



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40865 (13) A

(51) 7 C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЛІНІЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНИХ КЛІТИН ТЕСТИКУЛІВ ПОРОСЯТ ДЛЯ ВІРУСОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

(21) 2000084920

(22) 18.08.2000

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Жуковський Анатолій Миколайович, Куче-
рявенко Олексій Олександрович, Пітрович Віта-
лій Анатолійович

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УААН

(57) Лінія перещеплюваних клітин тестикулів по-
росят № 103 (Депозитарій Державного науко-
вого-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів) для вірусологічних досліджень.

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології і являє собою лінію перещеплюваних клітин тестикулів поросят, що використовуються для вірусологічних досліджень. Відома перещеплювана лінія СПЕВ широко застосовується для вірусологічних досліджень [1]. Культура характеризується утворенням моношару світлих без зернистості клітин, які щільно прилягають одна до одної і мають типову для даної лінії морфологію. Найбільш оптимальною є схема пересіву матрасів 1:3 і 1:4. При цьому кожна партія клітин протягом тижня пересівається 1-2 рази. Культура СПЕВ чутлива до більшості вірусів, проте ЦПД деяких вірусів проявляється на ній лише після попередньої адаптації, тоді як на культурі ПТП вже з першого пасажу.

Найбільш близьким технічним рішенням є штам перещеплюваних клітин тестикулів поросят [2]. Ця культура отримана із тестикулів поросят віком 1-30 днів. Вона характеризується наступними морфологічними та біологічними характеристиками: культура однорідна, представлена епітеліоподібними клітинами полігональної форми з добре вираженими межами, цитоплазма клітин світла, без зернистості, ядра округлі; коефіцієнт пересіву складає 1:4-1:5; частота пересіву 1-2 рази на тиждень посівна доза клітин для матрасів ємкістю 1-1,5 л - 80-100 тис./см³; формування моношару проходить на 4-5 добу. Клітини штаму КТП здатні залишатися на склі без субкультивування і зміни середовища протягом 10-14 днів.

Пересійна лінія культури клітин ПТП пройшла більше 150 пасажів, придатна до титрування інфекційності вірусів по ЦПД, постановки реакції нейтралізації, напрацювання біомаси вірусів з ціллю приготування вакцинних та діагностичних препаратів.

В основу винаходу поставлено завдання отримати нову лінію перещеплюваних клітин тестикулів поросят, яка вирощується з використанням вітчизняних живильних середовищ та володіє підвищеною чутливістю до більшості вірусів.

Поставлене завдання вирішується наступним чином. Поросят-гнотобіонтів віком 1-2 дні знекровлювали перерізанням сонних артерій. Тестикули в умовах асептики діставали на стерильну чашку Петрі, відокремлювали від них білкову оболонку, розрізали в довжину, вилущували паренхіматозну тканину в стерильну посудину. Паренхіматозну тестикулярну тканину ретельно відмивали стерильним розчином Хенксу з антибіотиками, гострими ножицями подрібнювали на шматочки розміром 2-3 мм. Роздрібнену тканину відмивали розчином Хенксу з антибіотиками (200 мг/мл стрептоміцину сульфату та 200 ОД/мл пеніциліну натрієвої солі) від обривків тканин та формених елементів крові до відходження прозорої рідини. Відмиті шматочки тестикулярної тканини для відокремлення від залишків розчину Хенксу декілька разів промивали розчином трипсину також до відходження прозорої рідини. В триптізаційну колбу із свіжим 0,3%-ним розчином трипсину переносили підготовлену тканину, куди опускали попередньо простерилізований магніт. Кількість розчину трипсину повинна бути 20-25 мл на 1 г тканини. Колбу ставили на магнітну мішалку, вмикали оберти та нагрівання для підтримки температури 37°C. Оберти магніту регулювали так, щоб забезпечити рівномірне перемішування вмісту колби з утворенням невеликого заглиблення (воронки) над магнітом, але без утворення піни. Дезінтеграцію проводили дрібно, до повного виснаження тканини, тобто через кожні 15-20 хвилин перемішували на магнітній мішалці, проводили злив суспензії клітин

у розчин трипсину. Усі порції суспензії клітин (крім першої) збирали у стерильний флакон з 20 мл сироватки, поставлений на лід. Зібрану суспензію клітин проціджували через 3-х шаровий марлевий фільтр та центрифугували при 1000 об/хв. протягом 10 хв. Надосадову рідину (розчин трипсину) зливали, а осад ресуспендували у невеликій кількості розчину Хенксу до початкового об'єму та знову центрифугували протягом 10 хв при 1000 об/хв.

Рідину обережно зливали, а осад ресуспендували у невеликій кількості ростового живильного середовища. Після повного ресуспендування у флакони доливали ростове середовище та фільтрували через марлевий фільтр у інші флакони з поділками для визначення об'єму суспензії. Визначали кількість живих клітин в 1 мл. Концентровану суспензію клітин розводили ростовим середовищем до визначеної посівної концентрації (0,7-0,9 млн кл. у 1 см³) та висівали у культуральні матраси об'ємом 1-1,5 л. Культуру клітин вирощували при 37°C у термостаті.

Для отримання первинної культури клітин використовували суміш середовища 199 з 0,5%-ним гідролізатом лактальбуміну на розчині Хенкса, взятих порівну з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби та антибіотиків у звичайній дозі (пеніцилін 100 ОД/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, рН 6,9-7,1).

Отриману первинну моношарову культуру тестикулів поросят піддавали тривалому інкубуванню у термостаті (37°C). При цьому більшість клітин первинної культури дегенерує, вони відпадають від скла. Але на протязі певного часу (через 35 та більше діб) на фоні масової дегенерації первинних клітин виявляються нові атипові первинні клітини, які, проліферуючи, утворюють пласти значних розмірів, що утворені щільно прилягаючими одна до одної епітеліоподібними клітинами. Колонії та пласти клітин знімали розчином версена та пересівали у посудину меншого розміру 0,1-0,5л. У них клітини формують суцільний шар через 4-6 днів. У наступних пасажах ріст клітин прискорюється, моношар утворюється на 4-5-ий день.

Для переадаптації нових клітин ПТП на вітчизняне живильне середовище поступово, починаючи з 10%, у культуральне (ростове) середовище вводили живильне середовище гемогідролізат (5%) для культури клітин. Кількість цього середовища у ростовому прогресивно збільшується (таким чином було доведено до зміни середовища 199 повністю на гемогідролізат).

Лінія пересівних клітин тестикулів поросят ПТП характеризується наступними морфологічними та біологічними властивостями: моношарова культура клітин нового штаму однорідна, представлена епітеліоподібними клітинами полігональної форми з добре вираженими межами, клітини відокремлюються від скла 0,02%-ним розчином версену, при піпетуванні клітини утворюють однорідну суспензію. Життєздатність клітин підтримується методом регулярних пересівів на свіже ростове середовище. Коефіцієнт пересіву - 1:8-1:16. Для пересіву використовували ростове середовище гемогідролізат з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби та антибіотиків у звичайній дозі. Посівна доза клітин для мат-

расів (об'ємом 1-1,5 л) 20-30 тис.кл./см³. Формування моношару відбувається на 2-3 добу. Клітини ПТП здатні довгий час (10-20 днів) залишатись на склі без субкультивування та зміни середовища.

Консервування клітин ПТП для тривалого зберігання досягається заморожування у рідкому азоті (-196°C).

Середовище для заморожування складається:

- ростове середовище - 90% (гемогідролізат 5% для культур тканин з додаванням 20% середовища 199, 10% сироватки ВРХ та антибіотиків;
- кріопротектор - 10% (гліцерин (чда) чи диметилсульфоксид (хч)).

Клітини від скла відділяли підігрітим (37-41°C) 0,02% розчином версену, або ж сумішшю трипсину та версену в співвідношенні 1:5, двома методами: безцентрифужним та при допомозі центрифугування. Клітини в оптимальній концентрації розливали в ампули, які заповнювали на 2/3-3/4 клітинної суспензії і запаювали над полум'ям горілки. Після цього формували в касети та поміщали в холодильник при +4°C на 1,5-2 години. При цьому кріопротектор проникає всередину клітини і проходить перехід від активних обмінних процесів до стану неповного анабіозу клітин.

Безпосередньо заморожування проводили в двоступінчастому режимі. Перша ступінь: від +4°C до -40°C, швидкість охолодження при цьому складала 1°C/хв. Друга ступінь: від -40°C до -196°C. Ампули швидко поміщали в посудину Дюара з рідким азотом.

Розморожування ампул з суспензією клітин проводили шляхом поміщення їх у водяну баню при температурі +40°C на 1,5-2 хвилини. Потім суспензію переносили на матрас для культивування і поступово добавляли ростове середовище. Після підрахунку життєздатних клітин, суспензію доводили до оптимальної посівної концентрації. Для кінцевого видалення кріопротектора і нежиттєздатних клітин через 24 години робили зміну ростового середовища. Життєздатність клітин при такому методі кріоконсервування складала біля 80%.

Використання штаму: пересівна лінія тестикулів поросят характеризується стабільною чутливістю до вірусів Тешена, ТГС.

Приклад 1. Моношар клітин ПТП знімали з поверхні 1,5л матрасу наступним чином. Зливали ростове живильне середовище, ополіскували двічі підігрітим до 38-40°C 0,02 %-ним розчином версену. В матрас вносили свіжу порцію розчину версену в кількості, яка необхідна для покриття моношару клітин (80-150 мл в 1,5л матрас). Матрас поміщали в термостат (37°C) на 5-10 хвилин. Після того, як клітини починають відшаровуватись, зливали версен, залишаючи в матрасі лише 10-15 мл. З метою відділення клітин від скла, матрас енергійно струшували і до отриманої суспензії добавляли невелику кількість поживного середовища, без сироватки, та брали пробу для підрахунку загальної кількості клітин в суспензії. Концентрацію клітин в суспензії доводили до посівної (20-30 тис.клітин/см³) та добавляли ростове живильне середовище до складу якого входить:

5% гемогідролізат, антибіотики в звичайних дозах та 10% сироватки великої рогатої худоби.

Потім суспензію клітин в ростовому живильному середовищі засівали в матраси і інкубували при 37°C протягом 3-4 діб до формування щільного моношару.

При зараженні культури ПТП вірусом Тешена (штам "Переченський-642") із матрасів виливали ростове середовище, моношар клітин промивали розчином Хенкса, та добавляли підтримувальне середовище (без сироватки) з вірусотримувальною рідиною. Паралельно аналогічним чином заражали культури клітин перещеплюваних ліній СПЕВ та КТП.

Інфіковану культуру інкубували при 37°C. ЦПД віруса Тешена у культурі ПТП проявляється через 17-20 годин, а в культурі КТП та СПЕВ через 18-22 та 20-23 години відповідно. Титр віруса у культурі ПТП становив $10^{-7,5}$ - 10^{-8} ТЦД₅₀/мл, а в культурі СПЕВ та КТП $10^{-7,0}$ - $10^{-7,5}$ ТОД₅₀/мл.

Приклад 2. Проводили дослідження по адаптації віруса ТГС (штам П-115) до культури нової лінії. Культуру клітин ПТП заражали вірусом ТГС (отримання культури та її зараження ідентичне методу, описаному в прикладі 1). Виявлено, що вірус ТГС дуже швидко адаптувався до даної культури. Вже на рівні першого пасажу титр віруса становив $10^{-6,8}$ - $10^{-7,5}$ ТЦД₅₀ / мл. В культурі клітин КТП титр віруса становив $10^{-6,8}$ - $10^{-7,3}$ ТЦД₅₀/мл. ЦПД віруса ТГС на культурі СПЕВ проявляється лише після попередньої адаптації і титр становив $10^{-5,6}$ - $10^{-6,5}$ ТЦД₅₀/мл.

Бібліографічні дані

1. Новохатский А.С., Михайлова Г.Р., Царева А.А. и др. Каталог перевиваемых клеточных линий. М., 1978, Т.2.

2. Авторское свидетельство СССР № 1389282, кл. С 12 N 5/00, 1985.

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
