

## Получение первичной культуры эмбриональных фибробластов мелкого рогатого скота как источника ядер для SCNT

Научный руководитель – Сингина Галина Николаевна

*Ворожбит Тимофей Александрович*

*Выпускник (магистр)*

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,  
Зоотехнии и биологии, Пчеловодства и рыбоводства, Москва, Россия

*E-mail: tima\_voron2008@mail.ru*

Метод SCNT (Somatic cell nuclear transfer) - перенос ядер соматических клеток, используется для получения клонов и создания животных с заданными свойствами. Условием реализации данного метода является создание банка соматических клеток, которые будут служить источником ядер. Для этих целей хорошо подходят эмбриональные фибробласты ранних пассажей. Выделение эмбриональных фибробластов производят методом, предполагающим механическое и ферментативное воздействие на эмбрион. Обработка трипсином может ухудшать качество получаемой культуры, негативно влиять на адгезивные свойства клеток, нарушать их морфологию.

Целью работы являлось оценить возможность получения культуры эмбриональных фибробластов без ферментативной обработки.

Для выделения первичной культуры эмбриональных фибробластов были получены эмбрионы возрастом 37 дней от романовских овец (post mortem). После извлечения из матки эмбрион многократно промывался в физиологическом растворе с антибиотиком.

Выделение первичной культуры производилось двумя методами: механический без ферментативной обработки и механический с трипсинизацией.

При механическом способе выделения фетальных фибробластов подготовленный эмбрион помещали в чашку Петри с 0,1 молярным раствором фосфатного буфера, где его протирали через культуральное ситечко с шириной ячейки 0,22 мкм. Суспензию клеток дважды центрифугировали 7 минут 2000 оборотов/мин с последующим ресуспендированием. Суспензию одиночных фибробластов рассеивали в культуральные планшеты с DMEM с 15% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиком.

При ферментативном методе - части эмбриона не прошедшие культуральное ситечко подвергали обработке 0,25% трипсином при температуре 38°C в течение 30 минут. Суспензию клеток в трипсине нейтрализовывали двойным объемом DMEM с 5% фетальной бычьей сыворотки, центрифугировали, ресуспендировали и рассеивали как в первом случае.

Культуральные планшеты помещали в термостат при 38°C и 5% CO<sub>2</sub>. Смену среды производили на второй день культивирования. При достижении 80-100% монослоя клетки снимали с поверхности планшетов 0.25% трипсином и замораживали для создания криобанка фибробластов ранних пассажей или пассировали.

Большая часть первичной культуры эмбриональных фибробластов (59,53%) была получена с помощью механического метода выделения фибробластов без использования ферментов. Клетки, полученные механическим способом, характеризовались фибробластоподобной морфологией, хорошо проявляли адгезивные свойства, успешно достигли монослоя в 80-100% на 4-5 день культивирования. Рост культуры и пассирование проходили без затруднений. В первичной культуре помимо одиночных клеток встречаются единичные конгломерации как в механическом, так и ферментативном методе.

В результате проведенного исследования можно сказать, что метод выделения первичной культуры эмбриональных фибробластов без применения ферментов позволяет получать жизнеспособную клеточную культуру, не уступающую полученной классическим методом.