

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ХОЛЕРНОМУ ТОКСИНУ И ТЕРМОЛАБИЛЬНОМУ ЭНТЕРОТОКСИНУ *E. coli* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ТОКСИНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Е. В. ГРИШИН, Т. И. ВАЛЯКИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

E-mail: grev@mx.ibch.ru

Получено 18.04.2013

Получены моноклональные антитела к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*, перекрестно не взаимодействующие с родственным токсином. Подобраны пары антител для количественного определения этих токсинов в «сэндвич»-варианте иммуноэнзимного анализа и биплексном иммунофлуоресцентном анализе с применением технологии xMAP (Luminex). Минимальные детектируемые концентрации холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli*, определенные в формате «сэндвич»-иммуноэнзимного анализа, — 0,2 и 0,4 нг/мл, значительно выше соответствующих величин в формате биплексного анализа — 0,01 нг/мл и 0,08 нг/мл. Присутствие в пробах молока, бульона и воды из открытого водоема, а также носоглоточных смывов не оказывает влияния на минимально детектируемые величины концентраций холерного токсина, определенные обоими методами. В аналогичных пробах, содержащих термолабильный энтеротоксин, они возростали по сравнению с соответствующими для контрольного буфера.

Ключевые слова: иммуноэнзимный анализ, «сэндвич»-анализ, мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ, xMAP-анализ, моноклональные антитела, минимальная детектируемая концентрация, холерный токсин, термолабильный энтеротоксин *E. coli*.

Интенсивное развитие международной экономической деятельности, открытие границ, усиливающаяся миграция населения, расширение сообщения и торговли привели к быстрому распространению инфекционных болезней. В современных условиях в любое время может начаться эпидемия, возбудителями которой могут быть новые или уже хорошо известные, занесенные из эндемических очагов, микроорганизмы. К основным современным источникам биологической опасности, представляющим наибольшую угрозу для населения, относят патогенные микроорганизмы, микроскопические грибы и продукты их жизнедеятельности. Токсические продукты микроорганизмов обладают высокой активностью

и чрезвычайно токсичны для человека. В России имеется большой организационный опыт в области противодействия инфекционным заболеваниям, однако дальнейшее совершенствование методов диагностики и профилактики опасных инфекций на сегодняшний день остается важнейшей проблемой.

Бактериальные токсины — это секретируемые микробные протеины, обычно ферменты, которые повреждают и убивают клетки хозяина в исключительно низких концентрациях. Исходя из механизма действия токсины группируют следующим образом: порообразующие токсины (альфа-токсин *St. aureus*, гемолизин *E. coli*), ингибиторы синтеза протеина (дифтерийный токсин,

шига-токсин), генераторы образования вторичных мессенджеров (холерный токсин и термолабильный энтеротоксин *E. coli*), протеолитические токсины (ботулинические, столбнячный), активаторы иммунного ответа (стафилококковые энтеротоксины), трехсоставные токсины (сибиреязвенный токсин) [1].

Холерный токсин (СТ), продуцируемый *Vibrio cholerae* и отвечающий за развитие симптомов такого смертельно опасного заболевания, как холера, и термолабильный энтеротоксин, продуцируемый энтеротоксигенными штаммами *E. coli* (LT), обуславливающий развитие симптомов менее опасного, чем холера, но более распространенного заболевания под названием «диарея путешественников», являются родственными токсинами. Они имеют большое сходство по структуре, функциональному действию, иммунохимическим характеристикам. В частности, сходство аминокислотной последовательности молекул токсинов составляет более 80% [2]. Поэтому большинство методов детекции не позволяют дифференцированно определять СТ и LT в исследуемых образцах. Поскольку холера по сравнению с диареей путешественников при отсутствии лечения в 50% случаев заканчивается летальным исходом, большое значение в диагностике этих заболеваний имеет дифференцированное определение токсинов.

Холерный токсин, продуцируемый *V. cholerae*, относится к группе токсинов, генерирующих образование вторичных мессенджеров, способных в значительной степени усиливать и искажать клеточную реакцию на различные сигналы. Холерный токсин обладает АДФ-рибозилтрансферазной активностью по отношению к ГТФ-азе клеток млекопитающих. После АДФ-рибозилирования ГТФ-аза вызывает пролонгированную активацию аденилатциклазы и резкое увеличение цАМФ в энтероцитах. Увеличение концентрации цАМФ приводит к выведению ионов хлора, бикарбоната и воды из клеток, обуславливая тем самым потерю электролитов и сильное обезвоживание [3].

Указанные токсины традиционно детектируют биологическим методом, наблюдая их патогенное действие на одноклеточных организмах, культурах клеток, куриных эмбрионах, а также на лабораторных животных. Эти методы трудоемки, длительны (около 2–6 сут) и характеризуются высокой себестоимостью. Для тестирования одной пробы используют несколько животных,

тесты проводят только в лабораториях, имеющих специальный сертификат [4, 5]. Для детекции и количественного определения токсинов используют также инструментальные методы, основанные на применении оборудования с высокой чувствительностью детекции: масс-спектрометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, капиллярный электрофорез и т. д. По чувствительности эти методы сравнимы с биологическими, но их использование ограничено кругом специально оборудованных лабораторий, имеющих в своем распоряжении дорогостоящую аппаратуру и высококвалифицированные кадры, что делает использование этих методов недоступным широкому кругу специалистов [6].

В настоящее время наиболее широко распространение в практике диагностирования бактериальных токсинов получили методы иммуноанализа. Ключевым компонентом в иммуноаналитических системах являются антитела. Для иммунохимического анализа токсинов используют три основных типа антител: моноспецифические поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела или фрагменты антител [7].

Цель настоящего исследования — получение методом гибридной техники моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*, не обладающим перекрестной активностью; определение их иммунохимических характеристик и создание биплексной тест-системы на основе мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа с применением микросфер (МИА) для одновременной количественной детекции холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* в одной анализируемой пробе.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), фетальная телячья сыворотка (FCS), глутамин, раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (НАТ) — (GIBCO-Invitrogen, США); неполный адъювант Фрейнда, пристан, BSA, DMSO, 4-хлор-1-нафтол, 3,3-диаминобензидин, OPD (ортофенилендиамин), *N*-оксисукцинимидный эфир биотина, Твин-20, метилизотиазолона гидрохлорид (MIT) и холерный токсин (*Vibrio cholerae*) — Sigma (США), SDS — Serva (Германия), полиакриламид — Amresco (США); нитроцеллюлозная мембрана BA 85 — Schleicher & Schuell (Германия); протеин-А — сефароза —

GE-Healthcare (США), поликлональные козы антитела, меченные пероксидазой хрена, к мышиным иммуноглобулинам, меченный пероксидазой хрена стрептавидин и набор для изотипирования иммуноглобулинов (mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit) — BD Biosciences Pharmingen (США); культуральный пластик и планшеты для ИЭА — Costar (США); карбоксилированные xMAP микросферы — Luminox Corporation (США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорид (EDC), *N*-гидроксисульфосукцинимид (*sulfo*-NHS) — Pierce (США); стрептавидин, меченный фикоэритрином (SA-PE) — One Lambda (США), поликлональные антитела, меченные фикоэритрином, к мышиным иммуноглобулинам — Dako (Швеция), снятое сухое молоко — Fluka (Германия). Стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB), термолабильный энтеротоксин *E. coli* (LT) были предоставлены д. б. н. Ю. В. Вертеевым (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН, Москва).

Получение гибридом

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*, получали согласно общепринятому методу гибридомной технологии, предложенному Келлером и Мильштейном [8]. Для иммунизации использовали мышей (самки весом 18 г) линии BALB/c категории SPF и конвенциональной категории. Животных иммунизировали в подушечки задних лапок препаратом токсина в присутствии неполного адьюванта Фрейнда.

Мышей категории SPF иммунизировали СТ или LT в дозе 10 мкг/мышь дважды с интервалом 2 недели. Мышей конвенциональной категории иммунизировали СТ или LT трижды с интервалом 2 нед дозами токсина от 2,5, 5 и 20 мкг/мышь. На 4-й день после 2-й иммунизации в сыворотке крови мышей обеих категорий определяли методом непрямого твердофазного ИЭА титр специфических антител к СТ и LT.

Через 6 сут после последней иммунизации у мышей забирали подколенные лимфоузлы, из которых выделяли лимфоциты для гибридизации с клетками миеломы SP2/0. Гибридизацию проводили при соотношении клеток 5:1 в 45%-м растворе ПЭГ-4000с, 10% DMSO в среде DMEM в течение 1 мин при совместной инкубации. После гибридизации клетки разносили по 96-луночным

планшетам, в которые за 24 ч до этого помещали мышинные макрофаги. Культивировали клетки в селективной среде следующего состава: DMEM с 20% FCS, 4 mM *L*-глутамином, 5 mM меркаптоэтанолом, 0,1 mM гипоксантином, $1,6 \cdot 10^{-5}$ М тимидином, $4 \cdot 10^{-7}$ М аминоксантином.

После завершения этапа селекции гибридных клеток от родительской миеломы их культивировали в среде, не содержащей аминоксантин. Через 7–10 сут после гибридизации из лунок с активно растущими клетками отбирали культуральную среду и тестировали ее непрямым твердофазным ИЭА на наличие антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*. Из лунок, в культуральной среде которых регистрировали достоверно положительную реакцию с токсинами, отбирали клетки и клонировали их трижды методом предельных разведений в НТ-среде роста. После двух последних клонирований число положительных клонов обычно составляло 100%.

Продукция антител в асцитной жидкости мышей

Мышам линии Balb/C (самки) вводили внутрибрюшинно 0,5 мл пристана. Через 10 дней животным вводили суспензию клеток гибридом в количестве $(0,5-1) \cdot 10^7$ клеток. После формирования асцита мышей декапитировали, забирали асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела, и центрифугировали на 300 г в течение 10 мин при комнатной температуре. Клеточный осадок подвергали процедуре замораживания при -70 °С, а из супернатанта выделяли моноклональные антитела.

Очистка моноклональных антител из асцитной жидкости аффинной хроматографией на протеин А-сефарозе

На колонку, содержащую протеин А-сефарозу, объемом 3 мл, уравновешенную 5 объемами стартового буфера (1,5 М глицин, 0,15 М NaCl, pH 8,9), наносили образец — асцитную жидкость (3 мл), разведенную тремя объемами стартового буфера. Колонку промывали стартовым буфером, собирая в отдельную пробирку не связавшиеся с сорбентом протеины. Затем элюировали протеины буфером для элюции (0,1 М цитрат Na) с уменьшением градиента pH от 6,0 до 4,0. Наличие протеинов в элюатах регистрировали на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм. Регенерацию колонки проводили в 0,1 М цитратном буфере, pH 3,0.

Все образцы, элюированные с колонки отдельными фракциями, диализовали против PBS с добавлением 0,02% азид натрия при 4 °С в течение ночи. Препарат антител, полученных после хроматографии на протеин А-сефарозе, концентрировали методом ультрафильтрации с использованием ячеек для ультрафильтрации (Amicon, США) и мембран, отсекающих протеины с молекулярной массой более 10 кДа, до достижения концентрации антител в растворе 1–1,5 мг/мл. Концентрацию выделенного протеина определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Чистоту полученных препаратов антител оценивали электрофоретически. Электрофорез проводили в восстанавливающих условиях в 12,5% ПААГ по методу Лэммли [9]. К анализируемому препарату антител добавляли равный объем 2-кратного разделяющего буфера, pH 6,8, содержащего 0,125 M Tris-HCl, 4% SDS и 20% -й глицерол, 10% -й 2-меркаптоэтанол. Образцы нагревали на водяной бане в течение 3 мин. В каждый образец добавляли по 1 мкл 0,2%-го раствора бромфенолового синего и вносили в лунки полиакриламидной пластинки, состоящей из концентрирующего 4%-го геля и разделяющего 12,5%-го геля. В качестве маркеров использовали смесь очищенных стандартных протеинов: фосфорилаза В (97 кДа), альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и α -лактальбумин (14,4 кДа). Электрофорез проводили при силе тока 10 мА до полного введения бромфенолового синего в гель, а затем при 20 мА. После окончания процесса (1,5–2 ч) гель окрашивали в течение 30 мин в 0,125%-м растворе Кумасси R-250 с последующим отмыванием геля в обезбечивающем растворе до полного исчезновения фоновой окраски.

Тестирование специфической активности антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину E. coli методом непрямого твердофазного ИЭА

Для тестирования использовали коммерческий препарат СТ с исходной концентрацией 2 мг/мл, препарат ЛТ с исходной концентрацией 0,32 мг/мл. Аликвоту исходных препаратов разводили в 0,1 M бикарбонатном буфере, pH 9,0, до концентрации 1 мкг/мл. Приготовленные растворы по 100 мкл вносили в лунки ИЭА-планшетов

с высокой степенью связывания. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °С. После инкубации свободные центры связывания на пластике планшетов блокировали 1%-м раствором BSA при 37 °С в течение 1 ч. Лунки планшетов промывали 3 раза PBS с 0,05%-м Твин-20 (PBST) и 3 раза — PBS. После промывания вносили 100 мкл культуральной среды или препаратов очищенных антител и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. По окончании времени инкубации поверхность лунок планшета отмывали (как описано выше), вносили пероксидазный конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, инкубировали 40 мин при комнатной температуре, отмывали и добавляли субстрат пероксидазы — OPD в концентрации 1 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 4,5, содержащем 0,015% пероксида водорода. После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10%-й серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

Определение константы аффинности антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину E. coli

Константу аффинности моноклональных антител при связывании с холерным токсином или с термолабильным энтеротоксином *E. coli* определяли по методу Битти непрямым твердофазным ИЭА [10].

Токсины сорбировали на поверхности лунок ИЭА-планшета с высокой степенью связывания из растворов, взятых в двух концентрациях 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл, в объеме 100 мкл на лунку. Далее проводили непрямым твердофазным ИЭА, как описано выше. Препараты анализируемых антител титровали от 40 мкг/мл до 40 пг/мл с шагом 2. Строили графики зависимости оптического поглощения при длине волны 492 нм от концентрации МА. Константу аффинности определяли по формуле:

$$K_{\text{афф}} = 1/(4[AT'] - 2[AT]) \pm 3 \cdot SD,$$

где [AT'] — концентрация антител, соответствующая 50%-му связыванию при внесении в лунку планшета токсина в концентрации 0,5 мкг/мл; [AT] — концентрация антител, соответствующая их 50%-му связыванию при внесении в лунку токсина в концентрации 1 мкг/мл; SD — среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения A_n , $n = 3$.

Получение конъюгатов биотина с моноклональными антителами к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*

К препарату очищенных антител (1 мг/мл) в 0,1 М бикарбонатном буфере, рН 9,0, добавляли раствор оксисукцинимидного эфира биотина в ДМСО (1 мг/мл) из расчета 120 мкл реагента на 1 мг протеина. Смесь инкубировали в темноте 3 ч при комнатной температуре, добавляли 1 М раствор триглицинового буфера, рН 8,2, в объеме 50 мкл на 1 мл антител и диализовали против PBS. Полученный препарат биотинилированных антител хранили при 4 °С в PBS с 0,02% аэридом Na.

«Сэндвич»-вариант ИЭА в формате планшета

В лунки ИЭА-планшета с высокой степенью связывания вносили 100 мкл раствора связывающих антител к СТ или LT в PBS с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 4 °С. Свободные центры связывания на поверхности лунок планшета блокировали 1%-м раствором сухого молока инкубацией в течение 1 ч при 37 °С. Далее в лунки планшета вносили токсин (СТ или LT) в концентрации 1 мкг/мл и делали двоичные и троичные разведения токсина в PBST (от 1 мкг до 0,1 нг/мл), инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем планшет отмывали 3 раза раствором PBST и 3 раза раствором PBS. В пробу добавляли по 100 мкл проявляющих меченных биотином МА к соответствующему токсину (10 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки добавляли раствор стрептавидина, меченого пероксидазой хрена, разведенного 1:1 000 в PBST, и инкубировали 40 мин при 37 °С. В качестве субстрата пероксидазы использовали раствор OPD (1 мг/мл). После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10%-й серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

Минимальную детектируемую концентрацию токсина определяли по:

$$\bar{A}_0 + 3 \cdot SD,$$

где \bar{A}_0 — среднее значение величин оптической плотности в лунках, не содержащих токсин; SD — среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения A_0 .

SD вычисляли по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_0 - \bar{A}_0)^2}{n-1}},$$

где A_0 — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, не содержащих токсин; n — число измерений. В большинстве экспериментов $n = 3$.

Получение конъюгатов моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* с микросферами

Конъюгирование связывающих антител с микросферами проводили согласно предложенному компанией Lumindex протоколу для конъюгации таких реагентов с помощью sulfo-NHS/EDC.

Для конъюгации со связывающими антителами к СТ применяли микросферы с номером ID 29, а для конъюгации со связывающими антителами к LT — микросферы с номером ID 36. Количество конъюгированных микросфер подсчитывали микроскопически с использованием камеры Горяева.

Анализ эффективности конъюгации микросфер со связывающими антителами к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*

Эффективность конъюгации микросфер со связывающими антителами оценивали по величине интенсивности медианного флуоресцентного сигнала, регистрируемого в спектральной области соответствующего ID используемых микросфер.

Препарат микросфер, конъюгированных с различными количествами (1, 5 и 25 мкг) антител, суспендировали и обрабатывали ультразвуком в течение 20 с. Полученную (стоковую) суспензию микросфер разводили до концентрации $6 \cdot 10^5$ микросфер в 1 мл и вносили в лунки планшета с фильтрующим дном MABVIN1250 plate (Millipore, США). Антимышьи антитела, меченные фикоэритрином, разводили PBS-BSA до концентрации 6 мкг/мл. Из препарата готовили троичные разведения, каждый разведенный препарат вносили в лунки, содержащие микросферы, конъюгированные с антителами. После инкубации супернатант из всех лунок одновременно удаляли при помощи вакуумного насоса со специальной насадкой для планшетов с фильтрующим дном (Millipore, США). После промывок микросферы суспендировали PBS для анализа на проточном анализаторе Lumindex 200.

Подбор оптимальных концентраций биотинилированных (детектирующих) антител для количественного определения холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* методом xMAP-анализа

Препарат микросфер, конъюгированных с различными количествами (1, 5 и 25 мкг) связывающих антител к СТ или LT, суспендировали и обрабатывали ультразвуком как описано выше. В полученной суспензии концентрацию микросфер доводили до $1,8 \cdot 10^5$ в 1 мл и помещали по 30 мкл в лунки планшета с фильтрующим дном. Далее в лунки добавляли 30 мкл токсина в концентрациях 30, 300 и 3 000 пг/мл. В эти же лунки вносили по 30 мкл соответствующих биотинилированных антител в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании в темноте при комнатной температуре. После инкубации лунки планшета промывали трижды PBS-BSA. В лунки планшета вносили по 100 мкл коммерческого препарата стрептавидина, меченного фикоэритрином. Планшет инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании в темноте при комнатной температуре. По окончании времени инкубации лунки планшета промывали трижды PBS-BSA и однократно PBS. После промывок микросферы суспендировали в 100 мкл PBS и анализировали на проточном лазерном анализаторе Lumineх 200.

Определение минимальной детектируемой концентрации холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* в мультимплексном «сэндвич»-xMAP-анализе

Препараты микросфер, конъюгированные со связывающими антителами к СТ и LT суспендировали и обрабатывали ультразвуком. Суспензии микросфер, конъюгированные со связывающими антителами к СТ и LT, смешивали таким образом, чтобы в общем объеме концентрация микросфер каждого типа составляла $6 \cdot 10^5$ микросфер/мл. Полученную суспензию обоих типов микросфер помещали по 50 мкл в лунки планшета с фильтрующим дном. Холерный токсин и термолабильный энтеротоксин *E. coli* смешивали таким образом, чтобы в общем объеме PBS-BSA их концентрация составляла 320 и 800 пг/мл соответственно. Делали двоичные разведения в круглодонном планшете и вносили соответствующие разведения токсинов по 50 мкл в лунки, содержащие микросферы. План-

шет инкубировали при постоянном перемешивании в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее лунки планшета промывали трижды PBS-BSA. В лунки вносили по 100 мкл раствора, содержащего биотинилированные антитела к LT и СТ, разведенные в PBS-BSA в оптимальных концентрациях (2 мкг/мл для обоих токсинов). Планшет инкубировали при постоянном перемешивании в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. По окончании времени инкубации лунки планшета промывали трижды и добавляли по 100 мкл коммерческого препарата стрептавидина, меченного фикоэритрином. Последующие стадии инкубации, отмывки и анализа на проточном лазерном анализаторе проводили так же, как при подборе оптимальных концентраций биотинилированных (детектирующих) антител для количественного определения холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* методом xMAP-анализа.

Минимальную детектирующую концентрацию определяли как самую низкую, с флуоресцентным сигналом, превышающим более чем на три стандартных отклонения среднее значение фонового флуоресцентного сигнала. Стандартное отклонение среднего значения фонового сигнала вычисляли по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_0 - \bar{A}_0)^2}{n-1}},$$

где \bar{A}_0 — среднее арифметическое значение медианного флуоресцентного сигнала в лунках, не содержащих токсин; n — число измерений; $n = 3$.

Подготовка образцов для определения в них токсинов методом «сэндвич»-ИЭА в формате планшета и xMAP-анализа

Для определения СТ и LT в биологических образцах препараты токсинов разводили BSA-PBS до концентрации 1 мкг/мл. Полученные растворы разводили образцами молока, мясного бульона, воды, носоглоточных смывов, не содержащими токсинов, до концентрации 1 нг/мл для СТ и 10 нг/мл для LT. Образцы с токсинами подвергали центрифугированию при 5 000 g в течение 5 мин. Для анализа отбирали интерфазу, переносили в лунки круглодонного планшета и делали двоичные и троичные разведения (СТ — от 1 до 0,01 нг/мл, LT — 10 до 0,1 нг/мл). Для xMAP-анализа подготовленные образцы, содержащие токсины, переносили по

50 мкл в лунки, содержащие конъюгаты связывающих антител с микросферами. Далее определяли токсины согласно выше-приведенному методу.

Для определения СТ или LT в воде, молоке и мясном бульоне методом «сэндвич»-ИЭА в формате планшета 100 мкл токсина в различных концентрациях (от 1 мкг до 0,1 нг/мл) вносили в лунки планшета и инкубировали в буфере, содержащем 10% воды из открытого водоема, коммерческого молока или мясного бульона. Далее проводили определение согласно методу «сэндвич»-варианта ИЭА в формате планшета, описанному выше.

Для получения образца смыва со слизистой носоглотки человека использовали тампон из синтетического негигроскопического материала. С помощью тампона собирали со слизистой носоглотки биоматериал. Тампон тщательно отмывали в 1 мл рабочего раствора PBST для «сэндвич»-ИЭА или в 1 мл BSA-PBS для МИА, центрифугировали при комнатной температуре при 5 000g в течение 5 мин и анализировали на содержание токсинов.

Результаты и обсуждение

Успех в получении гибридом — продуцентов моноклональных антител — определяется прежде всего эффективной схемой иммунизации животных (обычно мышей) — доноров иммунных лимфоцитов, являющихся партнерами при слиянии с клетками миеломы. Были выбраны короткие схемы иммунизации, инициирующие развитие локального иммунного ответа. Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*, использовали клетки миеломы SP2/0 — плазмоцитомной клеточной линии, не секретирующей иммуноглобулины, и лимфоциты, выделенные из подколенных лимфоузлов мышей линии BALB/c конвенциональной категории с естественной микрофлорой и категории SPF (specific pathogen free), свободных от патогенной микрофлоры [11]. Мышей иммунизировали токсином СТ (Sigma) и LT, выделенным из клеток *E. coli* штамм YM107, трансформированных плазмидой pLT, содержащий ген с полной последовательностью LT. Токсины вводили в подушечки задних лапок в присутствии неполного адъюванта Фрейнда (НАФ). Основанием для такого выбора адъюванта послужила имеющаяся в литературе инфор-

мация о том, что холерный токсин, а также термолабильный энтеротоксин *E. coli* обладают ярко выраженными свойствами адъюванта [12, 13]. Агентом, способствующим соматической гибридизации клеток, выбран полиэтиленгликоль 4 000.

Такие схемы иммунизации не обеспечивали очень высоких титров специфических антител в сыворотке крови, однако формирование лимфоцитов — предшественников плазматических клеток в лимфоузлах происходило в достаточной степени для получения гибридом, стабильно продуцирующих антитела в высоких титрах в культуральной жидкости, где титр составлял не менее 1:20 000. Отбор жизнеспособных гибридом проводили по стандартной схеме в культуральной среде, содержащей НАТ [8]

Скрининг клонов-продуцентов осуществляли методом непрямого ИЭА. Для СТ и LT уже на первом этапе отбора целевых клонов был осуществлен перекрестный скрининг с целью исключения из дальнейшей работы клонов гибридом, способных продуцировать антитела к общим антигенным детерминантам этих токсинов. После проведения первого скрининга клоны гибридом, продуцирующие специфические антитела к СТ или LT, подвергали клонированию методом последовательных разведений и повторному скринингу. Число клонов, продуцирующих антитела, которые детектировали оба токсина, было значительным и составляло более 30% от общего количества. В результате гибридизации лимфоцитов мышей конвенциональной категории, иммунизированных LT, было получено 7 гибридных клонов, а мышей категории SPF — 8 клонов, стабильно продуцирующих специфические МА, не связывающиеся с СТ. После гибридизации лимфоцитов мышей конвенциональной категории, иммунизированных СТ, получили 14 клонов, не детектирующих LT, а вследствие гибридизации лимфоцитов мышей категории SPF — 20 клонов [11].

Характеристика МА к СТ и LT включала изотипирование и определение типа тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Изотипирование проводили в соответствии с рекомендацией к коммерческому набору для изотипирования мышинных иммуноглобулинов. Результаты представлены в табл. 1 и 2. Здесь же приведены величины констант аффинности антител $K_{\text{афф}}$, установленные согласно методу Битти [10]. Величины констант аффинности МА к СТ варьируют от $0,11 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ до $2,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$; МА к LT — от $0,16 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ до $2,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Для определения

констант использовали высокоочищенные препараты антител, выделенные из асцитной жидкости мышей, привитых клетками гибридом.

Таблица 1. Характеристика моноклональных антител к термолабильному энтеротоксину *E. coli*

Гибридный клон	Тип тяжелой цепи	$K_{\text{афф}} \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$
E11F4	IgG1	0,16 ± 0,02
D11H11	IgG1	0,24 ± 0,03
2F4D9	IgG1	0,4 ± 0,04
G2H4	IgG1	0,27 ± 0,02
F5G2	IgG1	1,5 ± 0,04
F8F6	IgG1	1,8 ± 0,04
1B1G6F2	IgG3	0,5 ± 0,02
D12B9	IgG1	0,3 ± 0,01
D2E4	IgG1	0,3 ± 0,02
B11G11	IgG1	2,0 ± 0,04

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител к холерному токсину [8]

Клон	Типы тяжелой цепи	$K_{\text{афф}} \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$
A2B1	IgG1	0,42 ± 0,04
A6B9	IgG3	0,53 ± 0,04
A7G3	IgG3	0,21 ± 0,02
A11E3	IgG2a	0,74 ± 0,06
B1F8	IgG1	0,25 ± 0,04
C2B4	IgG3	2,2 ± 0,1
C5H10	IgG1	1,1 ± 0,1
C7F11	IgG3	2,9 ± 0,2
C10F10	IgG1	0,12 ± 0,02
D3D8	IgG2a	1,4 ± 0,1
D4D6	IgG2b	0,33 ± 0,03
D5C3	IgG3	1,2 ± 0,1
D6G7	IgG2b	0,11 ± 0,01
D7F11	IgG1	0,22 ± 0,02
E3B6	IgG1	0,13 ± 0,02
E6E10	IgG1	0,52 ± 0,03
F4F4	IgG1	1,3 ± 0,4
F5H3	IgG1	2,6 ± 0,1
G6D12	IgG1	0,62 ± 0,04
G7D8	IgG1	2,7 ± 0,15
H4B6	IgG1	0,51 ± 0,03
H5E10	IgG1	0,35 ± 0,04
H5G8	IgG3	0,45 ± 0,05
H8F8	IgG3	0,30 ± 0,02

Как следует из приведенных в табл. 1 и 2 данных, все моноклональные антитела относятся к иммуноглобулинам класса G, подклассам IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, что обеспечило определенные преимущества в выборе метода их очистки с помощью иммуноаффинной хроматографии на протеин А-сефарозе. Все эти антитела имели легкую цепь к-типа. В результате очистки выделены электрофоретически чистые препараты антител (рис. 1), пригодные для получения их биотинилированных производных.

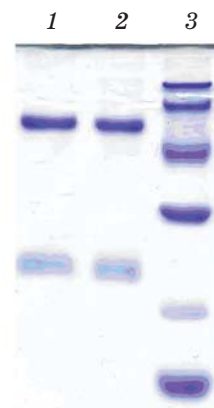


Рис. 1. Электрофореграмма моноклональных антител к СТ В1F8 и к LT F5G2 (дорожка 1 и 2 соответственно) в 12,5% ПААГ–SDS в восстанавливающих условиях.

На дорожке 3 представлена электрофореграмма смеси стандартных протеинов: фосфорилаза В (97 кДа), альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и α -лактальбумин (14,4 кДа)

Одним из методов выявления бактериальных токсинов в аналитических концентрациях является «сэндвич»-вариант ИЭА. В этом формате высокая чувствительность достигается применением двух МА-связывающих и детектирующих антител к различным эпитопам молекулы токсина. Связывающие антитела иммобилизованы на поверхности лунок планшета, а детектирующие представляют собой меченые биотином антитела. Для мечения детектирующих МА использовали сукцинимидный эфир биотина.

С целью подбора пары антител, позволяющей в «сэндвич»-ИЭА выявлять СТ и LT с высокой чувствительностью, все полученные антитела (табл. 1 и 2) тестировали в качестве как связывающих, так и детектирующих антител. Для этого каждое из антител было биотинилировано. Таким образом, все антитела были представлены в нативном виде и в виде биотинилированных производных.

Из полученных спектров антител подбирали пары, дающие возможность выявлять холерный токсин или термолабильный энтеротоксин *E. coli* с МДК менее 1 нг/мл. Такая величина МДК соответствует пределу детекции коммерческой тест-системы СТ и LT VET-RPLA detection kit (Oxoid) [14]. Отобранные пары МА в отсутствие токсина не связывались друг с другом и, таким образом, не формировали в пробах существенно неспецифического фона. Эти пары антител (табл. 3 и 4) не взаимодействовали с LT или СТ соответственно.

Для определения чувствительности «сэндвич»-варианта ИЭА детекции СТ или LT в буфере использовали двоичные и троичные разведения токсинов в интервале концентрации от 1 мкг/мл до 0,1 нг/мл. Минимальную детектируемую концентрацию (МДК) токсинов определяли как концентрацию, соответствующую значению оптического поглощения, превышающего не менее чем на три стандартных отклонения оптическое поглощение многократно измеренной нулевой точки (в отсутствие токсина). Пары антител оценивали по соответствующим величинам МДК.

Таблица 3. Пары моноклональных антител, выявляющие в «сэндвич»-анализе холерный токсин в концентрации ниже 1 нг/мл [8]

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	МДК СТ, нг/мл	Связывающие антитела	Детектирующие антитела	МДК СТ, нг/мл
B1F8	B1F8biot	0,4	F5/H3	B1F8biot	0,2
D4D6	D6G7biot	0,4		E6E10biot	0,2
	E6E10biot	0,4		D6G7biot	0,2
D7F11	D6G7biot	0,4	G7D8	D6G7biot	0,4
	B1F8biot	0,4		B1F8biot	0,4
F4F4	E6E10biot	0,4		E6E10biot	0,4
	B1F8biot	0,8	H8F8	D6G7biot	0,4
H4B6	D6G7biot	0,4		E6E10biot	0,4

Таблица 4. Пары моноклональных антител, выявляющие в формате «сэндвич»-ИЭА термолабильный энтеротоксин *E. coli* с чувствительностью ниже 1 нг/мл

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	Нижний предел детекции LT, нг/мл	Связывающие антитела	Детектирующие антитела	Нижний предел детекции LT, нг/мл
E11F4	F5G2biot	0,4	E11F4	B11G11biot	1,1
2F4D9		0,4	D11H11		0,6
G2H4		0,8	G2H4		0,4
F8F6		1,1	F5G2		0,5
1B1G6F2		0,3	F8F6		0,8
D12B9		0,9	1B1G6F2		0,6
B11G11		0,4	D12B9		0,9
E11F4	1B1G6F2biot	0,4	D2E4	G11F12biot	0,5
2F4D9		0,9	B11G11		0,5
G2H4		0,6	E11F4		0,5
F5G2		0,4	2F4D9		0,4
F8F6		0,5	G2H4		0,4
1B1G6F2		0,6	F5G2		1,0
B11G11		0,5	F8F6		0,4

Как следует из представленных в табл. 3 данных, пары антител F5H3–D6G7biot, F5H3–E6E10biot и F5H3–B1F8biot выявляли СТ с нижним пределом детекции 0,2 нг/мл токсина. При использовании антител D6G7, E6E10, B1F8 в качестве связывающих и антител F5H3 как детектирующих МДК СТ увеличивалась и составляла более 1 нг/мл холерного токсина. Следует отметить, что константа аффинности для антител F5H3 (табл. 2) была значительно выше, чем для D6G7, E6E10 и B1F8, что, очевидно, определило позицию МА F5H3 в качестве связывающего в «сэндвич»-анализе [11].

По данным табл. 4, тест-система определения LT методом «сэндвич»-ИЭА при использовании антител F5G2, 1B1G6F2, B11G11 и G11F12 в качестве детектирующих характеризовалась наименьшими величинами МДК. Эти антитела составляли пары со многими связывающими антителами и определяли LT с минимальными значениями МДК (менее 1 нг/мл). Антителам F5G2, 1B1G6F2, B11G11 и G11F12 присущи самые высокие константы аффинности (табл. 1) порядка 10^9 M^{-1} . Минимальный предел детекции LT составил 0,4 г/мл для пар B11G11–F5G2biot, E11F4–F5G2biot, F5G2–B11G11biot, D2E4–B11G11biot и B11G11–B11G11biot соответственно. В этих парах связывающие антитела также имели высокие константы аффинности.

Разработанная тест-система позволяет детектировать СТ и LT в меньшей концентрации, чем МДК коммерческой тест-системы VET-RPLA detection kit (Oxoid) [10], используемой для детекции СТ и LT методом непрямой пассивной латексной агглютинации, позволяющий определять энтеротоксины в концентрации 1–2 нг/мл. Следует отметить отсутствие перекрестного связывания МА к СТ с термолабильным энтеротоксином *E. coli* (LT), а антител к LT — с холерным токсином. Значения МДК известной иммуноэнзимной тест-системы дифференцированной детекции СТ и LT с применением пар, составленных из моноклональных и поликлональных антител, составляет 0,1 нг/мл [15]. Нами получены пары, составленные из моноклональных антител, позволяющие детектировать СТ и LT в буфере с МДК, сравнимой с МДК вышеназванной тест-системы — 0,2 нг/мл для СТ и 0,4 нг/мл для LT.

Полученные высокочувствительные и моноспецифические МА к LT и СТ определили возможность разработки биплексной иммунофлуоресцентной тест-системы на основе xMAP-технологии.

Разработанная тест-система на основе xMAP-технологии является разновидностью «сэндвич»-варианта метода ИХА, в котором связывающие антитела иммобилизованы на твердом носителе — полистирольных гранулах (микросферы) диаметром 5,6 мкм. Применяемые в этом методе микросферы уникальны по спектральным характеристикам, обусловленным комбинацией внутренних флуорофоров. Детектирующие антитела — вторые из подобранной пары — мечены фикоэритрином. Детекцию флуоресцентной метки проводили, используя компактный проточный флуоресцентный анализатор (Luminex 200) с программным обеспечением для обработки результатов Luminex IS 2.3. [16].

При разработке биплексной тест-системы на первом этапе работы исследовали пригодность отобранных методом «сэндвич»-ИЭА пар МА в xMAP-анализе. Разрабатывая тест-систему на основе xMAP-анализа, использовали 3 пары антител к СТ (F5H3–B1F8biot, F4F4–B1F8biot, F4F4–E6E10biot) и 5 пар антител к LT (E11F4–F5G2biot, E11F4–1B1G6F2biot, E11F4–B11G11biot, F5G2–1B1G6F2biot и F5G2–B11G11biot) [16].

Ключевой стадией в xMAP-технологии является получение высокоэффективного конъюгата микросфер со связывающими антителами. Связывающие МА к токсинам иммобилизовали на поверхности карбоксилированных полистирольных частиц карбодимидным способом. При разработке тест-системы для определения холерного токсина использовали карбоксилированные микросферы xMAP 129, имеющие спектральный адрес (ID) 29. В качестве связывающих СТ антител применяли F5H3 и F4F4. Для определения LT использовали карбоксилированные микросферы xMAP 136 (ID36). Связывающими LT антителами служили МА E11F4 и F5G2.

Для каждого МА подбирали оптимальные условия конъюгации. С этой целью конъюгацию микросфер проводили с различными количествами МА (25, 5 и 1 мкг). Эффективность процесса конъюгации микросфер с различными количествами связывающих антител оценивали по интенсивности медианного флуоресцентного сигнала полученного комплекса с поликлональными кроличьими антимышиными иммуноглобулинами, мечеными фикоэритрином. Каждая анализируемая проба характеризовалась значениями интенсивности медианного флуоресцентного сигнала (MFI), представляющего собой среднее значение интенсив-

ности флуоресценции 100 анализированных микросфер. Для выявления конъюгата микросфер со связывающими антителами с максимальной интенсивностью медианного флуоресцентного сигнала изучали зависимость сигнала от различных концентраций поликлональных кроличьих антимышиных меченных фикоэритрином иммуноглобулинов.

Максимальную интенсивность флуоресценции при минимальном неспецифическом фоне наблюдали для микросфер, конъюгированных с антителами F4F4 и F5H3 в количестве 1 и 5 мкг, а для антител E11F4 и F5G2 — 1 мкг.

Проведение экспериментов по определению оптимального количества связывающих антител, конъюгированных с микросферами, является обязательным для характеристики эффективности конъюгации.

На следующем этапе работы для отобранных конъюгатов связывающих антител с микросферами осуществляли подбор оптимальных концентраций детектирующих антител, меченных биотином.

В экспериментах использовали четыре концентрации биотинилированных антител — 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 мкг/мл и три концентрации токсина — 30, 300 и 3000 пг/мл. Максимальную интенсивность флуоресценции

при минимальном неспецифическом фоне наблюдали при концентрации детектирующих антител B1F8 2 мкг/мл, для антител E6E10 — 4 мкг/мл, F5G2 — 2 мкг/мл, а для 1B1G6F2 — 1 мкг/мл.

В табл. 5 приведены оптимальные количества связывающих антител, использованных в конъюгации с микросферами ID29 и ID36, и оптимальные концентрации детектирующих антител, определяющие максимальную интенсивность медианного флуоресцентного сигнала.

Определяли минимальную детектируемую концентрацию токсинов в буфере PBS-BSA в индивидуальном и биплексном анализе. Микросферы с иммобилизованными на них специфическими МА к СТ и LT инкубировали с соответствующими токсинами в различных концентрациях. МДК определяли в соответствии с общепринятыми стандартами как концентрацию, соответствующую среднему уровню флуоресцентного сигнала аналита, превышающему среднее значение фонового сигнала флуоресценции на три стандартных отклонения. В табл. 6 приведены величины МДК СТ и LT.

Самое низкое значение МДК для СТ (10 пг/мл) было определено с использованием следующих антител: связывающие анти-

Таблица 5. Пары МА, отобранные для xMAP-анализа токсинов СТ и LT

Токсин	Область ID	Связывающие антитела		Детектирующие антитела	
		Клон	Количество антител, иммобилизованных на микросферах, мкг	Клон	Концентрация биотинилированных антител, мкг/мл
СТ	36	F4F4	1	B1F8	2
			5	E6E10	4
		F5H3	1	B1F8	2
LT	29	E11F4	1	F5G2	2
				1B1G6F2	1
		F5G2	1	1B1G6F2	1

Таблица 6. Минимальные детектируемые концентрации СТ и LT, определенные в xMAP-анализе с участием различных пар связывающих антител, иммобилизованных на микросферах, и детектирующих антител

Токсин	Антитела, конюгированные с микросферами	Детектирующие антитела, несущие биотиновую метку	МДК, пг/мл
СТ	F5F3	B1F8	10
	F4F4	E6E10	20
	F4F4	B1F8	10
LT	E11F4	F5G2	80
	E11F4	1B1G6F2	160
	F5G2	1B1G6F2	100

тела F4F4, конъюгированные с микросферами и работающие в паре с детектирующими антителами B1F8biot, и связывающие антитела F5H3, конъюгированные с микросферами, в паре с детектирующими B1F8biot. В дальнейшей работе использовали пару антител F4F4 с биотинилированными B1F8. При определении МДК термолабильного энтеротоксина *E. coli* наибольшая чувствительность показана для связывающих антител E11F4, конъюгированных с микросферами, работающими в паре с детектирующими F5G2biot.

Для указанных выше пар с минимальными значениями МДК СТ и LT был проведен биплексный анализ, результаты которого представлены на рис. 2.

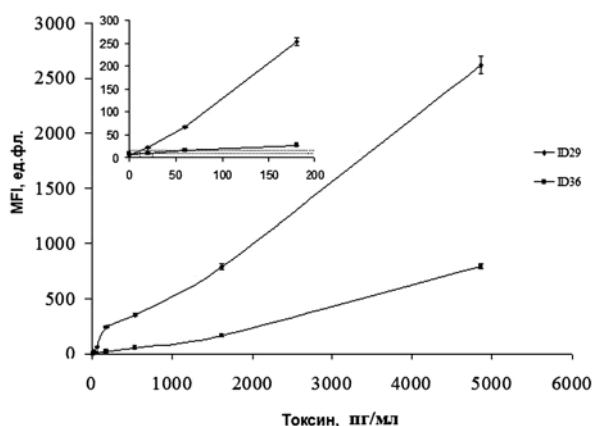


Рис. 2. Зависимость интенсивности медианного флуоресцентного сигнала от концентрации СТ и LT в хМАР-анализе, проведенном с участием пулов микросфер, конъюгированных с F4F4 и с E11F4, и с пулами детектирующих антител B1F8 biot и F5G2 biot.

На врезке приведен калибровочный график, соответствующий области низких концентраций токсинов. Пунктирной линией обозначено значение флуоресцентного сигнала, превышающее среднее значение флуоресцентного сигнала нулевой пробы на три стандартных отклонения. Концентрация СТ и LT при этих значениях флуоресцентного сигнала соответствует минимальной детектируемой концентрации

Из приведенных данных следует, что МДК СТ превышает МДК LT, что согласуется с данными, полученными при хМАР-анализе этих двух токсинов в индивидуальном анализе. В биплексном формате показатели, соответствующие фоновому сигналу флуоресценции, не превышали аналогичные показатели, полученные при хМАР-анализе токсинов в индивидуальном анализе. В табл. 7 представлены значения МДК для СТ и LT, регистрируемые в тест-системах формата хМАР-анализа и «сэндвич»-ИЭА.

Из данных таблицы следует, что МДК токсинов, определенные в биплексном и индивидуальном анализе, не различаются, однако они существенно ниже величин МДК токсинов, установленных с помощью «сэндвич»-ИЭА в формате планшета.

Было проведено сравнительное определение МДК токсинов LT и СТ в модельном буфере и в различных образцах объектов окружающей среды, продуктах питания и носоглоточных смывах человека методами «сэндвич»-ИЭА в формате планшета и иммунофлуоресцентном анализе с применением хМАР-технологии. Результаты представлены в табл. 8.

Из представленных данных следует, что чувствительность определения холерного токсина в молоке, бульоне, воде и в смывах носоглотки сравнима с чувствительностью определения токсина в модельном буфере. Значения МДК в биплексном анализе на два порядка превышают аналогичные значения, определенные в «сэндвич»-ИЭА. Для LT наблюдается увеличение значений МДК в молоке и в бульоне по сравнению с величиной в контрольном буфере. МДК, определенные в воде и в смывах со слизистой носоглотки человека, сравнимы с МДК в контрольном буфере. Значения МДК LT в биплексном анализе превышают, в основном на порядок, соответствующие величины МДК, полученные методом «сэндвич»-ИЭА. Эта мультиплексная тест-система позволяет определять токсины и в различных биологических

Таблица 7. Минимальные концентрации холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli*, детектируемые в биплексном иммунофлуоресцентном анализе с применением хМАР-технологии и в «сэндвич»-ИЭА в формате планшета

Токсин	МДК токсина в индивидуальном анализе, нг/мл	МДК токсина в мультиплексном анализе, нг/мл	МДК токсина в «сэндвич»-ИЭА, нг/мл
СТ	0,01	0,01	0,2
LT	0,08	0,08	0,4

Таблиця 8. Минимальные детектируемые концентрации (нг/мл) холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* в буфере, молоке, бульоне, смывах со слизистой носоглотки человека и в воде из открытого водоема, определенные методами «сэндвич»-ИФА в формате планшета и биплексного анализа с применением xMAP-технологии

Токсин		PBS-BSA	Молоко	Бульон	Вода	Носоглоточные смывы
МДК СТ	ИФА	0,2	0,2	0,2	0,2	0,30
	xMAP	0,01	0,02	0,02	0,02	0,09
МДК LT	ИФА	0,4	9,6	6,8	2,0	8,0
	xMAP	0,08	3,0	1,0	0,1	0,8

жидкостях, в объектах окружающей среды и в продуктах питания. Содержание СТ в молоке, мясном бульоне, в смывах с носоглотки можно устанавливать с такой же чувствительностью, как и для модельного буфера.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Супотницький М. В.* Микроорганизмы, токсины и эпидемии. — М.: Вузовская книга, 2000. — 376 с.
2. *Dallas W. D., Falkow S.* Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin // *Nature*. — 1980. — V. 288. — P. 499–501.
3. *Davy Vanden Broeck, Caroline Horvath, Marc J. S. De Wolf* Vibrio cholerae: Cholera toxin // *Inter. J. Biochem. Cell Biology*. — 2007. — V. 39, N 10. — P. 1771–1775.
4. *Определение «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов. Приложение 7. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: Метод. указания. МУ 3.3.1.2075-06.*
5. *Donta S. T., Moon H. W., Whipp S. C.* Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture // *Science*. — 1974. — V. 183. — P. 334–336.
6. *Lim D. V., Simpson J. M., Kearns E. A., Kramer M. F.* Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2005. — V. 18. — P. 583–607.
7. *Andreotti P. E., Ludwig G. V., Peruski A. H. et al.* Jr. Immunoassay of infectious agents // *Biotechniques*. — 2003. — V. 35, N 4. — P. 850–859.
8. *Köhler G., Milstein C.* Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. — 1975. — V. 256, N 5517. — P. 495–497.
9. *Laemmly U. K.* Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Ibid.* — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
10. *Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G.* Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // *J. Immunol. Methods*. — 1987. — V. 100. — P. 173–179.
11. *Петрова Е. Э., Комалева Р. Л., Лахтина О. Е. и др.* Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // *Биоорганическая химия*. — 2009. — Т. 35, № 3. — С. 357–367.
12. *Clements J. D., Dickinson B. L.* Use of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an oral adjuvant / *Mucosal Vaccines*, Kyono H., Ogra P. L., McGhee J. R. eds. — Academic, London and New York, 1996. — P. 73–87.
13. *Bowman C. C., Clements J. D.* Differential Biological and Adjuvant Activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Hybrids // *Infect Immun.* — 2001. — V. 69, N 3. — P. 1528–1535.
14. *VET-RPLA toxin detection kit. OXOID manual.* — 2006. — 9-th edition compiled by E. Y. Bridson. — P. 1039–1042.
15. *Honda T. Sato M., Miwatani T.* Differential detection of cholerae enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assays with antibodies specific to the two toxins // *J. Clin. Microbiol.* — 1984. — V. 20. — P. 664–667.
16. *Simonova M. A., Valyakina T. I., Petrova E. E. et al.* Development of xMAP Assay for Detection of Six Protein Toxins // *Anal. Chem.* — 2012. — V. 84. — P. 6326–6330.

**ОДЕРЖАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ
АНТИТІЛ ДО ХОЛЕРНОГО ТОКСИНУ
І ТЕРМОЛАБІЛЬНОГО ЕНТЕРОТОКСИНУ
E. coli ДЛЯ РОЗРОБЛЕННЯ
БІПЛЕКСНОГО АНАЛІЗУ ТОКСИНІВ
У ОБ'ЄКТАХ НАВКОЛИШНЬОГО
СЕРЕДОВИЩА**

*Є. В. Гришин
Т. І. Валякіна*

Федеральна державна бюджетна
установа науки
Інститут біоорганічної хімії ім. академіків
М. М. Шемякіна і Ю. А. Овчинникова
Російської академії наук, Москва,
Російська Федерація

E-mail: grev@mx.ibch.ru

Отримано моноклональні антитіла до холерного токсину і термолабільного ентеротоксину *E. coli*, які перехресно не взаємодіють зі спорідненим токсином. Підібрано пари антитіл для кількісного визначення цих токсинів у «сендвіч»-варіанті імуноензимного аналізу і біплексному імунофлуоресцентному аналізу із застосуванням технології xMAP (Luminex). Мінімальні детектовані концентрації холерного токсину і термолабільного ентеротоксину *E. coli*, що їх визначено у форматі «сендвіч»-імуноензимного аналізу — 0,2 і 0,4 нг/мл, значно вищі за відповідні величини у форматі біплексного аналізу — 0,01 нг/мл і 0,08 нг/мл. Присутність у пробах молока, бульйону та води з відкритого водоймища, а також носоглоткових змивів не справляє впливу на величини мінімально детектованих концентрацій холерного токсину, які визначено обома методами. В аналогічних пробах, що містять термолабільний ентеротоксин, вони зростали порівняно з відповідними показниками для контрольного буфера.

Ключові слова: імуноензимний аналіз, сендвіч-аналіз, мультиплексний імунофлуоресцентний аналіз, xMAP-аналіз, моноклональні антитіла, мінімальна концентрація, що детектується, холерний токсин, термолабільний ентеротоксин *E. coli*.

**OBTAINING OF MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST CHOLERA TOXIN
AND HEAT LABILE ENTEROTOXIN
OF *E. coli* FOR DEVELOPMENT
OF THE TOXINS DIPLEX ANALYSIS
IN ENVIRONMENTAL SPECIMENS**

*Eu. V. Grishin
T. I. Valiakina*

Federal State Institution of Science
Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry
of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation

E-mail: grev@mx.ibch.ru

The present study focuses on development of monoclonal antibodies (MAbs) which specifically interact with cholera toxin or heat labile enterotoxin of *E. coli*. Such monoclonal antibodies MAbs are possessed of ability to identify cholera toxin or heat labile enterotoxin in different immunochemical assays. We obtained hybridoma clones which produced monoclonal antibodies of IgG isotypes to cholera toxin and heat labile enterotoxin. On application of the method of serial dilutions we selected the clones which produced monoclonal antibodies with specific activity against only one of the toxins. We found the 16 pairs of monoclonal antibodies to cholera toxin and 28 ones to heat labile enterotoxin. By means of these monoclonal antibodies it was possible to realize the quantitative analysis of these toxins in sandwich immunoassay ELISA and diplex sandwich xMAP-assay. The limits of detection of cholera toxin and heat labile enterotoxin in ELISA in control buffer were 0.2 and 0.4 ng/ml, respectively, and in xMAP assay — 0.01 and 0.08 ng/ml, respectively. In probes of cow milk, meat soup, pond water and nasopharyngeal washes cholera toxin was detected in the both assays with the same limits of detections, but heat labile enterotoxin limits of detections were above the ones in control buffers.

Key words: ELISA, sandwich assay, multiplex immunoassay, xMAP analysis, monoclonal antibodies, minimal detectable concentration, cholera toxin, heat labile enterotoxin of *E. coli*.