

УДК 616.057.23.

©Коллектив авторов

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-NSE-АНТИТЕЛА: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ.

В.П. Чехонин, О.И. Гурина, Т.С. Портная, И.А. Рябухин, И.И. Шепелева

Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им В.П. Сербского, Москва

Разработаны способ очистки нейроспецифической енолазы (NSE) и технология получения гибридом, продуцирующих моноклональные анти-NSE-антитела. Реализация способа получения NSE позволила выделить из ткани мозга человека практически гомогенный препарат этого белка. Применение этого препарата при иммунизации мышей линии BALB/C дало возможность сенсibilизировать иммунокомпетентные клетки, способные при слиянии с клетками миеломы Sp 2/0-Ag 14 образовывать гибридомы, продуцирующие моноклональные анти-NSE-АТ класса IgG1. На основе высокоочищенного препарата NSE и моноклональных анти-NSE-АТ была разработана иммуноферментная тест-система для определения NSE в биологических жидкостях человека и животных в диапазоне концентраций от 0,4 до 128 нг/мл.

Иммуноферментные тест-системы анализа NSE в биологических жидкостях, разработанные на основе мышинных моноклональных анти-NSE-АТ, характеризуются высокой специфичностью, точностью и надежностью, что позволяет рекомендовать их для оценки резистентности ГЭБ при заболеваниях и экстремальных воздействиях, сопровождающихся нарушением его функций.

Ключевые слова: нейроспецифическая енолаза, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, иммуноблот-анализ.

ВВЕДЕНИЕ. Процесс превращения 2-фосфо-D-глицерата в фосфоенолпируват в нейронах катализирует нейроспецифическая енолаза (NSE) - ключевой фермент нейронального гликолиза, известный также как нейроспецифический антиген 14-3-2. Этот антиген был идентифицирован Моог в 1965 при исследовании спектра водорастворимых белков нервной ткани [1], спустя 10 лет открыта его енолазная активность [2] и только через 12 лет разработан способ его очистки [3], проведен его физико-химический анализ, получены поликлональные моноспецифические анти-NSE антисыворотки и разработаны иммуноферментные тест-системы для определения этого белка в ликворе и сыворотке крови.

Хорошо известны многочисленные сообщения об использовании различных иммунохимических методов анализа NSE для диагностики и контроля некоторых нервно-психических заболеваний и опухолей мозга [4 - 15].

Самостоятельным прикладным направлением в изучении NSE следует признать серию работ, связанных с изучением феномена антигенной дивергенции, т.е. синтеза NSE опухолевой тканью легкого. В 1982 г. Carneу и соавт. [16] и немного позднее Ariyoshi [17] показали диагностическую ценность иммуноферментного анализа NSE в сыворотке крови больных злокачественными опухолями легкого. Исследуя концентрацию NSE в динамике, авторы отметили ее

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-NSE-АНТИТЕЛА

прямую корреляцию с клиническим течением заболевания, а также с эффективностью проводимой терапии. В настоящее время этот иммуноферментный тест является обязательным при диагностике и, в особенности, при дифференциальной диагностике мелкоклеточного рака легкого.

Таким образом, была убедительно продемонстрирована адекватность применения иммуноферментного анализа NSE для диагностики и контроля за эффективностью проводимой терапии при заболеваниях, сопровождающихся нарушением резистентности ГЭБ, а также для диагностики и дифференциальной диагностики мелкоклеточного рака легкого.

Следует отметить, что практически все пионерские исследования NSE выполнены с применением иммунохимических тест-систем на основе поликлональных антител, в основном получаемых при иммунизации животных высокоочищенными препаратами этого белка. В то же время хорошо известно, что методы иммунохимического анализа на основе поликлональных антител, несмотря на относительно высокую специфичность, способны выявлять различные эпитопы антигена, что в значительной степени затрудняет сравнение результатов и делает невозможной полноценную стандартизацию диагностических тест-систем.

Описанная в 1975 г. Kohler и Milstein [18] гибридная технология получения моноклональных антител (МАт), предоставила возможность стандартизации иммунохимических тест-систем, а, следовательно, и адекватной оценки и сравнения клинико-лабораторных данных.

Учитывая постоянно растущий интерес специалистов к NSE как одному из информативных ферментов гликолиза в нейронах, с одной стороны, а также важному маркеру резистентности гематоэнцефалического барьера при заболеваниях, сопровождающихся его прорывом, с другой стороны, *целью* данной работы явилось получение гибридом, продуцирующих моноклональные анти-NSE-антитела (АТ); выделение и характеристика МАт, а также разработка иммуноферментной тест-системы для определения NSE в биологических жидкостях.

МЕТОДИКА. *Очистка препарата NSE.* Выделение высокоочищенного препарата NSE проводили по методу Grasso [3] в нашей модификации [15, 19]. Схема получения препарата представлена на рисунке 1.

Получение моноклональных антител. Моноклональные антитела к NSE получали по стандартной методике, описанной Kohler и Milstein [18] в нашей модификации.

Миеломные клетки линии Sp2/0-Ag14 культивировали в среде RPMI-1640 ("Sigma", США) с 10 % эмбриональной сывороткой теленка ("Gibco", США) в концентрации 10^5 - 10^6 /мл. За 1 сутки до слияния добавляли среду RPMI-1640 с 15 % FCS и высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л).

Иммунизацию взрослых мышей линии Balb/C проводили очищенным препаратом NSE по описанной ранее схеме [15]. Мышей декапитировали, кровь собирали для дальнейшего тестирования. Стерильно выделяли селезенку и помещали ее в чашку Петри диаметром 60 мм в холодную (+4° С) культуральную среду RPMI-1640 без сыворотки и перфузировали той же средой. Перфузию продолжали до полного выделения клеток. Выделенные клетки осаждали центрифугированием (1000 g). Надосадочную жидкость удаляли, клетки суспендировали в 5 мл той же среды, подсчитывали их количество, проверяли жизнеспособность, после чего проводили трехкратную отмывку этой же средой.

Параллельно подготавливали к слиянию клетки миеломной линии Sp 2/0-Ag 14: проводили трехкратную отмывку теплой средой (+36° С) RPMI-1640 без сыворотки.

Перед последней отмывкой клетки селезенки и миеломной линии Sp 2/0-Ag 14 объединяли в одной пробирке. Оптимальное соотношение В-лимфоцитов селезенки иммунизированной мыши и миеломных клеток составило соответственно 1:5.

ТКАНЬ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА



Взята на вскрытии не позднее, чем спустя 6 часов после смерти

ГОМОГЕНИЗАЦИЯ



10000g в 0,05M Трис-глициновом буфере, pH 8,2, с 0,1 % Твин-80 и 0,1 % Тритон X-100

ВОДНО-СОЛЕВОЙ ЭКСТРАКТ



Осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 60% насыщения осадок растворяли в $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 32% насыщения, осаждение ацетоном

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



DEAE-52-целлюлоза, отбирали фракции, элюирующиеся в диапазоне концентраций NaCl от 0,15 M до 0,22 M.

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ



Ультрафильтрация на мембране XM-30

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ



Сефадекс G-150, отбирали фракцию с $M_r = 75 \pm 10$ кДа

ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



Фенил-сефароза, отбирали фракцию, элюирующуюся в диапазоне концентраций $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от 1 M до 0,8 M

ИЗОХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЕ



PBE-гель, отбирали фракцию, элюирующуюся в диапазоне pH от 4,6 до 5,3

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ



NSE

Рисунок 1.

Схема очистки нейроспецифической енолазы.

После центрифугирования клетки ресуспендировали, проводили слияние с использованием раствора ПЭГ-ДМСО ("Sigma"). После окончания процедуры слияния клетки центрифугировали в течение 4 минут при 1000 g, добавляли среду DMEM ("Sigma") с 20 % FCS и клетки в пробирке помещали в CO_2 -инкубатор на 2 часа. Через 2 часа добавляли среду HAT ("Sigma") (из расчета 100 мкл на одну лунку 96-луночного планшета) и вносили в лунки 96-луночных планшетов.

После слияния клетки выдерживали в среде HAT в течение 10 дней, после чего гибридные клетки помещали в среду DMEM с 20 % FCS. Видимые клоны появлялись в течение 2-4 недель. При необходимости большую часть среды меняли на свежую. В среде DMEM с 20 % FCS клетки культивировали в течение 2-3 недель.

Первое тестирование культуральной жидкости проводили тогда, когда клон состоял из не менее 150-200 клеток. Всего выполнялось три тестирования. В случае увеличения титра соответствующих анти-NSE-антител, клетки из лунки

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-NSE-АНТИТЕЛА

высеивали на плашку с фидерным слоем (из расчета 1 клетка на 1 лунку 96-луночного планшета). После реклонирования полученных клонов гибридные клетки наращивали.

Гибридные клетки в количестве 3×10^6 вводили интраперитонеально мышам линии Balb/C через три недели после интраперитонеального введения 0,5 мл пристана (2,6,10,14-тетраметилпентадекан, "Sigma"). Остальные гибридные клетки замораживали по аликвотам 5×10^6 /мл и хранили в жидком азоте.

Моноклональные анти-NSE-АТ от полученных клонов выделяли из собранного асцита с помощью соответствующих иммуносорбентов на основе CNBr-сефарозы и высокоочищенного препарата NSE по общепринятой методике [20].

Для определения классовой принадлежности полученных МАт нами проводился иммуноферментный анализ с помощью анти-IgG- и анти-IgM-АТ.

Определение подклассов МАт выполняли с использованием метода двойной диффузии по Ouchterlony иммуноглобулинов, секретируемых гибридами в культуральную жидкость против кроличьих антител к субклассам мышинных иммуноглобулинов ("Dako", Дания).

Диск-электрофоретический анализ. Степень чистоты препарата NSE оценивали с помощью аналитического диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим иммунопроявлением [19], а также при проведении диск-электрофореза в ПААГ с додецил-сульфатом натрия [21].

Иммуноблот анализ. Специфичность МАт исследовали с помощью иммуноблот анализа [22].

Перед выполнением процедуры переноса препарата NSE на нитроцеллюлозную мембрану проводили диск-электрофоретический анализ антигена (25 мкг) в 7,5% полиакриламидном геле. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в течение 3 часов в 0,1 М трис-глициновом буфере (pH=8,3) при силе тока 500 мА в камере для иммуноблот-анализа ("Sigma").

После процедуры переноса нитроцеллюлозную мембрану отмывали в PBS с 1% Tween 20 ("Sigma"), наносили препараты моноклональных антител к NSE (20 мкг/мл) от полученных гибридных клонов и инкубировали в течение 2 часов. После соответствующей отмывки наносили вторые антитела, в качестве которых использовали антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой ("Dako") в разведении 1: 3000. Проявление ферментной активности проводили с использованием субстратной смеси, содержащей перекись водорода и оксифенилендиамин в цитратном буфере (pH 5,0), как описано ранее.

Разработка иммуноферментного анализа. Для количественного определения NSE в биологических жидкостях мы использовали твердофазный вариант иммуноферментного анализа (рис. 2).

Конъюгирование анти-NSE-АТ с пероксидазой хрена (тип VI фирмы "Sigma") осуществляли по методу Nakane и Kawaoi [23].

В ячейки специальных планшетов для иммуноферментного анализа вносили по 200 мкл 0,015% препарата антител к NSE от клона 5C5 в 0,05 М Na-карбонатном буфере (pH 9,6) и инкубировали в течение 12 часов при 4° С. Затем ячейки отмывали 0,05 М раствором PBS, pH 7,4 ("отмывочный буфер").

После промывки в опытные ячейки заливали по 200 мкл исследуемой биологической жидкости, в контрольные ряды ячеек вносили стандартные пробы с известной концентрацией NSE. После 2 часовой инкубации при комнатной температуре несвязавшиеся белки отмывали тем же "отмывочным буфером"; затем в ячейки вносили конъюгат анти-NSE-АТ от клона 5C4D12 с пероксидазой из хрена тип VI ("Sigma"), инкубировали в течение трех часов при комнатной температуре, а не связавшийся конъюгат тщательно отмывали буфером.

Для проявления ферментной активности пероксидазы, конъюгированной с антителами, использовали субстратную смесь на основе α -фенилендиамина и 0,1% раствора перекиси водорода. Субстратную смесь инкубировали 1 час, после чего проводили измерение оптической плотности растворов в каждой ячейке



Рисунок 2.

Схематическое изображение "сендвич"-варианта иммуноферментного анализа NSE.

1 - твердая фаза	4 - конъюгат антител от клона D8 с пероксидазой хрена
2 - антитела от клона D4	5 - субстрат
3 - NSE	6 - регистрируемый комплекс

планшета с помощью одноканального спектрофотометра фирмы "Dynatech" (Швейцария) при длине волны 490 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Реализация способа получения NSE, приведенного на рис. 1, позволила выделить из ткани мозга человека практически гомогенный препарат этого белка высокой степени чистоты. Аналитический диск-электрофорез в ПААГ препарата NSE выявлял единственную мажорную полосу в зоне подвижности α_2 -глобулинов, что свидетельствовало о высокой степени очистки препарата. Исследование молекулярной массы NSE методом гель-фильтрации на носителе Sephadex G-150 ("Pharmacia", Швеция) показало, что данный нейроспецифический белок обладает молекулярной массой $85,0 \pm 10,0$ и $82,0 \pm 7,4$ кДа (рис. 36). Сопоставление данных, полученных при исследовании молекулярной массы нативного NSE методом диск-электрофореза в ПААГ с SDS, с данными, полученными при исследовании молекулярной массы методом гель-фильтрации, позволяют сделать вывод о субъединичном строении молекулы, состоящей, по-видимому, из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой $48,0 \pm 2,7$ кДа, соединенных между собой легко восстанавливаемой β -меркаптоэтанолом связью (очевидно, S-S связью).

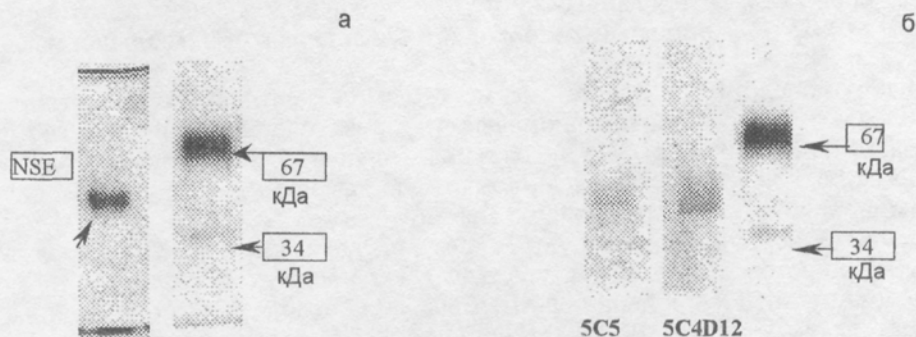


Рисунок 3.

Диск-электрофорез в ПААГ с SDS (а), и Вестерн-блот-анализ (б) препарата NSE человека.

Получение высокоочищенного препарата NSE открыло перед нами возможность изучения его химической характеристики. Как видно из табл. 1, где

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-NSE-АНТИТЕЛА

Таблица 1. Результаты общего химического анализа NSE

Химический состав NSE	мг/100мг антигена	Метод анализа
Белок	99,2	Lowry
Моносахариды	-	фенол-сернокислый, орциновый
Сиаловые кислоты	-	Эльсона-Моргана
Сульфат	+	ИК-спектроскопия

Таблица 2. Аминокислотный состав NSE

Аминокислоты	% аминокислоты на 100 аминокислот*		
	24 часа	48 часов	72 часа
His	1,4	1,2	1,1
Lys	5,2	4,3	3,9
Arg	4,7	3,2	2,9
Cys	2,2	-	-
Asp	11,8	11,2	10,8
Thre	3,5	3,9	3,8
Ser	5,1	4,7	4,4
Glu	12,3	12,6	12,8
Pro	3,8	3,5	3,5
Gly	9,7	9,4	9,5
Ala	10,5	8,9	9,3
Val	6,3	6,4	6,9
Met	2,1	2,1	2,1
Ileu	5,1	5,6	6,1
Leu	8,9	9,1	9,3
Tyr	2,5	3,1	3,0
Phala	2,8	3,4	3,3
Try	1,2	-	-

Примечание: *Исследование аминокислотного анализа NSE проводили после гидролиза 6 N HCl в течение 24, 48, 72 часов при 105° С. Существенных различий в аминокислотном составе между соответствующими образцами с различным временем гидролиза выявлено не было. Анализ проводили на аминокислотном анализаторе "Duttm-DS 500" (США).

представлены данные общего химического анализа NSE, γ -субъединица NSE представляет собой сульфатированный протеин, основным компонентом которого является белок (99,2 %). Детальный аминокислотный анализ которого представлен в табл. 2.

Анализируя представленные данные, необходимо отметить, что в структуре NSE преобладают моноаминодикарбоновые и алифатические аминокислоты, обуславливающие кислую рI NSE, сильный электроотрицательный заряд молекулы. N-концевой анализ γ -субъединицы NSE выявил в её структуре одну концевую аминокислотную группу, соответствующую аланину.

Эти данные хорошо коррелируют с результатами диск-электрофореза в ПААГ с SDS, при котором в его структуре обнаружена одна субъединица.

Высокоочищенный препарат NSE был использован нами в цикле иммунизации мышей линии Balb/C, В-лимфоциты которых использовали в слиянии с клетками миеломы для получения гибридом.

В результате процедуры гибридизации были получены гибридные клетки, продуцирующие моноклональные антитела, взаимодействующие с человеческим NSE. Процедура отбора гибридом включала иммуноферментный анализ культуральных жидкостей гибридных клеток с последующим клонированием лишь гибридом, продуцирующим моноклональные анти-NSE-АТ.

На следующем этапе селекции был проведен анализ культуральных жидкостей для определения класса МАт методом иммуноферментного анализа и подкласса моноклональных антител методом иммунодиффузионного анализа по Ouchterlony. В дальнейшую работу были выбраны два клона гибридом, продуцирующие МАт класса IgG1 - гибридомы 5C5 и 5C4D12.

При иммуноблот анализе с применением МАт от клонов гибридом 5C5 и 5C4D12 (рис. 3а, 3б), были выявлены линии, соответствующие молекулярным весам $51 \pm 2,1$ кДа, что соответствовало электрофоретической подвижности NSE, полученного из ткани мозга человека.

На основе высокоочищенного препарата NSE и моноклональных анти-NSE-АТ нами была разработана иммуноферментная тест-система для определения этого белка в биологических жидкостях человека и животных в диапазоне концентраций от 0,4 до 128 нг/мл и построена калибровочная кривая (рис. 4).

Иммунопроявление NSE проводили моноклональными анти-NSE-антителами от гибридом 5C5 и 5C4D12.

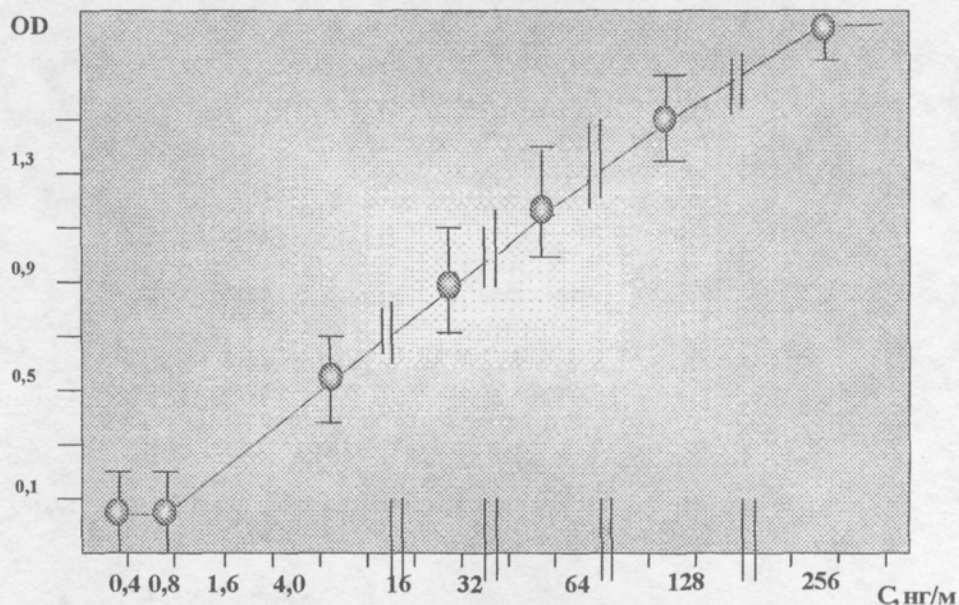


Рисунок 4.

Калибровочная кривая иммуноферментного анализа анти-NSE-антителами от гибридом 5C5 и 5C4D12.

Тестирование разработанных тест-систем на "параллелизм", проведенное с помощью кратных разведений экстракта из ткани мозга человека, позволяет получить кривые, практически параллельные стандартным. Результаты исследования систем анализа NSE в тестах на точность, воспроизводимость и надежность полностью соответствуют требованиям, необходимым для внедрения иммуноферментных тест-систем в клинично-лабораторную практику.

Таким образом, применение высокоочищенного препарата NSE при иммунизации мышей линии BALB/C позволяет сенсibilизировать иммунокомпетентные клетки, способные при слиянии с клетками миеломы Sp 2/0-Ag 14 образовывать гибридомы, продуцирующие моноклональные анти-NSE-АТ.

Иммуноферментные тест-системы анализа NSE в биологических жидкостях, разработанные на основе мышинных моноклональных анти-NSE-АТ, характеризуются высокой специфичностью, точностью и надежностью, что позволяет рекомендовать их для оценки резистентности ГЭБ при заболеваниях и экстремальных воздействиях, сопровождающихся нарушением его функций.

1. Moore B.W. (1976) *Advances in Neurochemistry*, **1**, 137-155.
2. Bock E., Dissing J. (1975) *Scand. J. Immunol.*, **4**, 31-36.
3. Grasso A., Roda G., Hoque-Angeletti R.A. et al. (1977) *Brain Research*, **124**, 497-507.
4. de Kruijk J.R., Leffers P., Menheere Pet al. (2001) *Acta Neurol Scand*, **103** (3), 175-179.
5. Barone F.C., Clerk R.K., Price W.J. et al. (1993) *Brain Res.*, **1**, 71-82.
6. Correale J., Rabinowicz A. et al. (1998) *Neurology*, **50**, 1388-1391.
7. Raabe A., Grolms C., Seifert V. (1999) *Br. J. Neurosurg.*, **13** (1), 56-59.
8. Herrmann M., Curio N., Jost S, et al. (2001) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **70** (1), 95-100.
9. Steinhoff B.J., Tumani H., Otto M., et al. (1999) *Epilepsy Res.*, **36** (1), 75-82.
10. Buttner T., Lack B., Jager M., et al. (1999) *J. Neurol.*, **246** (6), 459-461.
11. Rabinowicz A., Correale J. et al. (1996) *Epilepsia*, **37**, 122-125.
12. Karkela J., Bock E. et al. (1993) *J. Neurol. Sci.*, **116**, 100-109.
13. DeGiorgio C.M., Heck C.N., Rabinowicz A.L., et al. (1999) *Neurology*, **52** (4), 746-749.
14. Tapia F. J., Polak J.M., Barbosa A.J.A., Pearse A.G.E. (1981) *Lancet*, **1**, 808-811.
15. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Журков Ю.А. (2000) Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов.
16. Carney D.N., Marangos P.J., Ihde D.C. et al. (1982) *Lancet*, **1**, 583-585.
17. Arioshi Y., Kato K., Ishinuro Y. et al. (1983) *Gann*, **74**, 219-225.
18. Kohler G., Milstein C. (1975) *Nature*, **256**, 495-497.
19. Антонова О.М. (1997) Нейроспецифическая енолаза и её роль в механизмах антигательной агрессии в мозг, Дисс. ... к.м.н..
20. Weir D. (1978) *Handbook of Experimental Immunology*, Oxford;
21. Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel J.V. (1967) *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **28**, 815-820.
22. Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
23. Nakane P.K., Kawaoi A. (1974) *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084-1091.

Поступила 22.05.01

MONOCLONAL ANTI-NSE-ANTIBODIES: PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND IMMUNOENZYME ANALYSIS.

V.P. Chekhonin, O.I. Gurina, T.S. Portnaja, I.A. Rjabukhin, I.I. Shepeleva.

Serbsky National Research Centre for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia

The results of NSE purification procedure, as well as hybridoma technology of anti NSE monoclonal antibodies synthesis are presented. The employment of this procedure yielded highly purified NSE preparation. The immunization of BALB/C mice with NSE preparation led to sensitization of the immunocompetent cells, which could form hybridomes, producing the anti-NSE monoclonal antibodies, after the confluence with myeloma cells Sp 2/0-Ag 14.

The ELISA test-system for NSE analysis was developed on the basis of highly purified NSE preparation and monoclonal anti - NSE antibodies. This system was characterized by high specificity, accuracy and reliability. This system may be recommended for analysis of blood-brain barrier functions in the neurological and psychiatric diseases.

Key words: NSE, monoclonal antibody, enzyme-linked immunoassays, immunoblot analysis.