

Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий

М. Д. Хорольский*, И. С. Семенова, Е. В. Мельникова, Ю. В. Олефир

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

На сегодняшний день метод коротких tandemных повторов (STR-анализ) является признанным международным стандартом для установления подлинности и генетической стабильности клеточных линий, поэтому развитие и внедрение метода в рутинную практику банков/коллекций является актуальной задачей. Кроме того, развитие сферы биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), в которых клеточные линии являются основным компонентом, диктует необходимость внедрения метода STR-анализа и для оценки их подлинности в ходе экспертизы качества. В настоящее время Государственная фармакопея Российской Федерации не предусматривает обязательного применения метода STR-анализа для идентификации клеточных линий, в то время как в зарубежной практике для контроля качества клеточных линий он используется около десяти лет. Использование в медицинской практике идентифицированных клеточных линий обеспечит эффективность и безопасность применения БМКП. **Цель работы:** оценка возможности применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности клеточных линий человека на примере U937, WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1. **Материалы и методы:** клеточные линии человека — U937 (European Collection of Authenticated Cell Cultures, Европейский союз), WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1 (American Type Culture Collection, США). Определение аллельного профиля клеточных линий осуществляли методом STR-анализа с использованием набора COrDIS Plus (Gordiz, Россия). Электрофоретическое разделение проводили на приборе Genetic Analyzer 3500 Series. Сравнение профилей клеточных линий проводили с использованием данных, представленных на сайтах коллекций European Collection of Authenticated Cell Cultures, American Type Culture Collection. **Результаты:** на основе сравнительных данных о наборах AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и GenePrint® 10 System (Promega Corporation, США), предназначенных для определения подлинности клеточных линий методом STR-анализа, с характеристиками набора COrDIS plus установлено, что набор COrDIS plus содержит в себе все локусы суммарно из зарубежных наборов, а также включает локусы, рекомендованные Международным комитетом по идентификации клеточных линий человека. Установлено полное генетическое соответствие линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92 стандартным профилям, представленным на сайтах международных коллекций. Выявлена генетическая нестабильность клеточной линии Jurkat Clone E6-1, проявляющаяся потерей гена амелогенина. **Выводы:** подтверждена возможность применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности с использованием набора COrDIS plus на примере клеточных линий U937, WISH, WIL2-S, NK-92, Jurkat Clone E6-1. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения набора COrDIS plus для анализа клеточных линий, входящих в состав БМКП, в биомедицинских исследованиях, а также в ходе проведения экспертизы качества БМКП.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; идентичность (подлинность); аллельный профиль клеточных линий; STR-анализ; клеточная линия

Для цитирования: Хорольский МД, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(4):251–260. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>

Контактное лицо: Хорольский Михаил Дмитриевич; khorolsky@expmed.ru

The Use of Short Tandem Repeat Analysis for Cell Line Authentication

M. D. Khorolsky*, I. S. Semenova, E. V. Melnikova, Yu. V. Olefir

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Short tandem repeat analysis (STR) is a well-established international method of authentication and genetic stability testing of cell lines (CLs). Therefore, the development and introduction of this method into routine practice of cell banks and cell culture collections is a pressing concern. In addition, the expansion of the field of cell-line based biomedical cell products (BCPs) necessitates the implementation of STR as a tool of identification testing during quality control. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation does not require mandatory use of STR for cell line identification, while other countries have been using this method for cell line quality control for about a decade. The use of identified CLs in medical practice will ensure the efficacy and safety of BCPs. **The aim of the study** was to assess the possibility of using STR analysis for authentication and genetic stability testing of CLs using U937, WISH, WIL2-S, NK-92, and Jurkat Clone E6-1 CLs as examples. **Materials and me-**

thods: the following human CLs were used in the study: U937 (ECACC), WISH (ATCC), WIL2S (ATCC), NK-92 (ATCC), and Jurkat Clone E6-1 (ATCC). The CL allelic profiles were determined by STR using the COrDIS Plus kit (Gordiz, Russia). The electrophoretic separation was performed using a Genetic Analyzer 3500 Series instrument. The data provided on the websites of the European Collection of Authenticated Cell Cultures and American Type Culture Collection were used to compare the CL profiles. **Results:** the AuthentIFiler PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and the GenePrint 10 System (Promega Corporation, USA) intended for CL authentication by STR were compared with the characteristics of the COrDIS plus kit (Gordiz, Russia). The results of the comparison demonstrated that the COrDIS plus kit includes all the loci found in the foreign kits, as well as the loci recommended by the International Cell Line Authentication Committee. The U-937, WIL2S, and NK-92 CLs demonstrated genetic identity with the reference profiles available on the websites of the international collections. The Jurkat Clone E6-1 CL was found to be genetically unstable due to the loss of the amelogenin gene. **Conclusions:** it was demonstrated by the examples of U937, WISH, WIL2-S, NK-92, and Jurkat Clone E6-1 CLs that STR and the COrDIS plus kit could be used for authentication and genetic stability testing. The obtained results suggest the feasibility of using the COrDIS plus kit for the analysis of CLs used in BCPs, for BCP quality control, and biomedical research.

Key words: biomedical cell product; authenticity (identification); cell line allelic profile; STR; cell line

For citation: Khorolsky MD, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. The use of short tandem repeat analysis for cell line authentication. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):251–260. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>

*Corresponding author: Mikhail D. Khorolsky; khorolsky@expmed.ru

Одно из наиболее значимых достижений современной науки и медицины — это разработка препаратов для медицинского применения (иммунобиологических, биотехнологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов) с использованием / на основе клеточных линий (КЛ). Активное использование КЛ диктует необходимость развития методов контроля их качества и стандартизации, учитывая в первую очередь такие специфические параметры, как подлинность (генетическое соответствие организму — источник получения, наличие определенных поверхностных маркеров и секретомов) и безопасность (отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, генетическим материалом других КЛ). Аутентификация КЛ подразумевает доказательство ее соответствия исходному материалу на уровне ДНК и отсутствия контаминации другими КЛ (в том числе клеточными линиями других видов).

По данным ученых С. Korch с соавт. [1] и Т.Л. Rizner с соавт. [2], неверная идентификация КЛ и/или контаминация генетическим материалом других КЛ обнаруживается почти в 40 % банкированных КЛ и зачастую приводит к получению недостоверных результатов при научных исследованиях. Ошибки идентификации и дальнейшее медицинское применение контаминированных КЛ недопустимы и могут нанести существенный вред при их применении пациентам.

Отдельным классом препаратов, которые применяются в терапии заболеваний, являются биомедицинские клеточные продукты (БМКП), содержащие в себе одну или несколько КЛ и вспомогательные вещества, а также зарегистрированные лекарственные препараты / фармацевтические субстанции и/или медицинские изделия¹. Контроль качества БМКП отличается от контроля качества лекарственных препаратов (ЛП) в первую очередь обязательным определением соответствия качества КЛ, входящей в состав БМКП, что обусловлено особенностью их производства — наличием необходимого этапа культивирования КЛ.

Первые упоминания о межвидовой перекрестной (кросс-) контаминации КЛ человека и животных появились в конце

60-х годов XX века [3]. В работах А. Rojas с соавт. [4], L.C. Lin с соавт. [3] описываются случаи перекрестного загрязнения опухолевыми линиями клеток HeLa перевиваемых клеточных культур, использование которых в экспериментах искажало результаты биомедицинских исследований.

Для своевременного выявления контаминации в 2010 г. Международный комитет по идентификации КЛ (International Cell Line Authentication Committee) опубликовал рекомендации о необходимости периодического проведения видовой идентификации и аутентификации клеточных культур².

Методы определения подлинности КЛ постоянно совершенствуются. На протяжении многих лет для аутентификации клеток применялись такие методы, как изоферментный анализ, кариотипирование, HLA-типирование и иммунофенотипирование [5, 6]. Однако в последнее десятилетие наиболее широкое распространение получили молекулярно-биологические методы определения подлинности КЛ. Самыми известными и эффективными являются методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7]. Данная группа методов является чрезвычайно чувствительной и селективной.

Анализ профиля ДНК наравне с цитогенетическими методами, в соответствии с рекомендациями ВОЗ³ и документами ICH⁴, должен использоваться при характеристике главных и рабочих клеточных банков для подтверждения подлинности и генетической стабильности КЛ. Это требование становится особенно актуальным и в сфере развития банкирования КЛ человека для целей производства БМКП. Кроме того, отсутствие генетических изменений в результате проводимых манипуляций с клетками в процессе производства БМКП особенно важно в случае использования стволовых клеток из-за возможного риска онкогенной трансформации как *in vitro*, так и *in vivo* [7].

При выборе правильных генов-мишеней существует возможность определения подлинности большого количества клеточных культур различного происхождения. Разнообразие аналитических систем, позволяющих идентифицировать

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах».

² Guide to Human cell line authentication. 19 November 2012. International Cell Line Authentication Committee. https://standards.atcc.org/kwspub/home/the_international_cell_line_authentication_committee-iclac_/Authentication_SOP.pdf

³ Annex 3. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO Technical Report Series 978; 2013. http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf

⁴ ICH Topic Q5D Quality of biotechnological products: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products (CPMP/ICH/294/95). EMEA; 1998.

видовую принадлежность клеточных культур, привело к образованию концепции ДНК-фингерпринтинга — качественному и точному методу оценки генома, практически лишенному недостатков, к которому относится и метод коротких tandemных повторов (Short tandem repeat analysis, STR-анализ), который позволяет оценить распределение аллелей [8].

Методы, основанные на фрагментном анализе нуклеиновых кислот, для аутентификации КЛ в настоящее время рекомендуются и в нормативном документе США⁵, регламентирующем выбор методов для контроля качества КЛ. В Российской Федерации Государственная фармакопея⁶ на сегодняшний день не содержит конкретных рекомендаций по использованию молекулярно-генетических методов фрагментного анализа для определения подлинности КЛ.

Изначально метод STR-анализа применялся в судебной экспертизе при установлении личности подозреваемых, а также для определения степени родства [9–12]. Позже метод STR-анализа профилирования стал применяться в аутентификации КЛ при биомедицинских исследованиях различного характера [13]. Ввиду того что генетический профиль чистой КЛ должен оставаться неизменным на протяжении всего процесса культивирования, процедура идентификации методом коротких tandemных повторов становится обязательной. Ограничение применения данного метода может касаться только опухолевых КЛ, так как они часто дефектны по гетерозиготности или содержат множественные копии аллеля [14].

Немаловажную роль в актуальности и востребованности данного метода играет его применимость при генетическом профилировании клеток животных, которые активно используются в научных экспериментах, а также в качестве субстратов получения биотехнологических и иммунобиологических ЛП.

Клеточные линии мышей являются самым популярным выбором при исследовании человеческих генов и заболеваний. Они используются в биотехнологии рекомбинантных белков и являются фидерными клетками для эмбриональных стволовых клеток. Существуют данные о профилировании КЛ мышей при помощи набора STR-локусов с установлением зависимости длины фрагмента от количества повторов секвенированием по Сэнгеру. Проведенные исследования показали успешную идентификацию мышиных КЛ, а также возможность обнаруживать изменения в геноме [15].

Исследования по аутентификации КЛ животных проводились не только на клетках белых мышей, но и на обезьянах. Такой выбор обусловлен частотой использования и схожестью КЛ обезьян с клетками человека. Поскольку генотип обезьян схож с генотипом человека, для испытаний использовались самые распространенные наборы STR-локусов, предназначенные для идентификации КЛ человека. Восемь STR-маркеров были отобраны согласно следующим правилам: локус должен иметь как минимум 4 уникальных аллеля, локус должен отображаться в каждом повторе эксперимента, локус должен содержать тетраплекотидный повтор. По итогам проведенных исследований установлено, что наборы STR-локусов для идентификации человеческих КЛ можно использовать для идентификации клеток обезьян. Для установления стабильности данных локусов испытания проводились в течение 6 месяцев. По истечении этого времени было установлено, что эти участки остаются неизменными даже при высоком числе пассажей [16].

В настоящее время метод фрагментного анализа является одним из передовых способов аутентификации клеточных культур. Мировые коллекции КЛ, такие как American Type Culture Collection (ATCC), Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB), Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), используют метод STR-анализа для установления подлинности клеточных культур. В России в 1978 г. была создана Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур, объединяющая биобанки различных НИИ, в том числе коллекция культур клеток позвоночных ФГБУН Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Коллекция оказывает услуги по характеристике, стандартизации и хранению КЛ. В паспортах КЛ указана информация по аутентификации ДНК профиля КЛ человека методом STR-анализа по 9 локусам [17], которые соответствуют рекомендованным Международным комитетом по идентификации КЛ человека⁷. С 2017 г. STR-профилирование стало использоваться и в Покровском банке стволовых клеток (PSCB).

Американский национальный институт стандартов (American National Standards Institute, ANSI) вместе с ATCC разработали международный документ ASN-0002, стандартизирующий методологию и подходы к ДНК-профилированию. Общей целью этого документа является стандартизация методов выделения ДНК, метода проведения фрагментного анализа, метода обработки и интерпретации данных.

Принцип использования метода STR-анализа для подтверждения подлинности (аутентификации) КЛ заключается в нахождении соответствий между полученным генетическим профилем и референсным профилем, предоставленным биобанком/коллекцией. В случае получения аутологичного БМКП референсным выступает генетический профиль донора. Генетические профили состоят из комбинаций локусов (месторасположение определенного гена на хромосоме). Каждый локус представлен tandemно повторяющимися мономерами и достигает длиной до 9 пар оснований. Генетический профиль получается в результате амплификации определенных аллелей образца ДНК при помощи готовых STR-наборов. Такие наборы могут быть предназначены для идентификации до 20 локусов одновременно. В настоящее время в мире принято несколько локусных стандартов или групп локусов с определенными, конкретными локусами, которые используются для идентификации личности в судебной медицине, криминалистике и аутентификации КЛ в биомедицинских исследованиях. Самыми популярными из них являются следующие стандарты: CODIS (США), ESSS (ЕС), UK Core Loci (Великобритания), German Core Loci (Германия), Interpol Standard Set of Loci (международная база, не применяется в аутентификации КЛ).

В настоящее время только два набора импортного производства имеют непосредственное назначение «для установления подлинности клеточной линии» методом коротких tandemных повторов: AuthenticFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и GenePrint® 10 System (Promega Corporation, США) (табл. 1). Эти наборы кардинально отличаются перечнем определяемых STR-локусов (общий только один определяемый локус — TH01). Причем только набор GenePrint® 10 System предназначен для определения STR-локусов, рекомендованных Международным комитетом по идентификации КЛ⁸.

⁵ <1046> Cellular and Tissue-Based Products. USP 41–NF 36.

⁶ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

⁷ Guide to Human cell line authentication. 19 November 2012. International Cell Line Authentication Committee. https://standards.atcc.org/kwspub/home/the_international_cell_line_authentication_committee-iclac/_Authentication_SOP.pdf

⁸ Там же.

В Российской Федерации на данный момент не существует наборов STR-анализа отечественного производства, которые были бы предназначены конкретно для определения подлинности КЛ человека. Ранее нами была показана возможность применения набора отечественного производителя COrDIS plus (ООО «Гордиз», Россия) для фрагментного анализа, содержащего одновременно 20 локусов из разных баз данных [18].

Набор COrDIS plus (табл. 1) содержит в себе суммарно практически все локусы из наборов GenePrint и Authentifiler, а также включает локусы, рекомендованные мировым научным сообществом для идентификации⁹. Кроме того, при выборе набора COrDIS plus необходимо учитывать и экономическую составляющую при оценке стоимости анализов по аутентификации КЛ: набор отечественного производства значительно дешевле наборов, разработанных за рубежом.

Таким образом, для проведения нашего исследования был выбран набор COrDIS plus (ООО «Гордиз»), в который входят наиболее распространенные локусы (в соответствии с CODIS) и включающий все рекомендованные локусы для аутентификации КЛ. В ходе эксперимента нами была оценена возможность применения набора COrDIS plus для определения подлинности и генетической стабильности КЛ человека.

Цель работы — оценка возможности применения метода STR-анализа для аутентификации и определения генетической стабильности клеточных линий человека U937, WIL2-S, WISH, Jurkat Clone E6-1, NK-92.

Материалы и методы

Материалы

В таблице 2 представлен перечень КЛ, использованных для определения аллельного профиля методом STR-анализа с применением набора COrDIS Plus (арт. CP-192S, ООО «Гордиз», Россия). Характеристики набора COrDIS Plus представлены в таблице 1.

Методы

Выделение ДНК КЛ проводили при помощи набора PureLink gDNA (Invitrogen, кат. № K182002) в двух повторностях. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) при длине волны 260 нм.

Для постановки ПЦП при помощи набора COrDIS Plus в пробирку вносили 5 мкл активатора (содержащего буферный раствор и ионы Mg²⁺) и добавляли до 20 мкл исследуемой геномной ДНК для получения концентрации 1 нг. Оптимальное количество ДНК — 1 нг (в соответствии с рекомендациями к набору COrDIS Plus). Объем полученного раствора доводили до 25 мкл деионизированной водой. Реакционную смесь перемешивали до гомогенного состояния 5–8-кратным пипетированием и затем интенсивно перемешивали. Раствор на дне пробирки собирали коротким центрифугированием при 2000 об./мин в течение 15 с.

Помимо исследуемых ДНК, с каждой серией был амплифицирован один положительный и один отрицательный конт-

Таблица 1. Сравнительная характеристика наборов для STR-анализа
Table 1. Comparison of STR reagent kits

Показатель Parameter	Характеристика набора Kit description		
	AuthentiFiler™ PCR Amplification Kit	GenePrint® 10 System	COrDIS Plus
Количество локусов Number of loci	9+амелогенин 9+amelogenin	9+амелогенин 9+amelogenin	19+амелогенин 19+amelogenin
Локусы Loci	D10S1248 D1S1656 Amelogenin D2S1338 D22S1045 D19S433 TH01 D2S441 D6S1043 D12S391	TH01 D21S11 D5S818 D13S317 D7S820 D16S539 CSF1PO Amelogenin vWA TPOX	Amelogenin D3S1358 TH01 D12S391 D1S1656 D10S1248 D22S1045 D2S441 D7S820 D13S317 FGA TPOX D18S51 D16S539 D8S1179 CSF1PO D5S818 VWA D21S11 SE33
Назначение набора Kit's intended use	Для аутентификации клеточных линий, исключая судебные, диагностические и терапевтические исследования Cell line authentication, including forensic, diagnostic and therapeutic research	Для аутентификации клеточных линий человека Human cell line authentication	Идентификация личности Identification of personality
Чувствительность Sensitivity	0,125–2 нг 0.125–2 ng	10 нг 10 ng	0,2–2 нг 0.2–2 ng
Дискриминирующий потенциал набора Power of discrimination	Менее 1 на 10 ¹¹ Less than 1 in 10 ¹¹	Менее 1 на 10 ¹⁷ Less than 1 in 10 ¹⁷	Менее 1 на 10 ²¹ Less than 1 in 10 ²¹
Количество реакций Number of reactions	50	50	192
Время анализа, ч Analysis time, h	4	4–5	6–7
Тип ПЦП PCR type	Классическая Conventional	Классическая Conventional	Градиентная Gradient

⁹ Там же.

Таблица 2. Перечень клеточных линий, использованных в эксперименте по определению аллельного профиля методом STR-анализа

Table 2. Cell lines used in STR analysis of the allelic profile

№ п/п No.	Наименование Name	Пассаж Passage	Коллекция Collection	Происхождение Origin
1	Jurkat Clone E6-1	3	ATCC® TIB-152™	Человек, острая лейкемия, Т-лимфоциты, периферическая кровь Human, acute leukemia, T lymphocytes, peripheral blood
2	NK-92	8	ATCC® CRL-2407™	Человек, натуральные киллеры Human, natural killer cells
3	U-937	4	ECACC® General Collection Cat. No. 85011440	Человек, гистиоцитарная лимфома Human, histiocytic lymphoma
4	WIL2-S	2	ATCC® CCL-8885™	Человек, В-лимфобластные клетки, экспрессирующие на поверхности антиген CD20 Human, B lymphoblasts expressing the CD20 antigen on the cell surface
5	WISH	2	ATCC® CCL-25™	Человек, клетки амниона Human, amnion cells

Примечание. ATCC — American Type Culture Collection, США; ECACC — European Collection of Authenticated Cell Cultures, Европейский союз.
Note. ATCC: American Type Culture Collection, USA; ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures, European Union.

роль. Для приготовления положительного контроля вместо исследуемой ДНК в пробирку добавляли 1 мкл контрольной ДНК (входит в состав набора), для приготовления отрицательного контроля в пробирку вместо исследуемой ДНК добавляли деионизированную воду. Параметры температурного градиента для проведения ПЦР указаны в таблице 3.

Для получения полного STR-профиля соответствующей КЛ проводили фрагментный анализ — электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с помощью набора COrDIS Plus. Электрофоретическое разделение проводили на приборе Genetic Analyzer 3500 Series (Applied Biosystems). Перед загрузкой образцов готовили смеси деионизированного формамида и размерного стандарта S550 (входит в состав набора), разведенного в соотношении 10:1. Полученную смесь тщательно перемешивали и добавляли по 10 мкл смеси в каждую лунку стрипа. Во все лунки (за исключением лунки, предназначенной для «аллельного стандарта»), вносили по 1 мкл ПЦР-продукта. В отдельную лунку вносили 1 мкл раствора «аллельного стандарта». Готовый стрип тщательно встряхивали и центрифугировали.

Электрофоретическое разделение проводили на капиллярах длиной 50 см с использованием полимера POP6 и набором красителей Апу5Дуе.

Экспериментально полученные генетические профили сравнивали с представленными на сайтах¹⁰.

Результаты и обсуждение

Для оценки возможности применения метода STR-анализа нами были установлены генетические профили следующих КЛ из коллекций ATCC и ECACC: U-937, WIL2S, WISH, Jurkat Clone E6-1, NK-92.

В ходе эксперимента было установлено полное генетическое соответствие линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92 с представленными на сайте коллекций стандартными профилями. Генетические профили вышеуказанных линий представлены в таблице 4.

Экспериментально полученные профили представлены на рисунках 1, 2.

Генетический профиль КЛ Jurkat Clone E6-1 отличался от представленного на сайте ATCC стандарта по отсутствию од-

Таблица 3. Параметры температурного градиента для проведения ПЦР

Table 3. Temperature gradient parameters for PCR

Температура, °C Temperature, °C	Время Time	Количество циклов Number of cycles
94	3 мин (min)	4
98	30 с (s)	
59	120 с (s)	
72	90 с (s)	
94	30 с (s)	6
59	120 с (s)	
72	90 с (s)	
90	30 с (s)	18
59	120 с (s)	
72	75 с (s)	
68	10 мин (min)	1
15	∞	

ного аллеля гена амелогенина. Локусный состав полученного генетического профиля и стандарта ATCC представлены в таблице 5 и на рисунке 3.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента по построению генетического профиля КЛ у четырех из пяти КЛ аллельные профили соответствовали представленным данным коллекций. Для КЛ Jurkat Clone E6-1 была зафиксирована потеря гена амелогенина Y. В соответствии с данными Y. Huang с соавт. [19], геном клеток Jurkat Clone E6-1 является изменчивым и нестабильным, потеря одного из локусов при исследовании методом STR-анализа может происходить вследствие мутаций в геноме КЛ или изменения последовательности генов.

Выводы

В настоящее время метод коротких tandemных повторов является признанным международным стандартом для установления подлинности и генетической стабильности КЛ, поэтому развитие и внедрение его в рутинную практику банков/коллекций является актуальной задачей. Кроме того, развитие сферы БМКП, в которых КЛ являются основным компонентом, диктует необходимость внедрения метода STR-анализа и для

¹⁰ American Type Culture Collection. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=ru
European Collection of Authenticated Cell Cultures. <https://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx>

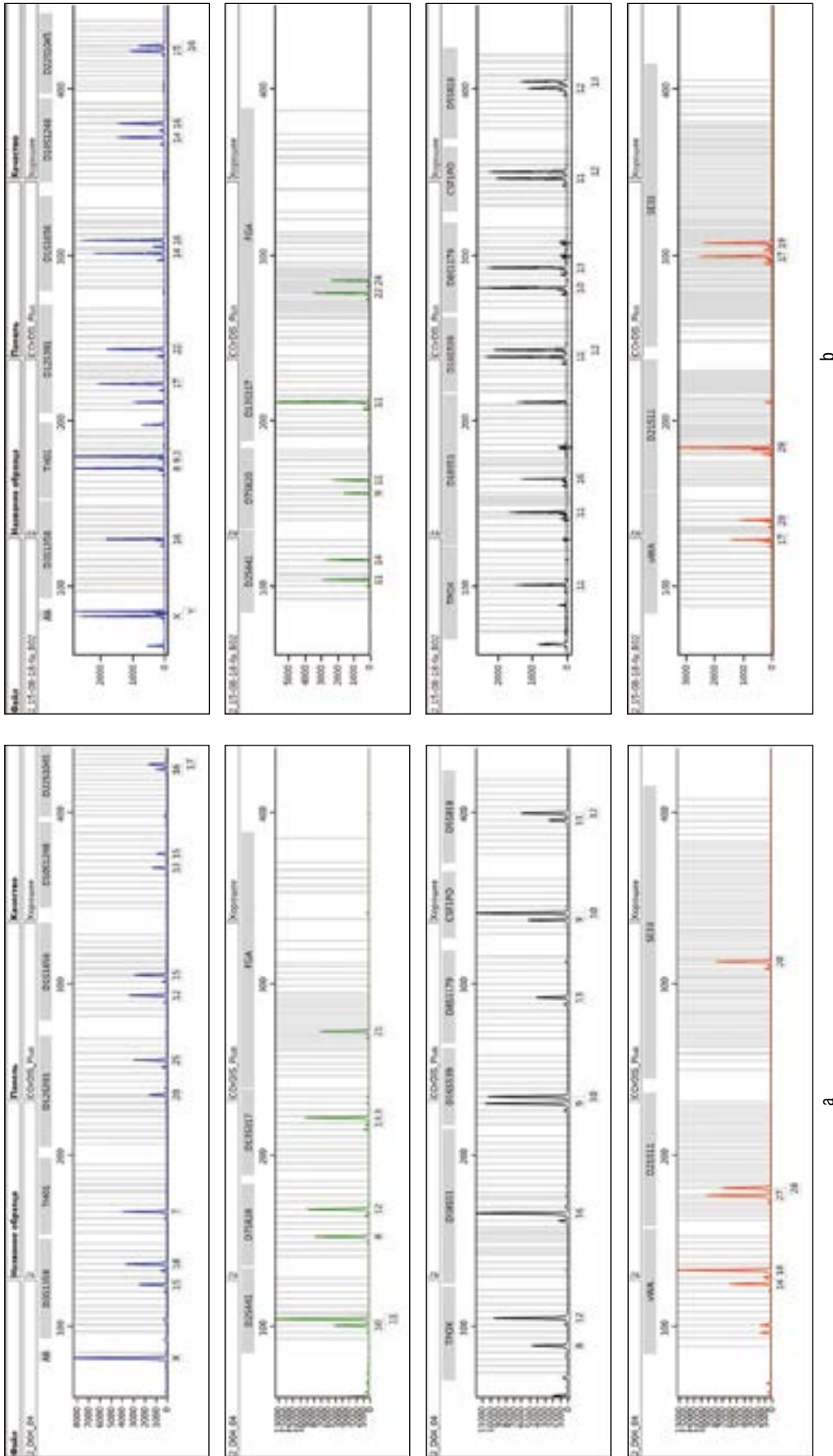


Рис. 1. Экспериментально полученные STR-профили клеточных линий: а — WIL2-S; б — WIL2-S.
 Fig. 1. Obtained STR-profiles: a — WIL2-S; b — WIL2-S.

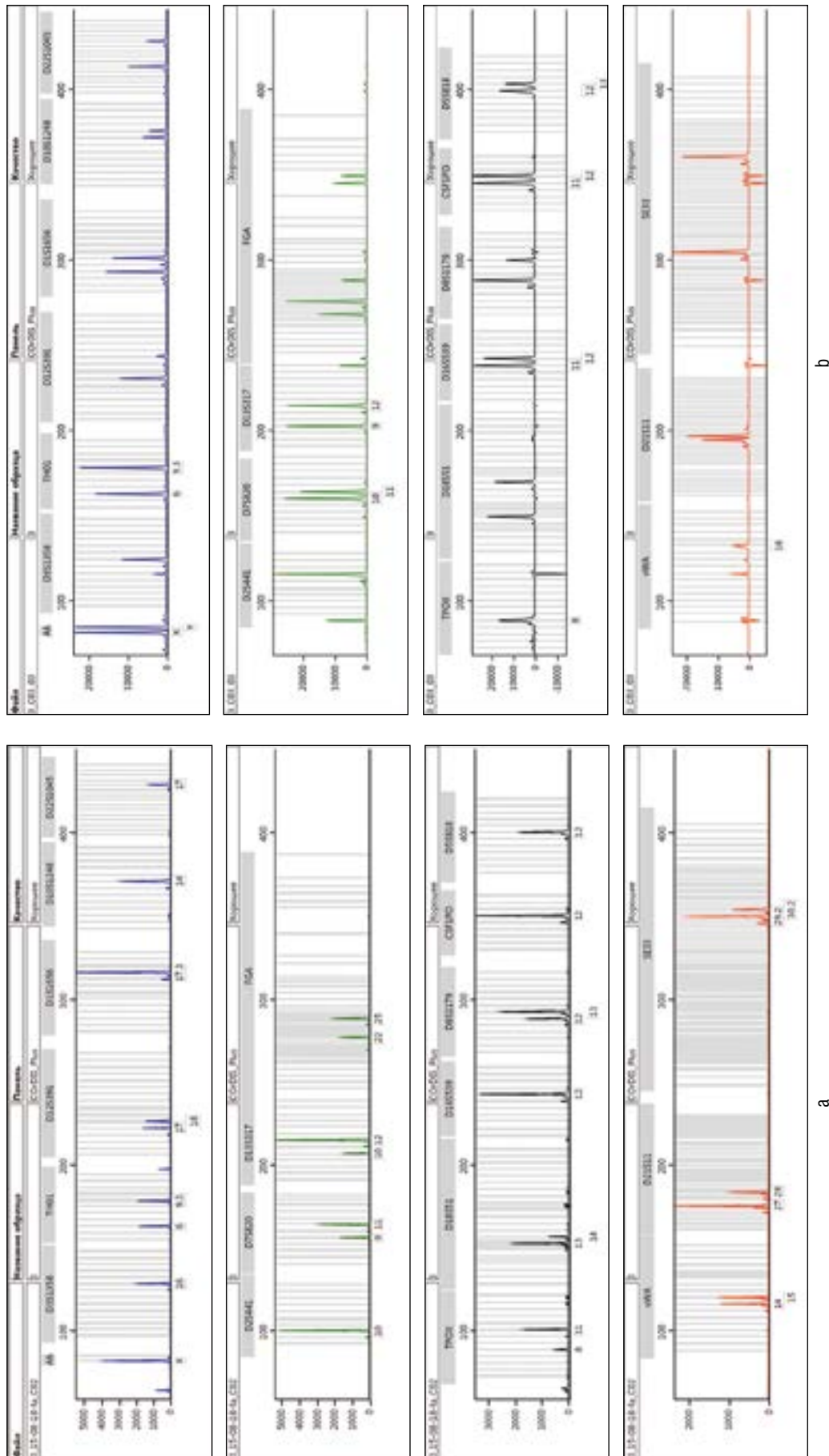


Рис. 2. Экспериментально полученные STR-профили клеточных линий: а — U937; б — NK-92.
 Fig. 2. Obtained STR-profiles: a — U937; b — NK-92.

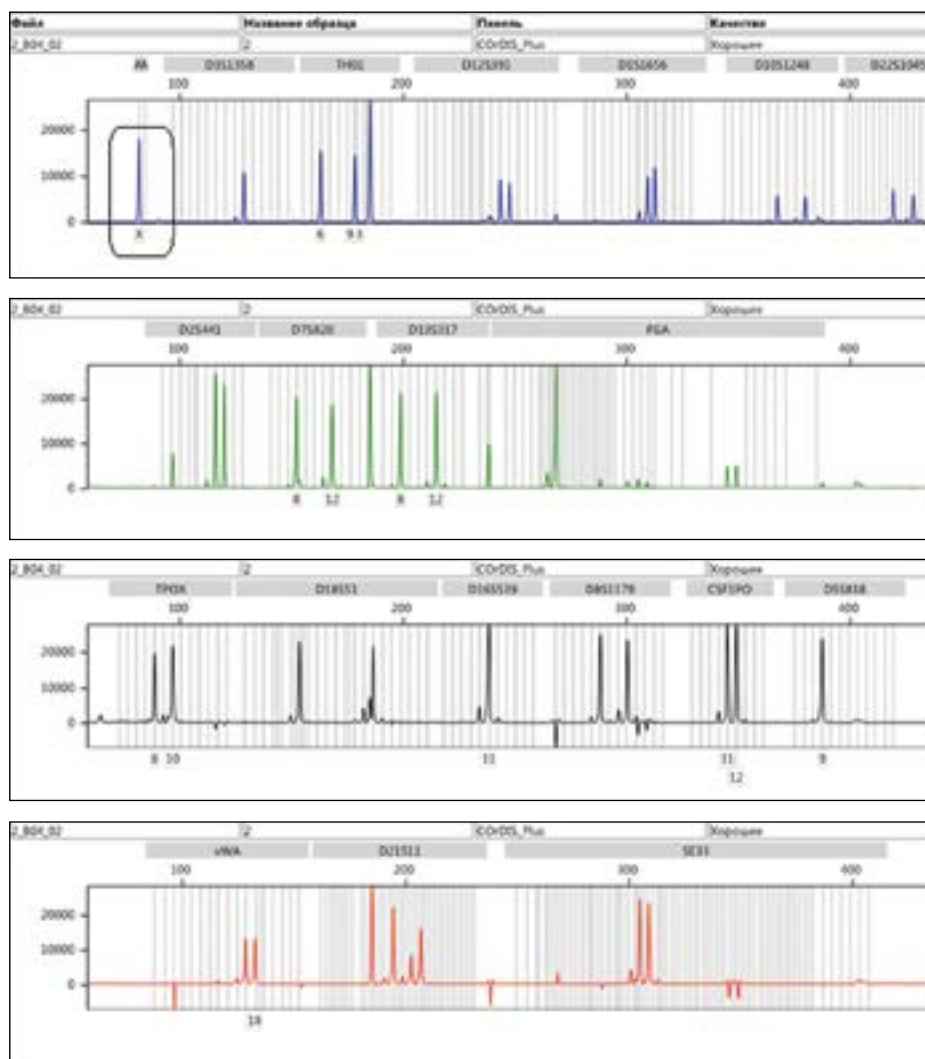


Рис. 3. Экспериментально полученный STR-профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1.
 Fig. 3. Obtained STR profile of the Jurkat Clone E6-1 cell line.

Таблица 4. Экспериментально полученные генетические профили клеточных линий U-937, WIL2S, WISH, NK-92
 Table 4. Genetic profiles of U-937, WIL2S, WISH, and NK-92 cell lines

U-937	WIL2S	WISH	NK-92
Amelogenin: X	Amelogenin: X,Y	Amelogenin: X	Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 12	CSF1PO: 11, 12	CSF1PO: 9, 10	CSF1PO: 11, 12
D13S317: 10, 12	D13S317: 11	D13S317: 13,3	D13S317: 9, 12
D16S539: 12	D16S539: 11, 12	D16S539: 9, 10	D16S539: 11, 12
D5S818: 12	D5S818: 12, 13	D5S818: 11, 12	D5S818: 12, 13
D7S820: 9, 11	D7S820: 9, 11	D7S820: 8, 12	D7S820: 10, 11
TH01: 6, 9,3	F13A01: 6, 7	THO1: 7	THO1: 6, 9,3
TPOX: 8, 11	F13B: 10	TPOX: 8, 12	TPOX: 8
vWA: 14, 15	FESFPS: 11, 12	vWA: 16, 18	vWA: 18
	LPL: 9, 10		
	THO1: 8, 9,3		
	TPOX: 8, 11		
	vWA: 17, 20		

оценки их подлинности в ходе экспертизы качества. Использование в медицинской практике идентифицированных КЛ обеспечит эффективность и безопасность применения БМКП. Для оценки возможностей метода STR-анализа в аутентификации и определении генетической стабильности КЛ нами были установлены STR-профили следующих линий: WIL2S, WISH, NK-92, Jurkat Clone E6-1, U937 с использованием набора CoDIS plus. Сравнение профилей клеточных линий WIL2S, WISH, NK-92,

U937 показало их полное совпадение с профилями, представленными на официальных сайтах коллекций. При аутентификации клеточной линии Jurkat Clone E6-1 была установлена потеря гена амелогенина. Данный фактор является примером детектирования генетической нестабильности КЛ методом фрагментного анализа.

Анализ и интерпретация полученных STR-профилей позволяют судить о целесообразности применения набора CoDIS plus для

Таблица 5. Генетический профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1, определенный экспериментально, в сравнении с профилем, представленным в American Type Culture Collection **Table 5.** Comparison of the obtained Jurkat Clone E6-1 genetic profile and the reference profile provided by the ATCC

Генетический профиль клеточной линии Jurkat Clone E6-1 Genetic profile of the Jurkat Clone E6-1 cell line	
Стандарт American Type Culture Collection Reference provided by the ATCC	Экспериментально полученный Obtained genetic profile
Amelogenin: X, Y	Amelogenin: X, ?
CSF1PO: 11, 12	CSF1PO: 11, 12
D13S317: 8, 12	D13S317: 8, 12
D16S539: 11	D16S539: 11
D5S818: 9	D5S818: 9
D7S820: 8, 12	D7S820: 8, 12
THO1: 6, 9,3	THO1: 6, 9,3
TPOX: 8, 10	TPOX: 8, 10
vWA: 18	vWA: 18

анализа КЛ, входящих в состав БМКП, в биомедицинских исследованиях, а также в ходе проведения экспертизы качества БМКП.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590045-2).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the FSBI «SCE-EMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590045-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

- Korch C, Hall EM, Dirks WG, Ewing M, Faries M, Varella-Garcia M, et al. Authentication of M14 melanoma cell line proves misidentification of MDA-MB-435 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2018;142(3):561–72. <https://doi.org/10.1002/ijc.31067>
- Rižner TL, Adamski J. It is high time to discontinue use of misidentified and contaminated cells: guidelines for description and authentication of cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;182:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.017>
- Lin LC, Elkashty O, Ramamoorthi M, Trinh N, Liu Y, Sunavala-Dossabhoy, et al. Cross-contamination of the human salivary gland HSG cell line with HeLa cells: a STR analysis study. *Oral Dis*. 2018;24(8):1477–83. <https://doi.org/10.1111/odi.12920>
- Rojas A, Gonzalez I. Cell line cross-contamination: a detrimental issue in current biomedical research. *Cell Biol Int*. 2018;42(3):272. <https://doi.org/10.1002/cbin.10904>
- Mrózek K, Tanner SM, Heinonen K, Bloomfield CD. Molecular cytogenetic characterization of the KG-1 and KG-1a acute myeloid leukemia cell lines by use of spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes Cancer*. 2003;38(3):249–52. <https://doi.org/10.1002/gcc.10274>
- Maiga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A*. 2015;87A(4):285–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22643>
- Corral-Vázquez C, Aguilar-Quesada R, Catalina P, Lucena-Aguilar G, Ligeró G, Miranda B, Carrillo-Ávila JA. Cell lines authentication and mycoplasma detection as minimum quality control of

- cell lines in biobanking. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(2):271–80. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9617-6>
- Roseti L, Serra M, Canella F, Munno C, Tosi A, Zuntini M, et al. In vitro gene and chromosome characterization of expanded bone marrow mesenchymal stem cells for musculo-skeletal applications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(23):3702–11.
- McLaren RS, Reid Y, Storts DR. Human cell line authentication: the critical first step in any project using human cell lines. In: Heizmann CW, eds. *Calcium-binding proteins and RAGE: from structural basics to clinical applications. Methods in Molecular Biology, vol 963*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. P. 341–53. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-230-8_21
- Alonso A, Barrio PA, Müller P, Köcher S, Berger B, Martin P, et al. Current state-of-art of STR sequencing in forensic genetics. *Electrophoresis*. 2018;39(21):2655–68. <https://doi.org/10.1002/elps.201800030>
- Geng T, Novak R, Mathies RA. Single-cell forensic short tandem repeat typing within microfluidic droplets. *Anal Chem*. 2014;86(1):703–12. <https://doi.org/10.1021/ac403137h>
- Silva SBS, Sawitzki FR, Scheible MKR, Bailey SF, Alho CS, Faith SA. Paternity testing using massively parallel sequencing and the PowerSeq™ AUTO/Y system for short tandem repeat sequencing. *Electrophoresis*. 2018;39(21):2669–73. <https://doi.org/10.1002/elps.201800072>
- An Q, Fillmore HL, Vouri M, Pilkington GJ. Brain tumor cell line authentication, an efficient alternative to capillary electrophoresis by using a microfluidics-based system. *Neuro Oncol*. 2014;16(2):265–73. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not202>
- Мельникова ЕВ, Меркулов ОВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ, Ручко СВ, Бокованов ВЕ. Идентификация клеточных линий человека с использованием метода генотипирования короткими tandemными повторами: мировая практика. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):3–10. [Melnikova EV, Merkulov OV, Merkulov VA, Olefir YuV, Ruchko SV, Bokovanov VE. Human cell line identification by typing of short tandem repeats: world practice. *Biofarmatsevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.)]
- Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014;66(1):133–47. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>
- Benabid AL, Delong M, Hariz M. Monkey-based research on human disease: the implications of genetic differences. *Altern Lab Anim*. 2015;43(3):205–6. <https://doi.org/10.1177/026119291504300309>
- Пинаев ГП, Полянская ГГ. Создание и развитие Российской коллекции клеточных культур человека, животных и растений. В кн.: *Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 26*. СПб.: Изд-во Политехн. унта; 2010. С. 3–61. [Pinaev GP, Polyanskaya GG. Establishment and development of the Russian collection of human, animals and plants cell cultures. In: *Cell Cultures. Information Bulletin. Issue 26*. St. Petersburg: Izd-vo Politekhn. unta; 2010. P. 3–61 (In Russ.)]
- Мельникова ЕВ, Рачинская ОА, Трусов ГА, Хорольский МД, Семенова ИС, Терешкина НВ, Меркулов ВА. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):28–38. [Melnikova EV, Rachinskaya OA, Trusov GA, Khorolsky MD, Semenova IS, Tereshkina NV, Merkulov VA. Justification of methodological approaches to identification testing of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38>
- Huang Y, Liu Y, Zheng C, Shen C. Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170384>

Об авторах / Authors

Хорольский Михаил Дмитриевич, *Mikhail D. Khorolsky*. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8222-0805>

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук. *Irina S. Semenova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9026-0508>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук. *Ekaterina V. Melnikova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 26.09.2019

После доработки 28.10.2019

Принята к публикации 22.11.2019

Received 26 September 2019

Revised 28 October 2019

Accepted 22 November 2019