

Sık Kullanılan Bazı Hücre Hatları için Kalite Kontrol: Mikoplazma Kontaminasyon Tespiti, Sitokrom B ve Sitokrom Oksidaz Alt Birim I Genlerinin DNA Dizi Analizlerinin Gerçekleştirilmesi*

Habibe KAHYA**, Tuğçe KARADUMAN***

Öz

Amaç: Laboratuvarlarda sık kullanılan serviks epitelyal karsinom (HeLa), insan periferel kan promiyelositik lösemi (HL-60), fare C3/bağ dokusu (L929), Madin Darby köpek böbrek (MDCK), fare nöroblastom (Neuro-2a) gibi bazı hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyon kontrollerinin yapılması, kimlik doğrulamalarının gerçekleştirilmesi ve klonalitelere belirlenmesidir.

Yöntem: Bu çalışmada üç farklı türe ait beş hücre hattı kullanılmıştır. Çalışılan tüm hatların Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile deoksiribonükleik asit (DNA) floresan işaretlemesi yapılarak mikoplazma kontaminasyonu kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Hücre hatlarından DNA izolasyonları yapılmış, elde edilen DNA örneklerinden sitokrom B (*CYTB*) geninin bölgesel amplifikasyonu için L14816 ve H15173 primerleri; sitokrom oksidaz alt birim I (*COI*) geni için ise LCO 1490 and HCO 2198 primerleri kullanılmıştır. İlgili amplifikasyonların DNA dizi analiz sonuçları, biyoinformatik araçlar kullanılarak referans dizilerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmada ilgili hücrelerin, Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile üretici firmanın protokollerine göre belirlenen konsantrasyon ve sürede yapılan boyama sonucunda mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. Ayrıca *CYTB* gen bölgesi için veritabanında yer alan referans dizi ile yapılan karşılaştırma sonucu HL-60 için %97; "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2a" hücre hatları için ise %98 oranında benzerlik bulunmuştur. *COI* gen bölgesi için ise bu benzerlik oranları "HeLa, HL-60, L929, MDCK ve Neuro-2a" hücre hatları için sırasıyla %95, %99, %96, %96 ve %98 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Bu bağlamda, çalışmadan elde edilen Bisbenzimid (Hoechst 33258) işaretleme ve DNA dizi analiz sonuçları, pek çok araştırmada kullanılan bu hücre hatlarının kalitesi konusunda kabul edilebilir bir belirteç ve güven sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: Hücre kültürü, *CYTB*, *COI*, DNA dizi analizi, mikoplazma, Hoechst 33258.

Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

Geliş / Received: 09.05.2022 & **Kabul / Accepted:** 12.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.38079/igusabder.114239>

* Bu çalışmanın verileri ilk yazarın yüksek lisans tezinden alınmıştır. İlgili çalışma 2019-007 numaralı proje ile Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

** Yüksek Lisans Öğrencisi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Aksaray, Türkiye. E-posta: kutukhabibe97@gmail.com [ORCID https://orcid.org/0000-0001-6616-6888](https://orcid.org/0000-0001-6616-6888)

*** Dr. Öğr. Üyesi, Aksaray Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Aksaray, Türkiye. E-posta: tugcekaraduman48@gmail.com [ORCID https://orcid.org/0000-0003-0728-0968](https://orcid.org/0000-0003-0728-0968).

Quality Control for Some Commonly Used Cell Lines: Mycoplasma Contamination Detection, DNA Sequence Analysis of Cytochrome B and Cytochrome Oxidase Subunit I Genes

Abstract

Aim: Mycoplasma contamination controls, identity verification and clonality determination of some cell lines such as cervix epithelioid carcinoma (HeLa), human peripheral blood promyelocytic leukemia (HL-60), mouse C3 / a connective tissue (L929), madin darby canine kidney (MDCK), mouse neuroblastoma (Neuro-2a) that are frequently used in laboratories.

Method: Five cell lines from three different species were used in this study. Mycoplasma contamination controls of all studied lines were performed by deoxyribonucleic acid (DNA) fluorescent labeling with Bisbenzimid (Hoechst 33258). DNA isolation was performed on cell lines and DNA samples were obtained. Regional amplification of obtained DNA samples was performed as follows: L14816 and H15173 primers were used for cytochrome B (*CYTB*) gene; LCO 1490 and HCO 2198 primers were used for cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene. Results of DNA sequence analysis for respective amplifications were compared with reference sequences using bioinformatics tools.

Results: In the study, no mycoplasma contamination was observed as a result of staining relevant cells with Bisbenzimid (Hoechst 33258) at the concentration and time determined by the manufacturer's protocols. In addition, comparing the results for *CYTB* gene region with the reference sequence in the database resulted in 97% similarity for HL-60, and 98% similarity for "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2a" cell lines. Similarity rates for *COI* gene region were 95%, 99%, 96%, 96%, and 98% for "HeLa, HL-60, L929, MDCK and Neuro-2a" cell lines respectively.

Conclusion: In this context, Bisbenzimid (Hoechst 33258) labeling and DNA sequence analysis results obtained from the study provided an acceptable indicator and confidence for the quality of these cell lines used in many studies.

Keywords: Cell culture, *CYTB*, *COI*, DNA sequence analysis, mycoplasma, Hoechst 33258.

Giriş

Kültüre edilmiş hücre hatları, kanser araştırmaları, ilaç keşfi, genetik ve biyogüvenlik dahil olmak üzere bir dizi biyomedikal araştırma ve klinik uygulamada, dünya çapında araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hatlar genellikle gerçek orijinaliteleri garanti edilmeksizin laboratuvarlar arasında değiş tokuş edilmekte, isimleri eksik ya da yanlış yazılmakta ve bu nedenle stok kayıtları her zaman doğru tutulamamaktadır. Böylece hücreler, çalışmalarda, orijin türleri doğrulanmaksızın yıllarca kültüre edilebilmektedir. Bununla birlikte bir hücre hattının farklı türdeki hücrelerle çapraz kontaminasyonu, farklı hücrelerin kullanıldığı laboratuvarlarda hücrenin orijinalitesinin bozulmasına neden olan bir diğer potansiyel risktir¹⁻⁵.

Ancak, araştırmacılar hücre hatlarının yanlış tanımlanmasını önemli bir sorun olarak görmemektedir. Hücre hatlarının başka bir birey veya türden gelen hücrelerle kontaminasyonunu dışlamak için laboratuvarlarda az çaba sarf edilmektedir ve bu sorun gün geçtikçe büyümektedir. Yanlış tanımlanmış hücre hatlarının halen alanında önde gelen bilim adamlarının çok sayıda ve tekrarlanan uyarılarına rağmen kullanılmaya devam ettiği bilinmektedir⁵. Dahası, kültürde tutulan ve alt kültürlerin tekrar ve tekrar evrimleştiği, sıklıkla "genetik sürüklenme" olarak adlandırılan bir süreç olduğu ortaya çıkmıştır⁶. Tüm bu olumsuzlukların bu hücre hatları ile çalışma yapan araştırmacılar için önemli bir sorun teşkil edeceği aşikârdır. Bu nedenle, bu tür kontaminasyonları kontrol etmek gereklidir^{1,2,7-9}.

Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan kontaminasyonun da hücresel karakterizasyonun farklılaşmasına neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir¹⁰⁻¹³. Hücre çapraz kontaminasyonundan farklı olarak bakteriyel ve fungal kontaminasyon, kolayca tespit edilebilir^{10,11}. Bununla birlikte mikoplazma kontaminasyonu genellikle gözle kolayca tespit edilemez, ancak varlıkları hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümelerine engeldir (hücrelerde kromozom anomalileri de dâhil birçok sorun oluştururlar)^{14,15}. Bu kontaminant hakkındaki bilginin artması ile son birkaç yılda mikoplazma kontaminasyonu nedeniyle sonuçların doğru yayımlanamaması üzerine bir dizi makale yayınlanmıştır^{12,13,16-18}. Bu nedenle hücre kültürlerinin sık ve gizli bir kontaminantı olan hücre duvarı bulunmayan mikoplazma hücre kültür çalışmaları için önemli bir tehdittir^{14,15,19}. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve Hoechst işaretleme, Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), q-PCR ya da kit kullanımları mikoplazma tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır¹⁹⁻²⁴.

Çapraz kontaminasyon ile hücre kültürü farklılaşma riski ise ilk olarak 1957'de kabul edilmiştir. Günümüze değin karyoloji, transplantasyon ve hemaglutinasyon deneyleri, immünofloresans ve DNA parmak izi ile çapraz kontaminasyon tespit edilmiştir. 1966'da izoenzim polimorfizmi genetik bir belirteç olarak kullanılmış ve Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) polimorfizmi HeLa hücre kontaminasyonu problemini netleştirmiştir. İzoenzim polimorfizminin biyokimyasal analizi, hücre çizgisi tanımlama ve kesişme noktalarının kontaminasyonunun kalite kontrolünde standart yöntem olarak kabul edilmektedir ve hücrelerarası çapraz kontaminasyon tespiti için DNA parmak izi ile birlikte rutin olarak dünyadaki ana biyolojik kaynak merkezleri American Type Culture Collection (ATCC), European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) ve Riken tarafından kullanılmaktadır⁹. Çok az sayıda laboratuvar, testlerin maliyeti ve karmaşıklığı nedeniyle düzenli olarak izoenzim analizleri veya parmak izi çalışmaları yapmaktadır. Buna ek olarak ve belki de en önemlisi, dergi editör kurulları, çalışma grupları ve araştırmaları destekleyen kuruluşlar, hücre hatlarının tür ve köken bilgilendirmesinin çalışma bilgisine dahil edilmesinde ısrar etmemektedir⁹.

Günümüze kadar kültüre edilmiş hücrelerin kimliğini ve saflığını kontrol etmek için çeşitli yöntemler ve işaretler kullanılmıştır^{5,9,14} ancak hücre kültürlerinin kalite kontrollerinde mtDNA çalışmaları da son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Günümüzde mitokondriyal DNA'nın dizi analizi çapraz kontaminasyonun saptanmasında önemli bir araç olarak görülmektedir^{3,4}. Laboratuvara getirilen her yeni hücre hattının, henüz başlangıç aşamasında elde edilen ve referans olarak kullanılacak mtDNA dizisi olmalıdır. Hücre hattının kimliğini, mtDNA değişikliklerini ve çapraz kontaminantların yokluğunu doğrulamak için, ilerleyen pasajlarda subkültüre edilmiş hücrelerin mtDNA'sı tekrar dizilenebilir. Bu sayede mtDNA verileri sadece çapraz kontaminasyon gösteren hücrelerin saptanması ve tanımlanması için değil, aynı zamanda hücre hattı kimlik doğrulaması için de kullanılabilir. Mitokondriyal DNA yüksek mutasyon oranına sahiptir ve memeli hücrelerinde yüzlerce hatta binlerce kopya halinde bulunur. Bununla birlikte hücre hatları, potansiyel kontaminantları izlemek için kullanılacak "mtDNA markerleri" olarak işlev gören çok spesifik mtDNA dizilerine sahiptir^{3,4}.

Günümüzde, PCR ile DNA analizi, ilgi konusu genlerin bölgelerinin amplifiye edilmesine izin verdiği için, türlerin tanımlanmasında rutin olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir²⁵⁻²⁷. Belirtilen analizler, en temel düzeyde hücre kültür tesislerinde bile kalite kontrol programlarını güçlendirmek için kolayca eklenebilir niteliktedir⁹. Primer tasarımına uygun korunmuş bölgeler, tür tanımlanmasında evrensel primer setlerinin kullanımına izin verir. İdeal bir tür belirteci için kriter, türler arasında yeterli değişkenlik gösteren ve tür içi varyasyonsuz veya çok az çeşitlilik gösteren bir dizi olmasıdır^{28,29}. Türlerin tanımlanmasında uluslararası olarak önerilen iki mitokondriyal bölge bulunmaktadır: sitokrom B (*CYTB*) ve sitokrom c oksidaz alt birim I geni (*COI*). *CYTB* ve *COI* bölgeleri evrensel primerler tarafından tanınan bazı stabil dizilere, kimliklendirmeyi sağlayacak birtakım dizi çeşitliliklerine sahiptir, bu nedenle bu nükleotid dizileri türe özgü bilgiler içerir^{9,27}.

Belirtilen hücre hatlarının (HeLa, HL-60, L929, MDCK, Neuro-2a); mikoplazma kontaminasyon kontrollerinin yapılması, hücresel köken kimlik doğrulamalarının gerçekleştirilmesi ve klonalitelere belirlenmesi çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

Bu amaca yönelik olarak gerçekleştirilecek deneysel çalışmalarla; hücre kültürlerinin gizli kontaminantlarından olan mikoplazma varlığının hücrelerin Bisbenzimid (Hoechst 33258) boyaması ile değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Ek olarak, türler arası çapraz kontaminasyon şüphesi olduğunda ya da tarama amacıyla, söz konusu hücre hatlarının türe özgü sekans göstermesi beklenen *CYTB* ve *COI* gen bölgelerine spesifik olarak dizayn edilmiş evrensel primer çiftlerinin kullanıldığı sistemle, hücre hattının farklı türde bir hücre hattı tarafından kontamine edilip edilmediği ya da yanlış etiketleme olma olasılığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada üç farklı türe ait beş hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hatları, teşhis ve araştırma amaçlı en yaygın kullanılanlar arasında yer alan bazı insan ve hayvan hücre hatlarıdır, çalışma bu yönüyle etik kurul izni gerektirmemektedir.

Hücre Hatlarının Üretilmesi

Dondurulmuş hücrelerden, çözme, pasajlama ve stoklama işlemleri beş farklı hücre tipi için literatürdeki protokollere uygun şekilde yapılmıştır³⁰. Hücreler Tablo 1’de belirtilen koşullardaki besiyerlerinde, 37°C’de ve %5 CO₂ ortamında üretilmiş, ardından ilgili analizler yapılmıştır.

Tablo 1. Kullanılan hücre hatları için genel bilgiler

Hücre Hattı / Temin Edilen Kaynak / Pasaj numarası	Besiyeri Bileşimi
HeLa (Erzurum Teknik Üniversitesi, Hücre Kültürü Laboratuvarı, P/25)	EMEM (EBSS) + 2mM Glutamin + %1 Esansiyel Olmayan Amino Asitler (NEAA) + %10 Fetal Sığır Serum (FBS).
HL-60 (Aksaray Üniversitesi Moleküler Metabolizma Laboratuvarı, P/38)	RPMI 1640 + 2mM Glutamin + %10-20 FBS.
L929 (Şap Enstitüsü, HÜKÜK Kayıt No: 92123004, P/18)	DMEM + 2mM Glutamin +%10 FBS.
MDCK (Şap Enstitüsü, HÜKÜK Kayıt No: 98011601, P/8)	EMEM (EBSS) + 2mM Glutamin +%1 NEAA +%10 FBS.
Neuro-2a (Hacettepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilimdalı Hücre Kültürü Laboratuvarı, P/36)	EMEM (EBSS) + 2mM Glutamin +%1 NEAA +%10 FBS.

Hücre Hatlarının Mikoplazma Kontrollerinin Gerçekleştirilmesi

Çalışılan tüm hatların mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmesi çalışmanın ön hazırlık safhasını oluşturmuştur. Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesi yapılarak mikoplazma kontaminasyonu kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için direkt yöntemle; en az 3 pasajı antibiyotiksiz ortamda üretilen hücre hatları (antibiyotik içeren besiyerinde üretilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır), ikişer adet 48 kuyulu hücre kültürü plaklarında başlangıç hücre sayısı 3. 10⁴-10⁵ olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılarak 1x (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) PBS yıkaması ve ardından %4 paraformaldehit ile 15 dakika

fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Tekrar üç kez 1xPBS yıkaması yapılmıştır. Hücreler, üretici firmanın bakteri ve sabit hücre boyaması için belirttiği koşullara uyumlu olarak 1 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile 15-20 dakika inkübe edilmiştir. Fazla boyanın uzaklaştırılması için tekrar 1X PBS yıkaması yapılarak hücreler flouresan mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir. HL-60 hücresi için, % 4'lük paraformaldehit fiksasyonunu takiben, 1X PBS yıkaması olacak şekilde revize protokol uygulanmıştır³¹. Tüm işlemler antibiyotik içeren besiyerinde üretilen hücreler için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir ve bu gruplar kontrol olarak kabul edilmiştir.

Hücre Hatlarından DNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesi

Dondurulmuş stok hücre hatları, 37°C'de çözündürülerek %10 (Fetal sığır serumu) FBS içeren besiyeri ile seyreltilmiştir. Ardından dilusyon 180xg'de santrifüj edilerek, elde edilen pelet 200 µl 1X PBS'te çözülmüştür veya hali hazırda açık olan hücre hatlarından 6-well platelere ekim gerçekleştirilerek Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (cat no: E3551) ile, DNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre yapılmıştır.

CYTB ve COI Bölge Amplifikasyonlarının Gerçekleştirilmesi & DNA Dizi Analizi

Elde edilen DNA örneklerinden *CYTB* geninin bir fragmanını çoğaltmak için L14816 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') ve H15173 (5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') primerleri; *COI* geninin bölgesel amplifikasyonu için LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') primerleri kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu için, 1,0 µl ileri ve 1,0 µl geri primer (10 pmol/µl), 1,0 µl dNTP mix (2,5 mM), 2,5 µl 10X PCR buffer (2,5 mM MgCl₂), 0,5 µl kalıp DNA (~60 ng/ µl), 1 µl Taq DNA polimeraz (5U/µl) içeren karışım 0,2 ml PCR tüpleri içerisinde 17,5 µl dH₂O ile toplam 25 µl olarak hazırlanmıştır.

Amplifikasyon koşulu, denatürasyon için 94°C'de 4 dakika, ardından 94°C'de 30 s, 51/58°C'de 30 s (*COI* ve *CYTB*), ve 72°C'de 30 s için ve 72°C'de 5 dakika son uzama şeklindedir. PCR ürünleri, elektroforez ile %1,5 agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. PCR ürünleri sekanslamadan önce enzimatik saflaştırma (Exo-SAP) yöntemiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünlerinin sekanslanması, Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon koşulu olarak, 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika programı 25 döngü olarak kullanılmıştır. Daha sonra ürünler etanol/sodyum asetat çökeltme yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer cihazında yürütülmüştür. İlgili bölgelerin dizileme çalışmaları çift yönlü okuma şeklinde gerçekleştirilmiştir.

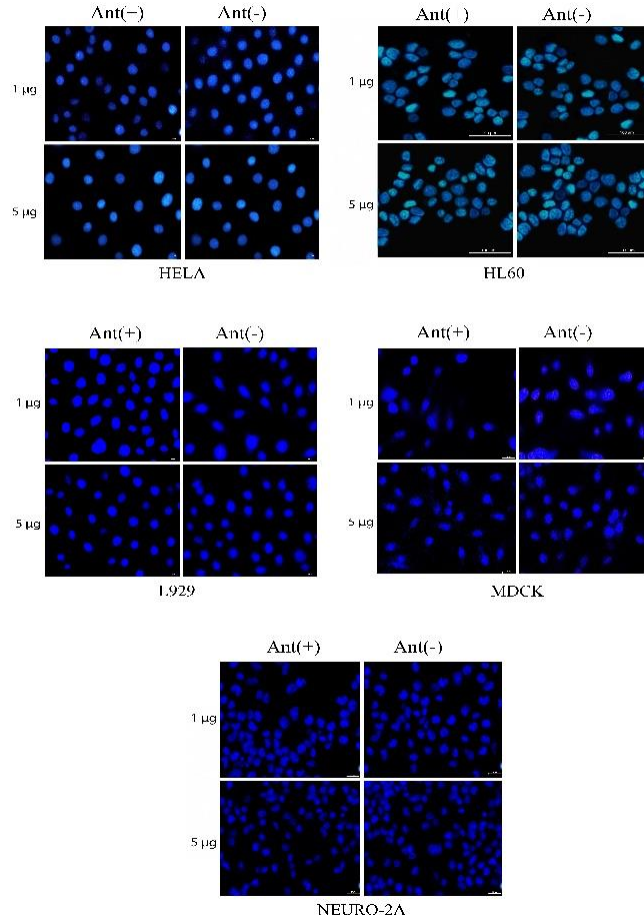
İlgili Amplifikasyonların DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Biyoinformatik Analiz ile Değerlendirilmesi

Sekans verilerine ilişkin ileri (forward) ve geri (revers) okumalar BioEdit programı ile bir araya getirilmiş daha sonra oluşturulan dizi, referans dizisi ile NCBI-Blast ile karşılaştırılmıştır. İlgili analizler ait sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Bulgular

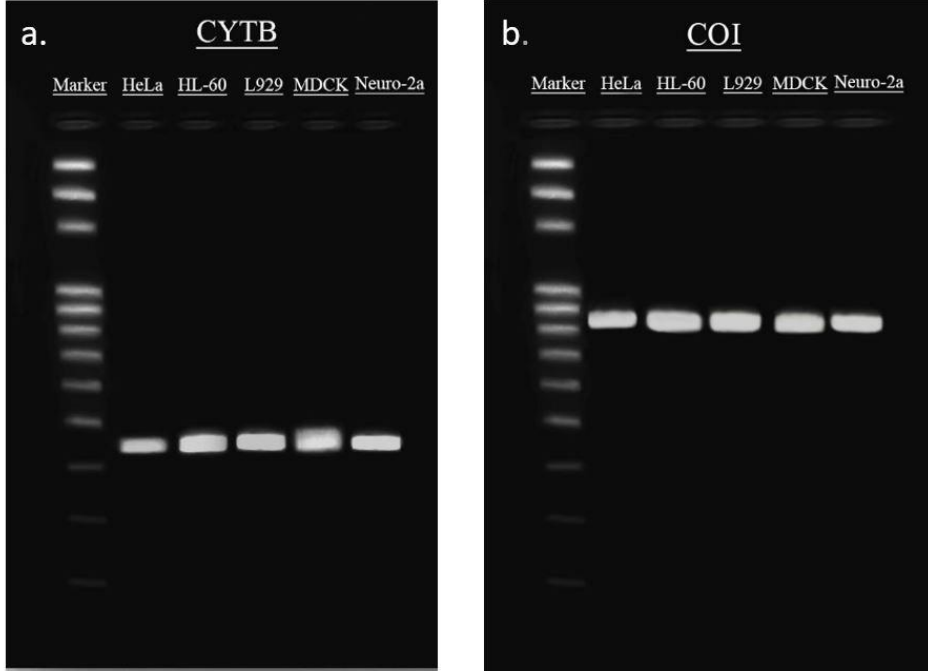
Çalışılan tüm hatların mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmiştir. Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesi yapılarak mikoplazma kontaminasyonu kontrolleri yapılmıştır. Aşağıda uygulama ve kontrol gruplarına ait 40x büyütmelerde alınan görüntüler verilmiştir, mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır (Şekil 1).

Şekil 1. HeLa, HL-60, L929, MDCK, Neuro-2a hücrelerinin antibiyotik içeren ve içermeyen besiyerlerinde üretilen pasajlarının farklı konsantrasyonlarda Bisbenzimid (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin 40x büyütmedeki görüntüsü

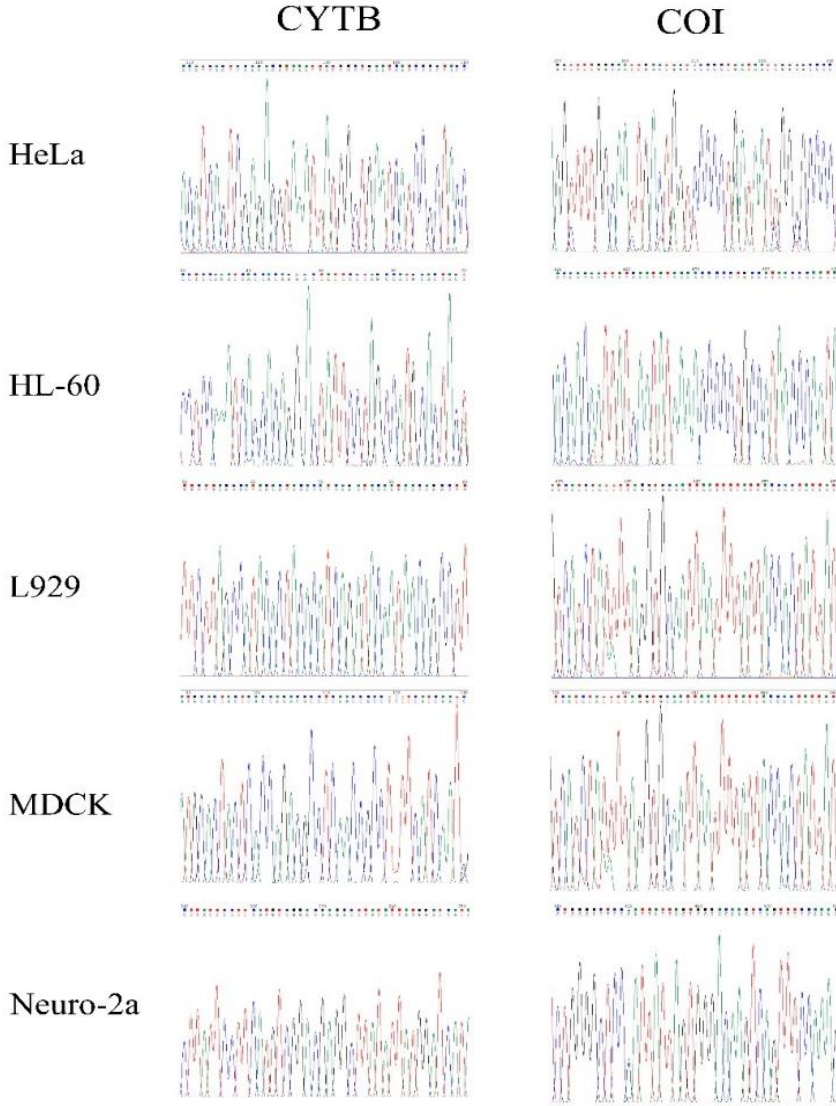


Elde edilen DNA örneklerinden *CYTB* geninin bir fragmanını çoğaltmak için L14816 ve H15173 primerleri; *COI* geninin bölgesel amplifikasyonu için ise LCO 1490 ve HCO 2198 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve her hücre hattı için elde edilen *CYTB* (358 bp) ve *COI* (710 bp) bölgelerine ait sonuçlar aşağıda verilmiştir^{32,33} (Şekil 2).

Şekil 2. İzole edilen her hücre hattı için elde edilen *CYTB* (a) ve *COI* (b) bölgeleri amplifikasyon görüntüleri



Şekil 3. HeLa, b. HL-60, c. L929, d. MDCK ve e. Neuro-2a hücrelerinin *CYTb* (sol) ve *COI* (sağ) gen bölgeleri DNA dizi analizi kromatogramları

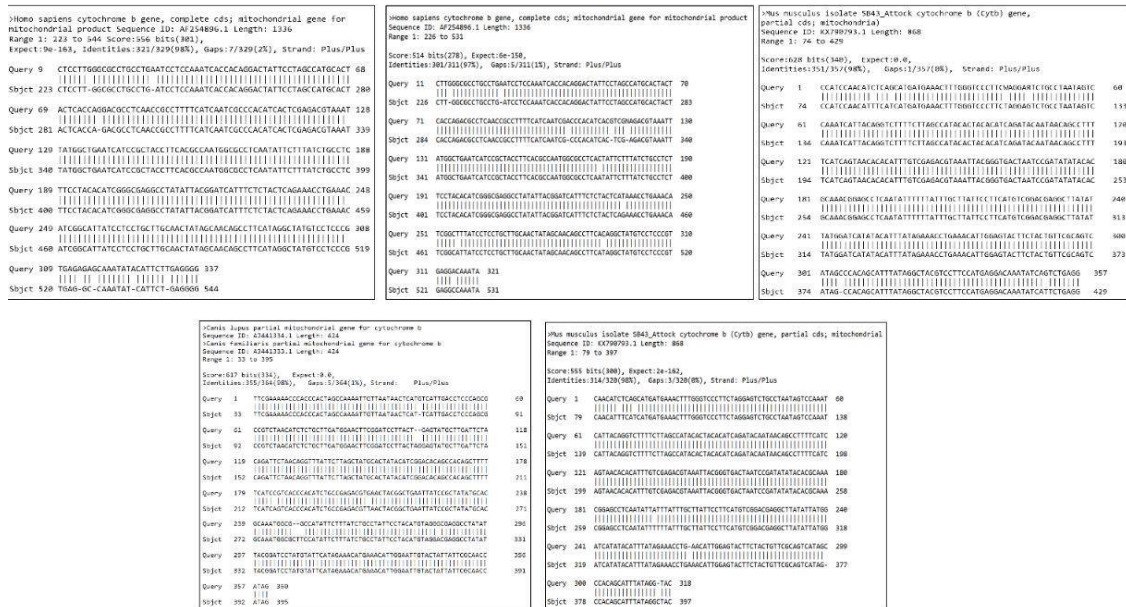


İlgili bölgelerin dizileme çalışmaları sonucunda oluşturulan biyoinformatik veri tabanları kullanılarak gerçekleştirilen analizlerine ait sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2).

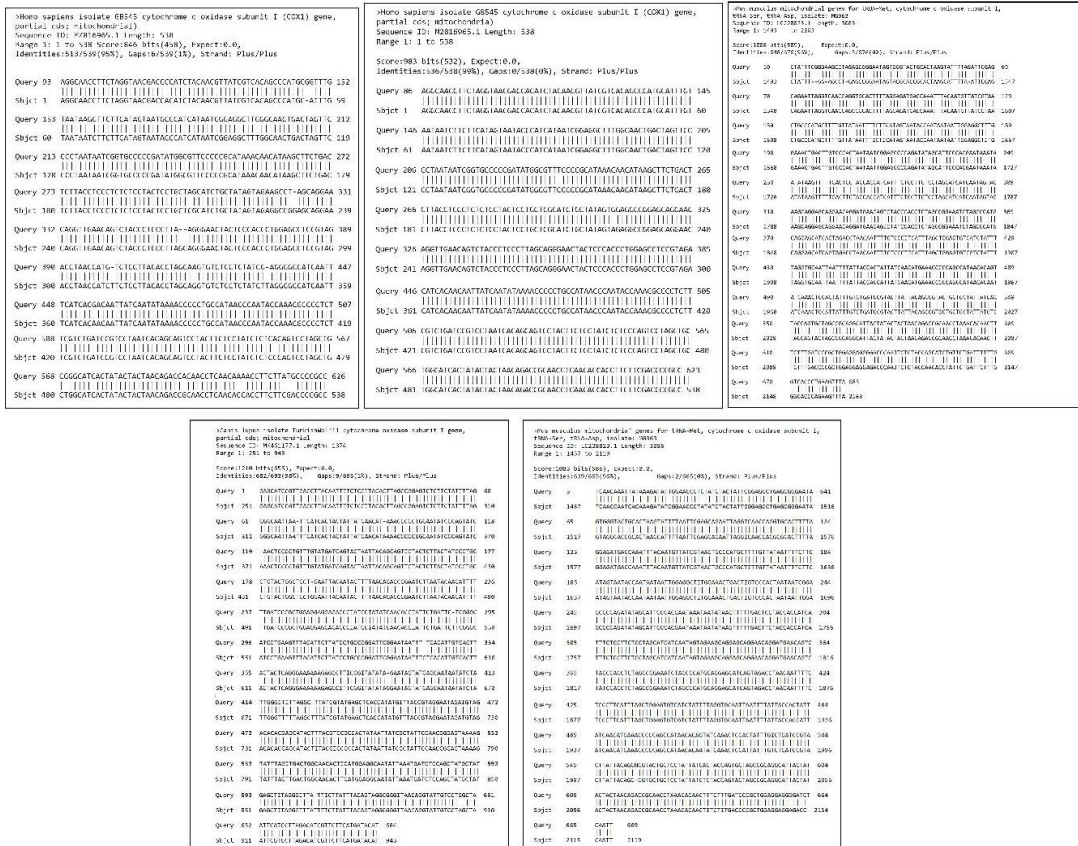
Tablo 2. *CYT B* ve *COI* bölgeleri için referans gen bölge bilgileri ve benzerlik oranı

Hücre hattı	<i>CYT B</i>		<i>COI</i>	
	Erişim (Accession) numarası	Benzerlik (%)	Erişim (Accession) numarası	Benzerlik (%)
HeLa	AF254896.1	98	MZ816965.1	95
HL-60		97		99
L929	KX790793.1	98	LC228823.1	96
Neuro-2a		98	MK461177.1	96
MDCK		98		98

Şekil 4. *CYT B* bölgesi için elde edilen sekansların referans dizilerle hizalama sonucu (NCBI-Blast) (HeLa, HL-60, L929, Neuro-2a ve MDCK sırasıyla verilmiştir)



Şekil 5. COI bölgesi için elde edilen sekansların referans dizilerle hizalama sonucu (NCBI-Blast) (HeLa, HL-60, L929, Neuro-2a ve MDCK sırasıyla verilmiştir).



Tartışma

Mikoplazmalar nispeten esnek hücre zarına sahip, çok küçük organizmalar oldukları için (0,3–1 µm) yaygın olarak kullanılan 0,45 µm mikrobiyolojik filtrelerden geçebilirler ve potansiyel olarak laboratuvardaki tüm kültürlerle yayılabilir²⁰. Bu organizma hücre fizyolojisi ile ilgili pek çok parametreyi değiştirebilir, bu da kontamine hücrelerle yapılan deneyleri değersiz hale getirir³⁴. Halihazırda kültüre edilen hücrelerin %10-15’inin mikoplazma ile kontamine olduğu tahmin edilmektedir¹⁹. Mikoplazma kontaminasyonunun hücre büyümesi, amino asit metabolizması, kromozomal anormalliklerin indüksiyonu, lenfosit aktivasyonunun indüksiyonu veya inhibisyonu, sitokinlerin indüksiyonu veya baskılanması ve hatta sinyal transdüksiyonu üzerinde etkisi vardır ve hücre kültürü çalışmaları açısından önemli bir tehdittir^{20,35}. Mikoplazma tespitinde 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve Hoechst işaretleme, PCR, q-PCR ya da kitler sıklıkla kullanılmaktadır²¹⁻²³.

Çalışma kapsamında Hoescht 33258 ile direkt işaretleme metodu kullanılmış olup, söz konusu hatlarda mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. Bununla birlikte uygulanmış olduğumuz teknik ucuz ve hızlı olması gibi avantajlarının yanı sıra; sonuçların yorumlanması konusunda zorluk ve tespit hassasiyetinin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir. Laboratuvara giren tüm yeni hücre kültürlerinin ve tüm hücre bankalarının mikoplazma varlığı için test edilmesi esastır. Ön değerlendirme olarak çalışmada olduğu gibi, direkt işaretleme metodu ile çalışılması, ek olarak ihtiyaç halinde, çalışmanın diğer parametresi olan PCR temelli belirleme yapılması, uygulamanın hızı ve duyarlılığı sebebiyle önerilmektedir. İndirekt işaretleme, agar ve broth kültürü uygulamaları da önerilen diğer yöntemler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte indirekt işaretleme, agar ve broth kültürü çalışmaları hassasiyet derecesi yüksek olan ancak, zaman alan uygulamalardır, agar ve broth kültürü ek olarak uzmanlık gerektirmektedir, her laboratuvarında rutin kullanımı yapılamamaktadır²².

Türleri teşhis edebilmek ve türler arası ilişkileri belirleyebilmek, biyoloji, ekoloji, evrim, sistematik, yaban hayatı yönetimi, koruma ve adli tıp bilimlerinde birincil derecede önemlidir. Tipik olarak filogenetik çalışmalar, *COI* ve/veya *CYTB* gen bölgelerinin veya daha genel olarak bir kısmının sekanslanmasına ve ardından veri tabanlarında yer alan DNA sekanslarıyla karşılaştırmasına dayanır. Bu karşılaştırmalar kayıtlı sekans verilerinin, doğru olduğunu ve sekansın başka bir türe ait olmadığını veya hatalar içerdiğini varsayabilir (1), nadir bir alt tür veya bireysel varyasyon örneği olmaktan çok, türün her temsilcisi için teşhis yapabilir (2), bir türün tüm bireylerinin aynı veya çok benzer DNA dizilerine sahip olduğunu gösterir (3)³⁶.

Mevcut çalışmada, ilgili genlerin üniversal primerlerle çoğaltılan ampikonları hücre kültür hatlarının tanımlaması için araştırılmış olup, bu amaçla incelenen türlerin *CYTB* ve *COI* gen dizileri DNA veri tabanlarında bulunmuştur. Elde edilen ileri ve geri okumalardan korunmuş dizi oluşturulmuştur. Oluşturulan korunmuş diziler ile veri tabanlarından elde edilen dizilerin karşılaştırılması belirli erişim numaralarına spesifik referans diziler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *CYTB* gen bölgesi için veritabanında yer alan referans dizi ile yapılan karşılaştırma sonucu HL-60 için %97; "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2a" hücre hatları için ise %98 oranında benzerlik bulunmuştur. *COI* gen bölgesi için ise bu benzerlik oranları sırasıyla %95, %99, %96, %96 ve %98 olarak bulunmuştur. Sekans dizileri ile veri tabanlarından elde edilen dizilerin karşılaştırılma sonuçlarının %95'in üzerinde benzerlik verdiği görülmüştür. Aynı türün iki üyesinin *CYTB*'de ya da *COI*'da neredeyse %100 kimliğe sahip olması beklenir. Özdeşlik eşleşmesi % 100'den az ise, o zaman ya bazı tür içi farklılıklar vardır ya da karşılaştırılan dizi bilinmeyen ancak yakından ilişkili bir türden gelir³⁷.

Yapılan bir çalışmada hücre hatları arasında çapraz kontaminasyonun belirlenmesi için multipleks PCR tabanlı uygulamayı takiben, daha geniş çeşitlilikteki hücre hatlarının tanımlanması için, *COI* geninin korunmuş dizilerini hedef alan evrensel bir primer karışımı

kullanarak, genellikle "barkod bölgesi" olarak tanımlanan 648-bp'lik bir bölgeyi amplifiye edilmiş ve dizilenmiştir ve bu bölgenin sekanslanmasıyla % 100'e yakın benzerlik elde edildiği bildirilmiştir³⁸. *CYTb* bölgesi temelinde RFLP tekniği ile gerçekleştirilen çalışmada elde edilen ek bantlarla bazı hatlar için klonaliteden farklılaşmalar olduğu tespit edilirken¹, aynı bölge için yuvalanmış PCR tekniği ile gerçekleştirilen çalışmada kullanılan hücre hatlarında çapraz kontaminasyon olmadığı bildirilmiştir³⁹. Bu çalışmalarda ilgili gen bölgeleri ile gerçekleştirilen çalışmaların izoenzim profillemesinden daha duyarlı olduğu ve bu tekniğe önemli alternatif oluşturduğu bildirilmiştir^{1,39}. *CYTb*^{40,41} ve *COI*⁴¹ bölgelerine tür spesifik primerlerle gerçekleştirilen çalışmalarda çapraz kontaminasyon tespit edilemediği çalışmalar mevcut iken, aynı metodoloji ile her iki gen bölgesinin çalışıldığı benzer bir çalışmada PCR ürünlerinin aynı zamanda sekanslandığı ve çalışılan hücre hatlarının tür kökenlerinin kesin olarak tespit edildiği bildirilmiştir⁹.

İlgili hatlardan laboratuvarlar arası transferler ile elde edilme durumu ve pasaj sayılarındaki artış gibi durumların klonal farklılaşmayı tetiklediği ve beraberinde kaynak türlerle benzerlik düzeyini düşürdüğü öngörülmüştür. Bununla birlikte hatların temin edildiği ilk izolatların sekans analiz verilerinin olmaması, farklılaşmanın zamana bağlı kullanım ile olan ilişkisi konusundaki hipotez kurulmasını zorlaştırmaktadır. Yine elde edilen verilerin, çalışmakta olunan hücre hatlarının kimliklendirilmesine ilişkin ilk çalışma verileri olması, aynı kaynak kökenine sahip hatların kullanımı ile başka klonalite çalışmalarının yapılmamış olması karşılaştırma yapabilme olasılığını sınırlı kılmıştır.

Sonuç

Sonuç olarak, benzerlik düzeyleri açısından izolatlardan elde edilen DNA'lardan sekans reaksiyonlarının tekrarlanması olasıdır. Ayrıca, hücrelerin morfolojik karakterizasyonunun köken alınan hücrelerle benzerliği, mikoplazma negatifliği göz önüne alındığında hatların çalışmalarda kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte hücrenin yaşlanmaya gitme, oksidatif stres vs. gibi nedenlerle mtDNA'sında ortaya çıkan dizi farklılıklarının tümüyle analiz edilebilmesi için mtDNA dizilemesi yapılabileceği de öngörülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmanın verileri ilk yazarın yüksek lisans tezinden alınmıştır. İlgili çalışma 2019-007 numaralı proje ile Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir. Şekillerin oluşturulmasında katkı sunan Sinem Sönmez'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Losi CG, Ferrari S, Sossi E, Villa R, Ferrari M. An alternative method to isoenzyme profile for cell line identification and interspecies cross-contaminations: Cytochrome b PCR-RLFP analysis. *In Vitro CellDevBiol-Animal*. 2008;44(8-9):321-329. doi:10.1007/s11626-008-9125-x.
2. Huang Y, Liu Y, Zheng C, Shen C. Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. Talamas-Rohana P, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0170384. doi:10.1371/journal.pone.0170384.
3. Yin C, Liu Y, Guo X, et al. An Effective strategy to eliminate inherent cross-contamination in mtDNA next-generation sequencing of multiple samples. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2019;21(4):593-601. doi:10.1016/j.jmoldx.2019.02.006.
4. Weissensteiner H, Forer L, Fendt L, et al. Contamination detection in sequencing studies using the mitochondrial phylogeny. *Genome Res*. 2021;31(2):309-316. doi:10.1101/gr.256545.119.
5. Souren NY, Fusenig NE, Heck S, et al. Cell line authentication: A necessity for reproducible biomedical research. *The EMBO Journal*. 2022;41(14):e111307. doi:10.15252/embj.2022111307.
6. Editorial. Reading between the lines. *Nature*. 2018;560(7718):281-281. doi:10.1038/d41586-018-05935-y. Published: 15 August 2018. Accessed: 20 November 2022.
7. Johnen G, Rozynek P, von der Gathen Y, et al. Cross-contamination of a UROtsa stock with T24 cells – molecular comparison of different cell lines and stocks. Cotterill S, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64139. doi:10.1371/journal.pone.0064139.
8. Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R, et al. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cells manufactured for therapeutic applications. *Stem Cell Rev and Rep*. 2016;12(4):394-420. doi:10.1007/s12015-016-9662-8.
9. Araújo SBD, Patricio GF, Simoni IC, Rivas EB, Fernandes MJB. Isoenzyme and molecular approach for authenticating and monitoring of animal cell lines. *An Acad Bras Ciênc*. 2019;91(3):e20180487. doi:10.1590/0001-3765201920180487.
10. Ali S. Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: Common contaminants, detection and elimination. *JSRT*. 2017;2(5):149-155. doi:10.15406/jsrt.2017.02.00078.

11. Shrader HR, Miller AM, Tomanek-Chalkley A, et al. Effect of bacterial contamination in bile on pancreatic cancer cell survival. *Surgery*. 2021;169(3):617-622. doi:10.1016/j.surg.2020.09.029.
12. Hoff FW, Hu CW, Qutub AA, et al. Mycoplasma contamination of leukemic cell lines alters protein expression determined by reverse phase protein arrays. *Cytotechnology*. 2018;70(6):1529-1535. doi:10.1007/s10616-018-0244-2.
13. Feng N, Huang X, Jia Y. Mycoplasma contamination affects cell characteristics and decreases the sensitivity of BV2 microglia to LPS stimulation. *Cytotechnology*. 2019;71(2):623-634. doi:10.1007/s10616-019-00311-8.
14. Dennert K, Kumar R. Traceability methods for cell line authentication and mycoplasma detection. *SLAS Technology*. 2021;26(6):630-636. doi:10.1177/24726303211030290.
15. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture. *Cell J*. 2012;13(4):203-212.
16. Doyle C, Nakamura R, Bing R, Rousseau B, Branski RC. Mycoplasma affects baseline gene expression and the response to glucocorticoids in vocal fold fibroblasts. *Journal of Medical Microbiology*. 2021;70(5):001362-8. doi:10.1099/jmm.0.001362.
17. Fratz-Berilla EJ, Faison T, Kohnhorst CL, et al. Impacts of intentional mycoplasma contamination on CHO cell bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;116(12):3242-3252. doi:10.1002/bit.27161.
18. Fratz-Berilla EJ, Angart P, Graham RJ, et al. Impacts on product quality attributes of monoclonal antibodies produced in CHO cell bioreactor cultures during intentional mycoplasma contamination events. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(9):2802-2815. doi:10.1002/bit.27436.
19. Soheily Z, Soleimani M, Keivan MA. Detection of mycoplasma contamination of cell culture by A loop-mediated isothermal amplification method. *Cell J*. 2019;21(1):43-8. doi:10.22074/cellj.2019.5624.
20. Baaity Z, Breunig S, Önder K, Somogyvári F. Direct qPCR is a sensitive approach to detect mycoplasma contamination in U937 cell cultures. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):720-5. doi:10.1186/s13104-019-4763-5.
21. Russell BJ, Horiuchi K, Velez JO, Goodman CH, Johnson BW. Mycoplasma detection in a historical arbovirus repository: Commercial kit comparison and implications for improved repository management. *Journal of Virological Methods*. 2020;276:113769-76. doi:10.1016/j.jviromet.2019.113769.

22. Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc.* 2010;5(5):929-934. doi:10.1038/nprot.2010.43.
23. Sugita S, Hono A, Fujino S, et al. Detection of mycoplasma contamination in transplanted retinal cells by rapid and sensitive polymerase chain reaction Test. *IJMS.* 2021;22(22):12555-67. doi:10.3390/ijms222212555.
24. Greenfield EA. Testing hybridoma cells for *Mycoplasma* contamination. *Cold Spring Harb Protoc.* 2021;2021(7):pdb.prot103283. doi:10.1101/pdb.prot103283.
25. Li P, Li D, Hong Y, et al. Combining DNA mini-barcoding and species-specific primers PCR technology for identification of heosemys grandis. *Front Ecol Evol.* 2022;10:822871. doi:10.3389/fevo.2022.822871.
26. Tsoupas A, Papavasileiou S, Minoudi S, et al. DNA barcoding identification of Greek freshwater fishes. Peng Z, ed. *PLoS ONE.* 2022;17(1):e0263118. doi:10.1371/journal.pone.0263118.
27. Dave AR, Chaudhary DF, Mankad PM, Koringa PG, Rank DN. Genetic diversity among two native Indian chicken populations using cytochrome c oxidase subunit I and cytochrome b DNA barcodes. *Vet World.* 2021:1389-1397. doi:10.14202/vetworld.2021.1389-1397.
28. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1462):1805-1811. doi:10.1098/rstb.2005.1730.
29. Ahmed S, Ibrahim M, Nantasenammat C, et al. Pragmatic applications and Universality of DNA barcoding for substantial organisms at species level: A review to explore a way forward. Khan S, ed. *BioMed Research International.* 2022;2022:1-19. doi:10.1155/2022/1846485.
30. Segeritz CP, Vallier L. Cell culture. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers.* Elsevier. 2017:151-172. doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
31. Huang YC, Kuo CL, Lu KW, et al. 18 α -Glycyrrhetic acid induces apoptosis of HL-60 human leukemia cells through caspases- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Molecules.* 2016;21(7):872-85. doi:10.3390/molecules21070872.
32. Yahia D, Kamata Y. PCR-RFLP and Sequence analysis of hair cytochrome b gene for identification of animal species. *Asian J of Animal and Veterinary Advances.* 2018;13(2):155-165. doi:10.3923/ajava.2018.155.165.

33. Abd-El-Samie EM, Elkafrawy I, Osama M, Ageez A. Molecular phylogeny and identification of the Egyptian wasps (Hymenoptera: Vespidae) based on COI mitochondrial gene sequences. *Egypt J Biol Pest Control*. 2018;28(1):36-42. doi:10.1186/s41938-018-0038-z.
34. Halbedel S, Stülke J. Tools for the genetic analysis of mycoplasma. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007;297(1):37-44. doi:10.1016/j.ijmm.2006.11.001.
35. Ligasová A, Vydržalová M, Buriánová R, et al. A New sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy. *Cells*. 2019;8(12):1510-26. doi:10.3390/cells8121510.
36. Tobe SS, Kitchener AC, Linacre AMT. Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit i mitochondrial genes. DeSalle R, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e14156. doi:10.1371/journal.pone.0014156.
37. Weir JT, Schluter D. The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rates of birds and mammals. *Science*. 2007;315(5818):1574-1576. doi:10.1126/science.1135590
38. Cooper JK, Sykes G, King S, et al. Species identification in cell culture: A two-pronged molecular approach. *In Vitro CellDevBiol-Animal*. 2007;43(10):344-351. doi:10.1007/s11626-007-9060-2.
39. Ramya R, Nagarajan T, Sivakumar V, et al. Identification of cross-contaminated animal cells by PCR and isoenzyme analysis. *Cytotechnology*. 2009;61(3):81-92. doi:10.1007/s10616-009-9245-5.
40. Parodi B, Aresu O, Bini D, et al. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: A PCR-based method. *BioTechniques*. 2002;32(2):432-440. doi:10.2144/02322rr05.
41. Soleimani S, Ziyaeifar F, Lotfi M. Study on identification of Iranian BHK-21-C5 cell line by two steps PCR. *Archives of Razi Institute*. 2021;76(2):193-201. doi:10.22092/ari.2020.128637.1419