

综述

细胞系错误识别与交叉污染及其检测方法

张彤彤 廉润通 朱羽婕 周彦铸 岳静 庄安琪 伍义行*

(浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 中国计量大学生命科学学院药理学系, 杭州 310018)

摘要 细胞系错误识别和交叉污染对科学研究及临床应用等造成了严重危害, 并已成为长期困扰国内外学者的问题。细胞交叉污染是指细胞在分离、培养和使用过程中, 混入了来源于种属内或种属外的非目标细胞而造成的污染。细胞系错误识别和交叉污染的检测是确保体外培养过程中目标细胞及其产品质量的关键控制环节, 是细胞治疗相关临床研究和细胞产品审批的必检项目。但目前仍缺乏一套可靠的细胞系错误识别和交叉污染的检测体系及评价标准。该文从形态学特征、染色体核型分析、同工酶谱分析、人类白细胞抗原分型、基于DNA的鉴定和细胞专属特性分析等方面, 系统地分析总结了体外培养中错误识别和交叉污染的细胞系的鉴定方法研究现状及存在的问题, 以期科研用和治疗用细胞及其相关产品质控体系的建立提供参考。

关键词 细胞交叉污染; 细胞系错误识别; 细胞系污染检测; 细胞系质量控制

Misidentification and Cross-Contamination of Cell Lines in Culture and Their Detection Methods

ZHANG Tongtong, LIAN Ruitong, ZHU Yujie, ZHOU Yanzhu, YUE Jing, ZHUANG Anqi, WU Yihang*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract The application of misidentified and cross-contaminated cell lines has caused by very serious consequence in scientific study and clinical application etc. It has plagued us for decades at home and abroad. Cell cross-contamination is the contamination of cell lines with unrelated cells from another cell lines (including the same species or other species) during cell isolation, cultivation and application. Detection for misidentification and cross-contamination of cell lines is the critical control points to ensure the quality of target cells with related products in culture. It is also one of the items that must be examined in approval process of clinical research related to cell therapy and cell-based therapeutic products. However, no reliable detection and evaluation system for mislabeled and cross-contaminated cell lines is available so far. Therefore, this paper reviewed the current status on detection methods for misidentification and cross-contamination of cell lines in the following six aspects such as morphological features, karyotyping, isoenzyme analysis, human leukocyte antigen typing, DNA-based authentication and cell-specific characteristics. Furthermore, to provide important references for the

收稿日期: 2022-02-05 接受日期: 2022-04-06

国家重点研发计划(批准号: 2018YFA0108403)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86836078, E-mail: yihangwu@126.com

Received: February 5, 2022

Accepted: April 6, 2022

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFA0108403)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86836078, E-mail: yihangwu@126.com

establishment of quality control system of cell lines used for scientific research and clinical therapy as well as related therapeutic products, the paper also analyzed the existing problems in verification and contamination detection of cell lines.

Keywords cell cross-contamination; misidentification of cell lines; contamination detection of cell lines; quality control of cell lines

1907年, HARRISON成功分离青蛙神经母细胞, 开创了体外细胞培养的先河^[1]。1952年第一株人源细胞系HeLa被成功建立, 从此细胞培养成为生物医药基础研究和产业发展不可或缺的工具^[2]。伴随着细胞培养的广泛应用, 细胞错误鉴定或培养物交叉污染逐渐成为一个长期困扰国内外相关工作者的问题。细胞交叉污染(cell cross-contamination)通常是指细胞在分离、培养(复苏、传代和冻存)和使用等过程中, 混入了非目标细胞而发生的污染(图1)。而国际细胞系认证委员会(international cell line authentication committee, ICLAC)的定义是: 一个细胞系的基因型与其最初供体不同时则认为这一细胞系出现了污染^[3]。第一例报道的有关交叉污染是由HeLa细胞引起的, 最早可追溯到上世纪50年代^[4]。随后发现了越来越多的细胞系被HeLa细胞所污染^[5-6]。据统计全球广泛使用的细胞系中有超过400种细胞系经证实被错误鉴定, 在美国及以欧洲和亚洲等国家实验室中至少有20%存储的细胞系被错误鉴定或交叉污染^[7]。而对来自中国22个机构的278种细胞系进行检测, 发现有46%(128/278)的细胞系被错误鉴定或交叉污染, 其

中由中国研究者建立的细胞系中有73.2%(52/71)被错误鉴定^[8]。显然, 交叉污染或细胞系身份错误识别而导致的研究结论错误问题, 对科研以及细胞生产、临床应用等造成了严重危害^[9]。ICLAC和*Nature*、*Science*杂志等机构多次呼吁研究者对细胞系进行鉴定^[10]。因此, 确保细胞系身份真实且不存在交叉污染, 是生产用细胞基质以及治疗用细胞产品的关键质控指标^[11]。原国家卫生与计划生育委员会联合原国家食品药品监督管理总局于2015年共同发布的《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》和2017年发布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)》, 也明确指出临床用细胞或细胞治疗产品应进行细胞鉴定, 确保细胞无交叉污染。但目前仍缺乏可靠的细胞系错误识别与交叉污染检测体系及评价标准。

本文从细胞形态学特征分析、染色体核型分析、同工酶谱分析、人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)分型、基于DNA的鉴定和细胞专属特性分析等六个方面, 系统地分析总结了细胞系错误识别和交叉污染的检测原理及评价方法的优点

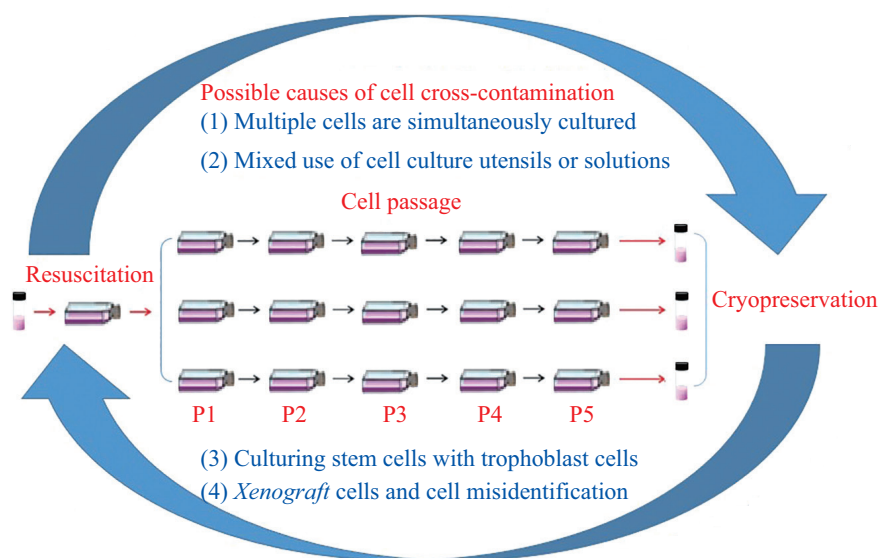


图1 细胞培养过程中交叉污染的主要环节及其可能原因

Fig.1 Main links of cell cross-contamination in the process of cell cultivation and its possible causes

与不足, 以期细胞系及细胞治疗产品质量控制体系的建立提供参考。

1 形态学特征分析

细胞形态学分析是细胞分型和鉴定的基本方法, 可分为光学显微镜检查和电子显微镜检查。通过对细胞形态观察可发现形态差异明显的细胞交叉污染, 如上皮细胞和成纤维细胞可在光镜下进行区分^[12]。对于贴壁细胞, 可通过细胞形态、生长特性等形态学特征初步判断细胞之间是否发生交叉污染; 对于悬浮细胞, 可通过分析细胞尺寸、体积等形态学特征初步判断是否存在交叉污染。若观察到细胞培养物形态学特征差异明显或疑似出现细胞交叉污染, 可选择其他检测方法进一步验证。除了通过显微镜观察对细胞形态特征进行定性描述之外, 也可通过对细胞表型特征进行定量检测, 从而分析不同培养时间、不同培养条件和不同实验室等培养的细胞的形态学特征^[13]; 还可通过定量相显微镜(quantitative phase microscopy, QPM)基于细胞形态学特征的相位成像技术对活细胞进行快速鉴定和分类^[14]。近来有研究报道采用深度学习方法, 结合AlexNet、BCNN和DilatedNet网络建立基于形态学的细胞交叉污染检测及活细胞鉴定的人工智能平台, 通过识别细胞形态学的细微差异可取得较好的鉴定效果^[15]。此外, 拉曼光谱法是根据不同细胞类型的拉曼光谱信号差异, 采用基于光纤探头的显微拉曼光谱对细胞的生化参数变化进行分析, 也是一种潜在的细胞鉴定手段^[16]。

2 染色体核型分析

染色体核型分析是以分裂中期细胞染色体为观察对象, 根据染色体长度、长臂与短臂的比例、着丝粒的位置等特征, 通过显微显带技术对染色后的染色体进行辨别区分, 随后对染色体进行排序和编号, 最终得到染色体核型图谱并进行形态分析的过程^[17]。染色体核型分析可以判断细胞是否变异以及变异程度, 如果细胞出现染色体变异, 就意味着可能出现细胞功能异常, 故细胞体外培养须保持正常核型, 核型分析是细胞鉴定的常用手段^[18]。当细胞系间存在不同的标记时, 或当需要对二倍体性状有显著差异的物种进行鉴别时, 核型标准十分有效, 因作为物种起源的核染色体能够保持稳定^[17]。染色体

核型分析除了能有效地确定物种来源和鉴定正常或恶性性质外, 还可检查细胞有无交叉污染^[19]。如小鼠染色体为40条, 不仅数目与人染色体不同, 着丝点位置也存在明显差异, 小鼠染色体以顶端着丝点为主, 而人染色体多为中央着丝点, 故核型分析可作为鉴定细胞系种属来源的依据。以细胞培养和G显带为基础的经典核型分析方法特异性高, 其地位尚不能被新的分子手段所取代^[20]。

光谱核型分析技术(spectral karyotyping, SKY)是一种新的染色体核型分析方法, 它是以光谱成像和傅里叶光谱学原理为基础, 对流式分选的染色体进行PCR标记, 直接标记荧光素或间接标记半抗原; 对5种光谱学不同的纯色染料(罗丹明、德克萨斯红、Cy5、FITC和Cy5.5)进行组合得到独特的染色体探针混合物, 将探针混合物与中期染色体进行杂交, 进而再采用图像处理软件进行分析^[21]。SKY可揭示G、R、Q带通常无法检测到的染色体结构的细微变异, 其具有高度的敏感性和特异性, 一次成像可同时区分24条染色体, 如结构复杂的易位、缺失、扩增、重排、双着丝粒、等臂及标记染色体, 检测稳定性染色体畸变等^[22]。SKY技术适用于鉴别与特殊表型相关的染色体异常, 可用于早期诊断和治疗监测, 以及细胞系遗传变异的鉴定^[23]。

3 同工酶谱分析

同工酶是催化作用相同, 但组成、结构及理化性质不同的一组酶, 广泛存在于同一种属或同一个体的不同组织, 或同一组织及细胞的不同细胞器中, 能较好地反映物种间的遗传差异, 常用于物种分类、鉴定及培养细胞污染检测研究中^[24]。不同种属来源的细胞具有不同的同工酶分布, 通过电泳分离可得到它们特异性的同工酶图谱, 因此同工酶谱(包括等位酶)分析可作为种属鉴别的依据而用于细胞系鉴定和交叉污染检测中^[25]。美国华盛顿大学GARTLER^[4]教授基于同工酶表达引入了多态性概念, 并将其用于人类细胞系的鉴别, 通过分析20个不同的人源细胞系的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-P-D)和磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucosmutase, PGM)的多态性发现: 只存在于非裔后代的G-6-P-D等位基因表型, 却在高加索人细胞系中被检测到, 说明研究涉及的细胞系被HeLa细胞污染。常用于同工酶分析的系列酶包括G-6-P-D、核苷磷酸化酶(nucleoside

phosphorylase, NP)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)、天冬氨酸转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)等,当污染细胞占培养物总细胞数10%以上时,这种技术能用于细胞交叉污染的有效鉴定^[26]。同工酶(包括等位酶)技术作为细胞培养质量控制的一种例行监测方法,主要用于种属间交叉污染检测,也可用于种属内交叉污染控制^[27]。

4 人类白细胞抗原(HLA)分型

HLA基因位于6号染色体(6p21.31)上,包括一系列紧密连锁的基因座,部分基因编码的细胞表面抗原,是免疫系统区分自身和异体物质的基础。HLA系统是已知最具基因多态性的系统之一,超过1 250个等位基因被鉴定并分布在HLA-I型分子(HLA-A、HLA-B、HLA-C)和HLA-II型分子(HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ)之间^[28-29]。HLA分型最早采用的血清学方法是根据抗原特异性血清与细胞表面表达的特异性HLA抗原反应的原理进行的^[29]。血清学及细胞学分型技术主要侧重于分析HLA产物特异性。目前HLA分型技术已由抗原水平发展到基因水平,包括早期利用序列特异性寡核苷酸(sequence-specific oligonucleotide, SSO)或等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针基于HLA-DQA1(或HLA-DQa)序列多态性检测进行法医鉴定和细胞系鉴定^[17,30]。而采用合成的序列特异性寡核苷酸探针(SSO probe, SSOP)和序列特异性引物(sequence specific primer, SSP)的分子方法,是通过特异标记引物对HLA基因座进行扩增,PCR扩增产物再与SSOP杂交^[31-32]。基于PCR-SSP的HLA分型技术具有较高的准确性和灵敏度,但主要的HLA分型是基于序列的分型法,即直接通过DNA测序实现^[33]。该法可采用基于第二代和第三代测序的HLA高分辨分型技术进行^[34-35]。同时,HLA分型研究也在不断更新中,如采用纳米孔测序技术进行高分辨HLA基因分型^[36]。

HLA系统是由负责淋巴细胞识别的细胞表面表达的一系列分子组成的,主要功能是把抗原决定簇呈递给T淋巴细胞,从而引发特异性免疫反应^[37]。HLA作为一种免疫学特征除了用于移植配型和疾病诊断之外,还可用于种属间细胞鉴定,但由于非人源细胞系研究不够深入,目前仅将其用于人源细胞系

鉴定,包括干细胞来源的鉴定^[38]。HLA因其高度多态性而成为代表个体特异性并伴随个体终身的稳定遗传标志,在无关个体之间HLA型别完全相同的几率极低,通过检测细胞HLA基因型可以鉴定细胞是否存在交叉污染^[39]。HLA系统已建有相关的参考数据库,但目前HLA分型只作为细胞交叉污染种属内鉴定的辅助方法。

5 基于DNA的鉴定方法

5.1 基于DNA保守序列的PCR检测法

基于种属间DNA进化保守性差异建立的PCR检测方法,具有速度快、灵敏度高、特异性强等优点,可用于鉴定实验细胞的种属,并判断该细胞是否存在种间交叉污染^[40]。2003年HEBERT等^[41]提出DNA基因序列可作为物种的“条形码”,并以线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)——细胞色素C氧化酶1(cytochrome c oxidase subunit 1, *COI*)为靶点对100种代表性物种进行了分类。DNA条形码(DNA barcode)是指生物体内能够代表该物种的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段。DNA条形码基于种内进化过程中高度保守的、编码或不编码蛋白的DNA序列,为物种分类鉴定提供了依据,而基于mtDNA包括来自人类*COI*和16S rRNA基因的短片段(157~541 bp)的PCR检测法还可用于法医鉴定^[42]。细胞色素b基因(*Cyt b*)和*COI*基因作为mtDNA中的保守编码基因,很少出现插入和缺失,种属内变异性较低(小于1%~2%),而不同种属间差异较大,故通过PCR扩增*Cyt b*或*COI*基因的检测方法与标准品对照不一致或存在非特异性扩增产物时,意味着细胞样本可能出现了种属间交叉污染,该法可用于人和动物细胞系种属鉴定及交叉污染检测^[43]。2015年美国发布了基于线粒体*COI*的动物细胞种属DNA条形码鉴定标准,为细胞系错误鉴定和不同种属来源的细胞交叉污染的检测提供了参考依据。而采用基于宏基因组的高通量测序,通过对线粒体*COI*基因序列进行比对,来鉴定细胞系和检测细胞交叉污染也是一种有用的质控方法^[44]。另外,采用基于mtDNA中*Cyt b*基因的巢式PCR技术在细胞系鉴定和细胞交叉污染检测方面具有快速、灵敏的优点,比同工酶谱分析更加灵敏,可检测1%的细胞交叉污染^[45]。

除mtDNA之外,核糖体亚基也可反映不同种

属的保守性, 12S rDNA和16S rDNA保守序列可用于种属和法医鉴定, 也能用于种属间细胞交叉污染检测^[41,46]。鉴于醛缩酶(*aldolase*)基因在动物和人类具有高度保守性, 采用PCR扩增醛缩酶基因(单独使用难以区分亲缘关系相近的种, 如大鼠和小鼠)结合DNA序列分析可用于细胞系鉴定和交叉污染检测^[47]。而基于*Cyt b*基因的PCR-RFLP法, 被证明是一种灵敏的、重现性好的种属间细胞交叉污染检测技术^[48]。同时, 基于PCR扩增基因组DNA限制性片段的扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术也能同时检测种属内和种属间的细胞交叉污染^[49]。另据报道, 基于 β -珠蛋白和 β -肌动蛋白基因的特异序列而建立的PCR检测方法, 用于人和动物细胞系的种属鉴定及交叉污染检测, 可以检测5%~10%的细胞交叉污染^[50-51]。此外, 通过扩增犁鼻器(vomeronasal)受体基因而建立的PCR检测法, 可用于人和动物细胞系的种属间细胞交叉污染检测^[52]。虽然PCR检测法具有快速和灵敏的优点, 但在细胞系鉴定和细胞交叉污染分析上, 单一PCR检测证据是不足的, 有必要采用多种检测方法进行验证^[53]。

5.2 DNA指纹及短串联重复序列分析

“DNA指纹”术语第一次被提到是指高突变小卫星DNA的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析^[54-55]。RFLP技术用于分析高突变DNA, 这些突变DNA广泛存在于生物基因组中, 以一段相同或相似的核苷酸序列为核心序列串联重复组成, 存在两种类型的串联重复序列。(1) 小卫星DNA, 又被称为可变数目串联重复序列(variable-number tandem repeat, VNTR), 核心序列长度在8~80 bp之间, 每个VNTR基因座在每个等位基因上有2个到几百个核心重复序列, VNTR在不同个体间由于重复数的不同而形成生物的多态性^[56]。(2) 微卫星DNA, 又被称为短串联重复序列(short tandem repeat, STR), 其核心序列长度为2~7 bp, STR在每个等位基因上通常有3~20个串联重复序列, 在某些情况甚至可能超过100个重复序列, 具有高度的长度多态性和等位基因位点多态性^[54-55,57]。由于VNTR和STR是可遗传的, 故VNTR和STR对DNA指纹检测是有用的, VNTR和STR主要通过PCR扩增检测, 不同长度的等位基因通过比较扩增片段的大小进行区分^[58]。由于STRs具有高度多态性并可稳定遗传, 不同个体

来源的细胞在不同STR位点具有特异性的重复次数, 使得不同细胞具有特征性的STR图谱, 根据图谱可以判定细胞是否为单一细胞, 故基于STR的多重PCR方法可用于个体鉴定, 并可改进法医学上基于VNTR的指纹分析技术的局限性^[59]。DNA指纹分析已被证明是一类重要的细胞系鉴定和细胞交叉污染排除方法, 而基于VNTR和STR基因座的PCR扩增检测代表了一类可靠的用于细胞系鉴定和细胞交叉污染检测的DNA指纹分析技术^[60]。

科研人员通过对大量细胞系的鉴定发现8个高度多态性的STR基因座和一个性别识别位点是筛选独特DNA图谱的最佳工具, 并建立了一个STR参考数据库(包含500多种人源细胞系), 为STR技术在细胞系鉴定上的实际应用奠定了基础^[61-62]。2011年美国ATCC制定了利用STR技术进行人源细胞系鉴定的标准, 该标准已被ICLAC、ATCC、DSMZ等权威机构推荐用于人类细胞系鉴定^[8]。伊朗国家细胞库首次采用基于13个CODIS(combined DNA index system, CODIS)核心STR基因座(CSFIPO、FGA、TH01、rIPOX、VWA、D3S1358、D5S818、D7S820、D8S1179、D13S317、D16S539、D18S51和D21S11)的PCR-STR分析法, 检测了100个人源细胞系, 通过与ATCC和JCRB的STR参考数据库比对, 发现有18.8%的细胞系出现交叉污染^[63]。STR基因分型法可用于种属间和种属内细胞交叉污染检测^[62]。总之, STR基因分型法是目前人源细胞系交叉污染鉴定使用最广泛的方法, 根据STR分型结果对细胞生长状态(是否存在交叉污染)和细胞株系进行确认, 该方法具有多态性高、位点分布广泛、检测较为灵敏等优点, 并已建立人源细胞系STR图谱数据库^[64]。

5.3 单核苷酸多态性(SNP)分析

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)作为分布广泛且相对稳定的遗传标记, 具有等位基因频率易于评估且易于基因分型等优势^[65]。SNP分型技术可用于人源和动物细胞系的鉴定和交叉污染检测, 目前已建立相应的SNP参考数据库, 其最低可检测5%的细胞污染^[66-67]。虽然在细胞系鉴定及交叉污染检测上, STR基因分型法已被DSMZ、ATCC和JCRB等采用^[8], 并且STR既可用于人源细胞鉴定, 也可用于动物细胞如鼠源和猴源细胞鉴定^[61,68-69], 但STR技术也具有局限性, 比如它难以区分来源于同一自交系小鼠的细胞, 也无法提供

长期传代细胞系的染色体拷贝数变化和功能改变信息,同时STR在培养细胞中的长期稳定性也存在问题^[67,70]。而SNP分型技术,相对于STR分型,被认为是一种更加精确、多功能替代的有效方法,可以弥补STR法的不足^[67,71]。SNP分型技术既可单独对细胞系进行鉴定,也可作为STR技术的补充,尤其是鉴定错配修复缺陷细胞系,基于SNP的多重细胞鉴定(multiplex cell authentication, MCA)技术可检测3%以下的细胞污染^[72]。因此,STR结合SNP技术将有助于解决细胞系错误鉴定和交叉污染问题。

5.4 RNA测序及其他鉴定法

基于高通量RNA测序(RNA-seq)的名为CeL-ID的新方法,被证明可用于细胞系的鉴定和细胞交叉污染的检测^[73-74]。据报道,有研究者成功利用RNA-seq技术鉴定了鼻咽癌细胞培养中污染的HeLa细胞^[75]。此外,以HPV-18作为生物标记,采用巢式PCR技术直接扩增细胞培养上清液,检测培养中HeLa细胞污染情况,该方法简便、快速,最低可检测1%的细胞污染,其灵敏度比STR技术高10倍,可用于细胞培养常规监测^[76-77]。

6 细胞专属特性分析

细胞系错误识别及交叉污染的检测除了采用上述通用方法分析外,一般还需要通过细胞专属特性或表型特征分析进行验证。细胞专属特性(或表型特征)包括细胞表面标记物、特异性表达产物、报告基因等,可采用流式细胞术(免疫分型)、免疫荧光染色、酶联免疫试验等方法检测。(1)流式细胞术,是通过直接或间接标记细胞表面受体或内部蛋白以获得细胞特异性标志物表达及比例等信息,可实现定性或定量细胞亚群分选和特异表达细胞的鉴定,也可通过细胞表型变化鉴别正常或异常细胞^[78]。而免疫分型(immunophenotyping)是根据存在于细胞表面、胞核或胞质中的标记物或抗原的类型,利用抗体对这些标记物或抗原进行检测,以鉴定目标细胞群的存在及比例。通过确定目标细胞的标记物,并将荧光染料与结合抗原的抗体偶联,即可对目标细胞进行识别。常用流式细胞术进行免疫分型,其优点是快速、方便且灵敏度高。细胞标记物是鉴定特定细胞群的有效方式,但这些标记物往往不是某种细胞的专属表达,通常需要同时使用多种抗体来评估细胞标记物的特异性表达。因此,免疫分型一般

不单独用于细胞交叉污染及错误鉴定的检测,而是对其他方法检测结果进行补充验证。(2)免疫荧光技术,是通过荧光标记抗体来示踪或检测细胞特异性抗原的方法。通过免疫荧光技术分析细胞是否表达某种蛋白可实现鉴定细胞的目的,也可通过对活细胞进行荧光标记,从而利用荧光显微镜观察活细胞成像来开展细胞鉴定研究^[79-81]。(3)酶联免疫实验,是用酶标记抗原或抗体,与吸附在固相载体上的抗体或抗原发生特异性结合,从而用酶标仪根据颜色反应对受检标本进行定性或定量分析,可用于检测细胞表面特异性标志物,但常需结合免疫荧光和流式细胞术分析^[82]。也有报道用一种方法同时分析有丝分裂细胞的形态特性、染色体核型和免疫表型^[83]。(4)报告基因法,是通过转染等途径使细胞携带特殊的报告基因(如绿色荧光蛋白基因),进而通过免疫荧光或流式细胞术检测荧光报告基因从而鉴定目的细胞的专属特征^[84](图2)。

7 总结与展望

错误鉴定和交叉污染细胞系的使用导致的问题已被关注了近70年,至今仍是包括中国在内的世界各国实验室面临的严重问题^[85]。首先,细胞库必须确保细胞产品的原始细胞系的质量、安全和可溯源,细胞系的充分认证是建立质量保证体系的重要组成部分^[86]。其次,使用细胞的研究机构和研究者,必须建立相应的细胞鉴定方法和质量监测体系,细胞系的经常性监测对开展细胞培养的任何机构都是必要的^[87]。

自从1987年WHO发布永生性细胞系作为灭活病毒疫苗生产基质的安全性评价指南*Acceptability of Cell Substrates for Production of Biologicals*以来,为了最大限度地保障生物制品的安全,相继发布了多项相关标准,如1998年人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)发布的“生物技术产品及生物制品生产用细胞基质的来源和鉴定”指导原则*Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/ Biological Products*。2011年美国ATCC发布了基于STR分型的人源细胞系鉴定标准*Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling*。2015年美国发布了基于线粒体COI DNA条形码的动物细胞种属鉴定标

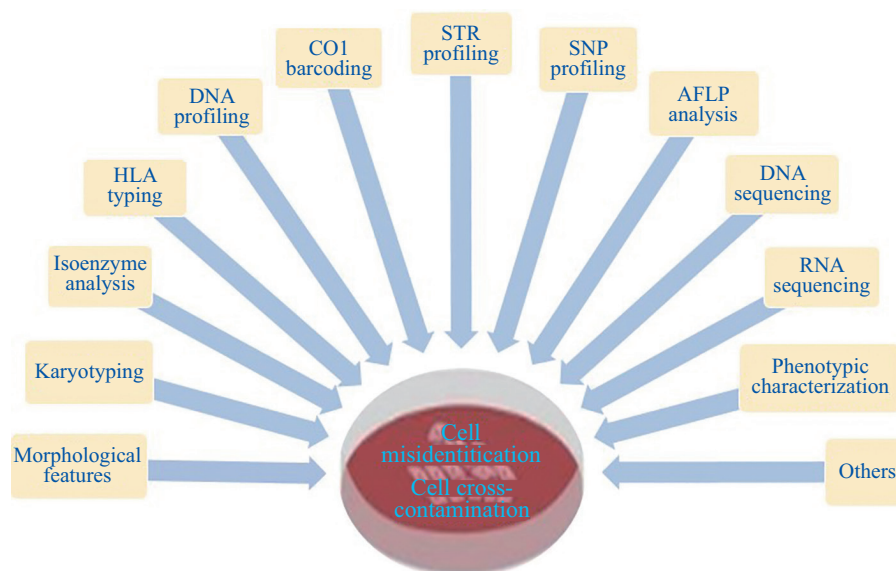


图2 细胞系错误识别及交叉污染的主要检测方法

Fig.2 Main detection methods for misidentification and cross-contamination of cell lines

准*Species-Level Identification of Animal Cells through Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) DNA Barcodes*(ASN-0003-2015)。另外, 2010年中国发布了《畜禽体细胞库检测技术规程》(GB/T 24862-2010); 2021年又发布了《哺乳动物细胞交叉污染检测方法通用指南》(GB/T 40172-2021)。此外, 中国深圳市还发布了《短串联重复序列基因分型法鉴定人源细胞系技术规范》(SZDB/Z 238-2017), 并提出了STR分型鉴定的标准, 将受检细胞系的STR位点基因分型数据与其对应的标准STR基因分型数据进行比对: (1) 若两者的匹配率不低于80%, 判定受检细胞系为标准细胞系或为标准细胞系的衍生细胞系; (2) 若两者的匹配率小于80%, 同时不低于56%, 建议结合细胞系形态、细胞系特异性标记物等辅助分析进行综合判断; (3) 若两者的匹配率低于56%, 判定受检细胞样本与标准细胞系不相关。

细胞系的错误识别以及种属内和种属间交叉污染代表了重要的潜在风险, 不仅仅是因为用错误鉴定的细胞系产生错误的研究结果而发表错误论文造成的危害, 更重要的是用这些细胞系生产的细胞产品(药物)最终要用于临床, 如干细胞系需要严谨的表征和质控, 因为它将应用于临床移植治疗^[88-89]。虽然已开发了多种不同原理的细胞系鉴定和交叉污染检测方法, 并发布了多项指南或标准, 但每种鉴定方法都有自己的局限性。(1) 形态学特征鉴定, 由于

大多数细胞不具有特殊的形态学特征, 所以形态学观察一般只能用于初步或辅助鉴定。(2) 染色体核型分析, 在识别染色体易位、倒位等方面具有不可替代性, 但缺失重复分辨率较低, 其检测灵敏度为1%~5%的细胞污染, 不适合在体外传代中易发生遗传变异的细胞系鉴定; 而SKY作为常规核型分析的补充, 其缺点是难以鉴定小的缺失、重复和倒位等内部改变。(3) 同工酶谱分析, 虽然是欧盟药典推荐的细胞系鉴定方法, 但它存在结果变异性高、重现性低, 且耗时和要求高浓度细胞等缺点, 而且其检测灵敏度为5%~10%以上的细胞污染^[48]。(4) HLA分型鉴定, 虽然可检测细胞是否存在交叉污染, 但确定培养细胞HLA单倍型的复杂性以及非人源细胞系研究不足限制了其应用, 目前主要作为人源细胞种属内污染鉴定的辅助方法。(5) DNA条形码技术, 基于深度测序(NGS)的DNA条形码其检测灵敏度可达1%以下的细胞污染, 其中对种属间细胞交叉污染(人源和小鼠细胞)其检测灵敏度可达0.1%的细胞污染^[90], 但难以区分来源于同种动物不同个体的细胞系或同一捐赠者不同组织的细胞系。(6) SNP分型鉴定, 根据已建立的SNP参考数据库, 其最低可检测3%~5%的细胞污染, 而基于SNP的MCA技术可检测3%以下的细胞污染; 相对于STR分型, SNP分型技术被认为是一种更加精确的方法, 可以弥补STR技术的不足^[71]。(7) STR分型技术, 虽然已作为人源细胞系鉴定标准,

表1 细胞交叉污染常用检测方法的比较

Table 1 Comparison of the identity assays commonly used for cross-contaminated cell lines

检测方法 Assays	敏感性/%* Sensitivity /%*	标准方法 Standard method	种内污染 Intraspecies contamination	种间污染 Interspecies contamination	原理 Principles
STR profiling	5.0%-10.0%	ASN-0002	√	√ [#]	Differentiation by STR profile
<i>COI</i> barcoding	0.1%-1.0%	ASN-0003	Limited	√	Conserved mitochondrial <i>COI</i>
Karyotyping	1.0%-5.0%	None	Limited	√	Chromosomal markers/number
Isoenzyme analysis	5.0%-10.0%	None	Limited	√	Isoenzyme polymorphism
SNP profiling	3.0%-5.0%	None	√	√ [#]	SNP polymorphism
HLA typing	-	None	√	√	HLA specificity/heterogeneity
DNA profiling	-	None	Limited	√	Conserved genes are examined
Whole genome sequencing	-	None	√	√	Genes conserved are examined
Immunophenotyping	0.1%	None	Limited	√	Species-conserved protein

敏感性/%*: 细胞交叉污染的百分比。#: 探针或引物与其他种类间存在特异性。

Sensitivity /%*: percent of cross-contaminated cells in the total cells. #: if probes or primers specific for other species.

但它也具有局限性,如难以区分来源于同一自交系小鼠的细胞,也无法提供长期传代细胞系的染色体拷贝数变化信息^[67]。(8) 细胞专属特性或表型特征检测,表型特征作为细胞独特的特征或功能,虽然不能单独用来鉴定细胞系,但可与其他分子鉴定方法结合,作为细胞系错误鉴定及交叉污染检测的补充或辅助证据(表1)。

通过采用STR分型方法对在中国使用的482种人源肿瘤细胞系进行验证,结果发现96种细胞系被错误识别。更重要的是这项研究还发现单独采用STR方法不足以排除种属间的细胞交叉污染,因为在被STR鉴定认为无污染的剩余386种细胞系中,采用基于PCR的物种鉴定方法仍检出3种细胞系存在种属间的交叉细胞污染,同时也说明STR配合PCR种属鉴定,并结合细胞形态学观察是必要的^[91]。虽然STR分型法具有不少优点,但这种技术也确实具有缺陷。(1) 细胞系基因稳定性问题,因为在不同的实验(培养)条件下,由于外在因素的影响可能导致细胞系的DNA STR图谱发生改变从而影响其鉴定结果^[92]。(2) 随机遗传漂变问题,是由于配子的随机取样引起的基因频率的变动,这个因素所引起的基因频率的变化是随机的,与由突变、选择和迁移所引起的变化完全无关^[69]。(3) 检测灵敏度问题,目前STR只能检测5%~10%的细胞污染,其检测灵敏度仍有待提高。因此,其他有关细胞系鉴定及细胞污染检测方法是对STR分析的必要补充,如同工酶谱分析、染色体核型分析、基于保守DNA序列的PCR检

测方法等,从而减少STR错误鉴定的几率^[93]。尽管如此,但STR分型仍是目前细胞系鉴定的主要手段。美国ATCC通过STR方法(采用多重PCR技术扩增8个STR基因座和性别决定位点*Amelogenin*基因)开展了所有保存细胞系的鉴定。2016年中国科学院昆明细胞库公布采用STR等方法发现了61种错误鉴定和污染的细胞系^[38]。经国家生物医学实验细胞资源库(北京协和细胞资源中心)采用STR等检测,截止2020年3月,共发现107种错误细胞系,其中47种属于建系过程中被污染。

此外,最近SMITH等^[94]在常规STR技术(或MSAT)基础上,报道了一种新的用于生物样本库日常监测和质控的多重MSAT方法。该方法使用新发现的来自人类基因组的具有足够多态性的MSATs,而不需要依赖以前的CODIS标记(STR基因座)。

细胞交叉污染的第一次鉴定,即HeLa污染的鉴定是通过核型分析和同工酶法联合检测实现的^[5,95]。在细胞系鉴定和细胞交叉污染检测的实际应用中,无论是细胞库还是干细胞库,同工酶谱分析和DNA指纹图谱分析常被选择作为常规监测手段,它们的应用对从源头上防止细胞系的错误识别具有重要意义^[96]。主体细胞库(master cell bank, MCB)和工作细胞库(working cell bank, WCB)的质量监测主要采用染色体核型分析、同工酶谱分析和DNA指纹图谱分析。核型分析是为了评估细胞在连续培养过程中染色体的稳定性,而DNA指纹和同工酶谱分析分别是为了检测种属内和种属间的交叉污染^[25,97]。STR、

HLA、SNP分型以及mtDNA测序和微阵列基因表达分析还可用于培养中人源胚胎干细胞的鉴定、稳定性和分化状态分析^[98]。另外,资源识别计划(research resource identifiers, RRID)通过推广独特的研究资源标识符(RRID),提醒研究者避免使用ICLAC数据库中罗列的问题细胞系,有助于减少错误鉴定和污染细胞系的使用^[99]。

综上所述,细胞系的质量控制是一个系统问题,需要建立完整的质保体系,每种细胞系使用前都应经过身份认证。目前还没有单一的鉴定方法可以确保所有细胞系的鉴定和污染检测准确无误,需要采用不同原理的多种方法联合验证才能确保细胞系的正确鉴定和无交叉污染存在。同时,也说明除了STR分型等鉴定方法外,仍迫切需要开发具有更高检测灵敏度和更具特异性的、适合筛选和日常监测的、简便快速的细胞鉴定及交叉污染检测新技术。

参考文献 (References)

- [1] NICHOLAS J S. "Ross Granville Harrison, 1870-1959" [J]. *Bioogr Mem Fellows R Soc*, 1961, 7: 111-26.
- [2] GEY G O, COFFMAN W D, KUBICEK M T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium [J]. *Cancer Res*, 1952, 12: 264-5.
- [3] SCHAEFFER W I. Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. Tissue Culture Association Terminology Committee [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26(1): 97-101.
- [4] GARTLER S M. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines [J]. *Nature*, 1968, 217: 750-1.
- [5] NELSON-REES W A, FLANDERMEYER R R. HeLa cultures defined [J]. *Science*, 1976, 191(4222): 96-8.
- [6] NELSON-REES W A, DANIELS D W, FLANDERMEYER R R. Cross-contamination of cells in culture [J]. *Science*, 1981, 212(4493): 446-52.
- [7] CAPES-DAVIS A, THEODOSOPOULOS G, ATKIN I, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(1): 1-8.
- [8] HUANG Y, LIU Y, ZHENG C, et al. Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170384.
- [9] MASTERS J R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 315-9.
- [10] MASTERS J R. Cell-line authentication: end the scandal of false cell lines [J]. *Nature*, 2012, 492: 186.
- [11] BUEHRING G C, EBY E A, EBY M J. Cell line cross-contamination: how aware are mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it [J]? *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2004, 40(7): 211-5.
- [12] TAN Y F, LEONG C F, CHEONG S K. Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy [J]. *Malays J Pathol*, 2010, 32(2): 97-102.
- [13] MANCIA A, ELLIOTT J T, HALTER M, et al. Quantitative methods to characterize morphological properties of cell lines [J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28(4): 1069-78.
- [14] TANG W B, JI Y, ZHANG M M, et al. A rapid detection method for morphological characteristics of biological cells based on phase imaging [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 4651639.
- [15] WANG R, WANG D, KANG D, et al. An artificial intelligent platform for live cell identification and the detection of cross-contamination [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(11): 697.
- [16] SAHU A, KRISHNA C M. Optical diagnostics in oral cancer: an update on Raman spectroscopic applications [J]. *J Cancer Res Ther*, 2017, 13(6): 908-15.
- [17] DEFENDI V, BILLINGHAM R E, SILVERS W K, et al. Immunological and karyological criteria for identification of cell lines [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1960, 25: 359-85.
- [18] REBUZZINI P, NERI T, ZUCCOTTI M, et al. Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture [J]. *Mamm Genome*, 2008, 58: 17-23.
- [19] NELSON-REES W A, FLANDERMEYER R R, HAWTHORNE P K. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination [J]. *Science*, 1974, 184(4141): 1093-6.
- [20] SHEPPARD D M, FISHER R A, LAWLER S D. Karyotypic analysis and chromosome polymorphisms in four choriocarcinoma cell lines [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1985, 16(3): 251-8.
- [21] SCHROCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes [J]. *Science*, 1996, 273: 494-7.
- [22] PADILLA-NASH H M, BARENBOIM-STAPLETON L, DIFILIPPANTONIO M J, et al. Spectral karyotyping analysis of human and mouse chromosomes [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(6): 3129-42.
- [23] ABDEL-RAHMAN WM, KATSURA K, RENS W, et al. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5): 2538-43.
- [24] O'BRIEN S U, KLEINER G, OLSON R, et al. Enzyme polymorphisms as genetic signatures in human cell cultures [J]. *Science*, 1977, 195(4284): 1345-8.
- [25] O'BRIEN S J, SHANNON J E, GAIL M H. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures [J]. *In Vitro*, 1980, 16(2): 119-35.
- [26] NIMS R W, SHOEMAKER A P, BAUERNSCHUB M A, et al. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34: 35-9.
- [27] HALTON D M, PETERSON W D JR, HUKKU B. Cell culture quality control by rapid isoenzymatic characterization [J]. *In Vitro*, 1983, 19(1): 16-24.
- [28] MARSH S G. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update October 2000 [J]. *Tissue Antigens*, 2001, 57(1): 93-4.
- [29] GERLACH J A. Human lymphocyte antigen molecular typing: how to identify the 1 250+ alleles out there [J]. *Arch Pathol Lab*

- Med, 2001, 126: 281-4.
- [30] PAGE-BRIGHT B. Proving paternity-human leukocyte antigen test [J]. *J Forensic Sci*, 1982, 27: 135-53.
- [31] CAO K, CHOPEK M, FERNÁNDEZ-VIÑA M A. High and intermediate resolution DNA typing systems for class I HLA-A, B, C genes by hybridization with SSOP [J]. *Rev Immunogenet*, 1999, 1: 177-208.
- [32] WELSH K, BUNCE M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP [J]. *Rev Immunogenet*, 1999, 1: 157-76.
- [33] TURNER T R, HAYHURST J D, HAYWARD D R, et al. Single molecule real-time DNA sequencing of HLA genes at ultra-high resolution from 126 international HLA and immunogenetics workshop cell lines [J]. *HLA*, 2018, 91(2): 88-101.
- [34] 陈佳, 舒明月, 里进, 等. 三代测序与靶向捕获技术联用进行高分辨HLA基因分型及MHC区域单倍体型精细鉴定[J]. 遗传 (CHEN J, SHU M Y, LI J, et al. The third-generation sequencing combined with targeted capture technology for high-resolution HLA typing and MHC region haplotype identification [J]. *Yi Chuan*), 2019, 41(4): 337-48.
- [35] LIU C, DUFFY B F, WEIMER E T, et al. Performance of a multiplexed amplicon-based next-generation sequencing assay for HLA typing [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0232050.
- [36] LIU C, BERRY R. Rapid high-resolution typing of class I HLA genes by nanopore sequencing [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2120: 93-9.
- [37] STEVANOVIC S. Structural basis of immunogenicity [J]. *Transpl Immunol*, 2002, 10: 133-6.
- [38] GARDNER J, DOWNIE J M, BATEMAN M, et al. Derivation of the human embryonic stem cell line RCe010-A (RC-6) [J]. *Stem Cell Res*, 2016, 16(2): 481-4.
- [39] POLLACK M S, HEAGNEY S D, LIVINGSTON P O, et al. HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1981, 66(6): 1003-12.
- [40] 卞晓翠, 刘玉琴, 王春景, 等. 应用聚合酶链式反应鉴定实验细胞的来源种属[J]. 基础医学与临床(BIAN X C, LIU Y Q, WANG C J, et al. Species identification of animal cells by polymerase chain reaction [J]. *Basic & Clinical Medicine*), 2009, 29(4): 423-30.
- [41] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-21.
- [42] FERRI G, ALÙ M, CORRADINI B, et al. Species identification through DNA “barcodes” [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2009, 13(3): 421-6.
- [43] PARODI B, ARESU O, BINI D, et al. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method [J]. *Biotechniques*, 2002, 32(2): 432-4, 436, 438-40.
- [44] LUNG O, CANDLISH R, NEBROSKI M, et al. High-throughput sequencing for species authentication and contamination detection of 63 cell lines [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21657.
- [45] RAMYA R, NAGARAJAN T, SIVAKUMAR V, et al. Identification of cross-contaminated animal cells by PCR and isoenzyme analysis [J]. *Cytotechnology*, 2009, 61(3): 81-92.
- [46] YANG L, TAN Z, WANG D, et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4089.
- [47] LIU M, LIU H, TANG X, et al. Rapid identification and authentication of closely related animal cell culture by polymerase chain reaction [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, 44(7): 224-7.
- [48] LOSI C G, FERRARI S, SOSSI E, et al. An alternative method to isoenzyme profile for cell line identification and interspecies cross-contaminations: cytochrome b PCR-RLFP analysis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, 44(8/9): 321-9.
- [49] MILANESI E, AJMONE-MARSAN P, BIGNOTTI E, et al. Molecular detection of cell line cross-contaminations using amplified fragment length polymorphism DNA fingerprinting technology [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(3/4): 124-30.
- [50] STEUBE K G, MEYER C, UPHOFF C C, et al. A simple method using beta-globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines: a progress report [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(10): 468-75.
- [51] STEUBE K G, KOELZ A L, DREXLER H G. Identification and verification of rodent cell lines by polymerase chain reaction [J]. *Cytotechnology*, 2008, 56(1): 49-56.
- [52] HOLDER M J, COOPER P R. Species identification and authentication of human and rodent cell cultures using polymerase chain reaction analysis of vomeronasal receptor genes [J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(6): 553-8.
- [53] BOHM M S, DAME M K, BOYD J, et al. Low-level mouse DNA in conditioned medium generates false positive cross-species contamination results in human organoid cultures [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 587107.
- [54] JEFFREYS A J, WILSON V, THEIN S L. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA [J]. *Nature*, 1985, 314(6006): 67-73.
- [55] JEFFREYS A J, WILSON V, THEIN S L. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA [J]. *Nature*, 1985, 316(6023): 76-9.
- [56] NAKAMURA Y, LEPPERT M, O’CONNELL P, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping [J]. *Science*, 1987, 235(4796): 1616-22.
- [57] JEFFREYS A J, ROYLE N J, WILSON V, et al. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA [J]. *Nature*, 1988, 332(6161): 278-81.
- [58] TAMAKI K, JEFFREYS A J. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing [J]. *Leg Med*, 2005, 7: 244-50.
- [59] EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats [J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(4): 746-56.
- [60] MATSUO Y, NISHIZAKI C, DREXLER H G. Efficient DNA fingerprinting method for the identification of cross-culture contamination of cell lines [J]. *Hum Cell*, 1999, 12(3): 149-54.
- [61] MASTERS J R, THOMSON J A, DALY-BURNS B, et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 8012-7.
- [62] DIRKS W G, DREXLER H G. STR DNA typing of human cell lines: detection of intra- and interspecies cross-contamination [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 27-38.
- [63] AZARI S, AHMADI N, TEHRANI M J, et al. Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR)

- loci: report from the National Cell Bank of Iran [J]. *Biologicals*, 2007, 35(3): 195-202.
- [64] BARALLON R, BAUER S R, BUTLER J, et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(9): 727-32.
- [65] WAKUI M. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) [J]. *Rinsho Byori*, 2013, 61(11): 1008-17.
- [66] KIMBACHER C, PAAR C, FREYSTETTER A, et al. Cell line controls for the genotyping of a spectrum of human single nucleotide polymorphisms in the clinical laboratory [J]. *Clin Lab*, 2018, 64(5): 823-34.
- [67] DIDION J P, BUUS R J, NAGHASHFAR Z, et al. SNP array profiling of mouse cell lines identifies their strains of origin and reveals cross-contamination and widespread aneuploidy [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 847.
- [68] ALMEIDA J L, HILL C R, COLE K D. Mouse cell line authentication [J]. *Cytotechnology*, 2014, 66: 133-47.
- [69] 樊金萍, 袁宝珠. 用于鉴别猴源细胞及其交叉污染短串联重复序列图谱分析方法的建立[J]. *中国生物制品学杂志*(FAN J P, YUAN B Z. Establishment of a STR profiling for cell identification and evaluation of cross-contamination of monkey cell lines [J]. *Chin J Biologicals*), 2018, 31(8): 874-81.
- [70] CAPES-DAVIS A, REID Y A, KLINE M C, et al. Match criteria for human cell line authentication: where do we draw the line [J]? *Int J Cancer*, 2013, 132(11): 2510-9.
- [71] DEMICHELI F, GREULICH H, MACOSKA J A, et al. SNP panel identification assay (SPIA): a genetic-based assay for the identification of cell lines [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 2446-56.
- [72] CASTRO F, DIRKS W G, FÄHNRIK S, et al. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(2): 308-14.
- [73] MOHAMMAD T A, TSAI Y S, AMEER S, et al. CeL-ID: cell line identification using RNA-seq data [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(Suppl 1): 81.
- [74] MOHAMMAD T A, CHEN Y. Approaching RNA-seq for cell line identification [J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(3): e3507.
- [75] STRONG MJ, BADDOO M, NANBO A, et al. Comprehensive high-throughput RNA sequencing analysis reveals contamination of multiple nasopharyngeal carcinoma cell lines with HeLa cell genomes [J]. *J Virol*, 2014, 88(18): 10696-704.
- [76] OGURA H, FUJII R, HAMANO M, et al. Detection of HeLa cell contamination: presence of human papillomavirus 18 DNA as HeLa marker in JTC-3, OG and OE cell lines [J]. *Jpn J Med Sci Biol*, 1997, 50(4/5): 161-7.
- [77] LIN J, CHEN L, JIANG W, et al. Rapid detection of low-level HeLa cell contamination in cell culture using nested PCR [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 227-36.
- [78] FLYNN J, GORRY P. Flow Cytometry Analysis to Identify Human CD8⁺ T Cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2048: 1-13.
- [79] 张荣兴, 朱德厚, 葛锡锐. 不同中间丝类型细胞系间交叉污染的抗中间丝蛋白免疫荧光检测[J]. *细胞生物学杂志*(ZHANG R X, ZHU D H, GE X R. Detection of cross-contamination between different type cell lines by immunofluorescence staining with antibodies against intermediate filament proteins [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 1997, 19(3): 143-5, 149.
- [80] MOLDAI L L, CHENG C L, MOLDAI R S. Cell-specific markers for the identification of retinal cells and subcellular organelles by immunofluorescence microscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1834: 293-310.
- [81] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, PATTERSON G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells [J]. *Science*, 2003, 300(5616): 87-91.
- [82] ALBERTI D, VAN'T ERVE M, STEFANIA R, et al. A quantitative relaxometric version of the ELISA test for the measurement of cell surface biomarkers [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(13): 3488-91.
- [83] TEERENHOVI L, WASENIUS V, FRANSSILA K, et al. A method for analysis of cell morphology, banded karyotype, and immunoperoxidase identification of lymphocyte subset on the same cell [J]. *Am J Clin Pathol*, 1986, 85(5): 602-4.
- [84] SALINAS-JAZMÍN N, ROSAS-CRUZ A, VELASCO-VELÁZQUEZ M. Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(7): 861-76.
- [85] YE F, CHEN C, QIN J, et al. Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China [J]. *FASEB J*, 2015, 29(10): 4268-72.
- [86] KERRIGAN L, NIMS R W. Authentication of human cell-based products: the role of a new consensus standard [J]. *Regen Med*, 2011, 6(2): 255-60.
- [87] MARKOVIC O, MARKOVIC N. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34(1): 1-8.
- [88] BUEHRING G C, EBY E A, EBY M J. Cell line cross contamination: how aware are mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it [J]? *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2004, 40: 211-5.
- [89] HYSLOP L A, ARMSTRONG L, STOJKOVIC M, et al. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2005, 7: 1-21.
- [90] CHEN X, QIAN W, SONG Z, et al. Authentication, characterization and contamination detection of cell lines, xenografts and organoids by barcode deep NGS sequencing [J]. *NAR Genom Bioinform*, 2020, 2(3): lqaa060.
- [91] BIAN X, YANG Z, FENG H, et al. A combination of species identification and STR profiling identifies cross-contaminated cells from 482 human tumor cell lines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9774.
- [92] PARSON W, KIRCHEBNER R, MÜHLMANN R, et al. Cancer cell line identification by short tandem repeat profiling: power and limitations [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3): 434-6.
- [93] NIMS R W, SYKES G, COTTRILL K, et al. Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(10): 811-9.
- [94] SMITH G, MATHEWS D, SANDER-EFFRON S, et al. Microsatellite markers in biobanking: a new multiplexed assay [J]. *Biopreserv Biobank*, 2021, 19(5): 438-43.
- [95] GARTLER S M. Genetic markers as tracers in cell culture [J]. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1967, 26: 167-95.
- [96] HEALY L, HUNT C, YOUNG L, et al. The UK Stem Cell Bank: its role as a public research centre providing access to well-characterised seed stocks of human stem cell lines [J]. *Adv*

- Drug Deliv Rev, 2005, 57: 1981-8.
- [97] MASTERS J R, THOMSON J A, DALY-BURNS B, et al. Short tandem repeat profiling provide an international reference standard for human cell lines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 8012-7.
- [98] JOSEPHSON R, SYKES G, LIU Y, et al. A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines [J]. BMC Biol, 2006, 4: 28.
- [99] BABIC Z, CAPES-DAVIS A, MARTONE M E, et al. Incidences of problematic cell lines are lower in papers that use RRIDs to identify cell lines [J]. eLife, 2019, 8: e41676.