

«Сейфуллин оқулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - С. 174-176

ГИБРИДИЗАЦИЯ ИММУНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ С КЛЕТКАМИ МИЕЛОМЫ ЛИНИИ SP2/O-Ag14

*Искакова И.Т. докторант PhD 2 курса
Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, г. Нур-Султан*

Получение гибридных клеточных линий путем слияния спленоцитов иммунизированных мышей с бессмертными клетками миеломы является общепризнанным методом получения моноклональных антител. Хотя в качестве эффективной альтернативы для получения моноклональных антител появились другие методы, использование гибридной технологии остается жизнеспособным методом, доступным для широкого круга лабораторий, выполняющих базовые клеточные биологические исследования. Гибридная технология представляет собой относительно простую процедуру с минимальными затратами для непрерывного производства нативных цельных иммуноглобулинов [1]. Для получения моноклональных антител В-клетки удаляют из селезенки животного, которое было иммунизировано соответствующим антигеном. Затем эти В-клетки сливают с опухолевыми клетками миеломы, которые могут неограниченно расти в культуре[2,3]. Это слияние осуществляется за счет повышения проницаемости клеточных мембран. Слитые гибридные клетки (называемые гибридомами), быстро и бесконечно размножаются и будут продуцировать большое количество желаемых антител. Их необходимо отбирать и впоследствии клонировать путем лимитирующих разведений[4,5].

Целью нашей работы являлась гибридизация иммунных спленоцитов с клетками миеломы линии SP2/O-Ag14 для получения гибридных клеток продуцирующих моноклональные антитела к рекомбинантному гликопротеину PAG3. В качестве иммуногена использовали рекомбинантный антиген PAG3 экспрессированный плазмидой pRSET-Tx-PAG3. Для иммунизации мышей линии Balb/c использовали очищенный растворимый белок. В результате тестирования сывороток крови иммунных мышей было определено, что использованный рекомбинантный гликопротеин PAG3 обладает достаточной степенью антигенности, стимулируют иммунную систему животных, титры специфических антител в ИФА при этом составили 1:12800-1-25600, что указывает на активную индукцию клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности.

Перед слиянием ампулы с клетками миеломы из жидкого азота переносили в водяную баню на 37⁰С. Содержимое ампулы переносили в центри-

					ноци- там			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	PAG 3	1/2560 0	12x10 ⁶	96 x10 ⁶	1:8	384	200	40

Как видно из таблицы 1 при гибридизации иммунных спленоцитов с клетками миеломной линии SP2/O-Ag14, количество миеломных клеток составляло 12×10^6 , а количество спленоцитов 96×10^6 , что составляет 1:8.

Формирование штаммов гибридом происходило в течение двух недель. Контроль роста проводили путем просмотра культур под инвертированным микроскопом. Тестирование культуральной жидкости клонов методом ИФА на наличие специфических антител начинали проводить с момента, когда наблюдалось незначительное пожелтение среды и гибридные клетки занимали более 30 % поверхности лунок. Для дальнейшей работы был отобран. Результаты исследований показали, что субклоны гибридомы 4F8 стабильно продуцировали антитела целевой специфичности. Оптическая плотность стабильно регистрировалась в пределах 0,9-1,2. Для дальнейшей работы был отобран субклон с наибольшей оптической плотностью в ИФА (4F8D8).

Таким образом, в результате проведенных исследований получен штамм гибридных клеток с авторским названием 4F8, который стабильно продуцировал специфические антитела к исходному антигену PAG3 в высоких титрах.

Список использованной литературы:

1 Kohler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [Текст] /Kohler G, Milstein C. // Nature,1975. 256:495–497

2 Kohler G. Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines [Текст] /Kohler G, Howe SC, Milstein C. // Eur J Immunol,1976. 6:292–295

3 Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus [Текст] / Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. // Nat Med. 2004. 10:871–875.

4 Yu X. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies [Текст] /Yu X, McGraw PA, House FS, Crowe JE, Jr. // J Immunol Methods. 2008. 336:142–151.

5 Karpas A. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies [Текст] /Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH. // Proc Natl Acad Sci USA. 2001. 98:1799–1804.

6 Gorny MK. Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1 [Текст]

/Gorny MK, Wang XH, Williams C, Volsky B, Revesz K, Witover B, Burda S, Urbanski M, Nyambi P, Krachmarov C, Pinter A, Zolla-Pazner S, Nadas A. // Mol Immunol. 2009. 46:917–926.