

PCR 诊断牛新孢子虫病的初步应用

王春仁^{1*}, 翟延庆¹, 赵兴存², 谭秋菊¹, 陈佳¹, 陈爱华¹, 王宇¹

【摘要】 目的 以犬新孢子虫 Nc-5 基因为目的基因的 PCR 诊断方法, 检测奶牛流产的胎牛脑组织的新孢子虫。方法 根据 GenBank 发布的新孢子虫特异性基因片段 Nc-5 基因序列, 设计 1 对特异性引物, 以犬新孢子虫 (*Neospora caninum*) 标准株 DNA 为模板, PCR 扩增 Nc-5 基因, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠埃希菌 JM109, 获得阳性重组质粒 pMD18-T-Nc-5, 并测序。以环形泰勒虫、牛巴贝斯虫、刚地弓形虫、杜氏利什曼原虫以及犬新孢子虫标准株 DNA 为模板进行扩增以验证 PCR 的特异性, 采用紫外分光光度计测定犬新孢子虫标准株 DNA 浓度和纯度, 取高纯度的 DNA 样品用灭菌水稀释, 分别取不同量的 DNA 进行 PCR 扩增, 确定 PCR 方法的敏感性; 利用该方法对 32 份奶牛流产的胎牛脑组织样品进行检测, 同时, 对其中 23 份流产的母牛血样进行 ELISA 血清学检测 (作为对照), 以评价犬新孢子虫 PCR 方法的检测效果。结果 克隆的犬新孢子虫标准株目的基因大小为 350 bp, 与 GenBank (AY459289) 中 Nc-5 基因序列一致性为 98%, 建立的犬新孢子虫 PCR 方法与环形泰勒虫、牛巴贝斯虫、刚地弓形虫和杜氏利什曼原虫均无交叉反应, 最低能检测犬新孢子虫 DNA 3.125 pg, 检测流产胎牛脑组织阳性率为 18.8% (6/32)。ELISA 检验流产母牛血样抗体阳性率为 17.4% (4/23), 这 4 份阳性样品与其流产胎牛 PCR 检测结果均为阳性。结论 建立的犬新孢子虫 PCR 诊断方法用于检测奶牛流产的胎牛脑组织新孢子虫的感染效果较好。

【关键词】 犬新孢子虫; Nc-5 基因; PCR 扩增; 胎牛

中图分类号: R382.3 文献标识码: A

Preliminary Application of PCR-based Assay for the Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted Fetus

WANG Chun-ren^{1*}, ZHAI Yan-qing¹, ZHAO Xing-chun², TAN Qiu-ju¹,
CHEN Jia¹, CHEN Ai-hua¹, WANG Yu¹

(1 College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August-First Land Reclamation University, Daqing 163319, China; 2 Fujian Entry and Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

【Abstract】 Objective To establish a PCR diagnostic method based on Nc-5 gene of *Neospora caninum*, for being used to detect *Neospora* in brain tissues of bovine aborted fetus. **Methods** Specific primers were designed and synthesized based on the reported Nc-5 gene of *N. caninum* (GenBank Accession No. AY459289). Using genomic DNA from *N. caninum* as templates, Nc-5 gene was amplified by PCR. The PCR product was cloned into pMD18-T vector, transformed into *Escherichia coli* JM109 and then sequenced. To evaluate the specificity of the PCR, genomic DNA of *Theileria annulata*, *Babesia bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* and standard strain of *N. caninum* were used as a template in the PCR. For determining the detection limit of amplification procedure, PCR was run on a dilution series of genomic DNA from *N. caninum* (1.562 5–200 ng/ml). Brain tissue samples of 32 aborted fetuses were detected by PCR-based assay, and 23 blood samples from mothers were tested by ELISA. **Results** The amplified DNA fragment (350 bp) had a high identity of 98% with the Nc-5 gene sequence of *N. caninum* (GenBank Accession No. AY459289). The PCR was specific for *N. caninum* and allowed the detection of 3.125 pg DNA of the parasite, while no amplification occurred with the other four species of protozoa. PCR-based assay and ELISA showed a positive rate of 18.8% (6/32) and 17.4% (4/23) of the samples tested, respectively. Moreover, all the 4 antibody positive samples showed PCR positive. There is no significant difference between the two assays ($P>0.05$). **Conclusion** PCR diagnostic method is promising in detecting *Neospora* infection in brain tissues of aborted bovine.

【Key words】 *Neospora caninum*; Nc-5 gene; PCR amplification; Bovine fetus

Supported by a grant from Daqing Science and Technology Bureau, Heilongjiang Province (No.SGG2005-032)

* Corresponding author, E-mail: chunrenwang@yahoo.com.cn

基金项目: 大庆市科技局攻关项目 (SGG2005-032)

作者单位: 1 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319; 2 中华人民共和国福建出入境检验检疫局, 福州 350001

* 通讯作者, E-mail: chunrenwang@yahoo.com.cn

新孢子虫病是由犬新孢子虫 (*Neospora caninum*) 寄生于牛、羊和犬等多种动物细胞内引起的一种原虫病。妊娠母牛感染此虫可引起流产, 即使发育至生产, 新生犊牛体质也较差, 并有先天性感染, 给畜牧业造成严重危害^[1]。犬新孢子虫的中间宿主为犬、绵羊、山羊、牛、马和鹿等, 可人工感染小鼠、大鼠、猫、狐狸、山狗、猪、小沙鼠和家兔等, 终末宿主为犬和郊狼^[2]。犬新孢子虫寄生于宿主中枢神经系统、肌肉、肝、脑及其他内脏组织的细胞内。犬新孢子虫病是全球性奶牛流产的主要原因, 其传播方式是经口、鼻感染速殖子, 通过胎盘可垂直感染胎牛^[3], 在新生犊牛的脑组织、肌肉、肺呼出物和皮肤脓疱渗出物等组织中均可检查到感染的犬新孢子虫。

犬新孢子虫感染是导致妊娠母牛流产的主要原因之一, 早期准确诊断是有效的控制其发生和蔓延的重要手段。虽然国内外相继建立了许多血清学诊断方法^[4-7], 但检测 5 月龄以内的犊牛和流产胎牛组织中犬新孢子虫的感染受到局限^[8]。因此, 本研究根据已知的犬新孢子虫 Nc-5 基因片段序列, 设计特异性引物, 建立检测奶牛流产的胎牛脑组织犬新孢子虫感染的 PCR 诊断方法。

材料与方 法

1 实验动物、虫体 DNA 及菌株来源

32 头奶牛流产的胎牛 (以下简称流产胎牛) 样品及其 23 份流产母牛 (以下简称流产母牛) 血样, 为 2005 年 5 月~2008 年 6 月, 在黑龙江省不同地区 10 个奶牛场获得, 妊娠期为 121~236 d。犬新孢子虫标准株基因组 DNA 由日本带广畜产大学玄学南教授惠赠。大肠埃希菌 JM109 感受态细胞由黑龙江八一农垦大学动物科技学院寄生虫实验室制备和保存。

2 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III, 以及 *Taq* DNA 聚合酶均为立陶宛 Fermentas 公司产品, 胶回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒为杭州博日科技有限公司产品。其他化学试剂均为进口或国产分析纯。

3 引物

根据 GenBank 发布的新孢子虫 Nc-5 基因序列 (登录号为 AY459289) 设计引物, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。上游引物为 5'-GACGTGTCGTTGTTGGCG-3', 下游引物为 5'-CTTGTCCTCCCAATGCG-3', 预计扩增产物为 350 bp。

4 PCR 扩增及其产物鉴定

PCR 反应总体积为 25 μ l: *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μ l, 脱氧核糖核苷酸 (dNTP)(2.5 mmol/L)2.0 μ l, 上、下游引物各 0.2 μ l (20 μ mol/L), 模板 DNA 0.8 μ l, ddH₂O 19.1 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l (5 U/ μ l)。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 59 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取扩增产物 2 μ l, 加入适量的上样缓冲液, 混匀后经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (溴化乙锭浓度为 5 μ g/ml, 电泳 200 V 10 min)。于成像系统 (Gel Doc2000, 美国 BioRad 公司) 观察并拍照。

用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。应用 pMD18-T 载体 (大连宝生物工程有限公司) 与纯化后的 PCR 产物连接并转化大肠埃希菌 JM109 感受态细胞。筛选重组菌落, 经碱裂解法提取质粒, 进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定 (*Bam*H I、*Hind* III)。将阳性重组菌送至北京英骏生物技术有限公司双向测序, 以确保其准确性。

5 特异性及敏感性试验

用已知的犬新孢子虫标准株、环形泰勒虫 (*Theileria annulata*)、牛巴贝斯虫 (*Babesia bovis*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 和杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*), 以及作为阴性对照的灭菌去离子水分别为模板, 利用上述 PCR 进行扩增, 检测 PCR 反应的特异性。

用 UV-2450 紫外分光光度计 (日本岛津公司产品) 测定标准株 DNA 浓度和纯度。用灭菌水稀释 DNA 样品为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 及 1.562 5 ng/ml, 分别取 1 μ l 进行 PCR 扩增, 电泳观察结果。以出现特异性扩增条带的最高稀释倍数的模板用量为最低检出量。

6 样品检测

采用十二烷基硫酸钠 (SDS)-蛋白酶 K 法提取流产胎牛脑组织基因组 DNA。分别取 32 份流产胎牛脑组织各 50 mg, 加入 280 μ l SDS 裂解缓冲液和 20 mg/ml 蛋白酶 K 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 消化过夜, 次日于 95 $^{\circ}$ C 15 min 灭活蛋白酶 K。Tris-饱和酚/三氯甲烷抽提, 预冷无水乙醇沉淀至少 1 h, 9 000 \times g 离心 10 min, 预冷 70% 乙醇洗涤沉淀物 3 次, 自然干燥, 去离子水溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

利用上述 PCR 法, 对临床采集的 32 份流产胎牛脑组织基因组 DNA 进行检测。同时, 用 ELISA 试剂盒 (美国 IDEXX 公司) 对 23 份流产母牛血样进行血

清学检测。

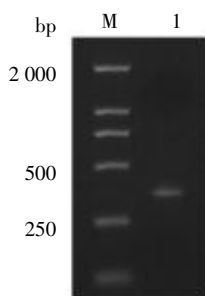
7 统计学分析

用 SPSS 10.0 统计分析软件对两种方法的实验结果进行 χ^2 检验。

结 果

1 新孢子虫 Nc-5 基因的 PCR 扩增结果

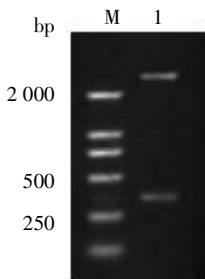
新孢子虫 Nc-5 基因 PCR 扩增产物电泳结果，获得约 350 bp 条带(图 1)，与预期相符。筛选得到的阳性质粒经 PCR 鉴定和酶切鉴定，与 PCR 扩增结果一致(图 2)。



M: DNA 标志物, 1: PCR 扩增产物。

M: DNA marker, 1: PCR product.

图 1 新孢子虫 Nc-5 基因 PCR 扩增结果
Fig.1 The result of PCR for Nc-5 gene



M: DNA 标志物, 1: BamH I 和 Hind III 双酶切产物。

M: DNA marker, 1: pMD18-T-Nc-5 digested by BamH I and Hind III.

图 2 pMD18-T-Nc-5 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pMD18-T-Nc-5 by restriction endonuclease

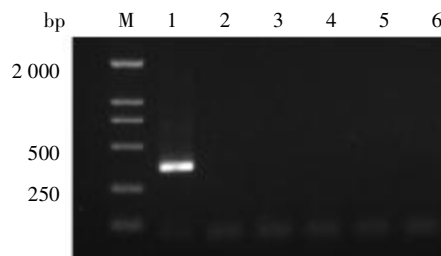
2 新孢子虫 Nc-5 基因测序与一致性分析

克隆的 Nc-5 测序结果与 GenBank 中新孢子虫 Nc-5 基因 (登录号为 AY459289) 序列一致性为 98%。与标准株相比，克隆的 Nc-5 基因第 54 位点脱氧核糖核苷 A→G, 162 位点 A→T, 188 位点 G→C, 247 位点 T→G, 291 位点 T→G, 307 位点 C→G, 331 位点 T→G。

3 特异性试验

用建立的犬新孢子虫 PCR 方法检测犬新孢子虫

标准株、环形泰勒虫、牛巴贝斯虫、刚地弓形虫、杜氏利什曼原虫及阴性对照组，结果显示仅犬新孢子虫标准株扩增出 350 bp 特异性目的基因片段(图 3)。



M: DNA 标志物, 1: 犬新孢子虫标准株, 2: 环形泰勒虫, 3: 牛巴贝斯虫, 4: 刚地弓形虫, 5: 杜氏利什曼原虫, 6: 阴性对照。

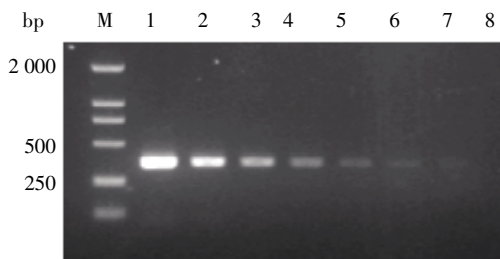
M: DNA marker, 1: *N. caninum*, 2: *T. annulata*, 3: *B. bovis*, 4: *T. gondii*, 5: *L. donovani*, 6: Negative control.

图 3 PCR 扩增特异性试验结果

Fig.3 PCR specific amplification

4 敏感性试验

对不同稀释度的犬新孢子虫 DNA 模板进行 PCR 扩增，结果显示，在 DNA 含量为 3.125 ng/ml (即 DNA 量为 3.125 pg) 时为检测最低界限(图 4)。



M: DNA 标志物, 1~8: DNA 浓度依次为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.5625 ng/ml。

M: DNA marker, 1-8: DNA, 1: 200 ng/ml, 2: 100 ng/ml, 3: 50 ng/ml, 4: 25 ng/ml, 5: 12.5 ng/ml, 6: 6.25 ng/ml, 7: 3.125 ng/ml, 8: 1.5625 ng/ml.

图 4 PCR 敏感性试验结果

Fig.4 PCR sensitivity test

5 样品检测

应用上述 PCR 方法，对 32 份流产胎牛脑组织进行检测，结果 6 份为阳性，阳性率为 18.8%。23 份流产母牛血样经 ELISA 试剂盒检测，结果有 4 份抗体阳性，阳性率为 17.4%，且这 4 份阳性样品与其流产胎牛 PCR 检测的阳性结果一致 ($P>0.05$)。

讨 论

自 1988 年 Dubey 等^[9]首次分离新孢子虫以来，研究工作取得了长足的进步，特别是在奶牛新孢子虫病诊断方面。目前，诊断奶牛新孢子虫病主要采用间

接血凝试验 (IHA)、ELISA 和间接荧光抗体试验 (IFAT) 等方法检测血清中新孢子虫的特异性抗体。对于奶牛流产的胎牛, 血清学方法已用于流产个体胎牛新孢子虫感染的检测, 但研究表明已被确认感染犬新孢子虫的胎牛其特异性抗体检出率仅为 50%~65%^[10,11], 敏感性不高。而且, 因无法采集血样, 该法也不适合检测产下后即死亡或胎死的感染胎牛。检测流产胎牛新孢子虫感染最基本的方法是对胎牛进行组织病理学检查。当发现流产胎牛出现多灶性、非化脓性、坏死性脑炎和非化脓性心肌炎病变时, 采用免疫组织化学法 (IHC) 对病变组织中的寄生虫进行检测, 然而该法用于确诊新孢子虫病时易出现漏诊, 因组织中新孢子虫量可能较少, 而使得 IHC 的敏感性相对较低。PCR 具有敏感、特异、简便及快速等优点, 可提高有新孢子虫组织病理学变化、但 IHC 和血清学方法无法检测的流产胎牛检出率。

由于新孢子虫 Nc-5 基因具有高度的特异性, 在其他寄生虫中不存在^[12], 因此, 国外许多研究者利用该基因建立了奶牛新孢子虫病 PCR 诊断方法, 并用于血液、精液、脊髓及组织样品的检测^[13-15], 取得较好效果。我国仅见蔡锦顺等^[16]、岳韬等^[17]利用该基因建立了检测胎牛脑脊液及实质脏器和流产母牛血液的新孢子虫感染诊断方法, 但利用该基因建立检测奶牛流产胎牛脑组织样品 DNA 的详细研究还未见报道。岳韬等^[17]利用 PCR 方法对流产奶牛血样进行检测, 其敏感性试验显示, 最低检出 DNA 量为 2.5 pg。本研究以新孢子虫 Nc-5 作为目的基因建立了检测流产胎牛脑组织的新孢子虫病 PCR 诊断方法, 最低检出 DNA 量为 3.125 pg, 结果与其相似, 但临床脑组织的样品采集量只有 50 mg, 非常适合于现场应用, 特别是在脑组织自溶、样本难以采集时, 本法显得尤其重要。特异性扩增试验结果显示, 犬新孢子虫 DNA 能扩增出特异片段, 而环形泰勒虫、牛巴贝斯虫、刚地弓形虫和杜氏利什曼原虫等的 DNA 则无。利用本研究建立的 PCR 方法检测 32 份流产胎牛脑组织样品, 其检出率为 18.8% (6/32); 用 ELISA 检测 23 份流产母牛血样, 抗体阳性率为 17.4% (4/23), 且 4 份阳性样品的流产胎牛 PCR 检测结果均为阳性。表明该诊断方法特异性强, 敏感性高, 可用于检测奶牛流产的胎牛脑组织新孢子虫感染和流行病学调查。

虽然国内外研究者对新孢子虫和新孢子虫病进行了大量研究, 但至今还未发现其与人类疾病感染有关。然而, 新孢子虫与弓形虫、隐孢子虫均为原虫, 弓形虫和隐孢子虫常与免疫缺陷性疾病 (如艾滋病) 协同感染, 极大地增加了这类疾病传染机会和危险

性, 因此, 深入开展新孢子虫病与人类疾病之间协同感染关系的研究势在必行。

参 考 文 献

- [1] Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis[J]. Vet Parasitol, 1999, 84(3-4): 349-367.
- [2] Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, et al. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(2): 159-161.
- [3] Perez E, Conzalez O, Dolz G, et al. First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica[J]. Vet Rec, 1998, 142(19): 520-521.
- [4] Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, et al. Recognition patterns of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by bovine IgG at different IFAT titres[J]. Parasite Immunol, 2004, 26(4): 177-185.
- [5] Jenkins MC, Fetterer R, Schares G, et al. HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis[J]. Vet Parasitol, 2005, 131(3-4): 227-234.
- [6] Howe DK, Tang K, Conrad PA, et al. Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(3): 611-615.
- [7] Ahn HJ, Kim S, Kim DY, et al. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen fragment of *Neospora caninum* in bovine sera[J]. Korean J Parasitol, 2003, 41(3): 175-177.
- [8] Zhai YQ, Zhao JP, Zhu XQ, et al. Research advances in the diagnosis of cattle neosporosis [J]. JAVA, 2007, 6(12): 1377-1387.
- [9] Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs[J]. J Am Vet Med Assoc, 1988, 192(9): 1269-1285.
- [10] Barr, BC, Anderson ML, Sverlow KW, et al. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test [J]. Vet Rec, 1995, 137(24): 611-613.
- [11] Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis[J]. J Parasitol, 1997, 83(3): 545-547.
- [12] Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, et al. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR[J]. Mol Cell Prob, 1996, 10(4): 289-297.
- [13] Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, et al. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows[J]. Vet Parasitol, 2004, 122(4): 307-315.
- [14] Paula VS, Rodrigues AA, Richtzenhain LJ, et al. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses[J]. Vet Res Commun, 2004, 28(7): 581-585.
- [15] Baszler TV, Gay LJ, Long MT, et al. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions [J]. J Clin Microbiol, 1999, 7(12): 4059-4064.
- [16] Cai JS, Lu C, Wang YF, et al. Development and application of polymerase chain reaction for detection of *Neospora* disease in bovine[J]. Chin J Prev Vet Med, 2007, 29(4): 312-315. (in Chinese)
(蔡锦顺, 鲁承, 王彦方, 等. 牛新孢子虫病 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(4): 312-315.)
- [17] Yue T, Qin JH, Zhao YL, et al. Development of polymerase chain reaction for detection of neosporosis in dairy cattle[J]. Chin J Vet Sci, 2008, 28(4): 386-389. (in Chinese)
(岳韬, 秦建华, 赵月兰, 等. 奶牛新孢子虫病 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(4): 386-389.)

(收稿日期: 2008-07-24 编辑: 富秀兰)