

站内搜索:

类别:

会员登录

用户名:

密码:

验证码:

相关文章

- 中草药防治奶牛乳房炎的研究...
- 仔猪腹泻的综合防治
- 牛梨形虫病的诊治
- 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究...
- 绵羊链球菌的分离与耐药性分...
- 猪霉菌感染及毒素中毒的发生...
- 浅谈奶牛子宫内膜炎
- 奶牛乳房炎病原分离鉴定与药...
- 鸡贫血病毒VP3基因的原核克隆...
- 莱姆病的现状及防治
- 猪圆环病毒与附红细胞体混合...

合作伙伴



猪胸膜肺炎放线杆菌、猪多杀性巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌复合PCR检测方法的建立

作者:米丰泉 陈小玲 赵玉军 王翠敏 王凤强 张彦 期号:2005年第4期

摘要 在已经建立的猪胸膜肺炎放线杆菌(APP)、猪多杀性巴氏杆菌(PM)、副猪嗜血杆菌(HPS)的单项PCR诊断方法的基础上,通过对扩增条件的筛选,成功地建立了APP、PM、HPS复合PCR诊断方法,并应用于临床。利用一次PCR反应,即可同时扩增APP的342bp、PM的457bp和HPS的821bp的特异性片段。该方法的建立对临床上进行这三种疾病的鉴别诊断和混合感染的检测都具有重要意义。

关键词 猪胸膜肺炎放线杆菌;猪多杀性巴氏杆菌;副猪嗜血杆菌;复合PCR
中图分类号 S851.34+7.1/.7

Development of a Multiplex PCR for Detecting Actinobacillus Pleuropneumoniae, Pasteurella Multocida and Haemophilus Parasuis

Mi Fengquan, Chen Xiaoling, Zhao Yujun, Wang Cuimin, Wang Fengqiang, Zhang Yan

Abstract TA multiplex PCR detecting App, Pm and Hps has been developed based on published single PCRs for these pathogens. The PCR reagents, annealing temperature and the PCR procedure were optimized. A 342bp fragment of App, a 457bp of Pm and a 821bp of Hps can be simultaneously amplified in one reaction. The assay is a potential tool for differentiation of the 3 pathogens and diagnosis of mixed infection by these bacteria.

Key words multiplex PCR; actinobacillus pleuropneumoniae (APP); pasteurella multocida (PM); haemophilus parasuis (HPS)

猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)为革兰氏阴性球杆菌,有荚膜,大多溶血。APP有两个生物型,生物I型是NAD依赖性细菌,有13个血清型[1],是主要的致病血清型。猪只感染APP后,主要表现为胸膜肺炎,急性爆发时,有很高的发病率和死亡率。一些病猪康复后常伴有慢性肺炎,导致生长停滞且长期带菌而成为其它猪只的传染源。本病给养猪业造成较大的经济损失[2]。

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, PM)为革兰氏阴性杆菌,是人畜共患病巴氏杆菌病的主要病原,也是猪肺炎的病原。该病死亡率较高,主要引起成年猪的急性败血症,有时也可导致慢性呼吸道症状,致使猪群生长缓慢,严重影响饲料报酬。该病在世界各国广泛流行,在我国规模化猪场常有发生。

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是一种革兰氏阴性、非溶血性、NAD依赖性细菌,有15个血清型。HPS可引起猪的纤维素性多发性浆膜炎、多发性关节炎、胸膜炎和脑膜炎。该菌自1910年以来就被认为是猪Glasser病的病原体。HPS也存在于健康猪的上呼吸道,临床上主要感染小猪,特别是4~6周龄的断奶仔猪,临床特征为急性败血症,往往在感染后2d死亡。该病同样会给养猪业造成重大的经济损失。

同繁殖障碍性传染病、胃肠道传染病一样,呼吸道传染病是危害养猪业的3大症候群之一,尤其是近几年来随着规模化养猪业的发展,呼吸道疾病呈递增趋势。目前国内兽医临床对以上3种疾病的诊断仍普遍采用传统的病原分离鉴定和血清学方法,但病原分离和生化鉴定不仅费时费力,而且敏感性和特异性都较差。血清学诊断方法不能在病的早期得出结果,也可能因实验室的不同而产生检验差异。虽然已有APP、PM和HPS的单项PCR诊断方法,但需分别检测每种病原。近年来开始较多研究的复合PCR方法则可较好地解决这一问题。为此,我们进行了APP、PM和HPS的复合PCR诊断方法的研究,现将结果报告如下:

1 材料与与方法

1.1 菌株和培养

APP、PM、HPS几种血清型参考菌株共10株均由澳大利亚昆士兰州动物研究所Pat Blackall 博士提供。培养时将菌株涂在混有胎牛血清和NAD的半合成固体培养基上进行培养,37℃12~24h即可。

1.2 检测样品的制备

挑取单个菌落悬浮于含100μl超纯水的小试管中,震荡混匀,用PCR仪95℃加热10min或煮沸10min后置于冰上冷却10min,12 000r/min离心2min,取上清液作为PCR反应的粗制DNA模板,-20℃保存备用。

1.3 PCR试验

1.3.1 引物设计与合成

采用已发表的引物序列[3-5],APP(342bp)引物P1: 5'-GATAAACCTTTCCGGAATT-3'和引物P2: 5'-TACCACACCGTGTATTATCAA-3'; PM(457bp)引物P3: 5'-GCTGTAACGAAGTAGCCAC-3'和引物P4: 5'-ATCCGCTATTTACCCAGTGG-3'; HPS(821bp)引物P5: 5'-GTGATGAGGAAGGTGGTGT-3'和引物P6: 5'-GGCTTCGTACCCCTCTGT-3'。

1.3.2 PCR试验方法

采用25μl反应体系: ddH₂O 7.3μl、10×PCR缓冲液2.5μl(MgCl₂浓度为1.5mM)、2.5mM dNTP2.0μl、10pmol/μl引物P1、P2、P3、P4各1μl、引物P5、P6各1.5μl、本组自制Taq 酶0.2μl、3种模板各2.0μl。

按下列参数进行PCR反应: 95℃ 预变性5min, 94℃ 变性45s, 60℃ 退火1min, 72℃ 延伸1min, 30个循环后72℃ 终延伸8min,产物于4℃保存。

1.3.3 PCR敏感性

用APP、PM、HPS的DNA样品(浓度为0.5μg/μl)分别做倍比稀释,取2μl做PCR扩增,以测定该复合PCR的敏感性。

1.3.4 PCR产物的检测

10μl扩增产物加2μl载样缓冲液在100V电压,1%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)上进行电泳。电泳液用1×TAE缓冲液。紫外灯下观察扩增结果,并一次成像拍照。

2 结果

2.1 复合PCR诊断方法的建立

利用引物P1、P2、P3、P4、P5、P6同时在一个PCR反应体系中按本文1.3.2的方法分别对已知的APP、PM、HPS样品DNA

进行扩增，只扩增出了相应的片段；同时加入这三种模板，则一次扩出了APP基因组中的342bp、PM基因组中的457bp和HPS基因组中的821bp3个片段（扩增结果见图1）。

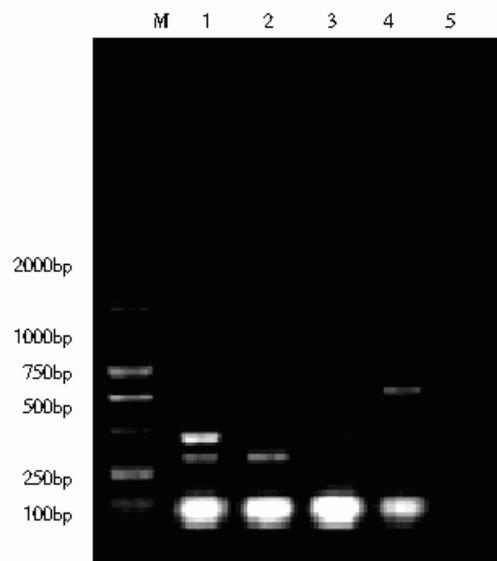


图1 APP、PM、HPS的复合PCR

1 APP+PM+HPS; 2 APP(阳性对照);
3 PM(阳性对照); 4 HPS(阳性对照);
5 阴性对照; M DL2000 Marker。

2.2 PCR敏感性测定

将单模板APP、PM、HPS的DNA做10倍递增稀释后，用含3对引物的PCR反应液进行PCR，结果显示能分别检测到100pg的APP、100pg的PM、100pg的HPS DNA（见图2、3、4）。

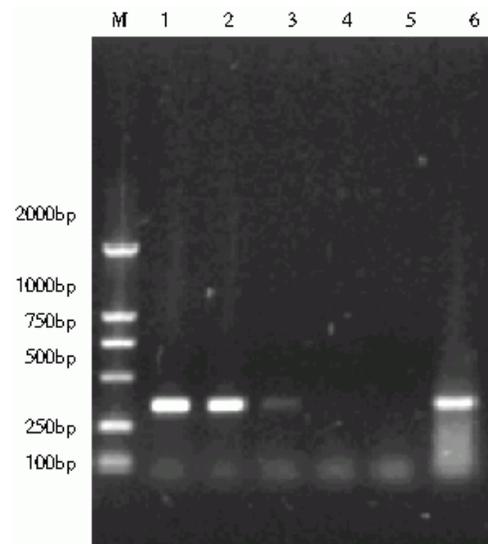


图2 APP-PCR敏感性试验

1~4 分别为 10^1 ~ 10^4 ng DNA 量的模板;
5 为阴性对照;
6 为阳性对照;
M DL2000 DNA Marker。

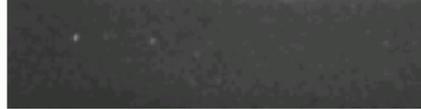


图3 PM-PCR 敏感性试验

1 阳性 PM;
2-6 分别为 10^1 - 10^6 ngDNA 量的模板;
7 阴性对照;
M DL2000DNA Marker。

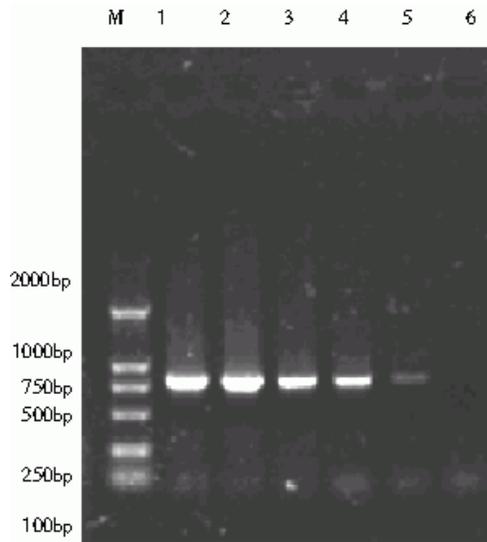


图4 HPS DNA 敏感性试验

1 阳性产物;
2-6 分别为 10^1 - 10^6 ngDNA 量的模板;
M DL2000 Marker。

3 讨论

3.1 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。本研究利用扩增APP、PM、HPS特异性片段的3对引物在一次PCR反应中扩增出342bp、460bp、821bp的特异性片段,成功建立了APP、PM、HPS的复合PCR检测方法。该方法的建立对在临床上进行这三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。

3.2 在PCR反应条件的选择上,是在对前人报道的各单项PCR的条件进行优化比较的基础上做出的。在APP的优化选择中,Mg²⁺浓度以1.5~2mM为好,而在PM和HPS试验中Mg²⁺浓度以1.5mM最好,因此选择Mg²⁺浓度为1.5mM。在引物浓度的选择上考虑到在复合PCR中一般以扩增短片段优先[6],因此适当加大了HPS的引物量。3种单项PCR反应的变性和延伸温度与时间很相似,故未做改变,而退火温度在APP、PM、HPS的单项PCR反应中最佳温度分别是57℃、55℃、59℃,在复合PCR优化试验中经多次检验发现退火温度为60℃时PCR特异性和产量最佳,因此退火温度选择60℃。

3.3 本试验中被检样品的DNA提取简单、快捷、易行,而PCR敏感性试验显示对于APP、PM、HPS可以分别检测到100pg、100pg、100pg的DNA,从而说明复合PCR为我们提供了一种快速检测APP、PM、HPS的方法。

参考文献

- 1 Blackall P. J., Proposal of a new serovar of *A. pleuropneumoniae* Vet. Microbiology, 2002, 84 (1~2): 47~52
- 2 陈小玲等. 猪传染性胸膜肺炎的流行现状和防控措施. 中国兽医杂志, 2001, 7: 33~35
- 3 Chiers Koen, Overbeke I. Van, Donne E. et al, 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. Veterinary Microbiology, 2001, 83: 147~159
- 4 Townsend K. M., Frost A. J., Lee C. W. et al, Development of PCR Assay for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36: 1 096~1 100
- 5 Oliveira S., Galina L. & Pijoan C., Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn Invest, 2001, 13: 495~501
- 6 赵俊龙, 陈焕春等. 猪细小病毒和伪狂犬病毒复合PCR检测方法的建立. 华中农业大学学报, 2002, 2: 123~125

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽 ICP备 05006846号

饲料工业杂志社地址:沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编:110036 投稿:E-mail:tg@feedindustry.com.cn 广告:E-mail:ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部:(024)86391926(传真) 编辑二部:(024)86391925(传真) 网络部、发行部:(024)86391237 总编室:(024)86391923(传真)