Введение

Для многих исследований, связанных с изучением биологических структур большую ценность представляют реагенты, способные специфически взаимодействовать с данной структурой. Универсальным реагентов, обладающим указанными свойствами является молекула иммуноглобулина. Иммунная система вырабатывает специфические антитела на огромное множество антигенов. В основе такой способности лежит наличие большого разнообразия клонов лимфоцитов, каждый из которых вырабатывает антитела одного типа с узкой специфичностью. [1]

Перед исследователями изначально стояла проблема получения антител с узкой специфичностью. Открытие в 1975 году Д. Келером и С. Мильштейном способа получения моноклональных антител решило эту задачу.

Моноклональные антитела невероятно быстро вошли в клиническую практику. Наиболее широко они используются в медицинской диагностике. Моноклональные антитела, введенные в живой организм, присоединяются к пораженным болезнью клеткам, а соответствующие индикаторные материалы позволяют выяснить их местонахождение. В последнее время активно разрабатываются методы лечения раковых опухолей при помощи моноклональных антител. [2]

Целью данной работы явилось изучение метода получения моноклональных антител путем слияния клеток мышиной миеломы с В-лимфоцитами, вырабатывающимися клетками селезенки иммунизированной мыши.

1. Моноклональные антитела. История открытия

Иммунная система организма защищает его от живых тел и веществ, несущих в себе признаки чужеродной генетической информации, т.е. антигенов. Антигенами могут быть любые микроорганизмы - бактерии, грибы, вирусы; клетки другого организма - клетки трансплантата, крови. Антигенами являются также яды, токсины, ферменты, гормоны, макромолекулы - белки, полисахариды, липиды с чужеродной генетической матрицей. Антигенами могут стать и клетки собственного организма, подвергшиеся генетическим изменениям.[2]

Иммунная система распознает чужеродные субстанции и включает соответствующие механизмы для инактивации антигенов. Основу иммунологической реактивности организма составляет сложный комплекс иммунологических реакций, осуществляющий развитие клеточного и гуморального иммунитета. Последний обусловлен продукцией антител, циркулирующих в жидких средах организма.

Антитела обладают уникальным свойством - абсолютной специфичностью, т.е. способностью реагировать лишь с тем антигеном, проникновение которого в организм вызвало их появление. После появления в организме антигена, из В-лимфоцитов, находящихся в крови, селезенке, лимфоузлах, дифференцируются плазматические клетки. Каждый из В-лимфоцитов способен синтезировать антитела лишь одной специфичности. Под влиянием соответствующего антигена происходит стимуляция лимфоцита и возникновение клона, синтезирующего определенные антитела. Разнообразие антител оценивается цифрой 107, т.е. существует столько же клонов антителопродуцентов. В организме одномоментно действует множество клонов, поэтому сыворотка является гетерогенной популяцией антител.

Настоящий переворот в области иммунологии произошел в 1970-х годах. Именно тогда была разработана методика получения моноклональных антител. Моноклональные антитела - антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. Моноклональные антитела могут быть выработаны практически на любое вещество (в основном белки и полисахариды), которое антитело будет специфически связывать.

Клетки миеломы человека и мышей интенсивно изучались уже с конца 1960-х годов, так как представляли собой уникальную модель клона антителопродуцирующих клеток. В 1970 голу появились первые сообщения о получении мышиных гибридом путем слияния миеломных клеток, вырабатывающих различные типы нормальных и вариантных молекул иммуноглобулинов.

Процесс получения моноклональных антител был изобретен в 1975 году Жоржем Келером и Сезаром Мильштейном, за что в 1984 году они получили Нобелевскую премию по физиологии. Идея состояла в том, чтобы взять линию миеломных клеток, которые потеряли способность синтезировать свои собственные антитела, и слить такую клетку с нормальным В-лимфоцитом, синтезирующим антитела, с тем, чтобы после слияния отобрать образованные гибридные клетки, синтезирующие нужное антитело.

Эта идея была успешно реализована и уже к началу 1980-х годов началось коммерческое получение различных гибридом и очистка антител против заданных антигенов. [2]

2. Среды для культивирования

.1 Описание основных сред для культивирования

Основными средами, употребляемыми при получении гибридом, являются среда RPMI 1640 и среда Игла в модификации Дульбекко. Применяются и другие среды, в частности среда Дульбекко в модификации Исакова. [1]

Среда Игла. Среда Игла, как правило, пригодна для культивирования большинства клеточных линий. Среда Игла содержит соли, глюкозу, 12 незаменимых аминокислот и 9 витаминов. Перед употреблением вместе с сывороткой добавляются глютамин и, если необходимо, антибиотики.[3] Содержание аминокислот и витаминов в среде Игла в модификации Дульбекко приведено в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотный и витаминный состав среды Игла в модификации Дульбекко[3]

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компонент | Содержание в питательной среде, мг/л | Компонент | Содержание в питательной среде, мг/л |
| Аминокислоты | | L-триптофан | 16,0 |
| L-аргинин-HCl | 84,0 | L-тирозин | 72,0 |
| L-цистин | 48,0 | L-валин | 94,0 |
| L-глютамин | 584,0 | Витамины | |
| L-глицин | 30,0 |  | |
| L-гистидин-HCl∙H2O | 42,0 | D-Ca-пантотенат | 4,0 |
| L-изолейцин | 105,0 | Холинхлорид | 4,0 |
| L-лейцин | 105,0 | Фолиевая кислота | 4,0 |
| L-лизин-HCl | 146,0 | i-инозитол | 7,2 |
| L-метионин | 30,0 | Никотинамид | 4,0 |
| L-фенилаланин | 66,0 | Пиридоксаль-HCl | 4,0 |
| L-серин | 42,0 | Рибофлавин | 0,4 |
| L-треонин | 95,0 | Тиамин-HCl | 4,0 |

Среда RPMI 1640. Среда представляет собой растворенную в очищенной воде смесь неорганических солей, аминокислот, витаминов, глюкозы и фенолового красного, простерилизованную фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0,1 мкм. В таблице 2 приведен состав среды RPMI 1640.

Таблица 2. Состав среды RPMI 1640[3]

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| КомпонентСодержание в питательной среде, мг/лКомпонентСодержание в питательной среде, мг/л |  |  |  |
| Аминокислоты | | Холинхлорид | 5,00 |
| L-аланин | 13,90 | D-Ca-пантотенат | 0,20 |
| L-аргинин-HCl | 42,10 | Фолиевая к-та | 10,00 |
| L-аспарагин | 45,00 | i-инозит | 36,00 |
| L-аспарагиновая к-та | 19,97 | Никотинамид | 0,50 |
| L-цистеин | 31,50 | Никотиновая к-та | 0,50 |
| L-глютаминовая к-та | 22,10 | ПАБК | 1,00 |
| L-глютамин | 219,20 | Пиридоксаль-HCl | 0,50 |
| Глицин | 7,50 | Пиридоксин-HCl | 0,50 |
| L-гистидин-HCl∙H2O | 20,96 | Рибофлавин | 0,20 |
| L-гидроксипролин | 19,70 | Тиамин-HCl | 0,20 |
| L-изолейцин | 39,36 | Цианокобаламин | 2,00 |
| L-лейцин | 39,36 | Соли | |
| L-лизин-HCl | 36,50 | CaCl2 | 100,0 |
| L-метионин | 14,90 | KCl | 400,0 |
| L-фенилаланин | 16,50 | MgSO4∙7H2O | 200,0 |
| L-пролин | 17,30 | NaCl | 6460,0 |
| L-серин | 26,30 | NaHCO3 | 2200,0 |
| L-треонин | 17,90 | NaH2PO4∙H2O | 580,0 |
| L-триптофан | 3,10 | Другие компоненты | |
| L-тирозин | 18,10 | Феноловый красный | 10,0 |
| L-валин | 17,60 | Глюкоза | 3000,0 |
| Витамины | | Глутатион | 0,50 |
| Аскорбиновая к-та | 0,50 | Бакто-пептон | 600,0 |
| Биотин | 0,20 | СПК | 0 - 30% |

2.2 Приготовление отдельных компонентов сред для культивирования

. 100-кратный концентрат ГТ (гипоксантин, тимидин). 136,1 мг гипоксантина и 38,75 мг тимидина добавить к 50 мл воды, затем по каплям при постоянном перемешивании прибавлять 0,1М NaOH до полного растворения реагентов. Довести объем до 100 мл, профильтровать и заморозить при -20°С.[1]

. 100-кратный концентрат аминоптерина. 1,76 мг аминоптерина растворить в 100 мл воды, профильтровать, профильтровать, хранить при -20°С. Раствор аминоптерина необходимо предохранять от света. [4]

. Выбор сыворотки. Наибольшей способностью поддерживать рост гибридомных клеток обладает сыворотка плода коровы (СПК). Чаще всего используют неинактивированную сыворотку, хотя иногда ее инактивируют прогреванием при 56°С в течение 30 мин для уменьшения возможной токсичности компонентов. СПК является одним из самых дорогих компонентов среды культивирования, поэтому обращаться с ней необходимо экономно. Для культивирования клеток сразу после слияния, а также для клонирования, используют высокую концентрацию СПК (15 - 20%). Как только гибридомы отобраны, их можно постепенно переводить на рост в 10% СПК. Если клетки хорошо адаптировались, то концентрацию можно снизить до 5%.

В предварительных экспериментах определяют сыворотку, обладающей наилучшей способностью поддерживать рост гибридомных клеток. Из клеток, взятых на логарифмической фазе роста (если готовых гибридомных клеток нет, используют миеломные родительские клетки), готовят четыре суспензии, содержащие 2000, 1000, 500 и 250 клеток в 1 мл. Помещают по 150 мкл среды, содержащей 20% тестируемой сыворотки, в лунки 1 - 6 96-ти луночного планшета. В лунки 1 - 7 вносят контрольную сыворотку для сравнения. Закапывают по 20 мкл каждой суспензии клеток в 24 лунки. Планшет помещают в CO2-инкубатор. Чрез 7 - 10 дней оценивают скорость роста клеток.

Вместо СПК применяют и другие сыворотки: сыворотку новорожденных телят, сыворотку коров, лошадиную сыворотку, кроличью сыворотку. [1]

. Буфер Hepes. Hepes - сокращенное обозначение 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты. Буфер Hepes нетоксичен для клеток и используется вместо бикарбоната. Буфер используется в концентрации 10 - 25 мМ и добавляется в среду из концентрата, который готовится следующим образом:

,6 г буфера Hepes растворить в 200 мл дистиллированной воды и довести до рН 8,1 с помощью NaOH.

Стерилизовать фильтрованием, используя мембранные фильтры с диаметром пор по 0,22 мкм и хранить при комнатной температуре. [3]

. Раствор для слияния клеток. Агентом, ускоряющим слияние клеток, является полиэтиленгликоль (ПЭГ). Способность ПЭГ индуцировать слияние возрастает при увеличении концентрации, однако при тех концентрациях, которые наиболее эффективны в отношении слияния, проявляются токсические свойства ПЭГ.

Важное значение имеет рН раствора ПЭГ. Максимальное число клонов получается при рН 8,0 - 8,5. Эффективность слияния можно повысить, добавив в раствор ПЭГ 5 - 15% диметилсульфоксида. Для оптимизации процесса слияния из среды удаляют сыворотку, так как она препятствует адгезии клеток.

Токсичность ПЭГ можно проверить в предварительных экспериментах. Для этого обрабатывают раствором ПЭГ миеломные клетки при таких условиях, в которых будет проводиться слияние, затем засевают обработанные клетки в культуру при низкой плотности и сравнивают их рост с ростом необработанных клеток.

Для приготовления раствора ПЭГ берут 2 г ПЭГ 4000, помещают в пробирку и расплавляют в водяной бане при 70°С. К расплавленному ПЭГ добавляют 0,4 мл диметилсульфоксида и 2 мл среды RPMI 1640. Пробирку оставляют открытой на воздухе до тех пор, пока рН раствора не станет щелочным (8,0 - 8,5). После этого теплый раствор стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры и держат до опыта в термостате при 37°С. [1]

. Среда для культивирования миеломных клеток. Полная среда с 10% СПК готовится из следующих компонентов:

среда RPMI 1640 или среда Игла в модификации Дульбекко, однократной концентрации - 450 мл;

мл 100 мМ раствора пирувата натрия;

мл 100-кратного раствора антибиотиков;

мл 200 мМ раствора L-глютамина;

,25 мл 0,1 М раствора 2-меркаптоэтанола;

мл 1 М буфера HEPES;

мл СПК.

Эту среду используют для культивирования миеломных клеток и при массовом размножении гибридомных клеток. При начальном культивировании гибридомных клеток и их клонировании концентрацию СПК увеличивают до 15 - 20%. При использовании среды Дульбекко в нее добавляют еще глюкозу до конечной концентрации 4,5 г/л.

Среды ГАТ или ГТ приготавливают путем добавления 5 мл соответствующего 100-кратного раствора к 500 мл полной среды. [4]

3. Получение моноклональных антител

Основные этапы получения моноклональных антител приведены на рисунке 1.



Рис.1. Основные этапы получения миноклональных антител:

- иммунизация животного; 2 - приготовление суспензии клеток селезенки; 3 - слияние; 4 - клонирование гибридом из положительных лунок; 5 - размножение клеток из положительных лунок

3.1 Приготовление суспензии миеломных клеток

Для гибридизации выбирают клетки культивируемой мышиной миеломной линии SP2/O - Ag14 или X63-Ag8.6.5.3., резистентные к 8-азогуанину.

Суспензию миеломных клеток готовят следующим образом:

) 50 мл среды с культивируемыми миеломными клетками, находящимися в логарифмической стадии роста, центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин, надосадок сливают в отдельную пробирку.

) Клетки суспендируют в 50 мл холодной ростовой среды без сыворотки, отмывают центрифугированием при тех же условиях и суспендируют в 20 мл холодной бесывороточной среды.

) Клетки подсчитывают в камере Горяева. Их количество должно быть не менее 107.[4]

.2 Иммунизация животного

Назначение иммунизации состоит в том, чтобы увеличить долю клеток, продуцирующих антитела заданной специфичности, и перевести эти клетки в функциональное состояние, при котором они способны сливаться и образовывать антителообразующие гибридные клетки.

Выбор экспериментального животного определяется наличием родительских миеломных линий, возможностью получения гибридов клеток этих линий и иммунных лимфоцитов. Обычно для иммунизации используют мышей и крыс. Это связано с тем, что подходящие миеломные клетки мышей и крыс широко распространены и, кроме этого, не представляет сложностей выращивания полученных гибридом в организме этих животных. Обычно для иммунизации используют самок мышей - самок инбредной линии BAL B/c в возрасте 8 - 12 ндель.

Конкретная схема иммунизации зависит от природы антигена и его иммуногенности. Антигены клеточной поверхности являются сильными иммуногенами, тогда как большинство растворимых белков - слабые иммуногены. Необходимо применять различные адъюванты - вещества, усиливающие иммунный ответ. Среди адъювантов наибольшее распространение получил полный адъювант Фрейнда (ПАФ). ПАФ содержит убитые туберкулезные микобактерии, суспензированные в масляной фазе водной эмульсии.

Используют следующую схему иммунизации:

) Животному вводят внутрибрюшинно растворимые белковые антигены (50 - 100 мкг), смешанные с равным объемом ПАФ.

) Через 2 - 3 недели проводят повторную иммунизацию без адъюванта.

) Через 2 - 4 недели после последней иммунизации берут пробы из хвостовой вены мыши. Выбирают животных, имеющих наибольший титр антител (титр антител - величина, обратная разведению сыворотки, при которой степень иммунологической реакции снижается в два раза по сравнению с максимальной).

) Проводят гипериммунизацию внутривенно в хвостовую вену (100 мкг) без адъюванта, либо внутрибрюшинно в течение трех дней по 30 мкг.

) Через три дня после внутривенной гипериммунизации мышь забивают цервикальной дисклокацией и берут селезенку. При гипериммунизации, проведенной внутрибрюшинно, мышь забивают на следующий день. [1]

.3 Приготовление суспензии клеток селезенки

Суспензию клеток селезенки готовят следующим образом:

) Животное погружают в 70%-ный этиловый спирт, извлекают. В стерильных условиях извлекают селезенку и помещают ее в чашку Петри, содержащую 5 мл среды RPMI 1640 с 2,5% СПК и слегка промывают ее. Ножницами делают несколько надрезов.

) Переносят селезенку в стеклянный гомогенизатор со слабо притертым пестиком. Очень осторожно пестиком растирают селезенку, оставляют на 5 мин для осаждения крупных частиц и переливают в центрифужную пробирку на 50 мл.

) Доводят объем пробирки до 30 мл добавлением холодной бессывороточной среды и отмывают клетки центрифугированием в течение 8 мин при 800 об/мин.

) Для удаления из суспензии клеток эритроцитов осадок суспендируют в 15 мл 0,83%-ного раствора NH4Cl на льду, через 5 мин инкубации осторожно подслаивают 10 мл любой сыворотки и центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин. Надосадок с лизированными в NH4Cl эритроцитами отбрасывают.

) Осадок чистых спленоцитов суспендируют в 20 мл холодной бессывороточной среды.

) Подсчитывают жизнеспособные клетки в камере Горяева в смеси 20 мкл клеточной суспензии с 1 мл 0,1%-ного раствора трипанового синего. Жизнеспособные клетки должны составлять не менее 80%. [1]

.4 Слияние клеток

) Смешивают суспензии клеток миеломы и селезенки в соотношении 1:10 и центрифугируют в течение 8 мин при 800 об/мин., супернатант удаляют, пробирку помещают в водяную баню на 37°С и держат там в течение всего времени обработки.

) Через 1 мин добавляют в течение 1 мин 1 мл теплого (37°С) раствора ПЭГ. Во время добавления перемешивают осадок кончиком пипетки. Продолжают перемешивание осадка в течение еще 1 мин.

) Той же пипеткой добавляют 1 мл теплой среды без СПК в течение 1 мин, постоянно перемешивая суспензию клеток кончиком пипетки.

) Повторяют этап 3.

) Добавляют при постоянном размешивании суспензии клеток еще 7 мл среды без СПК в течение 2 - 3 мин.

) Суспензию центрифугируют 8 мин при 800 об/мин. Осадок ресуспендируют в 10 мл теплой среды с СПК, переносят суспензию во флакон, содержащий 70 мл теплой среды с СПК.

) Засеивают по 0,2 мл этой суспензии в лунки четырех 96-луночных планшетов для культивирования клеток, планшеты помещают во влажный СО2-инкубатор с 5% СО2.

) Через 24 ч с помощью пастеровской пипетки, подсоединенной к вакууму, удаляют приблизительно 0,1 мл из каждой лунки и добавляют в каждую лунку по 0,1 мл ГАТ.

) Через 10 - 14 дней проверяют микропланшеты на появление клонов гибридом и заменяют среду ГАТ на среду ГТ, которую заменяют на свежую каждые 3 дня, пока выросшие клетки не займут 1/4 площади лунок.

) Переходят на ГС, которую также заменяют на свежую каждые 2 - 3 дня, удаляя 1 мл культуральной жидкости.

) После достижения клетками стадии слившегося монослоя проверяют активность антител в культуральной жидкости. Если культура продолжает продуцировать интересующие антитела, клетки клонируют, используя для этого небольшую часть культуры.

) Оставшуюся часть культуры размножают последовательным переносом клеток в культуральные сосуды большего размера. [1]

3.5 Клонирование гибридом

моноклональный антитело клонирование гибрид

Клонирование осуществляется для выделения стабильных клонов гибридомных клеток. Для недавно образовавшихся гибридомных клеток характерна высокая нестабильность, связанная с утратой хромосом.

К основным методам клонирования клеток относятся клонирование методом лимитирующих разведений, клонирование в полужидком агаре и клонирование с помощью прибора - проточного цитофлуориметра. Наиболее распространенным методом является клонирование методом лимитирующих разведений.

) Накануне готовят 96-ти луночные микропланшеты с питающими клетками из расчета одна гибридома на один микропланшет. Микропланшеты ставят во влажный СО2-инкубатор с 5% СО2 при 37°С.

) На следующий день готовят две суспензии гибридомных клеток в холодной среде из расчета 1 клетка в 100 мкл и 0,5 клетки в 100 мкл.

) Каждый 96-ти луночный планшет делят на две части и в каждые 48 лунок распределяют одну и другую клеточные суспензии одного клона гибридомы. Помещают планшеты в СО2-инкубатор.

) Через 10 - 14 дней проверяют рост колоний в микропланшетах и отбирают те, в которых колонии выросли в менее 30% лунок. Культуральные жидкости из этих лунок тестируют методом ИФА на присутствие специфических антител.

) Клетки из лунок, давших положительные результаты, последовательно наращивают в 96-, 24-луночных чашках. Часть наросших клеток замораживают для сохранения и дальнейшего использования. [1]

4. Очистка антител

Для многих целей не требуется очистка антител и они используются в виде культуральных жидкостей. Грубую иммуноглобулиновую фракцию можно получить высаливанием белков сульфатом аммония с последующим диализом.

Одним из методов, применяемых для очистки антител является метод очистки на белок А - сефарозе.

) К 20 мл культуральной жидкости при постоянном перемешивании добавляют по каплям 20 мл насыщенного раствора сульфата аммония, рН 6,5. Смесь оставляют на 1 ч при 4°С и затем центрифугируют.

) Супернатант отбрасывают, осадок растворяют в дистиллированной воде в 1/20 начального объема (1мл) и диализуют против текущей воды в течение 3 ч, затем - против двух смен фосфатного буфера, рН 8,0.

) 1,5 г белок А-сефарозы суспендируют в 0,1 М фосфатном буфере, рН 5,0, и заполняют пипетку на 10 мл, взятую в качестве колонки.

) Препарат отдиализованных антител наносят на колонку и промывают ее 25 мл уравновешивающего буфера. В случае, если антитела принадлежат к подклассу IgG1, их элюцию проводят цитратным буфером, рН 6,0. Антитела подклассов IgG2a и IgG3 элюируют цитратным буфером, рН 4,5.

) Полученные препараты антител диализуют против фосфатного буфера, рН 7,2, если нужно, концентрируют препарат антител до 2 - 5 мг/мл и хранят при 4°С с добавлением 0,01% NaN3.

Для очистки иммуноглобулинов класса М (IgM) применяют метод гель-фильтрации на сефадексе G-200. Для этого сухой сефадекс суспендируют в 200-кратном объеме воды и оставляют стоять на 48 ч при комнатной температуре для полного набухания. В колонку размером 2,5∙90 см вносят суспензию полностью набухшего геля. Сефадексу в колонке дают отстояться, затем с целью уравновешивания и достижения постоянной высоты столба геля колонку промывают 3 - 5 объемами буферного раствора. Для проверки равномерности заполнения через колонку можно пропустить раствор окрашенного белка, например, цитохрома с или голубого декстрана. При этом окрашенная зона должна быть компактной и двигаться по колонке параллельно ее основанию. Исследуемую белковую смесь растворяют в буферном растворе (Трис-HCl буфер - 0,1 М раствор, содержащий 0,5 М NaCl, рН 7,8) и вносят в колонку. [4]

5. Определение специфичности полученных гибридом

Для определения специфичности гибридом используют, как правило, непрямой метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антивидовых антител, конъюгированных с ферментной меткой.[5] Можно использовать конъюгаты кроличьих антимышиных антител с пероксидазой, который готовят следующим образом:

) 5 - 10 мг пероксидазы из хрена растворяют в 1 мл дистиллированной воды при легком перемешивании до конечной концентрации 5 мг/мл.

) К раствору фермента добавляют 0,2 М водный раствор NaJO4 до конечной концентрации 0,016 М. При этом раствор пероксидазы меняет цвет от золотисто-коричневого до зеленого. Инкубируют в темноте при легком перемешивании в течение 20 мин.

) Процесс окисления останавливают добавлением этиленгликоля до конечной концентрации 0,16 М. смесь инкубируют в течение 1 ч и диализуют против 1000-кратного объема ацетатного буфера при 4°С в течение 18-24 ч.

) Раствор антител прогревают при 56°С в течение 30 мин. Доводят рН раствора антител и модифицированной пероксидазы до 9,5 бикарбонатным буфером.

) Растворы немедленно объединяют, внося раствор иммуноглобулинов по капля, и инкубируют смесь при комнатной температуре в темноте в течение 2 ч при непрерывном легком перемешивании.

) Добавляют NaBH4 из расчета 1мг NaBH4 на 1 мг пероксидазы и инкубируют еще 2 ч при той же температуре. Диализуют против 1000-кратного объема 0,01 М фосфатного буфера.

ИФА проводят следующим образом.

) В лунки микропланшетов вносят раствор антигена в концентрации 1 мг/л и инкубируют в течение 1 ч при 37°С. Затем микропланшеты интенсивно отмывают фосфатным буфером, содержащим 0,05% твина-20.

) Блокирование неспецифических мест связывания проводят 1%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) по 100 мкл в лунку и инкубируют в течение 1 ч при 37°С.

) БСА интенсивно отмывают фосфатным буфером с твином-20 и в лунки вносят по 50 мкл культуральной жидкости. Микропланшеты инкубируют, тщательно отмывают и вносят по 50 мкл конъюгата кроличьих антител.

) После инкубации несвязавшиеся кроличьи антитела отмывают и вносят субстрат АБТС (2,2΄-азиноди-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)-2NH4). Реакцию останавливают через 30 мин добавлением 1 к 1н серной кислоты.

) Определяют величину оптического поглощения на спектрофотометре при 452 нм. В качестве положительного контроля берут сыворотку мышей, которые были иммунизированы данным антигеном и селезенки которых использовали для слияния. В качестве отрицательного контроля берут культуральную среду из лунок, не давших рост клонов.[4]

6. Применение моноклональных антител

Наиболее широко используются моноклональные антитела в медицинской диагностике. Если к антителами присоединить радиоактивные или магнитоактивные материалы и ввести их в живой организм, то можно выявить в нем патологические зоны. Такие моноклональные антитела присоединяются к пораженным болезнью клеткам организма, а соответствующие индикаторные материалы позволяют выяснить их местонахождение.[6]

Моноклональные антитела используются и в процессах очистки веществ. Современные технологии основаны на присоединении антител к твердой матрице носителя. К ним добавляют смесь молекул, содержащую искомый антиген. Затем комплексы антиген - антитело отмываются от примесей, не связанных с матрицей. После разрушения ковалентных связей антиген - антитело в растворе остаются свободные антигены.[7]

Если получить антитела определенного типа и иммунизировать ими животное, то образуются анти-антитела. Они могут быть использованы для стимуляции иммунной системы. На этом принципе основано получение вакцин нового типа. Наборы моноклональных антител могут быть также предназначены для борьбы с аллергенами.

Благодаря высокий специфичности моноклональные антитела широко используются в качестве зондов для точного определения природы молекул поверхности клеток и клеточных органелл. С их помощью также можно проводить детекцию активности ферментов.[6]

Методы иммуноферментного анализа применяют в диагностике вирусных заболеваний растений. Это позволяет сократить время получения безвирусного посадочного материала, отбирать новые вирусоустойчивые сорта. При генно-инженерных экспериментах можно быстро отбирать клоны - продуценты.[8]

Новые возможности применения моноклональных антител в терапии инфекционных и опухолевых заболеваний дает их конъюгация с токсическим веществом. Благодаря избирательному свойству антител связываться только с определенной клеткой, последняя может быть уничтожена посредством токсина или излучения. [2]

Заключение

Моноклональные антитела являются перспективным методом в иммунологии, позволяющим вести диагностику и лечение инфекционных и опухолевых заболеваний. Кроме того, моноклональные антитела находят широкое применение в биохимии, где используются для точного определения природы молекул поверхности клеток и клеточных органелл.

Моноклональные антитела получают путем слияния клеток мышиной миеломы с В-лимфоцитами, вырабатывающимися клетками селезенки иммунизированной мыши. Получение моноклональных антител таким методом включает в себя следующие этапы: иммунизацию животного путем введения необходимого антигена; приготовление суспензии клеток селезенки; слияние клеток миеломы с клетками селезенки с образованием гибридом; клонирование гибридом. Очистку антител проводят с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-200, либо на белок А-сефарозу.

Для выявления специфичности полученных гибридом используют метод иммуноферментного анализа.

Полученные таким образом моноклональные антитела, поскольку являются мышиными и синтезируют мышиный иммуноглобулин, нередко вызывают иммунную реакцию отторжения у человека. В связи с этим на сегодняшний день актуальна проблема «очеловечивания» мышиных антител, что способствует большей эффективности применения моноклональных антител в медицине.[8]

Список использованных источников

1. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под ред. Н.С. Егорова, В,Д, Самуилова. Кн. 3: Клеточная инженерия/Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин и др. - М.: Высш. шк., 1987. - 127 с.

. Виестур У.Э., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура. - Рига: Зинатне, 1987. - 263 с.

. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. Пер. с англ. - М.: Мир, 1983. - 262 с.

. Практикум по биохимии: Учеб. пособие/Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 509 с.

. Методы исследований в иммунологии. Пер. с англ./Под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. - М.: Мир, 1981. - 486 с.

. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. - СПБ: Издательская фирма «Наука», 1995. - 600 с.

. Биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ./Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. - М.: Мир, 1988. - 480 с.

. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000. - 593 с.