

# 牛布鲁菌与牛分枝杆菌双重 PCR方法的建立及应用

潘文<sup>1†</sup>, 王波<sup>1†</sup>, 薛红<sup>2</sup>, 赵明秋<sup>1</sup>, 琚春梅<sup>1</sup>, 陈金顶<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广州市动物卫生监督所, 广东 广州 510440)

**摘要:**根据 GenBank 中已发表的流产布鲁菌种特异的 omp25 基因序列及牛分枝杆菌特异保守的 16S rRNA 加工蛋白 rimM 基因序列设计了 2 对特异性引物, 通过对 PCR 条件的优化, 建立了快速鉴别检测牛布鲁菌 *Brucella abortus* 和牛分枝杆菌 *Mycobacterium bovis* 的双重 PCR 方法. 对建立的方法进行特异性和敏感性试验, 结果显示, 在牛布鲁菌和牛分枝杆菌中分别扩增出 448、269 bp 的特异性目的条带, 作为对照的大肠杆菌 *Escherichia coli*、沙门菌 *Salmonella typhimurium*、八叠球菌 *Sarcina lutea*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、巴氏杆菌 *Pasteurella multocida*、军团菌 *Legionella pneumophila*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 及溶血性链球菌 *Streptococcus pneumonia* 均未扩增出任何条带. 牛布鲁菌和牛分枝杆菌的 DNA 最低检出量均为 10 pg; 牛奶样品中人工污染的牛布鲁菌和牛分枝杆菌的检测敏感性分别为  $7.9 \times 10^3$  CFU/mL、3 ng/mL.

**关键词:**牛布鲁菌; 牛分枝杆菌; 双重 PCR; 快速鉴别检测

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)04-0100-04

## Establishment and Application of a Multiplex PCR Assay for the Detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis*

PAN Wen<sup>1†</sup>, WANG Bo<sup>1†</sup>, XUE Hong<sup>2</sup>, ZHAO Ming-qiu<sup>1</sup>, JU Chun-mei<sup>1</sup>, CHEN Jin-ding<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangzhou Animal Health Inspection, Guangzhou 510440, China)

**Abstract:** A multiplex PCR assay for the detection of *Brucella abortus* and *Mycobacterium bovis* infection simultaneously in bovine milk was established using two pairs of primers designed according to the species-specific omp25 gene of *B. abortus* and conserved 16S rRNA rimM gene of *M. bovis*. The multiplex PCR assay amplified unique 448 bp and 269 bp amplicons from *B. abortus* and *M. bovis* respectively, while none of 8 other common bacterial species strains revealed any amplification products. Sensitivity of genomic DNA detection of *B. abortus* and *M. bovis* were both 10 pg, meanwhile the limit of detection in artificially contaminated milk with *B. abortus* and *M. bovis* were as low as  $7.9 \times 10^3$  CFU/mL and 3 ng/mL, respectively.

**Key words:** *Brucella abortus*; *Mycobacterium bovis*; multiplex polymerase chain reaction; a rapid differential detection

收稿日期: 2009-11-11

作者简介: 潘文(1985—), 女, 硕士研究生; 王波(1985—), 男, 硕士研究生; †: 对本文贡献相同; 通信作者: 陈金顶(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: jdchen@scau.edu.cn

基金项目: 广东省动植物防疫检疫研究专项(粤财农[2009]225号); 国家自然科学基金-广东省自然科学基金联合项目(U0631006); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0723)

布鲁菌病(Brucellosis)和结核病(Tuberculosis)都是重要的人兽共患传染病,给畜牧业发展和人类健康造成了极大的危害<sup>[1-2]</sup>。世界动物卫生组织(OIE)将这2种病列为B类动物疫病,我国列为二类动物疫病<sup>[3]</sup>。牛布鲁菌病是由流产布鲁菌 *Brucella abortus* 引起,其主要感染的动物为牛,也可感染人。牛结核病主要由牛分枝杆菌 *Mycobacterium bovis* 引起,牛分枝杆菌拥有广泛的动物感染谱,包括牛、人、猪、犬、鹿、獾、猴、山羊、大象、海豹和狮子等<sup>[4]</sup>。牛布鲁菌定居和繁殖的靶器官主要是生殖器官和乳腺器官,该菌通常存在于流产胎儿、胎衣、阴道分泌物中,并通过阴道排泄物及乳汁向外排菌;牛分枝杆菌的靶器官主要是肺,也可随呼吸道分泌物向外排出,严重感染者还会出现菌血症,导致该菌随血液循环进入乳汁<sup>[5]</sup>。近年来,随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变,乳制品消费量迅速上升,污染牛布鲁菌和牛分枝杆菌的乳制品已成为人类布鲁菌病及结核病的重要传染源<sup>[3]</sup>。目前对奶牛群布鲁菌病和结核病的检疫手段主要包括病原分离鉴定、血清学方法等,常规方法分离病原菌条件要求苛刻、费力、费时、危险性高、成功率低,免疫学方法容易出现假阳性,均不能适应快速检验检疫要求。分子诊断具有特异性好、敏感性高、简单快速等优点,对于检测难以培养、生长缓慢的牛布鲁菌及牛分枝杆菌有着独特意义。多重 PCR 技术可快速检测多种病原体,在临床混合感染的鉴别诊断上具有较高的实用价值。为此,本研究根据牛布鲁菌 omp25 基因和牛分枝杆菌 rimM 基因建立了快速鉴别检测乳制品中牛布鲁菌和牛分枝杆菌的双重 PCR 方法,为乳制品中牛布鲁菌及牛分枝杆菌的快速检疫奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 牛布鲁菌 S19 株、牛分枝杆菌 93006 株、C68012 株和 C68007 株购于中国兽药监察所;卡介苗为上海生物制品研究所产品;结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* G001 株、G002 株、大肠杆菌 *Escherichia coli*、沙门菌 *Salmonella typhimurium*、八叠球菌 *Sarcina lutea*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、巴氏杆菌 *Pasteurella multocida*、军团菌 *Legionella pneumophila*、枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 及溶血性链球菌 *Streptococcus pneumonia* 为华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存。

1.1.2 主要试剂及培养基 EX<sup>TM</sup> Taq DNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA Ladder Marker、pMD18-T 载

体、RNase A 等为 TaKaRa 公司产品;胶回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品;QIAamp DNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品;蛋白酶 K 为广州英韦创津公司产品;异丙醇、无水乙醇等为国产分析纯产品;肝浸汤琼脂培养基参照已报道<sup>[6]</sup>的方法制备。

### 1.2 双重 PCR 方法的建立

1.2.1 细菌染色体 DNA 的制备 布鲁菌染色体 DNA 的制备:取肝浸汤培养基中培养 48 h 的牛布鲁菌 S19 株菌液 1 mL,参照已报道的热裂解法<sup>[7]</sup>提取 DNA。

分枝杆菌染色体 DNA 的制备:取细菌培养菌落,加入到 300  $\mu$ L DNA 裂解液(1  $\times$  PCR 缓冲液、45 g/L 吐温-20、45 g/L NP-40、20 g/L 蛋白酶 K)中,55  $^{\circ}$ C 水浴 3 h,95  $^{\circ}$ C 灭活 5 min;参照已报道的苯酚/氯仿方法<sup>[8]</sup>提取 DNA。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中已发表的流产布鲁菌 omp25 基因(GeneID: X79284. 1)和牛分枝杆菌 rimM 基因(GeneID: 887188)的保守序列,应用 Primer Premier 5.0 软件设计了 2 对特异性引物。布鲁菌 Bru-F: 5'-TCGTAATCGTCTCGGCTGC-3', Bru-R: 5'-CGGAACCTTGCTTTCGTCGT-3';分枝杆菌 MB-F: 5'-CTAAGGGGCCTTTTGACGG-3', MB-R: 5'-CACCACTTCGGTGACGACAC-3'。2 对引物预期扩增片段的理论长度分别为 448、269 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.3 双重 PCR 反应 在布鲁菌和分枝杆菌单项 PCR 的基础上对 PCR 反应体系及反应条件进行优化,建立了双重 PCR 反应体系。双重 PCR 的反应体系:10  $\times$  Ex-Taq Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L Bru-F、Bru-R 各 0.5  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L MB-F、MB-R 各 0.75  $\mu$ L, Ex-Taq DNA polymerase 0.15  $\mu$ L, 牛布鲁菌与牛分枝杆菌的基因组 DNA 模板各 1  $\mu$ L, 加灭菌超纯水补足 25  $\mu$ L。双重 PCR 扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min 预变性;94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环;72  $^{\circ}$ C, 10 min;4  $^{\circ}$ C 保存。以灭菌超纯水为阴性对照。反应结束后,取 5  $\mu$ L 于 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.2.4 PCR 产物的克隆和序列测定 分别用牛布鲁菌 S19 株和牛分枝杆菌 C68007 株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物纯化回收,分别克隆入 pMD18-T 载体,转化基因工程菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 选取阳性重组质粒送往上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.2.5 双重 PCR 特异性试验 用建立的双重 PCR

方法对牛布鲁菌 S19 株、牛分枝杆菌 93006 株、C68012 株、C68007 株、卡介苗、结核分枝杆菌 G001 株和 G002 株的基因组 DNA 进行扩增. 以大肠杆菌、沙门菌、八叠球菌、金黄色葡萄球菌、巴氏杆菌、军团菌、枯草杆菌及溶血性链球菌的基因组 DNA 为对照, 同时设空白对照, 评估双重 PCR 鉴别检测的特异性.

1.2.6 双重 PCR 敏感性试验 以布鲁菌 S19 株及牛分枝杆菌 C68007 株 100 ng 基因组 DNA 作为初始模板量, 10 倍梯度稀释, 进行双重 PCR 扩增, 评估双重 PCR 鉴别检测的敏感性.

### 1.3 人工染菌牛奶样品的检测

1.3.1 牛奶污染样品的制备 将牛布鲁菌 S19 株培养物(菌落计数为  $7.9 \times 10^{10}$  CFU/mL) 10 倍倍比稀释, 各取 100  $\mu$ L 的菌液分别加入 0.9 mL 灭菌新鲜牛奶中, 充分混匀即为不同浓度梯度污染布鲁菌的牛奶样品; 将 100  $\mu$ L 灭菌生理盐水加入到 0.9 mL 灭菌新鲜牛奶中作为对照. 用 1 mL 双蒸水溶解 1 安瓿的卡介苗(0.3 mg) 后 10 倍倍比稀释, 各取 100  $\mu$ L 的菌液分别加入 0.9 mL 灭菌新鲜牛奶中, 充分混匀即为不同浓度梯度污染牛分枝杆菌的牛奶样品; 将 100  $\mu$ L 灭菌生理盐水加入到 0.9 mL 灭菌新鲜牛奶中作为对照. 各取 100  $\mu$ L 不同稀释度的牛布鲁菌 S19 株培养物及卡介苗(BCG), 分别加入 0.8 mL 灭菌新鲜牛奶中, 充分混匀即为 2 种病原菌不同浓度梯度的污染牛奶样品; 将 200  $\mu$ L 灭菌生理盐水加入到 0.8 mL 灭菌新鲜牛奶中作为对照. 污染牛奶样品细菌 DNA 的提取采用 2 种方法, 即改良 CTAB/NaCl 法<sup>[7]</sup> 及试剂盒抽提法, 试剂盒抽提法参照 QIAGEN 公司 QIAamp DNA 提取试剂盒的说明书进行.

1.3.2 牛奶污染样品的检测 用建立的双重 PCR 法检测污染牛布鲁菌 S19 株或/和牛分枝杆菌(BCG)的牛奶样品, 评估检测方法的可行性.

## 2 结果与分析

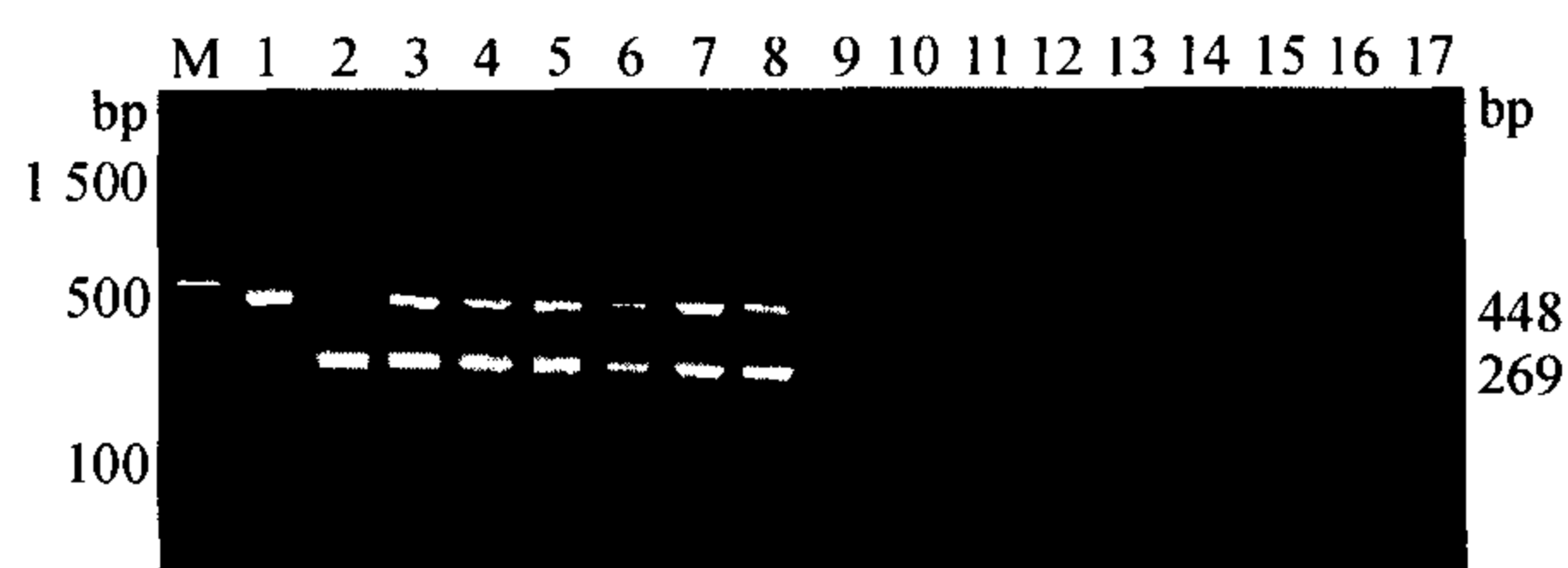
### 2.1 双重 PCR 方法的建立

在进行双重 PCR 之前, 先分别对牛布鲁菌 S19 株、牛分枝杆菌 C68007 株进行单对特异性引物的扩增, 结果表明, 牛布鲁菌 S19 株、牛分枝杆菌 C68007 株分别扩增出 2 条大小为 448、269 bp 的特异条带, 与预期片段大小相符(图略). 对 PCR 扩增产物进行基因序列测定, 应用 Clustalx 1.83 软件对测序结果进行分析, 结果表明, 所测得的基因序列与 GenBank 已发表的流产布鲁菌 omp25 基因序列和牛分枝杆菌

rimM 基因序列相似性均为 100%. 在布鲁菌和分枝杆菌单项 PCR 的基础上, 通过对扩增体系和扩增条件的优化, 建立了快速鉴别检测牛布鲁菌和牛分枝杆菌的双重 PCR 方法.

### 2.2 特异性试验

用建立的双重 PCR 方法对牛布鲁菌 S19 株、牛分枝杆菌、卡介苗、结核分枝杆菌、大肠杆菌、沙门菌、巴氏杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、军团菌及八叠球菌进行检测. 结果显示, 牛布鲁菌 S19 株扩增出 448 bp 的特异条带; 牛分枝杆菌、卡介苗及结核分枝杆菌中均扩增出 269 bp 特异性目的条带. 大肠杆菌、沙门菌、巴氏杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、军团菌及八叠球菌均无特异条带(图 1).



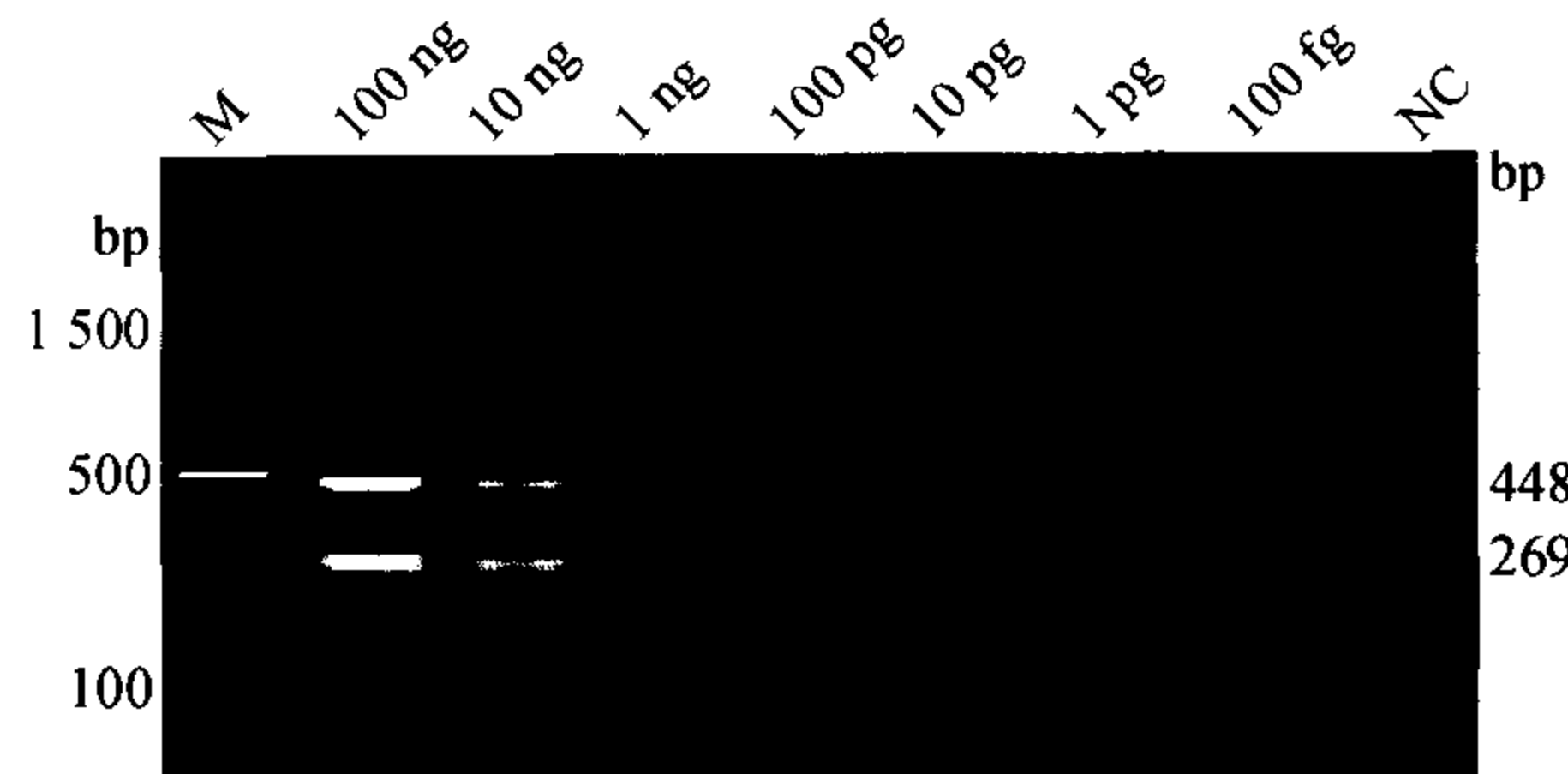
M: 100 bp DNA ladder marker; 1: 牛布鲁菌 S19 株; 2: 牛分枝杆菌 C68007 株; 3: 牛布鲁菌 S19 株 + 牛分枝杆菌 C68007 株; 4: 牛布鲁菌 S19 株 + 牛分枝杆菌 93006 株; 5: 牛布鲁菌 S19 株 + 牛分枝杆菌 C68012 株; 6: 牛布鲁菌 S19 株 + BCG; 7: 牛布鲁菌 S19 株 + 结核分枝杆菌 G001 株; 8: 牛布鲁菌 S19 株 + 结核分枝杆菌 G002 株; 9~16: 依次为大肠杆菌、沙门菌、巴氏杆菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、军团菌、八叠球菌; 17: 空白对照.

图 1 多重 PCR 特异性试验结果

Fig. 1 The specificity test of multiplex PCR assay with various kinds of bacterial species

### 2.3 敏感性试验

用建立的双重 PCR 方法对 10 倍梯度稀释的牛布鲁菌 S19 株和牛分枝杆菌 C68007 株 2 种病原基因组 DNA 为模版进行检测, 结果显示, 建立的双重 PCR 方法对牛布鲁菌及牛分枝杆菌的基因组 DNA 最低检出量均为 10 pg(图 2).



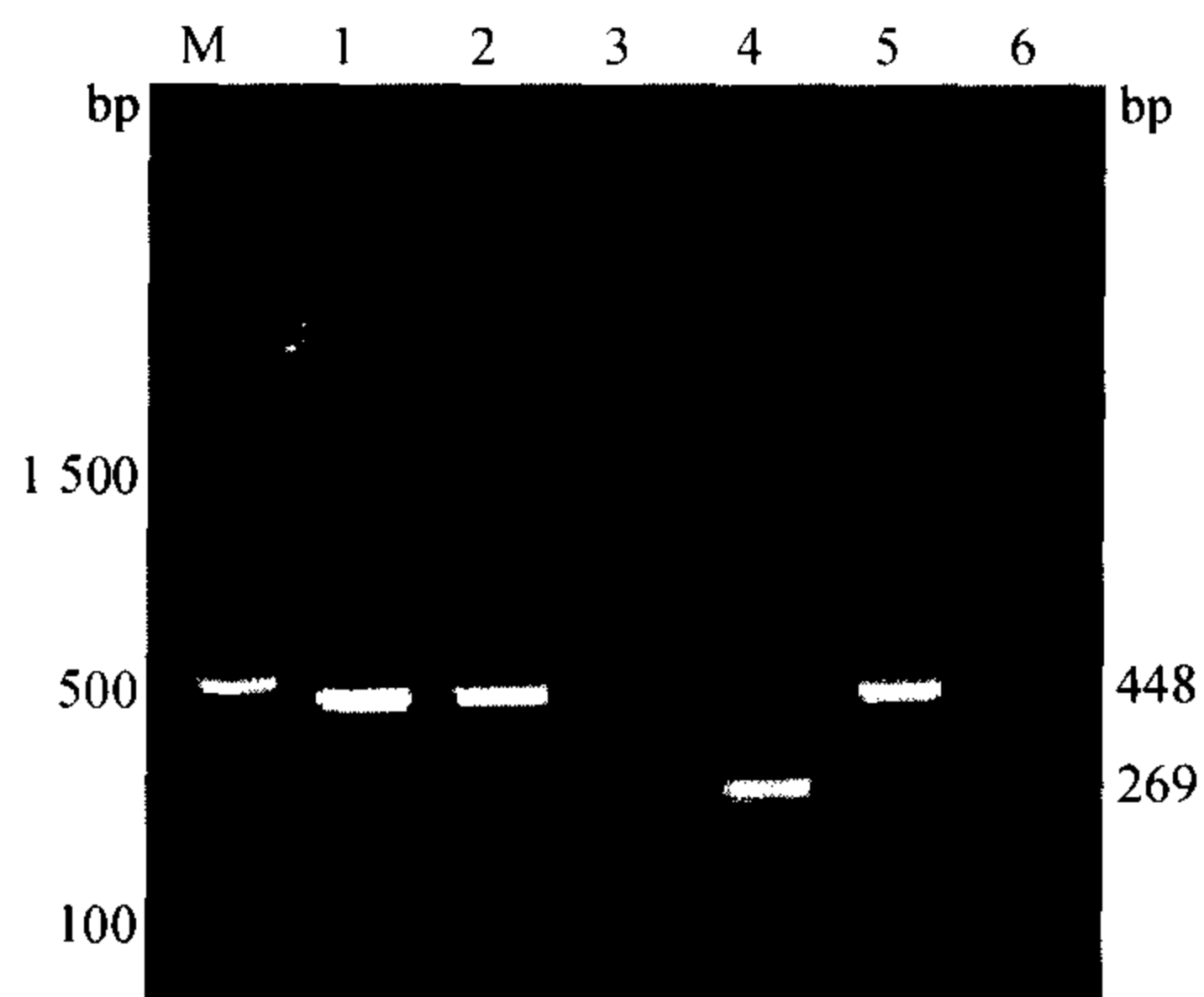
M: 100 bp DNA ladder marker, NC: 空白对照.

图 2 敏感性试验结果

Fig. 2 The sensitivity test of multiplex PCR assay

## 2.4 人工染菌牛奶样品的检测

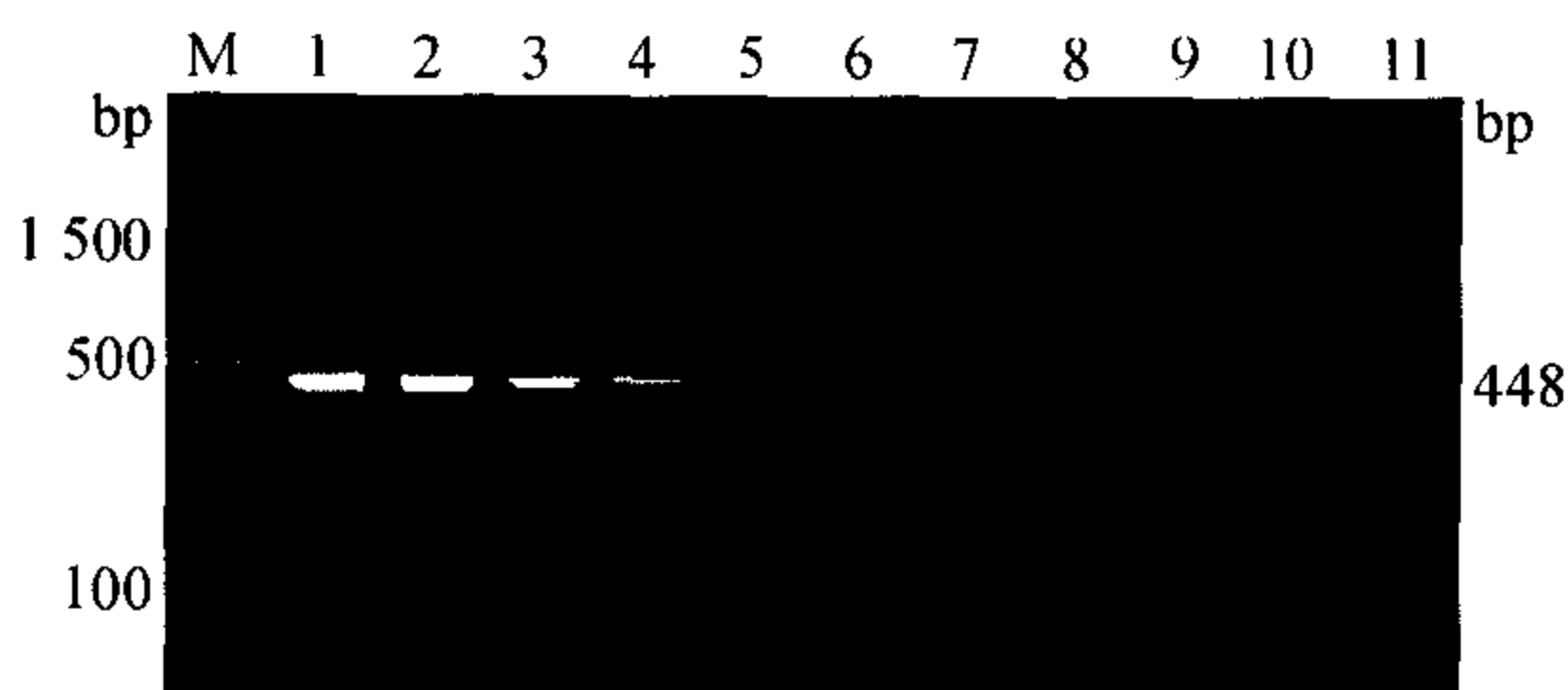
用建立的双重 PCR 法检测污染牛布鲁菌 S19 株或/和牛分枝杆菌(BCG)的牛奶样品,结果显示,该方法可以同时检出这 2 种细菌.当牛奶样品中牛布鲁菌为  $7.9 \times 10^3$  CFU/mL、牛分枝杆菌为 3 ng/mL 时,建立的双重 PCR 方法均可检出(图 3 ~ 图 5).



M:100 bp DNA ladder marker;1,2,4,5 为检测牛奶中 2 种病原菌(不同浓度组合);3,6:灭菌奶.

图 3 牛奶样品双重 PCR 试验结果

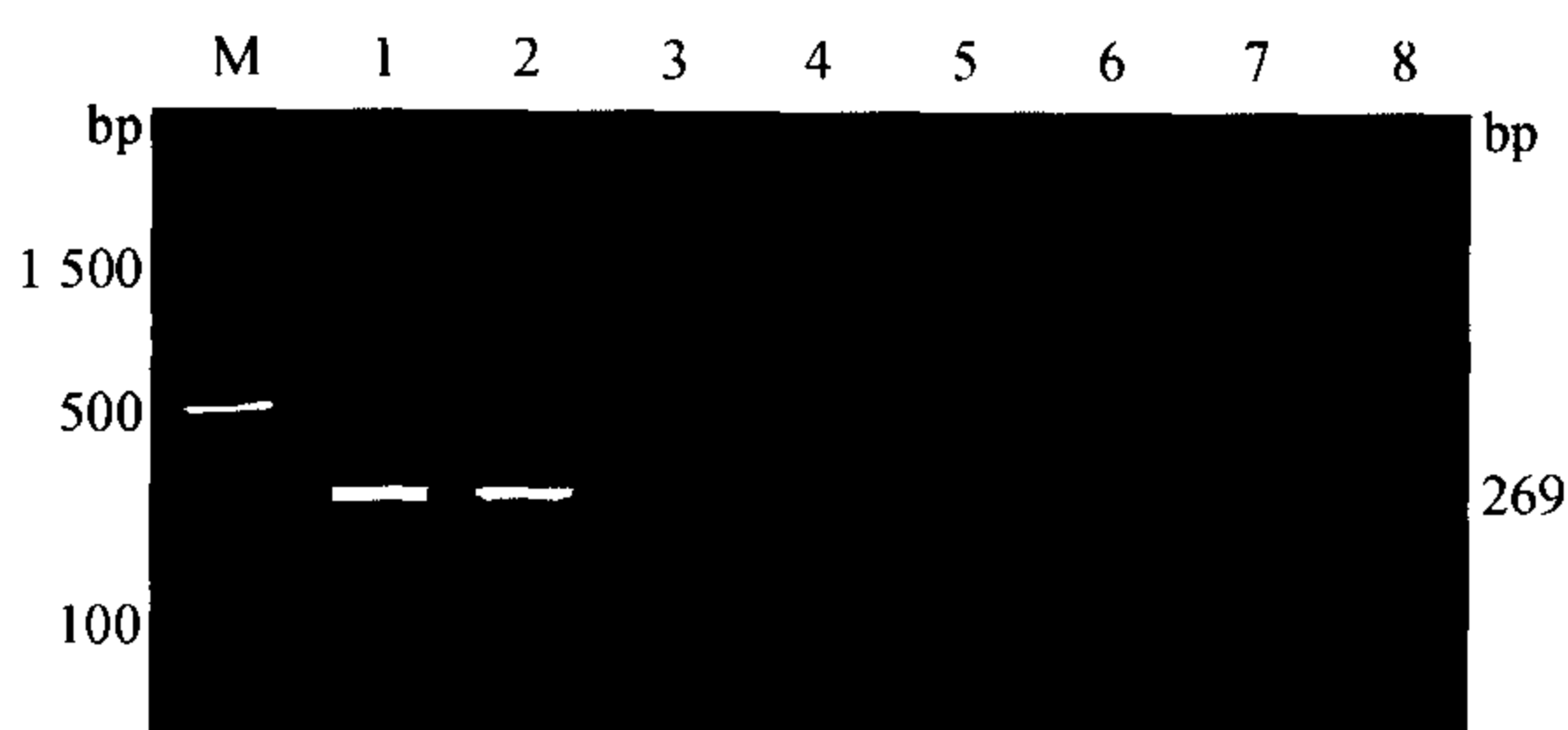
Fig. 3 The test of multiplex PCR assay from contaminated milk



M:100 bp DNA ladder marker;1: $7.9 \times 10^9$  CFU/mL;2: $7.9 \times 10^8$  CFU/mL;3: $7.9 \times 10^7$  CFU/mL;4: $7.9 \times 10^6$  CFU/mL;5: $7.9 \times 10^5$  CFU/mL;6: $7.9 \times 10^4$  CFU/mL;7: $7.9 \times 10^3$  CFU/mL;8: $7.9 \times 10^2$  CFU/mL;9: $7.9 \times 10^1$  CFU/mL;10: $7.9 \times 10^0$  CFU/mL;11:灭菌奶.

图 4 人工污染牛布鲁杆菌牛奶样品的敏感性试验结果

Fig. 4 The sensitivity test of multiplex PCR assay from contaminated milk with *Brucella abortus* vaccine strains S19



M:100 bp DNA ladder marker;1:30  $\mu$ g/mL;2:3  $\mu$ g/mL;3:300 ng/mL;4:30 ng/mL;5:3 ng/mL;6:300 pg/mL;7:30 pg/mL;8:灭菌奶.

图 5 人工污染牛分枝杆菌牛奶样品的敏感性试验结果

Fig. 5 The sensitivity test of multiplex PCR assay from contaminated milk with *Mycobacterium bovis*

畜牧业发展和人的健康造成了极大的危害.污染牛布鲁菌和牛分枝杆菌的乳制品已成为人类布鲁菌病及结核病的最重要的传染源,快速有效检测牛布鲁菌和牛分枝杆菌对于布鲁菌病和结核病的预防与及时治疗至关重要,本研究建立的双重 PCR 方法只需进行一轮 PCR 就可以同时检测牛布鲁菌及牛分枝杆菌,检测更为简单、快速、方便,可以应用于乳制品中牛布鲁菌及牛分枝杆菌的快速鉴别检测,这对于奶牛感染布鲁菌病和结核病的检疫和监测具有重要意义,为乳制品的食品安全监测提供了新的技术手段.

在建立双重 PCR 方法中,引物设计是非常重要的.流产布鲁菌外膜蛋白 Omp25 是目前具有代表性的第 3 组外膜蛋白(相对分子质量为 25 000),是布鲁菌重要的保护性抗原,编码该蛋白的 omp25 基因在所有布鲁菌的种型中是比较保守的<sup>[9]</sup>.对结核分枝杆菌及牛分枝杆菌全基因组序列比较分析及 BLAST 验证,发现 16S rRNA 加工蛋白 rimM 基因是结核分枝杆菌与牛分枝杆菌特异并且保守的基因,可以作为检测结核分枝杆菌及牛分枝杆菌新的分子标志,故本研究选取 omp25 基因和 rimM 基因高度保守序列进行引物设计,综合考虑到引物长度,G + C 含量, $T_m$  值,扩增产物大小等因素,最后本研究设计了布鲁菌及分枝杆菌 2 对特异性引物.在建立牛布鲁菌和牛分枝杆菌单项 PCR 检测的基础上,对双重 PCR 反应体系中的 EX<sup>TM</sup> Taq 酶、各引物比例、各模板比例,循环参数(退火温度、延伸时间)等条件进行优化,确定了双重 PCR 的最佳反应条件.

双重 PCR 法对牛布鲁菌和牛分枝杆菌基因组 DNA 最低检出量都为 10 pg,与谢芝勋等<sup>[10]</sup>报道的符合.牛奶样品成份复杂,含有大量蛋白质、脂类以及其他杂质,对 DNA 的提取效率和纯度均有较大影响.优化牛奶样品中布鲁杆菌和分枝杆菌基因组 DNA 提取方法,消除影响 PCR 反应的抑制因子及对 PCR 反应条件进行优化,都可以提高 PCR 检测的灵敏度<sup>[11]</sup>.本研究采用改良 CTAB/NaCl 法和试剂盒抽提法 2 种方法对牛奶样品中牛布鲁菌和牛分枝杆菌染色体 DNA 进行抽提,改良 CTAB/NaCl 法与试剂盒抽提法均能从牛奶样品中获得高质量的布鲁菌及分枝杆菌的染色体 DNA,但试剂盒提取方法不需要接触酚、氯仿等有毒的有机溶剂,提取过程较改良 CTAB/NaCl 法操作更简便、快捷,更适合于临床样品的大量检测,但成本上比较昂贵.

(下转第 107 页)

## 3 讨论

布鲁菌病和结核病都是人兽共患的传染病,给



试验利用高效液相色谱法测定复方清开灵注射液中栀子苷的含量,通过线性关系的考察、精密度、重现性、稳定性、空白加标回收率及加样回收率等一系列试验,建立了清开灵注射液中栀子苷的高效液相色谱法含量测定方法,证明了该法在测定复方清开灵注射液中栀子苷的含量中具有快速、准确、分离效果好等优点,为中药复方注射液提供了更加快速、准确的质量控制方法。

并利用建立的方法对同一厂家3个不同批号复方清开灵注射液中栀子苷含量进行了测定,分别为0.1254、0.1254、0.1270 mg/mL,因此,初步确定本注射液中含栀子苷不得少于0.1 mg/mL。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:1部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:173.
- [2] 沈爱宗,刘圣,汤源泉. 栀子药理作用及临床应用进展[J]. 基层中药杂志,1997,11(2):49-52.
- [3] 袁翠美,马自超. 紫外分光光度法测定栀子黄色素中栀子酚和栀子苷的含量[J]. 中国野生植物资源,1993(4):9-11.
- [4] 葛建华,刘捷. 薄层光密度法测定栀子金花丸中栀子苷的含量[J]. 中国药科大学学报,1990,21(3):185-186.
- [5] 朱玉,刘红霞,魏爱卿. 薄层扫描法测定清肝利胆粉剂中栀子苷的含量[J]. 药物分析杂志,1998,S1:47-48.
- [6] 胡晓丹,张德权,田许,等. 高效液相色谱法测定栀子苷的含量[J]. 核农学报,2008,22(5):669-673.
- [7] 胡震,王义明,罗国安,等. 栀子药材中三种有效成分HPLC定量分析结果不确定度的评定[J]. 中药材,2005;28(11):991-994.
- [8] 黄晓丹,傅英,陈禧翎,等. HPLC法测定清开灵胶囊中栀子苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(6):52-53.
- [9] 刘天柱,莫结丽. HPLC测定龙胆泻肝片中栀子苷的含量[J]. 中国医药导报,2008,5(10):34-35.
- [10] 王坤,谢强胜. HPLC法测定小儿退热颗粒中栀子苷的含量[J]. 中国医药导报,2009,6(25):48-49.
- [11] 刘瑞新. HPLC同时测定龙胆泻肝丸中龙胆苦苷和栀子苷的含量[J]. 中成药,2007,29(8):1170-1171.
- [12] 段启,庄义修,陈华师. HPLC法测定不同产地栀子中栀子苷含量[J]. 亚太传统医药,2009,5(6):20-21.
- [13] GUAN Ye, ZHU Hai-yan, ZHAO Hao-long, et al. HPLC method for the determination and pharmacokinetic studies on geniposide in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Yin-Zhi-Ku decoction[J]. Biomedical Chromatography,2006;20:743-747.
- [14] 田智勇,于培明,许启泰. 中药栀子的研究进展[J]. 时珍国医国药,2004(11):57-59.
- [15] 傅春升,委红祥,张学顺. 栀子的化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册,2004,19(4):152-156.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第103页)

#### 参考文献:

- [1] 崔步云. 中国布鲁氏菌病疫情监测与控制[J]. 疾病监测,2007,22(10):649-651.
- [2] 王海艳,刘中学,石新花,等. 牛结核病的现状与未来研究方向[J]. 检验检疫科学,2007,17(3):63-66.
- [3] 田文霞,邢全福. 对奶牛场“布鲁氏菌和结核杆菌病”防控工作的思考[J]. 中国动物检疫,2005,22(12):19-20.
- [4] COLE S T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. Microbiology, 2002,148(10):2919-2928.
- [5] SREEVATSAN S, BOOKOUT J B, RINGPIS F, et al. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle[J]. Clin Microbiol,2000,38(7):2602-2610.
- [6] 闫广谋,王兴龙,任林柱,等. 布鲁氏菌分子标记、毒力缺失疫苗株△S1922的构建[J]. 中国兽医学报,2007,27(5):690-694.
- [7] 杜振昆,郭军庆,张妙仙,等. 牛奶样品布氏杆菌套式PCR检测方法的建立[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34(2):169-174.
- [8] 刘艳环,苗利光. 结核分枝杆菌DNA的快速提取试验[J]. 特产研究,2004,3:16-17.
- [9] CLOECKAERT A, VERGER J M, GRAYON M, et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella* [J]. Microbiology,1995,141:2111-2121.
- [10] 谢芝勋,谢志勤,刘加波,等. 多重PCR快速检测鉴别牛布鲁氏菌和牛分枝杆菌的研究与应用[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(7):714-737.
- [11] RIJPENS N P, JANNES G, VAN ASBROECK M, et al. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(5):1683-1688.

【责任编辑 柴 焰】