

УДК 619:616-07

ВЫЯВЛЕНИЕ КОНТАМИНАНТОВ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ОВЕЧЬЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ПЦР

Айрапетян Ш.А., 5 курс факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. Барышникова Е.И.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Ключевые слова: культуры клеток, (СМЯ), Выявление микоплазм, ПЦР с электрофоретической детекцией для выявления генома (ЛМЖ).

Культуры клеток получили широкое распространение и применение в самых разнообразных областях экспериментальной биологии и медицины для изучения и решения кардинальных проблем общей и частной вирусологии, онкологии, биохимии, биотехнологии и т.д. Проблема идентификации клеток в культуре стала очевидной еще в 50-60-е годы XX века, когда при анализе хромосомных наборов и видоспецифических антигенов ряда клеточных линий человека и животных были выявлены случаи межвидовой клеточной контаминации.

Вирусы артрита-энцефалита коз (АЭК) и висна-маеди (ВМ) относятся к семейству *Retroviridae*, роду *Lentivirus*, в состав которого входит не только группа лентивирусов овец и коз, но и крупного рогатого скота (КРС), лошадей, кошек, приматов. Многие исследователи объединяют возбудителей ВМ и АЭК под общим названием – лентивирусы мелких жвачных (ЛМЖ).

АЭК и ВМ были зарегистрированы в странах Европы, Латинской Америки, Австралии. В связи с этим возрастает вероятность получения первичной культуры клеток овечьего происхождения, контаминированных ЛМЖ.

Цель исследования: целью нашего исследования являлось выявление вирусной и микоплазменной контаминаций в клеточных культурах овечьего происхождения методом ПЦР.

Материалы и методы

Для исследования были взяты клетки СМЯ, праймеры ЛМЖ (ПО-2, ЛЭЯ, СМЯ). «Набора препаратов для выявления генома лентивирусов мелких жвачных методом полимеразной цепной реакции» (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров); «МИК-КОМ» для выявления возбудителей микоплазмоза методом ПЦР (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

Культивирование культуры клеток овечьего происхождения, синовиальной мембраны ягненка (СМЯ)

Для исследования мы брали, сублинию клеток синовиальной мембраны ягненка (СМЯ) культивировали на питательной среде ДМЕМ с глутамином, содержащей 10% фетальной сыворотки телят в пластиковых матрасах объемом 25 см³, 50 см³ и 75 см³, рН ростовой среды 7,1-7,2 с помощью добавления необходимого количества 7,5% NaHCO₃.

Культивирование СМЯ проводили при условиях стационарного монослоя при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Пассирование клеток осуществляли в следующем порядке: из культуры со сплошным монослоем клеток удаляли ростовую среду и вносили предварительно подогретую до 37°C смесь 0,02%-ного раствора версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 1:1. Количество диспергирующей жидкости зависело от объема культуральной посуды (5, 10 и 20 мл соответственно на 25 см³, 50 см³ и 75 см³ матрас). После этого флаконы с культурой укладывали вниз пластом клеток на 1-3 мин, в течение которых происходило диспергирование клеточного слоя, проявляющееся в его отслаивании от поверхности стекла и дезагрегации на отдельные клетки или группы клеток, что визуально определяли по феномену “струйного стекания” клеточной массы при вертикальном положении культурального сосуда. В это время матрасы осторожно переворачивали клеточным слоем вверх и по поверхности, свободной от клеток, из них декантировали диспергирующую жидкость, оставляя по 1-7 мл в зависимости от объема культурального сосуда. В матрасы заливали небольшое количество ростовой среды для пристеночного выращивания и путем энергичного встряхивания суспендировали клетки. Затем количество среды в каждом матрасе доводили до уровня, превышающего исходный пропорционально выбранному коэффициенту пересева (1:2, 1:3). Пересев клеток осуществляли 2 раза в неделю (рис. 1 а, б)

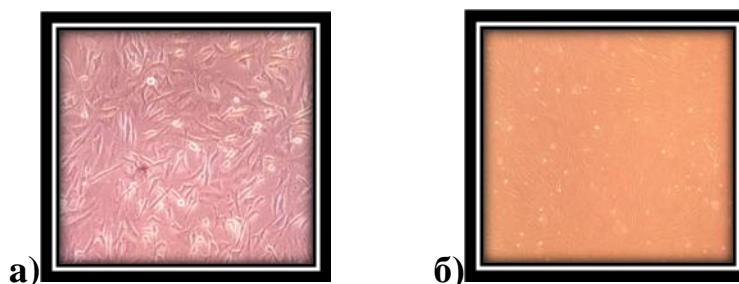


Рис. 1. а) на 2 сутки культивирование $\times 360$;
б) 3 пассаж: 6 сутки культивирование клеток СМЯ $\times 24$

Выявление контаминантов микоплазм клеточных культур

Проводили ПЦР – амплификация: Общий объем реакции-25 мкл, объем ДНК-пробы-10 мкл. В комплекте реагентов для ПЦР-амплификации «ПЦР-комплект» применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска.

Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95°C , что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Подготовили необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-РМИК-КОМ для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

На поверхность воска внесли по 10 мкл ПЦР-смесь-2blue, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесь-1-РМИК-КОМ.

Сверху добавили по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

Проведение амплификации

Взять подготовленный материал для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внесли по 10 мкл ДНК, выделенной из клинических проб или контролей этапа выделения.

Поставили контрольные реакции амплификации:

а) отрицательный контроль (К-) – вместо ДНК-пробы внесли в пробирку 10 мкл ДНК-буфер.

б) положительный контроль (К+) – внесли в пробирку 10 мкл ПКО ДНК

Запустили на амплификаторе программу (см. таб. 1). Когда температура в ячейке амплификатора достигает 95°C, поставили программу на паузу, поместили пробирки в ячейки амплификатора, закрыли крышку прибора и сняли программу с паузы.

Таблица 1 – Проведение амплификации

Цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке)		
	температура	время	циклы
0	95°C	пауза	
1	95°C	5 мин	1
2	95°C	10с	41
	61°C	10с	
	72°C	10с	
3	72°C	1 мин	1
4	10°C	хранение	

Время амплификации примерно 2 ч 30 мин на амплификаторе с регулированием температур по матрице и 1 ч 40 мин на амплификаторе с активным регулированием.

Образцы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре не выше минус 16°C (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска). Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Постановка ПЦР с электрофоретической детекцией для выявления генома лентивирусов мелких жвачных (ЛМЖ)

Амплификацию проводили на приборе PalmCycler. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: смесь праймеров VVMFw и VVMRev (10 pM каждого) - 2,0 µl, dNTP (10 mM) - 0,5 µl, MgCl₂ (25 mM) - 0,5 µl, 5x буфер для ПЦР (Амплисенс Blue) - 5 µl, Taq ДНК-полимераза - 0,1 µl, провирусная ДНК (исследуемый образец) – 7 µl, деионизированная вода - до 12 µl, масло.

Смесь перемешивали на смесителе типа «Vortex», капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек. Амплификацию проводили при следующих оптимальных режимах.

Таблица 2 – Проведение амплификации

Амплификацию проводили при следующих оптимальных режимах			
Цикл	температура	время	циклы
0	95°C	3 мин	1
1	95°C	20 сек	40
2	50°C	20 сек	
3	72°C	20 сек	
4	72°C	5 мин	1

В каждой серии анализов использовали контрольные образцы: положительный контроль и отрицательный контроль. Смеси для контрольных образцов готовили по той же прописи, что и для исследуемых образцов.

Выводы

При культивирование культуры клеток СМЯ в течение трех пассажных уровней микоплазменная контаминация методом ПЦР не выявлена и постановка ПЦР с электрофоретической детекцией генома лентивирусов мелких жвачных (ВАЭК и ВВМ) вирус артрита-энцефалита коз и вирус висна-маеди контаминанты тоже не выявлены.

Библиографический список

1. Анджапаридзе, О.Г. Персистенция вирусов / О.Г. Анджапаридзе, Н.Н. Богомолова, Ю.С. Борискин. - М.:1984. 256 с.
2. Архипов, Н.И. Медленные инфекции животных / Н.И. Архипов, И.А. Бакулов, Л.И. Соковых. – М.: Агропромиздат, 1987.- 190 с.
3. Артюшин, С.К. Диагностика микоплазма-контаминации методом ДНК-ДНК гибридизации: Доклады ВАСХНИЛ / С. К. Артюшин, И.Л.Куликова, Л. П.Дьяконов, Г.Ф. Коромыслов. М.: - 2. - 1990. 14-18.
4. Астахова, А. В. Некоторые биологические и физико-химические свойства вируса, выделенного из культуры клеток почек крупного эмбриона: А.В. Астахова / Вопр. вирусологии.-М.: 1977. №3, 345-351 с.
5. Борхсениус, С.Н. Микоплазм: Цитология / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова. М.: - 1987. - 2, 4. - 379-390с.
6. Борхсениус, С.Н. Микоплазмы Л.: Наука / С.Н. Борхсениус, О.А. Чернова. М.:1989. - 156 с.
7. Бурдинский, В.Г. Выявление геномов возбудителей аденоматоза и висна-маеди овец с помощью полимеразной цепной реакции: дис. ...канд. вет. наук: 03.00.06/ Бурдинский Владимир Геннадьевич. – Покров, 2009. – 114 с.
8. Federico M, From Lentiviruses to Lentivirus vectors / M. Federico // Lentivirus gene engineering protocols. — Humana Press, 2003. – Vol. 229. – P. 3-15.

IDENTIFICATION OF CONTAMINANTS OF CELL CULTURES OVINE ORIGIN BY PCR

Hayrapetyan Sh.A., Baryshnikov E.I.

Key words: cell culture (SMYA) Identification of Mycoplasma PCR electrophoretic detection to identify genome (LMZ).

Cell culture and widespread application in various fields of Experimental Biology and Medicine to study and solve the fundamental problems of public and private virology, oncology, biochemistry, biotechnology, etc. The problem of identification of cells in culture has become apparent in the 50-60s of the twentieth century, when the analysis of chromosome sets of species-specific antigens and a number of human cell lines and animals were cases of interspecies cell contamination.

УДК 619:616-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА РАБДОВИРУСОВ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

Курбанова К.М., 5 курс факультета ветеринарной медицины
Научный руководитель: к.б.н., с.н.с. Калабекова Ф.С.
ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Ключевые слова: ПЦР, идентификация, рабдovирусы, лососевые рыбы.

В статье представлены исследования по молекулярно-генетическим методам для идентификации генома рабдovирусов лососевых рыб.

По оценкам ФАО, аквакультура является самым быстрорастущим сектором сферы производства продуктов питания в мире.

Серьезным препятствием на пути успешного развития аквакультуры являются болезни объектов культивирования, из которых основной ущерб наносят вирусные болезни рыб [Ahne W, 1977].

В целом эпизоотическая обстановка по вирусным болезням рыб в РФ неблагоприятная. Это обусловлено наличием у культивируемых в стране рыб опасных вирусных инфекций, среди которых две относятся к МЭБ-декларируемым, неопределенностью эпизоотического статуса по вирусным инфекциям практически всех рыбоводных хозяйств и отсутствием реального ветеринарного контроля межхозяйственных перевозок, экспорта и импорта рыбы и оплодотворенной икры.

В 2000 г., на рыбоводных предприятиях России были зарегистрированы две экзотических вирусных инфекции – инфекционный некроз гемопоэтической ткани лососевых рыб (ИНГТ) и инфекционный некроз поджелудочной железы (ИНПЖ), из которых первая является МЭБ-декларируемой, а вторая находится в списке III Евросоюза [МЭБ]. Оба инцидента (первый – в Московской области, второй – в Мурманской области)