



鼠棒状杆菌 PCR 检测方法的建立及其应用

唐连飞¹, 周智君², 蔡婧怡¹, 孟芳¹, 魏颖¹, 俞远京², 苏志杰²

(1. 湖南出入境检验检疫局, 长沙 410004; 2. 中南大学湘雅医学院实验动物学部, 长沙 410008)

【摘要】 目的 建立鼠棒状杆菌 PCR 检测方法并应用于临床样本检测。方法 用脑心浸出液培养基复苏、培养鼠棒状杆菌(*Corynebacterium kutscheri*, *C. kutscheri*)并提取基因组 DNA 作模板;根据 GenBank 中 *C. kutscheri* 的 16S 基因序列设计合成引物,建立鼠棒状杆菌 PCR 检测方法并进行敏感性和特异性的评价;人工感染昆明鼠,建立小鼠棒状杆菌感染模型,采集肝脏和肾脏,提取 DNA 进行检测。结果 成功建立了鼠棒状杆菌 PCR 检测方法,该方法可检测到 100 个阳性质粒;对小鼠沙门氏菌、肺炎链球菌和巴氏杆菌无交叉反应;全部 8 个人工感染样本全部检测为阳性。结论 建立的鼠棒状杆菌 PCR 检测方法灵敏度高、特异性好,可作为鼠棒状杆菌感染的快速检测方法。

【关键词】 鼠棒状杆菌;PCR 检测方法;16S 核糖体 RNA

【中图分类号】 S858.91 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)09-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.009.011

Development and Application of a PCR for the Detection of *Corynebacterium Kutscheri* in Mice

TANG Lian-fei¹, ZHOU Zhi-jun², CAI Jing-yi¹, MENG Fang¹, WEI Ying¹, YU Yuan-jing², SU Zhi-jie²

(1. Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China;

2. Department of Laboratory Animal of Xiangya Medicine School, Centre South University, Changsha 410008, China)

【Abstract】 Objective To develop a PCR for the detection of *Corynebacterium kutscheri* (*C. kutscheri*) and apply it to clinical samples. **Methods** Genomic DNA was extracted as template for PCR from *C. kutscheri* (ATCC 11306) recovered and cultivated in brain heart infusion medium. According to the *C. kutscheri* 16S rRNA gene sequence available in GenBank a pair of primers were designed and synthesized in order to develop a PCR for detection of *C. kutscheri*. After evaluated for sensitivity and specificity the PCR method was applied to detect the *C. kutscheri* in clinical livers and kidneys of mice artificially infected with *C. kutscheri*. **Results** The PCR for the detection of *C. kutscheri* was developed successfully and were specific enough to distinguish *C. kutscheri* from salmonella, streptococcus pneumoniae and Pasteurella. A minimum of 100 positive plasmids could be detected, indicating a good sensitivity of the assay. **Conclusion** This method reported here is specific, sensitive and provides a fast detection of *C. kutscheri* and could be used for *C. kutscheri* clinical diagnosis.

【Key words】 *Corynebacterium kutscheri*; PCR method; 16S rRNA

棒状杆菌属细菌是一种人畜共患的多种型传染病病原菌。鼠棒状杆菌病呈世界性分布,特别是

在常规鼠群中,隐性感染非常普遍,发病率和死亡率高,暴发流行时可导致动物群覆没,在实验动物

[基金项目] 湖南省科技厅科技项目资助(2011TT2016)。

[作者简介] 唐连飞(1970-)男,高级兽医师,博士,病原生物学。

[通讯作者] 周智君(1971-)女,高级实验师,硕士,实验动物学。

的病原菌控制中是小鼠和大鼠病原菌必检项目。目前国内外对鼠棒状杆菌的检测研究很少,主要进行病菌分离培养^[1-4],国家标准 GB/T14926.9-2001 规定也是进行病菌分离培养^[5],还有进行血清学检测的报道^[6-7]。这些方法操作复杂、时间长、灵敏度低,容易造成漏检。本实验采用 PCR 技术,根据 GenBank 发表的鼠棒状杆菌 16S rRNA 基因,设计了特异性引物,建立了准确、快速检测鼠棒状杆菌 PCR 方法,并能很好地应用于临床样本的检测。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基和培养条件

鼠棒状杆菌标准菌株 (*C. kutscheri*, ATCC 11306),购于美国模式菌种收集中心,小鼠肺炎链球菌、沙门菌和巴氏杆菌由湖南出入境检验检疫局保存。用脑心浸出液对 *C. kutscheri* 菌种进行复苏、传代和液体培养。细菌用 250 mL 锥形瓶于 37℃、200 rpm 恒温振荡培养。

1.2 细菌 DNA 提取

取 10 mL 过夜培养液 5000 rpm 离心 10 min,去上清液。加 1 mL TE 悬浮沉淀,并加 0.1 mL 20% SDS, 50 μL 10mg/mL 蛋白酶 K,混匀,55℃ 孵育 1 h。加 0.2 mL 5 mol/L NaCl, 0.2 mL CTAB/NaCl 溶液,混匀,65℃ 孵育 20 min。加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),12000 rpm 离心 10 min,将上清液移至干净离心管。用等体积氯仿:异戊醇(24:1)再抽提一次,取上清液移至干净管中。加 1 倍体积异丙醇,颠倒混合,室温下静止 10 min。12000 rpm 离心 10 min,弃上清。70% 乙醇漂洗后,吸干,溶解于 0.1 mL TE, -20℃ 保存备用。

1.3 引物设计与 PCR 反应

根据表 1 中 *C. kutscheri* 16S rRNA 基因序列,利用 Primer Express 3 引物设计软件来设计引物,宝生物(大连)有限公司合成。引物和序列如下:上游引物:GCAACGCGAAGAACCCTTACC,下游引物:CCCGGCAGTCTCTCATGAGT,扩增片段大小为 200 bp。

表 1 引物和探针设计时所参照的菌株
Tab. 1 Strains used for designing primers and probe for *C. kutscheri* detection

菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession number
ATCC15677	D3780.2
CIP 103423T	X82063.1
CIP 103423	X81871.1
CIP 103423	AY438060.1

1.4 PCR 扩增体系及退火温度筛选

采用 GoTaq[®] Green Master Mix (promega) PCR 试剂盒,体系如下:

GoTaq [®] Green Master Mix, 2X	12.5 μL
上游引物, 10 μmol/L	0.5 μL
下游引物, 10 μmol/L	0.5 μL
DNA 模板, 13.0 ng/μL	2 μL
H ₂ O	9.5 μL

扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;按以下条件进行 30 个循环扩增:94℃ 40 s,48℃ ~ 56℃ 40 s,72℃ 40 s;最后 72℃ 延伸 5 min。温度梯度 PCR 仪为 Biometra TGradient。

1.5 阳性定量标准模板的制备

1.5.1 模板扩增:按 1.4 对提取的 *C. kutscheri* ATCC 11306 DNA 进行常规 PCR 扩增,退火温度选择 1.4 中最佳退火温度。

1.5.2 PCR 产物纯化和克隆:将 PCR 产物用 TaKaRa(大连)公司 DNA 纯化试剂盒纯化并连接到 pGEM[®]-T Easy 载体 (Promega) 上,转化至感受态 JM109。经 LB/氨苄/IPTG/X-Gal 平板蓝白筛选后挑取重组成功的白色菌落进行培养,用 TaKaRa(大连)公司小批量质粒 DNA 纯化试剂盒进行质粒提取。

1.5.3 重组质粒鉴定:以质粒为模板,进行 PCR 扩增鉴定是否重组成功。

1.6 方法敏感性的分析 测定提取质粒的浓度,计算每微升质粒中的分子数。将质粒稀释使其在 2 μL 中分别含有 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 10^1 拷贝数。按 1.4 进行 PCR 扩增,退火温度选择 1.4 中最佳退火温度。

1.7 方法的特异性分析 按 1.4 方法以 *C. kutscheri*、小鼠肺炎链球菌、小鼠沙门菌和巴氏杆菌的 DNA 为模板,确定方法的特异性。

1.8 鼠棒状杆菌感染模型建立及样本采集 按每只 5×10^6 个细菌量通过腹腔注射方法分别感染 4 只 SPF 级昆明小鼠,发病后采集肝脏和肾脏,按标准^[5]进行分离培养和常规方法提取组织 DNA。SPF 级昆明小鼠来源于湖南斯莱克景达实验动物有限公司(SCXK(湘)2011-0003),体重为 18~22g,在中南大学实验动物学部进行实验(SYXK(湘)2011-0001)。

2 结果

2.1 PCR 扩增和退火温度的筛选 以 *C. kutscheri*

(ATCC11036) DNA 为模板,采用 48℃ ~56℃ 的退火温度,成功扩增出与预期大小一致的 200 bp 的条带;在不同退火温度(55.2、54.3、53.4、52.4、51.5、50.5、49.6、48.7)下均能扩增出目的条带,但在以 54.3℃ 最好(图 1),因此选择 54℃ 作为本方法的最佳退火温度。

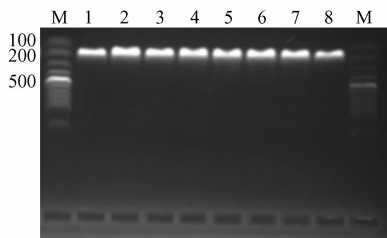


图 1 温度梯度 PCR 扩增

Fig. 1 Temperature gradient PCR amplification

泳道 M:100bp PCR marker;泳道 1-8:退火温度依次为

55.2℃、54.3℃、53.4℃、52.4℃、51.5℃、50.5℃、49.6℃、48.7℃

Lane M:100bp PCR marker; lane 1-8: the temperature is respectively

55.2℃、54.3℃、53.4℃、52.4℃、51.5℃、50.5℃、49.6℃、48.7℃

2.2 重组质粒的鉴定 以重组质粒为模板进行 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示产物大小与目的插入片段大小一致,重组成功(图 2)。

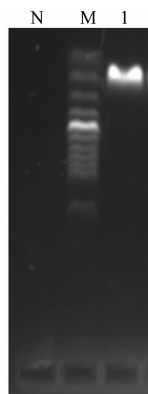


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombined plasmid

M:100bp PCR Marker;N:阴性对照;1:重组质粒

M: 100bp PCR marker; N:negative control;

1: the recombined plasmid

2.3 不同模板拷贝数的 PCR 扩增 在反应体系中分别加入、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0 拷贝数的质粒时, 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 可见特异性产物,显示本方法检测低限为 1×10^2 拷贝(图 3)。

2.4 检测方法的特异性分析 利用建立的方法对小鼠沙门菌、肺炎链球菌和巴氏杆菌 DNA 进行检测,结果显示方法对小鼠沙门菌、肺炎链球菌和巴氏杆菌无交叉反应,未出现扩增条带,只检测出鼠

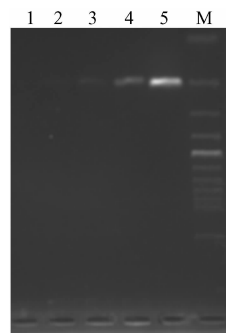


图 3 不同模板拷贝数的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of different copies of the target gene

M:100bp DNA marker;泳道 5-1 模板分别为为 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0

Lane M: 100bp DNA marker; Lane 5-1: copies of the target gene is respectively 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 1×10^0

棒状杆菌(图 4)。

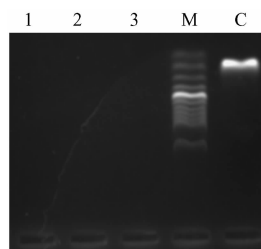


图 4 方法的特异性检测

Fig. 4 Results of specificity test

M:100bp marker;1-3:分别为小鼠肺炎链球菌、沙门氏菌和巴氏杆菌;C:鼠棒状杆菌

M: 100bp PCR marker; lane 1-3: streptococcus pneumoniae, salmonella and pasteurilla; M: C. kutscheri

2.5 小鼠棒状杆菌模感染型建立及样本采集和检测 小鼠注射 7 d 后全部发病,出现被毛逆立,精神萎靡不振,12 d 时全部死亡,小鼠肝脏和肾脏出现化脓性坏死灶。取死亡小鼠的肝脏和肾脏病灶进行细菌分离培养和 PCR 方法检测均为阳性。

3 讨论

目前鼠棒状杆菌的检测主要包括 2 种方法:分离鉴定和血清学检测^[1-7],还没有利用分子生物学技术检测的研究报道。与细菌分离鉴定和血清学检测相比,PCR 方法具有操作简单、特异性强、灵敏度高和检测时间短等优点。本研究根据鼠棒状杆菌 16S rRNA 的核酸序列,设计的引物能特异性的扩增出大小 200 bp 的 DNA 条带(图 1),而对小鼠沙门氏菌、肺炎链球菌和巴氏杆菌无交叉反应(图 4);

以重组质粒为模板进行灵敏度试验的结果表明建立的方法体系能够检测到 100 个拷贝的模板 DNA, 具有较高的敏感性。通过对试验感染样本的检测, 8 个样本全部为阳性, 显示本方法可以很好的应用与临床病变组织样本的检测。

16S rRNA 基因在其碱基组成、核苷酸序列、高级结构及生物功能等方面表现出进化上的高度保守性, 被广泛用于物种的分类鉴定和系统发育的研究工作中^[8], 本研究利用鼠棒状杆菌的 16S rRNA 基因对其进行检测鉴定。

鼠棒状杆菌能在机体抵抗力下降时导致大鼠和小鼠发病甚至死亡, 也影响实验结果的解释及评价, 因此在实验动物微生物等级及监测中是大鼠和小鼠的必检项目, 必须为阴性^[9]。常规的检测方法都是从气管分泌物和回盲段内容物中对棒状杆菌进行直接分离培养, 这种方法在隐性感染小鼠中的检出率分别为 1% 和 3%, 在诱发感染发病小鼠中的检出率也只有 19% 和 12% 的, 对自然发病的小鼠检出率为 22% 和 0^[10], 可见直接从气管分泌物和肠道内容物中分离培养的方法不适合对小鼠棒状杆菌监测和检测。通过选择性培养基增菌培养后有可能提高检出率^[11-12]。

在小鼠棒状杆菌病中内脏表现为广泛性的化脓性病变, 尤其是肝和肾的病变最为明显^[13], 因此, 本实验以肝脏和肾脏作为检测对象来探讨所建立的方法的适用性。结果表面, 对病变肝脏和肾脏, PCR 方法和分离培养方法都能检出, 但 PCR 方法操作更简单, 所需时间更短。对其他临床样本的适用性有待于通过与培养方法的比较来进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 陈德威, 宋万敏. 鼠棒状杆菌的分离与鉴定[J]. 《实验动物科学》, 1987, 4(2): 43-45.
- [2] 高正琴, 张强, 邢进, 等. 鼠棒状杆菌的分离与鉴定[J]. 《实验动物科学》, 2008, 25(1): 18-20.
- [3] Amao H, Akimoto T, Komukai Y, *et al.* Detection of *Corynebacterium kutscheri* from the oral cavity of rats[J]. *Exp Anim*, 2002, 51(1): 99-102
- [4] Amao H, Moriguchi N, Komukai Y, *et al.* Detection of *Corynebacterium kutscheri* in the faeces of subclinically infected mice[J]. *Lab Anim*, 2008, 42(3): 376-82.
- [5] GB/T14926.9-2001, 实验动物 鼠棒状杆菌检测方法[S].
- [6] Ackerman JI, Fox JG, Murphy JC. An enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Corynebacterium kutscheri* in experimentally infected rats[J]. *Lab Anim Sci*, 1984, 34(1): 38-43.
- [7] 蒋观成, 黄澜, 郑京晶. 应用血清学方法诊断大鼠中棒状杆菌的感染[J]. 中国实验动物学杂志, 1994, 4(1): 17-19.
- [8] 唐连飞, 肖家勇, 朱中武, 等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2010, 33(5): 339-342.
- [9] GB 14922.2-2011, 实验动物 微生物学等级及监测[S].
- [10] 李红, 贾瑞胜, 黄澜, 等. 小鼠感染鼠棒状杆菌的调查及检查方法的比较. 中国实验动物学杂志, 1992, 2(3-4): 170-171.
- [11] 崔洪波, 凌秋, 朱玉璞, 等. 鼠棒状杆菌的增菌培养基. 中国畜禽传染病, 1994, 4: 55-56.
- [12] 郑海洪, 杨永良, 赵林山. 鼠棒状杆菌的增菌培养基试验. 黑龙江畜牧兽医, 2003, 3: 39.
- [13] 侯伶俐, 靳彦华, 陈德威. 实验小鼠人工感染鼠棒状杆菌的病理形态学观察. 实验动物科学, 1987, 4(4): 125-128.

[修回日期]2012-08-17