

小鼠嗜肺巴斯德杆菌 PCR 检测方法的优化 及在不同样本处理中初步应用

彭丽娜¹, 潘雅君¹, 张 曼¹, 谷佳男², 徐汪节¹

(1. 上海交通大学实验动物中心, 上海 200240;

2. 上海市西南位育中学国际部, 上海 200233)

[摘要] 目的 建立活体实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的实时快速、灵敏简便的 PCR 检测方法。方法 通过比较不同样本采集及处理方法, 优化样本的处理流程, 简化 DNA 的提取步骤, 快速获取 PCR 模板后对嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型进行 PCR 扩增, 并结合测序进行鉴定。结果 4 种采样方法中, 口腔样本的检测效果最好; 2 种 DNA 提取方法中, 用培养后煮沸 1 min 的方法能快速获取样本中细菌基因组 DNA, 比试剂盒提取方法效果更好。结论 通过培养煮沸 1 min 的方法快速提取实验动物口腔样本中的细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板, 能显著提高嗜肺巴斯德杆菌的阳性检出率。

[关键词] 嗜肺巴斯德杆菌; 样本处理; DNA 快速提取; PCR

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)03-0236-06

嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumophila*)在自然界中分布广泛, 它有两种生物型, 分别被命名为“Jawetz”和“Heyl”, 主要感染啮齿类动物, 对实验小鼠、大鼠和豚鼠的危害较大^[1]。嗜肺巴斯德杆菌作为一种条件致病菌, 能够引起免疫缺陷动物或免疫功能低下的动物产生严重的肺炎, 并可能导致动物死亡。该菌也是人兽共患病原, 可引起人的局部和全身感染^[2-3]。实验动物及其设施内污染嗜肺巴斯德杆菌后很难去除, 给饲养管理和动物实验带来了很大干扰^[4]。该菌是国家标准《实验动物 微生物学等级及监测》14922.2—2011 中 SPF 级啮齿类实验动物必须排

除的病原菌之一^[5]。

国家标准检测嗜肺巴斯德杆菌的方法为传统的细菌分离培养、生化鉴定以及血清学方法。因国家标准检测方法费时费力、操作繁琐, 需要综合上述几种方法的检测结果才能得出结论, 且检测周期比较长, 不适用于对大规模活体实验动物感染嗜肺巴斯德杆菌的实时快速监测。

PCR 方法由于其操作简便、敏感性高、特异性强且重复性好, 已被广泛应用于实验动物的微生物检测。邢进等^[6]对经测序确认的 227 株嗜肺巴斯德杆菌菌株, 用 BD 自动生化鉴定的阳性率为 53.6%, 用 Benga PCR 方法可检出所有菌株, 表明 PCR 方法对病原菌的阳性检出率较高。本文采用 PCR 方法, 通过摸索前期采样及样本的处理方法, 建立快速、准确、简便和实时监测嗜肺巴斯德杆菌的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用动物饲养于上海交通大学实验动

[收稿日期] 2019-12-21

[基金项目] 上海交通大学决策咨询课题(JCZXSJB2018-024)

[作者简介] 彭丽娜(1983—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 实验动物环境与微生物质量控制。

E-mail: linapeng@sjtu.edu.cn

[通信作者] 徐汪节(1976—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 环境因素与生殖发育、实验动物模型。E-mail: hover_xwj@sjtu.edu.cn

物中心屏障设施[SYXK(沪)2018-0028]隔离检疫区隔离包内, 包括经第三方检测机构(苏州西山生物技术有限公司)检测确认感染嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型阳性[清洁级, C57BL/6, 16 ♂ 13 ♀, 6 周龄, 18~20 g, 共 5 笼, SCXK(沪)2017-001]和嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型阳性[清洁级, C57BL/6, 1 ♂ 2 ♀, 9 周龄, 25~30 g, 共 1 笼, SCXK(沪)2017-001]的待生物净化的实验小鼠, 以及饲养于本设施 SPF 屏障内的哨兵鼠[SPF 级, ICR, 116 ♀, 17 周龄, 40~45 g, 共 58 笼, SCXK(京)2016-0006]。

1.2 菌株

嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型标准株基因组 DNA 购自苏州西山生物技术有限公司。嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型菌株分离自实验室购买的转基因小鼠, 并和 Jawetz 型、Heyl 型的标准菌株基因组 DNA 作比对, 最终测序验证。

1.3 主要试剂与仪器

营养肉汤培养基购自杭州滨河微生物试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒和 100 bp DNA Ladder 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 2 × ES Tag Master Mix(Dye)购自北京康为世纪生物科技有限公司; 琼脂糖和 Sybr Safe 核酸染料购自英潍捷基(上海)贸易有限公司。

新加坡 ESCO Class II BSC 生物安全柜; 德国 Eppendorf Innova 40 恒温摇床; 美国 Thermo NanoDrop 2000 分光光度计; 美国 ABI Pro Flex PCR 仪; 美国 Bio-Rad Gel Doc XR+ 核酸电泳及凝胶成像系统; 德国 Eppendorf 高速冷冻离心机; 上海一恒医疗器械有限公司 LRH-150 生化培养箱。

1.4 实验方法

本研究方案经上海交通大学实验动物伦理与使用委员会(IACUC)批准, 并获取研究计划编号(A2017012)。

1.4.1 引物设计与合成 根据嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型基因序列的特异性区域, 参照文献[7]设计引物(表 1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4.2 PCR 反应条件的优化 用嗜肺巴斯德杆菌

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequences

引物名称	引物序列(5' → 3')	产物长度(bp)
Benga-F	ATGGGAGTGGGTTGTACCA	451
Jawetz-R	GGCATCCTAAAATACCCATCC	
Heyl-R	TTGCAGATACTTGCCCTTAC	326

Jawetz 型和 Heyl 型标准株基因组 DNA 分别摸索 PCR 引物的特异性和灵敏度。PCR 反应体系为 20 μL, 包括: 2 × ES Tag Master Mix(Dye) 10 μL, 引物浓度分别为 0.10 μmol/L、0.15 μmol/L、0.20 μmol/L、0.25 μmol/L 和 0.30 μmol/L, DNA 模板 20 ng。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55~60 °C 退火 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收后测序验证。

1.4.3 PCR 灵敏度测试 将嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型基因组 DNA 的模板终质量浓度分别调整为 10⁰ ng/μL、10⁻² ng/μL、10⁻⁴ ng/μL、10⁻⁶ ng/μL、10⁻⁸ ng/μL、10⁻¹⁰ ng/μL、10⁻¹¹ ng/μL、10⁻¹² ng/μL、10⁻¹³ ng/μL 和 10⁻¹⁴ ng/μL, 每个梯度各取 1 μL 进行 PCR 灵敏度测试。

1.4.4 实验动物的不同采样及处理方法 将嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型感染阳性的实验小鼠每笼取 2 只, 分别采集饮水、口腔、新鲜粪便和肠道内容物样本。2 只小鼠的样本均匀混合后, 分别用培养煮沸法和试剂盒方法提取各类样本中的 DNA, 并于 -20 °C 保存备用。

培养煮沸法: 各种采集样本分别接种于 5 mL 普通营养肉汤培养液, 其中饮水和口腔样本接种量均为 100 μL, 粪便和肠道内容物样本均用无菌枪头沾取少许接种。所有接种样本经 37 °C、180 r/min 培养 16~18 h, 取 1 mL 菌液经 4 °C、8 000 r/min 离心 3 min 后弃上清液, 加入 100 μL TE 缓冲液, 100 °C 分别煮沸 1 min、2 min、5 min 和 10 min 后放冰上 5 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 于 -20 °C 保存备用。

1.4.5 样本的 PCR 方法检测 将实验动物的检测样本通过不同采样以及处理方法, 获取基因组 DNA, 然后用摸索好的 PCR 条件进行 PCR 扩增。

1.4.6 实验动物样本采集及处理方法的重复性实验 将嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型感染阳性的 1 笼实验小鼠按照 1.4.4 的方法处理后, 通过 PCR 扩增验证嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型是否和 Heyl 型的检测效果一致。

1.4.7 在实验动物检测样本中的应用 采集本中心 SPF 屏障设施内 58 笼(每笼 2 只)共 116 只 ICR 哨兵鼠的口腔样本, 用培养煮沸 1 min 的方法提取样本 DNA, 分别进行嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型 PCR 扩增。另外将 15 笼(每笼抽检 1 只)哨兵鼠送第三方检测机构按照 SPF 级实验小鼠国家标准规定的检测项目进行全项检测。

2 结果

2.1 PCR 引物浓度的优化

PCR 结果显示, 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和

Heyl 型菌株 DNA 在引物浓度 $0.15 \sim 0.30 \mu\text{mol/L}$ 的扩增条件下扩增效果较好(图 1)。

2.2 PCR 退火温度的优化

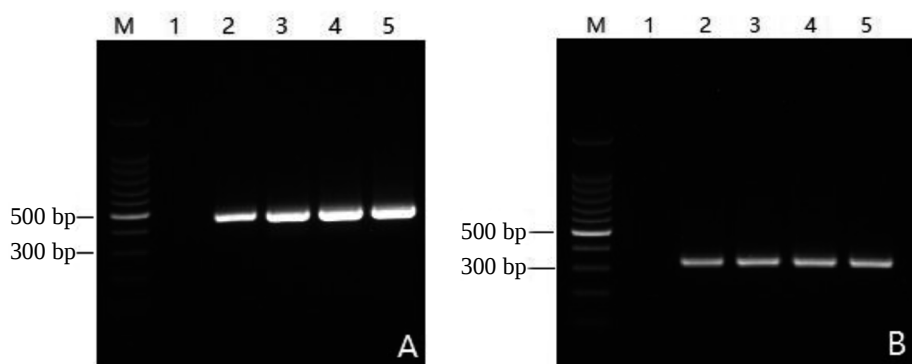
PCR 结果显示, 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型菌株 DNA 在退火温度 $56 \sim 60^\circ\text{C}$ 的扩增条件下扩增效果较好(图 2)。

2.3 PCR 灵敏度

PCR 结果显示, 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型和 Heyl 型的 DNA 模板最低检出量均为 $10 \sim 13 \text{ ng}$, 灵敏度较高(图 3)。

2.4 实验动物的不同采样方法比较

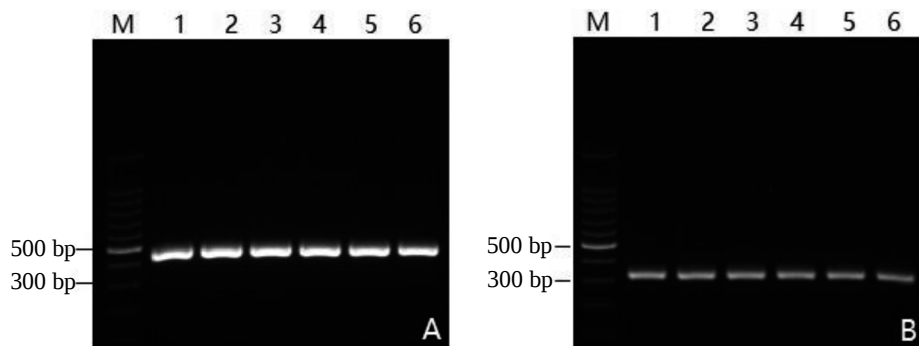
PCR 结果显示, 饮水和粪便样本中各只有 2 个样本扩出目的基因, 且扩增的目的条带较弱; 口腔和肠道内容物的 5 个样本均能扩出目的基因, 扩增效果较好(图 4)。



M: 100 bp DNA Ladder; 1~5: 引物浓度分别为 $0.10 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.15 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.30 \mu\text{mol/L}$ 。A: 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型; B: 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型。

图 1 PCR 引物浓度的优化

Figure 1 Optimization of PCR primer concentration

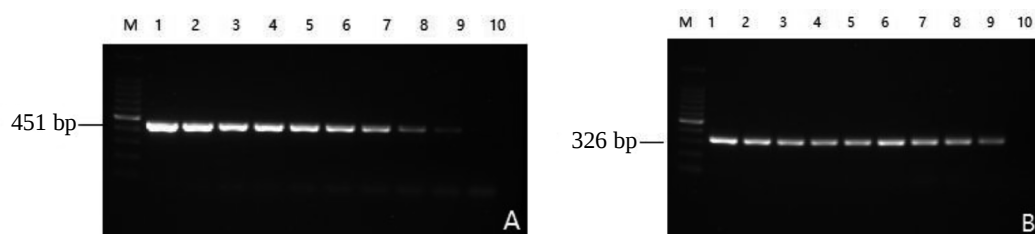


M: 100 bp DNA Ladder; 1~6: 退火温度分别为 55°C 、 56°C 、 57°C 、 58°C 、 59°C 和 60°C 。

A: 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型; B: 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型。

图 2 PCR 退火温度的优化

Figure 2 Optimization of PCR annealing temperature

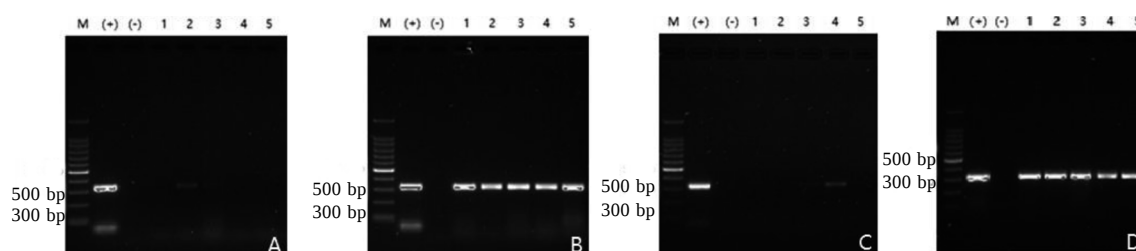


M: 100 bp DNA Ladder; 1~10: PCR 模板终质量浓度分别为 10^0 ng/μL、 10^{-2} ng/μL、 10^{-4} ng/μL、 10^{-6} ng/μL、 10^{-8} ng/μL、 10^{-10} ng/μL、 10^{-11} ng/μL、 10^{-12} ng/μL、 10^{-13} ng/μL 和 10^{-14} ng/μL。

A: 嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型; B: 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型。

图 3 PCR 灵敏度实验

Figure 3 Sensitivity of the PCR assay



M: 100 bp DNA Ladder; (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1~5: 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型感染的 5 笼小鼠样本。

A: 饮水样本; B: 口腔样本; C: 粪便样本; D: 肠道内容物样本。

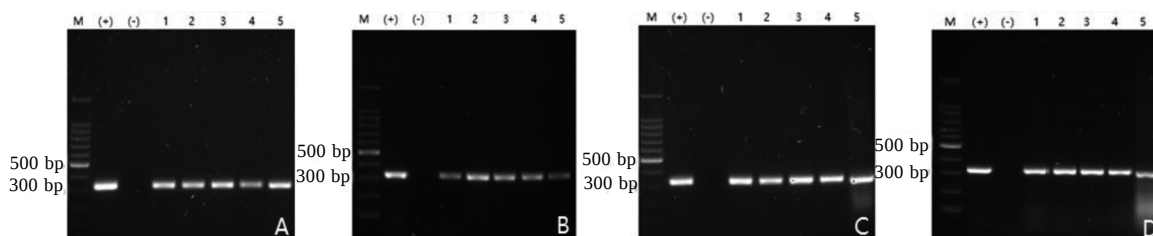
图 4 不同采样方法的比较

Figure 4 Comparison of different sampling methods

2.5 不同煮沸时间处理 DNA 方法的比较

PCR 结果显示, 5 笼实验小鼠的口腔样本用培

养煮沸法分别煮沸 1 min、2 min、5 min 和 10 min 后均能扩出目的基因, 且扩增效果较好(图 5)。



M: 100 bp DNA Ladder; (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1~5: 嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型感染的 5 笼小鼠口腔样本。A~D: 培养后煮沸 1 min、2 min、5 min 和 10 min。

图 5 不同煮沸时间提取 DNA 的比较

Figure 5 Comparison of different boiling time for DNA extraction

2.6 样本采集及处理方法的重复性实验

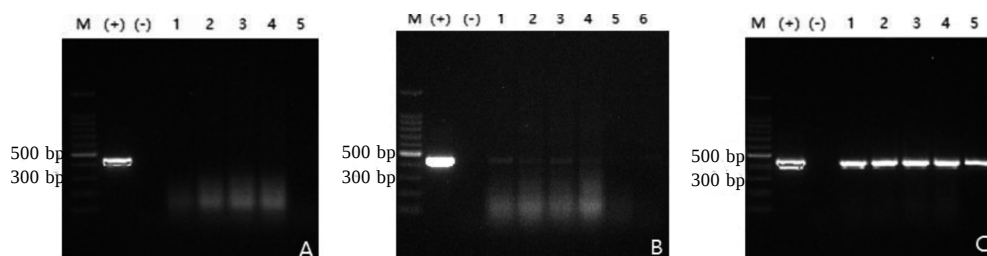
PCR 结果显示, Jawetz 型感染阳性小鼠的饮水样本用两种处理方式均未扩增出目的基因(图 6A); 粪便样本用 3 种方法处理, 有两种能扩增出目的基因(图 6B); 口腔样本用两种方法均能扩增出目的基因, 且扩增效果较好(图 6C)。

2.7 检测样本中的应用

所有检测小鼠的 PCR 结果和送检的结果均为阴性, 检测结果一致。

3 讨论

嗜肺巴斯德杆菌是目前啮齿类实验动物感染



A: 饮水样品; B: 粪便样品; C: 口腔样品。M: 100 bp DNA Ladder; (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1~4: 培养后煮沸 1 min、2 min、5 min 和 10 min 提取 DNA; 5: 细菌基因组试剂盒方法提取 DNA; 6: 粪便基因组试剂盒方法提取 DNA。

图 6 不同采样及处理方法的重复性实验

Figure 6 Repeated experiments of different sampling and processing methods

率最高的病原菌之一，主要感染实验动物的咽、气管、肺、子宫、眼部以及肠道等器官^[8]。国家标准实验室检测该菌的传统方法是，一般采集实验动物的呼吸道分泌物、病灶组织、脓汁或者肠道内容物，在血琼脂平皿上划线培养后进行后续分离纯化和生化鉴定。当遇到菌落形态等表型特征与嗜肺巴斯德杆菌接近的菌株时，容易混淆，造成假阳性结果^[6]。另外，由于国家标准检测方法与检测试剂、检测程序、硬件条件以及检测人员的业务水平和主观判断均有密切关系^[9]，因此该方法存在一定的局限性，需要借助一些其他手段，如 PCR 和基因测序等^[10]。

本研究用 PCR 方法对嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型和 Jawetz 型两对引物的特异性进行了验证，并通过灵敏度测试实验测出两对引物的最低模板 DNA 的检出量均为 10~13 ng，能够高效检出嗜肺巴斯德杆菌感染的低菌量实验动物样本。通过比较实验小鼠饮水、口腔、粪便以及肠道内容物等 4 种采样方法以及培养煮沸法和试剂盒法两种不同的样本 DNA 提取方法，对传统的样品采集和处理方式均进行了优化和改进。最终通过培养煮沸 1 min 的方法快速提取实验动物口腔样本中的细菌基因组 DNA 作为 PCR 模板，可有效检出嗜肺巴斯德杆菌的两种基因型。

本研究方法具有快速简便、灵敏、特异、稳定性高和成本低等优点，且对动物不会造成任何伤害，能够为高校和研究机构等实验动物使用单位在大规模实验动物日常监测、感染早期诊断、生物净化和隔离检疫时快速检测嗜肺巴斯德

杆菌提供借鉴。

参考文献:

- [1] 邢进, 冯育芳, 悦秉飞, 等. 嗜肺巴斯德杆菌研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2):90-94.
- [2] Macy JD Jr, Weir EC, Compton SR, et al. Dual infection with *Pneumocystis carinii* and *Pasteurella pneumotropica* in B cell deficient mice: diagnosis and therapy [J]. Comp Med, 2000, 50(1):49-55.
- [3] Hart ML, Mosier DA, Chapes SK. Toll-like receptor 4-positive macrophages protect mice from *Pasteurella pneumotropica*-induced pneumonia[J]. Infect Immun, 2003, 71(2):663-670.
- [4] 邢进, 岳秉飞, 赵德明, 等. 利用 AFLP 方法研究嗜肺巴斯德杆菌的遗传多态性[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6):92-98.
- [5] 中国实验动物标准化技术委员会. 实验动物 微生物学等级及监测: GB 14922.2-2011[S]. 2011-06-16.
- [6] 邢进, 冯育芳, 贺争鸣, 等. 北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6):54-57.
- [7] Benga L, Benten WP, Engelhardt E, et al. Development of a multiplex PCR assay based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection and identification of rodent *Pasteurellaceae*[J]. J Microbiol Methods, 2013, 95(2):256-261.
- [8] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan [J]. Exp Anim, 2013, 62(1):41-48.
- [9] 冯洁, 谢建云, 胡建华, 等. 3种条件性致病菌三重PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6):1390-1395.
- [10] 陈梅玲, 袁文, 张谱华, 等. 实验室病原菌检测能力的自我测试[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(3):370-373.

Optimization of PCR Detection Method for *Pasteurella pneumophila* in Mice and Its Preliminary Application in Different Sample Treatment

PENG Lina¹, PAN Yajun¹, ZHANG Man¹, GU Jeffrey Jianan², XU Wangjie¹

(1. Laboratory Animal Center of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. International Division of Shanghai Southwest Weiyu Middle School, Shanghai 200233, China)

[Abstract] **Objective** To establish a real-time, rapid, sensitive and simple PCR method for the detection of *Pasteurella pneumophila* in living laboratory animals. **Methods** By comparing different sample collection and processing methods, optimizing the sample processing process, and simplifying the method of DNA extraction, PCR amplification of Jawetz type and Heyl type of *Pasteurella pneumophila* was performed after rapid PCR template acquisition and combined with DNA sequencing for identification. **Results** Among the 4 sampling methods, the oral sample had the best detection effect. In 2 methods of DNA extraction, the bacterial genomic DNA could be obtained rapidly by culturing and boiling the samples for 1 min, which was more effective than the kit extraction method. **Conclusion** Rapid extraction of bacterial genomic DNA from the oral samples of experimental animals by incubation and boiling for 1 min as PCR template can significantly improve the positive detection rate of *Pasteurella pneumophila*.

[Key words] *Pasteurella pneumophila*; Sample processing; Rapid DNA extraction; PCR

更正启事

发表于本刊2020年第2期第104~110页的《不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型》第一作者单位信息不完整。现更正如下:

董若曦^{1,2}, 朱小丹^{1,3}, 樊伯珍^{1,3}, 许文娟^{1,3}

(1. 上海中医药大学附属普陀医院妇产科, 上海 200062; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 3. 安徽医科大学上海普陀中心临床学院妇产科, 上海 200062)

DONG Ruoxi^{1,2}, ZGU Xiaodan^{1,3}, FAN Bozhen^{1,3}, XU Wenjuan^{1,3}

(1. Department of Gynecology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 2. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3. Putuo Central Medical College, Anhui Medical University, Shanghai 200062, China)