



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47503** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
**C12N 5/07**  
**G01N 21/64**  
**C12N 5/071**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ МІЧЕННЯ КЛІТИН ПРИ ДОВГОСТРОКОВОМУ КУЛЬТИВУВАННІ

1

2

(21) u200908039

(22) 30.07.2009

(24) 10.02.2010

(46) 10.02.2010, Бюл.№ 3, 2010 р.

(72) ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ГОНЧАРУК ОЛЕНА ІВАНІВНА, ПАВЛОВИЧ ОЛЕНА ВОЛОДИМИРІВНА, ВОЛКОВА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, ПЕТРЕНКО ТЕТЯНА ПИЛИПІВНА

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб мічення клітин при довгостроковому культивуванні, що включає використання зонда карбоціанінового ряду, який **відрізняється** тим, що як такий зонд використовують зонд JC-1.

Корисна модель належить до галузі клітинної біології і може бути використана для дослідження функціонального стану клітин при культивуванні.

Відомий спосіб мічення клітин при довгостроковому культивуванні, де для дослідження пролиферації лейкоцитів та гематопоетичних клітин використовують люмінесцентний зонд карбоціанінового ряду PKH-26 [1].

Недоліком цього способу є те, що він не дає інформації про функціональний стан мічених клітин та потребує використання допоміжних речовин, таких як, Diluent B або C, що ускладнює його застосування.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб мічення мезенхімальних клітин косткового мозку, в якому для мічення використовують зонд карбоціанінового ряду CM-Dil (хлорометилбензамідодіалкілкарбоціанін) [2].

Недоліком цього способу мічення є те, що при культивуванні відбувається частковий перехід барвника із забарвленої клітини в клітину незабарвлену, внаслідок чого неможливо сокультивування різних клітинних ліній зі здійсненням контролю за забарвленими клітинами.

В основу корисної моделі поставлена задача створити такий спосіб мічення клітин при довгостроковому культивуванні, в якому б, шляхом заміни зонду, забезпечувалась можливість здійснення довгострокового сокультивування забарвлених та незабарвлених культур клітин.

Ця задача вирішується тим, що в способі мічення клітин при довгостроковому культивуванні, що включає застосування зонду карбоціанінового ряду, згідно з корисною моделлю як такий зонд використовують зонд JC-1.

Цей зонд має хімічну формулу 5,6-діхлор-2-[(E)-3-(5,6-діхлор-1,3-діетіл-2,3-дігідро-1H-бензоімідазоліден-2)-1-пропеніл]-1,3-діетил-3H-бензоімідазоліл-1 йодид і використовується для вимірювання мітохондріального мембранного потенціалу клітин [3].

При використанні зонду JC-1 виключається перехід барвника із клітини в клітину, що дає можливість використання його для контролю поведінки окремих клітин в культурі при сокультивуванні різних клітинних ліній.

Спосіб здійснюють таким чином.

Клітини інкубують з розчином зонду JC-1 в кінцевій концентрації  $10^{-5}$  моль/л протягом 15 хвилин з подальшим відмиванням. Після відмивання суспензію клітин довгостроково культивують сумісно з клітинною лінією, що не забарвлена, у вигляді моношарових культур. Культивування проводять з використанням стандартних умов культивування з подальшою ідентифікацією клітин методами люмінесцентної мікроскопії. У випадку проведення експериментів in vivo можливе нанесення забарвлених клітин на експериментальну рану у лабораторних тварин.

Приклад 1. Використовували  $1 \times 10^6$  клітин диплоїдної лінії фібробластів людини. Суспензію клітин фібробластів людини інкубували з розчином зонду JC-1 в кінцевій концентрації  $10^{-5}$  моль/л протягом 15 хвилин. Після цього барвник, що не зв'язався, видаляли шляхом однократного центрифугування з додаванням розчину Хенкса (Sigma) 1:9. Забарвлені зондом клітини культивували при 37°C і 5%-ному вмісті CO<sub>2</sub>. Клітини культивували сумісно з клітинною лінією нирки свині, що перевидається (СПЕВ) в середовищі Ігла ДМЕМ (Sigma) з

(19) **UA** (11) **47503** (13) **U**

додаванням 10% FCS (HyClone). Термін культивування становив 5-10 днів, під час якого проходило 4-8 подвоєнь клітин. Оцінку наявності барвника в клітинах проводили за допомогою конфокального флуоресцентного мікроскопа Carl Zeiss, при збудженні на 405nm або інвертованого флуоресцентного мікроскопа Olympus IX71 з цифровою камерою Olympus C-5060 при полосі збудження 450-490nm.

На Фіг. 1, 2 показано, що при сумісному культивуванні клітин культури фібробластів, мічених зондом JC-1, з незабарвленими клітинами СПЕВ перехід барвника з мічених в немічені клітини не відбувається. Це дає можливість здійснювати моніторинг окремої клітинної лінії

При сумісному культивуванні міченої культури СПЕВ та неміченої культури фібробластів також

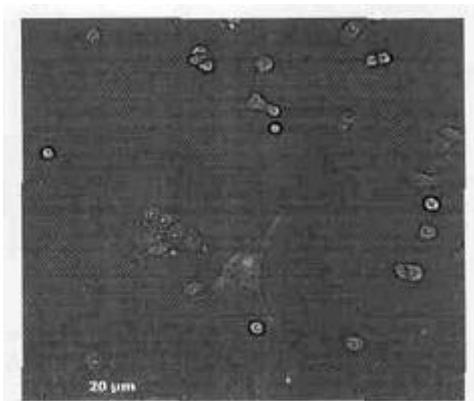
не спостерігається перехід зонду в немічені клітини (Фіг.3, 4).

Джерела інформації:

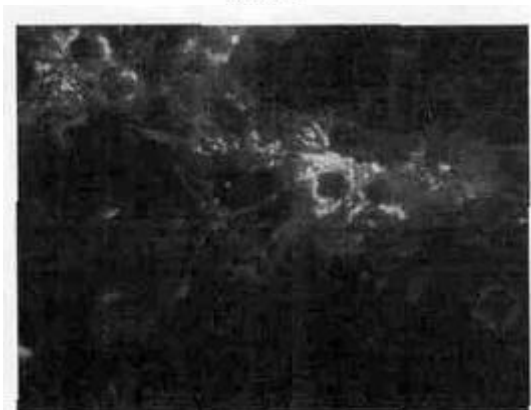
1. Usefulness of PKH fluorescent labelling to study leukemic cell proliferation with various cytostatic drugs or acetyl tetrapeptide - AcSDKP. - Boutonnat J., Faussat A. et al; BMC Cancer. 2005. - Vol. 5. - P. 120.

2. Kruij M.C., De Bruijn J., Veenhof M., Oner F.C., et al. Application and limitations of chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine for tracing cells used in bone tissue engineering // Tissue Engineering. - 2003, - Vol.9. - N1. - P.105-115.

3. Reers, M., Smith, T.W., and Chen, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. - Biochemistry. - 1991. - 30. - P. 4480-4486.



Фіг. 1



Фіг. 2

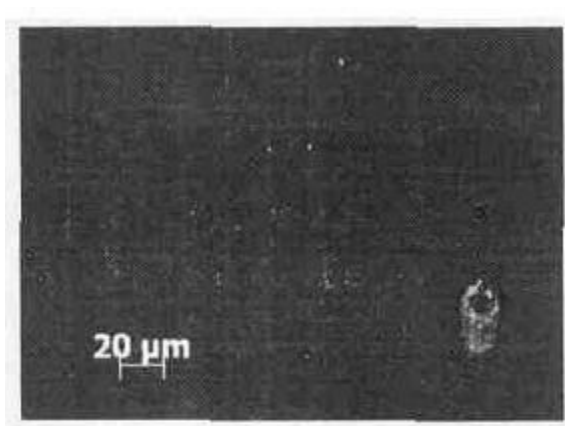


Fig. 3

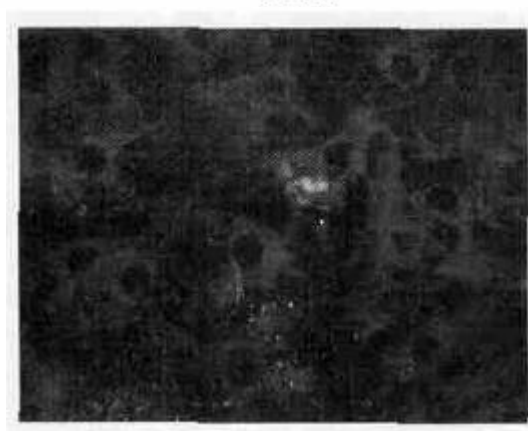


Fig. 4