

细胞污染及检测鉴定

陈琳^{1,2} 陈鲤群^{1,2*}

(¹福州大学应用基因组学研究所, 福州 350108; ²福州大学生物科学与工程学院, 福州 350108)

摘要 细胞作为重要的实验模型广泛应用于各类实验, 几乎所有科研实验室中均需进行细胞培养。细胞培养过程中最大的威胁就是细胞污染, 凡是混入细胞培养环境中, 对细胞生存有害的成分和造成细胞不纯的异物都应视为污染。细胞一旦遭到污染, 所有的实验结果都会变得毫无意义。因此, 及时检测并鉴定出所培养的细胞是否被污染至关重要。该文总结了细菌污染、真菌污染、支原体污染、细胞交叉污染和鞘氨醇单胞菌污染这五类细胞污染及其检测方法, 并提出了相关污染的预防措施及几种常见清除方法以供参考。

关键词 细胞污染; 污染分类; 鉴定

Detection and Identification of Cell Contamination

Chen Lin^{1,2}, Chen Liqun^{1,2*}

(¹Fuzhou University, Institute of Applied Genomics, Fuzhou 350108, China;

²College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract Cell lines are used extensively in various research as an important experimental model. Almost all research laboratories cultured cells. The most serious threat in cell culture is cell contamination. Ingredients and impurities which mixed into the cell culture environment, harmful to cells or caused cell impurities should be considered as contamination. Once the cells have been contaminated, all the results will be meaningless. Therefore, detection and identification of cell contamination in time is essential. This paper introduces the bacterial contamination, fungal contamination, mycoplasma contamination, cell cross-contamination, *Sphingomonas* pollution and some detection methods thereof. Additionally, several preventive measures and common cleaning methods are put forward so as to provide a reference for future reference.

Keywords cell contamination; pollution category; detection

过去几十年里, 细胞作为模型被广泛应用于各种科学实验、医疗研究或制药工业中。细胞因其能够替代组织或实验用生物进行体外测试的特点, 成为各类研究、药物开发或生产的基础。随着生物学的迅速发展, 几乎所有实验室均需进行细胞培养, 因此成功的细胞培养成为了各类细胞实验的基础。然而在细胞培养过程中, 会因取材不当、操作不慎或

灭菌不彻底等各种各样的原因导致细胞污染。若细胞遭到污染, 会导致时间及科研经费的浪费、实验数据有误、实验结果不可靠和实验无法重复等一系列严重的后果^[1]。若受污染的细胞系被用于疫苗或药物的开发或生产, 则下游生物制品的质量将受到严重影响^[2-4]。因此, 了解各类细胞污染类型并及时进行检测鉴别, 从而清除污染, 是成功培养细胞的关键。

收稿日期: 2016-09-12 接受日期: 2016-12-21

国家自然科学基金(批准号: 31500616)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22863805, E-mail: chenliqunair@hotmail.com

Received: September 12, 2016

Accepted: December 21, 2016

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (Grant No.31500616)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22863805, E-mail: chenliqunair@hotmail.com

网络出版时间: 2017-03-20 16:43:55

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1643.010.html>

键之一,也是成功实验的基础。细胞污染有细菌污染、真菌污染、支原体污染、病毒污染、昆虫和寄生虫污染、化学污染和细胞交叉污染等多种类型^[5]。

1 细菌、真菌污染

细菌和真菌污染是最常见的两类细胞污染类型。其中,常见的细菌污染有枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)等,常见的真菌污染有烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、毛霉菌(*Mucor*)、白色念珠菌(*Monilia albicans*或*Canidia albicans*)和酵母菌(*yeast*)等。

细菌和真菌污染很容易被检测,因为受到细菌、真菌污染的细胞,培养过程中培养基会出现肉眼可见的明显特征。细菌污染会导致培养基出现浑浊、颜色改变以及pH值急剧变化,受污染的贴壁细胞在几天内会逐渐脱壁死亡。真菌污染后的细胞生长速度变慢,培养基中会漂浮白色、浅黄色或黑色的小点^[1]。因此,通过观察培养基的颜色、漂浮物、pH值或在显微镜下观察细胞及其生长状态,从而能初步判断该细胞是否受细菌、真菌污染。

除了直接观察进行判断外,还可以使用培养检测法。将细胞培养物在各类培养基中适温培养若干天后,观察是否有细菌或真菌生长。其中,在营养琼脂培养基(*nutrient agar*)、血琼脂培养基(*blood agar*)和麦康凯琼脂培养基(*MacConkey agar*)中,37℃下培养可用于检测好氧细菌;在巯基乙酸盐肉汤培养基(*thioglycolate broth*)中37℃下培养可用于检测厌氧菌;在沙氏葡萄糖肉汤培养基(*Sabouraud's dextrose broth*)中30℃下培养10~14天后涂片观察可用于检测其他特殊菌^[6]。

2 支原体污染

细胞污染是世界细胞库面临且长期存在的一大问题。每年都会由于细胞污染导致数万美元的损失。而在这些污染之中,支原体污染是首要威胁^[7]。支原体是广泛存在于自然界中能独立生活的最小微生物^[8],直径300~800 nm,能在细胞内繁殖,且细胞壁的缺乏使其对常见抗生素如青霉素和链霉素具有更高的耐受性^[9],其灵活、小规模和多态性使它更容易透过0.22~0.45 μm滤膜。自1956年Robinson等^[10]

第一次报道支原体污染以来,世界各地实验室细胞库开始重视并检测细胞中是否存在支原体污染。有文献指出,细胞培养过程中,支原体感染发生率高达30%~60%^[11]。因此,及时、准确地检测出所培养的细胞是否有支原体污染至关重要。

污染细胞的支原体主要有人源、猪源和牛源三类,大部分是发酵支原体(*Mycoplasma fermentans*)、猪鼻支原体(*M. hyorhinis*)、口腔支原体(*M. orale*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、梨支原体(*M. pirum*)、唾液支原体(*M. salivarium*)、莱氏无胆甾支原体(*Acholeplasma laidlawii*)和人型支原体(*M. hominis*)^[12-15]。

支原体污染会影响细胞的形态、功能、代谢、细胞膜、生长速率、诱导染色体畸变、细胞内信号传导等各种细胞特性^[16-17]。受支原体污染的细胞在培养时培养基的pH值不会发生改变,也不会浑浊,因此,很难直接观察出细胞是否受到污染^[18]。常用的支原体检测方法有培养法、DNA荧光染色法、酶联免疫吸附法和PCR法等。

2.1 培养法

培养法是最传统的检测方法,该方法能直观地显示是否存在支原体污染。将细胞培养物置于PPLO肉汤培养基(*pleuropneumonia-like organisms broth base*)中,37℃培养3天后离心,将沉淀物转移至PPLO琼脂培养基相同条件下培养4~6周^[19],观察是否有“煎鸡蛋”样菌落出现,若有即为支原体污染^[6]。

这种方法简单易行,但耗时比较长,且存在不少缺陷。支原体由于遗传缺陷,导致某些代谢途径缺失,其生长很大程度依赖于培养基的成分^[20]。在配制培养基时,任何成分质量或批次的不同都会影响支原体的生长,从而影响检测的灵敏度^[21-22]。不同的生长条件(如好氧、厌氧、微氧等)也会影响检测结果,易导致假阳性^[23-24]。此外,还有许多支原体无法培养^[25],因此,使用培养法的检测结果并不全面。

2.2 DNA荧光染色法

DNA荧光染色法是基于使用荧光染料DAPI或Hoechst 33258的细胞化学染色法。荧光染料能选择性的结合细胞和支原体DNA的小沟,因此,在准备过程中,任何存在的DNA均会被染色^[26-27]且DNA-DAPI复合物吸收波长为340~488 nm^[9]。将待测细胞单层培养至70%~90%汇合度时,用细胞刮刀收取,以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ ~ $1 \times 10^5/\text{mL}$ 浓度转接至盖玻片上培养

12~24小时^[28],用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,并在37℃下用DAPI-甲醇溶液染色15分钟,无菌水洗涤并烘干后置于柠檬酸缓冲液(pH5.5):甘油(2:1)条件中,用指甲油密封^[29]。处理后的玻片置于荧光显微镜下观察,被支原体污染的细胞经染色后,细胞核外与细胞周围可看到许多大小均一的荧光点。

2.3 ELISA法

酶促反应作为生物化学检测手段可应用于培养细胞中支原体的检测,如通过测乙酸激酶、氨基甲酸激酶^[30-32]等各类酶的活性,能快速、灵敏地对细胞培养物进行筛选检测。

酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂可通过商业渠道购买,其中包括针对细胞培养过程中常见支原体/胆甾原体抗原的多克隆抗体。用于检测的抗体与生物素共轭结合后,链霉亲和碱性磷酸酶水解4-硝基苯基磷酸生成黄色的硝基苯酚产物,在405 nm波长下通过酶标仪量化^[33]。ELISA检测支原体污染有较好的特异性和敏感性,最显著的优点是能一次检测大量样品。

2.4 基于DNA聚合酶链式反应(PCR)的扩增检测

PCR技术是根据DNA高温变性、低温退火、适温延伸的原理进行的扩增技术。

自Uemori等^[34]公布了12种支原体16S-23S rRNA区域的序列后,应用PCR技术进行支原体检测的研究迅速发展。16S、16S-23S、23S rRNA是支原体基因组内的保守区域,根据这些区域的序列设计特异性引物,使用PCR的方法扩增后,利用琼脂糖凝胶电泳进行检测,通过比对分析扩增产物的大小,可进行支原体感染的初步分析鉴定。

PCR检测法与传统培养或荧光染色技术相比,具有快速、稳定、易重复及灵敏度高等特点^[35-36]。但易受其他污染物如细菌、真菌影响导致假阳性结果,且仍处于实验室研究阶段,尚无标准、准确的一套检测方案^[37]。

3 细胞交叉污染

细胞交叉污染问题来源已久,在上世纪七八十年代,细胞库中多达三分之一的细胞是被其他细胞系冒名顶替的,其中最著名的一个例子就是HeLa细胞系。HeLa细胞系是成立约翰·霍普金斯大学医学院(Johns Hopkins Medical School)的George Gey于1951年从一位31岁的已是四个孩子的母亲Henrietta

Lacks身上获得的宫颈癌细胞,也是研究者首次成功培养的人类癌症细胞系。随后几年里,几乎所有癌症基础研究实验室都开始培养HeLa细胞用于研究^[38]。在培养过程中,HeLa细胞生长速度惊人,并在不知不觉中取代了研究者培养的其他细胞,最终导致许多实验室所培养的细胞虽然贴着原来的细胞标签,但实际上已经被HeLa细胞替代了。1966年,细胞组织器官培养第二次十年回顾会议上, Gartler^[39]首次报道所谓独立起源的18个人源细胞系都是HeLa细胞。除了被其他细胞污染替代外,由于实验人员贴错标签导致细胞错认也经常发生,但在此前很长一段时间内,许多人由于自满,刻意否认和抵抗这一事实。与此同时,研究者们仍用错误的细胞进行实验、发表论文,导致许多论文结果均不可信^[40]。因此,时刻关注所培养的细胞是否单一且正确,是实验过程中必不可少的一个步骤。常见的细胞鉴定法有同工酶图谱分析法、人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)分型法和短串联重复序列(short tandem repeat, STR)图谱分析法等。

3.1 同工酶谱分析

同工酶是一组具有同一催化作用,但组成、理化性质和结构不同的酶,存在于高等生物细胞内,如乳酸脱氢酶、嘌呤核苷磷酸化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶,不同来源的细胞具有不同的同工酶分布,通过凝胶电泳分离后,对电泳带型和相对迁移距离进行分析,常用于细胞系种属鉴定^[41]。

进行同工酶谱分析时,首先要提取细胞的内同工酶,然后在冰浴上进行凝胶电泳,最后进行显色后即可得到所测样本的同工酶谱,对所得图谱进行分析即可判断细胞是否为同一种属。

同工酶谱分析能有效判断所培养的细胞是否为同一种细胞,且有一套商业化的分析系统被应用于细胞库中细胞系误认的检测^[42]。但有研究表明,污染的细胞至少需要占总细胞数量的25%,其同工酶才能被检测出来^[43]。

3.2 HLA的DNA分型技术

人类白细胞抗原(HLA)复合体是人类的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)。不同个体HLA基因中的碱基有较大差异,造成核酸限制性内切酶识别位点及酶切位点数目不同,因此,产生数量和长度不等的DNA酶切片段的长度多态性(restriction fragment length polymorphism,

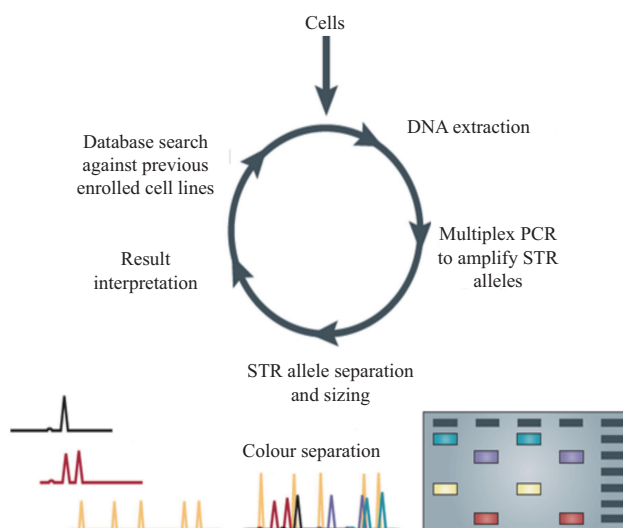


图1 短串联重复序列分析方法(根据参考文献[40]修改)

Fig.1 Short tandem repeat analysis (modified from the reference [40])

RFLP)。用特异性探针和整个基因组DNA酶切片段进行杂交,即可分析定型^[44]。

3.3 细胞STR图谱分析和单核苷酸多态性分析

短串联重复序列(STR)基因座由长度为1~6 bp简单的串联重复序列组成,这些重复序列广泛分布于人类基因组中,且具有高度的长度多态性。进行STR图谱分析时,先要提取细胞样品基因组,随后用所设计的混合引物进行荧光PCR,每一个STR位点均能被扩增且扩增产物标记上不同颜色的荧光,通过毛细电泳分离后得到不同大小的片段,将片段大小转换为等位基因峰图,通过峰图与参考数据库中的图谱进行比对后即能分析是否存在细胞交叉污染^[45]。过程如图1所示。

近年来,大量研究表明,STR基因分型法是进行细胞交叉污染鉴定最有效且准确的方法^[45]。此方法弥补了同工酶法只能进行细胞种属鉴别的不足,具有多态性高、数目多、稳定性高、检测灵敏等优点^[46]。关于人源细胞STR的实验有一套国际性的操作标准^[47]。短串联重复序列(STR)谱被广泛应用于各大生物资源中心细胞系的认证,包括德国菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ)、美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC)、日本癌症资源库(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, JCRB)和日本理化学研究所(Rikagaku KENkyusho/Institute of Physical and Chemical Research, RIKEN)。STR实验结果可在网上公开的人源细胞系STR分型共

享数据库中进行比对^[48],因此,许多科学家均呼吁使用人源细胞进行的实验论文发表前,都应提交STR鉴定图谱^[49]。

然而STR分型存在局限性,已有报道指出,广泛使用的细胞系(如Jurkat)在错配修复时会引起许多缺陷导致错配识别蛋白MutS或MutL功能缺失,在长期培养后,其STR特征会发生改变,导致错误的认证结果^[50]。因此,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)基因分析成为了另一种可用于跟踪生物样品的DNA分析方法,通过分析24个SNP指纹图谱来认证细胞^[51],对于衍生自近亲杂交的小鼠细胞的分型鉴定也有望通过SNP得到解决^[52]。但基于SNP的细胞鉴定方法尚未成为美国国家标准学会(American National Standards Institute, ANSI)批准的标准认证方法^[53]。

4 鞘氨醇单胞菌污染

鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas sp. Shah*)类属变形菌门,是Tahir等^[54]发现的一种新型细胞培养污染物。该污染物是从牛肾细胞(bovine kidney cell, MDBK)中分离出来的,能在含高浓度葡萄糖的改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle media, DMEM)中生长。鞘氨醇单胞菌污染的48小时潜伏期内,培养基底部会出现白色小圆点,5天左右这些小圆点逐渐清晰可见,到了14天左右时会在培养皿底部形成致密层,但不会造成培养基浑浊。鞘氨醇单胞菌能入侵多种哺乳动物细胞,造成如核周区域

空泡、细胞质颗粒和细胞膜起泡等各种各样的细胞病变^[54]。

鞘氨醇单胞菌的特殊之处在于它暂时没有有效快速的检测、预防和清除方法。Tahir等^[54]尝试使用检测细菌、真菌和支原体的培养基对细胞污染物进行培养,结果显示,细胞污染物在胰蛋白酶大豆肉汤培养基、液体巯基乙酸盐肉汤培养基、营养琼脂培养基、血琼脂培养基、PPLO肉汤培养基和PPLO琼脂培养基中均没有生长。因此,实验者需谨慎对待此类细胞污染。

5 污染的预防与清除

对于培养的细胞来说,一旦遭到污染,即使使用物理或化学的方法去除污染物,细胞的损伤也是无法修复的,因此细胞培养者的首要任务就是做好污染的预防工作。在细胞培养过程中,潜在的污染源主要有四大类:人源、环境、试剂耗材以及其他细胞系。

5.1 人源污染

首先,实验员身上夹带的灰尘、皮肤细屑、唾沫都会成为潜在的污染源,因此在进行细胞培养操作时,最好佩戴口罩和手套,避免唾沫中微生物的污染以及频繁洗手导致干燥、片状皮肤带来的颗粒污染^[5],且使用独立干净的实验服。其次,实验员操作时的失误如不同细胞使用了相同的实验器皿、标签错误等均会造成细胞污染,对此实验员在操作时必须谨慎,确保无误。

5.2 环境污染

环境中的污染源很多,首要污染源就是二氧化碳培养箱和水浴锅。首先,培养箱和水浴锅是霉菌、酵母等原核生物的聚集地,潮湿的环境和培养箱适宜的温度,为这些菌类提供了优良的生长环境,它们会通过放入其中的培养瓶、试剂瓶接触,从而再污染其他培养瓶甚至是直接污染细胞。因此,建议培养细胞时所需用水均使用无菌蒸馏水,每月定期

清洁培养箱、水浴锅、冰箱等仪器,可在其中放置0.05%苯扎氯铵(benzalkonium chloride)用于抑制微生物生长^[1]。其次就是细胞储存的环境,大多数实验室会将细胞储存于液氮中,而支原体虽然无法在液氮中繁殖,但它能够存活于液氮中,并通过液氮污染其中的细胞,因此,对于需要储存于液氮中的细胞,最好使用包裹管套的冻存管^[55]。

5.3 试剂耗材污染

影响最大的污染源就是实验用试剂及耗材,一旦遭到污染,那么将损失大量的细胞。细胞培养基和动物产品是使用频率最高的试剂也是污染的主要来源之一^[56]。大多数培养基无法高压灭菌,因此过滤除菌相当重要,必要时可以使用0.1 μm的过滤器进行过滤。精氨酸支原体和莱氏无胆甾支原体污染的主要来源是胎牛和小牛血清,猪鼻支原体的主要来源是胰蛋白酶^[57],除了过滤除菌外,也可以使用UV照射来消除潜在污染源且不损伤血清的成分^[15]。对于受污染的耗材,最好丢弃或经高压灭菌后再使用。

5.4 其他细胞系污染

最直接的污染源就是作为细胞起始培养材料的组织。因此,购买细胞时最好从信誉良好的正规渠道进行购买,对每一个进入实验室的细胞系都要在开始培养的初期就进行全面检测,没有问题之后再进一步进行实验或保存^[58]。在实验过程中,实验员应全面了解自己所使用细胞的各类特征特性,并在日常培养过程中时刻观察其形态和生长过程,特别是同时培养多种细胞系时,一旦发现细胞形态或生长特性有异,就应立刻进行检测,确保细胞系的单一无污染^[59]。

若培养的细胞不慎遭到了污染,那么可以尝试使用表1中的药物进行处理。

6 小结

细胞污染是细胞培养过程中常常会面临的挑战,且导致许多严重的后果。实验室的细胞一旦被

表1 细胞污染处理药物

Fig.1 Medicines used for cell contamination treatment

污染类型 Pollution type	处理药物 Treatment
Bacterial contamination	Penicillin/streptomycin, vancomycin, norfloxacin, cefazolin sodium
Fungal contamination	10% fluconazole sodium chloride, nystatin, griseofulvin
Mycoplasma contamination	Plasmocin, gentamicin, kanamycin

发现受到污染,除了实验室的信誉受到影响外,各类细胞实验结果均会遭到质疑,用受污染的细胞所制备的各类产品和药物均会贬值甚至禁止销售^[59]。此外,在受污染的细胞中生产的疫苗,会引发接种疫苗的动物或人感染疾病^[25,60]。因此,在任何涉及细胞培养的研究、开发或生产过程中,必须确保使用经过检测认定且低代数的细胞系^[61],并在实验过程中时刻检测所培养的细胞的状态,及时发现是否遭到污染。对于各种不同的污染类型都有不同的检测方法,通常情况下一种检测方法不能全面地检测出污染物,因此,需要根据细胞培养的状态选择合适的检测方法或几种检测方法联合使用。

检测并消除污染的同时,从根源上断绝污染也至关重要。污染通常源于操作不当、间接性细胞培养用品或外加的培养介质如血清、胰蛋白酶等^[62-65]。因此,规范实验操作、避免连续使用抗生素、拒绝“免费”细胞、从规范的细胞库购买细胞等各种方法都有助于减少实验室中的细胞污染。

细胞系认证报告能增加科研结果的可靠性,也可视为实验者对其研究结果充满自信的体现,缺乏该数据的论文常出现无法重复或后续实验失败的结果^[66-67]。因此,众多杂志和科学家均呼吁所有从事与细胞培养相关的研究者,做好细胞鉴定工作,并在论文发表时一并提交该报告^[68]。

除了培养过程中细胞污染导致的细胞问题外,细胞系的命名也是世界细胞库需要考虑的一大问题^[69]。在生物研究中,常常由于缺乏标准的细胞系命名法,而导致细胞系误认、细胞系交叉污染、细胞缺乏详细注释等问题,最终影响实验的可重复性^[70-75]。在各大细胞库元数据中,细胞系的命名缺乏一致性,同一个细胞在不同应用领域有不同的命名方式,其名称在大小写、缩写上略有区别,这在很大程度上影响了研究者检索的效率和有效性^[76-77]。许多科学家已经着手进行细胞标准化命名管理的研究^[69],但这并不容易,细胞的规范培养及管理还有很长的一段路要走。

参考文献 (References)

- Brinzeu DG, Feier V, Herbeck R, Cristodor P, Păunescu M, Condor A, *et al.* Microbial and fungal contamination of keratinocyte and fibroblast cell cultures. *J Exp Med Surg Res* 2008; 123-8.
- Baronti C, Pastorino B, Charrel R, de Lamballerie X. Mycoplasma removal: Simple curative methods for viral supernatants. *J Virol Methods* 2013; 187(2): 234-37.
- Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol* 2014; 106: 28.4.1-14.
- Jill N. Line of attack. *Science* 2015; 347(6225): 938-40.
- Ryan J. Understanding and managing cell culture contamination. Corning Incorporated. New York: Technical Publication CLS-AN-020, 2002.
- Mirjalili A, Parmoor E, Bidhendi SM, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals* 2005; 33(2): 81-5.
- Mcgarrrity GJ. Spread and control of mycoplasma infection of cell cultures. *In Vitro* 1976; 12(9): 643-48.
- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 62(4): 1094-156.
- Molla Kazemiha V, Bonakdar S, Amanzadeh A, Azari S, Memarnejadian A, Shahbazi S, *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. *Cytotechnology* 2016; 68(4): 1063-80.
- Robinson LB, Wichelhausen RH, Roizman B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science* 1956; 124(3232): 1147-48.
- Morozkin ES, Sil Nikov VN, Rykova EY, Vlassov VV, Laktionov PP. Extracellular DNA in culture of primary and transformed cells, infected and not infected with mycoplasma. *Bull Exp Biol Med* 2009; 147(1): 63-5.
- Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 2002; 38(2): 79-85.
- Dušanić D, Berčić RL, Cizelj I, Salmić S, Narat M, Benčina D. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*. *Vet Microbiol* 2009; 138(1): 114-9.
- Ueno PM, Timenetsky J, Centonze VE, Wewer JJ, Cagle M, Stein MA, *et al.* Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: Evidence for nuclear localization. *Microbiology* 2008; 154(10): 3033-41.
- Laleh N, Parvaneh F. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture. *Cell J* 2012; 13(4): 203-12.
- Kenny GE. CHAPTER 5-contamination of mammalian cells in culture by mycoplasmas. *Contamination in Tissue Culture* 1973; 49(10): 107-29.
- Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 1993; 11(4): 143-51.
- Coriell LL. CHAPTER 2-methods of prevention of bacterial, fungal, and other contaminations. *Contamination in Tissue Culture* 1973; 89(3): 29-49.
- Rottem S, Kosower NS, Kornspan JD. Contamination of tissue cultures by mycoplasma. Rijeka: INTECH Open Access Publisher, 2012, 35-8.
- Razin S. Structure and function in mycoplasma. *Annu Rev Microbiol* 1969; 23(1): 317-56.
- Guthertz LS, Griffith ME, Ford EG, Janda JM, Midura TF. Quality control of individual components used in Middlebrook 7H10 medium for mycobacterial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1988; 26(11): 2338-42.
- Windsor D, Windsor H. Quality control testing of mycoplasma medium. *Methods Mol Biol* 1998; 104: 61-67.
- Mcgarrrity GJ, Sarama J, Vanaman V. Factors influencing microbiological assay of cell-culture mycoplasma. *In Vitro* 1979;

- 15(2): 73-81.
- 24 Polak-Vogelzang AA, Haan HH, Borst J. Comparison of various atmospheric conditions for isolation and subcultivation of *Mycoplasma hyorhinis* from cell cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983; 49(1): 31-40.
- 25 Merten OW. Virus contaminations of cell cultures—A biotechnological view. *Cytotechnology* 2002; 39(2): 91-116.
- 26 Russell WC, Newman C, Williamson DH. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 1975; 253(5491): 461-2.
- 27 Chen TR. *In situ* detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977; 104(2): 255-62.
- 28 Andrade NM, Arismendi NL. DAPI Staining and fluorescence microscopy techniques for phytoplasmas. *Methods Mol Biol* 2013; 938: 115-21.
- 29 Uphoff CC, Gignac SM, Drexler HG. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines: II. Elimination with various antibiotics. *J Immunol Methods* 1992; 149(1): 55-62.
- 30 Mariotti E, Mirabelli P, Di NR, Fortunato G, Salvatore F. Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leuk Res* 2008; 32(2): 323-6.
- 31 Cheong KA, Agrawal SR, Lee AY. Validation of nested PCR and a selective biochemical method as alternatives for mycoplasma detection. *J Basic Microbiol* 2011; 51(2): 215-9.
- 32 Kazemiha VM, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R, *et al.* Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology* 2014; 66(5): 861-73.
- 33 Valley U, Scharfenberg K, Müller K, Ryll T, Wagner R. A rapid method for detection of mycoplasmas in mammalian cell cultures and comparison with other routine techniques. *Enzyme Microb Technol* 1995; 17(5): 391-400.
- 34 Uemori T, Asada K, Kato I, Harasawa R. Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 1992; 15(2): 181-6.
- 35 Yan Z, Mayhew A, Seng N, Takle GB. Validation of a PCR method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. *Biologicals* 2010; 38(2): 232-7.
- 36 Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals* 2004; 32(4): 177-82.
- 37 Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR Methods Appl* 1995; 4(4): 199-208.
- 38 Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 1952; (12): 264-5.
- 39 Gartler SM. Genetic markers as tracers in cell culture. *Natl Cancer Inst Monogr* 1967; 26(26): 167-95.
- 40 Alston-Roberts CBR, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, *et al.* Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(6): 441-8.
- 41 Nims RW, Shoemaker AP, Bauernschub MA, Rec LJ, Harbell JW. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34(1): 35-9.
- 42 Steube KG, Grunicke D, Drexler HG. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31(2): 115-24.
- 43 Hay RJ, Chen TR, Macy ML, Reid YA. Reply to “cells, lines and DNA fingerprinting”. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1992; 28(9/10): 593-4.
- 44 O’Toole CM, Povey S, Hepburn P, Franks LM. Identity of some human bladder cancer cell lines. *Nature* 1983; 301(5899): 429-30.
- 45 Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P, *et al.* Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 8012-7.
- 46 Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, Shokri F. Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: Report from the National Cell Bank of Iran. *Biologicals* 2007; 35(3): 195-202.
- 47 Authentication of human cell lines: Standardization of STR profiling. ANSI/ATCC ASN-0002-2011.
- 48 Dirks WG, Macleod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, *et al.* Cell line cross-contamination initiative: An interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int J Cancer* 2010; 126(1): 303-4.
- 49 Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Dirks WG, *et al.* Cell line cross-contamination: WSU-CLL is a known derivative of REH and is unsuitable as a model for chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2014; 38(8): 999-1001.
- 50 Parson W, Kirchebner R, Mühlmann R, Renner K, Kofler A, Schmidt S, Kofler R, *et al.* Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: Power and limitations. *FASEB J* 2005; 19(3): 434-6.
- 51 Castro F, Dirks WG, Fähnrich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *Int J Cancer* 2013; 132(2): 308-14.
- 52 Didion JP, Buus RJ, Naghashfar Z, Threadgill DW, Rd MH, de Villena FP. SNP array profiling of mouse cell lines identifies their strains of origin and reveals cross-contamination and widespread aneuploidy. *BMC Genomics* 2014; 15(1): 1-12.
- 53 Much M, Buza N, Hui P. Tissue identity testing of cancer by short tandem repeat polymorphism: Pitfalls of interpretation in the presence of microsatellite instability. *Hum Pathol* 2014; 45(3): 549-55.
- 54 Tahir AM, Al Ghanim K, Shahid M, Muhammad S, Jawad N, Rauf SA. *Sphingomonas* sp. is a novel cell culture contaminant. *J Cell Biochem* 2015; 116(6): 934-42.
- 55 Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Hum Reprod* 2009; 24(10): 151-8.
- 56 Windsor HM, Windsor GD, Noordergraaf JH. The growth and long term survival of *Acholeplasma laidlawii* in media products used in biopharmaceutical manufacturing. *Biologicals* 2010; 38(2): 204-10.
- 57 Barile MF, Hopps HE, Grabowski MW, Riggs DB, Delgiudice RA. The identification and sources of mycoplasmas isolated from

- contaminated cell cultures. *Ann NY Acad Sci* 1973; 225(1): 251-64.
- 58 Armstrong SE, Mariano JA, Lundin DJ. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals* 2010; 38(2): 211-3.
- 59 Masters JR. False cell lines: the problem and a solution. *Cytotechnology* 2002; 39(2): 69-74.
- 60 Wessman SJ, Levings RL. Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology* 1998; 28(1/2/3): 43-8.
- 61 Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *Biotechniques* 2007; 43(5): 575, 577-8, 581-2.
- 62 Bates MK, Wernersbach D. Cell culture contamination. *Methods Mol Biol* 2011; 731(731): 79-91.
- 63 Cobo F, Stacey GN, Hunt C, Cabrera C, Nieto A, Montes R, *et al.* Microbiological control in stem cell banks: Approaches to standardisation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68(4): 456-66.
- 64 Cheng HS, Shen CW, Wang SR. Effect of storage conditions on detection of mycoplasma in biopharmaceutical products. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007; 43(3/4): 113-9.
- 65 Polak-Vogelzang AA, Angulo AF, Brugman J, Reijgers R. Survival of *Mycoplasma hyorhinis* in trypsin solutions. *Biologicals* 1990; 18(2): 97-101.
- 66 Freedman LP, Gibson MC, Wisman R, Ethier SP, Soule HR, Reid YA, *et al.* The culture of cell culture practices and authentication-results from a 2015 survey. *Biotechniques* 2015; 59(4): 189-92.
- 67 Plant AL, Locascio LE, May WE, Gallagher PD. Improved reproducibility by assuring confidence in measurements in biomedical research. *Nat Methods* 2014; 11(9): 895-8.
- 68 Almeida JL, Cole KD, Plant AL. Standards for cell line authentication and beyond. *PLoS Biol* 2016; 14(6): e1002476.
- 69 Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MM, Aghajani S, Busse M, Yuan J, *et al.* A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature* 2015; 520(7547): 307-11.
- 70 Vikbladh O. Identity crisis. *Science* 2015; 349(6248): 595.
- 71 Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, *et al.* Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *Int J Cancer* 2013; 132(11): 2510-9.
- 72 Dirks WG, Drexler HG. STR DNA typing of human cell lines: Detection of intra- and interspecies cross-contamination. *Methods Mol Biol* 2013; 946: 27-38.
- 73 Anon M. Announcement: Reducing our irreproducibility. *Nature* 2013; 496(7446): 398.
- 74 Lorsch JR, Collins FS, Lippincott-Schwartz J. Fixing problems with cell lines. *Science* 2014; 346(6216): 1452-3.
- 75 Marc L. Persistent use of “false” cell lines. *Int J Cancer* 2008; 122(1): 1-4.
- 76 Sarntinivajai S, Ade AS, Athey BD, States DJ. A bioinformatics analysis of the cell line nomenclature. *Bioinformatics* 2008; 24(23): 2760-6.
- 77 Hunter L, Cohen KB. Biomedical language processing: What’s beyond PubMed? *Mol Cell* 2006; 21(5): 589-94.