

也不是所有的分泌活动都必须有 GERL 参加。如高尔基期和顶帽期精细胞的高尔基体的主要功能是产生顶体系统和多泡体,完成这一功能 GERL 是必需的;在顶体期精细胞中,GERL 退化,但高尔基体仍具有合成糖蛋白的功能,这些糖蛋白主要用于细胞膜糖蛋白的更新,这一功能不需要 GERL 的参加。

参 考 文 献

- [1] Golgi, O., 1898, *Arch. Ital. Biol.*, 30: 60—71.
 [2] Whaley, W. and M. Dawwalder, 1979, *Int. Rev. Cytol.*, 58: 199—245.
 [3] Novikoff, A. B., 1964, *Biol. Bull.*, 127: 358.
 [4] 汤雪明, 1983, 生殖与避孕, 3(2): 21—24.
 [5] Parat, M. and J. Painleve, 1924, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 179: 844—846.

- [6] Friend, D. S. and M. Murray, 1965, *Am. J. Anat.*, 117: 135—150.
 [7] Novikoff, A. B. and S. Goldfischer, 1961, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47: 802—810.
 [8] Smith, C. E., 1980, *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 16—26.
 [9] Tang, X. M. et al., 1982, *Am. J. Anat.*, 163: 283—294.
 [10] Novikoff, A. B., 1963. In: *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*, pp. 36—77.
 [11] 汤雪明, 1983, 电子显微学报, 2: 28—31.
 [12] 汤雪明等, 1983, 实验生物学报, 16(4): 457—465.
 [13] 汤雪明等, 1983, 实验生物学报, 16(4): 427—437.
 [14] Bainton, D. F. and M. F. Farquhar, 1966, *J. Cell Biol.*, 28: 277—301.
 [15] Bennett, G. and C. P. Leblond, 1977, *Histochem. J.*, 9: 393—417.
 [16] Caro, L. G. and G. E. Palade, 1964, *J. Cell Biol.*, 20: 473—495.
 [17] Novikoff, P. M. et al., 1971, *J. Cell Biol.*, 50: 859—886.

细胞培养中的支原体污染问题(续)

何大澄 张鸿卿 邱相寰* 薛绍白
 (北京师范大学 生物系)

6. 放射性同位素自显影方法

可用 ^3H 标记的胸腺嘧啶脱氧核苷或尿嘧啶核苷自显影实验检查支原体的污染。此法的简单原理是:无污染的正常细胞在 S 期 (DNA 合成期) 可摄取大量的胸腺嘧啶脱氧核苷到细胞核中。而当细胞被污染后,培养液的胸腺嘧啶脱氧核苷被支原体的嘌呤嘧啶核苷磷酸化酶分解成自由碱基,使细胞不能利用,故细胞核的掺入明显减少或消失。而支原体对核苷及自由碱基都可利用,故在支原体分布处可发生标记物的掺入。应用的另一类标记物尿嘧啶核苷为 RNA 合成的前体。在正常细胞中,它们首先是只掺入到细胞核中,约 20 分钟后才开始

从核进入细胞质中,支原体的存在同样可使核中的掺入减少,而在支原体分布处出现标记。

将生长有待检查细胞的玻片放在含有 ^3H —胸腺嘧啶脱氧核苷的标记液中培养 12—24 小时,或含有 ^3H —尿嘧啶核苷的培养液中脉冲标记 20 分钟。然后用浸沾法或其它方法在玻片有细胞的一面涂布一薄层感光乳胶。曝光 4—7 天。显影定影后在显微镜下观察银颗粒的分布。在用 ^3H —胸腺嘧啶脱氧核苷标记时,若有支原体的污染,则细胞核中的标记明显较正常细胞减少或根本无标记,同时在胞

* 江西医学院进修教师。

质区域及细胞周围出现明显的银颗粒(图5, 6)。但随着支原体种类的不同, 偶而也可见到整个样品上都无标记的情况(图7)。在用 ^3H -尿嘧啶核苷脉冲标记的无支原体污染样品中, 银颗粒出现在细胞核, 而污染的样品中银粒散布在整个细胞质和细胞周围区域。

7. 与DNA特异结合的荧光染色法:

此法的简单原理是: 荧光染料Hoechst 33258能与DNA特异结合, 在紫外线激发下, 产生黄绿色荧光。正常细胞表面无DNA存在, 故不被染色。而支原体因含有DNA, 可被染色从而在荧光显微镜下被检出(图8)。

基本上按照Chen的方法^[6]: 生长于盖片上的待检细胞用Carnog固定液固定2分钟, 更换新的固定液, 再固定5分钟。空气干燥后, 用Hoechst 33258*在室温和黑暗条件下染色10—20分钟。蒸馏水冲洗2次后, 在盖片上滴加甘油和新鲜配制的Meilvaine液**各1滴。将盖片扣在载片上, 即可在荧光显微镜下用360 nm紫外光源观察。制成的样品应保存在黑暗条件下, 并不可久存。

无支原体污染的细胞只显示出边缘清晰的细胞核荧光, 在胞质区无荧光出现, 而污染细胞则在支原体存在处皆显示有黄绿色的荧光点。

* Hoechst 33258 染液的配制:

储存液: 50 μg Hoechst 33258 荧光素用1 ml 蒸馏水溶解, 暗处保存。

使用液: 储存液用1000倍的Meilvaine磷酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 5.5)稀释成工作液, 使之最终浓度为0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以1:1000浓度的乙汞硫代水杨酸钠(thnerosal)加到染液中可以抑制微生物的生长。溶液于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。应防止用滤膜过滤除菌, 因为染料易与滤膜结合。

** M vaine 液的配制:

0.2 M 磷酸氢二钠 27.8 ml, 0.1 M 柠檬酸钠 22.2 ml, pH 调至5.5。

此外尚有物理性分离结合 ^3H 标记或结合rRNA分析的方法, 以及染色体组型分析检查法等等。其中有些方法是比较不易普及和比较费时费事的。以上较详细地介绍5、6、7三种方法。我们在自己工作中感到这几种方法操作不甚繁难, 漏检的可能性很小。

四、支原体污染的途径与防治

1. 支原体污染的主要来源与途径

原代培养细胞的污染率是非常低的, 随着培养期限延长, 污染的比例也增高。这说明支原体的污染是外源的。通过对污染的细胞样品中支原体类型的分型, 可明显地看出, 绝大多数支原体主要是来自牛和人类, 其次是猪。来自其它动物的支原体污染大约只占总数的1%。

牛是第一位的污染源, 这显然是通过牛血清带入培养细胞的。牛血清目前依然是几乎一切细胞培养基的必要成份, 而牛血清中不仅含有多种支原体, 同时还含有许多其它的微生物。

人类支原体的来源主要是操作者的口腔。这同时往往也是细菌污染的主要来源。在某些情况下, 人的头发、衣服等上的支原体也可污染细胞。大多数观察表明, 细胞培养中出现的人类支原体类型通常总是和操作者所携带的类型一致。

至于猪支原体的来源, 曾有许多人认为是通过消化细胞用的胰酶, 因为这主要是采用猪胰为原料的。但实验表明, 支原体在胰酶中最多只能生存几个小时。因此, 估计是通过屠宰和生物制品等环节又转辗通过牛血清而带入细胞培养物的。

由于动物的呼吸道、生殖道等部经常有支原体寄生, 因此用作培养的细胞材料本身也是一个不应忽略的污染源。

以上这些都是第一级的污染源。但若以细胞培养物被污染的实际数量而论, 则第二级污染源占有更大的比重。这主要就是已发生污染

的细胞造成新的污染。我们最近所做的检查也表明,当一个细胞系出现较严重的支原体污染时,同一实验室的其余细胞系也很难幸免。当受到胰酶的轻微消化时,支原体即可从细胞上大量脱落下来。在严重污染的细胞培养物中,支原体的密度通常可达 10^6 — 10^8 个/毫升,远超过自然条件下生长的密度。操作者通常是第二级污染的传播者。几乎各种常规的实验操作都可造成培养液的微量溅出。例如开启瓶塞,倾倒废液,离心,分装等等。1滴小至0.05 ml的飞沫即可携带 5×10^5 个支原体之多,足够造成一个培养物的污染。这些微滴不仅可在空中悬浮一定时间,并可能沾染到工作面和实验器具上,即使蒸发干燥后,支原体也还能存活几天之久。

2. 对已污染细胞的救治

对于如何消除已发生的污染,曾提出过不少办法。如用某些抗菌素高剂量处理(因为支原体对抑制成壁过程的抗菌素有抗性,而对阻抑蛋白质合成的抗菌素是敏感的),以及用抗血清处理等。如用含卡那霉素 $600 \mu\text{g/ml}$ 的维持液灌满培养瓶,浸泡18小时,再继续以含有 $200 \mu\text{g/ml}$ 卡那霉素的营养液培养三周,通常可使支原体消除。在上述各方法中用针对性的抗血清再辅以新鲜的豚鼠血清的方法可得到较好的效果。但总的来说,这些方法即使获得一定效果,多数也会在一个短时期内又重新出现污染。况且,污染既已发生,细胞在生理、生化、遗传诸方面都已发生变化,勉强救治对研究工作来说往往是徒劳无益的。所以建议非十分特殊的情况下应当将污染的细胞培养物废弃,并用高压灭菌法处理,同时要十分彻底地消毒环境,以防止污染继续传播。总之,在对待支原体的污染上,“预防为主”的方针是必需的。

3. 污染的预防措施

从支原体污染发生的几率来看,总是传代细胞比原代细胞高,使用抗菌素的比不用抗菌素的高;细胞培养数量大的比数量小的高;实

验室有污染历史的比无污染历史的高。在绝大多数情况下,污染是由于操作不够适当,环境与用具装备的不合规格,或对购入材料检查不严格造成的。每个实验室都有各自不同的情况和方法,但下述事项看来是值得共同注意的。

(1) 对每一批牛血清都应做严格的检查。目前商品牛血清的污染率还是比较高的。一定要确认不带有支原体方可投入使用。牛血清中的支原体主要来自不够严格的取血和加工过程,因此在可能条件下,实验工作者亲自参加取血可以大大降低污染的可能性。将血清在 56°C 灭活30分钟,然后在 41°C 下灭活18小时,也有利于抑制支原体的污染。

(2) 从其它单位向实验室引入细胞要非常慎重,防止污染细胞的传播。

(3) 要坚持严格操作。包括在每次实验前后对无菌间及操作台做认真的消毒处理。口罩、灭菌工作服和工作帽是绝对必要的,并且应当保持洁净。更换工作服比在日常衣服上套上工作服更好一些。操作时尽可能不要讲话和走动,口吸移液管在任何情况下不宜使用。

(4) 使用一些阻抑蛋白质合成的抗菌素,可有助于减少支原体的污染。如可在培养液中加庆大霉素 $100 \mu\text{g/ml}$,或卡那霉素 $50 \mu\text{g/ml}$ 。但决不可因使用了抗生素而放松其它方面的要求。

(5) 为了防止交叉感染,每种培养细胞应分别备有全套血清、培液、碳酸氢钠等添加剂以及单独的吸管、离心管等。当然最好是有分别的无菌间和有专人管理。血清、胰酶等应当分成小包装,每次用过后尽量不重复使用。此外,用作病毒库的细胞培养物,以及抗血清等也常常会成为交叉污染的媒介,应予以注意。

(6) 对所有培养细胞应当经常进行检查。因为在小范围轻度污染时是容易消除的,而一旦成为大范围的严重污染,再要彻底根除就困难得多了。发现污染现象时,最好是将其妥善地处理而不是简单地废弃。器具要慎重消毒,有关的培养添加剂要检查有否污染,最好不再

用,而同废弃的细胞及培液一起,高压灭菌后再倒掉。这时就需要取用保存的细胞复苏。为此,实验室通常应当在细胞培养的较早代次,选择生长良好的细胞,妥善冻存,以便在万一发生污染时使用。

所有这些措施同时也可以在很大程度上防止其它微生物、病毒,或某些竞争力强的细胞的污染。

很显然,为了做到上述这些,就应当使实验室的所有人员,包括只是使用细胞作实验材料的研究人员和其它有关人员,都能了解支原体污染的途径和可能造成的影响,并制订出相

应的制度。这可以说也是防污染措施中至关重要的一条。

参 考 文 献

- [1] Stanbridge, E. 1971. *Bacterio Rev.* 35: 206—227.
- [2] Barile, M. F., R. A. Delgiudice, H. E. Hopps, M. W. Grabowski and D. B. Riggs. 1973. *N. Y. Acad. Sci.* 225: 251—264.
- [3] Todaro, G. J., S. A. Aronson and E. Rands. 1971. *Exp. Cell Res.* 65: 256—257.
- [4] Russell, W. C., C. Newman, and D. H. Williamson, 1975. *Nature.* 253: 461—462.
- [5] Chen, T. R. 1977 *Exp. Cell Res.* 104: 255—262.

生 长 因 子 与 细 胞 增 殖

王 祖 武

(中国科学院药物研究所)

近年来对生长因子在调节正常和恶性细胞增殖作用的了解进展迅速。不少新发现来自体外培养细胞的研究结果。在维持细胞连续增殖和传代的过程中,血清是不可缺少的成份。培养细胞的最终饱和密度与培养基中的血清浓度密切相关。当血清中某些成份被耗竭时,细胞停止增殖而呈静止状态,处于 G_0/G_1 期。如果这时再补充新鲜的血清,又可刺激细胞重新开始合成DNA,并导致细胞分裂。恶性细胞明显的表型变化之一就是对培液中血清的需要量明显减少。最早 Wolstenholm 就曾提出一种设想,即动物血清中的某些成份,很可能就是几种生长因子(growth factors)在控制细胞增殖中起着决定性作用。多年来的有关工作,不仅证实了多种生长因子的存在,对其生物学作用的认识也有了明显的进展。本文仅就生长因子在调节细胞增殖的一些生物学现象及其与肿瘤恶性生长的关系扼要作些介绍。

一、生长因子对细胞分裂的作用

近年来已经纯化并鉴定了多种多肽生长因子,如表皮生长因子(EGF),成纤维细胞生长因子(FGF),成纤维细胞源生长因子(FDGF),胰岛素类生长因子(IGF_s),血小板生长因子(PDGF),及神经生长因子(NGF)等(表1)。并且认识到正常细胞的分裂要受到各种生长因子的调节,例如小鼠3T3株细胞在无血清培养基中可因这些外源性物质的刺激,重新开始合成DNA,并进入细胞增殖(表2)。几种肯定有效的生长因子在合并应用时对刺激细胞生长有显著的协同作用。甚至达到与血清同样的效果^[1,2]。可见血清在细胞培养中的重要作用是提供有关的细胞生长必需的激素和生长因子。已经证明,至少在四十种以上的细胞株中,可用胰岛素,离子载体转运蛋白,特定的生长因子或激素组合成培养基,部分或完全代替血清