

Зверко В.В.

ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ МЕЖВИДОВОЙ КОНТАМИНАЦИИ

Научный руководитель: д-р биол. наук, Фомина Е.Г.

Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Минск

Актуальность. Неверная идентификация и перекрестная контаминация клеточных линий представляет собой серьезную проблему, с которой, начиная с 60-х годов XX века и по настоящее время сталкиваются исследователи при культивировании клеток млекопитающих. Многолетняя история культуральной работы насчитывает немало случаев межвидовой и внутривидовой контаминации культур, происходящей как при получении новых линий, так и при одновременном культивировании нескольких клеточных линий. Отсутствие подтверждения подлинности и чистоты использованной в исследованиях клеточной линии подвергает сомнению результаты научных экспериментов. Работы, проведенные на ошибочно идентифицированных культурах, как правило приводят к распространению недостоверной информации в научной литературе, невоспроизводимости результатов, финансовым, временным и репутационным потерям.

Цель: оценить наличие межвидовой кросс-контаминации клеточных культур с использованием видоспецифической ПЦР.

Материалы и методы. Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 2мМ L-глутамина, 10% инаktivированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотик гентамицин в количестве 40 мкг/мл среды в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С. Пересев клеток осуществляли общепринятым методом. Для диссоциации клеток использовали 0,25% раствор трипсина и 0,02 % раствор Версена, в соотношениях 1:3. Клетки пересевали дважды в неделю по достижению монослоя на 3-4 сутки. Для получения геномной ДНК из клеточных культур применяли набор реагентов Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для определения концентрации и степени чистоты препарата выделенной ДНК применяли спектрофотометрический анализ с использованием прибора Nano Photometer P330 (Implen, Германия). Постановку ПЦР для оценки межвидовой контаминации осуществляли на термоциклере Quant Studio 5.0 (Applied Biosystems, США) с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Результаты и их обсуждение. С использованием отработанной методики было проведено исследование содержащихся в коллекции клеточных культур животного происхождения на предмет присутствия ДНК других биологических видов. Подтверждена чистота более 40 закладок 19 культур клеток в отношении межвидовой контаминации. Для одной закладки клеточной линии EL-4 было обнаружено наличие ДНК человека, свидетельствующее о контаминированности клеточной культуры мыши клетками человеческого происхождения. Для исключения культуры-контаминанта использован метод конечных разведений, который позволил получить отдельный клеточный клон «чистой» культуры EL-4.

Выводы. Отработана методика проведения видоспецифической ПЦР для выявления межвидовой кросс-контаминации клеточных культур, позволяющая выявлять ДНК 8 видов млекопитающих (человек, мышь, собака, бык, свинья, африканская зеленая мартышка, кролик, крыса). Подтверждена чистота более 40 закладок 19 культур клеток в отношении межвидовой контаминации. Методом конечных разведений получена «чистая» клеточная культура лимфомы мыши EL-4, которая была контаминирована клетками человеческого происхождения.