



(11) (21) EA - 960117

(13) A1

(51) 6 C 12 N 5/00

(19) Евразийское Патентное
Ведомство

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

1

(21) 960117
(31) 00216
(32) 10.01.96
(43) 30.09.97 Бюл. № 3
(72) Бурдули М.А. (GE)
(71) Бурдули М.А. (GE), Скориков А.Н. (RU)
(74) Скориков А.Н. (RU)
(54) МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ СПЕРМАТИДОВ, ИХ СЛИЯНИЕ В ЗИГОТОПОДОБНУЮ КЛЕТКУ И ИНЪЕЦИРОВАНИЕ АНДРОИДА В ЯЙЦО

(22) 24.12.96

(33) GE

2

(57) Изобретение относится к способу получения сперматидов, их слияния в зиготоподобную клетку и инъецирование андроида в ооциты, в котором в качестве питательной среды для сперматидов используют эмбриональную жидкость куриных эмбрионов в период ее образования, а слияние клеток проводят под давлением, обеспечивающим целостность клеточных мембран. 1 н.п., 2 з.п. ф-лы.

EA
960117
A1

EA
960117
A1

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 Людмила Александровна. Москва, 1985 г.

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. Суспензатант сливали, а осадок разрыхляли осторожным потряхиванием пробирки. К полученному осадку медленно добавляли 1 мл 50% 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 ресуспензировали 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. Клонирова отдельные гибридные клетки, получали клоны, производящие большое количество идентичных антител к одной антигенной детерминате. Такие инди-

видуальные клоны можно поддерживать неопределенно долго и в любой момент использовать для получения моноклональных антител в культуре.

Прототипом нашего труда 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. Москва. Мир, 1982 г, с. 78-93. Ученые ставили опыты с использованием в качестве пробирки нормальные живые клетки, 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 predetermined; 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 содержат ли ооцит вещества, регулирующие активность гена.

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 гаплоидные 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 сливаются 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 андроида в яйцо и получение тканевой культуры - может быть использована для изучения механизма как нормального, так и патологического роста.

Изучены потенциальные свойства андроида 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 андроида в яйцо.

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 в шприце эмбриональную жидкость.

После удаления оболочки семенники измельчали ножницами, полученную кашку переносили в центрифужные пробирки, подслаивали на дно 5 мл теплой питательной Среды и центрифугировали 5 мин при 400-500 об/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 были начаты 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 сут после инъекции и фиксировали в 12%-ном растворе нейтрального формалина. После фиксации объекты заливали в целлоидин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону.

Эффективность метода подтверждалась 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 сут 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 сут после инъекции материал представляет собой тканевую культуру, состоящую из дериватов экто и мезодермы и создающую организмоидный тип строения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения сперматидов, их слияния в зиготоподобную клетку и инъектирования андроида в ооциты (преимущественно в куриное яйцо), *отличающийся* тем, что в качестве живых клеток использованы сперматиды, предшественники сперматозоидов; питательная среда (эмбриональная жидкость) для сперматидов получена из куриных эмбрионов в период образования этой жидкости; слияние клеток проводится под давлением (величину давления выбирают в пределах, обеспечивающих целостность

клеточных мембран). Полученные андройды инъектируют в оплодотворенные ооциты (преимущественно в куриные яйца).

2. Способ по п. 1, *отличающийся* тем, что в качестве ооцитов использованы преимущественно куриные яйца или любые другие женские гаметы.

3. Способ по п. 1, *отличающийся* тем, что давление обеспечивается пропусканием суспензии в шприцах одноразового пользования двумя, тремя вращательными движениями поршня.

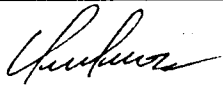
ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ КОНВЕНЦИЯ (ЕАПК)

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

EA-96-0117-GE

Дата подачи в Евразийское Патентное Ведомство: 24 декабря 1996 (24.12.96)		
Название изобретения: Метод получения сперматидов, их слияния в зиготоподобную клетку и инъектирования андроида в яйцо		
Заявитель(и): БУРДУЛИ Маради Александровна и др.		
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: C12N 5/06, 5/16 Согласно международной патентной классификации (МПК-6)		
Б. ОБЛАСТИ ПОИСКА:		
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК-6): C12N 5/00, 5/06, 5/12, 5/16, C12M 3/00, 3/10		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:		
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU, C1, 2003681 (КРЫМСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ), 30 ноября 1993 (30.11.93)	1
A	RU, C1, 2003686 (КРЫМСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ), 30 ноября 1993 (30.11.93)	1
A	RU, C1, 2012594 (ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ ЖИВОТНЫХ), 15 апреля 1994 (15.04.94)	1
A	RU, C3, 2049817 (АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОТЕХНОЛОГИЯ"), 10 декабря 1995 (10.12.95)	1
A	DE, A1, 3914339 (B.BRAUN MELSUNGEN AG), 31 октября 1990 (31.10.90)	1,3
A	FR, A1, 2636074 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)), 09 марта 1990 (09.03.90)	1-2
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета "D" документ, приведенный в евразийской заявке "Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень взятый в отдельности "У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях		
Дата действительного завершения патентного поиска: 20 мая 1997 (20.05.97)		
Наименование и адрес исполнителя поиска: Всероссийский научно-исследовательский институт государственной патентной экспертизы Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо :  В.П.Чиженок Телефон № (095) 240-5888