

# 16S rRNA 序列分析在猪肠道细菌鉴定中的应用

史 斌, 龙 塔\*, 赵战勤, 薛 云

(河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 为建立 16S rRNA 基因序列分析鉴定猪肠道细菌的方法, 选择细菌的 16S rRNA 基因为靶序列设计引物, 对 11 株猪肠道细菌进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行测序和序列分析。序列分析结果显示, A2、A4 序列与柠檬明串珠菌同源性 >99%; B2 序列与鼠乳杆菌同源性 >99%; C2 序列与唾液乳酸杆菌同源性 >99%; F3 序列与类肠膜魏斯氏菌同源性 >97%; F6 和 F7 序列与融合魏斯氏菌同源性 >99%; M3 和 M8 序列与洛菲氏不动杆菌同源性 >98%; M9 和 M11 序列与粪肠球菌同源性 >99%。表明建立的 16S rRNA 基因序列分析方法可以应用于鉴定猪肠道细菌。

**关键词:** 16S rRNA 基因; 序列分析; 猪; 肠道细菌

**中图分类号:** S852.61   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1004-3268(2013)06-0134-03

## Application of Sequence Analysis of 16S rRNA Gene in Identifying Porcine Intestinal Bacteria

SHI Bin, LONG Ta\*, ZHAO Zhan-qin, XUE Yun

(College of Animal Science, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** To develop a technique for bacterial molecular identification and evaluate its effect on identification of porcine intestinal bacteria, a serial of primers targeting 16S rRNA genes were chosen to amplify certain fragments by PCR. After sequencing, the nucleotide sequences were compared with those previously reported in GenBank database. The BLAST analysis and phylogenetic analysis indicated that the 16S rRNA genes of A2 and A4 were most similar to that of *Leuconostoc citreum* (similarity > 99%), while B2 was most similar to *Lactobacillus murinus* (similarity > 99%). For C2, F3, F6 and F7, the 16S rRNA genes were most similar to those of *Lactobacillus salivarius* (similarity > 99%), *Weissella paramesenteroides* (similarity > 97%), and *Weissella confusa* (similarity > 99%), respectively. The 16S rRNA genes of M3 and M8 were most similar to that of *Acinetobacter lwoffii* (similarity > 98%), while for M9 and M11, they were most similar to *Enterococcus faecalis* (similarity > 99%). This indicates that the 16S rRNA gene sequence technology is feasible for identifying porcine intestinal bacteria.

**Key words:** 16S rRNA gene; sequence analysis; porcine; intestinal bacteria

肠道微生物菌群不仅对宿主的生理健康有重要作用, 同时也是重要微生物资源的来源, 因此对肠道细菌的分类鉴定尤为重要<sup>[1-2]</sup>。传统的细菌鉴定主要是通过表型特征来鉴定, 采用分离培养、形态观

察、生化反应、血清凝集以及借助于全自动细菌鉴定仪辅助等方法进行鉴定<sup>[3-9]</sup>。这些鉴定方法虽广泛用于对病原菌的检测, 但存在所需时间长、敏感度低等缺点。16S rRNA 具有高度的保守性, 常作为细

收稿日期: 2013-02-04

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(112102110218)

作者简介: 史 斌(1989-), 男, 河南灵宝人, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子免疫病理。E-mail: smithbin@163.com

\* 通讯作者: 龙 塔(1956-), 女, 河南洛阳人, 教授, 博士, 主要从事动物病理学教学与科研工作。E-mail: longtamail@126.com

菌 PCR 扩增的目标序列。在 16S rRNA 基因保守区设计通用引物<sup>[10]</sup>,通过 PCR 扩增测序的方法获得细菌样本中 16S rRNA 的基因序列,并与 GenBank 数据库中的数据进行比对,可迅速鉴定细菌的种类。16S rRNA 序列分析方法敏感、快速、可靠性高、重现性强,能够弥补传统方法分析微生物群落的不足,为微生态细菌的分类鉴定研究提供了新的思路和方法。为此,利用该技术对 11 株猪肠道细菌进行了鉴定,以期 16S rRNA 序列分析在猪肠道细菌鉴定中的应用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源 11 株猪肠道细菌为 2012 年 5 月—12 月分离于洛阳周边地区猪粪便样品,接种于培养基,分离纯化后于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存在 15% 的脱脂牛奶中并冻干。11 株菌株分别编号为 A2、A4、B2、C2、F3、F6、F7、M3、M8、M9 和 M11。

1.1.2 主要试剂及仪器 培养基为 LB 培养基,美国 BD 公司产品;Taq 酶、dNTPs (25 mmol/L)、DNA Maker(DL2000)购于生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 仪器为 Applied Biosystems 9700 PCR 扩增仪,购于美国应用生物系统公司;凝胶成像系统为 Tanon 1600 全自动数码凝胶图像分析系统,购于上海圣科仪器公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 细菌的分离培养 用接种环蘸取粪便直接接种到 LB 培养基,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温箱中,培养 24 h 和 48 h 时各观察 1 次,从培养基上筛选形态不同的菌落进行革兰氏染色,挑取不同菌落进行纯化培养。

1.2.2 细菌的 16S rRNA 基因序列分析 利用细菌通用引物[上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'],由上海生工生物工程技术有限公司合成]扩增 16S rRNA 基因片段,预期扩增基因片段长度为 1 500 bp。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,其中  $10\times$  Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ;  $2.5\times 10^3$  mol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu\text{L}$ ;  $0.2\times 10^3$  mol/L dNTP 1  $\mu\text{L}$ ;上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ;5U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA Polymerase 1  $\mu\text{L}$ ; dd H<sub>2</sub>O 17  $\mu\text{L}$ 。扩增程序如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,52  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用 dd H<sub>2</sub>O 作为阴性对照。反应结束后,取 2  $\mu\text{L}$  扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将阳性 PCR 产物送上海生工

物工程技术服务有限公司测序,测序结果经 NCBI/BLAST 比对进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌平板形态与革兰氏染色形态观察

观察结果表明,A2、A4 菌株为革兰氏阳性球菌,无芽孢、不运动、兼性厌氧、生长缓慢、菌落较小,显微镜下观察多成对或链状;B2、C2 菌株为革兰氏阳性杆菌,无芽孢、兼性厌氧,琼脂平皿上的菌落突起、无色,直径 2~5 mm,显微镜下观察,菌体呈杆状、单个、链状或成丝状(图 1);F3、F6、F7 菌株为革兰氏阳性球菌或球杆菌,无芽孢、不运动、兼性厌氧或微需氧,显微镜下多呈单个、成双或短链状排列;M3、M8 菌株为革兰氏阴性球杆菌,有荚膜、无芽孢、无鞭毛,菌体大小约 1.5~2.5  $\mu\text{m}$ ,显微镜下多成双排列;M9、M11 菌株为革兰氏阳性球菌,菌落大而光滑,直径 1~2 mm,显微镜下观察多成双或呈短链状排列,不运动。

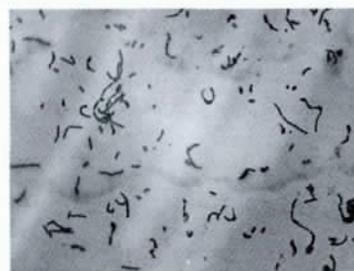
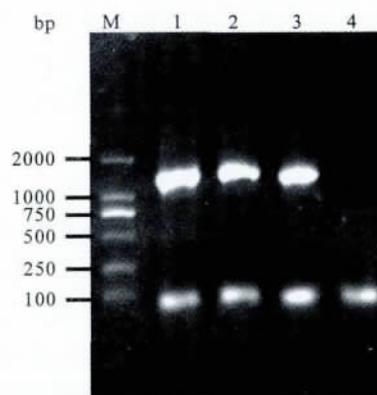


图 1 B2 菌落革兰氏染色形态

### 2.2 细菌的 16S rRNA 基因序列分析

2.2.1 16S rRNA 基因序列扩增产物 以目的菌株菌落为模板进行 PCR 扩增和 1% 琼脂糖凝胶电泳,部分菌株扩增结果见图 2。扩增片段大小约为 1 500 bp,与预计目的片段相符,而以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照,未出现特异性条带。



M. DL2000 DNA Marker; 1—3. 分离株 PCR 产物; 4. 阴性对照

图 2 部分分离菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

2.2.2 16S rRNA 碱基序列分析 将 A2、A4、B2、C2、F3、F6、F7、M3、M8、M9、M11 菌株的序列与 GenBank 中参考菌株 16S rRNA 基因核苷酸序列进行同源性比较分析。A2 和 A4 序列与柠檬明串珠菌同源性 >99%，为柠檬明串珠菌；B2 序列与鼠乳杆菌同源性 >99%，为鼠乳杆菌；C2 序列与唾液乳酸杆菌同源性 >99%，为唾液乳酸杆菌；F3 序列与类肠膜魏斯氏菌同源性 >97%，为类肠膜魏斯氏菌；F6 和 F7 序列与融合魏斯氏菌同源性 >99%，为融合魏斯氏菌；M3 和 M8 序列与洛菲氏不动杆菌同源性 >98%，为洛菲氏不动杆菌；M9 和 M11 序列与粪肠球菌同源性 >99%，为粪肠球菌。

### 3 讨论

16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列，在细菌中普遍存在，其可变区与保守区交错排列，因而适用于进化距离不同的各类生物亲缘关系的研究。并且 16S rRNA 大小适中，约 1 500 bp，既能体现不同细菌种属之间的差异，又能利用测序技术来较容易地得到其序列，便于序列分析<sup>[11]</sup>。张守印等<sup>[1]</sup>应用 16S rRNA 序列分析对 3 株非典型菌株进行了鉴定，结果表明，16S rRNA 序列分析可以较好地鉴定常规方法难以鉴定的非典型菌株；王亚宾等<sup>[3]</sup>利用 16S rRNA 和 Vitek-32 这 2 种常用的细菌分型方法对感染猪肠球菌的鉴定结果进行了比较和分析，发现 Vitek-32 对感染猪肠球菌的鉴定与 16S rRNA 比较出现了较大的差异；高正琴等<sup>[12]</sup>通过 16S rRNA 基因 PCR 扩增、测序分析，对 45 株小型猪细菌进行了分类鉴定，为我国小型猪细菌学检测和质量标准提供了依据；Fu 等<sup>[13]</sup>应用 16S-23S rRNA 研究鉴定了常见败血症细菌，结果表明，16S-23S rRNA 可以快速而灵敏的检测细菌感染，在新生儿败血症的临床诊断中具有非常重要的作用。猪肠道中栖息着大量的微生物，这些微生物在营养、免疫等方面对宿主的健康发挥重要作用，对这些胃肠道微生物的鉴定尤为重要。

本研究采用 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、序列分析方法，对 11 株猪肠道细菌鉴定到种的水平，包括 2 株柠檬明串珠菌、1 株鼠乳杆菌、1 株唾液乳酸杆菌、1 株类肠膜魏斯氏菌、2 株融合魏斯氏菌、2 株洛菲氏不动杆菌和 2 株粪肠球菌。上述细菌中，柠檬明串珠菌、鼠乳杆菌和唾液乳酸杆菌均是益生菌；洛菲氏不动杆菌和粪肠球菌则是潜在的条件致病菌，在机体抵抗力低下时引起感染，引起败血症、脑

膜炎、心内膜炎、泌尿生殖道感染等疾病<sup>[14-15]</sup>。

16S rRNA 基因在猪肠道细菌的鉴定方面有独特的优势，利用 16S rRNA 基因鉴定细菌不仅可以克服传统方法的不确定性，而且具有客观、准确等优点。随着测序技术的发展，测序准确性不断提高，并且价格越来越低，16S rRNA 基因鉴定细菌将会成为常规的检测方法。

#### 参考文献：

- [1] 张守印,李振军,张集,等. 16S rRNA 基因序列分析在非典型菌株鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008,18(4):616-617.
- [2] 郭海勇,吴静,许磊,等. 16S rRNA 基因序列在动物消化道细菌鉴定中的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17):7152-7154.
- [3] 王亚宾,张红英,陈丽颖,等. 16S rRNA 与 Vitek-32 对临床感染猪肠球菌鉴定结果比较[J]. 中国农学通报, 2009,25(6):9-12.
- [4] 焦振泉,刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点:16S-23S rDNA 间区[J]. 微生物学通报, 2001,28(1):86-89.
- [5] 王永,赵新,兰青阔,等. 4 种食源性致病菌的 PCR-SSCP 检测技术研究[J]. 天津农业科学, 2009,15(1):13-15.
- [6] 宋帅,李春玲,杨冬霞,等. 副猪嗜血杆菌 *hhdB* 基因的鉴定和分析[J]. 华北农学报, 2010,25(增刊):17-21.
- [7] 袁硕峰. 麋鹿致病性大肠杆菌的分离鉴定[J]. 现代农业科技, 2010(13):346-347.
- [8] 陈泽祥,襍雄标,许力干,等. 鳖源格氏乳球菌的分离及鉴定[J]. 现代农业科技, 2008(10):151,154.
- [9] 徐引弟,郭成留,王治方,等. 猪高热病副猪嗜血杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 河南农业科学, 2007(10):99-102.
- [10] 陶洪群,李向阳,杨锦红,等. 通用引物 PCR-SSCP 技术分析 16S rRNA 基因特征快速鉴定细菌[J]. 医学研究通讯, 2004,33(5):17-19.
- [11] 马章林,唐曙明,楼许柏. 16S rRNA 在医学微生物鉴定中的应用探讨[J]. 吉林医学, 2011,32(12):2291-2292.
- [12] 高正琴,张强,贺争鸣,等. 中国小型猪细菌分离鉴定及药敏试验[J]. 中国人兽共患病学报, 2010,26(1):46-52.
- [13] Fu J F, Yu H Y, Shang S Q, *et al.* A molecular biological study on identification of common septicemia bacteria using 16s-23s rRNA gene spacer regions[J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE, 2002,3(2):237-242.
- [14] 俞道进,尹兵,易秀丽,等. 猪源万古霉素耐药肠球菌分离及表型和基因型检测[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(2):236-242.
- [15] 李中华,段雄波. 魏斯菌属的分类与鉴定新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006,27(8):721-723.