

刘莉,林锋,曹铮,等. 南美白对虾肝胰腺超氧化物歧化酶和酚氧化酶的荧光定量 PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):290-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.096

南美白对虾肝胰腺超氧化物歧化酶和酚氧化酶的 荧光定量 PCR 检测

刘莉,林锋,曹铮,许怡

(浙江省淡水水产研究所/浙江省鱼类健康与营养重点实验室,浙江湖州 313001)

摘要:试验设计了南美白对虾超氧化物歧化酶和酚氧化酶的荧光定量 PCR 检测的特异性引物,用于检测肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)的表达。该方法避免了血清学检测免疫指标的不稳定性、测定值波动性较大的缺点,可作为评估南美白对虾免疫状态的一种分子检测方法。

关键词:南美白对虾;肝胰腺;SOD;PO;荧光定量 PCR

中图分类号:S945.4⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0290-02

南美白对虾属甲壳类动物,其免疫主要为非特异性免疫。包括体液免疫中的一些非特异性的酶或因子来进行的^[1-2]。抗氧化酶是无脊椎动物机体非特异性免疫的一个重要方面,其中 SOD 是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为 O₂ 和 H₂O₂ 的酶。超氧化物歧化酶(SOD)是抗氧化系统中起关键作用的酶,不仅具有清除体内自由基的作用,而且在机体免疫调节中具有重要的作用^[3-4]。酚氧化酶(PO)是一种含铜的氧化还原酶,能够催化单酚羟化成二酚,再把二酚氧化成醌,醌在非酶促条件下形成反应终产物黑色素。其反应链的短暂中间产物拥有很高的生物毒性,能够抑制病原体胞外蛋白酶以及几丁质酶的活性,属于一种酶级联反应系统,在南美白对虾抵抗病原菌侵袭过程中具有重要作用^[5-9]。

目前检测南美白对虾免疫活性因子通常是通过采集血清,采用生化反应方法检测免疫相关酶。由于采集过程及检测过程,酶活性极易受外界环境的影响,常导致检测结果波动性很大,检测的可靠性受影响。酶的产生是通过基因的转录、翻译及后加工形成的,其转录水平也可反映机体的免疫状态。虾肝胰腺是其血细胞产生的主要场所,肝胰腺组织免疫因子的转录表达也可作为评价机体免疫能力的指标之一。荧光定量 PCR 检测技术已经成为国际上检测基因表达通用的方法,能对低丰度 mRNA 水平进行定量分析^[10]。设计特异性强的引物以及合适的反应条件是利用荧光定量 PCR 检测南美白对虾免疫相关因子的关键。本发明设计的引物及反应条件可同时用于检测南美白对虾肝胰腺 SOD 和 PO 的转录相对定量表达检测,为今后准确分析其南美白对虾免疫状态提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

南美白对虾来自浙江省绍兴县某养殖场,SYBGreen 反应预混液购自 Bio-Rad 公司,M-MLV 酶、dNTP、RNase 抑制剂购自 TaKaRa(大连)公司,Trizol 购自 Invotrigen 公司。

1.2 肝胰腺总 RNA 的提取

取南美白对虾完整肝胰腺组织,加入 500 μL Trizol 裂解液,用研磨棒研磨,等彻底匀浆后,取 50 μL 匀浆液加入 1 mL Trizol 继续裂解 5 min。其余匀浆液置 -80 ℃ 保存备用,或将完整肝胰腺在液氮中速冻后置于 -80 ℃ 下保存。使用时将组织全部碾磨后,取 100 mg 加入 1 mL Trizol 裂解,其余组织粉末置 -80 ℃ 保存备用。

取出的 50 μL 匀浆液或 100 mg 组织粉末继续裂解 5 min 后,12 000 r/min 条件下离心 2 min,吸取上清至新的离心管。加入 200 μL 三氯甲烷,涡旋混匀,12 000 r/min 条件下离心 15 min,吸取上清。加入等体积异丙醇,颠倒混匀数次,静置 10 min,12 000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清。用 500 μL DEPC 水配制的 70% 乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去上清。100 μL DEPC 水溶解 RNA。测定 RNA 浓度和纯度后,-80 ℃ 保存备用。

1.3 引物设计与合成

引物是根据 GenBank 公布的南美白对虾 SOD(登录号:AY486424.1)、PO(登录号:JN393011.1)及 β-actin 内参基因序列(登录号:JF288784.1),由软件 Primer Premier 5.0 设计和手工修改后获得(表 1),均由苏州金维智生物科技有限公司合成。

1.4 cDNA 合成

取 1 μg 总 RNA 为模板,加入 1 μL 10 mmol/L dNTP、1 μL 50 mmol/L Oligo(dT)₁₅,加 DEPC 水至总体积 6.25 μL,65 ℃ 变性 5 min,冰上骤冷 2 min。上述反应液加入 2 μL 5 × M-MLV buffer、0.25 μL RNA 酶抑制剂、0.5 μL MMLV 逆转录酶、1 μL 10 mmol/L 二硫苏糖醇,使最终反应总体积达 10 μL。42 ℃ 反应 1 h 后,65 ℃ 孵育 10 min,cDNA 合成完毕。

收稿日期:2014-09-12

基金项目:浙江省农业推广基金会项目;浙江省钱江人才计划(编号:2012R10076);浙江省淡水养殖科技创新团队项目(编号:2012R10026-11)。

作者简介:刘莉(1972—),女,四川郫县人,副研究员,主要从事微生物与免疫学研究。E-mail:liuli6655@hotmail.com。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

检测基因名称	引物序列(5'→3')	扩增长度(bp)
<i>SOD</i>	<i>SOD</i> - F:CGCCCTTGAACCTCACATCT; <i>SOD</i> - R:ATTGCGCTTACGTCATTGGC	135
<i>PO</i>	<i>PO</i> - F:AATGACCGCGTTGAGGAGTT; <i>PO</i> - R:AGTGGGATCTTCAGCTTGCC	134
β -actin(内参)	β -actin - F:CGAGCGAGAAATCGTTCGTG; β -actin - R:GAATGAGGGCTGGAACAGGG	187

合成的 cDNA 加入 90 μ L 无菌双蒸水,用于后续荧光定量 PCR 扩增。

1.5 荧光定量的反应体系及条件

取 5 μ L 上述合成的 cDNA 稀释液作为扩增模板,加入 2 \times Sybgreen 反应预混液 12.5 μ L,分别加入 5 μ mol/L 相应特异性上、下游引物各 0.5 μ L,加 6.5 μ L 无菌双蒸水,使反应总体积达 25 μ L,置于荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环;60~90 $^{\circ}$ C 熔解曲线。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 扩增效果

从扩增曲线可以看出,*SOD*、*PO* 及内参基因 β -actin 的扩增曲线均较好,曲线拐点清楚,基线平,无上扬现象;*SOD* 的 C_t 值为 23.85,*PO* 的 C_t 值为 28.33,能较好地反映各基因的表达差异(图 1)。通过 C_t 值计算该样品中 *SOD* 和 *PO* 表达量相对于 β -actin 的表达量分别为 0.140 63、0.006 30 倍。

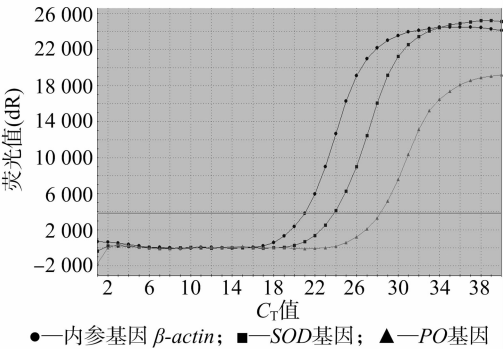


图 1 荧光定量 PCR 扩增曲线

2.2 荧光定量 PCR 扩增产物的熔解曲线

从扩增产物的熔解曲线看,*SOD*、*PO* 及内参基因 β -actin 均为单峰,且峰值较高(图 2),表明各扩增产物的特异性较好,且扩增效率较高。

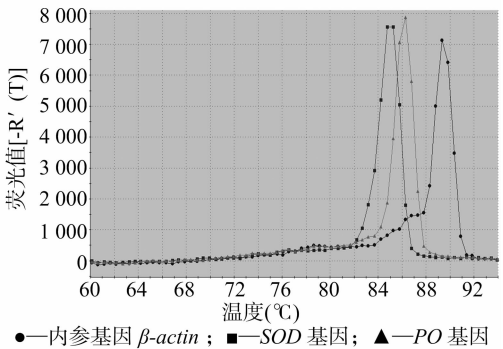
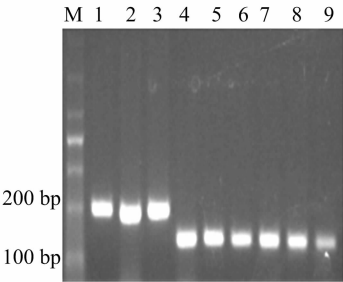


图 2 荧光定量 PCR 扩增产物的熔解曲线

2.3 荧光定量 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳检测

将荧光定量 PCR 的扩增产物进行琼脂糖电泳检测,结果显示 *SOD*、*PO* 及内参基因 β -actin 的各扩增产物的条带单

一,亮度较好,并能一定程度上看出各基因的表达差异(图 3)。进一步证实了其较好的扩增效率和较高的扩增特异性。



M—100 bp DNA Ladder marker: 1~3泳道—内参基因 β -actin; 4~6泳道—*SOD* 基因; 7~9泳道—*PO* 基因

图 3 荧光定量 PCR 扩增产物的琼脂糖电泳检测结果

3 结论与讨论

非特异性免疫因子的测定是评估南美白对虾免疫状态的主要指标,建立可靠的检测方法对于南美白对虾的免疫学研究、抗病育种研究等都具有重要意义。传统的体液免疫指标的测定常采用酶法检测,但易受多种因素干扰,测定值偏差较大。近几年,随着分子生物学迅猛发展,荧光定量 PCR 方法开始被广泛应用于多种免疫因子定量检测^[11-12]。荧光定量 PCR 检测方法的可靠性与所设计引物的特异性和扩增有效性密切相关。本方法针对 *SOD* 和 *PO* 等 2 个重要的非特异免疫指标设计了特异性较好、扩增效率较高的引物,建立了利用荧光定量 PCR 方法对南美白对虾肝胰腺 *SOD*、*PO* 的检测方法。该方法特异性强,敏感性高,克服了酶法测定易波动的问题,适合南美白对虾免疫活力的评估。

与酶法检测技术比较,本方法所提供的南美白对虾肝胰腺 *SOD*、*PO* 的荧光定量 PCR 检测方法具有以下优点:(1)所采用的肝胰腺组织较对虾血液采集更容易。(2)所采集的组织直接用 Trizol 处理或通过速冻方式保存,可有效减少 RNA 降解;较血清采集过程可能发生的溶血或其他导致酶失活的因素更易于控制,保证结果的可靠性。(3)设计的引物特异性好,扩增效率高,提高了检测的准确性。(4)采用相对定量方式,通过与内参基因表达量的对比,可同时测定多个免疫相关因子。

参考文献:

[1] 黄辉洋,李少菁,王桂忠. 甲壳动物酚氧化酶活力及其在养殖中的应用[J]. 海洋通报,2000,19(3):79-84.
[2] 李光,樊景凤,林凤翔,等. 对虾的免疫机制及其疾病免疫预防的研究进展[J]. 水产科学,2007,26(1):56-60.
[3] 刘恒,李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1998,29(2):113-118.
[4] 丁美丽,林林,李光友,等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼,1997,28(1):7-12.

高俊,王舒雅,冯迟,等.大孔树脂分离富集葛根中葛根素及大豆苷元[J].江苏农业科学,2015,43(9):292-296.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.097

大孔树脂分离富集葛根中葛根素及大豆苷元

高俊^{1,2},王舒雅^{1,2},冯迟^{1,2},雍晓雨^{1,2},周俊^{1,2},刘晓宁^{1,2},张亚兵^{1,2},谢欣欣^{1,2},陈怡露¹,郑涛^{1,2}

(1.南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京 211816; 2.南京工业大学生物能源研究所,江苏南京 211816)

摘要:研究 8 种不同极性大孔吸附树脂对葛根素、大豆苷元的吸附、解吸性能,筛选出分离富集葛根素、大豆苷元的最佳树脂 HP20。利用 HP20 大孔吸附树脂吸附富集葛根中 2 种异黄酮的过程为:上样液用盐酸调节 pH 值为 6,然后采用 HP20 大孔吸附树脂在 5 ℃ 的条件下进行吸附。结果表明,HP20 大孔吸附树脂对葛根素、大豆苷元的饱和吸附量分别为(71.78 ± 0.75)、(21.77 ± 0.01) mg/g;吸附饱和后用去离子水洗涤树脂以除去杂质,在 25 ℃ 条件下用 70% 乙醇解吸,得葛根素、大豆苷元,解吸率分别为 63.39%、80.68%,葛根素纯度由 8.62% 提高到 35.26%,大豆苷元纯度由 0.27% 提高到 10.17%。

关键词:葛根素;大豆苷元;大孔树脂;吸附;解吸;分离;富集;工艺条件

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0292-05

葛根是豆科类植物野葛 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 的根,是一种常用中药材。我国有着丰富的葛根资源,主要分为粉葛、野葛两大类,尤以野葛的分布最为广泛,且野葛中异黄酮类化合物含量高,常作药用。葛根享有“山人参”的美称,据《神农本草经》记载,葛根具有清热解毒、改善微循环、降血压、调节血脂等作用^[1-2]。葛根素、大豆苷元是葛根中主要的药物活性成分,临床研究表明,葛根素对心脑血管疾病的治愈率达 97.6%,且副作用低,深受患者欢迎;大豆苷元具有防止骨质疏松作用,还能减轻妇女更年期综合症、降低冠心病的发病率、促进神经元的保护和再生^[3-5]。随着物质生活日益丰富,心血管疾病患者不断增多,以葛根异黄酮类化合物为原料的药品是治疗该类疾病的特效药之一,因此,如何分离富

集葛根提取液中的葛根素、大豆苷元成为当下研究的热点。

大孔树脂是一类具有大孔网状结构的高分子有机聚合吸附剂,由于其具有理化性质稳定、吸附选择性独特、吸附和解吸条件温和、重复利用率高、安全无毒等优点,近年来广泛应用于皂苷、黄酮、生物碱等天然产物的分离纯化^[6-9]。目前葛根中异黄酮类化合物的分离富集方法多以葛根素为主,忽略了大豆苷元的市场应用价值,造成一定程度上的资源浪费^[10-11]。本研究选用不同极性的大孔树脂同时分离富集葛根提取液中的葛根素、大豆苷元,考察大孔树脂对葛根素、大豆苷元的吸附洗脱作用和过程动力学,并对优选出的树脂分离富集葛根素、大豆苷元的工艺条件进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葛根 [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] 购自江苏镇江药材市场,阴干、粉碎后保存备用。对照品为葛根素、大豆苷元, Sigma 公司产品;含量测定用色谱纯甲醇、乙酸为 J&K Chemical Ltd 产品;去离子水为自制;大孔吸附树脂 HPD750、HPD600 购自南开大学化工厂,HP20、D100、SP70、HPD722、HPD450A、HPD500 购自郑州勤实科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2014-09-16

基金项目:国家“973”计划(编号:2013CB733502);江苏省自然科学基金青年项目(编号:BK20130931、BK20130932)。

作者简介:高俊(1989—),男,江苏泰州人,硕士研究生,主要从事植物活性成分分离及天然药物提取研究。E-mail: gj1981118@njtech.edu.cn。

通信作者:郑涛,博士,教授,主要从事生物燃气、植物药研究与开发、微生物燃料电池研究。E-mail: zhengtiao@njtech.edu.cn。

[5] 王雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.

[6] 李天道,于佳,俞开康. 中国对虾血清中酚氧化酶活力研究[J]. 海洋湖沼通报,1998(1):51-56.

[7] 孟凡伦,张玉臻,孔健,等. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价[J]. 海洋与湖沼,1999,30(1):110-116.

[8] 李桂英,宋晓玲,孙艳,等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(6):1358-1367.

[9] 胡毅,谭北平,麦康森,等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响[J]. 中国水产科学,2008,15

(2):244-251.

[10] 王科,王晓雄,石炳毅. 实时荧光定量 PCR 在细胞因子 mRNA 检测研究中的应用[J]. 北京生物医学工程,2006,25(2):217-221.

[11] Zokaeifar H, Balcázar J L, Saad C R, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(4):683-689.

[12] Palmer C V, Bythell J C, Willis B L. A comparative study of phenoloxidase activity in diseased and bleached colonies of the coral *Acropora millepora* [J]. Development & Comparative Immunology, 2011, 35(10):1098-1101.