

# TLR5 基因启动子区甲基化修饰与 苏太断奶仔猪 *E. coli* F18 抗性的关系

戴超辉<sup>1</sup>, 冯海悦<sup>1</sup>, 宗秋芳<sup>1</sup>, 吴圣龙<sup>1,2</sup>, 包文斌<sup>1,2\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江苏省种猪繁育和健康养殖工程技术研究中心, 扬州 225009)

**摘要:** 旨在分析探讨 *TLR5* 基因启动子区甲基化修饰对断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性的调控作用。本研究首先利用 qPCR 和 Western blot 检测分析了 *TLR5* 基因在 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型苏太断奶仔猪小肠组织(十二指肠和空肠)中的差异表达, 然后利用生物信息学分析和双荧光素酶报告系统检测确定 *TLR5* 基因核心启动子区、CpG 岛及其作用元件, 进而检测并分析 *TLR5* 基因启动子区甲基化修饰与 *TLR5* 基因在 F18 大肠杆菌抗性和敏感型断奶仔猪小肠组织中表达水平的相关性。结果表明, *TLR5* 基因在敏感型断奶仔猪十二指肠和空肠组织中的 mRNA 表达水平分别显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于在抗性型个体中的表达, 且十二指肠和空肠组织中敏感组蛋白表达水平均显著高于抗性组 ( $P < 0.05$ )。 *TLR5* 基因启动子区包含 2 个 CpG 岛和 16 个作用元件, 启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化水平对 *TLR5* 基因的表达具有一定的调控作用, 该位点位于转录因子 Sp1 结合的核心启动子区域。本研究结果表明, 猪 *TLR5* 基因的表达水平和 F18 大肠杆菌的抗性有关, 其低表达可能有利于 F18 大肠杆菌抗性; *TLR5* 基因启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化能够显著抑制 *TLR5* 基因的表达, 并最终影响断奶仔猪对大肠杆菌的抗性。

**关键词:** 苏太猪; *TLR5* 基因; 甲基化; 大肠杆菌 F18; 相关性分析

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)05-0897-10

## Relationship between Methylation in Promoter Region of *TLR5* Gene and Resistance to *Escherichia coli* F18 of Sutai Weaned Piglets

DAI Chao-hui<sup>1</sup>, FENG Hai-yue<sup>1</sup>, ZONG Qiu-fang<sup>1</sup>, WU Sheng-long<sup>1,2</sup>, BAO Wen-bin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;  
2. Jiangsu Engineering Research Center for the Reproduction and Healthy Breeding of Boar, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the regulation function of methylation in promoter region of *TLR5* gene on the resistance to *E. coli* F18 of weaned piglets. The differential expressions of *TLR5* gene and protein in small intestine (duodenum and jejunum) between *E. coli* F18-resistant and *E. coli* F18-sensitive Sutai weaned piglets were detected by qPCR and Western blot, respectively. The core promoter region, CpG islands and their acting elements of *TLR5* were determined by bioinformatics analysis and dual luciferase reporter system, and the correlation between the methylation degree in promoter region and the expression of *TLR5* gene in *E. coli* F18-resistant and *E. coli* F18-sensitive Sutai weaned piglets was detected and analyzed. The results showed that expression levels of *TLR5* gene in duodenum and jejunum of sensitive individuals were significantly and very significantly higher than that in resistant individuals ( $P < 0.05$ ).

收稿日期: 2017-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(31772560; 31572360); 江苏省科技支撑计划(BE2016315); 扬州大学中青年学术带头人资助项目

作者简介: 戴超辉(1993-), 女, 湖南新化人, 博士生, 主要从事猪抗病育种研究, E-mail: chdai1993@163.com

\* 通信作者: 包文斌, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: wbbao@yzu.edu.cn

and  $P < 0.01$ ), respectively. And the protein expressions of TLR5 in duodenum and jejunum of sensitive individuals were significantly higher than that of resistant individuals ( $P < 0.05$ ). The core promoter region of *TLR5* gene included 2 CpG islands and 16 acting elements, the methylation level of the mC-6 site in the second CpG island of the promoter region had a certain regulation effect on the expression of *TLR5* gene. The site located in the core promoter bound by transcription factor Sp1. The above results indicated that *TLR5* gene played an important regulating role in the process of *E. coli* invasion, whose low expression was conducive to the piglets' resistance to *E. coli*. The methylation of the mC-6 CG site in the second CpG island of the *TLR5* gene promoter could inhibit the binding of the transcription factor Sp1, which inhibited the expression of the *TLR5* gene and ultimately affected the resistance of weaned piglets to *E. coli*.

**Key words:** Sutai pig; *TLR5* gene; methylation; *Escherichia coli* F18; correlation analysis

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是机体对病原体侵袭产生先天性免疫应答信号通路的一类受体, 在宿主免疫反应及炎症过程中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。TLR5 属于 TLRs 家族成员, 具有模式识别受体的功能, 同时它也是机体识别革兰氏阴性菌鞭毛蛋白的受体, 可以介导机体针对病原菌的先天性免疫及炎症反应<sup>[3-5]</sup>。KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 显示, TLR5 主要参与了髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88) 介导的 Toll-like 信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway) 以及炎症性肠病信号通路 (Inflammatory bowel disease, IBD)、致病性大肠杆菌感染信号通路 (Pathogenic *Escherichia coli* infection)、沙门氏菌感染信号通路 (*Salmonella* infection) 和军团菌病信号通路 (Legionellosis)。猪的 *TLR5* 基因全长 22 359 bp, 开放阅读区 (ORF) 长 2 571 bp, 编码的蛋白包括胞外区 (LRR 结构域)、跨膜区和胞内区 (TIR 结构域), 具有典型的 TLR 家族结构特征<sup>[6]</sup>。猪 TLR5 分子在肾、肝、肺、小肠、脾和胸腺等组织均有表达<sup>[6]</sup>, 并且具有较好的免疫反应性<sup>[7]</sup>。有研究表明, 猪 TLR5 分子可识别猪霍乱沙门氏菌等细菌的鞭毛蛋白<sup>[8-9]</sup>, 并且 *TLR5* 基因的特异单倍型与猪丹毒抗体免疫应答有关<sup>[10]</sup>。M. A. Dominguez 等<sup>[11]</sup> 通过扫描猪 *TLR5* 基因的启动子序列, 鉴定了启动子序列中 7 个单核苷酸多态性和两个 Indel 变异, 其中一个 Indel 由在 -581~-559 处核苷酸位置的 23 bp 插入组成, 产生另外的 STAT 结合位点, 从而调控 *TLR5* 的表达。本课题组前期对中国地方猪品种梅山猪 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型断奶仔猪十二指肠进行转录组测序分析, 筛选并初步确定 TLRs 信号通路可

对断奶仔猪大肠杆菌抗性具有重要调控作用<sup>[12]</sup>。上述研究表明, 猪 *TLR5* 基因在针对外源抗原的固有免疫应答中确实发挥了重要的调控作用。同时其作为 Toll-like 家族一员不仅本身在菌毛蛋白识别中具有重要作用, 而且在断奶仔猪大肠杆菌抗性调控中也发挥重要功能。

在真核生物中, DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰形式, 它通过影响染色质的结构、DNA 的构象、染色体的稳定性以及 DNA 和蛋白质的相互作用而调节基因表达, 最终影响生物学功能<sup>[13]</sup>。已有研究表明, DNA 甲基化在植物抗逆性以及动物的抗病性等方面发挥了重要作用<sup>[14-16]</sup>。鉴于猪 *TLR5* 基因重要的生物学功能, 本研究利用生物信息学分析和双荧光素酶报告系统检测确定 *TLR5* 基因核心启动子区、CpG 岛及其作用元件, 进而分析 *TLR5* 基因核心启动子区甲基化修饰与断奶仔猪对 F18 大肠杆菌抗性的关系, 以期揭示 *TLR5* 基因调控断奶仔猪大肠杆菌抗性的分子机制提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验猪来自于课题组前期建立的苏太猪 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型资源群体, 在 3 个苏太猪抗性型和敏感型资源家系中根据课题组建立的 V 型分泌系统展呈功能性黏附素和受体结合试验技术<sup>[17]</sup>, 筛选出确证的抗性型和敏感型个体各 3 头 (在相同环境下饲养, 初生重、断奶重、体形和毛色等性状基本一致)。在仔猪断奶前后, 也是最易感染 *E. coli* F18 而表现出腹泻症状的 35 日龄阶段, 屠宰后采集十二指肠和空肠组织样, 现场液氮保存, 然

后转移至  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

## 1.2 主要试验试剂

胎牛血清 FBS、培养液 DMEM/F12(DF)、胰酶 Trypsin-EDTA Solution、细胞培养皿和培养板均购自 Gibco 公司(美国);RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司(美国);反转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司(中国,南京);总蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白检测试剂盒购自南京凯源科技发展有限公司(中国南京);兔源一抗 TLR5(1:400)和  $\beta$ -actin(1:4000)购自 Abcam (Cambridge, UK);抗兔二抗(IgG-HRP, 1:3000)购自 Jackson (PA, USA)。猪小肠上皮细胞系 (IPEC-J2)由美国宾夕法尼亚大学惠赠;BW23473 感受态细胞购自成都传世科为生物技术有限公司;

pCpGL-basic 载体由中国农业大学友情提供;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司;EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 试剂盒和 PyroMark 系列试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司;切胶回收试剂盒、无内毒素质粒抽提试剂盒购自天根生物技术有限公司(北京,中国)。

## 1.3 引物设计及序列合成

根据 TLR5 基因编码序列(GenBank 登录号: AB208697.2)设计 TLR5 基因 qPCR 引物,以 GAPDH 为内参对目的基因的表达进行均一化。同时设计 TLR5 基因编码序列和启动子区的 PCR 扩增引物,确定核心启动子区的截短型引物以及进行甲基化检测的 BSP 引物。引物的具体信息见表 1,所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 扩增序列引物信息

Table 1 The primer information of amplification sequences

| 名称<br>Name   | 引物序列(5'→3')<br>Sequence of the primer                                    | 产物长度/bp<br>Length of products | 退火温度/ $^{\circ}\text{C}$<br>Annealing temperature |
|--------------|--|-------------------------------|---|
| TLR5 (qPCR)  | F: GGTTCCTCGCCACACATTA<br>R: GGGTCCCAAAGAGTCGGAAG                        | 123                           | 60  |
| GAPDH (qPCR) | F: ACATCATCCCTGCTTCTACTGG<br>R: CTCGGACGCTGCTTCAC                        | 188                           | 60  |
| TLR5-P1      | F: GGACTAGTGGTGGGGGTGGGGTTCTGCTTC<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG  | 2 000                         | 61  |
| TLR5-P2      | F: GGACTAGTGCAAGGCATTGTTTCTGTCAGG<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG  | 1 500                         | 59  |
| TLR5-P3      | F: GGACTAGTGTTCACCCAGAGCGCAATCCA<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG   | 1 000                         | 66  |
| TLR5-P4      | F: GGACTAGTATCGTGCTCATAGGACAGAAACG<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG | 750                           | 62  |
| TLR5-P5      | F: GGACTAGTGATCTCCACGGACATTTG<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG      | 500                           | 60  |
| TLR5-P6      | F: GGACTAGTGCGCCTCAGAGGAGCCTCAGGG<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG  | 200                           | 60  |
| TLR5-P7      | F: GGACTAGTAGAGAAAAGAAAGGGTTACCTG<br>R: CATGCCATGGTCCTCCCCGCCACCGAAGTAG  | 100                           | 60  |
| TLR5-B1      | F: AAAAGAGAAGGTAGGGTAGGATTAT<br>R: CTCAAACATAAATCTATCTAAATTCTAAAA        | 157                           | 56  |
| TLR5-B2      | F: AAATGTTGGTTTGGATGATTTTTTA<br>R: AAACACTCCTACTCCAACCCTAA               | 258                           | 60  |

qPCR 代表定量引物,P1~P7 分别代表启动子区不同区段的扩增引物,B1 和 B2 分别代表用于启动子区甲基化检测的 BSP 引物;P1~P7 中上下游引物斜体字母分别代表限制性内切酶 *Spe* I 与 *Nco* I 的酶切位点

qPCR represents quantitative primer; P1-P7 represent amplification primers with different regions of the promoter region, respectively; B1 and B2 represent BSP primers for promoter methylation detection, respectively; Italic letters in the upstream and downstream primers of P1-P7 represent the restriction enzymes digestion sites of *Spe* I and *Nco* I

## 1.4 TLR5 在苏太断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型小肠组织中的表达差异检测

1.4.1 组织总 RNA 的提取及 cDNA 合成 严格按照说明书,使用 Trizol 试剂提取 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型苏太断奶仔猪十二指肠和空肠组织的总 RNA。并以 1% 甲醛变性凝胶电泳和 Nano-Drop-1000 微量核酸测定仪检测总 RNA 的纯度和浓度,−70 °C 保存待用。以 RNA 为模板进行 cDNA 合成:10 μL 的反应体系中含 5 × qRT SuperMix II 2 μL,总 RNA 500 ng,RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 μL。反应条件:25 °C 10 min,50 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 保存。

1.4.2 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 反应体系:模板 cDNA 2.0 μL,上下游引物(10 μmol · L<sup>-1</sup>)各 0.4 μL,2 × SYBR Premix Ex-Tap<sup>TM</sup> II 10 μL,50 × ROX Reference Dye II 0.4 μL,RNase free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL,每个样本设置 3 个重复。扩增程序:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 34 s,共 40 个循环;为了分析扩增产物的特异性,在 PCR 扩增结束后采集多个信息点,进行熔解曲线的分析,具体程序:95 °C 15 s,60 °C 1 min;95 °C 15 s,60 °C 15 s。利用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算相对表达量<sup>[18]</sup>。

1.4.3 Western blot 分析 严格按照说明书,使用总蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白,使用 BCA 试剂盒标准化蛋白质水平,SDS-PAGE(聚丙烯酰胺电泳)条件:10 μL 蛋白样品液上样至 10% 浓度凝胶,120 V 电压电泳 90 min。Blotting(蛋白印记):蛋白转移到 PVDF 膜(聚丙烯二氟乙烯膜),与相关抗体进行免疫印迹,按约 0.1 m · cm<sup>-2</sup> 的量加入封闭液和适量一抗 TLR5(1 : 400)和 β-actin 抗体(1 : 4 000)。HRP 抗体作为二抗(辣根过氧化物酶标记抗体,二抗用封闭液 1 : 3 000 稀释),β-actin 蛋白作为参照。

## 1.5 TLR5 启动子区确定和作用元件分析

首先根据 TLR5 基因组序列(GenBank 登录号:NC\_010452.4)截取转录起始位点上游 2 000 bp 序列作为模板,通过设计截短型引物(表 1)在 3' 末端对序列进行截短以扩增不同区段的启动子片段。将 PCR 扩增产物进行电泳检测,条带正确的送测序验证。对确证的 6 对不同引物的 PCR 产物进行回收纯化,然后和 pCpGL-basic 载体进行双酶切(*Spe* I 与 *Nco* I)。酶切体系:PCR 产物/载体 1.0 μg,10 × Cutsmart buffer 5.0 μL,*Spe* I 1.0 μL,*Nco* I

1.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。37 °C 酶切 4 h,利用 PCR 回收试剂盒纯化酶切产物,通过 T4 连接酶进行连接反应,反应条件为 16 °C 过夜,连接产物转化感受态细胞 BW23473,用无抗生素的低盐 LB 培养液 220 r · min<sup>-1</sup> 复苏培养 1 h,涂布含博来霉素的抗性平板,37 °C 培养过夜。挑取单克隆摇菌 5 h,进行菌液 PCR,将电泳条带正确的菌液进行双向测序,测序载体上游引物 5' → 3' F: CTCTTTGTTCAGCTCTCT-GTTT。下游引物为相应 PCR 扩增的下游引物,对确证的重组菌液进行纯化培养和质粒抽提,分别命名为 −2 000 bp-pCpGL、−1 500 bp-pCpGL、−1 000 bp-pCpGL、−750 bp-pCpGL、−500 bp-pCpGL、−250 bp-pCpGL 和 −100 bp-pCpGL。

IPEC-J2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DF 培养液培养在 12 孔板中,培养条件为含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱,待生长至 80% 密度,将 7 种重组载体分别和海肾荧光素酶 TLK 载体共转染细胞,48 h 后进行双荧光素酶检测,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。对双荧光素酶活性有显著差异的区段,通过 BDGP 软件([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))预测 TLR5 基因启动子区的核心启动子区,利用 Alibaba2 软件(<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>)对猪 TLR5 基因核心启动子区进行转录因子结合域的分析。

## 1.6 TLR5 启动子区 CpG 岛甲基化和 mRNA 相关性分析

利用 MethPrimer 软件(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)预测分析猪 TLR5 基因启动子区的 CpG 岛,预测总片段为 1 000 bp,预测参数设定:CpG 岛指序列长度至少 100 bp,GC 含量大于 50%,CpGo/e 大于 0.6。为了检测 TLR5 基因启动子区甲基化水平及其与 mRNA 表达相关性,以苏太抗性型和敏感型个体空肠组织 DNA 为试验材料,先利用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit 试剂盒对基因组进行亚硫酸盐转化,然后利用 MethPrimer 软件,基于原序列经亚硫酸盐转化后的序列,设计 PCR 引物,利用 PyroMark PCR Kit 试剂盒进行 PCR 扩增,总体系为 25 μL:PyroMark PCR Master Mix 2 × 12.5 μL,CoraLoad Concentrate 10 × 2.5 μL,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 2 μL,Q-solution 5 × 5 μL,Primer F/R 各 0.5 μL,亚硫酸盐转化后的 DNA 液 2 μL。PCR 反应程序:

95 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共循环 45 次; 最后 72 °C 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶鉴定 PCR 扩增产物后用切胶回收试剂盒回收目的片段, 纯化后与 T 载体连接、转化, 每个样本挑取 20 个阳性克隆菌液送上海生工生物有限公司测序。将经甲基化引物扩增的序列和原始 DNA 序列以及转化序列比对, 找出发生甲基化的 CG 位点。分别以单个位点甲基化程度与 mRNA 表达进行相关性分析, 利用 GraphPad Prism 6 绘制关联图谱。

### 1.7 统计分析

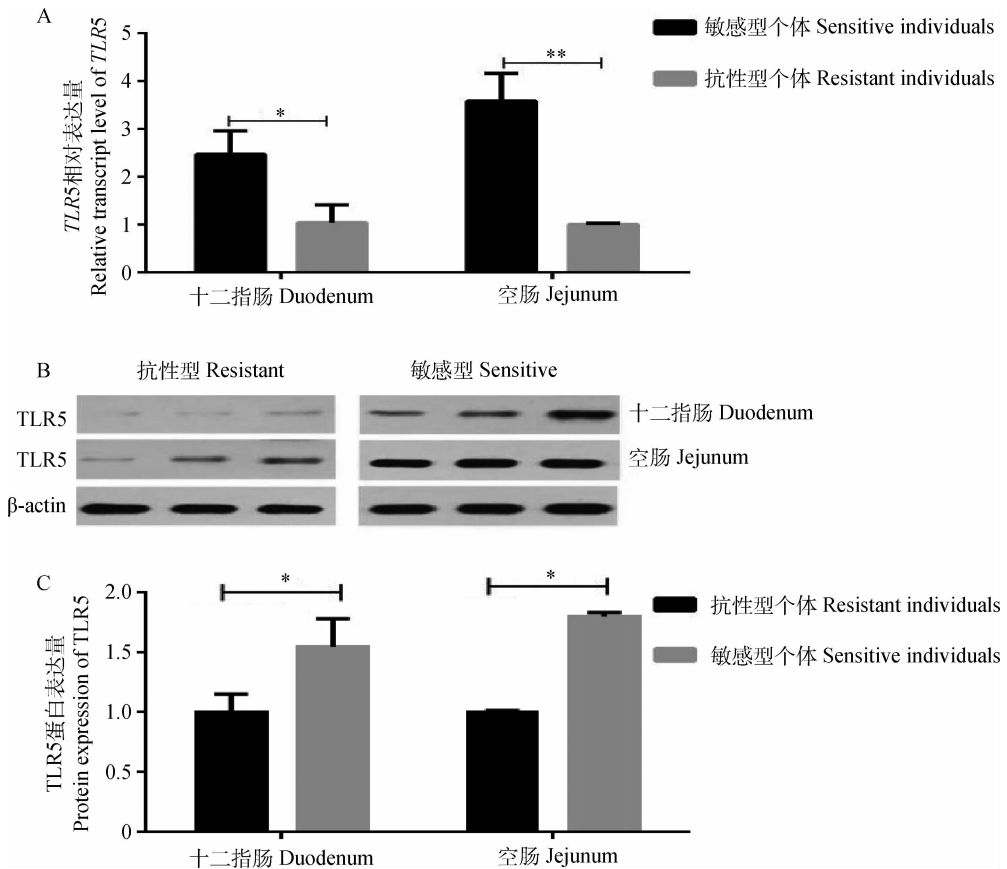
使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算基因表达的相对水平, 并用内参基因 *GAPDH* 来标准化基因表达水平<sup>[18]</sup>。用 SPSS 16.0 软件提供的独立样本 *t* 检验分析 *TLR5* 基因在抗性型和敏感型个体中的表达差异, 用单因素方差分析方法 (ANOVA) 分析启动子区不同区段双荧光素酶的活性差异。每个处理设计 3 个

重复, 结果用“平均数±标准差( $\bar{x}\pm SD$ )”表示。

## 2 结果

### 2.1 *TLR5* 在苏太仔猪不同 *E. coli* F18 抗性个体小肠组织中的表达差异分析

利用 qPCR 检测了 *TLR5* 基因在苏太断奶仔猪抗性组与敏感组肠道组织中的表达情况, 结果发现, 十二指肠中敏感组个体 *TLR5* 基因的 mRNA 表达水平显著高于抗性组 ( $P < 0.05$ ), 在空肠组织中敏感组极显著高于抗性组 ( $P < 0.01$ ) (图 1A); Western blot 结果表明, 敏感组中的 *TLR5* 蛋白表达水平也明显高于抗性组 (图 1B), 通过 Image J 对蛋白条带灰度面积进行统计, 以 *TLR5* 蛋白与内参  $\beta$ -actin 的比值作为灰度值, 并把抗性个体灰度值的平均值定义为单位 1, 对蛋白进行相对定量分析, 发现十二指肠和空肠中敏感组个体 *TLR5* 基因的蛋白表达水平均显著高于抗性组 ( $P < 0.05$ ) (图 1C)。



A. mRNA 表达水平; B. 蛋白免疫印迹; C. 蛋白相对表达水平。\* .  $P < 0.05$ , \* .  $P < 0.01$ , 下同

A. The mRNA expression level; B. Western blot; C. The relative protein expression. \* .  $P < 0.05$ , \* .  $P < 0.01$ , the same as below

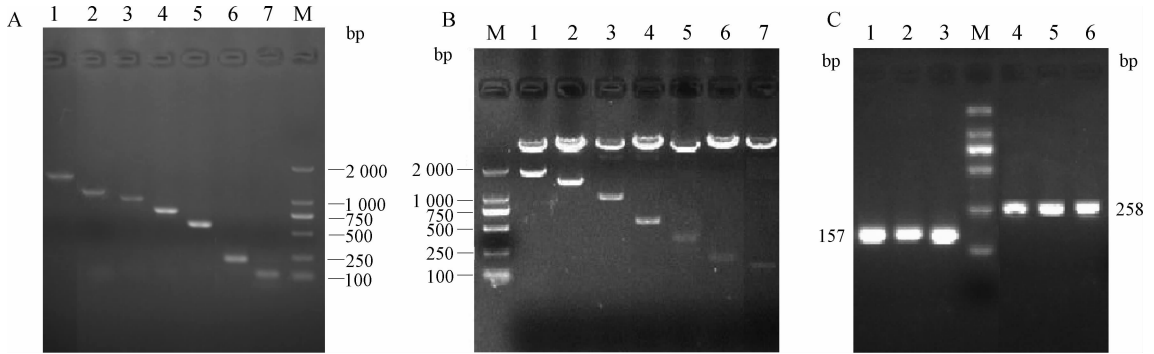
图 1 苏太猪肠道组织中 *TLR5* 基因 (蛋白) 在抗性组和敏感组中的表达

Fig. 1 The expression of *TLR5* gene (protein) in intestinal tissues of *E. coli* F18-resistant and sensitive Suta piglets

2.2 苏太猪 *TLR5* 启动子区 CpG 岛和作用元件分析

本研究首先结合双荧光素酶报告系统和核心启动子预测软件确定 *TLR5* 基因的启动子区和启动子区 CpG 岛以及作用元件。启动子扩增和甲基化扩增结果见图 2, 启动子区所有截短型引物均扩增正确, 重组载体酶切正确, 2 个 CpG 区段扩增正确。荧光素酶活性检测结果见图 3, 启动子 -2 000 bp 区段启动子活性极显著高于对照组, 且 -1 000 bp

处活性增加, 但差异不显著; 而 -500 ~ -250 bp 和 -250 ~ -100 bp 处, 启动子活性显著降低, 说明 -500 ~ -250 bp 和 -250 ~ -100 bp 区域内均存在调控元件, 对转录影响很大, 因此重点关注 -1 000 bp 区段的启动子区域。在线软件预测了 3 段 *TLR5* 基因的核心启动子区, 分别位于转录起始位点上游 13 ~ 62 bp、上游 255 ~ 304 bp 和上游 864 ~ 913 bp, 包含 2 个 CpG 岛, 16 个作用元件(图 4)。

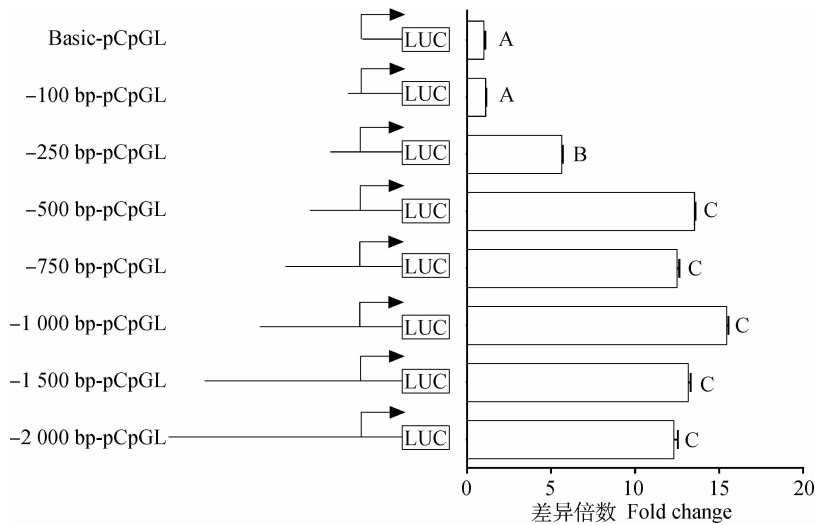


A. 截短型引物扩增的结果; B. 重组质粒酶切结果; C. 甲基化引物扩增结果, 其中 1~3 代表 CpG1, 4~6 代表 CpG2。M. DNA 相对分子质量标准

A. The amplification result of promoter fragments; B. The digestion result of recombinant plasmid; C. Amplification results of methylation primers, in which 1-3 represent amplification of CpG1, 4-6 represent amplification of CpG2. M. DL2000 marker

图 2 启动子和甲基化扩增结果

Fig. 2 Amplification results of promoter and methylation sequences

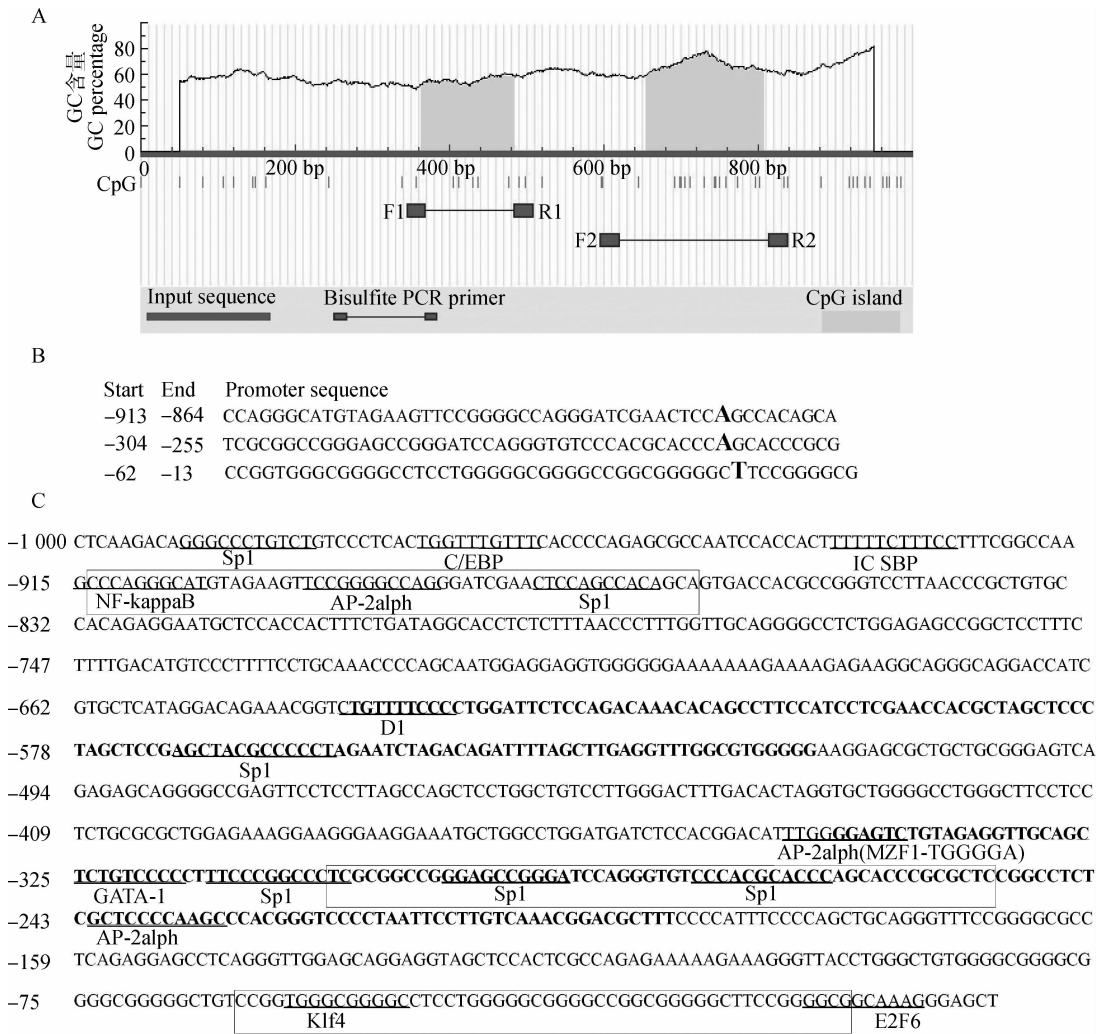


以萤火虫荧光素酶 Rn 活性/海肾素荧光素酶 Ff 活性的值作为荧光素酶活性。其中横坐标代表启动子区荧光素酶活性相对于对照质粒 Basic-pCpGL 的差异倍数, 纵坐标代表不同截短的区段对应的质粒, 不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

The luciferase activity was calculated as the ratio of the activity of firefly luciferase (Rn)/the activity of perineurin luciferase (Ff). The abscissa represents fold change in the luciferase activity of the promoter region compared to the control plasmid Basic-pCpGL. The ordinate represents the plasmids corresponding to the different truncated segments. Different capital letters indicate very significant differences ( $P < 0.01$ )

图 3 *TLR5* 基因启动子区不同区段双荧光素酶活性检测

Fig. 3 Detection of dual luciferase activity in different regions of *TLR5* gene promoter region



A. 转录起始位点上游 1 000 bp 处的 CpG 岛预测; B. 基于 BDGP 软件的核心启动子区预测; C. 启动子区作用元件分析, 其中带框碱基代表核心启动子区, 加粗碱基代表 CpG 岛, 下划线代表作用元件结合位点

A. CpG island prediction at 1 000 bp upstream of the transcription start site; B. Prediction of the core promoter region based on BDGP software; C. The analysis of acting elements in promoter region, in which the bases with box represent the core promoter region, bold bases represent CpG island sequences and the underlined bases represent the binding sites of acting elements

图 4 *TLR5* 基因核心启动子区和 CpG 岛预测以及作用元件分析

Fig. 4 Prediction of *TLR5* gene core promoter region and CpG island and analysis of acting elements

### 2.3 苏太猪 *TLR5* 启动子区 CpG 岛甲基化和 mRNA 相关性分析

在确定 *TLR5* 基因的核心启动子区域和作用元件后, 通过对图 4C 所在的启动子区 CpG 岛甲基化分析发现, CpG1 共有 6 个 CG 位点, 但是发生甲基化的位点只有 3 个, 并且各位点的甲基化与 mRNA 表达量并无显著相关; CpG2 总共有 15 个 CG 位点, 各位点均发生了不同程度的甲基化, 并且第 6 个 CG 位点的甲基化与 mRNA 表达有显著负相关 ( $P < 0.05$ ) (图 5 和图 6), 且该位点位于核心启动子区 Sp1 转录因子结合位点上。

### 3 讨论

研究表明, Toll 样受体 TLRs 家族能够识别保守的微生物结构 (如细菌脂多糖) 并激活信号通路, 从而导致由微生物感染引起的免疫应答<sup>[19]</sup>。TLRs 能够感应肠道中的微生物群体, 并启动促炎信号通路来抵抗微生物病原体的入侵<sup>[20]</sup>。与人源类似, 猪源 TLRs 信号通路也主要分为 4 种: MyD88 依赖通路、TICAM1 依赖通路、小 GTP 酶通路和磷脂酰肌醇 (PIPs) 通路<sup>[21-24]</sup>。所有的 TLRs 均包含 TIR 结构域, MyD88 的 TIR 结构域都可与之结合; MyD88

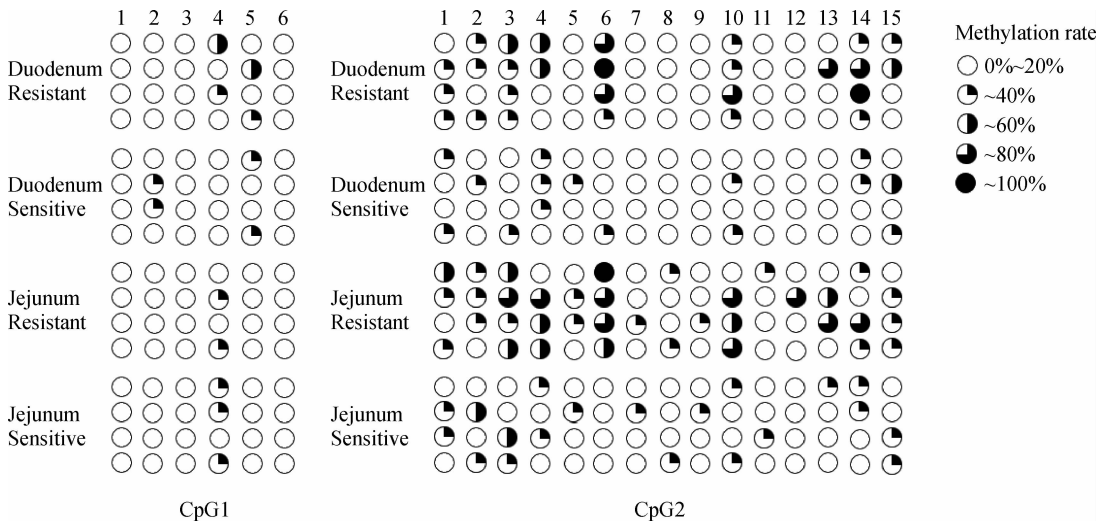


图 5 *TLR5* 基因启动子区 CpG 岛甲基化程度分析  
 Fig. 5 The methylation analysis of CpG islands in *TLR5* gene promoter region

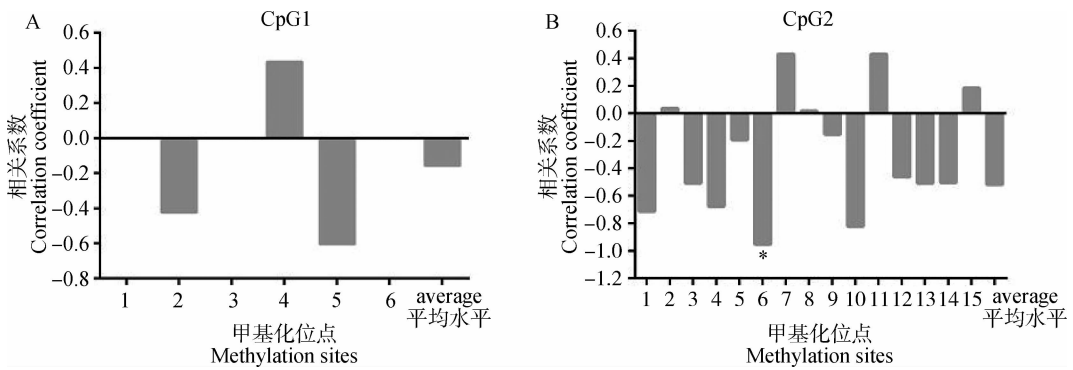


图 6 *TLR5* 基因启动子区 CpG 岛甲基化程度与 mRNA 表达的相关性分析  
 Fig. 6 The correlation analysis between methylation degree of CpG islands in *TLR5* gene promoter region and mRNA expression

依赖通路是除 TLR3 外所有 TLRs 的共同通路,因此 TLR5 信号通路属于 MyD88 依赖通路,它可以最终激活核因子- $\kappa$ B(Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),导致许多目的基因表达上调<sup>[25]</sup>。本课题组前期对中国地方猪品种梅山断奶仔猪 *E. coli* F18 抗性型和敏感型全同胞个体十二指肠组织进行了转录组学分析,并最终筛选出重要的免疫通路——TLRs 信号通路可能与断奶仔猪大肠杆菌抗性有关<sup>[12]</sup>。在本研究中,我们检测了苏太猪 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型个体小肠组织中 *TLR5* 基因的表达水平,发现 *TLR5* 基因在苏太断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性型十二指肠组织中的表达显著低于在敏感型中的表达( $P < 0.05$ ),其在抗性型空肠组织中的表达极显著低于在敏感型中的表达( $P < 0.01$ ),说明 *TLR5* 基因的表达水平确实和大肠杆菌的抗性有关,并且

进一步推断其低表达可能有利于断奶仔猪抵抗大肠杆菌侵染。本试验结果与 TLR5 作为细菌受体的生物学功能是一致的,其作为 Toll-like 家族一员不仅本身在菌毛蛋白识别中具有重要作用,并且在断奶仔猪大肠杆菌抗性调控中也发挥着重要功能。至于 *TLR5* 基因的表达是通过什么途径来调控大肠杆菌抗性的,有必要对 *TLR5* 基因调控大肠杆菌的分子机制进行进一步分析。

基因表达调控的方式有很多种,其中启动子区 DNA 甲基化是调节基因功能的重要手段。Z. Z. Xiao 等<sup>[26]</sup>对猪 *LYN* 基因启动子区甲基化状态及基因表达水平进行了分析,结果显示,甲基化对猪 *LYN* 基因的转录起着重要作用。L. Sun 等<sup>[27]</sup>证实了猪 *BPI* 启动子区 mC-15 位点的甲基化可以抑制 C/EBP $\beta$  与启动子结合的能力,并影响其表达。因



此,我们对 *TLR5* 基因启动子开展了一系列研究。我们首先根据双荧光素酶活性检测和软件预测了 *TLR5* 基因的核心启动子区和 CpG 岛,利用 BSP 克隆测序分析了启动子区的 2 个 CpG 岛各位点的甲基化程度,并与 mRNA 表达水平进行相关性分析,发现启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化水平对 *TLR5* 基因的表达具有一定的调控作用。而这个 CG 位点位于转录因子 Sp1 结合域,因此我们推测 *TLR5* 基因启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化阻碍了转录因子 Sp1 的结合,从而抑制 *TLR5* 基因的表达,并最终影响大肠杆菌的抗性。本研究结果表明,*TLR5* 基因启动子区存在调控 *TLR5* 基因表达的 CpG 岛(第 2 个 CpG 岛),其中存在转录调控元件(SP1)结合的重要 CG 位点(mC-6)。我们推测,当仔猪受到 F18 大肠杆菌侵袭时,*TLR5* 基因启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点发生甲基化阻碍了转录因子 Sp1 的结合,进而抑制 *TLR5* 基因的表达,并最终表现出对大肠杆菌的抗性。下一步将在细胞水平进一步验证 *TLR5* 基因的调控功能,并结合免疫共沉淀或凝胶迁移试验等技术深入研究转录因子对核心启动子的调控作用,以期对 *TLR5* 基因的表现遗传修饰作用提供更完整的试验依据。

#### 4 结 论

本研究首先通过组织和蛋白表达水平初步确定 *TLR5* 表达与大肠杆菌抗性的关系,发现猪 *TLR5* 基因的表达水平确实和 F18 大肠杆菌的抗性有关,其低表达可能有利于 F18 大肠杆菌抗性。然后通过启动子区 CpG 岛甲基化分析,预测并确定了 *TLR5* 核心启动子区和甲基化位点,发现启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化水平和 *TLR5* 基因的表达存在显著负相关。由此推测 *TLR5* 基因启动子区第 2 个 CpG 岛第 6 个 CG 位点甲基化能够显著抑制 *TLR5* 基因的表达,并最终影响断奶仔猪对大肠杆菌的抗性。

#### 参考文献(References):

[1] DE NARDO D. Toll-like receptors: Activation, signaling and transcriptional modulation [J]. *Cytokine*, 2015, 74(2):181-189.

[2] KANURI G, LADURNER R, SKIBOVSKAYA J, et al. Expression of toll-like receptors 1-5 but not TLR

6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Liver Int*, 2015, 35 (2): 562-568.

- [3] KRAVCHENKO V V, KAUFMANN G F. Bacterial inhibition of inflammatory responses via TLR-independent mechanisms[J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(4): 527-536.
- [4] MILLER A H, VAYTTADEN S J, AL-KHODOR S, et al. Assay development for image-based quantification of intracellular bacterial replication and analysis of the innate immune response to infection[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2015, 13(9):515-528.
- [5] ADIB-CONQUY M, SCOTT-ALGARA D, CAVAILLON J M, et al. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92 (3): 256-262.
- [6] SHINKAI H, TANAKA M, MOROZUMI T, et al. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(4):324-330.
- [7] 孙小林, 潘志明, 方 强, 等. 我国地方品种姜曲海猪 *TLR5* 基因的克隆、表达及鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(4):436-438.
- SUN X L, PAN Z M, FANG Q, et al. Cloning, expression and identification of *TLR5* gene from native Chinese variety Jiangquhai pigs[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2012, 28(4): 436-438. (in Chinese)
- [8] DEVRIENDT B, STUYVEN E, VERDONCK F, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells[J]. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34(11): 1175-1182.
- [9] SHINKAI H, SUZUKI R, AKIBA M, et al. Porcine Toll-like receptors; recognition of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms [J]. *Mol Immunol*, 2011, 48(9-10):1114-1120.
- [10] SHINKAI H, ARAKAWA A, TANAKA-MATSUDA M, et al. Genetic variability in swine leukocyte antigen class II and Toll-like receptors affects immune responses to vaccination for bacterial infections in pigs [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2012, 35(6):523-532.
- [11] DOMINGUEZ M A, LANDI V, MARTINEZ A, et al. Identification and functional characterization of novel

- genetic variations in porcine *TLR5* promoter [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(7):469-476.
- [12] WU Z C, LIU Y, DONG W H, et al. CD14 in the TLRs signaling pathway is associated with the resistance to *E. coli* F18 in Chinese domestic weaned piglets[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24611.
- [13] BAUER A P, LEIKAM D, KRINNER S, et al. The impact of intragenic CpG content on gene expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(12):3891-3908.
- [14] 刘 利, 高 雪, 高会江, 等. DNA 甲基化在奶牛金黄色葡萄球菌性乳房炎中的调控[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(10):1554-1558.
- LIU L, GAO X, GAO H J, et al. Regulation of DNA Methylation during *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnia Sinica*, 2012, 43(10):1554-1558. (in Chinese)
- [15] SHA A H, LIN X H, HUANG J B, et al. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2005, 273(6):484-490.
- [16] LUO J, YU Y, CHANG S, et al. DNA methylation fluctuation induced by virus infection differs between MD-resistant and -susceptible chickens [J]. *Front Genet*, 2012, 3:20.
- [17] 包文斌, 潘章源, 朱 璟, 等. 猪 *TLR4* 基因在 F18 大肠杆菌抗性型和敏感型资源群体间的差异表达分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(2):278-283.
- BAO W B, PAN Z Y, ZHU J, et al. Differentiation of porcine *TLR4* Gene mRNA expression between resistant and sensitive resource populations to ETEC F18[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnia Sinica*, 2011, 42(2):278-283. (in Chinese)
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [19] BARTON G M, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways [J]. *Science*, 2003, 300 (5625): 1524-1525.
- [20] BAILEY M. The mucosal immune system: Recent developments and future directions in the pig [J]. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(3):375-383.
- [21] LIN S C, LO Y C, WU H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling [J]. *Nature*, 2010, 465(7300):885-890.
- [22] SU X Q, LI S, MENG M, et al. TNF receptor-associated factor-1 (TRAF1) negatively regulates Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF)-mediated signaling [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(1):199-206.
- [23] MANUKYAN M, NALBANT P, LUXEN S, et al. RhoA GTPase activation by TLR2 and TLR3 ligands: connecting via Src to NF- $\kappa$ B [J]. *J Immunol*, 2009, 182(6):3522-3529.
- [24] ZHAO X L, XIAO S Y, BERK S, et al. Structural basis of Phosphoinositide (PIP) recognition by the TIRAP PIP-binding motif [J]. *Biophys J*, 2015, 108(2):93a.
- [25] BROWN J, WANG H, HAJISHENGALLIS G N, et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk [J]. *J Dent Res*, 2011, 90(4):417-427.
- [26] XIAO Z Z, WANG C, MO D L, et al. Promoter CpG methylation status in porcine *Lyn* is associated with its expression levels [J]. *Gene*, 2012, 511(1):73-78.
- [27] SUN L, WANG J, YIN X M, et al. Identification of a 5-methylcytosine site that may regulate C/EBP $\beta$  binding and determine tissue-specific expression of the *BPI* gene in piglets [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28506.

(编辑 郭云雁)