

ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS

Pers. Jur. Nº1.530.806

16 años de actividad
Tabla de contenidos

Julián Alvarez 1218 (C1414DRZ)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
abac_informes@yahoo.com.ar

Indice

ANUNCIOS

ARTÍCULO

[Identificación y confirmación de especie en líneas celulares de humanos y de animales: un método basado en PCR](#)

B. Parodi, O. Aresu, D. Bini, R. Lorenzini, F. Schena, P. Visconti,
M. Cesaro, D. Ferrera, V. Andreotti y T. Ruzzon

SERVICIOS OFRECIDOS por A.B.A.C.

Líneas Celulares Disponibles Control de Micoplasma Depósito de Ampollas en
Nitrógeno Líquido. Manual de ATCC
(Traducción ABAC)

Identificación y confirmación de especie en líneas celulares de humanos y de animales: un método basado en PCR

B. Parodi, O. Aresu, D. Bini, R. Lorenzini, F. Schena, P. Visconti, M. Cesaro, D. Ferrera, V. Andreotti y T. Ruzzon
National Institute for Cancer Research and TIB Molbiol, Genova, Italia
Traducción: Asociación Banco Argentino de Células (ABAC).

Resumen

La inadecuada identificación y las contaminaciones cruzadas son problemas que afectan a los cultivos celulares y pueden derivar en resultados científicos (o su reproducibilidad) poco confiables. Este trabajo describe un método basado en PCR para identificar o confirmar fácilmente la especie de origen de líneas celulares mediante el uso de un panel de oligonucleótidos específicos para las nueve especies animales más comunes en los laboratorios de cultivos celulares. Un panel de 35 líneas celulares humanas y animales, cuyas especies de origen fueron previamente confirmadas mediante el ensayo de isoenzimas, fue estudiado con nueve pares de primers especie-específicos que específicamente anillan a secuencias de DNA codificantes para humano, gato, perro, ratón, rata, caballo, conejo, citocromo coxidasa subunidad I (cox I) de mono verde africano y un par primer específico para el gen citocromo b de hamster chino. Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El método es simple, rápido, muy sensible y útil para monitoreo de rutina a la identidad de especie de los cultivos celulares.

Introducción

Las líneas celulares continuas son herramientas de amplio uso en los laboratorios de investigación en el mundo. Ellas son frecuentemente intercambiadas entre laboratorios sin ninguna garantía de su real origen, sus nombres son frecuentemente truncados y mal escritos, y no siempre se mantienen registros de la historia de las ampollas. De este modo los cultivos pueden ser crecidos, mantenidos y usados por años sin confirmar la especie de origen.

Sin embargo, la comunidad científica no reconoce la mala identificación de cultivos celulares como un problema de importancia. Se destina poco esfuerzo en los laboratorios a excluir la contaminación de líneas celulares con células de otro individuo o especie, y el sobrecrecimiento subsecuente ha ocurrido (20, 24). De hecho, los investigadores prestan más atención a la contaminación con microorganismos (6, 7, 12, 18, 20, 23). A diferencia de la contaminación por hongos y bacterias, la contaminación cruzada con células no es fácilmente detectable, y la morfología y el comportamiento de las células en cultivo pueden no cambiar. Esto también es cierto para la contaminación con micoplasmas, que no es fácilmente detectada, pero la conciencia de las consecuencias de esta contaminación está creciendo en la comunidad científica, así como el número de publicaciones en los últimos años sobre falsificación de datos debida a contaminación por micoplasmas (4, 26, 30). Por el contrario, la literatura sobre contaminación cruzada por células es limitada en cantidad y la comunidad científica no tiene suficientes respuestas a problemas relacionados con este tipo de contaminación. El riesgo de sobrecrecimiento de un cultivo celular por células no relacionadas fue primero reconocido en 1957 (5, 20). Desde entonces, la contaminación cruzada ha sido detectada por experimentos de cariología, trasplante, hemaglutinación (2, 34), inmunofluorescencia (31), y «fingerprinting» de DNA (22, 32). En 1966, el polimorfismo de isoenzimas fue implementado como marcador genético (11), y el polimorfismo de G6PD aclaró el problema de la contaminación de las células HeLa (8, 9). El análisis bioquímico del polimorfismo enzimático es actualmente considerado el método estándar en el control de calidad para identificación y/o contaminación interespecífica de líneas celulares y es rutinariamente usado en los principales Centros de Reposición de Biológicos en el mundo (ej.: ATCC, ECACC, DSMZ, y Riken) (13, 14, 25, 33), en conjunción con el «fingerprinting» de DNA para la detección de contaminación cruzada intraespecie (5, 19, 21, 32).

Muy pocos laboratorios realizan regularmente ensayos de isoenzimas o «fingerprinting» debido a los costos y la complejidad de los ensayos. Además, y lo que es más importante, los directorios

editores de revistas, secciones de estudio y otros que aportan a la investigación frecuentemente no insisten en que la certificación de especie y origen de líneas celulares sea incluida. En años recientes, la PCR se ha convertido en una herramienta de amplia difusión usada en la mayoría de los laboratorios de investigación (29). El ensayo descripto podría ser fácilmente agregado para reforzar los programas de control de calidad aún en el más modesto laboratorio de cultivos celulares.

Materiales y Métodos

Cultivos Celulares. Un panel de 35 líneas celulares continuas certificadas, integrantes del Interlab Cell Line Collection (ICLC) (27, 28), fueron usadas en este trabajo. La Tabla I muestra la lista de líneas celulares con los datos de origen disponibles. Entre las líneas celulares están representadas las normales, transformadas por virus y tumorales.. El rango de edad de los donantes va desde el estadio embrionario al adulto y, dentro de las especies, deferentes orígenes de cepas o etnias han sido tomados en cuenta. Las líneas celulares fueron crecidas en frascos descartables de 75 cm² en sus respectivos medios de cultivo (Invitrogen, Milan, Italia, y BiochronKG, Berlín, Alemania), en ausencia de antibióticos y suplementado con 10- 20% de suero bovino inactivado por calor (56C°, 30 min) (Mascia Brunelli S.p.A., Milan, Italia) y, cuando correspondiera, con otros suplementos, según los protocolos del Catálogo ICLC de Líneas Celulares Humanas y Animales, disponible en www.iclc.it. Los frascos fueron incubados en aire atmosférico humidificado, con 5% CO₂. Todos los cultivos celulares estaban libres de micoplasmas según lo demostrado por al menos dos métodos: tinción fluorescente de DNA por bisbenzamida (Hoechst 33258) (1, 3) y análisis por PCR.

Análisis de Isoenzimas

Las especies de origen de todas las líneas celulares, certificadas por el depositante, fueron verificadas y confirmadas mediante análisis de isoenzimas con los reactivos y equipos provistos en el Authentikit System (Innovative Chemistry, Marshfield, MA, USA). Para cada línea celular se determinó la movilidad electroforética de al menos dos diferentes isoenzimas, de un panel de siete (AST, G6PD, LD, MD, MPI, NP y Pep B) (Tabla 1). Brevemente, un pellet conteniendo 5x10⁶ células fue resuspendido en igual volumen de buffer de extracción de células (Tris Buffer, EDTA, y detergente en agua deionizada, pH 8,0), mantenido en reposo durante aproximadamente 15 min., y luego centrifugado a 2000g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante, conteniendo

do las proteínas extractadas, fue cosechado y 1-3 μ l fueron cargados en geles de agarosa fina y sometidos a electroforesis durante 25 min a 160 V. El gel fue cubierto con reactivo enzima-específico para una de las enzimas en análisis y luego incubado a 37°C durante 5- 20 min. El resultado fue la formación de una banda insoluble para marcar la localización de las enzimas en el gel. Las distancias de migración de las enzimas fueron medidas y comparadas con distancias de migración estandarizadas para las diferentes especies.

Análisis de PCR

Preparación de muestras. Un mililitro de suspensión celular con 5×10^5 células fue centrifugada a 12800xg durante 6 min. El pellet resultante fue lavado con PBS (Invitrogen) y centrifugado a 12800xg durante 6 min. El pellet fue luego resuspendido en 110 μ l de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, gelatina 0,01%) (GeneCraft, Münster, Alemania), 25 mM $MgCl_2$ (GeneCraft), 4,5 μ l de Nonidet P40 al 10% en agua destilada estéril (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 4,5 μ l de Tween 20 al 10% en agua destilada estéril (Sigma-Aldrich SRL, Milan, Italia), 0,6 μ l de proteinasa K (Invitrogen) desde una solución de 10 μ g/ml en agua destilada estéril. La muestra fue incubada por 1 h. a 60°C, seguido por 10 min. a 95°C. Las muestras se almacenaron congeladas a -20°C.

Control negativo. Para cada experimento se usó como control negativo de PCR, un «pool negativo de células» conteniendo 5×10^4 células de cada una de las ocho líneas representantes de ocho diferentes especies, excluyendo la especie en investigación. Ej.: el pool «no perro» contendría células de origen humano, ratón, rata, mono, gato, conejo, caballo y hamster. Fueron usadas las siguientes líneas celulares: Caski, Mab 62B1PC, B104, V-79, Vero, Cf2Th, PG-4 (S+L), SIRC y E. Derm (Tabla 1). En algunos experimentos fueron agregados líneas control adicionales de algunas especies seleccionadas.

Control positivo. En cada experimento fue usado como control positivo de PCR un «pool de células positivas», conteniendo 5×10^4 células de cada una de las siguientes nueve líneas celulares de las nueve diferentes especies para las cuales se habían preparado los primers: Caski, AKR/14C, JTC-27, V-79, Vero, Cf2Th, PG-4 (S+L), SIRC y E-Derm.

Primers. Los pares primers de oligonucleótidos, la información del GenBank y los tamaños de los productos de amplificación se han listado en la Tabla 2. Los oligonucleótidos fueron provistos por TIB Molbiol SRL (Génova, Italia). Fueron empleadas secuencias subunidad I Citocromo c oxidasa (cox I) para *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Canis*

familiaris, *Oryctolagus cuniculus*, *Mus musculus*, *Felis catus*, *Equus caballus*, *Cercopithecus aethiops* y secuencia citocromo b para *Cricetulus griseus* para seleccionar amplificaciones de primers altamente específicos. Se utilizó un programa de alineación de secuencias múltiples para analizar las posiciones polimórficas (10).

Amplificación. Para la amplificación, la mezcla de reacción (100 μ l) contenía 79 μ l de mezcla PCR [1,5 μ l de cada primer (en avance y retroceso) (10 pmol/ μ l), 10 μ l 10x de buffer PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), gelatina 0,01%, 15mM $MgCl_2$), 200 μ M dNTP (Hybaid, Teddington, UK) 10 μ l DMSO (Sigma Aldrich SRL), 39 μ l de agua destilada estéril], 20 μ l de muestra y 2,5 U Taq DNA polimerasa (GeneCraft). Las mezclas de reacción fueron cubiertas con 50 μ l de aceite mineral liviano (Sigma Aldrich SRL) y calentadas a 95°C durante 5 min., seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 seg., anillado de primer a 55°C durante 30 seg., y extensión a 72°C por 1 min. En el último ciclo el paso de extensión fue prolongado a 5 min. La amplificación se realizó en un termociclador programable OMN-E (Hybaid). En cada experimento se incorporó al menos un control negativo. El producto de la amplificación (10 μ l) fue corrido en un gel de agarosa al 2% (Bio-Rad Laboratories, Milan, Italia), teñido con bromuro de etidio (Invitrogen), visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiado.

Sensibilidad de la detección por PCR. Para determinar la sensibilidad de la amplificación PCR, extractos de DNA de líneas cultivadas con 1×10^5 células fueron diluidos 1/5, 1/12,5, 1/25, 1/125 y 1/625 con agua destilada estéril, hasta la cantidad de DNA correspondiente a 160 células y probada con el respectivo par-primer especie-específico. Se usaron las siguientes líneas celulares: MPP89, L929, GS-9L, V-79, Vero, Cf2Th, PG-4 (S+L), SIRC y E Derm.

Para verificar la capacidad del ensayo en detectar contaminación cruzada inter-especie, células de un cultivo celular de rata (RBL-1) fueron mezcladas con diferentes proporciones (0%, 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, y 100%) de células de mono verde africano (Vero): los extractos de 1×10^5 células de cada mezcla fueron luego probadas con los pares-primers específicos para mono.

Resultados

Amplificación PCR con pares primer especie-específicos

Líneas celulares humanas. Diez líneas celulares humanas fueron usadas para probar la especificidad de primers diseñados para reconocer una región de gen cox I humano (Tablas 1y2). Amplifica-

ción específica fue detectada en todas las líneas celulares humanas y en el control positivo, no detectándose amplificación en los controles negativos. La figura 1B muestra un resultado representativo.

Líneas celulares de ratón. El DNA de 8 líneas celulares murinas fue analizado por PCR usando primers específicos para la región del gen *cox I* de ratón. El origen murino fue confirmado para todas las líneas estudiadas (La figura 1C muestra un resultado representativo), mientras que no se detectó amplificación para los controles negativos. La especificidad del primer fue confirmada por amplificación PCR del DNA del pool de células positivas y el pool «no ratón» de células negativas (Figura 1 A).

Líneas celulares de rata. Seis líneas celulares fueron probadas con amplificación específica de DNA PCR de un fragmento de la región *cox I* de gen de rata. El origen rata fue confirmado para las seis líneas celulares (la figura 1 D muestra resultados de cuatro líneas celulares). También se detectó amplificación en el pool de células positivas (Figura 1A), mientras que no se detectaron amplificaciones en los controles negativos (Figura 1 A y D)

Líneas celulares de hamster chino. Tres líneas celulares de hamster fueron usadas para probar la especificidad de primers específicos para el gen citocromo b de hamster chino. Fue detectada amplificación específica en todas las líneas celulares de hamster y en el pool de células usadas como control positivo. No se detectó amplificación en los controles negativos (Figura 1 E).

Líneas celulares de mono verde africano. Dos líneas celulares de mono fueron usadas para probar la especificidad de primers diseñados para reconocer un fragmento del gen *cox I* de mono verde africano. Fue detectada amplificación específica en ambas líneas celulares y en el pool de células usado como control positivo. No se detectó amplificación en los controles negativos (Figura 1 F).

Líneas celulares de perro. El DNA de dos líneas celulares fue analizado por PCR con un par de primers específicos para la región *cox I* de perro. Se detectó amplificación específica en ambas líneas celulares y en el control positivo. No se observó amplificación en el pool de células usado como control negativo (Fig. 1 A y G).

Líneas celulares de gato. DNA de dos líneas celulares fue analizado por PCR con un par de primers que amplifican un fragmento de la región *cox I* de gato. Se detectó amplificación específica en ambas líneas celulares y en el control

positivo, mientras no hubo amplificación detectable en control negativo (Fig. 1 Ay G).

Líneas celulares de conejo. DNA de la línea celular SIRC fue analizado por PCR con un par de primers específicos para la región *cox 1* de conejo. Se observó amplificación específica en la línea celular y en el pool de células utilizado como control positivo. No se detectó amplificación en el pool de células usadas como control negativo (Fig. 1 H).

Líneas celulares de caballo. DNA de la línea celular E Derm, previamente probada con cuatro isoenzimas (LD, MD, NP y Pep B), aunque confirmada solamente con NP, fue analizado por PCR con un par de primers que amplifican un fragmento de la región *cox 1* de caballo. Se detectó amplificación específica en la línea celular y en el control positivo, mientras que no se detectó amplificación en los controles negativos (Fig. 1 A e I).

Sensibilidad de la detección por PCR. Los límites de detección para identificación fueron determinados mediante amplificación PCR, como se ha descrito en Materiales y Métodos. El límite inferior de detección fue determinado en alrededor de 4×10^3 células para hamster chino, 160 células para mono verde africano, y 800 para otras especies probadas (Fig.2).

La capacidad del ensayo para detectar contaminación cruzada interespecie fue verificada en un experimento en el que células de rata fueron mezcladas con diferentes proporciones de células de mono, y probadas en PCR pares primers específicos para mono. La banda específica es evidente en todas las líneas donde la línea celular de mono está presente, hasta en las menores concentraciones probadas (1%), y no se detecta banda en el control negativo (100% rata) (datos no mostrados).

Discusión

En este trabajo se presenta un método basado en PCR para definir o confirmar la especie de origen de líneas celulares de humanos o animales, y para detectar contaminación cruzada interespecie o incorrecta identificación de especie. Pares primers específicos fueron diseñados para el gen *cox I* o el gen citocromo b de nueve diferentes especies (humano, gato, perro, ratón, caballo, conejo, mono verde africano y hamster chino) entre las más usadas en los laboratorios de investigación (Tabla 2).

Un panel de 35 líneas celulares fueron probadas (Tabla 1), cuyas especies de origen habían sido previamente confirmadas mediante análisis bioquímico de isoenzimas. En todos los experi-

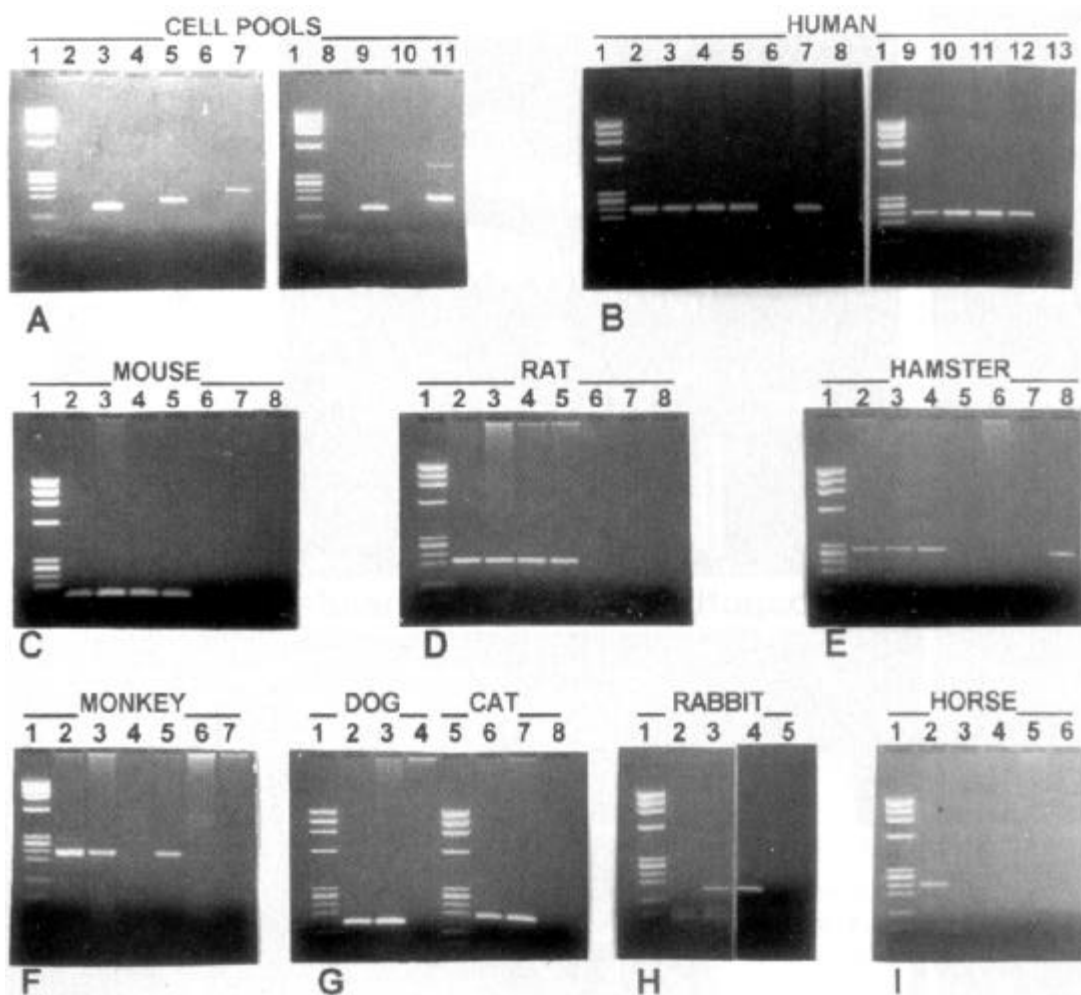


Tabla 1

mentos, las líneas celulares, cuando se probaron con el par primer relevante, mostraron una banda de amplificación correspondiente al tamaño esperado del fragmento amplificado, mientras que no se observó amplificación cuando se usaron primers específicos para diferentes especies.

La sensibilidad del ensayo fue probada para todas las especies estudiadas por ensayos de dilución (Fig. 2), una banda distinta es detectable a rangos de dilución entre 4×10^3 (hamster) y $1,6 \times 10^2$ células (mono). En un ensayo de contaminación cruzada, una banda de contaminación fue detectada en presencia de hasta 1% de células contaminantes (datos no mostrados). En base a estos resultados, se prepararon pools de células positivas y negativas como controles positivos y negativos.

Cuando el método aquí descrito se compara con el análisis bioquímico de isoenzimas, se pueden

hacer algunas consideraciones. El análisis de isoenzimas es considerado el test más confiable para la identificación de especies de líneas celulares y es ampliamente usado por los centros de reposición de líneas celulares en el mundo. El análisis de una línea celular con 3-5 sustratos de isoenzimas puede identificar o confirmar la especie de origen de la línea celular y puede detectar e identificar contaminación cruzada interespecie, siempre que el porcentaje de células contaminantes supere el 25% (15) o 11% (25). Por otra parte, requiere equipamientos específicos y reactivos costosos, y muy pocos laboratorios de investigación realizan esta prueba regularmente a sus líneas celulares como monitoreo de rutina. Además el ensayo de isoenzimas no siempre permite confirmar la especie de una línea celular. Por ejemplo, para la línea equina E Derm solamente una enzima (NP) da resultados compatibles con el origen esperado (Tabla 2).

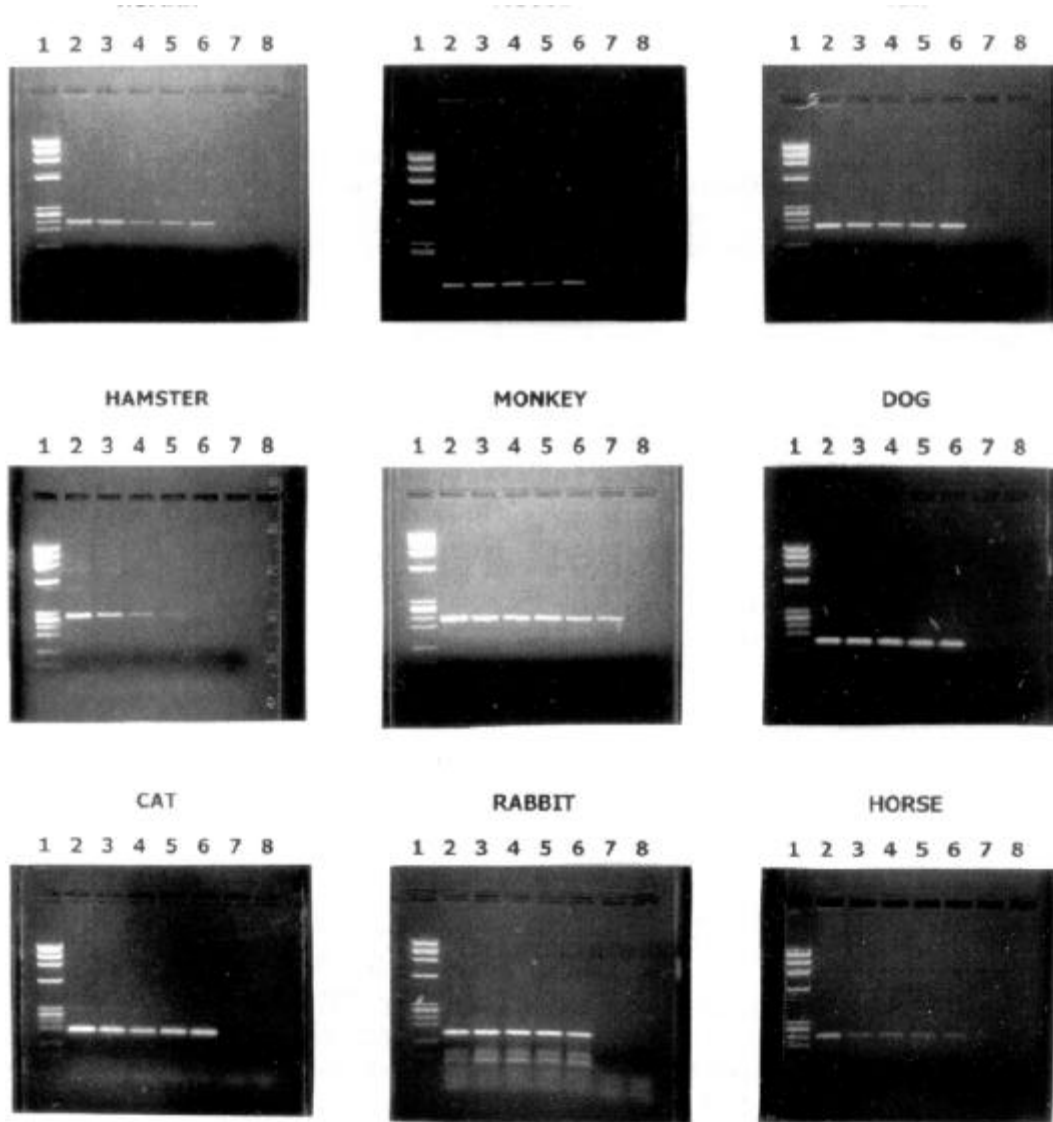


Tabla 2

La PCR se ha transformado en una técnica de rutina en un gran número de laboratorios de investigación biomédica, y la aplicación de esta técnica a la determinación del origen de las líneas celulares no implica equipamiento exclusivo ni reactivos costosos.

El presente ensayo permite confirmar la especie de origen de una línea celular mediante una simple amplificación PCR, y una contaminación cruzada con una especie definida puede ser detectada mediante un simple ensayo con un rango de sensibilidad entre 1 y 4% de células contaminantes. Más aun, el origen equino de la línea E Derm puede ser fácilmente verificado por este ensayo.

El análisis de los catálogos de las principales colecciones de cultivos en el mundo muestra que las

líneas celulares de origen humano, ratón y rata cubren 77 al 92% del material disponible. Puede también postularse que esas son las especies mayormente usadas en los laboratorios de investigación. Cuando se sospecha una contaminación cruzada interespecie, la línea celular puede ser monitoreada con primers relevantes dependiendo de las especies de las líneas mayormente usadas en el laboratorio. Así, un simple ensayo con 3-4 pares de primers, diseñados para servir como chequeo de rutina, puede rápidamente determinar si la línea celular ha sido «sobrecrecida» por una línea de diferente especie o si ha ocurrido un error de rotulado. El uso de este test junto con ensayos capaces de detectar contaminación intraespecie (sistema de perfil de DNA, tal como multiplex STR) darán una aceptable confiabilidad en la calidad de las líneas usadas en la mayoría de los laboratorios.

REFERENCES

1. **Barile, M.F.** Mycoplasma –tissue cell interactions. p. 425-574. *In* JG Tully and R. F. Whitcomb. (Eds). *The Mycoplasmas*, vol II. Academic Press. New York.
2. **Brand K. G. And T.J. Syverton** . 1960. Immunology of cultivated mammalian cells. Species specificity determined by hemagglutination. *J.Natl.Cancer Inst.* 24:1007-1009.
3. **Chen T.R.** 1977. In situ detection of my cytoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res.* 104:255-262.
4. **Denecke J.K., Becker H, JurgensR. Gross and J.F.A. Wolff.** 1999. Falsification of tetrazolium dye (MTT) based cytotoxicity assay results due to mycoplasma contamination of cell culture. *Anticancer Res.* 19: 1245-1248.
5. **Drexler H.G. W.G. Dirks and R.A.F. MacLeod** 1999. False human hematopoietics cell lines: cross-contaminations and misinterpretations. *Leukemia* 13: 1601-1607
6. **Fogh J.** 1973 *Contamination in Tissue Culture.* Academic Press. New York.
7. **Freshney R.I.** 1994. *Culture of Animal cells.* P 243-252. John Wiley & Sons. New York.
8. **Gartler S.M.** 1967 Genetic markers as tracers in cells culture. *Natl.Cancer Inst.Monogr.* 26:167-195
9. **Gartler S.M.** 1968. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* 217: 750-751.
10. **Hall T.A.** 1999 Symposium on RNA Biology III. RNA. Tool and Target. Research Triangle Park. North Carolina. USA. October 15-17. *Proc Nucleic Acids Symp.Ser* 47: 95-98
11. **Harris H.** 1996 Enzyme polymorphism in man. *Proc R Soc. Lond B Biol Sci* 164: 298-301
12. **Hay R.J.** 1991 Operator induced contamination in cell culture systems. *Dev. Biol. Stand.* 75: 193-204
13. **Hay, R.J.** 1992 Cell line preservation and characterization. P 95-148. *In* R. I. Freshney (Ed.), *Animal Cell Culture. A practical approach*, 2nd ed. Oxford University Press. Oxford.
14. **Hay, R.S. J.Caputo and M.I.Macy (Eds)** 1992. *ATCC Quality Control Methods for Cell Lines.* 2nd ed. American Type Culture Collection Publishing. Rockville, MD.
15. **Hay,R.J. T.R.Chen M.I.Macy and Y.A. Reid.** 1992 Replay to «Cell, lines and DNA fingerprinting». *In Vitro Cell Dev Biol* 28 A:593-594.
16. **Hopert A C.C. Uphoff , M. Wirth , H Hauser and H.G. Drexler.** 1993 Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. *J. Immunol.Methods.* 164: 91-100.
17. **Innovative Chemistry.** 1988. *AuthentiKit System. Handbook For Cell Authentication and Identification*, p 31-46 2nd ed. Marshfield. MA
18. **Lincoln,C.K. and M.G. Gabridge.** 1998 Cell culture contamination: sources, consequences, prevention and elimination. *Methods Cell Biol.* 57: 49-65
19. **Macleod R.A.F. W. G. Dirks Y. Matsuo, M. Kaufmann H.Mikh and H.G. Drexler.** 1999 Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int.J.Cancer* 83: 555-563
20. **Markovic, O and N. Markovic** 1998 Cell cross-contamination in cell cultures, the silent and Neglected danger. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34: 1-8
21. **Masters. J.R. J.A. Thomson, B. Daly-Burns Y. A. Reid, W.G. Dirks P. Parker I. H. Toji, T.Ohno et al** 2001 Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98 : 8012-8017.
22. **Masters J.R. P. Bedford A. Kearney S. Poverly and I.M. Frank** 1988. Bladder carcinoma cell line cross-contamination: identification using a locus specific minisatellite probe. *Br. J.Cancer* 57:284-286
23. **McGarrity G.J.** 1982 detection of mycoplasma infection in cell cultures. *Adv. Cell Cult.* 2: 99-131
24. **Nelson-Rees W.A. D.W. Daniels and R.R. Flandermeier.** 1981. Cross contamination of cell culture. *Science* 212: 446-452
25. **Nims R.W. A.P. Shoemaker M.A. Bauernschub** 1998 Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34:35-39
26. **Ong. G. L. and M. J. Mattes** 1998. The processing of antibodies bound to B-cell lymphomas: the effects of inadvertent mycoplasma contamination. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34:527-528
27. **Parodi B. O Aresu P Visconti M. Cesaro R. Lorenzini and T. Ruzzon** 2000. The Interlab Cell Line Collection (ICLC) Cell Banks a service to animal cell technology p. 313-314. *In* G. Stacey a A. Doyle (Eds). *Encyclopedia of Cell Technology.* Editor-in-Chief . R. E. Spier. John Wiley and sons. New York.
28. **Parodi B. O Areu P Visconti E Magi AM Parodi and T Ruzzon** 2000. Authentication and quality control of cell lines at the Interlab Cell Line Collection, p 282-286. *In* H Schoff, H. Spielmann and HA Triethart (Eds Ersatz und Ergarazuanmethoden zu Trersuchen Springer Wen New York.
29. **Salki RK DH Getfand ,S Stoffel ,SJ Scharf, R. Iliguchi ,GT Horn, KB Mullis and HA Erlich** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239: 487-491
30. **Salio M. V. Cerundolo and Lanzavecchia.** 2000. Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 705-708
31. **Sipson WF and CS Stulberg.** 1963. Species identification of animal strains by immunofluorescence. *Nature.* 189:616-617
32. **Stacey G. N., B. J. Bolton and A. Doyle.** 1992. DNA fingerprinting transforms the art of cell authentication. *Nature* 357: 261-262.
33. **Strube KG D Grunkke and HG Drexler** 1995. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31: 115-119
34. **Stulberg C. S.** 1973. Extrinsic cell contaminations of tissue cultures. P 1-27. *In* J. Fogh (Ed.), *Contamination in Tissue Culture.* Academic Press. New York

SERVICIOS OFRECIDOS POR ABAC

1- líneas celulares

La ABAC ofrece cada una de las líneas especificadas seguidamente en forma de ampollas con células congeladas o en botella descartable T 75 (superficie de trabajo de 75 cm²).

Líneas disponibles en INEVH

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
BHK-21	Riñón de hamster dorado	Hamster	Monocapa de fibroblastos	ATCC
CHO-K1	Ovario de hamster chino	Hamster chino	Monocapa epitelial	ATCC
MRC-5	Pulmón fetal humano (diploide)	Hombre	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Wish	Amnion humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Hep-2	Carcinoma humano (órgano)	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Vero C-76	Riñón de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Vero E-6	Riñón de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
L-929	Tejido conectivo de ratón	Ratón	Monocapa epitelial	ATCC
MDBK	Riñón bovino	Vaca	Monocapa epitelial	ATCC
RK13	Riñón de conejo	Conejo	Monocapa epitelial	ATCC
CRFK	Riñón de gato	Gato	Monocapa de fibroblastos	ATCC
HeLa	Carcinoma de cervix humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
RAJI	Linfoma de Burkitt humano	Hombre	Linfoblastos en suspensión	ATCC
IIBMel J	Melanoma humano	Hombre		ARGENTINA
T24	Carcinoma de vejiga humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
E. Derm	Dermis de caballo	Caballo	Monocapa de fibroblastos	ATCC
3T3 L1	Embrión de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Mc'Coy	Células de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Sarcoma 180	Sarcoma de ratón Swiss Webster	Ratón		ATCC
BT	Células de cornete nasal bovino (Bovine Turbinate)	Vaca		ATCC
EBTr	Traquea de embrión bovino	Vaca	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Clone C6/36	Larva de mosquito Aedes albopictus	Mosquito		ATCC
A-72	Tumor canino	Perro		ATCC
A-549	Carcinoma de pulmón	Hombre		ATCC
+3T3	Embrión de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	
SK-MEL-28	Melanoma maligno humano	Hombre		ATCC
CV-1	Fibroblastos de riñón	Mono		ATCC

Líneas disponibles en INTA:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
PK-15	Riñón porcino	Cerdo	Monocapa epitelial	ATCC
MDCK	Riñón canino	Perro	Monocapa epitelial	ATCC

Líneas aún no disponibles, que serán incorporadas para su distribución en un futuro próximo:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
C32TG	Melanoma amelanótico humano	Hombre		ATCC
P3HR1	Linfoblastos humanos derivados de Linfoma de Burkitt	Hombre		ATCC
Mosquito	Larva Aedes albopictus	Mosquito	Monocapa epitelial	ATCC
D-17	Sarcoma osteogénico de perro	Perro	Monocapa epitelial	ATCC
Y-1	Epitelio tumor adrenal	Ratón		ATCC
SF9	Ovario	Spodoptera frugiperda		ATCC
SL-29	Embrión	Pollo		ATCC
MDOK	Riñón	Ovino		ATCC

Aranceles:

No socios de ABAC: U\$s 90 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Los pagos se efectuarán contra entrega cuando las líneas celulares se retiren personalmente del lugar de distribución. En caso de ser requerido el envío postal, el material será despachado aproximadamente 72 horas luego de recibida la suma total. Esta será abonada por cheque o giro postal extendido a nombre de **Asociación Banco Argentino de Células**.

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INEVH dirigirse a:

Dra. Ana María Ambrosio
Instituto Nacional de
Enfermedades Virales Humanas (INEVH)
Monteagudo 2510
2700 Pergamino (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: anaambrosio@hotmail.com - Dra. Ambrosio
Tel.: (02477) 4 29712 /4 29713/ 4 29714
Fax.: (02477) 4 33045

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INTA dirigirse a:

Dr. Osvaldo Zabal
INTA Castelar
C.C. 77
1708 Morón (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: ozabal@cicv.inta.gov.ar - Dr. Osvaldo Zabal
Tel.: 4 621-1447/1278 int. 121
Fax: 4 621-1743

2- Control de micoplasmas en muestras de células*

El control de micoplasmas se realiza en muestras de células mediante la técnica de Chen, que consiste en la tinción del ADN con bis Benzimida (Hoechst 33258).

Aranceles:

No socios de la ABAC: U\$s 30 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Para coordinar el envío de muestras los interesados deberán contactarse con la Dra. Ambrosio por carta, telefónicamente o por Fax o e-mail.

*Chen TR In situ demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain.

Exp. Cell Res. 104: 255-262, 1977

3-DEPOSITO DE AMPOLLAS EN NITROGENO LIQUIDO:

Se recuerda que se encuentra a disposición de la comunidad científica la posibilidad de conservar réplicas de sus ampollas en tanques de nitrógeno líquido, asegurando así el resguardo de líneas valiosas. **El depósito de ampollas con células congeladas en nitrógeno líquido** tiene un **arancel anual de U\$s 50 por caña**, conteniendo 6 ampollas, siendo responsabilidad de la ABAC la custodia de los materiales en depósito y el mantenimiento del frío. Este servicio no involucra ningún tipo de control de calidad ni manipulación alguna de las líneas celulares en depósito.

Cada estudio sobre el material depositado se realizará a requerimiento específico del interesado, contra el pago de un arancel adicional. Los Socios de ABAC gozan de 1/3 de descuento de la cuota societaria sobre estos aranceles.

4- MANUAL DE ATCC:

La Comisión Directiva de la ABAC desea poner en conocimiento de sus asociados y a los usuarios de células cultivadas en general, que se encuentra dis-

ponible la versión en español de la publicación del American Type Culture Collection (ATCC):

ATCC - Métodos de Control de Calidad para Líneas Celulares - Edición 1992. Traducción ABAC

El costo de cada ejemplar es de treinta dólares (U\$ 30, o su equivalente en pesos) más los gastos de envío. Las órdenes de compra deberán remitirse a los destinos detallados en referencia a los servicios de la ABAC.

Informes y Venta

abac_informes@yahoo.com.ar

Se recuerda a los Sres. Asociados de ABAC que para poder acceder al beneficio de **descuentos en servicios o adquisición** de células, **DEBERÁN TENER LA CUOTA AL DIA, AL 31 DE JULIO DE CADA AÑO (fecha de cierre del ejercicio económico).**

Desde ya, agradecemos su colaboración.

CUOTA SOCIETARIA:

SOCIOS	ARANCEL ANUAL
INDIVIDUALES	\$ 30
INSTITUCIONALES	\$ 100
COOPERADORES	\$ 200

Los pagos se realizarán mediante:

1.- Giro postal a nombre de:

Dra. Ana María Ambrosio - ABAC

INEVH - Monteagudo 2510

Código Postal 2700, Pergamino

2.- Por medio de depósito en cualquier sucursal del Banco Francés, en cuenta:

ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS
Nº de Cuenta Corriente en Pesos: 106-3584/5
Enviar talón por correo postal simple a:
ABAC, Julián Alvarez 1218 (C1414DRZ),
Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

El recibo será remitido por correo.

Se convoca a los Sres. Asociados que adeuden las cuotas societarias correspondientes a dos o más años, a que regularicen su situación, hasta el 31 de julio del corriente. A partir de esa fecha serán dados de baja, acorde al artículo XVII del Estatuto vigente.

ABAC en su nueva sede dispone de espacio para la realización de Conferencias.

Los interesados pueden solicitar información sobre condiciones y precios, comunicándose a:

abac_informes@yahoo.com.ar