

Разработка стратегии получения рекомбинантных одноцепочечных антител против поверхностных клеточных биомаркеров на примере антигена CD34 человека

Ю. С. Николаев, О. Б. Горбатюк¹, М. В. Цапенко

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины АМН Украины»
Ул. Вышгородская, 67, Киев, Украина, 04114

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 60, Киев, Украина, 01033

ulian_s@ukr.net

Антитела против поверхностных клеточных белков выполняют важную функцию в процедурах детектирования, определения стадии дифференциации и выделения целевых популяций клеток. Поверхностные клеточные антигены часто имеют сложную структуру внеклеточного участка молекулы, характеризующуюся сильным гликозилированием и стабилизированную дисульфидными связями. При этом получение антител против таких белков является нетривиальной задачей. Цель. Разработать стратегию получения рекомбинантных антител против поверхностных клеточных биомаркеров. Методы. Конструирование библиотеки кДНК генов V_H и V_L иммуноглобулинов животных, иммунизированных рекомбинантным антигеном, и использование биопеннинга на антиген-позитивных клетках для обогащения исходной библиотеки последовательностями целевых антител. Детектирование и отбор клонов – продуцентов целевых антител осуществляли с помощью высокопродуктивных автоматизированных систем. Результаты. Получена панель из пяти антител, распознающих антиген на поверхности CD34-позитивных клеток. Выводы. Предложенная стратегия может быть использована для получения антител против поверхностных клеточных антигенов.

Ключевые слова: CD34, фаговый дисплей, рекомбинантные одноцепочечные антитела (ScFv), био-пеннинг.

Введение. Детектирование и отбор разнообразных популяций клеток из общего пула лейкоцитов крови проводят, используя в качестве маркеров белки, специфически представленные на поверхности клеток данной популяции, обозначаемые CD (Cluster of Differentiation).

CD34 был открыт в результате использования стратегии получения антител против антигенов на

поверхности небольших субпопуляций лейкоцитов человека [1]. Он представляет собой сильно гликозилированный поверхностный клеточный белок с молекулярной массой около 110 кДа.

В дальнейшем было показано, что CD34 можно использовать для детектирования и выделения из костного мозга и периферической крови популяции клеток, обеспечивающих возобновление гематопоеза у летально облученных животных при трансплантации [2]. В настоящее время он является

одним из трех основных маркеров гематопозитических стволовых клеток.

В молекулярном отношении CD34 представляет собой трансмембранный белок первого типа, содержащий внеклеточный домен со сложной структурой, включающей сильно гликозилированный N-концевой участок, а также глобулярный участок, стабилизированный тремя дисульфидными связями. Такое разнообразие антигенных детерминант в составе молекулы обуславливает широкий спектр антител, способных распознавать данные антигенные детерминанты.

В настоящее время основными способами получения антител против широкого спектра антигенов являются гибридная технология и технология фагового дисплея. Дисплей одноцепочечных рекомбинантных антител (single-chain fragment variable – scFv) на поверхности бактериофага M13 имеет ряд преимуществ перед гибридной технологией: у него более высокая производительность, и его использование направлено на получение большего количества и разнообразия целевых антител, в том числе антител, отсутствующих в иммунном репертуаре животных-доноров. Кроме того, стандартными молекулярно-биологическими манипуляциями могут быть сконструированы разные форматы рекомбинантных антител, пригодных для экспрессии клетками как про- так и эукариотов.

При получении набора антител, обладающих различной эпитопной специфичностью и аффинностью (панели антител), часто используют иммунные библиотеки переменных генов иммуноглобулинов. Преимуществом иммунных библиотек кДНК является изначальное обогащение библиотеки последовательностями антиген-специфичных антител. Кроме того, благодаря аффинному дозреванию последовательностей целевых антител в результате иммунизации с высокой долей вероятности удастся выделить высокоаффинные рекомбинантные антитела из исходной библиотеки [3].

Целью данной работы была разработка стратегии получения рекомбинантных одноцепочечных антител против поверхностных клеточных биомаркеров на примере антигена CD34 человека.

Материалы и методы. Генно-инженерные манипуляции с ДНК проводили согласно методам,

описанным в руководстве [4]. Иммунизацию мышей рекомбинантным внеклеточным фрагментом CD34 человека (rhExCD34), а также конструирование комбинаторной библиотеки кДНК переменных генов иммуноглобулинов осуществляли, как описано в работе [5].

Фаговую библиотеку получали по инструкции к набору реактивов «Expression Module Recombinant Phage Antibody System» («Amersham Biosciences», Швеция). Клетки линии KG1 миелобластоидного происхождения (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН) культивировали в среде RPMI1640 («Sigma», США), содержащей 20 %-й раствор эмбриональной бычьей сыворотки («Invitrogen», США). Клетки линии SP2/0-Ag14 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10 %-ю эмбриональную бычью сыворотку.

Клонирование и получение rhExCD34 в очищенной растворимой форме. Фракцию поли-А(+) РНК выделяли из клеток KG1 с использованием набора реактивов «QuickPrep Micro mRNA Purification Kit» («GE Healthcare», Великобритания) согласно рекомендациям производителя. кДНК синтезировали в реакции обратной транскрипции с помощью вырожденных гексануклеотидных праймеров. Полученная кДНК служила матрицей для ПЦР с праймерами Sense-CD34 (5'-ATC TGA ATT CAT ATG ATG AGT CTT GAC AAC AAC GG-3') и Antisense-CD34 (5'-TCA ATC TCG AGG GTC TTT TGG GAA TAG CTC T-3'), содержащими сайты эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *XhoI* соответственно.

Аmplификацию проводили при следующих условиях: 30 циклов при температуре 95 °С в течение 30 с; 55 °С – 30 с, 72 °С – 60 с. Полученную ДНК гидролизировали соответствующими рестриктазами, лигировали с вектором *pET-24a+* и использовали для трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3). Для экспрессии rhExCD34 клетками *E. coli* применяли модифицированный протокол аутоиндукции [6].

Рекомбинантный антиген rhExCD34 очищали и ренатурировали из телец включения методом иммобилизационной металл-аффинной хроматографии (IMAX) [7].

Селекция фаговой библиотеки. $1,4 \cdot 10^{11}$ фаговых частиц ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, 0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4 , pH 8,0), содержащего 1 %-й бычий сывороточный альбумин (БСА) («Sigma») и 1 мМ ЭДТА (ФСБ/БСА/ЭДТА), затем смешивали с $2 \cdot 10^7$ клеток KG1 в 200 мкл ФСБ/БСА/ЭДТА. Суспензию инкубировали в течение 1 ч при температуре 4 °С, промывали ФСБ/БСА/ЭДТА, ресуспендировали в 400 мкл ФСБ/БСА и делили на две равные части. Полученную суспензию клеток использовали для выделения целевых фаговых клонов по схемам селекции А и Б (схему селекции Б проводили согласно методике, описанной в [8]), селекцию на рекомбинантном антигене проводили по схеме В:

А – клетки осаждали центрифугированием при 400 g (5 мин), ресуспендировали в 200 мкл ФСБ/БСА, содержащем разведенную в 10 раз сыворотку иммунизированных rhExCD34 мышей. Инкубацию проводили в течение 20 мин при комнатной температуре, клетки осаждали центрифугированием. Супернатант вносили в 1 мл суспензии клеток TG1 в логарифмической фазе роста ($A_{600} \sim 0,4-0,5$) в среде $2 \times \text{YT}$ (17 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1 %-й раствор глюкозы ($2 \times \text{YT-AG}$), и инкубировали (1 ч, 37 °С).

В – в иммунологическую пробирку фирмы «Nunc» вносили раствор rhExCD34 с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Места неспецифической сорбции блокировали инкубацией с ФСБ, содержащим 0,1 %-й твин-20 (ФСБТ), на протяжении 30 мин. Далее в пробирку вносили $7 \cdot 10^{10}$ фаговых частиц, ресуспендированных в ФСБТ, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Пробирку с иммобилизованными фаговыми частицами промывали 10 раз ФСБТ и 2 раза – ФСБ, затем фаги элюировали инкубацией с клетками TG1 (1 ч, 37 °С).

После инкубации элюированных фагов с клетками TG1 аликвоты суспензии клеток рассеивали на чашки Петри для подсчета количества элюированных фаговых частиц. Оставшуюся суспензию клеток использовали для реамплификации библиоте-

ки, как описано в руководстве к «Expression Module Recombinant Phage Antibody System».

Скрининг фаговой библиотеки. Клетки *E. coli*, полученные после селекции, с помощью системы Colony Picker QPixII («Genetix», США) помещали в 384-луночные полистироловые планшеты фирмы «Nunc» в 100 мкл среды $2 \times \text{YT-AG}$, наращивали в течение 14 ч при $t = 30$ °С и хранили при температуре 4 °С для дальнейшего использования в качестве стоковой культуры. Для индукции экспрессии суспензию клеток соответствующих клонов из стоковой культуры переносили в среду $2 \times \text{YT-AG}$ и наращивали в течение 4 ч при $t = 30$ °С. Клетки осаждали центрифугированием, супернатант отбирали, клетки ресуспендировали в среде $2 \times \text{YT}$, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 1 мМ изопротил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Индукцию экспрессии проводили в течение 12–14 ч при $t = 30$ °С, клетки осаждали и использовали для получения периплазматических экстрактов по [9].

Внесение и отбор культуральных сред и клеточных суспензий при иммуноанализе клонов осуществляли с помощью системы Hydra System («Robbins», США). Связывание антител из периплазматических экстрактов с антигеном на поверхности клеток KG1 и rhExCD34 тестировали методами FMAT (Fluorometric Microvolume Assay Technology) и иммуноферментного анализа (ИФА) соответственно. ИФА проводили, как описано в [5].

FMAT-анализ: в раствор RPMI1640 («Sigma») содержащий 20 %-ю эмбриональную бычью сыворотку («Invitrogen»), вносили анти-E-tag-антитела, конъюгированные с Alexa 633. Раствор антител помещали в 384-луночные планшеты, оптимизированные для FMAT («Applied Biosystems», США). В соответствующие лунки вносили периплазматические экстракты, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого добавляли суспензию клеток KG1 и инкубировали на протяжении 4 ч в CO_2 -инкубаторе ($t = 37$ °С). Флуоресценцию клеток измеряли на приборе FMAT 8100 HTS («Applied Biosystems»). Связывание ScFv с rhExCD34 в растворе визуализировали, определяя их взаимодействие в присутствии rhExCD34 с поверхностным клеточным антигеном по снижению интенсивности флуоресценции. Специфичность свя-

звания антител с белками на поверхности клеток KG1 выявляли инкубацией с клетками SP2/0-Ag14.

Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток KG1. Суспензию клеток KG1 наносили на предметные стекла, фиксировали в парах формалина. Препараты последовательно инкубировали с периплазматическими экстрактами и антителами против метки E-tag, коъюгированными с пероксидазой хрена. Окрашивали с использованием красителя 3, 3'-диаминобензидина («Sigma»).

Анализ связывания ScFv с клетками KG1 методом проточной цитометрии. Периплазматические экстракты разводили буфером ФСБ до конечной концентрации ScFv 2 мкг/мл, смешивали с мышинными анти-E-tag-антителами и инкубировали в течение 20 мин при $t = 4^\circ\text{C}$. Клетки KG1 ($5 \cdot 10^5$ на пробу) осаждали центрифугированием (400 g, 5 мин, 4°C), ресуспендировали в буфере ФСБ/BCA/ NaN_3 (ФСБ, содержащий 1 % BCA и 0,02 % азида натрия) и инкубировали (40 мин, 4°C) с приготовленными растворами антител. Клетки промывали буфером ФСБ/BCA/ NaN_3 и инкубировали с антителами против иммуноглобулинов мыши, коъюгированными с ФИТЦ (F(ab')₂-FITC, «Sigma»).

Связывание ScFv с клетками анализировали, используя проточный цитофлуориметр EPICS XL («Beckman Coulter», США). Контролем аутофлуоресценции для канала ФИТЦ служила суспензия неокрашенных клеток. Экспрессию маркера CD34 клетками KG1 определяли с помощью ФИТЦ-коъюгированных моноклональных антител против CD34 (клон 581, «Beckman Coulter»). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения BD FACS Diva 6.1.2.

Результаты и обсуждение. Ранее для получения и очистки поликлональных антител против поверхностного клеточного маркера CD34 мы успешно использовали негликозилированный рекомбинантный внеклеточный фрагмент молекулы (rhExCD34), полученный экспрессией в клетках *E. coli*. Поскольку рекомбинантный антиген сохраняет ряд антигенных детерминант, свойственных нативному CD34, представляется возможным выделить ScFv, используя для иммунизации животных – доноров rhExCD34. В связи с этим первым этапом работы стало получение иммунной комби-

наторной библиотеки вариабельных участков иммуноглобулинов мыши.

Для синтеза кДНК V-генов и конструирования библиотеки использовали мРНК из селезенок трех иммунизированных мышей (титр специфичных антител в сыворотках 1:256000). После стандартных манипуляций по составлению библиотеки подсчетом трансформантов определена ее представленность – $1,8 \cdot 10^6$ индивидуальных клонов. Функциональный размер библиотеки, отражающий процент клонов, несущих полноразмерную вставку ScFv-ДНК, составил около 90 % проанализированных клонов ($n = 19$). Для дальнейшей работы библиотека была упакована в бактериофаг M13KO7.

Чтобы получить рекомбинантные антитела, специфичные к поверхностному клеточному антигену, в процедурах биопеннинга обычно применяют клетки антиген-позитивных линий [10, 11]. Поэтому для эффективного отбора антител против поверхностного клеточного антигена в процедурах биопеннинга использовали клетки CD34⁺ линии KG1. Для получения наибольшего спектра целевых антител в дальнейшей работе использовали две схемы биопеннинга на клетках. Первая схема (А) позволяет проводить направленный отбор антител, распознающих эпитопы, перекрывающиеся с эпитопами, распознаваемыми полученными нами поликлональными антителами. Согласно схеме А, после инкубации фаговой библиотеки с клетками фаги элюировали, добавляя в клеточную суспензию сыворотки иммунизированных мышей как источник антиген-специфичных антител.

Вторая схема селекции (Б) предполагает выделение всех фаговых частиц, специфически связавшихся с поверхностным клеточным антигеном. Ее использование *a priori* позволяет получить более широкий спектр антител, связывающихся с целевым антигеном, по сравнению с предыдущей схемой селекции. Эта процедура состоит в нанесении инкубационной смеси клетки-фаги на органическую фазу (дибутилфталат:циклогексан, о/о = 9:1) с последующим центрифугированием. При этом клетки с фаговыми частицами, специфически связавшимися с поверхностным клеточным антигеном, проходят сквозь органическую фазу и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. В то же

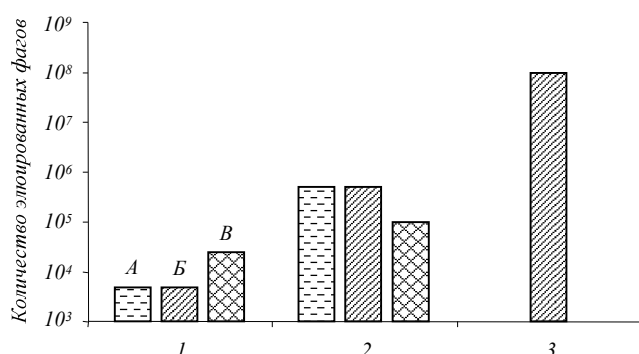


Рис. 1. Оценка количества элюированных фаговых частиц в зависимости от цикла и схемы биопеннинга: 1–3 – циклы селекции; А, Б, В – схемы биопеннинга

время бактериофаги, неспецифически связавшиеся с клетками, остаются в водной фазе [11].

Кроме того, чтобы проверить эффективность использования ghExCD34 в процедурах биопеннинга для получения антител против данного клеточного антигена, проводили селекцию библиотеки на иммобилизованном ghExCD34 (по схеме В). Связавшиеся с антигеном фаговые частицы после биопеннинга по схемам селекции Б и В элюировали, инкубируя их с суспензией клеток *E. coli*, как описано в [10]. Предполагается, что таким образом смываются фаговые частицы с экспонированными на поверхности высокоаффинными ScFv, что не всегда возможно при элюции как кислым, так и щелочным буфером [12].

После очередного раунда селекции оценивали количество элюированных фаговых частиц по каждой из схем селекции. Как видно из рис. 1, во всех последующих циклах селекции повышалось количество элюированных фаговых частиц. Это свидетельствует о целенаправленном обогащении популяции фаговых клонов, экспонирующих антитела, специфичные к клеточным антигенам, на поверхности клеток KG1 (либо к ghExCD34 при использовании схемы В).

Дальнейшая работа была направлена на отбор клонов – продуцентов антител, связывающихся с антигенами, представленными на поверхности клеток CD34⁺ линии KG1. Для этого исследовали связывание антител, продуцируемых случайным образом отобранными клонами после двух циклов селекции по схемам А и В (А2 и В2), а также после

второго и третьего циклов селекции по схеме Б (Б2 и Б3), с антигенами на поверхности клеток линии KG1 с помощью FMAT-анализа. Контролем в эксперименте служили клетки линии SP2/0-Ag14. Среди проанализированных клонов, полученных после селекции по схемам А2 ($n = 250$) и Б2 ($n = 250$), отобраны четыре и 11 клонов соответственно, связывающихся с поверхностным клеточным антигеном на клетках KG1. Из 96 клонов, селекционированных по схеме Б3, восемь взаимодействовали с антигеном на поверхности клеток KG1. Для антител, полученных по схеме В2, связывания с клеточным антигеном не наблюдалось.

Взаимодействие с иммобилизованным ghExCD34 анализировали методом ИФА. При этом связывание с антигеном отмечено для 208 антител из изученных клонов ($n = 384$), отобранных по схеме В2. В то же время связывания антител, продуцируемых клонами, отобранными с помощью селекции на клетках, не зафиксировано.

Различия в связывании антител, полученных с помощью указанных выше схем селекции, можно объяснить эпигенетическими отличиями в структуре рекомбинантного и нативного CD34. Вследствие гликозилирования клеточного антигена сайты связывания антител, отобранных по схеме В, могут быть заблокированы. И наоборот, в результате биопеннинга на клетках CD34⁺ могут выделяться антитела, не способные связываться с негликозилированным, ренатурированным *in vitro* rhExCD34. Таким образом, отсутствие взаимодействия антител при использовании схемы биопеннинга В с клеточным антигеном демонстрирует неэффективность данной схемы селекции для получения антител против нативного CD34.

На основании данных FMAT-анализа отобраны 23 клон, для которых детектировалось связывание продуцируемых антител с антигеном на поверхности клеток KG1. Отличия в последовательностях ScFv-ДНК выделенных клонов предварительно анализировали методом фингерпринта (данные не представлены). В итоге среди отобранных последовательностей антител выявлены три рестрикционные картины. Все они представлены среди клонов, отобранных по схеме Б2, две из них – по схеме А2. В то же время клоны, отобранные по схеме биопен-

нинга Б3, ограничены всего одной рестрикционной картиной. Это, а также низкий уровень связывания антител, полученных по схеме Б3, с антигеном на клетках KG1 позволяют предположить элиминирование в третьем цикле биопеннинга клонов с более низким уровнем продуцирования фагов.

То есть, по-видимому, при использовании высокопродуктивных систем скрининга клонов проведение третьего цикла селекции нецелесообразно, поскольку может вызывать снижение разнообразия последовательностей ScFv в полученной панели антител.

По итогам секвенирования 12 последовательностей ScFv–ДНК из клонов, полученных по схемам селекции А2 и Б2, выявлены пять вариантов последовательностей генов, кодирующих различные полипептидные продукты. В аминокислотном составе полипептидных последовательностей данных ScFv обнаружены существенные отличия. Все пять последовательностей антител представлены среди клонов, отобранных по схеме селекции Б2, две из них – по схеме А2. Полученные результаты хорошо демонстрируют особенности использованных схем селекции, описанные выше.

Далее исследовали связывание антител с антигеном на поверхности фиксированных и интактных клеток KG1. Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток CD34⁺ выявило взаимодействие полученных антител с поверхностным клеточным антигеном для всех пяти антител (рис. 2, см. вклейку). Связывание с антигеном на поверхности живых клеток KG1 определяли методом проточной цитометрии (рис. 3, см. вклейку). Внесение rhExCD34 в инкубационную среду антител с клетками в качестве конкурентного антигена не приводило к изменению интенсивности флуоресценции образцов. Это свидетельствует об отсутствии в составе rhExCD34 антигенных детерминант, распознаваемых полученными антителами в составе нативного поверхностного клеточного антигена.

Отсутствие в панели ScFv антител, способных распознавать антигенные детерминанты в составе рекомбинантного и нативного CD34, демонстрирует необходимость использования дополнительных схем селекции при получении указанных антител. Применение описанных выше схем селекции, по-

видимому, приводит к элиминации последовательностей таких антител в процессе обогащения фаговой библиотеки.

Таким образом, иммунизацией мышей рекомбинантным негликозилированным внеклеточным фрагментом CD34 и последующими генно-инженерными манипуляциями получена библиотека вариабельных участков иммуноглобулинов, содержащая $1,8 \cdot 10^6$ индивидуальных клонов, с функциональным размером ~90 %. Для обогащения библиотеки использованы схемы селекции с применением клеток CD34⁺, позволяющие получить наибольшее разнообразие последовательностей целевых антител. Показано, что фагмидная ДНК отобранных клонов – продуцентов ScFv кодирует пять последовательностей антител, имеющих отличия в вариабельных участках легкой и тяжелой цепей. Полученные антитела можно использовать для детектирования антиген-позитивных клеток в методах иммуноцитохимии и проточной цитометрии. Специфичность связывания данных антител с поверхностным клеточным маркером CD34 требует дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность В. М. Кирику за проведение и интерпретацию результатов метода проточной цитометрии.

Iu. S. Nikolaiev, O. B. Gorbatiuk, M. V. Tsapenko

The development of strategy for obtaining single-chain recombinant antibodies against cell-surface biomarkers on the example of human CD34

State Organization of Genetic and Regenerative Medicine
NAMS Ukraine

67, Vyshgorodska Str., Kyiv, Ukraine, 04114

Taras Shevchenko National University of Kyiv
64, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033

Summary

Antibodies against cell-surface proteins play an important role in cell detection, separation and determination of differentiation stage. The globular structure of extracellular region of cell-surface antigens is frequently characterized by heavily glycosylation and/or is stabilized by disulphide bonds. In this case the obtaining of antibodies against such proteins is a substantive problem. Aim. The development of strategy for obtaining recombinant antibodies against cell-surface biomarkers. Methods. The research strategy is based on the construction of cDNA library of V_H and V_L genes of animals, immunized with recombinant antigen, and subsequent cell-based bio-panning for the library enrichment with desired phage clones.

High-throughput automated systems were used for the detection and isolation of antigen-specific clones. Results. We have obtained a panel of five antibodies that recognize an antigen on CD34⁺ cell surface using the methods of immunocytochemistry and flow cytometry. Conclusions. The proposed strategy may be used for obtaining antibodies against cell-surface antigens.

Keywords: CD34, phage display, single-chain recombinant antibodies (ScFv), biopanning.

Ю. С. Николаєв, О. Б. Горбатюк, М. В. Цапенко

Розробка стратегії одержання рекомбінантних однокланцюгових антитіл проти поверхневих клітинних біомаркерів на прикладі антигену CD34 людини

Резюме

Антитіла проти поверхневих клітинних білків відіграють важливу роль у процедурах детектування, визначення стадії диференціації та виділення цільових популяцій клітин. Поверхневі клітинні антигени часто мають складну структуру зовнішньоклітинної ділянки молекули, яка характеризується сильним глікозилюванням та стабілізується дисульфідними зв'язками. При цьому одержання антитіл проти таких білків є нетривіальною задачею. Мета. Розробка стратегії одержання рекомбінантних антитіл проти поверхневих клітинних біомаркерів. Методи. Конструювання бібліотеки κДНК генів V_H та V_L імуноглобулінів тварин, імунізованих рекомбінантним антигеном, та використання біопенінгу на антиген-позитивних клітинах для збагачення вихідної бібліотеки послідовностями цільових антитіл. Детектування та відбір клонів – продуцентів цільових антитіл здійснювали за допомогою високопродуктивних автоматизованих систем. Результати. Одержано панель з п'яти антитіл, що розпізнають антиген на поверхні клітин CD34⁺, методами імуноцитохімії та проточної цитометрії. Висновки. Запропоновану стратегію можна використовувати для одержання антитіл проти поверхневих клітинних антигенів.

Ключові слова: CD34, фаговий дисплей, рекомбінантні однокланцюгові антитіла (ScFv), біопенінг.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Fackler M. J., Schwartz J. F., Shaper J. H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a

monoclonal antibody raised against KG-1a cells // *J. Immunol.*—1984.—**133**, N 1.—P. 156–165.

2. Berenson R. J., Andrews R. G., Bensinger W. I., Kalamasz D., Knitter G., Buckner C. D., Bernstein I. D. Antigen CD34⁺ marrow cells engraft lethally irradiated baboons // *J. Clin. Invest.*—1988.—**81**, N 3.—P. 951–955.

3. Azzazy H. M., Highsmith W. E., Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations // *Clin. Biochem.*—2002.—**35**, N 6.—P. 425–445.

4. Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E. F. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. publ., 1982.—545 p.

5. Pavlova M. V., Gilchuk P. V., Pokholenko Ya. O., Nikolayev Yu. S., Kordium V. A. Construction and characterization of immune cDNA combinatorial antibody library of mouse variable immunoglobuline genes // *Cytology and Genetics.*—2008.—**42**, N 2.—P. 10–15.

6. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // *Protein Expr. Purif.*—2005.—**41**, N 1.—P. 207–234.

7. Gilchuk P. V., Okunev O. V., Irodov D. M., Pavlova M. V., Yakovenko O. Ya. Immobilized single chain antibodies for affinity purification of recombinant human IFN-α2b // *Biopolym. Cell.*—2006.—**22**, N 2.—P. 157–161.

8. Giordano R. J., Cardo-Vila M., Lahdenranta J., Pasqualini R., Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands // *Nat. Med.*—2001.—**7**, N 11.—P. 1249–1253.

9. Gilchuk P. V., Okunev O. V., Irodov D. M., Pavlova M. V. Overproduction of single-chain antibodies against human IFN-α2b in *Escherichia coli* and its obtaining in biologically active form // *Ukr. Biochem. J.*—2006.—**78**, N 1.—P. 163–171.

10. Lipes B. D., Chen Y. H., Ma H., Staats H. F., Kenan D. J., Gunn M. D. An entirely cell-based system to generate single-chain antibodies against cell surface receptors // *J. Mol. Biol.*—2008.—**79**, N 2.—P. 261–272.

11. Huie M. A., Cheung M. C., Muench M. O., Becerril B., Kan Y. W., Marks J. D. Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**, N 5.—P. 2682–2687.

12. de Bruin R., Spelt K., Mol J., Koes R., Quattrocchio F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries // *Nat. Biotechnol.*—1999.—**17**, N 4.—P. 397–399.

UDC 57.083.3
Received 02.09.10

Figures to article by Iu. S. Nikolaiev et al.

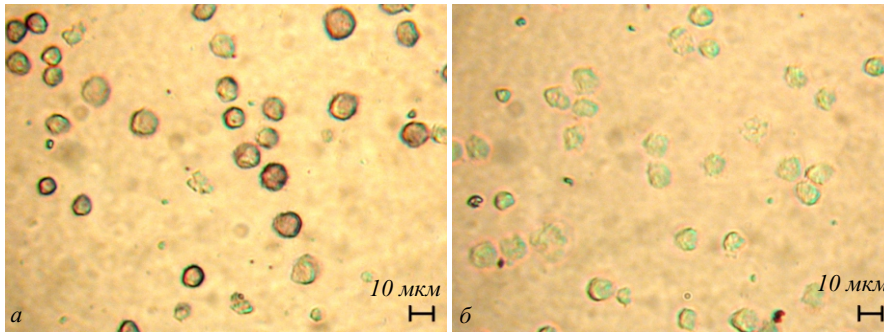


Рис. 2. Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток KG1: *а* – типичная микрофотография препарата клеток, окрашенных с использованием полученных ScFv; *б* – микрофотография клеток, инкубированных со вторичными и третичными антителами без ScFv (контроль специфичности)

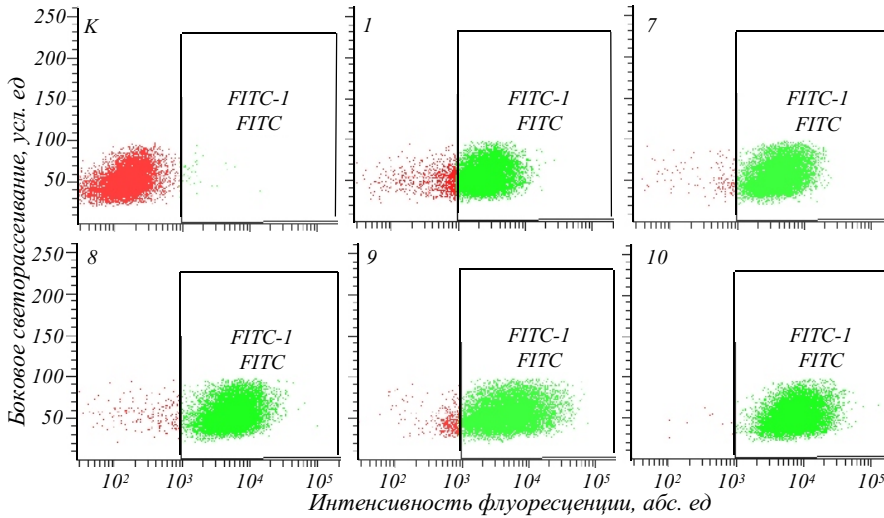


Рис. 3. Оценка связывания ScFv с клетками KG1 методом проточной цитометрии: *К* – контроль аутофлуоресценции клеток; *1, 7, 8, 9, 10* – связывание с клетками ScFv, отличающихся аминокислотными последовательностями и экспрессирующихся клонами № 1, 7, 8, 9, 10. Гейтом обозначен участок гистограммы, условно отделяющий окрашенные клетки от неокрашенных