

利用 16S rDNA 检测奶牛乳房炎 5 种病原菌 PCR 方法的建立及应用

李栋梁¹, 寇亚楠², 宋月², 魏战勇², 王亚宾^{1*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为建立快速检测引起奶牛乳房炎 5 种病原菌的方法, 参照 GenBank 发表的产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌序列, 分别根据其 16S rDNA 保守序列区间设计 5 对引物, 进行 PCR 扩增。结果显示: 这 5 对引物均能针对自身菌株扩增出目的条带, 且具有较强的特异性; 产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌菌液 DNA 的最低检测量分别为 3.40、0.89、0.91、3.30、3.60 ng/ μ L; 对临床采集的疑似患有乳房炎的奶牛所产的牛奶样品进行检测, 结果显示, 与传统的细菌分离鉴定相比, 新建立的方法具有灵敏、高效的特性。

关键词: 奶牛乳房炎; 16S rDNA; PCR; 产气荚膜梭菌; 乳酸乳球菌; 变形杆菌; 绿脓杆菌; 肠球菌
中图分类号: S854.4⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0132-05

Detection of Five Bacterial Species in Bovine Mastitis by PCR Based on 16S rDNA Sequence

LI Dong-liang¹, KOU Ya-nan², SONG Yue², WEI Zhan-yong², WANG Ya-bin^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: According to 16S rDNA conserved sequence, referring to the GenBank sequence, this test designed five pairs of primers, established a PCR assay for detection of five kinds of bovine mastitis pathogens. Experimental results showed that, Five pairs of primers for their own strains could amplify positive bands, and possessed high specificity. Sensitivity test showed that the primers were able to detect *Clostridium perfringens*, *Lactococcus lactis*, *Proteus bacillus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus* bacteria DNA concentration of 3.40, 0.89, 0.91, 3.30, 3.60 ng/ μ L. The method was used to detect milk samples which was collected from suspected clinical mastitis cows. Compared with the traditional bacteria isolation and identification method, the new method had the advantages of sensitivity and efficient. The results show that the new method is sensitive to detect cow mastitis pathogen and can be used in clinical practice.

Key words: bovine mastitis; 16S rDNA; PCR; *Clostridium perfringens*; *Lactococcus lactis*; *Proteus bacillus vulgaris*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus*

奶牛乳房炎又名奶牛乳腺炎, 是由多种原因引起的以乳腺叶间组织或腺体发炎为特征的疾病^[1-6]。乳房炎是奶牛养殖过程中最常见的疾病, 据报道, 国外奶牛乳房炎的发病率为 25%~60%, 我国奶牛乳房炎

的发病率在 40%~80%, 远高于国外发病水平^[7]。奶牛乳房炎严重危害奶牛乳腺健康, 影响产奶量, 同时也会造成乳汁理化性质的改变, 导致乳品质量下降, 给养殖户造成巨大的经济损失, 全世界每年因乳房炎

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 河南省重大科技攻关项目(112101110100); 郑州市重点实验室项目(114PYFZX509)

作者简介: 李栋梁(1989-), 男, 河南卫辉人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物传染病流行病学。E-mail: 497222038@sina.com

* 通讯作者: 王亚宾(1962-), 男, 河南灵宝人, 教授, 博士, 主要从事动物微生物与免疫学研究。E-mail: ybwang8686@126.com

造成的经济损失高达 350 亿美元^[8]。患有乳房炎的奶牛,其乳汁中含有大量的病原微生物、微生物代谢产物、治疗残留药物等,食用后可引起过敏、中毒等不良反应^[9],严重危害人类身体健康。因此,临床上需要建立快速、准确诊断乳房炎病原菌的方法,以便有针对性地进行治疗。

目前,诊断和检测奶牛乳房炎的方法有加州乳房炎检测法(CMT)、体细胞计数法(SCC)、乳汁电导率检测法、乳汁 pH 值检验法、乳清电泳诊断法等^[10],但这些方法都不能准确地鉴定乳房炎病原体,需进行病原菌分离和鉴定确诊。传统的病原分离鉴定方法繁琐、耗时、费力,PCR 技术的诞生为病原菌的快速检测和鉴定提供了方便、灵敏而特异的方法。目前,对引起乳房炎的主要病原菌金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌的 PCR 检测报道较多^[11-15],但对产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌病原菌检测方法的报道相对较少。为此,根据产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌 16S rDNA 保守序列区间设计 5 对引物,进行 PCR 扩增,旨在建立奶牛乳房炎病原菌的 PCR 检测方法,以期快速检测奶牛乳房炎提供新的诊断手段。

1 材料和方法

1.1 试验菌种及样品

本试验所用菌株有大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, ATCC 13124)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*, ATCC 12453)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853)、肠球菌(*Enterococcus*, ATCC 29212)、链球菌(*Streptococcus*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*),其中链球菌和乳酸乳球菌为河南省动物源性食品安全重点实验室保存菌种。待检测牛奶样品来自郑州及周边地区的奶牛养殖场。

1.2 主要试剂及仪器

LB 液体培养基、MRS 厌氧培养基由河南省动物源性食品安全重点实验室配置;胰蛋白胨大豆肉汤培养基、脑-心萃浸培养基购自广东环凯微生物科技有限公司;PTC-200 PCR 扩增仪购自 MJ Research 公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 发表的乳酸乳球菌、变形杆菌、

绿脓杆菌的 16S rDNA 特异性序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 3 对特异性引物;产气荚膜梭菌和肠球菌引物参考文献^[16]的序列,引物由生工生物(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 病原菌引物序列

菌名	引物序列(5'-3')	长度/ bp	退火温 度/℃
乳酸乳球菌	F:GATGATACATAGCCGACCTGA	234	55.4
	R:TTAGCCGTCCCTTTCTGG		
产气荚膜梭菌	F:ATGCAAGTCGAGCGATG	240	52.1
	R:TATGCGGTATTAATCTTCCTTT		
变形杆菌	F:ACCCGCAGAAGAAGCACC	182	56.4
	R:CTCTACAAGACTCAAGCCAACCA		
肠球菌	F:CCCTTATGTGTAGTTGCCATCATT	144	56.0
	R:ACTCGTTGTACTTCCCAATTGT		
绿脓杆菌	F:AGACACCGTCCAGACTCCTAC	277	59.2
	R:CCAACCTTGCTGAACACCTAC		

1.4 PCR 模板的制备

1.4.1 细菌培养 将冻存的菌种复苏后,进行划线培养,挑取单个菌落接种于液体培养基中,37℃摇床培养过夜,4℃保存备用。其中,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、绿脓杆菌采用 LB 培养基培养,肠球菌采用胰蛋白胨大豆肉汤培养基培养,链球菌采用脑-心萃浸培养基培养,产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌在含有 MRS 培养基的厌氧培养管中培养。

1.4.2 DNA 提取 采用传统的氯仿-异戊醇法提取细菌基因组总 DNA,并用紫外分光光度仪测定 DNA 浓度后保存备用。

1.5 PCR 扩增条件优化

分别对 5 种病原菌的 PCR 扩增条件进行优化,根据引物设计软件给出的参考温度,在上、下浮动 5℃的范围内摸索最佳退火温度。以提取的菌体 DNA 为模板,反应体系为 25 μL,其中 Mix Taq DNA 酶 8 μL、上下游引物(25 pmol/μL)各 1 μL、三蒸水 13 μL、DNA 模板 2 μL。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s,梯度退火温度 45 s,72℃ 45 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后取 5 μL 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,检测扩增结果,确定最佳退火温度。

1.6 各病原菌 PCR 的特异性试验

1.6.1 单一 DNA 模板的特异性检验 按上述优化的 PCR 反应条件和方法,分别以大肠杆菌、金黄色葡萄

球菌、链球菌、乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应结束后取 5 μL 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6.2 混合 DNA 模板的特异性检验 取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌 8 种细菌 DNA 各 5 μL 进行混合,此为混合菌 DNA;再分别取乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌依次除外的其他 7 种菌 DNA 各 2 μL 进行混和,此为各待检测菌的 S 混合菌 DNA。按上述优化条件和方法,分别用 5 对引物对混合菌 DNA 和各自待检测菌的 S 混合菌 DNA 进行扩增,以三蒸水为模板作为阴性对照。反应结束后取 5 μL 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 病原菌 PCR 灵敏度测定

根据肠球菌菌液 DNA 初始含量,将产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌菌液 DNA 分别按 1:4、1:5、1:11、1:5 进行稀释,然后将 5 种菌液 DNA 进行倍比稀释。按优化后的 PCR 反应条件和方法,用各引物分别对稀释后的 DNA 模板进行扩增。反应结束后取 5 μL 扩增产物进行电泳。

1.8 临床应用

从郑州周边地区采集疑似患有乳房炎奶牛所

产的牛奶样品,在挤奶前清洗奶牛乳房,用已灭菌的采样管收集牛奶约 20 mL,共采集样品 32 份。用所建立的 5 种细菌的 PCR 方法分别对产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、肠球菌、绿脓杆菌进行检测;同时,用传统的细菌分离鉴定的方法进行细菌的分离鉴定,统计各个样品中各种细菌的分离情况。记录统计 2 种方法的检测结果并分析一致性。

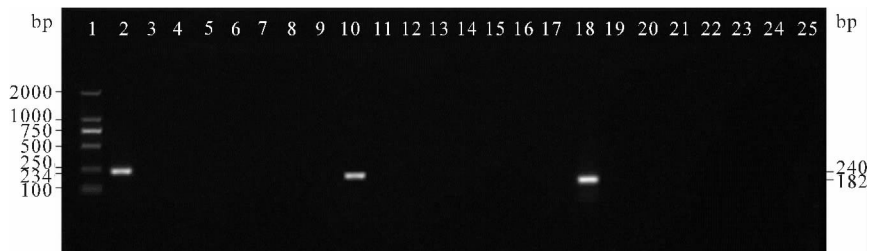
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增条件优化

产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、肠球菌、绿脓杆菌退火温度分别采用 55.4、52.1、56.4、56.0、59.2 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增出大小分别为 234、240、182、144、277 bp 的条带,且条带单一清晰,无拖带现象。

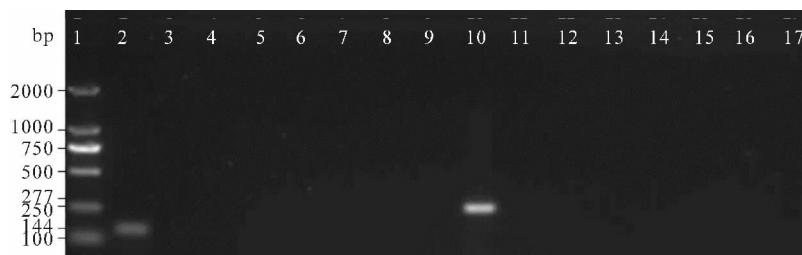
2.2 特异性试验结果

2.2.1 单一 DNA 模板的特异性试验结果 用 5 对引物分别扩增对应的菌株 DNA 模板及其他对照菌株 DNA 模板,结果显示,各引物均能扩增出对应的目的条带,但是其他对照菌株无条带出现(图 1—2)。表明,5 对引物都能特异性结合到对应的目的基因,但对其他基因无扩增能力,可以保证在检测时的准确性。



1. DL2000 Marker; 2. 乳酸乳球菌; 3—9. 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌; 10. 产气荚膜梭菌; 11—17. 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、乳酸乳球菌、变形杆菌、绿脓杆菌、肠球菌; 18. 变形杆菌; 19—25. 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、绿脓杆菌、肠球菌

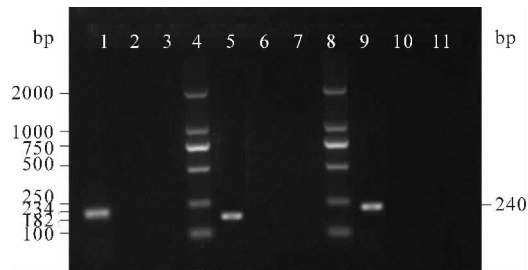
图 1 乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌引物的单一模板特异性检验结果



1. DL2000 Marker; 2. 肠球菌; 3—9. 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、绿脓杆菌; 10. 绿脓杆菌; 11—17. 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、乳酸乳球菌、产气荚膜梭菌、变形杆菌、肠球菌

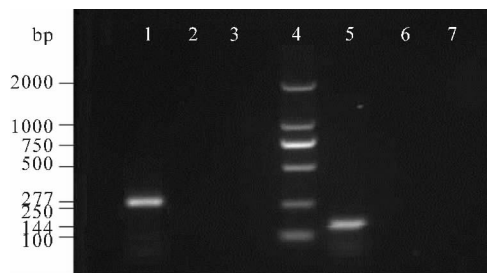
图 2 肠球菌、绿脓杆菌引物的单一模板特异性检验结果

2.2.2 混合 DNA 模板 PCR 的特异性试验结果 由图 3—4 可以看出,混合 DNA 均能扩增出对应的特异性目的条带,而 S 混合 DNA 和三蒸水均无条带出现。5 对引物均能在复杂的 DNA 模板环境中扩增出各自的特异性片段,同时,在无目的片段的复杂 DNA 模板环境中无特异性的扩增条带,表明所建立的检测方法能够排除复杂的背景 DNA 的干扰,准确、特异地检测出目的基因,在临床中具有较高的应用价值。



1. 混合 DNA; 2. 阴性对照; 3. 乳酸乳球菌 S 混合 DNA; 4. DL2000 Marker; 5. 混合 DNA; 6. 阴性对照; 7. 变形杆菌 S 混合 DNA; 8. DL2000 Marker; 9. 混合 DNA; 10. 阴性对照; 11. 产气荚膜梭菌 S 混合 DNA

图 3 乳酸乳球菌、变形杆菌、产气荚膜梭菌的混合 DNA 模板特异性检验结果



1. 混合 DNA; 2. 阴性对照; 3. 绿脓杆菌 S 混合 DNA; 4. DL2000 Marker; 5. 混合 DNA; 6. 阴性对照; 7. 肠球菌 S 混合 DNA

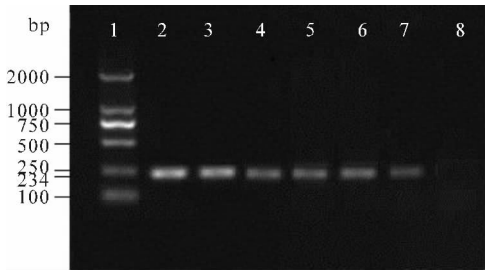
图 4 绿脓杆菌、肠球菌混合 DNA 模板特异性检验结果

2.3 灵敏度测定结果

对各自 DNA 模板进行稀释,然后进行扩增,以确定 PCR 方法的灵敏度,试验共进行 3 次,求其平均值。结果表明,各 PCR 能扩增出特异性目的条带的最小 DNA 质量浓度在 0.89~3.60 ng/ μ L(表 2,图 5—6)。

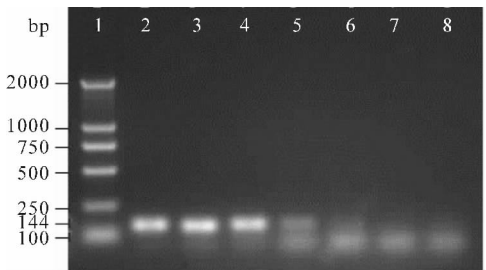
表 2 灵敏度检测结果

细菌种类	初始 DNA 含量/ (ng/ μ L)	最高稀 释倍数	DNA 含量/ (ng/ μ L)
乳酸乳球菌	113.3	2 ⁻⁵	0.89
产气荚膜梭菌	135.3	2 ⁻³	3.40
变形杆菌	321.2	2 ⁻⁵	0.91
肠球菌	28.7	2 ⁻³	3.60
绿脓杆菌	130.6	2 ⁻³	3.30



1. DL2000 Marker; 2—8. DNA 稀释倍数分别为 2⁰—2⁻⁶

图 5 乳酸乳球菌 DNA 倍比稀释后 PCR 结果



1. DL2000 Marker; 2—8. DNA 稀释倍数分别为 2⁰—2⁻⁶

图 6 肠球菌 DNA 倍比稀释后 PCR 结果

2.4 临床检测结果

由表 3 可以看出,每种细菌的 PCR 法检出率均高于传统的细菌分离鉴定。表明所建立的 PCR 方法比传统的分离鉴定法灵敏。其原因可能是,传统的分离鉴定需要对样品进行增菌培养,优势菌群的生长速度远远大于含量较少的菌群,进而使少量菌群的生长受到抑制,影响分离效率。而 PCR 方法检测病原菌,不需要进行增菌培养,可以尽可能地避免优势菌群的影响,从而检测出含量较少的菌群。

表 3 临床检测结果

细菌种类	样品总数/份	PCR 法阳性数/份	传统方法阳性数/份	符合率/%
乳酸乳球菌	32	22	20	90.91
产气荚膜梭菌	32	3	1	33.33
变形杆菌	32	17	12	70.59
肠球菌	32	6	6	100
绿脓杆菌	32	14	12	85.71

3 结论与讨论

16S rDNA 具有高度保守的一级结构^[17-19],种间差异小,非常适于细菌种属的检测。本试验利用 16S rDNA 的特异性保守序列建立了针对产气荚膜梭菌、乳酸乳球菌、绿脓杆菌、变形杆菌、肠球菌的 PCR 检测方法。在方法的特异性检验中,5 对

引物除了能特异地扩增出目的片段之外,均无其他非特异条带;在扩增其他种属细菌的 DNA 模板时,也未见扩增条带出现,表明引物具有非常高的特异性。对目的基因的扩增灵敏度在 $0.89 \sim 3.60 \text{ ng}/\mu\text{L}$,能够灵敏地检测出样品中的少量细菌。用 PCR 方法检测细菌,DNA 模板的获取至关重要,良好的 DNA 提取方法能在很大程度上影响 PCR 检测的灵敏度。试验中所涉及的引物目的片段长度适中,用常规方法获取 DNA 进行扩增即可得到良好的效果,可操作性强。同时通过试验优化了反应条件,建立了奶牛乳房炎 5 种病原菌的 PCR 检测方法,并在临床中进行了应用。由临床检验结果可知,5 种细菌的 PCR 检出率明显高于传统的细菌分离鉴定法。传统的分离鉴定方法耗时费力,且在分离某些含量低的细菌时,还有可能受到优势菌群的干扰,导致难以达到理想的效果。本研究所建立的 PCR 检测方法有效地避免了这些问题,使临床检测更加方便、准确。

参考文献:

- [1] 吴润,郝保青,农向,等. 奶牛隐性乳房炎的主要病原菌的 PCR 鉴定[J]. 中国牛业科学,2006,32(2):12-16.
- [2] 吕贞龙,尹召华,杨章平,等. 奶牛隐性乳房炎发病规律的初步研究[J]. 中国奶牛,2008(2):39-40.
- [3] 李素英. 中西药结合治疗奶牛临床性乳房炎的疗效观察[J]. 河南农业科学,2013,42(5):163-165.
- [4] 刘红侠. 奶牛乳房炎综合防治措施[J]. 现代农业科技,2012(19):279-280.
- [5] 尚友安,王照忠,徐先军. 奶牛乳房炎的发生原因及防治对策[J]. 现代农业科技,2010(20):332.
- [6] 王东,孙英峰,池晶晶,等. 奶牛真菌性乳房炎敏感药物的筛选[J]. 天津农业科学,2012,18(3):136-140.
- [7] Halasa T, Huijps K, Osterds O, *et al.* Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review[J]. Vet Quarterly,2007,29(1):18-31.
- [8] Bradley A J. Bovine mastitis: An evolving disease[J]. Vet Journal,2002,16(4):116-128.
- [9] 王桂琴. 奶牛乳腺炎的病因及防治[J]. 上海畜牧兽医通讯,2005(5):56-57.
- [10] 琚鹏飞,图格木乐. 奶牛乳房炎诊断方法[J]. 畜牧与饲料科学,2011,32(3):104.
- [11] 杨玉艾,杨亮宇,李红炳,等. 乳房炎乳样中链球菌的 PCR 检测[J]. 畜牧兽医科技信息,2010(11):16-17.
- [12] 朱战波,孙冰,崔玉东,等. 奶牛乳房炎 4 种主要病原菌 PCR 检测鉴定方法研究[J]. 中国兽医杂志,2001,43(11):24-27.
- [13] 谢志勤,谢芝勋,唐小飞,等. 多重 PCR 快速检测奶牛乳房炎 3 种主要病原体[J]. 畜牧与兽医,2006,38(7):4-7.
- [14] 张善瑞,王长法,高运东,等. 应用 PCR 方法检测奶牛乳房炎主要病原菌[J]. 家畜生态学报,2007,28(4):78-80.
- [15] 周斌,程杰,潘开元. 奶牛乳房炎 3 种主要病原多重 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医,2011,43(4):68-72.
- [16] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, *et al.* Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR[J]. Journal of Applied Microbiology,2004,97:1166-1177.
- [17] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews,1995,59(1):143-169.
- [18] 肖斌,陈玉惠. 2 株具有抗菌活性放线菌的筛选及鉴定[J]. 现代农业科技,2012(24):129-130.
- [19] 朱凤琼,陈达燕,杨林富,等. 猪肺炎支原体 PCR 检测方法的建立研究[J]. 现代农业科技,2012(3):319-321.