

«М.А. Гендельманның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- С.192-195.

УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЭПИТОПАМ АНТИГЕНОВ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

*Жахина А. А., докторант 2 курс
Алпысбай студент 4 курса
Боровиков С.Н., к.б.н., и.о. профессора
Казахский агротехнический исследовательский
университет им С.Сейфуллина, г. Астана.*

Кампилобактериоз является актуальной проблемой в связи с широким распространением, интенсивной циркуляцией возбудителей и высокими показателями заболеваемости среди животных и людей [1,2]. Учитывая огромную распространенность в природе бактерий рода *Campylobacter* и разнообразие источников их выделения, большое внимание в наше время уделяется частоте обнаружения и ранней диагностике этих микроорганизмов в различных объектах, в том числе при производстве пищевых продуктов. Бактерии рода *Campylobacter* все чаще регистрируются в качестве этиологического агента при обширных вспышках заболеваний, обусловленных потреблением недоброкачественной пищи и воды, а также в спорадических случаях бактериальных гастроэнтеритов и диарей [3]. Большое значение в возникновении пищевых инфекций имеют *Campylobacter jejuni* [4]. Степень бактерионосительства у сельскохозяйственных животных и домашней птицы очень велика и может достигать 90%. Установлено, что бактерии *C. jejuni* очень чувствительны к неблагоприятным условиям внешней среды и требовательны к условиям культивирования.

Избирательные свойства культивирования *C. jejuni* приводят к затруднениям при бактериологических методах диагностики заболевания.

Применение экспресс методов для обнаружения *C. jejuni* позволяет в короткие сроки диагностировать заболевание, а также является бюджетным вариантом т.к. его применения не требует дорогостоящего лабораторного оборудования и специально обученного персонала. Например, использование ИХА-теста актуально в силу того, что может применяться в полевых условиях, на фермах, а также при исследованиях продуктов животного происхождения на перерабатывающих предприятиях [5,6].

Иммунохроматографические (ИХА) тесты – это современный метод экспресс-диагностики болезней человека и животных. Внедрение иммунохроматографических тестов в ветеринарную практику позволит

сократить время анализа до 5-15 минут и получать результаты с высокой достоверностью [7].

При конструировании ИХА теста одним из важнейших компонентов являются моноклональные антитела, специфичные к исследуемому антигену или антителу, конъюгированные ("сшитые") с коллоидным золотом - маркером, который можно легко идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Эти антитела нанесены вблизи участка погружения тест-полоски в исследуемую физиологическую жидкость [8].

От качества моноклональных антител зависит чувствительность и специфичность ИХА - теста.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы является получение моноклональных антител к эпитопам антигенов *C. jejuni*.

Материалы и методы. В работе были использованы рекомбинантные антигены *C. jejuni* МОР32 и ОР18 полученные в лаборатории иммунохимии ТОО «Национальный центр биотехнологии» МЗ РК, полный и неполный адьюванты Фрейда, забуференный физиологический раствор (ЗФР), мыши линии Balb/c, миеломная линия клеток X63Ag8.653, ПЭГ 4000, среда для культивирования RPMI 1640 Medium (Sigma-aldrich), фетальная сыворотка плода (ThermoScientific).

Гибридизацию клеток миелом с клетками иммунных спленоцитов проводили по методу Oi V. & Herzenberg L. [9]. Тестирование культуральной жидкости проводили методом непрямого варианта ИФА.

Иммунизацию линейных мышей проводили путем внутрибрюшинного введения антигенов в дозе 0,1мл на голову с концентрацией белка 25 мкг/мл. Иммунизацию мышей проводили по короткой схеме, включающей в себя пятикратное парентеральное введение препарата с полным и неполным адьювантами Фрейда в 1 и 7 день иммунизации соответственно и с забуференным физиологическим раствором на 11, 12, и 13 дни иммунизации. На 17-ый день после начала иммунизации проводили отбор сывороток крови для тестирования.

Тестирование в иммуноферментном анализе проводили по стандартной методике. Сенсibilизацию лунок планшетов проводили рекомбинантными белками МОР32 и ОР18 в концентрации 0,001 мг/мл и инкубировали в течение 14 часов при 4°C. По результатам тестирования было выявлено, что в ответ на введение рекомбинантных белков в организме у подопытных животных выработались антитела заданной специфичности. При этом максимальные титры специфических антител составляли 1:25 600 и 1:12 800, соответственно. Высокие титры антител у иммунизированных животных позволили начать работу по гибридизации иммунных спленоцитов с миеломной линией клеток X63Ag8.653.

Выделение иммунных спленоцитов проводили в условиях ламинарного бокса, путем вымывания В-лимфоцитов методом перфузии из селезенки иммунизированных мышей. Подсчет клеток производили в камере Горяева.

Клетки миелом Х63Ag8.653 извлекали из жидкого азота, размораживали, культивировали на питательной среде, затем смывали со дна культурального матрица и подсчитывали в камере Горяева.

Гибридизацию (слияние) клеток миелом и В-лимфоцитов проводили в присутствии ПЭГ 4000, соотношение клеток составляло 1:10 соответственно. После гибридизации суспензию клеток по 0,1 мл разносили в лунки 96-ти луночных планшетов для культивирования. Лунки планшетов предварительно покрывали клетками перитонеальных макрофагов, которые являются питающим слоем. Планшеты помещали в СО₂-инкубатор с постоянным присутствием 5 % углекислого газа при температуре 37°C. Через 24 часа после гибридизации вносили селективную среду «НАТ» (Sigma), на 7 сутки проводили замену селективной среды на «НТ».

Скрининг роста гибридных клеток и определение их физиологического состояния осуществляли путем ежедневного просмотра планшетов под инвертированным микроскопом «*Micros*» рисунок 1.

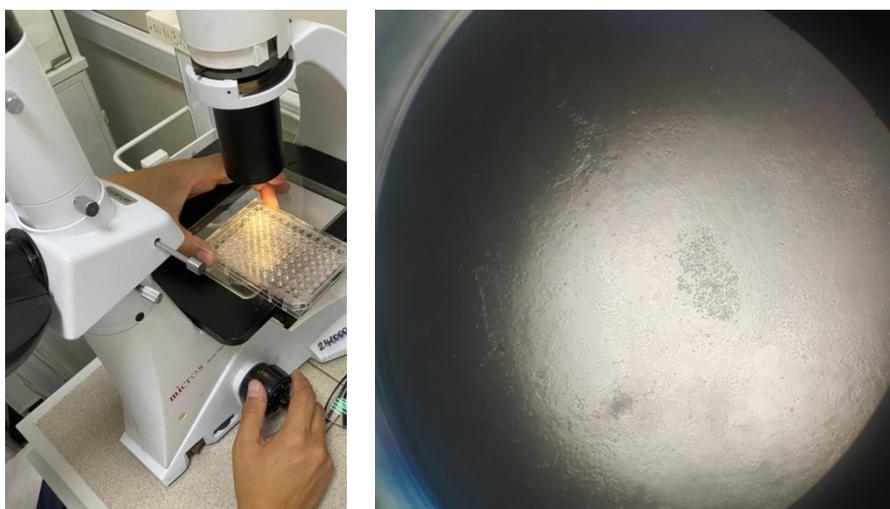


Рисунок 1 – Скрининг роста гибридных клеток

В результате просмотра под микроскопом, на 10 день после проведения гибридизации было обнаружено пять гибридных клонов. Далее, в более поздние сроки, клоны продолжали появляться, максимальное количество клонов было зафиксировано на 19-е сутки. Динамика клонообразования в зависимости от срока культивирования представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Динамика клонообразования в зависимости от сроков культивирования

Количество суток после гибридизации	Выход клонов, %	
	Количество клонов	% - от общего количества
10-е сутки	5	1,3
15-е сутки	37	9,6

19-е сутки	63	16,4
------------	----	------

Культуральную жидкость из лунок, в которых зафиксирован рост гибридных клеток, тестировали в ИФА на наличие специфических антител к исходному антигену. 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.

Всего на 19-е сутки было выявлено 63 гибридных клон, что составляет 16,4% от общего количества потенциально возможного образования клонов. При тестировании выявлено восемнадцать гибридных клонов, продуцирующих специфические иммуноглобулины к рекомбинантным белкам МОРР 32 (4,7%).

Таким образом, в результате слияния клеток Х63Аg8.653 с клетками иммунных спленоцитов мышей, получено 18 гибридных клонов, продуцирующих специфические иммуноглобулины к рекомбинантным белкам МОРР 32. Проведен отбор и культивирование положительных клонов.

Список литературы

- 1 European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trend sandsources of zoonoses, zoonoticagents and foodborne outbreaks in 2014 [Текст]/EFSA J. -2015. -Vol. 13, -N 12.
- 2 World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015[Текст]/ ISBN 978-92-4-156516-5. URL: www.who.int
- 3 Nachamkin I., Campylobacter infections [Text]/ Nachamkin I., Guerry P., Foodborne Pathogens. Microbiology and Molecular Biology. Caister Academic Press, -2005.- P. -285–293.
- 4 Vidal A.B., Ridley A. et al. Epidemiology and control of Campylobacter in modern broiler production [Text]/ Vidal A.B., Davies R.H., Rodgers J.D.,*Campylobacter* Ecology and Evolution ed. S.K. Sheppard.- Caister Academic Press,- 2014.
- 5 Булахов А.В., Обнаружение бактерий рода *Campylobacter* в птицепродуктах с помощью метода полимеразной цепной реакции [Текст]/ Булахов А.В., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. , Вопр. питания. -2010. -Т. 79, -№ 3.- С. 24–29.
- 6 Humphrey T., *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective [Text]/ Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. ,Int. J. Food Microbiol. -2007. -Vol. 117, -N 3. P.- 237–257.

7 Шевелева С.А., Изучение загрязненности пищевых продуктов бактериями рода *Campylobacter* [Текст]/ Шевелева С.А., Шурышева Ж.Н., Пискарева И.И., Вопр. питания. 2006. № 6. С. 38–43.

8 EFSA. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Pt A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates [Text]/ EFSA J. -2010. -Vol. 8.- P.- 1–99.

9 Oi V., Herzenberg L. Immunoglobulin – producing hybrid cell lines. Selected methods in cellular immunology [Text] /Oi V., Ed. By.Mishell B and Shiigi. – San Francisco. – 1980. – P.-351-352