

Прикладные аспекты иммунологии

Получение антител

к.х.н., доцент кафедры
микробиологии
Герловский Денис Олегович

Минск, 2014

Процесс введения животному антигена по разработанной схеме называется **иммунизацией**, а сыворотка крови иммунизированных животных — **антисывороткой**. В литературе описано большое разнообразие способов иммунизации, зависящих от структуры антигена, его доступных количеств, вида животного и т. д. По этим причинам условия получения иммунных сывороток подбираются эмпирически. Тем не менее имеются общие закономерности, которые позволяют выбрать условия получения высокоактивных антисывороток.

Иммуногенность антигена - это способность антигенов в организме иммунизированного животного образовывать антитела. Иммуногенность как биологическое свойство антигена является более сложным, чем антигенность. Антигенности того или иного вещества недостаточно, чтобы вызвать образование антител.

Иммуногенность веществ сильно зависит от их молекулярной массы: чем выше молекулярная масса, тем выше иммуногенность. Отсюда вытекает важное практическое следствие - сшивка биополимеров (белков, полисахаридов) между собой и другими белками повышает иммуногенность.

Зависимость иммуногенности от молекулярной массы, по-видимому, определяется следующими причинами:

во-первых, увеличение времени пребывания антигена в организме при возрастании его молекулярной массы;

во-вторых, у высокомолекулярных антигенов существенно возрастает способность взаимодействовать с макрофагами;

в-третьих, с увеличением молекулярной массы в антигене увеличивается как общее количество антигенных детерминант, так и их разнообразие, что повышает эффективность взаимодействия антигенов как с В-, так и с Т-лимфоцитами.

Плотность расположения и количество антигенных детерминант на поверхности антигенов также имеет важное значение: по мере увеличения этих показателей иммуногенность в начале растет, а затем начинает уменьшаться. Так, например, для динитрофенильной гаптеновой группы было показано, что из конъюгатов, содержащих 3, 16 и 28 групп на молекулу бычьего альбумина, максимальной антигенностью обладал конъюгат, содержащий 16 молекул гаптена.

Очень важным является понятие «чужеродность» иммуногена. Установлено, что чем более антиген отличается по своей структуре от гомологичного антигена иммунизируемого животного, тем выше его иммуногенность. Например, инсулины человека и многих видов животных имеют близкую первичную структуру и поэтому для них инсулин человека малоиммуногенен. «Чужеродность» зависит от генетических особенностей иммунизируемого животного, поэтому часто иммуногенность связывают с генетической чужеродностью антигена.

Из лабораторных животных чаще всего берут для иммунизации кроликов, морских свинок или мышей в зависимости от количества имеющегося антигена, доступности животного и т. д. Возможность использования группы лабораторных животных позволяет решить проблему отбора из них наиболее иммунореактивных. Иммунизировать удобнее самцов, так как у них иммуногенный ответ менее подвержен влиянию гормональных циклов. Для получения антител против вирусов эффективными оказались куры, у которых антитела накапливаются в яйцах. Большие количества антисывороток получают иммунизацией крупных, животных: козлов, баранов, ослов, лошадей.

Для получения специфических антисывороток важное значение имеет гомогенность (чистота) антигена. Это обусловлено тем, что примеси чужеродных антигенов могут обладать большей иммуногенностью, чем основной антиген, в результате чего, несмотря на небольшое количество примеси, против нее может образоваться достаточное количество антител. Так, например, вирусные антигены, выделенные из культуры ткани животных, содержат примесь тканевых антигенов, против которых вырабатываются антитела, дающие ложноположительные реакции в иммунохимическом анализе.

Степень иммунного ответа также зависит от количества введенного антигена. При определенных концентрациях антигена, как высоких, так и низких, наступает торможение гуморального иммунного ответа, называемое толерантностью. Это обуславливает необходимость выбора оптимальной дозы в каждом конкретном случае, с учетом чистоты препарата и его иммуногенности. Доза иммуногена для одной инъекции кролику или морской свинке составляет в среднем 100—300 мкг на 2 кг массы.

Способ введения антигена (подкожно, внутривенно, в лимфатический узел, внутрибрюшинно) и периодичность введения влияют на иммунологическую активность антисывороток. Так как иммунный ответ формируется в организме постепенно, принято различать первичный ответ (после первого введения антигена) и вторичный ответ (после повторных инъекций антигена). Первичные и вторичные антисыворотки отличаются по составу антител и их специфичности. Обычно высокоактивные антисыворотки получают после нескольких циклов иммунизации. Однако очень длительные иммунизации могут привести к снижению специфичности из-за постепенного увеличения титра антител к примесным антигенам.

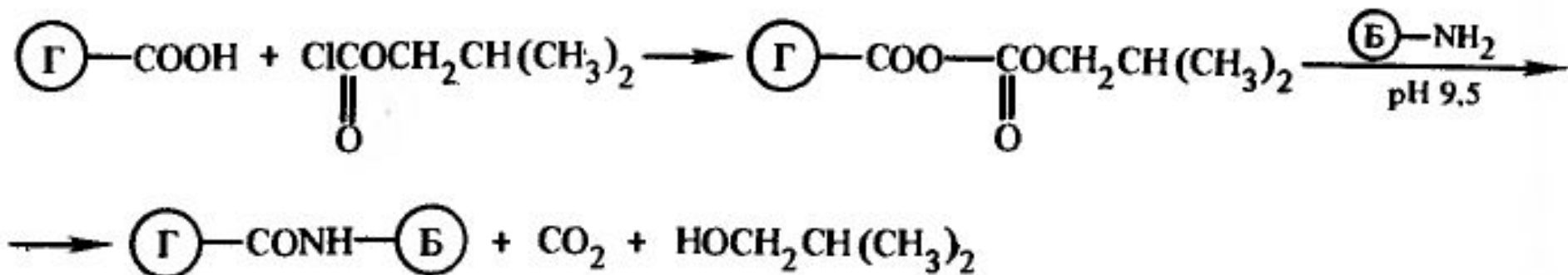
Синтез конъюгатов гаптен с носителями для получения антител

Для того чтобы гаптен обладал иммуногенными свойствами, необходимо получить конъюгат гаптена с высокомолекулярным носителем. В качестве носителей обычно используют бычий сывороточный альбумин (БСА), альбумин сыворотки человека, овальбумин, тироглобулин и синтетические пептиды типа полилизина. Особых преимуществ у какого-либо носителя не отмечено и поэтому чаще всего им является наиболее доступный белок — БСА.

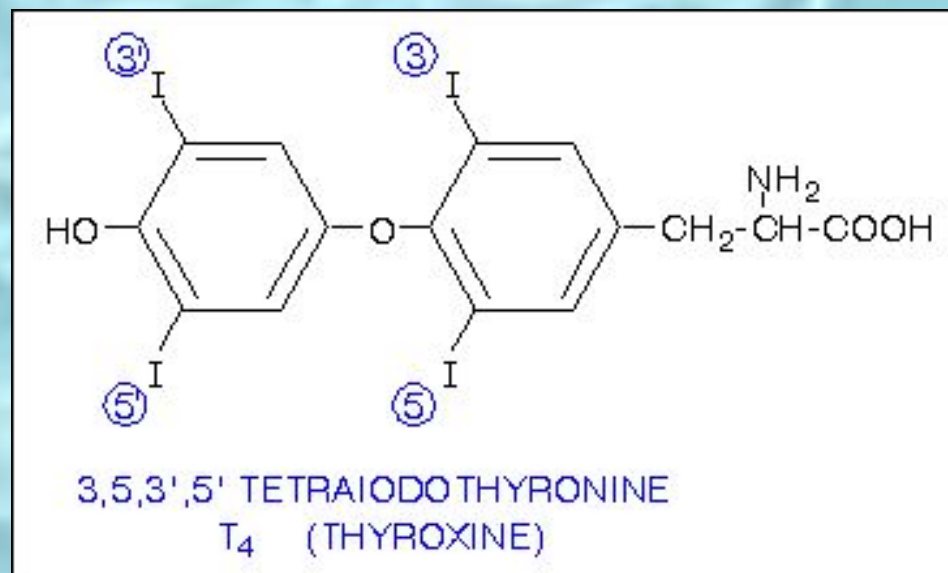
Известно несколько способов нахождения количества молекул гаптена, пришитых к носителю:

- спектрофотометрический способ
- электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия или по аминокислотному гидролизу конъюгата
- титрование свободных аминогрупп в исходном белке и конъюгате
- радиоизотопный метода, в котором используют меченный радиоактивным изотопом гаптен

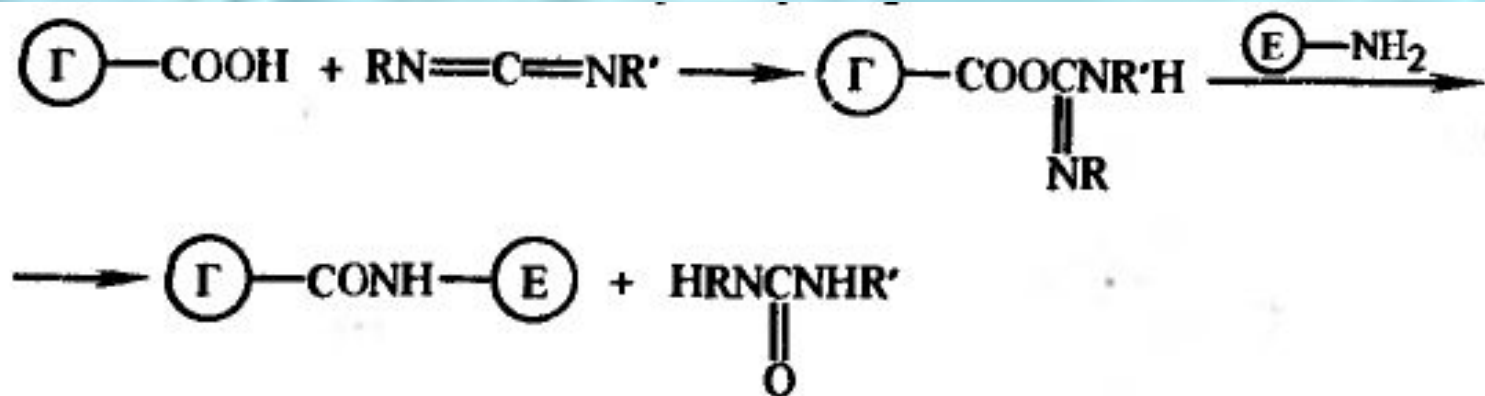
Получение конъюгатов-носителей с гаптенами, содержащими карбоксильную группу. Наиболее широко распространен метод смешанных ангидридов



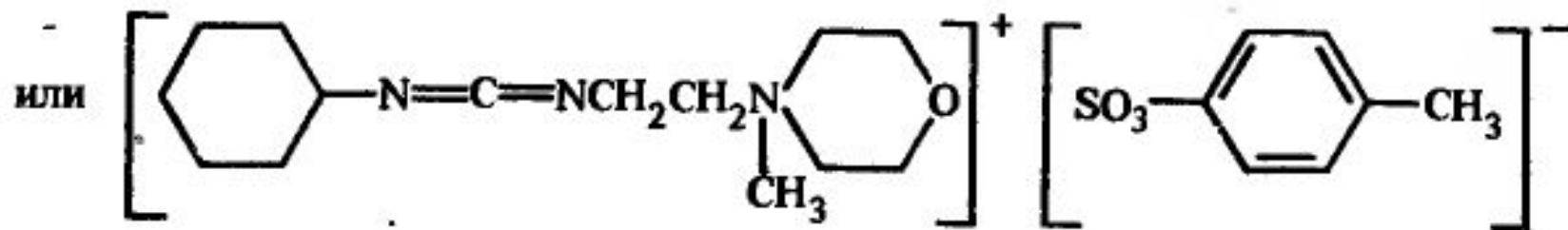
где Г – гаптен; Б – белок



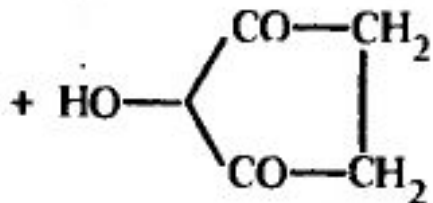
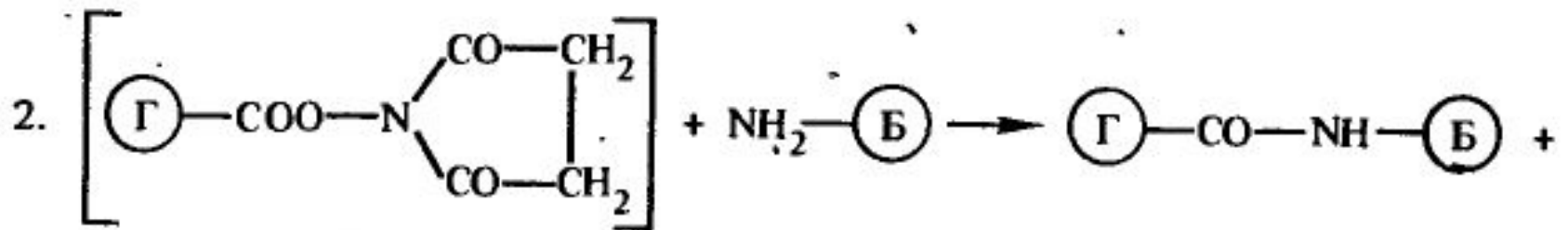
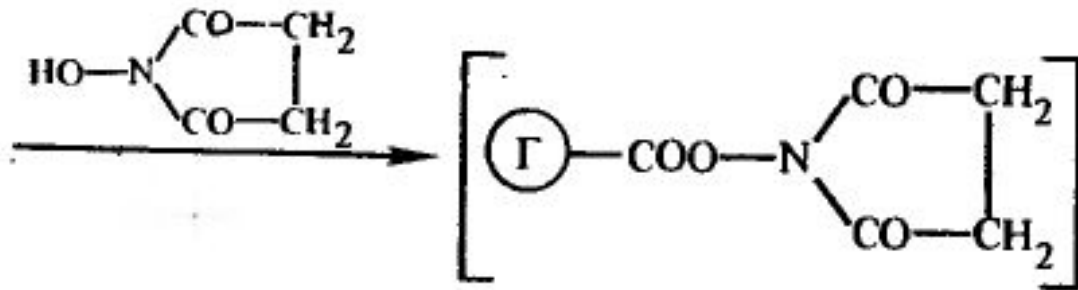
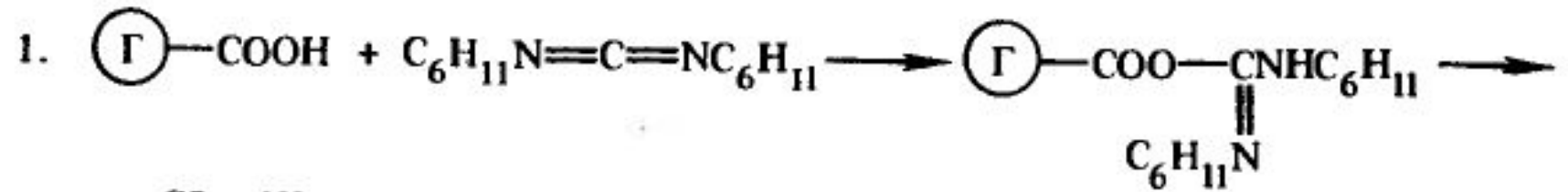
Конъюгаты могут быть получены и с помощью водорастворимых карбодиимидов



где $\text{RN}=\text{C}=\text{NR}'$: или $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}=\text{C}=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 \cdot \text{HCl}$;



Синтез конъюгата трийодтиронина — БСА.

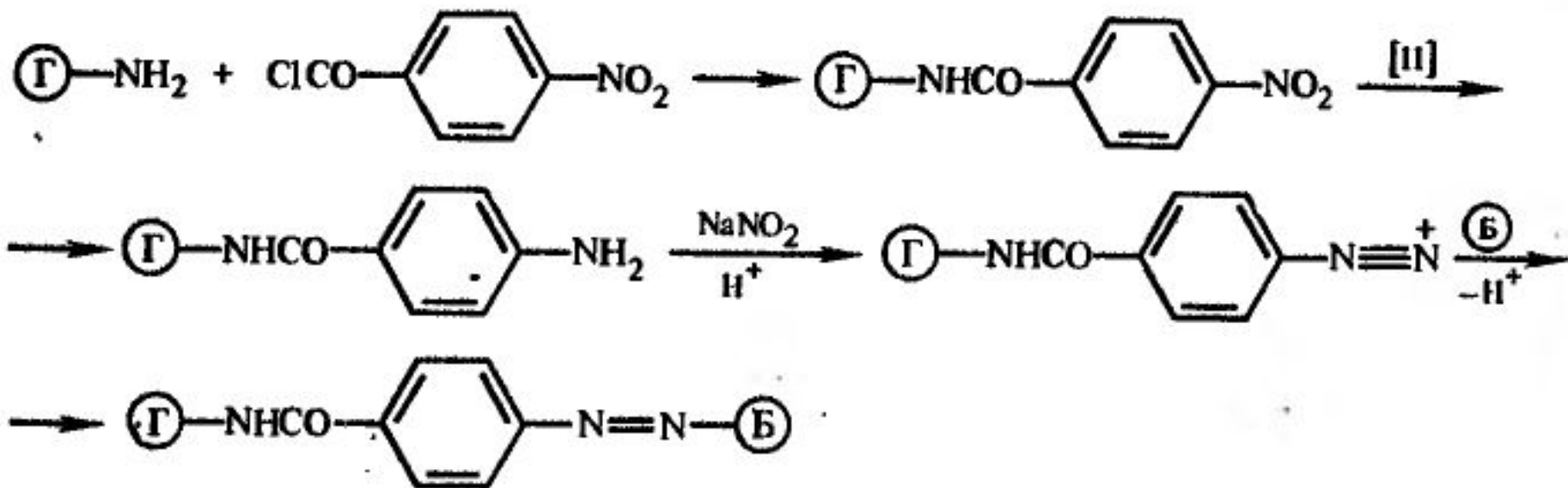


Получение конъюгатов-носителей с гаптенами, содержащими аминогруппу.

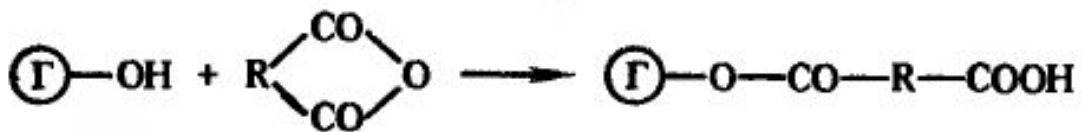
Ароматическая аминогруппа



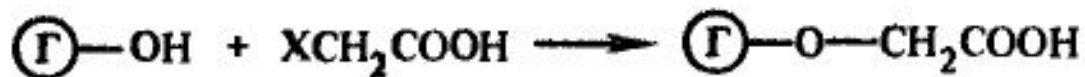
Алифатическая аминогруппа



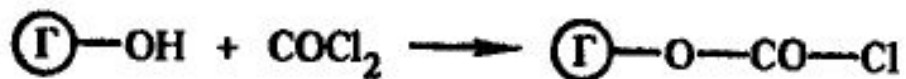
Получение конъюгатов-носителей с гаптенами, содержащими гидроксильную или карбонильную группу.



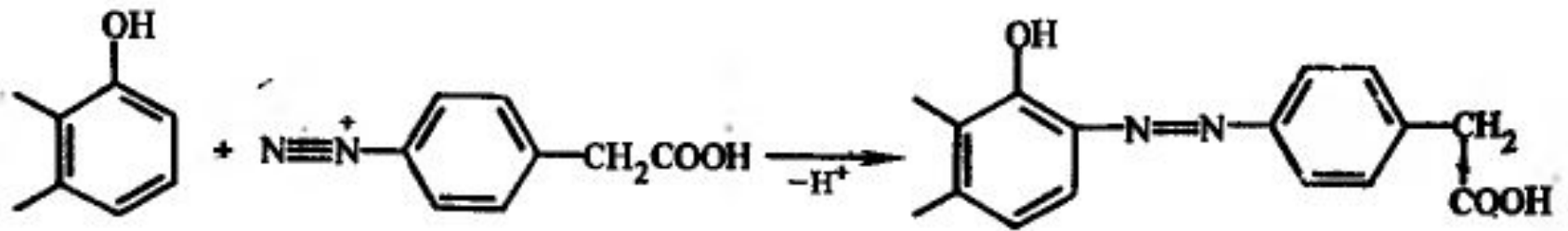
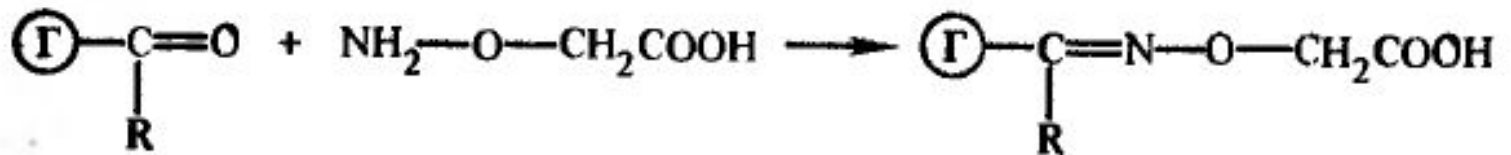
где R = $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—}$ (гемисукцинат) или —CH=CH— (гемималеат)



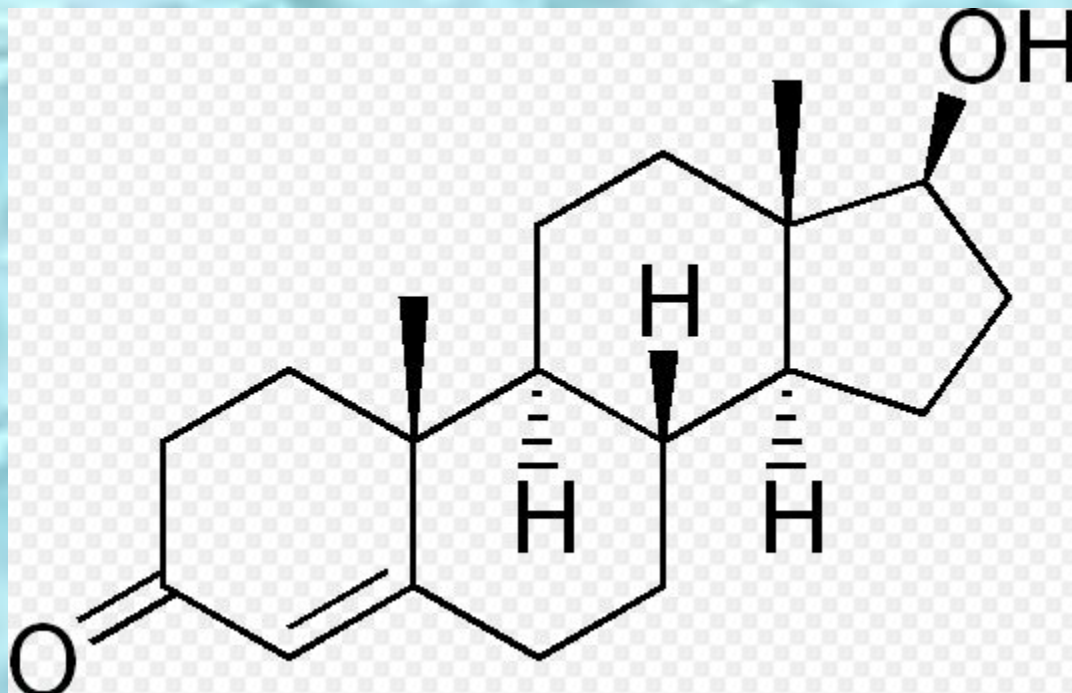
X = Br, I



Гаптены с карбонильными и фенольными группами



Тестостерон



Получение иммунных антисывороток

Адьюванты — это соединения, которые при введении в организм вызывают неспецифическое усиление иммунного ответа и тем самым повышают способность организма реагировать на любой иммуноген. Адьювантными свойствами обладают **масла, липосомы, клетки бактерий, полимеры и др.** Адьюванты, введенные в организм вместе с иммуногеном, выполняют две функции: **во-первых**, они способствуют более медленному освобождению иммуногена из участков инъекции, что замедляет его поступление в кровоток, в результате чего увеличивается вероятность встречи иммуногена с иммунокомпетентными клетками, а также резко снижается его токсичность. **во-вторых**, адьюванты вызывают сильное воспаление в месте введения иммуногена, при этом активируется фагоцитоз и стимулируется местная циркуляция лимфоцитов, происходит неспецифическая стимуляция иммунокомпетентных клеток. Для усиления такой неспецифической иммуностимуляции в состав адьювантов дополнительно включают препарат бактериальных клеток рода *Bacillus pertussium*. В настоящее время для целей иммунизации широко применяется коммерческий препарат полного адьюванта Фрейнда, в состав которого входят смесь **минеральных масел, эмульгатор и убитые микобактерии.**

Препарат адьюванта можно приготовить в лабораторных условиях, тщательно смешав три части минерального масла, одну часть безводного ланолина, четыре части 0,15 М К-фосфатного буфера и препарат микобактерий до конечной концентрации 10 мг/мл так, чтобы частички микобактерий равномерно распределились по всему объему. Адьювант смешивают с водным раствором иммуногена в отношении 2:1 до образования нерасслаивающейся эмульсии, в которой водный раствор иммуногена находится в мицеллах (вода в масле).

Способы иммунизации. Введение иммуногена приводит к активации лимфоидных клеток, расположенных вблизи от места инъекции. Наиболее эффективно вводить иммуноген малыми порциями в большое количество точек. Введение иммуногена можно осуществлять различными способами.

Внутрикожное введение. На очищенном от шерсти участке кожи животного делают острым скальпелем несколько царапин, а затем втирают в это место раствор иммуногена (25 мкл). Применение этого способа позволяет получать высокий иммунный ответ уже после однократного введения, в результате чего значительно сокращается расход иммуногена.

Подкожная иммунизация. В точки, расположенные вдоль позвоночника животного, вводят 5—6 порций раствора иммуногена объемом приблизительно 2 мл.

Внутримышечное введение. Одновременно часть иммуногена вводят в мышцу задних ног животного и небольшими порциями.

Внутрибрюшинное введение. Этот способ используют для иммунизации мелких лабораторных животных, таких, как мыши или морские свинки.

Прямое введение иммуногена в лимфатические узлы. Иммуноген инъецируют в лимфоидные узлы, расположенные в подколенной ямке задних ног кролика, что позволяет уменьшить его количество до 10—50 мкг, а объем вводимого раствора — до 25 мкл.

Внутривенное введение. Этот способ обычно применяется для повторных инъекций, после которых проводят отбор крови у животного. Раствор иммуногена вводят непосредственно в кровоток (в вену уха кролика, в яремную вену барана или козы). Адьювант в этом способе введения антигена не применяется, поскольку он оказывает токсический эффект и животное может погибнуть.

Более редко используются такие способы иммунизации, как введение иммуногена в подушечки лап или в конъюнктиву глаза, которые вызывают сильные болевые ощущения у животного.

Выделение и очистка антител

Для увеличения относительного количества антител обычно используют γ -глобулиновую или IgG-фракции иммунной сыворотки. Наиболее полное выделение γ -глобулиновой фракции без снижения ее иммунологической активности достигается при осаждении сульфатом аммония (30% от насыщенного раствора), после чего осадок длительно диализуется с частой сменой буферных растворов.

Другим широко распространенным способом является осаждение полиэтиленгликолем с $M_r = 4000—6000$. В 10%-ном растворе полиэтиленгликоля происходит агрегация всех белков с $M_r > 150000$, в результате чего осаждаются белки γ -глобулиновой фракции, а белки меньшей молекулярной массы остаются в растворе. (Обычно используют двухкратное осаждение 20%-ным раствором полиэтиленгликоля)

С целью повышения чувствительности и специфичности анализа во многих случаях полезно использовать для сорбции на твердой фазе и для получения конъюгатов IgG-фракцию нативной сыворотки. Наиболее простой и доступный способ выделения IgG — метод ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе или ДЭАЭ-целлюлозе.

Спасибо за внимание