

B.B. Зверко, Е.Е. Григорьева

**ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЖИВОТНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ МЕЖВИДОВОЙ КОНТАМИНАЦИИ**
Научный руководитель: д-р биол. наук Е.Г. Фомина

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

V.V. Zverko, E.E. Grigorieva

**ASSESSMENT OF THE PURITY OF CELL CULTURES OF ANIMAL ORIGIN
WITH RESPECT TO INTERSPECIES CONTAMINATION**

Tutor: PhD E.G. Fomina

Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk

Резюме. Отработана методика видоспецифической ПЦР для выявления межвидовой кросс-контаминации клеточных культур. Подтверждена чистота более 40 закладок 19 культур клеток. Для одной закладки клеточной линии EL-4 было обнаружено наличие ДНК человека. Методом конечных разведений получена «чистая» клеточная культура лимфомы мыши EL-4.

Ключевые слова: культура клеток, межвидовая контаминация, полимеразная цепная реакция.

Resume. The technique of species-specific PCR for detection of interspecific cross-contamination of cell cultures was developed. The purity of more than 50 bookmarks of 29 cell cultures was confirmed. The presence of human DNA was detected for one clade of the EL-4 cell line. A “pure” cell culture of mouse lymphoma EL-4 was obtained using the final dilution method.

Keywords: cell culture, interspecies contamination, polymerase chain reaction.

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 [1, 2]. Отсутствие подтверждения подлинности и чистоты использованной в исследованиях клеточной линии подвергает сомнению результаты научных экспериментов [3]. Работы, проведенные на ошибочно идентифицированных культурах, как правило приводят к распространению недостоверной информации в научной литературе [4, 5]. Результатом пренебрежения процедурами контроля качества используемых биологических объектов также становится невоспроизводимость результатов биомедицинских исследований [6].

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

Задачи:

1. Оптимизировать условия и разработать методику выявления межвидовой кросс-контаминации клеточных культур с использованием видоспецифической ПЦР.
2. Определить наличие межвидовой кросс-контаминации в культурах клеток животного происхождения.

Материалы и методы. Монослойные культуры клеток культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 2ММ L-глутамина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотик гентамицин в количестве 40 мкг/мл среды в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. 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.

Суспензионные клеточные культуры выращивали в среде RPMI–1640, содержащей 2ММ L-глутамина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотик гентамицин в количестве 40 мкг/мл среды в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Пересев осуществляли путем переноса необходимого количества суспензии клеток (1,0–2,0×10⁵ клеток/мл) в новый флакон со свежей ростовой средой.

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 осуществляли на термоциклиере Quant Studio 5.0 (Applied Biosystems, США) с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ОДО «Праймтех» (Республика Беларусь).

Состав реакционной смеси: 2,5 мкл 10х буфера А (АртБиоТех, Республика Беларусь), 0,5 мкл смеси дНТФ (10 мМ), 0,75 мкл 50мМ MgCl₂, по 10 пмоль соответствующего прямого и обратного праймера, 0,25 мкл Таq-полимеразы ArtStart (5 ед/мкл) (АртБиоТех, Республика Беларусь), 1 мкл матрицы, деионизованная вода до конечного объема 25 мкл. Режим амплификации: 1 цикл – 95 °С – 3 минуты; 35 циклов – 95 °С – 30 секунд, 55 °С – 30 секунд, 72 °С – 30 секунд. Анализ полученных результатов осуществляли методом электрофореза в агарозном геле.

Результаты и их обсуждение. Исследование по отработке методики проведения видоспецифической ПЦР для выявления межвидовой кросс-контаминации клеточных культур включало в себя ряд этапов: выбор видоспецифических праймеров; подбор оптимальных условий проведения ПЦР; оценка чувствительности и специфичности реакции.

На основании литературных данных и результатов проведенного *in silico* анализа представленных в GenBank нуклеотидных последовательностей СО1 участка генома 8 видов млекопитающих (человек, мышь, собака, бык, свинья, африканская зеленая мартышка, кролик, крыса) были выбраны олигонуклотиды, позволяющие с высокой специфичностью выявлять генетический материал указанных биологических видов. Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Табл. 1. Праймеры, использованные для проведения видоспецифической ПЦР

№ п/п	Биологический вид	Последовательности праймеров, 5'-3'	Размер фрагмента, п.н.	Источник

Продолжение таблицы 1

1	<i>Homo sapiense</i> (человек)	TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC TATGCGGGAAACGCCATATCG	228	[7]
2	<i>Mus musculus</i> (мышь)	ATTACAGCCGTACTGCTCSTAT CCCAAAGAATCAGAACAGATGC	150	[7]
3	<i>Rattus norvegicus</i> (крыса)	CGGCCACCCAGAAGTGTACATC GGCTCGGGTGTCTACATCTAGG	196	[8]
4	<i>Canis lupus familiaris</i> (собака)	GAACTAGGTCAAGCCGGTACTT CGGAGCACCAATTATTAACGGC	153	[7]
5	<i>Bos taurus</i> (бык)	TATTCCAACCGGGTAAAAGTC GAAAATAAAGCCTAGGGCTCAC	102	[8]
6	<i>Sus scrofa</i> (свинья)	CTACTATCCCTGCCAGTT GAATAGGAAGATGAAGCCC	460	[8]
7	<i>Cercopithecus aethiops</i> (зеленая мартышка)	CCTCTTCCTGCTGCTAATG TTTGATACTGGATATGGCG	222	[7]
8	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (кролик)	CGCCTATACAATATGAAATACTGTT TGTGGTTGTTAGTTCAATAGTCT	136	[8]

Данные праймеры были использованы с целью подбора оптимальных условий ПЦР для каждой моноплексной реакции, обеспечивающих накопление специфического продукта амплификации при минимальном количестве матрицы, и определения возможности унификации температурного профиля. В серии экспериментов применяли разные концентрации ионов Mg^{2+} , варьировали количество праймеров и Таq-полимеразы; видоизменяли параметры протокола: продолжительность этапов амплификации и температурный режим отжига праймеров. В качестве оптимального был определен следующий температурно-временной протокол: 1 цикл – 95 °C – 3 минуты; 35 циклов – 95 °C – 30 секунд, 55 °C – 30 секунд, 72 °C – 30 секунд.

Для всех пар праймеров экспериментально установлено отсутствие неспецифических реакций при тестировании образцов гетерологичной ДНК.

Для определения чувствительности реакции использовали серийные 10-кратные разведения геномной ДНК, выделенной из 8 клеточных супензий разного видового происхождения: St1=100 нг/мкл; St2=10 нг/мкл; St3=1,0 нг/мкл; St4=0,1 нг/мкл; St5=0,01 нг/мкл; St6=0,001 нг/мкл; St7=0,0001 нг/мкл.

По результатам проведенных исследований было установлено, что минимально детектируемое количество ДНК для различных биологических видов несколько варьировало (рисунок 1), при этом нижний предел обнаружения составил не более 0,01 нг/мкл.

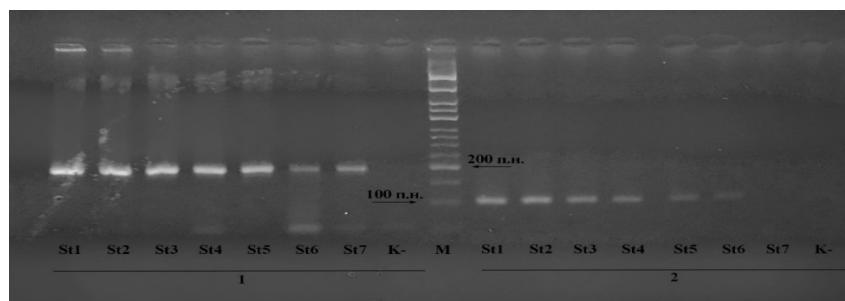


Рис. 1 – Оценка чувствительности реакции с использованием серийных разведений геномной ДНК методом электрофореза в агарозном геле. 1 – серийные разведения ДНК *Rattus norvegicus* (крыса); 2 – серийные разведения ДНК *Bos taurus* (бык); М – маркер молекулярных масс Step50 plus (Биолабмикс, Российская Федерация)

Способность анализа обнаруживать межвидовую перекрестную контаминацию проверяли в серии экспериментов, для проведения которых были приготовлены смеси клеток двух разных видов млекопитающих в фиксированных соотношениях (1:99, 5:95, 10:90, 20:80, 50:50) с последующим выделением ДНК из 100 мкл смеси и постановкой ПЦР в моноплексном и дуплексном форматах. На рисунке 2 в качестве примера представлены результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР, полученных в дуплексной реакции амплификации на матрице ДНК, выделенной из смеси культур клеток BGM (африканская зеленая мартышка) и McCoV (мышь).

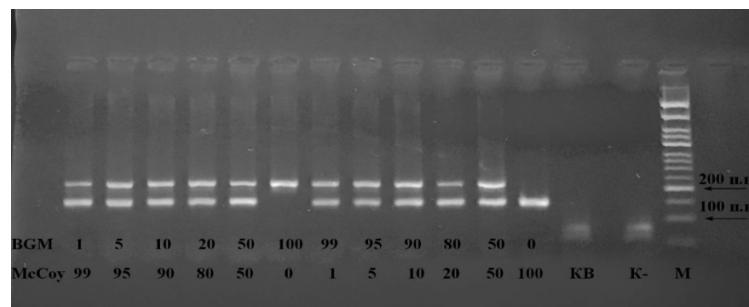


Рис. 2 – Электрофоретический анализ результатов амплификации ДНК африканской зеленой мартышки и мыши на матрице генетического материала, выделенного из смеси клеточных культур BGM и McCoV в различном соотношении. KB – контроль выделения; K⁻ – отрицательный контроль амплификации; М – маркер молекулярных масс Step50 plus (Биолабмикс, Российская Федерация)

Как видно из представленных данных, специфические амплификаты наблюдаются во всех образцах, где присутствуют клетки двух клеточных культур, в том числе при минимальном (1%, 50 клеток в 5000) содержании клеток как одной, так и второй клеточной линии. Данные результаты позволяют сделать вывод о возможности обнаружения примеси клеток другого вида млекопитающих при кросс-контаминации клеточной культуры в минимальных количествах и подтверждает чувствительность ПЦР-анализа. С использованием отработанной методики было проведено исследование содержащихся в коллекции 19 клеточных культур животного происхождения на предмет присутствия ДНК других биологических видов. Подтверждена чистота более 40 закладок 19 культур клеток в отношении межвидовой контаминации. Лишь для одной закладки клеточной линии EL-4 было

обнаружено наличие ДНК человека, свидетельствующее о контаминации клеточной культуры мыши клетками человеческого происхождения (рисунок 3). Для исключения культуры-контаминации использован метод конечных разведений, который позволил получить отдельный клеточный клон «чистой» культуры EL-4.

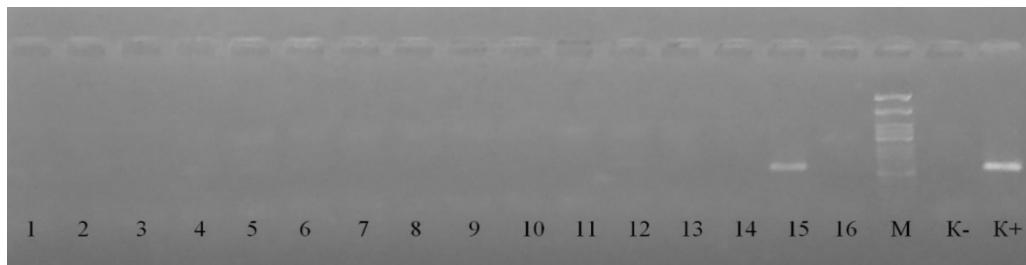


Рис. 3 – Электрофоретический анализ результатов выявления ДНК человека в генетическом материале клеточных культур животного происхождения: 1 – BGM, 2 – McCoy B, 3 – Vero E6, 4 – MDBK, 5 – C6, 6 – MDCK, 7 – СПЭВ, 8 – Ma-104, 9 – RK-13, 10 – NFS-60, 11 – L929, 12 – Vero, 13 – 46-47, 14 – CV-1, 15 – EL-4, 16 – L1210. K⁻ – отрицательный контроль амплификации; K⁺ – положительный контроль амплификации; М – маркер молекулярных масс Step50 plus (Биолабмикс, РФ)

Выводы:

1. 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).
2. Подтверждена чистота более 40 закладок 19 культур клеток в отношении межвидовой контаминации.
3. Методом конечных разведений получена «чистая» клеточная культура лимфомы мыши EL-4, которая была контаминарирована клетками человеческого происхождения.

Литература

1. Almeida, J. Standards for cell line authentication and beyond / J. Almeida, K. Cole, A. Plant // PLoS Biol. – 2016. – Vol. 14. – e1002476.
2. Capes-Davis, A. Authentication: a standard problem or a problem of standards? / A. Capes-Davis, R. Neve // PLoS Biol. – 2016. – Vol. 14, No. 6:e1002477.
3. Elgui de Oliveira, D. "Cell identity" crisis: another call for immediate action / D. Elgui de Oliveira, C. Marques, V. Losi // Cancer Lett. – 2016. – Vol. 381, No. 1. – P. 122–123.
4. Horbach, S. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature / S. Horbach, W. Halfmann // PLoS One. – 2017. – Vol.12, No. 10:e0186281.
5. Korch, T. The extensive and expensive impacts of HEp-2 [HeLa], Intestine 407 [HeLa], and other false cell lines in journal publications / T. Korch, A. Capes-Davis // SLAS Discov. – 2021. – Vol. 26, No. 10. – P. 1268–1279.
6. Jarvis, M. Irreproducibility in preclinical biomedical research: perceptions, uncertainties, and knowledge gaps / M. Jarvis, M. Williams // Trends Pharmacol. Sci. – 2016. – Vol. 37, No. 4. – P.290–302.
7. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method / B. Parodi [et al.] // BioTechniques. – 2002. – Vol. 32. – P. 432–440.
8. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach / J. Cooper [et al.] // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. – 2007. – Vol. 43, No. 10. – P.344–351.