

奶牛子宫内膜炎致病菌的 16S rRNA 序列鉴定

张洪波^{1,2}, 杨宏军¹, 何洪彬¹, 杨少华¹, 王长法¹, 高运东¹, 仲跻峰¹, 葛利江²

(1 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 山东 济南 250100; 2 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018)

【摘要】 **【目的】**对奶牛产后子宫内膜炎致病菌进行 16S rRNA 序列鉴定。**【方法】**从产后子宫内膜炎患牛子宫分泌物中分离致病菌,通过细菌培养、纯化、分离、革兰氏染色和生化试验进行初步鉴定。选取代表性菌株 11 株,利用细菌通用引物,通过 PCR 方法,对其 16S rRNA 基因的核苷酸序列进行扩增,将扩增产物与 pMD19-T 载体连接构建克隆载体,经 PCR 和双酶切鉴定正确后测序,测序结果与 GenBank 中已注册菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对。**【结果】**共分离到致病菌株 60 株,有代表性的 11 株细菌归类为:SD01 为琼氏不动杆菌,SD02 为粪肠球菌,SD03 为金黄色葡萄球菌,SD04 为中间葡萄球菌,SD05 为溶血葡萄球菌,SD06 为鲁非不动杆菌,SD07 为无乳链球菌,SD08 为芽孢杆菌,SD09 为枯草芽孢杆菌,SD10 为大肠杆菌,SD11 为假单胞杆菌。**【结论】**通过国际公认的 16S rRNA 序列鉴定技术,准确鉴定出引起奶牛子宫内膜炎的致病菌种类,为临床治疗该病提供了理论依据。

【关键词】 奶牛;子宫内膜炎;16S rRNA

【中图分类号】 S858.237.2⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)08-0019-06

Identification of the pathogenic bacteria from endometritis cow by 16S rRNA sequence analysis

ZHANG Hong-bo^{1,2}, YANG Hong-jun¹, HE Hong-bin¹, YANG Shao-hua¹,
WANG Chang-fa¹, GAO Yun-dong¹, ZHONG Ji-feng¹, GE Li-jiang²

(1 Research Centre of Dairy Cow, Shandong Academy of Agriculture Science, Ji'nan, Shangdong 250100, China;

2 College of Veterinary Science, Shandong Agricultural University, Taian, Shangdong 271018, China)

Abstract: **【Objective】** Pathogenic bacteria of the cow puerperal endometritis were identified by the 16S rRNA sequence analysis. **【Method】** Bacteria were isolated from the secretion of the cows infected with puerperal endometritis. Eleven typical strains were selected after culture, purification, separation, gram staining and identification of biochemistry. The universal primer of bacteria was used to amplify the 16S rRNA sequences by PCR. Then the PCR product was linked to the pMD19-T vector to construct cloning vector. The product was sequenced after PCR amplification and double enzyme digestion. The sequences were compared with the 16S rRNA sequences of the strains that have been registered in the GenBank database. **【Result】** We have isolated 60 strains, and 11 strains are typical. we classify it as follows: *Acinetobacter junii* (SD01), *Enterococcus faecalis* (SD02), *Staphylococcus aureus* (SD03), *Staphylococcus intermedius* (SD04), *Staphylococcus haemolyticus* (SD05), *Acinetobacter lwoffii* (SD06), *Streptococcus agalactiae* (SD07), *Bacillus* (SD08), *Bacillus subtilis* (SD09), *Escherichia coli* (SD10), *Pseudomonas sp* (SD11). **【Conclusion】** The pathogenic bacteria that cause cow puerperal endometritis have been determined by the internationally recognized method (16S rRNA sequence analysis method). The results of this experiment will provide a theo-

* [收稿日期] 2008-12-08

[基金项目] 山东省农科院重大成果培育基金(2006YCG012)

[作者简介] 张洪波(1984—),男,山东潍坊人,在读硕士,主要从事奶牛子宫内膜炎病原菌的分子检测及生物药品的开发研究。

E-mail: hongbo-zhangjun@163.com

[通信作者] 杨宏军(1976—),男,山东曲阜人,副研究员,博士,主要从事奶牛传染病研究。E-mail: longfei1997@sina.com

retical basis for clinical therapy of cow puerperal endometritis.

Key words: cow; endometritis; 16S rRNA

子宫内膜炎是困扰奶牛养殖业的三大疾病之一,近几年发病率呈上升趋势,给奶牛养殖业的发展带来严重影响。加拿大的一项研究表明,临床型子宫内膜炎对产后 4~6 周母牛生殖的影响达 15%~20%,亚临床型子宫内膜炎对产后 4~9 周母牛生殖的影响达 30%~35%^[1]。本病是引起奶牛不孕的主要因素,约占奶牛不孕病例的 60%~92%^[2]。引起子宫内膜炎的主要原因是受到病原微生物的感染^[3]。引起奶牛产后子宫内膜炎的病原菌种类繁多,据文献报道,绝大部分是需氧菌及兼性厌氧菌,严格厌氧菌所占比例较小^[4-7]。在不同地区、不同环境、不同养殖条件下,致病菌的种类、数量及其所占比例均不同。

传统的细菌鉴定方法主要依据微生物的细胞形态、生理生化特性、血清学反应等多方面进行综合鉴定,其鉴定依据是细胞的表型特征,缺点是检测项目多、工作量大、耗时、结果不稳定、易出现弱阳性反应或假阳性,而且鉴定的种类也有限。近年来,随着分子生物学的迅速发展,细菌的分类鉴定开始进入分子水平,16S rRNA 由于长度适中(长度约 1.5 kb),具有稳定遗传的特性,既能体现不同菌属之间的差异,又能利用测序技术较容易地得到其序列,而被细菌分类学家所接受^[8],成为细菌种属鉴定和分类的国际标准方法^[9],但将该法用于奶牛子宫内膜炎致病菌的研究尚未见报道。为此,本试验通过 16S rRNA 序列分析方法,对引起奶牛子宫内膜炎的细菌进行分类鉴定,旨在通过国际公认的方法更准确地鉴定引起奶牛子宫内膜炎的细菌及其多样性,为更好地治疗该病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 根据临床型子宫内膜炎的诊断标准^[3],从山东济南周边地区大型奶牛场随机分散选择典型子宫内膜炎患牛 30 例用于试验。

1.1.2 细菌培养基 体积分数 5% 的绵羊血培养基、营养肉汤等按常规方法配制;伊红美兰培养基(EMB)、麦康凯培养基、高盐甘露醇培养基、SS 琼脂、脑心浸液琼脂、Baird-Parker 培养基、营养琼脂、常规生化鉴定管、细菌微量生化试验试剂盒,均购自杭州天和微生物试剂有限公司,输精枪及套管购自

江苏通宝实业有限公司。

1.1.3 菌种 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 由奶牛研究中心实验室保存。

1.1.4 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T Vector、X-gal、Ampicillin、Agarose Gel DNA Purification kit、*Hind*Ⅲ、*Bam*H I 均购于 TaKaRa 公司, Easypure Genomic DNA Extraction Kit 购于北京全式金生物技术有限公司, Plasmid DNA Extraction Kit 购于北京百泰克生物技术有限公司, Lysozyme 购于 Sigma 公司, Tryptone、Yeast Extract 购于 Oxoid 公司。

1.2 奶牛子宫内膜炎致病菌的分离与初步鉴定

将患牛保定后,对奶牛的外阴部进行冲洗并消毒,将无菌的输精枪送入子宫内,外部连接 50 mL 注射器,回抽液体(当回抽困难没有液体时,可向子宫内灌注温热的灭菌生理盐水后再回抽),将液体注入无菌的 5 mL 离心管中,立即送往实验室。在超净工作台内用含体积分数 5% 小牛血清的 LB 液体培养基增菌,将摇菌后的菌液作适当稀释后接种绵羊血培养基,需氧培养 12~24 h,挑取平皿上不同菌落进行初步分离与纯化培养,以便分离到纯的单菌落。根据菌落形态、革兰氏染色特性等初步对细菌进行分类,然后挑取典型单菌落通过选择性培养基结合生化鉴定进行进一步细分(将鉴定相同或类似的病原菌置于甘油中-20℃保存),并在此基础上进行 16S rRNA 序列鉴定。

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

1.3.1 引物设计 根据 16S rRNA 两端的保守序列及文献[10],设计特异性引物,上游引物:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3',引物由上海生工合成,扩增目的片段长度为 1.5 kb 左右。

1.3.2 细菌基因组 DNA 的提取 依 DNA 提取试剂盒说明书提取各菌株全基因组 DNA。

1.3.3 细菌 16S rRNA 基因的扩增 参考文献[11]进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为:10×PCR Buffer 2.5 μL(不含 Mg²⁺),MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL,上、下游引物(25 μmol/L)各 0.5 μL,模板 DNA 1.5 μL,ddH₂O 17.5 μL。PCR 扩增参数:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,

58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,然后将目的条带用 DNA 回收试剂盒进行回收。

1.3.4 细菌 16S rRNA 基因的克隆、测序及系统发育分析 将纯化回收后的 DNA 片段与 pMD19-T Vector 连接后转入感受态细胞 JM109 中,经氨苄青霉素 (AMP)、5-溴-4 氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基-硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 筛选阳性重组子,用试剂盒按说明书提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切鉴定后,将鉴定正确的阳性细菌菌液送北京博亚公司测序。最后将测序所得序列与 GenBank 中的标准序列进行比较,挑出经 Blast 比对后同源性最高的序列,利用 MEGA4.0 构建各菌

株的 16S rRNA 基因系统发育树。

2 结果与分析

2.1 奶牛子宫内膜炎致病菌的初步分类

分离到的细菌通过纯化、鉴别培养基及常规生化试验大致分为以下几大类:杆菌、球菌、链球菌、球杆菌和芽孢杆菌等。

2.2 奶牛子宫内膜炎致病菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及双酶切鉴定

将 11 个菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,均获得 1.5 kb 的目的条带(图 1),与预期的扩增片段长度相同。扩增片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,获得了 2 600 bp 和 1 500 bp 的目的片段(图 2),也与预期结果一致。

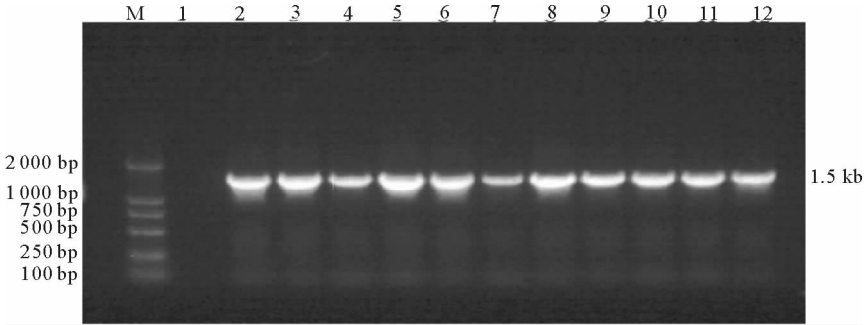


图 1 奶牛子宫内膜炎致病菌 16S rRNA 的 PCR 扩增结果
M, DL2000 DNA Marker;1. 阴性对照;2~12. 分别为 SD01,SD02,SD03,SD04,SD05,SD06,SD07,SD08,SD09,SD10 和 SD11 的 PCR 扩增产物
Fig. 1 Amplification results of PCR-16S rRNA for pathogenic bacteria from endometritis cow
M, DL2000 DNA Marker;1. Negative control;2—12. The products of SD01,SD02,SD03,SD04,SD05,SD06,SD07,SD08,SD09,SD10 and SD11 by PCR, respectively

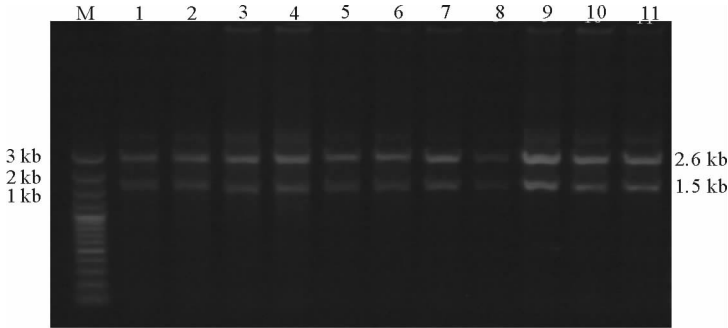


图 2 奶牛子宫内膜炎致病菌 16S rRNA 的双酶切鉴定
M, DL3000 DNA Marker;1~11. 分别为 SD01,SD02,SD03,SD04,SD05,SD06,SD07,SD08,SD09,SD10 和 SD11 的 16S rRNA *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切结果

Fig. 2 Identification of 16S rRNA for pathogenic bacteria from endometritis cow by *Bam*H I and *Hind* III
M, DL3000 DNA Marker;1—11. The results of identification of 16S rRNA by *Bam*H I and *Hind* III of SD01,SD02,SD03,SD04,SD05,SD06,SD07,SD08,SD09,SD10 and SD11, respectively

2.3 奶牛子宫内膜炎致病菌的 16S rRNA 序列分析 将所测菌株 16S rRNA 基因序列(16S rRNA 的扩增结果均为 1.5 kb 左右)与 GenBank 中已发表的相应菌株的标准序列进行同源性比较,结果显

示,分离的奶牛子宫内膜炎细菌根据同源性比较分别是:SD01 与琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*)的同源性为 100%,SD02 与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的同源性为 100%,SD03 与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的同源性为 100%,SD04 与中间葡萄球菌(*Staphylococcus intermedius*)的同源性为 100%,SD05 与溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)的同源性为 100%,SD06 与鲁菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)的同源性为 100%,SD07 与无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)的同源性为 100%,SD08 与芽孢杆菌

(*Bacillus*)的同源性为 100%,SD09 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同源性为 100%,SD10 与大肠杆菌(*Escherichia coli*)的同源性为 100%,SD11 与假单胞杆菌(*Pseudomonas sp*)的同源性为 100%。

2.4 奶牛子宫内膜炎致病菌 16S rRNA 基因系统发育树的构建

挑选 GenBank 数据库中细菌相似性较高的 16S rRNA 序列,经 Blast 比对后,利用 MEGA4.0 软件,根据亲缘关系的远近对每类菌株绘制系统发育树,分析分离株与已知细菌之间亲缘关系的远近,结果见图 3~8。

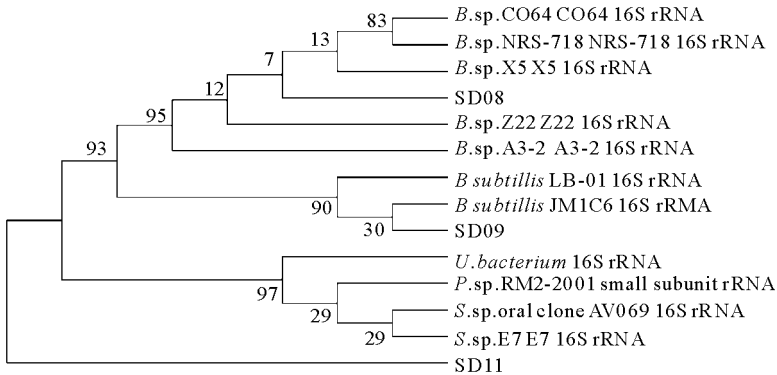


图 3 芽孢杆菌属各细菌 16S rRNA 序列系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *Bacillus*

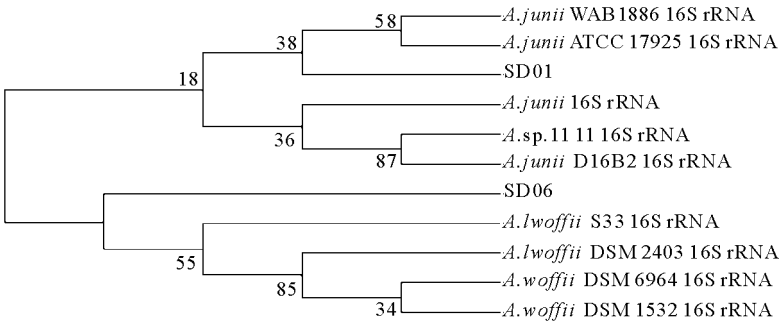


图 4 不动杆菌属各细菌 16S rRNA 序列系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *Acinetobacter*

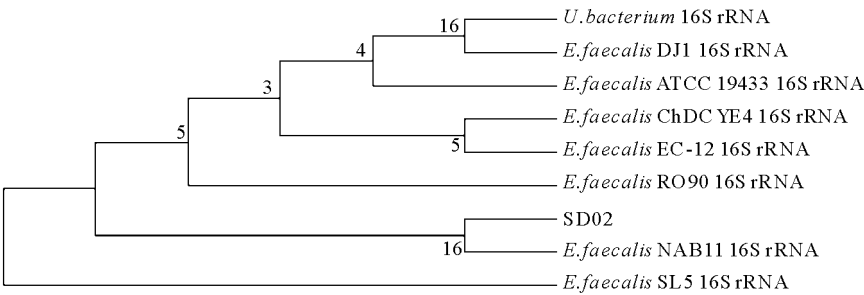


图 5 粪肠球菌 16S rRNA 序列系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *E. faecalis*

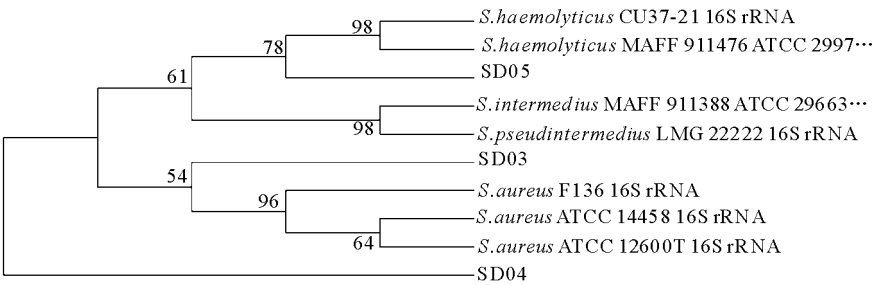


图 6 葡萄球菌 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *Staphylococci*

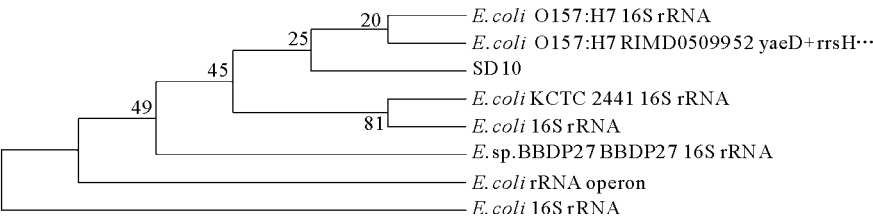


图 7 大肠杆菌 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *E. coli*

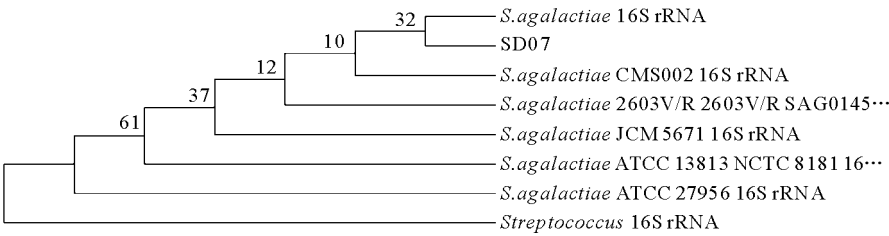


图 8 链球菌 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence for *Streptococcus*

从图 3~8 可以很直观地看出各分离株的种属分类及其与 GenBank 中所列菌种的亲缘关系。

3 讨论

本试验从产后子宫内膜炎患牛中分离到的细菌较多,鉴定比较复杂,遂采用细菌通用引物进行 PCR-16S rRNA 扩增与鉴定。有学者认为,当细菌的 16S rRNA 基因可变区序列同源性大于 97%时,便可认为这些细菌是同一种细菌^[12-13]。细菌分类学家普遍认为,若 2 个物种的 16S rRNA 序列同源性低于 97%,可以认为是属内不同的种^[8]。本试验以此为依据,将引起奶牛子宫内膜炎的细菌进行 16S rRNA 扩增,扩增结果提交 GenBank 从而得出比对结果,经序列分析鉴定,可以比较准确地对引起子宫内膜炎的细菌进行鉴定。

本试验中还分离到未见报道的粪肠球菌和报道较少的假单胞杆菌。粪肠球菌是因为奶牛的生理特

点决定的,本身该菌是肠道内的细菌,但在粪便较稀的情况下,产后奶牛体质较弱,子宫恢复不全,免疫力差,由于排出的粪便污染了阴门而导致子宫内膜感染;假单胞菌(绿脓杆菌)是一种条件性的化脓菌,当发生子宫内膜炎时可以降低子宫局部的抵抗力引起该菌的参与,从而造成混合感染,引起更为严重的子宫内膜炎和败血症^[14]。

4 结论

本试验采用分子生物学方法,对诱发奶牛子宫内膜炎的细菌进行 16S rRNA 扩增,经分类和鉴定,最终鉴定出菌株 11 株,其中粪肠球菌为新发现菌株,另外还分离到一些稀有菌属,如鲁菲不动杆菌、中间葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等。

[参考文献]

[1] Leblanc S J. Postpartum uterine disease and dairy herd repro-

- ductive performance; A review [J]. Veterinary Journal, 2008, 176(1): 102-114.
- [2] 宋晓平, 王建辰. 家畜子宫内膜炎的中草药治疗综述 [J]. 中国兽医学杂志, 2001(1): 33-36.
Song X P, Wang J C. Overview of the herb in treating the domestic animal endometritis [J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2001(1): 33-36. (in Chinese)
- [3] 赵兴绪. 兽医产科学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 376-384.
Zhao X X. Veterinary obstetrics [M]. 3 rd edition. Beijing: China Agricultural Press, 2002: 376-384. (in Chinese)
- [4] Azawi O I. Postpartum uterine infection in cattle [J]. Animal Reproduction Science, 2008, 105(3): 187-208.
- [5] 李世宏, 杨国林, 杨瑞乐, 等. 奶牛子宫内膜炎研究进展 [J]. 中国奶牛, 2007(1): 34-38.
Li S H, Yang G L, Yang R L, et al. Research progress of the cow endometritis [J]. China Dairy, 2007(1): 34-38. (in Chinese)
- [6] 张维军, 赵宏坤, 杨少华, 等. 奶牛子宫内膜炎致病菌的分离与鉴定及耐药性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(11): 28-31.
Zhang W J, Zhao H K, Yang S H, et al. Isolation and identification of pathogenic bacterium and resistance analysis of endometritis in cows [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2006, 33(11): 28-31. (in Chinese)
- [7] 王世荣, 庄文忠, 郁心连. 奶牛子宫内膜炎病原菌的检验 [J]. 中国兽医科技, 1986(2): 39-40.
Wang S R, Zhuang W Z, Yu X L. Pathogenic bacterium analysis of endometritis in cow [J]. China Veterinary Technology, 1986(2): 39-40. (in Chinese)
- [8] Sogin M L, Gunderson J H. Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. Evolutionary implications [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1987, 503: 125-139. (in Chinese)
- [9] 王爱杰, 任南琪. 环境中的分子生物学诊断技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 132-133.
Wang A J, Ren N Q. Molecular biology diagnostic techniques in the environment [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 132-133. (in Chinese)
- [10] 周 煜. 16S rRNA 序列分析法在医学微生物鉴定中的应用 [J]. 生物技术通讯, 1999(4): 297-304.
Zhou Y. Application of 16S ribosomal RNA approach for the identification of medical microbe [J]. Letters in Biotechnology, 1999(4): 297-304. (in Chinese)
- [11] Romero J, García-V M, Laclette J P, et al. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp [J]. Microbial Ecology, 200, 244(4): 317-326.
- [12] Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, et al. Enzyme linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoaveolar fluid [J]. Clinical Microbiology, 1995, 33(5): 1247-1257.
- [13] Takahiro M, Koichi W, Junji F, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human Feces [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5445-5451.
- [14] 李振林. 微生物学及检验技术 [M]. 3 版. 广州: 广东科技出版社, 1994: 220-224.
Li Z L. Microbiology and inspection technique [M]. 3rd edition. Guangzhou: Guangzong Science and Technology Press, 1994: 220-224. (in Chinese)