

异抗原专一性的抗体或抗体片段上,从而得到酶联抗体。这种酶主要用于体内治疗(也就是免疫毒素)。例如, anti-Tac-PLC等(酶联催化)。

其次,用过渡态类似物免疫动物后,直接用库克隆技术得到催化抗体功能片段,目前lerner等人已经建成了这样的组合文库。

再则,功能片段分子Fab与底物结合后,容易得到结晶,便于研究抗体酶在催化过程中的立体构象,当这样的数据积累到一定数量后,我们可以根据过渡态的特点建立一个数学模型,利用定点突变直接改造已知抗体而得到抗体酶。有关这方面的工作才刚刚开始。

### 参 考 文 献

- [1] Pietersz, G. A., 1992, *Immunol. Rev.*, 129: 57.
- [2] Morrison, S. L. et al., 1985, *Science*, 229: 1202.
- [3] Morrison, S. L. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81: 6851.
- [4] Neuberger, M. S. et al., 1985, *Nature*, 314: 268.
- [5] Danger, J. L. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 1989.
- [6] Morrison, S. L. et al., 1989, *Adv. Immunol.*, 44: 65.
- [7] Duncan, A. R. & Winter, G., 1988, *Nature*, 332: 738.
- [8] Shen, L. et al., 1987, *J. Immunol.*, 139: 534.
- [9] Riechmann, L. et al., 1988, *Nature*, 332: 323.
- [10] Riechmann, L. et al., 1988, *J. Mol. Biol.*, 203: 825.
- [11] Skarra, A. et al., 1988, *FEBS Lett.*, 271: 203.
- [12] Huse, W. D. et al., 1989, *Science*, 246: 1275.
- [13] LiBuglio, A. F. et al., 1991, *Monoclonal antibodies, Applications in clinical oncology*. pp 291 (Chapman and Hall Medical).
- [14] ChovniK, A. et al., 1991, *Cancer Res.*, 51: 465.
- [15] Mnlilax, R. L. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87: 8095.
- [16] Hoogenboom, H. R. & Winter, G. 1992, *J. Mol. Biol.*, 227: 381.
- [17] 叶敏, 1994, 免疫网络, (待发表).
- [18] Zanatti, M. et al., 1992, *Immunol. Rev.*, 130: 125.
- [19] Danishefsky, S. 1993, *Science*, 259: 469.

## 支原体污染研究的新进展

刘江 刘龙丁 孙明波

(中国医学科学院医学微生物学研究所 昆明 650107)

支原体污染细胞培养物是个极普遍的世界性问题,在十几年前就曾引起我国细胞培养工作者的广泛重视。它不仅引起细胞生物学性状的多种改变,影响细胞生物学的研究工作,而且也将导致用细胞基质制备的多种生物制品报废,造成巨大的人力物力浪费。多年来从事细胞生物学研究以及生物制品学工作的科学家们一直致力于检测细胞培养物中支原体方法的研

究。尤其是近几年来,分子生物学飞速发展,新技术新方法不断被应用,支原体的检测及防治取得了令人瞩目的成就。本文对有关的新进展作一概括介绍。

首先是对支原体生物学特性的研究,在新种分离、致病机理和分子生物学等方面都有了飞速的发展。迄今发现的支原体已达80余种,1986年首次报道的 *M. incognitus* 与 AIDs 病

有着密切的关系,引起国外学者的广泛探索,极大地推动了支原体在临床上的研究<sup>[1]</sup>。现确定对人致病的支原体已有五种,能引起人呼吸道、生殖道的多种疾病,其机理与宿主的免疫反应密切相关<sup>[2-3]</sup>。在分子水平上对支原体特性的进一步研究已确定支原体的基因组为一环状的DNA分子,大小约600—1,700 kb,含基因约500个,仅为*E. coli*的1/5; DNA分子的G+C%含量较低(23%—41%)<sup>[4]</sup>,不同种支原体的结构基因高度保守。近年来,国外学者还测出了常见的几种支原体的基因组的大部分序列,并建立了部分片断的限制性内切酶图谱<sup>[5]</sup>,这为用分子生物学方法检测和鉴定支原体污染提供了重要的依据。

对于细胞被支原体感染的情况,近年来也有了新的特点。80年代末在原代培养中,污染率较低(约1.5%),而传代细胞系经常被污染(50%—90%)<sup>[6]</sup>。90年代,污染有下降的趋势,Roulland-Dousoix<sup>[8]</sup>检测来源于世界各实验室的细胞系,发现污染率为23%(86/372);而Kuppeveld<sup>[9]</sup>应用培养法,DNA荧光染色法,探针杂交法和PCR法检测欧洲各实验室的细胞系,阳性率为55%(52/95);在国内<sup>[10]</sup>首都儿科研究所1993年的检测结果有49%(38/77)的传代细胞为支原体污染。来源于人,牛和猪的五种支原体;猪鼻支原体(*M. hyorhinis*),精氨酸支原体(*M. arginini*),口腔支原体(*M. orale*),发酵支原体(*M. fermentans*)和莱氏无胆甾体(*Acholeplasma Laidlawii*)则占了全部污染的95%以上<sup>[7]</sup>。

其次是在支原体的检测技术方面,由于分子生物学方法的介入使快速、灵敏、精确、简便地检出支原体污染成为现实。尤其是PCR检测法和DNA分子杂交检测法,易于推广,检出率也高,有望成为最常规可靠的方法。

PCR检测支原体污染是90年代初才真正发展起来的,到目前已取得了巨大成就,正逐步进入成熟阶段。对于临床肺炎和生殖道支原体的诊断,效果已令人满意<sup>[11]</sup>。其主要原理

是;设计一对引物,通过体外扩增支原体基因组中种属特异并高度保守的一段DNA序列(通常是16SrRNA基因中的一段或16s-23srRNA间隙子基因的一部分),然后通过凝胶电泳或Southern杂交的方法判定结果。此法在具体应用中又可分为一步PCR法,两步PCR法和逆转录PCR法(RT-PCR)。一步PCR检测法快速简便易于推广,Blanchard<sup>[12]</sup>设计一对引物RNA和RNA,用于扩增支原体16srRNA基因上属特异的一段序列,能成功地检出口腔,人型等8种支原体的污染;两步PCR扩增目前研究较多,一般是通过设计一对广泛引物(外培引物),对支原体基因组的,一段保守区进行粗扩增,再设计一对特异性引物(内部引物),对第一次扩增产物内部的特定片断进行再扩增,从而可以有效地提高灵敏度。同时由于广泛引物的设计往往是针对所有的原核生物,此法也可检出其他原核生物的污染。Spaepen<sup>[13]</sup>用此法扩增支原体16srRNA基因的保守区可检出口腔、发酵、精氨酸、人型、猪鼻支原体及莱氏无胆甾体的污染。日本Harasawa<sup>[14]</sup>则扩增支原体16s-23srRNA间隙子基因,能检出12种支原体污染;在国内<sup>[15]</sup>,中国药品生物制品检定所利用Harasawa赠的引物,成功地检测出了人为污染的7种支原体;逆转录PCR检测支原体是目前最灵敏的检测方法,它通过设计一对引物,先将16srRNA的特异片断逆转录成cDNA,再对其进行扩增,由于一个支原体中可含10以上的16srRNA,其模板量远大于通常的以DNA为模板进行的扩增。Kuppeveld<sup>[16]</sup>应用此法可检出单个的支原体污染,在说明细胞系中的支原体污染是否清除时,用此高灵敏的方法验证是很有说服力的。

对于核酸杂交法,由于对支原体16srRNA序列的深入了解,近来有了较大的改进。用于杂交的探针已不同于80年代中利用切口平移法制成的16srRNA基因的随机探针<sup>[17]</sup>,而是针对16srRNA上种或属特异序

列而合成的与其互补的寡聚核苷酸探针,此法大大地提高了检测的特异性和灵敏度,并可进行种的鉴定。Mattson<sup>[18]</sup>设计了三条5'端用[r-p] ATP标记的寡聚核苷酸探针,其中两条为属特异的,一条是莱氏无胆甾体种特异的,通过与固定于尼龙膜上的样品的核酸进行杂交,可检出细胞中各种支原体污染。其敏感性可达 $10^4$ CFU/ml,操作迅速方便,可在一天内得出结果。

由于有些传统的检测方法,如:电镜法、生物化学方法,氚标记的胸腺嘧啶脱氧核苷酸掺入检测等,其检测的特异性不强,灵敏度不高,有的要求特殊设备或操作复杂等,目前已

很少使用<sup>[19-20]</sup>。至于免疫学方法检测,国外Mannheim<sup>[21]</sup>制成了多克隆抗体试剂盒,可以检测出细胞中常见支原体污染,敏感性在 $10^5$ 至 $10^6$  CFU/ml;国内军事医学科学院也研制出单克隆抗体试剂盒用于支原体检测。若临时少量检测,试剂盒则极方便。对于支原体的培养法,由于能分离到支原体菌株,仍是最可靠的阳性检测;DNA荧光染色法则简单快速易于推广,检出率也高,和培养法一起成为IOM(国际支原体组织)推荐的最常规的检测方法<sup>[21-22]</sup>。现对这几种方法列表作一简单的比较(见附表)。

同时对于支原体的鉴定方法,近来也有了

表 支原体检测方法的比较

项 目	直接培养法	DNA 荧光染色法	PCR 检测法	核酸杂交法
特异性	阳性结果可靠,但不能检测到种,有的菌种无法培养,固体培养基上可能有假菌落干扰	有98%的可靠性,可能有假阳性,假阴性结果,不能检测到种	特异性强,可进行属或种的检测,有的种间有交叉反应可能会出现假阳性	可进行属或种的检测,但有的种间会出现交叉反应
敏感性	理论上可检测出单个支原体	轻度污染不易检出	是最敏感的检测法可查出反应体系中的单个支原体	约 $10^4$ — $10^5$ CFU/ml,受靶序列拷贝数影响
实验时间	4—10天	3—4天	2—4小时	可在1天内出结果
条件及操作	培养基成分较复杂,检测工作量大,费用高	需荧光素及荧光显微镜,一般要求培养无污染指示细胞,操作较简便	操作简便快速,程序自动化,费用低廉	操作简便,但使用同位素标记探针和放射自显影技术,对条件有一定要求

新的进展。利用RFLPS(限制酶片断长度多感性)技术,对分离到的支原体基因组的酶切图谱进行比较,很容易确定出支原体的种类<sup>[23]</sup>。

最后是防治方面的进展。近年来虽取得一些成果,但是人们现在清醒地认识到彻底清除支原体污染是相当困难的。大多数情况下支原体污染只是被抑制而并未被消除,而且已发现支原体对所有常用抗生素都能产生抗性。另外,受染后的细胞在生理,生化,遗传诸方面都已发生变化,救治很可能是徒劳无益的<sup>[24]</sup>。因此,目前的观点仍是“预防为主”:强调检测监督,严格无菌操作,隔离污染细胞和留存备用细胞种以替换受染细胞株。对于不能轻易废弃

的细胞,抗生素处理仍是目前去除支原体污染最为有效的方法。常推荐使用的有B-MCycline(Boehringer Mannheim 泰霉素和麦诺霉素的复合物)、MRA(Mycoplasma Removal Agent, 喹诺酮的衍生物)、Ciprobey(成份为环丙沙星)。Gignac<sup>[25]</sup>等单独使用MRA消除细胞系的支原体污染,有效率为72%(28/39),Up-hoff<sup>[26]</sup>等比较了上面三种药盒的有效率,细胞毒性和耐药性,发现Bmgycline的有效率最高,未见耐药性,但对细胞生长有明显的抑制作用,而三种药盒都无明显的细胞毒性。近来Coronato<sup>[27]</sup>利用二甲胺四环素、卡那霉素、胍胍素等共同根除Vero细胞中长期污染的口

腔支原体获得成功, 这为传统抗生素的再研究又开辟了前景。另外, Kotani<sup>[28]</sup>结合软琼脂技术在 50℃进行混合, 热破坏对温度敏感的支原体, 后于 37℃培养 1~3 天, 使污染支原体的细胞在琼脂中与抗生素充分接触, 此方法取得了良好的清除效果。至于 6-MPDR(6-甲基嘌呤脱氧核苷)有限稀释法, 也是一种较简单的去除支原体的新方法, 20 μmol/L 的 6-MPDR 是检测或消除支原体感染而不引起细胞毒的最大浓度, 通过稀释分离出未受感染的细胞培养, 进行再克隆, 而获得不含支原体的细胞传代。此法的实质并非真正的杀灭去除支原体, 而是通过有限稀释和检测, 从污染的细胞株中再重新分离出未受染的细胞, 再重新克隆传代。因此用此方法有可能获得性状未发生变化的克隆细胞株, 这是相当有意义的暗示, 有待更深入地研究讨论<sup>[29]</sup>。再者, 对于血清中支原体污染的去, 是防止初级污染的关键, 近年来常采用 56℃加热灭活 20 分钟或通过孔径 0.1 μm 的滤膜过滤的方法清除支原体<sup>[30]</sup>, 但这会降低血清的营养性能, 方法还待进一步改进。

总之, 随着上述新技术的引入和传统方法的不断完善, 支原体的检测正向着快速、简便灵敏、特异、易于推广的方向发展; 相信不久将能普遍实际地解决这一问题, 建立起一套系统规范的检测方法, 满足细胞生物学研究和生物制品生产的需要。与此相比, 支原体污染的去, 由于影响到培养细胞的生物学特征, 目前尚无完善的解决措施。因此, 在继续探索的同时, 更应强调对污染的预防, 树立“预防为主”的观念。

#### 参 考 文 献

- [1] Lo-s-c, *J Trop Med Hyg*, 1986, 35: 742—748.
- [2] Sasaki T et al; *J Clin Microbiol*, 1992, 30(9): 2435—2440.
- [3] Razin S et al; *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 100: 423—432.
- [4] Lim PO et al; *J Bacteriol*, 1991, 173: 2128—2130.
- [5] Neimark HC et al; *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 5433—5448.
- [6] 中华医学会微生物与免疫学会支原体组, 人支原体感染的实验诊断技术, 1992.
- [7] Rottem S et al; *Trends in Biotech h nol*, 1993, 11(4): 143—151.
- [8] Roulland-Dussoix D et al; *J Microbiol Methods*, 1994, 19(2): 127—134.
- [9] Van Kuppeveld FJ et al; *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(1): 149—152.
- [10] 任桂珍等, 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(2): 134.
- [11] Skakni L et al; *J Clin Microbiol*, 1992, 30(10): 2638—2643.
- [12] Blanchard A et al; *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 81: 37—42.
- [13] Spaepen M et al; *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 99: 89—94.
- [14] Harasawa R et al; *Res Microbiol*, 1993, 144: 489—493.
- [15] 魏红梅等, 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(2): 131—133.
- [16] VAN Kuppeveld FJ et al; *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(8): 2606—2615.
- [17] 何大澄等, 细胞生物学杂志, 1986, 8(1): 23—26.
- [18] Mattsson JG et al; *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 107: 139—144.
- [19] 何大澄等, 细胞生物学杂志, 1984, 6(4): 153—156.
- [20] 何大澄等, 细胞生物学杂志, 1995, 7(1): 4—7.
- [21] IRPOM/IOM Meeting Report, 1992.
- [22] Uphoff CC et al; *J Immunol Methods*, 1992, 149: 43—53.
- [23] Deng S et al; *PCR Methods Appl*, 1992, 1(3): 202—204.
- [24] Schaeffer WI et al; *J Bacteriol*, 1991, 173: 1382—1387.
- [25] Gignac SM et al; *Leuk Res*, 1992, 16(8): 815—822.
- [26] Uphoff CC et al., *J Immunol Methods*, 1992, 149: 55—62.
- [27] Coronato S et al., *J Virol Methods*, 1994, 46(1): 85—94.
- [28] Kotani H et al., *Invitro Cell Dev. Biol*, 1991, 27(A(6)): 507—513.
- [29] Ishiguro K et al., *J Immunol Methods*, 1988, 108: 39.
- [30] 张贵生等, 微生物与免疫学进展, 1991, (2): 51—55.

### 三、TAP 与某些免疫性 疾病关联性的研究

虽然 TAP 仅有有限的多态性,但鉴于它在抗原递呈中所起的重要作用,使它成为某些免疫性疾病易感基因的可能候选者<sup>[9]</sup>。现在对免疫性疾病中 TAP 多态性的研究主要限于乳糜泻(CD),多发性硬化症(MS)和胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)等。

Powis 在 81 名 CD 病人中发现 TAP 1 A、TAP 2 A 的频率有所升高,但在和 HLA-DR, DQ 相匹配的对照组进行比较时差别不显著,提示 TAP 1 A、TAP 2 A 与 HLA-DQ 2(与 CD 相关)之间存在着连锁不平衡现象<sup>[9]</sup>。

Libiau 等在 60 名 MS 病人中也未发现 TAP<sub>1</sub>、TAP<sub>2</sub> 基因与此疾病相关。但由于他们选择的病人都是反复发作的病人,所以作者并不排除 TAP 基因与慢性进行性 MS 存在关联性的可能<sup>[10]</sup>。

至于 TAP 与 IDDM 是否存在关联是颇有争议的。Colonna 等发现 TAP 2(665 Ala, 687 Gln)与 IDDM 存在负关联,同时 IDDM 病人中 TAP 2(665 Thr, 687 Stop)相应增多<sup>[11]</sup>。但在 Runnigen 的研究中却发现 TAP 2(665 Ala, 687 Gln)与 DR 1-DQ 5, DR 13-DR 6 单倍型连锁,这两个单倍型在 IDDM 中出现的频率降低。TAP 2(665 Thr, 687 stop)和 DR 4-DQ 8, DR 3-DQ 2 则有较强的连锁不平衡存在,而这两个单倍型与 IDDM 密切相关<sup>[11]</sup>。Caillat-Zucman 在 167 名 IDDM 病人中的研究结果则提示, TAP 2\*0201 与 IDDM 的抵抗性有关(RR = 0.3, Pc < 0.001)。而 TAP 2\*0101 与

IDDM 的易感性有关(RR = 3.4, Pc < 0.001)。TAP 2\* 0201 的保护效果与 DRB 1\*0201、DRB 1\*0602 单倍型的保护效果相独立,但两者有叠加效应。而且 Caillat-Zucman 的研究中未发现 TAP 2 与 HLA II 类基因有连锁不平衡存在。这些研究结果的差异可能与病人的选择,不同的人群与地域等因素有关<sup>[12]</sup>。

总之, TAP 与免疫性疾病关联的研究还刚刚起步,阳性的结果比较少。只有通过 TAP 功能及其作用机制的进一步研究,并结合 MHC 中的 II 类基因及其他免疫性疾病易感基因的研究,才能进一步了解 TAP 在免疫性疾病易感性中的可能作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Frank, M. et al., 1994, *Current Opinion In Immunology*, 6: 32-37.
- [2] Kelly, A. et al., 1990, *Nature*, 353: 667-668.
- [3] Powis, S. H. et al., 1993, *Immunogenetics*, 37: 373-380.
- [4] Colonna, M. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 3932-3936.
- [5] WHO Nomenclature Committee, 1992, *Human Immunol.*, 34: 4.
- [6] Townsend, A. et al., 1989, *Nature*, 340, 443-448.
- [7] Hammond, S. A. et al., 1993, *Nature*, 364: 158-161.
- [8] Zweerink, H. J. et al., 1993, *Immunol.*, 150: 1763-1771.
- [9] Powis, S. H. et al., 1993, *Immunogenetics*, 38: 345-350.
- [10] Libiau, M. D. et al., 1993, *Neurology*, 43: 1192-1197.
- [11] Runnigen, K. S. et al., 1993, *J. Immunol.*, 23: 1050-1056.
- [12] Caillat-Zucman, S. et al., 1993, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1783-1788.