

животных [Сулимова Г.Е. и др., 1992].

Таким образом, для улучшения качества молока необходимо максимально использовать быков с генотипом ВВ или АВ и закреплять их за коровами и телками, имеющими аллель В (ВВ или АВ) для получе-

ния или выведения животных с генотипом каппа-казеина ВВ. Накопление животных с генотипом каппа-казеина ВВ или АВ возможно только при целенаправленном отборе быков-производителей и формировании отдельных групп коров.

SUMMARY

The article presents the results from test for k-casein gene in sire bulls of 8 breeds and hybrids, belonging to Animal Improvement Organization «Tambovskoye» (Russia). Obtained information used with a view of animal classification by level of k-CnB gene frequency. Among the tested holsteinized red and white bulls, there is no evidence presents of BLAD- gene carriers.

Литература

1. Сулимова Г.Е. Молекулярно-генетический анализ генома животных и человека с использованием ДНК-маркеров // Автореф. дис. докт. биол. наук. Москва. 1998. 50 с.
2. Яковлев А., Терлецкий В., Митрофанова О., Дементьева Н. Определение носителей генетических дефектов среди быков-производителей // Молочное и мясное скотоводство. 2004. №7. С. 31-32.
3. Марзанов Н.С., Саморуков Ю.В., Ескин Г.В. Генетические исследования животных в России и за рубежом. Материалы международного научно-практического семинара. Быково. 2005. С. 6-10.
4. Сулимова Г.Е., Соколова С.С., Семикозова О.П. и др. Анализ полиморфизма ДНК кластерных генов у крупного рогатого скота: гены казеинов и гены главного комплекса гистосовместимости (BOLA) // Цитология и генетика. 1992. № 5. С. 18-26.

УДК 57.063.7 : 576.535 : 57.088.1

К.В. Кулешов

*ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАСХН (ВИЭВ),
Москва (Россия) лаборатория клеточной биотехнологии*

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР: РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ОСНОВАННЫХ НА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПРОДУКТА В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)

Введение

Длительно культивируемые клеточные линии человека и животных широко применяются как модельная система во многих отраслях экспериментальной биологии и ветеринарии. В Коллекции ВИЭВ депонировано большое количество клеточных линий и их сублиний от сельскохозяйственных животных основную часть составляют культуры клеток, полученных от коровы (71), овцы (17), свиньи (65) (Дьяконов Л.П., Ситьков В.И., 2000). Эти линии активно используются для вирусологических целей, получения гибридных культур клеток и исследовательской работы в разных областях иммунологии, биохимии, молекулярной биологии и генетики.

Одной из основных задач при длительном культивировании клеток является периодическая оценка (мониторинг) их ви-

довой принадлежности. Ранние методы видовой идентификации клеток в культуре были основаны на анализе белкового полиморфизма (Gartler, 1968; Tsareva et al., 1976). Изоферментный анализ используется и сегодня как один из основных методов видовой идентификации клеточных линий (Hay, 1992; Parodi et al., 2002; Stacey et al., 1992). Позднее был предложен ряд подходов, связанных с окраской видоспецифическими антителами и цитогенетическим анализом (Clausen and Syvertson, 1962; Coriell et al., 1958; Defendi et al., 1960; Simpson and Stulberg, 1963). В 1990-х гг. в связи с значительным прогрессом молекулярной биологии особое значение приобрели методы молекулярно-генетического анализа, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Cooper et al., 2007; Hay, 1992; Liu et al., 2008; Losi et al.,

2008; Milanesi et al., 2003; Ono et al., 2007; Parodi et al., 2002; Stacey et al., 1992; Steube et al., 2008; Steube et al., 2003). В последнее время особую актуальность приобретают методы основанные на ПЦР с детекцией продукта в реальном времени. Для данного подхода характерна более высокая чувствительность и специфичность, в сравнении с традиционными методами детекции основанными на электрофоретическом разделении продуктов.

Целью данной работы являлась разработка методики анализа видовой принадлежности клеточных линий, полученных от коровы, овцы и свиньи на основе полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы.

Материалом для исследований являлись клеточные культуры, депонированные в Коллекции ВИЭВ полученные от свиньи (СПЭВ, А4С2, ПК-15), коровы (ЛЭК, МДБК, ПТ-80) и овцы (ПО2, ПОХ-СО). Было проанализировано по 3 закладки каждой из клеточной культур и их сублиний. Тотальную ДНК из культуры клеток выделяли с использованием коммерческого набора Рибопреп (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора) согласно инструкциям производителя. На стандартное выделение брали 100 мкл суспензии концентрации 1×10^5 клеток/мл.

Панель контрольных образцов включала в себя ДНК выделенную из тканей: человека, свиньи, кошки, собаки, кролика, крысы, мыши, коровы (4 породы), овцы (4 породы) и свиньи (3 породы). Из тканей ДНК выделяли используя Протеиназу К с экстракцией фенол-хлороформной смесью и преципитацией солями (Sambrook et al., 2001). Чистоту и концентрацию полученной ДНК оценивали на спектрофотометре (Nanodrop, США).

Для оценки чувствительности реакции готовили десятикратные разведения клеточной суспензии $1 - 1 \times 10^6$ кл/мл с последующим выделением ДНК.

Анализ эффективности амплификации в ПЦР-РВ определяли, используя десятикратные разведения ДНК (7 точек) минимум по 3 повторности на точку, выделенной из 10^6 клеток, видовая принадлежность которых была подтверждена ранее.

Амплификацию мишени с детекцией в режиме реального времени проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия). ПЦР смесь в объ-

еме 25 мкл включала: по 6 пмоль каждого из двух видоспецифических праймеров, 3 пмоль зонда, дНТФ 200 мкМ каждого, 1х ПЦР-буфер с ионами магния и Taq-полимеразой (Синтол, Россия) и образец выделенной ДНК в объеме 10 мкл. Температурный цикл был следующим: начальная денатурация – 95°C 5 минут, затем 10 раундов с повышенной температурой отжига и без детекции флуоресцентного сигнала: 95°C – 20 секунд, 61°C – 25 секунд, 72°C – 20 секунд. Последующие 35 раундов проводили с детекцией флуоресценции на стадии отжига праймеров, 95°C – 20 секунд, 60°C – 25 секунд, 72°C – 20 секунд.

Результаты исследований.

В качестве мишени для идентификации видов *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Bos taurus* выбраны участки генов митохондриальной ДНК (мтДНК), кодирующие белки цитохром b и субъединицу I цитохром с-оксидазы (cytb и coxI). В качестве внутреннего контроля образца использовали гомологичный участок среди всех эукариот участок 18S рибосомальной ДНК (рДНК).

Для дизайна праймеров и зондов использовали последовательности мтДНК депонированных в GeneBank от 10 разных видов животных. Специфичность подобранных праймеров и зондов оценивали на наличие гомологии со всеми последовательностями в GeneBank, используя программу BLAST (Altschulet al. 1997). Температуру отжига праймеров и зондов рассчитывали по программе Primer Select (DNA-Star, США). Название праймеров и зондов для идентификации мтДНК свиньи, коровы и овцы, а также 18S рДНК приведены в таблице.

Праймеры SsF и SsR, предложенные (Cooper et al., 2007), модифицировали добавлением нуклеотидов к 5'-концу с целью оптимизации температуры отжига. Зонд SsZ2 rev соответствовал линейному типу (TaqMan) с температурой отжига 68°C, при этом сохранял стабильную вторичную структуру при 53°C. Для увеличения температуры отжига и эффективно-го тушения флуорохрома на АТ-богатых последовательностях мтДНК коровы и овцы подобраны длинные зонды OaZ и Bov-Z1 (27-29 п.о.), которые имели стабильную вторичную структуру в виде шпильки при температуре не выше температуры гибридизации с мишенью. Данная структура трех олигонуклеотидных зондов, конъюгированных с флуоресцентными красителями позволяет проводить детекцию флуоресценции как во время ПЦР, так и после

Таблица

Вид животного	Название праймеров и зондов	Размер ампликона, п.о.
<i>Sus scrofa</i> (свинья)	SsF	460
	SsR	
	R6G-SsZ2 rev	
<i>Ovis aries</i> (овца)	OaF	169
	OaR	
	FAM-OaZ	
<i>Bos Taurus</i> (корова)	BtF	675
	BtR	
	ROX-BovZ1	
Внутренний контроль (18S рДНК)	ICF	143
	ICR	
	FAM-ICZ1	

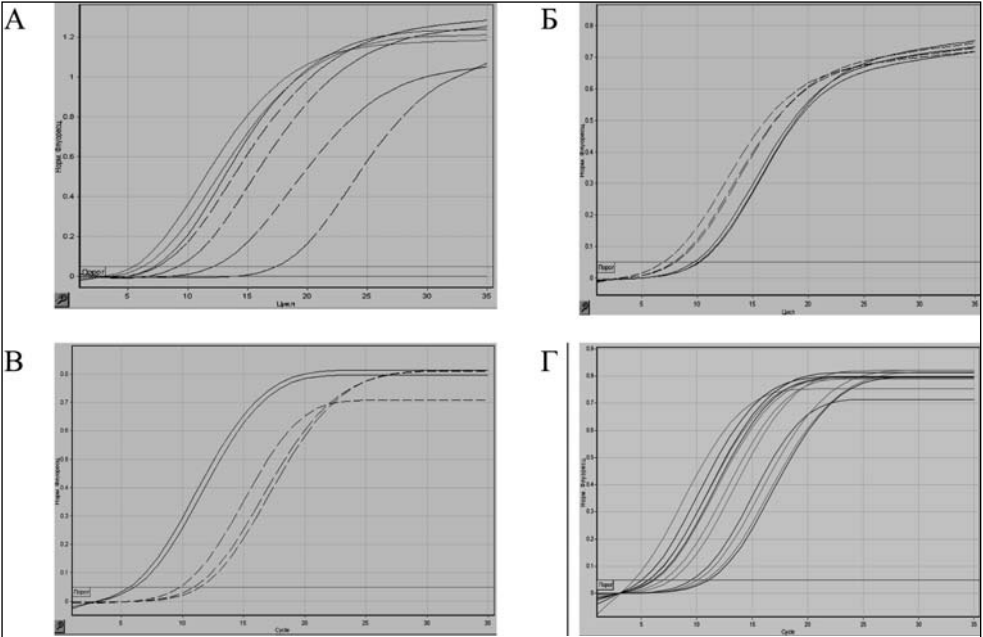
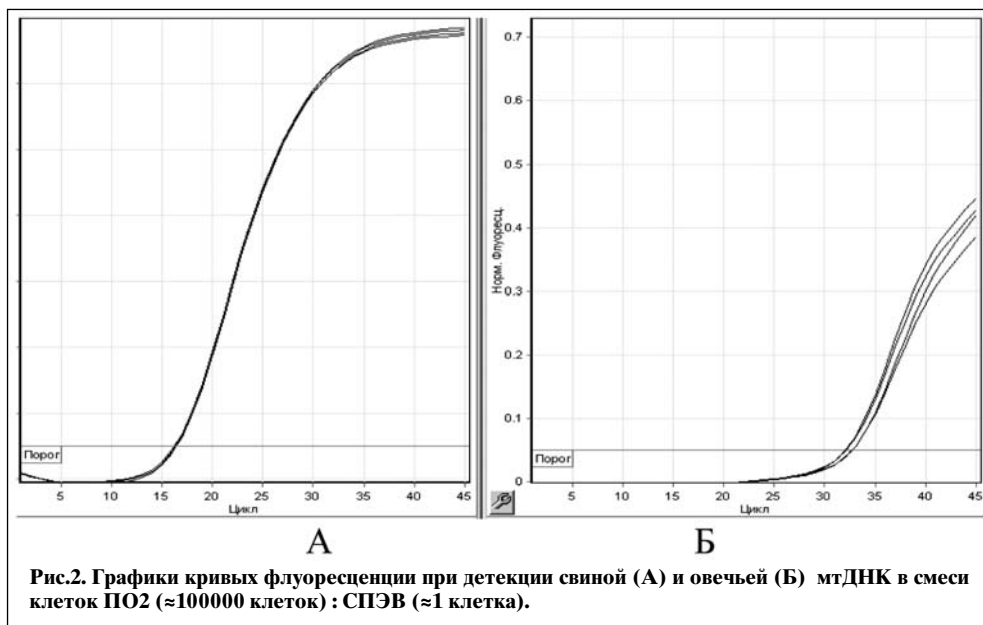


Рис. 1 Кривые флуоресценции при оценке специфичности праймеров и зондов для идентификации мтДНК коровы (А), свиньи (Б), овцы (В) разных пород (пунктирная линия) и клеточных культур (сплошная линия). Внутренний контроль панели контрольных образцов и исследуемых культур клеток (Г).

окончания реакции, что позволяет использовать в качественном формате детекции простые флуоресцентные детекторы (например, Ala-1 «Биосан», Латвия). Видоспецифичность выбранных праймеров и зондов оценивали на панели ДНК, выделенной из десяти видов животных, вместе с тем, исследовали культуры клеток на их видовую принадлежность. При анализе панели контрольных образцов и клеточных культур с праймерами и зондами специфичными к мтДНК *Bos*

taurus, положительный результат наблюдался только в образцах содержащих ДНК коров разных пород и ДНК клеточных культур ЛЭК, МДБК и ПТ-80 (Рис. 1А). Видоспецифическая ПЦР-РВ на панели контрольных образцов и клеточных культур с праймерами и зондами специфичными к мтДНК *Sus scrofa*, положительный результат обнаруживался в образцах только с ДНК свиней разных пород и с клеточными культурами СПЭВ, А4С2, ПК-15 (Рис. 1Б).



При анализе с той же панелью образцов, но с праймерами и зондами, специфичными к мтДНК *Ovis aries*, положительный результат наблюдался только в образцах куда вносили ДНК овец разных пород и клеточных культур ПО2, ПОхСО (Рис. 1В).

Наличие ДНК во всех образцах подтверждено положительным результатом амплификации участка 18S рДНК (Рис. 1Г).

Чувствительность ПЦР-РВ оценивали, используя суспензии клеточных культур СПЭВ, МДБК, ПО₂ содержащих от $1-1 \cdot 10^6$ кл/мл, видовая принадлежность, которых была уже подтверждена в видоспецифической ПЦР-РВ. Предел детекции метода для культур клеток каждого вида варьировал от 0,1 до 1 геном-эквивалента на миллилитр питательной среды (1 ГЭ/мл соответствует 1 клетке в мл питательной среды), что свидетельствует об аналитической надежности и возможности обнаружить следовые количества клеток.

Эффективность ПЦР-РВ для детекции мтДНК коровы, свиньи и овцы составила 96%, 97,3%, 98% соответственно, при коэффициенте детерминации $R^2 = 0,99$.

Чтобы определить возможность данного метода выявлять межвидовую клеточную контаминацию был поставлен эксперимент, где клеточные культуры СПЭВ, МДБК и ПО₂ смешивали друг с другом в различных соотношениях. Последующая постановка ПЦР-РВ с праймерами и зондом к мтДНК свиньи, овцы и коровы показала, что данный метод способен надежно обнаружить приблизительно 1 клетку в

присутствии порядка 100 тыс. клеток другого вида (Рис. 2).

Выводы

В статье впервые представлен метод видовой идентификации клеточных культур с помощью подобранных нами видоспецифических праймеров и зондов к митохондриальной ДНК, который основан на полимеразной цепной реакции с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

По сравнению с ранее предложенными подходами для видовой идентификации клеточных культур, где в качестве мишени применялись ген альдолазы, ген b-актина, короткие диспергированные повторы (SINE), мтДНК является наиболее предпочтительной. Многокопийность последовательности мтДНК (120 – 1700 копий на клетку (Robin and Wong, 1988)), напрямую влияет на чувствительность метода, что позволяет выявлять даже следовые количества клеток.

Использование видоспецифического зонда наряду с видоспецифическими праймерами увеличивает число генотипирующих позиций, и соответственно повышает специфичность реакции при высоких количествах посторонней ДНК в реакционной смеси. Применение зондов с разными флуорофорами, в отличие от использования красителей-интеркаляторов, позволяет разработать надежную мультиплексную систему для одновременной детекции мтДНК нескольких видов в одной реакции.

Метод детекции основанный на изменении интенсивности флуоресценции продукта реакции в реальном времени позволяет избежать риска контаминации ампликонами, который значительно повышается при электрофоретической детекции продукта, а также упростить процедуру исследования.

С помощью данного метода идентифицирована видовая принадлежность 8 культур клеток и их 17 сублиний. Метод явля-

ется предпочтительным по сравнению с используемыми в настоящее время кариологическим и изоферментным анализами и традиционной видоспецифической ПЦР и электрофоретической детекцией продуктов. Являясь полуколичественным, метод позволяет оценить концентрацию контаминирующих клеток. Метод может быть использован в качестве видоспецифического внутреннего контроля при экспертизе и сертификации биологических материалов.

РЕЗЮМЕ

Одной из основных задач при длительном культивировании клеток является периодическая оценка их видовой принадлежности. Нами разработан новый подход к идентификации клеточных линий следующих видов: *Ovis aries* (овца), *Bos taurus* (корова) and *Sus scrofa* (свинья). Метод основан на полимеразной цепной реакции с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для видовой идентификации в качестве мишени выбраны последовательности митохондриальной ДНК, кодирующие цитохром b и субъединицу I цитохром с-оксидазы. Валидированы праймеры и зонды, позволяющие добиться специфичности ПЦР. Высокая чувствительность метода позволяет надежно выявлять единичные клетки постороннего вида в смеси с значительно большим количеством (порядка сотен тысяч) клеток другого вида. С помощью данного метода идентифицирована видовая принадлежность 8 культур клеток и 17 сублиний. Метод является предпочтительным по сравнению с используемыми в настоящее время кариологическим и изоферментным анализами и традиционной видоспецифической ПЦР и электрофоретической детекцией продуктов.

SUMMARY

Testing of species specificity is a major requirement to maintain the identity of cell lines during long-term culturing. We developed a new method of identification of cell lines from the following species: *Ovis aries* (sheep), *Bos taurus* (cow) and *Sus scrofa* (pig). The method is based on polymerase chain reaction with real time detection of the amplification product. For species identification the sequences of mitochondrial DNA encoding cytochrome b and cytochrome c oxidase were used. Specificity of PCR was achieved with validated primers and probes. High sensitivity of the method allowed to reliably detect single cells of an irrelevant species as an admixture to hundreds of thousands cells of the species whose identity is analyzed. Eight cell lines and 17 sublines were tested, and their identity was confirmed. Thus, our method is advantageous over conventional karyologic and isoenzyme analyses or traditional PCR-based, electrophoresis-assisted identification of species.

Литература

- Дьяконов Л.П., Ситьков В.И. (ред.). Животная клетка в культуре. М.: «Спутник+», 2000, 400 с., илл.
- Altschul SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipma DJ (1997) Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc Acid Res* 25:3389-3402
- Clausen J.J. Comparative chromosomal study of 31 cultured mammalian cell lines [Text]/ Clausen J.J., Syvertson J.T. // *J Natl Cancer Inst.* 1962. Vol. 28. P. 117-45.
- Cooper J. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach [Text]/ Cooper J. [et al.] // *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. 2007. Vol. 43. № 10. P. 344-351.
- Coriell L.L. Common antigens in tissue culture cell lines [Text]/ Coriell L.L., Tall M.G., Gaskill H. // *Science*. 1958. Vol. 128. № 3317. P. 198-9.
- Defendi V. Immunological and karyological criteria for identification of cell lines [Text]/ Defendi V., Billingham R.E., Silvers W.K., Moorhead P. // *J Natl Cancer Inst.* 1960. Vol. 25. P. 359-85.
- Gartler S.M. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines [Text]/ Gartler S.M. // *Nature*. 1968. Vol. 217. № 5130. P. 750-1.
- Hay R.J. Methods for authenticating cell lines [Text]/ Hay R.J. // *Dev Biol Stand.* 1992. Vol. 76. - P. 25-37.
- Liu M. Rapid identification and authentication of closely related animal cell culture by polymerase chain reaction [Text]/ Liu M., Liu H., Tang X., Vafai A. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008. Vol. 44. № 7. P. 224-227.
- Losi C. An alternative method to isoenzyme profile for cell line identification and interspecies cross-contaminations: cytochrome b PCR-RLFP analysis [Text]/ Losi C., Ferrari S., Sossi E., Villa R., Ferrari M. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2008.
- Milanesi E. Molecular detection of cell line cross-contaminations using amplified fragment length polymorphism DNA fingerprinting technology [Text]/ Milanesi E. [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003. Vol. 39. № 3-4. P. 124-30.
- Ono K. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA [Text]/ Ono K. [et al.] // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007. Vol. 43. № 5-6. P. 168-75.
- Parodi B. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method [Text]/ Parodi B. [et al.] // *Biotechniques*. 2002. Vol. 32. № 2. P. 432-4, 436, 438-40.
- Robin E.D. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells [Text]/ Robin E.D., Wong R. // *J Cell Physiol.* 1988. Vol. 136. № 3. P. 507-13.
- Simpson W.F. Species Identification of Animal Cell Strains by Immunofluorescence [Text]/ Simpson W.F., Stulberg C.S. // *Nature*. 1963. Vol. 199. P. 616-7.
- Stacey G.N. DNA fingerprinting transforms the art of cell authentication [Text]/ Stacey G.N., Bolton B.J., Doyle A. // *Nature*. 1992. Vol. 357. № 6375. P. 261-2.
- Steube K. Identification and verification of rodent cell lines by polymerase chain reaction [Text]/

- Steube K., Koelz A.-L., Drexler H. // Cytotechnology. 2008. Vol. 56. № 1. P. 49-56.
18. Steube K.G. A simple method using beta-globin polymerase chain reaction for the species identification of animal cell lines-a progress report [Text]/ Steube K.G., Meyer C., Uphoff C.C., Drexler H.G. // In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2003. Vol. 39. № 10. P. 468-75.
19. Tsareva A.A. Isoenzyme characteristics of glucose-6-phosphage dehydrogenase and lactate dehydrogenase of continuous cells from the collection of the Sverdlovsk Research Institute of Virus Infections [Text]/ Tsareva A.A., Glinskikh N.P., Dreizin R.S., Kolesnikova G.G., Zhdanov V.M. // Vopr Virusol. 1976. № 5. P. 620-3.
20. Molecular cloning : a laboratory manual / Sambrook, Joseph; Russell, David W. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

УДК:619:616.391:636.5(07)

Н.К. Лисун

*Кафедра клинической диагностики и болезней молодняка
ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина*

ПРИМЕНЕНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ГУМИВАЛ В СХЕМАХ ИММУНИЗАЦИИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

В борьбе с инфекционными заболеваниями все большее значение приобретают методы специфической профилактики.

Вакцинация – необходимое средство защиты от инфекционных болезней, от которой мы не можем отказаться. Ряд вакцин являются обязательными. В тоже время многие из них вызывают осложнения: токсические реакции, связанные с остаточной токсичностью препаратов; аллергические (местные и общие) реакции; поражения нервной системы; обострение латентных процессов и хронических очагов инфекции, а также повышение температуры тела, угнетение, отказ от корма. Число животных с такими осложнениями достигает иногда 20-30%.

Иммунизация, как первичный контакт с антигеном, должна быть безвредной, причем вероятность осложнений при вакцинации должна быть меньше, чем ожидаемый риск заболевания с его собственными осложнениями.

Другая проблема вакцинации- выработка напряженного длительного иммунитета, способного защитить каждую привитую птицу от заражения.

Большинство вакцин не гарантируют этого, иногда по причине низкой иммуногенности самой вакцины, иногда в связи с недостаточной реактивностью иммунной системы вакцинированного животного.

Для повышения иммунного ответа организма птицы на проводимые специфические мероприятия в условиях интенсивного ведения отрасли, чаще всего используют препараты, стимулирующие естественную резистентность и иммунный ответ

организма птицы.

Сравнительно новым направлением специфической профилактики инфекционных болезней является сочетанное применение вакцин и иммуномодуляторов.

Ранее исследователями проводился ряд работ направленных на использование иммуномоделирующих препаратов в схемах вакцинации птиц. Большинство из них применялись парентерально, что в масштабах промышленного птицеводства, крайне затруднительно.

В связи с этим разработка новых схем и средств повышения эффективности специфической профилактики болезней птиц, а также удобство применения иммуномодулирующих препаратов является актуальной проблемой и требует решения.

Выяснение эффективности и целесообразности использования кормовой добавки Гумивал для повышения специфической профилактики в условиях промышленного птицеводства и явилось целью нашего исследования.

ГУМИВАЛ – кормовая добавка, используемая для улучшения продуктивности сельскохозяйственных животных на основе натриевых и калиевых солей гуминовых кислот (от 60 до 90% действующего вещества (ДВ)). Не содержит генномодифицированные организмы. Представляет собой порошок от темно-коричневого до черного цвета с размером частиц не более 2 мм, растворимый в воде, хорошо распределяемый в массе корма.

Длительное применение не вызывает привыкания, токсических и аллергических реакций, нарушений в обмене веществ.