

徐 彬,张敬峰,卢凤英,等. 基于特有基因 VY93_RS02885 为靶标的滑液支原体 qPCR 检测方法建立[J]. 江苏农业科学,2021,49(19):183-189.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.19.033

基于特有基因 VY93_RS02885 为靶标的滑液支原体 qPCR 检测方法建立

徐 彬,张敬峰,卢凤英,孙华伟,赵 莎,张晓曦,刘青涛,张小飞

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽医生物工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:利用 CD-HIT-EST 快速聚类分析和 BLASTN 同源性比对共鉴定出 17 个滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) 特有基因,并从中选取保守基因 VY93_RS02885 作为分子诊断的靶标基因。根据该基因核苷酸序列设计了 1 对引物,建立了滑液支原体的 SYBR green qPCR 检测方法。结果表明,该方法对不同浓度的模板和对应的 C_T 值具有较好的线性关系, R^2 值为 0.998 8;该方法的特异性较好,BLASTN 比对,检测引物对仅能匹配滑液支原体的特有基因 VY93_RS02885,结果显示,该方法能特异性地检测滑液支原体,与其他常见的引起禽关节炎的细菌/支原体性病原无交叉反应;该方法的敏感性较好,100% 阳性检测的靶标基因最小拷贝数为 10;该方法的重复性较好,对 3 个不同浓度的模板进行组间和组内重复检测,变异系数 $\leq 1.172\%$ 。此外,该方法对临床样品的检出率与传统检测方法相符。因此,本研究建立的针对滑液支原体特有基因的 SYBR green qPCR 检测方法具有用时短、特异性高、准确性高、敏感性高、可重复性强的优点,可为滑液支原体的快速诊断和流行病学调查提供技术手段。

关键词:滑液支原体;特有基因;qPCR;检测方法

中图分类号:S852.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)19-0183-07

滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) 是一种重要的禽病病原,是 OIE 必通报疫病病原。该病原所致疾病的致死率不高,但能导致鸡关节炎、气囊炎、生长迟缓、产蛋量下降、产畸形蛋并增加鸡对其他病

原的易感性和疾病程度等,疾病发展缓慢,病程长。该病原在鸡群中感染后很难根除,对家禽养殖业造成严重的经济损失^[1-3]。

对滑液支原体的快速诊断对该病原所致疾病的防控非常重要^[4],荧光定量 PCR (qPCR) 相对于常规 PCR 具有反应时间短、更高的敏感性、结果不用跑胶直接获得等优点。现阶段应用最广泛的 qPCR 方法分别是荧光探针法 qPCR (如 TaqMan qPCR) 和核酸染料法 qPCR (如 SYBR green qPCR)。对于单基因检测,SYBR green qPCR 相对于 TaqMan

收稿日期:2021-03-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500706);国家自然科学基金(编号:32002291)

作者简介:徐 彬(1987—),男,河北廊坊人,博士,助理研究员,主要从事动物传染病防治研究。E-mail:xubin9999@foxmail.com。

通信作者:张小飞,博士,研究员,主要从事动物传染病防治研究。

E-mail:xiaofei0804@sina.com。

virus) GP32 and HIV (human immunodeficiency virus) GP41: implications in viral entry[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,1992,186(1):95-101.

[5] Panin L E, Kostina N E, Poteriaeva O N, et al. Immunochemical homology of HIV-1 envelope proteins and human apolipoprotein AI [J]. Voprosy Virusologii,2001,46(5):13-16.

[6] 胡国芳,陈保生,杨晓慧,等. 血浆载脂蛋白 A-I 生理功能的研究:A-I 及其裂解片段对单纯疱疹病毒感染细胞的作用[J]. 中国医学科学院学报,1994,16(2):98-103.

[7] 高泽乾,孙建男,武 炜,等. 兽用免疫佐剂的研究进展[J]. 唐山师范学院学报,2012,34(2):45-48,51.

[8] 王 晶,白 丽,郭利军,等. 一种制备兔抗人 IGG 抗体的简易方法[J]. 大理医学院学报,1999(1):60,63.

[9] 徐志伟,徐一然,陈永霞,等. 优化 ApoB 抗原免疫剂量提高抗体

产生的效果[J]. 农学学报,2018,8(11):58-61.

[10] Owens B J, Anantharamaiah G M, Kahlon J B, et al. Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide analogues inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation[J]. Journal of Clinical Investigation,1990,86(4):1142-1150.

[11] 邵长玲,孔军伶. 制备免疫血清免疫法改良和效果[J]. 卫生职业教育,2011,29(9):111-112.

[12] 徐志伟,刘 泉,时小艳,等. 利用湖羊生产人 ApoB 多抗血清免疫新方法[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):186-187.

[13] Xu H, Niu Y L, Hong W M, et al. Development of a water-in-oil-in-water adjuvant for foot-and-mouth disease vaccine based on ginseng stem-leaf saponins as an immune booster[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2020,71:101499.

qPCR 等荧光探针法省去了探针的合成,经济上更实惠。许多报道也表明 SYBR green qPCR 具有不输于 TaqMan qPCR 的准确性和敏感性^[5-6]。因此,本研究着眼于建立滑液支原体 SYBR green qPCR 的诊断方法。

到目前为止,针对滑液支原体的 SYBR green qPCR 检测方法仅有 Jarquin 等建立的以 16S rRNA 的基因序列为靶标的方法。多项研究表明,仅针对单一基因位点进行病原检测,可能出现由于靶标病原基因引物区的突变、其他物种同源性较高基因的非特异性扩增等诸多情况导致结果不可靠^[7]。如 16S rRNA 属于所有物种的共有基因,在不同物种特别是近源物种之间具有不低甚至较高的同源性。Mekkes 等建立的针对鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*) 16S rRNA 的检测方法能非特异地检测出模仿支原体 (*Mycoplasma imitans*)^[8]。因此,建立针对其他靶点特别是特异性更高靶点的 SYBR green qPCR 具有研究价值。本研究选择以滑液支原体的特有基因作为诊断靶标建立 SYBR green qPCR 快速诊断方法,为滑液支原体的临床诊断和流行病学调查提供有效手段。

1 材料与方法

1.1 菌种和病料

试验用滑液支原体标准株 ATCC 25204、20 株滑液支原体临床分离株、3 株鸡毒支原体、6 株金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、4 株禽致病性大肠杆菌 (*Avian pathogenic Escherichia coli*)、2 株鸡白痢沙门氏菌 (*Salmonella pullorum*)、3 株鸡伤寒沙门氏菌 (*Salmonella gullinarum*)、3 株鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、48 份滑液支原体阳性鸡跗关节组织、10 份 SPF 健康鸡跗关节组织均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。试验时间自 2019 年底至 2021 年初,试验地点在江苏省农业科学院兽医研究所。

1.2 主要仪器和试剂

北京格瑞德曼公司 GT200 组织细胞样品均质仪;美国 ABI 公司 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪;德国 Eppendorf 公司 Mastercycler nexus gradient 多用途 PCR 仪和 BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪。2 × Taq Plus Master Mix II (Dye Plus), AceQ[®] qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX Premixed) 购自 Vazyme 公司;pMD18 - T Vector Cloning Kit,

MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 购自 TaKaRa 公司;Mycoplasma gDNA Miniprep Kit 购自 BIOMIGA 公司;Gel Extraction kit 和 Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA 公司。

1.3 生物信息学分析筛选和鉴定滑液支原体核苷酸水平特有基因

从 NCBI GenBank 中收集包括 6 株滑液支原体在内的 46 株来自 25 种/亚种动物致病性支原体的全基因组所有基因的核苷酸序列集。46 株支原体分别是:鸭支原体 (*Mycoplasma anatis*) NCTC10156 株;关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritis*) 158L3 - 1 株和 NCTC10162 株;牛生殖支原体 (*Mycoplasma bovis*) HAZ596 株和 NCTC10122 株;牛鼻支原体 (*Mycoplasma bovirhinis*) GS01 株和 HAZ141_2 株;牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) NADC58 株和 Ningxia - 1 株;加州支原体 (*Mycoplasma californicum*) HAZ106_1 株和 ST - 6 株;犬支原体 (*Mycoplasma canis*) LV 株和 PG 14 株;山羊支原体山羊亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*) ATCC 27343 株;山羊支原体山羊肺炎亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*) 04012 株和 87001 株;鸽口支原体 (*Mycoplasma columborale*) NCTC10179 株;犬支原体 (*Mycoplasma cynos*) C142 株;猫支原体 (*Mycoplasma felis*) Myco - 2 株;禽支原体 (*Mycoplasma gallinaceum*) NCTC10183 株和 Peacock20181011 株;生殖支原体 (*Mycoplasma genitalium*) G37 株和 M6282 株;嗜肝糖支原体 (*Mycoplasma glycophilum*) NCTC10194 株;猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 168 株和 7448 株;猪鼻支原体 (*Mycoplasma hyorhinis*) DBS 1050 株和 HUB - 1;猪滑液支原体 (*Mycoplasma hyosynoviae*) M60 株;衣阿华支原体 (*Mycoplasma iowae*) 695 株和 NCTC10185 株;火鸡支原体 (*Mycoplasma meleagridis*) NCTC10153 株;丝状支原体丝状亚种 (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*) Ben1 株和 T1/44 株;肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) M29 株和 M2192 株;雏支原体 (*Mycoplasma pullorum*) B359_6 株;鸡毒支原体 mx - 4 株、NCTC10115 株、str. Rlow 株;滑液支原体 53 株、86079/7NS 株、ATCC 25204 株、HN01 株、MS - H 株、NCTC10124 株。

将核苷酸同源性的阈值设置为 99%、核苷酸序列长度的差异阈值设置为 70%,其他参数均为默认参数,

利用 CD-HIT-EST 快速聚类方法(v 4.8.1)^[9]获取上面所提 46 株支原体的特有基因和共有基因。选取 6 株滑液支原体共有且相对于其他支原体特有的基因集进行 BLASTN 分析,鉴定滑液支原体相对于已知基因序列的其他物种的核苷酸水平特有基因。

1.4 支原体、细菌、跖关节组织基因组 DNA 的提取

支原体的基因组 DNA 利用 Mycoplasma gDNA Miniprep Kit 并按用户手册提取,细菌的基因组 DNA 利用 MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 并按用户手册提取。

取“1.1”节中病料和健康组织,经反复冻融 2~3 次、剪碎、按质量体积比 1:3 与 PBS(pH 值 7.4)混合后,利用均质仪进行组织的充分均质。均质物经 6 000 r/s 离心 5 min,取上清液用于基因组 DNA 的提取。利用 Mycoplasma gDNA Miniprep Kit 并按用户手册提取各样品基因组 DNA。

使用核酸蛋白测定仪测定各样品中 DNA 的含量。获得的样品基因组 DNA 立即使用,或置于 -40 ℃ 冰箱中保存,避免反复冻融。

1.5 引物设计与合成

利用 Primer Premier 5 软件对引物进行设计。qPCR 检测的上游引物命名为 qMS-2885F;下游引物命名为 qMS-2885R。设计好的引物经 BLASTN 分析是否能非特异性地结合除滑液支原体外其他物种的 DNA。同时设计用于常规 PCR 扩增 VY93_RS02885 基因片段的引物对 MS-2885F 和 MS-2885R。引物序列信息见表 1,交由南京擎科生物科技有限公司进行引物合成。

表 1 引物序列信息

引物名称	序列(5'-3')	产物长度 (bp)
qMS-2885F	CGCTTACAAC TTCATCGTAGAGACT	122
qMS-2885R	GCAAAATGTTTCCGCTGTAGAC	
MS-2885F	AATGAAAGTTTCATTGAAAACATT	1 361
MS-2885R	ATGCTATCGGGAATGCTAAAA	

1.6 阳性重组质粒的构建

以滑液支原体标准株 ATCC 25204 的基因组 DNA 为模板,以 MS-2885F 和 MS-2885R 为引物,利用 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)并按用户手册设置 PCR 反应体系和反应程序,扩增基因片段,基因片段命名为 MS-2885。

将 MS-2885 利用 pMD18-T Vector Cloning Kit 并按用户手册连接至 pMD-18T。将连接产物转化

至 DH5α。经 PCR 检测含有阳性重组质粒 pMD-18T::MS-2885 的 DH5α 送至南京擎科生物科技有限公司测序。测序结果显示没有碱基突变的 pMD-18T::MS-2885 作为后续使用的阳性重组质粒。

1.7 SYBR green qPCR 反应体系和反应程序

按照 AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX Premixed)的用户手册设置 qPCR 反应体系和程序。具体如下:

qPCR 反应体系(20 μL): AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix(High ROX Premixed)(2X)10 μL, 10 μmol/L 的 qMS-2885F 和 qMS-2885R 各 0.4 μL,样品 DNA 1 μL(浓度 <100 ng/μL),其余用灭菌双蒸水补齐。

qPCR 反应程序:预变性,95 ℃ 5 min;PCR 反应,95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s,40 个循环;按仪器默认设置进行解离步骤。

1.8 标准曲线的建立和溶解曲线分析

将“1.6”节中所得阳性重组质粒 pMD-18T::MS-2885 进行 DNA 浓度测定和调整及 10 倍梯度稀释。以 1×10⁹ 到 10 拷贝/μL 的质粒为模板,参照“1.7”节反应体系和反应程序进行 SYBR green qPCR 检测,并绘制标准曲线和进行熔解曲线分析。

1.9 敏感性分析

以 1 000、100、10、5、2.5、1 拷贝/反应的阳性重组质粒为模板,分别进行 10 次“1.7”节所述 qPCR 反应,统计每个拷贝能获得 C_T 值的百分率。以 100% 能阳性扩增获得 C_T 值的最小靶标基因拷贝数作为检测极限。

1.10 重复性分析

以 1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴ 拷贝/反应的阳性重组质粒为模板,分别进行 4 次(组间)“1.7”节所述 qPCR 反应,每次反应相同条件设置 4 个重复(组内)。计算组内、组间 C_T 值的平均值、标准差和变异系数。

1.11 特异性分析

取鸡毒支原体、禽致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和滑液支原体标准株和临床分离株的基因组 DNA。测定各基因组 DNA 的浓度并将浓度调整到 1 ng/μL。以各菌/支原体基因组 DNA 为模板进行“1.7”节所述 qPCR 反应。以灭菌双蒸水为阴性对照。每组 qPCR 反应进行 3 次独立试验。

1.12 滑液支原体阳性鸡组织和 SPF 健康鸡组织的检测

取实验室保存的 48 份基于病原分离培养、基因组 DNA 提取、常规 PCR 鉴定获得的滑液支原体阳性鸡跖关节组织和 10 份 SPF 健康鸡跖关节组织,提取这些鸡跖关节组织的基因组 DNA,并测定和调整 DNA 浓度到 1 ng/μL。以这些基因组 DNA 为模板进行“1.7”节所述 qPCR 反应。以灭菌双蒸水为阴性对照,每组 qPCR 反应进行 3 次独立试验。

2 结果与分析

2.1 滑液支原体核苷酸水平特有基因的筛选和后续分子诊断靶标的确定

CD - HIT - EST 快速聚类显示 46 株支原体中

总共有 22 044 个泛基因集。进一步筛查,总共有 433 个基因集是 6 株滑液支原体所共有且相对于其他 40 株支原体特有。以往的研究报道将 BLASTN 比对下,在 E 值 $<10^3$ 的情况下,匹配的非本物种基因覆盖度不大于 40% 的基因作为该物种的特有基因。将这 433 个基因集进行逐一的 BLASTN 比对,符合这一条件的特有基因集有 96 个。其中,在 E 值 $<10^3$ 的情况下,匹配的非滑液支原体基因覆盖度不大于 5% 的基因集总共有 27 个。由表 2 可知,为方便后续用于分子诊断靶标特有基因的确定,仅选取 >500 bp 的 17 个特有基因集用作后续分析;这 17 个基因集包含的基因均为各滑液支原体中的单拷贝基因。参照先前研究报道对滑液支原体共有基因的鉴定^[10],最终选择编码假定蛋白的特有基因 VY93_RS02885 作为后续分子诊断的靶标。

表 2 利用 CD - HIT - EST 快速聚类 and BLASTN 相似性搜索获得的滑液支原体特有基因

基因编号 (ATCC 25204)	表达产物	基因大小 (bp)	非特异性比 对最大覆盖 率($E < 10^{-3}$)	egMLST 分析 中是否为 滑液支原体 共有基因 ^[10]	6 株滑液支原体中的 DNA 序列相似性(%)					
					ATCC 25204	NCTC 10124	MS - H	86079/ 7NS	HN01	53
VY93_RS00965	假定蛋白	2 166	5%	否	99.12	99.12	99.12	99.17	99.22	100.00
VY93_RS02885	假定蛋白	1 431	4%	是	100.00	100.00	99.51	99.51	100.00	99.51
VY93_RS00010	假定蛋白	1 134	0%	是	99.21	99.21	99.21	99.21	99.47	100.00
VY93_RS00300	YwaF 家族蛋白	1 125	5%	否	100.00	100.00	99.64	99.64	99.73	99.37
VY93_RS00635	DUF3137 结构域包含蛋白	1 095	4%	是	100.00	100.00	99.91	99.91	99.82	99.36
VY93_RS02860	假定蛋白	897	0%	是	100.00	100.00	100.00	100.00	99.67	99.77
VY93_RS00640	假定蛋白	840	0%	是	99.88	99.88	100.00	100.00	99.76	99.40
VY93_RS02910	HpcH/HpaI 醛缩酶/柠檬 酸裂解酶家族蛋白	837	0%	是	100.00	100.00	99.38	99.38	100.00	99.38
VY93_RS00325	α/β 折叠水解酶	816	0%	否	99.39	99.39	99.51	99.51	99.51	100.00
VY93_RS02960	RDD 家族蛋白	654	0%	否	100.00	100.00	99.54	99.54	99.39	99.08
VY93_RS01985	DUF4231 结构域包含蛋白	600	0%	是	99.83	99.83	99.64	99.64	99.83	100.00
VY93_RS03395	假定蛋白	600	0%	否	99.83	99.83	99.17	99.17	99.67	100.00
VY93_RS01950	假定蛋白	588	0%	否	99.83	99.83	100.00	100.00	100.00	100.00
VY93_RS00835	DUF2714 结构域包含蛋白	558	0%	否	99.82	99.82	99.10	99.10	99.46	100.00
VY93_RS02705	假定蛋白	549	0%	否	99.45	99.45	99.64	99.64	99.82	100.00
VY93_RS03125	假定蛋白	534	0%	是	100.00	100.00	99.43	99.43	99.43	99.24
VY93_RS02355	MscL 家族蛋白	522	0%	否	99.23	99.23	99.23	99.23	99.04	100.00

2.2 引物的设计和特异性分析

利用 Primer Premier 5 在 VY93_RS02885 的开放阅读框中设计 SYBR green qPCR 诊断引物,预测的上游引物和下游引物的 T_m 值分别为 59.4 ℃ 和 59.6 ℃。引物扩增的片段大小为 122 bp(表 1)。经过 BLASTN 比对,该引物对仅能匹配滑液支原体的基因 VY93_RS02885,说明这对引物的特异性

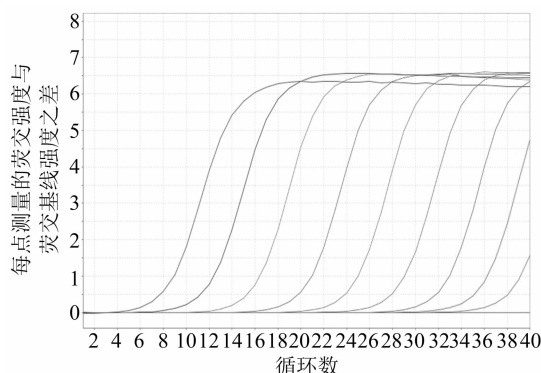
良好。

2.3 标准曲线的建立和溶解曲线分析

以 10 倍稀释所构建的阳性重组质粒,用上述引物对进行 SYBR green qPCR 检测。由图 1 可知,不同浓度的模板均能扩增出典型的“S”形扩增曲线,采用模板浓度从 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10$ 拷贝/反应及其对应的扩增 C_T 值作的标准曲线呈现良好的线性关系。

以模板浓度的 \lg 值为横坐标,以扩增 C_T 值为纵坐标,所作标准曲线的方程式为 $y = -3.7196x + 38.395$, r^2 为 0.9988。由图 2 可知,熔解温度 (T_m) 在 75.54 ℃ 左右出现狭窄、单一的特异性峰,没有引

物二聚体及非特异性扩增的峰,说明所构建的方法特异性较好。特异性扩增峰的 T_m 值相对较低,可能与滑液支原体基因的 GC 比在 28% 左右有关^[11]。



A 表示为不同拷贝数阳性重组质粒的扩增曲线图。从左侧起扩增曲线对应的阳性重组质粒的浓度分别是 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 拷贝/反应。B 表示为不同拷贝数阳性重组质粒与对应 C_T 值的标准曲线图

图1 扩增曲线图和标准曲线

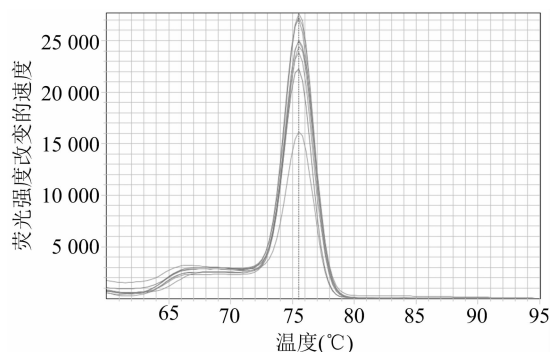


图2 阳性重组质粒的熔解曲线分析

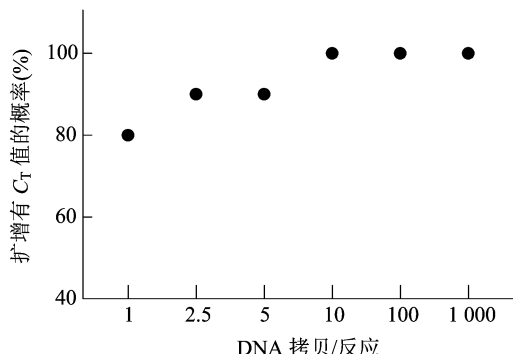
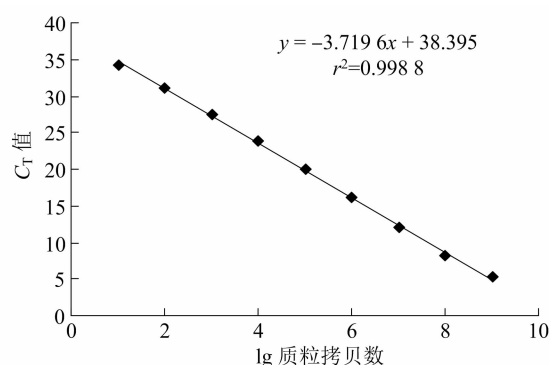


图3 敏感性分析

2.4 敏感性分析

将阳性重组质粒倍比稀释到 1 000、100、10、5、2.5、1 拷贝/反应并作为模板,以本研究建立的 qPCR 方法分别扩增 10 次,结果(图 3)表明,当模板在 1 000、100、10 拷贝/反应时,均能 100% 扩增出 C_T 值;当模板在 5.0、2.5、1.0 拷贝/反应时,分别有 90%、90%、80% 的概率扩增出 C_T 值。这说明本研究构建的 SYBR green qPCR 检测方法的敏感性为 10 拷贝/反应。

2.5 重复性分析

由表 3 可知,将 3 种不同浓度的阳性重组质粒模板分别组内和组间重复 4 次,组内标准差在 0.031 0 ~ 0.155 1 间,变异系数在 0.153 5% 到 0.651 5% 之间;组间标准差在 0.178 4 到 0.235 6 之间,变异系数在 0.747 1% ~ 1.165 8% 间,说明本研究建立的 SYBR green qPCR 检测方法的可重复性较好。

表3 重复性分析结果

项目	1×10^6 拷贝 C_T 值			1×10^5 拷贝 C_T 值			1×10^4 拷贝 C_T 值		
	平均值	标准差	变异系数(%)	平均值	标准差	变异系数(%)	平均值	标准差	变异系数(%)
第一次(组内)	15.923 8	0.043 5	0.273 1	20.200 3	0.031 0	0.153 5	23.811 5	0.155 1	0.651 5
第二次(组内)	15.897 5	0.073 1	0.460 0	19.818 8	0.092 4	0.466 4	24.042 0	0.078 3	0.325 6
第三次(组内)	16.174 0	0.104 3	0.645 0	20.387 3	0.055 6	0.272 7	23.697 3	0.083 4	0.351 9
第四次(组内)	16.296 0	0.082 2	0.504 3	19.945 8	0.070 9	0.355 3	23.985 5	0.146 8	0.611 9
组间	16.072 8	0.187 4	1.165 8	20.088 0	0.235 6	1.172 7	23.884 1	0.178 4	0.747 1

2.6 特异性分析

利用本研究建立的 SYBR green qPCR 诊断方法检测滑液支原体标准株 ATCC 25204 和 20 株临床分离株。由图 4 可知,结果均能扩增出现典型的“S”形扩增曲线,且 C_T 值在 13.595 ~ 17.377 间;检

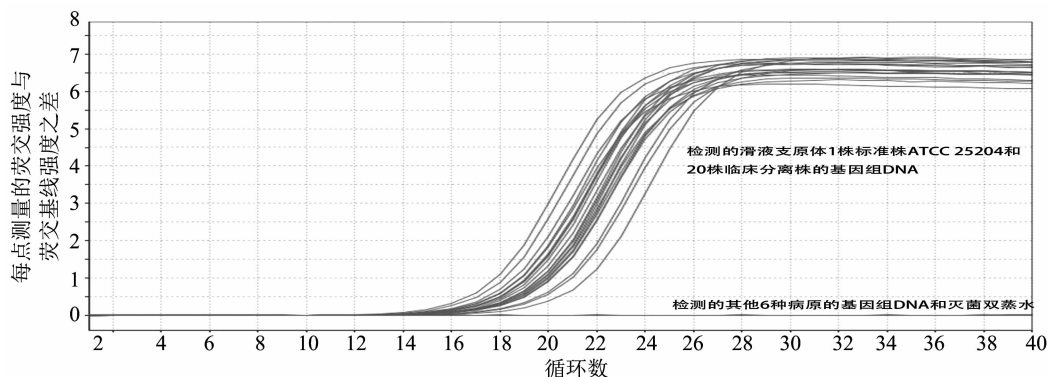


图4 特异性分析

2.7 鸡组织中病原检测

用本研究建立的 SYBR green qPCR 诊断方法检测实验室保存的 48 份滑液支原体阳性鸡跗关节组织样品的基因组 DNA,结果显示均能扩增出 C_T 值,最大的 C_T 值为 29.155;检测实验室保存的 10 份 SPF 健康鸡的跗关节组织基因组 DNA 和灭菌双蒸水均不能扩增出 C_T 值。说明本研究建立的诊断方法准确性较高。

3 讨论

滑液支原体的生长缓慢,且没有针对滑液支原体的选择培养基,从宿主分离出来的滑液支原体,前 2 代液体培养往往需要 1 周甚至更长的时间。因此,病原分离不适用于滑液支原体感染的及时诊断,且病原分离后也需要进行例如常规 PCR 等方法鉴定。滑液支原体所致疾病发展缓慢,往往需要 1 ~ 3 周的时间才能刺激宿主产生抗体^[12]。因此,ELISA 和血凝抑制试验不适用于滑液支原体感染的早期诊断。多种多样的 PCR 检测方法成为了滑液支原体感染的快速诊断方法。

国外研究学者建立了以滑液支原体 16S rRNA、23S rRNA 及其周围基因间序、vlhA 保守区为靶标的常规 PCR 检测方法^[13-15]。此外,针对以上 3 个靶点的 TaqMan qPCR 检测方法和针对 16S rRNA 的 SYBR green qPCR 检测方法也已建立^[16-17]。鉴于临床上区分野毒和弱毒活疫苗的需要,逐步建立了以 *obg* 基因为靶标的 SYBR green qPCR 检测方法和

测其他 6 种临床上常见的引起鸡关节炎的细菌/支原体性病原和灭菌双蒸水均检测不到 C_T 值,结果说明本研究建立的 SYBR green qPCR 检测方法具有较高的特异性。

以 *obg* 基因或者 *oppF* 基因为靶标的巢式 PCR 与高分辨率溶解曲线分析相结合的方法来鉴别 MS-H 疫苗株与野毒株^[18-20]。以及建立了以 HIT 家族蛋白编码基因的单碱基突变为靶标的错配放大突变分析方法区分疫苗株 MS1 和野毒株^[21]。2017 年开始我国开放进口弱毒苗 MS-H[(2017)外兽药证字 33 号],因此针对 MS-H 与野毒的鉴别诊断在我国也具有了临床意义。我国研究学者也以 vlhA 保守区为靶标建立了 TaqMan qPCR 诊断方法^[22]。鉴于如前言所述单基因靶标的潜在问题、qPCR 相对于常规 PCR 的检测敏感度、SYBR green qPCR 的经济实惠等因素,本研究重点建立针对其他靶点的滑液支原体 SYBR green qPCR 检测方法。

PCR 检测的特异性是临床诊断的重要方面,是准确诊断何种病原所致感染的关键。本研究利用生物信息学手段鉴定出多个核苷酸水平上的滑液支原体特有基因,并结合国外报道的滑液支原体共有核心基因来选择 qPCR 诊断的靶标,以从靶标选择上确保 PCR 检测的特异性。本研究鉴定的特有基因也为其他研究学者建立相关的分子诊断、病原基因分型方法提供备选靶标。

qPCR 的敏感性是该分子诊断方法的另一个重要方面。想要做到及时快速诊断,就要省略病原分离步骤,从发病甚至疑似发病的组织或者气管拭子、鼻拭子等直接提取基因组 DNA 用于诊断。从宿主组织中提取的 DNA 会掺杂很高比例的宿主基因组 DNA。从拭子中提取的 DNA 又往往浓度不高。

在这些情况下,就需要 qPCR 的检测敏感性足够高。本研究建立的 qPCR 诊断方法的敏感性在 10 拷贝/反应,高于国外针对 16S rRNA 所建立的 SYBR green qPCR 检测方法 1 倍以上^[12]。这对待检样品中病原含量较低时的快速准确诊断具有积极意义。

本研究建立的以特有基因为靶标的滑液支原体 SYBR green qPCR 检测方法具有用时短、特异性高、敏感性高、可重复性强、经济实惠等优点,能满足大批量样品的快速准确鉴定,有利于滑液支原体感染的早期诊断、及时治疗和预防病原的进一步扩散,有利于减少滑液支原体感染所致养禽业的经济损失,促进养禽业的健康发展。

参考文献:

- [1] Dufour - Gesbert F, Dheilly A, Marois C, et al. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 114(1/2): 148 - 154.
- [2] Kursa O, Pakula A, Tomczyk G, et al. Eggshell apex abnormalities caused by two different *Mycoplasma synoviae* genotypes and evaluation of eggshell anomalies by full - field optical coherence tomography[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15(1): 1.
- [3] Oh K, Lee S, Seo J, et al. Rapid serodiagnosis with the use of surface plasmon resonance imaging for the detection of antibodies against major surface protein A of *Mycoplasma synoviae* in chickens [J]. Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire, 2010, 74(1): 71 - 74.
- [4] Kleven S H. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry[J]. Avian Diseases, 2008, 52(3): 367 - 374.
- [5] Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S H. Comparison of SYBR green and TaqMan methods in quantitative real - time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes [J]. Advanced Biomedical Research, 2014, 3: 85.
- [6] Gomes C M, Cesetti M V, de Paula N A, et al. Field validation of SYBR green - and TaqMan - Based Real - Time PCR using biopsy and swab samples to diagnose American tegumentary leishmaniasis in an area where *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is endemic [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(2): 526 - 534.
- [7] Diene S M, Bertelli C, Pillonel T, et al. Comparative genomics of *Neisseria meningitidis* strains: new targets for molecular diagnostics [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2016, 22(6): 1 - 7.
- [8] Mekkes D R, Feberwee A. Real - time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum* [J]. Avian Pathology, 2005, 34(4): 348 - 354.
- [9] Huang Y, Niu B, Gao Y, et al. CD - HIT suite: a web server for clustering and comparing biological sequences [J]. Bioinformatics, 2010, 26(5): 680 - 682.
- [10] Ghanem M, El - Gazzar M. Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme [J]. Veterinary Microbiology, 2018, 218: 84 - 89.
- [11] Xu B, Liu R, Tao L, et al. Complete genome sequencing of *Mycoplasma synoviae* strain HN01, isolated from chicken in Henan province, China [J]. Microbiology Resource Announcements, 2020, 9(6): e01419 - e01480.
- [12] Jarquin R, Schultz J, Hanning I, et al. Development of a real - time polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* under industry conditions [J]. Avian Diseases, 2009, 53(1): 73 - 77.
- [13] Lauerma L H, Hoerr F J, Sharpton A R, et al. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae* [J]. Avian Diseases, 1993, 37(3): 829 - 834.
- [14] García M, Jackwood M W, Head M, et al. Use of species - specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplification products [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1996, 8(1): 56 - 63.
- [15] Ramírez A S, Naylor C J, Hammond P P, et al. Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 118(1/2): 76 - 82.
- [16] Fraga A P, de Vargas T, Ikuta N, et al. A multiplex real - time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(2): 505 - 510.
- [17] Sprygin A V, Andreychuk D B, Kolotilov A N, et al. Development of a duplex real - time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry [J]. Avian Pathology, 2010, 39(2): 99 - 109.
- [18] Shahid M, Markham P F, Marendia M S, et al. High - resolution melting - curve analysis of *obg* gene to differentiate the temperature - sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS - H from non - temperature - sensitive strains [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92215.
- [19] Zhu L, Konsak B M, Olaogun O M, et al. Identification of a new genetic marker in *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS - H and development of a strategy using polymerase chain reaction and high - resolution melting curve analysis for differentiating MS - H from field strains [J]. Veterinary Microbiology, 2017, 210: 49 - 55.
- [20] Dijkman R, Feberwee A, Landman W. Development, validation and field evaluation of a quantitative real - time PCR able to differentiate between field *Mycoplasma synoviae* and the MS - H - live vaccine strain [J]. Avian Pathology, 2017, 46(4): 403 - 415.
- [21] Kreizinger Z, Sulyok K M, Grözner D, et al. Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild - type *Mycoplasma synoviae* and MS - H vaccine strains [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175969.
- [22] 黄莉, 谢芝勋, 王盛, 等. 鸡滑液囊支原体和禽呼肠病毒的实时荧光定量 PCR 快速检测 [J]. 动物医学进展, 2018, 39(2): 1 - 6.