

猪肠毒素大肠杆菌(ETEC)F₁₈受体基因型检测报告

施启顺,谢新民,柳小春,黄生强,贺长青

(湖南农业大学动物科技学院,长沙 410128)

摘要:采用PCR-RFLP法检测了湖南境内大白、长白、杜洛克3品种共158头猪的*E. coli* F₁₈受体基因型。结果表明,抗性基因型AA的频率为0.11,敏感型AG、GG的频率分别为0.35和0.54。

关键词:猪;肠毒素大肠杆菌;F₁₈受体基因型

中图分类号:Q953⁺.5 文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)06-0656-03

Experimental Results on Enterotoxigenic *E. coli* F₁₈ Receptor Genotypes

SHI Qi-shun, XIE Xin-min, LIU Xiao-chun, HUANG Sheng-qiang, HE Chang-qing

(College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A total of 158 pigs of Yorkshire, Landrace and Duroc were selected from some swine breeding farms in Hunan province. The genotypes of enterotoxigenic *E. coli* F₁₈ receptor were tested by PCR-RFLP. The results showed that the frequency of resistant genotype AA was 0.11, the frequencies of susceptibility genotype AG and GG were 0.35 and 0.54 respectively.

Key words: pig; enterotoxigenic *E. coli*; genotype for F₁₈ receptor

1 前言

肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia Coli*, ETEC)是引起仔猪黄痢、白痢、断奶后腹泻、水肿病的主要病原菌。ETEC的致病能力决定于它们在宿主小肠上皮细胞的定居能力和产生肠毒素能力,两者缺一不可。ETEC定居于宿主小肠上皮细胞的能力由菌体表面的特异菌毛介导,这种特异菌毛称为定居因子或黏附素,按黏附素性质(抗原性质)可将*E. coli*分为K88(F₄)、K99(F₅)、F41(F₆)、F₁₇、F₁₈等^[1]。*E. coli* F₁₈黏附素是断奶仔猪的一种重要的病原性大肠杆菌毒素,它不仅可引起仔猪泻痢,有些F₁₈能产生一种类肠毒素,通过血液传播引起血管壁损伤,水分大量渗出而致水肿病。因此它是仔猪断奶后

腹泻和水肿病的主要病原菌,由此造成4~12周龄仔猪的死亡率分别为38%和22%^[2],国内报道猪水肿病的发病率约20%,但病死率可达80%~100%^[1]。

E. coli F₁₈能否致病决定于仔猪小肠粘膜上皮细胞刷状缘有无受体,Vögeli等^[2,3]采用候选基因法和体外黏附试验发现, $\alpha(1,2)$ 岩藻糖转移酶基因1(*FUT1*)可作为*E. coli* F₁₈R(ECF₁₈R)的候选基因。测序表明,在*FUT1*的307 bp处出现两个多态型,该处碱基由G突变成A,从而失去一个*Hin6I*酶切位点,且G对A显性,故AA型为对ECF₁₈抗性猪(隐性),GG型为敏感猪(显性),杂合子AG型也是敏感猪。据此原理,可通过标记辅助选择、标记辅助交配,实现抗病育种^[4]。为此,我们开展了部分猪只ECF₁₈R基因型的检测研究。

2 材料与方 法

2.1 耳 样 及 试 剂

耳样采自岳阳、益阳、衡阳、湘潭、望城等地种猪场的大白、长白、杜洛克猪群。扩增引物由上海生物工程公司合成, *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 及限制酶 *Hin*6I 均购自上海生物工程公司, 标准分子质量参照物 (pBR 322/*Msp*I DNA Markers) 购自华美生物工程公司, 其他试剂均为国产分析纯。

2.2 基因组 DNA 提取

DNA 提取按常规方法稍作修改。主要步骤为: 取耳样约 0.5g, 洗净去毛切碎, 加 0.5ml 提 DNA 缓冲液, 再加蛋白酶 K (10mg/ml) 15 μ l 混匀, 置 50 $^{\circ}$ C 摇床, 转速为 150r/min, 约 4h, 加入等体积 (0.5ml) 饱和苯酚, 充分摇匀, 然后 12 000r/min 离心 5min, 取上清液, 加入等体积氯仿/异戊醇抽提, 充分摇匀, 12 000r/min 离心 5min, 取上清液, 将上清液加两倍体积冰无水乙醇及 1/10 体积的 NaAc (3mol/L) 溶液, 9 000r/min 离心 3min, 去乙醇, 再加 70% 酒精清洗沉淀物, 12 000r/min 离心 5min, 去酒精并干燥, 加适量 TE 溶解, -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。其中提 DNA 缓冲液配方为: EDTA 10mmol/L, Tris-HCl 10mmol/L (pH7.4), SDS 2%, NaCl 300mmol/L。

2.3 PCR 扩增反应体系

采用 25 μ l 反应体系, 内含基因组 DNA 模板 (100ng/ μ l) 0.2 μ l, 缓冲液 (10 \times) 2.5 μ l, MgCl₂

(25mmol/L) 1.5 μ l, dNTP (2mmol/L) 1.2 μ l, *Taq* 酶 (4U/ μ l) 0.25 μ l, 引物 P₁、P₂ (均为 5PM) 各 1.25 μ l, 加 ddH₂O 16.85 μ l, 其中引物 P₁、P₂ 参照文献^[3]猪 *FUT1* 基因序列合成。

PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 180s, 94 $^{\circ}$ C 变性 60s, 56 $^{\circ}$ C 退火 60s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 300s, 共 40 个循环, 最后保持 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

2.4 酶切反应

每管 PCR 扩增产物 25 μ l, *Hin*6I 限制酶 2.5 μ l (其中 *Hin*6I 1 μ l, 10 \times 缓冲液 0.25 μ l, dd H₂O 1.25 μ l), 37 $^{\circ}$ C 过夜, 或 50 $^{\circ}$ C 约 2.5h。

2.5 电泳检测分析

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染法检测, 具体操作为酶切反应产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电压 220V, 时间约 3.5h, 电泳结束后用银染法染色, 在胶片观察灯上观察, 并拍照分析。

3 结果与分析

3.1 扩增结果

本次研究共检测 158 个样品, 各样品均成功地扩增出 421bp 的 DNA 片段, 扩增产物经 *Hin*6 I 酶切后显示, 在 *FUT1* 基因座 307bp 处由 G 突变成 A (M307), 形成 A 与 G 两个等位基因, AA 型有 2 个片段, 其长度为 328bp 和 93bp, GG 型有 3 个片段, 其长度为 241bp、93bp 和 87bp, AG 型则有 4 个片段, 其长度分别为 328、241、93 和 87bp, 与国外报道^[5]一致, 详见图 1。

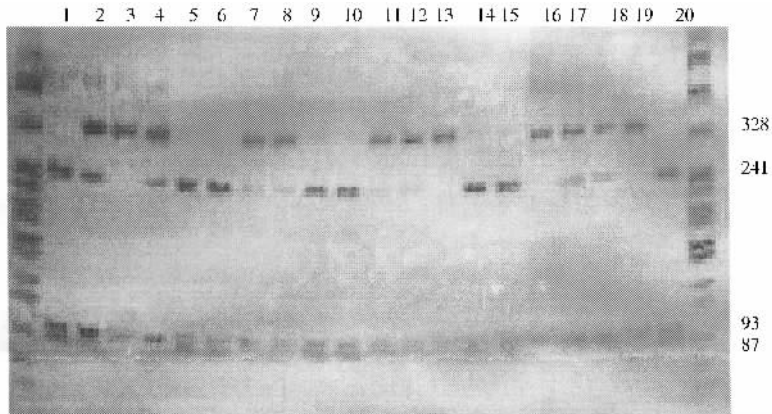


图 1 *ECF*₁₈*R* 基因 *Hin*6 I 酶切 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Patterns of *ECF*₁₈*R* gene defined by PCR *Hin*6I-RFLP

3.2 不同品种中 $ECF_{18}R$ 基因型及基因频率

测定 108 头大白猪、11 头长白猪和 39 头杜洛克猪的 $ECF_{18}R$ ($FUT1$) 的基因型频率和基因频率, 见表 1。

表 1 不同品种 $ECF_{18}R$ 的基因 ($FUT1$) 型频率和基因频率

Table 1 Genotype and allele frequencies of $ECF_{18}R$ by PCR-RFLP in three breeds

品 种	测定头数	$FUT1$ 基因型频率			$FUT1$ 基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
大白	108	0.14	0.35	0.51	0.31	0.69
长白	11	0	0	1.00	0	1.00
杜洛克	39	0.05	0.46	0.49	0.28	0.72
合计	158	0.11	0.35	0.54	0.28	0.72

表 1 可见, 不同品种猪 $FUT1$ 即 $ECF_{18}R$ 敏感型 (GG、AG) 均占绝对优势 (89%), 而抗性型 (AA) 仅占 11%。

4 讨 论

4.1 本项研究结果表明, 在大白、长白、杜洛克 3 个品种中, $ECF_{18}R$ ($FUT1$) 可清楚地地区分为 AA、AG、GG 3 种基因型, 其频率分别为 0.11、0.35 和 0.54, A 和 G 的基因频率分别为 0.28 和 0.72, 鉴于等位基因 G 对 A 显性, 故 GG、AG 为敏感型, AA 为抗性型, 抗性型比例为 11%, 与 Vögeli 等^[2,5] 报道在瑞士长白和大白猪中对 ECF_{18} 导致断奶后腹泻和水肿病具有抗性的猪占 5%~10% 的比例相近。

4.2 ECF_{18} 能否引起断奶后仔猪腹泻及水肿病, 决定于该菌进入仔猪小肠后能否在上皮细胞黏附并产

生肠毒素, 而能否黏附的关键在于小肠粘膜上皮细胞有无 ECF_{18} 受体 ($ECF_{18}R$), Vögeli 等^[2,3] 研究证明, $ECF_{18}R$ 位于猪 Chr6q11, 与血型抑制因子 S 及 RYR1 位点紧密连锁, 其重组率分别为 $\theta=0.05\%$ 和 3.1% 。而且 $FUT1$ 是 $ECF_{18}R$ 最理想的候选基因, 具有检测方便、分型清晰的优点, 为开展 ECF_{18} 抗病育种提供了可能。

4.3 此项研究未发现长白猪的抗性型 (AA), 可能与检测头数太少有关。也未检测地方猪种中 $ECF_{18}R$ 不同类型分布频率, 有待今后继续研究。

参 考 文 献 (References):

- [1] 房海主编. 大肠埃希氏菌[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997.
- [2] Vögeli P, Bertschinger H U, Stamm M, et al. Genes specifying receptors for F₁₈ fimbriated Escherichia coli, map to chromosome 6[J]. Animal Genetics, 1996, 27: 321~328.
- [3] Meijerink E, Fries R, Vögeli P, et al. Two α (1, 2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q 11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F₁₈ receptor ($ECF_{18}R$) Loci[J]. Mammalian Genome, 1997, 8: 736~741.
- [4] Edfors-Lilja, Wallgren P. Escherichia coli and Salmonella diarrhoea in pigs, eds P. F. E. Axford, S. C. Bishop, F. W. Nicholas and J. O. Owen; Breeding for Disease Resistance in Farm Animals [M]. CAB International, 2000, 253~267.
- [5] Vögeli P, Meijerink E, Fries R, et al. A molecular test for the detection of E. coli F₁₈ receptors: a breakthrough in the struggle against oedema disease and postweaning diarrhoea in swine[J]. Schweiz Arch Tierheilk, 1997, 139(11): 479~484.

大 自 然 探 索

畅销科普月刊 2003 年隆重改版

全彩色精美印刷, 全新栏目设计, 精彩无限!

动物、植物、沙漠、外星, 诸多自然未解之谜;

火山、地震、飓风、闪电, 种种自然雄奇角力;

地球、生命、太空、海洋, 幅幅自然壮丽画卷!

全国各地邮局(所)均可订阅。邮发代号: 62-139

凡直接汇款到本社邮购 2003 年《大自然探索》全年 1 份的订户, 均可免费获赠本刊《2002 年精华本》1 册 (2003 年上半年出版)。已经享受了六折订阅杂志的会员, 不再享受此项优惠。

地址: 成都市二环路南三段 1 号祥福苑东楼 17E 邮编: 610041 电话: 028-85563428