

УДК 602.68:57.083.3.616.097:579.842.14

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОМУ АНТИГЕНУ САЛЬМОНЕЛЛ

А.М. Тургимбаева<sup>1,2</sup>, Г.К. Каукабаева<sup>1</sup>, Г.А. Бакирова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> РГП «Национальный центр биотехнологии РК», г. Астана

<sup>2</sup> Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана  
lii@biocenter.kz

На предыдущих этапах работы из бактериальных масс *S. typhimurium* и *S. enteritidis* методом водно-фенольной экстракции по О. Westphal получили липополисахаридный антиген. Выход антигена в зависимости от количества бактериальной массы составил от 0,750 до 1,5 мг. Данная методика выделения липополисахарида позволяла получать достаточно чистые углеводы. Результаты окрашивания серебром ПААГ четко показывают ступенчатую модель полос с несколькими ступенями, что говорит о гладком типе грамотрицательных бактерий. Результаты окрашивания полиакриламидного геля красителем Кумасси показало отсутствие контаминирующих бактериальных белков. Полученный ЛПС антиген обладает достаточно высокой антигенной активностью. Схема иммунизации концентрацией антигена 50 мкг/мл способствует выработке достаточного количества сывороточных антител с высокой степенью их сродства к использованному антигену. Исползованная схема иммунизации мышей линии BALB/c липополисахаридными антигенами *S. typhimurium* и *S. enteritidis* пригодна для стимулирования иммунной системы подопытных животных на выработку достаточного количества антител против использованных антигенов. Титры специфических антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных ЛПС антигеном *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, в ИФА достигали 1:25600 и 1:12800 соответственно. Гибридизацию лимфоцитов мышей с миеломными клетками линии X63-Ag8.653 проводили в присутствии ПЭГ-4000. Выход клонов гибридом, обладающих антительной продуктивностью, в наших опытах находился в пределах 6,41–7,62%, что свидетельствует о довольно высоком иммунном фоне пула лимфоцитов и о возможности изолирования активных клонов с желаемыми свойствами.

Таким образом, методом гибридной технологии получены активные штаммы гибридных клеток, стабильно синтезирующих моноклональные антитела к липополисахаридным антигенам *S.typhimurium* и *S.enteritidis*.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, липополисахарид, моноклональные антитела.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема качества и обеспечение безопасности пищевых продуктов и продовольственного сырья является приоритетной задачей современного здравоохранения. Бактерии рода *Salmonella* являются одним из наиболее распространенных возбудителей пищевых отравлений, инфицирующих большинство видов сырых продуктов (мясо, яйца, растительные продукты). Классические бактериологические методы, используемые в ветеринарно-санитарном контроле, длительны, трудоемки и не всегда адекватны из-за высокой фенотипической изменчивости бактерий. В настоящее время высокопроизводительные специализированные лаборатории, занятые в сфере анализа продовольственного сырья и пищевой продукции, имеют возможность использовать в своей практике современные иммунологические и молекулярно-генетические методы анализа - ПЦР, иммуноферментный анализ, масс-спектрометрия и другие. Обладая высокой чувствительностью, они обеспечивают надежное выявление сальмонелл в анализируемом материале, однако требуют автоматизации процесса и наличия специализированных кадров [1-3].

Для удовлетворения требований производителей продуктов питания, нуждающихся в быстрой реализации готовой продукции и снижении затрат на ее хранение, необходимо использовать инновационные ускоренные методы обнаружения сальмонелл. На сегодняшний день иммунохроматографические тест-системы стали широко используемым средством экспресс-детекции разнообразных аналитов и патогенов, сфера применения которых постоянно расширяется. Успех в создании высокочувствительных иммунохроматографических тестов во многом зависит от состава и качества основных иммунореагентов – моноклональных антител, специфичных к патогену. Моноклональные антитела (МКА) – иммуноглобулины, направленные против уникальных эпитопов патогенов, характеризующиеся постоянными свойствами, т.е. продуцируемые одним определенным клоном и доступные в неограниченном количестве [4-7].

Моноклональные антитела являются незаменимыми реагентами в иммунодиагностике, в цитологических и иммунологических исследованиях. С их помощью возможно выделение биологически активных веществ из сложных смесей, изучение клеточных мембран, дифференциальная диагностика различных заболеваний, идентификация антигенных структур бактерий, изготовление вакцинных препаратов. В настоящее время моноклональные антитела находят все более широкое применение в ветеринарии и медицине как иммунодиагностические реагенты для обнаружения возбудителей инфекционных болезней и специфических к ним антител, для типирования клеток крови и идентификации микроорганизмов и онкогенов. В настоящее время для лабораторной диагностики сальмонеллеза компания SIFIN (Германия) производит 72 типа группо- и типоспецифических моноклональных антител (энтероклонов) к иммунодоминантным антигенам сальмонелл для их идентификации и серотипирования [8-14].

Целью настоящей работы являлось получение штаммов гибридных культивируемых клеток (гибридом) – продуцентов моноклональных антител к липополисахаридному антигену сальмонелл.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Антигены.* В качестве антигена для иммунизации мышей линии BALB/c использовали липополисахаридные антигены *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, полученные по методу Westphal O. (1967).

*Животные, использованные в работе.* При выполнении работы были использованы следующие виды животных: 50 беспородных мышей использованы в качестве источника перитонеальных макрофагов при создании «питающего слоя» клеток на поверхности лунок планшетов для культивирования гибридом; 20 мышей линии BALB/c 6-8-недельного возраста использованы для получения иммунных спленоцитов и с целью наработки *in vivo* моноклональных антител.

*Иммунизация мышей.* Для иммунизации использованы мыши линии BALB/c, 6-8-недельного возраста. В качестве антигена для иммунизации использовали липополисахаридные антигены *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. Антиген вводили мышам внутривенно в объеме 50 мкл, при этом в первый день иммунизации инъецировали с 0,1 мл неполного адьюванта Фрейнда (Gibco, США), а на 7, 11, 12, 13 дни иммунизации иммунизировали без адьюванта. Дозу антигена для инъекции доводили забуференным физиологическим раствором, pH 7,2-7,4.

*Получение штаммов гибридных клеток продуцентов моноклональных антител к липополисахаридным антигенам *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.* Гибридизацию клеток миеломы X63Ag8.653 и иммунных спленоцитов проводили по методу V.Oi, L. Herzenberg et al. [15]. Перед слиянием замороженные ампулы с миеломными клетками из жидкого азота переносили в водяную баню (37°C) до полного растворения льда, содержимое ампулы переносили в центрифужную пробирку с 10 мл холодной неполной ростовой среды и перемешивали, затем центрифугировали 5-7 минут при 1000 об/мин. Супернатант сливали, к осадку клеток добавляли необходимый объем полной ростовой среды, суспензировали и переносили в ячейки 24-луночного планшета на слой «питающих клеток», в количестве 200-300 клеток в каждую ячейку. Инкубировали клетки при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Для гибридизации использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста. Клетки переносили из культуральных сосудов в центрифужные пробирки (прикрепившиеся к подложке клетки снимали мягким пипетированием) и центрифугировали 5-7 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок суспендировали в 5 мл неполной ростовой среды и подсчитывали количество клеток в камере Горяева.

Гибридизацию клеток проводили в стерильных условиях в ламинарных шкафах (Assab, Швеция). Клетки миеломной линии X63Ag8.653 и спленоциты иммунизированных мышей смешивали в соотношении 1:5 (1 млн. клеток миеломной линии и 5 млн. клеток спленоцитов) и центрифугировали 7-10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок осторожно встряхивали и добавляли к нему в течение 1 минуты 1 мл теплого (37°C) раствора ПЭГ-4000, осторожно перемешивали осадок кончиком пипетки. Медленно добавляли 9 мл неполной ростовой среды и перемешивали. Смесь выдерживали 10 мин. при температуре 37°C и центрифугировали 7-10 мин. при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок суспензировали в 40 мл полной ростовой среды и высевали в ячейки 96-луночного планшета (Nunc, Дания) с «питающим слоем» перитонеальных клеток. Суспензию клеток в полной ростовой среде разливали по 0,1 мл в каждую ячейку планшета с помощью многоканальной микропипетки (Gilson, Франция). Планшеты с клетками инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

Через 24 часа после посева гибридизированных клеток в каждую ячейку планшета добавляли равное количество среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин - ГАТ (Flow, Шотландия) в двукратной концентрации. При этом объем селективной ростовой среды в каждой ячейке увеличивался до 0,2 мл, а концентрация ГАТ уменьшалась в 2 раза и становилась однократной.

Рост клонов гибридом в лунках планшеты учитывали, начиная с 7-10 суток после слияния. Просматривали лунки при помощи инвертированного микроскопа (Labovert, ФРГ) и отмечали в них наличие гибридных клонов. Гибридные клетки представляют собой слабо прикрепляющиеся к носителю округлые клетки размером с исходную миеломную клетку. Из лунок, в которых отмечен рост единичных клонов,

отбирали образцы культуральной среды в объеме 0,1 мл и исследовали их на содержание антител в иммуноферментном анализе.

*Определение активности итамов гибридом-продуцентов моноклональных антител.* Липополисахаридные антигены *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, использованные для иммунизации мышей, в концентрации 0,01 мг/мл в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), pH 7,2-7,4, адсорбировали в ячейках планшета для иммунологических реакций (Nunc, Дания) в объеме 0,1 мл, выдерживая в течение ночи при 4°C. Затем ячейки планшета отмывали три раза ЗФР с 0,05% содержанием твина – 20 и три раза ЗФР. Блокировали свободные участки носителя путем внесения в каждую из них 0,1 мл 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина и инкубировали планшет 1 час при температуре 37°C. Планшет отмывали, как описано выше. Затем в ячейки вносили образцы ростовой среды гибридных клеток и выдерживали 1 час в термостате (37°C). Ячейки вновь отмывали, а затем вносили антитела против иммуноглобулинов мыши, меченых пероксидазой – конъюгат (Sigma, США) и инкубировали 1 час при 37°C. Результаты ИФА определяли после отмывки ячеек планшета и добавления в них субстрата фермента – перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и хромогена – ортофенилендиамина (ОФД). Раствор субстрата готовили непосредственно перед использованием следующим образом: 10 мг ОФД растворяли в 10 мл цитратного буфера (pH 4,5) и добавляли 0,1 мл 3%-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. После перемешивания раствора субстрата вносили его в ячейки планшета по 0,1 мл. Через 10 минут останавливали реакцию внесением в ячейки 0,1 мл 2М серной кислоты. Результаты ИФА оценивали визуально или количественно с помощью фотометра (Dunattech, ФРГ) при длине волны 492 нм. Положительная реакция характеризовалась окрашиванием жидкости (раствора субстрата) в коричневый цвет различной интенсивности. В лунки, из которых была отобрана культуральная среда, добавляли равное количество полной ростовой среды, содержащей гипоксантин и тимидин (ГТ). В последующих исследованиях гибридом на продукцию антител в лунки планшета добавляли полную ростовую среду. Если находили культуру, продуцирующую специфические антитела, то клетки ресуспендировали и переносили в лунку 24-луночного планшета (Nunc, Дания). Если культура продолжала продуцировать специфические антитела при выращивании в 24-луночных планшетах, то часть клеток переносили в матрасы для дальнейшего размножения, и, одновременно, другую часть подвергали клонированию и замораживанию.

Гибридные клетки сохраняли методом криоконсервации в сыворотке плода коровы с 10% диметилсульфоксидом (ДМСО).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная схема иммунизации мышей линии BALB/c с липополисахаридными антигенами *S. typhimurium* и *S. enteritidis* оказалась вполне пригодной для стимулирования иммунной системы организма подопытных животных на выработку достаточного количества антител против использованных антигенов. Это указывает на активную индукцию клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности (табл. 1).

**Таблица 1.** Титры антител иммунизированных мышей линии BALB/c в непрямом ИФА

Группы мышей	Антиген, использованный для иммунизации	Титры специфических антител к	
		<i>S. typhimurium</i>	<i>S. enteritidis</i>
I	<i>S. typhimurium</i>	1:25600	1:6400
II	<i>S. enteritidis</i>	1:3200	1:12800

Как видно из таблицы 1, титры специфических антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных липополисахаридным антигеном *S. typhimurium*, против аналогичного антигена в ИФА достигали 1:25600. Антитела, образованные при иммунизации мышей ЛПС *S. Enteritidis*, связывались с искомыми антигенами до титра 1:12800 соответственно. Наблюдалась активная перекрестная реакция между антителами, выработанными против упомянутых антигенов, что свидетельствует о наличии общих детерминант использованных препаратов ЛПС.

Из каждой группы мышей отбирали животных с максимальными титрами антител, селезенки которых были использованы в качестве источника иммунных лимфоцитов. Гибридизацию лимфоцитов мышей с миеломными клетками линии X63-Ag8.653 проводили в присутствии ПЭГ-4000.

Результаты первоначального скрининга клонов гибридных клеток приведены в таблице 2.

**Таблица 2.** Результаты гибридизации спленоцитов иммунных мышей с клетками миеломы

№ гибридизации	Спленоциты мышей иммунизированных	Соотношение миеломных клеток и спленоцитов	Кол-во засеянных лунок	Образование клонов гибридом	
				кол-во	%
1	ЛПС <i>S. typhimurium</i>	1:10	384	236	61,5
2	ЛПС <i>S. enteritidis</i>	1:10	384	187	48,7

Как видно из таблицы 2, наилучший результат слияния клеток отмечен при гибридизации миеломной линии со спленоцитами мышей, иммунизированных липополисахаридным антигеном *S. typhimurium*. Так, рост гибридом наблюдался в 236 лунках из 384 засеянных, т.е. процент слияния клеток был сравнительно высок (61,5%). В случае использования лимфоцитов животных, стимулированных липополисахаридным антигеном *S. enteritidis* - составил 48,7%.

Достигнутая нами высокая степень гибридизации клеток позволила начать скрининг гибридом с целью выявления среди них антителообразующих клонов. Отбор позитивных штаммов гибридом продуцентов МКА к липополисахаридным антигенам *S. typhimurium* и *S. enteritidis* на продукцию антител начинали проводить с того момента, когда наблюдалось незначительное пожелтение ростовой среды, и клетки гибридом занимали более 30% поверхности лунок.

**Таблица 3.** Результаты тестирования культуральной жидкости гибридом в ИФА

№ гибридизации	Количество образовавшихся гибридом	Результаты ИФА	
		кол-во клонов, обладающих специфической антительной продуктивностью	процентное соотношение (%)
1	236	18	7,62
2	187	12	6,41

Как видно из таблицы 3, при исследовании культуральной жидкости (супернатанта) антительная активность по отношению к ЛПС *S. typhimurium*, в иммуноферментном анализе была установлена у 18 клонов из 236 образовавшихся гибридом. Синтез антител гибридомами, связывающихся с ЛПС *S. enteritidis*, были определены в супернатанте у 12 клонов из 187 гибридных клеток.

Таким образом, выход клонов гибридом, обладающих антительной продуктивностью, в наших опытах находился в пределах 6,41-7,62%, что свидетельствует о довольно высоком иммунном фоне пула лимфоцитов и о возможности изолирования активных клонов с желаемыми свойствами.

В целях отбора для дальнейшего исследования клонов, стабильно продуцирующих моноклональные антитела (МКА), активность полученных гибридом была проверена пять раз с помощью иммуноферментного анализа с интервалом 3-4 дня (табл. 4).

**Таблица 4.** Результаты скрининга гибридных клеток

№ п/п	Название клона	Антительная активность гибридом при скринингах				
		3	4	5	6	7
Против ЛПС <i>S. typhimurium</i>						
1	1A1	1:4	1:4	1:2	1:2	-
2	1B12	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16
3	1F4	1:4	1:8	1:16	1:32	1:32
4	1H4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16
5	<b>1B3</b>	1:8	1:16	1:16	1:32	1:64
6	1B8	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
7	2H4	1:2	1:4	1:4	1:4	1:4
8	2E2	1:8	1:8	1:8	1:4	1:4
9	2E3	1:4	1:4	1:2	1:2	1:2
10	<b>1C4</b>	1:16	1:16	1:32	1:64	1:64
11	3C8	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16
12	3H7	1:4	1:4	1:2	-	-
13	4B12	1:4	1:8	1:8	1:16	1:16
14	4A4	1:4	1:4	1:8	-	-
15	4C10	1:4	1:4	1:4	-	-
16	2C8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16
17	2B5	1:4	1:4	1:4	1:2	-
18	<b>2H10</b>	1:8	1:16	1:64	1:64	1:64
Против ЛПС <i>S. enteritidis</i>						
1	2C10	1:4	1:4	1:2	-	-
2	<b>4A4</b>	1:6	1:16	1:64	1:64	1:64
3	1B7	1:4	1:4	1:2	1:2	-
4	1G2	1:4	1:2	1:2	-	-
5	1H4	1:4	1:8	1:8	1:16	1:32
6	2H9	1:4	1:4	1:4	-	-
7	2B2	1:4	1:2	1:2	-	-
8	3G8	1:8	1:8	1:8	1:16	1:16
9	<b>2F4</b>	1:8	1:8	1:16	1:32	1:64
10	1A6	1:8	1:8	1:16	1:16	1:16
11	4B5	1:4	1:4	1:8	1:8	1:16
12	4C7	1:8	1:8	1:16	1:32	1:32

Из таблицы 4 видно, что при четвертом и пятом скрининге в супернатанте 5 клонов (1A1, 3H7, 4A4, 4C10, 2B5) по отношению к ЛПС *S. typhimurium* антитела не обнаруживались. У клонов 1B8, 2H4, 2E2, 2E3 антитела в течение исследованного периода выявлялись в начальных титрах (1:2 и 1:4). Наибольшей антителной активностью характеризовались иммуноглобулины, вырабатываемые клонами 1B3, 1C4 и 2H10. В супернатанте последних гибридом антитела тестировались до разведения 1:64. Стабильную секрецию специфических иммуноглобулинов показывали и остальные 6 клонов, у которых максимальные титры надосадочной культуральной жидкости находились в пределах 1:8–1:32.

Продукция антител у пяти клонов (2C10, 1B7, 1G2, 2H9, 2B2), положительными по соотношению к липополисахаридному антигену *S. enteritidis*, наблюдалась в течение трех тестирований и на 4-5-ом скрининге показала уже отрицательный результат. Наиболее высокие продуктивные характеристики наблюдались у клонов 4A4 и 2F4 с титром 1:64. Титры моноклональных антител в культуральной среде у испытуемых гибридом 1H4, 3G8, 1A6, 4B5, 4C7 составляли в среднем 1:16-1:32.

Таким образом, на основании предварительных результатов исследований можно заключить, что методом гибридомной технологии получены активные штаммы гибридных клеток, стабильно синтезирующих моноклональные антитела к липополисахаридным антигенам *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

## ВЫВОДЫ

1. Использованная схема иммунизации мышей линии BALB/c с липополисахаридными антигенами *S. typhimurium* и *S. enteritidis* оказалась вполне пригодной для стимулирования иммунной системы организма подопытных животных на выработку достаточного количества антител против использованных антигенов.
2. Титры специфических антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных ЛПС антигеном *S. typhimurium*, против аналогичного антигена в ИФА достигали 1:25600. Антитела, образованные при иммунизации мышей ЛПС *S. enteritidis*, связывались с искомыми антигенами до титра 1:12800 соответственно.
3. Выход клонов гибридом, обладающих антительной продуктивностью, в наших опытах находился в пределах 6,41-7,62%, что свидетельствует о довольно высоком иммунном фоне пула лимфоцитов и о возможности изолирования активных клонов с желаемыми свойствами.
4. Методом гибридомной технологии получены активные штаммы гибридных клеток, стабильно синтезирующих моноклональные антитела к липополисахаридным антигенам *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шуляк Б.Ф. Традиционные и новые подходы к лабораторной диагностике сальмонеллеза // Журнал «Справочник заведующего КДЛ». - 2009. - №12. - С. 21-26.
2. Yang Hong, Tongrui Liu, Margie D Lee et al. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles // BMC Microbiology. – 2008. - №8. - P.178.
3. Яцышина С.В. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03. – М., 2003. - 112 с.
4. Бровкина А.Н. Контроль возбудителей острых кишечных инфекций на основе иммунохроматографического метода // Научный журнал КубГАУ. – 2011. - №72 (08). – С. 1-8.
5. Кеннет Р.Г., Мак-Керн Д., Бехтов К. Моноклональные антитела // Гибридомы: Новый уровень биологического анализа / пер. с англ. Е.Д. Айгорн. – М.: Медицина, 1983. – 416 с.
6. Игнатъев С.В. Моноклональные антитела // Ветеринария. – 1990. - №8. – С. 27-33.
7. Федоров Ю.Н., Верховский Д.А., Феоктисова Т.А. Моноклональные антитела – новый путь в иммунодиагностике и иммунопрофилактике инфекционных болезней животных // Сельхоз. биология. – 1990. - №2. – С. 22-30.
8. Андросова М.В. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела с различной специфичностью к микобактериям туберкулеза человеческого и бычьего видов // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. - №5. – С. 352-355.
9. Дробышевская Э.И. Получение моноклональных антител к антигенным детерминантам полисахарида стрептококка группы А // Актуальные вопросы иммунологии: сб. научн. Трудов. - Р.-на-Д., 1988. – С. 18-19.
10. Hammerberg C., Schurig G. Characterization of monoclonal antibodies directed against swine Leukocytes // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1986. – Vol. 11, №2. – P. 107-121.
11. Fogel N., Kleemm P., Elling F. Passive immunization of newborn piglets with anti- K88 murine monoclonal antibodies // Proc. World Vet. Congress. – Barselona, 1986. – P. 131-149.
12. Раевская М.В., Белая Ю.А., Ковальчук Н.В., Петрухин В.Г., Черноусова Л.Н. Получение и характеристика мышинных моноклональных антител к К-антигену *Salmonella typhimurium* // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1994. - №6. – С. 633-635.
13. Nalbantsoy A., Karaboz I., Deliloglu I. Production of Monoclonal Antibodies in a Mouse Model via Lipopolysaccharide Conjugates with Synthetic Polymers Specific to *Salmonella Enteritidis* O Antigen // Foodborne pathogens and disease. - 2010. - Vol. 7, №12. –P. 1521-1529.
14. Раевская М.В., Белая Ю.А., Ковальчук Н.В. Получение моноклональных антител к О-антигену *Salmonella typhimurium* серогруппа (0-4;5) // Бюлл. эксп. биол. и мед. - 1994. - №6. – С. 630-632.
15. Oi V., Herzenberg L. et al. Immunoglobulin – producing hybrid cell lines // Selected methods in cellular immunology // ed. By. Mishell B. and Shiigi. – San Francisco, 1980. – P. 351-352.

### ТҮЙІН

Жұмыстың алдыңғы сатыларында О. Westphal бойынша сулы-фенолды экстракциялау әдісі арқылы *S. typhimurium* және *S. enteritidis* бактериалды массасынан липополисахаридті антиген алдық. Бактериалды массаның көлеміне байланысты антигеннің шығымы 0,750 ден 1,5 мг дейін. Липополисахаридті алудың осы әдісі таза көмірсуларды алуға ықпалын тигізді. ПААГ күміспен бояу арқылы көрсеткен нәтижесі бойынша бірнеше сатыдан тұратын сатылық модель жолағынан грам теріс бактериялардың бар екенін байқаймыз. Полиакриламидті гельді кумассимен бояу нәтижесі контаминирлеуші бактериалды ақуыздардың жоқ екенін көрсетеді. Алынған ЛПС антиген жоғары антигендік белсенділікке ие екені анықталды. Иммундеу схемасы антигеннің 50 мкг/мл концентрациясында қолданылған антигенге жоғары ұқсастығы бар сарысулық антиденелердің қалыптасуына ықпал етті. BALB/c линиясының тышқандарына қолданылған *S. typhimurium*

және *S. enteritidis* липополисахаридті антигенімен иммундеу схемасы тәжірибелік жануарлардың организмде иммундық жүйесін ынталандырып, қолданылған антигенге қарсы жеткілікті мөлшерде антиденелер шығаруға жарамды болды. *S. typhimurium* липополисахаридті антигенімен иммунделген тышқандардың қансарысындағы телімді антиденелердің титрі ИФТ әдісінде 1:25600 жетті. *S. enteritidis* липополисахаридті антигенімен иммунделген тышқандарда титрі 1:12800 жетті. Лимфоциттер мен Х63-Аг 8.653 линиясының миеломды жасушаларын будандастыруды ПЭГ-4000 қатысуымен жүргіздік. Біздің тәжірибеміздегі антиденелік өнімділігі бар гибридом клондарының шығыны 6,41% дан 7,62% дейінгі аралықта болды, лимфоциттердің жоғарғы иммундық жағдайын және қажетті қасиеттері бар белсенді клондарды жекелеп алу мүмкін екендігі байқалады.

Сонымен, гибридомды технология әдісімен *S. typhimurium* және *S. enteritidis*. липополисахаридті антигеніне моноклоналды антиденелерді тұрақты өндіруші гибрид жасушаларының белсенді штаммдары алынды.

**Кілтті сөздер:** салмонеллдер, липополисахарид, моноклоналды антиденелер.

## SUMMARY

In previous steps lipopolysaccharide antigen was extracted by water-phenol method of O.Westfal from bacteria *S. typhimurium* and *S. enteritidis*. The yield of antigen depended on the amount of bacterial mass, the yield was in the range from 0,750 to 1,5 mg. This extraction method of LPS allowed to isolate sufficient purified carbohydrates. Colouration of polyacrylamide gel by silver stain showed speed model of bands with several steps, it means smooth type of gramnegative bacteria. Colouration of polyacrylamide gel by Coomassie stain showed the absence of contaminant proteins. Obtained LPS has a sufficiently high antigenic activity. Immunization by 50 µg/ml of LPS contribute to produce of sufficient quantity of serum antibodies with high affinity to LPS. Used immunization scheme of BALB/c mice with LPS of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* is convenient for stimulation immune system of experimental animals with a view to produce sufficient antibodies against used antigens. Titers of specific mice antibodies against LPS of *S. typhimurium* and *S. enteritidis* reach to 1:25600 and 1:12800 in ELISA, respectively. Hybridization of mouse lymphocytes with myeloma line X63-Ag 8.653 was conducted by dint of PEG-4000. The yield of hybridoma clones, which are capable to product antibodies, ranged from 6,41% to 7,62%, that attests the quite high immune pool of lymphocytes and possibility of isolating active clones with the desired properties.

Thus, active hybrid cells were received by hybridoma technology methods. Hybrid cells stably synthesise monoclonal antibodies against LPS of *S. typhimurium* and *S. enteritidis*.

**Keywords:** *Salmonella*, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies.