

【文章编号】 1008-5041(2001)03-0226-01

· 经验交流 ·

## 简便快速检测细胞培养中支原体污染

### A simple and prompt method for assaying mycoplasma in cultured cells

武警医学院生物学教研室 张敏 买霞 陈小义 陈莉 (天津 300162)

【关键词】 支原体; 检测; Hoechst 33342

【中图分类号】 Q503

【文献标识码】 A

支原体是细胞培养中常见污染。支原体检测的方法很多,我们采用的 Hoechst33342DNA 荧光染色法为体外细胞培养的实验研究提供了一种快速、简便检测支原体的方法。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 细胞系来源与培养

K562 细胞系由协和医科大学基础所馈赠, MGC80-3 细胞系引自北京医科大学肿瘤所, 两种细胞系由我室保种传代。MGC80-3 培养于 DMEM (high glucose, GIBCO 产品), K562 培养于 RPMI1640 (GIBCO 产品), 补充 10% 热灭活胎牛血清, 2mmol/L 谷氨酰胺, 100u/ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素。在 37℃, 体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

##### 1.2 染色原理与方法

**1.2.1 原理** Hoechst33342 能透过胞膜完整的细胞, 嵌入细胞核 DNA 中, 使之发出明亮的兰色荧光。支原体体内含有 DNA, 亦能着色。

**1.2.2 方法** 应用电子天平精确称取 Hoechst33342 (SIGMA 产品) 1mg, 溶于 10mlDMSO 中, 使之配成 100ug/ml 的储备液。收集欲检测细胞, PBS 洗涤后制成细胞悬液, 每个标本取 200ul 移入 Eppendorf 管中, 加入荧光染料 Hoechst33342 至终浓度 10ug/ml, 37℃ 下染色 15min, 取 40ul 细胞悬液迅速滴在载玻片上, 加盖玻片, 在荧光显微镜 (日本 NIKON) 下观察结果。

#### 2 结果

在荧光显微镜下, 有支原体污染的 MGC80-3 细胞滴片上, 可见支原体呈蓝绿色小点, 散在细胞周围, 或

附于细胞膜表面; MGC80-3 细胞中加入具有抗肿瘤作用的土槿皮提取物土槿乙酸 (终浓度为  $1 \times 10^{-5}$  M) 培养 23 小时后, 染色观察, 支原体增多, 呈花环样附于细胞膜表面。无支原体污染的 K562 细胞滴片上则只能看到细胞核呈亮兰色。(图 1~3 见封 2)

#### 3 讨论

研究表明 5%~87% 的不同细胞系均已受到支原体的污染<sup>[1]</sup>。支原体是介于细菌和病毒之间能独立生活的最小微生物, 无细胞壁, 形态多变, 大小介于 0.2~2 微米之间, 约有 1% 可通过滤菌器<sup>[2]</sup>, 因此往往难以发现。细胞受支原体污染后, 一般不引起明显的细胞形态改变, 也不导致液体混浊, 仅凭外观难以发现。但被污染的细胞却可产生一系列生物学变化, 包括生长特征, 细胞膜组成, 染色体异常, 酶系改变和病毒产量变化等, 干扰实验结果<sup>[1]</sup>。我们采用的 Hoechst33342DNA 荧光染色方法简单, 耗时少, 一般的实验室均可操作。当体外培养的有支原体污染的 MGC80-3 细胞中, 加入具有抗肿瘤作用的土槿乙酸后培养一段时间发现, 细胞的生长受到抑制的同时支原体数目明显增多, 说明支原体的生长和繁殖与其寄主细胞的活性有密切关系。

#### 4 参考文献

- [1] 胡孟冬, 唐颂恩. 应用 PCR 技术检测细胞培养或生物制品中的支原体污染 [J]. 国外医学预防、诊断、治疗用生物制品分册, 1996, 19 (3): 110.
- [2] 鄂征. 组织培养技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988, 191-194.

(1999-06-07 收稿, 责任编辑 李宏伟 王奕飞)

# 氟中毒大鼠睾丸细胞 DNA 和 RNA 变化的 荧光组织化学研究 (正文见 187 页)

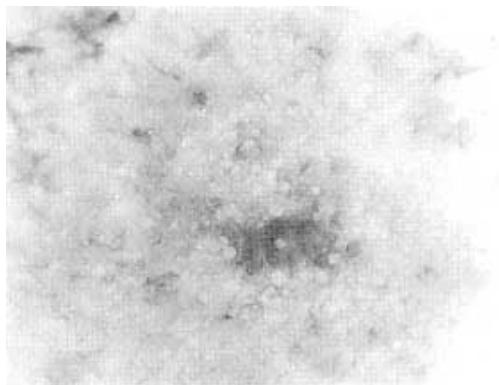


图 1 对照组睾丸曲精小管细胞 DNA 和 RNA 标记  
AO 荧光法  $\times 200$



图 2 氟中毒组睾丸曲精小管细胞 DNA 和 RNA 标记  
AO 荧光法  $\times 200$

## 简便快速检测细胞培养中支原体污染 (正文见 226 页)

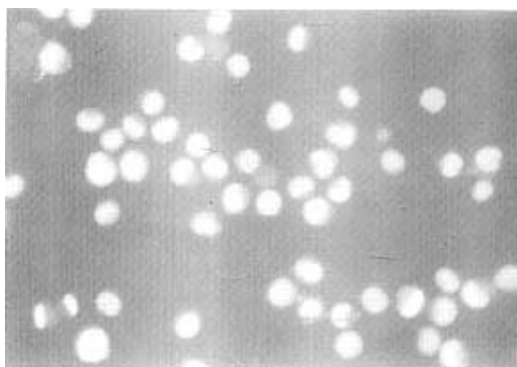


图 1 无支原体污染的 K562 细胞 ( $\times 100$ )

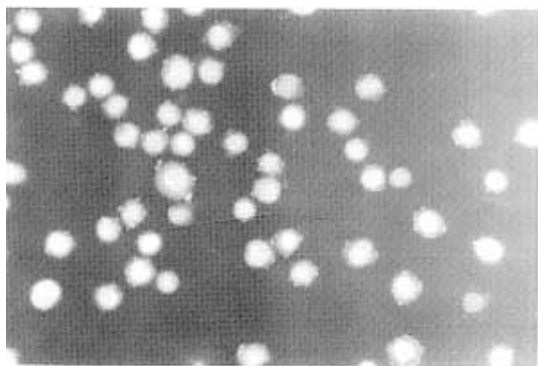


图 2 有支原体污染的 MGC80-3 细胞(未加药)( $\times 100$ )  
支原体散在细胞周围或附于细胞表面。

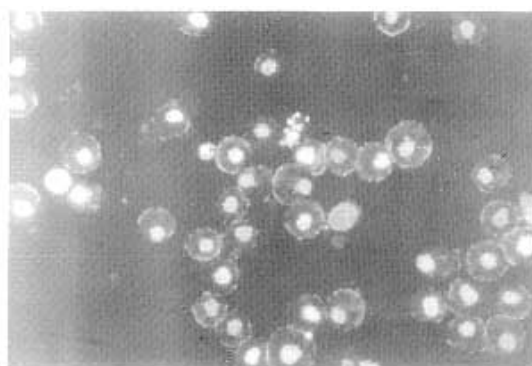


图 3 有支原体污染的 MGC80-3 细胞经  $1 \times 10^{-5}$   
M 土槿乙酸处理 23 小时 ( $\times 100$ )  
支原体增多, 呈花环样附于细胞膜表面。