

MC were labeled with fluorescent probes and fluorescence intensities were measured using confocal laser scanning microscopy. MC incubated in HG, F-actin bundles appeared less prominent and changed to irregular network, displaying partial disassembly of F-actin. As compared with NG, HG caused a decrease in F-actin fluorescence intensity and an increase in G-actin intensity, consequently reducing the F/G-actin fluorescence intensity ratio. In HG, the addition of VE or EN normalized HG-induced F-actin disassembly and F- and G-actin fluorescence intensities. These findings suggest that both VE and EN prevent HG-induced the alteration of actin assembly pattern.

Key words: Vitamin E Enalapril Mesangial cell Actin Assembly

实验技术

不同中间丝类型细胞系间交叉污染的 抗中间丝蛋白免疫荧光检测*

张荣兴 朱德厚 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

细胞系间的交叉污染, 严重地威胁着细胞系的质量控制, 特别是 HeLa 细胞的污染是世界性的棘手问题^[1,2]。目前采用的检测细胞系间交叉污染的方法主要是染色体分析和同功酶分析。但是, 由于体外培养细胞染色体的复杂性和同种不同细胞系的同功酶的同源性, 这些方法都存在一定的局限性, 需要建立一些新的检测手段来弥补上述方法的不足。

中间丝是一种细胞骨架结构, 其结构蛋白是组织和细胞类型特异性的: 上皮细胞中的角蛋白(keratin)、间质源细胞中的波形蛋白(vimentin)、肌肉源细胞中的结蛋白(desmin)、星形胶质细胞中的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经细胞中的神经丝蛋白(neurofilament proteins)^[3]。另外, 恶性细胞仍保持其来源细胞类型特异中间丝的表达这一事实, 已被广泛用于肿瘤诊断^[4,5], 如癌以表达角蛋白为特征, 肌肉肉瘤以表达结蛋白为特征等。本文根据中间丝蛋白的细胞类型特异性, 建立了抗中间丝蛋

白的间接免疫荧光法, 藉以检测不同类型细胞系间的交叉污染。

材料与方 法

1. 细胞

人宫颈腺癌细胞(HeLa)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、幼地鼠肾细胞(BHK)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO), 均来自本细胞库, 星形胶质瘤细胞(U 251)来自重庆医科大学范维珂教授实验室。

2. 抗体

兔抗人胼胝角蛋白抗体见张荣兴等^[6]。兔抗结蛋白抗体购自 Sigma 公司。抗胶质纤维酸性蛋白单抗购自重庆医科大学范维珂教授实验室。异硫氰酸荧光黄标记的第二抗体(FITC-羊抗兔 IgG 和 FITC-兔抗鼠 IgG)均由本细胞库制备。

3. 细胞系间实验交叉污染

取两个不同类型细胞系培养物分别计数, 然后按照一定比例混合后种入带盖片的培养瓶, 两种细胞总

* 中国科学院“八五”重点项目基金资助

数一般为每瓶五万左右, 37℃培养2—3天后取盖片, 作免疫荧光检测。

4. 间接免疫荧光染色

见张荣兴等^[6]。

结 果

1. 上皮细胞污染其它类型细胞系的检测

上皮细胞特异的中间丝蛋白为角蛋白, 非上皮细胞系若被上皮细胞所污染, 可用抗角蛋白抗体免疫荧光法进行检测。我们测定了两个实验交叉污染系统: 一是 HeLa 细胞污染的间质源的 CHO 细胞, 其比例为: HeLa/CHO = 10^{-4} , 经抗角蛋白免疫荧光染色, HeLa 细胞呈阳性染色, 而 CHO 细胞为阴性, 见图版图 1。二是 HeLa 细胞污染的星形胶质细胞源的 U 251 细胞, HeLa 细胞呈阳性染色, 而 U 251 细胞为阴性, 见图版图 2。

2. 肌肉源细胞污染其它类型细胞系的检测

文献证明, BHK 细胞与某些血管平滑肌细胞一样表达波形丝蛋白-结蛋白杂交分子(vimentin-desmin hybrid)^[7], 且此细胞系来源于胚胎血管平滑肌细胞^[8]。非肌源细胞若被肌原细胞所污染, 可用抗结蛋白抗体免疫荧光法进行检测。我们用 BHK 细胞实验污染了三个非肌源细胞系, 其比例分别为: BHK/CHO = 10^{-4} , BHK/Vero = 10^{-4} 和 BHK/HeLa = 10^{-4} 。然后用抗结蛋白抗体进行免疫荧光检测, 结果表明: BHK 细胞呈阳性反应, 而 CHO、Vero 和 HeLa 细胞为阴性, 见图版图 3, 4 和 5。

3. 星形胶质细胞污染其它类型细胞系的检测

星形胶质细胞特异的中间丝蛋白为胶质纤维酸性蛋白。其它细胞系若被星形胶质细胞所污染, 可用抗胶质纤维酸性蛋白抗体的免疫荧光法进行检测。图版图 6 为星形胶质瘤细胞(U 251)^[9]污染的 HeLa 细胞, 抗胶质纤维

性蛋白免疫荧光染色结果表明: U 251 细胞呈阳性反应, 而 HeLa 细胞为阴性。

讨 论

本文采用了三种抗中间丝蛋白抗体, 即抗角蛋白抗体、抗结蛋白抗体和抗胶质纤维酸性蛋白抗体, 对上皮细胞/间质源细胞, 上皮细胞/星形胶质细胞, 肌肉源细胞/上皮细胞, 肌肉源细胞/间质细胞, 和星形胶质细胞/上皮细胞等 6 个实验交叉污染系统进行了检测, 均获得可靠而明确的结果。特别是对光镜下形态均为成纤维样的 BHK 细胞和 CHO 细胞间的交叉污染, 也能顺利检测。见图版图 3。

结果表明: 抗中间丝蛋白抗体免疫荧光法是检测不同类型细胞系间交叉污染的一个非常有用的方法。与染色体分析法和同功酶法相比, 其明显优点是操作简便、对污染细胞的专一性强。在我们的实验中, 阳性反应的细胞荧光深浅虽有不同, 但与周围背景对比中总能容易的识别出来。因此检测的精度只取决于所检细胞的数量。但也存在缺点, 此法不能检测同种或异种动物的相同细胞类型的细胞系间的交叉污染。

由于许多体外培养的上皮细胞^[10], 肌源细胞和星形胶质细胞均能表达间质细胞所特有的波形丝蛋白, 或表达波形丝蛋白-结蛋白, 波形丝蛋白-胶质纤维酸性蛋白杂交分子^[11, 12], 因而给间质细胞污染其它类型细胞的检测带来了极大的麻烦。另外, 由于神经细胞的体外培养细胞系非常少, 因此在我们的实验中未采用抗波形丝蛋白和抗神经丝蛋白抗体。

摘 要

本文采用抗角蛋白抗体, 抗结蛋白抗体和抗胶质纤维酸性蛋白抗体的免疫荧光法, 对上皮细胞/间质源细胞, 上皮细胞/星形胶质细胞, 肌肉源细胞/上皮细胞, 肌肉源细胞/间质细胞和星形胶质细胞/上皮细胞等 6 个实验交叉污

染系统进行了检测。结果表明：此法是检测不同类型细胞系间交叉污染的一个非常有用的方法。其明显的优点是操作简便，结果灵敏可靠。

关键词：角蛋白 结蛋白 胶质纤维酸性蛋白
间接免疫荧光染色 交叉污染

参 考 文 献

- [1] Lavappa, K. S. et al., 1976, *Nature* (London), 259: 211—213.
[2] Lavappa, K. S. et al., 1978, *In Vitro*, 14: 469—475.
[3] Quinlan, R. A. et al., 1985, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 455: 282—306.

- [4] Ramaekers, F. C. S. et al., 1982, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 46 part I, 331—339.
[5] Osborn, M. and K. Weber. 1983, *Lab. Invest.*, 48: 372—394.
[6] 张荣兴、潘玉芝, 1988, *实验生物学报*, 21(4): 493—503.
[7] Quinlan, R. A. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79: 3452—3456.
[8] Berner, P. F. et al., 1981, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 2: 439—452.
[9] 西山明子, 熊西敏郎, 1989, *蛋白质、核酸、酵素*, 34: 65—80.
[10] Osborn, M. et al, 1980, *Exp Cell Res.*, 125: 37—46.
[11] Sharp, G. et al, 1982, *Exp Cell Res.*, 141: 385—395.
[12] Wang, E. et al, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 2102—2106.

DETECTION OF CROSS-CONTAMINATION BETWEEN DIFFERENT-TYPE CELL LINES BY IMMUNOFLOUORESCENCE STAINING WITH ANTIBODIES AGAINST INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS

ZHANG Rong Xing ZHU De Hou GE Xi Rui

(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

By immunofluorescence staining with antibodies against intermediate filament proteins, we examine six experimental cross-contamination systems, epithelial cell/mesenchymal cell, epithelial cell/astrocyte, muscle cell/epithelial cell, muscle cell/mesenchymal cell and astrocyte/epithelial cell. The results indicate that this method is a useful tool for detection of cross-contamination between different-type cell lines. This method has many advantages, easy to operate, reliable and very sensitive.

Key words: Keratin Desmin GFAP Indirect immunofluorescence microscopy
Cross-contamination

产品介绍

DNA 序列合成——PCR 引物, DNA 探针、接头、随机引物等

为了进一步满足众多的科研和临床检验人员对各种寡聚核苷酸的要求,本所癌基因室(ONCO-LAB)在国内首家购进了世界上先进的德国 ECOSYN 系列 DNA 合成仪,合成效率高、质量绝对保证、价格合理(14 元/碱基, 10 OD₂₆₀ 左右, 纯化)、短期交货(3—7 天)。

聚合酶链式反应(PCR)和定点突变技术的发明,给现代生物学及医学注入了全新的活力,本所癌基因室(ONCO-LAB)雄厚的 DNA 合成技术力量和丰富的经验将为您的临床诊断、目标基因克隆、突变分析、反义战略研究及新型药物开发提供全新服务。另有 DD-PCR(差异显示 PCR)全套引物盒及通用测序引物供应。

联系人: 胡拥军 徐 链 史 璨 联系地址: 上海市岳阳路 320 号 上海细胞生物学研究所 605 室
邮 编: 200031 联系电话: 021-64336896(直线) 传真(FAX): 021-64331090(请注明本室联系人, 以免延误)