

NHẬN DẠNG TẾ BÀO THẬN KHÍ XANH VERO 76 QUA CÁC THỂ HỆ CÂY CHUYỀN

Nguyễn Thị Kim Liên^{1,✉}, Nguyễn Văn Tụng^{1,2}, Nguyễn Huy Hoàng¹, Nguyễn Thị Mai Hương³, Nguyễn Thị Vân Quỳnh³, Phạm Văn Hùng³

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: ntkimlienibt@gmail.com

Ngày nhận bài: 24.3.2019

Ngày nhận đăng: 20.4.2019

TÓM TẮT

Tế bào thận khí xanh châu Phi *Chlorocebus aethiops sabaeus* (dòng tế bào Vero76) được sử dụng trong nhiều nghiên cứu sinh học như nuôi cấy virus, phát triển vaccine và các xét nghiệm gây độc tế bào. Tuy nhiên, việc nuôi cấy dòng tế bào qua nhiều thế hệ có thể dẫn đến sự biến đổi của các dòng tế bào sau nhiều lần cấy chuyển so với tế bào gốc ban đầu. Việc này sẽ dẫn đến những sai lệch trong kết quả nghiên cứu có sử dụng các dòng tế bào đã biến đổi. Vì vậy, cần định kỳ nhận dạng và đánh giá sự ổn định về mặt di truyền của các dòng tế bào nuôi cấy sau những lần cấy chuyển để đảm bảo vật liệu tế bào sử dụng là ổn định về di truyền. Trong các nghiên cứu gần đây, việc nhận dạng các dòng tế bào sử dụng phương pháp chỉ thị STR (short tandem repeat) đang trở thành một phương pháp đơn giản hiệu quả và được dùng phổ biến. Trong nghiên cứu này, tám chỉ thị STR: D17S1304, D5S1467, D19S245, D1S518, D8S1106, D4S2408, D6S1017 và DYS389 được sử dụng để nhận dạng và đánh giá sự ổn định về di truyền của các dòng tế bào Vero76 được cấy chuyển nhiều lần. Các đoạn chỉ thị STR được khuếch đại, giải trình tự và so sánh để xác định các điểm sai khác giữa các dòng tế bào ở các thế hệ cấy chuyển so với dòng tế bào gốc ban đầu. Kết quả đánh giá cho thấy các dòng tế bào ở các thế hệ cấy chuyển không có sự khác biệt nhau và so với dòng tế bào gốc, điều này khẳng định có sự ổn định về mặt di truyền của các dòng tế bào. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có thể sử dụng các chỉ thị STR trong việc nhận dạng các dòng tế bào Vero76.

Từ khóa: Chỉ thị STR, dòng tế bào, kiểu gen, nhận dạng tế bào, Vero76.

MỞ ĐẦU

Một số khảo sát gần đây về chất lượng dòng tế bào cho thấy dòng tế bào bị sai khác là phổ biến và rất đáng quan tâm (Chatterjee, 2007; Lucey *et al.*, 2009; Miller, 2009; Capes-Davis *et al.*, 2010). Các nguyên nhân phổ biến nhất của việc tế bào bị sai khác bao gồm dán nhãn sai, nhiễm bẩn các dòng tế bào trong quá trình nuôi cấy. Nguy cơ gặp một dòng tế bào sai khác với nguồn gốc ban đầu được ước tính

là 1: 6 (Drexler *et al.*, 2017). Dữ liệu này tương đương với 15% - 35% các dòng tế bào bị nhiễm hoặc xác định sai, dẫn đến sự lãng phí rất lớn và công bố dữ liệu sai lệch hoặc gây hiểu lầm (Liang-Chu *et al.*, 2015). Các dòng tế bào sai khác có thể được phát hiện thông qua nhận dạng. Nhận dạng tế bào được định nghĩa ở đây là các thử nghiệm được thực hiện để xác nhận danh tính của một dòng tế bào, chứng minh rằng nó có nguồn gốc chính xác từ dòng tế bào gốc ban đầu (Nims, Reid, 2017). Các

công cụ để nhận dạng các dòng tế bào rất quan trọng để kiểm soát chất lượng trong các thí nghiệm sinh học dựa trên tế bào. Hiện tại phương pháp để nhận dạng các dòng tế bào của con người bằng cách sử dụng các đoạn lặp lại ngắn (short tandem repeat - STR) được sử dụng thành công trong pháp y để nhận dạng tế bào người, nhưng chưa có phương pháp dựa trên STR để nhận dạng các dòng tế bào động vật (Barallon *et al.*, 2010; Capes-Davis *et al.*, 2010; Ried *et al.*, 2013).

Các tế bào Vero phân lập từ thận của khỉ xanh châu Phi (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) năm 1962 thường được sử dụng cho nuôi cấy virus, phát triển vaccine và xét nghiệm gây độc tế bào (Halter *et al.*, 2009; Barrett *et al.*, 2011). Nghiên cứu cho thấy con người và khỉ xanh châu Phi có sự tương đồng cao tại các vùng STR, điều này cho phép sử dụng các chỉ thị ở con người để nhận dạng đối với khỉ xanh châu Phi (Newman *et al.*, 2002; Jasinska *et al.*, 2007). Năm 2009, một nhóm nghiên cứu đã được thành lập để phát triển một tiêu chuẩn nhằm nhận dạng các tế bào của con người với một cơ sở dữ liệu của các đoạn lặp lại ngắn (STR) (Barallon *et al.*, 2010). Gần đây, việc sử dụng các chỉ thị lặp lại ngắn này được khuyến nghị để nhận dạng dòng tế bào người (Lorenzi *et al.*, 2009). Phương pháp này cũng có thể được mở rộng đến các dòng tế bào động vật (Almeida *et al.*, 2016).

Almeida và đồng tác giả năm 2011 đã sử dụng các chỉ thị STR: D17S1304, D5S1467, D19S245, D1S518, D8S1106, D4S2408, D6S1017 và DYS389 trong việc nhận dạng các dòng tế bào. Trong nghiên cứu này, sáu mươi hai mẫu DNA đã được nhận dạng thành công nhờ sử dụng tám chỉ thị trên. Công bố cũng xác nhận rằng các tế bào Vero76 và tế bào COS-7 có nguồn gốc tương ứng từ các tế bào Vero và CV-1. Thông qua việc đánh giá đối với các chỉ thị STR cho thấy có sự ổn định di truyền trong các tế bào Vero và tỷ lệ đột biến thấp trong dòng tế bào Vero này.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng tám chỉ thị STR D17S1304, D5S1467, D19S245, D1S518, D8S1106, D4S2408, D6S1017 và DYS389 trong việc nhận dạng và đánh giá sự ổn định của các dòng tế bào Vero76 được cấy chuyển nhiều lần.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Dòng tế bào Vero76 ATCC CRL-1587TM gốc loạt 59168527 (CS- Cell Seed) được cung cấp bởi Hãng ATCC, dòng tế bào này được lưu giữ tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Dòng tế bào MCB - Master Cell Bank là dòng tế bào được cấy chuyển sau 4 lần từ dòng tế bào Vero76 gốc ban đầu và dòng tế bào MCB được cấy chuyển tiếp tạo ra dòng tế bào WCB - Working Cell Bank (là dòng tế bào được cấy chuyển sau 8 lần tính từ dòng tế bào Vero76 gốc).

Phương pháp nghiên cứu

Các tế bào Vero (Vero76, MCB, WCB) được thu nhận và tách chiết DNA tổng số bằng bộ kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification của hãng Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, Mỹ.

Tám đoạn chỉ thị STR được khuếch đại từ các dòng tế bào Vero76 ở các thể hệ khác nhau bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu được tổng hợp theo báo cáo của Almeida và đồng tác giả (2011) (Bảng 1). Sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn chỉ thị trên được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp trên máy giải trình tự tự động ABI 3500 Bio System (Mỹ) theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả (1977). Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn STR từ các dòng tế bào ở các thể hệ khác nhau được so sánh với trình tự của dòng tế bào gốc bằng phần mềm BioEdit version 7.2.5

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2>) để xác định các biến đổi gen qua các thể hệ tế bào khác nhau.

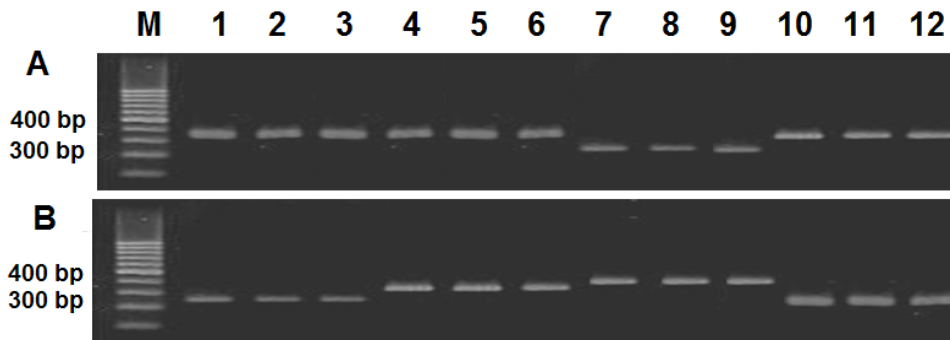
Bảng 1. Trình tự các đoạn mồi sử dụng trong nghiên cứu (Almeida *et al.*, 2011).

TT	Tên mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	D8S1106	F- GTTTACCCCTGCATCACTGG R- GGTGGCCTAACCAGAGTTGA	267-291
2	DYS389	F - CCAACTCTCATCTGTATTATCTATG R - GTCTTATCTCCACCCACCAGA	321-337
3	D1S518	F – GCAGATCTTGGGACTTCTCG R - GTGTGGGCAACTGCATTAGAG	182-198
4	D6S1017	F – CTGGCACAGGATAGGTGCTC R - GATTGAACCAGATGGGAACGA	354-374
5	D17S1304	F – ACCATGTCCTCTGGTTCTGG R -GTTTCTTACAGGTGGGACTTGGTGAAA	197-213
6	D4S2408	F - TCATTTCCATAGGGTAAGTGAAAA R – GCCATGGGGATAAAAATCAGA	336-360
7	D5S1467	F – GCCTAAGGTGGTGAATTGGA R - GAAGATGGCCCATTTCCATTT	313-329
8	D19S245	F – GACCTGCAATCAGCCATTTT R - GTTCTTGCAGTCTGTGGCTTG	225-249

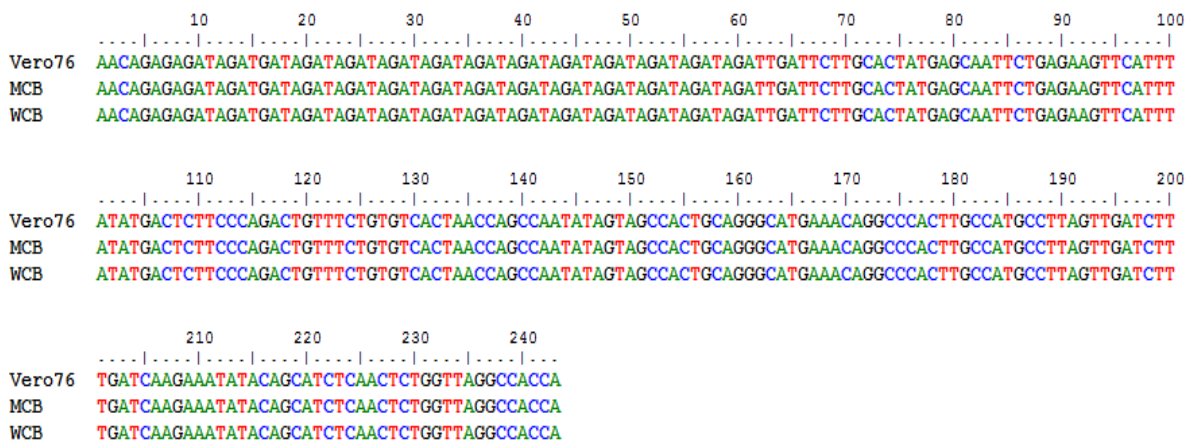
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khuếch đại 8 đoạn chỉ thị STR (D8S1106, D1S518, D17S1304, D5S1467, D19S245, D4S2408, D6S1017, DYS389) trên các dòng tế bào Vero76 bằng các cặp mồi đã được Almeida và đồng tác giả công bố năm 2011.

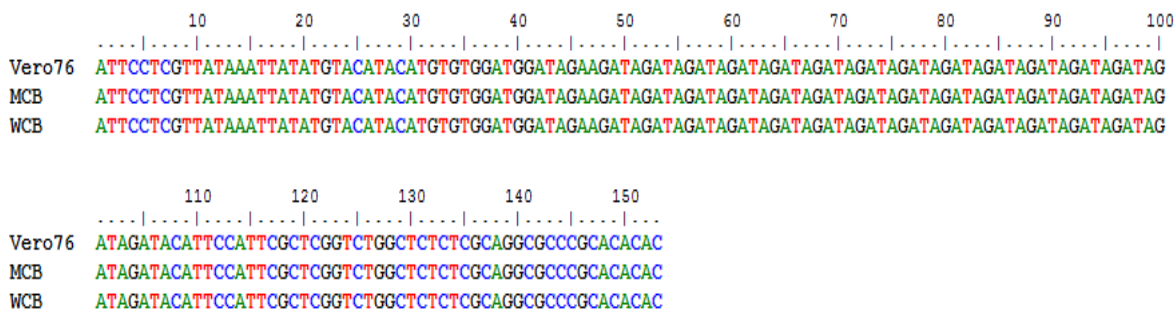
Kết quả khuếch đại 8 đoạn chỉ thị STR được trình bày trong Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 8 đoạn chỉ thị STR ở Hình 1 cho thấy chúng tôi đã khuếch đại được các đoạn chỉ thị mong muốn. Kết quả giải trình tự của các đoạn chỉ thị được so sánh bằng phần mềm BioEdit version 7.2.5 được thể hiện ở Hình 2 - 8.



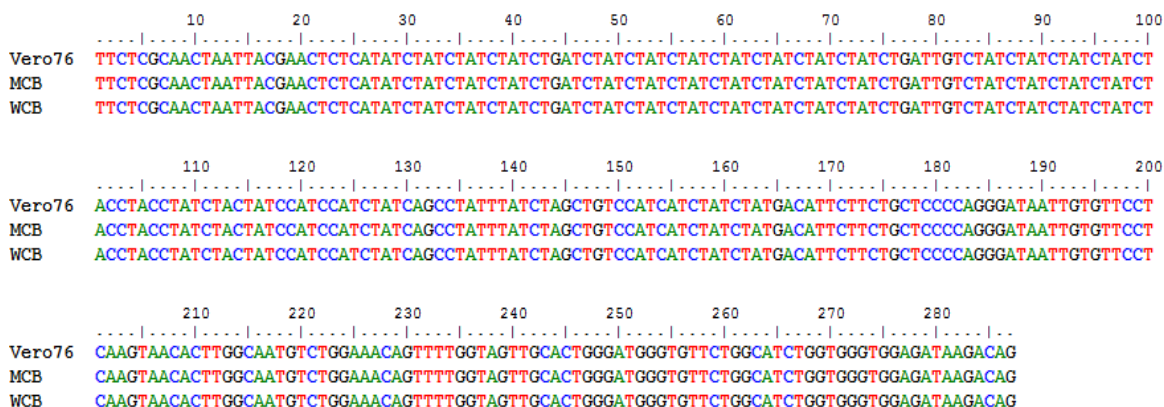
Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn chỉ thị STR của các dòng tế bào Vero76, MCB, WCB. A. M: Marker 100 bp. 1 - 3: Sản phẩm khuếch đại đoạn D4S2408. 4 - 6: Sản phẩm khuếch đại đoạn D6S1017. 7 - 9: Sản phẩm khuếch đại đoạn D17S1304. 10 - 12: Sản phẩm khuếch đại đoạn D5S1467. B. M: Marker 100 bp. 1 - 3: Sản phẩm khuếch đại đoạn D19S245. 4 - 6: Sản phẩm khuếch đại đoạn D8S1106. 7 - 9: Sản phẩm khuếch đại đoạn DYS389. 10 - 12: Sản phẩm khuếch đại đoạn D1S518.



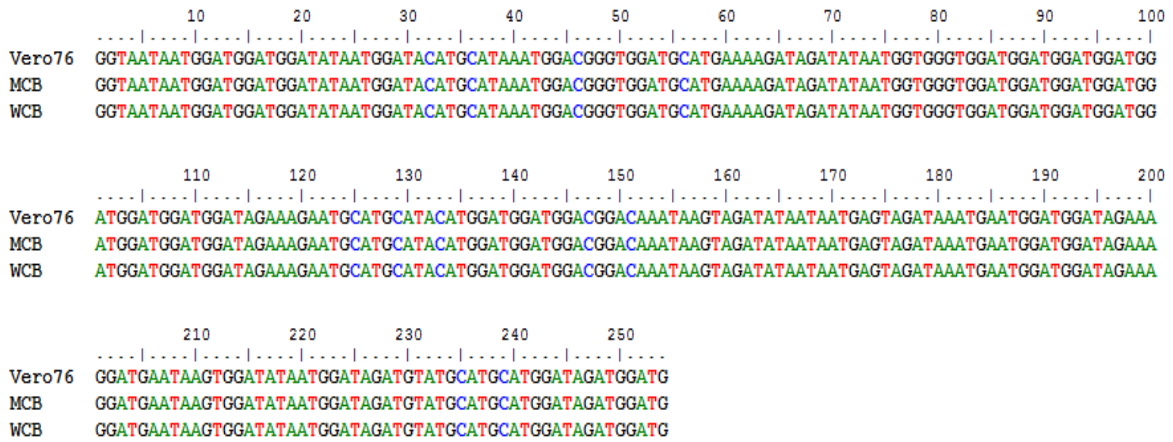
Hình 2. So sánh trình tự đoạn D8S1106 của các dòng tế bào Vero76.



Hình 3. So sánh trình tự đoạn D1S518 của các dòng tế bào Vero76.



Hình 4. So sánh trình tự đoạn DYS389 của các dòng tế bào Vero76.



Hình 8. So sánh trình tự đoạn D6S1017 của các dòng tế bào Vero76.

Kết quả phân tích trình tự của các đoạn chỉ thị STR trên các dòng tế bào Vero76 được cấy chuyền nhiều lần cho thấy không có sự khác biệt giữa các dòng tế bào ở các thế hệ khác nhau. Kết quả này cũng cho thấy các dòng tế bào có sự ổn định về di truyền mặc dù được cấy chuyền nhiều lần và chất lượng của các dòng tế bào là hoàn toàn ổn định, không có hiện tượng lây nhiễm xảy ra qua quá trình cấy chuyền.

Đảm bảo tính đồng nhất của dòng tế bào và khả năng phát hiện ô nhiễm tế bào là một trong những bước thiết yếu nhất của nghiên cứu dựa trên tế bào. Các vấn đề với nguồn gốc của một dòng tế bào thường liên quan đến số lần cấy chuyền của nó và chất lượng của các mẫu tế bào (MacLeod *et al.*, 2013). Một số phương pháp nhận dạng đã được sử dụng bao gồm phân tích isoenzyme, phân tích tế bào học, phân tích HLA, phân tích kiểu gen dựa trên chỉ thị STR và kiểu gen dựa trên các đa hình nucleotide đơn (single nucleotide polymorphism - SNP) (Fogh, 1986; Nims *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2015). Phân tích STR là phương pháp dựa trên sự xác định các biến thể trong trình tự hệ gen, đây là phương pháp hiệu quả đối với việc nhận dạng các dòng tế bào khác nhau và được sử dụng để phân biệt giữa các mẫu khác nhau (ASN 0002, 2010). Với chi phí thấp, hiệu quả phân biệt cao và độ tin cậy cao, phân tích dựa trên chỉ thị STR đã được chứng minh như một phương pháp

được lựa chọn để xác thực và giám sát nguồn gốc của các dòng tế bào người bảo đảm không bị lây nhiễm chéo trong nhiều nghiên cứu (Van Pelt *et al.*, 2003; Azari *et al.*, 2007).

Nhận dạng tế bào dựa trên kiểu gen được sử dụng để phát hiện sự sai khác của các dòng tế bào là một phương pháp đang được sử dụng hiện nay (Capes Davis *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2016). Các nghiên cứu trước đây cho thấy có thể sử dụng 8 - 13 chỉ thị STR được sử dụng trong nghiên cứu pháp y để nhận dạng các dòng tế bào một cách hiệu quả (Azzari *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng tám chỉ thị STR đã được sử dụng trong nghiên cứu pháp y và để nhận dạng các dòng tế bào của người để nhận dạng các dòng tế bào Vero76. Kết quả cho thấy khả năng nhận dạng thông qua việc khuếch đại thành công và so sánh trình tự của các đoạn chỉ thị STR từ các dòng tế bào Vero76 từ thận khỉ xanh châu Phi là đáng tin cậy và đạt hiệu quả rất tốt. Với các kết quả thu được này cũng gợi ý rằng có thể sử dụng tám chỉ thị STR trên trong việc đánh giá nhận dạng các dòng tế bào Vero76 nuôi cấy.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã khuếch đại và giải trình tự 8 đoạn chỉ thị STR (D8S1106, D1S518,

D17S1304, D5S1467, D19S245, D4S2408, D6S1017, DYS389) trên các dòng tế bào Vero76 được cấy chuyển nhiều lần. Kết quả phân tích trình tự cho thấy trình tự của các dòng tế bào ở các thế hệ không có sự thay đổi chứng tỏ các dòng tế bào là hoàn toàn ổn định về di truyền sau nhiều lần cấy chuyển. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy có thể sử dụng các chỉ thị STR trong việc nhận dạng các dòng tế bào Vero76.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí cho đề tài: “Thiết lập và đánh giá chất lượng ngân hàng tế bào Vero dùng trong kiểm định vắc xin, sinh phẩm y tế” của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Almeida JL, Hill CR, Cole KD (2011) Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. *BMC Biotechnol* 11: 102.

Almeida JL, Cole KD, Plant AL (2016) Standards for cell line authentication and beyond. *PLoS Biol* 14(6): e1002476. doi:10.1371/journal.pbio.1002476

ASN-0002 (2010) ATCC Standards Development Organization Workgroup. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer* 10(6): 441–448.

Azari S, Ahmadi N, Tehrani MJ, Shokri F (2007) Profiling and authentication of human cell lines using short tandem repeat (STR) loci: Report from the national cell bank of Iran. *Biologicals* 35: 195–202.

Barallon R, Bauer S, Buter J, Capes-Davis A, Dirks W, Elmore E, Furtado M, Kline M, Kohara A, Los G, et al (2010) Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol* 46: 727–732.

Barrett P, Berezuk G, Fritsch S, Aichinger G, Hart M, El-Amin W, Kistner O, Ehrlich H (2011) Efficacy, safety, and immunogenicity of a vero-cell-culture derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 377(9767): 751–759.

Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler H, Kohara A, MacLeod R, Masters J, Nakamura Y, Reid Y, Reddel R, et al (2010) Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 127: 1–8.

Castro F, Dirks WG, Fahrnich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M (2013) High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *Int J Cancer* 132(2): 308–314.

Chatterjee R (2007) Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science* 315: 928–931.

Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA, Uphoff CC (2017) False and mycoplasma-contaminated leukemia-lymphoma cell lines: time for a reappraisal. *Int J Cancer* 140(5): 1209–1214.

Fogh J (1986) Human tumor lines for cancer research. *Cancer Invest* 4(2): 157–184.

Halter M, Almeida J, Tona A, Elliott J, Plant A, Cole K (2009) A mechanistically relevant cytotoxicity assay based on the detection of cellular green fluorescent protein. *ASSAY and Drug Development Technologies* 7(4): 356–365.

Liang-Chu MM, Yu M, Haverty PM, Koeman J, Ziegler J, Lee M, Bourgon R, Neve RM (2015) Human biosample authentication using the high-throughput, cost-effective SNPtrace™ system. *PLoS ONE* 10(2): e0116218. doi:10.1371/journal.pone.0116218

Lorenzi P, Reinhold W, Varma S, Hutchinson A, Pommier Y, Chanock S, Weinstein J (2009) DNA fingerprinting of the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther* 8(4): 713–724.

Lucey B, Nelson-Rees W, Hutchins G (2009) Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133: 1463–1467.

MacLeod RA, Dirks WG, Drexler HG (2013) Where have all the cell lines gone? *Int J Cancer* 132(5): 1232–1234.

Miller L (2009) Identity crisis. *Nature* 457(7232): 935–936.

Nims RW, Sykes G, Cottrill K, Ikonomi P, Elmore E (2010) Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46(10): 811–819.

- Nims RW, Reid Y (2017) Best practices for authenticating cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 53(10): 880–887.
- Reid Y, Storts D, Riss T, Minor L (2013) Authentication of human cell lines by STR DNA profiling analysis. *Assay Guidance Manual* 18 pp.
- van Pelt JF, Decorte R, Yap PS, Fevery J (2003) Identification of HepG2 variant cell lines by short tandem repeat (STR) analysis. *Mol Cell Biochem* 243: 49–54.
- Yu M, Selvaraj SK, Liang-Chu MMY, Aghajani S, Busse M, Yuan J, Lee G, Peal F, Klijin C, Bourgon J, Kaminker JS, Neve RM (2015) A resource for cell line authentication, annotation and quality control. *Nature* 520(7547): 307–311.

AUTHENTICATION OF THE GREEN MONKEY KIDNEY VERO76 CELL LINES SUBCULTURED THROUGH MANY GENERATIONS

Nguyen Thi Kim Lien¹, Nguyen Van Tung^{1,2}, Nguyen Huy Hoang¹, Nguyen Thi Mai Huong³, Nguyen Thi Van Quynh³, Pham Van Hung³

¹*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology*

³*National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

SUMMARY

The Vero76 cell lines isolated from the kidney of an African green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaeus*), are commonly used for viral culture, vaccine development, and cytotoxicity assays. However, subculturation of cell lines over multiple generations can lead to a genetic change in these cell lines compared to the original cell. This will lead to deviations in results of research that using the modified cell lines. Therefore, identification and evaluation periodically the genetic stability of cell lines after subculture are necessary. In recently studies, cell authentication by using STR markers (short tandem repeat markers) have been becoming a simple and effective method that used commonly. In this study, we used eight STR markers: D17S1304, D5S1467, D19S245, D1S518, D8S1106, D4S2408, D6S1017, and DYS389 for cell lines authentication and evaluation of the genetic stability of subcultured Vero76 cell lines. The STR indicators were amplified, sequenced and compared with the original cell to identify the differences between cell lines in subcultured generations. The evaluation results showed that these cell lines did not have any differ compared with the original cell line, this confirmed that the genetic of the cell lines were stability. The results also suggested that STR markers can be used to authenticate for Vero76 cell lines.

Keywords: STR markers, cell line, genotyping, authentication, Vero76