

研究报告

## 猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*)诱导 NCI-H446 等 小细胞肺癌细胞在 *FIGNL1* 沉默时出现 S 期阻滞

厉建蕾 施嘉骏 李泉 张泽忠 白林泉 马伟\* 邓子新

(微生物代谢国家重点实验室 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

**摘要:**【目的】研究支原体对体外培养细胞基因功能的影响。【方法】利用 siRNA 抑制 DNA 双链损伤修复关键基因——*FIGNL1* 在无支原体感染、感染猪鼻支原体及清除支原体污染后的人小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 与 NCI-H1688 中的表达后,采用定量 PCR、流式细胞术等方法检测支原体感染对宿主细胞目标基因表达、细胞周期等影响。【结果】虽然猪鼻支原体感染对 siRNA 沉默 *FIGNL1* 表达无显著影响,无支原体感染及清除支原体污染的 H1688 和 H446 细胞 *FIGNL1* 表达沉默后,与仅加转染试剂的空白组(mock)相比较,靶标 *FIGNL1* 基因的实验组(T1)和阴性对照组(nc)的 S 期细胞比例均未发生显著变化。但猪鼻支原体感染的 H1688 和 H446 细胞相对于空白组,实验组与阴性对照组的 S 期细胞比例, H1688 细胞提高了约 1.38 倍和 0.51 倍, H446 细胞提高了约 1.27 倍和 0.55 倍。【结论】推测由于支原体会对宿主细胞 DNA 造成损伤,而 *FIGNL1* 是 DNA 双链断裂损伤修复的重要基因,从而导致沉默猪鼻支原体感染的 H1688 和 H446 细胞 *FIGNL1* 表达时,细胞会出现 S 期阻滞。鉴于支原体感染对细胞有广泛、显著的影响,在基因功能、肿瘤等细胞生物学研究中,应予以高度重视。

**关键词:** 猪鼻支原体, S 期阻滞, siRNA, *FIGNL1*

## *Mycoplasma hyorhinis* induces S phase arrest when suppressing expression of *FIGNL1* in NCI-H446 and NCI-H1688 human small cell lung cancer cells

LI Jian-Lei SHI Jia-Jun LI Quan ZHANG Ze-Zhong BAI Lin-Quan  
MA Wei\* DENG Zi-Xin

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University,  
Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objective] Effect of *Mycoplasma* on gene function was studied *in vitro*. [Methods] *FIGNL1*, a critical gene to repair DNA double-strand breaks, was suppressed by siRNA in H446 and H1688 cells infected with or without *Mycoplasma hyorhinis* or after *Mycoplasma* removal.

**Foundation item:** National Transgene Program (No. 2012ZX08011-002-004)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-34206722; E-mail: wma@sjtu.edu.cn

Received: January 28, 2016; Accepted: May 25, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 国家转基因专项项目(No. 2012ZX08011-002-004)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206722; E-mail: wma@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-01-28; 接受日期: 2016-05-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

Expression of targeted gene and cell cycle analysis was measured using real-time PCR, flow cytometry and other methods. **[Results]** No significant effect of *M. hyorhinis* was observed on the suppression of *FIGNL1* expression by siRNA. After expression of *FIGNL1* was suppressed in H1688 and H446 cells without Mycoplasma infection or after Mycoplasma removal, no significant change of cells proportion in S phase was observed between experimental group targeting *FIGNL1* (T1) and negative control group compared with the blank group containing transfection reagent (mock). However, cell proportion in S phase of experimental and negative control group was increased approximately 1.38 and 0.51 folds, respectively comparing with blank group in H1688 cells infected with *M. hyorhinis*, 1.27 and 0.55 folds respectively in H446 cells infected with *M. hyorhinis*. **[Conclusion]** When the expression of *FIGNL1* was suppressed in H1688 and H446 cells, *M. hyorhinis* can significantly induce S phase arrest because Mycoplasma can cause host cells DNA damage and *FIGNL1* is a critical gene to repair DNA double-strand breaks. Mycoplasma is widespread and significantly influential on cells, we should be highly alert to it on function study of gene and tumor research.

**Keywords:** *Mycoplasma hyorhinis*, S phase arrest, siRNA, *FIGNL1*

细胞培养中主要的微生物污染有支原体、细菌、真菌、酵母以及病毒等。污染可由培养基、血清、空气污染以及操作者本身无菌操作不规范等途径导致<sup>[1]</sup>。细菌、真菌等污染较容易被发现,由于支原体是直径仅为 0.3  $\mu\text{m}$ –0.8  $\mu\text{m}$  最小的原核微生物,其污染一般不会造成培养基浑浊、细胞生长明显异常而易被忽视<sup>[2]</sup>。美国食品药品监督管理局对 20 000 株细胞进行筛查发现,超过 15% 的细胞株(系)有支原体污染<sup>[3]</sup>。猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*)、口腔支原体(*M. orale*)、发酵支原体(*M. fermentans*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、人型支原体(*M. hominis*)以及莱氏无胆甾原体(*Acholeplasma laidlawii*)是最常见的支原体污染种类,约占支原体污染总数的 90%–95%<sup>[4-5]</sup>。

不同支原体以及相同支原体对不同细胞株所造成的影响各不相同,目前发现支原体污染对细胞影响非常广泛,包括:细胞生长速度<sup>[6]</sup>、染色体畸变<sup>[3,7]</sup>、核酸和氨基酸的合成与代谢<sup>[8-10]</sup>、膜结构改变<sup>[11]</sup>、细胞凋亡<sup>[12]</sup>等。支原体污染还可诱导细胞恶性转化<sup>[13-14]</sup>。THP-1 被 *M. fermentans* incognitus 感染后,可显著影响 THP-1 细胞的分化<sup>[15]</sup>。

Zhang 等<sup>[13]</sup>发现支原体在诱导宿主细胞 C3H 细胞恶性转化的过程中,对调控细胞周期、细胞凋亡和 DNA 修复在内的基因表达有显著影响;而 *M. fermentans* incognitus 感染,可导致 THP-1 单核

细胞的 G0 期阻滞现象<sup>[15]</sup>,但分子机制不明。既然研究报道支原体可造成细胞 DNA 损伤甚至染色体异常<sup>[3,5,7]</sup>,那么支原体感染是否会对 DNA 修复相关基因的沉默等实验产生干扰作用? *FIGNL1* 是修复 DNA 双链损伤的同源重组途径中的重要功能基因<sup>[16]</sup>,本研究计划在沉默 *FIGNL1* 表达时,检测小鼠肺癌细胞株 H446 和 H1688 的细胞周期等,以明确支原体感染对该类基因沉默实验的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及培养条件

无支原体感染的 NCI-H446 和 NCI-H1688 购买自中国科学院细胞库,支原体感染的 NCI-H446 和 NCI-H1688 为本实验室保存,细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养。

### 1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清,美国 Gibco 公司;RPMI 1640 培养基,美国 HyClone 公司;细胞周期检测试剂盒,江苏凯基生物技术股份有限公司;总 RNA 提取试剂盒、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒、SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;GMyc-PCR 支原体检测试剂盒、GMyc-1 支原体去除试剂盒,上海翊圣生物科技有限公司。

荧光定量 PCR 仪(型号为 Realplex<sup>4</sup>), 德国 Eppendorf 公司; 流式细胞仪(型号为 FACS Aria II), 美国 BD 公司。

### 1.3 siRNA 转染

靶向 *FIGNL1* 的 siRNA 序列由上海吉玛公司设计、合成, 靶向 *FIGNL1* 的 siRNA 序列与阴性对照 siRNA 序列见表 1。H446 和 H1688 细胞起始密度为  $2 \times 10^5$  个细胞/孔, 培养约 24 h 后, 采用 Lipofectamine 2000 (6.25  $\mu$ L)按说明书操作方法将各种 siRNA (125 pmol)分别转染 H446 和 H1688 细胞, 6 h 后更换完全培养基。

### 1.4 目标基因表达检测

定量 PCR 引物使用 Primer 3 (biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\_www.cgi)设计, 由上海捷瑞公司合成, 引物具体序列见表 2; H446 和 H1688 细胞转染 24 h 后, 分别进行总 RNA 提取、反转录。目标基因表达检测采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法, 相对于看家基因 *GAPDH* 进行相对定量。

定量 PCR 体系为: 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10  $\mu$ L, 引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.6  $\mu$ L, cDNA 模板 0.25  $\mu$ L, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 8.55  $\mu$ L。定量 PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环; 最后进行融链曲线分析。定量 PCR 实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算目的基因相对表达量。

### 1.5 支原体检测

采用套式 PCR 法进行支原体检测, 引物根据支原体 16S-23S rRNA 保守区段设计。第一轮 PCR 反应体系为: GMyc-1st PCR Mix 25  $\mu$ L, 细胞培养

液或阳性对照模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 24  $\mu$ L。阴性对照不加模板。第一轮 PCR 条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。第二轮 PCR 反应体系: GMyc-2st PCR Mix 25  $\mu$ L, 稀释 1 000 倍的第一轮 PCR 反应产物 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 24  $\mu$ L。第二轮 PCR 条件同第一轮 PCR 条件。取第二轮 PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物克隆后, 在上海桑尼公司进行序列测定。

### 1.6 支原体清除

对受支原体感染的细胞, 每 10 mL 培养基中加入 100  $\mu$ L GMyc-1 溶液(截短侧耳素类抗生素)培养 4 d, 然后换液, 每 10 mL 培养基中加入 100  $\mu$ L GMyc-2 溶液(四环素类抗生素)继续培养 4 d。重复以上处理 3 个循环。经支原体检测确认支原体去除后, 正常培养基培养 2 周后再开展后续实验。

### 1.7 细胞周期分析

H446 和 H1688 细胞经 siRNA 转染 72 h 后, 收集细胞, 75%的乙醇于 4  $^{\circ}$ C 过夜固定, 1200 r/min 离心 10 min 去除乙醇, PBS 清洗细胞, 用 0.1 g/L RNase A 于 37  $^{\circ}$ C 孵育细胞 30 min。用 40 mg/L PI 于 4  $^{\circ}$ C 对细胞避光染色 30 min。采用流式细胞仪进行细胞周期检测, 采用 Modfit 软件分析检测结果。

### 1.8 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件系统进行统计分析, 实验结果采用均数 $\pm$ 标准差表示; 采用 *t* 检验进行两组间变量分析; 采用 One-way ANOVA 进行多组间变量分析; *P*<0.05 时, 差异具有统计学意义。

表 1 以 *FIGNL1* 为靶标的 siRNA 序列  
Table 1 Sequence of siRNA targeting *FIGNL1*

siRNA	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
siRNA-T1	GGAUCAAGUUCGACCCAUATT	UAUGGGUCGAACUUGAUCCTT
siRNA-nc	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

表 2 定量 PCR 引物序列  
Table 2 Primer for realtime PCR

基因		序列
Gene		Sequence (5'→3')
GAPDH	Forward	TCCTGCACCACCAACTGCTT
	Reverse	GGGGCCATCCACAGTCTTCT
FIGNL1	Forward	CTCAGCGTGCATCAGGGTCT
	Reverse	CTGCTCTCCCCATCTTGCT

2 结果与分析

2.1 H446 和 H1688 支原体感染验证

H446 和 H1688 细胞进行支原体 PCR 检测结果显示，支原体感染的 H446 和 H1688 细胞株及阳性对照均扩增出 211 bp 特异性条带，而阴性对照未扩增出条带(图 1)。扩增片段克隆测序结果经 BLAST 数据库分析，确定均为猪鼻支原体(*M. hyorhinis*) (Score :100% ,*E* :1e-101)。而无支原体感染的 H446 与 H1688 细胞株经验证无污染。

对确认有猪鼻支原体感染的 H446 与 H1688 细

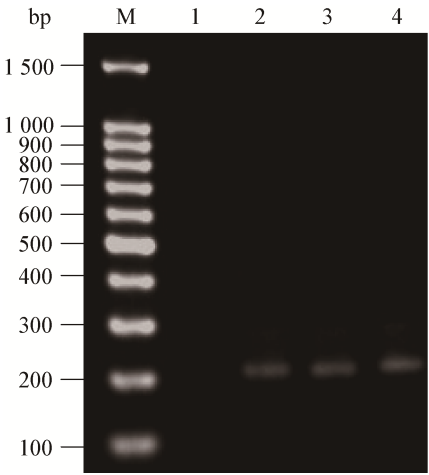


图 1 套式 PCR 法对 H446 和 H1688 细胞进行支原体检测

Figure 1 Mycoplasma inspection of H446 and H1688 by nested PCR

注：M：100 bp ladder marker；1：阴性对照；2：阳性对照；3：感染猪鼻支原体的 H446 细胞；4：感染猪鼻支原体的 H1688 细胞。

Note: M: 100 bp ladder marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: H446 infected with *M. hyorhinis*; 4: H1688 infected with *M. hyorhinis*.

胞株，经支原体去除处理后，再进行支原体检测，确认支原体均以去除(图 2)。

2.2 siRNA 沉默 FIGNL1 表达

无支原体感染、有支原体感染及清除支原体污染的 H446 和 H1688 细胞 siRNA 转染 24 h 后，分别提取 RNA，反转录后利用实时荧光定量 PCR 分别检测目标基因 *FIGNL1* 的表达。

对于感染猪鼻支原体的 H446 和 H1688 细胞，相对于空白组与阴性对照组，实验组的 *FIGNL1* 基因表达在 H446 和 H1688 细胞中分别下调了约 79%和 80% ( $P<0.001$ ) (图 3A 和 3B)。已清除支原体污染的 H446 和 H1688 细胞，*FIGNL1* 基因表达也分别下调了约 84%和 87% ( $P<0.001$ ) (图 3C 和 3D)。无支原体感染的 H446 和 H1688 细胞，*FIGNL1* 基因表达分别下调了约 83%和 88% ( $P<0.001$ ) (图 3E 和 3F)。

以上结果表明，猪鼻支原体感染对 siRNA-T1 片段沉默 *FIGNL1* 基因在 H1688、H446 细胞中的表达无明显差异。

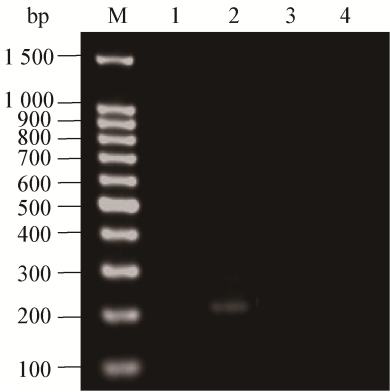


图 2 套式 PCR 法对经过支原体清除的 H446 和 H1688 细胞进行支原体检测

Figure 2 Mycoplasma inspection of H446 and H1688 after Mycoplasma removal by nested PCR

注：M：100 bp ladder marker；1：阴性对照；2：阳性对照；3：清除支原体污染的 H446 细胞；4：清除支原体污染的 H1688 细胞。

Note: M: 100 bp ladder marker; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: H446 after Mycoplasma removal; 4: H1688 after Mycoplasma removal.

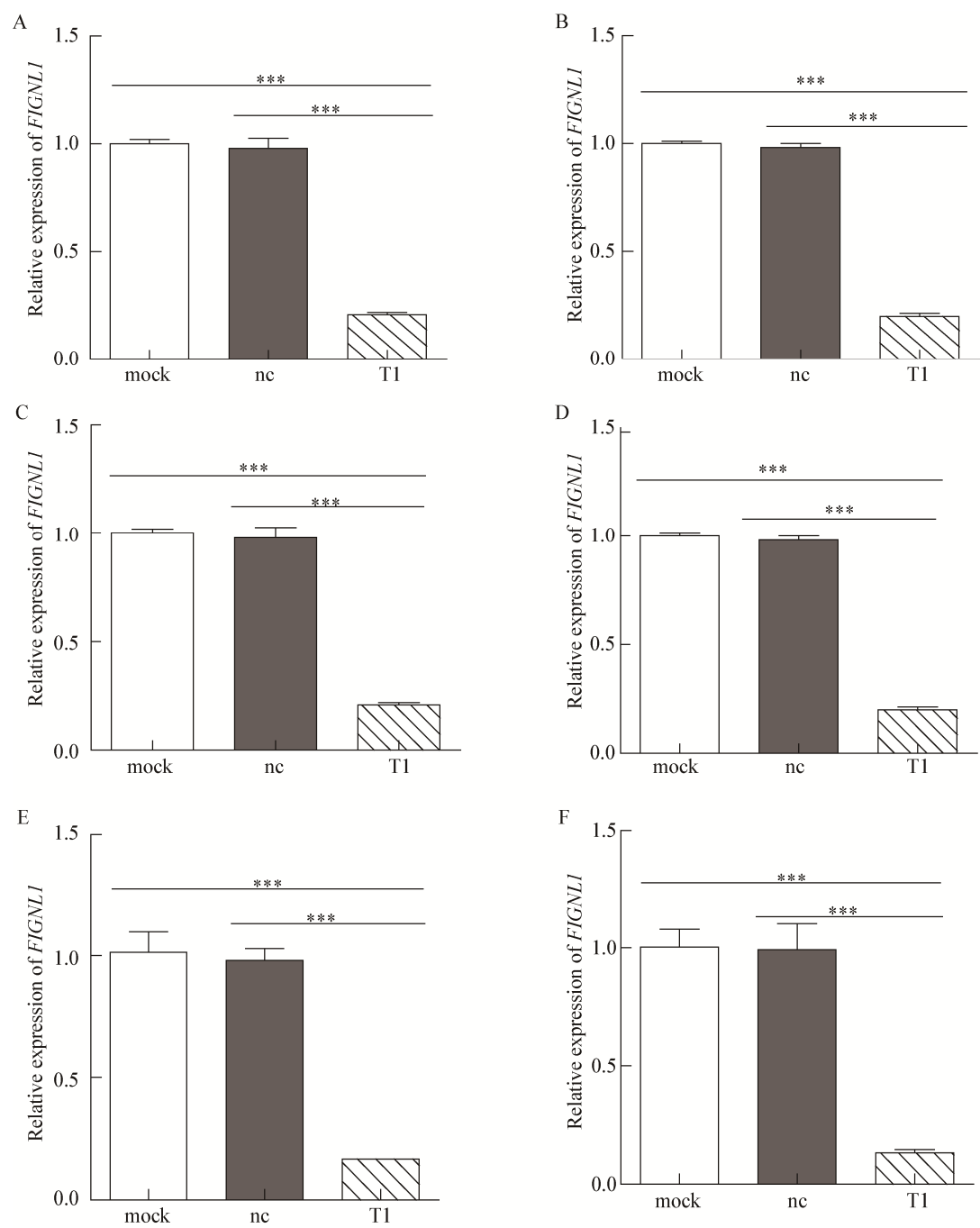


图 3 在 H446 和 H1688 中 siRNA 沉默 *FIGNL1* 基因表达

Figure 3 siRNA silencing *FIGNL1* in H446 and H1688

注：A：感染猪鼻支原体的 H446 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平；B：感染猪鼻支原体的 H1688 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平；C：清除支原体污染的 H446 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平；D：清除支原体污染的 H1688 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平；E：无支原体感染的 H446 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平；F：无支原体感染的 H1688 细胞中 *FIGNL1* 相对表达水平。

Note: A: *FIGNL1* relative expression level in H446 infected with *M. hyorhinis*; B: *FIGNL1* relative expression level in H1688 infected with *M. hyorhinis*; C: *FIGNL1* relative expression level in H446 after Mycoplasma removal; D: *FIGNL1* relative expression level in H1688 after Mycoplasma removal; E: *FIGNL1* relative expression level in H446 without Mycoplasma infection; F: *FIGNL1* relative expression level in H1688 without Mycoplasma infection.

### 2.3 猪鼻支原体感染对 H446 和 H1688 细胞周期的影响

如图 4A 和 4B 所示, 流式细胞术检测发现, *FIGNL1* 沉默后, 对于感染猪鼻支原体的 H1688 细胞, 实验组 G1/G0 期细胞比例为  $46.54\% \pm 1.94\%$ , S 期细胞比例为  $47.05\% \pm 1.33\%$ ; 而空白组的 G1/G0 期和 S 期细胞比例分别为  $75.54\% \pm 1.94\%$  和  $19.75\% \pm 0.82\%$ , 且两组的 G1/G0 与 S 期细胞比例

差异均具有统计学意义( $P < 0.001$ )。即实验组 G1/G0 期细胞比例比空白组低 29.00%, S 期高 27.30%。同时, 阴性对照组的 G1/G0 期细胞比例为  $64.78\% \pm 1.45\%$ , S 期细胞比例  $29.85\% \pm 1.85\%$ , 与空白组差异也有统计学意义( $P < 0.01$ )。

但是清除支原体污染后, H1688 细胞阴性对照组 S 期细胞比例为  $14.45\% \pm 0.73\%$ , 实验组 S 期细胞比例为  $15.84\% \pm 0.28\%$ , 与空白组的 S 期细胞比

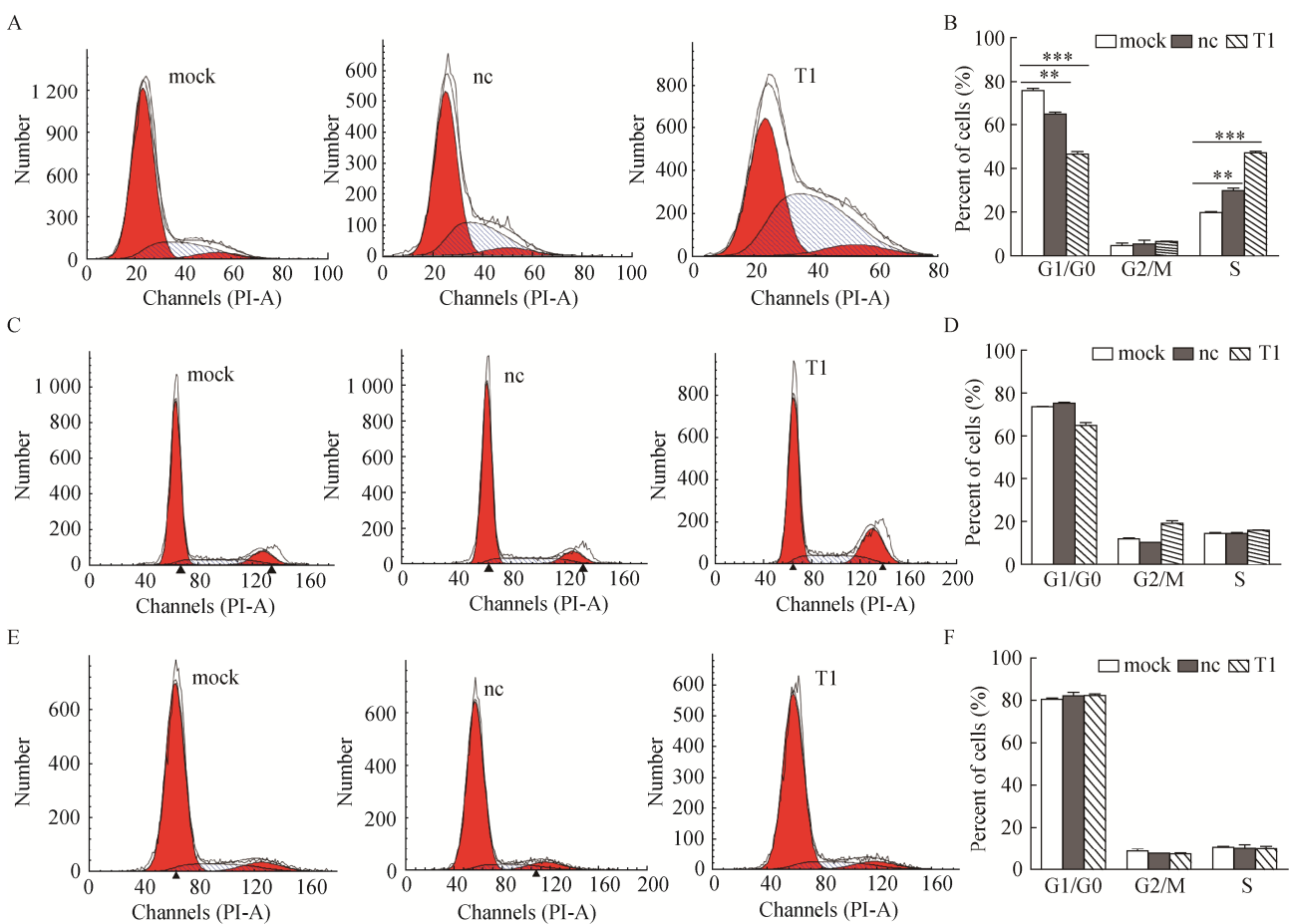


图 4 siRNA 沉默 *FIGNL1* 后无(有)支原体感染的 H1688 细胞周期分布

Figure 4 Cell cycle distribution of H1688 infected with or not with *M. hyorhinis* after *FIGNL1* silencing

注: A: 感染猪鼻支原体的 H1688 流式检测结果; B: 感染猪鼻支原体的 H1688 经 3 次独立试验后的细胞周期分布; C: 清除支原体污染的 H1688 流式检测结果; D: 清除支原体污染的 H1688 经 3 次独立试验后的细胞周期分布; E: 无支原体感染的 H1688 流式检测结果; F: 无支原体感染的 H1688 经 3 次独立试验后的细胞周期分布。

Note: A: FACS result of H1688 infected with *M. hyorhinis*; B: Cell cycle distribution of H1688 infected with *M. hyorhinis* calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments; C: FACS result of H1688 after Mycoplasma removal; D: Cell cycle distribution of H1688 after Mycoplasma removal calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments; E: FACS result of H1688 without Mycoplasma infection; F: Cell cycle distribution of H1688 without Mycoplasma infection calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments.

例  $14.46\% \pm 0.56\%$  比较, 均未发现细胞 S 期分布有明显的改变( $P > 0.05$ ) (图 4C 和 4D)。对于无支原体感染的 H1688 细胞, 阴性对照组 S 期细胞比例为  $10.27\% \pm 2.28\%$ , 实验组 S 期细胞比例为  $10.24\% \pm 1.36\%$ , 与空白组的 S 期细胞比例  $10.68\% \pm 0.78\%$  比较, 也均未发现细胞周期分布有明显的改变( $P > 0.05$ ) (图 4E 和 4F)。

如图 5A 和 5B 所示, 对感染猪鼻支原体的

H446 细胞采用 siRNA 沉默 *FIGNL1* 时, 呈现与感染猪鼻支原体的 H1688 相似的情况, 实验组 G1/G0 期细胞比例为  $47.51\% \pm 4.13\%$ , S 期细胞比例为  $49.94\% \pm 5.73\%$ ; 空白组的 G1/G0 期和 S 期细胞比例分别为  $75.05\% \pm 0.96\%$  和  $21.97\% \pm 1.45\%$ , 两组之间 G1/G0 期与 S 期细胞比例差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。即实验组 G1/G0 期细胞比例比空白组低 27.54%, S 期细胞比例比空白组高 27.97%。但是

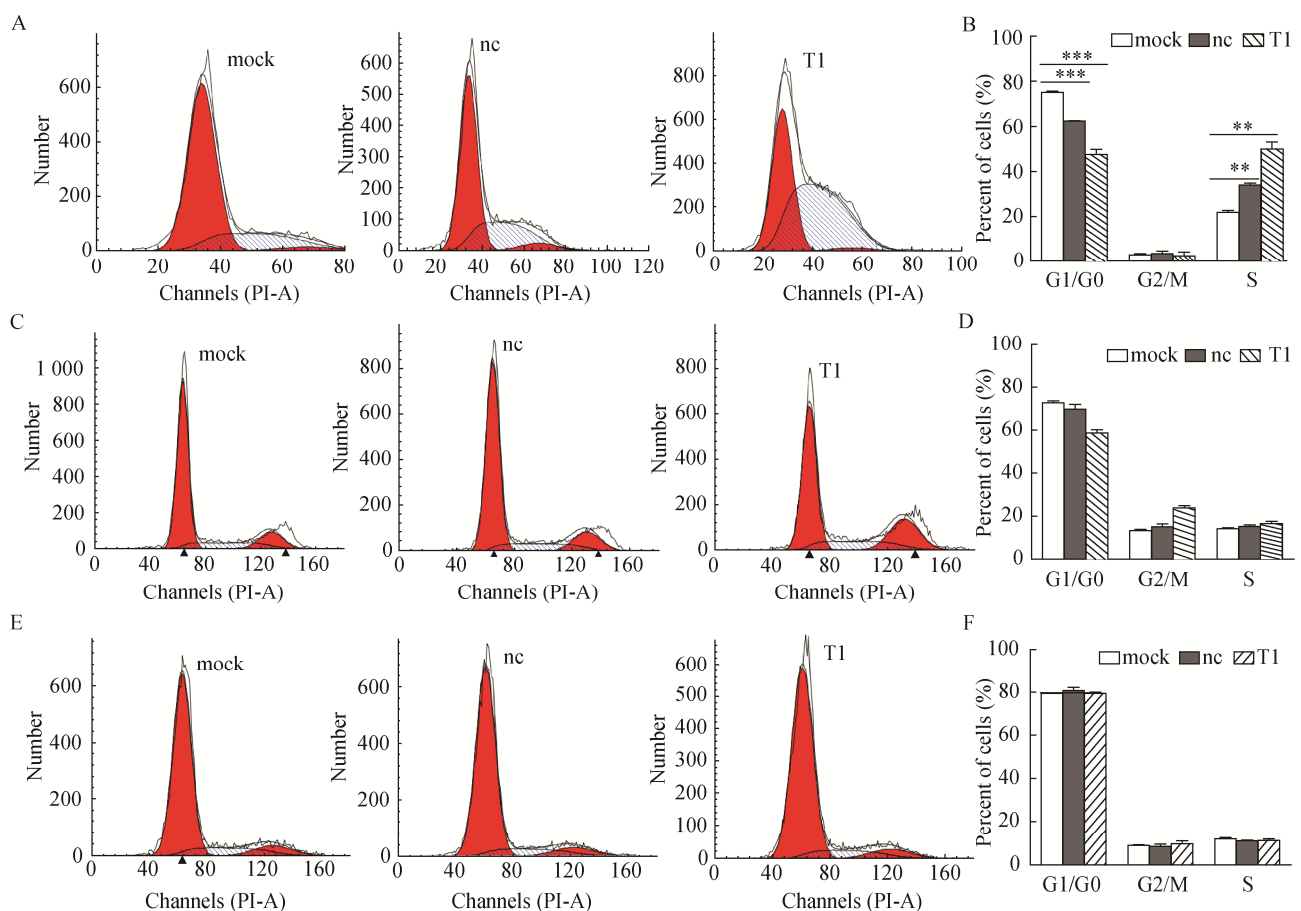


图 5 siRNA 沉默 *FIGNL1* 后无(有)支原体感染的 H446 细胞周期分布

Figure 5 Cell cycle distribution of H446 infected with or not with *M. hyorhinis* after *FIGNL1* silencing

注: A: 感染猪鼻支原体的 H446 流式检测结果; B: 感染猪鼻支原体的 H446 经 3 次独立试验后的细胞周期分布; C: 清除支原体污染的 H446 流式检测结果; D: 清除支原体污染的 H446 经 3 次独立试验后的细胞周期分布; E: 无支原体感染的 H446 流式检测结果; F: 无支原体感染的 H446 经 3 次独立试验后的细胞周期分布。

Note: A: FACS result of H446 infected with *M. hyorhinis*; B: Cell cycle distribution of H446 infected with *M. hyorhinis* calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments; C: FACS result of H446 after Mycoplasma removal; D: Cell cycle distribution of H446 after Mycoplasma removal calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments; E: FACS result of H446 without Mycoplasma infection; F: Cell cycle distribution of H446 without Mycoplasma infection calculated from three independent Flow cytometric analysis experiments.



阴性对照组 G1/G0、S 期细胞比例分别为  $62.36\% \pm 0.53\%$  与  $34.08\% \pm 1.57\%$ ，与空白组的差异也均具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

对于清除支原体污染的 H446 细胞，阴性对照组 S 期细胞比例为  $15.18\% \pm 1.36\%$ ，实验组 S 期细胞比例为  $16.54\% \pm 1.81\%$ ，与空白组的 S 期细胞比例  $14.09\% \pm 0.99\%$  比较，均未发现细胞 S 期分布有明显的改变( $P > 0.05$ ) (图 5C 和 5D)。对于无支原体感染的 H446 细胞，阴性对照组 S 期细胞比例为  $10.89\% \pm 0.48\%$ ，实验组 S 期细胞比例为  $11.02\% \pm 1.11\%$ ，与空白组的 S 期细胞比例  $11.82\% \pm 0.86\%$  比较，也均未发现细胞周期分布有明显的改变( $P > 0.05$ ) (图 5E 和 5F)。

上述结果表明，利用 siRNA 抑制有猪鼻支原体感染的 H446 和 H1688 细胞的 *FIGNL1* 表达时，两种细胞均呈现显著的 S 期阻滞现象。

### 3 讨论

本研究发现，采用 siRNA 沉默 DNA 双链断裂修复关键基因 *FIGNL1* 时，无支原体感染的及清除支原体污染的人小细胞肺癌细胞株 H1688 和 H446 细胞，实验组 S 期细胞比例与空白组和阴性对照组相比均无显著差异；而感染猪鼻支原体的 H1688 细胞，实验组和阴性对照组的 S 期细胞比例分别比空白组提高了约 1.38 倍和 0.51 倍；同样感染猪鼻支原体的 H446 细胞，实验组和阴性对照组 S 期细胞比例分别比空白组高约 1.27 倍和 0.55 倍。相关结果表明猪鼻支原体感染可导致 H1688 与 H446 细胞在 siRNA 沉默 *FIGNL1* 时出现显著的 S 期阻滞现象。

上述现象，我们推测由于 *FIGNL1* 是修复 DNA 双链损伤的同源重组途径中的关键基因，当该基因表达被 siRNA 抑制后，宿主细胞修复支原体造成的细胞 DNA 损伤<sup>[3,5,7]</sup>能力下降，加上支原体会对调控细胞周期、DNA 修复在内的基因的表达产生显著影响<sup>[13]</sup>，从而导致猪鼻支原体感染细胞出

现显著 S 期阻滞现象。

本研究的上述发现结合 *M. fermentans* incognitus 感染导致 THP-1 单核细胞的出现 G0 细胞周期阻滞现象<sup>[15]</sup>等，虽然具体分子机制尚有待进一步研究阐明，但已初步揭示支原体对宿主细胞周期等重要生物过程存在广泛、深刻的影响，而且这种影响是随支原体种类不同、人为操控目标基因功能的不同而变化。

对于本研究中阴性对照组也具有显著的 S 期阻滞效应的现象，我们推测可能是由于 siRNA-nc 序列是根据原核生物(放线菌)基因设计，siRNA-nc 通过影响猪鼻支原体的基因表达，从而间接影响 H1688 和 H446 细胞周期调控基因<sup>[15]</sup>，最终导致阴性对照组也出现了 S 期阻滞的现象。该实验结果同时提示，当阴性对照组出现异常实验结果时，应给予充分重视。

在细胞生物学、肿瘤生物学等研究中，对细胞周期是否有影响是判断基因功能、抗肿瘤药物功效的重要指标。因此，应通过规范操作、定期支原体污染检测等手段防止支原体污染对实验结果的干扰。

### 参考文献

- [1] Langdon SP. Cell culture contamination[J]. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, 2004, 88: 309-317
- [2] Darin N, Kadhon N, Brière JJ, et al. Mitochondrial activities in human cultured skin fibroblasts contaminated by *Mycoplasma hyorhinis*[J]. BMC Biochemistry, 2003, 4: 15
- [3] Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas[J]. Trends in Biotechnology, 1993, 11(11): 143-151
- [4] Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention[J]. Cytotechnology, 2002, 39(2): 75-90
- [5] Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma infection of cultured cells[J]. Nature, 1989, 339(6224): 487-488
- [6] McGarrity GJ, Phillips DM, Vaidya AB. Mycoplasma infection of lymphocyte cell cultures: infection with *M. salivarium*[J]. In Vitro, 1980, 16(4): 346-356
- [7] Aula P, Nichols WW. The cytogenetic effects of mycoplasma in human leukocyte cultures[J]. Journal of Cellular Physiology, 1967, 70(3): 281-290
- [8] Perez AG, Kim JH, Gelbard AS, et al. Altered incorporation of nucleic acid precursors by mycoplasma-infected mammalian cells in culture[J]. Experimental Cell Research, 1972, 70(2): 301-310



- [9] Levine EM, Thomas L, McGregor D, et al. Altered nucleic acid metabolism in human cell cultures infected with mycoplasma[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1968, 60(2): 583-589
- [10] Stanbridge EJ, Hayflick L, Perkins FT. Modification of amino-acid concentrations induced by mycoplasmas in cell culture medium[J]. Nature New Biology, 1971, 232(34): 242-244
- [11] Wise KS, Cassell GH, Action RT. Selective association of murine T lymphoblastoid cell surface alloantigens with *Mycoplasma hyorhinis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978, 75(9): 4479-4483
- [12] Sokolova IA, Vaughan ATM, Khodarev NN. Mycoplasma infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptotic-like endonuclease(s)[J]. Immunology and Cell Biology, 1998, 76(6): 526-534
- [13] Zhang SM, Tsai S, Lo SC. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 116
- [14] Taylor-Robinson D, Wirostko E, Wirostko WJ, et al. Mycoplasmas and oncogenesis[J]. The Lancet, 1996, 347(9014): 1555-1556
- [15] Reyes L, Davidson MK, Thomas LC, et al. Effects of *Mycoplasma fermentans* incognitus on differentiation of THP-1 cells[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(7): 3188-3192
- [16] Yuan JS, Chen JJ. FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(26): 10640-10645

(上接 p.335)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>