



УДК 57.083

НОВЫЙ ПРОСТОЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ КОЛИЧЕСТВ МЕЧЕНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОДБОРА ПАР В СЭНДВИЧ-ВАРИАНТЕ ИФА

© 2015 г. М. М. Зарипов*, Г. В. Афанасьева*, К. А. Глухова*, Ю. А. Тризна*, А. С. Глухов*, И. П. Белецкий**, О. В. Прусакова*,#

*ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3

**ООО “Инноград Пущино”, г. Пущино

Поступила в редакцию 12.11.2014 г. Принята к печати 12.12.2014 г.

Разработан простой и быстрый метод получения меченых моноклональных антител (мкАТ) из культуральной жидкости гибридом в количествах, достаточных для подбора пар антител в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа (ИФА) и определения их аффинности. Метод основан на предложенном впервые подходе, который заключается в аффинном связывании мкАТ из культуральной жидкости гибридом с молекулами антигена, сорбированными в 8-луночном планшете, и последующем кратковременном мечении образованных комплексов биотином. На примере мкАТ к рекомбинантному белку вируса осповакцины А27L показано, что количества меченных таким образом антител в лунке достаточно для проверки 25 потенциальных партнеров в сэндвич-варианте ИФА. Метод позволяет экономично и эффективно осуществлять подбор пар мкАТ, не имея больших количеств культуральной или асцитной жидкости и без проведения процедур выделения антител.

Ключевые слова: моноклональные антитела, сэндвич-вариант ИФА, биотин, вирус осповакцины.

DOI: 10.7868/S0132342315030124

ВВЕДЕНИЕ

Гибридомная технология, разработанная Г. Келером и С. Мильштейном еще в 1975 г. [1] успешно применяется во многих лабораториях в мире в своем первоначальном формате. Получение специфических моноклональных антител (мкАТ), как правило, требует серьезных усилий исследователей и финансовых ресурсов, не говоря уже об элементе удачи. В настоящее время вся процедура получения мкАТ занимает в лучшем случае около 70 дней. При необходимости получения мкАТ для сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (ИФА), который требует наличия пары антител, неконкурентно связывающих антиген, временные и материальные затраты увеличиваются многократно. Традиционно поиск пар-кандидатов включает в себя получение достаточно большой представительной панели гибридом-продуцентов антигенспецифических мкАТ, наработку больших объемов культуральной или асцитной жидкости,

выделение мкАТ в миллиграммовых количествах, мечение очищенных антител и проведение множества иммуноферментных реакций в сэндвич-варианте. В связи с этим разработка подходов, позволяющих ускорить и упростить процедуры получения аналитических количеств меченых моноклональных антител для подбора пар в сэндвич-варианте ИФА, является актуальной задачей.

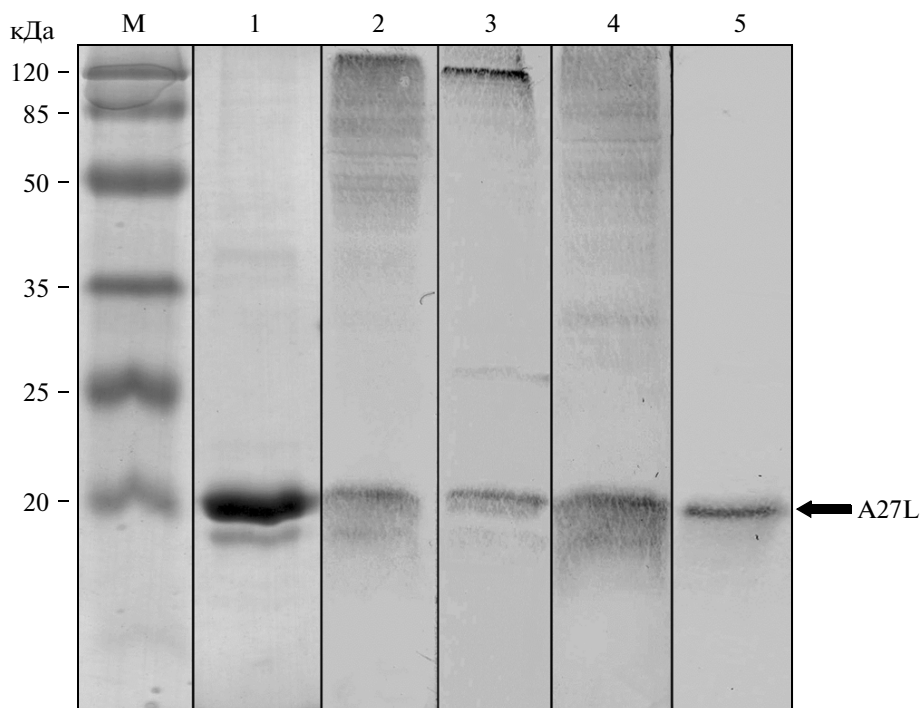
Цель настоящего исследования состояла в разработке простого и быстрого метода получения меченых моноклональных антител из культуральной жидкости гибридом в количествах, достаточных для подбора пар антител в сэндвич-варианте ИФА. В качестве антигена был использован рекомбинантный белок А27L (рА27L) вируса осповакцины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки метода использовали 25 моноклональных антител из гибридомных клонов, положительно отвечающих на рА27L. В качестве примера на рисунке представлены результаты иммуноблоттинга 4 из 25 использованных мкАТ. Подобное окрашивание было получено и для остальных клонов. Концентрация антител в куль-

Сокращения: мкАТ – моноклональные антитела; рА27L – рекомбинантный белок А27L вируса осповакцины; ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор, ООЕ – оспообразующие единицы.

Автор для связи (тел.: +7 (4967) 73-94-41; факс: +7 (4967) 33-05-53; эл. почта: o_proussakova@mail.ru).



Электрофореграмма (дорожка 1) и иммуноблот (дорожки 2–5) очищенного рекомбинантного белка осповакцины рА27L. Визуализация рА27L на иммуноблоте с помощью мкАТ 3.13 (дорожка 2), мкАТ 8 (дорожка 3), мкАТ 11.17 (дорожка 4), мкАТ 3.4 (дорожка 5), специфичных к рА27L. М – маркер молекулярной массы белков (Fermentas).

туральных жидкостях гибридом варьировала от 20 до 50 мкг/мл.

Для подбора оптимальных условий биотинилирования была проверена эффективность мечения в различных буферных системах. Для этого процедура биотинилирования сукцинимидным эфиром биотина была выполнена в трех различных буферных растворах: фосфатно-солевом, боратном и карбонат-бикарбонатном. Оказалось, что при параллельном титровании препаратов мкАТ, биотинилированные в ФСБ, показывают максимальный сигнал по сравнению с мкАТ, биотинилированными в других буферных системах. Все последующие эксперименты по подбору пар в сэндвич-варианте ИФА проводили с мкАТ, биотинилированными в ФСБ. Следует отметить, что только половина антител использованной панели эффективно биотинилировалась. Мы предположили, что различная эффективность мечения может быть связана с различной аффинностью антител. Для того чтобы установить эту связь, аффинность антител была измерена методом Битти и др. [2] (таблица). Оказалось, что эффективное конъюгирование характерно, прежде всего, для антител с константой диссоциации 10^{-9} – 10^{-10} .

Для подбора пар в сэндвич-варианте ИФА использовали те же мкАТ из 25 гибридомных клонов, положительно отвечающих на рА27L, и 12 биотинилированных антител с $K_d \sim 10^{-9}$ – 10^{-10} .

В результате было обнаружено более 150 пар мкАТ-антител, пригодных для сэндвич-варианта ИФА. Отобранные пары мкАТ были проверены в непрямом сэндвич-варианте ИФА с использованием вируса осповакцины в качестве антигена. Оказалось, что 104 пары анти-рА27L-мкАТ способны выявлять вирус осповакцины (таблица). Среди них 4 пары анти-рА27L-мкАТ позволяют обнаруживать вирусные частицы в концентрации 10^3 ООЕ/мл в сэндвич-варианте ИФА.

Таким образом, разработан простой и быстрый метод получения высокоаффинных меченных биотином моноклональных антител из культуральной жидкости гибридом в количествах, достаточных для подбора пар антител в сэндвич-варианте ИФА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ДНК, кодирующую А27L, синтезировали методом ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами, как было описано ранее [3]. Для конструирования праймеров использовали последовательность, аннотированную в базе данных GenBank (NC 006998). Конечный продукт ПЦР содержал на 5'- и 3'-концах участки расщепления для эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI соответственно. кДНК-фрагмент А27L клонировали в вектор рЕТ29b+ (Novagen). Правильность последова-

Активность пар первичных (мкАТ №№) и биотинилированных мкАТ (№-био) в сэндвич-варианте ИФА, выраженная в значениях ОП₄₉₀

К _Ф , М	мкАТ, №№	1-био	2.10-био	2.14-био	3.4-био	8-био	11.17-био	14-био	64-био	102-био	180-био	188-био	G12/2-био
1.7 × 10 ⁻¹⁰	1	–	0.245 ± 0.008	0.331 ± 0.009	0.218 ± 0.014	0.318 ± 0.016	0.189 ± 0.008	0.188 ± 0.01	0.533 ± 0.011	0.245 ± 0.011	0.209 ± 0.022	0.212 ± 0.01	0.201 ± 0.012
3.3 × 10 ⁻¹⁰	2.10	1.166 ± 0.034	–	0.264 ± 0.008	0.274 ± 0.013	0.277 ± 0.01	0.254 ± 0.013	0.205 ± 0.005	0.432 ± 0.012	0.241 ± 0.017	0.224 ± 0.013	0.241 ± 0.014	0.234 ± 0.023
5.5 × 10 ⁻⁸	2.13	0.554 ± 0.027	1.131 ± 0.002	0.977 ± 0.013	1.44 ± 0.019	1.106 ± 0.014	1.34 ± 0.012	0.344 ± 0.007	1.012 ± 0.011	1.324 ± 0.012	0.246 ± 0.014	1.3 ± 0.012	1.439 ± 0.016
9.2 × 10 ⁻⁹	2.14	0.235 ± 0.036	0.231 ± 0.008	–	0.243 ± 0.015	0.219 ± 0.013	0.278 ± 0.01	1.247 ± 0.021	1.305 ± 0.019	0.247 ± 0.013	0.219 ± 0.021	0.212 ± 0.01	0.202 ± 0.016
0.7 × 10 ⁻⁸	2.7	1.233 ± 0.025	0.931 ± 0.012	1.244 ± 0.012	1.13 ± 0.012	0.761 ± 0.019	1.327 ± 0.01	0.212 ± 0.01	0.213 ± 0.011	1.14 ± 0.019	0.245 ± 0.012	1.418 ± 0.015	1.022 ± 0.01
2.2 × 10 ⁻⁸	3.13	0.23 ± 0.013	0.377 ± 0.01	1.441 ± 0.009	1.108 ± 0.018	1.461 ± 0.009	1.114 ± 0.022	1.279 ± 0.021	1.432 ± 0.01	0.331 ± 0.012	1.334 ± 0.019	1.207 ± 0.018	1.356 ± 0.015
0.1 × 10 ⁻⁹	3.20	0.333 ± 0.008	0.434 ± 0.006	0.545 ± 0.007	0.274 ± 0.016	1.311 ± 0.012	1.211 ± 0.015	1.145 ± 0.016	0.191 ± 0.014	0.324 ± 0.019	1.148 ± 0.011	1.344 ± 0.012	1.241 ± 0.019
1.2 × 10 ⁻¹⁰	3.4	0.24 ± 0.005	0.209 ± 0.011	0.208 ± 0.015	–	0.239 ± 0.011	0.189 ± 0.005	0.191 ± 0.011	0.2 ± 0.017	0.222 ± 0.014	0.218 ± 0.012	0.239 ± 0.016	0.195 ± 0.024
1.3 × 10 ⁻¹⁰	8	0.142 ± 0.008	0.339 ± 0.007	0.266 ± 0.012	0.165 ± 0.011	–	0.215 ± 0.02	0.232 ± 0.013	0.324 ± 0.019	0.621 ± 0.013	0.207 ± 0.012	0.205 ± 0.019	0.234 ± 0.017
9.6 × 10 ⁻⁷	9	1.342 ± 0.008	1.029 ± 0.024	1.261 ± 0.01	1.129 ± 0.014	1.109 ± 0.024	1.111 ± 0.014	0.241 ± 0.01	1.141 ± 0.013	0.205 ± 0.014	1.115 ± 0.023	1.333 ± 0.022	1.015 ± 0.015
5.5 × 10 ⁻⁹	11.17	0.534 ± 0.011	0.453 ± 0.012	0.212 ± 0.01	0.202 ± 0.013	0.204 ± 0.012	–	1.002 ± 0.018	0.827 ± 0.016	0.324 ± 0.013	0.231 ± 0.016	0.271 ± 0.013	0.248 ± 0.01
5.9 × 10 ⁻⁹	14	0.625 ± 0.008	0.517 ± 0.007	0.762 ± 0.008	1.206 ± 0.008	0.32 ± 0.008	1.213 ± 0.025	–	1.424 ± 0.011	0.231 ± 0.012	0.241 ± 0.014	0.707 ± 0.011	0.936 ± 0.013
1.1 × 10 ⁻⁸	39	1.129 ± 0.003	1.306 ± 0.008	1.164 ± 0.006	1.337 ± 0.008	1.225 ± 0.015	1.405 ± 0.016	0.22 ± 0.014	0.229 ± 0.014	0.227 ± 0.015	1.176 ± 0.012	1.311 ± 0.012	0.893 ± 0.014
1.7 × 10 ⁻⁷	53	0.954 ± 0.02	1.112 ± 0.007	0.897 ± 0.017	1.172 ± 0.029	0.205 ± 0.008	0.209 ± 0.017	1.212 ± 0.013	1.113 ± 0.013	0.621 ± 0.013	0.327 ± 0.011	1.02 ± 0.015	1.155 ± 0.017
4.7 × 10 ⁻⁸	58	0.491 ± 0.004	0.863 ± 0.01	0.556 ± 0.011	1.375 ± 0.018	0.279 ± 0.018	1.257 ± 0.018	0.271 ± 0.018	0.2 ± 0.009	0.529 ± 0.022	0.209 ± 0.025	0.737 ± 0.016	1.223 ± 0.012
1.7 × 10 ⁻¹⁰	64	1.411 ± 0.005	1.163 ± 0.01	1.355 ± 0.008	1.391 ± 0.022	1.375 ± 0.024	1.333 ± 0.016	0.211 ± 0.015	–	0.297 ± 0.011	1.412 ± 0.012	0.669 ± 0.014	1.432 ± 0.016
3.2 × 10 ⁻⁸	67	1.112 ± 0.011	0.848 ± 0.018	1.159 ± 0.01	0.534 ± 0.017	0.521 ± 0.02	0.565 ± 0.011	0.222 ± 0.02	0.407 ± 0.013	0.193 ± 0.013	1.021 ± 0.022	1.139 ± 0.018	1.304 ± 0.023
8.5 × 10 ⁻⁹	102	0.212 ± 0.008	0.555 ± 0.012	0.633 ± 0.022	0.292 ± 0.016	0.315 ± 0.012	0.218 ± 0.005	1.334 ± 0.01	0.221 ± 0.022	–	0.519 ± 0.018	0.256 ± 0.022	0.213 ± 0.014
6.1 × 10 ⁻⁷	173	0.328 ± 0.005	0.215 ± 0.002	0.432 ± 0.01	1.257 ± 0.011	1.025 ± 0.018	1.432 ± 0.021	1.207 ± 0.016	0.327 ± 0.015	1.271 ± 0.015	0.992 ± 0.021	0.934 ± 0.019	1.113 ± 0.019
4.7 × 10 ⁻⁷	179	0.572 ± 0.008	0.278 ± 0.017	0.283 ± 0.008	0.803 ± 0.014	0.736 ± 0.014	0.251 ± 0.018	0.233 ± 0.014	0.213 ± 0.019	0.321 ± 0.021	1.303 ± 0.017	0.349 ± 0.014	1.304 ± 0.011
0.9 × 10 ⁻¹⁰	180	1.349 ± 0.031	1.275 ± 0.014	1.054 ± 0.022	1.171 ± 0.011	0.225 ± 0.012	0.219 ± 0.009	0.181 ± 0.024	0.421 ± 0.014	0.472 ± 0.018	–	0.522 ± 0.02	1.261 ± 0.013
2.6 × 10 ⁻⁷	181	1.092 ± 0.013	1.177 ± 0.014	1.071 ± 0.024	0.729 ± 0.023	0.611 ± 0.009	1.029 ± 0.011	0.219 ± 0.012	1.022 ± 0.023	0.313 ± 0.012	0.245 ± 0.011	1.2 ± 0.022	0.351 ± 0.011
5.7 × 10 ⁻⁷	186	0.704 ± 0.006	0.432 ± 0.016	0.568 ± 0.029	1.132 ± 0.021	0.325 ± 0.012	1.217 ± 0.015	0.437 ± 0.013	0.251 ± 0.021	1.321 ± 0.014	0.319 ± 0.021	1.334 ± 0.011	0.913 ± 0.012
0.7 × 10 ⁻¹⁰	188	0.485 ± 0.013	0.286 ± 0.014	0.767 ± 0.027	0.309 ± 0.011	1.035 ± 0.018	0.222 ± 0.006	1.332 ± 0.018	0.346 ± 0.017	0.239 ± 0.01	0.251 ± 0.013	–	0.237 ± 0.014
1.9 × 10 ⁻¹⁰	G12/2	0.208 ± 0.008	0.222 ± 0.012	0.317 ± 0.013	1.317 ± 0.013	0.25 ± 0.015	0.232 ± 0.01	0.195 ± 0.01	1.121 ± 0.014	0.341 ± 0.022	0.276 ± 0.01	0.188 ± 0.016	–
	Без мкАТ	0.21 ± 0.012	0.276 ± 0.014	0.259 ± 0.011	0.211 ± 0.022	0.219 ± 0.01	0.239 ± 0.013	0.251 ± 0.022	0.223 ± 0.014	0.219 ± 0.015	0.24 ± 0.008	0.231 ± 0.012	0.225 ± 0.019
	α-NAGAT	0.238 ± 0.01	0.215 ± 0.022	0.309 ± 0.013	0.217 ± 0.012	0.221 ± 0.011	0.257 ± 0.011	0.202 ± 0.011	0.192 ± 0.023	0.241 ± 0.012	0.271 ± 0.024	0.251 ± 0.022	0.299 ± 0.015

Для каждого из мкАТ анализ выполнялся в 3-х повторях. К_Ф, М – константы диссоциации анализируемых мкАТ. Пары мкАТ, выявляющие вирус осповакцины (А₄₉₀ превышает 1), выделены серым цветом. Пары мкАТ, выявляющие вирус осповакцины в концентрации 10³ ООЕ/мл, выделены подчеркиванием и жирным шрифтом. α-NAGAT – мкАТ против α-N-ацетилгалактозаминидазы (КФ 3.2.1.49) использовались в качестве отрицательного контроля.

тельности клонированного фрагмента подтверждали секвенированием.

Для экспрессии рA27L клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали вектором рЕТ29b-A27L. Через 3 ч после индукции изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (Sigma) клетки разрушали методом ультразвуковой дезинтеграции. рA27L экстрагировали из фракции нерастворимого белка с помощью 8 М раствора мочевины. Очистку рA27L проводили на колонке Ni-NTA HiTrap (Pharmacia, Sweden) в соответствии с инструкциями производителя [4]. Ренатурацию очищенного белка проводили диализом против буфера, содержащего 30 мМ Трис-НСl с 0.1% Тритоном X-100. После добавления тиомерсала (Sigma) до концентрации 0.01% препарат рA27L хранили при 4°C. Гомогенность белка оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриамидном геле [5] (рисунок). После проведения электрофореза образцы переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для визуализации рA27L в качестве первичных антител использовали анти-рA27L-мкАТ, в качестве вторичных – антимышьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (ДАКО, Glostrup, Denmark). Реакцию проявляли в растворе диаминобензидина в присутствии перекиси водорода с использованием коммерческого набора (Sigma, D7679) (рисунок). Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [6].

Для получения гибридом, секретирующих анти-A27L-специфические антитела, мышей линии BALB/c иммунизировали рA27L внутривенно по следующей схеме: первый день – 1 мкг белка в полном адьюванте Фрейнда; тридцать первый день – 1 мкг белка в неполном адьюванте Фрейнда; шестьдесят первый и шестьдесят второй дни – 20 мкг белка в ФСБ. Еще через сутки из селезенки животных выделяли спленоциты. Гибридизацию спленоцитов с клетками миеломы Sp2/0 проводили с использованием полиэтиленгликоля. Гибридомы клонировали в полужидкой среде по технологии Stemcell Technologies. Антигенспецифические антитела в культуральных жидкостях определяли с помощью ИФА. Положительно отвечающие клоны замораживали и хранили в криобанке. После добавления NaN₃ до конечной концентрации 0.1% культуральные жидкости хранили при 4°C.

Аффинность анти-рA27L-антител определяли по методу, описанному в работе [2].

Конъюгирование антител с биотином проводили в 8-луночном планшете, предварительно сенсibiliзованном рA27L (1 мкг). 400 мкл культуральной жидкости каждой из гибридом добавляли в лунки и оставляли на ночь при 4°C или на 2 ч при 37°C. После интенсивной промывки в лунки добавляли по 400 мкл Na-соли 3-сульфо-N-гидроксисукцинимидного эфира биотина (Sigma)

[7, 8] в фосфатно-солевом буфере (ФСБ – 0.02 М Na₂HPO₄, 0.02 М KH₂PO₄, 0.15 М NaCl, pH 7.4) или в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере (0.1 М Na₂CO₃, 0.1 М NaHCO₃, pH 9.0), или 0.2 М боратном буфере (0.2 М Na₂B₄O₇, 0.160 М NaCl, pH 8.5), и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Затем трижды промывали ФСБ, содержащим 0.025% Твин-20, и трижды раствором 0.150 М NaCl. Биотинилированные мкАТ элюировали 200 мкл глицинового буфера (0.1 М глицин-НСl, pH 2.7) и переносили в пробирки с нейтрализующим раствором (20 мкл раствора, содержащего 1 М Трис-НСl, pH 9.0, 5 М NaCl, 1% NaN₃). Конъюгаты хранили при 4°C.

Для подбора пар в сэндвич-варианте ИФА использовали отобранные 25 анти-рA27L-мкАТ и 12 биотинилированных мкАТ. 96-луночные планшеты сенсibiliзовали кроличьими анти-мышьиными иммуноглобулинами (ДАКО, Glostrup, Denmark) в количестве 750 нг/лунку. Затем в каждый планшет в 75 лунок добавляли по 100 мкл разведенной 1 : 100 культуральной жидкости гибридомного клона и инкубировали 1 ч при 37°C. После тщательной промывки ФСБ с 0.025% Твин-20 во все 25 планшетов вносили по 1 нг рA27L на лунку в ФСБ, содержащем 0.5% сыворотку неиммунизированных мышей. Планшеты оставляли на 1 ч при 37°C. Затем промывали и добавляли в каждый планшет в трех повторях раствор каждого из полученных биотинилированных мкАТ в разведении 1 : 100 в ФСБ, содержащем 0.5% сыворотки неиммунизированных мышей. Инкубировали 1 ч при 37°C и определяли связавшиеся мкАТ с помощью конъюгата авидин-пероксидазы хрена (Vectorlabs, Burlingame, CA) с последующей спектрометрией на планшетном ридере (Biorad, США). Специфичным сигналом анализируемых пар мкАТ считали значения A₄₉₀, в 3 раза превышающие значения отрицательного контроля (>1.0 OЕ₄₉₀).

Препарат вируса осповакцины был получен из ФБУН “Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор””.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки РФ, Соглашение № 14.604.21.0025 о предоставлении субсидии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Köhler G., Milstein C. // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
2. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. // J. Immunol. Methods. 1987. V 100. P. 173–179.
3. Stemmer W.P., Cramer A., Ha K.D., Brennan T.M., Heyneker H.L. // Gene. 1995. V. 164. P. 49–53.

4. *Franken K.L., Hiemstra H.S., van Meijgaarden K.E., Subronto Y., den Hartigh J., Ottenhoff T.H., Drijfhout J.W.* // *Protein Expr. Purif.* 2000. V. 18. P. 95–99.
5. *Sambrook J., Russel D.W.* // *Molecular Cloning* / Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. V. 2. P. 13.36–13.39.
6. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991. [Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. *Data for Biochemical Research.* Clarendon Press. Oxford, 1986.]
7. *Нго Т.Т., Ленхофф Г.* Иммуноферментный анализ: Пер. с англ. М.: Мир, 1988. [Ngo T.T. and Lenhoff H.M. *Enzyme-mediated immunoassay.* Irvine, California. Plenum Press. New York and London, 1985.]
8. *Johann H., Peters J.H., Baumgarten H.* // *Monoclonal Antibodies* / Ed. Springer Lab Manuals. 2011. P. 299–303.

A New Simple Technique for Producing Labeled Monoclonal Antibodies for Antibody Pair Screening in Sandwich-ELISA

**M. M. Zaripov*, G. V. Afanasieva*, X. A. Glukhova*, Y. A. Trizna*,
A. S. Glukhov*, I. P. Beletsky**, O. V. Prusakova*,#**

#Phone: +7 (4967) 73-94-41; fax: +7 (4967) 33-05-53; e-mail: o_proussakova@mail.ru

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Puschino, Moscow region, 142290 Russia

**Innograd Puschino Ltd., ul. Institutskaya 7, Puschino, Moscow region, 142290 Russia

A simple and fast method for obtaining biotin-labeled monoclonal antibodies was developed using content of hybridoma culture supernatant sufficient to select antibody pairs in sandwich ELISA. The method consists in chemical biotinylation of antigen-bound antibodies in a well of ELISA plate. Using as an example target Vaccinia virus A27L protein it was shown that the yield of biotinylated reactant is enough to set comprehensive sandwich ELISA for a moderate size panel of up to 25 monoclonal antibodies with an aim to determine candidate pairs. The technique is a cheap and effective solution since it avoids obtaining preparative amounts of antibodies.

Keywords: monoclonal antibodies, sandwich ELISA, biotin, Vaccinia virus