



УКРАЇНА

(19) UA (11) 28626 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) НАБІР ГІБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТІВ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ІgM ЛЮДИНИ, ПРИДАТНИХ
ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

1

2

(21) u200709073

(22) 07.08.2007

(24) 10.12.2007

(72) НІКОЛАСНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(73) НІКОЛАСНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(56)

(57) Набір гібридом-продуцентів моноклональних антитіл до ІgM людини, придатних для використання у імуноферментних тест-системах,

які отримані внаслідок хімічно індукованої гібридизації імунокомпетентних В-лімфоцитів та мієломи Sp 2/0, який відрізняється тим, що отримані за довгостроковою схемою імунізації мишей лінії BALB/c характеризуються більшою активністю у імуноферментному аналізі, специфічністю та афінністю моноклональних антитіл.

Корисна модель стосується гібридомної технології та імунобіотехнології і може бути використана для одержання гібридом-продуцентів моноклональних антитіл (МКАТ) специфічних до імуноглобулінів людини класу ІgM. Метою корисної моделі є одержання нових гібридом, що продукують високоафінні та високоспецифічні моноклональні антитіла до ІgM людини, придатні до використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі гібридоми, які продукують моноклональні антитіла до ІgM людини [1], які є непридатними для застосування у тест-системах, що побудовані за принципом імуноферментного аналізу та призначені для виявлення специфічних антитіл класу ІgM до збудників інфекційних захворювань.

Найбільш близькими до запропонованої корисної моделі є гібридами, що синтезують моноклональні антитіла специфічні до ІgM людини [2]. Проте у порівнянні із вищезгаданими гібридами 48B4.2, 43H3.2, 45A2, 45H7 характеризуються більшою активністю у ІФА, специфічністю та афінністю моноклональних антитіл, що продукують.

Гібридами одержані при злитті (гібридизації) клітин мишачої мієломи Sp 2/0-Ag-14 (скорочено - Sp 2/0) та імунокомпетентних В-лімфоцитів мишей лінії Balb/c та мають типову морфологію лімфоїдних клітин. Можуть культивуватися in vitro та in vivo, в організмі мишей. Характеристика МКАТ, які продукуються гібридомами наведена у таблиці.

Характеристика моноклональних антитіл до ІgM людини, які п

Назва гібридоми	Ізотип МКАТ	Константа афінності МКАТ, $\times 10^{10}M$	Титр МКАТ у культуральній рідині	
48B4.2	IgG ₁	8,9	1:1000	для сор
43H3.2	IgG ₁	10,0	1:800	краснух
45A2	IgG _{2a}	7,0	1:800	в скла
45H7	IgG ₁	5,4	1:1000	діагност
				хламідіс
				для сор
				хламідіс
				для сор

Приклад 1. Одержання гібридом (процедура гібридизації) [3, 4].

Тварину-донора імунокомпетентних лімфоцитів вибирали за результатами титрування сироваток мишей. Селезінку після забою миші стерильно видаляли та м'яко гомогенізували в середовищі з 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Для лізису еритроцитів селезінки клітини після центрифугування ресуспендували в 0,83% розчині хлориду амонію. Спленоцити витримували 3хв. при 4°C і осаджували при 1500об/хв. 5хв. Потім ще раз відмивали середовищем без сироватки, ресуспендували в 15мл DMEM та підраховували кількість життєздатних клітин у камері Горяєва.

Таким чином одержували $(3-5) \times 10^8$ лімфоцитів із високою життєздатністю за результатами

(19) UA (11) 28626

виключення тріпанового синього. Їх змішували з мієломними клітинами у співвідношенні 2:1 і центрифугували при 1000об/хв протягом 12хв у пробірці ємністю 50мл. Середовище майже повністю видаляли, а клітинний осад старанно розбивали, постукуючи пробіркою по столу ламінарного боксу. Потім у суспензію клітин вносили 1мл 40% розчину ПЕГ з 5% ДМСО.

Суміш клітин витримували в середовищі з ПЕГ 5хв при кімнатній температурі і центрифугували при 1000об/хв 2хв. Потім суспензію повільно розводили середовищем DMEM без сироватки до об'єму 50мл. До суспензії додавали 3мл ETC. Клітини після зливання осаджували при 1000об/хв 15хв. Надосад відсмоктували, а осад обережно ресуспендували у повному ростовому середовищі DMEM з 15% ETC і 50мкг/мл гентаміцину. Концентрацію клітин доводили до $(1-2) \times 10^6$ /мл і вносили в 96-лункові планшети по 100мкл на лунку.

Приклад 2. Зберігання гібридом у рідкому азоті.

Для зберігання гібридом-продуцентів використовували кріосередовище, що містить 5% ДМСО, 50% ETC та 45% DMEM.

В одну ампулу вносили від 10^5 до 2×10^6 клітин, які суспендували в 1мл кріосередовища, шляхом змивання моношару з 1-2 лунок 24-лункового планшету. Потім ампули поміщали в контейнер із теплоізоляційного матеріалу і повільно охолоджували до мінус 70°C . На другу добу ампули переносили в резервуар з рідким азотом. Таким чином, кріоконсервацію проводили по двоетапній схемі.

Приклад 3. Клонування гібридом.

Гібридами клонували методом лімітувальних розведень [5]. Суть його полягає у поступовому розведенні клітинної суспензії, поки концентрація не досягне однієї або менше клітин на лунку. Клонування проводили на 96-лункових плашках, на які попередньо вносили фідер із перитонеальних макрофагів по 100мкл на лунку.

Із суспензії гібридом відбирали об'єм від 1 до 10мкл, у залежності від вихідної концентрації клітин, і розводили до 3мл повним ростовим середовищем. Розносили по 100мкл на 1/4 частину плашки. Потім ще тричі повторювали розведення до заповнення всієї плашки. Таким чином, сумарний об'єм середовища в лунках становив 200мкл. У результаті отримували чотири різні концентрації клітин. У якомусь із розведень обов'язково росли ізольовані клони, які після тестування, пересаджували або знову клонували.

Приклад 4. Одержання асцитичної рідини.

Для накопичення значної кількості МКAT гібридами культивували у черевних порожнинах мишей. Для цього за 10-14 днів до ін'єкції клітин мишам вводили внутрішньочеревно по 0,5мл пристану. Мінеральне масло слугувало сильним стимулятором асцитотворення. Потім вводили від 2×10^6 до 10^7 гібридом в 1мл середовища. Через 5-8 днів у мишей починала накопичуватися рідина в черевній порожнині. Її відбирали шляхом проколювання черевної стінки товстою голкою. З однієї миші за кілька разів вдавалося отримати від 5 до 10мл асцитичної рідини. Після

центрифугування при 3000об/хв. протягом 5 хвилин асцит зберігали в замороженому стані.

Літературні посилання:

1. Shao Z., Xu D., Li J. et al. Detection of anti-HAV antibody with dot immunoglobulin filtration assay// World J. Gastroenterol. - 2003. - Vol.9. - P.1508-1511.

2. Ramskill S., Senior P., Barlow P. et al. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for cytomegalovirus antibody in donor plasma// J. Clin. Pathol. - 1988. - Vol.41. - P.1233-1235.

3. Ніколаєнко І.В. Отримання та порівняльний аналіз гібридом - продуцентів моноклональних антитіл, що диференціюють вакцинні та вірулентні поліовіруси I, II та III типів: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Київ, 1999. - 18с.

4. Широбоков В.П., Ніколаєнко І.В., Копаниця Л.В. та ін. Панель моноклональних антитіл для внутрішньотипової диференціації поліовірусів II типу// Мікробіол. журн. - 1997. - №6. - С.27-35.

5. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. - San Diego: Academic press, 1996. - 492p.