

MEASLES DIAGNOSTICS: PROBLEMS AND MODERN APPROACHES

Rayev M.B.^{1,2}, Khramtsov P.V.^{1,2}, Bochkova M.S.¹,
Timganova V.P.¹, Zamorina S.A.^{1,2}

¹FSBSI Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm; ²FSBEI HPE
Perm State National Research University, Perm, Russia

Key methods of measles diagnostics are presented in the paper. Immunoenzyme, chemiluminiscent assays and polymerase chain reaction are the most effective modern measles diagnostic methods. Development of more perfect diagnostic techniques is essential component of WHO Global measles and rubella strategic plan.

Key words: measles, diagnostics, ELISA, PCR, chemiluminiscence

ИЗУЧЕНИЕ РОСТА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАРЗ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Раев М. Б.^{1,2}, Заморина С. А.^{1,2}, Тимганова В. П.¹,
Бочкова М. С.¹, Храмцов П. В.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;
²Пермский государственный национальный исследовательский
университет, Пермь, Россия

Изучали рост и жизнеспособности клеток гибридомы ВАРЗ, производящей моноклональные антитела против трофобластического β 1-гликопротеина (ТБГ) после размораживания в условия культивирования в разных средах *in vitro*. Показано, что культивирование в среде [DMEM+12% FCS] приводит к максимальному росту клеток (в 1,8 раз за 2 суток) с сохранением жизнеспособности на уровне более 70%, в средах на основе [DCCM-1] прирост составил 1,1-1,2 раз, жизнеспособность в районе 55-59%; в среде [RPMI-1640+12% FCS] – прирост составлял 1,6 раз за 2 суток. Таким образом, использование среды [DMEM+12% FCS] выглядит наиболее рациональным для культивирования клеток с целью их восстановления после разморозки.

Ключевые слова: гибридома ВАРЗ, трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ), культивирование, рост клеточной массы, жизнеспособность

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) является онкофетальным белком, который продуцируется клетками цито- и синцитиотрофобласта и обладает иммуносупрессивными свойствами. Для исследователей доступны некоторые рекомбинантные формы белка (PSG1, PSG9), лишь частично соответствующие гетерогенному составу ТБГ *in vivo*. В лаборатории экологической иммунологии (ИЭГМ УРО РАН, г. Пермь) разработана и запатентована технология выделения и очистки нативного ТБГ [1]. Получаемый препарат максимально

близок к составу ТБГ, обнаруживаемого в сыворотке беременных. Для точной идентификации препарата ТБГ оценивали его состав методом LC/MS (танDEMная хромато-масс-спектрометрия). Исследование было проведено в Хайфском технологическом институте «Technion» (Smoler Proteomics Center, руководитель профессор А. Эдмон, Хайфа, Израиль) на приборе LTQ-Orbitrap («Thermo Fisher», США). Согласно данным LC/MS следует, что препарат содержит несколько молекулярных форм белка: ТБГ-1, ТБГ-3, ТБГ-4, ТБГ-7, ТБГ-9,

а также некоторые изоформы и прекурсоры, определяемые *in vivo*.

В рамках запатентованной технологии ТБГ человека получали комбинацией методов: аффинной хроматографией с использованием биоспецифического сорбента и последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrap™ Protin G HP («Amersham Biosciences», Швеция) [1]. В качестве биоспецифического сорбента использовали сефарозу CL 4B, модифицированную моноклональными антителами к ТБГ, продуцируемыми гибридомой ВАРЗ («Genovac», Германия).

Так как гибридные клетки хранятся в условиях сверх глубокой заморозки, необходимо понимать, в каких условиях они лучше восстанавливают свою пролиферативную и функциональную активность.

Целью работы изучение параметров роста и жизнеспособности клеток гибридомы ВАРЗ после размораживания в условия культивирования в различных средах *in vitro*.

Материал и методы. Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе «IG-150 Jouan» (Франция) при концентрации CO₂ 10%. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре Ньюбауэра, одновременно оценивали жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим (0,2%) («Sigma», США). Клетки гибридомы ВАРЗ хранили в криохранилище при температуре жидкого азота (количество клеток в каждой пробирке – 3-5×10⁶) в среде заморозки [DMSO («Sigma», США) +10% FCS («Biological Industries», Израиль)] и были разморожены согласно протоколу производителя («Genovac», Германия). После размораживания клетки были перенесены (жизнеспособность в момент переноса составляла 55%) в 48-луночный планшет («Eppendorf», Германия) для культивирования в среде роста [DMEM+12% FCS] в течение 48 часов. По истечении указанного времени клетки были перенесены во флaskи (75 см²) («Cellstar»®, Германия) с различными вариантами сред: 1 – DMEM+12% FCS, 2 – DCCM-1, 3 – DCCM-1+12% FCS, 4 – RPMI-1640+12% FCS. Все среды были модифицированы добавлением 3,3 мМ L-глутамина, 67 Ед пенициллина, 0,07 мг/мл стрептомицина, 0,17 мкг/мл амфотерицина В, 1мМ пирувата натрия (все компоненты и среды, кроме RPMI-1640, произведены «Biological Industries», Израиль, концентрации соглас-

но рекомендациям Antibody Unit, Dept. of Biological Services, Институт Вейцмана, Израиль, RPMI-1640 Sigma, США). Концентрацию клеток в динамике роста и их жизнеспособность контролировали в каждой экспериментальной серии в течении двух недель каждые 2 суток. По мере необходимости (изменение цвета среды, показатели жизнеспособности) клетки перевивали в свежую среду соответственно.

Результаты и обсуждение. Динамику клеточного роста оценивали по увеличению числа клеток в объеме среды за двое суток. При анализе прироста клеток гибридомы ВАРЗ и оценке их жизнеспособности в зависимости от состава среды было показано, что культивирование в среде 1 [DMEM+12% FCS] приводит в среднем к приросту в 1,8 раз с сохранением жизнеспособности на уровне более 70%, в среде 2 [DCCM-1] прирост составил 1,1 раз, жизнеспособность не изменялась и находилась в районе 55-59%); в среде 3 [DCCM-1+12% FCS] прирост составил 1,2 раза, при этом уменьшалось количество живых клеток в среднем на 15% (до 34%); в среде 4 [RPMI-1640+12% FCS] прирост составлял 1,6 раза, рост жизнеспособности на 10% (до 62%). Таким образом, использование среды 1 [DMEM+12% FCS] выглядит наиболее рациональным для культивирования клеток с целью их функционального восстановления в процессе разморозки. Стоит отметить, что применение среды 4 [RPMI-1640+12% FCS] также обеспечивает существенный прирост клеточной массы, однако жизнеспособность клеток несколько ниже. Тем не менее, с точки зрения экономической целесообразности применение RPMI-1640 также может быть оправдано. Что касается использования среды DCCM-1, то в процессе культивирования клеток гибридомы после разморозки она показала наименьший прирост клеток, причем в отсутствии FCS прирост был минимален, при том, что именно эта среда содержит в своем составе рекомбинантный трансферрин, который способствует пролиферации клеток, и рекомбинантный инсулин, в силу этого факта среда DCCM-1 является самой дорогой из исследуемых. Очевидно, что набор клеточной массы после разморозки необходим для того, чтобы реализовать конечную цель культивирования – синтез целевого продукта (моноклональных антител против ТБГ). Среда DCCM-1

является бессывороточной и рекомендуется именно для культивирования клеток гибридомы в продуктивной стадии. В дальнейшем мы планируем оценить эффективность продукции антител клетками гибридомы в зависимости от среды культивирования, что в совокупности с представленными результатами позволит оптимизировать процесс получения

целевого продукта, как с позиции технологии, так и с позиции экономической целесообразности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Раев М. Б. Способ выделения и очистки трофобластического β -1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449, опубликован 20.09.2009, Бюл. № 26.

INVESTIGATION OF GROWTH AND VIABILITY OF HYBRIDOMA BAP3 CELLS IN DIFFERENT CULTURE MEDIA *IN VITRO*

Раев М. В.^{1,2}, Zamorina S. A.^{1,2}, Timganova V. P.¹,
Bochkova M. S.¹, Khrantsov P. V.^{1,2}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; ²Perm State National Research University, Perm, Russia

Growth and viability in different culture media after thawing of hybridoma BAP3 cells that produces monoclonal antibodies against pregnancy-specific b1-glycoprotein (PSG) were studied *in vitro*. We show that cultivation in [DMEM+12% FCS] leads to maximal cell growth (1,8-fold in two days) with retention of viability of more than 70%. There were 1,1-1,2-fold growth and viability of 55-59% in [DCCM-1]-based media and 1,6-fold growth in two days in [RPMI-1640+12% FCS]. Therefore, application of [DMEM+12% FCS] medium seems to be the most appropriate for cultivation of hybridoma BAP3 cells after their thawing from cryopreservation.

Key words: hybridoma BAP3, pregnancy-specific β 1-glycoprotein (PSG), cell culture, cell mass growth, cell viability

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК-АПТАМЕРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Раев М. Б.^{1,2}, Храмцов П. В.^{1,2}, Бочкова М. С.¹,
Тимганова В. П.¹, Заморина С. А.^{1,2}, Кропанева М. Д.²

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук; ²ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аптамерами называют ДНК- и РНК-олигонуклеотиды, обладающие способностью к избирательному взаимодействию с молекулой-мишенью. Цель настоящей работы состояла в исследовании процесса взаимодействия биотинилированного ДНК-аптамера, специфичного к IgE человека, и углеродных наночастиц, ковалентно конъюгированных со стрептавидином. Было продемонстрировано, что максимально высокий уровень специфической сорбции достигается при концентрации аптамера 100 нМ и составляет порядка 40 пкМ на 1 миллиграмм наночастиц.

Ключевые слова: аптамеры, иммуноглобулин E, углеродные наночастицы