

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач Республики
Беларусь

С.В.Нечай
«1» 2 2024 г.
Регистрационный № 016-0624



АЛГОРИТМ АУТЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ НА ОСНОВЕ ДНК-ПРОФИЛИРОВАНИЯ инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ – РАЗРАБОТЧИК:

государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р биол. наук Фомина Е.Г.; канд. биол. наук Григорьева Е.Е.; Зверко В.В.;
Корень С.В.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен алгоритм аутентификации клеточных линий человека и животных на основе ДНК-профилирования для подтверждения подлинности культур клеток (в том числе HEP-2C, RD, BGM, которые используются для лабораторного вирусологического исследования согласно требованиям СанПин «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий в отношении отдельных инфекционных заболеваний, управляемых и предупреждаемых средствами специфической профилактики», утверждённым постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 13.07.2023 № 113 и СанПин «Требования к порядку организации и проведения санитарнопротивоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кишечных инфекций», утверждённым постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 25.01.2023 № 14) в соответствии с международными стандартами ANSI/ATCC ASN-003-2015 и ANSI/ATCC ASN-002.1-2021, а также ст. 5.2.3 Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

Инструкция предназначена для врачей-эпидемиологов, врачей клинической лабораторной диагностики организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Осуществление санитарно-эпидемиологического слежения за инфекционными заболеваниями.
2. Лабораторная диагностика вирусных инфекций.
3. Производство противовирусных вакцин.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Набор реагентов для выделения геномной ДНК Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) или аналог.
2. Набор реагентов для очистки ампликонов Cleanup Standard (Евроген, Российская Федерация) или аналог.
3. Набор реагентов для секвенирования фрагментов ДНК BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) или аналог.
4. Набор реагентов для очистки продуктов секвенирования iX-Pure™ Dye Terminator Cleanup Kit (Nimagen, Нидерланды) или аналог.
5. Набор реагентов для мультиплексного анализа STR-маркеров и локуса амелогенина человека COrDIS Plus (Гордиз, Российская Федерация) или аналог.
6. Среда ДМЕМ с высоким содержанием глюкозы для культур клеток, стерильная (Gibco) или аналог, содержащая 2 мМ L-глутамина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) или аналог, пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (100 мкг/мл).
7. Среда RPMI 1640, содержащая 2мМ L-глутамина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) или аналог, антибиотик гентамицин в количестве 40 мкг/мл.
8. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) следующего состава: 2,68 мМ KCl, 1,47 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 8,0 мМ Na₂HPO₄, pH 7,2-7,8 (Thermo Fisher Scientific) или аналог.
9. 0,5 М Na₂EDTA, pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific) или аналог.

10. 0,25% раствор трипсина (Thermo Fisher Scientific) или аналог.
11. 0,02% раствор Версена (Thermo Fisher Scientific) или аналог.
12. Олигонуклеотид VF1d_t1
5' – TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG – 3'.
13. Олигонуклеотид VR1d_t1
5' – CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA – 3'.
14. Олигонуклеотид LepF1_t1
5' –TGTA AACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG – 3'.
15. Олигонуклеотид LepR1_t1
5' – CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA – 3'.
16. Олигонуклеотид M13 Forward: 5' – CAGGAAACAGCTATGAC – 3'.
17. Олигонуклеотид M13 Reverse: 5' – TGTA AACGACGGCCAGTC – 3'.
18. ДНК-полимераза Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific, США) или аналог.
19. Маркеры молекулярных масс нуклеиновых кислот GeneRuler 1000 bp Ladder и GeneRuler 100 bp Ladder (Thermo Scientific, США) или аналог.
20. Формамид Seq-Di (Nimagen, Нидерланды) или аналог.
21. Ламинарный шкаф 2В класса защиты Kojair KR-125 (Финляндия) или аналог.
22. Инкубатор углекислотный Steri-Cult (Thermo Scientific, США) или аналог.
23. Термоциклер Quant Studio 5.0 (Applied Biosystems, США) или аналог.
24. Спектрофотометр Nano Photometer P330 (Implen, Германия) или аналог.
25. Генетический анализатор ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) или аналог.
26. Генетический анализатор НАНОФОР 5 с лазер-индуцированной флуоресцентной детекцией (Институт аналитического приборостроения, Российская Федерация) или аналог.

27. Инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon NC-2000 или аналог.
28. Холодильник, поддерживающий температуру +2...+8 °С.
29. Морозильник, поддерживающий температуру не выше минус 20 °С.
30. Низкотемпературный морозильник, поддерживающий температуру не выше минус 80 °С.
31. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 15000g.
32. Центрифуга-вортекс.
33. Флаконы для культур клеток 25 см², с вентилируемой крышкой, стерильные (Sarstedt, США) или аналог.
34. Набор автоматических дозаторов переменного объема («Ленпипет», «Socorex») или иной.
35. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА

Алгоритм аутентификации клеточных линий человека и животных на основе ДНК-профилирования представлен на рисунке.

Работу с биологическим материалом при реализации метода следует производить в соответствии с СанПин «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г. №2.

1. Подготовка культуры клеток

1.1. Монослойные клеточные культуры (в том числе HEP-2С, RD, BGM) культивируют в среде ДМЕМ, содержащей 2 мМ L-глутамина, 10%

инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотики пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С.

1.2. Пересев клеток осуществляется следующим способом. Для диссоциации клеток используется 0,25% раствор трипсина и 0,02% раствор Версена в соотношениях 1:3 или фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 0,5 мМ Na₂EDTA. Клетки пересевают дважды в неделю по достижению монослоя (как правило каждые 3-4 сутки).

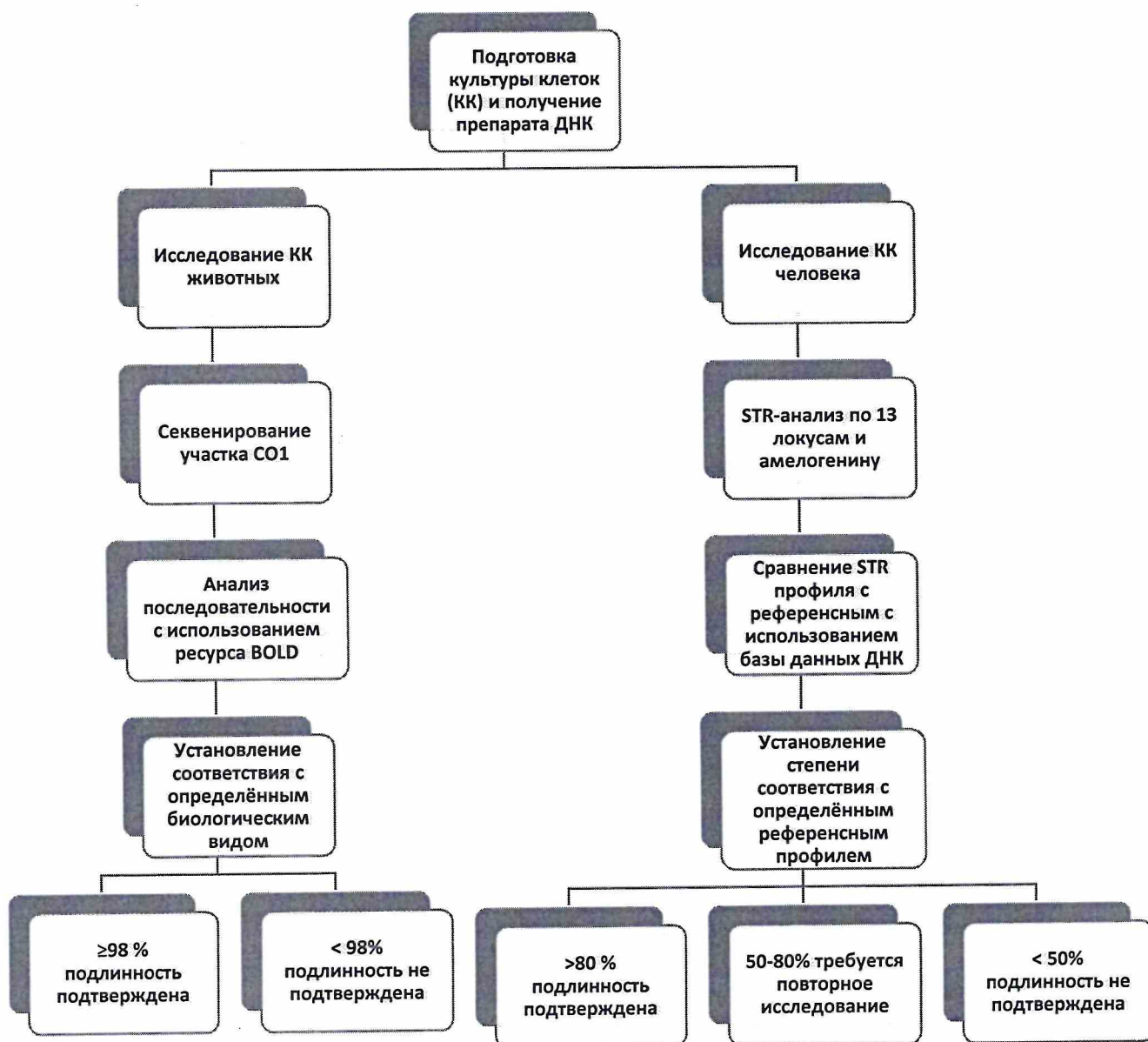


Рисунок – Алгоритм аутентификации клеточных линий человека и животных

1.3. Суспензионные клеточные культуры выращивают в среде RPMI 1640, содержащей 2мМ L-глутамин, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотик гентамицин в количестве 40 мкг/мл среды в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С.

1.4. Пересев осуществляют путем переноса суспензии клеток, содержащей $2,0 \times 10^5$ клеток/мл, в новый флакон со свежей ростовой средой.

2. Получение препарата ДНК

Для выделения генетического материала используют 500 тыс. клеток. ДНК выделяют с применением набора реагентов Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) или аналог, согласно инструкции производителя. Требования к геномной ДНК представлены в таблице.

Таблица – Требования к характеристикам геномной ДНК для последующего генотипирования

Параметр	Возможный метод оценки	Требование стандарта
Степень чистоты ДНК	Спектрофотометрия	A260/A280 = от 1.8 до 2.0
Целостность ДНК	Электрофорез в агарозном геле	Нефрагментированная ДНК размером >5 Kb, одна полоса в высокомолекулярной области
Концентрация ДНК	Спектрофотометрия	Значение A260 >20 нг/мкл

3. Исследование культуры клеток животных (в том числе BGM) с использованием секвенирования фрагмента гена цитохромоксидазы C (CO1) митохондриальной ДНК.

Для постановки ПЦР используют реакционную смесь следующего состава: 5,0 мкл 10xTaq-буфера, 2,0 мкл MgCl₂ (50 мМ), 1,0 мкл смеси дНТФ (10 мМ), по 15 пмоль олигонуклеотидов VF1d_t1, VR1d_t1, LepF1, LepR1, 0,25 мкл Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (5 ед/мкл), 10 нг матрицы, деионизованная вода до конечного объема 50 мкл. Амплификацию проводят в следующем режиме: 1 цикл – 98 °С – 30 секунд;

5 циклов – 98 °С – 10 секунд, 50 °С – 20 секунд, 72 °С – 30 секунд; 35 циклов – 98 °С – 10 секунд, 55 °С – 20 секунд, 72 °С – 30 секунд; 1 цикл – 72 °С – 10 минут. Амплификаты очищают с применением наборов реагентов Cleanup Standard (Евроген, Российская Федерация) или аналог, в соответствии с инструкцией производителя.

Для постановки секвенирующей ПЦР используют реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую 10 нг амплификата, 2,5x RR Sequencing Premix, 5x Sequencing Buffer, 15pM олигонуклеотидов M13 Forward и M13 Reverse. После денатурации образцов при 96 °С в течение 2 минут проводят 25 циклов амплификации при следующих температурно-временных параметрах: 15 секунд денатурации при 96 °С, 15 секунд отжига при 55 °С, 4 минуты элонгации при 60 °С. Очистку продуктов реакции от компонентов реакционной смеси (солей, ингибиторов, не включившихся ddNTPs) осуществляют набором iX-Pure™ DyeTerminator Cleanup Kit (Nimagen, Нидерланды) или аналог, в соответствии с инструкцией производителя. Очищенный материал растворяют в 20 мкл формамида. Пробы денатурируют при 96 °С в течение 2 минут, после чего пробирки помещают в морозильник. Электрофорез проводят на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) или аналог, используя 10 мкл пробы.

Критерии приемлемости: не менее 500 нуклеотидов (75%) непосредственно в участке гена CO1 размером ~660 п.н. (после обработки и удаления последовательностей праймеров) должны иметь значение показателя QV (Quality value), отражающего точность определения нуклеотида в каждой позиции, ≥ 30 .

Анализ полученной консенсусной последовательности участка гена CO1 проводят с использованием глобальной базы данных BOLD «Species level barcodes» (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine).

Идентичность последовательности анализируемого и референсного образцов в пределах 98-100% доказывает принадлежность клеточной культуры к определенному биологическому виду.

4. Аутентификация клеточных культур человеческого происхождения (в том числе НЕР-2С, RD) на основе определения высокополиморфных коротких tandemных повторов (STR (short tandem repeat)).

Для амплификации 13 полиморфных аутосомных STR-локусов и полиморфного участка в гене амелогенина (AMEL) используют набор реагентов COrDIS Plus (Гордиз, Российская Федерация) или аналог, в соответствии с инструкцией производителя. В реакционную смесь добавляют от 2 до 10 нг ДНК, отвечающей требованиям, представленным в таблице.

При постановке ПЦР устанавливают требования по соблюдению скорости изменения температуры не выше 0,3 °C/сек на этапах перехода от стадии отжига праймеров к стадии элонгации.

Аликвоты амплификата объемом 1 мкл смешивают с 10 мкл формамида и размерным стандартом (1 мкл), материал вносят в капилляр генетического анализатора НАНОФОР 5 или аналог. В результате электрофоретического разделения продуктов амплификации, обработки данных с использованием программного обеспечения OSIRIS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/osiris/>) получают генетические профили исследованных культур. Длина полученных фрагментов служит идентифицирующим фактором, продукты ПЦР анализируют одновременно с размерным стандартом, для идентификации аллельных вариантов исследуемых локусов используют аллельную лестницу.

Внимание! Результаты реакции считаются достоверными при соблюдении следующих условий:

отсутствие сигнала в отрицательном контрольном образце;

соответствие длины амплифицированных фрагментов в положительном контрольном образце размерам фрагментов контрольной ДНК по всем исследуемым локусам.

Для интерпретации результатов используют базу данных (<https://celldive.dsmz.de/str>). Сравнение клеточных линий предусматривает определение числа общих аллелей между ними, выраженного в процентах, с использованием алгоритма Танабе. Оценка степени идентичности может варьировать от 0% до 100%. При этом 0% имеет место, когда ни в одном локусе не обнаружено общих аллелей; 100% – когда одни и те же аллели наблюдаются в обоих образцах во всех локусах.

Для подтверждения подлинности клеточной линии при использовании для проведения анализа 13 локусов и гена амелогенина соответствие должно составлять 80-100%. Совпадение на 50-80% требует проведения повторного анализа, а значение параметра $\leq 50\%$ подтверждает отличное от референсного образца происхождение культуры клеток.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Использование культурального метода подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в боксах, предназначенных для работ с перевиваемыми клеточными линиями. При аутентификации клеточных линий с помощью настоящего алгоритма возможны следующие ошибки: качественные и количественные характеристики ДНК, выделенной из клеточных культур не соответствуют критериям приемлемости.

Для выделения ДНК, необходимо взять свежесеквирированные клетки. Строго соблюдать стерильные условия для культивирования клеток. Четко следовать инструкции производителя наборов для выделения ДНК.