ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

238 248

(11) (B1)

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 08 05 84
(21) PV 3407-84

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 14 02 85
(45) Vydáno 01 06 87

(75)
Autor vynálezu

DRÁBEK PETR RNDr.CSc., PRAHA,
JURMANOVÁ KVĚTA RNDr.CSc., BRNO

(54)

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MPH-01, produkující protilátku proti mykoplazmatům druhu Mycoplasma hyorhinis

Vynález se týká myšího lymfocytárního hybridomu, produkujícího protilátku třídy IgG_1 proti prasečím mykoplazmatům druhu Mycoplasma hyorhinis, uloženého ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV pod označením MPH-01. Monoklonální protilátka hybridomu MPH-01 je vhodná pro identifikaci izolovaných kmenů mykolpazmat v klinické veterinární diagnostice, dále pro identifikaci izolovaných kmenů mykoplazmat, kontaminujících buněčné kultury, což může vysvětlit případný zdroj kontaminace a také pro případnou dekontaminaci infikovaných buněčných kultur.

238 248

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného fúzí buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a myší slezinné buňky produkující protilátku proti mykoplazmatům druhu Mycoplasma hyorhinis, který je patogenní pro prasata a častým kontaminantem buněčných kultur.

Doposud se protilátky proti mykoplazmatům připravují hyperimunizací zvířat (nejčastěji králíků), a to injikováním přibližně 12 imunizačních dávek antigenu po dobu 2-3 měsíců. Sérum takto imunizovaných zvířat slouží jako zdroj protilátek užívaných zejména pro typizaci mykoplazmat. Tento postup, nazývaný konvenční imunizací, má řadu nevýhod. Pro každou imunizaci a testování protilátkové aktivity je nutno použít antigen připravený náročným způsobem. V séru imunizovaných zvířat se nachází heterogenní směs protilátek, jejichž spektrum je v každém organismu různé a neopakovatelné. Organismus vytváří protilátky proti celé řadě antigenů a antigenních míst a specificita sér mnohdy závisí na způsobu jejich absorbce a testování.

Uvedené nedostatky výše zmíněného a doposud používaného postupu odpadnou, je-li k dispozici hybridom, produkující protilátku proti druhu Mycoplasma hyorhinis, který je uložen ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze, Vídeňská 1083, pod označením IMG CZAS MPH-01.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury (Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256:495-497, 1975; Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.): Monoclonal antibodies, hybridomas: a new dimension in biological analysis, Plenum Press, New York and London, 1980). Pro fúzi byly použity buňky myší myelomové linie P3-X63-Ag8.653 a buňky získané ze slezin myší kmene BALB/c imunizovaných buňkami myší teratokarcinomové linie F9, které byly infikovány Mycoplasma hyorhinis.

Lymfocytární hybridom MPH-01 produkuje homogenní protilátku, tzv. protilátku monoklonální, která reaguje s kmeny

mykoplazmat, náležejícími do druhu Mycoplasma hyorhinis a nereaguje s dalšími druhy mykoplazmat. Hybridom MPH-01 je možno kultivovat in vitro v médiích určených pro savčí buňky a je adaptován pro růst v peritoneální dutině myší BALB/c. Z konserv uchovávaných v tekutém dusíku je možné zahájit produkci protilátek, aniž by bylo nutné provádět imunizace, absorbce a testování sér. Monoklonální protilátka produkovaná hybridomem MPH-01 je specifická pro druh Mycoplasma hyorhinis a je prosta jakýchkoliv balastních protilátek.

Příklad:

Za účelem pomnožení buněk hybridomu MPH-01 in vivo bylo aplikováno 10^7 buněk do peritoneální dutiny BALB/c myši. Aby došlo k větší produkci ascitické tekutiny, byla myš 14 dnů před aplikací hybridomových buněk ovlivněna olejem 2,6,10,14--tetramethylpentadecan (0,5 ml intraperitoneálně). Po 14 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukovaná ascitická tekutina odebrána. Celkově bylo získáno 3 ml ascitické tekutiny.

Monoklonální protilátka reagovala v nepřímém enzymoimunologickém testu s antigenem připraveným z Mycoplasma hyorhinis kmene CCM-M32 (izolovaným z plic prasete) a antigenem Mycoplasma hyorhinis kmene 100 (izolovaným z kultury myších teratokarcinomových buněk) až do ředění ascitické tekutiny 1 : $1,3 \times 10^6$. Protilátka přitom nereagovala s prototypovými antigeny druhu Mycoplasma arginini CCM-M43, Mycoplasma bovirhinis CCM-M22 a Mycoplasma bovigenitalium CCM-M62 ani v ředění 1 : 5 (viz tab. 1). Výsledky nepřímého radioimunologického a imunofluorescenčního testu prokázaly, že pomocí této protilátky lze bezpečně určit buňky kontaminované Mycoplasma hyorhinis (viz tab. 2).

Buňky hybridomu MPH-01, které jsou morfologicky podobné buňkám rodičovské myeloidní linie, rostou jako polosuspenzní kultura. Základním kultivačním médiem je Eaglovo minimální esenciální médium s Hanksovou solnou směsí, doplněné o neesenciální aminokyseliny, L-glutamin (3mM) a pyruvát sodný (1mM). Toto médium (označované jako H-MEMd, Ústav molekulární

genetiky ČSAV) je pro kultivaci hybridomu MPH-01 doplněno penicilinem, streptomycinem a teplotně inaktivovaným (56°C, 30 min) bovinním sérem (Bioveta, Ivanovice na Hané; 10%). Hybridom je kultivován při 37°C. Střední generační čas je 15,5 h; za 11 měsíců po sestrojení byl modální počet chromozomů 74. Produkovaná monoklonální protilátka je imunoglobulin třídy IgG_1, kappa.

Tab. 1. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MPH-01 s antigeny prototypových kmenů mykoplazmat

Antigen	Ředění ascitické tekutiny dávající positivní reakci[1]
Mycoplasma hyorhinis CCM-M32[2]	$1,3 \times 10^6$
Mycoplasma arginini CCM-M43	<5
Mycoplasma bovirhinis CCM-M22	<5
Mycoplasma bovigenitalium CCM-M62	<5
Mycoplasma hyorhinis 100[3]	$1,3 \times 10^6$

[1] Byl použit nepřímý enzymoimunologický test, ve kterém ascitická tekutina z myši s rostoucím hybridomem MPH-01 byla naředěna geometrickou řadou a přidána k antigenu typových kmenů mykoplasmat. Po inkubaci a odmytí nenavázané protilátky byla přidána peroxidázou značená protilátka králičí anti-myší IgG. Po inkubaci a odstranění nenavázané protilátky byla reakce vyhodnocována spektrofotometricky.

[2] CCM-M - označení kmenů mykoplazmat uvedené v katalogu Československé sbírky mikroorganizmů

[3] Kmen Mycoplasma hyorhinis izolovaný z kultury myších teratokarcinomových buněk.

Monoklonální protilátka produkovaná myším lymfocytárním hybridomem MPH-01 může být využita v klinické veterinární praxi

pro identifikaci kmenů mykoplazmat, izolovaných z nemocných zvířat, dále v laboratořích pracujících s tkáňovými kulturami, k bezpečné identifikaci Mycoplasma hyorhinis a jimi infikovaných buněk, nebo i k případné dekontaminaci infikovaných buněčných linií a k biochemické a biologické analýze cílové antigenní struktury.

Tab. 2. Reaktivita protilátek produkovaných hybridomem MPH-01 s buňkami infikovanými Mycoplasma hyorhinis

Buňky	Test použitý pro detekci reaktivity	
	Radioimunologický[1] (imp. min^{-1})	Imunofluorescenční[2] (% svítících buněk)
Neinfikované	100	<0,1
Infikované	6 700	97

[1] Byl použit nepřímý radioimunologický test, ve kterém myší teratokarcinomové buňky F9 byly inkubovány s kultivačním supernatantem hybridomu MPH-01, nenavázaná protilátka byla odmyta a buňky inkubovány s ^{125}I-značenými $F(ab)_2$ fragmenty protilátky králičí anti-myší IgG. Po odstranění nenavázané protilátky byla měřena radioaktivita vázaná na buňky.

[2] Byl použit nepřímý imunofluorescenční test, ve kterém v prvním stupni byl použit kultivační supernatant hybridomu MPH-01 a ve druhém stupni FITC-značená protilátka králičí anti-myší IgG.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

238 248

Myší lymfocytární hybridom IMG ČZAS MPH-01, produkující monoklonální protilátku třídy IgG_1 proti mykoplazmatům druhu Mycoplasma hyorhinis