

С. В. Ткачев, Е. Г. Фомина, Е. Е. Григорьева, Е. П. Счесленок, П. А. Семижон, Т. В. Школина,
О. В. Маханько, А. С. Владыко

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНОГО C_H2-C_H3 УЧАСТКА Fc-ФРАГМЕНТА IgG1 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЫШИНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Аннотация. В клетках *E. coli* синтезирован рекомбинантный белок rFc IgG, представляющий собой C_H2 и C_H3 домены Fc-фрагмента γ-цепи IgG1 человека. Белок rFc IgG является полидетерминантным антигеном, содержащим линейные эпитопы для антител к IgG человека. Проведена иммунизация мышей белком rFc IgG. Показано, что rFc IgG обладает высокой иммуногенностью для мышей и может быть использован для получения антивидовых поликлональных антител к IgG человека. Обнаружено, что мышиные поликлональные антитела к rFc IgG проявляют слабо выраженную перекрестную реактивность в отношении IgM человека, а кроме того, выявлена высокая вариабельность значений титров антител, полученных от разных животных. Для решения этих проблем предлагается проводить оценку качества материала, полученного в результате каждой иммунизации, и отбирать подходящие образцы антител с учетом их авидности, специфичности и титра.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, Fc-фрагмент иммуноглобулина G, антиген, антивидовые поликлональные антитела, иммунизация мышей

Для цитирования: Синтез рекомбинантного C_H2-C_H3 участка Fc-фрагмента IgG1 человека и его использование для получения мышиных поликлональных антител / С. В. Ткачев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – №4. – С. 41–47.

S. V. Tkachov, E. G. Fomina, E. E. Grigorieva, E. P. Scheslenok, P. A. Semizhon, T. V. Shkolina, O. V. Mahanko,
A. S. Vladyko

Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

SYNTHESIS OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE INCLUDING C_H2-C_H3 DOMAINS OF THE HUMAN IgG1 Fc-FRAGMENT AND ITS USE FOR MOUSE POLYCLONAL ANTIBODY PRODUCTION

Abstract. The recombinant polypeptide rFc IgG containing the amino acid sequence of the C_H2 and C_H3 domains of the Fc-fragment of the human IgG γ-chain was produced in *Escherichia coli*. The polypeptide rFc IgG is an antigen with many linear epitopes for human IgG. Wild-type mice were immunized with rFc IgG to obtain immune ascitic fluids containing polyclonal antibodies against human IgG. It was shown that rFc IgG was highly immunogenic for mice and could be used to produce polyclonal antibodies against human IgG. It was revealed that mouse polyclonal antibodies slightly cross-reacted with human IgM, in addition a high variability of titers of antihuman Ig derived from different mice was found. To solve these problems, it was offered to assess the quality of material obtained after every immunization and to select suitable antibody samples with appropriate avidity, specificity and titer.

Keywords: recombinant protein, Fc-fragment of immunoglobulin G, antigen, anti-species polyclonal antibodies, immunization of mice

For citation: Tkachov S. V., Fomina E. G., Grigorieva E. E., Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Shkolina T. V., Mahanko O. V., Vladyko A. S. Synthesis of recombinant polypeptide including C_H2-C_H3 domains of the human IgG1 Fc-fragment and its use for mouse polyclonal antibody production. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 4, pp. 41–47 (in Russian).

Введение. В настоящее время для продукции антител используют две основные стратегии: получение поликлональных антисывороток путем иммунизации животных соответствующим иммуногеном и гибридомную технологию синтеза моноклональных антител (МАТ). Выбор между этими стратегиями определяется возможностями конкретной лаборатории и задачами, которые предполагается решать с использованием полученных антител. И тот и другой способ обладают своими преимуществами и недостатками [1, 2]. К основному недостатку первого способа

можно отнести то, что поликлональная антисыворотка, полученная в результате иммунизации животных, содержит гетерогенные популяции антител, обладающие различной специфичностью и аффинностью по отношению к конкретному антигену и группе похожих антигенов [1–3].

Специфичность поликлональных антител (пАТ) можно повысить, ограничив количество эпитопов полидетерминантного иммуногена. При этом следует учитывать, что специфичность полученных антител должна соответствовать характеру работ, которые предстоит выполнить с их применением. Например, антитела, входящие в состав ферментного конъюгата, используемого для выявления комплекса антиген-IgG, должны распознавать все IgG, связанные с антигеном, следовательно, их специфичность должна быть ограничена на уровне класса антител.

Анализ спектра пАТ, синтезированных мышами в ответ на иммунизацию целой молекулой человеческого IgG, показал, что большинство антител вырабатывается на структурные и линейные антигенные детерминанты, локализованные в Fc-фрагменте IgG [3, 4]. В пределах C_H2 и C_H3 доменов IgG человека были идентифицированы участки, формирующие линейные эпитопы для взаимодействия с пан-IgG. Картирование эпитопов мАТ (pepscan analysis) выявило последовательности 290-KPREE-294 и 338-КАКGQPR-344, расположенные соответственно в C_H2 домене и N-регионе C_H3 домена и присутствующие у всех четырех классов IgG [5]. Также известно, что участок 383-SNGQPEN-390 выявляется пан-специфичными мАТ у всех подклассов IgG [6]. Гомология C_H3 доменов подклассов IgG составляет 96 %, C_H2 домена – 90–95, участка иммуноглобулинов, находящегося между C_H1 и C_H2 доменами (шарнирный фрагмент), – 50–60 % (для сравнения: гомология аминокислотных последовательностей Fc фрагмента различных классов иммуноглобулинов составляет ~30 % [7]). Можно предположить, что изолированный участок IgG человека, состоящий из консервативных C_H2 и C_H3 доменов, может быть использован в качестве иммуногена для индукции у животных поликлональных антител, обладающих панспецифичностью в отношении IgG человека и неспецифичных к иммуноглобулинам других классов.

Цель данного исследования – с помощью технологии рекомбинантной ДНК осуществить в клетках *E. coli* синтез мономерного Fc-фрагмента IgG1 человека (rFc IgG), включающего константные области γ-цепи IgG (домены C_H2 и C_H3), и оценить возможность его использования для получения мышиных пАТ, обладающих реактивностью в отношении IgG человека.

Материалы и методы исследования. *Бактериальные штаммы.* Штаммы *E. coli* XL-blue и BL21(DE3) использовали для проведения генно-инженерных работ и получения rFc IgG соответственно.

Выделение РНК и проведение ПЦР. В качестве прототипа генетической конструкции, содержащей необходимую нуклеотидную последовательность, использовали участок (709–1368 п. н.), кодирующий C_H2 и C_H3 домены γ-цепи IgG1 человека (GenBank, JX292764.2). РНК, необходимую для синтеза кДНК, выделяли из клеточной лимфобластной линии IM-9, продуцирующей IgG человека. Для выделения РНК использовали набор реагентов TRI Reagent (Sigma, США). Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР с применением набора реагентов OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Германия). Праймеры для ПЦР приведены в таблице. Для клонирования амплифицированных фрагментов в экспрессирующий вектор рJC40 в праймеры были включены сайты узнавания для HindIII и XhoI рестриктаз.

Конструирование рекомбинантной плазмиды. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду рJC40. Рестриктию вектора и амплифицированных фрагментов проводили с помощью HindIII и XhoI рестриктаз (Thermo Fisher Scientific, США). Реакционная смесь содержала по 0,2 мкг ампликона и векторной ДНК, буфер для ферментов рестрикции (Thermo Fisher Scientific, США) и по 1 U каждого фермента рестрикции. После проведения реакции ферменты рестрикции инактивировали в течение 20 мин при 80 °С. Лигирование фрагментов и вектора осуществляли в течение 20 мин при 22 °С в 20 мкл буфера (30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ

ПЦР-праймеры для синтеза кДНК, кодирующей Fc IgG
PCR primers for synthesis of cDNA coding of Fc IgG

Праймер	Последовательность
Прямой	5' – CGCGAAGCTTCCCGTCCCAGCACCT – 3'
Обратный	3' – GCGCCTCGAGTTTACCCGGAGACAG – 5'

Примечание. Сайты узнавания для HindIII и XhoI рестриктаз выделены курсивом.

и по 1 U каждого фермента рестрикции. После проведения реакции ферменты рестрикции инактивировали в течение 20 мин при 80 °С. Лигирование фрагментов и вектора осуществляли в течение 20 мин при 22 °С в 20 мкл буфера (30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ

MgCl₂, 10 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ), содержащего 0,2 мкг ДНК и 1 U ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм XL-blue.

Трансформация E. coli XL-blue рекомбинантной плазмидой. Колонии клеток *E. coli* XL-blue вносили в 5 мл LB-бульона (Sigma, США), помещали в термостат при 37 °С и инкубировали в течение 2–3 ч до достижения культурой логарифмической фазы роста. Далее культуру охлаждали до 4 °С и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,1 М CaCl₂. В бактериальную культуру вносили 10 мкл лигазной смеси, выдерживали 30 мин при 4 °С, после чего добавляли 900 мкл LB-бульона и инкубировали 60 мин при 37 °С. После инкубации клетки осаждали путем центрифугирования в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в 100 мкл среды. Трансформированные клетки высевали на селективную среду, содержащую 50 мкг/мл ампициллина (Sigma, США). Выросшие колонии проверяли на наличие рекомбинантной плазмиды методом электрофореза в 1 %-ном агарозе. Плазмидную ДНК из клеток выделяли с помощью набора QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, Германия).

Экспрессия rFc IgG. Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) рекомбинантной плазмидой и выращивание клеток в питательной среде проводили, как описано выше. Биосинтез целевого белка индуцировали внесением в питательную среду изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 0,4 мМ. Экспрессия белка в клетках *E. coli* сопровождалась образованием телец включения.

Тельца включения выделяли из клеточной массы следующим способом. Клетки *E. coli* (100 мл бактериальной культуры) осаждали путем центрифугирования (5000 об/мин, 10 мин), супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера (0,5 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,9). Затем клеточную суспензию обрабатывали 4 раза ультразвуком (20 кГц, 20 с) на льду, лизаты центрифугировали при 5000 об/мин, выпавшие в осадок тельца включения ресуспендировали в 100 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера (ФСБ; 0,15 М NaCl, pH 7,4). Для оценки содержания белка тельца включения растворяли в 0,05 %-ном додецилсульфате натрия (ДСН), концентрацию белка определяли с помощью набора Roti-Quant universal (Carl Roth, Германия). Выход очищенного белка составлял ~1,5 мг на 100 мл культуры клеток.

Электрофорез, вестерн-блот. Белки клеточных лизатов разделяли электрофорезом в 15 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с 0,1 % ДСН по методу Laemmli [8]. Гель окрашивали в растворе Coomassie R-250. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого электроблоттинга с использованием прибора Criterion Blotter (BioRad, США). Для детекции rFc IgG использовали мышиные антитела против IgG (или IgM) человека, меченные пероксидазой хрена (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей, получение иммуноасцитических жидкостей (ИАЖ). Для получения ИАЖ использовали нелинейных белых мышей в возрасте 8–12 недель массой 18–20 г. Иммунизацию проводили с помощью телец включения, содержащих rFc IgG. Первоначально суспензию иммуногена вводили подкожно в дозе 10 мкг белка/мышь в полном адьюванте Фрейнда (Sigma, США), через 14 сут материал вводили повторно в дозе 20 мкг белка/мышь в неполном адьюванте Фрейнда (Sigma, США). Через 21 сут после последней подкожной инъекции иммуноген вводили внутрибрюшинно в полном адьюванте Фрейнда в дозе 30 мкг белка/мышь, через 14 сут инъекцию повторяли, дозу белка увеличивали до 40 мкг белка/мышь. ИАЖ, содержащую пАТ, отбирали пункцией из перитонеальной полости мыши.

Проведение ИФА. Наличие пАТ к IgG человека в ИАЖ оценивали методом ИФА. Для этого на поверхность лунок иммунологического планшета (Greiner, Германия) сорбировали IgG (или IgM) человека (Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. Затем в лунки вносили ИАЖ, разведенные ФСБ, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали ФСБ. Далее в лунки вносили поликлональные козьи антитела к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Invitrogen, США), инкубировали 1 ч при комнатной температуре, промывали ФСБ и добавляли цитратно-фосфатный буфер, содержащий H₂O₂ и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Через 15 мин реакцию останавливали путем добавления 2 М H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) образцов измеряли при 450 нм. В качестве холостых проб использовали асцитическую жидкость мышей, которым вводили растворы для иммунизации, не содержащие rFc IgG.

Средние значения ОП₄₅₀ холостых проб составили $0,053 \pm 0,0013$ ($n = 6$) и $0,056 \pm 0,012$ ($n = 6$) при проведении реакции с IgG и IgM соответственно. При оценке результатов эксперимента считали, что проба содержит специфические иммуноглобулины, если ее ОП превышает среднее значение ОП холостых проб в 2 раза (уровень cut off).

Результаты и их обсуждение. Фрагмент кДНК, кодирующий Fc IgG, был амплифицирован, очищен и клонирован в вектор pJC40 по HindIII и XhoI сайтам рестрикции. Рекомбинантной плазмидной ДНК pJC40-FcIgG трансформировали клетки *E. coli* XL-blue. Присутствие в клетках *E. coli* рекомбинантной плазмиды определяли с помощью рестрикционного анализа по сайтам HindIII и XhoI (рис. 1). Анализ показал, что плазида pJC40-FcIgG, содержащая вставку, менее подвижна в агарозном геле, чем исходный вектор pJC40, при этом обработка рестриктазами делила ее на два фрагмента, один из которых по размеру соответствовал вектору pJC40 (2402 п. н.), второй – клонированной вставке FcIgG (680 п. н.).

Конструкцию pJC40-FcIgG использовали для экспрессии rFcIgG в *E. coli* BL21(DE3). В процессе экспрессии в клетках продуцента наблюдали образование нерастворимых телец включения. С помощью электрофореза в денатурирующих условиях установлено, что тельца включения сформированы белком с молекулярной массой около 32 кДа, что соответствовало ожидаемой массе для rFc IgG, а также практически не содержали примесей бактериальных белков. В растворимой клеточной фракции rFc IgG был выявлен в незначительных количествах (рис. 2, а).

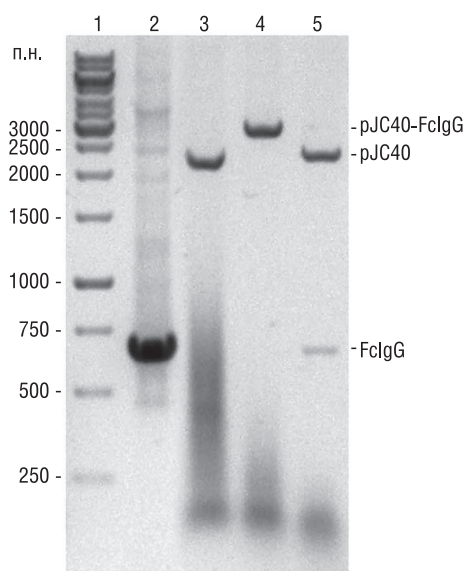


Рис. 1. Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pJC40-FcIgG и исходного вектора pJC40: 1 – маркер длины ДНК (Thermo Scientific, США); 2 – амплификат, полученный с парой праймеров, ограничивающих домены C_H2 и C_H3 IgG1 человека; 3 – рестрикция pJC40 по HindIII сайту; 4 – рестрикция pJC40-FcIgG по HindIII сайту; 5 – рестрикция pJC40-FcIgG по HindIII и XhoI сайтам

Fig. 1. Restriction analysis of the recombinant plasmid pJC40-FcIgG and the original vector pJC40: 1 – DNA sizes marker (Thermo Scientific, USA); 2 – PCR-product received with two primers by limiting C_H2 and C_H3 domains of human IgG1; 3 – restriction of pJC40 in HindIII site; 4 – restriction of pJC40 in XhoI site; 5 – restriction of pJC40 in HindIII and XhoI sites

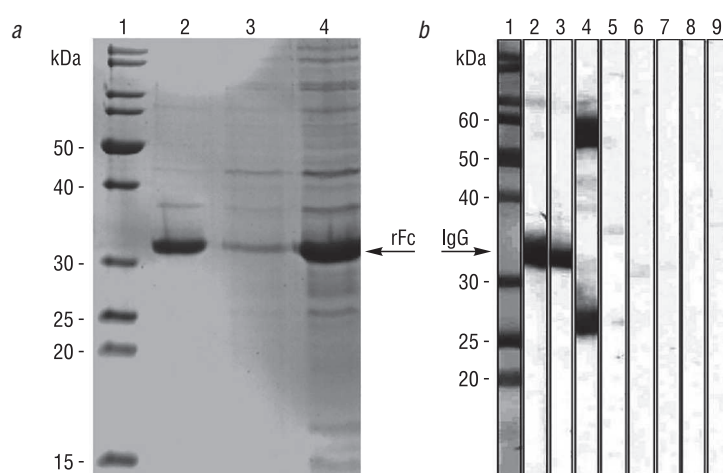


Рис. 2. Идентификация rFc IgG во фракциях лизата *E. coli* BL21(DE3) методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (а) и оценка антигенной специфичности rFc IgG методом вестерн-блот (b) (а: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – фракция лизата, содержащая тельца включения; 3 – супернатант, полученный после осаждения телец включения; 4 – лизат после индукции ИПТГ синтеза rFc IgG; б: 1 – маркер молекулярных масс; 2, 6 – лизат после индукции ИПТГ синтеза rFc IgG; 3, 7 – фракция лизата, содержащая тельца включения; 4, 8 – коммерческий IgG человека; 5, 9 – лизат нативной культуры *E. coli* BL21(DE3)). В качестве выявляющего реагента для образцов 2–5 использовали мышинный анти-IgG пероксидазный конъюгат, для образцов 6–9 – мышинный анти-IgM пероксидазный конъюгат

Fig. 2. Identification of rFc IgG in lysate fractions of *E. coli* BL21(DE3) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (a) and valuation antigen specificity of rFc IgG by Western-blot method (b) (a: 1 – molecular weight marker; 2 – lysate fraction containing an including body 3 – supernatant after sedimentation of an including body; 4 – lysate after IPTG induce rFc IgG expression; b: 1 – molecular weight marker; 2, 6 – lysate after IPTG induce rFc IgG expression; 3, 7 – lysate fraction containing an including body; 4, 8 – commercial human IgG; 5, 9 – lysate of native *E. coli* BL21(DE3) strain). As a detected tool, samples 2–5 used the mouse anti-human IgG peroxidase conjugate and samples 6–9 – the mouse anti-human IgM peroxidase conjugate

Способность rFc IgG выступать в качестве антигена по отношению к античеловеческим иммуноглобулинам оценивали с помощью вестерн-блот анализа. Показано, что rFc IgG реагирует с мышинными антителами против IgG человека, реакции rFc IgG с мышинными антителами против IgM человека не выявлено (рис. 2, *b*).

В следующей серии экспериментов изучали иммуногенные свойства rFc IgG. Исследования показали, что введение rFc IgG мышам индуцирует у животных выработку антител к IgG человека. Максимальное разведение ИАЖ, при котором в пробах фиксировали присутствие специфических антител к IgG человека, составило 10^6 раз (рис. 3, *a*). Также обнаружено, что введение rFc IgG стимулировало у мышей выработку антител, реагирующих с IgM человека. В данном случае положительный ответ регистрировали при разведении ИАЖ в 10^3 раз, при этом наблюдали разброс значений ОП в диапазоне 0,19–0,85 усл. ед. (рис. 3, *b*).

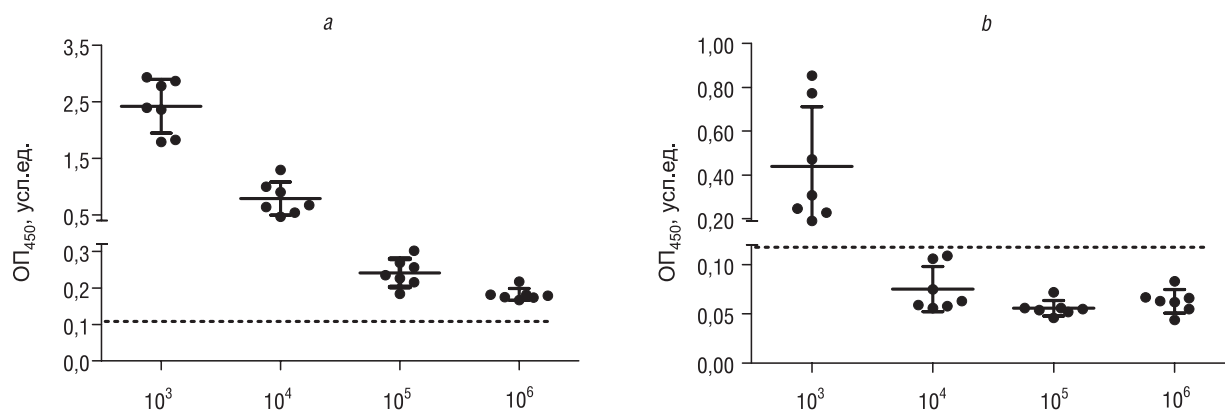


Рис. 3. Результаты ИФА по оценке реактивности ИАЖ, полученных после иммунизации мышей rFc IgG, по отношению к IgG (*a*) и IgM (*b*) человека. По горизонтали – разведение ИАЖ, разы; по вертикали – оптическая плотность (ОП₄₅₀), усл. ед.; ● – значения ОП₄₅₀ каждой отдельной пробы, горизонтальная черта – среднее значение ОП₄₅₀, вертикальная черта – стандартное отклонение, пунктирная линия – уровень cut off

Fig. 3. ELISA results for evaluation of the reactivity of immune ascetic fluids (IAF) after mouse immunization by rFc IgG in relation to human IgG (*a*) and human IgM (*b*). Horizontally – dilution of IAF, times; vertically – optical density (OD₄₅₀), rel. units; ● – value of OD₄₅₀ every distinct samples, horizontal line – average value of OD₄₅₀, vertical line – standard deviation, dashed line – cut off level

Заключение. Таким образом, нами получен рекомбинантный белок rFc IgG, представляющий собой C_H2 и C_H3 домены Fc-фрагмента γ-цепи IgG1 человека. Синтезированный белок можно рассматривать как полидетерминантный антиген, содержащий линейные эпитопы для антител к IgG человека. Показано, что rFc IgG обладает высокой иммуногенностью для мышей и может быть использован для получения антивидовых пАТ к IgG человека. Антитела к rFc IgG в данных условиях эксперимента (нелинейные животные, полидетерминантный антиген) формируются в результате функционирования множества клеточных клонов, что неизбежно должно приводить к гетерогенности материала [2], проявляющейся в нашем исследовании в виде перекрестной реактивности с IgM и высокой вариабельности значения титров антител, полученных от разных животных. Решение этих проблем, по всей видимости, лежит в оценке (верификации) качества материала, полученного в результате каждой иммунизации, и в отборе подходящих образцов антител с учетом их avidности, специфичности и титра [2].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. The production of polyclonal antibodies in laboratory animal. The report and recommendations of ECVAM workshop 35 / P. P. Leenaars [et al.] // ATLA. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 79–102.
2. Кэтти, Д. Антитела. Методы : пер. с англ. / Д. Кэтти, Ч. Райкундалиа. – М. : Мир, 1991. – Т. 2. – 382 с.
3. Novotny, J. Location of antigenic epitopes on antibody molecules / J. Novotny, M. Handschumacher, E. Haber // J. Mol. Biol. – 1986. – N 4. – P. 715–721.

4. Hajjghasemi, F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing human pan-IgG specific conformational or linear epitopes / F. Hajjghasemi, J. Khoshnoodi, F. Shokri // *Avicenna J. Med. Biotech.* – 2012. – Vol. 4, N 4. – P. 170–177.
5. Characterization of epitopes of pan-IgG/anti-G3m(u) and anti-Fc monoclonal antibodies / P. Nelson [et al.] // *Immunol. Lett.* – 2003. – Vol. 88, N 1. – P. 77–83.
6. Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping / N. Nelson [et al.] // *Biochem. Soc. Transact.* – 1997. – Vol. 25, N 2. – P. 373.
7. Schroeder Jr., H. W. Immunoglobulins: structure and function / H. W. Schroeder Jr., D. Wald, N. S. Greenspan // *Fundamental Immunology* / ed. W. E. Paul. – 7rd ed. – Philadelphia : Wolters Kluwer Health ; Lippincott Williams & Wilkins, 2013, XVIII. – 1283 p.
8. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

References

1. Leenaars M., Hendriksen C. F. M., de Leeuw W. A., Carat F., Delahaut P., Fischer R., Halder M., Hanly W. C., Hartinger J., Hau J., Lindblad E. B., Nicklas W., Outschoorn I. M., Stewart-Tull D. E. S. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. The report and recommendations of ECVAM workshop 35. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1999, vol. 27, no. 1, pp. 79–102.
2. Catty D. *Antibodies: a practical approach*, vol. 2. Oxford, IRL Press, 1989. 280 p. (Russ. ed.: Ketti D., Raikundalia Ch. *Antitela. Metody* [Antibodies. Methods], vol. 2. Moscow, Mir Publ., 1991. 382 p.
3. Novotny J., Handschumacher M., Haber E. Location of antigenic epitopes on antibody molecules. *Journal of Molecular Biology*, 1986, no. 4, pp. 715–721. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90502-4
4. Hajjghasemi F., Khoshnoodi J., Shokri F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing human pan-IgG specific conformational or linear epitopes. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2012, vol. 4, no. 4, pp. 170–177.
5. Nelson P., Westwood O., Soltys A., Jefferis R., Goodall M., Baumforth K., Frampton G., Tribbick G., Roden D., Hay F. Characterization of epitopes of pan-IgG/anti-G3m(u) and anti-Fc monoclonal antibodies. *Immunology Letters*, 2003, vol. 88, no. 1, pp. 77–83. DOI: 10.1016/S0165-2478(03)00056-7
6. Nelson N., Westwood O., Jefferis R., Goodall M., Hay F. Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping. *Biochemical Society Transactions*, 1997, vol. 25, no. 2, p. 373.
7. Schroeder Jr. H. W., Wald D., Greenspan N. S. Immunoglobulins: structure and function. *Fundamental Immunology*, 7th ed., in Paul W. E. (ed.). Philadelphia, Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins, 2013, XVIII. 1283 p.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. DOI:10.1038/227680a0

Информация об авторах

Ткачев Сергей Викторович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pjc40@mail.ru.

Фомина Елена Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: feg1@tut.by.

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru.

Счесленок Елена Павловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: elena_pavlovna@tut.by.

Семижон Павел Анатольевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavel5555@tut.by.

Information about the authors

Sergey V. Tkachov – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pjc40@mail.ru.

Yelena G. Fomina – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: feg1@tut.by.

Yelena E. Grigorieva – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru.

Elena P. Scheslionok – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elena_pavlovna@tut.by.

Pavel A. Semizhon – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavel5555@tut.by.

Школина Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Маханько Ольга Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Владыко Александр Станиславович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladuko@belriem.by.

Tatyana V. Shkolina – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

Olga V. Mahanko – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

Aleksandr S. Vladiko – D. Sc. (Med.), Professor, Chief researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladuko@belriem.by.