

如何检测支原体的踪迹

转自 细胞之邦



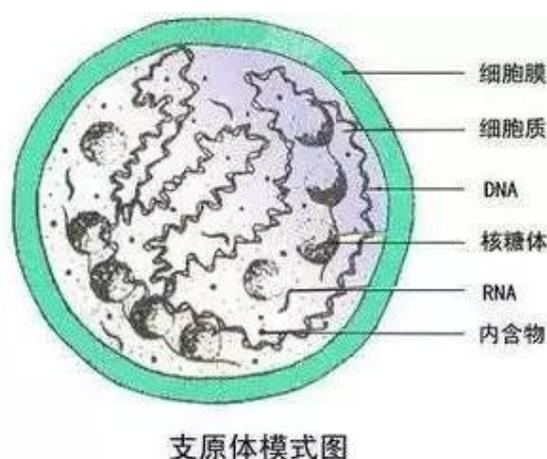
支原体

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，能在无生命的人工培养基上生长繁殖，直径 50-300nm，能通过细菌滤器。

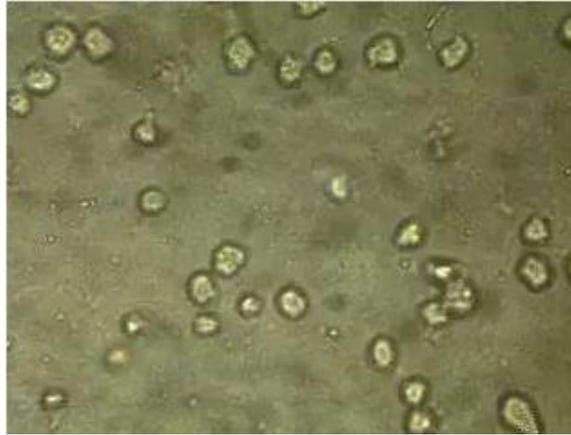
支原体在过去曾称之为类胸膜肺炎微生物（pleuropneumonia-like organism, PPLO），1967 年正式命名为支原体。

支原体（mycoplasma）：又称霉形体，为目前发现的最小的最简单的原核生物，基因数量为 480。支原体细胞中唯一可见的细胞器是核糖体（支原体是原核细胞，原核细胞的细胞器只有核糖体）。

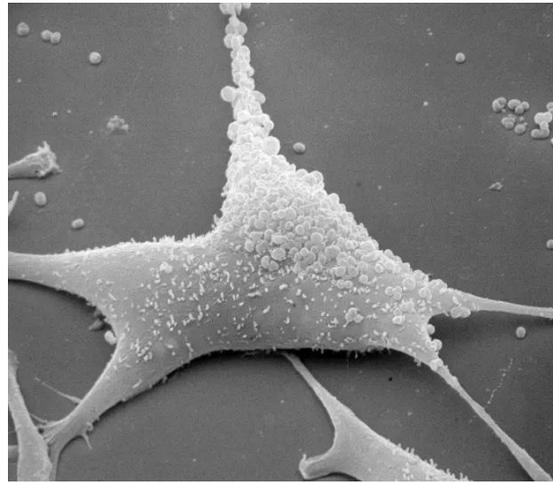
支原体结构也比较简单，多数呈球形，没有细胞壁，只有三层结构的细胞膜，故具有较大的可变性。



支原体这种微小的微生物，是细胞培养中令人头疼的大问题。支原体污染可能来自培养基、血清或实验操作者，会影响细胞生长率、细胞形态、基因表达、细胞代谢和细胞活力。支原体感染不易察觉，因此对培养细胞定期进行支原体检测就非常重要。



污染实验室培养细胞的支原体主要有八种，但还没有哪种检测方法能够单枪匹马把这八种支原体都检测出来。支原体非常顽强，**通常用于细胞培养的绝大多数抗生素都对其无效**。例如青霉素主要作用于细菌细胞壁，但支原体没有细胞壁因此就不受影响。无懈可击的细胞培养技术始终是预防支原体感染的最佳方式，另外及时找出受到支原体感染的培养物也很重要，这样才能在感染扩散前快速采取有效措施。下面就为大家介绍几种在培养细胞中检测支原体的常用方法。



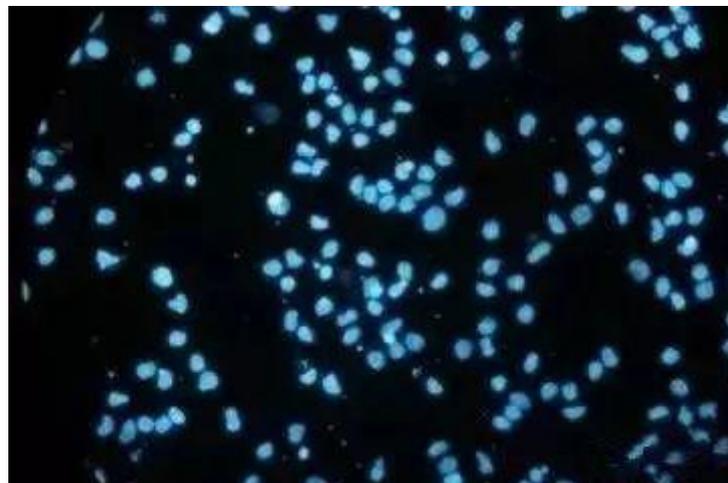
人成纤维细胞表面支原体的扫描电镜观察



分离培养法

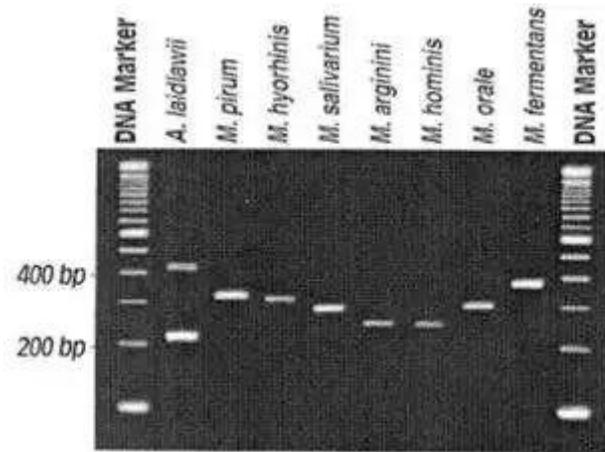
分离培养法是支原体检测的金标方法，其检测精确度最高。这种方法是从可疑的细胞培养体系中取样，并接种到最适宜支原体生长的琼脂平板上。如果样本中含有支原体，它们就会在这种琼脂平板上疯狂生长，最终形成明显可见的特征性菌落。分离培养法基本不会出现假阴性结果，因此被誉为支原体检测金标准。不过分离培养法也存在两个弊端，一是检测时间太长，支原体要长出明显克隆至少需要 4 周时间。二是尽管可以检测绝大多数支原体种类，分离培养法也有力所不及的时候，例如支原体 *M. hyorhinis*。

如果你实在不想等这么久，或者希望在分离培养法的等待过程中先拿到初步结果，你可以试一试 DNA、PCR 或酶学检测方法。不过需要注意的是，上述检测方法都不能单独检出所有类型的支原体，而且灵敏度也没有分离培养法高，所以最好结合使用两种方法以获得最可靠的检测结果。



DNA 检测

DNA 检测需要将可疑样品与指示细胞共同培养，因此一般需要几天时间。DNA 检测所用的指示细胞通常是细胞质区域较大的 Vero 细胞，如果原样本中含有支原体，那么当细胞 DNA 被荧光染料（如 Hoechst 染料）染色时，就可以在指示细胞的核周围观察到荧光斑点或荧光颗粒。分离培养法用来检测支原体 *M. hyorhinis* 菌株并不可靠，而 DNA 法可以准确的将其检测出来。



PCR 法

PCR 法也可以检测 *M. hyorhinis* 菌株，PCR 法检测支原体只需几个小时，是最快但也是最不灵敏的支原体检测方法。该方法采用针对支原体 DNA 的引物用 PCR 检测可疑样本，其中 PCR 引物通常针对支原体的 16S rRNA 基因。在凝胶电泳过程中，支原体 DNA 会显示为特异性条带，以此指示支原体的存在。PCR 法可以检测大多数支原体，但谨慎起见最好同时使用另一种检测方法来进行验证。



酶学检测和 ELISA

此外，也还存在一些其他支原体检测方法。例如酶学检测是将可疑样本添加到特定底物中，在这一体系内支原体的酶可以将 ADP 转化为 ATP，随后能利用 ATP 发光的 luciferase 酶就可以指示支原体的存在。ELISA 也能用于支原体检测，以 ELISA 法为基础的支原体检测一般使用针对支原体 16S rRNA 基因的带标记探针或抗体，来检测培养物中是否含有支原体。



定期检测

支原体感染会使培养细胞慢慢枯萎，因此对培养细胞定期进行支原体检测非常重要。一般来说每 1 至 3 个月就应该进行一次支原体检测。将定期支原体检测常规化坚持下去，是细胞培养实验室应对支原体感染的关键。

预防支原体污染的建议：

细胞培养工作中，主要从以下几个方面来预防支原体的污染：

控制环境污染；

严格实验操作；

细胞培养基和器材要保证无菌；

在细胞培养基中加入适量的抗生素。

支原体污染细胞后，特别是重要的细胞株，有必要清除支原体，常用方法有抗生素处理、抗血清处理、抗生素加抗血清和补体联合处理。支原体最突出的结构特征是没有细胞壁，一般来讲，对作用于细胞壁生物合成的抗生素，如 β -内酰胺类、万古霉素等完全不敏感；对多粘菌素(polymycin)、利福平、磺胺药物普遍耐药。对支原体最有抑制活性及常用于支原体感染治疗的抗生素是四环素类、大环内酯类及一些氟喹诺酮；其他类抗生素如氨基糖苷类、氯霉素对支原体有较小抑制作用，所以常不用来作为支原体感染的化学治疗剂。

支原体污染在细胞培养中实际上是比较常见的，据资料，可达 30%甚至更高。支原体污染时细胞表现为长得不好，也不死亡，同时，培养基又是清亮的。时间长达一周也没有什么变化。这时基本上可以判断出是支原体污染了，愿意检测就检测一下，不愿意直接用清除试剂处理吧。

避免细胞污染，可以从预防着手，超净工作台物品放置要合理、进入细胞房要换鞋和穿实验服、实验员戴手套后要用酒精等消毒、避免细胞交叉污染等等。