

谢 昆, 蒋成砚, 刘 杰, 等. 奶牛隐性乳房炎大肠杆菌 16S rRNA 序列分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(1): 27-28.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.007

# 奶牛隐性乳房炎大肠杆菌 16S rRNA 序列分析

谢 昆<sup>1,2</sup>, 蒋成砚<sup>1,2</sup>, 刘 杰<sup>2</sup>, 李桥善<sup>1</sup>, 周文树<sup>1</sup>, 唐秀华<sup>1</sup>, 汪 镜<sup>1</sup>

(1. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661199; 2. 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661199)

**摘要:**以笔者所在实验室提供, 从新鲜奶样中初步分离并通过生理生化鉴定的大肠杆菌为研究对象, 设计一对特异性引物, PCR 技术检测分离的大肠杆菌。结果表明, 扩增的 16S rRNA 序列大小为 1 419 bp, 与 GenBank 上发表的大肠杆菌 16S rRNA 序列核苷酸同源性为 96%, 从分子水平上确定分离的菌为大肠杆菌。这为奶牛隐性乳房炎的分子生物学鉴定奠定了基础。

**关键词:**奶牛; 隐性乳房炎; 大肠杆菌; 16S RNA; 序列分析; PCR 技术; 分离; 核苷酸; 同源性; 分子生物学鉴定

**中图分类号:** S858.237.2<sup>+</sup>6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0027-02

奶牛乳房炎是奶牛高发疾病之一, 极大地影响了奶牛业发展<sup>[1]</sup>, 根据临床表现可分为临床型、非临床型 2 种。其中, 非临床乳房炎即隐性乳房炎, 最主要是奶牛隐性乳房炎<sup>[2]</sup>, 导致奶牛隐性乳房炎的病原菌主要有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无乳链球菌等, 其中大肠杆菌较为重要<sup>[3]</sup>。目前, 奶牛乳房炎的治疗主要靠抗生素, 但是经过时间积累, 大量使用或者滥用抗生素现象较为突出, 导致抗生素大量残留在奶牛体内, 最终导致其产生耐药菌株<sup>[4]</sup>。因此, 尽早诊断出导致奶牛隐性乳房炎的病原菌, 对人类健康和经济发展至关重要<sup>[5]</sup>。奶牛隐性乳房炎不仅给奶牛养殖业带来了巨大经济损失, 而且牛奶也因为奶牛患病而使其营养价值下降, 甚至当人类食用带有病原菌的牛奶后会给人类健康带来巨大威胁<sup>[6-7]</sup>。本研究在生理生化初步鉴定的基础上, 提取病原菌 DNA, 设计特异性引物, 通过分子生物学方法检测奶样中大肠杆菌 16S rRNA, 并与 GenBank 中发表的 16S rRNA 序列进行比较, 以便建立一种检测奶样中大肠杆菌的分子生物学方法。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

经过生理生化鉴定的大肠杆菌为笔者所在实验室从奶样中分离保存。

### 1.2 细菌培养

在超净工作台中, 将经过生化鉴定并进行纯化培养后初步确定的大肠杆菌接种到 LB 培养液中, 再将培养液放置在 37 ℃、150 r/min 的摇床中培养 24 h 后提取细菌 DNA。

### 1.3 细菌 DNA 提取

应用 CTAB 结合 SDS 法提取大肠杆菌 DNA, 取 5 μL 进

行琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 含量。

### 1.4 大肠杆菌 16S rRNA 的 PCR 扩增

根据 GenBank 上发表的大肠杆菌 16S rRNA 序列 (NC002695), 应用 Primer premier 5 引物设计软件设计 1 对特异性引物, 引物序列如下: P1, 5' - GAATCACAAAGTGGTAAGCGC - 3'; P2, 5' - TCGAACAATAACAGGAAACAGC - 3', 以提取的细菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 49.7 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 100 s, 28 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存, 取 5 μL 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测。

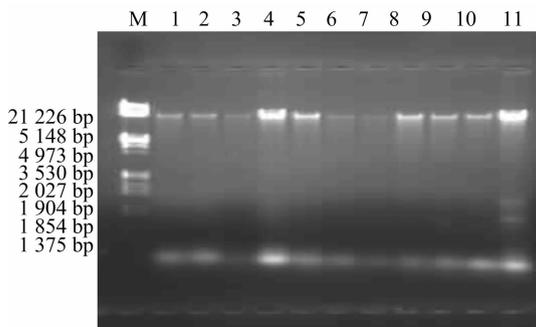
### 1.5 PCR 产物的测序和分析

将 PCR 扩增产物送到深圳华大基因科技服务有限公司, 完成正反测序, 序列结果运用 DNASTar 软件进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌 DNA 的提取

细菌 DNA 经 CTAB 结合 SDS 法提取后于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 细菌 DNA 约为 21 000 bp (图 1)。



M—λDNA/Hind III Marker; 1~11—细菌 DNA

图 1 细菌 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测结果

### 2.2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测, 结果见图 2, 从图 2 可以看出, PCR 产物约为 1 400 bp, 与预测结果一致。

### 2.3 序列同源性对比

PCR 产物经测序后, 将测序结果与 GenBank 中大肠杆菌

收稿日期: 2016-08-13

基金项目: 云南省科技厅应用基础研究项目 (编号: 2010ZC151); 红河学院大学生创新创业训练计划 (编号: DCXL151016); 红河学院大学生科技创新项目 (编号: SZ1520); 红河学院应用型科学研究项目 (编号: XJY15Z07); 红河学院博士专项 (编号: XJ15B13)。

作者简介: 谢 昆 (1975—), 男, 云南富民人, 博士, 副教授, 研究方向为动物生物化学与分子生物学。E-mail: xk\_biology2@126.com。

