

Тақырып: Вирусологияда клетка культураларын қолдану

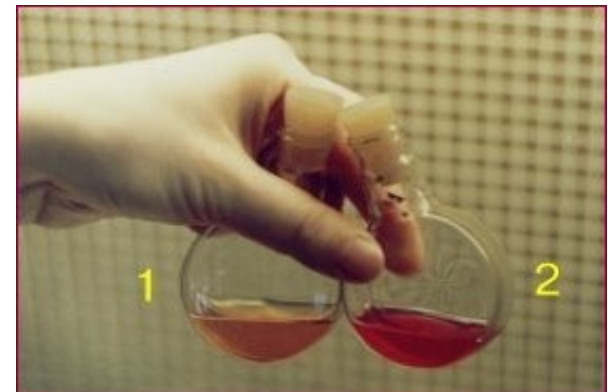
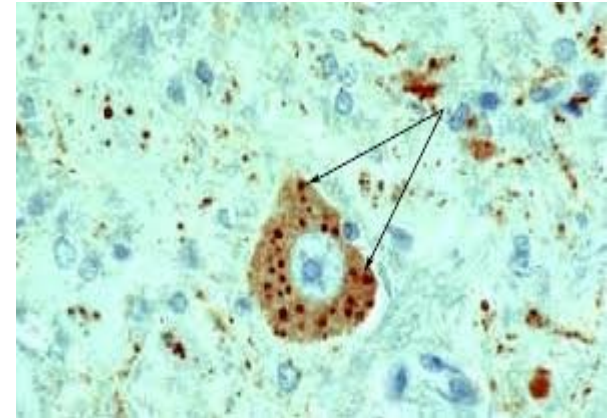
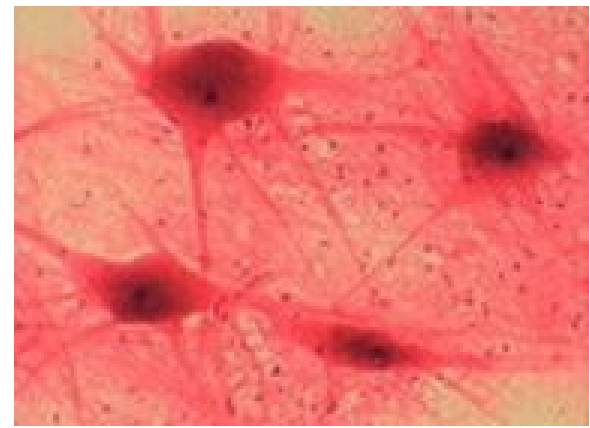


Жоспар:

- Вирусологияда қолданылатын клеткалар культуралары, оларға қойылатын талаптар, өсіру әдістері,
- Клетка культураларын сақтау
- Клеткалық культуралардың контаминациясы
- Қоректі орталар және олардың құрамы
- Вирусологияда клетка культураларын қолдану артықшылықтары
- Вирустарды жұқтыру, оларды клетка культураларыда өсіру және бөліп алу әдістері

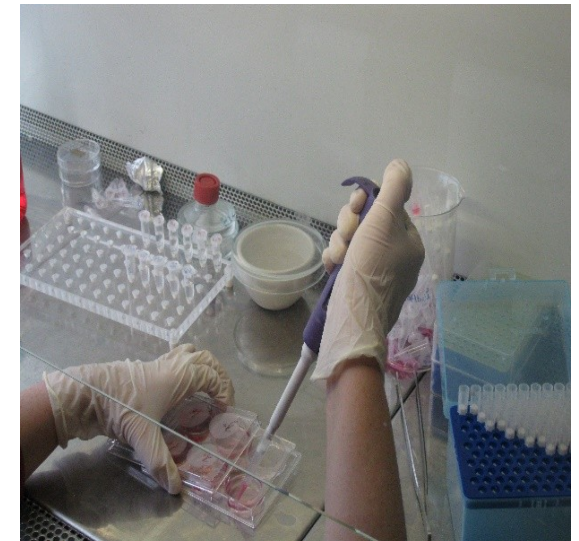
➤ Вирусологияда клетка культураларын қолдану мақсаттары:

1. Биологиялық материалда биологиялық үлгімен (биопроба) вирустарды анықтау,
2. Вирусты бөліп алу және оны клетка культурасында өсіру,
3. Зертханалық жағдайда вирустарды белсенді күйде сақтау,
4. Вирустарды титрлеу,
5. Вакциналар мен диагностикалық тест - жүйелерді өндіру үшін зертханалық зерттеу жұмыстарына қажет вирустардың үлкен биомассасын жинақтау,
6. Тест - объектілер ретінде нейтралдау реакциясына қолдану.



Клетка культураларына қойылатын талаптар:

1. Қолданылатын вирусқа сезімтал болуы қажет.
 2. Залалсыздандырылған жағдай қажет.
- ✓ Арнайы бокс немесе ламинар бокстар
 - ✓ Стерильді ерітінділер мен ерітінділер
 - ✓ Барлық орталарға антибиотиктер қосу 100 ЕД/мл
 - ✓ Клетка культураларын өсіруге қажет ыдыстарға қойылатын барлық талаптардың қадағалануы

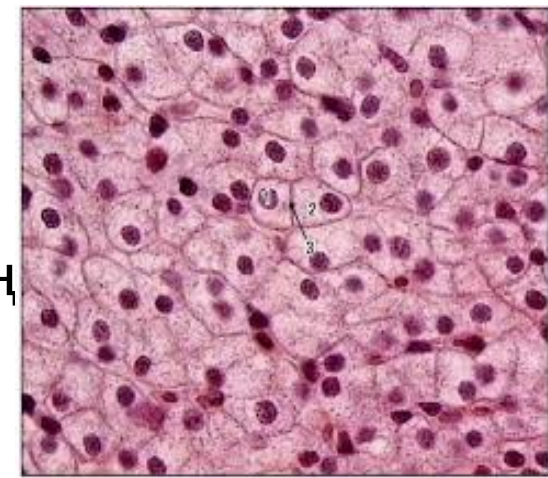


➤ Вирусологияда қолданылатын клеткалар культуралары:

- Трипсинмен өңделген алғашқы клеткалар культуралары
- Субкультуралар
- Кайтара егілетін клеткалардың екпе культуралары
- Диплоидты клеткалардың культуралары
- Суспензиялық клеткалардың культуралары

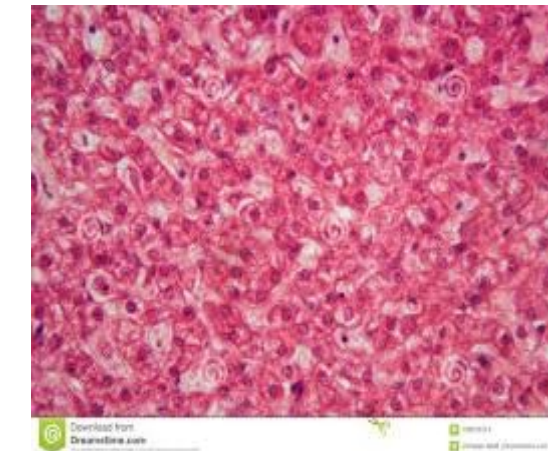


➤ **Трипсинмен өңделген алғашқы клеткалар культуралары** - *in vitro* жағдайында моноқабат қалыптастырып өсетін, организмдердің мүшелерінен немесе ұлпаларынан (бүйрек, өкпе, тері қабаттары, тимус, эмбриондардың немесе жас малдың тестикулалары) алынған клеткалар.



➤ **Клеткалар культураларын алу әдістемесі**

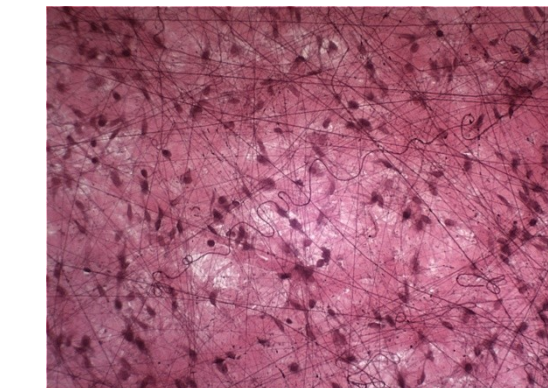
1. Биологиялық материалды кесінділерге (1-4 мм) бөлшектеп, ферменттермен (трипсин, панкреатин, коллагеназа) өңдеу.
2. Клеткалардың суспензиясын алу.
3. T-37°C термостатта пробиркаларда (матрастарда) өсіру.



➤ **Моноқабаттың қалыптасуы** - 3-5 тәулік,
өміршеңдігі 7-21 тәулік

Қабаттың қалыптасуына әсер ететін факторлар: ұлпа түрі, жануарлардың жас ерекшелігі, қоректік орта сапасы, егілетін клеткалар концентрациясы т.б.

Инвертті микроскоп.



➤ **Субкультуалар** – матрастарда өсірілген алғашқы клеткалар культураларынан 2-5 (сирек жағдайда 8-10) пассажда өсіріп алынады.

- Версен, трипсин ерітінділері.
- Моноқабаттық қалыптасуы 2-3 тәулік.

➤ **Қайтара егілетін клеткалардың екпе культуралары** – жасанды орта жағдайында ұзақ уақыт өсуге қабілетті клеткалар.

- Белгілі бір өсіру режимінде ұзақ уақыт қайтара егу барысында өсу белсенділігі жоғары алғашқы клеткалар культураларынан алынады.

▪ **Қайтара егілетін клеткалардың пайда болу механизмі:**

- генетикалық өзгергіштік,
- бірегей қасиетке ие клеткалардың сұрыпталуы.

- **Қайтара егілетін клеткалар** - біркелкі формада, гетероплоидты, in vitro – жағдайында тұрақты өсуге қабілетті, кейбіреулерінде онкогенді белсенділігі болады.

- **Клеткалар культурасын алуға жиі қолданылатын клеткалардың линиялары:**

Әйелдің жатыр қынабының қатерлі ісігі - **HeLa**

Адамның көмей карциномасы- **HeP**

Ауыз қуысының қатерлі ісігі- **KB**

Шошқа эмбрионының бүйрегі- **PPЭС**

Бұзау бүйрегі - **ППТ**

Қой бүйрегі - **ППО**

Сиыр трахеясының шырышты қабаты - **TR**

Тышқан фибробласттары - **L**

Циномальгус маймылының жүрегі- **СОЦ**

Жаңа туған атжалман бүйрегі - **ВНК**

- **Қайтара егілетін клеткалардың артықшылықтары:**

- Экономикалық жағынын тиімі,
- Латентті вирустар мен микрофлораны анықтау мүмкіндігі,
- Алғашқы клеткалар культураларына қарағанда клоналды линиялар вирустардың көбейюіне стандартты жағдайларды қамтамасыз етеді,
- Көптеген линиялардың вирустарға сезімталдығы кең спектрлілігі

- **Кемшіліктері:**

- Малингнизацияға бейім
- Вирустарға сезімталдығы бәсеңдеуі

- Клеткаларды қайтара егу әдістемесі

2-3 моноқабатты клеткалық культура



t - 35-37 °C 0,02% версен, 0,25% трипсин (9:1), 10-15 минут өңдеу



Версен мен трипсин (1 литр 5-10 мл, 0,1 литр 2-3 мл),
қоректік орта «Игла» немесе 199 өңдеу, 5-10 минут

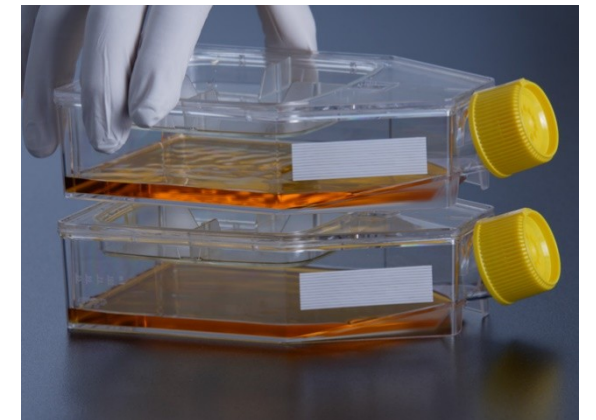
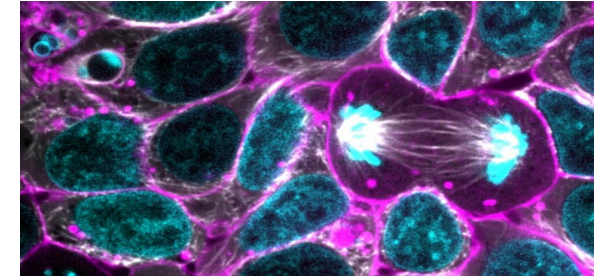


Горяев камерасында санау (1 мл 100-200 мың клетка) немесе
сұйылту (1:2 1:6), қоректік ортада (лактоальбумин гидролизаты
қосылған «Игла» немесе 199 t - 35-37 °C 3-4 тәулік бойы өсіру

- **Диплоидты клеткалар культуралары** – in vitro жағдайында өсіру барысында морфологиялық біркелкі, тұрақты, тіршілігі шектеулі, өсудің үш фазасымен сипатталатын, қайтара көшіру барысында бастапқы ұлпаға тән кариотипін сақтауға қабілетті, контаминанттардан таза, атжалмандарға тасымалдау кезінде туморагенді белсенділігі жоқ клеткалық линиялар.
- ✓ Алғашқы клеткалық культуралардан алынады. Кариотипті сақтау үшін **феталды сарысумен** өнделеді (Хейфлик және Мухерд, 1961 ж.).
- ✓ **Диплоидты клеткалар**: адам (өкпе, бүйрек, бұлшықет, тері, жүрек т.б.) және жануарлардың (ірі қара мал, шошқа, атжалман бүйректері) эмбриондарының ұлпаларынан алынады.
- ✓ **Максималды пассаж саны** - 50 ± 10 , Криосақтау - $196 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✓ **Артықшылықтары**: 10-12 тәулік қоректік орта алмастырылмаған жағдайда өміршең, жаңартылған қ.о. өміршеңдігі -4 апта сақталады, вирустарды ұзақ уақыт өсіруге жарамды, вирустарға сезімталдылығы сақталады.

➤ Суспензиялық клеткалық культуралар

- Қайтара егілетін клеткалық линиялар қолданылады.
- Микро тасымалдағыштар: сефадекс, силикогель, цитолар.
- Қатты субстраттарға клеткалардың бекіну түріне қарай: алғашқы реттік, субкультуралар, диплоидты деп бөлінеді.
- Клеткалық культураларды беттік тәуелді деп атайды.



- Клетка культураларын сақтау

Клетка культуралары

Клеткалардың суспензиясы,
10⁶/мл, 10 - 40 % сарысу, 10 % глицерин (ДМСО)

4 °C 1-6 апта

Ампулалар, 4 °C, 1-3 сағ

Этил спирт + құрғақ мұз,
1 °C /мин __ 25 °C

-70 °C сұйық мұз

- 78 °C құрғақ мұз

- 196 °C сұйық мұз



➤ **Клеткалық культуралардың контаминациясы**

- **Контаминаттар:** вирустар, бактериялар, саңырауқұлақтар, микоплазмалар, басқа клеткалық культуралардың клеткалары.
- **Тұрақты клеткалық линиялардың паспортизациясы** – микоплазмалармен контаминациясын анықтайтын тест бақылау.
- **Микоплазмамен контаминациясының белгілері** – қоректік ортаның күрт қышқылдануы немесе опалесценциясы.
- **Микоплазмалармен ластануды анықтау әдістері:** қоректік орталарға көшіру, тест культуралар, цитологиялық, радиоавтография, электронды микроскопиялық.
- Контаминацияланған клетка культуралары жойылады, сұйық азотта сақталған үлгілерді қайта жандандырады. Сирек бірегей культураларды деконтаминациялайды.
- Контаминацияның алдын алу үшін антибиотиктерді қолданады.

Препарат	Сезімталдық танытатын микроорг.	Антимикробтық әсері	Клетка культураларын өсірудің оптим. конц. (ед/мл, мкг/мл)
Пенициллин	Б +	Бактерицидное	100,0
Стрептомицин	Б±	»	100,0
Мономицин	Б±, М	»	100,0
Неомицин	Б+, М	»	50,0
Канамицин	Б±, М	»	200,0
Гентамицин	Б±, М	»	200,0
Полимиксин	Б±	»	50,0
Фурагин	Б±	»	8,0
Тетрациклин	Б±, М	Бактериостатическое	30,0
Эритромицин	Б±	То же	50,0
Линкомицин	Б±, М	»	100,0
Левомецетин (хлорамфенкол)	Б±, М	»	30,0
Тилозин	М	»	10,0
Олеандомицин	М	»	15,0
Астазилд (препарат 1)	М	»	10,0
Астазиан (препарат 2)	М	»	50,0
Нистатин	МГ	Фунгистатическое	50,0
Амфотерицин	МГ	»	2,5

• Хенкс ерітіндісі

- 1л бидистилденген су
- 8,0 г NaCl,
- 0,4 г KCl,
- 0,1 г MgSO₄ 7H₂O,
- 0,14 г CaCl₂,
- 0,06 г KH₂PO₄,
- 0,06 г NaH₂PO₄,
- 1,0 г глюкозы,
- 0,02 г фенолрот,
- 0,07 г NaHCO₃.

Эрл ерітіндісі

- 1л бидистилденген су
- 6,8 г NaCl,
- 0,4 г KCl,
- 0,1 г MgSO₄,
- 0,2 г CaCl₂,
- 0,125 г NaH₂PO₄,
- 2,2 г NaHCO₃,
- 1,0 г глюкоза.

- **0,25% трипсин ерітіндісі** – фосфатты буферде дайындалады
- **0,02% версен ерітіндісі** (этилендиаминтетрасірке қышқылының натрий тұзы) – Хенкс ерітіндісінде дайындалады.

Қоректік орталар: табиғи және жасанды (синтетикалық және жартылай синтетикалық).

Табиғи қоректік орталар құрамы: Хенкс және Эрл ерітінділер қоспасы, қан сарысуы (адам, жануар), ұлпа (эмбионалды) экстрактысы (тауық, сиыр, адам эмбрионы), сиырдың амнион сұйықтығы т.б.

Жасанды орталар

Жартылай синтетикалық орта құрамы: түрлі белоктық өнімдердің ферменттік гидролизаттары (5% лактальбумин гидролизаты, бұлшықет ферменттік гидролизаты, ферменттік казеинді ашытқы гидролизаты, 2,5% және 5% гемогидролизат, аминокептид т.б.).

Синтетикалық орта: «Игла», 199

- **Индикатор:** 0,002% қызыл фенол (сары түс - орта қышқылдығы артқанда, қызғылт малина түсі -сілтілігі артқанда, нейтрал мәнде (7,2-7,4) - сарғыш қызыл).
- Қоректік орта рН реттеуге – 7,5%-натрий бикарбонат (NaHCO_3) және 3%- сірке қышқылының (CH_3COOH) ерітінділері қолданылады.
- Микрофлораны тазарту үшін қоректік ортаны қолданарда антибиотиктер: пенициллин и стрептомицин 100 ЕД/мл қосады.
- Көгеруді тежеу үшін нистатиннің натрий тұзын 100 мкг /1 мл оректік ортаға қосады.

- **Қоректік орталар:**
- Өсіруге арналған (клеткалардың көбеюі мен өміршеңдігін қамтамасыз ететін), құрамына 2-10 % қан сарысу кіреді, клеткаларды бастапқы өсіру сатысында қолданады. Ірі қара мал сарысу құрамында: альбумин, фетуин болады.

- Клеткалардың өсіршеңдігін қолдайтын қоректік орта, клеткалаға вирустар жұқтырғаннан кейінгі өсіру сатысында қолданады.

➤ Вирусологияда клетка культураларын қолдану артықшылықтары

1. Барлық клетка культураларына вирустарды жұқтыру арқылы белоктық балласты аз, вирустарды жоғары концентрациясын алу мүмкіндігі,
2. Кез келген жануарлардан клетка культураларын алу негізінде вирустардың алуан түрін өсіру мүмкіндігі,
3. Тірі жүйені зақымдамай, инфекциялық процесті кез келген уақытта араласу мүмкіндігі,
4. Инфекциялық процестің жүруін үздіксіз басқару,
5. Культуралық сұйықтық түрінде вирустардың суспензиясын алу
6. Стерильді культуралық сұйықтық алу,
7. Клеткаларды вирустармен зақымдау және вирустық материалды алу әдістерінің қарапайым әрі арзан

➤ **Вирустарды бөліп алуға қойылатын талаптар:**

1. Клетка культуралары вирустарға сезімтал болуы керек,
2. Инокуляцияланатын вирус жас, ұзақ сақталмаған болуы қажет,
3. Вирустар мен клетка культуралардың қатынасы (10^6 - 10^4 ТЦД/ 10 млн клетка).
4. Клеткалардың өсуін қолдайтын қоректік ортаны вирус клеткаларға адсорбцияланғаннан кейін құяды (1-2 сағаттан соң 22 немесе 37 °С),
5. вирустардың моноқабатта таралуы біркелкі болуы қажет,
6. вирустардың көбеюіне оптималды температура 36-38 °С.
7. Вирустарды алу - ЦПД әсері 75 % жеткенде жоғары болады.

- Вирустарды клетка культурасында өсіру:
- Клеткаларды таңдап алу,
- Вирустық материалды алу,
- Вирустарды жұқтыруға дайындау,
- Вирустарды клетка культурасында өсіру,
- Вирустарды клетка культурасында индикациялау,
- Культуралық сұйықтықты жинау және оның құрамында вирустарды идентификациялау



➤ **Клеткаларға вирустарды жұқтыру**

- Клетка культуралар өсірілген пробиркаларды (матрастар) таңдау,
- Қоректік ортаны төгу, материалды 1-2 рет Хенкс ерітіндісімен жуу (сарысу антиденелерін және ингибиторларды тазарту),
- Әр пробиркаға 0,1-0,2 мл вирустық материалды құю,
- Пробиркаларды 1-2 сағат 22 °С немесе -37 °С қалдыру,
- Экспозициялау уақыты аяқталған соң, вирустық материалды төгу (1-2 рет Хенкс ерітіндісімен немесе қоректік ортамен шаю)
- Клеткалар өсуін қолдайтын ортаны құю (пробиркаларға 1-2 мл, ал матрастарға олардың көлемінің 10%)

➤ **Вирустарды культурада өсіру**

- t- 37 °С, вирустарды жұқтырғаннан кейін 7 тәулік қоректік ортаны ауытырмауға болады, рН 6,9-7,4 (рН тұрақтандыруға 7,5 % натрий бикорбанатын қолданады),
- Вирустар культуралық сұйықтықта жиналады, ал клетка ішіндегі вирустарды қатыру және еріту (2-3 тет)немесе ультрадыбыспен бөліп алады.