

- 543-551.
- [13] Weber, W. S. et al., 1991, *Dev. Biol.*, **148**: 393-397.
- [14] Sagata, N. et al., 1989, *Nature*, **342**: 512-518.
- [15] Presicce, G. A. and Yang, X., 1994, *Mol. Reprod. Dev.*, **37**: 61-68.
- [16] Parrish, J. J. et al., 1992, *Theriogenology*, **38**: 277-296.
- [17] Shi, Z. et al., 1993, *Theriogenology*, **38**: 309 (Abst.)

## STUDIES ON THE INDUCTION OF PARTHENOGENETIC ACTIVATION IN MOUSE OOCYTES BY STRONTIUM AND CYCLOHEXIMIDE\*

LI Guang Peng, WEI Peng, MENG Qing Gang, SUN Xing Shen, TAN Jing He  
(Department of Biotechnology, Northeast Agricultural University, Harbin, 150030)

### ABSTRACT

The experiment was conducted to study the effects of the concentration and treatment duration of strontium chloride, the egg age and the cycloheximide on the activation of mouse oocytes. The results were as follows: (1) The best activation percentage (87%) was obtained when the oocytes were treated with the calcium-free M16 medium containing 1.6 mmol/L SrCl<sub>2</sub>, significantly (P<0.05) higher than those obtained with the calcium-free M16 media containing 1.0, 5.0 or 10.0 mmol/L SrCl<sub>2</sub>; (2) The activation rate achieved when the oocytes were treated with the calcium-free M16 medium containing 1.6 mmol/L SrCl<sub>2</sub> for 10 min was significantly (P<0.05) higher than those achieved when the oocytes were treated with the same medium for 5, 20, 30 or 60 min; (3) The activation rates in the oocytes collected 18 and 20 hours post hCG injection (87% and 84.6%, respectively) were significantly higher than those in the oocytes recovered 14 and 16 hours post hCG (4.8% and 16.5%, respectively), when they were treated under the same conditions; (4) The activation rate was increased further when oocytes were cultured in the medium supplemented with CHX after stimulation with SrCl<sub>2</sub>, indicating that the two drugs have synergistic effect on oocyte activation.

**Key words:** SrCl<sub>2</sub> Parthenogenetic activation Cycloheximide Oocyte Mouse

\*Supported by grants from the Trans-century Talent Foundation of China Education Commission and the Heilongjiang Provincial Foundation for Outstanding Young Scientists.

### 经验交流

## EPO 工程细胞株支原体检测

陈琳 徐秀英

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

细胞培养过程中常常出现支原体污染,污染严重时,可造成细胞一系列生物学性质的改变,甚至使基因工程细胞表达产物不能应用。因此,鉴定工程细胞株时,排除支原体污染是其中

一个重要项目。目前,检测支原体的方法很多,

本工作得到我院微生物流行病学研究所辛颜彬和魏云玲老师的帮助,谨致谢意。

有培养法<sup>[1,2]</sup>、免疫荧光法、DNA 荧光法、探针杂交法<sup>[3]</sup>、PCR 法<sup>[4,5]</sup>等等。为鉴定我们建立的表达 EPO 的 C<sub>2</sub> 细胞株, 本文采用抗支原体单抗免疫荧光法和培养法对 EPO (Erythropoietin, EPO) 工程细胞株进行支原体检测。

## 材料和方法

### 一、材料

细胞株: 表达 EPO 的工程细胞 C<sub>2</sub> 株。

DMEM 培养基, 为 GIBCO 公司产品。

广谱抗支原体单抗免疫荧光法试剂盒购于本院微生物流行病学研究所。

I 号支原体培养基(粉剂): 卫生部生物制品检定所提供。

无支原体小牛血清, 浙江杭州四季青生物工程材料研究所生产。

酵母粉, 青霉素, 琼脂粉, 蛋白胨, 牛肉膏。

已知支原体(阳性对照): 由本院微生物流行病学研究所惠赠。

### 二、方法

1. 利用广谱抗支原体单抗免疫荧光法检测细胞支原体<sup>[6]</sup> 按照试剂盒使用说明书进行。具体步骤如下:

将受检细胞及支原体阳性对照细胞按  $40 \times 10^4$  / ml 浓度制成悬液滴于镀膜玻片孔内, 置密闭湿盒中,  $37^\circ\text{C}$  5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6-8h。室温干燥后, 置冷丙酮中  $-20^\circ\text{C}$  固定 30min。加入抗支原体单抗及对照抗体,  $4^\circ\text{C}$  过夜后用蒸馏水轻洗, 加荧光抗体  $37^\circ\text{C}$  培养 30min。蒸馏水轻洗, 荧光显微镜观察。

2. 按照说明书将 I 号支原体培养基(简称 I 号) 配成溶液并用此液配制液体培养基(按每管 5ml 分装于小试管中) 及固体培养基(按每个平皿 2ml 分装于直径为 36mm 的平皿中)。

3. 首次接种培养 待检的工程细胞 C<sub>2</sub> 株用无抗菌素的 10% FCS DMEM 培养基连续传三代, 选取铺满平层(细胞数约为  $2 \times 10^6$  个) 且三天未换液的一瓶细胞, 弃大部分培养液, 将瓶中细胞于  $-20^\circ\text{C}$  冻存过夜后用自来水冲瓶至培养液融化, 细胞脱落。轻轻吹打将细胞混悬均匀, 小平皿中接种 0.3ml (约  $0.2 \times 10^6$  个细胞), 液体培养管中接种 0.8ml (约  $0.5 \times 10^6$  个细胞),  $37^\circ\text{C}$  厌氧培养。肉汤管中接种 0.8ml,  $37^\circ\text{C}$  培养。以已知支原体为阳性对照, 不含细胞的 DMEM 培养液为阴

性对照, 培养观察 14 天。

4. 盲传两代 将结果为阴性的试管内培养液摇匀, 转种至新的液体培养管中, 同时用原细胞悬液再接种琼脂板, 继续培养 14 天。重复一次。

5. 制片 将平板上生长的支原体菌落制片, 然后用抗支原体单抗免疫荧光法染色<sup>[6]</sup>。

## 结果与讨论

1. 抗支原体单抗免疫荧光法检测 EPO C<sub>2</sub> 细胞支原体 结果可见阳性对照细胞的膜表面有明亮荧光(图版图 1), 阴性对照细胞膜表面无荧光, 同样 EPO C<sub>2</sub> 细胞膜表面也未见荧光, 表明该细胞无支原体污染。

2. 液体培养法检测细胞支原体 在液体培养基中培养 4 天, 阳性对照的培养液开始变黄, 受检样品颜色同阴性对照(红色)。继续培养至 7 天, 阳性对照的培养液明显变黄, 待检样品颜色仍然同阴性对照。继续培养至 14 天, 待检样品颜色仍然同阴性对照。

3. 固体培养法检测细胞支原体 小平皿培养至 7 天, 在显微镜下, 阳性对照可见支原体小菌落, 待检样品及阴性对照均未见任何菌落。继续培养至 14 天, 两块平板颜色略有差别, 阳性对照的平皿表面颜色偏黄, 加 C<sub>2</sub> 细胞悬液的平皿呈浅粉色; 在显微镜下, 阳性对照板上可见支原体菌落, 待检样品及阴性对照均未见任何菌落。支原体菌落制片后用特异抗体荧光染色可见典型荷包蛋形状(图版图 2), 而用无关抗体染色则未见荧光。

4. 细菌培养结果 在肉汤培养中, 对照及样品管中均未见任何沉淀形成及颜色改变。

以上结果表明, 受检工程细胞未被支原体污染。

利用抗支原体单抗免疫荧光法试剂盒检测支原体操作方便, 而且支原体阳性的细胞膜表面有明亮荧光, 阴性细胞膜表面无荧光, 结果易于判断, 但必须有荧光显微镜。

培养法不需要特殊仪器。利用液体培养法检测支原体, 阳性与阴性结果在颜色上显示出明显差别, 但是难以见到支原体菌落。而用固体

培养法检测支原体,阳性与阴性结果在颜色上仅略有差别,但是阳性结果在琼脂板上能够形成支原体菌落,在显微镜下,大菌落呈典型荷包蛋形状,结果显而易见。

本研究采用抗支原体单抗免疫荧光法和培养法同时对表达 EPO 的工程细胞株进行支原体检测,检测结果相吻合,表明该细胞株确为支原体阴性。两种方法同时采用,结果更可靠。

## 摘 要

支原体污染是细胞培养过程中最常见的问题之一,对细胞支原体的检测是细胞特性鉴定的重要方面。我们采用抗支原体单抗免疫荧光法和培养法(包括液体培养法和固体培养法)检测工程细胞支原体。单抗免疫荧光法检测结果表明:支原体阳性的细胞膜表面有明亮荧光,工程细胞 EPO C<sub>2</sub> 细胞膜表面无荧光。支原体液体培养法结果显示:作为阳性对照的支原体由于在生长过程中产酸使培养液变黄,而加入 EPO C<sub>2</sub> 株细胞悬液的样品管与阴性对照管相同,无

颜色变化。固体培养法结果显示:在显微镜下观察,支原体阳性对照在固体培养基上呈荷包蛋样集落,而阴性对照及 EPO C<sub>2</sub> 株细胞样品均无菌落生长。以上结果表明:受检的 EPO C<sub>2</sub> 株细胞未被支原体污染。

关键词: EPO 工程细胞 支原体 细胞培养 单抗免疫荧光法

## 参 考 文 献

- [1] 卢锦汉等,1989,中华微生物学和免疫学杂志,9卷,生物制品专辑,pp.80-83.
- [2] 郭进林等,中华医学会第一次全国细菌 L 型与支原体学术会议论文摘要汇编,p.164.
- [3] Mattsson, J. G. et al., 1993, *FEMS Microbiol. Lett.*, 107:139-144.
- [4] Van Kuppeveld, F. J. et al., 1992, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8):2606-2615.
- [5] Harasawa, R. et al., 1993, *Res. Microbiol.*, 144:489-493.
- [6] 杨保安等,1993,军事医学科学院院刊,17(1):36-38.

# THE EXAMINATION FOR MYCOPLASMA IN EPO C<sub>2</sub> ENGINEERING CELL LINE

CHEN Lin XU Xiu Ying

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

## ABSTRACT

Mycoplasma contamination must be prevented during cell culture. Mycoplasma examination is an important aspect in determining the characteristics of engineering cell line. There are many methods for detecting mycoplasma, including PCR method, probe blot method, culture methods (liquid and solid culture) and so on. In this study, we examine mycoplasma in EPO C<sub>2</sub> engineering cell line with an immunofluorescence method in which we use monoclonal antibody as probe. The results show that the EPO C<sub>2</sub> cell line examined has not been contaminated by mycoplasma.

Key words: EPO engineering Mycoplasma Cell culture Immunofluorescence method