

# 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用

崔沛, 王东方, 闫若潜, 王淑娟, 冉晓龙, 班付国  
(河南省动物疫病预防控制中心, 河南郑州 450008)

**摘要:** 为建立一种快速、敏感、特异的副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 荧光定量 PCR (Fluorescence Quantitative PCR, FQ-PCR) 检测方法, 根据 GenBank 登录的 HPS 16S rRNA 基因序列, 设计 1 对特异性引物和 1 条特异性 TaqMan-MGB 探针, 建立了 HPS 荧光定量 PCR 检测方法, 并对方法的敏感性、特异性以及重复性和稳定性进行了验证。结果显示: 本研究建立的 HPS FQ-PCR 方法在  $10^1 \sim 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  模板范围内有很好的线性关系, 所得相关系数为 0.998; 检测灵敏度可达 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 是常规 PCR 的 10 倍; 特异性好, 对 pGEM-T/HPS 重组质粒扩增呈现阳性反应曲线, 而对 4 个对照病原的扩增曲线均呈现阴性反应; 对不同浓度的 pGEM-T/HPS 重组质粒分别重复扩增 3 次, 重复结果良好。对 30 份临床疑似 HPS 感染的组织样品进行应用检测, 检出 19 份阳性, 比商品化的 HPS FQ-PCR 检测试剂盒及常规 PCR 方法的阳性检出率高。结果表明, 本研究建立的 HPS FQ-PCR 方法具有敏感性高、特异性好、稳定性强的优点, 可用于临床 HPS 感染猪的早期检测, 对 HPS 的快速诊断、综合防控具有重要意义。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 荧光定量 PCR; 建立

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2018) 00-0101-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.09.025

## Establishment and Preliminary Application of Fluorescence Quantitative PCR Assay for Detection of *Haemophilus parasuis*

Cui Pei, Wang Dongfang, Yan Ruoqian, Wang Shujuan, Ran Xiaolong, Ban Fuguo  
(Henan Animal Disease Prevention and Control Center, Zhengzhou, Henan 450008, China)

**Abstract:** In order to develop a rapid, sensitive and specific fluorescence quantitative PCR method (FQ-PCR) for detection of *Haemophilus parasuis* (HPS), based on the sequence of 16S rRNA of HPS published in GenBank, a pair of specific primers and a TaqMan-MGB probe were designed, and the FQ-PCR method was established. Then its sensitivity, specificity and repeatability were tested. The results indicated that the FQ-PCR assay was successfully established, and it showed a good linear relationship at the template range of  $10^1$  to  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ , with a coefficient correlation of 0.998; the lowest detection limit value was 10 copies/ $\mu\text{L}$ , which was 10 times than that of conventional PCR method; amplification of recombinant pGEM-T/HPS plasmid showed positive results, while amplification results of other four control pathogens were all negative. Using the established method to conduct repeated amplification towards different concentrations of pGEM-T/HPS plasmid for 3 times, the results were stable. Meanwhile, the method was applied in clinic to test 30 suspected tissue samples, and 19 samples were detected positive, the detection rate of the method was higher than that of commercial detection kits and conventional PCR. As a conclusion, the established HPS FQ-PCR assay was sensitive, specific and stable, it was suitable for early detection of HPS and had great significance in rapid diagnosis and comprehensive prevention and control of HPS.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; fluorescent-quantitative PCR; establishment

基金项目: 河南省科技创新人才计划项目 (174200510003)

同等贡献作者: 崔沛, 王东方

通信作者: 班付国

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪上呼吸道中常在的一种机会致病菌, 在特定条件下能够侵入机体, 引发以纤维素性多发性关节炎、脑膜炎和浆膜炎为主要特征的全身性疫病<sup>[1]</sup>, 是目前影响养猪业最严重的病原之一。HPS 在环境中普遍存在, 只感染猪<sup>[2]</sup>, 可影响 2 周龄至 4 月龄的青年猪, 主要在断奶后和保育阶段发病, 通常见于 5~8 周龄猪群, 发病率一般在 10%~15% 之间, 严重时死亡率可达 50%<sup>[3]</sup>。HPS 还常由猪繁殖与呼吸综合征病毒、圆环病毒和猪呼吸道冠状病毒等引起继发感染<sup>[4]</sup>。

近几年, HPS 感染使许多大规模猪场的经济效益受到较大冲击<sup>[5]</sup>。因此, 建立一种快速、敏感、特异的 HPS 检测诊断方法尤为重要。根据临床症状、剖检病变进行细菌分离鉴定是 HPS 的经典诊断方法。然而该菌培养条件苛刻, 很难从患病动物中分离到, 尤其是经抗生素治疗后, 其分离更加困难复杂<sup>[6]</sup>。目前, 用于检测 HPS 抗体的方法有补体结合试验、间接血凝试验和酶联免疫吸附试验。但血清学检测存在操作麻烦、检测周期长、敏感性和特异性低等不足。随着分子生物学研究的不断深入, PCR 诊断技术已广泛用于各个领域。张盼锋等<sup>[7]</sup>、万世平等<sup>[8]</sup>建立了 HPS PCR 检测方法, 但常规 PCR 方法只能定性, 并且敏感性有待提高。随着荧光定量 PCR 技术的快速发展, 该技术开始被广泛用于动物疫病检测。该技术灵敏度比普通 PCR 提高了 100 倍, 并能减少假阳性概率, 而且由于不用电泳, 减少了污染, 节省了时间, 使检测结果更为直观<sup>[6]</sup>。于江等<sup>[9]</sup>根据 *infB* 基因序列建立了 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法。SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法虽然敏感性高, 但特异性较差, 容易出现假阳性。罗宝正等<sup>[10]</sup>根据转录起始因子 *infB* 基因序列, 建立了 TaqMan 探针荧光 PCR 技术。但该方法的探针只是基于传统的 TaqMan 探针, 在敏感性、特异性方面仍有提高的空间。本研究以 HPS 的 16S rRNA 基因作为检测目标, 建立了 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌毒株及检测样品 重组质粒

pGEM-T/HPS: 河南省动物疫病预防控制中心实验室保存; HPS 菌株 (血清 1—15 型): 河南农科院惠赠; 猪链球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157: 河南省动物疫病预防控制中心实验室提供; 临床疑似 HPS 感染样品 (病死猪组织、心包积液、关节液): 采自河南省部分猪场。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

KingFisher 全自动核酸提取仪: 美国 Thermo Fisher 公司产品; 分光光度计 (UV-2450): 日本岛津公司产品; 荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500): 美国 ABI 公司产品; 梯度 PCR 仪: 德国 Biometra 公司产品; 凝胶成像分析系统: 美国 AlphaInnotech 公司产品。Ex Taq DNA 聚合酶、Rnase Inhibitor、DL2000DNA Marker、DNA 回收试剂盒、质粒 DNA 小量纯化试剂盒等: 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; pGEM-T easy 载体: 购自 Promega 公司; DNA/RNA 磁珠提取试剂盒: 购自 Abmion 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物与探针设计与合成

根据 GenBank 中 HPS 16S rRNA 基因序列 (登陆号 CP005384.1), 利用 Primer Premier 6.0 分析软件, 设计 1 对特异引物 P1/P2 (P1: 5'-AGCAGCCGCGGTAATACG-3'; P2: 5'-CCTTTACGCCAGTCATTCC-3') 和探针 Probe-P3 (FAM-5'-AGGGTGCAGCGT-3'-MGB)。引物和探针由 Invitrogen 公司合成。

#### 1.2.2 DNA 提取

利用 Kingfisher 全自动核酸提取仪, 参照磁珠法核酸提取试剂盒说明书, 提取 HPS、猪链球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 及疑似 HPS 感染样品的 DNA。

#### 1.2.3 标准模板建立

复壮 pGEM-T/HPS 重组质粒的工程菌, 利用 DNA 小量纯化试剂盒提取重组质粒, 用分光光度计测定  $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  及  $OD_{260}/OD_{280}$  值, 共重复 5 次; 参考 Kim 等<sup>[11]</sup>介绍的方法计算其浓度, 定量并稀释至  $1.0 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

#### 1.2.4 荧光定量 PCR 反应条件优化

用矩阵法对 FQ-PCR 循环参数、引物和探针浓度, 以及所选引物与探针的组合等进行筛选优化, 得到最佳的荧光定量 PCR 反应条件。

#### 1.2.5 标准曲线建立

用含  $1.0 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$

pGEM-T/HPS 重组质粒作标准品, 10 倍系列稀释成  $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$  拷贝 / $\mu\text{L}$ , 共 9 个稀释度, 以不同浓度的重组质粒为模板进行 FQ-PCR 检测。以起始模板数的对数为  $X$  轴, 以 FQ-PCR 循环次数  $C_t$  值为  $Y$  轴作回归曲线, 建立 HPSFQ-PCR 方法的标准曲线。

1.2.6 特异性试验 按照 1.2.4 中确定的最佳反应体系和条件, 以 1.2.2 中提取的 HPS、猪链球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 的 DNA 为模板进行 FQ-PCR 检测, 并设空白对照, 以检验本方法的特异性。

1.2.7 敏感性试验 利用本研究建立的 HPS FQ-PCR 方法对  $10^1 \sim 10^6$  拷贝 / $\mu\text{L}$  的 HPS 重组质粒进行敏感性扩增试验, 同时与 HPS 常规 PCR 方法进行比较。

1.2.8 重复性及稳定性试验 利用本研究建立的 HPS FQ-PCR 方法, 对 3 个不同浓度 ( $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$  拷贝 / $\mu\text{L}$ ) 的 pGEM-T/HPS 重组质粒, 分别设 3 个重复, 分 3 个批次进行试验, 以检验该方法的重复性和稳定性。

1.2.9 与常规 PCR 检测灵敏度的比较 以 pGEM-T/HPS 重组质粒为标准品, 10 倍系列稀释成  $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^6$  拷贝 / $\mu\text{L}$ , 以其为模板进行 FQ-PCR, 同时利用河南省动物疫病预防控制中心建立的常规 PCR 检测方法进行对照检测, 比较两种方法的检测灵敏度。

1.2.10 临床应用试验 利用建立的 HPS FQ-PCR 方法, 对 1.2.2 中提取的疑似 HPS 感染样品 DNA 进行检测, 并以 pGEM-T/HPS 为阳性对照、无菌双蒸水为阴性对照, 同时进行常规 PCR 检测, 验证二者的符合率。

## 2 结果

### 2.1 反应条件优化及结果判定

采用矩阵法优选引物和探针最佳浓度的结果表明, 采用终浓度为  $0.5 \mu\text{mol/L}$  的引物和  $0.8 \mu\text{mol/L}$  的探针, 对质粒标准品进行检测, 可获得较小的反应循环数 ( $C_t$  值) 和较大的荧光信号 ( $\Delta Rn$ )。FQ-PCR 循环条件优化结果表明, 双温循环及  $60^\circ\text{C}$  的退火温度为最佳循环条件。反应程序为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 3 min; 然后  $95^\circ\text{C}$  变性 15 s,  $60^\circ\text{C}$  退火延伸 40 s, 共

进行 40 个循环。在每个循环延伸结束时进行荧光信号检测, 荧光模式设为 FAM/NONE 标记模式, Passive reference 设为 NONE。阴性对照的检测结果应无特定的扩增曲线, 且  $C_t$  值  $> 38.0$  或无, 阳性对照  $C_t$  值  $\leq 25.0$ , 且出现特定的扩增曲线, 判定检测结果成立。在检测结果成立的前提下, 若样品检测结果  $C_t$  值  $\leq 36.0$ , 且出现特定的扩增曲线, 判定为阳性;  $C_t$  值  $> 38.0$  或无, 且无特定的扩增曲线, 判定为阴性;  $38.0 \geq C_t$  值  $> 36.0$  且有特定扩增曲线, 样品判定为可疑, 需重复验证。

### 2.2 标准曲线建立

以 10 倍系列稀释的标准 pGEM-T/HPS 重组质粒 ( $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^6$  拷贝 / $\mu\text{L}$ ) 为模板进行 FQ-PCR 检测, 根据检测结果所计算出标准曲线(图 1)。标准曲线的相关系数为 0.998, 斜率为 -3.62, 截距为 38.88, 从而可以得出拷贝数 ( $X$ ) 与  $C_t$  值之间的线性关系表达式为:  $C_t = -3.62 \times \lg X + 38.88$ 。将由仪器读取的  $C_t$  值代入上述表达式, 即可算出初始拷贝数。

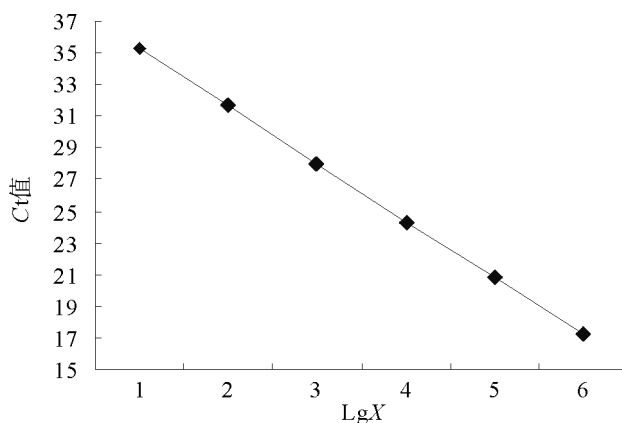


图 1 HPS 荧光定量 PCR 标准曲线

### 2.3 特异性试验

特异性试验结果显示, 以 pGEM-T/HPS 重组质粒为阳性对照, 有荧光信号, 而猪链球菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157 等对照病原体、阴性对照无荧光响应(图 2), 说明所建立的 HPS FQ-PCR 检测方法具有好的特异性。

### 2.4 稳定性和重复性

以 3 个浓度 ( $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$  拷贝 / $\mu\text{L}$ ) 的 pGEM-T/HPS 重组质粒为标准品进行 3 次重复测定。结果显示, 批内试验和批间试验的  $C_t$  值差异

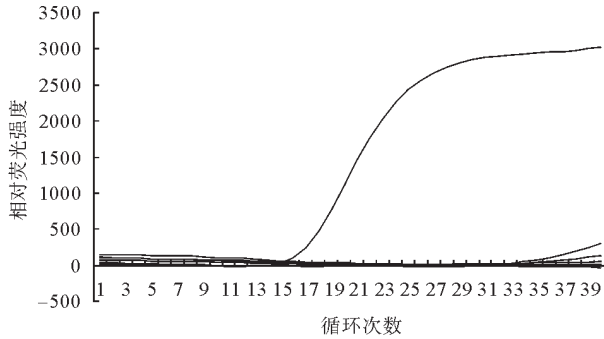


图2 HPS 荧光定量 PCR 特异性试验

极小, 变异系数均小于 0.1 (图 3、表 1), 表明该方法具有良好的稳定性和重复性。

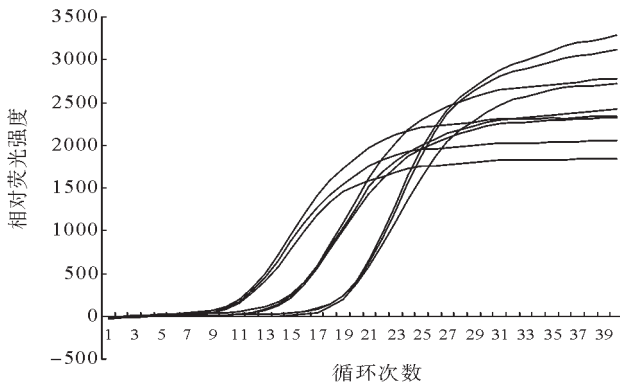


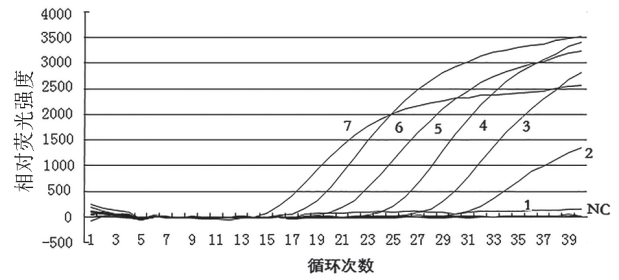
图3 HPS 荧光定量 PCR 重复性试验

表 1 重复性试验结果

DNA/ (拷贝 /μL)	批内试验				批间试验		
	Ct 平 均值	标准差	变异系 数/%	重复数	Ct 平 均值	标准 差	变异系 数/%
10 <sup>6</sup>	17.46	0.55	0.03	3	17.59	0.67	0.04
10 <sup>7</sup>	14.58	0.49	0.03	3	14.38	0.73	0.05
10 <sup>8</sup>	11.23	0.57	0.05	3	11.57	0.62	0.05

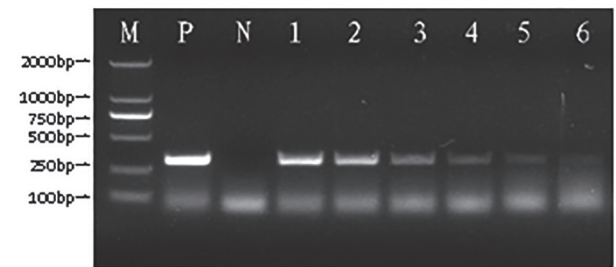
### 2.6 与常规 PCR 检测灵敏度比较

以 10 倍系列稀释的标准 pGEM-T/HPS 重组质粒 ( $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^6$  拷贝/μL) 为模板进行 FQ-PCR 检测, 当重组质粒浓度稀释为  $1.0 \times 10^1$  拷贝/μL 时, 能够出现特异性扩增曲线, 但质粒浓度稀释为  $1.0 \times 10^0$  拷贝/μL 时, 未出现特异性扩增曲线, 表明该方法的灵敏度为  $1.0 \times 10^1$  拷贝/μL (图 4)。采用常规 PCR 方法检测, 当模板重组质粒浓度稀释为  $1.0 \times 10^2$  时能扩增出条带, 但稀释到  $1.0 \times 10^1$  时不能扩增出条带, 说明常规 PCR 方法检测的极限灵敏度为  $1.0 \times 10^2$  拷贝/μL (图 5), 表明 FQ-PCR 方法的检测灵敏



NC. 阴性对照; 1~7. 分别对应质粒浓度  $1.0 \times 10^0$ 、 $1.0 \times 10^1$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^6$  拷贝/μL

图4 HPS 荧光定量 PCR 敏感性试验



M. DL2000 DNA Maker; P. 阳性对照; N. 阴性对照; 1~6. 分别对应的质粒浓度  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^1$  拷贝/μL

图5 HPS PCR 敏感性试验

度是常规 PCR 检测方法的 10 倍。

### 2.7 与商品化试剂盒及常规 PCR 方法比较

利用所建立的 HPS FQ-PCR 方法对疑似 HPS 感染的 30 份组织样品进行检测, 并与常规 PCR 进行比较分析。结果显示, HPS FQ-PCR 检出 19 份阳性, 而商品化的 HPS FQ-PCR 检测试剂盒和 HPS 常规 PCR 均检出 17 份阳性。对 HPS FQ-PCR 阳性产物进行克隆测序, 序列比对结果证明 19 份阳性产物均为 HPS 基因片段, 表明本研究建立的 HPS FQ-PCR 方法可用于临床样品检测, 并且敏感性高于商品化的 HPS FQ-PCR 检测试剂盒及常规 PCR 检测方法。

### 3 讨论

HPS 是现阶段造成我国哺乳和保育阶段仔猪死亡的重要原发或继发病原, 特别是在饲养管理条件不好的猪场能够造成猪只大量死亡, 给猪场带来较大经济损失<sup>[12]</sup>。由于 HPS 各血清型之间存在交叉反应, 血清学方法的准确性得不到保证。而 HPS 的实验室分离培养又比较困难, 所以很有必要建立一种快速、敏感, 特异性强、稳定性好的 HPS 检测方法。吴静波等<sup>[13]</sup>建立的 HPS PCR



方法的灵敏度为 100 拷贝/ $\mu\text{L}$ ；苗立中等<sup>[14]</sup>建立的 HPS SYBR Green I FQ-PCR 检测方法，特异性良好、敏感性高。FQ-PCR 技术具有敏感性高、特异性好、操作简单快捷等优点，给检测工作带来很大便利。FQ-PCR 技术分为染料法和探针法两种。Jamnikar 等<sup>[15]</sup>对染料法和探针法进行了比较，认为探针法用于定量比 SYBR Green I 染料法更准确。与传统 TaqMan 探针比较，探针 3 端加上 MGB，使探针长度缩短，可使探针的  $T_m$  值提高 10  $^{\circ}\text{C}$  左右，提高配对与非配对模板间的  $T_m$  值差异；由于探针 3 端的 Quencher 基团为不发光的荧光基团，并且与 Report 基团的空间位置更接近，从而可以使试验结果更精确，敏感性更高，而且试验条件优化后，步骤简单，重复性大大提高<sup>[16]</sup>。

#### 4 结论

本研究以 HPS 16S rRNA 序列为模板设计 1 对特异性引物和 1 条 TaqMan-MGB 探针，通过对 FQ-PCR 反应体系和条件的优化，可从 pGEM-T/HPS 重组质粒中检测出阳性，而其他 4 种病原对照均未出现特异性扩增，对质粒模板最低检出浓度为 10 拷贝/ $\mu\text{L}$ ，与常规 PCR 检测结果相比，敏感性高约 10 倍，表明该方法具有较好的特异性和敏感性。批内试验和批间试验的  $C_t$  值差异极小，变异系数均小于 0.1，表明稳定性和重复性良好。在 30 份临床疑似 HPS 感染的组织样品中检出了阳性样品，比常规 PCR 的阳性检出率高，表明本研究所建立的方法适用于临床样品的快速检测。本方法的建立对于 HPS 的快速诊断、综合防控及净化等具有重要意义。

#### 参考文献：

- [1] MACEDO N, CHEERAN M C J, ROVIRA A, et al. Effect of enrofloxacin on *Haemophilus parasuis* infection, disease and immune response[J]. Veterinary microbiology, 2017, 199: 91-99.
- [2] 孙华润, 翟亚军, 蔡田, 等. 副猪嗜血杆菌临床分离菌的药物敏感性试验与 ERIC-PCR 基因分型[J]. 江西农业学报, 2018, 30 (1): 7-12.
- [3] OIVEIRA S, GALINA L, PIJOAN C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections [J]. Journal of veterinary diagnostic investigation, 2001, 13 (6): 495-501.
- [4] 苏丹萍, 王文豪, 张显浩, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒和副猪嗜血杆菌病混合的诊断和防治 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 (8): 186-189.
- [5] CERDÀ-CUÉLLAR M, NARANJO J F, VERGE A, et al. Sow vaccination modulates the colonization of piglets by *Haemophilus parasuis* [J]. Veterinary microbiology, 2010, 145 (3/4): 315-320.
- [6] 张颖. 副猪嗜血杆菌病诊断研究进展 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2016, 6: 16-17.
- [7] 张盼锋, 仇微, 刘宇, 等. 副猪嗜血杆菌 PCR 快速诊断方法的建立 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2009, 34 (1): 33-36.
- [8] 万世平, 王建, 葛菲菲, 等. 副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 9-12.
- [9] 于江, 吴家强, 张玉玉, 等. 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 检测技术的建立与应用 [J]. 家畜生态学报, 2010, 31 (4): 77-81.
- [10] 罗宝正, 王振全, 薄清如, 等. TaqMan 探针荧光 PCR 检测副猪嗜血杆菌方法的建立和应用 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27 (6): 1367-1370.
- [11] KIM W I, KIM J J, CHA S H, et al. Significance of genetic variation of PRRSV ORF5 in virus neutralization and molecular determinants corresponding to cross neutralization among PRRS viruses[J]. Veterinary microbiology, 2013, 162 (1): 10-22.
- [12] 马超锋, 余洪涛, 彭燕, 等. 副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49 (2): 89-93.
- [13] 吴静波, 南文金, 黄健强, 等. 副猪嗜血杆菌和猪鼻支原体双重 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医科学, 2016, 46 (9): 1094-101.
- [14] 苗立中, 沈志强, 韩文瑜. 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2012, 33 (1): 85-89.
- [15] JAMNIKAR C U, GROM J, TOPLAK I, et al. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: Comparison of SYBR green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes[J]. Journal of virological methods, 2008, 147(2): 257-264.
- [16] KUTYAVIN I V, AFONINA I A, MILLS A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature[J]. Nucleic acids research, 2000, 28 (2): 655-661.

(责任编辑: 朱迪国)