

细胞培养及常见污染防治技术进展

曾今诚^{1,2}综述,徐军发^{1,2},周克元²审校

(1. 广东医学院检验医学研究所,广东东莞 523808;2. 广东省医学分子诊断重点实验室,广东东莞 523808)

关键词:细胞培养技术; 无菌生物; 综述

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 20. 038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2522-03

细胞培养始发于 1885 年 Roux 尝试的组织离体培养,随后 Harrison(1907 年)和 Carrel(1912 年)开始将组织培养作为 1 种方法进行离体动物细胞培养。至今细胞培养已在现代医学和生物科学研究中发挥至关重要的作用。细胞培养是 1 个无菌操作过程,对细胞培养条件要求比较苛刻。目前,国内外大多数实验室都建有标准化的细胞培养室,来避免微生物及其他有害因素的影响,满足细胞培养的要求,但细胞培养过程中污染问题还是会给研究人员带了极大麻烦。本文结合细胞培养技术,将重点阐述细胞培养过程中的常见污染类型及防治和去除手段,为广大细胞培养工作者提供参考。

1 细胞培养技术

1.1 细胞培养和传代 根据细胞生长类型(贴壁型和悬浮型)

表 1 常用的贴壁细胞分离方法和特点

处理方法	特点
胰酶溶液	一般胰酶含量为 0. 25%,温和降解蛋白,适用于多数贴壁细胞培养,消化时间应细胞种类而定
EDTA 溶液	一般 EDTA 含量为 0. 01%,螯合蛋白中的 Ca ²⁺ 或 Mg ²⁺
胰酶与 EDTA 混合消化液	0. 25%胰酶和 0. 01%EDTA 混合液,目前比较常用,适用于多数贴壁细胞培养,消化时间应细胞种类而定
机械剥离法	采用细胞刮刷,不常用,对细胞损伤较大,在一些不适合消化酶消化的细胞中适用
机械剥离加酶消化法 ^[1]	在上皮细胞的分离中比较适用,机械剥离可减少酶消化作用时间

1.2 细胞冻存和复苏 细胞冻存是细胞保种和间歇性实验所涉及的细胞冷冻保存过程。细胞冻存所用的冻存液需新鲜配制,常为含终浓度 5%~10%二甲基亚砷(DMSO)的新鲜培养液或含终浓度 5%~10%DMSO 的小牛血清。后者本实验室常用,与前者相比冻存细胞的存活率更高、保存时间更长。细胞冷冻的方法有 2 种,1 种是传统人工降温:4 ℃(30 min)→-20 ℃(30 min)→-80 ℃(16~18 h 或隔夜)→液氮长期保存。另 1 种是程序降温法,等速降温机以 1~3 ℃/min 的速度由室温降温至-120 ℃,放于液氮罐长期保存。冷冻细胞复苏的原则为快速解冻,冻存细胞从液氮取出后,快速放入 38 ℃~40 ℃温水中解冻。

2 污染来源

细胞培养实验室要求保持无菌操作,避免微生物及其他有害因素的影响。细胞培养室要相对封闭,洁净无尘,设有缓冲间。对实验室进行定期清扫,紫外消毒是避免细胞培养过程中由于实验室环境引起细胞污染的主要措施,此外,实验室内不要放太多杂物,保持实验室干燥,有利于降低因实验室条件引起的细胞污染率。

和细胞种类,细胞培养过程中需选取不同细胞培养容器和细胞培养液。细胞培养过程是一个严格的无菌操作过程,依赖特定除菌设备(紫外灯)的细胞培养房(含细胞培养箱、净化工作台、倒置显微镜、离心机等),并需要专门实验技术人员进行管理和维护。细胞培养条件一般都是 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养。当细胞生长到一定密度时,需要对细胞进行传代培养,否则细胞生长状态受到影响,引起细胞死亡,贴壁型和悬浮型细胞传代过程中涉及的方法存在差异。贴壁型细胞需要与黏附介质进行分离后,才能进行传代培养。不同细胞种类选取的细胞消化液、消化时间和处理方法各异,见表 1。一般细胞传代的稀释比例为 1:3~1:6,依细胞种类而异。

细胞培养过程中实验人员是否操作规范,是否严格遵守无菌工作流程,是细胞污染的一个主要因素。操作人员进培养室前,必须先洗手,在缓冲间换穿专用实验服和拖鞋,严禁在实验进行时频繁出入培养室。实验后应将实验产生的废物和废液及时清理出培养室,并清洁无菌工作台。

细胞培养过程中要注意防止培养液和血清的污染,试剂的除菌方法采用过滤除菌法,培养细胞所有血清必须储存于-20 ℃或-70 ℃。细胞培养过程所有的实验用具(如移液管、一次性枪头、一次性塑料离心管、冻存管等)需 121 ℃高压灭菌 20 min 后 37 ℃烤干备用,一些玻璃器皿(如细胞培养瓶等)须先泡酸、洗净、晾干后再高压灭菌备用。

3 污染种类与防治

细胞培养过程中常由于环境条件没有控制好或操作不当等原因造成细胞污染,细胞培养中常见的污染有细菌污染、真菌污染、支原体污染、螨虫污染等^[2-9],见表 2。虽然细胞培养过程中污染,时常是难以避免的。但研究者结合自身多年的细胞培养经验和查阅相关文献^[2-14],对某些细胞污染以采取挽回措施。见表 3。

表 2 细胞培养过程中常见污染种类及防治措施

种类	特点	主要来源	预防措施
细菌污染	常见污染细菌有革兰阴性菌(如大肠杆菌、枯草杆菌、假单胞菌等)和革兰阳性菌(葡萄球菌等),培养液混浊、变黄	实验室环境、实验人员(实验服)、实验用具等	培养液中添加双抗(青链霉素)、西司他丁钠+亚胺培南等
真菌污染	最常见的真菌有烟曲霉、黑曲菌、孔子霉、毛霉菌、白色念珠菌和酵母菌,培养液清亮或混浊,见菌丝或菌链	实验人员(实验服)	一定剂量制霉菌素、二性霉素、灰黄霉素、克霉唑、氟康唑等
支原体污染	长期传代培养的细胞系,支原体的污染极为常见,支原体污染后,在光镜下常可见到细胞核及胞浆内出现大小不等的颗粒或空泡,培养液清亮	血清	一般难于清除,添加抗生素防治
黑胶虫污染	400 倍显微镜下可见点状或片状游动小体	血清	一般难清除,少量对细胞影响不大
病毒污染	逆转录病毒感染,见于杂交瘤细胞	细胞系	

表 3 常见细胞污染挽回措施

污染种类	亚型	挽回措施	处理周期	对细胞的影响
细菌污染	多数细菌	广谱抗生素组合	不定	不定
	多数细菌	巨噬细胞吞噬法	1 周左右	影响不大
	多数细菌	动物接种除菌法	不定	影响不大
	香味菌	万古霉素、氧氟沙星	1 周左右	未报道
	海胆假单胞菌,藤黄微球菌等	诺氟沙星、头孢唑啉钠、阿米卡星	不定	影响不大
真菌污染	部分真菌	制霉菌素、二性霉素、灰黄霉素、克霉唑、结晶紫、煌绿、胆盐	不定	未报道
	酵母菌	10%氟康唑氯化钠注射液	污染控制后培养 4~6 代	无明显毒性
支原体	多数支原体	巨噬细胞+泰乐霉素和林可霉素	1 周左右	细胞生长数率有所下降
	多数支原体	抗支原体血清	1 周左右	无毒副作用
	多数支原体	5-溴尿嘧啶和 Hoechst33258 共同孵育后进行光照射	1 周左右	细胞 DNA 可能受到破坏
	部分支原体(M. hyorhinitis, M. arginsni, M. rale, A. laidfawii)	米诺环素和 Tiamutin	数周~数月	无毒副作用

4 小 结

细胞培养技术是现代医学和生物科学研究过程中不可或缺的手段。微生物污染是细胞培养过程中的大敌,其中以细菌、真菌和支原体污染最为常见。如何去除细胞培养过程中的发生的污染,一直是非常令人棘手的问题。细菌污染是细胞培养过程中极其常见的污染,即使在培养液中加入一定量抗生素,也可引起耐药细菌污染,给研究者带来极大麻烦。细菌污染后,培养液一般会出现浑浊和 pH 值改变,污染细胞生长变缓慢,形态变圆(贴壁细胞脱落),胞内颗粒增多,甚至坏死。常见的革兰阳性菌污染有葡萄球菌、枯草杆菌等;常见的革兰阴性菌有假单胞菌、大肠杆菌等。真菌污染是细胞培养过程中面临的一大难题,在细胞培养箱中,真菌生长较缓慢(最适生长温

度为 25 ℃左右),一般培养 3 d 左右显微镜下可见明显真菌生长,形态有丝状细胞、单一细胞和长链状排列的细胞,4 d 左右肉眼下可见棉絮状的菌丝团等。支原体也是细胞培养过程中常见的污染源,其个体微小(0.3~0.8 μm),可穿过 0.45 μm 孔径滤膜,且对大多数抗生素不敏感,因此极难防治。本文结合自身多年细胞培养经历和相关文献信息,回顾性总结了细胞培养技术及其培养过程中的常见污染来源,同时也总结了近年来国内外对细胞培养过程中常见污染防治和污染去除措施。这些将为熟悉掌握细胞培养技术、防治细胞培养过程中的污染发生及研究新的污染去除手段提供一定的帮助,有利于细胞培养技术在现代医学和生物科学研究中的合理、有效应用。

参考文献

[1] 杜永成, 许建英, 延峰. 胰酶冷消化加刮刷法分离培养气管上皮细胞的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(9): 1286-1288.

[2] 江千里, 王健民, 江汕, 等. 西司他丁钠+亚胺培南消除细胞培养中细菌污染的研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 114-115.

[3] 马强, 刘青松, 蔡燕, 等. 外周血淋巴细胞培养及染色体制备的几点体会. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1641-1642.

[4] 王恩军, 靳祎, 王亮. 氟康唑去除细胞培养中的真菌污染[J]. 河北职工医学院学报, 2007, 24(4): 7-8.

[5] Fortún J, Ruiz I, Martín-Dávila P, et al. Fungal infection in solid organ recipients[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012, 30(Suppl 2): 49-56.

[6] 邵荣标, 钱勍虎, 吴巨飞, 等. 细胞培养法真菌污染控制初探[J]. 南通医学院学报, 2002, 22(3): 278-280.

[7] Uphoff CC, Drexler HG. Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics[J]. Methods Mol Biol, 2011, 88(7): 327-334.

[8] Degeling MH, Maguire CA, Bovenberg MS, et al. Sensitive assay for Mycoplasma detection in Mammalian cell culture[J]. Anal

Chem, 2012, 84(9): 4227-4232.

[9] 刘岚, 陈绍坤, 余红. 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[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(8): 1221-1222.

[10] 赵俊, 王兴满, 胡勇. 动物细胞培养物中支原体污染的检测[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1151-1153.

[11] Charlemroij R, Oplatowska M, Kumpoosiri M, et al. Comparison of techniques to screen and characterize bacteria-specific hybridomas for high-quality monoclonal antibodies selection[J]. Anal Biochem, 2012, 421(1): 26-36.

[12] 敖弟书, 吴中明, 王玉. 一种罕见细胞污染的发现及处理-香味菌污染[J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(1): 81-83.

[13] Archambault M, Harel J, Gouré J, et al. Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of Actinobacillus pleuropneumoniae[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(2): 198-206.

[14] Tang YZ, Liu YH, Chen JX. Pleuromutilin and its derivatives-the lead compounds for novel antibiotics[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(1): 53-61.

(收稿日期: 2012-01-09)

• 综 述 •

基于 SISCAPA 技术的疾病标志物的转化医学研究*

王馨悦, 韩 冰 综述, 王立顺[△] 审校

(上海交通大学医学院附属瑞金医院细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025)

关键词: 质谱分析; 抗肽抗体; 免疫亲和富集; 稳定同位素标记; 转化医学
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 20. 039 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)20-2524-03

基于蛋白质组学技术的基础生物研究筛选出了大量蛋白候选标志物, 由于缺乏有效的验证手段, 阻碍了其在疾病诊断、临床处理和疾病预后中的应用。目前, 验证疾病候选标志蛋白主要依赖于免疫学分析方法, 如 ELISA。但对所有候选标志物都开发 ELISA 法, 是不切合实际的, 因为抗体开发费用高昂, 耗时长, 成功率低^[1-3]。这些因素导致大量的蛋白质标志物研究只能滞留在发现阶段而无法进入临床实践。现阶段亟须开发一种低成本、耗时短的“桥梁”技术, 填补生物标志物发现和临床应用之间的空白^[2]。多反应监测-质谱技术(MRM-MS)用于蛋白质标志物验证研究具有其独特的优势, 但是 MRM-MS 的敏感性尚不能满足目前临床常用的标志物检测的需求。近年来, 基于 MRM-MS 和同位素标记的标准肽段的蛋白质定量技术得以建立并迅速发展。Anderson 等^[2]开发了稳定同位素标准和用抗肽抗体提取(SISCAPA)技术。这项技术应用免疫亲和法富集和同位素稀释, 并联合 MRM-MS 技术, 达到候选标志物定量的目的^[2, 4]。SISCAPA 已经被证实具有高特异性、敏感性和准确性^[5-8], 同时保持了研发时间短、成本低的特点, 能有效弥补 MRM-MS 和 ELISA 技术的不足, 在不久的将来, 可能作为一种新型的蛋白质标志物转化医学研

究的手段。

1 SISCAPA 技术的基本原理和特点

SISCAPA 是一种复杂蛋白酶解产物中的多肽定量方法。抗肽抗体富集特定的目标肽段, 并加入与目标肽段有相同序列的稳定同位素标记多肽作为内标; 目标肽段从抗肽抗体上洗脱下来后, 用 MRM-MS 方法定性并定量分析天然和标记形式的目标肽段; 根据测定出的天然和同位素标记的目标肽段的丰度比值, 得知目标肽段含量^[2]。MRM-MS 分析起到类似二抗的作用, 有高度特异性, 大大减少了一抗交叉反应带来的弊端, 也降低了对一抗特异性的要求。

因为血清中许多候选标志蛋白在血清中天然以 ng/mL 甚至 pg/mL 级别存在, 远超出了传统质谱的检测范围。SISCAPA 利用抗肽抗体富集, 能实现血清低丰度目标肽段平均 120 倍富集。Whiteaker 等^[4]用磁珠作为连接抗体的固相支持物, 使目标肽段的质谱检测离子信号增强超过 103 倍, 足够定量分析血清中 ng/mL 范围的生物标志物。

2 SISCAPA 技术研发的关键节点

要开发针对一个蛋白质候选标志物的 SISCAPA-MS 方法, 最关键的是“特征性肽段”^[9]和质谱检测 MRM 离子对的选

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071668, 31170783); 上海科委科技基金(11QH1401700)。 [△] 通讯作者, E-mail: Jywangs@shsmu.edu.cn。