

检测禽多杀性巴氏杆菌 PCR 方法的建立

施少华^{1,2}, 程龙飞¹, 傅光华¹, 陈红梅¹, 万春和¹, 陈 珍¹, 彭春香¹, 黄 瑜¹

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;
2 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要: 为禽多杀性巴氏杆菌感染提供特异、敏感的诊断方法, 本研究建立了检测禽多杀性巴氏杆菌 PCR 方法。该方法能从禽多杀性巴氏杆菌扩增出 1 条 460 bp 的特异片段, 而无法从大肠杆菌、鸭疫里氏杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、禽 1 型副黏病毒、番鸭呼肠孤病毒和鸭基因组 DNA 扩增出目的片段。敏感性试验显示该 PCR 方法最低可检测出 1 ng· L⁻¹ 的细菌基因 DNA。
关键词: 禽源; 多杀性巴氏杆菌; PCR
中图分类号: S 85; TS 207 文献标识码: A

Development of PCR assay for detecting avian *Pasteurella multocida*

SHI Shao hua^{1,2}, CHENG Long fei¹, FU Guang hua¹, CHEN Hong mei¹, WAN Chun he¹, CHEN Zhen¹,
PENG Chun xiang¹, HU ANG Yu¹
(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China; 2 Fujian Animal Diseases Control Technology Development
Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: To establish a specific and sensitive detection methodology for avian *Pasteurella multocida* infection, PCR was applied. The 460 bp of the specific fragments was amplified from avian *P. multocida* genome. None could be obtained from *Escherichia coli*, *Riemerella anatipestifer*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Avian paramyxovirus type 1, Muscovy duck retrovirus or genome of duck. The sensitivity test indicated that a minimum of 1 ng· μL⁻¹ of avian *P. multocida* genome DNA could be detected by the newly developed PCR method.
Key words: fowl origin; *Pasteurella multocida*; PCR

禽霍乱又称禽多杀性巴氏杆菌病, 是一种由多杀性巴氏杆菌引起家禽和野禽发病死亡的接触性传染病, 常表现为败血型, 发病率和死亡率都很高, 但有时表现为慢性经过^[1]。早在 18 世纪欧洲各地的禽类常发生此病, 目前该病在世界大多数国家都有分布, 呈散发性或流行性, 给养禽业造成巨大的经济损失, 多年来一直都为国内外学者所重视, 被列为重点防治的家禽疫病之一。

在我国, 尤其南方数省, 禽霍乱仍然是危害养禽业的主要细菌性疫病之一, 发病率为 10% ~ 70%, 病死率为 30% ~ 80%, 除可造成巨大的直接经济损失外, 还可导致淘汰率增多、饲料转化率降低等不可估量的间接经济损失。然而随着禽病, 尤其是鸭病多病原混合感染的日益严重、类似病变的鸭病不断增多和禽霍乱的非典型性, 在临床上仅

依据症状和剖检病变难以获得确切性诊断, 即过去常规临床诊断的准确性大打折扣。因此, 急需建立一种简单、快速、特异和敏感的禽霍乱诊断技术应用 于兽医临床。

1 材料与方法

1. 1 菌株及质粒
- 禽多杀性巴氏杆菌 C48 1 由中国兽药监察所提供; 大肠杆菌、鸭疫里氏杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、禽 1 型副黏病毒、番鸭呼肠孤病毒由本研究室分离、鉴定和保存, 鸭红血球细胞为健康雏鸭按常规方法采集、洗涤而获得, 马丁肉汤由本研究室自制。
1. 2 酶和试剂
- Go TaqDNA 聚合酶购自 Promega 公司; DNA

收稿日期: 2009- 04- 12 初稿; 2009- 04- 26 修改稿
作者简介: 施少华 (1977-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事兽医微生物学的研究
通讯作者: 黄瑜 (1965-), 男, 博士, 研究员, 硕导, 主要从事动物传染病学研究 (E-mail: huangyu_815@ 163. com)
基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2007N0037); 现代农业产业技术体系建设专项资金

marker DL2000、dNTP Mixture 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖为 OXOID 公司产品, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通质粒小提试剂盒为 Omiga 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 细菌 DNA 提取

将单菌落接种于马丁肉汤液体培养基中, 37℃ 震荡培养过夜, 取 1.5 mL 培养物 13 000 g 离心 2 min, 沉淀中加入 540 μL 的 TE 缓冲液, 反复吹打使之重新悬浮, 加入 30 μL 10% SDS 和 15 μL 的蛋白酶 K, 混匀, 于 37℃ 温育 1 h, 加入 100 μL 5 mol · L⁻¹ NaCl, 充分混匀后加入等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 混匀后 13 000 g、4℃ 离心 10 min, 将上清转入另一离心管中, 加入 2.5 体积的无水乙醇, -20℃ 过夜 50℃ 作用 2 h 后 13 000 g、4℃ 离心 10 min, 沉淀用 1 mL 的 70% 乙醇洗涤后风干, 最后用适量的 ddH₂O 溶解、备用。

1.4 引物设计

参照 Kirsty 等^[2]的方法合成一对特异性引物, 该引物可扩增禽多杀性巴氏杆菌 *kmt* 基因片段:

P1: 5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3'

P2: 5'-GCTGTAAACGAACTCGCCAG-3'

预计扩增长度为 460 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.5 基因的扩增

PCR 反应体系为 25 μL, 其中模板 DNA 2 μL, 上下游引物 (20 pmol · L⁻¹) 各 1 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol · L⁻¹) 2 μL, 5 × Buffer 5 μL, MgCl₂ 2 μL, Go TaqDNA 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.25 μL, 以 ddH₂O 加足体系。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 51~55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 进行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。同时以 ddH₂O 做空白对照。取 5 μL PCR 产物在 1.0% (M · V⁻¹) 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物克隆测序

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 直接连入 pMD 18-T 载体后转化 DH5α 感受态细胞。经蓝白斑筛选后, 进行菌液 PCR 鉴定, 将鉴定为阳性克隆的菌株送往上海英骏生物有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 进行 Blast 搜索比对, 同时利用生物软件进行序列分析。

1.7 PCR 反应条件优化

主要从退火温度和 PCR 循环次数两方面进行调整来优化 PCR 扩增条件。退火温度梯度分别为 51℃、52℃、53℃、54℃ 和 55℃, PCR 循环次数从 20、25、28、31 和 35 次递增。取 5 μL PCR 产物, 用

1.0% (M · V⁻¹) 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

1.8 特异性试验

将大肠杆菌、鸭疫里氏杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、禽 1 型副黏病毒、番鸭呼肠孤病毒以及鸭红血球细胞按 1.3 方法提取核酸, 于同一 PCR 反应条件中进行扩增, 以检测该 PCR 方法特异性。

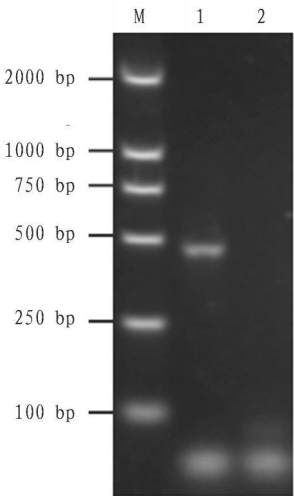
1.9 敏感性试验

对提取的禽多杀性巴氏杆菌基因组 DNA 以 ddH₂O 进行倍比稀释 (1: 10ⁿ), 按上述 PCR 反应的最佳反应条件进行 PCR 扩增, 测定模板最低检出浓度, 从而判定该 PCR 方法的敏感度。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以 C48-1 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增和凝胶成像系统观察, 发现在预期 460 bp 处出现了目的片段 (图 1)。



注: M- DL2000 DNA Marker; 1- 禽多杀性巴氏杆菌 C48-1; 2- 空白对照。

图 1 禽多杀性巴氏杆菌 PCR 电泳结果

Fig 1 PCR results of avian *P. multocida* detected by DNA electrophoresis

2.2 测序结果与序列分析

阳性克隆经 DNA 双向测序, 得到 1 条 460 bp 的核苷酸序列。序列分析发现, 所得核苷酸序列与引物设计模板序列 *kmt* 基因对应片段同源为 98.4%~100.0% (表 1)。

2.3 PCR 反应条件优化结果

经条件摸索发现, 当退火温度在 53℃ 时, 其 PCR 产物条带最亮, 并且非特异性条带弱, 因此选择 53℃ 作为最佳退火温度; 当 PCR 循环达到 25 次即可观察到明亮的条带, 而后增加循环数虽

PCR 产量有所增加但不明显，故以 25 次为循环次数。同时略去最后 72 ℃ 7 min 延伸程序。

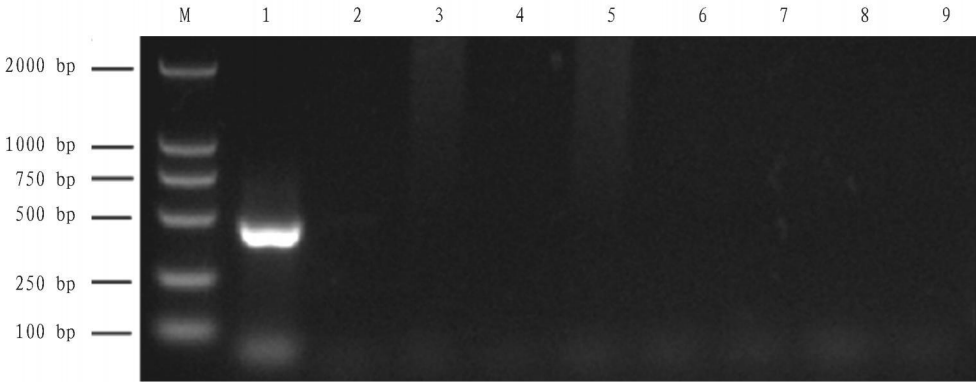
2.4 特异性试验结果

以禽多杀性巴氏杆菌和 4 种常见菌、2 种常见病毒和鸭红血球进行核酸提取，按上述优化的最佳

体系和循环参数进行 PCR 扩增。电泳结果显示（图 2），本方法对禽多杀性巴氏杆菌可扩增出 460 bp 的 DNA 片段，而不能从常见细菌、常见病毒及鸭基因组 DNA 组扩增出特异性片段，表明本研究所用的引物具有较好的特异性。

表 1 C48-1 *kmt* 基因与 GenBank 序列同源性分析
Table 1 Identity analysis between C48-1 *kmt* gene sequence and those published in GenBank

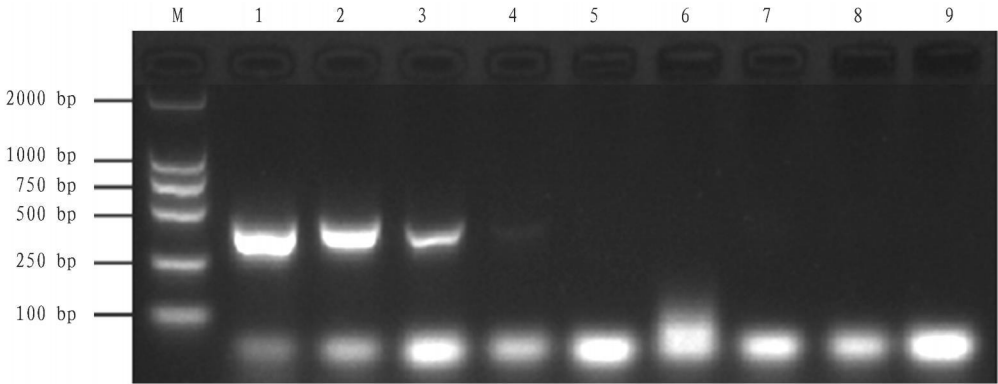
1	2	3	4	5	6	7	8		
	98.4	99.1	100.0	98.2	99.3	99.3	98.4	1	C48-1
		99.3	97.6	98.8	98.6	98.6	95.5	2	AY225343
			99.0	99.1	98.9	98.9	98.4	3	AF016259
				98.8	99.3	99.3	98.6	4	AY157572
					98.4	98.0	98.8	5	AY225341
						100.0	98.1	6	AY225342
							98.1	7	EU873317
								8	DQ233648



注：M- DL2000 DNA Marker；1- 禽多杀性巴氏杆菌 C48- 1；2- 空白对照；3- 大肠杆菌；4- 鸭疫里氏杆菌；5- 沙门氏菌；6- 金黄色葡萄球菌；7- 水禽源禽 1 型副黏病毒；8- 番鸭呼肠孤病毒；9- 鸭基因组 DNA。

图 2 PCR 特异性电泳结果

Fig 2 Specificity of PCR assay



注：M- DL2000 DNA Marker；1- 1μg • L⁻¹；2- 100 ng • L⁻¹；3- 10 ng • L⁻¹；4- 1 ng • L⁻¹；5- 100 pg • L⁻¹；6- 10 pg • L⁻¹；7- 1 pg • L⁻¹；8- 100 fg • L⁻¹；9- 10 fg • L⁻¹

图 3 RT-PCR 敏感性电泳结果

Fig 3 Sensitivity of RF PCR assay

2 5 敏感性试验结果

对不同稀释度的禽多杀性巴氏杆菌细菌 DNA 进行 PCR 扩增, 结果显示, 第 4 泳道为检测最低值, 其对应的模板 DNA 量为 $1\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 所以最低可检出 $1\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细菌 DNA (图 3)。

3 讨 论

由于禽多杀性巴氏杆菌可侵害各日龄的各品种家禽, 对养禽业危害极大, 因此各国学者均致力于该菌的快速检测研究。目前已建立了抗体捕获 ELISA^[3]、型特异 PCR 方法^[4]、重复基因外回文序列-PCR (Rep-PCR)^[5-6]、肠杆菌基因间共有多重序列 PCR (ERIC-PCR)^[7] 和单引物 PCR^[8] 等方法, 大大方便了对该菌的检测, 但这些方法操作要求较高, 尚缺乏基层广泛应用的可行性方案, 因此本研究以禽多杀性巴氏杆菌特异性保守基因为蓝本, 建立起该菌的 PCR 检测方法, 将为禽多杀性巴氏杆菌感染的临床快速诊断提供保障。

聚合酶链反应 (PCR) 技术的发明对现代分子生物学的发展带来了革命性的变化, 同样也对分子诊断产生深远的影响, 应用此技术人们可以很方便地从很少量的样品中检测到目的片段。本试验方法应用于大肠杆菌、鸭疫里氏杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、禽 1 型副黏病毒、番鸭呼肠孤病毒和鸭基因组 DNA 均不能扩增出目的片段, 而可从禽多杀性巴氏杆菌扩增出 460 bp 的特异片段, 表明引物对禽多杀性巴氏杆菌是特异的, 同时本试验所建立的 PCR 可检出最低为 $1\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的禽多杀性巴氏杆菌的基因组 DNA, 具有较高的敏感性。

参考文献:

[1] Y M SAIF. 苏敬良, 高福, 索勋, 等译. 禽病学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 745- 775.

[2] KIRSTY M, TOWNSEND, ALAN J, et al Development of PCR Assays for Species and Type Specific Identification of *Pasteurella multocida* Isolates [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36 (4): 1096- 1100.

[3] 钱建飞, 徐步, 陈溥言, 等. 单抗捕获 ELISA 法检测禽多杀性巴氏杆菌特异性 IgM 抗体 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31 (1): 63- 70.

[4] ROCKE T E, SMITH S R, MIYAMOTO A, et al. A serotype specific polymerase chain reaction for identification of *Pasteurella multocida* serotype 1 [J]. *Avian Diseases*, 2002, 46 (2): 370- 377.

[5] SHIVACHANDRA S B, KUMAR A A, CHAUDHURI P. Molecular characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup A: 1 based on amplification of repetitive regions by PCR [J]. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2008, 31 (1): 47- 62.

[6] SAXENA M K, SINGH V P, KUMAR AA, et al. REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from wild and domestic animals in India [J]. *Veterinary Research Communications*, 2006, 30 (8): 851- 861.

[7] SELLYEI B, VARGA Z, IVANICS E, et al Characterisation and comparison of avian *Pasteurella multocida* strains by conventional and ERIC-PCR assays [J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2008, 56 (4): 429- 440.

[8] SHIVACHANDRA S B, KUMAR A A, CHAUDHURI P. Differentiation of avian *Pasteurella multocida* strains by single primer PCR [J]. *Veterinary Research Communications*, 2007, 31 (8): 941- 949.

(责任编辑: 林海清)