

ПОВЫШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К β 2-МИКРОГЛОБУЛИНУ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДАХ АНАЛИЗА

Н.Н. Каркищенко¹, В.А. Езерский², О.Б. Жукова², Е.М. Колоскова^{2*}, Н.В. Петрова¹

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных —
филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Высокоспецифичные реагенты — белки и антитела к ним — необходимые компоненты систем верификации эффективности функционирования трансгенных/нокаутных животных биомоделей. В частности, идентификация β 2-микроглобулина мыши и человека в белковых фракциях органов и тканей трансгенных и нокаутных по гену β 2-микроглобулина мышей нескольких HLA-линий, созданных в последние годы в НЦБМТ ФМБА России, является важнейшим этапом их паспортизации. На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных β 2-микроглобулина мыши и человека (m β 2mg и h β 2mg), белки выделены и очищены. На следующем этапе работы получены аффинные сорбенты с иммобилизованными m β 2mg и h β 2mg. Для повышения видовой специфичности сыворотки «кролик-анти-h β 2mg» были истощены против рекомбинантного белка m β 2mg, и, напротив, «кролик-анти-m β 2mg» истощали против рекомбинантного белка h β 2mg. Высокоспецифичные антитела были очищены из истощенных сывороток на аффинных сорбентах. Методами дот- и вестерн-блоттинга на примере истощенных и аффинно-очищенных антител «кролик-анти-h β 2mg» было показано значительное повышение их специфичности относительно h β 2mg.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, β 2-микроглобулин мыши и человека, антиген, антитела, истощение антител, иммунизация

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*рХ человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Петрова Н.В. Повышение специфичности поликлональных антител к β 2-микроглобулину человека и мыши как альтернатива использованию моноклональных антител в иммунологических методах анализа. *Биомедицина*. 2024;20(2):53–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-53-65>

Поступила 20.03.2024

Принята после доработки 25.04.2024

Опубликована 10.06.2024

INCREASING THE SPECIFICITY OF POLYCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN AND MOUSE β 2-MICROGLOBULIN AS AN ALTERNATIVE TO THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNOLOGICAL ANALYSIS

Nikolay N. Karkischenko¹, Vadim A. Ezerskiy², Olga B. Zhukova²,
Elena M. Koloskova^{2,*}, Nataliya V. Petrova¹

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry —
All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village

Highly specific reagents, i.e., proteins and antibodies to them, are the necessary components of systems for verifying the effectiveness of transgenic/knockout animal biomodels. In particular, the identification of mouse and human β 2-microglobulin in the protein fractions of organs and tissues of transgenic and β 2m knockout mice of several HLA lines, which have been created in recent years at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia, is the most important stage of their certification. At the first stage of our research, *E. coli* producing strains of recombinant mouse and human β 2-microglobulin (m β 2mg and h β 2mg) were obtained, the proteins were isolated and purified. At the next stage of the work, affine sorbents with immobilized m β 2mg and h β 2mg were obtained. To increase the species specificity of the serum, “rabbit-anti-h β 2mg” were depleted against the recombinant protein m β 2mg, and, conversely, “rabbit-anti-m β 2mg” were depleted against the recombinant protein h β 2mg. Highly specific antibodies were purified from depleted sera using affinity sorbents. Using dot- and western-blotting methods on the example of depleted and affinity-purified rabbit-anti-h β 2mg antibodies, a significant increase in their specificity relative to h β 2mg was shown.

Keywords: recombinant protein, mouse and human β 2-microglobulin, antigen, antibodies, antibody depletion, immunization

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the research topic “Generation of a new line of humanized transgenic mice carrying the human HLA-A* β gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”) of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.

For citation: Karkischenko N.N., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Petrova N.V. Increasing, the Specificity of Polyclonal Antibodies to Human and Mouse β 2-Microglobulin as an Alternative to the Use of Monoclonal Antibodies in Immunological Analysis. *Journal Biomed.* 2024;20(2):53–65. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-53-65>

Submitted 20.03.2024

Revised 25.04.2024

Published 10.06.2024

Введение

Трансгенные гуманизированные животные, в т.ч. и с нокаутом собственных генов, находят все большее применение для биомедицинских исследований, фармакологических испытаний. Доказательная база интеграции трансгена, детекция трансляции

целевого белка в разных органах и тканях, доказательство отсутствия синтеза белка (или его нефункциональность) нокаутированного гена невозможна без высокоспецифичных реагентов — белков-антигенов и антител к ним.

В последние годы в НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько HLA-линий трансгенных и нокаутных по гену $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2mg$) мышей [1–5], в связи с чем поставлена задача идентификации $\beta 2mg$ мыши и человека ($m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ соответственно) не только на уровне ДНК-мРНК, но и в белковых фракциях органов и тканей животных полученных линий. Аминокислотный анализ $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$ показал 32% несовпадений у белков-предшественников (119 аминокислот (АК), из них 20 АК — сигнальный пептид). Это дает основания полагать, что спектры поликлональных антител, вырабатываемых на $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, как антигены при иммунизации животных будут иметь отличия благодаря несовпадающим эпитопам: в результате технологических манипуляций появляется возможность получения видоспецифических антител к $\beta 2mg$.

На первом этапе наших исследований были получены штаммы-продуценты *E. coli* рекомбинантных $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$. Нуклеотидные последовательности генов были адаптированы для синтеза в бактериальной системе, рекомбинантные белки, $m\beta 2mg$ и $h\beta 2mg$, очищены и наработаны в количествах, необходимых для получения аффинных сорбентов и иммунизации животных.

$\beta 2mg$ представляет собой белок с молекулярной массой 11,8 кДа, состоящий из 99 аминокислотных остатков (119 АК — вместе с сигнальным белком). Он синтезируется во всех ядродержащих клетках организма и играет важную роль в образовании комплекса МНС I класса (МНС-I), клеточном иммунитете. Тяжелая цепь МНС-I представлена доменами $\alpha 1$, $\alpha 2$ (образующими антигенсвязывающую часть комплекса) и $\alpha 3$. Домен $\alpha 3$ имеет иммуноглобулиновую укладку, такую же как соседний $\beta 2mg$, который синтезируется отдельно и стабилизирует комплекс. Химерная молекула, продукт трансгена, использованного

при получении наших трансгенных гуманизированных линий мышей, имеет нативный, мышинный домен $\alpha 3$, человеческие домены $\alpha 1$, $\alpha 2$ а также $h\beta 2mg$, связанный с $\alpha 1$ глицин-сериновым линкером [2, 3].

Иммуноглобулинподобные рецепторы киллерных клеток (KIR), экспрессирующиеся на мембране цитотоксических клеток, регулируют функцию уничтожения зараженных или трансформированных клеток путем взаимодействия с комплексами МНС-I, экспрессирующихся на всех типах клеток с ядрами. Конформационные изменения, происходящие в дистальной, пептидсвязывающей области молекулы МНС-I при замене $m\beta 2mg$ на $h\beta 2mg$, влияют на способность KIR взаимодействовать с МНС-I [7]. Сохранение топологической структуры, присущей пептидпрезентирующей части HLA-молекулы, обеспечивается в химерных молекулах наших трансгенных мышей $h\beta 2mg$ в их составе.

Если на поверхности клеток будут присутствовать оба варианта молекул, определить это можно с помощью вестерн-блот-гибридизации. С использованием антител (АТ), специфичных к молекулам HLA (например, моноклональных антител ab23755 или ab70328, «Abcam», США), можно обнаружить присутствие химерных молекул (молекул, содержащих тяжелую цепь HLA класса I) на поверхности клеток. С помощью **поликлональных** АТ к молекулам $\beta 2mg$ при наличии кросс-реактивности способны обнаруживаться как химерная молекула (56 кДа), так и нативный $m\beta 2mg$ (12 кДа). Если использовать АТ, специфичные к $\alpha 3$ -домену комплекса H2, возможно определить присутствие/отсутствие как нативных молекул H2, так и химерных молекул b2m-HLA-H2, и отличить их друг от друга за счёт разницы в молекулярной массе (44 и 56 кДа) (рис. 1).

Если применение поликлональных АТ к $m\beta 2mg$ или $h\beta 2mg$ в методе вестерн-блоттинга дает нам однозначный ответ о нали-

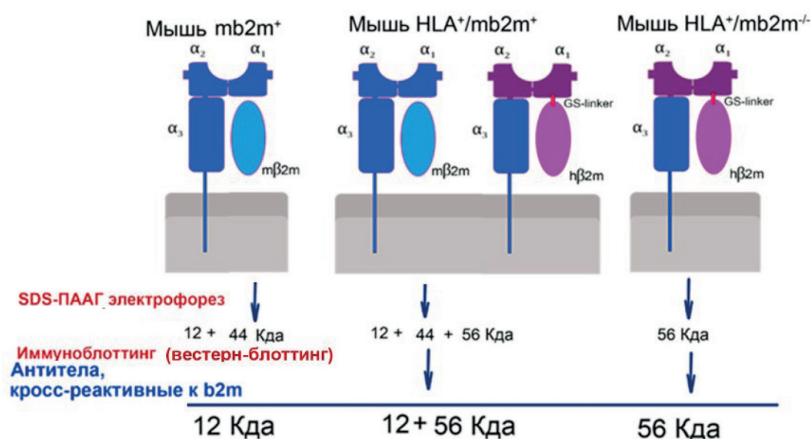


Рис. 1. Варианты вестерн-блоттинга с использованием поликлональных антител при детекции белка $\beta 2m$ в органах и тканях мышей дикого типа и HLA-TG линий: 1) мыши дикого типа ($B2m^+$) — полоса 12 кДа (неслитый $m\beta 2m$); 2) $HLA/B2m^+$ — две полосы — 12 кДа ($m\beta 2m$), 56 кДа — слитый $h\beta 2m$ в составе химерного белка; 3) $HLA/B2m^-$ — 56 кДа — слитый $h\beta 2m$ в составе химерного белка.

Fig. 1. Western blotting variants using polyclonal antibodies for detection of $\beta 2m$ protein in organs and tissues of wild-type mice and HLA-TG lines: 1) wild-type mice ($B2m^+$) — a 12 kDa band (not fused $m\beta 2m$); 2) $HLA/B2m^+$ — two bands — 12 kDa ($m\beta 2m$), 56 kDa — fused $h\beta 2m$ as part of a chimeric protein; 3) $HLA/B2m^-$ — 56 kDa — fused $h\beta 2m$ as part of a chimeric protein.

чии/отсутствии химерного белка и $m\beta 2m$, для более тонких иммунных методов — иммуногистохимии, иммуноцитохимии, не требующих выделения белковой фракции и разделения молекул по размерам, необходимо использование более специфичных антител, позволяющих считать присутствие $m\beta 2m$ и/или $h\beta 2m$ в месте их «прописки».

Целью нашей работы было получение на основе поликлональных кроличьих АТ, кросс-реактивных к $m\beta 2m$ и $h\beta 2m$, видоспецифичных антител, по эффективности приближенным к моноклональным. Нами ранее были получены штаммы-продуценты рекомбинантных $m\beta 2m$ и $h\beta 2m$, рекомбинантные белки (РБ) наработаны и очищены. Для достижения новой поставленной цели требовалось выполнить следующие задачи:

1. Иммунизировать кроликов РБ $m\beta 2m$ и $h\beta 2m$, получить антисыворотки с поликлональными АТ «кролик-анти- $h\beta 2m$ » и «кролик-анти- $m\beta 2m$ ».

2. Получить сорбенты с иммобилизованными РБ $m\beta 2m$ и $h\beta 2m$.

3. Получить кроличьи антитела, специфичные к $h\beta 2m$ (истощенные против эпитопов $m\beta 2m$).

4. Получить кроличьи антитела, специфичные к $m\beta 2m$ (истощенные против эпитопов $h\beta 2m$).

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 4 кроликах калифорнийской породы в возрасте 8–10 мес., массой 4–5 кг. В исследованиях придерживались требований, утвержденных протоколами исследования и стандартными операционными процедурами ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Маркировка клетки содержала данные о дате начала эксперимента, пол и номер животного. Кроликов маркировали с помощью ушных выщипов.

Содержание животных. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями ГОСТ Р от 02.12.2009 53434-2009 «Принципы

надлежащей лабораторной практики (GLP)». Кролики были размещены в индивидуальных клетках. Брикетированные комбикорма для лабораторных животных давались *ad libitum* в кормушки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории. Животным давалась очищенная вода *ad libitum*.

Подготовка антигенов для иммунизации. Антигены для иммунизации: рекомбинантные белки m β 2mg и h β 2mg, продукты штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3): *E. coli* BL21/pET-28/m β 2mg и *E. coli* BL21/pET-28/h β 2mg (отражены в предыдущей публикации). Для иммунизации кроликов брали объединенные фракции рекомбинантного белка, снятые с колонки Ni-сефароза. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд. Для получения эмульсии 1 мг антигена доводили до объема 1,5 мл стерильным физ. р-ром и смешивали с 4,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в 50 мл пробирках типа фалкон. С помощью ультразвукового гомогенизатора МЭФ 93.Т получали стабильную эмульсию обработкой ультразвуком 5 раз по 20 сек. с охлаждением на снегу между циклами.

Методика проведения инъекций животным. Кроликов иммунизировали внутрикожно, инъекции осуществляли в 50–60 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 50–100 мкл на точку. Каждым антигеном (АГ) иммунизировали по два кролика.

Забор крови у экспериментальных животных. Забор крови осуществляли у кроликов из краевой ушной вены на 62, 82 и 103-й день после инъекции, при убое животных.

Получение и хранение антисывороток. Полученную кровь инкубировали 1 ч при 37°C, далее выдерживали на холоде при 4°C в течение ночи и отделяли образовавшуюся сыворотку центрифугированием при 3000 g. К сывороткам добавляли насыщенный раствор сульфата аммония

(1:1 в объемном соотношении), получали сульфатный осадок (СО). Аликвоты сывороток по 200 мкл хранили при -20°C, СО — при 2–8°C.

Очистку рекомбинантных белков от компонентов буфера С (20 mM Трис-HCl, 0,5 M NaCl, 8 M мочевины, 50–500 mM имидазол, 5 mM 2-меркаптоэтанол, pH=7,9) проводили диализом против фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH=7,4) или 0,1 M Na-бикарбонатного буфера, pH=9,5, с использованием целлюлозных мембранных мешков с порами 12000 Да. Диализ проводили при 4–8°C, при постоянном перемешивании буфера в емкости, на протяжении 14–24 ч. Буфер меняли дважды. Раствор РБ концентрировали, помещая диализный мешок на сухой Sephadex G-200.

Получение сорбента с иммобилизованным РБ. К 4 мл промытой водой сефарозы-CL-4В добавляли 8 мл 0,7 M перидата натрия. Суспензию в течение 1 ч мягко перемешивали при комнатной температуре, добавляли 4 мл 2M этиленгликоля. Через 1 ч сорбент последовательно промывали водой, 0,1 M бикарбонатным буфером, pH=9,5, вносили 4 мл концентрированного после диализа РБ (h β 2mg или m β 2mg, 15–20 мг/мл). Реакцию продолжали при 4°C при мягком перемешивании в течение 48 ч. Сорбент с конъюгированным рекомбинантным белком промывали 0,1 M бикарбонатным буфером, pH=9,5, затем ФСБ. Оставшиеся реакционноспособные группы инактивировали р-ром боргидрида натрия в ФСБ (2 мг/мл). Реакцию продолжали при 4°C при мягком перемешивании в течение 1 ч. Сорбент промывали ФСБ, затем 5 мл 100 mM лимонной кислоты и ФСБ с 0,1% азидом натрия. Готовый сорбент хранили при 4–8°C до использования.

Получение антивидовых конъюгатов, меченых пероксидазой хрена (ПХ). Антитела «коза-анти-кролик» были выделены из полученных ранее антисывороток

аффинной очисткой на сорбенте сефароза-IgG кролика. Антитела конъюгировали с ПХ по методу Nakane [8] с нашими модификациями. Приготовленный конъюгат хранили в 33% глицерине в трис-солевом буфере (ТСБ) в конечной концентрации 1 мг/мл при температуре -18°C. В предварительных экспериментах оценивали рабочий титр конъюгата, готовили рабочий концентрат конъюгата в «Иммуностаб плюс» производства ЗАО «Иммунотех» (Россия). Хранили при 4°C.

ИФА-анализ сывороток. В работе использовали: комплект оборудования для хроматографии производства фирмы LKB, вертикальный фотометр «Униплан» производства ЗАО «Пикон», 96-луночные полистироловые планшеты «Dynatech», ProteinA Sepharose Fast Flow «Pharmacia Biotech», 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлорид (ТМБ) «Amresco».

Антиген (РБ hβ2mg) сорбировали в концентрации 5 мкг/мл в посадочном буфере (100 мМ натрий бикарбонатный буфер, pH=9,5), отмывали с этим же буфером и деионизированной водой. Блокировку проводили блокирующим раствором ООО «Иммункулус» (Россия), по окончании инкубации планшеты отмывали отмывочным буфером и деионизированной водой.

Для ИФА-анализа использовали сыворотки в разведениях, кратных двум, начиная с разведения в 4000 раз и заканчивая разведением в 512000 раз. Планшет с сыворотками после окончания инкубации отмывали, вносили конъюгат ПХ с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (рабочее разведение 5000 раз), инкубировали при 37°C 1,5 ч, после чего планшет отмывали и вносили субстратный буфер (ТМБ с перекисью водорода) для проявления реакции. Через 15 мин при появлении голубой окраски реакцию останавливали внесением стоп-раствора. Измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм

на фотометре вертикального сканирования сразу после остановки реакции.

Истощение антисывороток. Ресуспандированный сульфатный осадок сыворотки «кролик-анти-hβ2mg» центрифугировали при 10000 об./мин 10 мин при 10°C. Осадок растворяли в 20 мл трис-солевого буфера с азидом натрия (ТСБ-азид: 20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH=7,4, 0,1% азид натрия) и диализовали против ТСБ-азид в течение ночи при 4-8°C. Содержимое диализного мешка центрифугировали, для избавления от не растворившихся частиц супернатант пропускали через сорбент сефароза-CL4B/mb2mg, предварительно уравновешенный буфером ТСБ-азид. Сорбент промывали ТСБ-азидом до выхода на базовую линию, проскок собирали. Связавшиеся антитела снимали 0,1 М Na-цитратным буфером с pH=2,8, затем ТСБ-азидом. Процедуру повторяли еще 3 раза, последовательно избавляя антисыворотку «кролик-анти-hβ2mg» от перекрестно реагирующих АТ с mβ2mg и АТ к остаточным белкам *E. coli*. На последнем цикле истощения сорбент смешивали во флаконе с собранным проскоком и сорбцию продолжали при мягком перемешивании в течение ночи при 4°C. Сорбент вносили в колонку и проводили последний цикл истощения антисыворотки, как описано выше.

Для финальной очистки и концентрирования белка проводили аффинную хроматографию истощенной сыворотки «кролик-анти-hβ2mg» на колонке сефароза-CL-4B-hβ2mg. Сорбированные АТ снимали 0,1 М Na-цитратным буфером с pH=2,8. Фракцию, содержащую АТ, диализовали против ФСБ-азида, дважды меняя буфер. Содержимое диализного мешка центрифугировали, определяли концентрацию белка по ОП при λ_{280} . Раствор АТ «кролик-анти-hβ2mg» концентрировали с использованием колонок с размером пор 30 кДа до 2,8 мг/мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), дот-гибридизация, вестерн-блот. Лейкоциты крови человека и мыши

лизировали в 2% SDS, инкубировали 5 мин при 95°C и центрифугировали в течение 10 мин при 13000 об./мин. К образцам РБ и лейкоцитов, нормализованных по содержанию белка, добавляли $\times 2$ буфер для образцов (4% SDS, 10% 2-меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0,125 М Трис-HCl, pH=6,8, бромфеноловый синий 0,1%). Прогревали при 95°C.

Для дот-блоттинга подготовленные образцы г-h β 2mg и г-m β 2mg в количестве 1,5 мкл в виде пятен наносили на нитроцеллюлозную (НЦ) мембрану (Hybond-C, «Amersham Biosciences», США) с 5-кратными разведениями 1хБО. Проводили блокировку мембраны, отмывку, посадку первых истощенных АТ в разведении 1:1000, отмывку, посадку вторых АТ-ПХ, отмывку и проявку с использованием в качестве хромогенов хлорнафтола (ХН) и диаминобензидина (ДАБ).

ПААГ-SDS электрофорез проводили в 12,5% — разделяющем и 4% — концентрирующем геле. В лунку концентрирующего геля вносили 15 мкл подготовленного образца. Образцы разделяли в трис-глициновом буфере для электрофореза белков (25 mM Tris-OH, 250 mM глицин, 0,1% SDS). Для оценки размера белков использовали маркеры молекулярной массы Precision Plus Protein Unstained, 10–250 кДа («Bio-Rad», США). Гель после электропереноса белков окрашивали (0,125% кумасси R250; уксусная кислота 10%; метанол 50%), последовательно отмывали (50% метанол, 10% уксусная кислота и 5% метанол, 7% уксусная кислота).

После проведения электрофореза проводили полусухой перенос белков на НЦ мембрану при постоянном напряжении 25 В, продолжительностью 30 мин. Буфер для переноса — 25 mM Трис, 192 mM глицин, 20% v/v метанол, pH=8,3). Половину мембраны обрабатывали блокирующим р-ром, содержащим поливинилпирролидон (ООО «МБФ», Россия), вторую половину — 1% BSA в ФСБ. Инкубировали 1 ч при комнат-

ной температуре. Мембрану отмывали 2 раза по 5–10 мин в ФСБ; 0,05% Tween 20; 0,1% азид натрия (W-раствор, отмывочный раствор).

В качестве первичных АТ использовали сульфатные осадки сывороток иммунизированных кроликов в разведении 1:1000. Отмывали мембрану 3 раза по 10 мин W-раствором. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с вторичными АТ «коза-анти-кролик-ПХ» в разведении 1:2000–1:5000. Мембрану отмывали. Проявляли с использованием 4-хлор-1-нафтола (ХН) или ДАБ в ТСБ с перекисью водорода.

Результаты и их обсуждение

Получение антисывороток. Для иммунизации кроликов была выбрана схема однократной внутрикожной иммунизации. При проведении подкожных и/или внутрикожных инъекций в несколько мест инъекции небольших объемов иммуногена/адьюванта позволяют распределить иммуноген/адьювант на большей площади поверхности. АГ медленно всасывается в кровоток, но быстро поступает к иммунным клеткам лимфатической системы. Такая схема иммунизации приводит к более высоким титрам антител, снижает частоту возникновения тяжелой местной воспалительной реакции и абсцессов [9].

В среднем от каждого иммунизированного кролика нами было получено около 120 мл сыворотки или 240 мл сульфатного осадка.

Из **результатов ИФА-анализа** антисывороток, представленных на рис. 2, следует, что примененная нами схема иммунизации оказалась эффективной: высокий титр антител у кроликов 1 и 2 (антиген h β 2mg) сохранялся на протяжении 40 сут после иммунизации до убоя. Однако иммунный ответ у животных был индивидуален. Так, например, у кролика 1 он был практически постоянным, тогда как у кролика 2 постепенно снижался (оба кролика были иммунизированы РБ h β 2mg).

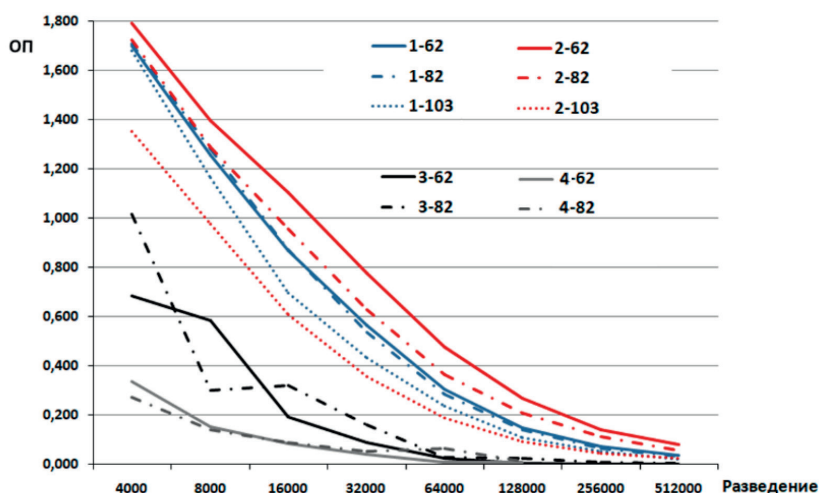


Рис. 2. Динамика титров антисывороток иммунизированных $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$ (1, 2) и $r\text{-m}\beta 2\text{mg}$ (3, 4) кроликов в реакции с иммобилизованным антигеном $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$. Обозначения: 1-62 — номер кролика-сутки после иммунизации.

Fig. 2. Dynamics of antiserum titers of immunized $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$ (1, 2) and $r\text{-m}\beta 2\text{mg}$ (3, 4) rabbits in reaction with immobilized $r\text{-h}\beta 2\text{mg}$ antigen. Designations: 1-62 — rabbit number-day post-immunization.

Неожиданно высокой оказалась видоспецифичность неистощенных антисывороток к антигенам: ОП продуктов ИФА-реакции сывороток «кролик-анти- $m\beta 2\text{mg}$ » (кролики 3 и 4 на рис. 2) при разведениях 4000–8000 была в 3–4 раза ниже, чем у «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ ».

Истощение антисывороток. АГ для иммунизации кроликов представляет собой РБ $h\beta 2\text{mg}$ ($m\beta 2\text{mg}$) с примесями белков штамма-продуцента *E. coli* (рис. 3). Известно, что продукты контаминации *E. coli* в рекомбинантных белках влияют на иммунный ответ [6]. При иммунизации кроликов образуются антитела как к рекомбинантным, так и бактериальным белкам. Поскольку сходство РБ $h\beta 2\text{mg}$ и $m\beta 2\text{mg}$ составляет более 68% (за счет полигистидиновых тэгов, тромбинового сайта и нескольких дополнительных АК на N-конце), спектры поликлональных АТ для наших АГ будут практически одинаковы. Для повышения видоспецифичности антисыворотки должны пройти существенное истощение: избавиться от большей части идентичных антител (рис. 4).

После истощения на сорбенте с $m\beta 2\text{mg}$ оставшиеся АТ «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » сорбировали на аффинной колонке сефароза- $h\beta 2\text{mg}$, что позволяло сконцентрировать раствор антител.

Эффективность процедуры истощения зависит от целого ряда факторов: емкость «аффинной» колонки и первоначальный объем взятой для истощения антисыворотки в нашем случае стали причиной трехкратного цикла «посадка – элюция – промывка».

В результате истощения 160 мл сульфатного осадка антисыворотки «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » через стадии «истощение» было получено около 110 мл разбавленного р-ра антител, после аффинной хроматографии на сефарозе- $h\beta 2\text{mg}$ сняли 6 мл элюата. В результате диализа и концентрирования было получено 1,4 мл р-ра АТ «кролик-анти- $h\beta 2\text{mg}$ » с концентрацией 2,8 мг/мл.

Для зрелого $h\beta 2\text{mg}$ (99 АК) с использованием девяти анти- $\beta 2\text{mg}$ моноклональных антител были обнаружены две основные антигенные детерминанты: по остаткам 57-63 SKDWSFY и 87-97 LSQPKIVKWDR.

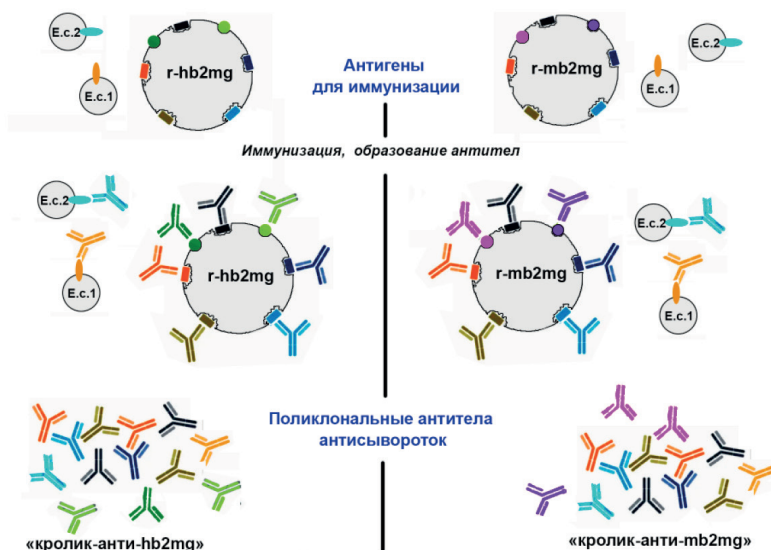


Рис. 3. Схема антигенных детерминант антигенов и их примесей, спектров поликлональных антител антисывороток «кролик-анти-hb2mg» и «кролик-анти-mb2mg». E.c.1,2 — условное обозначение белков штамма-продуцента, r-hb2mg и r-mb2mg — РБ, основные белки-антигены. На белках обозначены условные эпитопы, как общие (прямоугольные), так и специфические (кружки). Эпитопы и АТ к ним имеют общую окраску.

Fig. 3. Scheme of antigenic determinants of antigens and their impurities, spectra of polyclonal antibodies of antisera "rabbit-anti-hb2mg" and "rabbit-anti-mb2mg". E.c.1,2 is the symbol of proteins of the producer strain, r-hb2mg and r-mb2mg — RP, the main proteins are antigens. Conditional epitopes are indicated on the proteins, both general (rectangular) and specific (circles). Epitopes and their AB have a common color.

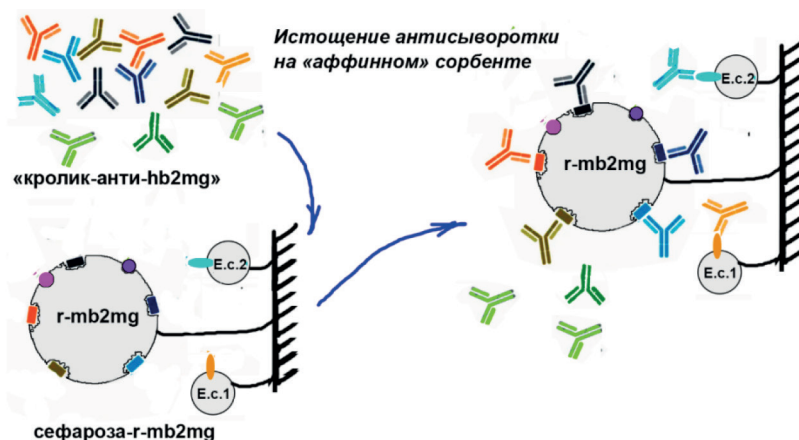


Рис. 4. Схема истощения против антигенных детерминант mb2mg и белков E. coli: антисыворотка «кролик-анти-hb2mg» подвергается очистке аффинной хроматографией на сорбенте сефароза-mb2mg, на которой, кроме РБ mb2mg, иммобилизованы и контаминирующие бактериальные белки. Антитела к видоспецифичным эпитопам hb2mg не связываются, остаются в проскоке.

Fig. 4. Depletion scheme against antigenic determinants of mb2mg and E. coli proteins: rabbit-anti-hb2mg antiserum is purified by affinity chromatography on sepharose-mb2mg sorbent, on which, in addition to RP mb2mg, contaminating bacterial proteins are immobilized. Antibodies to species-specific epitopes of hb2mg, do not bind, remain in the gap.

Эти последовательности в hβ2mg являются основными реактивными антигенными сайтами для моноклональных, а также поликлональных антител [10]. Однако при сравнении АК последовательностей зрелого белка hβ2mg и mβ2mg оказалось, что первый иммуногенный эпитоп не является видоспецифичным, у второго эпитопа 5 несовпадений из 11-ти АК, в целом идентичность зрелых белков оказалась 70% по сравнению с 68% предшественника β2mg (рис. 5). Это обстоятельство усложнило задачу: истощение антисывороток оказалось достаточно трудоемким процессом с относительно невысоким выходом высокоспецифичного продукта.

Проверка истощенных против сепароза-mβ2mg кроличьих антител к hβ2mg. В качестве первых АТ использовали сульфатные осадки «кролик-анти-hβ2mg», «кролик-анти-mβ2mg» и истощенные сыворотки «кролик-анти-hβ2mg», разведенные 1:1000, в качестве вторых антител — «коза-анти-кролик-ПХ» в разведении 1:5000 (рис. 6).

Окраска оставшихся в ПААГ после электропереноса белков массой выше 30 кДа свидетельствует об эффективном переносе из 15% геля белков с массой менее 25 кДа, но не высокомолекулярных белков. Специфичность истощенных АТ «кролик-анти-hβ2mg» (рис. 6А) выше, чем у сульфатной антисыворотки (рис. 6В), при этом

предпочтительно полученные истощенные АТ использовать в разведении более чем 1:1000. Антитела сульфатной сыворотки «кролик-анти-mβ2mg», с РБ mβ2mg реагировали заметно лучше (рис. 6С), что соответствует результатам ИФА (рис. 2).

При проверке белковой фракции лейкоцитов, выделенной из крови человека и мыши истощенные АТ «кролик-анти-hβ2mg» применяли в разведении 1:5000, 1:10000, в качестве хромогена использовали ХН, ДАБ и смесь ХН+ДАБ (рис. 7).

В выбранных условиях и разведениях наши истощенные АТ показали высокую видовую специфичность: при равном нанесении белковой фракции лейкоцитов мыши и человека для ПААГ ЭФ (дорожки остаточных белков) перекрестной реакции с β2mg мыши при выбранных разведениях не обнаружено.

Дот-блоттинг, проверка чувствительности. Подготовленные для электрофореза образцы г-hβ2mg и г-mβ2mg в количестве 1,5 мкл в виде пятен наносили на НЦ мембрану с 5-кратными разведениями 1хБО. Истощенные АТ «кролик-анти-hβ2mg» использовали в разведении 1:1000, вторые конъюгированные АТ — в разведении 1:5000. Проявляли разными хромогенами (рис. 8).

Использование ДАБ в качестве хромогена позволило повысить чувствительность детек-

Alignment statistics for match #1

NW Score	Identities	Positives	Gaps	
397	69/99 (70%)	83/99 (83%)	0/99 (0%)	
Query 1	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDW			60
Sbjct 1	..K..Q.....P....P.I....TQ...PH..IQM....KK.P...M..M.....			60
Query 61	SFYLLYYTEFTPTERDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDMD			99
Sbjct 61	...I.AH.....T.T.....K.ASMAB...T.Y.....			99

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей зрелого белка (99 АК) β2-микроглобулина мыши (sbjct) и человека (query). Идентичность — 70%, точки соответствуют совпадениям, красные буквы — отличия. Выделены и подчеркнуты антигенные детерминанты hβ2mg, описанные в работе Уильямса и коллег [10]. Сравнение последовательностей выполнены в онлайн приложении BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of mature protein (99 amino acids) of mouse β2-microglobulin (sbjct) and human (query). Identity – 70%, the dots correspond to the matches, the red letters are the differences. The antigenic determinants of hβ2mg described in the work of Williams, et al. [10] are highlighted and emphasized. Sequence comparisons are performed in the BLAST online application. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

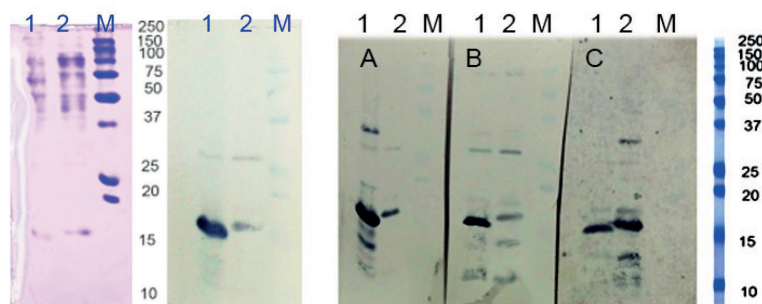


Рис. 6. ПААГ и НЦ: слева — электрофорез и вестерн-блоттинг РБ $h\beta 2mg$ (1) и $m\beta 2mg$ (2), первые антитела — истощенная сыворотка «кролик-анти- $h\beta 2mg$ ». ПААГ окрашен кумасси после электротрансфера. Справа: А) первые антитела — истощенная сыворотка «кролик-анти- $h\beta 2mg$ » в разведении 1:1000, В) первые АТ — СО «кролик-анти- $h\beta 2mg$ », С) первые АТ — СО «кролик-анти- $m\beta 2mg$ ». НЦ — окраска хлорнафтолом.

Fig. 6. PAAG and NC: on the left — electrophoresis and Western blotting RB $h\beta 2mg$ (1) and $m\beta 2mg$ (2), the first antibodies — depleted serum “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ”. PAAG is painted with coomassie after the electrotransfer. On the right: A) the first antibodies — depleted serum “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ” in a dilution of 1:1000, C) the first AB-SP — “rabbit-anti- $h\beta 2mg$ ”, C) the first AB-SP — “rabbit-anti- $m\beta 2mg$ ”. NC — chlorophthol staining.

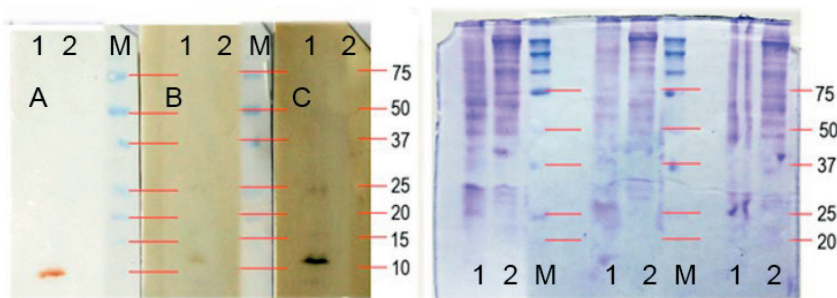


Рис. 7. НЦ и ПААГ: слева — вестерн-блоттинг белков лейкоцитов, разделенных ПААГ ЭФ. 1 — из лейкоцитов человека, 2 — из лейкоцитов мыши. А, С — разведение первых АТ 1:5000, В — 1:10000. А — окраска ДАБ; В, С — ДАБ+ХН. Справа — ПААГ, окрашенный после электропереноса.

Fig. 7. NC and PAAG: on the left — Western blotting of leukocyte proteins separated by PAAG electrophoresis. 1 — from human leukocytes, 2 — from mouse leukocytes. A, C — dilution of the first AB 1:5000, B — 1:10000. A — coloring DAB; B, C — DAB+CN. On the right — a PAAG painted after electric transfer.

ции в 25 раз. Незначительная неспецифическая реакция истощенных АТ (анти- $h\beta 2mg$) против $r-m\beta 2mg$ при выбранных разведениях образцов и первых антител сохранилась.

Заключение

На основании представленных результатов можно сделать заключение, что выполненная нами работа позволила получить кроличьи антитела, высокоспецифичные к $\beta 2mg$ человека; подобрать условия, при которых определяется только $h\beta 2mg$. Истощенные антитела «кролик-анти- $h\beta 2mg$ » работа-

ют при хорошем разведении (1:3000–6000). Антивидовые конъюгаты «коза-анти-кролик-ПХ», полученные нами, видоспецифично взаимодействуют с кроличьими антителами и работают в разведении 1:5000. Кроме того, нами были получены аффинные сорбенты с иммобилизованными рекомбинантными белками $\beta 2mg$ мыши и человека, т.е. практически создан необходимый инструментарий для иммунных методов детекции $\beta 2$ -микроглобулина мыши и человека в разнообразных прикладных исследованиях. Поликлональные

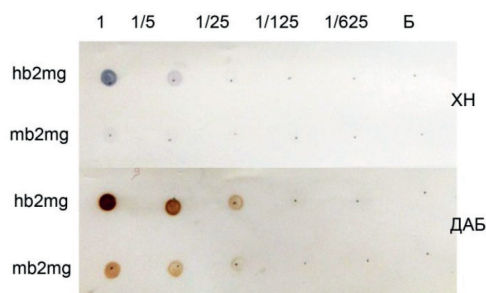


Рис. 8. Дот-блоттинг. Вверху — окраска хлор-нафтолом (ХН). Внизу — окраска диаминобензидином (ДАБ). Б — отрицательный контроль 1хБФ.

Fig. 8. Dot-blotting. At the top – a chloro-naphthol (ХН) stain. Below – a diaminobenzidine stain (ДАБ). Б — negative control of 1x sample buffer.

кросс-реактивные к $\beta 2\text{mg}$ мыши и человека кроличьи антитела могут быть использованы в задачах, связанных с вестерн-блот-

тингом $\beta 2\text{mg}$ различных молекулярных масс: нативным зрелым белком (12 кДа), рекомбинантным белком (16 кДа), $\beta 2\text{mg}$ человека в составе химерной HLA-молекулы (56 кДа) трансгенных мышей.

На примере метода получения истощенных антител «кролик-анти- $\text{h}\beta 2\text{mg}$ » осуществляется истощение антител «кролик-анти- $\text{m}\beta 2\text{mg}$ », тем самым расширяется палитра высокоспецифичных реактивов в первую очередь для наших собственных исследований. Не исключено, что при создании новых линий трансгенных животных при необходимости верификации синтеза новых белков или подтверждении отсутствия синтеза белков нокаутированными генами нам придется создавать собственные наборы доказательной реактивной базы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
- Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. [Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Sozdanie polnih gibritnih DNK-konstruktsij s genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(1):10–23. (In Russian)].
- Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-C*07:02:01:01, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомodelей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. [Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumanizirovannykh transgennykh myshey, nesushchih gen HLA-C*07:02:01:01, kak proobraz innovatsionnykh transgenno-nokautnykh biomodelей [Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with HLA-C*07:02:01:01, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. doi: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
- Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3Е):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizatsii sodержaniya i vyvedeniya transgennykh linij myshey v NCBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(3Е):70–75. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3Е-70-75.
- Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie

- aspekty sozdaniya novoj gumanizirovannoj transgennoj linii myshej s integrirovannym genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01 [Embryological aspects of creation a new humanized transgenic mice with integrated human HLA-A*02:01:01:01 gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-4-10-23.
6. Faber E., Tshilwane S.I., Van Kleef M., Pretorius A. The impact of Escherichia coli contamination products present in recombinant African horse sickness virus serotype 4 proteins on the innate and humoral immune responses, *Molecular Immunology*. 2022;152:1–13. DOI: 10.1016/j.molimm.2022.09.013.
7. Loralyn A.B., Rusung T. Xenogeneic β 2-Microglobulin Substitution Affects Functional Binding of MHC Class I Molecules by CD8⁺ T Cells. *J. Immunol.* 2007;179(6):3588–3595. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3588.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974;22(12):1084–1091. DOI: 10.1177/22.12.1084.
9. Vaitukaitis J.L. Production of antisera with small doses of immunogen: Multiple intradermal injections. *Methods in Enzymology*. 198;73:46–52.
10. Williams R.C. Jr., Malone C.C. Antigenic epitopes on beta 2-microglobulin reacting with monoclonal antibodies. *J. Lab. Clin. Med.* 1993;121(6):805–820.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., акад. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Жукова Ольга Борисовна, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Olga B. Zhukova, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: olgazhukova19801031@gmail.com

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Acad. L.K. Ernst;

e-mail: heleko3@yandex.ru

Nataliya V. Petrova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: m-sklad@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author