

用 Ciprofloxacin 去除传代细胞株中的支原体污染的研究

陈如颖 喻 峰 朱德厚

(中国科学院细胞库 上海 200031)

在细胞培养中,支原体污染是一个广泛存在的问题,国内实验室尤较严重。支原体的存在会大量消耗细胞培养液中的营养成分、影响细胞的正常生长、影响杂交瘤细胞的融合率,对于以细胞为材料的有关分子生物学方面的研究、其影响更是不可估量的^[1]。通常情况下,污染了支原体的细胞只能丢弃。随着越来越多细胞工程和基因工程细胞株、系的建立,如何挽救被污染的细胞已成为一个非常重要的课题。中国科学院细胞库目前已保存有约 300 株细胞,为全国各科研单位提供了大量的实验材料。为了提供更多合格的细胞株、系,应选择一种简单、有效的去除细胞中支原体污染方法。Schmitt 等^[2]于 1988 用 Ciprofloxacin 进行了一系列的实验,证明该药物对于支原体污染的去非常有效、便利。目前我们应用此方法已成功地去除了 Vero, SP 2/0-Ag 14 等细胞株(系)中的支原体,经长期检测未发现复发,能作为去除人库前细胞中支原体污染的一项常规工作。

材料与 方法

一、Ciprofloxacin hydrochloride 母液配制

Ciprofloxacin(SIGMA)100 mg 溶解于 10 ml 双重蒸馏水中,0.22 μm 滤膜过滤-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

二、Ciprofloxacin 抑制支原体最低有效浓度的测定

按 0.25, 0.5, 1, 2, 3, ……10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度系列,将 Ciprofloxacin 配制在 pH 6.5 和 7.6 的支原体营养肉汤(BBL)^[3]中,再分别加入三种支原体: *M. hyohinis*, *M. orale*, *M. arginini*, 并分设一支阴性和阳性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养一周后,连续三周进行支原体检测。

三、支原体对细胞株的感染

Vero 和 SP 2/0-Ag 14 细胞在 RPMI-1640(GIBCO BRL, 含 20% 小牛血清培养液中培养。将三种支原体 *M. hyohinis*, *M. orale*, *M. arginini* 从冻存管中复苏,分别接种入其相应 pH 值的营养肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至颜色发生变化后,再分别接种入 Vero 和 SP 2/0-Ag 14 细胞中,培养一周后进行支原体检测,连续三周,保证感染的稳定。

四、Ciprofloxacin 有效抑制细胞中感染的支原体的最短作用时间

配制含 Ciprofloxacin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (该浓度由方法二、确定,下同。)的 RPMI-1640 培养液,接种入上述感染了支原体的两种细胞 Vero 和 SP 2/0-Ag 14,分别培养 1-14 不等天后更换不含药的培养液,一周后每周进行支原体检测。

五、细胞株中支原体污染的检测

应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色法检测支原体^[4]。

六、Ciprofloxacin 对细胞株的影响

1. 对细胞增殖的影响

将 Vero 细胞接种于含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ciprofloxacin 以及不含该药的 RPMI-1640 培养液中,起始密度为 10⁴ /ml 细胞 5 ml/瓶,在 2.5 \times 4.5 cm² 的培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养 24, 72, 120, 148 小时等 4 个不同组。每组各 3 瓶,每瓶取样三次计数,取平均值作 Vero 细胞在两组培养液中的生长曲线。

2. 对杂交瘤细胞分泌单克隆抗体的能力的影响

分泌抗人肺癌单抗的杂交瘤细胞株 LSC-116,在含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ciprofloxacin 的 RPMI-1640 培养液中培养 2 周后换不含该药的 RPMI-1640 培养液中继续培养,并以未用药物处理过的 LSC-116 细胞为对照,两者的接种细胞浓度相同,均为 5 \times 10³ /ml, 3ml/瓶, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养一周。采用 ELISA 间接法,以人小细胞肺癌细胞株 SH-77 为抗原,检测培养物上清液中抗体效价。每组样品各设 15 个孔。

结 果

一、Ciprofloxacin 对支原体的最低抑制浓度

表 1 不同浓度的 Ciprofloxacin 对 3 种支原体的抑制作用

药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	<i>M. hyohinis</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. orale</i>
0	+	+	+
0.5	+	+	+
1	+	+	+
2	-	+	+
3	-	+	+
4	-	+	+
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	+	-
8	-	+	-
9	-	-	-
10	-	-	-

表 2 Ciprofloxacin 对 2 株感染了 3 种不同支原体的细胞处理不同时间后的支原体检测结果

时间 (天)	VERO			SP 2/0-Ag 14		
	<i>M. hyohinis</i>	<i>M. argitini</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. hyohinis</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. orale</i>
0	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+
3	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-

表 3 Vero 细胞在有药和不含 Ciprofloxacin 的 RPMI-1640 中生长曲线的数据及其显著性差异的 t 检验

	0 天	1 天	3 天	5 天	7 天
Vero		5.25 万	15.00 万	133.00 万	218.56 万
		6.00 万	16.50 万	131.50 万	214.60 万
		6.00 万	16.50 万	137.50 万	216.88 万
平均值	5 万	5.75 ± 0.433 万	16.00 ± 0.87 万	134.00 ± 3.12 万	216.68 ± 1.99 万
Vero(含药)		5.25 万	15.00 万	129.41 万	210.69 万
		5.25 万	15.75 万	130.50 万	203.75 万
		6.00 万	15.50 万	122.00 万	207.60 万
平均值	5 万	5.50 ± 0.43 万	15.42 ± 0.38 万	127.30 ± 4.62 万	207.01 ± 2.46 万
t 值		0.71	1.03	2.08	4.04

注: $t_{4,0.01} = 4.60$

实验结果(表 1)表明, *M. hyohinis* 比 *M. arginini* 和 *M. orale* 对 Ciprofloxacin 更敏感。含药浓度为 $9 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的肉汤管经连续三周的检测依然均为阴性。因此初步确定细胞培养液的含药浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 。

二、Ciprofloxacin 有效抑制细胞支原体的最短作用时间

实验结果(见表 2)表明, 两种细胞中的支原体经药物($10 \mu\text{g/ml}$)处理 5 天以上, 即均为阴性。我们对处理 7、14 天的细胞连续检测支原体 4 个月以上, 结果皆为阴性。在实际工作中, 为了杜绝支原体转阳的可能性, 我们对经药物处理一周后的细胞进行支原体检测, 阴性后继续处理一周加以巩固。

三、Ciprofloxacin 对细胞株的影响

1. 对细胞增殖的影响

由于 $t_{4,0.01} >$ 以上各天两组细胞生长曲线的 t 值, 故两组数据无显著差异。由此可见, 细胞经药物处理 7 天, 两组细胞增殖速率无显著差异, 表明 Ciprofloxacin 对 VERO 细胞的正常生长没有不良影响。

表3 经 Ciprofloxacin 处理 2 周后及未经处理的杂交瘤细胞株 LSC-116 其单抗分泌能力的 ELISA 检测结果

	O.D. 值 读 数														平均值	
未处理	0.645	0.704	0.765	0.679	0.649	0.796	0.634	0.653	0.658	0.710	0.666	0.621	0.742	0.757	0.711	0.693 + 0.053
处理过	0.722	0.626	0.776	0.695	0.718	0.661	0.631	0.634	0.632	0.765	0.704	0.706	0.685	0.684	0.677	0.688 + 0.046

注: O.D 阴性对照 = 0.155

2. 对杂交瘤细胞分泌单克隆抗体能力的影响

经计算, $t = 0.274 < t_{28, 0.05} (= 2.76)$, 因此, 两组数据无显著性差异, 即经含 Ciprofloxacin 的培养液培养的 LSC-116, 其分泌抗小细胞肺癌单抗的能力和未在含该药的培养液里的同株细胞相同。因此可得出结论, Ciprofloxacin 对于杂交瘤细胞 LSC-116 的单抗分泌能力无影响。

讨 论

在已经探索的去除传代细胞株污染的支原体的方法中, 大致可分为生化法(抗生素等各类支原体代谢拮抗物^[4-7], 免疫法(抗各类支原体血清^[8], 人、兔、猪、小鼠血清中的补体^[9]、裸鼠腹腔注射或用抗生素与巨噬细胞共培养^[10])等, 并辅之以细胞的克隆法^[9]。但这些方法或效果有限, 或对细胞有副作用, 或非常繁琐, 或会引起新的污染(如鼠源病毒)^[7]。Ciprofloxacin 是一种氟代喹诺酮类抗生素, 是微生物 DNA 拓扑酶 II 的一种抑制物, 而该酶对于微生物细胞的 DNA 超螺旋化是必需的^[2], 因此, 这种药物可能对去除支原体有一定的效果。通过对 Vero 和 SP 2/0-Ag 14 和 LSC-116 等细胞株一系列实验, 我们探索了该药物的工作浓度和工作时间, 确定为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 7 天为 1 个周期, 一般需两个周期。该药物对我们所实验的细胞的生长特征和功能没有不良影响, 而且操作过程简便。因此, 在细胞库的日常工作中, 以 Ciprofloxacin 去除细胞培养物中的支原体

和用以挽救被支原体污染的杂交瘤细胞是非常合适的。另外, 在实际去除支原体过程中, 我们注意到细胞接种的浓度, 在不影响细胞的正常生长的情况下要尽可能低, 同时每隔 2 天更换新的含药培养液(贴壁细胞换液前用胰酶消化), 以保证药物的活性和对细胞的充分作用。在以药物处理 7 天后开始检测, 检测结果为阴性后, 再巩固处理一周, 然后进行扩增保种, 并连续检测 1—2 个月, 以确保支原体始终为阴性。应用此方法, 我们已成功地对 B 16, HLF, K 562, V 79, Bcap-37, BEL-7402, CHL, A 549, ER-75-30, SMMC-7721, ao 10/17, 3 ao 10/3, CBRH-7919, SH-77, L-6 TG, L-02, SGC-7901 等 17 株细胞去除了支原体。

摘 要

在应用细胞培养手段的生物学研究和生物工程产品中, 支原体污染仍是一个非常棘手的问题。对 Vero 和 SP 2/0-Ag 14 等细胞, 应用 Ciprofloxacin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 14 天, 支原体检测全部转阴, 经 4 个月的培养、传代、冻存、复苏, 每次支原体检测均保持阴性。对去除了支原体的 Vero 和 LSC-116 细胞株, 测试了其生长特征和功能, 均未见受影响。

关键词: 细胞培养 支原体去除 Ciprofloxacin

参 考 文 献

- [1] Gerard J. McGarrity et al., 1985, *The Mycoplasmas.*, Vol. IV, 353—390.

- [2] Karl Schmitt, et al, 1988, *J. Immuno. Methods*, 109: 17—25.
- [3] 吕沅冈, 喻峰, 1992, 细胞生物学杂志, 14: 87—91.
- [4] Jorg Schmidt, et al, 1984, *Exp. Cell Res* 152: 565—570.
- [5] Theodore Gurney, JR., et al, 1981, *In Vitro*, 17: 993—996.
- [6] Hitoshi Kotani, et al, 1991, *In Vitro* 27 A: 509—513.
- [7] Menashe Marcus, et al., 1980, *Nature*, 285: 659—661.
- [8] Stig eansson, et al, 1985, *Exp. Cell Res.*, 161: 181—188.
- [9] H. W. L. Ziegler-Heitbrock, et al, 1987 *Exp. Cell Res.*, 173: 388—394.
- [10] L. Schimmelpfeng, et al. 1980, *Nature*, 285: 661—662.

STUDY ON THE ELIMINATION OF MYCOPLASMA WITH CIPROFLOXACIN FROM CELL CULTURES

Chen Ru-ying, Yu Feng, Zhu De-hou

(Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

ABSTRACT

The infection of Mycoplasma in cell cultures remains a bothering problem in the biological research using cell biological technology and in the biotechnological products. Treated with Ciprofloxacin (10 μ g/ml culture medium) for 14 days, vero, Sp 2/0-Ag 14 and other cell lines became negative in the tests for mycoplasma. These decontaminated cell lines kept negative in the above tests after at least 4 months of cultivation, subcultivation storage in the nitrogen and recovery from the liquid nitrogen. The growing characteristics of cell line Vero and the secreting activity of hybridoma cell line LSC-116 which had been both cultured in the Ciprofloxacin-contained medium were also tested while no side-effects were found.

Key words: Cell culture Mycoplasma Elimination Ciprofloxacin.

实验技术

预测鼻咽癌放射敏感性的CB微核法

史剑慧 程文英 杨星 徐萍 王建平 罗伟华

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

淋巴细胞胞质分裂阻滞微核法(Cytokinesis-Block Micronucleus Method), 简称CB微核法, 由Fenech和Morley在1985年首先建立^[1]。已被用来评估肿瘤患者的放射敏感性, 预测肿瘤的放射治疗效果。研究表明, 外周血淋巴细胞微核率与累积剂量呈良好线性正比关系^[2]。最近文献报道, 将人及小鼠肿瘤细胞株接种于裸鼠, 其肿瘤组织的微核剂量效应, 无论在整体照射还是离体照射的结果是一

致的; 且CB微核法与克隆形成法的剂量效应也呈高度相关^[3]。由于带有微核的细胞丧失了克隆形成的能力^[4], 因而对那些不能进行克隆法测定的肿瘤标本仍有可能进行CB微核分析, 更由于其费时短, 成功率高, 适于临床应用。本文以鼻咽癌细胞株及活检标本为研究对象, 探讨了CB微核法作为鼻咽癌放射敏感性预测指标的可能性。