

江西省布鲁菌分离株的鉴定及分子特征分析*

熊长辉,徐建民,杨 梦,宗 俊,潘欢弘,刘晓青[△]

江西省疾病预防控制中心,江西南昌 330029

摘要:目的 对江西省近几年分离的布鲁菌进行鉴定和分型,同时检测 rpoB 基因的携带情况并分析其遗传多态性。**方法** 利用 BCSP31-PCR 对分离的菌株进行布鲁菌鉴定,利用 AMOS-PCR 对布鲁菌进行种型分析,利用普通 PCR 对 rpoB 基因进行检测,将 rpoB 基因的 PCR 扩增产物进行测序并用 MEGA6.0 软件进行多态性分析。**结果** 经鉴定 32 株布鲁菌全部为羊种布鲁菌,通过对 rpoB 基因的 PCR 扩增产物序列分析显示羊种布鲁菌 rpoB 基因同源性较高。**结论** 江西省近年人感染的布鲁菌均为羊种布鲁菌,且近几年人感染的羊种布鲁菌 rpoB 基因高度同源。

关键词:布鲁菌; 多态性; 分子分型; 基因型; PCR

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)20-2778-03

Identification and molecular characterization analysis of Brucella strains isolated from human in Jiangxi province*XIONG Changhui, XU Jianmin, YANG Meng, ZONG Jun, PAN Huanhong, LIU Xiaoqing[△]

Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanchang, Jiangxi 330029, China

Abstract: Objective To identify and type Brucella isolated from Jiangxi Province in recent years, and at the same time, detect the rpoB gene and analyze the genetic polymorphism. **Methods** The isolated strains were identified by BCSP31-PCR, the type of Brucella was analyzed by AMOS-PCR, and the rpoB gene was detected by ordinary PCR, the PCR amplification products of rpoB gene were sequenced and the MEGA6.0 software was used for its polymorphism analysis. **Results** All 32 strains of Brucella were identified as Brucella melitensis. The sequence analysis of the PCR amplification products of the rpoB gene showed that the rpoB gene of Brucella melitensis had high homology. **Conclusion** The Brucella species infected by humans in Jiangxi Province in recent years were all Brucella melitensis, and the rpoB gene of the human-infected Brucella melitensis in recent years was highly homologous.

Key words: Brucella; polymorphism; molecular-typing; genotype; PCR

布鲁菌病是由于感染布鲁菌引起的人兽共患传染病。我国引起布鲁菌病的病原菌以羊种布鲁菌居多,其中又以羊种 3 型布鲁菌为主^[1]。为了解江西省近年来布鲁菌病流行情况,本研究对江西省近几年分离的布鲁菌进行鉴定和基因多态性分析。

1 材料与方法**1.1 菌株来源** 近几年从江西省布鲁菌病监测点及医院送检标本中分离得到的布鲁菌 32 株。**1.2 仪器与试剂****1.2.1 主要仪器** 生物安全柜(美国 Thermo)、培养箱(日本 EYELA SLI-1200)、超净工作台(江苏苏净)、PCR 仪(美国 Bio-Rad)、自动凝胶成像仪(美国 Bio-Rad)、高速冷冻离心机(德国 Sigma 3-18K)、微量

高速离心机(德国 Eppendorf)。

1.2.2 主要试剂及耗材 PCR 引物(上海生工公司合成)、布氏琼脂(BBL 公司)、普通琼脂糖(Geng 公司)、细菌 DNA 提取试剂盒(凯杰生物)、PCR 相关试剂均为大连宝生物公司产品。**1.3 方法****1.3.1 细菌基因组 DNA 的提取** 从平板上挑取纯化培养后的布鲁菌先灭活,再按照试剂盒说明书操作步骤,提取布鲁菌的 DNA,于 -20℃ 保存备用。**1.3.2 布鲁菌表面蛋白 31(BCSP31)PCR 鉴定** 参考文献[2],用 BCSP31-PCR 对布鲁菌进行鉴定。**1.3.3 AMOS-PCR 鉴定** 参考文献[2],用 AMOS-PCR_p[A、M、O、S 分别为牛(Abortus)、羊(Meliten-

* 基金项目:江西省重点研发计划项目(20202BBGL73041)。

作者简介:熊长辉,男,副主任技师,主要从事病原微生物学的相关研究。△ 通信作者,E-mail:liuxq13@163.com。

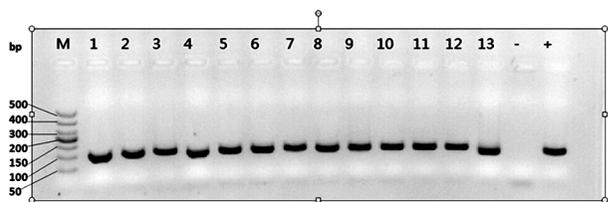
sis)、绵羊(Ovis)、猪(Suits)首字母的缩写]进行布鲁菌菌种的鉴定。

1.3.4 rpoB 基因检测 布鲁菌 rpoB 基因的 PCR 扩增,上、下游引物分别为 rpoB-F: 5'-ATGGCT-CAGACCCATTCTTTC-3', rpoB-R: 5'-TTATTCT-GCCGCGTCCGAA-3'。反应体系(25 μL):10×缓冲液 2.5 μL,脱氧核苷三磷酸(dNTPs)2 μL, rpoB 上、下游引物各 1 μL, Taq 酶(5 U/μL)0.5 μL,去离子超纯水 17 μL,模板 1 μL。PCR 条件:94 °C 3 min; 94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 50 s,35 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.5 rpoB-PCR 产物测序 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,获得特异性目的条带,并且送上海生工测序。测序结果用 MEGA6.0 软件分析。

2 结果

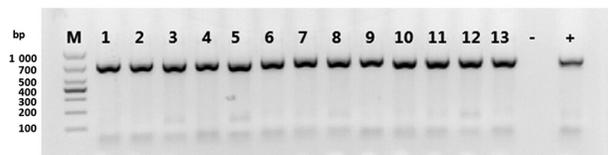
2.1 BCSP31-PCR 鉴定 所有菌株 DNA 的 BC-SP31-PCR 产物经电泳,均显示出布鲁菌特异性条带,部分菌株的 BCSP31-PCR 产物电泳结果见图 1。



注:M 为分子标准带;1~13 为布鲁菌 BCSP31-PCR 产物;+ 为阳性对照;- 为阴性对照。

图 1 BCSP31-PCR 产物电泳结果

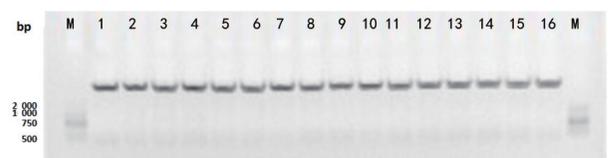
2.2 AMOS-PCR 鉴定 所有菌株 DNA AMOS-PCR 产物经电泳,均显示出 731 bp 的羊种布鲁菌特异性条带,部分菌株的 AMOS-PCR 产物电泳结果见图 2。



注:M 为分子标准带;1~13 为布鲁菌 AMOS-PCR 产物;+ 为阳性对照;- 为阴性对照。

图 2 AMOS-PCR 产物电泳结果

2.3 rpoB 基因检测 所有菌株 DNA 的 rpoB 基因 PCR 产物经电泳,均显示出 4 300 bp 的特异性条带,部分菌株的 rpoB 基因 PCR 产物的电泳结果见图 3。



注:M 为分子标准带;1~16 为布鲁菌 rpoB 基因 PCR 产物。

图 3 rpoB 基因 PCR 产物的电泳结果

2.4 rpoB-PCR 扩增产物测序 通过 MEGA6.0 软件分析其序列,N-J 法构建系统发育树,参数设置为“bootstrap=500”“cutoff=90%”,羊种布鲁菌 rpoB 基因高度同源,见图 4。

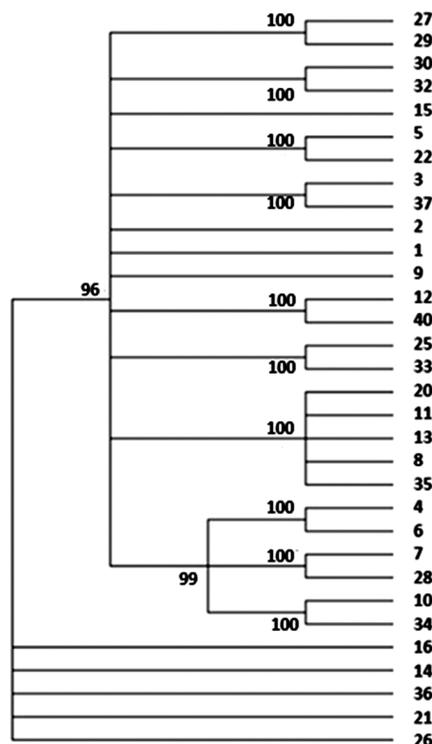


图 4 羊种布鲁菌 rpoB 基因的系统进化树

3 讨论

布鲁菌病是全球范围的动物源性人兽共患传染病^[3],据统计全球每年约有 50 万布鲁菌病新增病例^[4-6]。并且布鲁菌病感染早期症状与其他发热性疾病症状非常相似,许多患者在发病早期极易被误诊为其他发热性疾病,因此,探讨布鲁菌病患者早期快速诊断的方法对患者的治疗和预后有积极的意义。尽管目前布鲁菌病的诊断技术有了较大的提升,但仍存在诊断技术原因导致的误诊和延迟诊断^[7]。随着分子生物学的不断发展,PCR 检测技术广泛应用于布鲁菌的诊断,目前文献报道的 PCR 方法很多,布鲁菌属水平的检测一般用普通 PCR,其中主要是以 BCSP31 (B4/B5)、16S rRNA、Virb8,外膜蛋 omp25、omp31、LSP pgm 等基因为依据设计引物^[8-10],而种水平的鉴定则用多重 PCR 方法,比如 AMOS-PCR^[11]。BC-SP31 是布鲁菌中的一种免疫原性膜蛋白,存在于布鲁菌的各种型菌株中,根据 BCSP31 蛋白的基因设计 B4-B5 引物进行 PCR,各种型菌株均可出现特异性扩增产物^[12]。AMOS-PCR 检测方法可从属的水平上鉴定布鲁菌,但不能区分具体种型。有文献报道显示,羊种菌依然是当前主要流行种型,牛种菌次之,由此可见 AMOS-PCR 检测方法可以涵盖国内的流行菌株,有较高的应用价值^[13]。本研究采用 BCSP31 基因

对近年江西省分离的布鲁菌菌株进行鉴定,采取 AMOS-PCR 进行布鲁菌菌种的鉴定,结果显示江西省近年人感染的布鲁菌均为羊种布鲁菌。rpoB 基因编码 DNA 依赖的 RNA 聚合酶 β 亚单位,是一个高度保守的管家基因,也常被用作细菌鉴定的标志基因和系统发育分析的位点^[14-15]。基于 16S rRNA 的分析被普遍认为能鉴定细菌至属水平,而不能解决近缘种之间的分类问题^[16-17]。rpoB 基因表现出比 16S rRNA 更大的优越性。李旦等^[18]通过对布鲁菌 rpoB 基因的研究,认为 rpoB 基因能用于鉴定所有的布鲁菌种及大部分的生物变种。ADEKAMBI 等^[19]认为, rpoB 基因测序能准确反映细菌的鸟嘌呤加胞嘧啶的百分含量, DNA-DNA 杂交水平及平均核苷酸同源性(2 个菌株共享的全基因组序列的比例),能在种和亚种水平反映细菌系统发育关系,可作为一个强有力的微生物鉴定工具。本研究对近年江西省分离的布鲁菌菌株 rpoB 基因序列进行了同源分析,结果表明与江西省近年人感染的羊种布鲁菌 rpoB 基因序列高度同源。本研究利用 BCSP31-PCR 和 AMOS-PCR 对江西省分离的布鲁菌进行了鉴定和分型,利用 rpoB 基因序列进行同源分析,建立了用于布鲁菌实验室鉴定和分型的方法,为布鲁菌病的监测和疫情的处置提供了更快捷的实验室检测手段。

参考文献

- [1] 李明慧,刘志国,朴东日,等.我国羊种布鲁氏菌 rpoB 基因遗传多态性分析[J].疾病监测,2018,33(3):193-197.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.布鲁氏菌病诊断:WS 269-2019[J].北京:中国标准出版社,2019.
- [3] FRANC K A, KRECEK R C, HASLER B N, et al. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action[J]. BMC Public Health, 2018, 18(1): 125.
- [4] BYNDLOSS M X, TSOLIS R M. Brucella spp. virulence factors and immunity[J]. Annu Rev Anim Biosci, 2016, 4: 111-127.
- [5] ZHANG H, DOU X, LI Z, et al. Expression and regulation of the rpoB operon of Brucella melitensis in human trophoblast cells[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(4): 2723-2728.
- [6] MIRNEJAD R, JAZI F M, MOSTAFAEI S, et al. Epidemiology of brucellosis in Iran: a comprehensive systematic review and meta-analysis study[J]. Microb Pathog, 2017, 109: 239-247.
- [7] 姜海等.布鲁氏菌病诊疗及防控手册[M].北京:人民卫生出版社,2020.
- [8] KATIE M E, ROBERT E N, NATKUNAM K. Short report: brucellosis in northern Australia[J]. J Trop Med Hyg, 2010, 83(4): 876-878.
- [9] 刘公平,邢学森,吴杨,等.2011年湖北省首起人间布鲁氏菌病暴发的调查[J].中国人兽共患病学报,2012,28(12):1258-1260.
- [10] 高丽芬,胡海梅,钱发宝,等.云南楚雄州2014—2017年布鲁氏菌病流行特征分析[J].医学动物防制,2019,35(6):588-590.
- [11] 丁雪,王岩,刘丽蓉,等.布鲁氏菌病检测和防治方法研究进展[J].中国动物检疫,2019,36(5):43-48.
- [12] ARAJ G F. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36 Suppl 1: S12-S17.
- [13] 刘丽娅,陆桂丽,王杰,等.布鲁氏菌种荧光定量 PCR 快速检测方法的建立[J].中国动物检疫,2017,34(10):65-71.
- [14] QUEIPOORTUNO M I, COLMENERO J D, REGUERA J M, et al. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(9): 713-718.
- [15] 周晓艳,陈燕芬,崔步云,等.我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J].中国人兽共患病学报,2011,27(5):371-375.
- [16] LOPEZ-SANTIAGO R, SANCHEZ-ARGAEZ A B, DE ALBA-NUNEZ L G, et al. Immune response to mucosal brucella infection[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1759.
- [17] 黄文利,邱建平,吴成果,等.重庆市 2011 年布鲁氏菌病监测分析及首例病例[J].公共卫生与预防医学,2012,23(3):18-20.
- [18] 李旦,邢学森,刘力,等.2010—2016 年湖北省人间布鲁氏菌病流行病学特征分析[J].疾病监测,2018,33(3):203-207.
- [19] ADEKAMBI T, DRANCOURT M, RAOULT D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists [J]. Trends Microbiol, 2009, 17(1): 37-45.

(收稿日期:2022-02-16 修回日期:2022-05-28)