

从传代细胞株中去除支原体污染的研究

张汉荆 石奇明 胡齐全 何葆光 王 雅 陆秀英

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

用抗菌药物从传代细胞株中去除支原体污染的试验结果表明, 卡那霉素和庆大霉素对支原体均无明显的杀灭作用。用 $10\mu\text{g/ml}$ 的 Tiamutin 处理支原体的效果较好。采用单克隆细胞稀释、选择法与 Tiamutin($10\mu\text{g/ml}$) 处理相结合, 经电镜观察可去除细胞中支原体的污染。检查支原体的方法是否特异、敏感、快速是对试验结果正确判断的一个重要的关键。为了防止支原体的污染, 除了加强对原材料(包括小牛血清、培养液等)的检查以及把住严格的无菌操作条件外, 必要时可在培养基中加入 $10\mu\text{g/ml}$ 的 Tiamutin。

关键词 传代细胞; 支原体

细胞培养在医学、生物学研究工作中用途十分广泛, 但细胞培养中发生支原体的污染是极为普遍的^[1,2]。一般由于污染支原体的细胞在光学显微镜下不易发现异常, 故支原体难被检出, 即使在专为培养支原体的特殊培养基上不能形成支原体菌落者, 也不能轻易排除支原体的污染。严重污染支原体的细胞, 在培养中可导致各种异常变化^[3-5]。污染支原体的疫苗制品, 如肺炎支原体, 可引起人的原发性非典型性肺炎^[6]。因此, 支原体的污染早已引起医学和生物学界, 特别是细胞生物学、病毒学和生物制品工作者的关注。

我们曾将半固体支原体培养基^[7]培养检查为阴性的 LTK 和 CHO 细胞株, 改用电镜法^[8,9]观察, 发现两株细胞均污染了支原体样的微生物结构。为试图使用抗菌药物从 LTK 及 CHO 细胞株中去除支原体的污染, 我们进行了以下的试验。

材 料 和 方 法

(一) 细胞株

LTK 及 CHO 细胞株均系国外惠赠, 历史及代次均不详。在本实验室用液氮冻存, 使用前经复苏传代。LTK 细胞株的培养液采用 DMEM; CHO 细胞株采用 F12 培养液。培养液均含 10% 小牛血清, 用 NaHCO_3 调整 pH 至 7.2—7.4。细胞镜检形态立体感较强, 细胞界线尚清楚。LTK 细胞呈短梭形, CHO 细胞为圆形或短粗纤维形。

(二) 细胞株中的支原体检查

将培养至少在 7d 以上的细胞株, 取其培养液及细胞组织(包括碎片)以 2000r/min 离心 10min, 取其上清液再以 15000r/min 离心 60min, 弃上清液, 沉淀物加 1—2 滴生理食盐水制成悬液, 以铜网悬滴, 磷钨酸负染, 电镜观察。阳性者可见支原体呈线条状, 多形态, 长短不一(图 1)。从 LTK 细胞和 CHO 细胞中观察到的支原体, 形态类同, 均未经型别鉴定。

本文于 1987 年 8 月 31 日收到。

承向建之教授的大力支持与关怀; 电镜照片由向诚、孙荣夫两同志洗印, 特此致谢。



图1 从 LTK 细胞中查到的支原体 (40,000×)

Fig. 1 Mycoplasmas detected by EM from the LTK cell culture

(三) 抗菌药物

卡那霉素和庆大霉素均系国产, Tiamutin 系奥地利产品。

结 果

(一) 不同浓度卡那霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的作用

从表 1 中可见不论卡那霉素浓度在 LTK 或 CHO 细胞株的培养液中含量 500 $\mu\text{g/ml}$ 或 1000 $\mu\text{g/ml}$, 在作用 7、14 直至 21d 后仍能在细胞及培养液中查到支原体, 若与未加卡那霉素的对照细胞相比较, 支原体的量似乎有所减少。

(二) 不同浓度庆大霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的作用

表 2 表明不同浓度的庆大霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的作用。细胞培养液中含 1000 $\mu\text{g/ml}$ 或 500 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中的支原体作用 7、14 及 21d 后, 在细胞培养液中仍可查到支原体, 在同样条件下, 尽管卡那霉素和庆大霉素均不能杀灭支原体。但后者

表 1 不同浓度卡那霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的影响

Table 1 The effects of various concentration of kanamycin on contaminated LTK and CHO cell lines with mycoplasmas

细胞株 Cell strains	浓度 Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	处理后不同天数用电镜 检查支原体 Days after treatment (detected by EM)		
		7	14	21
LTK	1000	+	+	+
	500	++	++	++
	0	+++	+++	+++
CHO	1000	+	+	+
	500	++	++	++
	0	+++	+++	+++

注: +++ 严重污染 Heavily contaminated cells; ++ 中度污染 Most of the cells contaminated with mycoplasmas; + 轻度污染 Few mycoplasmas detected in the culture; — 未查到支原体 No mycoplasmas detectable.

对支原体的作用似更不如前者。

(三) 不同浓度 Tiamutin^[10]对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的作用

表 3 说明, 用不同浓度 Tiamutin 处理 LTK 及 CHO 细胞株 7、14 及 21d 后, 电

表2 不同浓度庆大霉素对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的影响

Table 2 The effects of various concentration of Gentamycin on contaminated LTK and CHO cell lines with mycoplasmas

细胞株 Cell strains	浓度 Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	处理后不同天数用电镜 检查支原体 Days after treatment (detected by EM)		
		7	14	21
LTK	1000	++	++	++
	500	++	++	++
	0	+++	+++	+++
CHO	1000	++	++	++
	500	++	++	++
	0	+++	+++	+++

注: 同表1 (As table 1)。

表3 不同浓度 Tiamutin 对 LTK 及 CHO 细胞株中支原体的影响

Table 3 The effects of various concentration of Tiamutin on contaminated LTK and CHO cell lines with mycoplasmas

细胞株 Cell strains	浓度 Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	处理后不同天数用电镜 检查支原体 Days after treatment (detected by EM)		
		7	14	21
LTK	10	—	—	—
	5	—	+	—
	0	+++	+++	+++
CHO	10	+	—	—
	5	+	—	—
	0	+++	+++	+++

注: 同表1 (As table 1)。

镜检查支原体的结果。表中用 $10\mu\text{g/ml}$ 的 Tiamutin 作用效果似乎比 $5\mu\text{g/ml}$ 为佳, 如用 $5\mu\text{g/ml}$ 处理 LTK, 作用 2 周后仍能查到支原体, 效果不一。用 $10\mu\text{g/ml}$ Tiamutin 作用于细胞培养, 14d 后未查到支原体, 培养到 21d 后, 在两种不同浓度的 Tiamutin 作用下, 几乎均找不到支原体。

以上抗菌药物试验均采用已长成单层细胞的 LTK 及 CHO 细胞株处理的, 传代时加入不同浓度的 Tiamutin, 其对细

胞的作用面较大, 可能影响药物的杀菌效果。因此, 我们进一步采用细胞株单克隆稀释、选择法, 在 96 孔微量细胞培养板中, 接种单个细胞的同时加入 $10\mu\text{g/ml}$ 的 Tiamutin, 当细胞生长成小岛后再进行胰酶消化传代, 逐步扩大接种细胞管直至细胞培养瓶。将形成单层的细胞检查其培养物中的支原体, 结果在单克隆细胞培养生长前后 21—28d 中形成单层的 LTK 及 CHO 细胞株, 经用电镜观察均未查到支原体。

讨 论

文献记载细胞培养常可被不同批号的牛血清^[11]、细胞培养液^[12]中的支原体污染。为了检查我们实验室中的牛血清以及细胞培养液中有否类似情况, 对一个大批号的牛血清及 DMEM、F12 细胞培养液进行抽样检查, 结果均为阴性。由于 LTK、CHO 细胞株均系国外赠送, 在本实验室已分传多代, 因此有必要检查较早代次的细胞株, 结果从这二株细胞株中均查到支原体。由于已往的牛血清、细胞培养液均已用尽, 无法再作回顾性检查, 故必须引为注意的是国外引进的细胞株, 在使用前有必要作支原体的常规检查。

应该指出的是, 检查支原体的方法是否特异、敏感、快速, 这对开展工作至关重要。我们曾采用半固体支原体培养基检查两株细胞 (LTK 和 CHO), 培养 2—3 个星期后均为阴性, 改用电镜法检测, 仅在 2h 内就证明两株细胞均污染了支原体。由此说明支原体在人工培养基中生长繁殖的营养条件比细菌要求高, 有些支原体很难培养^[13,14]。因此, 用半固体支原体培养基培养阴性的结果还不能排除支原体的污染。目前, 检测支原体的方法除采用电镜法外, 还有用荧光 Hoechst 33258 染色法

原位检查细胞培养中支原体的污染^[15], 有用间接免疫过氧化酶试验法^[16]或用免疫结合法^[17]检查支原体的。这些方法各有其优缺点, 可根据各实验室的条件进行。

文献报道^[10]和本实验结果均证明, 卡那霉素和庆大霉素对支原体无明显的作用, Tiamutin 对支原体似有杀灭作用。Tiamutin 浓度在 $10\mu\text{g/ml}$ 以上时即对细胞有毒性作用, 但细胞种类不同对 Tiamutin 的敏感性也不尽相同, LTK 细胞株比 CHO 细胞株对 Tiamutin 更有耐药性。 $50\mu\text{g/ml}$ Tiamutin 可抑制 CHO 细胞生长, 但 LTK 细胞仍能形成单层。苏联 Свердловский 病毒研究所采用联合抗菌素处理细胞中污染的支原体, 他们认为这种方法可以较少引起药物对细胞的毒性^[18]。从细胞株中去除支原体的污染采用单克隆接种传代, 同时加 Tiamutin ($10\mu\text{g/ml}$) 处理细胞, 比在细胞瓶中药物作用于大批细胞的效果为佳。用 Tiamutin 处理的单克隆 LTK 及 CHO 细胞株, 经过 2 个多月的培养传了 10 多代后再检查未曾发现支原体, 至于 Tiamutin 处理的细胞株是否会引起细胞

生物学特性的改变, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Barile, M. F. et al.: *Mycoplasmas Infection of Cell Cultures*, (ed G. J. McGarrity et al.), Plenum Press New York, 1978.
- [2] Stanbridge, E.: *Bact. Revs.*, **35**: 206, 1971.
- [3] Fogh, J. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**: 944, 1968.
- [4] Fogh, J. et al.: *In Vitro*, **7**: 26, 1971.
- [5] Schneider E. L. et al.: *Science*, **184**: 477, 1974.
- [6] Gail, H. et al.: *New Eng. J. Med.*, **304**: 30, 1981.
- [7] 中华人民共和国卫生部: 生物制品规程, 1979.
- [8] Brown, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**: 464, 1974.
- [9] 钱澄怀等: 电子显微学报, **5**: 92, 1986.
- [10] Schmidt, J. et al.: *Exp. Cell Res.*, **152**: 565, 1984.
- [11] Barile, M. F. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**: 432, 1971.
- [12] Beardsley, T.: *Nature*, **304**: 674, 1983.
- [13] Robinson, L. B. et al.: *Science*, **124**: 1174, 1956.
- [14] Cluss, R. G. et al.: *App. Enviro. Microbiol.*, **51**: 281, 1986.
- [15] Chen, T. R.: *Exp. Cell Res.*, **104**: 255, 1977.
- [16] Polak-Vogelzang, A. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **106**: 241, 1978.
- [17] Kotam, H. et al.: *J. Immunol Methods*, **85**: 257, 1985.
- [18] Тлинский, Н. П. и т д: *Вопросы Вирусологии*, **30**: 110, 1985.

STUDIES ON ELIMINATION OF MYCOPLASMAS FROM CELL LINE CULTURES

Zhang Hanjing Shi Qiming Hu Qiquan He Baoguang Wang Ya Lu Xiuying

(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Shanghai)

Mycoplasmas were effectively eliminated from contaminated LTK and CHO cell lines by means of the antibiotic Tiamutin ($10\mu\text{g/ml}$), while Kanamycin and Gentamycin were less potential. An elimination procedure which involved the consecutive treatment of the cell cloning over a periods of 21—28 days was adopted. This procedure was ef-

fective when applied to cell lines contaminated with unidentified and partially non-cultivable strains of mycoplasmas which could be detected by electronic microscope.

Key words

Cell lines; Mycoplasmas