



УКРАЇНА

(19) UA (11) 26767 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА ДО IGG ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, ПРИДАТНІ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ІМУНОФЕРМЕНТНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

1

2

(21) u200704445

(22) 23.04.2007

(24) 10.10.2007

(72) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA(73) НІКОЛАЄНКО ІГОР ВАСИЛЬОВИЧ, UA,
ГАЛКІН ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ, UA

(56)

(57) Моноклональні антитіла до IgG великої
рогатої худоби, придатні для використання у

імуноферментних тест-системах, належать до класу імуноглобулінів миші, продукуються гібридомами, які одержані внаслідок хімічно індукованої гібридизації імунокомпетентних В-лімфоцитів та мієломи Sp 2/0, які отримані за довгостроковою схемою імунізації мишей лінії BALB/c, характеризуються високими константою афінності, титром у культуральній рідині та титром пероксидазного кон'югату.

Корисна модель стосується імунохімії, гібридомної технології та біотехнології і може бути використаний для одержання моноклональних антитіл (МКАТ) до імуноглобулінів класу IgG великої рогатої худоби (ВРХ) та їхніх імуноферментних кон'югатів. Метою корисної моделі є одержання нових моноклональних антитіл до IgG ВРХ, придатних для використання у імуноферментних тест-системах.

Відомі МКАТ до імуноглобулінів класу IgG ВРХ [1]. Проте згадані моноклональні антитіла направлені до підкласів імуноглобулінів класу IgG великої рогатої худоби і непридатні для використання у імуноферментних тест-системах для серологічної діагностики.

Найбільш близьким до запропонованих є моноклональні антитіла, які взаємодіють із IgG ВРХ [2].

У порівнянні із вищезгаданим антитілами клони 83A3, 87B1 характеризуються більшою специфічністю та активністю у імуноферментному аналізі.

Моноклональні антитіла продукуються гібридними клітинами, що одержані при злитті мієломних мишачих клітин Sp 2/0 та спленоцитів мишей лінії Balb/c. Клоні МКАТ 83A3, 87B1 характеризуються наступними ознаками (таблиця 1).

Таблиця 1

Назва МКАТ	Ізотип	Константа афінності, $\times 10^{10}$ моль/л	Титр антитіл у культуральній рідині*
83A3	IgG ₁	5,0	1:600
87B1	IgG _{2b}	4,0	1:1000

*тестування у непрямому твердофазному ІФА на IgG ВРХ (сорбція 2мкг/мл)

Приклад 1. Одержання асцитичної рідини із вмістом моноклональних антитіл 83A3, 87B1

Черевину миші Balb/c обробляли спиртом та внутрішньочеревне вводили по 0,5мл пристану (Sigma, США, кат. номер T7640) за допомогою стерильного скляного шприца на 1мл або 2мл; використовували стерильні голки «Рекорд» 0,5 x 10-15мм. Мишей витримували 3-4 тижні. Процедуру праймування проводили у гумових рукавичках.

Кріопробірки з замороженими клітинами клонів 83A3, 87B 1 діставали з судини Дюара із рідким азотом, витримували на повітрі 2-3 хвилини та занурювали у воду із температурою 37-40°C. Пробірки витримували у воді до тих пір, поки повністю розтане лід. Після цього за допомогою піпетки на 1мл суспензії гібридом переносили у пробірки на 15мл (Nunc, кат. номер 366060), повільно додавали 10-15мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер D 5648) без сироватки. Центрифугували при 1300 об/хв. протягом 3 хв.

(13) U

(11) 26767

(19) UA

Надосад видаляли, а осад клітин ресуспендували у 10мл середовища DMEM (Sigma, США, кат. номер D 5648) без сироватки. Суспензію переносили у "пеніциліновий" флакон та закривали пробкою.

Суспензію клітин перемішували та набирали у стерильний шприц по 1мл, вводили у черевну порожнину мишей (справа або зліва від серединної лінії на 1 см нижче від реберної дуги), яка за 3-4 тижні до цього була праймована пристанем. Мишей залишали на 5-10 днів для накопичення у черевній порожнині асцитичної рідини.

Дану процедуру проводили у гумових рукавичках.

Через 5-10 днів після введення мишам суспензій гібридом 83A3, 87B 1 у очеревинних порожнинах спостерігалось накопичення асцитичних рідин. Для її відбору використовували трубку спеціальної голки довжиною 4 см. Голки стерилізували шляхом обробки етиловим спиртом (70%) протягом 10 хв. Черевину миші обробляли спиртом та робили голкою прокол справа або зліва від серединної лінії на 1 см нижче від реберної дуги, відбирали асцитичну рідину у пробірку на 15мл (Nunc, кат. номер 366060). Після відбору рідини місце проколу обробляли спиртовим розчином йоду та на 1 хв. затискали пінцетом. Повторний підбір асцитичної рідини проводили через 2-3 дні. Процедуру відбору асциту проводили доти, доки тварина залишалася живою. У середньому одна миша здатна дати 2-5мл асциту за один відбір. Асцитичну рідину центрифугували у пробірці на 15мл (Nunc, кат. номер 366060) при 5000 об/хв. упродовж 5 хв. Відбирали освітлену фракцію та зберігали у флаконах при мініус 20°C.

Процедуру відбору асциту проводили у гумових рукавичках.

Приклад 2. Виділення та очистка моноклональних антитіл 83A3, 87B1

Розморожували асцитичну рідину із вмістом моноклональних антитіл 83A3, 87B1 та переносили її у центрифужну пробірку на 15мл. Пробірку поміщали у нагріту до 37°C воду на 10 хвилин. Зважували сульфат натрію в кількості, потрібній для 18%-го насичення (вага на об'єм) асцитичної рідини, всипали у пробірку з асцитом та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням в осад МКАТ. Пробірку центрифугували при 10000об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 5мл деіонізованої води. Пробірку поміщали у нагріту до 45-50°C воду на 5 хвилин.

Знову зважували сульфат натрію у кількості, потрібній для 16%-го насичення (вага на об'єм) розчину антитіл, всипали у пробірку та старанно струшували до розчинення сульфату натрію. Спостерігали помутніння, зумовлене випадінням антитіл в осад. Пробірку центрифугували при 10000 об./хв впродовж 5 хвилин у кутовому роторі. Після чого надосад видаляли, а осад антитіл розводили у 2-3мл деіонізованої води.

Одержаний розчин МКАТ фільтрували через фільтри з порами 0,22мкм.

Для переведення МКАТ у фосфатний буфер використовували 0,02М фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) та колонку 1,5 x 20см з сефадексом G-25 зрівноважену фосфатним буфером. МКАТ, одержані раніше, в об'ємі 2-3мл наносили на гель, після поглинання розчину гелем наносили такий же об'єм буферу. Після поглинання гелем буферу колонку заповнювали фосфатним буфером доверху, вставляли адаптер та проводять елюцію фосфатним буфером із швидкістю 2мл/хв. Вихід піку реєстрували при 280нм. Збирали фракцію МКАТ в окремий флакон, додавали 1% 10%-ого азиду натрію та зберігали при плюс 4°C до 6 місяців.

Приклад 3. Спосіб одержання кон'югату моноклональних антитіл 83A3, 87B1 з пероксидазою хрому

Кон'югацію МКАТ з пероксидазою хрому здійснювали у співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 (масові долі) методом періодатного окислення за Tijssen [3] із власними модифікаціями.

При окисненні пероксидазу хрому розчиняли у 0,1М бікарбонатному буфері до концентрації 15мг/мл та додавали такий же об'єм 14мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Одержаний таким чином розчин активованої пероксидази додавали до розчину антитіл, які попередньо діалізували проти 0,1М карбонатного розчину, рН 9,2. Суміш переносили у герметичну хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G25, інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі.

По закінченні інкубації, розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємні частини водного розчину NaBH₄ (5мг/мл), залишаючи на 30хв. при кімнатній температурі. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60хв. Одержаний розчин пероксидазного кон'югату МКАТ переводили у 0,02М фосфатний буфер з 0,15М NaCl шляхом діалізу.

Приклад 4. Використання кон'югату моноклональних антитіл 83A3, 87B1 з пероксидазою хрому у тест-системах для діагностики лейкозу, бруцельозу, туберкульозу та лептоспірозу у великої рогатої худоби

У лунки імуносорбенту вносили розчин для розведення сироваток (80мкл) та досліджувані сироватки чи молоко ВРХ (20мкл). Планшет інкубували при 37°C упродовж 60 хвилин та відмивали фосфатно-сольовим буфером з детергентом (ФСБД) 4 рази. Далі в лунки вносили по 100мкл розчину кон'югату моноклональних антитіл (згідно таблиці 2) та інкубували при 37°C упродовж 30 хвилин.

Таблиця 2

Призначення тест-системи	МКАТ у складі кон'югату
--------------------------	-------------------------

Виявлення антитіл до <i>Brucella abortus</i> у сироватці крові великої рогатої худоби	87B1
Виявлення антитіл до <i>Brucella abortus</i> у молоці корів	
Виявлення антитіл до <i>Mycobacterium bovis</i> у сироватці крові великої рогатої худоби	
Виявлення антитіл до <i>Leptospira interrogans</i> у сироватці крові великої рогатої худоби	
Виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби	83A3

Далі в лунки вносили по 100мкл розчину хромогену - 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину - й інкубували при 18-25°C в темному місті протягом 30 хвилин, після чого реакцію зупиняли внесенням у всі лунки по 100мкл стоп-реагенту. Через 5 хвилин після зупинення реакції визначали оптичну густину при 450нм/620нм.

Джерела інформації:

1. Saegermana C., De Waeleb L., Gilsonb D. et al. Evaluation of three semm i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis // *Veterinary Microbiology*. - 2004. - Vol. 100, 1-2. -P. 91-105.
2. Kittelbergera R., Reichela M., Meynella R. et al. Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing // *Journal of Virological Methods*. - 1999. - Vol. 77, 1. - P. 109 - 114.
3. Tijssen P. Preparation of enzyme-antibody or enzyme-macromolecule conjugates // *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: practice and theory of enzyme immunoassays* / Editors R.H. Burdon, P.H. van Knippenberg. - Amsterdam: Elsevier, 1985. - P. 221-241.