

• 动物及兽医生物技术 •

基于可见光测定的山羊支原体山羊肺炎亚种抗原定量

葛家振, 高鹏程, 田彤彤, 吴晓妮, 李倩倩, 田可昕, 宋国栋, 郑福英*, 储岳峰*

中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000

葛家振, 高鹏程, 田彤彤, 吴晓妮, 李倩倩, 田可昕, 宋国栋, 郑福英, 储岳峰. 基于可见光测定的山羊支原体山羊肺炎亚种抗原定量[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4874-4886.

GE Jiazhen, GAO Pengcheng, TIAN Tongtong, WU Xiaoni, LI Qianqian, TIAN Kexin, SONG Guodong, ZHENG Fuying, CHU Yuefeng. Quantification of antigen of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* by optical assay[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4874-4886.

摘要: 山羊支原体山羊肺炎亚种(*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp)是山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)的病原, 可用灭活疫苗和荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)间接血凝试剂进行预防和血清学检测, 但高昂的培养成本和复杂的抗原定量一直困扰着生产人员。为解决生产实际中出现的这些问题, 本研究基于 Mccp 代谢组学的前期理论基础, 通过改变初始 pH 值的方法, 初步筛选出初始 pH 值为 7.8 的可以同时提高 2 种抗原产量的糖发酵培养基。利用紫外可吸收光谱可识别酚红, 以及十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)可与阴离子荚膜多糖结合的理论依据, 建立了利用紫外光谱分析 Mccp 达到的培养阶段, 以及利用 CTAB 沉淀法相对定量发酵液荚膜多糖抗原产量的方法。通过紫外图谱观察的方法可对应 Mccp 生长曲线进行指导生产, 大大节省传统颜色变化单位(color change unit, CCU)法的监测时间, 提高了肉眼观察方法的精确度。建立的 CTAB 沉淀法可在 5 h 内完成对 CPS 含量的监测, 与传统的差值法相比大大缩短了时间, 并且其准确度得到苯酚-硫酸法的验证。本研究优化的一种培养基和建立的两种相关性比较方法, 可有效降低 Mccp 生产成本, 提高生产效率, 这些方法已在本实验室的研究阶段得到应用, 为进一步改进 CCPP 灭活疫苗和荚膜多糖的生产工艺以及快速定量提供了实验数据。

关键词: 山羊支原体山羊肺炎亚种; 改良培养基; 荚膜多糖; 紫外图谱; CTAB 沉淀法

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1800704, 2022YFD1302101); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2021-LVRI)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800704, 2022YFD1302101) and the Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2021-LVRI).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Fuying, zhengfuying@caas.cn; CHU Yuefeng, chuyuefeng@caas.cn

Received: 2023-03-06; Accepted: 2023-05-16; Published online: 2023-05-31

Quantification of antigen of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* by optical assay

GE Jiazhen, GAO Pengcheng, TIAN Tongtong, WU Xiaoni, LI Qianqian, TIAN Kexin, SONG Guodong, ZHENG Fuying*, CHU Yuefeng*

State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) is the cause of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in goats. Inactivated vaccines and capsular polysaccharide (CPS) indirect hemagglutination reagents are available for prevention and serological detection, but high culture costs and complex antigen quantification have been plagued by production staff. In order to solve these problems in production practice, a sugar fermentation medium with an initial pH value of 7.8, which could improve the production of two antigens simultaneously, was screened out by changing the initial pH value based on previous Mccp metabolomics analysis. Since phenol red can be identified by UV absorption spectrum and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) can bind to anionic capsular polysaccharide, a UV spectrum measurement method for analyzing the culture stage reached by Mccp and a CTAB precipitation test for relative quantification of capsular polysaccharide antigen content in the fermentation broth were established. The UV spectrum observation method can guide the production of Mccp according to the growth curve of Mccp, which greatly reduces the monitoring time of the traditional CCU method and improves the accuracy of the original eye-observation method. The established CTAB precipitation test can complete the monitoring of CPS content within 5 hours, which greatly reduces the time required compared with the traditional differential technique, and its accuracy was verified by the phenol-sulfuric acid method. The optimized culture medium and the two correlation comparison methods established in this study can effectively reduce the production cost of Mccp and improve the production efficiency. The two assays have been used in the research at our laboratory, which provides experimental data for further improvement of the production process of CCPP inactivated vaccine and capsular polysaccharide as well as rapid quantification.

Keywords: *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*; modified culture-medium; capsular polysaccharide; ultraviolet spectrum; CTAB precipitation method

山羊支原体山羊肺炎亚种 (*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, Mccp) 引起山羊传染性胸膜肺炎 (contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)^[1], CCPP 被我国列为二类动物疫病^[2], 世界动物卫生组织 (World

Organization for Animal Health, WOAH) 法定报告疾病^[3]。CCPP 发病率、死亡率高, 对山羊养殖业危害严重, 近年来还出现感染藏羚羊和阿拉伯羚羊等的报道^[4]。有效防控 CCPP 是健康养羊亟待解决的问题。

我国现行的预防 CCPP 的方法是接种 Mccp 制备的灭活疫苗,目前实现商业化的监测 CCPP 流行和评价疫苗免疫保护水平的只有间接血凝试剂盒^[5]。目前 Mccp 的培养存在着生产效率有待提高、生长阶段不好判断、抗原定量繁琐等问题,这使得 Mccp 的疫苗和诊断试剂的生产成本较高。因此,需要开发提高抗原量、易于判断培养阶段、快速定量抗原含量的方法,以便优化 Mccp 生产工艺,降低生产成本。

Mccp 培养基由于清澈透明没有细菌常见的易于浑浊的现象,必须加入酚红作为指示剂指导培养。酚红颜色改变源于 pH 值的变化,已被用于多个领域,例如:丝虫病的诊断、细胞培养产生的过氧化氢的测量等^[6-7]。十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)作为阳离子表面活性剂其浓度超过临界胶束浓度时可以和阴离子荚膜多糖上的自由电荷发生中和反应,导致持续集聚,形成足够大的颗粒散射可见光^[8],而 Mccp 荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)已经被证明是一种阴离子多糖^[9]。因此利用可见光在培养基中检测 Mccp 培养状态和定量 CPS 在原理上是可行的。

本研究利用本实验室已优化的 Mccp 糖发酵培养基作为基础^[10],通过改变 pH 的方式进行培养,检测其生长曲线,按照疫苗制备方式制备全菌抗原后测算蛋白浓度,利用差值法测算培养基中荚膜多糖的含量后挑选出更适合的发酵培养基。以此培养基为基础,建立了测量紫外可见光图谱并分析与 Mccp 培养阶段之间的关系,用于指导 Mccp 培养,并初步建立了利用 CTAB 沉淀法相对定量 CPS 抗原的方法,通过与农业行业标准 NY/T 1676—2008 推荐的苯酚硫酸法相对比^[11],发现具有较高符合率,为进一步改进 CCPP 灭活疫苗、荚膜多糖间接血凝试剂的生产工艺和快速定量提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

PPLO Broth 购自 BD 公司;丙酮酸钠购自 Macklin 公司;灭活马血清购自 Gibco 公司;酚红购自 Sigma 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪科技股份有限公司;CTAB 购自源叶公司;无水葡萄糖标准品购自 Solarbio 公司。青霉素、酵母浸出液、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)显色液、无水乙醇、氯化钠、苯酚、浓硫酸、酒石酸钠钾、2-溴乙胺氢溴酸盐(2-bromoethylamine Hydrobromide, BEA)和硫代硫酸钠等均为国产分析纯试剂。UV-2550 紫外可见分光光度计购自岛津公司;酶标仪购自 Bio-Rad 公司;超微量紫外分光光度仪购自 DHS 公司。

1.2 菌株和培养基

山羊支原体山羊肺炎亚种 M1801 株与 M1601 株由中国农业科学院兰州兽医研究所动物疫病防控全国重点实验室保存, M1801 毒力强于 M1601^[12]。种子培养基:改良 Thiaucourt's 肉汤(modified Thiaucourt's broth, MTB)培养基配方:PPLO broth (21 g/L)、25%酵母浸出液(100 mL/L)、丙酮酸钠(2 g/L)、葡萄糖(2 g/L)、1%酚红(2.5 mL/L)、马血清(200 mL/L)、青霉素(20 万 IU/L),用 1 mol/L NaOH 将 pH 调至 7.8 左右。糖发酵培养基(GMTB):在 MTB 培养基中将葡萄糖添加至 4 g/L^[10]。

1.3 菌液的培养

将冻存的 Mccp M1801 和 M1601 菌株与培养基以 1:9 的比例接种于 4.5 mL 种子培养基,置于 37 °C 培养箱静置复苏。待培养基变黄后,分别传代 3 次,待其生长稳定之后,将菌液接种于糖发酵培养基,37 °C 静置培养。

1.4 pH 值测定

在培养 0、12、24、36、48、60、72、84、

96、108、120、132、144 h 时取菌液 3 mL, 加入 15 mL 离心管内, 用 pH 计测定菌液的 pH 值, 对糖发酵培养基的菌液设置 7.4、7.8、8.2 这 3 种初始 pH 值进行测算。

1.5 生长曲线的测定

测定菌液的颜色变化单位(color change unit, CCU), 然后取 1 mL 菌液稀释到 10^3 CCU/mL, 接种至 600 mL 培养基中, 培养基与培养瓶体积比为 3:5, 对待测菌液 0、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h 的样品进行 CCU 测定。取高压蒸汽灭菌后的 qPCR 连管放入 96 孔 PCR 架, 每孔分装 180 μ L 培养基, 在第 1 孔加入 20 μ L 待测菌液吹打均匀后, 吸取 20 μ L 加入第 2 孔, 依次重复以上操作至第 12 孔, 留 1 列培养基作空白对照, 每个时间点设 4 个平行孔, 37 $^{\circ}$ C 温箱静置培养, 每天观察培养基颜色变化, 直至颜色不改变为止, 查 MPN 表计算待测菌液的生长滴度, 用 CCU 表示, 以取样时间点为横坐标, \log_{10} CCU 为纵坐标, 绘制生长曲线, 每种样品做 3 次生物学重复取平均值。对糖发酵培养基的 M1601 和 M1801 的菌液进行了测算。具体来说, 选取初始 pH 值分别为 7.4、7.8 和 8.2 的培养基进行实验。

1.6 模拟 Mccp 灭活疫苗全菌抗原制备及蛋白浓度测定

将 2.04 g BEA 加入至 100 mL 的 0.175 mol/L 的 NaOH 里, 放置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅平衡, 每 20 min 摇晃一次, 共 3 次, 之后取每个时间点的菌液 10 mL 于离心管内, 用 0.01 mol/L PBS 清洗 3 遍, 浓缩 100 倍后灭活。平衡结束后用 0.22 μ m 的滤器过滤, 取 4 μ L BEI 加入 100 μ L 菌液中, 37 $^{\circ}$ C 温育 24 h 后配制 4.96 mg 硫代硫酸钠阻断灭活。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定对应样品蛋白浓度。以取样时间点为横坐标, 菌液蛋白浓度为纵坐标, 绘制蛋白浓度曲线。

1.7 培养液荚膜多糖含量的测定

苯酚-硫酸法测定 Mccp 荚膜多糖粗制品总糖量: 参照农业行业标准《食用菌中粗多糖含量的测定》进行实验^[11](有改进)。精准称取无水葡萄糖 50 mg 至 50 mL 离心管, 用三蒸水定容至 50 mL, 再取 5 mL 定容至 50 mL, 配制成 0.1 mg/L 的标准品溶液。以 5:1 的比例将浓硫酸加入 5% 的苯酚中配制成显色液。分别吸取 0、10、20、30、40、50、60 μ L 的标准葡萄糖溶液加入 1.5 mL 离心管中, 加三蒸水补齐至 100 μ L。之后分别加入 300 μ L 的显色液, 800 r/min、100 $^{\circ}$ C 金属浴 25 min。反应结束后水浴至 40 $^{\circ}$ C, 每孔 100 μ L 加入稀释板, 490 nm 处测定吸光度值, 以三蒸水为空白对照, 以横坐标为葡萄糖浓度, 纵坐标为吸光值, 绘制标准曲线。每个时间点各取 10 mL 菌液, 三蒸水清洗除酚红后, 加入 4 倍体积无水乙醇过夜沉淀多糖, 用 1 mL 三蒸水重悬, 取 100 μ L 混悬液, 加入显色液 300 μ L, 其余操作同上。

DNS 法测定 Mccp 荚膜多糖粗制品中还原糖的含量: 以三蒸水配制浓度为 0.1 mg/mL 的无水葡萄糖标准品溶液, 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 分别置干燥具塞试管, 加三蒸水补至 2 mL, 分别加入 DNS 显色液 2 mL, 混匀置沸水浴 5 min 后取出, 流水冷却至室温, 加入三蒸水 9 mL, 摇匀。520 nm 处测定吸光度值, 绘制标准曲线。还原糖含量测定: 取上述除酚红后的样品液 2 mL, 分别加入 DNS 试剂 2 mL, 其余操作同标准曲线的操作, 520 nm 处测定吸光度值。

荚膜多糖含量计算: 按“苯酚-硫酸法”计算得出的总糖含量减去“DNS 法”计算得出的还原糖含量即可得出荚膜多糖的含量。

1.8 各时间菌液紫外可见光图谱的测定

取 10 mL 各时间段的菌液利用紫外分光光度

仪进行 400–600 nm 吸光范围的测定, 每时间点菌液测 3 次, 利用未加酚红的培养基为对照, 导出数据利用 Origin 软件分析数据并绘制图谱。

1.9 CTAB 沉淀 Mccp 多糖发酵液相对定量方法的初步建立

去除培养液中的酚红: 利用张向飞等^[13]的方法去除培养液中的酚红。将培养液经 3 kDa 的超滤管进行超滤浓缩至原体积的 1/2; 向超滤浓缩后的培养液中加入 2 倍体积的三蒸水; 之后向培养液中加入 5% (体积分数) 的 Triton X-114, 4 °C 水浴振荡 1 h 后立即放入 37 °C 水浴锅中静置 1 h, 室温 10 000 r/min 离心 30 min; 吸出上清液, 上清液即是所得样品液。

CTAB 沉淀法测量各时间发酵液多糖相对含量的吸光值曲线: 将去除酚红的发酵液经 12 000 r/min 离心 30 min, 去除菌体, 取上清液。加入 4 倍体积的无水乙醇, 4 °C 静置 1 h, 离心取沉淀。加入所取上清液 1/10 体积的去离子水, 振荡溶解, 即制得样液。之后配制 0.2 μg/mL 的 NaCl 溶液, 用其配制 25 mg/mL 的 CTAB 溶液。取样品 50 μL 加入等体积的 CTAB 试剂 37 °C 反应 15 min, OD_{405} 处测定吸光度的值。绘制各时间荚膜多糖相对含量和吸光度相关的曲线, 并与上述“1.7”的方法测出的荚膜多糖含量利用 Origin 软件进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 pH 测定结果

测定 3 种初始 pH 的糖发酵培养基以上 13 个时间点的 pH 变化, 发现当初始 pH 值较高时其生长阶段中的 pH 变化很小, 当初始 pH 较低时其生长阶段中 pH 变化较大, 其中在初始 pH 为 7.4 和 7.8 的 2 组中可以明显看出 M1801 株的 pH 值下降速度要快于 M1601 株(图 1) ($P < 0.01$)。

2.2 生长曲线的测定

根据支原体颜色改变单位测定规范以及

MPN 表得出 2 株菌在 3 个初始 pH 梯度下的生长曲线。测定这 13 个时间点的 CCU 后发现在同一初始 pH 环境下 M1801 总是较 M1601 更快进入平台期, 更快进入衰退期(图 2), 这与实验

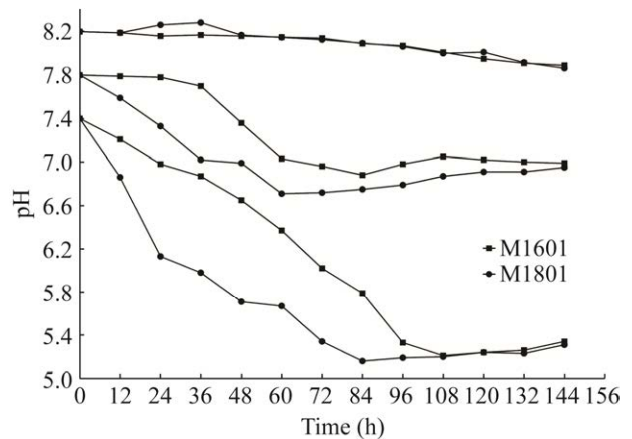


图 1 M1801 与 M1601 在初始 pH 7.4、pH 7.8、pH 8.2 的 GMTB 培养基中 pH 值变化曲线

Figure 1 Three sets of pH curves of two Mccp strains, M1601 and M1801, with initial pH values of 7.4, 7.8, or 8.2, were shown.

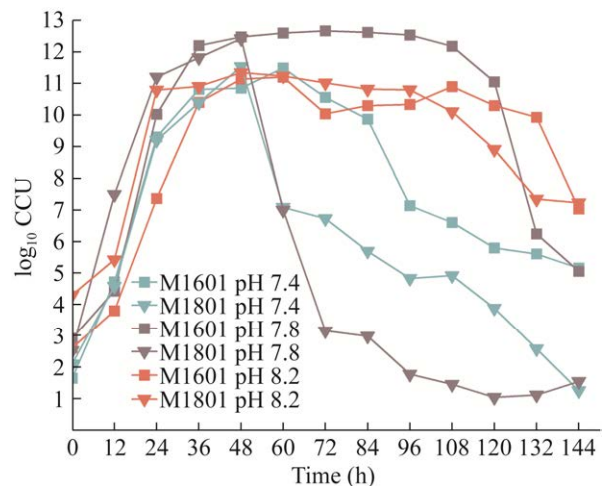


图 2 M1601 和 M1801 在初始 pH 7.4、pH 7.8、pH 8.2 的 GMTB 培养基中的 \log_{10} CCU 变化曲线

Figure 2 Growth curves of strains M1601 and M1801 at initial pH values of 7.4, 7.8, or 8.2. Experimental data are shown as the mean of three biological replicates.

室前期^[10]发现的一致,并且发现在 pH 7.8 的初始 pH 环境里 M1801 的生长滴度可达到 1.4×10^{11} – 2.67×10^{12} CCU/mL,比其他初始 pH 环境的生长滴度高一个数量级($P < 0.001$)。M1601 株也出现了相同的趋势,在初始 pH 为 7.8 的环境里生长滴度达到 1.07×10^{10} – 4.67×10^{12} CCU/mL,显著高于($P < 0.001$)其他初始 pH 环境的滴度。本研究测出的初始 pH 为 7.4 的环境里的生长滴度要高于实验室前期^[10]的研究结果,这可能是利用八连管的测定方式相较于细胞培养板提供了较高的 CO₂ 浓度更有利于 Mccp 的生长。

2.3 模拟 Mccp 灭活疫苗生产的全菌抗原蛋白浓度测定

测定 3 个 pH 梯度 13 个时间点的灭活之后的 M1601 和 M1801 全菌抗原蛋白浓度。如图 3 所示,初始 pH 为 7.8 的培养基发酵产生的蛋白质含量最高(M1601、M1801 分别为 3.299 mg/mL 和 2.790 mg/mL),且产量最高点相互差异极显

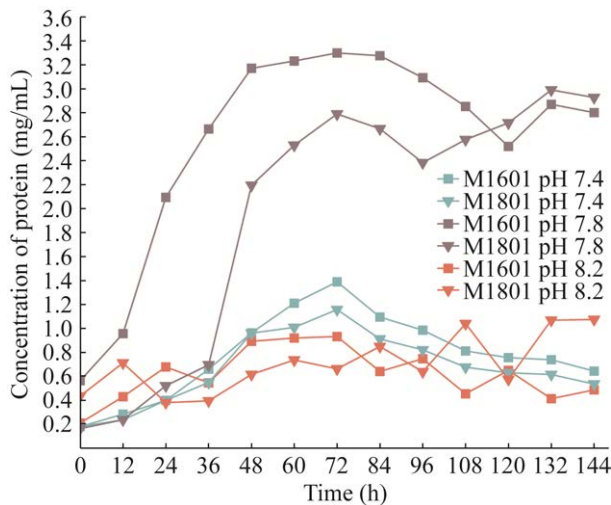


图 3 M1601 和 M1801 在初始 pH 7.4、pH 7.8、pH 8.2 的 GMTB 培养基中的灭活后蛋白浓度变化曲线

Figure 3 Curves of protein concentration after inactivation of strains M1601 and M1801 in GMTB medium with three initial pH gradients: 7.4, 7.8, or 8.2.

著($P < 0.001$)。该结果表明培养基的初始 pH 值影响 Mccp 的生长速度从而影响蛋白质的合成,与 Strobel 等^[14]研究结果相符。

2.4 不同初始 pH 培养基荚膜多糖含量的测定及曲线绘制

有文献报道培养基的初始 pH 值改变会导致荚膜多糖产量的变化^[15],本研究得到类似的结果。如图 4 所示,初始 pH 为 7.8 时 2 株 Mccp 的荚膜多糖产量较其他 pH 高,M1601 株最高在 120 h 时达到 101.11 mg/L,M1801 株最高在 48 h 达到 79.62 mg/L。同时也可在图 4 中看出偏碱的初始 pH 值的环境不适合 Mccp 产生荚膜多糖。图 4 中所示的 M1801 株 CPS 产量在 48 h 达到最大后出现了波浪起伏,这可能是菌体自溶后释放出细胞膜上的荚膜多糖又供给活菌利用之后又自溶释放,如此反复导致的。这在生长速率变化快的 M1801 株上较为明显,而 M1601 株的生长速率变化较缓、平台期较长,导致进入衰退期时已经缺少供活菌生长的空间,

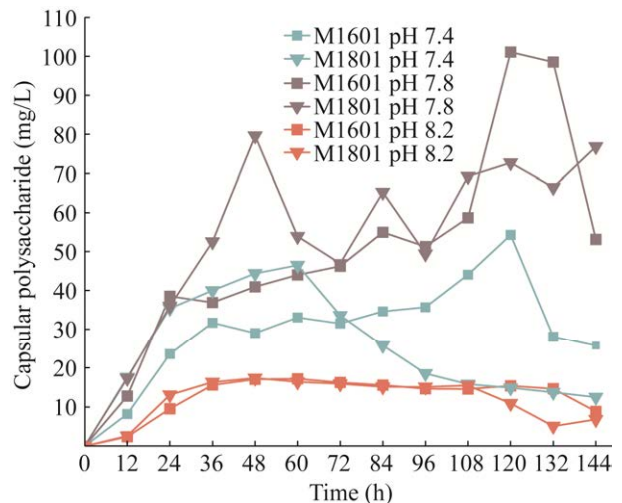


图 4 M1601 和 M1801 在初始 pH 7.4、pH 7.8、pH 8.2 的 GMTB 培养基中荚膜多糖产量变化曲线

Figure 4 Capsular polysaccharide production curves of strains M1601 and M1801 in GMTB medium with three initial pH gradients: 7.4, 7.8, or 8.2.

本身 M1601 株的糖酵解速率就低于 M1801 株, 因此没有出现荚膜多糖产量起伏的现象, 当培养基内活菌滴度下降到一定数量级时, 这种起伏便会越来越缓最后趋于稳定。

2.5 初始 pH 7.8 的糖发酵培养基的紫外可见光图谱的绘制

拟合系数 R^2 通常用作预测模型解释变量方差的比例的参数。本研究以 R^2 为工具, 测定可见光谱吸光度, 即酚红吸光曲线在实验 144 h 内每隔 12 h Mccp 逐渐生长时的变化, 以评估其潜在的可用于区分 Mccp M1601 和 M1801 两株山羊支原体山羊肺炎亚种的 GMTB 培养基的培养光谱特征。图 5A 显示了对照样品在只改变 H^+ 离子水平时的紫外可见光图谱, 其 pH 值在 7.8 和 5.6 之间。pH 7.8 代表了培养基原始 pH 值, 而 5.6 的 pH 值是改变 H^+ 离子水平后 pH 酸化的结果。酚红指示剂在 pH 6.8–8.0 之间正常显色, 图 5A 中的可见光图谱显示在 GMTB 培养基中也基本符合这一规律。图 5B 显示了在 560 nm 处吸光度和 pH 值之间的线性关系拟合系数 R^2 为 0.988 5, 这证明了酚红在该培养基中的颜色变化符合线性关系(注: 没有测算超出酚红显色范围的数据)。图 5C 显示了 R^2 与波长在 400–600 nm 之间关系的光谱图(注: 没有测算超出酚红显色范围的数据)。从图 5C 中可以看出, 在 491–599 nm 波长范围内, 吸光度与 pH 值之间有很高的线性关系($R^2 > 0.97$)。

图 6A 和 6B 分别表示 M1601 和 M1801 两株支原体在 144 h 内每隔 12 h 测定的紫外吸收图谱。所有光谱的吸收峰主要都位于 560 nm 附近, 和对照样品相似, 次峰都位于 436 nm 左右。可以看出 M1601 株和 M1801 株的紫外图谱存在差异, M1601 株的曲线相较于 M1801 株更为紧凑, pH 为 7.8 时的最高点 M1601 株也低于 M1801 株, 560 nm 处 M1601、M1801 分别为

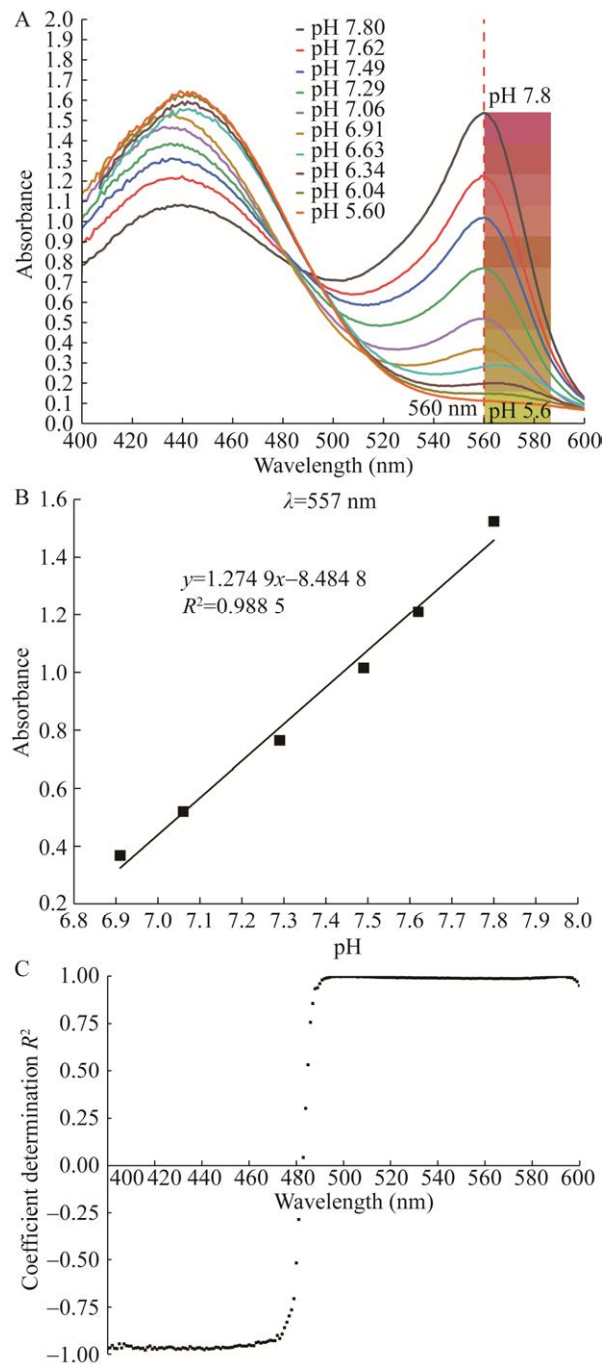


图 5 对只改变 H^+ 浓度的对照培养基的紫外图谱分析
Figure 5 Analysis of the UV profile of the control medium in which only the H^+ concentration was changed. A: UV-vis spectra of phenol red of control medium at different pH values. B: Linear regression between absorbance and pH at a wavelength of 560 nm. C: Graph of the coefficient determination R^2 versus wavelength (nm). The red data point represents the highest value of R^2 recorded at a wavelength of 560 nm.

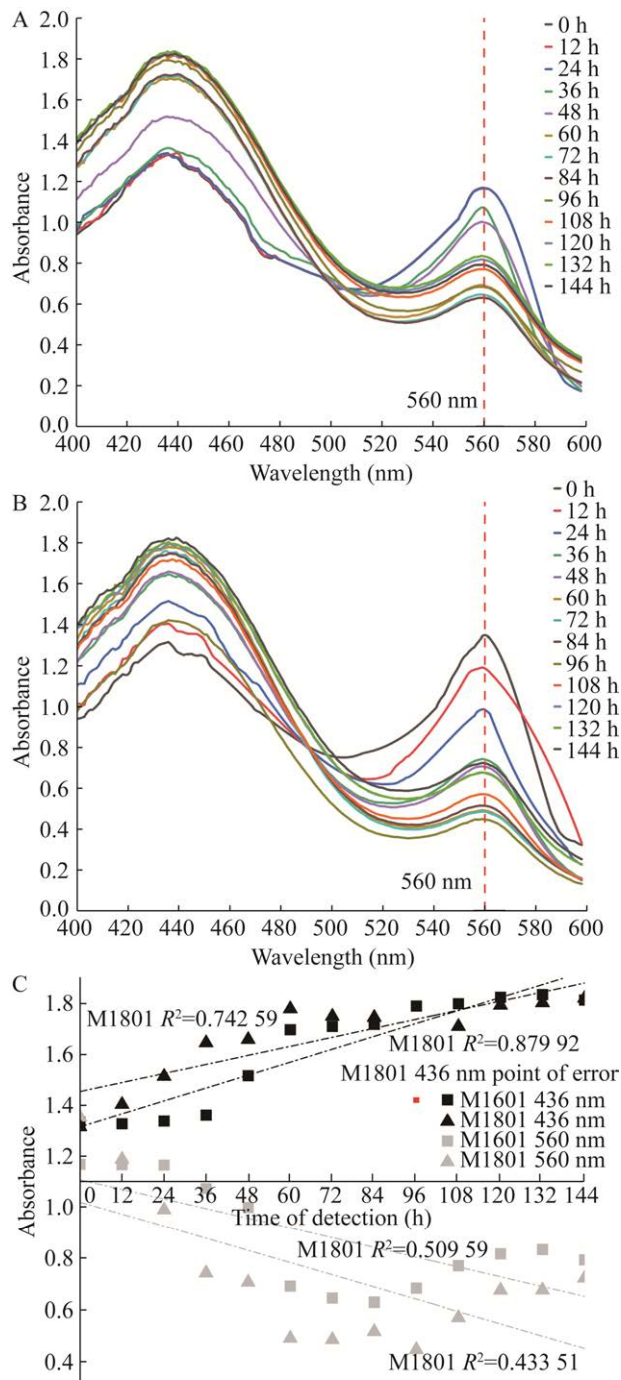


图 6 对 M1601 和 M1801 不同时间段培养液进行的紫外图谱分析

Figure 6 Analysis of the UV profiles performed on M1601 and M1801 cultures. The UV absorption patterns of strain M1601 (A) and M1801 strain (B). C: The coefficient of determination of the two peaks of the two mycoplasma strains, where the M1801 436 nm was not included.

1.168 6 和 1.342 6。图谱显示在较长的时间点上吸光度普遍增加，这种增加可能是细菌集聚过多所致。但在整个实验过程中培养基颜色遵循从粉红到黄色的变化，这表明不仅仅是酚红在导致吸光度变化，还有其他的影响因素。这一结论与 Amran 等^[16]在细胞培养基上发现的一致。这导致如图 6C 所示的酚红峰值光吸收度的 R^2 没有明显规律性，不过在正常生长的时间段内峰值的光吸收值还是具有良好的指导培养的意义。而 436 nm 的次峰吸收度 R^2 却表现出了良好的线性关系，这也可侧面反映导致吸光度变化的不仅仅是酚红。M1601 尤为明显，通过 436 nm 处产生的 R^2 结合 M1601 的生长曲线可得知，生长变化幅度较小的菌株其 436 nm 的波长与生长的时间趋近于正相关。而 M1801 由于生长速率变化过快，其 436 nm 处吸光度变化更大， R^2 值较稳定生长的菌株小。

图 7 显示了 2 株支原体在 400–600 nm 范围内时间与吸光度的 R^2 值与检测波长之间的关系。从图 7 中可以看出，M1601 的酚红光谱始

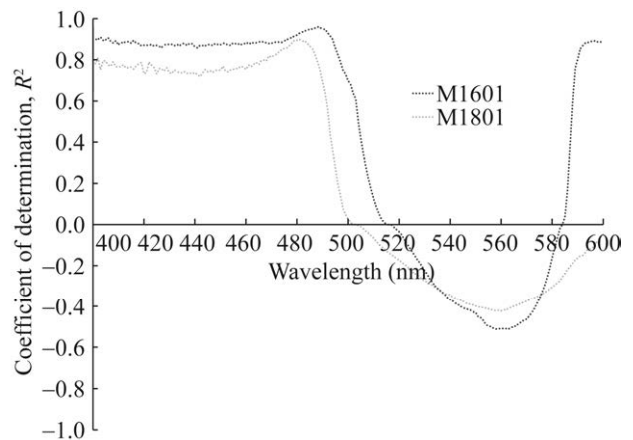


图 7 M1601 和 M1801 在 400–600 nm 范围内时间与吸光度的 R^2 值与检测波长之间的关系

Figure 7 Correlation between the R^2 values of time and the absorbance and detection wavelength in the range of 400 to 600 nm for strains M1601 and M1801.

终显现出高于 M1801 的 R^2 。这说明,由于 M1801 和 M1601 的生长速率差异, M1801 的培养基颜色改变迅速, 线性关系差, 生长速率变化较缓的 M1601 株和 M1801 株的特征紫外光谱之间存在差异。Amran 等将其归结为大型细胞器的增多导致光吸收值的增加^[16]。Amran 等使用贴壁细胞作为研究对象, 随着细胞增多或者由于癌细胞的细胞器较大等原因造成 435 nm 处光吸收值增加。贴壁生长的微生物比悬浮生长的支原体测量误差小, 从图 7 可以看出, M1601 的图谱基本符合 Amran 等和本次研究的推测, 但 M1801 96 h 时出现了一个极不符合规律的图谱, 这很大可能是取样巧合地避开较多悬浮生长的支原体所致。

2.6 CTAB 沉淀法对选定的发酵培养基荚膜多糖含量的测定

图 8A 显示了利用 CTAB 沉淀法对发酵培养基各时间点与 OD_{405} 相关的曲线。可以看出 M1601 和 M1801 的 OD_{405} 和时间的关系曲线与图 4 测出的荚膜多糖曲线高度相似。于是将 OD_{405} 处的吸光度值与标准推荐的苯酚硫酸法测出的数值建立相关性分析散点图(图 8B、8C), 使用 Origin 软件对散点图拟合, 发现测出的荚膜多糖含量与 OD_{405} 呈一定的线性相关。M1601 的线性拟合 R^2 为 0.861 45, 且比与 M1801 相同的荚膜多糖含量处的 OD_{405} 值要高, 这表示 M1601 的荚膜多糖电荷密度比 M1801 荚膜多糖高。M1801 的线性拟合 R^2 达到了 0.949 85, 引起差异的原因可能是微量酚红以及其他杂质对吸光值的干扰。

3 讨论与结论

本研究培养基的改良基于实验室先前的代谢组学研究^[10], 根据 Mccp 在对数中期和末期乳酸堆积导致 H^+ 增多这一现象, 沿用通过增加

葡萄糖含量提高 Mccp 的糖酵解效率, 弥补糖异生效率下降影响生长的 GMTB 培养基思路。又由于支原体缺少细胞壁, 因此 pH 对支原体的影响可能比细菌更大, 当出现乳酸堆积现象时, 培养基 pH 下降过快导致细菌滴度较低。本实验室在培养基中添加 20 mmol/L HEPES 缓冲剂后提高了蛋白浓度, 延长了平台期, 提高了活菌滴度, pH 下降速率被缓解^[10]。HEPES 缓冲剂的作用是吸收 CO_2 、 HCO_3^- 释放的 H^+ 延缓 pH 下降, HEPES 缓冲介质可抵抗 pH 急剧变化, 但不能完全阻止 pH 变化, 在 pH 6.8–8.2 的范围内显现出良好的效果。而高糖培养基的糖酵解效率的增加导致发酵产酸相应增加, pH 下降更快, 实验室前期开发的 HMTB 培养基 pH 最后下降到 6.2, 而支原体培养基 pH 下降到 6.5 后活菌会大量死亡^[17], 这也说明其使用的初始 pH 值为 7.4 的培养基不能为 HEPES 缓冲液发挥作用提供稳定的环境。因此本研究旨在找出一个可以满足 HEPES 缓冲剂发挥稳定缓冲作用的初始培养基 pH 值, 使最终的 pH 值落在 HEPES 缓冲剂稳定工作的范围内。本研究通过筛选 3 个初始 pH 梯度的 GMTB 培养基, 发现初始 pH 为 7.8 的培养基可以满足 HEPES 缓冲剂的工作条件同时也提高了抗原产量。由于目前 Mccp 的防控和诊断主要依赖 Mccp 全菌蛋白和荚膜多糖, 对 2 株 Mccp 进行了模拟灭活疫苗抗原的制备和荚膜多糖的粗提后, 发现初始 pH 为 7.8 的培养基可以满足蛋白和荚膜多糖产量的双提升。实践证明使用基于代谢组学的生长代谢相关基因分析后验证靶向能量代谢, 再验证代谢差异, 最后到实际模拟生产的这一思路是可行且高效的, 为进一步改良 GMTB 培养基、优化生产工艺提供了必要条件。本研究在测量 Mccp 生长曲线时出现了初始 pH 为 7.4 培养基的活菌滴度高于之前实验室

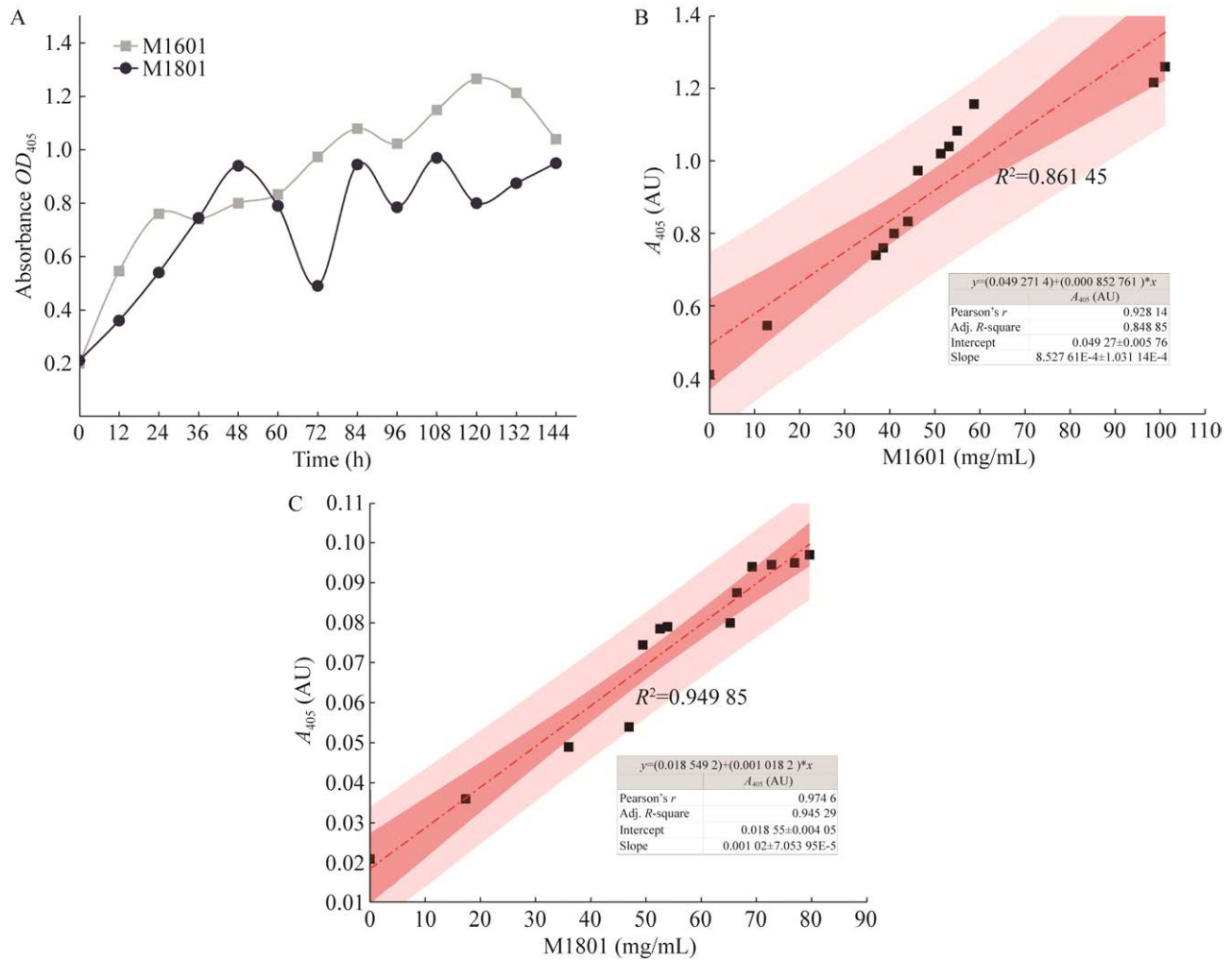


图8 CTAB沉淀法相对定量Mccp CPS含量的分析

Figure 8 Analysis of CPS content in Mccp for relative quantification by CTAB precipitation. A: The relationship between OD_{405} absorbance measured by CTAB precipitation method and the time of each measurement. B: The linear relationship between capsular polysaccharide content and OD_{405} absorbance of strain M1601. C: The linear relationship between capsular polysaccharide content of strains M1801 and OD_{405} absorbance. The red area is the 95% confidence interval, and the pink area is the 95% prediction interval.

测量的数据^[10],这是因为在实际测量中发现细胞培养板在温箱长时间存放时总会有微量的水分蒸发导致活菌死亡提前,说明该方法不能很好地提供实际培养时的密闭环境,为此本研究使用qPCR连管替代细胞培养板,这样既提供了接近于实际培养瓶的生长环境,使活菌滴度更真实地反映实际情况,同时也降低了成本。当然,本研究的培养基并非兼容CPS产量和蛋

白浓度的Mccp最佳培养基,后续实验中还将进行下一步优化发酵培养基并进行免疫原性和反应原性分析,对改良培养基的有效性进行检验。

本研究利用改良GMTB培养基培养了2株Mccp,制作了400–600 nm的可见光紫外图谱,由于培养基中的酚红吸光度随着pH的改变而改变,可作为潜在的区分Mccp不同株的比色

试剂。对培养的两株 Mccp 连续 144 h 的可见光谱进行分析, 显现出不同的特征。这种差异主要是由于 M1801 酸化更快导致的, 多名学者指出支原体乳酸氧化生成 H_2O_2 的能力是支原体毒力强弱的关键^[18-19], 因此推测, Mccp 可能有一种类似的途径产生毒力。乳酸化能力的高低很可能代表 Mccp 毒力的强弱, 本研究发现强毒株 M1801 的酸化能力强于 M1601, 符合这一推断, 不足的是目前还没有关于 Mccp 毒力强弱和乳酸化相关的详细解读。但目前可以利用这种差异使用紫外图谱对培养进行监测, 在相应的培养时间显现出不同的紫外图谱, 这相比利用 CCU 或者菌落形成单位(colony forming units, CFU)的计数方法监测 Mccp 培养大大减少了操作流程和时间成本。紫外图谱判断法是一种利用已测量的培养图谱快速判断 Mccp 生长阶段的方法。这种方法比 pH 判断法受到的干扰因素少, 因为 Mccp 生长后期的 pH 值不能反映出实际培养阶段。同样由于各种菌株的生长速度、产酸能力差异, 利用图谱对 Mccp 不同菌株进行抗原诊断也具有一定的潜力。

由于 CPS 结构的多样性, 人们为寻找某一信号强度与 CPS 的化学结构之间的联系付出了巨大努力, 目前发现唯一与浊度有统计学意义 ($P < 0.01$) 相关性的是糖的电荷密度, 较高的电荷密度增加了 CTAB 与阴离子结合的协同性^[20]。Lundqvist 等发现, CTAB 与直链淀粉的结合为协同型, 与支链淀粉的结合为 Langmuir 型, 不同类型淀粉多糖均能结合^[21]。罗毅峰发现, 利用 CTAB 沉淀法与多糖反应在 OD_{400} 的吸光度上观察具有一定相关关系^[22], 而 Aaron 等更是利用高纯度的商品化荚膜多糖建立了高通量检测定量 CPS 的方法^[23]。Aaron 等^[23]认为在更高的吸光度读取 OD 值会减少误差, 本研究利用 CTAB 和酸性阴离子荚膜多糖产生沉淀的原理,

利用 Aaron 等^[23]的理论基础建立了一种可直接在发酵阶段快速相对定量 CPS 产量的比浊方法, 通过与传统苯酚-硫酸差值法进行比较发现具有良好的应用价值。而在之前本实验室比较了多种测总糖的方法, 如蒽酮-硫酸法、硫酸-咔唑法, 最后发现, 改进的苯酚-硫酸法^[24]测总糖最为稳定, 与杨勤等^[25]的结果一致。同时也尝试过多种去除单糖影响的方法, 如超滤法和透析法, 但都因为时间耗费长, 成本比较高, 并不优于 DNS 法而没有使用。与行业标准推荐的苯酚硫酸法相比对, 在 M1601 株上应用时 $R^2 > 0.86$, 在 M1801 上应用时 $R^2 > 0.94$, 具有在生产实际中作为参考的价值。

综上所述, 本研究利用实验室的代谢组学基础成功优化出一种更适 pH 的 GMTB 发酵培养基, 并发现紫外图谱分析方法和优化后的培养基联用可以积极指导 Mccp 疫苗生产, 优化生产过程, 并具备诊断潜力。以此培养基为基础初步建立了一种利用 CTAB 沉淀法直接测量发酵液相对定量 Mccp 两株支原体 CPS 的方法, 只需 5 h 即可完成测算, 大大缩短传统差值法测算 CPS 含量的时间。以上研究为进一步改进 CCPV 灭活疫苗、荚膜多糖间接血凝试剂的生产工艺和快速定量提供了实验数据。

REFERENCES

- [1] 储岳峰. 我国山羊(接触)传染性胸膜肺炎病原学、流行病学研究及灭活疫苗的研制[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2011.
CHU YF. Etiology and Epidemiology of infectious pleuropneumonia in goats (contact) in China and development of inactivated vaccine[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese).
- [2] 中华人民共和国农业农村部公告, 第 573 号[EB/OL]. [2023-2-21]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202206/t20220629_6403635.htm.
- [3] Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial

- animals 2018. Contagious caprine pleuropneumonia. Chapter 3.7.4. 2018[EB/OL]. Available online: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.04_CCPP.pdf.
- [4] LIGNEREUX L, CHABER AL, SAEGERMAN C, MANSO-SILVÁN L, PEYRAUD A, APOLLONI A, THIAUCOURT F. Unexpected field observations and transmission dynamics of contagious caprine pleuropneumonia in a sand gazelle herd[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2018, 157: 70-77.
- [5] 郭晗. 山羊支原体山羊肺炎亚种的分离鉴定及其抗体间接血凝检测方法的建立[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2010.
- GUO H. Isolation and identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* and establishment of indirect hemagglutination assay for antibody detection[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese).
- [6] POOLE CB, LI ZR, ALHASSAN A, GUELG D, DIESBURG S, TANNER NA, ZHANG YH, EVANS TC, LaBARRE P, WANJI S, BURTON RA, CARLOW CKS. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP)[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0169011.
- [7] PICK E, KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture[J]. Journal of Immunological Methods, 1980, 38(1/2): 161-170.
- [8] LI Y, XU GY, WU D, SUI WP. The aggregation behavior between anionic carboxymethylchitosan and cetyltrimethylammonium bromide: MesoDYN simulation and experiments[J]. European Polymer Journal, 2007, 43(6): 2690-2698.
- [9] BERTIN C, PAU-ROBLOT C, COURTOIS J, MANSO-SILVÁN L, TARDY F, POUMARAT F, CITTI C, SIRAND-PUGNET P, GAURIVAUD P, THIAUCOURT F. Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 676-687.
- [10] 张晓亮. 山羊支原体山羊亚种与山羊肺炎亚种代谢特点比较[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
- ZHANG XL. Comparison of the metabolic characteristics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [11] 中华人民共和国农业部. 食用菌中粗多糖含量的测定: NY/T 1676—2008[S]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2008.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of crude mushroom polysaccharides: NY/T 1676—2008[S]. Beijing: Ministry of Agriculture, China, 2008 (in Chinese).
- [12] 蔡亚婷. 山羊支原体山羊肺炎亚种感染细胞和鸡胚方法的建立及应用[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2021.
- CAI YT. Establishment and application of a method for *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* infecting cell and chicken embryo[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2021 (in Chinese).
- [13] 张向飞, 张金龙, 李惠文, 王洁, 樊红柳, 赵峻. 一种去除细胞培养废液中酚红的方法: CN110241068B[P]. 2021-05-04.
- ZHANG XF, ZHANG JL, LI HW, WANG J, FAN HL, ZHAO J. Method for removing phenol red in cell culture waste liquor: CN110241068B[P]. 2021-05-04 (in Chinese).
- [14] STROBEL HJ, RUSSELL JB. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(11): 2941-2947.
- [15] KIM HO, LIM JM, JOO JH, KIM SW, HWANG HJ, CHOI JW, YUN JW. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*[J]. Bioresource Technology. 2005, 96(10): 1175-1182.
- [16] AMRAN EN, SUDIK S, OMAR AF, MAIL MH, SEENI A. Potential colorimetric detection of cancer cells using Phenol Red[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2019, 27: 380-384.
- [17] RODWELL AW, MITCHELL A. Nutrition, growth, and reproduction[M]//The Mycoplasmas. Amsterdam: Elsevier, 1979: 103-139.
- [18] MASUKAGAMI Y, de SOUZA DP, DAYALAN S, BOWEN C, O'CALLAGHAN S, KOUREMENOS K, NIJAGAL B, TULL D, TIVENDALE KA, MARKHAM PF, MCCONVILLE MJ, BROWNING GF, SANSOM FM. Comparative metabolomics of

Mycoplasma bovis and *Mycoplasma gallisepticum* reveals fundamental differences in active metabolic pathways and suggests novel gene annotations[J]. *mSystems*, 2017, 2(5): e00055-17.

- [19] FERRARINI MG, MUCHA SG, PARROT D, MEIFFREIN G, RUGGIERO BACHEGA JF, COMTE G, ZAHA A, SAGOT MF. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 108(6): 683-696.
- [20] HANSSON P, ALMGREN M. Interaction of C_n TAB with sodium (carboxymethyl) cellulose: effect of polyion linear charge density on binding isotherms and surfactant aggregation number[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, 100(21): 9038-9046.
- [21] LUNDQVIST H, ELIASSON AC, OLOFSSON G. Binding of hexadecyltrimethylammonium bromide to starch polysaccharides. Part I. Surface tension measurements[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2002, 49(1): 43-55.
- [22] 罗毅峰. 兽疫链球菌和猪链球菌 2 型荚膜多糖与圆环病毒 VLP 偶联研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2021.
- LUO YF. Study on The Conjugation of capsular polysaccharide of *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus suis* type 2 with porcine circovirus VLP[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] AARON N, AUSTIN B, RANGA G, NIGEL T, JONATHAN C, TARIT M. High throughput quantification of capsular polysaccharides for multivalent vaccines using precipitation with a cationic surfactant[J]. *Vaccine*, 2013, 31(48): 5659-5665.
- [24] YUE FF, ZHANG JR, XU JX, NIU TF, LÜ X, LIU MS. Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 963318.
- [25] 杨勤, 谷文超, 周浓, 张兰胜, 杨德全. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定地参多糖的比较研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(1): 343-350.
- YANG Q, GU WC, ZHOU N, ZHANG LS, YANG DQ. Comparison of phenol-sulfuric acid and anthrone-sulfuric methods for determination of polysaccharide in *Lycopus lucidus* Tilcz. var. *hirtus* Regel[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(1): 343-350 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)