



財團法人
食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute

生物資源保存及研究簡訊

第28卷第4期

中華民國 104 年 12 月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

研發成果 1

- ◎ BCRC 參與人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟之簡介
- ◎ iPSC 教育訓練服務能量
- ◎ iPSC 之特性鑑定、品質管制與公開提供
- ◎ 細胞誤用及細胞交叉汙染介紹

BCRC 參與人類疾病

誘導型多潛能幹細胞服務聯盟之簡介

生資中心 / 研究員
盧懷恩

一、人類疾病誘導型多潛能幹細胞聯盟成立緣起

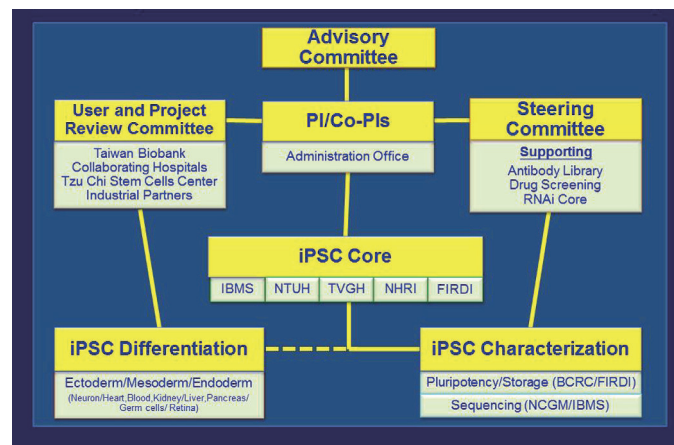
2006 年日本京都大學學者 Dr. Shinya Yamanaka 將 Oct4, Sox2, c-Myc 及 Klf4 等 4 個轉錄因子轉導入小鼠纖維母細胞中，成功驅動細胞重編程 (reprogramming) 為多潛能幹細胞狀態，因此稱這群細胞為誘導型多潛能幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。隔年該團隊再次成功將人類皮膚細胞誘導成為 iPSC，這個成果突破了人類胚胎幹細胞 (human Embryonic stem cell, ESC) 使用上的道德爭議與臨床使用上的限制，Dr. Shinya Yamanaka 也因這一成果獲得了 2012 年諾貝爾生理醫學獎。iPSC 細胞型態與 ESC 相似，不但表現多能幹細胞相關標誌蛋白質，且具有分化三胚層細胞的能力。再加上近年來 iPSC 技術的成熟，建立技術再現性高，提供了非常好的一個契機，iPSC 成為近年來藥物試驗、細胞治療或人類發育與基因調控的研究上，相當具研究價值之細胞。iPSC 技術可誘

導個體本身的體細胞，建立出符合自體基因型的幹細胞，在臨床醫療上有極高的治療應用潛力。2008 年美國哈佛大學研究團隊利用一名 82 歲的肌萎縮性脊髓側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者的皮膚細胞，在體外建立出第一株疾病 iPSC。接著將其分化為運動神經元，首次證明患者年齡和疾病狀態並不影響體細胞之 reprogramming 和細胞分化。之後常見的神經相關疾病 iPSC 如阿茲海默症、帕金森氏症等也陸續被建立出來。在 iPSC 心肌細胞模型的建立方面，2010 年 Carvajal-Vergara 等利用 LEOPARD syndrome 的疾病 iPSC，建立第一株疾病心肌細胞模型。LEOPARD syndrome 病患主要有肥厚型心臟病，因此該心肌細胞模型也具有肥厚特徵。在同一年 Moretti 等亦發表具 long-QT syndrome type I 心肌細胞模型，並成功應用於藥物測試。從 2008 年開始，關於疾病 iPSC 的發表的研究約有 20 多篇，包括神經系統、心血管系統、血液系統、糖尿病、肝臟疾病、精神分裂症

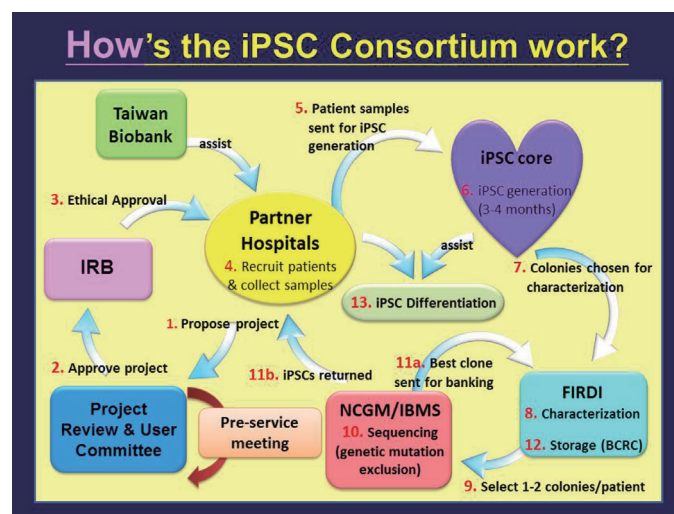
等多種遺傳疾病類型。過去在基礎疾病研究中，常受限於無法取得適當的疾病細胞，而透過 iPSC 技術可將疾病細胞建立成疾病 iPSC，再將其誘導分化成表現疾病特徵細胞模式，因此疾病 iPSC 的建立，將可作為基礎研究或藥物測試平臺。

二、人類疾病誘導型多潛能幹細胞聯盟介紹

有鑑於疾病 iPSC 未來之應用潛力，建立 iPSC 細胞庫已成為國際 iPSC 研究發展之趨勢。今年 NRPB 生技醫藥國家型科技計畫結合眾多專家、多個團隊成立人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟 (NRPB - Human Disease iPS Cell Service Consortium)。提供國內研究人員建立人類 iPSC 之服務、技術諮詢與教育訓練，並將所有人類 iPSC 統一儲存管理，建立台灣地區 iPSC 的細胞庫，提供產業界與學術界申請使用，主要目的以推動細胞醫療、教育與生技產業發展為宗旨，並成為產、官、學合作的溝通橋樑，提升整體台灣醫療科技的發展，成為國內細胞治療與相關研究的後盾。目前參與單位包括中央研究院、台北榮民總醫院、台大醫院、國家衛生研究院與食品工業發展研究所等五大體系，此聯盟也結合了多個機構與核心設施包含食品工業發展研究所，中研院國家基因體醫學研究中心，台灣生物資料庫，以及多家醫學中心。其中，食品工業發展研究所提供原已擁有 ISO 認證的技術及資源，負責 iPSC 鑑定、基因體序列檢測、以及細胞保存。為了更有效的運作，聯盟亦成立了諮詢及指導委員會與獨立的計畫審核及使用委員會，以評定各個申請計畫的優先



圖一、人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟架構



圖二、人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟運作流程。1. Propose project: 由使用者提出研究計畫；2. Approve project: 計畫交由使用者委員會審核通過；3. IRB: 人體試驗委員會審核通過；4. 由醫院端蒐集病患血液或皮膚細胞樣本；5-6: iPSC generation: 病患樣本送至聯盟核心設施進行建立 iPSC；7-8: 建立好之 iPSC 送至食品研究所進行鑑定；9-10: 將鑑定完成之 iPSC 送至中研院生醫所進行定序，藉以排除突變 iPSC；11. 完成鑑定之 iPSC 存放於食品研究所生物資源保存中心，並寄送 iPSC 給委託建立之使用者。

Service charge— iPSC generation (per sample)		
Derivation service modules	Rate for NRPB/MOST grant	Rate for Non-NRPB/MOST grant
iPSC-1: Reprogramming blood cells (PBMC) using Sendai virus method	131,690	236,540
iPSC-3 (ICC, EB formation, gene expression, teratoma formation, karyotyping, mycoplasma examination)	90,000 (3 iPS cell lines)	201,000 (3 iPS cell lines)
C2-14 (Genome wide human SNP 6.0)	26,864 (1 iPS cell line)	36,492 (1 iPS cell line)
Total	248,554	474,032

圖三、人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟服務費用

性並給予聯盟技術指導。聯盟每年也進行實地訪查，以確保每個核心設施都有適當及穩定的技術及環境，能提供高品質的服務。目前在台灣沒有此類的機制，而此服務聯盟的成立將是台灣對於幹細胞研究重要的一步；此聯盟能夠幫助台灣 iPSC 的研究，並提供穩定及高品質的服務。另外，此聯盟亦將致力於教學與訓練，

作為資源聯盟來幫助台灣學者進行幹細胞的研究。這樣的服務聯盟也能夠增加台灣學者研究的國際競爭力，與國際接軌、交流、合作，所以人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟的成立兼具提升國內能量，奠定國際地位的重要性。今年聯盟運作初期的所有經費，包含聯盟成立初期與後續營運所需費用，以及申請者所需

負擔的金額，皆有 NRPB 計畫大力支持。因此我們相信，此服務聯盟的成立將提供給台灣學界很大的機會去開創嶄新且令人興奮的研究題目與領域，對疾病的致病機轉有更深入的了解，以作為台灣在新藥開發、幹細胞治療、以及個人化醫療的研究與發展最堅實的後盾。

iPSC 教育訓練服務能量

生資中心 / 副研究員
溫政浩

人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟所提供的服務，除了接受 iPSC 的建立、保存與提供研究使用外，也積極對外宣導與舉辦各種教育訓練課程，希望藉由各醫療與學術單位間的合作，建立可提供各種疾病誘導型多潛能幹細胞的服務平台。聯盟對於接受本聯盟服務之使用者亦提供相關的訓練課程，旨在幫助受本聯盟服務的使用者更加了解服務內容，與如何正確的使用操作本聯

盟提供之細胞株。

教育訓練方面，目前主要規劃為兩部分：(1) 聯盟操作人員訓練 (2) 使用者之操作訓練。聯盟操作人員訓練部分，在 2015/01/28~01/30 共舉辦三天之教育訓練課程。主要參與人員為聯盟成員，包括中央研究院、台北榮民總醫院、台大醫院、國家衛生研究院與食品工業發展研究所等五單位推派代表參加，此次訓練課程由食品工業發展研究

主辦。此次教育訓練主要重點，在培訓各單位之操作人員如何正確的操作實驗，包括建立疾病的 iPSC、細胞的保存與鑑定與如何提供更高標準之產品為準則。會中也特別邀請了美國 Thermo Fisher Scientific 公司的資深研究員 Dr. Nirupama Shevde 與國內專家學者們，進行為期三天的演講與實地操作，並和與會人員進行經驗上的交流與分享。使用者的教育訓練課程方面，目前預計在 2016 年第一季舉辦，主要訓練各使用者如何正確的操作建立完成的 iPSC 細胞株，並提供完善的諮詢與問題反應服務，為使用者們建立快速且有效率的服務流程為宗旨。



圖一、2015 人類疾病誘導型多潛能幹細胞服務聯盟 iPSC 教育訓練課程

iPSC 之特性鑑定、品質管制與公開提供

生資中心 / 副研究員

徐詩涵

誘導型多潛能幹細胞是利用導入特定基因將一般的成體細胞“重新程式化”回到如同胚胎幹細胞般，具有自我更新和分化成各式各樣細胞的能力。而我們的任務主要是將 iPSC 進行是否具有如同胚胎幹細胞般能力的相關鑑定及進行細胞庫的保存和對外公開提供。鑑定的項目包括細胞的型態、病毒載體是否已剔除、特定的多能性鑑定標誌 (pluripotent markers) 以及 iPSC 在體外的分化能力 (in vitro differentiation)，也就是檢測 iPSC 是否具有可分化成三個胚胎層 (three germ layers) 的能力。同時，最重要的是細胞株的品管，所以，在鑑定 iPSC 前與鑑定完成要入細胞庫保存前，我們都會進行細胞株的污染檢測，不論是微生物污染檢測、細胞株種間污染檢測、細胞株株間污染檢測等。當以上的鑑定與品管都完成後，即可將 iPSC 入細胞庫保存並且對外公開提供研究人員所需之 iPSC，是進行疾病之致病機轉的研究或發展治療方法之良好研究材料，可藉以尋找疾病的原因及預防策略。另外，由於是利用患者本身的細胞所建構出的 iPSC，可獲得具有“個別性”和“專一性”之細胞材料，作為評估藥物劑量或是藥物毒性測試之最佳平台。

一、iPSC 之建立

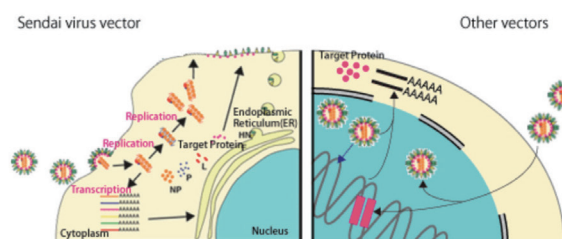
iPSC 的建立，我們是使用 CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai

Reprogramming Kit (圖一) 將四個與幹細胞特性相關的轉錄因子 Oct3/4、Sox2、c-Myc，以及 Klf4 (簡稱 OSKM，也被稱為「山中因子」Yamanaka factors)，利用病毒的方式導入人類的血液細胞後，即可促使血液細胞重新再程序化，形成具有多能性幹細胞的分化能力，如胚胎幹細胞般，能分化成多種細胞，這樣的細胞，稱為「誘導型多能性幹細胞」。不同的導入方式，也會影響 iPSC 形成之效率與使用安全性。CytoTune® 2.0 reprogramming vectors 的使用，不會嵌入宿主的基因體或是改變宿主的遺傳訊息，並且只要透過細胞的培養與繼代即可得到不含病毒載體

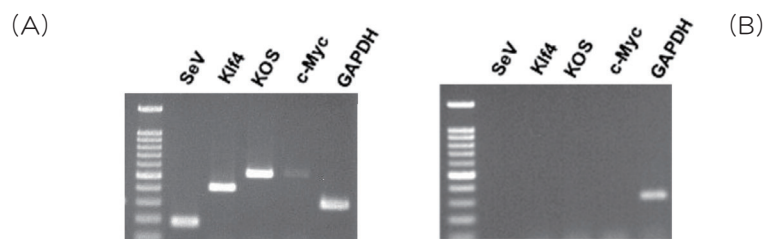
(virus-free) 的 iPSC。接著，我們利用聚合酶連鎖反應 (PCR: Polymerase chain reaction) 檢測導入之病毒載體: SeV, KOS, Klf4, c-Myc 的基因表現，確認建立好的 iPSC 是否已成為 virus-free 狀態 (圖二)，以便後續進行鑑定檢測。

二、iPSC 之型態

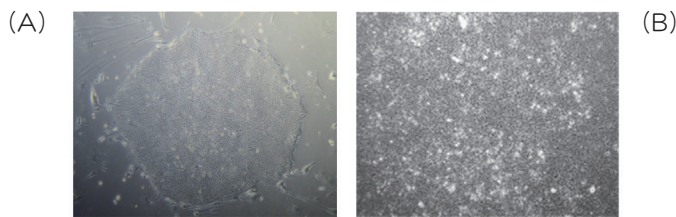
iPSC 在一般常規的培養過程下，細胞之自發性分化 (spontaneous differentiation) 是經常會發生的情況，因此，iPSC 之生長，需要特定及良好的培養環境，使其維持在具有多能性未分化的階段。iPSC 具有獨特之細胞型態，處於未分化階段之 iPSC 會形成緊密的細胞聚落 (compact colonies)，具有極高的核質比 (nuclear to cytoplasm ratio)，也就是有很大的細胞核很少的細胞質 (圖三)。反之，分化之細胞，通常細胞尺寸變大、細胞核較小



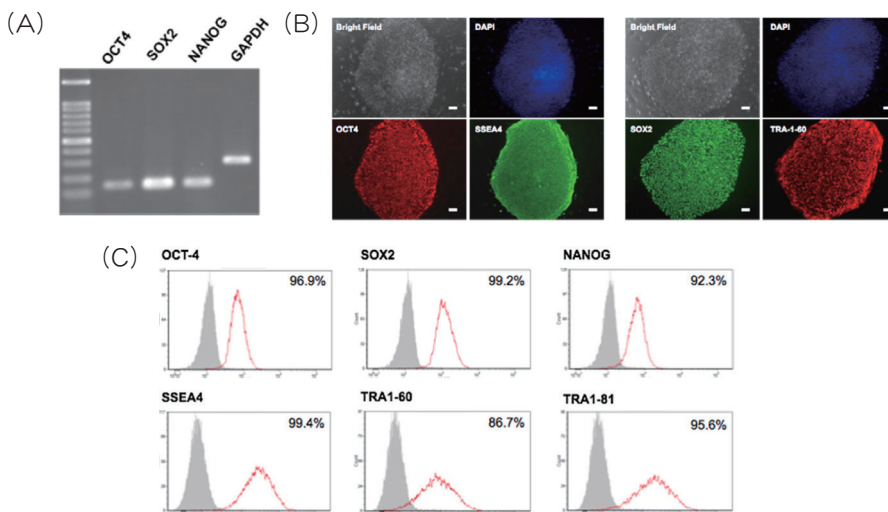
圖一、sendai 病毒載體與其他載體生命週期的比較。sendai 病毒 (左) 與一般常用的病毒載體 (右) 不同，不會進入宿主細胞之細胞核嵌入宿主的基因，影響宿主的遺傳訊息。(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cytotune_ips_2_0_sendai_reprog_kit_man.pdf)



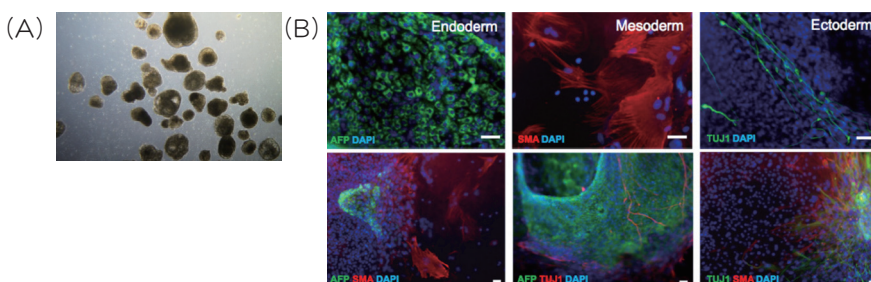
圖二、PCR 檢測 iPSC 內病毒載體的表現量
(A) 將病毒轉染細胞兩天的陽性對照組 (B) 已無病毒載體殘留的 iPSC



圖三、iPSC 之細胞型態。顯微鏡下觀察 iPSC (A) 細胞聚落的形成 (B) 具有高度的核質比



圖四、鑑定未分化 iPSC 的多能性 (A) 利用 PCR 分析 OCT4, SOX2, NANOG 的表現 (B) 細胞免疫螢光染色分析 OCT4, SSEA4, SOX2, TRA1-60 之蛋白質的表現 (C) 流式細胞儀分析 OCT4, SOX2, NANOG, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 鑑定 iPSC 的多能性



圖五、iPSC 在體外具有分化成三胚層的能力 (A) iPSC 懸浮培養形成球狀的胚胎小體 (B) 形成胚胎小體後逐漸分化成三個胚層，內胚層鑑定標誌為 AFP，中胚層鑑定標誌為 SMA，外胚層的鑑定標誌為 TUJ1

細胞質較多，通常會在 iPSC 聚落的週邊或中心之區域形成。因此，在 iPSC 培養的過程中，對於 iPSC 的分化與否，其 iPSC 型態的鑑定是極為重要的。

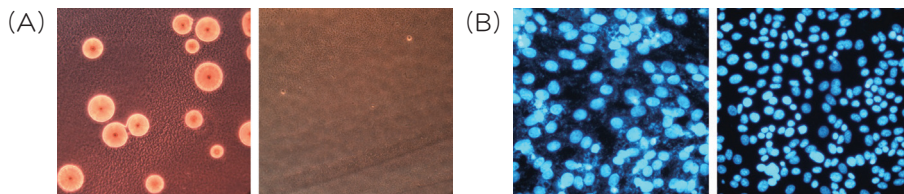
三、iPSC 之多能性 (pluripotency)

在體外培養 iPSC, 最重要的是維持其多能分化特性，亦即維持 iPSC 具有分化成三胚層細胞的能力。iPSC 特定的多能性鑑定標誌 (pluripotent markers)，處於尚未分化之 iPSC 內。因此，這部分是鑑定 iPSC 在培養後，是否維持在未分化的狀態並保有多

能分化特性。有關未分化 iPSC 之鑑定標誌有以下二種：A. iPSC 之細胞膜表面標誌：SSEA4, TRA1-60, TRA1-81；B. iPSC 會表達與多能分化性相關之特定標誌：OCT4, SOX2, NANOG。因此，我們利用聚合酶連鎖反應 (PCR: Polymerase chain reaction) 進行 OCT4, SOX2, NANOG 表現量的檢測分析。同時，也利用細胞免疫螢光染色 (Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit) 進行 OCT4, SSEA4, SOX2, TRA1-60 的偵測，以及利用流式細胞儀 (Flow cytometry) 進行分析多能分化性相關之特定鑑定標誌：OCT4, SOX2, NANOG 以及 iPSC 細胞膜表面會表現的分子標誌：SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 (圖四)。

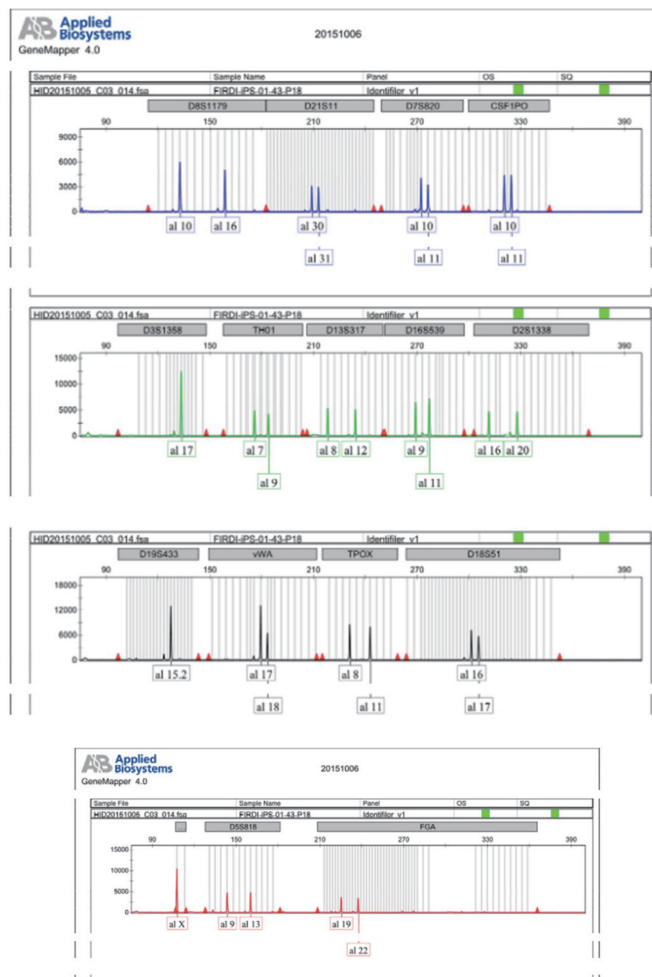
四、細胞株的體外分化 (In vitro differentiation) 能力

iPSC 具有分化成多種細胞的功能。因此，這部分是鑑定 iPSC 是否具有分化成三胚層的能力。將 iPSC 進行懸浮培養 (suspension culture)，在這種狀態下培養的 iPSC 會形成球狀的胚胎小體 (Embryoid Bodies) (圖五 A)，並逐漸分化出三胚層，分別是內胚層 (Endoderm)、中胚層 (Mesoderm) 和外胚層 (Ectoderm)。接著利用細胞免疫螢光染色 (3-Germ Layer Immunocytochemistry kit) 偵測特定的分化標誌 (differentiation markers)。分別為內胚層之代表 - 肝細胞的 alpha-fetoprotein (AFP)；中胚層之代表 - 肌肉細胞的 smooth muscle actin (SMA)；外胚層之代表 - 神經



圖六、iPSC 之黴漿菌污染檢測

黴漿菌污染檢測採用兩種方法 (A) 直接培養法 (B) DNA 螢光染色法，左圖是陽性對照組，右圖是 iPSC 檢測組，檢測結果為陰性。



圖七、iPSC 之 DNA 指紋分析

細胞株株間污染檢測採用 DNA 指紋分析檢驗細胞株是否正確無誤，其檢測結果為細胞株無被感染。



圖八、iPSC 之染色體核型分析

利用染色體核型分析鑑定 iPSC 之染色體。左圖為男性 iPSC，右圖是女性 iPSC，染色體檢測結果皆為正常。

細胞的 beta-III tubulin (TUJ1) 為偵測標誌。在兩兩分化鑑定標誌搭配下，進行三種組合的雙染 (double staining)，分別是內胚層與中胚層，內胚層與外胚層，最後是中胚層和外胚層 (圖五 B)。

五、細胞株污染檢測與細胞遺傳分析 (cytogenetic analysis)

細胞庫的品管流程包括微生物污染檢測、細胞株種間污染檢測、細胞株株間污染檢測等。其中黴漿菌污染檢測是品管的重要工作，我們將 iPSC 在從各單位收集來進行鑑定前以及完成鑑定後入細胞庫保存前，都會進行黴漿菌污染檢測。我們採用了直接培養 (direct culture) 及 DNA 螢光染色法 (Hoechst stain) 兩種方法，確認細胞是否被黴漿菌所污染 (圖六)。細胞株株間污染檢測則採用 DNA 指紋分析 (short tandem repeat DNA fingerprint) 檢驗細胞株是否正確無誤 (圖七)。而細胞遺傳的分析，在 iPSC 的鑑定程序中扮演著重要角色。當細胞具有不正常的遺傳組成時，會影響細胞株使用者對該細胞株應用之考量，因此，在細胞株經長期培養後，適當的染色體分析是必要的。對於細胞遺傳分析我們利用染色體核型分析 (chromosome karyotyping) 進行檢測 iPSC 其染色體是否有產生變異 (圖八)。當一切的鑑定實驗及細胞株品管的相關檢測皆偵測完畢後，該 iPSC 便會入細胞庫進行保存並且對外公開提供，成為各個研究人員進行所需的相關研究之平台與良好的細胞材料。

細胞誤用及細胞交叉汙染介紹

生資中心 / 副研究員
楊筑婷

一、前言

細胞株通常是指分離自特定組織來源，並具有無限增殖複製能力的一群細胞。細胞株的應用範圍極為廣泛，在醫學和疾病的研究上，常被用來作為研究模型，其中又以在癌症方面的相關研究最常被使用到。然而需要注意的是，使用細胞株時，有相當大的可能性會使用到已受汙染的細胞，尤其是在引進國外的細胞株或有些細胞可能已經受到微生物汙染的情況下，若沒有先行了解或經由特定的檢查程序確認，就有可能使用到汙染的細胞。

所謂的細胞交叉汙染 (Crosscontamination)，是指細胞遭受到另一株細胞的汙染，這種交叉汙染的情形是在 1950 年代首次被確認提出，而且令人擔憂的是這樣的問題截至目前為止還是相當的嚴重。主要是由於細胞交叉汙染或是實驗細胞的誤用，不僅將導致實驗結果的錯誤解釋，也會造成大量的研究資源浪費。許多細胞株在建立的早期就已經受到其他細胞的交叉汙染，所以在後續的研究中，受到汙染的細胞只會被認定為另一個細胞名稱而繼續被使用。而什麼樣的情況下可以讓研究者知道使用的細胞是被汙染的？這裡提出兩個方法：首先，就是去確認以前發表的文章，並檢查實驗時是否有交叉汙染的疑慮。雖然有些文獻已經很難追溯了，目前一份已知交叉汙染的細胞株清單，列出了來自 68

篇參考文獻共計 360 株細胞，統計出大多數的汙染出現在同一物種，在人類細胞株中 HeLa 仍是最常發現的 (29%，106/360)，其他物種的汙染在所有的汙染中占較少的比例 (9%，33/360)；其次，若先前沒有任何的報導指出該細胞株有交叉汙染的情形，另用鑑定測試來確認細胞是否有交叉汙染是必要的步驟。

目前許多國際期刊皆已正視到細胞株誤用問題的嚴重性，並開始紛紛要求論文投稿者於論文送審時，須同時提出細胞身分鑑定的證明資料，避免因為使用錯誤的細胞而影響研究成果的正確性。在本篇內容中，將針對目前科學界在細胞交叉汙染和細胞株誤用的發生情形、如何避免細胞誤用一再發生，和細胞株的鑑定分析方法，並參考發表在 International Journal of Cancer 的一篇回顧文獻，做相關的整理與介紹。

二、介紹

1. 細胞作為模型系統

可持續培養的細胞株常作為研究疾病的資源，這些細胞在適當的培養條件下有無限增殖生長的能力，這是一個相當罕見的情形，因為即使在腫瘤組織中，大部分的細胞在經過有限次數的分裂後將不再增殖 (Hanahan *et al.*, 2000)，然而一旦建立成可連續培養的細胞株即具有重複繼代、冷凍保存後可復甦並可觀察細胞類型或組織性質的特性 (Wistuba *et*

al., 1998；Ross *et al.*, 2000)，這些優勢使得細胞株被廣泛使用，可被用來模擬正常細胞的系統或測試多種疾病治療的情形。

細胞株最常被用來作為惡性腫瘤研究的模型，因為腫瘤衍生的細胞株，其基因的變異酷似來源的腫瘤，此外藉由正常細胞建立細胞株，可從中發現到細胞癌化時其基因的變化 (Reddel *et al.*, 2000；Boehm *et al.*, 2004)，正常的細胞因無法克服複製衰老，使得可持續培養的細胞株扮演相當重要的角色；能夠克服衰老的細胞繼續增殖，直到他們的端粒變短，染色體發生融合破損橋週期 (fusion-breakage- bridge cycles)，隨後基因不穩定性導致細胞壞死，偶爾（在細胞長到 1×10^7 的速率下），不朽化的細胞將再次開始分裂，進而變成細胞株，觀察這樣的過程，其進展即相似體內癌症的發展 (Masters *et al.*, 2000；MacLeod *et al.*, 2008)。

儘管使用細胞株有相當多的優勢，但有許多的文獻指出使用細胞株作為模型系統時應注意，細胞在培養的過程中若有引入特定基因，該細胞株之基因會轉化成非整倍體、異倍體的基因型和表型不穩定，細胞間可能有相當大的異質性，這種不穩定性可能導致細胞特性變化，值得注意的是細胞的改變也有可能不完全是基因型不穩定造成，而是有外來細胞汙染而造成細胞特性改變。

2. 細胞株交叉汙染及細胞誤認

引進新的細胞株時，若沒針對細胞進行鑑定分析或背景資料確認，就有很大的可能使用到汙染或錯誤的細胞，雖然微生物汙染的問題也相當嚴重，在此篇文章中將著重在細胞交叉汙染的議題上。有一些可能的原因會造

成細胞交叉污染，往往來自實作上常見的錯誤行為，包括操作者技術差，在操作時產生氣膠傳播或意外接觸不同的細胞、操作時不更換塑膠吸管、不同的細胞株卻共用相同的試劑、使用有絲分裂功能失活的細胞株作為滋養層細胞或使用條件培養基，若沒有經由凍解凍細胞或利用過濾方式小心地除去另一種細胞就會造成污染 (van Pelt *et al.*, 2003)，此外亂貼標籤或庫房管理不當的情況下，細胞常常在這樣的過程中被辨識成另一種細胞，標籤誤植或投稿時印刷錯誤雖然看似簡單的錯誤，但若是造成其他研究者錯誤沿用，多年後這將會造成無法挽回的學術災難。

現在已經有多項研究指出細胞交叉污染的嚴重性，應採取緊急行動，盡量減少交叉污染的發生，十年前德國微生物和細胞保存中心 (DSMZ) 分析測試他們細胞庫中的細胞，而這些細胞株來自各個不同的實驗室，數據指出 252 株細胞株中 18% 的細胞都有交叉污染的情形，驚人的是這些

污染僅來自 6 個實驗室的內部污染，隨後 DSMZ 增加測試細胞株的數量 (圖 1)，指出 598 株白血病淋巴瘤細胞株 (有提供完整遺傳資料的細胞株) 中，187 (31%) 被黴漿菌污染和 38 (6%) 被黴漿菌污染同時伴隨交叉污染。這些數據指出，在實驗室中不好的習慣會造成多種污染物的污染或多種細胞株的污染，如果這些培養物被他人使用，將會造成更廣泛的污染。

其他的研究指出，測試細胞株的人很少，通常沒辦法檢測到被污染的樣品，在 1990 年，康寧生命科學部的 John Ryan 調查研討會的與會者，詢問關於黴漿菌污染的情形，有 50% 從未進行測試，只有 18% 的人表示，他們會定期測試他們的細胞，但受訪者 (23%) 都表示細胞有黴漿菌污染，但如此少的人進行測試，可見真實的污染數字遠遠超過想像。另外，美國加州大學伯克利分校的 Walter Nelson-Rees 於 2004 年發表一篇關於細胞交叉污染的文章，主要是在探討 HeLa

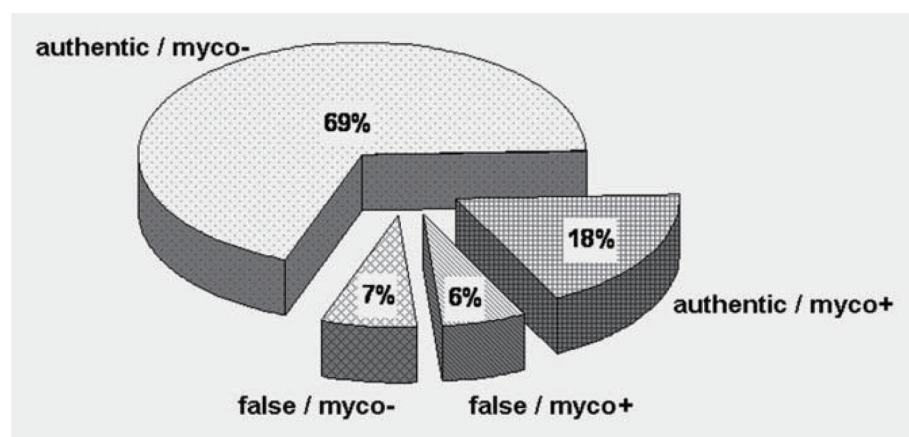
細胞株的污染 (Nelson-Rees *et al.*, 1976)，從 1970 年代即著重在交叉污染的調查，從 483 名受訪者的問卷結果發現，35% 的人不會從認證的細胞保存庫取得細胞，常見的是從另一個實驗室取得，但幾乎一半的受訪者不會確認細胞株是否有交叉污染。

從 Berglind 等人發表的文章中可以看到，細胞交叉污染的實際例子，作者分析了 UMD_p53 的數據庫 (2007 年) 的資料，內容包含 1211 株細胞株上 p53 基因的資訊，其中發現 23% (88/ 384) 的結果比對上有差異，而這資料來自於兩個獨立的實驗室，從結果來看這些樣品可能都受到細胞交叉污染的影響 (Berglind *et al.*, 2008)，作者指出許多研究人員依賴這些錯誤的資訊，導致解釋研究時造成進一步的混淆。

細胞庫通常有專業的知識可以檢測細胞交叉污染，並將已發現交叉污染的細胞株資訊公布在網路上並且開發新的檢測方法，但不幸的是，即使細胞庫提供詳細的資訊，大多數的實驗室並不具有可比對資料的資源，此外許多研究人員都是由鄰近的研究單位或實驗室取得細胞，而不是由從有信譽的細胞庫取得，這使得交叉污染變得普遍並難以檢測。

3. 應對方式

既然已經知道細胞交叉污染的問題如此嚴重，現在應該探討如何改善這個情形，一些癌症相關的期刊，包括國際癌症雜誌已經正視這樣的問題，他們改變允收期刊的標準，尤其研究者使用的細胞若是可以長久培養的細胞，即會要求研究者提出細胞株背景資料的證明，這些要求主要是要掌握研究者的細胞株是否有交叉污染或是誤認的情況，不過



圖一、白血病淋巴瘤細胞株污染率。由德國細胞庫 (DSMZ) 分析 598 株白血病細胞株其交叉污染及黴漿菌污染的數據。“False/authentic” 是指細胞株是否有交叉污染；“myco+/ myco-” 是指細胞株是否有黴漿菌污染。結果如下：authentic/ myco- (n = 411, 69%); authentic/ myco+ (n = 108, 18%); false/ myco- (n = 41, 7%) 及 false/myco+ (n = 38, 6%)。

表 1、細胞株交叉汙染列表

Type of contaminant	Number of cell lines affected
Intraspecies	
Human	324
Nonhuman	0
Interspecies	
Correct name—incorrect cell type (misidentified) ¹	3
Total	360
Contaminating cell line—12 most frequent	
HeLa (human cervical adenocarcinoma)	106
T-24 (human bladder carcinoma)	18
HT-29 (human colon carcinoma)	12
CCRF-CEM (human acute lymphoblastic leukemia)	9
K-562 (human chronic myeloid leukemia)	9
U-937 (human lymphoma)	8
OCI/AML2 (human acute myeloid leukemia)	8
Hcu-10 (human esophageal carcinoma) ²	7
M14 (human melanoma)	7
HL-60 (human acute myeloid leukemia)	6
PC3 (human prostate carcinoma)	6
SW-480, SW620 (human colon carcinoma) ³	6

¹ 其他誤認細胞清單可以參考 Drexler et al。
² 目前對於 Hcu-10 攜帶與 Hcu-18、Hcu-22、Hcu-27、Hcu-33、Hcu-37、Hcu-39 相同的遺傳特徵這點尚不確定。
³ SW480 和 SW620 來自同一個來源因此攜帶相同的遺傳訊息。

表 2、持續追蹤細胞交叉汙染情形的網址清單

Cell bank	Website address
ATCC	http://www.atcc.org/
CellBank Australia	http://www.cellbankaustralia.com/
DSMZ	http://www.dsmz.de/
ECACC	http://www.hpacultures.org.uk/collections/ecacc.jsp
JCRB	http://cellbank.nibio.go.jp/
RIKEN Bioresource Center Cell Bank	http://www.brc.riken.go.jp/lab/cell/english/guide.shtml

每一位有在做細胞操作的研究人員都會有已保存在液氮的細胞、正在培養的細胞或因應新研究而使用的新細胞，在這樣的情況下，身為研究者要如何知道細胞是否面臨交叉汙染的情形呢？針對這個問題有兩個答案：

A. 可以藉由確認以往發表過的文獻來檢查，例如在 PubMed 數據庫搜尋「cross-contamination」來檢視。

B. 檢查實驗室培養的細胞，除非所使用的細胞在取得前都已經鑑定分析過，否則所有的細胞株不論是在冷凍前或是解凍後都應藉由鑑定分析做確認；很多方法都可以鑑定分析細胞，針對人類細胞株，短相連重複序列 (short tandem repeat；STR) 分析法是目前國際上認可的標準方式，其符合經濟效應並且操作簡單，分析出來的結果也可與其他已知的資料進行比對，所以資料來源可來自於世界各地的組織或樣品，有相當大的比對價值 (Masters *et al.*, 2001)。

4. 文獻資料：細胞交叉汙染列表

在 2004 年調查 PubMed 數據庫內的摘要發現，不當使用交叉汙染細胞株的情形越來越多，儘管這個問題已經發現許久卻遲遲無法解決，可能的原因也包含許多研究者無法找到細胞交叉汙染的資訊，因此為了讓研究人員在發表文獻時更加容易，針對細胞交叉汙染藉由搜尋文獻和其他在線資源，將統整的資料列表發布在 Electronic Supporting Information。

為了統整出這個名單，作者參考了 PubMed 數據庫、與此主題相關的參考文獻和 5 個主要細胞庫的網頁：American Type Culture Collection (ATCC)、

DSMZ、European Collection of Cell Cultures (ECACC)、Japanese Collection of Research Bioresource 以及 RIKEN Bioresource Center Cell Bank，維基百科也有列表細胞交叉汙染的清單 (http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_contaminated_cell_lines)。細胞交叉汙染的清單有列出細胞名稱，包含物種及細胞類型，而這些確認汙染的細胞名稱都是可辨識並且在 PubMed 上有其被認定的 ID 可供比對，列表形式則是 Excel 電子表格或 PDF 格式以方便比對。

從這數據庫分析出來的細胞株分成兩種，第一種是細胞交叉汙染發生在相當早期，所以並沒有細胞被保存留下來，而另一種則是發生在相對的晚期，所以有些原始的細胞可能持續存在，可於下網頁看到詳細列表，此資料為文章補充資料 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25242/supinfo>)。目前細胞交叉汙染資訊的版本為 6.4，參考了 68 篇文獻包含 360 株細胞株，雖然細胞株的來

源物種至少有 8 種，但主要受到汙染的還是人類細胞株，而這些人類細胞株來自各種不同的組織，在這列表中細胞及腫瘤的類型都已經是確定的，而原本未知的也已經被細胞庫或是專門的實驗室定義出來，包含細胞的類型或腫瘤的特徵，在某些情況下，藉由定義細胞特性可以發現錯誤點並將其正名，因為有些細胞或腫瘤的特徵一直被錯誤識別，例如 RPMI-6666 細胞株最初被認為來自霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin lymphoma)，但現在已知其是 EBV 陽性的 B- 類淋巴母細胞株。

細胞交叉汙染的共同特點列表於表 1，可以看出大部分交叉汙染的情況事件出現在同一物種中，另外還有少數的細胞是伴隨著第二個物種的汙染 (9%，33/ 360)，同一物種間的汙染大多發生在人類細胞株，不過這其中有一個相當大的因素來自於檢測非人類物種的細胞相對來說是較困難的，最常見的汙染物仍然是 HeLa 細胞 (29%，106/ 360)，然後為 T-24 (5%，18/ 360) 及 HT-29 (3%，12/ 360)。

不斷更新細胞交叉汙染的列表是相當重要的，網路上發布較早的版本是由 ECACC 所提供，目前 6 個細胞庫已經同意將訊息提供在網路上並隨時更新，而這些提供細胞交叉汙染列表的網址詳列在表 2，未來研究者所提供的細胞鑑定資料中，必定包含比對交叉細胞汙染列表的步驟，在 ATCC 的標準開發組織 (The Standard Development Organization)，針對人類細胞株鑑定 STR 的方法，正著手訂定國際可以比對的標準 (ATCC SDO Workgroup ASN-0002)，利用 STR 比對癌細胞株結果相當的準確，唯一的考量為分析比對都需要消耗相當大的資本，尋求有系統、品質良好的數據庫，未來可應用的範圍將更廣。

5. 檢查所培養的細胞：細胞株鑑定

即使參考的文獻指出細胞株沒有汙染的跡象，目前使用的細胞仍然需要進行鑑定分析，我們應該以正面的角度正視細胞鑑定，因為確認細胞株正確，才能進一步保證研究人員的研究內容、資助機構的資源和期刊內容的正確性。

以許多方法可以用來鑑定細胞株的身份，在最初發現 HeLa 細胞汙染時，是以同功酵素法 (isoenzyme) 及染色體分析法 (chromosomal analysis) 加以辨別 (Nelson-Rees *et al.*, 1976；Gartler *et al.*, 1967)，這兩種技術目前都持續有人使用，但也有很多新的分子生物學方法出現，常用的鑑定分析法總結在表 3 中，而在這些方法中做選擇時應該考量那些重點？

實驗室對細胞是否有專業知識將是決定細胞品質的重要因

表 3、細胞株鑑定常見的方法

Name	Description	Purpose	References
Chromosomal analysis/karyotyping	Involves preparation of a metaphase spread with chromosome banding and painting to identify chromosome number and markers	Separates species, plus individual cell lines if detailed analysis performed	Ref. 35
Isoenzyme analysis	Biochemical method separating isoenzymes by electrophoresis; isoenzyme mobility may vary within or across species. Kits available include the Authentikit gel electrophoresis system	Separates species, sometimes individuals	Refs. 36,37
Multilocus DNA fingerprint analysis	Molecular method detecting variation in length within minisatellite DNA containing variable numbers of tandem repeat sequences. Analysis is by Southern blot hybridization using probes 33.6 and 33.15, M13 phage DNA, or oligonucleotide sequence	Separates individual cell lines across multiple species	Refs. 25,38
Short tandem repeat (STR) profiling	Molecular method detecting variation in length within microsatellite DNA containing variable numbers of short tandem repeat sequences. Analysis is by PCR with comparison to set size standards; usually available in a kit format allowing amplification of up to 16 loci	Separates individual cell lines within a single species	Refs. 26,39
Polymerase chain reaction (PCR) fragment analysis	Molecular method involving amplification of specific genes or gene families, aiming to detect variations in exon/intron sequence, transcript splicing, or the presence of pseudogenes. Genes examined include the <i>aldolase</i> gene family and the <i>beta-globin</i> gene	Separates species only	Refs. 40,41
Sequencing of "DNA barcode" regions	Involves sequencing of a DNA fragment from the mitochondrial gene cytochrome <i>c</i> oxidase subunit I, with comparison to sequence obtained from online databases. This "DNA barcode" has been shown in practice to distinguish a broad range of animal species	Separates species only	Refs. 27,42

素。實驗室若有細胞遺傳相關的經驗就有能力去分析細胞，例如利用染色體核型分析法來確認細胞物種，或藉由細胞上是否顯現特定的標記來確認 (MacLeod *et al.*, 2007)，雖然這樣的分析方式都有點古老，但它仍然能夠清楚的識別細胞株，很多細胞庫有提供細胞株核型分析的資料並指出細胞分析結果的特徵，讓實驗室在分析完細胞後進行比對，其中應該要注意的是，許多腫瘤衍生的細胞株，其染色體的分析結果

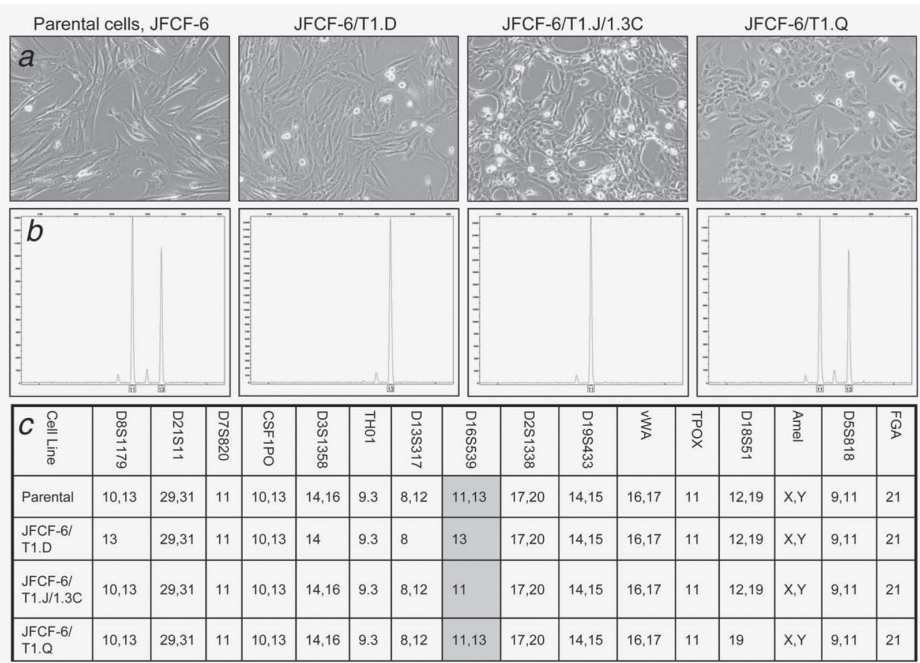
通常都很難判斷，操作者的經驗是成功的重要因素。

實驗室所擁有的細胞為何物種也相當重要。雖然部分鑑定方法可以分辨一種以上的物種，但 STR 這種分子技術的方法就只能分辨單一物種，其他物種的 DNA 無法被放大，若單單只是研究人類細胞株的實驗室，這樣的分析方式並不會遭遇到任何問題，但實驗室若有研究啮齒動物的細胞株，則必須再找尋更適合的方式來鑑定，在這樣的情況下，多位

點 DNA 指紋圖譜分析法即有明顯的優勢，因為其探針能夠雜交到其他的物種，但可惜的是，雖然在一間實驗室中這樣的分析方法很可行，但也具有挑戰性，得到分析結果必須做相當多的實驗組再比對 DNA 指紋圖譜，這樣的狀態下實驗室間數據交流或由細胞庫在網路上發布此類指紋分析結果都是困難的，所以利用一開始得到的組織或血液樣品取得 DNA，或是在相同的實驗中將待測樣品與已知樣品做比對都是比較明智的方法。

STR 分析法最大的好處在於，準確地分析出特定細胞株的特徵，並針對每一株細胞產生一個數字代碼，而這樣的代碼在網路上公告後可以讓每一位研究者分析並交流資訊，因為這些好處及便利性，使得 STR 分析法被國際認可為人類細胞株分析的參考標準，並在法律上被同意做為人類身分鑑定的標準方法，STR 分析的基礎在於判斷所有族群的基因中，部分特定區域基因重複的數量差異，藉由分析每一個重複的區域 (通常為四或五核苷酸重複序列，非編碼序列) 其重複數，藉由帶有螢光標記的引子 (Primer) 以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 放大，再利用電泳膠分析，確定每個等位基因的精確長度，進一步即可將結果與標準進行比對，這個分析的軟體給予每個基因座上的等位基因一個特定的編號 (圖 2)，聯邦調查局實驗室的 DNA 索引系統 FBI Laboratory's Combined DNA Index System(CODIS) 結合 13 個位點來分析，確認這樣的組合可以提供足夠的數據來唯一識別特定的人。

現在已經有許多實驗室 (例如參考文獻 Lorenzi *et al.*, 2009)



圖二、STR 的分析說明範例。JFCF-6 纖維細胞株及其 3 株衍生細胞株 JFCF-6/ T1.D、JFCF-6/T1.J/1.3C、JFCF-6/T1.Q 的 STR 分析結果，衍生的細胞株是由澳洲細胞庫所擁有，經由 SV40 病毒轉染建立後增殖保存及品管確認，每株細胞的 DNA 是藉由 AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Mulgrave, Australia) 放大表現，其中包括 16 個 STR 基因座的引子，放大的訊息是藉由 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 分析並比對 GeneMapper ID 軟體 (Applied Biosystems) 以得到結果。(a) 照片拍攝於細胞培養時，並可以將衍生細胞株與原始株做比對 (比例尺 =100 μm)，可以發現每一株衍生細胞株形態上具有顯著不同，藉由此特徵可確認出衍生細胞株與原始細胞株的不同。(b) 顯示每株細胞在 D16S539 基因座上 STR 波峰的表現。衍生細胞株波峰與原始細胞株不同，是由於建立 JFCF-6-3 衍生細胞時此位點的遺傳漂變 (genetic drift)。(c) JFCF-6 和其衍生細胞株的 STR 結果。在 b 所顯示的波峰來自 D16S539 基因座，在此圖以灰色表示；而比對發現衍生細胞株與原始細胞株的結果相當接近，其中的差異應該來自於遺傳漂變。

及數個細胞庫，將各株細胞 STR 的資料公佈在網路上，不過使用這個方法比對時有一些事項需要注意，首先在比對腫瘤細胞的樣品時，因為腫瘤樣品可能會因為失去遺傳雜和性 (heterozygosity) 和微衛星標記 (microsatellite) 不穩定使得比對的結果不一致，法醫鑑定上使用的正常組織檢體則較不會遇到這樣的問題，這樣無法比對的情形更常發生在腫瘤來源的細胞株，經由長時間的繼代培養後造成遺傳漂變 (genetic drift) 的情形發生，在網路上的數據庫比對資料時，研究者應尋找相近的結果，而不是要求完全相同，大多數的情況下，當比對結果有 80% 的相似性時，是可以被參考的；其次，研究者應注意成本問題，在實驗室內部建立 STR 分析技術須購買 STR 分析套組、DNA 萃取套組、精準定量的儀器、片段分析的機器和軟體，擁有以上的設備及材料才有辦法進行分析。

STR 分析僅適用於區分單一品種的細胞株，因此非人類細胞株的鑑定系統還需要開發，也由於嚙齒動物近親繁殖的情形相當平凡，使得實驗室中嚙齒動物的樣品目前無法準確識別，若是想要分辨大鼠或小鼠的細胞，可以著重在分辨品種的差異好過於分析單一細胞株的基因訊息，

尤其是實驗室若具有單核苷酸多態性 (SNP, single nucleotide polymorphism) 或單一序列長度多態性 (SSLP, single sequence length polymorphism) 分析的專業知識即可用於品種鑑定 (Witmer *et al.*, 2003; Petkov *et al.*, 2004)。SNP 分析法可以用來識別單個樣品，目前已經有應用到細胞鑑定，也是大家看好可以鑑別人類和非人類樣品的技術，實驗室正著手研究針對細胞表現的特定標記來鑑別細胞，目前就有一間實驗室發表了一項技術來鑑別融合瘤細胞，此技術主要藉由分析輕鏈上可變區的序列來鑑別 (Koren *et al.*, 2008)。

最近出現一種簡單的方法可以做為檢測異種污染的輔助，這方法由 Folmer 等人發現，使用特定的引子放大粒線體中細胞色素 C 氧化酶亞基 I (COI) 基因裡的特定 648 鹼基對 (bp) 片段，即可得到 DNA 條碼 (Folmer *et al.*, 1994)，在這個片段上序列的差異可有效地分辨幾乎所有的動物門類，雖然目前仍在辯論使否利用 DNA 條碼足以作為生物分類的關鍵技術，但跟以往從數據庫比對參考資料的方式來看，該技術可以輕易的識別一個未知物種的樣品 (Dawnay *et al.*, 2007)，DNA 條碼已經在測試是否能鑑定細胞株的物種，使用這個方法將減少異

種細胞株污染的發生率，目前約每十件交叉污染中會有一件是異種細胞污染的情形。

無論使用的認證方法為何，資料應該清楚地記錄在研究者的實驗記錄本上，可以的話，實驗室液氮桶的記錄與冷凍小管上的資料應是可連結並可追溯，這樣在品管上比較嚴謹，並且研究人員分配完實驗後，須注意使用細胞株的資訊應包含完整的細胞名稱 (原始名稱)、細胞來源、操作的流程及其相關鑑定的資料及細節以確保實驗細胞株的正確性。

三、結論

細胞株污染是一個嚴重問題，在我們利用細胞株作為研究的模型時，會誤導我們對於疾病的認知，尤其是在癌症的研究上；在實際使用細胞株前應詳細地確認細胞，藉由尋找以前的參考文獻或直接鑑定目前所擁有的樣品，可以大大降低風險，也可避免自己承擔污染的後果。

四、參考文獻

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI, *Int J Cancer*. 127, 1-8 (2010).

生物資源保存及研究簡訊 第104期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啟成所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、吳柏宏、許璦文、黃學聰

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路 331 號

電話：(03)5223191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：國大打字行

電話：(03)5264220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

中華郵政新竹誌字第0030號

交寄登記證登記為雜誌交寄

