

猪鼻支原体套式 PCR 诊断方法的建立及应用

彭 凌,刘博婷,杨旭夫

(韶关学院 英东生命科学院/中国农业科学院哈尔滨兽医研究所-韶关学院动物
疫病诊断中心联合实验室,广东 韶关 512005)

摘要: 为建立猪鼻支原体快速诊断方法,根据猪鼻支原体 *P69* 基因序列设计 2 对引物,建立了猪鼻支原体套式 PCR 诊断方法,对建立的方法进行特异性、敏感性检测,同时进行临床检测。结果表明,应用建立的套式 PCR 方法对猪鼻支原体 DNA 的检出限为 1.4×10^{-5} ng/ μ L,与常见感染猪的细菌、病毒均无交叉反应。利用建立的套式 PCR 方法对 23 份临床样品进行检测,阳性检出率为 73.9%。本研究建立的猪鼻支原体套式 PCR 具有特异性强、敏感性高等优点,可用于猪鼻支原体的临床诊断。

关键词: 猪鼻支原体;套式 PCR;诊断

中图分类号: S852.62 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)04-0121-03

Establishment and Application of Nested PCR Assay for Detection of
Mycoplasma hyorhinis

PENG Ling,LIU Boting,YANG Xufu

(Yingdong College of Life Science,Shaoguan University/Joint Laboratory of Animal Infectious Diseases Diagnostic
Center-Harbin Veterinary research Institute of Chinese Academy of Agriculture Science,Shaoguan 512005,China)

Abstract: In order to develop a rapid detection mehthod for *Mycoplasma hyorhinis*,two pairs of primers were designed according to the *P69* gene sequence of *Mycoplasma hyorhinis* in the study,and the nested PCR method for *Mycoplasma hyorhinis* detection was established. And then the specificity,sensitivity and clinical tests were carried out. The results showed that the sensitivity of the assay was reached to 1.4×10^{-5} ng/ μ L,and the detection method had no cross reaction with common bacterium and virus DNA from pig. In addition,twenty-three clinical specimens were detected by the nested PCR assay and the results demonstrated the positive rate was 73.9% . The nested PCR assay established in this study had the advantages of high specificity and high sensitivity,and could be used in clinical diagnosis of *Mycoplasma hyorhinis*.

Key words: *Mycoplasma hyorhinis*; nested PCR; detection

猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*)是寄居在猪上呼吸道中的正常菌群,在猪免疫力下降时,能够引起猪关节炎、胸膜炎、腹膜炎、咽鼓管炎等多发性浆膜炎,甚至能够引起猪的肺炎,是引起猪地方性肺炎的重要病原^[1-2]。猪鼻支原体一般由大猪或母猪传染给小猪,该病原引起的多发性浆膜炎一般多发生在 3~10 周龄小猪,一旦猪群中有感染病例,会很快在猪群中传播。目前,猪鼻支原体的感染在国内外

猪群中已经相当普遍^[3-5]。越来越多的研究表明,人的一些癌症的发生与体内的猪鼻支原体存在相关性^[6-8],这更加引起了国内外学者的广泛关注。

猪鼻支原体引起多发性浆膜炎和多发性关节炎^[9-11],临床上易与副猪嗜血杆菌病等多种疾病混淆,使鉴别诊断难度增大,一般以分离到病原体作为确诊依据。但猪鼻支原体的分离培养程序复杂,花费时间长,分离率较低,容易耽误治疗时机,且易出

收稿日期:2016-11-10
基金项目:韶关市科技计划资助项目(2014CX/K294);粤北生猪生产及疫病防控协同创新发展中心资助项目;广东省公益研究与能力建设专项资金资助项目(2014A020208140)
作者简介:彭 凌(1975-),男,江西奉新人,副教授,硕士,主要从事动物疫病防控、病原学及分子流行病学研究。
E-mail:penglingfx@126.com

现假阴性结果。因此,急需建立一种敏感、快速的分子生物学诊断方法。鉴于此,本研究探索了猪鼻支原体套式 PCR 检测技术,以期为快速诊断与预防猪鼻支原体的感染提供重要的技术手段。

1 材料和方法

1.1 菌株

猪鼻支原体 CVCC361 标准菌株购自北京豫鼎鑫捷科技有限公司,副猪嗜血杆菌(Hps)、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(App)、猪链球菌(SS)、猪肺炎支原体(Mhp)、猪瘟病毒(CSFV)、猪流感病毒(SIV)、猪圆环病毒(PCV)由韶关学院动物疫病诊断中心联合实验室保存。

1.2 试剂

DNA 提取试剂盒、*Taq* DNA 酶、dNTP、DL5000 DNA Marker 购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.3 引物

根据 GenBank 公布的猪鼻支原体 *P69* 基因序列,采用引物设计软件(Oligo 7)设计 2 对引物,其中,外套引物 P1、P2 的扩增长度为 1 295 bp,内套引物 P3、P4 的扩增长度为 871 bp。引物序列如下,P1:5′-CTATTCGTTATTGTGCCTTGGG-3′、P2:5′-TTCTGTTCTTTCTCCTGCTTGG-3′;P3:5′-AGAAAG-CAACATTCGCTGAACCAC-3′、P4:5′-TAATAAAGAC-CCGCCAACTGAACCT-3′,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 DNA 提取

分别用细菌和病毒基因组 DNA 提取试剂盒提取猪鼻支原体和其他菌株或毒株的基因组。待检病料经研磨、煮沸 10 min 后离心,上清作为模板。

1.5 套式 PCR 反应方法

第 1 次 PCR 反应体系:10 × PCR Buffer(Mg^{2+} Free)2.5 μL,25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μL,2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL,*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,猪鼻支原体 DNA 模板提取液 1 μL,灭菌超纯水补至总体积 25 μL。反应程序经优化确定为:95 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。再以第 1 次 PCR 扩增产物为模板(生理盐水为空白对照),采用同样条件用内套引物进行第 2 次 PCR 扩增^[12]。扩增产物采用 1% 琼脂糖进行电泳检测。

1.6 特异性试验

以猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、猪链球菌、猪瘟病毒、猪流感病毒、猪圆环病毒的基因组 DNA 或 cDNA 为模板,采用相同的引物和反应条件进行套式 PCR 扩增,检测方法的特异性。

1.7 敏感性试验

测定前述方法提取的猪鼻支原体的基因组 DNA 含量,用灭菌蒸馏水进行 10^1-10^{10} 倍倍比稀释,分别以这 10 个梯度稀释的 DNA 作为模板,按上述的套式 PCR 方法进行 2 次扩增,采用 1% 琼脂糖进行电泳检测 2 次扩增产物,从而确定反应的敏感性。

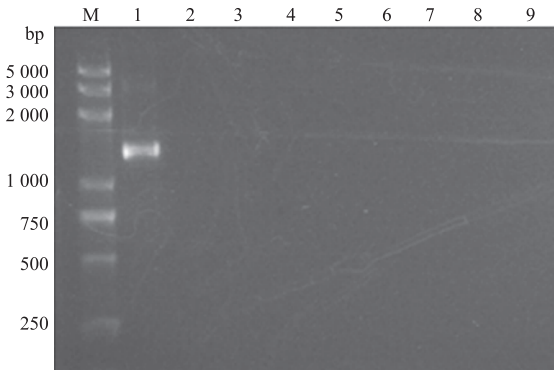
1.8 套式 PCR 方法对临床样品的检测

应用建立的套式 PCR 方法对粤北地区采集的 23 份猪肺组织样品进行检测,以检验建立的套式 PCR 诊断方法的临床应用效果。

2 结果与分析

2.1 特异性试验结果

特异性试验结果(图 1、图 2)显示,第 1 次和第 2 次 PCR 分别只能扩增出猪鼻支原体大小为 1 295 bp 和 871 bp 的片段,与预期大小相符。而其他对照细菌、毒株均未扩增出目的片段,表明建立的套式 PCR 诊断方法特异性好。



M:DL5000 DNA Marker; 1:猪鼻支原体; 2:猪肺炎支原体; 3:副猪嗜血杆菌; 4:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌; 5:猪链球菌; 6:猪瘟病毒; 7:猪流感病毒; 8:猪圆环病毒; 9:空白对照。图 2 同

图 1 第 1 次 PCR 特异性试验结果

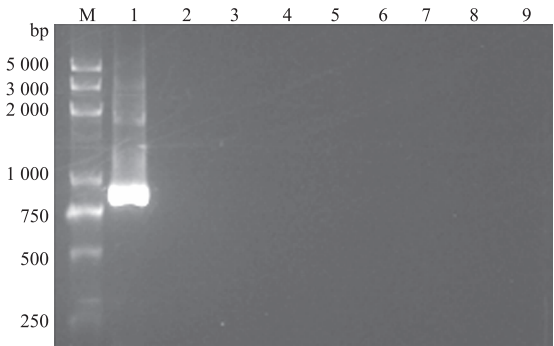
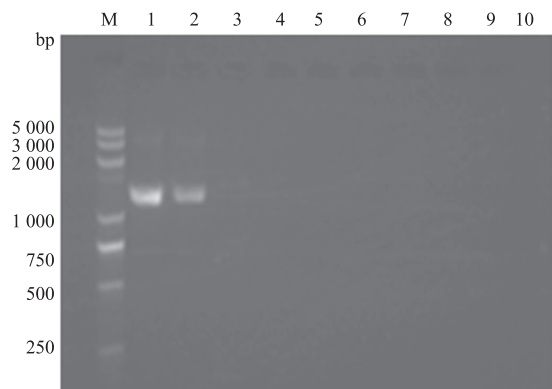


图 2 第 2 次 PCR 特异性试验结果

2.2 敏感性试验结果

从猪鼻支原体菌液中提取 DNA,质量浓度为 14 ng/μL。敏感性试验结果如图 3、图 4 所示,第 1 次 PCR 扩增产物检测极限为 0.14 ng/μL,而第 2 次 PCR 扩增产物检测极限为 1.4×10^{-5} ng/μL。

套式 PCR 检测的敏感性是普通 PCR 的 10^4 倍,表明该套式 PCR 检测方法具有很高的敏感性。



M:DL5000 DNA Marker; 1—10 分别表示猪鼻支原体 DNA 稀释倍数依次为 10^1 — 10^{10} 。图 4 同

图 3 第 1 次 PCR 的敏感性试验结果

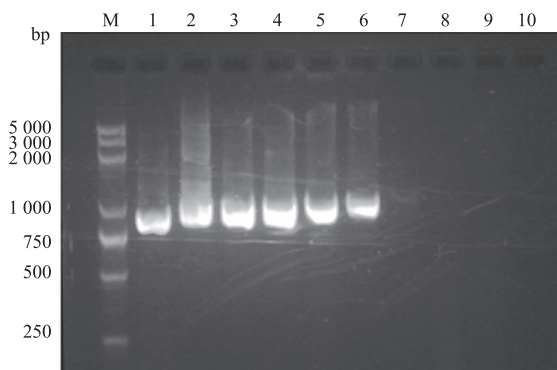


图 4 第 2 次 PCR 的敏感性试验结果

2.3 临床样品检测结果

利用建立的猪鼻支原体套式 PCR 诊断方法共检测了 23 份临床疑似猪鼻支原体感染的病料,检出阳性病料样品 17 份,阳性检出率为 73.9%。

3 结论与讨论

鉴于猪鼻支原体对规模化养殖场具有极大危害,为防控该病,有必要加强对该病原的快速、准确诊断。由于猪鼻支原体的分离培养程序复杂,花费时间长,分离率较低,且易出现假阴性结果。因此,通过分离鉴定来确诊猪鼻支原体存在弊端,常规分离鉴定方法并不适合该病的快速准确诊断。免疫学检测及分子生物学检测常用于猪鼻支原体的诊断,如陈冬杰等^[13]建立的猪鼻支原体抗体间接 ELISA 检测方法,可以检测血清中猪鼻支原体的抗体水平,具有较高的特异性和敏感性。PCR 方法具有特异性强、灵敏度高的特点,常被应用于猪鼻支原体早期感染的检测,具有常规分离诊断方法无法比拟的优势。但 Makhanon 等^[14]研究表明,猪鼻支原体普通单套 PCR 的敏感性较低,不能满足临床样品检测的要求。本研究根据 GenBank 上已收录的猪鼻支原体 P69 基因序列,设计合成 2 对引物,经过 PCR 反应

条件的优化,建立了猪鼻支原体的套式 PCR 快速诊断方法。检测结果显示,对照菌株的扩增结果均为阴性;第 1 次 PCR 检测的灵敏度为 $0.14 \text{ ng}/\mu\text{L}$,而第 2 次 PCR 检测的灵敏度达到 $1.4 \times 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$,表明该套式 PCR 诊断方法具有很高的敏感性。由于套式 PCR 方法检测的敏感性远高于普通 PCR,甚至可与荧光定量 PCR 方法相当,而所用设备、试剂与普通 PCR 一样,不需要荧光定量 PCR 检测方法所要求的特殊设备与试剂,更适合基层使用。

本研究建立的套式 PCR 诊断方法具有良好的准确性、特异性、敏感性,并且待检病料不需繁杂的 DNA 提取过程,只需研磨、煮沸后直接检测,可以在短时间内快速检测出低含量的猪鼻支原体,为猪鼻支原体的快速检测及早期发现和治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lin J H, Chen S P, Yeh K S, *et al.* Mycoplasma hyorhinis in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen[J]. Vet Microbiol, 2006, 115(1/2/3): 111-116.
- [2] 王占伟,熊琪琰,邵国青. 猪鼻支原体与猪地方性肺炎[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(10): 1036-1038.
- [3] 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.
- [4] Lobo E, Poveda C, Suarez A, *et al.* Mycoplasmas hyorhinis in different regions of Cuba: Diagnosis[J]. Braz J Microbiol, 2011, 42(2): 721-725.
- [5] 章红兵. 猪场应重视猪鼻支原体感染[J]. 养猪, 2016(2): 111-112.
- [6] Ketcham C M, Anai S, Reutzel R, *et al.* p37 induces tumor invasiveness[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(7): 1031-1038.
- [7] Namiki K, Goodison S, Porvasnik S, *et al.* Persistent exposure to mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6872.
- [8] 曹军,李建平,程伟,等. 猪鼻支原体 P40 蛋白在肾癌组织中的表达及意义[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 29(5): 556-558, 565.
- [9] 初振华. 猪鼻支原体引起的多发性浆膜炎和关节炎的防控措施[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007(9): 55.
- [10] 王桂昌. 猪鼻支原体引起的多发性浆膜炎和关节炎的防治[J]. 农村实用科技信息, 2008(8): 28.
- [11] 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.
- [12] 李和平,吴发兴,李晓成,等. 猪繁殖与呼吸综合征的套式 PCR 方法建立及应用[J]. 华北农学报, 2009, 24(1): 115-118.
- [13] 陈冬杰,危艳武,张志慧等. 猪鼻支原体抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(11): 1140-1144.
- [14] Makhanon M, Tummaruk P, Thongkamkoon P, *et al.* Comparison of detection procedures of Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyosynoviae, and Mycoplasma hyorhinis in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand[J]. Trop Anim Health Prod, 2012, 44(2): 313-318.