

甘肃地区牛源金黄色葡萄球菌分子鉴定及 RAPD 分型

邓海平, 蒲万霞*, 梁剑平, 倪春霞, 孟晓琴

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所 中国农业科学院新兽药重点开放实验室

甘肃省新兽药工程重点实验室, 兰州 730050)

摘要: 本研究目的是分离鉴定引起甘肃地区奶牛乳房炎的金黄色葡萄球菌, 掌握其基因型情况。利用 16S、23S rRNA 保守序列 PCR 扩增对乳房炎奶样中的金黄色葡萄球菌进行鉴定, 并进行 RAPD 基因分型。结果表明, 310 份奶样中共分离出金黄色葡萄球菌 100 株, RAPD 结果显示这 100 株金黄色葡萄球菌均可得到清晰的 RAPD 指纹图谱, 扩增产物在 2~7 条带之间, 具有多种带型组成。通过聚类分析 100 株菌产生 11 个基因型, 其中 I 型 4 株, II 型 4 株, III 型 10 株, IV 型 13 株, V 型 7 株, VI 型 24 株, VII 型 16 株, VIII 型 6 株, IX 型 4 株, X 型 10 株, XI 型 2 株。VI 型为该地区的流行优势菌群, 不同牛场各基因型菌株分布有明显差异。本研究说明牛场的环境与养殖条件对病原菌流行传播有明显的影响, 这一结果对地区性奶牛乳房炎的防治提供了可靠的理论依据。

关键词: 奶牛乳房炎; 金黄色葡萄球菌; 16S rRNA; 23S rRNA; RAPD; 基因型

中图分类号: S852.611

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)08-1134-06

Identification and RAPD Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Gansu Area

DENG Hai-ping, PU Wan-xia*, LIANG Jian-ping, NI Chun-xia, MENG Xiao-qin

(Key lab of New Animal Drug Project of Gansu Province, Key Openlab of New Animal Drug,

Lanzhou institute of Animal Sciences and Veterinary Pharmaceuticals, Chinese Academy

of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The aim of this study was to isolate and identify *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains causing bovine mastitis in Gansu province, and investigate genotype of this strains. 16S rRNA and 23S rRNA sequence was used for PCR identification on *S. aureus* isolate from milk samples of bovine mastitis. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) was utilized to research genotype of these strains. The results showed that 100 *S. aureus* strains were isolated and identified from 310 mastitis milk samples. All of the 100 *S. aureus* strains produced vivid fingerprint and number of electrophoresis strip was 2-7 with different banding pattern after RAPD. The *S. aureus* strains were separated to 11 genotype according to the cluster analysis and 4 strains were type I, 4 strains were type II, 10 strains were type III, 13 strains were type IV, 7 strains were type V, 24 strains were type VI, 16 strains were type VII, 6 strains were type VIII, 4 strains were type IX, 10 strains were type X and 2 strains were type XI. The preponderant genotype of *S. aureus* strains in this area was Type VI. Distribution of different genotype *S. aureus* strains were obvious difference in different cattle farm. Environment and factor of cultivation of the cattle farm had a distinct effect on transmission of pathogenic bacteria. These results provide a reliable theory evi-

收稿日期: 2011-01-08

基金项目: 国家科技支持计划(2006BAD04A05); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(1610322011010)

作者简介: 邓海平(1983-), 男, 甘肃兰州人, 助理研究员, 硕士, 主要从事兽医微生物研究, E-mail: denghaiping_001@163.com

* 通讯作者: 蒲万霞, E-mail: wanxiapu@yahoo.com.cn

dence for preventive treatment of regional bovine mastitis.

Key words: bovine mastitis; *Staphylococcus aureus*; 16S rRNA; 23S rRNA; RAPD; genotype

奶牛乳房炎是奶牛的常见病、多发病。不仅影响奶牛健康,降低乳制品质量,给奶牛养殖业造成巨大损失,还在一定程度上威胁到了公共安全。及时准确地掌握病原菌的种类和分子流行病学趋势对于该病的临床治疗和疫苗的研制都非常重要^[1-2]。DNA 随机多态性扩增(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术是一种简便、灵敏、可行的遗传标记技术。该技术问世后迅速在国内外被广泛应用于微生物的基因分型与鉴定^[3]。近年来有关金黄色葡萄球菌基因分型的研究主要集中于人医来源的菌株^[4],畜源菌株的基因分型研究相对较少,特别是奶牛乳房炎病原菌基因分型的相关研究在国内还罕有报道。本研究利用保守序列对引起甘肃地区奶牛乳房炎的金黄色葡萄球菌进行鉴定,并进行基因分型研究,探讨金黄色葡萄球菌性奶牛乳房炎分子流行病学特点,为地区性奶牛乳房炎的防治和基因工程疫苗的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

电泳分子量标准 DNA Ladder Marker(相对分子质量依次为 4 500、3 000、2 250、1 000、750、500、250 bp)、DL2000 Marker、Premix EX Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 提取试剂盒(离心柱型),购自 TIANGEN 生物制品公司;金黄色葡萄球菌标准菌 CVCC2246(购自中国兽医药品监察所);基因扩增仪(Biometra, GER)。

1.2 金黄色葡萄球菌分离鉴定

1.2.1 细菌纯化培养 310 份临床型乳房炎患牛奶样分别来自甘肃地区 3 个奶牛场。奶样接种于绵羊血平板培养基和却甫曼琼脂培养基纯化培养。

1.2.2 金黄色葡萄球菌生化鉴定 将菌落形态、镜检结果符合葡萄球菌特征的菌株参考相关生化特性进行金黄色葡萄球菌生化鉴定。

1.2.3 金黄色葡萄球菌分子生物学鉴定 根据已发表的金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 和 23S rRNA 基因保守序列(GenBank Accession No. X68417, No. X68425),并参照相关文献^[5-6],应用 Oligo6.67 软件设计 2 对引物(表 1)。提取菌落形态、镜检结果符合葡萄球菌特征菌株基因组 DNA

作为模板进行 PCR 扩增。采用 25 μ L 反应体系,扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 60 s,56.5 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物-20 $^{\circ}$ C 冻存。

表 1 扩增引物序列

Table 1 Primer of amplification

目标序列 Target sequence	引物 Primer
16S rRNA	P1:5'-GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3'
	P2:5'-TCCCGGTCCTCTCGTACTA-3'
23S rRNA	P3:5'-ACGGAGTTACAAAGGACGAC-3'
	P4:5'-AGCTCAGCCTTAACGAGTAC-3'

1.3 金黄色葡萄球菌分离株 RAPD 基因分型

1.3.1 引物设计与筛选 根据文献报道^[7-8],选择序列 OLP13:5'-ACCGCCTGCT-3',作为扩增引物。

1.3.2 RAPD 反应条件 采用 25 μ L 反应体系,体系参数:Premix 混合液 12.5 μ L, DNA 模板 2 μ L,引物 2 μ L,去离子水 8.5 μ L。PCR 循环参数:94 $^{\circ}$ C 5 min,37 $^{\circ}$ C 5 min,72 $^{\circ}$ C 5 min,循环 4 次;94 $^{\circ}$ C 1 min,37 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物-20 $^{\circ}$ C 冻存。

1.4 扩增产物凝胶电泳分析

取分子鉴定及 RAPD 扩增产物,1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,凝胶由 Quantity One 1-D 成像系统紫外成像。

1.5 数据分析

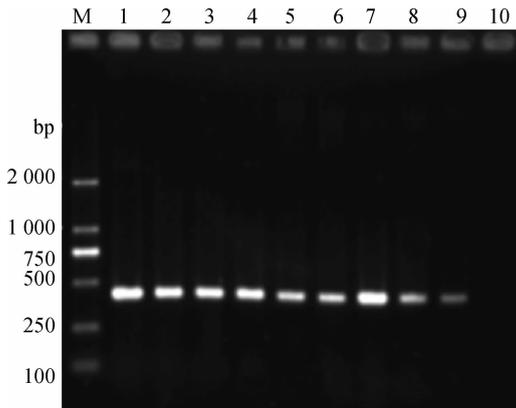
利用 BioNumerics 软件对 RAPD 扩增电泳结果进行数据处理,图像采用 Dice 相关系数和非加权组算术平均法 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)来进行聚类分析。

2 结果

2.1 细菌分离鉴定结果

菌株经生化鉴定,符合金黄色葡萄球菌生化指标菌株为 95 株;经金黄色葡萄球菌 16S rRNA 和 23S rRNA 保守序列 PCR 检测,有 100 株菌分别产

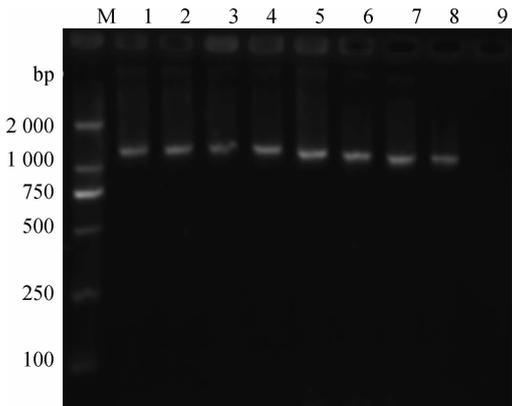
生了 450 和 1 250 bp 左右的目的片段(图 1、2)。结果表明生化鉴定结果与分子鉴定结果基本一致。分子鉴定为金黄色葡萄球菌的菌株情况见表 2。



M. DL2000 相对分子质量标准;1~8. 随机选择的阳性菌株;9. CVCC2246;10. 表皮葡萄球菌阴性对照
M. DL2000 Marker;1-8. *S. aureus* selected randomly; 9. CVCC2246;10. Negative control *S. epidermidis*

图 1 金黄色葡萄球菌 16S rRNA 鉴定结果

Fig. 1 Result of identification on 16S rRNA of *S. aureus*



M. DL2000 相对分子质量标准;1~7. 随机选择的阳性菌株;8. CVCC2246;9. 表皮葡萄球菌阴性对照
M. DL2000 Marker;1-7 *S. aureus* selected randomly; 8. CVCC2246; 9. Negative control *S. epidermidis*

图 2 金黄色葡萄球菌 23S rRNA 鉴定结果

Fig. 2 Result of identification on 23S rRNA of *S. aureus*

表 2 金黄色葡萄球菌菌株鉴定结果

Table 2 Result of identification on *S. aureus* isolates

牛场	菌株数	编号
Herds	Quantity of isolates	Serial number
QY	26	QY01~QY26
HG	39	HG01~HG39
KY	35	KY01~KY35

2.2 RAPD 结果

对分离鉴定出的 100 株金黄色葡萄球菌基因组 DNA 模板进行随机多态性扩增,扩增产物经凝胶电泳后结果显示所有菌株基因组 DNA 经扩增后均产生了清晰、可分辨的带谱,扩增产物在 2~7 条带,具有多种带型组成。利用 Bio-Numerics 分析软件对 100 株金黄色葡萄球菌 RAPD 产物电泳图谱进行聚类分析,建立了亲缘关系聚类图(图 3)。

可以看出,以相似性 0.4 为标准(竖线所示),100 株金黄色葡萄球菌根据其相似性可分为 11 个聚类群。其中 I 型 4 株,II 型 4 株,III 型 10 株,IV 型 13 株,V 型 7 株,VI 型 24 株,VII 型 16 株,VIII 型 6 株,IX 型 4 株,X 型 10 株,XI 型 2 株。

3 讨论

3.1 奶样中金黄色葡萄球菌分离鉴定

奶牛乳房炎是影响奶牛养殖业的主要疾病之一,是发病率最高、造成损失最大的奶牛疾病。据世界奶牛协会统计,全世界奶牛中有 50% 左右患各种类型的乳房炎^[9-10]。快速准确地掌握引起奶牛乳房炎病原菌的种类和分布是防治奶牛乳房炎和疫苗研制的首要条件。近年来,分子生物学技术在家畜疫病诊断中广泛应用。16S 和 23S rRNA 序列既具有高度保守性又具高变性,既能体现不同菌属之间的差异,又能利用测序技术快速得到核酸序列,已成为最理想的基因鉴定靶序列^[11]。作者利用金黄色葡萄球菌 16S 和 23S rRNA 保守序列设计扩增引物对奶样中分离出的金黄色葡萄球菌进行了 PCR 鉴定,并与传统鉴定方法进行了比较。结果表明 16S 和 23S rRNA 保守序列鉴定法和传统鉴定法两种方法的鉴定结果基本吻合。有 2 株菌传统方法未鉴定出,可能是因为受抗生素影响,菌体已经破裂死亡,所以无法检出。PCR 检测是以细菌基因组 DNA 保守序列为目标进行检测,病原菌的存活状态对其没有影响。而且分子鉴定的方法只需 1~2 d 即可得出结果,缩短了细菌性奶牛乳房炎的诊断时间,为及时的临床治疗提供了保障。

3.2 金黄色葡萄球菌 RAPD 分型

目前有多种方法用于金黄色葡萄球菌的分型,可归为两大类,一是表型分型,二是基因分型。随着分子生物学时代的到来,依赖于细菌 DNA 的分型方法更加受到关注。常用的金黄色葡萄球菌基因分型方法主要有高压脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)、

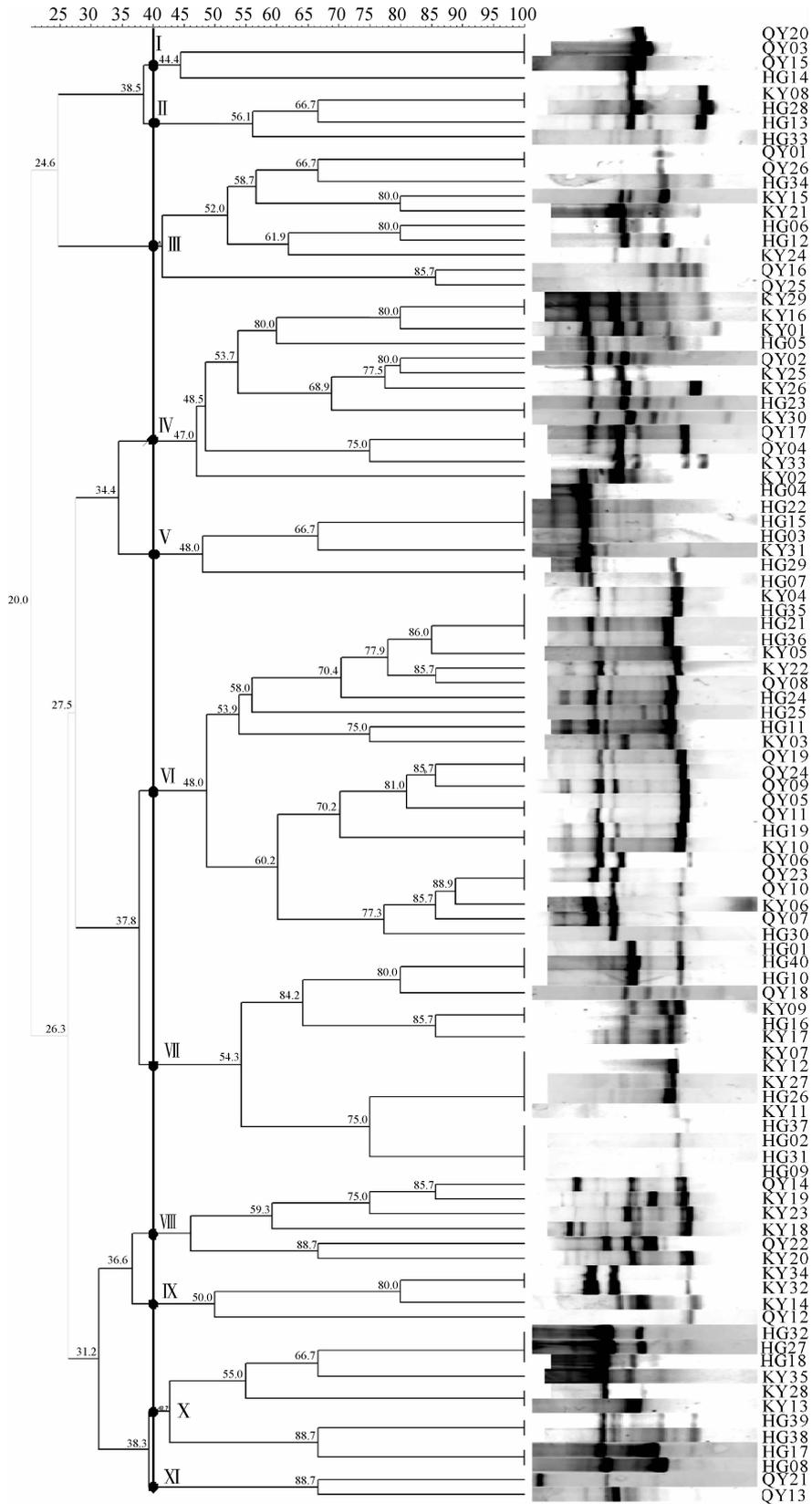


图 3 100 株金黄色葡萄球菌相似性关系树图

Fig. 3 Dendrogram of comparability between 100 *S. aureus* strains

多位点测序分型(MLST)、多位点数目可变串联重复序列指纹图谱分型(MLVF)等^[12]。其中 PFGE 是目前公认的金葡萄菌分型的“金标准”。但是 PFGE 也存在有 2 个缺点,首先费时,不适于实验室大量样本的分析。另外,还需特殊设备,从而限制了其适用范围^[13-14]。RAPD 是近年来兴起的一种揭示基因多态性的基因分型方法,据国外研究报道,利用 RAPD 方法对医院分离的金黄色葡萄球菌进行分型并与 PFGE 方法分型结果进行比较后发现两种方法分辨力相当且分辨结果高度一致^[15]。说明 RAPD 与 PFGE 在金黄色葡萄球菌分型方面具有相同的高效性。

早在 1997 年 Fitzgerald 等^[16]就利用 RAPD 技术对牛源金黄色葡萄球菌进行了基因分型研究,但是近年来 RAPD 技术还是更多的应用于人医临床病原菌的分型,在兽医病原菌方面的应用较少。乌兰巴特尔等^[17]对内蒙古地区分离到的 63 株引起奶牛乳房炎的金黄色葡萄球菌进行了 RAPD 分型,共分为 12 个基因型;王琳等^[18]将新疆地区两个奶牛场分离到的 16 株金黄色葡萄球菌进行 RAPD 分型并探索了最适反应条件。由于菌株数量较少,所以只分出了 2 个基因型,且其中 14 株为同一基因型。本研究对采自甘肃地区乳房炎奶样中的 100 株金黄色葡萄球菌进行了 RAPD 分型,所有菌株染色体 DNA 均扩增得到了清晰可分辨的条带,清楚地反映了菌株间的基因多态性特征。根据聚类分析树状图结果,100 株菌显示出 11 种基因型,Ⅵ型为甘肃地区主要流行的优势菌群。这与乌兰巴特尔报道的结果相似,但是与 Fitzgerald 的结果不同,这可能与地理气候环境差异对病原菌交叉传播的影响不同有关。不同基因型菌株在各牛场的分布有明显差异,牛场 QY 的菌株主要为Ⅵ型(10/26),且Ⅰ型和Ⅺ型菌株只在该牛场出现。其他 2 个牛场的菌株在各基因型均有部分分布,且没有明显占优势的基因型菌群。这在一定程度上说明了牛场 QY 中菌株与其他牛场流行传播相对较少,所以基因型也会较集中地分布。而另外 2 个牛场中菌株交叉传播频繁,产生了多种显著的变异,菌株基因型分布广泛。同一省份 3 个牛场乳房炎金黄色葡萄球菌分离株基因型分布的差异一定程度上反映了不同地理环境对牛场病原菌流行传播的影响,但更多的反映出的是养殖、管理水平差异对牛场病原菌流行的影响。

4 结论

环境差异和养殖条件对乳房炎病原菌的种类和流行传播趋势起至关重要的作用,及时准确掌握病原菌种类及基因型情况可为乳房炎的治疗提供依据。应用保守序列分子鉴定和 RAPD 技术对畜源病原菌进行快速流行病学调查,为兽医传染病分子流行病学研究提供了切实可行的研究方法,特别是对一些未建立标准分型和缺乏血清学分型等方法的菌属鉴定和分型尤为实用。其在兽医分子流行病学和传染病学等领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 路桂环,陈敏,尹秀生,等. 奶牛乳房炎发病原因及危害 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2009, 12: 41.
- [2] 易明梅,冯华,朱建国,等. 生物制剂在奶牛乳房炎防治中的应用 [J]. 中国奶牛, 2007, 10: 45-47.
- [3] ELINA R, SUSANA B, CECILIA F, et al. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts [J]. *Microbiol Res*, 2004, 159: 245-255.
- [4] 朱成宾,高应东. RAPD 在金黄色葡萄球菌分型中的应用研究进展 [J]. 临床输血与检验, 2009, 11(3): 283-285.
- [5] FITZGERAIL J R, MONDAY S R, FOSTER T J, et al. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(1): 63-70.
- [6] MARTIN M C, FUEYO J M, GONZALEZ M A, et al. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks [J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 94(3): 279-286.
- [7] NEELA V, MARIANA N S, RADU S, et al. Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals [J]. *World J Microbiol & Biotechnol*, 2005, 21: 245-251.
- [8] RANDA G N, SALWA M, BDOU R HM, et al. Enterotoxicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 183-187.
- [9] 尹柏双,李国江. 奶牛乳房炎的研究新进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 182-184.
- [10] MARCUS V C, JANALNA S N, PATRLCIA C, et al. Activity of Staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*

- involved in bovine mastitis [J]. *Res Microbiol*, 2007, 158(7):1-6.
- [11] 李 鹏, 马艳娇, 赵 云. 16S rRNA、23S rRNA 及 16S~23S rRNA 基因在细菌分离与鉴定中的应用 [J]. *现代畜牧兽医*, 2008, 7:49-52.
- [12] 倪春霞, 蒲万霞, 胡永浩, 等. 金黄色葡萄球菌基因分型方法研究进展 [J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(10): 64-68.
- [13] BOU G, CERVERO G, DOMINGUEZ MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting REP-PCR, AP-PCR and pulsedfield gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2000, 6:635-643.
- [14] SABOUR P M, GILL J J, LEPP D, et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8):3449-3455.
- [15] CHI O C, WEI H, YANG L. Comparison of pulsed-field gelelectrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:2186-2190.
- [16] FITZGERALD J R, MEANEY W J, HARTIGANI P J. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows [J]. *Epidemiol Infect*, 1997, 119(5):261-269.
- [17] 乌兰巴特尔, 郝永清, 海 岩, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌的分子流行病学调查 [J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(2):21-23.
- [18] 王 琳, 杨学云, 王治才, 等. 奶牛乳房炎病例中金黄色葡萄球菌 RAPD-PCR 基因分型的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(11):76-78.

(编辑 白永平)