

# 鸭疫里默氏菌病和大肠杆菌病鉴别诊断 双重 PCR 方法的建立和应用

覃宗华<sup>1,2</sup>, 蔡建平<sup>1,2\*</sup>, 吕敏娜<sup>1,2</sup>, 余劲术<sup>1,2</sup>, 吴彩艳<sup>1,2</sup>, 温列娜<sup>1,2</sup>, 谢明权<sup>1,2</sup>

(1. 广东省农业科学院兽医研究所, 广州 510640; 2. 广东省兽医公共卫生实验室, 广州 510640)

**摘要:** 本研究从鸭疫里默氏菌提取基因组 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物, 用 PCR 方法成功扩增出鸭疫里默氏菌的部分 16S rRNA 基因, 克隆及测序结果表明其全长 1 512 bp, G+C 含量为 51%, 该序列已登入 GenBank, 登录号为 DQ078779。同时利用生物软件对 GenBank 收录的鸭疫里默氏菌和大肠杆菌的 16S rRNA 基因序列进行分析后, 设计了鸭疫里默氏菌和大肠杆菌的种特异性引物, 分别能从各自的 16S rRNA 基因中扩增出长度为 342 和 718 bp 的 DNA 片段。并据此建立了一种能快速准确鉴别诊断鸭疫里默氏菌和大肠杆菌病的双重 PCR 方法, 该方法能从肝脏组织悬液煮沸后的上清、细菌培养物或提取的细菌基因组 DNA 中快速扩增出相应的片段, 进行鉴别诊断。

**关键词:** 鸭疫里默氏菌; 大肠杆菌; 16S rRNA; 鉴别诊断

中图分类号: S852.61<sup>+</sup>8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)04-0517-05

## Establishment and Application of Dulex PCR Assay for Differentiating *Riemerella anatipestifer* and *Escherichia coli* Infection in Ducks

QIN Zong-hua<sup>1,2</sup>, CAI Jian-ping<sup>1,2\*</sup>, LÜ Min-na<sup>1,2</sup>, YU Jin-shu<sup>1,2</sup>, WU Cai-yan<sup>1,2</sup>,  
WEN Lie-na<sup>1,2</sup>, XIE Ming-quan<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of  
Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Guangdong Key Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In this study, partial sequence of *Riemerella anatipestifer* 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the bacteria 16S rRNA gene universal primers, which its length was 1 512 base-pair (bp) and it has been recorded in GenBank and named as DQ078779. The BLAST analysis indicated that DQ078779 was the most similarity with reported 16S rRNA gene of *R. anatipestifer*. Moreover, species-specific primers were designed according to BLAST results of different 16S rRNA gene sequences of *R. anatipestifer* and *E. coli*, which 354 and 718 bp specific DNA fragment could be amplified by the two pairs of primers from *R. anatipestifer* and *E. coli*, respectively. Finally, dulex PCR with the specific primer for differentiating *R. anatipestifer* and *E. coli* infection in ducks was established, and genomic DNA or cultured bacteria or boiled liver tissue of ducks infected by *R. anatipestifer* and *E. coli* could be used as template.

**Key words:** *Riemerella anatipestifer*; *Escherichia coli*; 16S rRNA; differentiating diagnosis

鸭疫里默氏菌病是由鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*)感染引起的一种接触传染性疾病,该病主要侵害1~8周龄(尤其2~3周龄)雏鸭、雏鹅及雏火鸡等。在临床上主要以神经症状和纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎为特征,是目前造成养鸭业经济损失最为严重的传染病之一,其发病率可达90%以上,死亡率高达75%以上<sup>[1-2]</sup>。该病在临床上常与大肠杆菌呈混合感染,且二者在临床症状、病理变化及流行病学等方面都存在诸多相似的地方<sup>[3]</sup>。因此常规的诊断方法很难快速、准确地作出诊断<sup>[4]</sup>,故建立鸭疫里默氏菌病和大肠杆菌病鉴别诊断的分子生物学方法十分必要。

由于细菌16S rRNA基因分子结构上的高度保守性、分布的普遍性及其所含的大量信息,使16S rRNA基因成为了一个较为理想的用于细菌分类鉴定的靶序列。对其序列进行分析、根据序列分析结果设计种特异性引物进行PCR扩增,已被证明在细菌分类鉴定上具有重要价值<sup>[5-6]</sup>。本研究用细菌16S rRNA基因的通用引物,扩增出鸭疫里默氏菌的部分16S rRNA基因,并与GenBank中收录的鸭疫里默氏菌、大肠杆菌和其它禽源细菌性疾病病原的16S rRNA基因序列进行比对分析,选择鸭疫里默氏菌和大肠杆菌种特异性引物,通过敏感性和特异性试验,建立了快速鉴别诊断鸭疫里默氏菌和大肠杆菌感染的双重PCR方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验用菌株

鸭疫里默氏菌BL株(为血清1型)和鸭源大肠杆菌DG株(血清型O<sub>78</sub>):广东省农业科学院兽医研究所分离、鉴定并保存;鸭疫里默氏菌标准株:血清型1~10型,由新加坡国家兽医中心提供;禽源多杀性巴氏杆菌、禽副伤寒沙门氏菌:购自中国兽医药品监察所。

### 1.2 引物及其序列

根据文献<sup>[7]</sup>选择用于扩增细菌16S rRNA基因的通用引物,扩增鸭疫里默氏菌的16S rRNA基因,通用引物序列和编号如下,上游引物B16S-FOR:5'-TTAAGGAGGGATCCAGCCGC-3';下游引物B16S-REV:5'-TTCAACTAATTCCTG-GCTC-3',由上海生工生物工程公司合成。

### 1.3 分子生物学试剂及试剂盒

Premix Taq<sup>TM</sup>、DL2000; TaKaRa公司出品;

DNA胶回收试剂盒和小量质粒制备试剂盒:购自Omega公司;pGEM-T easy载体、基因组DNA提取试剂盒、DNA分子量标准及琼脂糖:购自Promega公司。

### 1.4 基因组DNA的提取

采用Promega公司基因组DNA提取试剂盒,根据说明书中不同样品基因组DNA提取的具体方法提取鸭疫里默氏菌、大肠杆菌、鸭肝脏组织、禽巴氏杆菌和沙门氏菌基因组DNA。

### 1.5 鸭疫里默氏菌BL株16S rRNA基因的克隆及序列分析

以鸭疫里默氏菌BL株基因组DNA为模板,用细菌16S rRNA基因的通用引物,利用PCR方法扩增鸭疫里默氏菌BL株16S rRNA基因。PCR扩增程序如下:94℃预变性5 min,然后进行30个循环PCR的扩增(94℃变性30 s、50℃退火1 min、72℃延伸2 min),然后72℃延伸7 min。PCR反应结束后取PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,酶切回收目的片段并与pGEM-T easy连接后转化*E. coli* JM109。经菌落PCR和限制性酶切分析均为阳性的克隆送上海生工生物工程公司测序。

### 1.6 鸭疫里默氏菌病和大肠杆菌病鉴别诊断双重PCR所用引物的设计

根据所克隆的及GenBank收录的鸭疫里默氏菌和大肠杆菌16S rRNA基因的序列,用DNAsist 1.02和Primer Premier 5.0分析,在鸭疫里默氏菌和大肠杆菌均保守的区域设计1条通用引物(RAEC-FOR),然后在各自的种内保守而种间不同的区域各设计另1条引物(RA-REV和EC-REV)与通用引物一起用于扩增种特异性片段并用于建立双重PCR诊断方法。同时对所设计的引物进行BLAST在线分析,分析所设计引物的特异性。引物序列如下,RAEC-FOR:5'-ACGTCATCCCAC-CTTCCTC-3'; RA-REV:5'-GTTCAGACTA-AGCGAAAG-3'; EC-REV:5'-TCATTGACGT-TACCCGCA-3',由上海生工生物工程公司合成。

### 1.7 PCR扩增

采用50 μL反应体系,其中Premix Taq<sup>TM</sup> 25 μL(含TaKaRa Ex Taq 1.25 U、dNTPs各0.4 mmol/L、4 mmol/L Mg<sup>2+</sup>);引物RAEC-FOR 100 pmol、引物RA-REV 50 pmol、EC-Rev 50 pmol;模板为1 μL;然后加H<sub>2</sub>O至50 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min,进行30个循环的PCR扩增

(94℃变性 30 s, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min), 最后 72℃延伸 7 min。PCR 反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外检测仪下检测结果。

### 1.8 PCR 敏感性试验

以鸭疫里默氏菌 BL 株和大肠杆菌 DG 株为参考菌株进行检测。测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>, 以确定各自基因组 DNA 含量, 用双蒸水将基因组 DNA 从 10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup> 进行 10 倍梯度稀释, 各取 1 μL 进行 PCR 扩增。确定该双重 PCR 检测方法的检测下限。同时以培养的菌液及二者人工感染鸭后 24 h 病鸭的肝脏组织研磨煮沸后直接进行 PCR 扩增, 探讨该方法的适用性。

### 1.9 PCR 特异性试验

以各血清型的鸭疫里默氏菌标准株、鸭源大肠杆菌 DG 株、禽多杀性巴氏杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和鸭肝脏组织基因组 DNA 为模板用 1.7 的 PCR 体系进行 PCR 扩增, 检测该方法的特异性。

### 1.10 PCR 方法的应用

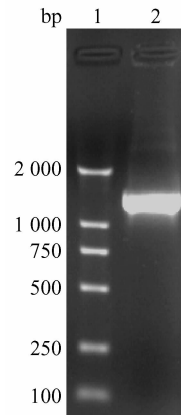
对来自不同鸭场鸭疫里默氏菌感染疑似病例(剖检具有心包炎、肝周炎和气囊炎等病变)的病鸭取肝脏进行鸭疫里默氏菌和大肠杆菌的分离鉴定<sup>[8-9]</sup>。同时, 无菌剪取部分肝脏组织, 称重, 按 10 倍量(1 g 肝脏组织加 10 mL PBS)加 PBS 研磨后煮沸 10 min, 10 000×g 离心 10 min, 取 2 μL 上清作为模板用所建立的方法进行 PCR 扩增。

## 2 结果

### 2.1 鸭疫里默氏菌 BL 株 16S rRNA 基因的克隆及序列分析

以鸭疫里默氏菌 BL 株基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示扩增出大小约为 1.5 kb 的 DNA 片段(见图 1)。PCR 产物经电泳后回收, 回收的 DNA 片段与载体 pGEM-T easy 连接后转化 *E. coli* DH5α, 经 PCR 和限制性酶切分析后的阳性克隆的测序结果显示其大小为 1 512 bp, G+C 含量为 51%。对测序结果进行 BLAST 分析, 其与已报道鸭疫里默氏菌的 16S rRNA 基因的序列同源性最高(>99%)。该序列目前已被 GenBank 收录, 登录号为 DQ078779。

### 2.2 鸭疫里默氏菌和大肠杆菌种特异性 16S rRNA 基因片段的扩增



1. DL2000(bp); 2. PCR 产物

1. DNA Marker DL2000; 2. PCR products

图 1 鸭疫里默氏菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR identification of *Riemerella anatipestifer* 16S rRNA gene

以鸭疫里默氏菌 BL 株基因组 DNA 为模板, 用种特异性引物 RAEC-For/RA-Rev 进行 PCR 扩增, 电泳分析可见 1 条约 300 bp 的 DNA 片段, 经克隆测序分析后, 其全长 354 bp, 其序列与 DQ078779 相应的序列完全一致, 与预期的 PCR 扩增结果一致。以大肠杆菌种特异性引物 RAEC-For/EC-Rev 对大肠杆菌基因组 DNA 进行扩增结果也与预期一致, 能扩增出长为 718 bp 的片段。见图 2。

### 2.3 鸭疫里默氏菌和大肠杆菌的 PCR 鉴别扩增

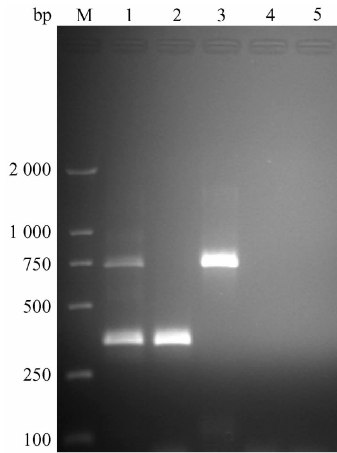
用不同的模板和引物组合进行 PCR 扩增, 结果显示以鸭疫里默氏菌和大杆菌为模板时, 二者的特异性引物能同时扩增出相应的特异性片段, 而以自己的种特异性引物扩增时, 只能扩增出相应的特异性片段, 且没有交叉反应, 说明所设计的 PCR 扩增体系和引物能有效鉴别扩增鸭疫里默氏菌(图 2)。

### 2.4 PCR 扩增的敏感性

以鸭疫里默氏菌 BL 株基因组 DNA 为模板时, 10<sup>0</sup>~10<sup>-5</sup> 倍稀释的模板呈现阳性结果, 由于模板的起始浓度约为 3.5 mg/mL, 故该双重 PCR 方法对鸭疫里默氏菌基因组 DNA 的检测下限约为 35 μg。而以大肠杆菌 DG 株基因组 DNA 为模板时, 10<sup>0</sup>~10<sup>-4</sup> 倍稀释的模板呈现阳性结果, 由于模板的起始浓度约为 0.48 mg/mL, 故该双重 PCR 方法对大肠杆菌基因组 DNA 的检测下限约为 48 μg。

### 2.5 PCR 扩增的特异性

鸭疫里默氏菌和大肠杆菌鉴别双重 PCR 体系对不同模板扩增的结果如表 1, 结果表明该体系具



M. DL2000 marker; 1. 模板: RA + EC, 引物: RAEC-FOR+RA-REV+EC-REV; 2. 模板: RA, 引物: RAEC-FOR + RA-REV; 3. 模板: EC, 引物: RAEC-FOR+EC-REV; 4. 模板: RA, 引物: RAEC-FOR+EC-REV; 5. 模板: EC, 引物: RAEC-FOR+RA-REV。其中 RA 表示鸭疫里氏杆菌基因组 DNA; EC 表示大肠杆菌基因组 DNA

M. DL2000 marker; 1. Template: RA + EC, Primers: RAEC-FOR + RA-REV + EC-REV; 2. Template: RA, Primers: RAEC-FOR+RA-REV; 3. Template: EC, Primers: RAEC-FOR+EC-REV; 4. Template: RA, Primers: RAEC-FOR+EC-REV; 5. Template: EC, Primers: RAEC-FOR + RA-REV. RA. is abbreviated from *R. anatispestifer* genomic DNA; EC. is abbreviated from *E. coli* DNA

图2 鸭疫里默氏菌和大肠杆菌 PCR 鉴别扩增结果  
Fig. 2 Differentiating *Riemerella anatispestifer* and *Escherichia coli* by PCR

特异性,不会在实际应用中引起非特异性的扩增。

## 2.6 PCR 方法的临床应用结果

对 16 份剖检变化具有明显肝周炎、心包炎和气囊炎的病死鸭的肝脏进行细菌分离和 PCR 鉴定,结果有 14 份样品细菌分离和 PCR 的鉴定结果一致,但 13 和 15 号样本没有分离到鸭疫里默氏菌和大肠杆菌,而 PCR 扩增时鸭疫里默氏菌呈阳性。PCR 方法对 16 个样品的检验结果显示,鸭疫里默氏菌和大肠杆菌感染的检测结果的阳性率分别为 81.25% (13/16) 和 37.50% (6/16),而其中有 4 个样品鸭疫里默氏菌和大肠杆菌检测结果同时呈阳性,且与细菌分离结果一致(表 2)。

## 3 讨论

16S rRNA 基因普遍存在于细菌并参与细菌的蛋白质合成过程,而且在生物进化的漫长历程中保

表 1 鸭疫里默氏菌和大杆菌鉴别双重 PCR 体系  
对不同模板的扩增结果

Table 1 Dulex PCR amplification of different samples

模板 Templates	RA*	EC*
<i>R. anatispestifer serotype</i> 1	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 2	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 3	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 4	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 5	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 6	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 7	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 8	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 9	+	-
<i>R. anatispestifer serotype</i> 10	+	-
鸭疫里默氏菌 BL 株	+	-
大肠杆菌 DG 株	-	+
禽副伤寒沙门氏菌	-	-
禽多杀性巴氏杆菌	-	-
鸭肝脏组织 DNA	-	-

\*. RA、EC 分别代表鸭疫里默氏菌或大肠杆菌特异性片段的扩增结果,表 2 同

\*. RA, EC represent amplification results of *R. anatispestifer* and *E. coli*, respectively. The same in Table 2

表 2 临床样品的细菌分离和 PCR 鉴定结果

Table 2 Bacterial isolation and PCR amplification of clinical samples

样本 Samples	细菌分离 Bacterial isolation		PCR 扩增 PCR	
	RA	EC	RA	EC
No. 1	+	-	+	-
No. 2	+	+	+	+
No. 3	-	+	-	+
No. 4	+	-	+	-
No. 5	+	+	+	+
No. 6	+	+	+	+
No. 7	-	-	+	-
No. 8	+	-	+	-
No. 9	+	-	+	-
No. 10	+	-	+	-
No. 11	-	+	-	+
No. 12	+	+	+	+
No. 13	-	-	+	-
No. 14	+	-	+	-
No. 15	-	-	+	-
No. 16	+	-	+	-

持不变,可看作为生物演变的时钟。其次,在 16S rRNA 分子中,既含有高度保守的序列区域,又有中度保守和高度变化的序列区域,因而它适用于进化距离不同的各类生物亲缘关系的研究。第三,16S rRNA 的相对分子量大小适中,约 1 540 个核苷酸,便于序列分析。因此,它可以作为测量各类生物进化和亲缘关系的良好工具<sup>[5]</sup>。16S rRNA 已被认为

是细菌分子分类和鉴定的一个重要指标,目前已有多种细菌建立基于 16S rRNA 基因分子诊断方法<sup>[10-12]</sup>。本研究根据细菌 16S rRNA 基因的通用引物,用 PCR 方法成功扩增了鸭疫里默氏菌的部分 16S rRNA 基因的序列,所克隆的序列全长 1 512 bp,通过测序及 BLAST 在线分析,结果显示所克隆的 16S rRNA 基因的序列与鸭疫里默氏菌的 16S rRNA 基因序列高度一致,核苷酸的一致性大于 99%。

细菌 16S rRNA 基因由可变区和保守区交替组成,保守区在所有细菌中高度一致,而可变区序列则因菌种的不同而有较大变化,本研究利用 16S rRNA 基因的这一特点,综合考虑扩增片段长度、碱基组成及退火温度等因素,从鸭疫里默氏菌和大肠杆菌相同的保守区设计了 1 条共用引物,而从各自的可变区设计了 2 条种特异性引物。在本试验的反应条件下分别能从鸭疫里默氏菌和大肠杆菌扩增出长度为 354 和 718 bp 的 2 个 DNA 片段,而鸭肝脏组织、沙门氏菌和禽多杀性巴氏杆菌的基因组 DNA 的扩增结果均为阴性,证实所建立的 PCR 法具有很好的种特异性。BLAST(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)同源性搜索显示,2 条种特异性引物亦具有很高的特异性,其中鸭疫里默氏菌的种特异性引物(RA-REV)与新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)的基因组 DNA 的一致性较高,而大肠杆菌的种特异性引物仅与一种未鉴定的薄壁门(Firmicutes)细菌的 16S rRNA 基因相近,而这 2 种菌均极少有机会感染鸭。此外,在双重 PCR 反应体系中,笔者将常规的 2 对引物改进为 3 条引物,在保证特异性基础之上,降低了多条引物在同一 PCR 反应体系中的相互干扰,提高了扩增效率,也降低了成本。

目前,鸭疫里默氏菌和鸭大肠杆菌是危害养鸭业的主要病原菌,而由于临床上抗菌药物的广泛使用甚至滥用,使得从感染鸭中成功分离细菌的机会很低<sup>[12]</sup>。研究中,笔者探讨了不同方法制备模板,除以试剂盒提取的细菌基因组 DNA 为模板外,还以细菌的纯培养物及人工感染鸭的肝脏煮沸后的上清为模板,均获得了特异性的结果,增强了所建立方法的实用性。用细菌分离和鉴定的传统方法以及 PCR 法对临床病料的检测结果表明,PCR 方法具有良好的可靠性和准确性,并且具有更高的敏感性,而简便快速的模板制备方法也使其在临床上具有相当大的实用价值。

在对临床病料的检测过程中,本研究比较了常

规的细菌分离与 PCR 2 种诊断方法,结果能分离出细菌的样品 PCR 结果均呈阳性,但 PCR 方法相对细菌的分离鉴定要快速简便,更能满足临床快速诊断的需要。而且所检测的 16 个样品中有 4 个样品同时有鸭疫里默氏菌和大肠杆菌感染,这一结果进一步证实了二者在临床上混合感染的普遍性。此外,有 2 个样品虽然没有分离鉴定出鸭疫里默氏菌,但多次重复的 PCR 结果均呈鸭疫里默氏菌阳性,结合病鸭具有典型的鸭疫里默氏菌感染的剖检变化,该结果提示该病鸭已在感染的恢复期,细菌的数量可能较少,细菌成功分离的概率降低,而 PCR 方法的敏感性可能要高于细菌的分离鉴定,所以呈现阳性结果。

### 参考文献:

- [1] KISS I, KARDOS G, NAGY J, et al. DNA fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* isolates from ducks[J]. *Vet Rec*, 2007, 160(1):26-28.
- [2] 张大丙, 曲丰发, 郑献进. 鸭传染性浆膜炎的诊断与防治技术[J]. *中国家禽*, 2005, 27(6):46-49.
- [3] 汪铭书, 程安春, 李淑梅, 等. 鸭疫里氏杆菌鸭源致病性大肠埃希氏菌和鸭沙门菌的 RAPD 研究[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(10):3-8.
- [4] 蔡秀磊, 韦强, 鲍国连, 等. 鸭疫里默氏菌实验室诊断方法研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(5):13-16.
- [5] WOO P C, NG K H, LAU S K, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):1 996-2 001.
- [6] 管宇, 沈志强, 刘吉山, 等. 应用 16S rRNA 基因测序法鉴定禽多杀性巴氏杆菌的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(5):349-352.
- [7] 刘佳文, 吕红艳, 吴雪琼. 16S rRNA 基因序列在分枝杆菌分类鉴定的研究进展[J]. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)*, 2001, 22(5):265-266.
- [8] 曹国文, 周淑兰, 姜永康, 等. 鸭传染性浆膜炎的病原分离鉴定与药防研究[J]. *四川畜牧兽医*, 2002, 29(8):15-16.
- [9] 陈兴生. 鸭源致病性大肠埃希氏菌生物学特性的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(5):340-342.
- [10] 曲丰发, 蔡畅, 郑献进, 等. 利用 16s rDNA 建立种特异性 PCR 快速检测鸭疫里默氏菌[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1):13-17.
- [11] 胡清海, 刘晓文, 赵世华, 等. 应用 PCR 检测技术检测鸭疫里默氏菌的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(6):471-473.
- [12] 何亮, 陈群, 曾忠铭, 等. 通过特异 PCR 扩增和 16S rDNA 序列分析检测动弯杆菌[J]. *微生物学报*, 2005, 41(1):27-30.