Original Article

Paramedical Sciences and Military Health
Volume 12, Number 2, Summer 2017

A PCR Assay for Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture by 16S rRNA Specific Primers

Zohre Soheyli[1], Mohammad Soleimani[2]*, Keivan Majidzadeh[3]

[1] *Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom branch, Qom, Iran*
[2] *Department of Microbiology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3] *Tasnim Biotechnology Research Center (TBRC), Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Introduction: Mycoplasmas are one of the most serious contaminants of cellular cultures and their biological productions. Mycoplasma diagnosis is conducted on the basis of culture and molecular methods. These methods are different from each other in terms of accuracy, reliability, and sensitivity. This study aimed to trace the mycoplasma contaminations in culture samples using 16S rRNA specific primers based on the PCR method.

Methods and Materials: 16S rRNA gene sequence of cell culture contaminant mycoplasmas were extracted from gen bank and were sorted using gene sequence pattern. Specific primers were designed using obtained synonymies. To build positive control structure, 16S rRNA gene proliferated based on the PCR methods then cloned in a plasmid vector.

Results: Electrophorus of PCR product of 16S rRNA revealed a band of 219bp length on Agarose gel. This pattern was not observed in negative control samples. Moreover, the fragment proliferation with the same size in recombinant plasmid confirmed the authenticity of cloning.

Discussion and Conclusion: Due to its high speed and accuracy, the method has potential for using in cell culture laboratories.

Keywords: Mycoplasma, Cell culture, Polymerase chain reactions (PCR)

*(Corresponding author) Mohammad Soleimani, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E-mail: m.soleimani@ajaums.ac.ir

مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی
سال دوازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۶

مقاله تحقیقاتی

شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16S rRNA

زهره سهیلی[۱]، محمد سلیمانی[۲*]، کیوان مجیدزاده[۳]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تسنیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: مایکوپلاسماها از مهم‌ترین و جدی‌ترین آلوده کننده‌های کشت‌های سلولی و فرآورده‌های بیولوژیک تولیدی در کشت‌های سلولی می‌باشد. تشخیص مایکوپلاسماها بر پایه کشت و روش‌های مولکولی می‌باشد. این روش‌ها از نظر سرعت، اطمینان، ویژگی و حساسیت با یکدیگر متفاوت هستند. هدف اصلی این مطالعه ردیابی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در نمونه‌های کشت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۱۶S rRNA بر اساس تکنیک PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: توالی ژن ۱۶S rRNA گونه‌های مایکوپلاسمای آلوده کننده کشت‌های سلولی از بانک ژن استخراج و هم ردیف سازی گردید. پرایمرهای اختصاصی با استفاده از ترادف‌های به دست آمده، طراحی شد. برای ساخت کنترل مثبت، توالی ژن ۱۶S rRNA به روش PCR تکثیر و سپس در وکتور پلاسمیدی کلون شد.

نتایج: الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۶S rRNA مطابق انتظار باندی به طول ۲۱۹ bp را بر روی ژل آگاروز نشان داد. این الگو در نمونه‌های کنترل منفی دیده نشد. همچنین تکثیر قطعه‌ای به همین اندازه در پلاسمید نوترکیب حاصل، صحت کلونینگ را تأیید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: این روش با داشتن مزیت‌هایی مانند سرعت بالا و دقت زیاد از پتانسیل مناسبی برای استفاده در آزمایشگاه‌های کشت سلول برخوردار است.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، کشت سلولی

مقدمه

کشت سلولی یکی از روش‌های مهم بررسی فرایندهای مختلف زیستی و پزشکی به شمار می‌رود (۱). یکی از جدی‌ترین و مهم‌ترین مشکلات مربوط به کشت سلولی، آلودگی محیط‌های کشت با گونه‌های مختلف باکتری مایکوپلاسما هست که از زمان آغاز به کار این تکنیک همواره با آن همراه بوده است (۲، ۳). برآورد می‌شود که ۵ تا ۳۵ درصد از کشت‌های سلولی بسته به رده سلولی، آزمون مورد استفاده و کیفیت تست‌های کنترل کیفی، به مایکوپلاسما آلوده هستند (۴، ۵). آلودگی کشت‌های سلولی با مایکوپلاسما موجب تغییراتی در رشد سلولی، مورفولوژی، متابولیسم آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک شده و بالطبع بر روی فرآورده‌های بیولوژیک تولیدی در کشت‌های سلولی تأثیر می‌گذارند که می‌تواند منجر به بروز اشتباه در تفسیر و تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش‌ها و در نتیجه به دست آوردن نتایج غیرقابل اعتماد می‌شود (۶، ۷).

* (نویسنده مسئول) محمد سلیمانی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
آدرس الکترونیکی: soleimanidor@yahoo.com تلفن: ۸۸۳۳۷۹۲۸

مایکوپلاسماها یکی از کوچک‌ترین میکروارگانیسم‌های زنده با زندگی آزاد و قابل تکثیر هستند که متعلق به رده مولی کوتس (Mollicutes) هستند. مهم‌ترین ویژگی‌های تمایزی آن‌ها شکل فیلامنتی و یا دایره‌ای، فقدان دیواره سلولی مستحکم و داشتن DNA کوچک در حد چند Mb است (۳، ۵، ۸). مایکوپلاسماها تعداد زیادی باکتری را شامل می‌شوند (بیشتر از ۱۰۰ گونه مختلف) که بیشتر آن‌ها بیماری زا نیستند و فقط تعداد اندکی بیماریزای انسانی هستند (۵). مهم‌ترین گونه بیماریزای انسانی شناخته شده مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia) هست (۹). گونه‌هایی از مایکوپلاسما که به فراوانی در کشت‌های سلولی یافت شده‌اند شامل مایکوپلاسما آرجینینی (Mycoplasma arginine)، اکولِپلاسما لیدلاوی (Acholeplasma laidlawii)، مایکوپلاسما هیورینیس (Mycoplasma hyorhinis)، مایکوپلاسما اوراله (Mycoplasma orale)، مایکوپلاسما فرمنتانس (Mycoplasma fermentans) و مایکوپلاسما هومینیس (Mycoplasma hominis) بوده و تخمین زده می‌شود که عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی‌های کشت سلولی هستند (۱۰).

روش‌های مختلفی تاکنون برای شناسایی مایکوپلاسما توسعه یافته است (۱۱). متداول‌ترین آن‌ها کشت میکروبی، تست‌های بیوشیمیایی، الایزا، رنگ آمیزی مستقیم و غیرمستقیم فلورسنت، ایمونوفلورسنت و تکنیک‌های مبتنی بر تکثیر نوکلئیک اسید می‌باشد (۵، ۷). برای سالیان متمادی، جداسازی بر روی محیط کشت اختصاصی به عنوان روش مرجع و به عبارت بهتر «روش استاندارد طلایی (gold standard)» به کار رفته است (۱۲). روش‌های بر پایه کشت، وقت گیر (نیازمند چندین هفته) با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است (۱۳). به همین دلیل جهت شناسایی آلودگی‌های کشت سلولی نیازمند استفاده از روش‌های سریع، حساس و دقیق هستیم (۹). بنابراین روش‌های بر پایه تکنیک‌های مولکولی به ویژه روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) که نتایج را بین چند ساعت تا نهایتاً یک روز مشخص می‌کند، جایگزینی مناسب برای روش‌های مبتنی بر کشت در آزمایشگاه‌های کشت سلولی به شمار می‌رود (۱۳). ثابت شده است که جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامل آلوده کننده کشت سلولی، خصوصاً مایکوپلاسماها، روش‌های مولکولی دارای سرعت و ویژگی است (۱۴، ۱۵). اما، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به روش استخراج DNA، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده، روش شناسایی محصول، نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد (۱۱، ۱۶).

هدف این مطالعه طراحی یک روش مولکولی جدید بر اساس تکنیک PCR برای ردیابی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در نمونه‌های کشت سلولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر: ابتدا توالی‌های مختلفی از ژن ۱۶S rRNA متعلق به گونه‌های مختلف مایکوپلاسما از بانک ژنی (GenBank) به آدرس http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ استخراج شد. توالی‌های از ۱۲ گونه مایکوپلاسما هومینیس، ۸ گونه مایکوپلاسما هیورینیس، ۳ گونه مایکوپلاسما سالیواریوم، ۳ گونه مایکوپلاسما اوراله، ۳ گونه اکولِپلاسما لیدلاوی، ۱ گونه مایکوپلاسما آرجینینی، ۵ گونه مایکوپلاسما فرمنتانس و ۵ گونه اسپیروپلاسما (Spiroplasma) استخراج شد. شماره شناسایی مربوط به بانک ژنی این توالی‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. توالی سپس توسط نرم افزار CLC Sequence Viewer ۶.۴ (CLC bio, Aarhus, Denmark) الاین (ترادف سنجی) شد و در ادامه بر اساس توالی‌های تکرار شده (conserved) با نرم افزار برخط (آنلاین) Primer Explorer V۴ از پایگاه داده Eiken chemical (http: //primerexplorer.jp/e/) پرایمرها طراحی شد. اختصاصی بودن پرایمرها با استفاده از سرویس BLAST پایگاه اینترنتی NCBI (http: //www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/) بررسی شد. پس از تأیید، پرایمرها توسط شرکت بایونیر، کره جنوبی (Bioneer, Daejeon, Korea) ساخته شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

استخراج DNA: ژنوم (DNA) مایکوپلاسماهای موجود در کشت‌های سلولی آلوده، سویه استاندارد مایکوپلاسما (به عنوان کنترل مثبت) و نیز سایر باکتری‌ها با استفاده از کیت تجاری EZ-۱۰ Spin Column Genomic DNA kit, Bio Basic Inc, Canada) و بر اساس پروتکل کیت، استخراج و پس از تأیید در فریزر ۸۰- °C ذخیره شد تا در مواقع لزوم برای تست‌های PCR مورد استفاده قرار گیرد.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی PCR (PCR Master mix) با غلظت

جدول ۱- شماره دسترسی (accession number) مربوط به توالی ۱۶S rRNA به دست آمده از پایگاه اینترنتی GenBank-NCBI مربوط به گونه‌های مختلف مایکوپلاسما مورد استفاده در طراحی پرایمر در این مطالعه

نام گونه	Accession number	لوکوس با تشابه بالا
Mycoplasma hominis	NR-118700, NR-113679, NR-074603, NR-041745, NR-041743, NR-041744, NR-041881, NR-024986, NR-024984, NR-024983, NR-024982, NR-024981	NR-041881
Mycoplasma hyorhinis	NR-117469, NR-114563, NR-113686, NR-041845, NR-036954, KC-688369, KC-688366, KC-686367	NR-036954
Mycoplasma salivarium	NR-113661, NR-041745, AB-680625	NR-041745
Mycoplasma orale	JQ-346727, NR-113660, NR-043199	NR-043199
Acholeplasma laidlawii	NR-113658, NR-074448, NR-025961	NR-074448
Mycoplasma arginine	NR-041743	NR-041743
Mycoplasma fermentans	NR-113683, NR-044666, NR-041881, MYCRRNAF, NR-102937	NR-041881
Acholeplasma	-	
Spiroplasma	NR-125517, NR-125516, NR-125515, NR-103946, NR-103945	NR-103946, NR-103945

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

اندازه باند	توالی پرایمر (۳'-۵')	نام پرایمر
۲۱۹	GCG ATG GCT AAC TAT GTC CC	F۳-Myco
	TCG CCT TTG GTG TTC TTC C	B۳-Myco

۲X (حاوی ۰/۰۵ U/µl آنزیم DNA پلیمراز Taq، بافر واکنش، ۳ میلی مولار MgCl۲ و ۰/۴ میلی مولار از هر dNTP)، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرها با غلظت ۰/۴ میلی مولار، ۶ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل به جای اسید نوکلئیک و برای کنترل مثبت از DNA استخراج شده از سویه استاندارد مایکوپلاسما استفاده شد. برنامه زمانی مورد استفاده برای تکثیر عبارت بود از یک دمای دناتوراسیون (denaturation) ۹۴ درجه اولیه به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه دمایی شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه برای ۴۵ ثانیه، اتصال (annealing) در ۴۸/۱ درجه برای ۴۵ ثانیه، طویل شدن رشته الگو (extension) در دمای ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی (final extension) واکنش در دمای ۷۲ درجه برای ۵ دقیقه. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (ABI ۲۷۲۰, Applied Biosystems, Warrington, UK) انجام گردید. بررسی محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در زیر دستگاه ماوراء بنفش انجام گرفت. اندازه محصول PCR با استفاده از مارکر ۱۰۰ bp DNA ladder ساخت شرکت فرمنتاز کشور آلمان مشخص گردید.

تعیین ویژگی: جهت بررسی میزان اختصاصی بودن پرایمرها، واکنش PCR طبق شرایط ذکر شده بر روی ژنوم چندین گونه باکتری گرم مثبت و منفی دیگر شامل Shigella sonnei ATCC ۹۲۹۰، Klebsiella pneumoniae ATCC ۷۸۸۱، Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) ATCC ۴۳۸۸۷، Bacillus subtilis ATCC ۶۰۵۱، Pseudomonas aeruginosa ATCC ۹۰۲۷، Staphylococcus aureus ATCC ۲۵۹۲۳، Enterococcus faecalis ATCC ۲۹۲۱۲ و Yersinia enterocolitica ATCC ۲۳۷۱۵ انجام شد. به دلیل کسب اطمینان از نتایج حاصله و بررسی تکرارپذیری آزمایش مذکور ۳ بار تکرار شد.

کلونینگ: جهت دستیابی به نمونه کنترل مثبت از روش کلونینگ محصولات PCR در وکتور Ptz۵۷R/T استفاده شد. بدین منظور واکنش PCR طبق شرایط مذکور بر روی تعدادی نمونه کنترل مثبت انجام شد. برای استخراج محصولات PCR از کیت شرکت بایونیر (AccuPrep® PCR Purification Kit - Bioneer) و جهت اتصال

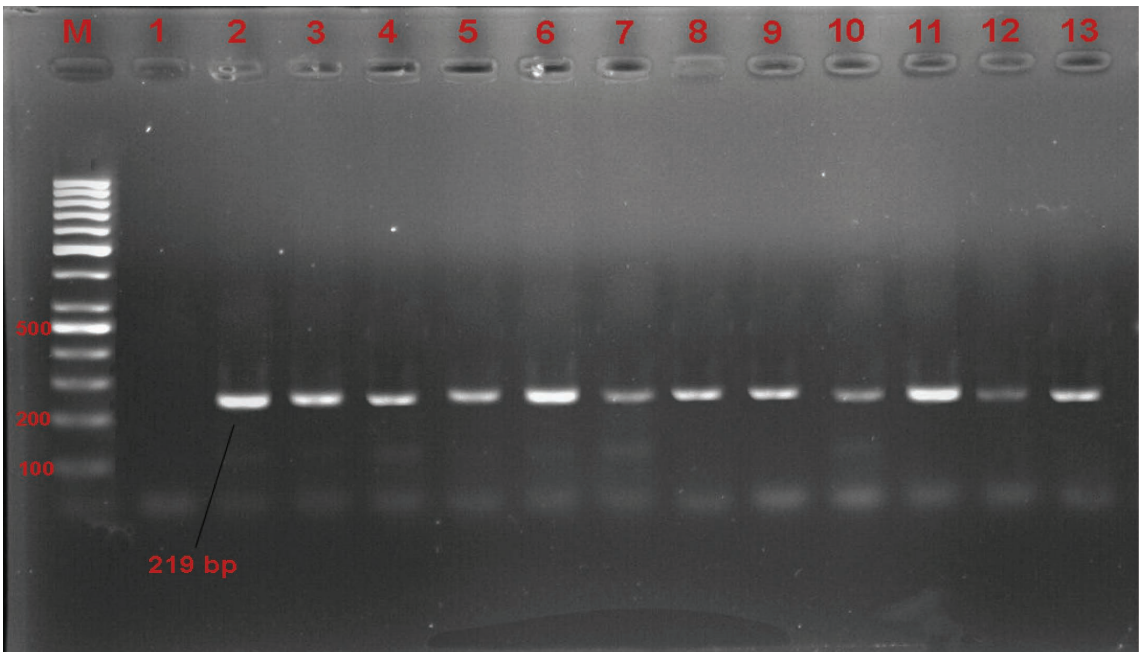
محصولات و وکتور از کیت شرکت فرمنتاز (InsTAclone TM PCR Cloning Kit - Fermentase) استفاده شد. باکتری E. coli top ۱۰ F´ به عنوان سلول ترانسفورم انتخاب شد. سلول‌های ترانسفورم شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط Luria-Bertani agar حاوی xgal (Fermentase) با غلظت ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر، ایزوپروپیل بتا دی تیوگالاکتوزیداز با غلظت ۳/۵ میکروگرم در میلی لیتر، آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و تتراسایکلین با غلظت ۲۰ میکرو گرم در میلی لیتر گرماگذاری شد. ارزیابی نتایج حاصله با استفاده از غربالگری سفید – آبی (بررسی میزان کلونی‌های نو ترکیب بر روی محیط از نظر کمی) انجام گردید. سپس پلاسمیدها از کلونی‌های انتخاب شده با کیت استخراج پلاسمید شرکت بایونیر (AccuPrep Plasmid Mini Extraction kit - Bioneer) استخراج شد و واکنش colony PCR طبق شرایط ذکر شده در مرحله PCR انجام شد.

نتایج

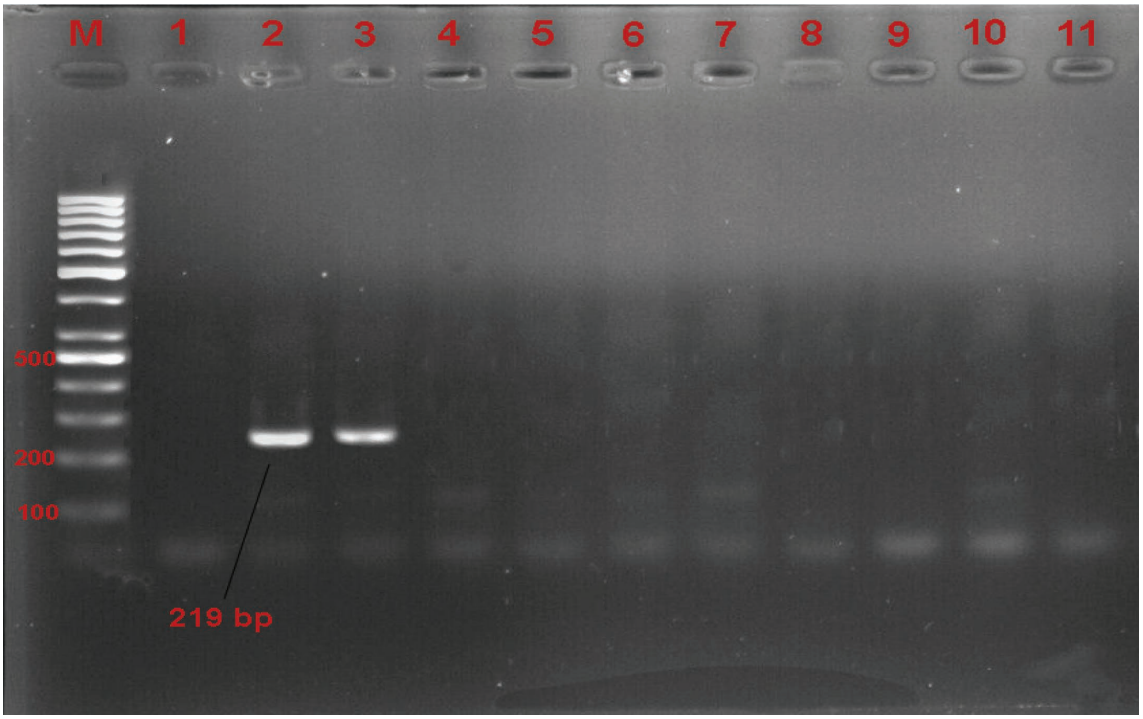
واکنش PCR: الکتروفورز محصول PCR پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای شناسایی مایکوپلاسماهای کشت‌های سلولی و نیز سویه مایکوپلاسمای استاندارد، باند اختصاصی ۲۱۹ جفت بازی (۲۱۹bp) را که مطابق طول ژن مد نظر بود را نشان داد. تصویر ژل الکتروفورز برخی از آن‌ها در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج تعیین ویژگی: همانطوری که در شکل ۲ نشان داده شده است واکنش PCR مربوط در هیچ یک از باکتری‌های گرم منفی و مثبت نتیجه‌ای نداشت، که این امر بیانگر ویژگی بالای پرایمرهای طراحی شده بود. نتایج Blast پرایمرها نیز حاکی از اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده تنها در خصوص گونه‌های مایکوپلاسما بود.

نتایج کلونینگ و تهیه کنترل مثبت: ۲۰ساعت‌بعدازترانسفورماسیون، کلنی‌های سفید و آبی بر روی پلیت LB-Agar حاوی X-Gal, IPTG, Amp نمایان گشت. چون انتظار داشتیم که کلنی‌های سفید دارای پلاسمید نوترکیب باشند لذا این کلنی‌ها انتخاب و DNA پلاسمیدی آن‌ها استخراج و بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز گردید. از آنجایی که قطعه هدف حدود ۲۰۰bp وارد پلاسمید اولیه شده بود این پلاسمید نوترکیب نسبت به پلاسمید pTZR۵۷ سنگین‌تر بوده و در الکتروفورز حرکت آهسته‌تری از خود نشان داد، و بر روی ژل آگارز بالاتر از پلاسمید بدون Insert قرار گرفت در ادامه واکنش PCR بر روی پلاسمید نوترکیب دارای قطعه هدف (کنترل مثبت)، مطابق انتظار یک باند با طول ۲۱۹ جفت باز در ژل آگارز ایجاد نمود.



شکل ۱- بررسی محصول PCR مایکوپلاسما در نمونه‌های مورد آزمایش: ردیف M: مارکر (۱۰۰ bp DNA ladder)، ردیف ۱ کنترل منفی، ردیف ۲، کنترل مثبت، ردیف ۳ تا ۱۳، نمونه‌های کشت سلولی آلوده به مایکوپلاسما در این مطالعه.



شکل ۲- بررسی محصول PCR در آزمایش ویژگی: ردیف M: مارکر (۱۰۰ bp DNA ladder)، ردیف ۱: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، ردیف ۲: کنترل مثبت (سویه استاندارد مایکوپلاسما)، ردیف ۳- کشت سلولی آلوده به مایکوپلاسما، ردیف ۴ تا ۱۱ باکتری‌های غیر مایکوپلاسمایی مورد استفاده در این مطالعه.

بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی کشت‌های سلولی با مایکوپلاسماها یکی از اصلی‌ترین مشکلات مربوط به این تکنیک است؛ لذا شناسایی آن‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است. اکثریت روش‌های در دسترس به دلیل محدودیت‌هایی از قبیل وقت گیر بودن، حساسیت نسبتاً پایین و نیازمندی به امکانات خاص و افراد با تجربه، برای شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی مناسب نیستند. روش PCR دارای حساسیت و ویژگی بهتری است و می‌تواند آلودگی مایکوپلاسمایی را به میزان بیشتری نسبت به روش‌های دیگر مثل کشت ردیابی کند و از طرف دیگر نسبت به کشت، بسیار سریع‌تر و ارزان‌تر است (۱۷). تاکنون چندین روش شناسایی مولکولی بر مبنای PCR برای شناسایی مایکوپلاسماها در کشت سلولی استفاده شده است. به طور مثال یوفوف (Uphoff) و درکسلِر (Drexler) در سال ۲۰۰۲ (۱۸)، سانگ (Sung) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۱۹)، وُراکُوا (Dvorakova) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ (۲۰)، تیمِنِتسکی (Timenetsky) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۲۱) و یانگ (Young) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ (۵) تحقیقاتی را به روش PCR جهت جداسازی مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت‌های سلولی انجام دادند. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که پرایمر مورد استفاده آن‌ها به خوبی با ژن هدف مایکوپلاسماها متصل می‌شود ولی علیرغم رضایت بخش بودن نتایج، واکنش‌های ناخواسته پرایمرهای طراحی شده با نمونه‌های باکتریایی دیگر هم مشاهده می‌شد. در مطالعه تانگ و همکاران در سال ۲۰۰۰ به روش PCR بر پایه ژن ۱۶S rRNA برای شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت سلولی واکنش‌های ناخواسته با برخی باکتری‌های گرم مثبت هم مشاهده شد (۷).

از طرف دیگر در مطالعات دیگر با پرایمرهایی که طراحی شده بود فقط گونه خاصی از مایکوپلاسماها قابل ردیابی و شناسایی بوده‌اند که این یک محدودیت در کاربرد آن‌ها به شمار می‌رود چراکه گونه‌های مختلفی از مایکوپلاسماها منجر به آلودگی کشت‌های سلولی می‌شوند و هر چقدر پرایمر طراحی شده طیف وسیعی از گونه‌ها را شناسایی کند برای کاربردهای عملی مناسب‌تر است. مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۲ توسط فضلی و همکارانش با پرایمری از ۱۶SrRNA انجام گرفت که صرفاً می‌توانست آلودگی مایکوپلاسمایی حاصل از مایکوپلاسما اوراله را شناسایی کند (۲۲). در مطالعه دیگری که توسط رستمی زاده و همکاران انجام شد فقط شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی با استفاده از

روش واکنش زنجیره پلیمرازی امکان پذیر بود (۲۳).
روشهایی که بر پایه واکنش زنجیرهای پلیمراز هستند برای شناسایی بخش‌هایی از DNA ژنومی مایکوپلاسما در تمامی گونه‌های جنس آن، خصوصاً سکانس‌های ثابت و مشترک ۱۶S rRNA به عنوان روشی سریع و ویژه گسترش یافته‌اند (۲۴). در این تحقیق نیز از ژن ۱۶S rRNA استفاده شد که پرایمر طراحی شده از بخش‌های ثابت و مشترک ژن بین گونه‌های مختلف به عنوان سکانس هدف استفاده شد. این پرایمر این مزیت را به کار ما می‌دهد که بتوانیم گونه‌های مختلفی از مایکوپلاسماها را در کشت‌های سلولی آلوده شناسایی کنیم (۲۵). علاوه بر این بررسی ویژگی و اختصاصی بودن پرایمر طراحی شده در این مطالعه با پایگاه داده ژنی نشان داد که برای ژن ۱۶S rRNA منحصر به فرد است. بنابراین مطابق انتظار، نتیجه واکنش PCR فاقد نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب بوده و در عمل نیز با هیچ یک از باکتری‌های مشابه مورد استفاده در تحقیق واکنش صورت نگرفت. بنابراین در این مطالعه پرایمرهای طراحی شده نه تنها اختصاصی بودن بسیار بالایی داشتند بلکه قابلیت بررسی و تشخیص طیف وسیعی از گونه‌های مایکوپلاسمایی می‌باشند.

از دیگر ویژگی‌های این مطالعه، انجام واکنش PCR بر روی DNA باکتری‌های مایکوپلاسما از کشت‌های سلولی آلوده می‌باشد. در اکثر مطالعاتی که قبل از این صورت گرفته واکنش صرفاً بر روی سویه‌های استاندارد انجام گرفته است ولی در مطالعه ما علاوه بر استفاده از سویه استاندارد کنترل مثبت و منفی، واکنش PCR بر روی کشت‌های سلولی که از آلودگی آن‌ها اطمینان کامل داشتیم نیز صورت گرفت که نتایج قابل قبولی را نشان داد.
اطمینان از سالم بودن رده‌های سلولی ازنظر آلودگی به مایکوپلاسما جهت تحقیقات مختلف بیولوژیکی و فرآورده‌های تجارتی بسیار مهم است. لذا توصیه می‌شود روش PCR که دارای سرعت عمل بسیار بالاتری است جایگزین روش‌های کشت در موارد اورژانسی گردد. با وجود این پیشنهاد می‌شود در موارد عادی روش PCR همزمان با کشت میکروبی باشد تا تعیین هویت باکتری و گونه آن نیز تعیین گردد. مهم‌ترین یافته این مطالعه قدرت روش PCR در تشخیص آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما در مقایسه با روش‌های دیگر تشخیصی می‌باشد.

References

1- Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell J (Yakhteh). 2011;13(4).
2- Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. Br J Cancer. 2014;111(6):1021-46.
3- Razin S, Hayflick L. Highlights of mycoplasma research—An historical perspective. Biologicals. 2010;38(2):183-90.
4- Uphoff CC, Denkmann S-A, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. BioMed Research International. 2012;2012.
5- Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures. Nature protocols. 2010;5(5):929-34.
6- Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology. 2002;39(2):75-90.
7- Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R. A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. Journal of Microbiological Methods. 2000;39(2):121-6.
8- Degeling MH, Maguire CA, Bovenberg MSS, Tannous BA. A simple and sensitive assay for mycoplasma detection in mammalian cell culture. Analytical Chemistry. 2012;84(9):4227-32.
9- Gotoh K, Nishimura N, Ohshima Y, Arakawa Y, Hosono H, Yamamoto Y, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. Journal of Infection and Chemotherapy. 2012;18(5):662-7.
10- Senterfit LB. Laboratory diagnosis of mycoplasma infections. Israel journal of medical sciences. 1984;20(10):905-907.
11- Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. Development of real-time PCR for detection of Mycoplasma hominis. BMC microbiology. 2004;4(1):1.
12- Jean A, Tardy F, Allatif O, Grosjean I, Blanquier B, Gerlier D. Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes. PloS one. 2017;12(2):e0172358.
13- Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F. Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. Leukemia Research.

2008;32(2):323-6.
14- Li J, Minion FC, Petersen AC, Jiang F, Yang S, Guo P, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of Mycoplasma hyopneumoniae. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013;29(4):607-16.
15- Song Q, Wang L, Fang R, Khan MK, Zhou Y, Zhao J. Detection of Mycoplasma wenyonii in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Tropical Animal Health and Production. 2012;45(1):247-50.
16- Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, et al. Development of two real-time PCR assays for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae in clinical samples. Veterinary microbiology. 2004;102(1):55-65.
17- Zhi Y, 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.
18- Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2002;38(2):79-85.
19- Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee C, et al. PCR-based detection of Mycoplasma species. JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL-. 2006;44(1):42.
20- Dvorakova H, Valicek L, Reichelova M. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. Journal Veterinary Medicine. 2005;50(6):262-8.
21- Timenetsky J, Santos L, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. Brazilian journal of medical and biological research. 2006;39(7):907-14.
22- Fazli A, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Detection of Mycoplasma orale contamination in cell culture by PCR method. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2013;7(1):7-14.
23- Rostamizadeh V, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Detection of Mycoplasma salivarium Contamination in Cell Culture using PCR Method. Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology. 2013;16(3):109-18.
24- Ghiasi M, shahhosseiny Mh, mohajerani Hr. Development of PCR based detection of Mycoplasmas contamination in cell cultures. New Cellularand Molecular Biotechnology Journal. 2014;4(14):41-6.
25- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. Clinical Microbiology and Infection. 2003;9(4):263-73.