

实验技术

应用 SYBR Green RealTime PCR技术检测细胞培养物中支原体污染

丁敏¹, 张瑞婷², 毛开荣², 朱鸿飞^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100084

2. 中国兽药监察所, 北京 100081)

摘要: 根据常见支原体 23S rRNA的保守区域基因序列, 设计通用引物, 应用 SYBR Green RealTime PCR技术, 研究建立了细胞培养物中支原体污染的快速检测方法。该方法能检测到污染细胞培养物的 6种常见的支原体, 敏感度达 4.2x10⁻² pg/mL模式株的 DNA

关键词: 支原体污染; RealTime PCR; 细胞培养物

中图分类号: S851 文献标识码: A 文章编号: 0529-5130(2009)01-0082-04

支原体是最小的能自我复制的微生物, 大小为 300~800 nm, 无细胞壁, 呈多形性。归属于柔膜体纲 (Mollicutes), 共有 6个属, 120个种别^[1]。支原体是生物制品中较常见的一种外源污染微生物, 据某些学者统计, 原代细胞培养物的支原体污染率为 1%~3%, 而继代细胞株和传代细胞系中的支原体污染率高达 45%~92%^[2]。上述各类细胞是进行病毒疫苗生产、单克隆抗体制备以及病毒学研究的重要介质, 支原体污染将引起细胞代谢和形态的变化并导致染色体畸变, 从而影响所收获病毒的滴度和单抗效

价, 给科研和生产带来严重的危害^[3]。

目前, 支原体检测方法主要有固体或液体分离培养法、DNA荧光染色法、电镜法、血清学方法和核酸探针法等, 因特异性、灵敏度及检测时间长的缺陷, 这些方法均不是理想的检测方法^[4]。本研究利用先进的 SYBR Green RealTime PCR技术, 对细胞培养物中支原体污染的快速检测进行了有益的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肺炎支原体 (Mycoplasma hyopneumoniae Mhp ATCC232)、鸡毒支原体 (Mycoplasma gallisepticum BG44 T)、滑液支原体 (Mycoplasma hyosynoviae WVU853)、精氨酸支原体 (Mycoplasma argini)

收稿日期: 2008-05-16 修回日期: 2008-11-02
基金项目: 国家科技支撑计划 (2008BAK51B08)
作者简介: 丁敏 (1982-), 女, 硕士。
* 通讯作者。

综上所述推断, SDG可能通过 2种机制促进乳腺发育: 一是通过胃肠道微生物转化后, 其代谢产物 ENDO和 ENL作用于乳腺, 与乳腺中的雌激素受体结合, 直接促进大鼠的乳腺发育; 另一种是通过神经内分泌途径, 与下丘脑、垂体的雌二醇受体结合, 引起动物自身与乳腺发育相关的激素 E₂ 和孕酮的生成和释放, 进一步促进大鼠的乳腺发育。其具体作用机制还有待于进一步试验研究。

参考文献:

[1] Wang Li-quan Mammalian Phytoestrogens: enterodiol and enterolactone [J]. Journal of Chromatography B 2002 777: 289-309.
[2] Bowey E, Adlercreutz H, Rowland J. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats [J]. Food and Chemical Toxicology 2003 41: 631-636.

[3] 周炜, 王国杰, 韩正康. 亚麻籽木脂素研究进展 [J]. 动物医学进展, 2007 28(3): 89-94.
[4] Tan Kah Poh, Chen Jiamin, Wendy E, et al. Mammary Gland Morphogenesis Is Enhanced by Exposure to Flaxseed or Its Major Lignan During Suckling in Rats [J]. J Society for Exp Biol Med 2004 147-157.
[5] Johansson P, Kamal-Eldin A, Lundgren LN, et al. HPLC method for analysis of secoisolariciresinol diglucoside in flaxseeds [J]. Agric Food Chem 2000 48(11): 5216-5219.
[6] Eliasson C, Kamal-Eldin A, Andersson R, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction [J]. Chromatogr 2003 1012: 151-159.
[7] 王月影, 王艳玲, 李和平, 等. 动物乳腺发育的调控 [J]. 畜牧与兽医, 2002 34(7): 36-38.
[8] 韩正康. 异黄酮植物雌激素对雌性动物生殖、泌乳和产蛋的影响及其作用机制探讨 [J]. 畜牧与兽医, 2005 37(6): 1-3.
[9] Han Zhenkang, Wang Guojie, Yao Wen, et al. Isoflavonic phytoestrogens: new prebiotics for farm animals: a review on research in China [J]. Curr Issues Intestinal Microbiol 2006 7: 53-60.

G230)、莱德劳(氏)无胆甾原体(*Acholeplasma laidlawii* ATCC 2406)和猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis* CVCC 361)购自中国兽医药品监察所;Vero细胞由本实验室保存;Light cycle荧光定量PCR仪购自BIO-RAD公司,Biofuge primo R低温台式高速离心机购自SORVALI公司,RealTime PCR 8联管购自AXYGEN公司;柱式细菌DNA_{out}试剂盒购自TIANDZ公司;BioEasy SYBR Green I RealTime PCR试剂盒购自BIOER公司。

1.2 SYBR Green RealTime PCR引物设计

根据GenBank中公布的猪肺炎支原体、滑液支原体、鸡毒支原体、精氨酸支原体、莱德劳(氏)无胆甾原体和猪鼻支原体23S rRNA基因序列,设计1条通用的反向引物:5'-CTTCC(A/C)TCAC(G/T)GTACT(A/G)GTTCACT₃'。鉴于莱德劳(氏)无胆甾原体与上述另5个支原体23S rRNA的基因序列差异较大,为其单独设计1条正向引物:5'-GGAAAATGTTATTTIGACGAACCT₃'。同时,为另5个支原体设计1条共用的正向引物:5'-TCTGAA(C/T)TGCCGGGACCACC₃^[5]。上述引物由Takara大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 套式PCR引物合成

根据文献[6],由Takara大连宝生物工程有限公司合成2对引物,其中,内部正向引物为:5'-GTCTTTGAAAACCTGAAT₃'。内部反向引物为:5'-GCATCCACCAAAAACCTCT₃'。外部正向引物为:5'-ACACCAIGGGAGCTGGTAAT₃'。外部反向引物为:5'-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGCCAT₃'。

1.4 猪肺炎支原体基因组的提取

按文献[7]制备KM₂液体培养基,将猪肺炎支原体冻干菌种在KM₂液体培养基中进行增殖,取1 mL培养物,按照TIANDZ公司的柱式细菌DNA_{out}试剂盒说明书提取基因组,作为优化SYBR Green RealTime PCR反应条件的模板。

1.5 SYBR Green RealTime PCR反应条件的优化

设计0.1、0.2、0.3 μmol/L 3个引物浓度,58℃、60℃、62℃ 3个反应温度,28 s、30 s、32 s 3个反应时间,35次、40次 2个反应循环次数。先固定40次反应循环次数,用BioEasy SYBR Green I RealTime PCR试剂盒中SYBR混合物、Taq DNA聚合酶、MgCl₂和灭菌双蒸水,对引物浓度、反应温度、反应时间进行正交试验优化;再固定已优化的引物浓度、反应温度、反应时间,进行反应循环次数优化,筛选出最佳的SYBR Green RealTime PCR反应条件。

1.6 猪肺炎支原体基因组标准曲线的建立

首先测定1.4所提取的猪肺炎支原体基因组的OD₆₀₀值,计算其浓度后进行10倍梯度稀释,取4.2×10²、4.2×10¹、4.2×10⁰、4.2×10⁻¹、4.2×10⁻²、4.2×10⁻³ pg/mL 6个稀释度,用上述设计的引物和已优化的反应条件,进行SYBR Green RealTime PCR反应。

1.7 SYBR Green RealTime PCR检测猪肺炎支原体基因组的灵敏度

以SYBR Green RealTime PCR检测猪肺炎支原体基因组的最低浓度作为其灵敏度,同时利用魏红梅等^[7]设计的套式PCR引物和已优化的反应条件:引物浓度为0.5 μmol/L,循环参数为:94℃预变性3 min;94℃变性4 s;54℃复性4 s;72℃延伸20 s;重复30次循环;72℃恒温3 min。以1.4所提取的猪肺炎支原体基因组为模板进行套式PCR,比较其灵敏度。

1.8 支原体感染Vero细胞及其基因组的提取

将猪肺炎支原体、鸡毒支原体、滑液支原体、精氨酸支原体、莱德劳(氏)无胆甾原体和猪鼻支原体冻干菌种用KM₂液体培养基进行增殖,将在50 mL小方瓶中已长成单层的Vero细胞培养液倒掉,分别加入1 mL上述支原体培养物,吸附1 h,加入10 mL细胞培养液,37℃培养3~5 d(同时设阴性对照)。收获经3次反复冻融的上述细胞培养物,取1 mL细胞培养物12 000 r/min离心30 min,去上清,加100 μL灭菌双蒸水悬浮后煮沸10 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液作为样品,按1.5所优化的条件进行SYBR Green RealTime PCR反应^[5]。

1.9 SYBR Green RealTime PCR检测生物制品中污染的支原体

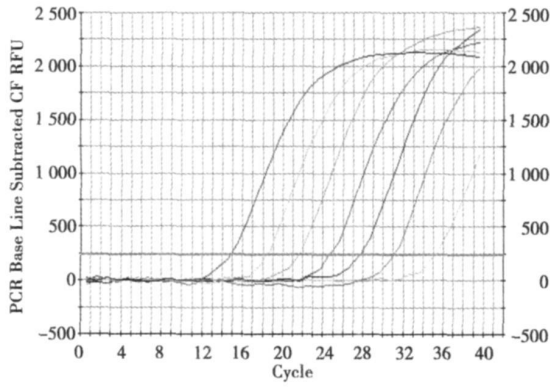
收集来自不同实验室的原代细胞(包括原代鸡成纤维细胞和猪肺泡巨噬细胞)和继代细胞(包括Vero Mar45和Dulac细胞)共16份,购自不同厂家的3份犊牛血清和18份活疫苗样品(常见畜禽及宠物活疫苗)。上述样品按1.8所述的方法提取其基因组,并按1.5所优化的条件进行SYBR Green RealTime PCR反应。同时按1.7所述方法进行套式PCR反应。

2 结果

试验结果详见图1~4。

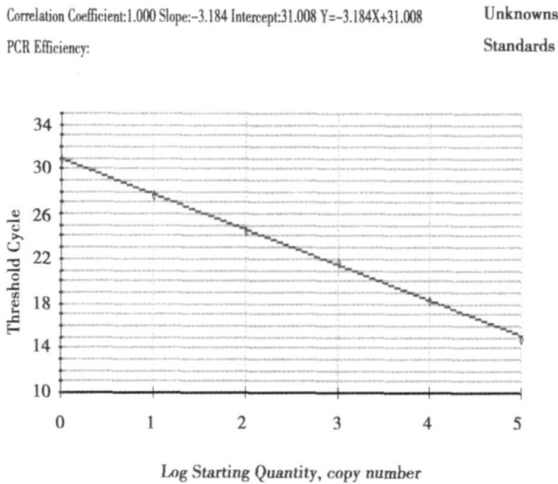
2.1 SYBR Green RealTime PCR最佳反应条件

经优化,最佳引物浓度为0.2 μmol/L,循环参数为:95℃预变性3 min;95℃变性10 s;60℃复性及延伸30 s;变性及复性过程重复40个循环。



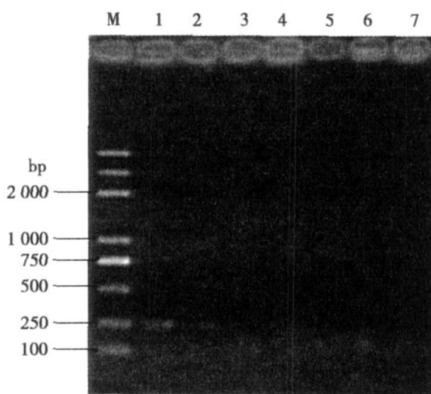
注：1) 横轴代表循环数，纵轴代表荧光值。
2) 图中曲线组由左向右所代表的起始浓度呈 10 倍依次递减，最右边为空白对照组

图 1 猪肺炎支原体基因组的扩增曲线



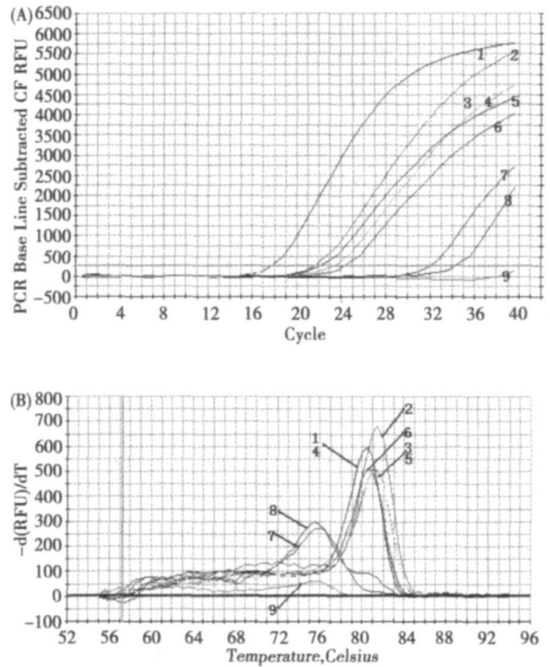
横轴表示起始模板浓度 (lg)，纵轴表示 Ct 值。相关系数 = 1.000，扩增效率 = 106.1%

图 2 猪肺炎支原体基因组得到的标准曲线



M. Marker DL2000 PLUS; 1~6. 4.2×10^2 , 4.2×10^1 , 4.2 , 4.2×10^{-1} , 4.2×10^{-2} , 4.2×10^{-3} pg/mL Mhp 基因组; 7. 空白对照

图 3 套式 PCR 检测猪肺炎支原体基因组的灵敏度



SYBR Green Real Time PCR的模板：1 猪肺炎支原体；2 精氨酸支原体；3 莱德劳（氏）无胆甾原体；4 猪鼻支原体；5 鸡毒支原体；6 滑液支原体；7~8 Vero细胞；9 双蒸水。

(A): 扩增曲线。对应的 C_t 为 17.7 21.7 18.2 23.2 22.1 24.2 32.0 和 34.2

(B): 溶解曲线。对应的 T_m 值为 80.5 °C、81.5 °C、81.0 °C、80.5 °C、81.5 °C、80.5 °C、75.5 °C、75.5 °C 和 75.5 °C

图 4 感染支原体的 Vero 细胞培养物的扩增结果

2.2 猪肺炎支原体基因组的标准曲线

将模式株猪肺炎支原体基因组进行 10 倍梯度稀释后作为模板进行 SYBR Green Real Time PCR 反应，得到猪肺炎支原体基因组 SYBR Green Real Time PCR 扩增曲线 (图 1)。

图中在 30 个循环后空白对照组出现荧光信号增强现象，经熔解曲线分析是引物二聚体形成所致 (图略)。

SYBR Green Real Time PCR 反应结束后由计算机根据起始模板浓度的对数值和相应的 C_t 值拟合出标准曲线，标准曲线相关系数 $R^2 = 1.000 (> 0.98)$ ，表明不同梯度浓度模板的对数值与 C_t 值之间呈现很好的线性关系，经计算，标准曲线扩增效率 $E = 1.061 (0.8 < E < 1.2)$ ，符合荧光定量 PCR 体系要求，详见图 2。

2.3 SYBR Green Real Time PCR 检测猪肺炎支原体基因组的灵敏度

SYBR Green Real Time PCR 可检测到 4.2×10^{-2} pg/mL Mhp DNA 而套式 PCR 只能检测到 4.2×10^{-1} pg/mL Mhp DNA (见图 3)。

2.4 SYBR Green RealTime PCR对感染支原体的Vero细胞培养物的检测

如图4所示,所设计的引物对人工感染6种常见支原体的Vero细胞培养物均可扩增出特异性的片段,而阴性对照的Vero细胞不能产生特异性反应。

2.5 SYBR Green RealTime PCR对生物制品中污染的支原体的检测

37份待检样品经第1次套式PCR扩增后检出12份,其中细胞培养物10份为阳性,活疫苗2份为阳性;经第2次套式PCR扩增后检出5份,其中3份细胞培养物为阳性,2份活疫苗为阳性。套式PCR共检出17份样品,其检出率为45.9%(17/37)。经过SYBR Green RealTime PCR共检出26份为阳性样品,检出率为70.3%(26/37)。

3 讨论

上世纪90年代中期诞生的实时荧光定量PCR技术,因具有定量准确、敏感性高(<5拷贝)、精确度高(CV<2%)、无后处理步骤、并可以进行多重检测等优点^[8],得以在基础研究和分子诊断技术领域受到青睐。目前的各类实时荧光PCR方法中,序列特异的荧光探针(如TaqMan探针)被看作是标准的检测模式^[9],但因探针合成费用较高,且每一种扩增子都需要一种对应的探针,不适于大量的不同基因序列的检测。本研究所采用的SYBR Green RealTime PCR受引物二聚体形成的影响,需通过优化反应条件和熔解曲线分析来提高其特异性,但因只需合成成本较低的特异性引物,实际应用前景较广。

原核生物的rRNA基因高度保守且进化缓慢,被称为“活化石”。目前,大部分已知支原体的23S rRNA基因序列已被测定并存入基因数据库。本研究针对猪肺炎支原体、鸡毒支原体、滑液支原体、精氨酸支原体、莱德劳(氏)无胆甾原体和猪鼻支原体的23S rRNA基因序列,利用DNASar软件和Primer5.0软件设计引物,建立了细胞培养物中支原体污染的SYBR Green RealTime PCR检测方法。试验表明,本方法能成功检出上述6种常见支原体,比常规的培养法和DNA间接荧光染色法快5~10d而与目前普遍使用的套式PCR检测法相比,也具有更高

的灵敏度^[6-10-11]。

本研究采用SYBR Green RealTime PCR技术进行细胞培养物及生物制品中支原体污染的检测,检出率为70.3%(26/37),此结果与郭玉广等^[12]和应蓓蓓等^[10]对生物制品中支原体污染检测结果80%、64.5%相似,表明细胞培养物和生物制品中支原体污染仍较为严重;同时,本研究将为相关主管部门、科研工作者和生物制品企业进行生物制品中支原体污染的检测,提供一种新型、高效、特异、灵敏的手段。

参考文献:

- [1] 邵国青. 我国主要动物支原体病研究述略与展望 [J]. 畜牧与兽医, 2000 32(2): 37-38
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 237
- [3] 葛可佑. 中国居民膳食营养素参考摄入量 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 458
- [4] 刘茂军, 张映. 霉形体检测技术简介 [J]. 中国兽医科技, 2002 32(3): 10-11
- [5] Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, et al. Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in cell cultures and vaccine using SYBR GREEN-BASED RealTime PCR [J]. Society for In Vitro Biology 2006 42(3): 63-69.
- [6] 魏红梅, 袁曾麟, 陈天寿. 两步PCR法检测细胞培养物中支原体污染的初步结果 [J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1994 14(2): 131-133.
- [7] 还红华, 邵国青, 倪艳秀, 等. 猪肺炎支原体培养技术研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2001 17(3): 70-71.
- [8] Bretagne C. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction assays and interest of the real time PCR assays [J]. Clin Microbiol Infect 2003 9: 505-511
- [9] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assay [J]. J Mol Evol 2000 25: 169
- [10] 应蓓蓓, 陆诗华, 吴维寿, 等. 生物制品中支原体污染的快速检测 [J]. 高技术通讯, 1999 (5): 53-56
- [11] 张曦, 腾峥, 朱兆奎. 应用NESTED-PCR法检测细胞培养物中的支原体污染 [J]. 上海预防医学杂志, 2002 14(9): 414-419
- [12] 郭玉广, 南文龙, 张春艳, 等. 应用聚合酶链式反应检测细胞培养物和细胞培养用小牛血清支原体污染 [J]. 中国动物检疫 2005 22(7): 30-33

· 喜讯 · 《畜牧与兽医》影响因子持续上升

根据2008年12月9日在北京召开的2007年度“中国科技论文统计结果”发布会公布的对1765种统计源期刊的统计结果,在核心版中《畜牧与兽医》影响因子为0.338,扩展版影响因子为0.498,总被引频次核心版为540,扩展版为994。核心版影响因子和总被引频次两项指标均位于畜牧、兽医科学类期刊第9名。《畜牧与兽医》影响因子继2005年版的0.118,2006年版的0.218,2007年版的0.280,持续上升到今年的0.338。