

狐阴道加德纳氏菌 PCR 诊断方法的建立与应用

颜 赞¹, 刘悦竹², 吴召强², 李宏梅¹, 孙 杰¹, 程艳丽¹, 刁有祥¹

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018; 2 山东立鼎生物技术研究, 山东 济南 250022)

【摘 要】 【目的】建立快速检测狐阴道加德纳氏菌的 PCR 诊断方法。【方法】根据阴道加德纳氏菌 16S rRNA 基因序列设计 1 对特异性引物, 以分离的狐阴道加德纳氏菌菌体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 建立狐阴道加德纳氏菌的 PCR 检测方法, 并对该方法的特异性、敏感性及其可行性进行检验。【结果】特异性试验结果表明, 狐阴道加德纳氏菌能扩增出 437 bp 的特异性核酸片段, 而大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌的扩增结果均为阴性。敏感性试验结果表明, PCR 的最低检出限量为 500 mL⁻¹。利用建立的 PCR 检测方法, 对 9 株从山东省不同地区分离的疑似狐阴道加德纳氏菌菌株进行检测, 结果有 4 株为阳性。【结论】研究建立的狐阴道加德纳氏菌 PCR 快速诊断方法, 敏感性高、特异性强, 可 1 次检测多个样品。

【关键词】 狐; 狐阴道加德纳氏菌; PCR; 诊断方法

【中图分类号】 S865.2⁺3; S858.92

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0032-04

Establishment and application of *Gardnerella vaginalis* of fox by PCR

YAN Yun¹, LIU Yue-zhu², WU Zhao-qiang², LI Hong-mei¹,

SUN Jie¹, CHENG Yan-li¹, DIAO You-xiang¹

(1 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2 Institute of Biotechnology, Shandong Liding, Ji'nan, Shandong 250022, China)

Abstract: 【Objective】PCR diagnostic method of rapid detection of *Gardnerella vaginalis* of fox was established. 【Method】On the basis of the *Gardnerella vaginalis* 16S rRNA gene, one pair of primers were designed. It took the separated *Gardnerella vaginalis* of fox DNA as a template and went on PCR amplification. So PCR detection method of *Gardnerella vaginalis* of fox was established, and its with specificity and sensitivity were studied. 【Result】It showed by the specific test results that *Gardnerella vaginalis* of fox can amplify 437 bp specific DNA fragment. However, the amplification results of *E. coli*, *Salmonella pullorum*, *Bacillus pyocyaneus*, *Staphylococcus* were amplified negatively. The result of the sensitivities test showed that at least 500 mL⁻¹ *Gardnerella vaginalis* of fox was detected with the approach. With the approach of the established PCR the 9 suspected strains isolated from different regions of Shandong Province were detected and 4 strains were positive. 【Conclusion】The PCR diagnostic method of rapid detection of *Gardnerella vaginalis* of fox is successfully established, and its sensitive and can detect more samples at are time.

Key words: fox; *Gardnerella vaginalis* of fox; PCR; diagnostic method

狐阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis* of fox, GVF)是引起狐空怀、流产和死胎的主要病原之

一。据报道,由狐阴道加德纳氏菌病引起的狐空怀、流产占狐空怀、流产总数的 45%~70%^[1]。该病主

* [收稿日期] 2009-11-02

[基金项目] 山东省中青年科学家奖励基金项目(2008BS07002)

[作者简介] 颜 赞(1985—),女,山东阳谷人,在读硕士,主要从事畜禽病原的分离鉴定与防治研究。E-mail: yanyun_yy@163.com

[通信作者] 刁有祥(1962—),男,山东胶州人,教授,主要从事畜禽病原的分离鉴定与防治研究。E-mail: yxdiao@163.com

要通过交配传播,也可以通过怀孕的母狐传染胎儿,其中银黑狐、北极狐、彩狐、赤狐、貉及水貂均易感染。该病一年四季均可发生,但配种期感染率明显增高,且不同品种、不同性别和不同日龄均可感染^[1]。

1953年Lepolds^[2]首次从前列腺炎和子宫宫颈炎患者体内分离到一种多形态的革兰氏阴性小杆菌。1955年,Gardner^[3]将其命名为阴道嗜血杆菌,但由于其不具备嗜血杆菌属的独特性状而被排除。1963年,Zinemann等将其归为棒杆菌属,为阴道棒状杆菌,但由于二者DNA中G+C的质量分数相差悬殊,再次被否定。直至1980年,Greenwood^[4]对78株临床菌的形态、生理生化 and 表形特征进行数值分析,并结合DNA/DNA杂交、细胞组分的化学分析后认为,群内具有高度的同源性,进而提出成立新属种——阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*, GV)并给予了定义。1987年,严忠诚等^[1]从国外进口狐的流产胎儿及流产狐的阴道分泌物中分离到阴道加德纳氏菌,并证实了其对狐的致病性和严重危害,认为该病为人畜共患病。狐阴道加德纳氏菌的微生物学特性有别于人体阴道加德纳氏菌,故定名为阴道加德纳氏菌狐亚种^[5]。

近年来,狐阴道加德纳氏菌病的流行呈上升趋势,给我国毛皮动物饲养业造成了严重的经济损失^[6]。目前,狐阴道加德纳氏菌病的实验室诊断方法主要有分离培养法及血清学方法等^[7-10]。但分离培养时狐阴道加德纳氏菌需要特殊的营养才能生长,而血清学方法的非特异检出较高,达不到快速诊断的目的。为此,本研究根据阴道加德纳氏菌16S rRNA基因序列设计特异性引物,建立了PCR检测狐阴道加德纳氏菌的快速诊断方法,并对该方法的特异性和敏感性进行了检测,以期对狐阴道加德纳氏菌病的防治提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 PCR仪(Eppendorf,德国);电泳仪、凝胶成像仪(Biorad,意大利);Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L),dNTP Mix,DNA Marker,限制性内切酶EcoRI、Sal I,TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0,均购于大连宝生物工程公司;其他相关化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 菌株 试验所用GVF分离株(分离于山东日照,编号为RZ-GVF)、大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)、绿脓杆菌(*Bacillus*

pyocyaneus)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*),均由本实验室分离并保存。

1.1.3 PCR引物 根据GenBank已发表的阴道加德纳氏菌16S rRNA基因序列设计1对特异性引物,上游引物:5'-AGTCGAACGGGATCTGAC-CAG-3';下游引物:5'-CGTAGTTAGCCGCGCT-TATTC-3',预期扩增片段为437 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 细菌培养基 参照文献^[11]配制固体培养基和液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组DNA的提取 将狐阴道加德纳氏菌分离株按常规方法接种于液体培养基中,37℃培养24 h后,按文献^[12]的方法,提取细菌基因组DNA。其他细菌DNA的提取均按上述方法进行。

1.2.2 PCR方法的建立 以提取的细菌基因组DNA为模板进行PCR扩增。反应体系为25 μ L:10 $\times$ PCR Buffer(含Mg²⁺ 25 mmol/L) 2.5 μ L,MgCl₂(浓度为1 mol/mL) 1 μ L,dNTP Mix(浓度为25 μ mol/L) 1.5 μ L,DNA模板2 μ L,上、下游引物(浓度为25 μ mol/L)各0.8 μ L,Taq DNA聚合酶0.3 μ L,灭菌双蒸水16.1 μ L。反应条件:94℃预变性5 min;94℃ 50 s,56℃ 50 s,72℃ 50 s,30个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。

1.2.3 PCR扩增产物的检测 取5 μ L扩增产物和2 μ L Loading Buffer混匀,加到含EB的质量分数为0.8%的琼脂糖凝胶中,同时加入DNA Marker(DL 2000),于90 V电压下电泳40 min左右,然后在凝胶成像仪中观察。

1.2.4 PCR产物的克隆及序列测定 PCR扩增片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定,在紫外灯照射下,切取特异性条带,按TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0说明书回收PCR扩增产物。

将回收的PCR扩增产物分别与pMD18-T Vector连接,转化DH-5 α 大肠杆菌感受态细胞,EcoRI、Sal I双酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 PCR的特异性试验 以大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌及2株分离的狐阴道加德纳氏菌为DNA模板,用建立的PCR方法检验引物设计的特异性。

1.2.6 PCR的敏感性试验 将RZ-GVF用液体培养基培养过夜,计数,然后进行10倍递增稀释,分别提取DNA用于PCR扩增。

1.2.7 PCR 方法的初步应用 将 9 株从山东省不同地区分离的疑似狐阴道加德纳氏菌株,经培养后提取细菌基因组 DNA,按本研究建立的反应体系和反应程序进行 PCR 反应,观察结果。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的克隆和序列测定

所得 PCR 产物经克隆、转化、测序,与 GenBank 中发表的阴道加德纳氏菌基因序列同源性为 95.2%,证明扩增所得的 PCR 产物为阴道加德纳氏

菌基因所特有。

2.2 特异性试验

以提取的狐阴道加德纳氏菌 DNA 为模板,扩增出了预期的长为 437 bp 的核酸片段,而大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌均未扩增出该片段(图 1)。

2.3 敏感性试验

RZ-GVF 经系列稀释后进行 PCR 扩增,结果在细菌浓度为 500 mL⁻¹时仍能出现明显条带(图 2)。

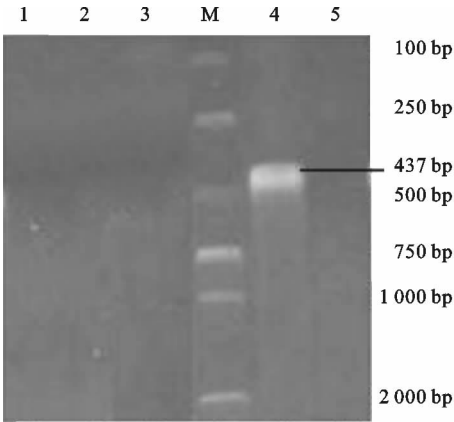


图 1 GVF PCR 的扩增结果

M. DNA Marker (DL 2000);1. 大肠杆菌;2. 沙门氏菌;
3. 绿脓杆菌;4. 狐阴道加德纳氏菌;5. 金黄色葡萄球菌

Fig. 1 Amplified product of GVF by PCR

M. DNA Marker (DL 2000);1. *E. coli*;2. *Salmonella pullorum*;
3. *Bacillus pyocyaneus*;4. GVF;5. *Staphylococcus*

2.4 PCR 方法对分离菌株的检测

9 株从山东省不同地区分离的疑似 GVF 菌株经培养后,进行 PCR 检测,结果有 4 株出现阳性结果(图 3)。说明本研究根据已发表的阴道加德纳氏菌 16S rRNA 基因序列设计引物,扩增特异的核酸片段,建立的狐阴道加德纳氏菌的 PCR 检测方法是可行的。

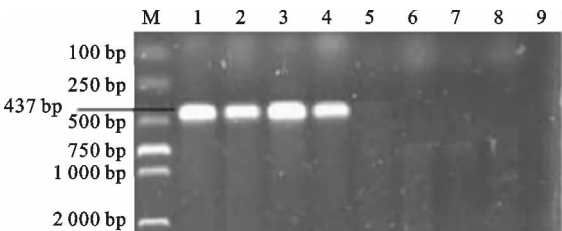


图 3 GVF 分离菌株的 PCR 检测结果

M. DNA Marker (DL 2000);1~9. GVF 分离菌株

Fig. 3 PCR test result of isolated GVF strains

M. DNA Marker (DL 2000);1~9. GVF isolates

3 讨 论

PCR 诊断技术是当前应用范围极广的分子生物学诊断方法^[12-14]。该方法能够对含有微量病原体的样品进行检测,且特异性强,敏感性高,检测速度快,为临床诊断提供了最为可靠的依据。

狐阴道加德纳氏菌在母狐阴道分泌物和流产胎儿体内分离率最高,但阴道分泌物内含有大量的杂菌,在进行病原分离鉴定时难以挑取典型的菌落,易造成漏检、误诊。因此建立一种特异、快速的诊断方法尤为重要。本研究建立的 PCR 快速诊断狐阴道加德纳氏菌方法的特异性试验结果表明,狐阴道加德纳氏菌能扩增出 437 bp 的特异性核酸片段,而大肠杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌的扩增结果均为阴性;敏感性试验结果表明,PCR 的 GVF 最低检出限量为 500 mL⁻¹。故建立的 PCR 检测方法敏感性高、特异性强。同时 PCR 可 1 次性

检测多个样品,检测速度快,大大提高了检测效率。

本研究对 9 株从山东省不同地区分离的疑似 GVF 菌株进行检测,有 4 株出现阳性结果,这表明狐阴道加德纳氏菌病已在山东省不同地区发生和流行。该病一旦发生,将严重影响山东省养狐业的发展,各地兽医防疫部门应加强对该病的检测和预防。目前,国内选用免疫原性优良的血清 I 型狐阴道加德纳氏菌株,研究出了氢氧化胶苗^[15-16],其安全性优,狐免疫接种后无任何不良反应,对 GVF I 型的保护率可达 92%,对 II、III 型的保护率也达 80% 以上,免疫持续期为 6 个月,可以有效地控制狐、貉和水貂的空怀和流产。

[参考文献]

- [1] 严忠诚,阎新华,赵传芳,等. 一种新的人畜共患传染病:狐阴道加德纳氏菌病的研究 [J]. 微生物学报,1995,35(3):209-215.
Yan Z C, Yan X H, Zhao C F, et al. *Gardnerella vaginalis* of fox: a new disease of anthroponosis [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(3): 209-215. (in Chinese)
- [2] Lepolds. Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system [J]. United States Armed Forces Medical Journal, 1953, 4: 262-266.
- [3] Gardner H L. Bacterial flora in abnormalities of the female genital tract [J]. Am J Obstet Gynecol, 1955, 69: 962-976.
- [4] Greenwood J R. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*; *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) [J]. Int J Syst Bacteriol, 1980, 30(1): 170-178.
- [5] 蔡妙英. 一种新的人畜共患传染病:狐阴道加德纳氏菌病的研究 [J]. 微生物学报, 1995, 35(1): 33-37.
Cai M Y. *Gardnerella vaginalis* of disease fox: a new disease of anthroponosis [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(1): 33-37. (in Chinese)
- [6] 徐龙涛,范伟兴. 狐阴道加德纳氏菌病及其防制 [J]. 动物医学进展, 2003(3): 18-20.
Xu L T, Fan W X. *Gardnerella vaginalis* of disease fox and its control [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003(3): 18-20. (in Chinese)
- [7] 阎新华. Dot-Elisa 检测狐阴道加德纳氏菌病血清抗体的研究 [J]. 微生物学报, 1995, 35(4): 287-291.
Yan X H. Study of Dot-Elisa for the detection of serum antibody of *Gardnerella vaginalis* of disease fox [J]. Acta Microbiologica Sinica, 1995, 35(4): 287-291. (in Chinese)
- [8] 阎新华. 狐阴道加德纳氏菌病虎红平板凝集试验诊断方法的研究 [J]. 特产研究, 1995(1): 1-5.
Yan X H. The study of the diagnosis method of Hu-hong plate agglutination test for *Gardnerella vaginalis* of disease fox [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 1995(1): 1-5. (in Chinese)
- [9] 宋秀丽,涂少华,叶永康. 阴道加德纳菌的分离培养、鉴定及药敏研究 [J]. 同济大学学报:医学版, 2001, 22(2): 45-46.
Song X L, Tu S H, Ye Y K. Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis* and susceptibility studies [J]. Journal of Tongji University: Medical Edition, 2001, 22(2): 45-46. (in Chinese)
- [10] 赵传芳,王长凤,阎新华,等. 不同培养基对阴道加德纳氏菌生长的影响 [J]. 特产研究, 1999(3): 49-50.
Zhao C F, Wang C F, Yan X H, et al. The effect of growth for *Gardnerella vaginalis* on different culture medium [J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 1999(3): 49-50. (in Chinese)
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2003: 22-23.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Guide to molecular cloning experiments [M]. 3rd ed. Huang P T, translated. Beijing: Science Press, 2003: 22-23. (in Chinese)
- [12] Alex van B, Ankie K, Peter V. Development of a species-specific polymerase chain reaction assay for *Gardnerella vaginalis* [J]. Molecular and Cellular Probes, 1995, 9: 167-174.
- [13] Linu H M, Tsui M S, Tu F C. Detection of *Gardnerella vaginalis* in the vagina and amniotic fluid using the polymerase chain reaction [J]. International Journal of Gynecology and Obstetrics, 2000, 71: 221-222.
- [14] Spiegel C. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid [J]. Clin Microbiol, 1983, 18(1): 170-177.
- [15] 阎喜军. 狐阴道加德纳氏菌病疫苗应用效果研究 [J]. 经济动物学报, 1999, 3(2): 1-3.
Yan X J. Using effect of *Gardnerella vaginalis* vaccine of fox [J]. Journal of Economic Animal, 1999, 3(2): 1-3. (in Chinese)
- [16] 李元刚,陈志国. 狐阴道加德纳氏菌病研究进展 [J]. 农业科学研究, 2006, 27(4): 65-67.
Li Y G, Chen Z G. Research progress on the disease of *Gardnerella vaginalis* of fox [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2006, 27(4): 65-67. (in Chinese)