



# 细胞培养之——支原体污染



客服热线：400-898-0321

E-mail: [trans@transgen.com.cn](mailto:trans@transgen.com.cn)

北京全式金生物技术有限公司  
[www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

背景介绍

支原体检测方法

支原体去除方法

支原体预防措施

# 研究背景

- 支原体：1898年，Nocard等发现的一种微生物。
- 曾用名类胸膜肺炎微生物，急性肺炎患者痰液中分离出来，1967年正式命名为支原体。
- 肺炎支原体是支原体的一种，是儿童呼吸道感染的主要致病菌。
- 在自然界中广泛存在，很多种类是动植物和人类的重要病原体，体外培养的细胞也常常被多种支原体污染，曾被认为是一种病毒。

## 什么是肺炎支原体呢？



细菌：  
直径 0.5-1 微米



支原体：  
直径 50-300 纳米

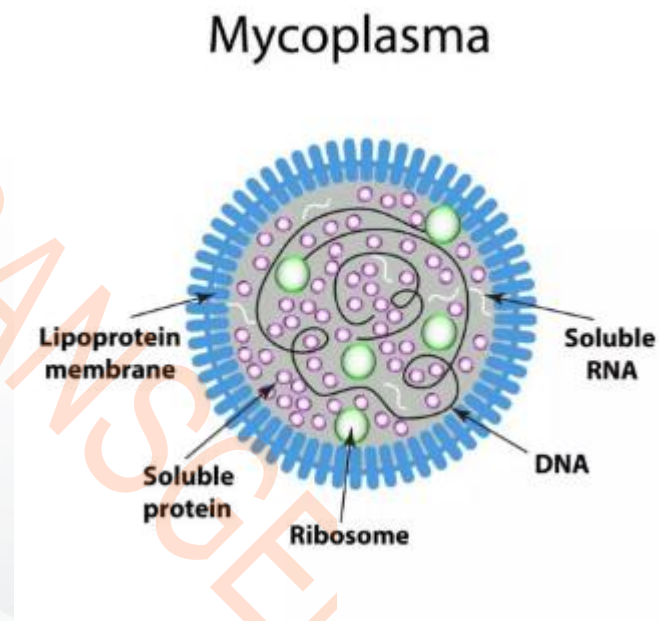


病毒：  
20-200 纳米



# 研究背景

- 体积比较小，介于**病毒和细菌**之间。
- 目前发现的最小的最简单的原核生物，基因数量为480。支原体中唯一可见的细胞器是核糖体。
- 结构比较简单，无细胞壁，多数呈球形，只有三层结构的细胞膜，故具有较大的可变性。



# 细胞学实验基本流程

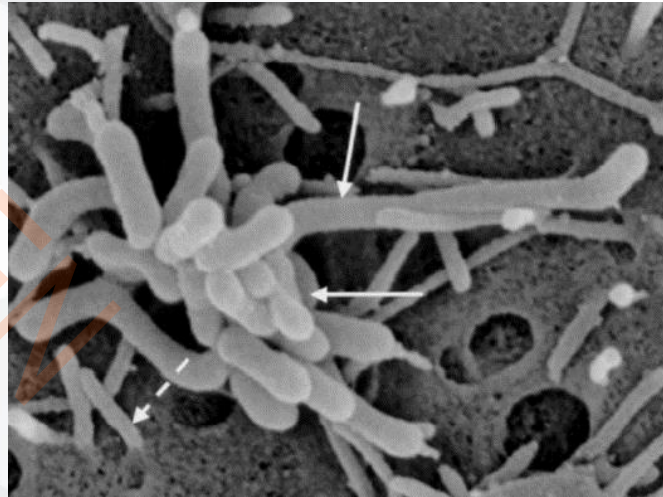


# 影响细胞培养的主要因素

- 血清、培养基
- 气体和pH值
- 温度
- 来自外界的污染（如细菌，真菌，**支原体**等）

# 支原体污染

- 支原体是1898年Nocard等发现的一种类似细菌但不具有细胞壁的原核微生物，直径在 50–300 nm，可轻松通过滤膜混入培养系统中，普通的抗生素对它不起作用，细胞被支原体污染无明显污染迹象，常给细胞培养工作带来污染的麻烦。



MDCK cell line infected with *M. arginini*; arrows indicate mycoplasmas, dashed arrow indicates microvilli.

Figure from Hans G. et al(2002)

# 支原体污染细胞的途径

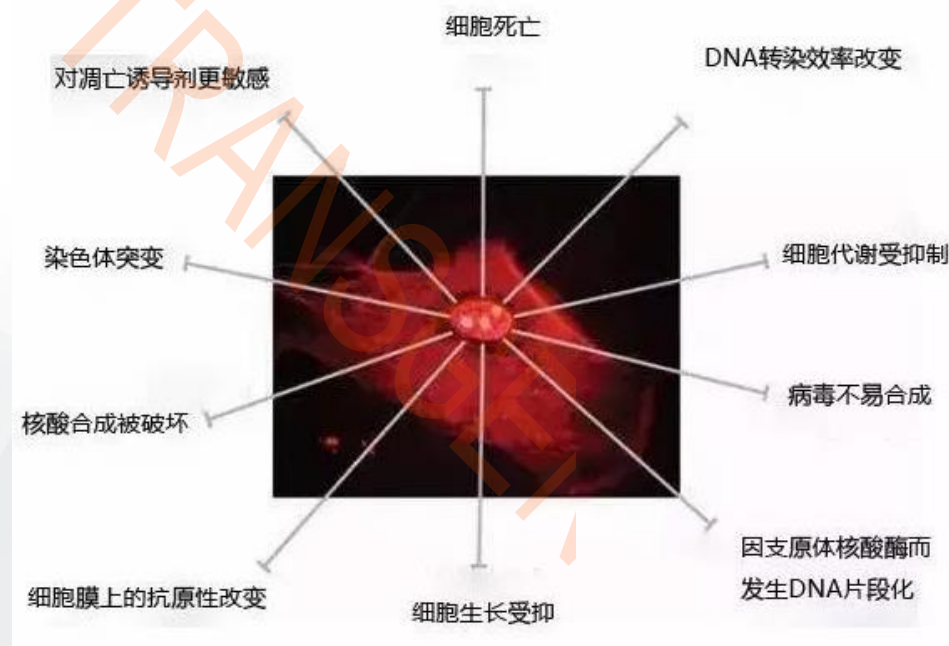
- 由于支原体直径较小，经常可以穿过实验室常规的0.20  $\mu\text{m}$ 孔径的除菌滤膜，高压过滤时，甚至可以穿过0.10  $\mu\text{m}$ 孔径的除菌滤膜，造成细胞的支原体污染。
- 细胞培养的支原体污染来源主要有：
  - (1) 细胞之间的交叉污染，这是支原体污染的最主要原因；
  - (2) 细胞培养操作人员的口腔、皮肤等。
  - (3) 细胞培养用的组分，如血清、培养液等；
  - (4) 组织细胞本身带有污染；



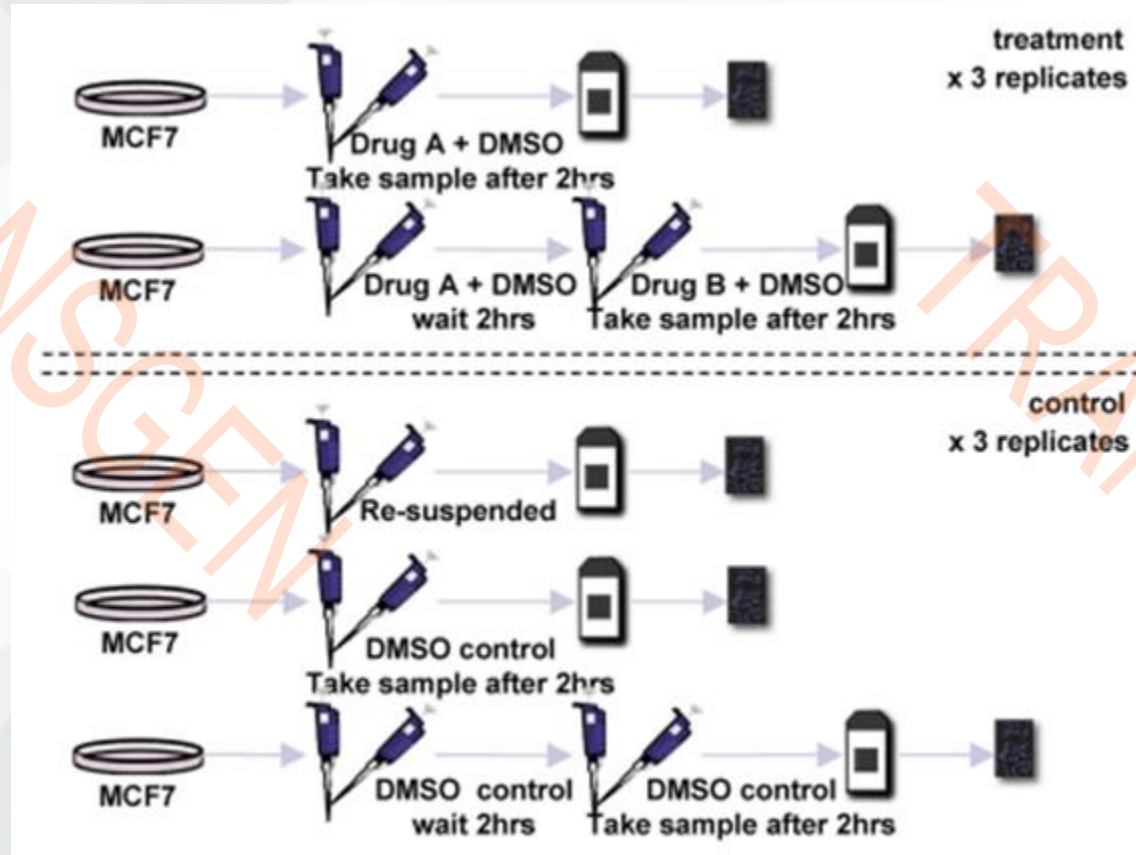
# 支原体污染细胞的危害

- 培养的细胞被支原体污染后，几乎可以改变细胞的所有功能，其可以导致细胞染色体的异常和损伤，改变细胞的代谢、生长、形状、附着，影响病毒的扩增能力和产量等等。

- 对细胞不同程度的生长抑制
- 改变细胞内正常的蛋白质
- RNA和DNA合成水平
- 诱导发生染色体畸变
- 粘附到细胞上改变细胞膜的成分（表面抗原、受体以及信号转导的改变）
- 影响造血细胞的活化、增殖和分化，诱导/抑制细胞因子和生长因子表达、增加B细胞分泌免疫球蛋白等多种细胞参数。



## 案例：Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles



The original experiment that provided the mycoplasma-contaminated cell lines.



# 高污染率的原因

- 支原体太小，无细胞壁，可透过一般过滤膜（0.22-0.45  $\mu\text{m}$ ）
- 支原体污染时，没有明显的肉眼或一般光学显微镜可观察到的特征变化
- 缺乏简单、快速且可靠的检测方式
- 细胞流通间缺乏品管，造成实验室间的相互污染
- 研究或操作人员忽略污染问题

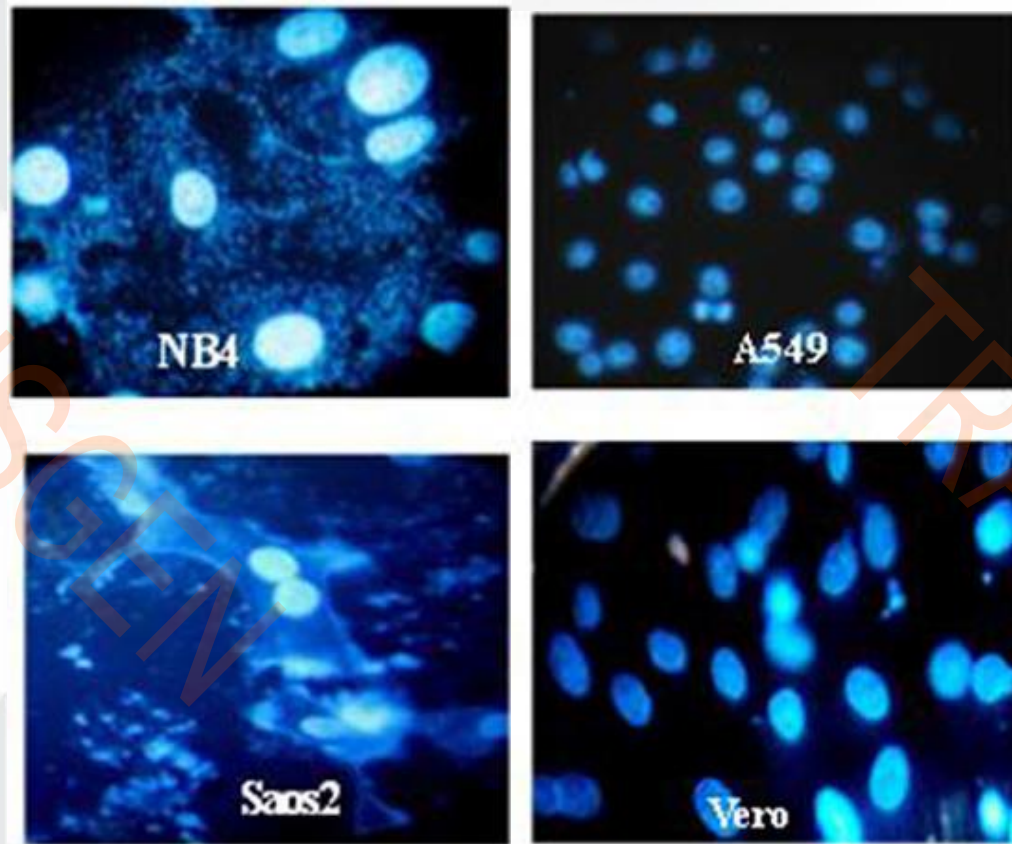
- 从2013年开始，《Nature》期刊已正式要求投稿的文章，如涉及细胞培养都必须要进行支原体检测。

#### Resources on cell line identity

To help curb the inadvertent use of cross-contaminated or otherwise misidentified cell lines, authors are asked to check their reagents against the list of known misidentified cell lines maintained by the [International Cell Line Authentication Committee](#) (ICLAC) and also accessible through the NCBI [BioSample database](#). If using a cell line that is on this list, authors should provide a scientific justification and state the identity issue in the Methods section. Editors reserve the right to demand that the data be removed from the paper if the justification is deemed unsatisfactory. In addition, authors must identify the source of cell lines (with catalog number if obtained from vendor or cell bank) and report whether the cell lines have been authenticated. They should include the method used, the results and when authentication testing was last performed for that cell line. Authentication test results must be provided upon request. [Mycoplasma contamination testing status must also be reported](#). As of May 2015, these requirements are particularly emphasized for cancer research where the issue of cell line misidentification has been well documented, but authors in all disciplines are strongly encouraged to comply with these reporting criteria. It is good practice to obtain cell lines from reputable repositories, to routinely authenticate cell line stocks and test them for mycoplasma contamination. Resources on cell line authentication follow.

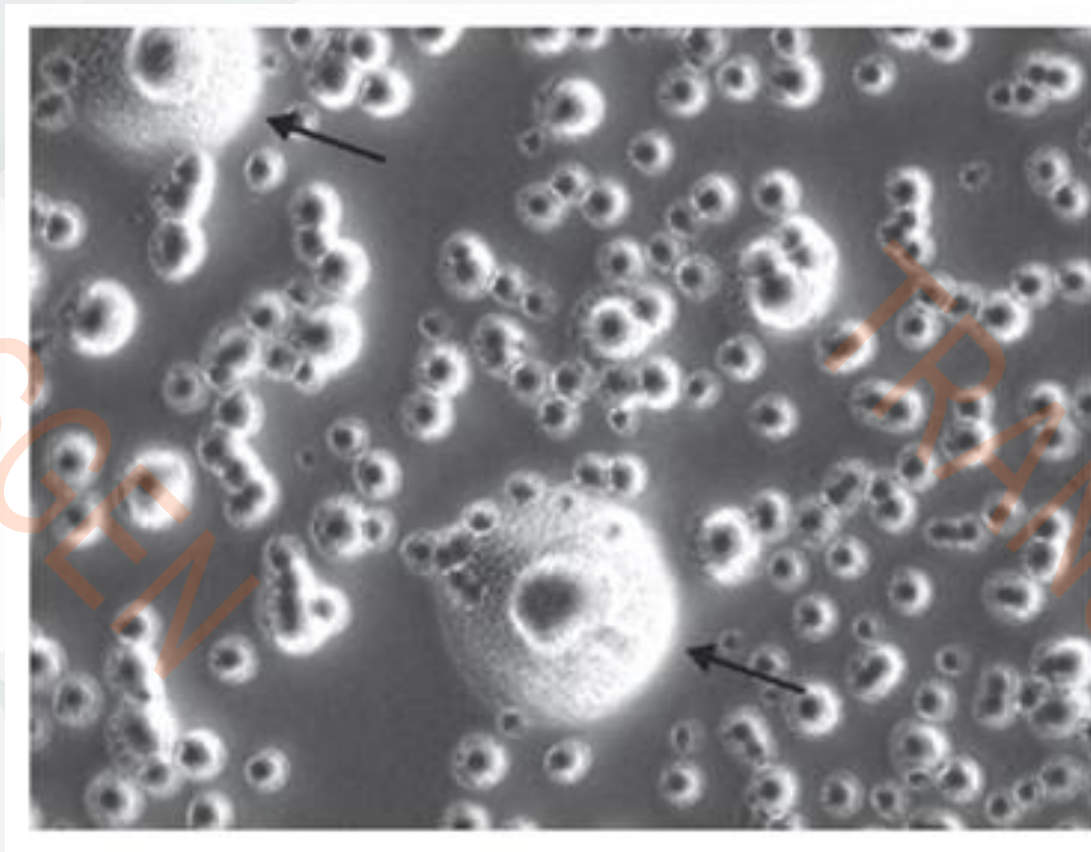
# 支原体检测方法

- 观察法
- DNA染色法
- 培养法
- PCR法
- 化学发光法
- 免疫荧光法



## DNA染色法检测支原体

注：NB4、Saos2细胞为支原体阳性细胞染色结果，A549、Vero为支原体阴性细胞染色结果



典型的支原体克隆

注：并非所有的支原体克隆均为此形态，图片来自于Lesley Young et al.,2010。

# PCR法检测原理

通过PCR方法检测培养细胞等生物材料中的支原体，针对支原体16S rRNA序列保守区域**设计特异引物，直接使用细胞培养液作为模板**，特异性扩增支原体DNA，具有操作简便、快速（2小时内即可出结果）、特异性强、灵敏度高的特点。

# PCR法检测过程

样品准备与热处理

约15 min

PCR

约70 min

凝胶电泳

约15 min

检测结果分析

约 10 min



1

Cell Culture  
Supernatant  
Collection



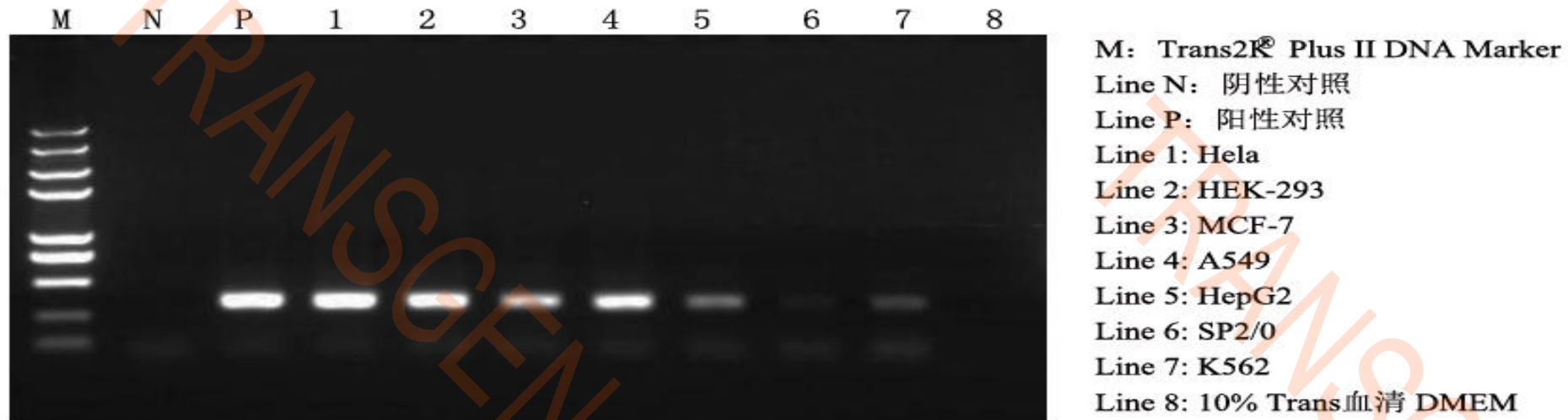
2

PCR



# PCR-Based支原体检测结果

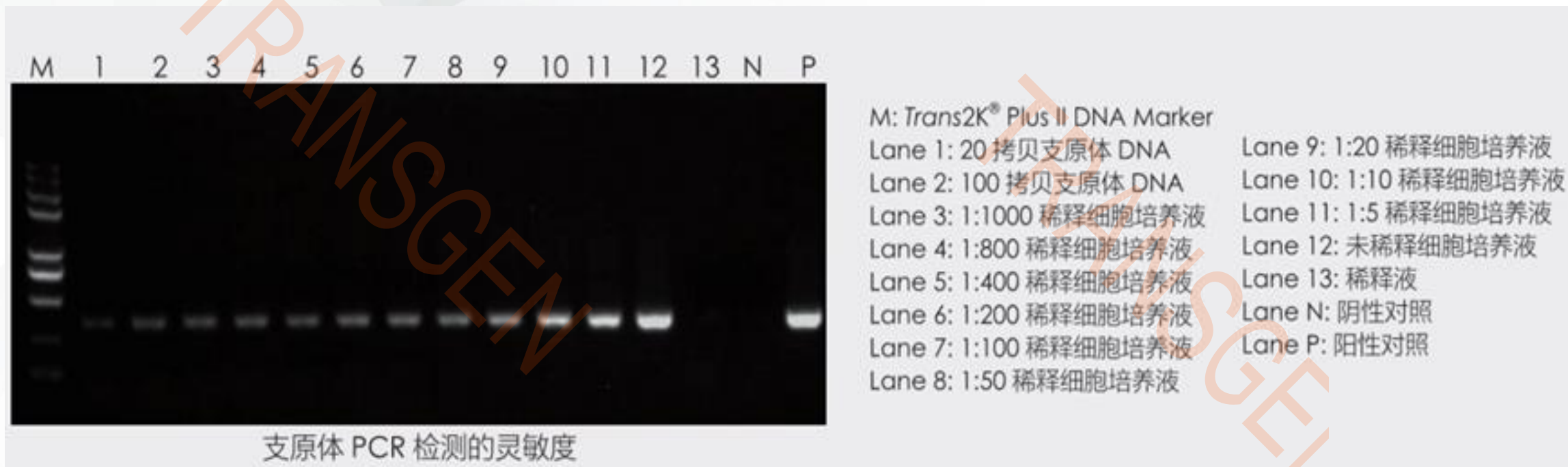
## (一) 凝胶电泳检测



- 支原体PCR检测结果发现，我们平常培养的细胞，包括HeLa、Hep G2、HEK-293T、HEK-293、N2a、A549、MCF-7、CHO、K562、NIH/3T3、Sp2/0、BHK-21、Vero、U937、SH-SY5Y等都有不同程度的支原体污染。
- 细胞培养用品，例如TransGen 血清、培养基、双抗、PBS 没有支原体污染。

# PCR-Based支原体检测结果

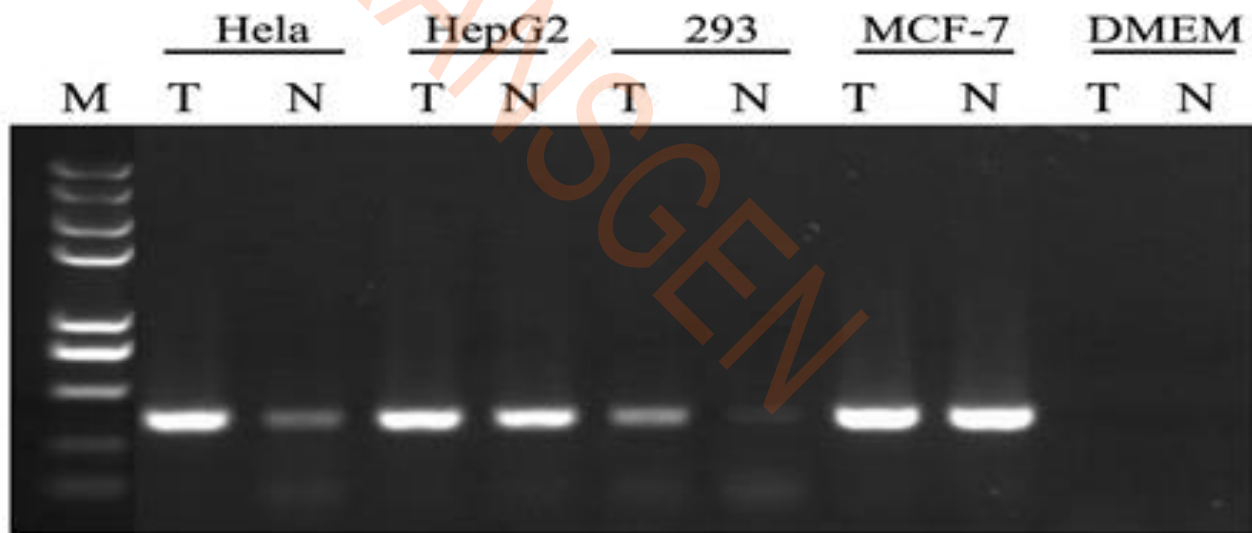
## (一) 凝胶电泳检测



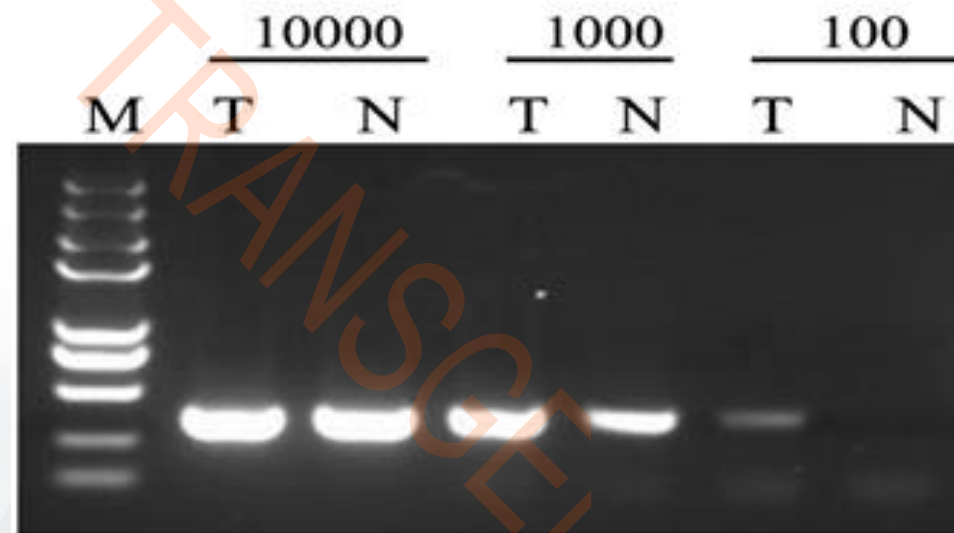
PCR法支原体检测

# PCR法——同类产品比较

### 检测结果一致性

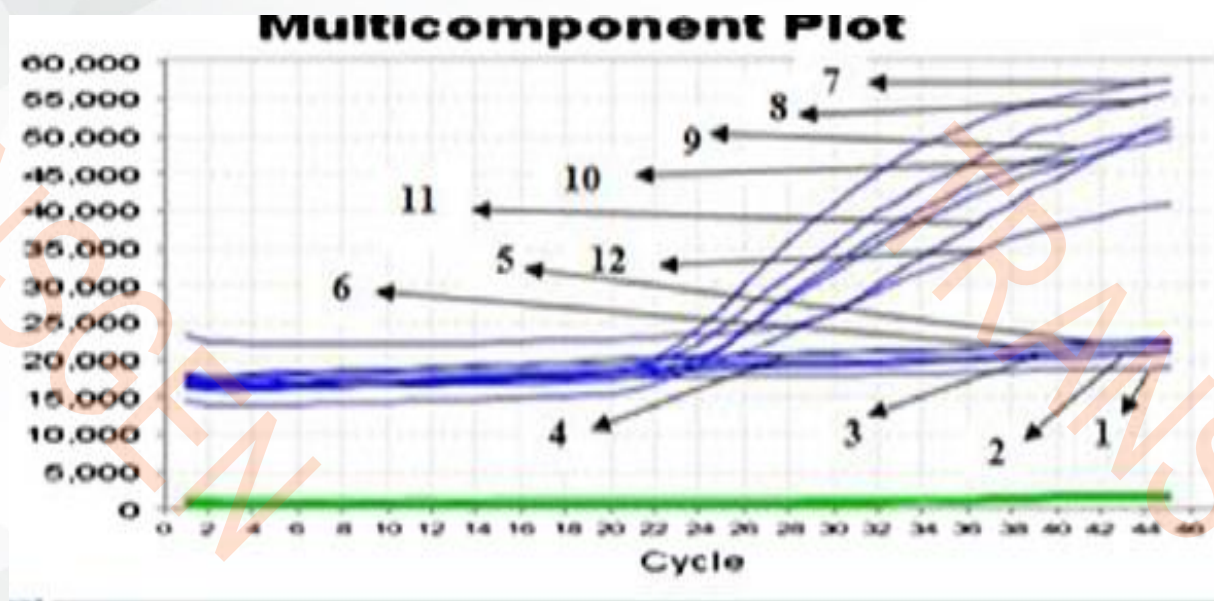


### 灵敏度比较



# PCR-Based支原体检测结果

## (二) 荧光定量检测



荧光定量QPCR检测支原体

注：1-6为阴性对照，7-12为不同样品的阳性对照，图片来自于Vahid Molla Kazemiha, et al.,2016。

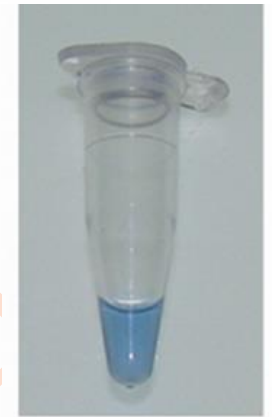
# PCR-Based支原体检测结果

## (三) 等温扩增检测原理

环介导等温扩增法，是针对支原体靶基因设计4种特异引物，在链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)的作用下，60-65℃恒温扩增反应，再利用荧光染料（如钙黄绿素或羟基萘酚蓝）作为指示剂，通过反应管溶液颜色的变化，即可判断检测结果。



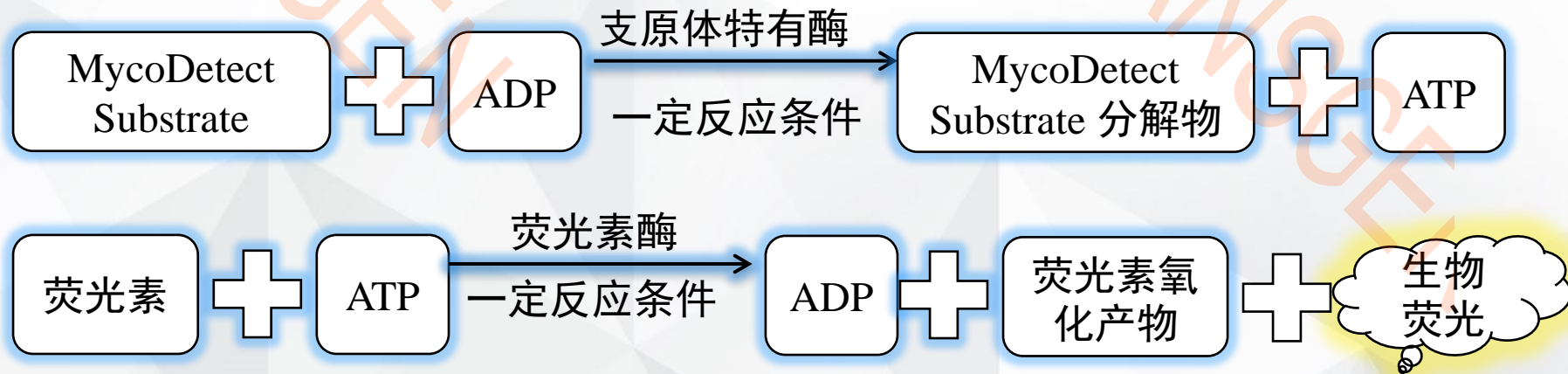
Negative reaction



Positive reaction

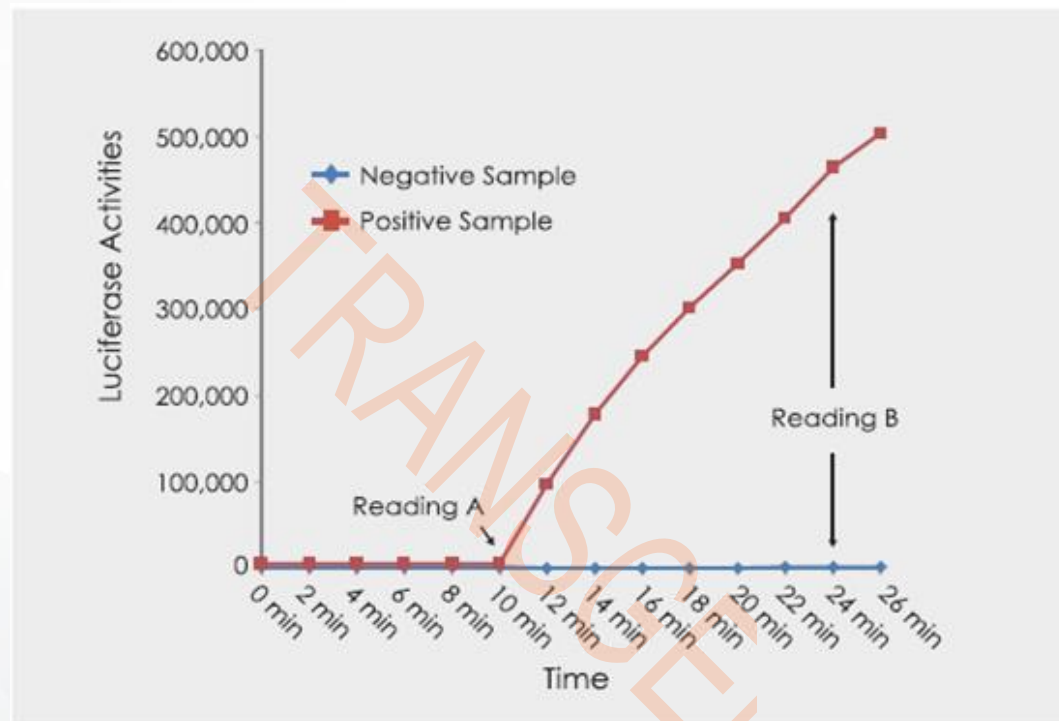
## 检测原理

利用支原体中所特有的酶设计而成，该酶分解 MycoDetect Substrate 的同时将 ADP 转换成 ATP，荧光素酶在 ATP 存在的条件下催化荧光素（luciferin）氧化发出生物荧光，通过检测生物荧光可以表征细胞培养物是否存在支原体污染。



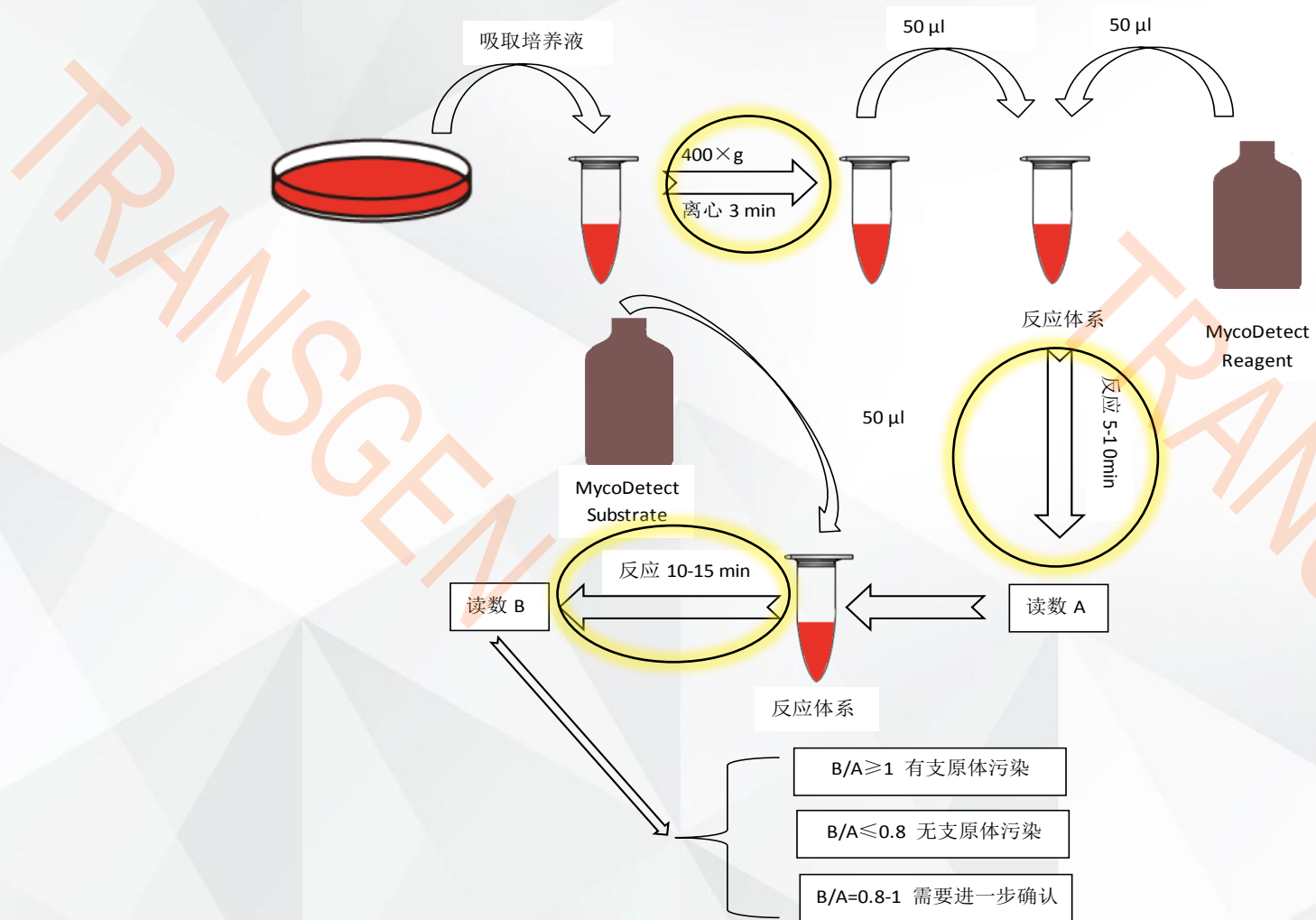
# 化学发光检测方法

- 灵敏度高、操作简便。
- 省时，整个检测过程只需要20-30min。
- 检测的是具有生物活性的支原体，得到的结果更加准确。



化学发光法支原体检测结果

# 化学发光法检测流程



整个检测过程仅需要  
20-30 min

# 支原体去除

- 由于很多实验室的细胞系中都或多或少的感染了支原体，而且其中许多细胞都没有未受污染的细胞替代，因此，有效和可行的支原体去除方法就显得非常有必要了。
- 如果污染细胞价值不大，应丢弃，重新培养；若污染细胞价值较大，又难以重新得到，就需要采取一些清除支原体的措施。

# 支原体去除

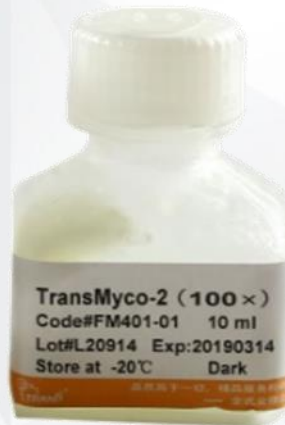
- 培养细胞一经污染，多数较难处理。如果污染细胞价值不大，弃之即可。在寻找原因后彻底消毒实验室，复苏留存细胞株或重新购买细胞株，重新培养。若污染细胞价值比较大，重新获得比较难，可采取一些措施进行支原体的清除。
- 文献中已经描述了许多从细胞中去除支原体的方法，这些方法包括物理的，**化学的**，**免疫的**等等。
  - 裸鼠体内净化支原体：利用宿主体内免疫系统的作用，杀死支原体。
  - 体外去除支原体：加温处理法、光灭活法、抗血清处理、抗生素。

# 支原体去除

- **加温处理：**将污染的组织 and 细胞培养物放在41℃作用5-10 h，以杀灭支原体，是一种比较简单的方法；
- **光灭活法：**利用5-溴尿嘧啶易掺入支原体核酸中，使DNA受光照而破坏的原理，可灭活污染的支原体，而对细胞无副作用。
- **抗血清处理：**采用多克隆的抗血清有利于解决支原体种株差异的影响，消除细胞中的多种支原体污染。

# 支原体去除

- **使用抗生素**：近年来，在人类/兽医医学和细胞培养中，三种独特的抗生素被证明对绝大多数支原体都是有比较良好的效果的，它们分别是**氟喹诺酮类**、**大环内酯类**和**四环素类**或其衍生物；



刘 岚，陈绍坤. (2008) 贴壁细胞培养过程中支原体污染的几种救治方案疗效比较研究.

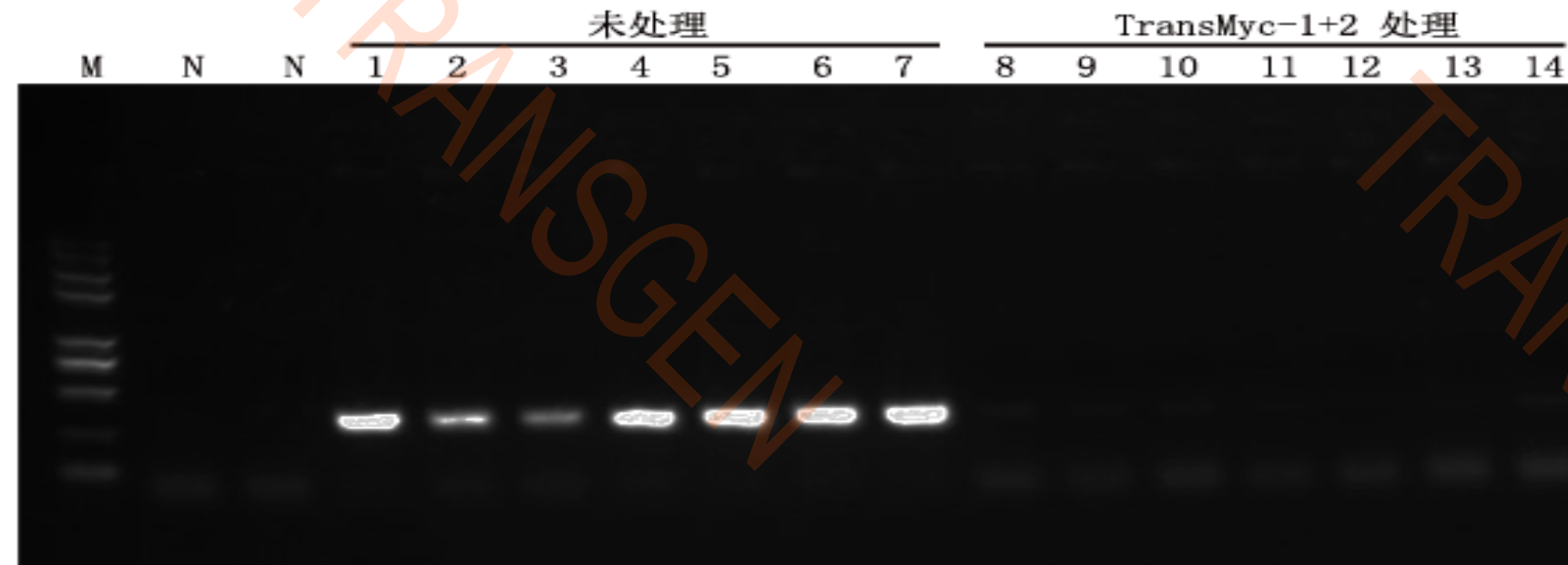
# 裸鼠体内净化支原体

将被支原体污染的肿瘤细胞注射接种到4周龄-6龄的Balb/c裸鼠的腹腔或颈背皮下，在裸鼠体内自然净化30d后，将肿瘤组织取出重新培养，获得细胞系。

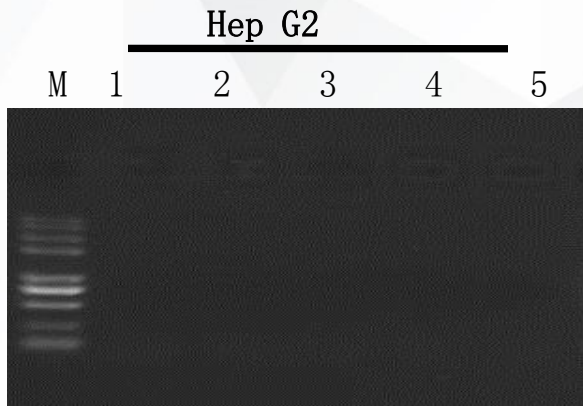
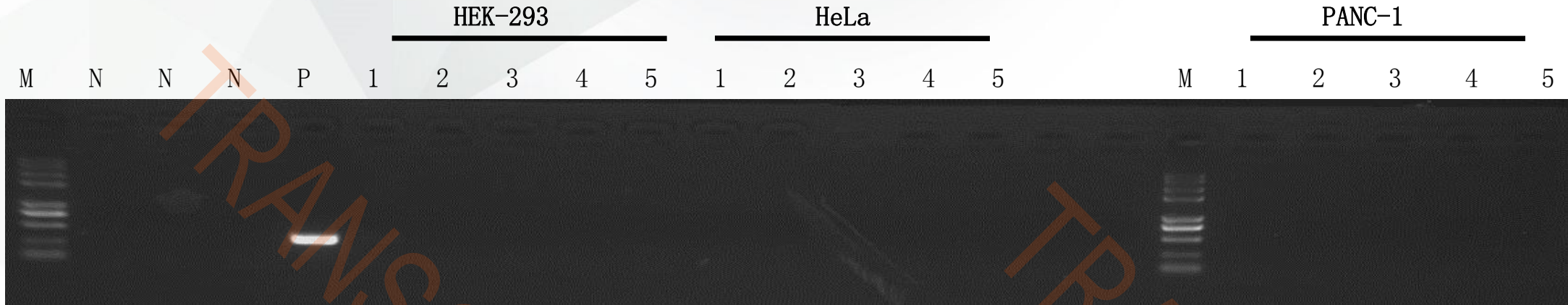
该方法是利用宿主体内免疫系统的作用，杀死支原体。支原体大多是附着在细胞的表面，裸鼠体内具有非常活跃的巨噬细胞系统和体液性杀菌物质，如抗体、补体及溶菌酶等，以上因素对附着种植细胞表面的支原体起吞噬与杀灭作用，从而使接种的细胞得以“净化”。



图片来自网络



M: Trans2K® Plus II DNA Marker  
Line N: 阴性对照  
Line 1 8: Hela 清除前后  
Line 2 9: HEK-293 清除前后  
Line 3 10: MCF-7 清除前后  
Line 4 11: A549 清除前后  
Line 5 12: HepG2 清除前后  
Line 6 13: SP2/0 清除前后  
Line 7 14: K562 清除前后



支原体检测为使用TransDetect Mycoplasma PCR Detection Kit进行检测。

N: 加入的模板分别为超纯水, DMEM+10%FBS, 1640+10%FBS

P: 试剂盒中提供的阳性对照

Lane 1: I公司处理两周

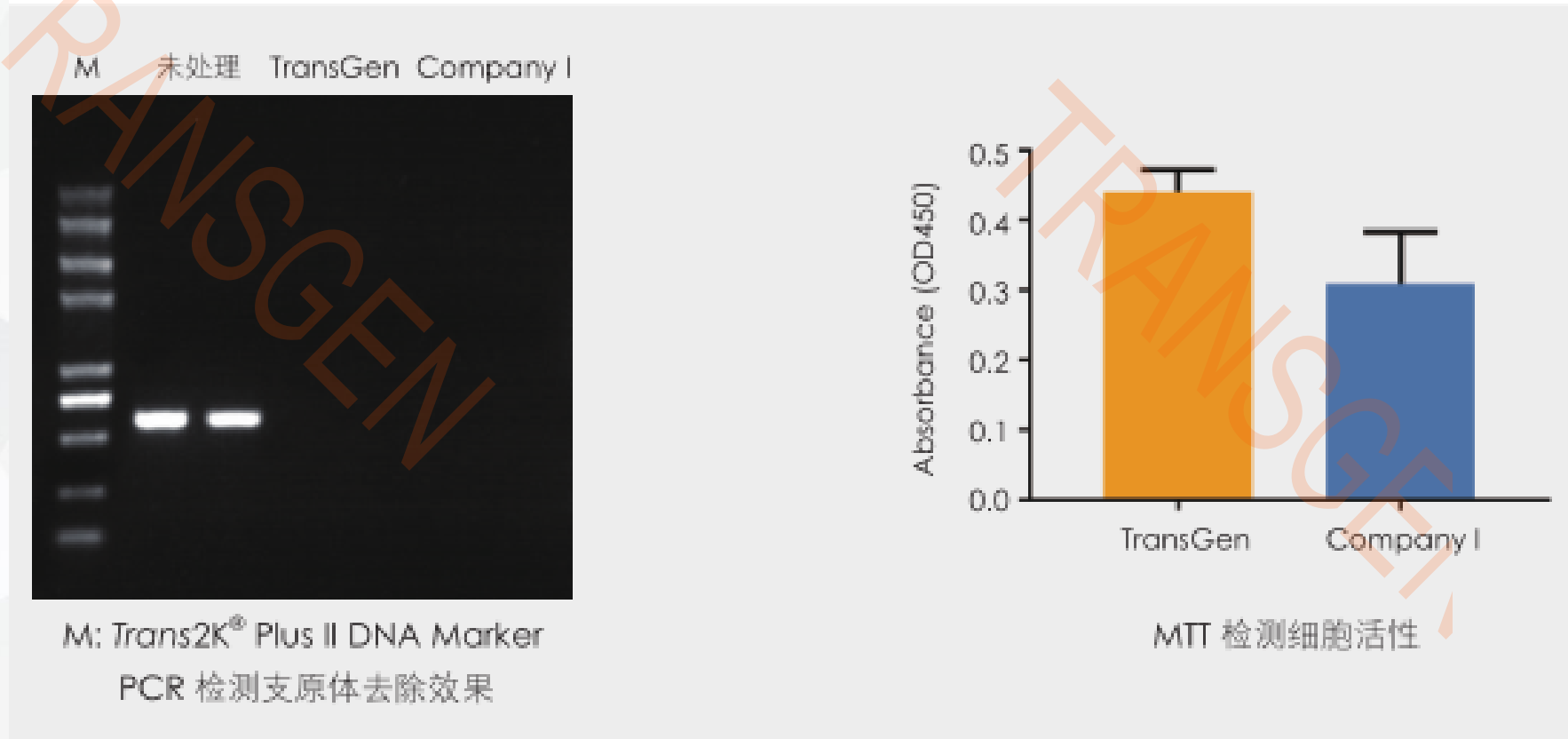
Lane 2: B公司1+2号试剂处理两周

Lane 3: B公司3号试剂处理两周

Lane 4: TransGen Myco1+2号试剂处理两周

Lane 5: TransGen Myco3号试剂处理两周

# TransSafe Mycoplasma Elimination Reagent (TransMyco Plus) Kit 产品应用实例



# 支原体预防

- 良好的无菌操作
- 良好的规章制度
- 保持工作区清洁
  
- 建立细胞库
- 合理利用抗生素
- 细胞污染的检测



图片来自网络

# 良好的无菌操作

- 配制培养液与试剂时应严格无菌
  - 避免倾倒和触碰细胞培养瓶的瓶口
  - 液体应分装并置4~8 °C保存
  - 每种细胞应使用单独的培养液
- 
- 超净工作台上用品不要过多或重叠放置
  - 一些操作用具擦洗后置于台内同时**紫外线消毒**
  - 实验前制定好**实验计划**和**操作程序**，备齐各种所需器材和物品、清点无误后将其放置操作场所(培养室、超净台)内。



图片来源于网络

# 良好的规章制度

- 只有相关人员才可进入细胞培养区
- 细胞培养区必须和其他区域分开
- 每个细胞培养区应布局合理，保证所需物品就近放置，在处理细胞时避免不必要的走动
- 细胞培养区应避免使用水池，从而避免微生物污染

# 建立细胞库

- 减少购买细胞所用的各种费用
- 冻存的细胞生物性状不发生改变
- 消除了隐蔽污染的潜在危害



图片来自网络

# 合理利用抗生素

- 过度依赖抗生素会使人们忽略无菌操作
- 滥用抗生素常导致耐药菌的产生
- 牢记抗生素不能代替无菌操作



图片来自网络



- 试剂在使用前**彻底化冻、混匀**。
- 整个检测过程中，请严格按照**PCR操作标准**在专属区域进行，**避免交叉污染造成假阳性**。
- 操作时请**戴口罩**，因口腔中含有支原体，可能会引起样品污染而造成假阳性。
- 细胞培养物中含有的青霉素和链霉素等抗生素以及血清不会影响本产品的检测结果。
- 为获得最佳检测效果，建议**细胞汇合度**达到80%（贴壁细胞）或密度达到 $10^6/\text{ml}$ （悬浮细胞）时取样进行检测。
- 对于非常微弱的阳性结果，建议再次检测确认结果，避免假阳性的影响。
- 为了确保细胞实验的**可靠性和稳定性**，避免细胞被支原体污染影响实验结果和文章发表，建议**定期检测**细胞以及细胞培养试剂的支原体污染情况。日常细胞培养很容易被支原体污染，建议使用支原体预防试剂TransSafe™ Mycoplasma Prevention Reagent（目录号：FM501）替代双抗使用，预防污染效果更好。

- 对于**增殖快的细胞系**，为了降低传代次数，如果细胞培养条件允许，建议降低细胞接种密度或适当降低血清浓度。
- 如果细胞**对抗生素非常敏感**，建议适当降低TransMyco-1、TransMyco-2和TransMyco-3的工作浓度。
- 如果环境或使用试剂中仍有污染源存在，细胞可能会再次污染支原体，建议做好适当的预防措施，培养基可以加入支原体预防试剂，建议使用TransSafe™ Mycoplasma Prevention Reagent（目录号：FM501）

背景介绍

支原体检测方法

支原体去除方法

支原体预防措施



谢谢!

[www.transgen.com.cn](http://www.transgen.com.cn)

北京全式金生物技术有限公司

