

郭龙飞, 燕 贺, 杨 霞, 等. 猪细小病毒种子批中污染的猪鼻支原体的清除[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 222–224.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.079

# 猪细小病毒种子批中污染的猪鼻支原体的清除

郭龙飞, 燕 贺, 杨 霞, 高东生, 陈 陆, 常洪涛, 王新卫, 赵 军, 王川庆

(河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002)

**摘要:**支原体是细胞和病毒培养中常见的污染物, 本研究尝试使用滤膜过滤法、反复多次冻融法、支原体抑制药物 M-plasmocin 处理法、氯仿抽提法等 4 种方法清除猪细小病毒种子批中污染的猪鼻支原体, 并对 4 种方法的清除效果进行比较。结果表明, 支原体抑制药物 M-plasmocin 处理法与氯仿抽提法效果较好, 支原体抑制药物处理 84 h 以及氯仿与被支原体污染的猪细小病毒液作用 5 min 均能彻底清除猪细小病毒种子批中污染的支原体。本研究筛选出的清除猪细小病毒中支原体方法为非囊膜类病毒种子批中支原体的清除提供了依据。

**关键词:**种子批; 支原体; 猪细小病毒; 氯仿; M-plasmocin

**中图分类号:**S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0222-03

生物制品是控制传染病的有效工具。病毒种子批是制造生物制品的基础, 其直接关系到生物制品的质量。许多需要借助体外细胞培养增殖的病毒常因载体细胞受到支原体污染而被污染, 致使生物制品报废<sup>[1]</sup>。支原体 (*Mycoplasma*) 是大小介于细菌和病毒之间的一类无细胞壁的原核细胞微生物, 一般过滤除菌方法无法去除, 因此支原体污染一般难于消除, 约有 30%~50% 的细胞培养物中有支原体污染<sup>[2]</sup>。国内外研究表明, 细胞培养中主要有口腔支原体、精氨酸支原体、猪鼻支原体、发酵支原体、梨支原体和莱氏无胆甾原体等

支原体污染<sup>[3-5]</sup>。支原体污染会导致细胞生长缓慢, 从而影响需要借助细胞培养的病毒增殖, 病毒种子批的建立, 疫苗和相关生物制品的生产。

被支原体污染有的病毒种子批接种细胞后, 支原体多吸附于细胞表面或散在细胞之间, 通过竞争营养和分泌有毒代谢产物影响细胞的生理特性, 常会误以为是病毒繁殖造成的病变效应, 使研究结果的真实性和可靠性大大下降<sup>[6]</sup>。利用被支原体污染的细胞增殖病毒时会干扰病毒的复制、影响病毒滴度<sup>[7]</sup>, 进而影响疫苗的免疫效果, 并可导致免疫抑制<sup>[8]</sup>。细胞、病毒种子批、血清等的支原体污染均给科研、疫苗生产及生物制品产业带来很多麻烦, 甚至造成事故。我国药典三部和欧洲药典都明确提出要对生物制品生产用细胞基质、病毒种子批、病毒收获液和细胞建库所用胰酶进行支原体检测<sup>[9-10]</sup>, 以确保生物制品的质量。

迄今已报道多种方法被用于去除或减少培养细胞中污染的支原体, 这些方法包括化学介质克隆法、特异性血清处理

收稿日期: 2014-01-10

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划项目(编号: 2011HASTIT009)。

作者简介: 郭龙飞(1988—), 男, 河南西华人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。E-mail: guolongfei1988@126.com。

通信作者: 赵 军, 博士, 教授。Email: zhaoj@henau.edu.cn。

因饲养地区条件差异, 山猪又分别形成了尖头型和团头型等。

与江苏其他猪种相比, 山猪的体高与姜曲海猪相近, 体长与二花脸相近, 大于姜曲海猪, 胸围和体质量小于姜曲海猪和二花脸猪; 性成熟晚于姜曲海猪和太湖猪, 与淮北猪相近; 产仔性能低于太湖猪, 高于淮北猪和姜曲海猪; 山猪的生长速度略低于淮北猪, 与姜曲海猪和太湖猪相近; 瘦肉率略低于淮北猪, 高于姜曲海猪, 与太湖猪相近。这些性能都表明山猪是江苏省优良的猪种之一。

山猪从类型来看, 目前只有 2 种类型, 鲫鱼头型已消失。20 世纪 90 年代, 因大力推广杂交猪生产, 纯种山猪在南京北部山区少量存在。2003 年各级领导重视保种, 又建立了保种场。江苏省南京市畜牧家禽科学研究所联合江苏省农业科学院、南京农业大学等科教单位在山猪的保种、种质特性和杂交利用研究方面做了大量的工作。近年来, 随着农村城镇化建设, 农村散养已很少, 但母猪饲养量在 50~100 头的小规模养殖场有所增加, 但总体饲养量在减少。建议省市各有关部门进一步加大对山猪这一宝贵种质资源的保护与研究的投入,

只有很好地保护山猪品种才能使其在今后的杂交商品猪生产上发挥更在的作用。

## 参考文献:

- [1] 郝正林, 章熙霞, 陆方善. 南京市山猪资源现状与保护利用对策[J]. 中国猪业, 2007(3): 24–26.
- [2] 江苏省家畜家禽品种志委员会. 江苏省家畜家禽品种志[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1987: 11–18.
- [3] 太湖猪育种委员会. 中国太湖猪[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991.
- [4] 姜曲海猪育种科研协作组. 中国姜曲海猪[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1995.
- [5] 张国汉. 内蒙黑猪种质特性[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1993, 14(2): 23–29.
- [6] 岳 敏, 范 沛, 吴丽红, 等. 广州地区三种小型猪血液生理生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 24–26.
- [7] 邱小田, 刘培琼, 张 勤, 等. 剑河香猪与长白猪血液常规指标的比较[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(3): 209–212.

法<sup>[11]</sup>、巨噬细胞吞噬法、抗生素处理方法等<sup>[12-13]</sup>,但这些方法存在效果不好和耗时长及成本高等缺点。

猪细小病毒引起猪繁殖障碍性疾病,其特征是感染母猪,使初产母猪产出死胎、畸形胎、木乃伊胎、流产及病弱仔猪,给养猪业造成巨大的经济损失,目前对该病的防治主要通过给易感动物接种猪细小病毒灭活疫苗为主,制备疫苗的病毒质量直接关系到疫苗质量优劣。本研究在去除猪细小病毒种子批中污染的支原体过程中,尝试几种不同方法,试图摸索出有效去除病毒培养物中支原体的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞 猪细小病毒(PPV HNZK-1 第35代);猪肾传代细胞系(PK15)均由河南农业大学传染病学教研室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 *Taq*<sup>TM</sup>酶、DL2000 DNA marker 等为大连宝生物工程公司产品;DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品;新生牛血清为美国 Hyclone 公司产品;支原体抑制药物 M-plasmocin 为 Invitrogen 公司产品;氯仿为分析纯。

### 1.2 方法

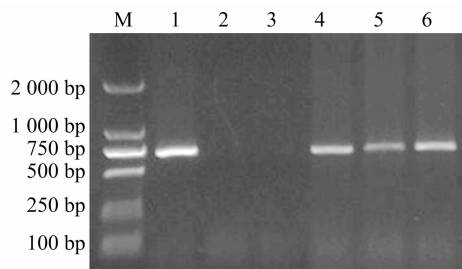
1.2.1 猪鼻支原体检测 猪鼻支原体检测参照 Kobayashi 等<sup>[14]</sup>建立的 PCR 方法,正向引物(F):5'-TATCGCATGATGAGTAATAG-3';反向引物(R):5'-GCTGCGTTAGTGAAATTAT-3',扩增片段理论跨度为 676 bp,由生工生物(上海)股份有限公司合成,PAGE 纯化。DNA 模板提取使用酚/氯仿抽提法,PCR 扩增体系:10×PCR buffer(含有  $Mg^{2+}$ ) 2.5 μL, dNTPs 50 μmol/L,上下游引物各 20 pmol, *Taq* DNA polymerase 2.5 U, DNA 模板 0.1 μg,加灭菌双蒸水补至 50 μL。反应过程:95℃预变性 5 min;95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 不同处理方法去除支原体效果比较 分别采用过滤法、反复冻融法、支原体抑制药物处理法和氯仿抽提法处理污染有猪鼻支原体的猪细小病毒培养物,具体操作为:过滤法是使用无菌注射器抽取 1 mL 污染有支原体的猪细小病毒液通过 0.10 μm 滤膜过滤,分别过滤 1、2、3 次。反复冻融法是将污染有支原体的猪细小病毒液分别反复冻融 5、10、15 次。支原体抑制药物处理法是在污染有支原体的猪细小病毒液中加入终浓度为 25 μg/mL 的支原体抑制药物 M-plasmocin 于 4℃下作用,设置 12、24、36、48、60、72、84、96 h 8 个作用时间。氯仿抽提法是将污染有支原体的猪细小病毒液与等体积氯仿混合,剧烈振荡混匀后在室温静置作用,设 5、10、15、20、25、30 min 6 个作用时间,然后 1 000 g 离心 5 min,分别取上清用于接种细胞。将上述方法处理后的病毒液分别接种猪细小病毒敏感的猪肾(PK-15)细胞系,待 90% 细胞出现病变时收毒,并将收获的病毒连续传代 5 次,利用 PCR 方法逐代检测支原体,以评价每种方法去除支原体的效果。

## 2 结果

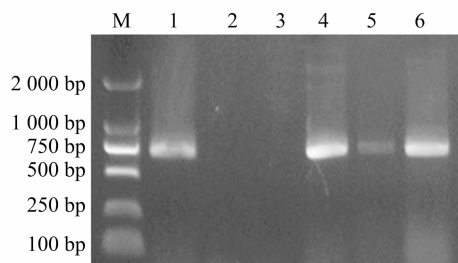
图 1 显示,分别将污染有支原体的猪细小病毒液用 0.10 μm 滤膜过滤 1、2、3 次后接种 PK-15 细胞,在收获的第

5 代病毒液中仍能检测到猪鼻支原体。图 2 显示,分别将污染有支原体的猪细小病毒液冻融 5、10、15 次后接种 PK-15 细胞,在收获的第 5 代病毒液中仍能检测到猪鼻支原体。



M—DL 2000 marker; 1—猪鼻支原体阳性对照; 2—猪鼻支原体阴性对照; 3—空白对照; 4~6—分别为过滤 1 次、2 次和 3 次

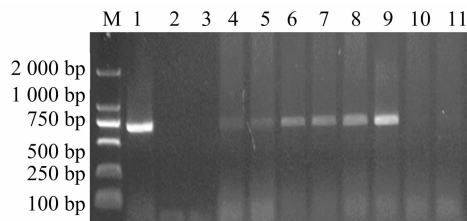
图1 过滤法清除猪细小病毒液中污染的猪鼻支原体效果



M—DL 2000 marker; 1—猪鼻支原体阳性对照; 2—猪鼻支原体阴性对照; 3—空白对照; 4~6—分别为冻融 5 次、10 次和 15 次

图2 反复冻融法清除猪细小病毒液中污染猪鼻支原体效果

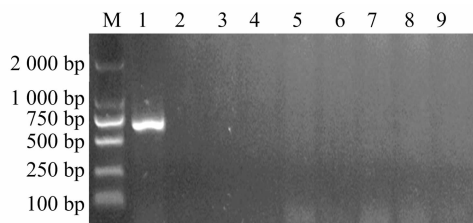
使用支原体抑制药物 M-plasmocin 对猪细小病毒液于 37℃水浴中作用不同时间,处理 12~72 h 后接种 PK-15 细胞,收获第 5 代病毒液中猪鼻支原体检测为阳性,处理 84~96 h 后接种 PK-15 细胞,第 5 代病毒液中支原体检测结果为阴性(图 3)。表明该药物对猪鼻支原体有抑制和消灭的作用,在 37℃作用 84 h 以上能清除猪细小病毒种子批中污染的猪鼻支原体。



M—DL 2000 marker; 1—猪鼻支原体阳性对照; 2—猪鼻支原体阴性对照; 3—空白对照; 4—药物处理 12 h; 5—药物处理 24 h; 6—药物处理 36 h; 7—药物处理 48 h; 8—药物处理 60 h; 9—药物处理 72 h; 10—药物处理 84 h; 11—药物处理 96 h

图3 药物处理法清除猪细小病毒液中污染的猪鼻支原体效果

使用氯仿处理污染有支原体的猪细小病毒液,结果表明,氯仿处理 5~30 min 后接种 PK-15 细胞,收获的第 5 代病毒液中猪鼻支原体检测结果均为阴性,作用 5 min 即可有效地清除猪细小病毒种子批中污染的支原体(图 4)。



M—DL 2000 marker; 1—猪鼻支原体阳性对照; 2—猪鼻支原体阴性对照; 3—空白对照; 4~9—分别为氯仿处理 5、10、15、20、25、30 min

图4 氯仿抽提法清除猪细小病毒液中污染的猪鼻支原体效果

### 3 讨论

猪细小病毒引起种猪的繁殖障碍,给养猪业带来巨大经济损失。目前对该病的防治主要是以灭活疫苗免疫为主,因此制备灭活疫苗的病毒种子批质量直接关乎疫苗成品的质量和安全性,支原体是细胞培养过程中常见的污染物质<sup>[15]</sup>,并由此污染病毒种子批,由于支原体可引起细胞病变,干扰病毒复制<sup>[16]</sup>,影响疫苗病毒的产量和质量,并有可能对疫苗的使用带来危险,因此需要一种简单有效且对病毒感染性没有影响的方法来消除支原体<sup>[17]</sup>。

支原体大小介于细菌和病毒之间,最小为 0.2  $\mu\text{m}$ ,但其具有变形性,使用 0.10  $\mu\text{m}$  滤膜过滤时,在一定压力下可能改变形态通过滤膜,所以仅通过滤膜过滤不能完全清除支原体。不过可以相对减少支原体的含量,结合其他清除支原体的方法可以更有效地清除支原体的污染。

支原体抑制药物 M-plasmocin 是 Invitrogen 公司推出的用于清除细胞中支原体污染的试剂,它作用于支原体的蛋白系统和干扰其 DNA 复制,该药物在推荐使用浓度对细胞几乎没有毒副作用。本研究在 4  $^{\circ}\text{C}$  水浴中,支原体抑制药物 M-plasmocin 与污染有支原体的猪细小病毒液作用,84 h 能有效清除支原体。但是由于支原体抑制药物 M-plasmocin 价格昂贵,该方法成本较高。

支原体具有蛋白质和脂质组成的膜样结构,其中胆固醇含量较多,约占 36%,对保持其细胞膜的完整性具有一定作用。脂溶剂氯仿能与胆固醇发生作用并破坏支原体膜状结构,杀死支原体,而猪细小病毒不含脂质囊膜,对氯仿不敏感。本研究利用猪细小病毒和支原体对氯仿敏感性不同,尝试用氯仿抽提达到去除猪细小病毒液中污染的支原体。本试验摸索了氯仿与猪细小病毒液的作用时间,表明静置作用 5 min 可有效清除猪细小病毒液中污染的支原体,表明氯仿抽提法对支原体的清除效果很好。由于脂溶剂氯仿对于具有脂质囊膜的病毒具有破坏和灭活作用,故该方法只能用于清除非囊膜病毒中污染的支原体。支原体污染源可能存在于实验室和生产的各个细节(工作环境、培养器皿、培养基)。这就要求生产及检验过程中严格遵循生物制品生产及检验规范,做到对工作环境定期消毒,严格区分人员和物品的流通通道,实验或生产操作前对操作平台和生产设备彻底消毒。由于支原体污染比较隐蔽,一旦病毒种子批被支原体污染,将对生物制品质量造成影响。所以实验和生产过程中杜绝和清除支原体污染是保证病毒种子批纯净和生物制品质量的基础。

本研究用支原体抑制药物处理和氯仿抽提 2 种方法成功地清除了猪细小病毒种子批中污染的支原体,而且这 2 种方法均不影响病毒的感染性,为疫苗等生物制品的质量和安全性提供了保障。

### 参考文献:

- [1] Volokhov D V, Graham L J, Brorson K A, et al. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques[J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(2/3): 69-77.
- [2] Timenetsky J, Santos L M, Buzinhan M, et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2006, 39(7): 907-914.
- [3] Dusanic D, Bercic R L, Cizelj I, et al. Mycoplasma synoviae invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 138(1/2): 114-119.
- [4] Ueno P M, Timenetsky J, Centonze V E, et al. Interaction of mycoplasma genitalium with host cells: evidence for nuclear localization[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 10): 3033-3041.
- [5] Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells[J]. Physiological Reviews, 2003, 83(2): 417-432.
- [6] Kulcsar G, Farsang A, Soos T. Testing for viral contaminants of veterinary vaccines in Hungary[J]. Biologicals, 2010, 38(3): 346-349.
- [7] 严冬梅, 张勇, 王东艳, 等. 浅析支原体污染对非脊髓灰质炎肠道病毒分离率的影响[J]. 中国计划免疫, 2004, 10(6): 329-332.
- [8] 郭伟干, 冀锡林. 支原体污染与病毒增殖、疫苗免疫效力的关系[J]. 中国畜禽传染病, 1990, 54(5): 63-65.
- [9] 中国生物制品标准化委员会. 中国生物制品规程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 31-331.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录XB75-761.
- [11] 杨吉成, 宋礼华, 周建华, 等. 医用细胞工程[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2003.
- [12] Uphoff C C, Drexler H G. Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2002, 38(2): 86-89.
- [13] 高林, 廖德芳, 姚俊, 等. 用乙基环丙沙星重建受猪鼻支原体污染的 BHK-21 细胞的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(12): 45-49.
- [14] Kobayashi H, Morozumi T, Miyamoto C, et al. Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 1996, 58(2): 109-113.
- [15] 吴高辉, 彭聪, 顾焕华, 等. 体外细胞培养支原体的检测与清除[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(12): 111-113.
- [16] 周欣想, 郭萌, 李稻, 等. 支原体污染对重组逆转录病毒的产生和感染靶细胞的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2008, 28(12): 1527-1530.
- [17] 徐程林, 陈波, 陈秀珍, 等. 疫苗毒支原体检测中去除本病毒干扰方法的探索[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(11): 1141-1144.