

致犊牛肺炎和关节炎牛支原体新疆株的分离与鉴定

姚永进¹, 剡根强¹, 王静梅¹, 范伟兴², 李岩³

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032;

3. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:自2010年7月以来,新疆北疆部分地区某些奶牛场犊牛陆续出现严重的肺炎和关节炎,为确定其病原,无菌采集8个牛场病死犊牛的肺脏和关节液,患病犊牛的血清和部分鼻拭子,病料接种筛选培养基,通过菌落形态观察、特异性PCR鉴定、生长抑制试验和血清学检测,确定牛支原体15株,其中7株牛支原体克隆测序,与PG45 OPPF基因同源率为97.32%~100.00%。牛支原体ELISA试剂盒检测92份血清显示,阳性率82.61%。结果表明,该地区奶牛场发病犊牛以牛支原体感染为主。

关键词:犊牛;肺炎;关节炎;牛支原体;分离;鉴定

中图分类号:S852.62

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2011)12-0076-03

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)主要引起犊牛肺炎、关节炎和奶牛乳房炎。牛支原体已经在欧美的很多国家流行,引起牛呼吸道疾病并造成严重经济损失(Nicholas等,2003)。辛九庆等(2008)在患肺炎犊牛的肺脏中分离到牛支原体,首次证实国内部分地区存在牛支原体的流行。冉智光等(2010)又从患严重肺炎和关节炎的引进肉牛中分离出牛支原体,进一步证实中国部分地区牛支原体感染已经严重影响养牛业的发展。自2010年7月以来,新疆石河子、奎屯等某些规模化奶牛场部分犊牛陆续发生一种以高热,呼吸道症状,胸膜肺炎和膝关节肿大为特征的疾病,发病率为35%~40%,病程长,犊牛生长缓慢,采用多种抗生素治疗,有一定效果,但常复发,病死率为5%~10%;该病主要发生于6月龄内犊牛,其中以1~2月龄多发。据调查,已有8个牛场出现病例,并有上升趋势。为查明病原,采集病死犊牛病料,通过实验室诊断,确定病原为牛支原体,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 样品和试剂 采集新疆石河子8个奶牛场表现严重肺炎犊牛的血清92份和鼻拭子24份,病死犊牛肺脏病料4份和关节液3份。牛支原体阳性基因组DNA由中国动物卫生与流行病学中心惠赠,

绵羊肺炎支原体Y98由石河子大学预防兽医学实验室保存。DNA胶回收试剂盒、Ex Taq酶和dNTPs购自天根生化科技(北京)有限公司;pMD19-T购自TaKaRa公司;牛支原体ELISA试剂盒购自比利时Bio-X公司,中国动物卫生与流行病学中心提供。

1.2 培养基 选用牛源支原液体筛选培养基和1%琼脂固体筛选培养基。胎牛血清为无支原体血清,购自北京鼎国生物公司。

1.3 病原的分离

1.3.1 鼻拭子的采集与处理 用75%酒精棉球对有咳嗽、流鼻涕症状犊牛鼻腔外侧消毒,将灭菌的棉拭子插入鼻腔深部,转动5圈取出,将拭子头部剪下分别放入1管液体筛选培养基中,置8% CO₂培养箱培养48 h,盲传1次,3~5 d培养基变为橙黄色且清亮,用0.1 mol/L PBS以1:10、1:30、1:50稀释,接种固体培养基培养,待出现典型菌落时,用手术刀挑单个菌落,接种液体培养基,重复克隆纯化3次,观察生长情况及菌落特征。将液体培养物冻存于-80℃,备检。

1.3.2 肺脏的处理 将采集的肺组织表面火焰灭菌,取深部组织一小块,将其剪碎放入液体筛选培养基培养,纯化方法同上。

1.3.3 关节液的采集与处理 对关节肿大且皮肤无损伤的犊牛关节部剪毛,75%酒精棉球消毒,将2 mL灭菌肉汤注入关节肿大部,反复抽吸3次,抽出关节液,放入灭菌的青霉素小瓶,将其同时接种液体和固体培养基培养,纯化方法同上。

1.4 特异性PCR鉴定

收稿日期:2011-05-05

作者简介:姚永进(1985-),男,陕西人,硕士生,主要从事动物传染病的诊断与防治。

通信作者:剡根强(1958-),男,甘肃人,博士生导师,主要从事动物传染病与免疫学研究。E-mail: ygq58@shzu.edu.cn

1.4.1 模板的制备 将纯化的菌株接种 2 mL 液体培养基,置 8% CO₂ 培养箱 37 °C 培养 5 d,2 mL 培养物以 16000 r/min 离心 20 min 弃上清,用 0.1 mol/L PBS 反复冲洗 2 次,将沉淀加入 50 μL PBS 置于沸水中煮沸 10 min,立即冰浴,作为 DNA 模板。

1.4.2 PCR 反应 参考李大伟等(2011)检测牛支原体特异性序列合成引物。引物序列为:P1:5'-CGTTATGCAAGATTAATACTTACGAC-3', P2:5'-TGAAAACCTTCTCAGCATTAGCC-3',预计扩增片段长度为 448 bp,引物由上海生工合成。

PCR 反应体系 25 μL:模板 3 μL,P1、P2 各 0.5 μL(10 μmol/L),dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL,10× Buffer 2.5 μL,Taq 酶 0.5 μL(2.5 U/μL),ddH₂O 16 μL。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min;4 °C 条件下保存。

1.5 目的基因的克隆与鉴定 使用胶回收试剂盒回收 PCR 产物,将胶回收产物与 pMD19-T 载体连接,连接产物转化至 DH5α 感受态细胞中,以 PCR 扩增鉴定重组质粒,命名为 pMD-OPP F。将 7 株分离株目的基因克隆阳性菌送北京六合华大基因公司测序。

1.6 序列分析 用 DNASTar 软件对 OPP F 基因序列分析,将 7 株支原体与国际标准株 PG45 进行同源比对。

1.7 生长抑制试验 牛支原体犊牛阳性血清和阴性血清由牛支原体 ELISA 试剂盒检测确定,试验方法参照吴移谋等(2008)。

1.8 血清学检测 采集 92 份犊牛(6 月龄以内)血清,按照牛支原体 ELISA 试剂盒说明书操作。

2 结果与分析

2.1 病原的分离 在 3 份肺脏病料、3 份关节液和 15 份鼻拭子病料中分离到支原体,它们在接种培养基 3~5 d 开始变为橙黄色,培养基清亮,将培养物接种固体培养基培养 3 d 后,出现针尖大的菌落,第

5 天在光学显微镜下看到菌落呈典型的“煎蛋样”形态(图 1),其余病料在培养 24~48 h 后,颜色变黄浑浊,将其通过 0.45 μm 超滤膜过滤,继续接种培养基培养,没有分离到支原体。



图 1 分离菌株的菌落形态(40×)

2.2 PCR 鉴定 以牛支原体特异性引物检测 21 株支原体和 *M. bovis* 阳性 DNA,15 株支原体扩增出约 448 bp 的片段,与预期的扩增片段相符,而阴性对照 Y98 未见特异性条带(图 2)。

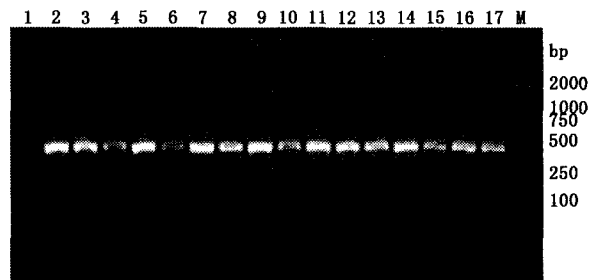


图 2 牛支原体分离株 PCR 扩增结果

注:1 为绵羊肺炎支原体 Y98;2 为 *M. bovis*;3~5 为肺源分离株;6~8 为关节液分离株;9~17 为鼻拭子分离株;M 为 DL2000 DNA Marker。

2.3 测序结果分析 7 个重组质粒测序结果表明,目的片段长度均为 448 bp,7 株分离株之间同源率为 96.65%~100.00%,与 PG45 同源率为 97.32%~100.00%。分离株与 PG45 OPP F 基因系统进化树见图 3。

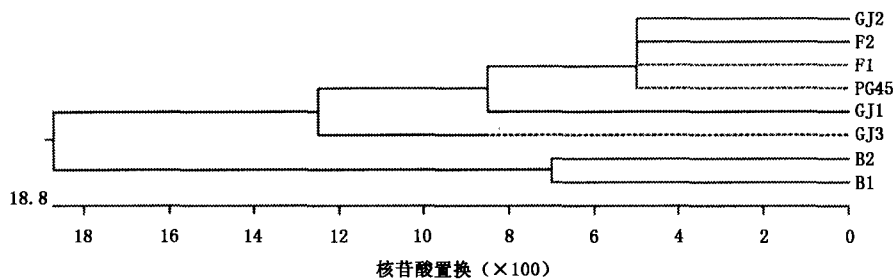


图 3 牛支原体 OPP F 基因系统进化树

2.4 生长抑制试验结果 15 株支原体阳性血清滤

纸片周围均出现大于 2 mm 的抑菌圈,证明牛支原

体阳性血清可抑制牛支原体分离株的生长,而阴性血清滤纸片周围没有出现抑菌圈。

2.5 ELISA 检测结果 按照牛支原体 ELISA 试剂盒说明书的判定方法,被检血清 92 份中,血清抗体阳性数为 76 份,阳性率为 82.61%。

2.6 抗体阳性犊牛鼻拭子牛支原体检测结果 对 19 头抗体阳性犊牛的鼻拭子支原体检测结果为 9 头分离到牛支原体,两者符合率为 47.37%。

3 讨论

3.1 牛支原体的流行情况 1961 年首次在美国患有乳房炎的病牛中分离到牛支原体(Hale 等, 1962),由于其有多重耐药性,没有有效疫苗预防,已经给欧洲和北美养牛业造成了很大的经济损失。有报道称,牛支原体入侵牛场 2 周,会引起全群流行(Allen 等,1992),其主要引起慢性疾病,发病率很高,但致死率却很低(Dorothy, 2006)。在牛慢性肺炎和关节炎综合症(CPPS)中,牛支原体很可能是一种机会性侵入菌,只有在其他病原体存在下,才有可能发生 CPPS(Gagea 等,2006)。本研究通过对感染犊牛群血清的牛支原体 ELISA 检测也证明,具有呼吸道症状犊牛的抗体阳性率为 82.61%(76/92),且抗体阳性犊牛鼻拭子牛支原体的检出率为 47.37%(9/19)。另据马晓菁等(2010)在 2009 年从同一地区 2 个犊牛肺炎发病牛场死亡犊牛病料中分离到 4 株荚膜血清 A 型多杀性巴氏杆菌,并证明分离株对试验动物有很强的致病性,采用分离株制备灭活佐剂菌苗免疫犊牛后,可明显降低犊牛死亡率,进一步验证牛支原体及荚膜血清 A 型多杀性巴氏杆菌均是引起该地区犊牛肺炎的病原体,而后者可能是造成犊牛死亡率高的主要原因。

3.2 牛支原体的 PCR 诊断方法 针对 16S rRNA 基因的 PCR 可以将牛支原体与丝状支原体区别开,但是牛支原体与无乳支原体(*M. agalacia*)曾同属一个种,两者亲缘关系很近,16S rRNA 基因同源性很高,即使测序也很难区分。序列比较显示编码牛支原体和无乳支原体寡肽膜透酶(OPP)的基因差异较大(冉智光等,2010)。有研究报道,使用牛支原体 OPP F 基因特异性引物只能扩增出牛支原体的特异片段,不但可以与丝状支原体丝状亚种鉴别,也可以用于牛支原体与无乳支原体的鉴别(Rifatbegovic 等,2007)。OPP D/F 基因序列分析显示,*M. bovis* PG45 株与 *M. agalacia* PG2 株同源率为 77%。此

次牛支原体的感染发生在自繁自养的奶牛场,而国内的报道显示出与长途运输有一定相关性。国内其他省份牛支原体分离株与新疆的分离株遗传上是否有差异,还有待进一步研究。

4 小结

通过对发病犊牛肺脏及关节炎病料牛支原体分离培养、分离株特异性 PCR 鉴定、菌落生长抑制试验及特异性抗体 ELISA 检测,结果表明,牛支原体是致新疆北疆 8 个规模化奶牛场犊牛肺炎及关节炎的病原之一。但由于国内尚未报道牛支原体分离株的人工感染结果,有关牛支原体是否为致犊牛肺炎和关节炎的原发性病原,还是引起继发感染或混合感染的病原,致犊牛肺炎牛支原体的毒力及致病机理等还有待进一步研究。本研究首次在新疆分离出牛支原体,证实牛支原体已在新疆流行,为其诊断和病原学研究奠定基础。

参 考 文 献

- 1 马晓菁,王静梅,剡根强. 犊牛肺炎多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报,2010,30(9):1193~1196.
- 2 冉智光,谢建华,骆璐,等. 我国部分地区牛支原体肺炎和关节炎的病原体诊断[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(1):40~43.
- 3 李大伟,黄灿平,张彦明,等. 牛支原体、无乳支原体和丝状支原体丝状亚种小克隆三重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(2):306~310.
- 4 辛九庆,李媛,郭丹,等. 国内首次从患肺炎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.
- 5 吴移谋,叶元康. 支原体学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008, 320~323.
- 6 Allen J W, Viel L, Bateman K G, et al. Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory diseases[J]. Can J Vet Res, 1992, 56:177~183.
- 7 Dorothy E K. Chronic pneumonia and polyarthritis syndrome in a feedlot calf[J]. Can Vet J, 2006, 47:1019~1021.
- 8 Gagea M, Bateman K, van Dreumel A, et al. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots[J]. J Vet Diag Invest, 2006, 18:18~28.
- 9 Hale H H, Helmboldt C F, Plastring W N, et al. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species [J]. Cornell Veterinarian, 1962,52: 582~591.
- 10 Nicholas R A J, Ayling R D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control [J]. Veterinary Science, 2003, 74: 105~112.
- 11 Rifatbegovic M, Assuncao P, Poveda J B, et al. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina[J]. Vet Rec, 2007, 160:484~485.

噬菌体展示技术及其在动物病毒学中的应用

高顺平, 吴国华, 张强

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室,
甘肃省生物检测工程技术研究中心, 甘肃兰州 730046)

摘要: 文章介绍了噬菌体展示技术的基本原理, 分别阐述了单链丝状噬菌体、 λ 噬菌体、T4噬菌体及 T7噬菌体展示系统的特点和用途, 综述了近年来该技术在动物病毒学中的应用并对其发展前景进行了展望。

关键词: 噬菌体展示技术; 动物病毒学; 应用

中图分类号: Q782

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2011)12-0079-05

1985年Smith等将编码EcoR I核酸内切酶的部分基因片段插入到丝状噬菌体fd的基因III中, 使目的基因编码的多肽以融合蛋白的形式表达并展示于噬菌体表面, 表达产物具有较高的生物学活性, 并能被EcoR I核酸内切酶抗体有效中和, 说明以融合蛋白形式表达的酶分子与天然酶分子有着极其相似的构象和活性。这一试验的成功标志着噬菌体展示技术的诞生。

噬菌体展示技术的优点主要有以下几个方面:

①这项技术将表型和基因型统一在同一个噬菌体中, 使研究者能在基因水平上实现对表型的控制; ②噬菌体展示单个文库就能包括数量庞大的可变肽段, 并可根据需要对其进行筛选; ③噬菌体展示的多肽可在很大程度上保持蛋白质原有的空间构象, 有利于研究依赖空间构象发挥作用的蛋白质。文章对噬菌体展示技术发展至今所出现的几种主要展示系统进行了总结, 并综述了该技术在动物病毒学研究中的重要应用, 以期能给相关的研究人员提供参考。

1 噬菌体展示技术的基本原理

噬菌体展示技术的基本原理是利用基因工程技术将蛋白质或多肽的编码基因或基因片段插入到噬菌体表面蛋白基因中, 在阅读框正确且不影响表面蛋白正常功能的条件下, 使蛋白质或多肽以融合蛋白的形式表达并展示在噬菌体表面。被展示的蛋白质或多肽可保持相对独立的空间结构和生物活性,

收稿日期: 2011-05-31

作者简介: 高顺平(1986-), 男, 河北人, 硕士生, 主要从事动物病毒学研究。

通信作者: 张强, 副研究员。Tel: 0931-8343725; E-mail: qzhang1616@sohu.com

基金项目: 国家自然科学基金(31001056); 甘肃省重大科技专项(092NKDA032)。

Isolation and Identification of *Mycoplasma bovis* Xinjiang Strain Inducing Pneumonia and Arthritis of Calf

YAO Yong-jin¹, YAN Gen-qiang¹, WANG Jing-mei¹, FAN Wei-xing², LI Yan³

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;

3. Production and Construction Corps Animal Husbandry and Veterinary Primal Station, Urumqi 830052, China)

Abstract: Since July 2010, a serious pneumonia and arthritis occurred in the calves of some dairies in north area of Xinjiang. In order to detect the pathogen, the died calf lungs and joint fluid, the sick calf serum and some nasal swabs was collected with asepsis from 8 dairies. Add the samples was inoculated the selected material medium. The 15 *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) isolates were identified by colony morphology, specific PCR, growth inhibition test (GIT) and serological test, 7 isolates were cloned and sequenced, the homology of nucleotide sequences were 97.32% to 100.00% in *OPP F* gene with PG45 strain. Furthermore, 92 serum samples were detected by ELISA, and the positive rate was 82.61%. The results indicated that the disease was primarily caused by *M. bovis*.

Key words: calf; pneumonia; arthritis; *Mycoplasma bovis*; isolation; identification