

УДК 576.343

ВИРУСОЛОГИЯ

А. А. ЦАРЕВА, В. Н. ГАДАШЕВИЧ, В. В. ПЕРЕКРЕСТ, С. А. ДЕМИДОВА,
действительный член АМН СССР В. М. ЖДАНОВ

**ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗА-ИЗОЭНЗИМ
В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ**

Несмотря на то что перевиваемые клеточные культуры в процессе длительного пассирования приобретают много общих черт — морфологических, кариологических, биохимических и др., т. е. происходит их унификация, возможность загрязнения одного вида клеток другим долгое время игнорировалась, хотя наличие такой контаминации было показано уже в 1959—1962 гг. иммунологическими и цитологическими методами (1). Использование ряда генетических маркеров открыло новые пути в решении проблемы внутривидовой контаминации клеток. В 1967—1968 гг. Гартлер (2, 3), применив метод электрофореза в крахмальном геле, показал контаминацию 18 линий человеческого происхождения клетками линии HeLa. Как известно, линия клеток HeLa была получена из раковой опухоли шейки матки женщины негритянского происхождения. Работами ряда исследователей (4, 5, 5-8) показано, что около 30% американских негров имеют глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу (Г-6-ФДГ), обладающую более высокой электрофоретической подвижностью, — так называемые быстрые формы фермента типа А; для 70% негров и остального населения характерны медленные формы фермента типа В. Линия клеток HeLa имеет электрофоретическую подвижность Г-6-ФДГ типа А.

Изучение подвижности Г-6-ФДГ перевиваемых и первично-трипсицизированных культур клеток американской коллекции обнаружило присутствие быстрой формы фермента во многих линиях перевиваемых клеток. На основании полученных данных был сделан вывод о контаминации перевиваемых культур клеток клетками линии HeLa, хотя при этом и не исключалась возможность селекции и видоизменения Г-6-ФДГ в процессе пассирования. Вопрос дискутируется по сей день (2).

В настоящем сообщении впервые приводятся результаты исследования электрофоретической подвижности Г-6-ФДГ в различных перевиваемых и первично трипсицизированных культурах клеток, имеющих в лаборатории культуры тканей Института вирусологии им. Д. И. Иванова

Т а б л и ц а 1

Характеристика Г-6-ФДГ культур клеток человеческого происхождения

№№ п.п.	Клеточные культуры *	Число хромосом	Тип Г-6-ФДГ	№№ п.п.	Клеточные культуры	Число хромосом	Тип Г-6-ФДГ
1	HeLa	79	А	7	РН	62—66	АВ
2	Her-2	79	А	8	ПЭЧ + V	64	АВ
3	Fl	71	А	9	ЛЭЧ (дипл.)	46	В
4	D-6	64	А	10	ФЭЧ	46	В
5	Wich	74	А	11	ПЭЧ	46	В
6	J-96	62—64	АВ	12	Гемолизат	46	В

* Культуры клеток № 1—5 получены из американской коллекции; № 6 — из Института вирусных препаратов Министерства здравоохранения СССР; № 7 — из Института биологии Адольфо Лутц (Сан-Паулу, Бразилия); № 8 — из Института вирусологии АМН СССР; № 9 — диплоидный штамм, выведенный в Институте вирусологии им. Д. И. Иванова АМН СССР.

АМН СССР. Часть клеточных культур получена из американской коллекции клеточных культур, другая часть получена из разных источников, некоторые клеточные линии выведены в Советском Союзе (табл. 1).

Изучали подвижность Г-6-ФДГ в 7% полиакриламидном геле по методу Дависа (9). Гомогенаты клеток готовили, используя в качестве суспендирующей среды 0,25 M раствор сахарозы (рН 7,4), содержащий 1 M ЭДТА (10). Материал трижды замораживали при -70° и оттаивали при

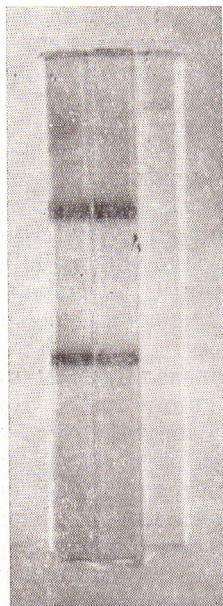


Рис. 1

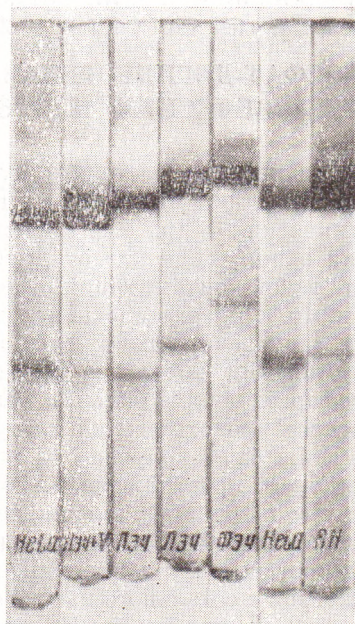


Рис. 2

Рис. 1. Электрофоретическая подвижность Г-6-ФДГ в клетках линии HeLa

Рис. 2. Электрофоретическая подвижность Г-6-ФДГ в различных перевиваемых и первично-трипсинизированных культурах клеток

30° , центрифугировали при 4000 об/мин. Спектрофотометрически определяли количество белка в надосадочной жидкости. На столбик геля наносили 200–500 мкг белка. Зоны локализации Г-6-ФДГ выявляли по методике, модифицированной К. А. Коровниковым (11). Распределение окрашенных зон сравнивали визуально. Для правильной оценки электрофоретической подвижности Г-6-ФДГ одинаковый материал наносили в две-три трубочки. Электрофоретическую подвижность Г-6-ФДГ различных культур клеток оценивали, сравнивая с подвижностью фермента в клетках линии HeLa (тип А) и гемолизатов эритроцитов человека (тип В).

На рис. 1 показаны три столбика геля, на которые был нанесен гомогенат клеток линии HeLa. Первый и второй столбики после электрофореза находились в инкубационной среде, содержащей полный набор ингредиентов; третий, контрольный, инкубировали в среде без глюкозо-6-фосфата натрия. Не вызывает сомнения, что зоны локализации Г-6-ФДГ находятся на одном уровне. Такое идентичное расположение зон локализации фермента при электрофорезе одинакового материала было характерно для всех опытов.

Сопоставление электрофоретической подвижности Г-6-ФДГ перевиваемых и первично-трипсинизированных культур клеток человеческого происхождения (рис. 2, табл. 1) выявило, что линии клеток Her-2, F1 Д-6, Wich имели А-тип подвижности энзима, тогда как первично-трипсинизирован-

ные культуры почек и фибробластов эмбриона человека (ПЭЧ и ФЭЧ), а также диплоидный штамм клеток легкого эмбриона человека обладали электрофоретической подвижностью Г-6-ФДГ типа В. Линии клеток J-96, RH ПЭЧ+V характеризовались подвижностью типа АВ.

Таким образом, результаты наших исследований частично подтверждают опубликованные ранее данные (2, 3). Следует подчеркнуть, что диплоидный штамм клеток ЛЭЧ, выведенный В. В. Перекрест, имел медленный тип Г-6-ФДГ. Особый интерес для решения вопроса о контаминации культур клеток клетками линии HeLa представляет линия клеток ПЭЧ+V, полученная из нормальных клеток почки плода человека после введения онкорнавирусов типа А и В перевиваемых клеточных культур. Клеточная культура ПЭЧ+V регулярно перевивалась. При электронно-микроскопическом изучении в ней обнаруживались частицы онкорнавирусов А и В. Кариологический анализ показал, что это гетероплоидная линия с 62 хромосомами. На рис. 3 представлены данные изучения электрофоретической подвижности Г-6-ФДГ клеток ПЭЧ+V в сравнении с таковой в клетках линии HeLa и первично-трипсицинизированных клетках почек плода человека. На этом рисунке четко показано, что клеточная культура ПЭЧ+V обладает подвижностью Г-6-ФДГ типа АВ. Работы по получению трансформированной клеточной культуры под действием онкорнавирусов проводили в особо строгих условиях, возможность контаминации клетками линии HeLa была исключена.

В заключение надо отметить, что поиски стабильных клеточных маркеров чрезвычайно полезны для изучения генетической однородности клеточных линий. Поэтому данные Гартлера, использовавшего различия в электрофоретической подвижности изоэнзима Г-6-ФДГ для решения вопроса о контаминации клеточных культур клетками HeLa, заслуживают большого внимания. Однако решить вопрос о том, что многие человеческие перевиваемые линии клеток контаминированы клетками HeLa на основании только изучения одного фермента Г-6-ФДГ нам кажется преждевременным. Нельзя не принимать во внимание, что клеточные культуры обладают различной морфологией, пролиферативной активностью, чувствительностью к вирусам, токсинам и т. д. Длительное культивирование, наличие онкорнавирусов, интегрированных в геном клетки, как показано нашими исследованиями, меняет электрофоретическую подвижность Г-6-ФДГ.

Авторы приносят глубокую благодарность К. А. Коровникову за консультативную помощь при освоении метода определения Г-6-ФДГ.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
17 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 W. F. Simpson, C. S. Stulberg, Nature (London), v. 199, 616 (1963). 2 S. M. Gartler, Nat. Cancer Inst. Monogr., v. 26, 167 (1967). 3 S. M. Gartler, Nature (London), v. 217, 750 (1968). 4 S. H. Boyer et al., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., v. 48, 1868 (1962). 5 S. M. Gartler et al., Nature (London), v. 193, 602 (1962). 6 R. G. Davidson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 50, 481 (1963). 7 H. N. Kirkman, E. M. Hendrickson, Am. J. Hum. Genet., v. 15, 241 (1963). 8 L. Luzzatto, N. C. Allan, Biochem., Biophys. Res. Commun., v. 21, 547 (1965). 9 B. I. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 124, 404 (1964). 10 А. А. Покровский, Л. В. Кравченко и др., ДАН, т. 205, 1483 (1972). 11 К. А. Коровников, Биохимия, т. 35, 1, 159 (1970).

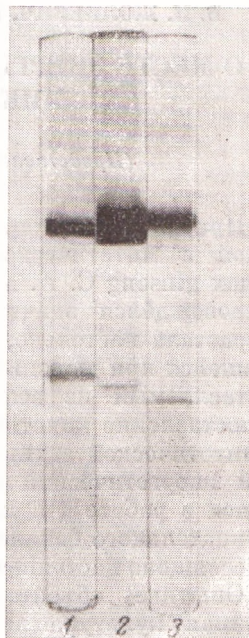


Рис. 3. Электрофоретическая подвижность Г-6-ФДГ в линии клеток HeLa (1), Пэч+V (2) и первично трипсицинизированных клетках почки эмбриона человека (3)