

Utvrđivanje autentičnosti staničnih linija analizom kratkih ponavljajućih sljedova STR profil

Galeković, Mia

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:768755>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mia Galeković

**UTVRĐIVANJE AUTENTIČNOSTI
STANIČNIH LINIJA ANALIZOM
KRATKIH PONAVLJAJUĆIH
SLJEDOVA – STR PROFIL**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Mia Galeković

**UTVRĐIVANJE AUTENTIČNOSTI
STANIČNIH LINIJA ANALIZOM
KRATKIH PONAVLJAJUĆIH
SLJEDOVA – STR PROFIL**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA i Laboratoriju za kulturu tkiva pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskoga fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić.

Rad sadrži: četrdeset (40) listova, četiri (4) tablice i četiri (4) slike.

Zahvala

Za početak, željela bih zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Mišković Špoljarić na pruženoj pomoći, uloženom vremenu i strpljenju. Također, željela bih zahvaliti i svim zaposlenicima na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju kao i svima koji su na neki način pridonijeli pisanju ovoga završnog rada.

Zahvaljujem i svojim roditeljima, bližnjima i prijateljima na neizmjerljivoj potpori koju mi pružaju ne samo sada pri pisanju završnog rada, već i tijekom cijeloga mogega obrazovanja.

POPIS KRATICA

| | |
|-----------------|---|
| ADO | alel drop-out |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| Caco-2 | stanična linija kolorektalnog karcinoma |
| CCRF-CEM | stanična linija iz periferne krvi u stanju akutne limfoblastične leukemije |
| CLIMA | Cell Line Integrated Molecular Authentication |
| CODIS | Combined DNA Index System |
| DNK | deoksiribonukleinska kiselina |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| FBI | Federal Bureau of Investigation |
| HeLa | stanična linija adenokarcinoma cerviksa |
| HPLC | visoko učinkovita tekućinska kromatografija (eng. High performance liquid chromatography) |
| HT-29 | stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma |
| K-562 | stanična linija iz koštane srži u stanju kronične mijeloične leukemije |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OL | off-leader |
| PCR | lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase chain reaction) |
| STR | kratki ponavljajući sljedovi (eng. Short tandem repeat) |
| SW620 | stanična linija metastaze kolorektalnog adenokarcinoma |

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. STANIČNE LINIJE | 1 |
| 1.2. UNAKRSNA KONTAMINACIJA STANIČNIH LINIJA | 2 |
| 1.3. AUTENTIFIKACIJA STANIČNIH LINIJA – STR PROFILIRANJE | 3 |
| 1.4. KAPILARNA ELEKTROFOREZA | 5 |
| 2. CILJ RADA | 7 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 8 |
| 3.1. USTROJ STUDIJE | 8 |
| 3.2. MATERIJAL..... | 8 |
| 3.2.1. <i>Stanične linije</i> | 8 |
| 3.2.2. <i>Kemikalije</i> | 9 |
| 3.3. METODE..... | 10 |
| 3.3.1. <i>Određivanje broja živih stanica u kulturi</i> | 10 |
| 3.3.2. <i>Izolacija DNK</i> | 11 |
| 3.3.3. <i>Mjerenje koncentracije DNK</i> | 12 |
| 3.3.4. <i>Amplifikacija DNK lančanom reakcijom polimerazom (PCR)</i> | 13 |
| 3.3.5. <i>Kapilarna elektroforeza</i> | 15 |
| 3.3.6. <i>Uspoređivanje dobivenih STR profila s bazom podataka</i> | 15 |
| 3.4. STATISTIČKE METODE..... | 17 |
| 4. REZULTATI | 18 |
| 5. RASPRAVA | 25 |
| 6. ZAKLJUČAK | 28 |
| 7. SAŽETAK | 29 |
| 8. SUMMARY | 30 |
| 9. LITERATURA | 31 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 34 |

1. UVOD

Kontinuirane stanične linije dobro su utvrđeni modeli za proučavanje raznih zdravstvenih stanja, posebice malignih oboljenja. Međutim, treba biti oprezan i svjestan mogućih problema kontaminacije kada se koriste kontinuirane stanične linije (1). Problem unakrsne kontaminacije, koji je prvi puta uočen još pedesetih godina 20. stoljeća, prisutan je i danas, a nastaje kao rezultat onečišćenja jedne stanične linije drugom ili mikroorganizmom. Mnogo staničnih linija biva kontaminirano vrlo rano te se u tom slučaju istraživanje zapravo provodi na kontaminantu koji je zamijenio tu staničnu liniju te se od tog trenutka skriva pod njezinim imenom (1). U današnje vrijeme, unatoč brojnim saznanjima o samom postupku utvrđivanja autentičnosti staničnih linija, unakrsna kontaminacija i pogrešna identifikacija staničnih linija još su uvijek golem i, često, nerješiv problem brojnih istraživanja (1,2). Onečišćenje stanične linije ima dalekosežne posljedice na rezultate znanstvenih istraživanja. Stoga su osmišljeni brojni testovi pomoću kojih se utvrđuje jesu li stanične linije uistinu autentične te kao takve ispravne za korištenje u samom istraživanju što onda u konačnici znači dobivanje relevantnih rezultata koji su cilj svakog istraživanja.

1.1. Stanične linije

Stanične kulture jesu kulture dobivene postupkom izuzimanja stanica iz životinja ili biljaka primjenom enzimatskih, mehaničkih ili kemijskih postupaka razdvajanja, odnosno izolacije te njihovim daljnjim rastom u specifičnim, njima prilagođenim uvjetima (3). Stanice mogu biti izuzete iz tkiva izravno ili mogu biti izvedene iz već uspostavljene stanične linije, odnosno staničnog soja (3). Razlikuju se primarne i sekundarne stanične kulture. Primarna stanična kultura dobiva se iz stanica, tkiva ili organa uzetih izravno iz organizma i naziva se primarnom kulturom sve do prve subkultivacije, odnosno presađivanja. Jednom kada je primarna kultura subkultivirana, ona postaje sekundarnom staničnom kulturom, odnosno staničnom linijom. Stanične se linije, nadalje, mogu podijeliti na konačne i kontinuirane stanične linije. Konačne stanične linije imaju ograničen životni vijek te prolaze kroz točno određen broj generacija (4). S druge strane, kontinuirane su stanične linije transformirane i besmrtni i kao takve imaju sposobnost beskonačne proliferacije, bržeg rasta te im nedostaje svojstvo kontaktne inhibicije zbog čega mogu rasti jedna preko druge (3,5). Upravo zbog tih osobina, kontinuirane stanične linije našle su svoje mjesto u brojnim istraživanjima koja opisuju tematiku zdravlja i bolesti te su zbog svoje učinkovitosti postale modelom ispitivanja

normalnih staničnih procesa, ali i raznih patogenih stanja (1). Kontinuirane stanične linije osobito su privlačne studijama o raku te prvenstveno služe kao modeli za proučavanje malignih stanja (1). Jedna od najpoznatijih staničnih linija koja se koristi u te svrhe, a ujedno je i jedna od najpoznatijih staničnih linija općenito, jest HeLa stanična linija. Ona je značajna zbog toga što dokazano uzrokuje adenokarcinom cerviksa (rak vrata maternice), zbog čega je i postala modelom istraživanja upravo tog tipa raka (6). Ipak, unatoč svim tim prednostima, kada govorimo o staničnim linijama, vrlo je važno obratiti pozornost na mogućnost nehotične kontaminacije stranom staničnom linijom ili mikroorganizmom, s čime se sve češće susrećemo upravo pri radu s kontinuiranim staničnim linijama (1).

1.2. Unakrsna kontaminacija staničnih linija

Unakrsna kontaminacija jest kontaminacija jedne stanične linije drugom, stranom staničnom linijom, te je ona, uz kontaminaciju mikroorganizmima, vodeći problem s kojim se danas sve češće susrećemo pri radu sa staničnim kulturama (7). Studije pokazuju da udio kontaminiranih staničnih linija iznosi između 16 i 35 % (8). Unakrsna kontaminacija jedne stanične linije drugom staničnom linijom ponekad može dovesti do zamjene originalne stanice kontaminirajućom staničnom tvari, i to pogotovo u slučajevima kada kontaminirajuća stanična linija raste brže od one originalne (5). Općenito, unakrsna kontaminacija definira se i s obzirom na vrijeme javljanja u staničnoj kulturi, stoga postoje „rana“ i „kasna“ kontaminacija. Kada do kontaminacije dođe odmah na početku, tada nije moguće pronaći ostatke originalne stanične linije. Kontaminant u potpunosti prerasta originalnu staničnu liniju prije nego što je ona uopće postojala samostalno te je u tom slučaju riječ o „ranoj“ unakrsnoj kontaminaciji (9). S druge strane, kada do kontaminacije dođe kasnije, nakon što su originalne stanice jedno vrijeme ipak postojale i rasle samostalno, tada je, unatoč tomu što je kontaminant u konačnici prerastao originalne stanice, još uvijek moguće pronaći bar dijelove originalne stanične tvari, a tada je riječ o „kasnoj“ unakrsnoj kontaminaciji (9). Nažalost, u laboratorijima diljem svijeta uglavnom se javlja „rana“ kontaminacija te unakrsne kontaminacije ako se i dogode, dogode se upravo u tom prvom stadiju dok originalne stanične linije nisu ni postojale samostalno kao takve što kontaminirajućim staničnim tvarima daje priliku da otpočetak i u potpunosti prerastu originalnu staničnu liniju. Upravo je zbog te činjenice zapravo vrlo lako moguće pogrešno identificirati staničnu liniju, odnosno zamijeniti ju kontaminirajućom zbog toga što su prilikom identifikacije vidljive samo one. Neželjene kokulture i rast više različitih staničnih tipova unutar jednog medija mogu predstavljati velik problem u smislu ugrožavanja kvalitete

rezultata istraživanja što za posljedicu ima nastanak medicinski neispravnog proizvoda koji se ne smije upotrebljavati zato što svaka stanična linija, kao i njezin proizvod, mora biti u potpunosti „čista“ od svih vrsta kontaminirajućih tvari, uključujući i prisutnost druge stanične linije (7). Vrlo je teško odrediti točan razlog i trenutak u kojem se dogodila sama kontaminacija, ali se vjeruje da su pogreške u samoj tehnici izvođenja različitih pokusa na staničnim linijama, dijeljenje istih medija i reagensa među različitim vrstama stanica i nedovoljno pročišćen zrak, koji u tom slučaju može prenijeti različite stanice i mikroorganizme i tako kontaminirati staničnu liniju, potencijalni uzročnici kontaminacije (1). Zatim, jedan od mogućih razloga kontaminacije može biti i fizička zamjena dviju staničnih linija uslijed nepažljivog rukovanja pri čemu se, najčešće, stanične linije pogrešno označe i zbog toga zamijene (1). Pogreške u manipulaciji uglavnom postanu vidljive tek nekoliko godina kasnije, kada drugi istraživač pokuša iskoristiti te iste, kontaminirane stanične linije u svojem istraživačkom radu i dobije rezultate koji nisu relevantni zbog neprovjerene autentičnosti stanične linije (10). Kako bi se to izbjeglo, postoji etičko pravilo koje nalaže kako istraživači ne bi trebali osobno koristiti ni predlagati drugim istraživačima korištenje određenih staničnih linija bez dopuštenja osobe koja je prva provela istraživanje s tom staničnom linijom za koju je prije samog istraživanja provela postupak autentifikacije zbog čega sa sigurnošću može tvrditi kako je ta stanična linija autentična te kao takva spremna za korištenje u istraživačke svrhe (10). Upravo je iz tih razloga, a sve kako bi se istraživačima olakšalo korištenje staničnim linijama, sastavljen popis najčešće kontaminiranih staničnih linija na kojem se za sada nalazi 360 staničnih linija koje su uglavnom humanog podrijetla (1). Ono što je zajedničko većini staničnih linija na tom popisu jest ista kontaminirajuća tvar, a riječ je o HeLa staničnoj liniji koja se nalazi u čak 29 % slučajeva kontaminacije, odnosno kontaminira 106/360 staničnih linija na tom popisu (1). HeLa je stanična linija od uspostave 1951. godine do danas kontaminirala više od 90 drugih staničnih linija, zbog čega i jest smatrana vodećom kontaminirajućom staničnom linijom općenito (1,8).

1.3. Autentifikacija staničnih linija – STR profiliranje

Utvrđivanje izvornosti stanične linije, odnosno autentifikacija predstavlja skup postupaka kojima se utvrđuje identitet stanične linije i potvrđuje da je linija „slobodna“ od druge stanične linije i/ili mikroorganizama.

Iako postoje različite metode autentifikacije, trenutačna metoda izbora i „zlatni standard“ u postupku autentifikacije jest analiza kratkih ponavljajućih sljedova deoksiribonukleinske kiseline (eng. deoxyribonucleic acid - DNA), poznatija kao STR profiliranje (11). Kratki ponavljajući sljedovi (eng. short tandem repeat - STR) osiguravaju kvalitetu i cjelokupnost humanih staničnih linija zbog čega su jedni od najčešće korištenih markera u humanom genomu (12). Mikrosateliti u humanom genomu dopuštaju identifikaciju pojedinačne stanice na razini DNK (13). Prema preporuci ATCC-a, za potvrdu autentičnosti staničnih linija potrebno je odrediti minimalno osam STR markera (lokusa), a preporučeni su markeri: D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO i amelogenin (12). Amelogenin je najpogodniji biljeg za određivanje spola u uzorcima humanog podrijetla (13). Analiza STR markera omogućuje razlikovanje između pojedinaca s granicom razlučivosti $1 - 10^8$ koja se povećava i do 10^{18} kombinacijom 17 STR lokusa i amolegenina (8,12). STR je profiliranje jednostavna, jeftina i prije svega pouzdana molekularna metoda autentifikacije (8). Danas se u laboratorijima diljem svijeta rutinski analiziraju kratki ponavljajući sljedovi koji uobičajeno sadrže 2 – 7 parova baza te se najviše koriste u svrhu same identifikacije (14). Analiza kratkih ponavljajućih sljedova DNK podrazumijeva simultanu amplifikaciju multipli (8-15) autosomalnih STR lokusa i amelogenina primjenom fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih početnica (12,15). Identifikaciju spola ispitivanog DNK uzorka omogućava amplifikacija amelogenina na X - kromosomu pri čemu nastaje ampikon veličine 106 parova baza, dok umnažanjem amelogeninskog odsječka Y - kromosoma nastaje fragment veličine 112 parova baza (13). Nakon umnažanja sekvence lančanom reakcijom polimerazom (eng. polymerase chain reaction - PCR), dobiveni PCR odsječci razdvajaju se kapilarnom elektroforezom. Veličina razdvojenih PCR fragmenata određuje se usporedbom s postojećim standardima poznate veličine i služi za identifikaciju alelnih varijanti pojedinih STR lokusa koje se imenuju brojem koji opisuje broj nukleotidnih ponavljanja u pojedinom PCR odsječku. Na temelju dobivene kombinacije alelnih varijanti moguće je izraditi osnovni genetički profil ispitivane stanične linije koji se, u konačnici, koristi za izradu referentnih baza podataka (8,12). Upravo je ta različitost u broju kratkih nukleotidnih ponavljanja unutar pojedinog lokusa ono što STR profiliranje čini toliko vrijednim DNK identifikacijskim sredstvom (16). Izrada takvih baza podataka uvelike olakšava svaku sljedeću analizu STR profila budući da je u tom slučaju dostatno samo usporediti genetički profil ispitivane stanične linije s njezinim profilom unutar referentne baze podataka te tako provjeriti je li riječ uistinu o imenovanoj staničnoj liniji. Koristeći se odgovarajućim algoritmom, baze podataka uspoređuju traženi uzorak sa svim dostupnim STR profilima koje sadrže te na osnovi toga

sastavljaju popis svih staničnih linija koje se u određenom udjelu podudaraju s ispitivanom staničnom linijom (17). Budući da je gotovo nemoguće pronaći dvije identične stanične linije kod kojih će podudarnost iznositi 100 %, važno je tražiti stanične linije sa sličnim STR profilima, odnosno studije bi se složile da se već podudarnost od 80 % može smatrati prikladnom za potvrđivanje autentičnosti određene stanične linije (1). Znajući da je unakrsna kontaminacija velik problem s kojim se nerijetko susreću brojni istraživači diljem svijeta, potrebno je odrediti autentičnost svake stanične linije prije samog početka korištenja. Tek kada analiza autentičnosti kontinuiranih staničnih linija postane dio svakodnevne prakse, moći će se očekivati smanjenje učestalosti pojave kontaminacije staničnih linija. Primjena standardiziranih tehnika autentifikacije omogućuje bolje povezivanje izvora stanične linije među svim korisnicima i ponovljive istraživačke rezultate.

1.4. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza jest metoda visoke razlučivosti koja svoju primjenu nalazi u velikom broju raznolikih analitičkih postupaka. Temelji se na usmjerenom gibanju električno nabijenih molekula kroz potporni medij, u uskoj cjevčici, odnosno kapilari promjera 25 - 100 μm , pod utjecajem električnog polja jakosti do 500 V/cm (18,19). Navedeni uvjeti osiguravaju razdvajanje i analizu različitih vrsta molekula, od najmanjih ionskih vrsta, do velikih polimernih molekula. U odnosu na visokotekućinsku kromatografiju i plinsku kromatografiju, kapilarna elektroforeza ima nekoliko prednosti, uključujući visoku učinkovitost razdvajanja velikog broja molekula u kratkom vremenskom periodu, smanjenu zahtjevnost u pogledu volumena uzorka, potrošnih otapala i materijala, velik izbor selekcijskih parametara te široku lepezu aplikativnih uređaja (18).

Uzorak se nanosi na ulaznom kraju kapilare te se nabijene čestice gibaju duž kapilare i razdvajaju pod utjecajem električnog napona na temelju razlike u veličini i naboju, a na drugom se kraju kapilare nalazi detektor koji bilježi prolazak umnoženih odsječaka STR lokusa koji su vezanjem početnica tijekom PCR reakcije ostali fluorescentno obilježeni (19). Ta se metoda najčešće koristi za otkrivanje nukleinskih kiselina. Svoju primjenu našla je, između ostalog, i u analizi genetičkog profila staničnih linija, odnosno utvrđivanju STR profila. Amplikoni dobiveni PCR metodom analiziraju se metodom kapilarne elektroforeze uz primjenu internog standarda koji služi za identifikaciju alelnih varijanti ispitivanih STR lokusa. Baze STR profila zapravo služe za utvrđivanje autentičnosti stanične linije, bila ona

UVOD

novouspostavljena ili već postojeća, dobro poznata i opisana (8). Rezultat se analize prikazuje u obliku elektroferograma, uspoređuje s bazom podataka te se određuje udio podudarnosti između staničnih linija i baze STR profila, na osnovu čega je onda moguće odrediti autentičnost određene stanične linije.

2. CILJ RADA

Ciljevi su ovoga rada:

- ❖ utvrditi autentičnost šest staničnih linija uzgojenih *in vitro* metodom analize kratkih ponavljajućih sljedova – STR profiliranjem te
- ❖ odrediti udio podudarnosti elektroferograma s ATCC-ovom bazom podataka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Riječ je o temeljnom, kvalitativnom istraživanju i o stručnoj studiji.

3.2. Materijal

3.2.1. Stanične linije

Analizirane stanične linije materijal su koji se koristi u znanstveno-istraživačke i obrazovne svrhe Laboratorija za kulturu stanica Medicinskog fakulteta Osijek. Stanične su linije:

- ❖ HeLa (ATCC®CCL-2™) – jedna od najpoznatijih staničnih linija, epitelne morfologije, izolirana iz adenokarcinoma cerviksa; značajna zbog toga što je potvrđeno da sadrži HPV-18 sekvence poznate kao uzrok adenokarcinoma cerviksa;
- ❖ HT-29 (ATCC®HTB-38™) – stanična linija izolirana iz kolorektalnog adenokarcinoma; osim što je značajna u procesu praćenja progresije kolorektalnog karcinoma, posebnu pozornost izazvala je i u studijama o probavi i apsorpciji hranjivih tvari;
- ❖ CCRF-CEM (ATCC®CCL-119™) – stanična linija strukture T-limfoblasta izolirana iz periferne krvi u stanju akutne limfoblastične leukemije;
- ❖ K-562 (ATCC®CCL-243™) – stanična linija izolirana iz koštane srži osobe oboljele od kronične mijeloične leukemije (CML); zbog svoje iznimne osjetljivosti, koristi se u *in vitro* testiranjima kao meta NK stanica;
- ❖ SW620 (ATCC®CCL-227™) – stanična linija epitelne morfologije, predstavlja metastazu kolorektalnog adenokarcinoma izoliranu iz limfnog čvora; služi za promatranje genetskih promjena u progresiji kolorektalnog karcinoma i model je za apsorpciju različitih hranjivih tvari;
- ❖ Caco-2 (ATCC®HTB-37™) - stanična linija izolirana iz kolorektalnog adenokarcinoma, također epitelne morfologije; iako je stanična linija tumorigenična, pri određenim uvjetima uzgoja, pri postizanju konfluencije, stanice se spontano diferenciraju u enterocite; značajan *in vitro* model za proučavanje diferencijacije enterocita i model za apsorpciju hranjivih tvari.

3.2.2. Kemikalije

U postupku određivanje broja stanica korišteni su sljedeći reagensi:

- ❖ Tripan plavilo 0,4 %, 0,8 % NaCl, sterilno filtriran (Lonza; Basel, Švicarska)

U postupku izolacije DNK korišteni su sljedeći reagensi:

- ❖ QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen; Hilden, Njemačka), koji sadrži:
 - Proteinazu K
 - AL pufer (Buffer AL)
 - Etanol (96 – 100 %)
 - AW1 pufer (Buffer AW1)
 - AW2 pufer (Buffer AW2)
 - AE pufer (Buffer AE)

U postupku mjerenja koncentracije DNK korišteni su sljedeći reagensi:

- ❖ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Molecular Probes by Life Technologies; Eugene, Oregon, SAD), koji sadrži:
 - Qubit MMX radnu otopinu, razrjeđenja 1:200 (Qubit dsDNA BR Buffer, Qubit dsDNA BR Reagent)
 - Qubit dsDNA BR Standard (Qubit MMX radna otopina, Std stock otopina)

U PCR reakciji korišteni su sljedeći reagensi:

- ❖ AmpFlSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems by Life Technologies; Foster City, Kalifornija, SAD), koji sadrži:
 - Identifiler PLUS Reaction Mix
 - Identifiler PLUS Primer Set

U postupku kapilarne elektroforeze korišteni su sljedeći reagensi:

- ❖ GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems by Life Technologies; Foster City, Kalifornija, SAD)
- ❖ Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems by Life Technologies; Foster City, Kalifornija, SAD)

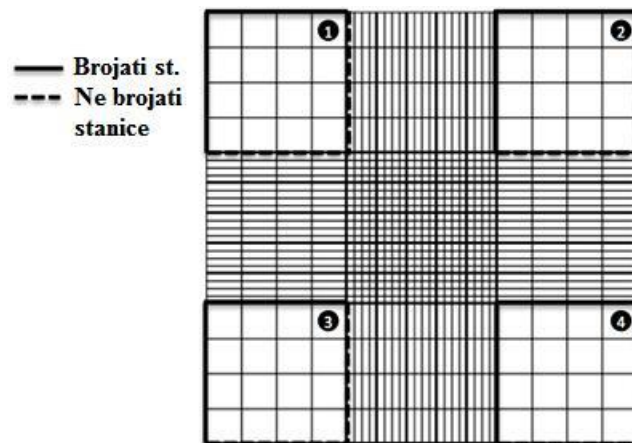
3.3. Metode

Tablica 1. Protokol za izradu STR profila

| Protokol za izradu STR profila | |
|--------------------------------|---|
| 1. Brojenje stanica | Određivanje broja stanica pomoću Bürker Türk-ove komorice (hemocitometra). |
| 2. Izolacija DNK | Izolacija DNK prema QIAGEN protokolu (QIAamp DNA Blood Mini Kit). |
| 3. Mjerenje koncentracije DNK | Mjerenje koncentracije DNK pomoću Qubit 3 fluorometra. |
| 4. Priprema PCR reakcije | Amplifikacija DNK lančanom reakcijom polimeraze (PCR) korištenjem AmpFISTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit-a. |
| 5. Kapilarna elektroforeza | Elektroferogram – dobivanje specifičnih STR profila. |
| 6. Analiza STR profila | Uspoređivanje rezultata dobivenih elektroforezom (elektroferograma) s ATCC-ovom bazom podataka – određivanje udjela podudarnosti. |

3.3.1. Određivanje broja živih stanica u kulturi

Broj stanica određuje se pomoću Bürker-Türkove komorice (Slika 1.). Prije samog brojenja stanica, stanice je potrebno vizualizirati, a vijabilnost se postiže metodom bojenja stanica bojom Tripan Blue. Naime, Tripan Blue boja je koja ulazi u mrtve stanice kojima je membrana uništena te zbog toga lako prodire u njih, zbog čega mrtve stanice vidimo kao plavo obojene, dok žive stanice ostaju nebojene. Nebojene se stanice zatim broje u hemocitometru pod svjetlosnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).



Slika 1. Bürker-Türkova komorica (20)

Broj vijabilnih stanica određuje se formulom:

$$N/4 * 3 = X * 10^4 \text{ stanica/cm}^3$$

gdje je:

N – broj stanica

4 – broj polja u komorici

3 – čimbenik razrjeđenja

3.3.2. Izolacija DNK

Izolacija DNK provedena je prema uputi proizvođača uz korekciju broja stanica potrebnih za izolaciju. Broj je reduciran na $7,5 \times 10^5$ st/ml i primijenjen je za svaku staničnu liniju.

Postupak: Na 200 μ l uzorka stanica dodano je 20 μ l proteinaze K i 200 μ l AL pufera, kratko izmiješano na vorteksu i inkubirano na 56°C/10 minuta. Tijekom inkubacije proteinaza K cijepa proteine i oslobađa DNK čineći je pogodnom za daljnje korake izolacije. Slijedi

dodatak 200 μ l etanola (96 – 100 %), kratko miješanje (15 s) i prebacivanje uzorka na kolone za izolaciju. Tako se pripremljen uzorak centrifugira na 6000 g/1 min. Kolona se prebacuje na novu sabirnu tubicu, dodaje 500 μ l AW1 pufera nakon čega slijedi centrifugiranje (6000 g/1 min). Filtrat se odbacuje i na kolonu se dodaje 500 μ l AW2 pufera nakon čega slijedi centrifugiranje u uvjetima 20000 g/3 min. Kolona se prenosi na čistu 1,5 ml eppendorf tubicu, dodaje 200 μ l AE pufera, inkubira jednu minutu na sobnoj temperaturi (15 – 25°C) te centrifugira na 6000 g/1 min.

3.3.3. Mjerenje koncentracije DNK

Za mjerenje koncentracije DNK korišten je Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Qubit 3 fluorometar (Slika 2.) koji predstavlja novu inačicu fluorometra za precizno mjerenje koncentracije DNK, RNK i proteina. Načelo prema kojem se radi određivanje koncentracije ciljane molekule jest pomoću fluorescentne boje koja emitira signal samo kada je vezana na ciljane molekulu, u ovom slučaju za DNK, što minimalizira učinak kontaminirajućih tvari na rezultate.

Postupak: Potrebno je pripremiti Qubit MMX radnu otopinu razrijeđenja 1:200 koju čine dvije komponente: komponenta A (Qubit dsDNA BR reagens) i komponenta B (Qubit dsDNA BR pufer). U idućem koraku pripremljen je standard (Std1 i Std2) koji su činile MMX radna otopina volumena 190 μ l i Std stock otopina volumena 10 μ l. U trećem su koraku pripremljeni uzorci tako da je prvo ispipetirano 5 μ l DNK u 195 μ l Qubit MMX radne otopine, nakon čega je bilo potrebno vorteksirati 2 – 3 sekunde te inkubirati dobivene uzorke 2 min. na sobnoj temperaturi. Nakon pripreme uzoraka, slijedi određivanje koncentracije DNK. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Koncentracije DNK staničnih linija

| Uzorak – stanična linija | C (DNA) ng/ μ l |
|--------------------------|---------------------|
| HeLa | 18,8 |
| HT-29 | 22,4 |
| CCRF-CEM | 9,08 |
| K562 | 13,8 |
| SW620 | 17,6 |
| Caco-2 | 19,8 |



Slika 2. Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Qubit 3 fluorometar (21)

3.3.4. Amplifikacija DNK lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

PCR jest metoda eksponencijalnog *in vitro* umnažanja fragmenata molekule DNK i zahvaljujući toj metodi moguće je dobiti milijune kopija točno određene sekvence DNK za svega nekoliko sati. Za izvođenje PCR-a potrebna je izolirana DNK i niz reagensa koje se zajednički nazivaju PCR mješavinom (PCR Master Mix). Za amplifikaciju DNK korišten je AmpFlSTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit.

Postupak: Uzorci su za potrebe PCR reakcije razrijeđeni kako slijedi: HeLa (30x), SW-620 (30x), HT-29 (20x), Caco-2 (20x), CCRF-CEM (20x), K-562 (10x). Za pripremu PCR reakcije potrebno je pripremiti, prema uputi proizvođača, Master Mix na bazi $n=1$ koji čine Identifiler PLUS Reaction Mix (3,2 μ l), Identifiler PLUS Primer Set (1,6 μ l), voda (2,7 μ l) i DNK uzorak (0,5 μ l). Umnažanje ciljnih odsječaka DNK provedeno je na PCR uređaju Applied Biosystems ProFlex PCR System (Slika 3.) u uvjetima navedenim u Tablici 3.



Slika 3. Applied Biosystems ProFlex PCR System (22)

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije – temperatura i trajanje faza PCR reakcije

| Koraci | Aktivacija enzima | PCR ciklus n=30 | | Produženje | Krajnji korak |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|-------------------|----------------------|
| | Drži | Razdvajanje | Sljepljivanje | Drži | Drži |
| Temperatura / °C | 95 | 94 | 59 | 60 | 4 |
| Vrijeme /min | 11 | 20 s | 3 | 10 | ∞ |

U prvom koraku ili tzv. inicijalizacijskom koraku aktiviraju se enzimi da bi se denaturirale DNK matrice (95°C). Potom slijedi postupak umnažanja DNK, odnosno PCR reakcija koji se sastoji od 30 ciklusa i nakon kojeg je dobiveno nekoliko milijuna kopija željenog fragmenta DNK. Sam postupak umnažanja sastoji se od triju specifičnih postupaka, a to su denaturacija pri temperaturi od 94°C, prianjanje pri kojem dolazi do hibridizacije DNK i

početnica na temperaturi od 59°C te elongacija koja podrazumijeva sintezu novih DNK lanaca. Nakon toga odrađen je korak terminacije što je zapravo dovršavanje sinteze nedovršenih DNK lanaca te nakon toga i posljednji korak održavanja koji osigurava stabilnost novosintetiziranih DNK lanaca na temperaturi 4 °C.

3.3.5. Kapilarna elektroforeza

Kao metoda razdvajanja ranije amplificiranih fragmenata DNK PCR-om korištena je kapilarna elektroforeza na ABI PRISM® 310 Genetic analizatoru (Applied Biosystems, SAD). Razdvajanje kapilarnom elektroforezom izvodi se u dvjema staklenim kapilarama u električnom polju, uz odgovarajući pufer i način detekcije. Uzorak se dodaje u sustav tako da se jedan pufer privremeno zamijeni uzorkom te računalo mjeri vrijeme od kada su fragmenti DNK stavljeni u kapilaru pa sve do kraja kapilare gdje se nalazi laser pomoću kojeg se uzorak detektira. U radu je analizirano 15 lokusa, CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX i vWA, plus amelogenin.

Po završetku samog postupka elektroforeze, dobije se elektroferogram, odnosno specifični STR profili koji se u daljnjoj analizi uspoređuju s ATCC-ovom bazom podataka te se određuje udio podudarnosti.

3.3.6. Uspoređivanje dobivenih STR profila s bazom podataka

Najčešći su izvori referentnih baza STR profila ATCC i DSMZ baze koje se koriste za utvrđivanje autentičnosti stanične linije i usporedbu dobivenog STR profila. U Tablici 4. prikazani su profili dobiveni u referentnim analitičkim centrima koji služe kao baza za usporedbu.

MATERIJAL I METODE

Tablica 4. STR profil staničnih linija prema ATCC i DSMZ bazi: HeLa (23), HT-29 (24), CCRF-CEM (25), K-562 (26), SW620 (27) i Caco-2 (28).

| Marker (lokus) | Stanične linije | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------------|---------|-------------|
| | HeLa | HT-29 | CCRF-CEM | K-562 | SW620 | Caco-2 |
| 1. Amelogenin | X | X | X | X | X | X |
| 2. CSF 1PO | 9,10 | 11,12 | 10,11 10,13 11 9,10,11 | 9,10 | 13,14 | 11 |
| 3. D13S317 | 12,13.3 13,13.3 12 12,14 | 11,12 11 | 11,12 11 10,11,12 | 8 | 12 | 11,13,14 |
| 4. D16S539 | 9,10 | 11,12 | 10,13 10,13,14 | 11,12 11,12,13 | 9,13 | 12,13 |
| 5. D18S51 | 16 | 13 | 13,18 | 15 15,16 | 13 | 12 |
| 6. D21S11 | 27 27,28 | 29,30 | 30,33.2,34.2 30,33.2 | 29,30 29,30,31 | 30,30.2 | 30 |
| 7. D3S1358 | 15,18 | 15,17 | 14,15,16 14,15 15 15,16 | 16 | 16 | 14,17 |
| 8. D5S818 | 11,12 | 11,12 | 12,13 12,13,14 | 11,12 11,12,13 | 13 | 12,13 |
| 9. D7S820 | 8,12 | 10 | 9,13 9,12 | 9,11 | 8,9 | 12 11,12 |
| 10. D8S1179 | 12,13 | 10 10,16 | 12,13 13 | 12 | 13 | 12 12,14 |
| 11. FGA | 18,21 | 20,22 | 23,24,25 23,24 | 21,24 | 24 | 19 |
| 12. Penta D | 8 8,15 | 11,13 | 10,11 | 9,13 | 9,15 | 9 9,11 |
| 13. Penta E | 7,17 | 14,16 | 5,14 | 5,14 | 10 | 7 |
| 14. TH01 | 7 | 6,9 | 6,7 | 9,3 | 8 | 6 |
| 15. TPOX | 8,12 | 8,9 | 8 7,8 | 8,9 | 11 | 9,11 |
| 16. Vwa | 16,18 | 17,19 | 17,19 17,18,19,20 18,19 | 16 | 16 | 16,18 |

3.4. Statističke metode

STR profili dobiveni postupkom kapilarne elektroforeze analizirani su pomoću GeneMapper softvera koji radi na osnovi algoritma koji uspoređuje broj alela između dvaju uzoraka analizirane stanične linije pri čemu se rezultati izražavaju u postotku (%). Stanični profil koji ima podudarnost s bazom podataka veću od 80 % smatra se autentičnom staničnom linijom.

4. REZULTATI

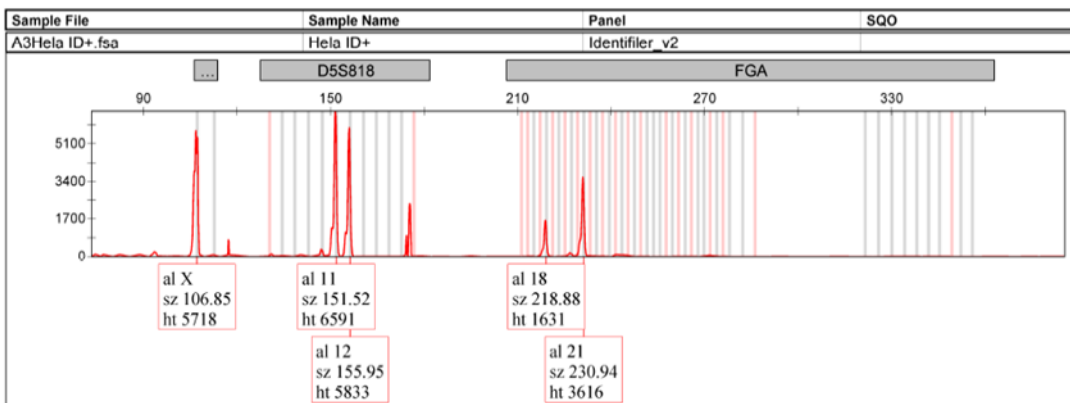
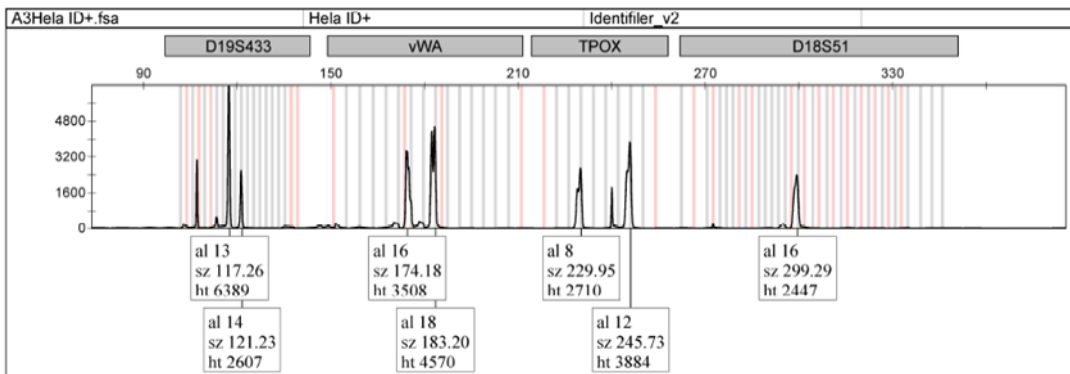
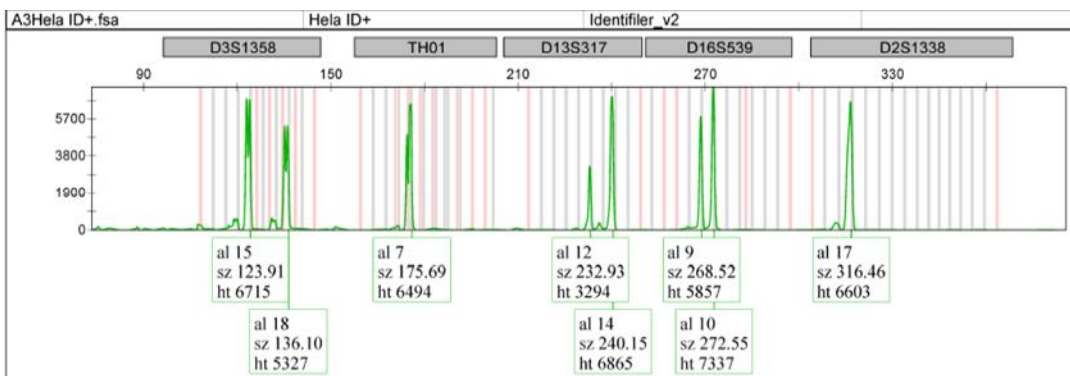
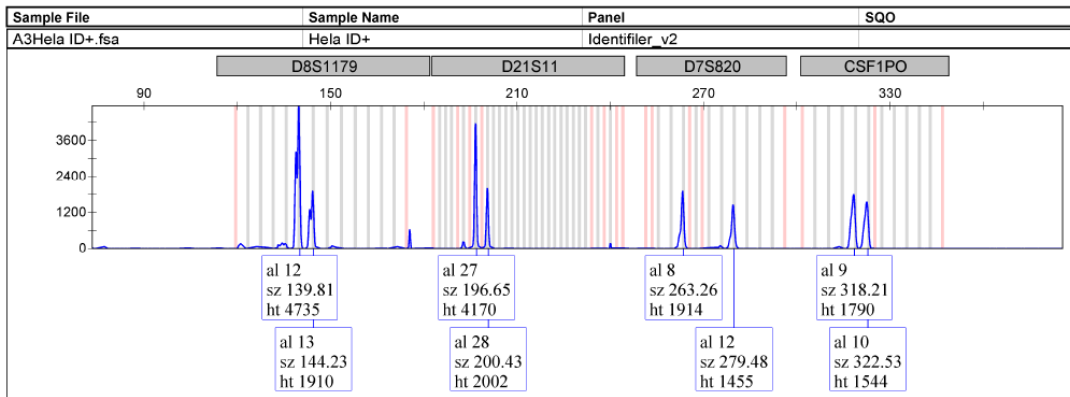
Rezultati ovog istraživanja prikazani su u obliku elektroferograma koji se uspoređuju s bazom podataka te se na osnovi toga određuje udio podudarnosti. Analizirano je 15 lokusa + amelogenin i dobiven je STR profil 6 staničnih linija (Slika 4.).

Elektroferogram (Slika 4.) staničnih linija za HeLa (4a), HT-29 (4b), CCRF-CEM (4c), i SW520 (4d) pokazuje 100 %-tnu podudarnost na svih 15 + 1 (amelogenin X) analiziranih lokusa u usporedbi s referentnim bazama (ATCC, DSMZ, Cellosaurus) STR staničnih profila. Prema dobivenim podacima i programski kreiranim elektroferogramima, navedene su četiri stanične linije čiste, ispravno označene i autentične bez prisutnosti kontaminanata.

Rezultati STR analize Caco-2 (Slika 4e) stanične linije pokazuju podudarnost s referentnim bazama u 6 + 1 lokus (amelogenin). Prema dobivenim rezultatima, podudarnost u proširenoj STR analizi, koja je rađena na 15 + 1 lokusu, iznosi 40 %. U usporedbi s preporučenih 8 + 1 lokus, što se smatra dostatnim za utvrđivanje staničnog profila, podudarnost s referentnim bazama iznosi 75 %. Caco-2 staničnu liniju potrebno je dodatno provjeriti i provesti novi skup analiza kako bi se mogao donijeti konačan zaključak o statusu stanične linije i njezinoj autentičnosti.

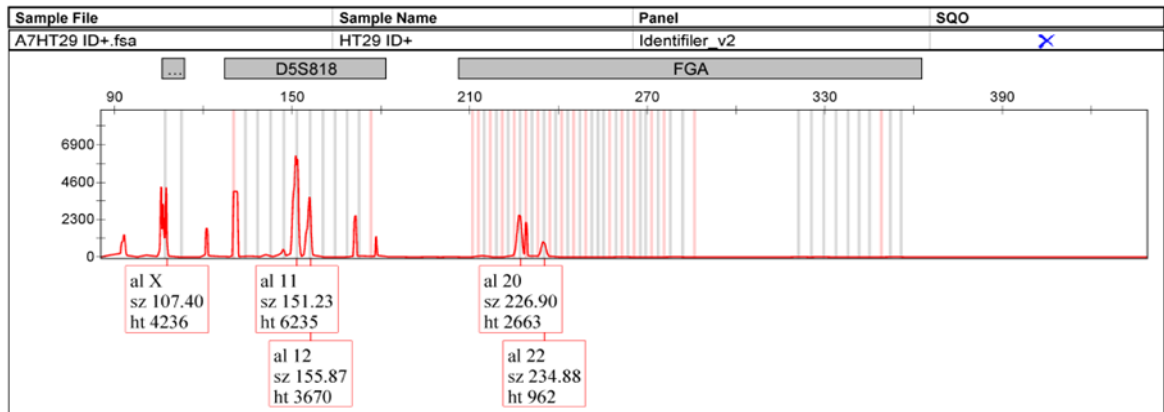
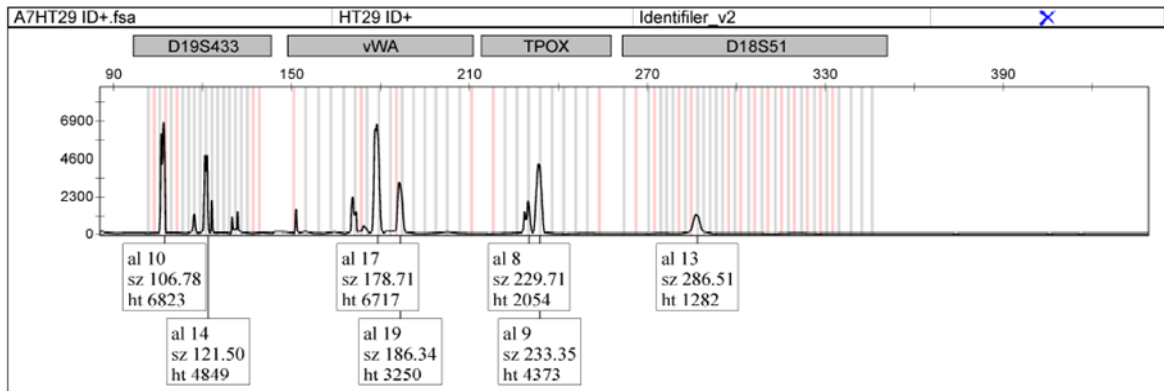
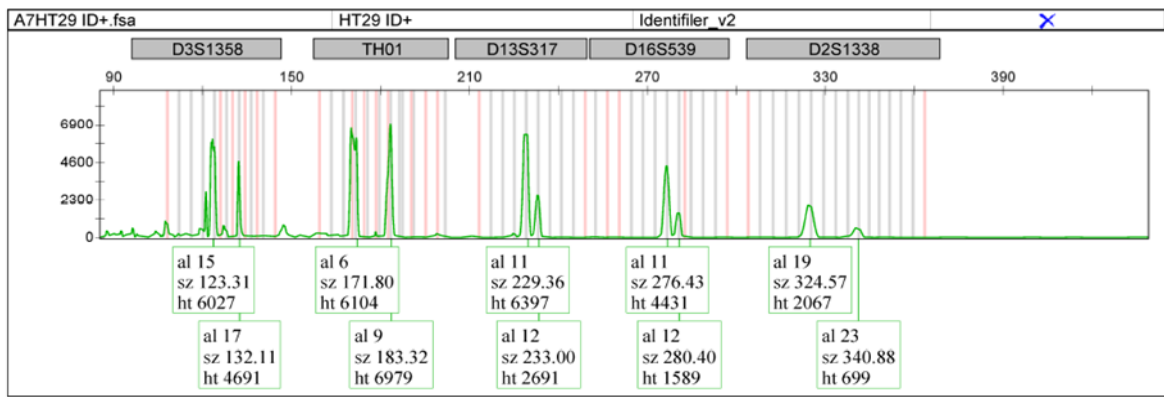
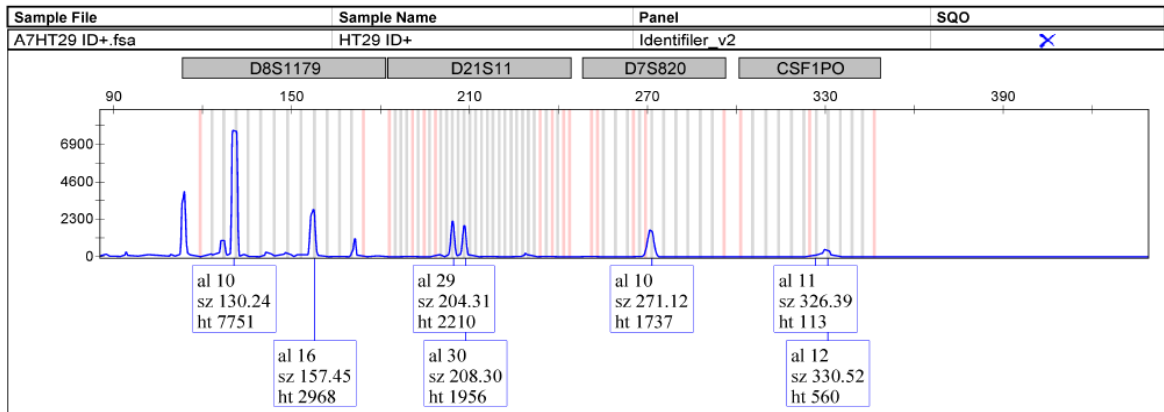
Rezultati STR analize provedeni na K-562 staničnoj liniji dali su pik samo na 1 lokusu (TH01) prema referentnim bazama (Slika 4f). Analiza se mora ponoviti, počevši od uzgoja stanica, izolacije, PCR reakcije do elektroforeze i novog elektroferograma.

REZULTATI



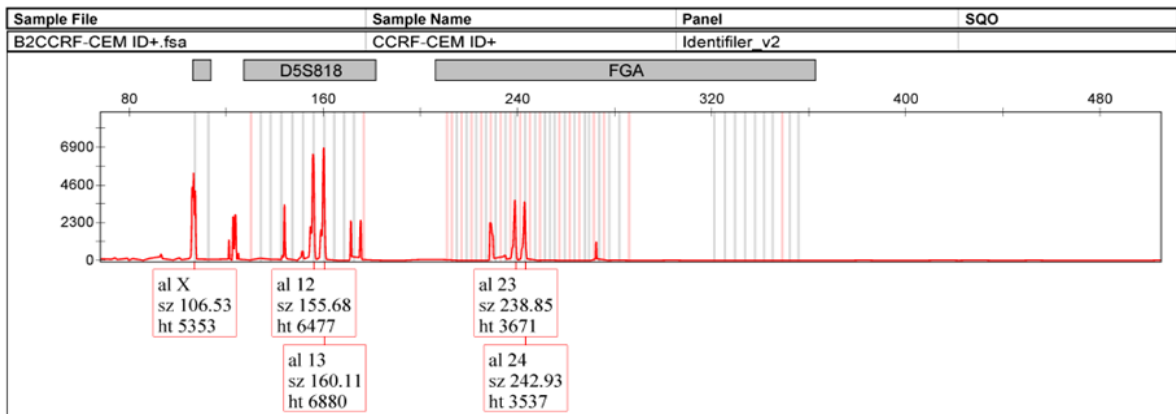
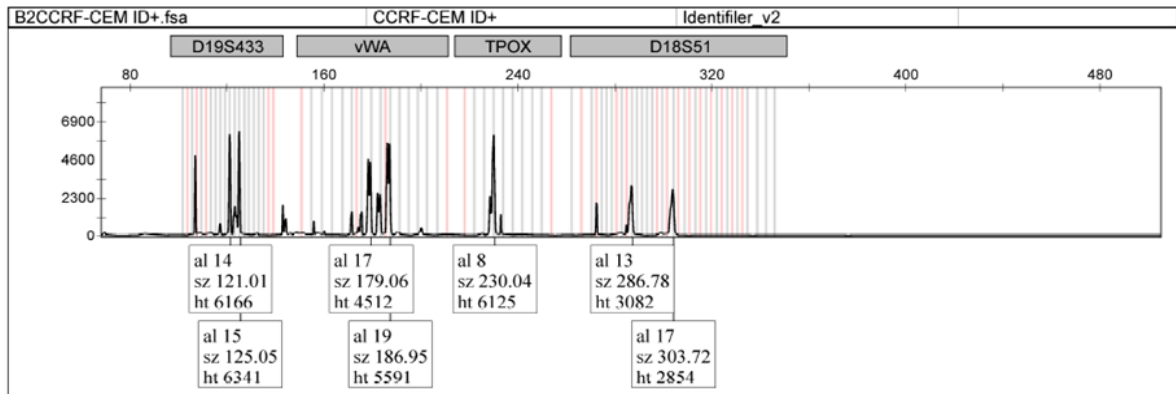
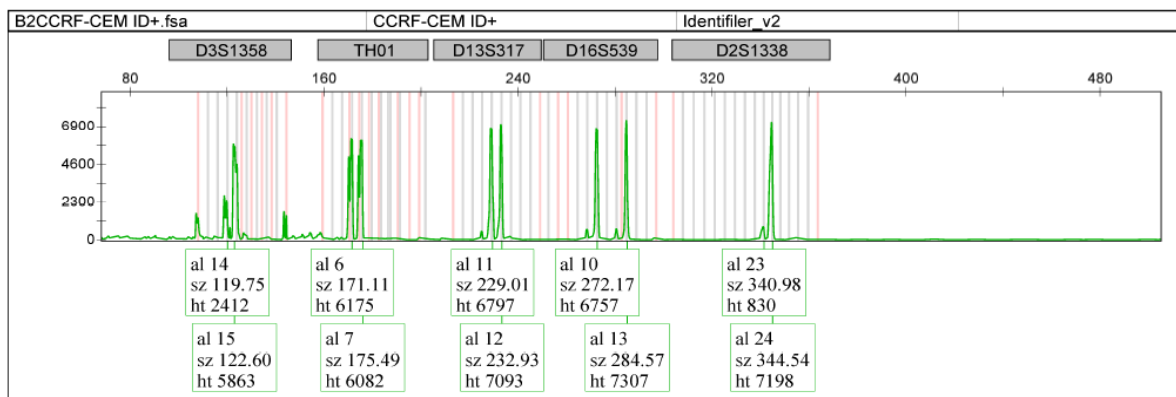
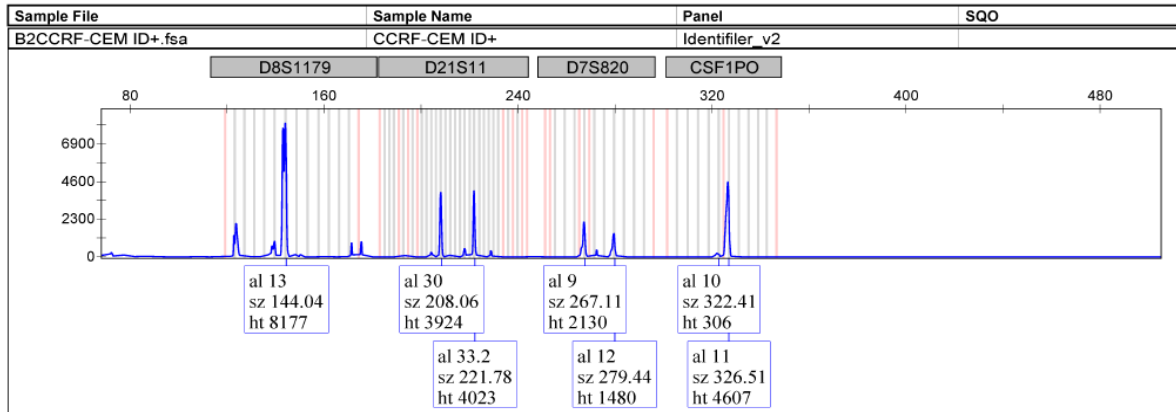
4a)

REZULTATI



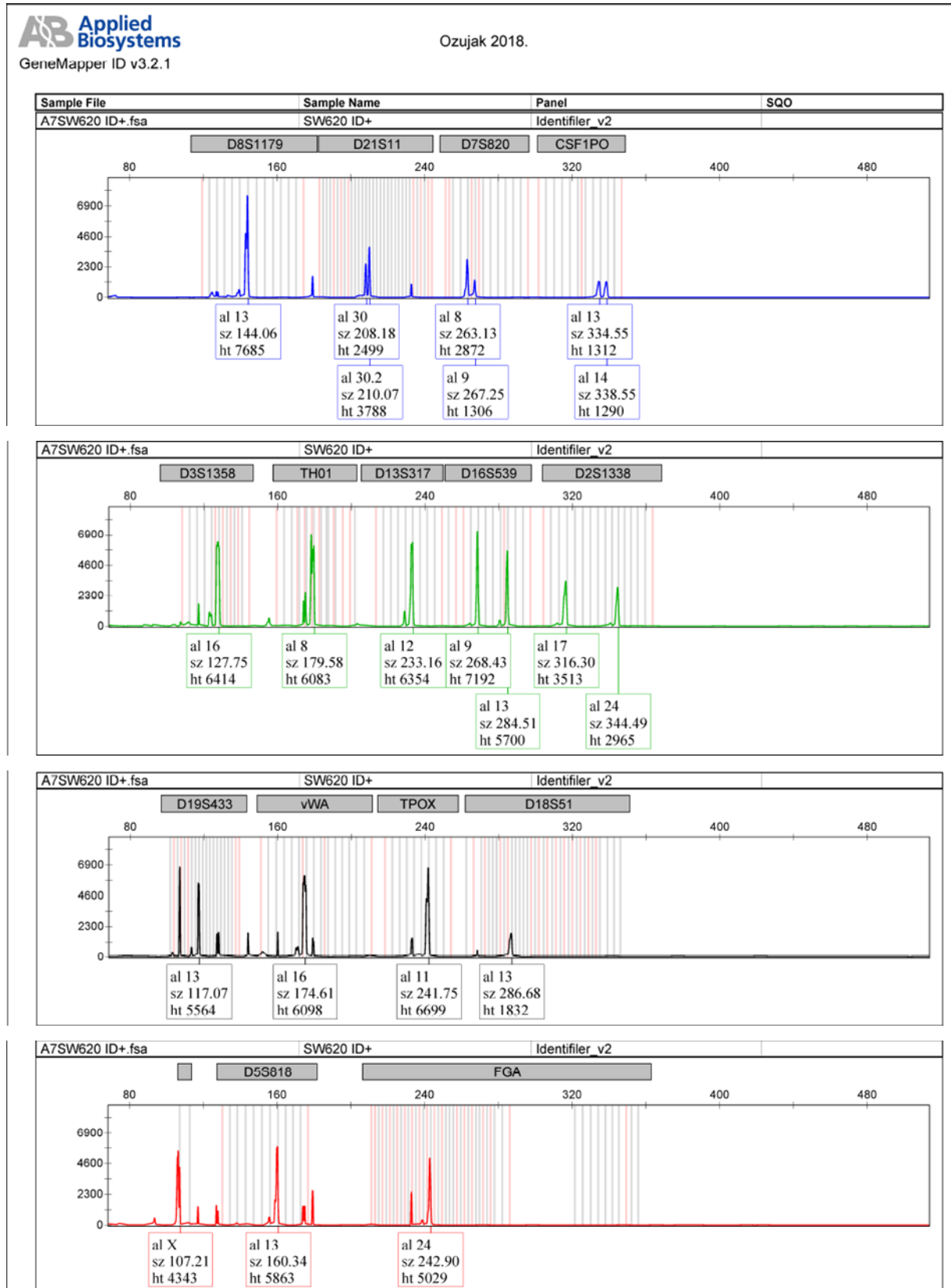
4b)

REZULTATI



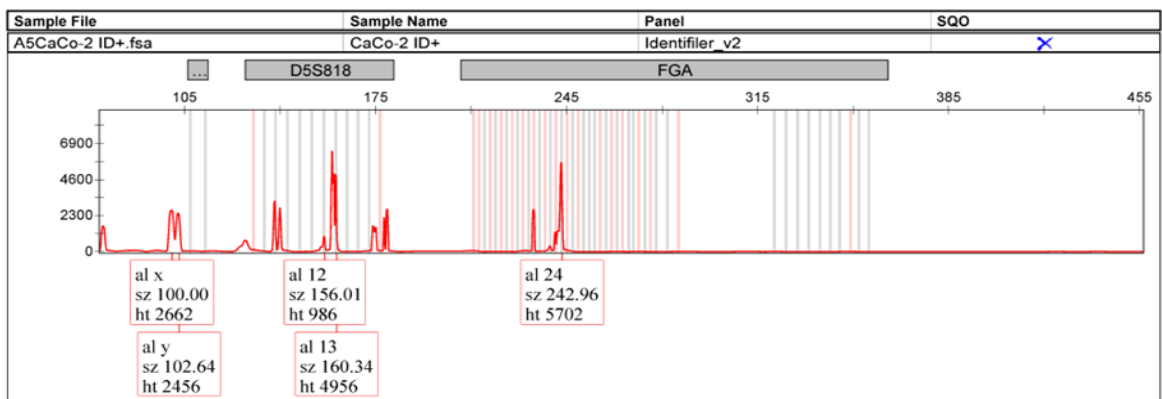
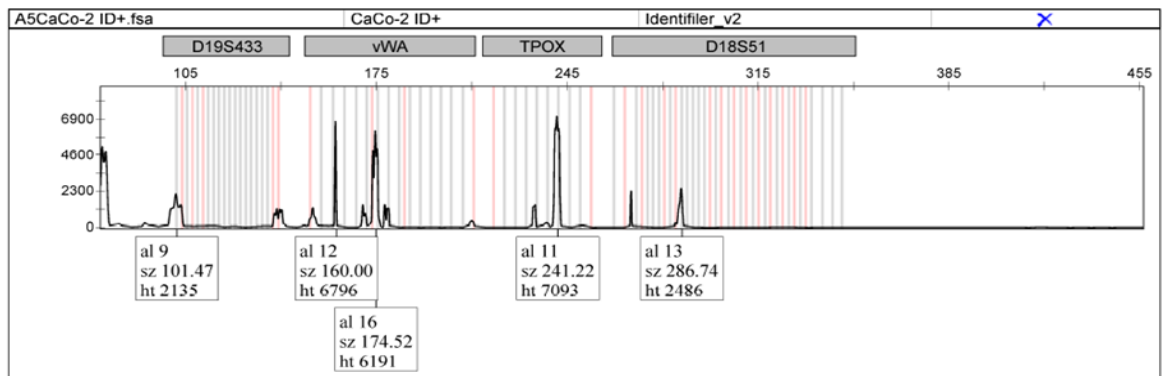
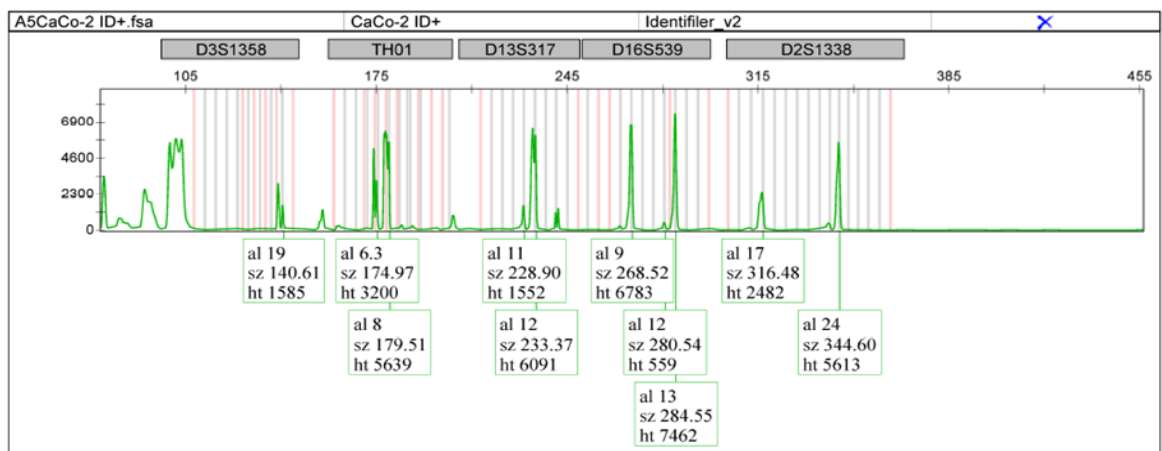
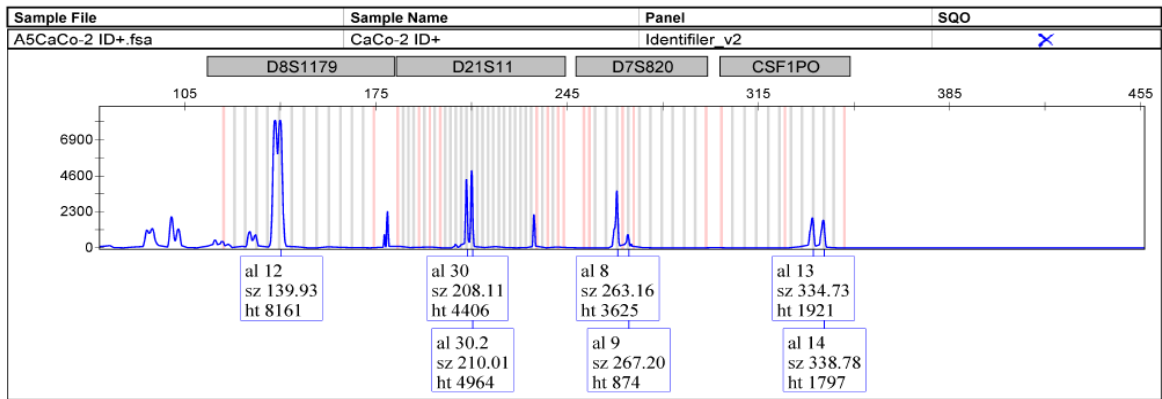
4c)

REZULTATI



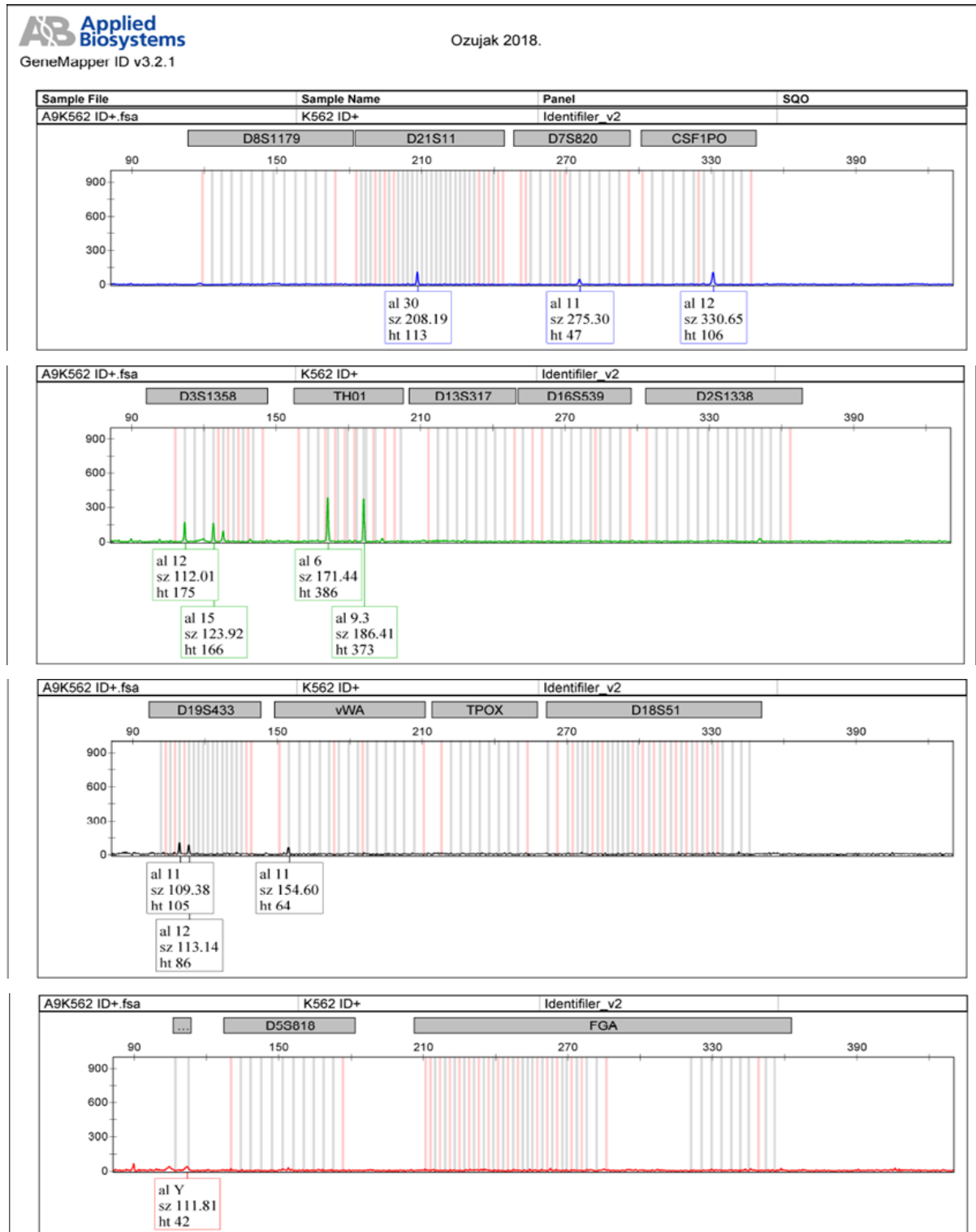
4d)

REZULTATI



4e)

REZULTATI



4f)

Slika 4 (a-f). STR profil humanih tumorskih staničnih linija. Slike prikazuju histograme dobivene metodom kapilarne elektroforeze nakon obrade GeneMapper softverom. Određeni su profili staničnih linija: a) HeLa; b) HT-29; c) CCRF-CEM; d) SW620; e) Caco-2; f) K-562.

5. RASPRAVA

Kontinuirane stanične linije, unatoč činjenici da je riječ o dobro utvrđenim modelima za proučavanje malignih oboljenja, podložne su kontaminaciji koja može biti rezultat djelovanja mikroorganizma ili, što je češći slučaj, kontaminaciji koja nastaje miješanjem s drugom staničnom linijom (29). Takav tip kontaminacije poznat je kao unakrsna kontaminacija. Unakrsna kontaminacija predstavlja velik problem koji je otkriven sredinom 20. stoljeća nakon što je stanična kultura kao model postala gotovo nezamjenjiva tehnika istraživanja različitih bioloških procesa i molekularnih mehanizama. Relativno jeftina i prihvatljiva, ubrzo je postala sveprisutna. Prva utvrđena kontinuirana stanična linija, odnosno HeLa, koja je uspostavljena još davne 1951. godine, postala je jedan od glavnih kontaminanata u unakrsnoj kontaminaciji sa zastupljenošću od 29 %, odnosno do sada je poznato da je kontaminirala 90 staničnih linija (30,1). Kontaminacija posljedično dovodi do upitnih, netočnih i neponovljivih rezultata u istovjetnim uvjetima provođenja. Svijest o problemu kontaminiranosti staničnih linija dovela je do razvoja i uspostave nekoliko referentnih baza STR profila poput ATCC, DSMZ, CLIMA, Cellosaurus i NCBI Biosample koje omogućuju svima koji se koriste staničnim linijama provjeriti njihovu autentičnost (31,32,33,34,35).

Tehnološki napredak u području molekularne biologije omogućio je razvoj i uspostavu tehnike STR profiliranja koja je danas „zlatni standard“ u utvrđivanju autentičnosti staničnih linija. Analiza STR markera omogućuje razlikovanje između dviju staničnih linija u granicama razlučivosti $10^8 - 10^{18}$ ovisno o broju i kombinaciji testiranih lokusa (8,12). Prema uputi Međunarodnog odbora za autentičnost staničnih linija, dostatno je ispitati osam autosomalnih lokusa i jedan lokus na spolnim kromosomima kako bi se utvrdila autentičnost stanične linije (36). CODIS (eng. Combined DNA Index System), američka baza DNK profila kojom se koristi Federalni istražiteljski ured (eng. Federal Bureau of Investigation - FBI), preporučuje analizu 13 lokusa na autosomalnim kromosomima i jednog STR lokusa na spolnim XY- kromosomima (37). Podudarnost analize s referentnom bazom podataka iznad 80 % definira staničnu liniju autentičnom, 56 – 79 % zahtijeva dodatne testove, a podudarnost manja od 55 % upućuje na to da stanična linija nije autentična (36). Pri analizi koriste se alelni standardi koji predstavljaju najčešće alele na svakom lokusu. Alelni su standardi formirani na osnovi provedene evaluacije podataka STR analize nekoliko stotina pojedinaca. Međutim, mogu se pojaviti i aleli koji iskaču iz alelnih standardnih veličina i nazivaju se „off-leader“ aleli (OL). Vrlo je važno znati veličinu alelnih standarda jer analitički program za

analizu veličine alela podatke analizira i uspoređuje samo s poznatim alelnim standardima. Svi aleli koji se razlikuju od njemu poznatih veličina program je označivao kao OL alel (8).

Kada se utvrđuje autentičnost humanih tumorskih staničnih linija, nije neuobičajeno da se pri analizi STR markera zabilježi pojava genetičke nestabilnosti (38). Većina humanih staničnih linija izolirana je iz tumora koji se genetički razlikuju od normalnih stanica. Štoviše, stanične linije imaju sposobnost stjecanja dodatnih genetskih promjena tijekom uzgoja u kulturi. Primjer je studija provedena na 24 uzorka karcinoma pluća gdje je došlo do potpune delecije alela na više lokusa u odnosu na STR profil normalnog tkiva (39).

Interpretacija rezultata STR profila tumorskih staničnih linija također predstavlja određeni problem zbog: 1) gubitka heterozigotnosti što je poznato i kao alel „drop-out“ (ADO), 2) nestabilnosti pika, 3) pojave višestrukih pikova na nekoliko lokusa (8). U slučaju nestabilnosti pika, željena amplifikacija jednog alela preko drugog može biti rezultat udvostručenja gena, aneuploidije ili prisutnih kimernih stanica (8). Prisutnost više pikova na nekoliko lokusa može biti posljedica somatske mutacije, trisomije ili udvostručenja gena koji mogu rezultirati trima ili više pikova na 1 – 2 lokusa. Prisutnost više od triju pikova na više od trima lokusima upućuje na staničnu kontaminaciju. U svakom slučaju, potrebno je primijeniti dodatnu, nezavisnu metodu analize kako bi se isključila stanična kontaminacija (8). Sve navedene promjene doprinose jedinstvenosti i specifičnosti u identifikaciji staničnih linija (8).

U cilju utvrđivanja autentičnosti staničnih linija koje se koriste za potrebe znanstvenih istraživanja Laboratorija za kulturu stanica provedena je STR analiza na šest tumorskih staničnih linija. Analizirane su HeLa, CCRF-CEM, K-562, HT-29, SW620, Caco-2. Analizirane linije, uz izuzetak Caco-2, ubrajaju se među 12 najčešće pogrešno označenih ili kontaminiranih staničnih linija (1). Primjenjujući uputu i algoritam (ANSI) te podatke referentne baze Cellosaurus utvrđena je 100 %-tna podudarnost s referentom bazom za HeLa, CCRF-CEM, HT-29 i SW620 stanične linije. Nešto je manja podudarnost utvrđena za Caco-2 (87,5 %), dok je jedino K-562 stanična linija ostala nepotvrđena. Kod K-562 stanične linije samo su na dvama lokusima (TH01 i D3S1358), od 15 analiziranih, detektirani pikovi.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju potrebu za pravovremenom autentifikacijom svake stanične linije koja se planira koristiti u istraživačke svrhe. U suprotnom, pojava kontaminanata može ugroziti kredibilitet dobivenih rezultata. Stoga je postupak autentifikacije nužan u istraživanjima koja se temelje na staničnim linijama, posebice ako je

RASPRAVA

stanična linija dobivena iz neprovjerenog izvora, donirana ili zatečena u internoj banci staničnih linija. Preporuka je da se s vremena na vrijeme ponovno odredi STR profil već utvrđene stanične linije kako bi se provjerilo da nije došlo do kontaminacije ili zamjene s drugom staničnom linijom tijekom rada.

6. ZAKLJUČAK

- ❖ U ovom je radu proveden postupak autentifikacije šest staničnih linija analizom kratkih ponavljajućih sljedova, odnosno STR profiliranje.
- ❖ Potvrđena je autentičnost četiriju staničnih linija: HeLa, SW620, CCRF-CEM, HT-29 sa 100 %-tnom točnošću.
- ❖ Caco-2 stanična linija rezultirala je s podudarnim pikovima na šest autosomalnih i X spolnom kromosomu, što prema minimalnim zahtjevima za potvrdu autentičnosti iznosi 75 % te je potrebno provesti dodatne analize.
- ❖ K-562 stanična linija nije dala zadovoljavajuće rezultate i analizu je potrebno ponoviti.

7. SAŽETAK

Uvod: Kontinuirane stanične linije dobro su utvrđeni modeli za proučavanje raznih zdravstvenih stanja, osobito malignih oboljenja – iako, pri radu s njima treba biti oprezan i svjestan mogućih problema kontaminacije koja ima dalekosežne posljedice na rezultate znanstvenih istraživanja. Upravo iz tog razloga osmišljeni su brojni testovi pomoću kojih je moguće odrediti identitet stanične linije, odnosno odrediti je li stanična linija „slobodna“ od druge stanične linije i/ili mikroorganizma. Takvi se testovi nazivaju testovima autentifikacije, a najčešće je korišten test, koji je ujedno i trenutni „zlatni standard“, analiza kratkih ponavljajućih sljedova, odnosno STR profiliranje.

Cilj: Cilj je ovog istraživanja utvrđivanje autentičnosti šest staničnih linija uzgojenih *in vitro* metodom analize kratkih ponavljajućih sljedova – STR profiliranjem kao i određivanje udjela podudarnosti elektroferograma s ATCC-ovom bazom podataka.

Materijal i metode: U istraživanju je korišteno šest staničnih linija (HeLa, SW620, CCRF-CEM, K-562, HT-29, Caco-2) kojima je analizirano 15 lokusa + amelogenin. Koraci su analize: izolacija DNK, određivanje koncentracije DNK, PCR umnažanje i elektroforeza. Za analizu rezultata primijenjen je program GeneMapper softver za izradu elektroferograma.

Rezultati: Dobiveni su elektroferogrami koji su uspoređivani s referentnom bazom STR profila te je na osnovi toga određena autentičnost i udio podudarnosti među staničnim linijama. Autentičnima su se pokazale stanične linije HeLa, SW620, CCRF-CEM, HT-29 sa 100 %-tnom podudarnošću, Caco-2 sa 75 %-tnom, a kod K-562 stanične linije nije se odredio STR profil.

Zaključak: Određivanjem STR profila utvrđena je autentičnost HeLa, SW620, HT-29, CCRF-CEM staničnih linija, dok je za Caco-2 potrebno provesti dodatne analize kako bi se donio konačan zaključak o autentičnosti. Za K-562 potrebno je ponoviti cjelokupan analitički proces utvrđivanja STR profila.

Ključne riječi: stanična linija, kontaminacija, autentičnost, STR profil

8. SUMMARY

Introduction: Continuous cell lines are well-recognized models for the study of medical conditions, particularly for cancer. However, there are cautions to be aware of when using continuous cell lines, including the possibility of contamination which has far-reaching consequences on the results of the research. This is the reason why there are a lot of tests designed to help authentication of the cell line, which actually means finding out whether a certain cell line is “free“ from another cell line and/or microorganism or not. These kinds of tests are called authentication tests. The most frequently used one, also called “gold standard”, is a short tandem repeat profiling (STR) test.

Objective: The aim of this study was to authenticate 6 cell lines grown *in vitro* using short tandem repeat (STR) profiling, as well as to define match percentage between electropherograms and ATCC- database.

Materials and methods: 6 cell lines were used in this research (HeLa, SW620, CCRF-CEM, K-562, HT-29, Caco-2) and were analyzed on 15 loci + amelogenin. The steps of the analysis were: DNA isolation, determination of DNA concentration, PCR duplication and electrophoresis. GeneMapper software for electropherograms was used for the analysis of the results.

Results: Electropherograms obtained were compared to standard reference STR database which made it possible to determine if cell lines were authentic and the percentage match between them. 4 cell lines, HeLa, SW620, CCRF-CEM and HT-29, were verified as authentic at 100 %, CaCo-2 cell line authentic at 75 %, while K-562 STR profile was not determined.

Conclusion: Short tandem repeat profiling (STR) test established the authenticity for HeLa, SW620, HT-29 and CCRF-CEM cell lines, while further analysis should be conducted with Caco-2 cell line in order to make a final conclusion about its authenticity. Furthermore, analytical procedure for K-562 cell line should be repeated.

Keywords: cell line, contamination, authentication, STR profile.

9. LITERATURA

1. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, G. Drexler H, Kohara A, A.F. MacLeod R, i sur. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer.* 2010;127:1-8.
2. Huang Y, Liu Y, Zheng C, Shen C. Investigation of Cross-Contamination and Misidentification of 278 Widely Used Tumor Cell Lines. *PLOS ONE.* 2017; 12(1):e0170384.
3. GIBCO. *Cell Culture Basics.* Nashville: Vanderbilt University; 2016.
4. University of Kent. Study Guide- Biotechnology and Cell Culture. Dostupno na adresi:
<https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2604&chapterid=160>.
Datum pristupa: 13.06.2018.
5. ATCC. *Animal Cell Culture Guide.* Manassas: University Blvd; 2014.
6. ATCC. Dostupno na adresi: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-CCL-2.aspx>. Datum pristupa: 10.06.2018.
7. Routray I, Mahmood A, Ngwa NE, Tasleem M, Sahin K, Kucuk O, i sur. Cell Line Cross-Contamination and Accidental Co-Culture. *J Stem Cell Res Ther.* 2016;1(5):00031.
8. Reid Y, Storts D, Riss T, Minor L. Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis. *Assay Guidance Manual.* 2004.
9. Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG, MacLeod RA. Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. *LeukRes.* 2002;26:329–33.
10. Shimada Y. Researchers should have respect for the originator of the cell lines. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4634.
11. Biocompare. STR Profiling for Cell Line Authentication. Dostupno na adresi:
<https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/350110-STR-Profiling-for-Cell-Line-Authentication/>. Datum pristupa: 03.07.2018.
12. ATCC. Searchable STR database for human cell lines. Dostupno na adresi:
https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Testing_and_Characterization/STR_Profiling_Analysis.aspx?geo_country=hr. Datum pristupa: 24.08.2018.
13. DSMZ. Authentication of Cell Lines. Dostupno na adresi:
<https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines/quality->

LITERATURA

- assurance/identity-control/authentication-of-cell-lines.html. Datum pristupa: 24.08.2018.
14. Fang R, Shewale JG, Nguyen VT, Cardoso H, Swerdel M, Hart RP, i sur. STR Profiling of Human Cell Lines: Challenges and Possible Solutions to the Growing Problem. *J Forensic Res.* 2011;2:005.
 15. F. Tian, M. de Mars, Y. Reid. STR Profiling: Authentication of Human Cell Lines and Beyond. *BioPharm International.* 2017;30(7).
 16. Genetica cell line testing. What is STR profiling?. Dostupno na adresi: <https://www.celllineauthentication.com/what-is-str-profiling-.html>. Datum pristupa: 03.07.2018.
 17. Eppendorf Handling Solutions. STR Profiling. Dostupno na adresi: <https://handling-solutions.eppendorf.com/cell-handling/identity/scientific-background/str-profiling/>. Datum pristupa: 03.07.2018.
 18. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza. *Farmaceutski glasnik.* 2010;66
 19. Dončević L. Primjena elektroforetskih tehnika u analizi nukleinskih kiselina. (završni rad) Osijek 2017.
 20. Bürker-Türkova komorica. <https://www.hemocytometer.org/hemocytometer-protocol/>. Datum pristupa: 19.08.2018.
 21. Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Qubit 3 fluorometar. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/product-images/sho-qubit-instrument.jpg-650.jpg>. Datum pristupa: 28.08.2018.
 22. Applied Biosystems ProFlex PCR System. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4484073>. Datum pristupa: 01.09.2018.
 23. STR profil HeLa stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0030
 24. STR profil HT-29 stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0320
 25. STR profil CCRF-CEM stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0207
 26. STR profil K-562 stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0004
 27. STR profil SW620 stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi. https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0547

LITERATURA

28. STR profil Caco-2 stanične linije prema ATCC i DSMZ bazi.
https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0025
29. Liang-Chu MMY, Yu M, Haverty PM, Koeman J, Ziegle J, Lee M, i sur. Human Biosample Authentication Using the High-Throughput, Cost-Effective SNP trace™ System. PLOS ONE. 2015;10(2): e0116218.
30. Callaway E. Deal done over HeLa cell line. Nature. 2013;500(7461):132-133.
31. ATCC. Search the STR database. Dostupno na adresi: https://www.lgcstandards-atcc.org/STR_Database.aspx?geo_country=hr. Datum pristupa 06.09.2018.
32. DSMZ. Online STR Analysis. Dostupno na adresi:
<https://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html>. Datum pristupa: 06.09.2018.
33. CLIMA 2.0. Human STR profiles. Dostupno na adresi:
<http://bioinformatics.hsanmartino.it/clima2/index.php>. Datum pristupa: 06.09.2018.
34. Cellosaurus. A knowledge resource on cell lines. Dostupno na adresi:
<https://web.expasy.org/cellosaurus/>. Datum pristupa: 06.09.2018.
35. NCBI. BioSample. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/>. Datum pristupa: 06.09.2018.
36. ANSI/ATCC ASN-0002. Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling. 2012.
37. Butler J. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. Journal of Forensic Sciences. 2006; 51(2):253-265
38. Ronald J, Duffy KJ, Kaye MT, Shepard MT, McCue BJ, Shirley J, i sur. Loss of Heterozygosity Detected in a Short Tandem Repeat (STR) Locus Commonly Used for Human DNA Identification. Journal of Forensic Sciences. 2000;45(5):1087–1089.
39. Peloso G, Grignani P, Rosso R, Previderè C. Forensic evaluation of tetranucleotide STR instability in lung cancer. ICS. 2003;1239:719-721.

ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Mia Galeković

Datum i mjesto rođenja: 22. svibnja 1996., Osijek

OBRAZOVANJE

2003. – 2011. Osnovna škola Jagode Truhelke

2011. – 2015. II. gimnazija Osijek

2015. – 2018. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika