



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58224** (13) **U**
(51) МПК
C12N 5/02 (2011.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ АДАПТАЦІЇ АДГЕЗІЙНИХ КЛІТИН ДО РОСТУ В СЕРЕДОВИЩІ БЕЗ СИРОВАТКИ**

1

2

(21) u201010037

(22) 13.08.2010

(24) 11.04.2011

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) КОЩІЙ СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА, ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ВИСЕКАНЦЕВ ІГОР ПАВЛОВИЧ

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

(57) Спосіб адаптації адгезійних клітин до росту в середовищі без сироватки, який включає вирощування клітин в стандартному середовищі культивування, що містить сироватку, і поступове зниження концентрації сироватки після ряду пасажів, який **відрізняється** тим, що при першому пересіві зі зниженим вмістом сироватки в середовище культивування додатково вводять 0,1% метилцелюлози.

Корисна модель належить до галузі біотехнології і може бути використана для отримання нових культур клітин, здатних до культивування у безсироваточному середовищі.

Відомий спосіб адаптації адгезійних клітинних ліній до вирощування у середовищі без сироватки, який складається з трьох етапів: переведення клітин до суспензійного культивування, що включає обробку клітин трипсином для їх зняття з поверхні культурального флакону і пересів отриманого інокулята в культуральні флакони, оброблені силіконом; вирощування клітин в стандартних середовищах культивування з сироваткою, поступово знижуючи вміст сироватки і частково замінюючи її добавками, що виконують роль сироватки, і культивування до отримання високої густоти клітин [1].

Недоліком цього способу є його трудомісткість, яка пов'язана з тим, що для отримання суспензійного інокулята при пасуванні клітин потрібна обробка культуральних флаконів силіконом, а після адаптації клітини являють собою суспензійні культури, тому для їх прикріплення до поверхні флаконів в середовище культивування додають сироваточні фактори адгезії або обробляють поверхню флаконів субстратом для адгезії клітин. Крім цього, несприятливим в способі є необхідність використання трипсину для зменшення міжклітинної агрегації, який негативно впливає на клітини.

Відомий спосіб адаптації адгезійних клітин до вирощування у середовищі без сироватки, в якому в процесі культивування, після відкріплення клітин з культуральної поверхні сумішшю трипсину з версеном і ресуспендування в живильному середо-

вищі, їх інокулят вносять одразу без додавання сироватки в безсировинне середовище СНО Т1. Травмуючу дію трипсину зупиняють інгібітором з соєвих бобів. Для збереження адгезії клітин при кожному пересіві їх вирощують в заздалегідь покритих адгезивним субстратом культуральних флаконах [2].

Недоліком цього способу є необхідність використання трипсину при пересівах для відкріплення клітин з поверхні культурального флакону, який травмує клітини, особливо ті, що культивуються без сироватки.

Найбільш близьким до заявленого способу за своєю суттю є спосіб адаптації адгезійних клітин до зростання без сироватки, який включає вирощування клітин в стандартному середовищі культивування, що містить суміш середовищ F12 і DME (1:1) та сироватку, концентрацію якої поступово знижують після ряду пасажів. Для стимуляції розмноження клітин сироватку одночасно замінюють набором гормонів, гормоноподібних ростових факторів, простагландинів, транспортних білків, сироваточних факторів адгезії, специфічних для окремої клітинної лінії. При пересівах для відкріплення клітин з поверхні флаконів використовують трипсин, залишкову дію якого інактивують інгібітором з соєвих бобів [3].

Недоліком цього способу є необхідність додавання в стандартне середовище культивування замість сироватки забагато композицій, а також використання трипсину при пересівах, що ускладнює спосіб. Крім того, застосування трипсину негативно впливає на клітини.

(19) **UA** (11) **58224** (13) **U**

В основу корисної моделі поставлена задача спростити відомий спосіб адаптації адгезійних клітин до зростання без сироватки за рахунок зменшення кількості добавок в стандартне середовище культивування для заміни сироватки, а також за рахунок відмовлення від використання трипсину при культивуванні ліній клітин, адаптованих до росту в середовищі з низьким вмістом сироватки.

Ця задача вирішується тим, що в способі адаптації адгезійних клітин до росту в середовищі без сироватки, який включає вирощування клітин в стандартному середовищі культивування, що містить сироватку, і поступове зниження концентрації сироватки після ряду пасажів, згідно з корисною моделлю, при першому пересіві зі зниженим вмістом сироватки в середовище культивування додають 0,1% метилцелюлози (МЦ).

Введення 0,1% МЦ в стандартне середовище культивування дозволяє одержати популяцію адгезійних клітин, здатних до росту в безсироваточному середовищі, без застосування набору гормонів, гормоноподібних ростових факторів, простагландинів, транспортних білків та сироваточних факторів адгезії. Використання 0,1% МЦ в процесі адаптації клітин запобігає агрегації клітин і дозволяє позбавитись від трипсину для ліній клітин, що культивуються в середовищі з вмістом сироватки <1%. Все це дає можливість спростити спосіб і зробити його більш доступним для широкого застосування.

Спосіб здійснюють таким чином.

Клітини вирощують в стандартному середовищі 199 з 5% сироватки ВРХ, послідовно знижуючи її концентрацію через декілька пасажів до 2,5, 1,0, 0,5, 0,2, 0,12, 0,06 і 0%. При першому пересіві, починаючи з 2,5% сироватки, в середовище культивування додають 0,1% МЦ. Після адаптації клітин до культивування в середовищі з відповідним зниженим вмістом сироватки і утворення клітинами повноцінного моношару, їх знімають зі скла спочатку відкріплюючим розчином трипсину з версеном, а починаючи з вмісту сироватки 1,0% при культивування - тільки розчином версеном. Далі ресуспендують в середовищі культивування і до отриманої суспензії клітин додають середовище з більш низьким вмістом сироватки. Так поступово одержують популяцію адгезійних клітин, здатних до формування повноцінного моношару при культивуванні в безсироваточному середовищі.

Приклад

Попередньо готували стерильний 2% розчин МЦ в середовищі 199, перемішували, залишали на

добу при кімнатній температурі, потім зразки залишали в холодильнику при 4°C до повного розчинення.

Перевиті клітини нирки ембріона свині (СПЕВ) культивували в стандартному середовищі 199 з 5% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби і 100 ОД/мл канаміцину, послідовно знижуючи концентрацію сироватки до 2,5, 1,0, 0,5, 0,2, 0,12, 0,06 і 0%, відповідно, через 6, 6, 10, 5, 4, 6, 6 пасажів. Починаючи з концентрації 2,5%, при кожному пересіві в стандартне середовище культивування додавали по 0,1% МЦ. Через місяць, після адаптування клітин до зростання в середовищі з 2,5% ЕС, клітини були здатні до формування щільного моношару. Далі клітини знімали зі скла відкріплюючим розчином 0,25% трипсину з 0,02% версеном в співвідношенні 1:4. Суспензію клітин центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, ресуспендували середовищем культивування з 0,1% МЦ і 1,0% ЕС, інокулять клітин з концентрацією 1,2-2,0·10⁵ кл/мл переносили в культуральний флакон об'ємом 0,2 л з 20 мл середовища 199, що містило 1,0% ЕС і 0,1% МЦ, і інкубували при +37°C протягом 72-96 годин. Адаптували клітини декілька пасажів. При пересівах, після отримання моношару клітин, їх знімали з поверхні культурального флакону 0,02% розчином версеном. Аналогічно продовжували адаптувати клітини до росту в середовищі культивування з більш низьким вмістом сироватки: 0,5, 0,2, 0,12, 0,06 і 0%. Таким чином, поступово одержали популяцію адгезійних клітин, здатних до формування повноцінного моношару при зростанні в середовищі без сироватки. Здатність клітин одержаної лінії до формування повноцінного моношару, який зберігався без змін протягом 3-х діб, а також високий рівень (>95%) збережених клітин за фарбуванням 0,4% трипанового синього, свідчило про адаптацію отриманої лінії клітин СПЕВ до росту в середовищі без сироватки.

Джерела інформації:

1. M.S. Sinacore, D. Drapeau, S.R. Adamson. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. // Molecular Biotechnology. - 2000. - V 15. - P. 249-257.
2. M. Schroder, P. Friedl. A Protein-free solution as replacement for serum in trypsinization protocols for anchorage-dependent cells. // Methods in Cell Science. - 1997. - V. 19. - P. 137-147.
3. D. Barnes, G. Sato. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. // Analytical Biochemistry. - 1980. - V. 102. - P. 255-270.