

EFFECT OF THE ENDOGENOUS SPINAL CORD SUBSTANCES ON THE SURVIVAL OF THE NEURONS OF SPINAL CORD IN VITRO

LIANG Zhe YANG Hao NONG Yi BAO Xuan JU Gong

(Institute of Neurosciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT

The survival of neurons in vitro is an important index to evaluate the trophic effect of neurotrophic factors (NTFs). Crude extract was prepared from human fetal spinal cord and further divided into three fractions, <10 KD, 10—30 KD and >30 KD with centricon (Millipore). The effects of the crude extract and the three fractions on the survival of spinal cord neurons were examined. MTT, NSE-ELISA and assay of total proteins were used to evaluate the viability of the cells. All three methods demonstrated increase viability in cultures with the crude extract and <10 KD group. It is concluded that there are neuron survival prompting substance(s) in the extract of human fetal spinal cord.

Key words: Neurotrophic factor(s) Extract Human fetal spinal cord Mouse spinal cord Cell survival

实验技术

细胞培养中支原体污染的 PCR 检测

刘江 姜述德

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明 650107)

细胞培养物中污染支原体是个极普遍的问题, 1992年 Kuppeveld 应用培养法、DNA 染色法、探针杂交法和 PCR 法等检测欧洲各实验室的细胞系, 阳性率为 55% (52/95)^[1]; 1993年首都儿科研究所应用培养法检测了国内 77 个传代细胞样品, 支原体污染率为 49%^[2]。其中发酵支原体 (*M. fermentans*), 猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*) 和莱氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*) 占了全部污染的 95% 以上。

检测支原体, 目前已建立了多种方法, 但由于支原体污染的特殊性, 尚没有一种方法能

令人完全满意^[3,4]。随着分子生物学的发展, 对支原体核酸的结构及分子组成越来越了解^[5,6]。90年代初, 国际上已开始把 PCR 技术应用于支原体的检测^[7-9]; 在国内这方面的工作还处于起步阶段。本文以细胞培养中常见的各种污染支原体为模式株, 试对其 16S rDNA 特异性序列进行扩增的 PCR 检测, 并与 DNA 染色法和培养法比较, 评估其对实验室人为污染的细胞和送检样品检测的实用性。

材料和方 法

1. 支原体参考菌株

6 种支原体参考菌株: *Mycoplasma arginini*,

M. fermentans, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. hominis* 及 *Acholeplasma laidlawii* 由首都儿童病研究所细菌室提供。在精氨酸或葡萄糖的支原体肉汤或琼脂培养基上传代培养, 对数生长期的培养物可经 -20°C 冻存两月左右。

2. 细胞及生物样品

无支原体污染的 Vero 细胞, 作为样品检测时的阴性对照、间接 DNA 染色的指示细胞和实验室人为感染支原体的细胞样品。

送检 49 份生物样品, 包括 20 份血清, 5 份原代细胞及 24 份传代细胞: 人肺肺细胞(7 份), 淋巴细胞(6 份)、Vero 细胞(5 份)、CHO 细胞(2 份)、Hep-2 细胞(2 份)、Hela 细胞(1 份)和 MRC-5(1 份)。

3. 实验室人为污染 Vero 细胞

冻存的 6 种支原体于室温化冻, 接种于适宜的支原体培养液中, 培养至对数生长期。取 1 ml 上述培养物接种于 20 ml 新传代的 Vero 细胞中共同培养, 细胞长成单层后再传代一次, 使其更接近自然感染。

4. 培养法、DNA 染色法^[10]

采用常用的培养法和 DNA 染色法与 PCR 法平行检测送检样品, 比较三者的检出率和灵敏性, 以评估 PCR 方法的实用性。

培养法采用支原体双相培养基和固体培养基进行检测, 观察培养液的颜色变化和固体培养基上的典型菌落的出现判定结果。

DNA 染色法以 Vero 细胞作指示细胞, 用 Hoechst 33258 作荧光染色, 在荧光显微镜下镜检判定结果。

5. 从支原体、E. coli 和 Vero 细胞中提取 DNA

从支原体参考株中抽提基因组 DNA^[11]: 100 ml 对数生长期的支原体菌液, $12000\text{ g } 4^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 沉淀的菌体用原倍体积的洗液(0.25 mol/L NaCl , $20\text{ mmol/L Na}_2\text{PO}_4$, 10 mmol/L MgSO_4 pH 7.0)洗 2 次, 再用半倍体积 ConTE($50\text{ mmol/L Tris.HCl}$, 10 mmol/L EDTA , pH 7.5)洗 2 次后, 将沉淀菌体悬浮于少量 ConTE 液中, 转移至一个 1.5 ml 微离心管中, 再离心沉淀后, 重新悬于 100 μl 的 ConTE 中, 低温冷冻后融化, 再置于 55°C 水浴, 并加入 1.0 ml 含 1% SDS 的 TEE 液($50\text{ mmol/L Tris.HCl}$ 10 mmol/L EDTA , 2 mmol/L EGTA pH 8.0)及 11 μl proteinasek(10 mg/ml), 保温 15 min 后, 加入 11 μl 胰 RNaseA($5\text{ }\mu\text{g/ml}$), 置 37°C 保温 1 hr., 再加入 5 mol/L 醋酸钾溶液 100 μl , 置 0°C 30 min 后离心, 上清液分入两个 1.5 ml 微离心

管, 与等体积氯仿:异戊醇(24:1)混合, 室温轻摇 15 min 后离心 2 min, 取上层水相, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc pH 4.8 和两倍无水乙醇, 置 0°C 30 min 后用吸头吸出丝状 DNA 沉淀, 70% 乙醇洗涤两次后挥发干燥溶于 450 μl TE 液冻存。

为验证 PCR 的特异性, 应用酚-氯仿抽提法, 从 *E. coli* 和 Vero 细胞中抽提 DNA 样品作对照实验。

6. 引物的选择^[12]

通过比较各种支原体和细菌的 16 s rDNA 序列, 选择 Remy Teyssou 设计的三条寡聚核苷酸用于特异性地扩增各支原体 16 s rDNA 上特定片段的 PCR 引物:

引物 1 P_1 : 5'-TACGGGAGGCAGCAGTA-3'

引物 2 a P_{2a} : 5'-TCAAGATAAAGTCATT-TCCT-3'

引物 2 b P_{2b} : 5'-TACCGTCAATTTTTAA-TTTTT-3'

它们相对于 *E. coli* 16 s rDNA 上的位置分别在, 343—359, 468—482 和 451—471 的碱基对上。其中 P_2 能与支原体属和尿原体属的 16 s rDNA 特异互补, P_{2b} 则是针对无胆甾原体 16 s rDNA 特异的, 而 P_1 是针对所有原核生物的 16 s rDNA 设计的。 P_{1-2a} 组成一套引物特异地扩增支原体属和尿原体属各支原体 16 s rDNA 上长 142 bp 的 DNA 片段, P_{1-2b} 扩增无胆甾原体 16 s rDNA 上长 128 bp 的片段。

7. 待检样品的准备^[13]

待检的血清, 培养的细胞悬液冻存于 -20°C , 经融化后可直接作为培养法和 DNA 染色法的样品。PCR 检测时取 2 ml 样品经 $12000\text{ g } 4^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min, 沉淀悬浮于 100 μl 溶液 A($10\text{ mmol/L Tris}\cdot\text{HCl}$ pH 8.3, 100 mmol/L KCl , 2.5 mmol/L MgCl_2), 补加 100 μl 溶液 B($10\text{ mmol/L Tris}\cdot\text{HCl}$ pH 8.3, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 1% Tween 20, 1% TritonX-100, 120 μg proteinasek), 于 60°C 保温 1 hr., 再 95°C 煮沸 10 min, 冷却后取 10 μl 作 PCR 反应的模板。

8. PCR 扩增

PCR 反应的条件主要是在 Remy Teyssou 方法的基础上, 对影响 PCR 反应的几个重要因素(Tag DNA 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、模板浓度、引物浓度、退火、延伸的温度时间和反应的循环次数)做对比选优后, 进行了一些调整, 以期能获得灵敏特异的扩增。扩增的终体积为 50 μl , 内含 2.5 Utaq DNA 聚合酶,

200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1 $\mu\text{mol/L}$ 各引物, 1 \times 反应缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl_2 及 5 μl 的 DNA 模板或 10 μl 的待检样品。扩增在 DNA 自动扩增仪上进行, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 最后一轮在 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。反应产物取 10 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ EB) 上电泳 (2.5 V/cm) 1 hr. 后于 uv 检测仪下观察结果并拍照。

结 果

1. PCR 检测的特异性

用 P_{1-2a} 扩增细胞培养中常见的 4 种支原体属的支原体 DNA 抽提物, 均只产生一条 142 bp 的特异性产物, 而对 *E. coli* 和 Vero

细胞的 DNA, 均不出现这条特异扩增带; P_{1-2b} 扩增无胆甾原体属的 *A. laidlawii* DNA, 总能获得一条 128 bp 的特异性扩增产物, 而对 *E. coli* 和 Vero 细胞则无特异性扩增 (图 1)。另 P_{1-2a} 对 *A. laidlawii* 的 DNA, P_{1-2b} 对以上 4 种支原体属菌株的 DNA 均不产生特异性扩增 (图片省略)。

2. PCR 检测的灵敏性

10 倍稀释的五种支原体内肉汤培养物样品或 DNA 样品, 经 P_{1-2a} 或 P_{1-2b} 扩增分析, 结果表明, 在扩增体系里可检出含 10 CFU (克隆形成单位) 的 *M. arginini* (图 2), *M. fermentans*, *M. hyorhinis* 及 10^2 CFU 的 *M. orale* 和 *A. laidlawii* (图片省略)。

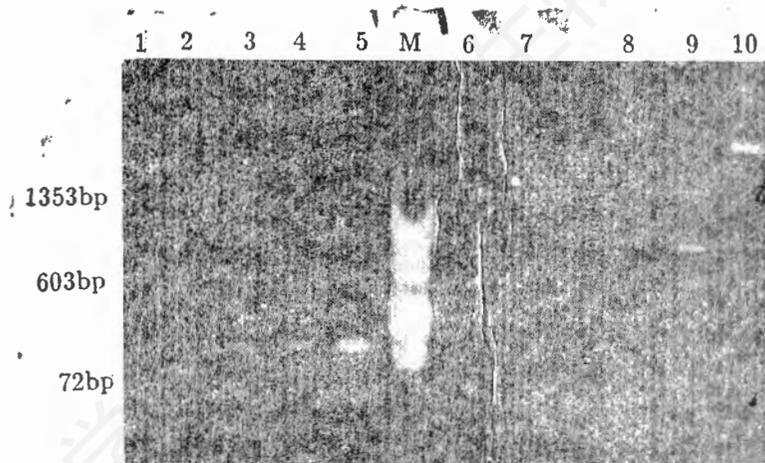


图 1 PCR 扩增各种 DNA 样品的特异性

列①—③依次是: ①Vero 细胞 ②*E. coli* ③*A. laidlawii* (用引物 P_{1-2a})

列④—⑨依次是: ④*M. arginini* ⑤*M. fermentans* ⑥*M. orale* ⑦*M.*

hyorhinis ⑧*E. coli* ⑨Vero 细胞 (用引物 P_{1-2a})

列⑩: *M. fermentans* DNA (未扩增) M: Marker-phix 174/Hae III.

3. 实验室人为污染的 Vero 细胞的检测

6 种支原体污染的 Vero 细胞, 经样品准备后分别用两套引物进行 PCR 检测。结果表明, 接种支原体属的五个细胞样品均产生 142 bp 的支原体特异性扩增带; 接种 *A. laidlawii* 的细胞也出现 128 bp 特异性扩增带; 对未污染支原体的 Vero 细胞无扩增 (图 3)。

另外, 为了简化操作, 把三条引物一起加

在同一反应体系里, 拟形成一有 P_{1-2a} 和 P_{1-2b} 两套引物的扩增系统, 以期能用一个扩增体系检出所有支原体 (包括支原体属、无胆甾原体属)。结果两套引物合并后对六种支原体污染样品的特异性扩增没有影响, 同时对 *E. coli* 和 Vero 细胞并无引起干扰的特异扩增 (图 4)。

4. 生物样品的支原体检测

49 份生物样品经过如前的样品准备后,

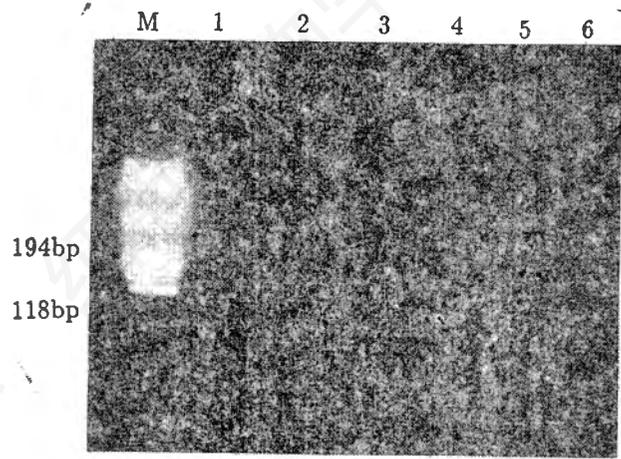


图 2 PCR 检测 *M. arginini* (引物 P_{1-2a}) 的灵敏性

列①—⑥浓度依次是: 10^5 CFV, 10^4 CFV, 10^3 CFV, 10^2 CFV, 10^1 CFV, 10^0 CFV

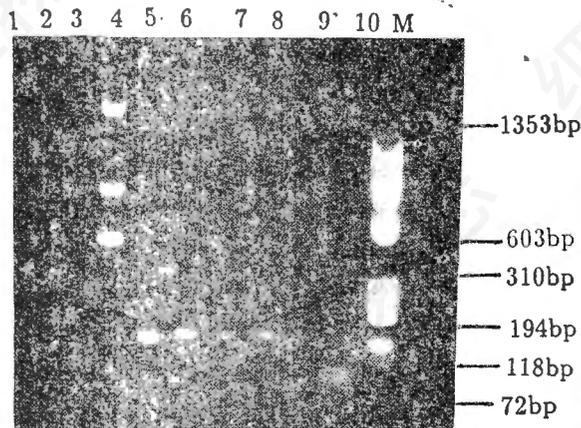


图 3 实验室人为污染 Vero 细胞的 PCR 检测

列①用 *E. coli* 污染的 Vero 细胞 (引物 P_{1-2b})

- ②用 *E. coli* 污染 (P_{1-2a})
- ③未受染的 Vero 细胞 (P_{1-2b})
- ④未受染 Vero 细胞 (P_{1-2a})
- ⑤被 *A. laidlawii* 污染 (P_{1-2b})
- ⑥受 *M. arginini* 污染 (P_{1-2a})
- ⑦被 *M. fermentans* 污染 (P_{1-2a})
- ⑧ *M. orale* 污染 (P_{1-2a})
- ⑨ *M. hyorhinis* 污染 (P_{1-2a})
- ⑩ *M. horninis* 污染 (P_{1-2a})

用 PCR 法, 培养法和 DNA 法检测。其中五份原代细胞经 3 种方法检测均为阴性; 20 份血清样品, 3 种方法检测一致为阳性的 1 份, 为阴性的 13 份, 另有 6 份结果判定不一致。对

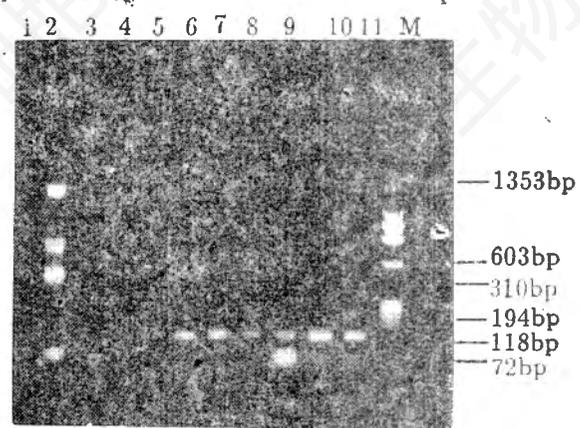


图 4 用两套引物合并的 PCR 检测人为污染的 Vero 细胞

列① H_2O

- ②未受染 Vero 细胞
- ③用 *E. coli* 污染
- ④用 *M. arginini* 污染 (仅以 P_{1-2b} 作单套引物无扩增对照)
- ⑤用 *A. laidlawii* 污染 (以 P_{1-2a} 作单套引物无扩增对照)
- ⑥用 *A. laidlawii* 污染
- ⑦用 *M. arginini* 污染
- ⑧用 *M. fermentans*
- ⑨用 *M. orale*
- ⑩用 *M. hyorhinis*
- ⑪用 *M. horninis* 污染

于 24 份连续传代的细胞样品, PCR 检测为支

原体污染阳性的有 14 份(占 58%), DNA 染色检测阳性的有 10 份(42%), 培养法有 8 份(33%)(表 1)。

表 1 24 份传代细胞样品的支原体检测:

细胞样品数	检测方法		
	PCR	DNA 染色	培养
10	-	-	-
8	+	+	+
2	+	±	-
4	+	-	-
支原体污染阳性率	14/24 (58%)	10/24 (42%)	8/24 (33%)

±表示结果可疑, 不易判定

为了对 3 种检测方法的灵敏性作一比较, 从 3 种方法检测均为阳性的传代细胞样品中, 选取两份(KMB₁₇ 和 CHO), 用细胞培养液 10 倍稀释, 再用三种方法检测。PCR 能检测到 10⁻³ 的稀释度, 而培养法和 DNA 染色法均只能检测到 10⁻¹ 稀释度(表 2)。

表 2 3 种检测支原体方法的灵敏性比较

细胞样品	稀释倍数	检测方法		
		PCR	DNA 染色	培养
KMB ₁₇	10 ⁰	+	±	+
	10 ⁻¹	+	+	+
	10 ⁻²	+	±	-
	10 ⁻³	+	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-
CHO	10 ⁰	+	+	+
	10 ⁻¹	+	+	+
	10 ⁻²	+	-	-
	10 ⁻³	±	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-

讨 论

本实验应用一步 PCR 方法可检出细胞培养中常见的各种污染支原体, 其检测具有支原体属的特异性, 而以 E. coli 和 Vero 细胞为代表的原核和真核细胞均无干扰扩增的作用。实验中 P₁₋₃ 对 Vero 细胞基因组 DNA 有 3 条

大片段(>500 bp)的扩增, 这可能是因为 Vero 细胞基因组上具有几处能与引物特异互补的序列; 对于其他的受检细胞样品, 实验中未发现类似的扩增, 且在有支原体污染的 Vero 细胞样品, 这种扩增也观察不到, 分析这是由于支原体 DNA 模板对引物的竞争更强的结果。实践中这类扩增并不影响结果的分析。

实验中, PCR 法最小可检出反应体系里 10 CFV 的菌体污染, 这是探针杂交等其他方法所不能达到的^[14]。对于不同支原体, 检测的灵敏性略有差异, 这可能是各菌种所含模板 DNA 数量不同所致。

对于两套引物合并组成的 PCR 扩增体系, 一次能检出 Vero 细胞中人为污染的各种支原体, 并具有良好的支原体扩增的特异性, 这提示可在实践中加以应用, 以简化操作, 节约人物力。

对于 49 份生物样品, PCR 法与常规的培养法和 DNA 染色法的结果相比, 大部分都表现出很好的一致性。总体上看, PCR 检测的阳性率较其他两种方法略高, 分析这是由于培养法和 DNA 染色法易受原材和操作的限制, 并对某些支原体难以检出^[15]; 同时稀释试验证实 PCR 检测的灵敏性高于其他两种方法, 这也从另一角度解释了 PCR 检测阳性率高的结果。

本实验使用的 PCR 方法操作简便, 样品用量少, 取样保存方便, 检测快速、特异、灵敏, 所需费用低廉, 很有希望发展成为细胞培养中支原体污染的常规检测方法, 应用于细胞操作和生物制品的质量控制。

摘 要

根据支原体 16 s rDNA 序列, 选择 Remy Teyssou 设计的三条寡核苷酸链, 组成两套引物; P₁₋₂ 能检测出细胞培养中常见的各种支原体, P₁₋₂ 能检出无胆甾原体。反应可检出体系中 10 CFV 的菌体。此法先用于对实验室人为污染支原体 Vero 细胞的检测, 后与 DNA

染色法和培养法比较,检测了49份生物样品,其中24份传代细胞,PCR检测的阳性率为58%,DNA染色法为42%,培养法为33%;三者的灵敏性比较,PCR可检出 10^{-3} 稀释度的阳性样品,高于其他两种方法。此PCR方法快速、灵敏、特异,适用于细胞培养中支原体污染的检测。

关键词: PCR 支原体 细胞培养

参 考 文 献

- [1] Van Kuppeveld F J et al., 1994, *Appl Environ Microbiol*, 60 (1): 149—152.
- [2] 任桂珍等, 1994, 中华微生物学和免疫学杂志, 14(2), 114.
- [3] 何大澄等, 1984, 细胞生物学杂志, 6(4): 153.
- [4] 何大澄等, 1985, 细胞生物学杂志, 7(1): 4.
- [5] Neimark HC et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18: 5433—5448.
- [6] Lim P O et al., 1991, *J Bacteriol.*, 173: 2128—2130.
- [7] Spaepen M et al., 1992, *FEMS Microbiol Lett.*, 99: 89—94.
- [8] Harasawa R et al., 1993, *Res Microbiol.*, 144: 489—493.
- [9] Van Kuppeveld F J et al., 1992, *Appl Environ Microbiol*, 58 (8): 2606—2615.
- [10] Vphoff C C et al., 1992, *J Immunol Methods.*, 149: 43—53.
- [11] Patricia G Hempstead, 1990, *CAN J Microbiol.*, 36: 59—61.
- [12] Remy Teyssou et al., 1993, *Molecular and cellular Probes*, 7: 209—216.
- [13] Blanchard A et al., 1991, *FEMS Microbiol Lett*, 81: 37—42.
- [14] Mattson J. G et al., 1993, *FEMS Microbiol Lett*, 107: 139—144.
- [15] 中华医学会微生物与免疫学会支原体组, 人支原体感染的实验诊断技术, 1992.

DETECTION OF MYCOPLASMA CONTAMINATION IN CELL CULTURES BY POLYMERASE CHAIN REACTION

LIU Jiang JIANG Shu De

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650107)

ABSTRACT

According to 16s rDNA sequences, three oligonucleotides designed by Remy Teyssou were synthesized to form two sets of primers. Primer 1-2a is able to promote amplification of all Mycoplasma and Primers 1-2b to Acholeplasma species examined. In the study of sensitivity, 10 CFU of mycoplasma can be detected. In this study, the PCR method, first applied to the detection of experimentally infected Vero cell lines, was then evaluated for the detection of mycoplasma in 49 biological samples and compared with DNA staining and culture methods. The positive rates of mycoplasma contamination in 24 continuous cell lines obtained by PCR, DNA staining or culture were 58%, 42% and 33% respectively. Furthermore, in dilution experiments, PCR detected the infecting mycoplasma at the lowest level of 10^{-3} , whereas the other assays were less sensitive. It is concluded that this PCR system is a simple, rapid, specific and high sensitive method suitable for the detection of mycoplasma contamination in cell cultures.

Key words: PCR Mycoplasma Cell culture