

武军元,康 强,钱文熙. 新疆天山马鹿布氏杆菌病流行病学调查[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):235-237.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.077

新疆天山马鹿布氏杆菌病流行病学调查

武军元¹,康 强²,钱文熙¹

(1.塔里木大学/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300;

2.新疆阿克苏地区动物疫病控制诊断中心,新疆阿克苏 843000)

摘要:采用平板凝集试验、试管凝集试验对采自新疆 3 个集约化养殖鹿场、1 个散养鹿群的 410 份血清样本进行布氏杆菌特异性抗体检测;采用分子生物学方法,根据 GenBank 公布的布氏杆菌外膜蛋白 Omp25c 的基因序列设计特异性引物,对疑似布氏杆菌阳性的 10 份羊水病料进行 PCR 扩增,并将扩增产物克隆到 pGEM-T Easy Vector 进行测序。结果表明,血清稀释比例为 1:25 时,平板凝集试验、试管凝集试验的抗体阳性率分别为 15.1%、14.6%,4 份羊水样本的 PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上均观察到预期 149 bp 大小的扩增条带,BLAST 比对分析显示该扩增序列与布氏杆菌基因组的核苷酸序列同源性为 100%,从而判定新疆集约化养殖的天山马鹿存在布氏杆菌病的感染。

关键词:布氏杆菌;天山马鹿;平板凝集;试管凝集;Omp25c

中图分类号:S852.61⁺2;S858.255.1⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0235-02

布氏杆菌病(brucellosis)又称马尔他热、波状热,是由布氏杆菌属(*Brucella*)细菌引起的人畜共患病。布氏杆菌可感染人类、多种家畜和野生动物,引起相似的临床症状与病理损伤。该病最典型的症状为怀孕母畜流产、空怀不育、子宫炎、乳房炎,以及公畜睾丸炎、关节炎等。世界动物卫生组织(OIE)将其列为 B 类动物疫病,中国将其列为二类动物疫病。全世界有 170 多个国家和地区存在和流行人畜共患布氏杆菌病,每年因该病造成的经济损失约 30 亿美元^[1]。根据其宿主的嗜好性可将布氏杆菌分为猪、牛、羊、犬、绵羊附睾、沙林鼠种布鲁氏菌 6 个种及 20 个型^[2]。我国鹿群中流行的布鲁氏菌主要为猪型、牛型、羊型、非典型布鲁氏菌^[3-4]。天山马鹿是产于新疆维吾尔自治区天山山脉的鹿品种,是国家二类保护动物。目前,关于新疆天山马鹿感染布氏杆菌的情况尚未见报道,更无应用分子生物学手段对天山马鹿进行布氏杆菌流行病学的检测及研究。通过对新疆地区集约化养殖、散养的天山马鹿进行布氏杆菌病流行病学调查,以了解当地天山马鹿的布氏杆菌感染状况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清及病料来源 410 份血清样本分别采自新疆地区 3 个集约化养殖鹿场、1 个散养鹿群;10 份疑似布氏杆菌阳性的羊水病料采自新疆地区集约化养殖鹿场。

1.1.2 试验菌株 布氏杆菌疫苗株 M5 购自新疆天康畜牧生物技术公司。

1.1.3 主要试剂及仪器设备 HiPure Gel Pure DNA Kits,购自 Magen 公司;pGEM-T Easy Vector,购自 Promega 公司;Trans 2K DNA Markers、Trans Taq-T DNA Polymerase,均购自

北京全式金生物技术有限公司;质粒小提试剂盒,购自天根生化科技有限公司;布氏杆菌虎红平板凝集抗原、布氏杆菌试管凝集抗原、布氏杆菌标准阳性血清,均购自中国兽药药品监察所;布氏杆菌阴性参考血清为笔者所在实验室保存。梯度 PCR 仪、全自动凝胶成像分析系统、高速离心机均为德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 虎红平板凝集试验 虎红平板凝集试验是一种快速、敏感的检测方法,用于布氏杆菌病的田间筛选,具体操作及判定方法参照 GB/T 18646—2002《动物布鲁氏菌病诊断技术》。

1.2.2 试管凝集试验 试管凝集试验是一种特异、敏感的布氏杆菌病检测方法,用于布氏杆菌病的诊断,具体操作及判定方法参照 GB/T 18646—2002《动物布鲁氏菌病诊断技术》。

1.2.3 布氏杆菌基因组 DNA 的制备 将疑似布氏杆菌阳性的羊水病料划线接种于 TSA 琼脂平板,置于培养箱中 37 ℃ 培养 24 h,挑取单菌落接种至 TSB 培养基。取 1 mL TSB 培养物以 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。

以 200 μL TE(1 mmol/L EDTA,10 mmol/L Tris-HCl,pH 值 7.6)重悬沉淀,于 95 ℃ 煮沸 5 min,以 12 000 r/min 离心 10 min,上清即为细菌 DNA 模板。

1.2.4 样品的 PCR 检测 根据布氏杆菌特异性基因 Omp25c 的保守片段,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列为:Omp25c FP 5'-TTTGGATGAAAATAACGCC-3';Omp25c RP 5'-ATTCGCCCCCTGTTCTCA-3'。

所采用的 25 μL 反应体系为:10 × PCR 缓冲液 2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 1.0 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U)0.5 μL、上下游引物各 1.0 μL(10 μmol/L)、DNA 模板 2.0 μL、无 RNA 酶的水 17.0 μL。反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 反应产物于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,在紫外灯下观察结果。

1.2.5 PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序 采用 HiPure Gel

收稿日期:2015-02-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460610、31260569)。

作者简介:武军元(1980—),男,甘肃武威人,博士,副教授,主要从事动物病原微生物学研究。E-mail:wjyn-w@126.com。

Pure DNA Kits 试剂盒,按照说明书对电泳后的 PCR 产物进行回收并纯化,将纯化回收的 PCR 产物连接至 pGEM - T Easy Vector。连接产物按常规方法转化大肠杆菌感受态 DH5 α (天根公司产品)并进行氨苄青霉素抗性筛选。选择抗性菌落增菌培养,并采用质粒小提试剂盒从扩增的细菌培养物中提取质粒,将 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 血清学检测结果

用 PBS 溶液对采集的 410 份天山马鹿血清依次进行倍比稀释(1 : 25、1 : 50、1 : 100、1 : 200),并分别采用平板凝集试验、试管凝集试验进行检测,检测结果见表 1、表 2。

2.2 PCR 检测结果

应用针对特异性基因 *Omp25c* 保守片段设计的引物,分别对疑似阳性病料、对照疫苗菌株 M5 的 DNA 模板进行 PCR 扩增。结果显示,10 份疑似布氏杆菌阳性的羊水病料中有 4 份呈阳性,阳性率为 40%,在 1.2% 琼脂糖凝胶上观察到预期大小为 149 bp 的扩增条带。采用 M13 通用引物对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行测序,并将获得的核苷酸序列进行 BLAST 对比,证明所扩增及克隆的核酸片段为布氏杆菌 *Omp25c* 保守的核苷酸序列。阳性样品的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1,扩增子测序序列的 BLAST 比对分析结果见图 2。

```
Query 1 ATTCGCCCTGTTTCTCAGGCTGCCGAAAGCCACACCGCTGCGATATAGGGCAGGAAGC 60
Sbjct 131568 ATTCGCCCTGTTTCTCAGGCTGCCGAAAGCCACACCGCTGCGATATAGGGCAGGAAGC 131627

Query 61 GGTC AACCGCATAAACGGCGCGTGC GCACGGCACC GGACAGCGAAGCGGTTTTC AA 120
Sbjct 131628 GGTC AACCGCATAAACGGCGCGTGC GCACGGCACC GGACAGCGAAGCGGTTTTC AA 131687

Query 121 AGGTGGCGGCGGCGTTATTTTCATCCAAA 149
Sbjct 131688 AGGTGGCGGCGGCGTTATTTTCATCCAAA 131716
```

Query: 扩增子测序序列; Sbjct: 布氏杆菌部分基因组序列

图2 扩增序列的 BLAST 比对分析结果

3 结论与讨论

布鲁氏菌病是由布氏杆菌引起的一种人兽共患传染病,布氏杆菌是一种兼性胞内寄生菌,具有逃避机体免疫保护的能力。对于布氏杆菌病的诊断,GB/T 18646—2002《动物布鲁氏菌病诊断技术》规定的虎红平板凝集试验(RBT)、试管凝集试验(SAT)一直是我国动物布病检测的经典试验方法^[5]。然而,对于受到免疫抑制且携带病原的宿主动物,抗体水平很难达到有效的检测滴度,需借助分子生物学方法来检测动物体内的病原体,因此必须筛选布氏杆菌种间高度保守的目的基因,而 *Omp25c* 是目前最具代表性的布氏杆菌外膜蛋白之一,具有较强的免疫原性,且在布氏杆菌各种间高度保守^[6-7]。以 *Omp25c* 外膜蛋白为研究对象,选取特异性较好的基因片段设计引物,进行动物体内布氏杆菌病原菌的检测。

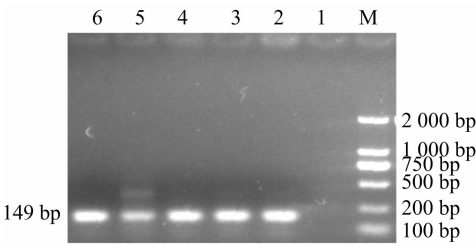
近年来,新疆地区多个畜种均有布氏杆菌病感染的报道^[8-10],严重威胁当地人畜健康及畜牧业的安全生产。天山马鹿是产于新疆维吾尔自治区天山山脉的鹿品种,是国家二类保护动物。早期,野生天山马鹿在新疆较为多见,随着近年来市场对天山马鹿所产鹿茸、鹿胎、鹿血、鹿筋、鹿角胶等鹿产品需求的不断扩大,天山马鹿在新疆呈现集约化养殖的趋势。

表 1 平板凝集试验检测结果

血清稀释比例	检测数(份)		阳性率(%)
	阳性	阴性	
1 : 25	62	348	15. 1
1 : 50	58	352	14. 1
1 : 100	36	374	9. 0
1 : 200	28	382	7. 0

表 2 试管凝集试验检测结果

血清稀释比例	检测数(份)		阳性率(%)
	阳性	阴性	
1 : 25	60	350	14. 6
1 : 50	55	355	13. 4
1 : 100	32	378	7. 8
1 : 200	25	385	6. 0



M—DL 2 000 DNA marker; 1—布氏杆菌阴性对照; 2—布氏杆菌阳性对照; 3~6—待检样品

图1 待检样品的 PCR 检测结果

有文献初步报道,新疆天山马鹿由野生放养到与其他家畜混养,曾出现过布氏杆菌感染的病例^[11-12],然而上述流行病学调查研究均仅限于血清学水平,不能排除假阳性、假阴性存在的情况。为系统了解新疆天山马鹿集约化养殖后,布氏杆菌病在该畜群中的流行状况,本研究采用血清学与分子生物学相结合的技术手段,对当地天山马鹿布氏杆菌病的感染情况进行系统的流行病学调查。结果表明,新疆天山马鹿集约化养殖后确实出现了布氏杆菌病感染的病例。对血清样品进行布氏杆菌特异性抗体检测时,平行采用虎红平板凝集试验与试管凝集试验,然而以不同方法对同一批血清测得的阳性率不同,可见仅靠血清学检测抗体的方法难以对畜群感染布氏杆菌的程度进行定论。以布氏杆菌高度保守的 *Omp25c* 外膜蛋白基因为研究对象,从 10 份疑似布氏杆菌阳性的羊水病料中筛选出 4 份阳性病例,进一步提供了布氏杆菌感染新疆天山马鹿的证据。确定感染新疆天山马鹿的布氏杆菌种型尚需进一步研究,从而有针对性地对天山马鹿进行布氏杆菌病的防控。

参考文献:

[1] Seleem M N, Boyle S M, Sriranganathan N. Brucellosis: a reemerging zoonosis[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3/4): 392 - 398.

王海,王康环,蒋小松,等. 优质肉鸡硫胺素含量以及 *TPK1* 基因的多态性分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):237-239.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.078

优质肉鸡硫胺素含量以及 *TPK1* 基因的多态性分析

王海¹,王康环¹,蒋小松²,徐亚欧¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041;2. 四川省畜牧科学研究院,四川成都 610066)

摘要:为研究大恒优质肉鸡硫胺素沉积规律及大恒肉鸡不同家系间硫胺素的差异,选取大恒优质肉鸡的 4 个品系(S08、S07 × S01、D2、D1)为试验材料,采用高效液相色谱法对硫胺素含量进行测定,并对其相关基因 *TPK1* 进行多态性分析。结果显示:10 周龄时,S08 品系胸肌中硫胺素含量极显著高于品系 D1、D2($P < 0.01$),4 个品系中公鸡胸肌中的硫胺素含量均高于母鸡,差异不明显;10 周龄时,公鸡、母鸡中腿肌的硫胺素含量极显著高于胸肌($P < 0.01$),公鸡中的腿肌、胸肌硫胺素含量均分别高于母鸡的腿肌、胸肌,但都差异不明显。对大恒肉鸡 5 个品系(S07 × S05、S07、S08、S07 × 01、S08 × 01) *TPK1* 基因的所有外显子及部分 3'非编码区进行了多态性位点的检测,在 3'非编码区发现了 1 个 G878A 单碱基突变,该 SNP 位点对腹脂质量具有显著影响($P < 0.05$),该基因座上的基因型 NN 个体的腹脂质量显著高于基因型 MN 个体的腹脂质量,但与大恒优质肉鸡 2 个品系鸡肉中硫胺素含量差异不显著。

关键词:优质肉鸡;硫胺素;*TPK1* 基因;基因多态性

中图分类号:S831.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0237-03

硫胺素(Thiamine)即维生素 B₁,不仅是维持机体代谢的重要物质,而且是肉产品产生芳香物质的关键前体物质。热降解硫胺素可以产生许多含硫化物,包括硫醇、硫化物、二硫化物等芳香化合物^[1-2],其中 2-甲基-3-巯基咪唑、2/3-巯基-3/2-戊酮是重要的挥发性化合物,5-羟基-3-巯基-2-戊酮不仅是硫胺素降解过程中的重要中间产物,而且是一类芳香化合物。因此,硫胺素及其衍生物的含量已经成为了肉食品品质的重要指标。本研究以 4 个优质肉鸡品系为样本,研究硫胺素的含量差异,同时对硫胺素合成代谢

关键酶中硫胺焦磷酸激酶(*TPK1*)基因进行多态性分析^[3],以期为优质肉鸡的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验材料为四川大恒家禽有限公司培育的 S08、S07 × S01、D2、D1、S07 × 05、S07、S08 × S01 共 7 个品系总,试验鸡有专人饲养,饲养条件及营养水平一致,统一在 70 日龄屠宰,屠宰前翅下静脉采血保存于真空采血管中,4℃ 保存用于 DNA 的提取。

1.2 试验方法

1.2.1 肌肉中硫胺素含量的测定 采用高效液相色谱法(荧光检测)。准确称取 4~6 g 肉样,使用电动匀浆器匀质后置于 250 mL 三角瓶中,加入 50 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液混匀,于高压灭菌锅中 121℃ 处理 30 min,室温冷却。用 2 mol/L 乙酸钠溶液调节水解液使 pH 值为 4.0~4.5,加入高峰氏淀粉酶,置于水浴锅中 45~50℃ 酶解 3 h,冷却后全部移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至 100 mL,混匀后用滤纸过

收稿日期:2015-03-10

基金项目:四川省应用基础项目(编号:2013JY0044);四川省肉鸡现代产业链关键技术集成研究与产业化示范项目(编号:2012NZ0037);西南民族大学研究生创新型科研项目(编号:CX2013SZ59);西南民族大学项目(编号:2012NFW001)。

作者简介:王海(1987—),男,山东济南人,硕士研究生,研究方向为遗传育种。E-mail:biohwang@163.com。

通信作者:徐亚欧,教授,研究方向为动物遗传资源。E-mail:xuyaou@163.com。

[2] Díaz - Apancio E, Marin C, Alonso - Urmeneta B, et al. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* in fection of goats [J]. Clin Microbiol, 2004, 32(5): 1159 - 1165.

[3] 邓小红,曾政,王希良. 布鲁氏菌 pcDNA3.1 - omp17.3 基因疫苗的研制[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(6): 505 - 509.

[4] 陈伟业,胡森,黄克和,等. IS711 和 omp2 作为布氏杆菌种属及种株间分子鉴别诊断标记的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(6): 676 - 680.

[5] 郑锦玲,蒋成观,董仲生,等. 布氏杆菌病检测技术的研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 25 - 28.

[6] 曲勐,王玉飞,乔凤,等. Omp25c 基因对马耳他布鲁菌疫苗株 M5 的毒力及免疫保护性的影响[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(5): 639 - 642.

[7] Caro H P, Fernandez L L, de Miguel M J, et al. Role of the omp25/omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis* [J]. Infection and Immunity, 2007, 75(8): 4050 - 4061.

[8] 李玲,闫晶华,闫昊,等. 新疆畜间布鲁氏菌病流行情况及防控技术研究[J]. 草食家畜, 2012, 156(3): 19 - 22.

[9] 石琴,袁立岗,蒲敬伟,等. 山区牧场牛羊布鲁氏菌病感染情况调查与分析[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(2): 40 - 41.

[10] 张鲁安,苏贵成,李杰,等. 新疆生产建设兵团畜间布病监测分析及防控对策[J]. 新疆农垦科技, 2012(4): 26 - 28.

[11] 曾鹏武,李灵,陈胜文. 天山马鹿布氏菌病的检疫和防控[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(1): 73 - 75.

[12] 孟庆玲,杨奋东,贾桂珍,等. 昌吉地区天山马鹿布氏杆菌病血清学调查[J]. 塔里木大学学报, 2006, 18(3): 32 - 33.