

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 185 997

A bejelentés napja: (22) 81.12.18.

(21) (3864/81)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
DE

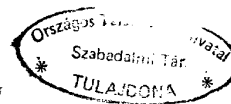
(32)
80.12.20.

(31)
(P 30.48 289.4)

A közzététel napja: (41) (42) 83.09.28

Megjelent: (45) 1987.06.18.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄
C 12 N 5/02



Feltaláló(k): (72)

dr. RÖDER Anton, vegyész, Kelkheim/Taunus, DE

Szabadalmaz: (73)

Hoechst AG., Frankfurt/Main, DE

(54)

ELJÁRÁS ROVARSEJTEK TENYÉSZTÉSÉRE

(57) KIVONAT

A találmány tárgya szokásos komponenseket tartalmazó tápközeg rovarok sejtjeinek tenyésztésére és sokszorozására, amely adalékanyagként 0,1—5 súly%, előnyösen 0,5—2 súly% tojássárgáját tartalmaz.

A találmány tárgy új tápközeg rovarok sejtjeinek tenyésztésére és sokszorozására.

A kémiai kártevőirtószerek környezetre gyakorolt hatásának vizsgálata következtében egyre növekszik a biológiai kártevőirtás jelentősége. A legeredményesebbnek ígérkező módszer a specifikus inszektpatogén vírusok, elsősorban a magpoliéder-vírusok (NPV) és a baculovírusok csoportjából származó granulóz-vírusok (GV) felhasználása. Ezeket a kémiai peszticidekhez hasonlóan kihordják a környezetbe és ott specifikus gazdaállatokban okoznak vírusfertőzést, amely gyors halálhoz vezet. A kereskedelmi forgalomban illetve gyakorlati kipróbálás alatt egy sor NPV- és GV-preparátumot találunk [lásd Shieh és Bohmfalk: Production and Efficiency of Baculoviruses, Biotechnology and Bioengineering XXII, 1357 (1980)].

A szükséges mennyiségű vírustömeg előállítása azonban olyan gyakorlati problémákba ütközik, melyeket eddig még nem oldottak meg kielégítő mértékben. Alapvetően két út ismeretes:

- nagy mennyiségű gazdaállat kitenyésztése, mesterséges megfertőzése a vírussal és a vírus izolálása az elpusztult állatokból;
- rovarok sejtjeinek in vitro tenyésztése megfelelő tápközegben, a sejtek fertőzése és a vírustömeg feldolgozása.

Az elsőnek említett eljárás nagy mennyiségű vírustömeget eredményez, jelentős hátránya azonban, hogy a gazdaállatok csak meghatározott évszakokban állnak rendelkezésre és a kapott vírustömeg rovarmaradványokkal és mikrobiológiai szennyezésekkel együtt nyerhető ki. Elvileg lehetséges a vírustömeg tisztítása, ez azonban jelentősen megrálgatja a termelést.

A második eljárás kiküszöböli ezeket a hátrányokat, ez csak a megfelelő tápközegtől függ. Az eddig ismert és alkalmazott tápközeg az általában szervesen sokat, vitaminokat, aminosavakat, cukrot és egy sor szerves vegyületet tartalmaznak sejtfiziológiai jelentőségük miatt. Valamennyi eddig ismert tápközeg tartalmaz 5–20% magzati borjúsérumot (FKS), amely a sejtnövekedéshez elengedhetetlen. Tipikus összetételeket ismertetnek például a Nature 195, 4843 (1962) és J. Invertebrate Pathology 25, 363–370 (1975) cikkekben.

A rovarsejtek tenyésztésére szolgáló másik ismert eljárás szerint az FKS koleszterinnel és lecitinnel helyettesíthető [Invertebr. Syst. in Vitro (Proc. Int. Conf.) 5, 1979 (Pub. 1980) 66–67. Szerkesztette: E. Kurstak, K. Maramorosch, A. Duekendorfer, Elsevier, Amsterdam, Netherlands]. Ez az eljárás azonban a tápközeg alacsony hatásfoka miatt nagy méretekben nem alkalmazható.

Kémiaiilag pontosan definiált összetételű táptalajt dolgoztak ki a Shell-cég kutatói [Dev. Biol. Stad. 1980. 46 (Proc. Gen. Meet. Eur. Soc. Anim. Cell. Technol., 3, 1979) 29–37], mely azonban igen sok anyagból áll, és így előállítása költséges, és technikai méretekben szinte megvalósíthatatlan.

Az ismert eljárások elterjedését tehát vagy az FKS felhasználása, vagy a bonyolult összetétel gátolja, emiatt ezek igen drága és csak korlátozott mértékben alkalmazható eljárások. Rovarsejtek ipari méretű termelése, amely így inszektpatogén vírusok ipari termelésének feltétele, ilyen körülmények között nem megoldott. Emiatt fontos követelmény, hogy az FKS adalékanyagot más olcsó és nagy tömegben rendelkezésre álló komponenssel pótoljuk.

2

Meglepő módon azt találtuk, hogy lényegesen jobb hatás érhető el tojássárgája felhasználásával.

A találmány tárgya tehát tápközeg rovarok sejtjeinek tenyésztésére és sokszorozására, amely adalékanyagként tojássárgáját tartalmaz.

A tojássárgája mennyisége 0,1–5 súly%, előnyösen 0,5–2 súly% a tápközegben. A tojássárgája teljesen vagy akár részlegesen helyettesítheti az FKS-t. Ilyenkor a sejttenyésztésre alkalmas tápközeg előállításához a szükséges FKS-mennyiség töredéke, mintegy 5–20%-a kell. Nem szükséges, hogy a tojássárgáját elválasszuk a fehérjétől, felhasználhatunk felvert és habart tojást is. Előnyösen azonban a kereskedelmi forgalomban lévő tojássárgája-emulziót használjuk.

A tojássárgája származása sem döntő szempont. Könnyű hozzáférhetősége miatt legalkalmasabb a tyúktojás sárgája, de felhasználható más, például kacs- vagy lúdtojás sárgája is.

A találmány szerinti tápközeg alkalmas rovarok, így például a Diptera és Lepidoptera rendből származó rovarok sejtvonalainak tenyésztésére. Különösen alkalmas a Spodoptera frugiperda, Lymantria dispar, Mamestra brassicae, Trichoplusia ni, Aedes albopictus és Aedes aegypti fajtákból származó sejtvonalak tenyésztésére. Ezek pedig alkalmasak számos inszektpatogén vírus, például a Parvo-, Pox-, Baculo- és Rhabdo-vírusok, ezek közül különösen a magpoliéder-vírusok, így például az autographa spp., Spodoptera spp. és Lymantria spp. tenyésztésére.

A találmány szerinti tápközeg a Spodoptera frugiperda (Sf) telepített sejtörzsének tenyésztésén mutatjuk be: A kereskedelmi forgalomban lévő TC 10 jelű tápközegben [összetétel: sóoldat, glükóz, megadott mennyiségű aminosav és vitamin, protein hidrolizátum (Triptoseboulion) és 10% FKS: Gardiner, Stockdale: Invertebrate Pathology 25, 363 (1975)] az FKS-koncentrációt 5%-ra csökkentjük és tojássárgája-emulziót (gyártó: Oxoid) adunk hozzá (végkoncentráció 0,5%). A sejtek tenyésztését egysejtréteg-tenyésztésre alkalmas üvegben (3 ml), rázó kultúrában (20 ml) és keverő edényben (500 ml) végeztük. Az adalékanyag a sejtkitermelést a kétszeresére növelte ($1,4 \times 10^6$ sejt/ml-ről $2,8 \times 10^6$ sejt/ml-re, az összehasonlítást a 10% FKS-tartalmú kontroll vizsgálattal végeztük). A további vizsgálatok során a sérumot teljesen elhagytuk és különböző koncentrációjú tojássárgájával helyettesítettük. 1% tojássárgája hozzáadásával az FKS teljesen helyettesíthető, a sejtkitermelés azonos nagyságrendben mozgott, mint 10% FKS felhasználásakor (lásd az 1. táblázatot).

50

1. táblázat

Sejtkitermelés az egysejtréteg tenyésztésére alkalmas üvegben

	sejtkitermelés (sejt/ml) TC/10 tápközeg esetén	
	+10% FKS	+1% tojássárgája emulzió
55		
60		
	1. kísérlet	$1,4 \times 10^6$
	2. kísérlet	$2,0 \times 10^6$
65	3. kísérlet	$1,4 \times 10^6$
		$1,8 \times 10^6$

Hasonló eredményeket kaptunk szuszpenziós sejtek felhasználásakor rázó- és keverő edényben is. A hosszantartó kísérletek során megállapítottuk, hogy a sejtnövekedés a találmány szerinti tápközegben 60 nemzedék után is stabil marad. Az FKS-mentes és tojássárgáját tartalmazó tápközegben tenyésztett sejteket szubsztrátként használtuk inszektpatógén magpoliéder-vírusok termelésekor. A víruskitermelés az FKS-tartalmú kontroll kísérlethez viszonyítva változatlan maradt (lásd a 2. táblázatot).

2. táblázat

Víruskitermelés az egységreteg tenyésztésére alkalmas üvegben

	víruskitermelés TC/10 tápközeg esetén	
	+10% FKS	+1% tojássárgája
FIB/ml	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
(polyhedral inclusion bodies)	$1,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
(soklapú bezáródó testek)	(2. kísérlet)	(3. kísérlet)

Ábra nélkül

Az elektronoptikai vizsgálatok és az in vitro fertőzések szerint a termelt vírus morfológiája és biológiai aktivitása változatlan.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szokásos komponenseket tartalmazó tápközeg rovarok sejtjeinek tenyésztésére és sokszorozására, *azzal jellemezve*, hogy a szokásos komponensek mellett adalékanyagként 0,1–5 súly % tojássárgáját tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti tápközeg kiviteli alakja, *azzal jellemezve*, hogy adalékanyagként 0,5–2 súly % tojássárgáját tartalmaz.