

复合 PCR 鉴定胸膜肺炎放线杆菌和多杀性巴氏杆菌方法的建立及初步应用

贺英 赵萍 储岳峰 高鹏程 张建军 逯忠新*

(中国农业科学院 兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室/农业部草食动物疫病重点开放实验室/农业部畜禽病毒学重点开放实验室,甘肃 兰州 730046)

摘要:在已经建立的胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌的单项 PCR 诊断方法的基础上,通过对扩增条件和引物的筛选,成功地建立胸膜肺炎放线杆菌(App)、多杀性巴氏杆菌(PM)复合 PCR 诊断方法,利用 1 次 PCR 反应,即可同时扩增 App 的 342 bp 和 PM 的 457 bp 的特异性片段。检测灵敏度分别达 $9.7 \text{ pgDNA}/1.4 \times 10^3 \text{ OCFU}$ 和 $16 \text{ pgDNA}/2.3 \times 10^3 \text{ OCFU}$,用建立的方法检测临床分离的 23 株可疑菌株,App 阳性 8 株,PM 阳性 2 株,与其它鉴定方法检测结果相符,表明该方法的建立能够对这 2 种疾病进行临床鉴别诊断。

关键词:胸膜肺炎放线杆菌;多杀性巴氏杆菌;复合 PCR;应用

中图分类号:S852.611 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0123-05

Development and Application of Multiplex-PCR for Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*

HE Ying ZHAO Ping, CHU Yue-feng,
GAO Peng-cheng ZHANG Jian-jun, LU Zhong-xin*

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Key Laboratory of Grazing Animal Diseases of Ministry of Agriculture Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The multiplex PCR detecting App and PM were developed based on published single PCR for these pathogens. The PCR reagents, annealing temperature and the PCR procedure were optimized and the primers were screened. A 342 bp fragment of App, and a 457 bp of PM could be simultaneously amplified in one reaction. App was as low as $1.4 \times 10^3 \text{ CFU}$ or 9 pg DNA and PM was as low as $2.3 \times 10^3 \text{ CFU}$ or 16 pg DNA. For 23 suspected isolates, this multiplex-PCR method correctly identified 4 App and 2 PM. The result suggests the usefulness of the multiplex PCR for routine identification of App and PM.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Pasteurella multocida* multiplex-PCR; application

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App)是猪传染性胸膜肺炎的病原菌,传染性胸膜肺炎是高度接触传染性呼吸道疾病^[1]。App为革兰氏阴性小球杆菌,有时呈链状或多形性。有荚膜或不完全荚膜。不形成芽孢且无鞭毛。有菌毛。血清型较多,共有 2 个生物型 15 个血清型^[2-3]。生物 I 型生长需烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)^[4-5],所有血清型都可以致病,但致病力强弱各有不同。

收稿日期:2009-10-30 修回日期:2009-12-10

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD06A12)、国家科技支撑计划项目(2006BAD06A01)和国家科技基础性工作专项(2008FY210200)

作者简介:贺英(1980-),女,研究实习员,主要从事细菌分子生物学研究,E-mail:heyings6576@163.com;* 通讯作者:逯忠新,研究员,E-mail:luzhongxin@hotmail.com。

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, PM)是猪肺疫的病原菌,是两端钝圆,中央微凸的短杆菌,革兰氏阴性。用印度墨汁等染料染色时,可看到清晰的荚膜。本菌利用不同的分类方式可分为若干血清型,一般应用特异性荚膜(K)抗原用英文大写字母表示,菌体(O)抗原和耐热抗原用阿拉伯数字表示来共同对其进行分类。猪肺疫在临床上可分为三类型:最急性猪肺疫突然发病、迅速死亡,病死率100%;急性型体温升高、呼吸困难,表现急性胸膜肺炎,多因窒息而死;就是慢性型的病死率也在60%~70%^[6-7]。给养猪业造成了巨大的损失。

这两种菌型态相似,生化鉴定上相似较多。故需要建立一种新的诊断方法,能够准确、快速区分这两种菌。本研究针对 App 的 *apxlVA* 基因的序列和 PM16SRNA 各设计特异性引物,建立了鉴定 App 和 PM 的复合 PCR 诊断方法,并作了初步的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 App 和 PM 标准菌株由中国农业科学院兰州兽医研究所传染病室保存。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA Polymerase、dNTP Mix、MgCl₂·10 × *Taq* buffer 均购自大连宝生物公司;DNA marker DL2000 购自大连宝生物公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)购自国药集团化学试剂有限公司;电泳琼脂糖为 BLOWEST 公司产品。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪(BIO. RAD PTC-100) 凝胶分析成像系统(BIO. RAD Gel Doc EQ) 核酸蛋白分析仪(ependorf biophotometer),台式高速低温离心机(Thermo MIC ROCL 17)。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中 App 的 *apxlVA* 毒素基因和 16S rRNA 序列发表引物和 PM 发表引物设计了 4 条特异性引物,引物由上海生工生物公司合成。序列如下:引物 P1:5' - GAT AAA CCT TTT CCG GAA TT - 3';引物 P2:5' - TAC CAC ACC GTG TTT ATC AA - 3'。引物 P3:5' - ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG - 3';引物 P4:5' - GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC - 3'。引物 P1 和 P2 为胸膜肺炎放线杆菌特异性引物^[8],引物 P3 和 P4 为多杀性巴氏杆菌特异性引物^[9]。

1.3 复合 PCR 试验方法的建立

1.3.1 菌株的培养和 DNA 的提取 将 App 接种于含 NAD 的胰蛋白胨大豆琼脂固体培养基上,烛缸法培养 18~24 h,再挑取单个菌落接种于液体培养基中,培养 18~24 h^[10]。将 PM 接种于血平板,37℃ 培养 24 h,再挑取单个菌落接种于液体培养基中,培养 18~24 h^[11]。

将液体培养物 5 000 r/min 离心 2 min,加入 400 μL 的裂解缓冲液(含 SDS、PrK 等),再用酚仿异戊醇抽提 2~3 次,加入无水乙醇沉淀 1~2 h,12 000 r/min 离心 5 min,φ(乙醇)=70% 洗涤 2~3 次,自然干燥 20 min 后,加入 50 μL TE 溶解 DNA,置 4℃ 备用^[12]。

1.3.2 复合 PCR 试验的扩增条件 反应体系为 50 μL,其中各组分的量为:DNA 模板(1:10)各 2 μL (50 pmol/L)、10 × *Taq* Buffer 5 μL、dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)5 μL、上、下游引物(50 pmol/L)各 0.5 μL、*Taq*TM DNA 聚合酶(5 U/L)0.5 μL,灭菌去离子水补至 50 μL。离心混合均匀后置 PCR 扩增仪中,反应条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 30 s,循环扩增 30 次,最后 72℃ 延伸 10 min,取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,观察结果。

1.3.3 PCR 特异性试验 用本文“1.3”的方法提取 Bb、HPS、Mhp、大肠杆菌和链球菌等标准菌株的 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增,分别以 App 和 HPS 参考菌株作阳性对照。反应结束,取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,观察结果。

1.3.4 PCR 的敏感性试验 核酸蛋白分析仪测量菌株的 DNA 浓度,系列 10 倍稀释后进行 PCR 反应,以 PCR 反应检测 DNA 的含量的灵敏度。反应结束后取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,观察结果。

1.3.5 复合 PCR 的应用 临床病料检测按本文“1.2.2”方法,以上述试验 PCR 反应条件对送检的 23 份患呼吸道病的临床猪肺病料抽提的 DNA 进行 PCR 检测,观察结果。

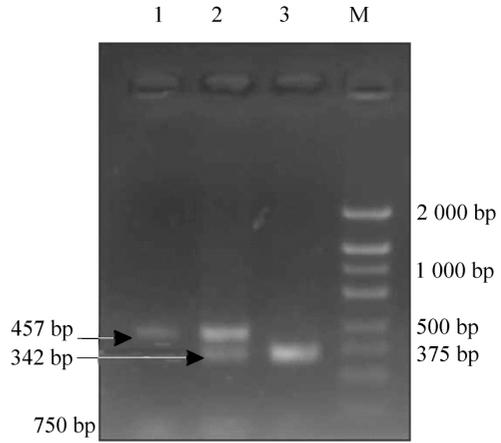
2 结 果

2.1 复合 PCR 诊断方法的建立

利用引物 P1、P2、P3、P4 同时在 1 个 PCR 反应体系中按本文 1.3.2 的方法分别对已知的 App、PM 样品 DNA 进行扩增,只扩增出了相应的片段;同时加入这 2 种模板,则一次扩出了 App 基因组中的 342 bp 和 PM 基因组中的 457 bp 2 个片段(图 1)。

2.2 PCR 特异性试验

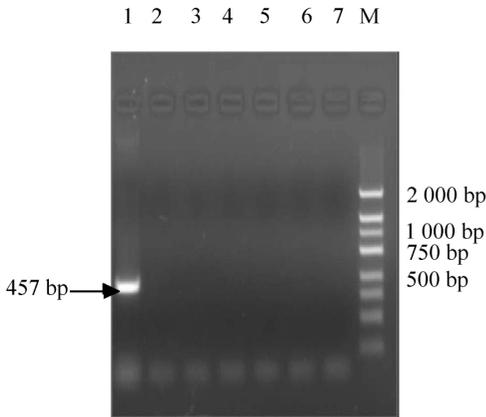
分别利用引物 P1、P2 和 P3、P4 对已经提取 Bb、HPS、Mhp、大肠杆菌和链球菌等标准菌株的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,分别以 App 和 PM 参考菌株作阳性对照。产物反应结束,取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测,结果 Bb、HPS、Mhp、大肠杆菌和链球菌等标准菌株均未出现特异性条带,阳性对照成立(图 2~图 3)。



1. 复合 PCR;2. 多杀性巴氏杆菌;3. 胸膜肺炎放线杆菌;M. 2 000 DNA 分子质量标准。

1. The multiplex - PCR; 2. PM; 3. App; M. DL2 000 DNA Marker.

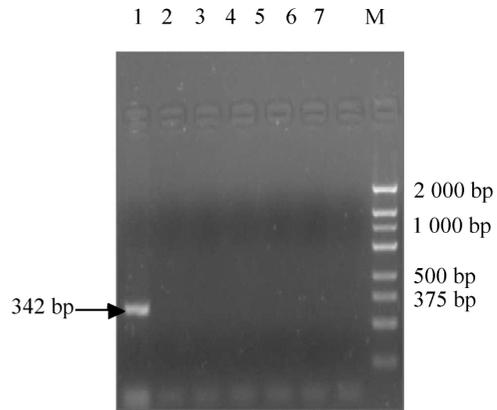
图 1 多杀性巴氏杆菌和胸膜肺炎放线杆菌复合 PCR 结果
Fig. 1 The multiplex - PCR product of PM and App



1. 巴氏杆菌;2. 支原体;3. 胸膜肺炎放线杆菌;4. 波氏杆菌;5. 大肠杆菌;6. 链球菌;7. 副猪嗜血杆菌;M. 2000 DNA 分子质量标准。

1. PM;2. Pms;3. App;4. Bb;5. *E. coli*;6. *Streptococcus*;7. HPS;M. DL2000 DNA Marker.

图 2 多杀性巴氏杆菌 PCR 特异性试验结果
Fig. 2 The PCR product of PM



1. 胸膜肺炎放线杆菌;2. 副猪嗜血杆菌;3. 支原体;4. 波氏杆菌;5. 大肠杆菌;6. 链球菌;7. 巴氏杆菌;M. 2 000 DNA 分子质量标准。

DNA Marker;1. App; 2. HPS;3. Pms; 4. Bb;5. *E. coli*;6. *Streptococcus*;7. PM ;M. DL2000.

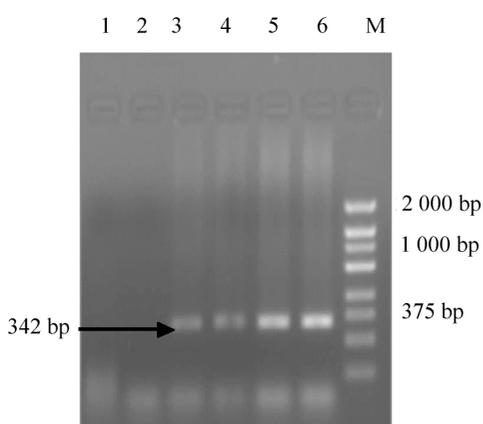
图 3 胸膜肺炎放线杆菌 PCR 特异性试验结果
Fig. 3 The PCR product of App

2.3 PCR 敏感性测定

将单模板 APP、PM 的 DNA 作 10 倍递增稀释后,分别用含特异性引物的 PCR 反应液进行 PCR,用 PCR 扩增的 PM DNA 稀释度分别为每 1 μ L 含 DNA 9.7 ng, 970, 97, 9.7, 0.97, 0.097, 0.0097, 7 pg, 前 4 个稀释度都出现阳性扩增,最后 2 个稀释度无扩增,PCR 最低检出 App DNA 浓度为 9.7 pg;PM DNA 稀释度分别为每 1 μ L 含 DNA 1.6 ng, 160, 16, 1.6, 0.16, 0.016, 0.0016 pg, 前 3 个稀释度都出现阳性扩增,后面其他稀释度均无扩增,PCR 最低检出 PM DNA 浓度为 16 pg;结果显示(图 4~图 5)。

2.4 应用结果

将 23 份送检疑似病料应用特异性引物进行扩增,扩增结果显示 13 份送检病料为阴性,8 份为 APP 感染,扩增出特异性条带 342 bp,2 份为多杀性巴氏杆菌感染,扩增出特异性条带 457 bp(图 6)。

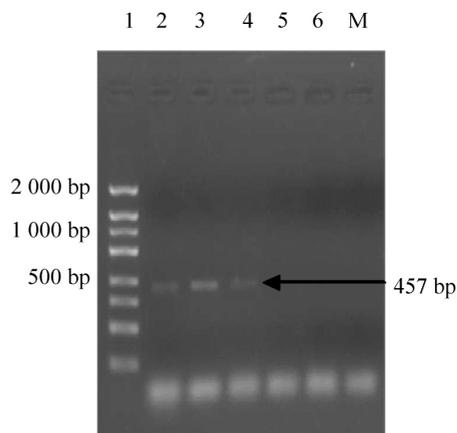


M. 2 000 DNA 分子质量标准;6 - 1. PCR 扩增的 App DNA 稀释度分别为每 1 μ L 含 DNA 9.7 ng ,970 , 97 μ g , 9.7 μ g , 0.97 μ g , 0.097 μ g , 0.009 7 μ g。

M. DL2 000 DNA Marker;6 - 1. PCR products from diluted DNA of App of 9.7 ng ,970 , 97 μ g , 9.7 μ g , 0.97 μ g , 0.097 μ g , 0.009 7 μ g.

图 4 引物 P1、P2 扩增不同浓度胸膜肺炎放线杆菌 DNA 的电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR am plification products from DNA of App



M. 2 000 DNA 分子质量标准;6 ~ 2. PCR 扩增的 PM DNA 稀释度分别为每 1 μ L 含 DNA 16 μ g ,1.6 ng , 160 μ g ,16 μ g , 0.16 μ g。

M. DL 2 000 DNA Marker;6 - 2. PCR products from diluted DNA of PM of 16 μ g ,1.6 ng ,160 μ g ,16 μ g , 0.16 μ g.

图 5 引物 P3、P4 扩增不同浓度多杀性巴氏杆菌 DNA 的电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from DNA of PM

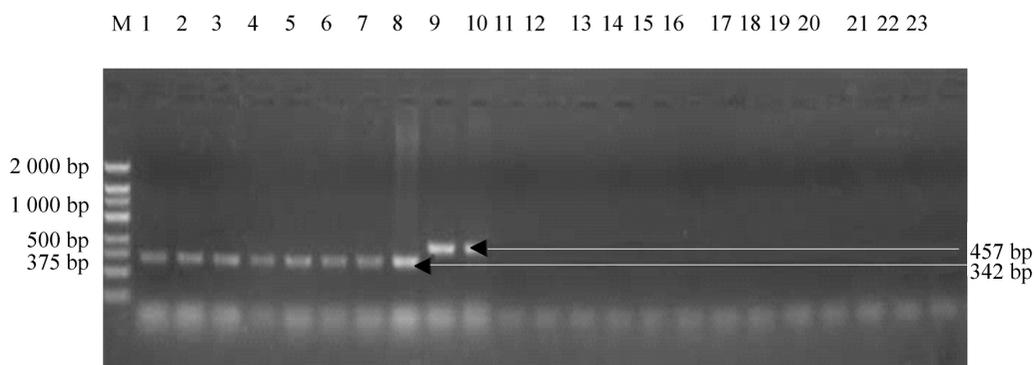


图 6 送检样品 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 6 The result of clinical application by multiplex - PCR

M. 2 000 DNA 分子质量标准;1 ~ 23 分别为送检样品肺组织匀浆悬浮液的上清液。

M. DL2 000 DNA Marker;1 - 23. Supernatant of Submitted samplelung tissue homogenate soliquoid.

3 讨 论

(1) 复合 PCR 是一种特殊的 PCR 形式 ,该方法已被不少学者用于检测多种疾病的混合感染及鉴别诊断中^[13]。本研究利用扩增 App、PM 特异性片段的 2 对引物在 1 次 PCR 反应中扩增出 342 bp、457 bp 的特异性片段 ,成功建立了 App、PM 的复合 PCR 检测方法。该方法的建立对在临床上进行这 2 种疾病的鉴别诊断和混合感染的检测都具有很高的使用价值。

(2) 在引物的选择上 ,本试验经过多次筛选确定了 2 对特异性引物 ,使这 2 种引物均不能从其他呼吸道疾病病原扩增出特条带 ,很好的提高复合 PCR 的特异性。

(3) 在敏感性试验中 ,App 和 PM 最低检测量分别为 9.7 μ g 和 16 μ g ,本试验的敏感性很好 ,所以对 DNA 的浓度要求不高 ,不仅能对临床症状明显的进行检测 ,同时也能够对隐性感染做出正确的判断结

果。这为这 2 种呼吸道疾病的预防和控制提供了很好的技术支持。

(4) 我们将复合 PCR 应用于近 1 年甘肃地区送检的 23 份组织样品中, 经检查出现 8 份 App 阳性, 2 份 PM, 其余均为阴性, 这与其他检测方法相一致^[14]。甘肃省猪传染性胸膜肺炎呈现流行趋势, 本试验方法在预防和控制过程中均能起到一定的作用。尤其在鉴别诊断上将发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Willson P J, Falk G, Klashinsky S. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs [J]. *Can Vet J*, 1987, 28(2): 111 - 116.
- [2] 逯忠新, 鲁炳义, 赵萍. 用间接血凝试验检测猪传染性胸膜肺炎 [J]. *中国兽医科技*, 1999, 29(10): 25 - 27.
- [3] Jansen R, Briaire J, Kamp E M, et al. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by *Apx* toxins [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 126(2): 139 - 143.
- [4] Gram T, Ahrens P, Nielsen J P. Vet microbiol evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils [J]. 1996, 51(2): 95 - 104.
- [5] Gram T, Ahrens P, Andreasen M, et al. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes - evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs [J]. *Vet Microbiol* 2000, 75(1): 43 - 57.
- [6] Keen Chiers, Jasad Van Overbeke. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene [J]. *Veterinary Microbiology* 2001, 83(8): 147 - 159.
- [7] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 198 - 200.
- [8] 梁金华, 刘镇明, 顾万军, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离及 PCR 诊断方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2004, 26(1): 36 - 38.
- [9] Davies R L, Maccorquodale R, Baillie S, et al. Characterization and comparison of *Pasteurella muhoecida* strains associated with *Porcine pneumonia* and *Atrophic rhinitis* [J]. *Journal of Microbiology* 2003, 52(1): 59 - 67.
- [10] Sthitmatee N, Sirinarumit T, Makonkeyoon L, et al. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based - *apx* genes [J]. *Mol Cell Probes* 2003, 17(6): 301 - 305.
- [11] Shivachandra S B, Kumar A A, Biswas A, et al. Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida* [J]. *Trop Anim Health Prod* 2004, 36(8): 743 - 750.
- [12] Register K B, DeJong K D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine [J]. *Vet Microbiol* 2006, 117(2): 201 - 210.
- [13] Shivachandra S B, Kumar A A, Biswas A, et al. Antibiotic sensitivity patterns among Indian strains of avian *Pasteurella multocida* [J]. *Trop Anim Health Prod* 2004, 36(8): 743 - 750.
- [14] 贺英, 赵萍, 储岳峰, 等. 复合 PCR 鉴定胸膜肺炎放线杆菌和副猪嗜血杆菌方法的建立及初步应用 [J]. *江西农业大学学报* 2009, 31(1): 13 - 17.