

生物制品生产所用细胞基质的支原体检查¹

本文描述了目前生物制品生产中所用的细胞基质支原体检测方法。

支原体检测建议所用的方法包括：A.培养法；B.指示细胞培养法；C.核酸扩增法（NAT）。

主细胞库、工作细胞库以及生产过程中的细胞培养都应进行支原体检查。检查应同时采用方法 A 和方法 B。需指出的是方法 C 可在进行适当的验证后替代方法 A 和/或方法 B。

采用方法 A 或方法 B 之前，应先确认样本中是否存在抑制支原体生长的因子。如果测试到抑制生长的因子，应采用合适方法中和或去除该物质，比如离心或细胞传代。

如果样本在获得后 24 小时内就进行检查，可存放于 2-8℃。如果超过 24 小时，样本应存放在 -60℃ 或更低温度。

如果样本中检查到了有支原体，进行支原体菌株的鉴定有助于确定污染源。

A. 培养法

1. 培养基

同时采用琼脂平板和肉汤培养基。每一批琼脂平板和肉汤培养基应不含除青霉素以外的其他抗生素。参考《生物制品最低要求》²中的有关培养基选择。如果能够满足下述第 2 条所描述的要求，其他培养基也可以采用。

2. 培养基适用性

每一批培养基都应检查支原体的生长特性。为了证明所选培养基能够检测已知支原体，每次检查都应设置质控。质控至少包括有 2 种已知种属或株型的支原体，其中之一应是葡萄糖发酵的（如肺炎支原体 ATCC 15531，NBRC 14401 或与之相当的种属或株型），另一种应该是精氨酸水解的（如口腔支原体 ATCC 23714，NBRC 14477 或与之相当的种属或株型）。用于阳性质控的支原体菌株应代数较低且来源于官方或权威机构，并恰当处理。以 100CFU 或 100CCU 或更少量接种于培养基。

3. 培养和观察

- 1) 均匀接种不少于 0.2mL 的检查样本（细胞悬浮液）于两块或更多块琼脂平板上。平板表面干燥后，放于含 5-10% CO₂ 的氮气环境中，35-37℃ 培养不少于 14 天。
- 2) 接种不少于 10mL 的检查样本（细胞悬浮液）于两管或更多管 100mL 肉汤培养基中，35-37℃ 培养。

如果培养基中含任何生长抑制因子，如抗生素，这些抑制因子应去除。生长抑制因子的验

证测试参考《生物制品最低要求》²中有关生长抑制因子检测中所描述的。

3) 分别在培养到第 3, 7, 14 天的各管中取 0.2mL 的肉汤培养物涂布于两块或更多的琼脂平板上。每 2 天或 3 天观察肉汤培养, 如果颜色发生变化, 则再次涂布于新的琼脂平板上。平板放于含 5-10% CO₂ 的氮气环境中, 35-37°C 培养不少于 14 天。

4) 所有平板在第 7 天和第 14 天, 用显微镜在 100 倍或更大倍数下检查克隆数。

B. 指示细胞培养法

采用 Vero 细胞基质, 100CFU 或 100CCU 或更少量的猪鼻支原体(ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC14858 或与之相当的种属或株型) 和口腔支原体(ATCC 23714, NBRC 14477 或与之相当的种属或株型) 预先测试方法的适用性。

其他细胞基质和支原体菌株如果检测已知支原体的灵敏度与上述细胞基质和支原体相当或更高, 也可以采用。支原体菌株代数较低且来源于官方或权威机构, 处理过程应得当, 接种前应确定接种量。细胞基质应来源于有资质的细胞库且保证无支原体污染。获得的细胞进行培养、传代, 制备无支原体污染的足量的种子细胞。种子细胞采用本文描述的至少一种方法检测支原体确保无污染, 然后冻存。每次测试都应从库中取一管新的细胞且确保代数在 6 代以内。

将盖玻片放于细胞培养皿或相当的容器中, 指示细胞应在盖玻片上培养 1 天。接种至少 1mL 测试样本(细胞培养上清) 至 2 个或更多的细胞培养皿中。

该测试应包括 1 个阴性对照(未感染)和 2 个阳性支原体对照, 如猪鼻支原体(ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC14858 或与之相当的种属或株型) 和口腔支原体(ATCC 23714, NBRC 14477 或与之相当的种属或株型)。阳性对照的支原体接种量为 100CFU 或 100CCU 或更少量。

细胞于 35-38°C, 5% CO₂ 条件下培养 3-6 天。

细胞固定后用 DNA 结合荧光染料, 如二苯并酰亚胺或类似的染料染色, 在落射显微镜(400-600 倍或更大倍数) 下进行观察, 对比测试物与阴性对照和阳性对照的显微分析情况。

过程

- 1) 将灭菌的盖玻片在无菌状态下放入细胞培养皿(35mm 直径)。
- 2) 用含 10% 胎牛血清的 EMEM(Eagle's minimum essential medium) 培养基准备 Vero 细胞悬浮液, 密度为 1×10^4 /mL。胎牛血清使用前应先确认无支原体污染。
- 3) 每个培养皿接种 2mL Vero 细胞悬浮液。确保盖玻片完全被培养基浸没, 没有漂浮在培养基表面。细胞于 35-38°C, 5% CO₂ 条件下培养 1 天, 使细胞贴在盖玻片上。
- 4) 用 2mL 新鲜培养基替换后, 加入 0.5mL 的测试样本(细胞培养上清) 至每个培养皿中。

阳性对照（2 种类型支原体，如猪鼻支原体（ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC14858 或与之相当的种属或株型）和口腔支原体（ATCC 23714, NBRC 14477 或与之相当的种属或株型））和阴性对照也做相同处理。

- 5) 于 35-38℃，5% CO₂ 条件下培养 3-6 天。
- 6) 移去培养皿中的培养液，加入 2mL 醋酸（100）和甲醇的混合物（1:3，固定液），放置 5 分钟。
- 7) 移去培养皿中固定液，再次加入相同量的固定液，放置 10 分钟。
- 8) 移去培养皿中固定液，完全晾干培养皿。
- 9) 各培养皿中加入 2mL 二苯并酰亚胺荧光染料溶液，加盖，室温放置 30 分钟。
- 10) 移去染料溶液，用双蒸水洗涤 3 次，每次 2mL。去除盖玻片，晾干。
- 11) 在每块盖玻片上滴一滴封固液。擦去盖玻片边缘的封固液。
- 12) 用落射荧光显微镜在 400-600 倍或更大倍数下进行观察。
- 13) 对比测试物与阴性质控和阳性质控的显微分析情况。
- 14) 如果超过 0.5%（每 1000 个细胞中 5 个）的细胞出现荧光点环绕在细胞核外围，则判定为阳性。

C. 核酸扩增法（NAT）

核酸扩增法是利用特异引物扩增来自细胞或病毒的基因或 mRNA 的核酸序列，扩增产物可采用多种方法检测。支原体核酸扩增法采用支原体靶序列特异性的引物/探针扩增从样本（细胞悬浮液或细胞培养上清）提取的核酸，具有较高的灵敏度。核酸扩增法可以检出是否有支原体靶序列存在但不能确定是否为活支原体。

核酸扩增法不止限于一种方法，不同方法都可以使用。但使用 NAT 方法前需进行方法验证，包括灵敏度、专属性、耐用性，保证该方法不受提取方法参数改变或反应混合液组分更改而影响。任何核酸扩增法只要按照本章进行专属性和灵敏度验证，都可以使用。若使用商业化试剂盒，验证可以由生产商进行并提供相关信息给用户。但是，用户可能由于仪器和测试的靶细胞不同而得出不同的结果。用户应使用自身的实验设施来确认厂商的验证结果。如果用户的靶细胞与厂商不同，试剂盒的检测限和重复性应使用用户关注的细胞进行确认。如果用户的提取方法和检测仪器等与厂商不同，应进行验证。

此外，由于厂商未必能提供引物/探针或试剂盒中试剂的信息，应采取方法确保试剂盒更新后获得相关更新信息。如果试剂盒中试剂的组分有更改，用户应确认该试剂盒检测目标支原体

的检测限和检测的准确度与之前的试剂盒相当。另一方面，考虑到商业化试剂盒可能存在无法供货的情况，应考虑后备合适的可替代方法。

由于细胞培养过程中支原体生长的细胞依赖性，应选择细胞悬浮液作为测试样本而非细胞上清液。如果采用细胞培养上清作为测试样本，应对检测方法进行验证以确保可以完全检出细胞培养物中的支原体污染。

如果核酸扩增法按照下文描述方法进行验证且对所列出的不同种属支原体具有足够的灵敏度，可以替代方法 A 和/或 B。

为了增加检测灵敏度，可以将待测样本与 Vero 细胞一起培养，富集样本中可能存在的支原体。同样，采用该方法需进行验证以显示方法对所列不同种属支原体有足够的灵敏度。

C-1. 核酸扩增法检测支原体

该测试方法应包括一个阳性对照(例如 100CFU 或 100CCU 或更少量的 ATCC 17981, NBRC 14858 或与之相当的其他种属或株型) 和一个阴性对照。用于阳性对照的支原体菌株应代数较低且来源于官方或权威机构，处理过程应得当。接种量应在使用前确定。细胞悬浮液作为测试样本时，需进行预测试确认细胞核酸对 NAT 的影响，并确认阴性对照也没有获得阳性信号。阴性对照是没有支原体污染的细胞。如果样本无支原体序列扩增则判定检测结果通过。

C-2. 预防措施

由于核酸扩增方法可以检测到微量核酸，来自于设备、仪器、试剂等污染带来的扩增产物会导致假阳性。为降低污染风险，尽可能每个步骤分区进行，包括试剂储存和配制、核酸抽提、核酸扩增、扩增产物检测，并有特别的预防措施。为避免扩增产物带来的假阳性结果，可以在实验过程中引入 UNG 酶。为避免样本抽提效率低或样本中存在影响扩增的干扰物质带来的假阴性结果，推荐随行该测试细胞的管家基因作为内部质控。

另一方面，如果使用自动化封闭系统进行抽提和扩增，则不必采取分区操作。但将扩增产物从自动化系统取出丢弃时应做好措施以防污染。

C-3. 支原体检测核酸扩增法的验证

用于检测目标序列的核酸扩增法可以是定量的也可以是定性的。细胞基质的支原体污染检测定性方法即可，可把该检测认为是限度测试。本节描述用于评估支原体污染的定性核酸扩增法的方法验证。这些验证方法也可用于有最佳临界值的定量核酸扩增法。

分析过程最重要的验证参数是专属性和检测限。此外，还可以评估分析过程的耐用性。本文介绍的核酸扩增法验证应包括从提取到检测的整个过程。

如果商业化试剂盒用于整个或部分分析过程，试剂盒供应商提供的全面验证数据文件可以取代用户的验证数据，用户无需进行全面验证。但用户需针对自身测试系统测试试剂盒的性能（如专属性、检测限）。

核酸扩增法可用于：

- 过程控制
- 方法 A 和/或 B 的替代方法

本章节基于上述应用将呈现 2 个原则，一个用于核酸扩增法的方法验证，另一个用于核酸扩增法与方法 A 或方法 B 的对比研究。

在 NAT 的专属性或检测限验证的不同阶段都需要支原体参考菌株。这些参考菌株的浓度可以是 CFU 的，也可以是等效的拷贝数的。常规测试中，支原体参考株或由支原体参考株校准浓度后的测试样本可作为阳性对照。支原体或支原体核酸（如质粒）可以用作阳性对照。支原体在方法验证过程，包括提取效率中需要用到。

1) 评估参数

需评估 3 个参数：专属性，检测限和耐用性。

2) 专属性

专属性是指在样本中能够明确检测到目标核酸存在的能力。核酸扩增法的专属性依赖于引物/探针的选择和测试条件的严谨性（包括扩增和检测步骤）。

选择特异的及对绝大多数支原体（柔膜体纲，如支原体属和相关种属如解脲支原体，螺原体，无胆甾原体等）保守的序列来设计引物/探针是相当重要的。核酸扩增法检测支原体种属的能力应该由检测 3 中所列的参考支原体的实验结果来确认，而不推荐采用引物/探针与数据库比对的方法。

3) 检测限

检测限是一个分析方法对样本中目标核酸能检测出的最低量，但无需准确定量。在建立分析方法的检测限时，需要确定核酸扩增分析的阳性临界值。阳性临界值是 95% 的测试中能被检测到的每体积样本中的目标序列拷贝数。阳性临界值受每份样本中支原体核酸序列和诸如酶效率等因子影响，在不同的测试中会有不同的 95% 的临界值。确定阳性临界值需对表征过的且已校准（CFU 或核酸拷贝数）的支原体参考株或国际标准株做一系列的梯度稀释，并于不同时间（日间）进行检测以检查测试间的差异。

检测限的验证需用到如下支原体种属。这些种属是根据生物制品生产所用的哺乳细胞、种

系亲缘关系以及培养和生产过程中用到的动物来源组分中支原体种属污染频率而确定。这些支原体只用于核酸扩增法的验证，而非用作常规检测的阳性质控。

- 莱氏无胆甾原体（ATCC 23206，NBRC14400 或与之相当的种属或株型）
- 精氨酸支原体（ATCC 23838 或与之相当的种属或株型）
- 发酵支原体（ATCC 19989，NBRC14854 或与之相当的种属或株型）
- 猪鼻支原体（ATCC 17981，NBRC14858 或与之相当的种属或株型）
- 口腔支原体（ATCC 23714，NBRC 14477 或与之相当的种属或株型）
- 肺炎支原体（ATCC 15531，NBRC 14401 或与之相当的种属或株型）
- 唾液支原体（ATCC 23064，NBRC 14478 或与之相当的种属或株型）

若生产过程采用的是昆虫或植物细胞，则除上述支原体外，还应增加来源于昆虫或植物的支原体种属（如柠檬螺旋原体）。若生产过程采用或暴露于禽类细胞或材料，来源于禽类的支原体种属需被测定以确定是否有禽类支原体被检测出（如鸡滑液囊支原体）。

为确定检测限，支原体要进行合适的梯度稀释（10 倍或 $10^{0.5}$ 倍）。用于稀释的支原体须进行浓度评估（如 CFU 计数）。每个稀释度都进行核酸扩增。基于稀释度来显示检测限，阳性临界值应由测试样本的目标序列的最小 CFU 数决定。假如采用电泳分析扩增产物，荧光染色检测到阳性条带，需确认无支原体的细胞样本是否未出现该阳性条带。采用定量 PCR 方法需设定合适的循环数临界点，且该临界点设定需经过验证。由于样本核酸的提取效率会影响检测灵敏度，细胞悬浮液中的支原体检测应进行评估。

对于上述所列的每种支原体参考株，至少设置 3 个独立的 10 倍稀释的系列浓度测试，同时每个浓度应设置足够的重复以保证每个浓度可有 24 个结果，以进行统计学分析。例如，实验室可以在不同日测试 3 个稀释浓度，每个稀释浓度设置 8 个重复；或者在不同日测试 4 个稀释浓度，每个稀释浓度设置 6 个重复；或者在不同日测试 6 个稀释浓度，每个稀释浓度设置 4 个重复。为保证稀释度在可控范围内，应预先测定一个阳性临界值的初步值（例如有阳性信号的最高稀释度）。稀释度范围可以根据初步的阳性临界值选择。95% 的测试中能被测到的支原体浓度可以用合适的统计学方法进行计算。这些结果也可以用于评估分析过程的差异。

4) 耐用性

分析过程的耐用性是指方法参数有小的变动时，测定结果不受其影响的能力，同时为在正常使用中表明其可靠性。

开发阶段就应评估耐用性。耐用性应显示方法参数有小的变动时分析过程的可靠性。对于

核酸扩增法，方法参数小的变动就至关重要。方法开发阶段，在测试试剂（如 $MgCl_2$ ，引物和脱氧核糖核酸）浓度时，浓度变化就可以用于验证耐用性。此外，还可以评估提取试剂盒或提取过程的优化以及不同类型的 PCR 仪。

5) 核酸扩增法替代方法 A 和/或方法 B

核酸扩增法可以取代方法 A（培养法）和/或方法 B（指示细胞培养法）。这种情况下，需进行可比性研究。该可比性研究主要包括核酸扩增法与方法 A 和/或方法 B 的检测限的对比。此外，专属性（多种的支原体检测，假定的假阳性结果）也应该在对比中。

检测限的可接受标准如下：

- 如果用于取代方法 A（培养法），核酸扩增系统对 3 中所列的每种支原体应能检测到 10CFU/mL。
- 如果用于取代方法 B（指示细胞培养法），核酸扩增系统对 3 中所列的每种支原体应能检测到 100CFU/mL。

针对这两种情况，都应使用合适的标准品以校准 CFU 数，以确定能达到这些标准。

可以采用如下 2 条策略中的其中 1 条进行此可比性研究：

- 采用同种校准株（有 CFU 数）同时对比核酸扩增法和方法 A 或方法 B 的检测限。
- 采用方法 A 或方法 B 的历史数据与核酸扩增法进行对比。这种情况 2 种方法所使用的参考菌株都需要校准，还需对他们的稳定性进行仔细研究。

可比性研究的检测限也可以通过检测样本中支原体的核酸拷贝数等进行。这种情况需先确定 CFU 数和核酸拷贝数之间的关系。

6) 质控

- 内部质控：方法验证中，内部质控用于确认扩增反应不受样本基质抑制。内部质控用来确认常规的提取和扩增是否受到抑制也是必要的。内部质控可能包含引物结合位点或其他合适的序列也是可以用的。建议在分离核酸之前，内部质控加入到样本中以控制包括提取、反转录、扩增和检测的整个过程。样本来源的细胞基因也可用作内部质控。
- 外部质控：外部阳性质控是一个确定拷贝数的目标序列或者是以 CFU 计数的一种或多种支原体。这样的支原体是已验证过的符合测试条件的。其中的一种阳性质控值应接近阳性临界值，以证明可以达到期望的灵敏度。外部阴性质控不含目标序列，也不必与测试样本的基质相同。

7) 结果解释

引物/探针可能会扩增非支原体核酸而导致假阳性。必要时，应在确定阳性结果时应建立一个确认程序。

C-4 支原体与 Vero 细胞共培养方法

- 1) 每个检查样本、阳性质控、阴性质控都至少需要 2 个细胞培养皿。
- 2) 2ml Vero 细胞（密度 $1 \times 10^4/\text{mL}$ ）悬液接种到含 10%胎牛血清（胎牛血清使用前应先采用核酸扩增法确认无支原体污染）的 EMEM（Eagle's minimum essential）培养基的细胞培养皿（直径 35mm）中。培养皿放置在 35-38℃，5% CO₂ 条件下培养 1 天。
- 3) 用新鲜培养基替换后，将 0.5mL 检查样本（细胞培养上清）加入至 2 个或更多个 Vero 细胞的培养皿中。阳性质控（100CFU 或 100CCU 的猪鼻支原体（ATCC 17981, NBRC14858 或与之相当的种属或株型）和阴性质控也进行相同处理。
- 4) 上述检查样本、阳性质控、阴性质控的培养皿在 35-38℃，5% CO₂ 条件下培养 3-6 天。

（宗伟英 译，杨志行 校）

中国科学院上海生命科学研究院湖州营养与健康产业创新中心

湖州申科生物技术有限公司

文章来源：

1. Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/ Biological Products. p2460~2464, Biotechnological/Biological Products / General Information, JP XVII.
2. MINIMUM REQUIREMENTS FOR BIOLOGICAL PRODUCTS. National Institute of Infectious Diseases, Japan, 2006.