

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研究

蒋 隽,施启顺,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 13 号染色体上与 K88ab 和 K88ac 受体基因连锁的 2 对引物(S0223 和 S0068),研究沙子岭猪和大约克猪的遗传差异性。结果表明,2 个猪种在 2 个基因座均存在多态性,其基因杂合度和 Shannon 信息指数存在很大差异,而中外猪种的 K88ab 和 K88ac 受体基因也存在遗传差异,这 2 对引物可望作为 K88ab 和 K88ac 受体基因的遗传标记。

关键词:ETEC;微卫星;基因杂合度;Shannon 信息指数;遗传标记

中图分类号:Q75

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)02-0160-03

The Genetic Variation of Two Microsatellite Markers of *Escherichia coli* F4(K88) Receptor in Different Swine Breeds

JIANG Juan, SHI Qi-Shun, LIU Xiao-Chun, HUANG Sheng-Qiang, HE Chang-Qing

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

Abstract: The genetic variation of ETEC F4 receptor in Shaziling and Yorkshire breeds were studied using two microsatellite markers(S0223 and S0068). The results showed that there were polymorphisms in the two markers, and there were great variations of the gene heterozygosity and Shannon information index in the two breeds. It was also reported that there were differences in K88ab and K88ac receptors in Chinese native breeds and foreign breeds, so the two markers might be the genetic markers of F4 receptor gene.

Key words: ETEC; microsatellite; gene heterozygosity; Shannon information index; genetic marker

仔猪泻痢给养猪生产造成巨大经济损失,而肠毒素大肠杆菌(ETEC)是导致仔猪腹泻的最重要的病原菌。ETEC 有多种黏附素,其中研究得比较详尽的有 F18 等黏附素^[1,2],而 F4(K88)是最常见的一种黏附素。已知 K88 抗原具有 K88ab、K88ac 和 K88ad3 种血清型变异,其中 K88ab 和 K88ac 受体基因已被精确定位于家猪 13 号染色体,且二基因座紧密连锁($\theta=0.01$)^[3]。另有报道表明,中国梅山猪中尚未发现 K88ab 和 K88ac 黏附表型,这与欧洲猪种有着显著差异^[4,5]。

本试验筛选了 S0068 与 S0223 2 对 13 号染色体上与 K88ab 和 K88ac 受体连锁的微卫星标记,研究中国地方猪种与外来猪种在这 2 个标记的多态性差异。以期探索这 3 个标记作为 K88 受体基因的遗传标记的可能性。

1 材料和方法

1.1 试验猪群

大约克猪 152 头采自湖南正虹种猪场,沙子岭猪 106 头采自湘潭沙子岭猪保种区。各样本采集耳

收稿日期:2003-03-13;修回日期:2003-07-14

基金项目:国家自然科学基金项目(30070553)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30070553)]

作者简介:蒋 隽(1973-),男,博士研究生,研究方向:动物遗传育种。E-mail: jiangjun1121@sohu.com

通讯作者:施启顺,男,教授,博导。Tel:0731-4618753,E-mail: yqyzz@public.cs.hn.cn

样,冷冻保存。

1.2 试验方法

1.2.1 微卫星引物

2 对引物均由 IOWA 大学 Rothshild 实验室惠赠。详见表 1。

1.2.2 模板 DNA 的提取

参照 Sambrook 等的方法^[6]。

1.2.3 PCR 反应体系及反应程序

反应体系为 10 μ L,其中含 50ng 模板 DNA,1 \times PCR 缓冲液,250 μ mol/L MgCl₂,200 μ mol/L dNTPs,

10pmol/L 引物,1U Taq 酶。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;35 个循环(94 $^{\circ}$ C 1min,60 或 62 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min);72 $^{\circ}$ C 后延伸 8min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 染色 扩增产物采用聚丙烯酰胺结合银染法。详见蒋隽的方法^[7]。

1.3 数据分析

计算 2 个猪种在不同基因座的基因杂合度 $H_k = 1 - \sum p_i^2$ 和 Shannon 信息指数 $S = -\sum p_i \ln p_i$ 。(p_i 指各等位基因的频率, $\ln p_i$ 指 p_i 的自然对数)。

表 1 微卫星引物及其反应条件

Table 1 The microsatellite primers and their reaction condition

| 引物号 Primer | 相对位置(cM) Relative position | 序列(F:正向,R:反向) Sequence(F:forward,R:reverse) | 退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature | Mg ⁺⁺ (mol/L) | 产物长度(bp) Product length |
|---------------|-------------------------------|--|--|--------------------------|----------------------------|
| S0223 | 59 | F:GCCTGAGAAATTCATATGC R:TTTAATCCTCACAAACACCTG | 60 | 2.5 | 124~146 |
| S0068 | 62.2 | F:AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT R:CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC | 62 | 2.5 | 216~260 |

2 结果与讨论

2.1 扩增产物分析

图 1 和图 2 分别是 S0068 和 S0223 微卫星基因座扩增的电泳图谱。可见这两个微卫星基因座的多态性很丰富。根据标记计算 S0068 标记的带纹长度在 220~268bp 之间,根据迁移率大小依次定为 1~4,长度分别为 220bp、235bp、254bp 和 268bp 稍微高出 USDA MARC database 报道的 216~260bp, S0223 扩增出的带纹长度在 123~161bp 之间,根据迁移率大小依次定为 1~4,长度分别为 123bp、136bp、147bp 和 161bp,也略超出 USDA MARC database 的 124~146bp。这是由于银染法灵敏度虽然很高,但估测的碱基长度却存在一定误差。

2.2 遗传差异性分析

将每条带纹作为一个等位基因,计算各等位基因的频率,结果见表 2。根据基因频率分别计算二个猪种在不同基因座的杂合度和 Shannon 信息指数,结果见表 3。

由表 2 可见,在 S0223 基因座,大约克猪主要为等位基因 2(0.597),等位基因 1 和 3 频率低(分别为 0.063 和 0.084)。沙子岭猪则等位基因 1 和 2 的频率均较高(分别为 0.306 和 0.342),等位基因 3 和 4 的频率相对较低(分别为 0.187 和 0.165)。在

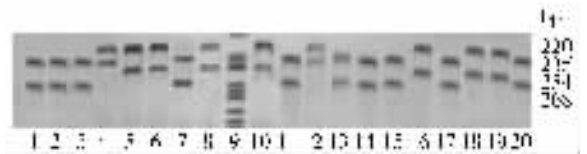


图 1 S0068 微卫星基因座电泳结果

1~8:大约克样本;9:Marker;10~20:沙子岭猪样本。

Fig.1 The electropherogram results of microsatellite S0068

1~8:Yorkshire breed;9:Marker;10~20:Shaziling breed.

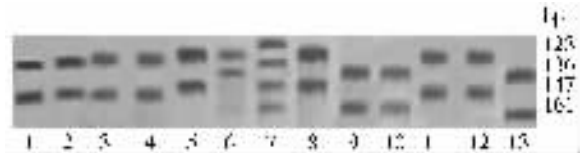


图 2 S0223 微卫星基因座电泳结果

1~6:大约克样本;7:Marker;8~13:沙子岭猪样本。

Fig.2 The electropherogram results of microsatellite S0223

1~6:Yorkshire breed;7:Marker;8~13:Shaziling breed.

S0068 基因座,大约克猪等位基因 1 和 3 频率较高(分别为 0.520 和 0.398),而等位基因 2 和 4 的频率很低(分别为 0.048 和 0.034)。沙子岭猪则 4 个等位基因的频率差异相对较小。可见这两个猪种在不同基因座具有各自的特点。而且基因杂合度与 Shannon 信息指数存在相关。但后者的变异幅度更大,更能反映群体的多样性。

表 2 2 个猪种在不同微卫星基因座的基因频率

Table 2 The gene frequency of the 2 breeds at 2 microsatellite loci

| 品 种 Breed | 基因座 Locus | 样本数 Number of samples | 带纹数 Number of bands | 等位基因频率 Allele frequency | | | |
|----------------|--------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 沙子岭猪 Shaziling | S0223 | 106 | 4 | 0.306 | 0.342 | 0.187 | 0.165 |
| 大约克猪 Yorkshire | S0223 | 158 | 4 | 0.063 | 0.597 | 0.084 | 0.256 |
| 沙子岭猪 Shaziling | S0068 | 106 | 4 | 0.313 | 0.265 | 0.186 | 0.236 |
| 大约克猪 Yorkshire | S0068 | 158 | 4 | 0.520 | 0.048 | 0.398 | 0.034 |

表 3 2 个猪种在不同微卫星基因座基因杂合度及 Shannon 信息指数

Table 3 The gene heterozygosity and Shannon information index of the 2 breeds at 2 microsatellite loci

| 猪 种 Breed | 微卫星 Microsatellite locus | 样本数 Number of samples | 带纹数 Number of bands | 基因杂合度 Heterozygosity | Shannon 信息指数 Shannon information index |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|---|
| 沙子岭猪 Shaziling | S0223 | 152 | 4 | 0.727 | 1.340 |
| 大约克猪 Yorkshire | S0223 | 206 | 4 | 0.567 | 1.030 |
| 沙子岭猪 Shaziling | S0068 | 152 | 4 | 0.742 | 1.369 |
| 大约克猪 Yorkshire | S0068 | 206 | 4 | 0.568 | 0.852 |

由表 3 可见,沙子岭猪在 S0223 基因座的杂合度和 Shannon 信息指数分别为 0.727 和 1.34,而大约克猪基因杂合度和 Shannon 信息指数值低于沙子岭猪(分别为 0.567 和 1.03)。在 S0068 基因座,沙子岭猪的杂合度(0.742)和 Shannon 信息指数(1.369)也高于大约克猪的基因杂合度(0.568)和 Shannon 信息指数(0.852)。这表明沙子岭猪的基因多样性要高于大约克猪。

根据国外研究,大白猪中存在 K88ab 和 K88ac 黏附表型,而在梅山猪等中国地方猪种未发现 K88ab 和 K88ac 黏附表型^[4,5],表明中外猪种的 K88ab 和 K88ac 受体基因座可能存在遗传差异。这可能就是中外猪种仔猪腹泻的发病率存在差异的原因。本次试验选取 2 个与之连锁的微卫星标记,分别以沙子岭猪和大约克猪作为研究对象,探索其遗传差异性。结果表明,沙子岭猪和大约克猪在 S0223 和 S0068 2 个微卫星标记基因座均存在很大差异。暗示这 2 个微卫星标记可望作为 K88 受体的遗传标记。由于目前国内外尚无关于对 K88 受体基因进行 PCR 扩增的引物的报道,探索与之连锁的遗传标记具有重要意义。

参 考 文 献 (References):

[1] SHI Qi-Shun, HUANG Sheng-Qiang, LIU Xiao-Chun, HE Chang-Qing, JIANG Juan. Polymorphism of *E. coli* F18 receptor gene in different pig breeds. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(3): 221~224.

施启顺, 黄生强, 柳小春, 贺长青, 蒋 隽. 不同猪种 *E. coli* F18 受体基因的多态性. *遗传学报*, 2003, 30(3): 221~224.

- [2] SHI Qi-Shun, XIE Xin-Min, LIU Xiao-Chun, HUANG Sheng-Qiang, HE Chang-Qing. Experimental results on Enterotoxigenic *E. coli* F18 receptor genotypes. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(6): 656~658.
- 施启顺, 谢新民, 柳小春, 黄生强, 贺长青. 猪肠毒素大肠杆菌 (ETEC) F18 受体基因检测报告. *遗传*, 2002, 24(6): 656~658.
- [3] Edfors-Lilja, U Gustafsson, 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. *Animal Genetics*, 1995, 26: 234~242.
- [4] Chappuis J P, Duval Duval-Iflah Y, Ollivier L. *Escherichia coli* K88 adhesin: a comparison of Chinese and Large White piglets. *Genetique, Selection and Evaluation*, 1984, 16: 358~390.
- [5] Michaels R D, Whipp S C, Rothschild M F. Resistance of Chinese Meishan, Fengjing and Minzhu pigs to the K88+ strain of *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research*, 1994, 55: 333~338.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T EDITED (JIN Dong-Yan, LI Meng-Feng transtrated). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd edition). Beijing: Science Press, 1992.
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇等著 (金冬雁, 黎孟枫等译). *分子克隆实验指南* (第二版). 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] JIANG Juan, SHI Qi-Shun, WU Xiao-Lin, LIU Xiao-Chun, HE Chang-Qing. Association of SSC1 microsatellite markers with backfat thickness in pigs. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2002, 28(2): 132~134.
- 蒋 隽, 施启顺, 吴晓林, 柳小春, 贺长青. 家猪 1 号染色体微卫星标记与背膘厚的相关性. *湖南农业大学学报*, 2002, 28(2): 132~134.