



УДК 57.083.3:57.086.8

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ХОЛЕРНОМУ ТОКСИНУ

© 2009 г. Е. Э. Петрова*, Р. Л. Комалева*, О. Е. Лахтина*, Л. В. Самохвалова*,
Н. А. Калинина*, Н. С. Шошина*, А. Ю. Рубина**, М. А. Филиппова**, Ю. В. Вертиев***,
Т. И. Валякина**, Е. В. Гришин*

*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 31.10.2008 г. Принята к печати 27.11.2008 г.

Получены моноклональные антитела к холерному токсину, перекрестно не взаимодействующие с термолabileм токсином (LT) *Escherichia coli*, с ридином, дифтерийным токсином, токсинами стафилококков SEA, SEB, SEI, SEG, с летальным фактором сибиреязвенного токсина и протективным антигеном сибиреязвенного токсина. Подобраны пары антител для количественного определения холерного токсина в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа (ИФА). Предел обнаружения токсина достигает 0.2 нг/мл в планшетном формате ИФА и 0.44 нг/мл в формате микрочипа. Присутствие в пробах с холерным токсином молока, мясного бульона и воды из открытого водоема не снижает чувствительность ИФА определения токсина.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; сэндвич-анализ; биологический микрочип; В-субъединица холерного токсина; холерный токсин; моноклональные антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенные микроорганизмы и продуцируемые ими токсины являются причиной тяжелых заболеваний людей, нередко заканчивающихся смертельным исходом. Они представляют серьезную угрозу населению и имеют наибольший потенциал для использования в качестве биологического оружия. Токсин холерного вибриона полностью определяет симптоматику холеры и является одним из центральных объектов мониторинга бактериальных токсинов в окружающей среде. Для обнаружения токсина используют два принципиально разных подхода: обнаружение продуцента токсина или детекция вырабатываемых продуцентом продуктов. Учитывая, что характер отравления определяется токсином и может проявляться в отсутствие продуцента, для лабораторной диагностики представляется оптимальным проводить определение самого токсина. Доза токсина, вызывающая заболевание, как правило, чрезвычайно мала [1], в связи с чем, задача лабораторной диагностики токсина заключа-

ется в разработке тестов с максимально возможной чувствительностью.

Иммунохимические методы обнаружения и количественного анализа различных токсинов, в частности ИФА-системы, остаются наиболее используемыми, достоверными и рекомендованы рядом международных контролирующих организаций, такими, например, как Американская администрация по анализу пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) и Европейское агентство по контролю качества пищевых продуктов [2, 3]. Важным фактором, определяющим чувствительность и специфичность иммунохимических методов анализа, являются антитела. В настоящее время методом гибридной технологии получают стабильные препараты специфичных высокоаффинных моноклональных антител, которые эффективно используются в диагностических системах для идентификации различных биологически активных веществ, в том числе и токсинов бактериального происхождения.

Современная диагностика развивается в двух направлениях: разработке мультиплексных систем, позволяющих проводить анализ больших серий образцов и одновременно определять в образце широкий набор токсинов (примером являются биологические микрочипы [4]), и создании методов для экспресс-диагностики в лабораторных условиях,

Сокращения: СТ – термолabileм холерный токсин; LT *E. coli* – термолabileм токсин *Escherichia coli*; OPD – орто-фенилдиамин; PBS – фосфатно-солевой раствор, pH 7.4; PBST – PBS с 0.1% Твин-20; МА – моноклональные антитела; SE – стафилококковые энтеротоксины.

Автор для связи (тел.: (495) 335-35-33; эл. почта: valyaki-na@ibch.ru).

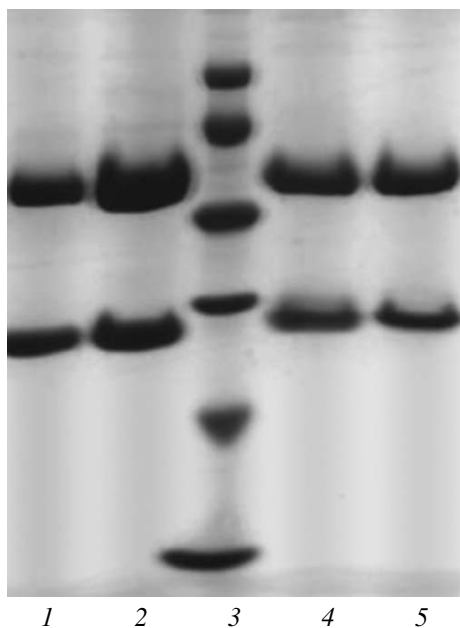


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов моноклональных антител в 12% ПААГ-SDS в восстанавливающих условиях. 1, 2 – препараты антител В1/Ф8, Е6/Е10 после очистки каприловой кислотой; 3 – белки-маркеры (сверху вниз фосфорилаза В → α-лактальбумин); 4, 5 – препараты антител D6/G7, D4/D6 после очистки на протеин-А-сефарозе.

необходимых для подтверждения клинического диагноза в случае заболевания и для превентивного контроля потребляемых человеком продуктов и воды, в частности твердофазный ИФА в формате планшета [5, 6].

Целью настоящего исследования явилось получение моноклональных антител для использования в иммуноаналитических системах обоих типов: в формате планшета и в формате микрочипа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к холерному токсину (СТ), использовали клетки миеломы SP2/0 и лимфоциты подколенных лимфоузлов мышей BALB/c конвенциональной категории и категории SPF. Мышей иммунизировали в подушечки задних лапок, инициируя развитие в подколенных лимфоузлах локального иммунного ответа, который сопровождался выраженным увеличением размеров узлов. Для усиления процесса воспаления и привлечения к участию в иммунном ответе соответствующих клеточных и гуморальных элементов воспаления использовали неполный адъювант Фрейнда. Эта схема иммунизации не обеспечивала очень высоких значений титров специфических антител в сыворотке крови мышей. Обычно титр не превышал 1 : 14000, однако формирование лимфоцитов – предшествен-

ников плазматических клеток происходило в достаточной степени для получения гибридом, стабильно продуцирующих антитела в высоких титрах как *in vitro*, так и в асцитной жидкости мышей (1 : 20000 и 1 : 2000000 соответственно), согласно данным непрямого ИФА. В результате гибридизации лимфоцитов конвенциональной категории мышей с клетками миеломы было получено 14 клонов, а гибридизации лимфоцитов мышей категории SPF – 20 клонов.

Полученные гибридомы продуцировали МА исключительно класса IgG, подклассов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, что создало определенные преимущества в очистке таких антител и их использовании в диагностических тест-системах. Очистку антител проводили двумя методами: IgG1, IgG2a осаждением балластных белков каприловой кислотой, а IgG2b и IgG3 аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе. В результате очистки получили электрофоретически чистые препараты антител (рис. 1), пригодные для конъюгирования с биотином.

Для характеристики МА проводили их изотипирование в соответствии с рекомендацией к коммерческому набору для изотипирования мышечных иммуноглобулинов. Определяли типы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов в культуральной среде клонов гибридом. Результаты представлены в табл. 1. Как следует из приведенных данных, все антитела относятся к иммуноглобулинам класса G, 13 клонов продуцируют IgG1, 2 клон – IgG2a, 2 клон – IgG2b и 7 клонов – IgG3. Все полученные антитела имели легкую цепь κ-типа.

В этой же таблице представлены величины констант аффинности (K_{aff}) антител, определенных согласно методу Битти [7], варьирующие от 0.1×10^9 до $2.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и свидетельствующие о высокой специфичности связывания полученных антител с СТ. Для определения констант использовали высокоочищенные препараты антител, выделенные из асцитной жидкости мышей, привитых клетками гибридом. Ни для одного из клонов не наблюдали роста солидной опухоли. Содержание специфических иммуноглобулинов в полученных препаратах антител, оцененное по электрофореграмме в 12% ПААГ-SDS в восстанавливающих условиях, составляло не менее 95% (рис. 1). Выход очищенных иммуноглобулинов составлял от 1 до 3 мг на мл асцита.

Для создания высокочувствительной тест-системы количественного определения СТ использовали сандвич-вариант ИФА. Подбирали пары антител, позволяющие регистрировать токсин в концентрации, не превышающей 1 нг/мл. Для подбора пар проводили биотинилирование всех МА с помощью сукцинимидного эфира биотина. Сандвич-анализ проводили, используя полученные МА в качестве как связывающих, так и детектирующих антител. Для определения чувствительности анализа, обеспе-

чиваемого изучаемыми парами антител, использовали двоичные или троичные разведения СТ в интервале концентраций от 1 мкг/мл до 0.1 нг/мл. Аналитическую чувствительность анализа, т.е. наименьшую тестируемую концентрацию СТ, определяли как концентрацию, соответствующую значению оптического поглощения, превышающего не менее чем на два стандартных отклонения оптическое поглощение многократно измеренной нулевой точки. Пары антител сравнивали по наименьшей детектируемой с их помощью концентрации СТ. Пары, детектирующие СТ в концентрации ниже 1 нг/мл, приведены в табл. 2.

Пары антител F5/H3–D6/G7, F5/H3–E6/E10 и F5/H3–B1/F8 выявляли СТ с наибольшей чувствительностью. Нижний предел детекции составил 0.2 нг/мл токсина. При использовании антител E6/E10, B1/F8, D6/G7 в качестве связывающих, а антитела F5/H3 в качестве детектирующего, чувствительность метода заметно снижалась и составляла более 1 нг/мл холерного токсина. Примечательно, что константа аффинности для антитела F5/H3 (см. табл. 1) была значительно выше, чем для E6/E10, B1/F8, D6/G7, что, по-видимому, определило позицию МА F5/H3 в качестве связывающего в сэндвич-анализе.

Известно, что холерный токсин состоит из двух компонентов, которые отличаются друг от друга по функциональным и иммунохимическим свойствам [8, 9]. Один из них называют А-субъединицей (M 29 кДа), другой компонент обозначают В-субъединицей. В-субъединица с M 56 кДа представляет собой нековалентно ассоциированный комплекс из пяти мономеров с $M \sim 11$ кДа каждая. Субъединицы не связаны друг с другом ковалентной связью, а удерживаются вместе посредством ионных и гидрофобных связей. Каждая из субъединиц в отдельности не обладает специфической токсической активностью в концентрациях, сравнимых с интактным токсином, но выполняет четкую и определенную функцию в сложном взаимодействии молекулы токсина с клетками-мишенями: субъединице А принадлежит активаторная функция, субъединице В – рецепторная. Кроме того, каждая из них отличается строгой иммунохимической специфичностью. Результаты изучения антигенных свойств на уровне субъединиц СТ свидетельствуют о том, что более иммуногенна В-субъединица, тогда как антитела к субъединице А малочисленны и обладают слабой нейтрализующей активностью [10].

В данной работе мы определяли специфичность связывания полученных МА с субъединицами А и В холерного токсина, полученными с помощью SDS-электрофореза токсина в невозстанавливающих условиях с последующим иммуноблотингом (рис. 2). Антитела F5/H3, D6/G7, E6/E10, B1/F8 специфически связывались с В-субъединицей токсина. Антител, связывающихся с А-субъединицей, выявлено

Таблица 1. Характеристика моноклональных антител к холерному токсину

Клон	Типы тяжелой цепи*	$K_{\text{aff}} \times 10^{-9}, M^{-1}$
A2/B1	IgG1	0.42 ± 0.04
A6/B9	IgG3	0.53 ± 0.04
A7/G3	IgG3	0.21 ± 0.02
A11/E3	IgG2a	0.74 ± 0.06
B1/F8	IgG1	0.52 ± 0.04
C2/B4	IgG3	2.2 ± 0.1
C5/H10	IgG1	1.1 ± 0.1
C7/F11	IgG3	2.9 ± 0.2
C10/F10	IgG1	0.12 ± 0.02
D3/D8	IgG2a	1.4 ± 0.1
D4/D6	IgG2b	0.33 ± 0.03
D5/C3	IgG3	1.2 ± 0.1
D6/G7	IgG2b	0.11 ± 0.01
D7/F11	IgG1	0.22 ± 0.02
E3/B6	IgG1	0.13 ± 0.02
E6/E10	IgG1	0.52 ± 0.03
F4/F4	IgG1	1.3 ± 0.4
F5/H3	IgG1	2.6 ± 0.1
G6/D12	IgG1	0.62 ± 0.04
G7/D8	IgG1	2.7 ± 0.15
H4/B6	IgG1	0.51 ± 0.03
H5/E10	IgG1	0.35 ± 0.04
H5/G8	IgG3	0.45 ± 0.05
H8/F8	IgG3	0.30 ± 0.02

* Все полученные антитела имели легкие цепи типа κ.

не было. Антитела E6/E10, B1/F8, D6/G7 и антитело F5/H3 узнавали разные антигенные детерминанты В-субъединицы токсина, поскольку антитела E6/E10, B1/F8, D6/G7 узнавали как пентамерный комплекс В-субъединиц, так и мономерную В-субъединицу, в то время как антитело F5/H3 узнавало комплекс В-субъединиц, но не узнавало мономерную В-субъединицу.

Различие антигенной специфичности полученных МА определило эффективность их использования для тестирования низких концентраций СТ в сэндвич-варианте ИФА. Оптимальной композицией антител в сэндвич-варианте явились пары, в которых связывающим антителом было F5/H3, а в качестве детектирующих могло быть каждое из трех других (табл. 2). Чувствительность метода при использовании вышеозначенных пар антител была одинаковой и составляла 0.2 нг/мл холерного токсина.

Существует несколько коммерческих тестов для определения СТ с чувствительностью, превышаю-

Таблица 2. Пары моноклональных антител, выявляющие в сандвич-анализе холерный токсин в концентрации ниже 1 нг/мл

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	Нижний предел детекции СТ, нг/мл
B1/F8	B1/F8	0.4
D4/D6	D6/G7	0.4
	E6/E10	0.4
D7/F11	D6/G7	0.4
	B1/F8	0.4
F4/F4	E6/E10	0.4
	B1/F8	0.8
F5/H3	B1/F8	0.2
	E6/E10	0.2
	D6/G7	0.2
G7/D8	D6/G7	0.4
	B1/F8	0.4
	E6/E10	0.4
H4/B6	D6/G7	0.4
H8/F8	D6/G7	0.4
	E6/E10	0.4

щей заявленную в нашей работе [11, 12]. Один из них имеет чрезвычайно высокую чувствительность [11]. Это комбинированный вариант сандвич-ИФА с использованием, на этапе сорбции антигена, ганглиозида GM1 – рецепторной молекулы СТ и термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LT) [13]. Для проявления связавшегося с GM1 холерного токсина

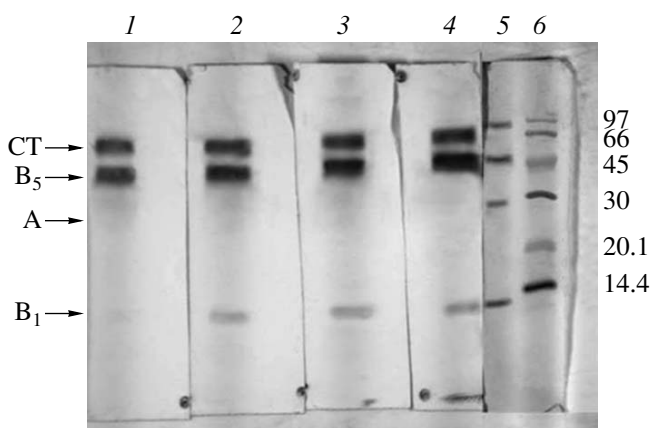


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ связывания МА с субъединицами холерного токсина. Полосы, отмеченные стрелками, соответствуют целному токсину (СТ), пентамерному комплексу В-субъединиц (B₅), А-субъединице (А) и мономерной В-субъединице (В₁). Обработка реплик моноклональными антителами F5/H3 (1), D6/G7 (2), E6/E10 (3) и B1/F8 (4), окрашивание амидовым черным (5, 6). 6 – стандартные белки как на рис. 1.

применялись специфические МА. Предел обнаружения в таком варианте ИФА составлял 10 фг/мл. В данной работе не приводятся данные по изучению перекрестного взаимодействия в комбинированном варианте сандвич-ИФА с LT. Авторы работы [12] предложили модификацию ИФА для детекции СТ в биологическом материале пациентов, при этом система тестирования включала иммобилизованные на полистирольных частицах поликлональные антитела. Минимальная детектируемая доза СТ в данном методе достигала 26 пг/мл, однако данная система была специфична не только к СТ, но и к LT.

Известно, что между представителями холероподобной группы токсинов существует значительное антигенное родство и исследования подтвердили способность антител, полученных к одному из токсинов группы, нейтрализовать активность других токсинов. В первую очередь это относится к термолабильному токсину *E. coli* (LT). Как и СТ, термолабильный токсин *E. coli* представляет собой глобулярный белок и не содержит в своем составе углеводов и липидов [14, 15]. Показано, что антигенное родство обоих энтеротоксинов наблюдается как на уровне целой молекулы, так и на уровне отдельных составляющих субъединиц. В связи с этим, получение МА, связывающихся исключительно с СТ, представляло особую задачу. Уже на стадии первичного клонирования мы идентифицировали гибридомы, продуцирующие антитела с моноспецифичностью к СТ. Следует отметить, что число клонов, продуцирующих антитела, связывающиеся как с СТ, так и с LT, было значимым и составляло примерно 30% от их общего количества. В данной работе изучались только антитела к СТ, перекрестно не взаимодействующие с LT.

Для исключения возможности связывания полученных МА к СТ с другими бактериальными (летальным фактором сибиреязвенного токсина, протективным антигеном сибиреязвенного токсина, дифтерийным токсином, SEB, SEA, SEI и SEG) и растительным (рицином) 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. СТ был введен нами в композицию биочипа, во-первых, для определения моноспецифичности полученных к СТ моноклональных антител, во-вторых, для определения минимальной концентрации СТ, детектируемой с участием МА в сандвич-варианте ИФА в формате биочипа.

Биочипы – массивы индивидуальных микроэлементов, содержащих различные молекулярные зонды – в отличие от стандартных методов позволяют проводить многопараметрический анализ образцов. В данной работе использованы трехмерные

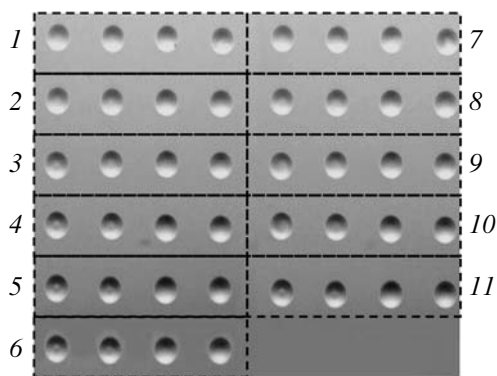


Рис. 3. Фотография биочипа в проходящем свете. Биочип содержит гелевые элементы, диаметром 100 мкм и объемом 0.1 нл (по четыре одинаковых элемента в ряду) с иммобилизованными МА к холерному токсину – D7/F11 (1) и F5/H3 (2), летальному фактору сибиреязвенного токсина (3), протективному антигену сибиреязвенного токсина (4), дифтерийному токсину (5), рицину (6), SEB (7), SEA (8), SEI (9), SEG (10), пустой гель (11).

гидрогелевые биочипы, изготовленные по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН [16]. В основе технологии гидрогелевых биочипов лежит метод фотоиндуцируемой сополимеризации. Технология универсальна и позволяет изготавливать биочипы, содержащие различные по своей природе иммобилизованные зонды: ДНК, РНК, белки, сахара и пр. В нашей работе использована разработанная ранее конструкция биочипа с иммобилизованными антителами против восьми токсинов: летального фактора и протективного антигена сибиреязвенного токсина, рицина, дифтерийного токсина и стафилококковых энтеротоксинов А (SEA), В (SEB), I (SEI) и G (SEG) [17, 18]. На рис. 3 приведена структура биочипа для одновременного количественного иммуноанализа этих биотоксинов, а также введенного в состав данного микрочипа холерного токсина, выявляемого полученными нами моноклональными антителами D7/F11 и F5/H3.

На изготовленных биочипах проводили выбор оптимальных пар антител, оценку их специфичности, чувствительности и воспроизводимости определения СТ в сэндвич-анализе с флуоресцентной регистрацией сигнала.

Для выбора высокочувствительных пар антител к СТ были построены калибровочные кривые по данным сэндвич-анализа токсина на биочипе (рис. 4). Концентрация СТ в калибровочных пробах во всех случаях была одинакова и составляла: 0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 нг/мл. При построении калибровочных кривых использовали кусочно-линейную интерполяцию.

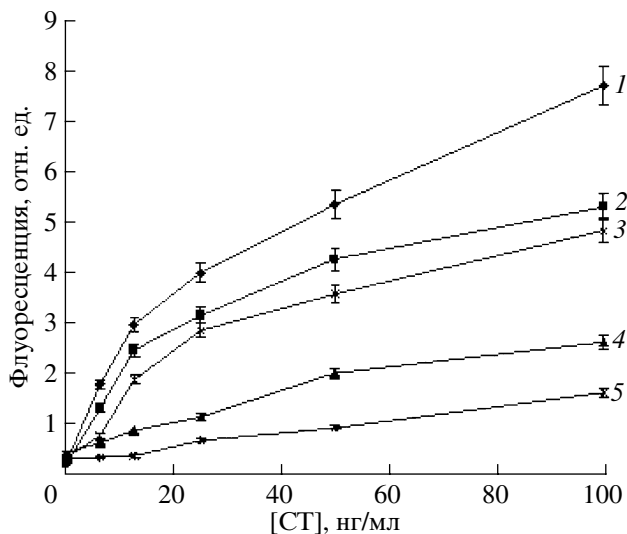


Рис. 4. Калибровочные кривые для определения концентрации СТ в сэндвич-анализе на микрочипах с использованием пар антител F5/H3–B1/F8-biot (1), F5/H3–D5/G7-biot (2), F5/H3–E6/E10-biot (3), D7/F11–D6/G7-biot (4) и D7/F11–E6/E10-biot (5).

Исходя из полученных данных, для определения СТ в биочипе были выбраны три наиболее перспективные пары антител F5/H3–B1/F8-biot; F5/H3–E6/E10-biot и F5/H3–D6/G7-biot, для которых была проведена оценка аналитической чувствительности и специфичности анализа.

Для оценки воспроизводимости и чувствительности анализа была проведена серия экспериментов на биочипах. Для выбранных пар антител F5/H3–B1/F8-biot; F5/H3–E6/E10-biot и F5/H3–D6/G7-biot получали калибровочные кривые в трех повторях и проводили измерения фонового сигнала (рис. 5). Каждая точка калибровочной кривой представляет собой среднее значение из измерений на трех биочипах. Вертикальными отрезками показаны величины стандартных отклонений. Коэффициент вариации для различных концентраций СТ не превышал 15%.

Чувствительность анализа, рассчитывали как концентрацию, соответствующую значению флуоресценции, превышающему не менее чем на два стандартных отклонения флуоресцентный сигнал многократно измеренной (пять раз) калибровочной пробы, не содержащей антиген.

Величину чувствительности определяли экспериментально по полученным калибровочным кривым и рассчитывали как описано в “Эксперимент. части”. Аналитическая чувствительность (нг/мл) для пары F5/H3–B1/F8-biot составила 0.44, для пары F5/H3–E6/E10-biot – 0.50 и для пары F5/H3–D6/G7-biot – 1.0.

Нижний предел определения СТ равнялся 0.44 нг/мл, что примерно в 2 раза выше минималь-

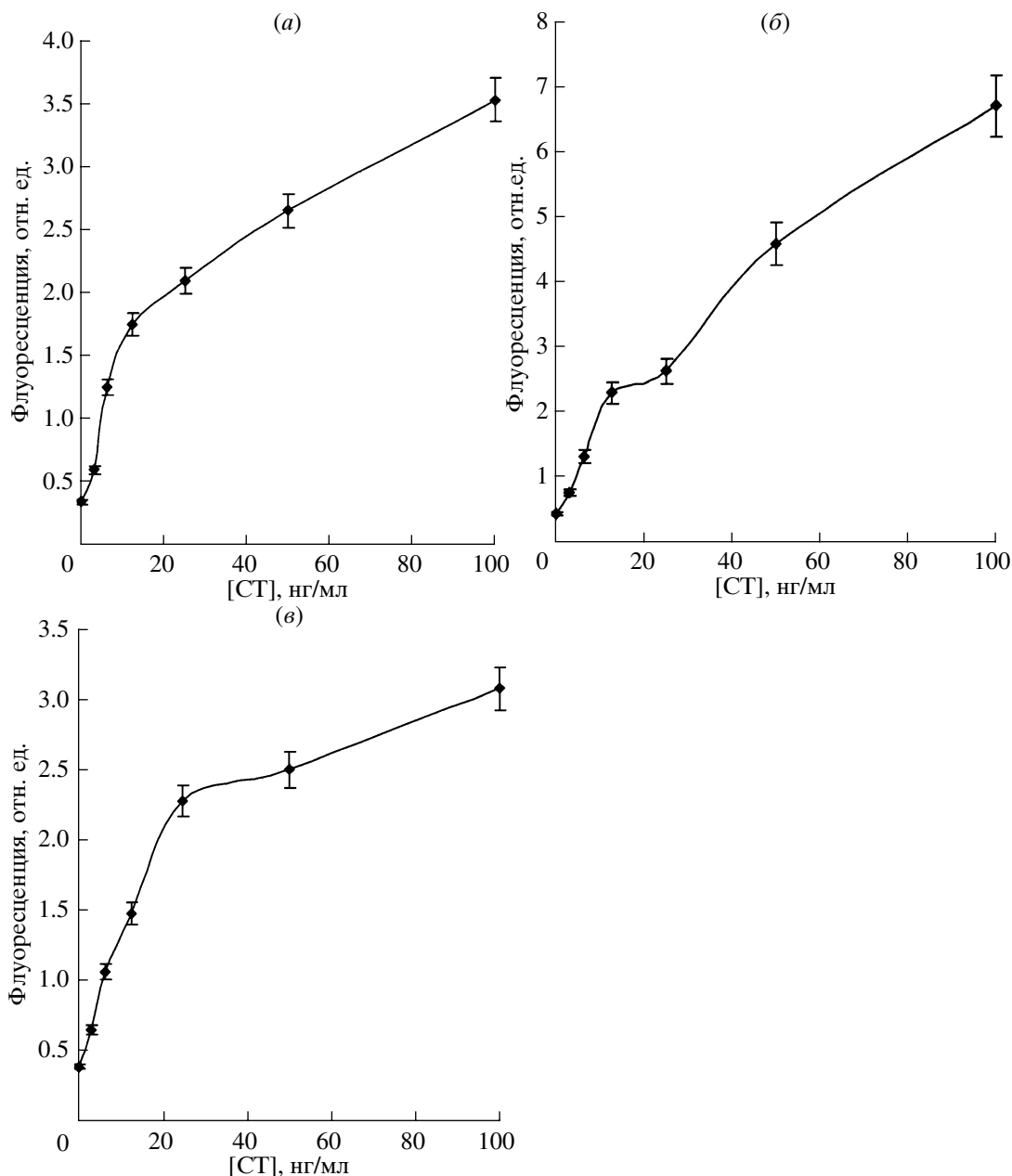


Рис. 5. Калибровочные кривые пар антител F5/H3-E6/E10-biot (а), F5/H3-B1/F8-biot (б) и F5/H3-D6/G7-biot (в) для детекции минимальной концентрации СТ в сэндвич-анализе на микрочипах.

ной концентрации токсина, определенной нами в планшетном варианте сэндвич-анализа. Для детекции биологических токсинов описано применение чипов различной конструкции, в которых минимально детектируемая концентрация СТ составила 1.6 нг/мл [18], что в 3 раза превышает соответствующую концентрацию токсина, определяемую в данном формате биочипа.

Оценку специфичности взаимодействия пар антител F5/H3-B1/F8-biot; F5/H3-E6/E10-biot и F5/H3-D6/G7-biot с холерным токсином проводили на биочипе в два этапа:

1. Сэндвич-анализ смеси девяти выше указанных токсинов, включая СТ, с препаратом одних из проявляющих биотинилированных антител к СТ: B1/F8-biot, D6/G7-biot или E6/E10-biot.

2. Сэндвич-анализ смеси восьми токсинов, не содержащей СТ, с использованием в качестве детектирующих смеси биотинилированных антител к следующим токсинам: летальному фактору и протективному антигену сибирязвенного токсина, рицину, дифтерийному токсину, SEA, SEB, SEI и SEG.

В первом случае оценивали специфичность взаимодействия детектирующих антител с другими во-

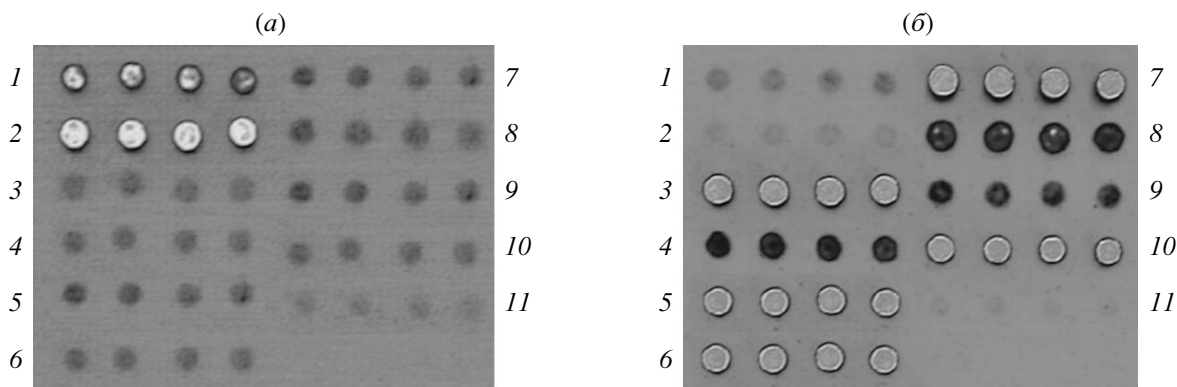


Рис. 6. Оценка специфичности связывания пар антител D7/F11–B1/F8-biot и F5/H3–B1/F8-biot с различными токсинами биочипа. Флуоресцентные изображения биочипов после проведения сэндвич-анализа смеси девяти токсинов, включающей холерный токсин, с проявляющими антителами к холерному токсину B1/F8-biot (а), смеси восьми токсинов, не содержащей холерный токсин, с детекцией смесью биотинилированных антител к восьми различным токсинам, исключая МА к СТ (б). Биочип содержит гелевые элементы (по четыре одинаковых элемента в ряду) с иммобилизованными МА к холерному токсину D7/F11 (1), F5/H3 (2), летальному фактору сибиреязвенного токсина (3), протективно-му антигену сибиреязвенного токсина (4), дифтерийному токсину (5), рицину (6), SEB (7), SEA (8), SEI (9), SEG (10), пустой гель (11).

семью биотоксинами, во втором случае оценивали специфичность взаимодействия иммобилизованных на биочипе антител D7/F11 и F5/H3 с холерным токсином. Результаты представлены на рис. 6.

Детектирующие антитела к холерному токсину B1/F8-biot, D6/G7-biot и E6/E10-biot специфически взаимодействуют с СТ, поскольку флуоресцентные сигналы наблюдаются только от ячеек микрочипа, содержащих иммобилизованные антитела против СТ (в качестве примера см. рис. 6а). Данные, представленные на рисунке 6б, позволяют сделать вывод о специфичности связывания иммобилизованных антител D7/F11 и F5/H3 с СТ, так как после проведения анализа наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек микрочипа с иммобилизованными антителами против восьми токсинов и не наблюдаются флуоресцентные сигналы от ячеек с иммобилизованными антителами против СТ.

Хорошо известно, что холера передается фекально-оральным путем при употреблении загрязненной воды при питье или при купании, а также через пищу и при контактах. В связи с этим особое значение приобретает разработка методов эффективного обнаружения как микробиологического заражения, так и токсинов в продуктах питания и объектах окружающей среды. При разработке тест-систем для обнаружения биологических токсинов важным является решение вопроса о пределах обнаружения токсинов с целью проведения достоверного тестирования опытных образцов, содержащих различный биологический материал. Мы сравнивали чувствительность определения СТ в стандартном препарате (PBS) и в препаратах, содержащих воду из открытого водоема, молоко и мясной бульон. В этих экспериментах использовали в качестве связы-

вающего антитела F5/H3, а в качестве детектирующих – B1/F8, D6/G7, E6/E10 (рис. 7).

Аналитическая чувствительность определения холерного токсина в PBS и образцах, содержащих воду из открытого водоема, молоко и мясной бульон, была сходной (кривые статистически не отличались, $p > 0.5$) и составляла 0.2 нг/мл. Таким образом, присутствие перечисленных продуктов питания и воды не влияет на чувствительность метода, что делает разработанную систему пригодной для обнаружения холерного токсина в объектах окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены моноклональные антитела, использование которых в сэндвич-ИФА позволяет определить холерный токсин в концентрации до 0.2 нг/мл в планшетном формате и до 0.44 нг/мл при сэндвич-варианте иммунофлуоресцентного анализа в формате микрочипа, что превышает чувствительность тестов в аналогичных форматах с использованием моноклональных антител, предложенных другими авторами [19–21]. Большей чувствительностью обладали лишь тесты, выполненные в иных форматах с использованием в качестве связывающих токсин молекул ганглиозида GM1, включенных в липосомы [11], или поликлональных антител, сорбированных на полистирольных частицах [12]. В данной работе также было показано, что предлагаемая тест-система в формате планшета позволяет определять СТ с одинаковой чувствительностью в образцах пищевых продуктов (молоке, бульоне) и воде из открытого водоема.

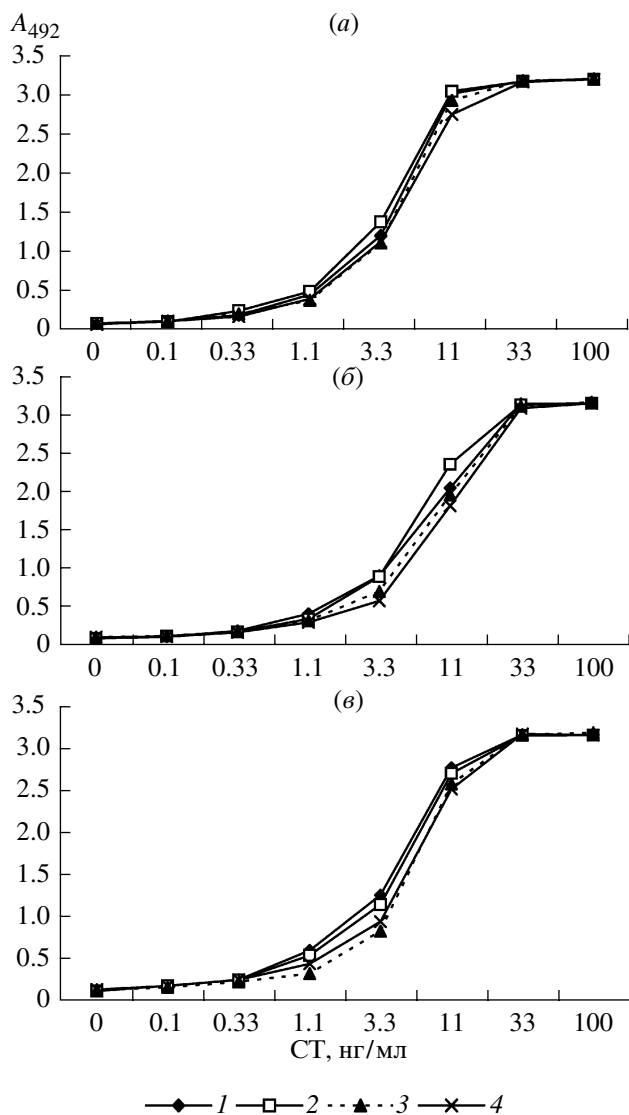


Рис. 7. Сандвич-анализ холерного токсина в PBS (1), молоке (2), мясном бульоне (3) и воде (4). Были использованы пары антител: F5/H3-B1/F8-biot (а); F5/H3-E6/E10-biot (б); F5/H3-D6/G7-biot (в).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), фетальную телячью сыворотку (FCS), глутамин, раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT) – (Gibco-Invitrogen, США); неполный адъювант Фрейнда, пристан, BSA, DMSO, 4-хлор-1-нафтол, 3,3-диаминобензидин, OPD, *N*-оксисукцинимидный эфир биотина, Твин-20, метилизотиазолон гидрохлорид (MIT), поливиниловый спирт (PVA), 50 кДа; поливинилпирролидон (PVP), 360 кДа и холерный токсин (*Vibrio cholerae*) – Sigma (США); DEAE-целлюлозу, SDS – Serva (Германия), каприловую кислоту – Koch-Light LTD (Англия); полиакриламид – Amresco (США); нитроцеллюлозную мембрану BA-85 – Schleicher &

Schuell (Германия); протеин-А-сефарозу, Cy5-меченый стрептавидин, сефадекс® G-25 coarse и Bind Silane – 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); 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.

Получение гибридом. Мыши BALB/c категории SPF и конвенциональной категории были иммунизированы в подушечки задних лапок холерным токсином с неполным адъювантом Фрейнда. Мыши SPF были вакцинированы СТ в дозе 10 мкг/мышь и ревакцинированы той же дозой токсина через 2 недели. Мыши конвенциональной категории были иммунизированы трижды с интервалом 2 недели дозами токсина: 2.5, 5 и 20 мкг/мышь. Через 6 сут после последней иммунизации у мышей забирали подколенные лимфоузлы, из которых выделяли лимфоциты для гибридизации с клетками миеломы SP2/0 по методу Келлера и Мильштейна [22]. Гибридизацию проводили при соотношении клеток 5 : 1 в 45% растворе ПЭГ-4000 с 10% DMSO в среде DMEM в течение 1 мин совместной инкубации. После гибридизации клетки разносили по 96-луночным планшетах, в которые за 24 ч до этого помещали мышинные макрофаги. Клетки культивировали в селективной среде следующего состава: DMEM с 20% FCS, 4 mM *L*-глутамином, 5 mM меркаптоэтанолом, 0.1 mM гипоксантином, 1.6×10^{-5} М тимидином, 4×10^{-7} М аминоптерином.

После завершения этапа селекции гибридных клеток от родительской миеломы, их культивировали в среде, не содержащей аминоптерин. Через 7–10 сут после гибридизации из лунок с активно растущими клетками отбирали культуральную среду и тестировали ее непрямым твердофазным ИФА на наличие антител к холерному токсину. Из лунок, в культуральной среде которых регистрировали достоверно положительную реакцию с токсином, отбирали клетки и клонировали их трижды методом предельных разведений в среде роста. После двух последних клонирований число положительных клонов составляло 100%.

Очистка МА из асцитной жидкости осаждением балластных белков каприловой кислотой [23]. Для получения асцитов клетки гибридом прививали мышам BALB/c ($1-2 \times 10^6$ клеток/мышь), предобработанным за 10–12 сут до инокуляции гибридомы,

0.5 мл пристана. Асцитную жидкость разбавляли двумя объемами 0.06 М ацетатного буфера pH 4.0, доводили pH смеси до 4.8, затем при непрерывном помешивании медленно, по каплям, добавляли каприловую кислоту из расчета 120 мкл кислоты на 1 мл исходного асцита. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, денатурированные белки осаждали центрифугированием. Супернатант диализовали 18 ч против 0.015 М ацетатного буфера pH 5.7 при 4°C, после чего добавляли DEAE-целлюлозу, уравновешенную тем же буфером, из расчета 0.12 г целлюлозы на 1 мл исходного асцита, перемешивали 30 мин при 18°C. DEAE-целлюлозу отделяли центрифугированием, а надосадочную жидкость, содержащую иммуноглобулины, концентрировали ультрафильтрацией.

Очистка МА из асцитной жидкости преципитацией сульфатом аммония и аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе. Асцитную жидкость разбавляли в 2 раза PBS, центрифугировали 20 мин при 10000 g и антитела из супернатанта осаждали равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония. Раствор оставляли на ночь при 4°C для формирования осадка, центрифугировали, осадок растворяли в буфере (1.5 М глицин и 3 М NaCl, pH 8.9). Полученный препарат наносили на колонку с протеин-А-сефарозой. Элюцию МА, в зависимости от субкласса IgG, проводили 0.1 М раствором лимонной кислоты pH 6.0, 5.0 или 4.0. Раствор антител после элюции нейтрализовали 1 М Трис-HCl pH 8.0 и диализовали против раствора PBS.

Конъюгирование антител с биотином [24]. К раствору очищенных антител (1 мг/мл) в 0.1 М бикарбонатном буфере pH 9.0 добавляли раствор оксисукцинимидного эфира биотина в DMSO (1 мг/мл) из расчета 120 мкл реагента на 1 мг белка. Смесь инкубировали в темноте 3 ч при комнатной температуре, добавляли 1 М раствор Трис-глицинового буфера pH 8.2 (50 мкл на 1 мл антител) и диализовали биотинилированные антитела против PBS. Антитела хранили при 4°C в PBS с 0.02% азидом Na.

Непрямой твердофазный ИФА антител к холерному токсину. В лунки ИФА-планшета с высокой степенью связывания сорбировали холерный токсин при концентрации белка 1 мкг/мл в 0.1 М бикарбонатном буфере pH 9.0. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора антигена и инкубировали в течение ночи при 4°C. После сорбции свободные центры связывания блокировали при инкубации в течение 1 ч с 1% раствором BSA при 37°C. Лунки планшета отмывали 4 раза PBST и 2 раза PBS, далее вносили 100 мкл культуральной среды или препаратов очищенных антител и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Отмывали (см. выше), вносили пероксидазный конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, инкубировали 40 мин при комнатной температуре, отмывали и вносили субстрат пероксидазы – OPD в концентрации 1 мг/мл в

50 mM цитратном буфере pH 4.5, содержащем 0.015% перекиси водорода. После развития окраски реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10% серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

Сандвич-вариант ИФА в формате планшета. В лунки ИФА-планшета с высокой степенью связывания вносили связывающие МА (10 мкг/мл) в PBS и сорбировали их в течение ночи при 4°C. Свободные центры связывания блокировали 1% раствором сухого молока при инкубации в течение 1 ч при 37°C. Далее в лунки планшета вносили холерный токсин с концентрацией от 1 мкг до 0.1 нг/мл, инкубировали 1 ч при 37°C, затем планшет отмывали 4 раза раствором PBST и 2 раза раствором PBS. Добавляли по 100 мкл проявляющих меченных биотином МА (10 мкг/мл) и инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки добавляли раствор меченного пероксидазой хрена стрептавидина в рабочем разведении и инкубировали 40 мин при 37°C. В качестве субстрата использовали раствор OPD (1 мг/мл) (см. выше). После развития окраски реакцию останавливали 10% серной кислотой и определяли оптическое поглощение при 492 нм. Для определения СТ в воде, молоке и мясном бульоне антиген вносили в планшет и инкубировали в буфере, содержащем 10% воды из открытого водоема, коммерческого молока или мясного бульона "Maggi".

Изготовление микрочипов. Гидрогелевые биочипы изготавливали по запатентованной технологии полимеризационной иммобилизации [16], разработанной в ИМБ РАН [17, 18]. Качество полученных биочипов проверяли в проходящем свете с помощью биочип-анализатора (ИМБ РАН), снабженного специальным программным обеспечением TestChip и QualityControl (ИМБ РАН). В результате проверки качества отбраковывали биочипы, для которых отклонения значений радиусов гелевых элементов превышали 5% внутри каждого биочипа и 8% между всеми биочипами данной партии.

Сандвич-иммуноанализ на биочипах. Раствор проявляющих биотинилированных антител (30 мкл) добавляли к 30 мкл анализируемого образца (или калибровочной пробе) и инкубировали на биочипе в течение 17 ч при 37°C. После процедуры отмывки (20 мин, PBST) биочипы обрабатывали флуоресцентно-меченым стрептавидином 10 мин при 37°C, повторно отмывали и регистрировали флуоресцентные сигналы.

Для построения калибровочных кривых были использованы следующие концентрации холерного токсина: 0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 нг/мл. Антиген и биотинилированные антитела разводили до нужной концентрации в фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 0.14% PVA, 0.14% PVP, 10% BSA.

Флуоресцентные измерения проводили с использованием портативного флуоресцентного анализа-

тора биочипов с возбуждением при помощи лазера с использованием фильтров 650/670 нм (возбуждение/регистрация) [25]. Расчет интенсивности флуоресцентного сигнала от каждой ячейки биочипа и определение концентраций токсинов проводили с помощью специального программного обеспечения ImagerAssay (ИМБ, Москва). При анализе полученных данных интенсивность флуоресценции рассчитывали как медианный сигнал от четырех одинаковых гелевых ячеек.

Оценка аналитической чувствительности. Величину чувствительности определяли экспериментально, по полученным калибровочным кривым и рассчитывали следующим образом:

$$IF_0 + 2SD,$$

где IF_0 – значение интенсивности флуоресценции для каждого измерения нулевой пробы; SD – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения IF_0 .

SD вычислялось по следующей формуле

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (IF_0 - \overline{IF_0})^2}{n - 1}},$$

где $\overline{IF_0}$ – среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции при измерении нулевой пробы; n – число измерений.

Определение констант аффинности антител при связывании с холерным токсином проводили по методу Битти непрямым ИФА [6] и вычисляли по формуле $K_{\text{aff}} = 1/(4[Ab'] - 2[Ab])$, 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 [26] и иммуноблотинг. Для разделения белков в невозстанавливающих условиях образцы антител растворяли в 0.125 М Трис-НСI-буфере pH 6.8, содержащем 4% SDS и 20% глицерина. Разделение белков проводили в 10% ПААГ. Для определения молекулярной массы белков использовали стандартную смесь (M , кДа): фосфорилаза В (97.0), альбумин (66.0), овальбумин (45.0), карбоангидраза (30.0), ингибитор трипсина (20.1), α -лактальбумин (14.4 кДа). По завершении процесса разделения белков гель окрашивали в 0.25% растворе Кумасси R-250 или использовали для переноса на нитроцеллюлозную мембрану BA-85 согласно методу [27]. 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 лиофилизиро-

ванного молока в PBS, после чего реплики обрабатывали анализируемыми МА к холерному токсину (5 мкг/мл) и мечеными пероксидазой хрена козыми антителами к мышинным иммуноглобулинам (1 : 500). Для окрашивания использовали смесь хлорнафтола и диаминобензидина [28].

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. *Scarlatos A., Welt B., Cooper B., et al.* // J. Food. Sci. 2005. V. 70(8). P. 121–124.
2. U.S. Food, Drug Administration. // Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. Bacteriological Analytical Manual. 2001.
3. European Food Safety Authority (EFSA) // The EFSA J. 2007. V. 130. P. 4–352.
4. *Peruski A.H., Peruski L.F.* // Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003. V. 10(4). P. 506–513.
5. *Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., et al.* // Anal. Biochem. 2005. V. 340. P. 317–329.
6. *Rucker V.C., Havenstrite K.L., Herr A.E.* // Anal. Biochem. 2005. V. 339. P. 262–270.
7. *Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G.* // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
8. *Kaper J.B., Srivastava B.S.* // Indian J. Med. Res. 1992. V. 95. P. 163–167.
9. *Clements J.D., Finkelstein R.A.* // Infect. Immun. 1978. V. 22(3). P. 709–713.
10. *Lindholm L., Holmgren J., Wikstrom M., Karlsson U., Andersson K., Lycke N.* // Infect. Immun. 1983. V. 40(2). P. 570–576.
11. *Ahn-Yoon S., DeCory T.R., Baeumner A.J., Durst R.A.* // Anal. Chem. 2003. V. 75(10). P. 2256–2261.
12. *Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Uesaka Y., Horigome K., Paul M., Sen D., Pal S.C., Takeda T., Takeda Y., Nair G.B.* // J. Clin. Microbiol. 1992. V. 30(7). P. 1783–1786.
13. *Sixma T.K., Pronk S.E., Kalk K.H., Wartna E.S., van Zanten B.A., Witholt B., Hoi W.G.* // Nature. 1991. V. 351. P. 371–377.
14. *Clements J.D., Finkelstein R.A.* // Infect. Immun. 1979. V. 24(3). P. 760–769.
15. *Clements J.D., Yancey R.J., Finkelstein R.A.* // Infect. Immun. 1980. V. 29(1). P. 91–97.
16. *Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В.* Патент РФ № 2216547 // Б. И. 2003. № 32.
17. *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.
18. *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.

19. Ligler F.S., Rowe Taitt C., Shriver-Lake L.C., Sapsford K.E., Shubin Yu., Golden J.P. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377(3). P. 469–477.
20. Delehanty J.B., Ligler F.S. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74(21). P. 5681–5687.
21. Сидорович И.Г., Николаева И.А., Игнатъева Г.А. // *Сборн. трудов ЦНИИВС им. Мечникова. М.*, 1985. С. 88–96.
22. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 495–499.
23. Steinbuch M., Audran R. // *Arch. Biochem. And Biophys.* 1969. V. 227. P. 680–685.
24. Bayer E.A., Wilchek M. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 184. P. 138–162.
25. 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.
26. Laemmly U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Burnett W.N. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 112(1). P. 195–203.
28. Vilija P., Krohn K., Tuohimaa P. // *J. Immunol. Methods.* 1985. V. 76. P. 73–83.

Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies to the Cholera Toxin

E. E. Petrova^a, R. L. Komaleva^a, O. E. Lakhtina^a, L. V. Samokhvalova^a, N. A. Kalinina^a,
N. S. Shoshina^a, A. Yu. Rubina^b, M. A. Filippova^b, Yu. V. Vertiev^c,
T. I. Valyakina^{b#}, and E. V. Grishin^a

Phone: +7(495) 335-35-33; e-mail: valyakina@ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, Moscow, 117997 Russia

^b Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^c Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Monoclonal antibodies to cholera toxin were obtained. They do not cross-react with the termolabile toxin (LT) of *Escherichia coli*, ricin, diphtherial toxin, staphylococcus enterotoxins of SEA, SEB, SEI, SEG, or the lethal factor and protective antigen of the anthrax toxin. Pairs of antibodies for the quantitative measurement of the cholera toxin in sandwich enzyme immunoassay (EIA) were selected. The detection limit of the toxin is 0.2 ng/ml for plate EIA and 0.44 ng/ml for microchip EIA. The presence of milk, broth, or surface water in the toxin samples does not reduce the sensitivity of EIA.

Key words: enzyme immunoresearch; sandwich assay; biological microchip; B subunit of cholera toxin; cholera toxin; monoclonal antibodies.