

## ВОЗМОЖНОСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КОРОТКИМИ ТАНДЕМНЫМИ ПОВТОРАМИ

*А.Ю. Маркарян, А.А.Бахарев, П.В. Устьянцев*

ФГУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург,

Virus@etel.ru

Представлены результаты, полученные при анализе культур человеческого происхождения банка-музея Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций (ЕНИИВИ). Использовали методику полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением моноплексов тетрамерных STR-локусов человека. Первичный анализ показал отсутствие кросс-контаминации исследованных культур, позволил уточнить генетические характеристики некоторых из них, выявить генетические различия в отдельных клонах. В результате работы установлено частичное совпадение длин амплифицированных фрагментов STR-локусов человека и культивируемых клеток африканской зеленой мартышки (линия Vero). Предполагается наличие гомологичных фрагментов геномов.

**Ключевые слова:** клеточные культуры, ПЦР, STR-локусы.

Вопросы стандартизации клеточных культур, используемых в вирусологии и биотехнологии, являются неотъемлемой частью исследований, связанных с их качественными характеристиками. Широкое применение культур клеток в экспериментальной, диагностической, производственной работе и прикладных исследованиях подразумевает длительное серийное пассирование, при котором клеточные культуры проявляют тенденцию к непрерывному изменению основных характеристик, обусловленному контаминацией различными агентами, приводящей к изменению кариотипа и генотипа, что требует ведения постоянного контроля и анализа.

Наряду с применением клеточных культур как модельных систем, широкое прикладное значение в последнее время они приобрели, в частности, в заместительной клеточной терапии, где диплоидные клетки выступают производителями и носителями стимуляторов роста - цитокинов, способствующих регенерации тканей у пациентов при лечении ожогов, пародонто, заживлении ран и т.д. [1].

Точная идентификация клеточных линий необходима для своевременного выявления

контаминации, связанной со случайным занесением материала от других культур. Так, в частности, исследование депозитария банка клеточных культур Германии выявило, что 18 % из 252-х заложенных "новых" линий оказались кросс-контаминированными [2].

Детекцию контаминации клеточных культур проводят с помощью изоферментного анализа, HLA-типирования, кариотипирования, а также анализа полиморфизма на уровне ДНК. Открытие гипервариабельных регионов ДНК привело к концепции ДНК-дактилоскопии или фингерпринту - достаточно точному и качественному методу оценки генома, основными недостатками которого являются трудоемкость и высокая стоимость [3,4]. Новая тенденция использования локус-специфических последовательностей, так называемых STR (Short Tandem Repeats)-локусов, расширяет возможности использования их в качестве маркеров для стандартизации и при мониторинге клеточных культур на предмет контаминации и/или обнаружения изменения генотипа.

Следовало бы отметить, что данные STR-маркеры нашли в настоящее время применение в судебной медицине, в филогенетической реконструкции последовательностей, а также ранней диагностике химеризма при трансплантации органов, аллогенных клеток костного мозга [5]. Высокая информативность STR-локусов выражается аллельными частотами, распределением последних и уровнем гетерозиготности (табл. 1).

Таблица 1. Краткая характеристика STR-локусов

| Наименование локуса | Хромосомная локализация | Число аллелей | Диапазон аллелей п.н. | Уровень гетерозиготности, % |
|---------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------------|
| VWA                 | 12p-12p ter             | 18 (10-25)    | 123-171               | 52,2                        |
| THO1                | 11p-15,5                | 9 (3-14)      | 156-195               | 72,1                        |

Последние качества дают возможность не просто проводить идентификацию личности, но также разрабатывать маркеры различных этнических групп. Данные выдающиеся факты не остались без внимания, и исследователи ряда ведущих институтов выступили с предложением использовать определенный набор локусов для стандартизации клеточных культур, основной ряд которых представлен тетраповторами и содержит 7 локусов [2].

### Материал и методы

В наших исследованиях применялся метод амплификации локусов посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием моноплексов, что сделало метод относительно независимым от дорогостоящего оборудования и комплектующих и достаточно доступным для любой лаборатории, обладающей минимальным набором молекулярно-биологического оборудования (табл. 2).

Таблица 2. Перечень праймеров STR-локусов, применяемых в эксперименте

| №<br>№ | Локус   | Длина повтора | Диапазон аллелей п.н. |
|--------|---------|---------------|-----------------------|
| 1      | VWA     | 4             | 123-171               |
| 2      | THO1    | 4             | 156-195               |
| 3      | D5S818  | 4             | 119-155               |
| 4      | D3S1358 | 4             | 105-156               |
| 5      | D19S433 | 4             | 104-144               |
| 6      | D7S820  | 4             | 209-249               |
| 7      | D11S554 | 4             | -                     |
| 8      | F13AO1  | 4             | 278-330               |

Температурный режим амплификации составил: 35 циклов –  $T^0$  денатурации  $94^{\circ}\text{C}$  – 40 сек.,  $T^0$  отжига –  $60^{\circ}\text{C}$  – 40 сек.,  $T^0$  элонгации  $74^{\circ}\text{C}$  – 60 сек., заключительный синтез  $74^{\circ}\text{C}$  – 15 минут. Последующий анализ длин амплифицированных фрагментов проводился в полиакриламидном геле (23 см), в качестве леддера (маркера) использовался набор синтезированных фрагментов ДНК шагом в 100 пар и 50 пар нуклеотидов (п.н.). Концентрация геля составляла 10-12% в зависимости от длин фрагментов, напряжение подавалось не более 8В/см. В последующем проводилось окрашивание геля бромистым этидием и экспозицией на ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

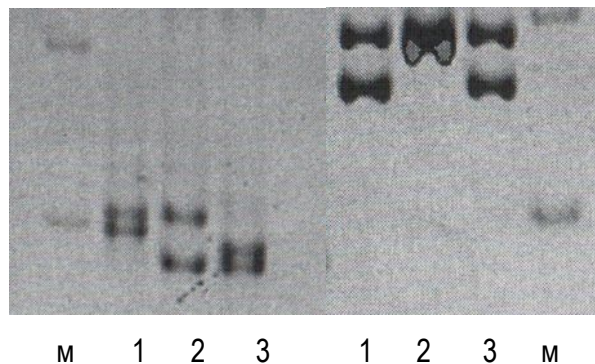
Анализировали диплоидные клеточные культуры ЛЭЧ-3 (легкие эмбриона человека), а также перевиваемые - HeLa (карцинома шейки матки), HEP2 (карцинома гортани), Vero (почка

африканской зеленой мартышки) из Коллекции банка-музея клеточных культур ЕНИИВИ. Анализируемые клетки культивировали и готовили к анализу по методике, приложенной производителем к тест-системе на основе методических рекомендаций по проведению работ в диагностических лабораториях МУ 1.3.1888-04, утвержденных Минздравом РФ от 04.03.2004 г.

### Результаты

Для испытания праймеров и собственно системы был проведен пробный анализ идентификации родственных связей (рис. 1). Показана электрофореграмма, подтверждающая оптимальность режима амплификации и работы праймеров.

Рис.1 Генотипирование VWA и THO1 на предмет родства.



Примечание: 1-я дорожка – отец, 2-я дорожка – дочь, 3-я дорожка – мать.

Праймеры прошли, также, испытание на амплификацию ДНК собаки, КРС и кур с полностью отрицательными результатами, что подтвердило видоспецифичность системы.

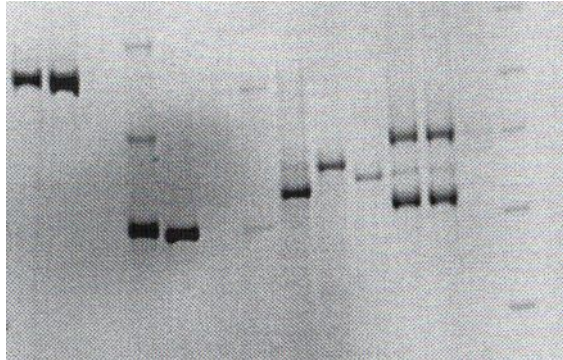
На последующих этапах проводили анализ наиболее часто используемых и востребованных культур, таких как ЛЭЧ-3, HeLa, HEp 2.

Как и следовало ожидать, высокой стабильностью отличались диплоидные клетки. Независимо от длительности пассирования не отмечено каких-либо изменений в фрагментарном спектре, указывающих на контаминацию в процессе пассирования. Практически аналогичную картину наблюдали и при исследовании перевиваемых культур.

Исключение составил трофовариант культуры HeLa клон 72, зарекомендовавший себя стабильной культурой. В клоне HeLa 72 была обнаружена делеция длиной 36 п.н. по локусу D7S820 (7-я хромосома), что является на данном этапе свидетельством внутрелинейной полиморфности культуры HeLa и может служить генетическим маркером данного

трофоварианта (рис. 2). Происхождение делеции можно объяснить мутацией исходной клетки клона.

Рис. 2. STR-анализ амплификатов клеток HeLa первичного и клона 72.

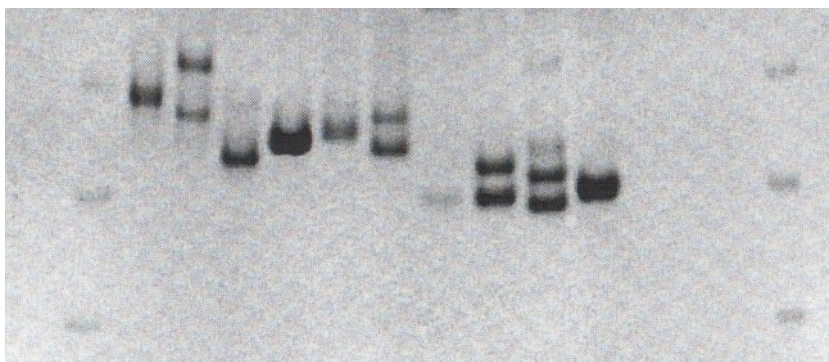


1 2 3 4 м 5 6 7 8 м  
F13AO1 D19S433 D7S820 D11S554

Примечание: 1, 3, 5, 7 дорожки – HeLa 72 (5-я дорожка содержит делецию).

Неожиданные результаты получены при анализе клеток линии Vero (почка африканской зеленой мартышки), в которой сработало пять пар праймеров человека (рис. 3).

Рис. 3. Сравнительный STR-анализ амплификатов клеточных культур Vero, ЛЭЧ-3, HEp-2.



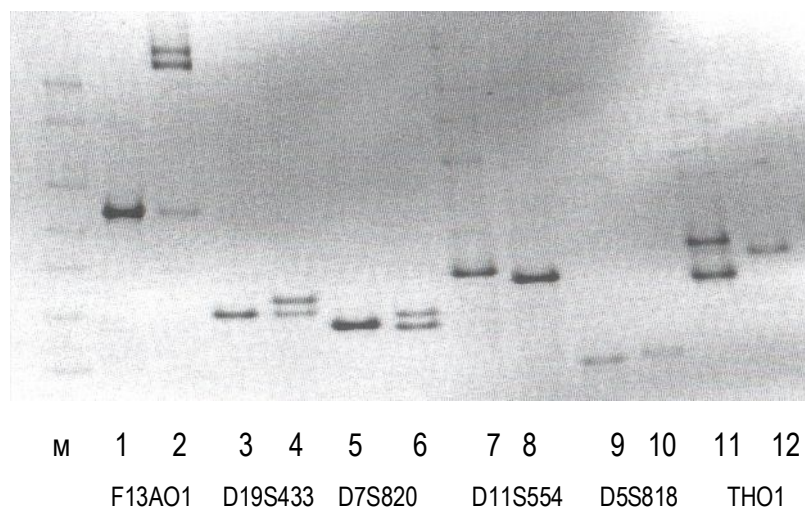
М 1 2 3 4 5 6 м 7 8 9 м  
D11S554 D7S820 D19S433

Примечание: 1, 4, 7 дорожки – Vero; 2, 5, 8 дорожки – ЛЭЧ; 3, 6, 9 дорожки – HEp-2.

Сравнительный анализ предполагаемой контаминации линии Vero клетками HeLa не дал положительного результата (рис. 4). Таким образом, хотя и не подтверждена гипотеза о контаминации данной линии клетками HeLa, сделать однозначный вывод о причинах

указанного явления пока нельзя. Возможные объяснения: контаминация другой культурой человеческого происхождения или наличие идентичных человеческим STR- локусов в ДНК клеток мартышки. Присутствие аналогичных локусов амплифицированных фрагментов в других культурах не человеческого (приматы?) происхождения будет указывать на контаминацию клетками человека. Для уточнения ответа на данный вопрос нужны дополнительные эксперименты.

Рис. 4. Сравнительный STR-анализ амплификатов клеточных культур HeLa и Vero.



Примечание: 1, 3, 5, 7, 9, 11 дорожки – HeLa; 2, 4, 6, 8, 10, 12 дорожки – Vero.

Таким образом, уже первичный анализ клеточных культур с помощью метода генотипирования короткими tandemными повторами выявил факты, указывающие на необходимость использования данного метода для паспортизации клеточных культур и ведения постоянного их мониторинга. Следующим этапом работы будет проведение исследований по точной идентификации и стандартизации клеточных культур Коллекции банка-музея ЕНИИВИ, используемых в разработке иммунобиологических препаратов, в вирусологии и биотехнологии.

### Список литературы

1. Федоров В.Д., Саркисов Д.С., Туманов В.П. Методические рекомендации «Метод хирургического лечения ожогов у детей с использованием культивированных аллофибробластов человека». Москва, 1997, 15 с.
2. Jogn R. Masters, Jim A. Thomson, Bernadette Daly-Burns, Yvonne A. Reid, Wilhem G. Dirks, Phil Packer, Lloraine H. Toji, Tadao Ohno, Hideyuki Tanabe, Colin F. Alrett, Lloyd R. Kelland, Maureen Harrison, Arvind Virmani, Timoty H. Ward, Karen L. Ayres, and Paul

- G. Debenham.** Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. PNAS 2001, 98,14: 8012-8017.
3. **Alec J. Jeffreys., V Wilson., S.L. Thein.** Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature. 1985, 314: 67-73.
  4. **Alec J. Jeffreys., V. Wilson., S.L. Thein.** Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature, 1985, 316: 76-79.
  5. **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 allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation. 2006, 37: 751-755.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОПЛАЗМ И ВИРУСА БЫЧЬЕЙ ДИАРЕИ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

***Р.Я. Подчерняева, Л.В.Урызаев, А.В. Дедова, Л.В. Дедова, К.С. Ионова, Г.Р. Михайлова,  
Н.А.Парасюк, О.М. Гринкевич, Т.К. Селиванова, Т.В. Гребенникова, А.Д. Петрачев,  
М.Н. Щетвин,***

ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России, Москва,  
cells@rambler.ru

В работе представлены данные по определению токсичности эмбриональных телячьих сывороток разных фирм. Контаминацию культур клеток микоплазмой определяли с помощью антибиотика оливомицина и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Контаминацию 83 коллекционных клеточных линий вирусом бычьей диареи определяли с помощью ПЦР. Показано, что 30% исследованных линий содержат этот вирус.

**Ключевые слова:** культуры клеток, токсичность бычьих сывороток, контаминация, микоплазма, вирус бычьей диареи.

На базе Лаборатории культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского находится созданная в 1957 г. Коллекция клеточных культур, которая насчитывает более 150 линий клеток человека и животных. Все линии охарактеризованы в соответствии с требованиями международной коллекции ATCC и включены в Каталог Всесоюзной Коллекции клеточных культур (1991 г.) и Европейский Каталог клеточных линий человека и животных