

Розділ 9. Біотехнологія

УДК 619:57.08:576.535

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ И ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ

Дьяконов Л.П., Кулешов К.В., Гальнбек Т.В., Киселева Д.Р.

ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко РАСХН (ВИЭВ), г. Москва

Подчерняева Р.Я., Гринкевич О.М.

ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

Использование клеточных культур в различных областях фундаментальной и прикладной науки требует надежных критериев стандартизации и оценки соответствия культивируемых клеток первоначально полученным линиям. Использование клеток с отсутствием идентификационных характеристик ставит под сомнение объективность полученных результатов. Для решения данных проблем необходимо развитие современных подходов, связанных с тщательной и полной разработкой процедуры идентификации и сертификации клеточных линий. Важными так же является научная обоснованность и возможность стандартизации используемых методик и подходов.

В настоящее время во многих лабораториях для контроля видовой идентичности клеточных линий применяются кариологический и изоферментный методы, но они достаточно трудоемки и обладают меньшей чувствительностью и возможностью стандартизации в сравнении с современными методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенировании нуклеотидной последовательности маркерных участков ДНК (Buehring et al., 2004; Gilbert et al., 1990; Kaplan and Hukku, 1998). Одним из наиболее существенных преимуществ традиционной (специфичной) ПЦР, в сравнении с другими модификациями данного метода, является высокая аналитическая специфичность, чувствительность, скорость исследования и возможность стандартизации процедур анализа между различными лабораториями [2].

Материалы и методы исследований. В качестве объектов для цитогенетического анализа были использованы клеточные культуры, полученные от 5-ти видов млекопитающих и человека: кролика (*Oryctolagus cuniculus*) – клеточная культура RK-13; лошади (*Equus caballus*) – клеточная культура ЭКЛ; коровы (*Bos taurus*) – клеточные культуры MDBK и ЛЭК, свиньи (*Sus scrofa*) – клеточная культура A₄xL (межвидовая гибридная клеточная культура – свинья х лошадь) и A₄xC₂ (внутривидовая гибридная клеточная культура – свинья х свинья); собаки (*Canis familiaris*) – MDCK и человека (*Homo sapiens*) – клеточная культура K562.

Для сравнительной оценки специфичности молекулярно-генетических методов и кариологического анализа для некоторых клеточных линий (K562, RK-13, ЭКЛ, MDBK, ЛЭК, A₄xL, A₄xC₂, MDCK) были приготовлены хромосомные препараты по методу Moorhead и др. (1960). Ввиду сложности при идентификации хромосом хромосомные препараты части клеточных линий окрашивали на G-полосы методом «трипсин-Гимза», предложенную Seabright (1971).

Для идентификации клеточных линий методами молекулярно-генетического анализа нами предложено применение двух подходов. Первый – секвенирование нуклеотидной последовательности 5'-концевых участков генов цитохром-с-оксидазы (COI) и цитохрома b (cytb) митохондриальной ДНК (мтДНК) с помощью ранее предложенных универсальных праймеров (Armstrong and Ball, 2005; Hebert and Gregory, 2005). Второй подход – анализ видовой принадлежности каждой клеточной линии с использованием разработанной в лаборатории клеточной биотехнологии ВИЭВ видоспецифичной ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (вПЦР-РВ) (Кулешов и др., 2008). Данная методика была разработана для определения следующих видов: *Sus scrofa* (свинья), *Bos taurus* (корова), *Canis familiaris* (собака), *Felis catus* (кошка), *Cercopithecus aethiops* (африканская зеленая мартышка), *Equus caballus* (лошадь), *Oryctolagus cuniculus* (кролик), *Ovis aries* (овца), *Mesocricetus auratus* (золотистый хомяк), *Mus musculus* (мышь), *Rattus norvegicus* (серая крыса), *Cricetus gricetus* (китайский хомяк) в том числе и человека (*Homo sapiens*).

Результаты исследований. Наиболее гетерогенными по присутствию клеток с разным числом хромосом оказались клеточные культуры K562, RK-13, ЭКЛ. В них наблюдается значительное смещение модального класса хромосом в сторону три- и тетраплоидизации кариотипа. Вместе с тем, модальный класс хромосом клеточных культур MDCK, A₄xC₂, A₄xL, ЛЭК и MDBK был близок к нормальному диплоидному числу хромосом соответствующего вида (табл.1).

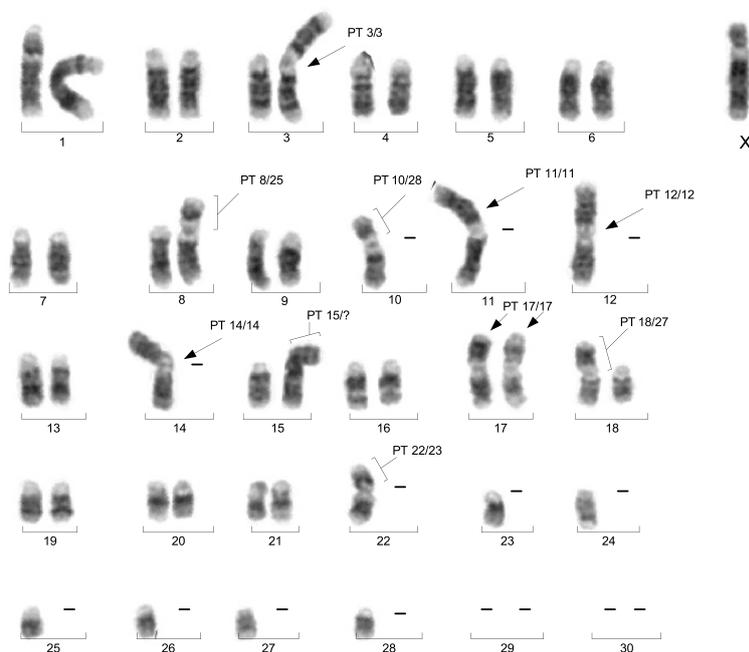
Таблица 1 – Модальный класс и пределы варьирования числа хромосом в клеточных культурах

| № п/п | Название клеточной культуры | Нормальное число хромосом данного вида | Пределы варьирования хромосом и модальный класс |
|-------|--------------------------------|--|---|
| 1 | K562 | 46 | 30-140 (64-69) |
| 2 | RK-13 | 44 | 35-64 (58) |
| 3 | A ₄ xC ₂ | 38 x 38 | 37-40 (39) |
| 4 | A ₄ xL | 38 x 64 | 36-78 (39) |
| 5 | ЭКЛ | 64 | 45-103 (96-103) |
| 6 | MDBK | 60 | 45-67 (64) |
| 7 | ЛЭК | 60 | 38-51 (46) |
| 8 | MDCK | 78 | 79 |

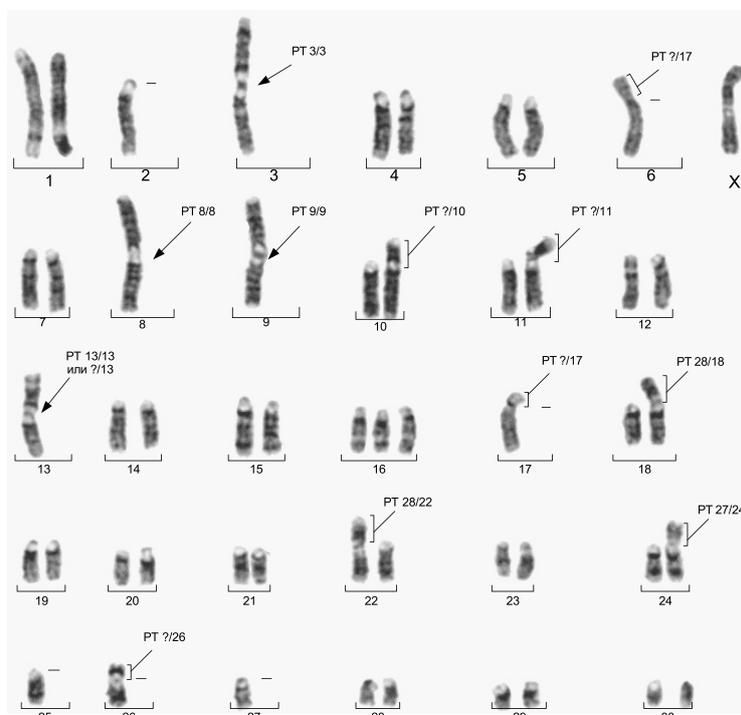
Розділ 9. Біотехнологія

По результатам исследования в клеточных культурах MDBK и ЛЭК выявлена высокая частота робертсоновских транслокаций, приводящая к изменению морфологии и числа хромосом. Так, для культуры клеток MDBK характерны робертсоновские транслокации гетеролитического типа. Напротив, в клетках культуры легкого эмбриона коровы (ЛЭК) характерно равное соотношение транслокаций как гомологичного, так и гетеролитического типа (рис. 1).

Наряду с высокой количественной изменчивостью хромосомного набора, характерного для большинства исследованных клеточных культур, методами рутинного окрашивания с последующей раскладкой и анализа различных морфологических групп хромосом достаточно легко идентифицировались кариотипы человека, кролика и свиньи.



А



Б

Рис. 1 Кариотипы клеточных культур (А) MDBK, (Б) ЛЭК (Микрофото, ок. х 10, об. х90, окраска на G-полосы). кариотипах стрелками указаны робертсоновские транслокации гомологичного типа, квадратной скобкой – гетеролитического.

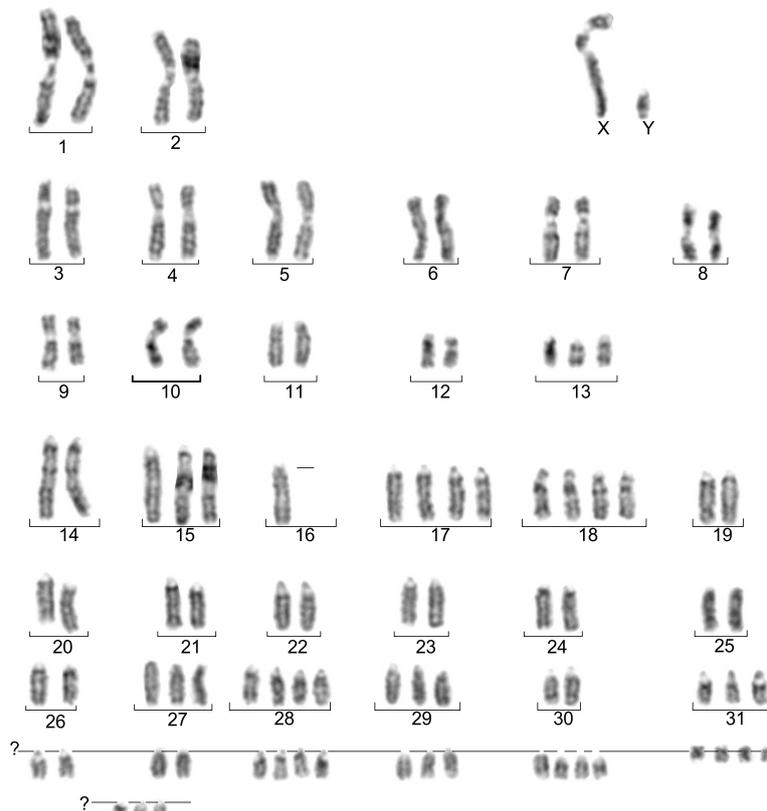


Рис. 2 Кариотип клеточной культуры ЭКЛ (n=97) (Микрофото, ок. x 10, об. x90, окраска на G-полосы). – хромосомы неизвестной природы

Видовая идентификация клеточных линий с использованием вПЦР-РВ и анализа нуклеотидных последовательностей участков генов *cytb* и *COI*

В работе были исследованы 42 клеточные линии полученные от 20 различных видов млекопитающих и рыб, депонированных в двух специализированных коллекциях.

Каждый из образцов клеточной культуры оценивали на видовую принадлежность к каждому из 13-ти видов с использованием разработанной вПЦР-РВ, в том числе исследовали клеточные культуры млекопитающих и рыб (МК-2, FRhK, ПС, СНН-1, CHSE-214, ЕРС, RTG-2, WSSK). Результаты вПЦР-РВ в случае обнаружения видового несоответствия исследуемой клеточной культуры подтверждали методами секвенирования участков мтДНК.

Согласно результатам исследования с использованием вПЦР-РВ и секвенирования мтДНК все наименования клеточных культур и их отводки, которые относились к видам: *Canis familiaris* (собака) – MDCK, *Felis catus* (кошка) – ПК-91, CRFK, FS, *Sus scrofa* (свинья) – А₁хС₂, А₁хL, ЛГС, ДЩС, СПЭВ, ЩС, *Ovis aries* (овца) – FLK, ПОхСО, СЯ, ПО₂, *Saiga tatarica* (сайга) – ПС, *Mesocricetus auratus* (сирийский хомяк) – ВНК-21, BSR, *Mus musculus* (мышь) – ЭПНТ-5, L₉₂₉, *Rattus norvegicus* (крыса) – С₆, соответствовали исходному виду животного.

В некоторых клеточных культурах или их отводках: *Homo sapiens* (человек), *Macacus mulatta* (макак резус), *Bos taurus* (корова), *Oryctolagus cuniculus* (кролик), *Cricetus gricetus* (китайский хомяк), *Cyprinus carpio* (каarp), *Oncorhynchus tshawytscha* (чавыча), *Oncorhynchus keta* (кета), *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель) были выявлены несоответствия.

Исследование клеток из коллекции «Перевиваемых соматических клеток позвоночных» показало, что среди 8-и исследованных клеточных культур человека одна из отводов глиобластомы человека (GL-6), которая была получена из другой лаборатории в ходе сотрудничества, идентифицировалась, как клетки вида *Bos taurus*.

При этом анализ отводки клеточной культуры GL-6, непосредственно депонированной внутри коллекции на протяжении длительного времени, показал полное соответствие клеткам человека. Клетки почки эмбриона макаки резус (МК-2) идентифицировались, как клетки мыши. Исследование 4-х отводов клеток яичника китайского хомяка (СНО-К1), заложенных в криобанк в разное время показало, что 2 отводки являлись клетками человека. Клетки остальных 2-ух отводов соответствовали исходному виду животного.

В «Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных» было выявлено, что одна из ранних отводов клеток почки эмбриона коровы (MDBK) и все три исследуемые отводки клеточной культуры кожи кролика (RSK) по видовой принадлежности относились к клеткам свиного происхождения – *Sus scrofa*.

Клеточные культуры выделенные от рыб – СНН-1, CHSE-214, RTG-2, WSSK-1, и от млекопитающих – FRhK и ПС в вПЦР-РВ не идентифицировались, поэтому последующий анализ их видовой принадлежности основывался на определении нуклеотидной последовательности участков митохондриальных генов *cytb* и *COI* на протяжении ряда пассажей данной клеточной линии.

По результатам анализа нуклеотидных последовательностей клетки эмбриона осётра (WSSK-1), почки плода макаки резус (FRhK) и клетки почки сайги (ПС) соответствовали исходной видовой принадлежности. Идентификация клеток почки сайги

основувалась на послідовності участка гена *cytb* из-за отсутствия последовательностей гена *COI* в международных базах данных нуклеотидных последовательностей. Согласно нуклеотидной последовательности *cytb* клеточная линия ПС соответствовала изначально заявленному виду.

Анализ клеточных линий разных пассажей, полученных от рыб, показал, что клетки сердца кеты (СНН-1) (*Oncorhynchus keta*) относились по видовой принадлежности к клеткам чавычи, клетки эмбриона чавычи (СНСе-214) (*Oncorhynchus tshawytscha*) и клетки эпителиальной папилломы карпа (ЕРС) (*Cyprinus carpio*) относились к одному виду и идентифицировались, как черный толстолог, а клеточная культура, полученная из гонад радужной форели (RTG-2) (*Oncorhynchus mykiss*), относилась к виду синезаберный солнечник (*Lepomis macrochirus*). Исходя из анализа существующего разнообразия клеточных линий рыб в различных специализированных Коллекциях, можно сделать предположение, что клеточная линия СНН-1 является клеточной линией СНСе-214. Культуры клеток СНСе-214 (*Oncorhynchus tshawytscha*) и ЕРС (*Cyprinus carpio*) идентифицируются, как клетки черного толстолога (*Pimephales promelas*) и являются клеточной линией FHM. Клеточная линия RTG-2 (*Oncorhynchus mykiss*) относилась к виду синезаберный солнечник (*Lepomis macrochirus*) и, по-видимому, может являться клеточной линией BF-2.

Обсуждение результатов исследования. Многолетняя история культивирования клеток млекопитающих насчитывает немало случаев межвидовой клеточной и внутривидовой контаминации культур, происходящей при получении новых линий и при одновременном культивировании нескольких линий клеток [5]. Исследования большого числа клеточных линий двух коллекций позволило еще раз указать на существование и важность проблемы возможной контаминации или перепутывания клеточных линий в ходе длительного культивирования и активного обмена между лабораториями без каких-либо промежуточных процедур сертификации на предмет их изначальных характеристик.

В целом результаты наших сравнительных исследований кариологического и молекулярно-генетических методов показывают, что *in vitro* кариотип многих клеточных культур претерпевает значительные количественные и структурные изменения, что сильно в некоторых случаях затрудняет интерпретацию видовой принадлежности. В качестве примера можно привести кариотипы клеточных линий КРС-ЛЭК, MDBK и лошади – ЭКЛ, в которых в ходе длительного культивирования происходит не только полиплоидизация кариотипов, но и образуются псевдометацентрические хромосомы за счет Робертсоновских транслокаций гетеролитического и гомологического типов. Идентификация кариотипов такого рода требует более тонкой и длительной процедуры кариологического анализа, что существенно увеличивает время исследования определенной клеточной линии. Стоит указать, что у ряда клеточных линий очень сложно и подчас невозможно получить качественные хромосомные препараты или провести их анализ в силу специфичных особенностей кариотипа – морфологии и числа хромосом.

Сравнительная оценка результатов цитогенетического анализа клеточных культур на предмет видовой принадлежности полностью совпадала с результатами ВПЦР-РВ и секвенированием участков генов *cytb* и *COI* мтДНК. Как показано в работе, методами молекулярно-генетического анализа, основанных на специфичной ПЦР и секвенировании, где в качестве мишени нами была использована последовательность митохондриальной ДНК, не удалось подтвердить гибридную природу клеточной культуры А₄XL. Хотя цитогенетический анализ позволил выявить присутствие некоторых гибридных кариотипов. Отсутствие мтДНК лошади в клеточной культуре А₄XL, согласуется с ранее опубликованными данными о элиминации мтДНК одного из доноров во время гибридизации соматических клеток. Следовательно, актуальным является поиск новых видоспецифических маркеров хромосомной природы.

Вместе с тем, применение методик секвенирования фрагментов *COI* и *cytb* генов мтДНК дало возможность определить видовую принадлежность культуры клеток полученных от различных видов млекопитающих и рыб, а применение видоспецифичной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в сравнении с традиционной ПЦР с электрофоретической детекцией продукта, является более чувствительной и специфичной. Синтезированные зонды с разными флуорофорами позволяют перейти к мультиплексному формату, при котором в одной реакции возможно идентифицировать две и более видоспецифических мишеней. При этом время анализа на одну клеточную линию значительно сокращается.

Выводы. Полученные нами данные указывают на необходимость тщательного контроля клеточных культур, особенно в крупных специализированных коллекциях с применением системы предложенных нами молекулярно-генетических методов анализа. Это важно, прежде всего для клеточных культур, для которых ранее не представлялось возможным проводить цитогенетический или изоферментный анализ ввиду методических трудностей.

Список литературы

1. Кулешов, К. В. Использование современных молекулярно генетических методов анализа для идентификации клеточных линий /Кулешов К.В., Дьяконов Л.П.// Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных, роль нанотехнологий в реализации приоритетных задач биотехнологии: 7-ая международная научная школа-конференция: сборник трудов науч. конф. 23-24 октября 2008 г. – Дубровицы, 2008. – С. 65-74.
2. Кулешов, К. В. Идентификация видовой принадлежности клеток в культуре / Л. П. Дьяконов, Т. В. Гальнбек, К. В. Кулешов//Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) – М.:КомпанияСпутник+, 2009. – С. 244 – 255.
3. Armstrong, K.F. and Ball, S.L. (2005) 'DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 360, No. 1462, P. 1813-1823.
4. Buehring, G.C., Eby, E.A. and Eby, M.J. (2004) 'Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it?', *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, Vol. 40, No. 7, P. 211-5.
5. Gartler, S.M. (1968) 'Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines', *Nature*, Vol. 217, No. 5130, P. 750-1.
6. Gilbert, D.A., Reid, Y.A., Gail, M.H., Pee, D., White, C., Hay, R.J. and O'Brien, S.J. (1990) 'Application of DNA fingerprints for cell-line individualization', *Am J Hum Genet*, Vol. 47, No. 3, P. 499-514.
7. Hebert, P.D. and Gregory, T.R. (2005) 'The promise of DNA barcoding for taxonomy', *Syst Biol*, Vol. 54, No. 5, P. 852-9.
8. Irwin, D.M., Kocher, T.D. and Wilson, A.C. (1991) 'Evolution of the cytochrome b gene of mammals', *J Mol Evol*, Vol. 32, No. 2, P. 128-44.
9. Kaplan, J. and Hukku, B. (1998) 'Cell line characterization and authentication', *Methods Cell Biol*, Vol. 57, P. 203-16.
10. Natalia V. Ivanova (2007) 'Universal primer cocktails for fish DNA barcoding', *Molecular Ecology Notes*, Vol. 7, No. 4, P. 544-548.
11. Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. (2007) '- bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>)', Vol. – 7, P. 364.
12. Simpson, W.F. and Stulberg, C.S. (1963) 'Species Identification of Animal Cell Strains by Immunofluorescence', *Nature*, Vol. 199, P. 616-7.
13. Stulberg, C.S., Simpson, W.F. and Berman, L. (1961) 'Species-related antigens of mammalian cell strains as determined by immunofluorescence', *Proc Soc Exp Biol Med*, Vol. 108, P. 434-9.

MODERN METHODS OF SPECIFIC IDENTIFICATION OF CELLULAR LINES USED FOR PRODUCTION OF BIOPREPARATIONS AND DIAGNOSTICS OF ANIMAL DISEASES

*Diakonov L.P., Kuleshov K.V., Gal'nbek T.V., Kiselyova D.R.**All Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko of RAAS (ARIEV), Moscow**Podchernyayeva R.Ya., Grinkevych O.M.**Scientific Research Institute of Virology named after D.I. Ivanovsky of RAMS**Materials concerning the modern methods of specific identification of cellular lines used for production of biopreparations and diagnostics of animal diseases are presented in the article.*

УДК 619:616-001.28/.29

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МИКРОБНОГО АНТИГЕНА-РАДИТОКСИНА ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ОЛБ

*Низамов Р.Н., Нефедова Р.В., Шарифуллина Д.Т., Рахматуллина Г.И., Вагин К.Н.**Федеральный центр токсикологической и радиобиологической безопасности животных, г. Казань*

Иммуномониторинг радиационных поражений организма складывается из совокупности показателей, полученных с использованием трудоёмких, сложных, дорогостоящих методов исследований, которые недостаточно информативны, неэкспрессны, часто не учитывают индивидуальные особенности организма, и поэтому проблема разработки новых методов диагностики является актуальной.

В связи с перспективностью современных иммунохимических и серологических методов индикации антигенных веществ и антител инфекционной и неинфекционной природы, в последнее время пристальное внимание исследователей по радиационной биологии привлекают иммунологические методы обнаружения радиоиндуцированных антигенов и радиотоксинов. При этом рабочей гипотезой служили сообщения о том, что ионизирующее излучение, поражая иммунную систему организма, индуцирует лучевые антигены – радиотоксины белковой, липоидной и хиноидной природы, которые могут быть детектированы в иммунохимических реакциях. При моделировании лучевых поражений с радиотоксинаемией, обычно в качестве источников лучевых антигенов используют органы и ткани облученных животных, растительные ткани и микроорганизмы [1, 2, 3].

Исходя из этого, задачей настоящих исследований явилась разработка тест-систем для осуществления иммуномониторинга при радиационных поражениях организма.

Материалы и методы. В качестве продуцента лучевого антигена – радиотоксина использовали микробы кишечной палочки (*E. coli* шт. «ПЛ-6»), поскольку химический состав микробной клетки существенно отличается от тканевых клеток животного и растительного происхождения. Известно, что гипериммунизация животных тканевыми и растительными антигенами обуславливает синтез гетерологичных антиканевых антител, что ведет к неспецифичности диагностических антисывороток. Для получения лучевых антигенов, клетки *E. coli* выдерживали на твердой питательной среде (МПА) при 37°C в течение 24 часов и по истечении указанной экспозиции подвергали облучению на гамма-установке «Исследователь» в дозе 2,5 Гр. Облученную бакмассу экстрагировали 96 %-ным этанолом в течение 24 часов, после этого экстракт удаляли на вакуумном испарителе. Полученный экстракт стандартизировали стерильным физиологическим раствором (рН 7,0-7,2) до концентрации 5 мг/мл и использовали для гипериммунизации животных.

Гипериммунизацию животных проводили согласно общепринятой в иммунологии схеме иммунизации и через 7 дней после окончания гипериммунизации у животных брали сыворотки. После определения в них титра антител использовали в качестве исходного сырья для изготовления диагностических препаратов.

Из гипериммунных сывороток выделяли глобулины путем осаждения сульфатом аммония с последующей хроматографией на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой и гельфильтрацией на сефадексе G-200. Для получения иммуноферментных препаратов глобулины конъюгировали с ферментом (пероксидаза хрена), используя одноступенчатый глутаральдегидный метод. Очистку конъюгатов проводили путем диализа на колонке с сефадексом; полученные фракции фотометрировали на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 280 и 403 нм. Коэффициент специфичности (Ксп) рассчитывали по соотношению экстинкции 403/280 нм. Иммуноферментные конъюгаты испытывали на активность и специфичность в ИФА (прямой и непрямой «сэндвич» - варианты). Результаты учитывали визуально и спектрофотометрически при длине волны 492 нм по критерию коэффициента специфичности, равного или превышающего 2,0. Контролем служили гомологичный и гетерологичный антигены.

После проверки на активность и специфичность, иммуноферментные пероксидазные конъюгаты (ИФК) расфасовывали в ампулы и лиофилизировали на установке «Лозанна».

Индикацию лучевых антигенов в периферической крови и патологическом материале проводили в прямом варианте ИФА взятых от пораженных внешним ионизирующим излучением животных, в дозах, вызывающих острую лучевую болезнь легкой, средней и тяжелой степени тяжести.

Подготовку антигенсодержащего материала перед иммуноферментным анализом проводили путем прогревания исследуемых сывороток крови облученных (отрицательный контроль) животных в водяной бане при 56°C в течение 10-15 минут для инактивации комплемента, а проб из патологического материала – путем прогревания 10 %-ной взвеси гомогенатов в водяной бане в указанных режимах, используя в дальнейшем для анализа надосадочную жидкость в качестве исследуемого материала.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований была изготовлена экспериментальная серия иммуноферментного конъюгата (ИФК) на основе антигена микробного происхождения – хиноидного радиотоксина и гомологичного к нему антирадиотоксина.

Активность и специфичность изготовленного диагностикума была испытана на лабораторных (белые мыши – 300, белые крысы – 90, кролики – 60) и с.-х. (овцы – 60, свиньи – 12) животных. Установлено, что радиационное поражение организма сопровождается появлением в сыворотке крови токсических продуктов в титрах 1:8 и выше в ИФА-тесте. При этом титры антигенов (радиотоксинов) коррелировали с дозой облучения животных, то есть значения титров радиоиндуцированных антигенов в ИФА-тесте имели прямую пропорциональную зависимость от степени тяжести лучевой болезни. Сопоставительный анализ