

猪 *FUT2* 基因沉默对其所在通路基因表达及小肠上皮细胞 *E. coli* F18 黏附能力的影响

孙 丽¹, 宗秋芳¹, 吴 森¹, 吴嘉韵¹, 吴圣龙^{1,2}, 包文斌^{1,2*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 扬州大学教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 扬州 225009)

摘 要: 旨在细胞水平上进一步探讨 *FUT2* 基因的功能及其在猪小肠上皮细胞受到 F18 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 侵染时的调控机制, 为提高仔猪对 F18 大肠杆菌病抵抗力的分子选育提供理论基础。运用 Real-time PCR 方法检测分析 *FUT2* 基因在大肠杆菌 F18ab、F18ac 感染和脂多糖 (LPS) 诱导小肠上皮细胞前后的 mRNA 表达差异, 并采用 Western blotting 方法检测大肠杆菌 F18ab、F18ac 感染小肠上皮细胞前后 *FUT2* 的蛋白表达差异; 同时设计并构建猪 *FUT2* 基因慢病毒干扰载体, 筛选并获得 *FUT2* 基因稳定沉默的小肠上皮细胞系, 检测 *FUT2* 基因沉默对其所在球系列鞘糖脂生物合成通路其他关键基因 (*FUT1*、*ST3GAL1*、*HEXA*、*HEXB*、*B3GALNT1*、*NAGA*) 表达以及小肠上皮细胞 *E. coli* F18 黏附能力的影响。结果表明, 在 F18 大肠杆菌感染和 LPS 诱导小肠上皮细胞后, *FUT2* 基因的 mRNA 相对表达水平均极显著升高 ($P < 0.01$), 同时大肠杆菌感染后小肠上皮细胞的 *FUT2* 蛋白表达上升。此外, 本研究成功构建 *FUT2* 基因慢病毒干扰载体, 并获得 *FUT2* 基因稳定沉默的小肠上皮细胞系; *FUT2* 基因沉默后, 其所在的球系列鞘糖脂生物合成通路其他关键基因的表达都存在不同程度的下降, 其中 *FUT1* 基因表达水平显著下调 ($P < 0.05$), *ST3GAL1*、*HEXA* 和 *HEXB* 基因表达水平极显著下调 ($P < 0.01$), 而 *B3GALNT1* 和 *NAGA* 基因表达水平未发生显著变化, 同时 *FUT2* 基因沉默后 F18 大肠杆菌对小肠上皮细胞的黏附能力显著降低。结果显示, *FUT2* 基因低表达可能不利于仔猪大肠杆菌受体的形成, 以增强猪小肠上皮细胞抵抗 *E. coli* F18 感染的能力, 本试验结果同时为球系列鞘糖脂生物合成通路在仔猪抗大肠杆菌感染过程中的作用机制研究提供一定的理论基础和依据。

关键词: 猪; *FUT2* 基因; RNAi; 大肠杆菌; 球系列鞘糖脂生物合成通路

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)11-2034-12

The Effects of *FUT2* Gene Silencing on the Expression of Genes Involved in Glycosphingolipid Biosynthesis-globo Series Pathway and the Adhesion of *E. coli* F18 to Small Intestinal Epithelial Cells

SUN Li¹, ZONG Qiu-fang¹, WU Sen¹, WU Jia-yun¹, WU Sheng-long^{1,2}, BAO Wen-bin^{1,2*}

(1. Key Laboratory for Animal Genetics, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology,

Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Joint International Research Laboratory of Agriculture & Agri-Product Safety, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The purpose of this study was to further explore the function of *FUT2* and its regulation mechanisms in swine epithelial cells infected by *E. coli* F18 at the cellular level, which provide

收稿日期: 2017-05-02

基金项目: 国家自然科学基金(31572360; 31372285); 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2015329; BE2016315); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 孙 丽(1992-), 女, 江苏如皋人, 博士生, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: sl19920327@163.com

* 通信作者: 包文斌, 博士, 研究员, 博导, 主要从事猪抗病育种研究, E-mail: wbbao@yzu.edu.cn

theoretical basis for molecular breeding of improving the resistance of piglets to *E. coli* F18. The expression differences of *FUT2* gene in intestinal epithelial cells before and after *E. coli* F18ab, F18ac infection and lipopolysaccharide(LPS) induction were detected by Real-time PCR. Then, the Western blotting was performed to identify the protein expression differences of *FUT2* in intestinal epithelial cells before and after *E. coli* F18ab and F18ac infection. Meanwhile the lentiviral interference vectors of porcine *FUT2* were designed and constructed, and the intestinal epithelial cells line with *FUT2* gene silencing was obtained. The effects of *FUT2* gene silencing on the mRNA expression of key genes (*FUT1*, *ST3GAL1*, *HEXA*, *HEXB*, *B3GALNT1*, *NAGA*) involved in glycosphingolipid biosynthesis-globo series pathway and on *E. coli* F18 adhesion to intestinal epithelial cells were further analyzed. The results showed that the *FUT2* expression levels in intestinal epithelial cells were significantly increased after *E. coli* infection and LPS induction ($P < 0.01$), and the *FUT2* expression level in intestinal epithelial cells was also increased after *E. coli* infection. Moreover, the lentiviral interference vectors of porcine *FUT2* were successfully constructed, and the intestinal epithelial cells line with *FUT2* gene silencing were obtained. After *FUT2* gene silencing, the expression level of key genes in glycosphingolipid biosynthesis-globo series pathway were decreased at different degrees. The expression level of *FUT1* after *FUT2* silencing was significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression levels of *ST3GAL1*, *HEXA*, *HEXB* were extremely significantly reduced ($P < 0.01$), while the expression levels of *B3GALNT1* and *NAGA* genes showed no significant changes. In addition, the adhesion ability of *E. coli* F18 to swine epithelial cells was decreased significantly ($P < 0.05$). These results show that the lower expression level of *FUT2* may hinder the formation of *E. coli* F18 receptor, and thus elevate the resistance capability of porcine small intestine epithelial cells to *E. coli* F18 infection. Our findings can also provide theoretical foundations and evidence for further investigating on the mechanisms of glycosphingolipid biosynthesis-globo series pathway in resistance of pigs to *E. coli* infection.

Key words: swine; *FUT2* gene; RNAi; *Escherichia coli*; glycosphingolipid biosynthesis-globo series pathway

F18 大肠杆菌(*E. coli* F18)属于产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC),是造成当今断奶仔猪腹泻高发病率和死亡率的主要病原菌之一^[1-2]。F18 大肠杆菌通过表面的宿主特异性肠吸附菌毛(黏附素)特异性吸附于小肠上皮细胞表面的刷状缘受体,定居并大量繁殖,随后产生肠毒素(Enterotoxin)和内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)进入细胞内,使细胞壁损伤,刺激肠上皮细胞分泌大量液体进入肠腔并发挥病理效应,从而导致仔猪腹泻、脱水甚至死亡^[3-5]。小肠上皮细胞是猪抵抗肠道致病菌的第一道防线,是与革兰氏阴性菌及其释放的脂多糖(LPS)直接作用的细胞,它的病变将会导致仔猪的腹泻和水肿等症状的出现。研究发现,大肠杆菌 F18 受体的最小抗原决定簇为 ABH 血型抗原中的 1 型 H 抗原,该抗原主要由 *FUT2* 酶

催化^[6-7]并在球系列鞘糖脂生物合成通路中合成^[8]。

本课题组前期研究发现,鞘糖脂生物合成-球系列通路可能对断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性具有重要的调控作用^[9],并初步确定鞘糖脂生物合成-球系列通路中 α -(1,2)岩藻糖转移酶基因(*FUT1*、*FUT2* 基因)对 F18 大肠杆菌病抗性具有关键的调控作用^[10]。*FUT1*、*FUT2* 基因在染色体上呈串联形式排列^[11],两者共同调控 α -(1,2)岩藻糖转移酶的功能活性,催化 ABH 血型抗原中 1 型 H 抗原的形成,从而影响 F18 大肠杆菌受体的形成及 F18 大肠杆菌的黏附^[12]。研究发现,*FUT1* 基因可以影响 *E. coli* F18 受体蛋白的表达,该基因存在 2 个突变位点 M307 和 M857 位点,且 M307 位点的遗传变异可作为猪抗 *E. coli* F18 育种的遗传标记,并已实现了多个国外品种的抗病育种^[13-14]。然而本课题

组及其他学者发现,在 20 多个中国地方猪品种中 *FUT1* 基因 M307 和 M857 位点均呈现极端偏态分布^[15-18];在国外猪品种中抗 *E. coli* F18 育种得以应用的 *FUT1* 遗传标记可能不适合中国地方猪品种,需要寻求新的适合中国地方猪品种的重要候选基因及其有效遗传标记;基于 *FUT2* 的生物学功能和前期研究结果,开展 *FUT2* 基因的功能及其与 *E. coli* F18 抗性关系的研究无疑具有重要的科学意义和应用前景。本课题组前期在 mRNA 水平上的研究进一步表明,*FUT2* 基因在 *E. coli* F18 抗性组猪十二指肠和空肠的表达量极显著低于敏感组,且 *FUT2* 基因的表达与 *FUT1* 基因呈极显著正相关,两者都参与 *E. coli* F18 的抗性调控^[19]。迄今为止,关于猪 *FUT2* 基因的研究大多集中在探讨基因多态和表达与仔猪抗大肠杆菌病的关系,还需要在细胞水平上开展功能研究及验证工作。

RNAi 技术是目前发展起来的基因阻断技术之一,是现今生物学研究的一种重要手段。它能够在细胞水平上研究基因在信号通路和动物个体中的功能,从而改善动物的遗传性状,提高经济价值,甚至能提高动物的抗病力,防治疾病^[20-22]。本试验利用大肠杆菌刺激和脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导处理猪肠上皮细胞系(IPEC-J2),检测处理前后 *FUT2* 基因 mRNA 水平相对表达量,分析大肠杆菌感染和 LPS 诱导条件下 *FUT2* 基因的表达变化规律,同时设计并构建靶向猪 *FUT2* 基因的 shRNA 干扰序列及阴性对照,进行慢病毒包装,转染猪小肠上皮细胞系,利用 Real-time PCR 方法检测干扰效率,选择效率最高的慢病毒进行后续功能验证,获得 *FUT2* 基因稳定沉默的肠上皮细胞后,分析 *FUT2* 基因沉默对其所在细胞鞘糖脂生物合成通路其他关键基因(*FUT1*、*ST3GAL1*(β -半乳糖苷 a-2,3-唾液酸转移酶 1)、*HEXA*(β -N-乙酰半乳糖胺酶 A)、*HEXB*(β -N-乙酰半乳糖胺酶 B)、*B3GALNT1*(β -1,3-N-乙酰基半乳糖基转移酶 1)、*NAGA*(N-乙酰基半乳糖苷酶 A))表达以及对小肠上皮细胞 *E. coli* F18 黏附能力的影响,在细胞水平上探讨 *FUT2* 的功能,以期研究 *FUT2* 基因及其所在通路在猪肠上皮细胞受到 *E. coli* F18 侵染时的调控作用及其分子机制提供基础,同时为今后提升仔猪抗大肠杆菌侵染能力的分子选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪小肠上皮细胞系 IPEC-J2 由美国宾夕法尼亚大学惠赠;人胚肾上皮细胞 293T 购自中国科学院细胞库;大肠杆菌 F18ab、F18ac 由扬州大学朱国强教授馈赠。DMEM/F12(1:1)培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、Opti-MEM、Trypsin-EDTA Solution 及 Polybrene 均购自 Gibco BRL(Life Technologies, Grand island, NY, USA);LPS 购自 Sigma 公司(Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA);Trizol 购自 Invitrogen 公司(美国);反转录试剂盒、SYBR 定量试剂盒购自 Vazyme 公司(中国,南京);穿梭质粒 pGLV3/H1/GFP + Puro 和包装质粒 pGag/Pol、pRev、pVSV-G 由上海吉玛构建制备;RNAi-Mate 转染试剂、T4 DNA 连接酶、质粒中提试剂盒均购自 Invitrogen 公司(美国)。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 数据库提供的猪 *FUT2* 基因序列(U70881.2)设计 4 个针对 *FUT2* 基因的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)干扰序列(表 1);并设计鞘糖脂生物合成通路 7 个关键基因序列的实时荧光定量 PCR 引物。所有荧光定量引物片段大小均在 100 bp 左右,且都跨外显子设计,以避免基因组 DNA 污染;使用 *GAPDH* 基因作为内参基因,规范所有其他组织产物的循环阈值(CT)。同时根据大肠杆菌菌毛蛋白基因 *PILIN* 设计荧光定量引物,并设计猪 β actin 基因的荧光定量引物,用细胞基因 β actin 作为内参对细菌菌毛基因 *PILIN* 进行均一化。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。引物的详细信息如表 2 所示。

1.3 大肠杆菌 F18ab、F18ac 菌体感染和 LPS 诱导 IPEC-J2 细胞

将大肠杆菌 F18ab、F18ac 分别接种于 LB 培养液,200 r·min⁻¹ 摇菌 12 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集菌体,用 PBS 缓冲液重悬洗涤并离心,重复 3 次。最后用细胞培养液将细菌稀释至 1.0 × 10⁹ CFU·mL⁻¹,按每孔 1 mL 的量加入细胞培养孔,每组有 3 个平行样,4 h 后收集细胞。

将 LPS 用细胞培养液稀释至 0.1 μ g·mL⁻¹,按每孔 1 mL 的量加入细胞培养孔进行诱导,阴性对照组只加用于配置诱导液的细胞培养液,每组有 3 个平行样。分别在诱导后的 4、8、12 h 收集细胞。

表 1 shRNA 寡聚单链 DNA 序列

Table 1 The oligomeric single stranded DNA sequence of shRNAs

名称 Name	oligo 序列(5'→3') oligo sequence
1F	<i>GATCC</i> <u>GTGTAACCACACTGTCATGACTTCAAGAGA</u> <u>GTCATGACAGTGTGGTTACACTTTTTTG</u>
1R	<i>AATTCAAAAAA</i> <u>GTGTAACCACACTGTCATGACTCTCTTGAA</u> <u>GTCATGACAGTGTGGTTACACG</u>
2F	<i>GATCC</i> <u>GACCATCTACCTGGCCAATTATTCAAGAGA</u> <u>TAATTGGCCAGGTAGATGGTCTTTTTTG</u>
2R	<i>AATTCAAAAAA</i> <u>GACCATCTACCTGGCCAATTATCTCTTGAA</u> <u>TAATTGGCCAGGTAGATGGTTCG</u>
3F	<i>GATCC</i> <u>GACTCTCCCTTCCTCAAACCTCTTCAAGAGA</u> <u>GAGTTTGAGGAAGGGAGAGTCTTTTTTG</u>
3R	<i>AATTCAAAAAA</i> <u>GACTCTCCCTTCCTCAAACCTCTCTCTTGAA</u> <u>GAGTTTGAGGAAGGGAGAGTCG</u>
4F	<i>GATCC</i> <u>GGAGCACACATTGTTCCATGTTTCAAGAGA</u> <u>ACATGGAACAATGTGTGCTCCTTTTTTG</u>
4R	<i>AATTCAAAAAA</i> <u>GGAGCACACATTGTTCCATGTTCTCTTGAA</u> <u>ACATGGAACAATGTGTGCTCCG</u>
N-F	<i>GATCC</i> <u>TTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGA</u> <u>AGTTAGTTGGGACTTTGTTGCTTTTTTG</u>
N-R	<i>AATTCAAAAAA</i> <u>TTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAA</u> <u>AGTTAGTTGGGACTTTGTTGCG</u>

斜体部分为引入酶切位点, 双下划线部分为干扰序列及其互补序列, 单下划线部分为 loop 序列

The italic parts are the introduced enzyme digestion loci, the double underlines are the interference sequences and their complementary sequences, and the single underlines represent the loop sequences

表 2 Real-time PCR 引物信息

Table 2 The information of Real-time PCR primer

基因名称 Name	GenBank 登陆号 Accession No.	引物序列(5'→3') Sequence	片段大小/bp Length
<i>FUT1</i>	U70883	F: TTTTAAGCCCCAAACTGCC R: TAAATCGACCCCATCAGCCTC	126
<i>FUT2</i>	U70881.2	F: AATCCCTGACCTCACTCCGTG R: CGGAACTACAACCTGCTGGCC	123
<i>ST3GAL1</i>	M97753.1	F: TGGTTCGATGAGCGATTCAAC R: ATTCTTTCCGCGCCTGTTTA	140
<i>HEXA</i>	EU442572.1	F: CGCACACCTTCCAGTTCAG R: GCGAAAGTGCAAAGTCACG	123
<i>HEXB</i>	AB529531.1	F: TGGCTTCCCTGTGATCCTTTC R: GCCAAGGACACGCTTCTCTC	133
<i>B3GALNT1</i>	NM_214351.1	F: GCTAAGGAACACCACATGCCA R: GCGACTCAGTGACCTTCCCAT	137
<i>NAGA</i>	EU442573.1	F: AACCTGATGCCTGATCCCAAG R: AACCCATGCAGGTGAAGCTG	121
<i>GAPDH</i>	AF017079.1	F: ACATCATCCCTGCTTCTACTGG R: CTCGGACGCTGCTTCAC	187
<i>PILIN</i>	M25302.1	F: AGGCCGAACCAAAGAAGCAT R: TCACCATCAGGGTTTCTGAGT	117
<i>βactin</i>	NC_010445.3	F: GTCGFACTCCTGCTTGCTGAT R: CCTTCTCCTTCCAGATCATCGC	119

1.4 荧光定量检测大肠杆菌 F18ab、F18ac 菌体感染和 LPS 诱导 IPEC-J2 细胞后的基因表达变化

利用 Trizol 法提取所收集细胞的总 RNA, 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和核酸/蛋白浓度测定仪 NanoDrop ND-1000 检测 RNA 的纯度和浓度, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。以每个个体的 RNA 作为模板按照反转录试剂盒操作程序进行 cDNA 合成: 每 10 μL 的反应体系中含 $5\times\text{qRT SuperMix II } 2\text{ }\mu\text{L}$, 总 RNA 不超过 500 ng, RNase-free ddH₂O 补足至 10 μL 。反应条件: $25\text{ }^{\circ}\text{C } 10\text{ min}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ min}$, $85\text{ }^{\circ}\text{C } 5\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

荧光定量 PCR 反应体系 20 μL : cDNA (100~500 ng) 2 μL , 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , $50\times\text{ROX Reference Dye II } 0.4\text{ }\mu\text{L}$, $2\times\text{AceQ}^{\text{TM}}\text{ qPCR SYBR Green Master Mix } 10\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O 6.8 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C } 5\text{ min}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C } 10\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 34\text{ s}$, 40 个循环; 扩增结束后分析熔解曲线, 程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$; $95\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 15\text{ s}$ 。应用熔解曲线检测其是否具有 $(85\pm 0.8)\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tm 扩增的特异性, 每个样本进行 3 次实时 PCR 检测, 取平均值。

1.5 Western blotting 检测

以大肠杆菌感染前后的细胞为样本, 使用 NEPER 试剂盒提取细胞总蛋白, 并通过 BCA 试剂盒检测蛋白含量, 使蛋白质水平标准化。SDS-PAGE (10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳): 取 10 μL 蛋白质上样, 160 V 跑胶 70 min。Western blotting (蛋白印迹): 蛋白质转移到 PVDF (聚丙烯二氟乙烯) 膜上, 与相关抗体进行免疫印迹, FUT2 抗体 (1:500) 作为一抗, 兔原抗体 (1:3000) IgG 作为二抗, β -actin 抗体作为参照。

1.6 干扰载体构建

将合成的 5 对 oligo 序列分别通过退火处理成双链, 克隆入 pGLV3/H1/GFP+Puro 载体。退火程序: 正反单链 ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 5 μL , 退火缓冲液 ($10\times$) 2 μL , 双蒸水 8 μL , 置于 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 然后室温自然冷却 20 min, 形成双链。连接程序: 连接缓冲液 ($5\times$) 4 μL , 双链 DNA ($10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL , pGLV3 ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 2 μL , T4 DNA 连接酶 ($1\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , 双蒸水 9 μL , 室温连接处理 30 min。连接产物分别转化感受态细胞 DH5 α , 在含氨苄青霉素的固体培养基上培养 16 h, 挑取多个单克隆提取质粒并进行测序验证。经测序验证序列

连接正确后, 抽提高纯度质粒备用。

1.7 慢病毒载体包装及滴度测定

293T 细胞在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 的培养箱中培养至覆盖率达到 80%, 按照 RNAi-Mate 转染说明书将慢病毒重组载体与包装质粒共转染 293T 细胞, 72 h 后收集培养液 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 4 min, 取上清, 去除细胞和碎片, 并用 0.45 μm 的滤器过滤; 将病毒原液在 $20\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下超速离心 2 h, 去除上清, 重悬于 Opti-MEM 培养液中。

用含 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Polybrene、10% FBS 的 DMEM 培养液, 按 10 倍梯度稀释病毒液, 每梯度各取 100 μL 加入培养有 293T 细胞的 96 孔板, 每梯度 3 个重复孔。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后, 吸弃稀释病毒液, 加 10% FBS 的 DMEM 培养液, 继续培养 48 h。在荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量, 病毒滴度为各孔中表达荧光的细胞平均数除以每孔中含有的慢病毒液体积。

1.8 病毒液侵染猪 IPEC-J2 细胞及干扰效率验证

取滴度为 $1\times 10^8\text{ TU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 pGLV3-FUT2-shRNA 及阴性对照病毒液 10 μL , 加入指数生长期 IPEC-J2 细胞的 12 孔板中, 同时设置不转染的正常细胞组。48 h 后观察荧光情况, 使用 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素进行药物筛选, 每 24 h 换 1 次含灭嘌呤霉素的新鲜培养液, 荧光显微镜下观察阳性细胞情况, 直至正常细胞全部死亡停止加药。收集细胞总 RNA, 检测 FUT2 基因相对表达情况, 并计算干扰效率。

1.9 定量检测 FUT2 基因沉默对 IPEC-J2 细胞中球系列鞘糖脂生物合成通路相关基因表达的影响

选择干扰效率最高的慢病毒载体侵染后的细胞继续培养, 加嘌呤霉素维持, 获得 FUT2 基因沉默的 IPEC-J2 细胞系, 分别将 FUT2 干扰组、阴性对照组及空白对照组处理的细胞以 5.0×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 密度接种至 12 孔板培养。收集细胞提取总 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测 FUT2 基因沉默对 IPEC-J2 细胞中球系列鞘糖脂生物合成通路关键基因表达的影响 (FUT1、FUT2、ST3GAL1、HEXA、HEXB、B3GALNT1、NAGA), 比较分析干扰 FUT2 基因表达对通路中其他基因表达水平的影响, 以分析 FUT2 基因在球系列鞘糖脂生物合成通路中的作用。

1.10 FUT2 基因沉默对大肠杆菌黏附能力的影响

上述 3 组细胞按 5.0×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度分别接种到 12 孔板, 培养至细胞铺满整个孔室。大肠

杆菌 F18ab 和 F18ac 分别接种至 LB 培养液, 37 °C 摇床 200 r · min⁻¹ 培养 12 h, 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 收集菌体, PBS 缓冲液重悬洗涤并离心, 重复 3 次。用细胞培养液将细菌稀释至 1.0 × 10⁹ CFU · mL⁻¹, 向培养板中分别加入 1.0 mL 细菌悬液, 各 3 个重复, 37 °C 5% CO₂ 培养箱孵育 1 h。弃去培养孔中细菌液, PBS 洗涤 3 次,

一板用超纯水配制的 0.5% Triton X-100 溶液处理 20 min, 再用移液器收集细菌悬液并按 10 倍浓度进行梯度稀释, 涂布于 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 统计平板上菌落个数。一板立即向其中加入 DNA 提取试剂盒裂解液, 严格按照试剂盒说明提取细胞和细菌 DNA。以抽提细菌和细胞混合 DNA 为模板, 每个样本 3 个重复孔, 以相对定量模式进行定量检测。

1.11 数据处理与分析

采用 2^{-ΔΔCt} 法^[23] 处理相对定量的结果, 用内参基因对表达水平进行均一化。使用下列公式: ΔΔCt = (待测组目的基因平均 Ct 值 - 待测组内参基因平均 Ct 值) - (对照组目的基因平均 Ct 值 - 对照组内参基因平均 Ct 值)。利用 SPSS 16.0 软件的一般线性模型 (General Linear Model, GLM) 对细胞感染细菌前后、LPS 不同处理时间、RNAi 基因前后的细胞基因表达差异情况及干扰前后的细胞黏附情况进行比较分析。

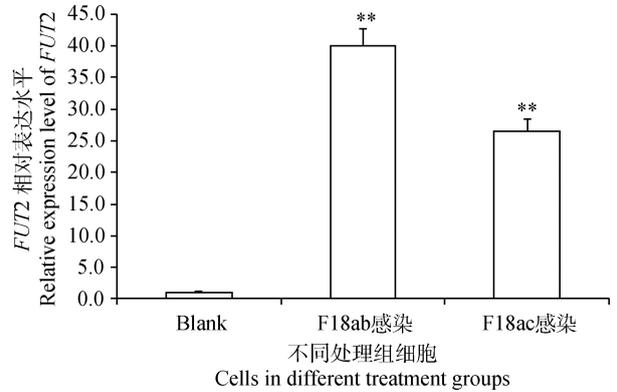
2 结果

2.1 *FUT2* 基因在大肠杆菌感染猪小肠上皮细胞后的 mRNA 表达水平变化

大肠杆菌 F18ab 和 F18ac 菌体分别感染 IPEC-J2 细胞后, 细胞 *FUT2* 基因的表达量呈极显著上升 ($P < 0.01$), 且大肠杆菌 F18ab 感染 IPEC-J2 细胞后的 *FUT2* 基因表达水平高于 F18ac 感染后的细胞。

2.2 LPS 诱导 IPEC-J2 后不同时间 *FUT2* 基因表达量的差异

以空白对照组 *FUT2* 基因的表达量为 1, 对 LPS 不同诱导阶段 IPEC-J2 细胞中 *FUT2* 基因的荧光定量结果进行统计, 发现在 0.1 μg · mL⁻¹ 的 LPS 诱导后, 随诱导时间的延长 *FUT2* 基因表达呈阶梯状增长, 如图 2 所示。在 LPS 诱导 4、8 和 12 h 后, *FUT2* 基因表达量均极显著高于空白对照 ($P < 0.01$), 但 3 个不同时间点之间 *FUT2* 基因表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。



Blank. 空白处理组细胞; * * . 表示差异极显著 ($P < 0.01$). 下同

Blank stands for the cells without any treatment; * * . Means extremely significant difference between the treatments ($P < 0.01$). The same as below

图 1 *FUT2* 基因在大肠杆菌菌体感染细胞后的 mRNA 相对表达水平

Fig. 1 The mRNA expression level of *FUT2* gene in cells infected by *Escherichia coli*

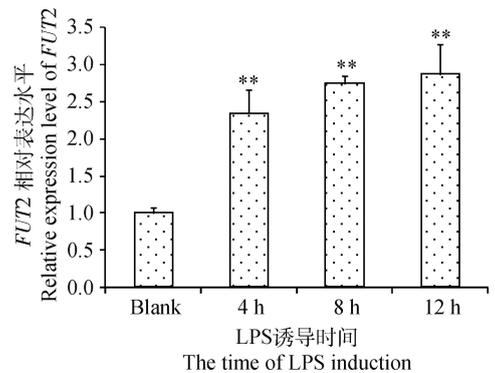


图 2 0.1 μg · mL⁻¹ LPS 诱导 IPEC-J2 后 *FUT2* 基因的表达量

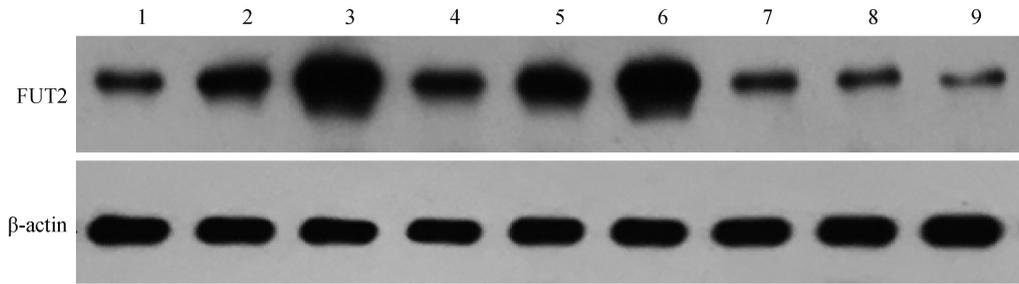
Fig. 2 The expression of *FUT2* in IPEC-J2 induced by 0.1 μg · mL⁻¹ LPS

2.3 Western blotting 分析大肠杆菌感染 IPEC-J2 后 *FUT2* 蛋白的表达

从图 3 可以看出, 大肠杆菌 F18ab 和 F18ac 感染 IPEC-J2 后 *FUT2* 蛋白表达水平高于对照组。这与 mRNA 相对定量的结果一致。

2.4 干扰载体构建与慢病毒液滴度测定

通过对所挑取阳性克隆进行测序验证, 最终获得连接正确的 4 个干扰和 1 个阴性对照慢病毒重组质粒载体, 分别命名为 pGLV3-*FUT2*-1、pGLV3-*FUT2*-2、pGLV3-*FUT2*-3、pGLV3-*FUT2*-4 和 pGLV3-*FUT2*-NC。包装成功后收集病毒液进行病毒滴度检测和计算: 4 个干扰载体滴度均为 3 × 10⁸ TU · mL⁻¹, 阴性对照为 2 × 10⁸ TU · mL⁻¹, 该滴度水平达到了细胞感染的要求。用 Opti-MEM 培养液将慢病毒液稀释至 1 × 10⁸ TU · mL⁻¹, 并分装保存于 -80 °C。



1~3. F18ab 感染组;4~6. F18ac 感染组;7~9. 对照组

1-3. F18ab infection group; 4-6. F18ac infection group; 7-9. The control group

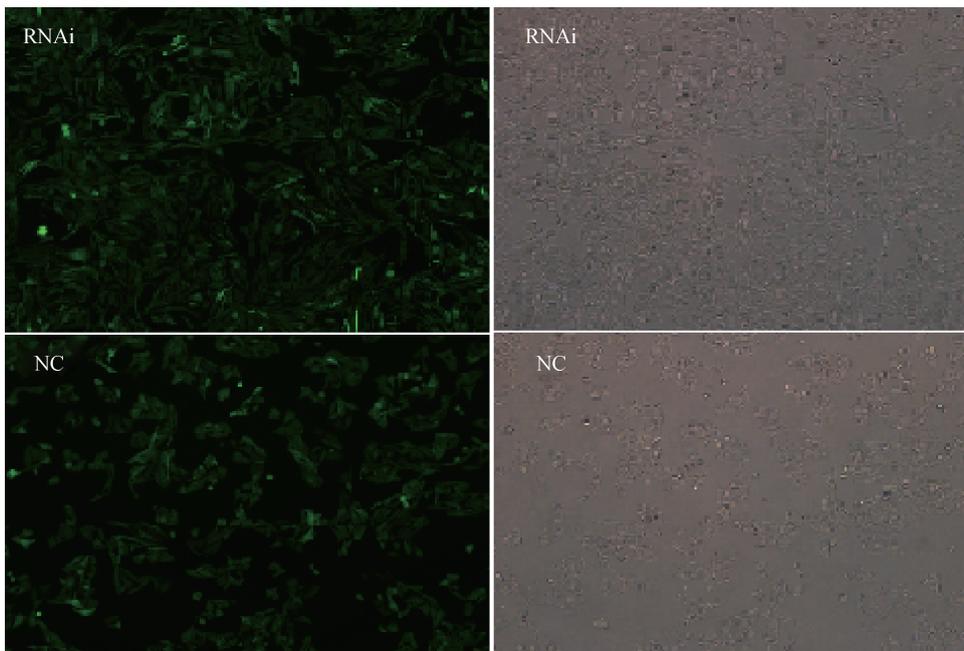
图 3 *FUT2* 蛋白在大肠杆菌 F18ab 和 F18ac 菌体感染 IPEC-J2 细胞前后的差异表达

Fig. 3 Differential expression of *FUT2* protein before and after *E. coli* F18ab and F18ac infection

2.5 慢病毒载体干扰效率验证

由图 4 可知,慢病毒侵染 IPEC-J2 细胞后,细胞能表达绿色荧光蛋白;药物筛选 72 h 后均能持续稳定表达绿色荧光蛋白,表明慢病毒载体已成功转染细胞并稳定表达。提取总 RNA 进行实时荧光定量

检测 *FUT2* 基因转录水平表达情况,由图 5 可知,pGLV3-*FUT2*-2 处理的 IPEC-J2 细胞中猪 *FUT2* 基因相对表达水平为 0.13,干扰效率为 87%,即 pGLV3-*FUT2*-2 干扰效率最高,可用于后续试验。



RNAi 表示 *FUT2* 基因干扰,NC 表示阴性对照。左列是荧光显微镜下观察到的细胞,右列是普通光镜下与左侧相同视野的对照

RNAi represent *FUT2* gene interference, and NC represent negative control. The left are cells observed by the fluorescence microscope, and the right are the control of the same view in left observed by ordinary light microscope

图 4 pGLV3-*FUT2*-shRNA 病毒颗粒侵染 IPEC-J2 细胞荧光效果(40×)

Fig. 4 Fluorescence effect of pGLV3-*FUT2*-shRNA virus particles infecting IPEC-J2 cells(40×)

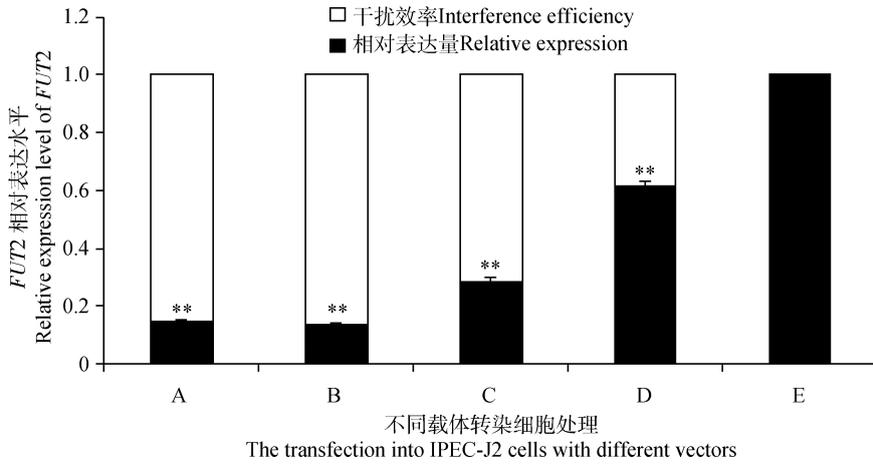
2.6 *FUT2* 基因沉默对球系列鞘糖脂生物合成通路相关基因表达的影响

由图 6 可知,*FUT2* 基因沉默造成 *ST3GAL1*、*HEXA* 和 *HEXB* 基因表达水平极显著下调($P < 0.01$),*FUT1* 基因表达水平显著下调($P < 0.05$),而 *B3GALNT1* 和 *NAGA* 基因表达水平未发生显

著变化。

2.7 *FUT2* 基因沉默对大肠杆菌黏附能力的影响

由图 7 和图 8 可以看出,细菌黏附的荧光定量结果和菌落定量结果均显示,*FUT2* 基因沉默后大肠杆菌 F18ab 和 F18ac 对 IPEC-J2 细胞的黏附能力均显著下降。

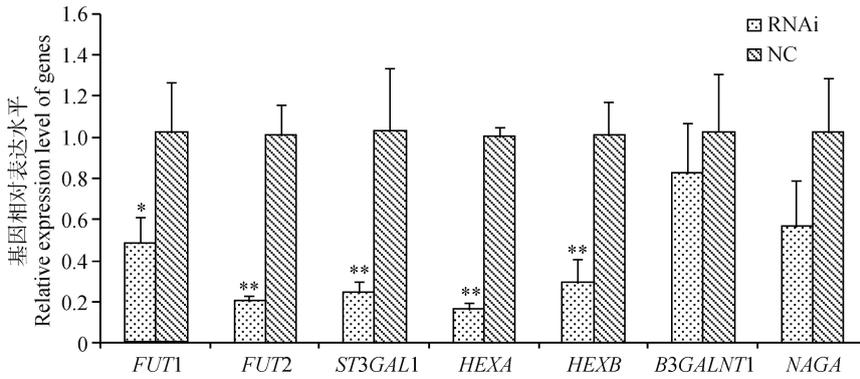


A~E. 依次为 pGLV3-FUT2-1、pGLV3-FUT2-2、pGLV3-FUT2-3、pGLV3-FUT2-4 和 pGLV3-FUT2-NC 转染 IPEC-J2 细胞处理

A-E. Transfection into IPEC-J2 cells with pGLV3-FUT2-1, pGLV3-FUT2-2, pGLV3-FUT2-3, pGLV3-FUT2-4 and pGLV3-FUT2-NC, respectively

图 5 实时荧光定量检测 *FUT2* 基因 mRNA 表达水平及干扰效率分析

Fig. 5 The mRNA expression of *FUT2* and analysis of interference efficiency

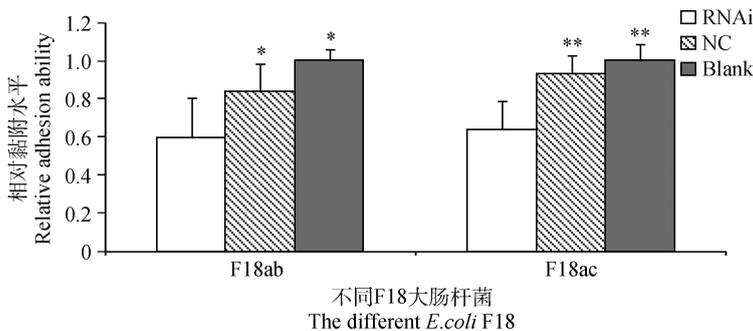


RNAi 表示 *FUT2* 基因干扰, NC 表示阴性对照。* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同

RNAi represents *FUT2* gene interference, and NC represents negative control. * means significant difference between the treatments ($P < 0.05$). The same as below

图 6 *FUT2* 基因沉默后 IPEC-J2 细胞中各基因的表达

Fig. 6 Expression of genes in IPEC-J2 cells after *FUT2* gene silencing



Blank 表示空白对照

Blank represents blank control

图 7 *FUT2* 基因沉默的 IPEC-J2 细胞对大肠杆菌的黏附水平的荧光定量结果

Fig. 7 The fluorescence quantitative results about the adhesion of IPEC-J2 cells to *Escherichia coli* after silencing *FUT2* gene

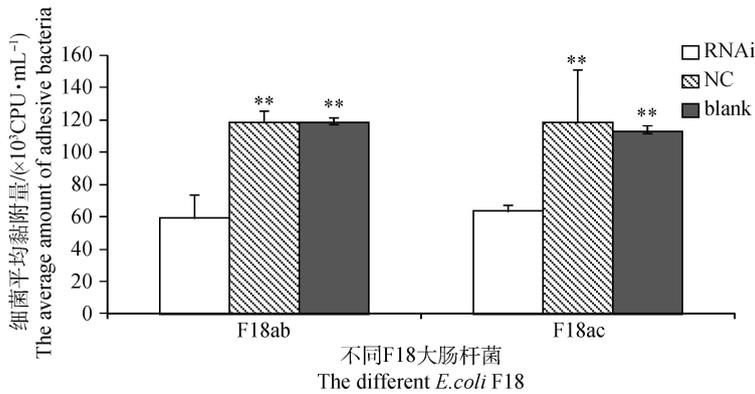


图 8 *FUT2* 基因沉默的 IPEC-J2 细胞对大肠杆菌黏附水平的菌落定量结果

Fig. 8 The colonies quantitative results about the adhesion of IPEC-J2 cells to *Escherichia coli* after silencing *FUT2* gene

3 讨论

鞘糖脂在免疫应答、细胞发育分化、细胞识别过程中都发挥重要的作用^[24],它能和糖肌醇磷脂锚定蛋白(GPI 锚定蛋白)在反式高尔基体上形成聚集物,然后靶向定位于极化的上皮细胞顶端域。这种分布特性使得上皮细胞在不利环境中能免受侵害,另外可作为肠道共生菌群黏附结合的位点^[25-26]。因此球系列鞘糖脂生物合成通路在 *E. coli* F18 受体形成的过程中发挥着重要的作用。目前研究表明,球系列鞘糖脂生物合成通路中的 *FUT2* 基因与肠道菌群以及病毒性腹泻的易感性存在着重要的联系,了解病毒感染的整体框架,有助于提高机体对病毒性腹泻的抵抗力^[27]。*FUT2* 基因的遗传多态性与克罗恩病等炎症性肠道疾病的易感性有着密切的关系,它能影响肠黏蛋白的功能状态,从而影响疾病的易感性^[28]。另有研究表明,*FUT2* 基因的遗传多态能够影响肠黏膜和其分泌物的岩藻糖基化水平,导致肠道菌群的生态失调,从而引起炎症反应的发生。同时肠内微生物和细菌黏附也影响 *FUT2* 基因的表达^[29-30]。*FUT2* 基因催化形成的 1 型 H 抗原(组织血型抗原)主要分布在分泌液及大量外胚层或中胚层起源的组织中,导致了 *FUT2* 基因在肠道组织中的高表达^[31]。同时基于 *FUT2* 基因参与 *E. coli* F18 受体的形成,因此本试验选用小肠上皮细胞作为试验对象,开展一系列细胞水平的研究。本课题组研究表明,*FUT2* 基因在 *E. coli* F18 抗性组仔猪十二指肠和空肠的表达量极显著低于敏感组,且 *FUT2* 基因的表达与 *FUT1* 基因呈极显著正相关,两者都参与 *E. coli* F18 的抗性调控^[19]。本试验结果表明,在 F18 大肠杆菌菌体刺激和 LPS 诱导

后,IPEC-J2 细胞 *FUT2* 基因的表达均表现出明显的上升。LPS 是大肠杆菌黏附肠上皮细胞所释放的内毒素,其诱导细胞后 *FUT2* 基因的极显著上调与大肠杆菌感染所引起的基因变化一致,说明 *FUT2* 基因的低水平表达有利于机体抵抗大肠杆菌的感染。而这一结果与之前课题组在 mRNAs 水平上的试验结果完全一致,进一步说明了 *FUT2* 基因的低水平表达有助于提高仔猪对大肠杆菌病的抵抗力,其在 *E. coli* F18 的抗性调控中发挥着重要的作用。

国外研究表明,*FUT2* 基因敲除后岩藻糖基化结构减少,多糖结构 Lewis-a 增加,从而导致岩藻糖基化黏蛋白的缺失,破坏幽门螺杆菌表达血型抗原结合黏附素对胃黏膜的黏合,进而防治幽门螺杆菌感染^[32]。为了在细胞水平上对 *FUT2* 基因进行更深入的功能验证,进一步构建 4 个靶向 *FUT2* 基因的 shRNA 慢病毒干扰载体,检测干扰前后对细胞球系列鞘糖脂生物合成通路关键基因表达和 *E. coli* F18 黏附能力的影响。本研究结果表明,*FUT2* 基因干扰后其所在的鞘糖脂生物合成-球系列通路中 *FUT1*、*ST3GAL1*、*HEXA* 和 *HEXB* 基因表达水平显著或极显著下调,而 *B3GALNT1* 和 *NAGA* 基因表达水平虽有所下调,但未发生显著变化,同时其干扰后对大肠杆菌的黏附能力显著降低。这说明 *FUT2* 基因与球系列鞘糖脂生物合成通路中 *FUT1*、*ST3GAL1*、*HEXA* 和 *HEXB* 等基因存在着协同互作作用,*FUT2* 基因的下调也将导致 *FUT1*、*ST3GAL1* 等基因的下调。*B3GALNT1* 酶和 *NAGA* 酶主要促进 H 抗原前体物质的合成,且 *NAGA* 酶可以水解 O-型糖链上的复合物;*HEXA* 酶和 *HEXB* 酶对 H 抗原前体的合成具有反向催化作用,两者主要参与己糖胺酶的合成;*ST3GAL1* 酶

主要作用于 H 抗原前体合成唾液酸,再链接于酸化的糖配体末端形成不同的受体^[17]。结合以上功能分析推测,*FUT2* 基因的下调一方面影响 α -(1, 2) 岩藻糖转移酶的功能活性,减少 ABH 血型抗原中的 1 型 H 抗原和 F18 大肠杆菌受体的形成,降低对 F18 大肠杆菌的黏附,从而参与 *E. coli* F18 的抗性调控。另一方面,*FUT2* 基因的下调也将导致 *FUT1*、*ST3GAL1* 等基因的下调,抑制了 H 抗原前体物质的合成,从而抑制 H 抗原和唾液酸的合成,导致 F18 大肠杆菌受体的形成受到了阻碍。此外,*FUT2* 基因的低水平表达降低了肠黏膜和其分泌物的岩藻糖基化水平,提高了肠黏蛋白的功能状态,促进肠道菌群的生态平衡,使宿主增强了对细菌侵袭的抵抗力。

基于本试验研究结果,下一步将继续运用 RNA 干扰技术构建共抑制或过量表达一种而抑制另一基因表达的双向表达载体,转染小肠上皮细胞,测定对小肠上皮细胞 F18 大肠杆菌黏附状态的影响,从而较准确地确定基因之间的协同或颞颥作用。同时设计 *FUT2* 基因敲除载体,获得 *FUT2* 基因敲除猪,在个体水平上研究 *FUT2* 基因在抵抗 *E. coli* F18 感染过程中发挥的作用。这有助于解决中国地方品种大肠杆菌病抗性育种的问题,为今后制定抗大肠杆菌病遗传选育策略提供一定的理论依据。

4 结 论

本研究结果表明,*FUT2* 基因低表达可能不利于仔猪大肠杆菌受体的形成,以增强猪小肠上皮细胞抵抗 *E. coli* F18 感染的能力,本试验结果同时为球系列鞘糖脂生物合成通路在仔猪抗大肠杆菌感染过程中的作用机制研究提供一定的理论基础和依据。

参考文献(References):

- [1] BOLDIN B. Persistence and spread of gastro-intestinal infections; The case of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets[J]. *Bull Math Biol*, 2008, 70(7): 2077-2101.
- [2] NGUYEN U V, CODDENS A, MELKEBEEK V, et al. High susceptibility prevalence for F4⁺ and F18⁺ *Escherichia coli* in Flemish pigs[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 202: 52-57.
- [3] IMBERECHTS H, WILD P, CHARLIER G, et al. Characterization of F18 fimbrial genes fedE and fedF involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86[J]. *Microb Pathog*, 1996, 21(3): 183-192.
- [4] IMBERECHTS H, DE GREVE H, SCHLICKER C, et al. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, fedA[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(5): 1963-1971.
- [5] 蒋 磊,周明旭,夏芃芃,等. 产肠毒素大肠杆菌感染的分子致病机制[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(9): 1551-1560.
- JIANG L, ZHOU M X, XIA P P, et al. Molecular pathogenic mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(9): 1551-1560. (in Chinese)
- [6] MOONENS K, BOUCKAERT J, CODDENS A, et al. Structural insight in HISTO-blood group binding by the F18 fimbrial adhesin FedF[J]. *Mol Microbiol*, 2012, 86(1): 82-95.
- [7] LONARDI E, MOONENS K, BUTS L, et al. Structural sampling of glycan interaction profiles reveals mucosal receptors for fimbrial adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Biology (Basel)*, 2013, 2(3): 894-917.
- [8] HAKOMORI S. Traveling for the glycosphingolipid path[J]. *Glycoconj J*, 2000, 17(7-9): 627-647.
- [9] BAO W B, YE L, PAN Z Y, et al. Microarray analysis of differential gene expression in sensitive and resistant pig to *Escherichia coli* F18[J]. *Anim Genet*, 2012, 43(5): 525-534.
- [10] 叶 兰. 断奶仔猪大肠杆菌 F18 菌株抗性候选基因的筛选与功能分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- YE L. Screening and function analysis of candidate genes related to *E. coli* F18 resistance in weanling pigs[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013. (in Chinese)
- [11] ABRANTES J, POSADA D, GUILLON P, et al. Widespread gene conversion of alpha-2-fucosyltransferase genes in mammals[J]. *J Mol Evol*, 2009, 69(1): 22-31.
- [12] CODDENS A, DISWALL M, ÅNGSTRÖM J, et al. Recognition of blood group ABH type 1 determinants by the FedF adhesin of F18-fimbriated *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 9713-9726.
- [13] VOGELI P, MEIJERINK E, FRIES R, et al. A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors;

- a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine [J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1997, 139(11): 479-484.
- [14] MEIJERINK E, FRIES R, VÖGELI P, et al. Two α (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and *Escherichia coli* F18 receptor (*ECF18R*) loci[J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(10): 736-741.
- [15] 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.
- SHI Q S, HUANG S Q, LIU X C, et al. Polymorphism of *E. coli* F18 receptor gene in different pig breeds[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(3): 221-224. (in Chinese)
- [16] 晏学明, 任 军, 郭源梅, 等. 猪 α 1-岩藻糖转移酶基因 (*FUT1*) 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.
- YAN X M, REN J, GUO Y M, et al. Research on the genetic variations of α 1-fucosyltransferase (*FUT1*) gene in 26 pig breeds [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(9): 830-834. (in Chinese)
- [17] BAO W B, WU S L, MUSA H H, et al. Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (*FUT1*) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds [J]. *J Anim Breed Genet*, 2008, 125(6): 427-430.
- [18] 吴圣龙, 包文斌, 鞠慧萍, 等. 猪 α 1-岩藻糖转移酶基因 (*FUT1*) M857 位点遗传变异分析[J]. 遗传, 2007, 29(9): 1071-1076.
- WU S L, BAO W B, JU H P, et al. Analysis of genetic variations at M857 locus of the α 1-fucosyltransferase (*FUT1*) ORF in pigs [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(9): 1071-1076. (in Chinese)
- [19] DONG W H, DAI C H, SUN L, et al. Expression of key glycosphingolipid biosynthesis-globo series pathway genes in *Escherichia coli* F18-resistant and *Escherichia coli* F18-sensitive piglets [J]. *Anim Genet*, 2016, 47(4): 428-435.
- [20] 赵宇航, 梁 浩, 刘明秋, 等. 基因敲除技术在大型家畜中的应用[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(1): 1-8.
- ZHAO Y H, LIANG H, LIU M Q, et al. The application of gene knockout technologies in big domestic animals [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(1): 1-8. (in Chinese)
- [21] 杜 琛, 李金泉, 陈秀娟. 白绒山羊 *PPAR γ* 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及对肌内脂肪细胞增殖分化的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4): 671-678.
- DU C, LI J Q, CHEN X J. Construction of lentiviral RNAi Vector of *PPAR γ* gene in cashmere goat and its effect on proliferation and differentiation of intramuscular adipocytes [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(4): 671-678. (in Chinese)
- [22] 郑 敏, 罗 乐, 熊朝丽, 等. 靶向鸭肠炎病毒 *NP* 基因 RNAi 对 DEV 增殖的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(1): 132-139.
- ZHENG M, LUO L, XIONG Z L, et al. Effect of targeting DEV-*NP* gene on DEV proliferation by RNA interference [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(1): 132-139. (in Chinese)
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] 王艳萍, 王 征, 朱 健, 等. 鞘糖脂研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(6): 583-591.
- WANG Y P, WANG Z, ZHU J, et al. Progress in study of glycosphingolipids [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(6): 583-591. (in Chinese)
- [25] ICHIKAWA S, HIRABAYASHI Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis [J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(5): 198-202.
- [26] UEMURA A, WATARAI S, IWASAKI T, et al. Induction of immune responses against glycosphingolipid antigens: Comparison of antibody responses in mice immunized with antigen associated with liposomes prepared from various phospholipids [J]. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(12): 1197-1201.
- [27] RODRÍGUEZ-DÍAZ J, GARCÍA-MANTRANA I, VILA-VICENT S, et al. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45559.
- [28] MCGOVERN D P B, JONES M R, TAYLOR K D, et al. Fucosyltransferase 2 (*FUT2*) non-secretor status is associated with Crohn's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(17): 3468-3476.
- [29] NANTHAKUMAR N N, MENG D, NEWBURG D S. Glucocorticoids and microbiota regulate ontogeny of intestinal fucosyltransferase 2 requisite for gut homeostasis [J]. *Glycobiology*, 2013, 23(10): 1131-1141.

- [30] RAYES A, MORROW A L, PAYTON L R, et al. A genetic modifier of the gut microbiome influences the risk of graft-versus-host disease and bacteremia after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2016, 22(3): 418-422.
- [31] 夏日炜, 钦伟云, 甘丽娜, 等. 不同日龄苏太仔猪 *FUT2* 基因的组织表达谱和表达差异分析[J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(9): 1-4.
- XIA R W, QIAN W Y, GAN L N, et al. Tissue expression profile and differential expression of *FUT2* gene in Sutai piglets at different ages[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(9): 1-4. (in Chinese)
- [32] MAGALHÃES A, ROSSEZ Y, ROBBE-MASSÉL-OT C, et al. Muc5ac gastric mucin glycosylation is shaped by *FUT2* activity and functionally impacts *Helicobacter pylori* binding [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25575.

(编辑 郭云雁)