

- 2 Orita M, Iwaha H, Kanazawa H *et al.* Genomics, 1989; 5: 874
- 3 Gyllenstein U B, Erlich H A. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 7652
- 4 Hollstein M, Sidransky O, Vogelstein *et al.* Science, 1991; 253: 49
- 5 Charles H S, Yvone C T, Dolly P H *et al.* Cancer Res, 1992; 52: 4787
- 6 Buchman V L, Chumakov P M, Ninkina N N *et al.* Gene, 1988; 70: 245
- 7 Norio T, Keiko H, Miesko K *et al.* Mutation Res, 1990; 234: 61

用 PCR 检测细胞培养中支原体污染

王正森 吴建新 赵小元 孙宝岭 郭章澍* 李 敏*

(首都儿科研究所生化免疫室, 北京 100020)

摘要 细胞培养中支原体污染已经成为严重的问题. 为了扩增 6 种支原体 (精氨酸支原体, 口腔支原体, 人型支原体, 猪鼻支原体, 发酵支原体及莱氏支原体) 核糖体 RNA 操纵子的 16s 和 23s DNA 间区, 设计了三个通用 PCR 引物 (F1, F2 及 R1). 当以 6 种支原体 DNA 为模板时, 引物 F1 和 R1 产生 340 到 468bp 的片段, 引物 F2 和 R1 产生 145 到 211bp 的片段. 当用 HeLa 细胞或 *E. coli* DNA 作为模板, 用引物 F1 和 R1 时, 在电泳中未观察到特定区带. 此法最小能检出 8.5fg 精氨酸支原体 DNA, 相当于 13 个精氨酸支原体. 这说明, 当这些支原体污染细胞培养时, 能用 PCR 法检测出来.

关键词 聚合酶链反应 (PCR), 支原体, 污染, 细胞培养

目前, 细胞培养技术已经成为生物学和医学研究的重要工具. 而细胞培养中支原体污染也是个极严重问题. 国外报道细胞培养中支原体污染率在 24%—29% 之间. 支原体是能独立生活的微生物, 它通过本身的特殊结构、酶和毒素, 以及消耗培养基和宿主细胞的细胞成分, 使培养的细胞和组织从功能到形态的各种参数发生改变, 直至死亡. 用这些已被支原体污染的培养细胞或组织进行研究, 可能产生错误的结果. 检测细胞培养中支原体污染的方法, 最常用的有支原体培养法^[1]及分子杂交法^[2,3]. 支原体培养法耗时长, 又可能被其它污染原污染. 有关探针诊断, 美国 Gen-Probe^[4]已推出支原体组织培养 I 型试剂盒及改进快速型 (TC I 型) 试剂盒, 采用 ³H 标记, 液相杂交, 虽然快速, 但敏感性较差, 且存在批间差异. 其它有 DNA 荧光染色法、特异性酶测定法、ELISA 及免疫印迹法, 或特异性差, 或灵敏度低, 或本底高, 均未能成为常规检测

手段. 聚合酶链反应 (PCR) 法已广泛应用于检测各种病毒与细菌, 我们建立了巢式 (nested) PCR 检测细胞培养中污染支原体的方法. 该法具有特异、灵敏、简便、可靠的特点.

1 材料与方法

1.1 支原体菌株

所用精氨酸支原体 (*M. arginini*)、口腔支原体 (*M. orale*)、人型支原体 (*M. hominis*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinitis*)、发酵支原体 (*M. fermentans*) 及莱氏支原体 (*A. laidlawii*) 均为我所细菌室提供.

1.2 支原体模板 DNA 制备

取支原体培养液 1—2ml, 15 000r/min 离心 15min, 弃上清, 沉淀用 400 μ l STE (100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA pH8.0) 悬浮, 加入 Triton X-

*首都儿科研究所细菌室.

收稿日期: 1993-12-27, 修回日期: 1994-03-15

100 (终浓度 1%), 煮沸 10min, 立即置冰上冷却, 4℃ 储存用于 PCR. 也曾将支原体培养液煮沸 10min, 4000r/min 离心 10min 后, 取上清直接用于 PCR.

将上述精氨酸支原体提取液, 用等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 及等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1) 各抽提一次, 15 000r/min 离心 5min. 取水相加入 1/10 体积 3mol/L NaAc (醋酸钠), 混悬后, 再加入 2.5 倍体积预冷无水乙醇, -20℃ 过夜. 15 000r/min 离心 5min, 弃上清, 用少量双蒸水逐渐溶解沉淀, 终体积加至 30μl, 用于灵敏度试验.

1.3 大肠杆菌及 Hela 细胞 DNA 提取

取 1.5ml *E. coli* (DH52) 培养菌液, 7000r/min 离心 5min, 弃上清, 沉淀用 200μl STET (50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 50mmol/L EDTA, 8% 蔗糖, 0.1% Triton X-100) 重悬, 加溶菌酶 (50μg/ml) 4μl, 放置室温 5min, 然后 94℃ 1min. 加 SDS 及蛋白酶 K 至终浓度为 0.5% 及 100μg/ml, 37℃, 1h. Hela 细胞沉淀用 STE150μl 悬浮, 加 SDS 及蛋白酶 K 浓度分别为 1% 及 200μg/ml, 37℃ 反应 2h.

两者用酚、氯仿抽提及乙醇沉淀均同精氨酸支原体提取法.

1.4 引物

根据 Uemori 等人^[5]设计, 扩增 16s—23s rRNA 间区序列. F1: 5' ACAC-CATGGGAGCTGGTAAT3', F2: 5' GTTCTTTGAAAACCTGAAT3', R1: 5' GCATCCACCAAAAACCTCT3'. 由北京市康复中心用自动 DNA 合成仪合成, 并部分纯化.

1.5 PCR 反应

应用 PCR 仪 (Easy Cyclor TM series, ERICOMP, INC). 首先按表 1 配制反应混合液、酶稀释液, 表 1 内所列数值为每反应管含量, 每项需乘以总反应管数. 然后每反应管加反应混合液 17.5μl, 模板 5μl, 阴性对照用注射用水, 上覆盖 25μl 石蜡油. 94℃ 8min 变性, 在变性 6min 时逐管加入 Taq DNA 多聚酶稀释液 2.5μl 至下层反应液层. 总反应体积 25μl. 扩增反应采用 94℃ 变性 40s, 55℃ 退火及 72℃ 延伸各 1min, 共做 35 个循环; 最后再 72℃ 延伸 10min. 每次实验均设阴性对照.

表 1 反应混合液和酶稀释液的配制

试剂 (浓度)	每反应管含量/μl			最终浓度
	反应混合液	模板	酶稀释液	
Taq DNA 多聚酶缓冲液 (10×)*	2.25	—	0.25	1×
MgCl ₂ (25mmol/L)*	2.5	—	—	2.5mmol/L
dATP, dCTP, dTTP, dGTP (均为 10mmol/L)	各 0.5	—	—	各 0.2mmol/L
引物 (均为 20μmol/L)	各 0.125	—	—	各 0.1μmol/L
模板	—	5	—	—
Taq DNA 多聚酶 (5U/μl)*	—	—	0.125	0.025 单位/μl
双蒸水	10.5	—	2.125	—
合计 (μl)	17.5	5	2.5	25

* 均为 Promega 产品.

1.6 扩增产物检测

采用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶中含

0.5μg/ml 溴化乙锭. 取扩增产物 5μl 与 1μl 6× 染液 (含 0.25% 二甲苯氰 FF, 30% 甘油的

水溶液)混匀,加样.75V,电泳30~40min,用紫外检测仪(KZJ-A型,上海顾村电光仪器厂)观察并照像.

2 结果

2.1 检测细胞培养中污染支原体的通用性

根据 Uemori 等人^[5]发表的发酵支原体、猪鼻支原体、口腔支原体、人型支原体及精氨酸支原体 16s—23s rRNA 间区序列与引物序列比较,仅有猪鼻支原体与 F1,口腔支原体与 F2 各有一个碱基差异,发酵支原体及猪鼻支原体与 R1 互补序列也各有一个碱基差异,可见设计的引物有通用性.图 1 显示第一次 PCR 反应产物中,精氨酸支原体、发酵支原体、猪鼻支原体、口腔支原体及人型支原体在 344 及

506bp 区间有明显条带(图 1a 中的 1, 2, 3, 5 及 6).而莱氏支原体经第一轮 PCR 为阴性,取其扩增产物做 10^{-2} 稀释后,用相同引物(F1 及 R1)再做第二轮 PCR,可得第一次 PCR 扩增产物,片段长度与精氨酸支原体大小相似,约 346bp (图 1a 中的 4).

为了防止用 F2 及 R1 内引物进行第二次 PCR 出现非特异性杂带,将第一次 PCR 反应产物做 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 稀释, 10^{-3} 稀释除莱氏支原体为单一条带外,其余五种支原体均有杂带出现, 10^{-2} 稀释,精氨酸支原体有杂带,其它均为单一条带,而 10^{-1} 稀释,莱氏支原体为阴性,其它五种则均为单一特异性条带,片段长度约在 150—210bp 区间.因此,做第二次 PCR 时,若第一次 PCR 为阴性,产物做 10^{-2} 稀释;若第一次 PCR 为阳性,则做 10^{-3} 稀释(图 1b).

2.2 检测细胞培养中污染支原体的特异性

我们用常见污染细菌大肠杆菌及细胞培养中最常用的 Hela 细胞株,提取 DNA 为模板,用巢式 PCR 进行扩增,多次均为阴性(图 1a 中的 7 与 8).各实验中阴性对照均无扩增条带.

2.3 检测精氨酸支原体的灵敏度

根据紫外分光光度计测 A 值计算,提取液 DNA 浓度为 $17\mu\text{g}/\text{ml}$ ($85\text{ng}/5\mu\text{l}$), 10 倍系列稀释,选 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 及 10^{-5} 稀释度做 PCR 扩增, $5\mu\text{l}$ 中相应含量分别为 8.5ng,

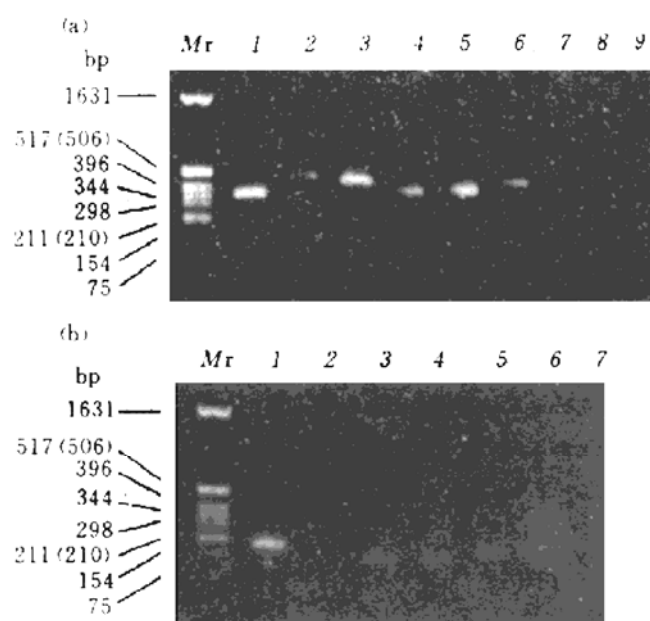


图 1 用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增片段

(a) 第一次 PCR 用 F1 及 R1 引物做第一轮 PCR: 1: *M. arginini*; 2: *M. fermentans*; 3: *M. hyorhinis*; 5: *M. hominis*; 6: *M. orale*; 7: Hela; 8: *E. coli*; 9: 阴性对照(注射用水). 4: 用 F1 及 R1 引物将 *A. laidlawii* 第一轮 PCR 产物 10^{-2} 稀释作为模板做第二轮 PCR. (b) 第二次 PCR 用 F2 及 R1 内引物, 第一次 PCR 产物做 10^{-1} 稀释: 1: *M. fermentans*; 2: *M. hyorhinis*; 3: *M. hominis*; 4: *M. arginini*; 5: *M. orale*; 7: 阴性对照(注射用水). 第一次 PCR 产物做 10^{-2} 稀释 6: *A. laidlawii* Mr: 分子量大小标志, 为 pBR322 用 Hinf I 酶切片段.

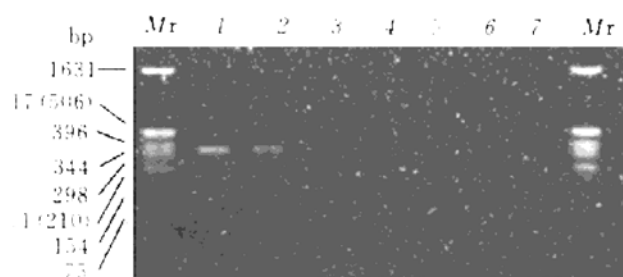


图 2 用 PCR 检测精氨酸支原体的灵敏度

精氨酸支原体基因组 DNA 含量: 2: 8.5ng; 3: 85pg; 4: 850fg; 5: 8.5fg; 6: 85ng; 7: 阳性对照采用精氨酸支原体 DNA; 7: 阴性对照(注射用水); Mr: 同图 1.

85pg, 850fg, 8.5fg 及 85ag, 当精氨酸支原体基因组 DNA 含量为 8.5fg 时(图 2 中的 4), 在 344bp 处仍有明显扩增产物条带可见, 已知精氨酸支原体基因组长度为 610kb, 其分子量为 3.965×10^8 , 根据计算 8.5fg DNA 相当于 13 个支原体。

2.4 初步应用

用此法检测我所三个细胞培养液, 图 3 显示, 2 号标本与阳性对照相应部位有扩增产物条带出现, 而 1 号及 3 号标本及阴性对照均为阴性。外单位送检标本 7 例, 经 PCR 检测 3 例阳性, 4 例阴性, 与支原体培养结果一致。

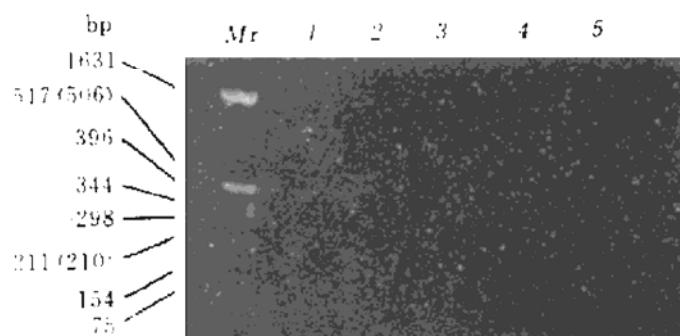


图 3 用 PCR 法检测细胞培养液支原体污染

1: 阳性对照; 2: 1 号标本; 3: 2 号标本; 4: 3 号标本; 5: 阴性对照 (注射用水); Mr: 同图 1。

3 讨 论

在设计引物时既希望能扩增出这 6 种支原体的 DNA 片段, 又要求不能扩增其它种, 如细菌及细胞基因组 DNA. Blanchard^[6]等人,

根据 16s rRNA 序列设计引物 RNA1 及 RNA2, 能扩增出的支原体与细胞培养污染有关的仅二种: 口腔支原体及人型支原体. Uemori 等人^[5], 用 PCR 技术扩增出支原体的 16s—23s rRNA 间区, 6 种常见细胞培养污染的支原体均为阳性。因此, 我们选择了扩增 16s—23s rRNA 间区的设计, 试验结果表明, 此法可以扩增细胞培养中常见的 6 种污染支原体, 因此具有通用性。同时, 实验也证明了此法具有特异性及高度灵敏性, 且方法比较简便, 仅 1d 就可出结果。此法还有另一个优点, 因 16s—23s rRNA 间区, 每种支原体长短差异较大, 根据扩增片段长度可以初步判断支原体属于哪一种。方法的建立为制备 PCR 检测细胞培养支原体污染试剂盒及调查北京地区细胞培养支原体污染率及各种支原体所占的比例打下良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Ogata M G, Koshimizu K. *Jpn J Microbiol.* 1967; 11: 289
- 2 Razin S, Gross M, Wormser M *et al.* *In Vitro.* 1984; 20 (5): 404
- 3 Göbel U B, Stanbridge E J. *Science.* 1984; 133: 1211
- 4 Johansson K-E, Johansson I, Göbel U B. *Mol Cell Probes.* 1990; 4: 33
- 5 Uemori T, Asada K, Kato I *et al.* *System Appl Microbiol.* 1992; 15: 181
- 6 Blanchard A, Gautier M, Mayan V. *FEMS Microbiol letters.* 1991; 81: 37

[1, 2-d] thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl] naphtho [1, 2-d]-thiazolium bromide] is highly specific for single strand oligo-deoxynucleotidyl fragment; no other cell component produces influence. The method permits the estimation of TdT activity as low as 3U. It is a simple assay suitable for clinical analysis of TdT in human leukemias and providing information useful in classifying haematological neoplasms.

Key words terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), stains-all, classifying haematological neoplasms

Research on Phosphorus Content in Living Rabbits by *in vivo* Neutron Activation Analysis. Luo Xianqing, Wu Jingping, Wang Haiying, Huang Hanqiao, Liu Xiaohua, Lu Xihai, Yu Aiping, Luo Qiandi. (*Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 547—549

Research on the determination of phosphorus content in living rabbits by *in vivo* neutron activation analysis (IVNAA) was carried out, and the average value of the phosphorus percentage content which were measured for ten rabbits was $(1.26 \pm 0.01)\%$.

Key words *in vivo* neutron activation analysis, living rabbits, phosphorus content

A Non-radioactive Single-strand Conformation Polymorphisms of Asymmetric PCR and its Application. Chen Jun, Wang Huimin, Li Manzhi, Wu Yintang. (*Cancer institute, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510060*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 550—553

PCR-single strand conformation polymorphisms is a powerful method for screening mu-

tations and widely used in studying mutations of oncogene and tumor suppressor gene. The ordinary PCR-SSCP needs the use of radioactivity and sequencing apparatus, thus compromises its application. Here, a non-radioactive asymmetric PCR-SSCP was established. Single-stranded DNA was generated by asymmetric PCR, separated by mini PAGE and silver stained. The exon 5, 6, 7, 8 of p53 gene in four cell lines of nasopharyngeal carcinoma-CNE1, CNE2, HK1 and SUNE1 were investigated. The method was proved to be successful in screening mutations.

Key words asymmetric PCR, single-strand conformation, polymorphisms, mutation, p53, nasopharyngeal carcinoma

PCR Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. Wang Zhengsen, Wu Jianxin, Zhao Xiaoyuan, Sun Baoling, Guo Zhanggai, Li Min. (*Department of Biochemistry and Immunology of the Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 553—556

Mycoplasma contamination of cell culture is a serious problem in biomedical research. Three common PCR primers (F1, F2 and R1) were designed to amplify the spacer region between 16S and 23S DNA in rRNA operons of 6 species of mycoplasmas (*M. arginini*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans* and *A. laidlawii*). When the DNA of 6 species was used as the template, primers F1 and R1 produced fragments of 340 to 468 bp, and primers F2 and R1 produced fragments of 145 to 211 bp. No discrete band was observed in electrophoretic gels when HeLa cell or *E. coli* DNA was served as the template with the use of primers F1 and R1. As little as 8.5fg DNA of *M. arginini*, approximately 13 orga-

nisms could be detected. This suggests that mycoplasma contamination to cell cultures can be detected by PCR.

Key words PCR (polymerase chain reaction), mycoplasma, contamination, cell culture

Rapid Production of Digoxigenin Labeled Probes by Hot Start PCR. Li Lijia, Zhang Xiyuan, Jiang Haibo. (*Life Science College of Wuhan University, Wu Han 430072*). *Prog.*

Biochem. Biophys. (China), 1994; 21 (6): 557—558

A method for generating a nonradioactive digoxigenin labeled probes is described. It was achieved by substituting the dTTP with Dig-11-dUTP and utilizing human genome DNA as template during the Hot Start PCR.

Key words Hot Start PCR, genome DNA, digoxigenin labeled probes

征订启事

《生物工程进展》

欢迎订阅

欢迎刊登广告

中国生物工程学会会刊《生物工程进展》，创刊于1976年，是我国第一家中央级综合性生物工程大型刊物。

《生物工程进展》综述报道国内外生物工程高技术领域的重大研究进展，刊载学术报告、动态、生物工程专利、国际学术交流信息、商业生物技术情报，介绍国内外生物工程政策、规划以及我国发展生物工程及产业化的对策，报道经济建设主战场上的生物工程消息、人物，宣传生物工程企事业单位和新技术新产品，为促进我国生物工程高技术及产业发展提供全方位多层次多侧面的服务。该刊物曾两次获得中国科学院科技进步奖。

《生物工程进展》的主要读者对象是：生物工程领域科研院所、大专院校、科技企业、大

中型企业和乡镇企业、各级科委、各地高新技术产业开发区以及生物工程计划决策与服务部门的科技工作者和管理人员。

《生物工程进展》为双月刊，16开64页，每期定价4.00元，全年订价24.00元，北京市邮局邮发代号82—673，全国各地邮局均可订阅。

编辑部现编辑有《生物工程信息快报》(月刊)，报道国内外生物工程科研与产业最新消息、最新成果、专利、商情动态，每期工本费8.00元，全年订价96.00元，订阅者请向《生物工程进展》编辑部(北京市中关村科学院南路8号，邮政编码100080)索取订单或直接汇款订阅。