

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

90 ЛЕТ В АВАНГАРДЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ БЕЛАРУСИ

Сборник трудов
Республиканской научно-практической конференции
с международным участием,
посвященной 125-летию со дня рождения Б. Я. Эльберта

Минск, 18 декабря 2015 г.

Под редакцией члена-корреспондента НАН Беларуси,
профессора Л. П. Титова



Минск БГМУ 2015

¹Павлов К. И., ²Дуж Е. В., ²Гончаров А. Е., ²Титов Л. П.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК МОНОНУКЛЕАРНЫХ
ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, HELA, THP, DAUDI
И MT-2 ДЛЯ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧНОСТИ
МИКРОЭРРЕЙ-ИССЛЕДОВАНИЯ**

¹ Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

*² Республиканский научно-практический центр эпидемиологии
и микробиологии, г. Минск, Беларусь*

Микроэррей — развивающаяся методика, поэтому на современном этапе существуют многочисленные подходы к верификации и стандартизации данных. Предложены методы подтверждения корректности данных с помощью экспрессионного ПЦР-анализа, Нозерн-блота, чипов других производителей. Каждая из данных методологий имеет как свои достоинства, так и свои недостатки. Перспективной с нашей точки зрения является оценка качества полученных данных по исследованию специфичности экспрессии исследуемых генов. Большинство клеток организма отличается строгим функциональным разделением и экспрессирует одновременно характерные только для них антигенные детерминанты [1]. Они выявляются

как на стадии экспрессируемых генов, так и в дальнейшем, при исследовании белковых продуктов методами проточной цитометрии и иммуногистохимии. Накоплен относительно большой объем информации для оценки того, что характерно для данной культуры клеток и тканей, а что нет. Таким образом, можно более-менее объективно представить, что «должно» экспрессироваться для данной культуры клеток, а что нет [2]. Поэтому для контроля специфичности целесообразно использование контролей относящихся:

- к разным тканям;
- к разным видам организмов;
- клетки в физиологическом состоянии и опухолевые;
- отрицательный контроль с абсолютно минимальной гомологией.

Таким образом, **цель** исследования — оценить специфичность экспрессии, используя разные культуры клеток и контроли.

Материалы и методы

С использованием диагностических чипов Human Discover Chips™ (ArrayIT corporation, California, USA) была измерена экспрессия 390 генов основных путей клеточной физиологии и реализации генома для культур клеток МПК, *HELA*, *THP*, *Daudi* [3]. Дополнительно в качестве контролей были использованы растительная кДНК на основе культур ячменя и кДНК из ткани мозга мыши, а также универсальный политканевой контроль кДНК ArrayIT Universal reference Cy3-labeled cDNA™. Negative-контроль представлял собой результаты выполнения только процедуры отмывки, блокировки, контакта с гибридизационным гелем и конечной отмывки фирменными растворами. РНК была получена из 40 млн клеток с помощью Tri-реагента (Applied), синтез кДНК выполнен прямым методом с помощью наборов SuperScript™ Direct plus cDNA Labeling System (Invitrogen). Для анализа результатов использован пакет программ Expander 6.

Результаты и обсуждение

Отрицательный контроль и растительная кДНК характеризовались низкой и относительно однородной флюоресценцией, что представлено на дот-плотах. При исследовании абсолютных значений средней флюоресценции Mean комплементарная ДНК культуры HeLa также отличалась низким средним значением, однако с большей вариабельностью в сторону увеличения. Наибольшей интенсивностью отличался политканевой контроль, как и должно было быть (рис.).

Для всех исследованных контролей был проведен корреляционный анализ с оценкой коэффициента регрессии для оценки подобия образцов между собой (табл.). Наибольшим подобием с остальными культурами и образцами характеризовалась культура клеток Daudi. Для культур HeLa и отрицательного контроля коэффициент регрессии характеризовался низкими значениями.

Raw Data Box-plot

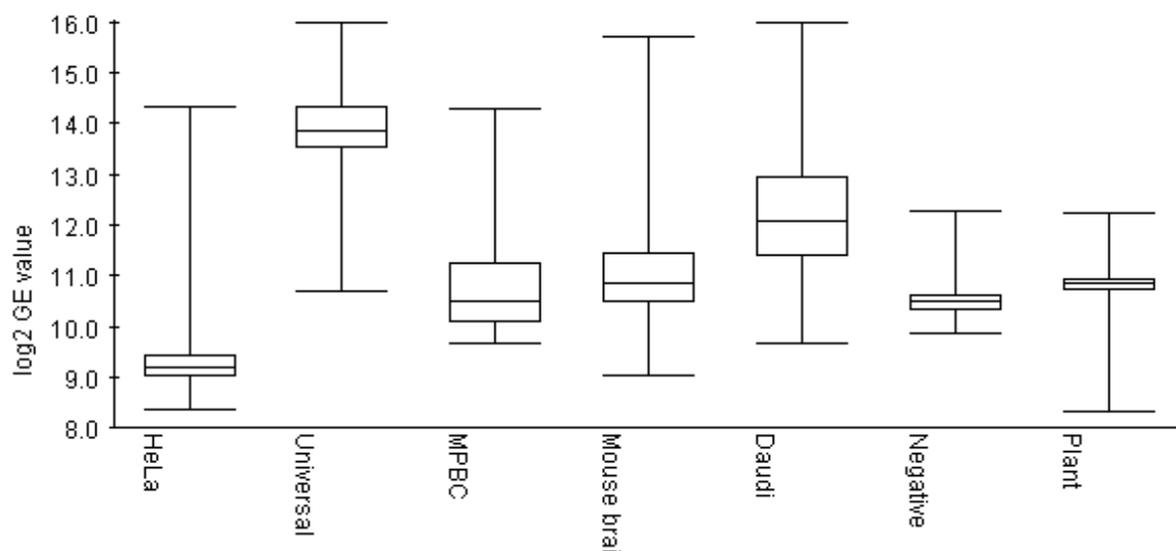


Рис. Бокс-плоты для абсолютных значений средней яркости

Значения коэффициента регрессии R для исследованных культур

	Universal	MPBC	THP	Mouse brain	Daudi	MT2	Negative	Rastenie
HeLa	0,14	0,15	0,24	0,12	0,29	0,13	0,031	0,014
Universal		0,16	0,084	0,15	0,2	0,13	0,22	0,017
MPBC			0,48	0,58	0,62	0,31	0,22	0,16
THP				0,45	0,7	0,31	0,13	0,001
Mouse brain					0,75	0,44	0,1	0,029
Daudi						0,55	0,23	0,17
MT2							0,033	0,21
Negative								0,04
Rastenie								

HELA — линия клеток раковой опухоли шейки матки, способных к абсолютно неограниченному делению. *THP-1* — культура клеток человека, острый моноцитарный лейкоз, периферическая кровь. Клетки характеризуются моноцитоподобной морфологией и экспрессируют поверхностные молекулы CD4, CD11b, CD11c, CD15, CD36, CD40, CD45, CD54, CD80, CD83, CD105, CD205. *MT 2* — культура клеток человека, Т-лимфобластный лейкоз, периферическая кровь. Клетки с лимфобластоподобной морфологией экспрессируют поверхностные рецепторы CD1a, CD2, CD3int, cCD3lo, CD4, CD25, CD45, CD123, HLA-ABC, HLA-DR. *Daudi* — В-лимфоцитоподобная культура клеток человека, происходящих из лимфомы Беркитта. Культура *Daudi* характеризуется экспрессией следующих поверхностных маркёров: CD10, CD19, CD27, CD34lo, CD43, CD45, CD54, CD62L, CD69, CD79a, CD80, CD86. Поэтому подобие между культурами *THP*, *Daudi*, *MT-2* и МПК объяснимо. Также отмечено высокое подобие

с кДНК мозга мыши. Однако уникальных спотов кДНК мозга мыши со- держала мало. Высоким количеством уникальных спотов отличалась куль- тура Daudi. Всего для этой культуры обнаружен 21 уникальный спот. Для ткани мозга мыши и культуры HeLa и моноклеарных лейкоцитов отмечено по 4 уникальных спота. Культуры ТСН и МТ-2 содержат по 12 и 13 уникальных спотов соответственно.

Выводы

Таким образом, использование разных культур клеток позволяет оце- нить специфичность и качество микроэрей-исследования. Уникальные для каждой культуры споты являются наиболее вероятными кандидатами как экспрессии, так и специфическими маркёрами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *BioGPS* [Electronic resource]. Mode of access : <http://biogps.org>. Date of access : 20.10.2015.
2. *KEGG* : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Electronic resource]. 2015. Mode of access : <http://www.genome.jp/kegg>. Date of access : 1.10.2015.
3. *Arrayit* Corporation [Electronic resource]. 2015. Mode of access : <http://arrayit.com>. Date of access : 1.10.2015.

Pavlov K. I., Duzh E. V., Hancharou A. E, Titov L. P.

PBMC, HELA, THP, Daudi and MT2 cell cultures using for microarray specificity investigation

PBMC, HELA, THP, Daudi and MT2 cell cultures were used for DNA- microarray specificity. It has been applied Human Discover Chips™ (ArrayIT corporation, California, USA) microarrays and Expander 6 soft. Mouse and plant cDNA was also used. It was found that the greatest specificity marker po- tential have unique for every culture spots.