

## Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах

Н. Д. Ёлшин, А. В. Петров

Федеральное государственное унитарное предприятие  
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
Федерального медико-биологического агентства,  
197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7

Поступила 08.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Микоплазмы — основные контаминанты клеточных культур. Персистируя в клеточных культурах, микоплазмы многообразно влияют на функционирование клеток-хозяев. Проведение экспериментов на таких контаминированных клетках нерационально, как и наработка в них белка. Цель работы — изучить возможность быстрого выявления контаминации микоплазмами культур клеток и биотехнологических продуктов с воспроизведением ранее разработанной методики, при внесении в нее упрощающих модификаций, повышающих доступность такого анализа в России, а также оценить возможность валидации методики для контроля в процессе производства. Из уже существующих методик детекции микоплазмы методом qPCR (quantitative PCR) была выбрана наиболее пригодная для работы, произведена модификация анализа: дорогостоящие и недоступные к синтезу в России MGB-зонды были заменены на обычные флуоресцентные. Воспроизводимость и чувствительность модифицированной методики были изучены на примере работы с *M. hominis*. Чувствительность данного теста достигает 10 генных копий микоплазм на реакцию. На основании сопоставления полученных результатов и регламентируемых нормативными документами требований к методам детекции микоплазм сделан вывод, что предложенная методика на основе qPCR анализа хорошо подходит для своевременной и регулярной проверки культур клеток на предмет контаминации микоплазмами, теоретически нет никаких противоречий с современной регламентирующей документацией для использования этого метода в качестве основного.

**Ключевые слова:** микоплазмы; контаминация клеточных культур; qPCR определение микоплазм; контроль качества биотехнологических продуктов.

**Библиографическая ссылка:** Ёлшин Н.Д., Петров А.В. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2017; 17(3): 173–179.

Представители класса Mollicutes — микоплазмы — являются самыми малыми из ныне известных прокариот, способных к самовоспроизведению. Обладая малым количеством генетической информации, скудными синтетическими возможностями и не имея клеточной стенки, микоплазмы занимают широкую экологическую нишу и распространены практически повсеместно исключительно благодаря сосуществованию с высшими эукариотами.

Обнаруженная впервые 60 лет назад контаминация клеточных культур микоплазмами — сейчас уже хорошо известная любому биотехнологу проблема. Хотя имеется много данных о высоких уровнях контаминации культур в лабораториях [1], очевидно, что с ростом озабоченности этой проблемой очищение от микоплазмы должно происходить стремительно, учитывая хорошо разработанные методы эрадикации [2]. Источником спонтанного заражения сред является сам исследователь или компоненты сред (сыворотки крови животных).

Микоплазмы — основные контаминанты клеточных культур [3]. Урон, который наносится микоплазмами исследованию или производству многообразен. Обедняя среду, микоплазма, как минимум, угнетает клеточный рост культуры. Персистируя в культуре, микоплазмы могут приводить к целому спектру повреждений клеток: от почти незаметных морфологических изменений до апоптоза [4]. Микоплазмы изменяют различные свойства культивируемых клеток: метаболизм, пролиферацию, сигналинг и экс-

прессию генов [5]. Их присутствие в клетках может вызывать нарушения целостности мембран клеток-хозяев и функционирования мембранных рецепторов. Микоплазмы ингибируют слияние клеток при работе с гибридной технологией, влияют на стабильность малых интерферирующих РНК [6]. Показано, что при такой контаминации происходит повреждение хромосом клеток-хозяев [7].

Таким образом, сложно правильно интерпретировать любые результаты исследования, проведенного на линии клеток, зараженной микоплазмой. Также, безусловно, недопустима контаминация терапевтических продуктов микроорганизмами. Нецелесообразным является любое ведение линий, зараженных микоплазмой, следовательно, возникает необходимость постоянного контроля возможной контаминации.

### Образцы для анализа

Образцами для анализа в большинстве случаев служат образцы ДНК, выделенной из клеток и супернатантов клеточных культур. Хотя это и возможно, но образцы супернатантов без выделения ДНК при анализе лучше не использовать, поскольку ПЦР часто ингибируется компонентами сред или секретируемыми белками, в таком случае внутренний контроль реакции особенно актуален. Для выделения ДНК из клеточных культур доступна масса наборов

и протоколов для самостоятельного приготовления необходимых буферов.

Отечественная фармакопея описывает испытание на присутствие микоплазм для посевных клеток, мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, посевного и рабочего вирусных банков, готового лекарственного препарата, которые согласно нормативной документации не должны содержать микоплазм [8].

## Методы определения микоплазм

Микоплазмы сложно детектируются, так как не видны при фазово-контрастной микроскопии и многие имеют очень низкую скорость роста в культуре. Микоплазмы столь малы (0,15–0,3 мкм), что могут проходить через фильтры, через которые обычно фильтруют культуральные среды. При этом даже их огромное количество в среде невозможно определить визуально.

Методы, которыми может определяться присутствие микоплазм, в соответствии с требованиями отечественной [8] и Европейской фармакопей [9]: культуральный (микробиологический) метод и цитохимический (метод индикаторной клеточной культуры). В отечественной фармакопее разрешено использование альтернативных методов исследования, однако отсутствуют рекомендации по валидации. Подходы к валидации методов амплификации нуклеиновых кислот для определения присутствия микоплазм имеются в Европейской фармакопее.

**Культуральный метод.** Рекомендован в последних изданиях американской, европейской, японской фармакопей в качестве «золотого стандарта» определения микоплазм, имеет ряд недостатков [10]:

- длительное время анализа — требует 28 суток,
- чувствительность теста сильно зависит от правильного приготовления сред и качества компонентов сред,
- ложноотрицательные результаты также могут быть получены из-за неправильного хранения образца перед анализом: на жизнеспособность микоплазм может повлиять время и температура хранения образца, т.е. не будут обнаружены присутствующие, но уже нежизнеспособные микоплазмы.

Несмотря на эти недостатки, в фармакопеях рекомендовано в качестве основного метода для определения микоплазм использовать именно культуральный метод.

**Метод индикаторной клеточной культуры.** Основан на внесении испытуемого образца в клеточную культуру, чувствительную к микоплазмам (обычно Vero), и последующей обработке культуры клеток специфическим флуоресцирующим красителем Hoechst-33258. После инкубации с красителем его сливают и микроскопируют клетки в люминесцентном микроскопе. Недостатки этого метода: длительное время анализа (инкубация в течение 5 суток), метод не прост в использовании, необходимы специальная клеточная культура, среды, а также люминесцентный микроскоп.

**Методы амплификации нуклеиновых кислот.** Самым простым и доступным из этой группы методов является ПЦР (полимеразная цепная реакция) — многократное увеличение количества копий представленной в образце ДНК при наличии необходимых компонентов реакции (нуклеотиды, ДНК-полимераза, праймеры) и термостатирования. За счет увеличения количества копий достигается высокая чувствительность метода. При срав-

нении метода индикаторной клеточной культуры, культурального метода и методов амплификации нуклеиновых кислот, по фактической чувствительности ПЦР проигрывает культуральному методу, однако многократно выигрывает по времени — скорость анализа методом ПЦР в реальном времени с учетом выделения ДНК занимает 3–4 часа. Данный метод однозначно наилучшим образом подходит для быстрой рутинной проверки образцов на присутствие микоплазм. Также только такой быстрый метод, как ПЦР, может быть использован для проверки промежуточных продуктов, таких как биомасса из биореактора, которую часто необходимо подвергать немедленной обработке.

Целью работы являлось изучение возможности быстрого выявления контаминации микоплазмами клеточных линий и биотехнологических продуктов с воспроизведением ранее разработанной методики, при внесении в нее упрощающих модификаций, повышающих доступность такого анализа в России, а также после определения чувствительности оценить возможность валидации методики для контроля на производстве.

## Материалы и методы

**Реагенты и оборудование.** Смесь для ПЦР (в расчете на одну реакцию 25 мкл): 0,4 мкл HS Taq ДНК полимеразы («Евроген», Россия, РК015L), 2,5 мкл буфера для ПЦР, поставляемого вместе с полимеразой (10×), 2 мкл смеси дезоксирибонуклеотидов по 2,5 мМ каждого («Sigma», США, DNTP100A), вода 7,6 мкл. Праймеры и зонды смешивали заранее, такая смесь содержала каждого смыслового праймера 4 мкМ/л, 2 мкМ/л каждого антисмыслового праймера, 2 мкМ/л каждого зонда, 0,8 мкМ/л, 0,4 пг/мл внутреннего контроля. В реакцию общим объемом 25 мкл такой смеси добавляли 2,5 мкл и 10 мкл исследуемого образца. В работе использовали систему определения ПЦР в режиме реального времени iCycler IQ5 («Bio-Rad», США) и соответствующее стандартное программное обеспечение. Cq (Ct; Threshold cycle) определялся автоматически.

**Выделение ДНК.** Производили с использованием самостоятельно приготовленных буферов [11] по методике, основанной на лизисе клеток и денатурации комплексов ДНК и белков в растворе гуанидина тиоционата.

**Праймеры и зонды.** Последовательности праймеров, зондов, а также внутреннего контроля, разработанные К. Janetzko с соавт. [12], приведены в таблице 1. Использованные в работе зонды приведены в таблице 2. Праймеры и зонды были заказаны в компании «Бигль» (Россия), последовательность внутреннего контроля синтезирована компанией «Евроген» (Россия). Использовали двухступенчатый протокол ПЦР: после предварительной денатурации в течение 3 минут при 95 °С проводили 40 циклов амплификации: 15 секунд при 95 °С и 60 секунд при 50 °С.

**Стандартный образец.** Для измерения чувствительности анализа после его воспроизведения с измененной последовательностью зонда в работе использовали два контрольных образца: контрольный образец от набора ФЕМОФЛОР компании «ДНК-Технология» (Россия), содержащий 10<sup>6</sup> генных копий микоплазм в 1 мл, и образец лиофилизированных *M. hominis*, который был предоставлен ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Методом титрования в «питательной среде для выявления *M. hominis*» (производства того же института)

была определена концентрация микоплазм в культуре. Культуру микоплазм с содержанием  $10^6$  КОЕ в 1 мл подвергали последовательному разведению для оценки чувствительности ПЦР-анализа. Используя эти два стандарта было показано, что чувствительность анализа соответствует описанной при использовании MGB-модифицированного зонда.

Несколько лет назад ВОЗ был введен международный стандартный образец микоплазм, который доступен к заказу [13]. Но из-за строгости таможенных правил и сложности правил перевозки микроорганизмов заказать в нашу лабораторию такой стандарт не получилось. Такой валидированный образец хорошо подходит для проведения экспериментов по чувствительности тестов, так и для валидации методики.

## Результаты и обсуждение

### Чувствительность воспроизведенной qPCR методики после изменения последовательности зондов

При обзоре литературы по детекции микоплазм видно, что перед исследователями чаще стоит задача определения какого-то одного вида микоплазм. Поскольку клеточные линии могут быть контаминированы различными видами класса Mollicutes (Микоплазмы), для детекции рационально использовать тест, специфичный сразу к

наибольшему возможному количеству видов микоплазм, контаминирующих культуры клеток. Выбранный нами для работы тест удовлетворяет этому требованию: в нашей работе использовались праймеры К. Janetzko с соавт. [12]: немецкими учеными был найден консенсус последовательностей 16S рибосомальной ДНК 18 видов микоплазм (в том числе *Ureaplasma* и *Acholeplasma*), позволяющий проводить амплификацию с ДНК любого из этих видов микоплазм с использованием всего восьми праймеров, а детектировать флуоресценцию с помощью одного, комплементарного ко всем последовательностям зонда (табл. 1). Также авторами была предложена для синтеза последовательность внутреннего контроля и зонд, комплементарный этой последовательности.

Авторами оригинальной тест-системы (К. Janetzko с соавт.) были предложены зонды с MGB (minor groove binding) модификацией. Обычно такие зонды используются для аллель-специфичной ПЦР, так как основным преимуществом такой модификации является большая специфичность к последовательности, чем у немодифицированного олигонуклеотида [14]. В данном случае зонды, вероятно, были модифицированы для теоретически большей стабильности, целесообразность такой модификации без необходимости аллельной дискриминации можно ставить под вопрос. В России олигонуклеотиды с такой модификацией не синтезируют, синтезируют их только компа-

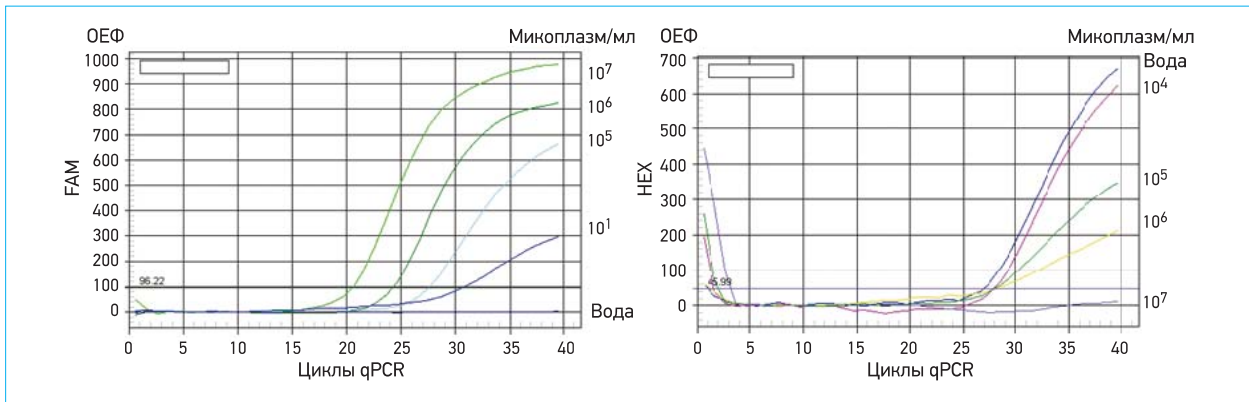
Таблица 1. Оригинальный дизайн праймеров К. Janetzko с соавт. [12]

	Последовательность (5' → 3')	Специфичность
<b>Праймеры</b>		
Myco16sQF1	gcaaaagctatagatagatagtagaggt	<i>Mycoplasma orale</i> , <i>M. mycoides</i> , <i>M. capricolum</i> и внутренний контроль
Myco16sQF2	gcraagctatagaratagtagggaggt	<i>M. arthritis</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. penetrans</i> , <i>M. pirum</i> , <i>M. salivarium</i> , <i>M. synoviae</i>
Myco16sQF3	gcaatgctatagatagatagcggaggt	<i>M. arginini</i>
Myco16sQF4	gcaaaagctatggagacatagtagggaggt	<i>M. fermentans</i>
Myco16sQF5	gcaaaagttatggaacataatggaggt	<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. genitalium</i>
Myco16sQF6	gcgacgctatagaataatagtagggaggt	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>U. parvum</i>
Myco16sQF7	gcaaaagcttagaataagttcggagggc	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
Myco16sQR1	gttgcgctcgttgcgggac	Все Mollicutes
Myco16sQR2	gttgcgctcgttgcaggac	Все Mollicutes и внутренний контроль
<b>Зонды</b>		
Myco16sQProbe	FAM-tggtgcatggtgttc-MGB	Все Mollicutes
Myco16sQICProbe	VIC-cacgcccgtaaacga-MGB	Внутренний контроль
<b>Внутренний контроль</b>		
Myco16sQIC**	ggcaaaagctatagatagatagtagaggttagtccaccgcccgtaaacgata tgctcgcaagagtaaccttcgcaaaagctatagctctgcaacgagcgcgaacc	

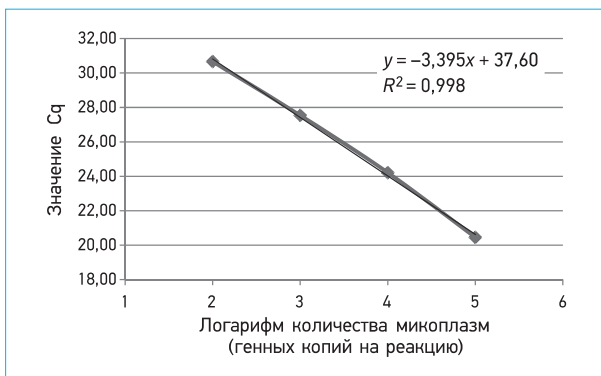
Таблица 2. Зонды для детекции ДНК микоплазм и внутреннего контроля

Зонд	Последовательность (5' → 3')	Специфичность
qMycoProbe	FAM-TGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTCTCGT-BHQ	Все Mollicutes
qMycoICProbe	HEX-CACGCCGTAACGATATGCTCGCAAGAGTA-BHQ	Внутренний контроль

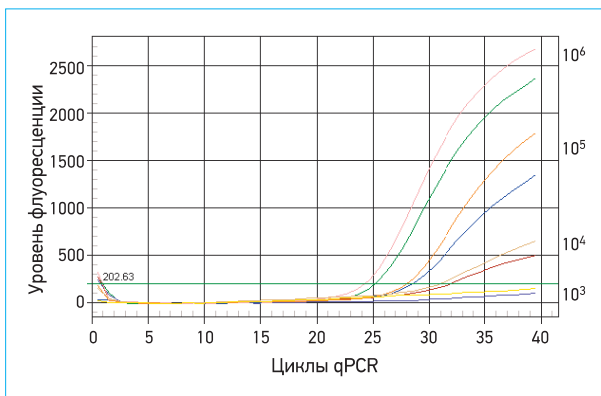
**Примечания.** Последовательность ДНК внутреннего контроля ПЦР содержит сайты для посадки праймеров Myco16sQF1, Myco16sQR2 и зонда Myco16sQICProbe. В зонды, использованные в этой работе, не вносилась MGB-модификация, отсутствие такой модификации компенсировано удлинением зондов с 3'-конца, краситель VIC на зонде к внутреннему контролю в нашей работе был заменен HEX. Объяснение причин внесенных изменений — в тексте.



**Рис. 1.** Графики нарастания флуоресценции при амплификации с ДНК микоплазм (метка FAM) и с ДНК внутреннего контроля (метка HEX). Обе реакции идут в одной пробирке, что позволяет детектировать ложноотрицательные результаты, связанные с присутствием ингибиторов ПЦР в образцах. Справа от графиков указана концентрация генных копий микоплазм на 1 мл в образце, в реакцию вносилось 10 мкл образца.



**Рис. 2.** Стандартная кривая qPCR ДНК *M. hominis* в 10-кратных разведениях ( $10^4$ – $10^7$  генных копий микоплазм в 1 мл, т.е.  $10^2$ – $10^5$  микоплазм на реакцию).



**Рис. 3.** Графики нарастания флуоресценции при амплификации с ДНК микоплазм. Выделение ДНК производилось вместе с клетками (5 млн. клеток СНО на выделение) и без них. Запаздывающие на 0,5–1 цикла кривые — реакции на матрице образцов ДНК микоплазм, смешанных с клетками; опережающие — выделение ДНК производилось только из клеток микоплазм. Справа от графиков указана концентрация микоплазм на 1 мл в образце, в реакцию вносилось 10 мкл образца.

ния «Applied Biosystems» и стоимость MGB-модифицированных зондов более чем в 10 раз превосходит стоимость обычных. Поэтому, несмотря на хорошо подобранные ав-

торами места для посадки праймеров и зондов, для экономии времени и средств необходимо было внести изменения в структуру зондов.

В связи с этим нами были заказаны флуоресцентные зонды без MGB-модификации, удлиненные относительно оригинальных (для достижения необходимой температуры плавления) на 3'-конце и с тушителем BHQ (Black Hole Quencher) на 3'-конце. При этом в случае зонда, детектирующего ДНК микоплазм, был соблюден консенсус детектируемых последовательностей — один зонд остается комплементарным ко всем 18 последовательностям. Чувствительность анализа после модификации была проверена на единственном доступном нам виде микоплазм (два образца из разных источников) с известной концентрацией — *M. hominis*. Было показано, что после произведенных модификаций чувствительность теста не снизилась относительно заявленной в оригинальной статье (рис. 1). Такие же результаты были показаны для зонда к внутреннему контролю, хотя в данном случае это менее значимо: ПЦР с зондом без MGB-модификации, предложенным в таблице 2, обладает такой же чувствительностью, что и по данным оригинальной статьи.

При вынужденной работе с одним видом микоплазм, мы не можем однозначно утверждать, что чувствительность теста не снизилась для обнаружения других видов. Однако, учитывая, что модифицированный зонд комплементарен к одной и той же последовательности геномов 18 обозначенных видов микоплазм, теоретическая вероятность этого очень высока.

Важной для валидации опцией теста является разработанный внутренний контроль. В реакцию добавляется олигонуклеотид размером в 100 нуклеотидов (Mycos16sQIC) и флуоресцентный зонд (Mycos16sQICProbe), комплементарный ему. При этом флуоресцентная метка на зонде к внутреннему контролю отличается от метки на зонде к последовательности ДНК микоплазм (Mycos16sQProbe), что позволяет проводить мультиплексный анализ в одной пробирке. При отсутствии флуоресценции от метки зонда Mycos16sQProbe, происходит ПЦР на матрице внутреннего контроля и детектируется флуоресценция зонда Mycos16sQICProbe (рис. 1). Так верифицируется отсутствие ингибиторов ПЦР в образце и доказывается, что отсутствие амплификации связано непосредственно с отсутствием матрицы — ДНК микоплазм. Таким образом, внутрен-

ний контроль реакции обеспечивает детекцию ложноотрицательных результатов.

При выделении ДНК для анализа, обычно потери ее отсутствуют или невелики, однако в данном случае для правильной количественной оценки контаминации процент выхода ДНК нуждается в валидации. Отдельный вопрос вызывает анализ клеточных культур и вероятное снижение выхода ДНК в ходе совместного выделения ДНК клеток культуры и ДНК потенциально присутствующих клеток микоплазм. Для оценки возможных потерь ДНК микоплазм при выделении из смеси клеток микоплазм и клеток культуры, нами были проведены предварительные эксперименты по оценке пропорциональности выделения. Известные количества микоплазм добавлялись к 5 миллионам живых клеток СНО, после чего из этой смеси производилось выделение ДНК и qPCR на матрице выделенных образцов. По нашим данным, выход ДНК микоплазм незначительно снижался (на 30 %), но, вероятно, это связано с неоптимизированной под данную задачу технологией выделения ДНК, выделение производилось только с использованием самостоятельно приготовленных буферов (рис. 3). При выделении ДНК в данном случае важно не превышать емкость сорбента.

### Чувствительность методики qPCR и требования фармакопей

Метод ПЦР обычно рекомендуется как дополнительный к культуральному и цитохимическому [15]. Однако одной из задач исследования являлось выяснение возможности использования данной модифицированной методики ПЦР как основной для контроля отсутствия микоплазм.

В отечественной фармакопее разрешено использование альтернативных методов исследования, однако не имеется рекомендаций по валидации и не предъявляются требования к чувствительности метода. В такой ситуации логично ориентироваться на Европейскую фармакопею, особенно в условиях переориентации производств на международные стандарты GMP. Подходы к валидации методик амплификации нуклеиновых кислот (АНК) для определения присутствия микоплазм имеются в Европейской фармакопее, начиная с издания 8.0.

Требуемая чувствительность метода по данным этого руководства должна достигать 10–100 КОЕ/мл [9]. В ПЦР анализируется не более 10 мкл образца. Так, анализируя 10 мкл образца, мы не можем напрямую достичь чувствительности 10 КОЕ/мл даже теоретически, так как при этом в реакции окажется 0,1 КОЕ, т.е. ни одной микоплазмы. По данным литературы и по нашим данным — пределом детекции является 10–50 генных копий микоплазм на реакцию (в зависимости от вида микоплазм), при пересчете на 1 мл получается 1000–5000 микоплазм/мл. В случае *M. hominis* предел детекции оказывается в диапазоне 20–30 генных копий на реакцию.

Для соответствия требованию можно воспользоваться ячейками для ультрацентрифугирования (например, Sartorius Vivaspin или Amicon Ultra Centrifugal Filters), которые позволяют сконцентрировать образцы более чем в 100 раз. Так, объем 10 мл можно сконцентрировать до 50 мкл, тем самым увеличив концентрацию потенциально присутствующих микоплазм более чем на два порядка. После концентрирования образца становится возможной детекция 10–50 генных копий в 1 мл, что удовлетворяет

указанным выше требованиям. Концентрирование образца при помощи специальных приспособлений — процесс быстрый (от 10 минут) и простой — потребуется только центрифуга.

Отдельный вопрос, результаты обсуждения которого обычно являются аргументом в пользу методов АНК, — уровень соотношения генных копий и КОЕ. При сравнении чувствительности культурального метода и методов АНК, обычно основываются на предположении, что 1 КОЕ соответствует 1 клетке микоплазмы, содержащей одну генную копию с одним локусом 16S rDNA. Однако соответствие 1 КОЕ одной микоплазме не совсем верно. Определение КОЕ неточное, так как сильно зависит от условий культивирования, разницы в скорости роста разных видов микоплазм и субъективной интерпретации результатов [4]. Большие колонии могут быть результатом роста более чем одной клетки микоплазмы. Результаты экспериментов показывают, что соотношение КОЕ/генные копии варьирует от 5 до 5000 генных копий на 1 КОЕ [10, 16].

Таким образом, метод qPCR, в том числе при использовании описанной в статье методики, может быть использован не только для рутинного или срочного анализа образцов на присутствие микоплазм, но и, с использованием концентрирования образцов и при должной валидации, для контрольных анализов на производстве. Для такой работы в первую очередь необходимо получение стандартных образцов микоплазм разных видов.

### Выводы

Для анализа клеточных линий и биотехнологических продуктов была выбрана наиболее подходящая методика, однако, нуждавшаяся в модификации. После внесенных в методику изменений по замене MGB-зондов на менее дорогие и доступные в Российской Федерации флуоресцентные зонды не обнаружено снижения чувствительности теста на примере работы с *M. hominis*.

Чувствительность данной модификации методики qPCR достигает 10 генных копий микоплазм на реакцию, при концентрировании образца это значение может быть многократно увеличено.

### Литература

1. Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med.* 2004; 88: 309–17.
2. Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 267678.
3. Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* 1993; 11(4): 143–51.
4. Stemke GW, Robertson JA. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. *J Clin Microbiol.* 1982; 16(5): 959–61.
5. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(5): 2535–42.
6. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(8): 2606–15.
7. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol.* 1998; 57: 49–65.
8. ОФС. 1.7.2.0031.15. Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015. С. 827–35. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.

9. 2.6.7. *Mycoplasmas*. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://pharneuropa.edqm.eu/ep900>.
10. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* 2011; 25(2–3): 69–77.
11. Ёлшин НД. Определение остаточной ДНК клеток-продуцентов *E. Coli* и *CHO* в субстанциях рекомбинантных белков методом qPCR. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(4): 245–52.
12. Janetzko K, Rink G, Hecker A, Bieback K, Kluter H, Bugert P. A single-tube real-time PCR assay for Mycoplasma detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(1): 83–9.
13. 1st WHO International Standard for mycoplasma DNA for nucleic acid amplification technique-based assays designed for generic mycoplasma detection. Available from: <https://go.gil/Ue2xP9>.
14. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(2): 655–61.
15. Шалунова НВ, Волкова РА, Волгин АР, Петручук ЕМ, Бердникова ЗЕ, Эльберт ЕВ и др. Микоплазмы — контаминанты клеточных культур. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16(3): 151–60.
16. Peredeltchouk M, David SA, Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(1): 54–60.

## Об авторах

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, 197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7.  
 Ёлшин Никита Дмитриевич. Младший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии.  
 Петров Александр Владимирович. Начальник лаборатории иммунофармакологии.

Адрес для переписки: Ёлшин Никита Дмитриевич; [nikita.yolshin@gmail.com](mailto:nikita.yolshin@gmail.com)

## Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures

N. D. Yolshin, A. V. Petrov

Federal State Unitary Enterprise  
 «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations»  
 of the Federal Medico-Biological Agency  
 Pudojskaya st. 7, St. Petersburg 197110, Russian Federation

Mycoplasmas are the main contaminants of cells cultures. They persist in cell cultures and can extensively affect host cell functions. Conducting experiments or producing protein in contaminated cultures are impractical. The aim of the study was to explore the possibility of quick detection of mycoplasma contamination of cell cultures and biotechnological products by a previously developed method which was modified to make it simpler and more affordable in Russia; and to assess the possibility of method validation for quality control. The authors chose the most applicable qPCR method of all qPCR methods currently used for mycoplasma detection, and modified it in the following way: expensive MGB-probes which cannot be synthesized in Russia were substituted by ordinary fluorescence probes. The reproducibility and sensitivity of the modified method were tested with *M. hominis*. The sensitivity of the test was equal to 10 mycoplasma gene copies per reaction. Comparison of the obtained results with regulatory requirements for mycoplasma detection showed that the proposed method complies with current official requirements and could be used as the main method for routine prompt cell culture testing for mycoplasma contamination.

**Key words:** mycoplasma; cell culture contamination; qPCR mycoplasma detection; biotechnological products quality control.

**For citation:** Yolshin ND, Petrov AV. Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures. *БИОпрепараты. Профилактика, Диагностика, Лечение* 2017; 17(3): 173–179.

## References

1. Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med*. 2004; 88: 309–17.
2. Uphoff CC, Denkmann SA, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012: 267678.
3. Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol*. 1993; 11(4): 143–51.
4. Stemke GW, Robertson JA. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. *J Clin Microbiol*. 1982; 16(5): 959–61.
5. Oларerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(5): 2535–42.
6. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(8): 2606–15.
7. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol*. 1998; 57: 49–65.
8. OFS. 1.7.2.0031.15. Testing for the presence of mycoplasma. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. 13th ed. V. 2. P. 827–35. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
9. 2.6.7. *Mycoplasmas*. European Pharmacopoeia 9.0. Available from: <http://pharneuropa.edqm.eu/ep900>.
10. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes* 2011; 25(2–3): 69–77.

11. Yolshin ND. Detection of residual *E. coli* and CHO host-cell DNA in recombinant proteins by qPCR. *BiOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(4): 245–52 (in Russian).
12. Janetzko K, Rink G, Hecker A, Bieback K, Kluter H, Bugert P. A single-tube real-time PCR assay for *Mycoplasma* detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(1): 83–9.
13. 1st WHO International Standard for mycoplasma DNA for nucleic acid amplification technique-based assays designed for generic mycoplasma detection. Available from: <https://goo.gl/Je2xP9>.
14. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(2): 655–61.
15. Shalunova NV, Volkova RA, Volgin AR, Petruchuk EM, Berdnikova ZE, Elbert EV, et al. *Mycoplasma* contamination of cell cultures. *BiOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16(3): 151–60 (in Russian).
16. Peredeltchouk M, David SA, Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(1): 54–60.

## Authors

Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute of Highly Pure Biopreparations» of the Federal Medico-Biological Agency, Pudojskaya st. 7, St. Petersburg 197110, Russian Federation.

Yolshin ND. Junior research scientist of the Immunopharmacology Laboratory.

Petrov AV. Head of the Immunopharmacology Laboratory.

**Contact e-mail:** Yolshin Nikita Dmitrievich; [nikita.yolshin@gmail.com](mailto:nikita.yolshin@gmail.com)