

- 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^[1-3]。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^[4],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^[5,6]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^[7],此法的主要原理是:rRNA在原核细胞是高度保守的^[8]。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³²P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%^[9]。在DNA杂交法检查中,它们的标记片段出现部位分别为^[7]:

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^[9]。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10⁵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

程为例。利用 TK⁻ 细胞不掺入 BudR 因而可在含有 BudR 的培养液中存活的性质来选择基因工程中某一阶段的产物,是非常常用和重要的方法。但被若干种支原体感染的 TK⁺ 细胞会表现为 TK⁻ 的性质,即不再掺入 BudR 而无法选择下去。依靠 HGPRT 缺陷进行的选择也同样可因支原体的污染而归失败^[10]。再以细胞转化的研究为例。在软琼脂上生长的能力是细胞转化的重要标志之一。一些支原体的感染,可使非转化细胞具备这种能力,甚至当去除支原体后,软琼脂生长能力仍比感染前高 10~150 倍^[11]。支原体感染还可造成细胞形态的重大改变,包括成纤维型与上皮型之间的形态转化。此外,正常细胞在人体内不引起自然杀伤细胞的攻击,也不诱导干扰素的产生,而支原体感染的细胞则象肿瘤细胞一般,可引起自然杀伤细胞的攻击和诱导干扰素的产生^[12,13]。随着这些研究的空前兴旺,支原体污染的防治也就显得日益迫切。

最后是防治方面的发展。与检测水平相比较,可显著看出迄今为止有效防治手段的相对贫乏。甚至最有经验的组织培养工作者面对支原体污染问题也是一筹莫展。

细胞被支原体污染以后的救治是极为困难的。人们曾想了许多救治方法,但即使其中最有效的一些,也会在不同程度上影响细胞的正常生理功能^[14,15]。一些抗生素能对支原体有效地控制其生长^[16],但它们往往不是对所有的支原体有效,如泰乐菌素(Tylosine)对 AI, M. h. 和 M. o 都很有效,而对 M. a 却无效^[17]。同时,有些支原体很易对抗生素产生抗性,并在被清除之前就形成了抗性株^[18]。另外的一些抗生素如卡那霉素(Kanamycin),壮观霉素(Spectinomycin)和林肯霉素(lincomycin)等则只是在高浓度,对细胞有明显毒性时,方才有效。曾有人提出采用 5-溴尿嘧啶,结合 Hoechst 33258 和光处理法来杀灭支原体,但此法引起高毒性,并会迅速激活宿主细胞(如鼠细胞)内源性 c 型逆转录病毒^[14]。将被污染的

细胞接种到裸鼠体内传代,从而再获得无支原体的细胞^[15]或者通过与鼠巨噬细胞一起培养来去除污染的支原体^[20]都曾被认为是效果最佳的救治方法。但这两种方法也同样很易使这些细胞遭到宿主鼠细胞中 c 型逆转录病毒的感染^[19]。综上所述,可以说现有的救治方法中,还没有一种是能得到理想的结果的。这方面最近的一个进展是采用两种新的抗生素配合重新克隆的方法^[17]。泰霉素(Tiamutin)和麦诺霉素(Minocycline)与其它抗生素比较,有显著的优点。它们对已知的所有支原体都有抑制功效(表 1)。并且所有支原体都不会对之产生抗性。在有效浓度下,对细胞无明显毒性,不影响或基本不影响细胞的生长。具体处理方法是,将欲救治的污染细胞按照表 1 所示浓度用泰霉素或和麦诺霉素处理。细胞大约每周按照比较大的稀释比传代一次,并每半周就要更换一次带有抗生素的新鲜培养液,抗生素要现加现用。通常要处理 4—5 周。若处理时间短于 2 周,往往会很快又出现污染,估计这是由于一些支原体因细胞的包封作用而被保存下来的缘故^[21]。为了获得更好的效果,经抗生素救治的细胞可进一步用胰酶消化,悬浮,在多孔板上按每孔 1—2 个细胞接种(每孔培液 200 μ l),培养液中不再加抗生素,选择适当的克隆,扩增后按上法重复克隆一次,充分生长后,用培养瓶分装,一瓶用于检查,其余则可传代保存。用这两种抗生素处理的方法好处是操作简单,用费低廉,副作用小,特别是对难以鉴定和难以培养的支原体来说,更是简单有效的方法。这两种抗生素都有商品供应。

当然,这种方法也还不是完美无缺的。如前所述,支原体感染引起的某些变化是不可逆的,这就注定了很难有一种十全十美救治方法。但至少通过杀灭支原体和重建无支原体克隆的处理已经使这种“后遗症”的可能性减到了最小的程度。然而建立克隆这一步带来了相当大的工作量。

如同我们在前篇文章中讲到的^[1],救治

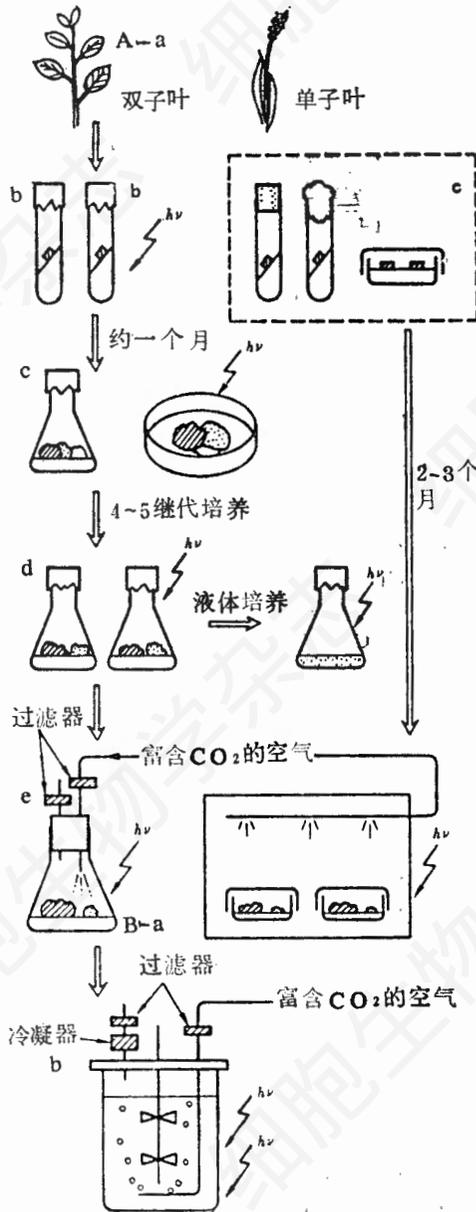
植物细胞的光自养培养

山田 康之

光合作用是植物的基本特性之一，迄今为止植物的细胞培养是在外加糖分的条件下进行的，但如要进

行绿叶叶肉细胞的生理、代谢机能的研究，则必须进行光照条件下的自养培养。特别是液体培养可将高等植物细胞象绿藻那样处理。光自养培养不仅可进行光合作用等基础性的研究，而且还可应用于鉴定除草剂、筛选耐除草剂的株系和光合作用活性高的植物等各个方面。有关绿色培养细胞的特性，可参考佐藤与山田的综述。

建立植物细胞在光自养培养系的程序如图1所示。



← 图 1 植物细胞的光自养培养

A-a 材料的选择

- ① 植物的选择
- ② 叶、幼嫩的组织

b. 诱发愈伤组织

光照下在含有 $\text{NAA } 5 \times 10^{-5} - 10^{-5} \text{ M}$

细胞分裂素类 $5 \times 10^{-6} - 10^{-6} \text{ M}$ 的 LinsMaier-Skoog 培养基中诱导

c. 光自养的愈伤组织诱导愈伤组织化出现 具有各种绿色程度(光合活性)的细胞

d. 细胞的选择

- ① 肉眼的(叶绿素含量)的选择
- ② 光合作用合成活性的选择

e. 光自养培养自发的选择

- ### B-a.
- ① 增加 CO_2 浓度
 - ② 提高光的强度

b. 促进光自养的生长发育

- ① 降低生长素的浓度
- ② 降低 O_2 分压
- ③ 提高磷酸的浓度

建立植物细胞光自养培养系的必要条件是选择光合活性高的细胞和给予适于进行光合作用的培养条件,筛选材料时,除可在诱导发生愈伤组织后进行外,在诱发愈伤组织时就可进行光照条件下自养培养的选择。这种在光照下自养培养(不添加糖)的条件本身也大大增加了选择的压力。

A. 愈伤组织的诱导培养和选择

a. 材料的选择(参照表1)。迄今获得生长发育比较好的光自养培养的细胞来自表1中所列的植物。目前绿色细胞培养的事例在不断增加。特别应注意在环境主要因子以外的因素(例如物种差异)的巨大影响。水稻等单子叶植物几乎不能绿化,因而至今未能获得光自养的细胞。取材的部位,除叶外也应考虑易于产生胚胎发生的(embryogenic)幼嫩组织(如胚、生长点和其他分生组织)。

b. 愈伤组织的诱导 诱导愈伤组织的方法,一般用含1—3%糖(蔗糖或葡萄糖)的LS培养基,在光照*(3000—6000 lx)下进行。用于诱导愈伤组织的植物激素,以NAA $5 \times 10^{-5}M$ — $10^{-5}M$ 与BA(苄基氨基腺嘌呤)或KT(激动素) $10^{-5}M$ — $10^{-6}M$ 的组合为佳。光照用白色荧光灯,如用青色光照则可促进绿化。

c. 愈伤组织诱导时的筛选 光自养培养的愈伤组织的诱导,可在不添加糖的培养基中进行。诱导发生愈伤组织的条件b(见图1)愈严格,对这一阶段筛选光自养培养的细胞也愈有利。

d. 筛选光合作用活性高的绿色细胞 在光照下诱导出的愈伤组织,出现各种程度的绿色。一般选择绿色程度(叶绿素含量)高的细胞用于光自养培养。但是叶绿素含量未必是光合作用的指标。因而希望用光合作用中 $^{14}CO_2$ 的固定或光合作用的氧气发生量作为指标。

[实验1:用氧电极测定光合作用活性]

将约100 mg材料悬浮于50 mM磷酸缓冲液,放入氧电极的反应槽。经用10 cm水层(或吸收红外线滤光片)消除了红外线的强光(30,000—100,000 lx)照射五分钟后,注入NaHCO₃溶液(相当于CO₂最终浓度为0.2~1.0%, pH 7.8, 2~10 mM),随后测定氧气发生量。另一方面用黑布遮蔽测定黑暗中吸收氧气的呼吸活性,电极用空气饱和的蒸馏水(25℃下氧气浓度258 mM)与Na₂S₂O₄补充校正,简便的求出无氧状态的电流值之差。求出葡萄糖氧化酶定量消耗的氧气量。氧电极是美国的Yellow Spring Instrument,英国的Rank Brothers以及Hansatch的产品,随每个反

应槽而销售的。

e. 光自养培养时的筛选 在d(图1)阶段被选择的细胞株在光照下混合营养(mixotroph,即同时具有光自养与异养)情况下,多含有在遗传、生理上抑制光合作用的细胞。因而这样筛选出细胞株在光自养条件下培养,最初几代差不多不能生长,须经过几个世代的筛选,才能选择出真正的光自养培养的细胞,能在光自养培养中稳定的生长。

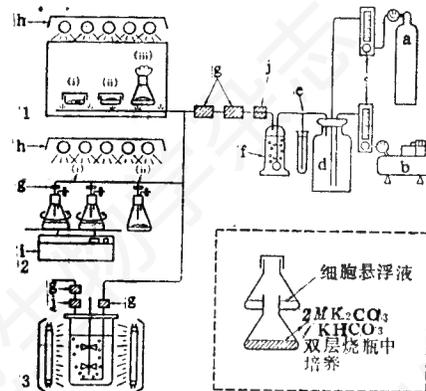


图2 富含CO₂混合气体中光自养培养的系统

- ①. 培养箱内培养
 - (i) 液体培养基中浅层培养
 - (ii), (iii) 固体培养
- ②. (i) 液体振荡培养
- (ii) 普通固体培养
- ③. 大瓶培养方法的一例
 - a: CO₂气体钢瓶
 - b: 空气压缩机
 - c: 流量计
 - d: 气体停留瓶
 - e: 安全瓶(保持一定压力系统)
 - f: 气体洗净瓶(气体增加湿度)
 - g: 灭菌用过滤器(滤膜、棉塞等)
 - h: 照明
 - i: 振荡培养器
 - j: 冷凝器(除去多余水分)

2. 光自养培养系统

光自养培养的条件是必须有富含CO₂浓度的空气(1~5%, V/V)与充足的光照强度,不满足这些条件光自养培养是难以进行的。

a. CO₂浓度的富化 有二个方法可以调节CO₂

* 距两盏20 W荧光灯30 cm时约2500~4000 lx,距三盏40 W荧光灯30 cm时为5000~7000 lx,15 cm时为8000~11000 lx。

表1 光自养培养的实例

细胞种类	愈伤组织的诱导与筛选	光自养培养(不添加糖培养)	生长速度	叶绿素含量 光合作用活性
石刁柏 <i>Asparagus officinalis</i>		修改 MS 培养基(-NH ₄ 盐, + 100 ppm 谷氨酸, NAA 1 ppm, 激动素 0.5 ppm) 通入空气/N ₂ (1:1) 2% CO ₂ , 300 ml/min/450 ml vol, 120 μE/m ² /s, 25°C	高密度培养 5 mg, DW/ml 2 倍/5.8 天 低密度培养 2 mg, DW/ml 2 倍/1.9 天	4.4 mg/g, DW 2.0 mg/g, DW
红藜 <i>Chenopodium rubrum</i>	从胚轴诱导, MS 培养基 10 ⁻⁶ M 2,4-D, 2% 蔗糖 19 W/m ²	修改 MS 培养基(-有机物) 10 ⁻⁷ M 2,4-D 液体培养→大瓶培养(1.5 l) 均可	7 倍/14 天 (混合营养的 细胞 5 倍/7 天)	200 μg/g, FW 36-38 μmol CO ₂ 固定/g, FW/hr
金雀花 <i>Cytisus scoparius</i>	从种子诱导, LS 培养基 10 ⁻⁵ M NAA, 10 ⁻⁶ M 苄基氨基腺嘌呤, 3% 蔗糖 约 3000 lx	培养基条件同左(+3 倍量磷酸) 通入富含 1% CO ₂ 空气到约 10 -20 ml/min/烧瓶 约 8000 lx, 固体培养	7 倍/42 天	60-200 μg/g· FW 64 μMol CO ₂ / mg 叶绿素/hr
大豆 <i>Glycin max</i> L. Var. Corsey	从子叶诱导, MS 修改培 培养基, 1 ppm NAA, 0.2 ppm 激动素 1% 蔗糖	培养基条件同左(根据情况 + 5 mM HEPES 缓冲液 pH 7.0) 通入富含 5% CO ₂ 空气到 11.25 ml/烧瓶 200-300 μE/m ² /s 液体培养	10-14 倍/ 14 天	200-280 μg/g· FW 450-600 μMol/ mg 叶绿素/hr
天仙子 <i>Hyoscyamus niger</i>	从叶片诱导, 不加糖或含 3% 蔗糖的 LS 培养基, 10 ⁻⁵ M NAA, 10 ⁻⁶ M 苄基氨基腺 嘌呤或 5 × 10 ⁻⁶ M, 3000- 5000 lx, 不加糖情况下通入 富含 1% CO ₂ 空气	培养基条件同左 20 l 容积培养箱中培养皿内培 养 约 8000 lx 通入富含 1% CO ₂ 空气到 1- 2 l/min/培养箱	3 倍/21 天	31 μg/g· FW 138 μmol CO ₂ /mg 叶绿素/hr
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> var. samsun	从髓部诱导, LS 修改培养 基(含有二倍量的维生素) 10 ⁻⁵ M NAA, 10 ⁻⁶ M 激动 素 3% 蔗糖	培养基条件同左 约 8000 lx, 通入富含 1% CO ₂ 空气到 10-20 ml/min/烧瓶。 大瓶培养情况下, 空气: N ₂ (7:3) 4 l/min/5 l	固体培养 5-8 倍/48 天 大瓶培养 1.8 倍/18 天 浅层培养 4-6 倍/28 天	50-100 μg/g. FW 132 μmol/mg 叶 绿素/hr
菠菜 <i>Spinachia oleracea</i>	幼苗, MS 修改培养基(+ 200 ppm 谷氨酸) 0.1 ppm NAA, 0.2 ppm 激动素 1% 蔗糖, 2.2-4.8 × 10 ³ erg/cm ² /s	通入空气/N ₂ , 1% CO ₂ 用 ClO ₂ 调节 67-100 μmol/l, 1.8 l, 大 瓶连续培养	2 倍/6-11 天	1.1-1.4 mg/g. DW 410-550 μMol CO ₂ /mg 叶绿素/hr
<i>Marchantia polymorpha</i>	Miller 培养基, 2% 蔗糖, 10% 椰乳 White 培养基, 2% 葡萄糖 1 ppm 2,4-D → MS 修改培 培养基, 2% 葡萄糖, 1 ppm 2,4-D, 5700 erg/cm ² /s	修改 MS 培养基(增加磷酸浓 度) 2,4-D 1 ppm 23.2 W/m ² 通入富含 1% CO ₂ 空气到 500 ml/500 ml 培养基/min	41 倍/18 天	

此外, 报道光自养培养的植物尚有骆驼蓬(*Peganum harmola*), 糖芥属(*Erysimum decumbes*), 胡萝卜(*Dacus carota*), 鸡眼藤属(*Morinda lucide*), 油菜(*Brassica napus*), 长春花(*Catharanthus roseus*)。详细情况不清楚。

浓度。一是 CO₂ 气体和空气按一定比例混合再通气的方法(图 1)。二是用双层烧瓶利用 2 M K₂CO₃/KHCO₃ 溶液配制 CO₂ 平衡空气的方法(图 2)。前一方法, 气

体的其他成份(例如氧气分压)容易变化, 但适于大量培养。

[实例: 已富含 CO₂ 空气的通气(参照图 2)].

将空气压缩机和 CO₂ 钢瓶调到定压(例如 1 kg/m²), 按一定比率(空气:CO₂100:1/-5)的流量混合, 混合空气增加湿度后, 用过滤器(HA 型 0.45 μm 滤膜或棉塞)除菌, 再通入培养箱、烧瓶、振荡培养器、大型培养瓶等。向烧瓶等培养器内直接通气, 因为易于混入杂菌须经二三个连续的过滤器。适宜的通气量为 10—20 ml/min/每一烧瓶或 2—4 l/min/20 l 容积培养箱。

b. 充足的光照

在光自养培养时, 在光照的混合营养情况下须强光照明, 通常需要 8000—15000 lx。但是在液体培养中生长旺盛, 细胞相互遮蔽, 光合作用的有效限量降

低。此时, 细胞低密度培养就可以促进生长。例如石刁柏细胞在连续培养下, 细胞密度从 5 mg D. W./ml 降低到 2 mg D. W./ml, 细胞倍增时间则从 5.8 天缩短到 1.9 天。

c. 稳定光自养培养的保持

促进光自养的重要因素除上述的以外, 尚有以下几点: 1. 生长素的浓度要低。2. 降低氧分压。3. 增加磷酸的浓度等等。特别是在液体培养基中大量培养情况下, 呼吸活性高, 降低 O₂ 分压对光自养培养是十分重要的。

(周荣仁节译自《植物细胞培养マニュアル》一书的 29~34 页“光独立栄養培養”一节)

人胃管状腺癌细胞系(NGCC-8310)的建立 及其生物学特性的观察

陈惠英 毕慧颖 鞠九龙 张佃乾 乐美兆
(中国人民解放军第八一医院)

建立人癌细胞系, 对癌变机理的探讨, 以及临床诊断, 药物筛选等方面的研究, 提供了较好的细胞实验模型。国内已有数例胃癌细胞系建立的报告, 但尚未见人体胃管状腺癌细胞系建立的报道。我院自一九八三年十月开展了建立该细胞系的工作, 至今已连续体外传代培养近 16 个月, 传至 118 代, 细胞生长旺盛, 定名为 NGCC-8310。

一、材料来源

肿瘤组织取自本院外科手术标本, 患者仇 × ×, 男性, 55 岁, X 线摄片报告为胃小弯侧角切迹处偏后见有一个 2 × 1.5 cm 龛影, 周围粘膜增粗, 部分粘膜破坏, 消化蠕动中断, 符合溃疡型癌, 范围为 6.5 cm。切除的肿块经病理学检查, 诊断为胃管状腺癌。

二、建株经过

将手术切除的胃癌组织标本立即在无菌操作下, 去除结缔组织和坏死组织, 用 Hank's

液冲洗数次, 置入培养皿中, 取出部分供病理诊断, 其余肿块剪成 1—1.5 mm³ 左右的小块, 经少量培养液湿润后, 把组织块分散贴在培养瓶中, 底面朝上, 同时加入 RPMI-1640 培养液 3 ml, 内含 20% 小牛血清, 青、链霉素各 100 u/ml 置 37℃ 培养箱内, 2 小时后, 待组织块粘附瓶壁后, 再轻轻翻转小瓶, 使组织块浸在培养液中, 静置培养, 根据 pH 的变化, 更换培液。于培养第十一天在部分组织块周围生长出细胞晕, 有的组织块周围生长出纤维样细胞, 第二十二天纤维样细胞铺满瓶底, 用 Hank's 液洗二次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行第一次传代。第三十天行第二代传代。第四十四天观察到一堆生长旺盛的上皮样细胞, 细胞轮廓清楚, 透亮, 纤维样细胞粗大, 内含粗颗

电镜观察得到三〇二医院梁士哲同志的热心指导, 谨致谢意。