

认合格后方可使用。通常血清的使用浓度为 10% ~ 15% 左右。

**¼ 乳蛋白水解物** 乳蛋白水解物是乳中白蛋白、乳球蛋白和血清蛋白的水解产物。在含有乳蛋白水解物的培养基进行高压灭菌时必须注意压力, 温度不得过高, 防止乳蛋白水解物的营养成份被破坏, 乳蛋白水解物中含有支原体所必需的 12 种氨基酸, 是支原体生长所需营养成份的重要来源。由于各个厂家生产的乳蛋白水解物质量不同, 批号不同而有所差别, 使用前须做预备试验。

**½ 琼脂** 琼脂质量是支原体检验成功的一个关键因素。琼脂主要由琼脂糖琼脂胶组成, 琼脂在培养基中起支持作用, 不含营养成份。不同厂家不同批号凝胶强度不一样, 使用时要选择适宜的浓度, 琼脂量使用过大, 导致固体培养基过硬, 影响营养成份的渗透和扩散, 不利于支原体的生长; 含量过低, 容易从平皿上脱落。

**¾ 酵母浸出液** 酵母浸出液是培养支原体不可缺少的营养成分, 它含有丰富的 B 族维生素和各种氨基酸, 对促进支原体的生长发育, 提高支原体的检出率起到重要作用。提取酵母浸出液时掌握好温度, 以免温度过高引起炭化。合格的酵母浸出液颜色呈淡黄色或橘黄色的澄清液体。酵母浸出液制备方法见[4]。

**2.2 培养基质量检测** 培养基配制后, 必须检测其生长能力, 一般来说, 质量良好的培养基可使支原体的活菌滴度达到  $10^9$  以上。用活菌计数方法检测, 改良 Frey 培养基用滑液支原体检测, 支原体培养基用猪鼻支原体检测。

操作步骤:

(1) 小试管, 每组设 2 排, 每排 11 管。

(2) 培养基装量 1.8ml/ 支。

(3) 将已复壮的种子液接种到第 1 管 0.2ml, 按 10 倍递减稀释到第 10 管, 第 11 管作阴性对照。

(4) 判定: 37℃ 培养 48 ~ 96h, 以培养物颜色变黄的最后 1 管为终点, 达到  $10^7$  ccu/ml 以上为合格。

**2.3 其他需注意的问题**

**2.3.1 初次分离培养的支原体菌落并不象书上描述的典型,** 一般初次分离的支原体菌落呈圆形“隆起”表面呈颗粒状; 聚集如杨梅状; 无外晕; 只有经过多次传代后才能形成典型“荷包蛋”状菌落。

**2.3.2 支原体检验要求的条件非常苛刻,** 检验中所用的各类玻璃器皿必须洁净, 达到组织培养的标准, 忽视这一问题, 将会影响支原体检验工作的质量。

**2.3.3 要养成良好的工作习惯,** 检验操作前后对工作台都要进行消毒, 检验操作时必需戴口罩; 工作帽; 穿洁净的工作服。操作中尽可能不讲话, 不来回走动。

**2.3.4 操作时绝对禁止用口吹吸管;** 口腔是支原体感染的主要途径。

**2.3.5 支原体生长要求的条件非常苛刻,** 在正式检验产品前最好将制备培养基的原材料进行测试, 避免检验工作出现被动。

**参考文献:**

- [1] 殷震, 刘景华 主编. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985, 197.
- [2] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准(一九九二年版)[S], 1992.
- [3] 张瑞婷, 张立春, 夏业才, 等. 支原体检验用培养基的改进[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(1): 35-37.
- [4] 张瑞婷, 张立春. 酵母浸出液提取方法的改进[J]. 中国兽药杂志, 1998, 32(2): 39-40.

## 猪白细胞干扰素在细胞培养物中干扰牛病毒性腹泻/ 粘膜病(BVD/MD) 病毒的试验

王乐元, 江焕贤, 兰玉珍

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2000— [文献标识码] B [文章编号] 1002-1280(2001)-02-0030-03 [中图分类号] S859.797

**[摘要]** 对猪白细胞干扰素在细胞培养物中干扰牛病毒性腹泻/ 粘膜病(BVD/MD) 病毒的作用进行了试验。猪白细胞干扰素在 500u/ml 以上浓度可完全抑制牛病毒性腹泻/ 粘膜病(BVD/MD) 病毒所产生的细胞病变, 在 250u/ml 浓度可部分抑制病毒所产生的细胞病变, 在 250u/ml 以下浓

度不能抑制病毒所产生的细胞病变,但可使细胞产生细胞病变的时间延长,病变程度减轻。本试验证实干扰素在猪和牛之间存在交叉活性。

[关键词] 猪白细胞干扰素;牛病毒性腹泻/粘膜病(BVD/MD)病毒;干扰试验

干扰素是一种能够抑制病毒增殖的低分子糖蛋白,具有广谱抗病毒和调节免疫应答的作用。作者对我国某生物制品有限公司提供的猪白细胞干扰素在细胞培养物中干扰牛病毒性腹泻/粘膜病(BVD/MD)病毒的作用进行了试验。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 猪白细胞干扰素 我国某生物制品有限公司提供的中试产品,批号 960209,效检 5000u/ml,安瓶装,2ml/支。

1.1.2 牛病毒性腹泻/粘膜病(BVD/MD)病毒 本所制备(BVDV Oregon C24V, F4, 0.5g/支, 1994.7.27 冻干)。

1.1.3 犊牛肾(BK)原代细胞 自制。

1.1.4 制备猪白细胞干扰素用细胞营养液 生产猪白细胞干扰素的我国某生物制品有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 按常规方法制备犊牛肾(BK)原代细胞,将制备好的犊牛肾(BK)原代细胞分散分装到链霉素小瓶中,3d 后长成单层进行试验。

1.2.2 将干扰素用细胞维持液配成含干扰素 2000u/ml 的溶液,然后进行倍比稀释,使之成为分别含干扰素为 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25u/ml。

1.2.3 将牛病毒性腹泻/粘膜病(BVD/MD)病毒用细胞维持液配成  $10^{-4}$ 和  $10^{-5}$ 两个稀释度。

1.2.4 将牛病毒性腹泻/粘膜病(BVD/MD)病毒用含 31.25u 干扰素的细胞维持液配成  $10^{-4}$ 和  $10^{-5}$ 两个稀释度。

1.2.5 将长好细胞单层的小瓶中的液体倒掉,加入不含干扰素的  $10^{-4}$ 或  $10^{-5}$ 病毒液 0.1ml,每个浓度 6 瓶,共 12 瓶(用于病毒对照和制备猪白细胞干扰素用细胞营养液对照)。加入含 31.25u 干扰素的  $10^{-4}$ 或  $10^{-5}$ 病毒液 0.1ml,每个浓度 42 瓶,共 84 瓶(用于干扰素干扰试验)。然后将细胞瓶置 37℃ 吸附病毒 1h。

1.2.6 吸附完成后,将用不含干扰素维持液配制的  $10^{-4}$ 和  $10^{-5}$ 病毒液作用的细胞各 3 瓶,分别加入正常细胞维持液 0.9ml,作为病毒对照。将剩余的用不含干扰素维持液配制的  $10^{-4}$ 和  $10^{-5}$ 病毒液作用的 3

瓶细胞,分别加入制备猪白细胞干扰素用细胞营养液 0.9ml,作为制备猪白细胞干扰素用细胞营养液对照。

1.2.7 吸附完成后,将用含 31.25u 干扰素维持液配制的  $10^{-4}$ 和  $10^{-5}$ 病毒液作用的细胞分为两组,每组的两个病毒稀释度都分别加入含 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25u/ml 干扰素的维持液 0.9ml,每个干扰素浓度各 3 瓶,进行干扰素干扰试验。

1.2.8 将正常细胞中的液体倒掉,分别加入 1ml 含不同浓度干扰素的正常细胞维持液,每个干扰素浓度 3 瓶,作为干扰素对照。另取 3 瓶正常细胞换正常细胞维持液,作为正常细胞对照。

1.2.9 所有细胞培养物在第 4d 后开始观察细胞病变(细胞浆内产生空泡),一直观察到第 12d。出现细胞病变记录为“+”,不出现细胞病变记录为“-”。

2 结果

2.1 对照试验

2.1.1 病毒、营养液及正常细胞对照

表 1 病毒、营养液及正常细胞对照

病毒对照		制备干扰素用细胞营养液对照		正常细胞对照
$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	
+	+	+	+	-
+	+	+	+	-
+	+	+	+	-

2.1.2 干扰素对照

表 2 干扰素对照 (u)

2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-

2.2 干扰试验

2.2.1 第一组

表 3 第一组干扰试验

病毒	干 扰 素 (u)						
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25
$10^{-4}$	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+
$10^{-5}$	-	-	-	+	+	+	+
	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+

2.2.2 第二组

表 4 第二组干扰试验

病毒	干 扰 素 (u)						
	2000	1000	500	250	125	62. 5	31. 25
10 <sup>-4</sup>	-	-	-	+	+	+	+
	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	+	+	+	+
10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	-	+	+	+
	-	-	-	-	+	+	+

3 结论和讨论

由试验结果可见,猪白细胞干扰素在 500u/ ml 以上浓度可完全抑制牛病毒性腹泻/ 粘膜病(BVD/ MD) 病毒所产生的细胞病变,在 250u/ ml 浓度可部分抑制病毒所产生的细胞病变,在 250u/ ml 以下浓度不能抑制病毒所产生的细胞病变。

一般认为干扰素具有相对种属特异性,如鸡胚细胞产生的干扰素不能保护人或其它哺乳动物,但在一些种属关系较远的动物间也存在交叉活性。本试验证实干扰素在猪和牛之间存在交叉活性。另外,在试验过程中发现,尽管猪白细胞干扰素在 250u/ ml 以下浓度不能抑制病毒所产生的细胞病变,但细胞产生细胞病变的时间较晚,病变程度较轻,说明干扰素仍然起一定作用。

参考文献:

[1] 王明俊主编,兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社,1997.  
[2] 中华人民共和国农业部,中华人民共和国兽用生物制品规程[S](一九九二年版),1992.

掺假阿莫西林的鉴别方法

郭青敏, 赵小萍

(石家庄华牧集团公司, 河北石家庄 050061)

[收稿日期] 2000-05-22 [文献标识码] B [文章编号] 1002-1280(2001)-02-0032-02 [中图分类号] S859. 796

[摘要] 用高效液相色谱法对阿莫西林和氨苄青霉素进行区分,结果证实,该法简便、快速、准确。  
[关键词] 高效液相色谱法; 阿莫西林; 氨苄青霉素

阿莫西林是一种新型的抗生素类药,《中国药典》1995 年版已有收载<sup>[1]</sup>,其含量测定方法是紫外分光光度法。当掺有氨苄青霉素时,依照药典进行鉴别、含量检测均符合规定,未发现掺假现象,可能误判为合格。我们依据《中国药典》2000 年版<sup>[2]</sup>的测定方法,经过多次试验,能够通过高效液相色谱法迅速查明阿莫西林掺假的质量问题。

1 仪器与试样

TU-4201 紫外分光光度计(北京普析仪器公司),高效液相色谱仪(日本岛津公司),A EG-220G 电子天平(日本岛津公司),PHS-29A 酸度计(上海第二分析仪器厂)。

阿莫西林对照品(中国兽医药品监察所,含量 86. 3%,批号 K022301298);氨苄青霉素(华北制药厂);阿莫西林(石家庄制药集团);阿莫西林饮水剂 10%(石家庄华牧集团公司兽药厂,批号 20000305),以下称 1 号样;自制混合样品 4 批(含阿

莫西林 5%,氨苄青霉素 5% 二批;含阿莫西林 8%,氨苄青霉素 2% 二批)。以下称 2、3、4、5 号样。

2 方法

2. 1 按文献[1]阿莫西林项下鉴别及含量测定法测定各样。

2. 1. 1 鉴别 精密称取 1 号样及自制混合样适量,加水制成每 1ml 中含 5mg 的溶液,在 50℃ 水浴微温使溶解后,依法测定(文献[1]附录 H)。

精密称取 1 号样及自制各样适量,加水溶解并稀释成 1mg/ ml 的溶液,依法测定([1]附录 E)。

2. 1. 2 含量测定 精密称取 1 号样及自制各样适量,按紫外分光光度法测其含量。

2. 2 用 HPLC 法测定阿莫西林含量(依据文献[2]),测定条件:固定相为十八烷基硅烷键合硅胶(柱长 30cm),以磷酸盐缓冲液(pH5. 0)(取磷酸二氢钾 13. 6g,加水溶解后稀释到 2000ml,用 8mol/ L 氢氧化钾溶液调 pH 值至 4. 9~ 5. 1)-乙腈(96 : 4)