



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008149653/13, 16.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.12.2008

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: JP 2002306164 A, 22.10.2002. JP 2004315394
A, 11.11.2004. RU 2285043 C2, 10.10.2006. RU
2186106 C1, 27.07.2002. WO 2007044731 A2,
19.04.2007.

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., Новосибирский
р-н, р.п. Кольцово, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора, зав. патентным отделом
Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):

Казачинская Елена Ивановна (RU),
Перебоев Александр Владимирович (RU),
Иванова Алла Владимировна (RU),
Качко Алла Васильевна (RU),
Субботина Екатерина Леонидовна (RU),
Чепурнов Александр Алексеевич (RU),
Разумов Иван Алексеевич (RU),
Локтев Валерий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
науки "Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора) (RU)

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО *Mus musculus* L.1B2 - ПРОДУЦЕНТ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛА,
СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО,
ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА
ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga)

(57) Реферат:

Получены штамм гибридных клеток
животного *Mus musculus* L. 1B2,
депонированный в Коллекции клеточных
культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор", являющийся
продуцентом моноклональных антител,
специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола,
субтип Заир (штамм Mainga) и используемых в
качестве захватывающих антиген в
иммуноферментной системе формата "сэндвич"
для выявления нуклеопротеина вируса Эбола,
субтип Заир (штамм Mainga), и штамм
гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus*
7B11, депонированный в Коллекции клеточных
культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор", являющийся
продуцентом моноклональных антител,
специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола,
субтип Заир (штамм Mainga) и используемых в

качестве индикаторных меченных биотином в
иммуноферментной системе формата "сэндвич"
для выявления нуклеопротеина вируса Эбола,
субтип Заир (штамм Mainga). Описаны
моноклональные антитела 1B2, продуцируемые
штаммом гибридных клеток животного *Mus*
musculus L. 1B2, относящиеся к субклассу
иммуноглобулинов IgG1, имеющие тяжелую 55
кДа и легкую 25 кДа цепи, и моноклональные
антитела 7B11, продуцируемые штаммом
гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus*
7B11, относящиеся к субклассу
иммуноглобулинов IgG. Антитела используют
совместно в иммуноферментной системе
формата "сэндвич" для выявления
нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир
(штамм Mainga). Использование изобретения
позволяет получать результаты при

лабораторных исследованиях ВЭ и при
конструировании тест-систем для выявления

антигена с более высокой достоверностью. 5
н.п. ф-лы, 3 ил., 2 табл.

R U 2 3 9 5 5 7 6 C 1

R U 2 3 9 5 5 7 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2008149653/13, 16.12.2008**

(24) Effective date for property rights:
16.12.2008

(45) Date of publication: **27.07.2010 Bull. 21**

Mail address:

**630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n,
r.p. Kol'tsovo, FGUN GNTs VB "Vektor"
Rospotrebnadzora, zav. patentnym otdelom Ju.N.
Mistjurinu**

(72) Inventor(s):

**Kazachinskaja Elena Ivanovna (RU),
Pereboev Aleksandr Vladimirovich (RU),
Ivanova Alla Vladimirovna (RU),
Kachko Alla Vasil'evna (RU),
Subbotina Ekaterina Leonidovna (RU),
Chepurnov Aleksandr Alekseevich (RU),
Razumov Ivan Alekseevich (RU),
Loktev Valerij Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie nauki
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
biotekhnologii "Vektor" Federal'noj sluzhby po
nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i
blagopoluchija cheloveka (FGUN GNTs VB
"Vektor" Rospotrebnadzora) (RU)**

(54) STRAIN OF HYBRID ANIMAL CELLS *Mus musculus* L - PRODUCER OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR EXPOSING NUCLEOPROTEIN OF EBOLA VIRUS, ZAIRE SUBTYPE (Mainga STRAIN) (VERSIONS), MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCED BY SAID STRAIN (VERSIONS) AND SET FOR "SANDWICH" FORMAT IMMUNOENZYMOMETRIC TEST SYSTEM FOR EXPOSING NUCLEOPROTEIN OF EBOLA VIRUS, ZAIRE SUBTYPE (Mainga STRAIN)

(57) Abstract:

FIELD: chemistry; biochemistry.

SUBSTANCE: invention discloses a strain of hybrid animal cells *Mus musculus* L. 1B2, which is deposited in the Collection of cell cultures of the State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, which is a producer of monoclonal antibodies which are specific to the nucleoprotein of the Ebola virus, Zaire subtype (Mainga strain) and are used as binding antigens in a "sandwich" format immunoenzymometric system for exposing the nucleoprotein of the Ebola virus, Zaire subtype (Mainga strain), and a strain of hybrid animal cells *Rattus Norvegicus* 7B11 which is deposited in the Collection of cell cultures of the State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR and which is a producer of monoclonal antibodies which are specific to the nucleoprotein of Ebola virus, Zaire subtype (Mainga strain) and are used as biotin labelled indicators in the "sandwich" format

immunoenzymometric system for exposing nucleoprotein of the Ebola virus, Zaire subtype (Mainga strain). The invention describes monoclonal antibodies 1B2 which are produced by the strain of hybrid animal cells *Mus musculus* L. 1B2, which relate to the subclass of immunoglobulins IgG1 which have a heavy 55 kDa and a light 25 kDa chain, and monoclonal antibodies 7B11 which are produced by the strain of hybrid animal cells *Rattus Norvegicus* 7B 11 related to the subclass of immunoglobulins IgG. The antibodies are used together in the "sandwich" format immunoenzymometric system for exposing nucleoprotein of the Ebola virus, Zaire subtype (Mainga strain).

EFFECT: use of the invention enables to obtain results during "BЭ" laboratory reseach and when designing a test system for highly reliable exposure of an antigen.

5 cl, 3 dwg, 2 tbl, 7 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к медицинской вирусологии и иммунологии, может быть использовано для проведения иммунодиагностики геморрагической лихорадки Эбола (ГЛЭ).

5 Вирус Эбола (ВЭ) относится к семейству филовирусов, распространяется от человека к человеку через прямой контакт с биологическими жидкостями. Аэрозольный путь передачи также возможен, как показали исследования на экспериментально зараженных животных [1, 2] и высокая смертность среди медицинских работников во время вспышки в Уганде 2000-2001 г. [3]. Природный резервуар и переносчики неизвестны, эффективные средства специфической профилактики для людей отсутствуют. При данном заболевании важна быстрая и дифференциальная диагностика, так как стремительно развивающаяся геморрагическая лихорадка приводит к летальному исходу в течение нескольких дней [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10] и симптомы подобны симптомам при заболеваниях, вызванных другими патогенами [11], для которых разработаны вакцины и методы лечения [12]. 15 Вирус Эбола опасен для человеческой популяции из-за развития туризма в страны Африки, где возможен контакт с больными обезьянами [13]. Нуклеопротеин (NP) филовирусов является одним из трех мажорных компонентов, составляя 17% (белок VP35 - 24,5% и белок VP40 - 37,7% соответственно) от массы вириона [14]. 20 Исследование иммунного ответа организма против ВЭ в течение вспышки в 1996 г. в Габоне показало, что в сыворотках крови впоследствии выживших пациентов рано появлялись и увеличивались количественно IgG, преимущественно против нуклеопротеина и матричного VP40 [15]. ВЭ появляется в культуральной жидкости при заражении культуры клеток Vero и Л-68 на 3-4 сутки, в крови инфицированных морских свинок на 4-7 сутки, в крови обезьян Papio Namadryas на 7 сутки от заражения (в день появления температуры) и может быть обнаружен методом иммуноферментного анализа (ИФА) [16, 17]. У пациентов, страдающих от ГЛЭ, вирус 30 присутствует в тканях и крови в высоких титрах 10(6)-10(8) вирусных частиц в миллилитре и может быть обнаружен на третий день после начала симптомов [18]. В настоящее время в России нет коммерчески доступных ПЦР и ИФА тест-систем по экспрессному выявлению антигена ВЭ. Препараты очищенных моноклональных антител (МКА) могут служить основой ИФА тест-системы по выявлению вирусного антигена и как подтверждающий тест к ПЦР-диагностике. В работе [19] авторы 35 используют для ПЦР-диагностики праймеры для фрагмента гена нуклеопротеина ВЭ и делают вывод о целесообразности использования дополнительно надежного метода ИФА по обнаружению вирусного антигена.

40 Наиболее близким аналогом является коллекция из 12 линий мышинных гибридом, продуцирующих МКА к рекомбинантному нуклеопротеину (субтип Заир), полученному в бакуловиральной экспрессионной системе. Известна также тест-система на основе этих МКА, "захватывающих" антиген, в качестве "индикаторных" были использованы поликлональные антитела кролика [20]. Данная лабораторная тест-система выявляла вирион-ассоциированный нуклеопротеин в клинических образцах (сыворотка крови, печень, селезенка), полученных от обезьян во время вспышки Эбола - Рестон на Филиппинах в 1996 г. и хранившихся при -80°C до 2003 г. [21]. 45

Однако достоверность данных с использованием указанных МКА существенно ограничена. 50

Техническим результатом предлагаемого технического решения является получение таких штаммов гибридных клеток *Mus musculus* L. и *Rattus norvegicus*, продуцирующих специфические МКА, в качестве "захватывающих" антиген и в качестве

"индикаторных", меченных биотином, не конкурирующих между собой за антигенные эпитопы, что позволяет использовать их в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина ВЭ с более высокой достоверностью результатов при лабораторных исследованиях ВЭ и при конструировании тест-систем для выявления антигена.

Указанный технический результат достигается получением штамма гибридных клеток животного *Mus musculus* l. 1В2, депонированного в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющегося продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga) и используемого в качестве захватывающих антиген в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

Указанный технический результат достигается также получением штамма гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus* 7В11, депонированного в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющегося продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga) и используемого в качестве индикаторных меченных биотином в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

Указанный технический результат достигается также получением моноклональных антител 1В2, продуцируемых штаммом гибридных клеток животного *Mus musculus* l. 1В2, относящихся к субклассу иммуноглобулинов IgG1, имеющих тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи, и моноклональных антител 7В11, продуцируемых штаммом гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus* 7В11, относящихся к субклассу иммуноглобулинов IgG, используемых совместно в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

Также возможно их индивидуальное использование в иммунофлуоресцентном и иммуноферментном методах для выявления ВЭ в инфицированных клетках и тканях.

Штаммы получают путем слияния клеток мышинной миеломы р3-Х63/Ag8.653 (NS/1) с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных очищенным, концентрированным, инактивированным препаратом ВЭ, субтип Заир (штамм Mainga) [22] и путем слияния клеток крысиной миеломы 210 RC.Y3-Ag 1.2.3. (Y-3) с клетками селезенки крысы LOU, иммунизированной этим же антигеном. Заявляемые штаммы гибридных клеток получены в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора Российской Федерации и депонированы в Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ "Вектор". Авторское название гибридных клеточных линий - 1В2 и 7В11.

Родословная штамма *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" 1В2. Гибридные клетки штамма получены путем слияния клеток мышинной миеломы р3-Х63/Ag8.653 (NS/1) с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных очищенным, концентрированным, инактивированным препаратом ВЭ. В качестве сливающего агента использовали 45% раствор полиэтиленгликоля фирмы "Sigma" с молекулярным весом 1300-1600 кДа по методу [23]. Клетки после слияния выращивали в селективной среде ГАТ в 96-луночных культуральных планшетах. В качестве фидерных клеток использовали перитонеальные макрофаги беспородных мышей. Гибридомы, стабильно продуцирующие специфические МКА, клонировали 3 раза. Выход позитивных клонов в последнем клонировании составил 100%.

Родословная штамма *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11. Гибридные клетки штамма получены путем слияния клеток крысиной миеломы 210 RC.Y3-Ag1.2.3. (Y-3) с клетками селезенки крысы LOU, иммунизированной очищенным, концентрированным, инактивированным препаратом ВЭ. В качестве сливающего агента использовали 45% раствор полиэтиленгликоля фирмы "Sigma" с молекулярным весом 1300-1600 кДа по методу [23]. Клетки после слияния выращивали в селективной среде ГАТ в 96-луночных культуральных планшетах. В качестве фидерных клеток использовали перитонеальные макрофаги крысы LOU. Гибридомы, стабильно продуцирующие специфические МКА, клонировали 3 раза. Выход позитивных клонов в последнем клонировании составил 100%.

Число пассажей к моменту депонирования: 7-10 пассажей.

Маркерные признаки и методы их оценки.

Штамм *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" 1В2 секретирует мышинные моноклональные иммуноглобулины субкласса IgG1 (имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи), специфически взаимодействующие с белком NP ВЭ. Анализ мышинных иммуноглобулинов проводят методом ИФА, используя в качестве антигена инактивированный ВЭ, субтип Заир (штамм Mainga) или рекомбинантный нуклеопротеин (рек. NP), (полученный как описано [25] в результате биосинтеза в клетках *E.coli* на основе плазмидной конструкции, включающей полный ген NP ВЭ) и антитела против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена.

Штамм *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 секретирует крысиные моноклональные иммуноглобулины субкласса IgG, специфически взаимодействующие с белком NP ВЭ. Анализ крысиных иммуноглобулинов проводят методом ИФА, используя в качестве антигена инактивированный ВЭ, субтип Заир (штамм Mainga) или рекомбинантный белок NP и антитела против IgG крысы, меченные пероксидазой хрена.

Контаминация бактериями и грибами не обнаружена.

Культуральные свойства. Среда для культивирования DMEM/F12 с глутамином, пиридоксином, Нерес (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора). Содержание фетальной сыворотки, оптимизированной для гибридом (HyClone, USA) в ростовой среде - 10%. В среду также добавляют 80-160 мкг/мл сульфата гентамицина.

Штаммы являются монослойно-суспензионными культурами, в которых до 20% клеток находится в суспензии, не прикрепляясь к поверхности посуды для культивирования. Клетки с поверхности культуральной посуды удаляются раствором трипсина/версена = 1/1 (объем/объем). Посевная доза 200 тысяч кл/мл. Частота пассирования через 3-4 суток. Индекс пролиферации - не менее 5. Культивирование штамма *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" 1В2 в организме животного. Самкам мышей BALB/c (виварий ГНЦ ВБ "Вектор") предварительно вводят внутрибрюшинно 0,3-0,5 мл пристана (Sigma). Через 2-4 недели животным прививают внутрибрюшинно 10 млн гибридных клеток. Асцитическая опухоль формируется на 7-10 день. Гибридома прививается в 100% случаев. От одного животного можно получить 3-5 мл асцитической жидкости, содержащей МКА. Культивирование штамма *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 в организме животного *Rattus norvegicus*. Самкам крыс LOU (виварий ГНЦ ВБ "Вектор") предварительно вводят внутрибрюшинно 5 мл вазелинового масла или пристана (Sigma). Через 2-4 недели животным прививают внутрибрюшинно 30-50 млн гибридных клеток. Асцитическая опухоль формируется на 10-12 день. Гибридома прививается в 100% случаев. От одного животного можно получить 15-30 мл асцитической жидкости, содержащей

МКА.

Характеристика полезного продукта штамма *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" 1В2. Типирование гибридных иммуноглобулинов 1 В2 проведено методом твердофазного ИФА с использованием моноспецифических мышинных антител («Sigma», США). МКА относятся к субклассу IgG1. Они специфически взаимодействуют с нативным белком NP ВЭ (96 кДа) и рек. NP (96 кДа) в реакции иммуноблота. В ИФА титр МКА в асците составляет 1:2187000. Стабильная продукция МКА сохраняется на протяжении не менее 10 пассажей *in vitro* при непрерывном культивировании. Из одного миллилитра асцитической жидкости можно получить 3-5 мг очищенных МКА.

Характеристика полезного продукта штамма *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11. МКА специфически взаимодействуют с нативным белком NP ВЭ (96 кДа) и рекомбинантным белком NP (96 кДа) в реакции иммуноблота. В ИФА титр МКА в асците составляет 1:512000. Стабильная продукция МКА сохраняется на протяжении не менее 10 пассажей *in vitro* при непрерывном культивировании. Из одного миллилитра асцитической жидкости можно получить 3-5 мг очищенных МКА.

Криоконсервирование. Среда для замораживания - среда ДМЕМ(М) - 50%, фетальная сыворотка - 40%, диметилсульфоксид - 10%. 1-1,5 мл клеточной суспензии переносят в пластиковые криопробирки и помещают в пенопластовый контейнер с толщиной стенок 1 см. Контейнер вносят в пары жидкого азота и через 18-24 часа пробирки переносят в жидкий азот. Размораживание проводят, опуская пробирки в воду с температурой 37-41°C. Клетки разводят средой ДМЕМ(М) и центрифугируют при 1000 об/мин. Осадок ресуспендируют в ростовой среде и клетки переносят в культуральные флаконы в концентрации 200-300 тысяч в миллилитре. Жизнеспособность клеток после размораживания составляет 60-80% (по результатам окрашивания 0,25% трипановым синим).

Каждая ампула содержит не менее 10 млн/мл клеток.

Изобретение поясняется графическим материалом, представленным на фиг.1-3.

На фиг.1 представлена электрофореграмма очищенных МКА, где:

1, 2 - препараты очищенных МКА 1В2 и 7В11 (по 1 мкл), стрелками обозначены цепи иммуноглобулинов:

- т - тяжелая цепь (55 кДа); л - легкая цепь (25 кДа);
- 3 - белковые маркеры молекулярного веса (10 мкл)(Bio-Rad);
- 4 - значения молекулярного веса белковых маркеров.

На фиг.2а представлена электрофореграмма нативных белков вируса Эбола и рекомбинантного нуклеопротеина (NP), где:

- 1 - очищенный рекомбинантный нуклеопротеин (NP) (10 мкл);
- 2 - препарат вируса Эбола (20 мкл), стрелками обозначены вирусные белки;
- 3 - обозначения вирусных белков.

На фиг.2в представлен иммуноблот нативного и рекомбинантного нуклеопротеина, где:

- 1 - препарат вируса Эбола, обработан МКА 1В2 в разведении 1:500;
- 2 - препарат вируса Эбола, обработан МКА 7В11 в разведении 1:500;
- 3 - рекомбинантный NP, обработан МКА 1В2 в разведении 1:500;
- 4 - рекомбинантный NP, обработан МКА 7В11 в разведении 1:500;
- 5 - препарат вируса Марбург, обработан МКА 1В2 в разведении 1:500 (отрицательный контроль);
- 6 - препарат вируса Марбург, обработан МКА 7В11 в разведении 1:500

(отрицательный контроль);

7 - лизат E.coli., обработан МКА 1В2 в разведении 1:500 (отрицательный контроль);

8 - лизат E.coli., обработан МКА7 В11 в разведении 1:500 (отрицательный контроль).

На фиг.3 приведен график титрования антигена вируса Эбола и рекомбинантного нуклеопротеина парой МКА 1В2 и 7В11*, где: исходная концентрация препаратов антигенов по СФ 1 мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл;

7В11* - индикаторные МКА меченные биотином;

в качестве отрицательного контроля использовали пару МКА 9С7 и 5F11*, специфичных к нуклеопротеину вируса Марбург [24];

концентрация МКА для "захвата" антигенов - 10 мкг/мл;

концентрация индикаторных МКА, меченных биотином, - 1 мкг/мл.

Методика получения штамма Mus musculus L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1В2.

Штамм гибридных клеток Mus musculus L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1В2 получают следующим образом. Самок мышей BALB/c (виварий ГНЦВБ "Вектор"), массой 15-20 г, иммунизируют по схеме, которая приведена ниже в таблице 1.

Таблица 1			
Схема иммунизации			
дни	раствор для разведения антигена	доза антигена (мкг/мышь)	область инъекции
0	полный адьювант Фрейнда	10	внутрибрюшинно
7	неполный адьювант Фрейнда	10	внутрибрюшинно
11	физиологический раствор	40	внутривенно
12	физиологический раствор	60	внутривенно
14	Гибридизация	(забор селезенки)	

Для слияния используют соотношение 3/1 селезеночных клеток мышей и клеток мышинной миеломы NS/1. Смесь клеток центрифугируют, супернатант тщательно удаляют и к клеточному осадку добавляют 0,4 мл 45% раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1300-1600. Смесь центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин. После 3 мин паузы слой ПЭГ медленно разбавляют 5 мл раствора версена, после чего осадок ресуспендируют. Затем клетки снова осаждают (10 мин при 1000 об/мин) и осадок растворяют в ростовой среде. Клетки распределяют в пять 96-луночных микроплат (Costar) по 100 мкл в лунку. Селекцию гибридных клеток проводят в среде ГАТ, состоящей из питательной среды ДМЕМ(М), в которую добавлены 10% фетальной сыворотки коров (Girco), 0,1 мМ гипоксантина, 0,04 мМ тимидина и 0,01 мМ аминокпертина. Отбор специфических гибридов проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки микроплат (ВНИИМедПолимер) в качестве антигена сорбируют 100-200 нг очищенного ВЭ. Места неспецифического связывания насыщают 0,5% раствором казеина (ICN). Затем в лунки переносят по 100 мкл культуральной среды исследуемых гибридом и инкубируют 45 мин при 37°C. После инкубации лунки промывают 3-5 раз физиологическим раствором, содержащим 0,05% твин-20 (Sigma). Далее в планшеты вносят по 100 мкл антивидового конъюгата (иммуноглобулины кролика против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена) и выдерживают 45 мин при 37°C. Планшеты промывают и проводят ферментативную реакцию. Результаты анализа определяют на спектрофотометре "Multiscan" (Финляндия).

Методика получения штамма Rattus norvegicus ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11.

Штамм гибридных клеток Rattus norvegicus ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 получают следующим образом. Самок крыс Lou (виварий ГНЦВБ "Вектор"), массой 180-200 г,

иммунизируют по схеме, которая приведена ниже в таблице 2.

Таблица 2			
Схема иммунизации			
дни	раствор для разведения антигена	доза антигена (мкг/крыса)	область инъекции
0	полный адъювант Фрейнда	10	внутрибрюшинно
7	неполный адъювант Фрейнда	10	внутрибрюшинно
11	физиологический раствор	50	внутривенно
12	физиологический раствор	100	внутривенно
14	Гибридизация	(забор селезенки)	

Для слияния используют соотношение 3/1 селезеночных клеток крысы и клеток крысиной миеломы 210 RC.Y3-Agl.2.3. (Y-3). Смесь клеток центрифугируют, супернатант тщательно удаляют и к клеточному осадку добавляют 0,4 мл 45% раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 1300-1600. Смесь центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин. После 3 мин паузы слой ПЭГ медленно разбавляют 5 мл раствора версена, после чего осадок ресуспендируют. Затем клетки снова осаждают (10 мин при 1000 об/мин) и осадок растворяют в ростовой среде. Клетки распределяют в пять 96-луночных микроплат (Costar) по 100 мкл в лунку. Селекцию гибридных клеток проводят в среде ГАТ, состоящей из питательной среды ДМЕМ(М), в которую добавлены 10% фетальной сыворотки коров (Gipro), 0,1 мМ гипоксантина, 0,04 мМ тимидина и 0,01 мМ аминоптерина. Отбор специфических гибридов проводят методом иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки микроплат (ВНИИМедПолимер) в качестве антигена сорбируют 100-200 нг очищенного вируса Эбола. Места неспецифического связывания насыщают 0,5% раствором казеина (ICN). Затем в лунки переносят по 100 мкл культуральной среды исследуемых гибридом и инкубируют 45 мин при 37°C. После инкубации лунки промывают 3-5 раз физиологическим раствором, содержащим 0,05% твин-20 (Sigma). Далее в планшеты вносят по 100 мкл антивидового конъюгата (иммуноглобулины кролика против IgG крысы, меченные пероксидазой хрена) и выдерживают 45 мин при 37°C. Планшеты промывают и проводят ферментативную реакцию. Результаты анализа определяют на спектрофотометре "Multiscan".

Полученные гибридные штаммы дважды клонируют методом предельных разведений, переводят в массовую культуру и замораживают в жидком азоте. Приведенные ниже примеры подробно раскрывают полезные свойства объектов изобретения.

Пример 1. Культивирование гибридных клеток штамма *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1B2, продуцирующих МКА к нуклеопротеину ВЭ в организме животных, мышей BALB/c.

Мышам BALB/c (виварий ГНЦВБ "Вектор"), весом 20-22 г, не менее чем за 10 дней до прививки гибридомных клеток вводят внутрибрюшинно по 0,3-0,5 мл пристана. Культивируемые клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, стерильно центрифугируют 5-10 мин при 1000 об/мин на центрифуге ОПН-3. Надосадок удаляют, а осадок клеток суспензируют в стерильном растворе Эрла или Хенкса. Через 2-4 недели животным прививают внутрибрюшинно 10 млн гибридных клеток в объеме 1 мл клеточной суспензии. Через 7-10 дней животных усыпляют и из брюшной полости извлекают 3-5 мл асцитической жидкости. Клетки из асцитической жидкости отделяют центрифугированием и в надосадочной жидкости определяют титр МКА с помощью ИФА, как описано выше.

Пример 2. Культивирование гибридных клеток штамма *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ

"Вектор" 7B11, продуцирующие МКА к нуклеопротеину ВЭ в организме животных, крыс Lou.

Крысам Lou (виварий ГНЦВБ "Вектор"), весом 180-200 г, не менее чем за 10 дней до прививки гибридных клеток вводят внутривентально 5 мл вазелинового масла или пристана. Культивируемые клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста,

стерильно центрифугируют 5-10 мин при 1000 об/мин на центрифуге ОПН-3.

Надосадок удаляют, а осадок клеток суспензируют в стерильном растворе Эрла или Хенкса. Через 2-4 недели животным прививают внутривентально 30-50 млн

гибридных клеток в объеме 3 мл клеточной суспензии. Через 10-12 дней животных усыпляют и из брюшной полости извлекают 15-30 мл асцитической жидкости. Клетки из асцитической жидкости отделяют центрифугированием и в надосадочной жидкости определяют титр антител с помощью ИФА, как описано выше.

Пример 3. Выделение очищенных моноклональных антител, продуцируемых гибридными культивируемыми клетками штаммов *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1B2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7B11

Один объем асцитической жидкости, содержащей МКА, разводят 4 объемами 0,6 М ацетатного буфера (0,04 М лимонной кислоты, 0,2 М натрия ацетата), рН 4,0 и доводят рН до 4,5 с помощью 0,1 N раствора едкого натра. К разведенному образцу добавляют по каплям, с постоянным перемешиванием, каприловую кислоту из расчета 25 мкл на 1 мл раствора и инкубируют ночь при +4°C. Затем центрифугируют 30 мин при 8000 g и осадок удаляют, а надосадок смешивают с 10-кратным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и устанавливают рН 7,4 раствором 1,0 N едкого натра. Равный объем насыщенного раствора сульфата аммония добавляют к этому раствору, встряхивают и выдерживают ночь при +4°C или 30 мин при 20-25°C. Центрифугируют 15 мин при 5000 g. Надосадок сливают, а осадок растворяют в ФСБ, рН 7,4. Остатки сульфата аммония удаляют путем диализа против 50-100 объемов ФСБ, рН 7,4. Электрофорез очищенных препаратов МКА проводили по методу, описанному в работе [26] в прерывистой буферной системе с использованием 12-15% полиакриламидного геля с 0,1% додецилсульфата натрия в трис-глициновом буфере. Разделяющий гель содержал 0,0625М трис-НСl (рН 8,8), 0,1% SDS, 10(15)% акриламид, 1% N,N-метиленабисакриламид. Препараты МКА (по 1 мкл) наносили на дорожку в объеме 30 мкл буфера, содержащем 0,0625М трис-НСl (рН 6,8), 2% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий. Перед нанесением буфер, содержащий МКА, прогревали 3 мин при 95°C. Электрофорез вели в режиме 10 В/см. Окраску геля проводили при помощи Кумасси G-250. Очищенные препараты в виде электрофореграммы представлены на фиг.1.

Пример 4. Определение методом ИФА специфического взаимодействия МКА, продуцируемых гибридными клетками штаммов *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1B2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7B11 с вирусом Эбола или рекомбинантным белком NP.

ИФА проводили на полистироловых планшетах; антиген в рабочем разведении (очищенный и инактивированный вирус Эбола или рекомбинантный белок NP) сорбировали в ФСБ, рН 7,4 в объеме 100 мкл/лунка на планшеты. Места неспецифического связывания насыщали при 37°C 45 минут 0,5% раствором казеина в буфере ТСБ-Твин (0.145 М хлористого натрия, 20 mM Трис-НСl, 5 mM PMSF (Sigma), 0,1% Tween-20 (Serva), рН-7,4) и затем инкубировали с очищенными МКА 45 минут при 37°C. Специфическое связывание МКА с антигеном выявляли антивидовыми мечеными пероксидазой антителами против IgG мыши для 1B2 или против IgG крысы

для 7B11. Далее добавляли хромоген, 0,1% О-фенилендиамин, в цитратно-фосфатном буфере (0,2 М лимонной кислоты, 0,5 М Na₂HPO₃, pH 5,0) с 0,03% перекиси водорода). Останавливали реакцию добавлением 100 мкл на лунку 1 N HCl и измеряли
 5 оптическую плотность образцов на спектрофотометре "Multiscan" с использованием светофильтра с максимумом пропускания 492 нм. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали гомологичные нормальную (неиммунную) и гипериммунную сыворотки мыши и крысы соответственно.

Пример 5. Выявление в иммуноблоте взаимодействия МКА, продуцируемых
 10 гибридными клетками штаммов *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1B2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7B11 с белком NP вируса Эбола (субтип Заир) и рекомбинантным белком NP.

Вирусные белки и рекомбинантный белок NP после 12% ПААГ-электрофореза были
 15 перенесены на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США). Места неспецифического связывания насыщали 0,5% раствором казеина в буфере ТСБ-Твин (0,145 М хлористого натрия, 20 mM Трис-HCl, 5 mM PMSF (Sigma), 0.1% Tween-20 (Serva), pH-7,4) при 37°C 2 часа. Затем отдельные полоски мембраны инкубировали с очищенными МКА 4 часа при 20-22°C. Специфическое связывание антител,
 20 взаимодействующих с вирусными белками, выявляли с помощью конъюгата антивидовых антител против IgG мыши для 1B2 и против IgG крысы для 7B11, меченных пероксидазой хрена. В качестве отрицательного контроля использовали полоски мембраны с перенесенными после электрофореза инактивированным вирусом Марбург [24] и лизатом *E.coli.*, также обработанными МКА. Результаты представлены
 25 на фиг.2а и 2в.

Пример 6. Приготовление конъюгатов МКА с биотином. Для биотинилирования
 моноклональных иммуноглобулинов использовали следующую методику: готовили
 30 свежий раствор NSB (N-hydroxysuccinimidobiotin), для этого растворяли 2 мг биотина в 0,5 мл ДМСО и доводили объем до 2 мл. Затем готовили раствор очищенных МКА (в 0,1М NaHCO₃ pH 9,0) в концентрации 1 мг/мл. Раствор NSB капельно добавляли к раствору МКА в объемном соотношении 1/1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов. Затем доводили объем раствора до 1 мл 0,05М
 35 фосфатным буфером (PBS) с pH 7,0, содержащим 0,15М натрия хлорида и 0,1% азида натрия. Диализовали против фосфатного буфера. Процесс включения биотина в иммуноглобулины контролировали титрованием меченых МКА на антигене, иммобилизованном на пластик, с конъюгатом пероксидазы со стрептовидином.

Пример 7. Конкурентный ИФА формата "сэндвич" для выявления нативного
 40 белка NP ВЭ, субтип Заир (штамм Mainga) и рекомбинантного белка NP.

В лунках высокосорбционных полистироловых планшетов ("Testiks" или "Nunc") сорбировали очищенные МКА 1B2 в 0,5 М карбонатном буфере (pH 9,0) в объеме 100 мкл в рабочей концентрации (10 мкг/мл) при 22°C в течение 12 ч. Места для
 45 неспецифического связывания антител на планшетах насыщали 0,5% раствором казеина и выдерживали при 37°C в течение 30 минут. Титрование антигена проводили с разведения 1:400 двухкратным шагом в течение ночи при 4°C или при 37°C в течение часа. Затем в лунки планшетов вносили конъюгаты МКА 7B11 с биотином в рабочих разведениях (1 мкг/мл), выдерживали при 37°C в течение часа и после 3-кратной
 50 отмывки лунок вносили в них конъюгат стрептавидина с пероксидазой. Специфическое связывание антител, меченных биотином, с конъюгатом выявляли жидкой субстратной системой ТМБ (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine, Sigma) по 100 мкл на лунку. Выдерживали планшеты 30 мин в темноте, останавливали реакцию

добавлением 100 мкл на лунку 1N соляной кислоты и измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре "Uniscan" при длине волны 450 нм. Положительным считали результат измерения ОП в лунке, превышающий в 2 раза таковой для лунки с отрицательным контролем. Для отрицательного контроля связывания антител с антигеном использовали пару МКА, выявляющих нуклеопротеин вируса Марбург. График титрования антигенов представлен на фиг.3.

Вышеприведенные свойства штаммов гибридных клеток *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1В2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 (авторское название клеточных линий 1В2 и 7В11) позволяют заключить, что впервые на основе мышшиной и крысиной миелом получены гибридомы *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1В2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 - продуценты МКА, не конкурирующих между собой за антигенные эпитопы нуклеопротеина ВЭ.

Штамм гибридных клеток *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" - 1В2 обеспечивает получение мышшиных моноклональных иммуноглобулинов субкласса IgG1 в количестве 3-5 мг очищенных антител из миллилитра асцитической жидкости. Штамм гибридных клеток *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 обеспечивает получение крысиных моноклональных иммуноглобулинов субкласса IgG в количестве 3-5 мг очищенных антител из миллилитра асцитической жидкости. Очищенные МКА специфично реагировали в ИФА с ВЭ и рекомбинантным нуклеопротеином (титр МКА составлял 1:2187000 для 1В2 и 1:512000 для 7В11 соответственно); выявляли в иммуноблоте вирус-ассоциированный нуклеопротеин и рекомбинантный белок, полученный в результате биосинтеза в клетках *E.coli* на основе плазмидной конструкции, включающей полный ген NP ВЭ. Совместное использование МКА в ИФА в формате "сэндвич" позволяет выявлять нативный и рекомбинантный белки с чувствительностью менее 1 нг/мл. Использование данных препаратов МКА и рекомбинантного нуклеопротеина в качестве положительного контроля на антиген, позволит эффективно выявлять случаи ГЛЭ на территории России в формате ИФА "сэндвич".

Вышеуказанные свойства штаммов *Mus musculus* L. ГНЦ ВБ "Вектор" 1В2 и *Rattus norvegicus* ГНЦ ВБ "Вектор" 7В11 (авторское название клеточных линий 1В2 и 7В11) отличают их от всех описанных ранее гибридом, продуцирующих МКА к белкам вируса Эбола.

Источники информации

1. Пьянков О.В., Сергеев А.Н., Пьянкова О.Г., Перебоева Л.А. / Патологические изменения в организме приматов, аэрозольно инфицированных вирусом Эбола. // Изучение и профилактика особо опасных вирусных инфекций. Межведомственная конференция 7-8 апреля 1993 г. Кольцово, тезисы докладов.

2. Johnson E, Jaax N, White J, Jahrling P. / Lethal experimental infection of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. // *Int J Exp Pathol* 1995. 76(4):227-36.

3. World Health organization report 3 January 2001. / Ebola haemorrhagic fever in Uganda.

4. Bowen ET, Lloyd G, Harris WJ, Platt GS, Baskerville A, Vella EE. / Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. // *Preliminary studies on the aetiological agent. Lancet* 1977. 1:571-573.

5. Johnson KM, Lange JV, Webb PA, Murphy FA. / Isolation and partial characterization of a new virus causing acute hemorrhagic fever in Zaire. // *Lancet* 1977. 1:569-571.

6. World Health organization reports 1995, 2007. / Ebola haemorrhagic fever in Zaire.

7. World Health organization reports 1996, 1997, 2001, 2002. / Ebola haemorrhagic fever in Gabon.

8. World Health organization reports 2000, 2001, 2007. / Ebola haemorrhagic fever in Uganda.
9. World Health organization reports 2002, 2003, 2005. / Ebola haemorrhagic fever in Congo.
10. World Health organization report 2004. / Ebola haemorrhagic fever in Sudan.
11. Gear JH. / Haemorrhagic fevers, with special reference to recent outbreaks in southern
5 Africa. // Rev Infect Dis 1979. 1:571-591.
12. Турьянов М.Х., Царегородцев А.Д., Лобзин Ю.В. / Инфекционные болезни. М.: Медицина, 1998.
13. Science News. ScienceDaily Aug.31, 2005. / Poaching, logging, and outbreaks of Ebola
10 threaten central african gorillas and chimpanzees.
14. Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB. / Descriptive analysis of Ebola virus protein. // Virology 1985. 147, pp.169-176.
15. Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot MC, Capron M, Lansoud-Soukate J, Debre P, Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Georges AJ. / Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. // Nat Med 1999. 5(4):423-426.
16. Мерзликин Н.В., Чепурнов А.А., Истомина Н.Н., Офицеров В.И., Воробьева М.С. / Разработка и применение иммуноферментных тест-систем для диагностики лихорадки Эбола. // Журнал "Вопросы вирусологии" №1, 1995. С.31-35.
20
17. Мерзликин Н.В. / Иммуноферментные тест-системы для изучения лихорадки Эбола. // Автореферат диссертации канд.биол.наук. Кольцово, 1995.
18. Rowe AK, Bertolli J, Khan AS at all and Ksiazek TG. / Clinical, virologic and immunologic follow up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household
25 contacts, Kikwit Democratic Republic of the Congo. // J Infect Dis, 1999. 179(1), p.28-35.
19. Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, Lee WF, Spiropoulou CF, Ksiazek TG, Lukwiya M, Kaducu F, Downing R, Nichol ST. / Rapid diagnosis of Ebola fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient
30 viral load as a predictor of outcome. // J Virol 2004. 78(8):4330-41.
20. Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda M, Morikawa S. / Detection of Ebola viral antigen by enzyme-linked immunosorbent assay using a novel monoclonal antibody to nucleoprotein. // Journal of Clinical Microbiology 2001. 39(9):3267-71.
21. Ikegami T, Niikura M, Saijo M, Mir Calaor ME, Hernandez M, Acosta LP, Manalo DL, Yoshikawa I, Morikawa S. / Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay fo detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. // Clin Diagn Lab Immunol 2003. 10(4):552-557.
35
22. Чепурнов А.А., Мерзликин Н.В., Рябчикова Е.И., Чепурнова Т.С., Волчков В.Е., Истомина Н.И., Кузьмин В.А., Воробьева М.С. / Получение очищенного вируса Эбола. // Журнал "Вопросы вирусологии" №6, 1994. С.254-257.
40
23. Gefler ML, Margulies DH, Schaff MD. / A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. // Somat Cell Genet 1977. V3, pp.231-236.
24. И.А.Разумов, Е.Ф.Беланов, А.А.Букреев, Е.И.Казачинская. Моноклональные антитела к белкам вируса Марбург и их иммунохимическая характеристика. / Вопросы
45 вирусологии №6. 1998, с.274-279.
25. А.В.Сорокин, Е.И.Казачинская, А.В.Качко, А.В.Иванова, А.А.Букреев, И.А.Разумов. / Сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природного и рекомбинантного белков VP35 вируса Марбург./ Вопросы
50 вирусологии №5. 1999, с.206-213.
26. Остерман А.А. / Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. // Москва, 1981. С.37-64.

Формула изобретения

1. Штамм гибридных клеток животного *Mus musculus* L. 1B2, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga) и используемых в качестве захватывающих антиген в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

2. Моноклональное антитело 1B2, продуцируемое штаммом гибридных клеток животного *Mus musculus* L. 1B2 (субкласс иммуноглобулинов IgG1, имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи), используемые в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

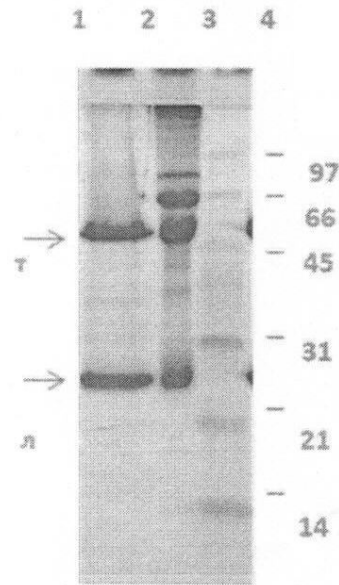
3. Штамм гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus* 7B11, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga) и используемых в качестве индикаторных меченных биотином в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

4. Моноклональное антитело 7B11, продуцируемое штаммом гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus* 7B11 (субкласс иммуноглобулинов IgG), используемые совместно в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

5. Набор для иммуноферментной тест-системы формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga), включающий моноклональные антитела 1B2, продуцируемые штаммом гибридных клеток животного *Mus musculus* L. 1B2 и сорбированные на полистироловых планшетах, конъюгаты биотина с моноклональными антителами 7B11, продуцируемыми штаммом гибридных клеток животного *Rattus Norvegicus* 7B11, конъюгат стрептавидина с пероксидазой и тетраметилбензидин, количественное содержание которых в наборе достаточно для проведения иммуноферментной реакции.

Приложение 1

Электрофореграмма очищенных МКА.

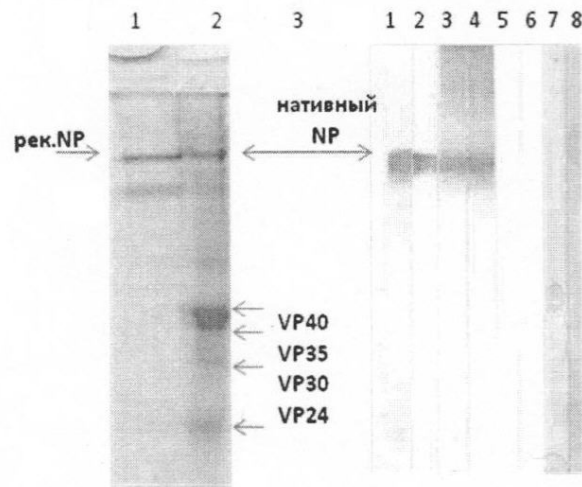


Фиг.1

Приложение 2

Электрофореграмма нативных белков вируса Эбола и рекомбинатного нуклеопротеина (NP).

Иммуноблот нативного и рекомбинатного нуклеопротеина.



Фиг. 2



Фиг. 3