维普资讯 http://www.cqvip.com

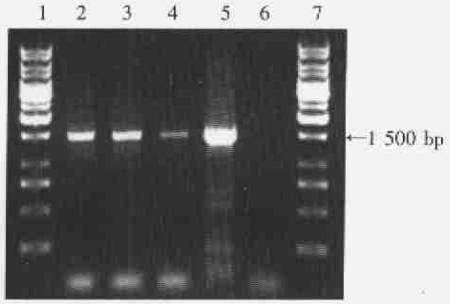
1.5 PCR扩增

PCR扩增细菌类16S rRNA特异性序列通用引物[6-7]。上游引物(A-17)：5′-GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′；下游引物(3-17)：5′-AAG GAG GTA ATC CAG CC-3′；扩增片段大小约1 500 bp。

2 结果

2.1 检测细胞培养中细菌类微生物污染的通用性

本实验所用的引物是根据温博海等[7]设计的原核细胞16S rRNA基因序列通用引物。人为污染绿脓杆菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌，以及支原体 *M. fermentans* 的Hela细胞的培养上清中均扩增出约1 500 bp大小的片段，与目的片段相符(图1)。

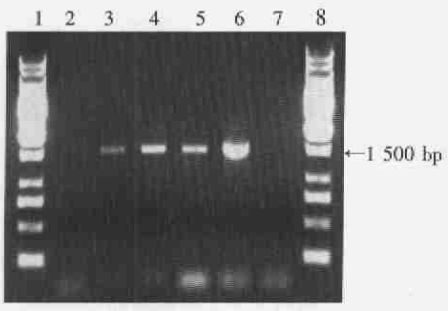


1和7：GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder marker；2-5：分别被 *P. aeruginosa*、*E. coli*、*S. epidermidis* 和 *M. fermentans* 污染的Hela细胞培养上清中的DNA扩增产物；6：空白对照

图1 PCR方法的通用性检测结果

2.2 灵敏度检测

根据紫外分光光度计A值计算，煮沸法小量制备的细菌基因组DNA的浓度为13 μg/ml，10倍系列稀释后，分别取1 μl作为模板进行PCR扩增。当模板浓度降低到52 fg/ml时，在1 500 bp处仍可见明显的扩增条带(图2)。



1和8：GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder marker；2-6：模板DNA浓度分别为5.2 fg/ml、52 fg/ml、520 fg/ml、5.2 ng/ml和52 ng/ml的扩增产物；7：空白对照

图2 PCR方法的灵敏度检测结果

2.3 初步应用

用上述方法检测了本室所冻存的11个细胞系中冻存批次较早细胞(表1)，其中有3个批次的培养上清中扩增出1 500 bp大小的片段，认为该批次的冻存细胞污染了细菌类微生物，考虑到这些细胞系较廉价，故将该批次以及来自该批次来源的其他冻存细胞丢弃。

表1 本实验检测的体外培养细胞株

细胞系	细胞株数量	阳性结果冻存批次
Vero细胞	2	-
ECV细胞	2	-
C6/36细胞	2	20010130
CHO细胞	1	-
HepG-2细胞	2	20020610
BHK细胞	1	-
COS7细胞	1	-
HeLa细胞	1	19990921
Sf 9细胞	1	-
Sf21细胞	1	-
SP2/0细胞	1	-

3 讨论

细胞培养被细菌类微生物(包括细菌和支原体)污染，是常见而又严重影响细胞培养后续研究工作的问题。特别是支原体污染，对体外培养的细胞的几乎所有的指标及产物均有影响，而且可以不被察觉地随着细胞的传代而传代[1-5]。早在1994年Wirth等[1]就利用PCR技术检测培养物中支原体的污染，但由于培养物的DNA提取以及PCR技术本身要求的实验条件和成本较高，在普通实验室不易推广；而且设计的引物如果不能涵盖所有的支原体种也容易造成检测标本的假阴性[3]。所以多数实验室宁可将怀疑有污染的细胞丢弃，也不进行检测。本实验采用煮沸法粗提DNA，合成原核微生物16S rRNA特异性序列通用引物，用PCR扩增法检测细胞培养物中是否有原核微生物的存在，建立了简便廉价且灵敏快速的细胞培养中细菌类微生物污染的检测方法。

本实验采用煮沸法粗提细菌基因组DNA，成本低且简便易于操作，当模板量降低到52 fg/ml时用PCR法仍可扩增出目的条带，说明该方法比较灵敏快速，可以在污染的较早期迅速检测到污染的存在，对一些珍贵细胞的挽救非常重要。另外，16S rRNA基因序列是原核生物特有的基因序列而且比较保守，在细菌的分类中被认为是分子进化钟[6-7]，本实验利用通用引物扩增这一区段，还可以进一步测序证实污染物的种类，以便进行有针对性的挽救。

[参考文献]

[1] Wirth M, Berthold E, Grashoff M, et al. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction[J]. Cytotechnol-