



Получение моноклональных антител к рекомбинантному белку PAL *Legionella pneumophila*

Автор: м.н.с. лаборатории молекулярной биологии Зенинская Н.А.
Руководитель: заместитель директора по научной работе, д.б.н., Шемякин И.Г.
ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Московская область)

Цель исследования

Получение моноклональных антител (МКА) против антигена PAL рода *Legionella* и оценка их специфичности на панели микроорганизмов.

Актуальность

В настоящее время существует проблема своевременного распознавания болезней, проявления которых не имеют патномоничных симптомов. Особенно, если данные заболевания имеют тенденцию к быстрому и острому развитию, которое при отсутствии соответствующей терапии ведут к летальным исходам среди инфицированных людей. К одной из таких инфекций относится *Legionella pneumophila* (и в меньшей степени иные представители рода *Legionella*), вызывающая легионеллезную пневмонию и лихорадку Понтиак. На сегодняшний день нет оптимального диагностического стандарта, позволяющего в короткие сроки определить любых возбудителей легионеллезов.

Рис 1. Структурная 3d-модель белка PAL

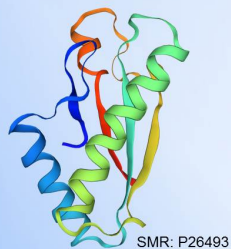
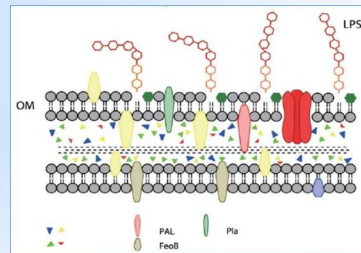


Рис 2. Факторы вирулентности легионелл, входящие в состав клеточной оболочки

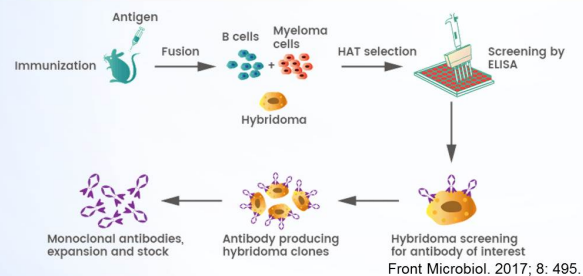


PAL – пептидогликан-ассоциированный липопротеин,
FeoB – белок-переносчик Fe,
Pla – группа фосфолипаз A,
LPS – липополисахарид.
Ann Clin Lab Res. 2015; 3(2).

Материалы и методы

3 группы по 6 животных (мыши методом электрослияния на приборе линии BALB/c и C57BL/6 и крысы ВТХ ECM2001 (Harvard Apparatus, линии Wistar) были иммунизированы США) и методом Келера и рекомбинантным белком PAL *L. Мильштейна* с использованием в *pneumophila*, разведенным с полным качестве агента для слияния раствора адъювантом Фрейнда, по короткому протоколу слияния выступали спленоциты трехнедельному протоколу слияния с селезенки животного с миеломной сенсibilизации. Животные с наибольшим значением титров мышинной линией клеток Sp2/0-Ag14. антител отбирались для участия в дальнейшем эксперименте. Стабильные клоны МКА Гибридизацию производили анализа в панели на 40 точек.

Рис 3. Стандартная схема получения МКА

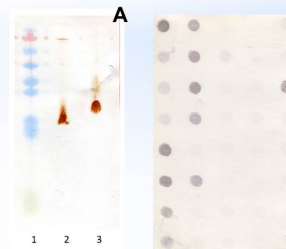


Результаты

Максимальные титры антител к PAL у штаммами вида *L. pneumophila*, как мышей линии BALB/c составили 1:8000, у референсными, так и клиническими мышей линии C57BL/6 – 1:16000, у крыс изолятами. Это можно объяснить различной экспрессией белка-мишени у разных штаммов.

Эффективность гибридизации составила у штаммов МКА мыши по-разному крыс – 14,52%, у мышей – 7,50%. Общая реагировать с остальными представителями эффективности при электрослиянии *Legionella spp.*, что говорит о структурных различиях белка PAL внутри рода *Legionella*. составила 9,17%, а при слиянии методом Келера и Мельштейна – 16,46%. После Все полученные МКА не проявляют двухмесячной селекции и серии специфичности ни к каким иным клонирований было отобрано 12 бактериальных штаммам, кроме индивидуальных продуктивных клонов. Все представителей вида *Staphylococcus aureus* полученные крысиные МКА (рис 4-Б, пятно № 35), что является высокоспецифичны к целевому белку PAL, а предсказуемым результатом, так как данный также в разной степени интенсивности вид синтезируется белок А, с которым взаимодействуют со всеми используемыми взаимодействуют любые иммуноглобулины.

Рис 4. Оценка специфической активности МКА 2-33-1-5 в отношении целевой мишени



А – оценка методом иммуноблоттинга, где 1 – метчик, 2 – белок PAL, 3 – лизат бактерий *L. pneumophila* ATCC 33215.
Б – оценка методом дот-блот анализа, где (сверху-вниз и слева-направо) 1 – белок PAL; 2-12 - представители вида *L. pneumophila* разных серогрупп; 13-14 - иные условно патогенные представителя рода *Legionella*; 15-40 - штаммы иных грамотрицательных бактерий, PAL которых был максимально идентичен легионеллезному, возбудителей пневмоний и инфекций мочевыводящих путей.
Все использованные штаммы получены из ГКПМ ФБУН ГНЦ ПМБ.

Выводы

Для получения гибридом, синтезирующих использования в качестве основы для моноклональные антитела к PAL, оказалось разработки диагностической тест-системы. наиболее выгодно использовать крыс линии Wistar, так как именно крысиные гибридомы в патогенными представителями рода *Legionella* дают наибольшее количество можно использовать при стабильных клонов-продуцентов. Все комбинировании антител между собой для исследуемые МКА, по нашему мнению, идентификации конкретных видов. можно считать приемлемыми для