

猪链球菌 9 型荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

拜廷阳<sup>1,2</sup>,杨增岐<sup>1</sup>,吴志明<sup>3</sup>,普志平<sup>2</sup>,赵明军<sup>3</sup>,闫若潜<sup>3</sup>

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100; 2 周口市动物疫病预防控制中心,河南 周口 466000;  
3 河南省动物疫病预防控制中心,河南 郑州 450008)

【摘 要】 【目的】建立猪链球菌 9 型(SS9)的快速诊断和定量分析方法。【方法】根据 GenBank 已登录的 SS9 *cps9H* 基因保守部分序列设计合成引物和 TaqMan 荧光探针,建立了 SS9 的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法(Taq-Man FQ-PCR),并进行了敏感性、特异性和重复性试验;利用所建立的检测方法对河南省 11 例疑似猪链球菌临床样品进行了应用检测,并与常规 PCR 方法进行了对比。【结果】成功建立了 SS9 的 FQ-PCR 检测方法和定量标准曲线,FQ-PCR 方法的检测灵敏度可达 1.0 拷贝/μL,特异性高且重复性良好;利用该方法对 11 份临床疑似猪链球菌感染组织病料进行的应用检测表明,其中有 3 份样品为阳性,与常规 PCR 方法检测的阳性符合率为 100%。【结论】成功建立的 SS9 FQ-PCR 诊断方法,可用于临床 SS9 型病菌感染的快速诊断及样品中细菌含量的定量分析。

【关键词】 猪链球菌 9 型;荧光定量 PCR;TaqMan 荧光探针;检测方法

【中图分类号】 S858.285.1<sup>+</sup>1      【文献标识码】 A      【文章编号】 1671-9387(2008)01-0007-06

Establishment and application of Real-time TaqMan-quantitative PCR assay for detection of *Streptococcus suis* serotype 9

BAI Ting-yang<sup>1,2</sup>, YANG Zeng-qi<sup>1</sup>, WU Zhi-ming<sup>3</sup>, PU Zhi-ping<sup>2</sup>,  
ZHAO Ming-jun<sup>3</sup>, YAN Ruo-qian<sup>3</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;  
2 Zhoukou City Centre for Animal Diseases Control & Prevention, Zhoukou, Henan 466000, China;  
3 Henan Centre for Animal Diseases Control & Prevention, Zhengzhou, Henan 450008, China)

**Abstract:**【Objective】The study is to establish a rapid detection and quantitative analysis diagnosis method for *Streptococcus suis* Serotype 9 (SS9) clinic infection. 【Method】The TaqMan Fluorescent probes and primers were designed and synthesized according to the conserved district of *cps9H* gene of SS9 available in GenBank, and then reaction parameters were optimized and standard carve was established to develop a real-time TaqMan-fluorescent-quantitative PCR assay (FQ-PCR) of *Streptococcus suis* Serotype 9. The sensitivity, specificity and repetition assay of FQ-PCR were tested, and 11 suspected tissue samples from pigs on farms in Henan Province were detected by using the established FQ-PCR assay compared with the routine PCR method. 【Result】The FQ-PCR method and quantitative standard carve were successfully established. The developed FQ-PCR assay, which exhibited high specificity and good reproducible, could detect 1.0 copy/μL of plasmid DNA and its sensitivity was 100 times higher than that of the routine PCR. The FQ-PCR was used to detect the DNA of 11 tonsil tissue samples taken from suspicious *S. suis* infected

\* [收稿日期] 2007-01-26  
[基金项目] 河南省科技攻关项目(0624410098)  
[作者简介] 拜廷阳(1968—),男,河南扶沟人,在读硕士,主要从事兽医微生物学和分子免疫学研究。E-mail:bty1968@126.com  
[通讯作者] 闫若潜(1971—),男,河南南阳人,博士,高级兽医师,主要从事动物疫病病原分子生物学研究。  
E-mail:yrq1688@126.com

pigs and 3 samples were displayed positive, which was completely consistent with the results of the routine PCR. 【Conclusion】 A SS9 FQ-PCR method was successfully established, which could be used to diagnose rapidly and analyse quantitatively clinic SS9 infection samples.

**Key words:** *Streptococcus suis* Serotype 9; real-time TaqMan-fluorescent-quantitative PCR; TaqMan fluorescence probe; detection method

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*)是一种重要的人兽共患病原菌,常会引发猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、败血症和突然死亡等。此病各年龄段的猪均可感染,多发于 3~12 周龄,尤以断奶仔猪最易感染。该菌亦可引起人类的感染,导致脑膜炎等严重疾患甚至死亡<sup>[1]</sup>。

根据猪链球菌的荚膜多糖抗原(cps)可将其分为 35 个血清型,即 1~34 型和 1/2 型,其中能引起人和动物发病的血清型主要是 1 型(SS1)、2 型(SS2)、7 型(SS7)和 9 型(SS9)<sup>[2]</sup>。近年来,SS2 型和 SS9 型的流行呈上升趋势,给养猪业造成了巨大的经济损失,并且引起了人的感染和死亡<sup>[3]</sup>。

建立猪链球菌的快速诊断和血清型分型方法,对该病的早期临床诊断、防治、疫苗防疫及公共卫生等具有重要的实际意义。用传统的微生物学病原分离技术结合血清学试验,能够对猪链球菌进行诊断和血清学分型,但该方法费时费力,而且敏感性不高,易产生非特异性结果。因此,建立猪链球菌快速、敏感、特异的诊断及血清型分型方法,对猪链球菌病的防控非常必要。目前,对 2 型猪链球菌快速诊断、血清型分型方法等已有较多研究<sup>[4]</sup>,但对 SS9 的快速诊断及血清型分型方法等的研究相对还较少。

荧光定量 PCR(Fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)技术,是利用荧光技术对核酸进行绝对定量的一项新兴技术<sup>[5]</sup>,具有操作简便、结果直观、敏感性高、特异性强、重复性好及具有实时性和无污染等优点,已成为病原学检测的重要方法,但迄今为至,国内外尚未见利用 FQ-PCR 诊断 SS9 感染的相关报道。为此,本试验建立了 SS9 水解探针(TaqMan)模式的 FQ-PCR 检测方法,以期为 SS9 的快速诊断和定量分析,并为 SS9 隐性感染、持续带菌猪及其污染肉食品的快速检测诊断提供技术上的支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 ABI 7000 型荧光定量

PCR 仪,美国应用生物技术公司产品;梯度 PCR 仪,德国 Biometra 公司产品;UV-2450 型分光光度计,日本岛津公司产品;凝胶成像分析系统,美国 Alpha Innotech 公司产品;DNA 回收试剂盒及质粒小量提取试剂盒等,购自大连(宝)生物工程有限公司;pGEM-T Easy 载体,购自 Promega 公司;含 SS9 型 cps9H 部分基因的 pGEM-T-cps9H 重组克隆菌,由河南省动物疫病预防控制中心实验室保存。

1.1.2 参考菌株 猪链球菌 1 型(SS1)、2 型(SS2)、7 型(SS7)、9 型(SS9)标准对照菌,由中国动物卫生与流行病学中心惠赠,葡萄球菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、弓形体、猪附红细胞体及大肠杆菌,由河南省动物疫病预防控制中心实验室保存并提供。

1.1.3 检测样品 检测样品为河南省兽医院根据临床症状,诊断为疑似 *S. suis* 感染后,采集的病猪扁桃体样品,共 11 份。

### 1.2 引物和 TaqMan 探针的设计与合成

根据 *cps9H* 基因序列(GenBank 登录号:AB246918)中的保守片段,利用 Primer Express 2.0 软件设计了 1 对特异引物 P1、P2 及 TaqMan 探针(Probe)和扩增 *cps9H* 部分基因片段的引物对 P3、P4。以上引物和探针均由大连(宝)生物工程有限公司合成。引物和探针序列见表 1,探针的 5'端用 FAM 标记,3'端用 TAMRA 标记。

### 1.3 SS9 重组质粒的提取

37℃振荡培养含 SS9 型部分 *cps9H* 基因的(pGEM-T-cps9H)工程菌,提取 SS9 重组质粒,用分光光度计测定 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>并计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>,共重复 5 次。确定质粒 DNA 的浓度和纯度,并稀释至  $1.0 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , -20℃保存备用。

### 1.4 SS9 FQ-PCR 检测方法的建立

用矩阵法对 FQ-PCR 的循环参数、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,以得到最佳的荧光定量 PCR 反应条件。

### 1.5 SS9 FQ-PCR 检测方法的敏感性试验及标准曲线的建立

用含 pGEM-T-cps9H 重组质粒的溶液作标准品,10 倍系列稀释成  $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$

拷贝/ $\mu\text{L}$ ,共 10 个稀释度,以其作为模板进行 FQ-PCR。以起始模板数的对数为  $X$  轴,以 FQ-PCR 循环次数  $C_i$  值为  $Y$  轴作回归曲线,建立 SS9 检测的标准曲线。

表 1 PCR 引物和探针的序列及相关参数

| 名称<br>Names | 核苷酸序列<br>Nucleotides sequences                           | 长度/bp<br>Length | G+C 含量/%<br>G+C percent | 解链温度/ $^{\circ}\text{C}$<br>Melting temperature |
|-------------|----------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| P1          | 5'-TTG GAT GAT TCG TGC ACA ATG G-3'                      | 22              | 45                      | 60                                              |
| P2          | 5'-TAA TTT ATG GAT AAT GCC CCT GAT TAG-3'                | 27              | 33                      | 60                                              |
| Probe       | FAM-5'-TTC TTT GGA TTC GGT ATG CTC TTC<br>GTA A-3'-TAMRA | 28              | 39                      | 65                                              |
| P3          | 5'-GGC TAC ATA TAA TGG AAG CCC-3'                        | 21              | 48                      | 62                                              |
| P4          | 5'-CCG AAG TAT CTG GGC TAC TG-3'                         | 20              | 55                      | 62                                              |

1.6 SS9 FQ-PCR 检测方法的特异性试验

以  $1.0\times10^5,1.0\times10^4,1.0\times10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  3 个浓度的 pGEX-T-cps9H 重组质粒为模板,进行实时荧光定量分析,同时按文献[6]的方法提取葡萄球菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、弓形体、猪附红细胞体和大肠杆菌及 SS1、SS2、SS7 等 3 个标准链球菌株的 DNA,然后进行 FQ-PCR 检测,并以无菌双蒸水为阴性对照以检验该方法的特异性。

1.7 SS9 FQ-PCR 方法的稳定性和重复性试验

用 FQ-PCR 方法对模板质粒 DNA 含量分别为  $1.0\times10^6,1.0\times10^5,1.0\times10^4$  和  $1.0\times10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 4 个样品进行重复检测,检验该方法的稳定性和重复性。

1.8 SS9 FQ-PCR 检测方法与常规 PCR 检测方法的比较

以 pGEM-T-cps9H 重组质粒为标准品,10 倍系列稀释成  $1.0\times10^9\sim1.0\times10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,以其为模板进行 FQ-PCR,同时利用 P3、P4 引物对进行常规 PCR 检测。常规 PCR 反应总体积为  $25\mu\text{L}$ : $10\times\text{ExTaq Buffer } 2.5\mu\text{L},\text{dNTPs } 2\mu\text{L},\text{Taq 酶 } 0.25\mu\text{L},\text{P3/P4 引物各 } 0.25\mu\text{L},\text{模板 } 1\mu\text{L},\text{ddH}_2\text{O } 18.75\mu\text{L}$ ,均匀混合,置 PCR 仪(Biometra)上进行扩增反应。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;然后  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s},57\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s},72\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s},40$  个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ 。用  $1.5\text{ g/L}$  琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,比较 2 种方法检测的灵敏度。预计扩增片段长度为  $388\text{ bp}$ 。

1.9 SS9 FQ-PCR 检测方法的临床应用试验

参照文献[7]的方法,提取疑似 *S. Suis* 感染的 11 份猪扁桃体组织病料总 DNA 和 SS9 标准对照株菌液 DNA,以无菌双蒸水为阴性对照进行 FQ-PCR 扩增;同时对以上样品的 DNA 进行常规 PCR 检测,以验证二者的符合率。

2 结果与分析

2.1 pGEM-T-cps9H 重组质粒 DNA 浓度的测定

提取 pGEM-T-cps9H 重组质粒的 DNA 并经分光光度计测定,其  $\text{OD}_{260}$  平均值为  $1.556,\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  平均值为  $1.981$ 。参照文献[8]的方法,可计算出所提质粒 DNA 溶液的浓度为  $2.75\times10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。

2.2 SS9 FQ-PCR 的反应条件

采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度,结果表明,用  $0.5\mu\text{mol/L}$  的引物浓度和  $0.25\mu\text{mol/L}$  的探针浓度对质粒标准品进行检测,可获得较小的反应循环数( $C_i$ )和较大的荧光信号强度( $\Delta R_n$ )。FQ-PCR 循环条件的优化结果表明,双温循环及  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  的退火温度为最佳的循环条件。FQ-PCR 反应总体积为  $25\mu\text{L}$ ,其中  $10\times\text{ExTaq Buffer } 2.5\mu\text{L}(\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $2.0\text{ mmol/L}),\text{dNTPs } 2\mu\text{L},\text{ExTaq 酶 } 0.25\mu\text{L},\text{上下游引物各 } 0.25\mu\text{L}(50\mu\text{mol/L}),\text{探针 } 0.125\mu\text{L}(50\mu\text{mol/L}),\text{模板 } 1\mu\text{L},\text{ddH}_2\text{O } 18.625\mu\text{L}$ ,混合均匀,置 ABI 7000 型荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $4\text{ min}$ ;然后  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s},60\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火延伸  $30\text{ s}$ ,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/TAMRA 双标记模式。

2.3 SS9 标准曲线及 FQ-PCR 的灵敏度

以 10 倍系列稀释的标准 pGEM-T-cps9H 重组质粒 ( $1.0\times10^9\sim1.0\times10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ) 为模板进行 FQ-PCR,其结果见图 1。由图 1 可知,稀释为  $1.0\times10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时荧光曲线的  $\Delta R_n$  值最高在 2 000 左右, $C_i$  值为 29.27,表明该方法检测的灵敏度为  $1.0\times10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。根据检测结果所计算出的标准曲线见图 2。图 2 曲线的相关系数为 0.996,斜率为  $-2.36$ ,截距为 31.27,从而可以得出拷贝数( $X$ )与  $C_i$  之间的线性关系表达式为: $C_i=-2.36\lg X+$

31.27。将由仪器读取的  $C_i$  值代入该表达式即可算出样品的拷贝数。

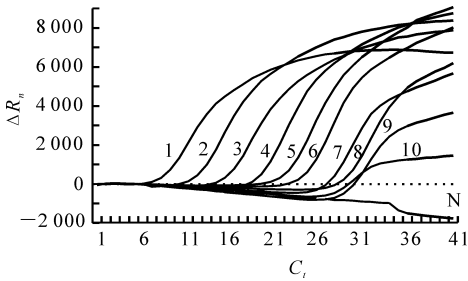


图 1 10 倍梯度稀释的猪链球菌 cps9H 重组质粒的荧光定量 PCR 检测

1~10. 对应的重组质粒模板浓度依次分别为  $1.0 \times 10^9$ ,  $1.0 \times 10^8$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^2$ ,  $1.0 \times 10^1$  和  $1.0 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ; N. 阴性对照

Fig. 1 FQ-PCR assay of the recombinant pGEM-T-cps9H plasmid by 10 fold serial dilutions

1—10. Indicate the FQ-PCR results of the recombinant pGEM-T-cps9H plasmid at the dilutions of  $1.0 \times 10^9$ ,  $1.0 \times 10^8$ ,  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^2$ ,  $1.0 \times 10^1$  and  $1.0 \times 10^0$  copy/ $\mu\text{L}$ , respectively; N. Negative control

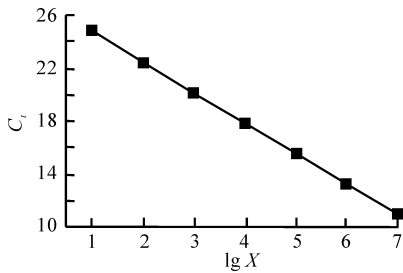


图 2 SS9 FQ-PCR 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve established from the SS9 FQ-PCR result

## 2.4 SS9 FQ-PCR 的特异性

特异性试验结果如图 3 所示。由图 3 可见,以  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  3 个浓度的 pGEX-T-cps9H 重组质粒为模板的 PCR 产物及阳性对照样品的扩增产物均有荧光响应,而 6 个对照细菌或寄生虫 DNA、阴性对照以及猪链球菌标准株 SS1、SS2、SS7 等的扩增产物均无荧光响应。说明所建立的 SS9 FQ-PCR 诊断方法,具有很好的特异性。

## 2.5 SS9 FQ-PCR 的稳定性和重复性

以 4 个浓度的 pGEM-T-cps9H 重组质粒为标准品进行多次重复测定,其结果如图 4 所示。通过计算及统计分析可知,当起始浓度分别为  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时, pGEM-T-cps9H 重组质粒标准品的最终实际测得值分别为  $1.002 \times 10^6$ ,  $0.996 \times 10^5$ ,  $0.987 \times 10^4$  和

$0.988 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,表明所建立的 FQ-PCR 方法具有良好的稳定性和重复性。

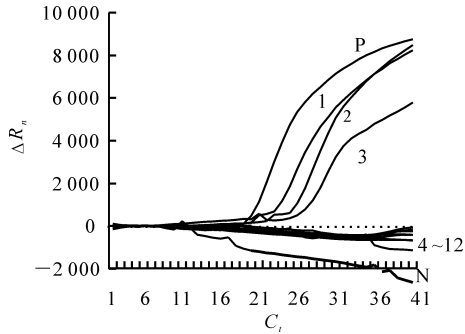


图 3 SS9 FQ-PCR 的特异性试验

P. 阳性对照;1~3. 对应的质粒模板浓度分别为  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;4~12. 葡萄球菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、弓形体裂殖体、猪附红细胞体、大肠杆菌、SS1、SS2 和 SS7;N. 阴性对照

Fig. 3 Specificity test results of the developed SS9 FQ-PCR method.

P. Positive control;1—3. FQ-PCR results of recombinant pGEX-T-cps9H plasmid with concentrations of  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$  copy/ $\mu\text{L}$ ;4—12. FQ-PCR results of the controls including the *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Toxoplasma tachyzoite*, *Mycoplasma suis*, *E. coli*, SS1, SS2 and SS7; N. Negative control

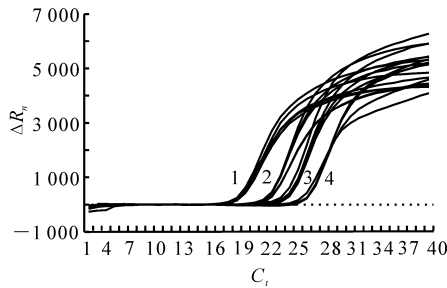


图 4 SS9 FQ-PCR 的稳定性和重复性试验

1~4. 分别以  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$  和  $1.0 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 pGEX-T-cps9H 重组质粒为模板采用 FQ-PCR 方法重复扩增 4 次的结果

Fig. 4 Accuracy and repetition assay of the developed SS9 FQ-PCR method

1—4. Indicate the repeated 4 times FQ-PCR test results of the recombinant pGEX-T-cps9H plasmid at the dilutions of  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^3$  copy/ $\mu\text{L}$ , respectively

## 2.6 SS9 FQ-PCR 与常规 PCR 的比较

采用常规 PCR 方法检测时,当模板重组质粒浓度稀释为  $1.0 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时,尚能扩增出条带,但模板浓度稀释到  $1.0 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时将不再能扩增出条带,说明常规 PCR 方法检测的灵敏度为  $1.0 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ (图 5,表 2),而 FQ-PCR 检测的灵敏度为  $1.0 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ (图 1,表 2)。因此可见,所建立的 SS9 FQ-PCR 方法的检测灵敏度,是常规 PCR

检测方法的 100 倍。

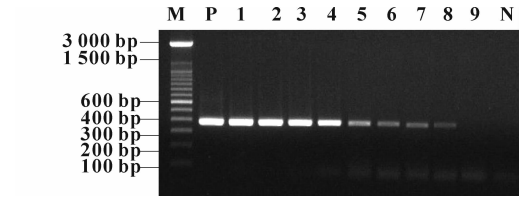


图 5 pGEM-T-cps9H 重组质粒常规 PCR 检测的琼脂糖凝胶电泳结果

M. 100 bp DNA 标准分子量对照; P. 阳性对照; 1~9. 对应的重组质粒模板浓度依次为  $1.0\times10^9$ ,  $1.0\times10^8$ ,  $1.0\times10^7$ ,  $1.0\times10^6$ ,  $1.0\times10^5$ ,  $1.0\times10^4$ ,  $1.0\times10^3$ ,  $1.0\times10^2$ ,  $1.0\times10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ; N. 阴性对照

Fig. 5 Agarose electrophoresis of the routine PCR products obtained from  $10\times$  serial dilutions recombinant pGEX-T-cps9H plasmid.

M. 100 bp DNA Marker; P. Positive control; 1–9. PCR products of recombinant pGEM-T-cps9H plasmid at the dilutions of  $1.0\times10^9$ ,  $1.0\times10^8$ ,  $1.0\times10^7$ ,  $1.0\times10^6$ ,  $1.0\times10^5$ ,  $1.0\times10^4$ ,  $1.0\times10^3$ ,  $1.0\times10^2$ ,  $1.0\times10^1$  copy/ $\mu\text{L}$ ; N. Negative control

表 2 SS9 FQ-PCR 与常规 PCR 方法检测 pGEM-T-cps9H 重组质粒灵敏度的比较

Table 2 Comparison the sensitivity by detecting the recombinant pGEM-T-cps9H plasmid using the developed FQ-PCR and the routine PCR method

| 质粒模板/<br>(copy · $\mu\text{L}^{-1}$ )<br>Recombinant plasmid | 常规 PCR<br>Rroutine PCR | FQ-PCR |                    |
|--------------------------------------------------------------|------------------------|--------|--------------------|
|                                                              |                        | $C_t$  | 灵敏度<br>Sensitivity |
| $1.0\times10^9$                                              | +                      | 6.89   | +                  |
| $1.0\times10^8$                                              | +                      | 10.27  | +                  |
| $1.0\times10^7$                                              | +                      | 14.02  | +                  |
| $1.0\times10^6$                                              | +                      | 17.77  | +                  |
| $1.0\times10^5$                                              | +                      | 19.76  | +                  |
| $1.0\times10^4$                                              | +                      | 22.34  | +                  |
| $1.0\times10^3$                                              | +                      | 26.24  | +                  |
| $1.0\times10^2$                                              | +                      | 27.46  | +                  |
| $1.0\times10^1$                                              | —                      | 28.74  | +                  |
| $1.0\times10^0$                                              | —                      | 29.27  | +                  |

注:“+”表示检测结果为阳性,“—”表示检测结果为阴性, $C_t < 30$  代表 FQ-PCR 检测呈阳性。

Note:“+” indicates the positive results;“—” indicates the positive results;  $C_t < 30$  indicate the positive results of FQ-PCR.

### 2.7 SS9 FQ-PCR 与常规 PCR 对临床样品检测应用的比较

提取疑似猪链球菌感染扁桃体组织病料和标准 SS9 株总 DNA,分别用常规 PCR 和 FQ-PCR 进行检测,其结果如图 6,7 所示。由图 6,7 可见,标准 SS9 株经两种方法检测的结果均为阳性;两种方法均能从 11 份疑似病料中检出 3 份 SS9 型阳性,二者的检测结果完全相符。

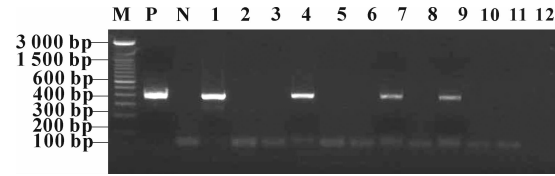


图 6 常规 PCR 临床检测猪链球菌的电泳结果  
M. 100 bp DNA 标准分子量对照;P. 阳性对照;N. 阴性对照;

1. SS9 标准株;2~12. 11 份临床疑似猪链球菌感染猪扁桃体组织病料  
Fig. 6 Agarose electrophoresis of routine PCR products obtained from the 11 clinic suspicious *S. suis* infected tonsil tissue and standard SS9 strain

M. 100 bp DNA Marker;P. Positive control;N. Negative control;  
1. Standard SS9 strain;2–12. 11 clinic suspicious *S. suis* infected tonsil tissue samples

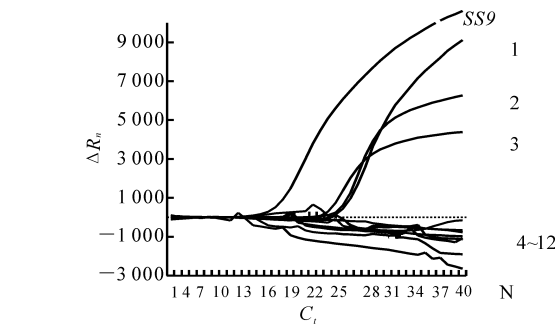


图 7 FQ-PCR 临床检测猪链球菌疑似样品扩增曲线  
SS9. 标准猪链球菌 9 型株;1~3. 临床样品中 3 种 SS9 阳性样品的 FQ-PCR 扩增曲线;4~12. 临床样品中 8 种 SS9 阴性样品的 FQ-PCR 扩增曲线;N. 阴性对照

Fig. 7 FQ-PCR detection curves of the clinic suspicious *S. suis* infected tonsil tissue and standard SS9 strain  
SS9. Standard *S. suis* serotype 9 strain;1~3. Carves of the 3 positive samples of the 11 clinic suspicious *S. suis* infecte dsamples;  
4–12. Carves of the 8 negative samples of the 11 clinic suspicious *S. suis* infected samples;N. Negative control

## 3 讨论

引起猪和人发病的猪链球菌血清型除 2 型外,还有 9 型、7 型、1/2 型、1 型及 14 型等。在欧洲 7 个国家分离的 411 株猪链球菌中,SS9 型株所占的比例仅次于 SS2 而位居第二<sup>[2]</sup>;自猪体内分离的 SS9 型分离株可致死小鼠<sup>[9]</sup>,我国也有关于 SS9 型株感染的报道<sup>[10]</sup>。SS9 株成为继 2 型株之外危害最大的致病性猪链球菌血清型之一。迄今为止,国内外对猪链球菌的研究,主要集中在 2 型猪链球菌的研究上<sup>[3,11-13]</sup>,有关 SS9 的研究报道很少,Smith 等<sup>[14]</sup>研究了 1 型、2 型、9 型猪链球菌的多重 PCR 鉴别诊断方法;Wisselink 等<sup>[15]</sup>报道了 1 型、14 型、2

型,1/2 型,7 型和 9 型等 6 个血清型的多重 PCR 鉴别诊断方法;国内刘军等<sup>[10]</sup>也对 SS9 与 SS2 型的多重 PCR 诊断方法进行了研究。本研究则首次建立了 SS9 荧光定量 PCR 诊断方法,与常规 PCR 方法相比,该方法诊断更加迅速,整个反应可在 1~2 h 内完成,而且不需要电泳,从而大大降低了对环境的污染,且其检测灵敏度是常规 PCR 方法的 100 倍(表 2),并能实现对样品的实时定量检测。因此,该方法对 SS9 的早期快速诊断、疫苗免疫及防控等均具有非常重要的意义。

*cps9H* 基因是 SS9 血清型特异的单拷贝基因,也是对其血清型分型的依据,选取 *cps9H* 基因为靶基因设计 PCR 引物,可确保 SS9 PCR 检测的特异性<sup>[14]</sup>。本研究建立的 FQ-PCR 方法,以 *cps9H* 基因为模板设计探针和引物,在特异性方面具有双重保证,因此具有较常规 PCR 更高的特异性。特异性和重复性试验表明,FQ-PCR 只对不同浓度的 pGEM-T-*cps9H* 重组质粒呈现阳性反应,而对 6 个对照细菌和寄生虫 DNA 样品以及其他血清型的致病性猪链球菌株(标准 SS1、SS2、SS7 株)均呈现阴性反应,说明本研究所建立的 FQ-PCR 方法,具有很高的特异性,可用于 SS9 的快速诊断与分型研究。另外,对同一样品重复多次检测,均可得到一致的  $C_t$  值和荧光强度,表明所建立的 FQ-PCR 方法具有很高的稳定性和重复性。

利用 FQ-PCR 方法进一步对 11 份临床疑似猪链球菌感染的扁桃体组织样品和标准 SS9 株进行了检测,其检测结果与用常规 PCR 方法的检测结果完全一致,说明该方法可成功应用于 SS9 的临床应用检测;同时也暗示在我国猪群感染猪链球菌病例中,存在着 SS9 感染,因此建议临床上在重视 SS2 感染控制的同时,还应该加强对 SS9 感染的防控。

## [参考文献]

[1] Staats J J, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present[J]. Vet Res Commun, 1997, 21(6): 381-407.

[2] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries[J]. Vet Microbiol, 2000, 74(3): 237-248.

[3] Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6): 914-920.

[4] Swildens B, Wisselink H J, Engel B, et al. Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR[J]. Vet Microbiol, 2005, 109(3/4): 223-228.

[5] 许颂霄, 王虹, 尹一兵. 定量 PCR 的荧光技术[J]. 生命的化学, 2005, 25(5): 413-415.

Xu S X, Wang H, Yin Y B. The fluorescence technique of the quantitative PCR[J]. The Chemistry of the Life, 2005, 25(5): 413-415. (in Chinese)

[6] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, et al. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3169-3175.

[7] Wisselink H J, Reek F H, Vecht U, et al. Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR[J]. Vet Microbiol, 1999, 67(2): 143-157.

[8] 宋志军, 宋长绪, 杨增岐, 等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 98-102

Song Z J, Song C X, Yang Z Q, et al. Development of real-time TaqMan-quantitative RT-PCR assay for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(2): 98-102. (in Chinese)

[9] Costa A T, Lobato F C, Abreu V L, et al. Serotyping and evaluation of the virulence in mice of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2005, 47(2): 113-115.

[10] 刘军, 冯书章, 尹铁勇, 等. 猪链球菌 2 型和 9 型菌株的多重 PCR 检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(6): 510-514.

Liu J, Feng S Z, Yin T Y, et al. Multiplex PCR assay for the detection of serotype 2 and 9 of *Streptococcus suis*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(6): 510-514. (in Chinese)

[11] Tayoro J, Besnier J M, Laudat P, et al. Infective endocarditis due to *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996, 15(9): 765-766.

[12] Tang J Q, Wang C J, Feng Y J, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Plos Med, 2006, 3(5): 151-157.

[13] Luengo-Alvarez J, Martin-Ruiz C, Sanchez Munoz-Torrero J F, et al. Meningitis due to *Streptococcus suis*: a case report[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006, 24(5): 352-354.

[14] Smith H E, Veenbergen V, van der Velde J, et al. The cps genes of *Streptococcus suis* serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3146-3152.

[15] Wisselink H J, Joosten J J, Smith H E. Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2922-2929.