

奶牛体细胞裂解方法的研究进展

冯万宇 周庆民 徐馨 张艳

黑龙江省兽医科学研究所, 齐齐哈尔 161005

摘要 乳房炎一直是影响奶牛业发展的重要因素之一, 乳汁细胞学是目前最常用的诊断方法, 本文就目前乳汁体细胞裂解技术在奶牛乳房炎诊断中的应用进行了综述, 并就其前景和发展趋势进行了展望。

关键词 奶牛; 乳房炎; 体细胞; 裂解

乳房炎是对奶牛养殖危害最为常见的疾病之一, 其感染率从 15% 到 70% 不等, 发病奶牛泌乳量下降、治疗及额外人工费增加、治疗性抗生素的使用也会带来数量不等的废弃奶, 奶牛乳房炎极易复发, 其中隐性乳房炎所占比例更大, 是影响规模化养殖场奶牛高效养殖的主要因素之一。由于隐性乳房炎奶牛没有明显症状, 因而常规临床检查方法不能确诊病例, 从而延误了治疗时机, 并有可能并发其他疾病, 导致奶牛发生不孕乃至最终淘汰。采用奶牛乳汁细胞学诊断是目前临床上诊断隐性乳房炎最常用的方法。

乳汁细胞学诊断法主要是通过检测乳中体细胞(中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞等)数量, 即基于牛乳体细胞数量多少来判断奶牛是否患有隐性乳房炎的一种方法, 包括显微镜及电子计数的直接诊断法和以 CMT 法为基础而随之衍生出来的 LMT 法、BMT 法和 SMT 法等间接诊断法。间接诊断的原理是对体细胞裂解破坏, 使其中的 DNA 释放出来, 在乳中产生沉淀或者形成凝胶, 体细胞越多, 产生的沉淀和凝胶越多, 从而间接计算乳中体细胞数量和判断奶牛乳房炎。现就体细胞裂解方法在奶牛乳房炎诊断中的应用作一综述, 并就其应用远景和发展趋势进行展望。

1 CMT 试验

CMT 法的测定原理是利用阴离子表面活性剂十二烷基磺酸钠破坏乳中体细胞, 使体细胞表面脂

类物质发生乳化, 乳汁体细胞被破坏, 从而让 DNA 释放出来产生沉淀或凝块。乳中体细胞数越多, 释放的 DNA 越多, 凝集状态越强, 出现的凝集和沉淀也就越多。依据释放的 DNA 与体细胞线性关系间接判定乳中细胞数而达到间接诊断奶牛乳房炎目的。CMT 法操作简便, 较适用于大规模奶牛场的检测。但每次加药量需要准确量取, 判断时需要有一定的经验。而且 CMT 试验法无法确定乳中具体的体细胞数, 实际操作中往往根据经验划分一个大致的范围。

2 拟 CMT 试验

在 CMT 法基础上, 依据我国各地实际情况, 一些高校和科研院所相继研发了一些适合我国国情的奶牛乳中体细胞间接监测的方法, 包括兰州中兽医研究所研究的 LMT 检测法、上海奶牛研究所的 SMT 检测法、北京奶牛研究所的 BMT 检测法、西北农林科技大学研制的 YMT 诊断液、黑龙江省兽医科学研究所研制的 HMT 检测法及浙江大学的 HMT 诊断粉检测法和山东省农业科学院畜牧兽医研究所的 JMT 诊断粉检测法等。这些都是以 CMT 法原理为基础, 并进行了一定的改进, 对体细胞裂解依靠的是阴离子表面活性剂分子结构的亲油基和亲水基吸附体细胞膜表面的磷脂和胆固醇, 由于细胞磷脂和胆固醇是阳离子表面活性剂和非离子表面活性剂, 检测加入的阴离子表面活性剂形成球形胶束, 带负电荷的亲水基在胶束的表面与水接触, 亲

油基在球形胶束的内层。当胶束遇见细胞生物膜时,对带正电的磷脂强烈吸附,使生物膜解体。被吸引出来的磷脂和解脱的胆固醇自身或与阴离子表面活性剂共同形成胶束。由于乳汁中体细胞裂解时,生成单个磷脂和胆固醇分子浓度不大,因而这些胶束主要形成球形胶束,是一个不平的球状结构,亲油基朝向内核以液体状存在,球的外层区域水化的亲水基被结合水包围。当细胞各层次生物膜解体后,DNA 就被释放出来。DNA 是一个直链结构的分子,每一个 DNA 分子长度可达几厘米,分子中有数十亿个阴离子集团在强烈地吸附水。这个极大的高分子在水中实际上形成的是高分子溶液,高分子溶液的黏度特别高。体细胞越多,释放出的 DNA 越多,形成的高分子水溶液黏度也就越高。即乳汁体细胞数量与释放出的 DNA 数量成正相关,与检测时形成的高分子溶液黏度成正相关,与隐性乳房炎的轻重成正相关。与 CMT 法类似,这些衍生出来的方法也不能准确计算乳中体细胞的数目,只能提供一个大致范围。

3 壬烷基苯聚氧乙烯醚和脂肪酸聚氧乙烯

壬烷基苯聚氧乙烯醚和脂肪酸聚氧乙烯是 2 种非离子表面活性剂,是中国农业科学院中兽医研究所在进行隐性乳房炎检测试验拟筛选的 3 种 LMT 诊断试剂之一,对于乳中体细胞裂解应该是与细胞表面的胆固醇结合后,破坏了细胞膜结构,使其中的 DNA 释放后与水分子形成黏性高分子溶液,其最后判断结果也与 CMT 法类似。

4 二苯胺和吡啶

体细胞中 DNA 的含量相对比较确定,通过将体细胞破碎,提取出的 DNA 含量和体细胞数成正比。

Sedinova 和 Urbanova 等人通过孔径为 2~5 μm 的硝化纤维膜将体细胞从牛奶中分离出来,然后用二苯胺和吡啶试剂进行处理,让体细胞中的 DNA 释放出来,利用分光光度计测定 DNA 含量,以 8 mg DNA 相当于 10^6 个体细胞的关系,把 DNA 含量换算成体细胞数,用这种方法测得的结果与标准方法显微镜计数测得结果的相关系数达到了 0.997。

5 结 语

传统研究中用于细胞裂解的方法很多,比如低渗裂解、超声裂解、微波裂解、冻融裂解和颗粒破碎等物理裂解方法,加入各种表面活性剂(SDS、TritonX-100、Tween20、NP-40、CTAB、sarcosyl、Chelex-100 等)或强离子剂(异硫氰酸胍、盐酸胍、肌酸胍)等通过化学作用进行细胞裂解,或者加入溶菌酶、蛋白酶等酶制剂作用使细胞破裂发生生物裂解,或使用 2 种或 2 种以上方法进行复合裂解。主要目的就是提高细胞裂解效率,使试验研究所需的目标物质释放出来,与此同时,所采取的裂解方法不能对下一步试验或其他工作产生干扰。

体细胞是乳房炎奶牛乳中成分之一,裂解后 DNA 数量与其成正相关,DNA 数量反映了乳中体细胞数量,也代表着奶牛患有乳房炎的严重程度,奶牛乳中体细胞裂解后的 DNA 与乳糖、乳蛋白和乳脂等其他成分混合在一起,只能进行体细胞数量估计和粗略的计算,因此,能否在植物或者其他动物细胞裂解中找到一种合适的乳中体细胞裂解方法,使乳中体细胞 DNA 释放后与其他乳成分实现完全或者接近分离状态,从而通过计算 DNA 含量来精测乳中体细胞数,进而提高对奶牛隐性乳房炎诊断的准确性,实现奶牛隐性乳房炎快速准确诊断,是当今乃至今后一段时间内牛乳体细胞裂解方法研究的主攻方向之一。