

云中宴,任春宇,车 达,等. 气肿疽梭菌不同靶基因检测方法的比较[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):278-280.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.085

气肿疽梭菌不同靶基因检测方法的比较

云中宴¹,任春宇²,车 达³,金清洙⁴,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; 4. 吉林省延吉市动物卫生监督所,吉林延吉 133000)

摘要:为检测牛、羊等反刍动物的气肿疽梭菌,筛选出更为特异、敏感的 PCR 检测方法,分别以 *fliA*(*C*)、*nanA*、*cctA* 为靶基因进行 PCR 检测,并对其敏感性、特异性等方面进行比较。结果表明,以 *cctA* 为靶基因的 PCR 检测方法敏感性最高,最小检测 DNA 量为 12.30×10^{-5} pg/ μ L;以 *fliA*(*C*)、*nanA* 为靶基因的 PCR 检测方法敏感性较低,最小检测 DNA 量为 0.123 ng/ μ L;3 种靶基因引物菌未扩增出 D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌、巴氏杆菌等基因片段,具有较好的特异性。本试验为气肿疽的快速诊断提供了更为敏感、特异的检测技术。

关键词:气肿疽梭菌;*fliA*(*C*) 基因;*nanA* 基因;*cctA* 基因;PCR 方法

中图分类号:S855.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0278-02

气肿疽别称黑腿病,是由气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*)引起的牛、羊等反刍动物的急性、热性、败血性传染病^[1]。动物感染气肿疽梭菌的典型症状为触诊肌肉部位有捻发音,穿刺或切开肿胀处如同天然孔,流出泡沫样的暗红色血液^[2-3]。气肿疽呈散发性流行或地方性流行,一年四季均可发病,尤以炎热干旱的夏季容易发生,冬季则较少见。气肿疽梭菌的芽孢具有很强的存活力,可在土壤中存活 5 年之久,在腐败的尸体中也可存活 3 个月,因此难以从根本上预防并控制本病的发生和流行,使畜牧业蒙受巨大的经济损失^[4-5]。本试验根据 GenBank 上已公布的气肿疽梭菌 *fliA*(*C*) 基因序列(AB058931)、*nanA* 基因序列(FM213082)、*cctA* 基因序列(JQ692583)设计了 3 对引物,并从特异性、敏感性方面对建立的 PCR 检测方法进行比较分析,以期为气肿疽的快速诊断筛选出更简便、快捷、高效的检测技术。

1 材料与方法

1.1 模板与试剂

以气肿疽梭菌标准株 C54-1 全基因组 DNA 为模板。*r Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;NI-DL 3 000 DNA Marker 购自 Newbio Industry 公司;D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌、巴氏杆菌均由延边大学预防兽医学实验室保存。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上已公布的气肿疽梭菌 *fliA*(*C*) 基因序列(AB058931)、*nanA* 基因序列(FM213082)、*cctA* 基因序列(JQ692583),采用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 对特异性引物(表 1),由北京新产业公司合成。

表 1 试验所用引物及 PCR 产物大小

基因序列	上游引物	下游引物	PCR 产物大小(bp)
<i>fliA</i> (<i>C</i>)	5'-AGTTATTAGATGGTGGTTTC-3'(P1)	5'-ATGCCATCATTTCCTTA-3'(P2)	750
<i>nanA</i>	5'-CAGGTGAAACTACAGCGAAAG-3'(P3)	5'-TCCTGGTCTGTTCCTAAAA-3'(P4)	704
<i>CctA</i>	5'-CGGGATCCGGTGGGTATTATCAAGC-3'(P5)	5'-CCCTCGAGAGTTCCTTTTGGTGC-3'(P6)	501

1.3 DNA 模板的制备及浓度测定

采用酚-三氯甲烷抽提法提取气肿疽梭菌菌体核酸 DNA,并用紫外分光光度仪测定其浓度。

1.4 PCR 反应

以气肿疽梭菌标准株 C₅₄₋₁ 全基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系:10×buffer 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、DNA 模板 2 μ L、上下游引物各 1 μ L(10 pmol/L)、*r Taq* 0.25 μ L,用水补

齐至 25 μ L。以 *fliA*(*C*)、*nanA*、*cctA* 为靶基因,优化后的扩增程序为:95.0℃预变性 5 min;95.0℃变性 45 s,43.4℃退火 45 s,72.0℃延伸 45 s,35 个循环;72.0℃延伸 10 min,4.0℃反应结束。95.0℃预变性 5 min;95.0℃变性 45 s,42.5℃退火 45 s,72.0℃延伸 45 s,35 个循环;72.0℃延伸 10 min,4.0℃反应结束。95.0℃预变性 5 min;95.0℃变性 45 s,48.8℃退火 45 s,72.0℃延伸 45 s,30 个循环;72.0℃延伸 10 min,4.0℃反应结束。采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.5 特异性试验

以 D 型产气荚膜梭菌、E 型产气荚膜梭菌、腐败梭菌、巴氏杆菌的基因组 DNA 为模板,以灭菌去离子水为阴性对照,分别用 3 对特异性引物进行 PCR 扩增,以判断其特异性。

1.6 敏感性试验

提取气肿疽梭菌菌体 DNA 并测其 *D*_{260 nm} 值,将 DNA 模

收稿日期:2014-11-27
基金项目:吉林省教育科学技术研究项目[编号:吉教科合字(2014)第 6 号]。
作者简介:云中宴(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。

板按 1 : 10 比例连续稀释后,分别用 3 对特异性引物进行 PCR 扩增。采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,以确定 PCR 方法的敏感性。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的浓度

提取气肿疽梭菌标准株 C_{54-1} 菌体 DNA 后,采用紫外分光光度计测定其 $D_{260\text{ nm}}$ 值,计算得到 DNA 浓度为 12.3 ng/ μL 。

2.2 特异性试验结果

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、巴氏杆菌的基因组 DNA 为模板,以灭菌去离子水为阴性对照,按照“1.4”节的扩增体系和反应条件,采用 3

对特异性引物进行 PCR 扩增,并采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果。结果(图 1)显示,气肿疽梭菌扩增出了特异性目的条带,而其他均未出现目的条带,表明 3 种靶基因的 PCR 检测方法均具有较好的特异性。

2.3 敏感性试验结果

将气肿疽梭菌菌体 DNA 标准品按 1 : 10 比例稀释后,采用上述 PCR 方法进行扩增,并采用琼脂糖凝胶电泳检测结果。结果(图 2)显示,3 种靶基因的 PCR 检测方法中,以 *cctA* 为靶基因的 PCR 方法敏感性最高,最小检测 DNA 量为 12.30 fg/ μL ;以 *fliA*、*nanA* 为靶基因的 PCR 方法敏感性较低,最小检测 DNA 量同为 123.0 pg/ μL 。

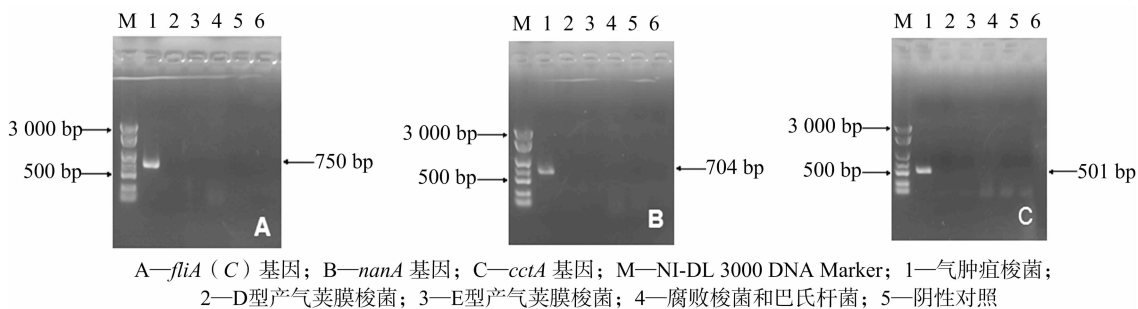


图1 特异性试验结果

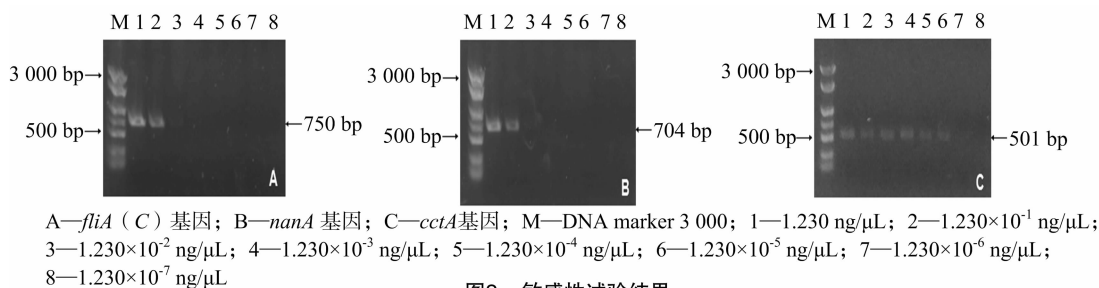


图2 敏感性试验结果

3 结论与讨论

目前,诊断牛、羊等反刍动物的气肿疽病主要采用间接 ELISA、普通 PCR、实时荧光定量 PCR、套式 PCR、二重 PCR、多重实时定量 PCR 等分子生物学诊断方法^[6-11]。PCR 检测方法因其特异性强、灵敏度高而被广泛采用,但由于不同基因的开放阅读框稳定性不同,其特异性、敏感性受到不同程度的影响;因此,有必要筛选出特异性好、敏感度高的气肿疽病 PCR 诊断方法。

近年来,Moussa 报道的气肿疽梭菌鞭毛蛋白不仅是一种重要的保护性抗原,也是引起生物体感染和发病的重要毒力因子^[12]。唾液酸酶别称神经氨酸酶、NanA,分子质量为 81 ku,编码 722 个氨基酸,是由 2 个分子质量为 72 ku 的多肽所组成的 150 ku 的二聚体。该酶可作为反刍动物抵抗病原体入侵、防治黑腿病感染的优秀候选基因^[13]。气肿疽梭菌细胞毒素 A (CctA) 是 Frey 等通过全基因序列分析得出的一种新型蛋白质毒素,该毒素是细菌毒素的杀白细胞素总科、 β -微孔形成毒素家族中的一种。细胞毒素 A 是气肿疽梭菌的主要细胞毒素和溶血素,也是黑腿病疫苗研究中极具价值的候选基因^[14]。本试验根据 GenBank 上已公布的气肿疽梭菌

fliA (C) 基因序列 (AB058931)、*nanA* 基因序列 (FM213082)、*cctA* 基因序列 (JQ692583) 设计了 3 对引物,并从特异性、敏感性方面对建立的 PCR 检测方法进行比较分析。结果表明,3 对引物均具有较强的特异性,而以 *cctA* 为靶基因设计的引物最为敏感,其最小检测 DNA 量为 1.230×10^{-5} pg/ μL 。本试验通过比较不同靶基因 PCR 检测方法,筛选出以 *cctA* 为靶基因引物的 PCR 方法,为气肿疽病临床诊断提供了可靠技术手段。

参考文献:

- [1] 王正兴. 山区牛气肿疽诊断与防治[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011(2):107.
- [2] 陆安法,徐官红,简延安,等. 牛气肿疽的防治[J]. 动物医学进展, 2003, 24(6):131-131.
- [3] 姜丹丹. 气肿疽梭菌单克隆抗体的制备及胶体金诊断试纸条的研制[D]. 延吉:延边大学, 2013:1-45.
- [4] 白实,郭宇鹏,李艳华,等. 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] Groseth P K, Ersdal C, Bjelland A M, et al. Large outbreak of blackleg in housed cattle[J]. The Veterinary Record, 2011, 169(13):339.

陈 圆, 张 龙, 王 莹, 等. 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子体外释放动力学研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 280–282.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.086

金雀异黄素壳聚糖纳米粒子体外释放动力学研究

陈 圆¹, 张 龙^{1,2}, 王 莹², 刘天晴²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学化学化工学院, 江苏扬州 225002)

摘要:采用透析法考察不同介质 pH 值和离子浓度对金雀异黄素壳聚糖纳米粒子体外释放的影响, 并采用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程和双相动力学方程, 对纳米粒子的体外释放动力学进行探讨。结果表明, 该纳米粒子的体外释放与介质 pH 值和离子浓度有关, 随着介质 pH 值增大, 纳米粒子中药物释放量减少; 随着介质中离子浓度的增大, 纳米粒子的释药量相应增大。释药数据拟合显示, 金雀异黄素对照品在含 40% 乙醇的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的体外释放符合零级动力学方程, 呈线性释放, 释放速率常数为 0.122 min^{-1} ; 而该纳米粒子在释放介质中的释药行为符合双相动力学方程, 先快速释药, 后缓慢释放, 释放速率常数分别为 0.110 、 0.032 min^{-1} 。

关键词:金雀异黄素; 壳聚糖; 纳米粒子; 释放动力学; 释放速率常数

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0280-03

目前, 药物释放研究大致可分为混合药膜体系和大分子药物体系, 其中, 前者是使药物物理分散在生物大分子中, 即用生物大分子来包裹药物, 这类药物在溶出过程中必须通过生物大分子载体, 并在载体完全降解后才得以全部释放; 而后者是通过可降解生物大分子与药物分子之间化学相互作用形成化学键, 这类药物释药必须通过酶解或水解来进行。

壳聚糖 (chitosan)^[1-4] 作为一种天然生物材料, 因其具有良好的生物相容性和可降解性, 在医药领域的应用研究中, 已成为新型的纳米药物载体。金雀异黄素是一种存在于豆科植物中的天然异黄酮化合物, 具有广泛的抗肿瘤药理活性。文献[5]研究了金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的制备与性能表

征, 发现该纳米粒子不仅具有良好的负载能力, 还具有良好的缓释性能。然而, 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的具体释药模型还有待进一步阐释。目前, 药物体外释放模型归纳起来可分为动力学模型、概率分布模型、多项式模型、Logistic 模型、Gompertz 模型、Higuchi 模型等。本研究运用常用的零级动力学^[6]、一级动力学^[7]、Higuchi 动力学^[8-10]和双相动力学模型对金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的体外释放进行拟合, 探讨其释放动力学行为。

1 试验部分

1.1 试剂

乙醇 (AR, 国药集团化学试剂有限公司产品), 磷酸盐缓冲液 (Sigma 公司产品), 金雀异黄素 (99%, 上海融合医药科技发展有限公司产品), 金雀异黄素壳聚糖纳米粒 (自制), 去离子水。

1.2 金雀异黄素壳聚糖纳米粒子的体外释放性能测定

采用透析法研究不同介质 pH 值和离子浓度对金雀异黄素纳米粒体外释放性能, 释放试验同文献[5]所述, 用 UV-2550 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司) 测定所取样液中药物的含量, 进而计算累积药物释放量 (Q)。

收稿日期: 2014-12-20

基金项目: 江苏省研究生科技创新计划 (编号: CXZZ13_0893); 江苏省 2012 年度“青蓝工程”资助项目。

作者简介: 陈 圆 (1981—), 女, 江苏泰兴人, 博士, 副教授, 研究方向为药物新剂型。E-mail: jstzchenyuan@163.com。

通信作者: 张 龙 (1966—), 男, 江苏靖江人, 教授, 研究方向为药物新剂型, E-mail: longz98@163.com; 刘天晴 (1959—), 男, 江苏淮安人, 博士, 教授, 研究方向为胶体与界面化学, E-mail: tqliu@yzu.edu.cn。

[6] 车 达, 金 鑫, 陈莹莹, 等. 延边黄牛气肿疽间接 ELISA 诊断方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 1042–1044.

[7] Uzal F A, Hugenholtz P, Blackall L L, et al. PCR detection of *Clostridium chauvoei* in pure cultures and in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 91(2/3): 239–248.

[8] Halm A, Wagner M, Küfer 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.

[9] 姜丹丹, 金 鑫, 陈 莹, 等. 气肿疽梭菌套式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(11): 1171–1174.

[10] 彭小兵, 李旭妮, 王 楠, 等. 二重 PCR 方法鉴别气肿疽梭菌和

腐败梭菌[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(3): 20–22.

[11] Lange M, Neinrich H, Seyboldt C. Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium*[J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(4): 204–210.

[12] Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, et al. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 76(4): 359–372.

[13] Vimr E R, Kalivoda K A, Deszo E L, et al. Diversity of microbial sialic acid metabolism[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(1): 132–153.

[14] Frey J, Johansson A, Bürki S, et al. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis[J]. Vaccine, 2012, 30(37): 5500–5505.