



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

259995

(11) B₁

(51) Int. Cl.^A

C 12 N 5/00

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28. 04. 87
(21) PV 2998-87.U

(40) Zveřejněno 15. 03. 88

(45) Vydáno 11. 05. 89

(75)
Autor vynálezu

PĚKNICOVÁ JANA RNDr. CSc.,
MOOS JIŘÍ,
ČECHOVÁ DANA RNDr. DrSc.,
ŠULCOVÁ BRIGITA ing., PRAHA

(54)

Myší lymfocytární hybridom produkující
monoklonální protilátku proti akrozinu

Myší lymfocytární hybridom, produkující protilátku proti akrozinu, která reaguje s akrozinem prasete, býka, berana a myši je uložen ve sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky CSAV pod označením MO. AKR. 4. Samotná monoklonální protilátka hybridomu MO. AKR. 4 je vhodná pro použití v radioimunologické nebo enzymoimunologické analýze stanovení množství prasečího, býčího, beraního a myšího akrozínu. V imunofluorescenčním testu značí nepoškozený akrozom u prasete, býka, berana, myši.

Vynález se týká nového hybridomu, tj. hybridního jednobuněčného organismu, sestrojeného buněčnou fuzí myelomové myší linie a myší slezinné lymfoidní buňky, produkující protilátku proti prasečímu akrozinu.

Protilátky proti akrozinu se vyrábějí tak, že je akrozin opakovaně injikován jako antigen pokusným zvířatům, nejčastěji myším nebo potkanům. Sérum takto imunizovaných zvířat, odebrané po určité době působení antigenu, slouží jako zdroj protilátek, užívaných pro stanovení akrozinu u poškozených spermií. 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 vytváří kromě protilátek vůči žádanému antigenu i protilátky proti nečistotám antigenního preparátu; ty je nutné ze sér odstraňovat vysycováním. Šarže konvenčních sér se proto dají těžko standardizovat. Pro výrobu každé šarže je třeba připravit čistý imunizační antigen a další antigeny pro vysycení balastních protilátek proti nečistotám.

Je známá monoklonální protilátka proti prasečímu akrozinu, specifická vůči β -formě akrozinu produkovaná Hybridomem MO. AKR.1, který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vítězská č. 1083, pod označením IMG CZAS MO. AKR 1.

Další monoklonální protilátku proti akrozinu produkuje nový hybridom MO AKR.4 podle vynálezu, který je uložen ve Sbírce hybridomů Ústavu molekulární genetiky ČSAV v Praze 4, Vítězská

č. 1083, pod označením IMG CZAS MO. AKR. 4. Tento hybridom produkuje monoklonální protilátku proti prasečímu, býčímu, beranímu a myšímu akrozinu, reaguje tedy mezidruhově, podobně jako konvenčním způsobem připravená protilátka; zároveň má však všechny výhody monoklonální protilátky /homogennost, standartnost, snadná příprava velkého množství protilátky/. V imuno-fluorescenčním testu /Immunochemistry in: Immunochemistry in Practice, eds. A. Johnstone, R. Thorpe, p 256. 1982/ značí monoklonální protilátka hybridomu MO. AKR. 4 akrozóm prasete, býka, berana a myši u nepoškozených spermií.

Uvedený hybridom byl získán způsobem známým z odborné literatury /Fazekas de St. Groth, S., Scheidigger, O.: Produktion of monoclonal antibodies: Strategy and tactics, J. Immunol. Met., 35: 1-21, 1980; Galfre, 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 fuzí myši myelomové linie Sp 2/o - Ag 14 a buněk, získaných ze sleziny myši kmene BALB/c, imunizovaných akrozínem.

Hybridom MO. AKR. 4 je možné kultivovat in vitro v médiích vhodných pro živočišné buňky a je adaptován pro růst in vivo v peritoneální dutině myši kmene BALB/c. Z konzerv, uchovávaných v kapalném dusíku, je možné zahájit produkci protilátky bez dalšího antigenu.

Příklad

Za účelem pomnožení hybridomových buněk in vivo bylo aplikováno $2 \cdot 10^6$ buněk do peritoneální dutiny myši. Aby došlo k lepšímu uchycení aplikovaných buněk, byla myš 10 dní před přenosem buněk hybridomu ovlivněna parafinovým olejem /0,5 ml intraperitoneálně/. Po 10 dnech růstu hybridomu v peritoneální dutině byla myš zabita a naprodukováná ascitická tekutina odebrána. Celkem bylo získáno 5 ml ascitické tekutiny, která obsahovala 7 mg/ml imunoglobulinu, třídy IgM. Monoklonální protilátka obsažená v ascitické tekutině reaguje s akrozínem různých druhů

zvířat /prase, býk, beran, myš/ v ELISA testu do ředění 10^{-5} /.

Buňky hybridomu MO. AKR. 4 mají ultrastrukturální obraz typických myelomových buněk. In vitro rostou jako polosuspenní kultury. Základním kultivačním médiem je médium RPMI 1640 /Moore, G.E. a spol. J. Am. Med. Assoc., 199:519, 1967/ připravené Ústavem molekulární genetiky ČSAV, doplněné glutaminem, HEPES-em, antibiotiky a 10% telecího séra /Bioveta, Ivanovice na Hané/. Hybridom je kultivován při 37 °C a 5 % CO₂. Střední generační čas je 17,3 hod.

Hybridom MO. AKR. 4 může být průmyslově využíván jako zdroj protilátky nejen proti prasečímu akrozínu, ale i akrozínu býků, beranů a ve výzkumu u myší. Pomocí této protilátky lze stanovit množství uvolněného akrozínu u poškozených spermií různých druhů zvířat, a tím otestovat různé inseminační dávky spermatu po rozmrazení a vybrat vhodné /fertilní, nepoškozené/ pro inseminaci.

V ELISA testu je množství akrozínu stanoveno tak, že supernatant z odebraných spermií od zvířat nebo rozmrazených spermií, který obsahuje uvolněný akrozín je nakapán do Terasakiho destiček /Dalečín/. K nakapanému antigenu - akrozínu je přidána monoklonální protilátka MO. AKR. 4 ředěná geometrickou řadou. Po inkubaci antigenu s monoklonální protilátkou je přidána prasečí protilátka proti myším imunoglobulinům značená peroxidázou /SWAM Px, USOL, Praha/, po přidání ortho-phenyldiaminu /substrát pro peroxidázu/ vzniká barevná reakce, kterou lze vizuálně odečíst.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MO. AKR. 4, vyznačující se tím, že produkuje monoklonální protilátku proti akrozínu, která reaguje s akrozínem prasete, býka, berana a myší.

Užgorodský výrobně-poligrafický podnik "Patent", Gagarina 101, Užgorod
№ 2330, Cena 2,40 Kčs