

引用:高天宇,郭清城,潘志远,等.基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的支原体检测技术在生物药生产中的应用探索[J].聊城大学学报(自然科学版),2026,39(3):447-456.

Citation:GAO Tianyu, GUO Qingcheng, PAN Zhiyuan, ZHU Weifan, ZHUANG Huangzhen, REN Yule, CHEN Yi, GUO Menghui, LIU Tao, WANG Chenguang, JI Lusha, QIAN Weizhu, HOU Sheng, LI Jun, SUN Ziqiao, WANG Xuekun, XU Jin, ZHANG Dapeng, GUO Huaizu. Exploration of RPA-CRISPR/Cas12a-based *mycoplasma* detection technology for application in biopharmaceutical production[J]. Journal of Liaocheng University (National Science Edition), 2026, 39(3): 447-456.

文章编号 1672-6634(2026)03-0447-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025030022

基于 RPA-CRISPR/Cas12a 的支原体检测技术在生物药生产中的应用探索

高天宇^{1,2}, 郭清城^{1,2,3,4}, 潘志远^{1,2}, 朱漳帆^{1,2}, 庄煌圳^{1,2}, 任雨乐^{1,2}, 陈一^{1,2},
郭梦慧^{1,2}, 刘涛^{1,2,3,5}, 王晨光^{1,2,3,4}, 冀芦沙^{1,2,3}, 钱卫珠^{1,2,3}, 侯盛^{1,2,3},
李军^{1,2,3}, 孙梓乔^{1,2,3}, 王学堃^{1,2,3,6}, 徐进^{1,2,3}, 张大鹏^{1,2,3}, 郭怀祖^{1,2,3,6}

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院、大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 山东 聊城 252059; 2. 国家药品监督管理局 治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203; 3. 温州医科大学 药学院、大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 浙江 温州 325035; 4. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏 泰州 225316; 5. 复旦大学 华山医院肿瘤科, 上海 200040; 6. 张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 上海 201203)

摘要 支原体污染是生物药生产中的重大风险源, 严重威胁抗体药物等生物制品的安全性和有效性。传统检测方法因耗时长、灵敏度不足或操作繁琐, 难以满足生物制药全流程快速质控的需求。针对这一挑战, 本研究基于前期开发的 RPA-CRISPR/Cas12a 支原体检测技术, 进一步拓展了其多场景中应用潜力, 并评估了体系的实用性与可靠性。通过预混 CRISPR 体系优化显著提升操作便捷性, 验证其在 4 °C 条件下稳定保存 7 天且性能无显著衰减, 为现场检测提供技术保障。半定量分析实现支原体的快速定量评估。应用测试覆盖生物制药工艺全流程: 在上游工艺中, 系统可于 CHO 细胞培养的早期污染预警; 在下游纯化步骤, 可以进行多步骤污染去除能力监测, 突显其高灵敏度优势。此外, 该方法还可应用于细胞库、培养基及血清的支原体检测, 并在模拟污染实验中展现高可靠性。研究表明, RPA-CRISPR/Cas12a 系统兼具快速、灵敏、操作简便及多场景适用性, 为生物制药生产中支原体污染过程监测提供了创新解决方案, 显著提升了质量控制效率与产品安全性, 具有广阔的应用前景。

关键词 支原体; RPA-CRISPR/Cas12a; 过程分析技术(PAT); 生物制药; 过程监测

中图分类号 TQ464

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Exploration of RPA-CRISPR/Cas12a-based *mycoplasma* detection technology for application

收稿日期: 2025-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(22304067); 上海东方英才项目(CYQN2023031); 山东省自然科学基金项目(ZR2023QB257, ZR2023QB196); 山东省高等学校“青创团队计划”团队(2022KJ111); 光岳青年学者创新团队项目(LCUGYTD 2022-04)资助

通信作者: 郭怀祖, 男, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 上海产业菁英高层次人才, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: guo-huaizu@163.com; 张大鹏, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: bigbirdzcn@163.com; 徐进, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 抗体药物与质量控制, E-mail: xujinn_1985@163.com.

in biopharmaceutical production

GAO Tianyu^{1,2}, GUO Qingcheng^{1,2,3,4}, PAN Zhiyuan^{1,2}, ZHU Weifan^{1,2},
ZHUANG Huangzhen^{1,2}, REN Yule^{1,2}, CHEN Yi^{1,2}, GUO Menghui^{1,2},
Liu Tao^{1,2,3,5}, WANG Chenguang^{1,2,3,4}, JI Lusha^{1,2,3}, QIAN Weizhu^{1,2,3},
HOU Sheng^{1,2,3}, LI Jun^{1,2,3}, SUN Ziqiao^{1,2,3}, WANG Xuekun^{1,2,3,6},
XU Jin^{1,2,3}, ZHANG Dapeng^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,6}

(1. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 5. Department of Oncology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 6. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract *Mycoplasma* contamination poses a critical risk in biopharmaceutical production, severely compromising the safety and efficacy of biological products such as monoclonal antibodies. Traditional detection methods are often time-consuming, lack sensitivity, or are complex to operate, making it difficult to meet the fast quality control demands throughout the biopharmaceutical manufacturing process. To address this challenge, this study further expands the application potential of the RPA-CRISPR/Cas12a-based *mycoplasma* detection technology, which was previously developed, and evaluates its practicality and reliability. The optimization of the pre-mixed CRISPR system significantly enhances operational convenience and ensures stability for up to 7 days at 4 °C without significant performance degradation, providing technical support for on-site detection. Semi-quantitative analysis allows for the rapid and accurate assessment of *mycoplasma* levels. Application testing spans the entire biopharmaceutical production process: in upstream processes, the system provides early contamination warnings during CHO cell culture; in downstream purification steps, it monitors the efficiency of multiple-step contamination removal, highlighting its high sensitivity. Additionally, the method was successfully applied to *mycoplasma* detection in cell banks, culture media, and serum, exhibiting high reliability in simulated contamination experiments. The RPA-CRISPR/Cas12a system integrates rapidity, sensitivity, user-friendliness, and multi-scenario adaptability, offering an innovative solution for *mycoplasma* monitoring in biopharmaceutical production. This advancement significantly enhances quality control efficiency and product safety, underscoring its broad application potential.

Keywords *mycoplasma*; RPA-CRISPR/Cas12a; process analytical technology; biopharmaceuticals; process monitoring

0 引言

支原体(*Mycoplasma*)作为缺乏细胞壁的微小微生物,因其天然耐药性、形态可变性及穿过滤膜(0.22 μm)的能力,已经成为生物制药生产中的重大污染风险源^[1-2]。其污染不仅通过竞争宿主细胞营养、诱导异常增殖及基因表达紊乱,直接威胁抗体药物等生物制品的质量与安全性,还可能引发潜在的生物安全风险^[3]。鉴于支原体的这些特性,它们被视为细胞培养和生物制药领域中的潜在污染物,必须通过精确的检测

和控制措施进行风险控制^[4]。因此,开发高灵敏度、高特异性的快速检测技术,对保障生物制品质量^[5],以及实现污染早期预警及过程控制至关重要^[6-7]。

现行药典推荐的检测方法中,培养法虽被视为金标准,具有较高的灵敏度(10 CFU/mL)^[8-9]。但其耗时长达 28 天,且无法检测不可培养或活力低下的支原体^[10-11],显著制约生产决策效率。细胞染色法通过培养细胞以检测支原体污染,相较于传统培养法,耗时显著缩短,但该方法的灵敏度较低(100 CFU/mL)^[12],结果的解读相对复杂,难以满足高通量质控需求^[13-15]。此外,以上两种方法只能检测活性较好或者可培养的支原体,而样本储存条件(如温度与时间限制)进一步增加了检测的不确定性^[16-17]。为了降低支原体活力对检测结果的影响,核酸扩增技术(NAT)若具备足够的灵敏度并经过适当验证,则可接受其作为传统检测方法的替代方案^[18-19]。NAT 虽显著提升灵敏度与速度,但 qPCR 等主流方法仍需依赖昂贵设备与复杂操作,限制了其在现场检测与多场景应用中的推广^[20-22]。

针对上述瓶颈,本研究聚焦于重组酶聚合酶扩增(RPA)^[23]与 CRISPR/Cas12a^[24]系统的创新性整合^[25]。RPA 技术通过等温扩增突破传统 PCR 对温控设备的依赖,结合 CRISPR/Cas12a 对靶标 DNA 的特异性识别及反式切割功能,实现了双重特异性验证,有效规避非特异性扩增导致的假阳性风险^[26-27]。相较于 qPCR,该体系在灵敏度相当的前提下,兼具以下核心优势:(1) 快速性:全程检测可在几十分钟内完成;(2) 便携性:无需复杂仪器,适配现场检测;(3) 多场景适用性:可覆盖细胞库、培养基、上游培养及下游纯化全流程。

前期我们首次开发了一种应用与抗体药物工艺的 RPA-CRISPR 支原体检测方法并进行了系统的验证与优化,并与现有检测方法结果进行比较,显示出高度一致性^[28]。为进一步拓展其在生物制药生产中的实用性,本研究重点评估该体系的耐用性,验证其在 4℃ 条件下稳定保存 7 天的性能,以便提升操作便捷性;通过拓展的精密度评估,确认方法的可靠性;同时进行半定量分析,实现支原体的快速定量评估。此外,通过模拟 CHO 细胞培养及下游纯化工艺的应用测试,验证该系统在早期污染预警及检测中的高灵敏度优势。同时还进一步进行了应用拓展(图 1)。该研究的实施可有效支持生物制药全流程的支原体污染监测,为提升质量控制效率与产品安全性提供创新解决方案。

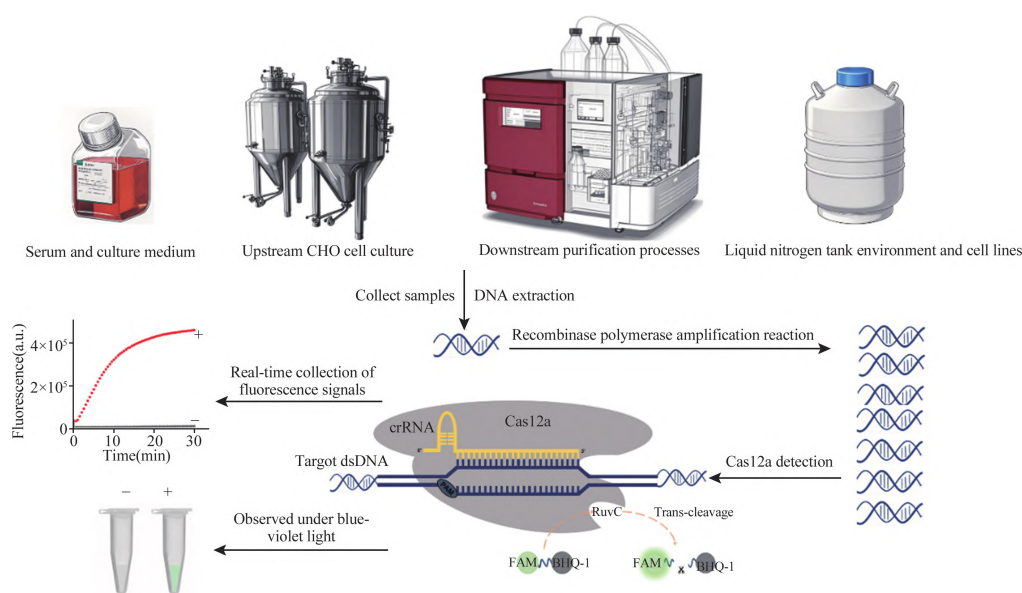


图 1 RPA-CRISPR/Cas12a 系统模式图

Fig. 1 Schematic of the RPA-CRISPR/Cas12a system

1 材料

1.1 菌株与质粒

实验选用 9 种常见支原体菌株^[29-30]。肺炎支原体(ATCC15531)、口腔支原体(ATCC23714)购自

ATCC 美国菌种保藏中心;发酵支原体(ATCC 19989)、柑橘螺原体(ATCC 27556)、精氨酸支原体(ATCC 23838)、莱氏无胆甾原体(ATCC 23206)、人型支原体(ATCC 23114)、唾液支原体(ATCC 23064)、猪鼻嗜酸支原体(ATCC 17981) 16s rRNA 序列的质粒均由北京擎科生物合成。

1.2 试剂与耗材

LbCas12a 蛋白,购自 New England Biolabs; TwistAmp basic 核酸扩增试剂盒,购自 TwistDX; Venor © GeM Sample Preparation Kit,购自 Minerva-Biolabs; DNA 引物, ssDNA 探针, crRNA 均由上海生工生物合成。

1.3 仪器与设备

台式高速离心机(Thermo Fisher);超微量分光光度计(Nanodrop);PCR 核酸扩增仪(BIO-RAD);琼脂糖凝胶电泳仪;实时荧光定量 PCR 仪(Applied biosystems);AKTA Avant 层析系统(GE Healthcare)。

2 方法

2.1 RPA 引物、crRNA、ssDNA 探针及质粒的设计与合成

根据九种常见支原体 16s rRNA 的基因保守序列^[31-33],设计 RPA 通用引物^[34]和 Cas12a 的 crRNA。首先在 <https://www.atcc.org> 中下载九种支原体的 16s rRNA 的基因序列,MEGA11 对比筛选九种支原体高同源性和高度保守的序列,结合 Cas12a 的 PAM 位点(TTTN)设计 crRNA。RPA 引物(30 bp 左右)位于 crRNA 上下游同源区,扩增子长度不大于 500 bp。引物特异性通过 Blast 验证,二级结构通过 Oligo Analyzer 评估。阳性质粒以 PUC57 为载体构建,分别包含各支原体 16S rRNA 靶序列^[35]。

2.2 样本制备

取 200 μ L 细胞上清液,使用 Venor®GeM 样品制备试剂盒提取支原体 DNA。样本与调节液混合,70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min(涡旋 3~4 次)。加入 400 μ L 吸附缓冲液,混合液转移至核酸纯化柱,10 000 $\times$ g 离心 1 min,去除流穿液。依次用缓冲液 A1、A2 洗涤,最大速度离心去除残留液。60 μ L 预热至 70 $^{\circ}$ C 的缓冲液 E 洗脱 DNA,提取的 DNA 可直接用于后续的核酸扩增反应。

2.3 阳性质粒标准品制备

通过 Nanodrop 测定质粒浓度。根据测得的浓度数据,结合质粒的分子量和长度,计算出每微升溶液中所含质粒的准确拷贝数。按照 10 倍梯度对质粒溶液进行逐级稀释,从而制备系列浓度递减的阳性质粒定量标准品。

2.4 RPA-CRISPR 检测体系构建

RPA 体系:将 30 μ L RPA 再水合缓冲液、10 μ L ddH₂O、2.5 μ L RPA-F(10 μ mol/L)、2.5 μ L RPA-R(10 μ mol/L)放入 RPA 冻干反应微球中短暂涡旋混匀,分为四份,一份 RPA 预混液 10 μ L。

CRISPR 体系:一份 CRISPR 预混液 18 μ L,包括 13 μ L Cas12a Buffer(1 $\times$)、2 μ L Cas12a(1 μ mol/L)、2 μ L gRNA(1 μ mol/L)、1 μ L F-Q 报告探针(10 μ mol/L)。

RPA-CRISPR 体系:将 2 μ L 样品、0.5 μ L MgOAc(280 mmol/L)放入管盖,一份 RPA 预混液(10 μ L)放入管底,短暂离心混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,得到 RPA 预扩增产物。再将 2 μ L RPA 预扩增产物移入 18 μ L 一份的 CRISPR 预混液中,迅速振荡混匀后放入 PCR 仪,37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min,每 30 s 采集一次荧光信号。

2.5 支原体污染加标模拟

CHO 细胞培养:在模拟发酵条件下,采用摇床培养系统培养工程 CHO 细胞,使用 CHOM-B02 培养基,摇床温度 37 $^{\circ}$ C,CO₂ 浓度 5%,摇床转速 120 r/min, pH 维持在 6.9~7.0 之间。口腔支原体接种浓度低于 10 CFU/mL。连续取样 6 天,监测支原体生长及其对 CHO 细胞发酵过程的影响。

下游工艺:工程 CHO 细胞培养经过深层过滤膜包以去除细胞碎片和其他污染物。过滤后,用 Protein A 亲和层析柱纯化,亲和层析填料为 Mabcapture-R 耐碱重组蛋白 A 层析介质,平衡液:20 mmol/L PB + 150 mmol/L NaCl (pH 7.0),洗脱缓冲液:20 mmol/L 柠檬酸(pH 3.0),收集亲和层析洗脱峰。亲和层析纯化后的洗脱峰经阳离子交换层析纯化,阳离子层析介质为 Nuvia S 阳离子层析交换介质,平衡液:

20 mmol/L NaAc-HAc + 30 mmol/L NaCl (pH 5.0),洗脱缓冲液:20 mmol/L PB + 50 mmol/L NaCl (pH 7.5),收集阳离子交换层析洗脱峰。收集后进行阴离子交换层析纯化,层析介质为 Capto Adhere,平衡液为 20 mmol/L PB + 50 mmol/L NaCl (pH 7.2),收集阴离子交换层析流穿峰。

2.6 多场景应用测试

细胞库样本:从液氮罐底部取沉淀物,置于洁净的 EP 管中。待液氮完全挥发后,将液氮罐盖子上的冰屑刮入 EP 管中,待其融化后,即为待测样品。血清及培养基:取 200 μ L 血清或培养基,使用 Venor®GeM 样品制备试剂盒进行样本制备。

拓展精密度可靠性评估:4 名实验员独立操作同一批次样本,评估结果一致性。

2.7 数据处理

数据分析采用 GraphPad Prism 8 统计软件完成。所有实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)的形式表示。荧光值的差异显著性通过 t 检验进行分析。统计结果中, P 值小于 0.05 表示差异具有显著性,以“*”标记;“ns”表示无显著性差异。

3 结果分析

3.1 RPA-CRISPR 系统性能确认

耐用性与便捷性。为了提升 CRISPR 体系的使用便利性及实际应用效率,本研究对 CRISPR 体系进行了预混处理优化,预混 CRISPR 体系由 18 μ L 反应液组成,包含 13 μ L Cas12a Buffer(1 $\times$)、2 μ L Cas12a(1 μ mol/L)、2 μ L gRNA(1 μ mol/L)、1 μ L F-Q 报告探针(10 μ mol/L)。通过每日制备预混体系并保存于 4 $^{\circ}$ C,预混体系样品依次命名为 Day1-Day6 用于系统评估其稳定性。结果显示,预混体系在 4 $^{\circ}$ C 条件下至少可稳定保存 7 天,且在此期间检测性能未发生明显衰减[图 2(a-b)]。这一优化显著降低了现场操作的复杂性,缩短了反应准备时间,同时保障了检测结果的可靠性,为生物制药生产中的快速支原体监测提供了技术支撑。

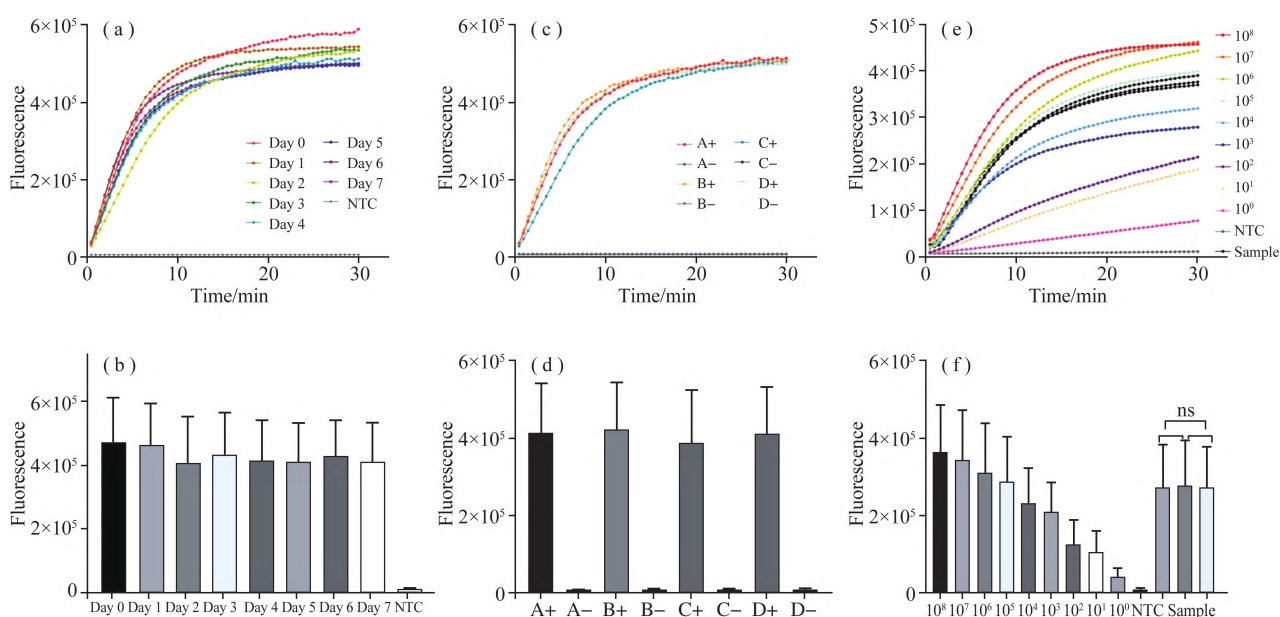
在实际应用测试过程中,一锅法和传统的两步法各有优势。其中,一锅法通过将 RPA 扩增与 CRISPR 检测整合于单一反应管中,简化操作流程及时间,降低了污染的风险。相比之下,两步法虽需独立优化扩增与检测步骤,但其分步操作模式允许对 RPA 扩增产物进行精细调控,尤其适用于高背景样本的检测,可有效避免非特异性信号的干扰。在生物制药场景中,两步法凭借其高特异性与灵敏度,更适用于对检测精度要求严格的环节,而一锅法则更适配于需快速响应的现场检测需求。基于此预混体系,后期还可以进一步进行一锅法的方法探索。

精密度与可靠性。为了进一步确认检测的精密度,我们进行了拓展的精密度评估。进一步确认检测系统的可靠性,本研究选取了 A、B、C、D 四名的实验人员对同一批次的加标样本(+)以及未加标样本(-)进行独立检测。结果显示[图 2(c-d)],不同操作者的检测结果无显著差异($P > 0.05$),表明该检测系统具有优异的精密度及可靠性。这一特性不仅降低了人为操作误差对结果的影响,还为该方法在缺乏专业实验室条件的生产现场推广提供了可行性。

半定量与灵敏度。基于 NAT 方法的检测限(LOD)以目标生物体的基因组拷贝数(GC)为量化指标。而传统培养法则依赖菌落形成单位(CFU)。由于支原体样本中 GC/CFU 比值受生理状态及样本处理条件影响显著。本研究采用阳性质粒标准品建立半定量分析模型,将待测样品组重复三次平行对照。实验结果表明,样本中支原体靶标浓度检测范围为 $10^4 \sim 10^5$ 拷贝/ μ L,验证了该方法的灵敏度与重复性[图 2(e-f)]。

蛋白质工程的最新进展已扩展了 CRISPR-Cas12a 可识别的 PAM 序列范围,进一步提升 crRNA 设计的灵活性^[36]。这一进展不仅拓宽支原体亚种的检测覆盖范围(如对非典型 PAM 序列的支原体靶标),还可通过多 crRNA 组合策略实现多重检测,这为我们后续复杂样本中支原体污染的精准筛查提供新思路。

综上,RPA-CRISPR/Cas12a 系统通过预混处理优化、拓展精密度及半定量灵敏度分析,展现了其在生物制药生产中的高效性、可靠性与多场景潜在适用性,为支原体污染的快速监测与过程控制提供了创新解决方案。



注: NTC: 无模板对照。

图2 RPA-CRISPR 系统优化及性能确认(a-b) 预混 CRISPR 体系稳定性分析;

(c-d) 系统精密度评估;(e-f) 半定量灵敏度评估

Fig. 2 Optimization and verification of RPA-CRISPR/Cas12a system (a-b) Stability analysis of premixed CRISPR components; (c-d) Precision verification of the system; (e-f) Semi-quantitative and sensitivity evaluation

3.2 生物药上下游工艺应用测试

支原体污染对生物制药生产的威胁贯穿于上下游全流程,其不仅通过竞争宿主细胞营养、诱导基因表达紊乱直接影响产品质量,还可能残留在纯化工艺中引发安全隐患。一种快速准确的抗体药物质量管理策略有望加速技术框架的发展,从而增强产品开发和质量控制能力。本研究通过模拟生物药生产的关键工艺环节,系统验证了 RPA-CRISPR/Cas12a 系统在细胞培养早期污染预警及下游纯化污染监测中的应用潜力,展现了其在复杂生产场景中的独特优势。

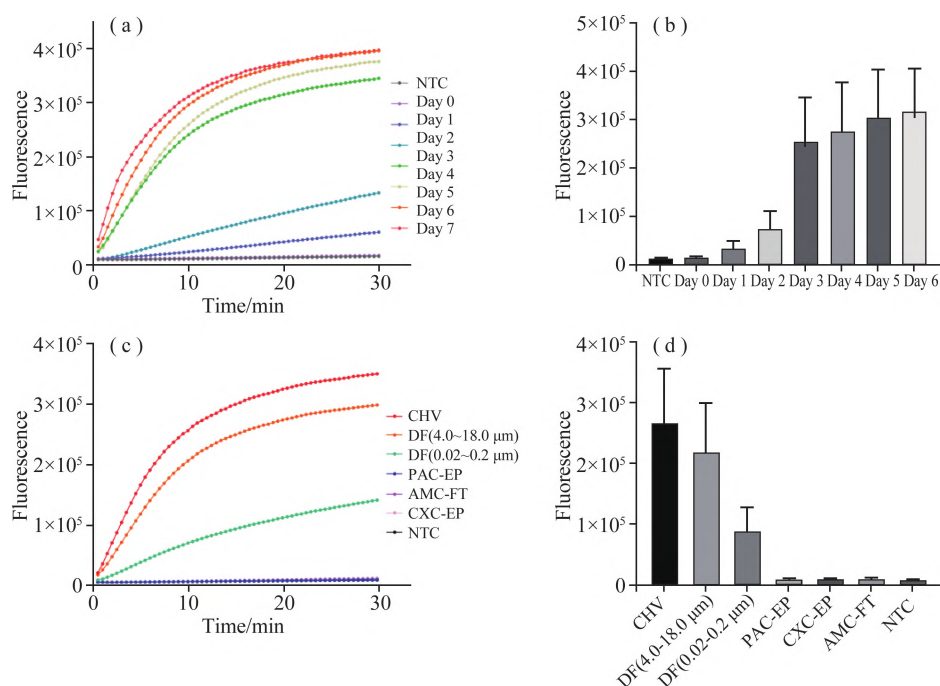
上游工艺:早期污染预警与细胞培养监测

为评估系统在动态细胞培养环境中的实时监测能力,本研究构建了生物药生产的 CHO 细胞培养模型,模拟支原体污染(初始接种浓度小于 10 CFU/mL),并连续 6 天采集样本进行检测,并将收集的样本依次命名为 Day1-Day6。结果显示,RPA-CRISPR/Cas12a 系统在培养 24~72 h 内即可检测到微弱支原体信号[图 3(a-b)],此时间窗口对应支原体生长的对数期。值得注意的是,系统在污染初期(24 h)即能捕获微量核酸,在高背景样本中仍保持高特异性,较传统培养法(需 28 天)显著缩短检测周期。这一早期预警能力为生物制药生产中的快速干预提供了关键时间窗口,可有效避免污染扩散至整个培养体系,从而最大限度降低原料浪费和产品安全风险。

下游工艺:纯化步骤监测与去除效率评估

下游加工中的支原体污染挑战在于传统过滤工艺可能无法完全去除污染物。本研究通过引入支原体污染的工程化 CHO 细胞样本,分别采用孔径为 0.02~0.2 μm 和 4~18 μm 的深层过滤膜包进行预处理,并对比检测残留核酸。结果显示[图 3(c-d)],0.02~0.2 μm 的深层过滤膜包虽能捕获大部分支原体,但 RPA-CRISPR/Cas12a 系统仍可检出微量核酸残留,而大孔径深层过滤膜包(4~18 μm)则无法有效截留支原体。

在层析纯化步骤,仅仅采用 Protein A 层析柱处理污染样本后,支原体核酸残留量较过滤前降低多个数量级。该结果不仅验证了层析工艺的污染物去除能力,还凸显了 RPA-CRISPR/Cas12a 系统的高灵敏度优势——即便在低拷贝数条件下仍能可靠检测。这一特性使其成为下游工艺中污染监测的理想工具,为生物制药质量控制提供了实时数据支持。若后期进一步结合病毒去除过滤步骤,以及多种机制层析步骤,污染可以降低至检测限以下,多步骤联合策略可显著提升去除效率。



注:CHV:细胞收获液,;DF:深层过滤,;PAC-EP:亲和层析洗脱峰,;CXC-EP:阳离子层析洗脱峰,;AMC-FT:阴离子层析流穿峰。

图3 RPA-CRISPR 系统在生物药工艺中的应用测试 (a-b) 上游 CHO 细胞培养中支原体早期污染检测; (c-d) 下游纯化工艺污染残留监测

Fig. 3 Application of RPA-CRISPR system in biopharmaceutical processes (a-b) Early detection of mycoplasma contamination in upstream CHO cell culture; (c-d) Monitoring residual contamination in downstream purification processes

3.3 多场景应用拓展

支原体污染的来源多样,覆盖从原材料到终产品的全生产链。本研究通过拓展 RPA-CRISPR/ Cas12a 系统的应用场景,验证其在血清与培养基检测、液氮罐环境监测及实际产品细胞株分析中的适用性,进一步突显其多场景适配能力。

血清与培养基污染检测

有血清培养基因牛血清潜在的支原体污染(阳性率高达 29%)^[37],成为高风险污染源。此外,由于培养基中的血清成分无法承受高温高压灭菌,通常采用除菌过滤的方式来确保其无菌性。然而,支原体体积微小且形态多变,部分支原体能够轻易通过 0.22 微米的滤膜,这表明在实际应用中,仅依靠除菌过滤可能无法彻底去除支原体,从而存在潜在的污染风险。相比之下,无血清培养基在干粉状态下由于不含有血清成分,其自身污染风险相对较低。在使用无血清培养基时,可通过严格的来料验收与检查程序,确保其符合质量标准,从而有效降低支原体污染的可能性。这包括对无血清培养基的供应商进行评估、对每一批次的培养基进行支原体检测,以及在储存和使用过程中严格遵守无菌操作规程等措施。

本研究模拟血清及培养基污染样本,以验证支原体检测在血清与培养基污染中的效能,其中 FBS、NBCS 为血清,其余均为培养基。结果显示系统均可检测到多个模拟污染样品中的低拷贝数支原体[图 4(a-b)]。对于无血清培养基,尽管其干粉状态污染风险较低,但系统仍能有效检出模拟的支原体污染。这一结果表明,该系统不仅适用于高风险血清样本,还可作为无血清培养基来料验收的快速质控工具。

液氮罐环境监测与细胞库安全管理

液氮罐虽为低温无菌环境,但支原体仍可存活并引发交叉污染^[38]。尽管支原体在液氮环境中不会繁殖,但它们能够存活并导致细胞交叉污染。尽管液氮(LN₂)本身通常被认为是无菌的,但液氮罐中的环境和细胞仍可进行支原体检测。本研究对主细胞库、工作细胞库、液氮罐底部沉淀物及罐盖冰屑样本进行检测。结果显示[图 4(c~d)],我们未在实际使用的液氮罐中检测到支原体。然而,通过定期检测结合消毒维护策

略(如季度性罐体清洁),可进一步降低污染风险。该结果强调了系统在细胞库长期保存中的监控价值,为生物样本安全性提供了双重保障。

实际抗体产品细胞株的通用性验证

为验证系统在工业场景中的普适性,本研究选取 CMAB007、CMAB008 和 CMAB009 三种抗体产品的细胞株进行检测。结果显示[图 4(e~f)],系统在加标样本中均能稳定输出阳性信号,而未加标样本的荧光值维持在背景水平,且三者间无显著差异。这一结果表明,RPA-CRISPR/Cas12a 系统具有强通用性,可适配不同抗体产品的细胞株检测需求,为多品种生物药生产的标准化质控提供了技术基础。

通过上下游工艺及多场景应用测试,RPA-CRISPR/Cas12a 系统展现了其在生物制药全流程中的核心优势:早期预警:上游培养 24 h 内检测污染,较传统方法缩短 95%检测周期;高灵敏度监测:下游纯化后仍可检出低拷贝数污染;场景适配性:覆盖血清、培养基、液氮罐及多品种细胞株检测,满足复杂生产需求。这些特性使其成为提升生物药生产效率与安全性的创新工具,为行业质量控制提供了全新解决方案。

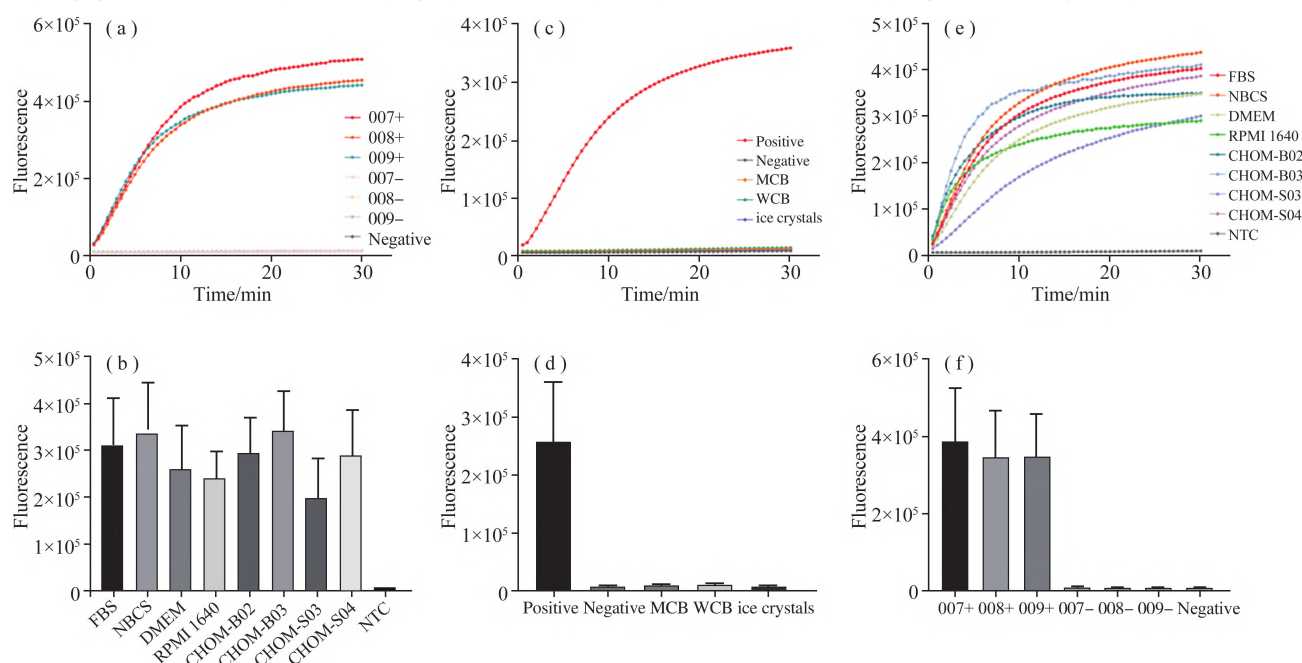


图 4 RPA-CRISPR/Cas12a 系统的多场景支原体检测应用 (a-b) 血清与培养基污染检测;

(c-d) 液氮罐环境安全性评估;(e-f) 抗体产品细胞株污染筛查

Fig. 4 Multi-scenario application of RPA-CRISPR/Cas12a system for mycoplasma detection (a-b) Detection of contamination in serum and culture medium; (c-d) Safety assessment of liquid nitrogen tank environment; (e-f) Screening of mycoplasma in antibody-producing cell lines

6 结论

本研究通过系统优化、性能确认与多维度应用测试,证实了 RPA-CRISPR/Cas12a 检测技术在生物制药生产中解决支原体污染问题的突破性价值。该技术整合了 RPA 的等温扩增和 CRISPR/Cas12a 的双重特异性识别机制,实现了高灵敏度、半定量、快速检测以及便携化操作,有效克服了传统方法耗时长、设备依赖性强等瓶颈。

在技术特色与核心优势方面,预混 CRISPR 体系在 4 ℃ 条件下可稳定保存 7 天且性能无显著衰减,显著降低了现场检测的复杂性,为生产一线快速响应提供了技术保障。多操作者独立实验验证了系统的高度一致性,确保其在非专业实验环境中的推广可行性。此外,半定量分析模型实现了支原体浓度的快速评估,结合蛋白质工程扩展的 PAM 序列范围,可为多重检测与复杂样本筛查奠定基础。

在抗体生产全流程应用效能方面,该系统可在 CHO 细胞培养(小于 10 CFU/mL)24 h 内捕获微量支原体信号,较传统培养法缩短了 95% 的检测周期,为污染早期干预提供了关键时间窗口。即使经过 0.02~0.2

μm 深层过滤,仍可检出低拷贝的核酸残留,突显了其高灵敏监测能力。联合多步骤层析以及纳滤工艺,可显著降低污染的安全性风险。此外,该技术成功应用于血清、培养基、液氮罐环境及多品种抗体细胞株(如 CMAB007/008/009)的检测,覆盖了生物制药全链条的质控需求。

综上所述,RPA-CRISPR/Cas12a 系统不仅为支原体污染提供了高效的解决方案,更通过其快速性、便携性与多场景适用性,重塑了生物制药生产的质量控制范式。未来,通过一锅法优化与多重检测策略开发,该技术有望进一步拓展至其他微生物污染监测领域,为全球生物药的安全性生产效率提升提供基础工具。

表 1 RPA 引物及 crRNA 设计序列

Tab. 1 Design sequences of RPA primers and crRNA

名称	序列(5'-3')
crRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCGCCAAUAAUUCCGAUAACGC
RPA-F	GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
RPA-R	AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
ssDNA 探针	56-FAM-CTCTCATTTTTTTTTTTAGAGAG-3'-BHQ1

表 2 RPA 引物与 crRNA 错配位点分析

Tab. 2 Mismatch analysis between RPA primers and crRNA

菌种	RPA F(5'-3')	RPA R(5'-3')	crRNA(5'-3')	错配数
ATCC 23838	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	0
ATCC 23714	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	0
ATCC 23114	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	0
ATCC 23064	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	0
ATCC 19989	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	A $\square$ ACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	1
ATCC 17981	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	A $\square$ ACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTA $\square$ GGAAT	CGCCCAUAAUUCCG- GAUAACGC	2
ATCC 23206	GACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTTTGCTC	AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCA $\square$ UAA $\square$ UCCG- GAUAACGC	2
ATCC 27556	GACTAC $\square$ AGGGTATCTAATC- CT $\square$ TTTGCTC	$\square$ AAACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAA $\square$ UCCG- GAUAACGC	4
ATCC 15531	GACTAC $\square$ AGGGTATCTAATC- CT $\square$ TTTGCTC	A $\square$ ACTCCTACGGGAGGCAG- CAGTAGGGAAT	CGCCCAUAA $\square$ UCCG- GAUAACGC	4

注:错配位点用方框字体表示。

参 考 文 献

[1] RAZIN S, HAYFLICK L. Highlights of mycoplasma research—an historical perspective[J]. Biologicals, 2010,38(2): 183-190.

[2] ROSENGARTEN R, CITTI C, GLEW M, et al. Host-pathogen interactions in Mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2000, 290(1): 15-25.

[3] FRATZ-BERILLA E J, FAISON T, KOHNHORST C L, et al. Impacts of intentional Mycoplasma contamination on CHO cell bioreactor cultures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019,116(12): 3242-3252.

[4] VOLOKHOV D V, GRAHAM L J, BRORSON K A, et al. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques[J]. Molecular and Cellular Probes, 2011,25(2/3): 69-77.

[5] 徐梦娇,刘涛,徐进,等. 英夫利西单抗糖化方法开发验证及其在抗体药物中的普适性[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2024, 37(5), 155-168.

- [6] MOLLA KAZEMIHA V, BONAKDAR S, AMANZADEH A, et al. Real-time PCR assay is superior to other methods for the detection of Mycoplasma contamination in the cell lines of the National Cell Bank of Iran[J]. Cytotechnology, 2016,68(4): 1063-1080.
- [7] ROTTEM S. Interaction of mycoplasmas with host cells[J]. Physiological Reviews, 2003,83(2): 417-432.
- [8] BURGOS R, GARCIA-RAMALLO E, SHAW D, et al. Development of a serum-free medium to aid large-scale production of Mycoplasma-based therapies[J]. Microbiology Spectrum, 2023,11(3): e0485922.
- [9] BEIER L S, SIQUEIRA F M, SCHRANK I S. Evaluation of growth and gene expression of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma hyorhinis in defined medium[J]. Molecular Biology Reports, 2018,45(6): 2469-2479.
- [10] SPERGSEER J, DESOYE P, RUPPITSCH W, et al. Mycoplasma tauri sp. nov. isolated from the bovine genital tract[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2022,45(1): 126292.
- [11] L'ECUYER C. Enzootic pneumonia in pigs: propagation of a causative Mycoplasma in cell cultures and in artificial medium[J]. Canadian Journal of Comparative Medicine, 1969,33(1): 10-19.
- [12] WEISKIRCHEN S, SCHRÖDER S K, BUHL E M, et al. A beginner's guide to cell culture: practical advice for preventing needless problems[J]. Cells, 2023,12(5): 682.
- [13] UPHOFF C C, DREXLER H G. Eradication of Mycoplasma contaminations[J]. Methods in Molecular Biology, 2013,946: 15-26.
- [14] MCAULIFFE L, ELLIS R J, MILES K, et al. Biofilm formation by Mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival[J]. Microbiology, 2006,152(Pt 4): 913-922.
- [15] LIGASOVÁ A, VYDRŽALOVÁ M, BURIÁNOVÁ R, et al. A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy[J]. Cells, 2019,8(12): 1510.
- [16] DABRAZHNETSKAYA A, FURTAK V, VOLOKHOV D, et al. Preparation of reference stocks suitable for evaluation of alternative NAT - based Mycoplasma detection methods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014,116(1): 100-108.
- [17] DABRAZHNETSKAYA A, VOLOKHOV D V, DAVID S W, et al. Preparation of reference strains for validation and comparison of Mycoplasma testing methods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011,111(4): 904-914.
- [18] UPHOFF C C, DREXLER H G. Detecting Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction[J]. Methods in Molecular Biology, 2011,731: 93-103.
- [19] SHAHHOSSEINY M H, HOSSEINY Z, KHORAMKHORSHID H R, et al. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction[J]. Journal of Basic Microbiology, 2010,50(2): 171-178.
- [20] NÜBLING C M, BAYLIS S A, HANSCHMANN K M, et al. World health organization international standard to harmonize assays for detection of Mycoplasma DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015,81(17): 5694-5702.
- [21] SUNG J, HAWKINS J R. A highly sensitive internally-controlled real-time PCR assay for Mycoplasma detection in cell cultures[J]. Biologics, 2020,64: 58-72.
- [22] INGBRITSON A L, GIBBS C P, TONG C, et al. A PCR detection method for testing Mycoplasma contamination of veterinary vaccines and biological products[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015,60(2): 174-180.
- [23] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006,4(7): e204.
- [24] CHEN J S, MA E B, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. Science, 2018,360(6387): 436-439.
- [25] CHEN Y, XU X L, WANG J C, et al. Photoactivatable CRISPR/Cas12a strategy for one-pot DETECTR molecular diagnosis[J]. Analytical Chemistry, 2022,94(27): 9724-9731.
- [26] DENG Z L, HU H Y, TANG D, et al. Ultrasensitive, specific, and rapid detection of Mycoplasma pneumoniae using the ERA/CRISPR-Cas12a dual system[J]. Frontiers in Microbiology, 2022,13: 811768.
- [27] WANG B, WANG R, WANG D Q, et al. Cas12aVDet: a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and visual nucleic acid detection[J]. Analytical Chemistry, 2019,91(19): 12156-12161.
- [28] ZHANG D P, GAO T Y, GUO Q C, et al. Rapid and sensitive Mycoplasma detection in antibody bioprocessing via RPA-CRISPR/Cas12a[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2025,263: 116904.
- [29] MARKOULLIS K, BULIAN D, HÖLZLWIMMER G, et al. Mycoplasma contamination of murine embryonic stem cells affects cell parameters, germline transmission and chimeric progeny[J]. Transgenic Research, 2009,18(1): 71-87.
- [30] MOLLA KAZEMIHA V, AMANZADEH A, MEMARNEJADIAN A, et al. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of Mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran[J]. Cytotechnology, 2014,66(5): 861-873.

(下转第 474 页)

- [21] QI M, GONG X J, WU B, et al. Landing dynamics of swimming bacteria on a polymeric surface: effect of surface properties[J]. *Langmuir*, 2017, 33(14):3525-3533.
- [22] ANGMO K, KUMARI A, SAVITRI et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 66:428-435.
- [23] 温贺, 肖凤艳, 段翠翠, 等. 植物乳杆菌 Sc52 益生特性评价及其在降血糖产品中的应用[J]. *食品科学*, 2018, 39(6):148-154.
- [24] 张媛媛, 赵梦迪, 李悦垚, 等. 犬源乳酸片球菌 GLP236 的分离鉴定、体外益生功能及小鼠安全性评价[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(12):8148-8160.
- [25] SCHRECK K, MELZIG M F, SCHRECK K, et al. Intestinal saturated long-chain fatty acid, glucose and fructose transporters and their inhibition by natural plant extracts in caco-2 cells[J]. *Molecules*, 2018, 23(10):2544.
- [26] LIU Y J, WANG J L, ZHENG H H, et al. Multi-functional properties of lactic acid bacteria strains derived from canine feces[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 5(11):1404580.
- [27] KUMAR V, KHAN A A, TRIPATHI A, et al. Role of oxidative stress in various diseases; relevance of dietary antioxidants[J]. *Journal of Phytopharmacology*, 2015, 4(2):126-132.
- [28] BAO Y, WANG Z L, ZHANG Y, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* P-8 on lipid metabolism in hyperlipidemic rat model[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114(11): 1230-1236.
- [29] 陈楠, 余泽旭, 季暄, 等. 犬源抗氧化益生菌的筛选及功效评定[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(2):1303-1314.
- [30] JI K, CHO Y S, KIM Y T. Tyrosinase inhibitory and anti-oxidative effects of lactic acid bacteria isolated from dairy cow feces[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018, 10(1):43-55.
- [31] 段瑞峰. 犬源降糖益生菌的筛选及其对 1 型糖尿病小鼠的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [32] ZHAO M D, ZHANG Y Y, LI Y Y, et al. Complete genome sequence and probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* CLP03 isolated from healthy *Felis catus*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2025, 17(2):903-917.
- [33] 魏雪, 胡少震, 康文丽, 等. 具有缓解犬腹泻功能乳酸菌的分离鉴定及益生功能评价[J]. *饲料研究*, 2022, 45(12):52-57.
- [34] DANIELSEN M, WIND A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82(1):1-11.
- [35] 张丽芳, 田洪涛, 张玉兰, 等. 健康人体及保健品中乳酸菌和双歧杆菌的抗药性分析[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(6):144-151.
- [36] 李姗姗. 潜在益生乳杆菌的抗生素敏感性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 456 页)

- [31] TIMENETSKY J, SANTOS L M, BUZINHANI M, et al. Detection of multiple *Mycoplasma* infection in cell cultures by PCR[J]. *Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 2006, 39(7): 907-914.
- [32] DABRAZHNETSKAYA A, VOLOKHOV D V, LIN T L, et al. Collaborative study report: evaluation of the ATCC experimental *Mycoplasma* reference strains panel prepared for comparison of NAT-based and conventional *Mycoplasma* detection methods[J]. *Biologicals*, 2013, 41(6), 377-383.
- [33] JEAN A, TARDY F, ALLATIF O, et al. 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[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172358.
- [34] SALLING H K, BANG-CHRISTENSEN S R. Multi-primer qPCR assay capable of highly efficient and specific detection of the vast majority of all known *Mycoplasma*[J]. *Biologicals*, 2016, 44(3): 129-138.
- [35] DREOLINI L, CULLEN M, YUNG E, et al. A rapid and sensitive nucleic acid amplification technique for *Mycoplasma* screening of cell therapy products[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2020, 17: 393-399.
- [36] KLEINSTIVER B P, SOUSA A A, WALTON R T, et al. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 276-282.
- [37] MAUNSELL F P, DONOVAN G A. *Mycoplasma bovis* infections in young calves[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2009, 25(1): 139-177.
- [38] BAJERSKI F, BÜRGER A, GLASMACHER B, et al. Factors determining microbial colonization of liquid nitrogen storage tanks used for archiving biological samples[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 131-144.

(责任编辑:刘庆松)