

朱亮,屠珏,王德军. 非人哺乳动物细胞系身份鉴定的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 413-416.
Zhu L, Tu J, Wang DJ. Authentication of non-human mammalian cell lines [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 413-416.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.018

非人哺乳动物细胞系身份鉴定的研究进展

朱亮,屠珏,王德军*

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

【摘要】 非人哺乳动物细胞系在医学生物学研究中正起着越来越重要的作用。与人源细胞一样,非人哺乳动物细胞在使用中也面临着错用、污染和变异的问题。但与人源细胞相比,非人哺乳动物细胞受到的关注比较少,细胞身份鉴定技术发展较慢。目前对非人哺乳动物细胞系身份鉴定的研究主要集中在小鼠、中国仓鼠和非洲绿猴 3 个物种,方法以短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 标记检测为主,单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析为辅。本文就非人哺乳动物细胞系身份鉴定技术在不同物种中的发展现状进行综述。

【关键词】 非人细胞系;细胞系身份鉴定;质量控制;短串联重复序列
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0413-04

Authentication of non-human mammalian cell lines

ZHU Liang, TU Jue, WANG Dejun*

(Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: WANG Dejun. E-mail: wdj0369@126.com

【Abstract】 Non-human mammalian cell lines play an increasingly important role in medical and biological research. Like human cells, non-human mammalian cells face the problems of misuse, pollution and variation. However, compared with human cells, the authentication of non-human mammalian cell lines has received less attention and has not yet been fully explored. To date, research into the authentication of non-human mammalian cell lines has mainly focused on cell lines from mice, Chinese hamsters, and African green monkeys. The authentication method mainly use short tandem repeat (STR) markers, supplemented by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. Here, we review the development of the authentication of non-human mammalian cell lines in different species.

【Keywords】 nonhuman cell line; cell line authentication; quality control; short tandem repeats
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验细胞系为研究者提供了取之不尽、经济实惠的医学生物学研究材料。利用细胞系模拟人体生物学机制,检测治疗效果以及合成治疗用蛋白已成为常用的研究手段。在动物细胞使用过程中,细胞系误用、细胞系间交叉污染和长期传代导致细胞遗传变异这三个问题长期困扰着学术界和产业界^[1-5]。

针对人源细胞,研究者开发了多种细胞来源鉴定方法,主要有染色体核型分析、同工酶分析、多位

点 DNA 指纹分析、短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 标记检测、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析、RNA 序列分析,乃至全基因组测序分析。从检测准确度、技术普及度、人力物力和时间成本各方面综合考虑,目前 STR 标记检测法是最佳选择。2011 年美国国家标准学会 (ANSI) 和美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 发布了人源细胞系 STR 标记检测标准,对人源细胞系鉴定的必要性和操作方法进行了详尽的说明^[6],确立

[作者简介] 朱亮 (1978—),女,副研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email:20061047@zcmu.edu.cn
[通信作者] 王德军 (1975—),男,正高级实验师,研究方向:实验动物与比较药理。Email:wdj0369@126.com

了 STR 标记检测法在细胞系身份鉴定中的核心地位。美国典型培养物保藏中心(ATCC)、德国微生物与细胞保藏中心(DSMZ)、日本研究生物资源细胞库(JCRB)和日本理化研究所生物资源中心(RIKEN)等权威细胞库都对保藏的人源细胞系进行了 STR 标记检测,并建立了人源细胞系 STR 标记数据库。

与人源细胞相比,非人源细胞污染现象同样严峻,但受到的关注比较少,鉴定技术发展较慢。德国最权威的细胞库 DSMA 对其保藏非人源细胞系检测结果显示,细胞交叉污染率为 6%,而人源细胞交叉污染率为 10%^[7]。日本 RIKEN 生物资源中心的研究显示,该中心保藏的小鼠细胞系错误率为 4.2%,与该中心人源细胞系错误率相当^[8]。因此,非人源细胞系,尤其是常用的哺乳类实验动物细胞系急需准确可靠的身份鉴定技术。

目前,非人哺乳类动物细胞系身份鉴定技术的研究报道仅见于小鼠、中国仓鼠和非洲绿猴。本文将对这 3 个物种的细胞系鉴定技术进行总结,旨在让使用相关细胞的研究人员对其有一个系统的认识。

1 小鼠细胞系鉴定

在研究人类基因和疾病的过程中,小鼠是最常用的模型系统。小鼠细胞被用于重组蛋白的生物工程制造^[9],也被作为滋养层细胞用于胚胎干细胞培养^[10]。尤其是伴随着以 CRISPR/Cas9 为代表的基因技术的进步,越来越多的基因工程小鼠和新细胞系在研究中产生,需要有可靠的方法进行区分鉴别。

相比人源细胞,小鼠细胞身份鉴定较困难,鉴定方法还没有像人源细胞那样被充分建立。这主要是因为大部分的小鼠细胞系来源于少数近交品系,广泛的杂交使得大量等位基因在不同小鼠品系间分布,而人源细胞的来源不存在近交和品系杂交的现象。因此,完全参照人源细胞鉴定使用的 STR 标记检测法,无法满足精确鉴定小鼠细胞系的要求。

1992 年,麻省理工学院的 Dietrich 等^[11]发布了小鼠遗传连锁图,包括 317 个 STR 标记,覆盖 99% 的小鼠基因组。这 317 个 STR 标记被称为 MIT 标记,被广泛用于多领域,也成为小鼠细胞系鉴定用 STR 标记的来源。经过长期的研究和改进,一个包括 18 个小鼠 STR 标记和 2 个人 STR 标记(用于鉴

别种间污染)的组合表现出了较高的鉴定精度。该技术在来自美国、英国和瑞士的 12 个实验室间进行了检测对比试验,结果显示条带一致率保持在 92% 以上。证明其能够实现小鼠细胞系的鉴定^[12]。但小鼠 STR 标记也有其局限性:在多次传代细胞系中的稳定性和近缘品系鉴别中的分辨力表现不稳定^[12-13],以及无法检出细胞传代中出现的染色体拷贝数变化^[14-16]。

SNP 的全称是单核苷酸多态性,即由单个核苷酸碱基的改变而导致的核酸序列的多态性。尽管就单个 SNP 标记而言只有两种变异体,变异程度不如 STR 标记,但 SNP 标记在基因组中数量巨大,分布频密。因此就整体而论,它们的多态性要高于 STR 标记。SNP 标记与 STR 标记的鉴别效率相似^[17],且 SNP 标记能够检出细胞核倍数改变,弥补 STR 标记的局限性。但是 SNP 标记检测成本较高,尚未建立标准化的检测流程。目前在小鼠细胞系身份鉴定中,SNP 标记检测常被作为 STR 标记检测的补充方法使用。

2 中国仓鼠卵巢细胞鉴定

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞是外源真核基因的最佳蛋白表达系统之一,也是生物制药中最常用的哺乳动物细胞。为了规范依托 CHO 的重组蛋白表达生产系统,避免细胞污染和错用,有必要对 CHO 细胞进行来源鉴定。

美国国家标准与技术研究院(NIST)正在研发针对 CHO 细胞系的 STR 标记,截止 2017 年 9 月,已经筛选得到 7 个四碱基重复 STR 标记,能够在中国仓鼠基因组 DNA 中稳定扩增,同时无法在其他啮齿类动物中获得扩增产物,说明其具有中国仓鼠物种特异性,可以满足种间鉴别的要求。稳定性研究显示,这 7 个 STR 标记在 CHO-K1 细胞系中产生的检测结果,可以在传代 35 代后保持结果不变,具有高度稳定性^[18]。NIST 研究小组正在开发更多的 STR 标记,以达到种内鉴别的目标。

3 非洲绿猴细胞鉴定

非洲绿猴(African green monkey)属灵长目、猕猴科。1962 年从非洲绿猴的肾上皮细胞中分离培养得到的异倍体细胞(Vero cells)被广泛用于病毒扩增、疫苗开发和细胞毒性实验^[19-24]。

为监控和防止非洲绿猴细胞的错用和污染,研

究者建立了 Vero 细胞的 STR 标记鉴定体系。目前没有非洲绿猴的基因组数据,但其与人类的近缘性使得其与人类共享大量 STR 区域。Almeida 等^[25]根据以下四个标准从大量人 STR 标记中筛选出 8 个组成非洲绿猴鉴定体系:(1)杂合度高于 50%;(2)每个位点有至少四个等位基因;(3)扩增成功率高;(4)标记重复单元为四碱基。以 62 只非洲绿猴基因组为材料的实验显示,这 8 个 STR 标记能够精确区分来自不同非洲绿猴个体的细胞,误差低至一百九十万分之一^[26]。但同时,研究者也指出,这 8 个 STR 标记的组合无法分辨来自同一个体的不同细胞系。例如,来自同一只绿猴肾的 COS-7 细胞系和 CV-1 细胞系的基因组序列一样,STR 标记检测结果也一样,需要通过 SV40 T 抗原检测来区分^[26]。

4 新的方法

STR 标记鉴定和 SNP 标记鉴定是目前非人源动物细胞身份鉴定的常用方法。两者都局限于基因组的特定区域,无法全面检测各种类型的序列变化。随着二代测序技术成本和检测周期的持续下降,利用测序技术来鉴定细胞身份成为可能^[27]。基于序列信息的细胞鉴定方法中最被看好的是 RNA 测序法。

RNA 序列检测最早在 2014 年被用来验证人肺癌细胞和结肠癌细胞来源和污染情况^[28-29]。后来研究者尝试将其应用于细胞系鉴定。Mohammad 等^[30]收集了 934 个常用人细胞系的 RNA 序列信息,并建立数据库,提供比对服务。细胞使用者只需要将序列比对信息(bam file)或序列变异信息(vcf file)输入,数据库就会进行配对比较并返回最匹配的细胞名称。如果匹配度低,数据库还能推测可能的污染细胞。相较于 STR 或 SNP 标记法只局限于有限的固定区域,RNA 法测序法的最大优势在于其以完整的转录组变异数据为判断依据,从而避免了前者由于等位基因丢失导致的错判。在等位基因重叠率较高的实验动物中,这一优势显得格外有意义。

5 结语

目前,已建立的非人哺乳动物细胞身份鉴定技术仅针对小鼠、中国仓鼠和非洲绿猴 3 个物种,技术以 STR 标记检测法为主。覆盖物种少,分析软件单一,数据库完善程度参差不齐是该领域有待解决的

问题。

首先,增加检测物种。需要建立针对更多物种,尤其是在生物医学研究中越来越重要的实验动物的细胞系身份鉴定方法,以规范科学研究中动物细胞的使用,从而保证实验结果的准确性。其次,开发分析软件。目前有很多软件可用于测序片段的拼接、比对和变异识别,但绝大部分是针对人类测序数据的。针对非人哺乳动物细胞鉴定的分析软件数量少且功能有限。因此,针对非人物种的序列拼接、比对和变异识别工具的开发将是未来发展的重点。最后,完善数据库。细胞系 STR 标记鉴定法很大程度上依赖于实验数据与已有数据的比对,分析软件的开发必定基于相关数据库的建立和完善。如果没有详实全面的数据作为基础,就不能保证后续分析是基于合理的前提假设,那么得出的结论就不可靠。甚至可以说,细胞遗传信息数据库的建立和实验数据本身同等重要。

参 考 文 献(References)

- [1] Lorsch JR, Collins FS, Lippincott SJ. Fixing problems with cell lines [J]. Science, 2014, 346(6216): 1452-1453.
- [2] Masters JR. Cell-line authentication: end the scandal of false cell lines [J]. Nature, 2012, 492(7428): 186.
- [3] Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP, et al. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication [J]. Nat Methods, 2015, 12(6): 493-497.
- [4] Capes DA, 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.
- [5] Lacroix M. Persistent use of "false" cell lines [J]. Int J Cancer, 2010, 122(1): 1-4.
- [6] Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling. ANSI/ATCC. ASN-0002-2011 [EB/OL]. [2020-10-15] <https://webstore.ansi.org/Search/Find?in=1&st=asn0002>
- [7] Dirks WG, Drexler HG. STR DNA typing of human cell lines: detection of intra- and interspecies cross-contamination [J]. Methods Mol Biol, 2013, 946: 27-38.
- [8] Yoshino K, Saijo K, Noro C, et al. Development of a simple method to determine the mouse strain from which cultured cell lines originated [J]. Interdisciplinary Bio Central, 2010, 2(4): 141-149.
- [9] Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ. Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NSO expression system [J]. Biotechnol Bioeng, 2001, 73(4): 261-270.
- [10] Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, et al. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells [J]. Int J Dev Biol, 2008, 52(4): 353-363.

- [11] Dietrich W, Katz H, Lincoln SE, et al. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses [J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 423–447.
- [12] Almeida JL, Dakic A, Kindig K, et al. Interlaboratory study to validate a STR profiling method for intraspecies identification of mouse cell lines [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218412.
- [13] Castro F, Dirks WG, Fährnich S, et al. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2012, 132(2): 308–314.
- [14] Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, et al. The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8143–8149.
- [15] Rebuzzi P, Neri T, Zuccotti M, et al. Chromosome number variation in three mouse embryonic stem cell lines during culture [J]. *Cytotechnology*, 2008, 58(1): 17–23.
- [16] Peterson SE, Westra JW, Rehen SK, et al. Normal human pluripotent stem cell lines exhibit pervasive mosaic aneuploidy [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23018.
- [17] Didion JP, Buus RJ, 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.
- [18] Chinese hamster ovary (CHO) cell line authentication. National Institute of the Standards and Technology [EB/OL]. [2020–10–15]. <https://www.nist.gov/programs-projects>
- [19] Montagnon BJ, Fanget B, Nicolas AJ. The large-scale cultivation of Vero cells in micro-carrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine [J]. *Dev Biol Stand*, 1981, 47: 55–64.
- [20] Vincent FJC, Peyron L, Souvras M, et al. Qualification of working cell banks for the Vero cell line to produce licensed human vaccines [J]. *Dev Biol Stand*, 1989, 70: 153–156.
- [21] Montagnon BJ. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line [J]. *Dev Biol Stand*, 1989, 70: 27–47.
- [22] Barrett PN, Berezuk G, Fritsch S, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a Vero-cell-culture-derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2011, 377(9767): 751–759.
- [23] Govorkova EA, Kaverin NV, Gubareva LV, et al. Replication of influenza A viruses in a green monkey kidney continuous cell line (vero) [J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(1): 250–253.
- [24] Halter M, Almeida JL, Tona A, et al. A mechanistically relevant cytotoxicity assay based on the detection of cellular green fluorescent protein [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2009, 7(4): 356–365.
- [25] Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers [J]. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 102.
- [26] Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants [J]. *Cell*, 1981, 23(1): 175–182.
- [27] Almeida JL, Cole KD, Plant AL. Standards for cell line authentication and beyond [J]. *PLoS Biol*, 2016, 14(6): e1002476.
- [28] 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): 10696–10704.
- [29] Fasterius E, Raso C, Kennedy S, et al. A novel RNA sequencing data analysis method for cell line authentication [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171435.
- [30] Mohammad TA, Tsai YS, Ameer S, et al. CeL-ID: Cell line identification using RNA-seq data [J]. *BMC Genom*, 2019, 20(1): 81.

[收稿日期] 2020–10–16