分析软件计算



1、2、3、5、6、8、11、12、14、15、16、18 为 AB 基因型; 4、7、9、10、13、17 为 BC 基因型; M 为 pBR322/Msp I markers。

图 1 微卫星 S0222 座位 PCR 产物电泳图谱

Fig.1 A profile of PCR products amplified with microsatellite S0222

其片段大小，分别为 184、209、238 bp。其他微卫星座位的等位基因数分别为 4 个或 5 个，等位基因按片段大小用 A、B、C、D、E 表示。

2.2 微卫星座位的多态性

表 2 给出了所选用的 8 个微卫星座位在不同猪种表现出的遗传特性。

表 2 微卫星座位在不同猪群中的多态性

Table 2 Genetic characteristics of microsatellite loci in different populations of pig

基因座	等位基因数/个	片段范围/bp	猪品种	杂合度	多态信息含量
SW2448	4	182 ~ 223	SZL	0.745 4	0.723 8
			WZS	0.718 7	0.684 5
			LW	0.676 2	0.613 2
			D	0.620 1	0.574 9
S0223	4	124 ~ 146	SZL	0.750 0	0.724 7
			WZS	0.749 9	0.710 5
			LW	0.745 5	0.706 4
			D	0.680 9	0.635 9
S0222	3	180 ~ 238	SZL	0.624 3	0.578 2
			WZS	0.639 8	0.584 6
			LW	0.665 4	0.625 4
			D	0.664 8	0.636 7
SW2458	5	151 ~ 157	SZL	0.731 2	0.695 4
			WZS	0.710 8	0.678 6
			LW	0.645 5	0.613 5
			D	0.618 4	0.557 4
S0283	3	132 ~ 148	SZL	0.716 4	0.685 2
			WZS	0.683 6	0.654 7
			LW	0.625 6	0.593 1
			D	0.634 3	0.603 5
SWR1008	4	201 ~ 255	SZL	0.724 6	0.693 1
			WZS	0.736 8	0.700 8
			LW	0.656 4	0.624 5
			D	0.632 8	0.600 5
SW207	3	170 ~ 188	SZL	0.695 4	0.662 4
			WZS	0.722 6	0.691 2
			LW	0.635 8	0.602 3
			D	0.624 2	0.592 7
SW458	4	116 ~ 125	SZL	0.731 2	0.705 9
			WZS	0.691 4	0.642 7
			LW	0.611 7	0.595 1
			D	0.658 1	0.615 7

由表 2 可见，4 个猪种在 8 个微卫星座位均具有高度多态性，杂合度(H)为 0.611 7~0.750 0，多态信息含量(PIC)在 0.557 4 以上，最高为 0.724 7。地方品种在 SW2448、SW2458、SW458 座位上的杂合度和多态信息含量比外来品种略高，在 S0222 座

位上则略低。总体而言，地方品种的基因多样性要比外来品种高。

2.3 微卫星座位基因型与 F4 受体黏附表型的关系

由表 3 可知，在微卫星座位 S0223 和 SW207，

2 个猪种不同基因型在 F4ab 和 F4ac 血清型黏附表型上差异显著或极显著, 其中在 S0223 位点, AC 基因型在沙子岭猪中的 F4ab 黏附表型为 25 头, 远高于不黏附型的 7 头; BD 基因型黏附表型为 12 头, 低于不黏附型的 19 头, 二者差异极显著. 基因型与 F4ac 黏附型的相关分析表明基因型与黏附型存在相关, 差异显著. 大约克猪中也存在相同情况, AC 基因型在沙子岭猪中的 F4ab 黏附表型为 27 头, 远高于不黏附型的 8 头; BD 基因型的黏附表型为

10 头, 低于不黏附型的 14 头, 二者差异极显著. 对大约克猪基因型与 F4ac 黏附型的相关分析也表明, 不同基因型与黏附型存在显著相关. 在微卫星座位 SW207 中, 2 个猪种不同基因型与 F4ab 和 F4ac 黏附型也存在显著相关.

该结果表明, S0223 和 SW207 微卫星与 F4ab 和 F4ac 黏附型存在显著相关, 很可能 F4ab 和 F4ac 受体就位于这 2 个位点之间.

表 3 2 个猪种 8 个微卫星座位上不同基因型与黏附表型的关系
Table 3 The relationship between genotypes and adhesive appearance of 8 microsatellite loci in two breeds

基因座	品种	基因型	F4ab			F4ac			F4ad		
			A/头	N/头	χ^2	A/头	N/头	χ^2	A/头	N/头	χ^2
SW2458	SZL	AC	26	7		10	21		9	26	
		BD	24	6	3.189 9	8	24	0.027 5	6	22	1.271 1
	LW	AC	19	11		6	22		7	21	
		BD	16	14	0.701 8	4	18	1.428 6	9	23	1.672 5
SW2459	SZL	AC	24	10		19	15		21	11	
		BD	21	8	1.125 3	15	14	1.504 4	17	14	0.283 1
	LW	AC	10	18		7	19		9	20	
		BD	9	23	2.157 7	9	25	1.638 7	5	26	0.050 9
S0222	SZL	AB	14	18		12	18		16	14	
		BC	14	17	3.419 1	8	25	1.113 6	15	18	1.596 4
	LW	AC	21	15		8	23		6	19	
		BD	14	10	3.659 1	4	25	0.523 8	8	27	2.387 6
SW458	SZL	AC	5	6		4	7		8	6	
		BD	15	18		11	18		12	13	
		DE	8	11	3.819 6	13	10	2.917 5	11	13	2.367 0
	LW	AC	11	8		9	7		11	7	
		BD	15	14		16	13		13	11	
		DE	7	5	3.041 1	9	6	2.189 2	10	8	2.837 7
SWR1008	SZL	AC	25	9		7	24		21	9	
		BD	18	11	3.889 9	12	20	0.027 5	19	14	1.271 1
	LW	AC	14	8		8	21		15	10	
		BD	22	16	0.701 8	12	19	1.428 6	21	14	1.672 5
S0223	SZL	AC	25	7		5	34		8	24	
		BD	12	19	9.841 9**	16	8	7.027 5*	10	21	1.271 1
	LW	AC	27	8		7	25		14	11	
		BD	10	14	7.701 8**	17	14	4.428 6*	19	16	1.672 5
SW207	SZL	AB	18	10		12	15		14	16	
		BC	14	17	8.419 1**	19	16	5.113 6*	14	19	1.596 4
	LW	AB	24	15		16	14		12	18	
		BC	9	12	6.659 1**	13	17	4.523 8*	15	12	2.387 6
S0283	SZL	AB	15	18		7	28		15	21	
		BC	12	18	2.419 1	5	23	1.113 6	7	22	1.596 4
	LW	AB	23	15		17	11		9	21	
		BC	16	6	2.259 1	18	14	0.523 8	18	12	2.387 6

A 黏附型猪; N 不黏附型猪. *示差异显著 ($P<0.05$), **示差异极显著 ($P<0.01$).

3 讨 论

早期的研究表明, F4ab和F4ac受体可能是由控制常染色体F4 黏附素的复杂共显性基因, 或者由 2

个紧密连锁的基因控制^[10-11]. Edfors-Lilja等^[12]将 F4ab和F4ac受体精确定位于 13 号染色体长臂 3.1 区, 并且 2 个基因座间紧密连锁($\theta=0.01$, $Z=41.06$). 本试验证实了这个研究结果. 结果还表明,

F4ad受体与8个微卫星座位都不存在显著相关,这与Peelman等^[13]报道的F4ad受体不位于13号染色体相符,也意味着在其他染色体上可能存在控制F4受体的基因。另据报道^[14-15],在梅山猪等中国地方猪种中未发现F4ab和F4ac黏附型,而在本试验沙子岭猪中检测到了F4ab和F4ac黏附型,这与中国地方猪种繁多、基因库多样化有关。本研究中发现地方猪种的基因多样性比外来猪种高,这与文献^[16]的报道相符。

本研究结果表明, S0223 和 SW207 微卫星与F4ab 和 F4ac 的黏附型存在显著相关,表明 F4ab 和 F4ac 受体就位于这2个位点之间。这为抗性猪的选择提供了可能。这2个微卫星座位可望作为ETEC F4抗性基因的遗传标记。

参考文献:

- [1] 施启顺, 黄生强, 柳小春, 等. 不同猪种*E. coli* F18受体基因的多态性[J]. 遗传学报, 2003, 30(3): 221-224.
- [2] Fang L, Gan Z, Marquardt R R. Isolation, affinity purification, and identification of piglet small intestine mucosa receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac+ fimbriae[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 564-569.
- [3] Erickson A K, Baker D R, Bosworth B T, et al. Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins[J]. Infect Immun, 1994, 62(12): 5404-5410.
- [4] Jin L Z, Marquardt R R, Baidoo S K, et al. Characterization and purification of porcine small intestinal mucus receptor for *Escherichia coli* K88ac fimbrial adhesin[J]. Immunol Med Microbiol, 2000, 27(1): 17-22.
- [5] 施启顺, 谢新民, 柳小春, 等. 猪肠毒素大肠杆菌(ETEC)F18受体基因检测报告[J]. 遗传, 2002, 24(6): 656-658.
- [6] Cheng D, Sun H, Xu J, et al. Prevalence of fimbrial colonization factors F18ab and F18ac in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China[J]. Vet Microbiol, 2005, 30(12): 35-39.
- [7] 黄生强, 柳小春, 晏光荣, 等. 微卫星标记预测猪部分经济性状杂种优势的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 592-594.
- [8] 晏光荣, 柳小春, 黄生强, 等. 有效微卫星标记预测猪部分经济性状杂种优势[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(2): 157-160.
- [9] Baker D R, Billey L O, Francis D H. Distribution of F4 *Escherichia coli* adhesive and non-adhesive phenotypes among pigs of four breeds[J]. Vet Microbiol, 1997, 54: 123-132.
- [10] Grange P A, Mouricout M A, Levery S B, et al. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors[J]. Infect Immun, 2002, 70(5): 2336-2343.
- [11] Billey L O, Erickson A K, Francis D H. Multiple receptors on porcine intestinal epithelial cells for the variants of *Escherichia coli* F4 fimbrial adhesin[J]. Vet Microbiol, 1998, 59(2): 203-212.
- [12] Edfors-Lilja I, Gustafsson U, Duval-Iflah Y. The porcine intestinal receptor for *Escherichia coli* K88ab, K88ac: Regional localization on chromosome 13 and influence of IgG response to the K88 antigen[J]. Ani Genet, 1995, 26(4): 237-242.
- [13] Peelman L J. Genetic investigation of the resistance mechanisms of the pig against diarrhea caused by *E. coli*[J]. Verh K Acad Geneesk Belg, 1999, 61(4): 489-515.
- [14] Chappuis J P, Duval Duval-Iflah Y, Ollivier L. *Escherichia coli* K88 adhesin: A comparison of Chinese and Large White piglets[J]. Genet, Select Eval, 1984, 16(3): 358-390.
- [15] Michaels R D, Whipp S C, Rothschild M F. Resistance of Chinese Meishan, Fengjing and Minzhu pigs to the K88+ strain of *Escherichia coli*[J]. Am J Vet Res, 1994, 55(3): 333-338.
- [16] 蒋隽, 施启顺, 柳小春, 等. 不同猪种肠毒素大肠杆菌(ETEC)F4受体微卫星标记遗传差异性分析[J]. 遗传, 2004, 26(2): 160-162.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠