

УДК 616.31-089.845

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДОМ ПЦР

Данлыбаева Г.А., Иманбекова М.К., Секенова А.Е.

Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Уалиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан

lsc@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Широкое использование клеточных культур в научных и прикладных исследованиях подразумевает длительное культивирование клеток. При этом культуры клеток могут проявлять тенденцию к изменению основных характеристик, обусловленную как условиями культивирования, так и контаминацией посторонними агентами. Обычно при работе с культурами клеток млекопитающих исследователей больше волнует контаминация различными микроорганизмами (бактериями, дрожжами, микоплазмой), в то время перекрестная контаминация другими видами культур клеток (как внутри- так и межвидовая) может остаться незамеченной. Чистота и точная характеристика используемой модели, которой во многих случаях служат постоянные клеточные культуры, являются абсолютно необходимым условием проведения биомедицинских научных исследований и требует их надежной идентификации. Согласно данным Международного комитета по идентификации клеточных линий, до 50% клеточных культур, используемых в научных исследованиях, неверно идентифицированы или кросс-контаминированы. Этот факт является существенным обоснованием необходимости проведения видовой идентификации. В данной работе приведены результаты определения видовой идентичности 6 новых диплоидных штаммов, полученных в Казахстане, и 5 перевиваемых клеточных культур, находящихся в депозитории Национального центра биотехнологии. Был проведен ПЦР-анализ с использованием видоспецифических праймеров к различным видам млекопитающих. В ходе экспериментов была проведена оптимизация условий проведения ПЦР с изменением концентрации $MgCl_2$ и температуры отжига праймеров. В результате исследований установлено, что оптимизация условий позволяет определить в образце наличие 10 клеток/мл. Выявлено, что использованные видоспецифические праймеры показали полное соответствие испытуемых клеточных культур исходному виду млекопитающих.

Ключевые слова: клеточные культуры, видовая идентификация клеточных линий, ПЦР, праймер.

SPECIES IDENTIFICATION OF CELL CULTURE BY PCR METHODS

Danlybaeva G.A., Imanbekova M.K., Sekenova A.E.

National Center for Biotechnology, 13/1 Valikhanova str., Astana, 010000, Kazakhstan

lsc@biocenter.kz

ABSTRACT

The widespread using of cell cultures for scientific and applied research implicates the long-term cell cultivating process. Wherein this cell culture may have a tendency to change the basic characteristics due to as the cultivating conditions and as contamination by extraneous agents. Normally, when working with mammalian cell cultures researchers concerns about the contamination by various microorganisms (bacteria, yeasts, mycoplasma), while the cross-contamination by other types of cell cultures (both intra- and inter-species) may remain unnoticed. Purity and delicate description of the used model, which in many cases serves continuous cell cultures, are an absolute necessary condition for conducting of biomedical scientific researches, is requires their reliable identification. According to data of the International Cell Line Authentication Committee up to 50% of cell cultures used in research, misidentified or cross-contaminated. This fact is significant justification for authentication of cells and cell lines. In this paper presents the results of determining the species identity 6 new diploid strains obtained in Kazakhstan and 5 continuous cell cultures that are in the depository of the National Center for Biotechnology. Was carried out PCR with species-specific primers to various types of mammals. The experiments were carried out to optimize the conditions for PCR with the concentration of $MgCl_2$ and primers, annealing temperature. The studies

found that the optimization of the conditions to determine the presence in a sample of 10 cells/ml. Was revealed that the species-specific primers used showed full compliance with the original test cell cultures mammalian species.

Keywords: cell lines, species identity of cell lines, PCR, primer.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные культуры с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины и сельского хозяйства. Их используют при решении таких общебиологических проблем как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической подвижности, злокачественной трансформации и многих других.

Наряду с применением клеточных культур в качестве альтернативных экспериментальных модельных систем, в настоящее время они приобрели большую значимость в производстве вакцин, биофармацевтических препаратов и клеточной (регенеративной) терапии [1-7].

Впервые о проблеме межвидовой перекрестной (кросс-) контаминации клеточных линий человека и животных было сообщено в конце 60-х годов XX века [8, 10, 11]. Широко известны масштабные случаи перекрестного контаминирования опухолевыми линиями клеток *Hela* нормальных перевиваемых клеточных культур. Использование таких контаминированных клеточных культур приводит к искажению результатов экспериментов и научных изысканий [12-14]. В связи с участвовавшими случаями и для своевременного выявления контаминации, связанной со случайным занесением в культуру примесных клеток и получения достоверных результатов, в 2010 году Международный комитет по идентификации клеточных линий (*International Cell Line Authentication Committee*) опубликовал рекомендации о необходимости периодического проведения видовой идентификации клеточных культур, используемых в различных исследованиях [15].

Определение видовой специфичности клеточных культур проводят различными методами: иммунологическое исследование с использованием видоспецифических антисывороток, кариотипирование, изоферментный анализ, HLA-типирование, а также тесты с использованием генетических маркеров для анализа полиморфизма на уровне ДНК.

Одним из распространенных методов для видового подтверждения клеточной линии является изоферментный анализ, основанный на разной электрофоретической подвижности определенных ферментов у разных таксономических групп животных и человека: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и нуклеозидфосфорилазы (НФ). Метод относительно прост, дает воспроизводимые результаты и не требует дорогостоящего оборудования, однако достаточно трудоемок и сложен для интерпретации. Кроме того, для тестирования требуется наличие большого количества присутствующих контаминантов (примерно 25% от общей популяции клеток), вследствие чего перекрестное загрязнение (кросс-контаминация) в пределах близкородственных видов может оказаться незамеченным [16, 17].

В последнее десятилетие широкое распространение получили молекулярно-генетические методы идентификации биологических объектов. Наиболее известным и эффективным является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который является чрезвычайно чувствительным. При выборе правильного гена-мишени, генетический подход позволяет идентифицировать огромное количество клеточных культур различного происхождения с высоким разрешением. Существует ряд аналитических систем для видовой идентификации клеточного материала на основе ПЦР [18-22]. Так, открытие гипервариабельных регионов ДНК привело к концепции ДНК-фингерпринтинга -

качественному и достаточно точному методу оценки генома, основными недостатками которого являются трудоемкость и высокая стоимость [23-25].

Новое направление с использованием локус-специфических последовательностей, так называемых STR (Short Tandem Repeats)-локусов, расширило возможности использования их в качестве маркеров при тестировании клеточных культур на предмет контаминации и/или обнаружения изменения генотипа. В настоящее время STR-маркеры нашли применение в судебной медицине, в филогенетической реконструкции последовательностей, а также ранней диагностике химеризма при трансплантации органов, аллогенных клеток костного мозга. Высокая информативность STR-локусов выражается распределением аллельных частот и уровнем их гетерозиготности [26-29]. Использование RAPD-ПЦР со случайными праймерами (OPA1, OPA11, OPA17, SB2, P29, P92) также показало, что данный метод эффективно выявляет реальные вариации в структуре ДНК и может быть использован как для геномной паспортизации клеточных культур, так и для контроля их стабильности и генетической изменчивости при длительном пассировании [30]. Мультиплексный ПЦР-метод основан на использовании стабильных и информативных участков генов цитохрома b (*cytb*) и субъединицы I цитохром-С-оксидазы (*COI*) в качестве генетического маркера и выявляет видовую принадлежность клеточных культур, полученных от разных видов животных и длительно культивируемых *in vitro* [22, 31-33].

Таким образом, кросс-контаминация или неправильная идентификация клеточных культур является актуальнейшей проблемой для современных исследователей, работающих с клетками человека и животных. Несмотря на широкое внедрение различных способов определения чистоты клеточных линий в зарубежных лабораториях, такие методики, как и сам метод изолированных культур клеток и тканей, альтернативный в работе с животными, не получили должного развития в Казахстане.

Задачей данного исследования является изучение видовой идентичности новых диплоидных клеточных культур человека, выделенных в лаборатории стволовых клеток Национального центра биотехнологии (НЦБ) в 2009-2011 гг., и перевиваемых клеточных линий животных с целью исключения перекрестной контаминации с использованием стандартного ПЦР-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки

В исследовании были использованы:

а) диплоидные культуры: фибробласты крайней плоти человека (ФКПЧ 2/11), фибробласты кожно-мышечной ткани (ФЭЧ 2/09, ФЭЧ 3/09, ФЭЧ 5/11) и легкого эмбриона человека (ЛЭЧ 2/12) (диплоидные клетки были выделены в лаборатории стволовых клеток НЦБ);

б) перевиваемые клеточные линии: карцинома толстой кишки человека (HT-29), почки африканской зеленой мартышки (Vero и его клоны: Vero E6, Vero M, №1 и №2), почки обезьяны макака-резус (MA-104), почки собаки спаниэля (MDCK);

в) первичная культура фибробластов мыши (MEF).

Клетки выращивали в питательных средах DMEM («РАА», Австрия), MEM («Sigma», США), Игла («РАА», Австрия), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 200 mM L-глутамина, 4,5 г/л глюкозы и антибиотиков (по 200 Ед/мл) в культуральных флаконах (матрасах) фирмы «Nunc» (США) объемом 50 мл при 37°C в инкубаторах с регулируемой подачей двуокиси углерода (5% CO₂) и 95% влажности. До проведения исследований клеточные линии хранились в жидком азоте (-196°C). Клетки тестировались на различных пассажах от 3 до 40.

Деконсервация клеток

При размораживании ампулы с клетками из жидкого азота переносили в водяную баню на 37°C. После полного оттаивания суспензию клеток переносили в стерильную пробирку, содержащую 10 мл холодной неполной ростовой среды, отмывали один раз путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 7 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали в полной ростовой среде и засеивали в культуральный флакон объемом 50 мл. Клетки культивировали до образования монослоя в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 3-4 суток. Окраску и подсчет жизнеспособных клеток проводили в камере Горяева с помощью окрашивания клеток 0,4% трипановым синим.

Микроскопическое наблюдение и подсчет клеток проводился с помощью инвертированного микроскопа «Zeiss» (Germany). Пассирование клеточных культур проводили с интервалом 4-5 дней. Для снятия клеток после образования конфлуентного монослоя применяли смесь растворов 0,25% трипсина и 0,02% Версена («Sigma»).

Клеточные лизаты

Для деструкции клеточных мембран и высвобождения ДНК культуру клеток обрабатывали лизирующим раствором из комплекта «ДНК-сорб-АМ» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в присутствии частиц сорбента. В каждую пробирку вносили по 20 мкл универсального сорбента, после чего вносили по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Выделение геномной ДНК

Выделение ДНК из культуры клеток проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ».

Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клеточного материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 30 секунд и последующей отмывкой, с добавлением 1 мл отмывочного раствора.

Для получения высокоочищенного препарата ДНК, свободного от ингибиторов реакции амплификации, к сорбенту добавляли раствор для элюции ДНК.

ПЦР-амплификация

В ходе экспериментов была проведена оптимизация условий ПЦР с изменением концентрации MgCl₂ и температуры отжига праймеров. В результате амплификация была выполнена в 30 мкл реакционного объема, содержащего 1 мкл (10 пмоль) каждого праймера, 3 мкл 10x буфера, 16,2 мкл деионизованной воды, 5 мкл матричной ДНК, 2 mM MgCl₂, 1U ДНК-полимеразы и 0,6 мкл 2 mM dNTP. Амплификацию продуктов проводили в следующих условиях: 5 мин при 95°C для инициации денатурации, следующие 35 циклов, 30 сек при 95°C, 30 сек при 60°C, 1 мин при 72°C на амплификаторе «GeneAmp. PCRsystem 9700, ABI», с сохранением продуктов при -20°C. Были использованы специфичные праймеры:

1. (Homo sapiens (human) Hs-F-TAGACATCGTACTACACGACACG, Hs-R-TCCAGGTTTATGGAGGGTTC;

2. Canis familiaris (dog) Cf-F-GAAGTAGGTCAGCCCGGTAAT, Cf-R-TTCGGGGAATGCCATGTC;

3. Cercopithecus aethiops (Green Monkey) Ca-F-CTTCTTTCTGCTGCTAATG, Ca-R-TTTGATACTGGGATATGGCG;

4. Macaca mulatta (Rhesus monkey) Mmul-F-CCCACCCAGTTCAACTAAGC, Mmul-R-AATGGTGAAGGATGGGTTCG).

Праймеры были получены в лаборатории органического синтеза ИЦБ.

Чувствительность оценивали на основе последовательных десятикратных разведений суспензии клеток в питательной среде в концентрациях от 10 до 100000 клеток/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

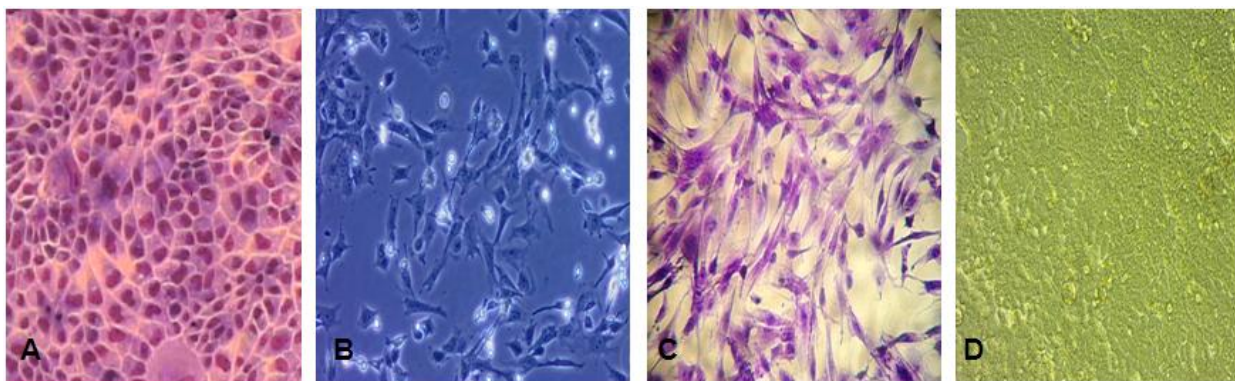
Чистота и точная характеристика используемой модели, которой во многих случаях служат постоянные клеточные культуры, являются абсолютно необходимым условием проведения биомедицинских научных исследований и требует их надежной идентификации.

Обычно клеточные культуры выращивают в богатой микроэлементами, витаминами, белковыми факторами питательной среде, которая может поддерживать усиленный рост любых контаминантов – микроорганизмов или посторонних культур клеток. Большинство бактериальных и грибковых загрязнений подавляют рост культуры в течение короткого периода времени и, как правило, видны невооруженным глазом. Для минимизации возможности загрязнения и распространения на другие клеточные линии любая культура клеток с визуальными и микроскопическими признаками контаминации не должна использоваться в исследованиях.

Наличие и использование в научных исследованиях разнообразных клеточных линий создает предпосылки перекрестной контаминации клетками других линий, обладающих более высокой пролиферативной активностью. Особенно это актуально для обеспечения безопасности продукта и поддержания постоянства производственных клеточных линий при получении биологических препаратов. В связи с тем, что в дальнейшем диплоидные клетки, полученные в нашей лаборатории, планируется применять как в регенеративной медицине, так и в физиологии и токсикологии, проведено определение видовой идентичности клеточных культур с использованием ПЦР-анализа. Высокая специфичность анализа ПЦР-диагностики обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный для каждого вида эукариот фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от метода иммуноферментного анализа, где нередки ошибки из-за перекрестной реакции антигенов. К тому же высокая чувствительность ПЦР-анализа позволяет выявлять даже единичные клетки в тех случаях, когда другими методами (микроскопическими или иммунологическими) это сделать невозможно. В ходе экспериментов была проведена оптимизация условий ПЦР с изменением концентрации $MgCl_2$ и температуры отжига праймеров.

Для проведения видовой идентификации проводили деконсервацию испытуемых диплоидных и перевиваемых клеточных линий, находящихся в жидком азоте: фибробласты крайней плоти человека (ФКПЧ 2/11), фибробласты кожно-мышечной ткани (ФЭЧ 2/09, ФЭЧ 3/09, ФЭЧ 5/11) и фибробласты легкого эмбриона человека (ЛЭЧ 2/12); карцинома толстой кишки человека (НТ-29), почки африканской зеленой мартышки (Vero и клон Vero Е6), почки обезьяны макака-резус (МА-104), почки собаки спаниэля (MDCK) и первичной культуры фибробластов мыши (MEF).

На рисунках 1 и 2 приведены некоторые из них.



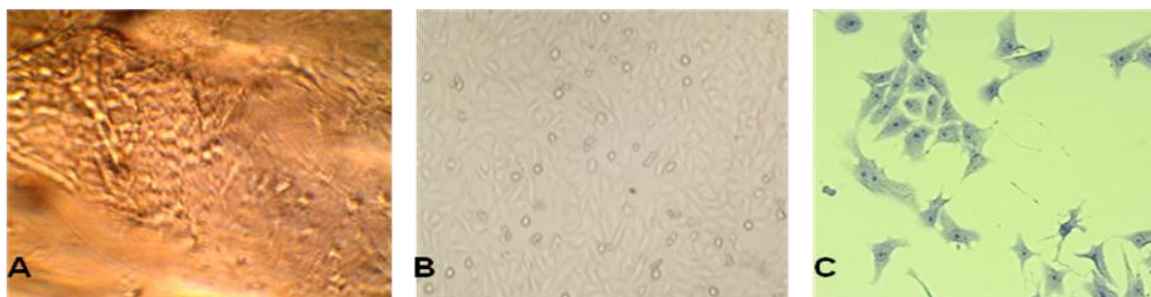
A - MDCK (окрашенные азур-эозином); B - MEF(окрашенные кристалл-виолетом); C - ФЭЧ-2 (окрашенные азур-эозином); увеличение 200x; D - HT-29 (неокрашенные), увеличение 100x

Рисунок 1 - Морфология клеточных культур

A - MDCK (dyed with azure-eosin); B - MEF (dyed with crystal violet); C - HEF-2 (dyed with azure-eosin): 200x magnification; D - HT-29 (unpainted) 100x magnification

Figure 1 - Morphology of cell cultures

Как видно из рисунка 1, культура клеток MDCK представлена эпителиоподобными клетками с четкими границами и крупными ядрами разнообразной формы, ядрышки крупные, от одного до нескольких в ядре. Цитоплазма ячеистая, патологических митозов не обнаружено. Другие линии почечного происхождения - MA-104 и Vero, в отличие от MDCK, имеют менее выраженную оболочку и 1-3 небольших ядра. Культура HT-29 также представлена эпителиоподобными клетками полигональной формы, с четкими хорошо выраженными границами и округлыми ядрами, которые растут колониями, равномерно распределяясь по всей поверхности культуральных матрасов. В последующих пассажах пролиферативная активность опухолевых клеток возрастает, культура становится морфологически однородной. Фибробласты же, как мышинные, так и человеческие, представляют собой удлиненные клетки веретеновидной формы с овальным ядром с 1-2 ядрышками и гомогенной, мелкосетчатой цитоплазмой.



A - клетки MA-104; B - клетки Vero, увеличение 100x (неокрашенные); C - клетки Vero, увеличение 200x (окрашивание кристалл-виолетом)

Рисунок 2 - Морфология клеток животных

A – MA-104 cells; B – Vero cells, magnification 100X (unstained); C - Vero cells, magnification 200x (crystal violet dyeing)

Figure 2 - Morphology of animal cells

Пересев культур проводили по мере формирования монослоя. Монослой при пассажах формировался на 3-5 сутки. Из матрасов с выросшим монослоем (90-95% поверхности) удаляли питательную среду, вносили в них подогретую до 37°C смесь растворов Версена (0,02%) и трипсина (0,25%) в соотношении 1:1 в количестве необходимом, чтобы покрыть весь клеточный монослой. Матрасы помещали в термостат на 3-5 минут для отделения клеток от поверхности. Клеточную взвесь тщательно пипетировали до образования однородной массы и добавляли свежую ростовую среду. Коэффициент пересева составлял 1:2 - 1:4, т.е. клетки, снятые с одного матраса, рассеивали на 2-4 аналогичных матраса. Оптимальная плотность пересева составляла $1,0-2,0 \times 10^4$ клеток/см². Клетки культивировали в питательных средах ДМЕМ или Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% влажности в течение 2-3 и более пассажей.

Необходимо отметить, что при микроскопировании монослоя клеток любого происхождения (человека или животных) визуально заметить наличие другого типа клеток невозможно (рисунок 2).

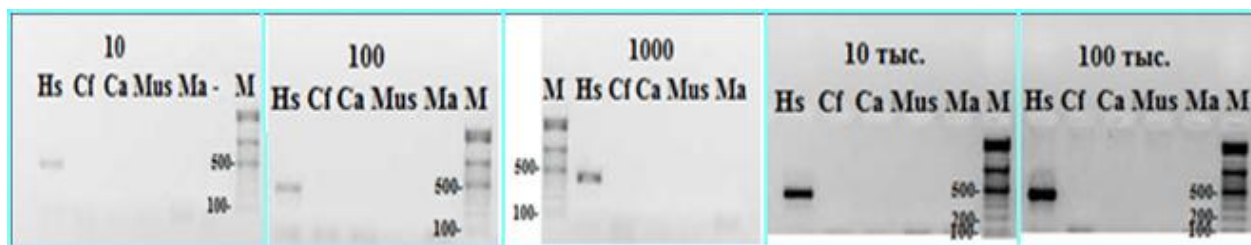
Анализ каталогов мировых специализированных коллекций клеточных культур и данных литературы показывает, что наиболее распространенными являются клеточные культуры, полученные от 12-ти видов млекопитающих, а именно: от человека, мыши, крысы, китайского хомячка, сирийского хомячка, зеленой африканской мартышки, коровы, свиньи, кролика, собаки, кошки, овцы и лошади. Для доказательства видовой идентичности и чистоты новых диплоидных и перевиваемых клеточных линий использовали стандартный ПЦР-анализ. На начальном этапе был осуществлен синтез видоспецифических праймеров с использованием последовательностей, предложенных V.Parodi et al. (2002). Последовательность олигонуклеотидных праймеров для определения видовой специфичности испытуемых клеточных культур млекопитающих (человека, африканской зеленой мартышки, макаки-резус, спаниеля и мыши) представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Последовательность олигонуклеотидных праймеров

Table 1 - The sequence of oligonucleotide primers

Размер, пн Size, bp	Вид Species	Название прямого праймера Name of the forward primer	Последовательность Sequence	Название обратного праймера Name of the reverse primer	Последовательность Sequence
391	Homo sapiens (human)	Hs-F	TAG ACA TCG TAC TAC ACG ACA CG	Hs-R	TCC AGG TTT ATG GAG GGT TC
172	Canis familiaris (dog)	Cf-F	GAAC TAGGTCAGC CCGGTACTT	Cf-R	TTCCGGGGGAAT GCCATGTC
222	Cercopithecus aethiops (Gr. Monkey)	Ca-F	CTTCTTTCTGCTG CTAATG	Ca-R	TTTGATACTGGG ATATGGCG
287	Macaca mulatta (rhesus monkey)	Mmul-F	CCCACCCAGTTCA ACTAAGC	Mmul-R	AATGGTGAAGG ATGGGTTCG
150	Mus musculus (mouse)	Mmus-F	ATTACAGCCGTAC GCTCCTAT	Mmus-R	CCCAAAGAATC AGAACAGATGC

Для проведения ПЦР-анализа была проведена оптимизация условий с изменением концентрации $MgCl_2$ и температуры отжига праймеров. Оптимизированные условия описаны в разделе «Материалы и методы». Для определения минимальной концентрации клеток, выявляемой при проведении ПЦР-диагностики с применением 2 mM $MgCl_2$, использовали десятикратные разведения клеточной суспензии от 100 000 до 10 клеток в 1 мл среды. Как видно из электрофореграммы на рисунке 3, продукт амплификации молекулярной массой 391 п.н. слабо, но все же визуализируется при электрофорезе в 2% агарозном геле с содержанием 0,01% бромид аэтидия, определяя наименьшее количество клеток, использованное в опыте. Данные результаты позволяют сделать вывод о возможности обнаружения примеси клеток другого вида млекопитающих при кросс-контаминации клеточной культуры в минимальных количествах и подтверждает чувствительность ПЦР-анализа.



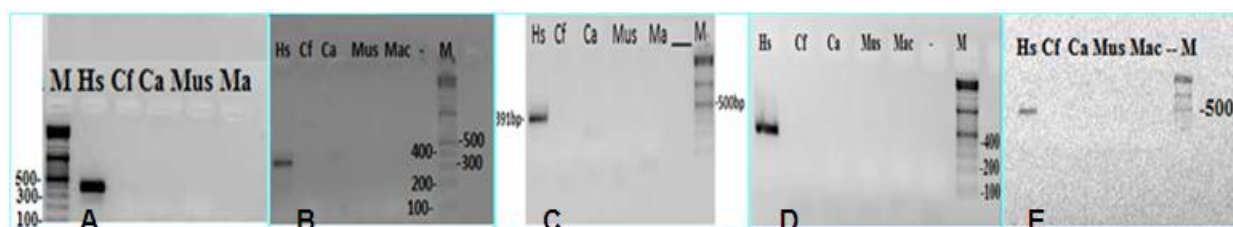
M - маркер длин ДНК; Hs – человек; Cf - собака; Ca – мартышка; Mus – мышь; Ma – макака резус

Рисунок 3 - Результаты оценки чувствительности оптимизированного протокола при различных концентрациях клеток ФЭЧ 5/11

M - DNA marker lengths; Hs - man; Cf - dog; Ca - monkey; Mus - mouse; Ma - rhesus macaque

Figure 3 - The results of evaluate the sensitivity of the optimized protocol at different HEF 5/11 cell concentrations

В следующей серии экспериментов проводили анализ клеточных линий человека, полученных в нашей лаборатории, таких как ФЭЧ-2, ФЭЧ-3, ЛЭЧ-2, ФКПЧ и перевиваемой карциномы кишечника НТ-29, культивируемых в течение различного периода времени (от 3 до 40 пассажей). Независимо от длительности пассирования клеточной культуры, не отмечено каких-либо изменений в спектре электрофоретического разделения, указывающих на контаминацию в процессе пересевов и на электрофоретических дорожках, выявлен только специфический продукт амплификации молекулярной массой 391 п.н. (рисунок 4). Используемые видоспецифические праймеры показали полное соответствие испытываемых клеточных культур исходному виду - человеку.



M - маркер длин ДНК; видоспецифические праймеры: Hs – человек; Cf - собака; Ca – мартышка; Mus – мышь; Ma – макака резус; A - ФЭЧ 2/09; B - ФЭЧ3/09; C - ФКПЧ 2/11; D - ЛЭЧ /12; E - НТ-29

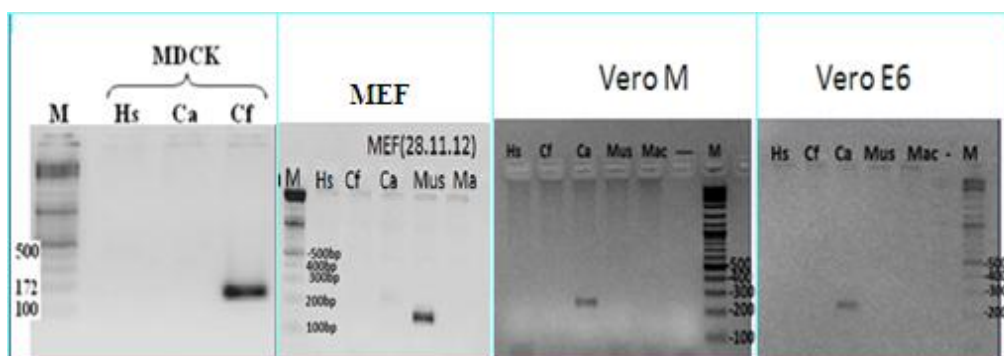
Рисунок 4 - Видовая идентификация клеточных линий человека

M - DNA marker lengths; Hs - man; Cf - dog; Ca - monkey; Mus - mouse; Ma - rhesus macaque; A – HEF 2/09; B – HEF 3/09; C – HFF 2/11; D – HLE /12; E – HT-29

Figure 4 - Species identification of human cell lines

Практически аналогичную картину наблюдали и при исследовании перевиваемых клеточных линий животного происхождения – клеток почек собаки MDCK, клонов клеток почек африканской зеленой мартышки Vero M и Vero E6 и фибробластов эмбрионов мышей MEF.

Как видно из рисунка 5, оптимизация условий проведения теста выявила специфические ПЦР-продукты амплификации генов молекулярной массой 172 п.н. в клетках MDCK, 150 п.н. в мышинных фибробластах, 222 п.н. в клонах Vero M и Vero E6 только на соответствующих этим видам млекопитающих электрофоретических дорожках. Полученные результаты свидетельствуют о специфичности метода.



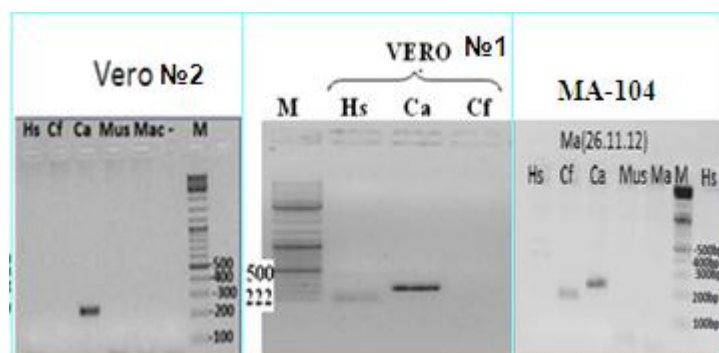
M - маркер длин ДНК; видоспецифические праймеры: Hs – человек; Cf - собака; Ca – мартышка; Mus – мышь; Ma – макака резус

Рисунок 5 - Видовая идентификация клеточных культур животного происхождения

M - DNA marker lengths; Hs - man; Cf - dog; Ca - monkey; Mus - mouse; Ma - rhesus macaque

Figure 5 - Species identification of cell cultures of animal origin

Исключение составили вариант культуры почек африканской зеленой мартышки Vero №1 и почки макаки резус МА-104, полученные из музея клеточных культур Института вирусологии им. Д. Ивановского (г. Москва) до 2010 года (рисунок 6).



M - маркер длин ДНК; видоспецифические праймеры: Hs – человек; Cf - собака; Ca – мартышка; Mus – мышь; Ma – макака резус

Рисунок 6 - Выявление кросс-контаминированных клеточных линий (Vero №2 – контроль)

M - DNA marker lengths; Hs - man; Cf - dog; Ca - monkey; Mus - mouse; Ma - rhesus macaque

Figure 6 - Identification of cross-contaminated cell lines (Vero №2 - control)

В результате исследования выявлена перекрестная контаминация вышеуказанных клеточных культур, в реакционной смеси которых присутствует ДНК человека и собаки соответственно, что свидетельствует о высокой специфичности разработанного протокола: Vero №1 примесными клетками человека и МА-104 примесными клетками собаки. Однако в остальных вариантах культуры клеток Vero, полученных из этой же клеточной коллекции позднее, кросс-контаминации другими клетками не обнаружено. Вероятно, контаминированные культуры клеток, содержащие ДНК других видов, были загрязнены в ходе использования в лаборатории и впоследствии элиминированы из банка клеток после 3-кратного подтверждения результатов.

Таким образом, проведена видовая идентификация клеточных культур млекопитающих с использованием оптимизированного ПЦР-анализа.

ВЫВОДЫ

Методом ПЦР проведен анализ видовой идентичности 6 новых казахстанских диплоидных штаммов и 5 перевиваемых клеточных культур с использованием видоспецифических праймеров к различным видам млекопитающих. Проведена оптимизация условий проведения ПЦР с изменением концентрации $MgCl_2$ и температуры отжига праймеров. Установлено, что оптимизация условий ПЦР позволяет определить в образце наличие 10 клеток/мл. Выявлено, что использованные видоспецифические праймеры показали полное соответствие испытываемых клеточных культур исходному виду млекопитающих.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории органического синтеза НЦБ за синтезирование видоспецифических праймеров.

Работа выполнялась по проекту «Разработка технологии получения клеточного препарата для лечения ожогов и длительно незаживающих ран» по бюджетной программе 026 «Предоставление инновационных грантов в рамках направления Производительность - 2020», финансируемой Министерством индустрии и новых технологий Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубев Д.Б., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. - Л.: Медицина, 1976. – 224 с.
2. Червонская Г.П. Культура клеток - альтернативная биологическая модель в токсикологических исследованиях // Тезисы докладов 1 съезда токсикологов России. – М., 1998. – С. 328.
3. Knäblein J., Barrett P. N. Portsmouth D., Ehrlich H.J. Accelerated Biopharmaceutical Development: Vero Cell Technology and Pandemic Influenza Vaccine Production // In: Modern Biopharmaceuticals: Recent Success Stories. – 2013.
4. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. Culture of Cells for Tissue Engineering. – N-Y.: Gardners Books, 2006.
5. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Туманов В.П. Метод хирургического лечения ожогов у детей с использованием культивированных аллофибробластов человека: Методические рекомендации. - М., 1997. – С. 15.
6. Sun L.Y., Lin S.Z., Li Y.S., Harn H.J., Chiou T.W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research // Cell Transplant. - 2011. - №20(1). - P. 49-62 // <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887678>
7. WHO TRS №927. Requirements for the use of animal cells in vitro substances for the production of biologicals. – Geneva, 2005.
8. Gartler S.M. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell line // Nature. – 1968. – Vol. 217(5130). – P. 750-751.
9. Nelson-Rees W.A., Daniels D., Flandermeyer R.R. Cross-contamination of cells in culture // Science. – 1981. – Vol. 212. – P. 446-452.
10. Stacey G.N. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action no // Nature. – 2000. – Vol. 403(6768). – P. 356.
11. Masters J.R. False cell lines: the problem and the solution // Cytotechnology. – 2002. – Vol. 39. – P. 17–22 // <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022908930937>
12. Masters J.R., Thomson J.A., Daly-Burns B., Reid Y.A., Dirks W.G., Packer P., Toji L.H., Ohno T., Tanabe H., Alrett C.F., Kelland L.R., Harrison M., Virmani A., Ward T.H., Ayres K.L., Debenham P.L. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines // PNAS. – 2001. – Vol. 98, №14. – P. 8012-8017.

13. Steube K.G., Koelz A.-L., Uphoff C.C., Drexler H.G., Kluess J., Steinberg P. The necessity of identity assessment of animal intestinal cell lines: A case report // *Cytotechnology*. – 2012. – Vol. 64(4). – P. 373–378 // [http://dx. doi.org/10.1007/s10616-011-9420-3](http://dx.doi.org/10.1007/s10616-011-9420-3)
14. Hay R.J. Methods for authenticating cell lines // *Dev. Biol. Stand.* – 1992. – Vol. 76. – P. 25-37.
15. Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., Drexler H.G., Kohara A., MacLeod R.A., Masters J.R., Nakamura Y., Reid Y.A., Reddel R.R., Freshney R.I. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines // *Int. J. Cancer*. - 2010. - Vol. 127(1). - P. 1-8.
16. Маргулис Б.А. Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа // *Методы культивирования клеток*. – Л.: Наука, 1988. – С. 98-103.
17. Parodi B., Aresu O., Bini D., Lorenzini R., Schena F., Visconti P., Cesaro M., Ferrera D., Andreotti V., Ruzzon T. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method // *Biotechniques*. – 2002. – Vol. 32(2). – P. 432–440.
18. Liu M.Y., Lin S.C., Liu H., Candal F., Vafai A. Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing // *In Vitro Cell Dev.Biol. Anim.* – 2003. – Vol. 39(10). – P. 424–427.
19. Lorenz J.G., Jackson W.E., Beck J.C., Hanner R. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2005. – Vol. 360 (1462). – P. 1869–1877.
20. Steube K.G., Meyer C., Uphoff C.C., Drexler H.G. A simple method using beta-globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines - a progress report // *In Vitro Cell DevBiol Anim.* – 2003. – Vol. 39(10). – P. 468–475.
21. Cooper J.K., Sykes G., King S., Cottrill K., Ivanova N.V., Hanner R., Ikonomi P. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach // *In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal.* – 2007. – Vol. 43. – P. 344–351.
22. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA // *Nature*. – 1985. – Vol. 314. – P. 67-73.
23. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual-specific “fingerprints” of human DNA // *Nature*. – 1985. – Vol. 316. – P. 76-79.
24. Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls // *Bioassays*. – 2007. – Vol. 29, №2. – P. 188-197.
25. Nims R.W., Sykes G., Cottrill K., Ikonomi P., Elmore E. Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification // *In Vitro Cell. Dev.Biol. Anim.* – 2010. – Vol. 46 (10). – P. 811-819 // [http:// dx.doi: 10.1007/s11626-010-9352-9](http://dx.doi.org/10.1007/s11626-010-9352-9).
26. Sellathamby S., Balasubramanian P., Sivalingan S., Shaji RV., Mathews V., George B., Viswabandya A., Srivastava A., Chandy M. Post-Transplant Events Developing an algorithm of informative markers for evaluation of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplantation*. – 2006. – Vol. 37. – P. 751-755.
27. Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A., Dirks W.G., Elmore E., Furtado M., Kline M.C., Kohara A., Los G.V. et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells and tissues // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2010. – Vol. 46(9). – P. 727-32.
28. Маркарян А.Ю., Бахарев А.А., Устьянцев П.В. Возможности стандартизации клеточных культур с помощью метода генотипирования короткими tandemными повторами // http://www.cytspb.rssi.ru/eotk/markaryan_27_ru.pdf
29. Бутовская П.П. Соматический мозаицизм у человека и мыши по данным мультилокусного маркирования ДНК: автореф. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 23 с.

30. Ye Y., Wu J., Luo H.B., Wang Z., Li Y.B. Multiple amplification of 16SrRNA gene and Cyt b gene in mitochondrial DNA for species identification // *Fa Yi Xue Za Zhi.* – 2008. – Vol. 24, №4. – P. 259-61.

31. Ono K., Motonobu S., Yoshida T, Ozawa Y., Kohara A., Takeuchi M., Mizusawa H., Sawada H. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2007. – Vol.43. – P. 168–175 // [http:// dx.doi: 10.1007/s11626-007-9033-5](http://dx.doi.org/10.1007/s11626-007-9033-5)

32. Кулешов К.В. Определение видовой принадлежности клеточных культур методами молекулярно-генетического анализа: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. – Щелково, 2009. – С. 150.

REFERENCES

1. Golubev D.B., Somnina A.A., Medvedeva M.N. *Rukovodstvo po primeneniju kletochnyh kultur v virusologii* [Guidance on the application of cell cultures in virology]. Leningrad, Medicina, 1976, 224 p.

2. Chervonskaja G.P. *Kultura kletok — alternativnaja biologicheskaja model v toksikologicheskikh issledovaniyah* [Cell Culture - an alternative biological model in toxicological studies.] *Tezisy dokladov 1 sezda toksikologov Rossii.* M., 1998, pp. 328.

3. Knäblein J., Barrett P. N. Portsmouth D., Ehrlich H.J. Accelerated Biopharmaceutical Development: Vero Cell Technology and Pandemic Influenza Vaccine Production. In: *Modern Biopharmaceuticals: Recent Success Stories*, 2013: [http://dx.doi.org/ 10.1002/9783527669417.ch16](http://dx.doi.org/10.1002/9783527669417.ch16)

4. Vunjak-Novakovic G., Freshney R.I. *Culture of Cells for Tissue Engineering.* N-Y, Gardners Books, 2006.

5. Fedorov V.D., Sarkisov D.S., Tumanov V.P. *Metod hirurgicheskogo lechenija ozhogov u detej s ispolzovaniem kultivirovannyh allofibroblastov cheloveka: metodicheskie rekomendacii* [Guidelines "Method of surgical treatment of burns in children using cultured human allofibroblasts"]. Moskva, 1997, pp. 15.

6. Sun L.Y., Lin S.Z., Li Y.S., Harn H.J., Chiou T.W. Functional cells cultured on microcarriers for use in regenerative medicine research. *Cell Transplant.* 2011, vol. 20(1), pp. 49-62: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887678> : [http://dx. doi: 10.3727/096368910X532792](http://dx.doi.org/10.3727/096368910X532792).

7. WHO TRS №927. *Requirements for the use of animal cells in vitro substances for the production of biologicals.* Geneva, 2005.

8. Gartler S.M. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell line. *Nature*, 1968, vol. 217(5130), pp.750-751.

9. Nelson-Rees W.A., Daniels D., Flandermeyer R.R. Cross-contamination of cells in culture. *Science*, 1981, vol. 212, pp. 446-452.

10. Stacey G.N. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action no. *Nature*, 2000, vol. 403(6768), pp. 356.

11. Masters J.R. False cell lines: the problem and the solution. *Cytotechnology*, 2002, vol. 39, pp. 17–22: [http://dx. doi.org/10.1023/A:1022908930937](http://dx.doi.org/10.1023/A:1022908930937)

12. Masters J.R., Thomson J.A., Daly-Burns B., Reid Y.A., Dirks W.G., Packer P., Toji L.H., Ohno T., Tanabe H., Alrett C.F., Kelland L.R., Harrison M., Virmani A., Ward T.H., Ayres K.L., Debenham P.L. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *PNAS*, 2001, vol. 98, no. 14, pp. 8012-8017.

13. Steube K.G., Koelz A.-L., Uphoff C.C, Drexler H.G., Kluess J., Steinberg P. The necessity of identity assessment of animal intestinal cell lines: A case report. *Cytotechnology*, 2012, vol. 64(4), pp. 373–378: [http://dx. doi.org/10.1007/s10616-011-9420-3](http://dx.doi.org/10.1007/s10616-011-9420-3)

14. Hay R.J. Methods for authenticating cell lines. *Dev. Biol. Stand*, 1992, vol. 76, pp. 25-37.

15. Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., Drexler H.G, Kohara A., MacLeod R.A., Masters J.R., Nakamura Y., Reid Y.A., Reddel R.R., Freshney R.I. Check your cultures! A list of

cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer*, 2010, vol. 127(1), pp. 1-8.

16. Маргулис Б.А. Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа. *Методы культивирования клеток*. Л., Наука, 1988, С. 98-103.

17. Parodi B., Aresu O., Bini D., Lorenzini R., Schena F., Visconti P., Cesaro M., Ferrera D., Andreotti V., Ruzzon T. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method. *Biotechniques*, 2002, vol. 32(2), pp. 432–440.

18. Liu M.Y., Lin S.C., Liu H., Candal F., Vafai A. Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2003, vol. 39(10), pp. 424–427.

19. Lorenz J.G., Jackson W.E., Beck J.C., Hanner R. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2005, vol. 360(1462), pp. 1869–1877.

20. Steube K.G., Meyer C., Uphoff C.C., Drexler H.G. A simple method using beta-globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines - a progress report. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2003, vol. 39(10), pp. 468–475.

21. Cooper J.K., Sykes G., King S., Cottrill K., Ivanova N.V., Hanner R., Ikonomi P. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.*, 2007, vol. 43, pp. 344–351.

22. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature*, 1985, vol. 314, pp. 67-73.

23. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 1985, vol. 316, pp. 76-79.

24. Waugh J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioassays*, 2007, vol. 29, no. 2, pp. 188-197.

25. Nims R.W., Sykes G., Cottrill K., Ikonomi P., Elmore E. Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2010, vol. 46(10), pp. 811-819: [http:// dx.doi: 10.1007/s11626-010-9352-9](http://dx.doi:10.1007/s11626-010-9352-9)

26. Sellathamby S., Balasubramanian P., Sivalingan S., Shaji R.V., Mathews V., George B., Viswabandya A., Srivastava A., Chandy M. Post-Transplant Events Developing an algorithm of informative markers for evaluation of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2006, vol. 37, pp. 751-755.

27. Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A., Dirks W.G., Elmore E., Furtado M., Kline M.C., Kohara A., Los G.V. et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells and tissues. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2010, vol. 46(9), pp. 727-32.

28. Markarjan A.Ju., Baharev A.A., Ust'jancev P.V. *Vozmozhnosti standartizacii kletchnyh kul'tur s pomoshh'ju metoda genotipirovanija korotkimi tandemnymi povtorami* [Possibilities for the standardization of cell cultures using the genotyping short tandem repeats]: http://www.cytspb.rssi.ru/eotk/markaryan_27_ru.pdf

29. Butovskaja P.R. *Somaticeskij mozaicizm u cheloveka i myshi po dannym mul'tilokusnogo markirovanija DNK: avtoref.kand. biol. Nauk* [Somatic mosaicism in human and mouse according to multilocus DNA labeling]. Moskva, 2010, 23 p.

30. Ye Y., Wu J., Luo H.B., Wang Z., Li Y.B. Multiple amplification of 16SrRNA gene and Cyt b gene in mitochondrial DNA for species identification. *Fa Yi Xue Za Zhi.*, 2008, vol. 24, no. 4, pp. 259-61.

31. Ono K., Motonobu S., Yoshida T., Ozawa Y., Kohara A., Takeuchi M., Mizusawa H., Sawada H. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 2007, vol. 43, pp. 168–175: [http:// dx.doi: 10.1007/s11626-007-9033-5](http://dx.doi:10.1007/s11626-007-9033-5)

32. Kuleshov K.V. *Opreделение vidovoj prinadlezhnosti kletochnyh kul'tur metodami molekulyarno-geneticheskogo analiza*: diss. kand. biol. nauk: 03.00.23 [Determining the species of cell cultures by molecular genetic analysis]. Shhelkovo, 2009, pp. 150.

ТҮЙІН

Үздіксіз өсірілетін жасушалар өмір туралы ғылымдарының төңірегінде үлкен ғылыми зерттеулер ортасы үшін кең қолданыстағы үлгілерді алға тартады. Осыған қарамастан жасуша культуралары негізгі сипаттамасын өзгерту үрдісін көрсете алады, ол өсіру жағдайымен және бөгде агенттермен залалдануы болып табылады. Әдетте зерттеушілер сүтқоректілердің жасуша культурасымен жұмыс кезінде әр түрлі микроағзалармен (бактериямен, ашытқымен, микоплазмамен) залалдануы уайымдатады, осы кезде басқа жасуша культуралар түрімен айқасып залалдануы (түрішілік және тұраралық секілді) байқалмай қалуы мүмкін. Көп жағдайда тұрақты жасуша культурасы болып табылатын, қолданылатын модельдің нақты сипаттамасы мен тазалығы, биомедициналық ғылыми зерттеулер жүргізуде абсолютті қажетті жағдай болып табылады және олардың сенімді идентификациясын талап етеді. Ғылыми зерттеулерде 50%-ға дейін қолданылатын жасуша культураларының, жасуша линияларының идентификациялайтын Халықаралық комитеттің мәліметтеріне сәйкес, сәйкестендірілуі қате немесе кросс-залалданған. Бұл дерек түрлік сәйкестендіру жүргізу қажеттілігінің айқын негізі болып табылады. Берілген жұмыста Қазақстанда алынған 6 диплоидты штамдардың түрлік сәйкестігін анықтау және Ұлттық биотехнология орталығының депозитариында орналасқан 5 үздіксіз өсірілетін жасуша культуралары нәтижелері келтірілген. Алуан түрлі сүтқоректілердің арнайы түрлік праймерлерін қолдану арқылы ПТР талдау жүргізілді. Тәжірибе жүргізу барысында, ПТР жүргізу жағдайын оңтайландыру, $MgCl_2$ концентрациясын өзгертумен және праймерлерді температурамен өңдеу жүргізілді. Зерттеулердің нәтижесінде жағдайдың оңтайлануы үлгідегі 10 жасуша/мл болуын анықтауға мүмкіндік беретіні бекітілді. Қолданылған арнайы түрлік праймерлер, сыналып отырған жасуша культураларының сүтқоректілердің бастапқы түріне толық сәйкестігін көрсетті.

Негізгі сөздер: жасуша культуралар, жасуша линияларын түрлік идентификациясы, ПТР, праймер.