

И.А. Пунтус¹, К.Н. Жасланова², Г.М. Салхожаева³, М.К. Тыныкулов⁴,
К.М. Уразов⁵

^{1,2,5} ТОО «Biotron Group» Степногорск, Казахстан,

^{3,4} Кафедра биотехнологии и микробиологии Евразийского национального университета
имени Л.Н.Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

(E-mail: puntusira@mail.ru, karlygash_1506@mail.ru, gaukhar_7077@mail.ru, tynykulov@list.ru,
kunya_93-31@mail.ru)

Оптимальные технологические параметры культивирования линии клеток ВНК-21

Аннотация: В статье представлены результаты культивирования линий клеток ВНК-21 и ВНК-21(cl-13) стационарным, роллерным, роллерным монослойно-суспензионным методами. Приведены оптимальные технологические параметры культивирования клеток и подобраны ростовые модифицированные обогащенные питательные среды для испытуемых линий клеток. Рассмотрены аспекты масштабирования процесса культивирования клеток.

Подобраны оптимальные условия инкубирования линии ВНК-21(cl-13): постоянная температура $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в термальной комнате, скорость вращения роллеров 0,5–0,8 об/мин, модифицированная обогащенная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), кратность рассева 1:15-1:25 или посевная концентрация 85-150 тыс.кл/мл, метод снятия клеток–версен+трипсин (9:1). Предложен роллерный монослойно-суспензионный метод культивирования для накопления биомассы клеток ВНК-21(cl-13) в роллерах.

Ключевые слова: линии клеток ВНК-21 и ВНК-21(cl-13), стационарные, роллерные, роллерные монослойно-суспензионные методы, модификация, вакцина, культура, титр, монослой, инкубация.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-130-1-37-46>

Введение. Ветеринарная биологическая промышленность Республики Казахстан нуждается в современных технологиях, которые позволят сделать нашу продукцию «привлекательной» на внутреннем рынке и конкурентоспособной на внешнем. Культивирование клеток и вирусов в традиционной биотехнологии при производстве живых и инактивированных вирусных вакцин проводится по методам стационарного, роллерного, суспензионного культивирования и культивирования на микроносителях [1, 2, 3, 4].

Использование метода стационарного культивирования клеток ограничено большими затратами рабочего времени, материалов и реактивов, при этом урожай клеток лимитирован доступной для роста поверхностью культурального сосуда.

Роллерный метод культивирования позволяет получить значительно большее количество клеток по сравнению с традиционным стационарным методом. Он более экономичен, характеризуется оптимальным отношением полезной площади культивирования к объему питательной среды и открывает благоприятные возможности для накопления клеточной массы и получения более высокого выхода вирусного антигена (на 1,0–2,0 lg в сравнении со стационарным). При этом методе возможны различные пути увеличения площади поверхности роллерных сосудов, на которой происходит прикрепление и размножение клеток. Способностью к росту и размножению в роллерных условиях обладают субкультуры, диплоидные и перевиваемые культуры, реже первичные линии. Для лучшего размножения клеток в роллерных аппаратах необходима первичная их адаптация к новым условиям культивирования. Стационарный и роллерный методы культивирования относятся к непроточным монослойным двухмерным (2D) системам культивирования [5, 6, 7].

Очевидны некоторые преимущества монослойных культур: высокая плотность клеток в монослое; возможность полной замены питательной среды в процессе культивирования; наличие тесных межклеточных контактов, которые требуются для распространения вирусов; частичная контаминация отдельных сосудов не приводит к потере всей серии биоматериала.

К недостаткам монослойных культур следует отнести: требование большой поверхности субстрата; высокая стоимость и трудоемкость при масштабировании, трудность отбора проб для контроля; неоднородность получаемого биоматериала; сложность контроля pH и концентрации кислорода.

Рост требований к количеству и качеству разрабатываемых вакцин способствовал усовершенствованию методов культивирования клеток. Принципиальный шаг в этом направлении сделан при разработке суспензионного и псевдосуспензионного методов культивирования [8].

Промышленное производство биопрепаратов представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных физических, химических, биохимических процессов, происходящих в разнообъемном и разнотипном оборудовании, связанном в технологические линии. Ключевым моментом производства вакцин является процесс отработки технологических параметров культивирования клеток в лабораторных условиях с последующим масштабированием поверхностнозависимых и суспензионных культур клеток. Этапы определения оптимальных параметров культивирования связаны с получением качественной биомассы клеток, чувствительной к заражению производственным вирусом. Основные принципы масштабирования связаны со способностью животных культур клеток расти в двух отдельных системах - монослойной и суспензионной, при этом выделяют два подхода к масштабированию - объемный и прогрессивный [3, 5, 7, 8].

При масштабировании лабораторных технологий необходимо учитывать возрастающий риск контаминации пропорционально высокой стоимости используемой культуры клеток, а так же приготовление питательной среды и качественной раскладки культуры клеток в оптимальном физиологическом состоянии. Контроль этих параметров на должном уровне позволит рассматривать масштабирование как наиболее прогрессивный процесс в биотехнологии производства вакцин [5, 8].

Целью наших исследований было изучение оптимальных технологических параметров культивирования клеток ВНК-21 и ВНК-21(cl-13) стационарным, роллерным, роллерно-суспензионными методами культивирования.

Для этой цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение оптимальных технологических параметров и условий проведения стационарного и роллерного способов выращивания монослойной линии клеток ВНК-21 и суспензионной культуры ВНК-21 (cl-13).
2. Подбор оптимальной питательной среды для суспензионной линии клеток ВНК-21 (cl-13).

Методы исследований. Для проведения исследований использовалась перевиваемая культура клеток ВНК-21 (Baby Hamster Kidney cell line 21, почка новорожденного сирийского хомячка) с паспортными данными: тип роста – фибробластоподобный, способ культивирования – монослойный, жизнеспособность не менее 92%, кариологическая характеристика - $2n=44$, модальное число хромосом - 49-50, маркеры отсутствуют (рутинная окраска), а так же перевиваемая культура клеток ВНК-21 (cl-13) - клон, адаптированный для суспензионного и монослойного культивирования. Исходно полученные культуры клеток выращивались на синтетических питательных средах Игла+199 с добавлением 10% сыворотки крови КРС.

В опытах по подбору оптимальной ростовой среды для тестируемых культур клеток использовали синтетические питательные среды ЕМЕМ (ИглаМЕМ), ДМЕМ (Дюльбека МЕМ), среду 199 и ферментативные: гидролизат мышечных белков сухой (ФГМ-С), гидролизатлактатальбумина (ГЛА) в различных сочетаниях основных компонентов с добавлением 10% нормальной сыворотки крови КРС и обогащением питательных сред факторами, стимулирующими рост клеток (растворы витаминов, стабилизированных аминокислот, углеводы). Во всех вариациях питательных сред добавлялись антибиотики – бензилпенициллина натриевая соль и стрептомицина сульфат в дозе 100 ЕД/мл- и проводили коррекцию pH 7,57%-ым раствором бикарбоната натрия.

При работе использовались общепринятые методики трипсинизации клеток, их подсчета и посева с соблюдением правил работы в стерильных боксовых помещениях.

Культивирование клеток проводили по общепринятой методике на пластиковых матрасах ($V=50-200 \text{ см}^3$), стеклянных матрасах ($V=1500 \text{ см}^3$) и стеклянных роллерных флаконах ($V=2000$ и 3000 см^3). Для определения количества клеток, индекса пролиферации и процента жизнеспособных клеток ежедневно снимали по три матраса в течение 7 дней жизненного цикла и проводили подсчет клеток в камере Горяева, используя 0,5% водный раствор трипанового синего по общепринятым методикам. Каждые 12 ч в течение 5 суток культивирования проводили микроскопирование исследуемой линии клеток, оценивая состояние культуры, морфологию, формирование клеточного монослоя. Инкубировали в термальной комнате при $+37 \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ со скоростью вращения роллеров 0,4–0,6 об/мин. на роллерной установке «Weaton» [2].

Для отработки методики роллерного монослойно-суспензионного накопления биомассы клеток ВНК-21 (сl-13) проводили модифицированное роллерное культивирование клеток в сосудах объемом 2,0 л с загрузкой от 100 до 400 мл подобранной ростовой среды с посевной концентрацией клеток от 50 до 100 тыс./мл и со скоростью вращения роллеров 0,4-0,7-1,0-2,5 об/мин. Подбор параметров роллерно-суспензионного культивирования проводили в сравнении с базовым вариантом роллерного культивирования, формируя контрольные и опытные группы по принципу подобия, меняя несколько параметров выращивания клеток.

Критериями оценки результатов при роллерном методе культивирования являлись выход клеток и индекс пролиферации, жизнеспособность клеток и индекс пролиферативной активности в следующем пассаже [9, 10, 11].

Результаты и их анализ. При работе с культурой клеток **ВНК-21** в стационарном монослое использовались синтетические и ферментативные питательные среды с добавлением 10% нормальной сыворотки крови КРС. Исследования показали, что использование гидролизатной питательной среды ФГМ-С в различных модификациях позволяет получать средний выход клеток с матраса в 1,5-2,0 раза больше в сравнении с базовыми вариантами (ДМЕМ, ДМЕМ+ГЛА и Игла МЕМ).

Для последующих работ были отобраны полусинтетическая питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1) и синтетическая Игла МЕМ+199 + 10% сыворотки КРС серии №2, которые в пассажах давали стабильные результаты. Установлено, что обогащение полусинтетической питательной среды ФГМ-С+ДМЕМ факторами, стимулирующими рост клеток (растворы витаминов в объеме 3-5% к питательной среде, стабилизированные моно и комплексы аминокислоты, D-глюкоза) значимо не увеличивало индекс пролиферативной активности, а лишь незначительно ускоряло процесс формирования клеточного монослоя и улучшало морфологические показатели клеточной культуры. В то же время добавление D-глюкозы более чем 2000 мг/л вызывало подкисление питательной среды и гибель до 5% клеток. Добавление концентрата незаменимых аминокислот и L-глутамина в количестве 200 мг/л позволило закрепить максимальные выходы клеток на уровне $81,0 \pm 9,5$ млн.кл./матр. Коррекция витаминного и аминокислотного состава синтетической среды Игла МЕМ+199 не показала видимых изменений ни в ростовых, ни в культурально-морфологических показателях. Жизнеспособность клеток в обоих вариантах культивирования составляла 97-99%.

Стационарное культивирование клеток ВНК-21 в стеклянных и пластиковых флаконах (рисунок - 1) показало, что к 24-48ч клетки начинали формировать обширные зоны роста, а формирование полного монослоя клеток происходит к 72-96 часам при посевной концентрации 50–100 тыс.кл/мл., а наслоение клеток практически отсутствовало при культивировании 5-суточными циклами.

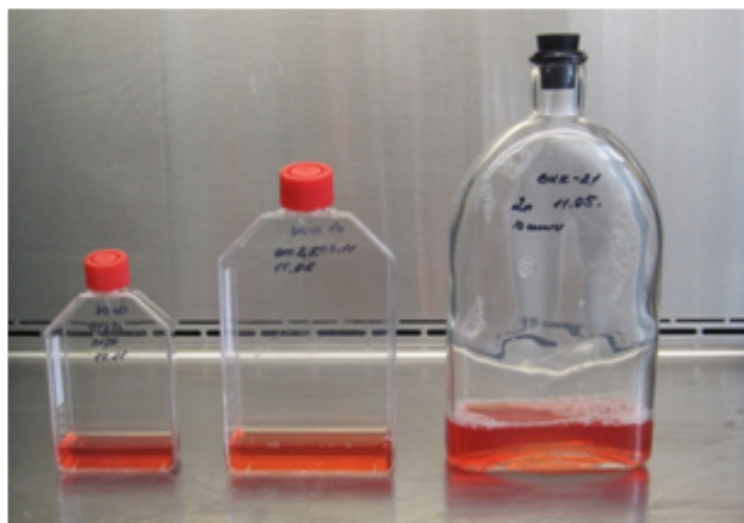


Рисунок 1 – Матрасы с культурой клеток ВНК-21, стационарное культивирование

При накоплении клеток в матрасах РУ объемом 1500 мл ($S \approx 260 \text{ cm}^2$) выход составил $81,0 \pm 9,5$ млн.кл./матр. (ИП=7,3-10,4). Условия стационарного культивирования – температура $+37^0 \text{ C}$, 5-суточные циклы. Отрабатывая 7-суточные циклы накопления клеток, установили, что необходимо снижение посевной концентрации на 30-35% и дополнительная корректировка pH питательной среды на 5-е сутки культивирования с 6,8-6,9 до 7,05-7,1, при этом ИПА составил 6,5-9,0.

Получили следующие оптимальные условия стационарного культивирования клеток ВНК-21: температура $+37 \pm 0,1^0 \text{ C}$, 5-суточные циклы пересевов, питательная среда Игла MEM+199 или ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), кратность посева 1:7 или посевная концентрация 50–100 тыс.кл/мл, метод снятия клеток - версен+трипсин (4:1).

Роллерное культивирование клеток ВНК-21 проводили в стеклянных роллерных флаконах объемом 2,0 л ($S \approx 800 \text{ cm}^2$) – выход клеток составил $157,8 \pm 30,9$ млн.кл./рол., и $253,8 \pm 38,4$ млн.кл./рол. с 3-х литровых сосудов ($S \approx 1200 \text{ cm}^2$) (ИП=11,0-15,0), при этом посевная концентрация составляла 70–100 тыс.кл/мл. Культивирование проводили в термальной комнате при $+37 \pm 0,2^0 \text{ C}$ и постоянном вращении со скоростью 0,25-0,5 об/мин, пятисуточными циклами, метод снятия - версен+трипсин (9:1). В сравнительном аспекте роллерное культивирование монослойной линии ВНК-21 в 2,0-2,5 раза эффективнее стационарного при тех же затратах питательных сред и реактивов.

По отработанным технологическим параметрам стационарного культивирования на оптимальной ростовой питательной среде Игла MEM+199 провели накопление культуры клеток ВНК-21 в количестве 10 матрасов, 5-й пассаж, которую после трипсинизации использовали для закладки в лабораторную коллекцию клеток. Приготовили 45 криопробирок общим объемом 5,0 мл с культурой клеток ВНК-21 и криопротектором диметилсульфоксидом.

Подбор оптимальной питательной среды для суспензионной линии клеток ВНК-21 (cl-13) проводили из тех же питательных сред, что и для монослойного клона, но выращивание клеток проводили роллерным способом для лучшей оценки клеточного монослоя. При культивировании клеток ВНК-21 (cl-13) роллерным способом использовали посевную концентрацию клеток 10 млн.кл./рол. Инкубирование проводили при $+37^0 \text{ C}$ в термальной комнате, скорость вращения роллеров- 0,5–0,8 об/мин. Пассажи клеток проводили пересевом через 5 и 7 суток. В каждом опыте использовали по 3 роллерных флакона объемом 2 литра. Результаты исследований роста суспензионной перевиваемой линии клеток ВНК-21(cl-13) на некоторых испытываемых питательных средах представлены в таблице-1.

Таблица 1 – Данные исследования ростовых свойств клеток ВНК-21 (с1-13) при культивировании роллерным способом на некоторых испытуемых питательных средах

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток роллера, млн.кл. с	Выход клеток роллера, ср.знач., млн.кл. с	Индекс пролиферации
ДМЕМ*	14/6	120–200	157,8±30,94	8,5–19,0
ДМЕМ+ГЛА*	12/10	115–230	161,67±46,63	11,5–23,0
ЕМЕМ+ФГМ-С*	13/8	150–300	226,67±78,48	15–30
ЕМЕМ	10	95–140	126±28,54	9,5–14,0
ФГМ-С	5/4	100–160	143,33±27,08	10–16
ФГМ-С+ГЛА	8/10/12	165–320	228,33±65,35	16,5–32,0
ФГМ-С+ДМЕМ	6/17/14	250–350	290,0±36,40	25–35
ФГМ-С+ГЛА+ДМЕМ	10/14	270–450	340,0±73,05	27–40

* – базовый вариант культивирования $n=3$, $P < 0,05$

Как видно из таблицы 1, выход клеток и, соответственно, индекс пролиферации изучаемой суспензионной линии колеблется в довольно в широких интервалах. Использование модифицированных нами ферментативных сред ФГМ-С+ДМЕМ и ФГМ-С+ГЛА+ДМЕМ позволило значимо увеличить выход клеток в сравнении с базовым вариантом сред (до 290,0–340,0 ± 54,7 млн/мл), что подтверждает статистический инструмент анализа данных: двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями (t -статистика 3,68610 > t -критическое двустороннее 2,44691, и $P(T < =t)$ двустороннее 0,0102 < заданного уровня значимости $P=0,05$).

Стационарное культивирование клеток ВНК-21 (с1-13) на питательной среде ФГМ-С+ДМЕМ показало, что формирование монослоя клоном клеток с1-13 происходит быстрее, чем монослойной линией (ВНК-21). После формирования монослоя к 48 часам часть клеток ВНК-21(с1-13) начинала формировать обширные зоны роста сверху монослоя, часть клеток отторгалась в среду, где их размножение происходило неинтенсивно (единичные клетки). Культура клеток ВНК-21 при той же посевной концентрации образовывала полный монослой к 72-96 часам, а наслоение клеток практически отсутствовало при культивировании 5-суточными циклами. При накоплении клеток в матрасах объемом 650 мл ($S=175 \text{ см}^2$) получали выход клеток $43,3 \pm 6,2$ млн.кл./матр. (ИПА=12,0-16,2), в матрасах РУ объемом 1500 мл ($S \approx 260 \text{ см}^2$) выход составил $86,0 \pm 11,7$ млн.кл./матр. (ИПА=14,0-17,4). Следует отметить, что несмотря на небольшую разницу в численном выходе клеток ВНК-21 и ВНК-21 (с1-13), которые составили $81,0 \pm 9,5$ и $89,5 \pm 11,7$ млн.кл./матр., соответственно, ИПА у культуры ВНК-21(с1-13) при стационарном культивировании был выше в 1,5-2,5 раза.

Роллерное культивирование ВНК-21 (с1-13) проводили по технологии масштабирования в роллерных флаконах объемом 2,0 л ($S \approx 800 \text{ см}^2$), получали средние выходы $290,0 \pm 36,40$ млн.кл./рол., 3,0 л ($S \approx 1200 \text{ см}^2$) - $428 \pm 42,90$ и $535,0 \pm 65,3$ млн.кл./рол., с 4-х литровых сосудов ($S \approx 1600 \text{ см}^2$) (ИП=25,0-35,0). Дальнейшее направление масштабирования было связано с использованием 3-х литровых рифленых роллерных сосудов, которые при тех же объемах имеют в 2-3 раза большую площадь роста. В сравнительном аспекте роллерное культивирование клеток ВНК - 21(с1-13) в 3,0-3,5 раза эффективнее стационарного при тех же затратах питательных сред и реактивов (рисунок 2).



Рисунок 2 – Роллеры с культурой клеток ВНК-21(сl-13), объемом 2, 3, 4 литра

При культивировании клеток роллерным способом отработали посевную концентрацию клеток 10 млн.кл./2. рол. Подобраны оптимальные условия инкубирования: постоянная температура при $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в термальной комнате, скорость вращения роллеров 0,5–0,8 об/мин, модифицированная обогащенная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), кратность посева 1:15-1:25 или посевная концентрация 85-150 тыс.кл/мл, метод снятия клеток версен+трипсин (9:1). Пассажи клеток проводили как 5-ти, так и 7-ми суточными циклами пересевов.

По отработанным параметрам на оптимальной ростовой модифицированной питательной среде ФГМ-С+ДМЕМ (3:1) провели накопление культуры клеток ВНК-21(сl-13) в количестве 8 роллеров, 4-й пассаж, которую после трипсинизации использовали для закладки в лабораторную коллекцию клеток с криопротектором диметилсульфоксидом.

Для увеличения количественного выхода клеток с роллерного флакона мы использовали способность суспензионной культуры клеток ВНК-21(сl-13) реплицироваться одновременно в роллерном монослое и в суспензии питательной среды ФГМ-С+ДМЕМ (3:1). Для этого мы увеличили скорость вращения роллеров до 1,0–2,5 об/мин., довели объем питательной среды до 200 и 400 мл, при посевной концентрации клеток 100 тыс./мл, что стало основой двух опытных групп. При базовом варианте культивирования скорость вращения роллеров составляла 0,4–0,6 об/мин, объем питательной среды – 100 мл, посевная концентрация клеток – 100 тыс./мл. Контролем опыта служили роллеры с заполнением на 200 и 400 мл, со скоростью вращения 0,4–0,7 об/мин и посевной концентрацией клеток 100 тыс./мл.

Установлено, что максимальный выход клеток отмечался в опытной группе №2 при объеме заполнения роллеров 400 мл и скорости вращения до 1,5–2,5 об/мин., который в 3–5 раз был выше, чем в базовом варианте культивирования, и в 1,35 раза больше, чем в идентичной контрольной группе, но со скоростью вращения роллеров 0,4–0,7 об/мин (таблица-2).

Таблица 2 – Экспериментальные группы и результаты культивирования клеток ВНК-21(сl-13) роллерно-суспензионным методом

Экспериментальные группы	Объем заполнения, мл	Скорость вращения, об/мин	Выход клеток в монослое, млн.кл/рол	Выход клеток в суспензии, тыс.кл/мл*	Всего клеток в отношении к базовому варианту
Базовый вариант	100 мл	0,4–0,7	186,7±46,43	166,6±125,83	1,0 (100%)
Контроль №1	200 мл	0,4–0,7	200±40,82	680,7±125,29	1,5 и >
Опытная №1	200 мл	1,0–2,5	226,6±49,88	866,7±133,17	1,8 и >
Контроль №2	400 мл	0,4–0,7	246,7±57,35	913,3±331,26	2,8 и >
Опытная №2	400 мл	1,0–2,5	303,3±67,98	1590,5±461,38	4,3 и >

* – приведен выход клеток в логарифмической фазе роста $P < 0,05$

Из таблицы 2 видно, что максимальный выход клеток отмечался в опытной группе №2, который в 2,5–5 раз был выше, чем в базовом варианте, и в 1,35 раза больше, чем в идентичной контрольной группе №2. Максимальное общее количество клеток в этой группе с монослоя и суспензии достигало 940–1210 млн.кл/рол (рисунок-3), а в контрольной группе №2 на 260–410 млн. клеток меньше.

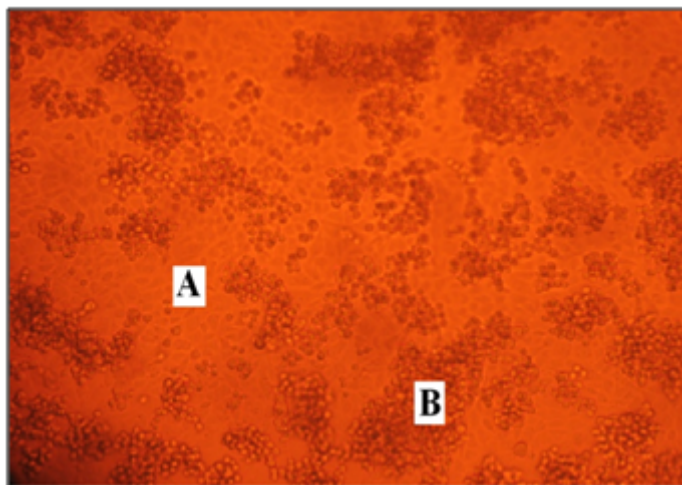


Рисунок 3 – Одновременный интенсивный рост клеток ВНК-21(сl-13) в монослое (А) и в суспензии (В) через 72 часа культивирования

Индекс пролиферативной активности составил: в опытных группах №1 и 2 – от 8,0 до 16,5; в контрольных группах №1 и 2 – от 7,5 до 14,0; в базовом варианте – 14,0–21,0 (что связано с наименьшей посевной концентрацией клеток, следовательно, сравнение ИПА является сугубо относительным). Жизнеспособность клеток во всех группах составляла 96–99%.

Кривые роста клеток ВНК-21(сl-13) в суспензии при роллерном монослойно-суспензионном культивировании по условиям выращивания клеток в опытной группе №2 представлены на рисунке 4.

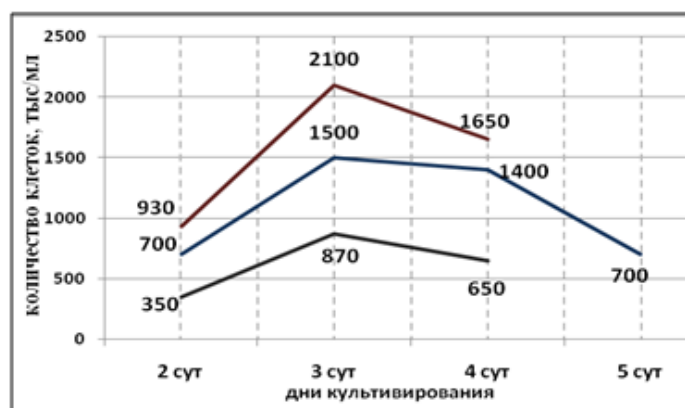


Рисунок 4 – Кривые роста клеток ВНК-21(сl-13) в суспензии при роллерном монослойно-суспензионном культивировании

По данным изучения роста клеток ВНК-21(сl-13) в суспензии (рисунок 4) был определен оптимальный срок получения биомассы клеток на пике логарифмического роста, который наблюдался через 72 часа культивирования. В последующие 24 часа рост замедлялся, переходил в стационарную фазу роста клеток с умеренным снижением количества клеток и резким снижением популяции клеток в период от 96 до 120 часов культивирования.

Решающими факторами, которые стимулировали пролиферативную активность клеток при роллерном монослойно-суспензионном способе культивирования клеток ВНК-21(сl-13), стали обороты вращения роллеров, увеличение объема культуральной жидкости

и посевной концентрации клеток. Увеличение оборотов способствовало лучшему газообмену и преимущественному размножению клеток в культуральной среде (в суспензии). Дополнительное количество питательной среды, коррелирующее с увеличением посевной концентрации, также способствовало усиленному росту клеток. Подобранный нами модифицированная обогащенная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ позволила получить максимальный выход клеточной массы при оптимизации условий культивирования клеток роллерно-суспензионным методом.

Данный метод культивирования позволяет сократить объем работ по накоплению клеток для заправки биореактора с 40 роллеров до 10, снижает расход питательных сред и реактивов более чем в 3 раза, а также дополняет свежеприготовленную питательную среду культуральной жидкостью, полученной после выращивания гомологичных клеток, образуя тем самым кондиционированную питательную среду.

Предложенный роллерно-суспензионный метод культивирования клеток ВНК-21(c1-13) позволяет получить выход клеток минимум в 2,7 раза выше, чем в базовом варианте культивирования, и может быть использован для накопления биомассы клеток. Полученные роллерно-суспензионным способом клетки ВНК-21(c1-13) были испытаны при загрузке биореактора для культивирования суспензионным способом.

Заключение.

1. Изучены оптимальные технологические параметры и условия проведения стационарного и роллерного способов выращивания монослойной линии клеток ВНК-21 и суспензионной культуры ВНК-21(c1-13), подобрана обогащенная модифицированная ростовая питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1) + D-глюкоза 4000 мг/л, + L-глутамин 150–300 мг/л и ростовая сыворотка крови КРС для максимального накопления клеток.

2. Отработаны оптимальные условия стационарного культивирования клеток ВНК-21: температура $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, 5-суточные циклы пересевов, питательная среда Игла МЕМ+199 или ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), кратность посева 1:7 или посевная концентрация 50–100 тыс.кл/мл, метод снятия клеток –версен+трипсин (9:1).

3. Подобраны оптимальные условия инкубирования линии ВНК-21(c1-13): постоянная температура при $+37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в термальной комнате, скорость вращения роллеров 0,5–0,8 об/мин, модифицированная обогащенная питательная среда ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), кратность посева 1:15-1:25 или посевная концентрация 85-150 тыс.кл/мл, метод снятия клеток –версен+трипсин (9:1).

4. Предложен роллерный монослойно-суспензионный метод культивирования для накопления биомассы клеток ВНК-21(c1-13) в роллерах для последующей заправки биореактора, позволяющий увеличить выход клеток в 2,5–5 раз по сравнению с базовым вариантом роллерного культивирования. При этом получали до 940–1210 млн.кл/ролл., культивируя клетки ВНК-21(c1-13) по разработанной схеме: исходная концентрация клеток – 100 тыс.кл/мл; объем среды – 400 мл/ролл; скорость вращения флаконов – 1,0–2,5 об/мин.

5. Проведено депонирование перевиваемых культур клеток ВНК-21 и ВНК-21(c1-13) в лабораторную клеточную коллекцию (низкотемпературное хранение -86°C и жидкий азот- 196°C), подготовлена технологическая инструкция по криоконсервированию перевиваемых культур клеток.

Список литературы

- 1 Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. -М.: «Мир», 1983. -263 с.
- 2 Блажевич О.В. Культивирование клеток. -Мн.: «БГУ», 2005. -78 с.
- 3 Дьяконов Л.П., Ситков В.И. Животная клетка в культуре.-М.: «Спутник», 2000. -400 с.
- 4 Дьяконов Л.П. Культивирование клеток и тканей животных. -Ставрополь.: «Правда», 1988. -91 с.
- 5 Алмагамбетов К.Х. Основы биотехнологии [Электронный ресурс].– 2006. –URL: <http://biotechnolog.ru.kz/stst-2006.htm> (дата обращения:20.06.2013)
- 6 Фрешни Р. Культура животных клеток. -М.: «Мир» 1989. -318 с.
- 7 Бальшев В.М., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф. Разработка и использование вирусвакцины против оспы овец сухой культуральной//Производство и контроль медицинских ветеринарных препаратов, опыт применения и реализации их в странах СНГ: Тезисы докладов конференции. –Вольгинский, 1999. - 22 с.

- 8 Достоевский П.П., Судаков Н.А., Атамас В.А. Справочник ветеринарного врача. – К.: «Урожай», 1990. 784 с.
- 9 Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: «Колос», 1998. 928 с.
- 10 Жавненко В.М. Практикум по вирусологии. – Минск.: «Дизайн», 1998. 144 с.
- 11 Госманов Р.Г., Колычев Н.М. Ветеринарная вирусология. – М.: «Колос», 2006. 288 с.

И. А. Пунтус¹, К.Н. Жасланова², Г.М. Салхожаева³, М.К. Тыныкулов⁴, К.М. Уразов⁵

^{1,2,5} «Biotron Group» ЖШС, Степногор, Қазақстан

^{3,4} Биотехнология және микробиология кафедрасы, Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

ВНК-21 жасуша линияларын өсіруде қолайлы технологиялық параметрлер

Аннотация. Мақалада ВНК-21 және ВНК-21(cl-13) жасушалар желілерін тұрақты, роллерлік, роллерлік моноқабатты-суспензиялық әдістермен өсіру нәтижелері берілген.

Жасушаларды өсірудің қолайлы технологиялық параметрлері келтірілген және зерттелетін жасуша линияларын өсіруде модификацияланған байытылған қоректік орталары таңдап алынған. Жасушаларды өсіру процесін масштабтау аспектілері қарастырылған.

ВНК-21(cl-13) желісін инкубациялаудың қолайлы шарттары таңдап алынды: қолайлы температура $+37 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ жылы бөлмеде, роллерлердің айналу жылдамдығы 0,5–0,8 айн/мин, модификацияланған байытылған қоректік орта ФГМ-С+ДМЕМ (3:1), егу жиілігі 1:15–1:25 немесе егу концентрациясы 85–150 мың.кл/мл, жасушаларды алу әдісі – версен+трипсин (9:1). Роллерде ВНК-21(cl-13) жасушаларының биомассасын жинақтауға арналған роллерлік моноқабатты-суспензиялық әдіс ұсынылды.

Түйін сөздер. ВНК-21 және ВНК-21(cl-13) жасушалар желілері, стационарлы, роллерлі, роллерлік моноқабатты-суспензиялық әдістер, модификациялау, вакцина, культура, титр, моноқабат, инкубация.

I.A. Puntus¹, K.N. Zhaslanova², G.M. Salkhozhayeva³, M.K. Tynykulov⁴, K.M. Urazov⁵

^{1,2,5} LLP “Biotron Group” Stepnogorsk, Kazakhstan

^{2,3} Department of Microbiology and Biotechnology of L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

The optimal technological parameters of cultivation of the cell line VNK-21

Abstract. The article presents the results of cultivation of cell lines VNK-21 and VNK-21(cl-13) stationary, roller, roller monolayer-suspension methods. Optimal technological parameters of cell cultivation are given and growth modified enriched nutrient media are selected for the tested cell lines. Aspects of scaling the process of cell culture are considered.

The optimal incubation conditions of the VNK-21(cl-13) line were selected: constant temperature $+37 \pm 0.1^{\circ} \text{C}$ in the thermal room, roller rotation speed 0.5–0.8 rpm, modified enriched nutrient medium FGM-C+DMEM (3:1), sieving multiplicity 1:15–1:25 or sowing concentration 85–150 thousand CL/ml, cell removal method - versin+trypsin (9:1). A roller monolayer-suspension cultivation method is proposed for accumulation of biomass of VNK-21(cl-13) cells in rollers.

Keywords. VNK-21 and VNK-21(cl-13) cell lines, stationary, roller, roller monolayer-suspension methods, modification, vaccine, culture, titer, monolayer, incubation.

References

1. Adams R. Metody kultury kletok dlya biohimikov [Cell culture Methods for biochemists], (Mir, Moscow, 1983).
2. Blajevich O.V. Kultivirovanie kletok [Cultivation of cells], (BGЭ, Minsk, 2005).
3. Diakonov L.P., Sitkov V.I. Jivotnaya kletka v kulture [Animal cell in culture], (Sputnik, Moscow, 2000).
4. Diakonov L.P. Kyktivirovanie kletok i tkanei jivotnyh [Cultivation of cells and tissues of animals], (Pravda, Stavropol, 1988).
5. Almagambetov K.H. Osnovy biotekhnologii [Fundamentals of biotechnology], Elektronnyi resurs [Electronic resource], (2006). Available at: <http://biotechnolog.ru>. (Accessed: 20.06.2013).
6. Freshni R. Kylytra jvyotnyh kletok [Culture of animal cells] (Mir, Moscow, 1989).
7. Balyshev V.M., Zhesterev V.I., Gorshkova T.F. Razrabotka i ispol'zovanie virusvacciny protiv ospy ovec suhoj kul'tural'no'j proizvodstvo i kontrol' medicinskih veterinarnyh preparatov, opyt primeneniya i realizacii ih v stranah SNG [Development and use of virus vaccine against sheep smallpox dry cultural, Proizvodstvo i kontrol' medicinskih veterinarnyh preparatov, opyt primeneniya i realizacii ih v stranah SNG [Production and control of veterinary drugs, experience of their application and implementation in the CIS countries]. Abstracts of the conference (Vol'ginskij, 1999, p. 22.).
8. Dostoevskij P.P., Sudaakov N.A., Atamas V.A. Spravochnik veterinarnogo vracha [Manual of a veterinary] (Urozhaj, Moscow, 1990).
9. Syurin V.N., Samujlenko A.YA., Solov'ev B.V., Fomina N.V. Virusnye bolezni zhivotnyh [Viral diseases of animals] (Kolos, Moscow, 1998).
10. Zhavnenko V.M. Praktikum po virusologii [Workshop on virology] (Dizajn, Minsk, 1998).
11. Gosmanov R.G., Kolychev N.M. Veterinarnaya virusologiya [Veterinary Virology] (Kolos, Moscow, 2006).

Сведения об авторах:

Пунтус И.А. - заведующий лабораторией культур клеток ТОО "Biotron Group", Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Казахстан.

Жасланова К.Н. - вирусолог ТОО "Biotron Group", Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Казахстан.

Салхожаева Г.М. – кандидат биологических наук, Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Мунайтпасова, 13, корпус № 3, Нур-Султан, Казахстан.

Тынкыкулов М.К. -кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель, Евразийский национальный университет имени Л.Н.Гумилева, Мунайтпасова, 13, корпус № 3, Нур-Султан, Казахстан.

Уразов К. М. – старший вирусолог ТОО "Biotron Group", Пром. зона 4, корпус 7, Степногорск, Казахстан.

Puntus I. A. – "Biotron Group" LLP, head of the laboratory of cell cultures, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Zhaslanova K.N. – "Biotron Group" LLP, virologist, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Salkhzhayeva G. M. – candidate of biological sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaytpasov 13, building №3, cab. 234, Nur-Sultan, Kazakhstan,

Тынкыкулов М. К.- candidate of agricultural sciences, senior lecturer, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaytpasov 13, building №3, cab. 234, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Urazov. K.M. – "Biotron Group" LLP, senior virologist, Ind. zone 4, building 7, Stepnogorsk, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 27.01.2020