



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012108030/10, 05.03.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.03.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.03.2012

(45) Опубликовано: 10.10.2013 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2353650 C1, 27.04.2009. RU 2348688 C1,
10.03.2009. RU 2348689 C1, 10.03.2009. JP
2008220198 A, 25.09.2008.

Адрес для переписки:

109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп.1,
ВИЭВ

(72) Автор(ы):

Завьялова Елена Александровна (RU),
Карпова Марианна Алексеевна (RU),
Дрошнев Алексей Евгеньевич (RU),
Гулюкин Михаил Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии
им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) Российской
академии сельскохозяйственных наук (RU)**(54) ПОСТОЯННАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК OMG ИЗ ГОНАД РАДУЖНОЙ
ФОРЕЛИ (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии, в частности к получению перевиваемых линий клеток. Постоянная линия клеток получена из ткани гонад радужной форели путем длительного пассирования на среде Игла МЕМ на солях Эрла с 25 мМ NEPES с 10% эмбриональной сыворотки. Линия может быть использована как тест-культура для выделения, накопления, титрования и изучения вируса инфекционного некроза поджелудочной железы

лососевых (IPNV), вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHSV), инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых (IHNV), весенней виремии карпов (SVCV), герпес-вируса карпа кои (KHV), герпес-вируса осетровых (SbSHV). Постоянная линия клеток OMG найдет широкое применение в лабораторных исследованиях по вирусологии и в биотехнологии при производстве вирус-вакцин и диагностикомов. 1 табл.

RU 2 495 120 C1

RU 2 495 120 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 495 120** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012108030/10, 05.03.2012**

(24) Effective date for property rights:
05.03.2012

Priority:

(22) Date of filing: **05.03.2012**

(45) Date of publication: **10.10.2013 Bull. 28**

Mail address:

**109428, Moskva, Rjazanskij pr-kt, 24, korp.1,
VIEhV**

(72) Inventor(s):

**Zav'jalova Elena Aleksandrovna (RU),
Karpova Marianna Alekseevna (RU),
Droshnev Aleksej Evgen'evich (RU),
Guljukin Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut
ehksperimental'noj veterinarii im. Ja.R.
Kovalenko (VIEhV) Rossijskoj akademii
sel'skokhozjajstvennykh nauk (RU)**

(54) **PERMANENT OMG CELL LINE FROM GONADS OF TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: permanent line of cells is produced from tissue of trout gonads by means of long-term passage in the medium of Igla MEM on Earl salts with 25 mM of HEPES from 10% embryonic serum. The line may be used as a test culture for extraction, accumulation, titration and study of a infectious pancreas necrosis virus (IPNV) of salmon fishers, virulent haemorrhagic septicemia

virus (VHSV) of salmon fishes, infectious hemopoietic necrosis virus (IHNV) of salmon fish tissue, spring viraemia of carps virus (SVCV), koi herpes virus (KHV), sturgeon herpes virus (SbSHV).

EFFECT: permanent line of OMG cells will find wide application in laboratory research on virology and biotechnology in production of virus vaccines and diagnosticums.

1 tbl

RU 2 4 9 5 1 2 0 C 1

RU 2 4 9 5 1 2 0 C 1

Предполагаемое изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии, в частности, к получению перевиваемых линий клеток, используемых при вирусологических и биотехнологических исследованиях.

5 Вирусные болезни рыб являются одним из основных сдерживающих факторов развития мировой аквакультуры. В связи с завозом из-за рубежа рыбопосадочного материала и экзотических видов рыб в последние годы в стране значительно обострилась эпизоотическая ситуация по особо опасным и карантинным вирусным болезням рыб. Метод культуры клеток позволяет моделировать процессы, 10 происходящие в организме при взаимодействии с различными патогенными факторами, исследовать молекулярный характер инфекционного процесса, изучать репликацию вирусов, их ростовые показатели, с целью получения антигенов для производства вакцин и до сих пор остается «золотым стандартом» в диагностике заболеваний рыб вирусной природы.

15 В мире известны более 30 линий клеток, полученных из разных органов и тканей радужной форели, и только одна из них RTO, фибробластоподобной морфологии, была получена из ткани яичников [1]. Однако ее чувствительность к вирусам не была определена, таким образом невозможно использовать ее в работах по выделению и 20 изучению вирусов-возбудителей опасных заболеваний рыб.

Известна также линия клеток ICO, полученная из гонад неполовозрелого карпа (*Cyprinus carpio*), используемая для выделения и культивирования вирусов рыб различных таксономических групп.

25 Морфологические признаки: линия представлена эпителиоподобными клетками, преимущественно однородными, их форма близка к кубической. Ядра крупные округлые, число ядрышек от 1 до 3, чаще 1. Ядрышки крупные, при окраске по Паппенгейму окружены зоной просветления, цитоплазма гомогенная. Модальный класс - 90 хромосом, с интервалом изменчивости от 71 до 178, величина модального 30 класса 36%.

Культуральные свойства: клетки культивируют в среде Игла 2 MEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Снимают с использованием стандартных растворов трипсина 0,25% и версена 0,02% в соотношении 5:7, с коэффициентом пересева 1:5. Монослой формируется через сутки 35 после посева при посевной концентрации 3×10^5 кл./см², при температуре 18-25°C.

Криоконсервация клеток: криозащитная среда следующего состава: ДМСО - 10%, фетальная сыворотка - 30%, среда Игла 2 MEM - 60%. Концентрация клеток при замораживании составляет 1-3 млн. кл./мл.

40 Линия клеток ICO чувствительна к вирусу весенней виiremии карпов, вирусной геморрагической септицемии, инфекционного некроза гемопоэтической ткани, рабдовируса европейского угря, рабдовируса мальков щуки и иридовируса угря [2 прототип]. Однако, данная линия не обладает чувствительностью к вирусам инфекционного некроза поджелудочной железы и герпесвирусу осетровых.

45 В задачу наших исследований входило - получить перевиваемую линию клеток из гонад половозрелой радужной форели, обладающую высокой чувствительностью к ихтиовирусам различных таксономических групп.

Предложенная линия клеток получена из первично-трипсинизированной ткани 50 гонад половозрелой (3-ая стадия по шкале Киселевича) радужной форели путем длительного пассирования на среде Игла MEM на солях Эрла с 25 мМ HEPES с 10% эмбриональной сыворотки.

Линия клеток гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) названа авторами OMG

и депонирована в Специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных (СХЖ РАСХН) под номером 75 в 2010 году.

Предложенная линия обладает следующими свойствами:

5 **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ** - постоянная линия радужной форели представляет собой ровный, плотный монослой из клеток эпителиоподобной, полигональной формы, с крупными ядрами округлой или овальной формы с 1-3 ядрышками. Клетки делятся обычным двуполосным митозом. Кариотип
10 соответствует видовому признаку форели, модальный класс содержит 60 хромосом ($2n=60$) и составляет 77%.

Видовая идентичность подтверждена кариологическими методами.

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА - клетки выращивают при температуре - 15-22°C в пристеночных условиях в сосудах различной емкости; ростовой средой является
15 среда Игла МЕМ на солях Эрла с 25 мМ NERES с 10% эмбриональной сыворотки без антибиотиков, рН среды 7,4-7,6. Дезагрегацию монослоя при субкультивировании осуществляют смесью трипсина 0,25% и версена 0,02% (4:1), кратность посева 1:3-6. Посевная концентрация $250-300 \times 10^3$ клеток/мл. Первые сутки после
20 субкультивирования содержат при 20-22°C, для формирования монослоя, через 2 суток монослой переносят на хранение при 15°C. частота посева 1 раз 2-3 недели.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ - линия клеток чувствительна к вирусам инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHSV), инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых (IHNV), весенней виремии карпов (SVCV), герпесвирусу карпа кои (KHV), герпесвирусу осетровых (SbSHV).
25

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ - криоконсервацию осуществляют по 2-ступенчатому методу. Температуру снижают по 1-2°C до -30°C, далее по 3-5°C до -70°C. По
30 достижении -70°C ампулы с клетками помещают в жидкий азот. Криозащитную среду готовят следующим образом: среда культивирования - 50%, сыворотка эмбриональная телячья - 40%, ДМСО - 10%, концентрация - 3-4 млн.кл/мл.

КОНТРОЛЬ НА ПОСТОРОННИЕ КОНТАМИНАНТЫ - при исследовании
35 клеточной линии OMG на наличие бактерий, грибов, микоплазм и латентных вирусов получены отрицательные результаты.

ПРИМЕР: Культуру клеток OMG культивируют на среде Игла МЕМ на солях Эрла с 25 мМ NERES с 10% эмбриональной сыворотки без антибиотиков. При посеве клетки снимают со стекла (пластика) 0,25% раствором трипсина и 0,02% раствором
40 версена (4:1) при температуре 22°C. Монослой формируется на 1-2 сутки культивирования. После образования монослоя культуру заражают вирусом и инкубируют при температуре оптимальной для исследуемого вируса.

45 Экспериментальные данные по чувствительности клеточной линии OMG к патогенным вирусам рыб приведены в таблице 1.

Таблица 1				
Вирус	Культуры клеток			
	OMG		Референтная для данного вируса	
	Проявление ЦПД вируса, суток.	Титр вируса ТЦД ₅₀ /мл	Проявление ЦПД вируса, час.	Проявление ЦПД вируса, час.
инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV),	2	$10^{9,0}$	3	RTG-2/10 ^{8,0}

	геморрагической септицемии лососевых (VHSV)	3	$10^{8,0}$	2	$EPC/10^{7,5}$
5	инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых (IHNV)	3	$10^{8,75}$	3	$EPC/10^{7,5}$
	весенней виiremии карпов (SVCV)	5	$10^{6,6}$	5	$EPC/10^{8,0}$
10	герпес-карпа кои (KHV)	2	$10^{9,0}$	2	$FHM/10^{7,5}$
	герпес-осетровых (SbSHV)	5	$10^{6,0}$	5	$WSSK-1/10^{6,0}$

Титры исследованных вирусов в культуре клеток OMG через 5 дней инкубации на порядок выше, чем в референтной для каждого вируса культуре.

15 Предложенная клеточная линия апробирована с положительным результатом в лаборатории ихтиопатологии ВИЭВ с января 2010 по январь 2012 года для накопления, титрования и изучения вируса инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых (IPNV), вирусной геморрагической септицемии лососевых (VHSV),
20 инфекционного некроза гемопозитической ткани лососевых (IHNV), весенней виiremии карпов (SVCV), герпес вируса карпа кои (KHV), герпес вируса осетровых (SbSHV) и для диагностической работы по выявлению этих вирусов при мониторинговых исследованиях.

25 Постоянная линия клеток OMG найдет широкое применение в лабораторных исследованиях по вирусологии и в биотехнологии при производстве вирус-вакцин и диагностикумов.

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

30 1. Li M.F. A quantitative study of the effects of naturally occurring supplements on the growth of rainbow trout gonadal cells / M.F.Li, J.E.Stewart // Can.J.Microbiol. - 1965. - Vol.11. - p.9-14.

2. Патент №23533650 C12N 5/06 от 27.04.2009.

Формула изобретения

35 Постоянная линия клеток OMG из гонад радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), используемая для вирусологических исследований и чувствительная к 6 вирусам разных видов рыб, разводимых в условиях аквакультуры, депонирована в Специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур
40 сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции культур клеток при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии (СХЖ РАСХН) под №75.

45

50