

猪鼻支原体 PCR 检测方法的建立

李石友¹ 胡小九¹ 吉丽¹ 赵谦² 徐英¹ 刘丽仙¹

1.云南农业职业技术学院,昆明 650212;2.云南农业大学动物科技学院,昆明 650201

摘要 采集疑似猪鼻支原体的病猪的肺脏并提取 DNA 作为模版,根据 GenBank 的数据库中猪鼻支原体膜蛋白 P37 的序列设计 1 对特异性引物,建立猪鼻支原体 PCR 检测方法。试验结果显示,建立的 PCR 方法有较强的特异性,为快速准确鉴别猪鼻支原体提供了一个有效的临床手段,也对药物的使用具有指导意义。

关键词 猪鼻支原体;PCR 检测方法;引物

猪鼻支原体最先于 1953 年由 McKay 和 Carler 从猪的传染性萎缩性鼻咽的呼吸道中分离出来,于 1955 年被 Switzer 正式命名为 *Mycoplasma hyorhinis*^[1]。Mhr 是一种寄生于真核细胞胞膜或胞内的革兰氏阴性菌,它能够在无细胞培养基中自我复制,独立生存^[2]。猪鼻支原体也是一种条件致病菌,当饲料霉变、饲养密度过大、猪舍空气质量差及存在其他疾病和应激因素时容易发病。Mhs 常常能从患病母猪传染给哺乳仔猪,仔猪一般在 3~10 周龄最易感染发病,成猪发病少。已有研究者统计,能从 30%~40% 的断奶仔猪以及 10% 的母猪鼻腔和鼻窦分泌物中分离到该支原体^[3]。多数感染猪不会表现出临床症状,但一经感染,该支原体在上呼吸道迅速传播,且能从感染猪的肺脏及鼻咽管中分离到。

由于猪鼻支原体是猪体内的常在菌,人们常常忽视了它的致病性。据近年来的相关报道发现,猪鼻支原体对猪养殖场造成的危害日趋严重。所以针对该病需要建立一种具有实用性、较高敏感性、快速便捷的分子生物学检测方法,以便能够尽早发现该病,早隔离、早治疗,最大程度地降低猪鼻支原体病所带来的损失。为了满足现今猪场对猪鼻支原体的检测要求,本研究对疑似猪鼻支原体感染的病料采用分离培养和生化鉴定的方法,成功获取 1 株猪鼻支原体,并提取其 DNA 作为模板,再根据 P37 基

因设计 1 对特异性引物,建立相应的聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)检测方法,为在临床上对猪鼻支原体的诊断治疗提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1)病料来源。2017 年楚雄州送检的猪的肺组织。

2)主要试剂。组织 / 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)购自北京百泰克生物技术有限公司, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2 × TransHiFi Super Mix II 购自北京全式金生物技术有限公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、pMD-18T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司,异丙醇、75%乙醇、琼脂粉、TAE 缓冲液、双蒸水等均由云南农业大学动物科技学院预防兽医学实验室提供。

3)主要仪器。电泳仪(北京六一仪器厂),恒温培养箱(上海市跃进医疗器械一厂),高速离心机,凝胶成像系统(天能科技有限公司),PCR 仪(MJ Research 公司),恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司),恒温水浴锅,冰箱,电子秤,高压蒸汽灭菌锅,细菌过滤器等。以上仪器均由云南农业大学动物科学技术学院预防兽医学实验室提供。

收稿日期:2018-03-07

李石友,男,1969 年生,硕士,副教授。

[2] 鲍俊杰,张艳玲,平凡,等.益生菌对保育猪生产性能和发病率影响的效果试验[J].饲料工业,2015,36(2):39-40.

[3] 刘佳.复合益生菌制剂对猪生长性能和腹泻情况的影响研究[J].

中国动物保健,2015,17(5):13-14.

[4] 王雅静,高长松.日粮中添加益生菌对保育仔猪生长性能及畜舍环境的影响[J].饲料博览,2012(10):24-26.

1.2 方法

1)引物设计合成。参考 GenBank 公布的猪鼻支原体膜蛋白 P37 基因序列,利用 DNASTAR、Primer5.0 软件设计 1 对特异性引物,上游引物 5'-TTGCTG-TATCAGATGCTAGG-3',下游引物 5'-AGCTC-GAACAGATGGATCGTA-3',预期扩增片段 494 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,用于特异性检测的猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌的引物由实验室提供。

2)样品 DNA 提取。参照北京百泰克生物技术有限公司组织 / 细菌基因组 DNA 试剂盒说明书提取病料总 DNA。

3)PCR 检测方法的建立。PCR 反应体系为:Mix (含 10 × PCR buffer, dNTPs, TransTaq 酶)12.5 μL, dH₂O 10.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, DNA 1 μL, 总反应体系为 25 μL。扩增反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,50 ~ 60 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环;72 °C 7 min。进行梯度 PCR 扩增,确定最佳退火温度,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测。

4)可靠性检测。将扩增结果为阳性的 PCR 产物克隆至 pMD18-T 载体上,构建重组质粒,并进行测序分析。

5)特异性试验。提取猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌疫苗中的 DNA。用已经建立的 PCR 检测方法扩增模板 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳最后分析所建方法的特异性。

6)灵敏性试验。用核酸定量仪对 Mhs 的 DNA 进行含量测定,将 DNA 进行 10 倍比稀释,稀释至 10⁻¹⁰ 倍,以优化的 PCR 检测方法对模板进行扩增。最后经过琼脂糖凝胶电泳结果分析该方法的灵敏性。

2 结果与分析

1)猪鼻支原体 PCR 检测方法建立。经过对反应体系和反应条件的优化,最终确定 PCR 反应体系为:Mix 12.5 μL,dH₂O 10.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,DNA 1 μL,总反应体系为 25 μL。反应条件为:94 °C 3 min;94 °C 30 s,59 °C 30s,72 °C 30 s,40 个循环;72 °C 7 min;PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,扩增结果与预期扩增结果相符(图 1)。将阳性扩增样品克隆至 pMD18-T 载体上,构建重组质粒。质粒送往上海生工(生物)有限公司测序鉴定。测序结果结合 BLAST 和 MEGA 软件进行分

析。分析结果显示,此次试验设计的引物扩增所获得的产物为猪鼻支原体序列,且与 GenBank 上公布的 16 个猪鼻支原体菌株同源性均在 99%以上,表明用本试验设计的引物扩增所获得的产物确为猪博卡病毒。

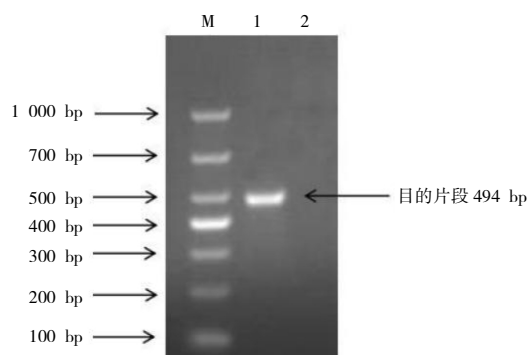


图 1 猪鼻支原体 PCR 电泳结果(目的片段长度:494 bp)
注:泳道 1 为猪鼻支原体 PCR 电泳结果;泳道 2 为猪鼻支原体 PCR 阴性对照电泳结果。

2)特异性检验。为了验证所建立的 PCR 检测方法的特异性,用所建立的方法肺炎支原体和副猪嗜血杆菌进行 PCR 扩增,以相同体系与条件进行反应,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,结果只有猪鼻支原体扩增出片段,其余扩增结果均为阴性,表明该方法有较好的特异性,可应用于猪鼻支原体的检测。

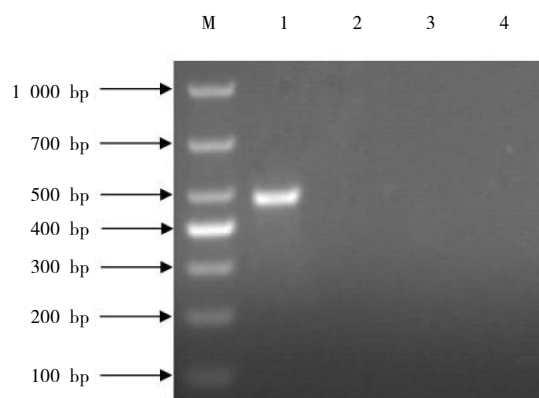


图 2 特异性检验电泳结果

注:泳道 1 为猪鼻支原体 PCR 电泳结果;泳道 2 为猪肺炎支原体 PCR 电泳结果;泳道 3 为副猪嗜血杆菌 PCR 电泳结果;泳道 4 为猪鼻支原体 PCR 阴性对照电泳结果。

3)灵敏性检验结果。用核酸定量仪对提取的 DNA 进行定量,含量为 344 ng/μL,接着按 10 倍比稀释的方法依次稀释 10 次,并以此作为模板。用优化的 PCR 检测方法对稀释模板扩增,结果显示,该 PCR 检测方法能检测到的最低浓度为 3.44 × 10⁻⁸ ng/μL (图 3),结果表明该方法具有灵敏性高的特点。

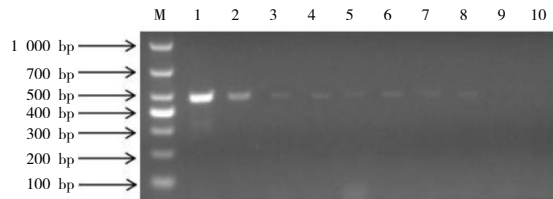


图 3 灵敏性检验电泳结果

注:泳道 1~10;DNA 浓度依次为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} ng/ μ L;M:DNA Marker 由下至上依次为 100、200、300、400、500、700、1 000 bp。

3 讨论

近年来,随着世界养猪业的发展,猪场大都采用集约化、规模化饲养,猪鼻支原体的感染对猪场的危害呈上升趋势,许多国家也都已报道了猪群中猪鼻支原体的呼吸道感染。在国外,美国和英国报道的慢性猪肺炎案例中,Mhs 有 50%以上的检出率,猪鼻支原体在地方性猪肺炎暴发时检出率也很高;丹麦、英国、德国和捷克斯洛伐克 4 个国家发现并分离出的几株 Mhs 能经呼吸道诱发猪肺炎^[4]。在国内,规模化猪场 Mhr 感染比例达 38.97%,Mhr 与猪繁殖与呼吸综合征的混合感染率达到 33.80%。2008 年 8 月至 2010 年 6 月,广西的 3 个规模化猪场检测出猪鼻支原体^[5];长沙市对 5 个县收集的 326 份病料进行支原体的检测,其中猪鼻支原体的检出率为 22.3%^[6];江苏省对从姜曲海瘦肉型猪和其它外来猪种采集来的 399 份鼻拭子进行猪鼻支原体的检测,阳性率为 70.9%^[7];2001 年及 2002 年采集的患地方性肺炎的猪肺组织中,猪鼻支原体的阳性检出率分别为 72.3%和 99.4%^[8]。以上的报道数据表明,猪鼻支原体对猪养殖业的影响日益严重,应当引起重视。

目前据报道,针对猪鼻支原体的病原学方法以分离培养为主,但该方法耗时过长,不能满足临床诊断治疗上的时效性。免疫学检测方法有基于多种猪鼻支原体单克隆抗体的双抗体夹心 ELISA^[9]、以膜

蛋白 P37 为抗原的 ELISA 和间接血凝检测法^[10]。分子生物学检测方法已经建立起巢式聚合酶链式反应 (Nested PCR)^[4],该方法增加可观察量;TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法也已被建立起来^[10],可以进行定量试验,且具有高自动化特点,这 2 种方法的灵敏性虽优于常规的 PCR 反应,但成本高。本研究通过引物设计、反应条件优化等,建立了特异针对该病原的分析检测方法。试验结果证明,本研究建立的 PCR 检测方法可为临床快速准确地确诊该病、采取及时有效的措施控制疾病的蔓延提供可用手段。

参 考 文 献

- [1] 纪燕,熊祺琰,王佳,等.猪鼻支原体可变脂蛋白家族重组蛋白的构建表达及黏附细胞功能检测[J].中国人兽共患病学报,2016(4):338-343.
- [2] 刘星,张丽芳,杨玉萍,等.抗猪鼻支原体单克隆抗体的研制及双抗体夹心 ELISA 检测法的建立[J].中国比较医学杂志,2008(3):55-58.
- [3] 余秋阳.一例猪鼻支原体引起的多发性浆膜炎病的分析及防治措施[J].山东畜牧兽医,2013(3):25-26.
- [4] 白方方,武昱孜,靳蒙蒙,等.巢式 PCR 检测猪鼻支原体方法的建立及应用[J].中国兽医学报,2013(7):1007-1010.
- [5] 刘茂军,王占伟,韦艳娜,等.猪肺炎支原体和猪鼻支原体双重 PCR 检测方法的建立与应用[J].中国兽药杂志,2012(9):7-10.
- [6] 王贵平,戴玮,贾小雅,等.用 PCR 检测长沙市猪肺炎支原体和猪鼻支原体的感染情况[J].养猪,2011(3):81-82.
- [7] JOYCE W M,熊祺琰,韦艳娜,等.套式 PCR 检测中国江苏省猪场猪鼻支原体和猪肺炎支原体的感染(英文)[J].中国人兽共患病学报,2014(8):800-805.
- [8] 杨丹,曹允考.猪鼻支原体致病性研究进展[J].畜牧兽医科技信息,2014(8):13-14.
- [9] 王涛,赵满丽,孙卫东.猪鼻支原体间接血凝及 ELISA 检测方法的初步建立[J].中国畜禽种业,2012(11):31-33.
- [10] 白方方,武昱孜,刘茂军,等.猪鼻支原体 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法的建立[J].中国预防兽医学报,2013(10):833-836.