

·技术交流·

PCR 和分离培养检测细胞培养支原体污染的比较

赖小敏 方国源 李彩霞 王传恩

(中山医科大学微生物学教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 检测细胞培养中支原体的污染, 建立支原体通用的 PCR 方法。方法: 根据已出版的序列设计并合成一对支原体(柔膜体纲)16S rRNA 基因组特异引物。对实验室所存的 12 种支原体、大肠杆菌、变形杆菌及无支原体污染的组织培养细胞进行了 PCR 扩增。以 PCR 与分离培养比较检测了 33 份细胞培养标本。结果: 12 种支原体均出现了约 620 bp 左右的特异性扩增带, 敏感性为 100~1 000 个支原体细胞, 且常见的 6 种细胞培养污染支原体的扩增片段均能被 *Hind* III 切成 280 与 340 bp 左右的 2 条带。理论上推测这对引物可扩增所有支原体 16S rDNA。但对大肠杆菌、变形杆菌及无支原体污染的组织培养细胞等未见有扩增带出现。在对 33 份细胞培养标本的检测中, 除 PCR 和分离培养同时检出 2 份阳性外, 前方法还另检出阳性 3 份。5 份 PCR 扩增物均被 *Hind* III 切出 2 条带。结论: PCR 较分离培养敏感性高, 可提高细胞培养污染支原体的检出率, 防止出现假阴性结果; 如做好质量控制, 对于一般实验室检测细胞培养支原体污染, PCR 扩增较分离培养具有更大的应用意义。

关键词 细胞, 培养的; 支原体; 污染; 16S rRNA; 聚合酶链反应

中图分类号 R 375.3

PCR Versus Cultivation for the Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures

Lai Xiaomin Fang Guoyuan Li Caixia Wang Chuanen

(Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To detect mycoplasmas contaminations in cell cultures and establish a mycoplasma group-specific PCR technique. **Methods:** A pair of 16S rRNA-based mycoplasmas (Mollicute) group-specific primers were designed and synthesized. The established PCR method was investigated by testing 12 Mycoplasma and Acholeplasma species preserved in our laboratory as well as *E. coli*, *P. vulgaris* and culture cell lines not carrying mycoplasma contaminants. Thirty-three cell cultures were examined by using PCR and microbiological culture. **Results:** About 620 base-pairs specific fragments from all 12 Mycoplasma and Acholeplasma species were amplified by this PCR. The sensitivity of mycoplasma detection ranged between 100 and 1 000 cells. PCR products from 6 common contaminants of cell cultures could be digested by *Hind* III to produce 2 fragments of each of 280 bp and 340 bp size. It was inferred that 16S rDNA of all mycoplasma (Mollicute) species may be detected by this PCR method. DNA from *E. coli*, *P. vulgaris* and normal culture cell lines were not amplified by the PCR. Two of 33 cell cultures were found positive by both PCR and culture. Additional 3 samples were positive by PCR but negative by culture. All 5 amplified products could be digested by *Hind* III resulting in two fragments. **Conclusion:** As a more sensitive method than culture, PCR might increase detection rate of mycoplasma contaminants and avoid false-negative results. PCR will serve as a major diagnostic tool in the detection of mycoplasmas contamination in cell cultures if quality control of the method is implemented.

Subject headings cells, cultured; mycoplasma; contamination; 16S rRNA; polymerase chain reaction

支原体污染是导致细胞培养失败的重要原因之一,猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、口腔支原体(*M. orale*)、发酵支原体(*M. fermentans*)、唾液支原体(*M. salivarium*)、莱氏无胆甾原体(*A. laidlawii*)及其他一些人源或动物源性支原体是主要的污染种类。已有多种方法从细胞培养中检测这些支原体,包括 DNA 荧光素染色、支原体分离培养、单克隆抗体(McAb)检测、核酸杂交^[1,2]及 PCR^[3,4]等。我们根据支原体的 16S rRNA 基因,建立了 PCR 检测支原体污染的方法,并与分离培养方法作了比较。

1 材料和方法

1.1 支原体及细菌菌株

猪鼻支原体 ATCC17981、精氨酸支原体 G 230、口腔支原体 ATCC23714、发酵支原体 ATCC19989、唾液支原体 ATCC23069、莱氏无胆甾原体 OR 株、鸡败血症支原体(*M. gallisepticum*) PG31、猪肺炎支原体(*M. hyopneumoniae*) NCTC10110J、人型支原体(*M. hominis*) PG21、肺炎支原体(*M. pneumoniae*) FH 株、生殖支原体(*M. genitalium*) G37、及解脲脲原体(*U. urealyticum*) 1-14 血清型标准株,以及大肠杆菌、变形杆菌均为本室保存菌种。

1.2 细胞培养上清

来自中山医科大学数个实验室,共 33 份。

1.3 支原体及细菌菌株的培养

按常规方法进行。

1.4 细胞培养上清的支原体培养

培养基为:改良 Hayflick 基础基,另添加 200 mL/L 小牛血清,5 g/L 酵母浸膏粉,10 g/L 葡萄糖,5 g/L 精氨酸,100 万 U/L 青霉素、0.04 g/L 酚红,pH 7.2。添加 14 g/L 琼脂使成固体基。将待检细胞培养上清 0.2 mL 接种入 1.8 mL 培养液中,37 °C 48 h 至 1 周后,如培养液变红或变黄而仍透明澄清,转种固体基,若观察到菌落判为支原体阳性。

1.5 标本 DNA 的提取

支原体及细菌菌株培养液、细胞培养上清或上清支原体培养液 1 mL 以 12 000×g 离心(TCL 15 G 台式离心机),STE 离心洗涤后,沉渣以 10 mL/L TritonX-100-STE 50 μL 悬浮,100 °C 煮沸 10 min,-20 °C 保存备用。

1.6 PCR 扩增

通过计算机辅助分析,设计了支原体 16S rRNA

基因组特异引物:

M16S1:5'-GAACGGGTGAGTAACACGT

M16S2:5'-GGTGTCTTCCATATATCTACGC

样本 DNA 3 μL,加 10×PCR 缓冲液(华美)5 μL,2 mmol/L 4×dNTP 5 μL,2 nmol/L 上下游引物各 5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(3×10⁶ U/L,华美)0.6 μL,加水至 50 μL。扩增条件为:94 °C 30 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,40 个循环周期后 72 °C 7 min。以 20 g/L 琼脂糖电泳鉴定。

1.7 扩增产物的限制性酶切分析

扩增液 10 μL 直接加入最终为 30 μL 酶切反应液中,以 20 U *Hind* III(NEB)作酶切分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增方法的建立

2.1.1 方法的特异性 用支原体 16S rRNA 基因组特异引物检测了 12 种支原体、2 种细菌株及 HeLa 细胞株等,PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖电泳鉴定。结果见图 1 和图 2。12 种支原体均可见明显带型,产物约 620 bp,而大肠杆菌、变形杆菌及 HeLa 细胞株则未见。



图 1 常见污染支原体 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results for important contamination mycoplasmas

Lane M: DNA marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8: *M. hyorhinis*, *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. hominis* and *M. pneumoniae* respectively

2.1.2 方法的敏感性 将支原体培养液提取核酸后按不同量加入作 PCR 扩增,结果能检测出≥1 000 个莱氏无胆甾原体、猪鼻支原体、猪肺炎支原体和鸡败血症支原体,≥100 个其他 8 种支原体细胞。

2.1.3 方法的重复性 10 倍反应浓度(2 nmol/L)

的引物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 6个月后,仍能扩增出相同带型。

2.1.4 PCR产物的酶切分析结果 用 *Hind* III 分别对扩增产物作酶切, 8种常见污染支原体的酶切结果见图3。从图中可见,除莱氏无胆甾原体和发酵支原体外,均能被切成280 bp及340 bp左右的两条带。

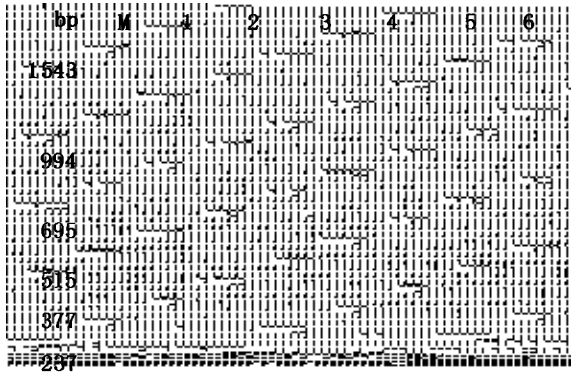


图2 其他支原体、细胞株及细菌 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR results for other mycoplasmas cell line and bacteria strain

Lane M: DNA marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6: *M. genitalium*, *U. urealyticum* Serotype 4, *M. hyopneumoniae*, *M. gallisepticum*, HeLa cell and *E. coli* respectively

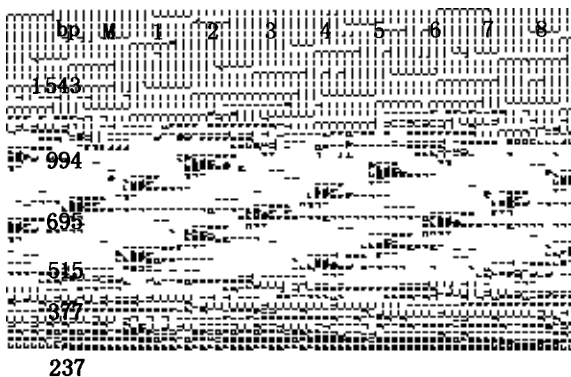


图3 常见污染支原体扩增产物 *Hind* III 酶切结果

Fig. 3 *Hind* III-digested results of amplified products from important contamination mycoplasmas

Lane M: DNA marker; Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8: *M. hyorhinis*, *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. hominis* and *M. pneumoniae*, respectively

2.2 细胞培养污染支原体的检测结果

2.2.1 PCR 扩增和支原体分离培养结果比较 两种方法同时检测 33 份细胞培养标本, 结果见表 1。

表1 PCR 与分离培养比较

Table 1 Comparison of the results for detection of mycoplasmas contamination in cell cultures by PCR and isolation

Isolation	PCR		Total
	+	-	
+	2	0	2
-	3	28	31
Total	5	28	33

2.2.2 酶切分析结果 5份 PCR 阳性的扩增产物均可被 *Hind* III 酶切, 其中与分离培养同时阳性的 2 份酶切结果见图 4。

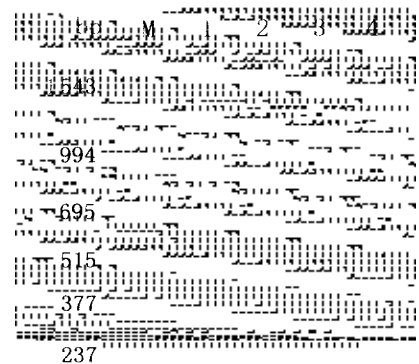


图4 部分细胞培养标本 PCR 扩增及产物 *Hind* III 酶切结果

Fig. 4 PCR and *Hind* III-digested results of amplified products for 2 cell culture samples

Lane M: DNA marker; Lane 1 and 2: sample 1 and sample 1 by *Hind* III; Lane 3 and 4: sample 2 and sample 2 by *Hind* III

3 讨论

各种检测支原体污染的方法如 DNA 荧光素染色、核酸杂交、分离培养可出现假阴性结果, 而 PCR 可出现假阳性与假阴性结果^[4]; McAb 检测则常应用某一种支原体的 McAb 来检测, 因此也常导致漏检。上述各种方法在国内已有应用报道, 其中 PCR 方法多采用国外报道的引物进行^[5,6]。

柔膜体纲 (Mollicute) 的各种支原体含低数量的 rRNA 基因, 且以原核细胞方式排列^[7], 而 16S rDNA 虽与许多原核细胞微生物存在同源性, 如与 *E. coli* 有 70% 的同源性, 但仍存在纲内特异性的序列。根据这一原理, 我们通过计算机辅助分析, 设计出了一对支原体 16S rDNA 组特异引物, 结果能扩增出实验室所存的 12 种支原体核酸, 片段大小约为 620

bp 左右,敏感性至少达 1 000 个支原体细胞,并且除莱氏无胆甾原体及发酵支原体外,其他 6 种常见污染支原体的扩增片段均能被 *Hind* III 切成 280 和 340 bp 左右的两条带。已有报道用 PCR 能检测出 25 种支原体的 16S rDNA^[8]。理论上推测,本文设计的引物也可扩增所有支原体 16S rDNA。此外,对某些细菌如 *E. coli*、变形杆菌及 HeLa 细胞等均未见有扩增带出现。因此,这对引物可用于细胞培养中污染支原体的快速检测。

以 PCR 扩增及分离培养同时检测了 33 份细胞培养标本,结果前方法 5 份阳性,后方法 2 份阳性,同时阳性者 2 份,5 份 PCR 扩增物均被 *Hind* III 切出 2 条带。提示这 5 个细胞株均发生了支原体污染。分析分离培养出现 3 份假阴性,可能系方法敏感性低所致。由于分离培养花费时间长,而 PCR 方法快速、敏感、操作简便,如做好方法的质量控制,对于一般实验室检测细胞培养污染支原体,PCR 扩增较分离培养具有更大的应用意义。

参 考 文 献

- Mattsson J G, Johansson K E. Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 109 (2-3): 139
- Göbel U B, Geiser A, Stanbridge E J. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between mycoplasma species. *J Gen Microbiol*, 1987, 133 (7): 1969
- Rawaki G, Dussurget O. Advances in PCR-based detected of mycoplasmas contamination cell cultures. *PCR Methods Appl*, 1995, 4(4): 199
- Van Kuppeveld E J, Johansson K E, Galama J M, *et al*. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1): 149
- 王正森, 吴建新, 赵小元, 等. 用 PCR 检测细胞培养中支原体污染. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(6): 553
- 魏红梅, 袁曾麟, 陈天寿. 两步 PCR 法检测细胞培养中支原体污染的初步结果. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1994, 14(2): 131
- Amikam D, Glaser G, Razin S. Mycoplasma (Mollicutes) have a low number of rRNA genes. *J Bacteriol*, 1984, 158(1): 376
- Wirth M, Berthold E, Grashoff M, *et al*. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. *Cytotechnology*, 1994, 16(2): 67
- Mattsson J G, Johansson K E. Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 109 (1997-12-15 收稿 1998-10-28 修回)
- Ozaki C F, Anderson J C, Lieman R P, *et al*. Duplex ultrasonography as anovisive technique for assessing portal hemodynamics. *Am J Surg*, 1988, 155(1): 70
- Lomas D J, Brilon P D, Summerton C B, *et al*. Duplex doppler measurement of the portal vein in portal hypertension. *Clin Radiol*, 1993, 48(5): 311
- Gorka W, Mulla A, Sebayer M A, *et al*. Qualitative hepatic venous doppler sonography venous portal flowmetry in predicting the severity of esophageal varices in hepatitis C cirrhosis. *Am J Roent Genol* 1997, 169(2): 511
- Ljubicic N, Duvnjak M, Rotkvic L, *et al*. Influence of the degree of liver failure on portal blood flow in patients with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*, 1990, 25(4): 395
- Koda M, Murawaki Y, Kawasaki H, *et al*. Portal velocity and portal blood flow in patients with chronic viral hepatitis: relation to histological liver fibrosis. *Hepato Gastroenterol*, 1996, 43(7): 199
- 中华医学会传染病寄生虫病学会修订. 病毒性肝炎防治方案(试行)(1995年5月北京第五次全国传染病寄生虫病学术会议修订). *中华传染病杂志*, 1995, 13(4): 241
- 黄自平, 梁扩寰. 门静脉高压. 见: 梁扩寰. *肝脏病学*. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 677~729 (1998-09-18 收稿 1999-01-22 修回)

(上接第 143 页)