



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239800

(II)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 15/00

/22/ Přihlášeno 15 08 84

/21/ PV 6192-84

(40) Zveřejněno 13 06 85

(45) Vydáno 15 04 87

(75)

Autor vynálezu

DRÁBER PAVEL RNDr.; VIKLICKÝ VLADIMÍR MUDr. CSc.;

DRÁBEROVÁ EDUARDA RNDr.; BÁRTEK JIŘÍ MUDr. CSc., PRAHA

(54) Myši lymfocytární hybridom IMG CZAS TU-04

Řešení se týká myšního lymfocytárního hybridomu IMG CZAS TU-04, produkujícího protilátku proti tubulinu, zejména prasečímu, uloženého ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením TU-04. Samotná monoklonální protilátka hybridomu TU-04 je vhodná pro použití v enzymoimunologické a radioimunologické analýze a při vizualizaci mikrotubulů v buňkách na úrovni optického a elektronového mikroskopu.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného buněčnou fúzí myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezině lymfoidní buňky, produkující protilátku proti prasečímu tubulinu.

Doposud se protilátky proti tubulinu vyrábějí tak, že je tubulin opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji králíkům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebírané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných zejména pro identifikaci buněčných struktur, obsahujících tubulin.

Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má několik nevýhod. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém jednotlivém organismu různé a neopakovatelné.

Organismus zpravidla vytvoří kromě protilátek vůči žádanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu; ty je nutné ze sér odstraňovat složitým způsobem, zvaným vysycování.

Výrobní šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat a vycházejí z výroby v širokém rozmezí kvality.

Pro výrobu každé šarže je třeba připravit značně čistý imunizační antigen a další antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a dosud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující monoklonální protilátku proti prasečímu tubulinu, uložený ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vídeňská ul. č. 1083, pod označením IMG CAS TU-04.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury /Fazekas de, St., Groth, S., Scheidigger, D.: Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Meth., 35: 1-21, 1980; Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, Nature 266-550, 1977/ klonováním souboru hybridních buněk, vzniklých fúzí myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buněk, získaných ze sleziny myší kmene Balb/c, imunizovaných prasečím tubulinem.

Výhodou hybridomu je, že produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která je schopna specificky reagovat s prasečím tubulinem, ale i s tubulinem řady dalších druhů /mezi jinými též s lidským tubulinem/.

Hybridom TU-04 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myší kmene Balb/c. Z konzerv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu.

Protilátka produkovaná hybridomem TU-04 je specifická výhradně pro tubulin a není třeba se zbavovat protilátek balastních.

P ř í k l a d

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno 2×10^6 buněk do peritoneální dutiny myší. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 13 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem /0,5 ml intraperitoneálně/. Po 18 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána.

Celkem bylo získáno 3,5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 15 mg/ml imunoglobulinu. Protilátka reagovala se specifickým antigenem v enzymoimunologickém testu /při použití prasečí antimyší protilátky značené křenovou peroxidázou/ až do ředění 1 : 10⁷.

Pomocí nepřímé imunofluorescenční techniky byl takto získanou protilátkou zobrazen mikrotubulární komplex v buňkách myší fibroblastoidní linie C₃H původu. Buňky hybridomu TU-04 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk, kde převažující organelou jsou volné a na membrány vázané polyribosomy.

In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí a doplněné o nesenciální imunokyseliny, L-glutamin /3mM/, pyruvát sodný /1mM/.

Toto médium /označované jako H-MEMd, Ústav molekulární genetiky ČSAV/, je pro kultivace hybridomu TU-04 doplněno penicilinem, streptomycinem, gentamycinem, 2-merkaptóetanolem /0,05 mM/ pufrům HEPES /10 mM/ a inaktivovaným bovinním sérem /Bioveta, Ivanovice na Hané 10 %/.

Hybridom je kultivován při 37 °C. Střední generační čas je 14 hod. a 12 měsíců po sestrojení byl modální počet chromosomů 79. Produkovaná protilátka je monoklonální imunoglobulin třídy IgM kappa, namířená proti epitopu na alfa-podjednotce tubulinu.

Reaguje s jiným epitopem než MP TU-01, což bylo zjištěno imunoblotingem protilátek na alfa a beta tubulinu separovaného na SDS PAGE a na peptidických štěpech celého tubulinu stejně separovaného.

Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem TU-04 analogicky s konvenčními protilátkami reaguje s tubulinem řady druhů. Je proto využitelná k detekci buněčných cytoskeletálních struktur většiny druhů obsahujících tubulin.

Hybridom TU-04 může být průmyslově využíván jako zdroj monoklonální protilátky proti tubulinu v metodách analytických nebo preparativních.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS TU-04, produkující monoklonální protilátku třídy IgM proti tubulinu řady druhů.