

鸡毒支原体灭活抗原超滤浓缩工艺的研究

胡来根, 张小飞, 于漾, 尹秀凤, 薛家宾, 何家惠 (南京天邦生物科技有限公司, 江苏南京 211102)

摘要 [目的] 建立一套适合生产鸡毒支原体灭活疫苗的抗原浓缩工艺。[方法] 采用 Millipore 中型盒式超滤系统对鸡毒支原体灭活抗原进行超滤浓缩试验, 并利用紫外光度法测定不同倍数浓缩滤液的吸光度变化。[结果] 消毒液高压灭菌后无细菌污染, 超滤仪回流液循环后、抗原浓缩前后均无细菌污染。瑞氏染色后发现, 除尾液样品中无支原体外, 其他样品中均可见形态不规则、蓝色的支原体菌体。使用 100 K 超滤膜堆浓缩后, 支原体抗原无泄漏。溶液的吸光度随着浓缩倍数的增加而上升。原液浓缩 5、10、15 倍后, 吸光度分别增加了 0.718、1.281 5 和 1.464 5。[结论] 此次试验建立了适合于鸡毒支原体抗原超滤浓缩的生产工艺流程, 为鸡毒支原体疫苗及其多联疫苗的研制奠定了基础。

关键词 鸡毒支原体; 超滤浓缩; 抗原

中图分类号 S858.31 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)30-14725-02

Research on the Ultrafiltration and Concentration Technique for Inactivated Antigen of *Mycoplasma gallisepticum*

HU Lai-gen et al (Nanjing Tianbang Bio-industry Co., Ltd, Nanjing, Jiangsu 211102)

Abstract [Objective] The aim was to establish a set of antigen concentration technology for producing inactivated vaccine of *Mycoplasma gallisepticum*. [Method] The ultrafiltration and concentration experiment was carried out on the inactivated antigens of *M. gallisepticum* with Millipore medium boxy ultrafiltration system and the absorbance changes of filtrates concentrated for different times were determined by UV spectrophotometry. [Result] There was no bacterial contamination in disinfectant solution after autoclave sterilization and there was no bacterial contamination in return fluid in ultrafiltration instrument after cycling, before and after antigen concentration. It was found after Wright's staining that except that there was no mycoplasma in the sample of tail liquid, there were blue mycoplasma thalli with irregular shapes appeared in the other samples. After concentration with 100 K ultrafiltration membrane stack, there was no mycoplasma antigen leaked. The absorbance of the solution was increased as the concentration times were increased. After the stock solution was concentrated for 5, 10 and 15 times, the absorbance was increased for 0.718, 1.281 5 and 1.464 5 resp. [Conclusion] The production process suitable for the ultrafiltration and concentration of *M. gallisepticum* antigen was established in this experiment and it laid a foundation for preparing *M. gallisepticum* vaccine and its multivalent vaccine.

Key words *Mycoplasma gallisepticum*; Ultrafiltration and concentration; Antigen

鸡毒支原体病(MG)是鸡的一种慢性呼吸道传染病,具有分布广泛、感染率高的特点,以呼吸道发生啰音、咳嗽、流鼻涕和窦部肿胀为特征。其单独感染可致死鸡只,但危害更甚的是常继发或并发感染大肠杆菌病、传染性支气管炎等多种细菌病和病毒病。鸡群一旦感染,可长期蔓延,造成肉仔鸡生长不良、成鸡产蛋减少,给养禽业带来重大的经济损失。由于药物对支原体感染不能根治且易使之产生抗药性,限制了该病的防制效果^[1],因此,国内外许多禽病工作者开展了MG灭活疫苗的研究工作,并取得了满意的效果^[2-3]。

但由于现行的鸡毒支原体培养工艺生产的抗原含量不高,即使抗原效价达 10^8 CCU/ml时配制灭活疫苗也需要进行8倍浓缩。为提高单位体积抗原量,常采用冷冻干燥、离心沉降、透析、醇类脱水、分子胶吸水等方法^[4],但这些都因成本高或操作条件等因素限制而不能满足规模化生产需要。该试验利用 Millipore 公司生产的超滤装置进行鸡毒支原体灭活抗原浓缩,并通过吸光度测定进行浓度比较,旨在建立一套适合鸡毒支原体灭活疫苗生产的抗原浓缩工艺。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验仪器。超滤仪(MODEL No. XX814V230, Millipore 公司生产)、超滤膜堆(PLCHK-C, 100K, Millipore 公司生产)、光学显微镜(XSP-24N, 重庆光学仪器厂)、分光光度计(U-2800, HITACHI 公司生产)。

1.1.2 抗原。鸡毒支原体灭活抗原, 24 L, 南京天邦生物科

技有限公司制备。

1.1.3 消毒液与清洗液。NaOH 溶液(0.05 mol/L)、灭菌注射用水、PBS 液(pH 值 7.0), 使用前均经过 121 °C, 20 min 高压灭菌处理。

1.1.4 稀释液。灭菌生理盐水, 自制, 4 °C 保存备用。

1.1.5 培养基。营养琼脂平板培养基, 自制。

1.1.6 瑞氏染液。自制。

1.2 方 法

1.2.1 超滤膜堆的选择。在病毒浓缩过程中选择孔径合适的超滤膜是至关重要的, 如果超滤膜孔径太小浓缩速度很慢, 而孔径太大有可能造成抗原液有效成分过多丢失。理想的浓缩过程应是在短时间内完成抗原浓缩, 并使抗原的有效成分尽可能少地丢失, 即有效成分接近于 100% 的回收。现根据鸡毒支原体分子量大小及常规浓缩工艺选定相对截流分子量 100 K 的超滤膜堆。

1.2.2 超滤膜堆的预处理。按照 Millipore 超滤膜堆维护手册进行。

1.2.3 超滤设备消毒试验。将进口管、回流管、滤过液管 3 条管道同时连接到 5 L 灭菌消毒液中, 开机循环 30 min, 取样, 接种于营养琼脂平板培养基进行无菌检验。

1.2.4 超滤程序。按照 Millipore 超滤膜堆使用说明书进行。将灭活抗原液用过滤或离心的方法进行浓缩前的澄清处理, 使其成透明或半透明溶液, 将澄清处理后支原体液倒入浓缩瓶中, 开启浓缩设备, 选用截留分子量为 100 K 孔径的超滤膜对支原体液进行浓缩。在浓缩试验中, 分别取灭活抗原浓缩前原液、浓缩尾液、5 倍、10 倍、15 倍浓缩液, 进行浓度比较试验。

1.2.5 浓度比较。

1.2.5.1 显微镜观察支原体密度。分别取灭活抗原浓缩前原液、浓缩尾液、5倍、10倍、15倍浓缩液适量涂片,自然干燥后经瑞氏染色液染色,显微镜观察有无支原体及其密度。

1.2.5.2 分光光度计测定支原体浓度。分别取灭活抗原浓缩前原液、浓缩尾液、5倍、10倍、15倍浓缩液于1 cm 石英比色池中,置分光光度计测定波长 600 nm 处的吸光度(OD

值),根据 OD 值绘制吸光谱,并推算抗原液浓度。

2 结果与分析

2.1 超滤设备消毒试验结果 消毒液高压灭菌后无细菌污染,超滤仪回流液、抗原浓缩前后均无细菌污染。

2.2 浓度比较 尾液、5倍、10倍、15倍浓缩后与浓缩前样品液体浓度对比,结果见图1。从图1可以看出,随着浓缩倍数的增加,样品浓度有规律地呈上升趋势。



图1 尾液、5倍、10倍、15倍浓缩后与浓缩前样品液体浓度对比

Fig.1 Liquid concentration comparison between the pre-concentration and post-concentration of tail liquid,5 times,10 times,15 times

镜检结果:瑞氏染色后发现,除尾液样品中无支原体外,其他样品均可见形态不规则、蓝色的支原体菌体,但浓度差异不明显。说明使用 100 K 超滤膜堆浓缩支原体后,抗原无泄漏,所选膜堆适合。但不适合以镜检方式对比支原体浓度差异。对抗原尾液、原液、5倍、10倍、15倍浓缩液在 600 nm 的吸光度进行了测定,结果分别为 0.011 5、0.544 5、1.262 5、1.826、2.009。

结果表明,随着浓缩倍数的增加,溶液的吸光度也在上升。原液浓缩 5倍、10倍、15倍的吸光度(OD 值)分别比原液增加 0.718 0、1.281 5、1.464 5。

3 结论与讨论

(1)采用 Millipore 中型盒式超滤系统对鸡毒支原体灭活抗原进行了初步的浓缩试验,结果表明,该设备具有良好的抗原浓缩功能。其特点有:①浓缩工艺简单。该设备对料液预处理要求不严,抗原液在浓缩前仅用 100 目铜纱网滤后即可进行浓缩;浓缩机操作简单。②浓缩效率高。试验使用 1 块 100 K 的超滤膜堆将 24 L 抗原 15 倍浓缩用时 100 min,如果增加超滤膜的数量,浓缩速度还将加快。③浓缩过程料液升温不高,可根据生物制品的要求控制料液温度。④该设备结构简单,易于清洗消毒。

(2)通过对超滤浓缩工艺流程的研究表明,按此工艺操作,抗原浓缩前后均无细菌污染。浓缩后镜检发现除尾液样

品中无支原体外,其他样品均可见形态不规则、蓝色的支原体菌体,说明使用 100 K 超滤膜堆浓缩支原体后,抗原无泄漏,所选膜堆适合。

(3)对样品吸光度测定发现,随着浓缩倍数的增加,溶液的吸光度也在上升。原液浓缩 5倍、10倍、15倍后,吸光度 OD 值分别增加 0.718 0、1.281 5、1.464 5,基本呈线性关系。

(4)浓缩后镜检可用于检验所选膜堆大小是否合适,超滤过程中是否出现污染,但不适合以此对比细菌浓度差异。样品吸光度测定可以用于判定样品浓缩后浓度标准,但浓缩倍数与溶液吸光度变化的系数关系,尚需要在进一步大量的试验和生产数据的基础上推导和验证。

(5)经过镜检和吸光度测定证明,选择 100 K 的超滤膜堆是可行的。此次建立的适合于 MG 抗原超滤浓缩的生产工艺流程,为鸡毒支原体疫苗及其多联疫苗的研制奠定了基础。

参考文献

- [1] 艾武,牟建青,李峰,等. 鸡毒支原体油乳剂灭活疫苗的研究[J]. 山东农业科学,2002(2):38-40.
- [2] YODER H W, HOPKINS JR S R, MITCHELL B W. Evaluation of inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterins for protection against airsacculitis in broilers[J]. Avian Diseases, 1983, 28(1): 224-234.
- [3] 宋勤叶,张中直,张冰,等. 鸡毒支原体油乳剂灭活苗对降低 MG 垂直传播作用的研究[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(3):285-290.
- [4] 黄兵,王传庆,王莉莉,等. 鸡新城疫病毒抗原超滤技术研究[J]. 中国预防兽医学报,2000,22(2):108-110.