

牛无浆体 16S rRNA 基因的克隆测序及分析

周作勇^{1,4}, 聂奎², 唐成³, 胡世君¹, 周荣琼¹, 张泽^{4*}

(1. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆 402460; 2. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715;

3. 四川省遂宁船山区畜牧食品局, 遂宁 629000; 4. 西南大学蚕学与系统生物研究所, 重庆 400715)

摘要: 从自然感染无浆体的重庆黄牛无菌采集血液, 提取全血基因组, 用血营养菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 得到长约 1 500 bp 的扩增片段, 将其克隆到 pMD18-T 载体后进行测序, 并与 5 条边缘无浆体、4 条中央无浆体、4 条牛无浆体、4 条羊无浆体和 3 条嗜吞噬细胞无浆体 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析。结果表明所克隆的基因片段长度为 1 412 bp, GenBank 登录号为 FJ169957。序列比较结果显示, 所获得的序列与 Kawahara 公布的牛无浆体日本株 (AB211163) 同源性最高, 达到 99.0%, 系统发育分析发现, 该序列被聚类到牛无浆体群, 并与嗜吞噬细胞无浆体群聚类到一个大的分支。本文从分子水平证实重庆地区存在牛无浆体, 牛无浆体与嗜吞噬细胞无浆体的亲缘关系比其他 3 种无浆体更近。

关键词: 牛无浆体; 16S rRNA; PCR; 序列分析

中图分类号: S852.64

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)10-1359-05

Cloning and Sequence Analysis of the 16S rRNA Gene of *Anaplasma bovis* in Cattle

ZHOU Zuo-yong^{1,4}, NIE Kui², TANG Cheng³, HU Shi-jun¹, ZHOU Rong-qiong¹, ZHANG Ze^{4*}

(1. Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University,

Chongqing 402460, China; 2. College of Animal Science and Technology, Southwest University,

Chongqing 400715, China; 3. Chuanshan Animal Husbandry Bureau of Suining, Suining

629000, China; 4. Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University,

Chongqing 400715, China)

Abstract: In the study, we cloned and sequenced the 16S rRNA gene of *Anaplasma bovis* isolated from Zhongxian in Chongqing. The 16S rRNA gene of *A. bovis* was 1 412 bp in length. The sequence was submitted to GenBank (accession number: FJ169957). The 16S rRNA gene of *A. bovis* (FJ169957) had highest homology (99.0%) with that by Kawahara published (AB211163). In addition, 5 homologous sequences from *A. marginale*, 4 from *A. centrale*, 4 from *A. bovis*, 4 from *A. ovis* and 3 from *A. phagocytophilum* available were downloaded from GenBank. Phylogenetic analyses on *Anaplasma* 16S rRNA sequences were performed. The results indicated that *A. bovis* has closer genetic relationship to *A. phagocytophilum* than that to *A. marginale*, *A. centrale* and *A. ovis*.

Key words: *Anaplasma bovis*; 16S rRNA; PCR; sequence analysis

无浆体 (*Anaplasma*) 是一类由蜱传播的专性细胞内寄生菌, 主要寄生于牛羊等动物的红细胞, 引起边虫病 (Anaplasmosis, 也称微孢子虫病)^[1]。该病

临床症状为高热、贫血、黄疸和渐进性消瘦, 严重感染时可导致死亡, 给养殖业造成严重的经济损失^[2]。目前已报道的能引起牛发病的无浆体有边缘无浆体

收稿日期: 2010-03-12

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目 (CSTC, 2006BA1009); 西南大学青苗基金 (09QMR01); 西南大学荣昌校区动医系科研基金

作者简介: 周作勇 (1979-), 男, 四川冕宁人, 讲师, 博士生, 主要从事分子进化与进化基因组学研究, E-mail: zzyxny@163.com

* 通讯作者: 张泽, E-mail: zezhang@swu.edu.cn

(*Anaplasma marginale*)、中央无浆体(*Anaplasma centrale*)、牛无浆体(*Anaplasma bovis*)和嗜吞噬细胞无浆体(*Anaplasma phagocytophilum*) 4 个种^[3]。1987 年,我国最早在河北卢氏县分离到牛边缘无浆体,近年来国内已有多篇关于牛无浆体病及无浆体感染检测方法的报道,但是这些报道的病原均为牛边缘无浆体^[4-7]。2005 年,Liu 等从分子水平证实了在我国西北地区存在边缘无浆体和羊无浆体^[8],作者的研究也证实重庆地区存在牛边缘无浆体感染^[9]。目前为止,我国尚未见有中央无浆体(*A. centrale*)、牛无浆体(*A. bovis*)和嗜吞噬细胞无浆体(*A. phagocytophilum*)感染牛的报道。在本试验中,作者首次克隆测序了重庆忠县牛无浆体(*A. bovis*)16S rRNA 基因序列并进行了系统发育分析。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker2000、pMD18-T 载体均购自 TaKaRa 公司;全血基因组提取试剂盒、胶回收试剂盒购于 Promega 公司。克隆有边缘无浆体 16S rRNA 基因片段(FJ389578)的阳性质粒由西南大学荣昌校区预防兽医学实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 登录的血营养菌 16S rRNA 基因设计通用引物,上游引物 SF:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物 SR:5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,预计扩增片段长度为 1 500 bp 左右。

1.2.2 全血基因组 DNA 提取 用一次性 10 mL 注射器于忠县野外放养的黄牛颈静脉采血 5~8 mL,柠檬酸钠抗凝,4 °C 保存备用。经血液涂片姬姆萨染色镜检疑似无浆体感染者,将抗凝血 2 000 r·min⁻¹离心 2 min,小心吸取红细胞 300 μL 按全血基因组提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。

1.2.3 无浆体 16S rRNA 基因 PCR 扩增 PCR 反应体系总体积 25 μL,其中 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.0 μL 和 dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹)0.5 μL, SF(20 μmol·L⁻¹)0.5 μL, SR(20 μmol·L⁻¹) 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.25 μL, ddH₂O 18.75 μL, 模板 1 μL。

PCR 程序:94 °C 变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次;最后 72

°C 延伸 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 无浆体 16S rRNA 基因克隆测序 按试剂盒说明书进行 PCR 扩增产物回收,与 pMD18-T 载体连接并转化至 DH5α 受体菌中,筛选阳性克隆进行质粒提取及 PCR 鉴定后,送上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果用在线 BLASTn 进行同源性搜索。

1.2.5 系统树的构建及序列分析 以立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*) (L36217)和反刍类考德里体(*Cowdria ruminantium*) (X61659)作为外群,选择无浆体科牛边缘无浆体(*A. marginale*) (AF309866、AF309867、AF389578、AF389579 和 AF414871)、中央无浆体(*A. centrale*) (EF520686、AF414869、AF318944 和 AF309869)、牛无浆体(*A. bovis*) (GU064901、GU064902、AF470698、AB211163 和 FJ169957)、羊无浆体(*A. ovis*) (AJ333049、AJ333050、AJ333051 和 AJ333052) 和嗜吞噬细胞无浆体(*A. phagocytophilum*) (AF470701、AB196721 和 AB196720)共 21 条 16S rRNA 基因序列,用 Clustal X 1.83 程序进行 16 S rRNA 基因序列对位排序,采用 Mega4.0 数据处理,按照 Kimura 双参数法计算遗传距离,采用邻近法(NJ)构建 16SrRNA 基因的分子系统树,并用 DNASTar 软件进行多序列的同源性比较。

2 结 果

2.1 牛无浆体感染血样染色镜检

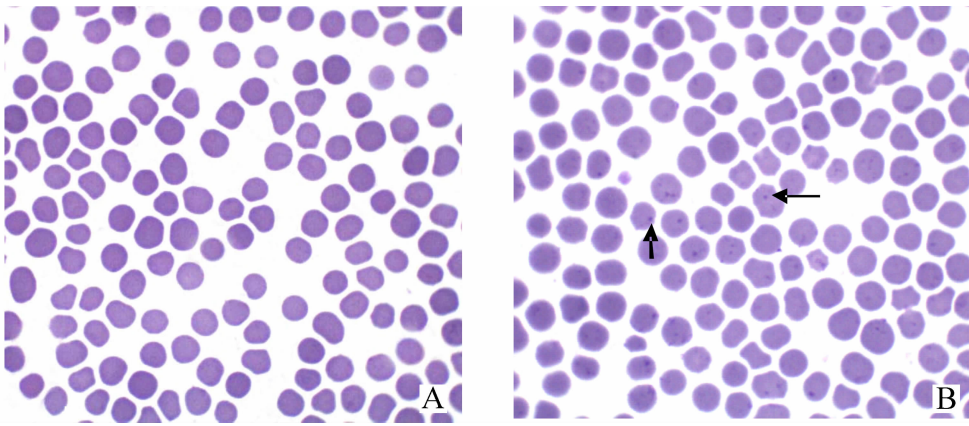
对采集的黄牛血液进行涂片染色,无浆体感染为阴性牛的红细胞呈圆形,紫红色(图 1A)。无浆体感染阳性牛的红细胞边缘或红细胞内部可见有一个或多个呈蓝紫色的无浆体(图 1B 箭头所示)。

2.2 牛无浆体 16S rRNA 基因 PCR 扩增

利用通用引物对所提取的无浆体阳性和阴性血样全血基因组 DNA 进行 PCR 扩增,设牛边缘无浆体 16S rRNA 基因阳性质粒(FJ389578)作为对照。结果牛无浆体感染呈阳性的血样扩增出大小约为 1 500 bp 的条带,牛边缘无浆体 16S rRNA 基因对照也扩增出大小为 1 500 bp 左右的条带,而镜检无浆体感染呈阴性的血样未扩增出条带(图 2)。

2.3 牛无浆体 16S rRNA 基因测序结果及序列分析

对扩增得到的 DNA 片段进行克隆测序和序列比对分析,结果所扩增的牛无浆体 16S rRNA 基因

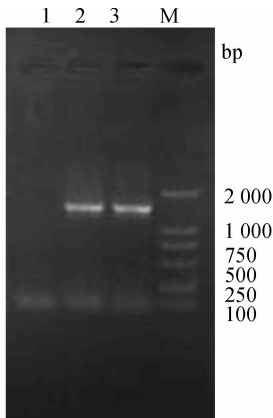


A. 阴性血样;B. 阳性血样,→示无浆体

A. Negative blood sample; B. Positive blood sample,→ denotes *A. bovis*

图 1 牛血液样本无浆体感染姬姆萨染色镜检结果 ×1 000

Fig. 1 Detection of *Anaplasma bovis* from blood by microscope ×1 000



M. DL2000 相对分子质量标准;1. 镜检阴性血样;2. 牛边缘无浆体 16S rRNA 基因;3. 镜检阳性血样

M. DL2000 marker;1. Negative blood of *A. bovis* infection detected by microscope;2. 16S rRNA gene of *A. marginale*;3. Positive blood of *A. bovis* infection detected by microscope

图 2 牛无浆体 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of 16S rRNA gene of *A. bovis*

序列为 1 412 bp,GenBank 登录号为 FJ169957。同源性比对发现,该序列与 Kawahara 公布的牛无浆体日本株(AB211163)同源性最高,达到 99.0%,与其他几株牛无浆体的同源性为 97.4%~98.2%。与边缘无浆体同源性为 94.5%~94.8%,与中央无浆体的同源性为 94.6%~94.7%,与羊无浆体的同源性为 94.6%~94.7%,而与嗜吞噬细胞无浆体的同源性为 94.9%~95.0%。与立克次氏体(*Rickettsia rickettsii*)(L36217)和反刍类考德里体(*Cow-*

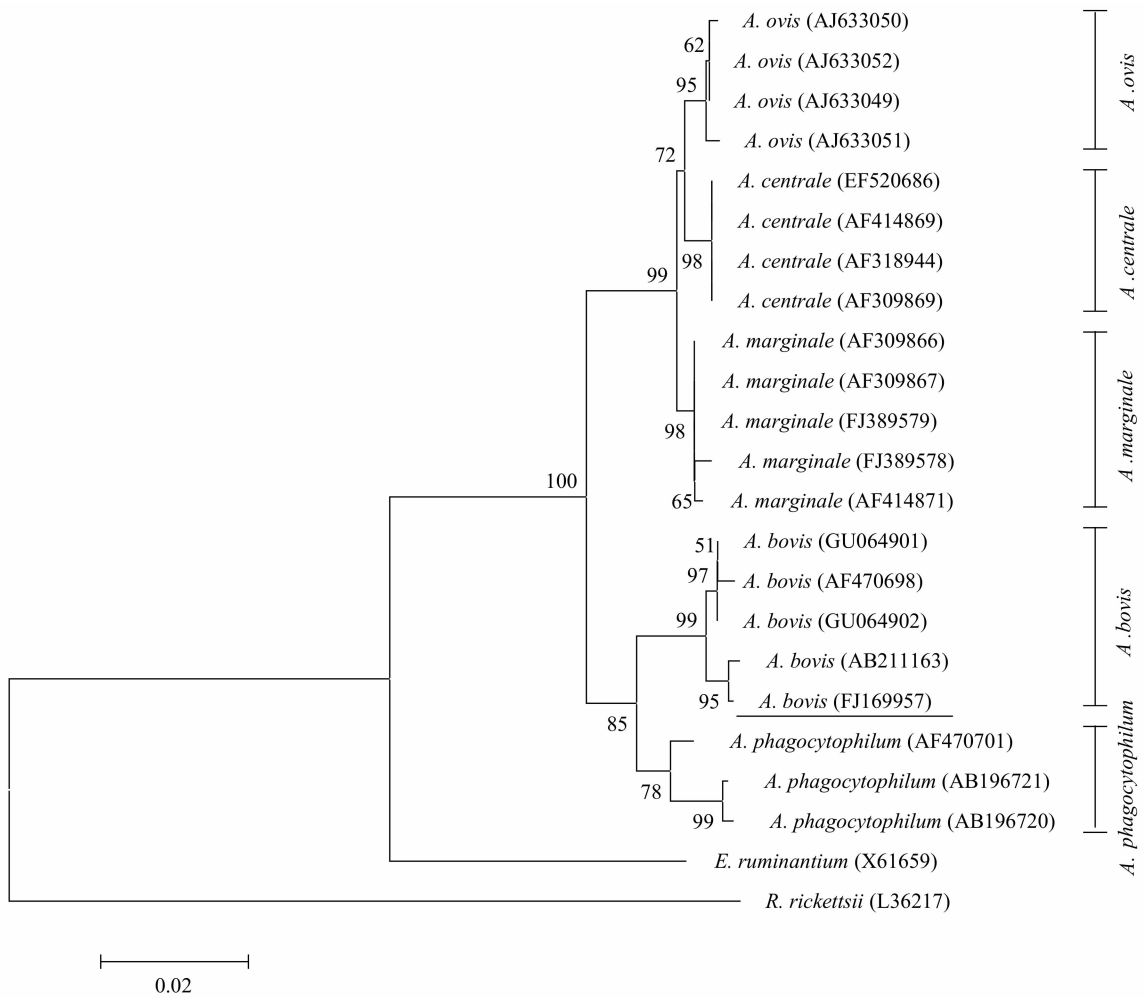
dria ruminantium)(X61659)同源性最低,分别为 88.3%和 78.1%。

2.4 系统进化树的建立和分析

依据所建立的无浆体系统发育树,除去外群,系统树可分为 5 个明显的分支,第 1 个分支为羊无浆体(*A. ovis*),第 2 个分支为中央无浆体(*A. centrale*),第 3 个分支为牛边缘无浆体(*A. marginale*),第 4 个分支为牛无浆体(*A. bovis*),第 5 个分支为嗜吞噬细胞无浆体(*A. phagocytophilum*)。作者克隆获得的牛无浆体 16SrRNA 序列被聚类到牛无浆体群(图 3)。

3 讨论

牛无浆体(*A. bovis*)感染牛的报道主要集中在非洲国家,该病在这些国家主要引起牛的亚临床感染,其症状表现包括发热、淋巴性疾病、精神沉郁和生产性能下降等,然而对该病原的流行病学研究资料很少^[10]。2008 年,Ooshiro 等在日本于那国岛(Yonaguni Island)牛血液中检测到牛无浆体(*A. bovis*),首次在亚洲地区证实存在该病原感染^[11]。作者的研究结果首次证实了牛无浆体(*A. bovis*)在我国重庆地区存在。本次试验发现牛无浆体大多数寄生在红细胞边缘,有的也位于红细胞内部,一般每个红细胞染虫 1~4 个,其涂片染色特点类似于边缘无浆体,边缘无浆体亦大多寄生于牛红细胞的边缘,每个红细胞可染虫 1~3 个^[12]。对重庆忠县牛无浆体 16S rRNA 基因序列同源性分析发现,该序列与



枝上显示数字为 Bootstrap 1 000 次重复抽样百分比

The numbers at nodes are the bootstrap values of 1 000 resampling replicates

图 3 用 16S rRNA 基因序列构建的无浆体系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Anaplasma* species based on partial nucleotide sequences of the 16S rRNA gene by using Neighbor-Joining method

Kawahara 公布的牛无浆体日本株 (AB211163) 同源性最高, 达 99.0%; 而与边缘无浆体、中央无浆体和羊无浆体同源性为 94.5%~94.8%, 均低于该序列与嗜吞噬细胞无浆体的同源性 (94.9%~95.0%)。系统发育分析也发现牛无浆体 (*A. bovis*) 与嗜吞噬细胞无浆体 (*A. phagocytophilum*) 被聚类到一个大的分支中, 而边缘无浆体、中央无浆体和羊无浆体被聚类到另一个大的分支, 表明牛无浆体与嗜吞噬细胞无浆体 (*A. phagocytophilum*) 亲缘关系比与边缘无浆体 (*A. marginale*)、中央无浆体 (*A. centrale*) 和羊无浆体 (*A. bovis*) 的亲缘关系更近, 该结果与 Dumler 等的分析结果一致^[13]。

国内研究已经证实微小牛蜱 (*Boophilus micro-*

plus)、亚东璃眼蜱 (*Hyalomma asiaticum*)、篦子硬蜱 (*Ixodes ricinus*) 和有纹革蜱 (*Dermacentor pictus*) 可以传播边缘无浆体, 草原革蜱 (*Dermacentor nuttalli*)、亚东璃眼蜱 (*H. asiaticum*) 和短小扇头蜱 (*Rhipicephalus Purmilio*) 可以传播羊无浆体^[4], 而牛无浆体的传播媒介在我国还是空白。在非洲一些国家的研究已经表明璃眼蜱属 (*Hyalomma spp.*) 和具尾扇头蜱 (*Rhipicephalus appendiculatus*) 为牛无浆体的传播媒介^[14], 在亚洲的日本和韩国一些学者研究认为长角血蜱 (*Haemaphysalis longicornis*) 和巨棘血蜱 (*Haemaphysalis megaspinosa*) 可能是传播牛无浆体, 造成牛边虫病流行的重要媒介^[15-17]。Jilintai 等试验发现, 日本北海道 15%

的牛感染牛无浆体,低于梅花鹿牛无浆体的感染率(23%),认为梅花鹿由于野外饲养,和蜱接触机会更多,因此无浆体的感染率更高,他们对3头牛无浆体16S rRNA 基因 PCR 产物进行测序,发现与作者报道的忠县牛无浆体 16S rRNA 的同源性达100%^[18]。由于牛无浆体主要在热带、亚热带和部分温带地区广泛传播,重庆市为亚热带湿润季风气候,适宜于该病原的传播,在重庆地区,牛微小牛蜱(*Boophilus microplus*)感染率达15%^[19],微小牛蜱是否为重庆地区牛无浆体的传播媒介以及重庆地区牛无浆体感染率如何有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LEW A E, GALE K R, MINCHIN C M, et al. Phylogenetic analysis of the erythrocytic *Anaplasma* species based on 16S rDNA and GroEL (HSP60) of *A. ovis* and the specific detection of *A. centrale* vaccine strain[J]. *Vet Microbiol*, 2003, 92:145-160.
- [2] KOCAN K M, BLOUIN E F, BARBET A F. Anaplasmosis control: past, present and future[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 916:501-509.
- [3] INOKUMA H. Vectors and reservoir hosts of *Anaplasmatataceae*[M]//Raoult D, Parola P. Rickettsial Diseases. New York: Taylor & Grancis Group LLC, 2007: 199-212.
- [4] 党志胜, 蒋锡仕, 黄孝玢. 我国牛羊边虫及边虫病的研究现状[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2003, 33(4): 39-41.
- [5] 何德肆, 李海辉, 欧阳叙向, 等. 湖南省部分地区牛无浆体病感染情况调查[J]. 中国草食动物, 2009, 29(1):41-43.
- [6] 王贵强, 李树清, 张子群, 等. 实时荧光 PCR 检测牛边缘无浆体方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(8):634-636.
- [7] 李海辉, 何德肆, 欧阳叙向, 等. 奶牛无浆体人工感染实验动物及其传播途径的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10):790-794.
- [8] LIU Z J, LUO J X, BAI Q, et al. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in China for phylogenetic analysis[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 107: 145-148.
- [9] ZHOU Z Y, NIE K, TANG C, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Anaplasma* in Southwestern China based on 16S rRNA sequence[J]. *Res Vet Sci*, 2010, 89(2):262-265.
- [10] WOLDEIHWET Z, SCOTT G R. Tick-borne (pasture) fever[M]//Woldehiwet Z, Ristic M. Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Oxford: Pergamon Press, 1993:233-254.
- [11] OOSHIRO M, ZAKIMI S, MATSUKAWA Y, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa Japan[J]. *Vet Parasitol*, 2008, 154:360-364.
- [12] 陈江, 何德肆, 刘毅, 等. 牛边缘无浆体病原学研究进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(6):35-40.
- [13] DUMLER J S, BARBET A F, BEKKER C P, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmatataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Norickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51:2145-2165.
- [14] RIOCHE M. Lesion microscopique de la rickettsiose generale bovine *Rickettsia (Ehrlichia) bovis* (Donatien et Lestoquard 1936)[J]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 1967, 20:415-427.
- [15] KIM C M, KIM M S, PARK M S, et al. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* ticks from Korea[J]. *Vect Born Zoon Dis*, 2003, 3:17-26.
- [16] LEE M J, CHAE J S. Molecular Detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma bovis* in the Salivary Glands from *Haemaphysalis longicornis* Ticks[J]. *Vect Borne Zoonotic Dis*, 2010, 10(14):411-413.
- [17] YOSHIMOTO K, MATSUYAMA Y, MATSUDA H, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspina* in Hokkaido, Japan[J]. *Vet Parasitol*, 2010, 168(1-2):170-172.
- [18] JILINTAI, SEINO N, HAYAKAWA D, et al. Molecular survey for *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* infection in cattle in a pastureland where sika deer appear in Hokkaido, Japan[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(1):73-75.
- [19] 汤明, 聂奎, 吴庆东, 等. 重庆市畜禽寄生虫区系调查(一)[J]. 中国兽医寄生虫病, 2003, 11(1):25-30.