

С. Сейфуллиннің 125 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 15: Жастар, ғылым, технологиялар: жаңа идеялар мен перспективалар» атты халықаралық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии - новые идеи и перспективы», приуроченной к 125 летию С. Сейфуллина. - 2019. - Т.І, Ч.1 - С.133-136

ГИБРИДИЗАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОВ С НОВЫМИ ХОЗЯЙСТВЕННО - ПОЛЕЗНЫМИ СВОЙСТВАМИ

¹*Пак София,*

²*Тулепбергенова Д.С., ²Мухам М.Б.*

г. Нур-Султан, Назарбаев интеллектуальная школа физико-математического направления¹

г. Нур-Султан, Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина²

В настоящее время, наиболее перспективным направлением клеточной инженерии является гибридная технология [1]. Гибридные клетки (гибридомы) образуются в результате слияния клеток с различными генетическими программами. Работы по получению новых моноклональных антител (МКА) в целях создания на их основе лекарственных и диагностических средств очень перспективны. Они позволят вывести практическую медицину на качественно новый уровень. Гибридная технология стала прорывом в разработке препаратов для лечения злокачественных новообразований, вирусных, аутоиммунных и многих других заболеваний. Терапия с помощью МКА эффективна, очень специфична, т.е. нацелена только на определенный патологический механизм, являющийся причиной заболевания, и, следовательно, сравнительно безопасна. Уже сегодня 20% разрабатываемых биофармацевтических препаратов являются продуктами гибридной технологии [2,3,4].

Примером достижения данной технологии являются гибридомы, полученные в результате слияния нормальных лимфоцитов и миеломных клеток, в результате гибридные клетки приобретают свойства обеих родительских клеток: бессмертие и способность секретировать огромное количество какого-либо одного антитела определенного типа. Эти работы имели огромное значение и открыли новую эру в экспериментальной иммунологии. Моноклональные антитела высокоспецифичны, они направлены против одной антигенной детерминанты, это позволяет использовать их в разработке современных тестов для диагностики болезней человека и животных [5,6,7,8].

Целью работы является гибридизация В-лимфоцитов иммунной мыши с миеломными клетками для получения гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к эпитопам AflatoxinaB1.

Полученные лимфоциты отмывали от эритроцитов и другого балласта путем центрифугирования, затем подсчитывали количество клеток в камере Горяева. При подсчете, количество лимфоцитов, продуцирующих иммуноглобулины к афлатоксину В₁, составило $30 \cdot 10^6$. Этого количества вполне достаточно, поскольку для одного слияния с миеломными клетками требуется примерно $20 \cdot 10^6$ лимфоцитов.

Гибридизацию клеток проводили путем слияния миеломной линии клеток X-63 – Ag 8.653с В-лимфоцитами иммунизированных мышей линии *Balb/c*. Для этого со дна культурального матраса смывали миеломные клетки находящиеся в фазе геометрической прогрессии роста, и переносили в центрифужную пробирку. Центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин, супернатант удаляли осадок ресуспендировали в 5 мл теплой неполной питательной среды. Количество миеломных клеток составило 4 млн. в 5 мл, клетки центрифугировали, осадок ресуспендировали в 5 мл неполной среды. Количество В-лимфоцитов составило 80 млн. в 5 мл. Для проведения слияния использовали половину объема суспензии В-лимфоцитов, к которому добавили суспензию миеломных клеток. Таким образом, было получено соотношение 1:10 миеломных клеток к В-лимфоцитам соответственно.

В качестве сливающего агента использовали ПЭГ 4000 содержащего в своем составе 10 % диметилсульфоксида (ДМСО), 1 мл которого вносили в течение 1 мин и затем выдерживали 30 сек., следом в течение 1 мин внесли 10 мл неполной среды и инкубировали в течение 10 мин в CO₂ – инкубаторе при температуре 37°C.

Суспензию слившихся клеток по 0,1 мл разлили в 96-ти луночные планшеты и поместили в CO₂-инкубатор при температуре 37°C в атмосфере с 5%. По истечению 24-х часов проводили внесение в лунки планшетов селективной среды «ГАТ», которая обеспечивает рост только гибридных клеток и позволяет избавиться от неслившихся миеломных клеток, которые не могут адаптироваться к этим условиям. На 7 день после слияния производили замену среды на селективную среду ГТ замену, которой на полную среду произвели на 14 день после слияния. На 14-й день после слияния при просмотре лунок планшет было обнаружено несколько колонии гибридных клеток.

В дальнейшем проводили скрининг культуральной жидкости в непрямом варианте ИФА для выявления гибридных клеток продуцирующих антитела к антигену Афлатоксину В₁.

На 17 день после гибридизации было обнаружено 13 гибридных клонов. В лунки планшетов, из которых была отобрана культуральная среда для тестирования, добавляли равное количество полной ростовой среды. Далее культивирование клеток проводили только на полной ростовой среде, включающей в свой состав 10%-ную фетальную сыворотку. Тестирование гибридом на антительную продуктивность начинали проводить, когда наблюдалось незначительное пожелтение ростовой среды и клетки гибридом занимали более 30% поверхности лунок планшета.

Культуральную жидкость из лунок, в которых зафиксирован рост гибридных клеток, тестировали в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антивидового конъюгата на наличие специфических антител к исходному антигену. Сенсибилизировали 96-луночный планшет антигеном в концентрации 10 мкг/ и инкубировали 14-16 часов при 4°C. После этого отмывали планшет PBS с твином (Tw). Блокировали 1% БСА свободные участки и инкубировали 1 час 37°C. После отмывки вносили культуральную жидкость гибридных клеток, инкубировали 1 час при 37°C. Затем отмывали и вносили антивидовой конъюгат *anti-Mouse IgG* в рабочем разведении 1: 5000, инкубировали в течении 1 часа при 37°C.

На следующем этапе постановки ИФА после отмывки вносили субстрат ТМБ (тетраметилбензидин), после появления окраски реакцию останавливали (0,05 М серная кислота) и учитывали результат с помощью спектрофотометра STAT FAX 2100 с длиной волны 450 нм.

В результате постановки ИФА было выявлено, что из образовавшихся 13-ти гибридных клон, способность продуцировать антитела заданной специфичности имеют 2 клон: 1G8 и 3D7.

Таблица 1 – Результаты гибридизации миеломных клеток и В-лимфоцитов

Кол-во гибридизаций	Кол-во засеянных лунок	Количество образовавшихся клонов	%-ное соотношение	Положительные клоны	% от общего кол-ва
1	384	13	3,38 %	2 1G8, 3D7	0,52 %

Как видно из таблицы 1, при гибридизации иммунных спленоцитов с клетками миеломной линии на 17-е сутки было выявлено 13 гибридных клонов, что составляет 3,38% от общего количества потенциально возможного образования клонов, 2 из которых продуцировали специфические антитела к исходному антигену.

Таким образом, в результате слияния В-лимфоцитов и миеломных клеток удалось получить 2 клон гибридных клеток, продуцирующих специфические антитела (МКА) к антигену Афлатоксина В₁. Полученные моноклональные антитела могут быть использованы при конструировании экспресс-тестов для выявления афлатоксинов В₁ в кормах и пищевых продуктах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алмагамбетов, К. Х. Биотехнология. – Астана, 2011. – С. 24-26
2. Моноклональные антитела – новое направление современной фармакотерапии [Электронный ресурс] // medconfer.com. URL: <https://medconfer.com/node/4265>

3. Моноклональные антитела в терапии онкологических заболеваний [Электронный ресурс] // scienceforum.ru. URL: <https://www.scienceforum.ru/2018/3092/4880>

4. Kenneett R., Mckearn T., Bechtol K. Monoclonal antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analyses. – New York, 1981. – P. 13-15

5. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела. Использование в диагностике заболеваний и лечебные моноклональные антитела. – Тверь, 2012. – С. 4-5

6. Вечканов Е.М., Сорокина И.А. Основы клеточной инженерии: Учебное пособие. – Ростов-на-Дону, 2012. – С. 38

7. Kalinichenko A.A., Panina A.A., Aliev T.K., Shemchukova O.B., Solopova O.N., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Structure of the antibodies against aflatoxins. FEBS Journal V. 275 (1), p. 406 (Abstracts of 33d FEBS Congress, Athens, 28 June – 4 July 2008)

8. Боровиков С.Н., Сыздыкова А.С. Получение штаммов-продуцентов моноклональных антител к антигенам *Campylobacter jejuni*. // Вестник государственного университета им. Шакарима города Семей. – Семей, № 2 (82) /2018. – С.133-137

Научный руководитель: Боровиков С.Н., к.б.н., и.о. профессора