47 卷 2 期
2007 年 4 月 4 日

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

47(2):240 ~ 243
4 April 2007

细菌学方法和 HOOF-Prints 技术在绵羊种布鲁氏菌 019 株鉴定中的比较研究

王远志[1],陈创夫[1*],崔步云[2],柳建新[1]

([1] 新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室 石河子大学动物科技学院 石河子 832003)

([2] 中国疾病预防与控制中心传染病预防控制研究所 北京 100050)

摘 要:应用细菌学常规方法和分子生物学检测方法对绵羊种布鲁氏菌非典型株 019 进行分类研究。利用高变 8 聚核苷酸 DNA 指纹技术(HOOF-Prints)对绵羊种布鲁氏菌 019 株可变数目重复片段(VNTR)的 8 个位点进行 PCR 扩增和序列测定,将测定结果与 GenBank 数据库比较分析,应用 DNAMAN 进行同源性分析,并构建系统进化树。结果表明,绵羊种布鲁氏菌 019 株和绵羊种布鲁氏菌参考株 63/290 的亲缘关系高于绵羊种布鲁氏菌 019 株与其他参考株的亲缘关系,该结论与细菌学常规鉴定结果一致。应用 HOOF-Prints 技术可以对绵羊种布鲁氏菌非典型株 019 进行鉴定,该技术有望弥补传统分类方法的不足。

关键词:绵羊种布鲁氏菌 019 株;细菌鉴定;常规方法;HOOF-Prints

中图分类号:Q78,Q939 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2007)02-0240-04

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患传染病。人感染后常表现为持续性感染,造成生殖系统的损害,牛、羊感染后易造成流产。近年来,全国人、畜间布病疫情异常活跃,人间布病暴发点增多,疫情出现回升势头[1]。基于布鲁氏菌易感天然宿主、培养是否需要 CO_2、染料、噬菌体敏感性、单因子血清学实验等,目前将布鲁氏菌分为 6 个种 19 个生物型。传统分类方法是国际公认的,对人、畜布鲁氏菌病的流行病学调查和防治具有重要意义。但由于畜牧业地区人、畜布鲁氏菌弱毒活疫苗的大面积免疫,大量消毒剂的应用和超剂量抗生素使用等因素,国内外分离到的非典型布鲁氏菌株和变异菌株越来越多,它们大约占分离菌株的 10% ~ 30%[2]。由于这些菌株应用传统的分类鉴定方法不能在分类表上找到合适的位置,表明现有布鲁氏菌传统分类鉴定方法存在不足,有必要结合其他方法完善布鲁氏菌的分类判定。

HOOF-Prints 最早由欧洲流行病学分子标记研究组提出[3]。该方法建立的理论基础是:各布鲁氏菌基因组中广泛分布着可变数目重复片段(VNTR),布鲁氏菌全基因组测序表明,各布鲁氏菌在基因组的 8 个位点都有同样的 8 碱基重复序列,而 8 碱基重复序列的重复次数在布鲁氏菌菌株、生物型、种属水平上存在差异,对某一布鲁氏菌菌株八个位点 8 碱基重复序列重复次数的绘制和分析就可判断该菌株与标准株存在的关系,这一技术被命名为"高变 8 聚寡核苷酸指纹技术",即 HOOF-Prints 技术。1980 年,刘志文等[4]采用综合诊断的方法对新疆紫泥泉种羊场的部分种羊进行了检查,发现了种公羊附睾炎的病例,并从患病公羊的精液中分离出了绵羊种布鲁氏菌 019 株。近年,本实验室对绵羊种布鲁氏菌 019 外膜蛋白基因 omp25[5]、omp31[6]、omp2b[7] 等测序发现,该菌株与绵羊种布鲁氏菌标准株 63/290 存在较大差异,这为绵羊种布鲁氏菌 019 的分类带来疑虑,有必要对该菌株用常规细菌学方法和新近的 HOOF-Prints 技术进行进一步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:绵羊种布鲁氏菌 019 株和标准株 63/290 均为本室保存。

1.1.2 主要试剂:*Taq* DNA 聚合酶(2.5U/μL),DNA Marker Ⅱ,DNA 回收试剂盒,pBS-T 连接试剂盒均购自天根生化(北京)科技有限公司。所用引物委托上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.3 培养基:实验中所用的 LB 培养基参见文献

基金项目:国家自然科学基金(C02030606)

* 通讯作者。Tel:86-993-2058002;Fax:86-993-2031130;E-mail:ccf-xb@163.com

作者简介:王远志(1977 -),男,新疆人,博士研究生,研究方向为免疫遗传与抗病机理研究。E-mail:wangyuanzhi621@126.com

收稿日期:2006-10-18;接受日期:2006-11-22;修回日期:2006-12-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[8]配制。10%小牛血清固体培养基：每升含 Trptone 10.0g，Yeast extract 5.0g，NaCl 10.0g，Agar 15.0g，用蒸馏水定容至 860mL，pH 7.0，100kPa 高压蒸汽灭菌 20min，约冷至 65℃，加室温放置的 25%葡萄糖 40mL（预先 55kPa 高压蒸汽灭菌 20min），再加 100mL 无菌小牛血清。

1.2　常规鉴定方法

将绵羊种布鲁氏菌 019 初代分离保存的冻干菌接种于 10%小牛血清琼脂培养基，置于 CO_2 培养箱，37℃，10% CO_2 培养 4d，挑取单菌落，接种于斜面培养基再培养 4d，菌株严格按《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》送交中国疾病预防与控制中心传染病预防控制所按布鲁氏菌标准鉴定方法进行细菌学鉴定。

1.3　HOOF-Prints 鉴定

1.3.1　引物设计：参考 Bricker 等[3]报道的布鲁氏菌 8 个序列，经生物学分析软件 DNAMAN 对牛种、羊种和猪种布鲁氏菌 HOOF-Prints 序列的 8 个位点侧翼序列分析后，自行设计 8 对引物，其中上游引物 8 条（Locus-1 fp1，Locus-2 fp2，Locus-3 fp3，Locus-4 fp4，Locus-5 fp5，Locus-6 fp6，Locus-7 fp7，Locus-8 fp8），下游引物 2 条（rp1：5′-GTTAAGGGAATAGGGGAATAAGGG-3′ 和 rp2：5′-GTATGTTTTGGTTGCGCATG-3′），上游引物序列和 PCR 反应时选取的各对引物见表 1。

表 1　用于 HOOF-Prints 分析的上游引物序列及与其配对的下游引物

Table 1　The upstream primer sequences and the Paired reverse primers

Forward primer	Sequences (5′→3′)	Paired with reverse primer
Locus-1 fp_1	TATCGACTGGTCTTCGGGTCGCA	rp_1
Locus-2 fp_2	AACAGCTGGATGCGGCGGCGTGAATA	rp_2
Locus-3 fp_3	AGGCGCTTGAGGATGAGGCGGCAGT	rp_1
Locus-4 fp_4	AGAATTTTCGAGGCATTCGGCG	rp_2
Locus-5fp_5	ACGGCTACAAGATCGAAGTGCTCC	rp_1
Locus-6fp_6	AGGCGATCTGGAGATTATCGGGAAG	rp_1
Locus-7fp_7	AGAGCCGTCGGTGGTTACTTGAGT	rp_2
Locus-8fp_8	ATGAAGCGTTATCCTTTAACGGG	rp_1

1.3.2　HOOF-Prints PCR：反应采用 25μL 体系，反应条件：95℃ 3 min；94℃ 80s，53℃ 50s，72℃ 60s，35 个循环；72℃ 15min。进行 1.2%琼脂糖电泳观察。

1.3.3　扩增目的基因片段的测序：扩增目的基因片段的回收、T-载体的连接及转化感受态细胞严格按产品说明进行。蓝白斑筛选的阳性克隆送交 TaKaRa 公司测序。

2　结果

2.1　常规细菌学鉴定

用常规鉴定方法将绵羊种布鲁氏菌 019 株与参考株绵羊种布鲁氏菌菌 63/290、猪种布鲁氏菌 1330、牛种布鲁氏菌 544A 以及羊种布鲁氏菌 16M 进行常规细菌学鉴定试验。结果表明(表 2)绵羊种布鲁氏菌 019 和绵羊种布鲁氏菌菌 63/290 的鉴定结果最相近，但在 R/C 噬菌体裂解试验中出现差异。

表 2　所用菌株的常规鉴定方法和结果

Table 2　Conventional identity methods and results of used Brucella strains

Experiments and results		Strains				
		019	63/290	16M	544A	1330S
CO_2 requirement	+	+	−	−	−	
Dye inhibition[a]	Thionin	+	+	+	−	+
	Basic fuchsin	+	+	+	+	−
Lysitic test of phage (RTD[b])	Tb RTD	+		−	+	−
	Tb10^4 RTD	+		−	+	+
	Iz	+				
	BK_2	−		+	+	+
	R	−	−			
	R/O	+	+			
	R/C	−	+			
Agglutination test of specific serum[c]	A	−	−	−	+	+
	M	−	−	+	−	−
	R	+	+	−	−	−
Results	Species Biotype	*B. ovis*	*B. ovis*	*B. melitensis* 1	*B. abortus* 1	*B. suis* 1

a：Dye concentration of *Brucella* agar medium 20μg/mL (1:50000)；b：RTD：the rate of Rational test dilution (the highest dilution rate, at which the Tb phage completely lyses *Brucella* spp；c：A = A mono-specific serum；M = M mono- specific serum；R = R mono-specific serum.

2.2　HOOF-Prints PCR

以绵羊种布鲁氏菌 019 为模板 PCR 扩增后(图略)，除阴性对照形成引物二聚体外，其余所有扩增目标片段均在 100 ~ 300bp 之间，所有片段条带单一，扩增具有特异性。

2.3　序列分析

以 *B. melitensis* 16M、*B. suis* 1330、*B. abortus* 2308、*B. ovis* 八个位点(Locus1 ~ Locus8)，和 Bricker 等[3]报道的绵羊种布鲁氏菌 Locus1、Locus2、Locus3、Locus4、Locus5、Locus6、Locus8 序列为参考，自行克隆并委托测序的 *B. ovis* 019 Locus1 ~ 8 和 *B. ovis* 63/290 Locus7，总结出 *B. ovis* 019 株与布鲁氏菌参考株各位点 VNTR 的重复次数，结果见表 3。

将绵羊种布鲁氏菌 019 八个位点重复序列与参考株对应序列用生物学软件 DNAMAN 进行序列分析：*B. ovis* 019 八个位点的重复序列与参考株对应序列相比，一致性较差，只有 *B. ovis* 019 的 Locus1，Locus6 和 Locus8 与 *B. ovis* 的对应位点重复序列一致，*B. ovis* 019 的 Locus3，Locus7 和 Locus8 与 *B. melitensis* 16M 的对应位点重复序列一致，而 *B. ovis* 019 的 8 个位点重复序列与 *B. abortus* 2308、*B. suis* 1330 的对应位点没有共同的重复序列次数。

© 中国科学院微生物研究所 版权所有 http://www.journals.im.ac.cn

表 3 *B*. *ovis* 019 株与布鲁氏菌参考株 8 位点 VNTR 的重复次数

Table 3 Numbers of repeat units in 8 loci among *B*. *ovis* 019 and Brucella reference strains

Loci	Number of repeat units				
	B. *ovis* 019	*B*. *ovis*	*B*. *melitensis* 16M	*B*. *abortus* 2308	*B*. *suis* 1330
Locus1	11π	11π	1π + 4Δ	2π	4π
Locus2	* 1π	2πor 5π	1ω + 4π	1ω + 4π	2π
Locus3	1π	2π	1π	4π	4π
Locus4	* 2π + 4Δ	1π	1π + 6Δ	4π	1π
Locus5	8π	0π	7π	2π	7π
Locus6	* 5π	5π	1π	2π	4π
Locus7	* 8π	* 14π	8π	14π	11π
Locus8	6π	6π	6π	2π	4π

π means repeat unit AGGGCAGT. Δ means repeat unit GGGGCAGT. ω means repeat unit AAGGCAGT. * π means repeat unit AGGGCAGT. Δ means repeat unit GGGGCAGT. ω means repeat unit AAGGCAGT. * means the sequences of our submission to NCBI, and their accession numbers are DQ861297, DQ861298, DQ861299, DQ861300, DQ984141.

2.4 系统发育分析

就 HOOF-Prints 8 个位点的序列而言,绵羊种布鲁氏菌 019 与 Bricker 等[3] 报道的绵羊种布鲁氏菌对应序列不完全一致;绵羊种布鲁氏菌 019 株的 Locus1、Locus3、Locus6、Locus8 序列与 Bricker 等[3] 报道的绵羊种布鲁氏菌对应序列在系统发育树(图 1)上相对最近。

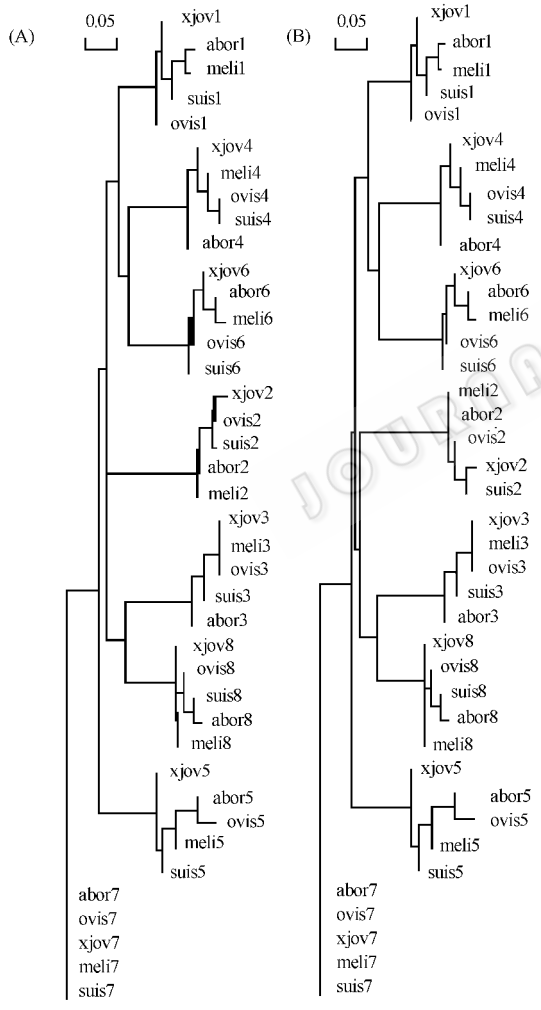

图 1 *B*. *ovis* 019 株与布鲁氏菌参考株的系统发育树

Fig. 1 Phynogenetic tree of *B*. *ovis* 019 and *Brucella* reference strains. (A) 2 AGGGCAGT repeat units contained in *B*. *ovis* locus 2 were concerned in phynogenetic tree. (B) 5 AGGGCAGT repeat units contained in *B*. *ovis* locus 2 were concerned in phynogenetic tree. xjov = *B*. *ovis* 019; ovis = *B*. *ovis* standard strain; suis = *B*. *suis* 1330; abor = *B*. *abortus* 2308; meli = *B*. *melitensis* 16M. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mean the sequences of locus 1, locus 2, locus 3, locus 4, locus 5, locus 6, locus 7, locus 8, respectively.

3 讨论

布鲁氏菌传统的鉴定方法表明,绵羊种布鲁氏菌 019 与实验参比株绵羊种布鲁氏菌 63/290 在培养是否需要 CO_2、染料敏感实验和单相因子血清凝集试验等具有一致性,但在噬菌体敏感试验中,两者对噬菌体 R/C 敏感试验存在差异,这为绵羊种布鲁氏菌 019 株的分类带来困惑,为进一步判定绵羊种布鲁氏菌 019 株在分类表中的地位,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所用脉冲场凝胶电泳对该菌株进行进一步鉴定,结果表明该菌株与绵羊种布鲁氏菌标准株 63/290 一致,最终认为绵羊种布鲁氏菌 019 株为非典型绵羊种布鲁氏菌菌株。为进一步考察绵羊种布鲁氏菌 019 与典型绵羊种布鲁氏菌的遗传关系,用新近的布鲁氏菌 HOOF-Prints 技术对绵羊种布鲁氏菌 019 株进行分析:在 8 个 VNTR 位点中,绵羊种布鲁氏菌 019 株的 Locus1、Locus6 和 Locus8 3 个位点与 Bricker[3] 报道的绵羊种布鲁氏菌对应序列重复次数一致;以羊种布鲁氏菌 16M、猪种布鲁氏菌 1330、牛种布鲁氏菌 2308、绵羊种布鲁氏菌为参考株,对绵羊种布鲁氏菌 019 株的 8 个 VNTR 位点进行系统发育树分析,结果表明绵羊种布鲁氏菌 019 株在 Locus1、Locus3、Locus6、Locus8 位点与参比菌绵羊种布鲁氏菌遗传关系最近,但在其他 4 个位点存在遗传关系上的多样化,进一步证明绵羊种布鲁氏菌 019 株属绵羊种布鲁氏菌范畴,但与典型绵羊种布鲁氏菌存在差异。

目前,国际公认绵羊种布鲁氏菌只有一个生物

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

型，但对绵羊种布鲁氏菌 019 外膜蛋白基因的分析表明，该菌株部分 DNA 组成不具有国际公认的绵羊种布鲁氏菌的特性。以绵羊种布鲁氏菌 63/290 为参考株，绵羊种布鲁氏菌 019 株：Omp25 蛋白不存在 12 个氨基酸的缺失；Omp2a 蛋白 3′端多出 21 个氨基酸，并在其他位点有 10 个氨基酸位点的改变(序列登陆 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez，参见 DQ861301)；omp2b 基因测序表明，*B. ovis* 019 和 *B. ovis* 63/290 编码基因的同源性只有 78.91%，并且在其编码基因上 *B. ovis* 019 比 *B. ovis* 63/290 多 48bp；omp31 存在 7 个氨基酸位点的改变，这些事实均暗示绵羊种布鲁氏菌 019 与绵羊种布鲁氏菌参考株 63/290 存在差异。存在差异的可能原因：①绵羊种布鲁氏菌 019 株受外界环境影响，发生变异；②现有布鲁氏菌分类方法的标准存在缺陷性，不能将某些菌株(常规方法鉴定为非典型菌株或深度变异菌株)归类到其应有的分类位置上。随着大量非典型菌株或深度变异菌株的不断出现，现有布鲁氏菌的分类标准急需完善，HOOF-Prints 技术有可能成为潜在的分类标准之一。

在常规细菌学培养鉴定中，光滑型布鲁氏菌有时会丧失 A 和 M 抗原，暴露出 R 抗原，可与 R 抗血清发生凝集反应[8]，导致对这些 S→R 变异菌株的鉴定带来困惑或错误判断，此时，结合 HOOF-Prints 技术对部分难以鉴定的菌株进行 HOOF-Prints 分析，对于这些菌株种、生物型的准确判断也将有所裨益。

致谢　感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所李兰玉技师、李元凯技师近期用脉冲场凝胶电泳和生化实验、噬菌体裂解等实验对绵羊种布鲁氏菌 019 株的鉴定和技术指导。

参 考 文 献

[1] 王茂武，宫新生，尚德秋，等. 市场经济下布鲁氏菌病防治工作的新思路. 疾病监测，2004，**19**(8)：306－308.

[2] 崔步云，尹继明，李兰玉，等. 布鲁氏菌的 Rep-PCR 分型研究. 疾病检测，2005，**20**(8)：397－400.

[3] Betsy J Bricker，Darla R Ewalt. *Brucella*‘HOOF-PRINTS’：strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiology*，2003，**3**：1－13.

[4] 刘志文，廖礼维，王莹等. 新疆绵羊种布鲁氏菌的首次分离和鉴定. 中国兽医杂志，1983，**9**(6)：5－7.

[5] 柳建新，陈创夫，田晶华，等. 新疆地区绵羊种布鲁氏菌 Omp25 基因的分子克隆及核苷酸序列测定. 中国兽医杂志，2005，41(11)：6－8.

[6] 杨丽娟，陈创夫. 新疆地区绵羊种布鲁氏菌 Omp31 基因的克隆与表达载体的构建. 当代畜牧兽医，2005，**1**：22－24.

[7] 滕文军，陈创夫，任雪艳，等. 新疆绵羊种布鲁氏菌 Omp2b 的克隆与表达. 动物医学进展，2005，**26**(8)：80－83.

[8] Sambrook J，Fritsch EF，Maniatis T. 金冬雁，黎孟枫，等译. 分子克隆实验克隆. 第二版. 北京：科学出版社，1995.

[9] 陆承平. 兽医微生物学. 北京：中国农业出版社，2001.

Comparative study on identity of *B. ovis* 019 strain by traditional methods and HOOF-prints technique

WANG Yuan-zhi[1]，CHEN Chuang-fu[1]，CUI Bu-yun[2]，LIU Jian-xin[1]

([1] *Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease/Animal Science & Technology College*，*Shihezi University*，*Shihezi* 832003，*China*)

([2] *Institute of Infectious Disease Control And Prevention*，*Chinese Center For Disease Control And Prevention*，*Beijin* 100050，*China*)

Abstract：*B. ovis* 019 strain was identified by traditional methods and HOOF-Prints technique. Software DNAMAN was used to analyze phylogenetic tree for *B. ovis* 019 and reference strains of *B. abortus* 2308，*B. melitensis* 16M，*B. suis* 1330 and *B. ovis* 63/290. The results showed that the similarity between *B. ovis* 019 and *B. ovis* 63/290 was higher than that between *B. ovis* 019 and the other reference strains，which was in accordance with the results by conventional bacteriological methods. HOOF-Prints technique would be a promising method for identifying *Brucella* species and even biovars.

Keywords：*B. ovis* 019；bacterial identity；conventional methods；HOOF-Prints

Foundation item：National Natural Science Foundation of China (C02030606)

* Corresponding author. Tel：86-993-2058002；Fax：86-993-2031130；E-mail：ccf-xb@163.com

Received：18 October 2006/Accepted：22 November 2006/Revised：2 December 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn