

鸡毒支原体与滑液囊支原体双重PCR检测方法的建立与应用

吴旭锦, 朱小甫, 熊忙利, 张文娟, 尹宝英, 邢蕾, 李虹

(1咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 咸阳市动物疫病分子生物学诊断技术研究重点实验室, 陕西咸阳 712000)

摘要: 为建立鸡毒支原体(MG)与滑液囊支原体(MS)双重PCR检测方法, 一次反应即可诊断鸡毒支原体与滑液囊支原体感染情况。根据GenBank公开的MG、MS基因序列, 设计了2对质粒构建引物和2对检测引物, 优化了检测反应体系与条件, 进行了灵敏性试验、特异性试验和临床检测应用。结果表明, 该方法检测MG、MS阳性质粒的极限为10拷贝/ μL ; 与常见的H9禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、I群禽腺病毒4型、副鸡嗜血杆菌、鸡大肠杆菌6种病原无交叉反应; 应用该方法检测335份样品, MG单阳性率为7.8%, MS单阳性率为31.3%, MG、MS双阳性率为17.0%, 两种支原体总的感染率为56.1%。成功建立了检测MG、MS的双重PCR检测方法, 为流行病学调查和诊断提供了可靠的技术手段。

关键词: 鸡毒支原体; 滑液囊支原体; 双重PCR; 检测

中图分类号: S852.659.1

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2020)01-016-05

鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)主要引起鸡慢性呼吸道病(Chronic respiratory disease, CRD), 以流鼻涕、咳嗽、结膜炎和气囊炎为特征^[1,2]。滑液囊支原体(*Mycoplasma synovialum*, MS)可侵害鸡关节滑液囊膜及腱鞘, 引起渗出性滑膜炎、腱鞘炎及附关节和脚垫肿胀, 此外还会造成生长发育迟缓、产蛋下降, 并且与呼吸道疾病有关^[3,4]。MG、MS即可水平传播也能垂直传播, 在鸡群中净化难度较大。自2017年以来, 鸡群支原体感染呈急剧上升趋势, 造成临床上呼吸道问题、产蛋下降问题、关节肿胀引起的瘫痪问题层出不穷, 严重影响了鸡群正常生产, 养殖场经济损失较大^[5-7]。

由于支原体实验室培养难度大, 生长缓慢, 分离鉴定耗时过长, 甚至多数情况下难以分离成功, 给支原体病确诊造成很大困扰^[8]。此外, 支原体诊断常用血清学方法, 但由于血清学方法敏感性较低、存在非特异性反应干扰等缺点, 诊断的准确性可靠性不足。因此, 为了对MG、MS准确诊断, 需要开发更为准确特异的诊断方法。秦璐璐等^[9]根据MG特异性序列fMG-2设计1对引物, 建立检测鸡毒支原体的PCR方法, 对MG的最少检出量为3pg, 用

建立的PCR方法对临床采集的样品进行检测, 同时对相应的样品进行细菌分离, 结果PCR的阳性检出率为20.5%, 细菌分离培养的阳性率为0.9%, 表明PCR的敏感性高于细菌分离鉴定。丁美娟等^[10]依据MS 16S rRNA设计引物, 建立了检测MS的PCR方法, 该方法特异性好, 能检出MS的最低DNA量为1pg, 对鸡肿胀跗关节腔内容物临床样品检测, PCR检出率为21.1%, 显著高于病原分离方法的9.2%。本研究拟针对MG、MS两种病原设计双重PCR方法, 在一个反应体系中一次检测这两种病原, 为临床快速检测区分MG、MS感染提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料与喉头棉拭子 2018年—2019年间采集陕西地区养鸡场疑似MG感染的待检组织病料(喉头、气管、肺)63份, 疑似MS感染的肿胀关节样品12份, 喉头棉拭子样品260份。组织病料研磨离心后取上清液, 关节样品取关节液和刮取关节滑膜, 喉头棉拭子加适量生理盐水浸泡后反复挤压, 取液体备用。

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 西安市科学技术研究计划项目(20193036YF024NS024); 西咸新区凯歌牧业有限公司委托横向课题研究项目“鸡支原体病快速诊断技术的研究与临床检测”

作者简介: 吴旭锦(1979—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士, 主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究工作。

1.1.2 参考病毒与细菌 H9禽流感病毒、新城疫病毒、I群禽腺病毒4型、副鸡嗜血杆菌、鸡大肠杆菌为本实验室分离保存, 马立克病毒为市售疫苗毒株CVI988。

1.1.3 主要试剂 DNAiso reagent、RNAiso plus、rTaq酶、dNTP等购自宝生物工程(大连)有限公司; pGEM-T easy载体克隆试剂盒购自Promega公司; UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒均为生工生物工程(上海)有限公司产品; DH5 α 大肠杆菌本实验室保存。

1.1.4 主要仪器 PCR仪(2720型), 美国ABI公司产

品; 高速冷冻离心机(5424R), 德国艾本德公司产品; 超微量紫外-可见光分光光度计(NanoDrop one), 美国Thermo公司产品; 全自动凝胶成像系统(GeneGenius), 英国SYNGENE公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据GenBank中公开的MG基因序列L35043、MS 16S rRNA基因序列NR_044811, 设计了4对引物, MG-F/MG-R、MS-F/MS-R引物用于构建阳性质粒, MG-JF/MG-JR、MS-JF/MS-JR引物用于MG、MS核酸检测, 引物信息见表1。

表1 引物基本信息
Table1 The Basic Information of the primers

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5' →3') Nucleotide sequence (5' →3')	长度 Length
MG-F	TAAGAATTCATAAAAGTGAGA	1232bp
MG-R	GATTTCAAATCGATAAGGT	
MG-JF	ATCATTTCCTTAACAATAATC	
MG-JR	GGTCCAGAAGGTTTAAAGAA	
MS-F	GCGAATGGGTGAGTAACAC	805bp
MS-R	GTTTCACTCTTGGGAGCAT	
MS-JF	ATGTTTAGCGGGTTGAG	246bp
MS-JR	CGGCTGCTGGCACATAGTT	

1.2.2 组织病料中DNA的提取 吸取处理好的组织病料上清液100 μ L置于1.5mL无菌无酶离心管, 加700 μ L DNAiso reagent裂解液, 振荡混匀后静置静置10min, 室温12000g离心1min, 将700 μ L上清液转移至另一离心管中, 加入700 μ L冰冷的无水乙醇, 室温静置10min, 12000g离心10min, 弃去液体, 加入1mL70%无水乙醇洗涤一次, 弃去液体后瞬时离心, 用移液器吸取弃去残余液体, 自然干燥后用40 μ L超纯水反复吹打溶解, 即得DNA溶液。

1.2.3 MG、MS基因克隆 MG、MS两个病原质粒构建基因片段扩增PCR反应体系一致, 超纯水17.0 μ L, DNA溶液2.0 μ L, 10 \times Buffer2.5 μ L, dNTP2.0 μ L, MG-F/MG-R引物各0.5 μ L, rTaq DNA聚合酶0.5 μ L。PCR程序为95 $^{\circ}$ C预变性5min, 循环中94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共循环35次, 循环结束72 $^{\circ}$ C延伸5min。MS扩增只更换引物为MS-F/MS-R。反应完毕电泳成像观察。

1.2.4 MG、MS阳性质粒的构建 PCR产物电泳后在紫外分析仪中切下目的条带, 将胶块放入1.5mL

EP管中, 每管加入Binding Buffer 700 μ L, 55 $^{\circ}$ C水浴10 min至胶块充分融化, 将融化的胶溶液转移到吸附柱中, 室温放置2 min, 8 000g离心1 min, 弃去收集管中废液, 在吸附柱中加入 500 μ L洗液, 8 000g离心30 s, 弃去废液, 重复洗涤一次, 弃去废液后将吸附柱10 000g空离心15 s, 在吸附柱膜中央加入20 μ L 55 $^{\circ}$ C水浴预热的Elution Buffer, 将吸附柱放入洁净1.5 mL EP管中, 室温放置2 min, 10 000g离心2 min, 离心管中液体即为回收的VP1基因DNA片段。将回收的DNA片段与pGEM-T Easy载体连接, 4 $^{\circ}$ C水浴过夜, 转化DH5 α 感受态细胞, 经氨苄阳性LB培养基筛选, 挑取单个菌落, 37 $^{\circ}$ C、200r/min摇动培养, PCR鉴定阳性的菌液用碱裂解法提取质粒, EcoR I酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。测序正确的质粒分别命名为pGEM-T-MG、pGEM-T-MS。

1.2.5 MG、MS双重检测方法的建立 分别以MG、MS阳性质粒做为模板, 改变扩增体系和反应条件, 确定单一PCR检测方案。PCR反应体系, 质粒

1.0 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL , MG-JF/MG-JR引物各0.5 μL , 梯度增加rTaq DNA聚合酶用量(0.25~1.0 μL), 用超纯水补足25.0 μL 。反应条件, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火温度由52 $^{\circ}\text{C}$ ~58 $^{\circ}\text{C}$ 按1 $^{\circ}\text{C}$ 递增, 时间30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 共进行35个循环; 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。MS扩增只更换引物为MS-JF/MS-JR。确定了MG、MS单一检测的体系与条件后, 组合2对引物, 进行双重PCR反应。反应体系中调整两对引物比例, 探索最佳反应体系。

1.2.6 MG、MS双重检测方法灵敏性试验 用微量紫外分光光度计测定阳性质粒pGEM-T-MG、pGEM-T-MS的浓度, 根据质粒计算公式换算为质粒拷贝数, 混合后按10倍梯度稀释质粒溶液, 用建立的方法进行PCR反应, 测定方法的检测极限。

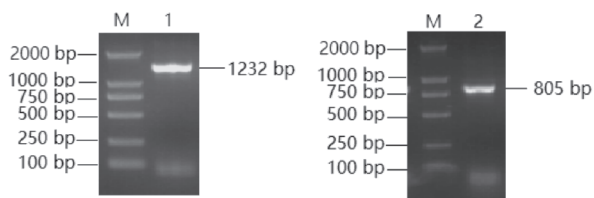
1.2.7 MG、MS双重检测方法特异性试验 用RNAiso plus试剂提取H9禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒核酸并反转录获得cDNA; 提取I群禽流感病毒4型、副鸡嗜血杆菌、鸡大肠杆菌等DNA模板, 用建立的方法检测, 验证方法的特异性。

1.2.8 MG、MS双重检测方法临床应用 用建立的检测方法对收集的63份组织样品、12份关节样品、260份喉头棉拭子样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 MG、MS基因扩增结果

通过PCR方法, 从MG、MS阳性病料中成功扩增出了预期1232bp、805bp目的条带(图1)。



M: DNA标准DL2000; 1: 阳性病料中MG基因扩增;
2: 阳性病料中MS基因扩增
M: DNA Marker DL2000; 1: clone MG gene from tissue;
2: clone MS gene from tissue

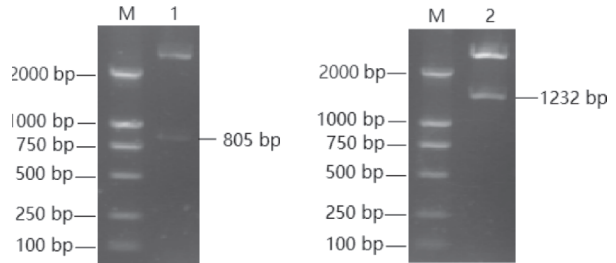
图1病料中MG、MS基因扩增结果

Fig.1 The result of clone MG,MS gene from tissue by PCR

2.2 MG、MS基因重组阳性质粒的构建结果

回收PCR产物连接pGEM-T Easy载体, 转化DH5 α 感受态细胞, 培养后挑取单个菌落, 菌液

PCR为阳性后提取质粒, EcoR I酶切鉴定为阳性(图2), 测序后NCBI BLAST比对证实序列无误, 提示MG、MS基因重组阳性质粒pGEM-T-MG、pGEM-T-MS构建成功。



M: DNA标准DL2000; 1: pGEM-T-MS重组阳性质粒酶切;
2: pGEM-T-MG重组阳性质粒酶切

M: DNA Marker DL2000; 1: enzyme digest recombinant plasmids pGEM-T-MS
2: enzyme digest recombinant plasmids pGEM-T-MG

图2 重组阳性质粒酶切结果

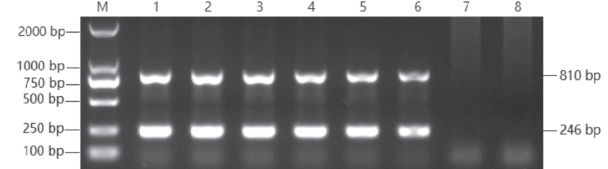
Fig.2 The electrophoresis result of enzyme digest recombinant plasmids

2.3 MG、MS双重检测方法的建立

通过单一质粒、双质粒为模板的扩增体系和反应条件的探索, 确定最佳PCR方案为, PCR反应体系中, 超纯水16.4 μL , 质粒1.0 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTP 2.0 μL , MG-JF/MG-JR各0.8 μL , MS-JF/MS-JR各0.5 μL , rTaq DNA聚合酶0.5 μL ; 最优反应程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 共循环35次, 最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

2.4 MG、MS双重检测方法灵敏性试验

用微量紫外-可见光分光光度计测定pGEM-T-MG、pGEM-T-MS质粒浓度, 用质粒拷贝数计算公式换算并梯度稀释质粒, 以 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ μL 共8个浓度梯度为模板进行PCR扩增, 电泳结果见图3。从图3可知, 建立的PCR方法检测的极限为10拷贝/ μL , 提示建立的方法有很高的灵敏度。



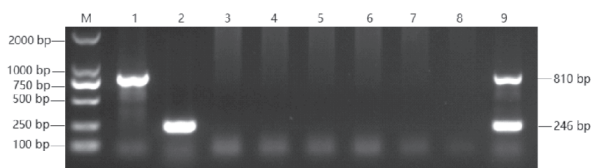
M: DNA标准DL2000; 1~8: 质粒浓度依次为
 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝/ μL

M: DNA Marker DL2000; 1~8: $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^2$ copies/ μL of pGEM-T-MG and pGEM-T-MS

图3 双重PCR检测方法灵敏度试验结果

Fig.3 Results of the sensitivity test of the dual PCR detection method

2.5 MG、MS双重检测方法特异性试验



M: DNA标准DL2000; 1: pGEM-T-MG; 2: pGEM-T-MS; 3: H9; 4: NDV; 5: IBV; 6: FAdV-4; 7: 副鸡嗜血杆菌; 8: 鸡大肠杆菌; 9: pGEM-T-MG+ pGEM-T-MS
M: DNA Marker DL2000; 1:pGEM-T-MG; 2:pGEM-T-MS; 3:H9; 4:NDV; 5:IBV; 6:FAdV-4; 7:Haemophilus parachi; 8:Escherichia coli; 9:pGEM-T-MG+ pGEM-T-MS
图4 双重PCR检测方法特异性试验结果

Fig.4 The result of specialization test for dual PCR detection method

用建立的双重PCR方法扩增H9禽流感病毒、新城疫病毒、

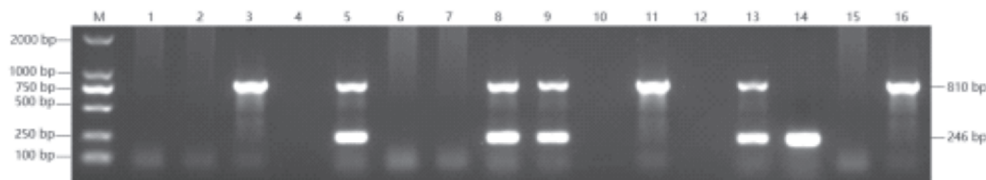
新城疫病毒、传染性支气管炎病毒cDNA, I群禽腺病毒4型、副鸡嗜血杆菌、鸡大肠杆菌DNA模板, 同时用pGEM-T-MG、pGEM-T-MS质粒作为对照。结果从pGEM-T-MG、pGEM-T-MS质粒扩增出了810bp、246bp的目的条带, 从两种质粒混合物中扩增出810bp、246bp两个特异性条带, 其他5种病原均为阴性。提示所建立的方法特异性良好(图4)。

2.6 MG、MS双重检测方法临床检测

应用该方法对63份组织样品、12份关节样品、260份喉头棉拭子样品进行检测(图5), 统计结果见表2。

表2 检测结果统计
Table 2 Statistics of test results

样品种类/数量 Sample type/quantity	MG 阳性数/阳性率 MG positive number/positive rate	MS 阳性数/阳性率 MS positive number/positive rate	MG+MS 阳性数/阳性率 MG+MS positive number/positive rate	合计/阳性率 Total/positive rate
组织样品/63 Tissue sample/63	9/14.3%	16/25.4%	12/19.0%	37/58.7%
关节样品/12 Joint samples/12	0/0	7/58.3%	0/0	7/58.3%
喉头棉拭子/260 Laryngeal cotton swab/260	17/6.5%	82/31.5%	45/17.3%	144/55.4%
合计/阳性率 Total/positive rate	26/7.8%	105/31.3%	57/17.0%	188/56.1%



M: DNA标准DL2000; 3/11/16为MG阳性; 14为MS阳性; 5/8/9/13为MG、MS双阳性; 1/2/4/6/7/10/12/15为阴性
M: DNA Marker DL2000; 3/11/16 is MG positive; 14 is MS positive; 5/8/9/13 is MG and MS double positive; 1/2/4/6/7/10/12/15 is negative

图5 部分临床样品检测结果

Fig.5 Partial clinical sample test results

由表2可知, 在组织和喉头棉拭子样品中均检测出了MG单阳性结果, 总阳性率为7.8%(26/335), 关节样品未检出MG。MS单阳性结果在组织、关节和喉头棉拭子样品中均有检出, 总阳性率为31.3%(105/335), 尤其是关节样品中阳性率高达58.3%(7/12)。MG、MS双阳性率为17.0%(57/335), 提示二者混合感染现象比较普遍。总体看, 两种支原体感染率为56.1%(188/335), 表明鸡群中MG、MS感染率很高。

3 讨论

为了准确测定建立的检测MG、MS双重PCR方法的灵敏性, 本研究从病料样品中扩增了MG、MS基因片段, 构建了两种病原的阳性质粒作为参照。通过MG、MS单扩增探索反应体系和条件后进行混合双重PCR扩增, 确定了最佳反应体系与条件。灵敏性检测证实, 建立的双重PCR方法检测的极限为10拷贝/ μ L, 其灵敏度与单一PCR检测相当^[11,12], 比谢志勤等^[13]建立的多重PCR方法灵敏度高, 完全满足临床检测灵敏度的需要。特异性试验表明, 该方法仅能扩增MG、MS核酸模板, 不与常见的鸡群病原H9禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病

毒、I 群禽腺病毒4型、副鸡嗜血杆菌、鸡大肠杆菌发生交叉反应。在引物设计上充分考虑到图像判读问题, MG、MS扩增产物分别为810 bp、246bp, 条带长度差异较大, 清晰无杂带干扰, 结果判定直观准确。

应用该方法对陕西地区养鸡场2018年—2019年间335份样品进行检测, MG单阳性率为7.8%, MS单阳性率为31.3%, MG、MS双阳性率为17.0%, 两种支原体总的感染率为56.1%, 鸡群中MG、MS感染率很高, MS比MG感染率更高, 和马爽等^[14]对11个省份2010—2015年间鸡滑液囊支原体流行病学调查的平均发病率13.92%相比, MS阳性率上升不少, 提示养鸡场要高度重视支原体感染问题造成的经济损失。从样品种类来看, 喉头棉拭子适用于MG、MS检测, 其具有来源简单、采样方便、便于处理检测的优点, 可以推广使用。临床检测进一步验证了该方法的实用性良好, 可用于MG、MS感染的快速诊断检测。

参考文献

- [1]牛家强,徐业芬,胡思顺,等.藏鸡鸡毒支原体的分离鉴定及对常用抗菌药物的敏感性试验[J].中国兽医学报,2018,38(11):2084-2093.
- [2]刘利明,冯立志,胡登峰,等.鸡毒支原体研究进展[J].中国畜牧兽医,2005,32(6):61-62.
- [3]徐怀英,刘星丽,秦卓明.鸡滑液支原体病的防控应引起高度重视[J].家禽科学,2019,4:9-14.
- [4]丁美娟,尹秀凤,黄显明,等.鸡滑液囊支原体病研究进展[J].中国家禽,2013,35(13):39-41.
- [5]孙世宇.规模鸡场支原体MG、MS的危害与防治[J].畜牧兽医科技信息,2019,(6):147.
- [6]石晓磊,齐田苗,边海霞,等.宁夏地区鸡滑液囊支原体的分离鉴定与药敏试验[J].动物医学进展,2018,39(11):134-136.
- [7]孙法良,马艳芳,王荣梅.蛋鸡滑液囊支原体流行现状及防控措施[J].家禽科学,2019,(12):44-46.
- [8]雷元元,郭亚男,郭磊,等.一起禽滑液囊支原体病的诊断及垂直传播验证[J].中国动物传染病学报, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.S.20191022.1705.004.html>
- [9]秦璐璐.鸡毒支原体PCR检测方法的建立[J].动物医学进展,2009,30(2):39-42.
- [10]丁美娟,张小飞,尹秀凤,等.鸡滑液囊支原体的分离和鉴定研究[J].中国家禽,2012,33(24):27-29.
- [11]赵杰,徐建义,隋兆峰,等.鸡毒支原体套式PCR检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2015,5(7):706-710.
- [12]丁美娟,卢凤英,尹秀凤,等.应用PCR快速检测鸡滑液囊支原体的研究[J].中国家禽,2015,37(19):68-70.
- [13]谢志勤,谢芝勋,庞耀珊,等.应用多重聚合酶链式反应检测鸡毒支原体、鸡滑液囊支原体和禽衣阿华支原体的研究[J].畜牧与兽医,2000,32(5):4-6.
- [14]马爽,郭莉莉,宋新宇,等.鸡滑液囊支原体感染的流行病学调查与分析[J].中国家禽,2016,38(23):68-71.

[责任编辑 王军利]

Establishment and Application of Dual PCR Detection Method for Mycoplasma Gallisepticum and Mycoplasma Synovialum

WU Xu-jin, ZHU Xiao-fu, XIONG Mang-li, ZHANG Wen-juan, YIN Bao-ying, XING Lei, LI Hong

(1. Key Laboratory of Molecular Biology Diagnosis of Animal Epidemic Disease of Xianyang City, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang, 712000, China)

Abstract: In order to fulfill the quick diagnose of infection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synovialum, A dual PCR detection method for Mycoplasma gallisepticum (MG) and Mycoplasma synovialum (MS) was established. Based on the MG and MS gene sequences published by GenBank, two pairs of plasmids construction primers and two pairs of detection primers were designed, by optimization of the detection reaction system and conditions, and then, the sensitivity tests, specificity tests, and clinical detection applications were performed. The results showed that the limit of detection of MG and MS positive plasmids by this method was 10 copies/ μ L; there was no cross-reactions to common H9 avian influenza virus, Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, group I avian adenovirus type 4, Haemophilus paragallinarum, and 6 pathogens of chicken and Escherichia coli. There were 335 samples detected with this method, in which, the MG single positive rate was 7.8%, the MS single positive rate was 31.3%, and the MG and MS double positive rates were 17.0%. The infection rate was 56.1%. The dual PCR detection method for detecting MG and MS was successfully established, which provided reliable technical means for epidemiological investigation and diagnosis.

Key words: Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synovialum, Duplex PCR, detection