文章编号:1000-5404(2009)23-2403-02

技术方法

细胞培养中污染支原体的检查

唐书谦,伍津津,杨 涛,王兵强,杨桂红 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤性病科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨细胞培养中简便可靠的支原体污染的检查法。**方法** 收集本室现有不同批次的种子细胞和试剂等,根据检查方法不同分类。①DNA荧光染色检查法:包括成纤维细胞(Fibroblast,Fb)、角朊细胞(Keratinocyte,KC)小牛血清、Vero细胞-1、A549细胞 、Vero细胞-2 、DMEM完全培养基、DMEM无抗菌素培养基、1640培养基、胎牛血清、鼠尾胶原、牛尾胶原、壳多糖、硫酸软骨素透明脂酸酶、磷酸盐缓冲液、D-Hanks液等待检标本16种。②培养检查法:包括Fb、KC和小牛血清3种主要标本,采用"精氨酸支原体肉汤培养基"、"支原体半流体培养基"培养法。**结果** DNA荧光染色法检查16种标本,阳性率为18.75%(3/16)。培养法检查:Fb、KC和小牛血清3种主要标本中,阳性率为33.3%(1/3)。**结论** 细胞培养中支原体检查方法,DNA荧光染色法较之培养法具有简单、方便,相对需时较短等优点,结果稳定、可靠。

支原体是细胞培养污染中最常见的一种微生物,世界范围内细胞系的支原体污染率在15% ~50%之间[1]。充分说明支原体感染是一个普遍存在的问题,不可忽视。受支原体污染的细胞,用于科研或临床都将产生不良的后果。有关支原体的检查方法有多种,如支原体培养法、DNA荧光染色法、DNA杂交法和PCR快速检查法、基因突变细胞检测法等。本研究收集了本室现有不同批次的种子细胞和试剂等16种标本,以DNA荧光染色法检查。并同时对FB、KC和小牛血清3种主要的标本作了培养检查法。现将结果和体会报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

收集本室不同批次之种子细胞和试剂:包括成纤维细胞(Fibroblast)、角朊细胞(Keratinocyte)小牛血清、Vero细胞-1(本校微生物教研究室提供)、A549细胞(本校全军免疫研究所提供)、Vero细胞-2(上海生物研究所购)、DMEM完全培养基和DMEM无抗菌素培养基(Gibco公司提供)、1640培养基、胎牛血清、鼠尾胶原、牛尾胶原、壳多糖、硫酸软骨素透明脂酸酶、磷酸盐缓冲液、D-Hank液共16种。

精氨酸支原体肉汤培养基[mycoplasma(Ma)broth medium base]、支原体半流体培养基(mycoplasma semi-fluid base)。北京三药科技开发公司生产。

二苯甲酰胺荧光染料(Hoechst 33258)工作液,由碧云天生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA荧光染色法[2]

1.2.1.1 材料准备 取指标细胞(Vero细胞)传代培养,经消化后制成10^5/ml细胞悬液。然后取6孔或12孔细胞培养板,每孔分别接种Vero细胞0.5 ml。并同时再分别加入"无抗菌素1640培养基"。置于5% CO_2孵箱(36±1)℃培养过夜,备用。

1.2.1.2 待检标本培养 将供试待检标本经"无抗生素培养液"培养,并传代至少1次。然后取细胞已长满、且3 d未换液的细胞培养上清液2 ml,加入上述备用的指示细胞培养板孔内,其他待检标本如培养基等可直接取量加入。然后置于5% CO_2孵箱(36±1)℃培养3~5 d,至少传代1次,在末次传代时同时作爬片培养3~5 d。最后取爬片培养作DNA荧光染色。

1.2.1.3 DNA荧光染色法 吸出培养孔中的培养液,加入固定液于培养孔内固定爬片5 min,然后弃去固定液重新加固定液固定10 min,再吸出固定液使细胞爬片在空气中干燥,加二苯甲酰胺荧光染料(Hoechst 33258)工作液,室温染色30 min。吸出染液,水洗3次,每次1 min,最后取出细胞爬片于空气中干燥,然后另取洁净载玻片加封片液1滴,分别将细胞爬片的细胞面向下,盖在封片液上即完成制片。Olympus荧光显微镜观片。

1.2.1.4 结果判断 阳性在细胞内、外可见大小不等、不规则的荧光颗粒,或丝状物。阴性:仅见指示细胞的细胞核呈现黄绿色荧光。

1.2.1.5 对照实验 阴性对照用"无抗生素培养基"2 ml替代待检标本,同上法操作。阳性对照实验用已知"阳性感染标本"2 ml替代待检标本,同上法操作。

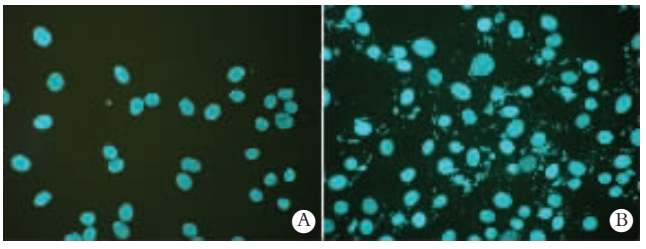
1.2.2 培养检查法[2] 按"精氨酸支原体肉汤培养基"、"支原体半流体培养基"培养法常规进行。①准备"精氨酸支原体肉汤培养"、"支原体半流体培养基"各4支(半流体培养基用前煮沸10~15 min,冷却至56 ℃左右,加入20%灭活小牛血清,并同时加入适量青霉素充分摇匀。液体培养基除无需煮沸外,用前同时加上述成分)。②每支培养基接种待检标本(细胞培养上清液)0.5~1 ml,置孵箱(36±1) ℃培养21 d。③于接种后的第7 d从上述各4支中再分别各取2支进行次代培养,每一支分别接种于"半流体培养基"及"支原体肉汤培养基"各2支,置孵箱(36±1) ℃培养21 d。每隔3天观察1次。④结果判断:"半流体培养基"、"支原体肉汤培养基"阳性:可见培养有菌生长、pH值发生改变。pH值无改变、培养无菌生长为阴性。如疑有支原体生长,可取加倍量待检标本复试。如

作者简介:唐书谦,男,四川省大竹县人,主任技师,主要从事皮肤病理、真菌和性病实验诊断方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757599
通信作者:伍津津,电话:(023)68757591
收稿日期:2009-06-02;修回日期:2009-06-18

再无支原体生长,待检标本判断为合格。如仍有支原体生长,则判断为不合格。

2 结果

DAN 荧光染色法检查:包括 Fb 、KC、小牛血清、Vero 细胞-1、A549 细胞、Vero 细胞-2、DMEM 完全培养基、DMEM 无抗菌素培养基、1640 培养基、胎牛血清、鼠尾胶原、牛尾胶原、壳多糖、硫酸软骨素透明脂酸酶、磷酸盐缓冲液、D-Hank 液等 16 种待检标本。其中 Fb、Vero 细胞-1、A549 细胞三种标本为阳性。阳性率为 18.75%(3/16),见图 1。培养检查法:Fb、KC 和小牛血清 3 种主要标本中,Fb 为弱阳性,阳性率为 33.3%(1/3)。



A:阴性结果;B:阳性结果

图 1 DNA 荧光染色 Vero 细胞 (荧光显微镜 ×200)

3 讨论

本研究结果仅代表本室普查的支原体污染情况。DNA 荧光染色:3 种被感染的阳性细胞中,Vero 细胞-1 和 A549 细胞为一般实验室提供(非专业机构来源)。Vero 细胞-2 和有关培养基、试剂等(专业机构引进的种子细胞)未发现感染。提示本室的污染情况与标本来源有一定关系。其次,另 1 例 Fb 受染者为本室标本,当时估计可能与牛血清有关,后经反复证实牛血清为阴性,最后确认为与原代细胞培养或处理过程被污染有关。根据有关文献介绍关于支原体的来源一般认为是多途径的[3]。有研究者[4]利用支原体 16S ~ 23S 区域扩增来检查细胞系中的支原体感染率,在 22 株细胞系中有 77.3%(17 株)阳性。以 M. Fementams 和 M. hyorhinis 支原体多见。其中 M. Fementams 的自然宿主是人。因此,认为支原体感染来源是原代培养。M. hyorhinis 支原体宿主是牛、猪,表明血清的污染是一个重要途径。本室原代培养的细胞主要来源于人的包皮。因此,提醒我们应高度重视材料来源的常规监控。我们体会主要的预防办法是:①原代培养细胞应常规支原体监测检查后使用。②原代细胞或工作细胞库应分别管理,以防交叉感染。③细胞株传代时,应同时作培养或 DNA 染色检查,检测保存过程有否感染。④除牛血清常规灭活外,应对疑有感染的细胞或培养基、各种液体等以温控灭活支原体作为常规。⑤坚持定期对培养的细胞或有关的试剂、液体进行支原体常规检测,如已发现或疑有支原体感染时,应及时对现用的细胞、试剂、所用液体等进行及时的全面质检,迅速清除可能的感染源。⑥严格细胞室无菌操作管理制度,注意环境消毒。⑦坚持从规范的专业机构引进种子细胞。⑧应避免对支原体可能的污染原因估计不足。如细胞污染后虽然增殖缓慢、部分细胞变形、贴壁细胞脱落等,但多数细胞的生长速度、形态等变化不明显,培养上清液仍清等,造成无污染假象使我们忽略处理,引起感染的蔓延和扩大。通过这些措施我们认为:在细胞培养过程中,支原体污染虽然常见而且难以清除。但随着实验室一系列常规监控管理措施的实施,再加上我们对支原体污染、预防等问题的重视、警惕,支原体污染的发生率确能获得一定的控制。

培养检查法与 DNA 荧光染色法的同样标本比较,二者结果虽然一致,但培养法需时较长。早期有研究者用培养法、DNA 荧光染色和 PCR 法比较,认为培养法时间长、阳性低。DNA 荧光染色敏感性比较高,但易出现假阳性或有主观因素影响。PCR 是一种快速的方法,敏感性高,但需要一定设备和试剂。我们认为 DNA 染色法:如果掌握得好应该是比较理想的一种方法,因不需很特殊设备,简单、方便,相对需时较短,结果稳定。培养法比较可靠,但需时间较长。

关于支原体感染后的处理:是一个公认的棘手难题,结合文献和实际工作体会,我们认为以下措施可参考:①除重要细胞或无法重新获得的细胞外,最好是及时灭活弃之,置换新代细胞。②可凝标本需经处理后再用,如加温处理法:将感染标本在 41 ℃作用 5 ~ 10 h,最长不超过 18 h,以杀灭支原体。培养基或液体试剂可采用 56 ℃灭活法。但结果也并不理想,尚需近一步探讨。③在培养基中加抗菌素或联合加抗菌素预防污染,如卡那霉素、四环素以及新一代 M-plasmocin (InvitroGen 公司)等。④对有关接触的用器进行高温或不宜高温者采用环氧氧乙烷或钴 60 灭菌处理。

关键词:支原体;支原体检查;指示细胞 DNA 染色方法
中图法分类号:R375;R446.5 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Uphoff C C, Drexler H G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infection in continuous cell lines[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002,38:79 - 85.
[2] 国家药典委员会. 附录ⅦB 支原体检查法[M]//国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2005 年版 三部. 北京:化工业出版社,2005:75 - 76.
[3] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 第2版. 西安:世界图书出版公司,2007:81 - 84.
[4] 戴 悦,吕允威,张春凤,等. 细胞系中支原体检测及分型[J]. 北京大学学报:医学版,2005,37(2):207 - 210.

(编辑 栾 嘉)