

# 真核细胞基因调控的新线索——记“增效子”的发现

赵 尚 林  
(第二军医大学)

近年来,相继在真核细胞中发现具有增高基因转录活性的特殊核苷酸片断,称之为增效子(enhancer element)<sup>[1]</sup>。本文就有关报道予以综述。

## 一、增效子的发现与意义

Grosschedl 和 Birnstiel(1980)<sup>[2]</sup>在对海胆 H<sub>2</sub>A 组蛋白基因调控区的研究中,首次报道了该区在功能上含有三类 DNA 片段,分别称之为调节子(modulator)、选择子(selector)和启动子(initiator element)。启动子与选择子是指令产生 H<sub>2</sub>A mRNA 正确 5' 端的特异因子,而调节子是控制这些特异因子的工作速率的。后来许多工作者在病毒基因组的研究中发现了类似调节子的 DNA 片段,称之为增效子。

转录增效子是一段短的、顺式作用的调节序列,能有力地刺激邻近基因启动子的转录。SV<sub>40</sub> 病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒、Rous 肉瘤病毒、鼠肉瘤病毒以及 Moloney 肉瘤病毒等基因组中的增效子已陆续做过检测

了<sup>[3,4]</sup>。SV<sub>40</sub> DNA 增效片段位于早期转录开始位点上游的 110—276 bp,多瘤病毒晚期区开始的 244 bp DNA 片段具有增效活性;腺病毒 5 型 EIA 基因转录控制区增效子位于 -141—-305 bp 间;Rous 肉瘤病毒 DNA 的增效序列确定为 143 bp。对每一种上述病毒来说,大约距 Goldberg—Hogness TATA 盒子约 100—250 bp 的单一上游序列具有增效活性。近年来,通过分子杂交试验在真核细胞包括在人的 DNA 序列中同样发现了增效子片段<sup>[5]</sup>。在某些细胞启动子中所鉴定的“上游序列”(通常远离转录起始位点—100 bp 序列)在功能上与增效子相关。通过对酵母 mRNA 编码序列上游缺失突变株的研究,证明位于转录区 113—155 bp 的上游区序列对野生型基因表达是必需的<sup>[6]</sup>。最近,利用限制性内切酶技术对免疫球蛋白增效子的核苷酸序列已作了分析(图 1)<sup>[1]</sup>。

## 二、增效子的特性

据 Weither 等<sup>[7]</sup>报道,SV<sub>40</sub> 与多瘤病毒基

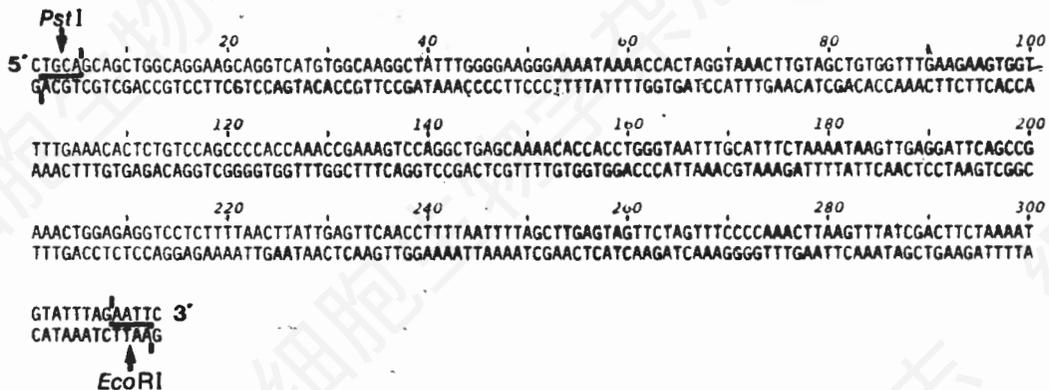


图 1 Ig 增效子的核苷酸序列

因组中所发现的 DNA 片段能大大增强许多真核启动子的转录。多数报道认为病毒增效子的作用特点似乎是双向的,在上游或下游的各可变部位来刺激各种启动子。除了增加来自同源启动子的转录水平外,还可增加来自许多异源的、病毒的或非病毒的启动子的转录。SV<sub>40</sub> 增效子可使得 Igλ 基因在 HeLa 细胞中表达。增效活性通常与增效子的方向无关,并且与启动子之间的距离似乎也无关,一般此距离可在几百到几千个碱基范围。

Luciw 等<sup>[8]</sup>利用微量注射技术将含有单纯疱疹病毒(HSV) tk 基因与 Rous 肉瘤病毒(RSV)或 SV<sub>40</sub> 病毒增效子片段的 PBR 322 重组质粒导入小鼠 L 细胞胸苷激酶缺陷株(TK<sup>-</sup>),结果发现,大约 1/4 注射过的 TK<sup>-</sup> 小鼠 L 细胞转化为稳定的 TK<sup>+</sup> 株,无论增效子的方向与部位如何,均较只注射 tk 基因重组质粒的对照组提高 20—40 倍。同时还发现,在完全培养基中这些经注射的细胞培养成细胞系时,只含有 HSV tk 基因的细胞仅少数可在选择性培养基内生长。相反,含有 HSV tk 基因与 RSV 增效子片段的细胞 80% 可在选择性培养基生长。说明病毒增效子在转化试验中对 tk 基因的表达有显著影响。由于他们也证实了含有 HSV tk 基因和 RSV DNA 增效序列的质粒与只含 HSV tk 基因的质粒,是以相同的比例整合到宿主细胞基因组中的,因此,认为 tk 基因的高效率表达是受增效子的作用,而与其整合及稳定无关。

在真核细胞中所发现的增效序列同样能增高 tk 基因的表达而不依赖方向,很类似病毒增效子。同时进一步发现在人 DNA 中存在许多此种序列,故有人提出此序列存在成簇的现象。但 Rosenthal 与 Khoury 利用与 BK 病毒增效子杂交经分离获得的人基因组中此序列是单一的,其中含有重复的 21 bp 因子与 BK 病毒增效区某些片段同源,增效活性较其它的高。腺病毒 5 型 E1A 基因的增效子含有重复的核心序列(AGGAAGTGA),即 11 bp 重复因子,去除此重复片段的一个拷贝时,E1A 表达减少

2—3 倍,去除二个拷贝时表达下降 15—20 倍<sup>[9]</sup>。据报道,免疫球蛋白增效子的核苷酸序列含有的重复成分,很类似于许多病毒增效子中所发现的。有关真核细胞增效子与病毒增效子的同源性问题<sup>[10]</sup>报道不一,有人强调同源序列的存在与意义,然而也有人甚至认为这可能是个巧合<sup>[8]</sup>。据最近 Herr 与 Gluzman (1985)<sup>[11]</sup>报道,在不同种增效子序列之间没有很明显的同源性,但存在许多短的简并同一(degenerate consensus)序列,作者利用增效子序列碱基点突变试验发现,SV<sub>40</sub> 病毒原突变株中的缺陷通过增效子序列中单一衔接重复(tandem duplication)可以克服。

这里不妨引证 Villiers 与 Schaffner 的报道<sup>[12]</sup>,增效子在克隆化真核 DNA 表达中具有如下特性:

1. 是相当短的序列
2. 似乎不依赖其方向起作用
3. 在长距离范围内是有效的
4. 作用似乎不限于特殊的连接基因
5. 连接基因的转录在 mRNA 帽子位点开始
6. 高水平的转录物是可检出的
7. 增效作用不限于单一细胞系

### 三、增效子的作用及其机理

Banerji 等(1983)<sup>[13]</sup>利用 DNA 重组的暂时表达试验检测了在小鼠免疫球蛋白稳定区的 DNA 编码增效子的设想,并提出增效子可能密切相关到真核细胞正常的与异常的发育。

免疫球蛋白基因的分子研究揭示出<sup>[1]</sup>,一个免疫球蛋白多肽链是由分散在基因组染色体上的多基因片段编码的。在 B 淋巴细胞中这些基因片段必需聚集在一起形成一个有活性的完整的免疫球蛋白基因,组成分子重链与轻链,每条链都有一个可变区与一个恒定区,可变区决定分子的特异性,而恒定区决定它在身体何部位起作用。免疫球蛋白基因片段的这一体内装配,是通过在 B 细胞分化期间发生一系列发

育控制的重组事件完成的。其中有二种类型重组发生, V-J 或 V-D-J 结合时, 对分别编码的轻链与重链可变区(V)的 DNA 序列是必需的, 这类重组通常发生在细胞遇到抗原之前; 而转换(switch)重组是重链序列的恒定区(C)以  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$  等类型来替代通常的  $\mu$  类型的重组过程。为使转换重组后起作用, 免疫球蛋白增效子必须位于转换区的上游<sup>[13]</sup>, 否则它就会随着上述转换而被丢失了。Gillies 等(1983)利用 DNA 转染技术, 把一个克隆重链免疫球蛋白基因引入小鼠骨髓瘤细胞, 测试其高水平表达所需的 DNA 序列。结果发现, 功能上准确有效转录的重排  $V_H$  启动子需要  $J_H-C_H$  区的 DNA 序列, 亦即在转染的骨髓瘤细胞中, 高水平表达需要功能上重排的重链免疫球蛋白基因的 VDJ 与 C 外显子之间的一个主要内含子序列。同病毒转录增效子相似, 这些细胞序列可刺激同源  $V_H$  基因片段的启动子或异源  $SV_{40}$  启动子的转录, 放在重排的  $V_H$  基因片段的 5' 或 3' 侧时, 它们均有活性, 方向反转时也起作用。去除此主要内含子, 重链基因不显示高水平表达, 表现在 RNA 转录水平上表达减低。与病毒增效子不同, 在于 Ig 基因增效子似乎是以组织特异性方式起作用的, 因此它在小鼠 B 细胞中有活性, 而在小鼠成纤维细胞中无活性。

增效子组织特异性的发现, 结合 B' 细胞各阶段的发育特征, Gillies 等(1983)认为此因子在细胞分化中可能起作用。在 B 细胞发育的早期阶段,  $\mu$  重链以低水平表达。在 B 细胞遇到抗原并与调节的 T 细胞相互作用后, 最终使分化的浆细胞出现, 并产生非常高水平的免疫球蛋白。在 B 细胞发育的不同阶段, 免疫球蛋白基因表达的定量差异可提示, 增效子的功能具有阶段特异性, 在这一增效区内包含多个调节序列, 但增效水平的表达也可能归于单一增效子的结合作用。据 Grosscheal 与 Birnstiel 报道, 利用“替代遗传学方法”(surrogate genetics approach)可区分出三种类型的调节序列, 增效子(即调节子)必须处于选择子与启动子之下

游, 三者协同作用才能导致转录, 仅增效子自身是不起诱导转录活性作用的<sup>[12]</sup>。

各种增效子之间序列的异同有力地提示出, 通过特异的调节蛋白可以识别它们, 以此方式, 可激活许多单一基因并以相应水平表达它们。例如, 同鼠乳腺肿瘤病毒的启动子区结合的糖皮质激素, 可能系增效子的结合蛋白。现已表明, 鼠乳腺肿瘤病毒的启动子上游序列对激素反应是必需的, 并以不依赖方向的方式起作用。在细胞分化期间, 这些基因调节机制全部或部分地起作用似乎是可能的。以此方式, 多数基因的表达仅通过相当少量的调节蛋白便可控制。腺病毒 5 型 EIA 增效子导致 EIA 基因表达, 而该基因产物可随之再激活病毒的其余的转录单位<sup>[14]</sup>。

据 Struhl 报道, 说明真核启动序列远距离调控存在二种模式。第一种模式, 系 RNA 聚合酶 II 作用具有根本不同于 *E. coli* RNA 聚合酶的机理, 例如, 转录活性酶可能是个多体(multimer); 可能先同远距离位点结合然后再以某种方式移动; 可能需要同聚合酶与远距离位点相互作用的因子。第二种模式, 系机体内 DNA 模板结构起重要作用, 在聚合酶结合前, 需要核小体的准确相变(correct phasing); 同转录开始位点接近时需要远距离序列具有精细的或携带更高级有效的 DNA 结构; 或非组蛋白与 RNA 聚合酶特异结合的相互作用。最近, Treisman 与 Maniatis(1985)<sup>[15]</sup>利用重组质粒与离体核转录试验证实,  $SV_{40}$  增效子至少部分地起到增加 RNA 聚合酶 II 分子的数量作用, 处于连接基因 5' 侧的增效子可增加 RNA 聚合酶量 30 倍到 50 倍。据 Weber 与 Schaffner(1985)<sup>[16]</sup>报道, 在连接基因内的  $SV_{40}$  增效子也证实增加 RNA 聚合酶的密度, 同时通过分离核的连续转录试验证实增效子显然是增加了转录开始的速率, 而不影响其特异性或前体 mRNA 的加工。

增效子对细胞癌基因有激活作用, 在鸟类白血病病毒(ALV)诱导的鸡 B 细胞淋巴瘤中

发现, ALV DNA 增效片段被整合在 *c-myc* 癌基因邻近, 造成 *c-myc* 高水平表达。被整合的前病毒是由两侧含有近 310 个核苷酸序列组成的, 称之为长末端重复(LTR)<sup>[17]</sup>。LTR 具有增效活性。最近, 在癌基因激活研究中发现了细胞增效子的作用<sup>[18]</sup>。在许多鼠和人的淋巴瘤中发现有染色体易位, 其中癌基因被重排到免疫球蛋白基因片段 C 区, 在人的 Burkitt 淋巴瘤中的重排发生在 C<sub>α</sub> 区。总之, 癌基因可被同源的或异源的增效子激活, 或本身易位被邻近的增效子激活都是可能的。

近年 Wasylyk 等<sup>[19]</sup>提出增效子对转录激活的双向“超”入口位点(bidirectional“super” entry site)模式, 颇受关注。作者认为具有增效活性的 SV<sub>40</sub> 上游因子(72 bp 重复)可能是 RNA 聚合酶 B 的双向“超”入口位点, 它的序列可能直接优先被 RNA 聚合酶 B 或转录机器的其它成分所识别。72 bp 重复使酶易于进入模板, 随之便从其任一个方向追踪(tracking) DNA(称之“追踪机理”), 来发现促进转录开始的序列。通过这一方式, 附近潜在的启动子序列将优先被激活。作者在以 72 bp 重复重组体转染的细胞中发现, SV<sub>40</sub> 微小染色体部分处于“开放”结构, 在包围 72 bp 重复和复制原点区带有核小体裂隙(gap)。72 bp 重复区引起这一染色体特殊结构的出现, 可能是通过与宿主细胞相关因子相互作用的结果。同时指出此重复序列可引出“开放”微小染色体特征性的 DNA 酶 I 敏感态, 仅通过 72 bp 本身不能产生核小体裂隙。对此, Qcen 与 Baltimore(1983)等通过 DNA 酶消化敏感试验提出, 增效子与类似的 DNA 片段可被相关激活基因所暴露, 因此对 DNA 酶消化是敏感的, 以此旁证了上述工作<sup>[20,21]</sup>。Wasylyk 等指出, 要弄清其详细作用机理, 有待建立正确反映体内启动子序列要求的离体研究体系, 此项工作目前正在进行之中。

#### 四、展 望

就目前报道, 学者们认为增效子可能作为

真核生物基因调节中的普遍机理, 增效子作为基因表达的调节基因可能还不限于高等真核生物体系, 有证据表明, 酵母异-1-细胞色素 C 基因被原血红素激活需要此基因的上游序列。酵母组蛋白结构基因的表达需要位于转录区 113—155 bp 上游序列。应该指出克隆的免疫球蛋白基因引进淋巴样细胞中的最新技术进展, 使得在这些真核细胞中研究特异 DNA 序列与基因表达之间的结构与功能的相互关联成为可能。增效子的发现, 无疑对分子生物学家、遗传工程工作者等是一重要信息, 随着有关工作不断深入, 可望真核基因调控研究会出现新的突破。

#### 参 考 文 献

- [1] Gillies, S. D. et al., 1983, *Cell*, 33: 717—728.
- [2] Grosscheal, R. and M. L. Birnstiel, 1980, *Proc. Natl. Sci USA* 77: 7102—7106.
- [3] Banerji, J. et al., 1983, *Cell*, 27: 299—308.
- [4] Levinson, B. et al., 1982, *Nature* 295: 568—572.
- [5] Fried, M. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2117—2121.
- [6] Strehl, K., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4461—4465.
- [7] Weiher, H. et al., 1983, *Science*, 219: 626—613.
- [8] Luciw, P. A. et al., 1983, *Cell*, 33: 705—716.
- [9] Hearing, P. and T. Shenk, 1983, *Cell* 33: 695—703.
- [10] Conrad, S. E. and M. R. Botchan, 1982, *Mol Cell Biol*, 2: 949—965.
- [11] Herr, W. and Y. Gluzman, 1985, *Nature*, 313: 711—714.
- [12] de Villiers, J. and W. Schaffner, 1981, *Nucleic Acids Res*, 9: 6251—6254.
- [13] Banerji, J. et al., 1983, *Cell*, 33: 729—740.
- [14] Imperiale, M. J., 1983, *Cell*, 35: 127—136.
- [15] Treisman, R. and T. Maniatis, 1985, *Nature*, 315: 72—75.
- [16] Weber, F. and W. Schaffner, 1985, *Nature*, 315: 75—77.
- [17] Hayward, W. S. et al., 1981, *Nature*,

表1 几种抗生素对支原体作用的比较

| 支原体种类          |        | A.1     | (抗生素用量)<br>μg/ml M.a | M.h  | M.o  |
|----------------|--------|---------|----------------------|------|------|
| 抗生素(μg/ml)     |        |         |                      |      |      |
| Tiamulin       | (10)   | -       | -                    | -    | -    |
| Minocycline    | (5)    | -       | -                    | -    | -    |
| Kanamycin      | (500)  | ++(毒)   | (50)+                | -(毒) | +    |
|                | (5000) | -(毒)    | (500)-(毒)            | -(毒) | +(毒) |
| Tylosine       | (200)  | -       | (20)+++              | -    | -    |
|                | (2000) | x       | (200)++              | x    | x    |
| Spectinomycine | (200)  | +++ (毒) | (20)+++              | +++  | 未作   |
|                | (2000) | +++ (毒) | (200)-(毒)            | +++  | +++  |
| Lincomycin     | (500)  | ++(毒)   | (50)++               | ++   | +(毒) |
|                | (5000) | -(毒)    | (500)-(毒)            | x    | x    |
| Gentamycin     | (50)   | -       | +++                  | +++  | +    |
|                | (500)  | -       | +++                  | +++  | +    |

注: +++: 严重污染; ++: 多数细胞轻度污染; +: 培养物中有支原体检出; -: 无支原体检出 (DNA 荧光法); (毒): 有细胞毒性; x: 细胞因毒性死亡。

比起预防来, 总是下策。新的较好救治方法的出现也没有改变这一点。我们知道, 培养细胞用的血清是造成支原体初级污染(或称偶发污染)的主要来源<sup>[22]</sup>, 而已发生污染的培养物则是次级污染(或称继发污染)的主要来源<sup>[23]</sup>。对于预防来说, 血清中携带支原体的问题是一个长期以来最令人头痛的问题。因为首先是我们到现在还不能确切知道支原体是如何进入血液的。甚至我们亲自在严格无菌条件下取血仍有时会有少数血清被污染。估计这可能是来自母体生殖道。若鉴定一下小牛血清中支原体与母牛生殖道中支原体的种类, 加以比较, 可能有助于澄清这个问题。其次是血清中的支原体数量少, 又不贴附在细胞表面, 因此检测起来也困难得多。至于血清中支原体的去除, 有人采用加热灭活法, 但多数是用过滤。由于支原体不具有坚硬的细胞壁, 容易通过一般的细菌滤器, 而孔径更小的滤膜因极易吸附蛋白发生堵塞而无法用于过滤血清。目前在去除血清中的支原体方面已经出现了具有实际应用价值的进展。日本密滤膜(Millipore)公司出品了一种正压过滤装置, 可以滤除血清中的支原体。它的全部秘密就在于其使用的 Durepore 滤膜良好

的表面特性。这种滤膜是用聚二氟乙烯(polyvidene fluoride)制造的, 其化学抗性类似聚四氟乙烯, 膜本身是憎水性的, 但通过表面的化学修饰, 可以使之与水亲和。这样它可以迅速被水浸湿, 同时保持了原材料对化学物质的抗性和物理特点。特别是, 它对于蛋白质的非特异性结合极弱。所以它可以多层迭装, 下层的孔径较上层为小, 每层间夹放两层涤纶筛布, 从而即可滤除支原体, 又不会发生通常过滤血

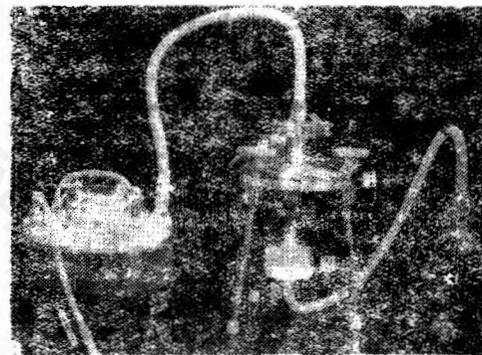


图1 正压过滤装置全图

箭号示正压供应 1. 不须灭菌 2. 滤器, 需灭菌

清时恼人的堵塞问题。图1为该装置的一套装置。此法除了具有可靠的效能外, 尚有使用方便, 过滤迅速的优点。Durepore 滤膜具有高度

稳定性,可用蒸气或126℃消毒处理,前置过滤部分不须消毒。该装置可用来对加有血清的培液进行一次性过滤灭菌,为了去除支原体,应用两层以上0.22 $\mu$ 孔径滤膜,此时在0.7 kg/cm<sup>2</sup>压力下,每分钟可过滤2—3.5升,亦即每15秒钟即可滤出500 ml的一瓶。若使用可弃型则打开包装,不须再灭菌即可使用。用后即丢掉,更为方便。目前该公司正试制孔径0.1 $\mu$ 的滤膜,它对于滤除支原体将更为适合<sup>[24]</sup>。我们经过初步试用,血清和培养细胞尚未发现有支原体。

总之,上述技术上的新进展,已经和正在改变着人们对支原体污染长期以来“防不住、治不好”的状况。我们相信,普遍地在实际上解决这一问题,已经为时不远了。

### 参 考 文 献

- [1] 何大澄,张鸿卿等,1984,细胞生物学杂志 6: 153.  
 [2] Barile, M. F. et al., 1978, Mycoplasma Infection of Cell Culture (ed G. J. McGarrity) Plenum Press, New York. P35—46.  
 [3] Stanbridge, E., 1971, Bact. Revs, 35:206.  
 [4] Mc Garrity, G. L., 1982, Advance in Cell Culture Vol. 2, New York. P99—131.  
 [5] Russell, W. C. et al., 1975, Nature 253:

461.  
 [6] Chen, T. R., 1977, Exp. Cell Res, 104: 255.  
 [7] Razin, S. et al., 1984, In Vitro, 20: 404.  
 [8] Amikam, D. et al., 1982, Nucleic Acids Res, 10: 4215.  
 [9] Hopps, H. E. et al., 1973, Ann. Ny. Acad Sci, 225: 265.  
 [10] Van Diggelen, O. P. et al., 1978, In Vitro 14: 734.  
 [11] Mc Pherson, I. et al., 1966, Nature, 210: 1343.  
 [12] Birke, C. et al. 1981, J. Immunol, 127: 94.  
 [13] Beck, J. et al., 1980, J. Immunol. Methods 38: 63.  
 [14] Marcus, M. et al., 1980, Nature 85: 659.  
 [15] Van Diggeler, O. P. et al 1977, Cancer Res. 37: 2680.  
 [16] Busicirk, H. H., 1967, Appl. Microbiol. 15: 1442.  
 [17] Schmidt, J. et al., 1984, Exp. Cell Res. 152: 565.  
 [18] Kenney, G. E., 1978, In Vitro 14: 338.  
 [19] Traika, T. S. et al., 1983, J. Natl. Cancer Inst. 71: 591.  
 [20] Schimmelpfeng, L. et al., 1980, Nature, 285: 661.  
 [21] Bogh T. et al., 1969, Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 125: 423.  
 [22] Barile, M. F., 1971, J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 138: 423.  
 [23] Beardsley, T., 1983, Nature 304: 674.  
 [24] Millipore Laboratory Products Catalogue, 1982.

### 信 息

中国科学院上海细胞生物学研究所与在国家科委大力支持下成立的中美合资经营的华美生物工程公司合作,乐意为我国的生物工程及分子生物学的发展作出贡献。最近,在上海细胞生物学研究所内设立华美公司上海办事处,该办事处主要经销由生物技术发展出来的产品,并不断开发新产品。目前该公司已可供应遗传工程中常用的工具酶,其中包括 T<sub>4</sub> DNA 连接酶, RNA 聚合酶, DNA 聚合酶 I 等 60 余种,及其它有关底物或试剂几十种。另外还供应多种型号的微波炉,塑料真空干燥器等小型仪器。该公司实行新的供应办法,接受来函来电订货,市区内可在 24 小时内免费送货上门,为对用户高度负责,试行“先使用,后付款”的办法,如在规定时间内,使用者发现质量不合规格,用户可要求退货或无条件换货,经本公司调查核实确属产品内在质量问题,则酌情赔偿用户由此造成的经济损失。该公司真诚地希望与广大科技工作者密切联系,热诚地为大家服务。

中国科学院上海细胞生物学研究所开发部

- 290: 475—480.
- [18] Klein, G., 1983, *Cell*, 32: 311—315.
- [19] Wasylyk, B. et al., 1983, *Cell*, 32: 503—514.
- [20] Qcen, C. and V. Baltimore, 1983, *Cell*, 33: 745—748.
- [21] Tyndall, C. et al., 1981, *Nucleic Acids Res*, 9: 6231—6250.
- [22] Vernon, T. Qi et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 825—829.

## 支原体污染防治研究的新进展

何大澄 张鸿卿 薛绍白

(北京师范大学生物系)

几乎对每一个用培养细胞为材料的工作者来说,支原体的污染都是一个极常见而又最棘手的问题,并日益得到普遍的关注<sup>[1-3]</sup>。直至不久前为止,对支原体污染中的一些重要问题,特别是血清净化和污染细胞的救治问题都还没有理想的解决方法。近来却都有了令人瞩目的突破。我们和一些实验室已开始试验采用其中一些新技术。兹将有关的新进展介绍给大家供参考。

首先是支原体检测的技术,在灵敏、精确、简便易行等方面都有迅速的进展<sup>[4]</sup>,从而使人们对支原体污染的普遍性和严重程度引起了更高的警觉。特别是DNA染色法<sup>[5,6]</sup>和扫描电镜检查法简单快速,易于推广,检出率也高,成为最常规的方法。在检测方面的新进展,我们应当提到DNA分子杂交检查法<sup>[7]</sup>,此法的主要原理是:rRNA在原核细胞是高度保守的<sup>[8]</sup>。将已知支原体的rRNA基因的主要部分,克隆到质粒PBR 325中进行扩增,再以缺刻转移法(nick-translation)制成<sup>32</sup>P标记的探针。而待检查的细胞培养物则消化悬浮后,慢速离心,取其上清液,提取DNA,用EcoRI降解2小时,凝胶电泳,用Southern blot法转移到硝酸纤维素膜上。最后以探针在膜上与之杂交。此膜与X光底片重迭放置24—48小时,即可根据探针存在的部位判定结果。此法的优点之一

是特异性或者说可靠性高。来自支原体的探针不会与真核细胞的DNA杂交,即不存在宿主DNA干扰的问题;而支原体及大多数原核细胞DNA皆可杂交,故从支原体的种类上来说,不存在漏检的可能性。并可以同时完成支原体种类的大致鉴别。在可以感染细胞的众多支原体中,主要的4类可占全部污染的86%<sup>[9]</sup>。在DNA杂交法检查中,它们的标记片段出现部位分别为<sup>[7]</sup>:

| 支原体种类                         | (简称)  | 标记片段         |
|-------------------------------|-------|--------------|
| <i>Acholeplasma laidlawii</i> | (A.l) | 5.2 和 8.8 kb |
| <i>M. arginini</i>            | (M.a) | 4 和 7 (弱)kb  |
| <i>Mycoplasma orale</i>       | (M.o) | 5 kb         |
| <i>M. hyorhinitis</i>         | (M.h) | 8.6 kb       |

此外,支原体以外的原核生物也可能被检出,但这未尝不是一件好事。与之相比,传统的培养检测法,虽然灵敏度很高,但却可能漏检。如M. h.是不能用一般支原体培养基培养的<sup>[9]</sup>。用多价抗体检查的方法也存在类似的不足之处。而生化方法则常常受到宿主细胞及其泄漏物质的干扰。分子杂交法的优点之二是灵敏度高,可检出少至1 ngDNA,即10<sup>5</sup>个支原体的DNA。优点之三是设备和操作都不复杂。

其次是近年一些新研究领域的兴起,使支原体的防治获得了更为重要的地位。以基因工