

- mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3920195
- 2 Riaz S, Zeidan A, Mraiche F. Myocardial proteases and cardiac remodeling[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3244 – 3250
- 3 Haque ZK. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(6): 983 – 1000
- 4 Spaich S, Backs J. Ongoing controversies surrounding cardiac remodeling: is it black and white – or rather fifty shades of gray? [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 202
- 5 Ding Z, Jian S, Peng X, *et al.* Loss of MiR – 664 Expression Enhances Cutaneous Malignant Melanoma Proliferation by Upregulating PLP2[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(33): e1327
- 6 Zhang L, Wang T, Valle D. Reduced PLP2 expression increases ER – stress – induced neuronal apoptosis and risk for adverse neurological outcomes after hypoxia ischemia injury[J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(25): 7221 – 7226
- 7 Badreddin A, Attia H, Hafez M, *et al.* What role does the stress response have in congestive heart failure? [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2863 – 2870
- 8 Zhang C, Liu R, Yu J. Role of endoplasmic reticulum stress, autophagy, and inflammation in cardiovascular disease[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4: 29
- 9 Wang S, Fang Q, Wang Z, *et al.* Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 175(8): 1293 – 1304
- 10 Yao Y, Lu Q, Hu Z, *et al.* A non – canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress – induced apoptosis and heart failure[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 133
- 11 Zhang N, Wei WY, Yang Z, *et al.* Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Protects Against Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure – Overload via Inhibition of NADPH Oxidases and Endoplasmic Reticulum Stress[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(4): 1313 – 1325
- 12 Wang Z, Wang Y, Ye J, *et al.* bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischaemia/reperfusion via activation of PI₃K/Akt/ERK1/2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 595 – 607
- 13 Longo A, Librizzi M, Luparello C. Effect of transfection with PLP2 antisense oligonucleotides on gene expression of cadmium – treated MDA – MB231 breast cancer cells [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(6): 1893 – 1901

(收稿日期:2017 – 08 – 16)

(修回日期:2017 – 08 – 29)

联合使用聚合酶链式反应和培养法可以提高培养细胞支原体的检出率

卞晓翠 王晓婉 杨振丽 赵晓梅 李 姜 刘玉琴

摘 要 目的 分析国家实验细胞资源共享服务平台及其他实验室细胞支原体污染的情况,探讨聚合酶链式反应(PCR)和培养法在实验细胞支原体检测中的一致性。**方法** 通过 PCR 法对 245 例细胞培养上清进行了支原体检测,并检测了阳性样品支原体感染的种类;对其中 127 例新鲜上清同时进行了培养法检测,通过 McNemar 检验分析了二者的一致性。对二者检测不一致的细胞进行复检,同时使用生物发光法进行验证。**结果** 国内培养细胞支原体感染率在 19% ~ 66%;培养法和 PCR 法检测支原体只有假阴性,没有假阳性;延长取样前细胞在无抗生素培养基中的培养时间至 96h,可以提高低效价支原体感染样品的检出率。**结论** PCR 法和培养法检测支原体具有较好的一致性,应联合使用两种方法对培养细胞进行定期检测,提高支原体的检出率。在细胞培养过程中使用合格制剂,严格无菌操作,预防为主。

关键词 细胞培养 质量控制 支原体污染 PCR 培养法

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.009

A PCR – based Assay Combined with Microbial Culture for Improving Mycoplasma Detection. *Bian Xiaocui, Wang Xiaowan, Yang Zhenli, et al. Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China*

基金项目:国家科技基础条件平台项目(NSTI – CR17)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院病理学系

通讯作者:刘玉琴,电子邮箱:liuyuqin@pumc.edu.cn

Abstract Objective To assess mycoplasma contamination levels and species in experimental cells from the China Infrastructure of Cell Line Resource and customers' laboratories and to discuss the practical methods for mycoplasma detection by comparing the consistency of PCR – based assay and microbial culture. **Methods** Totally 245 cell culture supernatant samples were assessed by PCR – based assay for mycoplasma detection, and mycoplasma species of positive samples were further detected. A total of 127 fresh samples were tested simultaneously by combination of the PCR – based assay and microbial culture. McNemar's test was used compare proportions in 2 – by – 2 contingency tables. For samples with inconsistent test results, cells were re – sampled, and tested by PCR, microbial culture, and bioluminescent assays. **Results** In China, the rate of mycoplasma contamination in experimental cells was 19% – 66%. False negatives but no false positives were found for both methods and prolonged culturing for 96h before sampling for mycoplasma detection could improve the detection of low titer infections. **Conclusion** The performances of the methods did not significantly differ, and the results were in good agreement. The combined use of these two assays could improve the detection rate of mycoplasma. More strict quality control and more vigorous aseptic techniques must be employed in cell culture studies to prevent mycoplasma contamination.

Key words Cell culture; Quality control; Mycoplasma contamination; PCR; Microbial culture

支原体感染是细胞培养中非常常见的问题,被感染的细胞可能发生特性改变,导致实验结果不准确^[1-5]。但是支原体感染又不同于细菌、真菌的感染,其培养基往往不发生改变,感染不易被察觉。目前,支原体感染的检测多是采用培养法、荧光染色法和 PCR 法。《中国药典(2015 年版)》把培养法作为支原体检测的金标准。该方法准确性高,但是耗时长,需要经过 28 天的培养才能得到结果,因此在某些需要快速做出“去/留”决定的检测时,这种方法并不适用^[6]。但是哪种方法更好或怎么联合更有效尚无一致观点。本研究中联合使用培养法和 PCR 法,分析二者在检验结果上的一致性,探讨单方法或两种方法联合对检测结果的影响。

材料与方法

1. 材料:本研究中的检测样品均由国家实验细胞资源共享服务平台、中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心收集、取样,其中中心保藏细胞扩增后复检样品 189 份,新引入或外来细胞培养上清 56 份,合计 245 份。所有样本均是细胞在无抗生素培养基中培养 3 ~ 4 天、汇合度达 90% 以上(贴壁细胞)或者细胞密度达 5×10^6 的以上时收集。检测支原体时,127 例新鲜样品(取材 8h 内)同时采用培养法和 PCR 法,其余 118 例保藏在 4℃ 的样品仅采用 PCR 法。

2. 培养法检测支原体:取待检细胞培养上清后 24h 内进行培养法检测支原体,具体操作参考《中国药典 2015 年版》,包括精氨酸肉汤培养法和半流体培养法。首先用商业化粉末配制精氨酸肉汤培养基和半流体培养基,灭菌,加 20% 胎牛血清,6 毫升/支分装至试管中,冷却至 37℃ 以下方可进行试验;随后将

0.5ml 样品分别接种至 3 支精氨酸肉汤培养基中,37℃ 需氧培养 7 天后,再各取 0.5ml 复种至 3 支新的培养基中,继续培养 22 天,如果有支原体生长,则培养基的颜色会改变(粉色或黄色);将 0.5 ~ 1.0ml 样品分别接种至 2 支半流体培养基中,37℃ 需氧培养 30 天,如有支原体生长,则培养基中会出现絮状沉淀;实验中以已知阴性和阳性样品分别作为阴性对照和阳性对照。

3. PCR 法检测支原体:本研究中所用支原体检测的引物包括通用引物和种属特异性引物,序列参照国际上权威保藏机构(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ)所用,或文献报道,见表 1,由上海英潍捷基公司合成^[7-9]。分别稀释、混合上下游引物,工作液中每条引物的浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 。取 1.5ml 待检上清,12000r/min 离心 10min,去除上清后用 DNA 提取试剂盒(K1820,美国 Invitrogen 公司)提取和纯化支原体 DNA,加入 $100 \mu\text{l}$ 的灭菌去离子水洗脱。混合 PCR 反应体系:12.5 μl 2 × EasyTaq Mix (AS111,美国 Transgen 公司)、DNA 5 μl 、引物对 1 μl 、去离子水 6.5 μl ,反应条件为 95℃ 5min;95℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 40s,32 个循环;72℃ 10min。随后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以已知阴性和阳性样品分别作为阴性对照和阳性对照,以内参 DNA 作为内对照。内参 DNA 为在通用引物上下游的序列中间加入无关序列构建的质粒,扩增片段长度约为 760bp。所有样品首先用通用引物检测是否存在支原体污染,结果阳性的样品再用支原体种属特异性的引物进行扩增,检测精氨酸支原体、口腔支原体、猪鼻支原体、莱氏无胆甾支原体和唾液支原体等 5 种常见类型的支原体。

表 1 支原体检测所用的引物

支原体类型	引物名称	序列(5'→3')	扩增片段(bp)	参考文献
通用	MP-F-1	CGCCTGAGTAGTACGTWCGC	502~520	[8]
	MP-F-2	TGCCTGRGTAGTACATTCCG		
	MP-F-3	CRCCTGAGTAGTATGCTCGC		
	MP-F-4	CGCCTGGGTAGTACATTCCG		
	MP-R-1	GCGGTGTGTACAARACCCGA		
	MP-R-2	GCGGTGTGTACAAACCCCGA		
精氨酸支原体	M-1-F	TGATCATTACTCGGTGGAGAGTTC	326	[9]
	M-1-R	TATCTCTAGAGTCCTCGACATGACTC		
口腔支原体	M-2-F	TGATCATTAGTCGGTGGAATACTA	325	
	M-2-R	TATCTCTAGAGTCCTCGACATGACTC		
猪鼻支原体	M-3-F	CGATGATCATTAGTTGCTGGAATAAAT	334	
	M-3-R	AGGCAGTATCTCTAGAGTCCTTAACCTA		
莱氏无胆甾支原体	M-4-F	GATGAGAACTAAGTGTGGCCATAA	300	
	M-4-R	CGCTAGAGTCCCCAACTTAATGA		
唾液支原体	M-5-F	GATCATTAGTCGGCAGAGAACTCG	324	
	M-5-R	TATCTCTAGAGTCCTCGACATGACTC		

W = A + T; R = A + G

4. 生物发光法检测支原体:当培养法和 PCR 法检测结果不一致时,即出现单阳性的结果时,该样品使用 MycoAlert™ PLUS 支原体检测试剂盒(Lonza Walkersville, Inc., USA, Catalog No. LT07-701)进一步检测。该试剂盒是测定支原体酶活性的生化检测方法。通过加入底物前(A)后(B)样品读数,来判断是否存在支原体的污染。B/A < 1 时样品支原体阴性, > 1.2 为阳性, 1.0 ~ 1.2 需要复检。

5. 统计学方法:使用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计分析,配对样本的一致性分析采用 McNemar 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用以下的统计参数比较 3 种方法的结果:敏感度(%) = 真阳性/

(真阳性 + 假阴性) × 100%; 特异性(%) = 真阴性/(真阴性 + 假阳性) × 100%; 阳性结果的预测值(%) = 真阳性/(真阳性 + 假阳性) × 100%; 阴性结果预测值(%) = 真阴性/(真阴性 + 假阴性) × 100%; 准确性(%) = (真阳性 + 真阴性)/总例数 × 100%。

结 果

1. 实验细胞支原体污染的阳性率:通过精氨酸肉汤培养法和半流体培养法对 127 例样品进行了支原体检测,结果发现有 31 例为阳性。127 例样品中,有 94 例来自本中心保藏细胞,其中 11 例为支原体阳性,阳性率为 11.7%;有 33 例样本为外来细胞,其中有 20 例为阳性,阳性率达 60.6%(表 2)。

表 2 培养法支原体检测结果(n)

来源	阳性例数	阴性例数	总例数	阳性率(%)
国家实验细胞资源共享服务平台	11	83	94	11.7
其他实验室	20	13	33	60.6
总计	31	96	127	24.4

通过 PCR 法检测了 245 例细胞培养上清,结果发现有 83 例为阳性(图 1)。例如, UACC812(人乳腺导管瘤细胞)和 HepG₂(人肝癌细胞)培养上清的 PCR 产物出现了 ~ 500bp 的阳性条带,但经过 BM-cyclin 处理去除支原体污染后再检测阳性条带消失。培养用试剂如含有 10% 胎牛血清的完全培养基、0.05% 的胰酶及磷酸缓冲液 PBS 均为阴性。245 例

样品中,有 189 例来自本中心保藏细胞,其中 46 例为阳性,阳性率为 24.3%;有 56 例为外来细胞培养上清,其中 36 例为阳性,阳性率达 64.3%(表 3)。

2. 单阳性样品的复检:127 例培养上清采用培养法和 PCR 法联合检测,结果 87 例为双阴性,27 例为双阳性,另外 13 例为单阳性的样品,其中 9 例为 PCR 阳性、培养法阴性,4 例为培养法阳性、PCR 阴性。研

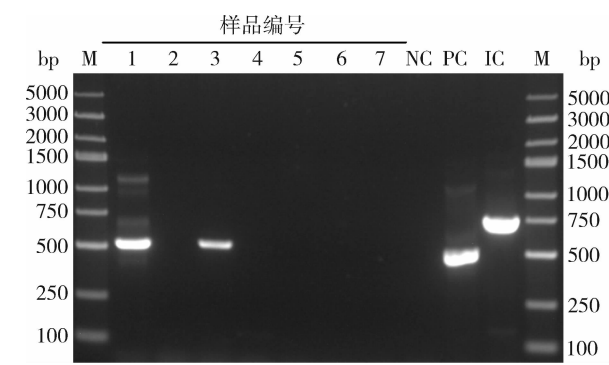


图 1 实验细胞支原体检测的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

1,2. UACC812(人乳腺导管瘤细胞)支原体去除前、后的培养上清;3,4. HepG₂(人肝癌细胞)支原体去除前、后的培养上清;5. 含有 10% 胎牛血清的完全培养基;6. 0.05% 胰蛋白酶;7. 磷酸缓冲盐溶液。NC. 阴性对照(ddH₂O);PC. 阳性对照;IC. 内对照;bp. 引物对;M. DNA marker

究中将这 13 种细胞取与初次检测相同的冻存批次重新复苏,在无抗生素的条件下培养 4 天以上,重新取样,采用 PCR 法、培养法和化学发光法检测是否存在支原体的污染。复检后有 9 种细胞 3 种方法检测均为阳性,其中 8 例在初次检测中培养法阴性,1 例 PCR 法阴性。另外 4 种细胞在复检的时候 PCR 法和培养法的结果仍不一致。通过化学发光法的检测,发现 IPEC - J2B(猪小肠上皮细胞)和 NHBT - P13(兰州黑白花奶牛舌尖细胞)为支原体阳性,与培养法结果一致;NCI - H508(人结肠癌细胞)和 NHBN - P13(兰州黑白花奶牛鼻镜细胞)分别为阳性和阴性,与 PCR 法结果一致(表 4)。

3. 假阳性与假阴性结果的判断:有 127 例细胞培养上清同时用培养法和 PCR 法检测支原体感染的情况,检测结果见表 5。综合初检和复检的结果,培养

表 3 PCR 法支原体检测结果

来源	阳性例数(n)	阴性例数(n)	总例数(n)	阳性率(%)
国家实验细胞资源共享服务平台	46	143	189	24.3
其他实验室	36	20	56	64.3
总计	82	163	245	33.5

表 4 初检结果不一致的样品复检结果

编号	细胞	名称	初检		复检			感染支原体的种类
			培养法	PCR 法	培养法	PCR 法	生物发光法(B/A)	
1	BALB/c 3T3	小鼠胚胎成纤维细胞	-	+	+	+	+(4.56)	猪鼻支原体
2	Ca Ski	人宫颈癌细胞	-	+	+	+	+(6.64)	其他种类的支原体
3	F9C9	小鼠杂交瘤细胞	-	+	+	+	+(25.17)	猪鼻支原体
4	HCT116	人结直肠癌细胞	-	+	+	+	+(47.34)	猪鼻支原体
5	HCT-8	人结直肠癌细胞	-	+	+	+	+(14.23)	莱氏无胆甾支原体
6	INS-1	大鼠胰岛细胞瘤细胞	-	+	+	+	+(20.20)	猪鼻支原体
7	PC-3M-2B4	人前列腺癌细胞	-	+	+	+	+(27.94)	猪鼻支原体,精氨酸支原体
8	PC-3M-1E8	人前列腺癌细胞	-	+	+	+	+(99.13)	猪鼻支原体,口腔支原体,精氨酸支原体
9	NCI-H508	人结直肠癌细胞	-	+	-	+	+(4.84)	猪鼻支原体
10	IPEC-J2B*	猪小肠上皮细胞	+	-	+	-	+(1.34)	未检出
11	NHBN-P13*	兰州黑白花奶牛鼻镜细胞	+	-	+	-	-(0.85)	未检出
12	NHBT-P13*	兰州黑白花奶牛舌尖细胞	+	-	+	-	+(1.36)	未检出
13	NHBT-P18*	兰州黑白花奶牛舌尖细胞	+	-	+	+	+(18.07)	口腔支原体

* 这 4 种细胞是来自于同一个实验室

表 5 培养法和 PCR 法支原体检测结果比较(n=127)

方法	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
培养法	39	88	30.7
PCR 法	37	90	29.1
总计	40*	87#	31.5

* 培养法或 PCR 法检测出的阳性样品数;# 培养法和 PCR 法检测出的阴性样品数

法显示有 39 例样品(30.7%)为支原体阳性,PCR 法检测有 37 例(29.1%)阳性。共计有 40 例细胞培养上清被培养法和(或)PCR 法判定为支原体污染。阳性率为(31.5%),高于单一的检测方法。结合生物发光法的检测,发现培养法和 PCR 法在检测支原体时均没有假阳性,二者均显示了很好的特异性和阳性结果的预测值。然而,就敏感度、阴性结果的预测值

和准确性而言,在初次检测中 PCR 法要优于培养法。复检时延长培养时间至 4 天以上,培养法的检测结果要优于 PCR 法(表 6)。但是,经过配对的 McNemar 检验,尚不能认为两种方法的阳性率不同($P = 0.317$),即两种方法检测支原体具有较好的一致性。

4. 污染支原体种类的分析:对 83 例 PCR 法阳性的样本进一步分析了感染支原体的种类,检测种类包括精氨酸支原体、口腔支原体、猪鼻支原体、莱氏无胆甾支原体和唾液支原体,检出情况见表 6。其中感染了前 4 种常见的牛源性支原体的有 60 例,占 72.3%。PCR 后经琼脂糖凝胶电泳发现,有的样品可以同时存在多种支原体的感染(图 2),如 PC-3M-IE8(人前列腺癌细胞),甚至同时存在精氨酸支原体、口腔支

原体、猪鼻支原体和唾液支原体等 4 种支原体的感染(图 2H)。

表 6 培养法和 PCR 支原体检测的统计结果

统计参数		培养法	PCR 法
初检	敏感度	31/40(77.5%)	36/40(90%)
	特异性	87/87(100%)	87/87(100%)
	阳性结果的预测值	31/31(100%)	36/36(100%)
	阴性结果的预测值	87/96(90.6%)	87/91(95.6%)
	准确性	118/127(92.9%)	123/127(96.9%)
复检	敏感度	39/40(97.5%)	37/40(92.5%)
	特异性	87/87(100%)	87/87(100%)
	阳性结果的预测值	39/39(100%)	37/37(100%)
	阴性结果的预测值	87/88(98.9%)	87/90(96.7%)
	准确性	126/127(99.2%)	124/127(97.6%)

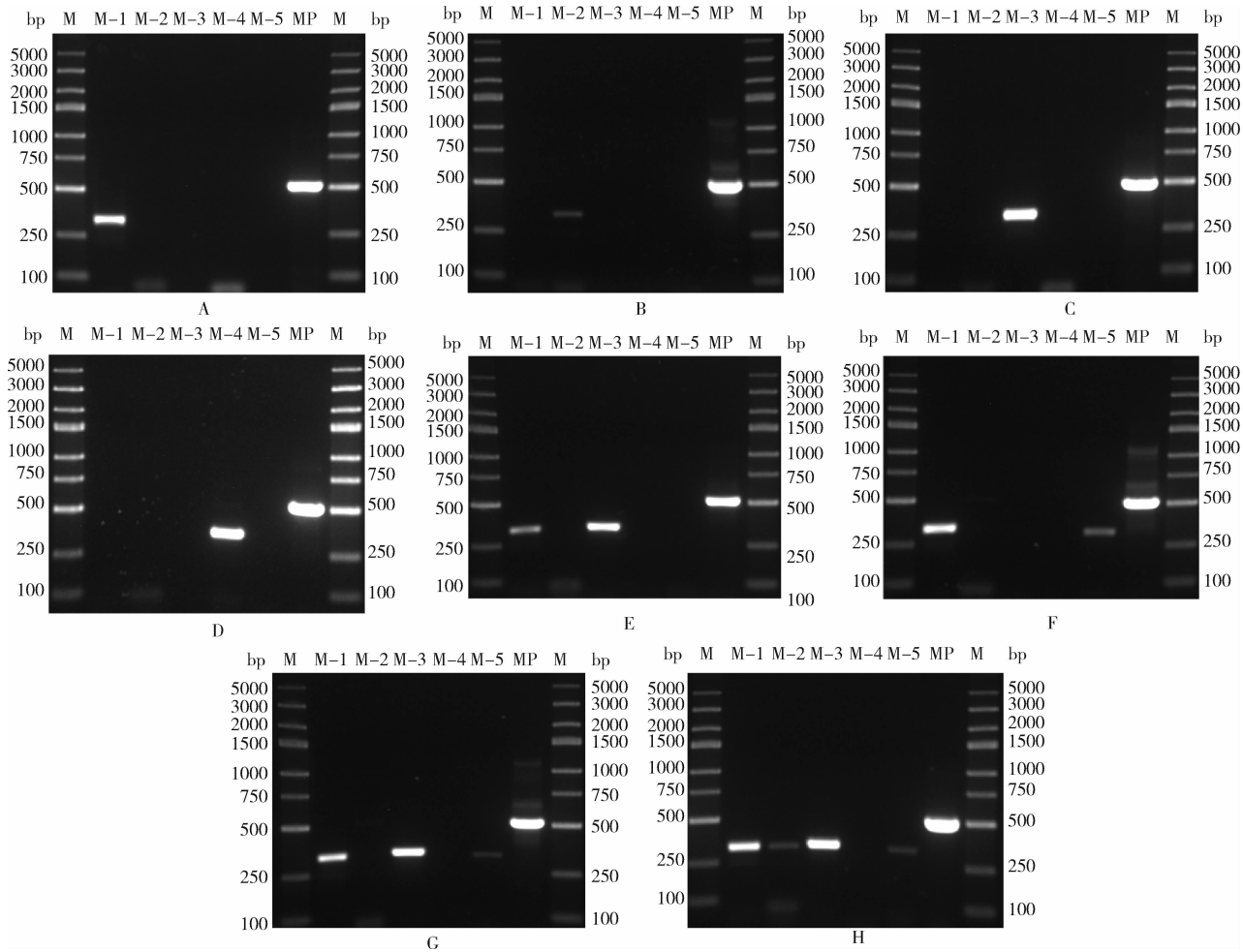


图 2 感染不同种类支原体的样品 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

A. 人宫颈癌细胞(HeLa 229);B. 小鼠前胃癌细胞(MFC-B5-GFP);C. 人巨核白血病细胞(UT-7);D. 人结直肠癌细胞(Colo320DM-RFP);E. 小鼠黑色素瘤细胞(B16-Muc1);F. 人多发骨髓瘤细胞(U266);G. 人肝癌细胞(Hep G2);H. 人前列腺癌细胞(PC-3M-IE8);M-1. 精氨酸支原体;M-2. 口腔支原体;M-3. 猪鼻支原体;M-4. 莱氏无胆甾支原体;M-5. 唾液支原体;MP. 通用引物;M. DNA 相对分子质量标准;bp. 引物对

表 7 培养法和 PCR 法支原体检测的一致性分析 (n)

培养法	PCR 法		总计
	阳性例数	阴性例数	
阳性例数	36	3	39
阴性例数	1	87	88
总计	37	90	127

表 8 PCR 法检测感染支原体的类型

支原体种类	阳性例数	阳性率 (%)
精氨酸支原体	30	36.1
口腔支原体	7	8.4
猪鼻支原体	31	37.3
莱氏无胆甾支原体	5	6.0
唾液支原体	13	15.7
其他类型支原体	23	27.7
总计	83 *	100

* 有些样品可能被多种支原体污染

讨 论

支原体感染一直是细胞培养过程中令人头痛的问题。目前其检测方法有培养法、Hoechst33258 荧光染色法、PCR 法、Real-time PCR 法、生物化学检测法、扫描电镜等,最常用的是前 3 种^[6,9-15]。培养法作为一种非特异性的支原体检测方法,绝大多数支原体均可通过培养检出,因此国家实验细胞资源共享平台一直参照《中国药典》,将该方法作为实验细胞支原体感染检测的金标准。但是培养法耗时长,在某些需要快速做出“去/留”决定的检测时,如引入新细胞时,这种方法并不适用^[6]。PCR 法检测支原体快速、灵敏、成本低,而且阐释客观、结果可重复,便于记录。有多篇文献报道了通过单一或巢式 PCR 进行广谱或精确种类的支原体检测,大多数是采用支原体 16S rDNA 中含有的保守序列作为扩增的靶序列^[12,16,17]。

目前市场上也有多种商品化的试剂盒,直接取细胞培养上清作为模板进行 PCR 反应,通过琼脂糖凝胶电泳观察有无阳性条带来判断结果。但是培养上清中可能会存在一些未知的细胞分泌物,这些成分会抑制 PCR 反应体系中 Taq 聚合酶的活性,从而引起假阴性。所以,本研究中是采用离心柱的方法对细胞培养上清中的可能存在的支原体 DNA 进行了分离和纯化,并且构建了内对照的质粒模板,来排除 PCR 反应体系的问题。

据文献报道,细胞培养中支原体污染的阳性率在 15.0%~88.7%,美国为 15%,荷兰在 25% 以上,德国为 28%,前捷克为 37%,伊朗为 57.5%,日本为 80%,墨西哥为 88.7%^[6,12]。本研究中联合培养法

和 PCR 法发现,来自于其他实验室的细胞支原体污染的阳性率(66.1%,37/56)远高于中心保藏细胞(24.3%,46/189)。只有通过严格质控,生长状态良好、支原体检测阴性、无种内或种间交叉污染的细胞才能被国家实验细胞资源共享平台保藏、对外共享。但是由于过去仅采用培养法检测支原体,且取样前细胞在无抗生素的培养基中常规培养 3 天,使得某些支原体污染程度较轻的细胞没有检测出来。本研究中,同时使用了敏感度更高的 PCR 法,且延长取样前无抗生素培养时间至 4 天以上,使得本中心的细胞支原体的检出率也有所提高。进一步本文利用支原体种类特异性的引物对 83 例阳性样品进行了扩增,发现四种牛源性的支原体——精氨酸支原体、口腔支原体、猪鼻支原体、莱氏无胆甾支原体,感染率达 72.3%,唾液支原体占 15.7%,其他支原体感染占 27.7%。有的样品甚至同时检出了两种或多种支原体。这一结果提示使用质检合格的血清、培养基制品以及严格无菌操作才能有效地预防培养细胞的支原体感染。对于支原体污染的细胞,本中心常规丢弃或者替代,但是某些比较珍贵的细胞采用 BM-cyclin 处理以去除支原体。

本研究的目除了分析国内实验细胞支原体污染的情况外,还要比较培养法和 PCR 法的检出情况。对 127 例同时用培养法和 PCR 法进行支原体检测的细胞培养上清,其检测结果经配对的 McNemar 检验,证明两种方法检测支原体具有较好的一致性($P > 0.05$)。培养法作为金标准,其检测结果只有假阴性,没有假阳性。培养法敏感度较低是其出现假阴性结果的重要原因。另外,经鉴定污染支原体的种属,发现 37.3% 的阳性细胞被猪鼻支原体污染。这种支原体很难培养,在初检中 9 例培养法阴性、PCR 法阳性的样本,经鉴别有 7 例是感染了该种支原体,所以这是导致培养法假阴性的另一个原因。对于初检中结果不一致的样品,联合使用生物发光法进行复检时,发现 PCR 法检测支原体同样仅有假阴性,没有假阳性。导致 PCR 法假阴性的原因是感染支原体种类的问题。PCR 法中所用的引物不够广谱,未能与感染该类型的支原体 DNA 发生特异性结合,而导致了假阴性的出现。因此,联合使用两种方法,可以减少假阴性,避免支原体污染细胞的漏检。

总之,培养法和 PCR 法在培养细胞的支原体检测方面有较好的一致性。培养法为非特异性检测,可培养出的支原体种类广泛,但是敏感度低,而 PCR 法

灵敏、快速,但是局限于某些支原体的种类,两者的检测结果只有假阴性,没有假阳性。因此,在支原体检测中应该联合使用两种方法,并且延长取样前的细胞在无抗生素培养基中的培养时间,以避免假阴性,提高阳性检出率。另外经统计,中心以外实验室来源的样品支原体感染率已经达 60% 以上,严重影响研究结果的可靠性。在此强烈建议科研人员在细胞培养的过程中,使用合格制剂,严格无菌操作,预防支原体感染,并且定期采用两种不同的方法检测支原体,以保证实验结果的准确性。

参考文献

- 1 Yu T, Wang Y, Zhang H, *et al.* Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC - 1 cells[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016,408(16): 4267 - 4273
- 2 Denecke J, Becker K, Jurgens H, *et al.* Falsification of tetrazolium dye (MTT) based cytotoxicity assay results due to mycoplasma contamination of cell cultures[J]. *Anticancer Res*, 1999,19(2A): 1245 - 1248
- 3 Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA, Uphoff CC. False and mycoplasma - contaminated leukemia - lymphoma cell lines: time for a reappraisal[J]. *Int J Cancer*, 2017,140(5): 1209 - 1214
- 4 Kim BC, Kim SY, Kwon YD, *et al.* Mycoplasma detection and elimination are necessary for the application of stem cell from human dental apical papilla to tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Biomater Res*, 2015,19: 6
- 5 Olarerin - George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA - seq archive[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015,43(5): 2535 - 2542
- 6 Falagan - Lotsch P, Lopes TS, Ferreira N, *et al.* Performance of PCR - based and Bioluminescent assays for mycoplasma detection[J]. *J Microbiol Methods*, 2015,118: 31 - 36
- 7 Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations in

- cell cultures by PCR analysis[J]. *Hum Cell*, 1999,12(4): 229 - 236
- 8 Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002,38(2): 79 - 85
- 9 Molla Kazemiha V, Bonakdar S, Amanzadeh A, *et al.* Real - time PCR assay is superior to other methods for the detection of mycoplasma contamination in the cell lines of the National Cell Bank of Iran[J]. *Cytotechnology*, 2016,68(4): 1063 - 1080
- 10 Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, *et al.* Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test[J]. *Leuk Res*, 2008,32(2): 323 - 326
- 11 Cheong KA, Agrawal SR, Lee AY. Validation of nested PCR and a selective biochemical method as alternatives for mycoplasma detection[J]. *J Basic Microbiol*, 2011,51(2): 215 - 219
- 12 Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention[J]. *Cytotechnology*, 2002,39(2): 75 - 90
- 13 Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, *et al.* Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green - based real - time polymerase chain reaction[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006,42(3 - 4): 63 - 69
- 14 Jean A, Tardy F, Allatif O, *et al.* Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes[J]. *PLoS One*, 2017,12(2): e0172358
- 15 Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures[J]. *Nat Protoc*, 2010,5(5): 929 - 934
- 16 Lawrence B, Bashiri H, Dehghani H. Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms[J]. *Biologicals*, 2010,38(2): 218 - 223
- 17 Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction[J]. *Methods Mol Biol*, 2011,731: 93 - 103

(收稿日期:2017 - 11 - 21)

(修回日期:2017 - 11 - 27)

(上接第 24 页)

- 15 Brudno JN, Kochenderfer JN. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management[J]. *Blood*, 2016,127(26): 3321 - 3330
- 16 Oluwole OO, Davila ML. At The Bedside: Clinical review of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for B cell malignancies[J]. *J Leukoc Biol*, 2016,100(6): 1265 - 1272
- 17 蒋卉男. 复发难治 B 系淋巴瘤 CAR - T 治疗后细胞因子变化[J]. *实用药物与临床*, 2016,19(10): 1277 - 1280
- 18 Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, *et al.* Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T - cell therapy for acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Discov*, 2016,6(6): 664 - 679
- 19 Makita S, Yoshimura K, Tobinai K. Clinical development of anti - CD19 chimeric antigen receptor T - cell therapy for B - cell non - Hodgkin lymphoma[J]. *Cancer Sci*, 2017,108(6): 1109 - 1118
- 20 Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, *et al.* Chemotherapy - re-

- fractory diffuse large B - cell lymphoma and indolent B - cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti - CD19 chimeric antigen receptor[J]. *J Clin Oncol*, 2015,33(6): 540 - 549
 - 21 Tasian SK, Gardner RA. CD19 - redirected chimeric antigen receptor - modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B - cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)[J]. *T - her Adv Hematol*, 2015,6(5): 228 - 241
 - 22 罗晓庆, 曾韞璟, 张诚, 等. CAR - T 细胞治疗复发/难治性急性淋巴细胞白血病的临床观察——附 3 例报告[J]. *中国输血杂志* 2016,29(10): 1096 - 1098
 - 23 姚超, 钱程. CAR - T 细胞在肿瘤治疗中的机遇与挑战[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017,24(1): 6 - 11
 - 24 Wilkins O, Keeler AM, Flotte TR. CAR T - cell therapy: progress and prospects[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2017,28(2): 61 - 66
- (收稿日期:2017 - 09 - 13)
- (修回日期:2017 - 10 - 04)