

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.04

PCR 检测方法在多杀性巴氏杆菌定种中的应用

张 媛, 李 建, 李伟杰, 魏财文, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2016-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0016-06 [中图分类号] S852.612

[摘要] 为修订行业标准《猪巴氏杆菌病诊断技术》(NY/T 564-2002), 改进多杀性巴氏杆菌定种方法, 采用 16S rDNA 基因序列分析法对中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)保藏的 63 株猪源多杀性巴氏杆菌进行复核鉴定。63 株猪源多杀性巴氏杆菌中有 60 株菌种与原鉴定结果一致。建立多杀性巴氏杆菌基于 *kmtI* 基因的 PCR 定种方法, 对经 16S rDNA PCR 方法确认为多杀性巴氏杆菌的 60 株菌进行定种。结果表明, 60 株菌均扩增出了预期片段, 基于 *kmtI* 基因的 PCR 定种方法与 16S rDNA PCR 方法试验结果相一致。研究结果显示, 可将基于 *kmtI* 基因的 PCR 定种方法增添至行业标准中, 作为原有生化鉴定方法的补充进行多杀性巴氏杆菌的定种。

[关键词] 多杀性巴氏杆菌; 16S rDNA 基因; *kmtI* 基因; 序列分析

Application of PCR for Identification of *Pasteurella multocida*

ZHANG Yuan, LI Jian, LI Wei-jie, WEI Cai-wen, JIANG Yu-wen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

Abstract: In order to revise the industry standard Diagnostic Techniques of Swine *Pasteurella* (NY/T 564-2002), 16S rDNA sequence analysis was added to identify *Pasteurella multocida*. 63 strains of *Pasteurella multocida* from swine in China Veterinary Culture Collection Center(CVCC) were check identified with 16S rDNA sequence analysis. 60 strains of 63 strains suspected *Pasteurella multocida* were identified as *Pasteurella multocida*. *Pasteurella multocida kmtI* PCR identification method was constructed and applied to identify the above 60 strains of *Pasteurella multocida*. As a result, expected size DNA was amplified. The result is accordant with data of 16S rDNA sequence analysis. The result indicates that *Pasteurella multocida kmtI* PCR identification method can be added to the industry standard Diagnostic Techniques of Swine *Pasteurella* as *Pasteurella multocida* identification method besides original biochemical identification method.

Key words: *Pasteurella multocida*; 16S rDNA; *kmtI*; sequence analysis

基金项目: 农业行业标准制定和修订(农产品质量安全)项目(572-2014)

作者简介: 张媛, 副研究员, 从事需氧菌类生物制品的检测工作。李建, 助理研究员, 从事需氧菌类生物制品的检测工作, 为共同第一作者。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

行业标准《猪巴氏杆菌病诊断技术》(NY/T 564-2002)^[1]于 2002 年予以实施,其中病原鉴定、血清学试验等均通过菌株表型特征予以确定,广大兽医工作者参照此标准进行猪巴氏杆菌病的诊断^[2-5]。但十余年来,分子生物学技术发展迅猛,许多新的分子生物学技术已经在巴氏杆菌病诊断中得以应用^[6-8],这些新技术相比传统诊断技术更加快速便捷。为此,本课题组承担了《猪巴氏杆菌病诊断技术》(NY/T 564-2002)行业标准的修订工作,拟以中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)保藏的猪源多杀性巴氏杆菌为研究对象,对多杀性巴氏杆菌定种方法开展研究。为了确保研究对象的准确性,本课题组采用 16S rDNA 基因

序列分析法对 CVCC 保藏的 63 株猪源多杀性巴氏杆菌进行复核鉴定。鉴定结果表明,63 株猪源多杀性巴氏杆菌中有 60 株菌种与原鉴定结果一致,可用于《猪巴氏杆菌病诊断技术》修订的研究工作。本课题组建立了基于 *kmtI* 基因的 PCR 定种方法,对经 16S rDNA PCR 方法确认为多杀性巴氏杆菌的 60 株菌进行定种,并将此结果与 16S rDNA PCR 结果相比,两种方法的定种结果完全吻合。这一结果为把基于 *kmtI* 基因的 PCR 定种方法增添至行业标准中提供了依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 实验所用菌株为 63 株,均为 CVCC 保藏^[9]。各菌株相关信息如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株

Tab 1 Strains in the test

序号	菌株编号(CVCC)	收藏时间/年	来源历史	具体用途
1	1657	1979	苏联兽药监察所	科研及血清定型
2	1658	1979	苏联兽药监察所	科研及血清定型
3	1659	1979	苏联兽药监察所	科研及血清定型
4	1660	1979	苏联兽药监察所	科研及血清定型
5	1661	1987	四川兽研所	科研及血清定型
6	1662	1987	贵州生药厂	科研及血清定型
7	1694	1987	成都生药厂	科研及血清定型
8	1695	1987	四川兽研所	科研及血清定型
9	1696	1984	中国兽医药品监察所	研究
10	1697	1984	中国兽医药品监察所	研究
11	1698	1984	中国兽医药品监察所	研究
12	1699	1984	中国兽医药品监察所	研究
13	1700	1984	中国兽医药品监察所	研究
14	1701	1984	中国兽医药品监察所	研究
15	1702	1984	中国兽医药品监察所	研究
16	1703	1984	中国兽医药品监察所	研究
17	1704	1988	广东生药厂	研究
18	1705	1989	河南许昌市兽医站	科研及血清定型
19	1765	1976	成都生药厂	生产猪多杀性巴氏杆菌活疫苗
20	1966	1979	苏联兽药监察所	科研及血清定型
21	3048	2005	东北农业大学	研究
22	386	1963	英国国家兽医学院	制造定型血清(用于小白鼠被动保护试验)
23	387	1963	英国国家兽医学院	制造定型血清(用于小白鼠被动保护试验)

续表

序号	菌株编号 (CVCC)	收藏时间/年	来源历史	具体用途
24	388	1963	英国国家兽医学院	制造定型血清(用于小白鼠被动保护试验)
25	389	1963	英国国家兽医学院	制造定型血清(用于小白鼠被动保护试验)
26	390	1963	英国国家兽医学院	制造定群血清
27	391	1963	英国国家兽医学院	制造定群血清
28	392	1963	英国国家兽医学院	制造定群血清
29	393	1982	美国动物疾病中心	制造定群血清
30	394	1989	美国动物疾病中心	制造定群血清
31	395	1989	美国动物疾病中心	制造定群血清
32	396	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
33	397	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
34	398	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
35	399	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
36	400	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
37	401	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
38	403	1980	日本家畜卫生试验场	制造定型血清
39	420	1972	美国动物疾病中心	制造定型血清
40	426	1987	成都生药厂	生产灭活苗用后备菌种
41	427	1987	南京生药厂	生产灭活苗用后备菌种
42	428	1978	内蒙古生药厂	生产猪巴氏杆菌活疫苗
43	429	1987	江西农科所	科研及血清定型
44	430	1987	西北畜牧兽医学院	科研及血清定型
45	431	1987	华东农科所	科研及血清定型
46	432	1987	广东梅县兽医站	科研及血清定型
47	433	1987	北京市清河猪场	科研及血清定型
48	434	1987	江苏农科院	科研及血清定型
49	435	1987	江苏农科院	科研及血清定型
50	436	1987	成都生药厂	科研及血清定型
51	437	1987	广东兽研所	科研及血清定型
52	438	1987	广东兽研所	科研及血清定型
53	439	1987	广东兽研所	科研及血清定型
54	440	1987	四川兽研所	科研及血清定型
55	441	1987	四川兽研所	科研及血清定型
56	442	1987	上海奉贤县兽医站	科研及血清定型
57	443	1987	江苏农学院	科研及血清定型
58	444	1987	湖南生药厂	科研及血清定型
59	44401	1955	浙江农业科学研究所	制造灭活疫苗和抗血清
60	44408	1987	成都生药厂	检验灭活疫苗
61	445	1987	安徽省畜牧局	科研及血清定型
62	446	1987	贵州生药厂	科研及血清定型
63	8201	/	中国兽医药品监察所	研究

1.2 培养基及试剂 马丁肉汤培养基、改良马丁琼脂培养基均购自北京中海动物保健科技公司。Taq DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTP、DL2000 DNA Marker 和琼脂糖均购自宝生物工程(大连)有限公司。染料 Goldview 购自北京赛百盛基因技术有限公司。PCR 阴性对照品和阳性对照品均由中国兽医药品监察所细菌制品检测室制备。

1.3 PCR 引物 16S rDNA 基因序列扩增引物:上游引物为 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 下游引物为 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (表 2)。*kmtI* 基因序列扩增引物:上游引物为 5'- ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG -3', 下游引物为 5'- GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC -3' (表 2)。引物均由上海 Invitrogen 公司合成。

表 2 多杀性巴氏杆菌基因扩增用引物

Tab 2 Primers for amplifying *P. multocida* genes

引物名称 Primer names	基因库编号 GenBank Accession	上游引物位置 Upstream primer position	下游引物位置 Downstream primer position	引物长度/bp Product length
16S rDNA 片段	AY057994.1	1534-1515	30-33,34-50	1505
<i>kmtI</i> 片段	CP006976.1	1711129-1711110	1710673-1710692	457

1.4 菌体培养 开启菌种,用含 0.1% 绵羊裂解血细胞全血及 4% 新生牛血清的马丁肉汤溶解菌种,划线接种含 0.1% 绵羊裂解血细胞全血及 4% 新生牛血清的改良马丁琼脂平板,37 °C 培养 24 h。挑取单菌落接种含 0.1% 绵羊裂解血细胞全血及 4% 新生牛血清的马丁肉汤,37 °C 200 r/min 培养 15 h。

1.5 基因组 DNA 提取 取 1 mL 菌液 12000 r/min 离心 1 min,尽弃上清,加入 100 μL 超纯水,混匀,沸水浴 10 min,冰浴 5 min,12000 r/min 离心 1 min,吸取上清作为 16S rDNA PCR 及基于 *kmtI* 基因 PCR 的模板。

进行序列拼接,根据峰值图修正重叠序列中几次测序结果不一致位置的核苷酸,选择测序峰较好区域的序列与 GenBank 上的 DNA 序列进行比对。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 16S rDNA PCR 产物电泳条带 1505 bp,部分菌株的 16S rDNA 基因扩增结果见图 1。基于 *kmtI* 基因 PCR 产物电泳条带 457 bp,部分菌株的基于 *kmtI* 基因扩增结果见图 2。

2.2 16S rDNA 序列比对分析结果 经核酸序列比对确定 63 株菌中有 60 株为多杀性巴氏杆菌,60 株多杀性巴氏杆菌与 GenBank 公布的多杀性巴氏杆菌对应 DNA 序列的同源性均大于 97%,比对结果见表 3。

2.3 基于 *kmtI* 基因 PCR 定种结果 用多杀性巴氏杆菌基于 *kmtI* 基因种特异性 PCR 方法对经 16S rDNA PCR 方法确定为多杀性巴氏杆菌的 60 株菌进行种鉴定,符合率 100%。

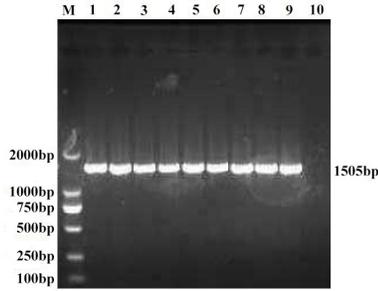
3 讨论

原核生物的核糖体是由 50S 和 30S 两个亚基所组成,而 30S 亚基进一步由 3 种类型组成,即 23S、16S 和 5S,它们分别含有约 2900、1500 和 120 个编码核苷酸^[10]。目前由于分子量适中,又具有保守性和存在的普遍性等特点,一般采用 16S rDNA 对微生物进行测序分析。

一般来讲,在种分类等级上,如果 2 个分类单位间的 16S rDNA 序列同源性大于 97%,则认为属于同一个种^[11]。本课题组以多杀性巴氏杆菌 16S rDNA 的一段保守区序列设计了一对通用引物,对

1.6 PCR 扩增及电泳检测 16S rDNA PCR 反应体系为 50 μL,依次加入超纯水 36.75 μL,10×PCR 缓冲液(含 MgCl₂ 15 mmol/L 及 KCl 500 μmol/L) 5 μL,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL,上、下游引物(20 μmol/L) 各 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,模板 2 μL。基于 *kmtI* 基因 PCR 反应体系亦为 50 μL,依次加入超纯水 36.75 μL,10×PCR 缓冲液(含 MgCl₂ 15 mmol/L 及 KCl 500 μmol/L) 5 μL,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μL,上、下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL,模板 2 μL。PCR 反应条件均为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。取 10 μL 16S rDNA PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,140 V 电泳 30 min。显色剂为 Goldview。

1.7 序列测定及分析 取 16S rDNA PCR 产物送交上海基康生物工程有限公司测序。取测序结果

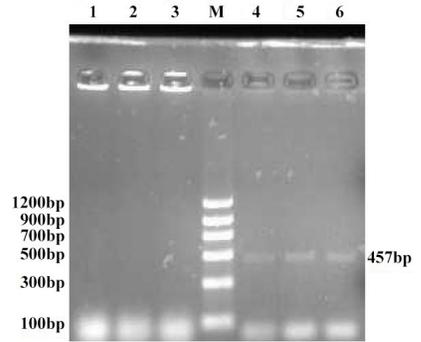


M: DNA 分子质量标准; 1: 菌株 CVCC1657; 2: 菌株 CVCC1658; 3: 菌株 CVCC1659; 4: 菌株 CVCC1660; 5: 菌株 CVCC1661; 6: 菌株 CVCC1662; 7: 菌株 CVCC1694; 8: 菌株 CVCC1695; 9: 菌株 CVCC1696; 10: 阴性对照; 无菌超纯水

M: DNA marker; 1: CVCC1657 strain; 2: CVCC1658 strain; 3: CVCC1659 strain; 4: CVCC1660 strain; 5: CVCC1661 strain; 6: CVCC1662 strain; 7: CVCC1694 strain; 8: CVCC1695 strain; 9: CVCC1696 strain; 10: Negative control; sterile ultrapure water

图 1 9 株多杀性巴氏杆菌 16S rDNA PCR 产物的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of 16S rDNA PCR products from 9 strains *P. multocida*



M: DNA 分子质量标准; 1: 胸膜肺炎放线杆菌;

2: 副猪嗜血杆菌; 3: 波氏杆菌; 4: 菌株 CVCC1657; 5: 菌株 CVCC1658; 6: 菌株 CVCC1659

M: DNA marker; 1: Actinobacillus pleuropneumoniae;

2: Haemophilus suis; 3: bordetella bacilli; 4: CVCC1657 strain; 5: CVCC1658 strain; 6: CVCC1659 strain

图 2 3 株多杀性巴氏杆菌 kmtI PCR 产物的电泳图

Fig.2 Electrophoresis of kmtI PCR products from 3 strains *P. multocida*

表 3 63 株猪源多杀性巴氏杆菌 16S rDNA PCR 鉴定结果

Tab 3 16S rDNA PCR identification results of 63 strains *P. multocida* isolates originated from Swine

菌株编号	鉴定结果	菌株编号	鉴定结果	菌株编号	鉴定结果
CVCC44401	多杀性巴氏杆菌	CVCC1966	多杀性巴氏杆菌	CVCC429	多杀性巴氏杆菌
CVCC44408	多杀性巴氏杆菌	CVCC3048	Bacterium NLAE	CVCC430	多杀性巴氏杆菌
CVCC1657	多杀性巴氏杆菌	CVCC386	多杀性巴氏杆菌	CVCC427	多杀性巴氏杆菌
CVCC1658	多杀性巴氏杆菌	CVCC387	多杀性巴氏杆菌	CVCC428	多杀性巴氏杆菌
CVCC1659	多杀性巴氏杆菌	CVCC388	多杀性巴氏杆菌	CVCC431	多杀性巴氏杆菌
CVCC1660	多杀性巴氏杆菌	CVCC389	多杀性巴氏杆菌	CVCC432	多杀性巴氏杆菌
CVCC1661	多杀性巴氏杆菌	CVCC390	多杀性巴氏杆菌	CVCC433	多杀性巴氏杆菌
CVCC1662	多杀性巴氏杆菌	CVCC391	多杀性巴氏杆菌	CVCC434	多杀性巴氏杆菌
CVCC1694	多杀性巴氏杆菌	CVCC392	多杀性巴氏杆菌	CVCC435	多杀性巴氏杆菌
CVCC1695	多杀性巴氏杆菌	CVCC393	多杀性巴氏杆菌	CVCC436	多杀性巴氏杆菌
CVCC1696	多杀性巴氏杆菌	CVCC394	多杀性巴氏杆菌	CVCC437	多杀性巴氏杆菌
CVCC1697	多杀性巴氏杆菌	CVCC395	多杀性巴氏杆菌	CVCC438	多杀性巴氏杆菌
CVCC1698	多杀性巴氏杆菌	CVCC396	多杀性巴氏杆菌	CVCC439	多杀性巴氏杆菌
CVCC1699	多杀性巴氏杆菌	CVCC397	多杀性巴氏杆菌	CVCC440	Bisgaard Tasson
CVCC1700	多杀性巴氏杆菌	CVCC398	多杀性巴氏杆菌	CVCC441	多杀性巴氏杆菌
CVCC1701	多杀性巴氏杆菌	CVCC399	多杀性巴氏杆菌	CVCC442	多杀性巴氏杆菌
CVCC1702	多杀性巴氏杆菌	CVCC400	多杀性巴氏杆菌	CVCC443	多杀性巴氏杆菌
CVCC1703	多杀性巴氏杆菌	CVCC401	多杀性巴氏杆菌	CVCC444	多杀性巴氏杆菌
CVCC1704	多杀性巴氏杆菌	CVCC403	多杀性巴氏杆菌	CVCC445	多杀性巴氏杆菌
CVCC1705	多杀性巴氏杆菌	CVCC420	多杀性巴氏杆菌	CVCC446	多杀性巴氏杆菌
CVCC1765	多杀性巴氏杆菌	CVCC426	多杀性巴氏杆菌	CVCC8201	Enterococcus faecalis

CVCC 保藏的 63 株多杀性巴氏杆菌的一段 16S rDNA 序列进行扩增,并将扩增产物的核苷酸序列与 GenBank 上的标准序列进行比较,其中有 60 株菌与标准株核苷酸序列的同源性都大于 97%,可以确认为多杀性巴氏杆菌。

2001 年国外学者 Townsend 通过消减杂交确定了多杀性巴氏杆菌种特异性基因 *kmtI*,针对该特异性 DNA 序列设计引物,所有的多杀性巴氏杆菌都可以扩增出一个 460 bp 的片段,由此建立了多杀性巴氏杆菌定种的 PCR 鉴定方法^[12]。Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014 已将 *kmtI* 作为靶基因建立多杀性巴氏杆菌的 PCR 诊断技术,用于出血性败血症的病原鉴定。虽然基于 *kmtI* 基因种特异性 PCR 方法与 16S rDNA PCR 方法试验结果的符合率为 100%,但鉴于采用基于 *kmtI* 基因种特异性 PCR 方法对多杀性巴氏杆菌定种无需测序及序列分析,较 16S rDNA PCR 方法在应用上更加快捷,故拟将基于 *kmtI* 基因种特异性 PCR 方法增添至行业标准中以实现猪巴氏杆菌病原的快速鉴定,从而满足猪巴氏杆菌病快速诊断的需求。

参考文献:

[1] NY/T 564-2002. 猪巴氏杆菌病诊断技术[S].
NY/T 564-2002. Diagnostic Techniques of swine Pasteurellosis[S].

[2] 岛明康,李进涛. 猪巴氏杆菌病的诊治及其预防[J]. 云南畜牧兽医, 2013(6): 2-4.
DAO M K, LI J T. Diagnosis and prevention of swine pasteurellosis[J]. Yunnan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2013(6): 2-4.

[3] 任士飞,张林吉. 一例猪巴氏杆菌病的实验室诊断及治疗[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(6): 94-95.
REN S F, ZHANG J L. Laboratory diagnosis and treatment of one case of swine pasteurellosis [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013(6): 94-95.

[4] 郑书森. 猪巴氏杆菌病的诊断及防治[J]. 湖北畜牧兽医, 2013, 34(8).
ZHENG S S. Diagnosis, prevention and cure of swine pasteurellosis [J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2013, 34(8).

[5] 李宝林,金海林. 猪巴氏杆菌病的诊断与防治[J]. 甘肃畜牧兽医, 2013(10): 34-35.
LI B L, JIN H L. Diagnosis, prevention and cure of swine pasteurellosis [J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 2013(10): 34-35.

[6] 黄海燕,王印,彭娟,等. 猪源多杀性巴氏杆菌 PCR 鉴定方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(7): 1111-1116.
HUANG H Y, WANG Y, PENG J, et al. Development of PCR identification method for *Pasteurella multocida* from porcine [J]. Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica, 2012, 43(7): 1111-1116.

[7] 李鹏,马艳娇,夏伟,等. 猪肺炎支原体、多杀性巴氏杆菌和猪胸膜肺炎放线杆菌三重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(8): 607-610.
LI P, MA Y J, Xia W, et al. Development of multiplex PCR for detection of swine *Mycoplasmal pneumonia*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2010, 32(8): 607-610.

[8] 贺英,赵萍,储岳峰,等. 复合 PCR 鉴定巴氏杆菌和副猪嗜血杆菌的方法[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(6): 1315-1319.
HE Y, ZHAO P, Chu Y F, et al. Method of multiplex-PCR for identification of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2009, 25(6): 1315-1319.

[9] 中国兽医药品监察所. 中国兽医菌种目录[M]. 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 94-95.
China Institute of Veterinary Drugs Control. China Veterinary Species Catalogue [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2002: 94-95.

[10] 冯瑞华. 用 AFLP 技术和 16S rDNA PCR-RFLP 分析毛苕根根瘤菌的遗传多样性[J]. 微生物学报, 2000, 40(4): 339-345.
FENG R H. Genetic diversity of rhizobia of *Medicago edgeworthii* by AFLP and RFLP analysis [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(4): 339-345.

[11] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 842-849.

[12] Townsend K M, Boyce J D, Chung J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 924-929.

(编辑:李文平)