

- 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.Урываев, 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

(1993 г.). На протяжении всего периода функционирования лаборатории постоянным разделом работы является индикация (с помощью оливомицинового метода, а впоследствии метода ПЦР) микоплазм в клеточных линиях (1-3), а также их деконтаминация различными препаратами (4, 7-10).

Так как в последние годы серьезной проблемой является отсутствие стандартных нетоксичных и неконтаминированных эмбриональных телячьих сывороток, выпускаемых различными фирмами, регулярно проводится проверка их на токсичность и на наличие микоплазм и вируса бычьей диареи (ВД).

Учитывая, что вирусные заболевания крупного рогатого скота (КРС) широко распространены во всем мире, в том числе и в России (8-14), внимание вирусологов привлечено к изучению наиболее часто встречающихся возбудителей вирусной диареи – болезни слизистых КРС. Вирус бычьей диареи (ВД) является представителем рода Pestivirus семейства Flaviviridae. Известные к настоящему времени изоляты ВД КРС подразделяются по своему воздействию на культуры клеток на нецитопатогенные (не сопровождаются видимыми морфологическими изменениями клеток) и цитопатогенные, вызывающие быстрое развитие цитопатического действия (ЦПД) и гибель клеток путем апоптоза (9). В последние годы ВД обнаруживается не только в нативных сыворотках КРС, но и в клеточных линиях, для культивирования которых необходимо применение сывороток. Исходя из этого, задачей данной работы было определение токсичности коммерческих эмбриональных телячьих сывороток (ЭС) и проверка их на наличие ВД, а также обнаружение ВД и микоплазм в различных культурах клеток.

Материал и методы

Изучено 83 клеточных линии Коллекции культур тканей Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, представленные в таблице в разделе «Результаты и обсуждение». Культивирование клеток проводили на стандартных питательных средах (199, Игла, Игла МЕМ, ДМЕМ в зависимости от типа клеток) производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН с 10% эмбриональной телячьей сыворотки от разных производителей. Антибиотики при культивировании клеток не использовались.

Определение токсичности сывороток проводили на наиболее чувствительной диплоидной клеточной линии легкого эмбриона человека (ЛЭЧ). Для этого на монослой клеток в пластиковом матрасе (25 см² фирмы Costar) наносили 5 мл нативной сыворотки и матрас

помещали в термостат при 37⁰С на 24–72 ч. Ежедневно клетки просматривали под инвертированным микроскопом (ок.10хоб.20). О токсичности сыворотки судили по наличию в клетках дегенеративных изменений.

Определение микоплазм в клетках проводили с помощью отечественного препарата оливомицина. Для этого клеточные культуры выращивали на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах и фиксировали через 2-3 суток роста в охлажденном до 4⁰С 70%-ном этиловом спирте в течение 1 часа. Рабочий раствор оливомицина наносили на препарат и помещали в темную камеру на 1,5-2 ч. После промывки в дистиллированной воде покровные стекла с культурой монтировали на предметных стеклах в глицерине с дистиллированной водой (1:1) и просматривали под люминисцентным микроскопом с использованием фильтров: ФС 1-4, СС 15-7, БС-82.

Выделение ДНК из клеток, проведение ПЦР и анализ продуктов реакции для выявления микоплазм.

Суммарную ДНК выделяли из монослоя клеток, обработанных раствором версена с добавлением химотрипсина для отслоения клеток от подложки. Клетки центрифугировали при 4⁰С в течение 10 минут и 1,5 об/мин, суспендировали в 200 мкл 0,14 М NaCl и добавляли 600 мкл лизирующего буфера из набора «Ветбиохим, Россия». Далее - по методике производителя. Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР с целью обнаружения микоплазмы в культуре клеток с помощью универсальных праймеров GPOI (ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA), GPO3 (GGAGCAAATAGGATTAGATACCCT), MGSO (TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC), Uni (TAATCCTGTTTGCTCCCCAC).

ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл ДНК; 10 пмоль каждого праймера, 0,25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Таг-полимеразы, x10 ПЦР буфер. Программа амплификации была следующая: (94⁰ С - 1 минута) 1 цикл; (94⁰ С - 30 сек, 55⁰ С - 25 сек., 72⁰ С - 30 сек.) - 30 циклов. Результаты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза, используя Tris-ацетатный буфер, содержащий этидиумбромид в концентрации 0,4-0,5 мкг/мл. Гели анализировали под трансиллюминатором с УФ светом. Величина фрагментов ПЦР в случае использования пары праймеров GPO3/ MGSO составляла 288 п.н.; для праймеров GPOI/ Uni - 472 п.н; 724 п.н. для пары праймеров GPOI/MGSO.

Выделение РНК из клеток, проведение ОТ-ПЦР и анализ продуктов реакции для выявления генома вируса бычьей диареи.

Суммарную РНК выделяли из монослоя клеток с использованием неорганического носителя и набора «Тест-система для обнаружения вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота методом ПЦР» («Ветбиохим», Россия) по методике производителя. Для выявления генома ВД КРС использовалась та же тест-система. Анализ проводили с помощью метода «nested» ПЦР.

ОТ-ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 10 пмоль каждого праймера для ПЦР-1, 0.25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 1,25 ед. ревертазы (M-MuLV Revers), 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂. Использовали следующие параметры ПЦР: (50°C - 50 минут, 94°C - 5 минут) - 1 цикл, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 20 секунд)- 30 циклов, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 5 минут) - 1 цикл. После ОТ-ПЦР проводили второй раунд амплификации.

ПЦР-II проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл продукта реакции ОТ-ПЦР, 10 пмоль каждого праймера для ПЦР-II, 0.25 mM каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂. Использовали следующие параметры ПЦР: (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 20 секунд)- 30 циклов, (94°C - 20 секунд, 55°C - 20 секунд, 72°C - 5 минут) - 1 цикл.

Результаты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (2%), используя Трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,4-0,5 мкг/мл. Гели анализировали, используя трансиллюминатор (длина волны 254 нм). Размер фрагментов ПЦР после проведения анализа составлял 264 п.н.

Результаты и обсуждение

Все поступающие в лабораторию коммерческие эмбриональные телячьи сыворотки (ЭТС) проверяются в первую очередь на их токсичность для диплоидной клеточной линии легкого эмбриона человека (ЛЭЧ), затем на контаминацию микоплазмой и вирусом бычьей диареи.

Для культивирования клеток применяются нетоксичные ЭТС, когда морфология клеток ЛЭЧ в матрасе при добавлении сыворотки остается неизменной после 24 ч инкубации в термостате при 37 °С также, как и в контрольном матрасе. В том случае, если сыворотка обладает токсичностью, то уже спустя 24 ч наблюдается полная дегенерация клеток. Такая сыворотка не пригодна для культивирования коллекционных клеток. К сожалению, большинство коммерческих сывороток являются либо токсичными (дегенерация клеток через 24 ч), либо слаботоксичными, когда изменение морфологии наблюдается через 48 или 72 ч.

Индикация микоплазм в клеточных культурах с помощью антибиотика оливомицина определяется визуально. Микоплазма под люминесцентным микроскопом обычно выглядит в виде отдельных гранул, окрашенных в желто-зеленый цвет, расположенных вдоль границ цитоплазмы и в межклеточном пространстве.

В случае наличия микоплазм мы проводили определение их видовой принадлежности, используя метод ПЦР. Были протестированы следующие клеточные линии: ФЭЧ, ЭПНТ, HeLa, Caco-2, МДСК, CH5, Lunet, Mpf, Vero E6, ЛЭЧ, PLC, L929 на наличие микоплазм *Hominis* и *Laidlawii*, используя готовую тест-систему «ЛТПФ ДНК-технология». В изученных линиях клеток оба вида микоплазм не были обнаружены.

С помощью метода ПЦР выявлено наличие ВД в различных коммерческих ЭТС, полученных из разных фирм (ПанЭко – катал. №35422 и 35205, ООО «Биолот» - Б-04-35, Gibco -41G9872K, Biowest – So471651810, Hy Clone – 35422, ASF29574, ASF29773, Amimed – 70050, Sigma -057K3396). В сыворотке ЭТС (ПанЭко) ВД обнаруживался как до, так и после прогревания в водяной бане при 56 °С в течение 30 и 60 мин.

В таблице представлены результаты определения ВД с помощью ПЦР в 83 клеточных линиях человека и животных. Из таблицы видно, что все диплоидные клетки человека не содержат ВД, а у 62% исследованных лимфобластоидных линий клеток человека этот вирус был обнаружен. Из 26 различных перевиваемых клеток человека наличие ВД выявлено в 7 видах культур. ВД был обнаружен у всех линий клеток КРС, у 50% клеточных линий обезьян, в 2-х из 4-х закладок клеток почек свиньи, в 1-ой из 9 клеточных линий мышей, в 2-х из 3-х закладок клеток кролика, в 2-х линиях клеток кошек, в 1 линии клеток почки овцы и в 2 из 7 различных закладках клеток почки собаки (МДСК). В таблице приведены линии клеток МДСК, заложенные в жидкий азот в различные годы (с 2000 по 2009 г.г.). В клетках 2000 г. и в более поздних закладках (в 2008 и 2009 г.г) ВД не обнаружен, однако в закладке 2003 г. выявлено наличие этого вируса. Возможно, что при культивировании этих клеток применялась сыворотка, содержащая ВД. Выявлено также, что клеточные линии хомячка, крыс, клетки мозга хорька и клетки кур не содержат ВД.

Таким образом, из 83 изученных линий приблизительно в 30% из них обнаружено наличие ВД. Зависимости наличия в клетках ВД с цитотоксическим действием этого вируса нами не было выявлено.

Аналогичные результаты были получены при анализе 41 клеточной линии Американской коллекции клеточных культур (14), когда в 13 разных линиях (тоже в 30%) была обнаружена

контаминация ВД. Так, вирус диареи был обнаружен у всех 10 проверенных линий клеток коров, у 1 из 7 клеточных линий кролика, у 1 из 5 линий кошек и у 1 линии клеток козы. Культуры клеток барана, свиньи, хомячка, собаки, обезьяны и человека не были контаминированы ВД.

Известно, что присутствие в клетках микоплазмы и ВД приводит к снижению чувствительности к репродукции в них вирусов, а это важно не только для проведения научных исследований, но и для получения антигенов, используемых для приготовления любых медико-биологических препаратов.

Таблица. Определение вируса бычьей диареи в клеточных культурах

Наименование	Обозначение	Орган выделения	Время закладки	Определение ВД
Диплоидные клетки человека	ЛЭЧ	Легкое эмбриона	9.07.82г	-
	ЛЭЧ	Легкое эмбриона	11.08.08г	-
	ФЭЧ	Фибробласты эмбриона	11.02.08г	-
	М ₇	Кожно-мышечная ткань	15.10.07г	-
Перевиваемые клетки человека не контаминированные клетками HeLa	A-549	Карцинома легкого	29.09.09 г	-
	GL-6	глиобластома	11.04.05 г	-
	T-24	Опухоль мочевого пузыря	18.08.08 г	-
	HT29	Карцинома толстой кишки	31.05.77 г	-
	HT29		27.07.09 г	-
	CaCo	Карцинома кишечника	28.12.09 г	+
	GM-639	Фибробласты больного галактоземией	21.12.09 г	-
L ₄₁	Костный мозг больного лейкемией	3.03.08 г	-	
Перевиваемые клетки человека HeLa и HeLa подобные	HeLa	Карцинома шейки матки	28.01.93 г	-
	HeLa	-«-	30.11.07 г	-
	HeLa лхм	-«-	30.06.80 г	-
	Hep-2	Карцинома гортани	27.10.97 г	-
	Hep-2	-«-	12.05.09 г	-
	RH	Почка эмбриона	23.05.80 г	-
	Chang conjunctiva	конъюнктура	10.11.09 г	-

	Chang liver	Печень	22.06.09 г	-
	Huh-7	Гепатома	23.11.09 г	+
	Huh-7	-«-	20.01.10 г	-
Лимфобластоидные клетки человека	Raji	Лимфома Беркита	9.06.77 г	-
	Namalva	-«-	20.04.82 г	+
	Daudi	-«-	26.02.07 г	—
	P3H3(R-1)	-«-	6.05.81 г	+
	P3H3	-«-	20.12.83 г	+
	L ₁₀₁	Лейкоциты крови больного лейкозом	30.03.77 г	+
	T ₁₃₈₇	Т-лейкоциты костного мозга	4.12.06 г	+
	Molt-4	Т-лейкоциты больного лейкемией	26.06.06 г	-
Клетки обезьян	BGM	Почка зеленой мартышки	9.02.05 г	+
	CV1	-«-	28.12.77 г	-
	Vero	-«-	27.09.04 г	-
	Vero E6	-«-	27.07.09 г.	+
	Vero(B)	-«-	-«-	-
	4647	-«-	28.04.05 г	+
	GMK	-«-	15.05.78 г	+
	BSC-1	-«-	7.11.05 г	
	MA-104	Почка макаки резус	25.12.92 г	+
	LLC-MK-2	-«-	15.12.08 г	-
	Frhk-4/R	-«-	22.03.04 г	+
Клетки крупного рогатого скота	МДБК	Почка КРС	31.01.05 г	+
	РТ-80	Почка телят	17.06.83 г	+
	ПЭК	Почка эмбриона коровы	10.12.07 г	+
	ТЭБ	Тестикулы эмбриона быка	19.06.92 г	+
Клетки собаки	МДСК	Почка	14.05.01	+
	МДСК	-»-	20.10.03	+
	МДСК	-»-	07.04.09	-
	МДСК	-»-	28.12.09	-
	МДСК	-»-	14.12.00	-
	МДСК	-»-	04.02.08	-
	МДСК	-»-	29.01.07	±

Клетки свиньи	PS	Почка свиньи (Чехословакия)	29.06.77 г	-
	СПЭВ	Почка эмбриона (Россия)	26.05.94 г	+
	СПЭВ	Почка –«-	07.04.08г	+
	ППЭС	Почка –«-	11.04.05 г	–
Клетки крыс	НГУК-1	Невринома Гассерова узла	04.02.08 г	-
	ХС	Саркома	27.05.77 г	-
	NWERC	Эмбриональные опухоли крыс Wistar трансформированные вирусом саркомы Рауса	21.03.77 г	-
	NRK	почка	26.06.79 г	-
Клетки мышей	L ₉₂₉	фибробласты	13.09.93 г	-
	L ₉₂₉	-«-	21.07.08 г	-
	3T3 BALB/C	Фибробласты эмбриона	18.02.93 г	-
	SC-1	-«-	21.07.77г	-
	Lsv 5	-«-	20.04.77г	-
	Ltk	-«-	29.12.76 г	+
	ЭПНТ-5	глиобластома	2.06.08 г	-
	У-1	Опухоль коры надпочечника	3.07.80 г	-
Tb1Lu (NBL-12)	Легкое летучей мыши	10.05.77 г	-	
Клетки хомячка	ВНК-21	Почка новорож-денного сирийского хомячка	10.10.05 г	-
	НАК	Почка сирийского хомячка	2.12.96 г	-
	ХТК-2	Кожно-мышечная ткань сирийского хомячка	25.03.81 г	-
	ВНК-BS	Почка сирийского хомячка с парамиксовирусом	29.10.79 г	-
	Сер	Гибрид хомячок/курица	9.02.81 г	-
	СНО-К1	Яичник китайского хомячка	06.11.06 г	-
Клетки кролика	RK	почка	25.09.06г	+
	RK82	почка	19.10.84 г	+
	RS537	Фибробласты кожи	23.12.76 г	-
Клетки кошки	CREK	почка	20.03.06 г	+
	CC-81	почка	26.12.05 г	+
Клетки овцы	FLK	почка	2.04.07 г	+

Клетки хорька	Mrf	мозга	5.12.05 г	-
Клетки кур	LOC	Лимфома яичника	3.09.07г	-
Итого: 83, положительных 26 (т.е. 30%)				

Список литературы

1. Михайлова Г.Р., Бердникова З.Е. Использование ДНК-специфического флюорохрома оливомицина для работы с клеточными культурами. Цитология и генетика. 1991, 5:15-20.
2. Михайлова Г.Р., Хижнякова Т. М., Подчерняева Р.Я., Грикевич О.М. Использование фторхинолонов для элиминации микоплазм в клеточных культурах. Тез. Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология – XXI век» Саратов. 2004, 1: 157-158.
3. Михайлова Г.Р., Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Селиванова Т.К., Гребенникова Т.В., Гринкевич О.М. Индикация микоплазм и деконтаминация их в клеточных линиях для проведения вирусологических исследований. Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 2007: 238.
4. Михайлова Г.Р., Новохатский А.С., Родова М.А. Новый способ выявления микоплазм в культурах перевиваемых клеток. Вопросы вирусологии. 1982, 6: 119-121.
5. Михайлова Г.Р., Хижнякова Т.М., Подчерняева Р.Я., Гринкевич О.М., Алипер Т.И. Метод деконтаминации клеточных культур от микоплазм при помощи фторхинолонов в сочетании с антибиотиками. Инф. бюлл. «Клеточные культуры». 2005, вып. 20: 41-45.
6. Михайлова Г.Р., Хижнякова Т.М., Подчерняева Р.Я. Использование антибиотиков для деконтаминации клеточных культур от микоплазм. Ветеринарная патология. 2005, 1: 48-52.
7. Ночевный В.Т., Подчерняева Р.Я., Михайлова Г.Р. Деконтаминация перевиваемых линий клеток от микоплазм при помощи фторхинолонов. Цитология. 2001, 43, 4: 374.
8. Глотов А.Г., Петрова О.П., Сергеев А.Н., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Шевченко Н.И., Мошкина С.В. Распространение вирусных респираторных заболеваний. Ветеринария. 2002, 3: 11-15.
9. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н. Выделение и характеристика изолятов вируса вирусной диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2006, 1: 42-45.
10. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М. 2007: 522 с.
11. Bolin. S.R., Matthews P.I., Ridpath I.F. Methods for detection and antibodies against bovine viral diarrhea virus I. Vet. Invest, 1991, 3: 199-203.
12. Hoff H.S., Donis R.O. Induction of apoptosis and cleavage of poly (ADPribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection. Virus Res., 1997, 49: 101-113.
13. Zevings R.L., Wessman S.I. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Dev. Biol. Stand. 1991, 75: 177-181.
14. Steven R. Bolin., Iulia F. Ridpath, John Black, Marvin Macy, Richard Roblin. Survey of cell lines in the American Type Culture collection for bovine viral diarrhea virus. J. of virological Method, 1994, 48: 211-221.