

构, 细胞外骨架与细胞膜下的细胞内骨架(肌动蛋白、中间丝、微管)相对, 并呈平行交错排列, 细胞内、外骨架相互连接相互作用, 使细胞在支持物上形成支撑点而向前铺展及移动^[5]。

FN 分子上具有许多功能区, 可分别结合纤维蛋白、胶原、糖胺多糖、DNA、透明质酸、肌动蛋白、细菌及细胞表面^[6], 构成细胞与细胞外基质相互间的复杂结合。FN 片段对心肌细胞铺展作用小于 FN, 可能是其功能单位减少所致。

摘 要

本研究用分离的新生大鼠心肌细胞, 观察不同的细胞外基质, 在培养不同时间对心肌细胞铺展的影响。结果表明, 不同的细胞外基质影响心肌细胞铺展, 在培养 8 小时即出现差别, 48 小时差异明显, 其中 FN 促进心肌细胞铺展, 而 FN 的片段延缓心肌细胞的铺展。

实验技术

细胞培养中支原体污染的检测*

吕沅圃 喻 峰

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

支原体是细胞培养中常见的污染源, 能影响培养细胞的各项参数^[1]。其个体微小(0.3—0.8 μm), 能透过 0.45 μm 孔径的滤膜, 且对大多数抗生素不敏感^[2], 致使对污染的防治仍颇为困难。

American Type Culture Collection(ATCC)和日本理化研究所细胞银行等提供标准化细胞系的细胞库/细胞银行都制订了细胞培养物的支原体污染的检测条例。中国科学院细胞库也把对支原体污染的检测作为最基本的质量控制项目之一。

图 版 说 明

1. 新生大鼠心肌细胞, 培养 1 小时, 细胞贴壁, 呈圆形或多角形。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400
2. 新生大鼠心肌细胞, 培养 12 小时后, 细胞铺展, 呈三角形或梭形, 出现应力纤维。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400
3. 新生大鼠心肌细胞, 培养 48 小时后, 细胞出现明显的横纹。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400

参 考 文 献

- [1] Borg TK, 1982, *Anat Rec*, 165: 435—444.
- [2] Borg TK, et al., 1984, *Dev Biol*, 104: 86—96.
- [3] Rubin K, et al., 1981, *Exp Cell Res*, 135: 127—135.
- [4] Hynes RO, 1987, *Cell*, 48: 549—554.
- [5] 马学惠等, 广州医药, 1989, 3: 40—43.
- [6] Yamada KM, et al., In: *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Ed by Trelstad RL, Alan R, Liss, Inc, New York, 1985, 89—121.

我们采取了以应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色为主, 辅之以微生物培养(支原

* 本工作属于“七五”中科院生物学重大课题“细胞库的建立及技术研究”的内容之一。工作中得到沈鼎武、吕淑霞、葛锡锐、朱德厚、洪龙生等老师的指导和周翠堤老师的指点, 特此致谢!

** 在 90 ml 超纯水中溶解 5 g 葡萄糖, 1 g 精氨酸, 2 mg DNA, 92.2 mg 氯化胆碱, 2 mg 盐酸吡哆醛, 11 mg 肌醇, 2.4 mg 烟酰胺, 2.4 mg 泛酸钙, 1.3 mg 叶酸, 1 mg 核黄素, 0.3 mg 维生素 B₁₂, 0.2 mg 生物素, 1 mg 维生素 B₁, 37°C 溶解后定容至 100 ml, 用 0.22 μm 滤膜过滤, -70° 保存。

*** 均由中国兽药监察所提供, 特此致谢。

体营养肉汤培养和支原体营养琼脂培养)的支原体污染的综合检测体系,检测了45个细胞系,结果报道如下。

材料和方法

一、应用指示细胞培养物的DNA荧光染色方法^[3]

在放有小盖片的平皿接种 1.0×10^4 /ml 的指示细胞(Vero 细胞 ATCC CCL 81, DMEM 培养液含 10% 小牛血清), 在 37°C 、5% CO_2 中培养 24 小时后, 每皿接种 100 μl 样品, 继续培养 4 天。取出盖片, 用 D-Hanks 液漂洗, 以固定剂(甲醇:乙酸 = 3:1)固定两次, 分别为 5 分钟、10 分钟。然后用 Hoechst 33258 染液(5 mg/ml 33258 染料, 加入 100 ml 不含酚红的 D-Hanks 液室温搅 45 分钟, 分装 -20°C 保存。临用时再以同样溶液作 1% 稀释, 搅拌 30 分钟)染 30 分钟。干燥后封片(22.2 ml 0.1 mol/L 柠檬酸、27.8 ml 0.2 mol/L Na_2HPO_4 及 50 ml 甘油)。 $\times 400$ 荧光显微镜检查。指示细胞的细胞核外有细小荧光亮点者为阳性(图版图 2), 反之则为阴性(图版图 1)。

二、支原体营养肉汤培养^[4]

设置 pH 6.5 和 pH 7.6 两列支原体营养肉汤管(1.47 g 支原体肉汤培养基 BBL-11458, 溶于 60 ml 超纯水, 加 20 ml 马血清, 10 ml 25% 新鲜酵母抽提液, 10 ml 添加剂**, 0.2 ml 1% 酚红。0.22 μm 孔径滤膜过滤), 3 ml/管。加样 100 μl /管, 37°C 培养一周, 见初始 pH 6.5 管变碱者可能为精氨酸型支原体污染; 见初始 pH 7.6 管变酸者可能为发酵型支原体污染。

三、支原体营养琼脂培养

加 100 μl 样品于支原体营养琼脂上(2.38 g 支原体琼脂培养基 BBL-11456, 溶于 60 ml 超纯水, 121°C 15 分钟。冷至 50°C , 无菌加入 20 ml 马血清, 10 ml 25% 新鲜酵母抽提液, 10 ml 添加剂**, 调 pH 7.2。每只 $\phi 45$ mm 平皿加 4 ml), 37°C 、5% CO_2 培养。3 天后至 4 周内 $\times 100$ 显微镜观察有无特征性形状——煎蛋状的支原体集落形成。有者即为阳性(图版图 3)。

四、各种检测方法的灵敏度的测定

1) 支原体标本 $1/4$ 稀释系列准备。配制一系列支原体肉汤管 3 ml/管, 编号 1^* — 20^* , 吸 1 ml 支原体标本加入 1^* 管混匀后, 从 1^* 吸 1 ml 加入 2^* 混匀, 依次吸加至 20^* , 得到 4^{-n} 即 4^{-1} — 4^{-20} 的支原体标本稀释系列。

2) 以每个稀释度为样品分别加到指示细胞生长的平皿、支原体肉汤管和琼脂平皿中, 上样量均为

25 μl 。每一样品作 3 个复份。以显示阳性结果样品的最大稀释度的倒数为检测滴度。

3) 原始(未经稀释)支原体标本以集落形成单位 Colony Forming Units, CFU) 的计数^[5]。按公式:

$$\text{CFU/ml} = \text{某适当稀释度的平均集落数} \times \frac{1}{\text{稀释度}} \times 40$$

即为未经稀释标本的支原体浓度 (CFU/ml)。

4) 检测方法的检测灵敏度的计算。

检测灵敏度 (CFU/ml) =

$$\frac{\text{原始标本支原体浓度 (CFU/ml)}}{\text{相应方法的检测滴度}}$$

五、细胞培养物的支原体污染检测

共检测了 45 个细胞系, 包括人的肿瘤细胞, 小鼠、大鼠、中国仓鼠的肿瘤和正常细胞, 小鼠-小鼠杂交瘤细胞, 其中有国内自建的也有国外引进的。分别由中科院细胞所的有关课题组, 中科院生化所、生理所和上海市第九人民医院等单位提供。

1) 细胞样品的采集。

贴壁生长细胞, 用无抗生素的培养液传代, 换无抗生素培养 3—4 天后呈连续单层生长, 弃去大部分培养液, 将贴壁细胞冲下成细胞悬液, 从中取样。

悬浮生长细胞, 用无抗生素培养液换液两次, 从生长 3—4 天高密度培养物中取样。

冻存细胞, 直接从解冻安瓿取样。

2) 检测过程。每份标本同时分别采取应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色、支原体营养肉汤培养和支原体营养琼脂培养来检测支原体污染。

3) 检测结果的判断。应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色, 支原体营养肉汤培养和支原体营养琼脂培养, 虽然其中任何一种方法的阳性结果都可表示受检标本被支原体或其它微生物的污染, 但由于各种方法在检测专一性、灵敏度和标准化等方面各有利弊, 为控制假阴性和假阳性在最低限度, 我们把 3 种方法的结果综合起来判断检测结果。以应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色呈阳性, 判别该受检标本为支原体等微生物所污染。以支原体营养琼脂培养呈阳性, 确证受检标本为支原体所污染。以支原体营养肉汤培养呈阴性, 判别受检标本未经支原体等污染。

每组实施时, 均设置阳性和阴性对照。阳性对照* 为 *M. hyorhinis* (BST-7) 和 *M. arginini* (G 230), 阴性对照为支原体营养肉汤。

结果与讨论

我们检测的 45 个细胞系中 30 个细胞系有

支原体等微生物污染,污染率达66.6%;确证支原体污染的有14个细胞系,污染率为31%(表3)。

在数百例检测中仅遇到几次对支原体营养肉汤培养阳性而应用指示细胞培养物的DNA荧光染色阴性的标本,经营养肉汤扩增后再作检测都得到了应用指示细胞培养物的DNA荧光染色阳性的结果,其中有一例支原体营养琼脂培养也阳性。

以两种支原体标本为例,三种检测方法的灵敏度见表1。支原体营养肉汤培养显示的最高滴度管(相当于已扩增之标本)。再作应用指示细胞培养物的DNA荧光染色和支原体营养琼脂培养检测,都显示阳性。

由此可见,基于标准微生物学检测过程的支原体营养肉汤培养最为敏感,而支原体营养琼脂培养则专一性最强。但诸如培养基的配方成份、培养条件等因素都可显著地影响支原体在人工培养基的生长^[6]。还有些支原体株,如 *M. hyorhinis* DBS 1050 等,不能在无(宿主)细胞的标准培养基上生长和形成特征性的集落,根本无法用经典的培养方法来检测^[7]。支原体不侵入哺乳动物细胞,通常吸附在宿主细胞表面^[8]。Chen^[9]率先使用非特异性的DNA荧光染料Hoechst 33258,直接对可贴壁生长细胞培养物作DNA荧光染色,检测支原体污染,扩大了可被检出的支原体种类,缩短和简化了检测过程。Del Giudice等^[7]报道,直接的DNA荧光染色方法对细胞培养中常见支原体污染种类的检出与微生物培养及荧光抗体法等的结果的符合率是相当高的(表2),其检测灵敏度取决于各种支原体对宿主细胞的附着能力。Hoechst 33258是对DNA专一的染料,因此含DNA的微生物污染都可检出,如表3的E₄₉细胞系的细菌污染。随后Richard等^[10]发展了应用指示细胞培养物的DNA荧光染色方法,因具下述优点而被广泛使用,(1)可设置阳性和阴性对照并使受检标本有一致的背景,从而提高了标准化程度;(2)能检出经典培养方法

不能检测的支原体种类;(3)对不能贴壁生长的培养物也能作支原体污染检测;(4)尤其适宜于大批量的不同株系培养物的支原体污染检测,如可简化培液配制等。指示细胞的选择则要求,(1)尽量减少可干扰结果的非特异性背景活性;(2)能有效地支持各种支原体株系的生长;(3)已建系的细胞。因此除本文使用的非洲绿猴肾细胞(Vero)外,常被选用的还有瑞士白化体小鼠胚胎细胞(3T6)和婴幼儿仓鼠肾细胞(BHK-21)等。

表1 三种检测方法的灵敏度

灵敏度 (CFU/ml)	应用指示细胞培养的 DNA 荧光染色	支原体营养肉汤培养	支原体营养琼脂培养
<i>M. hyorhinis</i>	$>1.0 \times 10^2$	$>1.0 \times 10$	$>6.0 \times 10^4$
<i>M. arginini</i>	$>4.0 \times 10^4$	>5.0	$>6.4 \times 10^8$

表2 支原体检测的DNA荧光染色与经典培养方法的比较 (1975—1981)

支原体种类	DNA 荧光染色/培养及荧光抗体的方法	DNA 荧光染色阳性率%
<i>M. orale</i>	358/372	96
<i>M. salivarium</i>	3/3	100
<i>M. hominis</i>	22/22	100
<i>M. fermentans</i>	39/49	80
<i>M. arginini</i>	179/188	95
<i>A. sp</i>	85/90	94
<i>M. bovis</i>	4/4	100
<i>M. hyorhinis</i>	421/421	100
Serogroup 38	16/21	76
Total	1127/1170	96

在细胞培养物的支原体污染的检测方面,我们采取的应用指示细胞培养物的DNA荧光染色,基本满足了细胞培养物中各种可能污染的支原体种类的检出,包括那些不能在无细胞培养基生长的种类,如表2的NVK细胞系等DNA荧光染色检出阳性而培养呈阴性就有这种可能。同时我们辅之以支原体营养肉汤培养,保证了诸如 *M. arginini*, *M. orale* 等对宿主细胞附着能力差的支原体株在低滴度污染

表3 45个细胞系的检测结果

应用指示细胞 细胞株系	培养的 DNA 荧光染色	支原体营养 肉汤培养 pH 6.5	支原体 营养琼 脂培养	细菌营 养肉汤 培养
BEL-7402	+	-	+	+
QGY-7703	+	-	+	+
BEL-7404	+	+	-	+
BEL-7405	+	-	+	+
RAT-1	+	-	+	+
CHL	+	-	+	+
B 16	+	-	+	+
Lovo	+	+	-	-
BRL	+	+	-	-
3 T3	+	+	-	-
SMMC-7721	+	-	+	+
SH-77	+	-	+	-
SPC-A-1	+	-	+	-
SL	-	-	-	-
CL 2	-	-	-	-
CL 5	-	-	-	-
CHO	+	+	-	-
KB	+	+	-	-
CNE	+	+	-	-
*SP 2/0	+	+	-	+
**NS-1	+	+	-	+
K 562	+	-	+	-
S 562	+	-	+	+
舌癌	-	-	-	-
MFC	-	-	-	-
P-653	-	-	-	-
S-180	+	-	+	+
RH-35	-	-	-	-
L-6 TG	+	-	+	+
*SP 2/0	-	-	-	-
**NS-1	-	-	-	-
XAg 653	-	-	-	-
RF	-	-	-	-
HOP-2	+	+	-	-
KB-C 10	+	-	+	-
B 7 H 11	+	+	+	-
NVK	+	-	-	-
PC	+	+	+	+
乳腺癌	-	-	-	-
E 49	+	+	+	+
N-H	-	-	-	-
J 1	+	+	+	-
HG 2	+	+	+	-
LC-1	-	-	-	-
LSG-116	-	-	-	-

*,** SP 2/0, NS-1 等来自不同实验室。

时的检出；支原体营养琼脂培养检测则满足了检测系统的完整性。这样就满足了动物细胞库质量控制的要求。

何大澄等^[1]曾介绍了一些检测支原体污染的方法，并对使用电镜方法作过较详细的介绍，电镜方法除了存在该文所提到的假象干扰外，由于支原体分布极不均匀，常会影响检测的实际灵敏度。同时因电镜标本制作及观察的时间较长，及人力、物力的限制，也不宜在细胞库作常规检测手段。

由于不同支原体的 rRNA 基因有显著的顺序同源性^[12]，使得支原体表现出免疫原性上所固有的相似性^[13]，因此将可能筛选出对支原体具有广泛交叉活性而对非支原体的其它原核生物和真核生物没有交叉反应的单克隆抗体，从而为使用固相酶联吸附分析(ELISA)方法来提高支原体污染检测的灵敏度和专一性，并简化检测程序，提供了新的前景。

摘 要

本文介绍以应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色为主，辅之以微生物培养(支原体营养肉汤和琼脂培养)的方法作为细胞培养中的支原体污染的检测系统。用该系统检测了 45 个细胞系，支原体等微生物污染达 66.6%，其中确证支原体污染率为 31%。

参 考 文 献

- [1] Barile, M. f. 1981, *Isr. J. Med. Sci.* 17, 1.
- [2] Freundt, E. A. and D. G. Edward 1979, In: *The Mycoplasma*, ed. by Barile, M. F. ed. I, 1-41 Academic Press, New York.
- [3] Hay, R. J. 1985, *ATCC quality control methods for cell lines* pp. 159-165 ATCC Maryland 20852.
- [4] Barile, M. F. and G. J. McGarrity 1983, In: *Methods in Mycoplasmaology II*, ed. by Tully, J. G. and S. Razin pp. 159-165 Academic Press, New York.
- [5] Rodwell, A. W. and R. F. Whitcomb 1983, In: *Methods in Mycoplasmaology I*.

- ed. by Razin, S. and J. G. Tully pp. 186—188 Academic Press, New York.
- [6] McGarrity, G. J. et al. 1979, *In Vitro*. 15: 73—81.
- [7] Del Giudice, R. A. et al. 1980, *Current Microbio.* 4: 75—80.
- [8] Del Giudice, R. A. and R. S. Gardella 1984, *In Vitro monograph No. 5* pp. 104—115 Tissue Culture Association Gaithersburg, Md.
- [9] Chen, T. R. 1977, *Exp. Cell Res.* 104: 255—262.
- [10] Richard, A. et al. 1978, In: *Mycoplasma Infection on cell culture* ed. by McGarrity, G. J. et al. Plenum Press. New York.
- [11] 何大澄等, 1984, *细胞生物学杂志*, 6 (4): 153—156.
- [12] Amikam, D. et al. 1984, *J. Bacteriol.* 153—156 158: 376.
- [13] Kotani, H. et al. 1987, *Isr. J. Med. Sci.* 23: 752.

从固定的细胞和组织中分离 DNA 研究人 tk 基因多态性

乔守怡 刘 阳 孙光荣 蔡新中 赵寿元

(复旦大学遗传和遗传工程系 200433)

目前从 DNA 水平上开展人类遗传学和医学遗传学的研究受到人们的重视。例如: 调查人群中某些基因座位 DNA 片段长度多态性的出现频率以探讨种群之间进化上的亲缘关系、分析 RFLP 与某些疾病之间的连锁关系作为疾病诊断指标、研究遗传病患者的基因结构的特征等都是当前十分活跃的研究领域。这些研究往往需要采集许多 DNA 样品, 包括遗传病患者的 DNA。由于我国幅员广阔, 所需调查的对象有些处于边远地区, 鲜血或组织材料中的 DNA 极易降解, 不便长途携带, 这给研究工作带来很大困难。本文介绍用固定液固定人体组织块或白细胞, 从中抽提 DNA, 用于研究 tk 基因的 RELP, 取得了令人满意的结果, 解决了上述困难问题。

材料与方 法

一、材料

1. 人体胃癌及癌旁非癌胃组织(由第二军医大学附属长海医院手术室提供), 在手术后立即用 TE 缓冲液洗涤后固定。

2. 取 5 ml 人静脉血, 1000 rpm 离心 10 分钟,

取中间白细胞层, 用 PBS(pH 7.4)洗涤一次, 1000 rpm 再离心 10 分钟, 收集沉淀。低渗去除红细胞后, 1000 rpm 离心 10 分钟, 收集白细胞后固定。

二、固定液

人体组织块、白细胞和培养细胞分别加入固定液甲醇:冰醋酸(3:1)或乙醇:冰醋酸(3:1), 置 4℃冰箱保存数天至数月。

三、DNA 的抽提

固定的细胞先离心弃去固定液, 用 TE 洗涤细胞 3—5 次, 准备抽提 DNA。固定的组织块 1.0—1.5 克, 离心弃去固定液。用 TE 反复洗涤后, 将组织块剪碎, 放入不锈钢电动组织捣碎器中, 加入液氮, 捣碎成粉状。待液氮挥发后, 再用 TE 洗涤, 准备抽提 DNA。这些经预处理的材料用 0.5% SDS 处理, 而后加 150 μg/ml 蛋白酶 K 处理, 37℃过夜。次日用酚、氯仿各抽提一次, 透析过夜。加 RNaseA 至 100 μg/ml, 37℃ 3 小时, 再加 SDS、蛋白酶 K, 37℃处理过夜。重复用酚及氯仿抽提, 用 TE 缓冲液(pH 8.0)透析, 隔日取出。乙醇沉淀 DNA, 用玻璃棒挑出絮状 DNA, 溶解在 TE 中, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

四、酶的消化与分子杂交

将收集到的 DNA 用 KpnI 酶消化。10 μg DNA 样品加入 5—8 μl KpnI(上海华美公司产品, 16 u/ul),