



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104313163 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201410593890.1

(22)申请日 2014.10.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104313163 A

(43)申请公布日 2015.01.28

(73)专利权人 河南省农业科学院畜牧兽医研究所

地址 450002 河南省郑州市金水区花园路116号

(72)发明人 李海利 王克领 朗利敏 徐引弟 张立宪 朱文豪 张青娴 游一 焦文强 许峰 郑万录 施巧婷 宁忠山

(74)专利代理机构 郑州市华翔专利代理事务所(普通合伙) 41122

代理人 王明朗

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

审查员 毛颖

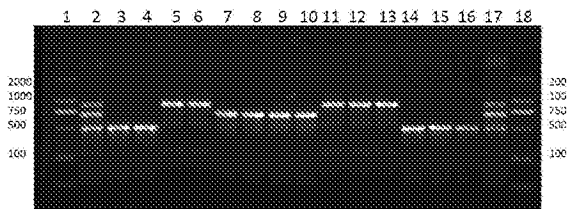
权利要求书1页 说明书7页 序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测方法、试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测方法、试剂盒及其应用,该方法包括猪传染性胸膜肺炎临床菌株的DNA提取;PCR产物扩增,包括在PCR试剂管中加入反应液,包括10×PCR buffer的PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs和2型、3型和6型三对特异性引物,以提取的DNA为模板,反应液总体积为50 μl;最后对扩增产物检测。该方法特异性强、灵敏度高、操作简便、省工省时,能同时满足检测多种血清型基因的需求,提高了检测的准确性和特异性。本发明能快速、方便的检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型,可用于细菌鉴定、疾病诊断、临床疫苗筛选和分子流行病学调查与分析,具有广阔的市场前景和较大的经济效益。



1. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测的试剂盒,其特征在于:试剂盒组成包括:PCR试剂管、反应缓冲液10×PCR buffer、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs和三对特异性引物,以猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的DNA为阳性对照,以副猪嗜血杆菌DNA为阴性对照:

所述的试剂盒进行检测时,各成分的具体组成:

组成成分	加入体积数	最终浓度
10×PCR buffer	5μl	1×PCR buffer
MgCl <sub>2</sub>	6μl	25mM
dNTPs	1μl	10mM
Ap2F	2.5μl	5mM
Ap2R	2.5μl	5mM
Ap3F	3μl	5mM
Ap3R	3μl	5mM
Ap6F	2μl	5mM
Ap6R	2μl	5mM
Taq	0.25μl	
H <sub>2</sub> O	17.75μl	

其中三对特异性引物如下:

菌种	引物名称	引物序列
2 型	Ap2F	AGTATCCGATACTCACGATTCAT
	Ap2R	GGATTAGCCAAACGCCATTCTC
3 型	Ap3F	TTTCGCGACTAGTGCTGGATA
	Ap3R	TTCAAATAATCTTGCTCGAATCTT
6 型	Ap6F	TTGCACTCACAAACCACATTAC
	Ap6R	AATCCGATGCTTATGGTCTCGTC。

## 一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测方法、试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种放线杆菌血清型的PCR检测方法,属于生物技术领域,具体涉及一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的三重PCR检测方法、试剂盒及其应用。

### 背景技术

[0002] 猪接触性传染性胸膜肺炎又称坏死性胸膜肺炎,是由胸膜肺炎放线杆菌引起的一种急性呼吸道传染病,以急性出血性纤维素性肺炎和慢性纤维素性坏死性胸膜炎为主要特征。急性者病死率高,慢性者常能耐过。

[0003] 猪接触性传染性胸膜肺炎各种年龄的猪均可感染,通常以2~5月龄、体重为30~60kg的猪多发。胸膜肺炎放线杆菌是对猪有高度宿主特异性的呼吸道寄生物,急性感染不仅可在肺部病理变化和血液中见到,而且在鼻液中也有大量细菌存在。猪群规模越大,发病危险亦越大。本病有明显的季节性,多在4~5月和9~11月发生。病猪和带菌猪是本病的主要传染源,无临床症状有病理变化猪,或无临床症状无病理变化阴性带菌猪较常见。如继发或并发其他疾病,常引起临床症状加剧和死亡率升高。该病近年来在我国发生呈逐年上升的趋势,已成为危害养猪业最严重的疾病之一,给我国养猪业造成严重的经济损失。

[0004] 近年来,由放线杆菌所引起的猪接触性传染性胸膜肺炎已成为影响养猪业发展的一种重要细菌性疾病。发病后及时采用抗生素进行治疗可显著降低动物死亡率,同时在生产过程中适当添加抗生素也可在一定程度上降低该病的发生率。但随着大量抗菌药特别是广谱抗菌药在养猪业中的广泛使用,细菌对抗菌药物的耐药性问题日趋突出,与此同时也有研究资料表明亚抑制浓度的抗生素可以影响细菌的代谢过程而改变细菌的毒力或细菌对环境的适应能力等。

[0005] 目前已报道的猪接触性传染性胸膜肺炎有15个血清型,各血清型具有特异性,其血清型特异性取决于加膜多糖和菌体脂多糖。根据烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的依赖性可把15个血清型分为两个生物型。生物I型为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖菌株,包括血清型1~12型和15型;生物II型的生长不依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,但需要其他特定嘌呤或嘌呤前产物以辅助生长,包括血清型13、14。其中血清型1和5型又可分为A和B两个亚型,即血清型1A、1B和5A、5B。此外,还有一些分离到的放线杆菌依据现在的分类系统还不能划分其血清型。不同血清型间致病力有明显的差异,血清型间不存在交叉保护力。放线杆菌分布广泛,世界各国均有流行。随着各国之间引进种猪的不断增多,血清型也趋于复杂。一些国家或地区存在多个血清型同时流行,甚至同一猪场内还可能不存在不同血清型。我国目前已发现并分离到血清型有1、2、3、4、5、7、8和15等多种血清型,主要流行血清型有1、3、5和7型。

[0006] 目前,常用细菌血清型鉴定方法主要有血凝实验、ELISA法、PCR法等,其中血凝法和PCR法最为常用。但是从细菌分离培养到纯化及DNA提取至少需要3-4天才能做出初步鉴定,不仅费时费力,结果也不准确,而且敏感性差,容易产生假阳性的结果,不利于养殖户和规模化企业采取相应的血清型疫苗和药物来进行及时的治疗。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于：提供一种适于猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测方法，本方法操作简便、省工省时，可以一次检测三种目的基因，为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌临床菌株的血清定型及检测提供技术支持和理论基础。

[0008] 在上述检测方法的基础上，相应提供了猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测的试剂盒，以及所述检测方法在猪接触性传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三种血清型细菌中的单个或多个混合感染的样品检测中的应用。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的：

[0010] 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的三重PCR检测方法，包括以下步骤：

[0011] (1) 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型临床菌株的DNA提取；

[0012] (2) PCR产物扩增：扩增体系的建立，在PCR试剂管中加入反应液，反应液包括10×PCR buffer的PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs以及2型、3型和6型三对特异性引物，以步骤(1)提取的DNA为模板，反应液总体积为50μl，扩增体系的具体组成如下：

组成成分	加入体积数	最终浓度
10×PCR buffer	5μl	1×PCR buffer
MgCl <sub>2</sub>	6μl	25mM
dNTPs	1μl	10mM
Ap2F	2.5μl	5mM
Ap2R	2.5μl	5mM
Ap3F	3μl	5mM
Ap3R	3μl	5mM
Ap6F	2μl	5mM
Ap6R	2μl	5mM
Taq	0.25μl	
H <sub>2</sub> O	17.75μl	

[0015] 其中的三对特异性引物如下：

[0016]

菌种	引物名称	引物序列
2 型	Ap2F	AGTATCCGATACTCACGATTCAT
	Ap2R	GGATTAGCCAAACGCCATTCTC
3 型	Ap3F	TTTCGCGACTAGTGCTGGATA
	Ap3R	TTCAAATAATCTTGCTCGAATCTT
6 型	Ap6F	TTGCACTCACAAACCACATTAC
	Ap6R	AATCCGATGCTTATGGTCTCGTC

[0017] (3) 扩增产物检测:将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统下观察结果。

[0018] 所述猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型临床菌株的DNA提取,包括以下步骤:

[0019] ①刮取固体培养基表面的菌落,收集到干净的离心管中;

[0020] ②加入1.5ml裂解液,裂解液的组成为:0.15mol/L的NaCl,0.1mol/L的Na<sub>2</sub>EDTA,15mg/ml的溶菌酶,pH=8.0;

[0021] ③37℃水浴30min;

[0022] ④加入230μl无水乙醇,温和翻转离心管混合均匀,离心;

[0023] ⑤将步骤4中的溶液和絮状物一起倒入DNA置于收集管的吸附柱中,室温放置2min;

[0024] ⑥12000rpm离心1min,弃去收集管,将DNA吸附柱放入另一干净的收集管中;

[0025] ⑦在DNA吸附柱中加入500μl Buffer,Buffer中酚、氯仿、异戊醇的体积比为25:24:1,室温放置2min,12000离心1min,弃去收集管,将DNA吸附柱放入另一干净的收集管中;

[0026] ⑧在DNA吸附柱中加入500μl Buffer醋酸钠,12000离心1min,弃废液,将DNA吸附柱放回收集管中;

[0027] ⑨重复步骤8;

[0028] ⑩12000rpm离心2min;将DNA吸附柱转入1.5ml离心管中,向硅胶膜的中央加50μl pH≥7.0的去离子水,将1.5ml离心管的盖子扣在DNA吸附柱上,做好标记,去除DNA吸附柱的盖子;室温放置2min,12000rpm离心1min,离心结束后再加入50μl pH≥7.0的去离子水;重复此步骤;

[0029] 其中PCR扩增时的扩增程序如下:95℃预变性3min,94℃变性1min,56℃退火1min,72℃延伸1min,33个循环后72℃延伸10min。

[0030] 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清3型、6型和2型从上到下的扩增长度分别为950bp、730bp和500bp;琼脂糖凝胶电泳时的凝胶浓度为1.5%,其中含有1%的凝胶燃料,220V电泳1h。

[0031] 试剂盒的组成包括:PCR试剂管、反应缓冲液10×PCR buffer、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs和三对特异性异物,以猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的DNA为阳性对照,以副猪嗜血杆菌的DNA为阴性对照;

[0032] 各成分的具体组成:

[0033]

组成成分	加入体积数	最终浓度
10×PCR buffer	5μl	1×PCR buffer
MgCl <sub>2</sub>	6μl	25mM
dNTPs	1μl	10mM
Ap2F	2.5μl	5mM
Ap2R	2.5μl	5mM
Ap3F	3μl	5mM
Ap3R	3μl	5mM
Ap6F	2μl	5mM
Ap6R	2μl	5mM
Taq	0.25μl	
H <sub>2</sub> O	17.75μl	

[0034] 其中的三对特异性引物如下：

[0035]

菌种	引物名称	引物序列
2 型	Ap2F	AGTATCCGATACTCACGATTCAT
	Ap2R	GGATTAGCCAAACGCCATTCTC
3 型	Ap3F	TTTCGCGACTAGTGCTGGATA
	Ap3R	TTCAAATAATCTTGCTCGAATCTT
6 型	Ap6F	TTGCACTCACAAACCACATTAC
	Ap6R	AATCCGATGCTTATGGTCTCGTC

[0036] 所述的PCR检测方法在检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三种细菌中的一种或多种混合感染样品中的应用。

[0037] 本发明的积极有益效果(优点)：

[0038] 本发明提供了一种能同时检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的三重PCR检测方法,该方法能快速、准确的检测出猪传染性胸膜肺炎放线杆菌,可对猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的单个样品检测,也可对血清2型、3型和6型的同时检测,可用于猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清型普查、分子流行病学调查及疫苗筛选和检测。

[0039] 本发明的方法是建立在分子生物学基础上的,检测中提供了阴性和阳性对照,大大提高了血清定型的准确度,降低假阳性的出现几率,特异性较强。

[0040] 本发明的三重PCR检测方法不仅具有单个PCR的特异性、敏感性、准确性,而且可以在一个反应体系里同时扩增三份DNA样本的不同目的基因片段,省时省力,使原来需要做三次PCR和三次电泳的检测,现在一次就可以完成,传统的单一PCR方法检测时间一般2-3天,该三重PCR方法将检测时间缩短至1天,大大提高了工作效率。

[0041] 本发明特别适合于猪接触性传染性胸膜肺炎放线杆菌混合感染的大量临床样本

的快速诊断,可以为临床和科研上这三种血清型的疾病防治和治疗提供科学依据,而且对提高猪接触性传染性胸膜肺炎放线杆菌的检测、监控、血清定型、疫苗筛选和耐药性检测机动物源性食品的安全具有重要意义。

### 附图说明

[0042] 图1为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR扩增产物与单一PCR扩增产物的对比图。

[0043] 图中1和18号泳道为DL2000DNA Marker,2号和17号泳道为三重PCR,可同时把血清2型、3型和6型区分开,分别为950bp、730bp和500bp;3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16号泳道为单重PCR,每次只能检测一种血清型,其中5、6、11、12、13号泳道为血清3型,7、8、9、10号泳道为血清6型,3、4、14、15、16号泳道为血清2型。

[0044] 具体实施方法

[0045] 以下通过实施例进一步说明本发明。文中的百分含量,如没有特别说明均指重量百分比。

[0046] 实施例1:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的三重PCR检测方法,包括以下步骤:

[0047] (1)猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型临床菌株的DNA提取:

[0048] ①刮取固体培养基表面的菌落,收集到干净的1.5ml离心管中;

[0049] ②加入1.5ml裂解液(裂解液组成为:0.15mol/L的NaCl,0.1mol/L的Na<sub>2</sub>EDTA,15mg/ml的溶菌酶,pH=8.0)。

[0050] ③37°C水浴30min。

[0051] ④加入230μl无水乙醇,温和翻转离心管10次混合均匀,避免产生大量泡沫,简短离心,去除离心盖上的液体;

[0052] ⑤将步骤4中的溶液和絮状物一起倒入或者用移液器转入DNA吸附柱(置于收集管)中,室温放置2min;

[0053] ⑥12000rpm离心1min,弃收集管,将DNA吸附柱放入另外一个干净的收集管中;

[0054] ⑦在DNA吸附柱中加入500μl Buffer,Buffer中酚、氯仿、异戊醇的体积比为25:24:1,室温放置2min,12000rpm离心1min,弃收集管,将DNA吸附柱放入另外一个干净的收集管中;

[0055] ⑧在DNA吸附柱中加入500μl Buffer醋酸钠,12000rpm离心1min,弃废液,将DNA吸附柱放回收集管中;

[0056] ⑨重复步骤8;

[0057] ⑩12000离心2min;将DNA吸附柱转入1.5ml离心管中,向硅胶膜的中央加50μl去离子水(pH≥7.0),将1.5ml离心管的盖子扣在DNA吸附柱上,做好标记,去除DNA吸附柱的盖子;室温放置2min,12000离心1min,离心结束后再加入50μl去离子水(pH≥7.0)重复此步骤;

[0058] (2)PCR产物扩增:在PCR试剂管中加入10×PCR buffer的PCR反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs和2型、3型和6型三对特异性异物、模板DNA,反应液的总体积为50μl,体系组成如下:

[0059]

组成成分	加入体积数	最终浓度
10×PCR buffer	5μl	1×PCR buffer
MgCl <sub>2</sub>	6μl	25mM
dNTPs	1μl	10mM
Ap2F	2.5μl	5mM
Ap2R	2.5μl	5mM
Ap3F	3μl	5mM
Ap3R	3μl	5mM
Ap6F	2μl	5mM
Ap6R	2μl	5mM
Taq	0.25μl	
H <sub>2</sub> O	17.75μl	

[0060] 其中三对引物是按照下述碱基序列由DNA合成仪合成的DNA片段,三对引物如下:

[0061]

菌种	引物名称	引物序列	预期扩增片段长短
----	------	------	----------

[0062]

2 型	Ap2F	AGTATCCGATACTCACGATTCAT	500bp
	Ap2R	GGATTAGCCAAACGCCATTCTC	
3 型	Ap3F	TTTCGCGACTAGTGCTGGATA	950bp
	Ap3R	TTCAAATAATCTTGCTCGAATCTT	
6 型	Ap6F	TTGCACTCACAAACCACATTAC	730bp
	Ap6R	AATCCGATGCTTATGGTCTCGTC	

[0063] (3) PCR扩增:扩增程序如下:95℃预变性3min,94℃预变性1min,56℃退火1min,72℃延伸1min,33个循环后72℃延伸10min,最后保存于4℃;

[0064] (4) PCR扩增产物的检测:三重PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶浓度为1.5%,含有1%的凝胶燃料,220V电泳1h,在凝胶成像系统下观察结果。

[0065] 实施例2:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测的试剂盒

[0066] 该试剂盒的组成包括:PCR试剂管、反应缓冲液10×PCR buffer、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA聚合酶、dNTPs、凝胶燃料、上样缓冲液和三对特异性引物,以猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型的DNA为阳性对照,以副猪嗜血杆菌的DNA为阴性对照;

[0067] 各成分的具体组成:

[0068]

组成成分	加入体积数	最终浓度
10×PCR buffer	5μl	1×PCR buffer
MgCl <sub>2</sub>	6μl	25mM
dNTPs	1μl	10mM



Ap2F	2.5 $\mu$ l	5mM
Ap2R	2.5 $\mu$ l	5mM
Ap3F	3 $\mu$ l	5mM
Ap3R	3 $\mu$ l	5mM
Ap6F	2 $\mu$ l	5mM
Ap6R	2 $\mu$ l	5mM
Taq	0.25 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	17.75 $\mu$ l	

[0069] 其中三对引物按照下述碱基序列由DNA合成仪合成的DNA片段,引物如下:

[0070]

菌种	引物名称	引物序列	预期扩增片段长短
2 型	Ap2F	AGTATCCGATACTCACGATTCAT	500bp
	Ap2R	GGATTAGCCAAACGCCATTCTC	
3 型	Ap3F	TTTCGCGACTAGTGCTGGATA	950bp
	Ap3R	TTCAAATAATCTTGCTCGAATCTT	

[0071]

6 型	Ap6F	TTGCACTCACAAACCACATTAC	730bp
	Ap6R	AATCCGATGCTTATGGTCTCGTC	

[0072] 以上仅为本发明的较佳实例,凡依本发明申请专利范围所做的等同变化与修饰,皆属于本发明的保护范围。

		SEQUENCE LISTING	
[0001]			
[0002]	<110>	河南省农业科学院畜牧兽医研究所	
[0003]	<120>		
[0004]		一种猪传染性胸膜肺炎放线杆菌血清2型、3型和6型三重PCR检测方法、试剂	
[0005]		盒及其应用	
[0006]	<130>	PCR检测方法	
[0007]	<160>	6	
[0008]	<170>	PatentIn version 3.5	
[0009]	<210>	1	
[0010]	<211>	23	
[0011]	<212>	DNA	
[0012]	<213>	人工序列	
[0013]	<400>	1	
[0014]		agtatccgat actcagcatt cat	23
[0015]	<210>	2	
[0016]	<211>	22	
[0017]	<212>	DNA	
[0018]	<213>	人工序列	
[0019]	<400>	2	
[0020]		ggattagcca aacgccattc tc	22
[0021]	<210>	3	
[0022]	<211>	21	
[0023]	<212>	DNA	
[0024]	<213>	人工序列	
[0025]	<400>	3	
[0026]		tttcgcgact agtgctggat a	21
[0027]	<210>	4	
[0028]	<211>	24	
[0029]	<212>	DNA	
[0030]	<213>	人工序列	
[0031]	<400>	4	
[0032]		ttcaaataat cttgctcgaa tctt	24
[0033]	<210>	5	
[0034]	<211>	22	
[0035]	<212>	DNA	
[0036]	<213>	人工序列	
[0037]	<400>	5	

---

[0038]	ttgcactcac aaaccacatt ac	22
[0039]	<210> 6	
[0040]	<211> 23	
[0041]	<212> DNA	
[0042]	<213> 人工序列	
[0043]	<400> 6	
[0044]	aatccgatgc ttatggtctc gtc	23

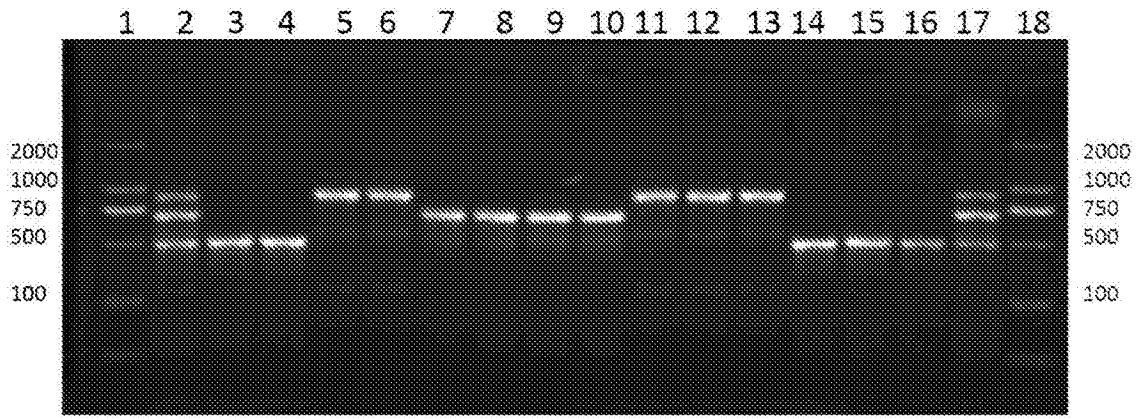


图1