

Изобретение принадлежит к биологии развития и медицине.

Аналогичный случай нашли в диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук "Ранние этапы образования гибридом, продуцирующих моноклональные антитела". Цой Л.А. М.: 1985.

Получение лимфоцитов из селезенки.

Мышь забивали, вскрывали брюшную полость и выделяли селезенку, поместив ее в чашку Петри со средой Дульбекко, тщательно очищали и переносили либо в другую чашку, либо в стеклянный гомогенизатор (Доинсе) с неплотно притертым поршнем в 20 мл среды Дульбекко. В первом случае клетки "вычесывали" из селезенки пинцетом, во втором - выдавливали двумя-тремя вращательными движениями. Суспензию клеток осторожно пипетировали и переносили в пробирки. Через 5 мин, когда кусочки селезеночной капсулы и крупные комочки слипшихся клеток оседали на дно, суспензию пипеткой осторожно переносили в центрифужный стакан объемом 50 мл, подслаивали на дно 5 мл сыворотки и центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и оставляли стерильно до употребления.

Слияние клеток.

В стеклянную центрифужную пробирку вносили миеломные клетки и лимфоциты в различных соотношениях: 1:2, 1:5, 1:10. Суспензию клеток тщательно перемешивали и центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин. Супернатант сливали, а осадок разрыхляли осторожным потряхиванием пробирки. К полученному осадку медленно добавляли 1 мл 50%-ного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) в течение 1 мин. Затем пробирку на протяжении 1 мин медленно покачивали, после чего добавляли теплую среду Дульбекко в течение 5 мин до общего объема 20 мл. Взвесь клеток центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в селективной среде ГАТ (Гипоклантин, Аминоптерин, Тимидин) и вносили по 0,2 мл в 96-луночную панель.

В опытах сливали клетки мышинной миеломы с лимфоцитами из селезенки мышей, иммунизированных определенным антигеном. Образующиеся в результате клетки гибридной миеломы или "гибридомы" обладают и способностью лимфоцитов вырабатывать специфические антитела, и свойством миеломных клеток оставаться бессмертными. Клонировав отдельные гибридные клетки, получали клоны, производящие большое количество идентичных антител к одной антигенной детерминате. Такие индивидуальные клоны можно поддерживать неопределенно долго и в любой момент использовать для получения моноклональных антител в культуре.

Прототипом изобретения служат данные экспериментальных исследований Э.М. Де Робертис и Дж.Б. Гердон, изложенные в статье

"Пересадки генов и анализ развития". "Молекулы и клетки", выпуск седьмой. М.: Мир, 1982, с.78-93. Ученые ставили опыты с использованием в качестве пробирки нормальных живых клеток, где нормально функционируют гены из других клеток, введенные с помощью метода микроинъекций.

Целью исследователей была разработка метода, сочетающего точность экспериментов в пробирке с естественной средой живой клетки. Таким методом явился метод введения очищенных макромолекул в ооциты лягушки.

Ооциты - предшественники яйцеклеток - представляют собой удобную экспериментальную модель из-за их большого размера, устойчивости к экспериментальным воздействиям (в них можно инъецировать те или иные вещества в количестве, составляющем до 5% их объема, без каких-либо последствий и наличия их жизнеспособности в культуре, они остаются живыми и функционируют в течение нескольких недель в простом солевом растворе). Ооциты особенно пригодны для эмбриологических исследований, поскольку природа их предопределена; они становятся яйцами, а затем зародышами и уже содержат большую часть молекулярных механизмов, необходимых для раннего развития.

Ядра соматических клеток выделяют с помощью мягких методов, обрабатывают лизолецитином - фосфолипидом, который внедряется в наружную мембрану ядра, и в каждый ооцит инъецируют большое число таких ядер. Опыты с микроинъекциями ставились для того, чтобы выяснить содержит ли ооцит вещества, регулирующие активность гена.

Суть изобретения и исходящий из него технический результат.

Зигота - идеальная зародышевая клетка; из нее равновероятно может быть получен любой из клеточных типов, входящих в организм данного вида. Любая другая клетка, кроме зиготы, не в состоянии дать начало другим клеточным популяциям.

Для биологии развития известны партеногенетическая форма развития, когда зигота образуется только из гаплоидных женских гамет, и андрогенез, когда в яйцеклетке образуется ядро слиянием двух сперматозоидов.

Для биологии развития известно не только то, что зиготу образуют диплоидные клетки, но и то, что гаметы имеют блокаду на мейоз; без редуктивного деления они стареют и становятся непригодными для оплодотворения; в таком случае соматические и половые клетки идентичны, так как реальное различие между ними очевидно после мейоза, что и определяет гаплоидный набор хромосом гамет; во многих экспериментах стимулируют женские гаметы для партеногенетического развития.

Соматические клетки имеют диплоидное число хромосом, в отличие от гамет, не слива-

ются друг с другом, не могут образовать зиготоподобную клетку. Однако, общеизвестно, что в различных тканях, особенно в экспериментальных условиях в культурах тканей, число хромосом подвергается большим колебаниям; анеуплоидия наблюдается при злокачественном росте тканей.

В литературе нет данных о возможности слияния в экспериментальных условиях двух гаплоидных сперматидов. Поэтому, весьма вероятно, неизвестно, что может дать такая зиготоподобная клетка-андроид. Надо полагать, что при слиянии мужских гамет образуется клеточная популяция, отличающаяся от клеточной популяции, полученной при слиянии разных гаплоидных клеток. Однако, не исключено, что в клеточных популяциях, полученных после слияния однородных гамет, могут формироваться конструкции, образующиеся при слиянии разных гамет.

Экспериментальная система, с помощью которой возможно выделение и слияние гаплоидных сперматидов в зиготоподобную клетку, инъектирование анроида в яйцо и получение тканевой культуры, может быть использована для изучения механизма как нормального, так и патологического роста.

Общее описание метода.

Изучены потенциальные свойства анроида с помощью экспериментальной системы, которая включает выделение гаплоидных клеток, предшественников сперматозоидов-сперматидов, помещение сперматидов в питательной среде, слияние их в зиготоподобную клетку под давлением и инъектирование полученного анроида в яйцо.

Конкретный пример осуществления метода.

Опыты проводились в природных условиях. Под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость петуха, вырезали семенники и переносили в стерильную чашку Петри в теплой питательной среде.

Питательную среду - эмбриональную жидкость - собирали из 12 дневных куриных эмбрионов. Для этого яйца располагали вверх воздушной полостью, протирали спиртом, удаляли верхнюю часть скорлупы и отсасывали шприцем эмбриональную жидкость.

После удаления оболочки семенники измельчали ножницами, полученную кашицу переносили в центрифужные пробирки, подслаивали на дно 5 мл теплой питательной среды и центрифугировали 5 мин при 400-500 об/мин; через 5 мин, когда крупные комочки слипшихся клеток оседали на дно, суспензию осторожно переносили в стерильные пробирки, добавляли по 5 мл теплой среды и опять центрифугировали 5 мин 200-300 об/мин, оставляли на 5 мин, затем суспензию переносили в шприцах одноразового

пользования и сливали клетки под давлением; полученные андроиды инъектировали в оплодотворенных куриных яйцах, где было начато за 1,2,3 и больше дней развитие эмбрионов. Часть яиц оставляли без инъекции для контроля возраста эмбриона.

С целью морфологического изучения материал брали через 24 и 48 ч и спустя 3,5,7,9,10, 11,12,14 суток после инъекции и фиксировали в 12%-ном растворе нейтрального формалина. После фиксации объекты заливали в целлоидин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и микрофуксином по Ван-Гизону.

Эффективность метода подтверждается полученными результатами: андроиды в яйце размножаются.

Гистологическое изучение материала показывает, что:

1. По истечении 24 ч после инъекции материал представлен однослойной клеточной культурой, состоящей из однотипных, круглых клеток с круглыми ядрами, расположенными в центре тел клеток. Среди названных клеток изредка встречаются фигуры митоза.

2. По истечении 48 ч после инъекции материал представлен однослойной клеточной культурой, состоящей из круглой и округлой формы клеток с круглыми и овальными ядрами, расположенными в центре тел клеток.

3. Спустя 3 и 5 суток после инъекции материал представляет собой однослойную клеточную культуру, однако расположение клеток имеет определенную ориентацию, проявляющуюся образованием столбиков, состоящих из 10-12 рядов круглых и округлых клеток. Столбики прямолинейные или образуют петли.

4. Спустя 12 суток после инъекции материал представляет собой тканевую культуру, состоящую из дериватов экто и мезодермы и создающую организмоидный тип строения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения клеточной популяции, включающий выделение живых клеток и введение их в ооциты, отличающийся тем, что в качестве живых клеток используют сперматиды, после выделения их помещают в эмбриональную жидкость, затем сливают полученную суспензию под давлением, величина которого обеспечивает целостность клеточных мембран, в зиготоподобные клетки и инъектируют полученные андроиды в оплодотворенные ооциты.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве ооцитов используют куриные яйца.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что давление обеспечивается пропусканием суспензии через шприц одноразового пользования двумя-тремя вращательными движениями поршня.

