

«АСТАНА МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АҚ

Жалпы иммунология кафедрасы

ПРЕЗЕНТАЦИЯ

ТАҚЫРЫБЫ: МОНОКЛОНДЫ АНТИДЕНЕЛЕР, ОНЫҢ
ГИБРИДИОНДЫ ТЕХНОЛОГИЯСЫ. МОНОКЛОНДЫ
АНТИДЕНЕЛЕРДІҢ ИММУНОЛОГИЯДАҒЫ НЕГІЗГІ
ҚОЛДАНУ АЙМАҒЫ.

Орындаған: Барат Е.Н.

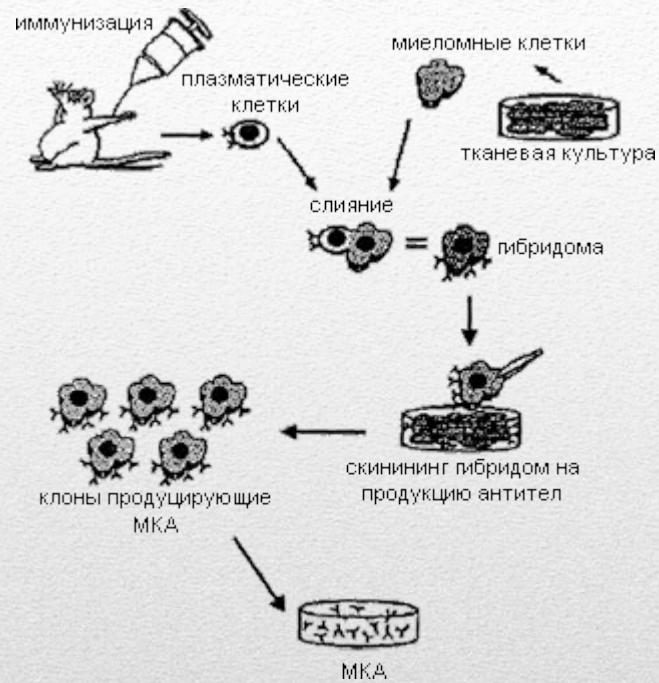
Тобы: 323 ЖМ

Тексерген: Мухашева Н.Е.

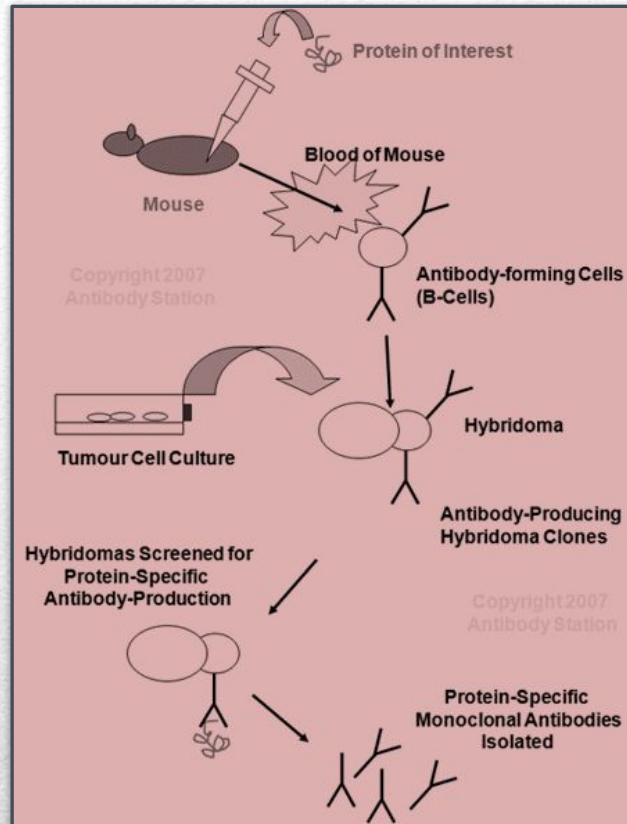
Жоспар

- Гибридомды технологиямен танысу. Әдістің ұстанымы.
 - Моноклондарды алу. Тышқандардан жасанды ісік – гибридомалар – алу.
 - Гибридомалардан және иммундық жасушалардан гибридтық жасушаларды алу.
 - Моноклоналды антиденелерді алғанда ұйымдастырылатын жұмыстар және қолданылатын құрал-жабдықтар.
 - Сынауға жануарларды тандау.
 - Гибридомды технологиямен танысу. Әдістің ұстанымы.
 - Моноклондарды алу. Тышқандардан жасанды ісік – гибридомалар – алу.
-

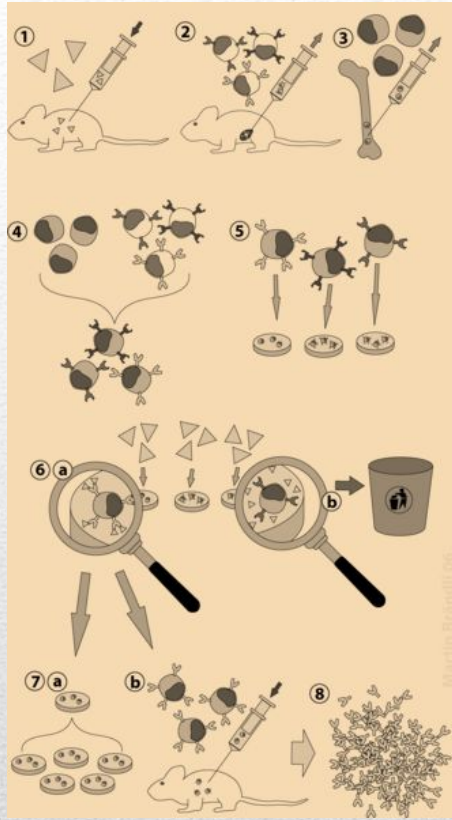
- Әдістің тарихы. Зерттеушілердің негізгі мақсаты – өзгешелігі жоғары антиденелерді алу әдістерін табу. Бір белгілі жағдайда бактериалды полисахаридтермен иммунизация өткізсе – өзгешелігі жоғары антиденелердің жоғарыгомогенді аппаратын алуға болады. Осыдан басқа, плазмацитоманың (антидене жарату жасушадан жаратылған ісік) иммунды жануардың көк бауырының жасушаларымен қосылуы мүмкін. Осылай гибридтік жасушалар (гибридомалар) алынады. Гибридомалар ісік жасушалардан шексіз көбею мүмкіншілігін, ал көк бауырдың жасушаларынан – белгілі өзгешелігі бар антиденелер синтездеу мүмкіншілігін алған.
- Моноклоналды антиденелерді синтездейтін гибридомаларды алу әдісіне келесі методологиялық жұмыстар жол берген:
- Миеломалар алу, оларды ағзадан бөлек өсіру;
- Жасушалардың соматикалық гибридизация әдісі.



Monoclonal Antibody Production Diagram



- Әдістің ұстанымы. Гибридомаларды алу әдістің негізінде көкбауырдың сенсibiliзденген лимфоциттердің және миеломды жасушалардың қосылуынан кейін гибридік жасушалардың сериялық өсіруі жатыр.
- Кейіннен керекті ерекшелігі бар антиденелерді секреттейтін клондарды іріктейді. Іріктелген клонды жасушалардың дақылдары ретінде сақтайды немесе тышқандардың ағзасында асцидік ісік ретінде сақтайды. Гибридомды технология бір неше кезеңдерден тұрады: дайындық жұмыстар, моноклондарды алу, клондарды сақтау, реклондау, асцидік ісік алу, антиденелерді тестілеу, антиденелерді тазалау.

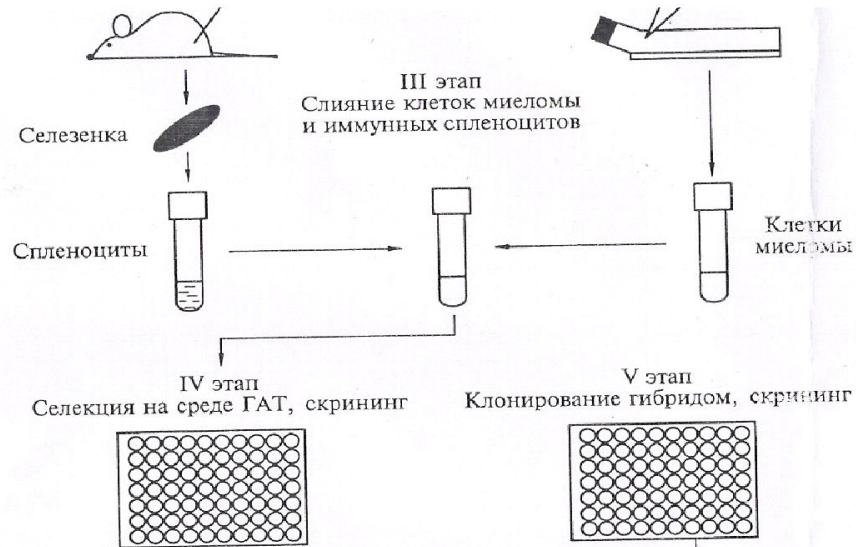


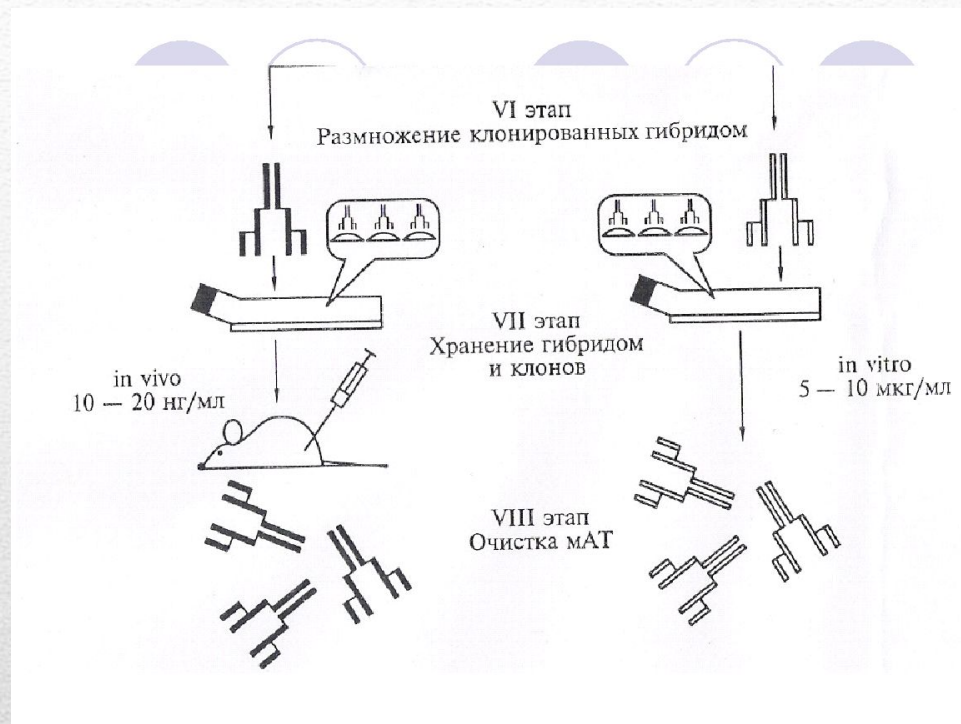
- (1)иммунизация животных;
- (2)выделение В-лимфоцитов из селезенки;
- (3)культура клеток миеломы;
- (4)слияние В-лимфоцитов и клеток миеломы;
- (5)сегрегация клеточных линий;
- (6)скрининг и селекция линий, производящих антитела;
- (7)размножение гибридомы *in vitro* (a) или *in vivo* (b);
- (8) получение антител.

**Гибридомаларды алу және моноклоналды антиденелерді бөліп алу кестесі:
Антиген еңгізу.**

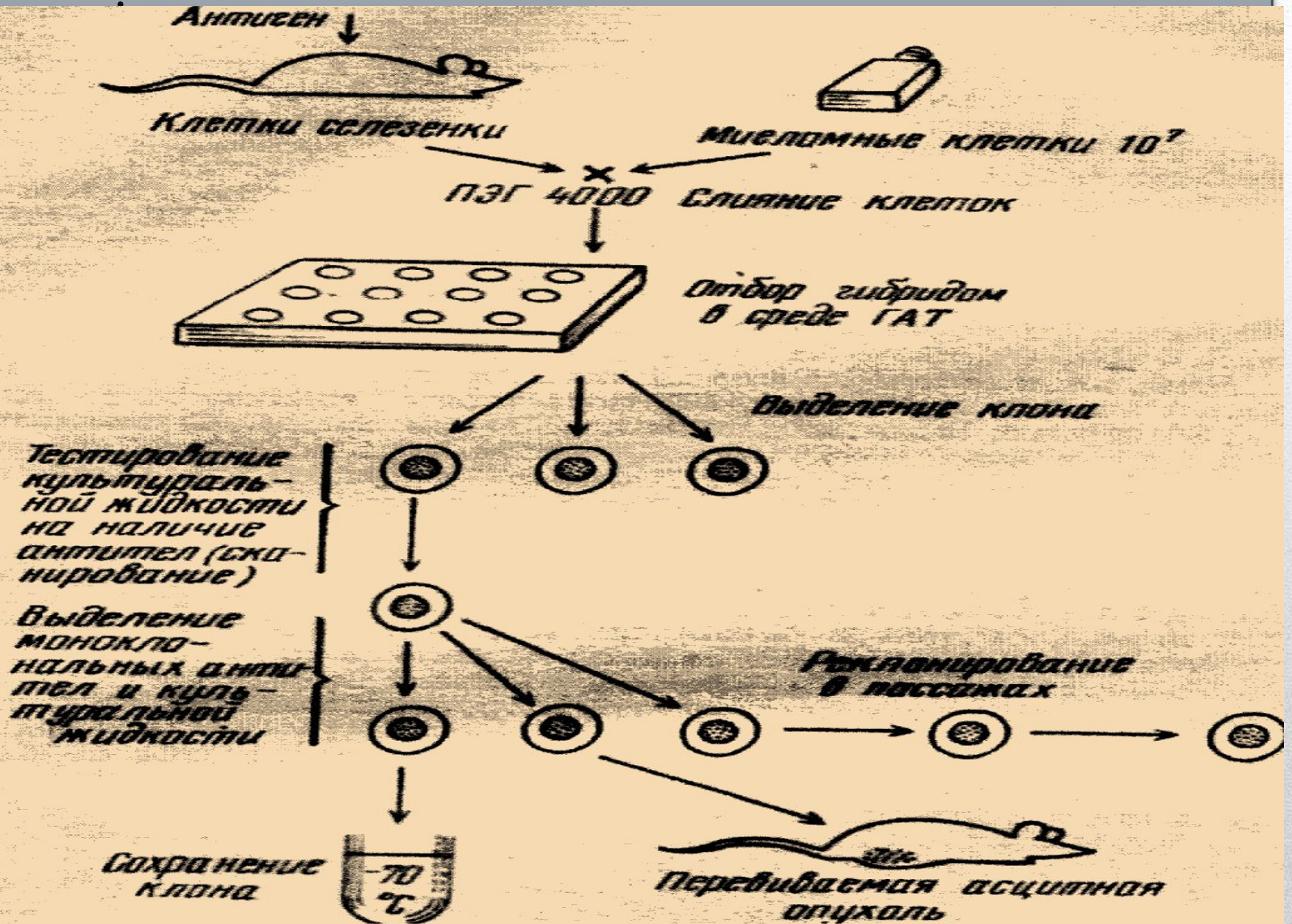
- Көк бауырдың жасұшаларын алу (10^8).
- Миеломды жасұшаларды алу (10^7).
- ПЭГ 4000 ортасында жасұшаларды қосу.
- ГАТ ортасында гибридомаларды іріктеу.
- Клондарды бөліп алу.
- Дақылды сұйықтықты антиденелер болуына тексеру.
- Пассаждарда реклондау.
- Дақылды сұйықтықтан моноклоналды антиденелерді бөліп алу.
- Клонды -70 градуста сақтау.
- Асциттік ісік алу.

Этапы гибридной технологии.

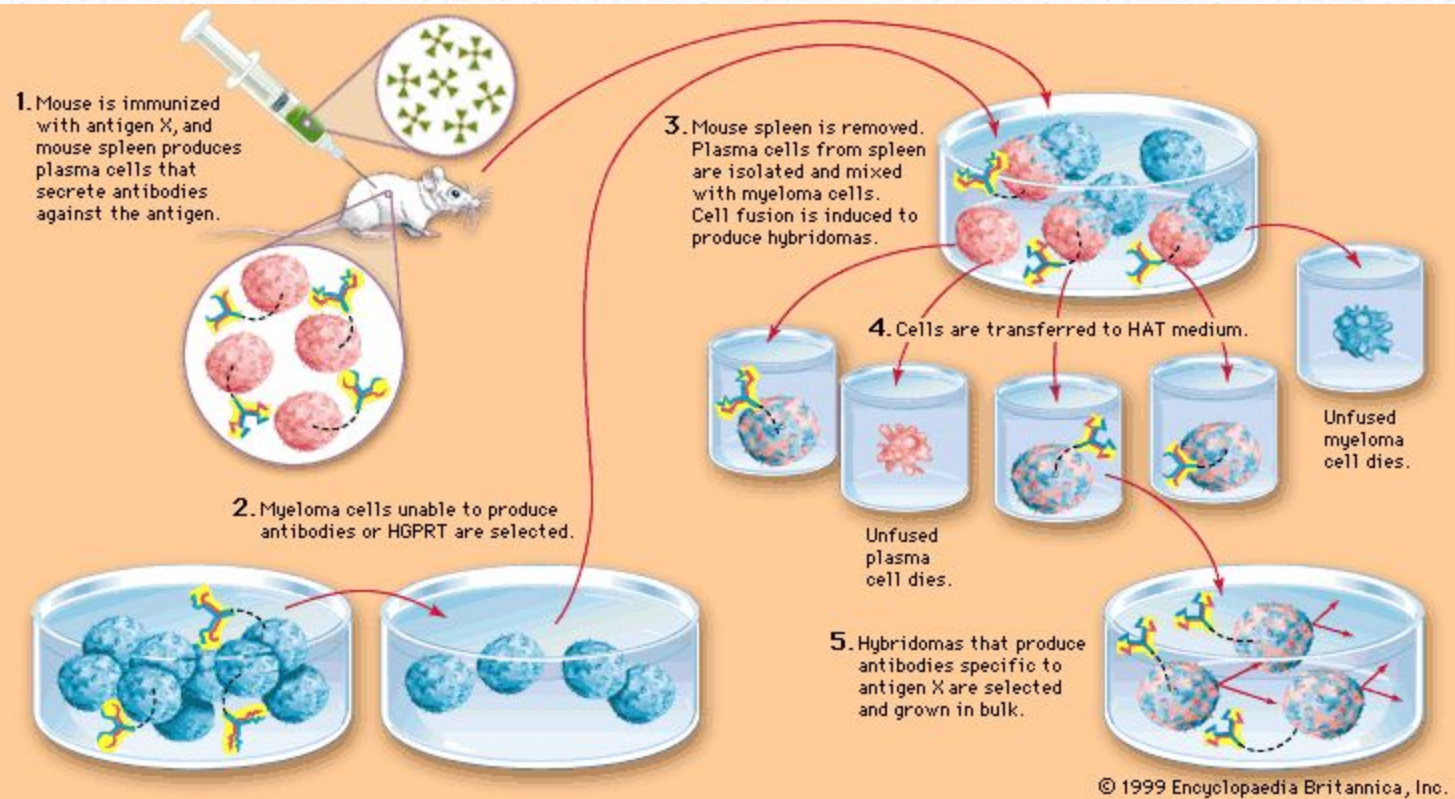




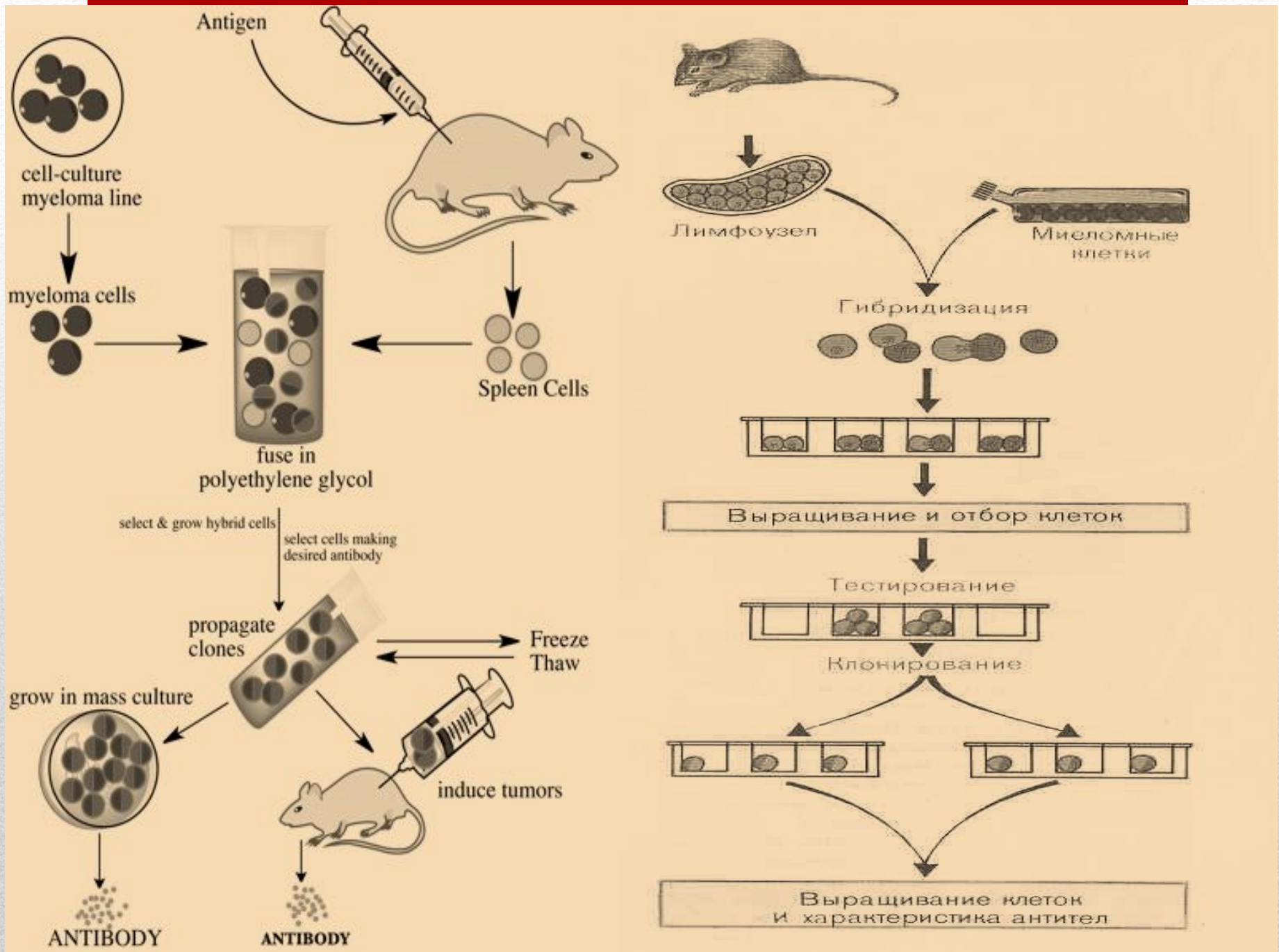
Гибридомаларды алу және моноклоналды антиденелерді бөліп алу



- Тышқандардың ішіне бір неше рет көп уақыт минерал майларымен әсер етіп, олардың ағзаларында миелома тұдырып, жұмысқа жарамды миеломды жасушаларды алады.
- Осы жасушаларды әдейленген зертханаларда да алады.
- Клондау жұмыстарын жалғастыру үшін ГАТ ортасына қоректік жасушалар ретінде 500 мл ортаға 10^8 көкбауыр жасушаларын және 10^6 перитонеалды жасушаларды салады.
- Суспензияны 1 мл-ден 96-ұялы панельге құйып көмірқышқыл инкубаторда 37 градуста ұстайды. Әр бір үш тәуліктен кейін ортаны ауыстырып отырып, жасушалардың өмірге жарамдығын тексереді. Дақылды сұйықтықта секреттейтін клон болса моноклоналды антиденелер жаратылады. Іріктеліп алынған гибридоманың клонын келесі микродақылдарда реклондайды. Дақылды сұйықтықтың құрамында моноклоналды антиденелер болса, оларды эксперименттерде, иммунодиагностикумдарды дайындау үшін биотехнологиялық үдірістерде қолданады.



© 1999 Encyclopaedia Britannica, Inc.



- Жұмыстарды ұйымдастыру және қолданылатын құрал-жабдықтар.
- Гибридомаларды алу жұмыстарын бөлек бөлмеде өткізеді.
- Келесі құрал-жабдықтар болу керек:
- Ламинарлы бокс.
- Бір белгілі мөлшерде ылғалды, температураны, көмірқышқыл газды ұстап тұратын инкубатор.
- Центрифуга.
- Микроскоптар.
- +4 және -200 градус ұстайтын холодильник.
- +37 және +560 градуста жұмыс істейтін су моншасы.
- Осыдан басқа бөлек бөлмеде жасұшалар сақтау үшін -700 градусты тоңазытқыш және сұйық азоты бар Дьюар ыдысы болу керек. Гибридомаларды алу үшін жасұшалардың дақылдарына арналған әдейленген пластикалы ыдыстарды дайындап қою керек.
- Олар: түбі тегіз 96-ұялы планшеталар, 24-ұялы планшеталар, көлемі
- 25, 75 см² пластикалы ыдыстар, культивирлеуге арналған орталар, керекті реактивтер.

комплекс антиген-антитело

липополисахарид поверхности патогена

1. классический путь
C1*
C4
C2*

2. альтернативный путь
C3
B*
D*

ранние компоненты

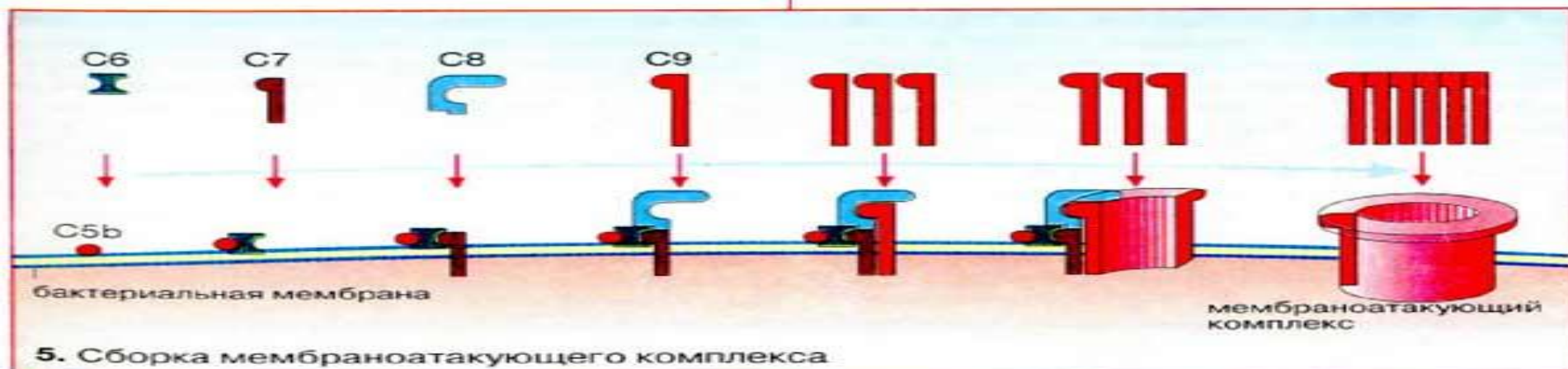
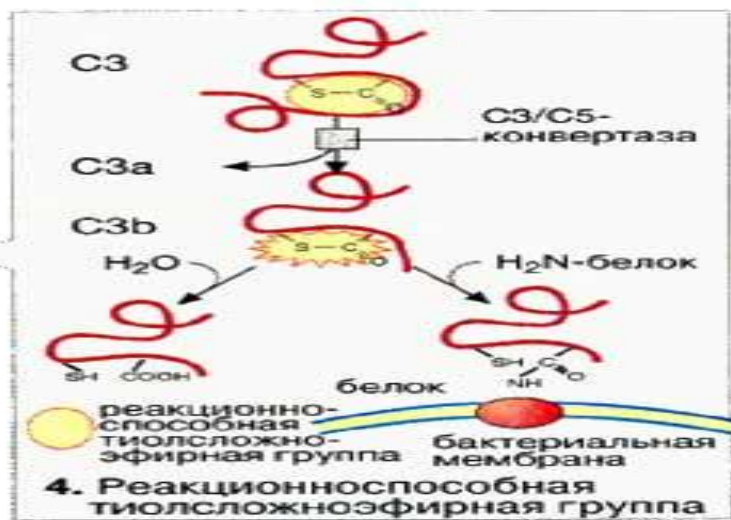
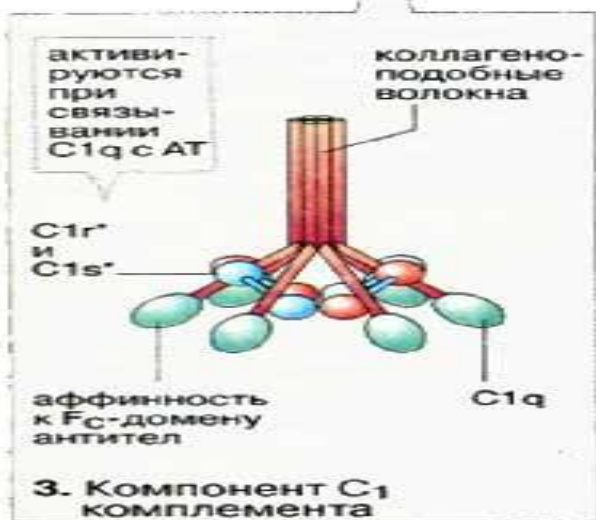
C3 / C5-конвертаза
3.4.21.43/47

C3
C3b

C3a
C4a
C5a

3. Компонент C1 комплемента
C5b
C6
C7
C8
C9

поздние компоненты



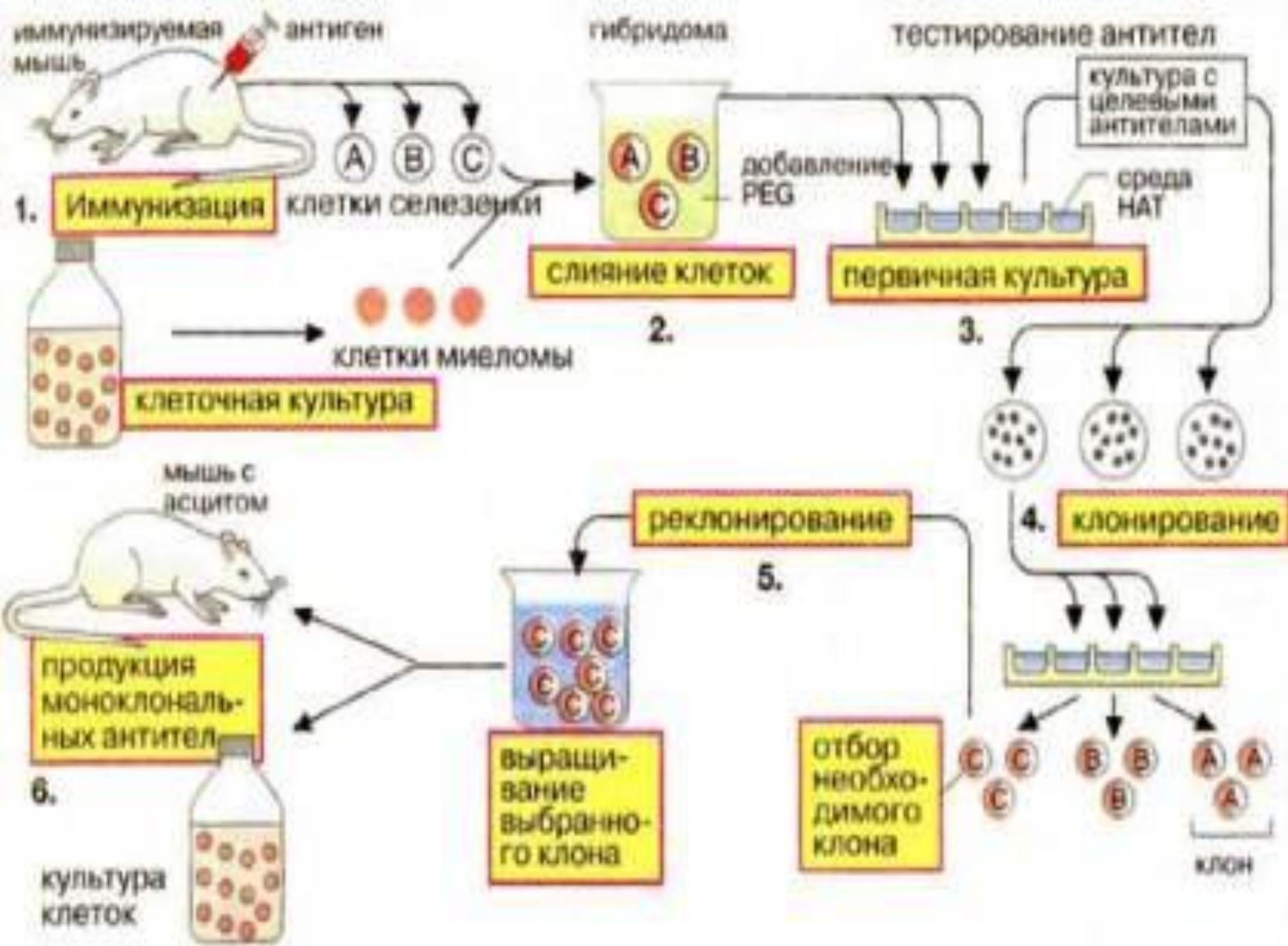
А. Активация комплемента

- Экспериментке жануарды таңдау.
- Иммунизацияға тышкандармен және егеу құйрықтылармен қолданады.
- Осы жануарлардың ағзаларында
- миеломды жасушалар жақсы өседі. Басқа жануарлармен қолданбайды.
- Реклондау – клондарды дамыту.
- Тірі қалған гибридомды жасушаларды олар иммуноглобулиндер шығара бастағанша
- реклондайды. Іріктеп алған гибридтік жасушаларды 1, 10, 100, 1000 жасушалардан
- ұяларға салады. Моноклоналды антиденелер 12 күннен кейін жаратыла бастайды.
- Керекті клонды 20 мл ГАТ ортасына салады, сол пассажда сақтайды. 5 – 15 пассаж
- өткеннен кейін моноклоналды антиденелердің мөлшері ең көп болады. Клонның
- өмірге жарамдығы қоректік ортаның қоректік жасушаларына байланысты.

- Моноклоналды антиденелерді шығаратын клондарды 5 - 10, қай бір кезде 30 пассажға дейін апарып дамытуға болады. Кейіннен олар өмірге жарамды болады, бірақ ерекше иммуноглобулиндерді синтездемейді. Антидене шығаратын клондардың көлемі антигендік препараттардың қасиетімен байланысты болып 2 - 20 пайыз құрайды. Клондар М- және G-класс иммуноглобулиндерді синтездейді.
- Іріктеліп алған клонды сақтау керек. Іріктелген клондардың бір бөлегін -70 градус құрамында МДСИ, 20 пайыз қанның сары суы, 10 пайыз диметилсульфоксид бар ортада қатырады. Екінші бөлегін осы ортада сұйық азотта сақтайды, клондың тағы бір бөлегін тышқандарда асцидтік ісік тұдыруға жібереді. Іріктелген клонды асықпай, абайлап, кезеңмен қатырады. Жасушаларды еріткенде жылдам 40 градуста су моншасында ерітеді.

• Асцидтік ісікті алу.

- Жануарлардан гибридомалар алу үшін, олардың қарындарының ішіне гибридтік жасұшалар жаратылу мақсатымен 0,5 мл тристан (тетраметилпептадекан) немесе Фрейнд адьювантын және тұзды буфердегі керекті клонның жуылған 1 – 2 мл (1 мл – 10 жасұша) жасұшаларын еңгізеді.
- Тышқанның ішінде ісік белгіленеді. Асцидтік сұйықтықта моноклоналды антиденелерді анықтайды.
- Тышқанның қанының сары суында және асцидтік сұйықтықта иммуноглобулиндердің көлемі 3 15 г/л, ал
- моноклоналды антиденелер – 50 мг/л. Бір тышқаннан 10 мл асцидтік сұйықтықты алады. Асцидтік сұйықтықты кейіннен тағын ісік алуға жіберуге болады (айына 1 рет) және серологиялық реакцияларда антигенді анықтағанда қолданады.



Моноклоналды антиденелерді тесттілеу.

- Моноклоналды антиденелерді анықтау үшін сезімталды тест-жүйелермен қолданады: радиоиммунологиялық, иммунофлуоресценттік, иммуноферменттік.
- Моноклоналды антиденелерді тесттілеуге арналған тест-жүйелердің компоненттері – тышқанның антисары суы және антигенді препараттар. Олар көп болу керек, неге десек, әр бір 3 күнде әр бір ұяның құрамын моноклоналды антиденелерін барына зерттейді. Осындай тесттілеуді сканирование деп атайды.
- Бірінші сканирование қосылу өткеннен кейін он екінші күнде өткізіледі. Он реакция беретін гибридті жасұшаларды пассажға ауыстырып, бір ұяда бір клон болғанша көлемін арттырады.

- Антиденлерді тазалау. Алынған дақылдың және асцидтік сұйықтықтың құрамында моноклоналды антиденелерден басқа компоненттер болады. Оларды жою керек.
- Иммуноглобулин М бөліп алғанда дақылды сұйықтықтың 100 мл 28 гр аммоний сульфатын салады (45 пайыздық ерітінді). Қоспаны 12 сағат 4 градуста сақтайды, 20 минут 10000 об/мин центрифугаттайды.
- Тұнбаны 45 пайызды аммоний сульфатымен жуады, 10 мл 0,05М тристан буферінде орнына келтіреді, сефароза бар хроматографиялық колонкасынан өткізеді, 0,1М альфаметилгликозиді бар 0,05М трисбуфермен жуады.
- Моноклоналды антиденелердің кейінгі қолдануы олардың титрімен, аффиндігімен, ерекшелігімен байланысты.

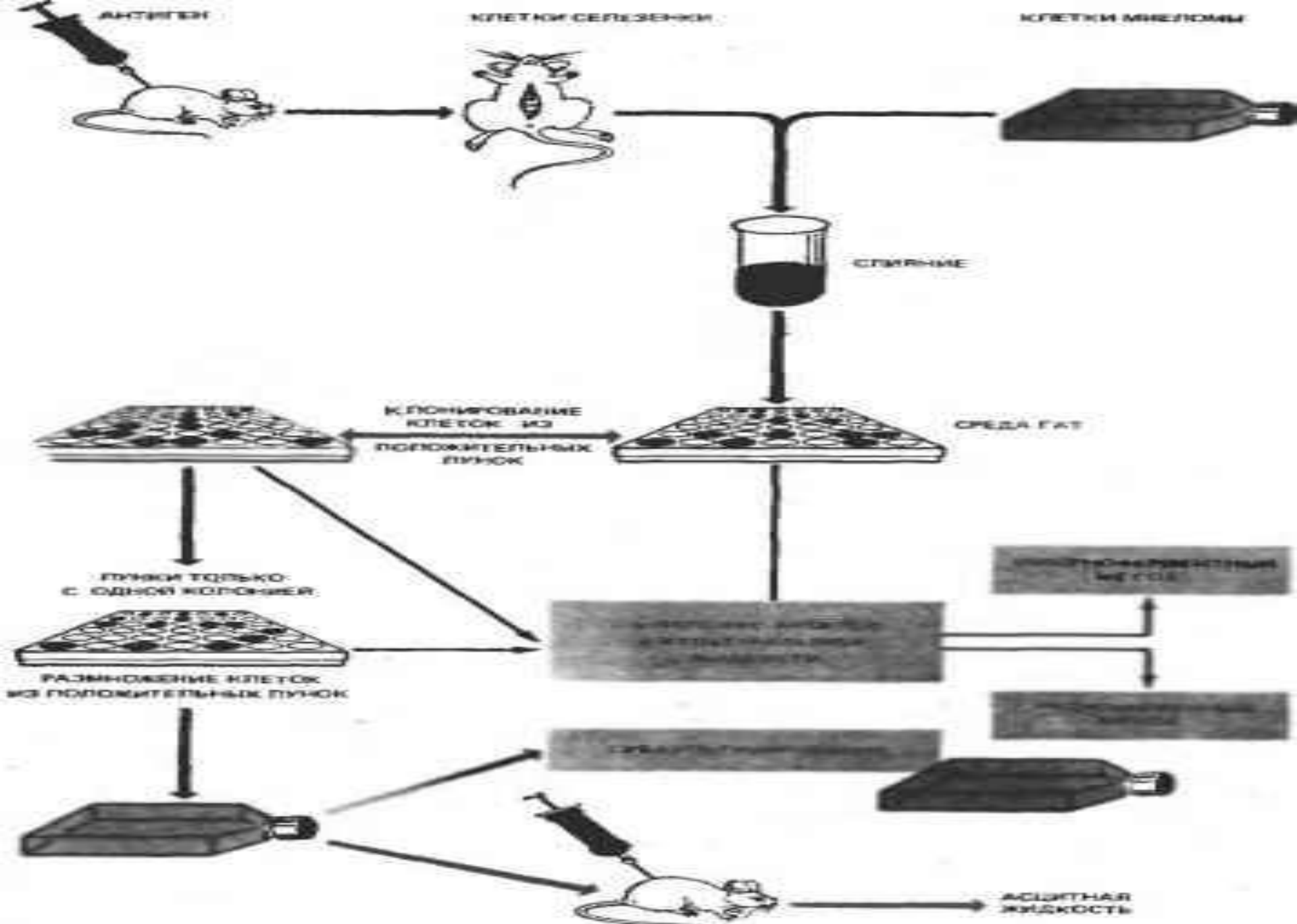


Рис. 43. Основные этапы получения гибридом, синтезирующих моноклональные антитела

- Афиндік – антидененің және антигенді детерминантаның қатнасу деңгейі. Моноклоналды антидененің титрі төмен, афиндігі әр түрлі болады.
- Иммунохимияда және аффинді хроматографияда төменаффинді моноклоналды антиденелермен қолдануға болады, бірақ ИФА сараптауға моноклоналды антидене жоғары аффинді болу керек.
- Диагностикалық мақсатымен моноклоналды антидененің бір неше клондарының кешендерін қолданады.
- Моноклоналды антиденелермен таза түрінде қолданбайды. Оларды ферменттермен және радиоизотоптармен таңбалап ИФА және РИА сараптауда қолданады.

• Қолданылған әдебиет

- Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М., Девришов Д.А. Иммунология.- М. Колос-Пресс, 2002.-408 с.
- Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А, Сидорович И.Г. Иммунология.- М.: Медицина, 2000.- 432с.
 - Радчук Н.А., Дунаев Г.В., Колычев Н.М. и др. Ветеринарная микробиология и иммунология.- М.: Агропромиздат, 1991.-383 с.
 - Алехин Р.М., Бакулов И.А., Третьяков А.Д. Ведерников В.А. и др. Руководство по общей эпизоотологии. Под ред. И.А.Бакулова, А.Д.Третьякова.- Москва: Колос.-1979.-с.30-88.
 - . Алешукина А.В. Медицинская микробиология. Ростов-на-Дону: «Феникс». -2003.
 - Микробиология и иммунология. Под ред. А.А.Воробьева. М.: «Медицина». -1999.
 - Муромцев Г.С. и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. Москва ВО «Агропромиздат». -1990.
 - Никитин Е.Б. Основы биотехнологии. Павлодар.-2004.
 - Гилберт С.. Биология развития. В 3-х томах. Биология развития. М. Мир. -1993.
 - Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М. Мир. -2002. 589 с.
 - Корочкин Л.И. Биология индивидуального развития(Генетический аспект) М. МГУ. -2002.- 264 с.
 - Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. 2-е изд. М. Высшая школа. -2003.
-