

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ДИФТЕРИЙНОМУ ТОКСИНУ

© 2009 г. Т. И. Валякина[#], О. Е. Лахтина*, Р. Л. Комалева*, М. А. Симонова*, Л. В. Самохвалова*, Н. С. Шошина*, Н. А. Калинина*, А. Ю. Рубина**, М. А. Филиппова**, Ю. В. Вергиев***, Е. В. Гришин*

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

***Государственное учреждение научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. поч. акад. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Поступила в редакцию 10.04.2009 г. Принята к печати 30.04.2009 г.

Получены моноклональные антитела к дифтерийному токсину, перекрестно не взаимодействующие с термолабильным токсином (LT) *Escherichia coli*, с рицином, холерным токсином, токсинами стафилококков SeA, SeB, SeE, SeI, SeG, с летальным фактором сибиреязвенного токсина и протективным антигеном сибиреязвенного токсина. Подобраны пары антител для количественного определения дифтерийного токсина в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа (ИФА). Предел обнаружения токсина достигает 0.7 нг/мл в планшетном формате ИФА и 1.6 нг/мл в формате микрочипа. Присутствие в пробах с дифтерийным токсином секретов из смывов носоглотки не снижало чувствительность определения токсина методом сэндвич-ИФА. В процессе иммунизации мышей дифтерийным токсином и конъюгатом дифтерийного токсина с полистирольными микросферами было показано, что иммунизация животных конъюгатом приводит к формированию клонов гибридом, продуцирующих антитела исключительно к эпитопам А-фрагмента дифтерийного токсина, тогда как иммунизация нативным токсином приводит к образованию клонов гибридом, продуцирующих антитела преимущественно к эпитопам В-фрагмента.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; сэндвич-анализ; биологический микрочип; А- и В-фрагменты дифтерийного токсина; дифтерийный токсин; моноклональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Глоточная или кожная дифтерия, вызываемая токсикогенными штаммами бактерий *Corynebacterium diphtheriae* и *C. ulcerans*, представляет серьезную проблему для здоровья людей во многих регионах мира [1–3]. Главным патологическим фактором дифтерии является токсин, продуцируемый в клетках коринебактерий и отвечающий за летальность заболевания. Дифтерийный токсин (DT) представляет собой высокотоксичный внеклеточный белок молекулярной массой 58 кДа, состоящий из двух структурно различаемых областей: ферментативно активного фрагмента А (24 кДа), ответственного за подавление клеточного белкового синтеза путем ADP-рибозилирования эукариотического

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; MIX1 – PBS с 1% поливинилового спирта, 1% поливинилпирролидона и 10 мг/мл BSA; MIX2 – MIX1 с 0.1% Твин-20; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBSP – PBS с 1% поливинилового спирта; PBST – PBS с 0.1% Твин-20; МА – моноклональные антитела.

[#]Автор для связи (тел.: (495) 335-3533; эл. почта: valyakina@ibch.ru).

фактора элонгации 2 (eEF2), и рецепторсвязывающего фрагмента В (37 кДа) [4–6]. Воздействие дифтерийного токсина на чувствительных к нему животных и людей летально в дозе 100 нг/кг массы тела и менее [5]. Поэтому методы детекции должны быть направлены на быстрое и точное выявление экзотоксина в биологических образцах с целью подтверждения клинического диагноза дифтерии и воспрепятствования распространению болезни.

В настоящее время для идентификации ДТ в клинических образцах наиболее распространены микробиологический метод Элека [7], иммунопреципитация [8, 9], коагуляция [10], латекс-агглютинация [11], а также иммуноаналитические методы [12–15]. В нашей стране, в основном, используют микробиологические методы [8], с помощью которых можно получить качественные данные о наличии возбудителя в образце лишь на 5 сутки после отбора пробы [8, 16]. К настоящему времени наиболее чувствительным из предложенных иммунохимических методов определения ДТ является сэндвич-вариант ИФА, разработанный Энглер и соавт. [17]. Авторы предлагают использовать поликлональные лошадиные антитела к ДТ в качестве связывающих и меченные щелочной фосфатазой моноклональные антитела в качестве проявляющих. Данный метод позволяет определять ДТ в минимальной концентрации 0.1 нг/мл.

Следует отметить, что в нашей стране также был разработан сэндвич-вариант ИФА и диагностическая система «Дифтерия-Монозим» на его основе, которая была разрешена к применению в практике здравоохранения [18]. Чувствительность определения ДТ с помощью данной системы составила 2–4 нг/мл [19]. Как и в работе [17], в качестве источника связывающих антител авторами было предложено использовать поликлональные противодифтерийные сыворотки, а в качестве проявляющих – моноклональные антитела.

Энглер и соавт. разработали также иммунохроматографический метод определения ДТ [20]. Как и в сэндвич-варианте ИФА, использовали смешанную поликлонально-моноклональную систему. Порог чувствительности разработанного авторами иммунохроматографического метода составил 0.5 нг/мл, что сравнимо с описанным выше методом сэндвич-ИФА в формате планшета. Следует отметить, однако, что для выявления токсина методом иммунохроматографии в клинических образцах (мазках) пробы необходимо было подвергнуть предварительной культивации в течение 3 ч при 37⁰С в аэробных условиях.

Для выявления различных биомолекул, в том числе и токсинов, в настоящее время разрабатываются мультиплексные системы. Их применение позволяет значительно увеличить эффективность метода, поскольку дает возможность проводить анализ больших

серий образцов и одновременно определять в образце широкий набор токсинов [21, 22]. Одним из примеров таких систем являются трехмерные гелевые микрочипы с иммобилизованными «связывающими» антителами, которые способны в экспресс-режиме анализировать одновременно множество образцов биомолекул [23].

Целями данного исследования являлись получение моноклональных антител против DT, а также их дальнейшее использование для создания и оптимизации тест-систем для проведения иммуноаналитических исследований как в формате планшета, так и в формате микрочипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали DT, который получали из культурального фильтрата штамма PW8 *C. diphtheriae*, предоставленного Институтом вакцин и сывороток им. И.Н. Мечникова (Москва). Выделение токсина проводили по методу Джилла и Диниуса [24]. Процесс получения очищенного препарата DT включал в себя осаждение белков 60% сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-50 и хроматографию на DEAE-целлюлозе. Электрофореграмма DT после выделения (рис. 1, дорожка 3) свидетельствует о чистоте препарата. Результаты, полученные при проведении электрофореза DT в восстанавливающих условиях (рис. 1, дорожка 2), согласуются с имеющимися в литературе данными [24, 25] о частичном гидролизе DT в процессе выделения трипсиноподобной бактериальной протеиназой по сайту RVRRS. В результате появляются два фрагмента – А (24 кДа) и В (37 кДа), – соединенные между собой S-S-связью, которая разрушается в восстанавливающих условиях.

Рис. 1.

Гибридомы, продуцирующие МА к DT, получали согласно ранее описанному нами методу [26], однако в настоящей работе для индукции локального иммунного ответа в подколенных лимфоузлах мышей трижды иммунизировали очищенным препаратом DT или конъюгатом этого препарата с полистирольными микросферами (DT-сPM). Согласно данным ИФА, титр специфических антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных DT, составил 1 : 50 000, а иммунизированных DT-сPM – 1 : 25 000.

В результате гибридизации лимфоцитов из подколенных узлов иммунных мышей с клетками миеломы SP2/0 было отобрано: 13 стабильных клонов при иммунизации DT и 9 – при иммунизации DT-сPM. Все клоны-продуценты подвергались двукратному клонированию. Препаративные количества антител выделяли из асцитной жидкости мышей, которым вводили клетки клонов-продуцентов. Очистку антител проводили методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе. Согласно данным

электрофореза, чистота полученных препаратов антител была более 95% (данные не приводятся).

Для оценки специфичности связывания полученных МА к DT и к DT-сPM с фрагментами А или В токсина после SDS-электрофореза в восстанавливающих условиях проводили вестерн-блот-анализ. Соответствующие результаты представлены на рис. 2 и в табл. 1. Согласно этим данным, в результате иммунизации мышей DT-сPM полученные гибридомы продуцировали МА, связывающиеся исключительно с А-фрагментом DT, в то время как иммунизация мышей DT приводила к тому, что полученные гибридомы продуцировали антитела преимущественно к В-фрагменту. Можно предположить, что конъюгация DT с полистирольными микросферами приводит к экранированию антигенных детерминант, локализованных на В-фрагменте молекулы DT и одновременному экспонированию эпитопов на А-фрагменте, которые в интактной молекуле DT, как правило, закрыты [27].

Рис. 2.

Таблица 1

Полученные антитела использовали для создания тест-системы количественного определения DT в формате твердофазного сандвич-ИФА. С этой целью из числа полученных МА подбирали пары связывающих и детектирующих антител, которые позволяли обнаруживать DT в концентрации, не превышающей 4 нг/мл. Очищенные препараты всех полученных антител были биотинилированы и использованы в дальнейшем в качестве детектирующих антител (маркировка biot). В табл. 2 представлены результаты экспериментов, которые свидетельствуют о том, что подобранные нами пары МА позволяют детектировать DT в формате твердофазного сандвич-ИФА в концентрациях от 0.7 до 4 нг/мл. Пары антител для детекции DT образовывались между МА, полученными в результате иммунизации мышей как DT, так и DT-сPM (см. табл. 1 и 2). В пары также входили МА, узнающие один и тот же фрагмент DT, как, например, E6B9–F3H10biot (оба узнающие фрагмент В) или D2B10–E4C4biot (оба узнающие фрагмент А), так и антитела, узнающие разные фрагменты, например, E6B9–D6C10biot (А–В) (см. табл. 2 и 3).

Следует обратить внимание на тот факт, что работа по подбору пар МА осложнялась наличием неспецифического взаимодействия целого ряда антител друг с другом, следствием чего являлись высокие значения оптического поглощения в контрольных пробах (без токсина). Ранее подобное явление было описано Свиридовым и соавт. [19]. Использование разобщающих агентов, таких, как BSA, желатина, сухое молоко, 5% сахара, Твин-20, в концентрации более 0.1%, не приводило к устранению

данного эффекта. Для некоторых пар антител применение таких разобщающих агентов, как поливиниловый спирт и поливинилпирролидон, в значительной степени приводило к снижению неспецифического взаимодействия, однако устранить данный эффект полностью не удалось. Поэтому антитела, обладающие указанным выше свойством (около 50% всех полученных МА), изымались из эксперимента.

Таблица 2

Антитела, которые составляли пары для детекции ДТ с требуемой чувствительностью (см. табл. 2), были охарактеризованы. Для этого проводили определение констант аффинности и изотипирование антител в соответствии с рекомендацией к коммерческому набору для изотипирования мышинных иммуноглобулинов (см. табл. 3). Все охарактеризованные МА были исключительно класса IgG подклассов IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Величины констант аффинности для охарактеризованных антител варьировали от $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ до $1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Таблица 3

Для исключения возможности связывания полученных МА к ДТ с другими бактериальными (холерным, летальным фактором и протективным антигеном сибиреязвенного токсина, термолабильным энтеротоксином *E. coli* (LT) и стафилококковыми энтеротоксинами А, В, Е, I и G (SeA, SeB, SeE, SeI, SeG)) и растительным (рицин) токсинами, обладающими сильным токсическим действием на человеческий организм, мы использовали иммунохимический метод их обнаружения в трехмерных микрочипах на основе гидрогелей. Данные микрочипы разработаны для количественного обнаружения всех выше перечисленных токсинов. ДТ был введен нами в композицию биочипа, во-первых, для определения моноспецифичности полученных к ДТ МА, во-вторых, для определения минимальной концентрации ДТ, детектируемой с участием МА в сэндвич-варианте ИФА в формате биочипа.

В данной работе использованы трехмерные гидрогелевые биочипы, изготовленные по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. В основе технологии гидрогелевых биочипов лежит метод фотоиндуцируемой сополимеризации. На первом этапе исследования проводили отбор пар антител по уровням максимального и фонового сигналов. Для этого на микрочипы наносили смеси растворов токсина с концентрацией 0 или 100 нг/мл и одного из биотинилированных антител (концентрации см. табл. 4), с последующей обработкой стрептавидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Cy5. После завершения анализа рассчитывали дискриминацию между значимым и нулевым

флуоресцентными сигналами для каждой пары антител. Для дальнейшей работы были выбраны проявляющие антитела, дающие максимальную дискриминацию – F3H10biot.

Таблица 4

Для количественного определения концентрации DT методом иммунофлуоресцентного анализа на микрочипе было необходимо получить график зависимости флуоресцентного сигнала гелевых элементов, содержащих иммобилизованные антитела, от концентрации DT в калибровочной пробе (калибровочную кривую). С этой целью были изготовлены калибровочные пробы с концентрацией DT: 0, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100 нг/мл. Анализ проводили на биочипах, содержащих семь иммобилизованных антител против DT. В качестве проявляющих антител использовали ранее отобранные по дискриминации F3H10biot (рис. 3). При построении калибровочных кривых использовали кусочно-линейную интерполяцию. Каждая точка калибровочной кривой представляла собой среднее значение из измерений на трех микрочипах. Вертикальными отрезками (рис. 3б) показаны величины стандартных отклонений. Коэффициент вариации для различных концентраций DT не превышал 15%. Исходя из полученных данных, для дальнейшей работы были выбраны три пары антител: E6B9–F3H10biot, G10B6–F3H10biot, C2G5–F3H10biot, для которых была проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности анализа.

Рис. 3.

Одной из основных характеристик количественного иммуноанализа является его чувствительность – наименьшая достоверно определяемая концентрация антигена. Для оценки аналитической чувствительности определения DT была проведена серия экспериментов на микрочипах: для выбранных пар антител получали калибровочные кривые в трех повторах и проводили шестикратное измерение нулевой калибровочной пробы, не содержащей антиген. Чувствительность анализа рассчитывали как концентрацию, соответствующую значению флуоресценции, превышающему не менее чем на два стандартных отклонения флуоресцентный сигнал многократно измеренной нулевой калибровочной пробы, не содержащей анализируемого соединения.

Как видно из приведенных данных (табл. 5), пара C2G5–F3H10biot обеспечивала наибольшую чувствительность (см. рис. 3), но при этом она имела низкую дискриминацию между максимальным значением и фоновым сигналом (рис. 3а). В связи с этим, в качестве оптимальной пары была выбрана G10B6–F3H10biot, которая обеспечивала достаточную чувствительность и дискриминацию.

Таблица 5

Для оценки специфичности взаимодействия антител в сэндвич-иммуноанализе с флуоресцентной регистрацией сигнала использовали микрочипы с иммобилизованными антителами против одиннадцати токсинов: холерного и дифтерийного токсинов, летального фактора и протективного антигена сибиреязвенного токсина, рицина, термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LT) и стафилококковых энтеротоксинов SeA, SeB, SeE, SeI и SeG (рис. 4).

Рис. 4.

Оценку специфичности антител проводили в два этапа. Во-первых, на биочипе с иммобилизованными антителами против одиннадцати токсинов проводили сэндвич-анализ смеси данных одиннадцати токсинов с проявляющими антителами против DT – F3H10biot (см. рис. 5a). В эксперименте использовали одиннадцать антигенов в следующих концентрациях (нг/мл, где не указано особо): летальный фактор и протективный антиген сибиреязвенного токсина – 125 для каждого; рицин – 55; DT – 100; холерный токсин – 50 мг/мл; SeA – 75; SeE, SeB – 100; SeI – 300; SeG, LT – 200. Во-вторых, на микрочипе с иммобилизованными антителами против одиннадцати токсинов проводили сэндвич-анализ смеси десяти токсинов, взятых в тех же концентрациях, не содержащей DT, с проявляющими антителами против данных десяти токсинов (летального фактора и протективного антигена сибиреязвенного токсина, рицина, холерного токсина, SeA, SeB, SeI, SeE, SeG, LT) (рис. 5б).

В первом случае оценивали специфичность взаимодействия проявляющих антител F3H10biot против DT по отношению к остальным десяти биотоксинам. Во втором случае оценивали специфичность взаимодействия иммобилизованных на микрочипе антител G10B6. Как видно из приведенных данных (рис. 5a), проявляющие антитела против DT F3H10biot взаимодействовали специфично со «своим» антигеном: наблюдаются флуоресцентные сигналы только от ячеек микрочипа, соответствующих иммобилизованным антителам против DT. Из данных рис. 5б можно сделать вывод, что иммобилизованные антитела против DT G10B6 также взаимодействуют специфично, поскольку после проведения анализа наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек микрочипа с иммобилизованными антителами против десяти токсинов и не наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек с иммобилизованными антителами G10B6.

Таким образом, пара антител G10B6–F3H10biot для детекции DT удовлетворяет требованиям, предъявляемым к антителам при проведении одновременного многопараметрического количественного иммунофлуоресцентного анализа на биологическом микрочипе, и может быть использована при разработке тест-системы для анализа нескольких биотоксинов в образце.

Рис. 5.

Хорошо известно, что дифтерия передается воздушно-капельным путем при контакте с зараженными людьми. В связи с этим особое значение приобретает разработка методов эффективного обнаружения как микробиологического заражения, так и ДТ в секретах заболевших людей. Мы сравнивали чувствительность определения ДТ в стандартном растворе (PBST) и в растворах, содержащих смывы носоглотки здорового человека. В этих экспериментах использовали в качестве связывающих антител Е6В9 и G10В6, а в качестве детектирующих – С2G5biot и F3H10biot (рис. 6).

Рис. 6.

Аналитическая чувствительность определения ДТ в PBST и образцах, содержащих смывы носоглотки здорового человека, была сходной (кривые статистически не отличались, $p > 0.5$) и составляла 1.3 нг/мл. Таким образом, присутствие секретов носоглотки не влияло на чувствительность метода, что делает разработанную систему пригодной для обнаружения ДТ в биологическом материале, взятом от пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены МА против ДТ, использование которых в сандвич-ИФА позволяет специфично определять ДТ в концентрации от 0.7 нг/мл в планшетном формате и от 1.33 нг/мл в формате микрочипа, что сравнимо с чувствительностью тестов аналогичного формата, предложенных другими авторами [17, 19]. В настоящей работе показано, что предлагаемый сандвич-ИФА в формате планшета позволяет определять ДТ в биологических образцах без снижения чувствительности. Показано также, что иммунизация мышей конъюгатом ДТ с полистирольными микросферами (ДТ-сPM) приводила к генерации МА, связывающихся исключительно с А-фрагментом данного токсина, в то время как иммунизация интактным ДТ приводила к тому, что полученные МА преимущественно узнавали В-фрагмент ДТ. Таким образом, использование для иммунизации ДТ-сPM позволяет решать специальные задачи по получению МА к А-фрагменту ДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), фетальную телячью сыворотку (FCS), глутамин, раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (НАТ) – (Gibco-Invitrogen, США); глутаровый альдегид, неполный адъювант Фрейнда (НАФ), пристан, BSA, DMSO, 4-хлор-1-нафтол, 3,3-диаминобензидин, *орто*-фенилендиамин, *N*-оксисукцинимидный эфир биотина, Твин-20, метилизотиазолон гидрохлорид (MIT),

поливиниловый спирт (50 кДа); поливинилпирролидон (360 кДа) (Sigma, США); DEAE-целлюлозу, SDS (Koch-Light LTD, Германия); полиакриламид (Amresco, США); нитроцеллюлозную мембрану BA-85 – (Schleicher & Schuell, Германия); протеин-А-сефарозу, Cy5-меченный стрептавидин (GE-Healthcare, США); хроматографические колонки Micro Bio-Spin (Bio-Rad Laboratories, Франция); поликлональные козы антитела, меченные пероксидазой хрена, к мышинным иммуноглобулинам, меченный пероксидазой хрена стрептавидин и набор для изотипирования иммуноглобулинов (mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit) – (BD Biosciences Pharmingen, США); полистирольные микросферы – (Fluka, США); культуральный пластик и планшеты для ИФА (Costar, США). В качестве подложки для биочипов использовали стеклянные слайды Corning 2947 Micro Slides (Corning Glass Works, США). Остальные химические реактивы были получены из коммерческих источников и использованы без предварительной очистки. Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Очистка DT. Выделение токсина проводили по методу Джилла и Диниуса [24] из культурального фильтрата штамма PW8 *C. diphtheriae*, предоставленного Институтом вакцин и сывороток им. И.Н. Мечникова (Москва). К культуральному фильтрату (20 мл) добавляли сульфат аммония до 60% насыщения, осадок собирали центрифугированием при 10000 *g* в течение 15 мин и растворяли в 0.15 М NaCl. Растворенный материал (2 мл) наслаивали на колонку размером 1 x 10 см, заполненную сефадексом G-50 и уравновешенную 0.01 М PBS. Содержимое свободного объема собирали и наслаивали на колонку 1 x 5 см, заполненную DEAE-целлюлозой и уравновешенную 0.01 М PBS. Элюцию токсина проводили 0.01 М фосфатным буфером, содержащим 0.18 М NaCl. Фракции объемом 0.5 мл собирали и анализировали на присутствие DT методом SDS-ПААГ-электрофореза.

DT-сPM. DT конъюгировали с микрочастицами диаметром 0.5 мкм (Micro particle size standard based on polystyrene monodisperse size: 0.5 μm cat.#95585) согласно прилагаемой инструкции производителя с помощью 2.5% глутарового альдегида.

Получение гибридом. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно в подушечки задних лапок DT в дозе 15 мкг/мышь или DT-сPM в дозе DT 10 мкг/мышь, в присутствии НАФ дважды с интервалом 2 недели. Через 14 сут после последней иммунизации мышам вводили DT или DT-сPM в физрастворе в тех же дозах. Через 6 сут у мышей забирали подколенные лимфоузлы, из которых выделяли лимфоциты для гибридизации с клетками миеломы SP2/0 по методу Келлера и Мильштейна [28]. Нарращивание клеток миеломы для гибридизации и гибридизацию проводили в среде DMEM, содержащей 20% FCS и 50 мкМ 2-меркаптоэтанол. Слияние лимфоцитов

подколенных узлов мышцы с клетками миеломы проводили в соотношении 3 : 1 в присутствии полиэтиленгликоля-4000 в течение 1 мин совместной инкубации. После гибридизации клетки разносили по лункам 96-луночных планшетов, в которые за 24 ч до этого помещали мышинные макрофаги. Клетки культивировали в селективной среде DMEM с добавлением 0.1 мМ гипоксантина, 1.6×10^{-5} М тимидина и 4×10^{-7} М аминоптерина.

Через 8 сут после гибридизации из лунок, в которых наблюдался активный рост клеток, отбирали культуральную среду и тестировали ее методом непрямого твердофазного ИФА на наличие антител к ДТ. Из лунок, в культуральной среде которых регистрировали достоверно положительную реакцию с токсином, отбирали клетки и клонировали их трижды методом предельных разведений в среде роста. Для дальнейшей работы отбирали культуры, уровень активности которых превышал контроль в 15–20 раз.

Очистку МА из асцитной жидкости осуществляли методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе. Асцитную жидкость разбавляли в 4 раза стартовым буфером (1.5 М глицин и 3 М NaCl, pH 8.9) и наносили на колонку, заполненную аффинным носителем и уравновешенную тем же буфером. Элюцию МА проводили 0.1 М цитратным буфером, ступенчато понижая pH до 6.0, 5.0 и 4.0. После элюции полученные фракции, содержащие антитела, нейтрализовали 1 М Трис-HCl, pH 8.0, и диализовали против PBS.

Конъюгаты антител с биотином. Раствор *N*-гидроксисукцинимид-биотина в диметилформамиде (10 мкл, 5 мг/мл) добавляли к 70 мкл раствора антител (5 мг/мл в 0.01 М бикарбонатном буфере, pH 9.8), реакцию проводили 1 ч при перемешивании и температуре 20⁰С в темноте. Конъюгат антител–биотин очищали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на Micro Bio-Spin-колонке, заполненной сефадексом G-25 и уравновешенной PBS.

Непрямой твердофазный ИФА. ДТ сорбировали на поверхности лунок ИФА-планшета из раствора с концентрацией 1 мкг/мл в 0.1 М PBS в объеме 100 мкл в течение ночи при 4⁰С. По окончании инкубации планшет промывали PBST. Свободные центры связывания блокировали 2% обезжиренным молоком, инкубируя планшет в течение 1 ч при 37⁰С. Затем планшет снова промывали PBST, в лунки вносили антитела в концентрации 5–10 мкг/мл, делали двухкратные разведения и инкубировали 1 ч при 37⁰С. После промывания в лунки планшета вносили пероксидазный конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, инкубировали 1 ч при 37⁰С, отмывали PBST и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата пероксидазы – орто-фенилендиамин – в концентрации 1 мг/мл в 1% цитратном буфере, pH 4.5, содержащем

0.05% перекиси водорода. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 М серной кислоты и интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при 490 нм.

Сандвич-вариант ИФА в формате планшета. В лунки ИФА-планшета вносили растворы связывающих МА (10 мкг/мл) в PBS, в объеме 100 мкл на лунку, и сорбировали их в течение ночи при 4⁰С. Свободные центры связывания блокировали 2% раствором обезжиренного молока, инкубируя планшет в течение 1 ч при 37⁰С. Далее в лунки планшета вносили раствор ДТ в концентрации 1 мкг/мл (по 100 мкл на лунку), делали двухкратные разведения и инкубировали 1 ч при 37⁰С. Затем планшет промывали PBST, в каждую лунку добавляли детектирующие биотинилированные МА (5–10 мкг/мл) в объеме 100 мкл, и инкубировали 1 ч при 37⁰С. После отмывки добавляли раствор меченного пероксидазой хрена стрептавидина в рабочем разведении (по 100 мкл на лунку) и инкубировали 40 мин при 37⁰С. В качестве проявляющего субстрата использовали раствор *орто*-фенилендиамина (1 мг/мл), см. выше. После развития окраски реакцию останавливали 2 М серной кислотой и определяли оптическое поглощение при 490 нм. Для определения ДТ в смывах носоглотки антиген растворяли в образце смыва, взятом от здорового человека, разбавляли в 10 раз PBST и вносили в планшет с сорбированными связывающими антителами и заблокированными свободными сайтами. Далее проводили анализ как описано выше.

Изготовление микрочипов. Гидрогелевые биочипы изготавливали по технологии полимеризационной иммобилизации [29–31]. Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры на основе метакриламида и *N*-замещенных аминсахаров, а также подлежащие иммобилизации антитела наносили с помощью робота QArray («Genetix», Великобритания) в виде микрокапель объемом 0.1 нл на поверхность подложки. Расстояние между центрами гелевых элементов составляло 250 мкм. Каждую концентрацию каждого из иммобилизуемых антител наносили в 4-х повторях (по четыре одинаковых гелевых элемента). Полимеризацию гелевых ячеек проводили под УФ-светом с максимальной длиной волны 350 нм в течение 50 мин при 20⁰С в токе азота. Интенсивность УФ-излучения 0.06 мВт/см² (GTE lamp F15T8/350 BL, Sylvania, Danvers, MA). Качество полученных биочипов проверяли в проходящем свете с помощью биочип-анализатора, снабженного специальным программным обеспечением (ИМБ РАН). Для дальнейшей работы отбирали биочипы, для которых отклонения значений радиусов гелевых элементов не превышали 5% внутри каждого биочипа и 8% между всеми биочипами данной партии. Микрочипы перед проведением анализа отмывали в течение 40 мин PBST, затем ополаскивали дистиллированной водой. Для

уменьшения неспецифических взаимодействий микрочипы обрабатывали блокирующим буфером PBSP в течение 1 ч, затем промывали дистиллированной водой.

Сандвич-иммуноанализ ДТ с использованием авидин-биотинового комплекса на микрочипах. К 30 мкл раствора ДТ в MIX1 добавляли 30 мкл раствора конъюгата антител с биотином в MIX1 (20 мкг/мл). Смесь перемешивали и наносили на микрочип. Микрочипы инкубировали при 37⁰С в течение 17 ч. После инкубации с микрочипов удаляли реакционные камеры, ополаскивали дистиллированной водой и отмывали 20 мин PBST, вновь ополаскивали водой, высушивали в токе воздуха и наносили 50 мкл раствора флуоресцентно меченного Cy5 стрептавидина, 10 мкг/мл в MIX1. Микрочипы инкубировали в течение 10 мин при 37⁰С. После инкубации с микрочипов удаляли реакционные камеры, ополаскивали дистиллированной водой и отмывали 30 мин PBST, вновь ополаскивали водой и высушивали в токе воздуха, затем регистрировали флуоресцентные сигналы.

Измерения сигналов флуоресценции и построение калибровочных кривых. Измерения сигналов флуоресценции проводили с использованием флуоресцентного анализатора микрочипов, снабженного компьютером и программным обеспечением для обработки флуоресцентных изображений ImaGel Research [32]. Измерения с флуоресцентным красителем Cy5 проводили с использованием фильтров 650/670 нм (возбуждение/эмиссия), время экспозиции 1000 мс. Все измерения были выполнены при комнатной температуре. При анализе полученных данных интенсивность флуоресценции рассчитывали как медианный сигнал от четырех одинаковых гелевых ячеек.

Флуоресцентный сигнал J определялся согласно формуле $J = \frac{C - B_{d.c.}}{B_{r.g.} - B_{d.c.}}$, где C – медианный флуоресцентный сигнал, рассчитанный для ячейки. Для того чтобы учесть пространственную неоднородность интенсивности источника излучения, микрочип заменяли красным стеклом с такими же геометрическими размерами. Получали фоновый сигнал от участков, соответствующих гелевым ячейкам ($B_{r.g.}$). Для учета шумов микроскопа флуоресцентный и фоновый сигналы корректировали шумовым сигналом $B_{d.c.}$, измеренным при нулевой интенсивности облучения.

Константы аффинности антител при связывании с ДТ определяли по методу Битти непрямым твердофазным ИФА [33] и вычисляли по формуле $K_{aff} = 1/(4[Ab'] - 2[Ab])$, где $[Ab']$ – концентрация антител, соответствующая 50% связыванию от максимального при внесении в лунку планшета токсина в концентрации $[Ag]$, а $[Ab]$ – концентрация антител, соответствующая их 50% связыванию от максимального при внесении токсина в концентрации $2 \times [Ag]$ в лунку.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез образцов ДТ и МА в восстанавливающих условиях проводили в 12.5% ПААГ по методу Лэммли [34]. В качестве стандартов молекулярных масс использовали смесь белков (Amersham Pharmacia Biotech UK): фосфоорилаза В – 97.0, альбумин – 66.0, овальбумин – 45.0, карбоангидраза – 30.0, ингибитор трипсина – 20.1, α -лактальбумин – 14.4 кДа. Для разделения белков в невосстанавливающих условиях к образцам антител и ДТ добавляли 0.125 М Трис-НСl-буфер рН 6.8, содержащий 4% SDS и 20% глицерина. Разделение белков проводили в 10% ПААГ. По завершении процесса электрофореза гель окрашивали 0.125% раствором Кумаси R-250 или использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану BA-85, согласно методу [24]. Контрольные реплики окрашивали 0.5% раствором амидового черного в смеси уксусная кислота–метанол–вода, 1 : 5 : 4. Неспецифическое связывание на репликах блокировали обработкой их 1% раствором обезжиренного молока в PBS, после чего реплики обрабатывали анализируемыми МА к ДТ (5 мкг/мл) и мечеными пероксидазой хрена антителами к мышинным иммуноглобулинам (1 : 500). Для окрашивания использовали смесь хлорнафтола и диаминобензидина [35].

Работа выполнена при финансовой поддержке из средств ФЦП "Национальная технологическая база" на 2007–2011 гг. в рамках государственного контракта № ГП/07/538/НТБ/К от 11.09.2007 г., шифр "Биопатоген".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Efstratiou A., George R.C.* // Rev. Med. Microbiol. 1996. V. 7. P. 31–42.
2. *Sharma N.C., Banavaliker J.N., Ranjan R., Kumar R.* // Indian J. Med. Res. 2007. V. 126. P. 545–552.
3. *Galazka A.M., Robertson S.E., Oblapenko G.P.* // J. Epidemiol. 1995. V. 11. P. 95–105.
4. *Holmes R.K.* // J. Infect. Diseases. 2000. V. 181 (Suppl. 1). P. 56–67.
5. *Pappenheimer A.M.* // Annu. Rev. Biochem. 1977. V. 46. P. 69–94.
6. *Rolf J.M., Eidels L.* // Infect. Immun. 1993. V. 61. P. 993–1003.
7. *Engler K.H., Glushkevich T., Mazurova I.K., George R.C.* // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. P. 495–498.
8. *Супотницкий М.В.* Микроорганизмы, токсины и эпидемии. М.: Вузовская книга, 2000. С. 376.
9. Эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации и основные направления деятельности по ее стабилизации. Материалы к докладу Г.Г. Онищенко – Главного государственного санитарного врача Российской Федерации – на 8-м съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва 26–28 марта 2002 г. М.: Минздрав РФ, 2000.
10. *Jalgaonkar S.V., Saoji A.M.* // Indian J. Med. Res. 1993. V. 97. P. 35–36.
11. *Toma S., Sisvath L., Iwanaga M.* // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. P. 3147–3149.
12. *Hallas G., Harrison T.G., Samuel D., Colman G.* // J. Med. Microbiol. 1990. V. 32. P. 247–253.
13. *Hielsen P.B., Koch S., Fiss H., Heron I.* // J. Clin. Microbiol. 1987. V. 25. P. 1280–1284.
14. *Pietrzak J., Muehlestein S., Gasser M.* // Zbl. Bakt. 1990. V. 274. P. 61–69.
15. *Wreghitt T.G., Morgan-Capner P.* ELISA in the clinical microbiology laboratory. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. P. 312.
16. *Туц Н.У.* Энциклопедия клинических лабораторных тестов. М.: Лабинформ, 1997. С. 942.
17. *Engler K.H., Efstratiou A.* // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 1385–1389.
18. Государственный реестр лекарственных средств. Том I (по состоянию на 1 января 2006 г. Часть 2. Приложения 1–4).
19. *Свиридов В.В., Зайцев Е.М., Дельвиц А.А., Мазурова И.К., Семенов Б.Ф.* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1986. Т. 1. С. 30–35.
20. *Engler K.H., Efstratiou A., Norn. D., Kozlov R.S., Selga I., Glushkevich T.G., Tam M., Melnikov V.G., Mazurova I.K., Kim V.E., Tseneva G.Y., Titov L.P., George R.C.* // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40. P. 80–83.
21. *Hoshino A., Fujioka K., Manabe N., Yamaya Sh., Goto Y., Yasuhara M., Yamamoto K.* // Microbiol. Immunol. 2005. V. 49. P. 461–470.
22. *Rucker V.C., Havenstrite K.L., Herr A.E.* // Anal. Biochem. 2005. V. 339. P. 262–270.
23. *Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S.* // Anal. Biochem. 2005. V. 340. P. 317–329.
24. *Gill D.M., Dinius L.L.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 1485–1491.
25. *Вертуев Ю.В., Скворцов В.Т., Езенчук Ю.В.* // Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1424–1431.
26. *Petrova E.E., Komaleva R.L., Lakhtina O.E., Samokhvalova L.V., Kalinina N.A., Shoshina N.S., Rubina A.Yu., Filippova M.A., Vertiev Yu.V., Valyakina T.I., Grishin Ye.V.* // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2009. V. 35. P. (Петрова Е.Э., Комалева Р.Л., Лахтина О.Е., Самохвалова Л.В., Калинина Н.А., Шошина Н.С., Рубина А.Ю., Филиппова М.А.,

- Вертуев Ю.В., Валякина Т.И., Гришин Е.В.* // Биоорган. химия. 2009. Т. 35. С. 357–367).
27. *Tortorella D., Sesardic D., Dawes C.S., London E.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27439–27445.
28. *Kohler G., Milstein C.* // Nature. 1975. V. 256. P. 495–499.
29. *Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В.* Патент РФ № 2216547. // Б. И. 2003. Т. 32.
30. *Rubina A.Yu., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D.* // BioTechniques. 2003. V. 34. P. 1008–1022.
31. *Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D* // Anal. Biochem. 2004. V. 325. P. 92–106.
32. *Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A.* // J. Biomol. Screening. 2002. V. 7. P. 247–257.
33. *Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G.* // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
34. *Laemmly U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
35. *Vilija P., Krohn K., Tuohimaa P.* // J. Immunol. Methods. 1985. V. 76. P. 73–83.

Таблица 1. Локализация эпитопа в молекуле дифтерийного токсина, выявляемая моноклональными антителами, продуцируемыми различными клонами гибридом

Иммуноген: DT		Иммуноген: DT-cPM	
Клон	Узнаваемый фрагмент молекулы DT	Клон	Узнаваемый фрагмент молекулы DT
F3H10	B	D6D10	A
G10B6	B	D2B10	A
E6B9	B	A1H8	A
C2G5	B	C12E5	A
G2D9	A	E4C4	A
C9F12	B	G6C2	A
D12C2	A	H10B3	A
C3F10	B	G6H12	A
B4H4	B	F5H10	A
A12C7	B		
A12D10	B		
G10C12	B		
H9G11	B		

Таблица 2. Пары моноклональных антител, выявляющие в сандвич-ИФА дифтерийный токсин в концентрации ниже 4 нг/мл

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	Нижний предел детекции DT, нг/мл
E6B9	F3H10	1.3
	C2G5	1.3
	G2D9	4
	C12E5	3
	D6D10	0.7
	G6C2	2
G10B6	F3H10	1.3
C2G5	F3H10	1.3
	D12C2	4
D2B10	E4C4	4
E4C4	D2B10	4

Таблица 3. Характеристика моноклональных антител к дифтерийному токсину, составляющих пары для сандвич-ИФА и позволяющих определять токсин в концентрации ниже 4 нг/мл

Клон	Тип тяжелой цепи	$K_{aff} \times 10^{-9}, M^{-1}$	Локализация эпитопа в молекуле токсина
C2G5	IgG1	0.60±0.06	В
C12E5	IgG2b	1.8±0.2	А
D2B10	IgG2a	0.16±0.02	А
D6D10	IgG2a	1.6±0.2	А
D12C2	IgG1	0.013±0.001	А
E4C4	IgG2a	3.7±0.4	А
E6B9	IgG1	0.40±0.05	В
F3H10	IgG3	1.3±0.1	В
G10B6	IgG1	0.8±0.1	В
G2D9	IgG2a	14±1	А
G6C2	IgG2a	1.2±0.1	А

Таблица 4. Антитела, используемые для сандвич-ИФА дифтерийного токсина на микрочипах

Клон	Связывающие антитела [Ab], мг/мл	Детектирующие антитела [Ab], мг/мл
E6B9	0.3	
D2B10	0.33	12
G10B6	0.45	
C12E5	0.22	
D6C10	0.45	13.3
E4C4	0.3	14.6
G6C2		12.3
F3H10		12.3
D12C2		12.3
C2G5	0.36	11.1

Таблица 5. Значения аналитической чувствительности пар моноклональных антител для детекции дифтерийного токсина в сэндвич-ИФА на микрочипах

Пары антител	Аналитическая чувствительность, нг/мл
E6B9–F3H10biot	4
G10B6–F3H10biot	2
C2G5–F3H10biot	1.6

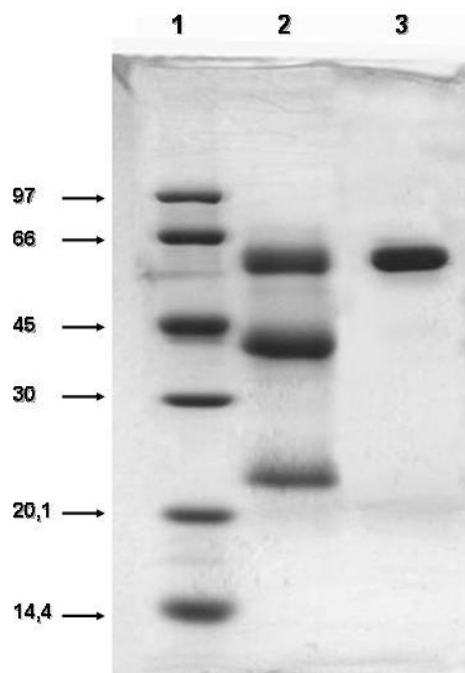


Рис. 1. Электрофореграмма препарата дифтерийного токсина, выделенного из культурального фильтрата штамма PW8 *C. diphtheriae* в 12% ПААГ-SDS в восстанавливающих (2) и невосстанавливающих (3) условиях. 1 – белки-маркеры (сверху вниз фосфоорилаза В→ α -лактальбумин).

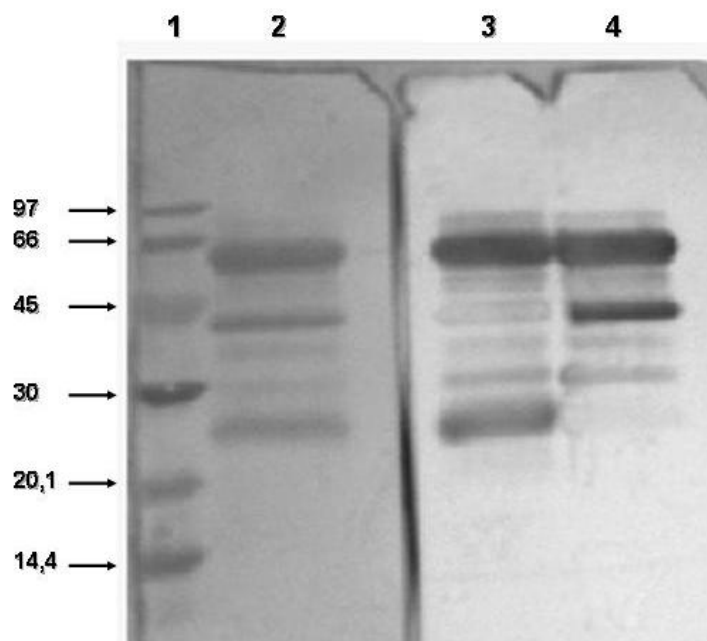


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ связывания моноклональных антител с фрагментами дифтерийного токсина. Обработка реплик антителами G6E12 (3), E6B9 (4), окрашивание амидовым черным (2). 1 – Стандартные белки как на рис. 1.

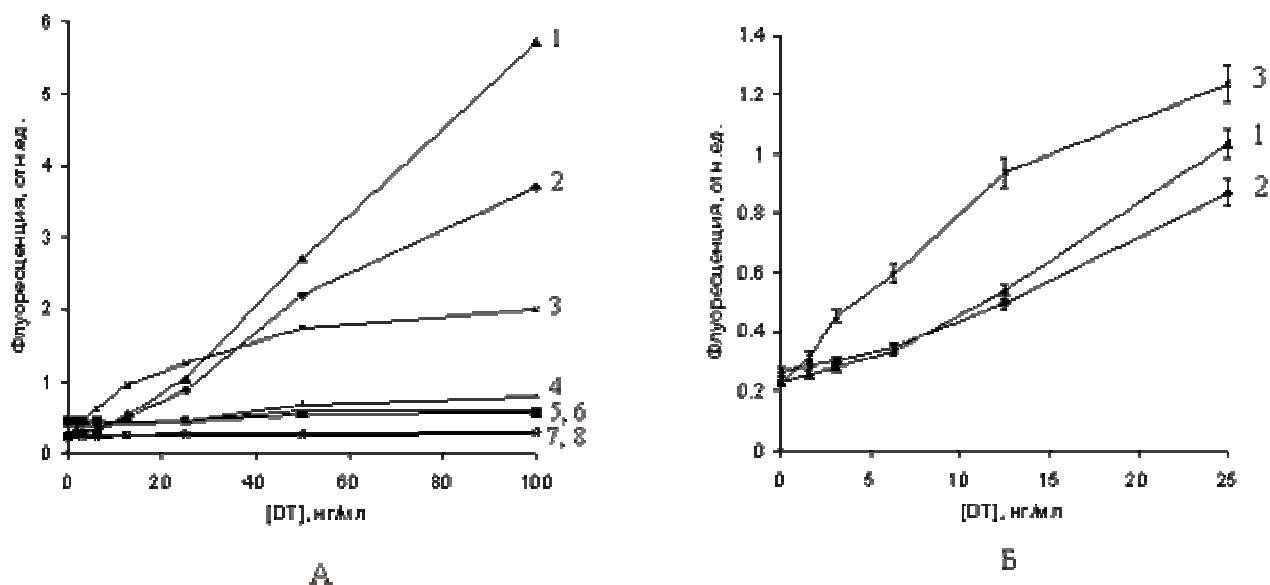


Рис. 3. Графики зависимости интенсивности флуоресцентного сигнала гелевых элементов, содержащих иммобилизованные антитела против дифтерийного токсина от концентрации антигена в калибровочной пробе: 1 – G10B6; 2 – E6B9; 3 – C2G5; 4 – D6D19; 5 – D2B10; 6 – E4C4; 7 – C12E5; 8 – пустой гель. В качестве проявляющих использованы антитела F3H10biot. (а) – диапазон 0–100 нг/мл для всех пар антител; (б) – выделен участок низких концентраций для трех пар.

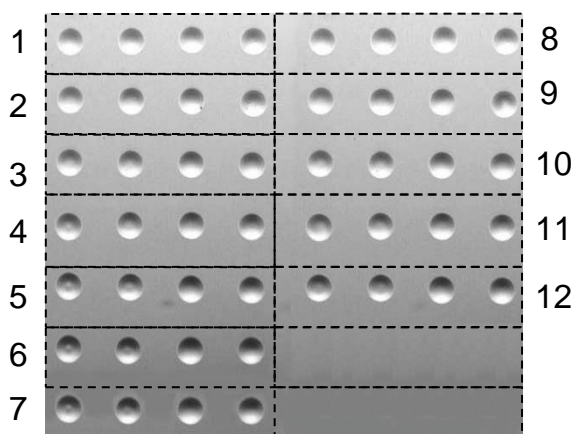


Рис. 4. Увеличенное фотоизображение микрочипа для оценки специфичности взаимодействия пары антител G10B6–F3H10biot для детекции дифтерийного токсина. В ячейках микрочипа иммобилизованы МА против: летального фактора сибиреязвенного токсина (1), протективного антигена сибиреязвенного токсина (2), рицина (3), дифтерийного токсина (4); холерного токсина (5), LT (6), SeA (7), SeB (8), SeE (9), SeI (10), SeG (11), пустой гель (12).

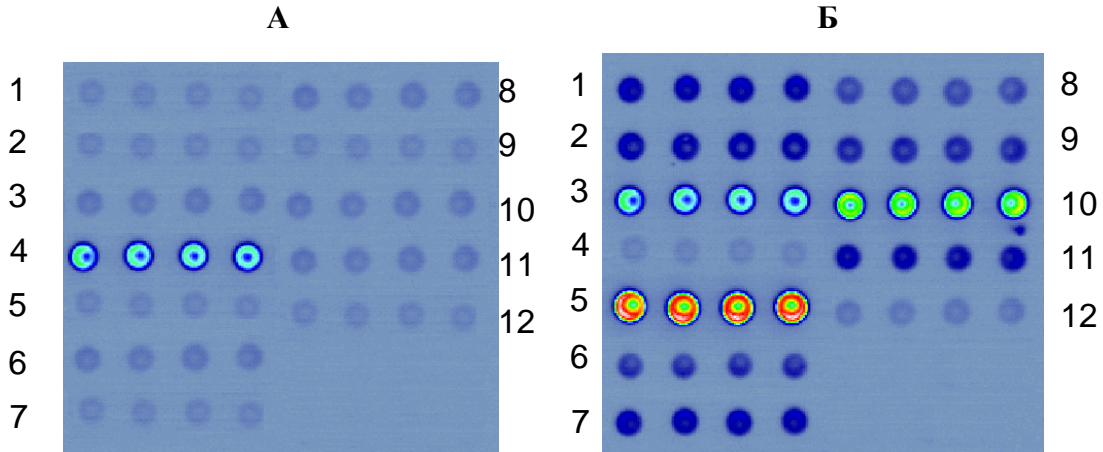
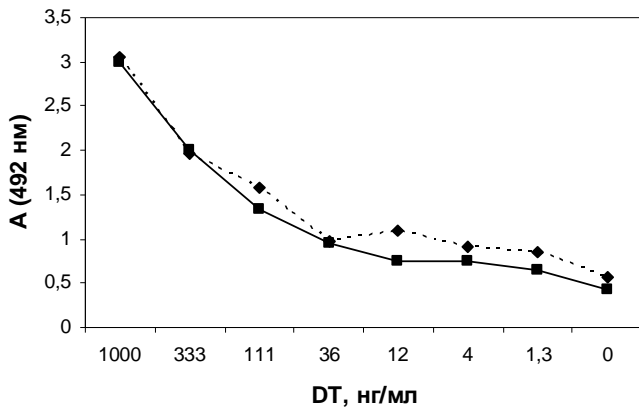
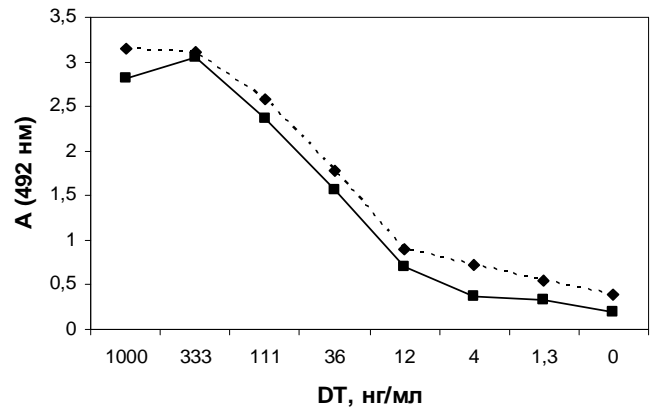


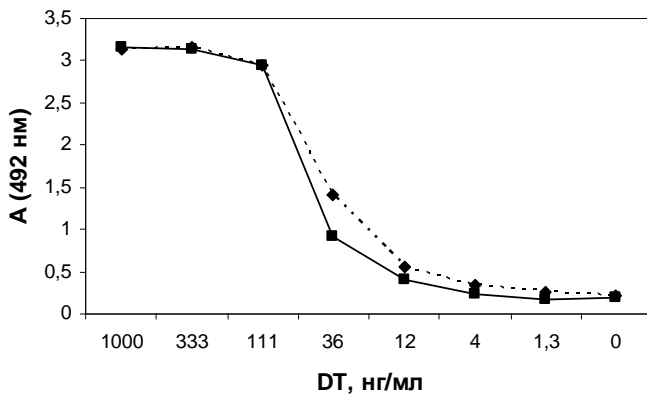
Рис. 5. Оценка специфичности пары антител G10B6–F3H10biot. Флуоресцентные изображения биочипов после проведения сэндвич-иммуноанализа смеси одиннадцати токсинов, включая дифтерийный токсин, с проявляющими антителами против дифтерийного токсина F3H10biot (а); смеси десяти токсинов, не содержащей дифтерийный токсин, с проявляющими антителами против десяти токсинов (б).



А



Б



В

---◆--- 1 —■— 2

Рис. 6. Сэндвич-анализ дифтерийного токсина в PBST (1) и образце, содержащем смывы носоглотки здорового человека (2). Использованы пары антител: G10B6–F3H10biot (а), E6B9–C2G5biot (б), G10B6–F3H10biot (в).