ВСЕСОЮЗНАЯ ОРДЕНА ЛЕНИНА И
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК имени В. И. ЛЕНИНА

ВСЕСОЮЗНЫЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я. Р. КОВАЛЕНКО

УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ
ИНСТИТУТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОЛУЧЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ КЛЕТОК ИЗ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ДРУГИХ ОРГАНОВ СВИНЬИ

Москва—1985

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации разработаны в лабораториях технологии клеточных культур и питательных сред и по изучению болезней свиней ВИЭВ, лаборатории культур тканей Украинского НИВИ

Авторы. профессор Л. П. Дьяконов, Г Х Субаев, Т. В. Гальнбек, Ш С. Такташев, Е А Непоклонов, Е. С. Федорова, О Ш Расулев.

Рекомендации рассмотрены и рекомендованы для издания на заседании секции «Биология, общая и сравнительная патология животных» Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ. Протокол № 2 от 3 июня 1985 г.

Методические рекомендации предназначены для использования в научных учреждениях и диагностических лабораториях.

1. Введение

Разработка метода культивирования клеток вне организма является одним из крупных достижений биологической науки. В настоящее время клеточные культуры широко используются в практике ветеринарных лабораторий для выделения вирусов и диагностики многих вирусных инфекций, а также при производстве вирус-вакцин и диагностикумов.

Традиционными в ветеринарной вирусологической практике стали культуры первичных и перевиваемых клеток из ткани почек сельскохозяйственных животных (1, 2, 3).

Однако для научной и практической работы необходимы культуры клеток и из других органов, обладающие избирательной чувствительностью к вирусам, поражающим преимущественно определенные органы животных (4). В инфекционной патологии свиней в настоящее время, как известно, значительное место занимают вирусные заболевания желудочно-кишечного тракта. В связи с тем, что ткани свиного происхождения наиболее чувствительны к вирусам свиней, важным представляется использование нетрадиционных тканей для получения клеточных культур. Одной из таких тканей является щитовидная железа. Культура из щитовидной железы чувствительна к корона-вирусу, возбудителю вирусного (трансмиссивного) гастроэнтерита свиней (ВТГС) и представляет хорошую модель для вирусологических исследований. Имеющиеся литературные сообщения (7, 8) о культурах клеток из ткани щитовидной железы поросят и взрослых свиней немногочисленны и применение их ограничено Все это вызывало необходимость создания эффективных и экономичных способов получения культур клеток из щитовидной железы и разработки методов их длительного субкультивирования. Также важно получение диплоидных и перевиваемых культур клеток щитовидной железы.

Изложенные в настоящих методических рекомендациях приемы и методы получения и выращивания культур первичных клеток щитовидной железы плодов свиньи, поросят, щитовидной железы взрослых свиней, диплоидной (ЩС—ВИЭВ) и перевиваемых клеток щитовидной железы поросенка (ЩЖП—Укр. НИВИ) и щитовидной железы свиньи (КЩС — Укр. НИВИ), разработанные в ВИЭВ и Укр. НИВИ с учетом на-

копленного опыта работы и имеющихся литературных данных, позволят специалистам научно-исследовательских ветеринарных учреждений и диагностических лабораторий более эффективно проводить работу по изучению и диагностике высокоспециализированных вирусов свиней.

2. Оборудование и материалы

Для получения и выращивания культур клеток требуется специальное оборудование и материалы.

2.1. Стерильное боксовое помещение с предбоксником. Площадь бокса должна быть достаточной для размещения в нем необходимого для манипуляций по приготовлению и пересевам культур клеток следующего оборудования:

— рабочий стол, покрытый пластиком, выдерживающим обжигание спиртовым факелом;

— подсобный стол с таким же покрытием для размещения на нем необходимых инструментов, материалов (салфетки, вата и др.), банки с 0,5%-ным раствором хлорамина (для отработанных пипеток и др.);

— два лабораторных (винтовых) стула;

— магнитная мешалка с набором магнитов (ММ-3 и др.);

— баня водяная электрическая;

— спиртовка (или газовая горелка);

— контейнер для сбора использованных материалов (оберточная бумага и т. д.).

В предбокснике, кроме специальной одежды для персонала (халаты, косынки, маски), желательно разместить центрифугу (ЦЛР-1, К-70 и др.), термостат, холодильник бытовой, микроскопы и т. д.

В боксе и предбокснике перед работой проводится влажная уборка с обработкой поверхности стен, мебели и пола 0,5% раствором хлорамина с последующим облучением этих помещений бактерицидными лампами в течение 45—60 минут. Поверхности столов, а также вносимых в бокс флаконов со средами (среда 199, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина и др.) и растворами (Хенкса, Эрла, версена, трипсина и др.) перед началом работы обжигаются спиртовым факелом.

2.2. Стеклянная посуда, инструменты и другие материалы, в том числе:

— стеклянные плоские сосуды (матрасы) для посева и культивирования в них клеток (на 1500, 1000, 500, 250, 100, 50 мл);

— пробирки биологические;

— пенициллиновые флаконы;

— предметные и покровные стекла;

— колбы, в том числе конические плоскодонные (на 1000, 500, 250, 100 мл);
— чашки Петри;
— пипетки мерные (на 10, 5, 2, 1, 0,1 мл);
— флаконы для питательных сред и растворов (на 1000, 500, 250 мл);
— банки стеклянные (на 1000, 500, 250, 100 мл); воронки стеклянные (на 250 мм, 150 мм);
— пробки резиновые (№№12, 14, 16, 18, 20, 24, 27, 29, 42, 45);
— груши резиновые (№№ 1, 3, 6);
— пинцеты (анатомические, хирургические и глазные);
— зажимы;
— корнцанги;
— ножи для вскрытия;
— скальпели;
— лотки (кюветы) эмалированные и др.

2.2.1. Обработка стеклянной посуды и резиновых изделий. Обработку стеклянной посуды и резиновых изделий, подготовку их для работы с культурами клеток производят одним из рекомендованных методов (П. И. Ремезов и др., 1966; Д. Б. Голубев и др., 1976; Дьяконов Л. П., Поздняков А. А. и др., 1980; Методические рекомендации УкрНИВИ, 1981, 1984 и др.).

Новую посуду очищают от загрязнения ершами механическим путем, ополаскивают водой и обрабатывают хромовой смесью (хромпиком). Хромовую смесь вносят в сосуд, ею обводят внутреннюю поверхность сосуда. Избыток ее сливают. Контакт хромпика со стеклом продолжается 2—3 часа. После обработки хромпиком посуду необходимо промыть водопроводной водой (не менее 10 раз) и ополоснуть 8—10 раз дистиллированной водой. При этом необходимо внимательно следить за тем, чтобы вода равномерно стекала со стенок посуды.

В случае отсутствия хромовой смеси новую посуду после ополаскивания водой погружают в бак с моющим раствором, содержащим на 10 л теплой воды 150,0 тринатрийфосфата (1,5%) или 30,0 (0,3%) моющих порошков «Новость», «Лотос» и др., кипятят в этом растворе 1 час и моют ершами, а затем тщательно промывают струей водопроводной воды и помещают в 1—2% раствор соляной кислоты для нейтрализации щелочных компонентов или 3—4 раза ополаскивают в растворе соляной кислоты, вновь ополаскивают 4—5 раз проточной водопроводной водой и 5—6 раз дистиллированной водой.

Равномерное стекание дистиллированной воды с внутренней поверхности и отсутствие капелек воды на стеклах сосудов является показателем хорошей мойки.

Посуду, бывшую в употреблении, помещают в 0,5%-ный раствор хлорамина на 1—3 часа или на ночь, а затем моют ершами в теплом 0,3—0,5%-ном растворе детергентов («Новость», «Лотос» и др.). Посуду тщательно выполаскивают 6—8 раз теплой водопроводной водой, а затем дистиллированной.

Хорошие результаты дает кипячение вымытой посуды в дистиллированной воде — 1 час. В целях повышения адгезивных свойств поверхности стеклянной посуды, ее после дистиллированной воды рекомендуется обработать 0,1N раствором уксусной кислоты (овлажнить стенки флаконов и оставить на 1 час, а затем снова ополоснуть 1—2 раза дистиллированной водой.

Смонтированную посуду стерилизуют автоклавированием при 1,5 атм — 1 час или сухим жаром при 150° — 3 ч, 160° — 2 ч, 180° — 1 час.

Хирургические инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы, зажимы и др.), а также магниты к мешалкам моют водой, загрязненные части инструментов очищают тампоном с двууглекислым натрием, промывают дистиллированной водой, вытирают насухо чистым полотенцем и просушивают (на воздухе или в сушильном шкафу). Перед работой их стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 30 минут.

2.3. Растворы и питательные среды. Для приготовления культур первичных клеток щитовидной железы плодов свиньи, поросят, взрослых свиней и культивирования диплоидного штамма (ЩС — ВИЭВ), перевиваемых клеток (ЩЖП УНИВИ — 01, КЩС) используют следующие растворы и питательные среды: Игла, 0,5% раствор гидролизат лактальбумина (ГЛА), 199, 0,25—0,30% раствор ферментативного гидролизата мышечных белков сухого (ФГМ — С), гемогидролизат 5%, раствор Хенкса для промывания тканей без солей кальция и магния, раствор Хенкса (полный), 0,02% раствор версена, 0,25% раствор трипсина (Дифко, Ферак и др.).

Питательные свойства новых серий сред (Игла, 199, 0,5% ГЛА, гемогидролизата 5%-ного) и сыворотки крови крупного рогатого скота проверяют при выращивании культур клеток путем сравнения с заведомо качественными (контрольными) их образцами. В случае проявления при этом токсического эффекта, определяемого по наличию сильной зернистости, слабого роста и отслоению клеток от поверхности стекла в однослойных культурах, питательные среды и сыворотки не допускаются к использованию для культивирования клеток. Пригодными считаются среды и сыворотки, в присутствии которых пролиферативная активность и морфология клеточной популяции существенно не отличаются от таковых при использовании контрольных образцов.

3. Получение первичной культуры клеток из ткани щитовидной железы поросенка

3.1. Взятие материала, предварительная обработка ткани. Для получения этих культур используют клинически здоровых, хорошо развитых поросят, желательно 1—6-месячного возраста.

Поросят подвергают убою и обескровливанию перерезкой сонных артерий, раскладывают на стерильные эмалированные кюветы спинкой вниз. Кожу вентральной поверхности шеи и груди фламбируют горящим ватным тампоном, смоченным в спирте, и обрабатывают настойкой йода. После этого делают разрез кожи и подкожной клетчатки по серединной линии нижней трети шеи, рассекают грудинно-челюстную и грудинно-подъязычную мышцы, под которыми каудальнее щитовидного хряща находят щитовидную железу.

Щитовидную железу отпрепаровывают от окружающих тканей, извлекают на стерильную чашку Петри, освобождают (глазными пинцетами) от жира и соединительной ткани. Затем перекладывают ее в стерильную баночку из-под майонеза, содержащую 20—40 мл раствора Хенкса с антибиотиками (пенициллин 500 ед/мл, стрептомицин 500 мкг/мл), и измельчают острыми ножницами до размеров частиц 1—3 мм.

Измельченную ткань тщательно (4—7 раз) промывают раствором Хенкса с антибиотиками

Обязательным условием является проведение всех манипуляций с соблюдением правил асептики и использованием стерильных инструментов, посуды и других материалов.

3.2. Дезагрегация ткани. Измельченную и промытую ткань с частью раствора Хенкса переносят в колбу для трипсинизации, в качестве которой используется стерильная коническая плоскодонная колба емк. 500—2000 мл Кусочки ткани в колбе дважды промывают диспергирующей жидкостью (смесь 0,25%-ного раствора трипсина и 0,02%-ного раствора версена, взятых в соотношении 2 · 1). Затем в колбу с кусочками ткани наливают свежую порцию диспергирующей жидкости к измельченной ткани 10 : 1, опускают стерильный магнит, закрывают колбу стерильной резиновой пробкой и ставят на магнитную мешалку. Вращение магнита регулируют так, чтобы обеспечивалось равномерное перемешивание содержимого колбы с образованием небольшого углубления («воронки») над магнитом, а в колбе не происходило образование пены.

Дезагрегацию ткани проводят при комнатной температуре (20—22° С) в течение 2—4 часов непрерывно Взвесь клеток в диспергирующей жидкости процеживают через стерильный 2-х слойный марлевый фильтр и центрифугируют в течение 10 минут в рефрижераторной центрифуге при 800—1000 об/мин. По окончании центрифугирования надосадочную жидкость

сливают, а осадок ресуспендируют в небольшом объеме (30—40 мл) подогретой до 37° С питательной среды (0,5% ГЛА) с антибиотиками.

3.3. Определение концентрации клеток. Полученную концентрированную клеточную суспензию тщательно перемешивают и отбирают из нее пробу в количестве 0,2 мл для подсчета числа клеток. Подсчет клеток производят в камере Горяева.

Для дифференциального подсчета живых и мертвых клеток к 0,2 мл клеточной суспензии добавляют 0,8 мл 0,5%-ного водного раствора трипанового синего (получается разведение суспензии в 5 раз), тщательно перемешивают, выдерживают 5 мин. и заряжают камеру Горяева. Трипановый синий окрашивает только мертвые клетки; они принимают синий цвет. Подсчитывают живые, неокрашенные клетки, с хорошо выраженным ядром и неповрежденной цитоплазмой. Конгломераты, в которых количество клеток не четко выражено, принимают за одну клетку. Подсчет клеток производят при малом увеличении микроскопа (окуляр 7, объектив 20) два—три раза, по всей площади сетки камеры Горяева, выводят среднее арифметическое число клеток в одной камере.

Концентрацию клеток в 1 мл суспензии определяют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot n \cdot 1000}{0{,}9}, \text{ где}$$

X — число клеток в 1 мл суспензии;
a — среднее число клеток в одной камере;
n — кратность (общий коэффициент) разведения концентрированной клеточной суспензии;
1000 — число кубических микролитров в 1 мл (1 $см^3$);
0,9 — объем камеры Горяева в микролитрах.

Для упрощения подсчета среднее число клеток в одной камере умножают на коэффициент разведения суспензии, а затем на 1100, то есть вычисляют по формуле: $X = a \cdot n \cdot 1100$; где:

X — число клеток в 1 мл суспензии;
a — среднее число клеток в одной камере;
n — кратность (общий коэффициент) разведения концентрированной клеточной суспензии;
1100 — индекс подсчета.

Например, если концентрированная суспензия клеток предварительно разводилась (питательной средой) в три раза и для окрашивания смешивалась равным объемом 0,5%-ного раствора трипанового синего (общий коэффициент разведения $= 3 \times 2 = 6$), а среднее (арифметическое) число клеток в одной камере 200, то:

$$X = 200 \times 6 \times 1100 = 1\,320\,000 \text{ клеток},$$

следовательно, в 1 мл концентрированной суспензии клеток содержится 1 320 000 клеток.

Если количество суспензии клеток достаточное, то концентрацию клеток можно подсчитать следующим способом:

К 1 мл пробы суспензии добавляют 1 мл раствора краски. После перемешивания окрашенную суспензию вносят в камеру. Подсчет клеток также проводят в нескольких сетках, по всем квадратам и среднее число клеток умножают на 2200. Получают концентрацию клеток в 1 мл.

Процент жизнеспособности клеток в суспензии определяют по формуле:

$$\frac{\text{Общее число клеток} - \text{Число мертвых клеток}}{\text{Общее число клеток}} \times 100$$

Например, если число клеток в 1 мл 1 320 000, из них число мертвых клеток — 66 000, то жизнеспособность клеток в этой суспензии составляет:

$$\frac{1320000 - 66000}{1320000} = 95\%$$

Выход клеток из одного грамма ткани щитовидной железы поросенка составляет 30—60 млн и зависит от сроков обработки органа, качества трипсина и т. д.

Клеточные суспензии можно хранить в холодильнике (+4, +6°) в течение 1—4 дней. Однако желательно их высевать в день трипсинизации, так как при хранении жизнеспособность клеток заметно снижается.

3.4. Приготовление рабочей суспензии клеток. Полученную при дезагрегации ткани концентрированную суспензию клеток разводят ростовой средой (0,5% ГЛА — 45%, среды Игла — 35%, сыворотки крови крупного рогатого скота — 20%) с антибиотиками (пенициллина — 100 ЕД/мл, стрептомицина — 100 мкг/мл) до определенной посевной концентрации клеток в 1 мл.

Например, 100 мл концентрированной суспензии (в каждом миллилитре содержится по 1 320 000 клеток) требуется развести до концентрации 750 000 клеток в 1 мл.

Значит, общее количество клеток (в 100 мл концентрированной суспензии) $= 1\,320\,000 \times 100 = 132\,000\,000$. Чтобы получить рабочую суспензию с посевной дозой 750 000 клеток в 1 мл необходимо развести концентрированную суспензию ростовой средой до 176 мл (132 000 000 : 750 000), то есть довести общий объем суспензии (добавлением ростовой среды) до 176 мл; каждый миллилитр такой суспензии будет содержать 750 000 клеток.

При засеве в пробирки концентрированную суспензию разводят питательной средой до требуемой концентрации.

Пробирки и матрасы закрывают у пламени горелки стерильными резиновыми пробками, делают отметку верхней поверхности засеянных сосудов с указанием наименования ткани и даты посева.

3.5. Выращивание однослойной культуры первичных клеток ЩЖП. Засеянные пробирки укладывают в лоток (кювет) под углом 5°, пробками вверх.

Лотки с пробирками и матрасы помещают в термостат (+37°) в горизонтальном положении с отметкой даты посева вверх. Культивирование клеток производят при 37° С в стационарных условиях. Через 48—72 ч. инкубирования образуются островки клеток различной величины. К этому времени ростовая среда истощается, происходит сдвиг pH среды в кислую сторону. Поэтому через 48—72 ч после засева в целях поддержания дальнейшего роста клеток производят смену ростовой среды: среду из пробирок и матрасов в стерильных условиях сливают и наливают равное количество свежей среды (pH 7,2—7,4). Растущую культуру вновь помещают в термостат (+37°). Сплошной монослой клеток при нормальном росте культуры образуется на 4—6 сутки выращивания. Если за этот промежуток времени монослой не сформировался, производят повторную смену среды с 10% сыворотки на 4—5 сутки после засева клеток.

4. Получение первичной культуры клеток из ткани щитовидной железы плода свиньи

4.1. Подготовка материала. Плоды свиньи доставляют в стерильной емкости с мясокомбината сразу после убоя животного. Плоды раскладывают на стерильные эмалированные кюветы спиной вниз. Перед вскрытием кожу поверхности шеи и груди фламбируют горящим ватным тампоном, смоченным в спирте. Извлеченную щитовидную железу помещают в стерильную банку из-под майонеза с раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин 200 ед/мл и стрептомицин 200 мкг/мл) промывают несколько раз рабочим раствором Хенкса и измельчают ножницами до размеров 2—3 мм, переносят в коническую колбу и дополнительно промывают их раствором Хенкса до получения прозрачного сливного раствора. Кусочки ткани заливают смесью раствора трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в соотношении 2 : 1 и оставляют на 30—40 мин при температуре 37° С.

Дезагрегацию ткани щитовидной железы свиньи проводят дробно на магнитной мешалке при температуре 30—32° С. Продолжительность одного цикла 40—60 мин. Полученную взвесь клеток сливают в центрифужные флаконы, добавляют

3—4% сыворотки крупного рогатого скота для прекращения действия трипсина и центрифугируют 20 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в небольшом объеме питательной среды и хранят при температуре 4° С. К оставшейся ткани вновь добавляют смесь трипсина и версена и ставят на магнитную мешалку для дальнейшей дезагрегации клеток. Такую процедуру повторяют до полного истощения ткани.

Ресуспендированные осадки собирают в общий сосуд Из полученной взвеси отбирают пробу для подсчета клеток.

4.2. Приготовление однослойной культуры клеток щитовидной железы плодов свиньи. После подсчета клеток концентрированную суспензию доводят до рабочей концентрации (350—400 тыс. в 1 мл для матрасов и 600 тыс. для пробирок) и высевают в культуральные флаконы. Культивирование клеток проводят в термостате при температуре +37° С.

Ростовой средой могут служить смеси сред ГЛА+199, ГЛА+Игла, среда ФГМ-С с 10% эмбриональной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. Смену среды проводят через 2—3 суток культивирования.

Культура клеток щитовидной железы плодов свиньи формирует монослой на 5—7 сутки культивирования.

Первичная культура клеток плодов свиньи представлена клетками смешанного типа с преобладанием клеток эпителиоподобного типа. Ядра крупные, овальной или округлой формы, содержат 1—3 ядрышка. Цитоплазма неоднородна, большинство клеток содержит вакуоли различного размера. Отмечено наличие клеток, имеющих два ядра.

5. Получение первичной культуры клеток щитовидной железы свиньи

5.1. Взятие материала, предварительная обработка ткани. У взрослых свиней щитовидную железу извлекают обычно на мясокомбинате или бойне, где трудно создать асептические условия. Извлеченную железу обжигают над спиртовым факелом, помещают в широкогорлую стерильную банку с раствором Хенкса, содержащим антибиотики (пенициллин по 400 ед и стрептомицин по 400 мкг на 1 мл). Банку над пламенем горелки закрывают резиновой пробкой и транспортируют в термосе со льдом.

В лаборатории банку со щитовидной железой вынимают из термоса, обрабатывают ее поверхность ватой, смоченной в формалине, 3%-ном растворе едкой щелочи или спирте, передают в стерильный бокс Щитовидную железу извлекают из банки, проводят через пламя горелки, помещают в чашку Петри; пинцетом и ножницами освобождают ее от жира и соединительнотканных тяжей, измельчают в стерильной банке

ножницами на кусочки 2—3 мм и переносят в стерильную колбу, где тщательно (5—7 раз) промывают раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин 200 ед/мл и стрептомицин 200 мкг на 1 мл). Обработку щитовидной железы можно провести и другим способом. Извлеченную из раствора Хенкса щитовидную железу освобождают от окружающей ткани и жира. Подготовленную щитовидную железу опускают в 96° спирт и затем обжигают. Стерильными инструментами срезают узкую полоску ткани и вырезают внутреннюю не поврежденную во время обработки ткань, которую затем измельчают и переносят в стерильную колбу, где промывают раствором Хенкса с антибиотиками.

5.2. Дезагрегация ткани. Измельченную ткань щитовидной железы свиньи после тщательной промывки помещают в стерильную трипсинизационную колбу с магнитом, заливают диспергирующей жидкостью (20—22° С) в отношении 1 : 20—1 : 30. В качестве диспергента используется 0,25%-ный раствор трипсина или смесь 0,25%-ного раствора и 0,02%-ного раствора версена, взятых в соотношении 2 : 1. Колбу ставят на магнитную мешалку и устанавливают скорость вращения магнита. Через 2 часа перемешивания при комнатной температуре (20—22° С) взвесь клеток в диспергирующей жидкости удаляют, так как большая часть (до 80%) содержащихся в ней клеток оказывается нежизнеспособной. Ткань в колбе заливают таким же количеством свежей диспергирующей жидкости, ставят на магнитную мешалку, установленную в холодильнике (4—6° С) и перемешивают в течение 16—20 часов. Взвесь клеток в диспергирующем растворе процеживают через двухслойный марлевый фильтр и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут. Осадок клеток ресуспендируют в 40—50 мл питательной среды (0,5% ГЛА). Суспензию клеток фильтруют через двухслойный марлевый фильтр и производят подсчет клеток в концентрированной суспензии вышеописанным методом.

Выход клеток из 1 г ткани щитовидной железы свиней колеблется от 20 до 60 млн.

5.3. Приготовление однослойной культуры клеток ЩЖС. Для приготовления однослойной культуры концентрированную суспензию разводят ростовой средой до требуемой посевной концентрации клеток. Состав ростовой среды: 0,5%-ный ГЛА — 45%, среда Игла — 35%, сыворотка крови крупного рогатого скота нативная (без консерванта) — 20% и антибиотики (пенициллин 100 ед/мл и стрептомицин 100 мкг/мл); pH среды при посеве — 6,8—7,0, при смене среды — 7,2—7,4.

Посевная концентрация клеток в 1 мл суспензии: для пробирок 800—900 тыс., для матрасов — 600—700 тыс. Засеянные культуральные сосуды плотно закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в термостат (37° С) для

выращивания. Через 72 часа в культурах производят смену ростовой среды на свежую. Образование монослоя клеток наступает на 6—8 сутки. При необходимости на 6—7 сутки после засева делают повторную смену ростовой среды.

6. Получение первичной культуры клеток тестикулов поросят

В работе используют поросят 1—30-дневного возраста, доставленных из благополучных по инфекционным заболеваниям свиней хозяйств.

После обескровливания поросят раскладывают на стерильные эмалированные кюветы спинкой вниз. Кожу мошонки фламбируют горящим ватным тампоном.

Стерильными ножницами вскрывают мошонку; захватив анатомическим пинцетом, подтягивают один из тестикулов и перерезают семенной канатик. То же делают со вторым тестикулом. Извлеченные тестикулы помещают в стерильную чашку Петри, удаляют белочную оболочку и патологически измененные участки, разрезают тестикулы вдоль и вылущивают ткань в стерильную стеклянную баночку, содержащую 30—50 мл стерильного раствора Хенкса с антибиотиками. Тестикулярную ткань тщательно промывают раствором Хенкса с антибиотиками, измельчают острыми ножницами на кусочки 1—3 мм. Измельченную ткань отмывают от обрывков ткани и эритроцитов стерильным раствором Хенкса с антибиотиками до полной прозрачности промывной жидкости.

6.1. Приготовление однослойной культуры клеток тестикулов поросят (ТП). Отмытые кусочки тестикулярной ткани переносят в колбу для трипсинизации. Ткань в колбе дважды промывают рабочим раствором трипсина (pH 7,4—7,6). Затем заливают свежей порцией раствора трипсина. Дезагрегацию ткани проводят при температуре (20—22°), дробно, до полного истощения ткани, т. е. через каждые 10—15 минут перемешивания на магнитной мешалке производят слив взвеси клеток в растворе трипсина. Все порции взвеси клеток собирают в приемник (стерильный флакон с 20—40 мл ростовой среды), установленный в холодильнике (4—6°). Собранную взвесь клеток процеживают через стерильный 2-х слойный марлевый фильтр и центрифугируют при 800—1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в небольшом объеме (20—40 мл) питательной среды (0,5 ГЛА) с антибиотиками.

Концентрированную суспензию, после подсчета клеток разводят ростовой средой до определенной посевной концентрации и засевают в сосуды для культивирования.

При засеве в пробирки концентрированную суспензию клеток тестикулов разводят так, чтобы в 1 мл суспензии со-

держалось 400—500 тыс. клеток; при засеве в матрасы концентрацию клеток доводят до 200—300 тыс. в 1 мл. Ростовая среда 0,5%-ный ГЛА с 10% сыворотки крупного рогатого скота, pH среды при посеве 6,9—7,1.

Лотки с пробирками, а также матрасы помещают в термостат в горизонтальном положении. Через 24—48 часов инкубирования образуются островки клеток различной величины. Смену среды проводят через сутки.

Сплошной монослой при нормальном росте культуры образуется на 3—5 сутки выращивания.

Если образование монослоя затягивается, производят повторную смену ростовой среды на 5—6 сутки после засева клеток

7. Субкультивирование клеток щитовидной железы

После формирования клетками ЩЖП и ЩЖС монослоя проводят их пересев коэффициентом 1 : 1,5 или 1 : 2. Предпочтительнее при субкультивировании использовать бесцентрифужный метод: меньше теряется клеток при пересеве, уменьшается также опасность контаминации клеток.

Из флаконов с выросшим клеточным монослоем удаляют ростовую среду, промывают монослой раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин — по 100 ед/мл); вносят в матрас смесь 0,02%-ного раствора версена и 0,25%-ного раствора трипсина в соотношении 4 : 1, подогретых до 37° С, в количестве, необходимом, чтобы покрыть весь клеточный монослой (50—100 мл в 1—1,5-литровые матрасы). Матрасы помещают в термостат (+37°) на 10—20 минут — до начала отделения единичных клеток от стекла. Затем основную часть диспергирующей смеси удаляют, оставляя 7—12 мл (в 1—1,5-литровых матрасах) до полного отделения клеток от поверхности стекла. После этого матрасы энергично встряхивают, клеточную взвесь тщательно пипетируют до образования однородной массы и добавляют свежую ростовую среду (0,5% ГЛА — 45%, среды Игла — 45%, сыворотки КРС — 10% и антибиотики в обычной дозировке (в количестве, необходимом для пересева культуры с соответствующим коэффициентом) и перемешивают.

Концентрация клеток при посеве в 1—1,5-литровые матрасы — 100—150 тыс/мл, в пробирки — 200—250 тыс/мл. Суспензию клеток разливают в культуральные сосуды, выращивают в термостате (+37—38° С)

Субкультуры растут обычно без смены среды, формируют монослой через 2—3 суток, имеют более однородную популяцию клеток, чем первичные культуры; по чувствительности к вирусам они не уступают первичным клеточным культурам.

8. Использование первичных культур клеток ЩЖП и ЩЖС и их субкультур

Первичные культуры ЩЖП, ЩЖС и их субкультуры используются для выделения, идентификации и титрования вирусов-возбудителей заболеваний свиней, а также для накопления больших количеств вируса и изготовления вирус-вакцин и диагностикумов.

Перед заражением вирусом монослойные культуры клеток просматривают макро- и микроскопически. Макроскопически — среда в культуральных сосудах (матрасы, пробирки) должна быть прозрачной, иногда с легкой опалесценцией, красновато-розового цвета, микроскопически — культура должна покрывать культуральную поверхность стекла сплошным пластом эпителиоподобных клеток. Производят смену ростовой среды на поддерживающую: ростовую среду из сосудов сливают, монослой клеток отмывают от сыворотки, ополаскивая его раствором Хенкса с антибиотиками, в сосуды с клеточной культурой вносят поддерживающую среду, состоящую из тех же компонентов, что и ростовая, но без сыворотки.

Если культура со сформировавшимся монослоем не может быть использована в течение 1—2 суток, также следует произвести смену ростовой среды на поддерживающую.

9. Диплоидная культура клеток щитовидной железы свиньи (ЩС-ВИЭВ)

За последние годы накоплен материал, свидетельствующий о том, что культуры диплоидных клеток являются ценными для решения многих научных вопросов. Преимущество диплоидных культур очевидно. Это морфологическая однородность культуры, высокая чувствительность к вирусам, редкая контаминация микроорганизмами, отсутствие спонтанной трансформации.

Диплоидная культура клеток ЩС представлена клетками эпителиоподобного типа. Ядра крупные, овальной или округлой формы, содержат 2—4 ядрышка. В цитоплазме содержатся вакуоли различного размера. Рост клеток монослойный. Клетки плотно прилегают друг к другу. Сплошной монослой образуется на 3—4 сутки культивирования на среде 199 с 10% сыворотки КРС при посевной дозе 2×10^5 в мл, без смены среды. Только при культивировании ЩС—ВИЭВ в роллерных установках требуется дополнительная смена среды на 3 сутки культивирования. Концентрация клеток для матрасов 2×10^5 в мл, пробирок $4{,}5—5\times10^5$ в мл, в условиях роллера $6{,}5—7\times10^5$ в мл.

9.1. Митотический индекс. Вычисляется как отношение митотически делящихся клеток к общей сумме подсчитанных клеток.

$$МИ = \frac{М \times 1000}{КЛ} \%\ ,\ где$$

МИ — митотический индекс,
М — сумма митозов,
КЛ — сумма клеток.
Митотический индекс обычно выражается в промилле (‰), поэтому в числителе дроби сумма митозов умножается на 1000.

Для вычисления митотического индекса культуру клеток высевают в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Концентрация клеток в суспензии должна быть 2×10^5 в мл, объем суспензии 1,5—2 мл. Через определенные промежутки времени (1, 2, 3, 4 суток) покровные стекла извлекают, промывают в теплом растворе Хенкса, фиксируют (раствор Буэна, фиксатор Карнуа или др.) окрашивают гематоксилин-эозином, заключают в бальзам и проводят подсчет митозов. Для получения объективных и точных величин митотического индекса необходимо подсчитать не менее пяти препаратов.

Наибольшая митотическая активность диплоидного штамма ЩС-ВИЭВ отмечена через 48 часов культивирования. К этому времени митотический индекс составляет 22—25 ‰.

9.2. Пересев культуры. Пересев культуры ЩС проводят по мере формирования монослоя. Из матрасов с выросшим монослоем удаляют питательную среду, вносят в них подогретую до 36° С смесь растворов версена (0,02%) с трипсином (0,25%) в соотношении 9 : 1 и оставляют на столе на 1—2 мин. (Количество добавляемой смеси зависит от площади поверхности, на которой выращены клетки. В 1,5-литровый матрас наливают 80 мл смеси, в 1,0-литровый матрас — 50 мл, в 0,5-литровый — 30 мл и т. д.). Затем сливают избыток смеси и оставляют небольшое ее количество до полного отделения клеток от стекла.

Раствор версена связывает двухвалентные катионы магния и кальция, трипсин расщепляет межклеточное вещество, в результате чего пласт клеточной культуры разделяется на отдельные клетки и отслаивается от стекла. При дополнительном пипетировании образуется однородная масса. Коэффициент пересева 1 : 2—1 : 3. Клетки, снятые с одного матраса, рассеивают на 2—3 аналогичных матраса. При обнаружении неравномерного, недостаточного роста, а также дегенеративных изменений в клетках, такие культуры выбраковываются. На случай запрязнения культуры необходимо иметь в запасе резервные дубликативные культуры, которые сохраняются в термостате, при комнатной температуре и в условиях жидкого азота.

10. Выведение перевиваемых линий клеток

10.1. Перевиваемая линия клеток щитовидной железы поросенка (ЩЖП УНИВИ-01). Выведена в лаборатории культур тканей Укр. НИВИ Г. Х. Субаевым. Для выведения линии перевиваемых клеток ЩЖП УНИВИ-01 использовали первичную моносло́йную культуру щитовидной железы поросенка. Щитовидную железу поросенка после соответствующей предварительной обработки подвергали трипсинизации вышеописанным методом. Для засева в 1—1,5-литровые матрасы посевную концентрацию клеток увеличивают, доводят ее до 1 млн в 1 мл суспензии Культура выращивается на ростовой среде следующего состава: 0,5%-ного гидролизата лактальбумина в растворе Хенкса (ГЛА) — 45%, среды Игла — 35%, сыворотки крупного рогатого скота — 20%, антибиотики (пенициллин 100 ед/мл и стрептомицин — 100 мкг/мл), pH среды при посеве 6,9—7,0, при смене среды 7,2—7,3.

Полученную первичную культуру в моносло́е подвергают вначале длительному инкубированию в термостате (+37° С) с еженедельной сменой среды, а затем и субкультивированию. При длительном инкубировании часть клеток округляется, дегенерирует и отпадает от стекла, а часть из них удлиняется (вытягивается), образуя в разных участках моносло́я тяжи, состоящие из дегенерирующих зернистых клеток. Через 30 и более суток, чаще в приподнятой части сосуда, а иногда и в других местах, обнаруживаются новые атипичные мелкие круглые клетки, которые образуют гроздевидные скопления. Колонии новых клеток постепенно увеличиваются в размерах. С образованием значительных пластов клеток среда быстро закисляется, культуру пересевают в сосуд меньшего размера (в 0,1—0,25-литровый матрас).

В первых пассажах субкультура имеет смешанную клеточную популяцию с преобладанием эпителиоподобных клеток, которые растут колониями, равномерно распределяясь по всей культуральной поверхности матрасов. В последующих пассажах (к 20—25 и более) пролиферативная активность клеток возрастает, культура становится морфологически однородной, состоящей из эпителиоподобных клеток. Клетки полигональной формы, с четкими, хорошо выраженными границами, ядра их округлые, с 1—3 ядрышками, цитоплазма светлая, иногда вакуолизированная.

Для переадаптации на отечественную питательную среду с 25-го пассажа в состав ростовой среды постепенно вводили «Среду гемогидролизат 5% для культур тканей» (изготовляет предприятие по производству бактерийных препаратов Белорусского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии); количество этой среды в составе ростовой среды прогрессивно увеличивали начиная с 10%; и со 125 дня

культура выращивается на ростовой среде следующего состава: среда гомогидролизат 5% для культур тканей — 86%, нативная сыворотка крупного рогатого скота — 14% и антибиотики (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл).

В результате длительного инкубирования, субкультивирования и отбора получена новая перевиваемая линия клеток ЩЖП УкрНИВИ-01. Эта линия за 3,5 года пассируется более 100 раз.

Клетки снимаются со стекла 0,02%-ным раствором версена, при пипетировании образуется однородная взвесь клеток. Жизнеспособность перевиваемых клеток ЩЖП УкрНИВИ-01 поддерживается путем регулярных пересевов на свежую среду гемогидролизат 5% для культур тканей, с добавлением к ней 14% нативной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков (пенициллина — 100 ед/мл, стрептомицина — 100 мкг/мл), pH среды 7,2—7,4. Частота пересевов культуры клеток ЩЖП — 1—2 раза в неделю, коэффициент пересева — 1 : 2—1 : 3.

10.2 Линия перевиваемых клеток щитовидной железы свиньи (КЩС—УНИВИ). Выведена в лаборатории культур тканей Укр.НИВИ Т. Х. Субаевым. Для получения линии КЩС использовали первичную культуру клеток щитовидной железы свиньи, выращенную в 1—1,5 литровых матрасах по методике, описанной выше.

Первичную культуру подвергают инкубированию в течение 2—3 месяцев в термостате (+37°), вначале с частичной сменой ростовой среды (0,5% ГЛА — 35%, среда Игла — 45%, сыворотка крупного рогатого скота — 20% и антибиотики — пенициллин и стрептомицин — в обычной дозировке) в течение первых 3 недель — на 1/3, в течение следующих 3—4 недель — на 1/2, затем на 2/3 и 3/4. Для этого через каждые 6—8 дней из матрасов с клеточной культурой удаляют соответствующую часть старой среды, которую заменяют равным объемом свежей среды, позднее проводят полную смену ростовой среды.

По мере инкубации часть клеток первичной культуры дегенерирует, отпадает от стекла и при смене среды удаляется. Большая часть клеток при этом несколько удлиняется (вытягивается). На фоне массовой дегенерации «стянутого» в тяжи монослоя через 45 и более суток обнаруживаются (чаще по краям монослоя, а также между «стянутыми» его участками) крупные полигональные клетки, из которых формируются скопления — колонии клеток, размеры колоний постепенно увеличиваются и сливаются, они нередко образуют разных размеров пласты плотно прилегающих друг к другу крупных эпителиоподобных клеток.

Колонии новых клеток снимают со стекла 0,02%-ным раствором версена и пересевают в 100 мл матрас, в котором

клетки формируют сплошной монослой на 5—7 день. В последующих пассажах рост клеток ускоряется, монослой формируется на 4—5 день.

В перевиваемых культурах КЩС клетки однородны, эпителиоподобного типа, полигональной формы, плотно прилегают друг к другу, имеют четко выраженные границы, крупнее клеток ЩЖП УНИВИ-01, ядра их округлые с 1—3 ядрышками, цитоплазма светлая, без зернистости.

Поддержание жизнеспособности клеток перевиваемой линии КЩС достигается регулярными пассажами с использованием ростовой среды состава 0,5% ГЛА — 45%, среды Игла — 45%, сыворотки крови крупного рогатого скота нативной — 10% и антибиотики (пенициллина — 100 ед/мл, стрептомицина — 100 мкг/мл). Клетки снимаются со стекла 0,02%-ным раствором версена. Культура пересевается через каждые 3—5 дней с коэффициентом 1 : 3—1 : 5. За 2,5 года эта линия прошла в УНИВИ более 50 пассажей.

10.3. Криогенизация и длительное хранение диплоидной культуры клеток ЩС-ВИЭВ, перевиваемых линий клеток ЩЖП УНИВИ-01 и КЩС в жидком азоте. Диплоидные и перевиваемые линии клеток в лабораторных условиях используются на протяжении длительного времени, однако поддержание их путем непрерывного пассирования представляет определенные трудности. Частые пересевы трудоемки, требуют значительных затрат питательных сред, материалов, труда и связаны с риском контаминации клеток биологическими агентами различной этиологии Поэтому проблема консервирования и длительного хранения клеточных культур имеет большое значение.

Для замораживания отбирают монослойные культуры клеток хорошего качества, просматривая их под микроскопом (окуляр 7, объектив 20).

Клеточный монослой снимают со стекла, воздействуя смесью растворов версена (0,02%) с трипсином (0,25%) — 9 1 или 0,02%-ным раствором версена. Взвесь клеток центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут. Осадок ресуспендируют в соответствующей криозащитной среде: концентрацию клеток доводят до $3—6\times10^6$ в 1 мл среды.

Криозащитная среда для ЩС-ВИЭВ состоит из среды 199 (50%), сыворотки КРС (40%), диметилсульфоксида (10%)

Криозащитная среда для клеток перевиваемых линий ЩЖП УНИВИ-01 состоит из: 80% среды гемогидролизата 5% для культур тканей, 10% сыворотки крупного рогатого скота, 10% глицерина х/ч/ или диметилсульфоксида (и антибиотиков (пенициллин—100 ед/мл и стрептомицин 100 мкг/мл).

Состав криозащитной среды для клеток линии КЩС. 0,5% ГЛА — 40%, среды Игла — 40%, сыворотки крупного рогатого скота — 10%, глицерина х/ч (или диметилсульфоксид) —

10% и антибиотики (пенициллин — 100 ед/мл и стрептомицин — 100 мкг/мл).

Суспензию клеток определенной концентрации в криозащитной среде разливают в стерильные 5 миллилитровые ампулы по 3 мл. Ампулы запаивают над пламенем горелки и помещают в холодильник (+4—6°) на 1—2 часа (для эквилибрации).

Замораживание суспензии клеток в ампулах осуществляют ступенчато: до —30°—со скоростью 1° в 1 минуту, от —30° до —70° — со скоростью 4—6° в минуту. Для программного замораживания применяют камеру АХК-4, а при отсутствии такой камеры замораживание клеточных суспензий производят в смеси сухого льда со спиртом, контролируя понижение температуры по показателям низкотемпературного термометра.

Охлажденные до —70° ампулы с суспензией клеток помещают в специальных кассетах для длительного хранения в сосуд Дьюара в жидкий азот при —196° С. При необходимости ампулы с замороженными клеточными суспензиями извлекают из сосудов Дьюара и помещают в водяную баню (+37°) для оттаивания. Размороженную суспензию клеток переносят из ампул в матрасы с небольшим количеством ростовой среды, перемешивают и производят подсчет клеток по описанной выше методике; концентрацию клеток доводят добавлением ростовой среды до посевной ($10—20\times10^4$ клеток в 1 мл). Засеянные матрасы помещают в термостат (+37° С).

На другой день в матрасах производят смену среды для удаления криозащитного вещества (глицерина или диметилсульфоксида). Клетки формируют монослой в обычные для культуры данной линии сроки.

10.4. Чувствительность первичной культуры, субкультур и перевиваемых линий клеток щитовидной железы свиньи к вирусам. Первичная культура, субкультура и перевиваемые линии клеток щитовидной железы свиньи обладают высокой чувствительностью к энтеровирусу свиней, вирусу трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) и, кроме того, линия клеток КЩС чувствительна к ротавирусу свиней. На данных культурах энтеровирус свиней, парвовирус свиней, ротавирус свиней и вирус ТГС репродуцируется с проявлением цитопатогенного действия без длительной предварительной адаптации и накапливается в титре $10^6—10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$/мл. Культуры клеток щитовидной железы свиньи успешно используются в ВИЭВ. Укр.НИВИ и др. учреждениях для проведения работ по индикации и идентификации этих вирусов, для накопления вирусного антигена необходимого при производстве диагностических и вакцинных препаратов, культивирования вируса ТГС с целью сохранения антигенных и иммуногенных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авилов В С, Матюгина Н И, Гофман И Бюл. ВИЭВ, 1978, с 45—46.

2 Д Б Голубев, А А Соминина, М Н Медведева Руководство по применению клеточных культур в вирусологии Медицина — 1976

3 Дьяконов Л П Проблемы культивирования клеток животных и некоторые вопросы цитопатологии — Бюл ВИЭВ, вып 19, 1983, с. 3—8

4 Дьяконов Л П., Глухов В Ф, Поздняков А А, Г Ф Денисенко, Г Е Панкова, М. Т Гололобова, Т. П. Калмыкова Культура клеток и тканей животных (Учебно-методическое пособие), Ставрополь, 1980

5 Поздняков А А, Авилов В С, Гололобова М Т., Дьяконов Л П., Жидков С. А, Козыренко Т И., Позднякова Е А., Сурин Б М В кн «Атуальные вопросы ветеринарной вирусологии», ч 1, Владимир, 1976, с. 103—105.

6. Сергеев В А Размножение вирусов животных в культуре ткани М, «Колос», 1966

7. Субаев Г Х Методические рекомендации по приготовлению и использованию в научно-исследовательских лабораториях первичных культур клеток тестикулов, почек и щитовидной железы свиней Киев, 1981

8 Лабутинс А В, Серейка В И Культивирование энтеровирусов свиней в культуре клеток щитовидной железы — В сб · Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, ч. 1, Владимир, 1976, с 125—126.

10 K H. White Isolation of the virus of transmissible gastroenteritis (TGE) from naturally infected piglets in cell culture. — Zbl Vet Med B 18, 770—778 (1971).

gost.e-ecolog.ru