



研究报告

不同牛分枝杆菌特异性基因 PCR 方法的比较

张春燕^{Δ1} 秦玉明^{Δ1} 边增杰¹ 徐中清¹ 牛凯¹ 许冠龙¹ 丁家波¹
鑫婷^{*2} 朱良全^{*1}

1 中国兽医药品监察所 北京 100081

2 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 北京 100193

摘要:【背景】牛结核病是我国二类动物疫病,世界动物卫生组织将其列为法定报告的动物疫病。牛主要通过患病牛呼吸道分泌物和咳嗽所产生的气溶胶感染;人则主要通过食用未经高温处理的病牛肉或奶感染。因此,经过病原学 PCR 检测对疑似患病牛牛奶或屠宰组织样品进行快速检验确诊,能够最大限度地减少奶牛养殖中乳品生产业的经济损失。【目的】研究并确定适宜的牛分枝杆菌 PCR 扩增引物及参数,为临床快速准确诊断牛结核病提供参考。【方法】对已报道的 5 对 PCR 引物,运用降落(touch down) PCR 法确定适宜退火温度(T_m);运用梯度稀释的牛分枝杆菌 C68001 株(国内牛结核菌素生产用菌株)基因组 DNA 以及不同菌液含量的人工模拟临床样本(淋巴结、肺脏和牛奶),确定不同引物 PCR 方法的敏感性;同时以 6 种常见牛感染菌(牛种布鲁氏菌 2308、羊种布鲁氏菌 Rev.1、牛分枝杆菌 C68001 和 AN5、禽分枝杆菌 C68202、副结核分枝杆菌 C68681 和胞内分枝杆菌 C68226)核酸样本,确定不同引物 PCR 方法的特异性。【结果】所有引物在 53-63 °C 均含有目的条带,确定引物的最佳退火温度是 60 °C。在细菌核酸敏感性检验中,1 号和 3 号引物的检测敏感性最高,达 10^{-10} ng/ μ L;其次是 2 号和 5 号,达 10^{-5} ng/ μ L。对于人工模拟感染样本,1 号、3 号和 4 号引物在淋巴结和肺脏中检测敏感性最高,其次是 2 号;而 2 号、3 号、4 号和 5 号引物对奶样检测敏感性最高。对于特异性检验,2 号和 5 号引物特异性较好,可检测到明显的牛分枝杆菌特异性条带,对通常不引起牛结核病而只干扰免疫学诊断的禽分枝杆菌检测条带较微弱,而布鲁氏菌、副结核分枝杆菌和胞内分枝杆菌均无检测条带。【结论】2 号引物及其反应参数的 PCR 方法敏感性、特异性良好,适合用于牛结核病的快速准确诊断。

关键词: 牛分枝杆菌, 引物, PCR, 敏感性, 特异性

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFF0208603, 2016YFD0500902)

Δ These authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: XIN Ting: 86-10-62819364; E-mail: xinting@caas.cn

ZHU Liang-Quan: Tel: 86-10-61255325; E-mail: zhuliangquan_ivdc@126.com

Received: 08-07-2019; Accepted: 05-08-2019; Published online: 22-11-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0208603, 2016YFD0500902)

Δ 对本文贡献相同

*通信作者: 鑫婷: Tel: 010-62819364; E-mail: xinting@caas.cn

朱良全: Tel: 010-61255325; E-mail: zhuliangquan_ivdc@126.com

收稿日期: 2019-07-08; 接受日期: 2019-08-05; 网络首发日期: 2019-11-22

Comparison on of different PCR methods for *Mycobacterium bovis* specific genes

ZHANG Chun-Yan^{Δ1} QIN Yu-Ming^{Δ1} BIAN Zeng-Jie¹ XU Zhong-Qing¹ NIU Kai¹
XU Guan-Long¹ DING Jia-Bo¹ XIN Ting^{*2} ZHU Liang-Quan^{*1}

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: [Background] Bovine tuberculosis is a second-class animal disease in China, and it was listed as a legally reported animal disease by World Organisation for Animal Health (OIE). Cattle are mainly infected by aerosols produced by respiratory secretions and coughs in *Mycobacterium bovis*-infected cattle; people are mainly infected with meat or milk from diseased cattle that have not been treated with high temperature. Therefore, the rapid detection of suspected diseased milk or slaughter tissue samples by pathogen PCR detection can minimize the economic loss of dairy farming industry, which is of great significance. [Objective] To study and determine the suitable PCR amplification primers and parameters of *Mycobacterium bovis*, providing reference for rapid and accurate diagnosis of Bovine tuberculosis. [Methods] For the five pairs of PCR primers reported, the appropriate annealing temperature (T_m) was determined by touch down PCR; to determine the sensitivity of PCR methods with different primers, we used the genomic DNA of the *Mycobacterium bovis* C68001 strain (the domestic strain for bovine tuberculin production) and the artificial liquid with different bacterial contents in simulate clinical samples (lymph nodes, lungs, and milk); and then 6 common bacteria infecting bovines (*B. abortus* 2308, *B. melitensis* Rev.1, *M. bovis* C68001 and AN5, *M. avium* C68202, *M. paratuberculosis* C68681 and *M. intracellulare*) were used to determine the specificity. [Results] All primers contained the target band at 53–63 °C, and the best suitable T_m was 60 °C. The primers No. 1 and No. 3 had the highest sensitivity detecting nucleic acid of C68001, reaching 10^{-10} ng/ μ L; followed by No. 2 and No.5, up to 10^{-5} ng/ μ L. For artificially simulated infection samples, primers No. 1, 3, and 4 were most sensitive to detection in lymph nodes and lungs, followed by No. 2; and primers No. 2, No. 3, No. 4, and No. 5 were the most sensitive to milk samples. For specificity tests, primers 2 and 5 have better specificity which can detect significant *M. bovis* specific bands. It is weak when detecting *M. avium* that do not normally cause bovine tuberculosis but interfere with immunological diagnosis, and it had no bands in brucella, *M. bovis*, *M. paratuberculosis* and *M. intracellulare*. [Conclusion] The PCR method with primer No. 2 had the best sensitivity and specificity, so it is suitable for rapid and accurate diagnosis of bovine tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, Primer, PCR, Sensitivity, Specificity

牛结核病(bovine tuberculosis)是“国家中长期动物疫病防治规划(2012–2020年)”16种优先防治的国内重大动物疫病之一,我国将其列为二类动物疫病,世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, OIE)将其列为法定报告的动物疫病。牛结核病是以渐进性消瘦、咳嗽、多种组织器官形成干酪样坏死或钙化结节为特征的一种人兽共患慢性肉芽肿性传染病^[1-2]。该病主要由结核分枝杆菌复合群成员——牛分枝杆菌感染引起,此菌也可以感染包括人在内的大部分哺乳动物。在基因组水平

上,牛分枝杆菌和结核分枝杆菌一致性达到99.95%,而禽分枝杆菌一般认为对牛不致病,但感染后可干扰牛结核病的检疫^[1]。

近几年,有关部门对我国牛场结核病的流行病学进行调查,发现我国牛结核病的发病率一直呈现上升态势^[2]。当前,牛结核病的防控主要采取“检疫-淘汰”方法。国内外用于诊断牛结核病的检测方法大体上可分为三大类^[3]:一是基于细菌学检测方法,如细菌染色涂片镜检、细菌培养和细菌接种易感动物试验等;二是基于免疫学的检测方法,如结

核菌素皮内变态反应试验、IFN- γ 释放试验和胶体金试验等；三是基于分子生物学的诊断技术，如基因芯片、核酸探针、PCR 等方法。到目前为止，世界动物卫生组织推荐的牛结核病诊断方法只有结核菌素(purified protein derivatives, PPD)变态反应，但该方法存在很多弊端，除检验时间长(72 h)、主观判断性强(测皮厚)的缺点外，还存在非典型分枝杆菌干扰，常造成非特异性反应的发生^[4-5]。细菌分离培养是牛结核病诊断的“金标准”，但分枝杆菌培养基要求高，而且培养时间长(初次培养一般至少 3 周以上)、分离率低，已不能满足现代临床诊断的需要。

近年来，随着分子生物学技术的发展以及结核杆菌特异性核苷酸序列分析所取得的成果，通过基因扩增进行结核分枝杆菌的鉴定已成为该类菌鉴定最可靠的技术方法之一^[6-7]。2003 年，王仲元等^[8]用 3 套分枝杆菌特异引物，在同一退火温度下同时扩增菌株的基因组 DNA，一次性将结核分枝杆菌、牛分枝杆菌与非结核分枝杆菌区别开，取得了很好的效果，特异性达到 100%，灵敏度为 10 ng/反应。2007 年，谢芝勋等^[9]根据牛布鲁氏菌具有种特异性的 BCSP-31K 基因和牛分枝杆菌 23S rRNA 基因，设计并合成了两对分别扩增牛布鲁氏菌和牛分枝杆菌的特异性引物，建立了 PCR 同时快速检测鉴别以上两种病原体的方法。2013 年，张喜悦等^[10]用 MYCGEN 引物检测临床分离菌株，扩增有 1 030 bp 片段的的目的基因，证实分离菌株属于 MTC (mycobacterium tuberculosis complex)群。2016 年，岳筠等^[11]选择牛分枝杆菌保守基因区域合成特异性引物，构建了可检测牛分枝杆菌病原核酸的 PCR 方法，均具有良好的敏感性和特异性，可用于鲜乳样品的检测。2019 年，Barandiaran 等^[12]等分别用 PCR 方法和细菌分离培养法检测了 266 份猪组织样本中的牛型分枝杆菌，结果显示 PCR 方法的灵敏度(82.9%)高于细菌分离培养的灵敏度(79.9%)，两种方法的特异性几乎相同，证实 PCR 可以作为一种检测猪的牛型分枝杆菌的快检方法。

在牛结核病流行病学中，患病奶牛是结核病的重要

要传染源，牛主要通过患病呼吸道分泌物和咳嗽所产生的气溶胶感染；人则主要通过食用未经高温处理的病牛肉或奶感染^[1,13]。因此，对疑似患病牛牛奶或屠宰组织样品进行快速检验确诊，对于防范该病及其畜产品扩散、蔓延，具有非常重要的公共卫生意义。鉴于此，依据传统的流行病学、临床症状、病理变化或 PPD 试验做出初步诊断后，通过病原学 PCR 检测进行牛结核病确诊，对于最大限度地减少奶牛养殖业乳品生产业的经济损失，意义重大。

本研究对已报道的 5 对引物，运用牛分枝杆菌标准菌株及人工模拟临床样本(淋巴结、肺脏和牛奶)系统比较了其敏感性和特异性，为畜牧业从业者和科研工作者快速准确诊断牛结核病提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

牛分枝杆菌 AN5 (国际牛结核菌素生产用菌株)、牛分枝杆菌 C68001 (国内牛结核菌素生产用菌株)、参考菌株牛种布鲁氏菌 2308 株、羊种布鲁氏菌 Rev.1 株、禽分枝杆菌 C68202 株、胞内分枝杆菌 C68226 株、副结核分枝杆菌III-V (C68681)株，均由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应。

组织核酸提取试剂盒，Qiagen 公司；细菌基因组提取试剂盒，天根生物技术有限公司；溶菌酶，索莱宝生物科技有限公司；PreTaq mix, TaKaRa 公司；大豆酪蛋白琼脂 TSA, Oxoid 公司；细菌浊度标准对照品，中国药品生物制品检定所。NanoDrop 核酸测定仪，Thermo 公司。

健康牛组织样本，本实验采集并保存；全脂牛奶(蒙牛)，购自超市。

佩氏培养基、大豆酪蛋白琼脂平板(TSA)购自中国兽医药品监察所。

1.2 引物合成

用表 1 中引物扩增特异性基因片段。

1.3 适宜退火温度(T_m)的确定

采用生物信息学软件 DNASTar 评价 5 对引物

表 1 本文所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物编号 Primers No.	靶基因 Target gene	引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')	扩增长度 Sizes (bp)	参考文献 References
1	Mycgen	Mycgen-F Mycgen-R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TGCACACAGGCCACAAGGGA	1 030	[10]
2	IS6110	IS6110-F IS6110-R	GGATCCTGCGAGCGTAGGCG CATCAGCCGCGTCCACGC	323	[11]
3	23S rRNA	23S rRna-F 23S rRna-R	GCGAACGCGGAACAGGCTAAAC AGCTTATCCCCCGCCGTCTCA	838	[9]
4	α antigen gene	MT-F MT-R	TTCTACCAGCGAGCTGCCG CCCCAGTACTCCCAGCTGTGC	500	[8]
5	IS6110	IS-F IS-R	CGGAGACGGTGCCTAAGTGG GATGGACCGCCAGGGCTTGC	1 000	[8]

T_m , 确定其退火温度范围; 然后采用降落 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 模板 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, ddH₂O 7 μ L, 2 \times Taq mix (0.1 U/ μ L) 10 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53–63 $^{\circ}$ C (每循环降落 1 $^{\circ}$ C) 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min, 34 次循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。依据 PCR 结果选取确定适宜的退火温度。

1.4 敏感性试验

1.4.1 细菌核酸最小检测量确定

(1) 菌液培养、核酸提取。将牛分枝杆菌 C68001 株冻干菌株用 0.3 mL 蛋白胨水溶解, 密集划线接种 2 支佩氏培养基斜面, 37 $^{\circ}$ C 培养 1 个月^[14]。肉眼观察长出干燥颗粒状结核菌落且生长纯粹后, 用 5 mL 生理盐水洗下, 80 $^{\circ}$ C 水浴灭活 2 h, 备用。按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取核酸, 测定其浓度。

(2) 最小检测量确定。用 PBS 将核酸浓度依次稀释为 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} ng/ μ L, 阴性对照为 ddH₂O, 依据 1.3 获得的适宜 T_m 及反应条件进行 PCR, 确定不同引物 PCR 方法的核酸最小检测量。

1.4.2 人工模拟临床样本最小检测量确定

(1) 人工模拟感染组织样本(肺脏/淋巴结)检测。将灭活的 C68001 菌液依次 2 \times 梯度稀释后测定其 OD₆₀₀ 值, 确定其初始浓度, 并稀释到 10^8 CFU/mL, 然后用 PBS 进行 10 \times 倍比稀释, 依次分别加入到肺脏/淋巴结组织匀浆(100 μ L)中, 每份匀浆加入 10 μ L 稀释菌液, 随后分别用组织核酸

提取试剂盒提取核酸后进行 PCR 检测, 依据 1.3 获得的适宜 T_m 进行 PCR, 确定不同引物 PCR 方法对组织中核酸的最小检测量。

(2) 人工模拟感染牛奶样本检测。将(1)中稀释各浓度的菌液, 依次分别加入到 1 mL 全脂牛奶中, 每份加入 10 μ L 稀释菌液, 然后分别用组织核酸提取试剂盒提取核酸后进行 PCR 检测, 依据 1.3 获得的适宜 T_m 进行 PCR, 确定不同引物 PCR 方法对牛奶中核酸的最小检测量。

1.5 特异性试验

1.5.1 菌液培养及核酸提取

将牛分枝杆菌 C68001 株、牛分枝杆菌 AN5 株、禽分枝杆菌 C68202 株、胞内分枝杆菌 C68226 株和副结核分枝杆菌 C68681 株按 1.4.1 方法进行培养并提取核酸。牛种布鲁氏菌 2308 株、羊种布鲁氏菌 Rev.1 株分别接种大豆酪蛋白琼脂平板(TSA), 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后, 用 5 mL 生理盐水洗下, 80 $^{\circ}$ C 水浴灭活 2 h, 再按 1.4.1 方法提取核酸。

1.5.2 PCR 方法检测

按 1.3 获得的适宜 T_m 进行 PCR, 分别对上述菌株核酸进行检测, 并设相同条件灭菌 ddH₂O 对照, 以确定 PCR 方法的特异性。

2 结果与分析

2.1 适宜退火温度 T_m 的确定

经过生物信息学软件 DNASTar 分析得出, 5 对引物的 T_m 范围在 53–63 $^{\circ}$ C 之间, 在此范围内设置温度梯度, 每循环降落 1 $^{\circ}$ C, 以 C68001 核酸为模板

进行 PCR 扩增。结果显示, 5 对引物在 53–63 °C 退火范围内均能扩出目的条带(图 1)。综合考虑, 选择 60 °C 作为 5 对引物的最佳退火温度, 并建立 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

2.2 敏感性试验

2.2.1 细菌核酸的最小检测量

提取牛分枝杆菌 C68001 株核酸, 用 NanoDrop 核酸测定仪测其浓度为 33.3 ng/μL, 用 PBS 将核酸

稀释至 10^{-3} ng/μL, 然后依次进行 10 倍比稀释, 浓度依次为 10^{-3} 、 10^{-4} …… 10^{-10} ng/μL, 依据 2.1 建立的 PCR 反应条件分别进行 PCR, 确定不同引物 PCR 方法的最小核酸检测量。

从 PCR 结果能够看出(图 2), 1 号和 3 号引物对 C68001 基因组的检测灵敏度最高, 达到 10^{-10} ng/μL 甚至更低的检出限; 其次是 2 号和 5 号引物, 可以达到 10^{-5} ng/μL; 4 号引物可以检出最小 10^{-4} ng/μL 的核酸。

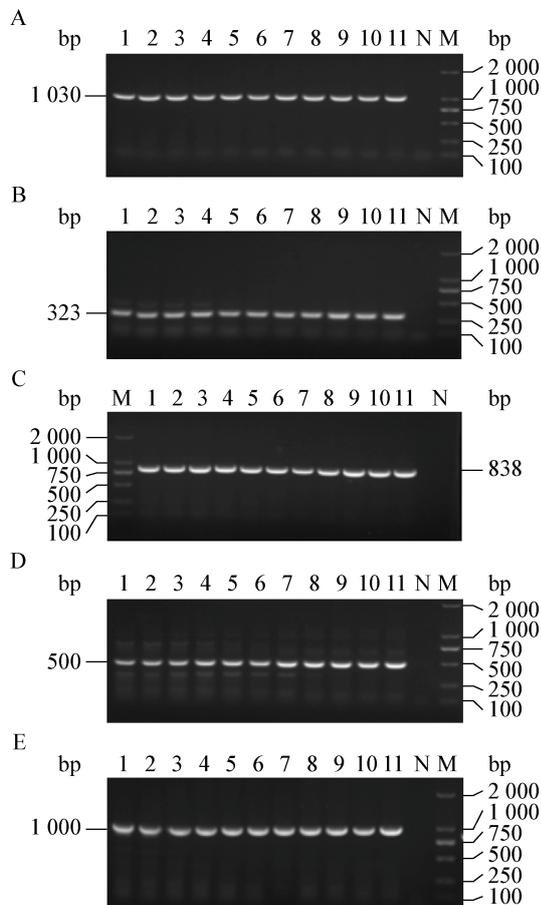


图 1 不同引物退火温度的确定

Figure 1 Determination of annealing temperature of different primers

注: N: 阴性对照; M: DNA 分子质量标准 DL2000; 1–11: 退火温度分别为 53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63 °C。A: 1 号引物; B: 2 号引物; C: 3 号引物; D: 4 号引物; E: 5 号引物。

Note: N: Negative control (ddH₂O); M: DL2000 DNA Marker; 1–11: The annealing temperature is 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 or 63 °C. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

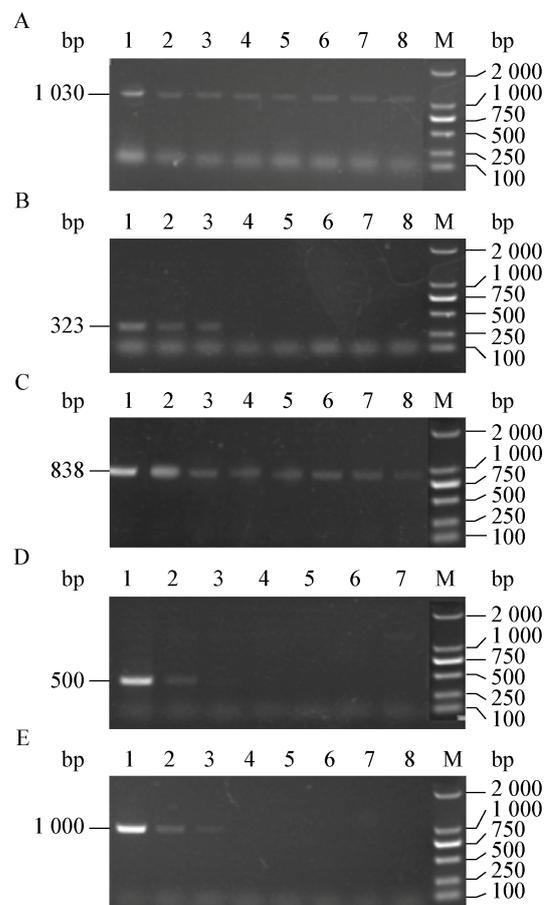


图 2 不同引物对细菌核酸的敏感性

Figure 2 Sensitivity of different primers to bacterial nucleic acids

注: M: DNA 分子质量标准 DL2000; 1–8: 核酸浓度依次为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} ng/μL。A: 1 号引物; B: 2 号引物; C: 3 号引物; D: 4 号引物; E: 5 号引物。

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1–8: The concentration of DNA is 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} or 10^{-10} ng/μL. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

2.2.2 人工模拟临床样本的最小检测量

(1) 人工模拟感染组织样本(肺脏/淋巴结)检测。将灭活的 C68001 菌液测定 OD_{600} 值, 确定其初始浓度, 当菌液稀释 16 倍时浓度是 25×10^8 CFU/mL, 用 PBS 将菌液稀释至 10^8 CFU/mL 并依次进行 10 倍比稀释, 取 10 μ L 稀释菌液依次分别加入到肺脏和淋巴结组织匀浆(100 μ L)中,

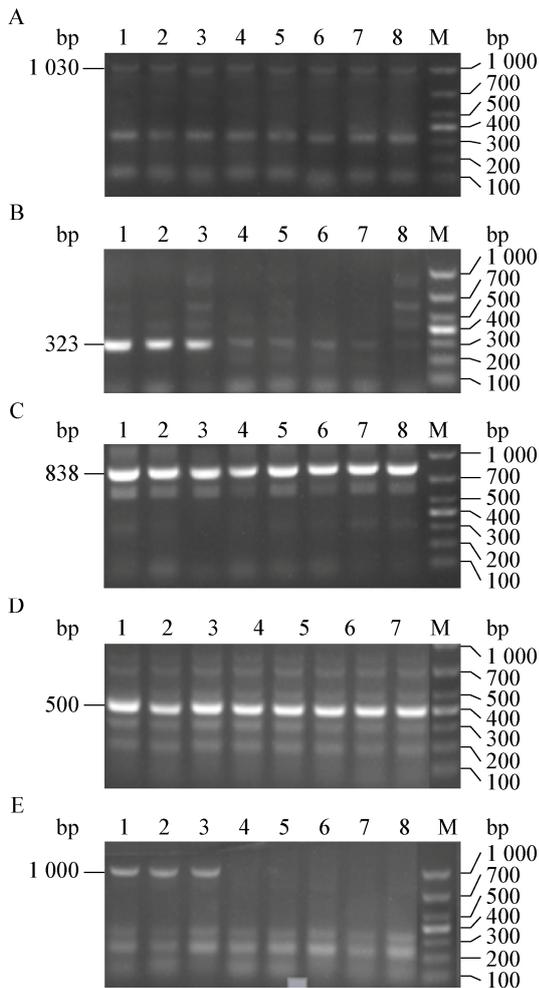


图3 不同引物对肺脏中 C68001 核酸的检测敏感性

Figure 3 Sensitivity of different primers to detection of C68001 nucleic acid in lung

注: M: DNA 分子质量标准 DL1000; 1-8: 菌液浓度依次为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 个/mL。A: 1号引物; B: 2号引物; C: 3号引物; D: 4号引物; E: 5号引物。

Note: M: DL1000 DNA Marker; 1-8: The CFU of bacteria is 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 or 10^1 CFU/mL. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

提取核酸后进行 PCR 检测, 从而确定不同引物 PCR 方法对组织中核酸最小检测量(图3和图4)。结果显示: 1号、3号和4号引物对淋巴结和肺中牛分枝杆菌(C68001)的检测灵敏度最高, 达到 10 个菌/mL 甚至更低的检出限; 其次是 2号引物, 可以检出 100 个菌/mL; 5号引物灵敏度最低。

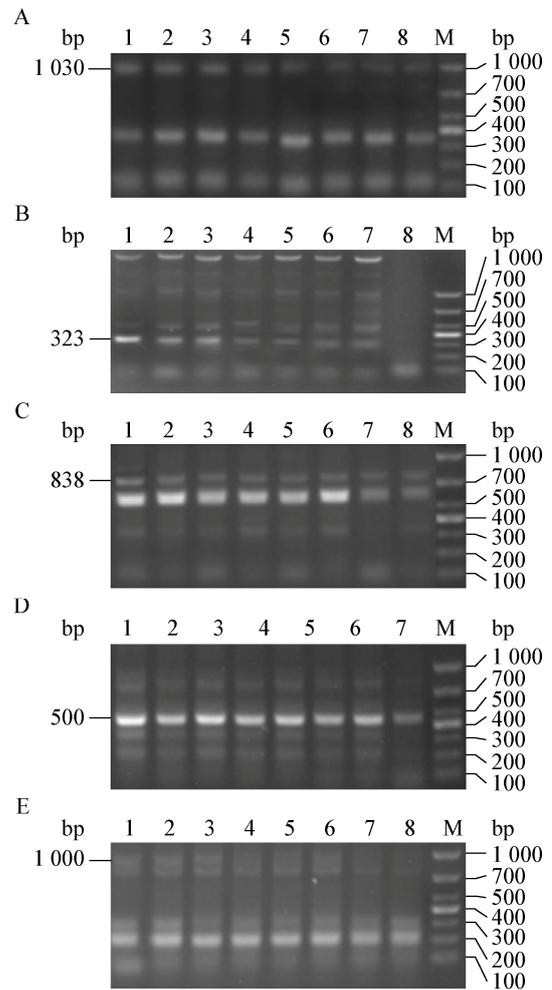


图4 不同引物对淋巴结中 C68001 核酸的检测敏感性

Figure 4 Sensitivity of different primers to detection of C68001 nucleic acid in lymph nodes

注: M: DNA 分子质量标准 DL1000; 1-8: 菌液浓度依次为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 个/mL。A: 1号引物; B: 2号引物; C: 3号引物; D: 4号引物; E: 5号引物。

Note: N: M: DL1000 DNA Marker; 1-8: The CFU of bacteria is 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 or 10^1 CFU/mL. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

(2) 人工模拟感染牛奶样本检测。将 1.4.2 (1) 稀释各浓度的菌液分别取 10 μ L, 依次分别加入到 1 mL 全脂牛奶中, 提取核酸后进行 PCR 检测, 确定不同引物 PCR 方法对牛奶中核酸最小检测量 (图 5)。结果显示 2 号、3 号、4 号和 5 号引物对人工模拟奶样中牛结核菌(C68001)的检测灵敏度都可以达到 10 个菌/mL; 1 号引物检测奶样的灵敏度较低, 只有 10⁶ 个菌/mL。

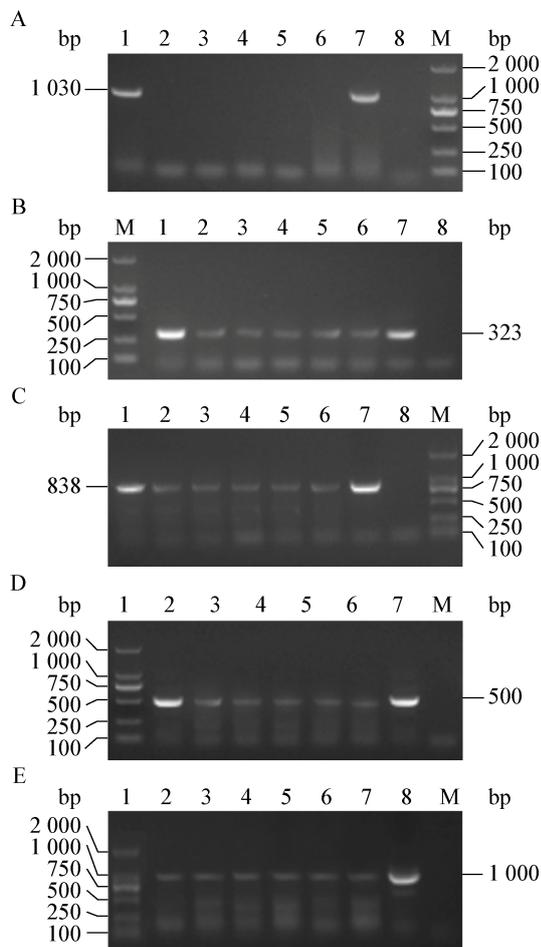


图 5 不同引物对人工模拟奶样的灵敏度检测

Figure 5 Sensitivity of different primers to detection of C68001 nucleic acid in milk samples

注: M: DNA 分子质量标准 DL2000; 1-8: 菌液浓度依次为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 个/mL。A: 1 号引物; B: 2 号引物; C: 3 号引物; D: 4 号引物; E: 5 号引物。

Note: N: M: DL2000 DNA Marker; 1-8: The CFU of bacteria is 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ CFU/mL. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

2.3 特异性试验

用牛种布鲁氏菌 2308 株、羊种布鲁氏菌 Rev.1 株、牛分枝杆菌(C68001)、牛分枝杆菌(AN5)、禽分枝杆菌(C68202)、副结核分枝杆菌(C68681)和胞内分枝杆菌(C68226)的核酸进行特异性检测, 用 ddH₂O 作为阴性对照, 结果显示(图 6) 2 号和 5 号

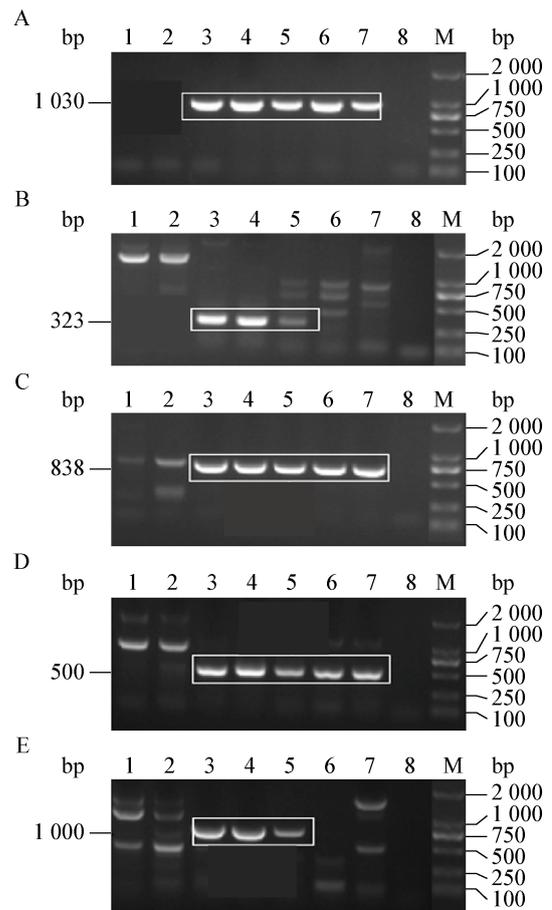


图 6 引物特异性的检测

Figure 6 Detection of primer specificity

注: 1: 牛种布鲁氏菌 2308; 2: 羊种布鲁氏菌 Rev.1; 3: 牛分枝杆菌 C68001; 4: 牛分枝杆菌 AN5; 5: 禽分枝杆菌 C68202; 6: 副结核分枝杆菌 C68681; 7: 胞内分枝杆菌 C68226; 8: 阴性对照; M: DNA 分子质量 DL2000。A: 1 号引物; B: 2 号引物; C: 3 号引物; D: 4 号引物; E: 5 号引物。

Note: 1: *Brucella abortus* 2308; 2: *Brucella melitensis* Rev.1; 3: *Mycobacterium bovis* C68001; 4: *Mycobacterium bovis* AN5; 5: *Mycobacterium avium* C68202; 6: *Mycobacterium paratuberculosis* C68681; 7: *Mycobacterium intracellulare* C68226; 8: Negative control (ddH₂O); M: DNA DL2000 Marker. A: Primers number 1; B: Primers number 2; C: Primers number 3; D: Primers number 4; E: Primers number 5.

引物只与两种牛分枝杆菌发生强烈反应, 与禽结核分枝杆菌反应较弱, 与布鲁氏菌、副结核分枝杆菌和胞内分枝杆菌均不反应, 而禽分枝杆菌一般不会感染牛, 所以这 2 对引物可用于牛型分枝杆菌的检测; 而 1 号、3 号和 4 号引物与布鲁氏菌外的其他 5 种分枝杆菌均发生强烈反应, 所以不适合作为牛结核 PCR 检测的引物。

3 讨论与结论

3.1 牛结核病的病原学检测的重要性

牛结核病是由结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTC) 中的牛分枝杆菌引起的一种慢性、消耗性人畜共患病^[1]。淋巴结和肺脏是牛结核病重要的靶组织, 而乳液是牛结核病风险评估中最易采集、最容易监测的样本^[11,13]。屠宰检疫中, 通过肺脏等相关组织及淋巴结的特征性变化初诊后运用 PCR 确诊, 是防止感染牛肉进入市场的最后环节。乳液 PCR 筛查对于最大限度地减少奶牛养殖业和乳品生产业的经济损失意义重大。

3.2 引物是建立 PCR 方法的关键, 不同引物其敏感性及其特异性有差异

本研究对 5 种报道的引物运用牛分枝杆菌核酸以及人工模拟感染临床样本(肺脏、淋巴结和牛奶)敏感性检测, 发现 3 号引物在核酸及人工模拟样本中敏感性较好, 优于其他引物, 但其特异性差。2 号引物敏感性略逊于 3 号, 但特异性最好。依据传统的流行病学、临床症状、病理变化或 PPD 试验初步诊断后, 采用 2 号引物及其反应参数的病原 PCR 方法, 适合临床牛结核病的快速准确诊断, 其检测核酸的敏感性可达到 0.1 fg, 临床模拟样本可达 10 个菌/mL, 因此具有良好的应用前景。此外, 引物的退火温度是 PCR 反应参数的关键, 运用生物学软件将引物评估后, 然后设计从 63 °C 至 53 °C 的梯度温度降落 PCR 进行扩增, 结果 5 对引物均在较为宽泛的退火温度得到有效扩增, 因而为便于操作, 统一了引物的退火温度。

3.3 特异性是 PCR 很重要的参数

决定特异性因素包括待检菌基因是否特异、与其他菌种的同源性高低以及菌株之间的变异情况等^[15]。本研究选择常见的牛组织及奶液中分枝杆菌属成员 DNA: 含牛分枝杆菌参考株、禽分枝杆菌 C68202 (主要引起禽结核)、副结核分枝杆菌 III-V (主要引起牛副结核)、结核分枝杆菌 H37RV 株(主要引起人结核)、胞内分枝杆菌等, 以及牛奶中常污染的布鲁氏菌 DNA, 并以双蒸水作为阴性对照, PCR 反应发现 1、3、4 号引物对分枝杆菌属成员均识别, 而 2、5 号引物仅对牛分枝杆菌及禽结核分枝杆菌亚种识别, 鉴于本研究主要针对牛结核病疑似样品进行诊断, 而牛结核病一般由牛分枝杆菌或结核分枝杆菌引起, 禽分枝杆菌一般认为对牛不致病。因此一旦疑似牛结核病料组织 DNA 中经 PCR 扩增出此特异性带, 即可判定为牛结核病。

3.4 灵敏度是 PCR 检测另一重要参数

1989 年法国学者 Hance 等^[16]首次运用 PCR 可检测 1-100 fg 纯化结核分枝杆菌 DNA, 阳性检出率明显高于常规细菌学方法^[17]; 2006 年, 刘思国等^[18]建立的 PCR 可分别检出 50 pg 及 250 fg 牛分枝杆菌 DNA; 2016 年, Zhang 等^[19]建立的牛分枝杆菌多重 PCR 灵敏度可以提高到 15 pg DNA, 特异性 100%。本研究筛选出的 2 号引物(IS6110 插入序列片段)对核酸的检测敏感性较高, 达到 0.1 fg。据报道, IS6110 插入序列是结核分枝杆菌复合群的一个转座基因, 在结核分枝杆菌复合群中存在不同数量的拷贝数^[20], 而在分枝杆菌属其他菌种中不存在^[21]。此外, 即使是同一基因插入序列, 不同片段引物其敏感性也有差异, 如 2 号引物及 5 号引物。

3.5 PCR 检测效果受反应条件、靶基因在基因组中的拷贝数等影响大

在处理模拟样本时, 面临的最大难点在于提取组织样品和奶样中分枝杆菌核酸。由于结核分枝杆菌壁厚, 脂质含量高, 破壁困难; 再加上组

织样本和奶样成分复杂,许多样品存在 *Taq* DNA 聚合酶抑制物,可能还有大量的非特异性 DNA 模板竞争扩增^[5,22]。因此,采取适当方法对临床标本进行处理,去除其中的杂质,使分枝杆菌 DNA 尽可能地释放出来,避免外源性核酸和扩增子的污染是很重要的环节。2016 年, Fell 等^[23]用磁珠法提取牛和红鹿组织样本中的牛分枝杆菌进行 PCR 检测,取得了满意的效果。本试验同时采用常规方法和磁珠法分别进行核酸提取,在采用常规细菌组织基因组提取试剂盒提取核酸时,额外加入了 40 mg/mL 的溶菌酶,并进行 37 °C 孵育 2 h 破壁;在提取奶样中核酸时,预先对乳液采用 12 000 r/min 离心 1min,挑弃上层乳脂再进行试验,均取得较好效果。另外,采用基于磁珠法原理的商品化自动核酸萃取系统完成组织核酸提取也效果良好。

3.6 电泳胶“断带”现象原因分析

在添加不同浓度菌液进行临床模拟样本 PCR 试验中,有时电泳胶会出现“断带”现象,即添加高浓度菌液样本无目的条带,而低浓度出现明显条带。经试验分析,这主要与分枝杆菌本身的特性有关,因为牛分枝杆菌菌落在固体培养基上呈颗粒、结节、花菜状,在液体培养基上易形成皱折状菌膜^[14],因而菌体容易在溶液或匀浆液中发生聚集和沉淀,在添加菌液和提取组织核酸时需注意不间断混匀。

REFERENCES

- [1] Guo AZ. Bovine Tuberculosis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese)
郭爱珍. 牛结核病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015
- [2] Li FF, He XL, Cheng C, et al. Research progress of molecular detection technology of *Mycobacterium bovis* based on PCR method[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 54(5): 70-73 (in Chinese)
李凡飞, 何小丽, 程成, 等. 基于 PCR 方法的牛分枝杆菌分子检测技术研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(5): 70-73
- [3] Zhang YJ, Xue Y, Du MT, et al. Construction of a real-time fluorescent PCR for detecting the *Mycobacterium tuberculosis* complex in the milk of cow[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2006, 29(2): 79-83,92 (in Chinese)
张跃建, 薛昱, 杜明韬, 等. 牛乳中结核分支杆菌复合群的实时荧光 PCR 检测技术[J]. 乳业科学与技术, 2006, 29(2): 79-83,92
- [4] Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, et al. Use of ESAT-6 in the interferon- γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 80(1): 37-46
- [5] Qi WB, Chen SC, Luo ML, et al. Development of a nested PCR for rapid detection of bovine tuberculosis[J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(10): 815-819 (in Chinese)
元文宝, 陈世灿, 罗满林, 等. 牛结核病巢式 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(10): 815-819
- [6] Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube[J]. PCR Methods and Applications, 1992, 1(4): 269-273
- [7] Nahar Q, Pervin M, Islam MT, et al. Application of PCR for the detection of bovine tuberculosis in cattle[J]. Journal of the Bangladesh Agricultural University, 2011, 9(1): 73-78
- [8] Wang ZY, Kuang TJ, Jin GF, et al. Species identification of Mycobacteria with multiprimer PCR[J]. Bulletin of the Chinese Antituberculosis Association, 2003, 25(6): 391-392 (in Chinese)
王仲元, 匡铁吉, 金关甫, 等. 复方 PCR 用于分支杆菌菌种鉴定的初步研究[J]. 中国防痨杂志, 2003, 25(6): 391-392
- [9] Xie ZX, Xie ZQ, Liu JB, et al. Development of a rapid and sensitive assay for the detection of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* in dairy cows by multiplex PCR[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007, 23(7): 714-717,737 (in Chinese)
谢芝勋, 谢志勤, 刘加波, 等. 多重 PCR 快速检测鉴别牛布鲁氏菌和牛分枝杆菌的研究与应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(7): 714-717,737
- [10] Zhang XY, Hu XD, Cao R, et al. Application of multi-PCR assay for identifying *Mycobacterium bovis*[J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2013, 30(7): 68-71 (in Chinese)
张喜悦, 呼西旦, 曹瑞, 等. 多重 PCR 方法鉴定牛结核分支杆菌的研究[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(7): 68-71
- [11] Yue J, Cheng ZT, Ou DY, et al. Application of PCR detection technology in monitoring dairy cow tuberculosis fresh milk samples[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 52(10): 77-79 (in Chinese)
岳筠, 程振涛, 欧德渊, 等. PCR 检测技术在奶牛结核病鲜乳样本监测中的应用[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(10): 77-79
- [12] Barandiaran S, Pérez Aguirreburualde MS, Marfil MJ, et al.

- Bayesian assessment of the accuracy of a PCR-based rapid diagnostic test for bovine tuberculosis in swine[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 204
- [13] Gulnur T, Nurbahiti, Gulbahrem S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolation from suspected samples collected in slaughterhouse and the identification by PCR[J]. *Grass-feeding Livestock*, 2015(3): 39-42 (in Chinese)
古努尔·吐尔逊, 努尔巴哈提, 古丽拜克热木·斯拉吾丁, 等. 屠宰场疑似牛结核病的细菌分离和 PCR 鉴定[J]. *草食家畜*, 2015(3): 39-42
- [14] Committee for Veterinary Biological Product Rule, Ministry of Agriculture, China. *Veterinary Biological Product Rule 2000*, People's Republic of China[Z]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 167-170,399-411 (in Chinese)
农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程 2000 版[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 167-170,399-411
- [15] Cheng S, Chen W, Chen YY, et al. Establishment and application of multiplex PCR to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2012, 28(4): 333-337 (in Chinese)
程实, 陈伟, 陈颖玉, 等. 结核分枝杆菌复合群四重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(4): 333-337
- [16] Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frédault V, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA[J]. *Molecular Microbiology*, 1989, 3(7): 843-849
- [17] Patal RJ, F Ries JWU, Piessens WF, et al. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(3): 513-518
- [18] Liu SG, Wang CL, Gong Q, et al. The development and preliminary application of specificity detection of *Mycobacterium bovis* by PCR based on the gene *pncA*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2006, 28(1): 80-83 (in Chinese)
刘思国, 王春来, 宫强, 等. 牛分枝杆菌特异性 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2006, 28(1): 80-83
- [19] Zhang Q, Tan HM, Cai XY, et al. Development of one-tube multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Mycobacterium bovis*[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 78(12): 1873-1876
- [20] Allix C, Walravens K, Saegerman C, et al. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(6): 1951-1962
- [21] Masala S, Molicotti P, Bua A, et al. Molecular characterization of Sardinian *Mycobacterium tuberculosis* isolates by IS6110 restriction fragment length polymorphism, MIRU-VNTR and rep-PCR[J]. *New Microbiologica*, 2010, 33(2): 155-162
- [22] Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction[J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 43(2/3): 227-240
- [23] Fell S, Bröckl S, Büttner M, et al. Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex members in cattle and red deer tissue samples[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16: 213