



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92848** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C12N 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02652	(72) Винахідник(и): Кривошия Павло Юрійович (UA), Кот Леся Богданівна (UA), Рудь Олег Григорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2014	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ЗАХІДНОГО ПОЛІССЯ НААН, вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2014, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ МІКРОМЕТОДУ ОТРИМАННЯ КЛОНІВ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб мікрометоду отримання клонів клітин включає отримання біомаси клітин, внесення клітин в матриці з поживним середовищем та виділенням клонів після розмноження однієї клітини. Використовуються 96-лункові плашки та автоматичні дозатори із змінними наконечниками для зменшення витрат реагентів, часу та праці.

UA 92848 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології та ветеринарної вірусології, зокрема до способів отримання клонів клітин та може бути використана в роботі діагностичних і науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

При довготривалих пасажах у перещеплюваних клітин можуть змінюватися морфологічні та фізіологічні властивості, а також чутливість до вірусів. Однією з причин цього може бути неоднорідність клітинної популяції культури. Культура, виділена з тканини, нерідко складається з декількох типів клітин епітеліоподібних та фібробластоподібних. При вирощуванні цих клітин спостерігається більш інтенсивний ріст одного типу клітин над іншим. Зміна умов культивування може сприяти переважному розвитку того чи іншого типу клітин, а також зміні їх біологічних властивостей. Тому для повного відтворення результатів при вірусологічних дослідженнях на перещеплюваних культурах краще користуватися клонами (лініями) перещеплюваних клітин, отриманих з однієї клітини. Вони є більш стабільні при довготривалих пасажах, ніж батьківські перещеплювані культури. У загальноприйнятій технологічній процес виділення клонів клітин входить отримання суспензії клітин шляхом зняття вирощених клітин з поверхні матраців для культивування клітин з використанням 0,02 % розчину версену. Отриману суспензію центрифугують при 1500 об./хв. протягом 20 хвилин. З осаду клітин готують суміш на середовищі наступного складу: середовище 199-45 %, середовище Ігла - 45 %, сироватка великої рогатої худоби - 10 %. На середовищі вказаного складу готують суміш клітин з таким розрахунком, щоб в 10 мл внесених в матраці Повітської ємкості в 100 мл містилося 30 клітин. Більша частина клітин (20-25) прикріплювались до скла, з них 8-12 клітин розмножувались та утворювали колонії. До десятого дня інкубації діаметр колоній досягав 1-1,5 мм. Виділення колоній, утворених з однієї клітини, проводять не пізніше 6-8 дня інкубації. З цією метою з матраца зливають поживне середовище, потім кінцем пастерівської піпетки вилучають колонію наступним шляхом: попередньо кінець пастерівської піпетки злегка відтягують на вогні та згинають під прямим кутом так, щоб довжина зігнутого кінця складала приблизно 3-4 мм. Потім кінець піпетки обережно відламували пінцетом, щоб він був рівним. В кінчик піпетки набирали невелику краплину поживного середовища і потім знімали колонію за допомогою надітого на піпетку відсмоктувача. У зв'язку з тим, що дрібні колонії без освітлення майже не видно, матраці освітлюють за допомогою освітлювача до мікроскопа. Промінь світла направляють на матрац вперед та знизу під кутом 30°. Поверхня матраца, на якій розташовані колонії, повернута до верху. Піпетку обережно вводять в матрац, зігнутий кінець її розміщують над колонією і притискають до скла. Потім за допомогою відсмоктувача відокремлені від скла колонії засмоктують з краплиною середовища в піпетку і переносять в пробірку з 7-ма мл поживного середовища. Колонії в пробірках підрощують протягом 8-10 днів, потім їх знімають з використанням розчину версену і засівають у матраці. Після чого проводиться три послідовні клоновані пасажі [Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней /под. ред. П.Ф. Здродовского и проф. М.И. Соколова. - М.: Медицина, 1965. - 596 с. Руководство по ветеринарной вирусологии /под. ред. В.Н. Сюрица. - М.: Колос, 1966. - 687 с].

Недоліком цього способу є те, що для свого застосування він потребує значної кількості компонентів, посуду, що перешкоджає масовому отриманню клонів клітин та більш ефективному проведенню вірусологічних досліджень.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, який досить суттєво зменшить витрати реагентів, час, трудомісткість праці та полегшить отримання клонів клітин.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб мікрометоду отримання клонів клітин, що включає отримання суспензії клітин, висів їх мінімальної концентрації на матраці та вилучення після визначеного періоду росту за допомогою пастерівської піпетки й висів на пробірки, а в подальшому на матраці, який відрізняється тим, що для виділення клонів використовують 96-лункові плашки та автоматичні дозатори зі змінними наконечниками для зменшення витрат реагентів, часу та праці, також дає змогу більш ефективно проводити вірусологічні дослідження.

Спосіб постановки мікрометоду отримання клонів клітин, здійснюється наступним чином: клітини, вирощені в матрацах, знімають з використанням 0,02 % розчину версену, підігрітого до 37 °С впродовж 10-15 хвилин. Отриману суспензію центрифугують 1500 об./хв. протягом 5 хвилин. З осаду клітин готують суміш на середовищі наступного складу: середовище 199-45 %, середовище Ігла - 45 %, сироватка великої рогатої худоби - 10 %. У лунки 96-лункової плашки вносять по 0,1 см³ живильного середовища з антибіотиками. В першу лунку ряду додають 0,1 см³ суспензії клітин. Після перемішування, шляхом піпетування 0,1 см³ суміші клітин переносять до наступної лунки плашки. Таким чином отримують розведення клітин від титру 1:20 до 1:2560. Потім плашку з розведеними в лунках клітинами поміщають в термостат, а потім

в пристрій для культивування клітин (Патент № 67895 Україна, МПК G01 N33/00. № u201109473. Заявлено 28.07.2011; Опубл. 12.03.2012; Бюл. № 5).

Через 2-3 дні після засіву клітин в плашки визначали лунки, де були поодинокі клітини, що розмножувались та утворювали колонії. Виділення колоній, утворених з однієї клітини проводили не пізніше 6-7 дня їх культивування. З цією метою з лунки, де були утворені з однієї клітини колонії, дозатором відбирали поживне середовище, після чого кінцем пастерівської піпетки вилучали колонію, проводячи дану маніпуляцію при збільшенні мікроскопа $\times 120$ та використовуючи освітлювач. Відокремлені клітини з лунки плашки переносили в 6-лункову плашку, призначену для культивування клітин з лунками, які мають діаметр 30 мм, та додавали поживне середовище. Колонії в таких лунках підрощують протягом 10-12 днів, потім їх знімають з використанням розчину версену та засівають в матраци. Після чого проводили в наступному три послідовні клоновані пасажі.

Експериментальні дослідження, проведені в лабораторії інституту сільського господарства Західного полісся НААН, показали, що розроблений спосіб отримання клонів клітин є досить ефективним та не є трудомістким. Користуючись ним, можна проводити масові виділення клонів клітин із значною економією часу та реагентів. Запропонований спосіб знайде застосування у вірусологічних лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20

Спосіб мікрометоду отримання клонів клітин, що включає отримання біомаси клітин, внесення клітин в матраци з поживним середовищем та виділенням клонів після розмноження однієї клітини, який **відрізняється** тим, що використовують 96-лункові плашки та автоматичні дозатори із змінними наконечниками для зменшення витрат реагентів, часу та праці.

25

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601