

УДОСКОНАЛЕНИЙ МЕТОД ОТРИМАННЯ КЛОНІВ КЛІТИН

П. Ю. Кривошия, канд. вет. наук,

Л. Б. Кот, мол. наук. співр.,

М. В. Романко, ветлікар

Дослідна станція епізоотології Інституту ветеринарної медицини НААН,
вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028, Україна

У статті розглядаються питання, пов'язані з виділенням клонів клітин із перещеплюваної культури, а саме ефективного шляху їх виділення без значних витрат реагентів та робочого часу. Наведено методiku їх виділення на основі розроблених методичних підходів із застосуванням 96-лункових стерильних мікропланшетів для культур клітин, автоматичних дозаторів та розробленого пристрою для культивування клітин. Авторами зроблено висновок про те, що даний підхід по виділенню клонів клітин є більш ефективним за попередній та менш ресурсоемкий.

Ключові слова: КЛОНИ КЛІТИН, МЕТОДИКА ОТРИМАННЯ, 96-ЛУНКОВІ МІКРОПЛАНШЕТИ, КУЛЬТУРА КЛІТИН.

При довготривалих пасажах у перещеплюваних клітин можуть змінюватися морфологічні та фізіологічні властивості, а також чутливість до вірусів. Однією з причин цього може бути неоднорідність клітинної популяції культури. Культура, виділена з тканини, нерідко складається з декількох типів клітин — епітеліоподібних та фібробластоподібних. При вирощуванні цих клітин спостерігається більш інтенсивний ріст одного типу клітин над іншим. Зміна умов культивування може сприяти переважному розвитку того чи іншого типу клітин, а також зміні їх біологічних властивостей. Тому для повного відтворення результатів при вірусологічних дослідженнях на перещеплюваних культурах краще користуватися клонами (лініями) перещеплюваних клітин, отриманих з однієї клітини. Вони є більш стабільні при довготривалих пасажах ніж батьківські клітини перещеплюваної культури.

У загальноприйнятій технологічній процес виділення клонів клітин входить отримання суспензії клітин шляхом зняття вирощених клітин з поверхні матраців для їх культивування з використанням 0,02% розчину версену. Отриману суспензію клітин центрифугують при 1500 об./хв. протягом 20 хвилин. З осаду клітин готують суміш на середовищі наступного складу: середовище 199 — 45%, середовище Ігла — 45%, сироватка великої рогатої худоби — 10%. На середовищі вказаного складу готують суміш клітин з таким розрахунком, щоб в 10 см³ внесених в матраці Повітської ємкості в 100 см³ містилося 30 клітин. Більша частина клітин (20-25) прикріплювалась до скла, з якої 8-12 клітин розмножувались та утворювали колонії. До десятого дня інкубації діаметр колоній сягав 1-1,5 мм. Виділення колоній, утворених з однієї клітини, проводять не пізніше 6-8 дня інкубації. Для цього з матраца зливають поживне середовище та кінцем пастерівської піпетки вилучають колонію. Попередньо кінець пастерівської піпетки злегка відтягують на вогні та згинають під прямим кутом так, щоб довжина зігнутого кінця складала приблизно 3-4 мм. Потім кінець піпетки обережно відламували пінцетом, щоб він був рівним. У кінчик піпетки набирали невеликий об'єм поживного середовища та шляхом піпетування і за допомогою надітого на піпетку відсмоктувача знімали колонію. У зв'язку з тим, що дрібні колонії без освітлення майже не видно, матраці освітлюють за допомогою освітлювача до мікроскопа. Промінь світла направляють на матрац вперед та вниз під кутом 30°. Поверхня матраца, на якій розташовані колонії, повернута до верху. Піпетку обережно вводять в

матрац, зігнутий кінець її розмішують над колонією і притискають до скла. За допомогою відсмоктувача відокремлені від скла колонії засмоктують з краплиною середовища в піпетку і переносять в пробірку з 7-ми см³ поживного середовища. Колонії в пробірках вирощують протягом 8-10 днів. Їх знімають за допомогою розчину версену і засівають у матраци, після чого проводиться три послідовні пасажі клонів клітин [1].

Недоліком цього способу є те, що для свого застосування він потребує значної кількості компонентів, посуду, а це перешкоджає масовому отриманню клонів клітин та більш ефективному проведенню вірусологічних досліджень.

Мета досліджень — розробити спосіб, який суттєво зменшить витрати реагентів, час, трудомісткість та полегшить отримання клонів клітин.

Матеріали і методи. Так для вирішення поставленого завдання у досліді була використана перещеплювальна культура клітин трахеї теляти (ТТ) вирощена в скляних матрацах для культивування клітин у вигляді моношару. Для вирощування перещеплюваної лінії були використані поживні середовища (199, Ігла), сироватка крові великої рогатої худоби, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ). Для зняття клітин застосовували диспергуючий розчин 0,02% версену. Для отримання клонів клітин використовували культуральні 96-лункові стерильні мікропланшети.

Результати й обговорення. Культивування клітин та отримання суспензії клітин культури (ТТ) проводили за загальноприйнятими підходами з використанням диспергуючих розчинів для їх зняття. Суспензію клітин центрифугували 1500 об./хв. протягом 5 хвилин. Осад клітин після центрифугування та відмивання, ресуспензували в мінімальному об'ємі поживного середовища, в склад якого входило: середовище 199 – 45%, середовище Ігла – 45% та сироватка крові великої рогатої худоби – 10%.

У лунки 96-лункової стерильної мікропланшети для культур клітин вносили по 0,1 см³ живильного середовища з антибіотиками. В першу лунку ряду додавали 0,1 см³ суспензії клітин, розведених 1:10. Після перемішування, шляхом піпетування 0,1 см³ суміші клітин із першої лунки переносили до наступної лунки плашки. Таким чином отримували розведення клітин від титру 1:20 до 1:2560. Потім плашку з розведеними в лунках клітинами поміщали в розроблений нами пристрій для культивування клітин [2] та встановлювали в термостат при температурі 37 °С.

Через 2-3 дні проводили перегляд росту клітин за допомогою імерсійного мікроскопа “Біолам 1-П”. Таким чином визначали лунки, де були поодинокі клітини, що розмножувались та утворювали колонії. Виділення колоній, утворених з однієї клітини, проводили не пізніше 6-7 дня їх культивування. З цією метою з лунки, де були утворені колонії з однієї клітини, дозатором відбирали поживне середовище, після чого додавали диспергуючий розчин 0,02% версену. Після інкубації протягом 20-ти хвилин при температурі 37 °С розчин версену відбирали та додавали поживне середовище з одночасним піпетуванням з метою суспензування відокремлених клітин.

Відокремлені клітини з лунки плашки переносили в 6-лункову плашку, призначену для культивування клітин з лунками, які мають діаметр 30 мм та додавали поживне середовище. Колонії в таких лунках вирощували протягом 10-12 днів. Їх знімали з використанням розчину версену та засівали в скляні матраци малого об'єму (50 см³), після чого проводили три послідовні пасажі клонів.

ВИСНОВКИ

1. Експериментальні дослідження показали, що розроблений методичний підхід отримання клонів клітин є досить ефективним та не є трудомістким. Користуючись ним, можна проводити масові виділення клонів клітин із значною економією часу та реагентів.

2. Запропонований спосіб знайде застосування у вірусологічних лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах.

Перспективи подальших досліджень. Розроблений підхід по виділенню клонів клітин дасть можливість для ширшого його застосування у ветеринарній вірусологічній практиці.

THE IMPROVEMENT METHOD OF PRODUCING CELL CLONES

P. Y. Krivoshiya, L. B. Kot, M. V. Romanko

Research Station of Epizootology of Institute of Veterinary Medicine of NAAS
16/18, Kniazia Volodymyra str., Rivne, 33028, Ukraine

S U M M A R Y

This article discusses issues related to the evolution of cell clones from cell line culture, namely the effective ways of their separation without substantial amounts of reagents and working hours. The technique of their allocation on the basis of methodological approaches developed using sterile 96-well microplate for cell culture, pipettes and device developed for the cultivation of cells.

The authors concluded that this approach to allocate cell clones is more efficient than the previous one and less resource-intensive.

Keywords: CELL CLONES, METHOD OF OBTAINING, 96-WELL MICROPLATES, CELL CULTURE.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КЛОНОВ КЛЕТОК

П. Ю. Кривошея, Л. Б. Кот, М. В. Романко

Исследовательская станция эпизоотологии Института ветеринарной медицины НААН
ул. Князя Владимира, 16/18, Ровно, 33028, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье рассматриваются вопросы, связанные с выделением клонов клеток из перевиваемой культуры, а именно эффективного пути их выделения без значительных затрат реагентов и рабочего времени. Приведена методика их выделения на основе разработанных методических подходов с применением 96-луночных стерильных микропланшетов для культур клеток, автоматических дозаторов и разработанного устройства для культивации клеток. Авторами сделан вывод о том, что данный подход по выделению клонов клеток является более эффективным чем предыдущий и менее ресурсоёмким.

Ключевые слова: КЛОНЫ КЛЕТОК, МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ, 96-ЛУНОЧНЫЕ МИКРОПЛАНШЕТЫ, КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Здродовский П. Ф.* Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней / П. Ф. Здродовский, М. И. Соколов. — Москва: Медицина, 1975. — С. 596.

2. *Кривошея П. Ю.* Патент на корисну модель №67895 Україна, МПК G01N 33/00. Спосіб культивування клітин у чашках Петрі та полістиролових плашках / П. Ю. Кривошея,

С.Ю. Ляш; заявник і власник Інститутт епізоотології УААН. — и 201109473; заявл. 28.07.2011; опубл. 12.03.2012, Бюл. № 5.

Рецензент — А. В. Лисиця, к. б. н., Дослідна станція епізоотології ІВМ НААН.