

- 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

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) 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)	×	(200) + +	×	×
Spectinomycine	(200)	+ + + (毒)	(20) + + +	+ + +	未作
	(2000)	+ + + (毒)	(200) - (毒)	+ + +	+ + +
Lincomycin	(500)	+ + (毒)	(50) + +	+ +	+ (毒)
	(5000)	- (毒)	(500) - (毒)	×	×
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; ×: 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^[22],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^[23]。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

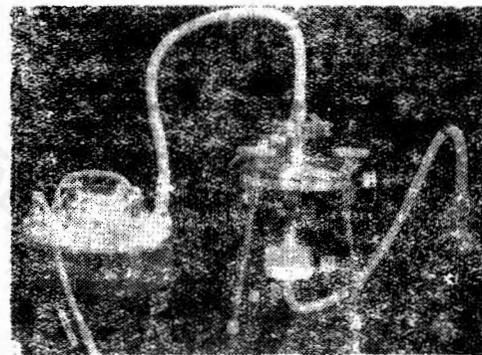


图1 正压过滤装置全图

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 μ 孔径滤膜,此时在0.7 kg/cm²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 μ 的滤膜,它对于滤除支原体将更为适合^[24]。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] McGarrity, 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 T₄ 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