

(19)



(10) **LT 3986 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3986**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 5/16**
C12N 7/00

(21) Paraiškos numeris: **IP1883**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 02 24**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 06 25**

(72) Išradėjas:

Aušra Nemeikaitė, LT
Juozapas Račkus, LT
Pranas Sadauskas, LT

(73) Patent savininkas:

Imunologijos institutas, Mokslininkų g. 12, 2600 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

VSKK/P/455D, Specializirovannaja kolekcija perevivaemych somatičeskich kletok pozvonočnych Vsesojuznoj kolekciji kletočnych kultur, Institut citologii, Sankt-Peterburg, RU

(54) Pavadinimas:

Karvės embriono plaučių ląstelių kultūra galvijų leukozės viruso kultivavimui

(57) Referatas:

Išradimas priklauso ląstelinės biotechnologijos ir veterinarinės imunologijos sričiai. Jis gali būti pritaikytas galvijų leukozės viruso kultivavimui.

Karvės embriono plaučių ląstelių kultūra L-BLV pasižymi aukštesniu proliferaciniu aktyvumu nei žinomos kultivuojamos ląstelių linijos Mi ir FLK. Ji gerai auga Rusijos gamybos maitinamosiose terpėse ir serumuose. Kultūrą galima auginti dideliais kiekiais, norint sukaupti žymią viruso masę, kuri reikalinga kaip komponentas, gaminant imunodiagnostikos ir imunoprolifaktikos priemones, o taip pat tiriant galvijų leukozės viruso biologiją bei atliekant retrovirusų antigeninių savybių palyginamąją analizę.

Išradimas priklauso ląstelių biotechnologijos ir veterinarinės imunologijos sričiai. Jis gali būti pritaikytas galvijų leukozės viruso (GLV) kultivavimui dideliais kiekiais siekiant pagreitintai sukaupti viruso biomasę, kuri toliau panaudojama kuriant ir gaminant galvijų leukozės imunodiagnostikos ir imunoprofilaktikos priemones. Pateikta ląstelių kultūra taip pat gali būti panaudota tiriant GLV biologiją, tuo pačiu analizuojant retrovirusų antigenines savybes.

Šiuolaikiniai molekulinės biologijos analizės metodai parodė, kad egzistuoja genetinis heterogeniškumas tarp atskirų to paties viruso štamų, taip pat ir GLV /Burny N., Bruck C., Clouter Y. et al. Bovine leukemia virus as an inducer of bovine leukemia // In: Animal models of retrovirus infection and their relationship to AIDS. A.P. No 4. 1986. P. 107-120/. Tokiu būdu, kiekvienos naujos permissyvinės ląstelių kultūros sukūrimas atskirų GLV štamų (izoliatų) reprodukcijai papildo ląstelių producentų kolekciją ir padeda gauti bei ištirti įvairius GLV genetinius variantus ir jo antigenus. Tai stimuliuoja labiau jautrių imunodiagnostikos ir imunoprofilaktikos priemonių sukūrimą minėtai retrovirusinei infekcijai.

Yra žinoma keletas ląstelių linijų, produkuojančių GLV. Svarbiausiu išradimo analogu yra ląstelių linija ТЭК-MBA-76 /Авторское свидетельство СССР. 1979. № 702073, кл. C. I2 K 9/00/.

Rūšiniu požiūriu ji pasižymi alogeniškumu, kadangi buvo gauta infekuojant GLV pirminę karvės embriono timuso ląstelių kultūrą. Kultūros trūkumas - GLV genetinis variabilumas štamų atžvilgiu - tai jos infekavimas vietinio viruso štamu.

Išradimo analogui galima priskirti ir FLK (avies embriono inkstų) ląstelių liniją. Ji gauta permanentiškai infekavus avies embriono inkstų ląsteles GLV ir intensyviai naudojama kaip GLV producentas ląstelių biotechnologijoje /Van der Maaten M.J., Miller J.M. Replication of bovine leukemia virus in monolayer

cell cultures //Bibl. Haematol. 1976. V.43. P. 360-362 (analogas)/. FLK ląstelių linija infekuota amerikietišku galvijų leukozės virusu. Pagrindinis FLK ląstelių trūkumas - pačių ląstelių rūšinis ksenogeniškumas, pasireiškiantis gausiu antigeniniu heterogeniškumu gaminant galutinius produktus. Žinoma, kad galvijų kraujo serume gali cirkuliuoti antikūnai prieš avies ląstelių antigenus /Stear M.J., Cutteridge P.M., Dufty J.M. et al. Antibodies to ovine lymphocytes exist in bovine alloantisera //Exptl. Clin. Immunogenet. 1986. V.3. P. 28-33/. Tokiu būdu, galima tikėtis, kad naudojantis ksenogeninėmis virusą produkuojančiomis ląstelėmis galimas galutinio produkto užteršimas rūšiniais specifiniais antikūnais, dėl ko gali pakisti serologinių teigiamų reakcijų santykis.

Išradimo prototipu yra ląstelių linija Mi 18, kuri naudojama GLV produkcijai /Адомайтене Д.-И.Ю., Немейкайте А.И., Рачкус Ю.А., Садаускас П.Б. Штамм культивируемых клеток почки эмбриона коровы для культивирования вируса лейкоза крупного рогатого скота //Авторское свидетельство СССР. 1991. № I652338, кл. C 12 N 5/00 (prototipas)/. Ji gauta kokultivuojant pirmąją karvės embriono inkstų fibroblastų kultūrą su letaliai apšvitinta FLK ląstelių linija. Mi 18 ląstelių linija, lyginant su FLK, leidžia gauti galutinį produktą, pasižymintį didesniu rūšiniu antigeniniu homogeniškumu, kadangi rūšiniu požyriu yra alogeninė. Bet kuriant labiau specifines imunodiagnostikos ir imunoprofilaktikos priemones tam tikrų trūkumų gali turėti ir pats galutinis produktas, gaunamas iš Mi 18 ląstelių linijos, kurios galvijų leukozės virusas yra FLK ląstelių linijos palikuonis, t.y. amerikietiško izoliato. Kaip trūkumas paminėtinas nepakankamas proliferacinis linijos aktyvumas.

Išradimo tikslas - gauti naują ląstelių liniją, produkuojančią vietinio (lietuviško) izoliato galvijų leukozės virusą, kuri pasižymėtų žymiai aukštesniu proliferaciniu aktyvumu ir leistų gauti didesnio imunobiologinio aktyvumo galutinį produktą lyginant su žinomais.

Stamas gaunamas tokiu būdu.

Prisilaikant aseptikos reikalavimų išimami trijų mėnesių karvės embriono plaučiai ir sterilioje Petri lėkštelėje žirkklėmis susmulkinami į 1-3 mm dydžio gabalėlius. Po to atliekama švelni

tripsinizacija. Vėliau ląstelės resuspenduojamos Iglo ir I99 terpių mišinyje (1:1), turinčiame 10% galvijų kraujo serumo, kuris iš anksto buvo patikrintas imunodifuzijos reakcijoje GLV antikūnų atžvilgiu. Ląstelių koncentracija skiedžiama iki $5-8 \times 10^4$ ląst./ml ir inkubuojame esant 37°C . Pirmas persėjimas, susiformavus kultūros monosluoksniui, atliekamas po 7 parų, o sekantys - vieną kartą per savaitę. Po trečio persėjimo (pasažo) pirminės kultūros ląstelės produktyviai infekuojasi GLV. GLV donoru naudojami leukoze sergančios karvės limfocitai (Lietuvos žaliųjų veislės). Virusso transfekcija atliekama kokultivacijos būdu.

Gautam štamui charakteringas morfologinis ir kultūrinis stabilumas. Jis pažymimas L-BLV. L-BLV štamas saugomas specializuotoje ląstelių kultūrų kolekcijoje Rusijoje, Sankt-Peterburge (numeris ВСКК/П/ 455Д). Ląstelių kultūra yra charakterizuojama tokiais požymiais.

1. Morfologiniai požymiai.

Tai poligonalinės, verpstinės ląstelės, panašios į fibroblastus, susisiebiančios viena su kita atšakų pagalba. Turi aiškiai išreikštas ribas ir skaidrią citoplazmą. Ląstelės centre - stambus ovalinės formos branduolys.

2. Fiziologiniai požymiai.

Stacionarinėje kultūroje Iglo ir I99 terpių mišinyje (1:1), kur pridedama 10% inaktyvuoto galvijų kraujo arba karvės embriono serumo bei antibiotikų įprastinė dozė, ląstelės auga monosluoksniu pavidalu. Optimalus pasėlio tankis - $1-3 \times 10^4$ ląst./ml. Ląstelės pasižymi geru adhezyvumu. Tankus monosluoksnius formuojasi po 4-5 parų kultivavimo. Persėjant kultūrą monosluoksniu dezintegracija atliekama apdorojant ląsteles 3-5 min 0,25 % tripsino ir 0,02 % verseno mišiniu (1:1), pašildytu iki 37°C . Ląstelių pasėlio koeficientas 1:3 - 1:5. Persėjimas atliekamas 1-2 kartus per savaitę.

3. Kariologiniai požymiai.

L-BLV ląstelių linijos kariologinė analizė, atlikta 42 pasaže parodė, kad chromosomų skaičiaus kintamumo spektras ląstelių populiacijoje gana platus (22-122), aiškiai išreikšta aneuploidija. Hiperdiploidinių ląstelių yra 73 %, chromosomų kiekis modalinėje klasėje 57-70, modalinės klasės ląstelės sudaro 48 %,

akrocentrinų chromosomų - 84 %, markerinės chromosomos neapre-
gistruotos.

4. Imunobiologiniai ir biocheminiai požymiai.

L-BLV ląstelių antigenų imunologinė analizė parodė, kad immu-
difuzijos reakcijoje (IDR) ląstelių ekstraktas reaguoja su triu-
šių imuniniu serumu prieš L-BLV ląsteles. Imuninis serumas prieš
L-BLV ląsteles teigiamai reaguoja IDR su karvės embriono plaučių
ekstraktu, o taip pat su galvių kraujo serumo baltymais. Virusas
ir jo antigenų buvimas registruojamas IDR /Miller J.M., van der
Maaten H.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion
test for bovine leukemia virus antibodies //Europ. J. Cancer.
1977. V.13. P. 1369-1375/ ir imunofermentinio analizės (IFA) me-
todo pagalba /Rejssang A.A., Cielkeas A.L.J., Quak J. et al. Stu-
dies on bovine leukosis. Enzyme-linked immunosorbent assay for
the detection of antibodies to bovine leukosis virus //Veteri-
nar. Quarter. 1976. V.3. No I. P. 31-33/, o taip pat sugebė-
jimu sudaryti si²citijų indikatorinių ląstelių C3H1 kultūroje
/Ferrer J.P., Cebraçilla C., Gupta P. Use of a feline cell line
in the syncytia infectivity assay for the detection of bovine
leukemia virus infection in cattle //Amer. J. Vet. Res. 1981.
V.42. P. 9-14/. Biocheminių metodų pagalba didžiausias galvių
leukozės virusinių dalelių išėjimas į ląstelių-producentų kul-
tūrinę terpę registruojamas 5-6 parą po persėjimo ir sudaro
 10^8 - 10^9 virusinių dalelių/ml. Tai nustatoma pagal revertazės
aktyvumą /Ложа В.П., Гринберг Г.И., Мелдрайс Я.А. и др. Выделе-
ние бычьего вируса лейкоза из продуцирующих культур клеток
и изучение стабильности вирионов //В кн: Репродукция и биоло-
гические свойства онкорнавирусов. Рига: Зинатне. 1979. С. 60-73/.

Kriokonservavimas

Kriokonservavimui buvo naudojamas Iglo ir I99 terpių mišinys
(1:1), pridant 10 % galvių kraujo arba karvės embriono krau-
jo serumo. Kaip krioprotektorius naudojamas 10 % dimetilsulfok-
sidas, esant ląstelių koncentracijai $2-3 \times 10^6$ ląst./ml. Gyvybin-
gų ląstelių po atšildymo išlieka 80-85 %.

L-BLV ląstelių sterilumo tyrime (buvo ieškoma grybų, bakterijų,
mikoplazmų) gauti neigiami rezultatai.

Tiriant L-BLV ląstelių liniją, panaudojant suaugusias ir nau-

jagimes baltas peles, patogeninių agentų aptikti nepavyko.

L-BLV ląstelių linijos panaudojimas paaiškinamas sekančiais pavyzdžiais.

I pavyzdys. Proliferacinis aktyvumas. Proliferacinio aktyvumo palyginamajai analizei buvo panaudoti: ląstelių-producentų (prototipo) Mi 18 kultūra, vienas iš labai produktyvių FLK ląstelių linijos klonų - FLK 44/2 /Altaner C., Ben J., Zajac V. et al. Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukemia virus //Folia Biol. (Prague). 1985. V.31. P. 107-114/ (analogas) ir nauja ląstelių kultūra L-BLV. Ląstelės vienodose sąlygose buvo sėjamos į matrusus 1glo ir 199 terpių mišinyje (1:1), pridedant 10% galvijų kraujo serumo bei antibiotikų normali dozė, ir inkubuojamos prie 37° C. Pradinė ląstelių koncentracija visoms kultūroms - 25000 ± 1000 ląst./ml. Vėliau kiekvieną parą, kol kultūra pereidavo į stacionarinę augimo fazę, kultūrinis skystis buvo nušilamas, monosluksnis dezintegruojamas ir ląstelių kiekis skaičiuojamas Gorjajevo kameroje.

Gauti duomenys parodė, kad ląstelių linija L-BLV pasižymi aukštesniu proliferaciniu aktyvumu. Iš pirmos figūros matome, kad L-BLV linijos ląstelės stacionarinę augimo fazę pasiekia viena para anksčiau nei FLK 44/2 ląstelės ir dvi paras - nei Mi 18 kultūros ląstelės. Paraleliai kultūrinėje terpėje, surinktoje nuo monosluksnio, registruojama nepanaudotos gliukozės, pagrindinio energijos šaltinio kultūrinėje terpėje, koncentracija ir laktato, ląstelinio metabolizmo produkto, lygis /Биотехнология клеток животных //Под ред. Р.Е.Спир, Я.Б. Гриффитс М.: Агропромиздат. 1989. Т. 22. -516 с./. Tam tikslui yra panaudojami ekspres analizatoriai "Eksanas-6" ir "Eksanas-2" (Lietuvos Mokslų akademijos Biochemijos institutas). Antroje a figūroje pateikti rezultatai rodo, kad L-BLV ląstelės kultūrinėje terpėje gliukozę sunaudoja 4-tą parą, t.y. viena para anksčiau nei FLK 44/2 ir trimis paromis anksčiau nei Mi 18. Iš antros b figūros matome, kad L-BLV linijoje laktato susikaupimas kultūrinėje terpėje vyksta greičiau ir 5-tą parą pasiekiana maksimali koncentracija, t.y. viena para anksčiau nei FLK 44/2 ląstelių kultūroje ir dviem - nei Mi 18 kultūrinėje terpėje.

Tokiu būdu, naudodami L-BLV ląstelių kultūrą kaip producentą, labiau specifinį galutinį produktą galime gauti 1-2 perom anksčiau nei vertodami kontrolines ląstelių kultūras. Tai labai svarbu atliekant kultūravimą dideliais kiekiais.

2 pavyzdys. Antigeno gavimas IDR. L-BLV ląstelės auginamos kaip aprašyta 1 pavyzdyje panaudojant 1,5 l matrasus arba rolerius. Ląstelės suformavus tankų monosluoksnį (tai įvyksta 4-5 parą), kultūrinis skystis nuo monosluoksnio surenkamas. Monosluoksnis dezintegruojamas 3-5 min 0,25 % tripsino ir 0,02 % verseno tirpalų mišiniu (1:1) ir atliekamas pakartotinis persėjimas, persėjimo santykis - 1:3-1:5.

GV antigeno išskyrimas iš kultūrinės terpės atliekamas sekančiai. Surinktas kultūrinės terpės skystis nušviešinamas centrifuguojant 20 min esant 5000 aps./min ir 4°C. Supernatantas surenkamas, į jį laipsniškai dedamas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ iki 30 % koncentracijos. Gauta tirpalo pH sulgginamas iki 6,0 - 7,5 pripilant NaOH ir ant magnetinės maišiklės maišoma 30 min, po to vėl centrifuguojama 20 min esant 5000 aps./min ir 4°C. Susideriusios nuosėdos resuspenduojamos fiziologiniame tirpale (1/100 kultūrinės terpės pradinio tūrio). Gautas tirpalas supilamas į dializės maišelius ir dializuojamas prieš fiziologinį tirpalą I parą esant 4°C.

Išskirtas antigenas praskiestas fiziologiniu tirpalu (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) testuojamas IDR, panaudojant teigiamus ir neigiamus serumus prieš GV (Korsko biofabriko gamyba). Reakcijos rezultatai apskaičiuojami po 48 val. Antigeno titru laikomas paskutinis praskiedimas, duodantis precipitatą su teigiamu serumu. Mūsų atveju titrai paprastai buvo 1:1 - 1:8. Iš 1 litro kultūrinės terpės galima gauti iki 1050 dozių diagnostikui, kurį galima panaudoti kaip test-antigeną serologinėse imunodiagnostinėse reakcijose tikrintant antikūnus prieš GV.

3 pavyzdys. Antigeno gavimas IFA. Virusą produktojančios L-BLV ląstelės stacionariai kultivuojamos plokščiadugniuose matrasuose arba roleriuose kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Surinkta kultūrinė terpė su virusine medžiaga centrifuguojama 20 min esant 5000 aps./min ir 4°C. Po to virusas nusodinamas centrifuguojant supernatantą 2 val. esant 20000 aps./min virš 20 % sacharozės pagalvės, paruoštos iš ENB (0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,001 M Na_2EDTA , pH 7,4) buferyje. Nusodintas virusas resuspenduojamas 5 ml ENB buferio ir

15 % sacharozės mišinįje. Virusų suspensijos alikvotos užnešamos ant linijinio 25 - 50 % sacharozės gradiento. Visi sacharozės tirpalai ruošiami TBE buferyje. Po to vėl centrifuguojama 3,5 val esant 32000 aps./min ir 4° C. IFA panaudojamos tarybinės gamybos polistirelinės pakuotės su 96-šiomis plokščiadugnėmis duobutėmis. Jos panaudojamos virusinių preparatų (0,1 ml į duobutę), o antigenus imobilizuojamas inkubuojant 12 val esant 4° C. Silpnai adsorbuotas kaltynas nuplaunamas per 3-5 kartus fosfatinio buferinio tirpalo (FBT), turinčio 0,05 % Twin-20, o likęs blokuojamas 1 % žmogaus albumino tirpalu per 1 val esant 37° C, po to duobutės vėl plaunamos IFT. Toliau inkubuojame su tiriamais galvijų kraujo serumo pavyzdžiais, praskiestais FBT (0,1 ml į duobutę). Kaip kontrolę panaudojami Kursko biofabriko gamybos teigiami ir neigiami serumi prieš GLV. Po 2 val inkubavimo esant 37° C duobutės atidžiai praplaunamos ir įpilami po 0,1 ml darbinio praskiedimo antriniai antikūnai (antiserumas prieš GLV imunoglobulinas), pažymėti peroksidas (Rusijos Medicinos mokslų akademijos N.P. Gamselėjos vardo epidemiologijos ir mikrobiologijos institutas). Vėl inkubuojama 1 val esant 37° C. Po išplovimo pridedama po 0,1 ml o-fenilendiamino (0,24 mg/ml izovandenilio peroksido (0,06 mg/ml). Kambaryje temperatūroje inkubuojama 15-25 min. Reakcija sustabdoma pridėjus į kiekvieną duobutę po 0,1 ml 8 N sieros rūgšties. Fermentinės reakcijos produktai nustatomi spektrofotometriškai. Teigiamai IFA reakcija (antikūnų prieš GLV aptikimas) infekuotiems galvijams įvertinama pagal optinio tankio santykį testuojamajame ir neigiamame (kontroliniame) serumuose, esant 490 nm. Esant teigiamai IFA reakcijai, santykis paprastai būna didesnis nei 2. Mūsų sąlygomis nustatyta, kad teigiamai reakcijai su sergančio leukozės galvijų serumu atbirtas esant 1:100 arba 1:200 praskiedimai.

Tokiu būdu, siūloma karvės embrionų leučių ląstelių kultūra L-BLV, permanentiškai infekuota GLV, produkuoja virusą į kultūrinę terpę žymiai aktyviau. Minėto producento kultūrinė terpė gali būti panaudota, kaip viruso surinkimo šaltinis ruošiant test-antigeną imunodiagnostinėms reakcijoms (IDR ir IFA) tam, kad aptikti antikūnus prieš GLV. L-BLV ląstelių - producentų alogeniškumas ir jų produkto vietinio izoliato GLV įgalina surinkti galutinį produktą, pasižymintį aukštesniu imunobiologiniu aktyvumu. Tai leis efektyviai panaudoti jį veterinarijoje gaminant labiau specifines imunoprofilaktines ir imunodiagnostines priemones.

LT 3986 B

Tuo pačiu minėtą producentą galima pritaikyti kaip modelį laboratoriniams tyrimams virusologijoje, tame tarpe ir retrovirusų antigeninių savybių palyginėjimui analizei.

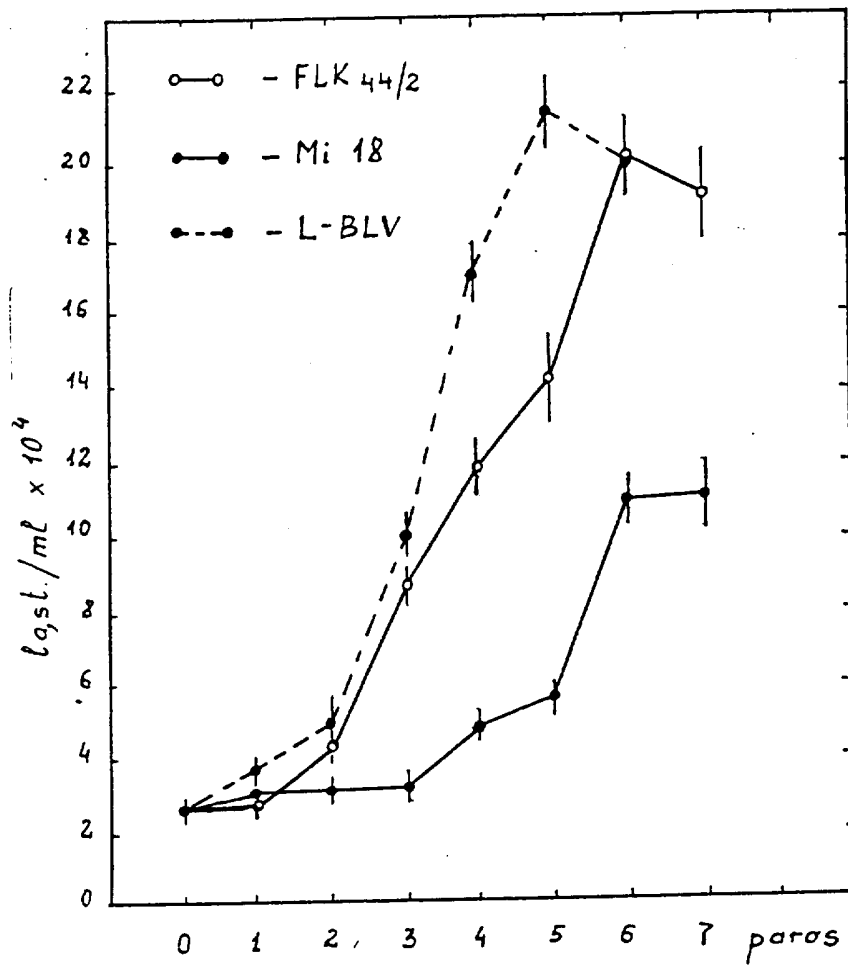


Fig. 1. Įvairių ląstelių kultūrų, produkujančių GLV, augimo dinamika
(Mi 18 - prototipas, FLK 44/2 - analogas, L-BLV - nauja kultūra)

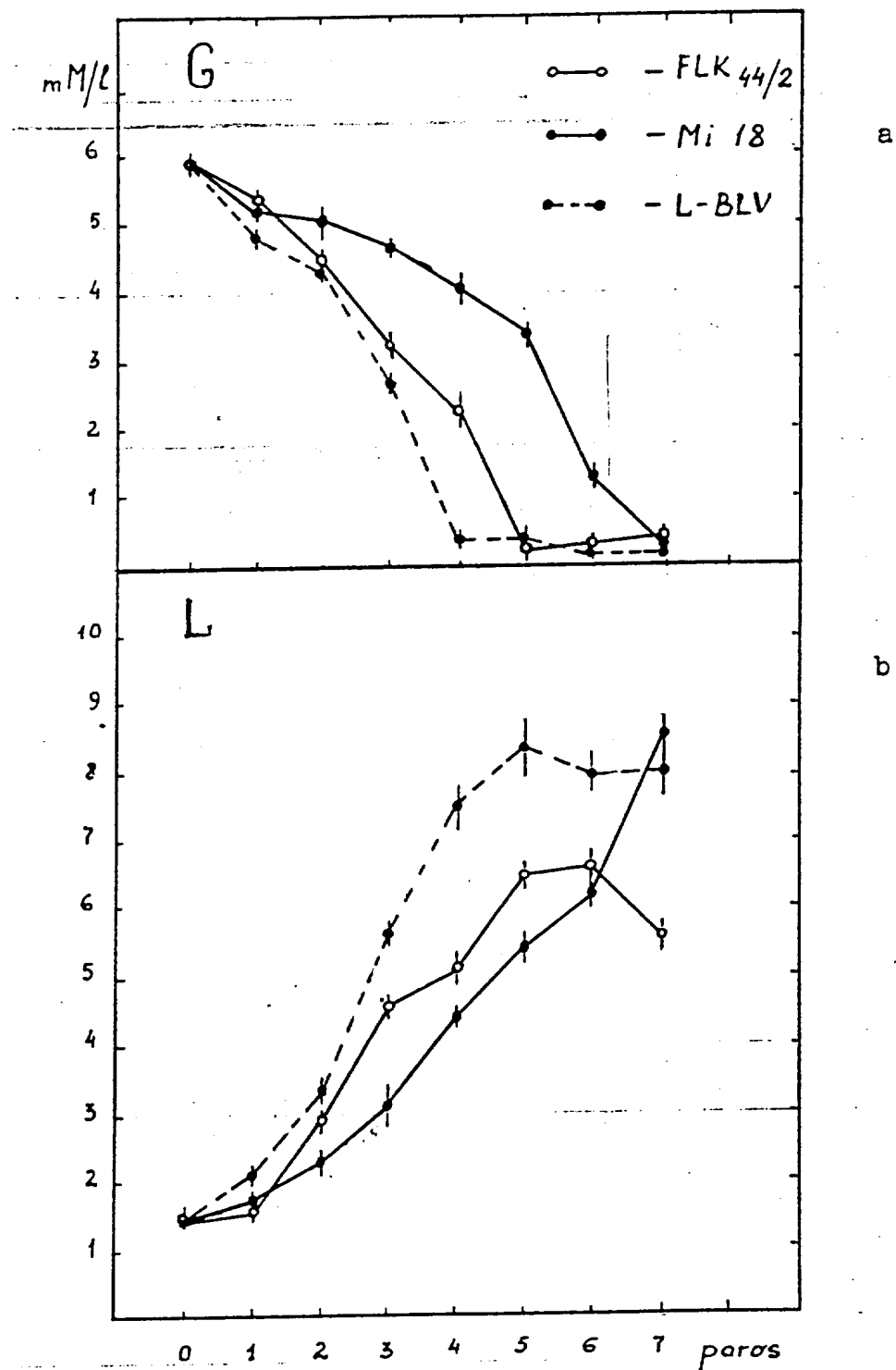


Fig. 2. Ląstelių metabolitų koncentracijos dinamika kultūrinėje terpėje pas įvairias ląstelių kultūras, produkujančias GLV
a - gliukozė, b - laktatas

LT 3986 B

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Karvės embriono plaučių ląstelių kultūra BCHK/II/ 455Д, skirta galvijų leukozės viruso kultivavimui.