

Стандартная операционная процедура

«Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Контаминация клеточных линий бактериями, микоплазмами и грибами является одной из важнейших проблем исследователей. Источниками заражения могут быть лабораторное оборудование, реактивы, сами исследователи, а также другие клеточные линии. Тем не менее существует ряд мер, позволяющих минимизировать последствия подобных инфекций. Однако первостепенной задачей является выявление самой инфекции и её возбудителя. Заражение клеточных культур грибами и бактериями довольно легко установить при помощи светового микроскопа. Однако в случае с микоплазмой это невозможно и выявление является довольно затруднительным процессом. К настоящему моменту установлено, что микоплазмой контаминировано порядка 5–10 % всех клеточных линий. Для её детекции были разработаны различные подходы, в том числе ПЦР-анализ [1]. Отсутствие контаминации бактериями, микоплазмой и грибами в культурах является необходимым условием достоверности получаемых в ходе исследований результатов и их правильной интерпретации.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями» разработан в качестве стандарта для обеспечения контроля контаминации клеточных линий человека и животных для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит унификации протокола тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями.

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.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга – вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Термошейкер для пробирок 1,5 мл.
- Холодильники на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Камера для горизонтального электрофореза.
- Столик для выравнивания агарозного геля.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.
- Лед.
- Термоконтэйнер (в том числе пенопластовые коробки).
- Микроволновая печь.

- Весы.
- Химическая стеклянная колба (термостойкая).

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

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Набор для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-color (×2) (Биолабмикс, МНС010-1020).
- Праймеры (Биосет).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Протеиназа К.
- Лизирующий буфер.
- Вакуумная смазка (Corning).
- Изопропанол.
- 70 % этанол.
- Фенол.
- Хлороформ.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий
- ДНК-маркер 100 – 1500 пар оснований.
- Клеточная суспензия, полученная при пересадке соответствующих линий.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением ДНК клеточную суспензию промыть в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –20 °С до момента выделения ДНК.

- ×50 ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации ×50 буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Агарозный гель для проведения электрофореза ДНК: взвесить 3 г агарозы и растворить в 100 мл ×1 буфера ТАЕ, нагревая раствор в микроволновой печи. Добавить раствор бромистого этидия до рабочей концентрации 5 мкг/мл. Залить в столик для выравнивания геля и поместить лопатки для формирования карманов.
- Лизирующий буфер: Tris-HCl pH 7,5 10 mM, ЭДТА 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 0,5 %.

Выделение ДНК

- 1) К клеточному осадку добавить лизирующий буфер из расчёта 300 мкл на образец и протеиназу К в рабочей концентрации 100 мкг/мл.
- 2) Пробирки поместить в термошейкер при 55 °С и 500–700 об/мин и дождаться полного растворения образцов (1–2 ч).
- 3) К полученному клеточному лизату добавить фенол и хлороформ в соотношении 1:1 (объем каждого раствора должен быть не менее 300 мкл) и перемешать. К каждому образцу добавить вакуумной смазки (~ шарик с диаметром до 0.5 см).
- 4) Центрифугировать при 14000 g 10 мин. Полученный супернатант, располагающийся над слоем вакуумной смазки, перенести в чистую пробирку.
- 5) Добавить 1 мл изопропанола, перемешать и центрифугировать при 14000 g 10 мин. Убрать супернатант и промыть полученный осадок ДНК 1 мл 70 % этанола.
- 6) Убрать супернатант и просушить осадок ДНК в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Растворить осадок ДНК в небольшом объеме деионизированной воды (20–50 мкл) и измерить концентрацию (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы ДНК могут храниться при –20 °С.

ПЦР анализ

- 7) Разморозить реакционную смесь для ПЦР, осторожно и тщательно перемешать.
- 8) В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color – 25 мкл, прямой и обратный праймер (конечная концентрация каждого 1 нМ), ДНК-матрица (конечное количество 0,2–1 мкг), стерильная вода (до 50 мкл). Замешивать реакционные смеси для ПЦР следует в пробирках, помещенных в лед. Осторожно перемешать реакционную смесь и сбросить капли, используя центрифугу.
- 9) Прогреть термоциклер до 95 °С и быстро переместить в него готовую реакционную смесь. Провести ПЦР в следующих условиях: предварительная денатурация

– 95 °С 5 мин, дегатурация – 95 °С 30 с, отжиг 55–56 °С (в зависимости от праймеров) 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин, финальная элонгация – 72 °С 5 мин. Количество циклов 35 (для праймеров Bact – 25). Последовательности праймеров и соответствующая информация о них приведена в таблице X.1. Для тестирования на контаминацию микоплазмой использовать следующие пары праймеров: MусoF-MусoR; MусoF1-MусoR1; MусoF2-MусoR3; MусoF3-MусoR1; MусoF4-MусoR1; MусoF5-MусoR1; MусoF5-MусoR2; MусoF6-MусoR1; MусoF7-MусoR1.

Таблица X.1 – Праймеры для тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями

Название	Последовательность	T отжига, °С
BactF	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	56
BactR	5'- GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'	56
FungiF	5'- GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3	56
FungiR	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3	56
MусoF	5'- GAT CAG CCA CAT TGC CCA G -3'	56
MусoR	5'- CGT TGC GAA TAG TCA CTG CT -3'.	56
MусoF1*	5'- CGCCTGAGTAGTACGTCCGC- 3'	55
MусoF2*	5'- CGCCTGAGTAGTACGTACGC- 3'	55
MусoF3*	5'- TGCCTGGGTAGTACATTCGC- 3'	55
MусoF4*	5'- TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3'	55
MусoF5*	5'- CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3'	55
MусoF6*	5'- CACCTGAGTAGTATGCTCGC-3'	55
MусoF7*	5'- CGCCTGGGTAGTACATTCGC -3'	55
MусoR1*	5'- GCGGTGTGTACAAGACCCGA -3'	55
MусoR2*	5'- GCGGTGTGTACAAAACCCGA -3'	55
MусoR3*	5'- GCGGTGTGTACAAAACCCCGA -3'	55
* Праймеры из [1]		

10) Поместить агарозный гель в камеру для электрофореза. Нанести по 8–10 мкл ДНК-образцов в карманы агарозного геля. Для определения размеров амплифицированных продуктов нанести ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.

11) Провести горизонтальный гель-электрофорез при напряжении 5 В/см². Зафиксировать результаты ПЦР при помощи гель-документирующей системы.

В норме клеточные культуры не должны содержать ДНК бактерий, микоплазмы и грибов.

При подготовке СОП «Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями» использованы следующие литературные источники:

1 Písal R.V., Hřebíková H., Chvátalová J., Kunke D., Filip S., Mokry J. Detection of Mycoplasma Contamination Directly from Culture Supernatant Using Polymerase Chain Reaction // Folia Biol (Praha). 2016. 62(5). 203–206.