



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40311 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ ГЕПАТИТУ С

1

(21) u200900923

(22) 06.02.2009

(24) 25.03.2009

(46) 25.03.2009, Бюл. № 6, 2009 р.

(72) РИБАЛКО СВІТЛАНА ЛЕОНТІЇВНА, UA, ПОРВА ЮЛІЯ ІВАНІВНА, UA, ДЯДЮН СВІТЛАНА ТЕРЕНТІЇВНА, UA, ЗАВЕЛЕВИЧ МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ, UA, БОРОВІКОВ ВАДИМ МИХАЙЛОВИЧ, UA, ФЕДОРЧЕНКО ДАР'Я БОРИСІВНА, UA, АЛЕКСЕЄНКО ІВАН ПРОКОПОВИЧ, UA, ЖАРКОВА ЛЮДМИЛА ДМИТРІВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ

2

ІМ.Л.В.ГРОМАШЕВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ", UA, РИБАЛКО СВІТЛАНА ЛЕОНТІЇВНА, UA, ПОРВА ЮЛІЯ ІВАНІВНА, UA, ДЯДЮН СВІТЛАНА ТЕРЕНТІЇВНА, UA, ЗАВЕЛЕВИЧ МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ, UA, БОРОВІКОВ ВАДИМ МИХАЙЛОВИЧ, UA, ФЕДОРЧЕНКО ДАР'Я БОРИСІВНА, UA, АЛЕКСЕЄНКО ІВАН ПРОКОПОВИЧ, UA, ЖАРКОВА ЛЮДМИЛА ДМИТРІВНА, UA

(57) Спосіб культивування вірусів гепатиту С, що включає культивування на суспензійних культурах клітин, який відрізняється тим, що як суспензійну культуру клітин використовують трансфектовану кДНК-ВГС культуру МТ-4.

Корисна модель відноситься до вірусології, і може використовуватись для одержання біомаси вірусів, вірусних антигенів для діагностики, одержання вакцинних препаратів.

Вірус віднесений до роду Hepatitis C like-viruses родини Flaviviridae [1], містить РНК позитивної полярності [2], яка характеризується високим ступенем гетерогенності [3].

Відомі численні спроби створення моделі гепатиту С [1, 2, 3, 4], які довгий час не давали бажаних результатів, оскільки рівні реплікації ВГС в системах in vitro були низькими. Прототипом для корисної моделі є трансформовані клітини людської гепатоми Huh-7, з люцеферазною репортерною конструкцією pGL3 [5]. Стандартними моделями, які використовувалися зарубіжними авторами - клітини МТ-4, клітини Daudi, а також клітини Hela, трансформованої рекомбінантною плазмідною (pВК-СМС-НСV-реплікон), що містить структурні гени ВГС [5].

Культивування ВГС в культурах клітин не є стабільним і при зберіганні при температурі мінус 70°C вірус втрачає інфекційність.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб отримання продукуючих вірус гепатиту С культур клітин МТ-4-кДНК ВГС за рахунок відомих етапів.

Поставлене завдання вирішують введенням в чутливу культуру клітин кДНК ВГС від хворої людини методом трансфекції.

Приклад 1. Спосіб одержання продукуючих ВГС культур клітин для цього виділяють РНК ВГС у відповідності до рекомендацій фірми виробника за допомогою комплексу реагентів «РИБО-сорб» (ФГУН «ЦНДІЕ» Роспотребнагляду, Москва), який призначений для виділення РНК/ДНК збудників інфекційних хвороб для наступного аналізу методом зворотної транскрипції та полімеразної реакції.

В пробірки, що містять по 450 мкл лізуючого розчину і 5 мкл внутрішнього контрольного зразку (ВКЗ), додають по 100 мкл проб (сироватка або плазма хворих на вірусний гепатит С). В кожную пробірку окремим наконечником вносять по 25 мкл ресуспендованого сорбенту. Сорбцію проводять при кімнатній температурі протягом 5 хв., ресуспендує на вортексі. Далі пробірки центрифугують для осадження сорбенту при 10000 об/хв. протягом 30 сек на мікроцентрифузі «Eppendorf». Супернатант відбирають, використовуючи вакуумний відсмоктувач.

До осаду додають 400 мкл розчину для відмивки 1. Перемішують на вортексі до повного ресуспендування сорбенту, центрифугують 30 сек при 10000 об/хв. Супернатант відбирають, використовуючи вакуумний відсмоктувач.

Далі осад промивають двічі розчином для відмивки 3 (по 500 мкл), що містив 70% етанол. Ретельно ресуспендує та осаджують сорбент при 10000 об/хв. Супернатант відбирають, використовуючи вакуумний відсмоктувач.

(13) U

(11) 40311

(19) UA

Останню відмивку аналогічно попереднім проводять в ацетоні (400 мкл). Повністю видаляють супернатант із кожної пробірки. Осад підсушують в твердотільному термостаті «Біоком» (Росія) при температурі 60°C протягом 10 хвилин.

Елюцію РНК проводять в 50 мкл деіонізованої води, що не містить РНКаз. Інкують в термостаті при 60°C протягом 3 хв. Супернатант містить очищену РНК. Проби готові до постановки реакції зворотної транскрипції і ПЛР.

Далі отримують кДНК. Реакцію зворотної транскриптази РНК проводять у відповідності до рекомендацій фірми виробника за допомогою комплексу реагентів «Реверта-Л» (ФГУН «ЦНДІЕ» Роспотребнагляду, Москва), який призначений для отримання кДНК по матриці РНК збудників інфекційних хвороб для наступного аналізу методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Матеріалом для дослідження слугує розчин РНК, виділений з використанням комплексу реагентів «РИБО-сорб» (ФГУН «ЦНДІЕ» Роспотребнагляду, Москва).

Реакційна суміш складається з DTT ліофілізованого, 125 мкл розчину RT-mix та 6 мкл ревертази (MMLV). До 10 мкл готової реакційної суміші додають 10 мкл РНК-проби. Зворотну транскрип-

цію здійснюють при 37°C протягом 30 хв., в результаті чого отримують кДНК.

Трансфекцію суспензійних культур МТ-4 здійснюють кальцій-фосфатним методом [6]. Ізотонічний розчин, що містить буфер HEPES, фосфат і ДНК змішують з хлористим кальцієм. Утворюється осад із часток фосфату кальцію та ДНК, розмір яких лежить в нанометровому діапазоні. Суспензію додають до культури клітин, які поглинають частки.

Готують розчини: А - HEPES - рН 7,1 - 300 мкл; В - 2 М CaCl₂ - 300 мкл. Для приготування розчину В до 36 мкл CaCl₂ додають 20 мкг кДНК HCV і доводять дистильованою водою до 300 мкл. Потім розчин А по краплям додають до розчину В, продувають повітря і витримують 30 хв. при кімнатній температурі до утворення осаду. Отриманий осад по краплям додають в культури клітин МТ-4. Культури трансфєкованих кДНК вірусу гепатиту С інкують при температурі 36,5°C в термостаті з подачею 5% CO₂. Тестування вірусу здійснюють методом ПЛР на 2-му пасажі на 9-у добу культивування та на 5-му пасажі на 17 добу культивування.

Приклад 2. Результати визначення продукції вірусу гепатиту С подані в таблиці 1.

Таблиця 1

Культивування кДНК ВГС в культурі клітин МТ-4

№№ п/п	Вихідне вірусне навантаження (г/екв.)	1-й пасаж, 9-й день культивування (г/екв.)	5-й пасаж, 17-й день культивування (г/екв.)
1	328 540	133 164	108 098
2	176 351	19 440	22 385
3	221 335	84 888	118 291
4	165 225	237 168	285 415
5	124 176	459 756	472 156

Після 30 діб культивування продукуючих культур клітин МТ-4, трансфєкованих вірусом гепатиту С, їх заморожують у рідкому азоті. За 24 години до заморожування клітинної лінії ростове середовище (RPMI-1640 + 10 % фетальної сироватки) замінюють на підтримуюче середовище (RPMI-1640 + 2% фетальної сироватки).

Клітини знімають версеном, ресуспендують в поживному середовищі, підраховують в камері Горяєва та відмічають їхню життєздатність (за допомогою 1% розчину трипанового синього). Клітини заморожують, якщо їх життєздатність переви-

щує 90%, для чого їх сконцентровують шляхом центрифугування. Для заморожування використовують як криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО), який вносять в попередньо охолоджену клітинну суміш. Потім клітини переносять у рідкий азот.

Через 1 місяць продукуючі МТ-трансфєковані ВГС культури розморожують та культивують в термостаті при температурі 36,5°C з подачею 5% CO₂. Результати визначення продукції вірусу гепатиту С подані в таблиці 2.

Таблиця 2

Культивування кДНК ВГС в культурі клітин МТ-4 (після розморожування)

№№ п/п	На 5-й день культивування (г/екв.)	На 30-й день культивування (г/екв.)
1	309 784	127 978
2	51 916	31 659
3	828 240	616 622
4	658 326	517 085
5	545 988	520 312

Таким чином, одержані продукуючі культури клітин, трансфеговані кДНК ВГС, які дають стабільну продукцію вірусу гепатиту С як до заморожування трансфегованих клітин MT-4, так і після розморожування.

Література.

1. Hepatitis C Like Viruses // International Committee on Taxonomy of Viruses. 6-th Report. - New York, 1977. - P. 424.

2. Choo Q.-L., Kuo G., Weiner A.I. et al. // Science. - 1989. - Vol. 244. - P. 359-362.

3. Qn D., Hahtz O., Goug M. Et al. // J. Gen Virol. - 1994. - Vol. 75. - P. 1063-1070.

4. Carloni G., Lacovacci S., Sargiacomo M. et al. // Arch. Virol. - 1993. - Suppl. - № 8. - P. 31-39.

5. Mizutani T., Kato N., Ikeda et al. Characterization of hepatitis C vims replication in cloned cells obtained from a human T-cell leukemia virus type 1-infected cell line, MT-2 // J.virol. - 1996. - 70. - P.7219-7223.

6. Graham F.L., van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. / Virology, 1973, 52 (2), P. 456-467.