云巾宴,任春宇,车　达,等. 气肿疽梭菌 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):53 – 55.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2015.10.015

气肿疽梭菌 PCR 检测方法的建立

云巾宴[1], 任春宇[2], 车　达[3], 段雪岩[1], 司　唯[1], 金　鑫[1]
(1. 延边大学农学院动物医学系,吉林延吉 133002; 2. 吉林省延边州畜牧总站,吉林延吉 133000;
3. 吉林省延边州动物疫病预防控制中心,吉林延吉 133000)

摘要:为建立气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*)的快速检测方法,根据 GenBank 中气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 基因序列(登录号:JQ692583.1)设计了 1 对引物,以气肿疽梭菌标准株 C54 – 1 全基因组 DNA 为模板,建立了牛气肿疽梭菌的 PCR 检测方法,并进行了特异性、敏感性试验。结果表明,建立的气肿疽梭菌 PCR 检测方法扩增出的片段大小为 501 bp,与 GenBank 上气肿疽梭菌的同源性达 99.4%,且该方法与 D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌和巴氏杆菌等病原体无交叉反应,最低检测浓度为 12.30 fg/μL。结果表明,建立的 PCR 检测方法具有特异、敏感、高效等优点,与其他诊断方法相比更适用于气肿疽梭菌的诊断。

关键词:气肿疽梭菌;细胞毒素 CctA;PCR 诊断
中图分类号: S858.23　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2015)10 – 0053 – 03

气肿疽别称黑腿病,是由气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*)引起的以皮下组织和肌肉丰满部位发生气性、炎性肿胀,按压之有捻发音为特征的急性、热性和败血性传染病[1]。病牛是本病的主要传染源,但并不直接传染给健康牛,而是随污染的土壤经饲料或饮水间接进入消化道而感染[2]。其芽孢能在土壤中长期生存,成为持久的传染源。本病一年四季均可发生,尤以炎热干旱的夏季容易发生,严冬则较为少见;呈地方性流行,低温高湿、低湿山谷或低洼地区更易发生[3]。

由于气肿疽梭菌的生长速度和其他梭状芽孢杆菌相比较为缓慢[4-5],因其与其他梭状芽孢杆菌易发生交叉感染,所以很难从病原学和免疫学的角度对其病原体进行准确检测[6];因此建立快速高效的检测方法显得尤为重要。近年来,随着生物技术的不断发展,逐步建立了一些新的血清学诊断方法和分子生物学诊断方法。本试验根据气肿疽梭菌细胞毒素 *CctA* 基因设计了 1 对特异性引物,旨在建立灵敏、准确的针对气肿疽梭菌的 PCR 检测方法,对已发生气肿疽病的牧场其他个体进行快速、高效的诊断,并广泛应用于临床实践。

1　材料与方法

1.1　试验样本及试剂

试验样本为气肿疽梭菌 C54 – 1 标准株;Ex *Taq* DNA 聚合酶、DNTP、pMD 18 – T Simple vector 均购自大连宝生物工程有限公司;NI – DL3000 DNA marker 购自 Newbio industry 公司;凝胶回收试剂盒、质粒少量提取试剂盒购自美国 Omega 生物技术公司;D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌和巴氏杆菌均由延边大学预防兽医学实验室保存。

1.2　引物的设计与合成

根据 GenBank 上气肿疽梭菌细胞毒素 *CctA* 基因序列(登录号:JQ692583.1),用 Primer Premier 5.0 设计了 1 对引物 P_1(5′ – CGGGATCCGGTGGGTATTATCAAGC – 3′)、P_2(5′ – CCCTCGAGAGTTCCTTTTGGTGC – 3′),由北京新产业公司合成。

1.3　基因组 DNA 的提取

采用酚 – 氯仿抽提法提取气肿疽梭菌菌体核酸 DNA。

1.4　PCR 反应体系及条件

PCR 在 25 μL 反应体系中进行,双蒸水 16.25 μL、10 × Ex *Taq* buffer 2.50 μL、DNA 模板 2.00 μL、dNTP 2.00 μL 和 P_1、P_2 各 1.00 μL、Eq *Taq* 0.25 μL,共计 25 μL。PCR 扩增程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,48.8 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃保存。

1.5　PCR 产物的回收、克隆及测序

PCR 产物 50 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶回收试剂盒回收目的条带;将回收产物与 pMD 18 – T simple vector 进行连接,再转化进 DH – 5α 大肠杆菌感受态细胞内,继而接种于含有氨苄抗性的 LB 固体培养基上,经 37 ℃恒温培养 12 ~ 16 h,挑取单个菌落于含有氨苄抗性的液体培养基中增菌培养,并提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定后将质粒送往上海立菲生物技术有限公司测序。将测序结果与 GenBank 中气肿疽梭菌 ATCC 10092 菌株 *CctA* 基因进行同源性比较。

1.6　特异性试验

将 D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌、巴氏杆菌的 DNA 按照气肿疽梭菌的 DNA 浓度稀释,用本研究建立的方法进行 PCR 扩增,并设阴性对照。

1.7　敏感性试验

提取气肿疽梭菌菌体 DNA,测其 $D_{260\ nm}$ 值,将 DNA 模板按 1∶10 比例连续稀释后进行 PCR 扩增,以此来确定本 PCR

收稿日期:2014 – 10 – 07
基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(编号:吉教科合字[2014]第 6 号)
作者简介:云巾宴(1990—),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事动物传染病学研究。E – mail:yunjinyan@hotmail.com。
通信作者:金　鑫,博士,教授,主要从事动物传染病学研究。E – mail:jinxin@ybu.edu.cn。

方法的敏感性。

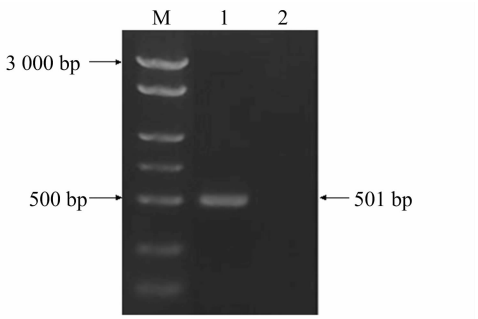
2　结果与分析

2.1　气肿疽梭菌 CctA 基因目的片段的 PCR 扩增

以气肿疽梭菌菌体 DNA 为模板，经 PCR 扩增出了大小为 501 bp 的目的片段（图 1）。

2.2　目的基因的序列分析

将测序得到的结果与 GenBank 中气肿疽梭菌 ATCC 10092 菌株 *CctA* 基因序列（JQ692583.1）进行同源性比较，结果显示，核苷酸序列同源性达 99.4%，共存在 3 处突变（图 2），表明该引物适用于气肿疽梭菌的检测。



M—DNA marker 3000；1—气肿疽梭菌；2—阴性对照

图1　目的基因的 PCR 扩增

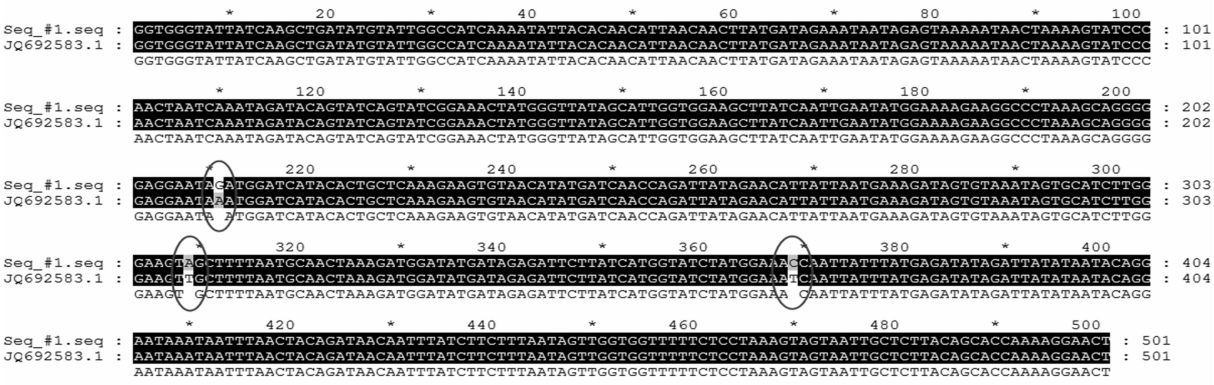
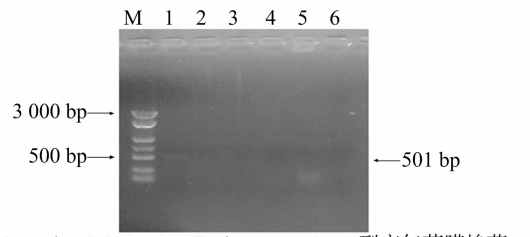


图2　PCR 产物的测序结果

2.3　特异性试验

分别以气肿疽梭菌、D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌和巴氏杆菌的基因组 DNA 为模板，按照“1.4”节所述的扩增体系和反应条件进行 PCR 扩增，并以灭菌去离子水作阴性对照，后经琼脂糖凝胶电泳检测结果。结果显示，只有气肿疽梭菌扩增出目的条带，而其他均未出现目的条带，表明本试验建立的 PCR 检测方法具有较好的特异性（图 3）。

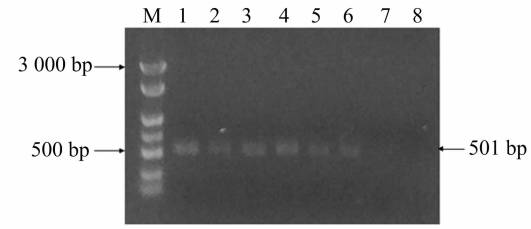


M—DNA marker 3 000；1—*C. chauvoei*；2—D型产气荚膜梭菌；3—E型产气荚膜梭菌；4—腐败梭菌；5—巴氏杆菌；6—阴性对照

图3　特异性试验

2.4　敏感性试验

取气肿疽梭菌菌体 DNA 标准品，按 1∶10 倍比稀释后，用上述 PCR 方法进行检测，PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳观察，结果表明，该 PCR 最低检测量为 12.30 fg/μL（图 4）。



M—DNA marker 3 000；1—1.230 ng/μL；2—123.0 pg/μL；3—12.30 pg/μL；4—1.230 pg/μL；5—123.0 fg/μL；6—12.30 fg/μL；7—1.230 fg/μL；8—0.1230 fg/μL

图4　敏感性试验

3　讨论

气肿疽梭菌是引起气肿疽的病原体，常随污染的土壤经饲料或饮水间接进入消化道而感染[2]，也可经皮肤伤口或通过吸血昆虫叮咬进行传播[7]。该菌的芽孢潜伏期长、存活能力力强，能在土壤中长期生存，可成为持久传染源，故很难从根本上预防和控制本病的发生及流行，这些特性严重制约了畜牧业的发展。而随着其易感群体的逐渐扩大，气肿疽梭菌也越来越多地威胁到了人类的安全。

目前常用的检测手段存在一定的弊端，病原学检查和免疫学试验都很容易与梭菌属的其他细菌发生干扰，并不能达到良好的效果。与常规检测方法相比，分子生物学方法更有优势，可准确检测低含量的病原菌。

本试验以牛气肿疽梭菌细胞毒素 A（*CctA*）基因为基础建立的 PCR 检测方法，所获得的序列与 GenBank（登录号 JQ692583.1）上公布的序列同源性为 99.4%，与产气荚膜梭菌、腐败梭菌、巴氏杆菌等病原体无交叉反应，证明其具有很好的特异性；最少可检测到 12.30 fg/μL 的 DNA，证明其具有较好的敏感性；说明本试验建立的检测方法可广泛应用于对临床样本进行快速、高效的诊断，与其他诊断方法相比更适用于气肿疽梭菌的诊断。

参考文献：

[1]王正兴. 山区牛气肿疽诊断与防制[J]. 上海畜牧兽医通讯，2011(2)：107.

刘广卿,丁　芳,孙喜云,等. 速生高抗雄性杨的组织培养与快繁研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):55 – 56.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2015.10.016

速生高抗雄性杨的组织培养与快繁研究

刘广卿, 丁　芳, 孙喜云, 孙凤岭
(河南省商丘市农林科学院,河南商丘 476200)

摘要:利用正交试验研究不同基本培养基,不同浓度 6 – BA、NAA、IBN、ZT 等 5 个因子对速生高抗雄性杨树增殖及壮苗和生根的影响,结果表明:5 个因素对于杨树侧芽增殖的影响由强到弱依次为:基本培养基 > 6 – BA 浓度 > IBN 浓度 > ZT 浓度 > NAA 浓度。5 个因素对于杨树生根的影响由强到弱依次为:基本培养基 > 6 – BA 浓度 > ZT 浓度 > NAA 浓度 > IBN 浓度。最适宜杨树增殖的培养基为:1/2MS + 6 – BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L + IBN 0.5 mg/L + ZT 0.15 mg/L,最适宜杨树壮苗与生根的培养基为:WPM + 6 – BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + IBN 1.0 mg/L + ZT 0.05 mg/L。

关键词:速生高抗雄性杨;增殖;壮苗;生根;培养基筛选;激素
中图分类号: S792.110.5　　**文献标志码**: A　　**文章编号**:1002 – 1302(2015)10 – 0055 – 02

杨树是华北、华东地区栽培量最大的树种,其特点是生长迅速、高大挺拔、迅速成林,能防风沙、吸收废气。杨树可广泛用于生态防护林、三北防护林、农林防护林、工业用材林。杨树作为道路绿化、园林景观也是非常优秀的树种。目前,很多人摒弃原有生长速度稍缓的雄性杨,大量栽培速生的雌杨树,以致每年四五月份杨絮漫天飞扬,近年来,杨絮已经成为污染环境、引发火灾的重要原因之一。四五月份正赶上冬小麦灌浆期,大量杨絮包裹在小麦植株上,影响其光合作用,造成小麦大面积减产。近年来,三倍体杨等陆续问世,但由于其在材质、抗虫性等方面存在一些问题,阻碍了三倍体杨的大面积推广,速生高抗雄性杨具有材质优良、抗虫、抗病、速生等特征,是取代现有杨树品种的不二选择[1]。为了尽快获得大量速生高抗雄性杨幼苗,笔者采用正交试验方法,对杨树组培苗进行瓶内增殖与生根,筛选出最适宜的组培苗壮苗与增殖的培养基配方,旨在为促进杨树产业化发展提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

速生高抗雄性杨。

1.2　方法

取当年生枝条,获取无菌瓶苗,筛选出适合其增殖壮苗及生根的培养基。

1.2.1　试验设计　采用 MS、WPM、1/2MS、1/2 WPM 培养基作为基本培养基,6 – BA、NAA、IBN、ZT 4 种植物激素各设 4 个梯度水平,采用正交试验进行最佳培养基激素配比筛选(表 1)。培养基中均加入蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L,pH 值为 5.8,每个培养基分装 8 瓶,经高压灭菌后待用。

表 1　速生高抗雄性杨组织培养条件正交试验因素水平

水平	因素				
	基本培养基	6 – BA 浓度(mg/L)	NAA 浓度(mg/L)	IBN 浓度(mg/L)	ZT 浓度(mg/L)
1	MS	0.1	0.1	0.1	0.05
2	1/2MS	0.5	0.5	0.5	0.10
3	WPM	1.0	1.0	1.0	0.15
4	1/2WPM	1.5	1.5	1.5	0.20

1.2.2　材料处理　选择生长健壮的植株,剪取当年生、半木质化腋芽饱满的枝条 5 ~ 10 cm,去掉可见叶,在流动的自来水中冲洗 15 ~ 20 min,揩干水分。在无菌室内的超净工作台上用 75% 乙醇处理 30 s,0.1% $HgCl_2$ 灭菌 10 min,用无菌水冲洗 5 ~ 7 次,剪成长 0.5 ~ 1.0 cm、含有 1 ~ 2 个腋芽的茎段,接种到基本培养基中,待腋芽长出 1 ~ 2 cm 再接种到增殖培养基中进行增殖培养,继代增殖以后,转入壮苗生根培养基中进行壮苗生根培养,培养温度 26 ℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx,每 3 d 记录 1 次,共记录 45 d。采用正交试验设计,共 16 个处理,试验因子见表 1,每个处理 8 瓶,每瓶接种 3 ~ 4 个茎段。

收稿日期:2014 – 08 – 14
作者简介:刘广卿(1972—),女,河南商丘人,副研究员,主要从事植物组织培养研究。E – mail:lmc2565626@163.com。

[2]郭洪友,郑　聃. 牛气肿疽病的诊治[J]. 现代农业科技,2010(7):367,369.
[3]陆安法,徐官红,简廷安,等. 牛气肿疽的防制[J]. 动物医学进展,2003,24(6):131 – 131.
[4]白　实,郭宇鹏,李艳华. 敦化地区黄牛气肿疽的防治与诊断[J]. 吉林畜牧兽医,2007,28(6):38 – 39.
[5] Kuhnert P, Krampe M, Capaul S E, et al. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR[J]. Veterinary Microbiology, 1997, 57(2/3): 291 – 298.
[6] Halm A, Wagner M, Köfer J, et al. Novel real – time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in clostridial myonecrosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(4): 1093 – 1098.
[7]孙　瑛,雷国云,于林洁. 牛气肿疽诊断与综合防治[J]. 中国畜禽种业,2008(17):59 – 60.