

# 猪鼻支原体黏附宿主细胞间接免疫荧光检测方法的建立

纪 燕<sup>1,2</sup>,熊祺琰<sup>2</sup>,韦艳娜<sup>2</sup>,马庆红<sup>2</sup>,白方方<sup>2</sup>,冯志新<sup>2</sup>,刘茂军<sup>2</sup>,邵国青<sup>1,2</sup>

**摘要:**目的 猪鼻支原体是临床猪场的常见病菌,可引起猪多发性浆膜炎、肺炎、关节炎、中耳炎等慢性炎症,同时其与多种人类肿瘤有明显相关性,但其致病机理有待深入,其感染细胞机制的研究尚未明确,因此,本研究欲建立一种用间接免疫荧光技术检测猪鼻支原体黏附宿主细胞的方法。**方法** 以猪鼻支原体和猪肾上皮细胞为研究对象,以兔抗猪鼻支原体纯化抗体为一抗,以 FITC 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,通过反应条件的优化,建立猪鼻支原体黏附宿主细胞的间接免疫荧光检测方法(IFA)。**结果** 最终确定最小黏附滴度为 1:10<sup>7</sup> CCU/mL,猪鼻支原体黏附 PK15 所需时间为 6 h 以上,一抗的最佳工作浓度为 1:100,二抗的最佳工作浓度为 1:1600。**结论** 表明间接免疫荧光技术可以用来检测猪鼻支原体对宿主细胞的黏附作用。为猪鼻支原体的研究特别是感染细胞机制的体外研究提供基础方法,同时为疾病的诊断及疫苗的研发奠定基础。

**关键词:**猪鼻支原体;黏附;间接免疫荧光技术

中图分类号:R375

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)03-0239-05

## Establishment of an indirect immunofluorescence assay for detection of adherence of *Mycoplasma hyorhinis* to host cells

JI Yan<sup>1,2</sup>, XIONG Qi-yan<sup>2</sup>, WEI Yan-na<sup>2</sup>, MA Qing-hong<sup>2</sup>, BAI Fang-fang<sup>2</sup>  
FENG Zhi-xin<sup>2</sup>, LIU Mao-jun<sup>2</sup>, SHAO Guo-qing<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095 China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture / National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**ABSTRACT:** In the present study, an indirect immunofluorescence assay (IFA) was established for the detection of Mhr adherence to host cells. We used purified anti-Mhr IgG as the primary antibody and the fluorescein (FITC) isothiocyanated conjugate goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody. Optimization of reaction conditions was carried out, including the concentration of first antibody and second antibody, and then the minimum titer and the time of Mhr adhesion to cells. As a result, the optimum working concentration of anti-Mhr IgG and FITC-labeled goat anti-rabbit IgG was determined to be 1:100 and 1:1600, respectively. The minimum titer and time of Mhr adhesion to the PK15 cells was 1×10<sup>7</sup> CCU/mL and longer than 6 hours. The IFA established in this study provides the basic method, in particular, for the *in vitro* study of cellular mechanisms of infections caused by Mhr. In conclusion, our study outlines the basis for disease diagnosis and the development of Mhr vaccine.

**KEY WORDS:** *Mycoplasma hyorhinis*; adherence; indirect immunofluorescence assay

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31300155) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130702)

Corresponding author: Shao Guo-qing, Email: gqshaonj@163.com

国家自然科学基金(No. 31300155),江苏省自然科学基金(No. BK20130702)

通讯作者:邵国青,Email:gqshaonj@163.com

作者单位:1.南京农业大学动物医学院,南京 210095;

2.江苏省农业科学院兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,南京 210014

猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*, Mhr)是第一种从猪体内分离得到支原体<sup>[1]</sup>,可引起猪的肺炎、多发性浆膜炎、关节炎、中耳炎等临床症状,导致保育猪、育肥猪等生长性能下降,,对养殖业造成巨大危害<sup>[2-4]</sup>。Mhr 也是人类和多种动物细胞培养中

常见的污染物<sup>[5]</sup>,同时近年来许多研究证实其与多种人类肿瘤的发生有明显的相关性<sup>[6-7]</sup>。目前,有关Mhr的研究较少,其与宿主之间的关系、发病机制、免疫逃避机制以及不同毒株的致病力差异等诸多问题尚未定论。Mhr对宿主细胞的黏附是其侵入机体的第一步也是关键的步骤<sup>[8-9]</sup>,因此对于Mhr黏附细胞机制的深入研究至关重要,可为疾病病因阐释及疫苗研发奠定基础。本研究建立的Mhr黏附宿主细胞的间接免疫荧光检测方法为利用体外感染细胞模型研究Mhr黏附、侵染宿主细胞以及其黏附因子等的研究奠定基础。

## 1 材料及方法

**1.1 菌株、细胞及试剂** 猪鼻支原体10071603株及猪肾上皮细胞PK15均由江苏省农业科学院兽医研究所家畜疾病防控研究室保存。

兔抗Mhr多抗由实验室自制,用Mhr全菌抗原免疫新西兰大白兔,共免疫三次,每次间隔2周,第三次免疫后2周采血,制备血清后,用饱和硫酸铵沉淀法纯化抗体,PBS透析后分装于-20℃冻存,效价测定为1:51 200;FITC-羊抗兔IgG,购自武汉博士德生物工程有限公司;DMEM,购自Gibco公司;小牛血清,购自兰州民海生物工程有限公司。

**1.2 Mhr培养** Mhr10071603株以1:10比例接种于含20%猪血清的KM2培养基,待菌液生长至对数生长期时备用。

**1.3 PK15细胞培养** PK15细胞用含10%小牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL的DMEM培养液培养,待细胞汇合至90%以上时,胰蛋白酶消化。细胞以2×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔细胞板,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。

**1.4 Mhr黏附细胞** 取4 mL新鲜培养的处于对数生长期的Mhr,12 000 r/min离心30 min。菌体沉淀用PBS洗涤一次,DMEM维持液(含2%的小牛血清)重悬菌体备用。96孔板中的细胞用PBS洗涤一次。将DMEM维持液重悬的Mhr菌体按100 μL/孔接种于铺有细胞的细胞板中,于37℃黏附一定时间。用PBS洗涤未黏附的Mhr,洗涤3次,每次5 min。冰乙醇4℃固定30 min,100 μL/孔。

**1.5 间接免疫荧光试验程序** 冰乙醇固定后的96孔板用PBS洗涤3次,每次5 min;用1% BSA 4℃封闭过夜;次日用PBS洗板3次,每次5 min;然后加入100 μL 1:100稀释的兔抗Mhr多抗,于37℃孵育1.5 h;用PBS洗板4次,每次5 min;然后加入50 μL 1:50稀释的荧光二抗FITC-羊抗兔IgG,于

37℃避光孵育1 h;然后用PBS洗板5次,每次5 min。最后将细胞板置于倒置荧光显微镜下观察结果。

**1.6 间接免疫荧光试验最佳工作条件的确定** 以下试验分别对黏附滴度、黏附时间、一抗工作浓度及二抗工作浓度4个指标进行优化,每次仅改动一个变量。

**1.6.1 Mhr黏附滴度的确定** 用颜色改变单位法(Colour chang unit,CCU)测定DMEM维持液重悬的Mhr的滴度。同时将DMEM维持液重悬的Mhr菌液按10倍系列稀释接种于铺有细胞的孔中,孵育6 h后,进行IFA试验,其它条件同上述反应程序。观察Mhr滴度对试验结果的影响。

**1.6.2 Mhr黏附时间的确定** Mhr黏附PK15细胞的时间分别采取1 h、2 h、4 h、6 h、8 h和10 h,进行IFA试验,其它条件同上述反应程序。观察黏附时间对试验结果的影响,确定最适的Mhr黏附时间。

**1.6.3 一抗工作浓度的确定** 将纯化的兔抗Mhr多抗(效价为1:51 200)进行1:10、1:100、1:500、1:1 000倍稀释,进行IFA试验,其它条件同上述反应程序,观察比较不同稀释度对试验结果的影响,确定最佳的一抗工作浓度。

**1.6.4 二抗工作浓度的确定** 以上述确定的最佳抗体稀释度作为一抗的工作浓度,分别将市售荧光二抗作1:100、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400倍稀释,其它条件同上述反应程序,进行IFA试验,测定呈现明显荧光强度的最大稀释倍数,确定最适的二抗工作浓度。

## 2 结 果

**2.1 Mhr黏附滴度的确定** 试验结果表明,1×10<sup>9</sup> CCU/mL、1×10<sup>8</sup> CCU/mL的Mhr与PK15作用6 h,可见大量的Mhr黏附于细胞;1×10<sup>7</sup> CCU/mL的Mhr与PK15作用6 h,有较多量的Mhr黏附于细胞;1×10<sup>6</sup> CCU/mL与PK15作用6 h,仅少量的Mhr黏附于细胞;1×10<sup>5</sup> CCU/mL的Mhr与PK15作用6 h,与阴性对照区别不明显。表明Mhr黏附PK15细胞的最小滴度为1×10<sup>7</sup> CCU/mL(图1)。

**2.2 Mhr黏附时间的确定** 试验结果表明,当Mhr与PK15作用1 h时,仅有少量Mhr黏附于细胞表面;当作用4 h时,黏附的Mhr明显增多,作用6 h和8 h时可看到大量的Mhr黏附于细胞表面。而当作用到达10 h时,细胞开始出现一定的脱落,这可能与Mhr对细胞的感染损伤有关。当间接免疫荧光试验用于研究Mhr对细胞黏附作用时,可选

择作用 6~8 h(图 2)。

**2.3 一抗工作浓度的确定** 试验结果表明,当一抗以 1:10、1:100 稀释时,特异性荧光强度高;当一

抗以 1:500、1:1 000 稀释时,特异性荧光强度相当较弱,考虑试验的操作性和便利性,确定一抗的最佳工作浓度为 1:100(图 3)。

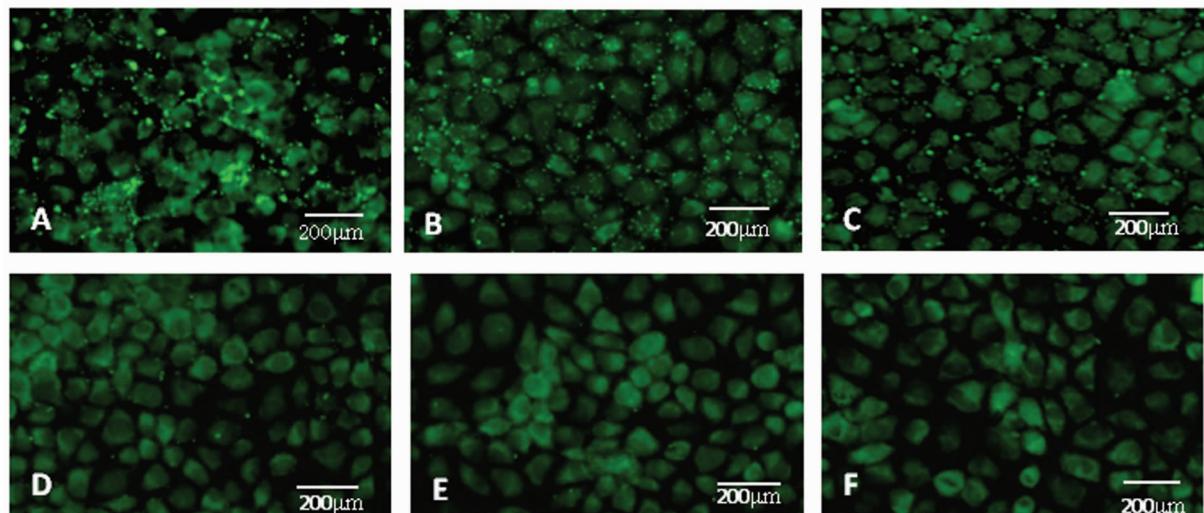


图 1 不同滴度的 Mhr 与 PK15 的黏附作用

Fig. 1 Adherence of Mhr with different titers to PK15 cells

Titers adhesion to PK15 cells are shown.

A:  $1 \times 10^9$  CCU/mL; B:  $1 \times 10^8$  CCU/mL; C:  $1 \times 10^7$  CCU/mL; D:  $1 \times 10^6$  CCU/mL; E:  $1 \times 10^5$  CCU/mL;  
F: Negative control.

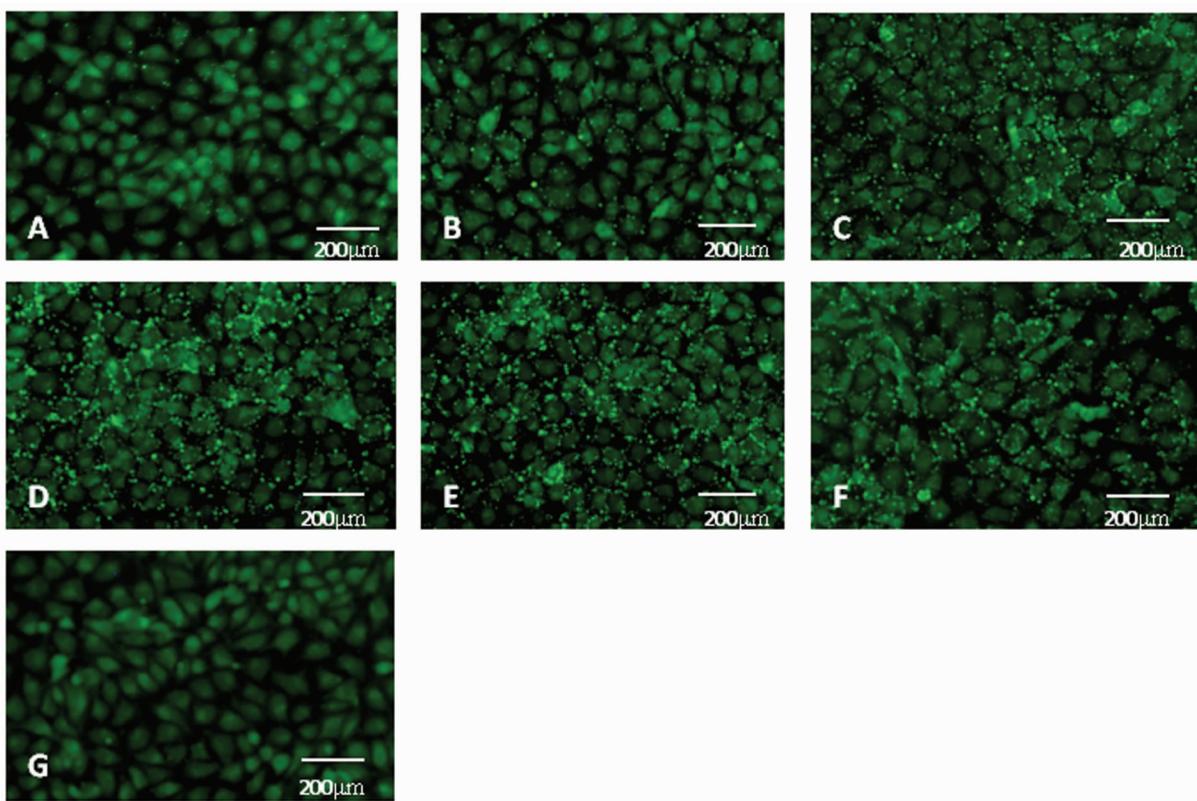


图 2 Mhr 与 PK15 作用不同时间对黏附作用的影响

Fig. 2 Adherence of Mhr to PK15 cells affected by reaction time

Results of Mhr adhesion to PK15 cells for 1 hour (A), 2 hours (B), 4 hours (C), 6 hours (D), 8 hours (E), and 10 hours (F) are shown. G: Negative control

**2.4 二抗工作浓度的确定** 试验结果表明,当二抗以 $1:100$ 、 $1:400$ 、 $1:800$ 、 $1:1\,600$ 稀释时,特异性荧光强度依次降低,但整体仍维持在较好水平;当

二抗以 $1:3\,200$ 、 $1:6\,400$ 稀释时,特异性荧光强度相当较弱,因此二抗的最佳工作浓度确定为 $1:1\,600$ (图4)。

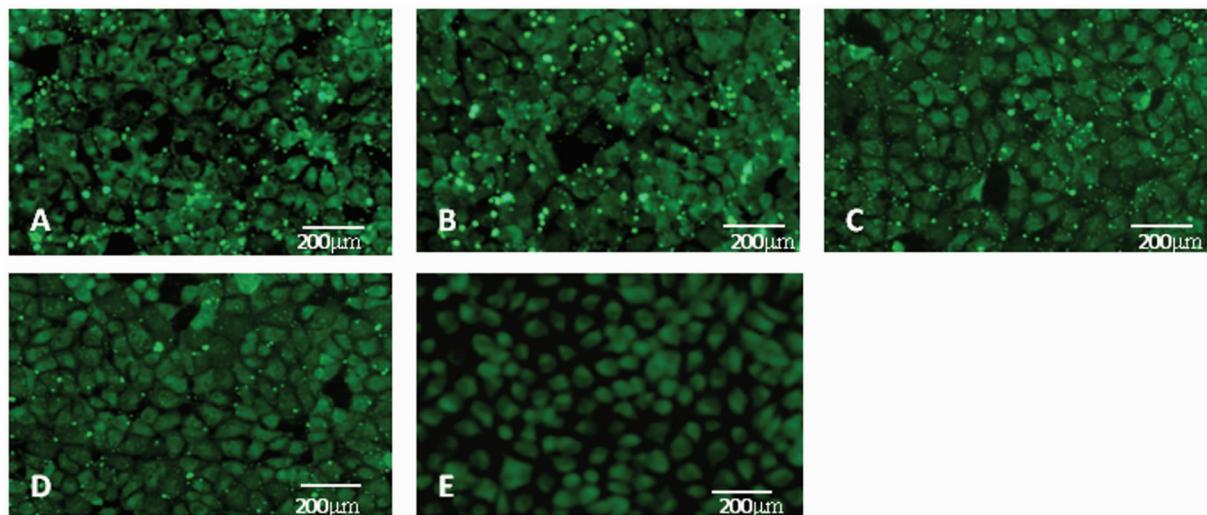


图3 一抗工作浓度对荧光效果的影响

Fig. 3 Influence of different dilution of first antibody to fluorescent effect

Results of  $1:10$  (A),  $1:100$  (B),  $1:500$  (C), and  $1:1\,000$  (D) dilution of first antibody to fluorescent effect are shown. E: Negative control.

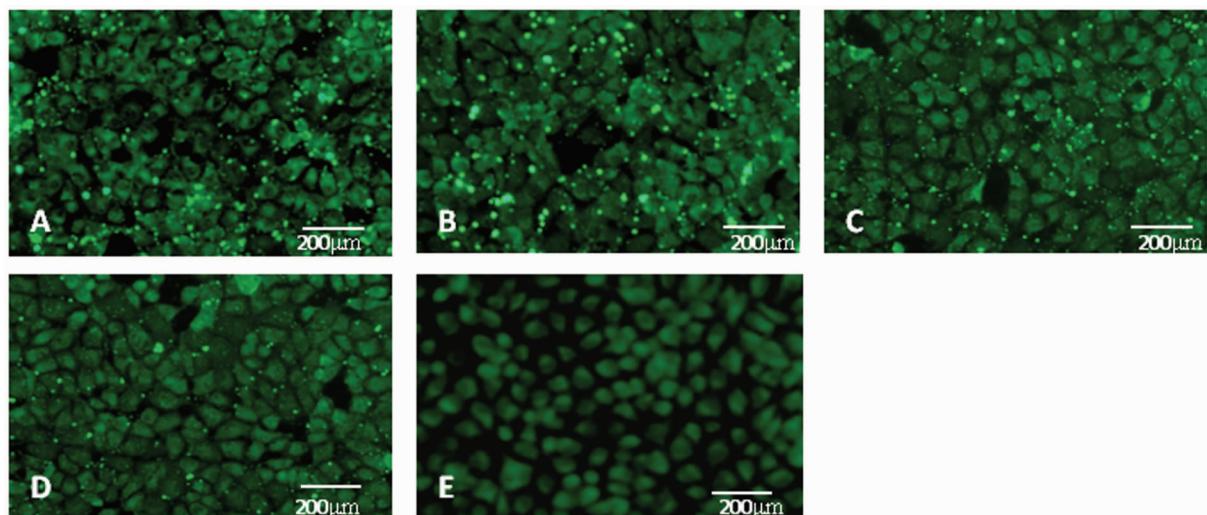


图4 二抗工作浓度对荧光效果的影响

Fig. 4 Influence of different dilution of second antibody to fluorescent effect

Results of  $1:100$  (A),  $1:400$  (B),  $1:800$  (C),  $1:1\,600$  (D),  $1:3\,200$  (E), and  $1:6\,400$  (F) dilution of second antibody to fluorescent effect are shown. G: Negative control

### 3 讨 论

目前,关于Mhr黏附宿主细胞及感染致病机制的研究较少。William<sup>[10]</sup>等人在早期发现大多数Mhr菌株能够黏附到原代猪肾细胞质膜表面,通过聚集一定数量损害细胞质膜,引起细胞颗粒状、胞浆浓缩等细胞质损伤特征,但对细胞核未造成直接损害,该发现为Mhr感染细胞相关方面的研究提供思路。但目前对于Mhr的黏附因子尚未见报道。另

一方面,Jonathan D<sup>[11]</sup>等人认为,Mhr仅黏附于细胞表面并不能造成细胞的发病,宿主细胞与入侵的Mhr之间互作信号的产生是造成细胞损伤的关键。

本研究建立的Mhr黏附PK15细胞的间接免疫荧光检测方法为Mhr感染细胞机制的体外研究提供了基础方法。用免体制备的Mhr免疫血清纯化多抗为一抗,未观察到明显的由交叉反应导致的本底偏高的现象,说明直接用多抗进行Mhr黏附细

胞的间接免疫荧光检测是可行的,避免了单抗制备以及单抗反应效果可能不佳的问题。经结果分析发现,当Mhr与PK15细胞作用达到10 h时,相较于孵育6、8 h的细胞数量发生了一定降低,镜检观察细胞状态变差,如果继续作用更长的时间,细胞会出现更明显的脱落情况。这很可能与Mhr逐步地对细胞进行体外感染、影响细胞生长状态有关。因此,如果单纯研究Mhr对细胞的黏附情况,或者对其黏附因子进行研究,将孵育时间控制在8 h以内,可以保持较好的细胞形态,而如果要研究Mhr对细胞的侵染、与细胞的相互作用等,可以考虑选择更加长的作用时间,能够较明显地观察细胞的变化。

## 参考文献:

- [1]Straw BE. Diseases of swine[M]. 9<sup>th</sup> ed. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2006: 701-718.
- [2]Lin JH, Chen SP, Yeh KS, et al. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen[J]. Vet Microbiol, 2006, 115(1/3): 111-116. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.02.004
- [3]Morita T, Fukuda H, Awakura T, et al. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media[J]. Vet Pathol, 1995, 32(2): 107-111. DOI: 10.1177/030098589503200202
- [4]Kim B, Lee K, Han K, et al. Development of *in situ* hybridization for the detection of *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from naturally infected pigs with polyserositis[J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(9): 1225-1227.
- [5]Zinoccer S, Wang MY, Gaustad P, et al. *Mycoplasma* contamination revisited: mesenchymal stromal cells harboring *Mycoplasma hyorhinis* potently inhibit lymphocyte proliferation *in vitro* [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16005. DOI: 10.1371/journal.pone.0016005
- [6]Urbanek C, Goodison S, Chang M, et al. Detection of antibodies directed at *M. hyorhinis* p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 233. DOI: 10.1186/1471-2407-11-233
- [7]Mariotti E, Gemei M, Mirabelli P, et al. The percentage of CD133<sup>+</sup> cells in human colorectal cancer cell lines is influenced by *Mycoplasma hyorhinis* infection[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 120. DOI: 10.1186/1471-2407-10-120
- [8]Razin S, Jacobs E. *Mycoplasma* adhesion[J]. J Gen Microbiol, 1992, 138(3): 407-422. DOI: 10.1099/00221287-138-3-407
- [9]Sachse K. Detection and analysis of *Mycoplasma* adhesins[J]. Methods Mol Biol, 1998, 104: 299-307. DOI: 10.1385/0-89603-525-5:299
- [10]Switzer WP. Swine mycoplasmosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 1967, 143(1): 281-286. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb27667.x
- [11]Kornspan JD, Tarshis M, Rottem S. Invasion of melanoma cells by *Mycoplasma hyorhinis*: enhancement by protease treatment[J]. Infect Immun, 2010, 78(2): 611-617. DOI: 10.1128/IAI.01017-09

收稿日期:2013-06-27;修回日期:2013-08-06

## • 消息 •

### 《中国人兽共患病学报》逐步实现HTML全文上网

为方便读者浏览、查询及免费下载全文,自2013年第29卷第1期始,《中国人兽共患病学报》逐步实现HTML全文上网。读者可免费登陆本刊网站首页:www.rsghb.cn的读者在线浏览下载,内容包括中英文题目、中英文摘要、中英文关键词、中英文作者及单位、基金资助、DOI、参考文献、文章导读和HTML全文等。

读者即可根据需要选择本刊期数进行下载,欢迎广大读者登陆主页下载。