

- 64: 1307.
- [18] Sakatani, S. et. al., 1982. *Proc. Japan. Cancer Association. The 41 st Annual Meeting*, p 133.
- [19] Lohmann-Mattas. et. al., 1979. *Eur. J. Immunol.*, 9: 261.
- [20] Olofsson, J. et. al., 1980. *Blood*, 55: 975.
- [21] Meltzer, M. S. et. al., 1978. *Cell Immunol.*, 35: 99.
- [22] Snyderman, R. et. al., 1976. *Science*, 193: 270.
- [23] Kasakura, S., 1982. *Clin. Immunol.*, 14: 599.
- [24] Ting, C-C. et. al., 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 4265.
- [25] Bendinelli, M. et. al., 1975. *J. N. C. I.* 55: 1425.
- [26] Paglieroni, T. et. al., 1977. *J. Clin. Invest.*, 59: 1120
- [27] Hillinger, S. M. et. al., 1978. *J. Clin. Invest.*, 61: 1620.
- [28] Nagauchi, H., 1982. *J. Sapporo Med. Soc.*, 51: 189.
- [29] Taniyama, T., 1982. *Japanese J. Reticuloendol. Soc.*, 22: 29.

细胞培养中的支原体污染问题

何大澄 张鸿卿 邱相寰* 薛绍白

(北京师范大学生物系)

支原体污染与细菌污染是细胞培养中两种最主要的污染。在青链霉素广泛应用以来,细菌污染已经较易控制,而支原体的污染及其传播却益发突出了。据近年来国外报道^[1,2],支原体的污染相当普遍,并且其中约有十分之一是同时被两种以上的支原体所感染的。甚至有人提出,在引用已有文献中的实验结果时,都应考虑和分析所用的细胞是否可能有支原体污染,如有支原体污染,则相应实验结果的可靠性要重新加以考虑。最近,我们检查了本室培养的全部细胞系及一些兄弟单位的培养细胞,发现存在大范围的支原体污染。有些污染已持续很久,程度很高,已经严重影响到实验工作的进行和实验结果的正确性。特别应当指出的是其中一些直到本次检查之前还没有被察觉。故支原体污染实是一个亟待解决的有普遍性的问题。现根据我们的工作及有关文献,对支原体污染的一些有关问题做一简单的讨论。

一、支原体的基本结构与特点

支原体(*Mycoplasma*)早期被称为类胸膜肺炎微生物(Pleuropneumonia-like organisms

简称 PPLO),是一种最简单的原核生物。其大小和结构的复杂程度皆介于细菌与病毒之间。支原体呈球状,细丝状成分枝状,但多数为球状。可单个,或结合成双,或呈念珠状。其直径约为 0.15—0.8 μm 。早期多有报道为 0.1—0.3 μm 的,这主要是因样品制备不适当所致。由于支原体没有细菌那样坚硬的细胞壁,仅具一三层结构的界限膜(unit membrane),故具有较大的可变形性,容易通过细菌滤器。除了含有一个环状 DNA 分子和核糖体外,缺少线粒体、溶酶体、高尔基器和内质网等多种细胞器。目前多数的支原体已经可以在不同的培养基上进行培养,多数支原体在琼脂培养基上可长成特征性的“煎荷包蛋”样的菌落,菌落的中部较为致密而周边颜色浅淡。支原体最早发现于 1898 年,1956 年首次从体外细胞培养物中作为污染物被分离出来。迄今,已发现几十种。按照营养型,支原体可分为能分解碳水化合物的发酵株和非发酵株两类,后者以精氨酸为主要能量来源。支原体通常附着在细胞表面。已有研究表明在细胞和支原体上可能都有亲和

* 江西医学院进修教师

性的位点,有些种类的支原体并有特化的、与附着有关的结构。支原体出现在细胞质某些空泡内的情况只在电镜下偶有发现,并且这一现象是否由于细胞表面凹陷在切片时造成的假象也还有待证实。支原体的繁殖方式转为多样。一般认为它与细菌的分裂相似,一分为二,在裂殖中有时也产生大小不同的新个体,另外还有出芽生殖。同时在支原体中常有DNA复制与胞质分裂不同步现象,造成细长的“多核”支原体,然后通过胞质分裂形成串珠状新个体,进而再分开成为单独的支原体。

二、支原体对宿主细胞的作用

虽然支原体是附着在细胞的表面,但它对细胞的形态、生理、遗传等多方面都能产生具有长期影响的效应。所以支原体的污染在应用体外培养的所做的各方面研究中,都可造成严重的影响。

1. 对细胞生长的影响

轻度污染对培养细胞生长无显著的影响,但通常支原体的污染可使细胞生长减缓或完全中止生长,并使细胞不能达到正常的生长密度。这可能是因为支原体使培养液中的必需氨基酸——精氨酸和核苷急剧减少造成的。不同种类的支原体对不同细胞生长的影响也不同。有些支原体污染的细胞可继续传代多次,或在支原体达到 10^8 个/毫升高度污染情况下,仍然表现基本正常的生长。

2. 对细胞形态的影响

支原体污染对细胞形态的影响随支原体的种类和污染的程度不同而异。从无明显变化,到引起细胞病变,直至细胞裂解都可出现。支原体污染引起的细胞病变(cytopathogenic effect缩写CPE)与病毒等引起的CPE大致类似,如细胞收缩,细胞之间的空隙加大,一些圆缩细胞在局部发生结团生长等。同时在超微结构水平也有一些变化,如在细胞内出现一些空泡,核内出现异染色质样的深染区域等。此外我们用荧光素标记的抗微管蛋白抗体对支原体污染

的细胞进行染色观察,发现纤维状的微管荧光消失,表明支原体污染可能导致细胞微管的解聚,这显然也是导致细胞形态变化的一个原因。

3. 细胞中化学成分的改变

支原体的污染可导致细胞酶谱的改变,通常是在细胞中出现某些支原体编码的酶的活性。此外支原体还能导致细胞内核酸的非特异性降解。而与此同时,培养液中的核苷及精氨酸可急剧减少以至消失。

4. 细胞代谢的改变

由于有些支原体耗用大量精氨酸而使培养细胞缺乏这种必需氨基酸,这种变化被称为“精氨酸效应”。精氨酸效应造成蛋白质合成障碍,从而又进一步影响DNA的合成以及rRNA、mRNA等的生成,这又反过来进一步影响到蛋白质(包括酶)的合成,从而形成恶性循环造成细胞代谢的严重失常。

5. 导致多种染色体异常

包括染色体数目改变(主要是减少),染色体断裂,以及造成双着丝点染色体、环状染色体等等。这可能与支原体耗用了细胞内的“核苷库”及造成细胞核酸的降解有关,或与“精氨酸效应”导致的DNA合成障碍有关,也可能是这二者的共同结果。

6. 对细胞中病毒产量的影响

支原体的污染可使某些病毒在细胞中的产量显著下降。这主要是由于精氨酸的缺乏妨碍了病毒蛋白质的合成,因而在进行病毒实验时,往往不能获得预期产量的病毒。但另一方面,又能使某些病毒的产量显著增加。这主要发生在使用低感染量的情况下,可能是通过抑制干扰素的生产或影响干扰素的活性而发生作用的。

7. 对恶性细胞致癌能力的影响

被支原体污染的恶性的细胞致癌能力通常有显著的下降。用支原体污染的癌细胞接种动物时,比用非污染的瘤细胞产瘤率低,发展慢,瘤体也小。

除此以外,支原体污染尚可造成细胞膜性

质的改变, 以及影响淋巴细胞的分化等。从以上可清楚地看出, 支原体的污染可造成细胞深刻而广泛的改变, 决不仅仅是影响细胞的生长而已。并且我们由此也能大致了解支原体污染对实验结果干扰的趋向与途径。

三、支原体污染的检查

几乎一切培养细胞都可以被支原体所污染, 包括原代的和传代的, 单层培养和悬浮培养的, 上皮型和成纤维型的, 有丝分裂和间期的, 以及转化细胞, 杂交细胞, 已被病毒感染的细胞等。由于支原体个体微小, 在光镜下不易检出, 培养液不象细菌污染那样容易变得混浊; 细胞常常还能保持生长等原因, 支原体的污染往往容易漏检。甚至长时间持续污染还未引起注意。此外, 对支原体污染的检查方法尚不普及, 这也是支原体污染得以传播的一个原因。实际上目前已有若干可供采用的检查方法^[3,4]。

1. 普通观察

当细胞生长有非正常的减缓或停止, 又找不到其它原因时, 即应引起对支原体污染的警觉。当有一定经验后, 在光镜下即可根据细胞的形态(包括CPE), 细胞的折光率变化和表面光滑程度等作出初步判断。用姬姆萨(Giems)或地衣红(Orcein)染色后观察, 都可在支原体分布区看到颗粒状的染色。用暗视野显微镜也可发现支原体的存在。

2. 培养法

这是较早就开始采用的方法, 可以将待检样品加到液体、半固体或琼脂培养基以及饲养层上, 检查有无菌落形成。支原体在琼脂培养基上形成的菌落中部的生长深入琼脂中, 而菌落外周部则只在琼脂表面生长, 从而表现独特的“煎荷包蛋”样。但菌落的大小与形状都随着支原体的种类、琼脂的浓度、培养温度、pH以及环境的CO₂含量等不同会有一定变化。此法的主要不足是目前对有些支原体尚未找到适合其生长的培养基。

3. 免疫荧光法

用支原体作为抗原免疫动物, 即可得到特异的抗血清。将抗血清用荧光标记, 通过直接或间接免疫荧光法, 就能在荧光显微镜下检出不支原体的存在。用这种方法可以同时完成对支原体的检出和支原体种类的鉴别。但是目前已知的支原体就至少有16种以上不同的血清型, 互相之间没有交叉免疫。故需要准备有全套的抗血清, 工作量颇大。一个较简便的方法是使用混合的多价抗血清。由于90%的污染都是由5种最常见的支原体造成的, 用这5种抗血清即可基本敷用。但对少量例外的则可能漏检。

4. 特异性酶的比色法

对支原体特有的酶或酶产物进行比色分析可检出是否有支原体污染存在。如可用瓜氨酸比色法, 嘌呤或嘧啶核苷磷酸化酶比色法等。

5. 电镜检查法

用常规制备样品的的方法, 可以分别在透射电镜和扫描电镜进行检查。

透射电镜检查:

以单层培养细胞为例, 倾去培养液, 用2%戊二醛固定液固定15分钟。固定液配制于0.2M的可力丁(Collidine, 即三甲基吡啶混合物)缓冲液,pH调至7.4。在加入固定液后随即将细胞刮下, 并离心成块。然后用配制于同种缓冲液的1%锇酸后固定20分钟。用系列乙醇脱水,Epon 812包埋, 切成600—800Å左右超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 在透射电镜观察。

在透射电镜下可看到支原体分布在细胞近旁(图版图1)。多呈圆形, 有三层结构的外膜。支原体的主要特点是其内部可看到细微的分枝状的染色质丝和较多的核糖核蛋白体, 其直径比宿主细胞的核糖核蛋白体略小, 且形状较不规则。支原体与细胞本身结构或其它附着物不难分辨(图版图2)。只是细胞表面有时可切到一些含有核糖核蛋白体的泡状物, 应注意

防止混淆。由于经过超薄切片，在透射电镜下看到的每个细胞附着的支原体较少。在严重污染时也通常只有10—50个左右。

扫描电镜检查：

将生长有待检查的细胞的盖玻片小条在2%戊二醛溶液(配制方法与透射电镜相同)中固定15—30分钟。系列乙醇脱水。最后用乙酸异戊酯置换。经在临界点干燥器用液体CO₂干燥后，真空喷镀金膜，置扫描电镜下观察。整个样品制备过程可在一天内完成。

在扫描电镜下，支原体的形态多呈不规则的圆球形，大小也很不一致。通常在0.15—0.5 μm(图版图3)。支原体在细胞上的聚集总的来说是随机的，但散布不均匀，常形成一些密集区(图版图4)。常常在细胞的一侧附着大量

的支原体，而另一侧则几乎完全看不到。同样，一个细胞被严重污染而相邻的细胞却完全没有支原体的现象也常可见到。这也许可以表明，多数支原体在细胞表面附着一脱离一再附着的活动至少是不活跃的。观察还表明，支原体似乎特别容易在细胞交界处和微绒毛丰富的地方附着。根据这些分布特点，即使是轻度污染也很容易被扫描电镜检出。但在观察时应注意区分支原体与细胞本身的泡状物以及注意识别由于细胞微绒毛尖端电荷积累而显出的“颗粒”假象。

扫描电镜与透射电镜的检查可以结合使用。通常是用扫描电镜做初步检查，继而是用透射电镜加以证实，这就使结果更加可靠。

(未完待续)

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的

Ti 质粒 (二)

白永廷 唐 惕 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所 细胞生理室)

转移 DNA—T-DNA

Chilton 等人利用同位素标记的 Ti 质粒做探针，发现加入高浓度烟草肿瘤的 DNA 后 Ti 质粒 DNA 的复性速度有加快的趋势，表明肿瘤 DNA 中有 Ti 质粒的顺序，但该顺序不多，而且没有检测到完整的 Ti 质粒。以后这些作者将章鱼肉碱型的 Ti 质粒 B6—806 用内切酶 SmaI 分解成 19 个片段，分别用同位素标记做成探针，然后与肿瘤进行分子杂交，结果有二段 Ti 质粒的 DNA (3b 和 10c) 能和肿瘤 DNA 杂交，这是二个相邻近的片段，称为 T-DNA (图 4)。Ti 质粒中与肿瘤 DNA 同源的 DNA 部分叫 T 区 DNA。这是首次证明了在高等植物的细胞内存在有微生物的 DNA 顺序。

Ti 质粒的 T 区 DNA 的长度约为 23 kb(千碱基对)。章鱼肉碱型和胭脂碱型的 T 区 DNA

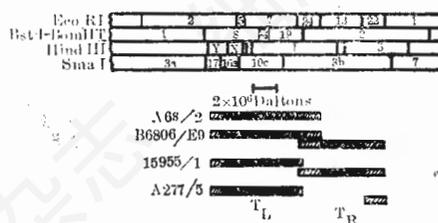


图 4 T-DNA 与 Ti 质粒 DNA 的片段的杂交试验^[21]。

上方—包含 T-DNA 区的 Ti 质粒的一部分；

下方—几个肿瘤系 DNA 与 Ti 质粒 DNA 片段杂交部分(黑色区)；

TL—T-DNA 左区；TR—T-DNA 右区

都有 8—9 kb 长的一段 DNA，即为保守区(或称核心区)，而且在几乎所有的肿瘤系中都有这一段 DNA。章鱼肉碱型和胭脂型的保守区 DNA 顺序中同源性达 90%。T 区 DNA 包含有激发和保持肿瘤状态所必需的基因^[32]。没有测到 T 区 DNA 和植物 DNA 之间有同源性，叶绿体