

УДК 619:579.831.004.4+575+577.2

ПРИМЕНЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК

*Е.Ю. Хамзина, Ю.М. Кириллова, Э.М. Плотникова, Т.Х. Фаизов,
А.В. Гильман, Р.Х. Хусаенов*

Аннотация

Показана целесообразность комплексного, цитогенетического и молекулярно-генетического анализа в установлении видовой принадлежности неидентифицированной линии клеток для сертификации и паспортизации клеточных культур на примере немаркированной монослойной линии, растущей в стандартных условиях (среда Игла MEM с добавлением сыворотки крупного рогатого скота). В качестве объектов сравнения использовали перевиваемые линии клеток почек эмбриона коровы (MDBK) и почек африканской зеленой мартышки (Vero).

В результате кариологического анализа были установлены модальное число хромосом и интервал изменчивости. Методом ПЦР и кариологическими исследованиями показана принадлежность немаркированной клеточной культуры к перевиваемой клеточной линии MDBK.

Ключевые слова: хромосомы, кариология, культура клеток, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

В настоящее время культуры клеток широко применяются в самых разнообразных областях экспериментальной биологии и медицины для изучения и решения кардинальных проблем общей и частной вирусологии, онкологии, биохимии, биотехнологии и т. д. Чистота и точная характеристика используемой модели, которой во многих случаях служат постоянные клеточные линии, являются абсолютно необходимым условием работы и требуют их надежной идентификации [1]. В условиях культивирования клетки разных видов животных морфологически трудно различимы. Кроме того, нередко в результате технических ошибок персонала возможно перекрестное заражение клетками разных линий, что происходит довольно часто [2]. Видовая идентификация является одной из основных процедур сертификации и паспортизации культур клеток при создании банка клеточных культур.

Наиболее распространенным методом определения видовой принадлежности является кариологический анализ, однако высокая кариотипическая изменчивость, которая отражается в изменении модального числа хромосом путем появления маркерных хромосом, усложняет оценку кариотипа. В качестве альтернативного метода для видовой идентификации клеточных культур и выявления факта возможной контаминации клетками иного видового происхожде-

ния используют молекулярно-генетические методы, и в частности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В настоящей работе показана возможность комплексного цитогенетического и молекулярно-генетического анализа видовой идентификации немаркированной перевиваемой линии клеток криобанка.

Материалы и методы

Объектом исследования служила неидентифицированная линия клеток, растущая монослоем на среде Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и канамицин) по 100 ед/мл. В качестве объектов для сравнения использовали перевиваемые линии клеток MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney Cells*, крупный рогатый скот, почка) и Vero (*Vero cells line*, зеленая мартышка, почка), относящиеся к разным видам животных и хранящиеся в одном контейнере с исследуемой культурой. Для приготовления препаратов использовали суточные культуры клеток исследуемых линий, которые инкубировали в стандартных условиях [3]. Приготовление препаратов осуществлялось по методу Мурхеда [4]. Подсчет числа хромосом в пластинках проводили под иммерсией с помощью микроскопа АУ-12, увеличение ок. 15, об. 90. В ходе работы было подсчитано 100 метафазных пластинок.

Для получения образцов ДНК культуры трипсинизировали и ресуспендировали в STE-1 буфере (0.1 М NaCl, 0.1 М трисHCl, 0.001 М EDTA, pH 7.4). Выделение нуклеиновых кислот осуществляли с помощью фенольно-хлороформной экстракции [5]. Для дифференциации культуры клеток и индикации использовали произвольный праймер № 29 (3'-CCGGCCTTAC-5'). Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием 5 нг ДНК в следующей реакционной смеси из расчета на 1 пробу объемом 13.5 мкл: 0.2 мМ dNTP, 1 мкМ праймеров, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы в соответствующем 1-кратном буфере (ООО «СибЭнзим», г. Москва), минеральное масло для ПЦР – 20 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Россия) при соответствующих условиях: 94 °С – 30 с, 38 °С – 30 с, 72 °С – 40 с, 40 циклов. Продукты ПЦР анализировали в 2%-ном агарозном геле (1ХТВЕ, режим постоянного напряжения 150 В) с последующим окрашиванием этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовался ДНК-маркер 100bp+1.5Kb+3Kb (ООО «СибЭнзим», г. Москва). Результаты электрофореза были визуализированы при 254 нм с помощью цифрового фотоаппарата и обработаны в программе Quantity One 1-D Analysis Software, версия 4.6.3 (BioRad, США).

Вирусологические исследования по выявлению цитопатического действия (ЦПД) на культуры клеток проводили с использованием вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) вакцинного штамма ТК-А(ВИЭВ)-В2 (ВИЭВ, г. Москва) адаптированного к росту на линии MDBK и реовируса 1-го типа референтного штамма Lang (Великобритания), к которому чувствительна линия Vero. Данное исследование проводилось для подтверждения видовой принадлежности немаркированной линии клеток к культуре MDBK.

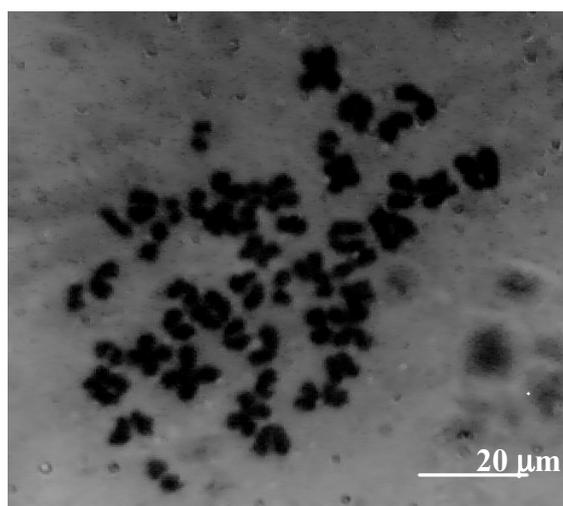


Рис. 1. Метафазная пластинка неидентифицированной культуры клеток. Ув. ок. 15, об. 90

Табл. 1

Модальный класс и пределы варьирования числа хромосом

Название	Немаркированная линия	MDBK	Vero
Интервал изменчивости	26–59	40–75	53–60
Модальное число хромосом	36–40	42	53–60

Результаты

При подсчете числа хромосом установлено, что исследуемая клеточная линия характеризовалась модальным числом хромосом в пределах 36–40, при этом предел изменчивости для исследуемой линии составлял от 26 до 59 хромосом (рис. 1).

При сравнении полученных результатов с данными каталога специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных [6] нами было определено, что данная культура по модальному числу хромосом наиболее близка к перевиваемой линии клеток почек эмбриона коровы MDBK (табл. 1).

В результате исследований морфологии клеточного монослоя исследуемой линии показано, что монослой формируется на 3–4-е сутки после пересева и представлен, как и у MDBK, эпителиоподобными клетками, в отличие от фибробластоподобного роста клеток Vero (рис. 2).

С помощью ПЦР-амплификации с произвольным праймером № 29 были получены ДНК-профили контрольных образцов и ДНК-профиль исследуемой культуры. В зависимости от разновидности клеток было получено от 10 до 11 паттернов с молекулярной массой от 264 до 1508 пар нуклеотидов (рис. 3).

Согласно полученным результатам ДНК-профиль неизвестной культуры практически идентичен ДНК-профилю перевиваемой культуры клеток MDBK, в то же время ДНК-профиль неидентифицированной культуры значительно отличается от профиля перевиваемой культуры клеток Vero. Так, в результате

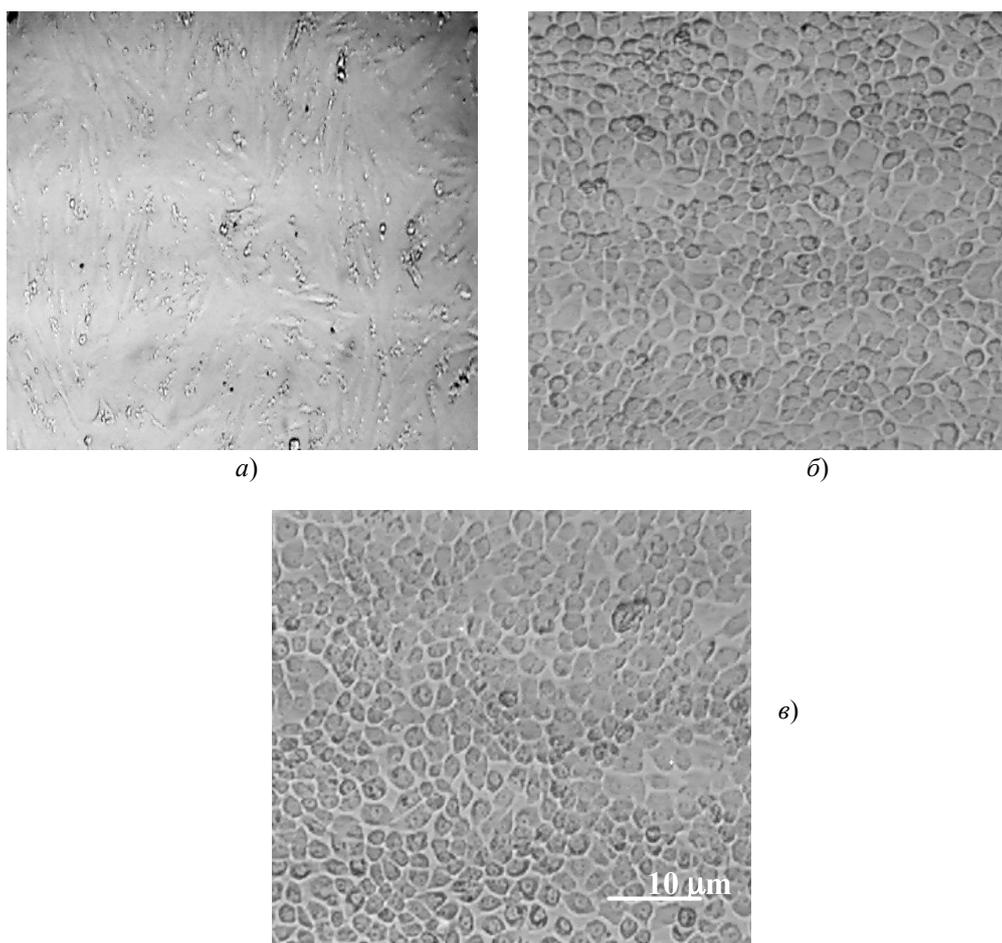


Рис. 2. Перевиваемая линия клеток Vero (а), MDBK(б), исследуемая линия (в). Ув. ок. 10, об. 20

электрофореза продуктов ПЦР-амплификации ДНК линии MDBK и исследуемой культуры образуется 11 паттернов молекулярным весом 255, 278, 384, 404, 521, 569, 623, 707, 1085, 1175 и 1508 пар нуклеотидов. В результате ПЦР-анализа ДНК линии Vero образуется 10 паттернов с молекулярным весом 264, 390, 425, 475, 535, 615, 682, 760, 900 и 1083 пары нуклеотидов.

Наличие продуктов амплификации с молекулярным весом в 255, 278, 384, 404, 521, 567, 623, 708, 1084, 1175 и 1508 пар нуклеотидов, полученных в результате ПЦР с ДНК неидентифицированной культуры, служит маркером того, что исследуемая клеточная линия является перевиваемой линией MDBK и, наряду с кариотипированием, подтверждает данное заключение.

По данным вирусологического исследования немаркированная культура оказалась нечувствительной к реовирусу. При внесении в клеточный монослой вируса ИРТ на 48–96-й час после заражения отмечалось его цитопатическое действие, проявляющееся зернистостью, округлением клеток с последующим формированием сферических синцитиев, содержащих по 10–20 ядер.

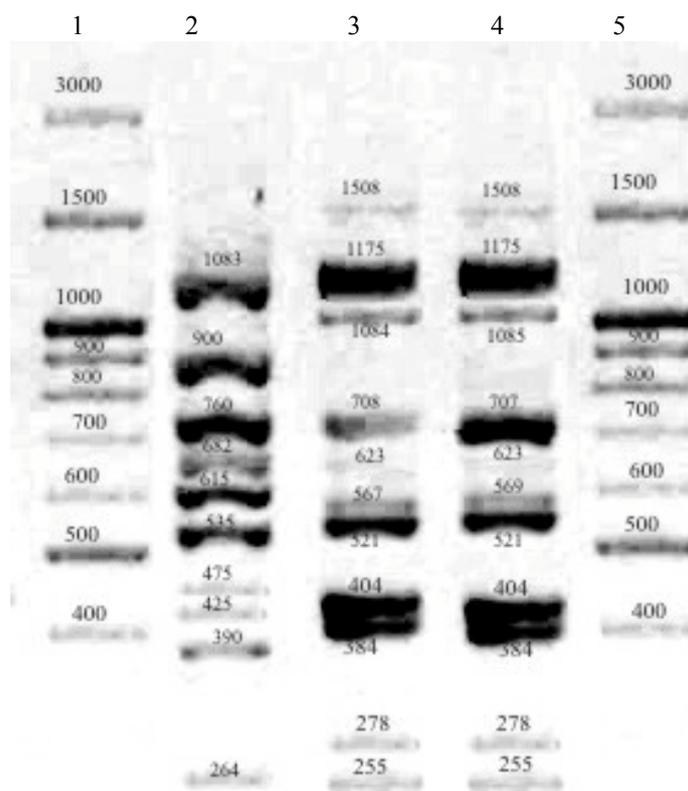


Рис. 3. Результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации образцов ДНК. Треки 1, 5 – маркеры молекулярного веса, трек 2 – линия VERO, трек 3 – исследуемая культура, трек 4 – линия MDBK

Обсуждение результатов

По характеру роста клеток в монослое и результатам кариологического анализа нами было установлено сходство неидентифицированной линии клеток с перевиваемой линией MDBK. Неточное соответствие модального числа хромосом MDBK (42) и исследуемой культуры (36–40) может быть связано с высокой наследственной изменчивостью перевиваемых линий клеток, которая наблюдается при длительном их культивировании под действием меняющихся условий внешней среды: питательные среды, pH, сыворотка, биологически активные добавки [7].

Результаты электрофореза продуктов амплификации ДНК исследуемой культуры (контрольных линий) показывают идентичность неизвестной культуры и перевиваемой культуры клеток MDBK, в то же время показаны значительные различия между исследуемой культурой и линией Vero.

По результатам анализа данных электрофореза с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software (версия 4.6.3) построена дендрограмма, дающая четкое определение сходства ДНК-профилей перевиваемой культуры клеток MDBK и немаркированной культуры. Степень совпадения составляет 97%, что фактически означает идентичность линий (рис. 4).

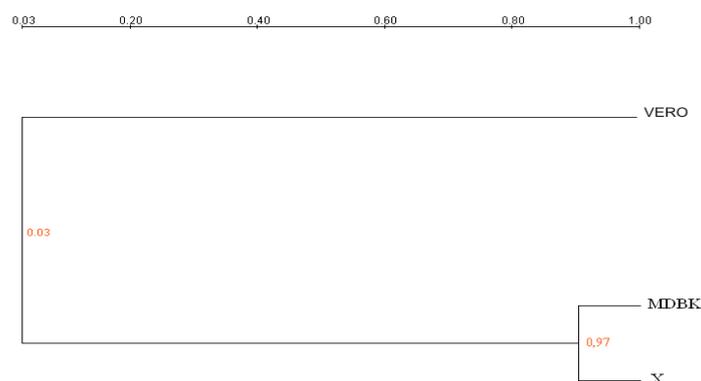


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основании анализа электрофореграммы продуктов амплификации с произвольным праймером № 29 программой Quantity One 1-D Analysis Software (версия 4.6.3). Числами обозначена степень сходства при шкале от 0 до 1, где 1 – идентичность

Результаты вирусологических исследований подтверждают данные кариологического анализа и ПЦР об идентификации немаркированной культуры как перевиваемой линии клеток MDBK.

Таким образом, комплексный кариологический и молекулярно-генетический анализ позволяет определять видовую принадлежность перевиваемых культур клеточных линий, что подтверждается результатами вирусологических исследований. Данный подход может быть реализован для определения видовой идентификации, сертификации и паспортизации перевиваемых клеточных линий.

Summary

E.Yu. Khamzina, Yu.M. Kirillova, E.M. Plotnikova, T.Kh. Faizov, A.V. Gilman, R.Kh. Khusaenov. Application of Cytogenetic and Molecular-Genetic Methods for Specific Identification of Finite Cell Lines.

This article shows the necessity of an integrated cytogenetic and molecular-genetic analysis in specific identification of a non-identified cell line for certification of cell cultures on the example of a non-tagged monolayer line growing in standard conditions (Eagle's MEM with cattle serum). Finite MDBK and Vero cell lines were used for comparison. As a result of karyological analysis, modal chromosome number and variability interval were determined. Karyological research and PCR analysis showed that the non-tagged cell culture belongs to the finite MDBK cell line.

Key words: chromosome, karyology, cell culture, PCR.

Литература

1. *Адамс Р.* Методы культуры клеток для биохимиков. – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. Клеточные культуры. Информ. бюл. / Отв. ред. М.С. Богданова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – Вып. 26. – 61 с.
3. *Куляшов К.В.* Определение видовой принадлежности культур клеток методами молекулярно-генетического анализа. Дис. ... канд. биол. наук. – Щелково, 2009. – 150 с.
4. *Moorhead P.S., Nowell P.S., Mellman W.I.* Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // *Exper. Cell Res.* – 1960. – V. 20. – P. 613–616.

5. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных промысловых животных РККК(П), (СХЖ РАСХН): Каталог / Л.П. Дьяконов и др. – М., 2006. – 115 с.
7. Методы культивирования клеток / Под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.

Поступила в редакцию
25.10.11

Хамзина Елена Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

E-mail: lenahamzina@yandex.ru

Кириллова Юлия Марсельевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

Плотникова Эдия Миначетдиновна – доктор ветеринарных наук, доцент ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

Фаизов Тагир Хадиевич – доктор ветеринарных наук, профессор ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

Гильман Агнесса Вячеславовна – младший научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.

Хусаенов Рим Халимович – младший научный сотрудник ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань.