

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^{1,2}, 蒋成砚^{1,2}, 刘 杰², 李桥善¹, 周文树¹, 唐秀华¹, 汪 镜¹

(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⁺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病之一,极大地影响了奶牛业发展^[1],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^[2],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^[3]。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^[4]。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^[5]。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^[6-7]。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。

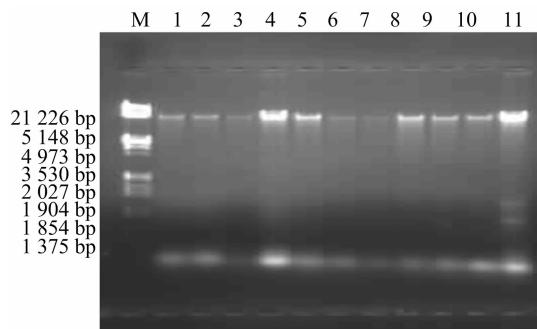
1.5 PCR 产物的测序和分析

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。

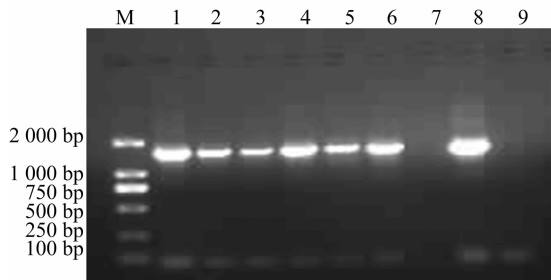
2.3 序列同源性对比

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。



M—Trans2×DNA Marker；1~9—细菌 PCR 扩增产物
图2 细菌 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

E.coli 16S rRNA.seq	GAATCACAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAT
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	GAATCACAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTAT
E.coli 16S rRNA.seq	TCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCAITGGAGTGCAGTTCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCGCGTTGCTC
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCCGACTTCAITGGAGTGCAGTTCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCGCGTTGCTC
E.coli 16S rRNA.seq	TCGCGAGGTGCGTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTGGTCTAAGGGCCATGATGACTTGAAGTCAATCCCACTTCTCCAGTTTATCA
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TCGCGAGGTGCGTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTGGTCTAAGGGCCATGATGACTTGAAGTCAATCCCACTTCTCCAGTTTATCA
E.coli 16S rRNA.seq	CTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCGCGGCGGACCGCTGGCAACAGGAGGCTGCTCGTGGGAGGCCAACCAATTTACAACACGAGCTGACGACA
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	CTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCGCGGCGGACCGCTGGCAACAGGAGGATAAGGGTTGCGCTGTTGCGGGACCTTAACCAATTTACAACACGAGCTGACGACA
E.coli 16S rRNA.seq	GCCATGCGACACCTGTCTCAGGTTCCCGAAGGCACCTTCTCATCTCTGAACTTCCGTGGATGTCAAGACAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATGCAATTAA
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	GCCATGCGACACCTGTCTCAGGTTCCCGAAGGCACCTTCTCATCTCTGAACTTCCGTGGATGTCAAGACAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATGCAATTAA
E.coli 16S rRNA.seq	ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTGAGTTTTAACTTTCGCGCGGTACTCCCAAGGCGGTGACCTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCC
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTGAGTTTTAACTTTCGCGCGGTACTCCCAAGGCGGTGACCTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCC
E.coli 16S rRNA.seq	ACGCGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGCGGTGGACTACCAAGGATATCTAATCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTCGACCTGAGCGTCAGTCTT
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	ACGCGCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGCGGTGGACTACCAAGGATATCTAATCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTCGACCTGAGCGTCAGTCTT
E.coli 16S rRNA.seq	CGTCCAGGGGGCGCGCTTCGCGACCGGTAATTCCTCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTTACACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCAGTA
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	CGTCCAGGGGGCGCGCTTCGCGACCGGTAATTCCTCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTTACACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCAGTA
E.coli 16S rRNA.seq	TCAGATGCAAGTTCAGGTTGAGCCGGGGATTTCACATCTGACTTAAACAAACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTACGCTTGCACCTCCG
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TCAGATGCAAGTTCAGGTTGAGCCGGGGATTTCACATCTGACTTAAACAAACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTACGCTTGCACCTCCG
E.coli 16S rRNA.seq	TATTACCGCGCTGCTGGCAGGAGTGGTCTGTGCTGCTTCTGCGGGTAACGTCATGAGCAAGGATTAACTTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTT
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TATTACCGCGCTGCTGGCAGGAGTGGTCTGTGCTGCTTCTGCGGGTAACGTCATGAGCAAGGATTAACTTTACTCCCTTCTCCCGCTGAAAGTACTT
E.coli 16S rRNA.seq	TACAACCGAAGGCGCTTCTTATACACGCGGCTAGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TACAACCGAAGGCGCTTCTTATACACGCGGCTAGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGT
E.coli 16S rRNA.seq	TCAGTTCAGTGTGGCTGCTCATCTCTCAGACGACTAGGATCGTGCCTAGGTGAGCGTTACCCACCAACAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGG
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	TCAGTTCAGTGTGGCTGCTCATCTCTCAGACGACTAGGATCGTGCCTAGGTGAGCGTTACCCACCAACAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGG
E.coli 16S rRNA.seq	CAAGAGGCGCGAAGGTCCCGCTCTTTGGTCTTGCAGCTTATGCGGTATTAGTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCGCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACT
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	CAAGAGGCGCGAAGGTCCCGCTCTTTGGTCTTGCAGCTTATGCGGTATTAGTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCGCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACT
E.coli 16S rRNA.seq	CACCCGTCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAAGCTGTTTCTGTTACCGTTCGA
GenBank E.coli 16S rRNA.seq	CACCCGTCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAAGCTGTTTCTGTTACCGTTCGA

图3 大肠杆菌 16S rRNA 基因序列同源性对比

16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,存在于所有细菌的染色体基因组中,具有较高的保守性,由于 16S rRNA 基因核苷酸序列总长度适宜,结构完整,更便于对细菌进行各种研究。因此设计一对引物,以 16S rRNA 为靶分子在适当条件下进行 PCR 扩增,便得到扩增后的 16S rRNA 片段,将扩增后的 16S rRNA 基因序列与基因库中的片段比对,便可以知道未知菌与其他菌的同源性,从而完成对菌的鉴定。

参考文献:

[1] 李永安. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及防制研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.
[2] 程振涛. 奶牛隐性乳房炎的诊断方法与细菌学研究[D]. 贵阳:

16S rRNA 基因序列 (NC002695) 进行同源性对比分析,发现二者序列相似性为 96%,同源性对比结果见图 3。

3 讨论与结论

细菌基因组 DNA 提取方法较多,有 SDS 法、CTAB 法^[8]、传统 DNA 抽提法、加热煮沸法、试剂盒抽提法、chelex 100 法。本研究利用 SDS、CTAB 混合法提取细菌基因组 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳检测可看到细菌 DNA 提取过程中无污染,琼脂糖凝胶条带中无拖尾现象,说明细菌提取的基因组 DNA 较为完整。

贵州大学,2006.
[3] 苏俊强,王建亮,梁海峰,等. 奶牛隐性乳房炎发生规律探讨[J]. 湛江海洋大学学报,2002,22(6):65-68.
[4] 闫常平. 奶牛隐性乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2003.
[5] 高会玲. 双抗体夹心 ELISA 检测奶牛隐性乳房炎的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2007.
[6] 尹柏双,王秋竹,付连军,等. 隐性乳房炎奶牛乳清中部分酶活性变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):276-277.
[7] 罗志尧,陈天来. 奶牛隐性乳房炎大肠杆菌的鉴定与药敏试验[J]. 江西畜牧兽医杂志,2013(4):11-14.
[8] 周彪,郭政宏,严亨秀. 藏猪粪便芽孢杆菌基因组 DNA 的提取方法[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):93-95.