

图版说明

系膜细胞经荧光漂白后的荧光回复现象

- A. 相邻两细胞之一经荧光漂白后 9 分钟可见荧光回复现象  
B. 与其他细胞无连接的单个系膜细胞经荧光漂白后无荧光回复现象

### 经验交流

## 细胞培养物中的逆转录病毒检测

张荣兴 吕沅冈 杨正洪 喻峰 朱德厚 葛锡锐

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

细胞培养物的各种内源性和外源性病毒感染特别是人病毒如 EBV、狂犬病毒、疱疹病毒、腺病毒和人 RNA 肿瘤病毒等,严重地威胁细胞系(株)的质量控制。同时,如防护不当,将危及操作人员的身体健康。为此美国典型培养物保藏中心(ATCC)的细胞库目录中,对一些具有内源病毒的细胞系(株)均明确指出具体的防护要求。例如释放高滴度 EBV 的 B 95-8 细胞<sup>[1]</sup>和产生 T-细胞白血病病毒的 MJ 细胞等<sup>[2]</sup>,均要求作为潜在的生物危险材料而至少在二级生物安全规范(Biosafety Level 2 Containment)下操作。因此,作为收集和保藏细胞系(株)的中国科学院细胞库,不断建立各种内源和外源病毒的检测方法是当务之急。

与淋巴瘤密切相关的逆转病毒的特征是在

病毒颗粒中存在逆转录酶(Reverse Transcriptase, RT),此酶在病毒的增殖过程中是必须的<sup>[3]</sup>。因此,通过 RT 的检测,可间接证明逆转录病毒的存在。本文用非放射性法对 Hut-102 等 6 个细胞系进行了逆转录病毒检测。

### 材料和方法

#### 1. 细胞

人慢性髓性白血病细胞 K 562,小鼠骨髓瘤细胞 SP 2/0,人正常肝细胞 L-02,人肺腺癌细胞 SPC-A-1,人肝癌细胞 SMMC-7721 和人皮肤 T 细胞淋巴瘤细胞 HUT-102 均来自本细胞库。

#### 2. 细胞培养物准备

中国科学院“八五”重点项目基金资助。

细胞处于良好生长状态对逆转录酶的检测是非常重要的。一般当细胞长到最大密度的50%—60%时更换培养液,并继续培养24小时后收集培养液。

### 3. 样品制备

培养液经4℃,8000g离心10分钟,小心取出上清液,弃去沉淀。取9毫升上清液再经4℃,10000g水平头超速离心0.5小时,尽量吸干上清液,沉淀作为逆转录酶待测样品,−70℃保存。

### 4. 逆转录酶测定,流程图如下

沉淀溶于40μl溶解缓冲液(Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.8, 含KCl 80 mmol/L, DTT 25mmol/L, EDTA 0.75 mmol/L 和0.5% TritonX-100)室温30分钟。

↓  
加20μl反应混合液[Tris-HCl 50 mmol/L, KCl 290mmol/L, MgCl<sub>2</sub>30mmol/L, DTT 10mmol/L, Digoxigenin-dUTP, biotin-dUTP 和 dTTP 10μmol/L 及 template/primer hybrid (PolyA. Oligo(dT)<sub>15</sub>)0.75 A 260nm/ml], 37℃, 15 小时。

↓  
将60μl反应液加到用链酶亲和素(Streptavidin)包被的ELISA板孔中, 37℃, 1 小时。

↓  
吸去反应液,用洗涤液洗5次,每次30秒钟以上。

↓  
加200μl过氧化物酶标记的抗Digoxigenin抗体(200mU/ml), 37℃, 1 小时。

↓  
用洗涤液洗5次,每次30秒钟以上。

↓  
加200μl过氧化物酶底物, 25℃, 30 分钟。

↓  
测定O.D.<sub>405</sub>值。

标准曲线用40μl不同浓度的重组HIV-1逆转录酶代替测定样品,同上步骤同时进行。测定试剂均购自BOEHRINGER MANNHEIM公司。

## 结 果

我们用非放射性法对6个细胞系进行了逆转录酶测定,同时每次测定均用不同浓度的重组HIV-1-RT作标准曲线和阳性对照,用不加HIV-1-RT的溶解缓冲液和正常培养液作为阴性对照。待测样品O.D.<sub>405</sub>值大于阴性对照2.1倍为阳性(表1)。

图1为逆转录酶非放射性法测定的酶标照片。A为不同量的重组HIV-1-RT,自上至下为0、2、5、10、20、40、60、和80pg。B为9ml不同细

表1 逆转录酶测定结果

HIV-1RT (pg/well)	O. D. <sub>405</sub>	细胞*	O. D. <sub>405</sub>
0	0.124	正常培养液	0.113
2	0.244	K562	0.112
5	0.408	SP2/0	0.140
10	0.607	L-02	0.109
20	1.462	SPC-A-1	0.111
40	2.308	SMMC-7721	0.111
60	2.680	Hut-102	1.051
80	over	Hut-102	0.394

\* 9mL 培养液浓缩物

胞培养上清液的超速离心沉淀物,自上至下分别为K562、SP2/0、L-02、SPC-A-1、SMMC-7721、Hut-102和Hut-102细胞。图2为逆转录酶标准曲线。

结果表明,Hut-102细胞为阳性,而其它5个细胞系为阴性。从对照标准曲线可知9ml Hut-102细胞培养液中逆转录酶的含量约为5—18pg。

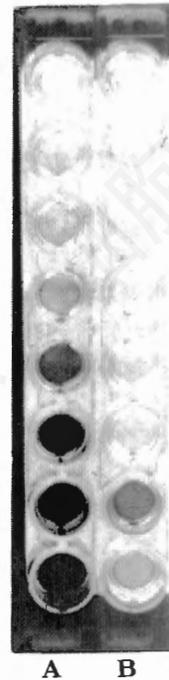


图1 非同位素法定量检测结果  
A. 为不同稀释度的(0—80pg/well)的HIV-1-RT  
B. 为不同培养上清的超速离心沉淀物,自上至下分别为:  
1 正常培养液      5 SPC-A-1  
2 K562              6 SMMC-7721  
3 SP2/0             7 Hut-102  
4 L-02                8 Hut-102

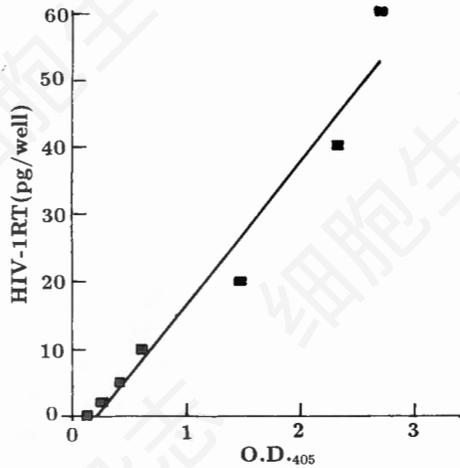


图 2 逆转录酶测定标准曲线

## 讨 论

本文用非放射性法测定了 6 个培养细胞培养液超离心沉淀物逆转录酶的含量,间接证明细胞培养物中逆转录病毒的存在。在 6 个细胞系中,Hut-102 细胞为阳性,这与 Hut-102 细胞释放与 T-细胞淋巴瘤有关的 C 型逆转录病毒的结果相一致,此病毒被鉴定为 HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus)<sup>[4,5]</sup>。

由于逆转录病毒包括许多重要的动物病原体和两个新发现的人病原体:AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)和成熟 T-细胞白

血病/淋巴瘤致病因子<sup>[3]</sup>。同时 RNA 肿瘤病毒与多种疾病有关,其中包括一些人的致死疾病,如白血病、淋巴瘤、肉瘤和中胚层来源的肿瘤,乳房癌、肝癌、肾癌和自身免疫疾病等<sup>[6]</sup>。因此,为了操作人员的健康安全,细胞培养物中的逆转录病毒的检测是至关重要的。

## 摘 要

本文用非放射性法测定了 K562,SP2/0,L-02,SPC-A-1,SMMC-7721 和 Hut-102 等 6 个细胞培养液超离心沉淀物逆转录酶的含量,间接证明细胞培养物中逆转录病毒的存在。结果表明,Hut-102 细胞为阳性,其它 5 个细胞系为阴性。

关键词: 逆转录酶试验 逆转录病毒 细胞系

## 参 考 文 献

- [1] Hay, R., et al., American Type Culture Collection, Catalogue of Cell lines and Hybridomas, Seventh Edition, 1992, p. 153.
- [2] 同上, p. 187.
- [3] Varmus, H., 1988, *Science*, **240**:1427-1435.
- [4] 同文献[1], p. 298.
- [5] Poiesz, B., J., et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:7415-7419.
- [6] Francki, R., I., B., et al., 1991, *Archives of Virology suppl.* **2**:290-299.

## DETECTION OF RETROVIRUSES IN CELL CULTURES

ZHANG Rong Xing LU Yuan Gang YANG Zheng Hong YU Feng ZHU De Hou GE Xi Rui  
(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

### ABSTRACT

By non-radioactive reverse transcriptase (RT) assay, we detected RT activity of ultracentrifuged pellet of culture supernatant in six different cell lines. The results indicate that only Hut-102 cell shows positive reaction, but K562, SP2/0, L-02, SPC-A-1 and SMMC-7721 cells are negative. We suggest that Hut-102 cells release retrovirus as indicated by Poiesz, B., et al. It is very important to detect retroviruses in cell cultures because retroviruses are associated with a variety of diseases, including some lethal diseases.

Key Words: Reverse transcriptase assay Retrovirus Cell line.