



Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител против рецептор-связывающего домена ботулотоксина типа В

Автор: Зенинская Н.А.

Соавторы: Марьин М.А., Комбарова Т.И., Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Фирстова В.В.

Название учреждения: ФБУН ГНЦ ПМБ

Введение

Ботулотоксин, синтезируемый анаэробной спорообразующей почвенной бактерией *Clostridium botulinum* и реже иными представителями рода *Clostridium*, является наиболее опасным из природных ядов. Существует 8 типов ботулотоксинов (А-Н), а также множество их субтипов. Клиническими значимыми, вызывающими тяжелые пищевые интоксикации у человека, являются токсины типов А, В и Е. Все ботулотоксины имеют бинарную природу и состоят из легкой и тяжелой цепи. Тяжелая цепь представлена рецептор-связывающим доменом и транслокационным доменом. Легкая цепь является каталитическим доменом и представляет собой цинк-эндопептидазу. В зависимости от типа токсина она разрезает разные белки семейства SNARE, препятствуя экзоцитозу ацетилхолина из нейронов, что приводит к параличу мышц.

Цель

Целью данной работы является получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к рекомбинантному белку рецептор-связывающего домена ботулотоксина типа В (rBoNT/B-NC50) *C. botulinum*.

Материалы и методы

Восьминедельные мыши линии BALB/c были иммунизированы в основание хвоста белком rBoNT/B-NC50 в дозе 100 мкг. Иммунизация производилась с интервалом в 3 недели: сначала в смеси с полным адъювантом Фрейнда в объемном соотношении 1:1, затем с неполным адъювантом Фрейнда; за 3 дня до слияния была введена бустерная доза белка внутривенно. Титры IgG в крови животных к таргетному белку определялись методом непрямого твердофазного ИФА каждые 2-3 недели. Спленоциты селезенки мышей с наибольшими показателями титров антител использовались для слияния с миеломной линией клеток-партнеров Sp2/0-Ag14 методом электрослияния на приборе BTX ECM2001 (Harvard Apparatus, США) в количественном соотношении 4:1. Полученные в итоге гибридные клетки культивировались без фидера на среде DMEM под давлением НАТ с последующим переводом на НТ. После нарастания клеток проводился двукратный скрининг культуральной жидкости на наличие моноклональных антител к таргетному белку rBoNT/B-NC50. Позитивные клоны гибридом подвергались двукратному клонированию и криоконсервации.

Результаты

Для электрослияния использовались спленоциты мышей со значениями титров антител 1:128 000-256 000 (Рис. 1). Эффективность гибридизации составила 99,81% при учете значений OD против двойного отрицательного контроля (Рис. 2). По итогам отбора было получено 19 штаммов гибридомом.

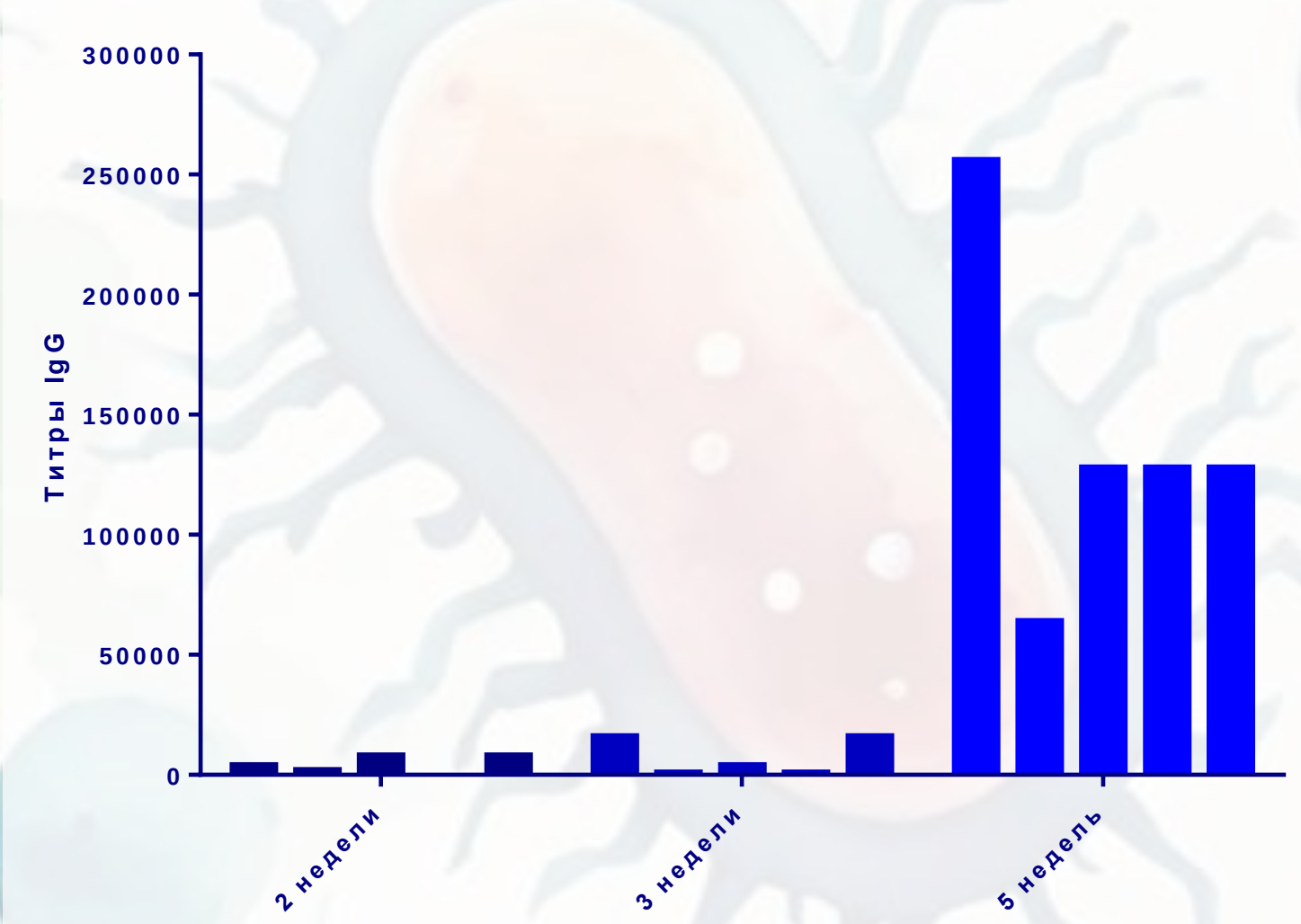


Рис. 1. Изменение титров антител к rBoNT/B-NC50 в крови мышей между иммунизациями.

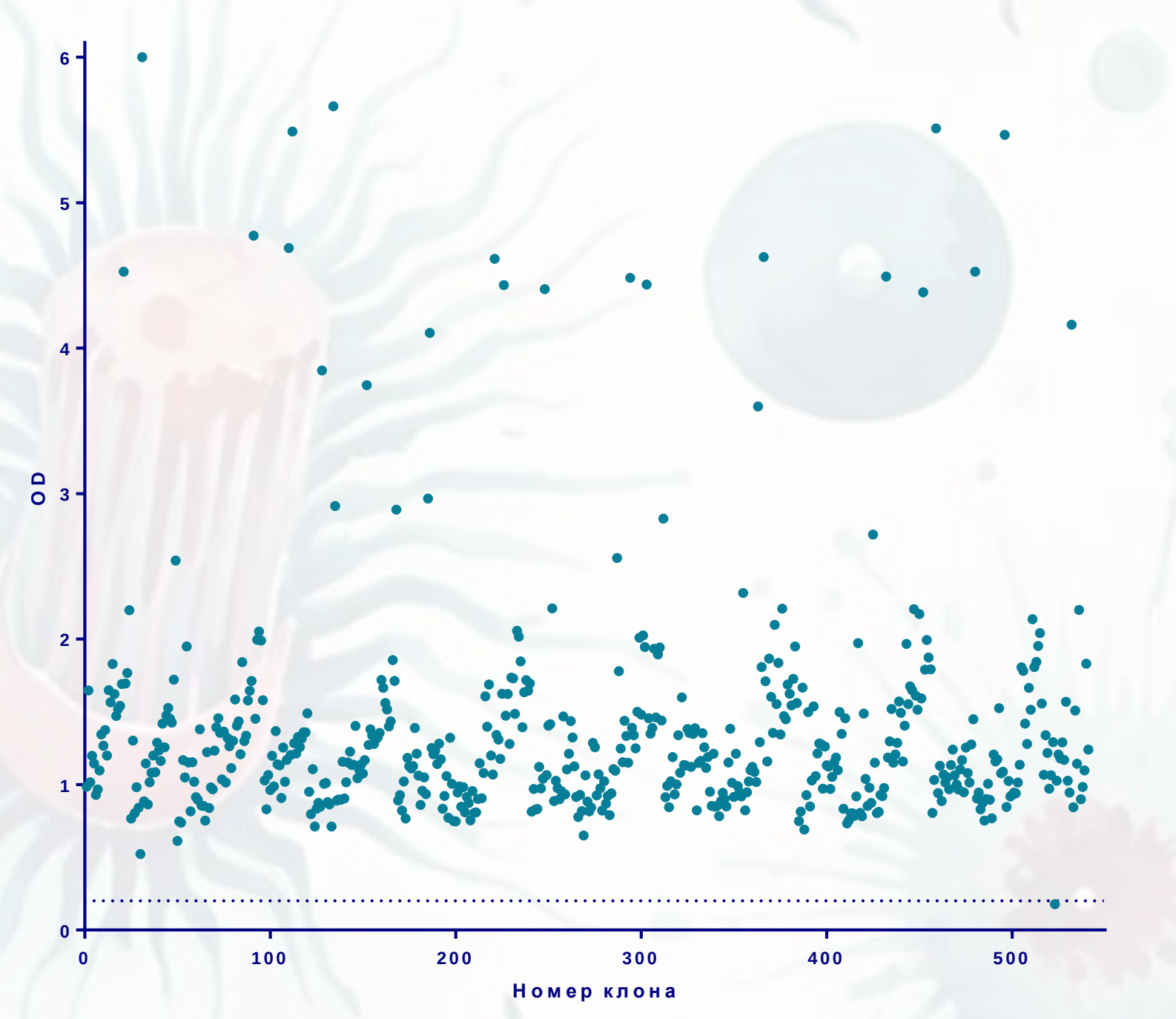


Рис. 2. Скрининг культуральной жидкости гибридомом. Измерения произведены на приборе Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, США).

Выводы

Полученные штаммы мышинных гибридом являются специфичными в отношении белка rBoNT/B-NC50 и выступают в качестве приемлемых кандидатов как для разработки диагностических тест-систем для детекции ботулотоксина типа В в продуктах питания и анализах больных, так и основы для конструирования терапевтических препаратов химерных антител мышь-человек.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 31.10.2019 г. № 075-15-2019-1671).



IX НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС
БАКТЕРИОЛОГОВ

Москва • 17 - 19 сентября 2024 г.