

# 莱芜黑猪 a1 岩藻糖转移酶基因(FUT I) 不同基因型对大肠杆菌 F18 抵抗力研究

王继英<sup>1,2</sup>, 郭建凤<sup>1,2</sup>, 孙守礼<sup>1,2</sup>, 郭立辉<sup>1,2</sup>, 藺海潮<sup>1,2</sup>, 王<sup>1,2</sup>, 武<sup>1,2</sup>, 诚英<sup>1,2</sup>

(1. 山东省农科院 畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100; 2. 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100)

**摘要:** 为了研究不同猪种(山东省地方猪种莱芜黑猪和引进猪种大约克)和 FUT I 不同基因型仔猪对肠毒性大肠杆菌 F18 (ETEC F18) 的抵抗能力和肠黏膜上皮细胞对 ETEC F18 黏附能力的差异, 在采用 PCR2RFLP 技术对莱芜黑猪和大约克 FUT I 基因型检测的基础上, 选取易感性和抗性断奶仔猪, 利用野生型 ETEC F18 标准株进行试验猪口服细菌攻毒试验和肠黏膜黏附试验。由于多方面原因, 接受 ETEC F18 细菌攻毒的试验猪均未发病, 无法判断试验猪对 ETEC F18 的抵抗能力。ETEC F18 标准菌株能与所有 FUT I 敏感基因型仔猪的小肠黏膜上皮细胞黏附, 而不能与抗性基因型仔猪小肠上皮黏膜细胞黏附, 莱芜黑猪与大约克的肠黏膜上皮细胞与 E. coli F18 的黏附特性并无品种差异。但是养猪生产实践中, 莱芜黑猪极少发生断奶仔猪水肿和腹泻病。所以除 FUT I 基因外, 也许本地猪种有其他导致遗传抗性的突变或抗性基因。

**关键词:** 莱芜黑猪; F18 大肠杆菌; FUT I 基因; 小肠黏膜上皮细胞; 黏附

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)05-0064-05

## Research on the Resistance Capability to Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC F18) of Different FUT I Genotypes in Laiwu Black Pigs

WANGJi2ying<sup>1,2</sup>, G Jian2feng<sup>1,2</sup>, SUN Shou2li<sup>1,2</sup>, G Li2hui<sup>1,2</sup>, UOUO

LIN Hai2chao<sup>1,2</sup>, WANG Cheng<sup>1,2</sup>, WU Ying<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinarian of Shandong Province, Jinan 250100, China;

2. Key Lab of Disease Control and Animal Breeding of Shandong Province, Jinan 250100, China)

**Abstract:** On the basis of detection of FUT I genotypes of Laiwu Black Pigs and Yorkshire using PCR2RFLP, small intestinal epithelium cells of different genotypes, susceptible genotype and resistant genotype, were selected to test resistance and adhesion capability to the wild type enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC F18). Because of several reasons, the pigs orally taken E. coli F18 did not catch the diseases, and it was impossible to judge their resistance to E. coli F18. The result dedicated that E. coli F18 could adhere to all the small intestinal epithelium cells of susceptible genotype and not to the small intestinal epithelium cells of resistant genotype. There was not difference of adhesion capability in Laiwu Black Pigs and Yorkshire. But in the pig production, postweaning diarrhea and edema disease seldom happened in Laiwu Black Pigs. Therefore, except of FUT I gene, perhaps there are other mutation and resistant gene of E. coli F18 in Laiwu Black Pigs and other indigenous pig breeds of China.

**Key words:** Laiwu black pigs; E. coli expressing F18 fimbriae; FUT I gene; Small intestinal Epithelium cells; Adhesion

断奶仔猪腹泻和仔猪水肿病是由肠毒性大肠杆菌 F18 (ETEC F18) 引起的。仔猪对该病原的易感性取决于小肠黏膜上皮细胞上是否存在 F18 菌毛的受体以及具有显性遗传特性。geli P 等<sup>[1]</sup>研究表明, V

F18 受体基因位点控制着 F18 受体的敏感性, 该基因位点有一对等位基因, 表达为能与 ETEC F18 结合的受体的基因为敏感性基因, 呈显性遗传; 反之则为抗性基因, 呈隐性遗传。后又用连锁分析法和候选

收稿日期: 2009-02-27

基金项目: 国家“863”项目 (2006AA10Z1E1); 山东省农科院青年基金 (2007QN030); 山东省农业良种工程项目 (2006LZ08)

作者简介: 王继英 (1977-), 女, 山东聊城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事猪的分子遗传育种研究。

通讯作者: 武 (1956-), 女, 山东肥城人, 高级研究员, 主要从事猪遗传育种和营养研究。英

基因法研究了位于猪染色体 6qll 区的  $\alpha 1$  岩藻糖转移酶基因 (FUT I) 可作为控制 ETEC F18 黏附的一个候选基因。该基因 307 位点存在多态性,该处碱基由 G 突变为 A,从而失去一个 Hin6 I 酶切位点,这个突变也使得苏氨酸代替了丙氨酸,从而改变了蛋白质的构象和功能,导致了猪对 ETEC 18 的抗病性和敏感性,其中 AA 型为抗性基因型,GG和 AG型为敏感性基因型。

Bertschinger 等 [2] 研究发现,ETEC F18 在体内或体外均能黏附于仔猪小肠黏膜上皮细胞刷状缘和微绒毛上。采用仔猪小肠上皮细胞的黏附试验来验证和区分断奶仔猪腹泻和水肿病个体,为猪育种实践中断奶仔猪腹泻、水肿病抗性和敏感型个体的鉴定提供了一种准确的途径,从而加快猪抗 F18 大肠杆菌病的分子育种进程。

莱芜黑猪是山东省地方黑猪的典型代表,具有耐粗饲、抗逆性强、繁殖率高、肉质细嫩香醇等优点,从分子遗传学角度对莱芜黑猪的抗逆性进行研究是十分必要的。莱芜黑猪 FUT I 基因不同基因型仔猪对 ETEC F18 的抗病力及其小肠黏膜上皮细胞与 ETEC F18 的黏附关系未见报道。为此本研究以莱芜黑猪和大约克为研究对象,在采用 PCR2RFLP 技术对莱芜黑猪和大约克进行 FUT I 基因基因型检测的基础上,选取 6 周龄的抗性和易感性断奶仔猪,利用野生型大肠杆菌标准株进行细菌攻毒试验,剖杀后取仔猪小肠制备小肠黏膜上皮细胞,分析小肠黏膜上皮细胞对 ETEC F18 黏附能力的差异,在细胞水平上更客观的评价仔猪对 ETEC F18 的实际抗病性,从而为直接采用基因型方法来鉴定 ETEC F18 受体抗性猪提供依据,加快抗病育种。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物和细菌来源

本试验所用 5 头莱芜黑猪 (35 日龄断奶) 和 8 头大约克 (28 日龄断奶) 健康断奶仔猪分别来自莱芜市杨庄莱芜黑猪保种场和山东省良种猪繁育工程技术中心。

本试验所用大肠杆菌菌株为 F107/86 (F18ab+ 大肠杆菌),8813 (F18ac+ 大肠杆菌) 和无菌毛大肠埃希氏菌 HB101 株 (不黏附,做对照) 均由扬州大学提供。将冻存的大肠杆菌标准株分别接种到 10 mL TSB 培养基,37 °C 复苏培养,连传 3 代后,再接种到 50 mL TSB 培养基上,37 °C 振荡培养,待细菌达到对数生长期时收集菌液,4 °C 条件下 4000 r/min 离心 10 min。将细菌用 PBS 反复离心洗涤 3 次,调整细菌浓度至约

$2 \times 10^9$  cfu/L,用于细菌试验和肠黏膜黏附试验。10

### 1.2 E. coli F18 菌株的检测

参照文献 [3] 利用双重 PCR 扩增以检测细菌是否污染。

### 1.3 FUT I 基因 M307 位点基因型检测

FUT I 基因扩增的引物设计参照 V geli P [1] 等。引物由上海生物工程有限公司合成。

PCR 扩增反应体系为:10 × Buffer 2.5 μL,2 μLL dNTP,上、下游引物各 1 μL (20 μLmol/L),50 ng/μL 模板 1 μL,Taq 酶 1 U,加双蒸水至 25 μL。反应条件 LL 为:94 °C 变性 5 min,35 次循环 (94 °C,30 s;55 °C,30 s;72 °C,1 min),72 °C 延伸 8 min。

RFLP 分析:6 μL PCR 产物加入 0.5 μL Hin6 I LL 及 1.5 μL Buffer,加双蒸水至 15 μL,37 °C LL 水浴过夜。酶切产物用 3% 的琼脂糖电泳检测。

### 1.4 细菌试验

试验猪进入试验地点,适应 3~5 d。用针管灌服 107/86、株各 0.5 mL ( $2 \times 10^9$  cfu/L)。观察试 881310 验猪反应 5 d,观察指标如下:生长发育情况 (试验期间的日增重);精神状态;粪便评分。

### 1.5 仔猪小肠上皮细胞的制备

细菌攻毒试验结束后,扑杀仔猪并采集小肠 10~20 cm 肠段 (十二指肠和空肠) 置于冰上,小肠上皮细胞的制备参考文献 [4]。取 10 cm 左右纵向剖开,用冷的低渗 EDTA (5 mmol/L EDTA,pH 7.4) 轻轻漂洗以除去粪便和碎屑。用盖玻片刮擦肠黏膜表面以获取上皮细胞,并将细胞置于 50 mL 的低渗 EDTA 溶液中,4 °C 培养 30 min。1200 × 离心 10 min 沉淀刷状缘细胞,沉淀的刷状缘细胞溶于 PBS 溶液中,1200 × 再次离心 10 min 沉淀刷状缘细胞,重溶于 g PBS 溶液中 (加入抗生素),用显微镜计数并调整细胞浓度至约  $1 \times 10^6$  cfu/mL,置于 4 °C 10 保存。

### 1.6 仔猪小肠上皮细胞的黏附试验

仔猪小肠上皮细胞的黏附试验参考文献 [5]。取 F18ab+ 和 F18ac+ 大肠埃希氏菌悬液 0.2 mL,加入终浓度为 1% 的甘露糖溶液,于 37 °C 作用 30 min 后与 0.5 mL 小肠上皮细胞混匀,再于 37 °C 孵育 30 min,1200 r/min 离心 5 min,用蒸馏水悬浮后取 50 μL 滴于洁净玻片上,自然干燥,火焰固定,用美蓝 L (0.1%) 染色 8~10 min,油镜 (OL YPUS2BX51) 下观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 大肠杆菌菌株检测结果

图 1 是 E. coli F18 菌株的培养物,可见其为短

杆菌,分布较均匀,菌株之间很少有黏连,常以单菌株形式存在,偶尔有两个细菌黏在一起。

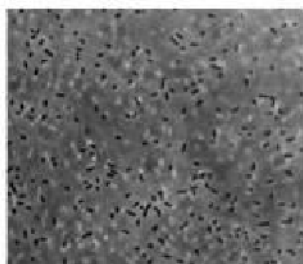
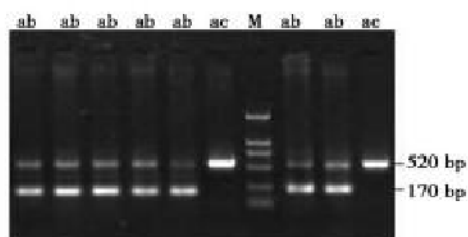


图 1 E. coli F18 菌株(×000)1

Fig. 1 The E. coli F18 strain (×000)1

在进行黏附试验前对大肠杆菌菌株进行检测,以保证它们是本试验所需菌株,并确定未受污染。大肠杆菌的 PCR 检测结果见图 2。双重 PCR 中,

F18ab 作为模板时,扩增产物为约 520 bp 和 170 bp 两个片段,而以 F18ac 作为模板时,扩增产物仅为约 520 bp 的片段。由此可以判断出两种大肠杆菌菌株亚型均未受到污染,有很好的特异性。



M. DNA Marker DL2000。

图 2 ETEC F18 fedA 基因双重 PCR 扩增

Fig. 2 Duplex PCR product of fedA of ETEC F18

## 2.2 FUT1 基因 M307 位点 PCR2RFLP 基因型分析

本试验所扩增的 FUT1 基因片段长度为 421 bp,第 307 位点处多态性酶切位点因变异(由 G 突变成 A)而消失时,241 bp 和 87 bp 的片段合并产生 328

bp 片段。FUT1 基因进行 PCR2RFLP 分析,结果有三种情况(图 1):328 bp,93 bp 纯合子(AA 基因型);328,241,93 和 87 bp 杂合子(AG 基因型);241,93,87

bp 纯合子(GG 基因型)。由于 93 bp 和 87 bp 2 条带分子量相差较小,所以在琼脂糖凝胶上成 1 条带,实际看到 AA 和 GG 纯合子均为 2 条带,AG 杂合子为 3 条带,具体酶切图谱见图 3 所示。

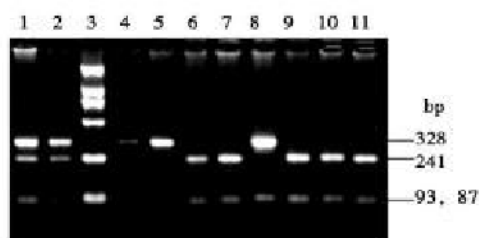


图 3 FUT1 基因 PCR2RFLP 基因型分析

Fig. 3 Genotyping of porcine FUT1 gene by PCR2RFLP

根据检测结果从 12 头莱芜黑猪仔猪和 32 头大约克仔猪中挑选 GG 基因型的莱芜黑猪和大约克各 2 头,AG 基因型的莱芜黑猪 1 头和大约克 2 头,AA 基因型的莱芜黑猪 2 头和大约克 4 头用于肠黏膜 ETEC F18 黏附试验。

## 2.3 细菌攻毒试验结果与分析

用 ETEC F18 标准株 F18ab+ 大肠埃希氏菌 107/86 株(水肿)和 F18ac+ 大肠埃希氏菌 8813 株(腹泻)在断奶仔猪上直接测试 AA 基因型仔猪对 F18 大肠杆菌的感染和肠道定居、断奶仔猪腹泻和仔猪水肿

病的抵抗力及测试 GG 基因型和 AG 基因型仔猪个体的易感型,但是试验猪均发病,试验未成功。接受 E. coli F18 的 107/86 和 8813 菌株口服攻毒的大约克和莱芜黑猪试验猪均未发病,分析原因,可能有以下几个方面:一为增强细菌试验成功的儿

率,本试验中采用双菌株联合攻毒试验的方式,但 107/86 和 8813 均为模式菌株,经过实验室内数次传代,毒力已下降很多。二为避免更换饲料带来的试验猪腹泻对试验干扰,试验过程中采用的是市场购买的仔猪料。但是疏忽了该仔猪料中含有较高浓度

的抗生素,抗生素对口服 E. coli 细菌有很强的杀伤力,致使能够到达小肠部位的活的 E. coli 细菌减少。

## 2.4 肠黏膜观察及小肠黏膜上皮细胞的制备

仔猪剖杀后,立即取十二指肠和空肠前部约 15

cm。由图 4 可以看出:相同日龄的莱芜黑猪和大约克断奶仔猪的小肠从外观上既可见明显不同。莱芜黑猪仔猪小肠较同日龄大约克仔猪要厚和红润。纵向剖开后,可见莱芜黑猪的小肠黏膜比大约克仔猪长,毛细血管丰富。

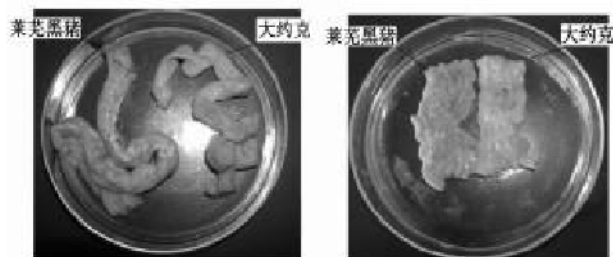


图 4 莱芜黑猪和大约克仔猪小肠比较

Fig. 4 Comparison of small intestinal of

Laiwu Black Pigs and Yorkshire

图 5 是制备的散在的、完整的小肠黏膜上皮刷状缘细胞。可以看出,制备的小肠黏膜上皮细胞大

部分结构完整,该细胞呈柱状,顶端为毛刷状。

## 2.5 黏附试验显微镜检测结果

取从 3 种不同基因型断奶仔猪分离得到的小肠黏膜上皮细胞和 ETEC F18 进行体外黏附试验,显微

镜下观察,结果表明,FUT I 基因 M307 位点 GG 和 AG 两种基因型的莱芜黑猪和大约克仔猪的小肠上皮细胞与表达 F18ab 菌毛的标准菌株 107/86 和表达 F18ac 菌毛的标准菌株 8813 均能发生黏附作用,而 AA 基因型的仔猪小肠上皮细胞不能与上述两种

大肠杆菌发生黏附作用。HB101 对照组的小肠上皮细胞未发现细菌黏附。图 6 中刷状缘周围聚集大量大肠杆菌,该细胞为黏附型;图 7 中刷状缘周围没有大肠杆菌,该细胞为非黏附型。

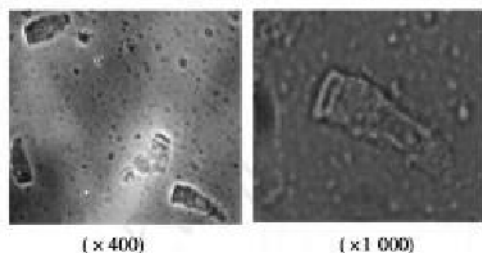


图5 小肠黏膜上皮刷状缘细胞

Fig. 5 The brush border epithelial cell of small intestine

在该试验中,大肠杆菌菌株 F107/86 (F18ab+ 大肠杆菌) 和 8813 (F18ac+ 大肠杆菌) 菌可在 TSB 培养基中在 37 °C 温度的培养条件下很好的表达。但是 F107/86 的黏附能力略强于 8813。

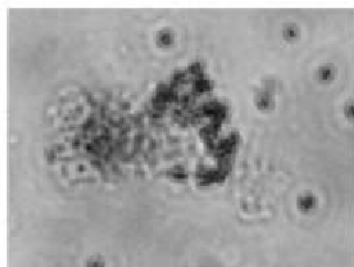


图 6 ETEC F18ab 与刷状缘的黏附(美蓝染色,×000)1

Fig. 6 Adhesion of ETEC F18 to the brush border cell



图 7 ETEC F18ab 与刷状缘的非黏附 (×000)1

Fig. 7 Nonadhesion of ETEC F18 to the brush border cell

### 3 讨论

莱芜黑猪是山东省地方黑猪的典型代表,很少发生断奶仔猪腹泻和水肿病,从分子遗传学角度对莱芜黑猪的抗 ETEC F18 研究是十分必要的。笔者 [6] 对 206 头莱芜黑猪的 FUT I 基因 M307 位点的多态性检测结果显示:莱芜黑猪群体内存在 FUT I 基因 M307 位点的多态性,但抗病 AA 基因型频率很

低,只有 01043 7,杂合 AG 基因型频率为 01252 4。晏学明等 [7,8]、启顺等 [9,10]、引红等 [11]、鹏施张孙翔 [12]、姜勋平 [13] 和何小平等 [14] 对几十个中国地方猪种进行 FUT I 基因 M307 位点的多态性检测结果表明,只有临高猪在该 FUT I 基因位点存在多态性,其他中国地方猪种均表现为极端的单态分布,只有易感的 GG 基因型,没有多态性。在中国的养猪生产实践中,中国地方猪种的仔猪抗水肿与腹泻病能力普遍强于外来猪种,那么地方猪种应该含有较高的 A 基因频率,然而事实并不是如此。

在莱芜黑猪断奶仔猪上直接测试 AA 基因型仔猪对 F18 大肠杆菌的感染和肠道定居、断奶仔猪腹泻和仔猪水肿病的抵抗力及测试 GG 基因型和 AG 基因型仔猪的易感型,是验证 FUT I 基因作为 E. coli F18 抗性基因的最直接的验证。但是建立一个标准的断奶仔猪腹泻和水肿病细菌试验模型是很困难的事 [15]。Madec 等 [16] 利用 4 个 ETEC 菌株和几种不同的剂量方法对 168 头无特定病原猪进行试验,结果只在 50% 的试验猪中产生临床上显著的短暂的腹泻现象。在本试验中也尝试用 ETEC 标准株 F18ab+ 大肠埃希氏菌 107/86 株(水肿)和 F18ac+ 大肠埃希氏菌 8813 株(腹泻)在断奶仔猪上直接测试 AA 基因型对 F18 大肠杆菌的感染和肠道定居、断奶仔猪腹泻和仔猪水肿病的抵抗力及测试 GG 基因型和 AG 基因型个体的易感型,但是试验猪均发病,试验未成功。

另外,FUT I 基因作为抗仔猪腹泻和水肿病的候选基因,它对仔猪的影响首先应表现在生长性状,特别是和断奶仔猪腹泻和水肿病有密切联系的 70 日龄保育重。笔者 [6] 对 FUT I 基因的三种基因型对杜洛克、大约克和莱芜黑猪的仔猪的 70 日龄保育重的影响进行了统计分析,结果表明:杜洛克和大约克 AA 基因型的仔猪 70 日龄的保育重极显著 ( $P < 0101$ ) 或显著 ( $P < 0105$ ) 高于另外两种基因型的仔猪,莱芜黑猪 AA 基因型的仔猪的 70 日龄的保育重和另外两种基因型猪无显著差别 ( $P > 0105$ )。由此可推断,FUT I 基因具有品种特异性,可能不能作为莱芜黑猪抗 ETEC F18 病原菌候选基因。

本研究通过对莱芜黑猪和大约克 FUT I 基因不同基因型断奶仔猪的肠黏膜黏附试验结果显示:莱芜黑猪 FUT I 基因不同基因型仔猪的小肠黏膜上皮细胞与 ETEC F18 的黏附表现与大约克相同,并无品种差异。莱芜黑猪群体内 FUT I 基因以敏感基因型 (GG/AG) 为主,也就是说 ETEC F18 可以黏附于绝大多数莱芜黑猪的小肠黏膜上皮细胞,但是并不发病。

所以除 FUT I 基因外,也许我国本地猪种有其他导致遗传抗性的突变或抗性基因,所以有必要对莱芜黑猪等中国地方猪种所具备的遗传抗性做更深入的研究,寻找、定位其相应的 QT 和抗性基因。L

#### 参考文献:

- [1] geli P, Bertschinger H U, Stamm M, et al. Genes specifying V receptors for F18 fimbriated Escherichia coli, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to Chromosome 6[J]. Anim Genet, 1996, 27 (5): 321 - 328.
- [2] Bertschinger H U, Bachmann M, Mettler C, et al. Adhesive fimbriae produced in vivo by Escherichia coli O139: K12 (B): H1 associated with enterotoxaemia in pigs [J]. Veterinary Microbiology, 1990, 25 (2 - 3): 267 - 281.
- [3] 罗艳茹. 仔猪 E. coli F18 黏附型与 FUT I 基因型相关性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [4] 李玉华, 李何君, 邱小田, 等. 大肠杆菌 K88 的黏附性与仔猪初生重、断奶重和口增重的关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43 (5): 1 - 3.
- [5] 吴圣龙, 原志伟, 鞠慧萍, 等. 苏太仔猪 FUT I 基因 M307 位点多态性与 F18 大肠杆菌抗病相关性的体外鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29 (10): 783 - 787.
- [6] 王继英, 姜运良, 郭建凤, 等. 猪 FUT I 基因多态性及其与生长性能的相关性分析 [J]. 华北农学报, 2008, 23 (4): 65 - 68.
- [7] 晏学明, 任军, 郭源梅, 等. 猪  $\alpha$  岩藻糖转移酶基因 (FUT I) 在 26 个中外猪种中的遗传变异研究 [J]. 遗传学报, 2003, 30 (9): 830 - 834.
- [8] 晏学明, 郭源梅, 丁能水, 等. 不同品种猪  $\alpha$  岩藻糖转移酶基因遗传变异初析 [J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40 (3): 8 - 10.
- [9] 施启顺, 谢新民, 柳小春, 等. 猪肠毒素大肠杆菌 ETEC F18 受体基因型检测报告 [J]. 遗传, 2002, 24 (6): 656 - 658.
- [10] 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.
- [11] 张引红, 周忠孝, 曹果清. FUT I 基因多态性及其与产仔性状的相关性研究[J]. 遗传, 2007, 29 (1): 52 - 56.
- [12] 孙鹏翔, 吴圣龙, 包文斌, 等. 苏太猪 FUT I 基因多态性及其与生产性能的相关分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43 (5): 4 - 6.
- [13] 姜勋平, 刘永刚, 熊远著, 等. 猪 FUT I 基因对肉质和胴体性状的影响[J]. 遗传, 2005, 27 (4): 566 - 570.
- [14] 何小平, 彭勇波, 樊. 猪  $\alpha$  岩藻糖转移酶基因多态性检测及与性状关联的研究[J]. 养猪, 2006, 26 (3): 26 - 28.
- [15] Cutler S A, Lonergan S M, Cornick N, et al. Dietary Inclusion of colicin E1 is effective in preventing postweaning diarrhoea caused by F182positive Escherichia coli in pigs[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51: 3830 - 3835.
- [16] Madec F, Bridoux N, Bounaix S, et al. Experimental models of porcine postweaning colibacillosis and their relationship to postweaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field[J]. Vet Microbiol, 2000, 72: 295 - 310.