

**А**нтитела 1

**М**етоды

# **ANTIBODIES**

**Volume 1**

---

## **A PRACTICAL APPROACH**

**Edited by D. Catty**

**Department of Immunology, University of Birmingham Medical  
School, Vincent Drive, Birmingham B15, 2TJ, UK**

**IRL Press  
Oxford • Washington DC**

# Антитела

---

## Методы

Под ред. Д. Кэтти

Книга 1

Перевод с английского

В. Г. АБЛАМУНИЦА, Д. В. ВИНОГРАДОВА  
и канд. мед. наук Н. Ю. НЕСЫТОВОЙ

под редакцией

д-ра биол. наук О. В. РОХЛИНА



Москва «Мир» 1991

ББК 28.073  
А72  
УДК 616.097

**Авторы:** Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н. Р., Гордон Д.,  
Арвие Ж., Уильямс А. Ф.

**Антитела. Методы:** Кн. 1: Пер. с англ./Под ред. Д. Кэт-  
А72 ти. — М.: Мир, 1991. — 287 с., ил.

ISBN 5-03-002363-1

Книга английских авторов содержит последовательное, системати-  
зированное описание методов получения антител (моноклональные анти-  
тела человека и мыши, поликлональные антитела), их очистки и анализа.  
Книга относится к зарекомендовавшей себя серии издательства IRL  
Press.

Для молекулярных биологов, иммунологов и специалистов, разраба-  
тывающих радиоиммунологические и иммуноферментные методы опреде-  
ления.

А  $\frac{1902000000-180}{041(01)-91}$  90—91

ББК 28.073

*Редакция литературы по биологии*

ISBN 5-03-001762-3 (русск.)  
ISBN 5-03-002363-1  
ISBN 0-947946-86-1 (англ.)

© IRL Press Limited, 1988  
© перевод на русский язык, коллек-  
тив переводчиков, 1991

## ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Трудно найти область современной биологии, где бы ни использовались иммунологические и иммунохимические методы. От селекции безвирусных штаммов картофеля в сельском хозяйстве и до индивидуализации нейронов в нейробиологии — таков диапазон их применения. Однако это создает определенные трудности, связанные с недостаточным уровнем иммунохимической подготовки специалистов иных профилей.

В этой ситуации очень большое значение имеют хорошие теоретические и методические руководства. Настоящая книга (которая выходит в двух томах) относится к категории именно таких руководств. Она написана коллективом сотрудников отдела иммунологии медицинского колледжа Университета г. Бирмингем при участии сотрудников отдела клеточной иммунологии Оксфордского университета (Англия). Особенно ценным представляется то обстоятельство, что в книге обобщен собственный экспериментальный опыт авторов, и поэтому она представляет собой последовательное изложение основных методов получения поликлональных и моноклональных антител, характеристики антигенов и качественной и количественной оценки реакций антиген — антитело.

Привлекательной особенностью книги является то, что с одной стороны, в ней подробно изложены соответствующие методы, которые можно использовать в экспериментальной работе, не заглядывая в другие пособия, и, с другой — в каждой главе приведены необходимые теоретические пояснения, понятные (и необходимые) для неспециалистов. Наконец, четко указаны ограничения, присущие каждому методу.

Руководство безусловно будет полезно для широкого круга научных и практических работников в области биологии, медицины и сельского хозяйства.

*О. В. Рохлин*

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Книгой «Антитела. Методы», первый том которой вы держите в руках, издательство IRL Press продолжает свою чрезвычайно популярную серию руководств по биологии «Практические подходы», охватывая при этом область иммунологических исследований. Специфичность и антигенсвязывающие свойства антител используются в практике с начала нынешнего века, но за последние 20 лет популярность антител значительно возросла. Среди лабораторий, занимающихся изучением живых систем и биомолекул на физиологическом и биохимическом уровне, едва ли найдутся такие, где еще не оценили антитела и не поняли, что это самый удобный, а часто и незаменимый инструмент идентификации, количественной оценки и изучения структуры и биологических свойств различных молекул. Диапазон применения антител чрезвычайно широк: с их помощью изучают гормоны животных и растений, ферменты, клеточные рецепторы и маркеры дифференцировки, сывороточные белки, тканевые и клеточные антигены, опухолеспецифические, бактериальные и паразитарные антигены и др. Для того чтобы эффективно использовать антитела при решении столь широкого круга задач, необходимо обладать компетентностью в двух тесно связанных областях, а именно: уметь приготовить препараты высокоспецифичных антител с воспроизводимыми свойствами, а также выбрать и осуществить необходимый метод, основанный на использовании этих антител. В этой книге оба методологических аспекта сведены вместе. Она посвящена тому, как получить антитела, проверить их качество, а также как с ними работать. В ней собран богатейший опыт и глубокие знания нескольких моих коллег по отделу иммунологии в Бирмингеме; некоторые главы написаны специалистами из других центров.

Я надеюсь, что предлагаемое читателю двухтомное руководство будет полезно как желающим овладеть технологией получения поликлональных или моноклональных антител, так и более широкому кругу ученых, студентов и лаборантов, нуждающихся в методическом руководстве по использованию антител. Как это принято в серии «Методы», главы, расска-

зываются о тест-системах, основанных на применении анти-тел, написаны в стиле учебного руководства с целью оказать максимальную помощь исследователям в их повседневной лабораторной работе. В книге описаны три типа методов. Во-первых, это те, которые широко используются в повседневной практике, например реакции в гелях, гемагглютинация, иммуноферментный, радиоиммунологический анализы, иммунофлуоресценция, а также методы аффинной хроматографии. Во-вторых, речь пойдет о методах, применяющихся не так широко, но имеющих большое значение в клинической практике. Это — серотипирование эритроцитов и тканей, технология которых продолжает совершенствоваться. Наконец, читатель познакомится с методами, разработанными недавно, например флуоресцентной сортировкой клеток и использованием анти-тел для визуализации опухолей. Роль этих подходов в современной биологии и медицине постоянно возрастает, и они, без сомнения, имеют большое будущее.

*Д. Кэtti*

## **СПИСОК АВТОРОВ**

*J. Arvieux and A. F. Williams*

MRC Cellular Immunology Unit, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RE, UK.

*G. Brown, D. Catty, J. Gordon, N. R. Ling and C. Raykundalia*  
Department of Immunology, University of Birmingham Medical School, Vincent Drive, Birmingham B15 2TJ, UK.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ — антиген  
АТ — антитело  
БДБ — *бис*-диазотированный бензидин  
БГГ — бычий гамма-глобулин  
БГР — буфер для гемолитических реакций  
БСА — бычий сывороточный альбумин  
в/б — внутрибрюшинное введение  
в/в — внутривенное введение  
в/к — внутрикожное введение  
в/м — внутримышечное введение  
ВЭБ — вирус Эпштейна — Барр  
ГАТ — среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин  
ГГФРТ — гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза  
ГМФ — гемоцианин моллюска фиссуреллы  
ДАБ — диаминобензидин  
ДДГ — двойная диффузия в геле  
ДНФ — динитрофенил  
ДСН — додецилсульфат натрия  
ДСН-ЭПАГ — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия  
ДТТ — дитиотреитол  
ИЗЭФ — иммунопероксидазный тест  
ИПТ — изоэлектрофокусирование  
ИРМА — иммунорадиометрический анализ  
ИФА — иммуноферментный анализ  
ИФЛА — иммунофлуоресцентный анализ  
ИЗЭФ — иммуноэлектрофорез  
ЛПС — липополисахарид  
МАД — минимальная агглютинирующая доза  
МДП — мурамилдипептид  
МГДА — минимальная гемолитическая доза антител  
МКА — моноклональные антитела  
МКПК — моноклеарные клетки периферической крови  
МЭ — меркаптоэтанол  
НАФ — неполный адъювант Фрейнда

- ОРИД — обратная реакция радиальной иммунодиффузии  
ПАФ — полный адъювант Фрейнда  
ПГА — пассивная гемагглютинация  
п/к — подкожное введение  
ПХ — пероксидаза хрена  
ПЭГ — полиэтиленгликоль  
РИА — радиоиммунологический анализ  
РИД — радиальная иммунодиффузия в геле  
РСК — реакция связывания комплемента  
РТГА — реакция торможения гемагглютинации  
СПДП — N-сукцинимидил-3 (2-пиридилдитио) проприонат  
СПК — сыворотка плода коровы  
ТЕМЭД — тетраметилэтилендиамин  
ТНБС — тринитробензол (пикрил) сульфоновая кислота  
ТНФ — тринитрофенил  
ФМСФ — фенилметилсульфонилфторид  
ФР — физиологический раствор  
ЭБ — эритроциты барана  
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота  
BSS — сбалансированный солевой раствор (от англ. balanced salt solution)  
CNBr — бромистый циан  
DAB — физиологический буфер Дюльбекко АВ  
ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ  
H-RPMI — среда RPMI, содержащая Hepar  
Ig — иммуноглобулин  
PBS — фосфатный буферный раствор (от англ. phosphate buffered saline)  
PPD — очищенная белковая фракция туберкулина (от англ. purified protein derivative)

# ВВЕДЕНИЕ

Д. Кэтти

В 1890 г. фон Беринг и Китасато [1] изготовили бактериальные антитоксины и продемонстрировали их нейтрализующие свойства. Это открытие положило начало эпохе серологических исследований, замечательной своими достижениями. Были изучены свойства и роль антител и комплемента при бактериальных инфекциях, а также диагностическая ценность антисывороток при таких, например, заболеваниях, как брюшной тиф (реакция Видаля, 1896 г.) и сифилис (реакция Вассермана, 1906 г.). Успешно развивающаяся в настоящее время серодиагностика (область микробиологии) следует традициям этих первых открытий. Если антитела возникли как основное средство защиты от инфекций, можно было бы предположить, что их применение ограничится этой сферой и будет сведено к диагностике инфекционных заболеваний. Однако плодотворные исследования в других направлениях вскоре показали, что диапазон специфичности антител поистине безграничен, и их можно использовать не только для изучения антигенов микроорганизмов, но и для определения, выделения и количественной оценки огромного числа иммуногенных молекул. Иммуногенными, действительно, оказались в первую очередь наиболее сложные молекулы с мол. массой более 5000, чужеродные для иммунизируемых видов, однако в 1936 г. Ландштейнер [2] показал, что и молекулы меньших размеров (гаптены), конъюгированные с более крупным носителем, вызывают образование антител, обладающих необходимой специфичностью.

Иммунологический анализ как эмпирический метод изучения антигенов основывается на принципиальном понимании природы специфичности антител, а также количественного характера их взаимодействия с антигенами. В 1939 г. Гейдельбергер [4] показал, что способность антисывороток преципитировать растворимые антигены, описанная Краусом [3] еще в 1897 г. на примере культуральной жидкости *Vibrio cholerae*, представляет собой количественную реакцию. Гейдельбергер разработал принцип количественной оценки реакции преципитации и впервые получил чистый препарат антител. Преципитация антигена, лежащая в основе многих современных мето-

дов иммунологического анализа, — это результат поливалентной специфичности антисывороток. Антитела, содержащиеся в антисыворотке, связываются со множеством антигенных детерминант на поверхности сложных антигенов, при этом формируется пространственная решетка преципитата, который при соответствующем соотношении концентраций антигена и антитела выпадает в осадок. Несмотря на то что теоретические основы этой реакции были описаны Марраком [5] еще в 1938 г., ее использование в простых методах иммунологического анализа даже для изучения систем, содержащих один антиген, было невозможно до 1946 г., когда Оудин [6] показал, что диффузия антител и антигенов в жидкой фазе через поверхность раздела соприкасающихся агаровых гелей позволяет оценить относительные концентрации обоих компонентов реакции по расположению полос преципитации. Диффундируя навстречу друг другу, антиген и антитело формируют видимые комплексы в тех местах, где соотношение их концентраций оптимально для образования преципитата. Это технологическое достижение быстро привело к появлению метода двойной иммунодиффузии в геле, который был разработан в 1948 г. одновременно Елеком [7] и Ухтерлони [8]. Благодаря данному методу впервые появилась возможность определения антигенных взаимосвязей между молекулами, а также оценки специфичности антисывороток. В 1953 г. Грабар и Уильямс [9] разработали технологию иммуноэлектрофореза, а в 1965 г. Манчини, Карбонара и Хереманс [10] — метод количественной радиальной иммунодиффузии.

Принцип совмещения электрофоретической миграции антигена в агаре с его преципитацией под действием антител был развит в 1966 г. Лореллом [11], который разработал метод ракетного иммуноэлектрофореза для быстрой оценки количества индивидуальных антигенов в смеси с помощью моноспецифических антител, введенных в гель, а также двумерный (перекрестный) иммуноэлектрофорез, позволяющий оценить как качественный, так и количественный состав сложной смеси антигенов с помощью полиспецифических антисывороток.

Несмотря на то что методы преципитации в геле занимают значительное место в изучении и количественном определении антигенов, а также широко применяются для контроля специфичности и определения титра преципитирующих антител, предел чувствительности данных методов составляет около 5 мкг/мл, и их невозможно использовать для количественного определения антигенов небольшой мол. массы, которые образуют только нерастворимые комплексы. По этой причине возникла необходимость в разработке альтернативных методов количественного определения антигенов. В 1945 г. Кумбс и сотр.

[12] описали реакцию, при которой антисыворотка к иммуноглобулинам человека агглютинирует эритроциты, которые связали соответствующие иммуноглобулины. Помимо этой реакции, которая стала очень важным клиническим тестом (антиглобулиновый тест Кумбса), Кумбс также был первым, кто использовал эритроциты как индикаторную систему в иммунологическом анализе. Вскоре после разработки надежных способов присоединения антигена к мембране эритроцитов были найдены чувствительные методы на основе гемагглютинации, которые нашли очень широкое применение. Вслед за этим было показано, что обусловленная антителами агглютинация клеток, нагруженных антигеном, ингибируется в присутствии следовых количеств конкурирующего свободного антигена. Это наблюдение привело к созданию нового и очень чувствительного метода количественного определения антигенов в растворе. В дальнейшем были разработаны и другие методы, например реакция агглютинации эритроцитов, нагруженных антителами.

Следующий этап в истории создания чувствительных методов иммунологического анализа связан с открытием Фарром в 1958 г. [13] и Яллоу и Берсоном в 1960 г. [14] технологии меченя антигенов, антител и небольших пептидных гормонов радиоизотопами. Радиоиммунологический анализ позволил определять чрезвычайно малые концентрации (вплоть до пмоль/л) таких молекул, как инсулин, и выдвинул новые специальные требования к технологии получения антисывороток. Для иммунизации животных стали использоваться конъюгаты гаптен (гормонов) с молекулами-носителями. Именно этим способом удалось получить антитела с такой степенью специфичности и аффинности, какая раньше никогда не требовалась.

В 1950 г. Кунс и Каплан [15] впервые применили для регистрации взаимодействия антитела с антигеном связанную метку. Исследуя продукцию антител и локализацию антигенов в лимфоидной ткани, они использовали флуоресцеин — краситель, излучающий в ультрафиолетовой области спектра. В настоящее время в иммуноцитохимии используются как флуоресцентные красители, так и находящие все более широкое распространение фермент-субстратные системы (например, иммунопероксидазный метод). Разработка последних связана с тем, что в 1966 г. Аврамеас и Уриель [16], а также Накане и Пирс [17] обнаружили возможность конъюгации фермента с антителом или антигеном. О важности этого открытия свидетельствует то обстоятельство, насколько широко в настоящее время для обнаружения и количественного определения растворимых антигенов применяются различные хромогенные, флуо-

рогенные или люминесцентные фермент-субстратные системы, чувствительность которых приближается к чувствительности радиоиммунологического анализа. Основоположниками иммуноферментного анализа были Энгвалль и Перльман [18] в 1971 г. и Ван Вееман и Шурс в том же году [19], а в настоящее время известно огромное количество твердофазных иммуноферментных систем, которые применяются как в исследовательской работе, так и для проведения повседневных серологических тестов и обладают свойствами идеального метода иммунологического анализа — они просты в исполнении, дешевы (особенно, если применять реагенты, приготовленные самим исследователем), надежны и при этом достигают уровня чувствительности, более чем достаточного для решения большинства задач. Возможность получения моноклональных антител еще больше расширила область применения иммуноферментных методов.

С накоплением опыта по получению специфических антисывороток и увеличению их антигенсвязывающей активности иммунологические методы находили все более широкое применение. Их, в частности, стали использовать для изучения компонентов клеточных мембран, и опять значительный успех в этой области исследований был обусловлен использованием моноклональных антител. Было обнаружено, что комплементсвязывающие антитела способны избирательно повреждать клетки-мишени в гетерогенной клеточной культуре, оставляя нетронутыми другие клетки, не экспрессирующие специфического антигена. Естественно, что такие антитела в первую очередь были применены в клинике, например, для иммуносупрессии с помощью антилимфоцитарной сыворотки. Однако, после того как в 1956 г. Горрер и О'Горман [20] открыли лимфоцитотоксические антитела у мышей, антитела с подобными свойствами стали применять и в лаборатории как основной инструмент тканевого типирования. После открытия Доссе в 1958 г. [21] главного комплекса антигенов гистосовместимости появилась возможность типирования и человеческих тканей, а в 1964 г. данный метод был модифицирован Тerasaki и Мак-Клеландом [22]. Все шире используются антитела для идентификации клеточных популяций, несущих определенные поверхностные маркеры. Эта область развивается очень быстро, особенно после разработки в 1970 г. принципа флуоресцентной сортировки клеток, с помощью которой клетки определенных популяций, меченные флуоресцентными антителами, можно подсчитать и разделить по интенсивности флуоресценции. И здесь возможности идентификации клеточных популяций по поверхностным маркерам были существенно расширены благодаря применению моноклональных антител.

Ценность антител к компонентам клеточной поверхности заключается не только в их способности селективно уничтожать или идентифицировать клеточные популяции, но и в возможности определения конкретных молекул-мишеней. В настоящее время с помощью антител можно выделить компоненты, входящие в состав клеточных мембран, и определить их природу путем аффинного мечения после разделения в полиакриламидном геле. Такие методы лежат в основе современных исследований во многих областях клеточной биологии.

Прошло уже почти сто лет с того дня, как в процессе изучения бактериальных инфекций были открыты антитела. За это время методы, основанные на их использовании, радикальным образом расширили наши возможности идентификации различных молекул и изучения их свойств (см. табл. В.1).

В этой книге в логической последовательности изложены методы получения и применения антител. Поскольку эта область достаточно широка, а темпы развития новых методов и технологий очень велики, некоторые аспекты неизбежно должны были быть исключены из рассмотрения. Мы сосредоточили внимание на детальном описании самых популярных и наиболее часто используемых методов, осваивая которые можно быстро овладеть основными принципами работы с антителами. Вторая цель, которую мы преследовали, заключается в описании методов, представляющих самостоятельную ценность для прикладных исследований, а также тех, которые имеют большое клиническое значение в областях, где в настоящее время происходит особенно быстрое накопление знаний, и, следовательно, нуждающихся в проверке современной лабораторной практикой.

## Литература

1. von Behring E., Kilasato S. In: Immunology for Students of Medicine, Humphrey J. H. and White R. G. (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd edition, p. 5, 1964.
2. Landsteiner K. The Specificity of Serological Reactions, Charles C. Thomas [reprinted by Doner ress, New York, 1962], 1936.
3. Kraus R. Wien Klin. Wochenschr., 10, 736 (1897).
4. Heidelberger M. Bacteriol Rev., 3, 49 (1939).
5. MaPrack J. R. Medical Research Council Spec. Rep. Ser., No. 230 (1938).
6. Oudin J. C. R. Acad. Sci., Paris, 222, 115 (1946).
7. Elek S. D. Br. Med. J., 1, 493 (1948).
8. Ouchterlony O. Arkiv für Kemi, Mineralogi och Geologi, Biol., 26B(14), 1 (1948).
9. Grabar P., Williams C. A. Biochim. Biophys. Acta, 10, 193 (1953).
10. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. Immunochemistry, 2, 235 (1965).
11. Laurell C.-B. Anal. Biochem., 15, 45 (1966).

**Таблица В.1. Некоторые основные области применения антител**

**1. Идентификация антигенов**

Определение индивидуальных антигенов в сложных смесях в растворах.

Определение степени чистоты выделенных антигенов.

Определение областей продукции, экспрессии, локализации и активности антигенов в клетках и тканях.

Определение взаимосвязей структуры и функции антигенов, например в случае ферментов, антител, гормонов, цитокинов и клеточных рецепторов.

Определение дифференцировочных и онкофетальных клеточных антигенов.

Идентификация клеточных популяций, включая опухолевые.

Распознавание аллельных антигенов одного локуса — например, главного комплекса гистосовместимости.

Определение антигенных взаимосвязей между молекулами — например, различного видового происхождения, между гормонами и т. д.

Типирование лимфоцитов (HLA).

Типирование эритроцитов (группы крови).

Выявление экспрессии рекомбинантных ДНК (антигенов) в клоонах *Escherichia coli*, дрожжей и т. д.

Антигенная диагностика паразитарных, грибковых, бактериальных и вирусных инфекций путем выявления возбудителей или продуктов их жизнедеятельности в крови, мокроте, моче, кале, спинномозговой жидкости и т. д.

Серологическое определение типов и подтипов бактерий и вирусов.

Определение антигенных вариаций и генетических конверсий у паразитов.

Идентификация инфекционных агентов или их антигенов у переносчиков или хозяев.

**2. Количественное определение антигенов**

Компоненты плазмы крови, имеющие диагностическое значение, — например, изменение концентрации или состава иммуноглобулинов, белков комплемента, иммунных комплексов, белков острой фазы, сердечного миозина, альфа-фетопротеина и основного белка миелина при патологии нервных клеток, канцероэмбрионального антигена (КЭА) и т. д.

Гормоны: эндокринопатии, менструальный цикл, беременность и т. д.

Специфические антитела: инфекции, иммунный статус, аутоиммунные заболевания, образование антител в ответ на аллергены и т. д.

Меднаторы клеточной активности: интерфероны, интерлейкины, ростовые и хемотаксические факторы и т. д.

Лекарства и токсины

**3. Очистка антигенов и клеток**

Методы аффинной очистки антигенов с помощью антител.

Преципитация комплекса РНК/антиген из цитозоля при конструировании обогатенных генных библиотек для синтеза антигенов с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

Мечение клеток антителами для разделения с помощью флуоресцентного сортера клеток.

Связывание с отдельными компонентами клеточных мембран для последующего их выделения.

**4. Возможные терапевтические применения**

Иммуносупрессия — например, антилимфоцитарный глобулин; антитела к определению субпопуляций лимфоцитов; антиидиотипические антитела. Антитела к клеточным рецепторам.

Антитела к опухолевым антигенам, визуализация и избирательное поражение опухолевых клеток.

Антиидиотипические антитела как иммуногены.

Антитела к бактериальным токсинам, антигенам бактерий, вирусов, паразитических простейших, гельминтов и грибов.

Антитела к хорионическому гонадотропину человека и антигенам трофобласта для контроля фертильности.



12. *Coombs R. R. A., Mourant A. E., Race R. R.* Br. J. Exp. Pathol., **26**, 255 (1945).
13. *Farr R. S.* J. Infect. Dis., **103**, 239 (1958).
14. *Yalow R. S., Berson S. A.* Clin. Invest., **39**, 1157 (1960).
15. *Coons A. H., Kaplan M. A.* J. Exp. Med., **19**, 1 (1950).
16. *Acrameas A., Uriel J. C.* R. Acad. Sci., Paris, **262**, 2543 (1966).
17. *Nakane P. K., Pierce G. B.* J. Histochem. Cytochem., **14**, 929 (1966).
18. *Engvall E., Perlmann P.* Immunochemistry, **8**, 871 (1971).
19. *van Weeman B. K., Schuurs A. H. W. M.* FEBS Lett., **15**, 232 (1971).
20. *Gorer P. A., O'Gorman P.* Transplant Bull., **3**, 142 (1965).
21. *Dausset J.* Acta Haematol., (Basel), **20**, 156 (1958).
22. *Terasaki P. I., McClelland J. D.* Nature, **204**, 998 (1964).

# СВОЙСТВА АНТИТЕЛ И АНТИГЕНОВ

Д. Кэтти

## 1. Антигены и иммуногены

Согласно традиционным представлениям, антиген — это молекула, способная вызвать специфический иммунный ответ, который имеет три формы: продукцию антител, развитие реакций клеточного иммунитета или состояния толерантности. В более широком смысле антигенами обозначают и смеси молекул, целые микроорганизмы или клетки, используемые в качестве иммунизирующего агента или полидетерминантной мишени для связывания антител в иммунологических тестах. Соответственно эритроциты можно рассматривать как антиген в агглютинирующих тестах. Для того чтобы различать молекулы, индуцирующие образование антител (либо развитие реакций клеточного иммунитета), и молекулы, служащие мишенями для связывания антител, условно используют термин *иммуноген* для первых и *антиген* для вторых. Это помогает разделению представлений об иммуногенности и антигенных свойствах молекул, проявляющихся в связывании антител. Для того чтобы быть иммуногенной, молекула должна обладать определенной структурной сложностью (иммуногенностью). Природные иммуногены обычно представляют собой макромолекулы белков или углеводов, либо же их комбинации (в состав которых могут входить и липиды, которые сами по себе, однако, не являются иммуногенными). Мол. масса таких макромолекул превышает 1000 и обычно составляет более 5000. Высокоиммуногенные молекулы — это те, мол. масса которых обычно превышает 100 000. Иммуногенностью могут обладать и синтетические полипептиды и их сополимеры, если они отвечают указанным требованиям. Меньшие по размеру структуры, такие как замещенные ароматические группы, стероиды и пептиды, могут индуцировать специфический иммунный ответ в том случае, если их ковалентно связывают с молекулами-носителями большей мол. массы; такие группы проявляют себя как гаптены на сконструированном подобным образом иммуногене. Иммуногенность зависит и от степени родства (или чужеродности) данной молекулы по отношению к иммунизированному виду животного. В данном контексте иммуногенность определяется иммунной системой реципиента. Близ-

кие по видовой принадлежности молекулы, как правило, обладают низкой иммуногенностью. Кроме того, нередко наблюдается вариабельность в силе иммунного ответа на тот или иной иммуноген среди разных индивидуумов одного и того же вида животных. Причины этого обусловлены генетическими особенностями и могут быть изучены более основательно с помощью инбредных линий животных, а также при использовании иммуногенов с относительно простой структурой.

Исходя из серологических свойств, антиген лучше всего определить как молекулу, которая специфически связывается с антителами своими антигенными детерминантами, или эпитопами (см. разд. 2). Антигены могут быть неиммуногенными субъединицами иммуногена, свободными гаптенами, гаптенами, связанными с различными носителями, или природными молекулами, имеющими некоторые общие детерминанты с иммуногеном. Последнее обстоятельство служит причиной перекрестных реакций между антигенами (см. разд. 5).

## **2. Антигенные детерминанты: эпитопы**

Антигенные детерминанты — это определенные участки трехмерной структуры иммуногенов и антигенов. Эти структуры способны взаимодействовать как со специфическими рецепторами лимфоцитов, индуцируя тем самым иммунный ответ, так и с антигенсвязывающими центрами специфических антител. Сложные антигены обладают множеством различных антигенных детерминант. Иммунизация такими антигенами приводит к образованию поликлональных антител самой различной специфичности, которые можно обнаружить в антисыворотке. Одна детерминанта может быть образована 4—6 аминокислотными группами или остатками сахаров. Тем не менее детерминанты могут быть чрезвычайно разнообразны по форме и распределению зарядов и способствовать развитию достаточно разнообразных реакций гуморального иммунного ответа. Действительно, специфические к одной определенной детерминанте антитела могут быть клонально гетерогенны и при этом еще и значительно различаться по степени аффинности (см. разд. 4).

## **3. Антигенсвязывающие центры антител**

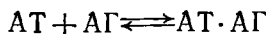
Каждая молекула антитела имеет участок, специфически связывающий антигенную детерминанту. В формировании антигенсвязывающего центра принимают участие вариабельные домены легких и тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина; при этом форма внутренней полости этого центра и распределение зарядов комплементарны таковым антигенных детерми-

нант. Именно эти участки связывания придают молекуле антитела ее специфичность. Подсчитано, что иммунная система способна продуцировать  $10^6$ — $10^7$  различных специфических антител.

Валентность молекулы иммуноглобулина или ее фрагмента определяется числом антигенсвязывающих центров. Большинство молекул IgG (преобладающего класса сывороточных антител, образующихся в результате хронической иммунизации животных) имеют два антигенсвязывающих центра, т. е. двухвалентны, и, следовательно, могут образовывать «мостики» между двумя молекулами антигена. IgM функционально пятивалентен, поэтому он обладает выраженной способностью преципитировать, агглютинировать или лизировать антигены.

#### 4. Аффинность и авидность антител

Аффинность антител связана с точностью стереохимического соответствия антигенсвязывающего центра и комплементарной ему антигенной детерминанты. В терминах термодинамики это можно рассматривать как прочность (энергию) целого ряда нековалентных взаимодействий между рецептором (антигенсвязывающим центром антитела) и лигандом (антигенной детерминантой). Математически аффинность выражается как константа ассоциации ( $K$ , л/моль), которую можно рассчитать в условиях равновесия между связанным и несвязанным лигандом в его обратимом взаимодействии с гомогенным источником антигенсвязывающих центров. Поскольку гетерогенная популяция антител обладает различной аффинностью по отношению к определенной антигенной детерминанте, то результирующая константа ассоциации представляет собой усредненное значение. В связи с этим невозможно оценить аффинность антисыворотки, обладающей полиспецифичностью, т. е. специфичной по отношению к множеству детерминант одного антигена. Однако такие сыворотки можно сравнивать друг с другом по их общим, суммарным характеристикам связывания с антигеном — по общей «силе» реакции в выбранной тест-системе, обозначаемой как авидность антител. Авидность — это строго функциональный термин, который описывает поведение антител (антисыворотки) в конкретной реакции. В условиях данного теста каждая из множества составляющих компонент взаимодействия подчиняется законам действия масс, для которых применима в данном случае формула:



Исходя из этого положения, можно дать более строгое определение авидности, выразив ее как константу ассоциации  $K_a$ .

## 5. Специфичность антител: перекрестные реакции

Каждая молекула антитела специфична по отношению к той антигенной детерминанте, с которой она связывается, — таково представление о специфичности в наиболее узком смысле. В отличие от этого специфичность антисыворотки определяется множеством специфичностей образующих ее антител. Антисыворотка связывается с одним определенным антигеном только в том случае, если совокупность специфичностей антигенсвязывающих центров всех антител в сыворотке направлена на детерминанты лишь этого антигена. Однако, как правило, некоторые детерминанты являются общими для нескольких молекул антигенов, особенно если речь идет о сходных молекулах родственных видов животных. В этом случае некоторые из антител, образовавшихся в ответ на стимуляцию данным антигеном, могут связываться и с другими антигенами. Такие антитела называют перекрестно-реагирующими, а содержащую их антисыворотку — неспецифичной или перекрестно-реагирующей. Специфичность подобной антисыворотки можно повысить путем очистки на сорбенте, которую называют истощением сыворотки. В процессе истощения перекрестно-реагирующие антитела удаляются путем контакта с антигенами, которые обладают общими с индуцирующим антигеном детерминантами и преимущественно находятся в нерастворимой форме (иммуносорбент).

Понятие перекрестной реактивности может быть применено и к антигенам. Перекрестно-реагирующий антиген — это такой антиген, который связывается с антителами, образование которых было индуцировано различными молекулами, обладающими с этим антигеном общими детерминантами. Однако такие соображения ничего не добавляют к концепции перекрестной реактивности.

## 6. Свойства поликлональных антисывороток и моноклональных антител

Используя специфические связывающие свойства антител, исследователь может выбирать между двумя различными формами реагента, приготовленного на их основе; это обычные поликлональные антисыворотки (или иммуноглобулиновые фракции, полученные из сыворотки) и моноклональные антитела (МКА). Препараты и тех, и других получают различными путями с различной целью; выбор между ними осуществляется зачастую не произвольно, а в большой степени зависит от соответствия специфических свойств антител требованиям теста.

### 6.1. Поликлональные антисыворотки

Поликлональная антисыворотка — это сыворотка иммунизированного животного, обычно кролика, барана или козы. Она содержит антитела неодинаковой специфичности по отношению к различным эпитопам полидетерминантного иммуногена. Основное преимущество поликлональных антисывороток заключается в их способности к образованию больших нерастворимых иммунных комплексов с антигеном либо к быстрой агглютинации клеток. Такие реакции можно наблюдать и регистрировать визуально или определять фотометрически, например путем нефелометрии. При всей своей ценности использование антисывороток животных в иммунологических тестах ограничено. Наиболее существенное ограничение — это гетерогенность антисывороток по их специфичности даже при взаимодействии с антигенами небольшой мол. массы. Другое ограничение связано с нестандартностью антисывороток, обусловленной необходимостью использовать для иммунизации более одного животного и в разные сроки. Антисыворотка образуется в результате функционирования многочисленных клеточных клонов и, следовательно, гетерогенна на самых разных уровнях: по классу и подклассу (изотипу) антител, их специфичности, титру и аффинности. Из одной и той же антисыворотки можно приготовить препарат, содержащий антитела к множеству отдельных антигенов (полиспецифичность), антитела к небольшому числу антигенов (олигоспецифичность) или антитела к одному-единственному антигену (моноспецифичность). Но даже в этом, последнем случае реагент не является гомогенным, поскольку индивидуальный иммуноген все же представляет собой полидетерминантную структуру, стимулирующую образование поликлональных, направленных к различным детерминантам антител, причем нередко относящимся к разным изотипам. Кроме того, в ходе гуморального иммунного ответа на индивидуальный эпитоп антитела продуцируются многочисленными клеточными клонами, и таким образом за один и тот же эпитоп могут конкурировать антитела с разной аффинностью. Значение подобной гетерогенности одной сыворотки и между сыворотками состоит в том, что каждая поликлональная сыворотка уникальна по составу специфических антител, оптимальным условиям связывания с антигеном и поведению в иммунологических реакциях. Поэтому в случае каждой отдельной сыворотки приходится принимать решение относительно ее пригодности для того или иного иммунологического теста. Если не производилась аффинная очистка антисыворотки, то специфические антитела составляют в ней (или в иммуноглобулиновой фракции) в большинстве случаев не более 20—

30% общего количества иммуноглобулина. Это обстоятельство снижает эффективность антисывороток в одних тестах и может привести к повышению фоновых значений в других тестах.

В связи с поликлональной полиспецифической природой обычных антисывороток их очистка до той степени специфичности, которая необходима для дальнейшего использования с целью выявления тонких структур и антигенных различий между молекулами на уровне индивидуального эпитопа, представляется непростой задачей, которую невозможно решить стандартным путем.

## 6.2. Моноклональные антитела

В 1975 г. Келер и Мильштейн [1] предложили альтернативный способ получения антител, представляющих собой моноклональные, моноспецифичные продукты. Такие антитела образуются одной гибридной антителообразующей клеткой, иммортализованной путем слияния с миеломной линией В-клеточного ряда (образующиеся гибриды называют «гибридомами»). Секретируемые гибридными клетками антитела гомогенны по специфичности, аффинности и изотипу. Каждый моноклональный продукт специфичен по отношению лишь к одной определенной антигенной детерминанте иммуногена, т.е. моноспецифичен. Образующие *in vitro* МКА преобладают (или оказываются единственным белком) в культуральной среде. В принципе МКА любой специфичности могут быть получены в неограниченном количестве, что позволяет в настоящее время использовать в соответствующих тестах универсальные стандартные реагенты. Область применения МКА быстро расширяется, поскольку все большее число лабораторий убеждается в их преимуществах и овладевает методами их получения. Целый ряд специфических МКА уже можно приобрести коммерческим путем, хотя каталоги до последнего времени обычно отражали лишь соответствующий интерес к этим антителам, проявляемый иммунологами и микробиологами. В данных областях МКА в качестве тест-систем используются уже очень широко. Их особая ценность заключается в способности выбирать уникальное свойство антигена, которое может, например, позволить определять и разделять клеточные популяции или осуществлять анализ бактериальных антигенов. При исследовании различных антигенов в растворе МКА, несомненно, могут способствовать решению множества проблем, связанных со специфичностью и чувствительностью, которые не могут быть решены с помощью поликлональных реагентов. Моноклональные антитела способны значительно упростить многие (прежде сложные в исполнении) тесты; они могут и

Таблица 1.1. Свойства методов, основанных на использовании антител

Принцип	Требования, предъявляемые к антителам	Чувствительность <sup>1)</sup> теста	Преимущества и недостатки метода
<i>Методы преципитации</i>			
Двойная диффузия в геле (ДДГ)	Диффузия реагентов с образованием видимых преципитатов в геле	≈ 10 мкг/мл АГ 5—20 мкг/мл АТ	Позволяет оценить степень сложности АГ, а также степень родства и специфичность антител. Прост и требует минимального оборудования. Низкая чувствительность, большая продолжительность
Иммуноэлектрофорез (ИЭФ)	Электрофоретическое разделение АГ, диффузия с образованием дуг преципитации в геле	50—100 мкг/мл АГ 20—100 мкг/мл АТ	То же, что и для ДДГ; кроме того, необходимо оборудование для электрофореза
Двумерный ИЭФ	Электрофоретическое разделение АГ в двух направлениях; при этом второй раз разделение белки составляют диффундировать в содержащем АТ геле с образованием пиков преципитации	Зависит от систем АГ—АТ	Разносторонняя характеристика АГ; оценка степени родства между АГ. Применение ограничено АГ, мигрирующими к аноду. Полуколичественный метод. Необходима охлаждаемая пластина для геля
Ракетный иммуноэлектрофорез	Электрофоретическая миграция АГ в содержащем АТ геле с образованием линий преципитации, имеющих форму ракеты	< 5 мкг/мл АГ	Возможность быстрой оценки АГ в области средней чувствительности. Применение ограничено АГ, мигрирующими к аноду, требует моноспецифических АГ. Необходимы антигенные стандарты



Радиальная им- мунодиффузия в теле (РИД)	Диффузия АГ в со- держателе АГ теле с образованием колец преципитации	Поликлональные, моно- специфические, преципи- тирующие	1—20 мкг/мл АГ	Очень простой метод, требующий минимального оборудования, но боль- ших временных затрат, особенно для АГ с высокой мол. массой. Необходи- мы антигенные стандарты
Обратная РИД	Диффузия АГ в со- держателе АГ теле с образованием колец преципитации	Поликлональные, моно- специфические, преципи- тирующие	1—20 мкг/мл АГ	То же, что для РИД. Тест продол- жительный, особенно для IgM. Не- обходима стандартная сыворотка сравнения (контрольная)
Агглютинационные тесты	АТ реагируют с рас- творимым антигеном, который «нагружали» на поверхность эри- троцитов; реакцию проводят в плашке- тах для микротитро- вания	Поликлональные и неко- торые моноклональные	1—10 нг/мл АТ	Необходимы фиксация АГ на эрит- роцитах и тщательная стандартиза- ция. Конечную точку титрования (титр) определяют визуально. Чувст- вительный и разносторонний метод определения специфичности и титра АТ. Применим для тестирования ан- тителулинов при использовании на- груженных АТ клеток
Реакция тормо- жения гемагглюти- нации (РТГА)	Пассивная гемагглю- тинация тормозится в присутствии специфич- еского антигена	Поликлональные и неко- торые моноклональные	1—10 нг/мл АГ	Как тест на определение АГ в об- ласти средней чувствительности со- периначает с ELISA и ИРМА. Резуль- таты менее точны в связи с суббек- тивной оценкой конечной точки тит- рования. Может использоваться для определения перекрестной реактивно- сти АГ
Обратная ПГА и реакция розетиро- вания	Опосредованная ан- тигеном агглютина- ция нагруженных АТ эритроцитов Может быть исполь- зована для определе- ния поверхностных клеточных антигенов	Моноклональные или аф- финно очищенные моно- специфические, поликло- нальные	1—10 нг/мл АГ	То же, что для РТГА. Возможны ос- ложнения в связи с эффектом прозо- ны. В качестве АГ могут быть ис- пользованы целые клетки (для теста на определение поверхностных мар- керов), если розетки образуются с АГ-положительными клетками

Принцип	Требования, предъявляемые к антигенам	Чувствительность <sup>1)</sup> теста	Преимущества и недостатки метода
<p>Методы с использованием меченых ферментами реагентов</p> <p>Иммуноферментный анализ (ИФА)</p> <p>Субстраты с хромогенными, флуорогенными или люминесцентными свойствами. Конкурентный метод анализа АГ</p>	<p>Связанный с ферментом АГ конкурирует со свободным АГ за антигенные АТ, фиксирующиеся на пластике или других поверхностях, например микросферах и т. д.</p>	<p>Поликлональные, моноспецифические (Ig-фрагменты) или аффинно очищенные АТ) или моноклональные АТ для фиксации на твердой фазе</p>	<p>Простой принцип конкурентного анализа; можно использовать различные типы твердой фазы. Необходим стандартный конъюгированный АГ. Результат может оцениваться визуально или по оптической плотности (необходим спектрофотометр)</p>
<p>Иммунологический тест с модулированным ферментом</p>	<p>Меченый ферментом АГ, на котором реакция «фермент — субстрат» стерически блокируется при связывании с АТ. Этот процесс ингибируется в присутствии свободного АГ. Гомогенный тест в жидкой фазе</p>	<p>Мкмоль — для лекарственных веществ</p>	<p>Обычно применяется для количественного определения небольших молекул, например молекул лекарственных веществ, где антигенные детерминанты расположены в непосредственной близости от структур, отвечающих за связывание фермента. Чувствительный и быстрый метод определения, не требующий процедур отмывания или разделения</p>
<p>Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA, от англ. enzyme-linked immunosorbent assay)</p> <p>Использование меченого АГ</p>	<p>Поликлональные или моноклональные, очищенные и меченые</p>	<p>&lt;10 нг/мл АГ</p>	<p>Простой принцип ингибирования с использованием стандартных конъюгированных АГ. Чувствительный метод количественного определения АГ. Возможны модификации</p>

ченых АТ для количественного определения АГ или АТ. Типы твердой фазы и субстраты как для ИФА	Метод сандвича: фиксированные на твердой фазе АГ связывают АГ, а тот в свою очередь — вторые АТ, конъюгированные с ферментом. Таким образом определяют количество связанного АГ	Поликлональные или моноклональные, а также их комбинация в качестве первых и вторых антител	<10 нг/мл АГ	Двойная моноклональная система может нуждаться в антигенах различной специфичности. Потенциально метод очень чувствителен, поскольку теоретически можно обнаружить даже одну связавшуюся молекулу АГ
	Метод, основанный на использовании меченого ферментом антиглобулина: связывание АТ с твердофазным АГ определяется с помощью меченого антиглобулина (получил название непрямого иммуноферментного метода)	Поликлональный, меченый антиглобулин	10 нг/мл АГ	Возможно разностороннее применение метода: титрование АТ, исследование специфичности и изотипа образующихся в процессе иммунного ответа антител. Лабораторная система скрининга МКА
Иммунологические тесты, основанные на использовании радиоактивной метки	Меченый АГ конкурирует с исследуемым АГ за связывание с лимитированным количеством АТ в жидкой фазе. Перед определением радиоактивности в преципитате или супернатан-	Поликлональные (моноклональные) или меченые и те и другие должны быть высокоаффинными	<10 фг/мл АГ (нмоль — пкмоль/л в случае гормонов)	Чрезвычайно чувствительный метод анализа, требующий строгой специфичности АТ и их высокой аффинности. Необходима стадия отделения комплексов от несвязавшегося АГ. Требуется дорогостоящее оборудование. Для измерения необходим стандартный АГ. Радиационная опасность
Радиоиммунологический анализ (РИА)				
Конкурентный ме-				

Принцип	Требования, предъявляемые к антигенам	Чувствительность <sup>1)</sup> теста	Преимущества и недостатки метода
<p>тод анализа для определения АГ в жидкой фазе</p>	<p>те отделяют преципитат</p>		
<p>Иммунорадиомерный анализ (ИРМА)</p> <p>Использование меченых АГ для количественного определения АГ или АТ</p>	<p>Метод, основанный на использовании радиоактивно меченных антител: связывание АГ с твердофазным АГ ингибируется присутствием свободного АГ</p> <p>Реакцию проводят в пластиковых пробирках или полистироловых планшетах</p>	<p>&lt;10 мг/мл АГ, и в области пкг</p>	<p>Тест проще, чем РИА; стадия отмывания заменяет отделение комплекса. Необходимы меченые АГ, а также стандартный АГ для ингибирования</p>
<p>Метод сандвича: твердофазные АГ связывают АГ, а тот в свою очередь — вторые (меченые) АГ; метод количественного определения связанного АГ</p>	<p>Поликлональные или моноклональные, либо их комбинация в качестве первых и вторых антигенов</p>	<p>&lt;10 пкг/мл АГ</p>	<p>Проще, чем РИА; обладает той же чувствительностью. Двойная моноклональная система может нуждаться в антигенах различной специфичности</p>
<p>Тест с радиоактивно меченым антиглобулином: связывание АГ с твердофазным АГ определяется по связыванию меченого антиглобулина</p>	<p>Поликлональный радиоактивно меченный антиглобулин</p>	<p>&lt;10 иг/мл АТ</p>	<p>Метод количественного определения поликлональных или моноклональных антител. Система лабораторного скрининга МКА, титрования АТ и определения изотипа АГ в процессе иммунного ответа</p>

Вестерн-блоттинг Идентификация и оценка степени чистоты АГ: специ- фичность АГ	АГ, разделенные в соответствии с разме- рами молекул путем электрофореза в по- лиакриламидном геле, переносят на нитро- целлюлозную мембра- ну (блоттинг); поло- сы, соответствующие АГ, выявляют с по- мощью меченых АТ	Моноклональные или по- ликлональные АГ, свя- занные с ферментом или радиоактивной меткой	Метод позволяет оценить чистоту, молекулярный размер и природу АГ. Может быть использован для опре- деления и сравнения специфичности МКА
Иммуногистохими- ческие и иммуно- цитохимические методы	Для определения АГ: использование АТ, конъюгированных с флуоресцентной или ферментной меткой, — часто в качестве вто- рого антигенулино- вого реагента — для окрашивания клеток и тканей. В случае применения фермента необходим нерасто- вимый, окрашенный субстрат	При использовании в качестве первого слоя с моноклональных (моно- специфических) АГ зна- чительно возрастает ко- личество определяемых АГ	Использование системы фермент — субстрат позволяет готовить постоян- ные препараты для обычной микро- скопии. Альтернативные способы ок- рашивания пригодны для исследова- ний одновременно двух антигенов. Иммунофлуоресценция (так же как и исследования с двойной меткой) позволяет детально окрашивать кле- точные структуры
Флуоресцентный сортировщик кле- ток (FACS, от англ. fluorescence- activated cell sor- ting)	Для изучения и раз- деления клеточных популяций	Как правило, монокло- нальные АТ — для флуо- ресцентных конъюгатов или в качестве первого слоя; флуоресцентный поликлональный антигло- булин — в качестве вто- рого слоя	FACS обеспечивает автоматизирован- ный подсчет антителосвязывающих клеток с оценкой размеров клеток и плотности маркеров. Усовершенст- ванные модели позволяют проводить исследования с множеством красок (меток)

<sup>1)</sup> Под чувствительностью метода здесь понимается минимально определяемое количество антигена (АГ) или антитела (АТ). Приведенные значения приблизительны и могут варьировать для различных АГ.

значительно расширить число тестируемых молекул. Наиболее существенный недостаток МКА заключается в том, что они в силу своей моноспецифичности обладают лишь слабыми антиген-преципитирующими свойствами либо не обладают ими совсем. По этой причине тесты с растворимыми антигенами, основанные на использовании моноклональных реагентов, ограничиваются теми модификациями, которые предусматривают непрямую регистрацию реакции антиген — антитело, т. е. наиболее чувствительными.

Потребность в полиспецифичных преципитирующих антисыворотках (и контроль их качества), равно как и значение самих преципитирующих методов, в связи с разработкой технологии получения МКА не снижается.

## 7. Выбор методов с участием антител

Целесообразно обобщить (табл. 1.1) методы, основанные на использовании антител, начиная с получения и оценки их свойств и кончая заключительным этапом исследования антигена.

Работа с антителами зачастую требует от исследователя самостоятельного получения реагентов, в связи с чем в первую очередь возникает задача получения иммуногена. В случае растворимых простых иммуногенов для достижения хороших результатов молекулы должны быть как можно лучше очищены. Поэтому первый рассматриваемый метод — это оценка чистоты антигенного препарата. После сбора антисыворотки необходимо оценить ее качество. В зависимости от характера тест-системы, используемой на заключительном этапе, сыворотку необходимо проверить на специфичность, титр и параметры связывания. Это требует знания процедур контроля качества, в некоторых случаях включающих в себя определение изотипического спектра антител. На заключительном этапе важен правильный выбор теста (табл. 1.2) — например, выбор между иммунофлуоресцентным и иммунопероксидазным методами в случае тканевых и клеточных антигенов либо между агглютинацией, ELISA, РИА и реакциями преципитации в случае растворимых антигенов. При использовании некоторых тест-систем может потребоваться очистка антител для последующего мечения либо получение и мечение антиглобулинового реагента. К оценке преимуществ и недостатков тест-систем следует подходить осторожно.

## Литература

1. Köhler G., Milstein C. *Nature*, 256, 495 (1975).

Таблица 1.2. Выбор метода, основанного на использовании антител

Цель метода	Рекомендуемые методы
<i>Оценка чистоты иммуногена</i>	Двойная диффузия в геле (ДДГ) Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) Двумерный ИЭФ Электрофорез в полиакриламидном геле
<i>Контроль качества антител</i> (а) Специфичность	ДДГ, ИЭФ, двумерный ИЭФ Иммунофлуоресцентный анализ (ИФЛА) { 1) на стандартных клетках/тканях Иммунопексидазный тест (ИПТ) { 2) как конкурентный тест с известным АТ
(б) Титрование (1) Растворимые антигены	Комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность Пассивная гемагглютинация (ПГА) ELISA Иммунорадиометрический анализ (ИРМА) Вестерн-блоттинг Обратная радиальная иммунодиффузия ПГА (включая антиглобулиновый тест) ИРМА ИФЛА ИПТ ИЭФ
(в) Чистота Ig-фракции АТ	ELISA, ИРМА, ПГА
(г) Чистота/титр антиглобулинового реагента	ДДГ ELISA { меченые анти-изотипические антитела ИРМА { окрашивание с помощью анти-изотипических антител ИФЛА { ИПТ {
(д) Определение изотипа антител	ДДГ, ИЭФ, двумерный ИЭФ ИРМА и РИА Иммуноферментный анализ (ИФА) РТГА ДДГ, ИЭФ, двумерный ИЭФ Вестерн-блоттинг Двумерный ИЭФ
<i>Методы исследования антигена</i> (а) Исследование антигенного родства между молекулами (в растворе)	Вестерн-блоттинг после разделения сложной смеси белков в полиакриламидном геле РИД Ракетный ИЭФ РТГА
(б) Анализ компонентов антигенных смесей в растворе	
(в) Количественное определение компонентов антигенных смесей в растворе	
(г) Идентификация и оценка чистоты препаратов с низкой концентрацией антигенов	
(д) Количественное определение антигена в растворе	

Продолжение табл. 1.2

Цель метода	Рекомендуемые методы
<p>(е) Определение клеточных и тканевых антигенов</p> <p>(1) Популяционный анализ клеточной суспензии</p> <p>(2) Типирование тканей: эритроциты лимфоциты</p>	<p>Обратная пассивная гемагглютинация ИФА и ELISA РИА и ИРМА ИФЛА, ИПТ</p> <p>ИФА, ИПТ FACS Обратное пассивное розетирование с нагруженными антителами эритроцитами Прямая гемагглютинация (см. кн. 2) Комплемент-опосредованная антителами цитотоксичность (см. кн. 2) ИФЛА Другие новые методы (см. кн. 2)</p>



## ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И КОНТРОЛЬ ИХ КАЧЕСТВА

*Д. Кэтти и Ч. Райкундалия*

### 1. Введение

Для разных целей требуются сыворотки с различными свойствами, поэтому нельзя разработать единый способ иммунизации животных, который бы гарантировал получение продукта, идеально удовлетворяющего всем требованиям. Тем не менее существуют определенные принципы получения антител, которые могут быть приняты за «основные правила». Идеальные антисыворотки получают в определенной степени методом проб и ошибок, поскольку каждый иммуноген отличается от других и процесс образования антител у каждого животного имеет свои особенности. Необходимые свойства антисыворотки — это высокий титр в сочетании с высокой средней avidностью, а также специфичность. Первые (на которые оказывают влияние различные адъюванты) зависят от достижения баланса между неограниченной стимуляцией антиген-чувствительных клеток в лимфоидных тканях животных при условии персистирования иммуногена, с одной стороны, и от конкуренции между клетками за лимитированное количество антигена таким образом, чтобы отвечали лишь клетки с наибольшей аффинностью, — с другой. Специфичность же критически зависит от чистоты иммуногена, поскольку даже небольшие примеси могут вызвать непропорционально сильное антителообразование.

Во многих реакциях используют преципитирующие свойства сывороток, а поскольку они зависят от эффективного образования решетки между антителами и несколькими антигенными детерминантами, то имеет значение не только полиспецифичность, но и баланс титров антител. Всегда предпочтительнее сыворотки, которые могут быть использованы в высоком разведении, что позволяет снизить фон. В ракетном и двумерном электрофорезе важно применять антитела, имеющие узкий изоэлектрический диапазон в агаровом геле, и в этом случае необходим правильный выбор вида иммунизируемого животного. Особенно хорошими свойствами с этой точки зрения обладают IgG<sub>1</sub> овцы.

Если антисыворотки предполагается использовать в более чувствительных количественных методах, например радиоим-

мунологическом или твердофазном иммуноферментном анализе, предъявляются более высокие требования к avidности и специфичности. Антиглобулины должны избирательно связываться с антигеном-мишенью — иммуноглобулином определенного вида или конкретного изотипа данного вида, для чего необходима тщательная абсорбция перекрестно реагирующих антител.

В большинстве случаев радиоиммунологический анализ используют для определения незначительных концентраций небольших молекул. Для иммунизации небольшие молекулы с низкой иммуногенностью необходимо ковалентно связать с более крупными белковыми носителями, причем метод связывания влияет на специфичность ответа. Может возникнуть необходимость тестирования нескольких сывороток для того, чтобы выбрать наиболее подходящую.

Получение сыворотки представляет собой лишь начальный этап приготовления нужного реагента. Для большинства методов необходима лишь иммуноглобулиновая фракция, остальные компоненты сыворотки могут быть отброшены. Это приводит к снижению отношения общего белка к антителам, уровня неспецифических реакций и к увеличению чувствительности метода. Процесс мечення антител флуорохромом, ферментом или изотопом, а также очистку методом аффинной хроматографии начинают с выделения иммуноглобулинов.

После начальной проверки специфичности и титра этапы контроля качества могут включать абсорбцию посторонних антител как альтернативу аффинной хроматографии. Лучше всего ее осуществлять с помощью нерастворимых антигенных полимеров или бус, поскольку жидкостная абсорбция приводит к формированию растворимых иммунных комплексов с нежелательными свойствами.

Если титр и специфичность антител удовлетворительны, их можно стандартизировать по отношению к данному антигену и окончательно испытывать в широком спектре иммунологических методов, в которых они могут найти применение. В табл. 2.1 обобщена стратегия получения антител и контроля их качества.

## **2. Основные правила получения антител**

### **2.1. Иммуноген**

#### **2.1.1. Небольшие молекулы**

При использовании веществ с мол. массой менее 5—10 кДа необходимо их ковалентное связывание с белком-носителем. В ответ на иммунизацию образуются антитела и к детерми-

**Таблица 2.1. Стратегия получения антител и контроля их качества**

1. *Получение иммуногена* (разд. 3 и 10)
  - а. Очистка
  - б. Проверка степени чистоты
  - в. В случае если мол. масса меньше 5—10 кДа — конъюгация с носителем.
2. *Иммунизация* (разд. 2, 4 и 6)
  - а. Выбор подходящего вида животного в качестве реципиента
  - б. Выбор формы представления антигена (т. е. с адъювантом или без него), способа введения, дозы и сроков. Обеспечение возможно более длительных интервалов между инъекциями (до нескольких месяцев)
  - в. Приготовление препарата иммуногена для инъекции (эмульсия, преципитат и т. д.) в достаточном количестве.
3. *Отбор проб и их тестирование* (разд. 5, 8 и 9)
  - а. Пробное взятие крови и отделение сыворотки
  - б. Проверка специфичности, титра и антигенсвязывающей активности, включая метод, в котором предполагается использовать сыворотку
  - в. Пробное истощение сыворотки на основе выявленных перекрестных реакций и приготовление нерастворимых сорбентов
  - г. Проверка истощенной сыворотки. При удовлетворительных результатах — приготовление сорбентов для очистки большого объема сыворотки
  - д. Определение стратегии бустерных инъекций на основе собственных контрольных исследований
  - е. При необходимости — повторение этапов а—г.
4. *Сбор, хранение и абсорбция сыворотки* (разд. 5, 7 и 9)
  - а. Сбор в течение длительного времени или путем забоя животного (зависит от требуемого объема сыворотки)
  - б. Хранение аликвот (—20 °С или ниже) с соответствующими пометками
  - в. Контроль и пробное истощение образцов, затем — истощение всей сыворотки.
5. *Фракционирование иммуноглобулинов* (разд. 10)
  - а. Применение двухэтапного метода (солевая преципитация и ионообменная хроматография)
  - б. Проверка чистоты фракции
  - в. Контроль активности фракции
  - г. Выбор условий хранения в зависимости от вида животного.
6. *Аффинная очистка антител* (разд. 10, см. также гл. 5)
  - а. Проверка чистоты антигена
  - б. Приготовление аффинной колонки с антигеном путем его химического связывания с выбранным матриксом
  - в. Проверка антигенной активности колонки, ее емкости и условий элюции антител
  - г. Пробная очистка. Контроль чистоты, активности и стабильности элюируемых антител
  - д. Очистка всей сыворотки с последующим хранением аликвот.
7. *Контроль качества* (разд. 11)
  - а. Исследование реагента с помощью методов, для осуществления которых он предназначен, по возможности со стандартными антигенами
  - б. Калибровка по отношению к контрольному реагенту
  - в. Расчет концентрации антител, специфичных к определенному растворимому антигену
  - г. Определение изотипа(ов) антител.

нантам носителя, поэтому следует выбирать такой носитель, который в дальнейших исследованиях не будет использован в качестве антигена и/или легко может быть приготовлен в виде сорбента. На первый взгляд удачное решение может заключаться в получении белков-носителей от животных того же вида, что и иммунизируемое, однако этого делать не следует, поскольку для формирования гуморального ответа на большинство (тимус-зависимых) иммуногенов необходимо распознавание Т-хелперами антигенных детерминант носителя. Необходимо помнить, что размер, заряд и полярные свойства гаптенa влияют на индукцию гуморального ответа, а сами эти свойства могут в значительной степени зависеть от однородности и прочности связывания гаптенa и белка-носителя, а также от природы самого носителя. Может возникнуть необходимость в приготовлении и испытании конъюгатов с различными носителями и с различными соотношениями гаптенa и носителя, с тем чтобы выбрать наиболее удачную конструкцию иммуногена. Как правило, к более крупным гаптенам могут быть получены гаптен-специфические антитела, однако они обычно тоже гетерогенны. На пространственную ориентацию гаптенa существенное влияние оказывает способ связывания и конкретный участок связывания в молекуле гаптенa (см. разд. 3.1), от этого зависит специфичность антител, которые обычно не направлены к участку связывания. Антитела к меньшим по размеру гаптенам могут иметь специфичность и к участку связывания. Может потребоваться конъюгация с использованием линкера. В любом случае специфичность антител к гаптену следует проверять с помощью либо свободного гаптенa (например, в радиоиммунологическом анализе или реакции торможения гемагглютинации), либо гаптенa, связанного аналогичным образом с другим носителем.

### 2.1.2. Крупные молекулы

Крупные молекулы за счет конформационной и структурной ригидности представляют собой более сильные иммуногены, имеющие иммунодоминантные участки и многочисленные разные антигенные детерминанты, что позволяет получить преципитирующие сыворотки. Тем не менее для достижения лучших результатов все же рекомендуется использовать адъювант.

### 2.1.3. Чужеродность

Нельзя забывать о том, что молекула иммуногена должна быть воспринята животным-реципиентом как чужеродная. Например, сывороточные белки млекопитающих, в основном от-

Таблица 2.2. Основные свойства адьювантов

1. Усиление продукции антител путем увеличения эффективности презентирования антигена и увеличение количества взаимодействующих и секретирующих клеток при снижении оптимальной дозы иммуногена.
2. Увеличение иммуногенности, благодаря которому удается вызвать образование антител в ответ на вещества с пограничными иммуногенными свойствами.
3. Изменение изотипического профиля секретируемых антител.
4. Продление гуморального ответа благодаря эффекту депонирования, что препятствует резорбции иммуногена из места введения и тем самым снижает потребность в повторных инъекциях.
5. Увеличение средней avidности и аффинности антител.

личаясь сложной структурой, представляют собой слабые иммуногены для близкородственных видов, что обуславливает применение адьювантов для стимуляции продукции антител при участии Т-хелперов (Т-зависимые антигены). В ответ на иммунизацию белками близкородственных видов образуются антитела, которые распознают только незначительные структурные различия между соответствующими молекулами двух данных видов животных. В некоторых случаях даже удается получить антитела к аллельным структурам, различным у молекул одного вида. Наоборот, если источником иммуногена является филогенетически отдаленный вид, полученные антитела обладают широким спектром специфичностей. В особенности это касается антител к сложным тимус-зависимым растворимым или связанным с клеткой антигенам млекопитающих. Овца и кролик хорошо отвечают на белки, гликопротеины и липопротеины других животных и человека, а также на антигены патогенных микроорганизмов. Важно помнить, что иммунизация микроорганизмами или их антигенными экстрактами может активировать естественный гуморальный ответ на антигены собственной микрофлоры реципиента за счет общих (перекрестно реагирующих) эпитопов.

## 2.2. Применение адьювантов

Адьюванты (лат. *adjuvare* — помогать) состоят из различных веществ, физические и (или) биологические свойства которых позволяют в различной степени изменять степень гуморального ответа на иммуноген (см. табл. 2.2). Свойства адьювантов хорошо изучены [1—3]. Адьюванты применяют в основном для получения антисывороток к тимус-зависимым иммуногенам в тех случаях, когда их использование позволяет снизить оптимальные дозы антигена до микрограммовых. Известно правило, согласно которому наименьшие дозы иммуно-

гена при длительном применении позволяют получить сыворотку наилучшего качества с точки зрения титра и аффинности. Ниже мы приводим примеры адъювантов, наиболее широко применяемых для иммунизации животных.

### 2.2.1. Полный адъювант Фрейнда (ПАФ)

ПАФ состоит из смеси минерального масла (Байол F), взвеси инактивированных нагреванием *Mycobacterium butyricum* или *Mycobacterium tuberculosis* и эмульгатора Арлацела А. Водный раствор иммуногена смешивают с адъювантом, и образуется эмульсия водной фазы в масле. ПАФ значительно усиливает и продлевает гуморальный ответ, что впервые описано Фрейндом [4]. Эмульсия стабильна и после внутримышечного введения (в/м) формирует депо иммуногена с медленным поступлением его в циркуляцию. Другие основные свойства данного адъюванта обусловлены микобактериями, некоторые продукты которых выступают как мощный стимулятор клеток регионарных лимфоузлов и грануломы, возникающей вокруг депо. В этом отношении наиболее выраженными свойствами обладают *M. tuberculosis*. Большое количество антител образуется грануломой, и эта активность сохраняется до тех пор, пока персистирует иммуноген, иногда — в течение многих лет. В результате введения ПАФ образуются грануломы, и собственные ткани организма приобретают свойства аутоиммуногена, поэтому данный адъювант не может применяться для иммунизации людей. Однако это едва ли не наиболее эффективный широко применяемый адъювант, используемый в повседневных методах получения антисывороток к растворимым антигенам животных и антигенам эмульгированных клеток. ПАФ в подавляющем большинстве случаев вызывает образование IgG у кролика (у овцы преобладает IgG<sub>1</sub> и у морской свинки — IgG<sub>2</sub>). ПАФ и неполный адъювант Фрейнда (НАФ), не содержащий микобактерий, предоставляет фирма Difco Ltd. (см. приложение). Приготовление этих адъювантов из отдельных компонентов, эмульгирование и методы введения описаны в разд. 4.1.

### 2.2.2. Неполный адъювант Фрейнда (НАФ)

Для депонирования иммуногена его можно эмульгировать с минеральным маслом и без микобактерий. Это тоже приводит к длительной и интенсивной выработке антител, поскольку резорбция иммуногена из места инъекции происходит постепенно. Однако при использовании НАФ образование антител обычно слабее и менее продолжительно, возможно, из-за

того, что при этом не происходит активное образование грануломы в области депо. Кроме того, у морских свинок изменяется изотип антител — например, в ответ на введение растворимых белков совместно с НАФ вырабатывается IgG<sub>1</sub>. Более слабые патологические эффекты позволяют использовать НАФ подкожно для бустерной иммунизации.

### 2.2.3. Иммуноген, адсорбированный на квасцах

Использование алюминиевых квасцов для адсорбции белков при щелочном pH [5] расширяет возможности получения новых иммуногенов и позволяет продлить гуморальный ответ. При в/м введении такие иммуногены способствуют накоплению плазматических клеток в области депо. При этом побочные эффекты оказываются минимальными, и данный метод используют для вакцинации человека дифтерийным и столбнячным анатоксинами. Адсорбированный иммуноген может быть введен подкожно, внутрибрюшинно или внутримышечно. Наиболее предпочтительно использовать адсорбированный на квасцах иммуноген для иммунизации мышей, часто в смеси с убитыми клетками *Bordetella pertussis* (см. разд. 2.2.4), и одно из его главных преимуществ заключается в том, что при этом происходит быстрая диссеминация иммуногена, исключающая связанную с введением антигена сенсibilизированным животным возможность развития острой летальной анафилактической реакции. Обычно используют методику иммунизации малыми дозами (микрограммы) через несколько дней в течение нескольких недель. Анатоксины и другие иммуногены, адсорбированные на квасцах, у ряда видов вызывают выработку IgE. Приготовление адсорбированных на квасцах белков для иммунизации описано в разд. 4.2.

### 2.2.4. *Bordetella pertussis*

Для усиления гуморального ответа, особенно у мышей, антиген вводят вместе с взвесью убитых клеток *B. pertussis*, основными активными компонентами которой служат липополисахарид (ЛПС) и коклюшный токсин. Известно, что токсин усиливает образование как IgG, так и IgE [6]. Суспензию убитых клеток *B. pertussis* можно приобрести коммерческим путем (см. приложение).

### 2.2.5. Липосомы

Можно приготовить искусственные липосомы из лецитина, холестерина и стерилamina [7]. Включение в их состав дифтерийного анатоксина приводит к усилению гуморального от-

вета. Иммуноген, заключенный в липосомах, после внутривенного введения быстро локализуется в селезенке, а после внутримышечного, подкожного и внутрикожного введения длительно высвобождается из депо. В первом случае действие адъюванта может быть связано с эффективным представлением встроенного в мембрану липосом антигена антиген-чувствительным клеткам. Активность адъюванта можно увеличить введением в его состав ЛПС, липида А или мурамилдипептида (разд. 2.2.6). Один из важных практических аспектов использования липосом — это возможность применять для иммунизации высокотоксичные вещества, например змеиные яды. Так, внутривенные и подкожные инъекции мышам, кроликам или овцам токсичных при ином способе иммунизации доз яда гадюки приводили к формированию длительного и выраженного гуморального ответа [8, 9].

### 2.2.6. Мурамилдипептид

Активный компонент микобактерий со свойствами адъюванта был идентифицирован как трипептид-моносахарид, наименьшая активная часть которого определена как мурамилдипептид (МДП) [10]. В настоящее время он поступает в продажу в виде коммерческого препарата (см. приложение) и может быть использован вместо убитых нагреванием микобактерий для приготовления ПАФ. Мурамилдипептид представляет собой и активный адъювант при введении совместно с иммуногеном в физиологическом растворе; при этом у мышей образуется исключительно  $IgG_1$ . Мурамилдипептид способствует выработке антител к синтетическим антигенам.

## 2.3. Выбор животного

### 2.3.1. Мыши и крысы

Большая часть наших представлений о природе иммунного ответа получена в исследованиях, проведенных с помощью мышей и крыс. Эти животные подходят для интенсивного использования в лаборатории, доступны в виде инбредных линий, представляющих интерес для иммунологов, а также сходным образом отвечают на любой антиген, благодаря чему могут служить надежным источником антител. Не менее важно другое обстоятельство: в ходе инбридинга аллельные различия полиморфных молекул фиксируются в генотипе данной линии, что создает уникальную возможность для изучения аллельных систем, таких как комплекс генов гистосовместимости, аллотипы и изоэнзимы. Межлинейная перекрестная имму-



низация дает аллельспецифические антитела. Кроме того, мыши и крысы представляют собой единственные виды лабораторных животных, клетки которых могут быть использованы для получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела. Таким образом, мыши и крысы занимают особое место среди животных, используемых для производства антител. У инбредных мышей и крыс существуют межлинейные различия в иммунном ответе на молекулы с низкой иммуногенностью, поэтому выбор той или иной линии может иметь очень большое значение.

### 2.3.2. Кролики

Для получения поликлональных антисывороток, используемых в повседневных иммунологических методах исследования, особенно в реакциях преципитации, применяют более крупных животных, в частности лабораторных кроликов. Кроликов можно содержать в клетках, они хорошо размножаются в неволе, выносливы и долго живут. Уход, иммунизация и взятие крови у этих животных не представляют труда. Полученные от кроликов антисыворотки обладают хорошими преципитирующими свойствами и стабильны при хранении, иммуноглобулиновая фракция легко поддается очистке. Кроме того, такие антисыворотки, обладая высокой авидностью/аффинностью, пригодны для использования в чувствительных иммунологических тестах. В течение нескольких месяцев в период максимального ответа можно получить не менее 100 мл антисыворотки и еще 150 мл при аутопсии. Аутбредные кролики отвечают на иммуноген по-разному, поэтому следует использовать для иммунизации несколько животных, протитровать их сыворотки по отдельности, затем смешать отобранные пробы, если требуется максимальное разнообразие антител. Кролики достаточно хорошо отвечают на широкий спектр иммуногенов в сочетании с адъювантом Фрейнда образованием IgG.

В некоторых случаях, например при хронической внутривенной иммунизации суспензией убитых пневмококков, у кроликов может вырабатываться специфический IgG к полисахариду в количестве более 50 мг/мл. Обычно же высоким титром считается 1—2 мг/мл антител, образующихся в ответ на введение белкового антигена. Это гораздо больше, чем у мышей, к тому же период полужизни IgG мыши составляет лишь 1—2 дня, он гораздо менее стабилен, особенно в очищенной форме, и слабо преципитирует антигены. Кроме того, от мыши можно получить лишь несколько миллилитров крови, и взятие такого количества сопровождается гибелью животного.

### 2.3.3. Овцы

Овец рекомендуют для получения больших количеств антисыворотки (свыше 5 л). Антитела овцы, так же как и кролика, обладают хорошими преципитирующими свойствами. При использовании ПАФ главным образом образуется  $IgG_1$ , который стабилен, хорошо хранится, легко поддается очистке и практически не обладает подвижностью в агаровом геле при рН 8,6, что важно для ракетного и двумерного иммуноэлектрофореза. В пересчете на объем получаемой антисыворотки овцы дешевле других животных. Их легко иммунизировать; используя плазмозаменители и восстанавливая клеточный состав крови, можно не прибегать к забоям животного. Молодых животных иммунизируют в первую же весну и лето и забирают кровь осенью и зимой без нарушения их репродуктивной активности.

Овцы, как и кролики, дают хорошие титры антител к  $Ig$  человека всех классов. От овец получены преципитирующие антисыворотки, специфичные к подклассам  $IgG$  человека, что, по-видимому, свидетельствует о способности этих животных распознавать тонкие структурные различия иммуноглобулинов других млекопитающих. Обычно от овцы и кролика получают одинаково хорошую антисыворотку к изотипам иммуноглобулинов крыс и мышей, а кроме того, как от филогенетически отдаленных видов, и к иммуноглобулинам друг друга. Например, в методах с использованием первых антител кроличьего происхождения вторыми антителами могут быть иммуноглобулины овцы к иммуноглобулину кролика, и наоборот. Очищенные с помощью аффинной хроматографии кроличьи и овечьи антитела стабильны при хранении. В дополнение ко всему вышесказанному Fab- и  $F(ab)_2$ -фрагменты могут быть получены из овечьих и кроличьих антител по хорошо описанной и легко воспроизводимой методике [11].

## 2.4. Рекомендации по использованию животных

### 2.4.1. Численность

При иммунизации всегда следует использовать несколько животных и контролировать иммунный ответ у каждого животного по отдельности. При этом принимают во внимание различия между животными и затем либо получают пул антисывороток, либо отбирают те из них, которые обладают максимальной avidностью/аффинностью.

#### 2.4.2. Состояние животных

Никогда не следует использовать животных в плохом физическом состоянии или находящихся в состоянии стресса. В случае применения лабораторных животных следует убедиться в том, что данная группа содержалась в хороших условиях и достаточно спокойной обстановке.

#### 2.4.3. Возраст и пол

Стараются использовать молодых взрослых животных. Идеально подходят мыши и крысы в возрасте 3—4 мес и кролики в возрасте 4—6 мес. Характерных различий в гуморальном ответе в зависимости от пола не наблюдается. Никогда не следует иммунизировать беременных животных, если это не предусмотрено целью специально разрешенного эксперимента.

#### 2.4.4. Юридическая ответственность

Инструкции Министерства внутренних дел Великобритании требуют, чтобы *все процедуры*, связанные с иммунизацией и последующим взятием крови, проводились при наличии персонального разрешения и утвержденного специального разрешения на предстоящие работы. Каждый исследователь несет личную ответственность за благополучие животных. Необходимо вести соответствующую запись всех процедур. Иммунизацию, анестезию, взятие крови и забой выполняют аккуратно, с целью снизить до минимума боль и стресс. Использование овец тоже требует специального разрешения. Без соответствующего разрешения нельзя проводить никаких работ, предусматривающих получение антисывороток и моноклональных антител. Лицензии необходимы для того, чтобы доказать наличие соответствующего опыта в работе с животными. Аналогичные строгие инструкции по использованию животных для получения антител существуют во всех странах, входящих в Европейское экономическое сообщество, и в США.

### 3. Приготовление иммуногена

#### 3.1. Иммуногены, получаемые путем конъюгации гаптена с белком

Для получения антител к веществам с низкой мол. массой необходима их конъюгация с носителем, обычно белком. Использование сложного белкового носителя имеет то преимущество, что он, как и тимус-зависимый антиген, вызывает актив-

вацию и пролиферацию Т-хелперов, которые способствуют формированию ответа на гаптен. Для получения эффективного ответа желательно, чтобы на каждые 100 кДа носителя приходилось 10—30 молекул гаптена.

Некоторые гаптены способны спонтанно соединяться с аминокгруппами белков и благодаря легкости синтеза и простоте строения занимают особое место в изучении клеточных основ, кинетики и специфичности гуморального ответа. Примерами таких гаптенов служат динитрофенил (ДНФ) и тринитрофенил (ТНФ). В качестве носителей обычно используют гетерологичные  $\gamma$ -глобулины, альбумины и тиреоглобулины, а также гемоцианины моллюска фиссуреллы и краба *Maia squinado*.

Если небольшие молекулы не могут спонтанно соединяться с носителем, необходима химическая активация или образование мостиков. Здесь существует несколько возможностей, выбор которых зависит от функциональных групп данного гаптена, от требуемой пространственной ориентации гаптена, расстояния между ним и носителем и от влияния конъюгации на биологические и антигенные свойства. Этот вопрос детально рассмотрен Паркером [12], методы конъюгации, не перечисленные ниже, освещены в двух обзорах [13, 14]. Далее приведены примеры, иллюстрирующие основные подходы.

### 3.1.1. Методы спонтанного связывания

1. ТНФ-бычий гамма-глобулин (ТНФ-БГГ). 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (пикрилсульфоновая кислота, ТНБС) взаимодействует с белками при pH 10—11 при комнатной температуре в водном растворе, при этом сульфат отщепляется и ТНФ замещает белковую аминокгруппу с образованием ТНФ-гаптена.

1. Растворяют 50 мг БГГ в 5 мл 0,1 М бикарбонатного буфера ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pH 9, в 20-мл стеклянном флаконе,

2. Отвешивают 25 мкг ТНБС на 1 мг белка-носителя (т.е. 1,25 мг) и растворяют в 1 мл того же буфера. Короткую (10 см) и узкую диализную трубочку обмывают дистиллированной водой, туго завязывают с одного конца, помещают внутрь раствор гаптена с помощью пастеровской пипетки и завязывают другой конец так, чтобы получился небольшой диализный мешочек.

3. Погружают мешочек в раствор белка и медленно перемешивают последний на ледяной бане с помощью магнитной мешалки в течение ночи при 4°C.

4. Заполняют небольшую (30×1,25 см) хроматографическую колонку сефадексом G25 (Pharmacia), уравновешенную PBS при pH 7,2, и пропускают через нее смесь с помощью

PBS. Собирают первую видимую желтую фракцию, содержащую конъюгат, свободный гаптен задерживается в верхней части колонки.

5. Для определения молярного отношения ТНФ : БГГ в конъюгате готовят разведения примерно 1 : 30 и определяют на спектрофотометре пики поглощения при длинах волн 355 нм (для гаптена) и 280 нм (для белка-носителя).

ОП 1 мг/мл ТНФ (мол. масса 229), в кювете 1 см = 62,9.

ОП 1 мг/мл БГГ (мол. масса. 150 000), в кювете 1 см = 1,45.

Например, получены следующие данные:

Оптическая плотность (ОП) при 355 нм при разведении 1 : 30 равна 0,137, ОП при 280 нм равна 0,185

$$\text{Содержание ТНФ в конъюгате} = \frac{0,137 \cdot 30}{62,9} = 0,07 \text{ мг/мл.}$$

$$\text{Содержание БГГ в конъюгате} = \frac{0,185 \cdot 30}{1,45} = 3,8 \text{ мг/мл.}$$

$$\text{Молярное соотношение гаптен : белок} = \frac{0,07}{229} : \frac{3,8}{150\,000} = 12.$$

Поскольку ТНФ, конъюгированный с белком, обеспечивает ~40% светопоглощения при 280 нм, то, следовательно, истинное соотношение близко к 20.

II. ДНФ-гемоцианин краба *Maia squinado*. Простой метод получения конъюгата заключается в следующем [15]:

1. 50 мкг гемоцианина растворяют в 10 мл 0,1 М боратного буфера, pH 8,5.

2. Этот раствор смешивают с 9 частями (по весу) 2,4-динитрофлуоробензола (ДНФБ) в масле.

3. Нагревают смесь до 37°C для перевода гаптена в водный раствор. Перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем интенсивно диализуют против физиологического раствора при 4°C для удаления свободного ДНФБ.

Данный метод позволяет получить соотношение ДНФ : гемоцианин = 150, учитывая, что мол. масса гемоцианина составляет около  $10^6$ .

### 3.1.2. Присоединение путем активации и формирования мостиков

В настоящее время известны три основных подхода для присоединения гаптена к белку-носителю:

1. Формирование мостиков между группами аминокислот гаптена и носителя путем введения диизоцианатов, галонитрофенолов или пмидоэфиров.

2. Использование бифункциональных солей диазония для формирования мостиков между остатками тирозина, гистидина или лизина.

3. Активация карбоксильных групп гаптена для взаимодействия с аминокруппами белка-носителя с образованием связи  $\text{CO}-\text{NH}$ . Для этого применяют такие вещества, как карбодимиды, алкилхлороформаты и соли изооксазолия.

*1. Конъюгация уреазы с IgG овцы одноэтапным методом с использованием глутарового альдегида.*

1. 5 мг очищенного IgG овцы в 2 мл диализуют в течение ночи против 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,8) при 4°C. При перемешивании добавляют 20 мг уреазы и 50 мкл 1%-ного раствора глутарового альдегида.

2. Инкубируют смесь при комнатной температуре 2 ч, а затем добавляют 200 мкл 1 М раствора лизина, рН 7,0, чтобы блокировать оставшиеся участки связывания. Спустя еще 2 ч диализуют смесь против PBS (рН 7,0) при 4°C в течение ночи и центрифугируют (40 000 g, 1 ч).

3. Для удаления непрореагировавшей уреазы наносят конъюгат на колонку с сефадексом G25 в PBS и собирают первый белковый пик.

*II. Связывание антибиотиков-аминогликозидов (амикацина, гентамицина) со свиным тиреоглобулином или бычьим сывороточным альбумином (БСА) с помощью водорастворимого карбодимиды [16].*

1. Растворяют 40 мг антибиотика в 0,5 мл дистиллированной воды и доводят рН до 5 (если необходимо) с помощью 1 М HCl. Добавляют 20 мг носителя, медленно растворяя его и избегая образования пены.

2. Растворяют 100 мг хлористоводородного 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодимиды в 0,5 мл дистиллированной воды, добавляют его в первый раствор и инкубируют 2 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая.

3. Диализуют смесь в течение 2 дней при 4°C против 1 л PBS (рН 7,2), меняя несколько раз диализный буфер для удаления несвязавшихся реагентов.

С помощью аминогликозидов, меченных тритием (Amersham International), разбавленных немеченым гаптенем в известной пропорции, было показано, что приведенный выше метод конъюгации дает соотношение 20—90 гаптенных групп на одну молекулу тиреоглобулина (мол. масса 650 000) и 5—20 на одну молекулу альбумина (мол. масса 66 000). Это было установлено путем отделения непрореагировавшего аминогликозида от конъюгата при нанесении смеси на колонку с сефадексом G25 в PBS и сбора первого, максимального белкового пика.

*III. Конъюгация  $\beta$ -D-галактозидазы и IgG овцы с использованием N,N'-O-фенилендималеимида.*

1. Диализуют 14 мг IgG овцы в 2 мл против 0,1 М ацетатного буфера (pH 5,0) в течение ночи и центрифугируют при 3000 об/мин 20 мин для удаления нерастворенного белка. Восстанавливают, добавляя 10 мМ (2,27 мг) 2-меркаптоэтиламина, и инкубируют при 37°C 90 мин.

2. Отделяют IgG от компонентов с меньшей мол. массой на колонке с сефадексом (1×40 см) G25, уравновешенной ацетатным буфером.

3. Определяют количество IgG по поглощению при 280 нм (1 мг/мл, 1 см, = 1,45).

4. Добавляют 3 мг в 1 мл восстановленного IgG по капле к 1 мл насыщенного раствора N,N'-О-фенилендималеимида (0,75 мМ) при 0°C. Инкубируют смесь при 30°C 20 мин, затем наносят на колонку с сефадексом G25 для удаления непрореагировавшего связывающего агента.

5. Доводят концентрацию IgG до оптической плотности около 1,0 при 280 нм. Инкубируют каждый 1 мл с 20 мкл β-D-галактозидазы (5 мг/мл) 20 мин при 30°C. Нейтрализуют смесь 1 М NaOH, добавляя 15—20 мкл/мл.

6. Добавляют по 2 мкл 5%-ного БСА и 1 М MgCl<sub>2</sub> для стабилизации фермента. Выдерживают смесь при 4°C 72 ч и очищают конъюгат на колонке с сефарозой 6В (1×40 см), уравновешенной 0,01 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,0), содержащим 0,1 М NaCl, 0,1% азида натрия, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,01% БСА. Используют этот буфер как для элюции, так и для хранения конъюгата.

#### IV. Безводная методика конъюгации гликохолевой кислоты и БСА [17].

Данный метод является основным для конъюгации стероидов с белками. Мы используем следующую модификацию [18]:

1. Растворяют 537 мг (1,1 мМ) гликохолевой кислоты в 10 мл диоксана. Добавляют 0,25 мл (1,1 мМ) три-*n*-бутиламина, а затем — 0,14 мл (1,1 мМ) изобутилхлоркарбоната. Реакцию проводят 20 мин при 4°C. Добавляют 1,5 г (0,02 мМ) БСА в 85 мл смеси воды и диоксана (1:1, объем на объем), содержащей 1,5 мл 1 М NaCl.

2. Через 1 ч добавляют 2 мл 1 м NaOH и оставляют смесь еще на 3 ч при 4°C. Добавляют ледяной (0°C) ацетон в реакционную смесь и собирают образовавшийся преципитат центрифугированием (5000 g, 30 мин, 4°C).

3. Суспендируют преципитат в NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,5) и повторно обрабатывают ледяным ацетоном. Ресуспендируют преципитат в NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,5) и диализуют против 0,5 М фосфатного буфера 48 ч. Последний этап необходим для полного удаления свободной гликохолевой кислоты из конъюгата. Анализ

забуференного раствора конъюгата с помощью 3 $\alpha$ -гидроксистероид-дегидрогеназы показывает, что можно связать 12 молей гликохолевой кислоты с 1 М альбумина.

*V. Конъюгация путем превращения ароматических аминок групп гаптена в группы диазония.*

Реакцию проводят в два этапа: диазотируют аминокгруппы гаптена с помощью HCl и NaNO<sub>2</sub>, а затем спонтанно конъюгируют их с тирозином белка-носителя. Использование бифункциональной соли диазония (бис-диазотированный бензидин) обеспечивает спонтанное образование мостиков между гаптенами с ароматическими аминокислотами (т. е. пептидами) и белками. Пример такой двухступенчатой реакции — конъюгация *пара*-аминобензойной кислоты с БСА.

1. Растворяют 100 мг БСА в 10 мл 0,5 М боратного буфера (рН 9,0).

2. Обрабатывают 15 мг *пара*-аминобензойной кислоты 1,6 мл 0,2 М HCl и доводят объем до 5 мл дистиллированной водой. Охлаждают до 0°C на ледяной бане.

3. Растворяют 8 мг NaNO<sub>2</sub> в 0,5 мл дистиллированной воды при 0°C и добавляют к раствору *пара*-аминобензойной кислоты. При этом образуется свободная азотистая кислота, определяемая по окрашиванию иодно-крахмальной бумажки в синий цвет. Избыток HCl необходим для образования гидрохлорида амина и азотистой кислоты, с тем чтобы последующая реакция соединения протекала в кислой среде.

4. Добавляют по капле парадиазония хлорид бензойнокислый в раствор БСА. Через 1 ч нейтрализуют раствор и удаляют несвязанный диазоний интенсивным диализом.

*VI. Конъюгация путем тиолирования неароматических аминокгрупп гаптена.*

Данный широко используемый метод включает предварительную обработку гаптена и белка-носителя путем соединения их аминокгрупп с N-сукцинимидил-3(2-пиридилдитио)проприонатом (СПДП) при рН 7,5.

Мы используем следующую методику конъюгации пероксидазы хрена (ПХ) с IgG [19].

1. Растворяют 10 мг ПХ в 2 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 0,1 М NaCl. Добавляют по каплям при помешивании 400 мкг СПДП, растворенного в 0,5 мл абсолютного спирта. Реакция протекает в течение 30 мин при комнатной температуре при периодическом помешивании.

2. Удаляют избыток СПДП и продукт реакции N-гидроксисукцинимид от 2-пиридил-дисульфид-замещенного фермента путем гель-фильтрации через колонку с сефадексом G25



(1,6×35 см), элюируя PBS замещенную ПХ в первом белковом пике.

3. Идентичную реакцию проводят с СПДП и IgG, используя 10 мг белка, но в этом случае только 10—15 мкг СПДП в 0,2 мл этанола. Замещенный IgG тоже элюируют с помощью PBS из колонки с сефадексом G25.

4. Создают активные тиоловые группы на ферменте путем восстановления 2-пиридил-дисульфидных групп с помощью раствора дитиотреитола из расчета 2,5 мМ на 1 мг замещенного фермента при комнатной температуре. Избыток восстановителя и пиридин-2-тиона удаляют гель-фильтрацией.

5. Содержащую тиоловые группы пероксидазу и 2-пиридил-дисульфид-IgG смешивают в соотношении 1:1 (вес на вес) и оставляют на 18 ч при 4°C.

6. Отделяют конъюгат и несвязавшийся фермент на колонке с сефакрилом S-200 (1,6×95 см), используя для элюции PBS. Первый белковый пик с ферментной активностью содержит конъюгат с мол. массой около 200 000.

#### VII. Конъюгация углеводных гаптенов с носителями.

Существует несколько методов конъюгации углеводных гаптенов с носителями, выбор метода зависит от использования карбоксильных (кислые углеводы) или гидроксильных групп [14].

Если карбоксильные группы отсутствуют, можно провести карбоксиметилирование с помощью хлорацетата, который связывается с гидроксильными группами с образованием карбоксила [20]. Используя этот прием, многие углеводы, так же как и кислые полисахариды, удается затем соединить с белками через карбоксильные группы, например, с помощью карбодимидной реакции.

Карбоксиметилированные и кислые углеводы (с собственными карбоксильными группами) широко применяют как носители в исследованиях гуморального ответа на тимус-независимые синтетические иммуногены. Аминоэтилирование позволяет подготовить эти носители для спонтанной конъюгации с гаптенами, типа ТНБС. Аминоэтил-карбоксиметил-фиколл (АЭКМ-фиколл), соединенный с ТНФ, — один из наиболее популярных тимус-независимых иммуногенов. Для его приготовления используют следующий метод [14]:

1. Растворяют 40 мг АЭКМ-фиколла в 2 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>. Добавляют по каплям 50 мкл ТНБС в концентрации 26 г/л.

2. Перемешивают смесь 18 ч при 4°C, а затем диализуют против физиологического раствора (4°C, 4 дня) для удаления несвязавшегося гаптена. Это позволяет связать около 4,2 молекул ТНФ с каждым 100 кДа носителя. АЭКМ-фиколл имеет мол. массу около 400 000.

### 3.2. Получение макромолекул для иммунизации

Большое разнообразие макромолекул, изучаемых с помощью антител, включает не только естественные продукты животных и растений, но и продукты микробного происхождения, и синтетические вещества. Приготовление поликлональной антисыворотки к определенным молекулам может включать предварительную очистку, если нельзя получить очищенный коммерческий препарат. Для компонентов клеточной поверхности современный подход — это получение моноклональных антител требуемой специфичности; при этом решается проблема очистки иммуногена (см. гл. 3). С другой стороны, с помощью уже существующих антител можно очистить компоненты клеточной поверхности, а также проводить обогащение клеток, экспрессирующих антиген-мишень. Эти подходы обсуждены в гл. 5. Метод экстракции имеет большое значение в тех случаях, когда необходимо получить полиспецифическую антисыворотку к смеси иммуногенов, например экстрагированных клеточных мембран, гомогенатов тканей, разрушенных ультразвуком бактерий, вирусов и паразитов. Невозможно в этой главе привести детальное руководство по экстракции и очистке огромного разнообразия иммуногенов. Существует специальная литература, посвященная методам получения углеводных, бактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных антигенов [21]. Очистка с помощью аффинной хроматографии описана в гл. 5, а приготовление иммуноглобулинов (как иммуногенов) — в разд. 10 настоящей главы. Ниже приведены методы получения иммуногенов и подходы к иммунизации, имеющие особое значение.

#### 3.2.1. Использование иммунных комплексов

Преципитат обладает высокой иммуногенностью и как бы представляет собой естественную форму адьювантированного антигена. Использование нанограммовых количеств иммуногена в составе преципитата позволяет получать хорошую антисыворотку при повторном введении с адьювантом.

1. *Преципитаты, получаемые в пробирке.* С помощью небольших исходных количеств антисыворотки иммуноген может быть селективно осажден из смеси веществ в пробирке. Преципитацию способствует добавление 3%-ного (вес на объем) раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) (мол. масса 6000, см. приложение). Рекомендуется использовать очищенный IgG, чтобы избежать включения в состав комплекса компонентов комплемента. Реакцию лучше проводить в небольших преципитационных пробирках с одним и тем же количеством анти-

тел и различными концентрациями иммуногена, который добавляют в эквивалентном объеме PBS (0,01 M, pH 7,4) с 6% ПЭГ. После инкубации в течение 1 ч при 37°C и в течение ночи при 4°C происходит видимая на глаз преципитация в средней части слоя. Для иммунизации используют преципитат из той пробирки, где содержался небольшой избыток антигена, центрифугируют (10 000 g, 1 ч) и трижды промывают 3%-ным раствором ПЭГ в PBS. Затем преципитат суспендируют в небольшом объеме PBS и вводят в ПАФ для инъекции (см. разд. 4). В тех случаях, когда антисыворотка принадлежит другому виду животных, при иммунизации, помимо ответа на антиген, образуются антитела к гетерологичным Ig. Антиглобулины, однако, легко удалить абсорбцией (см. разд. 9).

Преципитация иммунных комплексов из сыворотки с помощью ПЭГ необходима в том случае, когда подразумевается, что антиген для иммунизации циркулирует в крови в виде растворимых иммунных комплексов. Равные объемы сыворотки и 4%-ного ПЭГ смешивают и инкубируют 1 ч при 4°C, затем центрифугируют (10 000 g, 1 ч, 4°C), дважды отмывают преципитат 2%-ным ПЭГ в PBS, осадок ресуспенсируют в PBS и используют в комплексе с ПАФ.

II. *Линии и пики преципитации в гелях.* Преципитат, полученный в геле, после отмывания и гомогенизации может быть использован для иммунизации. При этом легко и быстро получить моноспецифические антитела, не прибегая к помощи трудоемких и требующих особых навыков методов выделения иммуногена. При проведении двумерного иммуноэлектрофореза (см. гл. 6) сложную смесь антигенов предварительно разделяют в одном направлении, а затем в другом (перпендикулярном первому) в слое агарозного геля, содержащего соответствующие антитела. Участки геля, где пики не перекрываются, можно аккуратно вырезать и использовать как очищенный комплекс для иммунизации. Данный метод применим к любому антигену, который мигрирует к аноду при pH 8,6 и содержится в исходной смеси в концентрации более 10—20 мкг/мл, т. е. способен образовать видимый пик. Пример подобного подхода приведен на рис. 2.2. Для получения удовлетворительных результатов мы рекомендуем использовать следующую методику.

1. Убеждаются, что электрофорез в первом направлении обеспечивает оптимальное выделение пика требуемого антигена.

2. Используют большие резервуары для буфера, свежий буфер и новые или тщательно вымытые фитили так, чтобы не контаминировать агарозу примесями ранее разделявшихся белков.

3. Используют IgG-фракцию антисыворотки в агарозе для уменьшения загрязнения агарозы белками; доводят концентрацию таким образом, чтобы нужный пик преципитации полностью сформировался и отстоял от других пиков.

4. Проводят электрофорез на плите с охлаждением в течение ночи или большего промежутка времени, чтобы не образовавшиеся преципитатов молекулы вышли из геля.

5. Используют несколько пластин, чтобы одновременно получить несколько пиков для первичной и бустерных инъекций.

6. Вырезают пики и погружают их в физиологический раствор (20 мл в универсальном стеклянном флаконе) при 4°C не менее чем на неделю, в течение которой раствор несколько раз меняют. Затем один или несколько пиков могут быть ресуспендированы в небольшом объеме PBS с помощью стеклянного гомогенизатора или электрического смесителя и далее эмульгированы с ПАФ.

В случае антигенов, при pH 8,6 мигрирующих к катоду, можно вырезать линии преципитации, образующиеся в результате ИЭФ с полиспецифической сывороткой. Могут быть использованы только те части линий, которые не пересекают и не касаются других. Настоятельно рекомендуется использовать очищенную фракцию IgG и очень энергично отмывать преципитат.

Используя моноспецифическую антисыворотку, можно выделять отдельные антигены из смеси с помощью ракетного ИЭФ (гл. 6). Преимущество данного метода заключается в том, что он позволяет получить множество идентичных ракет на одной пластине. Необходимо соблюдать те же указания, что и для двумерного ИЭФ, однако при этом не требуется осуществлять первый этап электрофоретического разделения белков. Метод чувствителен к контаминирующим антителам в так называемой моноспецифической антисыворотке, которые реагируют с другими компонентами смеси антигенов. Поэтому убедитесь, что вы используете для иммунизации только нужную часть ракеты.

### **3.2.2. Использование попов и реплик на нитроцеллюлозе**

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ЭПАГ) стал повседневной процедурой для определения компонентов сложных молекулярных смесей. Электрофоретический перенос полосы на нитроцеллюлозную мембрану (Вестерн-блоттинг) обеспечивает возможность не только тестирования специфичности антител, но и позволяет сконцентрировать макромолекулярный иммуноген для последующего введения его животным. Показано, что окрашенные на белок, вырезанные и тонко измельченные по-

люсы сохраняют антигенные свойства. Имеется сообщение о том, что мышей можно иммунизировать с помощью всего лишь 10 нм белка, адсорбированного на нитроцеллюлозе [22]. Большие количества антигена, адсорбированного на нитроцеллюлозе, используются для иммунизации после измельчения в ДМСО [23].

### **3.2.3. Простой метод получения антиглобулиновой сыворотки с помощью эритроцитов**

При гуморальном ответе животного на эритроциты другого вида образуются IgM и IgG. Затем антиэритроцитарные антитела «нагружают» на эритроциты-мишени, которые при введении донору эритроцитов, вызывают образование антиглобулинов. Этот простой подход позволяет избежать очистки иммуноглобулинов и дает хорошие результаты. Например, введя кролику внутривенно 1 мл отмытых в физиологическом растворе эритроцитов барана (10%-ная суспензия, объем на объем), можно легко получить соответствующие антиэритроцитарные антитела. При взятии крови через 10 дней после первой инъекции главным образом получают IgM. Повторное введение антигена через 1 нед и 2 раза в неделю в течение последующих нескольких недель с забором крови через 2—5 дней после последней инъекции преимущественно обеспечивает получение IgG. Сыворотки затем могут быть смешаны.

1. Прогревают 0,5 мл смешанной сыворотки при 56°C в течение 20 мин для инактивации комплемента. Добавляют к 5 мл отмытой 10%-ной суспензии эритроцитов, закрывают флакон и быстро перемешивают содержимое переворачиванием.

2. Медленно перемешивают клетки 20 мин в смесителе с круговым вращением, а затем отмывают 5 раз холодным PBS.

3. Отмытые и нагруженные антителами клетки могут быть использованы для иммунизации овец.

Аналогичный подход может быть, например, использован для получения кроличьей антисыворотки к мышиному иммуноглобулину. Процедура иммунизации описана в разд. 5.

Модифицируя метод, можно получить моноспецифические антисыворотки к IgM и IgG. В этом случае у кролика берут кровь на ранней стадии гуморального ответа, IgM отделяют от IgG и нагружают на эритроциты. В поздние сроки выделяют и аналогичным образом используют IgG. Предварительные этапы заключаются в следующем.

1. *Выделение IgM.* 5 мл инактивированной нагреванием сыворотки помещают на колонку с сефадексом G200 (40×3,5 см) в PBS, pH 7,2, пропускают со скоростью 25 мл/ч и собирают фракции объемом 5 мл. Каждую фракцию исследуют на агглютинирующую активность, и первые четыре положительных

образца, соответствующие первому элюируемому пику (IgM), отбирают и нагружают на эритроциты.

II. *Выделение IgG.* 5 мл инактивированной сыворотки, полученной от повторно иммунизированного кролика, разделяют, как описано выше. В этом случае четыре образца, соответствующие середине второго элюируемого пика (IgG), обладающие агглютинирующей активностью, собирают, смешивают вместе и нагружают на эритроциты. По нашему опыту, антисыворотка, полученная таким образом, обладает незначительной перекрестной реактивностью с легкими цепями, которую можно устранить абсорбцией с помощью эритроцитов, нагруженных антителами другого класса.

#### 3.2.4. Индукция толерантности

Антитела, распознающие минимальные структурные различия между родственными молекулами одного вида животных, часто трудно получить при ксеноиммунизации, поскольку иммунный ответ преимущественно направлен против сильных антигенных различий донора и реципиента. Иногда удается индуцировать специфическую толерантность по отношению к иммунодоминантным эпитопам и, таким образом, изменить специфичность гуморального ответа. Данный метод может использоваться для получения как поликлональных, так и моноклональных антител. Мы успешно получали овечью антисыворотку ко всем аллотипическим антигенам локусов *a* и *b* кроличьих иммуноглобулинов, вводя в/в новорожденным ягнтям 500 мг пула очищенного ультрацентрифугированием кроличьего IgG, лишенного какой-либо одной аллотипической детерминанты; в возрасте трех месяцев эту аллель вводили с ПАФ внутримышечно.

При получении МКА к подклассам IgG человека, специфичных в отношении лишь тех минимальных различий, которые существуют в областях, определяющих антигенность подкласса, оказалось полезным получение толерантности у мышей-продуцентов путем в/б инъекции около 12 мг IgG определенного подкласса за неделю до иммунизации другими подклассами [24]. Парапротеины, используемые для создания толерантности, подвергли биофильтрации путем пассажа на мышах, сыворотка которых служила в дальнейшем источником толерогена.

#### 3.2.5. Модуляция гуморального ответа путем образования комплексов антител с некоторыми определенными эпитопами антигена

В некоторых случаях удается изменить выраженность гуморального ответа на полидетерминантный антиген путем связывания с ним антител (моноклональных антител, специ-

фичных к определенным эпитопам) и применения полученного комплекса для иммунизации. Недавно было показано [25], что у мышей в ответ на введение  $IgG_d$  человека образуется большое количество анти- $\lambda$ -антител, в том случае, когда молекула  $IgG$  связана с одним или более моноклональным антителом к  $\gamma$ -цепи. Однако выработка анти- $\lambda$ -антител подавляется моноклональными антителами к  $\lambda$ -цепи. Более того, образование комплекса  $IgG$  с моноклональными антителами, специфичными к  $\gamma$ -цепи (анти- $Fc\gamma$ ), усиливает ответ на слабо иммуногенный домен  $\gamma 1$ , в то время как не удалось получить ответ на  $C\gamma 1$  у мыши, инъецированной  $IgG$ , связанным с моноклональными антителами к  $C\gamma 1$ . Аналогичную супрессию ответа не удавалось получить и при связывании антител с сильно иммуногенными участками молекулы. Этот подход важен с точки зрения стратегии изменения специфичности гуморального ответа к разным участкам молекул с низкой или умеренной иммуногенностью.

### 3.3. Контроль чистоты и состава растворимых иммуногенов

При получении моноспецифических антител основные проблемы обусловлены не уровнем гуморального ответа, а необходимостью абсорбции антител нежелательной специфичности, образующихся вследствие различных загрязнений иммуногена. Поэтому очень важно контролировать чистоту иммуногена и идентифицировать примеси. Даже в том случае, если они не могут быть удалены, знание их природы позволит в последующем провести абсорбцию антисыворотки. Если задача заключается в получении полиспецифических антител, то не менее важно продемонстрировать неоднородность смеси, поскольку это служит отправной точкой в успешном достижении баланса между разнообразными компонентами антисыворотки.

#### 3.3.1. Методы, основанные на использовании антител

Данные методы основаны на использовании полиспецифических антисывороток для определения либо чистоты выделенного антигена по сравнению с исходным материалом, либо качества контрольного реагента при получении новой антисыворотки с эквивалентной полиспецифичностью.

В этом отношении эффективны такие методы, как двойная диффузия по Ухтерлонн (наименее чувствительный метод), иммуноэлектрофорез (для индивидуального антигена или смеси антигенов), ракетный ИЭФ (для индивидуального антигена) и двумерный ИЭФ (для определенного антигена или смеси антигенов). Данные методы описаны в гл. 6. На рис. 2.1 при-

ведены электрофореграммы IgM человека из цельной сыворотки. Использованы контрольная антисыворотка к основным компонентам исходной смеси (антитела к цельной сыворотке человека) и вторая специфическая контрольная антисыворотка к молекулам, подлежащим очистке (к  $\mu$ -цепи IgM человека) в качестве положительного контроля.

На рис. 2.2, А показано распределение пиков антигенов взрослой особи *Schistosoma mansoni*, полученное методом двумерного ИЭФ с помощью полиспецифической антисыворотки, при этом может быть проконтролирована чистота отдельных антигенных компонентов. Рис. 2.3 иллюстрирует, каким образом чистота иммуногена может быть проверена с помощью метода Ухтерлони и ракетного ИЭФ.

**3.3.2. Электрофоретическое разделение белков в геле.  
Проведение электрофореза в полиакриламидном геле  
в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ЭПАГ)**

ДСН-ЭПАГ — это основной метод, который повседневно применяют для аналитического разделения белков. Он требует специального оборудования и дорогостоящих реагентов, но незаменим в процессе получения и исследования антител. Ценность метода заключается не только в его высокой разрешающей способности в широком диапазоне мол. масс, но и в том, что с помощью дополнительных этапов он позволяет определить специфичность антител. Мы не можем перечислить все варианты данного метода, поэтому отсылаем читателя к специальной литературе [26]. В данном разделе мы ограничимся лишь кратким описанием принципа и простейшей методики, применяемой для анализа белков. Дополнительные этапы, необходимые для воспроизведения методики при определении специфичности антител, приведены в гл. 6.

1. *Принцип метода.* Когда белки кипятят в присутствии ДСН и восстановителя (например, 2-меркаптоэтанола), они распрямляются и связывают около 1,4 г ДСН на 1 г белка. Пептидная цепочка приобретает форму жесткого эллипсоида вращения. Его малая ось имеет постоянную длину, а размер большой линейно связан с мол. массой белка. В результате связывания ДСН полипептидные цепи приобретают однородный отрицательный заряд, в результате чего отношение заряд: масса у них становится постоянным. Когда в соответствии с этим зарядом они электрофоретически перемещаются в полиакриламидном геле, их подвижность обратно пропорциональна логарифму массы. Таким образом, небольшие молекулы движутся быстрее и мигрируют дальше, а более крупные перемещаются медленнее. Положение каждого из компонентов после окрашивания на белок можно сравнить с положением



маркеров мол. массы, мигрирующих по контрольной дорожке, что позволяет определить мол. массу исследуемого белка. Для достижения максимальной разрешающей способности смесь белков вносят в карманы верхнего концентрирующего геля (для формирования карманов используют гребенку). Концентрирующий гель, содержащий меньше акриламида и обладающий минимальным ситовым эффектом, вместе с буфером, содержащимся в образце, создает прерывистую буферную систему из хлорид- и глицинатных ионов при pH 6,8, в которой подвижная граница с идущими впереди хлорид-ионами собирает белки в узкую зону до того, как они войдут в разделяющий гель.

Полиакриламид представляет собой продукт полимеризации акриламида и какого-либо вещества, образующего поперечные сшивки, — обычно  $N,N'$ -метиленабисакриламида (сокращенно бис-акриламида). Полимеризацию осуществляют в присутствии катализатора — например, системы персульфат аммония —  $N,N,N',N'$ -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) или рибофлавин — ТЕМЭД, причем первый наиболее часто используется в случае гелей, содержащих 3—4% акриламида. Высокая химическая и механическая стабильность полиакриламидных гелей придает им свойства идеальной поддерживающей среды для электрофореза белков.

II. Реагенты (см. табл. 2.3). Отметим следующее:

1. Акриламид и бис-акриламид представляют собой нейротоксины, особенно в непolyмеризованном состоянии, но и полимеризованный гель может содержать некоторое количество

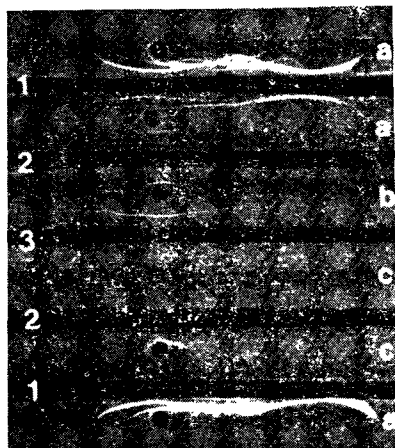


Рис. 2.1. Оценка чистоты IgM человека с помощью иммуноэлектрофореза. Реакция взаимодействия цельной сыворотки с соответствующей антисывороткой позволяет выявить широкий спектр возможных компонентов. Реакция с олигоспецифической антииммуноглобулиновой сывороткой свидетельствует о присутствии в неочищенном образце, кроме IgM, других классов иммуноглобулинов. Обе антисыворотки подтверждают чистоту конечного продукта, положение которого определено с помощью контрольной антисыворотки, специфичной к IgM. В лунки внесены: (а) цельная нормальная сыворотка человека; (б) частично очищенный IgM; (с) очищенный IgM. В канавки внесены: (1) полиспецифическая антисыворотка к цельной сыворотке человека; (2) контрольная сыворотка к IgM человека; (3) контрольная сыворотка к иммуноглобулинам (IgG, IgA, IgM) человека

этих веществ в мономерной форме. Отвешивать реактивы необходимо в маске и перчатках, в вытяжном шкафу. Обязательно используют перчатки при работе с растворами.

2. Концентрированные растворы можно хранить около 4 нед при 4°C. Не используют помутневшие растворы. Необходимо защитить растворы акриламида от света. Растворы ДСН, как и электродный буфер, хранят при комнатной температуре.

3. Персульфат аммония и ТЕМЭД хранят при 4°C.

4. Растворы геля необходимо дегазировать за 10—15 мин перед введением катализатора.

III. Приготовление гелей (см. табл. 2.4 для приготовления разделяющего геля шириной 14 см и толщиной 3 мм).

IV. Заливка гелей. Различные наборы для приготовления гелей включают пары стеклянных пластин, тефлоновые гребенки для формирования карманов в концентрирующем геле, прокладки для достижения требуемой толщины геля, форму и платформу для заливки геля, зажимы, прибор для вертикального электрофореза, источник питания, кюветы для отмывания и окрашивания гелей, приспособления для высушивания гелей и др. Поставщики оборудования — см приложение.

1. Отмывают стеклянные пластины, гребенки и прокладки и обезжиривают их метанолом. Изготавливают форму путем помещения прокладок (мы

Рис. 2.2. Двумерный ИЭФ экстракта растворимых антигенов поверхностной мембраны взрослой особи *S. mansoni*. А. Реакция в агарозе с полиспецифической антисывороткой, полученной при длительной иммунизации кроликов низкой дозой смеси антигенов в ПАФ. Б. Реакция в агарозе с моноспецифической антисывороткой, полученной в ответ на иммунизацию вырезанным пиком преципитации антигена 1 (положение антигена показано на верхнем снимке)

используем 3-мм прокладки) между пластинами у основания и по бокам и соединяют зажимами всю конструкцию. Помещают форму вертикально на смазанную жиром, покрытую резиновой платформу для заливки геля и обеспечивают надежное уплотнение. В некоторых случаях может потребоваться предварительная заливка нижней части формы 1%-ной (вес на объем) агарозой.

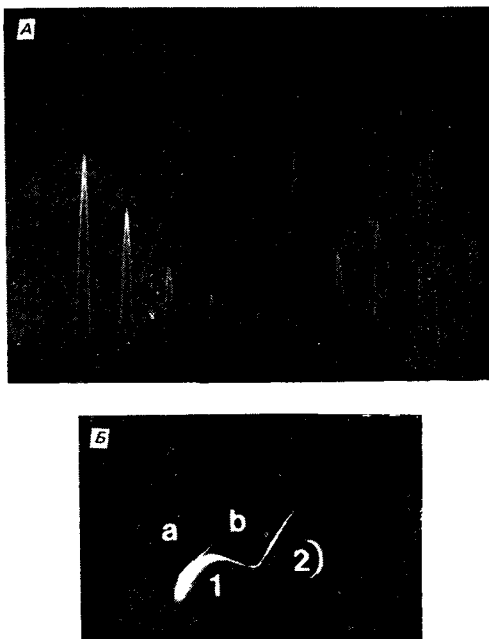


Рис. 2.3. Пример использования двух методов преципитации в геле для определения чистоты иммуногена с помощью антител. А. Ракетный иммуноэлектрофорез в агарозном геле, содержащем антитела к белкам цельной сыворотки, для проверки чистоты сывороточного альбумина (в лунках). Более длинные ракеты — результат реакции с альбумином; внутри них видны маленькие ракеты — результат реакции с контаминирующим антигеном в низкой концентрации. Б. Метод Ухтерлони для контроля чистоты альбумина: лунка 1 содержит полиспецифическую сыворотку к сывороточным белкам, лунка 2 — моноспецифическую сыворотку к альбумину. В лунку а внесен неочищенный препарат альбумина, который дает множественные линии преципитации с полиспецифической антисывороткой. В лунку б внесен очищенный альбумин, дающий одну линию с полиспецифической сывороткой и взаимодействующий с контрольной антисывороткой к альбумину

2. Готовят смесь для разделяющего (нижнего) геля требуемой концентрации, добавляют и перемешивают катализатор.

3. Заливают раствор геля плавно, но быстро в форму с помощью шприца или пипетки, стараясь не оставить пузырьков воздуха. Сразу же после заливки на гель наливают слой воды, чтобы исключить доступ воздуха и улучшить полимеризацию. Это позволяет выровнить и сгладить верхний край геля. На гель можно нанести 0,1%-ный водный раствор ДСН, изоамиловый спирт, или *n*-бутанол (последние имеют меньшую плотность, чем вода, что снижает возможность смешивания с

**Таблица 2.3. Реагенты, используемые для электрофоретического разделения белков в гелях**

<i>Исходные растворы акриламида</i>	
<i>Исходный раствор 1:</i>	
Акриламид 44 г	Доводят до 100 мл дистиллированной водой
Бис-акриламид 0,8 г	
<i>Исходный раствор 2:</i>	
Акриламид 30 г	Доводят до 100 мл дистиллированной водой
Бис-акриламид 0,8 г	
(Фильтруют через бумагу, например, Whatman № 1)	
<i>Буфер для образцов</i>	
10%-ный (вес на объем) ДСН	5 мл
0,5 М трис-НСl, рН 8,8	2,5 мл
Дистиллированная вода	5 мл
Глицерин	2,5 мл
2-Меркаптоэтанол	0,25 мл
5%-ный (вес на объем) бромфеноловый синий	0,2 мл
<i>Буфер для разделяющего геля, рН 8,9</i>	
Трис	36,6 г
1 М НСl	48 мл
Дистиллированная вода	до 100 мл
<i>Буфер для концентрирующего геля</i>	
Трис	12,1 г
Концентрированный НСl (доводят рН до 7,0)	
Дистиллированная вода до 100 мл	
<i>Другие компоненты геля</i>	
10 %-ный раствор (вес на объем) ДСН в дистиллированной воде	
Катализатор: 10%-ный раствор (вес на объем) персульфата аммония в дистиллированной воде — готовят свежий раствор непосредственно перед применением	
ТЕМЭД (длительно не хранят)	
<i>Электродный буфер (рН 8,3)</i>	
Трис	30 г
Глицин	144 г
ДСН	10 г
Дистиллированная вода	до 10 л
<i>Раствор красителя</i>	
Метанол : уксусная кислота : вода (25 : 10 : 65 по объему)	
0,03%-ный (вес на объем) раствор кумасси ярко-синего (перед использованием фильтруют)	
<i>Раствор для отмывания красителя</i>	
Состоит из тех же компонентов, за исключением кумасси ярко-синего	

Таблица 2.4. Приготовление разделяющего геля шириной 14 см и толщиной 3 мм

Разделяющий гель (мл)		Концентрирующий гель (мл)	
14%-ный гель			
Исходный раствор 1	18,75	Исходный раствор 2	5,0
10%-ный ДСН	1,50		0,3
1,5 М трис-НСI, pH 8,8	18,75		7,5
Дистиллированная вода	20,0		16,0
ТЕМЭД	0,140		0,08
10%-ный персульфат аммония	0,20		0,10
Продолжительность инкубации	15 мин		20 мин
10%-ный гель			
Исходный раствор 1	22,2	Исходный раствор 2	2,0
10%-ный ДСН	0,66		0,1
1,5 М трис-НСI, pH 8,8	16,6		2,5
Дистиллированная вода	25,18		5,3
ТЕМЭД	0,066		0,02
10%-ный персульфат аммония	0,66		0,10
Продолжительность инкубации	15 мин		15 мин

гелем). Однако, если гель будет храниться в течение ночи, лучше использовать воду или разделяющий буфер. Оставляют гель для полимеризации не менее чем на 30—45 мин, лучше — в течение ночи.

4. Приготавливают концентрирующий гель. Перед добавлением катализатора удаляют раствор, покрывающий слой нижнего геля, и ополаскивают гель водой. Добавляют катализатор, смешивают с концентрирующим гелем и заливают его. Немедленно вставляют гребенку требуемого размера для формирования карманов. На концентрирующий гель наливают воду для предотвращения испарения и выдерживают 20—30 мин.

5. Тем временем соединяют образцы с соответствующим буфером в разных объемах и помещают их в кипящую водяную баню на 2—5 мин. Образцы должны содержать 2—5 мг/мл белка из расчета 50 мкл (100—250 мкг) на лунку. Оптимальные концентрации варьируют в зависимости от состава исследуемой смеси, и их определяют опытным путем.

6. Удаляют гребенку из концентрирующего геля и трижды тщательно промывают карманы 0,1%-ным раствором ДСН в 0,5 М трис-НСI для удаления акриловой кислоты, образовавшейся в ходе полимеризации.

#### V. Проведение электрофореза

1. В карманы вносят образцы — высота образца должна быть меньше, чем расстояние от дна кармана до верхней границы разделяющего геля. Заполняют карманы электродным буфером.

2. Заполняют прибор для электрофореза электродным буфером и включают циркуляцию охлаждающей воды, если такая предусмотрена. Помещают пластины с гелем в прибор, заполненный буфером, и замыкают электрическую цепь.

3. Подключают ток 10—15 мА на 1,5 ч, а затем увеличивают силу тока вдвое на 1—2 ч до тех пор, пока фронт исследуемых образцов не окажется в 1 см от конца пластины. Отключают ток, размыкают электрическую цепь и извлекают пластины с гелем.

#### VI. Окрашивание и высушивание гелей.

1. Разнимают пластины и аккуратно вынимают гель под водой в небольшой кювете. Полностью погружают гель в раствор красителя для белка не менее чем на 1 ч.

2. Переносят гель в раствор для отмывания красителя и оставляют его на ночь до полного удаления фонового окрашивания. Усилить окраску можно методом серебрения с помощью специальных материалов (см. приложение). Это особенно целесообразно в тех случаях, когда исходная концентрация белка была низкой, а также для выявления полос небольших белковых включений.

3. Для высушивания гель помещают на гладкую поверхность полиэтиленовой пленки и накрывают фильтровальной бумагой. Затем высушивают. Для предотвращения образования складок высушенные гели хранят под грузом, например между страницами книги.

Описанный выше метод применяется для разделения экстрагированных бактериальных и паразитарных антигенов, а также компонентов сыворотки человека. Он позволяет получать хорошие полосы белков с мол. массой от 150 до 10 кДа. Для ограничения этого диапазона можно изменить концентрации акриламида. Известны наборы для приготовления мини-гелей (см. приложение). В них входят специальные кассеты для заливки гелей. Они более экономичны с точки зрения расхода реагентов и требуют меньше времени, но одновременно снижается разрешающая способность при разделении очень сложных смесей. Компромисс состоит в использовании мини-гелей с различными концентрациями акриламида. Рис. 2.4 иллюстрирует разрешающую способность 14%-ного геля шириной 14 см при разделении экстрагированных из мембран и разрушенных белков *E. coli* и микобактерий. Последние служат исходным материалом для получения как моноклональных антител, так и кроличьей полиспецифической антисыворотки. Белки *E. coli* получают следующим образом [27].

1. 250 мл культуры *E. coli* в середине логарифмической фазы роста центрифугируют (10 000 g, 10 мин, 4°C) и осадок ресуспендируют в 25 мл ледяного PBS (50 mM, pH 7,4). Затем

центрифугируют снова и осадок ресуспендируют в 2 мл PBS, содержащего 140 мМ 2-меркаптоэтанола, в небольшом флаконе.

2. Взвесь обрабатывают ультразвуком (ультразвуковой дезинтегратор W380 фирмы Life Science Lab.) на льду при максимальной мощности (380 Вт), применяя наконечник диаметром 1 см — 8 циклов по 30 с охлаждением взвеси на льду между циклами.

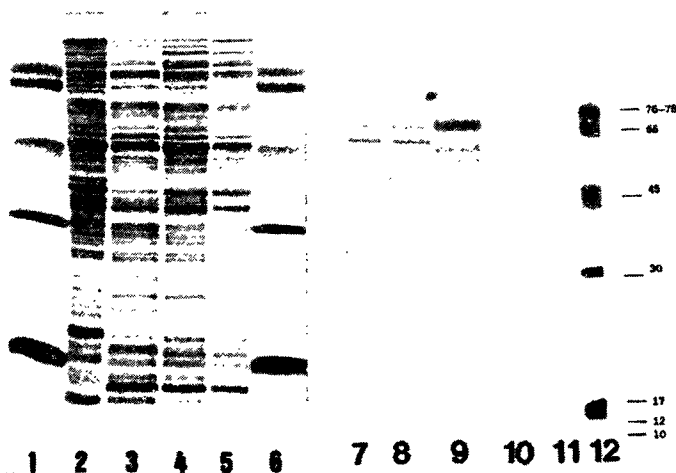


Рис. 2.4. Разделение экстрактов мембран *E. coli*, *M. bovis* (БЦЖ) и *M. tuberculosis* с помощью ДСН-ЭПАГ (14%-ный восстанавливающий гель). Пластины окрашены для выявления белков. Дорожки: 1, 6 и 12 — маркеры мол. массы; 2—5 — белки внутренней и наружной мембран *E. coli*; 7—8 и 9—11 — мембранные антигены и целый растворимый экстракт соответственно *M. tuberculosis* и *M. bovis* БЦЖ

3. Гомогенат центрифугируют (10 000 *g*, 10 мин, 4°C) и супернатант ультрацентрифугируют (100 000 *g*, 1 ч, 4°C), предварительно охладив ротор. Супернатант образует цитозоль.

4. Осадок ресуспендируют в 1 мл PBS (без 2-меркаптоэтанола) и вновь центрифугируют (10 000 *g*, 30 мин, 4°C). Осадок ресуспендируют в 100 мкл PBS.

5. Через 30 мин при комнатной температуре добавляют 10 мкл 20%-ного (вес на объем) саркозила (N-лаурилсаркозинат натрия) для растворения мембранных белков. Смесь ультрацентрифугируют (100 000 *g*, 30 мин, 10°C). Супернатант

представляет собой белки внутренней мембраны, осадок — белки наружной. На рис. 2.5 приведен пример анализа чистоты иммуногена с помощью ДСН-ЭПАГ.

#### 4. Получение адъювантов для иммунизации

##### 4.1. Водно-масляные эмульсии

##### 4.1.1. Неполный адъювант Фрейнда (НАФ)

Масляную фазу получают, добавляя 35% (объем на объем) эмульгатора Арлацела А (моноолеата маннита) к Байолу F — легкому парафиновому маслу. Компоненты тщательно перемешивают и хранят при 4°C.

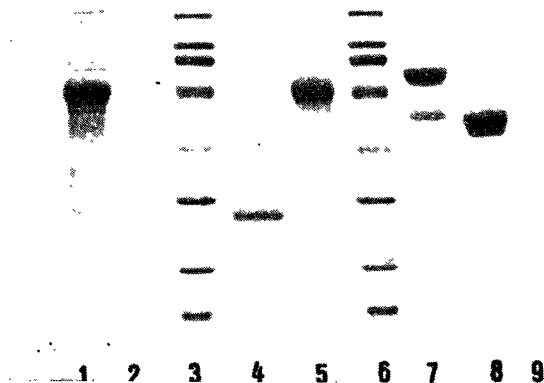


Рис. 2.5. Применение ДСН-ЭПАГ для определения чистоты иммуногена. Дорожки: 3 и 6 — маркеры мол. массы; 1 — мембранный экстракт БЦЖ; 4 — антиген БЦЖ 65 кДа; 5 — цельная сыворотка человека; 7 — легкие цепи иммуноглобулинов; 8 — тяжелые цепи IgG. Очищенный антиген БЦЖ любезно предоставлен д-ром Coulson из Национального института медицинских исследований, Милл Хилл, Лондон; субъединицы иммуноглобулинов — д-ром M. Walker

#### 1. Оборудование, необходимое для получения эмульсии иммуногена.

2-мл градуированные пипетки с плотной грушей

5-мл стеклянный флакон (bijou)

1—2 стеклянных шприца с замком Люэра со смазанными вазелином поршнями.

Игла № 20 с двумя канюлями или тефлоновые двухконечные адапторы для шприца (см. приложение)

50-мл мензурка с водопроводной водой

1—2-мл стеклянные шприцы для инъекций с поршнями, смазанными вазелином



## Инъекционные иглы.

### II. Методика.

1. Определяют необходимый общий объем эмульсии в соответствии с видом и количеством животных и способом введения; увеличивают этот объем на 20% в расчете на потери.

2. Переносят необходимый объем адьюванта во флакон.

3. Приготавливают равный объем раствора иммуногена (суспензии, преципитата) в воде и набирают его в шприц через иглу № 20, не втягивая воздуха.

4. Энергично вводят водную фазу с иммуногеном в масляную фазу и набирают весь объем в шприц аккуратно, без воздуха. Снимают иглу со шприца и присоединяют иглу с двумя канюлями или тефлоновый адаптор; удаляют воздух, присоединяют с другой стороны второй шприц с поршнем, смазанным вазелином. Убеждаются, что оба соединения хорошо уплотнены. Многократно перегоняют эмульсию из одного шприца в другой, пока белая эмульсия не загустеет и не возникнет сильного сопротивления. Эмульсию можно получить и с помощью одного шприца, набирая водную и масляную фазу из флакона в шприц и выдавливая обратно до тех пор, пока эмульсия не станет вязкой.

5. Стабильная водно-масляная эмульсия считается сформированной, когда капля ее, упавшая из иглы в холод-

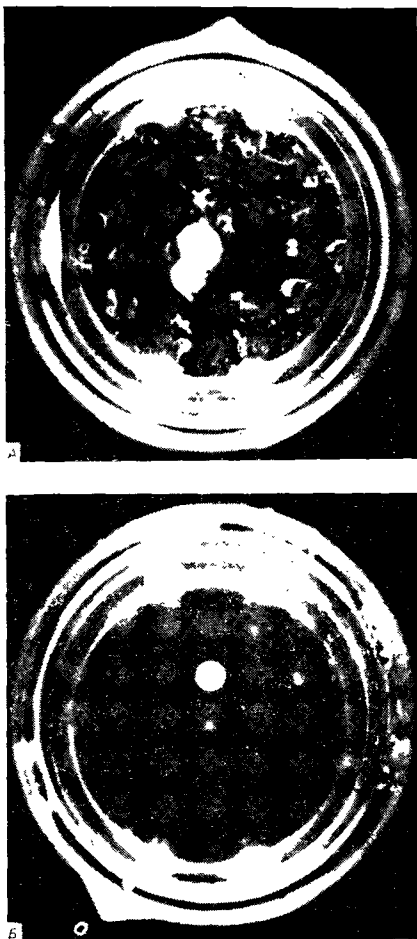


Рис. 2.6. Флотационная проба для проверки стабильности водно-масляной эмульсии иммуногена. А. Нестабильная, неправильно приготовленная эмульсия, которая разрушается в воде. Б. Стабильная эмульсия, капля не расплывается в воде

ную воду, быстро тонет, а затем всплывает, не распадаясь (рис. 2.6). Если капля распадается, эмульсию продолжают взбивать и испытывают снова. Это очень ответственный этап, поскольку нестабильная эмульсия после введения будет быстро распадаться в тканях.

6. Переносят готовую эмульсию обратно во флакон, а затем в 1—2-мл стеклянные шприцы со смазанными поршнями в объеме, требуемом для одной инъекции. Присоединяют иглу подходящего размера и убеждаются, что она плотно прилегает, поскольку во время инъекции скорее всего потребуется приложить значительное давление. Методика иммунизации с адьювантом подробно описана ниже (разд. 5.1.4).

#### 4.1.2. Полный адьювант Фрейнда (ПАФ)

1. Используя сухой порошок убитых нагреванием *M. tuberculosis* (H37Rv или H37Ra) или *M. butyricum*, готовят концентрированную суспензию — 10 мг/мл, растирая материал в небольшом объеме Байола F в ступке.

2. Эту суспензию добавляют к НАФ из расчета 0,5 мг микобактерий по сухому весу на 1 мл, т. е. 1 мл концентрированной суспензии на 20 мл НАФ.

Перед использованием суспензию тщательно перемешивают, особенно после хранения (4°C), поскольку микроорганизмы при этом оседают. ПАФ можно стерилизовать автоклавированием или облучением; после этого он хранится неопределенно долго. Эмульсию с ПАФ готовят так же, как и с НАФ (см. выше).

**Предупреждение:** попадание ПАФ в кожу вследствие неосторожного укола может вызвать очень болезненную локальную антимиkobактериальную воспалительную реакцию. Необходимо быть предельно внимательным. Из места укола выжимают кровь и обращаются за медицинской помощью, даже если повреждение кожи незначительно.

#### 4.2. Белки, адсорбированные на квасцах

Для приготовления адсорбированного на квасцах сывороточного альбумина или IgG в концентрации 10—20 мг/мл рекомендуется следующий метод [28].

1. К 10 мл белка добавляют 4,5 мл 1 м  $\text{NaHCO}_3$  при 20°C и перемешивают.

2. Медленно при перемешивании добавляют 10 мл 0,2 М раствора квасцов ( $\text{KAl}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) в дистиллированной воде. Оставляют смесь при комнатной температуре на 15—20 мин, а затем центрифугируют (3000 g, 10 мин).

3. Перед использованием трижды отмывают преципитат PBS. Его можно хранить с 0,01%-ным (вес на объем) раствором тиомерсала.

Методы получения других белков, адсорбированных на квасцах, детально описаны в литературе [29]. Такие адсорбированные антигены широко применяются для в/м или в/б иммунизации; кроме того, их можно использовать, введя в водную фазу эмульсии, приготовленной с ПАФ или НАФ.

#### 4.3. Бактериальные суспензии в качестве адъювантов

Для иммунизации грызунов обычно применяют суспензию убитых клеток *B. pertussis* ( $10^{10}$  бактерий в 1 мл). При внутривенных инъекциях ее обычно вводят в комплексе с белками, адсорбированными на квасцах ( $2 \cdot 10^9$  бактерий на одну инъекцию). Суспензии убитых нагреванием клеток *B. Pertussis* (при введении мышам) и *Proteus vulgaris* ØX 19 (при введении кроликам) использовали для выделения антибактериальных антител, которыми в последующем нагружали микроорганизмы для выработки антиаллотипических и антиидиотипических сывороток у животных аутологичных видов. Детали данного метода описаны в разд. 6.5 и 6.6.

#### 4.4. Липосомы

Ниже приведена методика приготовления липосом, содержащих иммуноген [8, 9].

1. Растворяют 20 мг сфингомиелина и 8 мг холестерина в 3 мл хлороформа и добавляют 3 мл эфира.

2. Обрабатывают ультразвуком на бане до получения однородной водно-масляной эмульсии вместе с иммуногеном (10 мг), растворенным в сбалансированном солевом растворе (BSS: 5,5 мМ глюкозы, 0,4 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,3 мМ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5,4 мМ KCl, 136 мМ NaCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 мМ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

3. Доводят объем до 2 мл с помощью BSS и обрабатывают 0,1%-ной (конечная концентрация) четырехоксиью осмия в физиологическом растворе.

4. Выдерживают суспензию при комнатной температуре 30 мин, затем интенсивно диализуют против воды.

5. Отделяют липосомы от свободного иммуногена центрифугированием (1000 g), включение белка определяют методом Лоури.

6. Для инъекции разводят суспензию липосом BSS до необходимой концентрации заключенного в них иммуногена.

Яд гадюки (*Echis carinatus*), заключенный в обработанные осмием липосомы, инъецировали внутривенно по 0,2 мл мышам и получали антитоксические антитела в высоком титре на протяжении всей жизни животных [30]. Подобные продолжительные ответы развивались и после одной внутривенной или подкожной инъекции яда кроликам или внутривенно — овцам.

## **5. Иммунизация и взятие крови у животных**

### **5.1. Инъекции**

#### **5.1.1. Основные положения**

1. Независимо от способа введения используют шприц минимального объема (желательно новый одноразовый или стерильный стеклянный) и новую плотно присоединенную иглу соответствующего размера.

2. Всегда дезинфицируют место инъекции тампоном, смоченным спиртом. В области инъекции должна быть сбрита шерсть, чтобы хорошо были видны кожа и поверхностные вены. После извлечения иглы прижимают место инъекции тампоном и убеждаются, что кровотечение остановилось.

3. Животное не должно находиться в состоянии стресса, держите его уверенно, при необходимости пользуйтесь помощью ассистента. Не делайте инъекций в одиночку без предварительной тренировки.

#### **5.1.2. Специальные положения**

1. Для введения эмульсий адъювантов всегда используют стеклянный шприц Льюэра.

2. При внутримышечном введении препарата на требуемую глубину втягивают поршень немного на себя, чтобы убедиться, что игла не находится в просвете кровеносного сосуда.

3. Избегают попадания в поверхностные кровеносные сосуды.

4. Соблюдают осторожность, проводя повторные внутривенные инъекции растворимых иммуногенов, поскольку многие животные предрасположены к системным реакциям гиперчувствительности немедленного типа.

5. Инъекции адъювантов (приводящих к депонированию антигена) в подушечки лап вызывают боль и нарушение ходьбы, их желательно исключить из практики. Аналогичные результаты можно получить, вводя антиген другим способом.

6. Используя ПАФ, следят за тем, чтобы эмульсия не слеживалась по ходу итлы по мере ее извлечения и не оставалась в поверхностных тканях. Это может привести к изъязвлениям кожи, которые причиняют боль и легко инфицируются.

### 5.1.3. Способы введения иммуногена

Животных можно иммунизировать внутрикожно (в/к), подкожно (п/к), внутримышечно (в/м), внутрибрюшинно (в/б) или внутривенно (в/в). Выбор способа введения зависит от природы вводимого вещества, вида животного и режима иммунизации.

1. В/к инъекции редко используют для инициации иммунного ответа, но к ним часто прибегают для бустерной иммунизации антигенами, растворенными в физиологическом растворе, особенно при работе с кроликами и морскими свинками. Реакция Артюса (которая часто развивается при подобных инъекциях) приводит к медленному высвобождению иммунных комплексов, формирующихся *in situ*, в регионарные лимфатические узлы.

2. П/к и в/м способы используют для иммуногенов, введенных в адъювант Фрейнда, поскольку они приводят к образованию гранулом вокруг депо и медленному высвобождению иммуногена в регионарные лимфоузлы.

3. Антигены, адсорбированные на квасцах, можно вводить различными способами, хотя обычно их вводят в/м или в/б и редко — в/в.

4. Клеточные и бактериальные суспензии, суспензии липосом и растворы иммуногенов обычно вводят в/б или в/в. Достаточное количество материала, введенного в/б (даже суспензия клеток), быстро поступает в циркуляцию и активирует клетки селезенки. При в/б введении можно предотвратить гибель животного от реакции гиперчувствительности при повторном введении растворимых иммуногенов. Однако даже в/б иммуноген нужно вводить медленно или малыми дозами повторно через несколько часов (дней). ПАФ нельзя назначать внутрибрюшинно, поскольку он вызывает разлитой перитонит.

### 5.1.4. Техника инъекций

#### 1. Мыши.

*Внутривенные инъекции.* Этот вид инъекций представляет наибольшие технические трудности, особенно у животных темной окраски, и требует большого опыта. Предварительно не-

обходимо потренироваться, используя 0,1%-ный (вес на объем) раствор синего Эванса в физиологическом растворе. Инъекцию осуществляют в дорзальную хвостовую вену. Мышь помещают в держатель, например изготовленный из 60-мл пластикового шприца, пропускают в отверстие хвост и погружают его в теплую (не слишком горячую) воду на 2 мин для расширения вен. Затем держатель запирают и кончик хвоста захватывают большим и указательным пальцами так, чтобы указательный палец поддерживал хвост снизу. Иммуноген должен быть заранее набран в 1-мл шприц. Убеждаются, что воздух удален и поршень перемещается свободно. Используют 10-мм иглу № 25. Протирают кожу хвоста спиртом. Держа иглу острием вниз (скосом вверх), осторожно вводят ее в вену, продвигая почти параллельно хвосту. Вена находится очень близко к поверхности, и при правильном введении иглы ее стенка почти не оказывает сопротивления. Продвигают иглу на 5 мм по ходу вены и вводят препарат, нажимая на поршень большим пальцем или ладонью. Сначала медленно вводят небольшой объем, чтобы проверить, поступает ли жидкость в вену. Если ощущается упругость и появляется вздутие, то это свидетельствует о том, что игла не находится в просвете вены. Тем не менее инъекцию можно попытаться осуществить, приподнимая хвост животного. Взрослой мыши можно ввести одновременно до 0,7 мл раствора антигена.

*Внутрибрюшинные инъекции.* Мышь извлекают из клетки, держа за хвост правой рукой, и опускают на крышку клетки. Как только передними лапками мышь схватится за крышку, большим и указательным пальцами левой руки захватывают кожу за головой, смещая ее вниз. Затем мышь можно безбоязненно перевернуть. Закладывают хвост под мизинец так, чтобы мышь оказалась растянутой на левой ладони животом вверх. Протирают брюшную стенку спиртом. Держа 1—2-мл шприц с 10-мм иглой № 25 в правой руке, вводят иглу в середину нижнего левого квадранта живота, направляя ее под углом около 20° к коже в сторону грудной клетки. Надавливают на поршень и извлекают иглу. За один раз взрослой мыши можно в/б ввести до 2 мл жидкости, но предпочтительно — не более 1 мл, поскольку большие дозы могут вытекать из места прокола.

*Внутримышечные инъекции.* В бедренную мышцу можно ввести до 50 мкл жидкости. Животное держат так же, как при в/б инъекциях. Ассистент выпрямляет заднюю лапку. Шерсть с задней поверхности бедра выстригают изогнутыми ножницами, место укола протирают спиртом и вводят препарат, используя 10-мм иглу № 25.

*Подкожные инъекции.* Мышь лучше держать так же, как

для внутрибрюшинных инъекций, но препарат вводят под кожу в сгиб между дорзальной поверхностью бедра и животом; 0,2 мл может быть введено с каждой стороны.

## II. Крыса.

При всех способах введения может быть использована та же техника, что и для мышей. Подкожные инъекции можно проводить под легко смещающуюся кожу над лопатками или в боковых отделах. Складку кожи поднимают и вводят до 0,5 мл жидкости, направляя иглу под углом 45°. Внутримышечные инъекции проводят в бедро, используя 25-мм иглу № 20. Эти же иглы обычно используют для в/б инъекции, которые позволяют ввести до 5 мл препарата. Для иммунизации крыс необходим опытный ассистент. Для в/в введений требуется специальная фиксирующая клетка.

## III. Морская свинка.

*Внутрикожные инъекции.* Этот вид инъекций легко воспроизводим у морских свинок и кроликов. В обоих случаях сначала сбривают шерсть и протирают кожу спиртом. Используют стеклянный туберкулиновый шприц с делениями 0,1 мл и 10-мм иглу № 25. Иглу мягко вводят в растянутую кожу под острым углом к поверхности и, осторожно надавливая и вращая, продвигают на 3—4 мм. Аккуратно вводят 0,1 мл жидкости с образованием папулы. Иглу, вращая, извлекают и место введения вытирают для удаления вытекающей жидкости.

*Внутривенные инъекции.* Их осуществляют в вену переднего края уха. Тонкую туберкулиновую 10-мм иглу № 26 обламывают у основания и на тупой конец надевают нейлоновый катетер длиной около 15 см. Другой конец катетера через обычную иглу присоединяют к 1—2-мл стеклянному шприцу. Морскую свинку оборачивают в полотенце так, чтобы голова была открыта, выстригают шерсть изогнутыми ножницами на переднем крае уха, которое затем согревают смоченной в горячей воде ватой. Как только вена хорошо наполняется, ее пунктируют в направлении головы. Рекомендуется использовать морских свинок-альбиносов. Через вену уха можно ввести до 2 мл раствора.

*Внутримышечные, внутрибрюшинные и подкожные инъекции.* Руководствуются той же техникой и используют те же объемы, что и при работе с крысами. Морские свинки очень чувствительны к белкам микобактерий, поэтому подкожные инъекции ПАФ могут привести к образованию язв. Используя этот адъювант, необходимо ограничиваться минимальными

объемами. Следует избегать старой методики введения ПАФ или НАФ в подушечки стоп, поскольку она необязательно обеспечивает развитие эффективного гуморального ответа. Рекомендуем небольшие количества препарата вводить в/м в бедро (в дорзальную поверхность), вытягивая заднюю лапку в левой ладони.

#### IV. Кролик.

*Внутривенные инъекции.* В этом случае используют 1—2-мл шприц и 16-мм иглу № 25. Иммуноген вводят в вену заднего края уха. Шерсть уха сбывают скальпелем и смачивают поверхность уха 70%-ным спиртом. Иглу вводят в направлении головы. Кролика лучше фиксировать на коленях ассистента, мягко надавливая руками на лопатки животного. Обычная доза — 1—2 мл, но можно ввести без особых затруднений до 5 мл раствора.

*Подкожные инъекции.* До 0,5 мл может быть введено под легко смещаемую кожу области лопаток или боковых отделов туловища с помощью 25-мм иглы № 20. Шерсть в области инъекции выстригают изогнутыми ножницами и протирают кожу спиртом. Таким образом обычно проводят бустерные иммунизации с адьювантами Фрейнда.

*Внутримышечные инъекции.* Кролика держат на коленях и оператор вытягивает в сторону заднюю лапу, обхватив колено снизу, шерсть на поверхности бедра над коленом выстригают. Протирая кожу спиртом, выявляют поверхностные кровеносные сосуды. Иглу (40 мм, № 21) вводят глубоко в бедро под углом вперед; впрыскивают до 0,5 мл раствора антигена, убедившись, что игла не находится в просвете глубоко лежащего сосуда. Затем иглу извлекают и место инъекции тщательно протирают для удаления вытекающей жидкости. Данный способ обычно используют для введения адьюванта Фрейнда.

#### V. Овца.

Работа с овцами обычно не вызывает проблем. При проведении большинства процедур сидящий сзади животного ассистент удерживает его, фиксируя коленями спину и руками наклоняя голову вверх и в сторону. Для в/м инъекций животное удерживают в положении стоя от движения вперед, мягко обхватив рукой грудь.

*Подкожные инъекции.* Обычно эти инъекции осуществляют в участок кожи, лишенный шерсти, в области складки между верхней частью бедра и нижним отделом живота в



положении животного сидя. Место инъекции протирают, кожу приподнимают щипком. 1—5 мл раствора иммуногена или до 0,5 мл эмульсии адъюванта Фрейнда вводят с помощью 25-мм иглы № 20 с обеих сторон.

**Внутримышечные инъекции.** В положении животного стоя выстригают шерсть на участке задней поверхности бедра и с помощью стеклянного 1-мл шприца и 50-мм иглы № 19 вводят глубоко в толщу мышц бедра до 1 мл эмульсии адъюванта Фрейнда.

**Внутривенные инъекции.** Шею животного вытягивают поворотом головы в сторону, поднимая подбородок вверх. Шерсть на участке шеи выстригают. Большим пальцем мягко надавливают на шею сбоку выше грудины для выявления наружной яремной вены. Протирают кожу спиртом и с помощью 30-мм иглы № 23 вводят в вену 5 мл и более раствора. Следят за тем, чтобы голова все время, пока вводят препарат, была хорошо фиксирована.

## 5.2. Взятие проб крови

**Общее положение:** У каждого животного перед иммунизацией необходимо взять пробу крови; при работе с мышами обычно смешивают образцы крови, взятые у нескольких животных.

### 5.2.1. Мышь

Мышь фиксируют как для внутривенных инъекций и согревают хвост теплой водой. Затем его высушивают тканью и мягко натирают вазелином, а кончик смачивают 70%-ным спиртом. Несколько миллиметров хвоста отрезают острыми стерильными ножницами. Мягко массируя хвост сверху вниз, обеспечивают поступление крови, которую собирают в небольшую стеклянную пробирку. Таким образом можно собрать до 0,5 мл крови и повторять эту процедуру еженедельно. Кровотечение останавливают, сжимая кончик хвоста тампоном, смоченным спиртом. Предпочтительно, учитывая столь малый объем, собирать плазму и использовать силиконизированные пробирки, что позволяет каплям крови сбегать до дна и предотвращает свертывание. Перед взятием крови можно поместить в пробирку небольшой объем (50 мкл) гепарина, разведенного физиологическим раствором. Кровь как можно скорее центрифугируют в небольших пластиковых преципитационных пробирках. Пробы хранят отдельно в маленьких конических пробирках с крышками при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.2. Крыса

Взятие проб крови у крыс обычно осуществляют путем кардиальной пункции под анестезией, используя камеру, заполненную смесью эфира с воздухом. Крысу извлекают в состоянии коллапса и помещают на спину на кусок ткани. Небольшую мензурку с пропитанной эфиром ватой помещают перед носом животного для поддерживающей анестезии. Шприцем на 1—2 мл с помощью 30-мм иглы № 23 пунктируют грудную клетку ниже мечевидного отростка грудины, держа грудную клетку между указательным и большим пальцами левой руки. Слегка втягивая поршень на себя, убеждаются в том, что игла попала в сердце. Шприц медленно наполняют и извлекают иглу. Крысы быстро выходят из эфирного наркоза, и их можно поместить в клетку, как только они полностью приходят в сознание. Таким способом можно взять до 1—2 мл крови один раз в неделю. Данную процедуру должен выполнять только специалист, имеющий соответствующий опыт.

### 5.2.3. Морская свинка

Забор крови у морских свинок тоже осуществляют путем кардиальной пункции, но после анестезии фентанилом/флуанизоном (гипнормом), который вводят в/м в дозе 1 мг/кг массы тела. Время наступления наркоза у морской свинки, по нашим наблюдениям, составляет не менее 15 мин. Описан метод введения гипнорма крысам внутрибрюшинно [31], этот путь может быть использован и для анестезии морских свинок. Препарат разводят в соотношении 1 : 10 дистиллированной водой и вводят из расчета 0,7 мл/100 г массы тела.

### 5.2.4. Кролик

Взятие крови у кролика производят из краевой вены уха. Животное кладут на колени и оборачивают полотенцем или халатом, оставляя открытой голову, шерсть на выбранном участке сбривают. Для расширения вен можно нанести на кончик уха с помощью ваты небольшое количество ксилولا. Участок кожи обрабатывают спиртом, выше и ниже втирают вазелин. Концом остроконечного скальпеля пересекают вену поперек и сдавливают ее выше разреза (со стороны головы). Кровь собирают в небольшой стеклянный флакон, обычно около 5 мл. Вату со спиртом мягко прижимают к месту разреза для остановки кровотечения; за это время ксилол полностью смывают с кончика уха 70%-ным спиртом, а затем водой. После возвращения кролика в клетку за ним нужно следить в

течение нескольких минут, чтобы убедиться, что при умывании животного кровотечение не возобновилось. Полезно нанести на место разреза пленку цианоакрилата.

### 5.2.5. Овца

У овец кровь берут из наружной яремной вены с помощью техники внутривенной инъекции. Иглой (30 мм, № 20) пунктируют вену по направлению к голове и забирают 5—10 мл крови.

## 5.3. Взятие проб в ходе гуморального ответа и окончательный забор крови

### 5.3.1. Мыши, крысы и морские свинки

Животных обескровливают под эфирным наркозом (по методике забора проб крови у крыс), морских свинок — после введения гипнорма. Лапки фиксируют на доске липкой лентой. При работе с мышами используют 25-мм иглу № 23 и шприц на 2 мл, крысами и морскими свинками — 10-мл шприц и 40-мм иглу № 21.

### 5.3.2. Кролик

Для успешного взятия крови ее количество не должно превышать 20 мл (один раз в неделю) или 50 мл (один раз в 2—4 нед). Используют краевую вену уха или центральную ушную артерию, которую пунктируют иглой-бабочкой с канюлей. Кроликов можно успокаивать в/м введением гипнорма (0,5 мг/кг веса). Окончательный забор крови проводят под анестезией путем сердечной пункции. Кролику можно ввести гипнорм 2—2,5 мг/кг или пентобарбитал натрия (сагатал, 60 мг/мл, в/в). Для последнего обычно руководствуются расчетом: 0,5 мл на кг веса, но кролики сильно варьируют по чувствительности, поэтому лучше с помощью шприца на 3 мл ввести 1 мл раствора, а затем вводить медленно препарат до потери корнеального рефлекса. Пункцию сердца проводят, как описано для крыс, с помощью 50-мл шприца, иглы диаметром 1,0 мм и нескольких 60-мл шприцев, или трансфузионной иглы и катетера, соединенного со стерильным флаконом. От взрослого кролика средних размеров может быть взято около 150 мл крови.

### 5.3.3. Овца

Из яремной вены у овцы с помощью системы для переливания крови получают за один раз 500—700 мл крови, которую можно собирать в антикоагулянт (например, лимоннокс-

лую декстрозу) для получения плазмы. В другом случае позволяя крови свернуться и на следующий день отделяют сыворотку. Кровь, собранную в антикоагулянт, центрифугируют в пластиковых мешках при 4000 об/мин и отделяют плазму. Такое количество крови можно получать от овцы несколько раз (интервал 1 мес) при условии хорошего кормления животного. Если кровь забирают более часто, то форменные элементы необходимо возвращать. Перед взятием крови овце вводят 0,2 мл гепарина. 200 мл стерильного физиологического раствора добавляют к осажденной клеточной взвеси в мешок с антикоагулянтом и суспензию возвращают в наружную яремную вену через капельницу в течение 5—10 мин. При этом овцу фиксируют в станке и вводят транквилизатор (20 мг диазепама).

## **6. Различные режимы иммунизации**

### **6.1. Антитела к гаптенам**

#### **6.1.1. Формирование иммунного ответа на гаптены у мышей и крыс**

Адсорбированный на квасцах конъюгат гаптена с белком (например, ДНФ-ГМФ или оксазалан-ГМФ) в качестве примирающей инъекции вводят в/б (50 мкг крысе или 30 мкг мыши) вместе с  $10^9$  убитых клеток *B. pertussis* в 0,5 мл физиологического раствора (ФР). На 21-й день можно ввести повторно 30—50 мкг одного только иммуногена в ФР (в/в — мышам и в/в — крысам). Кровь тестируют на содержание антител через 4 дня и далее после бустерной инъекции. Бустерные дозы можно вводить в/б; при интервале между ними более 2 мес доза повторно вводимого иммуногена в ФР может быть уменьшена до 10 мкг. Содержание антител достигает максимума к 6—7-му дню после каждой бустерной инъекции.

#### **6.1.2. Формирование иммунного ответа на гаптен у морских свинок**

Белковый конъюгат (50 мкг), например ТНФ-БСА, эмульгируют в ПАФ и вводят в мышцу бедра в общем объеме 0,2 мл. Через 3—4 нед животных повторно иммунизируют той же дозой иммуногена в НАФ п/к (0,2 мл) в различные участки. Пробы крови берут через 2 нед.

#### **6.1.3. Формирование иммунного ответа на гаптены (аминогликозиды) у кроликов [16]**

Конъюгаты гентамицина или амикацина с тиреоглобулином или БСА эмульгируют с ПАФ из расчета 1 мг конъюгата

в общем объеме 0,5 мл на введение одному кролику (по 0,25 мл в/м в оба бедра). Повторно вводят 100 мкг конъюгата с ПАФ п/к с 2-месячными интервалами.

#### **6.1.4. Формирование иммунного ответа на гликохолевую кислоту у кроликов [18]**

В случае применения слабых иммуногенов может возникнуть необходимость в увеличении дозы примирюющей и бустерных инъекций. Удовлетворительные антисыворотки для определения гликохолевой кислоты радиоиммунологическим методом были получены путем введения конъюгата гаптена с БСА в ПАФ в/м по 5 мг (первые две инъекции) и по 100 мкг конъюгата в ФР в/к (6 повторных инъекций в течение 4 нед после 2 нед перерыва).

### **6.2. Образование антител к отдельным белкам**

#### **6.2.1. Мыши и крысы**

Можно использовать ту же методику, что рекомендована для формирования иммунного ответа на гаптен, применяя адсорбированные на квасцах белки и убитые клетки *B. pertussis*. Для первой внутрибрюшинной инъекции мышам желательно использовать  $2 \cdot 10^9$  бактерий и 100 мкг адсорбированного белка в равном объеме [28]. Если между примириванием и бустерным введением пройдет два и более месяцев, то хороший гуморальный ответ достигается при повторном введении 10 мкг одного иммуногена. При более коротких интервалах могут потребоваться большие дозы.

#### **6.2.2. Кролики**

Для получения преципитирующей антисыворотки с высоким титром и преобладанием IgG, например к гетерологичному сывороточному белку, 100—200 мкг белка эмульгируют в ПАФ и 0,5 мл вводят кролику в/м в бедро. Повторное введение проводят через 10—14 дней в другое бедро. Через 10 дней после второй инъекции можно взять пробу крови. Обычно для получения антисыворотки с высоким титром необходимы бустерные инъекции. Для этого разработаны несколько режимов иммунизации, и все они предусматривают период «отдыха» в течение 2—3 мес.

1. Подкожные введения белка с ПАФ в несколько точек (лучше в 6—8); общая доза каждый раз 20—100 мкг.

2. Введение иммуногена с ПАФ подкожно в область плеча. По схемам (1) и (2) получают эффективную кроличью антисыворотку к IgG, IgA и IgM человека.

3. Серии внутрикожных инъекций иммуногена в ФР (10 мкг в 0,1 мл).

4. Инъекции п/к 50—100 мкг белка в ФР.

После повторного введения через 1 нед у кролика следует взять пробу крови. Это необходимо сделать и в том случае, когда после в/к инъекции развивается сильная реакция Артюса.

Эффективный метод получения кроличьей антисыворотки к мышиному иммуноглобулину заключается в следующем:

1. Мышей иммунизируют еженедельно, вводя в/б суспензию  $2 \cdot 10^9$  убитых клеток *B. pertussis* (курс состоит из 3—4 инъекций, его повторяют через 3 нед).

2. Иммунной сывороткой нагружают суспензию убитых клеток *B. pertussis* (0,5 мл сыворотки на  $10^{11}$  бактерий в 10 мл), инкубируют 1 ч при 37 °С и отмывают PBS.

3. Каждому кролику вводят по  $4 \cdot 10^9$  микроорганизмов, нагруженных антителами (IgG), в/в—4 раза с недельными интервалами. Через 1 нед после последнего введения берут пробу крови.

4. Иммунный ответ поддерживается повторными курсами спустя несколько недель.

### 6.2.3. Овцы

Овцы хорошо отвечают на в/м и п/к введения 20—50 мкг очищенных гетерологичных белков с ПАФ. Примировать можно 3—4-месячных ягнят. Рекомендуем сделать перерыв на несколько месяцев, для того чтобы затем получить наиболее эффективный ответ на бустерные инъекции, в ходе которых вводят 250—500 мкг белка с ПАФ. Подкожные инъекции небольших объемов белка дают такие же хорошие результаты, что и глубокие в/м инъекции, не приводя к формированию больших гранулематозных повреждений кожи. Пробы крови берут через 1 нед после каждой бустерной инъекции. Такая методика позволяет получить антисыворотки с высоким титром к широкому спектру гетерологичных сывороточных белков. Для получения антисыворотки к IgG человека в качестве иммуногена используют очищенный Fc-фрагмент; это позволяет избежать абсорбции для удаления антител к другим изотипам. Для получения анти-IgA и анти-IgM антисывороток используют целые молекулы Ig, так как последующая абсорбция для удаления антител к IgG не представляет затруднений (см. разд. 9.1.6, п. 2).

Аналогичный подход можно использовать для получения антисывороток ко многим антигенам, которые с целью очистки precipитируют в агарозе, например с помощью овечьих ан-

тител. В этих случаях количество гетерологичного белка, вводимого животному, гораздо меньше (измеряется нанограммами), и при соблюдении длительных интервалов между бустерными введениями можно получить хороший ответ.

Антисыворотки к иммуноглобулинам могут быть получены и без предварительной очистки (см. разд. 3.2.3). Например, для получения антисыворотки к кроличьему IgM 0,5 мл IgM-фракции свободной от комплемента сыворотки к эритроцитам барана 10 мин перемешивали с 5 мл 10%-ной (объем на объем) суспензии эритроцитов. Затем эритроциты 5 раз отмывали PBS, клетки смешивали с ПАФ и вводили в/м. Через 3 нед повторяли введение в три разные точки, а спустя 7 дней в пробе крови методом ИЭФ с антисывороткой к цельной кроличьей сыворотке выявили хороший ответ на IgM. Истощение антител к легким цепям с помощью IgG обусловило получение антисыворотки, специфичной к IgM. Подобный подход был применен для выделения антител, специфичных к IgG, при использовании фракции антиэритроцитарной сыворотки, богатой IgG. В этом случае контаминирующие антитела к IgM абсорбировали суспензией клеток, нагруженных IgM. Данный метод, как оказалось, приводит к преимущественному формированию ответа на изотипспецифические эпитопы Fc-фрагмента Ig. Возможности использования эритроцитов, нагруженных Ig соответствующего изотипа, для абсорбции детально рассмотрены ниже (разд. 9.1.4, п. 4). Подход во многом аналогичен тому, что используется для получения антител к аллотипам гомологичных иммуноглобулинов у мышей и кроликов (см. разд. 6.5).

### 6.3. Антисыворотки к сложным смесям белков

Такие антисыворотки используются для изучения компонентов смеси антигенов, а также как контрольные реагенты при определении индивидуальных молекул. При получении таких антисывороток важно достичь максимального разнообразия иммунного ответа и такого баланса титров антител с разной специфичностью, чтобы при использовании одной концентрации можно было выявить (в ИЭФ или двумерном ИЭФ) многочисленные антигены, составляющие смесь. Применяя в качестве исходного материала экстракт бактерий или паразитов, элюат клеточной мембраны или цельную сыворотку, которые содержат антигены в разной концентрации и с различной иммуногенностью, трудно получить сбалансированную антисыворотку, выявляющую антигены небольшой мол. массы, поскольку преимущественно будут образовываться антитела к большим молекулам. Может возникнуть необходимость в раз-

делении смеси на фракции и использовании большого числа животных, сыворотку которых затем смешивают в разных пропорциях. Получение сбалансированной полиспецифической антисыворотки требует как терпения, так и изобретательности.

### 6.3.1. Антитела к цельной сыворотке

Основная проблема использования цельной сыворотки или плазмы в качестве иммуногена заключается в получении эффективного ответа на  $\alpha$ -глобулины. Наилучший подход — электрофоретическое разделение белков сыворотки на горизонтальной пластине агарозного геля. Полосы геля затем можно разрезать поперек и заморозить, и компоненты собирать в ходе оттаивания. После этого можно иммунизировать овец различными фракциями в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Можно добавить антитела к отдельным компонентам цельной сыворотки, например компонентам комплемента. На рис. 2.7 приведена электрофореграмма хорошо сбалансированной овечьей антисыворотки к белкам сыворотки человека, полученной данным методом. Общая схема иммунизации аналогична той, что рекомендована для отдельных белков.

### 6.3.2. Бактериальные антигены

Существует много способов получения и экстрагирования бактериальных антигенов [32]. От выбора способа так же, как от условий и фазы роста бактериальной культуры, зависит природа иммуногена. Обработанные ультразвуком экстракты бактериальных стенок представляют собой чрезвычайно сложные смеси (см., например, рис. 2.4), и существует много способов физического и химического фракционирования, для того чтобы сделать исходный материал более однородным. Хорошим примером служит изучение антигенов микобактерий [33]. Полиспецифические антисыворотки особенно полезны при определении молекулярных компонентов основных фракций полисахаридов и белков по классификации Seibert [34].

По нашим данным, при иммунизации кроликов убитыми нагреванием или облучением *M. bovis* БЦЖ, или *M. tuberculosis*, или порошком, приготовленным из этих бактерий, и другими нерастворимыми бактериальными препаратами с НАФ главным образом образуются антитела к поверхностным белкам. Мы использовали  $5 \cdot 10^6$  интактных организмов или 1 мг порошка в НАФ для в/м введения, затем осуществляли подкожные инъекции повторно с интервалом 3—6 мес для полу-



чения соответствующей антисыворотки у кроликов. Для образования более широкого спектра специфических антител необходимо использовать растворы иммуногенов. Не существует стандартной смеси растворимых антигенов микобактерий для иммунизации. Различными способами можно достичь частичного фракционирования для получения основных белков, углеводов и гликолипидов [32]. Для экстракции мембранного антигена используют тот же метод, что и для *E. coli*, т.е. озвучивание, обработку детергентом и центрифугирование (см. разд. 3.3.2). 100 мкг белка повторно вводят с НАФ. У кроликов аналогично получают антисыворотку к очищенной белковой фракции туберкулина (PPD) *M. tuberculosis*. Основными белками PPD служат антигены 6 и 7 по номенклатуре Janicki [32].

У мыши развивается эффективный ответ на PPD. Антисыворотку с высоким титром у животных, иммунизированных с целью получения гибридом, получали, вводя в/б 50 мкг PPD с НАФ с бустерными инъекциями на 30-й и 60-й день (500 мкг с НАФ в/м); за 4 дня перед взятием клеток для слияния в/б вводили 1 мг антигена в физиологическом растворе. Подобный режим был использован и для получения антител к обработанным ультразвуком *M. tuberculosis* и *M. bovis* БЦЖ, но в качестве примиряющей дозы вводили 200 мкг антигена в НАФ.

Эффективный способ разделения бактериальных белков и углеводов для иммунизации, который применяют для обработанных ультразвуком микобактерий, основан на способности углеводов спонтанно связываться с эритроцитами барана, в то время как клетки, обработанные танниновой кислотой, абсорбируют только белки. Отмытые эритроциты (3%-ная суспензия, объем на объем), 10 мл, инкубируют при 37 °C с разведенным 1:100 обработанным ультразвуком анти-



Рис. 2.7. Двумерный ИЭФ позволяет продемонстрировать свойства сбалансированной полиспецифической антисыворотки к белкам сыворотки человека. Снимок любезно предоставлен д-ром A. R. Bradwell

геном в течение 2 ч, центрифугируют и повторно отмывают несколько раз. Авторы используют метод Бойдена [35]:

1. К 10 мл 0,2 М PBS (рН 7,2) добавляют 0,25 мг танниновой кислоты и смешивают с 10 мл 3%-ной (объем на объем) суспензии эритроцитов барана. Инкубируют смесь 10 мин при 37 °С.

2. Отмывают клетки один раз физиологическим раствором, центрифугируют и ресуспендируют осадок в 0,5 мл обработанного ультразвуком супернатанта БЦЖ.

3. Инкубируют смесь 2 ч (37 °С), затем добавляют 2 мл среды с Нерес, центрифугируют и отмывают еще раз.

4. Окончательно ресуспендируют клетки в 4 мл среды с Нерес, содержащей 0,1 % БСА.

5. Иммунизируют мышь повторными введениями разбавленной в 3 раза суспензией эритроцитов, нагруженных белками или углеводами (1 мл в/б).

### 6.3.3. Экстракты паразитов

Основным принципом получения преципитирующей антисыворотки с высоким титром антител к поверхностным антигенам или тотальным экстрактам гельминтов служит повторная иммунизация низкими дозами с ПАФ. Методы получения экстрактов зависят от вида паразита [36]. Так, в случае *Schistosoma* поверхностный антиген церкариев, 5-дневной легочной шистозомулы и молодых и половозрелых особей может быть элюирован путем медленного перемешивания в 4 М KCl в течение ночи при комнатной температуре. После оттаивания супернатант центрифугируют (10 000 об/мин, 4 °С, 1 ч) и диализуют против PBS. Для получения тотальных экстрактов паразитов обрабатывают ультразвуком (60 Вт и ток 0,8 А) в 4 мл PBS в течение 3 циклов по 5 мин на ледяной бане с 5-мин интервалами для охлаждения. Гомогенат центрифугируют (10 000 об/мин) и супернатант используют как иммуноген.

Кроликам и овцам вводят в/м 50—100 мкг белка с НАФ и второе в/м введение проводят спустя 2 нед. Бустерные инъекции осуществляют п/к (50 мкг с ПАФ) с интервалами 3—6 мес. Пробы крови забирают через 2 нед после каждой инъекции. Рис. 2.2 иллюстрирует широкую специфичность антисыворотки, полученной описанным способом к *S. mansoni* (А) и целесообразность использования вырезанных из пластин пиков преципитации для получения моноспецифической антисыворотки (Б).

## 6.4. Антисыворотки к бактериальным суспензиям

### 6.4.1. Мыши

I. *M. bovis* БЦЖ. Антисыворотку с высоким титром антител к белкам оболочки БЦЖ получают путем в/б инъекции  $2 \cdot 10^3$  клеток микобактерий, введенных в НАФ, после которой через 30-дневные интервалы вводят  $10^4$  клеток в физиологическом растворе в/б, увеличивая дозу до  $10^6$ . Для последующего слияния клеток селезенки с целью получения гибридом последнюю инъекцию осуществляют за 4 дня до слияния ( $10^6$  микобактерий).

II. *B. pertusis*. Мышам в/б вводят 1 раз в неделю  $2 \cdot 10^9$  *B. pertusis* в виде суспензии в 0,2 мл физиологического раствора. После четырех инъекций можно сделать перерыв на 3 нед. Получение антител к *B. pertusis*, главным образом IgG<sub>2a</sub>-изотипа ( $\gamma 2a$ ), лежит в основе приготовления аллотипических мышинных иммуноглобулинов, особенно для распознавания различий в локусах Igh-1  $\gamma 2a$ -молекул (получение аллотипических антител см. в разд. 6.5.1). *B. pertussis*, нагруженные мышинными антителами, могут быть использованы для получения гетерологичных антисывороток к мышинному иммуноглобулину (см. разд. 6.2.2).

### 6.4.2. Кролики

Кролики особенно широко используются для иммунизации убитыми бактериями. Единственное серьезное исключение — суспензии микобактерий, которые вызывают сильнейшие воспалительные процессы.

Могут быть успешно получены антисыворотки ко многим грамположительным и грамотрицательным бактериям. Поскольку преимущественно образуются серотипспецифические антитела (т. е. к углеводным структурам липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов, характерных для данного штамма), кроличьи сыворотки используют для серодиагностики. Перекрестная абсорбция клетками других типов и видов не представляет труда и позволяет удалить антитела к общим эпотипам белков наружной мембраны.

Общим принципом использования бактериальных суспензий для иммунизации следует считать в/в введение микроорганизмов в возрастающих дозах 1—2 раза в неделю курсами по 3—4 нед, давая животным отдых в течение нескольких недель между курсами. Обычно начинают с дозы  $10^6$ — $10^7$  микроорганизмов, которую по мере развития ответа увеличивают до  $10^9$  и более. Это позволяет компенсировать нейтрализацию бактерий антителами *in vivo* и быстрое удаление опсонизированных бактерий из лимфоидных тканей.

I. *Campylobacter jejuni*, серотипы 1, 2 и 4 [37]. Бактериальные культуры отбирают на логарифмической фазе роста в концентрации  $10^8$  клеток/мл. Суспензию отмывают, обрабатывают формалином и доводят оптическую плотность до 0,375 при 625 нм. Авторам удавалось получить антисыворотки с очень высоким титром, вводя суспензию сначала по 1 мл, а затем по 2 и 3 мл в/в два раза в неделю (курс 3 нед). Забор крови осуществляли через неделю после последней инъекции. Для повышения специфичности антисыворотку сорбировали грам-отрицательными бактериями других видов и иных серотипов данного вида [37].

II. Пневмококки типа III, антитела к углеводному компоненту S3. Очищенный компонент пневмококка S3 обладает чрезвычайно низкой иммуногенностью (или не обладает совсем) для кролика. Однако введенный в/в вместе с мембранными белками убитых нагретым микроорганизмов, он вызывает эффективное образование IgG, отличающихся высокой типовой и антигенной специфичностью. С помощью повторных курсов получают не менее 5 мг/мл специфических антител, и у многих животных можно повысить концентрацию IgG в сыворотке до 20 мг/мл и более. Данный ответ не зависит от влияния белковых иммуногенов на синтез антител. В одном из наших экспериментов [38] кролики получали не менее двух курсов по девять в/в инъекций в течение 19 дней; начальная доза составляла  $10^8$  микроорганизмов, с шестой инъекции —  $4 \cdot 10^9$ , а в конце дозу доводили до  $10^{10}$  микроорганизмов. Кровь забирали через 3—4 дня после последней инъекции.

III. *Proteus vulgaris* (φX19). Высокие титры IgG к углеводным антигенам протей получают с помощью формализованных суспензий. Получение таких антисывороток у кроликов, различающихся по аллотипам иммуноглобулинов, представляет собой первый этап наработки гомологичной аллотипспецифической сыворотки (кроличьей против кроличьего иммуноглобулина). При этом различающиеся по аллотипу антитела донора используют в виде комплексов «антитела — антигены *Proteus*».

На первом этапе кроликам вводят  $10^9$  клеток *Proteus* и 2 раза по  $2 \cdot 10^9$  на 8-й и 11-й день, а затем — по  $5 \cdot 10^9$  на 15-й и 18-й день. Через три недели курс повторяют. Кровь берут через три дня после каждого курса; титр остается высоким в течение 10 дней, что позволяет взять кровь еще дважды.

## 6.5. Антисыворотки к аллотипам иммуноглобулинов

### 6.5.1. Мыши

Суспензию клеток *B. pertussis* ( $10^{11}$ ) нагружают избытком антител к этим бактериям, полученным от инбредных мышей (например, C57BL), которые имеют тот или иной аллотип иммуноглобулина (структурный вариант тяжелой цепи, характерный для данной линии). Процедуру осуществляют в течение двух часов при 37 °С. После отмывания  $2 \cdot 10^9$  нагруженных антителами микроорганизмов вводят в/в или в/б аллогенному реципиенту (например, мышам линии BALB/c). Курс (4 инъекции один раз в неделю) может быть повторен после трехнедельного перерыва. Подробно методика описана Парсоном и соавт. [39].

### 6.5.2. Кролики

Кроликов иммунизируют суспензией клеток *Proteus*, нагруженных антителами, по методике, предусматривающей образование специфических антител. Число необходимых курсов зависит от иммуногенности данного аллотипа [40].

## 6.6. Получение антиидиотипических антител

### 6.6.1. Принцип метода

Антигенсвязывающие центры антител имеют сложную структуру. Антитела данной специфичности воспринимаются иммунной системой организма как клональный продукт, несущий набор эпитопов (идиотопов). Эти эпитопы носят общее название — идиотип, и они могут стимулировать аутологичный антиидиотипический ответ. Рассматриваемая как система внутреннего распознавания, обеспечивающая экспансию и регуляцию активности клеток-эффекторов, сеть идиотипов и антиидиотипов, как правило, неизмеримо велика и неопределенно сложно устроена. Однако в некоторых экспериментальных условиях повторное введение препарата определенных очищенных антител в комплексе с адъювантом может нарушить эту регуляцию и вызвать довольно сильный антиидиотипический ответ. Это явление используют не только для формального доказательства существования идиотипов и антиидиотипов, но и для подтверждения одного из главных предсказаний теории — наличия у некоторых антиидиотипов такого строения идиотипов, которое представляет собой «внутренний образ» эпитопов первого (экзогенного) иммуногена. Можно получить антиидиотипические антитела, которые способны заменить им-

муногены для иммунизации животного [41] и служить антигенами-мишенями для различных иммунологических методов исследования. Собственная иммуногенность очищенного антитела (его идиотипа) приводит к сильному антиидиотипическому ответу после перекрестной иммунизации животных одного вида (изологичный или аллогенный антиидиотип) или между животными разных видов (гетерологичный антиидиотип). Эти два подхода позволяют наиболее успешно получать антиидиотипические антитела, которые способны заменять иммуноген. Ниже представлены некоторые методы получения антиидиотипов.

#### 6.6.2. Мышинные антитела к идиотипам мыши (аппогенные)

Антиидиотипические антитела к моноклональным антителам в высоком титре были получены у мышей BALB/c, которых иммунизировали иммунными комплексами, состоящими из очищенного парапротеина человека (IgG<sub>1</sub>), конъюгированного с определенными моноклональными антителами мышей BALB/c [42]. Последние были направлены к эпитопу  $\lambda$ -цепи или к постоянным эпитопам C $\gamma$ 2- или C $\gamma$ 3-доменов тяжелой цепи. Можно использовать комплексы, содержащие пул МКА к  $\gamma$ - или  $\lambda$ -цепям человека. Преципитат комплекса готовили, добавляя небольшой избыток МКА или их смеси (асцитная жидкость после центрифугирования) к 1 мг/мл парапротеина человека в присутствии 5%-ного ПЭГ (мол. масса 3000). Преципитаты отмывали на холоду 5%-ным ПЭГ и разводили PBS до концентрации парапротеина 1 мг/мл. Мышей примировали в/б 100 мкг парапротеина в составе комплекса в смеси с 10<sup>9</sup> убитых клеток *B. pertussis* и алгидрогелем. Бустерное введение того же количества комплекса без *B. pertussis* проводили на 6, 13, 20 и 27-й или на 26, 40 и 48-й дни. Такие схемы позволяли получить высокие титры изологичных антиидиотипических антител (через 7 дней после последней инъекции), специфичных к моноклональным антителам в составе комплекса, а также антитела к парапротеину человека.

#### 6.6.3. Кроличьи антитела к идиотипам кролика (аппогенные)

Аллотипы иммуноглобулинов кролика кодируются несколькими генетическими локусами. У аутбредных животных любой донор и реципиент будут иметь различия. При использовании одной линии (донор и реципиент принадлежат к одной и той же линии) требуется высокая степень инбредности, по крайней мере по локусам *a* и *b*. Легко получить антиидиотипические антитела, направленные к идиотопам анти-

тел, специфичных к полисахариду *P. vulgaris*, у животных, совпадающих по аллотипу. При этом используют ту же методику с применением бактерий, нагруженных антителами, что и для получения аллотипспецифических антител, однако может понадобиться 4—5 курсов иммунизации.

Можно вызвать образование антиидиотипических антител к аффинно очищенным кроличьим антителам, не прибегая к приговлению комплексов [43]. При этом в/м вводят 100—200 мкг антител с НАФ (в равных объемах) повторно с интервалами в несколько месяцев.

Более быстрый ответ может быть получен повторными в/в инъекциями очищенных кроличьих антител, связанных с помощью глutarового альдегида с собственными эритроцитами реципиента [43].

1. Собирают свежие эритроциты с помощью гепарина и отмывают стерильным физиологическим раствором.

2. Осадок (15 мкл клеток) суспендируют в 300 мкл кроличьих антител (300 мкг) в 0,15 М фосфатном буфере и 20 мкл 2,5%-ного глutarового альдегида.

3. Выдерживают суспензию 1 ч при 4°C, затем трижды отмывают и ресуспенсируют в 3 мл стерильного физиологического раствора.

Кроликам вводят 1 мл эритроцитов, нагруженных антителами, в 1, 7, 10, 13 и 17-й дни. Курс повторяют через 2 нед, кровь берут через 1 нед после последней инъекции. Специфичность по отношению к идиотипу может быть проверена с помощью реакции гемагглютинации при использовании эритроцитов, нагруженных Ig данного идиотипа (метод отличается высокой чувствительностью).

#### 6.6.4. Кроличьи антитела к мышинным идиотипам (гетеропогичные) [44]

Кроликов иммунизировали глобулиновой фракцией мышинной асцитной жидкости, содержащей моноклональные антитела. Эту фракцию получали преципитацией 18%-ным сульфатом натрия и диализом против PBS. При каждом введении использовали 2,5 мкг белка. Первую инъекцию осуществляли в/м в оба бедра в комплексе с НАФ. Бустерные инъекции осуществляли через 6 нед в две точки п/к с НАФ, а на четвертом месяце — также, но без адьюванта. Кровь брали спустя 10 дней.

При иммунизации гетерологичным иммуноглобулином преимущественно образуются антитела к изотипическим и аллотипическим детерминантам чужеродного антитела. Это требует проведения абсорбции. В данном случае успешной абсорбции достигают при повторном пропускании кроличьей ан-

тисыворотки (5 мл) повторно через 10-мл колонку с нормальным мышинным иммуноглобулином, связанным с гелем сефарозы, пока не исчезнут все антитела к нормальным Ig мыши и мышиным моноклональным антителам, кроме моноклональных антител донора.

#### **6.6.5. Антитела морской свинки к идиотипам кролика (гетерологичные)**

Другой эффективный подход к получению специфических гетерологичных антиидиотипических антител заключается в подавлении нежелательного ответа к изотипическим детерминантам донорских антител [45]. Морским свинкам вводят в/в 5 мг дезагрегированного (подвергнутого ультрацентрифугированию) нормального кроличьего IgG непосредственно перед инъекцией 100 мкг аффинно очищенных гомогенных кроличьих IgG к углеродному антигену стрептококка в комплексе с ПАФ. В результате супрессии преимущественно образуются антитела, специфичные к идиотипу кроличьего антистрептококкового антитела.

#### **6.7. Антисыворотки к эритроцитам барана**

Иммунизация животных эритроцитами барана позволяет продемонстрировать в учебных целях кинетику и клеточные основы образования IgG и IgM, а также получить практические навыки в постановке реакций агглютинации, обратного гемолиза и титрования гемолизинов. Кроме того, использование эритроцитов, нагруженных антиэритроцитарными антителами определенного изотипа, аллотипа и т. д., лежит в основе реакций гемагглютинации для выявления антиглобулинов как одного из методов специфического тестирования и титрования антиглобулиновых антисывороток.

Эритроциты барана получают из крови, взятой стерильно в антикоагулянт (цитрат натрия — глюкоза). Порции крови по 20 мл центрифугируют (1500 об/мин, 20 мин), плазму и пленку лейкоцитов удаляют. Эритроциты отмывают 4 раза в 20 мл раствора Олсвера и ресуспендируют в том же объеме. Их можно хранить в течение недели при 4 °С. Для иммунизации клетки дважды отмывают в PBS и доводят их концентрацию до 10% (объем на объем) в том же буфере, что соответствует примерно  $10^9$  клеток/мл.

##### **6.7.1. Иммунизация мышей**

Животным вводят в/в или в/б около  $10^8$  клеток (0,5 мл 2%-ной суспензии эритроцитов). Через 5—6 дней после первой инъекции в сыворотке животных выявляют главным об-



разом IgM. Повторные введения эритроцитов 2 раза в неделю (до 4 нед) приводит к образованию преимущественно IgG. Лучше начинать бустерный курс не ранее чем через 2 нед, когда снизится содержание IgG. Дозы могут быть увеличены до 0,5 мл 10%-ной клеточной суспензии.

#### **6.7.2. Иммунизация кроликов**

Первая в/в инъекция  $4 \cdot 10^9$  клеток (или 1 мл 10%-ной суспензии эритроцитов/кг массы животного) приводит к образованию IgM через 5—6 дней. Далее можно провести интенсивный курс — около 10 инъекций: первые четыре — ежедневно, остальные — через день. Повторные курсы с интервалами в несколько месяцев обуславливают образование большого количества IgG, обладающего агглютинирующей активностью. Получение эффективных сывороток требует большого терпения.

### **6.8. Антисыворотки к мембранным антигенам клеток млекопитающих**

Трудно получить поликлональные антисыворотки к интактным ядерным клеткам или экстрактам клеточных мембран (которые представляли бы ценность для выявления дискретных антигенов клеточной поверхности) путем межвидовой или внутривидовой иммунизации. За исключением особых случаев, касающихся антигенов главного комплекса гистосовместимости и некоторых других важных антигенов лимфоцитов, существующих в виде полиморфных или аллельных систем, абсорбция полиспецифических сывороток для получения удовлетворительных результатов обычно представляет большие трудности. В литературе тем не менее имеются примеры успешного получения мышинных сывороток данной специфичности [28].

Более подробно мы эту важную проблему не рассматриваем, поскольку обычные методы, используемые для получения поликлональных антител к антигенам клеточной поверхности, в настоящее время вытеснены методами гибридомной технологии (гл. 3).

## **7. Получение и хранение сывороток**

### **7.1. Сбор сыворотки**

Кровь оставляют для свертывания при 37 °C на 1 ч. Сгусток отделяют от стенок сосуда, и затем кровь оставляют на ночь при 4 °C для ретракции сгустка. Сыворотку с минималь-

ным количеством эритроцитов переносят пипеткой в конические пробирки и центрифугируют при 1500 об/мин 20 мин для удаления эритроцитов. При необходимости на этой стадии добавляют консерванты. Образцы сывороток не следует смешивать до проведения анализа (исключением может быть иногда кровь, взятая у группы мышей). Из большого объема исследованных сывороток необходимо отобрать небольшие порции для последующего анализа. Это позволяет избежать оттаивания всего объема сыворотки. Удобно закрытую пробирку с пробной порцией приклеивать липкой лентой к стенке каждого общего контейнера.

## 7.2. Контейнеры для хранения

Для хранения сыворотки лучше использовать полипропиленовые бутылки на 50—500 мл с завинчивающейся крышкой, поскольку стеклянные могут лопнуть при замораживании; удобно использовать небольшие универсальные флаконы или пробирки с крышками. Важно, чтобы каждый контейнер был герметичен. Не следует использовать резиновые пробки, так как они повреждаются от мороза. На контейнере необходимо отметить номер животного, его вид и дату взятия крови. Пробы крови, отобранные последовательно, следует хранить вместе. Не делайте надписи на стекле, так как они могут смываться при оттаивании. Покрывайте надпись пленкой или используйте несмываемые чернила. Небольшие образцы можно хранить в пластиковой упаковке с приложением ярлыка, в пробирках, пронумерованных соответствующим образом. Алюминиевые поддоны шириной 20 см, которые легко вдвигаются в морозильную камеру, идеально подходят для хранения сывороток. Морозильные камеры должны иметь двустворчатые двери, а каждое отделение — 3—4 полки. Месторасположение того или иного образца сыворотки в холодильнике должно быть указано в специальном каталоге.

## 7.3. Консерванты

Тиомерсал (мертиолят) 1:10 000 или 0,1%-ный (вес на объем) азид натрия рекомендуются для длительного хранения сывороток. Ни одно из этих веществ, однако, не может быть применено *in vivo*. Азиднатрия тормозит реакции химического связывания и должен быть удален длительным диализом. Он токсичен и требует осторожного обращения. Растворы следует хранить плотно закупоренными. Если сыворотка стерильна и хранится при  $-70^{\circ}\text{C}$ , то консерванты не нужны.

#### 7.4. Замораживание

Хранящиеся при  $4^{\circ}\text{C}$  стерильные антисыворотки длительное время сохраняют свои свойства, но тем не менее рекомендуют глубокое замораживание, минимально до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Чтобы избежать повторных оттаиваний, порции должны иметь возможно меньший объем; особо ценные контрольные антисыворотки хранят аликвотами по 100 мкл в пробирках с крышками. При длительном хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$  вода возгоняется и вновь замерзает в виде льда в верхней части образца. Концентрированные белки агрегируют, образуя нерастворимый преципитат на дне пробирки. Размороженные образцы перед началом работы должны быть тщательно перемешаны и подвергнуты скоростному центрифугированию до разделения на порции. Ферменты, содержащиеся в сыворотке, продолжают разрушать белки и при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Идеально хранить сыворотки при  $-60^{\circ}\text{C}$  или ниже, однако такую роскошь можно позволить лишь в отношении самых ценных реагентов.

#### 7.5. Лиофильное высушивание

Разные образцы сыворотки после высушивания в замороженном состоянии имеют неодинаковую растворимость. Лучше применить данный метод в случае небольших объемов ценных реагентов, предварительно проверенных на растворимость и сохранение активности после регидратации, а также в тех случаях, когда антисыворотку транспортируют на большие расстояния по почте и нельзя обеспечить замораживание. На флаконе для лиофильной сушки отмечают уровень жидкости; отметка будет служить ориентиром для восстановления препарата дистиллированной водой.

#### 7.6. Плазма

Сбор плазмы позволяет получать большие объемы с меньшим гемолизом. Большие объемы плазмы у овец и других крупных животных лучше получать с помощью мешочков для переливания крови с антикоагулянтом, которые можно заполнять в асептических условиях. Для малых объемов крови цитрат (3,8%) или ЭДТА (2%) добавляют в шприц или бутыл в объеме 10%. Шприцы и флаконы с антикоагулянтом необходимо охладить на льду. Немедленно после взятия крови ее центрифугируют (2500 об/мин,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 мин), предварительно охладив ротор. Для получения сыворотки к плазме добавляют 2 мл 10%-ного безводного  $\text{CaCl}_2$  на каждые 10 мл цитрата или 1,6 мл 2%-ного раствора хлорида кальция на

каждые 10 мл ЭДТА при перемешивании. Выдерживают несколько часов при 4 °С. Образовавшийся сгусток необходимо сжать для получения максимального количества сыворотки. Последовательным замораживанием и оттаиванием можно разрушить сгусток, затем его удаляют центрифугированием или фильтрованием.

## **8. Предварительная оценка качества антисыворотки**

Получение эффективных антисывороток определяется стратегией пробных заборов крови после каждой инъекции, которые позволяют проследить за возрастанием титра антител и изменением их специфичности и avidности. От результатов, полученных в ходе этих пробных исследований, зависит процедура последующих инъекций (время проведения, доза, использование адъюванта, способ введения), а также выбор наиболее хорошо отвечающих животных и необходимость в той или иной абсорбции.

«Золотое правило» при взятии проб крови — это включение в систему тестирования именно того метода, для осуществления которого данная антисыворотка в конечном счете предназначена. Действительно, антисыворотка может работать в методе Ухтерлони, но обладать слишком малой специфичностью и (или) avidностью для осуществления радиоиммунологического анализа, для которого и была предназначена.

В табл. 1.2 (гл. 1) приведены разнообразные методы, используемые для тестирования исследуемых антисывороток, которые применяют в соответствии с природой исследуемого антигена и назначением получаемой антисыворотки. В табл. 2.5 данные методы рассмотрены более подробно и в соответствии с типом антигена. Подробное описание перечисленных методов можно найти в гл. 6 и других разделах этой книги, а также в кн. 2.

## **9. Абсорбция антисывороток**

### **9.1. Антисыворотки к отдельным антигенам в растворе**

Большинство антисывороток, предназначенных для изучения определенных антигенов, требуют предварительного удаления антител с нежелательной специфичностью. Это неизбежно при использовании даже самого чистого иммуногена, если у него есть общие эпитопы с родственными молекулами, находящимися в исследуемом образце. Эта проблема особен-

но актуальна при определении гормонов. Кроме того, обычно сыворотка содержит антитела к контаминирующим молекулам, находящимся в инъектируемой смеси, которые могут присутствовать в исследуемых образцах. Аффинная очистка на колонке с антигеном может в ряде случаев оказаться полезной (увеличить концентрацию, эффективность мечення антител, снизить фон), но не оказать влияния на специфичность: по изложенным выше причинам. Данный метод не позволит

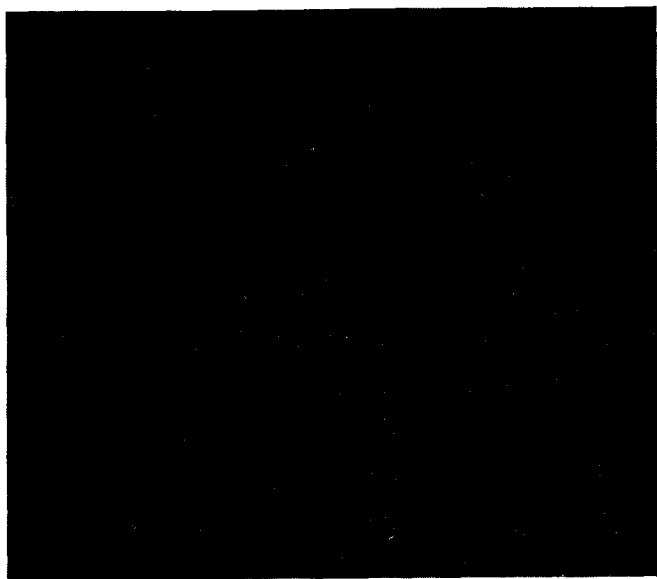


Рис. 2.8. Реакция обратной радиальной иммунодиффузии, используемая для сравнения титра и преципитирующих свойств антисыворотки к IgG человека (два нижних ряда) с контрольной антисывороткой (два верхних ряда). Сравнивая размеры колец преципитации, можно видеть, что исследуемая сыворотка содержит на 50% меньше антител, чем контрольная. 9,8 мл 1%-ной агарозы содержат 10 мкл цельной нормальной сыворотки человека и 3% (вес на объем) ПЭГ. Сыворотка разведена (слева направо) 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32. Лунки содержат по 5 мкл антисыворотки к IgG. Пластины инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч

решить проблему до тех пор, пока не будет выделена эпитоп-рестриктированная антигенспецифическая субъединица или пептид. Для большинства целей абсорбция антисыворотки представляет собой наиболее практичный метод решения проблемы, если уже известны перекрестно реагирующие антигены и примеси. Главное преимущество абсорбции (для удаления нежелательных антител) заключается в том, что несвязавшиеся антитела в ходе процедуры не подвергаются тем

Таблица 2.5. Системы контроля качества антисывороток

Иммуноген	Определение титра	Проверка специфичности
Гаптены	<p>ПГА: эритроциты нагружают гаптенем или гаптеном на носителе.</p> <p>ELISA/ИРМА: в лунках планшета адсорбируют гаптен, связанный с носителем, и используют меченый антиглобулин.</p> <p>Иммунологический тест с модулированным ферментом: используют гаптен, связанный с ферментом.</p> <p>РИА: применяют радиоактивно меченный гаптен или конъюгат (кн. 2).</p> <p>Равновесный диализ: анализ аффинности в случае гомогенных антител к небольшим гаптенам [51].</p>	<p>Метод Ухтерлонн: проверяют антисыворотку по отношению к (1) гомологичному гаптenu и носителю, (2) гаптenu и другому носителю, (3) другому гаптenu на том же носителе, конъюгированному с помощью той же химической реакции, (4) одному носителю (гл. 6).</p> <p>ELISA/ИРМА: используют (1) — (4) в качестве антигена (кн. 2).</p> <p>РИА: используя меченый стандартный антиген, сравнивают кривые связывания тестируемой и контрольной сывороток (кн. 2).</p>
Очищенные отдельные макромолекулы	<p>Метод Ухтерлонн: используют разведение антисыворотки в лунках, расположенных вокруг центральной лунки с антигеном.</p> <p>Радиальная иммунодиффузия (РИД): антиген, содержащийся в агарозном геле, взаимодействует с антисывороткой в лунках. Сравнивают с контрольной сывороткой (см. рис. 2.8).</p> <p>ПГА: эритроциты нагружают антигеном.</p> <p>ELISA/ИРМА в лунках планшета адсорбируют антиген (рис. 2.9).</p> <p>РИА: используют меченный изотопом антиген. Количественная реакция преципитации: определяют абсолютное количество антигена в преципитате, полученном при оптимальных соотношениях реагентов (кн. 2).</p>	<p>Метод Ухтерлонн: проверяют антисыворотку по отношению к иммуногену, стандартному антигену, смеси антигенов, родственным белкам и т. п.</p> <p>ИЭФ: проверяют антисыворотку к разным антигенам, как в методе Ухтерлонн (рис. 2.10).</p> <p>Двумерный ИЭФ: антисыворотка в агарозе реагирует со смесью антигенов, выбирают сыворотку, дающую один пик преципитации (рис. 2.2, б).</p> <p>ПГА, ELISA/ИРМА: используют нагруженные антигеном эритроциты или лунки с адсорбированным антигеном (рис. 2.9).</p> <p>Вестерн-блоттинг: ДСН-ЭПАГ позволяет получить отдельные полосы антигенов смесей, очищенного стандартного антигена, родственных белков и т. п.</p>
Изотипы иммуноглобулинов	<p>Методы контроля те же, что и для других отдельных макромолекул.</p> <p>Ig человека используют очищенные парaproтеины (миеомные белки), полноклональные изотипы нормальных сывороток, легкие цепи <math>\kappa</math> и <math>\lambda</math> белка Бенс-Джонса и Fc (<math>\gamma</math>)-фрагменты IgG. Стандарты</p>	

изотипов мыши — это очищенные моноклональные антитела (не антиглобулины). Миеломные белки можно получить от крыс. В случае других видов изотипы получают из пула нормальных сывороток.

### *Смеси антигенов*

Важно не столько титр, сколько сбалансированная полиспецифичность.  
ИЭФ: антисыворотка в канавках должна давать хорошие дуги преципитации при одном заполнении.  
Двумерный ИЭФ: содержание антисыворотки в агарозе должно быть менее 10%. Следят за балансом высоты пиков (рис. 2.7 и гл. 6).

### *Бактериальные экстракты*

ПГА: белковыми антигенами покрывают эритроциты с помощью танниновой кислоты или хлорида хрома. Углеводы адсорбируют пассивно.  
ИЭФ/двумерный ИЭФ: так же, как для смеси антигенов.  
ИФА: определяют предельный титр к различным бактериальным экстрактам и очищенным антигенам (кн. 2).  
ОРИД: используют очищенные антигены (ЛПС, полисахариды и т. п.) в агарозе. Сравнивают с контрольными сыворотками к ЛПС и т. п. (рис. 2.8)

### *Бактериальные суспензии*

Метод бактериальной агглютинации.  
Иммунофлуоресценция: метод разведений с меченым антиглобулином.  
Другие тесты — как для экстрактов, особенно для

ИЭФ: определяют число дуг преципитации со стандартной смесью антигенов и сравнивают с контрольной антисывороткой (рис. 2.10).

Двумерный ИЭФ: аналогично ИЭФ (рис. 2.7).  
Вестерн-блоттинг: сравнивают профиль связывания исследуемой и нормальной сыворотки со стандартным антигеном. Используют маркеры мол. массы для определения специфичности антигенов (см. гл. 6).

ИЭФ/двумерный ИЭФ: как для смеси антигенов. ELISA/IRMA: проверяют антисыворотку по отношению к (1) иммуногену, (2) другим экстрактам тех же бактерий, (3) антигенам других линий, серотипов и видов.

Вестерн-блоттинг: определяют перекрестно реагирующие антигены других бактерий с целью абсорбции (см. гл. 6).

Бактериальная агглютинация и иммунофлуоресценция: используют интактные клетки того же или родственного штамма, вида и т. п. разделенных поверхностных молекул.

### *Эритроциты*

Для эритроцитов барана применяют редко, но можно использовать эритроциты других видов. Типирование эритроцитарных антигенов человека (кн. 2).

Иммуноген	Определение титра	Проверка специфичности
<i>Суспензии других клеток</i>	Иммунофлуоресценция и иммуноферментные методы: прямые или с использованием меченого антиглобулина (кн. 2). Комплект-зависимая цитотоксичность с использованием красителя или <sup>51</sup> Cr.	Иммунофлуоресценция: лучше — с использованием клеточного сортера. Антисыворотку проверяют на способность тормозить связывание меченого контрольного конъюгата (кн. 2).
<i>Антигены в тканях</i>	Специфичность на гистологических срезах определяют: (1) путем использования стандартных антиген-позитивных и негативных тканей или клеток, (2) предварительным истощением чистым антигеном или антиген-позитивными клетками, (3) блокированием специфического связывания предварительной обработкой срезов меченой контрольной сывороткой перед применением исследуемой меченой (кн. 2).	
<i>Аллотипы иммуноглобулинов</i>	Наличие аллотипов зависит от мейделевского наследования аллелей в аллотипических локусах, экспрессируемых как кодоминантные антигенные маркеры. Новые типизирующие сыворотки требуют сравнения с контрольными реагентами по отношению к стандартным антигенам. Некоторые локусы у кролика могут быть типизированы с помощью преципитирующих сывороток методом Ухтерлони. Другие требуют постановки специфической РПГА или РИА. У мышей аллели различных изотипов экспрессируются у разных шибредных линий. Они выявляются с помощью РИА [52, 53].	
<i>Идиотипы иммуноглобулинов</i>	В случае специфичности к идиотипу связывание ограничено только молекулой антитела, вызвавшего ответ, антисыворотка не связывается с другими антителами. Обычно источником идиотипического иммуногена (и тест-антигена) служат гомологиичные, аффинно очищенные антитела (к углеводам), миеломный белок или (у мышей, крыс, человека) моноклональные антитела. Реакцию идиотип-анти-идиотип (и титры сывороток) проверяют методом Ухтерлони, ПГА (эритроциты, нагруженные идиотипом), ELISA/ИРМА или РИА.	



грубым денатурирующим воздействием, которые сопровождаются диссоциацией связавшихся антител при аффинной очистке. Более того, последние методы дают меньший выход антител, и обычно сохраняют активность лишь антитела самой низкой аффинности (наиболее легко диссоциирующие).

Абсорбция должна проводиться на твердой фазе, что требует химического соединения (или пассивного связывания) адсорбирующих антигенов с нерастворимой основой (например, с дериватами целлюлозы, полистиролом, эритроцитами, и т. д.) или получения геля из перекрестно-связанного антигена. Получение и использование наиболее часто применяемых иммуносорбентов приведены ниже.

#### **9.1.1. Перекрестное связывание сорбирующих белков глутаровым альдегидом**

1. Приготавливают раствор белка (250 мг в 5 мл фосфатного буфера, pH 7,0). Это может быть белковый антиген, или, если его мало, смесь антигена с сывороточным альбумином. Диализуют раствор против фосфатного буфера и проверяют pH.

2. Добавляют по каплям 1—2 мл 2,5%-ного раствора глутарового альдегида в воде при перемешивании до начала образования геля, нейтрализуя его при необходимости NaOH.

3. Выдерживают гель при комнатной температуре 3 ч и затем разрушают его до образования мелких частиц.

4. Промывают гель большим количеством воды, а затем 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,4; 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 3,2, далее несколько раз PBS, pH 7,4.

5. Блокируют оставшиеся участки связывания добавлением 1%-ного (вес на объем) раствора БСА в PBS в объеме, равном объему геля; реакцию проводят в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °C. Промывают гель, как указано в п. 4.

6. Для абсорбции неразведенной сыворотки ее соединяют с сорбирующим полимером в равных объемах и перемешивают (лучше вращением) при комнатной температуре в течение нескольких часов. Истощенная сыворотка может быть отделена центрифугированием.

7. Иммуносорбент может быть очищен от связавшихся антител и использован повторно. Для восстановления свойств сорбента его промывают в большом количестве 0,1 М глицин-HCl буфера, pH 3,2, для диссоциации антител, а затем — PBS до тех пор, пока pH элюата не достигнет 7,2—7,4, а оптическая плотность при 280 нм не станет минимальной и

близкой к оптической плотности чистого PBS. Промытый сорбент можно хранить при  $4^{\circ}\text{C}$  с добавлением 1% (вес на объем) азида натрия.

#### 9.1.2. Колонки с антигеном, иммобилизованным на сефарозе

Сефарозу 4В (Pharmacia) можно активировать CNBr (бромистым цианом) для придания ей способности к связыванию белков. Активированную сефарозу поставляют многие фирмы (например, Pharmacia), и в этом случае работу начинают с этапа 4 (см. ниже).

1. Отвешивают 2 г твердого CNBr в вытяжном шкафу. **Внимание:** CNBr токсичен, и этапы (2) и (4) следует тоже проводить в вытяжном шкафу.

2. Разводят 20 г сефарозы 4В в 50 мл дистиллированной воды и добавляют CNBr при перемешивании. Доводят pH до 11 с помощью 2 М NaOH и поддерживают его на этом уровне в течение следующих 10 мин.

3. Фильтруют активированные гранулы через воронку со стеклянным фильтром и промывают холодной дистиллированной водой, а затем — 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ .

4. Промывают гранулы в стеклянной мензурке на 200 мл тем же буфером и дают им осесть. Удаляют супернатант.

5. Растворяют 250—300 мг сорбирующего белка в 60 мл 0,1 М  $\text{NaHCO}_3$ , диализуют его и добавляют к гранулам. Перемешивают 12—16 ч при  $4^{\circ}\text{C}$  в закрытой мензурке или в ротационном смесителе, затем промывают большим количеством дистиллированной воды, PBS, 0,5 М уксусной кислотой и, наконец, снова PBS до тех пор, пока оптическая плотность не будет соответствовать таковой чистого PBS. Сорбент можно хранить при  $4^{\circ}\text{C}$  с 0,1% (вес на объем) азида натрия.

6. Помещают подходящее количество сорбента в колонку, используя в качестве буфера PBS: на 10 мл сорбируемой сыворотки берут 2 г исходной сефарозы. Пропускают сыворотку сверху вниз через колонку со скоростью не более 6 мл в час. Следят по оптической плотности за пиком сорбируемого белка в элюате.

7. В перерыве между сорбциями отмывают колонку от связавшихся антител, как описано в разд. 9.1.1.

#### 9.1.3. Колонки с антигеном, иммобилизованным на карбонате целлюлозы

Микрокристаллический *транс*-2,3-карбонат целлюлозы выпускает фирма Sigma. Он обладает рядом свойств, позволяющих рекомендовать его в качестве матрикса для сорбента.

**Карбонат целлюлозы связывает около 40 мг белка (например, IgG) на 1 г целлюлозы при мягких условиях, исключая денатурацию; в результате на его основе удается приготовить стабильный иммуносорбент с сильной связывающей активностью. Методика получения сорбента заключается в следующем [46]:**

1. 100 мг сорбирующего антигена растворяют в 20 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 6,8). Добавляют при перемешивании 1,6 г карбоната целлюлозы. Перемешивают смесь вращением при комнатной температуре в течение 24 ч.

2. Отмывают сорбент центрифугированием с 10 мл PBS (рН 7,4) четыре раза, ресуспендируют в 15 мл PBS и помещают в колонку (9×1 см) над 2-мл слоем сефадекса G25. При использовании в качестве сорбента IgG удается связать 60—70% белка.

3. Пропускают через колонку PBS со скоростью 10 мл в час до стабилизации оптической плотности при 280 нм на нижнем уровне. Через колонку может быть пропущено до 30 мл сыворотки.

4. Колонку можно восстановить для последующего использования отмыванием, как описано выше.

#### **9.1.4. Абсорбция с использованием эритроцитов**

Весьма удобный и простой метод удаления нежелательных антител из сывороток заключается в использовании эритроцитов, на поверхности которых присоединены или адсорбированы перекрестно реагирующие или примесные антигены, входящие в состав иммуногена. Перед абсорбцией сыворотка должна быть предварительно инактивирована нагреванием до 56 °С в течение 30 мин для потери способности к комплемент-зависимому лизису.

Процесс связывания может быть индуцирован применением таких веществ, как хлорный хром, глутаровый альдегид или танниновая кислота.

*1. Метод, основанный на использовании хлорного хрома [47, 48].*

1. Трижды отмывают эритроциты барана стерильным физиологическим раствором и центрифугируют для получения плотного осадка.

2. Из концентрированного раствора хлорного хрома готовят 1 мл 0,1%-ного раствора в 0,15 М физиологическом растворе. Добавляют 1 мл раствора белка в 0,15 М физиологическом растворе. Обычно используют 1 мг/мл белка, но можно попробовать применить и более высокие концентрации.

3. 2 мл плотного осадка эритроцитов добавляют к полученной смеси, закрывают сосуд и перемешивают вращением при комнатной температуре в течение ночи.

4. Отмывают клетки в физиологическом растворе. После этого они могут быть использованы для абсорбции антител. Количество эритроцитов, нагруженных белком, должно соответствовать конкретным задачам.

## II. Метод, основанный на использовании глутарового альдегида [49].

1. Отмывают эритроциты барана стерильным физиологическим раствором и центрифугируют для получения плотного осадка.

2. На каждые 0,4 мл осадка эритроцитов добавляют 0,4 мл физиологического раствора, содержащего 10—20 мг белка, закрывают крышкой и встряхивают.

3. Добавляют 2,5%-ный раствор глутарового альдегида. Как правило, достаточно 0,5 мл, но в зависимости от белка количество может быть увеличено до 2 мл.

4. Перемешивают смесь вращением в течение 1 ч при комнатной температуре; перед использованием промывают клетки в избытке физиологического раствора.

## III. Метод, основанный на использовании танниновой кислоты — см. разд. 6.3.2.

IV. *Нагруженные антителами эритроциты в качестве иммуносорбентов.* Эритроциты, нагруженные очищенными антиэритроцитарными иммуноглобулинами определенного изотипа и стабилизированные глутаровым альдегидом, позволяют достаточно просто сорбировать антиглобулины для достижения требуемой изотипспецифичности. В качестве примера приведем методику связывания эритроцитов с IgM:

1. Отмывают эритроциты барана PBS и добавляют 1%-ную суспензию (по объему) к 5 мл кроличьего антиэритроцитарного IgM (см. разд. 3.2.3).

2. Перемешивают суспензию клеток вращением при 37°C в течение 45 мин, затем отмывают их 6 раз PBS, тщательно диспергируя агрегаты клеток.

3. Осадок отмытых клеток суспендируют в PBS для получения 1%-ной (объем на объем) суспензии и инкубируют с 4% глутарового альдегида в течение часа при комнатной температуре при ротационном перемешивании. Непосредственно перед использованием клетки тщательно отмывают.

V. *Абсорбция сывороток эритроцитами.* 1%-ную суспензию нагруженных эритроцитов смешивают с равным объемом сво-

бодной от комплемента сыворотки и перемешивают вращением в течение 1 ч при комнатной температуре в закрытом флаконе. Истощенную сыворотку затем собирают центрифугированием. Остаточную активность антител удобно проверить методом геммагглютинации. Для этого используют эритроциты, нагруженные аналогичным способом, правда, продолжительность реакции связывания белка и концентрацию последнего, возможно, придется изменить. При необходимости абсорбция может быть повторена с помощью новых порций эритроцитов.

#### 9.1.5. Абсорбция сывороток бактериальными суспензиями

Бактерии, взятые в логарифмической фазе роста в концентрации около  $10^8$  клеток/мл, инактивируют подходящим способом, отмывают от культуральной среды и центрифугируют. Инактивированная нагреванием антисыворотка может быть сорбирована неоднократно. При этом каждый раз используют  $10^8$  микробных клеток и ресуспендируют их в 1 мл сыворотки путем перемешивания при вращении в течение 1 ч при комнатной температуре. Так, например, трехкратная абсорбция кроличьей антисыворотки к *S. jejuni* каждой из восьми суспензий других грамотрицательных микроорганизмов кишечника позволила получить антисыворотку к *Campylobacter* spp. с титром, превышающим 1:12 800 (по данным иммуноферментного анализа).

#### 9.1.6. Абсорбция антиглобулиновых сывороток

Специфичность антиглобулинов является критическим моментом во многих иммунологических исследованиях. Антигены-иммуноглобулины дают перекрестную реакцию между изотипами и видами, поэтому чтобы добиться специфичности антисыворотки к иммуноглобулину даниого вида, класса и подкласса, необходима тщательная абсорбция. Одна из наиболее распространенных ошибок начинающих исследователей — это представление о том, что антисыворотка, специфичная, например, к IgG кролика (т. е. не связывающаяся с кроличьим IgM или IgA), не будет взаимодействовать с IgG других видов. Чаще всего такое взаимодействие будет наблюдаться, если сыворотка не была истощена IgG этих видов.

I. Антисыворотка к IgG человека. Лучше всего получить такую сыворотку путем иммунизации Fc-фрагментами IgG, выделенного из сыворотки (разд. 10). Из-за некоторой примеси Fab-фрагментов в сыворотках обычно содержатся антитела и к легким цепям, которые связываются со всеми классами

иммуноглобулинов, а также антитела к общим эпитопам тяжелых цепей. Пример тестирования специфичности антисыворотки к IgG человека с помощью иммуноферментного метода представлен на рис. 2.9.

1. Абсорбируют сыворотку смесью  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей (очищенный белок Бенс — Джонса) или F' (ab)2-фрагментами, полученными путем расщепления IgG пепсином.

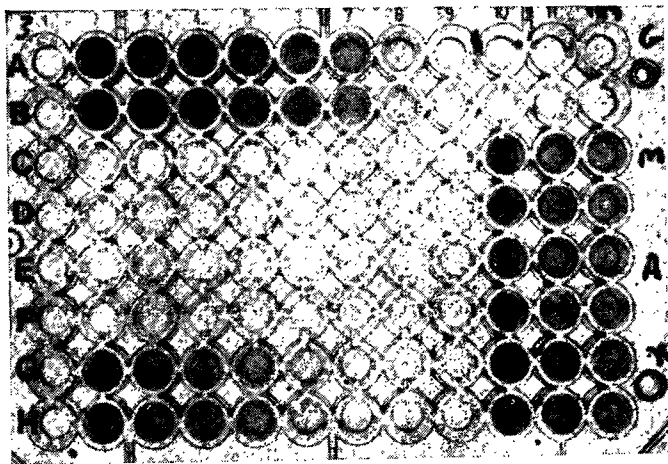


Рис. 2.9. Применение ELISA для тестирования специфичности антисыворотки к IgG человека. В лунках панели адсорбирован антиген (2,5 мкг/мл): ряды A и B — IgG человека, C и D — IgM человека, E и F — IgA человека (все антигены получены из нормальной сыворотки); G и H — легкие цепи  $\kappa$ . Исследуемая сыворотка добавлена в двукратных последовательных разведениях (начиная с 1:100) от вертикального ряда 2 до ряда 12 (ряды A и B) или до вертикального ряда 9 (другие горизонтальные ряды). Лунки вертикальных рядов 10—12 (ряды C — H) содержат разведения антисывороток, специфичных к адсорбированным на дне этих лунок антигенам. В реакции использовали конъюгат пероксидазы хрена с кроличьей антисывороткой к IgG овцы. Вертикальный ряд 1 — контроль (только конъюгат). Исследуемая антисыворотка взаимодействует только с IgG человека. Реакция в лунках рядов G и H идет вследствие примеси IgG, обнаруженной в препаратах  $\kappa$ -цепи, т. е. метод позволил определить чистоту антигена

2. Абсорбируют очищенными миеломными белками — IgM и (или) IgA. Если в их состав входят  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи, то этап 1 можно опустить.

3. При получении видоспецифической сыворотки для абсорбции используют полимеризованную смесь сывороток или колонку с IgG соответствующих видов животных.

II. Антисыворотки к IgA и IgM человека. Антисыворотки получают, иммунизируя животных интактными молекулами,

поскольку Fc-фрагменты приготовить трудно, в то время как абсорбция с помощью IgG (для удаления антител к  $\gamma$ - и легким цепям) не вызывает затруднений. Для получения IgM и IgA используют миеломные белки, причем Ig одного изотипа легко очистить от примесей другого, поскольку они сильно отличаются по мол. массе. Примеси IgG удаляют на колонке с протеин А-сефарозой (разд. 10.4.4). Для получения изотип-специфической сыворотки для абсорбции используют IgG в комплексе с IgA и IgM и дополнительные легкие цепи. Целесообразно полимеризовать сыворотку крови пуповины, которая богата IgG, но не содержит IgA и IgM. Для получения видоспецифической сыворотки используют солевые преципитаты эуглобулиновой фракции сывороток соответствующих видов животных. Тестирование исходной и абсорбированной сывороток к человеческому IgM методом ИЭФ показан на рис. 2.10.

III. Антисыворотка к подклассам IgG человека. Соответствующие антисыворотки получают, используя для иммунизации Fc-фрагменты или целые молекулы миеломного IgG определенного подкласса. Абсорбцию проводят, как описано в пп. 1 и 2 подраздела I, а затем путем нанесения сыворотки на колонку с соответствующими подклассами. Многие животные отвечают

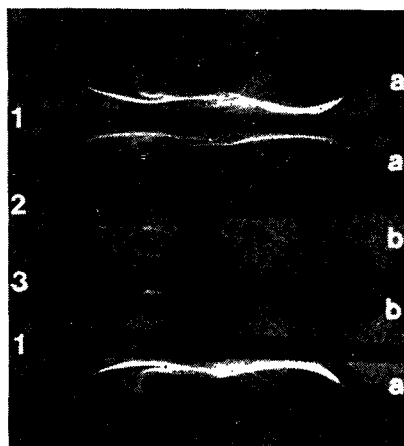


Рис. 2.10. Определение специфичности антисыворотки к IgM человека до и после абсорбции иммуноглобулинами других классов (иммуноэлектрофорез). В лунки внесены: (а) нормальная сыворотка человека, (б) очищенный IgM. В канавки внесены: (1) антисыворотка к цельной сыворотке человека, (2) неабсорбированная тестируемая антисыворотка, (3) исследуемая антисыворотка после абсорбции с помощью IgG и IgA. В результате абсорбции получен специфический реагент по крайней мере по данным иммуноэлектрофореза

без адекватного распознавания подклассов, а если такое распознавание наблюдается, то сыворотки тем не менее требуют тщательной абсорбции. Очень трудно получить антисыворотки, которые распознавали бы все подклассы миеломных белков без перекрестных реакций. Для иммунизации важен выбор вида животного. Показано, что для этих целей целесообразно использовать птиц ввиду их филогенетической отдаленности.

Наиболее эффективный метод получения антител к подклассам IgG человека основан на гибридной технологии [24, 50].

IV. *Антисыворотки к иммуноглобулинам мыши и крысы.* Для общих целей анти-IgG получают путем иммунизации животных фракцией IgG, полученной в результате аффинной очистки на колонке с протеина-сефарозой (разд. 10.6.1). Для удаления антител к другим классам иммуноглобулинов сыворотки сорбируют моноклональными антителами или сывороткой, лишенной IgG.

Анти-IgM сыворотку можно получить, вводя животному антиэритроцитарные гомологичные IgM в виде комплекса IgM-эритроциты; сыворотку абсорбируют суспензией эритроцитов, нагруженных IgG (см. разд. 9.1.4, подраздел IV).

Для проверки специфичности, как правило, используют реакцию диффузии в геле по Ухтерлони, но чаще РПГА, ELISA или ИРМА с помощью панели МКА всех изотипов.

Антисыворотки к подклассам IgA и IgG могут быть получены с помощью гибридной технологии. Готовые к применению аффинно очищенные антитела могут быть использованы как в качестве иммуногенов, так и в качестве сорбирующих антигенов. При этом простота в определении изотипов моноклональных антител сочетается с возможностью успешного получения специфической преципитирующей антисыворотки. Сыворотки получают, вводя животному интактные молекулы Ig или Fc-фрагменты, затем их истощают на колонках со смесью других изотипов, содержащих как  $\kappa$ -, так и  $\lambda$ -цепи. Получение чистого IgG<sub>2a</sub> мыши для иммунизации и адсорбции может быть осуществлено физико-химическими методами (разд. 10.6.1).

Иммунизация гомогенными миеломными белками и интактными молекулами моноклональных антител может привести к образованию как изотипспецифических, так и антиидиотипических антител. Этого можно избежать, если использовать Fc-фрагменты. Можно и сорбировать сыворотку с помощью Fab-фрагментов иммуногена. Если антиидиотипические антитела не являются помехой при дальнейшем использовании антисыворотки, антиизотипическую ее специфичность можно определить, используя другие МКА, которые отличаются по вариабельной области (Fab-фрагменту) от МКА, использованных при иммунизации.

V. *Полиспецифическая антииммуноглобулиновая сыворотка.* В ответ на иммунизацию каким-то одним интактным иммуноглобулином образуются антитела к легким цепям, которые связываются с иммуноглобулинами всех классов и под-



**Таблица 2.6. Применение очищенных иммуноглобулинов и их субъединиц**

Иммуногены — Fc-фрагменты IgG; IgM, IgA, IgE, IgD — очищенные нитчатые молекулы,  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепи.

Иммуносорбенты — для удаления перекрестно реагирующих антиизотипических антител, для аффинной очистки антиглобулинов.

Стандартные антигены — для проверки антиглобулинов и количественной оценки иммуноглобулинов.

Фракция сыворотки для мечения антител.

Исходный материал для аффинной очистки антител.

Первый этап получения стандартных антител к белкам и антителам.

Антитела с низким фоном в иммунологических методах исследования.

классов, и, следовательно, такая антисыворотка будет антииммуноглобулиновой. Однако, если для иммунизации не использовать смесь очищенных интактных молекул, баланс антител будет сдвинут в сторону того класса иммуноглобулинов, который используют для иммунизации. Наилучшее решение — смешать в подходящих пропорциях абсорбированные сыворотки, полученные к каждому классу и подклассу, и антисыворотки к  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепям.

### **10. Очистка иммуноглобулинов и субъединиц IgG**

Очищенные иммуноглобулины необходимы для разных целей (см. табл. 2.6).

#### **10.1. Очистка IgG человека**

##### **10.1.1. Простой метод**

1. Приготавливают анионообменник ДЭАЭ-целлюлозу (Whatman DE52) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2.

2. Диализуют сыворотку человека против 10 объемов буфера в течение 24 ч при 4°C с 5-кратной сменой буфера.

3. Дают ионообменнику осесть в мензурке, а затем удаляют избыток буфера. Переносят ДЭАЭ в небольшую мензурку или универсальный флакон и добавляют сыворотку (4—5 мл ДЭАЭ на 1 мл диализованной сыворотки). Тщательно перемешивают и оставляют смесь при комнатной температуре на 1 ч, периодически перемешивая.

4. Переносят смесь в толстостенную центрифужную пробирку, центрифугируют (4000 об/мин, 4°C, 20 мин) и собирают супернатант — фракцию IgG. Можно поступить иначе: перенести ДЭАЭ в шприц, перекрытый фильтровальной бумагой, и вытеснить раствор IgG, нажимая на поршень. При этом ДЭАЭ задерживает все сывороточные белки, кроме IgG. Некоторые авторы рекомендуют применять 0,02 М фосфатный буфер и pH 8,0.

**10.1.2. Многоступенчатый метод, повышающий степень очистки**

1. К цельной сыворотке на льду при перемешивании по капле добавляют насыщенный (при  $0^{\circ}\text{C}$ ) раствор сульфата аммония в количестве, необходимом для получения 33%-ного (по объему) насыщенного раствора. Выдерживают 1 ч на льду при помешивании (избегают вспенивания!), центрифугируют (3000 об/мин, 15 мин), а затем отмывают преципитат ледяным насыщенным (33%) раствором сульфата аммония в дистиллированной воде при центрифугировании и ресуспендировании.

2. Вновь отмывают преципитат и удаляют супернатант. Растворяют преципитат (без вспенивания) в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2 (объем буфера —  $\frac{1}{3}$  от исходного объема сыворотки) и диализуют раствор эуглобулина против того же буфера, как описано в разд. 10.1.1.

3. Готовят колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером из расчета 15—20 мл объема осадка на 5 мл раствора эуглобулина. Хорошо отмывают колонку, и, когда ДЭАЭ-целлюлоза осядет, удаляют избыток буфера, и наносят сверху эуглобулин. Когда последний проникнет в матрикс, добавляют буфер и подключают резервуар с буфером.

4. Пропускают буфер через колонку со скоростью около 20 мл в час, отбирая образцы по 5 мл. Определяют элюцию очищенного IgG с помощью УФ-монитора или спектрофотометра при 280 нм. Концентрацию определяют, исходя из того, что  $1 \text{ мг/мл (1 см)} = 1,45$ .

5. Определяют чистоту фракции методом ИЭФ, внося в лунки раствор, содержащий 10 мг белка в 1 мл, и используя антисыворотки к белкам сыворотки человека и IgG (Fcγ). Применяют нормальную сыворотку человека (исходный материал) и очищенный IgG в качестве стандартов.

6. Колонку можно отмыть PBS для удаления связавшихся белков и уравновесить 0,01 М фосфатным буфером для повторного использования.

**10.2. Очистка IgG овцы, быка, козы и кролика**

Принцип метода тот же, что и для IgG человека, но молярность и pH фосфатного буфера должны быть изменены: для овцы и козы — 0,03 М, pH 7,2; для IgG кролика — 0,02 М, pH 7,2; для IgG быка — 0,075 М, pH 6,4.

Для повседневного выделения фракции IgG из больших объемов антисыворотки рекомендуется одноступенчатый метод очистки диализованной сыворотки на ДЭАЭ-целлюлозе.

При этом достигается степень очистки, достаточная для большинства целей, кроме иммунизации. Увеличение объемов сыворотки и анионообменника существенно не сказывается на степени очистки и общем выходе иммуноглобулина. Для успешного проведения процедуры выделения IgG необходимы антитела к цельной сыворотке соответствующих видов животных и контрольные антитела к IgG.

### 10.3. Очистка IgM человека

Невозможно полностью очистить IgM с помощью одной хроматографии, поскольку заряд и размеры этого иммуноглобулина совпадают с параметрами других сывороточных белков. Наиболее легкий способ очистки — использование в качестве исходного материала сывороток пациентов, страдающих макроглобулинемией Вальденстрёма, которая характеризуется повышенной продукцией IgM. Можно использовать в качестве исходного материала преципитат эуглобулиновой фракции нормальной сыворотки в кислом буфере с низкой ионной силой. Это приводит к контаминации плазминогеном и компонентами комплемента. Далее проводят гель-фильтрационную хроматографию. Джонстон и Торп [11] рекомендуют для получения эуглобулиновой фракции сыворотки крови больных макроглобулинемией (в случае когда буфер с низкой ионной силой не позволяет получить преципитат) использовать 6%-ный (вес на объем) ПЭГ (мол. масса 6000) в физиологическом растворе, содержащем трис-буфер, pH 8,0.

#### 10.3.1. Получение эуглобулиновой фракции

1. Диализуют сыворотку против 10 объемов 2 мМ фосфатного буфера (pH 6,0, 4 °C), меняя его несколько раз.

2. Дважды отмывают преципитат тем же буфером, затем растворяют его при комнатной температуре в 0,15 М физиологическом растворе, содержащем 0,01 М трис-HCl буфер (pH 7,3) в объеме исходной сыворотки больного макроглобулинемией (или около  $1/10$  изначального объема нормальной сыворотки). Центрифугируют (6000 об/мин) для удаления нерастворимого материала.

#### 10.3.2. Гель-фильтрация

1. Приготавливают при комнатной температуре колонку диаметром 2,5 см с сефакрилом S300 (сверхмелким, Pharmacia) в физиологическом растворе, содержащем трис-HCl буфер, из расчета 100 мл геля на 2 мл сыворотки или эуглобу-

лина. Уплотняют гель при скорости потока 200 мл/ч при гидростатическом давлении не менее 200 см. Необходима колонка с клапанной системой, обеспечивающей поддержание давления и одновременное введение шприцем порций очищаемого материала.

2. После уплотнения геля, удалив воздух, смешивают порцию сыворотки с голубым декстраном, помещают его в колонку и производят разделение при несколько меньшем давлении.

3. Собирают элюат порциями по 5 мл, вымывая IgM с красящей меткой. Вместо сефакрила S300 можно использовать сефарозу 4В или 6В или сефакрил S200.

4. Концентрируют IgM до 1 мг/мл с помощью вакуумного диализа против PBS и хранят при 4°C во избежание precipitation. Из 1 мл нормальной сыворотки можно получить около 0,5 мг IgM (из сыворотки больного макроглобулинемией — приблизительно в 10 раз больше).

#### 10.4. Очистка IgA, IgD и IgE человека

Исходным материалом для очистки служит сыворотка больного миеломой. Предпочтительно отобрать образцы, в которых соответствующий изотип миеломного белка при ИЭФ медленно перемещается к катоду, поскольку окончательной очистки достигают адсорбцией и элюцией из анионообменника в буферном градиенте. Иммуноглобулины с низкой подвижностью при элюции в меньшей степени загрязнены молекулами, мигрирующими в  $\beta$ -области. Для выделения IgD необходима  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота (1 мг/мл) для предотвращения энзиматического расщепления Ig данного изотипа, чувствительного к действию ферментов.

1. Получают эуглобулиновую фракцию из сыворотки больного миеломой путем преципитации сульфатом аммония, как описано в разд. 10.1.2, п. 1.

2. Диализуют эуглобулин против 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,2) и наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную этим же буфером.

3. Элюируют данный изотип Ig в градиенте фосфатного буфера (pH 7,2) от 0,01 М к 0,1 М.

4. Удаляют примесь IgG из элюированной в градиенте фракции на колонке с протеин А-сефарозой CL-4В (Pharmacia). При этом связываются все молекулы IgG, за исключением подкласса IgG<sub>3</sub>. Маловероятно, что антитела данного подкласса существенно загрязняют получаемый иммуноглобулин, поскольку представляют собой лишь незначительную часть молекул IgG в нормальной сыворотке. В сыворотке больного, содержащей миеломные IgA, IgD или IgE, его содержа-

ние еще меньше. При необходимости  $\text{IgG}_3$  может быть удален адсорбцией на сефарозе в следующем порядке:

5. 10 мл осевшей активированной CNBr сефарозы смешивают с  $\text{IgG}$ -фракцией антител овцы или кролика к  $\text{IgG}$  человека (специфичных к Fcγ) из расчета 100 мг/10 мл с помощью метода, описанного в разд. 9.1.2. Промывают иммуносорбент PBS (pH 7,2) и используют его с тем же буфером.

### 10.5. Очистка подклассов $\text{IgG}$ человека

Очистка достигается элюцией миеломного белка из колонки с ДЭАЭ-целлюлозой в градиенте буфера, как описано в разд. 10.4 для  $\text{IgA}$ , при использовании в качестве исходного материала эуглобулиновой фракции.

Примеси иммуноглобулинов других классов или  $\text{IgG}$  других подклассов удаляют адсорбцией на колонке с протеин А-сефарозой CL-4B; при этом избирательно связываются  $\text{IgG}_1$ ,  $\text{IgG}_2$  и  $\text{IgG}_4$ . Подклассы  $\text{IgG}$  могут быть последовательно десорбированы в убывающем градиенте pH, начиная с 0,1 М фосфата натрия (pH 8,0) и затем увеличивая пропорцию 0,1 М лимонной кислоты.  $\text{IgG}_3$  не связывается протеином А, и это его свойство может быть использовано для дальнейшей очистки.

### 10.6. Очистка подклассов $\text{IgG}$ мыши

#### 10.6.1. Использование протеина А и нормальной сыворотки

До начала использования моноклональных антител разделение подклассов  $\text{IgG}$  независимо от требуемой степени чистоты оставалось трудной задачей. Методика очистки заключается в следующем [11]:

1. Уравновешивают колонку с протеин А-сефарозой CL-4B 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 8,0). Доводят pH мышиной сыворотки до 8,0 с помощью 2М трис-основания; добавляют равный объем фосфатного буфера, наносят смесь на колонку и медленно элюируют фосфатным буфером (5 мл/ч). Элюат содержит  $\text{IgG}_3$ , который в значительной степени загрязнен сывороточными белками, включая  $\text{IgM}$  и  $\text{IgA}$ . Для дальнейшей очистки  $\text{IgG}_3$  необходим иммуносорбент с антителами к  $\text{IgG}$ , но выход при элюции в кислой среде невелик.

2. Элюируют  $\text{IgG}_1$  из колонки с протеином А, используя цитратно-натриевый буфер (pH 6,0).

3. Элюируют  $\text{IgG}_{2a}$ , уменьшая цитратным буфером pH до 4,5.

4. Наконец, элюируют  $IgG_{2b}$  при pH 3,5; кислые фракции переводят в нейтральный буфер высокой емкости и диализуют против PBS (pH 7,2).

5. Другой способ очистки  $IgG_{2a}$  — элюция диализованной эуглобулиновой фракции из колонки ДЭАЭ-целлюлозы в градиенте молярности фосфатного буфера, которую проводят, как описано в разд. 10.4.2.

#### 10.6.2. Моноклональные антитела как источник подклассов IgG

Использование моноклональных антител, выделенных из асцитной жидкости или культуральной среды, существенно облегчает получение подклассов IgG мыши. Значительно более высокая концентрация Ig определенного изотипа в сочетании с гомогенностью белка позволяет с помощью протеина А получать иммуноглобулины высокой чистоты.

Смесь подклассов IgG (за исключением  $IgG_3$ ) может быть получена на колонке с протеином А при низком pH в один этап.

Доступность моноклональных антител в достаточно больших количествах позволяет использовать другой метод очистки подклассов IgG (так же как IgM, IgA и IgE) — аффинную хроматографию на колонках с иммуносорбентом. Процедуры аффинного связывания и элюции рассмотрены в гл. 5.

1. Связывают антиген с сефарозой 4В, как описано ранее (разд. 9.1.2), и приготавливают колонку с PBS (pH 7,2).

2. Эуглобулиновую фракцию асцитной жидкости получают с помощью сульфата аммония и диализуют ее против PBS (или диализуют непосредственно культуральную среду).

3. Наносят антитела на колонку и элюируют несвязавшиеся белки с помощью PBS (20 мл/ч) пока светопоглощение при 280 нм не достигнет нижнего уровня.

4. Элюируют антитела щелочным раствором тиоцианата калия (0,5 М  $NH_4OH$ , содержащим 3 М KSCN) из расчета 2 мл на 1 мл объема колонки. Промывают колонку PBS и немедленно диализуют антитела против PBS.

#### 10.7. Получение Fc-фрагментов IgG человека для иммунизации

1. Раствор очищенного IgG (10 мг/мл) диализуют против 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0 (см. разд. 10.1).

2. Добавляют хлористоводородный цистеин (1 мг/10 мг IgG) и ЭДТА (0,5 мг/10 мг IgG), затем папаин (1 мг/10 мг IgG). Инкубируют смесь в течение 4 ч при 37 °C.

3. Проводят ИЭФ (гл. 6), используя антисыворотку к целым молекулам IgG для определения степени гидролиза и наличия Fc-фрагментов, которые смещаются к аноду относительно интактной молекулы и образуют с ней перекрещивающиеся дуги.

4. Когда протеолиз в значительной степени завершен ( $\text{IgG}_3 > \text{IgG}_1 < \text{IgG}_4 < \text{IgG}_2$ ), замораживают продукт для прекращения дальнейшего расщепления, а затем диализуют при 4°C против 0,01 М фосфатного буфера, pH 8,0.

5. Уравновешивают ДЭАЭ-целлюлозу (ДЭ-52) 0,01 М фосфатным буфером и приготавливают колонку. Наносят расщепленный иммуноглобулин на колонку и проводят элюцию в градиенте фосфатного буфера (0,01 М—0,3 М, pH 8,0).

6. Первый пик — Fab-фрагменты (их целесообразно использовать для абсорбции), второй пик — главным образом Fc-фрагменты с небольшими примесями негидролизованного IgG (в основном IgG<sub>2</sub>).

7. Удаляют Fab-фрагменты, нанося второй пик на колонку с протеин А-сефарозой CL-4В, которая связывает Fc-фрагменты и все интактные молекулы IgG, кроме IgG<sub>3</sub>, но пропускает Fab-фрагменты. Элюируют Fc-фрагменты и IgG с помощью 3 М KСNS и диализуют собранную фракцию против PBS.

8. В заключение отделяют IgG от Fc-фрагментов на колонке с сефадексом G200 в PBS. IgG выходит в первом пике, а чистые Fc-фрагменты — во втором.

Поскольку Fc-фрагменты перемещаются к аноду, в ходе двумерного ИЭФ в агарозе они будут смещаться и формировать отдельный пик преципитации. Этот пик может быть вырезан и использован как источник очищенного иммуногена (Fc-фрагментов).

## 11. Контроль качества антител

Для получения достоверных данных с минимальными расхождениями между лабораториями применяют различные способы стандартизации и обычно уделяют основное внимание использованию стандартного антигена. Однако качество антисывороток тоже играет важную роль и на него следует обращать внимание в первую очередь. Это относится как к сывороткам, полученным самим исследователем, так и к коммерческим. Ни производитель, ни поставщик сыворотки не в состоянии проверить весь набор антител различной специфичности на предмет их пригодности для всевозможных исследований в конкретных условиях каждой лаборатории. Поэтому свойства того или иного реагента необходимо проверить непосредственно перед использованием.

### 11.1. Рекомендации

1. Применяют стандартный антиген для тестирования сывороток. В зависимости от предполагаемого использования сыворотки это может быть очищенное вещество в растворе, смесь разных антигенов, микроорганизмы, клетки, ткани и т. д.

2. При возможности всегда используют контрольную анти-сыворотку (см. рис. 2.8. и 2.10).

3. Всегда включают в систему контроля те методы исследования, для осуществления которых предназначается антисыворотка.

4. Каждую пробу крови от каждого животного исследуют отдельно и смешивают только вполне подходящие сыворотки.

### 11.2. Последовательность контрольных исследований

1. Проверяют специфичность, определяют, какая необходима абсорбция. После проведения необходимых мероприятий повторяют тестирование (см. табл. 2.5).

2. Определяют титр антител. Концентрированную IgG-фракцию можно добавить к сыворотке для увеличения отношения антитела: общий белок. Альтернативный путь — приготовить цельную сыворотку как фракцию IgG необходимой концентрации. Преимущество такого подхода заключается в еще большем увеличении отношения антитела: белок при уменьшении количества добавляемого белка в системе и уменьшении фона. Это также позволяет стандартизовать концентрацию антител в последовательно приготавливаемых сериях антител одной и той же специфичности. Целесообразно иметь в запасе некоторое количество антител в концентрации выше требуемой для «улучшения» сывороток. Антисыворотка, предназначенная для реакции преципитации, должна содержать не менее 1—2 мг специфических антител в 1 мл, а еще лучше — 5—10 мг/мл для уменьшения количества добавляемого белка. Необходимо проверить чистоту IgG-фракции полученных антител, и если она удовлетворительна, то определить общий белок по оптической плотности и установить отношение антитела: общий IgG.

3. Определяют avidность. Высокая avidность необходима для проведения радиоиммунологического анализа в жидкой фазе, а также для методов, где важно иметь низкий фон, в том числе для осуществления иммуногистохимических исследований клеток и тканей и Вестерн-блоттинга. Отличительное свойство антител с высокой avidностью заключается в том, что они сохраняют способность оптимально связываться с ан-



тигеном в высоких разведениях, а затем эта способность быстро падает до отрицательных значений при избытке антигена. Это свойство легко выявить, определяя угол наклона кривой связывания антисыворотки в различных концентрациях с одним и тем же количеством антигена. Сохранение оптимального связывания по мере разведения, за которым наступает резкое его падение, служит доказательством высокой авидности. Наклон можно определить как процент падения связывания (т. е. оптической плотности в ИФА, радиоактивности осадка в РИА и т. д.) при каждом последующем разведении в диапазоне линейной зависимости. Четко очерченные кольца и линии преципитации в геле тоже свидетельствуют о высокой авидности поликлональной антисыворотки.

Методы, позволяющие измерить образование иммунных комплексов в растворе, например нефелометрия, также дают возможность определить авидность сывороток. Высокоавидные сыворотки быстро образуют стабильные иммунные комплексы. Лишь небольшая часть сывороток, полученных от животных, имеет идеальные нефелометрические свойства.

4. Аффинность может быть определена только для антител к гаптенам с помощью равновесного диализа [51].

5. Изотип: хотя у кроликов и овец при иммунизации с применением ПАФ образуются антитела определенного изотипа ( $IgG_1$ ), у других видов животных (крыс, мышей, морских свинок) ответ также может быть рестриктирован по подклассам  $IgG$ . Если антитела выявляются с помощью меченого антиглобулина, то необходимо определить их изотип, чтобы использовать антиглобулин требуемой специфичности.

## 12. Благодарности

Авторы признательны R. Drew за рекомендации по очистке иммуноглобулинов и стратегии иммунизации для получения антиглобулинов и их абсорбции; д-ру A. R. Bradwell за рис. 2.7, а также д-ру L. Piddock из отделения клинической микробиологии за помощь в получении антигенов *E. coli* и их разделении с помощью ДСН-ЭПАГ. В заключение мы хотим выразить признательность миссис F. O'Reilly, напечатавшей эту рукопись, и штату сотрудников учебной службы за рисунки.

## Литература

1. Borek F. In: Sela M. (ed.), *The Antigens*, Vol. IV. Academic Press, New York, p. 369, 1977.
2. Warren H. S., Vogel F. R., Chedid L. A. *Annu. Rev. Immunol.*, 4, 369 (1986).
3. Adam A. *Synthetic Adjuvants*, John Wiley, New York, 1985.
4. Freund J. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1, 291 (1947).

5. *Glenny A. T., Pope C. G., Waddington H., Wallace U. J. Pathol. Bacteriol.*, **21**, 31 (1926).
6. *Munoz J. J., Arai H., Bergman R. K., Sadowski P. Infect. Immunol.*, **33**, 820 (1981).
7. *Allison A. C., Gregoriadis G. Nature*, **252**, 252 (1974).
8. *New R. R. C., Theakston R. D. G., Zumbuehl O., Iddon D., Friend J. New Engl. J. Med.*, **311**, 56 (1984).
9. *New R. R. C., Theakston R. D. G., Zumbuehl O., Iddon D., Friend J. Toxicon*, **23**, 215 (1985).
10. *Kotani S., Watanabe Y., Kinoshita F., Shimono T., Morisaki T., Shiba T., Kusumoto S., Tarumi Y., Ikenaka K., Biken J.*, **18**, 105 (1975).
11. *Johnstone A., Thorpe R. Immunochimistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1982.
12. *Parker C. W. Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*, Prentice Hall, New Jersey, 1976.
13. *Williams C. A., Chase M. W. (eds.) In: Methods in Immunology and Immunochimistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, p. 197, 1967.
14. *Mäkelä O., Seppälä. In: Weir D. M. (ed.) Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 3.1, 1986.
15. *Gray D., Chassoux D., Maclellan I. C. M., Bazin H. Clin. Exp. Immunol.*, **60**, 78 (1985).
16. *Wills P. J. Ph. D. Thesis*, University of Birmingham, UK, 1979.
17. *Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Lieberman S. J. Biol. Chem.*, **228**, 713 (1957).
18. *Murphy G. M., Edkins S. M., Williams J. W., Catty D. Clin. Chim. Acta*, **54**, 81 (1974).
19. *Catty D., Raykundalia C., Houba V. WHO Bench Manual, Part II, IMM/PIR/83: 1*, 1983.
20. *Inman J. K. J. Immunol.*, **114**, 704 (1975).
21. *Weir D. M. (ed.) Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, 1986.
22. *Sternick J. L., Sturmer A. M. Hybridoma*, **3**, 74 (1984).
23. *Knudsen K. A. Anal. Biochem.*, **147**, 285 (1985).
24. *Lowe J., Bird P., Hardie D., Jefferis R., Ling N. R. Immunology*, **47**, 329 (1982).
25. *Ling N. R., Elliot D., Lowe J. J. Immunol. Methods*, in press (1987).
26. *Hames B. D., Rickwood D. (eds.) Gel Electrophoresis of Proteins—A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1981.
27. *Filip C., Fletcher G., Wulff J. L., Earhart C. F. J. Bacteriol.*, **115**, 717 (1973).
28. *Dresser D. W. In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 8.1, 1986.
29. *Williams C. A., Chase M. W. (eds.) Methods in Immunology and Immunochimistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 197—306, 1967.
30. *Theakston R. D. G., Zumbuehl O., New R. R. C. Toxicon*, **23**, 921 (1985).
31. *Herbert W. J. In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology*, Appendix 4, Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. A 4.1, 1967.
32. *Poxton I. R., Blackwell C. C. In: Weir D. M. (e d.), Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 4.1, 1986.
33. *Daniel T. M., Janicki B. W. Microbiol. Rev.*, **42**, 84 (1978).
34. *Seibert F. B. Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, **59**, 86 (1949).
35. *Boyden S. V. J. Exp. Med.*, **93**, 107 (1951).
36. *Pearson T. W., Clarke M. W. In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 6.1, 1986.
37. *Penner J. L., Hennessy J. N. J. Clin. Microbiol.*, **12**, 732 (1980).

38. *Catty D., Humphrey J. H., Gell P. G. H.* Immunology, **16**, 409 (1969).
39. *Parson M., Herzenberg L. A., Stall A. M., Herzenberg L. A.* In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology, Vol. 3, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 97.1, 1986.
40. *Kelus A. S., Gell P. G. H.* Progr. Allergy, **11**, 141 (1967).
41. *Roth C., Somme G., Goufeon M. L., Theze J.* Scand. J. Immunol., **21**, 361 (1985).
42. *Ling N. R., Elliott D., Lowe J. J.* Immunol. Methods, in press, (1987).
43. *Hole N. J., Catty J. P., Catty D.* Mol. Immunol., **24**, 75 (1986).
44. *Praputpittaya K.* Ph. D. Thesis, University of Birmingham, UK, 1986.
45. *Eichmann K., Kindt T. J.* J. Exp. Med., **134**, 532 (1971).
46. *Kennedy J. F., Catty D., Klep P. A.* Int. J. Biol. Macromol., **2**, 137 (1980).
47. *Ling N. R., Stephens G., Bratt P., Dhaliwal H. S.* Mol. Immunol., **16**, 637 (1979).
48. *Gold E. R., Fudenberg H. H.* J. Immunol., **99**, 859 (1967).
49. *Avrameas S., Taudou B., Chuilon,* Immunochemistry, **6**, 67 (1969).
50. *Jefferis R. et al.* Immunol. Lett., **10**, 223 (1985).
51. *Stead M.* In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 25.1, 1986.
52. *Mage R. G.* Contemp. Top. Mol. Immunol., **8**, 89 (1981).
53. *Herzenberg L. A., Herzenberg L. A.* In: Weir D. M. (ed.), Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3rd edition, p. 39, 1978.

# МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА МЫШИ

*Дж. Браун и Н. Р. Линг*

## **1. Основные принципы получения антителообразующих клеточных линий**

В 50-е гг. Бернет, Эрне, Ледерберг и Толмейдж постулировали, что каждый В-лимфоцит запрограммирован на синтез антител одной определенной специфичности, относящихся к тому же идиотипу, что и молекулы, экспрессированные на поверхности данного лимфоцита в качестве антигенных рецепторов. В настоящее время это положение убедительно доказано. Если животное иммунизируют каким-либо антигеном, то начинается клональная экспансия и дифференцировка тех В-лимфоцитов, которые распознают этот антиген. В результате образуются плазматические клетки, которые продуцируют антитела. Если бы индивидуальные антиген-реактивные клетки лимфоидной ткани иммунизированного животного удалось длительное время поддерживать в культуре, то надосадочная жидкость содержала бы однородные молекулы антител (моноклональные антитела), которые были бы способны распознавать только один или несколько близкородственных антигенов. К сожалению, потомство индивидуального реактивного лимфоцита не удается длительное время выращивать в культуре для получения больших количеств моноклональных антител (МКА). Впервые эта проблема была решена Келером и Мильштейном в 1975 г. [1]. Исследователям удалось трансформировать антителообразующие лимфоциты путем слияния их с клетками иммортализованной клеточной линии с последующим клонированием индивидуальных гибридных клеток. Таким образом были получены линии гибридных клеток (гибридомы), каждая из которых продуцировала молекулы антител одного и того же идиотипа.

Уже давно было известно, что различные типы клеток разных видов животных могут сливаться между собой с образованием гибридных клеток. Однако высокодифференцированные признаки партнеров сохраняются в том случае, если они представляют собой клетки сходных линий, находящиеся приблизительно на одной и той же стадии дифференцировки [2]. Клеточная линия, секретирующая антитела, образуется путем слияния антителообразующей клетки лимфоидной ткани иммунизированного животного и клетки плазмацитомы, нахо-

дящейся на сходной стадии дифференцировки. Полученная в результате гибридома наследует от одной родительской клетки способность к секретиции антител определенного идиотипа и от другой (клетки плазмацитомы) — способность к неограниченному росту *in vitro*. Наиболее успешно получают гибридомы мышей и крыс, менее успешно — гибридомы человека. Технология гибридизации клеток других видов животных разработана недостаточно. Альтернативным подходом для получения антителообразующих клеточных линий человека служит использование вируса Эпштейна — Барр (ВЭБ) для трансформации определенной популяции В-клеток иммунизированного индивидуума [3]. Клетки, продуцирующие большое количество антител, затем подвергают селекции и клонированию (см. гл. 4). В данной главе будет рассматриваться только технология получения гибридом. Известны многочисленные литературные обзоры, посвященные этой теме, например [2, 4—6].

## 2. Оборудование и материалы

Необходимо хорошее оборудование для работы с культурами, в том числе  $\text{CO}_2$ -термостат (содержание  $\text{CO}_2$  в воздухе — 5%). Желательно иметь ламинарный бокс для осуществления манипуляций в стерильных условиях. Следует отметить, что знание основ асептики и некоторый опыт в работе с клеточными культурами важны для успешного проведения работ. Для визуального наблюдения за культурами необходим инвертированный микроскоп (например, Olympus SK; модель снабжена широкой ровной подставкой, объективом  $\times 10$  и бинокулярной насадкой WF 15 $\times$ ). Кроме контейнеров с жидким азотом для хранения плазмацитом и гибридом, для получения моноклональных антител необходимо не так уж много специального оборудования. Позднее будут рассмотрены возможные варианты процедур скрининга, которые, по-видимому, следует усовершенствовать и более широко внедрять в практику. Для иммунизации необходимо иметь инбредные линии мышей (обычно BALB/c) или крыс (Lou). Если предполагается выращивать гибридомы в виде асцитных опухолей, то понадобится довольно большое количество животных.

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Линии плазмацитом

Используемые для получения гибридом плазмацитомные клеточные линии дефектны по ферменту гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ) и отбираются на среде,

содержащей тиогуанин ( $2 \cdot 10^{-5}$  М). Это означает, что клетки, дефектные по ГГФРТ, не способны к синтезу ДНК, если их культивировать в среде с гипоксантином, аминоптеринном и тимидином (среда ГАТ). В результате слияния с родительскими лимфоцитами этот дефект устраняется. Таким образом, только гибридные клетки способны расти на среде ГАТ.

Линии плазмацитом обычно культивируют в стандартной неразбавленной среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина (Gibco Bio-cult, США), 10% сыворотки плода коровы (СПК), антибиотиков — пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл), а также тиогуанина (20 мМ). В продажу поступает коммерческий препарат (Gibco Bio-cult, США) исходного стократного (100×) раствора пенициллина и стрептомицина в нужной концентрации. Среду дополняют тиогуанином для удаления ревертантных клеток, содержащих «нормальный» уровень ГГФРТ, которые, подобно гибридным, выживают в среде ГАТ.

1. Готовят 100× раствор тиогуанина (2 мМ) следующим образом. Растворяют 33,44 мг безводного тиогуанина в 100 мл дистиллированной воды. Добавляют 1 М NaOH, если необходимо, для растворения тиогуанина и доводят pH до 9,5 уксусной кислотой. Фильтруют раствор через мембраны Millipore (размер пор 0,2 мкм), разливают на аликвоты и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

2. Для приготовления поддерживающей среды для плазмацитомы смешивают следующие растворы:

500 мл среды RPMI-1640, содержащей L-глутамин;

50 мл инактивированной нагреванием СПК (конечная концентрация — 9%);

5,5 мл исходного раствора пенициллин/стрептомицин;

5,5 мл стандартного исходного раствора тиогуанина.

ГАТ-чувствительная плазмацитома, полученная от мышей линии BALB/c, P3-NSI/Ag4-1 (как правило, обозначаемая NSI), представляет собой вариант линии MOPC21, не секретирующий иммуноглобулинов [4]. Она хорошо растет *in vitro* на среде RPMI-1640 с добавлением 10% СПК, а также при внутрибрюшинном введении мышам BALB/c. Эта плазмацитома синтезирует, но не секретирует легкие цепи иммуноглобулинов. ГАТ-чувствительная плазмацитома X63/Ag8.653, полученная от мышей линии BALB/c, представляет собой вариант линии X63/Ag8; она не синтезирует ни тяжелых, ни легких цепей иммуноглобулинов [4]. Клетки обеих линий хорошо сливаются, но гибридомы, образованные с помощью NSI, растут несколько лучше.

### 2.1.2. Реагенты, используемые для слияния

В ранних работах таким реагентом обычно служил инактивированный ультрафиолетом вирус Сендай. К настоящему времени его заменил полиэтиленгликоль (ПЭГ), который обычно применяют в виде 50%-ного (вес на объем) раствора. 50%-ный раствор ПЭГа целесообразно готовить на воде, а не на обычной культуральной среде, поскольку в этой концентрации он гипертоничен. ПЭГ — это слабая кислота; для ее нейтрализации достаточно 1 мМ NaOH.

1. Отвешивают 8 г ПЭГа 1500 в универсальный стеклянный флакон.

2. Готовят 1 мМ раствор NaOH в дистиллированной воде и добавляют к нему одну каплю фенолового красного (изменение окраски от красной до пурпурной). Добавляют 8 мл этого раствора к ПЭГ и оставляют при 37 °С для растворения.

3. Стерилизуют автоклавированием в негерметично закрытом сосуде и проверяют уровень жидкости по маркировке на флаконе. Если уровень раствора ниже отметки, доводят объем до первоначального с помощью стерильного раствора 1 мМ NaOH.

4. Остужают, разливают на аликвоты по 3 мл в стерильные ампулы и хранят при 4 °С.

### 2.1.3. Среда ГАТ

Эту среду обычно используют для селекции и культивирования гибридных клеток; она состоит из неразбавленной стандартной среды RPMI-1640, в которую добавлен L-глутамин, 20% СПК, пенициллин (100 Ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), 100 мкМ гипоксантина, 16 мкМ тимидина и 0,5 мкМ метотрексата.

Готовят следующие исходные растворы.

1. *Гипоксантин и тимидин*. Готовят 100× исходный раствор, содержащий 10 мМ гипоксантина и 1,6 мМ тимидина. Растворяют 408 мг гипоксантина в 10 мл дистиллированной воды при постоянном перемешивании и добавляют 1 М NaOH по каплям до растворения гипоксантина. Растворяют 114 мг тимидина в 100 мл дистиллированной воды. Смешивают оба раствора и доводят объем до 300 мл дистиллированной водой. Доводят pH до 10,0 с помощью HCl или NaOH, стерилизуют фильтрованием через мембраны Millipore, разливают на аликвоты и хранят при —20 °С.

2. *Аминоптерин (метотрексат)*. Аминоптерин (100× исходный раствор с концентрацией 50 мкМ) готовят из ампулированного лекарственного средства метотрексата. Ампулы со-

держат по 2 мл раствора с концентрацией 25 мг/мл. При извлечении препарата из ампул следует соблюдать осторожность, поскольку метотрексат токсичен. Разводят 0,9 мл раствора метотрексата в 1 л дистиллированной воды и доводят pH до 7,5 с помощью 0,01 М NaOH или 0,01 М HCl. Стерилизуют фильтрованием через мембраны Millipore, разливают на аликвоты и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3. *2-Меркаптоэтанол*. 2-Меркаптоэтанол в концентрации 50 мкМ может быть добавлен к среде ГАТ в качестве агента, способствующего росту гибридных клеток. Кроме того, его следует обязательно добавлять при клонировании гибридных клеток. Для приготовления среды с 2-меркаптоэтанолом к 10 мл стандартной среды RPMI-1640 добавляют 0,06 мл препарата. Стерилизуют фильтрованием, разливают на аликвоты и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для приготовления полной среды ГАТ необходимо смешать следующие стандартные растворы:

500 мл среды RPMI-1640 с L-глутамином;

100 мл инактивированной нагреванием СПК (концентрация СПК приблизительно 16%);

6 мл исходного раствора пенициллин/стрептомицин;

6 мл исходного раствора гипоксантин/тимидин;

6 мл стандартного раствора метотрексата;

12 капель (0,36 мл) 2-меркаптоэтанола добавляют пастеровской пипеткой, как указано выше.

#### 2.1.4. Среда Дюльбекко

Среду Дюльбекко готовят из готового сухого концентрата (Gibco Bio-cult, США) и используют вместо среды RPMI-1640 или в комбинации с ней. Так называемые щелочные среды Дюльбекко или RPMI-1640, обычно используемые на стадии слияния, — это среды, которые предварительно защелачивают в универсальных контейнерах путем равновесного взаимодействия с атмосферным воздухом. Этого очень легко достигнуть, если за несколько дней до использования крышку на флаконе закрыть неплотно.

#### 2.1.5. Сыворотки

Обычно используют сыворотку плода коровы (СПК), предварительно инактивированную нагреванием в водяной бане при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Различные партии СПК значительно варьируют по способности поддерживать рост культур, поэтому чрезвычайно важно выбрать хорошую партию. Самый простой и надежный способ определения качества сы-



воротки заключается в клонировании гибридомы методом лимитирующих разведений (см. разд. 6.4) в среде, содержащей образцы анализируемой сыворотки. Дополнительное введение в среду для инкубации лошадиной сыворотки (5%) часто оказывает положительный эффект, если СПК невысокого качества. Рекомендовано и применение сыворотки крови человека [7]. Разумеется, нельзя использовать сыворотку, содержащую антиген, к которому направлены получаемые моноклональные антитела (например, иммуноглобулин человека или других видов, с которыми наблюдаются перекрестные реакции, в том случае, когда требуется получить моноклональные антитела к иммуноглобулину).

### 2.1.6. Среда RPMI с буфером HEPES (H-RPMI)

Это среда RPMI-1640, которая забуферена HEPES (*N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-2-этансульфоновая кислота) в концентрации 4,6 г/л вместо обычного бикарбоната натрия. В среду H-RPMI добавляют 2% СПК (H-RPMI—2% СПК). В результате получают идеальный реагент для промывания и суспендирования клеток при работе с ними вне термостата, так как он сохраняет стабильное значение pH при атмосферных условиях. Но в качестве ростовой среды H-RPMI—2% СПК непригодна.

## 3. Иммунизация мышей

Могут быть использованы животные в возрасте 3—4 месяцев любого пола. Используемая схема иммунизации зависит от природы иммуногена в такой же степени, как и при получении поликлональной антисыворотки. Важно установить, что у мышей, клетки которых предполагается использовать в экспериментах по слиянию, в ответ на введение данного иммуногена образуются антитела. Забор крови для контрольного исследования производят из хвостовой вены спустя неделю после заключительной иммунизации. Если в сыворотке обнаруживают антитела в адекватном титре, то за 3—4 дня до извлечения селезенки для слияния клеток производят последнее введение иммуногена. Иногда трудно интерпретировать результаты тестирования крови, поскольку сыворотка содержит сложную смесь антител. Неоднозначно, что все данные антитела были образованы секретирующими клетками селезенки, а также, что именно эти антиген-реактивные клетки будут преимущественно синтезировать Ig в ходе иммунного ответа

на повторное введение антигена. Однако тестирование крови животного указывает на образование или отсутствие нужных антител.

### 3.1. Иммунизация антигенами клеточной поверхности (и другими корпускулярными антигенами)

Для антигенов клеточной поверхности может быть использована следующая схема иммунизации. Выбор процедуры может определяться количеством клеток, доступных для иммунизации.

1. Иногда достаточно двух внутрибрюшинных (в/б) инъекций  $10^7$  целых клеток в PBS, произведенных соответственно за 4 нед и за 3—4 дня до процедуры гибридизации.

2. Авторы предпочитают соблюдать следующую схему: за 3—4 нед до гибридизации внутрибрюшинно вводят первичную дозу ( $10^7$  целых клеток), а затем проводят последующие иммунизации за 7 и за 3 дня до слияния. За неделю до второго введения иммуногена кровь мышей тестируют.

3. Альтернативный подход заключается в иммунизации мышей внутрибрюшинно суспензией клеток в PBS (разовая доза составляет  $10^7$  клеток) на 0, 14 и 21-й день. Спустя семь дней тестируют кровь, и животным с высоким уровнем антител внутривенно (в/в) вводят по  $10^7$  клеток за три дня до слияния.

4. В том случае, когда мышей иммунизируют клетками человека, наблюдается выраженный ответ на видоспецифические антигены. Для того чтобы направить иммунный ответ мышей на антигены, селективно экспрессированные на поверхности определенных клеток, может быть использован метод «маскировки» антителами. Например, он был успешно использован при получении моноклональных антител, специфичных к антигенам, избирательно экспрессированным на клетках миелоидного ряда человека. Клетки миелоидного ряда, которыми иммунизировали мышей для экспериментов по гибридизации, были нагружены мышиными антителами к лейкоцитам периферической крови человека [8]. Смысл данного подхода заключается в том, что, нагружая клетки, удастся «замаскировать» иммуногенные поверхностные белки, экспрессируемые клетками человека.

Введенный в/б или в/в антиген достигает селезенки, и с этого момента данный орган обычно становится источником антитело-продуцирующих клеток, которые используются в экспериментах по слиянию. В ряде случаев непосредственно перед слиянием антиген вводится в/в, что может вызвать анафилактический шок. Если же необходимость в проведении в/в инъекции сохраняется, то для избежания возможного раз-

вития шока рекомендуется провести за несколько часов до этой инъекции в/б инъекцию (например, в/б утром и в/в в полдень).

### 3.2. Иммунизация растворимыми антигенами

Для растворимых антигенов известны разнообразные схемы иммунизации. Например, первую инъекцию 100 мкг антигена, эмульгированного в полном или неполном адъюванте Фрейнда, осуществляют подкожно (в 0,1 мл), а последующие инъекции (до 100 мкг в PBS объемом 0,5 мл) проводят в/б с интервалом в месяц. Отбирают пробу крови, чтобы убедиться в наличии адекватного титра антител в сыворотке, а затем осуществляют последние инъекции антигена (в/б утром и в/в днем), за 3—4 дня до гибридизации.

Некоторые исследователи предпочитают избегать применения адъюванта Фрейнда. Действительно, он может стимулировать развитие гранулом, клетки которых повышают фоновый рост в культурах после гибридизации. Предпочтительнее использовать адсорбированный на квасцах антиген в смеси с убитыми клетками *Bordetella pertussis* в качестве адъюванта [9]. Другой способ, который был успешно применен в случае иммуноглобулинов, заключается в связывании антигена с частичками пластика [10] с последующим осуществлением иммунизации в/б, без адъюванта. Относительно небольшие пептиды иногда необходимо конъюгировать с белком-носителем, но они могут приобрести иммуногенность при введении в полный адъювант Фрейнда.

## 4. Методика гибридизации

Известны различные модификации оригинального метода Келера и Милштейна [1]. Популярны методики Галфре [11] и Кеннета [5], однако практически каждый научный центр стремится развивать свою собственную методику, которой отдаст предпочтение.

Перед тем как рассмотреть некоторые наиболее существенные модификации, мы остановимся на двух основных методиках гибридизации, которые используются одинаково успешно. Они иллюстрируют возможность широких вариаций при осуществлении различных стадий метода без снижения эффективности гибридизации. В частности, в первом случае клетки после слияния культивируют в 96-луночной панели для микротитрования. Во втором случае гибридомы выращивают в 24-луночных панелях для культуры тканей (объем лунки 2 мл). В данном случае выбор панели может быть обусловлен как удоб-

ством манипуляций при работе с клетками, так и определенными навыками в работе с культурой ткани и имеющимся в распоряжении оснащением.

Успех экспериментов по гибридизации будет зависеть от тщательного и адекватного манипулирования с клетками во время процесса слияния (см. разд. 4.3). Если первая попытка оказалась неудачной, то необходимо повторить эксперимент, следуя выбранной вами вначале методике. Опыт, полученный в результате первой попытки, гарантирует, что при второй вы проведете эксперимент более тщательно. Если же у вас по-прежнему возникают проблемы при культивировании гибридных клеток, то следует прибегнуть ко второй методике. Таким образом можно избежать ошибки, о которой вы не подозреваете (см. разд. 4.3).

#### 4.1. Методика А

Удобно и целесообразно ставить параллельно два эксперимента по слиянию, используя селезенки от двух мышей. Перед процедурой слияния следует подготовить следующие материалы:

1. Отбирают образец плазмацитомной линии путем ресуспендирования клеток, растущих в среде с тиогуанином. В случае линии NSI при встряхивании флакона клетки ресуспендируются плохо, поэтому их переводят в суспензию, обмывая монослой средой, вытекающей из пастеровской пипетки. Из полученной суспензии отбирают 4 капли, добавляют 1 каплю 1%-ного трипанового синего и подсчитывают количество живых клеток. Для каждого отдельного эксперимента по слиянию центрифугируют по  $10^7$  жизнеспособных клеток в круглодонных пробирках (из пирекса) на 30 мл с крышками при 500 g в течение 5 мин. Удаляют супернатант, ресуспендируют клетки в 20 мл среды H-RPMI—2% СПК и оставляют при 4 °C.

2. Четыре шприца на 10 мл (каждый заполнен 10 мл H-RPMI—2% СПК и снабжен иглой № 26). Оставляют в закрытом стерильном боксе в ламинарном шкафу.

3. Два шприца на 1 мл (каждый заполнен 0,7 мл 50%-ного раствора ПЭГ в 1 mM NaOH). Оставляют в термостате на 37 °C.

4. Два универсальных контейнера, содержащие по 10 мл среды RPMI-1640. Оставляют при 4 °C.

5. Два универсальных контейнера, содержащие по 20 мл среды RPMI-1640. Оставляют при 37 °C.

6. Щелочная среда RPMI-1640. Небольшое количество оставляют в закрытом универсальном контейнере в ламинарном шкафу.

7. Два флакона, содержащие по 30 мл полной среды ГАТ. Оставляют в термостате на 37 °С.

8. На столе: секундомер, 70%-ный этанол, стерильные инструменты, водяная баня на 37 °С, шприцы на 1 мл, иглы для шприца (№ 15), две чашки Петри, содержащие по 1 мл Н-RPMI — 2% СПК.

9. В ламинарном боксе: две чашки Петри, пастеровские пипетки, пипетки.

10. 96-луночные панели для микротитрования. Их можно использовать без предварительной подготовки. Однако мы предпочитаем добавлять 1 каплю смеси равных объемов лошадиной сыворотки и среды ГАТ в каждую лунку, а затем оставляем панели на время процедуры гибридизации при 4 °С.

#### **4.1.1. Процедура гибридизации А (основанная на парном слиянии)**

На этой стадии кровь мышей предварительно уже была тестирована и анализ сыворотки показал, что в ней содержится достаточное количество антител к данному иммуногену.

1. Забивают мышь путем дислокации шейных позвонков и обмывают тушку 70%-ным этанолом. Удаляют избыток спирта с помощью фильтровальной бумаги. Помещают мышь на анатомический столик, предварительно обработанный 70%-ным этанолом, и стерильными инструментами производят продольный разрез брюшка, чтобы обнажить селезенку. Извлекают селезенку с помощью стерильных ножниц и пинцета, помещают ее в небольшое количество среды в маленькой, стерильной чашке Петри и переносят в ламинарный бокс.

2. Обмыв селезенку средой, переносят ее в новую чашку Петри и приступают к вымыванию лимфоидных клеток, используя шприцы на 10 мл с иглой № 26 (в каждый шприц набирают по 10 мл Н-RPMI — 2% СПК). Вымывание производят следующим образом. При помощи одного шприца удерживают селезенку, затем производят вымывание, последовательно прокалывая небольшие участки селезенки и выпуская жидкость сначала из одного шприца, затем из другого.

3. Удаляют капсулу и строму селезенки из чашки Петри и переносят суспензию клеток пастеровской пипеткой в пробирку на 30 мл, оставляя маленькие кусочки ткани селезенки, которые могли осесть на дне чашки. Пробирку оставляют в штативе в ламинарном боксе. Повторяют процедуру с другой селезенкой.

4. Помещают по 4 капли каждой суспензии спленоцитов в лунки панели для микротитрования (нестерильной). Помещают предварительно подписанные пробирки с суспензией спле-

ноцитов и пробирки с клетками плазмацитомы (извлеченные из холодильника на  $4^{\circ}\text{C}$ ) в центрифугу на 5 мин при 500 g. Тем временем добавляют по 1 капле 1%-ного трипанового синего в каждую лунку с суспензией клеток в панели для микротитрования, перемешивают пастеровской пипеткой и помещают каплю в камеру для подсчета клеток. Определяют количество жизнеспособных лимфоцитов и лимфобластов. Общее количество полученных спленоцитов обычно составляет  $0,6\text{—}1,2 \cdot 10^8$ , из них жизнеспособных — около 90%. В большинстве экспериментов  $10^8$  клеток селезенки сливают с  $10^7$  клетками плазмацитомы.

5. По окончании центрифугирования вынимают пробирки из центрифуги и осторожно сливают супернатант в стакан для отходов в стерильном ламинарном боксе. Слегка встряхивают пробирки, чтобы диспергировать осадок. Добавляют по 10 мл холодной среды RPMI-1640 в каждую пробирку с клетками селезенки и переносят содержимое каждой пробирки в одну из пробирок, содержащих клетки плазмацитомы. Осаждают клетки центрифугированием при 400 g в течение 7 мин, а в это время переносят чистую водяную баню на  $37^{\circ}\text{C}$  в стерильный ламинарный бокс. Полностью удаляют супернатант пастеровской пипеткой. К осадку клеток добавляют 5 капель щелочной среды RPMI-1640. Пробирки слегка встряхивают, чтобы диспергировать клетки.

6. Процедура гибридизации занимает 35 мин. Устанавливают секундомер на 35 мин. Последовательность операций описана в табл. 3.1. Все этапы, описанные для пробирки № 1, повторяют с пробиркой № 2. (Начало работы приходится на момент времени 29.00 в таблице для пробирки № 1). Когда закончено центрифугирование пробирки № 1, ее переносят в ламинарный бокс и центрифугируют приборку № 2, которая к этому времени должна быть готова.

7. Удаляют супернатант из пробирки № 1 и добавляют к осадку 30 мл теплой среды ГАТ. Закрывают пробирку и переворачивают ее, чтобы ресуспендировать и диспергировать клеточный осадок. Подготавливают и подписывают по 6 панелей для микротитрования на каждую из двух процедур слияния. Используя пастеровскую пипетку, распределяют клетки (по одной капле на лунку) во все 96 лунок каждой из 6 панелей. Когда все панели заполнены, их ставят друг на друга и переносят в  $\text{CO}_2$ -термостат с увлажненным воздухом. Повторяют те же процедуры с клетками, которые используются для второго слияния.

На ранних стадиях культивирования, когда общий объем содержимого в лунке составляет всего 0,07 мл, чрезвычайно важно, чтобы атмосфера термостата была насыщена влагой

Таблица 3.1. Хронометраж процедуры слияния клеток

Время (мин)	Последовательность этапов
35.00—29.00	Распределяют клеточные осадки по стенкам пробирок путем вращения их в горизонтальном положении (обе пробирки, попеременно).
29.00—25.30	Помещают пробирку № 1 в баню на 37 °С, периодически вынимая, встряхивая и вращая в горизонтальном положении.
25.30	Вынимают шприц с ПЭГ из термостата и помещают его в ламинарный бокс. Переносят среду RPMI-1640 (20 мл) в баню.
24.30—23.30	Вынимают пробирку № 1 из бани, встряхивают и вращают в горизонтальном положении.
23.00	Быстро добавляют ПЭГ (0,7 мл) в пробирку № 1.
23.00—21.00	Вращают пробирку № 1 в горизонтальном положении. Вся стенка пробирки должна быть покрыта клетками.
21.00—20.30	Помещают пробирку № 1 в штатив в ламинарном боксе и снимают крышку. Помещают пробирку № 2 в баню на 37 °С. Пастеровскую пипетку, снабженную резиновой грушей, опускают в пробирку, содержащую 20 мл теплой среды RPMI-1640, находящуюся в бане.
20.30—19.30	Быстро добавляют приблизительно 1 мл теплой среды RPMI-1640 в пробирку № 1 и вращают ее в горизонтальном положении.
19.30—18.30	Быстро добавляют еще 1 мл теплой среды RPMI-1640 в пробирку № 1 и снова вращают, перемешивая содержимое.
18.30—15.30	Удаляют крышку с пробирки № 1, помещают пробирку в баню и медленно добавляют оставшуюся часть среды RPMI-1640, перемешивая содержимое пробирки, не вынимая ее из бани.
15.00—0.00	Центрифугируют пробирку при 300 g в течение 15 мин (используя для уравнивания пробирку с 21 мл воды).

и поддерживался достаточный уровень  $\text{CO}_2$ ; в противном случае может произойти испарение. На пятый день в каждую лунку добавляют по 0,15 мл среды ГАТ с помощью многоканальной пипетки, снабженной стерильными полиэтиленовыми наконечниками. Среду наливают в стерильную емкость подходящего размера.

Когда среда в большинстве лунок станет желтой (что обусловлено ростом клеток, сопровождающимся выделением кислых продуктов метаболизма), то ее полностью заменяют, с тем чтобы удалить «фоновые» антитела, образуемые еще сохранившими жизнеспособность иммуноглобулин-секретирующими клетками селезенки. Это осуществляют следующим образом. Носик пастеровской пипетки вытягивают в очень тонкий капилляр, а затем кончик длиной около трех сантиметров загибают под прямым углом. Вытянутые пипетки стерилизуют автоклавированием в алюминиевых контейнерах.

На дно контейнера помещают немного хлопковой ваты, чтобы избежать повреждения кончиков пипеток. Пастеровские пипетки присоединяют к насосу, полностью удаляют жидкость из лунок и вносят в них по 0,2 мл среды ГАТ (иногда вместе с 5% лошадиной сыворотки), используя для этой цели многоканальную пипетку. Таким образом обрабатывают все панели и снова помещают их в термостат. Через 2 дня среда во многих лунках, как правило, опять становится желтой. Как раз в это время необходимо проверить супернатанты на содержание антител. Можно тестировать отдельные лунки по мере того, как среда в них желтеет, или подождать, пока это не произойдет в большинстве лунок, и тогда протестировать сразу все супернатанты. Первая процедура, которой следует отдать предпочтение, если используется трудоемкая система анализа, заключается в удалении почти всего супернатанта с помощью пастеровской пипетки и переносе его в пронумерованные панели для тестирования. Прежде чем приступить к тестированию среды в следующей лунке, предыдущую следует заполнить свежей средой. Чрезвычайно важно избегать переноса клеток из одной лунки в другую. Пастеровскую пипетку можно простерилизовать с помощью кипящей воды, набираемой и вновь выпускаемой из пипетки, и охладить, набирая холодную среду. Лишь затем эту пипетку используют для работы со следующей лункой. Если применяют простую систему анализа (например, реакцию пассивной гемагглютинации), то проще и информативнее отбирать пробы со всей панели, используя многоканальную пипетку. Технология скрининга рассматривается в разд. 5.

Панели следует ежедневно просматривать под инвертированным микроскопом. В течение первых двух дней, как правило, можно наблюдать лишь отдельные клетки (по размеру и морфологии сходные с плазмацитовыми) на фоне сгруппированных клеток селезенки. На четвертый день, если гибридизация прошла успешно, в некоторых лунках должны появиться небольшие колонии гибридомы. К пятому дню, когда в лунки дополнительно добавляют среду, в некоторых из них должны выявляться большие колонии гибридом, которые на 7-й день должны быть заметны уже в 20—100% от общего числа лунок. К этому времени выжившие клетки селезенки образуют скопления, которые могут интенсивно расти и угрожать выживанию медленно растущих гибридом. Успешная процедура слияния требует не только хороших условий для слияния клеток и обогащенной среды, стимулирующей рост, но и подавления роста сохранивших жизнеспособность клеток селезенки. К последним могут относиться макрофаги, фибробласты, предшественники тучных клеток [12] и лимфоциты,



которые образуют агломераты. Жизнеспособность этих клеток зависит от состояния их активности в селезенке к моменту забоя животного (мыши). Многие адъюванты повышают эту активность. Одна из причин добавления к клеткам после слияния холодной, щелочной лошадиной сыворотки заключается в том, что она, возможно, угнетает рост «фоновых» клеток, одновременно стимулируя рост клеток гибридомы. Конкуренция в росте важна только на очень ранних стадиях. Как только гибридома стабилизировалась, ее способность к размножению опережает таковую всех других типов клеток.

#### 4.2. Методика Б

В данном случае также удобно провести два слияния в один день, используя селезенки от двух мышей. Обычно мы ставим эксперименты по слиянию последовательно — утром и после полудня.

Непосредственно перед слиянием готовят следующие материалы и оборудование (в расчете на одно слияние).

1. Отбирают образец плазматомы, как описано в методике А, и помещают  $10^7$  жизнеспособных клеток в универсальный контейнер. Оставляют при  $37^\circ\text{C}$  до приготовления суспензии селезеночных клеток.

2. Шесть флаконов, содержащих по 20 мл среды RPMI-1640. Помещают в водяную баню или термостат на  $37^\circ\text{C}$ .

3. Четыре флакона, содержащие по 24 мл среды RPMI-1640 с 20% СПК и пенициллином/стрептомицином. Оставляют при  $37^\circ\text{C}$  с плотно закрытыми крышками, чтобы избежать застывания среды.

4. Два шприца на 10 мл с иглами № 23 (в каждом содержится по 10 мл среды RPMI-1640). Хранят в закрытой стерильной упаковке в ламинарном боксе.

5. Один шприц на 1 мл, содержащий 0,8 мл 50%-ного ПЭГ в среде RPMI-1640. Хранят при  $37^\circ\text{C}$ .

6. На столе: секундомер, 70%-ный этанол, фильтровальная бумага, пробирка для уравнивания с 21 мл воды, водяная баня на  $37^\circ\text{C}$ , стерильные инструменты, чашка Петри с 1 мл среды RPMI-1640.

7. В ламинарном боксе: пипетки, чашка Петри.

8. Две 24-луночные (объем лунки 2 мл) культуральные панели (Costar, США). Они используются без предварительной подготовки.

##### 4.2.1. Процедура гибридизации Б (основанная на одинарном слиянии)

Готовят суспензию клеток селезенки, как описано в методике А. Помещают  $10^8$  жизнеспособных клеток селезенки в

подходящий универсальный контейнер. Вынимают контейнер с клетками плазмацитомы из термостата на 37 °С. Дважды отмывают клетки селезенки и клетки плазмацитомы в отдельных контейнерах, используя предварительно нагретую до 37 °С среду RPMI-1640. Центрифугируют при 200 g в течение 10 мин и слегка встряхивают контейнеры, чтобы диспергировать осадок клеток, образовавшийся во время отмывания. После двух отмываний ресуспендируют клетки каждого типа в 10 мл теплой среды RPMI-1640. Вливают суспензию клеток селезенки в универсальный контейнер с клетками плазмацитомы и тщательно перемешивают клетки, осторожно переворачивая контейнер. Центрифугируют при 440 g в течение 10 мин. С помощью пастеровской пипетки полностью удаляют супернатант, оставив только осадок клеток. Слегка встряхивают контейнер, чтобы диспергировать клетки, а затем осуществляют следующие процедуры.

1. Помещают контейнер в водяную баню на 37 °С, находящуюся в ламинарном боксе, или в термостат и оставляют на 5 мин для достижения указанной температуры.

2. Помещают, вынув из термостата, наполненный ПЭГ шприц в ламинарный бокс. Вынимают контейнер из термостата на 37 °С и слегка встряхивают для перемешивания и распределения осадка клеток по коническому дну контейнера.

3. Через 1 мин добавляют в контейнер 0,8 мл ПЭГ. Вращают контейнер в наклонном положении, чтобы обеспечить равномерное распределение клеток и ПЭГ по коническому дну контейнера.

4. Оставляют контейнер на одну минуту при 37 °С в водяной бане или в обычном термостате.

5. Через 1 мин добавляют по каплям 1 мл среды RPMI-1640, нагретой до 37 °С.

6. Через 5 мин медленно добавляют 20 мл теплой среды RPMI-1640.

7. Центрифугируют клетки при 440 g в течение 15 мин, используя для уравнивания пробирку с 21 мл воды.

8. Удаляют супернатант и добавляют к осадку клеток 24 мл теплой среды RPMI-1640 с 20% СПК и антибиотиками. Закрывают контейнер крышкой, а затем, вращая его, ресуспендируют и диспергируют осадок клеток.

9. Подготавливают и надписывают две 24-луночные панели для культуры тканей. Используя градуированную пипетку или диспенсер на 1 мл, снабженный стерильным наконечником, добавляют по 0,5 мл суспензии клеток в каждую из 48 лунок.

10. Добавляют в каждую лунку по 1,5 мл теплой среды RPMI-1640 с 20% СПК и антибиотиками. Переносят панели

в термостат с регулируемым составом атмосферы и увлажнением.

День проведения эксперимента по слиянию обозначают как нулевой день — день 0. На 1, 2 и 3-й день после слияния осторожно заменяют по 1 мл среды из каждой лунки на 1 мл среды ГАТ. Важно не потревожить клетки в лунках, в частности, избежать перемещения клеток на одну сторону лунки при добавлении свежей среды. Это существенно по двум причинам. Во-первых, в результате обеспечивается возможность спокойного (без активации) роста «фоновых» клеток, что способствует росту гибридом. Во-вторых, на более поздних стадиях можно видеть, происходит ли в лунке рост одной или нескольких колоний гибридных клеток.

Кроме того, чрезвычайно важно избежать перекрестного переноса клеток из одних лунок в другие. Для удаления среды из каждой лунки мы используем диспенсер на 1 мл, снабженный новым наконечником одноразового использования. Когда в лунках происходит интенсивный рост гибридных клеток, то смена наконечников для каждой лунки гарантирует также, что в супернатанты, взятые для анализа, не будут занесены антитела из других лунок. Добавление свежей среды ко всем лункам (по 1 мл) можно производить одним наконечником при условии, что не происходит контакта наконечника со средой в лунках. После смены культуральной среды на 1, 2 и 3-й день после гибридизации вполне достаточно и удобно заменять 1 мл среды на 1 мл свежей среды ГАТ по понедельникам, средам и пятницам. Благодаря смене среды каждые 2—3 дня фоновые антитела, синтезированные сохранившимися жизнеспособными клетками селезенки, удаляются.

Перед сменой среды панели с клетками следует просмотреть под микроскопом. Морфология культур описана в методике А. Если клетки не повреждаются во время смены среды, то начавшие расти гибридомы должны образовать достаточно обособленные колонии. Если рост колоний наблюдается в большей части лунок, то необходимо подсчитать число индивидуальных колоний в каждой лунке. Если лунка содержит более одной колонии, то, проводя скрининг, следует, не откладывая, отбирать и клонировать линии гибридных клеток. В целом гибридомы, растущие в панелях Costar, должны быть клонированы как можно раньше, поскольку в данном случае (в отличие от того, когда используют панели для микротитрования) в лунках образуется более одной колонии. Полезно руководствоваться следующим соображением: если в  $\frac{1}{3}$  лунок или менее наблюдается рост клеток, то в большинстве случаев в лунках представлен рост клонов.

Обычно между 18-м и 25-м днями супернатанты исследуют на антительную активность. К этому времени гибридные клетки практически образуют монослой и среда имеет выраженную желтую окраску. Это гарантирует, что супернатант содержит оптимальное количество антител для скрининга. Скрининг супернатантов из всех 48 лунок, включая и лунки, где не наблюдается роста, имеет то преимущество, что позволяет провести положительный отбор на фоне остаточных антител. Чтобы определить, возрастает или снижается продукция антител данной отдельной культурой, целесообразно проводить последовательное тестирование содержания антител в супернатантах, отбираемых через каждые 2—3 дня. Снижение уровня антител может быть связано как с проблемой остаточного фонового роста в данной лунке, так и с повышенной ростовой активностью несекретирующих гибридных клеток по сравнению с линией гибридомы. Трудно спасти антителосекретирующие гибридомы из лунок, где в супернатантах выявляется прогрессивное снижение продукции антител. Кроме того, целесообразно попытаться клонировать отдельные клетки, но это не всегда приводит к желаемому результату.

#### 4.3. Замечания к различным стадиям процедуры гибридизации

1. Важно, чтобы плазмацитома находилась в логарифмической фазе роста. Нельзя допускать полного использования клетками культуральной среды. За день до слияния желательно сменить среду. Если есть опасения, что ко дню слияния клетки могут перерасти, то можно приготовить два или три флакона с клетками плазмацитомы в различной концентрации. В этом случае вы можете выбрать для слияния наиболее подходящую культуру. Жизнеспособность клеток, о которой судят по исключению красителя, должна быть высокой. Клеточные суспензии обычно готовят непосредственно перед слиянием, но клетки можно оставить на два часа в H-RPMI — 2% СПК при 4°C.

2. Спленоциты лучше получать, вымывая их из селезенки, чем измельчая или раздавливая орган в гомогенизаторе. В первом случае получают чистые однородные суспензии с высокой жизнеспособностью клеток. Клетки прекрасно сохраняют жизнеспособность в среде H-RPMI — 2% СПК на холоду. Это обеспечивает и более удобное последовательное приготовление двух селезенек. Иногда можно столкнуться с патологически измененной селезенкой, содержащей избыточное количество клеток гранулоцитарного или моноцитарного ряда, что может быть причиной неудачной гибридизации.

3. Среда RPMI-1640, используемая для промывания клеток, может быть заменена на среду Дюльбекко.

#### 4.3.1. Замечания к процедуре А

1. Пробные тесты показали, что суспендирование клеток в щелочной среде RPMI-1640 (или среде Дюльбекко) представляет собой решающий этап для стадии слияния. По некоторым причинам слияние лучше происходит в щелочной среде и при этом благодаря кратковременности инкубации клетки не повреждаются. Распределение клеток по стенкам пробирки при ее вращении тоже повышает эффективность слияния, по-видимому, потому, что это гарантирует равномерное перемешивание и тесный контакт клеток. Не возникает необходимости в использовании бани на 37 °С в ламинарном боксе, но клетки следует держать при температуре около 37 °С.

2. Большинство авторов рекомендуют добавлять ПЭГ медленно. Пробные тесты показали, что это не дает преимуществ в случае методики А. Однако если, поместив ПЭГ на дно пробирки, попытаться распределить его в среде так, чтобы обеспечить контакт со всеми клетками, расположенными на стенках пробирки, то смешивание ПЭГа со средой происходит очень медленно. Тем не менее крайне важно, чтобы после слияния ПЭГ разбавлялся медленно. Несколько порций среды, добавленные приблизительно с интервалом в 1 мин, создают условия, удовлетворяющие этому требованию. Быстрое же разбавление ведет к осмотическому повреждению клеток.

3. Обычно после слияния раскапывают по одной капле ресуспендированную клеточную смесь в пустые лунки и оставляют панели в тепле. Мы обнаружили, что целесообразно до внесения клеточной суспензии добавить в лунки по одной капле холодной 50%-ной лошадиной сыворотки. Это, по-видимому, подавляет рост «фоновых» клеток, в то же время не влияя на рост гибридом.

#### 4.3.2. Замечания к процедуре Б

1. При осуществлении этой методики не использовалась щелочная среда RPMI-1640 или Дюльбекко. Щелочные значения рН достигаются еще до стадии слияния промыванием клеток в свободной от сыворотки среде RPMI-1640, после чего клетки оставляют в очень небольшом объеме среды на 5 мин для достижения температуры 37 °С. За это время среда защелачивается.

2. Крайне важно, чтобы после слияния разбавление ПЭГ происходило медленно. Цвет клеточного осадка после центри-

фугирования, следующего за процедурой слияния, служат индикатором осмотического повреждения клеток. Если осадок клеток значительно бледнее, чем исходной смеси спленоцитов и клеток плазмациитов, то произошел некоторый лизис эритроцитов, а следовательно, и осмотическое повреждение гибридных клеток. Если клеточный осадок выглядит беловатым, то вероятность успешного слияния очень низка. В этом случае не имеет смысла вносить клеточную суспензию в лунки.

### 5. Селекция гибридом

Селекция гибридом, образующих специфические антитела, обычно происходит в два этапа. Сначала культуральную жидкость анализируют на содержание антител, специфичных к данному иммуногену. Положительные супернатанты затем подвергают скринингу с использованием тест-панели антигенов, чтобы обнаружить, связываются ли выявленные антитела селективно с интересующим исследователя антигеном. Лунки с нужными гибридами неизменно составляют только небольшой процент от общего числа лунок с растущими или антителопродуцирующими клетками. Важно идентифицировать нужные гибридомные клоны как можно скорее, в противном случае непроизводительно расходуются время и материалы для размножения большого числа бесполезных линий. Успех процедуры гибридизации для получения специфических антител в большой степени зависит от тщательного выполнения скрининга. Необходимо выявить данные антитела и отбросить ненужные клоны быстро и без сомнения.

Выбор используемой процедуры скрининга зависит от дальнейшего возможного использования моноклональных антител. Другими словами, если вы намерены получить моноклональные антитела, которые предполагаете использовать для лизиса клеток в присутствии комплемента, то и для скрининга следует использовать соответствующий тест (реакцию комплемент-зависимого лизиса). Подобно этому, если моноклональные антитела предполагается использовать в реакциях преципитации или для окрашивания заключенных в парафин препаратов тканей при иммуногистологических исследованиях, то именно эти методы и должны использоваться для скрининга гибридом. Тест, используемый для скрининга, в идеале должен удовлетворять следующим критериям:

1. Быть настолько простым, чтобы его мог успешно и уверенно проводить технический персонал лаборатории. Если используется простая тест-система, то более информативно собрать аликвоты со всей культуральной панели и, таким образом, отобрать положительные клоны на фоне контамини-

рующих антител, продуцируемых выживающими клетками селезенки.

2. Тест необходимо по возможности автоматизировать для быстрого скрининга большого количества проб из лунок. Этого можно достичь, используя многоканальную пипетку (8 проб за один раз) и проводя тестирование в планшетах.

3. Чувствительность теста должна составлять менее 1—10 мкг антител в 1 мл. Учитываемые величины должны превышать фон не менее чем в 3 раза.

4. Результаты скрининга должны быть известны исследователю не позднее следующего дня, чтобы своевременно уделить внимание нужным клонам и предупредить перерастание клеток.

5. Важна достоверность результатов, поэтому процедура скрининга должна предусматривать постановку положительных и отрицательных контролей.

6. Если используют антитела к иммуноглобулинам мыши, меченные флуоресцеином, пероксидазой или  $^{125}\text{I}$  (антиглобулиновый реагент), то следует тщательно проверить их специфичность по отношению к чистым белкам соответствующих подклассов ( $\text{IgG}_1$ ,  $\text{IgG}_{2a}$ ,  $\text{IgG}_{2b}$ ,  $\text{IgG}_3$ ,  $\text{IgA}$ ,  $\text{IgM}$ ).

7. С учетом того что в процессе скрининга исследуют большое количество проб, рекомендуется проводить скрининг, используя недорогостоящие реагенты и оборудование.

Помните, что необходимо отбирать для анализа супернатанты из лунок с хорошим ростом гибридом: такая проба будет содержать оптимальное количество антител. Очень простой радиоиммунологический метод может быть использован для тестирования адекватных уровней антител в супернатантах и для повседневного контроля за образованием антител в лунках [13]. Особую ценность данный метод приобретает в том случае, если наблюдается рост в большом числе лунок, а скрининг супернатантов еще не дает положительных результатов. Обнаружение с помощью антиглобулиновых реагентов значительных титров антител означает, что чувствительность первичного скрининг-теста недостаточна и его необходимо усовершенствовать. Если выявляют мышинные иммуноглобулины в незначительной концентрации, то необходимо подождать, пока гибридомные клетки вырастут, а затем взять повторные пробы для скрининга. Можно сконцентрировать анализируемые супернатанты, хотя обычно в этом нет необходимости.

Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что тесты, обычно используемые в лаборатории при исследовании поликлональных сывороток с высокими титрами антител, могут быть адаптированы для скрининга гибридом. Некоторые из них могут оказаться довольно сложными; например, цель исследователя может заключаться в получении моноклональных анти-

тел, которые определяют по торможению функции в каком-либо биологическом тесте. При использовании сложных и продолжительных тестов целесообразно уменьшить количество анализируемых проб. Для идентификации антителопродуцирующих клонов может быть использована простая процедура скрининга мышино-го иммуноглобулина, а затем уже только эти пробы вместе с отрицательным контрольным супернатантом исследуют более сложным путем. При получении антител к поверхностным клеточным антигенам мы обнаружили, что примерно в половине лунок с растущими клонами образуются мышинные иммуноглобулины, а примерно половина или более содержащих антитела супернатантов реагировала положительно с клетками, использовавшимися для иммунизации.

### **5.1. Процедуры скрининга при получении антител к антигенам клеточной поверхности и другим корпускулярным антигенам**

Существует определенная схема выявления специфического связывания антител с антигеном. Клетки-мишени могут быть живыми, зафиксированными глутаровым альдегидом, высушенными на стекле или же присутствовать в замороженных гистологических срезах. Тест неизбежно является непрямым, и реагентом для второй стадии могут служить антимышинные иммуноглобулины овцы, козы или кролика, меченные флуоресцеином, ферментом или радиоактивным йодом. Обычно пробу (одну каплю) супернатанта добавляют к  $0,5 \cdot 10^6$  клеток-мишеней в небольшом объеме в маленькой пластиковой пробирке или в лунке панели. После 30—60 мин инкубации при  $4^\circ\text{C}$  суспензию разбавляют, клетки осаждают центрифугированием, отмывают один раз и инкубируют в течение 30 мин при  $4^\circ\text{C}$  с соответствующими разведениями поливалентного антимышиного иммуноглобулина, конъюгированного с флуоресцеином. Клетки вновь отмывают и регистрируют флуоресценцию непосредственно под флуоресцентным микроскопом или с помощью проточного цитофлуориметра системы FACS [14]. Более детально упоминаемые процедуры скрининга изложены в кн. 2.

### **5.2. Процедуры скрининга при получении антител к растворимым антигенам**

Основные альтернативные тесты — это ELISA, РИА или реакция гемагглютинации. В первых двух случаях в лунках пластиковой панели для микротитрования адсорбируют антиген (1 ч) и затем отмывают остаток несвязавшегося антигена. Далее в каждую лунку вносят по одной капле исследуемого



супернатанта. Инкубацию продолжают в течение 30 мин или ночи, после чего отмывают избыток антител и добавляют антиглобулиновый реагент к иммуноглобулинам мыши, конъюгированный с ферментом или радиоактивным иодом. Инкубацию продолжают в течение часа, затем вновь осуществляют процедуру отмывания и в зависимости от выбранного теста либо выявляют ферментативную активность (ELISA), либо измеряют уровень радиоактивности в лунках (РИА). Эти процедуры детально описаны в кн. 2.

В реакции пассивной гемагглютинации эритроциты нагружают антигеном с помощью хлорного хрома. Такие эритроциты хранят в стерильных условиях до употребления [15]. Реакция, подробно описанная в гл. 7, заключается в следующем. Добавляют одну каплю супернатанта к одной капле 0,5%-ной суспензии нагруженных антигеном эритроцитов барана. Оставляют в течение 1—2 ч при комнатной температуре, а затем оценивают результаты.

Если следуют процедуре гибридизации А и гибридомные клетки растут в лунках панели для микротитрования, то забор образцов для тестирования одновременно со всех панелей можно осуществлять с помощью многоканальной пипетки. Отобранные пробы переносят непосредственно в панель для микротитрования с круглодонными лунками. Когда все панели с пробями полностью укомплектованы, в каждую лунку добавляют по одной капле 0,5%-ной суспензии нагруженных антигеном эритроцитов барана. Конкурирующий агент может быть добавлен в буфер для разведения с целью проверки специфичности моноклональных антител. Например, если нужно отобрать моноклональные антитела к IgG<sub>2</sub> человека, то используют эритроциты барана, нагруженные IgG<sub>2</sub>, а IgG<sub>1</sub> добавляют к буферу для разведения. В этом случае только те МКА, которые специфически распознают IgG<sub>2</sub>, будут агглютинировать нагруженные антигеном эритроциты барана, а МКА, которые связываются и с IgG<sub>2</sub>, и с IgG<sub>1</sub>, в основном взаимодействуют с избытком IgG<sub>1</sub> в буфере для разведения. Нужные клоны выращивают в культуре, как описано в разд. 6.

## 6. Клонирование линий гибридомных клеток

Моноклональность антител обеспечивается клонированием гибридом. Осуществляют ли клонирование непосредственно после слияния или же на более поздней стадии, в некоторой степени зависит от того, выращивались ли первичные гибридомные культуры в лунках панели для микротитрования (процедура гибридизации А) или в объеме 2 мл в лунках 24-х луночной панели для культуры тканей (процедура гибридизации Б).

### 6.1. Процедура гибридизации А

Если клетки после слияния рассеивают в лунки панели для микротитрования, то гибридомы, продуцирующие антитела нужной специфичности, затем пересаживают в 24 луночные панели для культуры тканей с объемом лунок 2 мл. Далее при образовании монослоя и окрашивания среды в желтый цвет, супернатант можно повторно тестировать, используя определенный набор антигенов. Если результаты тестирования удовлетворительные, то гибридому наращивают в нескольких лунках, затем в универсальных контейнерах и далее во флаконах постепенно возрастающего объема. К этому времени обычно уже происходит самопроизвольное клонирование клеток. Тот клон, который отличается наилучшим ростом (предполагаемый источник антител), постепенно получает преимущество над всеми другими в культуре.

Клонирование лучше всего проводить или на ранней стадии, чтобы не допустить вытеснения медленно растущего клона клетками быстрорастущих соседних клонов, или на конечной стадии, когда получена стабильная линия антителообразующих клеток. В последнем случае клонирование, как правило, лишь формально подтверждает моноклональность. Если до стадии продукции антител клонирования не проводили, то его необходимо осуществить позднее, в том числе и с уже клонированными линиями. Цель такого подхода — удаление непродуцирующих антитела клонов, которые иногда образуются после длительного культивирования. Если данные клоны не отделить в процессе последующего клонирования, то они могут постепенно вытеснить другие антителообразующие клоны. Некоторые линии чрезвычайно стабильны и не требуют повторного клонирования. У других гибридных линий изменяются ростовые характеристики и антителообразующая активность. В этом случае иногда целесообразно повторное клонирование, но некоторым линиям свойственна нестабильность. Поэтому сразу после клонирования линии клеток следует немедленно заморозить (по меньшей мере 10 ампул) в жидком азоте. Ими можно будет воспользоваться, если клонированная линия окажется нестабильной при дальнейшем культивировании.

Чем эффективнее гибридизация, тем больше вероятность, что в каждой лунке вырастет более одного клона и что два клона со сходными темпами роста будут сосуществовать в одной лунке. Наличие двух и более клонов можно выявить по обнаружению в супернатанте антител более чем одной специфичности и более чем одного класса и подкласса, а также с помощью изоэлектрофокусирования (сложный спектр анализируемых антител). При получении соответствующего результата необходимо безотлагательное клонирование.

## 6.2. Процедура гибридизации B

В том случае, когда клетки после слияния рассеивают в лунки панели для культуры ткани объемом 2 мл, вероятность того, что в одной лунке окажется более одного клона, повышается. Просматривая культуры под инвертированным микроскопом, можно наблюдать два и более клонов в лунке. Клонирование клеток, продуцирующих антитела нужной специфичности, предпринимают немедленно после образования монослоя (обычно на 21—28-е сутки после гибридизации). Тем не менее гибридо-му продолжают наращивать в нескольких лунках, а затем во флаконах, пока не образуется достаточное для замораживания и хранения в жидком азоте количество клеток. Необходимо иметь, по меньшей мере, пять ампул исходной клеточной взвеси на случай, если возникнут трудности или неудачи при клонировании. Во время культивирования гибридомы во флаконах культуральную среду тестируют для выявления антител нужной специфичности. Если наблюдается прогрессирующее снижение образования антител на стадии роста культуры во флаконах, то это означает, что несекретирующие варианты гибридных клеток обогнали в росте антителообразующие клетки. В таком случае важно отобрать антителообразующие гибридные клетки путем клонирования, а небольшое количество клеток из этих флаконов сохранить для последующих процедур клонирования. Клонирование клеток из тех флаконов, где в культуральной среде выявляют прогрессивное снижение образования антител, почти всегда безуспешно. Если все же очень важно выделить такую клеточную линию, то следует извлечь из жидкого азота и разморозить образец клеток, замороженный на самой ранней стадии культивирования и сразу же после восстановления клеток в культуре провести клонирование. Клонирование может быть осуществлено либо путем высевания небольшого количества клеток в мягкий агар, либо с помощью лимитирующих разведений.

## 6.3. Клонирование клеток в полужидком агаре

Для этой процедуры клонирования необходимы следующие материалы:

1. Клетки гибридомы ( $3 \cdot 10^5$  клеток в 1 мл полной среды ГАТ).

2. Среда ГАТ, содержащая 50 мкМ 2-меркаптоэтанола. Держат в водяной бане на  $44^\circ\text{C}$ .

3. 3%-ный и 5%-ный растворы бактоагара, приготовленные на 0,9%-ном растворе NaCl. Агар автоклавируют небольшими

Таблица 3.2. Процедура клонирования клеток в полужидком агаре

1. Расплавленный при 100 °С в сосуде с кипящей водой агар помещают в водяную баню на 44—45 °С. При обращении с горячим агаром соблюдают осторожность.

2. Разбавляют 5%-ный агар средой ГАТ до конечной концентрации 0,5% (1:10), хорошо перемешивают и помещают в водяную баню на 44 °С. Удобно одновременно готовить раствор агара на три чашки Петри (1,5 мл раствора агара + 13,5 мл среды).

3. Пипеткой наклоняют на дно 9 чашек Петри (диаметр 5 см) по 5 мл 0,5%-ного агара. Дают агару застыть.

4. Разбавляя 3%-ный агар, готовят 9 аликвот по 5 мл 0,3%-ного раствора агара в среде ГАТ и держат их в водяной бане на 44 °С.

5. Одну или две капли суспензии гибридных клеток тщательно смешивают с аликватами 0,3%-ного агара, хорошо перемешивают и распределяют ровным слоем по поверхности 0,5%-ного агара. Для каждой дозы гибридных клеток готовят по три чашки.

6. Складывают чашки в чистый пластиковый сандвич-бокс, в который помещены чашки Петри, наполненные стерильной дистиллированной водой. Это обеспечивает влажную атмосферу в боксе. Переносят бокс с негерметично закрытой крышкой в СО<sub>2</sub>-термостат с увлажнителем. Дают возможность воздуху в боксе прийти в равновесное состояние с атмосферой термостата, содержащей 5% СО<sub>2</sub>, закрывают крышку бокса и оставляют на 10—14 дней.

7. На 10—14-й день с помощью пастеровских пипеток собирают колонии и переносят их в лунки панели для микротитрования.

8. После образования монослоя тестируют супернатанты на содержание антител. Одновременно удаляют всю среду и заменяют ее свежей средой ГАТ.

9. Отобранные положительные клоны наращивают сначала в панелях для микротитрования, затем в лунках панели для культуры тканей объемом 2 мл и, наконец, в небольших флаконах.

10. Замораживают для хранения в жидком азоте по меньшей мере 10 ампул с образцами клеток клонированной линии.

порциями в стеклянных универсальных контейнерах и хранят при 4 °С;

4. Чашки Петри диаметром 5 см для работ с клеточными культурами. Процедура клонирования описана в табл. 3.2.

#### 6.4. Клонирование клеток методом лимитирующих разведений

Если гибридные клетки выращивали в панелях для культуры тканей с объемом лунок 2 мл (процедура гибридизации Б), а клонирование проводили в мягком агаре, как описано выше, то в некоторых случаях необходимо было проанализировать большое число колоний, прежде чем удалось обнаружить антителообразующую колонию. По этой причине клонирование проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах для микротитрования с помощью последовательных разведений клеточной взвеси. Преимущество такого подхода заключается в том, что образование антител единичными колониями, растущими в лун-

ках, в которые предварительно засеяли по одной клетке, может быть просто проконтролировано. Метод лимитирующих разведений легко воспроизводится. Он позволяет избежать проблем, связанных с технологией приготовления агара, когда эффективность клонирования часто зависит от качества агара и его консистенции.

Метод лимитирующих разведений — это трехстадийная процедура. Поэтому для получения клонированных клеточных линий с его помощью требуется больше времени.

#### **6.4.1. Первая стадия метода лимитирующих разведений**

В процессе клонирования необходимо отобрать наиболее жизнеспособные, хорошо растущие гибридомы с высоким уровнем продукции антител. Цель первой стадии — отделить субкультуру, характеризующуюся более высоким уровнем продукции антител, от первоначальной культуры, которую выращивают в лунках объемом 2 мл.

1. Помещают клетки гибридомы, взятые из первоначальной культуры, в панель для микротитрования из расчета 100 клеток на лунку в 200 мкл среды ГАТ ( $5 \cdot 10^2$  клеток в 1 мл).

Используют 48 центральных лунок панели (6 рядов по 8 лунок каждый). Лунки, расположенные по периферии панели, заполняют средой RPMI-1640, содержащей антибиотики (для предотвращения испарения влаги и концентрирования среды ГАТ в лунках, содержащих клетки).

2. Инкубируют панель в  $\text{CO}_2$ -термостате с увлажненным воздухом.

3. Спустя приблизительно 7 дней, когда клетки в лунках практически образуют монослой, исследуют супернатанты на содержание антител. Целесообразно протестировать неразбавленный супернатант и, если возможно, одно или два разведения (1:4 и 1:16). Из тех лунок, где антитела содержатся в наиболее высоких титрах, отбирают для клонирования единичные, наиболее жизнеспособные и хорошо растущие клетки. Выбирают две лунки, из которых клетки рассеивают на второй стадии метода лимитирующих разведений.

#### **6.4.2. Вторая стадия метода лимитирующих разведений**

Цель этой стадии — отобрать линии гибридных клеток, образовавшиеся из одной клетки, и осуществить рассев гибридом на фидерный слой клеток селезенки.

1. Готовят суспензию спленоцитов (как описано для процедур гибридизации) за день до постановки эксперимента по

клонированию и ресуспендируют клетки ( $10^6$  клеток в 1 мл среды ГАТ, содержащей 100 мкМ 2-меркаптоэтанола).

2. Оставляют клетки селезенки в универсальном контейнере на ночь при комнатной температуре в ламинарном боксе для стерильных работ. Преимущество этой процедуры заключается в том, что она позволяет экспериментатору на следующий день проверить спленоциты под микроскопом и убедиться, что они не загрязнены. Вероятно, это подавляет и рост фоновых клеток селезенки в лунках, где проводят клонирование.

3. Подготавливают две панели для микротитрования следующим образом. Опять используют только 48 центральных лунок панели (6 рядов по 8 лунок), а расположенные по периферии заполняют средой RPMI-1640, содержащей антибиотика. В 8 лунок первого ряда добавляют по 100 мкл полной среды ГАТ. В 8 лунок каждого ряда (со 2-го по 6-й) добавляют по 100 мкл суспензии клеток селезенки в концентрации  $10^5$  клеток на лунку.

4. Помещают обе панели в  $\text{CO}_2$ -термостат на время, необходимое для приготовления последовательных разведений гибридных клеток. Очень важно приготовить разведения и поместить их в панели как можно скорее. Если клетки оставить на длительное время в суспензии (в которой число клеток невелико), то они потеряют свою жизнеспособность. Две панели с повторными разведениями готовят, используя клетки двух выбранных лунок первой панели. Серии разведений двух популяций клеток гибридомы готовят последовательно и отбирают клетки из лунок первой панели по мере необходимости.

5. Готовят суспензии клеток в полной среде ГАТ: 1 мл суспензии с концентрацией  $10^3$  клеток в 1 мл, 1 мл суспензии с концентрацией  $10^2$  клеток в 1 мл, 1 мл суспензии с концентрацией 50 клеток в 1 мл, 2 мл суспензии с концентрацией 10 клеток в 1 мл и 1 мл суспензии с концентрацией 5 клеток в 1 мл. Следует заметить, что готовят последовательные разведения клеток, поэтому начать необходимо приблизительно с 1,5 мл суспензии с концентрацией  $10^3$  клеток в 1 мл.

6. Достают одну из приготовленных панелей для микротитрования из термостата. В каждую из восьми лунок первого ряда, который содержит только среду ГАТ, добавляют по 100 мкл суспензии с концентрацией  $10^3$  клеток в 1 мл. Таким образом, эти лунки содержат по 100 клеток, что обеспечивает постоянный запас клеток, отбираемых из панелей с первым разведением. В лунки второго ряда добавляют по 100 мкл суспензии с концентрацией  $10^2$  клеток в 1 мл, поместив таким образом по 10 клеток на лунку. Второй и все последующие ряды содержат фидерный слой клеток селезенки. В лунки третьего ряда добавляют по 100 мкл суспензии с концентрацией 50 кле-

ток в 1 мл (5 клеток на лунку), в лунки четвертого и пятого ряда — по 100 мкл суспензии с концентрацией 10 клеток в 1 мл (1 клетка на лунку) и в лунки шестого ряда — по 100 мкл суспензии с концентрацией 5 клеток в 1 мл (1 клетка на каждые две лунки). Конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в лунках, содержащих спленоциты и гибридные клетки, составляет 60 мкМ.

7. Переносят панель в  $\text{CO}_2$ -термостат и повторяют описанную процедуру для второй лунки с клетками, выбранной на панели с первыми разведениями.

8. Меняют в лунках среду, если она в результате роста колоний закислилась. При этом следует соблюдать осторожность, чтобы не нарушить клеточный слой, поскольку гибридные клетки будут затем расти на фидерном слое спленоцитов в виде отдельных колоний. При смене среды необходимо избегать перекрестной контаминации лунок.

9. Через 10—14 дней гибридные клоны следует осмотреть невооруженным глазом, а затем более тщательно, с помощью инвертированного микроскопа под малым увеличением, чтобы различить отдельные белые пятна в лунках. Записывают число колоний, растущих в каждой лунке. Лучше отбирать колонии, выросшие в тех лунках, которые засеивали из расчета 1—0,5 клеток на лунку. Однако если эффективность роста данной линии низка, то, возможно, придется выбирать клон из лунок, в которые было посеяно по 10—5 клеток на лунку, при условии присутствия в лунке только одного клона.

10. Когда колонии ясно видны невооруженным глазом, они обычно достаточно большие, чтобы проверить их антителообразующую активность. На этой стадии проверяют супернатанты со всей панели. Затем снова, если возможно, проверяют неразбавленный супернатант, а также одно или два разведения. Отбирают три отдельные колонии, которые продуцируют высокие титры антител. Предпочтительно выбирают колонии из тех рядов, в которые изначально клетки были рассеяны из расчета 1 или 0,5 клеток на лунку.

#### 6.4.3. Третья стадия метода лимитирующих разведений

Чтобы быть уверенными, что данные клоны получены из одной клетки, а не из двух, целесообразно повторить описанную выше процедуру второй стадии метода лимитирующих разведений для каждой из трех отобранных колоний. Повторение процедуры клонирования единичных клеток имеет и то преимущество, что при проверке индивидуальных колоний, полученных после третьей стадии процедуры лимитирующих разведений, они все должны продуцировать антитела. Таким образом, гиб-

ридомная линия, которую в конечном итоге наращивают до значительных объемов, — это линия, которая образовалась из одной клетки. Целесообразно пересадить три отдельные колонии после осуществления второй стадии метода лимитирующих разведений, поскольку одна или две колонии могут отличаться низкой эффективностью роста. Перенеся три колонии, вы можете быть уверены, что нарастите достаточно клеток для анализа на третьей стадии метода лимитирующих разведений.

Колонии, возникшие из одной-единственной клетки, выращенные на третьей стадии и проанализированные на секрецию антител, переносят в новые панели для микротитрования. При известных обстоятельствах предпочтительно сначала вести линию в лунках панели для микротитрования, затем в 2-мл лунках и далее, наконец, в небольших флаконах. По крайней мере 10 ампул следует заморозить в жидком азоте для хранения.

#### **6.4.4. Замечания по процедуре разведения**

На первый взгляд кажется, что описанная выше процедура требует много времени. Результат оказывается наиболее хорошим, если проверяют одно или два разведения супернатанта из каждой лунки и, таким образом, оценивают титр антител. Соответственно в процессе клонирования могут быть отобраны клетки, продуцирующие возрастающее количество антител. В нашей лаборатории с целью отбора проб для приготовления разведений в нестерильных панелях для микротитрования, а также последующего переноса проб в панели для проведения РИА мы используем многоканальную пипетку. Благодаря этому исследование 48 проб из каждой панели занимает совсем немного времени. Имея соответствующие навыки, процедуру лимитирующих разведений можно осуществить за короткое время.

Очень важно детально описывать все этапы культивирования клеток и регистрировать содержание антител в культуральной жидкости во время роста гибридом и по ходу экспериментов по клонированию.

### **7. Выделение антител из культурального супернатанта и из асцитной жидкости**

Моноклональные антитела, полученные с помощью гибридомной технологии, можно выделять из двух источников.

#### **7.1. Культуральная жидкость**

Культуральная жидкость не содержит других мышинных иммуноглобулинов, кроме моноклональных антител, но, разумеется, содержит большое количество белков СПК. Концентрация



антител в культуральной жидкости обычно составляет несколько мкг в 1 мл. Для получения чистых моноклональных антител все большее применение находят современные бессывороточные культуральные среды.

Для достижения оптимального содержания антител в культуральной жидкости гибридные клетки растут до высокой плотности (культуральная среда становится при этом желтой). Однако важно не допустить того, чтобы клетки росли до такой степени, чтобы возникла угроза снижения их жизнеспособности и наступила гибель клеток. Культуры гибридных клеток, содержащие высокий процент нежизнеспособных клеток, часто трудно восстановить и их приходится выбрасывать. Культуральную жидкость собирают и затем центрифугируют при 500 g в течение 5 мин для удаления клеток. Культуральную жидкость, собранную из нескольких флаконов с одной гибридной линией и полностью освобожденную от клеток, сливают в чистые стеклянные бутылки. Чтобы запастись достаточное количество культуральной жидкости для собственных нужд и снабдить им других исследователей, авторы рекомендуют приготовить 500 мл культуральной жидкости, содержащей 0,1% азида натрия. Так, ее можно хранить при 4°C. Большинство антител в такой культуральной жидкости стабильно. Контролируя содержание антител ее можно использовать в течение нескольких лет.

### **7.2. Асцитная жидкость, полученная в результате интраперитонеальной инъекции гибридных клеток мышам**

1. За 1—3 нед до инъекции клеток гибридомы, выращенных в культуре, мышам линии BALB/c, в возрасте 3—4 мес, проводят интраперитонеальную инъекцию 0,5 мл пристана (2,6,10,14-тетраметилпентадекана; Koch-Light, Великобритания).

2. Каждой мыши вводят по меньшей мере  $10^6$ , а желательно по  $10^7$  клеток в PBS. Гибридома растет в виде асцитной опухоли, и асцитная жидкость содержит антитела в концентрации, приблизительно в 10—500 раз превышающей таковую в культуральной жидкости (концентрация антител в асцитной жидкости составляет несколько мг в 1 мл).

3. Для того чтобы собрать асцитную жидкость, мышь забивают дислокацией шейных позвонков. Делают надрез таким образом, чтобы обеспечить доступ в перитонеальную полость, и дренируют ее пастеровской пипеткой, отбирая асцитную жидкость.

4. Центрифугируют асцитную жидкость (при высоком числе оборотов в минуту) для удаления клеток и клеточного дебриса. Супернатант лучше всего хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , разлив на али-

квоты по 1 мл, либо в большом объеме, если антитела будут подвергать дальнейшей очистке.

Разумеется, асцитная жидкость загрязнена другими иммуноглобулинами мыши. Содержание примесей зависит от чистоты содержания животных. Предпочтительно использовать мышей, свободных от видоспецифических патогенных возбудителей, если таковые доступны. Степень загрязнения антител увеличивается и при значительном излиянии крови в асцитную жидкость. Некоторые гибридомы хорошо растут в брюшной полости. Другие же линии, образующие достаточное количество антител в культуре, *in vivo* продуцируют мало антител, несмотря на хороший рост в виде асцитных опухолей. Некоторые гибридомы формируют солидные опухоли или метастазы. Иногда, еще не достигнув значительного роста, такие опухоли служат причиной гибели хозяина-носителя.

## **8. Контроль качества: клеточные линии и препараты антител**

Первостепенное значение для осуществления контроля качества имеет создание запаса замороженных гибридных клеточных линий с указанием даты заморозки. Следует замораживать образцы культивируемых клеток на каждой фазе роста. Образцы асцитных жидкостей следует замораживать с обозначением номера каждого пассажа.

### **8.1. Замораживание клеток**

Ниже представлена простая и эффективная технология замораживания.

1. Используют клетки хорошо делящейся, здоровой культуры. Центрифугируют в специальном контейнере приблизительно по  $10^7$  клеток на каждую ампулу, которая будет заморожена.

2. Удаляют супернатант и ресуспендируют клетки (в концентрации  $1 \cdot 10^7$  клеток в 1 мл) в 1 мл холодной СПК, содержащей 5 % диметилсульфоксида.

Смесь для замораживания следует приготовить заранее и хранить при  $-20^\circ\text{C}$ , разлив на аликвоты.

3. Переносят суспензию клеток в маленькие полипропиленовые ампулы, которые подписывают, используя несмываемый карандаш, с указанием кода замораживаемой линии и даты.

4. Помещают замораживаемые ампулы в большую коробку из полистирола с толщиной стенок приблизительно 2—3 см, снабженную крышкой. Коробку переносят в морозильник на  $-20^\circ\text{C}$  и оставляют на 30 мин. Подходящими для заморажи-

вания контейнерами служат маленькие коробки, в которых лаборатории получают легкобьющиеся материалы. Объемные полистироловые контейнеры обеспечивают медленное охлаждение ампул с клетками (идеально  $1^{\circ}\text{C}$  в мин) до температуры  $-20^{\circ}\text{C}$ .

5. Спустя 30 мин переносят коробку в морозильник на  $-70^{\circ}\text{C}$  и оставляют либо на 6 ч, либо на ночь. Затем ампулы переносят в контейнер с жидким азотом для хранения.

Согласно альтернативной методике замораживания, полипропиленовые пробирки переносят в 50%-ный глицерин, охлажденный до  $-32^{\circ}\text{C}$ . Спустя 40 мин пробирки извлекают, протирают тканью и переносят непосредственно в контейнер с жидким азотом.

## 8.2. Размораживание клеток

1. Чтобы восстановить культуру, нужно быстро разморозить пробирки, держа их в струе горячей воды из крана и легко покачивая до тех пор, пока лед в пробирке почти не исчезнет.

2. Клетки переносят в универсальный контейнер и затем медленно, по каплям, добавляют 2 мл теплой ( $37^{\circ}\text{C}$ ) среды H-RPMI.

3. Закрывают контейнер крышкой и перемешивают содержимое. Центрифугируют в течение 5 мин приблизительно при 500 g.

4. Удаляют супернатант, заливают клетки 4 мл среды ГАТ и помещают суспензию в две лунки панели для культуры тканей объемом 2 мл.

5. Панили инкубируют в термостате с регулируемым составом атмосферы, а затем рассеивают клетки. Жизнеспособность клеток обычно составляет 50—78% при условии, что была заморожена здоровая, хорошо растущая (непереросшая) культура.

Время от времени необходимо проверять содержание специфических антител в культуральной жидкости с помощью определенного набора контрольных антигенов. Очень важно оценить не только уровень специфических антител, но и возможных примесей. Обнаружение последних может быть обусловлено загрязнением гибридомы клетками другой линии, что легко может случиться, когда одновременно культивируют много линий.

Асцитные жидкости можно хранить в замороженном виде, но в этом случае отпадает необходимость в соблюдении стерильности (препараты будут использованы для последующих в/б инъекций), которая должна быть обеспечена при замораживании клеток для последующего культивирования *in vitro*. После центрифугирования асцитной жидкости осадок ресуспендируют в PBS, а не в среде ГАТ.

Самый простой путь определения концентрации моноклональных иммуноглобулинов в асцитных жидкостях — электрофорез с последующим окрашиванием гелей. На электрофореграмме должны быть видны отдельные полосы, характеризующиеся определенным положением в случае антител данной специфичности. Их интенсивность можно сравнить с интенсивностью полос, полученных при исследовании проб, отобранных на более ранних пассажах. Данный метод более удобен и информативен, чем титрование специфических антител, хотя время от времени следует применять и последний.

## 9. Применение моноклональных антител

Клиническое и экспериментальное применение моноклональных антител разнообразно и многочисленно. Ряд обзоров полностью посвящены этой теме и могут быть рекомендованы читателю [2, 4, 6]. Здесь мы рассмотрим практические выводы, имеющие отношение к использованию моноклональных антител.

Во-первых, в зависимости от области применения существует возможность выбора наиболее подходящего и удобного источника получения моноклональных антител: культуральной или асцитной жидкости. При использовании препаратов асцитной жидкости возникают определенные трудности при интерпретации полученных результатов, обусловленные примесью естественных мышинных антител к моноклональным антителам (высокие фоновые уровни). Однако в 1 мл асцитной жидкости содержится несколько мг МКА. Поэтому, когда используют разведение 1:1000 или более, значительная часть посторонних мышинных антител удаляется разбавлением. Иногда необходимо полностью удалить из препарата примесь естественных иммуноглобулинов (например, при использовании моноклональных антител для выделения и очистки небольшого количества белкового антигена с целью биохимического анализа). В последнем случае предпочтительно выделять моноклональные антитела из культуральной жидкости. При использовании в иммунологических реакциях асцитной жидкости следует иметь в виду присутствие посторонних фоновых антител. В некоторых случаях в организме мыши может существовать высокий титр природных антител, реагирующих с антигеном, специфически распознаваемым моноклональными антителами. При использовании асцитной жидкости возникают и проблемы неспецифического характера. Например, культуральная жидкость дает более ясное и точное окрашивание образца в иммуногистологических исследованиях.

Культуральная жидкость представляет собой удобный и адекватный источник моноклональных антител с целью исполь-

зования их для идентификации антигена как в собственной лаборатории, так и для снабжения этим реагентом коллег. При использовании одной капли чистой культуральной жидкости на тест, 10 мл достаточно для проведения приблизительно 200 тестов. Если моноклональные антитела получают коммерческим путем или используют в крупномасштабных исследованиях в ряде центров, то наиболее экономичным источником их получения служит асцитная жидкость. При использовании одной капли на тест и при работе с разведением около  $1:10^3$ , 1 мл хватает на 20 000 тестов. В этом случае моноклональные антитела обычно выделяют из асцитной жидкости в виде иммуноглобулиновой фракции.

В разд. 5 мы рекомендовали выбирать метод скрининга, адекватный использованию МКА. Следует иметь в виду, что в неадекватных системах МКА иногда не обнаруживают антигена. Например, моноклональные антитела к растворимым белкам, отобранные методом пассивной гемагглютинации с помощью эритроцитов, нагруженных антигеном, могут распознавать только одну антигенную детерминанту. Такие антитела не обладают преципитирующими свойствами. В таком случае преципитация антигена достигается при использовании комбинации моноклональных антител различной специфичности, которые распознают две различные детерминанты на молекуле белка.

Дальнейшие исследования возможностей использования моноклональных антител неожиданно встретили затруднения, обусловленные распознаванием моноклональными антителами только нативной формы антигена. Например, моноклональные антитела к клеточным антигенам часто не распознают антиген, перенесенный на нитроцеллюлозную мембрану с полиакриламидных гелей после проведения электрофореза растворимых клеточных экстрактов в присутствии ДСН. В данном случае антиген денатурируется и поэтому не связывается с антителами. Подобным образом моноклональные антитела, которые окрашивают клетки в суспензии, могут оказаться непригодными для иммуногистологических исследований парафиновых срезов зафиксированного формалином материала. Эти соображения наводят на мысль, что как выбор метода скрининга, так и природа материала, используемого для иммунизации мышей, являются важными факторами, влияющими на свойства полученных в конечном итоге моноклональных антител.

Серологические свойства моноклональных антител не всегда можно предсказать по известным серологическим свойствам адсорбированных поликлональных антисывороток. В случае поликлональных реагентов взаимодействие с антигеном осуществляется благодаря комбинированному эффекту различной специфичности антител, которые в совокупности идентифициру-

ют определенные типы клеток или белков и не распознают другие образования и структуры. Моноклональные антитела к корпускулярным антигенам или гликопротеинам могут проявлять неожиданные серологические свойства, а именно окрашивать различные клетки или же связывать большое число разнообразных гликопротеинов. Такие антитела, как правило, распознают специфические углеводные структуры, которые могут входить в состав самых разнообразных белков. Примером служит углеводная структура 3-фукозил-N-ацетиллактозамина, которая может быть обнаружена в кислом гликопротеине  $\alpha$ -1, лактоферрине,  $\alpha$ -амилазе секрета околоушной железы, цервикальном муцине и в секреторном компоненте. Моноклональные антитела различной специфичности могут найти практическое применение во многих областях биологии и медицины. С помощью серологических исследований следует предварительно определить, что определенные моноклональные антитела действительно проявляют специфичность именно в данной тестирующей системе.

В целом использование моноклональных антител в экспериментальных и клинических исследованиях помогает устранить проблему, связанную с неспецифическими реакциями обычной поликлональной антисыворотки, обусловленными присутствием посторонних антител, а также связыванием с антигеном компонентов неиммуноглобулиновой природы. Однако, как было сказано выше, исследователю может потребоваться более одного препарата моноклональных антител, специфичных к определенному антигену, с тем чтобы использовать такую комбинацию антител для проведения широкого спектра экспериментов.

## 10. Перспективы исследований

Гибридная технология интенсивно развивается. По-видимому, менее чем через десять лет будет получено около  $10^6$  различных типов моноклональных антител различной специфичности, синтезированных гибридами, полученными при слиянии клеток крыс и мышей. Большинство из этих гибридом будет рассредоточено во всем мире по отдельным лабораториям. Очевидно, в пределах различных центров некоторые виды гибридом будут многократно дублироваться. Это создает проблему иного плана, чем просто явное повторение. Важным свойством моноклональных антител является то, что они могут быть получены в количествах, достаточных для снабжения ими большого числа лабораторий, занимающихся сходными или дополняющими данную тему анализами. Результаты этих исследований можно сопоставить и сравнить. Однако часто различ-

ные лаборатории используют свои собственные моноклональные антитела для идентификации одного и того же антигена. Это определенно затрудняет возможность сопоставлять данные, полученные в различных центрах. Данная проблема может быть решена с помощью проведения международных рабочих совещаний, на которых несколько лабораторий имеют возможность сравнить свойства моноклональных антител при использовании различных технических приемов. Например, было получено множество различных моноклональных антител к человеческим лейкоцитарным антигенам. Два рабочих совещания (Париж, 1983; Бостон, 1984) организовали тестирование моноклональных антител к антигенам Т-, В-лимфоцитов и клеток миелоидного ряда в цитологической, гистологической и биохимической системах. В результате различные образцы МКА, реагирующие с одним и тем же дифференцировочным антигеном, объединили в группы (кластеры), которым присвоили определенный номер; кроме того, частично были охарактеризованы антигены-мишени. На еще одном, недавно проведенном рабочем совещании были охарактеризованы моноклональные антитела к подклассам IgG человека. Учитывая вышесказанное, можно заключить, что следует продолжать организацию и проведение подобных совещаний. Некоторые препараты моноклональных антител можно приобрести коммерческим путем, однако, к сожалению, зачастую по высокой цене. В какой-то степени это, возможно, будет способствовать получению таких антител в самих центрах при условии, что для крупномасштабных исследований гораздо более выгодно производить свои собственные реагенты. Значительно облегчает работу в области гибридомной технологии и то обстоятельство, что в специальных центрах в США (American Type Collection) и в Европе имеются коллекции замороженных, классифицированных по группам гибридных клонов, которые предоставляются на коммерческой основе всем заинтересованным лицам. Таким образом, многие антитела, которые в настоящий момент чрезмерно дороги, неизбежно станут намного дешевле благодаря наличию альтернативных клонов той же самой специфичности у исследователей-альтруистов и организаторов рабочих совещаний. Однако, даже если цена клона вполне доступна, культивирование его и хранение для последующего использования требуют все же значительных затрат. Поэтому существует большая необходимость в поиске более дешевых путей сохранения клеток животных.

Терапевтическое применение моноклональных антител *in vivo* — это обширная область, представляющая значительный интерес. Для этой цели, очевидно, более предпочтительно использование моноклональных антител человека. Моноклональ-

ные антитела могут быть, например, использованы для диагностики опухолей или элиминации опухолевых клеток. Однако получение клеток плазмацитомы человека для экспериментов по гибридизации натолкнулось на неожиданные трудности. Альтернативным подходом к получению клеточных линий человека, секретирующих моноклональные антитела, может служить методика трансформации с помощью ВЭБ (см. гл. 4). В настоящее время в этой области известно значительное число работ, что гарантирует применение новых подходов. В случае успеха появится возможность выявления многих антигенов (например, HLA), отличных от тех, которые уже были охарактеризованы с помощью антител мыши.

### Литература

1. Kohler G., Milstein C. *Nature*, 256, 495 (1975).
2. Yelton D. E., Margulies D. H., Diamond B., Scharff M. D. In: *Monoclonal Antibodies: Hybridomas — A New Dimension in Biological Analyses*, Kennett R. H., McKearn T. J. and Bechtol K. B. (eds.), Plenum Press, New York, p. 3, 1980.
3. Kozler D., Roder J. C. *Immunol. Today*, 4, 72 (1983).
4. Galfré G., Milstein C. In: *Properties of the Monoclonal Antibodies Produced by Hybridoma Technology and Their Application to the Study of Diseases*, Houba V. and Chan S. H. (eds.) UNDP/World Bank/WHO, p. 1, 1982.
5. Kennett R. H., Davis K. A., Tung A. S., Klinman N. R. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81, 77 (1978).
6. Bastin J. M., Kirkley J., McMichael A. J. In: *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, McMichael A. J. and Fabre J. S. (ed.), Academic Press, New York, p. 503, 1982.
7. Westerwoudt R. J., Blom J., Naipal A. M., Van Rood J. J. *J. Immunol. Methods*, 62, 59 (1983).
8. Fisher A. G., Bunce C. M., Toksoz D., Stone P. C. W., Brown G. *Clin. Exp. Immunol.*, 50, 374 (1982).
9. Sarnesto A., Ranta S., Seppälä I. J. T., Mäkelä O. *Scand. J. Immunol.*, 17, 507 (1983).
10. Phillips D. J., Reimer C. B., Wells T. W., Black C. M. *J. Immunol. Methods*, 3, 315 (1980).
11. Galfré G., Howe S. C., Milstein C., Butcher G. W., Howard J. C. *Nature*, 266, 550 (1977).
12. Schrader J. W., Nossal G. J. V. *Immunol. Rev.*, 53, 61 (1980).
13. Brown G., Kourilsky F. M., Fisher A. G., Bastin J., MacLennan I. C. M. *Hum. Lymphocyte Differ.*, 1, 167 (1981).
14. Anderson K. C., Park E. K., Bates M. P., Leonard R. C. F., Hardy R., Schlossman S. F., Nadler L. M. *J. Immunol.*, 130, 1132 (1983).
15. Ling N. R., Bishops S., Jefferies R. J. *Immunol. Methods*, 15, 279 (1977).



# МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

*Дж. Гордон*

## 1. Некоторые общие положения

### 1.1. Зачем нужны моноклональные антитела человека?

Как уже отмечалось в гл. 3, получение мышинных моноклональных антител можно наладить в любой лаборатории, где имеются соответствующие линии животных и условия для работы с культурами клеток и тканей. По сравнению с этим возможность получения моноклональных антител (МКА) человека остается проблематичной. Поэтому ответим сначала на вопрос: для каких исследований нужны именно такие МКА? Можно сразу же выделить две большие области, где они необходимы. Во-первых, это изучение антигенных систем человека. Для этого необходимы антитела очень тонкой специфичности, способные распознавать аллоантигены. Такие антитела нельзя получить ксеноиммунизацией неприматов, например грызунов, антигенами человека, в частности принадлежащими к столь полиморфной системе, как продукты главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II. Несмотря на многочисленные попытки получения МКА грызунов к антигенам МНС класса II человека, до сих пор никто не располагает препаратами, способными дифференцировать частные специфичности этих антигенов, что необходимо для серотипирования тканей. Ксеноиммунные антитела не позволяют выявлять и аллельные варианты антигена D в резус-системе человека. В настоящее время для определения этого антигена и для иммунотерапии гемолитической анемии новорожденных («голубые младенцы») применяют исключительно сыворотку человека, полученную из крови соответствующих доноров.

Другая область применения МКА человека — это терапия или диагностика заболеваний путем парентеральной инъекции антител. Наибольший интерес в этом отношении представляют попытки лечения рака. Однако при введении больному МКА грызунов в его организме в ответ на чужеродный белок начнут вырабатываться антитела, что может не только свести на нет терапевтический эффект, но и привести к опасным клиническим осложнениям. Проблема усугубляется еще и тем, что из-за резистентности опухолевых клеток к действию иммунных механизмов [1] больному необходимы неоднократные и притом большие дозы антител.

## 1.2. Ограничения, затрудняющие производство моноклональных антител человека

Несмотря на то что потребность в МКА человека совершенно очевидна, в настоящее время известно удивительно мало сообщений об их успешном получении. Причина этому — пока еще не решенные проблемы гибридомной технологии клеток человека. Эти проблемы заслуживают детального рассмотрения, поскольку в них отражаются принципиальные различия стратегий получения МКА человека и грызунов.

Первое, что обращает на себя внимание, — это ограничения в использовании иммунизации. На человеке недопустимо применять те схемы иммунизации, которые у грызунов вызывают максимально интенсивный иммунный ответ. Для получения клеток-предшественников нужной специфичности в большинстве случаев приходится рассчитывать на случайную иммунизацию. Однако это ограничение, по крайней мере в качественном аспекте, оказывается не таким уж строгим, как это может показаться на первый взгляд. Дело в том, что иммунный ответ на многие антигены, к которым требуется получить МКА, возникает естественным образом. Например, при беременности организм матери вырабатывает антитела к отцовским антигенам плода, которые используются для типирования и определения групп крови. Можно найти иммунные В-клетки и у больного раком, если в его крови циркулируют противоопухолевые антитела. Аналогичным образом иммунный ответ возникает в результате вирусных и бактериальных инфекций. И в этом случае можно получать иммунные клетки. Наконец, можно рассчитывать на весь спектр специфичностей нормальных антител индивидуума, включая и аутоантитела. Получение МКА человека, специфичных к собственным антигенам, намного упростило бы изучение патогенеза аутоиммунных заболеваний.

Второе весьма существенное различие между технологиями получения МКА человека и мыши касается источника клеток, синтезирующих иммуноглобулины. Единственный практически доступный источник В-клеток человека — это периферическая кровь. Иногда можно использовать клетки лимфатических узлов, удаленных у больных раком. Периферическая кровь, как известно, очень бедна плазматическими клетками, следовательно, для получения предшественников клеток, образующих антитела, необходимо разработать новые подходы.

Успешному получению МКА человека препятствует и то обстоятельство, что в распоряжении экспериментатора имеется очень мало перевиваемых *in vitro* линий миелом человека, пригодных в качестве партнеров для слияния. Однако эта проблема решается различными путями. Одни исследователи по-

стоянно ведут поиск новых миелом человека, другие используют для гибридизации обычные мышинные миеломы, добиваясь при этом заметных успехов. Кроме того, иногда довольно успешно используются так называемые гетеромиеломы, полученные путем слияния миеломных клеток мыши и человека, обеспечивающие одновременно и стабильность фенотипа, и высокую интенсивность синтеза антител.

Многие из проблем, которые возникают при соматической гибридизации клеток человека, успешно решаются, однако, другим путем. Дело в том, что с помощью вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) можно трансформировать и иммортализовать В-лимфоциты человека (но не мыши), не прибегая к слиянию с клетками миеломы [2, 3]. Применение ВЭБ-трансформации для создания линий-продуцентов представляет собой самое существенное отличие получения МКА человека по сравнению с МКА мыши. Данный метод будет подробно описан ниже.

## **2. Необходимое обеспечение** **(дополнение к списку, который приведен в гл. 3,** **посвященной получению моноклональных антител мыши)**

### **2.1. Вирус Эпштейна-Барр**

Существуют различные источники ВЭБ, но наиболее широко используют линию клеток мармозетки B95-8. Эта линия имеется во многих институтах, однако в случае затруднений автор настоящей главы готов ее предоставить. Весьма желательно, чтобы линия, используемая для репликации вируса, была свободна от микоплазм. В присутствии микоплазм эффективность клонирования В-лимфоцитов, инфицированных ВЭБ, резко падает, так же как и способность к стабильному росту. Проверять линию на контаминацию микоплазмами следует не только при поступлении ее в лабораторию, но и регулярно во время всех пересевов.

Незараженная микоплазмами линия B95-8 растет в виде монослоя, обладающего слабой адгезивностью к подложке. Для культивирования используют среду RPMI-1640, содержащую 8% сыворотки плода коровы (СПК) и стандартную добавку L-глутамина, антибиотиков и, если необходимо, фунгицидов. Как правило, линию выращивают в стандартных флаконах для культивирования, поместив их горизонтально в термостат во влажную атмосферу, содержащую 5% CO<sub>2</sub>. Для посева культуры нужно плотно завернуть крышку и, встряхивая флакон, добиться отделения части клеток от пластика, затем перенести их в новый флакон. При нормальной скорости роста это надо делать 1—2 раза в неделю.

Линия В95-8 спонтанно выделяет в среду вирус Эпштейна — Барр. Для получения достаточного количества вируса, вначале выращивают клетки до состояния сплошного монослоя, затем плотно закручивают крышку флакона и оставляют его в термостате на 10—14 дней. По истечении этого времени культуральная жидкость пожелтеет. Ее сливают из флакона и в асептических условиях фильтруют через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм, чтобы освободить от клеток и дебриса. Применение мембран с более мелкими порами *нецелесообразно* из-за неизбежных потерь вируса. Если вирус не будет использован в тот же день, фильтрат разливают на небольшие порции, каждая из которых достаточна для заражения примерно  $5 \cdot 10^6$  клеток, и хранят при  $-70^\circ\text{C}$ . Обычно такая порция имеет объем около 2 мл. Имеет смысл заготовить большую партию содержащего вирус фильтрата, инфекционность которого установлена при титровании одной порции. Лучший и наиболее быстрый способ оценки активности вируса — это определение его титра по стимуляции синтеза ДНК в В-лимфоцитах. Синтез ДНК определяют по включению [ $^3\text{H}$ ]-тимидина на 3-й день после заражения. Описание этого простого метода читатель найдет в литературе [4]. При необходимости можно осадить вирус из отработанной среды центрифугированием и, суспендировав его в меньшем объеме свежей среды, хранить, разлив на небольшие порции, при  $-70^\circ\text{C}$ . Эта процедура имеет двойное преимущество, поскольку, во-первых, вирус будет сконцентрирован, а во-вторых, удален из кислой среды, которая может повредить инфицируемые клетки.

## 2.2. Фидерные клетки

В качестве лучшего фидерного слоя для клонирования ВЭБ-трансформированных клеток предлагались самые разные типы клеток. Чаще других применяют мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и фибробласты, в частности легочные фибробласты плода человека. Проще всего получить МКПК, выделение которых описано ниже. Известны различные источники МКПК. Можно, например, использовать клетки, которые остаются после выделения лимфоцитов, связавшихся с исследуемым антигеном (см. разд. 3.2). Другой вариант — использовать кровь любого здорового донора. Целесообразно испытать в качестве фидерного слоя клетки от нескольких доноров и выбрать лучшие. Вне зависимости от особенностей донорской крови процедура выделения МКПК относительно проста.

1. Кровь, разведенную PBS в соотношении 1:2, наслаивают на равный объем градиента плотности типа фиколл-пак (Pharmacia, Швеция).

2. После центрифугирования градиента с нанесенной кровью в течение 20 мин при 400 g собирают пипеткой слой клеток на границе раздела фаз, трижды отмывают средой RPMI-1640 и суспендируют в полной среде до конечной концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл.

3. По 100 мкл клеточной взвеси вносят в лунки 96-луночной панели для культивирования.

4. Подвергают клетки  $\gamma$ -облучению в дозе 4000 рад примерно за 1—2 ч до рассева ВЭБ-трансформированных лимфоцитов.

### 2.3. Партнеры для гибридизации

В настоящее время для соматической гибридизации В-клеток человека можно воспользоваться одним из четырех партнеров:

1. Линии миеломных клеток человека [5].
2. Линии ВЭБ-трансформированных лимфобластоидных клеток человека [6].
3. Линии мышинных плазмацитом [7].
4. Гетеромиеломы [8].

Используемая линия должна быть дефектна по гену гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, а в идеальном случае обладать и маркером резистентности, например к уабаину, к которому чувствителен второй партнер по гибридизации. Это необходимо в связи с тем, что в отличие от В-клеток грызунов используемые В-клетки человека сами могут быть иммортализованы в результате ВЭБ-трансформации. Более подробную информацию о партнерах для гибридизации читатель найдет в литературе, указанной в конце настоящей главы. Практически все упомянутые авторы готовы выслать нужные линии в ответ на письменный запрос. Выбор того или иного партнера для гибридизации определяется исключительно волей экспериментатора, однако наиболее успешные, на наш взгляд, результаты дает использование мышинных плазмацитом, а также гетеромиелом.

## 3. Получение моноклональных антител человека путем ВЭБ-трансформации В-лимфоцитов

### 3.1. Введение

Конкретный план экспериментов, включая выбор донора, получение и очистку клеток-предшественников, а также методы выявления МКА, определяется природой выбранного антигена. Прежде чем начать работу, которая может оказаться весьма трудоемкой, экспериментатор должен быть уверен, во-первых, в реальной возможности получения достаточного количества

клеток-предшественников и, во-вторых, в существовании простого метода быстрого выявления антител нужной специфичности, дающего однозначные результаты. Для простоты мы изложим современный подход к получению МКА человека на примере антител к резус D (RhD)-антигену. Отклонения от стандартной схемы, необходимые при работе с другими антигенными системами, будут обсуждаться ниже. Мы выбрали в качестве модели именно антиген RhD, потому что эта наиболее подробно изученная на сегодня система позволяет делать необходимые сравнения и предлагать оптимальные подходы.

Основная программа эксперимента — накопление, размножение и клонирование клеток, продуцирующих нужные антитела, и в конечном счете получение стабильных клонов путем гибридизации.

### 3.2. Подготовка клеток к заражению ВЭБ

Взвесь МКПК, приготовленных по методу, описанному в разд. 2.2, состоит из моноцитов, Т- и В-лимфоцитов. В-лимфоциты составляют 5—10% от общего числа клеток, и в лучшем случае лишь 1% всех В-лимфоцитов синтезирует антитела нужной специфичности. Если на этой стадии сконцентрировать интересующие нас клетки, это существенно уменьшит объем дальнейшей работы. Можно выбрать один из трех способов накопления нужных клеток:

1. Можно заразить МКПК вирусом и культивировать без разделения. В такие неразделенные культуры необходимо добавлять фитогемагглютинин, иначе появившиеся специфические цитотоксические Т-лимфоциты вызовут гибель, ВЭБ-трансформированных В-лимфоцитов [9]. Если же непосредственно после заражения провести клонирование инфицированных клеток, то добавление фитогемагглютинина необязательно, поскольку популяция цитотоксических Т-клеток будет сильно разбавлена.

2. Перед заражением из взвеси МКПК можно удалить Т-лимфоциты путем розетирования с отмытыми эритроцитами барана. Для этого взвесь МКПК в концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл в среде RPMI-1640, содержащей 10% СПК, смешивают с равным объемом 2%-ной взвеси отмытых эритроцитов барана в PBS. После 5-мин инкубации при 37 °C клетки осаждают, осторожно центрифугируя при 150 g в течение 3 мин, и после этого инкубируют на льду 1 ч. Затем клеточный осадок ресуспендируют, слегка встряхивая пробирку. Далее клетки наслаивают на равный объем смеси фикол-пак и центрифугируют 20 мин при 400 g, после чего собирают фракцию клеток, расположенных на границе раздела фаз и трижды отмывают в

РPMI-1640. Выделенные клетки представляют собой моноциты и В-лимфоциты.

3. Можно непосредственно сконцентрировать и В-лимфоциты, синтезирующие антитела нужной специфичности. Это осуществляют вслед за только что описанной процедурой удаления Т-лимфоцитов (или без нее). В целом особенности выделения В-лимфоцитов зависят от конкретного антигена; в некоторых случаях сконцентрировать В-клетки вообще невозможно и приходится использовать варианты 1 или 2. Однако для селективного выделения В-клеток, образующих антитела к RhD-антигену, очень удобно использовать простую реакцию розетирования. Методика очень похожа на удаление Т-клеток (вариант 2), за исключением того, что лимфоциты образуют розетки с отмытыми эритроцитами RhD-положительного донора (группа крови 0), и последующая инкубация при 37°C не обязательна. Кроме того, собирают клетки, прошедшие сквозь градиент, а не расположенные на границе раздела фаз. Собранные клетки затем заражают ВЭБ.

### 3.3. Заражение клеток вирусом Эпштейна — Барр

1. Клетки, полученные согласно описанной выше методике (варианты 1—3), осаждают центрифугированием и ресуспендируют в среде, содержащей вирус, до конечной концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл.

2. Инкубируют клетки с вирусом 1,5 ч на водяной бане при 37°C, перемешивая взвесь каждые 15 мин.

3. Клетки однократно отмывают и суспендируют в полной среде (RPMI-1640 + 10% СПК, антибиотики и фунгициды) для культивирования. Если приготовлена обогащенная фракция В-клеток, рекомендуется добавить в среду 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М.

### 3.4. Размножение ВЭБ-трансформированных В-клеток

После заражения ВЭБ можно увеличить количество клеток, размножая их *in vitro*. Взвесь, содержащую  $2 \cdot 10^6$  зараженных клеток в 1 мл полной среды, помещают в культуральную посуду подходящего размера. Лучше использовать флаконы для культивирования с плоским дном, поскольку в них рост клеток легко оценить на глаз. Если из исходной взвеси не были удалены Т-клетки, то в течение первой недели культивирования в среду необходимо добавлять фитогемагглютинин (например, Gibco, 1:100). Через четыре дня культивирования можно увидеть, что некоторые клетки образуют агломераты, в то время как другие явно погибают. Размножающиеся клетки — это не что иное, как успешно трансформированные В-лимфоциты.

Через одну-две недели уже можно проверить, содержатся ли в культуральной среде искомые антитела. Если результат отрицательный, продолжать культивирование, разумеется, бессмысленно. Если же антитела обнаружены, предстоит выбрать один из двух вариантов для продолжения работы.

### **3.5. Селекция клеток, образующих антитела нужной специфичности, с помощью соответствующего антигена. Получение моноклональной культуры**

Исследователи, впервые пытавшиеся получить моноклональные антитела путем ВЭБ-трансформации В-лимфоцитов, наблюдали быстрое прекращение продукции антител при культивировании необогащенной взвеси клеток. Клетки, образующие антитела нужной специфичности, вытеснялись клетками, синтезирующими иммуноглобулины посторонней специфичности. Чтобы решить эту проблему, были предприняты попытки повысить в культуре концентрацию клеток, синтезирующих нужные антитела [10]. Теоретически это должно в конце концов привести к появлению моноспецифичной линии или по крайней мере к значительному росту числа клеток, образующих нужные антитела. Имеются сообщения о том, что с помощью этого подхода можно добиться успеха.

Для отбора В-клеток, образующих антитела к антигену RhD, можно воспользоваться описанной выше методикой розеттирования с эритроцитами. Для других антигенов могут потребоваться иные методы обогащения культуры, которые мы обсудим ниже. С помощью таких приемов можно наращивать синтез антител до тех пор, пока культура не станет моноклональной или по крайней мере моноспецифичной.

### **3.6. Клонирование линий клеток, образующих антитела**

В качестве альтернативы описанному выше подходу или дополнения к нему, для размножения клеток, образующих антитела, и доведения культуры до состояния моноклональности можно использовать простые методы клонирования. Одни исследователи проводят клонирование на как можно более ранних стадиях культивирования, т. е. непосредственно после заражения клеток ВЭБ [11]. Другие дают ВЭБ-зараженным клеткам подрасти и затем клонируют их [12]. Преимущество клонирования заключается в том, что культивируемая линия клеток, образующих антитела, с самого начала становится моноклональной. Непреодолимый недостаток клонирования, особенно в тех случаях, когда не применяется обогащение кле-



**Таблица 4.1. Методика получения моноклональных антител в неразделенных культурах МКПК человека**

1. Выращивают ВЭБ-трансформированные клетки в течение 2—3 нед.
2. Выявляют синтезированные антитела.
3. Рассеивают взвесь клеток (по  $10^4$ ) в лунки двух панелей для микротитрования (площадь дна лунки =  $0,32 \text{ см}^2$ ).
4. Выращивают клетки в течение 3—5 дней.
5. Выявляют продукцию антител.
6. Засевают от 10 до 1000 клеток, синтезирующих антитела, в лунки, содержащие фидерный слой.
7. Культивируют клетки еще 3—5 дней (а возможно, и дольше для того, чтобы наблюдать рост в лунках, засеянных малым числом клеток), а затем выявляют продукцию антител.
8. На данном этапе можно с помощью изоэлектрофокусирования (ИЗЭФ) оценить моноклональность образующихся антител, и, если требуется, культуру реклонировать.

ток, образующих антитела, состоит в том, что число лунок, которое требуется анализировать на каждом этапе, может быть чрезмерно большим. Ясно, что требуется найти компромисс. В табл. 4.1 приведена методика получения МКА в культурах неразделенных МКПК, в которой найдено равновесие между стремлением добиться моноклональности клеток, образующих антитела, и желанием ограничить число анализируемых микрокультур. Эта методика дает наилучшие результаты, если до заражения ВЭБ проводят и обогащение культуры клетками-продуцентами. Если же это невозможно, рекомендуется начать с удаления из взвеси МКПК Т-клеток (см. выше).

### 3.7. Стабилизация клеточных клонов, образующих антитела

В некоторых случаях клоны трансформированных ВЭБ клеток становятся истинно бессмертными линиями. Однако, как показывает опыт многих исследователей, большая часть ВЭБ-трансформированных клонов утрачивает способность к росту или образованию антител [12]. Кроме того, даже если клон остается стабильным, его уровень продукции антител может быть весьма низким. Именно поэтому в настоящее время все больше внимания уделяется попыткам гибридизации ВЭБ-трансформированных клеток со стабильными клеточными линиями, чтобы получить стабильные клоны, активно синтезирующие антитела.

Принципы гибридизации те же, что были описаны в гл. 2 для получения моноклональных антител грызунов. Возможные кандидаты в партнеры для слияния также были описаны выше.

В отличие от нормальных иммунных клеток ВЭБ-трансформированные лимфоциты обладают собственной высокой ростовой активностью, поэтому отбор гибридом может встретить за-

труднения. Однако гибридизацию проводят потому, что клоны не стабильны или синтезируют мало антител. Именно эти свойства можно использовать при селекции гибридом для устранения неслившихся клеток, образующих антитела. В том, что гибридизация прошла успешно, можно убедиться с помощью кариологического анализа. Однако чаще достаточно просто наблюдать морфологические изменения, которые вызывает гибридизация ВЭБ-трансформированных клеток с мышиной, человеческой миеломой или гетеромиеломой. Лучше всего производить слияние с партнерами, несущими маркер резистентности, например устойчивости к убаину.

### **3.8. Получение моноклональных антител в препаративных количествах**

В отличие от гибридом грызунов клетки человека, образующие антитела, разумеется, невозможно выращивать в брюшной полости сингенного хозяина. Однако исследуется возможность размножения клеток человека в брюшинной полости крыс и мышей *nude*. Большинство же препаратов МКА человека в настоящее время получают непосредственно в виде культуральной среды. Если антитела предполагается использовать для диагностических целей, достаточно просто профильтровать среду через мембрану с диаметром пор 0,2 мкм, чтобы удалить небольшую примесь вируса, который может латентно инфицировать лимфобластоидные клеточные линии.

Если же предполагается использовать полученные антитела для парентерального введения, необходимо принять более серьезные меры для нейтрализации потенциально опасного действия ВЭБ (особенно если больная находится в состоянии иммуносупрессии). Чтобы инактивировать вирус, можно, например, подвергнуть культуральную среду или препарат антител интенсивному ультрафиолетовому облучению.

## **4. Другие методы получения моноклональных антител человека**

Предыдущий раздел может служить руководством для тех, кому необходимо получить МКА человека. Однако для решения той же задачи существуют и другие подходы, с которыми читателю целесообразно ознакомиться. В большинстве других методик используется не ВЭБ-трансформация, а гибридизация клеток. В некоторых работах свежевыделенные клетки периферической крови сразу же сливали с перевиваемыми клеточными линиями [13]. В других — перед слиянием клетки стимулировали митогенами [14]. В-лимфоциты, очевидно, гибридизуются

лучше, чем клетки, находящиеся в состоянии покоя. Однако ни в одной из упомянутых работ не указана специфичность антител, которые удалось получить в результате гибридизации. Стремясь увеличить число клеток-предшественников нужной специфичности, некоторые исследователи пытались, и, по-видимому, небезуспешно, произвести перед слиянием иммунизацию *in vitro* [15]. Для того чтобы еще больше повысить вероятность успеха, такой подход можно совместить с накоплением В-клеток, образующих антитела нужной специфичности.

Как уже упоминалось, каждая антигенная система требует своего особого метода накопления соответствующих В-клеток. Метод накопления нужных В-клеток с помощью розетирования мы уже обсуждали в связи с получением МКА к антигену RhD. Данный метод вполне пригоден и для получения МКА к другим групповым антигенам крови. Для получения МКА к столбнячному анатоксину был описан другой прием: использовали антиген, конъюгированный с флуоресцентном, и затем выделяли связавшие метку клетки с помощью флуоресцентного сортера [16]. Если возникнет необходимость, у исследователей хватит изобретательности, чтобы разработать способ выделения В-клеток, специфичных к любой антигенной детерминанте.

### Литература

1. Gordon J., Abdul-Ahad A. K., Hamblin T. J., Stevenson F. K., Stevenson G. T. Br. J. Cancer, **49**, 547 (1984).
2. Steinitz M., Klein G., Koskimes S., Maekla O. Nature, **269**, 420 (1977).
3. Steinitz M., Sappela I., Eichmann J., Klein G. Immunology, **156**, 41 (1979).
4. Robinson J., Miller G. J. Virol., **15**, 1065 (1975).
5. Pickering J. W., Gelder F. B. J. Immunol., **129**, 406 (1982).
6. Kozbor D., Lagarde A. E., Roder J. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6651 (1982).
7. Kozbor D., Roder J. C., Chang T. H., Steplewski Z., Koprowski H. Hybridoma, **1**, 323 (1982).
8. Teng N. N. H., Kaplan H. S., Hebert J. M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1790 (1985).
9. Moss D. J., Scott W., Pope J. H. Nature, **268**, 735 (1977).
10. Boylston A. W., Gardner B., Anderson R. L., Hughes-Jones N. C. Scand. J. Immunol., **12**, 355 (1980).
11. Rosen A., Persson K., Klein G. J. Immunol., **130**, 2899 (1983).
12. Melamed M., Gordon J., Ley S. C., Edgar D. H., Huges-Jones N. C. Eur. J. Immunol., **15**, 742 (1985).
13. Croce C. M., Linnenbach A., Hall W., Steplewski Z., Koprowski H. Nature, **288**, 488 (1980).
14. Chiorazzi N., Wasserman R. L., Kunkel H. E. J. Exp. Med., **156**, 930 (1982).
15. Kozbor D., Roder J. C. Eur. J. Immunol., **14**, 23 (1984).
16. Kozbor D., Roder J. C. J. Immunol., **127**, 1275 (1981).

# ИММУНОАФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

*Ж. Арве и А. Ф. Уильямс*

## 1. Введение

Очистка поликлональных антител путем специфического связывания с нерастворимым антигеном всесторонне разрабатывалась как один из видов аффинной хроматографии [1] и вошла в широкую практику после открытия бромциановой активации, позволяющей присоединять содержащие аминокислотные группы лиганды к гранулированной полисахаридной матрице, в частности к агарозной [2, 3].

Несмотря на сравнительную простоту аффинной очистки антител, обратная процедура, а именно очистка антигена на колонке с иммобилизованными антителами, была, как правило, неэффективной. Дело в том, что для получения специфической антисыворотки обычно требуется чистый антиген, а его легче очистить традиционными методами, чем при помощи колонки с иммобилизованными специфическими поликлональными иммуноглобулинами. Одна из причин неэффективности колоночной очистки в данном случае заключалась в том, что специфические антитела составляют весьма незначительную долю всех иммобилизованных иммуноглобулинов.

Колонки с иммобилизованными поликлональными антителами, выделенными из сыворотки продуцентов, иммунизированных частично очищенным антигеном, все же оказывались полезными в ряде случаев. С помощью таких колонок удалось увеличить степень очистки некоторых вирусных ферментов [4] и интерферона человека [5], они использовались для первичной очистки антигенов клеточной поверхности Thy-1 и HLA. Тимокитарный антиген Thy-1 был аффинно очищен на колонке с антителами к полуочищенному мозговому Thy-1 [6], а нативная димерная форма HLA была выделена с помощью иммобилизованных антител к  $\beta_2$ -2-микроглобулину, который представляет собой легкую цепь этого димера и может быть в свою очередь получен из мочи при патологии почек [7].

Проще всего использовать колонки с иммобилизованными поликлональными антителами для очистки антигена от незначительных примесей, если эти примеси не ассоциированы с его молекулами [8]. Можно использовать специфическую антисыворотку с высоким содержанием антител к примесям или вы-

делить из нее чистые антитела, а емкость колонки, как правило, будет достаточной, поскольку количество вещества, от которого надо избавиться, очень мало.

Проблема получения специфических антител при отсутствии чистого антигена была решена с разработкой технологии получения моноклональных антител (МКА) [9], позволяющей выделять антитела к индивидуальным компонентам любой сложной смеси антигенов [10]. Очень скоро МКА были использованы в аффинной хроматографии — вначале для очистки антигенов клеточной поверхности [11, 12], а затем для выделения множества других белков [13, 14].

Помимо высокой специфичности МКА имеют еще два существенных отличия от поликлональных антител.

1. В препарате МКА (даже в виде асцитной жидкости) фактически все молекулы иммуноглобулина представляют собой антитела нужной специфичности в отличие от препарата поликлональных антител, в котором самое большее 20% молекул иммуноглобулина, а зачастую и намного меньше имеют необходимую специфичность. Это значит, что, используя МКА, можно приготовить аффинные колонки очень высокой емкости, пусть даже не достигающие теоретически возможной (см. ниже).

2. Каждый образец МКА обладает уникальными характеристиками кинетики и прочности связывания с антигеном и, как правило, распознает только одну его детерминанту.

Разнообразием индивидуальных свойств, которыми обладают МКА, можно воспользоваться, например, для выбора образца, обладающего нужными характеристиками (хотя, к сожалению, изредка встречаются образцы МКА с непригодными свойствами).

Монодетерминантное связывание МКА по сравнению с полидетерминантным создает лучшие условия для элюции антигена, связанного с колонкой. Правда, и при работе с поликлональными антителами в большинстве случаев каждая специфически связывающая молекула иммуноглобулина фиксирована на носителе колонки в окружении неактивных молекул, поэтому связывания более чем с одной детерминантой, как правило, не происходит.

На практике колонки с достаточно аффинными МКА всегда можно с пользой применить для очистки антигена, в то время как колонки с поликлональными антителами нередко для этого непригодны. На наш взгляд, основная причина широкого применения иммобилизованных МКА для аффинной очистки — это возможность их получения в препаративных количествах, иммунизируя продуцентов неочищенными антигенами.

В настоящей главе мы, во-первых, опишем методы очистки кроличьих поликлональных антител к мышинным и крысиным

Ig. Эти реагенты используются в серологических реакциях в качестве вторых антител для выявления связанных с антигенами МКА. Во-вторых, мы обсудим аффинную хроматографию с использованием МКА. Поскольку все частные приложения данного метода рассмотреть невозможно, мы сосредоточим внимание на принципах и схемах выделения антигенов клеточной поверхности в надежде, что таким образом нам удастся проиллюстрировать основные детали аффинной хроматографии при очистке других молекул. Детально мы опишем лишь те методы, которые многократно применялись в нашей лаборатории, а для всех прочих методов дадим (там, где это возможно) ссылки на соответствующие источники.

## **2. Буферные растворы**

### **2.1. DAB**

Физиологический буфер Дюльбекко АВ фирмы Oxoid Ltd., Великобритания.

### **2.2. Забуференные трисом растворы NaCl (трис/NaCl)**

Растворы NaCl, концентрация которых указана в каждом случае, содержащие 25 мМ трис-HCl, pH 7,4, и 0,02% NaN<sub>3</sub>.

### **2.3. Трис-буферы, содержащие дезоксихолат**

10 мМ трис-HCl, pH 8,2 (при комнатной температуре) или pH 8,5 при 4 °C, содержащий 0,02% NaN<sub>3</sub> и дезоксихолат натрия в указанной концентрации.

### **2.4. Трис-буфер, pH 8**

10 мМ трис-HCl-буфер, pH 8, содержащий 0,02% NaN<sub>3</sub>.

### **2.5. Буфер для элюции с высоким pH**

50 мМ HCl-диэтиламиновый буфер, pH 11,5, содержащий 0,5% дезоксихолата натрия.

## **3. Очистка антииммуноглобулиновых антител кролика**

Как показано на рис. 5.1, очищенные антитела к Ig — это важный реагент при серологическом использовании МКА. В настоящее время известны коммерческие препараты таких антител, но они слишком дорого стоят для того, чтобы их использо-

вать при очистке клеток с помощью розетирования или пэннинга<sup>1</sup>. Для количественного анализа, а также во избежание связывания с Fc-рецепторами клеток, чистые антитела расщепляют до F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов [16]. Иногда вместо поликлональных антител в качестве вторых антител используют МКА к Ig, однако это снижает чувствительность метода, поскольку с одной молекулой первого антитела в этом случае связывается лишь одна молекула второго. До сих пор не удается подобрать смесь МКА, которая бы полноценно заменила кроличьи поликлональные анти-Ig-антитела. Условия эксперимента могут иногда потребовать использования кроличьих антител, специфичных к Fab-фрагментам, L-цепям или Fc-фрагментам первых антител. Кроме того, всегда существует проблема перекрестных реакций антиглобулиновых антител с собственными Ig, фиксированными в исследуемой ткани. Так бывает, в частности, когда МКА мыши используются для изучения крысиных тканей, или наоборот, поскольку кроличьи антитела к Ig, например, мыши дают значительную перекрестную реакцию с Ig крысы. Кроличьи антитела к Ig грызунов практически не дают перекрестных реакций с Ig других видов животных. В любом случае молекулы антител, обладающие перекрестной активностью, легко удалить на соответствующей аффинной колонке или заблокировать, добавив в среду IgG или сыворотку. Ниже приведена схема получения кроличьих антител к IgG мыши, которые не дают перекрестных реакций с IgG крысы.

### 3.1. Выделение мышинового или крысиного IgG

См. гл. 2. Мы используем этот метод для выделения IgG как мыши, так и крысы, стараясь фракционировать одновременно по возможности больший объем сыворотки. Краткая схема выделения приведена ниже:

1. 100 мл мышиной или крысиной сыворотки центрифугируют (более 10 000 g) в течение 30 мин, отделяют супернатант, добавляют к нему Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до концентрации 18% (вес на объем) и затем инкубируют 30 мин при 37 °C.

2. Центрифугируют при 5000 g в течение 15 мин при 25 °C и собирают осадок.

---

<sup>1</sup> Пэннинг — метод очистки клеток с помощью антител, иммобилизованных на пластике. Антитела иммобилизуют на пластиковой чашке Петри, затем наливают в нее суспензию клеток. После того как часть клеток свяжется с антителами, суспензию сливают. Процедуру можно повторить несколько раз. В зависимости от задачи эксперимента очищаемая фракция будет содержаться в суспензии или на чашках. С чашек клетки удаляют интенсивным перемешиванием. — *Прим. перев.*

Клетка-мишень + X + моноклональные антитела анти-X

Отмывание

X анти-X

Иммуобилизованными в лунках панели

Или

растворимый антиген X, адсорбированный в лунках панели для микротитрования

Или

Антиген X, адсорбированный на нитроцеллюлозе

Инкабуляция с антителами к Ig

Конъюгированными с коллоидным золотом 125I

Конъюгированными с ферментом

Конъюгированными с пероксидазой

Конъюгированными с флуоресцентом

Конъюгированными с эритроцитами

Электронная микроскопия

γ-счетчик

Фермент

Цитофлуориметрия (FACS)

Розетирование для удаления клеток

Пэнинг для накопления клеток

Рис. 5.1. Использование очищенных антител к  $\mu$ g в различных вариантах непрямой реакции связывания с МКА



3. Суспендируют осадок в 33 мл воды, добавляют  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  до концентрации 16% и вновь собирают осадок центрифугированием.

4. Суспендируют осадок в 25 мл воды и диализуют трижды против 1 л буфера трис/50 мМ NaCl при 4°C.

5. pH и кондуктометрические характеристики диализованного IgG должны совпадать с соответствующими параметрами буфера, используемого при диализе.

6. Центрифугируют для удаления нерастворимого материала и определяют оптическую плотность при длине волны 280 и 260 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Отношение поглощения при 280 нм к поглощению при 260 нм примерно должно составлять 1,6; определяют концентрацию белка в мг/мл, разделив величину поглощения при 280 нм на 1,4. Из 100 мл мышиной сыворотки можно выделить до 360 мг белка (IgG).

7. Наносят материал на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой объемом 50 мл (например, Whatman DE-52) в том же буфере и собирают несвязавшуюся фракцию. Она должна содержать около 180 мг белка, представляющего собой в основном IgG. Препарат можно подвергнуть дальнейшей очистке с помощью гель-фильтрации на колонке с сефакрилом S300 в буфере трис/150 мМ NaCl.

Чистоту препарата проверяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Препарат мышиных IgG содержит IgG1, IgG2a и IgG2b, а крысиных в основном — IgG2a, IgG2b и IgG2c. В каждом случае именно к этим подклассам обычно принадлежат МКА.

### 3.2. Иммунизация

Для иммунизации используют наиболее чистые препараты IgG.

1. Вводят четырем кроликам внутримышечно по 0,5—1 мг мышиных IgG в полном адьюванте Фрейнда (см. гл. 2) в левое, а затем через неделю в правое бедро.

2. Через месяц после первой инъекции берут кровь и определяют в сыворотке содержание антител методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле (см. гл. 6) либо непрямым методом по связыванию на пластиковых панелях для микротитрования, нагруженных мышиным IgG.

3. При низком содержании антител кроликов повторно иммунизируют, вводя каждому внутривбрюшинно по 0,5—1,0 мг

адсорбированного на квасцах IgG (см. гл. 2). Повторную иммунизацию можно сделать и подкожно в неполном адъюванте Фрейнда или внутривенно без адъюванта. Антисыворотка должна содержать около 2 мг/мл антител к IgG.

4. Собирают достаточно большой объем сыворотки (например, 500 мл), инкубируют ее при 56°C в течение 30 мин, а затем перед аффинной хроматографией центрифугируют при 40 000 g в течение 30 мин.

### 3.3. Очистка антител [16]

Все этапы выполняют при 4°C.

1. Мышиный или крысинный IgG присоединяют к гранулам сефарозы CL-4B (см. ниже). Конечная концентрация иммобилизованного белка должна составлять около 10 мг/мл геля. Приготавливают колонки объемом по крайней мере 20 мл (мы обычно работаем с колонками объемом 40 мл). Каждую колонку промывают 150 мл 1M пропионовой кислоты, а затем буфером трис/500 mM NaCl.

2. Антисыворотку к IgG мыши наносят на колонку с крысиным IgG, подавая примерно 1 объем колонки в час, и проверяют полноту истощения вышедших из колонки фракций от перекрестно реагирующих антител. Затем все эти фракции объединяют и наносят на колонку с IgG мыши. Определяют содержание антител к Ig мыши в вышедших из колонки фракциях до полного насыщения колонки. Далее обе колонки промывают буфером трис/500 mM NaCl до тех пор, пока оптическая плотность элюата при 280 нм (1 см) не станет меньше 0,05.

3. Проводят элюцию 1M пропионовой кислотой. По мере элюирования определяют оптическую плотность фракции: во фракциях с наибольшим содержанием антител может появиться помутнение. Препарат следует немедленно нейтрализовать сухим трисом. После элюции вновь уравнивают колонку буфером трис/150 mM NaCl. Если не предполагается получать из антител F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, то элюат просто диализуют против буфера трис/150 mM NaCl или другого, выбранного буфера. Количество чистого IgG, элюируемого с колонки, насыщенной антителами, приблизительно равно количеству иммобилизованного IgG.

4. Для получения F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов элюат диализуют против 0,1 M Na-ацетатного буфера, pH 4,4 и добавляют до 2% (по весу) пепсин. Концентрация антител должна превышать 10 мг/мл. Если она недостаточна, препарат концентрируют ультрафильтрацией. Инкубируют 6—8 ч при 37°C, затем добавляют еще 1% (по весу) пепсина и инкубируют смесь в течение 12 ч. (Можно и более точно определить продолжительность

ферментативного гидролиза, сравнивая между собой электрофореграммы проб, взятых в разное время из гидролизуемой смеси и исследованных методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН до и после восстановления.) После окончания инкубации значение рН доводят трисом до 7 и отделяют  $F(ab')_2$  от других фрагментов с помощью гель-фильтрации на Сефакриле S200 (Pharmacia, Швеция) в буфере трис/150 мМ NaCl. Гель-фильтрация контролируется по оптической плотности элюата при 280 нм и с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Обычный выход  $F(ab')_2$ -фрагментов около 50% от веса ферментируемого IgG, что составляет 75% теоретически возможного выхода.

5. Препарат концентрируют ультрафильтрацией до нужной степени и хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. Аффинная хроматография с использованием моноклональных антител

##### 4.1. Антитела для приготовления иммуносорбента

При использовании аффинной хроматографии для выделения антигена из раствора используют антитела, иммобилизованные на нерастворимом носителе. При этом ключевым параметром иммуносорбции становится аффинность моновалентного взаимодействия [17]. Благодаря высокой концентрации МКА, присоединенных к гелю, связывание антигена, как правило, происходит достаточно быстро, и лишь в исключительных случаях кинетические параметры иммуносорбции требуют скорости потока меньшей, чем обычно используемая — один объем колонки в час. Выявление МКА обычно основано на поливалентном связывании с антигеном (см. рис. 5.1), в котором участвуют как низко-, так и высокоаффинные антитела. Однако для аффинной хроматографии требуются антитела, обеспечивающие моновалентное связывание. Поэтому среди имеющихся МКА необходимо провести дополнительный отбор препаратов, обладающих нужной аффинностью. Это можно сделать, например, по способности МКА вызывать иммунопреципитацию антигена или по торможению растворимым (моновалентным) антигеном связывания с поливалентным антигеном, иммобилизованным на поверхности клеток или пластиковых панелей [17]. На рис. 5.2 схематично изображены взаимодействия, возможные при реакции торможения. Очевидно, торможение происходит лишь в том случае, если время диссоциации 50% моновалентных связей примерно равно или превышает время проведения самого анализа. Антитела, у которых  $t_{1/2}$  составляет более 10 мин,

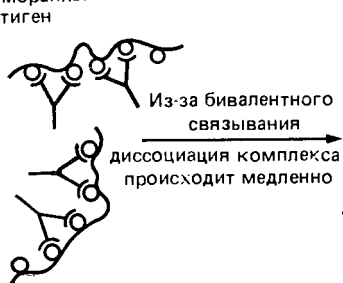
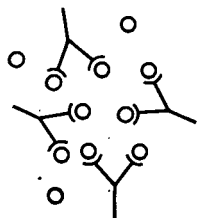
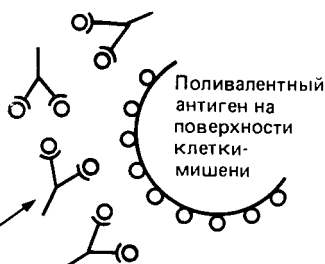
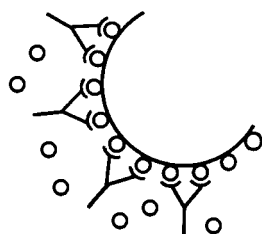
ПреинкубацияОпределение  
несвязавшихся антителПоливалентный  
мембранный  
антигенСвязывание  
блокированоМоновалентный антиген  
(в присутствии детергента)Медленная  
диссоциацияБыстрая  
диссоциацияСвязывание  
блокированоВозможно  
бивалентное  
связывание  
с клеткой-  
мишенью

Рис. 5.2. Зависимость подавления связывания антител с моно- или поливалентным антигеном определяется скоростью диссоциации иммунных комплексов

обычно имеют аффинность к белковым антигенам выше  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , что достаточно для аффинной хроматографии [18].

Для того чтобы выделить высокоаффинные МКА, лучше всего получать В-клетки от гипериммунизированных животных, дающих сильный вторичный иммунный ответ с преобладанием высокоаффинных IgG. Применение же IgM в аффинной хроматографии, насколько нам известно, никогда не было успешным.

Однако использование чрезмерно аффинных антител, по-видимому, нецелесообразно, поскольку может быть затруднена элюция связанного антигена. Правда, аффинность в диссоциирующих условиях необязательно коррелирует с аффинностью в физиологических условиях (т. е. при связывании). Поэтому в любом случае аффинность должна быть достаточно высокой для того, чтобы антиген эффективно задерживался колонкой во время нанесения на нее антигенсодержащего экстракта и при отмывании.

Применяя МКА к антигенам клеточной поверхности, необходимо учитывать, к каким детерминантам — белковым или углеводным — они специфичны. Каждый антиген обычно имеет уникальные белковые детерминанты, но даже в тех случаях, когда существует перекрестная реактивность с посторонними молекулами, аффинность антител к ним будет слишком низка, чтобы вызвать какие-либо затруднения. Углеводные же детерминанты, наоборот, часто бывают одинаковы у целого ряда гликопротеинов и гликолипидов, поэтому с помощью антител к углеводным частям антигенов клеточной поверхности нельзя добиться нужной степени очистки. Правда, при использовании МКА к гликопротеинам млекопитающих эта проблема не возникает. Среди таких МКА преобладают антитела к белковым детерминантам, возможно, потому что большинство углеводных структур многих видов млекопитающих весьма сходны друг с другом и поэтому не вызывают иммунного ответа у иммунизируемого животного. Однако в природе встречаются и чрезвычайно иммуногенные углеводы. Например, большинство МКА к гликопротеину миксомицет связываются с углеводной детерминантой, общей для множества различных мембранных молекул [19].

## 4.2. Выделение моноклональных IgG

Мы выделяем МКА класса G из асцитной жидкости, содержащей обычно более 2 мг/мл антител. Используется метод, применяемый для фракционирования мышинной сыворотки (см. разд. 3.1), но при этом обе стадии высаливания проводят, добавляя  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  до 18% (по весу), и исключают гель-фильтрацию. В ходе очистки необходимо контролировать активность МКА, снижение которой может происходить на стадиях высаливания и ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Иногда концентрацию  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  необходимо увеличить до 20%. Кроме того, случается, что некоторые образцы МКА остаются связанными с ДЭАЭ-целлюлозой даже в буфере трис/50 mM NaCl. В этом случае их можно элюировать с колонки буфером, содержащим 75 mM NaCl. Для многих целей можно использо-

вать полуочищенные МКА класса G, полученные лишь путем осаждения  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Однако, чтобы достичь максимальной емкости колонки, следует использовать IgG, очищенный на ДЭАЭ-целлюлозе. Если при реклонировании гибридомы достигается образование антител во всех лунках, примесь нормального IgG, в препарате МКА обычно не превышает 10%. Перед иммобилизацией мы доводим концентрацию IgG до 10 мг/мл и диализуем против боратного (0,05 M  $\text{N}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{HCl}$ ) буфера, pH 8,0.

### 4.3. Присоединение моноклональных антител к гранулам геля агарозы

**Внимание! Бромистый циан — ядовитое и летучее вещество!** Для присоединения антител к гранулам агарозы фирмы Pharmacia (Швеция) мы, как правило, используем бромистый циан (CNBr). Другие методы иммобилизации описаны в многочисленных руководствах, например [20]. Можно воспользоваться коммерческими гелями, уже активированными бромцианом, и вести присоединение по инструкции изготовителя. Однако осуществление метода Пората [21] собственными руками представляется нам наиболее простым, воспроизводимым и экономичным подходом. Раньше мы использовали сефарозы 2B, 4B и CL-4B фирмы Pharmacia. Но в настоящее время применяем лишь сефарозу CL-4B. В литературе описан метод иммобилизации МКА на протеин А-сефарозе 4B с последующей фиксацией глутаровым альдегидом [22]. Однако при иммобилизации антител спейсерная группа, функцию которой выполняет протеин А, не нужна. Связалась ли молекула антитела с носителем через Fc-фрагмент или через один из Fab-фрагментов, в любом случае по крайней мере один Fab-фрагмент останется свободным для связывания антигена. Расчеты показывают, что сорбент, получаемый при использовании протеин А-сефарозы 4B [22], по емкости не превосходит сорбенты, полученные прямым присоединением антител. В некоторых случаях, однако, присоединение через протеин А имеет существенные преимущества.

Обычно присоединяют 5—10 мг антител на миллилитр набухшего геля при минимальной концентрации CNBr, обеспечивающей полную сшивку. Для получения стабильных результатов необходимо использовать CNBr хорошего качества. Мы расфасовываем в вытяжном шкафу каждую новую упаковку, содержащую 25 г, в 16 предварительно взвешенных стеклянных флаконов объемом 5 мл с завинчивающимися крышками и затем взвешиваем их, чтобы определить количество CNBr в каждом флаконе. После этого флаконы помещаются в контейнер с влагопоглотителем. Контейнер помечают предупреждающей

надписью, тщательно герметизируют, закрыв крышкой и заклеив лентой, и хранят при температуре  $-20^{\circ}$ . Перед использованием контейнер помещают в вытяжной шкаф, чтобы он нагрелся до комнатной температуры, и извлекают из него порцию CNBr. Необходимо, чтобы на протяжении всего времени работы с CNBr он находился в герметичном контейнере под тягой.

Ниже приведено поэтапное описание присоединения антител к гранулам геля. Этапы 2—6 проводят в вытяжном шкафу.

1. Сефарозу отмывают водой и определяют объем осадка гранул геля после центрифугирования при 500 g в течение 5 мин в градуированной центрифужной пробирке.

2. Помещают 1 объем геля и 0,5 объема воды в стакан, вмещающий 5 объемов. Стакан ставят на ледяную баню, находящуюся на магнитной мешалке и помещают в него магнит. Непосредственно перед внесением CNBr к гелю добавляют 1 объем ледяного 4M  $K_2HPO_4$ /KOH-буфера, pH 11,5.

3. Берут CNBr (из расчета 30 мг на 1 мл осадка гранул геля сефарозы 4B или 40 мг на 1 мл сефарозы CL-4B) и растворяют в диметилформамиде до концентрации 300 мг/мл, а затем добавляют в течение 1 мин к перемешиваемым гранулам геля. Перемешивание продолжают еще 9 мин.

4. После этого взвесь гранул геля быстро переносят в воронку с фильтром из микропористого стекла и удаляют фильтрат с помощью водоструйного насоса. Затем промывают гель 4—5 раз пятью объемами ледяной воды, каждый раз полностью отсасывая жидкость.

5. Гранулы геля переносят в раствор IgG на 0,05 M боратном ( $Na_2B_4O_7/HCl$ ) буфере, pH 8, поместив в пластиковую пробирку с закручивающейся крышкой или в центрифужный стакан (гель должен впитать почти весь объем жидкости) и медленно вращают пробирку при  $4^{\circ}C$  в течение 2 ч или встряхивают ее каждые 10 мин. Затем оставляют гель при  $4^{\circ}C$  на ночь.

6. Всю использованную посуду замачивают в коммерческом растворе отбеливателя для нейтрализации CNBr и затем промывают большим количеством воды.

7. На следующее утро центрифугируют гранулы геля при 500 g в течение 5 мин и измеряют поглощение супернатанта при 280 нм, чтобы определить количество несвязавшегося IgG.

В нашей практике эффективность связывания обычно превышает 90%. Гранулы геля после присоединения отмывают на воронке с фильтром буфером трис/150 mM NaCl и оставляют на 10 мин в 50 mM HCl-этаноламиновом буфере, pH 8, чтобы заблокировать оставшиеся активные группы. Гель хранят в указанном выше трис-буфере при  $4^{\circ}C$ .

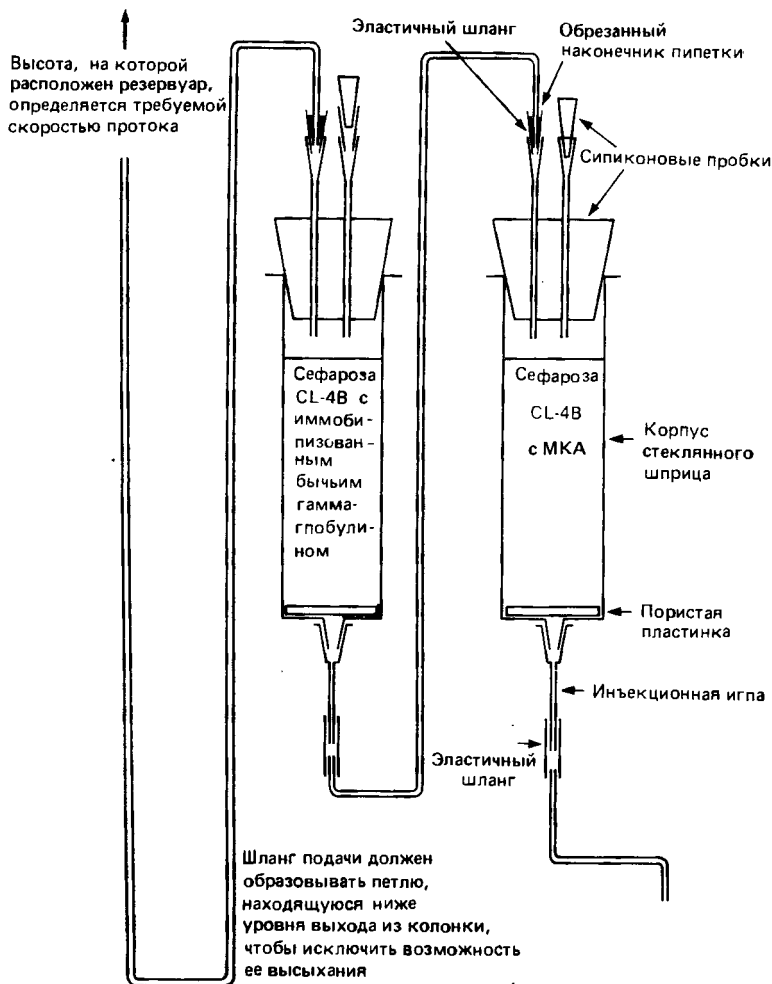


Рис. 5.3. Устройство системы аффинных колонок

8. Перед тем как проводить хроматографию, проводят элюцию колонки буфером, который затем будет использован для диссоциации комплексов антиген — антитело.

#### 4.4. Аффинные колонки и скорость хроматографии

Мы используем простейшие колонки, сделанные из цилиндров стеклянных шприцев, с подачей элюирующих растворов под действием силы тяжести (см. рис. 5.3). Из шприцев можно при-



готовить колонки наиболее часто используемого объема от 1 до 50 мл. Обычно мы пользуемся колонками объемом 5 мл и больше; они работают без снижения выхода, если количество нанесенного антигена будет ниже насыщения. На пути разделяемой смеси перед аффинной колонкой ставят предохранительную колонку объемом 10—20 мл, заполненную сефарозой CL-4B с присоединенным бычьим гамма-глобулином. Мы используем эту колонку (хотя необходимость в ней не доказана), чтобы удалить из разделяемой смеси любые частицы или молекулы, которые могут связаться с иммуносорбентом неспецифически. Скорость потока обычно составляет 1—2 объема колонки в час. Насос лучше не использовать, поскольку сопротивление колонки во время хроматографии иногда возрастает, что может привести к протечкам в местах соединения и потере материала. Промывать колонки можно на большей скорости.

#### 4.5. Бесколоночная иммуносорбция антигена

Для иммуносорбции антигена можно не пропускать экстракт через колонку, а смешать большой его объем с МКА-сефарозой CL-4B и инкубировать, перемешивая, в течение ночи при 4°C. Затем гель отделяют от супернатанта на фильтре из микропористого стекла и помещают в колонку для отмывания и элюирования антигена. Основное преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет очень быстро выделить антиген из большого объема экстракта — чтобы пропустить такой объем через колонку, требуется гораздо больше времени.

#### 4.6. Отмывание

После прохождения экстракта колонку промывают буферным раствором до тех пор, пока поглощение буфера при 280 нм на выходе из колонки не сравняется с поглощением буфера на входе. Основное требование к буферу для отмывания состоит в том, что он не должен элюировать антиген. Однако в ряде случаев целесообразно вести отмывание в условиях частичной десорбции связанного белка. Например, при очистке антигенов клеточной поверхности авторы сначала промывают колонку трис-буфером с добавлением 0,5% дезоксихолата, а затем точно таким же буфером, содержащим еще и 0,15 M NaCl (последний раствор готовят непосредственно перед использованием, поскольку дезоксихолат, оставленный на ночь при 4°C в присутствии NaCl, образует гель). Чтобы избавиться от примесей в конечном очищенном препарате, можно использовать для отмывания колонки буферные растворы с более сильными диссоциирующими свойствами.

#### 4.7. Элюция антигена

Для того чтобы вызвать диссоциацию комплекса антиген — антитело, необходимо частично денатурировать антитела. Однако полной денатурации, которая достигается обработкой 8М гуанидин-НСl или кипячением в ДСН, обычно не требуется. Это и хорошо, поскольку всегда желательно, чтобы после элюирования и антиген, и антитела восстановили свою нативную конформацию. Чаще всего элюция в диссоциирующих условиях используется при выделении антител, связавшихся с иммобилизованным антигеном. Как правило, используют следующее:

I. *Высокие значения pH.* Это один из наиболее эффективных методов. Обычно применяемый буфер — 50 мМ диэтиламин-НСl, pH 11,5. Он совместим со всеми детергентами, включая соли желчных кислот [6, 23, 24].

II. *Низкие значения pH.* Такая элюция широко применяется при очистке антител [3—5, 23]; используют 0,1 М HCl-глициновый буфер, pH 2,2, 0,1 М цитратный буфер, pH 2,2, 0,5 М раствор пропионовой кислоты, pH 3. Пропионовая кислота обладает тем преимуществом, что, вызывая диссоциацию комплекса антиген — антитело благодаря снижению pH, она, кроме того, ослабляет гидрофобные взаимодействия. При низком pH можно использовать неионные детергенты, но не соли желчных кислот.

III. *Хаотропные агенты.* Способностью нарушать белок-белковые взаимодействия обладают анионы (в порядке убывания эффективности)  $\text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$  и катионы  $\text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ . Например, с помощью 2,5 М KI или 2,0 М KSCN были эффективно элюированы антитела к Rh с эритроцитов [25].

IV. *Нагревание.* Мы обычно проводим элюирование при 4 °C. Известно, однако, что антитела теряют аффинность при повышении температуры. Элюирование при температуре выше 37 °C может быть предметом исследования.

V. *Гипотонические растворы.* Для элюирования фермента щеточной каемки почек использовали 2 мМ трис-НСl, pH 8 [26].

VI. *Поверхностно-активные вещества.* Комплексы антиген — антитело диссоциируют при высоких концентрациях этиленгликоля или диметилсульфоксида. Можно вызвать диссоциацию комплексов альбумина со специфическими антителами 60%-ным этиленгликолем при pH 3,5 или 9,5 [27].

VII. *Специальные случаи.* Иногда особенности взаимодействия антигена с антителом позволяют проводить элюирование в очень мягких условиях. Например, описан образец МКА к антигену Н-2, связывающих его в колонке в присутствии неионного детергента; при этом можно было проводить элюирование дезоксихолатом, хотя последний обычно не связывается с не-

гидрофобными участками белковых молекул [28]. Известны МКА к IX фактору свертывания крови, распознающие детерминанту, конформация которой зависит от присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Для элюирования антигена с иммуносорбента, приготовленного из этих МКА, использовали буфер, содержащий ЭДТА [29].

Для элюирования антигенов клеточной поверхности мы в нашей практике обычно используем 50 мМ HCl-диэтиламинный буфер, pH 11,5, содержащий 0,5% дезоксихолата, и сразу же после элюирования нейтрализуем элюат глицином. Затем определяем поглощение при 280 нм и измеряем антигенную активность препарата. Выход препарата обычно составляет около 50% от количества антигена, нанесенного на колонку. Фракции элюата концентрируем ультрафильтрацией и, если необходимо, освобождаем от дезоксихолата с помощью диализа. Однажды при очистке Т-лимфоцитарного антигена, названного MRC OX-34, мы не смогли определить в элюате ни антигенной активности, ни даже поглощения при 280 нм. При этом в экстракте, элюированном с колонки после нанесения антигена, антигенной активности тоже не было. Мы попробовали провести элюцию 0,5 М пропионовой кислотой без детергента и добились успеха, причем с хорошим выходом антигенной активности (A. F. Williams, неопубликованные данные). То же самое было в случае с крысиным антигеном CD4(W3/25). Элюирование щелочным буфером дало неудовлетворительные результаты, но пригодным оказался 0,1 М HCl-глициновый буфер, pH 2,5 [30]. При этом с колонки элюировался белок с нужной мол. массой, однако его антигенная активность частично была потеряна. Критериями очистки в данном случае служил сам факт утраты антигенной активности исходного экстракта после нанесения на колонку, а также элюирование из нее белка с известной мол. массой.

В нашей практике потеря антигенной активности при элюировании встречалась исключительно редко, зато было множество противоположных примеров, когда после элюирования буферами с очень кислым или очень щелочным pH белки сохраняли свою ферментативную или связывающую активность [13, 26, 31, 32].

#### 4.8. Емкость колонки и ее повторное использование

В нашей практике при концентрации присоединенных антигенов 10 мг на 1 мл сорбента емкость колонки обычно не превышает 20% от теоретически возможной. При такой емкости колонка объемом 10 мл способна связать 13,3 мг антигена с мол. массой 50 000. Однако чаще всего такой емкости добиться труд-

но. Особенно низка емкость колонок для крупных молекул. В некоторых случаях она не превышает нескольких процентов от теоретически возможной. Вероятно, большинство молекул МКА недоступно для антигена с очень большим радиусом Стокса. Параметры, определяющие емкость колонки, так же как и многие другие аспекты аффинной хроматографии, до сих пор еще не были предметом систематических исследований.

Обычно аффинные колонки можно использовать повторно. Хранят их при 4 °С в буфере трис/150 мМ NaCl.

#### 4.9. Утечка антител

В некоторых случаях мы наблюдали утечку МКА с колонки при элюировании антигена. При этом МКА и антиген после элюирования отделялись друг от друга с помощью гель-фильтрации. Иногда вместо гель-фильтрации элюат пропускали через аффинную колонку с антииммуноглобулиновыми антителами. В последнее время мы используем антитела, присоединенные к сефарозе CL-4B, и совсем не наблюдаем утечки антител, вероятно, благодаря применению перекрестношитого геля агарозы. Вообще в нашей практике утечка антител никогда не была серьезной проблемой.

### 5. Очистка антигенов цитоплазматической мембраны

В этом разделе мы остановимся на процедуре очистки антигенов клеточной поверхности (рис. 5.4). В качестве иллюстрации будет рассмотрена очистка антигена MRC OX-45.

Этот антиген содержится в лейкоцитах и эндотелиальных клетках [33] и особенно интересен тем, что на его примере проиллюстрирована процедура выделения антигенов из двух типов тканей, а именно из селезенки и мозга. Кроме того, пример выделения OX-45 из мозговой ткани крысы, где антиген сосредоточен в основном в эндотелии капилляров, показывает, какой высокой степени очистки можно достичь с помощью аффинной хроматографии на моноклональных антителах.

#### 5.1. Методы определения антигенной активности

Решающее значение имеет определение антигенной активности в экстрактах, с помощью которого можно установить, задерживается ли антиген на колонке. В то же время при достаточно высокой степени очистки определение антигенной активности в элюате может служить надежным доказательством того, что выделен нужный антиген, а не доминирующая примесь. Если в процессе элюирования антигенная активность ис-

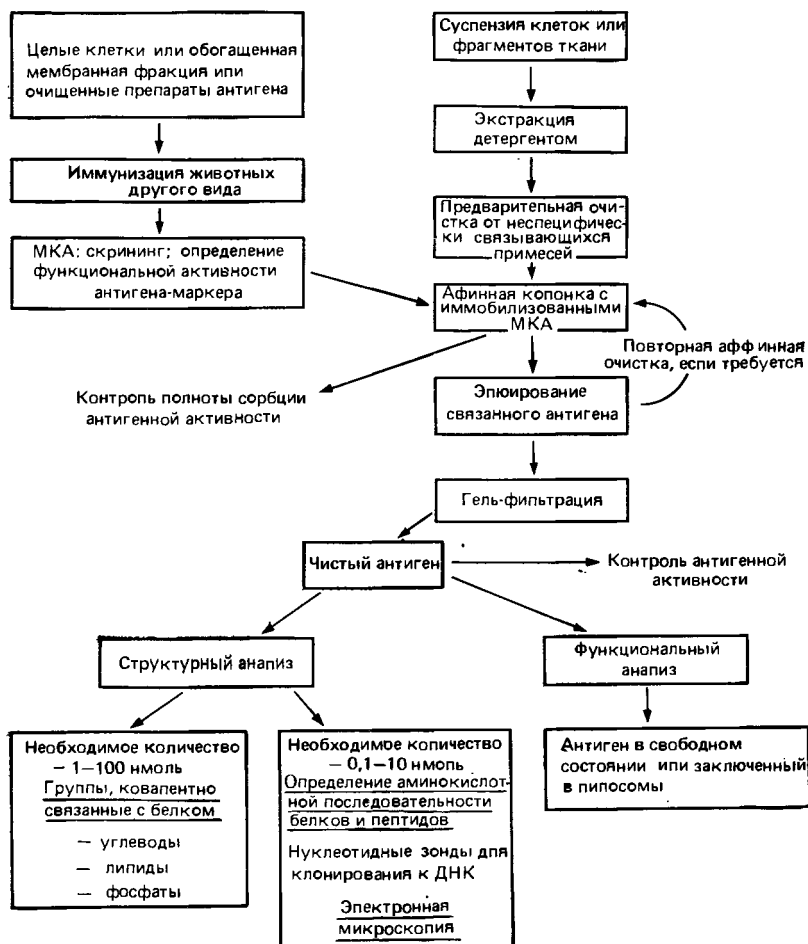


Рис. 5.4. Этапы очистки антигенов клеточной поверхности с помощью аффинной хроматографии при использовании иммобилизованных МКА

чезнет, нужны тщательные контроли, чтобы доказать, что преобладающий тип молекул в элюате относится к антигену.

Чтобы проследить судьбу антигена на всем пути от исходных клеток до очищенного препарата, мы используем непрямую реакцию торможения связывания МКА на фиксированных глutarовым альдегидом клетках-мишенях [15]. Однако существует и другой подход: на каждой стадии очистки полученный материал адсорбируют на нитроцеллюлозной мембране и выявляют содержание в нем антигена по связыванию МКА непрямым методом [34].

### 5.1.1. Фиксация клеток

(См. также метод анализа с использованием клеток, фиксированных в лунках панели для микротитрования, [35].)

1. Отмывают соответствующие клетки-мишени (лимфоциты, эритроциты, лейкозные клетки, клетки лимфобластоидных линий и т. д.) один раз в буфере DAB, суспендируют их в концентрации  $10^8$  клеток/мл и добавляют равный объем 0,25%-ного глутарового альдегида в DAB. Можно использовать и гомогенаты тканей [36].

2. После пятиминутной инкубации при  $23^\circ\text{C}$  останавливают реакцию, добавив  $1/10$  объема 10%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и отмывают клетки один раз 0,5%-ным БСА в DAB.

3. Суспендируют клетки в 10%-ном БСА в DAB, пропускают их через иглу от шприца, чтобы устранить клеточные агломераты, и добавляют 10%-ный БСА в DAB для доведения концентрации клеток до  $5 \cdot 10^8$  в 1 мл в случае эритроцитов и до  $10^8$  в 1 мл в случае других типов клеток. Клетки можно хранить несколько лет при  $-30^\circ\text{C}$  без потери антигенных свойств.

### 5.1.2. Оценка связывания антител с клетками косвенным методом

Все стадии проводят при  $4^\circ\text{C}$ .

1. В лунки панели для микротитрования с U-образным дном вносят по  $2 \cdot 10^6$  фиксированных клеток-мишеней (20 мкл) и по  $5 \cdot 10^6$  фиксированных эритроцитов барана (10 мкл), которые необходимы для того, чтобы во время отмывания осадок был лучше виден. Затем добавляют по 25 мкл серийных разведений антител (в DAB/0,5% БСА) и инкубируют в течение 1 ч при перемешивании.

2. Трижды отмывают клетки 0,1% БСА/DAB (добавив по 200 мкл в лунку), центрифугируя панели при  $500g$  в течение 5 мин, затем суспендируют клетки в 25 мкл того же раствора, содержащего F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты кроличьих антител к IgG мыши, меченные  $^{125}\text{I}$  [16] ( $2 \cdot 10^5$  имп./мин на лунку; специфическая активность  $\sim 4 \cdot 10^7$  имп./мин/мкг).

3. После перемешивания в течение 1 ч клетки три раза отмывают описанным выше способом и подсчитывают связавшуюся радиоактивность. В зависимости от используемых клеток-мишеней величина фона может варьировать от 500 до 2000 имп./мин.

4. Можно провести анализ и в пластиковых пробирках, как детально описано ранее [17].

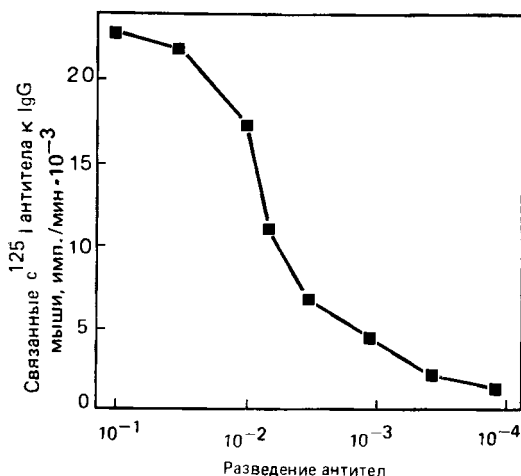


Рис. 5.5. Титрование антител к антигену MRC OX-45 в непрямой реакции связывания. Супернатант тканевой культуры, содержащий антитела, разводили буфером DAB с добавлением 0,02%  $\text{NaN}_3$  и 0,5% БСА. Аликвоты объемом 30 мкл вносили в лунки панели для микротитрования, содержащие такой же объем взвесей клеток-мишеней ( $2 \cdot 10^6$  тимодитов крысы +  $5 \cdot 10^6$  эритроцитов барана). Инкубация с  $^{125}\text{I}$ -F(ab')<sub>2</sub>-фрагментами антител кролика к мышиному Ig и процедура отмывания описаны в разд. 5.1.2

На рис. 5.5 представлены результаты титрования МКА к MRC OX-45 по связыванию на тимоцитах крысы. Для реакции торможения связывания было выбрано разведение культуральной среды гибридомы 1/150.

### 5.1.3. Реакция торможения связывания

Для определения содержания антигена в различных тканях можно применить адсорбционный анализ, когда антитела преинкубируют с тканевым гомогенатом, а затем после центрифугирования определяют, сколько МКА осталось в супернатанте (рис. 5.1 и 5.2).

1. Титруют образец антител описанным выше способом, выбирают подходящее разведение и готовят его на трис-буфере, содержащем 150 мМ  $\text{NaCl}$  и 2% БСА.

2. Готовят ряд трехкратных разведений фракций гомогената, содержащих антиген в том же буфере. Если в образцах присутствуют детергенты, в буфер добавляют 2% БСА, а при их отсутствии — 0,5% БСА (при всех реакциях связывания, включая взаимодействие антител с клетками-мишенями, БСА нейтрализует действие на детергент).

3. Смешивают равные объемы (например, по 100 мкл) разведений антигена и антител и инкубируют 2 ч при 4 °С (время можно увеличить или сократить в зависимости от конкретных условий и требуемой чувствительности метода).

4. Центрифугируют смеси и отбирают из каждой по две аликвоты объемом 60 мкл для определения антител по связыванию с клетками непрямым методом.

Результаты определения абсорбции антител к ОХ-45 тканевыми гомогенатами, представленные на рис. 5.6, А, показывают, что антигенная активность ткани селезенки в пересчете на 1 мг белка примерно вдвое превышает антигенную активность тимуса и в 20 раз — активность мозговой ткани. На рис. 5.6, Б представлены результаты определения абсорбции антител препаратом несолюбилизированных мембран крысиных спленоцитов и дезоксихолатным экстрактом тех же мембран. Дезоксихолат несколько смещает кривую торможения связывания антител в сторону уменьшения антигенной активности в расчете на белок, однако данный метод анализа вполне пригоден для определения сорбции и выхода антигена в процессе аффинной хроматографии.

## 5.2. Приготовление клеточных экстрактов

### 5.2.1. Получение ткани

В первую очередь следует обратить внимание на то, что для эффективной очистки требуется располагать достаточным количеством ткани. На рис. 5.4 приведены приблизительные количества материала, необходимые для различных целей. Если, например, выделяемый антиген имеет мол. массу 50 000 и представлен в количестве  $5 \cdot 10^4$  молекул на клетку, для получения 0,5 мг (10 нмоль) чистого гликопротеина необходимо иметь  $6 \cdot 10^{11}$  клеток (при предполагаемом выходе 10%). Такое количество клеток можно выделить из тимусов не менее 200 крыс. Для выделения этого же иммуноглобулина из нелимфоидной ткани требуется гораздо большее количество животных.

### 5.2.2. Свойства детергентов

В табл. 5.1 приведены свойства некоторых детергентов, использующихся для солюбилизации антигенов. Подходящий детергент обычно удаляет липиды, связанные с гидрофобными доменами, не денатурируя при этом остальные участки белка [37]. Детергенты добавляют в соотношении 10:1 по весу белка.

Ниже приведены некоторые аспекты использования различных типов детергентов.



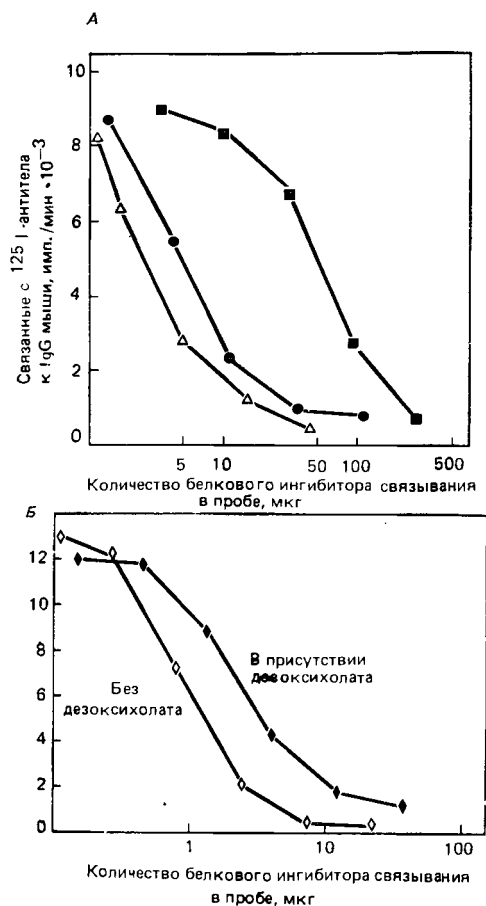


Рис. 5.6. Подавление связывания антител с MRC OX-45 различными тканевыми препаратами. Супернатант тканевой культуры, содержащий антитела, разводили 1/150 и инкубировали с равным объемом каждого из перечисленных ниже препаратов. После центрифугирования определяли количество не связавшихся антител. Подробности см. в разд. 5.1.3.

А. Для связывания антител использовали тимоциты (черные кружки), гомогенат селезенки (светлые треугольники), гомогенат мозга (черные квадраты). Б. Для связывания антител использовали препарат мембран из клеток селезенки крысы, полученный экстракцией твином-40 (см. разд. 5.2.4, светлые ромбы), и такой же препарат, полученный экстракцией дезоксихолатом (разд. 5.2.5, черные ромбы)

1. *Сильноионные детергенты (например, ДСН).* Додecil-сульфат натрия редко применяется в аффинной хроматографии, поскольку он связывается со всеми участками белка и вызывает сильную денатурацию. Однако некоторые антигенные детер-

Таблица 5.1. Свойства детергентов

Тип детергента	Размер мицелл ( $M_t$ )	Критическая концентра- ция образо- вания мн- целл (мм)	Связывание с белком		Способность пре- пятствовать взаимодействию антигена с ан- тителами	Активность при солюби- лизации	Прозрач- ность при 280 nm
			С большей частью по- следователь- ности	С гидрофоб- ными участ- ками			
Сильноионные Например ДСН	18 000—36 000 <sup>1)</sup>	0,5—8 <sup>1)</sup>	+	+	+	++	Да
Слабоионные Например, дезоксихолат натрия, холат натрия	1700 и более <sup>1)</sup> 900—1800	4—6 13—15	— <sup>2)</sup> —	++ +	— —	++ +	» »
Неионные Например, тригон X-100 Brij-96	90 000 большие	0,24 <0,04	— —	++ ++	— —	++ ++	Нет Да

Данные взяты из статьи [37]. Приведены показатели для комнатной температуры.

<sup>1)</sup> Зависит от состава буферного раствора.

<sup>2)</sup> Возможно незначительное взаимодействие с негидрофобными последовательностями.

минанты не зависят от конформации молекулы и в ряде случаев целесообразно денатурировать белок в ДСН, а затем перед аффинной хроматографией добавить дезоксихолат или неионный детергент, чтобы сформировались смешанные мицеллы, и предотвратить таким образом возможное повреждающее действие ДСН на колонку. Такой подход был использован для разделения двух цепей крысиного антигена CD8. Вначале с помощью аффинной хроматографии были очищены связанные дисульфидными мостиками димеры, затем провели диссоциацию цепей в ДСН, после чего добавили избыток дезоксихолата и повторили аффинную хроматографию для разделения цепей [38].

**II. Слабоионные детергенты.** В присутствии дезоксихолата, по-видимому, происходит наиболее полная солюбилизация мембран, а относительно высокая критическая концентрация мицеллообразования у этого детергента позволяет удалять его с помощью диализа. Кроме того, благодаря малому размеру мицелл связанный детергент не влияет на поведение солюбилизованных белков во время гель-фильтрации. Мы обычно применяем гель-фильтрацию после очистки на колонке с МКА для того, чтобы освободиться от незначительных примесей. Недостаток дезоксихолата заключается в том, что при pH ниже 8, а также в присутствии солей он превращается в гель. Холат, в этом смысле, причиняет меньше хлопот, но он и менее эффективен для солюбилизации. Однако иногда удобно солюбилизовать препарат в дезоксихолате, а после связывания антигена на колонке заменить его холатом. При работе с лимфоидной тканью, если предусматривается солюбилизация солями желчных кислот, необходимо предварительно удалить клеточные ядра. В противном случае высвобожденная ДНК значительно увеличит вязкость раствора. Если же антигены выделяют из мозговой ткани, в которой количество клеточных ядер на единицу веса гораздо меньше, можно сразу проводить экстракцию дезоксихолатом, поскольку в этом случае вязкость экстракта, очевидно, не будет чрезмерной.

Для дезоксихолатной солюбилизации необходимо прежде всего приобрести партию реагента с низким значением поглощения при 280 нм ( $<0,025$  для 0,05%-ного раствора). Такой дезоксихолат можно без предварительной обработки использовать почти на всех этапах очистки, однако реагент, применяющийся на последней стадии очистки антигена, должен быть свободен от неудаляемых диализом примесей. Для приготовления такого реагента 250 мл 10%-ного дезоксихолата помещают в диализный мешок и диализуют против 5 л буфера. Мы обычно используем 10 мМ трис-HCl-буфер, pH 8,2 (при комнатной температуре), содержащий 0,02%  $\text{NaN}_3$ , и получаем после диализа 5 л 0,5%-ного раствора дезоксихолата в этом буфере.

**III. Неионные детергенты.** Они используются для прямой солюбилизации мембранных молекул из целых клеток. Эти детергенты также обладают некоторыми недостатками: они солюбилизируют не все мембранные молекулы, большие размеры мицелл снижают эффект гель-фильтрации и, наконец, неионные детергенты невозможно удалить диализом.

### 5.2.3. Ингибиторы протеиназ

Солюбилизацию клеток или мембран детергентами мы всегда проводим в присутствии ингибиторов протеиназ, а иногда используем их и в процессе выделения мембран. Для ингибирования протеиназ, расщепляющих дисульфидные связи, мы используем иодоацетамид в конечной концентрации 2,5 мМ. Кроме того, этот ингибитор блокирует свободные сульфгидрильные группы и таким образом предотвращает образование дисульфидных связей между молекулами. Для инактивации сериновых протеиназ, с которыми в основном связывают общую протеолитическую активность лимфоцитов [39], мы применяем фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) (раньше мы использовали диизопропилфторид, но с ним сложнее работать, а ФМСФ, по-видимому, ничуть не менее эффективен). ФМСФ ядовит, поэтому хранить его следует в небольшом эксикаторе в вытяжном шкафу и работать с ним только под тягой. Перед использованием ФМСФ сначала взвешивают небольшой стеклянный бюкс с крышкой, затем в вытяжном шкафу помещают в него ингибитор и, закрыв крышкой, вновь производят взвешивание. ФМСФ растворяют в изопропанол до концентрации 100 мМ. Вначале ФМСФ добавляют к препарату до конечной концентрации 0,5 мМ, а затем на решающих этапах очистки вводят дополнительные аликвоты ингибитора до концентрации 0,1 мМ. Это необходимо потому, что ФМСФ легко гидролизует в воде, а предшественники ферментов могут активироваться на любой стадии приготовления препарата. Мы не храним остаток раствора ФМСФ в изопропанол, а разбавив его водой в вытяжном шкафу, сливаем в канализацию с большим объемом воды.

### 5.2.4. Приготовление препарата неочищенных мембран

Самым простым способом приготовления препарата мембран мы считаем описанный ниже метод с использованием твина-40. Все процедуры проводят при 0—4 °С.

1. Если необходимо выделить мембраны из клеток, легко отделяющихся от стромы и переходящих в суспензию (например, из тимоцитов), ткань тимуса измельчают в буфере трис/140 мМ NaCl, pH 7,4, и фильтруют через кисею. Концент-

рацию клеток в полученной взвеси доводят до  $10^9$  в 1 мл. Чтобы сохранить фрагменты разрушенных клеток, клеточную взвесь не следует отмывать. Для последующей обработки удобно приготовить 250 мл клеточной взвеси. Если требуется выделить мембраны непосредственно из плотной ткани, например из селезенки, берут 125 г ее (или другой исследуемой ткани) и гомогенизируют в 250 мл буфера трис/140 мМ NaCl, pH 7,4, в гомогенизаторе Уоринга.

2. Готовят 5%-ный раствор твина-40 в буфере трис/140 мМ NaCl, pH 7,4 (для растворения твина-40 смесь надо подогреть, а после растворения вновь охладить). Добавляют равный объем раствора твина-40 к взвеси или гомогенату клеток. На этом этапе можно ввести ингибиторы протеиназ, например, 2,5 мМ иодоацетамида и 0,5 мМ ФМСФ.

3. Перемешивают клетки с детергентом в течение 60 мин, а затем гомогенизируют шестью ударами поршня в электрическом гомогенизаторе Поттера—Элвейджама объемом 100 мл. Центрифугируют гомогенат при 1500 g в течение 10 мин и собирают супернатант, в котором должно содержаться примерно 60% исходной антигенной активности. Осадок суспендируют в 2,5%-ном растворе твин-40 (готовят на том же буфере). Объем смеси на этот раз должен составлять  $\frac{1}{3}$  объема, полученного в п. 2. Смесь снова гомогенизируют и центрифугируют. Полученный супернатант должен содержать еще 20% от исходной антигенной активности.

4. Супернатанты объединяют и подвергают центрифугированию. При простом центрифугировании получают осадок неочищенных мембран, при центрифугировании через «сахарозную подушку» — частично очищенные мембраны. В последнем случае супернатант наслаивают на 32%-ный раствор сахарозы в трис-буфере, pH 8, и используют центрифугу фирмы Вексман с угловым ротором типа 35 и поликарбонатными пробирками на 20 мл или бакет-ротором SW27 и полиалломерными пробирками на 10 мл.

Центрифугирование продолжают в течение 60 мин при 30 000 об/мин (ротор типа 35) или 25 000 об/мин (ротор SW27). Если приготовлены неочищенные мембраны, их осадок ресуспендируют, гомогенизируя в трис-буфере, pH 8, и хранят в замороженном состоянии. Если же применялось центрифугирование через «сахарозную подушку», мембраны собирают с поверхности раздела сахароза-буфер, стараясь при этом захватить минимальный объем супернатанта. Полученную фракцию разводят трис-буфером, pH 8, осаждают центрифугированием и вновь суспендируют так же, как и в случае с неочищенными мембранами. Выход антигенной активности в процентах от ее содержания в супернатанте для неочищенных мембран

приближается к 90%, а для частично очищенных — примерно 60%. Препараты мембран можно либо сразу солюбилизовать, либо хранить при  $-40^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.2.5. Солюбилизация мембран дезоксихолатом

1. К препарату мембран в трис-буфере, pH 8 (концентрация белка 3—4 мг/мл), добавляют равный объем 4%-ного раствора дезоксихолата в том же буфере, содержащем 5 мМ иодоацетамида и 0,5 мМ ФМСФ. Важно, чтобы весовое отношение дезоксихолат:белок было не меньше чем 10:1. Если необходимо, конечная концентрация дезоксихолата может превышать 2%. В свое время мы использовали различные концентрации (вплоть до 5%), но не заметили какого-либо влияния высоких концентраций детергента на результаты аффинной хроматографии.

2. Экстракт гомогенизируют и затем перемешивают его в течение 60 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Нерастворившийся материал отделяют ультрацентрифугированием при 70 000 g в течение 60 мин.

3. Супернатант наносят на колонку с иммобилизованными антителами или замораживают и хранят при  $-40^{\circ}\text{C}$ . После размораживания к препарату нужно вновь добавить ингибиторы протеиназ (1 мМ иодоацетамида и 0,2 мМ ФМСФ), перемешать в течение часа и затем центрифугировать, как описано выше. После размораживания в препарате всегда присутствует некоторое количество нерастворимого материала, однако потери антигенной активности при замораживании — оттаивании мы не отмечали.

#### 5.2.6. Непосредственная солюбилизация клеток в неионном детергенте

Для очистки гликопротеина, в наибольшем количестве содержащегося в мембранах тимоцитов крысы, был использован описанный ниже метод [41].

1. Тимус измельчают в буфере трис/140 мМ NaCl, pH 8, и доводят концентрацию тимоцитов в суспензии до  $1,5 \cdot 10^9$  клеток/мл.

2. Добавляют к клеткам 10%-ный (вес на объем) раствор Brij-96 в том же буфере, содержащем 10 мМ иодоацетамида и 1 мМ ФМСФ (в [41] использовали диизопропилфторфосфат), так, чтобы конечная концентрация Brij-96 составила 3%. Взвесь гомогенизируют шестью ударами поршня в гомогенизаторе Поттера — Элвейджема, перемешивают в течение 30 мин, а затем для удаления клеточных ядер центрифугируют при 6300 g в течение 20 мин.

3 Добавляют к супернатанту 3%-ный раствор дезоксихолата натрия в трис-буфере, pH 8, до конечной концентрации детергента 1%. Концентрация Brij-96 при этом снизится до 2%. Центрифугируют в течение 60 мин при 70 000 g. Супернатант можно сразу нанести на колонку или хранить при  $-40^{\circ}\text{C}$ . При воспроизведении методики выбирают тот детергент (например, нонидет Р-40, Lubrol-PX, тритон X-100 или Brij-96), который обеспечивает максимальное содержание антигенной активности в супернатанте после ультрацентрифугирования, определяемой по торможению связывания МКА (см. разд. 5.1.3).

#### 5.2.7. Солюбилизация гомогената мозга дезоксихолатом

1. Собирают 150 г (по влажному весу) мозговой ткани крыс и измельчают в гомогенизаторе Уоринга в 600 мл 30 mM трис-HCl буфера, pH 8, содержащего 0,02%  $\text{NaN}_3$ . Затем центрифугируют при 18 000 g в течение 60 мин, супернатант сливают.

2. Осадок суспендируют в 1,25 л 3%-ного раствора дезоксихолата в 30 mM трис-HCl буфере, pH 8, содержащем 0,02%  $\text{NaN}_3$ , 1 mM иодоацетамида, 0,1 mM ФМСФ. Затем подвергают краткосрочной обработке сначала в гомогенизаторе Уоринга, а затем Поттера — Элвейджема (см. разд. 5.2.4).

3. Полученный гомогенат центрифугируют при 18 000 g в течение 60 мин и собирают супернатант. Осадок вновь гомогенизируют в 200 мл 3%-ного раствора дезоксихолата и центрифугируют в том же режиме.

4. Экстракты можно сразу же подвергнуть аффинной хроматографии или заморозить. После размораживания препарат следует отцентрифугировать (при этом может произойти снижение вязкости).

#### 5.2.8. Выделение антигена ОХ-45 из клеток селезенки

1. Готовят гомогенат ткани селезенки крыс линии Sprague — Dawley в твине-40 (от 1000 крыс получают около 520 г ткани селезенки) и выделяют неочищенные мембраны. Солюбилизируют дезоксихолатом натрия, как описано выше (разд. 5.2.4 и 5.2.5).

2. Для выделения антигена ОХ-45 из дезоксихолатного экстракта применяют колоночный или бесколоночный метод. Используют 10 мл сефарозы CL-4В, к которой присоединены антитела к ОХ-45 из расчета 7 мг IgG на 1 мл сорбента. Перед очисткой сорбент элюируют буфером с высоким значением pH. Колоночный и бесколоночный методы очистки дают хорошие результаты, позволяя практически полностью выделить анти-

Таблица 5.2. Очистка антигена MRC OX-45 из эндотелия селезенки и мозга

Фракции	Количество белка (мг) <sup>1)</sup>	Антигенная активность (ед. · 10 <sup>-4</sup> ) <sup>2)</sup>	Выход антигенной активности (%)	Относ. специфич. активность
<b>Селезенка</b>				
Экстракт, приготовленный с помощью тви́на из 520 г ткани селезенки	52 000	1937	100	1
Неочищенные мембраны	7700	1395	72	4,9
Дезоксихолатный экстракт	7000	620	32	2,2
После нанесения на колонку иммобилизованных антител к MRC OX-45	7 540	31	1,6	—
Элюат с колонки	—	434	22	—
После хроматографии на сефакриле S300	—	291	15	—
После удаления дезоксихолата	1,06	437	22,6	11 000
<b>Мозг</b>				
Дезоксихолатный экстракт из 340 г мозговой ткани	17 000	41,2	100	1
После нанесения на колонку иммобилизованных антител к MRC OX-45	16 200	~0	~0	—
Элюат с колонки	—	25,6	62	—
После хроматографии на сефакриле S300	—	18,7	45	—
После удаления дезоксихолата	0,114	32,5	79	11 000 (170 0000)

<sup>1)</sup> Концентрацию белка в экстрактах измеряли по Лоурн, а концентрацию чистого гликопротеина — по данным аминокислотного анализа.

<sup>2)</sup> Одна единица активности антигена MRC OX-45 — это такое его количество, которое требуется для 50%-ного подавления связывания МКА.

<sup>3)</sup> По данным количественной иммуносорбции итоговый коэффициент очистки антигена MRC OX-45 относительно исходного гомогената мозга достигает 170 000.

ген примерно из одного литра экстракта с одинаково высокой степенью чистоты (табл. 5.2).

3. Вначале колонки промывают трис-буфером, содержащим 0,5% дезоксихолата, затем 0,15 М раствором NaCl в том же буфере (см. разд. 4.6) и, наконец, трис-буфером, содержащим 0,5% дезоксихолата натрия до тех пор, пока значение поглощения элюата при 280 нм не вернется к исходному.

4. Элюирование связавшегося материала производят 0,05 М HCl-диэтиламиновым буфером, pH 11,5, содержащим 0,5% дезоксихолата и 0,02% NaN<sub>3</sub>. Определив поглощение фракций при 280 нм, доводят их pH до 8—9 сухим глицином. На рис. 5.7 показан типичный профиль элюции. Антиген начинает выходить из колонки несколько раньше, чем повышается pH, вероятно, потому, что колонка обладает некоторой буферной емкостью.



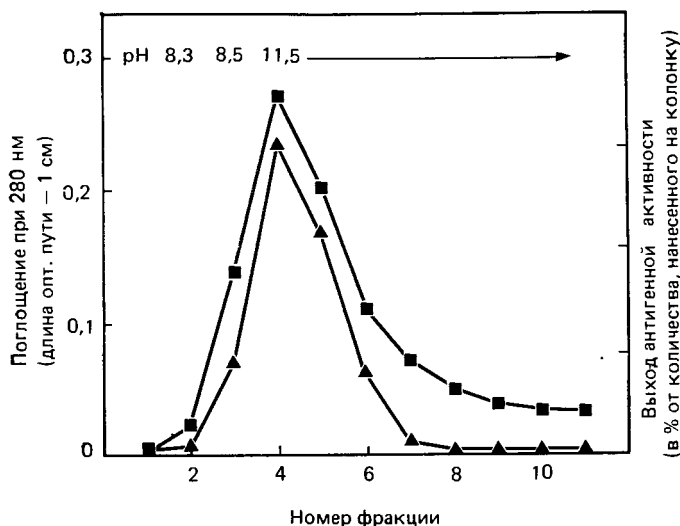


Рис. 5.7. Профиль элюции селезеничного антигена ОХ-45 с колонки с иммобилизованными антителами. Элюцию проводили 0,05 М HCl-диэтилaminовым буфером, pH 11,5, содержащим 0,5% дезоксихолата натрия и 0,02%  $\text{NaN}_3$ . Собирали фракции по 4 мл и определяли в них pH, поглощение при 280 нм (черные квадраты) и антигенную активность (черные треугольники)

5. Элюат концентрируют, диализуют и анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Следы антител в элюате выявляются на электрофореграмме только при первом использовании колонки.

6. На заключительной стадии очистки проводят гель-фильтрацию на колонке с сефакрилом S300. Антигенная активность выходит из колонки в виде симметричного пика, совпадающего с главным пиком белка (рис. 5.8).

7. Наиболее чистые (по данным электрофореза) фракции, содержащие антигенную активность, объединяют, концентрируют и диализуют против 0,1 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , чтобы удалить дезоксихолат до биохимического анализа. При электрофорезе чистый антиген мигрирует в виде слегка размытой полосы (рис. 5.9), что, по-видимому, вызвано высоким содержанием углеводов.

### 5.2.9. Выделение антигена ОХ-45 из мозговой ткани

В качестве исходного материала был взят дезоксихолатный экстракт из 340 г крысиного мозга, приготовленный, как описано в разд. 5.2.7. Вначале из экстракта выделяли антиген ОХ-2 [42], после чего заморозили при  $-40^\circ\text{C}$ . После оттаива-

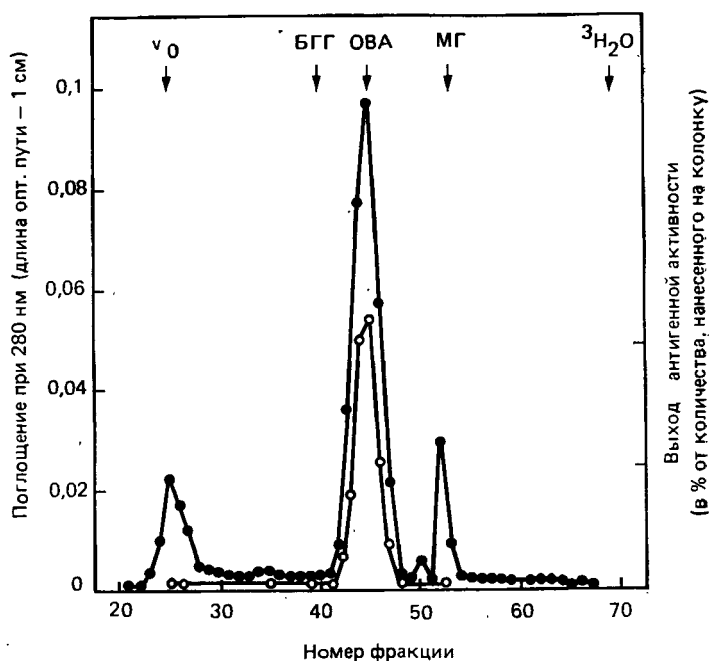
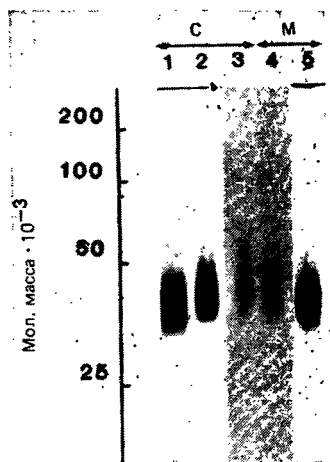


Рис. 5.8. Гель-фильтрация антигена ОХ-45 из селезенки. Элюат с аффинной колонки подвергли хроматографии на сефакиле S300 (использовали колонку 2,2×75 см) в 0,01 М трис-НСl буфере, рН 8, содержащем 5% дезоксихолата натрия, 0,02%  $\text{NaN}_3$ . Собирали фракции по 4,5 мл и определяли в них антигенную активность (светлые кружки) и концентрацию белка (по поглощению при 280 нм, черные кружки). Предварительно провели калибровку колонки.  $V_0$  — свободный объем, БГГ — бычий  $\gamma$ -глобулин, ОВА — овальбумин, МГ — миоглобин

ния к экстракту добавили ингибиторы протеиназ и центрифугировали при 70 000  $g$  в течение 60 мин.

Выход препарата и степень очистки приведены в табл. 5.2. Электрофореграмма очищенного антигена показана на рис. 5.9. Легко заметить, что антиген, выделенный из мозга, выглядит точно так же, как и антиген из селезенки. Небольшие различия по мол. массе обусловлены разным углеводным составом [33]. По сравнению с дезоксихолатным экстрактом выделенный антиген очищен в 110 000 раз, что соответствует 170 000-кратной очистке исходного гомогената мозга. При выделении антигена ОХ-45 не было отмечено ни неспецифического связывания, ни утечки антител с колонки, хотя при этом удалось очистить один из компонентов гомогената мозга, содержащийся в очень небольшом количестве. ОХ-45 мозга содержится в основном в мозговых капиллярах [33].

Рис. 5.9. Электрофорез антигенов MRC OX-45 в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии ДСН. С — антиген, выделенный из селезенки, М — антиген, выделенный из мозга. Для окрашивания серебром на гель наносили 1,3 мкг белка (дорожки 1, 2 и 5); для окрашивания иодной кислотой — реактивом Шиффа — наносили 5 мкг белка (дорожки 3 и 4). Образцы во всех дорожках, кроме 1, были восстановлены дитиотрептолом



### Литература

1. Silman I. H., Katchalski E. *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 873 (1966).
2. Porath J., Axen R., Ernback S. *Nature*, **215**, 1491 (1967).
3. Boegman R. J., Crumpton M. J. *Biochem. J.*, **120**, 373 (1970).
4. Livingston D. M. In: *Methods in Enzymology*, Jakoby W. B. and Wilchek M. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 34, p. 723, 1974.
5. Anfinsen C. B., Bose S., Corley L., Gurari-Rotman D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3139 (1974).
6. Letarte-Muirhead M., Barclay A. N., Williams A. F. *Biochem. J.*, **151**, 685 (1975).
7. Robb R. J., Strominger J. L., Mann D. L. *J. Biol. Chem.* **251**, 5427 (1976).
8. Robbins J. B., Schneerson R. In: *Methods in Enzymology*, Jakoby W. B. and Wilchek M. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 34, p. 703, 1974.
9. Kohler G., Milstein C. *Nature*, **256**, 495 (1975).
10. Williams A. F., Galfre G., Milstein C. *Cell*, **12**, 663 (1977).
11. Sunderland C. A., McMaster W. R., Williams A. F. *Eur. J. Immunol.*, **9**, 155 (1979).
12. Parham P. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8709 (1979).
13. Secher D. S., Burke D. C. *Nature*, **285**, 446 (1980).
14. Williams A. F., Barclay A. N. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Weir D. M. and Herzenberg L. A. (eds.), Blackwell Scientific Publications Limited, Oxford, 4th edition, Chapter 22, 1986.
15. Williams A. F. In: *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, Ada G. L. and Porter R. R. (eds.), Plenum Press, New York, Vol. 6, p. 83, 1977.
16. Jensenius J. C., Williams A. F. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 91 (1974).
17. Mason D. W., Williams A. F. *Biochem. J.*, **187**, 1 (1980).
18. Mason D. W., Williams A. F. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Weir D. M. and Herzenberg L. A. (eds.), Blackwell Scientific Publications Limited, Oxford, 4th edition, Chapter 38, 1986.
19. Toda K., Bozzaro S., Lottspeich F., Merkl R., Gerisch G., *Eur. J. Biochem.*, **140**, 73 (1984).
20. Wilchek M., Mikon T., Kohn J. In: *Methods in Enzymology*, Jakoby W. B. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 104, p. 3, 1984.
21. Porath J. In: *Methods in Enzymology*, Jakoby W. B. and Wilchek M. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 34, p. 13, 1974.

22. *Schneider C., Newman R. A., Sutherland D. R., Asser U., Greaves M. F. J. Biol. Chem., 257, 10766 (1982).*
23. *Read R. S. D., Cox J. C., Ward H. A., Nairn R. C. Immunochemistry, 11, 819 (1974).*
24. *Wilchek M., Bocchini V., Becker M., Givol D. Biochemistry, 10, 2828 (1971).*
25. *Edgington T. S. J. Immunol., 106, 673 (1971).*
26. *Gee N. S., Kenny A. J. Biochem. J., 230, 753 (1985).*
27. *van Oss C. J., Absolom D. R., Grossberg A. L., Neumann A. W. Immunol. Commun., 8, 11 (1979).*
28. *Herrmann S. H., Ming Chow C., Mescher M. F. J. Biol. Chem., 257, 14181 (1982).*
29. *Liebman H. A., Limentani S.-A., Furie B. C., Furie B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3879 (1985).*
30. *Jefferies W. Ph. D. Thesis, University of Oxford, 1985.*
31. *Unkeless J. C. J. Exp. Med., 150, 580 (1979).*
32. *Hsiung L.-M., Barclay A. N., Brandon M. R., Sim E., Porter R. R. Biochem. J., 203, 293 (1982).*
33. *Arvieux J., Willis A. C., Williams A. F. Mol. Immunol., 23, 983—990 (1986).*
34. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350 (1979).*
35. *Heusser C. H., Stocker J. W., Gisler R. H. In: Methods in Enzymology, Iangone J. J. and Vunakis H. V. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 73, p. 406, 1981.*
36. *Barclay A. N. Brain Res., 133, 139 (1977).*
37. *Helenius A., Simons K. Biochim. Biophys. Acta, 415, 29 (1975).*
38. *Johnson P., Gagnon J., Barclay A. N., Williams A. F. EMBO J., 4, 2539 (1985).*
39. *Fulton R. J., Hart D. A. Biochim. Biophys. Acta, 642, 345 (1981).*
40. *Standing R., Williams A. F. Biochim. Biophys. Acta, 508, 81 (1978).*
41. *Brown W. R. A., Barclay A. N., Sunderland C. A., Williams A. F. Nature, 289, 456 (1981).*
42. *Barclay A. N., Ward H. A. Eur. J. Biochem., 129, 447 (1986).*

# ИММУНОДИФфуЗИЯ В ГЕЛЕ, ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ И МЕТОДЫ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ

*Д. Кэтти и Ч. Райкундалия*

## 1. Введение

В настоящей главе описаны методы иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза (ИЭФ) в агаровых и агарозных гелях, а также иммунохимическое окрашивание реплик, полученных методом Вестерн-блоттинга после электрофореза в полиакриламидном геле.

Явление иммунопреципитации в гелях широко используется в целом ряде важных методик, которые широко применяются для изучения антител, а также для обнаружения и количественного определения растворимых антигенов. Иммунопреципитация основана на очень простом принципе. В толще гелей существует водная фаза, через которую легко диффундирует большинство макромолекул (мол. масса может превышать  $10^6$ ). Когда полидетерминантный сложный антиген перемещается в зону, содержащую антитела, то при оптимальном соотношении концентраций взаимодействующих компонентов образуются видимые линии преципитации. Реакцию обычно проводят в расположенных горизонтально тонких пластинах агарового геля на стеклянных подложках. Для реакций простой и двойной диффузии антигены и антитела вносят в лунки, вырезанные в геле напротив друг друга [1, 2]. Известны различные модификации метода иммунодиффузии: а) иммуноэлектрофорез (комбинация электрофоретического разделения белков по заряду с двойной диффузией и иммунопреципитацией в геле [3]; б) ракетный и двумерный электрофорез (электрофоретическое разделение антигенов в геле агарозы, содержащем антитела, см. работы [4—6]), что ускоряет преципитацию, облегчает идентификацию антигенов и позволяет производить их количественное определение; в) иммунодиффузия антигена в агаровом геле, содержащем антитела (или наоборот), что приводит к образованию колец преципитации, диаметр которых пропорционален концентрации антигена (антител) [7, 8]. Мы подробно опишем все перечисленные методы, рассмотрим некоторые примеры их применения, а также их сравнительные достоинства и недостатки. В последнем разделе настоящей главы приведена технология иммунохимического окрашивания реплик, полученных с помощью Вестерн-блоттинга [9, 10] по-

сле разделения антигенов методом электрофореза в полиакриламидном геле. Эта технология очень важна для определения молекулярных размеров антигена, а также гетерогенности антигенов и антител.

## **2. Оборудование и материалы для методов преципитации в геле**

### **2.1. Основное оборудование**

(список фирм, поставляющих оборудование и материалы,  
см. в приложении)

Источник питания: для работы с несколькими камерами для электрофореза требуется многоканальный источник.

Камера для электрофореза: рекомендуется использовать модели с большим объемом резервуара для буфера и охлаждаемой рабочей поверхностью.

Водяная баня.

Горизонтальный стол или юстировочный столик с уровнем.

Подогревная электрическая плита (60 °C).

Магнитная мешалка с подогревом.

### **2.2. Лабораторные принадлежности**

(список фирм, поставляющих оборудование и материалы,  
см. в приложении)

Стекланные пластины 8×8×0,15 см.

Перфораторы для геля — размеры: 1,5 мм (2 мкл), 2,3 мм (5 мкл), 3,0 мм (10 мкл), 5 мм (30 мкл), 6 мм (40 мкл) (объемы лунок указаны для гелей толщиной 1,5 мм). Можно использовать вытянутые и ровно обрезанные стекланные пипетки или набор пробковых сверл. Кроме того, доступны и коммерческие наборы перфораторов.

Вакуумный насос с наконечником (пастеровская пипетка) для удаления вырезанных кусочков геля.

Остроконечный скальпель с рукояткой.

Секционный нож (>8 см).

Металлическая линейка и две подставки 10×1×1 см для вырезания канавок.

Трафареты лунок и канавок (см., например, рис. 6.2, 6.7, 6.10, 6.13, 6.15, 6.16).

Микропипетки с тонкими наконечниками. Во избежание загрязнения образцов лучше использовать пипетки с одноразовыми наконечниками.

Микропипетки с переменным объемом на 10—250 мкл с наконечниками.

Окулярный микрометр для измерения колец преципитации.

Фильтровальная бумага Whatman № 1.

Бумажные полотенца.

Квадратные листы пленки Gelbond (8×8 см) в качестве подложки для геля.

Металлический контейнер для кипячения агаровых гелей.

Чистые пластиковые емкости с крышками (10×10××2 см) для окрашивания и хранения гелей.

Флаконы из пирекса (50 мл) с крышками (или универсальные стеклянные флаконы на 20 мл) для приготовленного агарового геля.

Конические колбы из пирекса (2 л) для приготовления исходного раствора агара.

Градуированные пипетки (10 мл) с грушей или другим аналогичным приспособлением (например, Pi-pump) (предпочтительнее).

Тонкие стеклянные пастеровские пипетки с резиновой грушей.

Стеклянные пробирки (15 мл) и штатив (для установки в водяную баню).

Пробирки (5 мл) для разведения образцов.

Хирургический бинт для электрофоретических фитилей.

Парафильм.

На рис. 6.1 показано основное оборудование для методов иммунодиффузии и ИЭФ.

### 2.3. Материалы, буферы и реагенты

Агароза — для большинства видов электрофореза требуется агароза с низким электроосмосом, ее же можно использовать для реакций диффузии.

Агар — для двойной диффузии в геле (ДДГ) и радиальной иммунодиффузии. Некоторыми марками можно заменить более дорогую агарозу (см. приложение).

Барбиталовый буфер: 0,05 М, pH 8,6; 9,21 г барбитола (5,5-диэтилбарбитуровая кислота) растворяют в трех литрах дистиллированной воды. Добавляют 51,54 г барбитурата натрия. Перемешивают, после растворения, добавляют 5 г азида натрия и доводят объем до 5 литров.

Фосфатный буферный раствор (PBS) pH 7,2.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  — 2,7 г

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,39 г

$\text{NaCl}$  — 9,0 г

} растворяют в 1 л  
дистиллированной воды.



Рис. 6.1. Оборудование для методов иммунодиффузии в геле и ИЭФ

Изотонический [0,85-ный % (вес на объем)] раствор NaCl в дистиллированной воде.

Растворы для окрашивания белков и отмывания геля:

1. Смешивают дистиллированную воду, ледяную уксусную кислоту и метанол в соотношении 5:1:5, общий объем — 2,5 л.

2. К одному литру раствора добавляют 5 г красителя ку-масси бриллиантового синего R (окрашивающий раствор).

3. Оставшиеся 1,5 литра — раствор для отмывания.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) (мол. масса 6000).

Бромфеноловый синий кристаллический.

Стандартные растворы антигенов в концентрации 1 мг/мл (индивидуальные антигены). В некоторых тестах для исследования сывороточных белков можно использовать пул нормальных сывороток. Для исследования сывороточных белков человека его целесообразно откалибровать по стандарту ВОЗ с известными концентрациями компонентов (см. приложение).

Контрольные антисыворотки — моно- или полиспецифические в зависимости от модификации теста (список фирм, поставляющих оборудование и материалы, см. в приложении).



## 2.4. Приготовление 1%-ного (вес на объем) агарозно-барбиталового геля

1. В двухлитровую коническую колбу наливают 500 мл горячего барбиталового буфера, добавляют 5 г сухой агарозы и перемешивают на магнитной мешалке с подогревом до растворения.

2. После полного растворения агарозы (раствор должен быть прозрачным) добавляют 15 г ПЭГ и продолжают перемешивать, пока он не растворится.

3. Разливают раствор во флаконы с крышками по 20—40 мл и хранят при 4°C. Для иммунодиффузии и некоторых модификаций ИЭФ вместо агарозы можно использовать агар (см. разд. 4.1.4, п. 2). Для этого готовят 1,0—1,5%-ный (вес на объем) раствор агара в PBS или 0,85%-ном растворе NaCl с 3% ПЭГ. Однако удобнее приготовить стандартный агарозный гель, который можно использовать при осуществлении любого метода. Агароза хорошо растворима, легкоплавка, не застывает при 56°C, а при охлаждении быстро превращается в прозрачный гель, обладающий при концентрации 1% достаточной прочностью. Подвижность крупных молекул зависит от концентрации геля.

## 3. Методы диффузии в геле

Два метода, описанные в этом разделе, основаны на пассивной диффузии антител и антигена в толще геля. Первый метод — качественный и используется для определения специфичности антигенов и антител; второй — полуколичественный и позволяет определять как антигены, так и антитела в моноспецифичных системах.

### 3.1. Двойная диффузия в геле (ДДГ)

#### 3.1.1. Принцип метода

Растворы антигенов и антител помещают в противоположные лунки глубиной около 1,5 мм, вырезанные в горизонтально расположенном агаровом или агарозном геле. Расположение лунок и расстояния между ними определяют по трафарету, подложенному под стекло. Это позволяет стандартизировать эксперименты. Антигены и антитела диффундируют в гель, встречаются друг с другом и образуют полосы преципитации между противоположными лунками. Время, необходимое для преципитации, определяется в основном расстоянием между лунками с антигенами и антителами. В целом расстояние между лунками не должно превышать 6 мм. Если все лунки одина-

кового размера, расстояние между ними не должно превышать двух диаметров лунки. При исследовании больших молекул (мол. масса  $>10^6$ , например IgM), которые диффундируют медленно, образование преципитатов занимает более 24 ч. Обычно достаточно инкубации в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ . При повышении температуры реакция идет быстрее, но иногда при этом ухудшается разрешение. Можно подобрать размеры лунок таким образом, чтобы соотношение реагирующих веществ было оптимальным, а полосы преципитации — четкими. Если относительные концентрации подобраны плохо, иммунные комплексы останутся растворимыми и линии преципитации либо не бу-

дут видны совсем, либо же получатся нечеткими и размытыми. Наилучшие результаты получают при использовании нескольких концентраций (разведений) антигенов и антител. В случае неразведенных антисывороток концентрация антигенов, как правило, должна составлять около 1 мг/мл. Используя антисыворотки с хорошими преципитирующими свойствами в соответствующих разведениях, можно определить индивидуальные антигены в концентрации 5 мкг/мл. На рис. 6.2 приведены примеры расположения лунок, которые могут оказаться полезными. Размеры лунок даны с учетом масштаба. Известны ком-

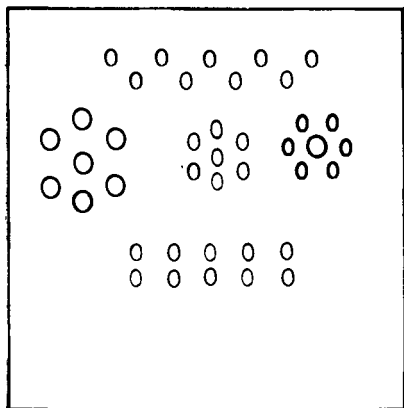


Рис. 6.2. Трафарет для реакций ДДГ. Расположение лунок можно изменять в зависимости от условий конкретного эксперимента

мерческие перфораторы для вырезания лунок, расположенных определенным образом относительно друг друга (см. приложение).

### 3.1.2. Применение метода

1. Важный первичный тест на преципитирующие свойства, приблизительный титр и специфичность антисывороток к растворимым антигенам.

2. Стандартный способ определения специфичности антисывороток.

3. Тест на идентичность антигенов, определение чистоты антигена и антигенных взаимосвязей между молекулами.

4. Приблизительное определение концентрации антигена.

### 3.1.3. Приготовление гелей

1. Открывают крышку флакона, в котором хранится агароза, и помещают флакон в кипящую воду до полного расплавления агарозы.

2. При использовании подложки Gelbond увлажняют пленку и прикладывают ее несмачиваемой стороной к стеклянной пластине. Помещают пластину на столик с уровнем или на рабочий стол и убеждаются в том, что она расположена горизонтально.

3. Наносят на пластину 9,6 мл расплавленной агарозы, которая растекается по пластине от центра к краям (при необходимости помогают агарозе растечься с помощью наконечника пипетки и убеждаются, что в геле не осталось пузырей). Образование неровного и мутного геля свидетельствует о том, что агароза была недостаточно горячей.

4. Дают гелю застыть, затем помещают пластину на трафарет и вырезают лунки. Ненужные кусочки геля отсасывают или удаляют с помощью остроконечного скальпеля или иглы для подкожных инъекций (можно использовать и маленький крючок).

### 3.1.4. Постановка реакции

1. Используя микропипетку с тонким наконечником, вносят в лунки антигены и антитела. Соблюдают осторожность, чтобы не повредить гель и не переполнить лунки. Лунки должны быть заполнены практически полностью, для этого надо правильно подобрать их размеры.

2. Помещают гель в кювету на влажную фильтровальную бумагу и закрывают крышкой. Никогда не оставляют гели открытыми, поскольку они быстро высыхают. Можно проводить реакцию при комнатной температуре, однако, если необходима инкубация в течение ночи, лучше проводить ее при 4°C. За гелем следует периодически наблюдать. Интенсивная преципитация может произойти уже через несколько часов. При образовании хорошо видимых линий преципитации (время инкубации — до 24 ч) гель отмывают, чтобы остановить реакцию, высушивают и окрашивают.

3. Погружают гель в кювету, заполненную 0,85%-ным раствором NaCl, и вымачивают в течение нескольких часов (лучше в течение ночи). Используют пленку Gelbond, чтобы предотвратить отделение геля от подложки. Заменяют раствор NaCl на дистиллированную воду, вымачивают гель несколько часов и затем извлекают его из кюветы.

4. Для высушивания геля на него помещают смоченную водой фильтровальную бумагу, а поверх нее — несколько слоев бумажных салфеток. Сверху помещают книгу или что-либо аналогичного веса (примерно 1 кг). Через 2 ч снимают груз и мокрые салфетки. Фильтровальную бумагу оставляют — она должна высохнуть сама. Для ускорения высыхания геля можно использовать фен. Сухая бумага легко отделяется от гладкой тонкой пленки высохшего агара. Подложку Gelbond на этой стадии можно снять со стекла вместе с высохшим гелем.

5. Для окрашивания геля, находящийся на стекле или подложке, помещают в краситель кумасси синий R примерно на 1 мин. Целесообразно использовать прозрачную кювету с подсветкой, чтобы наблюдать за развитием окраски. После окрашивания сливают краситель обратно во флакон и промывают пластину под струей воды. Помещают пластину в раствор для отмывания, чтобы устранить фоновое окрашивание, вновь промывают и высушивают. Гели на подложках Gelbond удобно хранить в альбоме. Стеклопластины с гелями хранят вертикально в стопках или в коробках, закрытых пленкой.

### 3.1.5. Интерпретация результатов

I. *Важность сбалансированных эквивалентных концентраций — использование разных соотношений антиген: антитело.* На рис. 6.3 видно, как различия в концентрации антигена (внешние лунки, IgG человека) влияют на расположение линий преципитации при взаимодействии с антителами (центральная лунка, антисыворотка к IgG человека) и на разрешающую способность теста. Это еще раз подтверждает, что при тестировании как антисывороток, так и антигенов следует использовать реагенты в различной концентрации. В множественных преципитирующих системах все антигены и антитела не удастся выявить при каком-либо одном разведении реагентов. Целесообразно использовать несколько разведений при первичном определении преципитирующих свойств и титров сывороток, когда концентрация антигена неизменна. Хорошая антисыворотка дает четкую полосу преципитации посередине между лунками с антигенами и антителами в разведении более чем 1 : 50.

II. *Множественные системы антиген: антитело и определение чистоты антигена.* Рис. 6.4 иллюстрирует результаты взаимодействия полиспецифической антисыворотки (центральная лунка) с раствором смеси антигенов и с антигеном возрастающей степени очистки. Непрерывные линии преципитации между лункой с антителами и внешними лунками свидетельствуют о полной идентичности и указывают на присутствие в разных лунках одного и того же антигена.



Рис. 6.3. Реакция иммунодиффузии в геле при расположении лунок в виде кольца демонстрирует, как различные соотношения антигенов и антител влияют на расположение и четкость линий преципитации. Антиген (IgG человека в концентрации 1 мг/мл) помещен в центральную лунку; антитела к IgG, исходное разведение 1:20 (верхняя правая лунка), двукратные разведения по часовой стрелке вокруг лунки антигена

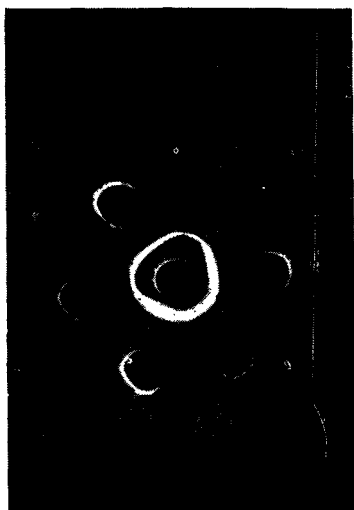


Рис. 6.4. Результат ДДГ показывает, что в одной из лунок находится чистый антиген (верхняя правая лунка), а в других он загрязнен примесями. Во всех лунках наблюдается реакция идентичности, хотя соотношение между антигеном и антителами (центральная лунка) в некоторых случаях не дает четкой линии преципитации. В центральной лунке — антисыворотка против суммарного пула сывороточных белков человека. Чистый антиген — альбумин

III. *Полностью, частично идентичные либо неидентичные антигены.* На рис. 6.5 показано, как, используя полиспецифическую антисыворотку (центральная лунка), исследуют идентичность антигенов, внесенных во внешние лунки. Использовали два антигена, не дающие перекрестных реакций: в лунках 1, 2 и 3 — IgG, а в лунках 3, 4 и 5 — сывороточный альбумин. Каждый антиген образует преципитат с соответствующими антителами, диффундирующими из центральной лунки. Около лунок, содержащих один и тот же антиген, формируются линии преципитации, свидетельствующие о полной идентичности. Две линии преципитации перекрещиваются между лунками 2 и 3, что свидетельствует о неидентичности (антигены не имеют общих эпитопов). В лунку 6 внесены F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты IgG, не содержащие эпитопов Fc-участка интактной молекулы IgG.

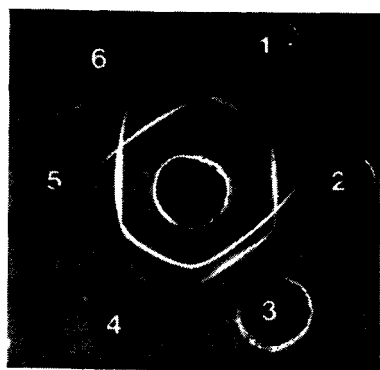


Рис. 6.5. Реакция ДДГ свидетельствует о неполной идентичности между целыми IgG (лунка 1) и  $F(ab')_2$ -фрагментами (лунка 6) при взаимодействии с антителами к интактным IgG (центральная лунка). Положение шпоры указывает на то, что интактные IgG несут эпитопы, отсутствующие на  $F(ab')_2$ -фрагментах. Взаимодействие антител с этими эпитопами продлевает линию преципитации. Кроме того, линии преципитации свидетельствуют о неидентичности между сывороточным альбумином человека (лунка 5) и  $F(ab')_2$ -фрагментами (лунка 6), а также между альбумином, смешанным с IgG (лунка 3) и IgG (лунка 2). IgG в лунках 1, 2 и 3 и альбумин в лунках 3, 4 и 5 полностью идентичны. В центральной лунке — антитела к IgG и альбумину. Две линии преципитации напротив лунки 3 указывают на присутствие в ней обоих антигенов

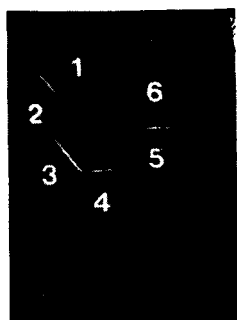


Рис. 6.6. Реакция ДДГ для тестирования специфичности антисывороток. Рисунок демонстрирует важность использования контрольных антител и стандартных антигенов для правильной интерпретации результатов. Пояснения см. в тексте

В результате наблюдается картина неполной идентичности с IgG из лунки 1. От основной линии преципитации здесь отходит так называемая «шпора»; шпора идет в направлении лунки, содержащей неполный (в отношении специфичности антител) антиген [ $F(ab')_2$ -фрагменты]. Антитела, диффундирующие по направлению к лунке 6 и встречающие на своем пути  $F(ab')_2$ -фрагменты, обладают специфичностью не только к  $F(ab')_2$ -, но и к Fc-участкам. Молекулы, специфичные к эпитопам Fc-участков, продолжают диффундировать до тех пор, пока не встретят интактные IgG, обладающие Fc-участками,

с которыми они и связываются. Таким образом, линия преципитации при взаимодействии IgG с антителами в этом месте образует шпору. Антигены, находящиеся в лунке 6 [F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты IgG] и лунке 5 (альбумин), неидентичны.

IV. *Специфичность антител.* На рис. 6.6 показаны результаты простого опыта, в котором контрольная (анти-Y) антисыворотка (лунка 5) сравнивается с двумя исследуемыми антисыворотками (лунки 3 и 4). В центральной лунке находится смесь антигенов, состоящая по крайней мере из двух компонентов, один из которых представляет собой мишень (Y) контрольной антисыворотки. В лунке 6 внесен стандартный очищенный антиген Y. Линии преципитации между лунками с контрольной антисывороткой к антигену Y, стандартным антигеном Y и антигеном Y в центральной лунке свидетельствуют об идентичности стандартного антигена Y и того же самого антигена, содержащегося в смеси. Исследуемая антисыворотка 1 (лунка 4) также содержит антитела к антигену Y, давая реакцию полной идентичности без дополнительных линий преципитации. Однако исследуемая антисыворотка 2 (лунка 3) содержит антитела, специфичные ко второму антигену, содержащемуся в смеси. Антиген X выявляется второй контрольной антисывороткой, содержащей к нему антитела (лунка 2), которая дает реакцию полной идентичности с очищенным антигеном X, помещенным в лунку 1. Преципитаты, образуемые двумя антигенами X и Y, совмещаются напротив лунки 3, однако, как это видно по отсутствию слияния дуг преципитации между лунками 2 и 3, а также 3 и 4, принадлежат двум независимым системам. Даже без стандартных антигенов и контрольных антител можно предположить, что эти антигены не обладают частичной идентичностью, поскольку линии преципитации не образуют шпор.

### 3.1.6. Преимущества и недостатки метода

Двойная диффузия в геле — это единственный в своем роде, уникальный и простой метод изучения антигенных взаимосвязей между молекулами и специфичности антител. Он имеет два главных недостатка: а) относительно низкую чувствительность по сравнению с непрямыми методами, например реакциями агглютинации и иммуноферментными тестами, и б) при исследовании смесей антигенов методом ДДГ часто наблюдаются перекрывающиеся и накладываются друг на друга линии преципитации. В этом отношении ДДГ уступает ИЭФ (разд. 4.1), в котором антигены разделяются в геле на начальной электрофоретической стадии.

## 3.2. Радиальная иммунодиффузия (РИД)

### 3.2.1. Принцип метода

Молекулы в растворе, помещенные в лунки агарового геля, радиально диффундируют и образуют иммунные комплексы с комплементарными молекулами антител или антигенов, содержащихся в жидкой фазе агара. В стандартной РИД агар содержит моноспецифические антитела, а радиально диффундирующий антиген, встречаясь с ними, образует кольцо преципитации. До тех пор пока в лунке сохраняется избыток антигена, происходит постепенное увеличение диаметра кольца преципитации. Реакция протекает в течение нескольких дней, причем время проведения определяется молекулярными размерами антигена. В случае IgM (мол. масса 900 000) времени требуется по крайней мере вдвое больше, чем для IgG (мол. масса 150 000). На практике, если молекулы имеют размер IgG или менее, для построения количественной кривой с использованием стандартных разведений антигена достаточно 24-часовой инкубации при 4°C или 16-часовой при комнатной температуре. Количественная оценка основана на том, что размеры кольца преципитации прямо пропорциональны количеству антигена в лунке (при равных объемах препаратов в лунках). По квадрату диаметра колец преципитации ( $D^2$ ) можно судить о соотношении концентраций антигена в лунках даже при сокращении времени инкубации. Для построения калибровочной кривой используют стандартные разведения антигена, концентрации которых отличаются в 10—20 раз и может достигать 5 мкг/мл. Образцы соотносят с калибровочной кривой, измеряя размеры кольца преципитации на еще влажном геле.

Аналогичный подход можно использовать для сравнения титра исследуемой антисыворотки с контрольной. Данный метод известен под названием обратной реакции радиальной иммунодиффузии (ОРИД), когда антисыворотка из лунок диффундирует в агар, содержащий антиген.

### 3.2.2. Применение

**1. Определение индивидуальных антигенов в растворе (РИД).** Данный метод обычно используют для определения сывороточных белков, в частности иммуноглобулинов при подозрении на множественную миелому или в случае недостаточности иммуноглобулинов. Можно определять и компоненты комплемента. В основном с помощью РИД определяют любые антигены (при наличии специфических антител), концентрация которых составляет не менее 5 мкг/мл и мол. масса не превышает  $10^6$ . Необходим и стандартный препарат антигена. Стан-



дартный антиген не обязательно должен быть чистым (так же как и опытные образцы), а концентрации могут быть выражены в относительных единицах по отношению к стандарту.

II. *Титрование антисывороток с использованием контрольных реагентов (ОРИД)*. Данный метод наиболее удобен для количественного определения IgG, полученного путем хронической иммунизации лабораторных животных. Такие антитела должны образовывать с антигеном одно кольцо преципитации. Кроме того, метод можно использовать и для повседневного тестирования сывороток пациентов с целью выявления антител к инфекционным агентам. Правда, в ряде случаев чувствительность метода недостаточна.

### 3.2.3. Постановка прямой (для антигенов) и непрямой (для антител) реакций

1. Расплавляют агарозу (или агар), как для ДДГ, и затем помещают флакон с агарозой в водяную баню на 56°C.

2. Подогревают в бане несколько стеклянных пробирок объемом 15 мл.

3. Помещают стеклянные пластины на подогревную плиту (56°C). Можно использовать подложки Gelbond.

4. Вносят в пробирки по 9,6 мл агарозы (одна пробирка на одну пластину).

5. Добавляют в пробирки необходимое количество антигена или антител, закрывают парафином и несколько раз осторожно переворачивают, чтобы тщательно перемешать агарозу с реагентом. Не допускают образования пузырей.

6. Переносят теплую пластину на горизонтальную поверхность и быстро выливают на нее смесь агарозы с реагентом. Если необходимо, используют линейку из твердого материала, чтобы равномерно распределить жидкость по всей поверхности пластины. Пузыри удаляют, прикасаясь к ним донышком пробирки, или отгоняя к краям.

7. После затвердевания геля помещают пластину во влажную кювету, закрывают крышкой и убирают в холодильник на 4°C. Если в агар добавлен азид натрия, пластины можно хранить несколько дней. Тем не менее для хранения в кювете используют чистую фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой.

8. Помещают пластину на трафарет (рис. 6.7) и вырезают в теле лунки диаметром 1,5 мм (объем 2 мкл) с помощью перфоратора. Удаляют вырезанные кусочки геля.

9. Приготавливают в маленьких пробирках несколько разведений стандартного антигена (для РИД) или контрольной антисыворотки (для ОРИД), а также разведения опытных образ-

цов и помещают в лунки по 2 мкл каждого препарата с помощью микропипетки. Для каждого образца используют отдельный наконечник. Выбор пипетки очень важен — ошибки в нанесении в основном и обуславливают плохие результаты.

10. Помещают пластину в закрытую ювету и оставляют на 24 ч (или на ночь).

### 3.2.4. Технические замечания

1. Количество вносимых в гель антител или антигенов определяют эмпирически, учитывая количество стандартного антигена (или контрольных антител) в лунках. Следует иметь в виду, что хорошую антисыворотку можно добавлять в агарозу в концентрации 0,5%

(объем на объем), а количество антигена (для ОРИД) примерно составляет 20 мкг на 1 мл агарозы (200 мкг на пластину). Стандартный антиген (для РИД) берут в концентрации 1 мг/мл — 5 мкг/мл (20 мкг — 10 нм на лунку). Контрольную сыворотку (для ОРИД) разводят до соотношения 1:10. Исследуемые сыворотки вносят в лунки неразведенными и в разведении 1:3.

2. Количество антител или антигенов, смешиваемых с агаром подбирают таким образом, чтобы образовались кольца преципитации, диаметр которых можно измерить на еще влажной пластине, причем размер кольца вокруг

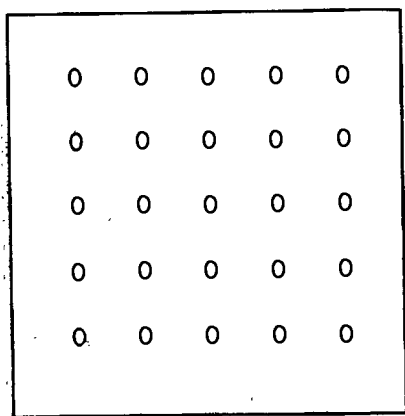


Рис. 6.7. Трафарет для реакций РИД и ОРИД. Размеры стекла 8×8 см, лунки образуют квадрат со сторонами 5 см

лунки с максимальной концентрацией стандартного антигена (или контрольных антител) по завершении реакции должен быть порядка 1 см. Чувствительность метода можно увеличить, снижая концентрацию реагента, вносимого в агар, и пропорционально уменьшая количества образцов в лунках. При уменьшении количеств взаимодействующих реагентов образуются более бледные кольца преципитации во влажном агаре. Можно увеличить контрастность, если окрасить отмытые и высушенные пластины. Таким способом можно повысить чувствительность метода определения антигена до 1 мкг/мл.

3. Очень важно вносить в лунки каждой пластины серию разведений стандартного антигена или антител, чтобы сравнивать с ними опытные образцы. Сравнение опытных образцов на одной пластине с контрольными на другой может исказить результаты, поскольку пластины отличаются друг от друга.

4. Чтобы нивелировать эффект возможных ошибок в нанесении образцов и увеличить таким образом точность метода, разведения стандартного антигена (или контрольных антител) следует вносить по крайней мере в двух параллелях. Опытные образцы тоже лучше дублировать, а кроме того, можно вносить их в двух разведениях.

5. Толщина агара должна быть равномерной по всей поверхности пластины. Чтобы избежать неоднозначности результатов, вызываемой различной толщиной геля в разных местах пластины, лунки для внесения стандартов нужно выбирать случайным образом.

6. Пластины следует подготавливать по крайней мере за 1 день до эксперимента и хранить при  $4^{\circ}\text{C}$ , чтобы внесенный в гель реагент равномерно распределился. Если эксперимент предполагается проводить при комнатной температуре, то перед нанесением образцов пластины следует вынуть из холодильника, чтобы они согрелись.

7. Следите за тем, чтобы реакция протекала при постоянной температуре. Сильные изменения температуры (например, от  $4^{\circ}\text{C}$  до комнатной) могут привести к появлению нескольких колец преципитации в системе с одним антигеном, поскольку растворимость комплексов зависит от температуры.

8. Желательно, чтобы антитела, вносимые в агар, представляли собой фракцию иммуноглобулинов класса G. Таким образом можно уменьшить концентрацию добавляемого в агар белка и тем самым фоновое окрашивание. По этой же причине лучше использовать антитела с высоким титром, концентрация которых в агаре может быть менее 1% (объем на объем).

9. Если для РИД антигенов используют моноспецифическую антисыворотку, стандартные антигены и опытные образцы не обязательно должны быть чистыми. При определении белков в сыворотках пациентов в качестве антигенного стандарта можно использовать цельную сыворотку. Точно так же для титрования антисывороток методом ОРИД можно вносить в гель неочищенный антиген, если опытные сыворотки моноспецифичны.

10. Для РИД малого количества образцов можно использовать стандартные стекла для микроскопии. Объемы агарозы и реагентов в этом случае втрое меньше, чем для пластин размером  $8 \times 8$  см.

### 3.2.5. Количественная оценка результатов

I. *Измерение колец преципитации на влажных и окрашенных пластинах.* Во многих случаях можно считать результаты с еще влажных гелей. Измерение проводят с помощью окулярного микрометра, прикладываемого к обратной стороне пластины. Пластину рассматривают на темном фоне при косом освещении. Существуют коммерческие модели ридеров с источником рассеянного света и линзой с координатной сеткой.

Прежде чем измерять кольца преципитации, пластины можно высушить и окрасить, как и в случае ДДГ (разд. 3.1.4). Высушивание следует проводить осторожно, чтобы кольца преципитации не изменили формы и размеров. Высушенные пластины можно измерять с помощью окулярного микрометра или специальных линеек, которые поставляются некоторыми производителями готовых пластин для РИД.

II. *Калибровочные кривые.* Диаметр колец находится в линейной зависимости от концентрации антигена только в том случае, если реакция продолжалась несколько дней и закончилась полностью. Если результаты учитывают через 24 ч после начала реакции, можно предложить в качестве компромисса построить график зависимости диаметра колец от логарифма концентрации антигена. Данный метод дает хорошее спрямление калибровочной кривой (рис. 6.8, А). Однако более популярны другие методы. Можно, например, построить график зависимости квадратов диаметра колец (в линейных координатах) от двукратных разведений стандарта (рис. 6.8, В) или от убывающих концентраций антигена (рис. 6.8, Б). Все три метода дают одинаково точные значения для опытных образцов.

На рис. 6.8 приведены графики зависимости диаметра колец преципитации от концентрации стандартного IgG человека. Измерения проводили через 16, 24, 36 и 48 ч после начала экспериментов по выявлению IgG в сыворотках человека. На рис. 6.9 показана пластина, на которой был поставлен этот тест. Условия опыта указаны в подписи к рисунку. Пример исследования антисывороток барана к IgG человека методом ОРИД показан на рис. 2.8, гл. 2.

III. *Точность, разрешающая способность и чувствительность.* Точность или воспроизводимость результатов радиальной диффузии сильно повышается, если использовать внутренние стандарты. Тогда случайные ошибки сводятся к разбросам в пределах пластины, главными причинами которых служат неточность разведения и нанесения образцов. По мере накопления опыта можно добиться таких результатов, когда

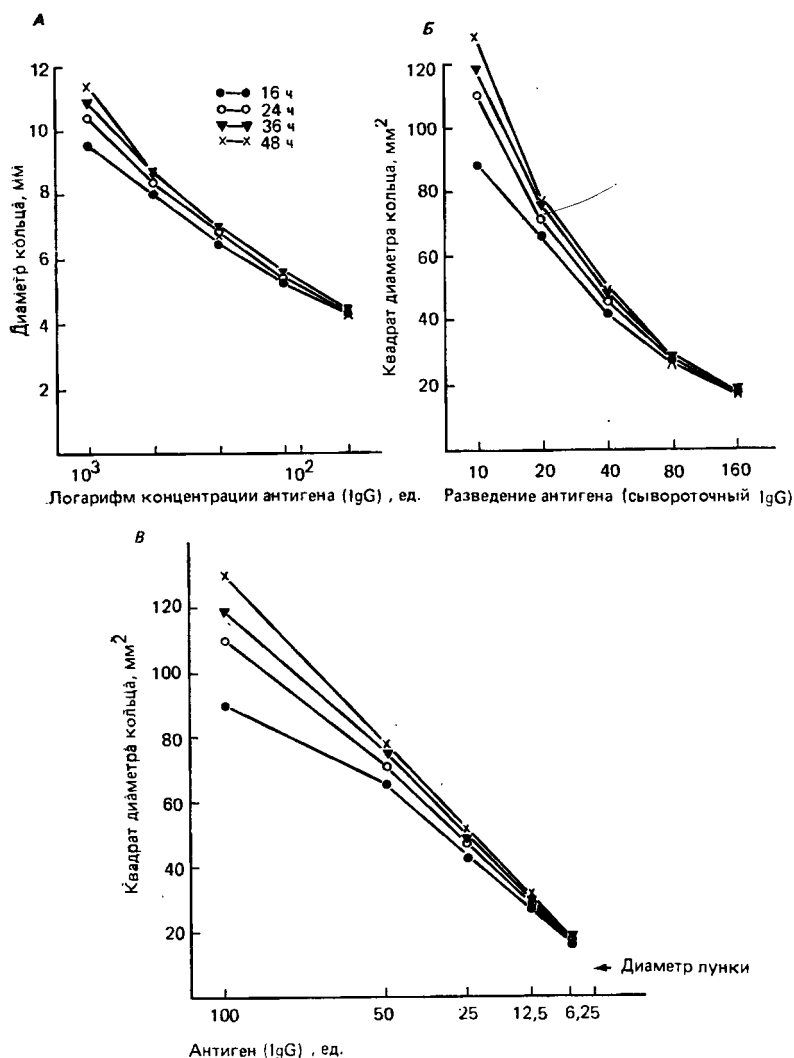


Рис. 6.8. Три способа построения калибровочных кривых по одним и тем же данным для определения антигена методом РИД. Кривые на каждом графике отражают реальные диаметры колец преципитации в опыте с IgG человека, измеренные через 16, 24, 36 и 48 ч. Обратите внимание, что наилучшая линейность кривой достигается при использовании метода, который иллюстрирует рис. В, однако для этого необходима инкубация в течение 48 ч. Кривые (16-часовая инкубация), построенные при использовании методов А и Б, обеспечивают недостаточную точность. Пластина РИД, с которой сняты данные для построения кривых, приведена на рис. 6.9. Условия опыта указаны в подписи к этому рисунку

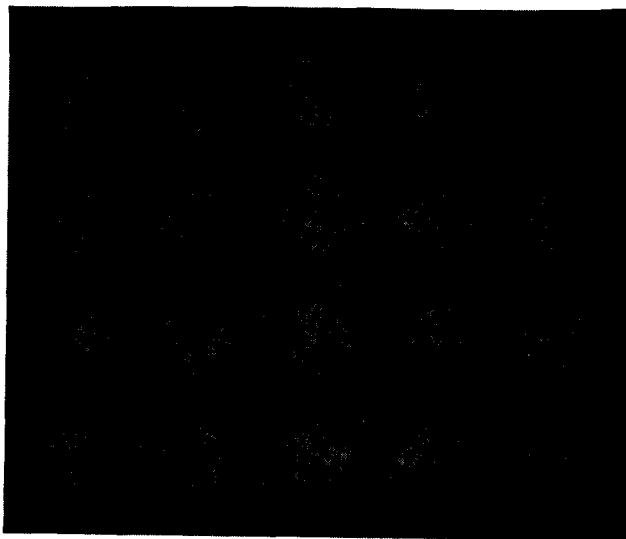


Рис. 6.9. Реакция РИД для определения концентраций IgG в сыворотке человека. К агарозе (9,6 мл) добавили 100 мкл IgG-фракции антител барана к IgG человека (Fc-специфические антитела). Для построения калибровочной кривой использовали пул нормальных человеческих сывороток (с известной концентрацией IgG) в разведениях 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 и 1:160. Каждое разведение вносили в две лунки, выбранные случайным образом. Опытные образцы, в частности сыворотки больных IgG-миеломой, разводили в 50 и 100 раз и каждое разведение вносили в две лунки. Пластины инкубировали 48 ч при комнатной температуре

ошибка будет составлять не более 5%. Ошибку можно определить, измерив разброс диаметров колец преципитации вокруг параллельных лунок. Кроме того, ошибки проявляются в нерегулярности полученной калибровочной кривой. Для уменьшения ошибки и приближения результатов к реальным значениям, желательно подбирать разведения таким образом, чтобы значения, полученные для опытных образцов, попадали на середину калибровочной кривой. Из двух разведений образца для определения его концентрации следует выбирать то, которое дало результат, лежащий ближе к центру калибровочной кривой, чем и объясняется необходимость использования двух разведений. Точность определения варьирует от разведения к разведению из-за разного наклона кривой. Если результаты ни для одного из разведений опытного образца не попадают в центр калибровочной кривой, опыт лучше повторить с другими разведениями. Точность увеличивается и в

том случае, если все разведения всех образцов вносят в параллелях (это снизит эффект случайных ошибок), и увеличивают количество точек калибровки, приблизив их друг к другу.

Чувствительность метода поднимается двояко. Во-первых, это возможность по данной калибровочной кривой уловить различия в концентрациях образцов. Результат зависит от того, с какой ошибкой найдены точки кривой, а также от ее наклона и линейности. Во-вторых, чувствительность определяется минимальным количеством антигена или антител, которое можно определить данным методом. В РИД этот параметр зависит от размера лунок, случайных ошибок, а также от того, насколько видимыми и четкими получились кольца преципитации при небольших концентрациях образцов.

### **3.2.6. Преимущества и недостатки радиальной иммунодиффузии**

Метод РИД прост, требует минимального оборудования и дает легко стандартизируемые результаты как для антигенов, так и для антител. По сравнению с гемагглютинацией и методами иммуноферментного анализа (гл. 7 и кн. 2) чувствительность РИД невелика (около 5 мкг/мл), однако это удобный и распространенный метод определения многих антигенов, концентрация которых удовлетворяет пределам чувствительности. Как для РИД, так и для ОРИД необходимо иметь моноспецифические преципитирующие антисыворотки, однако стандартные и опытные образцы антигенов не обязательно должны быть очищены. Методом РИД невозможно определить изменения свойств антигена (структуры, целостности эпитопов, гомогенности), но зато антигенные тесты не подвержены влиянию рН (сравните с ракетным и двумерным ИЭФ, см. разд. 4). Помимо низкой чувствительности метода, главный недостаток РИД — это время, необходимое для получения количественных результатов. Пластины, на которых поставлена РИД, удобны для хранения.

## **4. Иммуноэлектрофоретические методы**

В данных методах совмещены электрофоретическая миграция антигенов в агарозе с последующей иммунопреципитацией в геле. В результате первого процесса происходит частичное разделение смеси антигенов, поскольку скорость их миграции в геле зависит от суммарного заряда при данном рН буферного раствора. Кроме того, отрицательно заряженные молекулы быстро мигрируют в гель, содержащий антитела, что ускоряет преципитацию и сводит к минимуму латеральную диффузию.

Известны четыре широко распространенных модификации иммуноэлектрофореза. Они незаменимы для качественного и (или) количественного определения антигенов (как индивидуальных, так и находящихся в смеси) и значительно облегчают определение специфичности антисывороток.

#### 4.1. Иммуноэлектрофорез (ИЭФ)

##### 4.1.1. Принцип метода

В пластине агарозного геля вырезают лунки и расположенные между ними канавки (рис. 6.10). В лунки вносят растворы антигенов и накладывают на агарозу с противоположных сторон фитили, соединяющие ее с электродным буфером в двух резервуарах. После включения

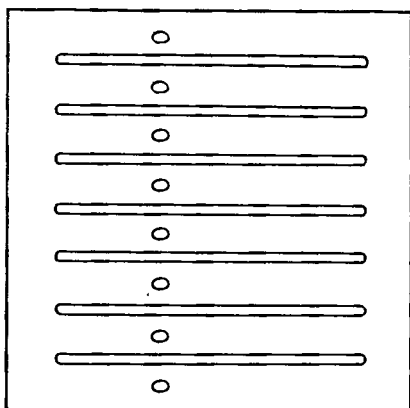


Рис. 6.10. Трафарет для лунок и канавок в случае проведения иммуноэлектрофореза на пластине 8×8 см. Показано расположение лунок для агарозы с низкой величиной электроосмоса, когда большинство антигенов мигрирует к аноду (например, белки сыворотки). При использовании гелей с высокой величиной электроосмоса для одновременного исследования «анодных» и «катодных» антигенов, лунки можно сместить к центру пластины

тока антигены начинают мигрировать из лунок вдоль геля и разделяются. По окончании электрофореза в канавки, параллельные направлению миграции антигенов, вносят антисыворотки. Антигены и антисыворотки диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия образуются дуги преципитации (рис. 6.11). Идентичность антигенов можно определить, используя известные антигены и антитела (рис. 6.1.2, А). Принцип интерпретации результатов такой же, как и для методов диффузии в геле.

##### 4.1.2. Применение

Иммуноэлектрофорез в первую очередь представляет собой качественный метод исследования антигенов и специфичности антител.

**1. Антигены.** Метод применяется для 1) определения антигенного состава смеси — это, в частности, важно при очистке антигенов, поскольку позволяет определить природу примесей, и 2) для анализа гетерогенности и гомогенности индивидуальных антигенов. Он является «краеугольным камнем» клиниче-





Рис. 6.11. Иммуноэлектрофореграмма сыворотки морской свинки, полученная с помощью полиспецифической кроличьей антисыворотки (агар с высокой величиной электроидмоса)

ского анализа парапротеинов (рис. 6.12, Б) и стандартным методом иммунохимического анализа широкого спектра белков [11]. Метод широко применяется при исследовании антигенов инфекционных агентов, белков плазмы и других физиологических жидкостей человека и животных. Он эффективно используется для первичного скрининга при исследовании недостаточности иммуноглобулинов и комплемента.

II. *Антитела.* Обычный тест на определение специфичности антисывороток (рис. 6.12, А). В качестве контроля эффективности антисыворотки против суммарного пула сывороточных белков.

#### 4.1.3. Воспроизведение метода

1. Готовят агарозные пластины, так же как для теста диффузии в геле (разд. 3.1.3).

2. Помещают пластину на трафарет (рис. 6.10), с обеих сторон пластины помещают две подставки для металлической линейки, по которой остроконечным скальпелем прорезают границы канавок. С помощью перфораторов диаметром 1,5 или 2,3 мм вырезают лунки, а затем последним вырезают концы канавок. В продажу поступают разнообразные коммерческие модели ножей для гелей (см. приложение). Удаляют вырезанные кусочки геля из лунок. Переворачивают пластину и, держа ее на уровне глаз, подцепляют конец каждой полоски геля в канавках, чтобы полоски выпали.

3. Наливают буфер в резервуары камеры для электрофореза и подают воду в змеевик охлаждающей пластины.

4. Вносят антигены в лунки, а на поверхность геля перед одной из лунок помещают кристаллик бромфенолового синего. Обрезают верхний правый угол геля, чтобы пометить верхний (анодный) край [на стекле (или подложке Gelbond) мож-

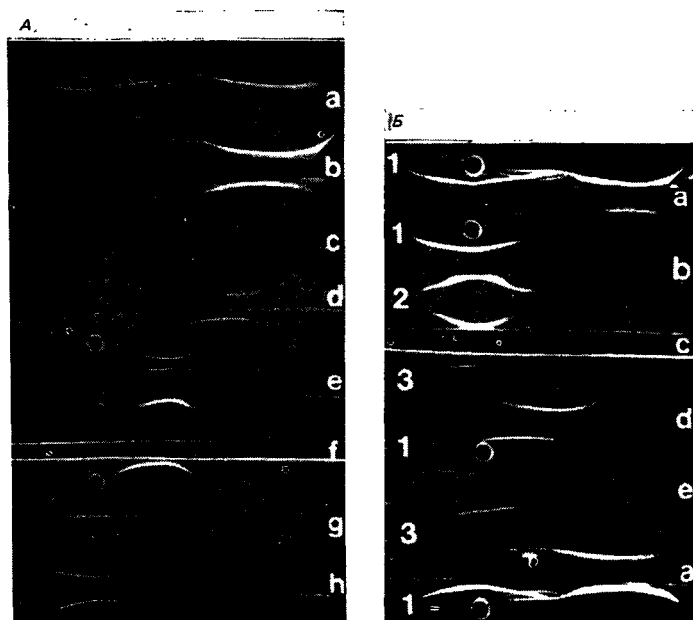


Рис. 6.12. Примеры иммуноэлектрофореза. А. Электрофореза некоторых сывороточных белков человека, полученная с помощью набора моноспецифических антисывороток. Все лунки содержат нормальную сыворотку человека. В канавках — специфические антисыворотки к (а) суммарному пулу сывороточных белков; (б) сывороточному альбумину; (в)  $\alpha$ -1-анти трипсину; (д) орозомукоиду; (е) СЗ-компоненту комплемента; (ф) трансферрину; (г) IgA; (h) IgG. Б. Выявление миеломных белков IgG $\kappa$  и IgA $\lambda$  в сыворотках двух пациентов с помощью соответствующих антисывороток. Лунки: (1) нормальная сыворотка человека, (2) сыворотка больного IgG $\kappa$ -миеломой; (3) сыворотка больного IgA $\lambda$ -миеломой. Канавки: антисыворотки к (а) цельной человеческой сыворотке; (б) IgG (Fc-специфическая); (в) легким цепям  $\kappa$ ; (д) IgA (Fc-специфическая); (е) легким цепям  $\lambda$ . Миеломные белки в сыворотке можно обнаружить по характерному изгибу дуги преципитации в форме лука, которую образует патологический иммуноглобулин благодаря высокой концентрации гомогенного белка. Кроме того, в зоне преципитации миеломного белка гомогенные легкие цепи концентрируются в области изгиба и в результате линия преципитации легкой цепи выглядит укороченной

но вытравить [кодовый номер]. Помещают гель на охлаждаемую пластину камеры для электрофореза, так чтобы канавки шли от буфера к буферу. Подготавливают два марлевых фитиля размером 25×8 см, смачивают их в буфере, избыток буфера отжимают и прикладывают короткими сторонами к противоположным краям геля, чтобы соединить резервуары для буфера через гель друг с другом. Для обеспечения непрерывно-

го контакта, осторожно прижимают фитили к краям геля, предварительно смочив пальцы в буфере.

5. Закрывают камеру крышкой (в современных камерах контактные разъемы для безопасности находятся в крышке). Присоединяют к камере провода, соблюдая полярность (анод — к правому краю пластины). Проверяют полярность проводов на источнике питания и включают ток. Создают напряжение около 80 В на пластину (10 В/см), при этом сила тока составляет 12 мА на пластину (1,5 мА/см). В большие камеры для электрофореза можно помещать до пяти пластин одновременно при параметрах тока 150 В и 60 мА. Проведение электрофореза при очень большом напряжении может привести к перегреву, деформации и высыханию геля, и ток перестанет проходить.

6. Убеждаются, что бромфеноловый синий мигрирует к аноду. При pH 8,6 скорость его миграции должна составлять около 4 см/ч. Прежде чем открыть крышку и осмотреть пластину, обязательно выключают источник тока. Электрофорез заканчивают, когда краситель переместится к краю канавки.

7. Немедленно переносят гель в неглубокую влажную камеру и помещают на столик с уровнем. Вносят в канавки около 150 мкл соответствующих антисывороток и закрывают крышку камеры. Не двигайте камеру (например, не помещайте ее в холодильник) до тех пор, пока сыворотка не войдет в гель.

8. Для прохождения реакции преципитации гели обычно оставляют на ночь при 4°C. Если реакцию проводят при комнатной температуре, проверяют гель через несколько часов и, если необходимо, останавливают реакцию, промыв гель водой до того момента, когда дуги преципитации еще сохраняют четкость. Лучше фотографировать влажные пластины в рассеянном свете, заполнив канавки водой. Нижнюю стеклянную поверхность пластины можно обезжирить глицерином. Пластины отмывают, высушивают и окрашивают так же, как и при осуществлении иммунодиффузии в геле (разд. 3.1.4). Для удаления из геля сывороточных белков его следует отмывать очень тщательно. Фоновое окрашивание белков уменьшается, если в качестве антител используют IgG-фракцию сыворотки.

#### 4.1.4. Технические замечания

1. *Электродный буфер и буферы для геля.* При pH 8,6 большинство белков мигрируют к аноду, поэтому для анализа сывороточных и других белков обычно используют барбиталовый буфер, pH 8,6, а лунки вырезают на катодной стороне пластины. Однако для лучшего разделения белков с другими

значениями  $pI$  можно использовать буферы с меньшим  $pH$  (до 4), что не влияет на стадию преципитации или целостность геля. Другие свойства буфера подбирают эмпирически. Буферы с низкой молярностью могут вызвать колебания  $pH$ , а в буфере слишком высокой молярности гель может перегреться. Обычно используют буферы 0,02—0,075 М. Неоднократно показано, что для хорошего разделения сложных смесей антигенов гораздо более важен выбор анионов буфера, чем его  $pH$ . Однако вместе с тем существуют данные о том, что для разделения белков, мигрирующих близко друг к другу при  $pH$ , например, 8,6, гораздо полезнее изменить  $pH$ , так чтобы приблизить его к значениям  $pI$  белков и тем самым усилить эффект небольшого различия их зарядов [12]. Препараты, плохо растворимые в воде (например, экстракты клеточных мембран), успешно разделяются, если добавить в электродный буфер и буфер геля соответствующий детергент, например ДСН.

II. *Свойства агара и агарозы и электроэндо́смос.* При щелочных  $pH$  буфера агар несет незначительный отрицательный заряд, обусловленный ионизацией неорганических кислых групп. В результате гель приобретает постоянный заряд, сбалансированный ионами  $H_3O^+$  растворителя. Это приводит к возникновению в жидкой фазе геля слабого катодного тока, называемого электроосмосом [12] или электроэндо́смосом. Коммерческие препараты агара в отличие от агарозы обладают ярко выраженными электроэндо́смотическими свойствами, и в результате  $\beta_2$ - и  $\gamma$ -глобулины, которые имеют в сыворотке при  $pH$  8,6 сильный отрицательный заряд (это молекулы с самым низким значением  $pI$ ), мигрируют к катоду (рис. 6.11). В этом нет большой беды, поскольку, правильно подобрав анионы буфера, можно разделить изучаемые антигены как в направлении к катоду, так и к аноду. Таким образом, работая с агаровыми гелями, лучше вырезать лунки в центре пластины, чтобы обеспечить миграцию белков к катоду. Часто наилучшее разделение иммуноглобулинов на классы достигается именно в агаровом геле.

В отличие от агара некоторые коммерческие препараты агарозы обеспечивают гораздо меньший суммарный заряд геля и обладают низкими электроэндо́смотическими свойствами. Следовательно, в такой агарозе миграция  $\gamma$ -глобулинов при  $pH$  8,6 минимальна, однако антигены, мигрирующие к аноду, разделяются очень хорошо. Агароза с низким электроэндо́смосом идеально подходит для методов, в которых антигены электрофоретически мигрируют при  $pH$  8,6 в гель, содержащий антитела (ракетный или двумерный ИЭФ, см. разд. 4.2 и 4.3), или когда антитела перемещаются по направлению к

антигену, быстро мигрирующему к катоду (встречный ИЭФ, см. разд. 4.4).

III. *Реагенты.* В лунки вносят 2—5 мкл антигена. Сыворотку можно использовать неразведенной (для определения небольших концентраций антигенов) или в разведении от 1:2 до 1:5. При определении индивидуального белка с концентрацией 1 мг/мл с помощью сильных антисывороток для получения удовлетворительных результатов достаточно 5 мкл препарата.

Количество антисыворотки, вносимой в канавки, следует подбирать таким образом, чтобы получались четкие дуги преципитации, не выходящие за пределы геля. Рисунок дуг зависит от соотношения концентраций антигена и антитела в геле. Если специфичность антисыворотки высока, для достижения удовлетворительных результатов достаточно внести в каждую канавку по 150 мкл неразведенной антисыворотки. В некоторых случаях необходимо через несколько часов после начала реакции вновь наполнить канавку антисывороткой. Другой способ — уменьшить антигенную нагрузку, если только это не отразится на образовании дуг преципитации. Использование цельной сыворотки, особенно если она содержит гемоглобин или большое количество липидов, может затруднить отмывание геля от фонового окрашивания. Поэтому лучше использовать IgG-фракции сывороток.

IV. *Распределение препаратов на пластине.* Для количественного определения антигенов и антител в лунки той же пластины необходимо внести контрольные антитела известной специфичности и стандартные антигены. Таким образом, при оценке чистоты фракции сывороточных белков методом ИЭФ реагирующие друг с другом контрольные сыворотку и антисыворотку следует расположить в верхней части пластины, а исследуемые антигены чередовать со стандартными. Примеси легко определить по расположению дуг преципитации, а для подтверждения инородности каких-либо молекул используют соответствующие специфические сыворотки. Аналогично и при исследовании антисывороток для контроля используют сыворотки с известной специфичностью.

V. *Буферы.* Резервуары для электродного буфера следует регулярно мыть, а буфер заменять свежим. В старом буфере появляются загрязняющие примеси, которые могут попасть в гель. Фитили тоже могут служить источником загрязнения, и следует регулярно использовать новые. При частом использовании камеры для электрофореза лучше каждый раз менять полюса электродов, чтобы буфер в обеих камерах истощался равномерно. Не забывайте при этом изменить и ориентацию

пластины. Пригодность буфера можно определить, измерив напряжение на пластине геля с помощью электрода.

#### 4.1.5. Преимущества и недостатки ИЭФ

Иммуноэлектрофорез считается незаменимым методом для качественного анализа смесей антигенов, например, сывороток. С помощью данного метода можно идентифицировать до 20 компонентов смеси. Удастся исследовать и аномалии индивидуальных белков, поскольку на стадии разделения обнаруживаются нарушения электрофоретической подвижности (например, гомогенность  $\rho I$  миеломных белков), существенные отклонения от нормальной концентрации (определяемые по интенсивности дуг преципитации) и изменения субъединичного состава (например, искажение соотношения легких цепей  $\kappa$  и  $\lambda$  у миеломных белков). Такие тонкие изменения трудно обнаружить с помощью простой диффузии в геле. Осторожно подбирая агарный/агарозный носитель, состав буфера и его  $pH$ , можно исследовать молекулы с самыми различными зарядами. Применимость данного метода, как и всех других, основанных на реакции преципитации, ограничена определением только таких молекул, концентрация которых в растворе не менее или равна 5 мкг/мл, а размеры не препятствуют образованию преципитатов.

#### 4.2. Ракетный иммуноэлектрофорез

Ракетный иммуноэлектрофорез был разработан в результате дальнейшего развития принципа комбинации электрофореза и иммунопреципитации. Он позволяет быстро оценить концентрацию индивидуального антигена в реакции с моноспецифической антисывороткой.

##### 4.2.1. Принцип метода

Индивидуальные антигены электрофоретически мигрируют из лунок, расположенных у основания геля, в агарозу, содержащую специфические антитела. С помощью специальных условий обеспечивается миграция антигена к аноду и неподвижность антител (IgG). По мере связывания антител мигрирующим антигеном образуются заостренные дуги преципитации (ракеты). Высота ракет пропорциональна концентрации антигена. Если на пластину нанесено несколько разведений стандартного антигена, то концентрации неизвестных (опытных) образцов легко определить, сравнивая их со стандартной кри-

вой. Для определения индивидуальных антигенов в смесях гель должен содержать моноспецифические антитела. Проводя реакцию с полиспецифической антисывороткой, можно оценить чистоту мигрирующего антигена, а используя смеси антигенов — подтвердить моноспецифичность антисыворотки. Применение теста ограничено антигенами, мигрирующими при рН 8,6 к аноду, но, с другой стороны, это очень быстрый метод (1—2 ч) количественного определения таких антигенов.

#### 4.2.2. Воспроизведение метода

1. Подготавливают пластину агарозного геля, содержащего антитела, как для осуществления РИД (разд. 3.2). Концентрация антител может быть иной — ее определяют эмпирически. Антисыворотки обычно используют в концентрации 1—2% (объем на объем). Для уменьшения фонового окрашивания лучше использовать IgG-фракции антисывороток.

2. Когда гель застынет (предпочтительнее оставить на ночь при 4°C, для того чтобы антитела равномерно распределились в геле), помещают пластину на трафарет (рис. 6.13) и вырезают перфоратором ряд из 11 лунок объемом 5 мкл. Удаляют вырезанные кусочки геля.

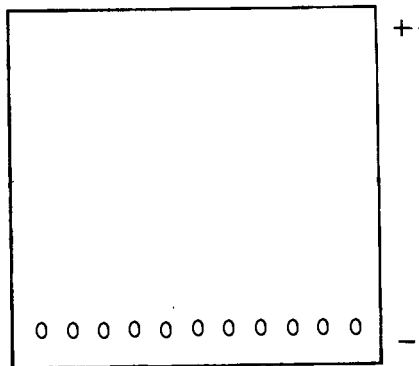


Рис. 6.13. Трафарет для проведения ракетного ИЭФ на пластине 8×8 см.

3. Готовят несколько разведений стандартного антигена — для большей точности рекомендуется использовать серию из пяти разведений: от 1 мг/мл до 10 мкг/мл. Подготавливают три опытных образца (на одну пластину), в двух разведениях, отличающихся друг от друга в 8 раз. Выбирают случайным образом лунки для стандартных и опытных образцов и вносят в них по 5 мкл каждого образца.

4. Немедленно начинают электрофорез. Верхний край пластины должен быть присоединен к аноду. Для быстрого электрофоретического разделения при высоком напряжении необходимо водяное охлаждение. При напряжении 80—100 В (10—12 В/см) электрофорез должен закончиться через 1—2 ч. Время окончания определяют по ракете наибольшей концентрации стандартного антигена. Когда ее пик заострится (рис. 6.14), ток выключают.

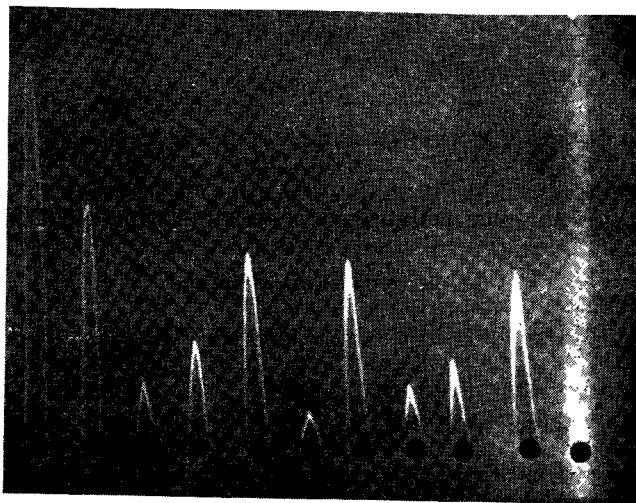


Рис. 6.14. Ракетный ИЭФ. Иммуноэлектрофореграмма, полученная при использовании пяти разведений стандартного антигена и двух разведений трех неизвестных сывороток. Цель эксперимента — определение сывороточного альбумина человека. К агарозному гелю (9,8 мл) добавили 80 мкл IgG-фракции антител овцы к альбумину. Использовали двукратные разведения стандартного антигена от 500 мкг/мл до 31,25 мкг/мл. Исследуемые сыворотки разведены в 250 и 500 раз

#### 4.2.3. Интерпретация результатов

Во избежание латеральной диффузии антигена электрофорез начинают немедленно после нанесения образцов. При большой скорости разделения ширина ракет не превышает диаметра лунок, что увеличивает точность определения. Концентрации стандартов выбирают таким образом, чтобы образовавшиеся ракеты не выходили за пределы пластины и ракета стандарта наибольшей концентрации занимала всю длину геля. Двойные или множественные ракеты указывают на то, что антисыворотка не моноспецифична (см. гл. 2, рис. 2.3).

#### 4.2.4. Количественная обработка результатов

1. Для быстрого получения результатов можно измерить высоту ракет, положив гель на стекло с подсветкой. Ракеты измеряют от вершины до верхнего края лунки. Если имеется достаточно времени, гель промывают 2—3 дня в 0,85%-ном растворе NaCl, затем в дистиллированной воде, высушивают и окрашивают, а затем проводят измерение.



2. Для определения количества антигена в неизвестных образцах строят калибровочную кривую, откладывая значения высоты пиков от концентраций стандартного антигена. Неизвестные концентрации определяют с помощью данной кривой. Чувствительность метода находится в пределах 5 мкг/мл. Ее можно увеличить, уменьшив концентрацию антигенов. В этом случае, чтобы увидеть и измерить ракеты, пластины, скорее всего, придется окрасить. Точность определения — 5—10%.

#### 4.2.5. Преимущества и недостатки метода

Главное преимущество описанного метода количественного определения антигенов по сравнению с РИД — это быстрое получение результатов. Однако ракетный ИЭФ применим только к тем молекулам, которые обладают средним или сильным отрицательным зарядом при pH 8,6, что исключает возможность определения иммуноглобулинов, для которых нужно подбирать специальные электролиты и агар. Отрицательный заряд исследуемых иммуноглобулинов можно увеличить карбамилрованием как опытных, так и стандартных сывороток. Это достигается следующим образом [13]:

1. Добавляют к двум объемам 2М KСNO один объем сыворотки.

2. Инкубируют при комнатной температуре 6—18 ч. На практике удобнее определять иммуноглобулины и комплемент с помощью РИД. Если же нужно быстро получить результаты или исследовать большую серию образцов, лучше применить нефелометрический и сходный с ним турбодиметрический методы [14, 15].

### 4.3. Перекрестный иммуноэлектрофорез

#### 4.3.1. Принцип метода и области применения

Данный метод совмещает в себе электрофоретическое разделение антигенов в одном направлении на первой стадии и принцип ракетного ИЭФ в другом направлении (под углом 90°) на второй стадии. Разделенные антигены мигрируют в агарозу с полиспецифическими антителами и образуют узор из ракет. Метод имеет большое аналитическое значение для исследования состава антигенов и, кроме того, обладает некоторыми чертами количественных подходов. Он очень полезен для тестирования чистоты антигенов, мигрирующих к аноду, а также специфичности антисывороток. Любые белки, которые входят в гель, содержащий антитела, но не образуют пре-

ципитатов, можно удалить из геля, продолжая электрофорез до тех пор, пока они не выйдут из него со стороны анода. Таким образом, данный метод можно использовать для очистки комплексов антиген — антитело и пики использовать для иммунизации. Это открывает доступ к большому количеству антигенов, которые трудно очистить другими способами. Сравнивая антигенные пики на пластинах с известными стандартами, можно производить количественную оценку смесей антигенов. Это позволяет, в частности, определить изменения состава сыворотки при заболевании. Можно наблюдать за изменениями индивидуальных белков, например активацией (ферментативное расщепление) третьего компонента комплемента (С3) и протеолизом других белков. Метод можно использо-

вать и для проверки специфичности антисывороток, внесенных в гель для осуществления второго этапа.

#### 4.3.2. Воспроизведение метода

##### 1. Первое направление.

1. Приготавливают агарозный гель на барбиталовом буфере, как в случае ИЭФ и ДДГ (разд. 3.1.3). Подложки Gelbond не используют.

2. С помощью трафарета (рис. 6.15) разрезают гель на полоски шириной 1 или 1,5 см и в указанных местах вырезают лунки.

3. Вносят в лунки антигены и проводят электрофорез (см. разд. 4.1.3). Когда бромфеноловый синий окажется на расстоянии 1 см от анодного края пластины, выключают ток.

4. Немедленно переносят полоску с разделенными антигенами на другую, стеклянную пластину. Пластина должна быть теплой. Полоску геля укладывают на край пластины (можно использовать подложку Gelbond), а на остальную поверхность наносят 8,5 мл заранее подготовленной смеси агарозы с антителами при 56°C. Новый гель должен плотно соединиться с пластиной первого. Эту стадию следует выполнять как можно быстрее, чтобы свести к минимуму диффузию зон разделенных антигенов в переносимой полоске геля. Полоску удобнее всего переносить на лезвии секционного ножа.

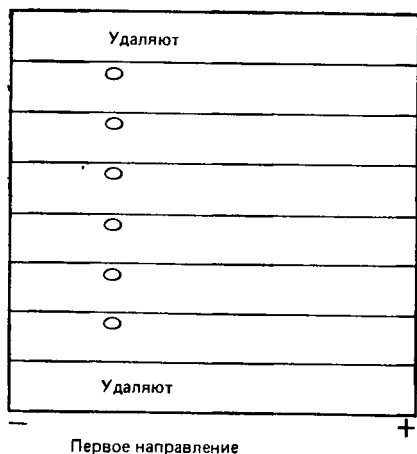


Рис. 6.15. Перекрестный иммуноэлектрофорез. Трафарет пластинный 8×8 см для электрофоретического разделения антигенов в первом направлении.

## II. Второе направление.

1. После застывания пластину геля переносят на охлаждаемую поверхность камеры для электрофореза, так чтобы пластина первого геля была соединена с катодным фитилем (т.е. второй электрофорез проводят под углом  $90^\circ$  к первому). Вторым этапом электрофореза рекомендуется проводить при напряжении 20 В (2,5 В/см) в течение ночи (16 ч). Если разделяемые антигены предполагается использовать для иммунизации, электрофорез должен продолжаться 24—48 ч.

2. Тщательно промывают гели в 0,85%-ном растворе NaCl и дистиллированной воде, высушивают под прессом и окрашивают (разд. 3.1.4). Для подготовки антигенов к иммунизации отмытый гель помещают на подсветку, вырезают нужный пик преципитации и вымачивают его в 0,85%-ном растворе NaCl — 1—2 нед.

Примеры перекрестного электрофореза приведены в гл. 2 (рис. 2.2 и 2.7).

### 4.3.3. Технические замечания

1. *Реагенты.* Для разделения в первом направлении обычно используют лунки объемом 2 мкл. Сыворотки (неразведенные) наносят, как правило, в объеме 1 мкл. На втором этапе в гель добавляют 200—500 мкл антител (2,5—6 %), однако это зависит от соотношения концентраций антигена и антител. Фоновое окрашивание белков можно уменьшить, используя IgG-фракцию антисыворотки.

2. Очень важно добиться, чтобы между двумя этапами прошло как можно меньше времени. Существенно проведение первого этапа на охлаждаемой поверхности, поскольку это позволяет ускорить процесс и получить сконцентрированные антигенные зоны. Охлаждение полезно и при разделении на втором этапе.

3. Второй этап заканчивают после того, как вытянутся наиболее выраженные пики преципитации. На электрофореграммах сывороток наибольший и ближайший к аноду пик дает альбумин (не считая пика преальбумина). По положению пика альбумина судят о качестве разделения в первом направлении. Если пик альбумина доходит до верхнего края пластины, значит, концентрация антител к суммарному пулу сывороточных белков подобрана правильно.

4. Для определения аномалий сывороточных белков очень важно стандартизировать эксперимент и использовать высококачественную сбалансированную полиспецифическую антисыворотку.

5. Если метод применяют для выделения антигенов, чрезвычайно важно соблюдать чистоту на всех стадиях работы. Буферные емкости не должны содержать посторонних белков (которые могут попасть туда из предыдущих гелей), бактерий и т. д. Для каждой пластины следует готовить новые фитили.

6. При определении чистоты антигенов или специфичности антител соответствующие концентрации должны быть в десять раз больше нормальных.

#### 4.3.4. Преимущества и недостатки метода

С помощью одних и тех же антисывороток перекрестный ИЭФ позволяет выявить большее число антигенов, чем простой ИЭФ. Дополнительное преимущество — это возможность очистки антигенов. Наибольшая ценность перекрестного ИЭФ заключается в том, что он позволяет определять специфичность антител в неденатурирующих антигены условиях. В то же время электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН с последующим Вестерн-блоттингом и иммунохимическим окрашиванием хотя и обладает очень высокой чувствительностью, однако позволяет обнаружить только те антигенные эпитопы, которые не изменяются после денатурации.

### 4.4. Встречный иммуноэлектрофорез

#### 4.4.1. Принцип метода и области применения

Антигены, значение  $pI$  которых при  $pH$  8,6 больше, чем у антител, находясь в геле, обладающем высокими электро-эндосмотическими свойствами, способны достаточно быстро мигрировать к аноду навстречу антителам, которые перемещаются из противоположной лунки к катоду. Использование этого явления позволяет быстро получить линии преципитации между лунками с антигенами и антителами при условии, что они внесены в соответствующих пропорциях. Встречный ИЭФ — очень чувствительный и быстрый метод определения как антигенов, так и антител [16]. Он широко применяется для выявления инфекционных антигенов в физиологических жидкостях (например, антигенов вируса гепатита В), изменений концентрации сывороточных белков (например,  $\alpha$ -фетопро-теина), а также для тестирования антител к целому ряду антигенов, мигрирующих к аноду. Чувствительность метода достигает 400 нг/мл.

#### 4.4.2. Воспроизведение метода

1. Готовят обычным способом пластины геля, выбрав соответствующую марку агара. Мы рекомендуем использовать агар Нобль фирмы Difco (1,2%). Этот агар обеспечивает миграцию антител в барбиталовом буфере, рН 8,6, к катоду.

2. Вырезают в геле лунки, используя трафарет (рис. 6.16). Обычно вырезают два ряда лунок диаметром 2 мм, находящихся на расстоянии 6 мм друг от друга. В ряд лунок, расположенных ближе к катодному краю пластины, вносят антигены (контрольные или исследуемые). В другой ряд лунок вносят по 5 мкл антител (исследуемые сыворотки или контрольные антитела). Подключают ток, так чтобы антигены мигрировали к аноду. Чтобы создать оптимальные условия для преципитации хотя бы в одной паре лунок, следует использовать разные разведения антигенов и антител. В поисках оптимальных соотношений можно вырезать антигенные лунки разного размера и объема.

3. Проводят электрофорез при стабилизированном токе, равном 1,5 мА/см. Результаты должны быть видны через 30 мин.

4. Чтобы повысить чувствительность определения, гели можно отмыть, высушить и окрасить (разд. 3.1.4).

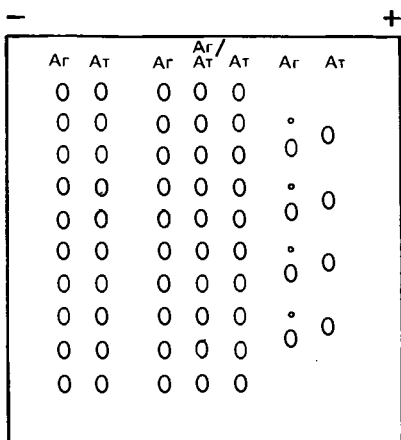


Рис. 6.16. Трафарет пластины 8×8 см для встречного иммуноэлектрофореза в агаре с использованием буферной системы, в которой антитела мигрируют к катоду, а антигены — к аноду. Два вертикальных ряда лунок слева предназначены для тестирования антигенов или антител в зависимости от того, имеются ли в наличии стандартный антиген (тест на антитела) или контрольные антитела (тест на антигены). Три вертикальных ряда в центре используются для одновременного определения антигенов и антител в опытных образцах сыворотки. В левый вертикальный ряд вносят стандартный антиген, в правый — контрольные антитела, а в центральный — исследуемую сыворотку. Лунки, расположенные справа, предназначены для определения антигенов, которые могут содержаться в образцах в различных концентрациях. Если в маленькие лунки вносить небольшие объемы (1—2 мкл), то по соотношениям, оптимальным для преципитации, можно определить очень высокие концентрации антигенов

## 5. Вестерн-блоттинг и иммунохимическое окрашивание антигенных попов

### 5.1. Принцип метода и области применения

Молекулы, разделенные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, можно электрофоретически перенести на нитроцеллюлозную мембрану, с которой они свяжутся, воспроизведя картину электрофоретического разделения. Этот процесс называют Вестерн-блоттингом или электроблоттингом [10, 17]. После блоттинга треки стандартного антигена и маркеров мол. массы окрашивают белковым или углеводным красителем, а остальные инкубируют с образцами антител [9, 18]. С помощью меченых антител выявляют отдельные антигенные полосы (после электрофореза в восстанавливающих условиях — субъединицы сложных молекул антигенов). Эту стадию называют иммунохимическим окрашиванием. В полном варианте метода используют как исключительную способность электрофореза в ПААГ разделять молекулы, концентрации которых очень малы, так и свойство антител выявлять специфические антигенные компоненты. Таким образом, метод чаще всего применяют для определения состава и молекулярных размеров антигенов, но, кроме того, он очень эффективен для определения специфичности антител (в частности, МКА) и поиска антигенно родственных молекул в однотипных или различных антигенных препаратах (например, различные виды бактерий, вирусные мутанты, клеточные экстракты и т. д.).

### 5.2. Оборудование и материалы (см. приложение)

Аппарат для электроблоттинга с системой охлаждения.

Нитроцеллюлозная мембрана.

Крупнопористая фильтровальная бумага.

Листы тонкого полиэтилена (например, «Clingfilm»).

Кюветы для отмывания и окрашивания.

Бритва или скальпель для разрезания мембраны на полоски.

Встряхиватель с подогревом.

Резиновые перчатки.

Емкость для полиакриламидного геля.

*Буфер для блоттинга*

Глицин 2,93 г (39 мМ)

Трис 5,81 г (48 мМ)

ДСН 0,375 г (0,0375%, вес на объем)

Метанол 200 мл (20%, объем на объем)

Дистиллированная вода — до 1 литра.

*Буфер для отмывания*

**PBS-твин:** PBS, pH 7,2 (разд. 2.3), содержащий 0,05% (объем на объем) твина 20.

**Блокирующий буфер**

PBS-твин, содержащий 5% (вес на объем) растворенного обезжиренного сухого молока.

**Первые антитела**, например мышинные МКА в виде асцитной или культуральной жидкости, поликлональные антисыворотки (например, кролика, барана и т. д.).

**Вторые антитела (антиглобулины)**, например конъюгированные с пероксидазой хрена антитела барана к мышинным иммуноглобулинам, антитела барана к кроличьим IgG, антитела кролика к IgG барана.

**Субстраты ферментов**

Широко используются следующие субстраты, дающие не растворимые окрашенные продукты:

1. 3-Амино/4-этилкарбазол (АЭК) — красновато-розовый. 4 мг субстрата растворяют в 200 мкл диметилформамида (BDH), вносят в 10 мл 0,05 М ацетатного буфера, pH 4,5 и фильтруют.

2. Диаминобензидин (ДАБ) — красно-коричневый. Перед использованием фильтруют. Буфер для ДАБ — 50 мМ трис-буфер, pH 7,4. В 10 мл буфера растворяют 0,5 мг субстрата. В оба субстрата добавляют  $H_2O_2$  (5 мкл на 20 мл).

**Авторадиография**

Меченный иодом аффинно очищенный антиглобулин (см. кн. 2).

Рентгеновская пленка и кассета.

Усиливающий экран (необязательно).

Проявитель (Kodak D19) и фиксаж.

### 5.3. Воспроизведение метода

#### 5.3.1. Электроблоттинг

Чтобы не загрязнить нитроцеллюлозу, все процедуры выполняют в резиновых перчатках.

1. Отделяют полиакриламидный гель от стекла в кювете с дистиллированной водой.

2. Переносят гель на толстую фильтровальную бумагу, пропитанную буфером для блоттинга, и помещают все это на еще несколько слоев пропитанной тем же буфером фильтровальной бумаги.

3. Отрезают квадратный листок нитроцеллюлозной мембраны подходящего размера, смачивают буфером для блоттинга и помещают на гель. На нитроцеллюлозу помещают несколько слоев увлажненной фильтровальной бумаги. Можно восполь-

зоваться пробиркой в качестве валика, чтобы удалить пузыри воздуха и обеспечить плотный контакт всех слоев друг с другом.

4. Плотно зажимают получившийся сэндвич, согласно инструкции к вашему аппарату, и вставляют в камеру для блоттинга. С обеих сторон от сэндвича помещают электроды, так чтобы анод находился со стороны нитроцеллюлозной мембраны. Проходящий через систему ток должен увлекать молекулы из геля по направлению к нитроцеллюлозе. Включают охлаждение (или помещают аппарат в холодную комнату).

5. Включают ток. Требуемая напряженность поля определяется исходя из площади и толщины геля. Ориентировочное значение —  $0,8 \text{ мА/см}^2$ . Рекомендованное время переноса белков из геля толщиной 1 мм в современном аппарате типа Multiphor II фирмы LKB — 45—60 мин. При использовании менее эффективных неохлаждаемых аппаратов процесс может потребовать более длительного времени — до 16—25 ч. В системе Multiphor можно проводить блоттинг с нескольких гелей одновременно. В этом случае каждая пара гель-нитроцеллюлоза отделяется от другой листом полиэтиленовой пленки (например, Clingfilm), смоченной буфером.

6. После блоттинга нитроцеллюлозную мембрану хранят в буфере для отмывания (PBS-твин) между двумя листами фильтровальной бумаги до окрашивания. Добавление твина существенно для блокирования участков неспецифического связывания иммуноглобулинов на стадии иммунохимического окрашивания.

### 5.3.2. Иммунохимическое окрашивание

Существуют два метода иммунохимического окрашивания. В первом используют антитела, меченные радиоактивным иодом, а затем проводят автордиографию. Второй метод основан на принципе ELISA и предусматривает использование антител к иммуноглобулинам, конъюгированных с ферментом, и реакцию локального окрашивания, когда субстрат превращается в нерастворимый окрашенный продукт в участках расположения комплексов антиген — антитело [10]. При использовании любого метода возникают проблемы неспецифического связывания, которые в обоих случаях решаются одинаково. Благодаря простоте и возможности длительного хранения реагентов иммуноферментный метод применяют чаще, за исключением тех случаев, когда требуется высокая чувствительность. Ниже приведено описание иммуноферментного метода, а в технических замечаниях описана процедура автордиографии. Методы приготовления антител к иммуноглобулинам описаны



в гл. 2. Технология конъюгации антител с ферментами (например, пероксидазой хрена, ПХ) описана в кн. 2. Существуют коммерческие препараты конъюгированных с ПХ антител к иммуноглобулинам различных видов животных (см. приложение). На рис. 6.17 приведены результаты Вестерн-блоттинга, полученные при использовании иммуноферментного метода.

1. Промывают мембрану в буфере PBS-твин в течение по крайней мере 1 ч, а затем разрезают ее на треки и нумеруют их, чтобы не перепутать. Окрашивают полосы, содержащие стандартный антиген и маркеры мол. массы, красителем для белков (или углеводов), как описано в гл. 2 (разд. 3.2.2, п. 7). Таким образом, вы удостоверитесь, что блоттинг прошел успешно, а потом сможете использовать эти полосы для сравнения.

2. Помещают остальные полосы в небольшую емкость и заливают раствором первых антител в буфере PBS-твин. Инкубируют 30—60 мин при 37°C, желательно на встряхивателе. Для стандартизации результатов рекомендуется процедуры инкубации и отмывания выполнять каждый раз в течение одного и того же времени, например 1 ч.

3. Тщательно отмывают полосы 30—60 мин в буфере PBS-твин и заливают раствором антииммуноглобулинов, конъюгированных с ПХ, в блокирующем буфере. Инкубируют 30—60 мин при 37°C и перемешивании.

4. Вновь отмывают полосы, помещают их в небольшие емкости, заливают раствором субстрата в соответствующем буфере. Помещают на встряхиватель и наблюдают за развитием окраски. На этой стадии не допускают попадания на полосы яркого света.

5. Когда полосы станут хорошо видны, останавливают реакцию, отмыв полосы буфером PBS-твин. Высушивают их на фильтровальной бумаге и помещают рядом с контрольными треками, окрашенными белковым красителем. Полосы можно приклеить на плотную бумагу.

### 5.3.3. Технические замечания

1. Разведение антииммуноглобулинов, конъюгированных с ПХ, определяют эмпирически. Наш опыт показывает, что конъюгат служит основной причиной неспецифического окрашивания, поэтому рекомендуется использовать его в наименьшей концентрации, которая еще обеспечивает достаточно интенсивное положительное окрашивание. Кроме того, на этой стадии применяют блокирующее вещество (обезжиренное молоко), а затем интенсивно промывают нитроцеллюлозу, по-

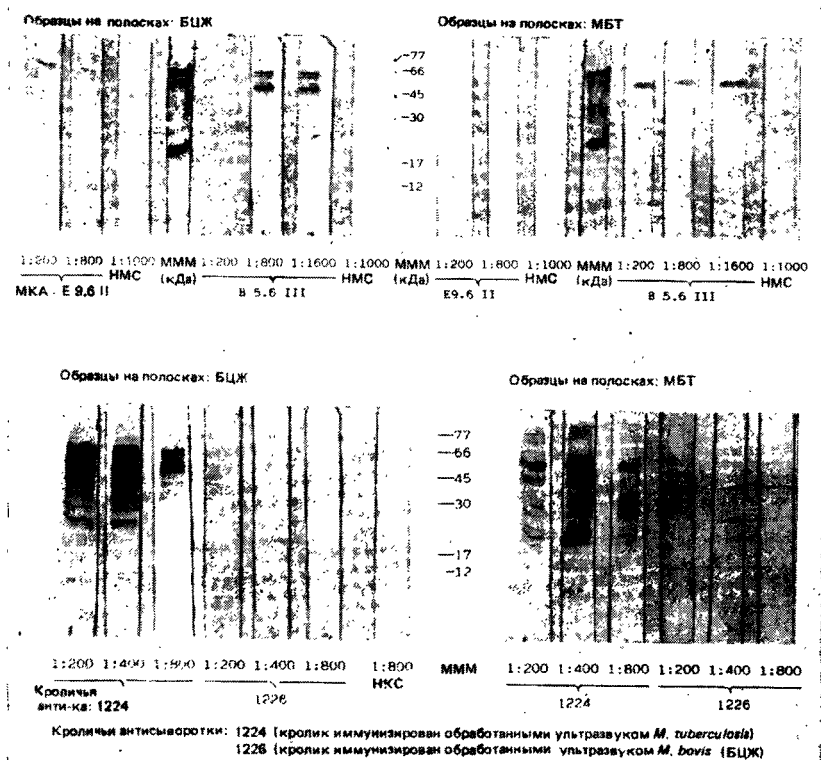


Рис. 6.17. Примеры иммунохимического окрашивания реплик, полученных методом Вестерн-блоттинга после электрофореза в ПААГ. Экстракты дезинтегрированных ультразвуком *M. bovis* БЦЖ (слева сверху и внизу, БЦЖ) и *M. tuberculosis* (справа, МБТ) разделили в 14%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях, перенесли с помощью электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану [включая и треки маркеров мол. массы (MMM, кДа)], разрезали на полосы, содержащие по одному треку, и инкубировали в индивидуальном порядке с антителами (треки MMM окрасили белковым красителем). Полосы, расположенные в верхней части рисунка, инкубировали с различными разведениями двух препаратов моноклональных антител (МКА) и нормальной мышиной сыворотки (НМС) в качестве контроля. Эти полосы окрашены антителами к мышиным иммуноглобулинам, конъюгированными с пероксидазой хрена. Субстрат — диаминобензидин. Полосы, расположенные в нижней части рисунка, инкубировали с двумя указанными кроличьими антисыворотками и нормальной кроличьей сывороткой (НКС) в качестве контроля. Эти полосы окрашены антителами к IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена

скольку следы молока, оставшиеся на ней, препятствуют реакции с субстратом. Следует также отметить, что при исследовании антигенов микроорганизмов в антисыворотке к иммуноглобулинам могут содержаться антитела, перекрестно реагирующие с разделенными антигенами. Возможно, придется предотвратить это нежелательное специфическое связывание путем абсорбции конъюгата. Концентрация конъюгата, которую используют для иммунохимического окрашивания в Вестерн-блоттинге, обычно примерно вдвое больше той, которую применяют в ELISA для получения оптической плотности окраски 1,0 за 20—30 мин при концентрации иммуноглобулинов, адсорбированных в лунках панели, 1 мкг/мл. Как правило, если для ELISA конъюгат разводят 1 : 5000, для блоттинга более чем достаточно разведения 1 : 1000.

2. При демонстрации связывания МКА с репликой антигена необходимо быть уверенным в специфичности конъюгата. Каждое моноклональное антитело имеет определенный изотоп. Для окрашивания реплики можно применять антитела, реагирующие со всеми изотипами мышинных иммуноглобулинов, однако такую специфичность следует подтвердить с помощью ELISA, используя для связывания с лунками панели чистые препараты всех изотипов. Другой способ — проверить набор МКА всех изотипов с помощью Вестери-блоттинга.

3. Критическим моментом может быть разведение первых антител, связывающихся с антигенами на нитроцеллюлозе. Чрезмерная их концентрация может привести к появлению большого числа неспецифических полос, что затрудняет интерпретацию результатов. Можно разделить один и тот же антиген в нескольких треках геля и затем инкубировать их с разными разведениями антител. Поскольку положительное окрашивание очень чувствительно, концентрация антител может быть снижена до 1 мкг/мл. Антитела в виде асцитиных жидкостей можно разводить более чем в 1000 раз.

4. Не следует ожидать, что все МКА, активность которых подтверждена другими методами, дадут положительную реакцию иммунохимического окрашивания в Вестерн-блоттинге. Изменение структуры молекул антигенов в условиях электрофореза в ПААГ приводит к разрушению многих эпитопов. По разным оценкам только 10—30% МКА к сложным белковым антигенам окрашивают реплики в любых концентрациях. С другой стороны, известны антитела, которые лучше окрашивают денатурированные антигены. На рис. 6.17 показаны результаты окрашивания реплик антителами к антигенам клеточной стенки микобактерий. В этом случае сохранилась антигенность исследуемых белков при осуществлении в денатурирующих и восстанавливающих условиях ИЭФ в ПААГ.

5. Для выявления антигенов можно использовать аффинно очищенные антииммуноглобулины, меченные радиоактивным иодом, или меченый белок А стафилококков. Эти реагенты применяют в сочетании с автордиографией. Используя белок А, следует помнить, что он связывает лишь некоторые изотипы антител [19]. При таком способе окрашивания к каждой полоске нитроцеллюлозы достаточно добавить в пересчете на радиоактивность по  $10^5$  имп./мин·мл любого из препаратов. После инкубации в течение 30—60 мин полосы многократно и очень тщательно отмывают PBS и лишь затем переходят к автордиографии. Методы радиоактивного мечения антител рассматриваются в кн. 2.

6. Автордиографию выполняют следующим образом:

а) помещают полосы нитроцеллюлозы на стекло и накрывают сверху листом рентгеновской пленки и вторым стеклом. Работать следует в темной комнате при безопасном освещении (например, темно-коричневая лампа Kodak 6B). Стекла скрепляют друг с другом клейкой лентой и укладывают в светонепроницаемую кассету или черный полиэтиленовый пакет, который хранят под графитовым экраном. Можно приобрести различные типы рентгеновской пленки (см. приложение). Для использования усиливающего экрана требуются пленки, покрытые эмульсией с двух сторон. Это позволяет увеличить чувствительность в случае очень слабого жесткого излучения. Усиливающий экран прикладывают к пленке с противоположной стороны от нитроцеллюлозы.

б) пленку экспонируют от 1 до 14 дней — в зависимости от изотопа (например,  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ ) и специфической активности антител. При использовании усиливающего экрана пленку экспонируют при  $-70^\circ\text{C}$ .

в) проявляют пленку проявителем Kodak D19 при комнатной температуре и безопасном освещении. Время проявления 5 мин.

### Литература

1. Ouchterlony O. In: Progress in Allergy, Kallos P. and Waksman B. H. (eds.), Karger, Basel, Vol. VI, p. 30 (1958).
2. Elek S. D. Br. Med. J., 1. 493 (1948).
3. Grabar P., Williams C. A. Biochem. Biophys. Acta, 10, 193 (1953).
4. Laurell C. B. Anal. Biochem., 15, 45 (1966).
5. Laurell C. B. Scand J. Clin. Lab. Invest., 29, 124, Suppl. (1972).
6. Ressler N. Clin. Chim. Acta, 5, 795 (1960).
7. Mancini G., Vaerman J. P., Carbonara A. O., Heremans J. E. In: Protides. Biological Fluids, Peeters H. (ed.), Pergamon Press, Oxford, Vol. II, p. 370, 1964.
8. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. Immunochemistry, 2, 235 (1965).

9. *Burnette W. N.* Anal. Biochem., **112**, 195 (1981).
10. *Gershoni J. M., Palade G. E.* Anal. Biochem., **131**, 1 (1983).
11. *Stites D. P., Rogers R. P. C.* In: Basic and Clinical Immunology, Stites D. P., Stobo J. D. and Wells J. V. (eds.), Appleton and Lange, Norwalk/Los Altos, p. 241, 1987.
12. *Williams C. A.* In: Methods in Immunology and Immunochemistry, Williams C. A. and Chase M. W. (eds.), Academic Press, New York, Vol. III, Chapter 14, p. 238, 1971.
13. *Milford-Ward A.* In: Techniques in Clinical Immunology, Thompson R. A. (ed.), Academic Press, 2nd edition, p. 1, 1980.
14. *Osler A. G.* In: Methods in Immunology and Immunochemistry, Williams C. A. and Chase M. W. (eds.), Academic Press, New York, Vol. III, Chapter 13, p. 83, 1971.
15. *Nilsson L.-Å.* In: Immunoassays for the 80s. Voller A., Bartlett A. and Bidwell D. (eds.) MTP Press, Lancaster, UK, Chapter 5, p. 43, 1981.
16. *Bussard A.* Biochim. Biophys. Acta, **31**, 258 (1959).
17. *Towbin H., Strahelin T., Gordon J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350 (1979).
18. *Haid A., Suissa M.* In: Methods in Enzymology, Fleischer S. and Fleischer B. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 96, p. 192, 1983.
19. *Johnstone A., Thorpe R.* Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd edition, 1987.

# ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЯ И РЕАКЦИИ АНТИТЕЛОЗАВИСИМОГО ГЕМОЛИЗА

*Н. Р. Линг и Д. Кэтти*

## 1. Введение

Все микрокорпускулярные антигены (например, бактерии, дрожжи, лейкоциты и эритроциты) могут агглютинироваться антителами, направленными к их поверхностным антигенным детерминантам. Этот феномен широко используется для изучения поверхностных антигенов клеток и микроорганизмов, а также для выявления антител. Добавление к антителам сывороточного комплемента позволяет в некоторых случаях разработать модификации тестов, основанные на явлении цитотоксичности и лизисе клеток-мишеней. Реакцию лизиса лучше всего наблюдать при использовании эритроцитов, поэтому гемолиз применяют для определения как содержания лизирующих антител, так и концентрации комплемента — последнее в так называемой реакции связывания комплемента.

В ряде случаев эритроциты представляют собой естественные мишени для антител у человека. Примером могут служить изоагглютинины к эритроцитарным антигенам системы АВО, определяющим группу крови: аутоантитела при некоторых аутоиммунных заболеваниях, а также при резус-несовместимости матери и плода (см. кн. 2). В некоторых случаях эритроциты используются в качестве источника антигена. В данной главе мы остановимся на описании наиболее распространенных методов, основанных на применении эритроцитов в реакции гемагглютинации и гемолитических тестах с целью выявления антител. В принципе эритроциты могут связываться не только антителами, специфическими по отношению к их мембранным антигенам (прямые тесты), но и антителами к антигенам, которые «нагрузили» на поверхность эритроцитов (непрямые или пассивные тесты). Такие очевидные преимущества прямых гемагглютинационных и гемолитических тестов, как удобство и высокая чувствительность, побуждали исследователей разработать методы присоединения различных растворимых антигенов к эритроцитам. Данный подход увенчался успехом и способствовал развитию многочисленных модификаций пассивных тестов.

Общепризнано, что эритроцит представляет собой наиболее пригодный корпускулярный «носитель» для пассивной аг-

глютинации, хотя эта система зачастую и считается «старомодной». Искусственные частицы, изготовленные из полистирола, полиакриламида или аминополистирола, успешно использовались для связывания белков [1, 2], однако основанные на их применении агглютинационные тесты оказались менее чувствительными, чем реакция гемагглютинации [3, 4].

Эритроциты различных видов животных значительно варьируют по величине, форме, стабильности и способности к агглютинации. Эритроциты человека превосходят эритроциты барана по размерам и по способности к агглютинации, бычки же эритроциты обладают наименьшей способностью к агглютинации, причем эта способность значительно варьирует от животного к животному [5]. Степень агглютинации эритроцитов любого вида животных можно повысить, обрабатывая их трипсином, нейраминидазой и другими ферментами, обнажающими поверхностные структуры клеточных мембран. Наиболее часто в лабораторных тестах применяют эритроциты барана (ЭБ), поскольку они не требуют предварительной обработки. Описанные ниже методики предполагают использование именно данных эритроцитов. Очень важен правильный подбор животных для получения крови. Кровь, приобретенная коммерческим путем, как правило, получена от случайных животных на бойне, причем качество эритроцитов зачастую оказывается невысоким. Более удовлетворительный материал удастся получить путем регулярного забора крови от баранов, содержащихся в специальных дентрах (при этом бараны предпочтительнее, нежели овцы, поскольку эритроциты беременных животных отличаются большей хрупкостью) и отобранных из большой группы животных в результате предварительного тестирования крови.

Принцип количественных, как прямых, так и пассивных, гемагглютинационных тестов аналогичен. Обычно используют пластиковые панели для микротитрования с 96 (12×8) U-образными лунками объемом 250 мкл (рис. 7.1). Готовят последовательные разведения антисывороток в лунках панели и затем в них добавляют суспензию эритроцитов. Если в лунке с данным разведением сыворотки количество агглютинирующих антител достаточно для образования перекрестных связей между поверхностными антигенами соседних эритроцитов, то эти клетки слипаются, или агглютинируются. Если разведение антител слишком высоко и они не способны связывать клетки между собой, то эритроциты оседают на дно лунки в виде компактной «бляшки». Конечной точкой титрования, или титром сыворотки, считают последнее ее разведение, которое еще агглютинирует эритроциты.

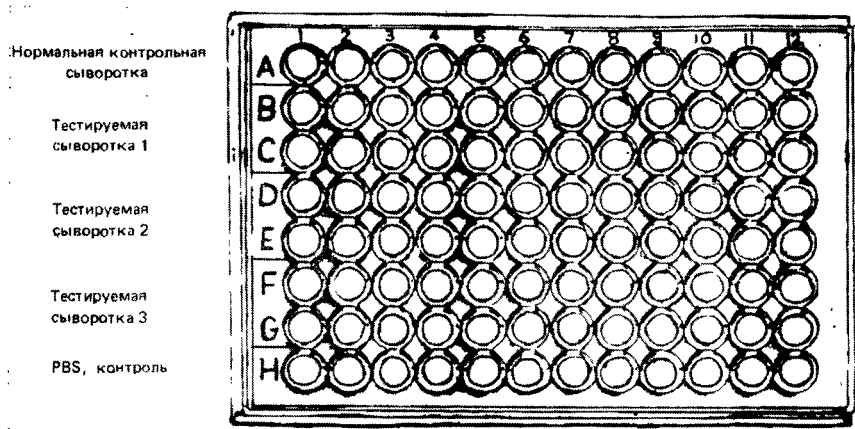


Рис. 7.1. Панель для микротитрования, используемая для постановки реакции прямой гемагглютинации. Ряды лунок размечены для исследуемых сывороток и контролей

У большинства видов животных агглютинирующими свойствами обладают как IgG, так и IgM. Антитела класса M более эффективны в реакции агглютинации, поскольку отличаются высокой валентностью. Прямые и пассивные тесты позволяют количественно (по титрам агглютинации) сравнивать между собой различные сыворотки при условии точной стандартизации условий эксперимента. Некоторые антиэритроцитарные антитела, полученные от человека или экспериментальных животных, слабо агглютинируют либо совсем не агглютинируют эритроциты как в прямых, так и в пассивных тестах. Причина этого может заключаться в недостаточном количестве либо в малой доступности антигенных детерминант на поверхности клеток. Другая причина — принадлежность исследуемых антител к классу G, которые представляют собой неэффективные агглютинины. Такие антитела можно выявить, связывая их с эритроцитами и используя антиглобулиновые сыворотки к иммуноглобулиновым детерминантам. Такие сыворотки получают путем иммунизации животных соответствующими антителами. Описанный тест был разработан Кумбсом для обнаружения так называемых «неполных» антител, к которым относятся, например, IgG человека к резус-антигену. Эта реакция, называемая пробой Кумбса, отличается высокой чувствительностью. Она применяется и в других целях; например, если в распоряжении исследователя имеются изотипспецифические антиглобулины, то с их помо-



щью можно определить (как в прямой, так и в пассивной модификации) класс, а также подкласс IgG, связанных с эритроцитами в субагглютинирующих дозах. Используя стандартные препараты эритроцитов, нагруженных иммуноглобулинами, пробу Кумбса можно применять для сравнения титров и специфичности приготовленных антиглобулиновых реагентов.

2-Меркаптоэтанол (2-МЭ) может вызывать диссоциацию IgM-пентамеров, в результате чего они утрачивают агглютинирующую способность. Поэтому добавление данного реагента приводит к тому, что в реакции агглютинации участвуют лишь IgG, что позволяет сравнивать титры IgM и IgG. Антитела, связывающие комплемент (источником которого служит свежая сыворотка), в его присутствии вызывают лизис эритроцитов-мишеней. У большинства видов животных лишь некоторые подклассы IgG способны связывать комплемент; в то же время IgM обладают более высокой комплемент-связывающей активностью. Поэтому антисыворотки с высоким содержанием IgM имеют более высокий гемолитический титр, чем сыворотки, в составе которых преобладают IgG. Гемолитические тесты, в целом, более чувствительны, чем агглютинационные — разумеется, лишь в том случае, если участвующие в реакции антитела связывают комплемент. Поскольку 2-МЭ обладает способностью ингибировать связывание комплемента IgM, он заметно снижает гемолитический титр антисывороток с высоким содержанием антител этого класса. В результате можно определить концентрацию IgM в сыворотке (см. рис. 7.2).

Реакция пассивной гемагглютинации, когда с поверхностью эритроцитов связан чужеродный антиген, отличается высокой чувствительностью и может быть использована для определения свободного антигена. В этом случае применяют предварительно оттитрованную агглютинирующую сыворотку в минимальном разведении. Антиген, находящийся в растворе даже в очень незначительной концентрации, легко ингибирует агглютинацию эритроцитов сывороточными антителами. Используя стандартные ингибирующие разведения, реакцию можно учитывать количественно.

## 2. Прямая реакция гемагглютинации

Прямая реакция гемагглютинации — это простой, чувствительный метод титрования антител к поверхностным антигенам эритроцитов. Он предусматривает приготовление последовательных разведений антител (объем проб 50 или 100 мкл) в лунках панели для микротитрования с U-образным дном с

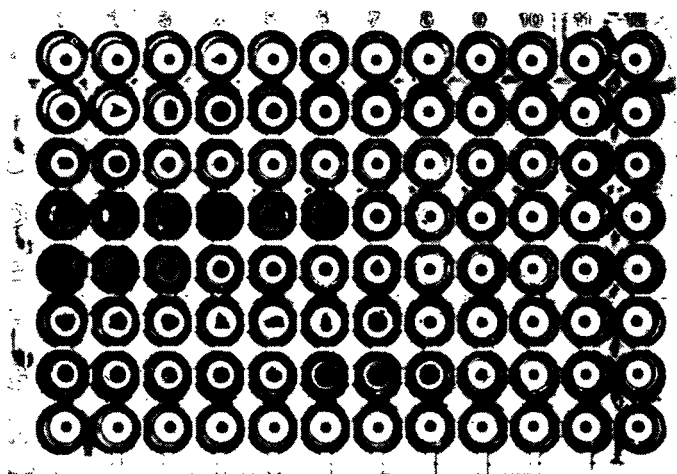


Рис. 7.2. Постановка реакций прямой гемагглютинации и прямого гемолиза, демонстрирующих эффект предварительной обработки сыворотки 2-меркаптоэтанолом (2МЭ). Сыворотки, тестируемые в рядах В и С, D и E, получены после первичной иммунизации (преобладают IgM). Комплемент добавляли в лунки рядов D и E для демонстрации литической активности IgM и ее изменения после добавления 2-МЭ (ряд E). Сыворотки, тестируемые в рядах F и G, получены в ходе вторичного иммунного ответа (преобладают IgG), поэтому 2-МЭ оказывает меньший эффект на агглютинацию (ряд G). В лунках G6, G7 и G8 наблюдается агглютинация без лизиса.

Интерпретация результатов приведена в разд. 2.2, 2.3 и 3.4.2 (п. 5)

последующим добавлением стандартной разбавленной суспензии клеток (например, 0,5%-ной, объем на объем). Затем клеткам дают осесть при комнатной температуре. Титр определяют по конечному разведению антител, при котором в лунке еще учитывается реакция агглютинации. При отрицательном результате клетки оседают на дне лунки в виде компактной «бляшки», в то время как агглютинировавшие эритроциты образуют в лунке округлое по форме скопление клеток, имеющее довольно большой диаметр. При эффективной агглютинации это скопление может иметь извилистый край. Данный тест высокочувствителен и в случае антител с низкой аффинностью при условии, что антиген хорошо экспрессирован на поверхности клетки. Приведенная ниже методика описывает титрование антител к ЭБ (например, антител, полученных от кроликов). Такие антитела специфичны по отношению к нескольким антигенам ЭБ. Несмотря на довольно ограниченную область применения данного теста, он представляет собой прекрасную модель для изучения принципов метода гемагглютинации и интерпретации результатов. Тест можно

модифицировать, если необходимо продемонстрировать агглютинацию и гемолиз с помощью  $\text{IgG}$  и  $\text{IgM}$ . На рис. 7.2 приведен пример титрования для иллюстрации различных аспектов тест-системы.

## 2.1. Оборудование и реагенты (см. также приложение)

Пластиковые панели для микротитрования с U-образными лунками, снабженные крышками.

Специальные приспособления (петли) для приготовления разведений в лунках на 50 или 100 мкл.

Микропипетка на 50 или 100 мкл со сменными наконечниками.

Бунзеновская горелка.

Сосуд с дистиллированной водой.

Фильтровальная бумага.

Нормальная кроличья сыворотка (лучше всего сыворотка крови, взятой у кролика до начала иммунизации).

Раствор Олсвера: декстроза, 2,05% (вес на объем);  $\text{NaCl}$ , 0,42% (вес на объем); цитрат натрия, 0,3% (вес на объем); лимонная кислота, 0,055% (вес на объем). Раствор стерилизуют фильтрованием.

Кроличьи антитела к для получения  $\text{IgM}$  кровь отбирают ЭБ: в ходе первичного иммунного ответа. Для получения  $\text{IgG}$  кровь отбирают после повторной иммунизации (см. гл. 2, разд. 6.7.2).

Свежие ЭБ в растворе Олсвера.

Фосфатный буферный раствор (PBS), pH 7,2.

0,1 М 2-МЭ в PBS.

Маркирующий карандаш.

## 2.2. Постановка реакции

1. Трижды отмывают ЭБ в PBS, удаляя после первого отмывания пленку эритроцитов. Готовят достаточное количество 0,5%-ной (объем на объем) суспензии. Можно использовать суспензии в концентрации до 2%, однако следует учитывать, что это влияет как на общую картину агглютинации, так и на конечный титр агглютинации и гемолиза.

2. На панели для микротитрования отмечают первый и последний ряды (A и H) и затем попарно объединяют оставшиеся ряды (например, B и C, D и E, F и G) (рис. 7.1 и 7.2).

3. В каждую лунку вносят по 50 или 100 мкл PBS.

4. Прокаливают добела в пламени горелки петлю для приготовления разведения и затем охлаждают ее, погружая в дистиллированную воду. Промакивают петлю фильтровальной бумагой (не вытирать!) и очень осторожно прикасаются к мениску нормальной кроличьей сыворотки (не погружать петлю в раствор!). Вносят петлю в лунку 1 ряда А, вращают несколько раз, а затем переносят в вертикальном положении в лунку 2 и т. д. вплоть до лунки 12. В конце промывают петлю дистиллированной водой и прокаливают. Ряд А — это контроль (нормальная кроличья сыворотка) (см. рис. 7.2).

5. Повторяют описанную выше процедуру с тремя исследуемыми сыворотками, но в этом случае используют объединенные ряды (например, В и С в качестве двойного повтора разведений). В лунки ряда Н сыворотку не вносят (см. рис. 7.2).

6. В лунки рядов А, В, D, F и H добавляют один объем PBS.

7. В лунки рядов C, E и G вместо PBS добавляют аналогичный объем 0,1 М 2-МЭ. 2-Меркаптоэтанол следует добавлять под тягой и с этого момента панель должна находиться только под крышкой (за исключением тех моментов, когда необходимо добавить реагенты или оценить результат).

8. Добавляют в каждую лунку по 50 или 100 мкл свеже-суспандированных ЭБ и закрывают панель крышкой.

9. Держа панель над белым фоном, осторожно перемешивают клетки, вращая ее и слегка постукивая по краям.

10. Панель оставляют на 2 ч или на ночь при  $4^{\circ}\text{C}$  для того, чтобы дать эритроцитам осесть. Реакцию можно ускорить, проводя ее при  $37^{\circ}\text{C}$ ; осаждение же клеток не зависит от температуры.

### 2.3. Интерпретация результатов и технические замечания

1. Многие нормальные (неиммунные) сыворотки содержат фоновые (гетерофильные) антитела к ЭБ, обычно в низких титрах. Иногда в первой лунке разведения нормальной сыворотки можно наблюдать агглютинацию эритроцитов.

2. Чувствительность теста обычно повышается при использовании 0,5%-ной клеточной суспензии по сравнению с более концентрированными.

3. В реакции гемагглютинации преимущественно выявляются IgM не только из-за поливалентности этих антител (пять функционально активных антигенсвязывающих центров в отличие от двух у IgG), но и из-за большого размера молекулы IgM. Поскольку клетки, агглютинированные IgM, находятся на большом удалении друг от друга, то уменьшается

сила взаимного отталкивания клеток, обусловленная их дзета-потенциалом.

4. Влияние обработки сыворотки 2-МЭ на снижение IgM-зависимой агглютинации можно наблюдать при первичном образовании антител к ЭБ (см. рис. 7.2). Остаточные агглютинирующие свойства сыворотки обусловлены наличием в ней IgG. Кроличьи антитела к ЭБ класса G менее гетерогенны по своим агглютинирующим свойствам по сравнению с антителами некоторых других видов животных. В последнем случае может потребоваться дополнительное использование антиглобулинового реагента для того, чтобы обнаружить связанные с эритроцитами IgG, обладающие слабой (или не обладающие совсем) агглютинирующей активностью (см. разд. 4).

5. Незначительное число доступных для IgG антигенных детерминант на поверхности эритроцитов может в некоторых случаях обусловить слабо выраженную агглютинацию. И наоборот, эффективную агглютинацию преимущественно вызывают антитела класса M (около  $5 \cdot 10^5$  доступных антигенных детерминант на клетку).

6. В контрольных лунках, не содержащих сыворотки, не должно наблюдаться спонтанной агглютинации клеток. Такая проблема редко возникает при использовании свежих клеток, обладающих высоким отрицательным поверхностным зарядом. Если же используют эритроциты, нагруженные растворимым антигеном (для постановки реакции пассивной гемагглютинации), поверхностный заряд зачастую уменьшается, и вследствие этого появляется возможность спонтанной агглютинации. Эту проблему можно решить, применяя для приготовления разведений раствор, содержащий белок. При постановке прямых реакций в этом, как правило, нет необходимости.

### **3. Реакции антителозависимого гемолиза и титрование комплемента**

#### **3.1. Принцип**

Комплемент представляет собой многокомпонентную систему белков, обычно присутствующих в сыворотке в неактивном состоянии. Если первый компонент комплемента активируется при связывании с комплексом антиген — антитело (антитела должны обладать комплемент-связывающей активностью), то он приобретает способность активировать молекулы следующего компонента, давая начало каскадной ферментативной реакции, кульминацией которой является лизис,

если мишенями служат чувствительные клетки, например эритроциты. Если антитела к антигенам эритроцитов разбавляются избытком комплемента, то конечная точка титрования, определяемая по гемолизу, может служить мерой активности препарата антител. Поскольку комплемент сыворотки нестабилен при хранении, точность титрования зависит от использования количественного избытка комплемента из внешнего источника (консервированной или свежей сыворотки морской свинки). Остаточную активность комплемента в исследуемых сыворотках элиминируют путем предварительного прогревания сывороток. Это помогает обеспечивать стандартизуемость теста. Для количественного определения добавленного комплемента его титруют в гемолитической системе эритроцитов (эритроциты, нагруженные антиэритроцитарными антителами) после предварительного истощения сыворотки морской свинки для удаления содержащихся в ней антител к эритроцитам. Титрование гемолизинов осуществляют следующим образом:

1. Получают нагруженные антителами эритроциты для титрования комплемента.

2. Тестируют адекватное связывание антител с эритроцитами путем лизиса в избытке комплемента.

3. Истощают комплемент эритроцитами в физиологическом растворе на холоду.

4. Титруют комплемент в литической индикаторной системе для определения разведения, дающего 50%-ный лизис ( $CH_{50}$ ). Для титрования исследуемых антител затем используют разведение комплемента, дающее 4  $CH_{50}$ -единицы (стандартный избыток).

5. Инактивируют комплект, прогревая исследуемые сыворотки.

6. Титруют исследуемые сыворотки (например, к ЭБ в прямом тесте) с использованием стандартного избытка комплемента.

### 3.2. Материалы и реагенты (дополнение к разд. 2.1; см. приложение)

#### *Буфер для гемолитических реакций (БГР)*

Исходный раствор А: 85 г NaCl

2,75 г барбитурата натрия.

Растворяют в 1400 мл дистиллированной воды

Исходный раствор В: 5,75 г диэтилбарбитуровой кислоты, растворенной в 500 мл горячей дистиллированной воды

Исходный раствор С: 20,3 г  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (2 М), растворенного в 50 мл дистиллированной воды

Добавляют 30 мл 1 М раствора  $CaCl_2$

Доводят объем раствора до 100 мл.

Конечные концентрации: 1 М  $MgCl_2$   
0,3 М  $CaCl_2$

1. Смешивают растворы А и В и охлаждают до комнатной температуры.

2. Добавляют 5 мл раствора С.

3. Доводят объем дистиллированной водой до двух литров и хранят раствор при 4°C (исходный раствор БГР).

4. Рабочий раствор БГР: к одной части исходного раствора БГР добавляют четыре части дистиллированной воды.

**Физиологический раствор (ФР):** 0,9%-ный (вес на объем) раствор  $NaCl$  в дистиллированной воде стерилизуют в бутылках из термостойкого стекла автоклавированием

**Кроличья антисыворотка к ЭБ:** Для приготовления эффективной гемолитической системы титрования комплекта необходимо отбирать кровь в ходе первичного иммунного ответа. Пробы, отобранные после повторной иммунизации, можно использовать для определения гемолитических титров  $IgG$  и  $IgM$

**Комплемент:** Консервированный (коммерческий) препарат или свежеполученная сыворотка морской свинки

**Раствор аммиака:** 0,04%-ный раствор в дистиллированной воде (или 10%-ный сапонин)

Водяная баня на 56°C.

Спектрофотометр.

Ротационный встряхиватель (в теплой комнате или термостате на 37°C).

Емкость для льда.

Стеклянные пробирки (2 мл) и штатив для пробирок.

Градуированные пипетки (2 мл) или автоматические пипетки (2 мл) с варьируемым рабочим объемом, снабженные наконечниками.

Универсальные стеклянные флаконы (20 мл).  
Мерный цилиндр (100 мл).

### 3.3. Титрование комплемента морской свинки

#### 3.3.1. Принцип

Нагруженные антителами эритроциты добавляют к разведениям комплемента в пробирках. Степень лизиса регистрируют спектрофотометрически, сравнивая его с поглощением гемоглобина в пробах с полным лизисом клеток. Лизис приближается к 100% по сигмовидной кривой (асимптотически), поэтому трудно определить величину литической единицы комплемента для полного лизиса. По этой причине определяют единицу 50%-ного лизиса ( $CH_{50}$ ) в стандартных условиях. К факторам, влияющим на лизис, относятся концентрация эритроцитов, концентрация антител, связанных с эритроцитами, тип буфера и температура. Поэтому величина  $CH_{50}$  в известной степени произвольна; она зависит от условий постановки теста.

#### 3.3.2. Получение ЭБ, нагруженных антителами

1. Инактивируют комплемент кроличьей сыворотки к ЭБ (1 мл), содержащий большое количество IgM, нагреванием в водяной бане при 56 °C в течение 30 мин.

2. Титруют сыворотку путем агглютинации 1%-ной (объем на объем) суспензии ЭБ (разд. 2) в БГР.

3. Рассчитывают объем этой сыворотки, необходимый для связывания с 10 мл 6%-ной (объем на объем) суспензии ЭБ в первом субагглютинирующем разведении, а также объемы, необходимые для получения разведений эритроцитарной суспензии на одну ступень выше и на одну ступень ниже этой концентрации. Добавляют три рассчитанных таким образом объема сыворотки в три флакона, содержащие по 10 мл 6%-ной суспензии эритроцитов в БГР (предварительно тщательно отмытых в БГР), хорошо перемешивают и помещают флаконы на ротационный встряхиватель (либо же вручную интенсивно перемешивают содержимое флаконов) при 37 °C на 30 мин. Полученную суспензию эритроцитов хранят при 4 °C; ее можно использовать в течение 24 ч.

#### 3.3.3. Тестирование не адекватное связывание антител с поверхностью эритроцитов (см. рис. 7.3)

1. Пробирку, в которую внесли 1 мл комплемента, помещают в ледяную баню (0 °C), добавляют 2 мл ледяного ФР и 0,3 мл осадка эритроцитов, промытых в холодном ФР. Пере-



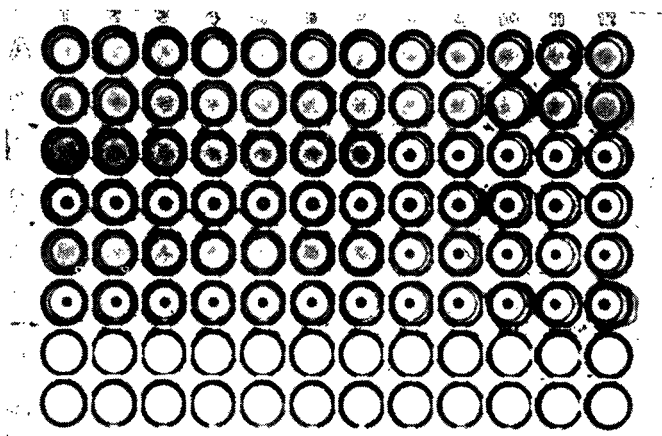


Рис. 7.3. Определение минимальной гемолитической дозы антител путем титрования комплемента с помощью нагруженных гемолитическими антителами эритроцитов в трех различных концентрациях (серии двойных разведений) в последующих двоянных рядах: А и В, С и D, Е и F. Комплемент добавлен в разведении 1:3 в вертикальный ряд 1 и последовательно разведен (1:2) в первом ряду каждой пары. Второй ряд каждой пары представляет собой контроль (только БГР) на отсутствие спонтанного лизиса или агглютинации. Эритроциты, перегруженные антителами (ряды А и В), спонтанно лизируются во время инкубации. Эритроциты, несущие на поверхности половину этого количества антител (ряды С и D), подвергаются опосредованному комплементом лизису вплоть до разведения комплемента 1:192, но с очевидной спонтанной (ауто) агглютинацией сенсibilизированных эритроцитов. Снижение концентрации антител на поверхности эритроцитов на следующей ступени разведения дает чувствительную гемолитическую систему без аутолизиса или аутоагглютинации. Это количество антител можно использовать в дальнейшем для приготовления индикаторных лизируемых клеток в целях постановки реакции связывания комплемента (разд. 8).

мешивают содержимое пробирки и оставляют ее на 1 ч при  $0^{\circ}\text{C}$ , для того чтобы истощить комплемент эритроцитами, т. е. удалить из него антиэритроцитарные антитела, в условиях, исключающих гемолиз. Затем суспензию ЭБ центрифугируют при 200 g и  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Истощенный комплемент собирают — теперь он разбавлен в соотношении 1:3 физиологическим раствором.

2. Из каждой пробы нагруженных антителами ЭБ (см. разд. 3.3.2, стадия 3) отбирают небольшую аликвоту и разбавляют ее до получения 1%-ной (объем на объем) суспензии в БГР.

3. В три пары рядов панели для микротитрования вносят по 50 мкл БГР и затем в каждой паре рядов оттитровывают

истощенный комплемент, используя для приготовления разведений специальные петли на 50 мкл. В последние три лунки второго ряда каждой пары вместо разведений комплемента добавляют только БГР. Затем в каждую лунку вносят по 50 мкл 1%-ной суспензии нагруженных антителами ЭБ, причем для каждой пары рядов панели используют один из трех имеющихся в распоряжении препаратов эритроцитарной суспензии. Содержимое лунок перемешивают осторожным постукиванием по панели, закрывают ее крышкой и оставляют на 1—2 ч при 37 °С. При оптимальной концентрации связанных с эритроцитами антител наблюдается лизис вдоль всего ряда лунок. Таким образом определяют минимальную гемолитическую дозу антител (МГДА). Иногда для получения результата необходимо специально подобрать концентрацию нагруженных на поверхность эритроцитов антител, а также исходное разведение истощенного комплемента. Связывание с эритроцитами слишком большого количества антител может привести к независимому от комплемента (спонтанному) лизису эритроцитов, как показано на рис. 7.3.

### 3.3.4. Титрование образца истощенного комплемента: $CH_{50}$

1. Последовательные разведения истощенного комплемента смешивают со стандартной суспензией эритроцитов, нагруженных 1 МГДА, в пробирках согласно схеме, приведенной в табл. 7.1. Исходное разведение комплемента (в БГР) должно составлять примерно 1:30 (см. разд. 3.3.5, стадия 3).

2. Пробирки закрывают и инкубируют 2 ч при 37 °С, периодически перемешивая содержимое, а затем помещают на 30 мин в ледяную баню. Добавляют в каждую пробирку по 1 мл ледяного БГР и перемешивают. Содержимое пробирок центрифугируют при 200 g в течение 10 мин, после чего измеряют оптическую плотность супернатантов при 413 нм.

3. Строят кривую зависимости лизиса (в процентах) от объема добавленного комплемента. За 100%-ный лизис принимают значение, полученное в девятой контрольной пробирке. В результате должна получиться сигмовидная кривая. С ее помощью определяют объем комплемента, необходимый для 50%-ного лизиса ( $CH_{50}$ ). Исходя из этого значения, рассчитывают то разведение комплемента, при котором в 50 мкл содержится 1 единица  $CH_{50}$ . Такое разведение комплемента необходимо для титрования антител с использованием 50 мкл 1%-ной суспензии ЭБ. Затем рассчитывают разведение комплемента, при котором в 50 мкл содержится 4 единицы  $CH_{50}$ , т. е. стандартный избыток.

Таблица 7.1. Титрование комплемента

БГР (мл)	Номер пробирки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (контроль)
	1,20	1,15	1,10	1,05	1,00	0,90	0,80	0,70	1,20 (аммиак)
Комплемент (1 : 30/мл)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,30	0,40	0,50	0,00
1%-ная взвесь эритроцитов, нагруженных 1 МГДА (мл)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Лизис	—	+	+	++	++	++	++	++	++ (100%)

### 3.3.5. Технические замечания

1. Можно использовать коммерческий препарат консервированного комплемента морской свинки (см. приложение). Такой комплемент разводят, если это необходимо, и хранят в соответствии с прилагаемой инструкцией. Обычно используют неразбавленный комплемент.

2. Свежую сыворотку морской свинки получают из свернувшейся крови, взятой путем пункции сердца (см. гл. 2, разд. 5.2.3) в стерильных условиях с обеспечением минимального гемолиза. Сыворотку как можно скорее осторожно отделяют от сгустка крови и центрифугируют при 200 g для осаждения оставшихся эритроцитов. Комплемент не теряет активности в сыворотке, хранимой в виде небольших аликвот при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

3. При титровании исходное разведение комплемента должно соответствовать разведению, вызывающему минимальный лизис во второй пробирке. На практике, как правило, оказывается, что разведение 1 : 30 в БГР, полученное из разбавленного в соотношении 1 : 3 истощенного комплемента, близко к оптимальному. В любом случае следует, однако, подбирать исходное разведение в соответствии с полученными экспериментальными результатами.

## 3.4. Реакция антителозависимого гемолиза

### 3.4.1. Сравнение гемолитических и гемагглютинационных титров сывороток

1. Маркируют панель для микротитрования, как описано в разд. 2. В каждую лунку вносят по 50 мкл БГР.

2. С помощью специальных петель (на 50 мкл) готовят один ряд разведений нормальной кроличьей сыворотки (ряд А), а под ним — двойные ряды разведений исследуемых сывороток.

3. Добавляют в один из двух рядов для каждой исследуемой сыворотки по 50 мкл БГР (вместо комплемента), а в остальные ряды — по 50 мкл разведения комплемента, содержащего 4 единицы  $\text{CH}_{50}$  (согласно определению, приведенному в разд. 3.3).

4. Добавляют во все лунки по 50 мкл 1%-ной суспензии ЭБ.

5. Перемешивают содержимое лунок легким постукиванием по панели, затем накрывают ее крышкой и инкубируют при 37 °С в течение 1—2 ч. Для оценки литической реакции в лунках панель следует рассматривать над белым фоном. Гемолитический титр определяют как последнее разведение, дающее полный лизис (т. е. отсутствуют интактные эритроциты, осевшие на дно лунки). Более точные результаты можно получить при использовании панелей с U-образными лунками. В лунках ряда Н (контроль без сыворотки) не должно наблюдаться лизиса или агглютинации. В лунках ряда А (контроль с нормальной сывороткой) могут наблюдаться агглютинация и лизис (частичные), что связано с наличием гетерофильных антител.

#### 3.4.2. Сравнение гемолитических титров IgM и IgG с помощью 2-меркаптоэтанола

Стадии (1) и (2) аналогичны таковым, описанным в разд. 3.4.1.

3. В лунки одного из двух парных рядов для каждой исследуемой сыворотки вносят по 50 мкл БГР (вместо 2-МЭ), а во все остальные ряды (в вытяжном шкафу) — по 50 мкл 2-МЭ. Накрывают панель крышкой и оставляют на 30 мин на столе.

4. Во все лунки добавляют 50 мкл комплемента ( $4\text{CH}_{50}$ ), а затем 50 мкл 1%-ной суспензии ЭБ. Перемешивают, накрывают панель крышкой и инкубируют, как описано выше.

5. Интерпретация результатов: на рис. 7.2 (ряды D и E) представлены результаты гемолитического теста с предварительной обработкой сыворотки 2-МЭ (ряд E) и без таковой (ряд D) (в этом случае с использованием 2%-ной суспензии ЭБ). Эффект обработки 2-меркаптоэтанолом проявляется в снижении гемолитического титра на 3 ступени (т. е. при последовательных разведениях 1:2, как в данном случае, в 8 раз).

## 4. Антиглобулиновые тесты (тесты Кумбса)

### 4.1. Определение неагглютинирующих антител

#### 4.1.1. Принцип

IgG к антигенам клеточной поверхности, экспонированным на ней в низкой плотности либо слабо выявляемым, иногда проявляют свойства моновалентных антител. Это обусловлено прежде всего их неспособностью формировать стабильные перекрестные связи. К такому типу, например, относятся IgG к резус-антигену. Однако связывание моновалентных антител с клетками можно выявить с помощью антиглобулинового реагента. Разумеется, необходимо тщательно отмыть несвязавшиеся иммуноглобулины сыворотки, участвующие в первой стадии реакции, которые в противном случае могли бы конкурировать со связавшимися молекулами иммуноглобулинов за антиглобулин.

#### 4.1.2. Необходимое оборудование и реагенты

Низкоскоростная центрифуга со специальными держателями для центрифугирования панелей.  
Пастеровские пипетки с вытянутыми тонкими кончиками.  
Антиглобулиновые реагенты: анти-IgM, анти-IgG, или анти-тела со смешанной специфичностью, истощенные эритроцитами барана (см. разд. 3.3, стадия 1).

#### 4.1.3. Постановка реакции

Титрование можно проводить в панелях или пробирках. Методика определения резус-антител пробирочным методом приведена в кн. 2. При использовании панелей для центрифугирования необходимо применять специальные держатели (только в некоторых типах центрифуг). Непродолжительное центрифугирование при низких скоростях (достаточных для осаждения эритроцитов) — это все, что необходимо для постановки реакции. Супернатант отсасывают с помощью вытянутой пастеровской пипетки. Клетки промывают один раз в PBS, снова центрифугируют, а затем тщательно ресуспендируют в 100—200 мкл разбавленного (примерно 1:100) антиглобулина. Перемешивают последовательным пипетированием, начиная с лунок с максимальным разведением антител. После осаждения клеток определяют титр.

## 4.2. Титрование антиглобулина с помощью предварительно сенсibilизированных клеток

### 4.2.1. Принцип

Описанная ниже методика представляет собой простой и эффективный способ титрования антиглобулиновых реагентов (анти-IgM или анти-IgG, а также антиглобулинов смешанной специфичности). Необходимость в таком титровании возникает, например, при стандартизации пробы Кумбса или при сравнении антиглобулиновых титров сыворотки для оценки ее качества. При этом используют эритроциты, предварительно нагруженные субагглютинирующей дозой специфических антител. IgM и IgG можно разделить хроматографическим путем, как описано в гл. 2 (разд. 3.2.3), а затем использовать для сенсibilизации клеток.

### 4.2.2. Постановка реакции

Эритроциты можно сенсibilизировать антителами, как описано в разд. 3.3.2. Используя для связывания с эритроцитами три концентрации антител, обычно можно с первого раза определить дозу, дающую крайне чувствительный антиглобулиновый тест, без какой-либо тенденции к спонтанной агглютинации. Однако в том случае, если эритроциты, нагруженные антиглобулинами в оптимальной концентрации, все же проявляют склонность к образованию конгломератов в безбелковом буфере, можно рекомендовать проводить тест с использованием буфера, содержащего 2% инактивированной нагреванием сыворотки плода коровы (СПК). Постановка реакции аналогична таковой в случае прямой гемагглютинации, однако в связи с ее высокой чувствительностью для определения конечной точки титрования возможно придется титровать антиглобулины в разведениях, превышающих 24-луночные серии, либо же начинать титрование с разведения 1:1000. Для достижения максимальной чувствительности можно использовать 0,5%-ную суспензию сенсibilизированных клеток.

Необходимы следующие контроли:

1. Нагруженные антителами эритроциты (суспензия в буфере).
2. Нормальная сыворотка (от того же вида животного, от которого получают антиглобулины) с нагруженными эритроцитами.
3. Антиглобулин с ненагруженными эритроцитами.

### 4.2.3. Другие области применения

Тест Кумбса можно применять для оценки чистоты препаратов IgM и IgG (сенсibilизирующих эритроциты), используемых для приготовления антиглобулиновых реагентов (см.

гл. 2, разд. 3.2.3). В пассивных тестах с использованием нагруженных антигеном эритроцитов изотипспецифические антитела могут применяться для исследования распределения изотипов неагглютинирующих антител первой стадии или же других антител, разбавленных до субагглютинирующей концентрации.

## **5. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) с использованием нагруженных антигеном эритроцитов**

### **5.1. Сравнение различных методов связывания антигена с эритроцитами**

Одним из наиболее давно применяемых агентов для связывания антигенов с эритроцитами служит *бис*-диазобензидин (БДБ). Использование этого и других реагентов освещено в литературе [6]. БДБ представляет собой молекулу с двумя активными диазогруппами, которые теоретически могут связываться с тирозильными или имидазольными группами клеточной поверхности, с одной стороны, и с аналогичными группами растворимого антигена, с другой. Такой «одностадийный» бивалентный сшивающий агент, как БДБ, добавляют непосредственно к смеси эритроцитов с антигеном. При этом, однако, невозможно предотвратить образование нежелательных комплексов антиген — антиген или эритроцит — эритроцит, а также модификацию антигена сшивающим агентом.

Первый удовлетворительный «двухстадийный» реагент, таннин, был предложен Бойденом [7]. Если эритроциты обрабатывать таннинами (полифенилгликозидами растительного происхождения) в среде, не содержащей белков, то одна часть молекулы таннина свяжется с поверхностным протеином эритроцита, другие же белок-связывающие группы останутся (после осторожного отмывания) доступными для связывания растворимых белковых антигенов. После того как весь имеющийся в наличии таннин свяжется с эритроцитами, добавление белкового антигена приведет к его более эффективной фиксации на эритроцитах. При этом происходит лишь незначительная модификация антигена или же она совсем отсутствует. В принципе данный метод, следовательно, более удовлетворителен, чем «одностадийный». Позднее он был усовершенствован Ставитским [8].

Известны и другие сшивающие реагенты, например дифтординитробензол [6] или диизоцианат [9]. Однако один из них приобрел особенно большую популярность. Это — глutarовый диальдегид, чаще называемый глutarальдегидом. Как и при использовании БДБ, стандартное количество сшивающего

агента добавляют к смеси отмытых эритроцитов и белкового антигена [10, 11]. Перекрестное связывание происходит быстро и заканчивается через несколько минут. Кроме того, глутаральдегид и обработанные эритроциты более стабильны, чем нативные эритроциты (обработка БДБ), поэтому их можно хранить при 4 °С в течение нескольких недель. Однако белковый антиген может подвергаться значительной модификации в результате взаимодействия тирозильных, имидазольных, сульфгидрильных и аминокрупп с альдегидом. Невозможно использовать глутаральдегид в качестве «двухстадийного» реагента, поскольку обе его активные группы быстро и легко вступают во взаимодействие с соответствующими группами определенного эритроцита, и реагент, являющийся липофильным, легко проникает внутрь эритроцита (в отличие от формальдегида) и фиксирует внутриклеточные белки [12]. Тем не менее можно непосредственно нагрузить белки на поверхность эритроцитов, предварительно обработав клетки формальдегидом, глутаральдегидом или другими альдегидами, а затем отмыв их [12, 13]. Для этого необходима лишь инкубация обработанных указанным способом эритроцитов с небольшим количеством антигена. Нагруженные эритроциты сохраняют антигенную активность неопределенно долго, даже после повторного отмывания. Нагруженные клетки могут храниться в асиде и использоваться в течение длительного периода времени. Другой метод, предусматривающий связывание антигена при участии альдегидных групп, заключается в мягком окислении периодатом углеводов групп на поверхности эритроцитов с последующим добавлением белкового антигена к эритроцитам, несущим вновь образованные реактивные группы [14].

Простой прямой «одностадийный» сшивающий агент, хлорный хром, впервые предложенный Яндлом и Симмонсом [15], получил широкое распространение после своего повторного внедрения благодаря работам Голда и Фуденберга [16]. Помимо простоты использования, данный реагент обладает еще целым рядом преимуществ: связанный с эритроцитами белок практически не подвергается модификации; кроме того, данный метод обеспечивает более эффективное связывание (лимитируемое используемым количеством хлорного хрома), чем непосредственная фиксация антигена на консервированных клетках [17]. Данный способ настолько мягок, что даже связанные антигена сохраняют активность, в то время как в результате реакции с глутаральдегидом они денатурируются. Удовлетворительная фиксация на эритроцитах с сохранением активности наблюдается и для стафилококкового белка А и лектинов (в том случае, если они не реагируют с остатками



сахаров на поверхности эритроцитов). В случае правильного выбора животного в качестве источника получения эритроцитов и строгом соблюдении стерильных условий на всем протяжении работ, нагруженные клетки удастся сохранять без лизиса при 4 °С в течение нескольких недель; при этом их гем-агглютинирующая активность не теряется.

## **5.2. Связывание белковых антигенов с эритроцитами при помощи хлорного хрома**

### **5.2.1. Материалы и реагенты**

Стерильные стеклянные пробирки 75×13 мм с крышкой.

Смеситель Вортекс.

Оборудование для диализа.

Маленькие стерильные пробирки с крышками.

Среда Hepes-RPMI (H-RPMI), в некоторых случаях содержащая 2% СПК, инактивированной нагреванием (H-RPMI—2% СПК).

Хлорный хром: исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл в физиологическом растворе, pH 5,0, выдержанный не менее 1 мес («созревший»).

Стерильный физиологический раствор (ФР).

Белковый антиген с концентрацией не ниже 3 мг/мл.

### **5.2.2. Воспроизведение метода**

Ниже описана рекомендуемая методика, модифицированная по [18].

1. Стерильно берут кровь барана в равный объем раствора Олсвера. На протяжении всей процедуры строго соблюдают стерильность.

2. Собранную кровь перемешивают, чтобы ресуспендировать клетки, и переносят в стерильную пробирку с крышкой. Добавляют стерильный ФР, снова закрывают пробирку крышкой, перемешивают содержимое и центрифугируют при 700 g в настольной центрифуге 10 мин. Удаляют супернатант и пленку лейкоцитов, образующуюся на поверхности. Эритроциты отмывают еще 5 раз стерильным ФР (700 g, 5 мин), каждый раз как можно тщательнее удаляя супернатант и пленку. В пробирке не должно наблюдаться следов лизиса. По окончании отмывания снова ресуспендируют клетки в ФР и осаждают их центрифугированием при 1100 g в течение 10 мин.

3. Полностью удаляют супернатант, затем, слегка встряхивая пробирку, разбивают клеточный осадок. Набирают определенный объем клеточной суспензии в градуированную пи-

петку (на 2 или 5 мл) и переносят в стеклянный флакон, содержащий 9 объемов стерильного ФР. Таким образом получают 10%-ную суспензию эритроцитов. Хорошо перемешивают ее и переносят аликвоты объемом 1 мл в надписанные стерильные стеклянные пробирки (75×13 мм) с крышками.

4. Когда все готово для процедуры связывания, осаждают эритроциты центрифугированием и удаляют супернатант. Добавляют определенный объем раствора белка, предназначенного для связывания с эритроцитами, во все пробирки, приготовив последовательные разведения антигена. Концентрация белка может составлять 1—3 мг/мл, а количество добавленного антигена в ряду разведений — 0,05—0,3 мг. Количество белка, равное 0,3 мг, представляет собой избыток и обычно дает результат, слегка превышающий таковой с 0,1 мг белка. Примерный нижний предел определения составляет 0,05 мг.

5. Каждую пробирку последовательно помещают на смеситель Вортекс. Добавляют необходимое количество хлорного хрома (0,4—1,2 мл, см. разд. 5.2.3, п. 5) и быстро перемешивают содержимое пробирок. Осторожно смывают реакционную смесь со стенок каждой пробирки, осторожно вливая 1 мл стерильного ФР.

6. Закрытые крышками пробирки оставляют на ночь. На следующий день в каждую пробирку добавляют по 2 мл среды Н-RPMI и перемешивают содержимое. Осаждают эритроциты центрифугированием, удаляют супернатант и ресуспендируют клетки в 4 мл среды Н-RPMI. Хранят при 4°C. Перед использованием в титровании суспензию эритроцитов разбавляют в соотношении 1:5 средой Н-RPMI — 2% СПК.

### 5.2.3. Технические замечания

1. Белки, предназначенные для связывания с эритроцитами, могут быть получены путем обычного солевого фракционирования и хроматографическими методами, однако перед использованием их необходимо диализовать против ФР. Далее раствор, подвергают высокоскоростному центрифугированию (11 000 g) или фильтруют через стерильную мембрану «Millipore» и затем по поглощению при 280 нм ( $A_{280}$ ) рассчитывают концентрацию белка в растворе. Небольшие аликвоты раствора помещают в маленькие стерильные пробирки, которые хранят на холоду (обычно при  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Поскольку все белки в равной степени связываются с эритроцитами, желательно использовать очищенный белок. Однако обычно не возникает необходимости в получении абсолютно чистого белка.

2. Хлорный хром. Исходный раствор готовят, растворяя 500 мг  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в 500 мл ФР.  $\text{CrCl}_3$  постепенно гидролизует

ется с образованием комплекса ионов хрома, причем значение рН раствора понижается. Ежедневно, в течение нескольких недель, рН раствора необходимо доводить до 5,0, добавляя по каплям 1 М NaOH. Нейтрализация сопровождается изменением окраски раствора с бледно-голубой на слабо-зеленую. Примерно через месяц хранения и периодической нейтрализации значение рН становится относительно постоянным; лишь иногда необходимо добавление капли 1 М NaOH для нейтрализации. Такой раствор считается «созревшим», он готов к употреблению. Перед использованием хлорный хром разбавляют ФР в 10 раз до конечной концентрации 0,1 мг/мл.

3. Физиологический раствор. Необходимое условие — это удаление из раствора фосфатов, ацетатов, белков и других инородных примесей, поскольку они ингибируют процесс связывания. Эритроциты, хлорный хром и белковые антигены необходимо готовить на ФР. Стерильный ФР можно приготовить автоклавированием в бутылках из твердого стекла (мягкое стекло выделяет щелочь) или фильтрованием через соответствующие мембраны.

4. Большинство белков, предназначенных для связывания с эритроцитами, лучше хранить в виде аликвот при  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-70^{\circ}\text{C}$ . Однако некоторые белки (например, IgM) лучше хранить при  $4^{\circ}\text{C}$ , поскольку при замораживании они денатурируются.

5. Количество хлорного хрома, необходимое для связывания, обычно зависит от конкретного препарата белка. Предварительно целесообразно использовать целый ряд объемов хлорного хрома (0,4—1,2 мл). Выбирают ту наибольшую дозу, которая еще не дает неспецифической агглютинации (отрицательная «картина осаждения» эритроцитов). Такие объемы хлорного хрома используют в будущих экспериментах.

### 5.3. Реакция пассивной гемагглютинации с эритроцитами, нагруженными белковым антигеном

#### 5.3.1. Принцип

Пассивная гемагглютинация осуществляется таким же образом, как и титрование антител к собственным антигенам эритроцитов. При этом используют серию последовательных разведений антител в рядах панели для микротитрования, добавляя нагруженные антигеном эритроциты и определяя титр антител путем оценки «картины осаждения» эритроцитов через несколько часов после их добавления. Вторую стадию, когда добавляют антиглобулин, можно проводить согласно методике, описанной в разд. 4.1.

### 5.3.2. Постановка реакции

1. Готовят последовательные разведения мышинных моноклональных антител (МКА) к  $\kappa$ -цепи иммуноглобулина человека в 50 мкл среды H-RPMI — 2% СПК.

2. В каждую лунку с антителами, а также в контрольные лунки, содержащие лишь 50 мкл среды для разбавления, добавляют по 50 мкл 0,5%-ной (объем на объем) суспензии нагруженных антигеном эритроцитов барана (в качестве антигена используют IgG<sub>κ</sub> или свободные  $\kappa$ -цепи IgG).

3. Через 2 ч определяют прямой титр пассивной гемагглютинации. Конечной точкой титрования считается последняя лунка ряда, в которой еще наблюдается гемагглютинация.

4. Панель осторожно центрифугируют (разд. 4.1), супернатанты удаляют, промывают клетки, добавляя по 100 мкл среды для разведения и снова центрифугируют. После удаления супернатантов в каждую лунку добавляют по 100 мкл иммуноглобулина барана к антителам мыши в разведении 1:100. Клетки ресуспендируют пипетированием, начиная с той лунки, где антитела максимально разведены. Через два часа определяют титр непрямой пассивной гемагглютинации.

### 5.3.3. Интерпретация результатов

Положительный результат в прямом титровании свидетельствует о способности антител и к связыванию с антигеном, и к перекрестному связыванию, в то время как на второй стадии выявляют антитела, способные к прочному связыванию с антигеном, но не к эффективному перекрестному связыванию. Таким образом двухстадийное титрование аналогично другим методам, таким как ELISA или ИРМА. Разница заключается в том, что в случае двухстадийного титрования антиген сохраняет свое нативное состояние (например, он не денатурируется при связывании с поверхностью пластика).

### 5.3.4. Технические замечания

1. В связи с высокой чувствительностью метода для полной раститровки антисыворотки могут потребоваться два ряда лунок; во избежание этого в первую лунку можно помещать разбавленную антисыворотку.

2. Нагруженные антигеном эритроциты имеют тенденцию к спонтанной агглютинации, которую можно предотвратить, используя для приготовления разведений богатую белками среду. Идеальная среда — это СПК, поскольку она не содержит иммуноглобулинов. Однако необходимо удостовериться в том,

что СПК действительно имеет фетальное происхождение. Кроме того, содержащийся в ней комплемент необходимо инактивировать нагреванием.

3. При осуществлении титрования на второй стадии в присутствии антиглобулина необходимо исключить наличие в нем антиэритроцитарных антител. При использовании иммуноглобулиновых антигенов следует убедиться в отсутствии реакции с молекулами Ig, которыми сенсибилизировали эритроциты.

4. Необходимо поставить следующие контроли:

а) среда для разведения и нагруженные антигеном эритроциты;

б) положительная сыворотка и эритроциты, не нагруженные антигеном;

в) нормальная (неиммунная) сыворотка и эритроциты, нагруженные антигеном;

г) антиглобулиновый реагент и эритроциты, нагруженные антигеном (при постановке непрямой пассивной гемагглютинации).

#### 5.4. Реакция пассивной гемагглютинации с эритроцитами, нагруженными полисахаридами и гаптенами

В целом полисахариды не могут быть связаны с эритроцитами спонтанно или при помощи таких реагентов, как хлорный хром или таннин. Известны два способа связывания этих антигенов (см. также гл. 2, разд. 3.1.2).

1. Периодатное окисление некоторых групп сахаров с образованием альдегидов, которые в свою очередь ковалентно связываются с аминок группами на поверхности эритроцитов [19, 20].

2. Прикрепление к полисахариду жирной кислоты с длинной цепью, например стеариновой. Липофильная часть такой молекулы приобретает способность прочно встраиваться в мембрану эритроцитов при 37 °С. Прикрепившиеся полисахариды экспонируются на поверхности эритроцитов [21]. Фактически существуют и многочисленные природные липополисахариды (ЛПС) такого типа, продуцируемые бактериями (например, ЛПС грамотрицательных микроорганизмов, производные тейхоевой кислоты, образуемые стрептококками и стафилококками). Связывание эритроцитов с такими антигенами происходит при непосредственной инкубации эритроцитов с культуральным фильтратом или бактериальным экстрактом. Многие антибиотики (в том числе пенициллин) тоже обладают способностью к спонтанному связыванию с эритроцитами. Это активный процесс, протекающий при 37 °С в течение 30—60 мин.

Гаптенные группы присоединяются к поверхности эритроцитов при непосредственной инкубации с активными производными (например, в случае динитрофенилового гаптена — с фтординитробензолом). Альтернативный подход заключается в прикреплении гаптенa посредством молекулы ЛПС [22, 23].

## **6. Обратная реакция пассивной гемагглютинации с эритроцитами, нагруженными антителами (ОРПГА)**

### **6.1. Принцип**

Антигены можно с большой чувствительностью (в том числе и количественно) определить с помощью эритроцитов, нагруженных антителами, которые имеют свободные антигенсвязывающие центры. Такие эритроциты могут агглютинироваться антигеном в растворе. Для того чтобы агглютинация могла произойти при непосредственном взаимодействии с антигеном, данный антиген должен обладать достаточно сложной структурой и иметь несколько эпитопов для антител, фиксированных на разных эритроцитах. В случае моноклональных антител, связанных с эритроцитами, антиген должен обладать двумя идентичными, но пространственно разобщенными эпитопами.

### **6.2. Связывание антител**

Предназначенный для связывания иммуноглобулин должен быть сравнительно чистым и в идеале состоять преимущественно из молекул специфических антител. Это не представляет проблемы при использовании МКА, полученных из асцитной жидкости и затем очищенных. В качестве препарата поликлональных антител лучше всего использовать антитела, очищенные путем аффинной хроматографии, или по крайней мере фракцию иммуноглобулинов, полученную с помощью ионообменной хроматографии (см. гл. 2, разд. 10). Метод связывания с эритроцитами должен быть мягким, неденатурирующим, поскольку специфическая антигенсвязывающая способность антител очень лабильна. Ниже приведены две наиболее распространенные и простые методики.

#### **6.2.1. Прямое связывание антител с ЭБ**

1. Отмывают аликвоты (по 0,1 мл) фиксированных глутаральдегидом или пируватным альдегидом эритроцитов барана и ресуспендируют их в 2 мл 0,1 М ацетатного буфера, pH 5,0, содержащего 10—100 мкг антител.

2. После инкубации при 37 °С в течение 2 ч с периодическим перемешиванием клетки дважды отмывают, а затем ресуспендируют в 2 мл PBS, содержащего 0,1% азида и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

### 6.2.2. Хлорный хром

Эта методика аналогична описанной для белковых антигенов. Ей следует отдать предпочтение в том случае, когда требуется максимальная чувствительность теста. Эритроциты, фиксированные диметилсуберимидатом, тоже могут быть нагружены с помощью хлорного хрома [17], однако эта методика обладает незначительными преимуществами. Она может использоваться для количественного определения антигенов в клеточных экстрактах, содержащих неионные детергенты, но если избыток детергента удаляется при добавлении смолы, то можно использовать и обычные нефиксированные нагруженные антителами клетки [25].

## 6.3. Интерпретация результатов

При титровании антигенов в реакции обратной ПГА обычно наблюдается выраженный эффект прозоны при высоких концентрациях антигена. Иногда эффект может быть настолько сильным, что только в нескольких лунках в середине панели для микротитрования наблюдается положительная реакция. Вероятность указанного эффекта возрастает в том случае, если связанные с эритроцитами антитела обладают низкой аффинностью либо недостаточно хорошо очищены.

## 6.4. Технические замечания

1. В одностадийном тесте в лунках готовят последовательные разведения антигена на среде H-RPMI—2% СПК и затем добавляют нагруженные антителами эритроциты. Далее панели инкубируют. Конечной точкой титрования антигена считают максимальное разведение, дающее положительную агглютинацию клеток. Тест используют как для выявления антигена, так и для его количественного определения против стандартных разведений.

2. Можно осуществить и вторую стадию — как в случае обычной ПГА — путем простого отмывания клеток с последующим добавлением в суспензию вторых антител. Очевидно, что вторые антитела должны быть направлены к тем детерминантам антигена, которые остаются доступными после «захвата» антигена связанными с эритроцитами антителами. Ес-

ли как на первой, так и на второй стадии используют моноклональные антитела, то они должны быть направлены к пространственно отдаленным друг от друга эпитопам.

3. Другой способ, применяемый особенно в тех случаях, когда исследователь имеет дело с моновалентными антигенами, — это использование для титрования смеси нагруженных антителами эритроцитов, причем антитела каждого типа должны быть специфичны по отношению к пространственно разобщенным детерминантам [24]. Иногда лучше проводить такую реакцию в две стадии: на первой стадии может быть использован реагент, представляющий собой связанные с эритроцитами антитела к свободным  $\lambda$ -цепям. Цель этой стадии заключается в отборе из смеси свободных и связанных с тяжелыми цепями  $\lambda$ -цепей только свободных  $\lambda$ -цепей. После отмывания клетки ресуспендируют и смешивают с эритроцитами, нагруженными антителами, которые реагируют как со свободными, так и со связанными антителами  $\lambda$ -цепями.

## **7. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**

### **7.1. Принцип**

Агглютинация нагруженных антигенами эритроцитов с помощью антител в концентрации, слегка превышающей их минимальную агглютинирующую дозу (МАД), легко ингибируется небольшими количествами того же антигена в растворе. Основанная на этом явлении тест-система включает в себя два последовательных титрования. Первое титрование антител осуществляют путем их последовательных разведений для определения примерного значения МАД. Второе же титрование, которое начинают с концентрации, составляющей примерно 4 МАД, необходимо для более точного определения титра. Пробное ингибирование (торможение) агглютинации стандартным антигеном затем проводят с использованием антител в количестве 2 единиц МАД. Цель заключается в достижении заметного торможения гемагглютинации, выражающегося в отсутствии агглютинации под влиянием антигена, разведенного до следовых количеств, в лунках, следующих за лунками с выраженной агглютинацией. Этот переход и представляет собой конечную точку титрования антигена. Пробы затем могут быть протестированы на присутствие антигена в растворе. Антиген определяют количественно по разведению путем сравнения его титра с титром стандарта.

### **7.2. Постановка реакции**

1. Готовят нагруженные антигеном эритроциты, как описано в разд. 5.2.



2. Проводят две предварительные реакции агглютинации (определение приблизительного и точного титра антител), используя 0,5%-ную суспензию нагруженных антигеном эритроцитов и среду Н-RPMI — 2% СПК. По результатам второй реакции определяют разведение антител, содержащее 2 МАД при использовании 0,5%-ной суспензии эритроцитов. Готовят определенный объем раствора антител в этом разведении.

3. Торможение стандартным раствором антигена. Вносят по 50 мкл среды для разведения в лунки трех рядов панели для микротитрования. С помощью петли для приготовления разведений добавляют 50 мкл антигена в первую лунку ряда А и последовательно разводят его в двух рядах панели. Если исходная концентрация антигена составляет 1 мг/мл, то в последнем разведении она должна составлять менее 100 пкг/мл. Добавляют в лунки по 50 мкл нагруженных антигеном эритроцитов, перемешивают, накрывают панели крышкой. Через 1—2 ч оценивают результаты по характеру оседания эритроцитов. Третий ряд лунок используют для постановки контролей. Они должны включать в себя нагруженные антигеном эритроциты (без антител), антиген в растворе и нагруженные эритроциты и антитела (без антигена в растворе).

4. Постановка реакции. Разводят в лунках панели параллельно стандарт и тестируемые антигены. Количество разведений стандартного антигена можно уменьшить, с тем чтобы конечная точка титрования находилась в пределах одного ряда панели. Для раститровки исследуемых антигенов могут понадобиться два ряда панели. Контроли должны включать в себя исследуемые антигены с нагруженными и ненагруженными эритроцитами, а также нагруженные эритроциты с антителами без антигена.

### 7.3. Технические замечания

1. РТГА часто предпочитают ПГА как метод количественного определения антигена. Он обладает рядом преимуществ. Так, например, нет необходимости в получении очищенных антител из антисыворотки или асцитной жидкости; антиген может быть мономерным и использоваться в реакции в нативном состоянии.

2. Описанный метод иногда может давать превосходные результаты. Неудача, как правило, связана с низкой аффинностью антител, которые вследствие этого преимущественно связываются с повторяющимися антигенными детерминантами на поверхности эритроцитов, а не со свободным антигеном.

3. Полезная модификация РТГА для изучения аллотипических маркеров иммуноглобулинов животных соединяет в

себе принципы антиглобулинового теста и ингибирования. Антитела к ЭБ могут использоваться для сенсибилизации клеток в субагглютинирующих дозах, в результате чего антиаллотипические сыворотки вызывают агглютинацию. Эту реакцию можно ингибировать свободными аллотипами. Животных, гомозиготных по известным аллотипам, можно легко иммунизировать эритроцитами для того, чтобы получить чувствительные антиаллотипические антитела. Такую стратегию успешно применяли для титрования аллотипических локусов кролика в непреципитирующих системах. В одном из методов неагглютинирующие изоантитела к кроличьим эритроцитарным аллельным антигенам использовались для сенсибилизации кроличьих эритроцитов [26].

## **8. Реакция связывания комплемента (РСК)**

### **8.1. Принцип**

Образование комплексов антиген — антитело *in vitro* можно регистрировать путем количественного определения связывания (потребления) комплемента, добавленного извне в стандартном, ограниченном количестве. Собственный комплемент, содержащийся в исследуемых сыворотках, инактивируют путем их предварительного нагревания. Успех тестирования в решающей степени зависит от наличия комплемент-связывающих изотипов антител, однако реакция может использоваться для выявления как антител, так и антигена.

### **8.2. Общая схема постановки реакции**

Стандартный раствор антигена и инактивированные комплемент-связывающие контрольные антитела разводят (в виде смеси) в ходе двойной разбавки антигена против антител (по принципу «шахматной доски»). В лунки вносят лимитирующее количество активного комплемента. Если комплемент связывается, то он уже не способен вызывать комплемент-зависимый лизис нагруженных антителами эритроцитов, которые добавляют в лунки в качестве индикаторной системы для выявления несвязывавшегося комплемента. В той части панели, где наблюдается заметный переход от отсутствия лизиса к полному лизису, выявляют те концентрации антигена и антител, которые можно воспроизвести в условиях реакции для их количественного определения.

Стадии проведения реакции описаны ниже:

1. Готовят гемолитическую индикаторную систему из сенсибилизированных эритроцитов и определенной дозы комп-

лемента. Антитела рекомендуется использовать в количестве 6 единиц МДГА, а комплемент — 4 единицы  $\text{CH}_{50}$ . Процедуры титрования, необходимые для определения этих концентраций антител и комплемента, а также приготовление сенсibilизированных эритроцитов и истощенного эритроцитами комплемента описаны в разд. 3.3.1—3.3.4.

2. Проводят двойную раститровку антигена и антител с добавлением комплемента.

3. Добавляют гемолитический индикатор и определяют чувствительную конечную зону (зону титра) для последующего использования полученных данных в тест-системе.

### 8.3. Подробное описание реакции

#### 8.3.1. Двойное («шахматное») титрование

1. Прогревают антисыворотку при  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин для инактивации содержащегося в ней комплемента. Во все лунки панели вносят по 50 мкл БГР (см. разд. 3.2). Затем проводят двойную (параллельную) раститровку антител во всех восьми рядах (А—Н) вплоть до вертикального ряда II (1:2048). Вертикальный ряд 12 оставляют свободным от антител в качестве контроля (добавляют только антиген).

2. В семи стеклянных пробирках на 2 мл, помеченных соответственно В—Н, готовят по 1 мл разведения антигена в БГР, причем последовательные разведения должны быть кратны 2. Вносят по 50 мкл разведения В (максимальная концентрация) в каждую лунку ряда В; повторяют то же для С—Н. Ряд А оставляют свободным от антигена в качестве контроля (добавляют только антитела).

3. В каждую лунку панели вносят по 50 мкл истощенного комплемента, содержащего 4 единицы  $\text{CH}_{50}$ , перемешивают; накрывают панель крышкой и оставляют на ночь (16 ч) при  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### 8.3.2. Стадия лизиса

На следующее утро панель инкубируют в течение 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , а затем добавляют по 50 мкл 0,5%-ной взвеси сенсibilизированных антителами (6 МДГА) эритроцитов, перемешивают, накрывают панель крышкой и снова инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин либо до наступления гемолиза.

#### 8.3.3. Интерпретация результатов

При соответствующих разведениях антигена и антител в «шахматной» раститровке зона в верхнем левом углу панели, где реагирующие компоненты находятся в максимальной

концентрации, представляет собой зону минимального или нулевого гемолиза, поскольку в этих условиях связывается максимальное количество комплемента. Для достижения такого результата необходимо предварительно правильно подобрать концентрации реагентов.

Высокий уровень гемолиза должен наблюдаться в контрольных лунках, где находится только антиген или только антитела (вертикальный ряд 12 и ряд А), а также в лунках, где антиген и антитела слишком разбавлены и поэтому не способны к образованию значительного числа комплемент-связывающих комплексов (направление на панели соответственно вниз и направо). В лунках центральной области панели должно происходить связывание комплемента, причем выявляется зона, состоящая из лунок с минимальным лизисом. Эта зона дает информацию о правильных соотношениях антигена и антител, которая необходима для последующего тестирования реагентов с неизвестными параметрами в условиях максимальной чувствительности.

#### 8.3.4. Тестирование сывороток или антигенов

Условия выбираются на основании результатов двойного («шахматного») титрования. Раститровку тестируемых реагентов осуществляют в одиночных рядах. Используют либо стандартную концентрацию антигена, либо стандартное разведение антител, изменяя при этом концентрацию второго реагента.

#### 8.4. Технические замечания

1. Конечную стадию получения картины осаждения клеток для определения степени гемолиза можно ускорить путем осторожного центрифугирования панелей.

2. В контрольных лунках, содержащих только антиген или только антитела, должен наблюдаться полный гемолиз, поскольку в них не происходит связывания комплемента. Отсутствие лизиса в обоих контролях свидетельствует о неадекватном связывании антител с индикаторными клетками. Отсутствие гемолиза только в одном контроле свидетельствует о наличии антикомплементарной активности добавленного реагента, который в таком случае следует заменить.

3. Поскольку IgM обладают высокой гемолитической активностью, их выявление с помощью данного метода предпочтительнее по сравнению с антителами других изотипов. Поэтому РСК широко используются в клинике для диагностики

недавно приобретенных бактериальных и вирусных инфекций.

4. Наиболее точный метод количественной оценки результатов заключается в использовании нагруженных антителами клеток, меченных  $^{51}\text{Cr}$ . 50%-ную суспензию клеток метят в течение 30 мин при 22 °C, трижды отмывают в БГР и разводят до 0,5%-ной суспензии. Реакцию проводят, как описано в разд. 8.3.1 и 8.3.2, но после инкубации с индикаторными клетками панель охлаждают до 4 °C и центрифугируют при 2000 g в течение 5 мин. Из каждой лунки отбирают супернатант (75 мкл) для подсчета радиоактивности в гамма-счетчике. Альтернативный подход — это спектрофотометрическое измерение поглощения гемоглобина в супернатантах (после центрифугирования) при 413 нм. В обоих случаях связывание комплемента сравнивают с контрольным 100%-ным лизисом, а результаты выражают как процент связывания комплемента. Конечную точку можно определить как максимальный титр антител или максимальное разведение антигена, дающие более 50% связывания комплемента [27].

### Литература

1. Aman A. J., Borg D., Kondo O. L., Wara D. W. J. Immunol. Methods, 17, 365 (1977).
2. Chao W., Yokoyam M. T. Clin. Chim Acta, 78, 79 (1977).
3. Singer J. M., Plotz C. M. Am. J. Med., 21, 888 (1956).
4. Winblad S. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 49, 500 (1960).
5. Gleeson-White M. H., Heard D. H., Mynors L. S., Coombs R. R. A. Br. J. Exp. Pathol., 31, 321 (1950).
6. Ling N. R. Immunology, 4, 49 (1961).
7. Stephen V., Boyden S. V. J. Exp. Med., 93, 107 (1951).
8. Stavitsky A. B. J. Immunol., 72, 368 (1954).
9. Gyenes L., Sehon A. H. Immunochemistry, 1, 43 (1964).
10. Onkelinx E., Mendelmans W., Jonian M., Loutie R. Immunology, 16, 35 (1969).
11. Avrameus S., Tan Don B., Chinton S. Immunochemistry, 6, 67 (1969).
12. Ling N. R. Br. J. Haematol., 7, 299 (1961).
13. Hirata A. A., Emirick A. J., Boley W. F. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 143, 761 (1973).
14. Sanderson C. J., Wilson D. V. Immunochemistry, 8, 163 (1971).
15. Jandl J. H., Simmons R. L. Br. J. Haematol., 3, 19 (1957).
16. Gold E. R., Fudenberg H. H. J. Immunol., 99, 859 (1967).
17. Ling N. R., Stephens G., Bratt P., Dhaliwal H. S. Mol. Immunol., 16, 637 (1979).
18. Ling N. R., Bishop S., Jefferis R. J. Immunol. Methods, 15, 279 (1977).
19. Bankert R. B., Mayers G. L., Pressman D. J. Immunol., 118, 1265 (1977).
20. Ghanta V. K., Hamlin N. M., Pretlow T. G., Hiramoto R. N. J. Immunol., 109, 810 (1972).
21. Hammerling U., Westphal O. Eur. J. Biochem., 1, 1 (1967).
22. Bankert R. B., Mayers G. L., Pressman D. J. Immunol., 123, 2466 (1979).
23. Bankert R. B., Wolf B. J. Immunol., 112, 1782 (1974).

24. *Ling N. R., Lowe J., Hardie D., Evans S., Jefferis R.* Clin. Exp. Immunol., 52, 234 (1983).
25. *Parish C. R., O'Neill N., McKenzie I. F. C.* J. Immunol. Methods, 39, 223 (1980).
26. *Mandy W. J., Todd C. W.* Immunochemistry, 6, 811 (1969).
27. *Brown D., Hobart M. J.* In: Techniques in Clinical Immunology, Thompson R. A. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2nd edition, Chapter 4, p. 80, 1981.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Список фирм, поставяющих оборудование и материалы

#### Оборудование и расходные материалы

- Bench centrifuge (with plate carries): C. 411 model with carries 11.17.41.68 — S.A. Jouan, 130 Western Road, Tring, Herts HP23 4BU, UK
- CO<sub>2</sub> incubator: Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 IPQ, UK
- Cork borers: Gallenkamp Co. Ltd, Technico House, Christopher Street, London EC2P 2ER, UK
- Dialysis tubing: Medicell International Ltd, 239 Liverpool Road, London N1, UK
- Diluting tulips: Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3, IPQ, UK
- Electrophoresis box with large buffer reservoirs: Chemical Laboratory (Chemlab) Instruments Ltd, 129 Upminster Road, Hornchurch, Essex RM11 3XJ, UK
- Electrophoresis units: Paines and Byrne Ltd, Pabyrn Laboratories, 177/179 Bilton Road, Perivale, Greenford, Middlesex UB6 7HG, UK
- Film developer and fixer: Kodak D19, Eastman-Kodak Co., PO Box 10, Dallimore Road, Manchester M23 9NJ, UK
- Gelbond<sup>TM</sup> film: Marine Colloids Division, FMC Corporation Bio-products, Rockland, ME 04841, USA
- Gel plate storage boxes (10×10×1,5 cm): Sterilin Ltd, Lampton House, Lampton Road, Hounslow, Middlesex TW3 4EE, UK
- Gel punches (and punch assemblies): Shandon Southern Products Ltd, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire WA7 IPR, UK
- Glass agar plates (8×8 cm): Appleton Woods Ltd, 313 Heeley Road, Selly Oak, Birmingham B29 6EN, UK
- Hamilton syringes: FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leics LE11 0RG, UK
- Hard-glass bottles (Duran bottles; graduated, screwcap, autoclavable): FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leics LE11 0RG, UK

- Homogenizer for cells; motor-driven: Ultra Turrax Model/T25 and Griffiths tubes, BDH Apparatus Division, PO Box 8, Dagenham, Essex RM8 1RY, UK
- IEP gel cutters: Shandon Southern Products Ltd, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
- Intensifier screens: DuPont Cronex 'Lightning Plus' (with Agfa Curix RP-2 films): DuPont Instruments, Peck Lane, Newtown, CT 06470, USA
- Inverted microscope; Olympus CK with  $\times 10$  objective and binocular wide field  $\times 15$  eyepieces: Olympus Optical Co., 43-2 Hatagya 2 Chome, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan
- Laminar flow tissue culture hood: Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK
- Liquid nitrogen containers: Cryoservices, Blackpole Trading Estate, Blackpole Road, Worcester WR3 8SG, UK
- Liquid nitrogen polypropylene storage vials: Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK
- Micropipettes (Finnpipettes): Jencon Scientific Ltd, Cherry Court Way, Industrial Estate, Leighton Buzzard, Bedford LU7 8UA, UK (Gilson): Anachem Ltd, Anachem House, 20 Charles Street, Luton, Beds LU2 0EB, UK  
(fixed and variable types): Oxford Labs, Boehringer Corp. (London), Boehringer Mannheim House, Bell Lane, Lewes, East Sussex BN7 1LG, UK
- Microtitration plates (U- and V-bottom): Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK
- Multichannel micropipettes (Titertek): Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK and Dynatech Laboratories Ltd, Daux Road, Billingshurst, Sussex RH9 5J, UK
- Parafilm: American Can Company, Greenwich, CT, USA
- Petri dishes; 5 cm sterile tissue culture grade: Sterilin Ltd, Lampton House, Lampton Road, Hounslow, Middlesex TW3 4EE, UK
- P1-pump pipette aids: FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leics LE11 0RG, UK
- Polycarbonate centrifuge tubes: Techmate Ltd, 10 Bridgeturn Avenue, Old Wolverton, Milton Keynes MK12 5QL, UK
- Power packs for electrophoresis (Vokam): Shandon Southern Products Ltd, Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
- Radial immunodiffusion plate reader: Transidyne General Corp., Ann Arbor, MI, USA
- Radial immunodiffusion ring measuring scale: Partigen-Behring



- Institute, Behring Diagnostics, Hoechst House, Salisbury Road, Hounslow, Middlesex TW4 6JH, UK
- Rotary cell mixer (Type BCM): Voss of Maldon, Essex, UK
- SDS—PAGE apparatus: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK
- Minigel apparatus: Biorad Laboratories Ltd, Caxton Way, Holywell Industrial Estate, Watford, Herts WD1 8RP, UK
- Shaker-incubator: New Brunswick Scientific (UK) Ltd, 26—34 Emerald Street, London WC1N 3QA, UK
- Sterile capped tubes: Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK
- Sterile filtration: Sartorius Instruments Ltd, 18 Avenue Road, Belmont, Sutton, Surrey, UK
- Millipore filters (0,2 and 0,45  $\mu\text{m}$  pore size): Millipore (UK) Ltd, 11/15 Peterborough Road, Harrow, Middlesex HA1 2 YH, UK
- Stopwatch: FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough Leics LE11 0RG, UK
- Teflon double-edged syringe adaptor for preparing water-in-oil emulsions: Becton and Dickinson Ltd, Lab Products Division, Between Towns Road, Cowley, Oxford OX4 3JY, UK
- Test tubes, 30 ml Pyrex, round-bottomed: FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leics LE11 0RG, UK
- Tissue culture flat-bottomed flasks: Sterilin Ltd, Lampton House, Lampton Road, Hounslow, Middlesex TW3 4EE, UK
- Tissue culture universal bottles: Sterilin Ltd
- Tissue culture 24-well (2 ml) trays 'Linbro': Flow Laboratories, Woodcock Hill, Harefield Road, Rickmansworth, Herts WD3 1PQ, UK
- Tissue culture 96-well plates 'Costar': Northumbria Biologicals Ltd, South Nelson Industrial Estate, Cramlington, Northumberland NE23 9HL, UK
- Vortex mixer (whirlmixer): FSA Laboratory Supplies, Bishop Meadow Road, Loughborough, Leics LE11 0RG, UK
- Warming plate; manufactured by Photax: available at all major photographic suppliers
- Water bath (type JB1): Grant Instruments Ltd, Barrington, Cambridge CB2 5QJ, UK
- Western blot (electroblot) and immunostaining apparatus: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK; Biorad Laboratories Ltd, Caxton Way, Holywell Industrial Estate, Watford, Herts WD1 8RP, UK

Nitrocellulose membrane-Hybond C: Amersham International plc, Lincoln Place, Green End, Aylesbury, Bucks HP29 2TP, UK

X-Ray film and cassettes; Agfa Curix RP-1: DuPont Cronex; DuPont Instruments, Peck's Lane, Newton, CT 06470, USA

### Материалы, химические реактивы и реагенты

#### Адьюванты

Arlacel A: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK

Bayol F: Esso Petroleum Co., Purfleet, Essex, UK

*B. pertussis* vaccine: Wellcome Diagnostics, Temple Hill, Dartford, Kent DA1 5AH, UK

FCA and FIA: Difco Laboratories Ltd, PO Box 14B, Central Avenue, East Molesey, Surrey KT8 0SE, UK

FCA can be provided with *M. tuberculosis* (H37Ra) or with *M. butyricum*

Liposomes; Lecithin/Sphingomyelin standard solution: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK

*M. bovis* BCG vaccine: Glaxo Laboratories Ltd, Greenford, Essex, UK

*M. tuberculosis*: Ministry of Agriculture Veterinary Research Station Weybridge, Surrey, UK and MRC Microbiological Supplies Division, Porton Down, Wiltshire, UK

Muramyl dipeptide: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7 NG, UK

#### Антисыворотки, МКА и антигенные стандарты

These suppliers include those offering HRP-antiglobulin conjugates for isotype screening.

Antiserum catalogue: Linscott Directory of Immunological and Biological Reagents, PO Box 55, East Grinstead, Sussex RH19 3YL, UK

Anti-SRBC (rabbit haemolytic and agglutinating reagents): Wellcome Diagnostics, Temple Hill, Dartford, Kent DA1 5AH, UK

BDS Biologicals Ltd, Vincent Drive, Edgbaston, Birmingham B15, UK

Behring Diagnostics, Hoechst UK Ltd, Hoechst House, Salisbury Road, Hounslow TW4 6JH, UK

Dako Ltd, 22 The Arcade, The Octagon, High Wycombe,

- Bucks HP11 2HT, UK  
Miles Laboratories Ltd, PO Box 37, Stoke Court, Stoke Poges, Slough SL2 4LY, UK  
Nordic Immunological Labs, PO Box 544, Maidenhead, Berks SL6 2PW, UK  
Serotec Ltd, 22 Bankside Approach, Kidlington, Oxford OX5 1JE, UK  
Oxoid Limited, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 0PN, UK  
WHO standard serum (for serum protein standards): WHO International Reference Centre for Immunoglobulins, Institute of Biochemistry, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

### **Хроматографические гели**

- Cellulose carbonate: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK  
DE-52 (DEAE): Whatman Biochemicals Ltd, Springfield Mill, Maidstone, Kent, UK  
Protein A—Sephacryl—4B: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK  
Sephadex (G25, 200 etc.), Sephacryl (S200, 300): Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK  
Sephacryl 4B, 6B and CL-4B: Pharmacia/LKB Biotechnology

### **Ферменты**

- HRP, papain, pepsin urease: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK

### **Материалы для конъюгации гаптенa с носителями**

- (i) Carriers  
Haemocyanin (Keyhole limpet [KLH] and Limulus): Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK  
Species serum albumins and gamma globulins, porcine thyroglobulin: Sigma Chemical Co. Ltd  
Ficoll: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK  
(ii) Haptens  
DNP and TNBS: Sigma Chemical Co. Ltd  
(iii) Linking agents

Glutaraldehyde; water-soluble carbodiimide( N,N'-O-phenylenedimaleimide; SPDP: Sigma Chemical Co. Ltd  
 Chromic chloride (chromium chloride,  $\text{CrCl}_3$ ): Sigma Chemical Co. Ltd  
 CNBr: Sigma Chemical Co. Ltd

### **Материалы для проведения ИЭФ в ПААГ в присутствии ДСН**

Gels, buffers, molecular weight markers, protein stains etc: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK  
 Silver staining kit: Biorad Laboratories Ltd, Caxton Way, Holywell Industrial Estate, Watford, Herts WD1 8RP, UK  
 Non-fat milk powder: St Ivel 5 pints (or similar brand): Grocery Stores and Supermarkets

### **Клетки, культуральные среды и их компоненты**

B95-8 marmoset cell line: from Dr J. Gordon, Department of Immunology, Medical School, University of Birmingham, Birmingham B15 2TJ, UK  
 DMSO: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK  
 Dulbecco's medium: Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 0PN, UK  
 Dulbecco's A+B buffer: Oxoid Ltd  
 Fetal calf serum (FCS): Gibco Europe Ltd, Unit 4, Cowley Mill Trading Estate, Longbridge Way, Uxbridge UB8 2TG, UK  
 Hepes: BDH Ltd, Four Ways, Atherstone, Warwick CV9 1JQ, UK  
 Hepes-RPMI medium (H-RPMI): Gibco Europe Ltd, UK  
 Horse serum: Gibco Europe Ltd, UK  
 Hypoxanthine: BDH Ltd, UK  
 2-Mercaptoethanol (2-ME): Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK  
 Methotrexate (aminopterin): Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearls River, New York, USA  
 Penicillin: Gibco Europe Ltd, UK  
 Plasmacytoma cell lines with HGPRT deficiency: P3-NS1/Ag4—1 and X63/Ag8.653 Gift of Professor C. Milstein, MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK (now carried by many laboratories—details from N. R. Ling)  
 Polyethylene glycol (PEG) 1500: BDH Ltd, Four Ways, Atherstone, Warwick CV9 1JQ, UK

RPMI-1640 tissue culture medium with L-glutamine: Gibco Europe Ltd, UK

Streptomycin: Gibco Europe Ltd

Thioguanine (anhydrous): BDH Ltd, Four Ways, Atherstone, Warwick CV9 1JQ, UK

### Другие химические реактивы и реагенты

Agar (Difco Bacto Agar, Difco Special Agar Noble, Difco Oxoid Ion Agar): Difco Laboratories Ltd, PO Box 14B, Central Avenue, East Molesey, Surrey KT8 0SE, UK

Agarose: Pharmacia/LKB Biotechnology, Pharmacia House, Midsummer Boulevard, Milton Keynes MK9 3HP, UK

BDH Chemicals Ltd, Poole, Dorset BH12 4NN, UK

Bacto-agar: Difco Laboratories Ltd

Bromophenol Blue stain: Sigma Chemical Co. Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7NG, UK

Complement (preserved): Wellcome Diagnostics, Temple Hill, Dartford DA1 5AH, UK

Coomassie Brilliant Blue R stain: Sigma Chemical Co. Ltd

Cyanoacrylate tissue adhesive: (isobutyl 2-cyanoacrylate monomer-IBC-2): Supplier: Archibald Young and Son Ltd, 37 Constitution Street, Edinburgh EH6 7BG

Manufacturer: Ethicon Ltd, Edinburgh, UK

Enzyme substrates — AEC and DAB: Sigma Chemical Co. Ltd  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: British Drug Houses (BDH Ltd)

Ficoll-paque: Pharmacia/LKB Biotechnology

Iodoacetamide: Sigma Chemical Co. Ltd

KCNO (for carbamylation): BDH Ltd

Nonidet P-40 (NP-40): Sigma Chemical Co. Ltd

Phytohaemagglutinin: Gibco Europe Ltd, Unit 4, Cowley Mill Trading Estate, Longbridge Way, Uxbridge UB8 2TG, UK

Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF): Sigma Chemical Co. Ltd

Pristane: Koch-Light Labs Ltd, Rockwood Way, Haverhill, Suffolk CB9 8PB, UK

Sarcosyl: Sigma Chemical Co. Ltd

Silicone Repelcote: BDH Ltd

Sodium azide: Sigma Chemical Co. Ltd

Sodium deoxycholate: Sigma Chemical Co. Ltd

Trypan Blue: Sigma Chemical Co. Ltd

Tween 20 and Tween 40 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate): Sigma Chemical Co. Ltd

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абсорбция антисывороток 92—104
- Авидность антисыворотки 20, 112, 113
- Агар для метода преципитации в геле 199, 201
  - свойства и электроэндо́смос 220
- Агароза для иммуноэлектрофореза 217
  - — методов преципитации в геле 199—201
  - свойства и электроэндо́смос 220
- Агарозно-барбиталовый гель 201
- Агглютинации методы *см.* Гемагглютинация
- Агглютинины 240
- Агглютинирующие антитела 239, 240
- Адсорбенты *см.* Иммуносорбенты
- Адьюванты (белки), адсорбированные на квасцах 66
  - антисыворотки к тимус-зависимым иммуногенам 37
  - бактериальная суспензия 67
  - водно-масляные эмульсии 64—65
  - применение 37—40
  - свойства 37—41
  - флотационная проба 66
- Аллотипические антигены кроличьих Ig, антисыворотка барана 54
- Алюминиевые квасцы, адсорбирование белков 39, 66
  - — получение иммуногенов 39
- Аминоэтил-карбоксиметил-фико́л, конъюгация с ТНФ 49
- Антигены, иммунохимическое окрашивание 230, 232—234
  - мол. масса, метод ДСН—ЭПАГ 56—63
  - неидентичные 205
  - перекрестно-реагирующие 21
  - перекрестные реакции 19, 21
  - полностью идентичные 205
  - преципитация в гелях 197—230
  - система контроля 96
  - стандартные, использование в методе преципитации в геле 216—218
- Антигенные детерминанты 19
- Антигенсвязывающие центры антител 19
- Антиглобулин(ы), контроль качества 96
  - образование у овцы и кролика 42
  - очистка иммуноаффинной хроматографией 166—170
  - получение 53
  - система контроля, использование в иммуноокрашивании 231
  - титрование 254
  - требуемые свойства 34
- Антиглобулиновые сыворотки, абсорбция 92—104
  - тесты (тесты Кумбса) 253
  - — — — — оборудование и реагенты 253
- Антиглобулиновый реагент при селекции гибридом 135
- Антиидиотипические антитела как иммуногены 16
- Антисыворотка(и), абсорбция 35, 92—105
  - абсорбция бактериальными суспензиями 101
  - замораживание 91
  - к аллотипам иммуноглобулинов, система контроля 96
    - — — — — у кроликов 67, 85
    - — — — — мышей 85
    - — — — — бактериальным антигенам, получение 80—82
    - — — — — система контроля 95
  - — — — — идиотипу иммуноглобулинов, система контроля 96
  - — — — — иммуноглобулинам, получение 77—78
  - — — — — отдельным антигенам, система контроля 96
  - — — — — эритроцитам барана 88
  - — — — — IgG мышей 167
  - — — — — человека 101—103
  - — — — — IgM человека 102
  - — — — — *Mycobacterium* 81
  - — — — — качество 92

- консерванты 90
- контейнеры для хранения 90
- контроль качества 35, 111—113
- кроличья к мышинному иммуноглобулину, получение 78, 104
- лиофильное высушивание 91
- моноспецифичность 22, 23
- олигоспецифичность 22
- перекрестно-реагирующая 21
- поликлональные, свойства 21—22
- полиспецифические 22, 80, 81
  - из плазмы 91
- получение и хранение 89
- с высоким титром антител к *Campylobacter jejuni* 84
  - — — получение 77—79
- — — IgG к антигенам *Proteus vulgaris* 84
- сбор и хранение 35, 89—91
- системы контроля качества 94—96
- тестирование 35, 92—104
- фракционирование иммуноглобулинов 35, 106—110
- Антитело(а), avidность 20
  - антигенсивязывающие центры 19
  - антидиотипические, получение 85—88
  - аффинность 20
  - выбор методов 24—32
  - детерминанты 19
  - к антигенам клеточной поверхности, скрининг 136
  - — — отдельным белкам, образование 77—79
  - — — растворимым антигенам, скрининг 136
  - — — углеводному компоненту пневмококка 84
  - — — цельной сыворотке, получение 80
  - — — экстрактам паразитов 82
  - контроль качества 111—113
  - моноклональные 23
    - — — получение 116—163
    - — — свойства 21—23, 148—150
  - моноспецифические, продукты 23
  - образование у кролика 77
  - основные области применения 16
  - отбор проб и тестирование 35
  - очистка 170—178. См также Иммуноаффинная хроматография
  - перекрестные реакции 21
  - поликлональные, получение 33—113
  - — — получение, основные правила 34—43
  - специфичность 21
- Антителозависимого гемолиза реакции 245—252
  - — — гемолитические титры IgM и IgC 252
  - — — истощенный комплемент 250
  - — — минимальная гемолитическая доза (МГДА) 250
  - — — принцип метода 245
  - — — титрование гемолизиннов 246
  - — — — комплемента 248—251
- Асцитная жидкость, источник моноклональных антител 144
- Аффинная хроматография см. Иммуноаффинная хроматография
- Аффинное связывание моноклональных антител 110
- Аффинность антител 20
  - константа ассоциации 20
  - определение 113
- Бактериальные антигены, иммунизация 80—82
- Бараны эритроциты, использование при получении антиглобулинов 53
- Безводная методика конъюгации 47
- Белок А, связывание IgC 108, 109
- Буфер для гемолитических реакций (БГР) 246
- Буферные растворы 166
- Бычий сывороточный альбумин, конъюгация с гаптеном 47
- Bordetella pertussis*, использование для получения антисыворотки к иммуноглобулину 78, 83
  - — — суспензия как адъювант 67
  - — — усиление гуморального ответа 39
- Вестерн-блоттинг 29, 230—232
  - антигенное родство между молекулами 31
  - иммунохимическое окрашивание 232—234
  - как система контроля качества антисывороток 95
  - оценка чистоты антигенов 31
  - получение иммуногена 52
  - применение 230
  - принцип метода 230
  - специфичность антител 31
- Взятие проб крови у животных 73. См. также под названиями животных
- Водно-масляная эмульсия см. Адъюванты

- $\beta$ -D-галактозидаза, конъюгация с IgG барана 46  
 Гаптены, конъюгация с белком 43—50  
 — молярные отношения с носителем 44  
 — определение 19  
 — связывание с белком-носителем 36, 43  
 Гельэлектрофорез см. Иммуноэлектрофорез  
 Гемагглютинация 238—269  
 — антиглобулиновые тесты 253  
 — пассивная 255—260  
 — получение антител к растворимым антигенам 136  
 — прямая 241—244  
 — реакция торможения, минимальная агглютинирующая доза (МАД) 264, 265  
 — — — постановка реакции 264, 265  
 — — — принцип метода 264  
 Гемоцианин фиссуреллы как носитель 44  
 Гибридизация А, парное слияние 125, 133, 138  
 — Б 139  
 — — — одинарное слияние 129, 133  
 — методика получения моноклональных антител 123—133  
 Гибридома(ы), образующие моноклональные антитела 134—136  
 — скрининг 134—136  
 Гибридомные клетки 146, 147  
 — — — клонирование 137—140  
 — — — размораживание 147  
 Гликохолевая кислота 77  
 Глутаровый альдегид, использование при конъюгации уреазы с IgG барана 46  
 — связывание сорбирующих белков 97, 100  
 Гуморальный ответ, взятие проб крови 75  
 Двойная диффузия в геле 201—207  
 — — — антигенное родство между молекулами 31  
 — — — — интерпретация результатов 204—207  
 — — — оценка чистоты иммуногена 31, 55, 204  
 — — — — преимущества и недостатки 207  
 — — — — применение 202  
 — — — — принцип метода 201  
 — — — — специфичность антител 31, 207  
 Дназотизация как метод конъюгации 48  
 Диффузия в гелях, метод 197—216  
 Динитрофенил (ДНФ) как гаптен 44  
 ДНФ-гемоцианин, получение конъюгата 45  
 Додecilсульфат натрия см. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додecilсульфата натрия (ДСН-ЭПАГ)  
*E. coli* белки, получение методом ДСН-ЭПАГ 62  
 — — — экстракты мембран, разделение 63  
 Иммунизация, антиидиотипические антитела, получение 85—88  
 — антисыворотки к аллотипам иммуноглобулинов 85  
 — антитела к бактериальным антигенам 80, 81  
 — — — отдельным белкам 77—79  
 — — — цельной сыворотке 80  
 — — — экстрактам паразитов 82  
 — — — животных 43  
 — — — возраст и пол 43  
 — — — юридическая ответственность 43  
 — иммунный ответ на гаптен 76, 77  
 — инъекции 68—73  
 — основные правила 34, 35—43  
 — полиспецифические антисыворотки 80, 81  
 — получение сыворотки к IgG мыши 169, 170  
 — — — макромолекул 50—54  
 — — — моноклональных антител 121—123  
 — — — различные режимы 76  
 — — — стратегия 35  
 — — — техника 69—73  
 — — — эритроцитами барана 88  
 Иммуноаффинная хроматография 164—194  
 — — — выделение моноклональных антител 173  
 — — — — мышиного и крысиного IgG 167  
 — — — — использование моноклональных антител 165, 171—180  
 — — — — поликлональных антител 164  
 — — — — колонки 176  
 — — — — очистка антигенов HLA 164  
 — — — — антигена ОХ-45 191, 192  
 — — — — Thy-антигена 164  
 — — — — антител 110, 166, 167, 171—179



- — — цитоплазматических мембран 180—194
- — — приготовление клеточных экстрактов 184—194
- — — присоединение моноклональных антител к агарозе 174
- — — реакция торможения 170
- — — элюция антигена 178
- Иммуинные комплексы 50, 55
- — — получение 50
- Иммунный ответ на амниогликозиды 76
- — — гаптены 76
- Иммуногенность 18
- Иммуногены 18
- Т-зависимые антигены 37
- иммуинные комплексы 50
- — — получение 35
- — — путем конъюгации гаптена с белком 43—50
- — — с помощью полос и реплик на нитроцеллюлозе 52, 53
- — — свойства для получения антител 34—37
- — — чужеродность 36
- Иммуноглобулины, антитела, свойства 38
- — — быка, очистка 106
- — — выделение 53, 54
- — — козы, очистка 106
- — — кролика, очистка 106
- — — мыши и крысы, очистка 109, 166—170
- — — подклассы 104, 109
- — — овцы 33
- — — конъюгация с  $\beta$ -D-галактозидазой 46
- — — — пероксидазой хрена 48
- — — — уреазой 46
- — — — очистка 106
- — — — очистка 105
- — — — подклассы 33, 38
- — — — фракции 105—110, 167
- — — человека, гидролиз папаином 110, 111
- — — — очистка 105, 107, 108
- — — — подклассы 108, 109
- — — — получение Fab- и Fc-фрагментов 110, 111
- Иммуногистохимические методы, свойства 29
- Иммунодиффузия в геле 197—216
- Иммунологические тесты с использованием радиоактивной метки 27
- — — модулированным ферментом 26
- — — — как система контроля качества антисыворотки 94
- Иммунопероксидазный тест (ИПТ) 31
- — — качество антител 31
- — — определение клеточных и тканевых антигенов 31
- Иммунопреципитация в гелях 197—230
- Иммунорадиометрический анализ (ИРМА) как система контроля качества антисыворотки 94, 104
- — — количественное определение антигена 31
- — — контроль качества антител 31
- — — свойства 28
- Иммуносорбенты, бактериальная суспензия 101
- — — использование в колонках с антигеном на сефарозе 98
- — — карбоната целлюлозы 98
- — — нагруженные антителами эритроциты 100
- — — получение и использование 97—99
- — — удаление примесей IgG на колонке 109
- — — Fab- и Fc-фрагменты IgG мыши 104
- Иммуоферментный анализ (ИФА), антигенное родство между молекулами 31
- — — как система контроля качества антисывороток 96
- — — количественное определение антигена 31
- — — — свойства 26
- — — — твердофазный (ELISA) 26
- — — — количественное определение антигена в растворе 31
- — — — получение моноклональных антител 136
- — — — система контроля качества антисывороток 94, 95, 102
- Иммуофлюоресцентный анализ (ИФЛА) 31
- — — как система контроля качества антисывороток 96
- — — клетки и тканевые антигены 31
- — — определение изотипов антител 32
- — — специфичность антител 31
- — — титрование тканей 32
- Иммунохимическое окрашивание 232
- — — блокирующий буфер 233
- — — использование антител, конъюгированных с пероксидазой хрена 233

- — — белка А 236
- — — моноклональных антител 235
- — — радиоавтографии 236
- — — субстраты ферментов 231
- — — технические замечания 233
- Иммуноцитохимические методы 29
- Иммуноэлектрофорез (ИЭФ), буферы 219
- встречный 228—229
- двумерный (перекрестный) 225—229
- — исследование антигена 31
- — как система контроля качества антисыворотки 95
- — количественное определение компонентов антигенных смесей 31
- — оценка чистоты препаратов 31, 55
- — очистка иммуногенов 51, 52
- — преимущества и недостатки 228
- — применение 225
- — принцип метода 225
- — проверка гидролиза IgG на Fc-фрагменты 111
- — свойства 24
- — технические замечания 22
- — исследование антигена 31
- — как система качества антисывороток 95, 103
- — контроль качества антител 31
- — определение специфичности антител 55, 56, 225
- — оценка чистоты иммуногена 31, 52, 55—56
- — перекрестный см. Иммуноэлектрофорез двумерный
- — преимущества и недостатки 222
- — применение 216
- — принцип метода 217
- — проверка расщепления IgG папаином 110, 111
- — распределение препаратов на пластине 221
- — свойства 24
- — агара и агарозы 220
- — электроэндоосмос 220
- Иммуноэлектрофоретические методы 215—229
- Инъекции см. Иммунизация
- Карбамиллирование антигенов для ракетного иммуноэлектрофореза 225
- Карбодимид, формирование мостиков при конъюгации 46, 49
- Карбонат целлюлозы как иммуносорбент 98
- Клонирование клеток гибридомы в полужидком агаре 139
- — — методом лимитирующих разведений 140—143
- — линий гибридомных клеток 137—140
- Колонки белок А — сепароза для получения подклассов IgG 108, 109
- Конкурентный метод анализа 27—28
- Константа ассоциации для антител 20
- Контроль качества препаратов антител 146
- Контрольная антисыворотка для метода преципитаций в геле 200
- — контроль качества 35, 112
- Конъюгация гаптена с носителем 36, 43—49
- Кролик, анестезия 75
- взятие проб крови 74, 75
- иммунизация 53, 72, 77, 83, 85—88
- как источник антител 41
- образование антител 38, 41
- — — к отдельным белкам 77
- — ответ на введение ПАФ 38
- — IgG 38
- Кролиčky антитела к идиотипам кролика (аллогенные) 86
- — — мышинным идиотипам 87
- Крыса, анестезия 74
- антитела к отдельным белкам 77
- взятие проб крови 74, 75
- иммунизация 71
- иммунный ответ на гаптены 76
- как источник антител 40—41
- Липополисахариды *Bordetella pertussis* 39
- Липосомы как адъюванты 39
- содержащие иммуноген, приготовление 67
- состав 39
- 2-Меркаптоэтанол, использование в методе гемагглютинации и гемоллизе 241, 243, 252
- — при ДСН-ЭПАГ 56
- Метод конъюгации гаптена с белком, формирование мостиков 45—50
- Методы с использованием антител, выбор 31
- — — — свойства 24—32
- — — меченных ферментами реагентов 26, 27
- — спонтанного связывания 44
- Минимальная агглютинирующая доза 264
- гемолитическая доза антител

- (МГДА), использование в методе титрования комплемента 250
- — — — — реакции связывания комплемента 267
  - Моноклональные антитела 116—163
    - — в асцитной жидкости 145, 173
    - — выделение 144—145
    - — иммунохимическое окрашивание 230, 232—234
    - — использование в иммуноаффинной хроматографии 171—178
    - — источник подклассов IgG мыши 109, 110
    - — источник получения 148—150
    - — контроль качества 146
    - — партнеры для гибридизации 157
    - — перспективы исследований 150
    - — применение 148—150, 153
    - — принципы получения 116
    - — продуцент ВЭБ 155—160
    - — свойства 23, 148—150
    - фидерные клетки 156
    - человека, гибридизация клеток 161
    - — — — — получение 154
    - — — — — путем ВЭБ-трансформации В-лимфоцитов 157—162
  - Морская свинка, анестезия 74
    - антитела к идиотипам кролика 88
    - — взятие проб крови 74, 75
    - — иммунизация 71
    - — иммунный ответ на гаптен 76
    - — ответ на введение НАФ 38
  - Мурамилдипептид как адъювант 40
    - состав 40
  - Мышинные антитела к идиотипам мыши 86
  - Мышь, анестезия 75
    - антитела к отдельным белкам 77
    - взятие проб крови 73
    - иммунизация 121—123
    - иммунный ответ на гаптены 76
    - иммуноглобулины, изотипы 104, 109
      - источник антител 40
  - Mycobacterium tuberculosis* в составе ПАФ 38
    - выделение антигена методом ДСН-ЭПАГ 63
  - НАФ см. Неполный адъювант Фрейнда
  - Неполный адъювант Фрейнда 64, 65
    - — — — — свойства 38
  - Обратная пассивная гемагглютинация 25, 262
    - — — — — интерпретация результатов 263
    - — — — — количественное определение антигена 32
    - — — — — связывание антител 262
    - радиальная иммунодиффузия (ОРИД) 25, 208, 209
      - — — — — применение 209
      - — — — — принцип метода 208, 209
      - — — — — титрование антител 31, 208—215
  - Овца, антисыворотка к иммуноглобулинам 79
    - антитела, конъюгация с ферментами 46—50
    - взятие проб крови 75
    - выработка антител 38
    - иммунизация 72
    - ответ на введение ПАФ 38
    - получение антисыворотки 42
  - Окрашивание гелей при разделении антигенов 62, 204; см. также Иммуноокрашивание
  - Олсвера* раствор 243
  - Опухолевые антигены, терапевтическое применение 16
  - Отбор проб 35
  - Пассивная гемагглютинация (ПГА) 25, 255—260
    - — — — — интерпретация результатов 260
    - — — — — использование хлорного хрома 257, 258
    - — — — — как система контроля качества антисывороток 94, 95, 104
    - — — — — контроль качества антител 31
    - — — — — принцип метода 259
    - — — — — с эритроцитами, нагруженными полисахаридами 262
    - — — — — связывание антигена 255
  - Пероксидаза хрена, конъюгация с IgG овцы 48
  - Плазма, получение сыворотки 91
  - Плазмацитомные клеточные линии, получение моноклональных антител 117, 118
  - Поликлональные антитела, очистка иммуноаффинной хроматографией 167—170
    - — — — — получение 33—113
    - — — — — применение в иммуноаффинной хроматографии 164
  - Полиэтиленгликоль для метода преципитации в геле 200
  - — — — — получение иммунных комплексов 50

- реагент для слияния 119
- ПАФ см. Полный адъювант Фрейнда
- Полный адъювант Фрейнда, получение 66
  - — — свойства 38
  - — — состав 38
- Преципитации метод 24. См. также Иммунопреципитация в геле
- Преципитация в гелях, очистка иммуногена 51, 52
- Проба Кумбса 240. См. также Антиглобулиновые тесты
- Прямая гемагглютинация 32
- Proteus vulgaris* как адъювант 67
- Реагенты, используемые для слияния при получении моноклональных антител 119
- Радиальная иммунодиффузия (РИД) 208—215
  - — как система контроля качества антисывороток 93, 94
  - — калибровочные кривые 212, 213
  - — количественное определение антигена 31, 208—215
  - — преимущества и недостатки 215
  - — применение 208
  - — принцип метода 208—209
  - — свойства 25
  - — точность, разрешающая способность и чувствительность 212
  - — IgG человека 212, 213
- Радиоиммунологический анализ (РИА) 27
  - — антигенное родство между молекулами 31
  - — как система контроля качества антисывороток 94
  - — получение антител к растворимым антигенам 136
- Ракетный иммуноэлектрофорез 222—225
  - — для немоноспецифической сыворотки 224
  - — интерпретация результатов 224
  - — калибровочная кривая 225
  - — количественная обработка результатов 224
  - — количественное определение антигена 31
  - — карбамилрование сывороток 225
  - — определение чистоты иммуногена 56, 59
  - — получение иммуногенов 52
  - — преимущества и недостатки 225
- — принцип метода 222
- — свойства 24
- Реакция розетирования 25
  - связывания гаптена см. Методы конъюгации гаптена
  - — комплемента (РСК) 266—268
  - торможения гемагглютинации 25, 264—266
- Сефароза, использование в иммуноаффинной хроматографии 174
  - матрице для сорбента 98
- Скрининг, получение антител к антигенам клеточной поверхности 136
- Слияние клеток, последовательность этапов 127
- Среда ГАТ (с гипоксантином, аминоксантином и тимидином) для получения моноклональных антител 118, 119
- Среда Дюльбекко 120
- Стандартный антиген, контроль качества антител 35, 111
- Сыворотки, получение моноклональных антител 120
- Сывороточные белки как иммуногены 36
  - — определение 200
- Танниновая кислота, адсорбция антисыворотки 100
- Тиоляция неароматических аминокислот гаптена 48
  - — — использование N-сукцинимидил-3(2-пиридилдитио)проприоната (СПДП) 48, 49
  - — — конъюгация с пероксидом хрена 48
- Титрование антител, качество антител 31, 94—96
  - комплемента, минимальная гемолитическая доза антител (МГДА) 250
  - — получение эритроцитов барана, нагруженных антителами 248
  - — принцип метода 248
  - — 50%-ный лизис ( $CH_{50}$ ) 248, 250
  - — реакции антителозависимого гемолиза 251
  - — — связывания комплемента 266
  - — удаление антиэритроцитарных антител 249
- Толерантность, использование при получении антисывороток 54

- Торможение гемагглютинации, антигенное родство между молекулами 31
- Тринитрофенил (ТНФ) — бычий гаммаглобулин, молярные отношения 44
- Трафарет для метода преципитации в геле 202, 210, 216, 223, 226, 229
- как гаптен 44
- молярные отношения с носителем 45
- реакции связывания 44
- Ухтерлони** метод, контроль качества антисыворотки 94, 95
- Уреаза, конъюгация с IgG барана 46
- Фидерные клетки** 156
- Флуоресцеин, использование при получении антител 136
- Флуоресцентный сортер клеток 29
- — — определение клеточных и тканевых антигенов 32
- Хлорный хром**, использование в методе обратной пассивной гемагглютинации 263
- — — пассивной гемагглютинации 257, 258
- — — как адсорбента 99
- Цитофлуориметр** системы FACS, скрининг моноклональных антител 136
- Электроблоттинг** см. Вестерн-блоттинг
- Электрофорез** см. Иммуноэлектрофорез
- в полиакриламидном геле см. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ЭПАГ)
- Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ЭПАГ), окрашивание и высушивание гелей 62, 63
- — — — — как система контроля качества антисыворотки 94
- — — — — принцип метода 56
- — — — — оценка чистоты иммуногена 31
- — — — — очистка антител 56, 63
- — — — — получение иммуногена 52
- — — — — разделение белков 58—63, 197
- Эпитопы 19
- Эпштейна — Барр вирус (ВЭБ), получение моноклональных антител 155—160
- Эритроциты в реакции гемагглютинации 238—269
- как иммуносорбент 100
- барана, нагруженные антителами 248
- — обратная пассивная гемагглютинация 262
- свойства для метода гемагглютинации 239
- Эуглобулин, исходный материал при очистке IgM человека 107—109
- Эуглобулиновая фракция асцитной жидкости 110

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редактора перевода . . . . .	5
Предисловие . . . . .	6
Список авторов . . . . .	8
Список сокращений . . . . .	9
Введение. <i>К. Кэтти</i> . . . . .	11
Литература . . . . .	15
<b>Глава 1. Свойства антител и антигенов. <i>Д. Кэтти</i></b> . . . . .	18
1. Антигены и иммуногены . . . . .	18
2. Антигенные детерминанты: эпитопы . . . . .	19
3. Антигенсвязывающие центры антител . . . . .	19
4. Аффинность и avidность антител . . . . .	20
5. Специфичность антител: перекрестные реакции . . . . .	21
6. Свойства поликлональных антисывороток и моноклональных антител . . . . .	21
7. Выбор методов с участием антител . . . . .	30
Литература . . . . .	30
<b>Глава 2. Получение поликлональных антител и контроль их качества. <i>Д. Кэтти и Ч. Райкундалия</i></b> . . . . .	33
1. Введение . . . . .	33
2. Основные правила получения антител . . . . .	34
3. Приготовление иммуногена . . . . .	43
4. Получение адъювантов для иммунизации . . . . .	64
5. Иммунизация и взятие крови у животных . . . . .	68
6. Различные режимы иммунизации . . . . .	76
7. Получение и хранение сывороток . . . . .	89
8. Предварительная оценка качества антисыворотки . . . . .	92
9. Абсорбция антисывороток . . . . .	92
10. Очистка иммуноглобулинов и субъединиц IgG . . . . .	105
11. Контроль качества антител . . . . .	111
12. Благодарности . . . . .	113
Литература . . . . .	113
<b>Глава 3. Моноклональные антитела мыши. <i>Дж. Браун и Н. Р. Линг</i></b> . . . . .	116
1. Основные принципы получения антителообразующих клеточных линий . . . . .	116
2. Оборудование и материалы . . . . .	117
3. Иммунизация мышей . . . . .	121
4. Методика гибридизации . . . . .	123

5. Селекция гибридом . . . . .	134
6. Клонирование линий гибридомных клеток . . . . .	137
7. Выделение антител из культурального супернатанта и из асцитной жидкости . . . . .	144
8. Контроль качества: клеточные линии и препараты антител . . . . .	146
9. Применение моноклональных антител . . . . .	148
10. Перспективы исследований . . . . .	150
Литература . . . . .	152
<b>Глава 4. Моноклональные антитела человека. Дж. Гордон . . . . .</b>	<b>153</b>
1. Некоторые общие положения . . . . .	153
2. Необходимое обеспечение (дополнение к списку, который приведен в гл. 3) . . . . .	155
3. Получение моноклональных антител человека путем ВЭБ-трансформации В-лимфоцитов . . . . .	157
4. Другие методы получения моноклональных антител человека . . . . .	162
Литература . . . . .	163
<b>Глава 5. Иммуноаффинная хроматография. Ж. Арвье и А. Ф. Уил- льямс . . . . .</b>	<b>164</b>
1. Введение . . . . .	164
2. Буферные растворы . . . . .	166
3. Очистка антииммуноглобулиновых антител кролика . . . . .	166
4. Аффинная хроматография с использованием моноклональных антител . . . . .	171
5. Очистка антигенов цитоплазматической мембраны . . . . .	180
Литература . . . . .	195
<b>Глава 6. Иммунодиффузия в геле, иммуноэлектрофорез и методы им- мунохимического окрашивания. Д. Кэтти и Ч. Райкундалич . . . . .</b>	<b>197</b>
1. Введение . . . . .	197
2. Оборудование и материалы для методов преципитации в геле . . . . .	198
3. Методы диффузии в геле . . . . .	201
4. Иммуноэлектрофоретические методы . . . . .	215
5. Вестерн-блоттинг и иммунохимическое окрашивание антиген- ных полос . . . . .	230
Литература . . . . .	236
<b>Глава 7. Гемагглютинация и реакции антителозависимого гемолиза. Н. Р. Линг и Д. Кэтти . . . . .</b>	<b>238</b>
2. Прямая реакция гемагглютинации . . . . .	241
3. Реакции антителозависимого гемолиза и титрования комп- лемента . . . . .	245
4. Антиглобулиновые тесты (тесты Кумбса) . . . . .	253
5. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) с использова- нием нагруженных антигеном эритроцитов . . . . .	255
6. Обратная реакция пассивной гемагглютинации с эритроци- тами, нагруженными антителами (ОРПГА) . . . . .	262
7. Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) . . . . .	264
8. Реакция связывания комплемента (РСК) . . . . .	266
Литература . . . . .	269
<b>Приложение . . . . .</b>	<b>271</b>
Список фирм, поставляющих оборудование и материалы . . . . .	271
<b>Предметный указатель . . . . .</b>	<b>278</b>

## УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва,  
1-й Рижский пер., д. 2.  
издательство «Мир»

Учебное издание

Дэвид Кэтти, Чандра Райкундалия, Джеффри Браун и др.

АНТИТЕЛА

Под ред. Д. Кэтти

Книга 1

Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова

Научный редактор М. А. Серова

Мл. научн. редактор О. В. Шагнян

Художник А. В. Захаров

Художественный редактор А. Я. Мусин

Технический редактор Е. В. Алехина

Корректор С. А. Денисова

ИБ № 7345

Сдано в набор 21.05.91. Подписано к печати 23.10.91. Формат 60×90<sup>1</sup>  
Бумага тип № 1. Печать высокая. Гарнитура Литературная. Обл.  
9,0 бум. л. Усл. печ. л. 18,00. Усл. кр.-отт. 18,00. Уч.-изд. л. 18,18.  
Изд. № 4/7092. Тираж 2800 экз. Зак. 997. Цена 9 руб.

Издательство «Мир»

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Министерства печати и массовой информации  
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.