

# 猪附红细胞体 PCR 检测方法的建立

王 妍<sup>1</sup>, 张守发<sup>1</sup>, 刘思国<sup>2</sup>, 王春来<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>延边大学农学院动物医学系, 龙井 133400; <sup>2</sup>中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 根据已发表的部分猪附红细胞体序列设计了一对特异性引物, 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增出了一条约 936 bp 的基因片段, 并成功地将该基因克隆于克隆载体 PMD18-T, 经酶切分析和 PCR 进一步鉴定后进行序列测定, 结果表明, 所克隆的目的基因与 GenBank 中发表的序列一致。并利用特异性引物初步建立了猪附红细胞体病 PCR 检测技术。

**关键词:** 猪; 附红细胞体; 克隆; PCR

## Establishment of the PCR Method for Detection of *Suis Eperythrozoonosis*

WANG Yan<sup>1</sup>, ZHANG Shou-fa<sup>1</sup>, LIU Si-guo<sup>2</sup>, WANG Chun-lai<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Veterinary Medicine Department, Agricultural College, Yanbian University, Longjing 133400; <sup>2</sup> Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

**Abstract:** The 16s ribosomal RNA gene of suis eperythrozoon was amplified using gene specific primers from DNA that had been extracted from the blood of infected pig. The 936bp positive product was obtained by PCR and was cloned into the pMD18-T sector. The fragment was sequenced after restriction enzyme analysis and further defined with PCR. The sequence data demonstrated that the complete sequence was similar with the published. PCR assay for identification of eperythrozoonosis was developed. Results show that PCR assay has specificity.

**Key words:** Swine; Eperythrozoon; Cloning; PCR

附红细胞体病 (Eperythrozoonosis) 是附红细胞体 (Eperythrozoon) 寄生于多种动物和人红细胞表面及血浆、骨髓内而引起的一种人兽共患病<sup>[1]</sup>。有关该病的研究国内还处于血清学研究阶段, 普通镜检和血清学诊断该病还是一种常用的方法<sup>[2-6]</sup>。而国外针对该病已进行了较为深入的研究。普遍将血清学试验作为附红细胞体病的定性依据, 1958 年 Splitter 率先将补体结合试验用于诊断猪附红细胞体病, 相继将荧光抗体试验、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 用于检测附红细胞体病<sup>[2-6]</sup>。鉴于上述的各种方法存在一定的局限性, 为克服这些方法的缺点, 1993 年 Gwaltneys 等人率先报道了用 PCR 检测猪附红细胞体病, 试验结果显示, PCR 方法是进行该病诊断和研究的一种有价值

的方法<sup>[7-15]</sup>, 而此法用于附红细胞体病的诊断和研究在国内尚属空白。本试验旨在初步建立 *E.suis* 的 PCR 检测技术, 克隆 *E.suis* 的部分基因, 为进一步开展 *E.suis* 基因的表达以及进行该病的早期诊断和预防奠定一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料来源

血液样品采于延边地区不同猪厂, 挑取经血液涂片检测为阳性的 35 份猪血液样品 (逐份检查)。

### 1.2 试剂

酚仿、溶菌酶、蛋白酶 K、Tag DNA 聚合酶、dNTP 均购于上海博亚生物技术有限公司; *Bam*H I、*Hind*III 和 T4 DNA 连接酶由哈尔滨兽医研究所

收稿日期: 2004-08-23

基金项目: 吉林省科技厅项目 (20020225)

作者简介: 王 妍 (1978-), 女, 吉林柳河人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病分子免疫学研究。Tel: 0433-3264661; E-mail: wangyan5\_78@sohu.com。张守发为通讯作者: Tel: 0433-3261730; E-mail: shoufazhang@sina.com

疫病实验室提供; LB 培养基、感受态细胞 BL-21、X-gal、克隆载体 PMD18-T 由哈尔滨兽医研究所疫病实验室提供。

### 1.3 附红细胞体 DNA 的提取

将无菌采取的带有明显临床症状的猪血液样品用 PBS 洗涤 3 次, 并反复冻融 3 次, 经溶菌酶( $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )作用 1 h 后, 溶于含有 10% SDS、 $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  蛋白酶 K、 $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaCl 和 5% 的十六烷基溴化三甲氨中,  $55^\circ\text{C}$  下处理 10 min。DNA 用酚/氯仿反复抽提 2 次, 70% 乙醇洗涤 1 次, 并用乙醇沉淀, 抽干, 所得 DNA 用 TE 缓冲液悬浮, 测其 OD 值,  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

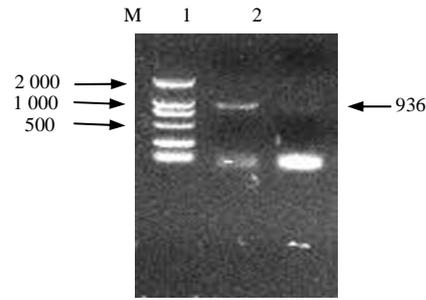
## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物根据

根据 GenBank Sequence Accession U88565 中已发表的猪附红细胞体 16s RNA 序列, 并与 GenBank 中的其它序列进行了同源性比较, 虽然同源性最高达 95% 左右, 但笔者选择了其中含有附红细胞体特有基因的部分片段, 用 Oligo6.57 和 Primer Premier 5.0 软件设计了一对特异性引物, 引物序列为: PE-U:  $5' \text{ -ATAACACATGCAAGTCGAACGA-3'}$ ; PE-L:  $5' \text{ -TGGTAAGGTTTTGCGTGTATGAT-3'}$ , 在  $25 \mu\text{l}$  反应体系中进行 PCR 扩增 ( $10\times$  Buffer  $2.5 \mu\text{l}$ , Dntp  $3.5 \mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $1.5 \mu\text{l}$ , 引物各  $1 \mu\text{l}$ , 模板  $2 \mu\text{l}$ , Taq DNA 聚合酶  $0.5 \mu\text{l}$ , 灭菌去离子水  $14 \mu\text{l}$ )。程序为:  $95^\circ\text{C}$  5 min,  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $55^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 共 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。取 PCR 产物  $5 \mu\text{l}$  用 1% 的琼脂糖凝胶, 在 TBE 缓冲溶液中电泳鉴定片段大小, 并设标准的 DL 2 000 DNA Marker 作为参照, 分析产物大小。经电泳分析, PCR 扩增出了一条 936bp 的特异条带 (图 1), 与预计目的片段大小相一致。

### 2.2 目的基因的克隆与 PCR 鉴定

将 PCR 产物用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 所得的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后, 利用 DNA 回收纯化试剂盒回收 DNA 片段, 将回收的目的基因与克隆载体 PMD18-T 载体进行连接,  $16^\circ\text{C}$  连接 1h 后, 取连接产物  $10 \mu\text{l}$  转化大肠杆菌感受态细胞 BL-21, 经处理后, 涂布于含 IPTG、X-gal、Ampr 的固体 LB 平板, 根据抗药性和蓝白斑筛选法挑选阳性白色克隆, 重组质粒命名为 PMDT-E1, 按碱性裂解法小量提取质粒 DNA。以提取的质粒 DNA 为模板,



M. DL 2000DNA marker; 1. PCR 产物, 936 bp; 2. 阴性对照  
M. DL 2000DNA marker; 1. PCR amplification 936 bp; 2. Negative

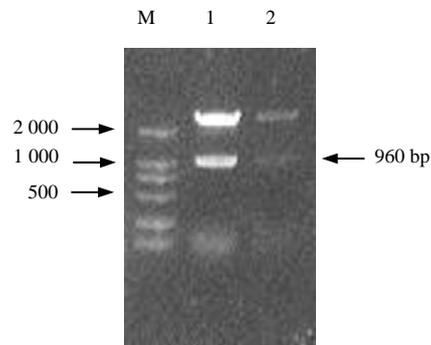
图 1 *E. suis* 基因的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplification of the gene of *E.suis*

按 1:10 稀释后, 进行 PCR 扩增 (方法同上 1.4), 出现目的条带, 进一步说明插入片段为目的片段。

### 2.3 目的基因的酶切分析

将上述经 PCR 鉴定的白色菌落接种于 5 ml 含  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的氨苄青霉素的 LB 培养液中,  $37^\circ\text{C}$  振荡培养过夜后, 按照碱性裂解法提取质粒 DNA, 沉淀用  $20 \mu\text{l}$  TE 缓冲液重悬, 使用 BamH I 和 Hind III 对质粒 DNA 进行双酶切, 经电泳分析, 得到了一条 960 bp 左右的基因片段 (图 2), 与预期的结果一致。



M. DL2000DNA marker; 1, 2. BamH I 和 Hind III 酶切产物, 960 bp 左右

M. DL2000DNA marker; 1, 2. BamH I and Hind III production of enzyme analysis, about 960 bp

图 2 克隆质粒的酶切结果

Fig.2 Production of enzyme analysis

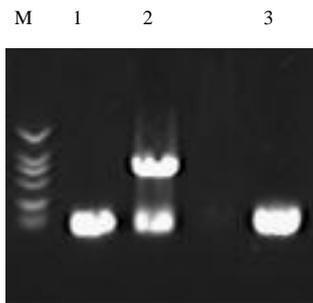
### 2.4 序列分析及同源性分析

将重组质粒送上海博亚生物技术有限公司进行测序分析, 并用 DNASTAR 序列分析软件将克隆质粒与已发表的核苷酸序列进行同源性分析。经序列

测定分析，结果与 GenBank U88565 中已发表的附红细胞体序列一致，证明该基因为目的基因。

### 2.5 特异性试验

应用隐孢子虫、猪附红细胞体、弓形虫抗原的 DNA 作为模板，在同样条件下，应用相同的引物进行 PCR 扩增。照片顺序为 M Marker、1 隐孢子虫、2 猪附红细胞体、3 弓形虫抗原。扩增结果：只有附红细胞体抗原在 936 bp 处扩增出了特异性条带（图 3），其它样品无特异性条带。说明试验有很好的特异性。



M. DL2000DNA marker; 1. 牛隐孢子虫; 2. 猪附红细胞体; 3. 弓形虫抗原  
M. DL2000DNA marker; 1. Cryptosporidiosis bovine; 2. Eperythrozoon suis; 3. Toxoplasmosis

图 3 PCR 特异性试验结果

Fig. 3 Specificity result of PCR

### 2.6 敏感性试验

取经镜检附红细胞体病阳性血液样品 1 份，提

取 DNA 测定其 OD<sub>260</sub> 值为 0.316 μg·μl<sup>-1</sup>，按 10 倍进行稀释，用特异性引物对不同稀释倍数的虫体 DNA 进行 PCR 扩增，样品经稀释后，经 PCR 方法能检出的最高敏感度 DNA 为 0.158 ng·ml<sup>-1</sup>。

### 2.7 现地试验结果

对采集于延边地区不同猪场，经血液涂片直接检查为阳性的 35 份血液样品，使用 PCR 技术进行现地检查，经现地检测的 35 份血液样品，其中阳性率为 94%。（如图 4 所示，其中 16 号与 31 号为阴性对照）

## 3 讨论

由于附红细胞体病是一种新近发生的疾病，具有广泛的流行性、高度的感染性，而且近年来感染动物的数目和种类也呈上升趋势<sup>[2-8]</sup>。有关附红细胞体病的病原学、分子生物学和建立快速有效的诊断方法等方面的研究，已成为防制该病的关键。

目前国内对该病的分子生物学以及基因方面报道甚少。本试验成功分离并提取了猪附红细胞体的基因组 DNA，根据猪附红细胞体基因的保守序列，设计了特异性引物，经 PCR 扩增出约 936bp 的基因片段，并成功地克隆了该基因，为进行 DNA 序列分析，明确附红细胞体的基因结构和基因表达研究提供了物质材料，并为了解其流行病学及致病机理都有着十分重要的参考价值。

近几年报道的附红细胞体病的感染和发病呈现全国性，而且愈演愈烈，在如此严峻的形势下，急需建立一种准确可靠的诊断方法并确定其致病

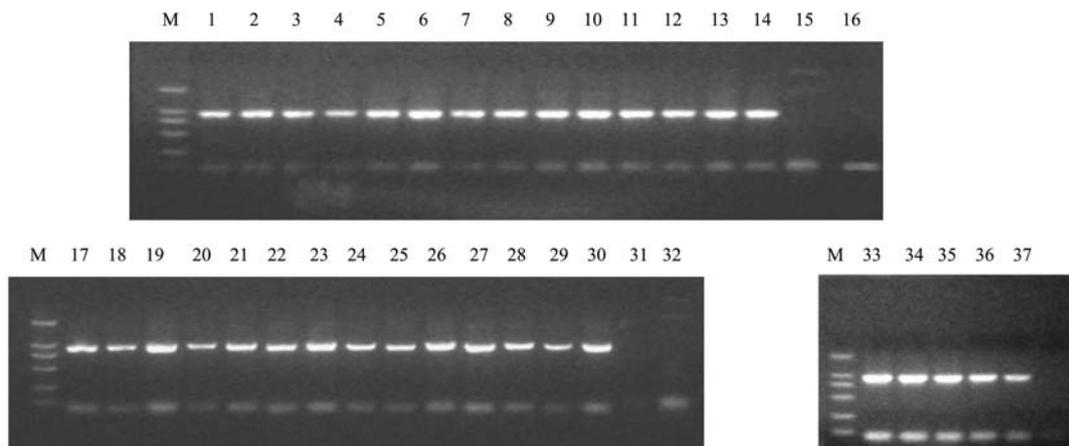


图 4 样品 PCR 检测结果

Fig.4 PCR detection result of 35 sample

性。分子诊断技术尤其是 PCR 方法在进行猪附红细胞体的检测方面具有极高的敏感性,可以用于检测急性附红细胞体病和临床健康的带菌猪。Gwaltney 等根据猪附红细胞体基因文库 KSU-2 克隆的序列资料,设计合成引物,首次建立了 *E.suis* 的 PCR 诊断方法<sup>[12, 13]</sup>。本试验基于猪附红细胞体 16sRNA 基因的序列特点,将在实验室提取的基因组位模板,进行 PCR 条件的优化,建立了猪附红细胞体病的 PCR 检测技术。经特异性和敏感性试验,表明所建立的 PCR 方法特异、快速、敏感,可以用来诊断猪附红细胞体病。而且,通过对 35 份现地血液样品的检测,阳性率为 94%,其中有 6 份无明显临床症状,涂片镜检阴性的血液样品也呈 PCR 阳性反应,说明所建立的 PCR 方法比涂片镜检更敏感,并且可以检测到发生隐性感染的病猪。

## 4 结 论

本试验根据已发表的部分猪附红细胞体序列设计了一对特异性引物,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增出了一条约 936 bp 的基因片段,并成功的将该基因克隆于克隆载体 PMD18-T,经酶切分析和 PCR 进一步鉴定后进行序列测定。结果表明,所克隆的目的基因与 GenBank 中发表的序列一致。并利用特异性引物初步建立了猪附红细胞体病 PCR 检测技术。

## References

- [1] 孙 刚, 孙 光, 郭昭林. 动物附红细胞体病. 黑龙江畜牧兽医杂志, 2003, (12): 72-73.  
Sun G, Sun G, Guo Z L. Animal eperythrozoonosis. *Heilong Jiang Journal of Veterinary Medicine*, 2003, (12): 72-73. (in Chinese)
- [2] 韩子强, 杨宏军, 李建基. 动物附红细胞体病的研究进展. 动物科学与动物医学, 2002, 19(7): 21-24.  
Han Z Q, Yang H J, Li J J. Review on research progress of animal eperythrozoonosis. *Animal Science and Animal Medicine*, 2002, 19(7): 21-24. (in Chinese)
- [3] 王君玮, 王志亮, 张喜悦. 猪附红细胞体研究进展. 中国动物检疫, 2003, 20(7): 44-46.  
Wang J W, Wang Z L, Zhang X Y. Review on research progress of suis eperythrozoonosis. *Chinese Animal Quarantine*, 2003, 20(7): 44-46. (in Chinese)
- [4] 王锡祯, 王泽华. 猪附红细胞体病的诊断与防制. 中国动物保健, 2003, (2) :55-56.  
Wang X Z, Wang Z H. Diagnosis and control of suis eperythrozoonosis. *Chinese Animal Health Protection*, 2003, (2): 55-56. (in Chinese)
- [5] 刘康华, 杨福兴, 叶大任, 潘唐贺. 猪附红细胞体病在我国的研究进展. 广东兽医科技, 2002, 27(3): 9-15.  
Liu K H, Yang F X, Ye D R, Pan T H. Review on research progress of suis eperythrozoonosis in China. *Guangdong Journal of Veterinary Science and Technology*, 2002, 27(3): 9-15. (in Chinese)
- [6] 古少鹏. 猪附红细胞体病. 当代畜禽养殖业, 2003, (7): 42-44.  
Gu S P. Suis Eperythrozoonosis. *Present Cultivation of Livestock*, 2003, (7): 42-44. (in Chinese)
- [7] Gwaltney S M, Oberst R D. Comparison of an improved polymerase chain reaction protocol and the indirect hemagglutination assay in the detection of Eperythrozoon suis infection. *Journal Veterinary Diagnosis Investigation*, 1994, 6(3): 321-325.
- [8] Oberst R D, Hall S M, Schoneweis D A. Detection of Eperythrozoon suis DNA from swine blood by whole organism DNA hybridizations. *Veterinary Microbiology*, 1990, 24: 127-134.
- [9] Joanne B M, Sandra K C. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16s rRNA gene for detection of Eperythrozoon suis infection. *Diagnosis Investigation*, 1999, 11: 229-236.
- [10] Oberst R D, Hall S M, Jasso R A, et al. Recombinant DNA Probe Detecting Eperythrozoon suis in swine blood. *American Journal of Veterinary Research*, 1990, 51: 1 760-1 764.
- [11] Ludwig E H, Dagmar A, Katharina H. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (Eperythrozoon suis) in porcine blood. *Veterinary Microbiology*, 2003(93):185-196.
- [12] Hall S M, Cipriano J A, Schoneweis D D, Smith J E, Fenwick B W. Isolation of infective and noninfective Eperythrozoon suis bodies from the whole blood of infected swine. *Technology*, 1988, 123: 651.
- [13] Gwaltney S M, Hays M P, Oberst R D. Detection of Eperythrozoon suis using the polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation*, 1993, 5(1): 40-46.
- [14] Harold N, Katherine M K. The cell wall-less rickettsia Eperythrozoon wenyonii is a Mycoplasma. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 156: 287-291.
- [15] Robert L, Carson A H, Mary K B. Use of a polymerase chain reaction assay to detect infection with Eperythrozoon wenyonii in cattle. Scientific Reports: Original Study. *JAVMA*, V2001. (10): November 15.

(责任编辑 林鉴非)