

西昌某牛场疑似牛支原体肺炎 RT-PCR 方法的诊断

尹灿友

(西昌市西乡乡畜牧兽医站, 四川 西昌 615013)

【摘要】应用 RT-PCR 方法对西昌市某牛场采集的 2 份疑似牛支原体肺炎鼻腔拭子进行检测, 结果显示, 两份样品均扩增出预期大小(300bp)的 DNA 片段。将其纯化回收、克隆、测序, 结果表明, 两份样品均与 GenBank 中牛支原体(*Mycoplasma bovis*) 16SrRNA 序列(GenBank 登录号: AF332754) 同源性为 99%; 牛支原体可能是导致牛发生肺炎的原因之一。

【关键词】牛支原体; RT-PCR; 诊断

【中图分类号】S858.236.3 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2010)01-0022-02

近年来, 我国部分地区肉牛发生以坏死性肺炎为主要特征的呼吸道传染病, 病牛出现咳嗽, 食欲不振, 消瘦等症状, 有的病牛出现继发性关节炎或腹泻^[1,2]。西昌市西乡乡某牛场发生类似临床症状, 本试验采样为该牛场发生肺炎的 2 例病牛和 2 头临床健康牛鼻腔棉拭子, 采用 RT-PCR 方法对样品进行了牛支原体检测, 其报告如下。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品采自西昌市某牛场, 共采集 4 份, 全部为鼻腔棉拭子。其中, 2 份肺炎病牛样品, 2 份临床健康牛样品。

1.2 酶、试剂和主要仪器

病毒 RNA 提取试剂盒、逆转录酶为罗氏公司产品; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体以及限制性内切酶均购自大连宝生物公司; DNA 纯化试剂盒 SpinPrep Gel DNA Kit 为 Novagen 公司产品; 其他为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 引物合成

根据 NCBI 上公布的支原体 16S rRNA 核酸序列, 参考文献[3]合成检测用引物-上游引物 P1: 5'-TATTATTTTTGCATGAAAGTAATAT-3'; 下游引物 P2: 5'-CGTCAAGGTAGCATCATTTTC-3'。提交上海生工合成。

1.3.2 RNA 提取

样品 RNA 提取按罗氏公司 RNA 提取试剂盒进行。

1.3.3 RT-PCR 反应

以上述提取的总 RNA 做模板, 超纯水为模板作为空白对照进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 反应体系为 50 μ L: 模板 6 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, r-taq 1.2 μ L, HPR-I 1 μ L, MLV 0.5 μ L, 上游引物 P1 (20 μ M)

2 μ L, 下游引物 P2 (20 μ M) 2 μ L, Rnase free H₂O 28.3 μ L。扩增程序为: 42 $^{\circ}$ C 40min; 95 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 35 cycles; 72 $^{\circ}$ C 7min。

取 4 μ L 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测扩增结果。

1.3.4 RT-PCR 产物克隆及测序

RT-PCR 产物采用 SpinPrep Gel DNA Kit 回收, 具体步骤参照该试剂盒进行。将纯化回收产物连接至 pMD18-T 载体, 连接体系如下:

pMD18-T Vector	1 μ L
PCR 扩增产物	1 μ L
ddH ₂ O	3 μ L
Solution I	5 μ L
总体积	10 μ L

16 $^{\circ}$ C 连接 3 小时以上, 取 1 μ L 连接反应液转化至大肠杆菌 DH5 α , 转化菌铺固体 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 取单菌落白斑接种至液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 提取质粒, 酶切鉴定为阳性的质粒送上海生工测序。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

两份病牛鼻腔拭子经 RT-PCR 扩增出预期约 300bp 片段, 临床健康牛及空白对照无条带出现, 具体见图 1。

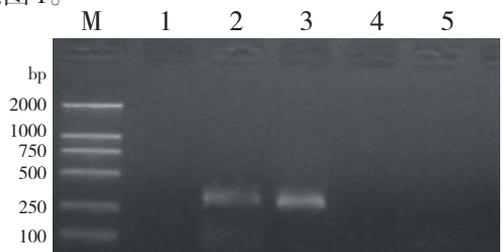


图1 牛支原体 RT-PCR 扩增结果

M 为 DNA Marker; 1 为空白对照; 2, 3 为病牛棉拭子样品; 4, 5 为健康牛棉拭子样品。

2.2 DNA序列比对结果

将两样品中的扩增产物克隆、测序,得到的序列利用NCBI BLAST,结果显示,两序列与GenBank中牛支原体(*Mycoplasma bovis*) 16SrRNA序列(GenBank登录号:AF332754)同源率为99%以上。

3 讨论

牛支原体最早在1961年被鉴定为致乳腺炎的病原^[4],现在被认为是育肥牛、青年奶牛与犊牛呼吸道疾病与多发性关节炎的重要病因。牛支原体除了导致牛急性呼吸系统疾病外,还可导致持续性的慢性感染,以慢性支气管炎伴有肺干酪样或凝固性坏死病变为主。牛支原体常与细菌、病毒协同作用,环境因子如天气、通风不良、过度拥挤、运输等

将加剧病情。

患有牛支原体的病牛可通过鼻腔分泌物排出牛支原体,健康牛可通过近距离解除病牛而感染发病。牛支原体在环境中存活力差,但在无阳光情况下可存活数天,如4℃下可在海绵中或牛奶中存活2个月,或水中存活2周以上;20℃存活1~2周,或37℃存活1周。粪便中可存活37d。常规消毒剂均可达到消毒目的^[5,6]。

本实验采用RT-PCR方法对采集的患肺炎病牛和健康牛鼻腔棉拭子样品进行了牛支原体核酸序列检测,将得到的序列与NCBI上进行比对证明所得序列与牛支原体具有很高的同源性,患病牛发生肺炎与该牛感染牛支原体存在一定关系。

注释及参考文献:

- [1]石磊,龚瑞,尹争艳.肉牛传染性牛支原体肺炎流行的诊断[J].华中农业大学学报,2008,27(5):629-633.
- [2]陈继明主编.重大动物疫病监测指南[M].北京:中国农业科学技术出版社,2008.
- [3]Cai H, Bell R, Rogers P, Parker L, et al. Development of a real time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples[J]. J Vet Diagn Invest, 2005, 17(6): 537-545.
- [4]CASWELL J L, ARCHAMBAULT M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. Anim Health Rev, 2007,8(2): 161-186.
- [5]辛九庆,李媛,郭丹,等.国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J].中国预防兽医学报,2008,30(9):661-664.
- [6]毕丁仁,王桂芝.动物霉形体及研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.

Using RT-PCR to Diagnose the Suspected *Mycoplasma Bovis* Pneumonia of Cows on a Farm in Xichang

YIN Can-you

(Xixiang Animal Medication Station, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: By using RT-PCR to test two suspected *mycoplasma bovis* pneumonia swab samples collected from the nose of a cow on a farm in Xichang, the result shows that both two samples enlarge and increase a DNA fragment with participated size (300bp). By purifying and recovering it, cloning it and testing its order, the result shows that the homology of two samples with the 16SrRNA series of *mycoplasma bovis* in GenBank (GenBank passwords: AF332754) is 99%. *Mycoplasma bovis* is likely to be one of the reasons to cause cow's pneumonia.

Key words: Pneumonia of cows; RT-PCR; Diagnosis