

文章编号:1000-0615(2009)03-0403-07

## 文蛤内脏产气荚膜梭菌毒素基因的 PCR 检测

蔡玉梅<sup>1</sup>, 柴同杰<sup>1</sup>, 段长民<sup>2</sup>, 黄丽波<sup>1</sup>, 蔡春梅<sup>2</sup>, 王 慧<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018;

2. 德州市肿瘤医院, 山东 德州 253000)

**摘要:**用细菌学方法分离并初步鉴定文蛤内脏中的产气荚膜梭菌,PCR 方法检测分离菌株的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、 $\beta_2$  和肠毒素等产气荚膜梭菌毒素基因,PCR 扩增片段克隆后进行核苷酸序列测定,然后与 GenBank 相应毒素基因的核苷酸序列进行同源性比较;分离菌株  $\alpha$  毒素全长基因克隆、测序后与不同来源分离株进行同源性比较;检测内脏产气荚膜梭菌阳性的蛤肉组织中的  $\alpha$  毒素基因以判定食品安全性。结果表明,文蛤内脏产气荚膜梭菌分离率为 71%,69% 的分离菌株为 C 型,31% 的为 A 型,两种毒素型均能扩增出特异性  $\beta_2$  条带及肠毒素条带,检出基因与 GenBank 相应毒素基因的同源性在 98% 以上;蛤肉组织  $\alpha$  毒素基因检测结果为阴性。文蛤内脏分离菌株  $\alpha$  毒素全长基因与不同来源分离株的同源性为 98.64%~99.58%。本研究首次在文蛤内脏检出产气荚膜梭菌的毒素基因,对水产动物产气荚膜梭菌的进一步研究及人类的食品安全有一定的指导意义。

**关键词:**文蛤;产气荚膜梭菌;毒素基因;核苷酸序列

**中图分类号:** Q 523; S 917

**文献标识码:** A

产气荚膜梭菌为革兰氏阳性厌氧菌,广泛分布于土壤、污水、畜禽及人的消化道内,可以产生多种外毒素和酶类, $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、 $\beta_2$  和肠毒素是其主要致病性毒素。根据 4 种主要分型毒素—— $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ ,产气荚膜梭菌分为 A( $\alpha$  毒素)、B( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$  毒素)、C( $\alpha$ 、 $\beta$  毒素)、D( $\alpha$ 、 $\epsilon$  毒素)和 E( $\alpha$ 、 $\iota$  毒素)5 个毒素型,每个毒素型均能感染人或畜禽引起特定疾病<sup>[1]</sup>。 $\beta_2$  毒素主要由 C 型和 A 型菌产生,与动物和人的梭菌性胃肠炎有关<sup>[2]</sup>;肠毒素主要是由 A 型菌在芽孢期产生的、部分 C 型和 D 型菌也可以产生,能引起人的食物中毒<sup>[3]</sup>。

产气荚膜梭菌是畜禽及人消化道的正常菌群,也是条件性致病菌,能引起牛羊“猝死症”、畜禽坏死性肠炎及人的食物中毒。目前,关于畜禽消化道产气荚膜梭菌的研究报道较多,贝类产气荚膜梭菌仅在少数文献中简单提及<sup>[4-6]</sup>,尚缺乏详细的研究资料。但是,贝类的生活环境为水体,可能被人畜粪便污染,那么常见贝类内脏中能否

分离出产气荚膜梭菌,其毒素型如何,毒素基因的核苷酸序列与不同来源分离株的同源性如何,这些正是本实验目的所在。

目前,产气荚膜梭菌毒素型的鉴定通常采用多重 PCR 方法在一个体系同时扩增  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、 $\beta_2$  和肠毒素基因<sup>[7-8]</sup>,虽然该方法在目前较为通用,但  $\beta$  和肠毒素基因的扩增产物量往往较少易漏检,因而检测结果与单基因 PCR 检测时通常不一致,所以需要建立更为准确的 PCR 检测体系。

本研究以常见贝类——文蛤 (*Meretrix meretrix*) 为材料,通过细菌学方法分离内脏中的产气荚膜梭菌,聚合酶链式反应检测分离株及蛤肉中的毒素基因,扩增产物克隆后进行核苷酸序列测定以排除假阳性条带, $\alpha$  毒素全基因克隆、测序后与不同来源分离株进行同源性比较,以期对水产动物产气荚膜梭菌的进一步研究及人类的食品安全提供参考。

收稿日期:2008-04-21 修回日期:2008-12-23

资助项目:国家自然科学基金专项基金项目(30571381)

通讯作者:柴同杰, E-mail: chaitj@sdau.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验动物

活文蛤 100 个,购自泰安“中百”超市,来源为某近海贝类养殖区。

### 1.2 参考菌株

产气荚膜梭菌参考菌株为 A 型(NCTC 8798)、B 型(NCTC 6121)、C 型(NCTC 4989)和 E 型(NCTC 8084),对照菌种为大肠杆菌(NCTC 12079)、葡萄球菌(NCTC 29062)、沙门氏菌(CCM 3572)、链球菌(CCM 2725),均由德国柏林大学提供。

### 1.3 主要试剂

PCR 相关试剂、DNA Marker DL2000、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD18-T Vector、*EcoR* I / *Pst* I 限制性内切酶、蛋白酶 K 等均由大连宝生物工程有限公司提供。

组织 DNA 提取液: 1 mol/L Tris-Cl (pH 8.0) 5 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL, 5 mol/L NaCl<sub>2</sub> 2mL, 10% SDS 10 mL 定容至 100

mL 后过滤除菌。

### 1.4 样品收集及细菌分离培养、鉴定

无菌条件下取文蛤内脏内容物约 5 g 接种于 45 mL 灭菌营养肉汤中,43 ℃ 厌氧(88% N<sub>2</sub>、7% H<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 培养 18 h,再接种于 5% 公绵羊血 - 1% 葡萄糖 - 血琼脂基础平板上 43 ℃ 厌氧培养 12 ~ 24 h,挑取绿色、周围有双层溶血环的菌落涂片、染色镜检,将革兰氏阳性、直短杆状的梭菌菌落接种鲜血平板两套,43 ℃ 分别进行厌氧和需氧对照培养 12 h,然后保存菌种,同时将纯分离培养菌落接种硫酸亚铁牛乳培养基,43 ℃ 厌氧培养 24 h,通过牛乳暴烈发酵试验进行细菌学鉴定。

### 1.5 产气荚膜梭菌毒素基因三步 PCR 检测体系及对参考菌株的扩增

PCR 模板制备方法参照文献[9]。产气荚膜梭菌毒素基因检测采用 3 次 PCR 反应完成,即 α、β<sub>2</sub>、ε、ι 毒素基因的四重检测及 β 和肠毒素的单基因检测,通过对参考菌株模板的扩增、特异性实验、扩增产物核苷酸序列测定来检验体系的可靠性。引物序列<sup>[8]</sup>见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 PCR primer sequences

基因 gene	上游引物(5'-3') forward primers(5'-3')	下游引物(5'-3') rearward primers(5'-3')
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	CCTCTGATACATCGTGTAAAG
<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA	GCAGGAACATTAGTATATCTTC
<i>etx</i>	GCGGTGATNCTCATCTATTTC	CCACTTACTTGTCTACTAAC
<i>iA</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG	CTTTCCTTCTATTACTATACG
<i>cpb2</i>	AGATTTTAAATATGNCTCTAAAC	CAATACCCTTACCAAATACTTC
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTACG	GGACCAGCAGTTGTAGATA

首先用四重 PCR 检测产气荚膜梭菌参考菌株 A 8798、B 6121、C 4989、D 8346、E 8084 的 α、β<sub>2</sub>、ε、ι 毒素基因(*cpa*、*cpb2*、*etx*、*iap*),预计扩增目的片段长度分别为 325 bp(*cpa*)、567 bp(*cpb2*)、656 bp(*etx*)、446 bp(*iap*)。反应体系为 25 μL,体系各组分如下:10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (2.5 mmol/L) 1.6 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, *cpa* 上下游引物 (25 μmol/L) 各 0.5 μL, *cpb2*、*etx* 上下游引物 (25 μmol/L) 各 0.75 μL, *iap* 上下游引物 (25 μmol/L) 各 1.0 μL,模板 DNA 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL;最后用灭菌双蒸水补足到 25 μL。

PCR 基本反应程序为 94 ℃ 5 min、95 ℃ 30

s、49 ~ 54 ℃ 30 s(第一个循环退火温度为 54 ℃,然后每隔 4 个循环降 1 ℃,直至退火温度降为 49 ℃)、72 ℃ 1 min,共进行 32 个循环,最后于 72 ℃ 延伸 10 min。

参考菌株 A 8798、B 6121、C 4989 的 *cpe*、*cpb* 单基因 PCR 检测体系,预计扩增目的片段长度分别为:235 bp (*cpe*)、196 bp (*cpb2*),上下游引物 (25 μmol/L) 各 0.75 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, *cpb* 退火温度 50 ℃, *cpe* 退火温度 52 ℃,其它同四重 PCR 检测体系。

### 1.6 PCR 反应的证实试验及特异性实验

上述 PCR 反应结束后,取 10 μL PCR 产物在 1.0% (β 条带用 1.5%) 的琼脂糖凝胶 90 V 电泳

35 ~ 40 min, 凝胶成像系统下观察扩增片段的大小, 然后将扩增条带分别用 DNA 凝胶回收试剂盒按说明回收, 并将纯化产物与 pMD18-T Vector 按一定比例(1:3) 16 °C 连接过夜, 连接产物与 DH5 $\alpha$  感受态细胞混合进行转化, 转化产物均匀涂布于 LB/Amp 琼脂平板 37 °C 过夜培养(10 ~ 14 h), 挑取白斑提取质粒, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 双酶切质粒, 根据酶切片段确定阳性重组质粒并送上海生物工程有限公司进行核苷酸序列测定, 然后与已发表标准序列进行同源性比较。

以相同的引物在相同的条件下对大肠杆菌、葡萄球菌、沙门氏菌、链球菌的模板 DNA 进行 PCR 扩增, 评定 PCR 反应的特异性。

### 1.7 文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株毒素基因的检测及扩增片段的克隆与核苷酸序列分析

采用以上建立的产气荚膜梭菌毒素基因 PCR 检测方法, 对文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株进行 6 种毒素基因(*cpa*、*cpb2*、*etx*、*iap*、*cpb* 和 *cpe*) 的检测, 并将扩增产物克隆测序, Blastn 在线比对检出基因与 GenBank 已发表的相应序列的同源性, 排除假阳性扩增。

### 1.8 蛤肉中产气荚膜梭菌及 $\alpha$ 毒素基因的检测

将内脏产气荚膜梭菌阳性的文蛤肉除去内脏并以无菌水洗净, 细菌学方法分离产气荚膜梭菌, 高盐法以组织提取液常规提取组织 DNA。然后, 分别以内脏产气荚膜梭菌阳性的蛤肉组织 DNA 为待检模版, 内脏产气荚膜梭菌阴性的蛤肉组织 DNA 为阴性对照检测产气荚膜梭菌的  $\alpha$  毒素基因, 检测体系 25  $\mu$ L, *cpa* 上下游引物(25  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, 退火温度 56 °C, 其它同 *cpb*、*cpe* 的单基因检测。

### 1.9 蛤内脏产气荚膜梭菌分离株与不同来源分离株的 $\alpha$ 毒素全基因序列分析

$\alpha$  毒素基因全长引物序列参照文献[10], C 型产气荚膜梭菌文蛤分离株, A 型产气荚膜梭菌中国分离株(羊源、猪源、兔源)、A 型产气荚膜梭菌日本空气分离株为 PCR 反应模板, PCR 反应体系 50  $\mu$ L:2.0  $\mu$ L 的模版 DNA, 10  $\times$  PCR Buffer ( $Mg^{2+}$  free) 5.0  $\mu$ L,  $MgCl_2$  (2.5 mmol/L) 3.4  $\mu$ L, dNTP(2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, *cpa* 全长上下游引物(25  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L; 最后用灭菌双蒸水补足到 50  $\mu$ L。PCR 基本反应程序为 94 °C 5 min、94 °C 1 min、52

°C 45 s、72 °C 80 s, 共进行 32 个循环, 最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物的回收、连接、转化及核苷酸序列测定同上, 最后用 DNAMAN 计算机软件分析序列同源性。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌学检查

文蛤内脏样品在厌氧环境下经过增菌、分离培养, 血琼脂平板上出现特征性具双溶血环(多)或单溶血环(少)的菌落, 纯分离需氧对照培养时则无菌落生长。菌落涂片、镜检可见典型革兰氏染色阳性、直短杆状的梭菌, 牛乳暴烈发酵试验阳性。根据菌落的性状、溶血环的特性、镜检结果及牛乳暴烈发酵实验结果可初步确定所分离细菌为产气荚膜梭菌。100 份文蛤内脏样品中有 71 份(71%)分离出该菌。

### 2.2 三步 PCR 对产气荚膜梭菌参考菌株的检测

通过对参考菌株  $\alpha$ 、 $\beta$ 2、 $\epsilon$  和  $\iota$  毒素的 4 基因检测及  $\beta$ 、肠毒素的单基因检测, A8798 菌扩增出  $\alpha$  和肠毒素条带, B6121 扩增出  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$  3 条条带, C4989 扩增出  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta$ 2 3 条条带, D 型菌扩增出  $\alpha$ 、 $\epsilon$  两条条带, E8084 扩增出  $\alpha$ 、 $\iota$  两条特异性条带(图 1), 此结果与参考菌株携带基因完全符合。通过扩增产物的克隆及核苷酸序列测定,  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 、 $\beta$ 2 和肠毒素扩增片段核苷酸序列与已发表标准株序列同源性为 100% [9], 从而证实了该方法的可靠性。

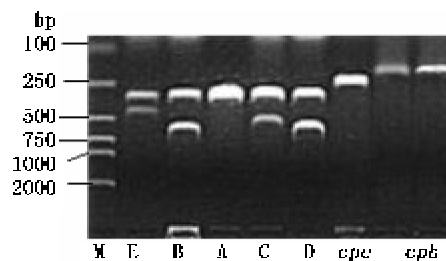


图 1 三步 PCR 体系对产气荚膜梭菌参考菌株 A8798、B6121、C4989、D8346、E8084 的检测结果

Fig. 1 PCR analysis results of *C. perfringens* reference strains A8798, B6121, C4989, D8346, E8084

### 2.3 PCR 特异性实验

以相同的引物, 用相同的体系对大肠杆菌、葡萄球菌、沙门氏菌、链球菌进行 PCR 扩增, 未见任何阳性条带。因而, 上述检测产气荚膜梭菌毒素基因的方法特异性强, 不与其他肠道菌发生交叉

反应,其结果不再用图显示。

### 2.4 产气荚膜梭菌文蛤分离株毒素基因检测

所有分离菌株均出现特异性的 *cpa* 条带(进一步证实分离株为产气荚膜梭菌<sup>[11]</sup>)。仅扩增出 *cpa* 条带的菌株为 A 型,占 31.0% (22/71),同时还扩增出 *cpb* 条带的菌株为 C 型,占 69.0% (49/71);A 型和 C 型菌株均能扩增出特异性的 *cpb2* 条带和 *cpe* 条带,A 型 *cpb2* 检出率 81.8% (18/22),C 型 *cpb2* 检出率 85.7% (42/49);C 型肠毒素基因检出率为 14.3% (7/49),A 型肠毒素基因检出率为 13.6% (3/22);分离菌株未检出  $\epsilon$  和  $\iota$  毒素基因(图 2)。

核苷酸序列测定结果,A 型、C 型分离株扩增片段长度分别为 325 bp (*cpa*), 196 bp (*cpb*), 567 bp (*cpb2*), 233 (234) bp (*cpe*); Blastn 在线分析,分离株毒素基因核苷酸序列(图 3)与 GenBank 所发表的产气荚膜梭菌相应毒素基因同源性在 98% 以上,说明扩增条带非假阳性。

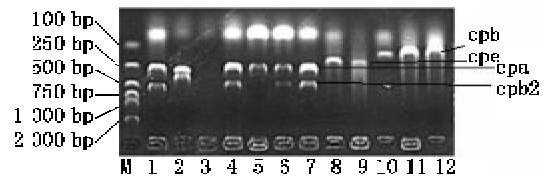


图 2 分离株  $\alpha$ 、 $\beta$ 2、 $\epsilon$ 、 $\iota$  毒素基因的四重 PCR 及  $\beta$ 、肠毒素基因的单重 PCR 检测结果

泳道 1: B6121, *cpa*、*etx* 条带; 2: E8084, *cpa*、*iA* 条带; 3: 空白对照; 4: C4989, *cpa*、*cpb2* 条带; 5: 分离株 *cpa* 条带; 6、7: 分离株 *cpa*、*cpb2* 条带; 8: A 8798, *cpe* 条带; 9: 分离株 *cpe* 条带; 10: C 4989, *cpb* 条带; 11、12: 分离株 *cpb* 条带

Fig. 2 Detective results of alpha, beta, epsilon, iota, beta2 and CPE toxins of the isolates

1. B6121, *cpa*, *etx*; 2. E8084, *cpa*, *iA*; 3. control; 4. C4989, *cpa*, *cpb2*; 5. *cpa*; 6, 7. *cpa*, *cpb2*; 8. A8798, *cpe*; 9. *cpe*; 10. C4989, *cpb*; 11, 12. *cpb*

### 2.5 蛤肉组织中毒素基因的检测结果

内脏产气荚膜梭菌阳性蛤肉中未分离到该细菌体,亦未检出毒素基因(图 4),说明蛤肉未被产气荚膜梭菌污染。

文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株  $\alpha$  毒素基因片段

Nucleotide sequence of  $\alpha$  toxin gene fragment of *C.perfringens* strain isolated from *M.meretrix* gut

1 GCTAATGCTC CTGCCGTCG TAGCCGAGGA CATGCTAAGT CTCGACCTT TCCGAGGGAA  
61 AAAAAACGAC ACTATAAAAT AAACACAGCA CCTTCGAAA CTAAATGAGG TTTTATGCT  
121 GATATCTTAA AAAACGAAAG TTTTATGCA TGGTCAAAG AACATGCAAG AGGTTTTGCT  
181 AAACACAGGA ATTCATACR CTATAGTCAT GCTAGCATGA GTCATGCTG GATAGMTGG  
241 GATTATGAC CAAAGGTAAC TCTAGCTAAC TCTCAAAGG GAACAGCGCG AATATTTAT  
301 AGATTCTTAC ACCATGATC AGAGG

文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株  $\beta$  毒素基因片段

Nucleotide sequence of  $\beta$  toxin gene fragment of *C.perfringens* strain isolated from *M.meretrix* gut

1 GCGAATATGC TGAATCATCT ACAATAGAAI ATGTCGCAAC TGATTTTTCT ACATACAGA  
61 CAGATCATTC AGCCCTCATA SCITCAISGG ATACAAAAT TACAGAGACT ACTGCTGCTA  
121 ACTATAATTT AAAATCAAAC ACCCCCTAT ATGGAATGA AACGTTTATG TACGGAAAT  
181 AACTAATGT TCTTC

文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株  $\beta$  2 毒素基因片段

Nucleotide sequence of  $\beta$  2 toxin gene fragment of *C.perfringens* strain isolated from *M.meretrix* gut

1 AGATTITAAA TATGATCCTA ACCAAAACI TAAATCATAT GAAATACAG GTTCAGAAA  
61 AATTGATAT GGTGAAATTT TTCTGTGAA AACAGATTT TAAATGCTG CTATATACAA  
121 IATGGAACTT ACAGTATCAT ATATCGATAA TAAATTAATG TAAAGTAAAT DGAATAGAA  
181 ATCAATAGTA AATGAGGTA ATGTAATTC TACCCAAGT TTCAGAACD AACITGTAC  
241 ATGSGAIGAC GAATTAGTC AATATATGG AGACGCTGT AGTCTTACG GTTCTAGTA  
301 ACTTCAATAT AGTTCATATA CGATTACAT AACTTTIAGA CAATATGCA CCTCCGGATC  
361 AAGATCCCTA AAGTAAAAI ACAGTGIAGT AGACCAITGG ATGIGGSGG ATCAGATTAG  
421 AGCTTCTCAA TGGGTATACG GTGAAATCC GGAATATGCT AGACAGATAA AATATATCT  
481 AGGTTGAGGA GAAACTITCA AAATATATAG AATTAAGTA GAAATATATA CCCCAGCATC  
541 GATTCAGTA TTTCCTCAAC CCTATTC

文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株 A 型产气荚膜梭菌肠毒素基因片段

Nucleotide sequence of enterotoxin gene fragment of *C.perfringens* toxin type A strain isolated from *M.meretrix* gut

1 GGAGATGGCT GGTATTTAGG GGAACCCCTCA STAGTTTCAA GTCAAAATTC TTAATCCATA  
61 TGAACAGGT ACCCTTAGCC AATCAIHAAC TAAATCTABA GAAGTATCTA TAAATCTAAA  
121 TCTTTCAGTT GGAATTACTT CTCACATTA ACAAGCATCT STAGATATCG GATTCGGAAT  
181 AACTATAGGA GAACAAATA CAATAGAAAG AACTGTATCT ACAACTGCTG TCC (234bp)

文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株 C 型产气荚膜梭菌肠毒素基因片段  
 Nucleotide sequence of enterotoxin gene fragment of *C. perfringens* toxin type C strain isolated from *M. meretrix* gut

```

1      GGAGATGGIT GGATATPAG GSAACCCOIA GTAGITTCAB STORAAATOC TAAICCTAAC
61     GAAACAGGTA CTTTLAGCCA ATGATPAACT AAATCTAAAG AAGTATCTAI AAACCTAAAT
121    TTPTCAGTTC GATTTACTTC TGAAITPATA CAAGCACCTG TAGAATAAGG AITTCGAATA
181    ACTATAGCAG AACAAAATAC AATACAAACA TCTGTACCTA CAACCTGCTG TCC (233bp)
  
```

C 型产气荚膜梭菌文蛤分离株 *cpa* 全长核苷酸序列—1 254 bp  
*C. perfringens* alpha-toxin gene complete genome of type C isolate in *M. meretrix* gut, 1 254 bp

```

1      GGGGATATAA AAATGAAAG AAGGTTTG7 AAGGTGCTTA TTTGTGCGCG GCTAGCAACT
61     ACCCTATGCG CTGCGGCAIC AACPAAACTC TACCGTTCGG ATGCAAAACAI TGAACGAAAC
121    GGAACICATG CTATGATLGT AACTCAAGGG GTTTCALCI TAGAAAAISA TGIGICAAAA
181    AATGAAACCG AAGGTGTARG AAAAARCTTA GGGATTCRA AAGAGACAI GCRDCASCI
241    CAATPAGTII CTACTTACCC AGATTATPAG AAGAAAGCCI ATGATCTATA TCAAGATCAI
301    TTCTGGGATC CTGATACAGA TAATAATTC DCAAAAGATA ATAGTITGTA TTTAGCTIAT
361    TCRATACCTG ACACGAGGGG ATCACAAATA AGAAAACTET CAGCATPAGC TAGATATGAA
421    TGGCAAAAGG GAAACTATA ACAAGCTACA TCTATCTTG GAGAGGCTAI GCACTATPIT
481    GGACATADAG ATACTCCATA TCATCCTGCI AATGTIACG CCGTTCATAG CCGCAGCAT
541    GTTAGTITTC AGACTTTTGC AGAGCAAGA AAGAAGACGT ATAAAAATAA CACAGCAGGT
601    TCGAAAACCTA ATGAGGATTT TTATCTTGAT ATCTTAAAA ACAAAAGATII TAATCGATGG
661    TCAAAAAGAI ATGCAAGAGG TTTTCTTAAA ACAGGAAAI CACTIATCIA TACTCATPCT
721    AGCATGAGTC ATAGTTGGGA TGATTGGGAT TATGCAACAA AGGTAACTII AGCTAACTCT
781    CAAAAAGGAA CAGCAGGATA TATTTATAGA TTCTTACAG ATGTATCAGA GGTAAATGAT
841    CCATCRATTC GAAGAAATGT AAAGACIA GTAGCTTACA TATCAACTAG TGGCAAAAA
901    GATGCTGAAA CAGATGACTA CATGTATTTI GGAATCABA CAAAGGATCG AAAAATCAA
961    GAATGGGAAA TGGACAACCC AGSAAATGAT TTTATGACTG GAGTAAAGC CACTTATPCT
1021  TICAATPAA AAGLCAAAA TCTAAAAAI GATGATAAC AAAATATGUG GATTCAAAA
1081  ACAAAATACA CAGCATTOCC AGATGCTTAT AAGCCAGAAA ACATAAAGAT AATAGTAAAI
1141  GSAAPAGTTC TAGTACACAA AGATATAAAT GAGTGGATTT CAGGAAAATC AACTTATPCT
1201  AIAAAATPAA AAAACTAAAA AAATAATPAA TGGTTTIGCI GGLAULTACA AAAI
  
```

图 3 分离株毒素基因核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of different toxin gene of *C. perfringens* isolates in *M. meretrix* gut

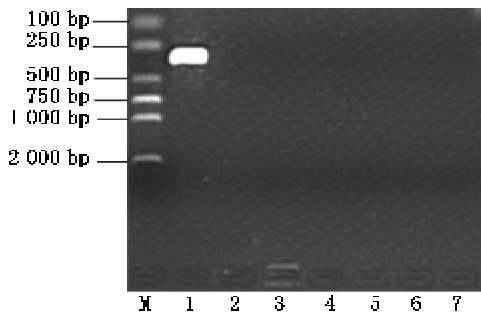


图 4 内脏产气荚膜梭菌阳性的蛤肉组织中  $\alpha$  毒素基因的 PCR 检测

1. A8798 阳性对照; *cpa* 条带阳性对照; 2~7. 待检蛤肉组织样品

Fig. 4 PCR amplification result of alpha toxin gene from *Meretrix meretrix* Linnaeus muscle with *C. perfringens* positive in intestinal content

1. Positive control NCTC A8798(*cpa*); 2-7. representative *M. meretrix* muscle samples

源、猪源、兔源分离株、A 型日本空气分离株均扩增出 1 254 bp *cpa* 全长条带(图 5)。

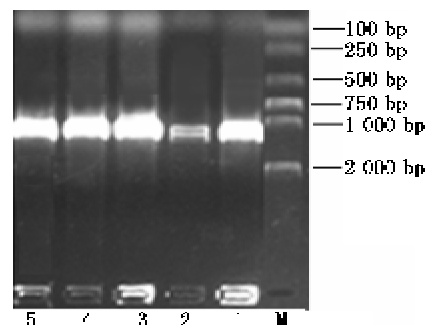


图 5 不同来源产气荚膜梭菌分离株 *cpa* 全长 PCR 扩增结果

Fig. 5 Detective results of complete alpha toxin of *C. perfringens* isolated from other different living environment

### 2.6 不同来源的产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素全基因序列分析

C 型产气荚膜梭菌文蛤分离株, A 型山东羊

经 DNAMAN 计算机软件分析, 产气荚膜梭菌文蛤分离株  $\alpha$  毒素全基因序列与 A 型羊源、猪源、兔源山东分离株及日本株的同源性分别为

99.58%、99.41%、98.64%、98.75% (图3)。

### 3 讨论

本实验通过 $\alpha$ 、 $\beta_2$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$ 毒素基因的四重PCR和 $\beta$ 、肠毒素的单基因PCR反应体系检测产气荚膜梭菌毒素基因,该体系虽然必须通过3次PCR反应才能完成,但是克服了以往六重检测体系对 $\beta$ 和肠毒素基因容易漏检的不足,与6种毒素的单基因检测结果完全一致,因而可以避免因 $\beta$ 和肠毒素基因的漏检而造成的分型错误。并且,通过对标准菌株的检测,证实该方法可靠、特异性强。

经典PCR反应模板的制备需要提取基因组DNA,费时费力。本实验将少数菌体裂解后直接进行PCR反应,微量杂蛋白对扩增效果的影响不大,而且灵敏度较高,可以对可疑菌株直接进行筛选,大大缩短了实验周期,这对于快速鉴定产气荚膜梭菌十分重要。

本实验中,4基因检测体系中各引物的退火温度( $T_m$ )自51.26到56.60℃变化较大,为提高扩增效率,减少非特异性扩增,退火温度设为自54℃开始,隔4个循环降1℃,直至退火温度为49℃;单基因检测体系退火温度为50℃和52℃,比以往报道的体系退火温度低3~5℃,保证了 $\beta$ 和肠毒素基因的充分扩增。

在文蛤内脏中分离到产气荚膜梭菌并检出 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta_2$ 和肠毒素基因,该发现与人类的食品安全有关。据报道,产气荚膜梭菌是引起细菌性食物中毒的主要病原之一<sup>[12]</sup>,主要致病因素是该菌产生的肠毒素、 $\beta$ 和 $\beta_2$ 毒素<sup>[1,13]</sup>。尽管目前在我国类似的病例报道较少,但本实验已在蛤内脏中分离出产气荚膜梭菌并检测到相应毒素基因,虽然蛤肉检测结果为阴性,但鉴于贝类在食用时一般不去除内脏,所以建议食用前,尽量使其吐尽内脏污物以尽可能避免食物中毒的发生。

根据以往的报道,A型产气荚膜梭菌在各型中所占比例最大<sup>[14]</sup>,近十几年以来,国内报道的畜禽源分离株多为A型,本实验PCR检测结果则以为,文蛤内脏产气荚膜梭菌分离株主要为C型(69%),但 $\alpha$ 毒素全基因序列与不同来源A型分离株的同源性较高(98.64%以上),毒素型不同的原因尚待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Rood J. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens* [J]. *Microbiology Reviews*, 1991, 55: 621-648.
- [2] Gibert M, Jolivet R C, Popoff M R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens* [J]. *Gene*, 1997, 203: 65-73.
- [3] 张红英, 杨霞, 卢中华, 等. 魏氏梭菌肠毒素研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2004, 31(9): 35-37.
- [4] David J E, Victor J C. Extraction of *Clostridium perfringens* Spores from bottom sediment samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 5: 1144-1149.
- [5] William B I, Kevin R C. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 4: 1375-1378.
- [6] Raymond L L, Charles P G, Sagar M G, et al. Relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 3: 588-596.
- [7] 文其乙, 刘秀梵. 多重聚合酶链反应检测环境中产气荚膜杆菌 [J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(6): 623-626.
- [8] 张小荣, 文其乙, 刘秀梵, 等. 应用多重PCR快速诊断山羊猝死症的研究 [J]. *中国兽医科技*, 2002, 32(3): 10-11.
- [9] 王磊. 山东省畜禽源性魏氏梭菌毒素型 Multi-PCR 调查 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [10] 陈小云, 张存帅, 关孚时, 等. A型产气荚膜梭菌中国标准株 $\alpha$ 毒素基因的克隆与序列分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(12): 5-8.
- [11] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 318-320.
- [12] Qi Y W, McClanel B A. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 5: 2685-2691.
- [13] 张小荣, 文其乙, 刘秀梵, 等. 致人腹泻产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2002, 18(4): 36-38.
- [14] Haagsma J. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment [J]. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 1991, 10: 749-764.

## Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* from *Meretrix meretrix* Linnaeus

CAI Yu-mei<sup>1</sup>, CHAI Tong-jie<sup>1</sup>, DUAN Chang-min<sup>1</sup>,  
HUANG Li-bo<sup>1</sup>, CAI Chun-mei<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. Dezhou Tumor Hospital, Dezhou 253000, China)

**Abstract:** To study the isolation rate and toxin type of *Clostridium perfringens* in fresh *Meretrix meretrix* Linnaeus, one hundred gut samples of *Meretrix meretrix* Linnaeus bought from market were examined bacteriologically for the occurrence of *C. perfringens*. Isolates were examined by polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding the four lethal toxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  and  $\iota$ ) for classification into toxin type and for genes encoding enterotoxin and the novel  $\beta_2$  toxin for further subclassification. The amplified complete  $\alpha$  toxin gene was cloned and sequenced and compared with strains isolated from other living environment. Then, alpha toxin gene detected from *Meretrix meretrix* Linnaeus muscle (*C. perfringens* positive in gut) was performed for food safety assessing. The results indicated that *C. perfringens* could be isolated in 71 gut samples (71%) from *Meretrix meretrix* Linnaeus, 49 strains (69%) were *C. perfringens* toxin type C ( $\alpha$  and  $\beta$  toxin positive), 22 strains (31%) were toxin type A ( $\alpha$  toxin positive). In addition, genes encoding for  $\beta_2$  toxin and enterotoxin were found in the both toxin types. These amplified toxin gene fragments were cloned and sequenced and compared with the corresponding genes in GenBank, and the identity exceeded 98%. The homology of complete  $\alpha$  toxin gene was 98.64%–99.58% when compared with strains isolated from other living environment. This is the first report of *C. perfringens* toxin genes in *Meretrix meretrix* Linnaeus in general, the origin of this bacterium and its importance to human food poisoning are discussed.

**Key words:** *Meretrix meretrix*; *Clostridium perfringens*; toxin type; nucleotide sequence