

支原体污染的检测及鉴定方法研究进展

英 聪^{1,2}, 刘 灿^{1,3}, 王海光¹, 宁宜宝^{1*}, 毕丁仁^{1,2}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081;

2. 华中农业大学, 湖北武汉 430070; 3. 中国农业大学, 北京 100193)

摘 要:自1956年国外学者第一次检测到细胞培养物中存在支原体污染以来, 这个世界性问题持续了半个多世纪。对于生物制品中支原体污染的检测方法多种多样, 但尚无统一的内控标准, 而建立一种快速、准确的方法用于支原体污染的检测, 可以有效地减少和预防支原体污染, 从而提高生物制品的纯净性。本文对支原体污染的几种常见检测及鉴定方法进行综述, 包括DNA荧光染色法、PCR、IFA与ELISA等, 以期对支原体污染的检测及鉴定研究提供参考。

关键词:支原体污染; 检测; 鉴定

支原体(Mycoplasma)又称霉形体, 大小介于细菌和病毒之间, 是一类缺乏细胞壁, 可在无生命培养基中生长繁殖的最小原核细胞型微生物。支原体结构简单、个体微小, 呈高度多形性、能通过滤菌器(0.22~0.45 μm), 广泛分布于自然界, 如污水、土壤、矿石、植物、昆虫、家畜和人体中, 它是易感染人、畜引发各种病症的病原体, 也是易污染用于生产的细胞、菌毒种和鸡胚的污染物^[1]。

1 支原体污染的现状

细胞培养物被支原体污染是极普遍的问题, 其中95%以上是由口腔支原体(*M. orale*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、发酵支原体(*M. fermentans*)、莱氏无胆甾原体(*Acholeplasma laidlawii*)和猪鼻支原体(*M. hyorhinitis*) 5种造成^[2]。自Robinson等^[3]首次报道细胞培养中存在支原体污染以来, 国内外关于支原体污染细胞报道屡见不鲜。在兽用活疫苗中存在支原体污染的问题同样也很严重, 除污染细胞的几种常见支原体外, 还包括污染牛睾丸细胞的牛支原体(*M. bovis*), 以及污染鸡胚的鸡毒支原体(*M. gallisepticum*)等。宁宜宝等^[4,5]从鸡胚及鸡胚生产的疫苗中分离出鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体。试验中支原体污染的已知来源主

要有动物血清、胰岛素和已污染培养物的气溶胶等, 根据实验室环境的影响, 会出现不同层次的支原体污染^[6]。支原体的污染严重影响生物制品的纯净性, 而对于支原体污染的检测及种属的鉴定也就成为十分重要的问题。

2 支原体污染的检测方法

以上个世纪最初的分离培养法为基础, 经过近二十年发展, 相继诞生了DNA荧光染色法、PCR法、探针法、ELISA等多种方法。

2.1 支原体的分离培养

支原体的病原学检测主要是从被污染的细胞、鸡胚中分离培养出支原体来确定, 分离培养法是检测支原体污染中最为可靠准确的方法。支原体对培养基的营养要求高且生长缓慢, 较一般细菌更难培养, 培养基中除基础营养物质外, 还需要酵母浸出物和动物血清。由于支原体类型多, 不同种支原体所需的培养基也不同, 常用的有通用培养基PPOL肉汤和适合禽类支原体生长的改良FM-4培养基。

支原体的分离培养分为液体培养和固体培养2种, 液体培养是根据液体培养基中指示剂颜色变化来判定支原体的生长; 固体培养是诊断支原体感染或污染的“黄金标准”, 它通过观察培养基中支原体生长的菌落形态进行鉴别。宁宜宝等^[7]通过分离培养从马立克氏病活疫苗和猪瘟活疫苗

收稿日期: 2012-08-16

修回日期: 2012-09-07

* 通讯作者, E-mail: ningyibao@ivdc.gov.cn

中分离到支原体。但是支原体对环境的影响敏感,容易被灭活,而且分离培养操作相对繁琐,所需时间较长(至少3~5 d,有时甚至达30 d),因此只能对支原体污染进行定性观察。分离培养法在常规的支原体检测中多用于辅助其它检测方法。比如,应用PCR法或DNA荧光染色法对样品进行初步筛选后,再经培养法对可疑的阳性样品进行检测,以提高检测的准确性。

2.2 DNA 荧光染色法

DNA荧光染色法较分离培养法缩短了检测周期,主要用于细胞培养中污染支原体的检测。支原体基因组比多数原核生物小,为环状双股DNA,大小一般为500 000~2 200 000 bp,其DNA中A-T含量高(55%~80%),DNA荧光染色法正是利用荧光染色剂双苯咪唑——Hoechst 33258能够结合支原体DNA中的A-T碱基富集区域的原理,被支原体污染的细胞经染色后,其细胞核外与细胞周围可看到许多大小均一的荧光点,即是富含A-T碱基区域的支原体DNA。DNA荧光染色法因为操作简单、经济、敏感,检出率达到98%,可检测出不易培养的支原体,常作为例行检测步骤而被广泛使用。李晶梅等^[8]将猪繁殖与呼吸综合征疫苗接种到Vero细胞后,通过DNA荧光染色法对其检测,其结果阳性率为30%,优化后的DNA荧光染色法可以用于疫苗的检测,对比培养法更为快速。但是,在DNA荧光染色液或指示细胞被支原体染污的情况下,该方法易出现假阳性结果;此外,由于口腔支原体和精氨酸支原体对细胞或盖玻片吸附能力较差,而容易出现检测时的假阴性。通过增加观察视野与重复数,可以提高DNA荧光染色法的检测准确性。

2.3 核酸杂交技术

核酸探针快速检测支原体的方法于20世纪80年代出现,其原理是将已知核苷酸片段用放射性核素或其他方法标记,加入已变性的待检样品中,在一定条件下即可与该样品中的同源序列的DNA区段形成杂交双链,从而达到鉴定样品DNA的目的。核酸探针技术不依赖于病原体的生长繁殖,很少受到非特异因素的干扰,给一些难培养支原体的快速检测开辟了新途径,解决了支原体培养费时、费力等问题,但核酸探针的敏感性

较差,采用的放射性核酸标记,不便于一般实验室常规检测。目前随着PCR技术的广泛应用,核酸杂交技术已较少用于支原体的检测。

2.4 PCR 技术

PCR作为一种快速、灵敏、特异且简便的基因诊断技术已应用于科学研究和疾病的诊断。Uemori等^[9]公布了12种支原体的16S~23S rRNA间隔区的完整序列,应用分子生物学技术检测支原体的研究迅速发展,大量的试验证明PCR技术可检测微量(10^{-5} g)的支原体DNA。根据支原体基因组内的保守序列设计特异引物,对待检样品的核酸进行扩增,通过对扩增产物的大小分析作出诊断。PCR检测技术用于支原体污染的检测,周期短、灵敏度高、特异性好、操作简单且一次可检测大量样品,特别对于难以培养的支原体,PCR技术是可行的方法之一。目前,检测支原体污染的常用PCR引物是通过支原体的核糖体16S rRNA、16S~23S rRNA之间的内转录间隔区(Internally transcribed spacer, ITS)以及23S rRNA的5'末端设计的通用引物。支原体的rRNA是进化上较为保守的大分子,与细菌的差异较明显,所以将支原体单独建立一个纲即软膜体纲,软膜体纲内有4目5科8属,共157个成员,少数污染细胞、鸡胚及生产的疫苗^[2]。为了建立一种广谱的支原体污染检测方法,根据rRNA核酸序列设计通用引物达到在一次PCR反应中能检测多种不同支原体的效果。伊秋生等^[10]通过对比12种支原体的16S与23S rRNA的高度保守核酸序列,设计了一对支原体属通用引物,一次PCR扩增能检测出12种支原体,在其检测的41份临床标本、16份细胞培养物和20只大鼠中,阳性率分别为14.6%、43.7%和20.0%。如今,已有德国Minerva Biolabs等公司开发出针对细胞中支原体污染检测的PCR试剂盒。但是PCR技术多用于细胞污染的检测,而针对疫苗中支原体污染的检测并不成熟。

此外,巢式PCR与多重PCR技术也被应用到支原体领域。巢式PCR又叫套式PCR、两步PCR法,通过使用两对引物(外围引物与内围引物),进行两次PCR扩增反应。Hopert等^[11]通过两步PCR法对42份细胞培养物进行支原体污染检测,其中29份细胞培养物的检测结果呈阳性。

巢式PCR的特异性和灵敏性较普通PCR都有所提升,检测准确性也相应得到增强。多重PCR又称多重引物PCR、复合PCR,它是在同一PCR反应体系中加入两对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,其反应原理、试剂和操作过程相同于普通PCR。在同一PCR反应体系中加入多种支原体的种属特异性引物,同时扩增出多个产物,达到一次PCR检测多种支原体的目的。邓显文等^[12]设计的多重PCR对禽类支原体进行扩增,可以检测出鸡毒支原体、鸡滑液囊支原体、衣阿华支原体和火鸡支原体4种最常见污染鸡胚的禽类支原体,而不与其它6种禽病病原体发生特异性反应。多重PCR操作简单,简化了试验流程,但同时也可能会降低检测的灵敏性和特异性,所以在引物设计时应更加注意二聚体的存在,不同引物的退火温度差值等问题。

2.5 间接免疫荧光试验(IFA)

IFA主要适用于细胞中支原体污染的检测及种属鉴定。基本方法是使用荧光素标记的支原体单克隆抗体及荧光标记的二抗间接检测样品中的支原体抗原,在荧光显微镜下,被支原体污染的细胞可见黄绿色颗粒,阴性细胞则被染为淡红色。过琴媛等^[13]应用IFA检测传代细胞中的支原体污染,其建立的方法可以检测污染细胞的5种支原体。间接荧光试验的特异性不强,存在支原体种属间交叉免疫反应,用于支原体种属鉴定时,会影响其结果。

2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

ELISA用于支原体污染的检测有着良好的特异性和敏感性,一次可以完成大量样品的检测。例如,Jacobson^[14]用捕获ELISA,以肺炎支原体P1抗原的膜蛋白(170 ku)的单克隆抗体3 h可以检测出感染者呼吸道分泌物的P1蛋白,特异性强,敏感性达 10^4 cfu/mL。高光等^[15]就将制备的抗口腔支原体、精氨酸支原体单克隆抗体应用到检测支原体污染的ELISA中,可以有效的检测出污染的口腔支原体、精氨酸支原体。如今已有R&D Systems等公司开发了针对细胞中污染支原体的ELISA检测试剂盒,具有简便、快速与定量定性检测等特点。

3 支原体种属鉴定技术

3.1 表面免疫荧光技术

在固体分离培养的基础上,通常用表面免疫

荧光技术对分离菌株进行种属鉴定,原理是对固体培养基上的支原体菌落固定后,应用不同种属的特异性荧光抗体染色,染色完成后通过菌落的荧光鉴别种属。宁宜宝等^[7]从马立克氏病活疫苗中分离到支原体后,通过表面免疫荧光技术准确的鉴定了鸡毒支原体与鸡滑液囊支原体。

3.2 生长抑制试验(GI)与代谢抑制试验(MI)

Edward等首先观察到,加入抗血清的固体培养基可以抑制相应的支原体生长,并用此法鉴定了生殖支原体的分离菌株。生长抑制试验也是在固体分离培养的基础上进行,它是利用特异性抗体能阻止支原体生长的原理,把特异性抗体浸湿的滤纸片贴在接种可疑菌落的固体培养基上,滤纸片中的抗体即向四周扩散,以阻止支原体的生长,通过观察出现的抑菌环来判定可疑菌落是否为目标支原体。但是,由于生长抑制试验的敏感性低,在固体培养基表面难以得到满意的抑制效果,例如,丝状支原体丝状亚种等在固体培养基中抑制的效果很不明显,所以不宜作为实验室常规的检测方法。

部分支原体在液体培养基中的代谢条件不同,比如发酵支原体能发酵葡萄糖产酸,使pH值下降;精氨酸支原体能够利用精氨酸产碱,脲原体利用尿素产碱,使pH值升高。在代谢抑制试验中,将含有支原体特异性抗体的待检血清加入带有指示剂的液体培养基中,支原体的生长与代谢会受到抑制,而培养基的颜色不会发生改变,以此来区分代谢条件不同的支原体。针对单一纯净的支原体液体培养物,代谢抑制试验的特异性强、敏感性高。

4 结论

综上所述,支原体污染的每种检测技术有一定的局限性和缺点,不足以视为黄金标准。《中华人民共和国兽药典》规定检测疫苗中支原体的方法为培养法,而常规培养法检测支原体,所需时间长,工作量大,个别亚型支原体培养难度较大;DNA荧光染色法,结果不易判定;相对成熟的ELISA,只是停留在对细胞中污染支原体的检测;PCR作为一种简便、快速、特异、灵敏的支原体检测方法已经在国外广泛用于支原体污染的初步筛选,但国内只是停留在实验室阶段,尚无广谱、准确的方法。为了减少和预防疫苗中支原体的污

染,提高疫苗的纯净性,就必须建立一个准确的检测方法作为业内的内控标准。随着分子生物学技术的不断发展,PCR技术本身具有的特点必然在支原体污染的检测方面有更大的发展空间,而建立一个广谱、精确的PCR检测方法用于疫苗中支原体污染的检测,将是目前亟待解决的问题。

参考文献:

- 1 毕丁仁,王桂枝. 动物支原体及研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998,9.
- 2 吴移谋,叶元康. 支原体学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008,1.
- 3 Robinson L B, Wichelhanzen R H. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia [J]. Science, 1956, 124 (3232):1147-1148.
- 4 宁宜宝,冀锡霖. 鸡胚制活疫苗中霉体污染的研究报告[J]. 兽医药品通讯,1988,3:15-20.
- 5 宁宜宝,冀锡霖. 鸡胚成纤维细胞制马立克疫苗中污染支原体的检测报告[J]. 中国兽药杂志,1989,4:22-23.
- 6 Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research—An historical perspective[J]. Biologicals,2010,38(2):83-90.
- 7 宁宜宝,冀锡霖. 细胞培养活疫苗中霉形体的污染[J]. 中国兽医杂志,1992,18(4):44-45,21.
- 8 李晶梅,张萍,秦红刚,等. DNA荧光染色和PCR技术在PRRSV冻干疫苗中支原体检测的应用[J]. 中国预防兽医学报,

2011,33(12):957-960.

- 9 Uemori T, Asada K, Ikunoshin K, et al. Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1992, 15(1):181.
- 10 伊秋生,马立人,王北宁. 支原体通用PCR引物的设计及在诊断的应用[J]. 中国人兽共患病杂志,2000,16(3):61-62.
- 11 Hopert A, Uphoff C C, Wirth M, et al. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines[J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 26;164 (1):91-100.
- 12 邓显文,谢芝勋,谢志勤,等. 应用多重聚合酶链反应检测四种霉形体的研究[J]. 中国兽医科技,2003,6:15-18.
- 13 过琴媛,卢锦汉. 应用生物素一亲和素间接免疫荧光法检测支原体[J]. 中国生物制品学杂志,1993,4:178-179.
- 14 Jacobson J B. Antigenic modulation *in vitro*. II. Modulation of thymus-leukemia (TL) antigenicity requires complement component C3[J]. Journal of Immunology, 1978, 120(1):188-197.
- 15 高光,郭玮,尹红章,等. 抗口腔支原体、精氨酸支原体单克隆抗体的制备及其应用方法的初步研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,1995,21:1-3.



(上接第45页)

- 4 Fouladi P. Effect of choline chloride supplement and canola oil on the performance and feed efficiency in the broiler chickens[J]. Research Journal of Poultry Sciences, 2008, 2(3):58-62.
- 5 Fouladi P. Effect of choline chloride supplement on the internal organs and carcass weight of broilers chickens[J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2008, 7(9):1164-1167.
- 6 周源,冯国强,李丹丹,等. 黄羽肉鸡对胆碱的需要量研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(3):14-17.
- 7 徐之勇,刘卫彩,余燕,等. 日粮中不同胆碱含量对雏鸡的影响[J]. 养禽与禽病防治, 2010, 2:11-14.
- 8 徐之勇,余燕,赵恒章,等. 日粮中添加胆碱对雏鸡脂肪肝的防治效果[J]. 河南农业科学, 2010, 2(6):128-131.
- 9 Parsons C M, Leeper R W. Choline and methionine supplementation of layer diets varying in protein content[J]. Poultry Science, 1984, 63(8):1604-1609.
- 10 Miles R D, Ruiz N, Harms R H. The interrelationship be-

tween methionine, choline, and sulfate in broiler diets[J]. Poultry Science, 1983, 62(3):495-498.

- 11 廖杰. 氯化胆碱对蛋鸡生产性能的影响[J]. 中国畜牧业, 2012, 2:51-53.
- 12 王晶. FMO3基因型和胆碱对鸡蛋三甲胺含量影响的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.
- 13 孙长春. 鸡蛋中卵磷脂含量调控的研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2010.
- 14 张定臣. 蛋鸭日粮添加氯化胆碱的词喂效果[D]. 武汉:华中农业大学, 1988.
- 15 吴东,高振魁,李吕木,等. 肉鸭日粮中添加氯化胆碱对其生长性能的影响[J]. 当代畜牧, 2001, 3:20
- 16 詹凯,李吕木,吴东,等. 胆碱+硫酸钠对肉鸭血液生化指标和生长性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2001, 37(5):23-25
- 17 龚绍明,何大乾,孙国荣,等. 氯化胆碱和维生素E不同水平对肉鸭增重的影响[J]. 上海农业学报, 2004, 20(3):102-108.



作者：[英聪](#)，[刘灿](#)，[王海光](#)，[宁宜宝](#)，[毕丁仁](#)
作者单位：[英聪, 毕丁仁\(中国兽医药品监察所, 北京100081; 华中农业大学, 湖北武汉430070\)](#)，[刘灿\(中国兽医药品监察所, 北京100081; 中国农业大学, 北京100193\)](#)，[王海光, 宁宜宝\(中国兽医药品监察所, 北京, 100081\)](#)
刊名：[中国家禽](#)
英文刊名：[China Poultry](#)
年，卷(期)：2012, 34(23)

参考文献(15条)

1. [毕丁仁;王桂枝](#) [动物支原体及研究方法](#) 1998
2. [吴移谋;叶元康](#) [支原体学](#) 2008
3. [Robinson L B;Wichelhansen R H](#) [Contamination of human cell cultures by pleuropneumma](#) 1956(3232)
4. [宁宜宝;冀锡霖](#) [鸡胚制活疫苗中霉体污染的研究报告](#) 1988
5. [宁宜宝;冀锡霖](#) [鸡胚成纤维细胞制马立克疫苗中污染支原体的检测报告](#) 1989
6. [Razin S;Hayrick L](#) [Highlights of mycoplasma research-An historical perspective](#) 2010(02)
7. [宁宜宝;冀锡霖](#) [细胞培养活疫苗中霉形体的污染\[期刊论文\]-中国兽医杂志](#) 1992(04)
8. [李晶梅;张萍;秦红刚](#) [DNA荧光染色和PCR技术在PRRSV冻干疫苗中支原体检测的应用\[期刊论文\]-中国预防兽医学报](#) 2011(12)
9. [Uemon T;Asada K;Ikunoshin K](#) [Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction](#) 1992(01)
10. [伊秋生;马立人;王北宁](#) [支原体通用PCR引物的设计及在诊断的应用\[期刊论文\]-中国人兽共患病杂志](#) 2000(03)
11. [Hopert A;Uphoff C C;Wirth M](#) [Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction \(PCR\) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines](#) 1993(164)
12. [邓显文;谢芝勋;谢志勤](#) [应用多重聚合酶链反应检测四种霉形体的研究](#) 2003
13. [过琴媛;卢锦汉](#) [应用生物素-亲和素间接免疫荧光法检测支原体](#) 1993
14. [Jacobson J B](#) [Antigenic modulation in vitro. II. Modulation of thymus-leukemia \(TL\) antigenicity requires complement component C3](#) 1978(01)
15. [高光;郭玮;尹红章](#) [抗口腔支原体、精氨酸支原体单克隆抗体的制备及其应用方法的初步研究](#) 1995

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgj201223011.aspx