

Стандартная операционная процедура «Элиминация микоплазмы из культур клеток»

Составлено: А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол получения элиминация микоплазмы из культур клеток

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Культивирование клеток проводится в условиях, близких к стерильным, однако иногда культуры клеток контаминируются бактериями или грибами. Для предотвращения роста бактерий в среду для культивирования добавляют антибиотики, обычно это смесь пенициллина и стрептомицина, хотя риск контаминации сохраняется даже при соблюдении всех правил безопасности. Кроме того, некоторые лаборатории даже рекомендуют постоянно вести культуры без антибиотиков, так как в некоторых случаях бактерии могут выживать в присутствии антибиотиков, и, постепенно приобретать к ним устойчивость. Среди особо злостных патогенов следует выделить микоплазму – смесь эндосимбиотических бактерий, не имеющую клеточной стенки. Контаминация клеточных культур микоплазмой осложняется тем, что изменяется физиологическое состояние клеток, и, нередко, возникают перестройки хромосом. Исследования, проведенные на клетках, зараженных микоплазмой, не могут быть полноценными, поскольку искажаются физиологические параметры клеток [1]. Для обнаружения контаминации клеток оптимально использовать чувствительные молекулярно-биологические методы, например, ПЦР. В случае контаминации уникальных культур клеток необходимо проводить лечение культур.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Элиминация микоплазмы из культур клеток» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК мыши для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола элиминации микоплазмы из культур клеток.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались: правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от

23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартиформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Ламинарный шкаф II класса защиты.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100-0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ и 37 °С).
- Термостат на 37 °С.
- Холодильники на –80 °С, –20 °С и +4 °С.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Для культивирования клеток используются стандартные реактивы. Для элиминации микоплазмы используется коммерческий набор антибиотиков.

- VM Cyclin (Sigma-Aldrich, 10 799 050 001).

Подготовка материалов

- Развести лиофилизированные компоненты VM Cyclin в соответствии с рекомендациями производителя.

Элиминация микоплазмы из культур клеток

Для элиминации микоплазмы из культур клеток проводится стандартное культивирование в течение двух недель с добавлением антибиотиков из набора VM Cyclin по графику. При пересадке клеток между добавлением антибиотика VM Cyclin добавляется дополнительно.

- 1) День 0 – VM Cyclin 1 4 мкл/мл среды для культивирования.
- 2) День 3 – VM Cyclin 2 4 мкл/мл среды для культивирования.
- 3) День 7 – VM Cyclin 1 4 мкл/мл среды для культивирования.
- 4) День 10 – VM Cyclin 2 4 мкл/мл среды для культивирования.

При подготовке СОП «Элиминация микоплазмы из культур клеток» использованы следующие литературные источники:

- 1 Drexler H.G., Uphoff C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention // Cytotechnology. 2002. 39(2). 75–90.