

Остаточна концентрація ПЕГу в сироватці крові ВРХ (визначена у відповідності з ТУ 10-19-59-89) знаходиться на рівні 1,0-2,5%. На виході з однієї частини нативної сироватки крові ВРХ, що піддається обробці ПЕГ, отримується 0,83 частини сироватки з пониженою фракцією високомолекулярних білків, котру використовують для вирощування перещеплюваних та первинних клітин тварин.

#### Приклад 1

При вивченні ростових властивостей очищеної запропонованим способом сироватки крові ВРХ у порівнянні з нативною сироваткою крові ВРХ та з сироваткою, очищеною за протоколом ЛІ Ігудна та ін., їх вносили в живильне середовище для росту перещеплюваних клітин FLK-71, ВНК-21 та РК-15 в кількості 10%. Строк формування моношару клітин, вирощуваних на середовищі, що вміщує сироватку крові, очищену за запропонованим способом впродовж всіх пасажів перевищував аналогічний показник в інших двох середовищах. Моношар культур не відрізнявся за морфологією клітин, вирощених у середовищах, що вміщували сироватку крові, як очищену за КМ, що передбачається, так і нативну сироватку крові. Клітини, вирощені на середовищі з сироваткою крові обробленої за способом прототипу, мали округлу

форму, а в моношарі спостерігались гігантські клітини. На 3-му пасажі цих клітин у моношарі спостерігались чітко виражені ознаки токсичності, які проявлялись деструкцією клітин. На середовищі з використанням сироватки, очищеної за запропонованим способом, клітини без ознак деструкції витримували 40 пасажів і успішно використовувались для накопичення вірусної біомаси.

#### Приклад 2

Для перевірки ростових властивостей вищезначеної сироватки після 12 місяців збереження при температурі 5°C її добавляли у живильне середовище для вирощування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV у кількості 10%. Цитоморфологічні показники клітин були характерними для цієї культури і не відрізнялись від контрольного варіанту, у якому клітини вирощувались з застосуванням нативної сироватки крові ВРХ.

Спосіб очистки сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) від гамма-глобулінової фракції розчином поліетиленгліколю (ПЕГ-6000) та отримання надосадової рідини триразовим низькотемпературним заморожуванням (-20°C) та відтаюванням з послідовним збиранням надосадової рідини забезпечує більш повну очистку сироватки крові від остаточної кількості поліетиленгліколю.

Комп'ютерна верстка А. Рябко

Підписне

Тираж 37 прим

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності вул. Урицького 45 м. Київ МСП 03680 Україна

ДП Український інститут промислової власності вул. Глазунова 1 м. Київ - 42 01601



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4432 (13) U

(51) 7 C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ СИРОВАТКИ КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) 20040503502

(22) 11 05 2004

(24) 17 01 2005

(46) 17 01 2005, Бюл. № 1, 2005 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Блокінь Віктор  
Степанович, Кіприч Валерій Володимирович, Лав-  
рик Олексій Анатолійович, Кучерявенко Роман  
Олексійович, Кучерявенко Вікторія Вікторівна(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-  
НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб очищення сироватки крові великої ро-  
гатої худоби (ВРХ), що включає очищення розчи-  
ном поліетиленгліколю від  $\gamma$ -глобулінової фракції  
білків нативної сироватки крові ВРХ, який відрізн-  
няється тим, що додатково триразово заморожу-  
ють ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) і збирають надосадову рідину

Корисна модель (КМ) відноситься до ветери-  
нарної вірусології та біотехнології і може бути ви-  
користаний для вирощування клітинних культур та  
накопичення на їх основі біомаси вірусів.

Сироватка крові - обов'язковий компонент рос-  
тових живильних середовищ для культивування  
клітинних культур. До її складу входить ряд біоло-  
гічно активних речовин, необхідних для росту клі-  
тин *in vitro*.

Поряд з біологічно активними речовинами си-  
роватка крові ВРХ містить різні фракції імуногло-  
булінів. Гамма-глобуліни є специфічними до збуд-  
ників інфекцій, тому при індикації або накопиченні  
вірусів з використанням культур клітин, їх наяв-  
ність знижує інфекційний титр вірусів, а іноді вза-  
галі перешкоджає їх реплікації в клітинах. Напри-  
клад, при накопиченні ротавірусів великої рогатої  
худоби в культурі клітин нирки теляти з викорис-  
танням сироватки крові великої рогатої худоби,  
яка вміщувала специфічні до ротавірусів глобулі-  
ни, інфекційний титр вірусу знижувався на 2-3 lg  
ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (Букринская Ротавирусная инфекция /  
М. Наука, 1990 - 213с).

Вилучення  $\gamma$ -глобулінів із сироватки крові ВРХ  
дозволяє використовувати її без попередньої пе-  
ревірки на наявність специфічних глобулінів для  
культивування клітинних культур з метою накопи-  
чення вірусів.

В Україні сироватка ВРХ виготовляється ви-  
робниками без очищення від  $\gamma$ -глобулінової фракції  
білків та перевірки на наявність специфічних анти-  
тіл.

Прототипом способу очистки, що патентуєть-  
ся, є "Способ очистки сыроватки крови крупного  
рогатого скота" Л.И. Игудин, С.Д. Орлов, Н.В. Ша-

лунова и др. // Вопр. вирусологии - 1980 №5 -  
С. 640". Для очистки від  $\gamma$ -глобулінової фракції біл-  
ків сироватку крові ВРХ обробляли стерильним  
40% розчином поліетиленгліколю (ПЕГ) з мол. м.  
5500-7000 (фірма "Serva", ФРН), кінцева концент-  
рація якого у сироватці доводили до 6-8%. Після  
експозиції 16-18 годин при  $+4^{\circ}\text{C}$  сироватку  
центрифугували при 2000-3000 об/хв протягом 20  
хвилин для видалення ПЕГ. Вміст білку в сироват-  
ці після обробки ПЕГом знижувався в 2 рази. Ос-  
новним недоліком цього способу очистки є залиш-  
кова дуже висока концентрація ПЕГу в сироватці  
крові, що негативно впливає на ріст клітин і робить  
фактично неможливим тривале їх культивування.

В основу КМ, що передбачається, поставлено  
задачу розробити спосіб очищення сироватки кро-  
ві ВРХ, що включає очищення розчином ПЕГ від  $\gamma$ -  
глобулінової фракції білків нативної сироватки  
крові ВРХ шляхом подальшого триразового замо-  
рожування ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) і збирання надосадової рідини,  
щоб забезпечити спосіб очищення сироватки крові  
ВРХ. Більш повне видалення глобулінової фракції  
білків сироватки крові та залишків ПЕГ можливе  
завдяки використанню цього способу.

При очищенні комерційної нативної сироватки  
крові ВРХ спосіб виконується таким чином: до сте-  
рильної сироватки крові ВРХ вносять 50%-й сте-  
рильний поліетиленгліколь (ПЕГ-6000) фірми  
Merck у співвідношенні 9:1 (дев'ять частин сирова-  
тки та одна частина ПЕГу) та перемішують впро-  
довж 20 хвилин не допускаючи спінювання сирова-  
тки, залишають на 12 годин при температурі 4-  
 $5^{\circ}\text{C}$ . Надосадову рідину відбирають та заморожу-  
ють при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Заморожування та відтаювання з  
відбором надосадової рідини повторюють тричі.

(19) UA (11) 4432 (13) U



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4432 (13) U

(51) 7 C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ СИРОВАТКИ КРОВІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

(21) 20040503502

(22) 11.05.2004

(24) 17.01.2005

(46) 17.01.2005, Бюл. № 1, 2005 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Білокінь Віктор  
Степанович, Кіприч Валерій Володимирович, Лав-  
рик Олексій Анатолійович, Кучерявенко Роман  
Олексійович, Кучерявенко Вікторія Вікторівна

2

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-  
НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ(57) Спосіб очищення сироватки крові великої ро-  
гатої худоби (ВРХ), що включає очищення розчи-  
ном поліетиленгліколю від  $\gamma$ -глобулінової фракції  
білків нативної сироватки крові ВРХ, який відрізн-  
няється тим, що додатково триразово заморожу-  
ють ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) і збирають надосадову рідину

Корисна модель (КМ) відноситься до ветери-  
нарної вірусології та біотехнології і може бути ви-  
користаний для вирощування клітинних культур та  
накопичення на їх основі біомаси вірусів.

Сироватка крові - обов'язковий компонент рос-  
тових живильних середовищ для культивування  
клітинних культур. До її складу входить ряд біоло-  
гічно активних речовин, необхідних для росту клі-  
тин in vitro.

Поряд з біологічно активними речовинами си-  
роватка крові ВРХ містить різні фракції імуногло-  
булінів. Гамма-глобуліни є специфічними до збуд-  
ників інфекцій, тому при індикації або накопиченні  
вірусів з використанням культур клітин, їх наяв-  
ність знижує інфекційний титр вірусів, а іноді вза-  
галі перешкоджає їх реплікації в клітинах. Напри-  
клад, при накопиченні ротавірусів великої рогатої  
худоби в культурі клітин нирки теляти з викорис-  
танням сироватки крові великої рогатої худоби,  
яка вміщувала специфічні до ротавірусів глобулі-  
ни, інфекційний титр вірусу знижувався на 2-3 Ig  
ТЦД  $50/\text{cm}^3$  (Букринская Ротавирусная инфекция /  
М. Наука, 1990. - 213с.).

Вилучення  $\gamma$ -глобулінів із сироватки крові ВРХ  
дозволяє використовувати її без попередньої пе-  
ревірки на наявність специфічних глобулінів для  
культивування клітинних культур з метою накопи-  
чення вірусів.

В Україні сироватка ВРХ виготовляється ви-  
робниками без очищення від  $\gamma$ -глобулінової фракції  
білків та перевірки на наявність специфічних анти-  
тіл.

Прототипом способу очистки, що патентуєть-  
ся, є "Спосіб очистки сироватки крові крупного  
рогатого скота. Л.И. Игудин, С.Д. Орлов, Н.В. Ша-

лунова и др. // Вопр. вирусологии. - 1980 №5. -  
С.640". Для очистки від  $\gamma$ -глобулінової фракції біл-  
ків сироватку крові ВРХ обробляли стерильним  
40% розчином поліетиленгліколю (ПЕГ) з мол. м.  
5500-7000 (фірма "Serva", ФРГ), кінцева концент-  
рація якого у сироватки доводили до 6-8%. Після  
експозиції 16-18 годин при  $+4^{\circ}\text{C}$  сироватку  
центрифугували при 2000-3000 об./хв. протягом 20  
хвилин для видалення ПЕГ. Вміст білку в сироват-  
ці після обробки ПЕГом знижувався в 2 рази. Ос-  
новним недоліком цього способу очистки є залиш-  
кова дуже висока концентрація ПЕГу в сироватки  
крові, що негативно впливає на ріст клітин і робить  
фактично неможливим тривале їх культивування.

В основу КМ, що передбачається, поставлено  
задачу розробити спосіб очищення сироватки кро-  
ві ВРХ, що включає очищення розчином ПЕГ від  $\gamma$ -  
глобулінової фракції білків нативної сироватки  
крові ВРХ шляхом подальшого триразового замо-  
рожування ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) і збирання надосадової рідини,  
щоб забезпечити спосіб очищення сироватки крові  
ВРХ. Більш повне видалення глобулінової фракції  
білків сироватки крові та залишків ПЕГ можливе  
завдяки використанню цього способу.

При очищенні комерційної нативної сироватки  
крові ВРХ спосіб виконується таким чином. до сте-  
рильної сироватки крові ВРХ вносять 50%-й сте-  
рильний поліетиленгліколь (ПЕГ-6000) фірми  
Merck у співвідношенні 9:1 (дев'ять частин сирова-  
тки та одна частина ПЕГа) та перемішують впро-  
довж 20 хвилин не допускаючи спіювання сирова-  
тки, залишають на 12 годин при температурі 4-  
 $5^{\circ}\text{C}$ . Надосадову рідину відбирають та заморожу-  
ють при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Заморожування та відтавання з  
відбором надосадової рідини повторюють тричі.

(13) U

(11) 4432

(19) UA

Остаточна концентрація ПЕГу в сироватці крові ВРХ (визначена у відповідності з ТУ 10-19-59-89) знаходиться на рівні 1,0-2,5%. На виході з однієї частини нативної сироватки крові ВРХ, що піддається обробці ПЕГ, отримується 0,83 частини сироватки з пониженою фракцією високомолекулярних білків, котру використовують для вирощування перещеплюваних та первинних клітин тварин

**Приклад 1.**

При визченні ростових властивостей очищеної запропонованим способом сироватки крові ВРХ у порівнянні з нативною сироваткою крові ВРХ та з сироваткою, очищеною за протоколом Л.І. Ігудіна та ін., їх вносили в живильне середовище для росту перещеплюваних клітин FLK-71, ВНК-21 та РК-15 в кількості 10%. Строк формування моношару клітин, вирощуваних на середовищі, що вміщує сироватку крові, очищеною за запропонованим способом, впродовж всіх пасажів перевищував аналогічний показник в інших двох середовищах. Моношар культур не відрізнявся за морфологією клітин, вирощених у середовищах, що вміщували сироватку крові, як очищену за КМ, що передбачається, так і нативну сироватку крові. Клітини, вирощені на середовищі з сироваткою крові, обробленої за способом прототипу, мали округлу

форму, а в моношарі спостерігались гігантські клітини. На 3-му пасажі цих клітин у моношарі спостерігались чітко виражені ознаки токсичності, які проявлялись деструкцією клітин. На середовищі з використанням сироватки, очищеної за запропонованим способом, клітини без ознак деструкції витримували 40 пасажів і успішно використовувались для накопичення вірусної біомаси

**Приклад 2.**

Для перевірки ростових властивостей вищезначеної сироватки після 12 місяців збереження при температурі 5°C її добавляли у живильне середовище для вирощування перещеплюваної культури клітин FLK-BLV у кількості 10%. Цитоморфологічні показники клітин були характерними для цієї культури і не відрізнялись від контрольного варіанту, у якому клітини вирощувались з застосуванням нативної сироватки крові ВРХ.

Спосіб очистки сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) від гамма-глобулінової фракції розчином поліетиленгліколю (ПЕГ-6000) та отримання надосадової рідини триразовим низькотемпературним заморожуванням (-20°C) та відтаюванням, з послідовним збиранням надосадової рідини забезпечує більш повну очистку сироватки крові від остаточної кількості поліетиленгліколю.