

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

Плотникова Э.М., Закурова Е.Ю., Иванов А.В., Фаизов Т.Х.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
г. Казань, Российская Федерация

В последнее время, как в нашей стране, так и за рубежом проводится интенсивная работа по использованию ПЦР-теста в ветеринарной медицине. Использование ПЦР позволяет провести скрининг микробной контаминации биологических проб лошадей, К. В. Кулешов использовал ПЦР-тест в реальном времени (ПЦР-РВ) для видовой идентификации клеточных культур [3]. 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 происхождения 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 не идентифицированная линия клеток, растущая монослоем на среде Игла MEM с добавлением 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотиков (ципрофлоксацин, энроксил, 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 AV-12, увеличение ок. 15, об. 90. В ходе работы было подсчитано 100 мета-фазных пластинок.

Для получения образцов ДНК культуры трипсинизировали и ресуспендировали в STE-1 буфере (0.1 M NaCl, 0.1 M трис-HCl, 0,001 M 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 мМ 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 (1ХТБЕ, 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 не маркированной линии клеток к культуре MDBK.

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

Результаты исследований. 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.

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 (таблица).

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

В наших исследованиях была сделана попытка дифференциации разных видов перевиваемых культур клеток Vero и MDBK с помощью производственных праймера. Принцип действия произвольных праймеров заключается в выявлении tandemных повторов в ДНК любых организмов. Известно, что они комплектарны к консервативным, повторяющимся участкам ДНК и строго специфичны для каждого вида организмов. В результате ПЦР мы получали и «генетический паспорт» каждого вида культур клеток.

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.

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 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.

По характеру роста клеток в монослой 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.

Выводы. 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.

Список литературы

1. *Адамс, Р.* Методы культуры клеток для биохимиков [Текст] / *Р. Адамс.* – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. Клеточные культуры [Текст]: 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 [Текст]: дис. ... канд. биол. наук / *К.В. Куляшов.* – Щелково, 2009. – 150 с.
4. *Moorhead, P.S.* Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood [Text] / *P.S. Moorhead, P.S. Nowell, W.I. Mellman* // *Exper. Cell Res.* – 1960. – Vol. 20. – P. 613–616.
5. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование [Текст] / *Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук*: пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных промысловых животных РККК (П), (СХЖ РАСХН) [Текст]: каталог / *Л.П. Дьяконов* [и др.]. – М., 2006. – 115 с.
7. Методы культивирования клеток [Текст] / под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.

APPLICATION OF CYTOGENETIC METHODS FOR VARIETY IDENTIFICATION OF ANIMAL CELLS LINES

Plotnikova E.M., Zakirova E.Yu., Ivanov A.V., Faizov T.Kh.

The Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

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). 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.

УДК 619:616.98:579.873.21-07

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ОЧИЩЕННОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЛЕРГЕНА (ОСА) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Притыченко А.Н.

УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Лысенко А.П.

РНИУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАНБ», г. Минск, Республика Беларусь

С введением в практику аллергической диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота считалось, что туберкулин – строго специфичный диагностикум [1, 4, 5]. По мере ликвидации туберкулеза обозначилась проблема реагирующих на туберкулин коров, не имевших на секции изменений, свойственных туберкулезу [1, 4]. Установлено, что наряду с латентной туберкулезной инфекцией, причиной реакций на туберкулин могут быть нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) [8]. С помощью референс-системы антигенов *M. bovis* БЦЖ и перекрестного иммуноэлектрофореза установлено, что до 90 % антигенов *M. bovis*, могут встречаться у НТМБ, а также у *Nocardia asteroides* и *Corynebacterium pyogenes* [3].

В процессе получения ППД туберкулина и его очистки происходит лишь количественное снижение концентрации общеродовых полисахаридных антигенов, а набор антигенов исходного культурального фильтрата сохраняется в целевом продукте [2].

Исследование видовой специфичности ППД туберкулина на крупном рогатом скоте показало, что она не превышает 30 % [9]. Парааллергические реакции на туберкулин наносят значительный экономический ущерб из-за убоя фактически здоровых животных.

Предприняты многочисленные попытки повышения видовой специфичности туберкулина и выделения видоспецифических антигенов *M. bovis* [5, 8, 9]. По данным Closs et al. [9] лишь антигены №2, 3, 5, 21, 46, 63, 70, 81, 84 из спектра более чем 100 антигенов, были специфичны для *M. bovis* [9]. Вместе с тем, углубленное изучение видовой специфичности выявило, что их число ограничивается несколькими антигенами, в первую очередь МРВ 70 с молекулярной массой 22–24 кДа, в зависимости от степени