

鼻气管鸟杆菌 PCR 诊断方法的建立与应用

李瑶瑶, 刁有祥

(山东农业大学, 山东 泰安 271018)

摘 要: 根据 GenBank 已发表的鼻气管鸟杆菌 (*Ornithobacterium rhinotracheale*, ORT) 16S rRNA 基因序列, 设计 1 对可扩增 671 bp 目的片段的引物, 建立了检测 ORT 的 PCR 方法。该方法能在 ORT 参考菌株中扩增到特异性片段, 而鸡大肠杆菌、副鸡嗜血杆菌、鸡白痢沙门氏菌、禽多杀性巴氏杆菌的扩增结果均为阴性; 敏感性试验表明该方法最低检出限量为 90 pg DNA。表明所建立的 PCR 方法具有敏感性高、特异性强的特点。利用建立的方法对分离菌株进行检测, 2 株为阳性。

关键词: 鼻气管鸟杆菌; PCR; 诊断

中图分类号: S 855. 12

文献标识码: A

PCR method for *Ornithobacterium rhinotracheale* detection

LI Yao yao, DIAO You xiang

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: Based on the 16S rRNA sequence in GenBank for *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), a pair of primers was selected for the amplification of the 671 bp fragment to establish a PCR method for ORT detection. This method could amplify the specific fragment in the reference strains, but not in chicken *E. coli*, *Haemophilus paragallinarum*, *Salmonella Pullorum* and *Avian pasteurella multocida*, of ORT. A sensitivity test indicated that the assay's lowest detection limit was 90 pg DNA. The PCR methodology appeared to be highly sensitive and specific for the purpose. Positive results were obtained on two isolated strains by using this newly developed PCR method.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale* ; PCR; diagnosis

鼻气管鸟杆菌是一种高度多形性、无运动性、不形成芽胞的 G⁻ 短杆菌, 大小为 0. 2~ 0. 6 μm × 0. 6~ 5. 0 μm, 属 rRNA 第 5 超科, 具有化学器官趋化性和嗜常温的特性^[1- 3], 在分类上与里默氏菌属相似, G+ C 摩尔含量为 37%~ 39%, 至今尚未发现该菌有其他特殊结构或性质。1981 年德国学者从 5 周龄火鸡的呼吸道中最先分离到该细菌, 随后英国、以色列、美国、比利时、法国、匈牙利、日本、巴西^[4] 等 10 多个国家也相继报道。我国陈小玲等^[5] 首次在国内分离到 2 株 ORT。过去, 人们一直把这种细菌认为是巴氏杆菌样细菌 (*Pasteurella-like organism*), 直到 1994 年 Vandamme 等将其命名为鼻气管鸟杆菌。2006 年 Wieliczko Alina 等人对波兰鼻气管鸟杆菌感染肉鸡和火鸡的流行病学研究, 结果检测出 30% 以上的阳性率^[6],

Payam Haghighi Khoshkhoo 等人对伊朗德黑兰省的商品蛋鸡中鼻气管鸟杆菌感染的血清学调查表明阳性率高达 94. 4%^[7], 并且病原易从老龄鸡群传到新的舍养的雏鸡群。病原分离及血清学调查结果表明, ORT 不断扩延, 可能呈世界性分布。

目前, ORT 鉴定方法有细菌分离鉴定^[4]、血清学诊断方法^[8- 9]、分子生物学方法^[10- 11] 等, 但是它们各有一定的缺陷: 细菌分离鉴定可用于该病的早期诊断, 但 ORT 是一种较难培养的细菌, 其生长条件苛刻, 生长速度非常缓慢, 在血平板上常被生长快速的细菌所覆盖, 因此存在操作繁琐、费时、费力, 容易污染以及准确率低等缺点; 血清学诊断方法如 AGP、ELISA 检测抗体、平板凝集试验、血凝抑制试验 (HI) 等, 对同一份血清需要使用不同的血清型抗原进行多次检测, 其血清型特

收稿日期: 2008- 10- 28 初稿; 2008- 11- 26 修改稿

作者简介: 李瑶瑶 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 禽病学

通讯作者: 刁有祥 (1962-), 男, 教授 (E-mail: yx diao@ 163. com)

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2006D10)

异性和交叉性影响结果，试验操作烦琐，有时也易出现自凝现象；PCR 方法具有准确、快速、敏感、特异性强的特点，被广泛应用于畜禽疾病的诊断和研究。本研究根据 ORT 16S rRNA 设计一对特异性引物，建立了检测 ORT 的 PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 ORT 参考菌株 (编号为 ORV94108、B3263191、O-96121，血清型分别为 D、A、B)，由英特威公司潭子龙博士、丘鹤英博士惠赠；ORT 分离株 (编号为 ORT1、ORT2)，由北京市农林科学院畜牧兽医研究所陈小玲研究员惠赠，鸡大肠杆菌 (编号为 E00799)、副鸡嗜血杆菌 (编号为 H00706)、鸡白痢沙门氏菌 (编号为 S00501)、禽多杀性巴氏杆菌 (编号为 A00703)，由本实验室分离并保存。

1.1.2 ORT 引物 根据 GenBank 已发表的鼻气管鸟杆菌 16S rRNA 基因序列进行多重比较后设计出一对特异性引物，上游引物：5'-ATAGC CCGGGGAAACTCGGATT-3'；下游引物：5'-GGCATCGTTTACTGCGTGGACT-3'，扩增范围为 671 bp，引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，用灭菌的双蒸水按 25 μmol·L⁻¹ 稀释，-20℃保存。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪 (Eppendorf，德国)；电泳仪、凝胶成像仪 (Biorad，意大利)。

1.1.4 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、DNA marker、限制性内切酶 *EcoRI*、*SalI*、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 均购自大连 TaKaRa 公司；营养琼脂培养基购自上海伯奥生物科技有限公司；其他相关化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 用 PBS 缓冲液复苏冻干保存的 ORT 参考菌株、ORT 分离株，接种于绵羊血液琼脂平板上，培养 24 h，4℃保存备用。鸡大肠杆菌、鸡白痢沙门氏菌用普通营养琼脂培养基，禽多杀性巴氏杆菌用血琼脂培养基，副鸡嗜血杆菌用鸡血清鸡肉汤琼脂 (S-琼脂) 培养基，均置于 37℃ 恒温箱内培养 18~24 h。

1.2.2 模板的制备 参照文献 [12-13] 用 PBS 缓冲液收集 ORT 参考菌株，用 30 μL 10% 的 SDS 裂解缓冲液和 3 μL 蛋白酶 K 消化，取上清液加等体积的苯酚/氯仿/异戊醇混合溶液抽提 1 次，上清液加冷异丙醇及 3 mol·L⁻¹ 乙酸钠沉淀 DNA，

洗涤后-20℃保存。

1.2.3 PCR 反应条件 以抽提的 DNA 为模板，采用 25 μL 反应体系：10×PCR buffer (含 Mg²⁺ 25 mmol·L⁻¹) 2.5 μL；MgCl₂ (浓度为 1 mol·mL⁻¹) 1 μL；dNTP Mix (浓度为 25 μmol·L⁻¹) 1.5 μL；DNA 模板 2 μL；上、下游引物 (浓度为 25 μmol·L⁻¹) 0.8 μL；Taq DNA 聚合酶 0.3 μL；灭菌的双蒸水 16.1 μL。

反应条件：94℃预变性 5 min；94℃ 50 s；56℃ 50 s；72℃ 50 s；30 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。

1.2.4 PCR 扩增产物的检测 取 5 μL 扩增产物与 1 μL Loading Buffer 混匀，加到含 EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶中，同时加入 DNA marker (DL2000)，电泳观察结果。

1.2.5 特异性试验 分别抽提鸡大肠杆菌、副鸡嗜血杆菌、鸡白痢沙门氏菌、禽多杀性巴氏杆菌的 DNA 作模板，用建立的 PCR 方法进行扩增，电泳观察结果。

1.2.6 敏感性试验 将抽提的 ORT 参考菌株的 DNA 电泳粗略定量为 450 ng·μL⁻¹，用灭菌的双蒸水作 10 倍倍比稀释，分别进行扩增，电泳观察结果。

1.2.7 分离菌株检测 抽提 ORT 分离株的 DNA 作模板，用建立的 PCR 方法进行扩增，电泳观察结果。选取一株 ORT 分离菌株进行测序。

1.2.8 PCR 产物的克隆及序列测定 在紫外灯照射下切取特异性条带，自然干燥后称重，按照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 介绍的方法进行 PCR 产物的纯化回收，回收产物与 pMD 18-T Vector 连接，转化 DH-5a 大肠杆菌感受态细胞，*EcoRI*、*SalI* 双酶切鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 特异性试验结果

分别以抽提的 ORT 参考菌株、鸡大肠杆菌、副鸡嗜血杆菌、鸡白痢沙门氏菌、禽多杀性巴氏杆菌 DNA 为模板，用建立的 PCR 方法进行扩增，结果 ORT 参考菌株扩增到 671 bp 的特异性片段，而其他菌株的扩增结果均为阴性，结果见图 1。

2.2 敏感性检测结果

ORT 参考菌株的 DNA 经系列稀释后，进行 PCR 扩增，结果能出现条带的最大稀释倍数为 10⁻⁴，最低检出限量为 90 pg 的总 DNA，见图 2。

2 3 分离菌株的检测

建立的 PCR 方法进行特异性扩增，扩增结果均为阳性。

抽提 ORT 分离株 ORT1、ORT2 的 DNA，用



图 1 PCR 特异性试验

Fig 1 PCR specificty test

注：1. DL2000Marker; 2. ORV94108; 3. B3263191; 4. O- 96121; 5. 鸡大肠杆菌; 6. 副鸡嗜血杆菌; 7. 鸡白痢沙门氏菌; 8. 禽多杀性巴氏杆菌。

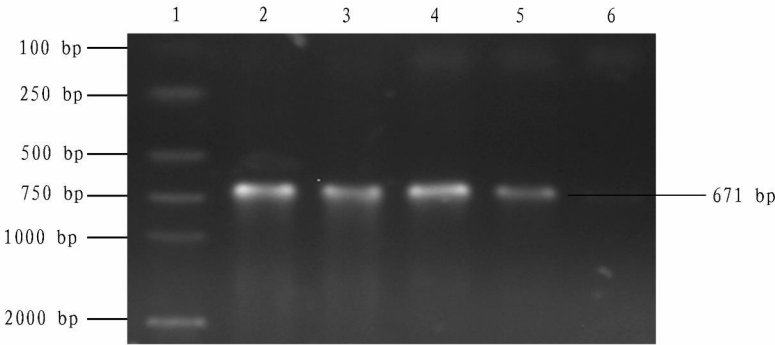


图 2 PCR 敏感性试验

Fig 2 PCR sensitivity test

注：1. DL2000Marker; 2. 900 ng DNA; 3. 90 ng DNA; 4. 9 ng DNA; 5. 900 pg DNA; 6. 90 pg DNA。

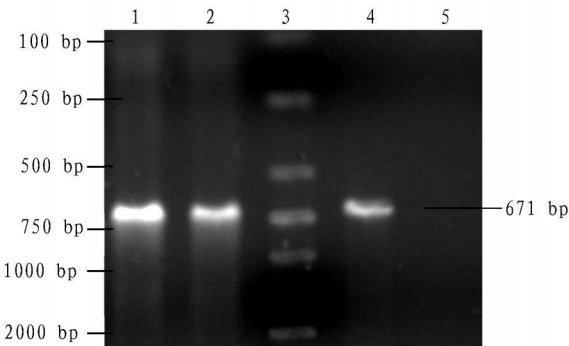


图 3 ORT 分离株的 PCR 扩增结果

Fig 3 Amplification of ORT isolates

注：1. ORT1; 2. ORT2; 3. DL2000Marker; 4. B3263191; 5. 阴性对照

2 4 ORT 分离菌株的序列测定及分析

将 ORT 分离菌株的 DNA 序列与 GenBank 已发表的 ORT 序列比较, 结果同源性均在 95% 以上,

其中与 U 87100、D95- 36425、CH200507S13a 的同源性达到 99.9%, 表明该扩增片段为 ORT 的特异片段。同源性比较结果见图 4。

Percent Identity														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
Divergence	1		99.9	99.7	99.7	99.4	99.6	99.1	99.9	99.9	95.4	95.4	1	ORT
	2	0.1		99.9	99.9	99.6	99.7	99.3	100	100	95.5	95.5	2	U87100
	3	0.3	0.1		99.7	99.4	99.6	99.1	99.9	99.9	95.7	95.7	3	U87101
	4	0.3	0.1	0.3		99.7	99.9	99.4	99.9	99.9	95.5	95.5	4	U87102
	5	0.6	0.4	0.6	0.3		99.6	99.7	99.6	99.6	95.4	95.4	5	U87103
	6	0.4	0.3	0.4	0.1	0.4		99.3	99.7	99.7	95.4	95.4	6	U87104
	7	0.9	0.8	0.9	0.6	0.3	0.8		99.3	99.3	95.1	95.1	7	YL200501L
	8	0.9	0	0.1	0.1	0.4	0.3	0.8		100	95.5	95.5	8	CH200507S13a
	9	0.1	0	0.1	0.1	0.4	0.3	0.8	0		95.5	95.5	9	D95-36425
	10	0.6	0.5	0.3	0.5	0.6	0.6	0.9	0.5	0.5		100	10	D95-36426
	11	0.6	0.5	0.3	0.5	0.6	0.6	0.9	0.5	0.5	0		11	D95-36427
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			

图 4 ORT 与 GenBank 上已发表的 ORT 分离株核苷酸序列的同源性比较
Fig 4 Comparison of isolate s and GenBank s ORT gene sequence and homologies

3 讨 论

3 1 ORT 主要引起火鸡和鸡的呼吸系统疾病，临床表现为咳嗽、流鼻涕、关节炎、产蛋量下降、死亡率升高、饲料转化率降低、生长抑制^[1-3]，病理变化是心包炎、气囊炎、坏死性肺炎、支气管炎、肝肿大，也常并发、继发和加重病毒如 NDV，细菌如博代杆菌和真菌性感染，还可以通过水平传播和垂直传播，引起急性死亡^[14]，危害很大，是一种值得重视的新病。

ORT 的 16S rRNA 是染色体上编码 rRNA 相对应的高度保守而又存在进化变异的 DNA 核酸序列，DNA-DNA 结合率、C+ C 摩尔含量也高度相似，可作为细菌分类的标志，又可将其作为临床病原菌检测和鉴定的靶分子。本研究根据 GenBank 已发表的鼻气管鸟杆菌 16S rRNA 基因序列设计一对引物，对 ORT 参考菌株进行 PCR 扩增，建立了检测 ORT 的 PCR 方法。该 PCR 方法能在 ORT 菌株中扩增到与预期大小一致的片段，而对鸡大肠杆菌、副鸡嗜血杆菌等阴性菌株的扩增结果均为阴性，该 PCR 方法特异性强，可用于诊断或鉴别鼻气管鸟杆菌。

3 2 ORT 是一种较难培养的细菌，其生长条件苛刻，生长速度非常缓慢，在血平板上常被生长快速的细菌所覆盖，易导致分离失败。PCR 是一种 DNA 的体外扩增，只要检测样品中有病原核酸存在，PCR 反应条件合适，在引物引导下都能扩增

出相应片段，而得到准确诊断结果。应用 PCR 方法鉴定鼻气管鸟杆菌病原，只需数小时，极大提高了对该病的诊断速度。这对疾病的早期诊断、及时定制有效地防治措施，避免疾病进一步扩大，减少经济损失均具有重要意义。

参考文献:

[1] 刁有祥. 禽病学: 第 2 版 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2005: 238- 240.

[2] 刘霓红, 译. 鼻气管鸟杆菌感染症 [J]. 预防兽医学进展, 2002, 2 (2): 65.

[3] SPRENGER S J, HARL VORSON D A, NAGARAJI K V, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* in immunoprophylaxis [J]. *Avi Ris*, 2000, 44 (3): 549- 555.

[4] CANAL C W, LEAO J A, ROCHA et al. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil [J]. *Research in Veterinary Science* June, 2005, 78 (3): 225- 230.

[5] 陈小玲, 宋程. 鼻气管鸟疫杆菌中国株的鉴定 [J]. 中国家禽, 2004, 6 (8): 8- 12.

[6] WIELICZKO A, KUCZKOWSKI M, SOKOL I. 波兰鼻气管鸟杆菌感染肉鸡和火鸡的流行病学 [C]. 世界禽病大会论文集, 2007: 368.

[7] PAYAM H K, GITA A A, MAHDIS. 伊朗德黑兰省的商品蛋鸡中鼻气管鸟杆菌感染的血清学阳性率 [C]. 世界禽病大会论文集, 2007: 370.

[8] VEEM L V, NIEUWENHUIZEN J, MEKKES D, et al. Diagnosis and incidence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections in commercial broiler chickens at slaughter [J]. *The Veterinary Record*, 2005, 156: 315- 317.

[9] CHANSIRIPORNCHAI, WANASAWAENG N, SIPSREEYAJAN W. Seroprevalence and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Broiler and Broiler Breeder Flocks in Thailand [J] . Avian Diseases, 2007, 51 (3) : 777 – 780.

[10] ANIL J, THACHIL B T, VELAYUDHAN, et al. Nagaraja. Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates [J]. Veterinary Diagnostic Investigation, 2007, 19: 417– 420.

[11] TSAI H J, HUANG C W. Phenotypic and Molecular Characterization of Isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Chickens and Pigeons in Taiwan [J]. Avian Diseases, 2006, 50 (4) : 502– 507.

[12] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, 精编分子生物学指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 29– 35.

[13] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗离奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南: 第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 24– 26.

[14] J FOYD S. 世界禽病动向及防治对策 [J] . 国外畜牧科技, 1998, 26 (6): 43– 44.

(责任编辑: 翁志辉)