Получение моноклональных антител к термолабильному энтеротоксину эшерихий Серебряков, Сергей Николаевич

ОГЛАВЛЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

кандидат биологических наук Серебряков, Сергей Николаевич

ВВЕДЕНИЕ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Причины возникновения кишечных инфекций.

1.2. Факторы патогенности Е.соП.

1.2.1.Адгезины энтеротоксигенных эшерихий.

1.2.2.Энтеротоксины эшерихий.

1.2.2.1.Термолабильный энтеротоксин.

1.2.2.2.Строение и свойства 1Т.

1.2.2.3. Иммунологические свойства 1Т.

1.2.2.4.Генетический контроль синтеза 1Т.

1.2.3.Характеристика энтеротоксинов эшерихий других типов.

1.2.4.Методы определения 1Т.

1.2.4.1. Биологические методы определения 1.Т.

1.2.4.2.Иммунохимические методы определения !Т.

1.2.4.3.Другие методы детекции 1.Т.

1.3.Гибридомная техника.

1.3.1.Применение моноклональных антител.

1.3.2. Перспективы исследований.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1.Иммунизация животных.

2.2.Получение гибридом.

2.2.1.Ведение клеточных культур.

2.2.2.Слияние клеток.

2.2.3.Клонирование гибридом.

2.2.4.3амораживание клеток.

2.2.5.Размораживание клеток.

2.3.Получение препаративных количеств мкАт.

2.4.0чистка мкАт.

2.5. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

2.6.Изоэлектрическое фокусирование в полиакриламидном геле.

2.7.Иммуноферментный анализ с использованием пероксидазы хрена.

2.7.1.Приготовление субстрата пероксидазы хрена-о-фенилендиамина(ОФД).

2.7.2.Непрямой метод иммуноферментного анализа.

2.7.3. Приготовление конъюгата мкАт с пероксидазой хрена.

2.7.4.Двухцентровой метод иммуноферментного анализа.

2.7.5.Определение оптимального буфера для нанесения мкАт. 55 2.8.0пределение константы связывания.

2.9. Определение изотипа мкАт с помощью двойной иммунодиффузии по Ухтерлони.

2.10. Связывание мкАт с антигеном в растворе.

2.10.1.Анализ связывания мкАт с меченым антигеном.

2.11.Конъюгирование белков с ВгС1Ч-активированной сефарозой.

2.11.1. Конъюгирование антигенов с ВгСЫ-активированной сефарозой.

2.11.2. Конъюгирование антител с ВгСЫ-активированной сефарозой.

2.12.Приготовление высокоспецифичных антител кролика к иммуноглобулинам мыши и НИ.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.

3.1. Получение гибридом, продуцирующих мкАт против термолабильного энтеротоксина Е.соП.

3.1.1. Определение оптимальных условий слияния клеток.

3.1.2. Результаты слияния клеток для получения гибридом, продуцирующих мкАт против термолабильного энтеротоксина Е.соП.

3.2. Получение препаративных количеств, оценка и характеристика мкАт против НИ.

3.2.1. Получение препаративных количеств и очистка мкАт.

3.2.2. Определение изотипов и изоэлектрической точки мкАт.

3.3. Исследование полученных мкАт методом ИФА.

3.3.1.Конъюгирование иммуноглобулинов с ПХ.

3.3.2.Получение конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с ПХ.

3.3.3. Определение константы связывания мкАт.

З.ЗАХарактеристика поликлональных антисывороток против 1-Т11.

3.3.5. Определение оптимальных условий посадки мкАт на пластик.

З.З.б.Определение антигенных регионов, против которых направлены полученные мкАт.

3.3.7.Выбор оптимальной формы хранения стандарта

1.171.

3.3.8. Определение оптимального блокирующего белка.

3.3.9. Определение оптимальных концентраций ОФД и Н202 субстратного раствора ИФА.

3.4.Возможности практического использования мкАт.

3.4.1 .Тест-система для определения ИЬ.

3.4.2.Конъюгирование антител с ВгСМ-активированной сефарозой.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВЫВОДЫ.