

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.2.086+577.2.087

doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.535-550

**ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА
ДЛЯ СКРИНИНГА ГИБРИДОМ И ПОЛУЧЕНИЯ
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

*И.И. Степанова, К.А. Артемьева, А.А. Степанов, И.М. Богданова,
М.Н. Болтовская, Е.А. Пономаренко*

*Научно-исследовательский институт морфологии человека
имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии
имени академика Б.В. Петровского», г. Москва, 119991, Россия*

Аннотация

В статье рассмотрены особенности и преимущества использования иммуноферментного анализа для проведения скрининга гибридом и отбора моноклональных антител, перспективных для использования в иммуногистохимических исследованиях и идентификации клеток *in vitro*. Поэтапно охарактеризована методика клеточного иммуноферментного анализа, демонстрируются его преимущества перед известными методами анализа структурных и секреторных белков. Предварительное проведение клеточного иммуноферментного анализа целесообразно использовать для отбора клонов, продуцирующих моноклональные антитела с интересующей специфичностью, определения оптимальной концентрации первичных антител для последующей постановки иммуногистохимической реакции и идентификации культивируемых клеток.

Ключевые слова: In-Cell ELISA, гибридома, моноклональные антитела, иммуногистохимия

Введение

Моноклональные антитела (МАТ), получаемые с помощью гибридомной технологии, представляют собой универсальные связывающие молекулы с высокой специфичностью для своих антигенных мишеней и являются незаменимыми исследовательскими инструментами в различных областях биологии и медицины. МАТ нашли широкое применение в иммуногистохимических (ИГХ) исследованиях после того, как Ч.Р. Тейлор и Дж. Бёрнс впервые успешно использовали меченные пероксидазой антитела для выявления плазматических клеток в приготовленных стандартным способом гистологических препаратах фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани [1]. Широкое внедрение ИГХ в диагностическую практику, в том числе для выявления диагностических и прогностических биомаркеров опухолей, обусловило потребность в МАТ, реагирующих с целевыми антигенами клеток и тканей в клиническом материале после рутинной обработки. Одним из главных условий, определяющих успех

гибридизации, является применение высокопроизводительных, чувствительных и специфичных методов скрининга гибридом. Такому требованию отвечает метод клеточного иммуноферментного анализа (ИФА), или In-Cell ELISA (ICE), известный также под названиями клеточный вестерн-блоттинг (In-Cell Western) и цитоблот [2, 3]. Метод, объединяющий преимущества ИГХ, гетерогенного ИФА и вестерн-блоттинга, обеспечивает возможность качественного и количественного определения широкого спектра внутриклеточных белков и/или белков клеточной поверхности, а также оценку таких посттрансляционных модификаций, как фосфорилирование, метилирование или ацетилирование [4]. Для скрининга большого количества образцов клеток он является высокочувствительной, простой, быстрой и недорогой альтернативой методу иммуофлуоресцентной проточной цитометрии для количественной оценки антигенов клеточной поверхности [5]. ICE позволяет выявлять целевые анализируемые молекулы *in situ* как в прикрепленных, так и во взвешенных клетках со специфичностью воспроизводимостью ИФА [6, 7]. Модификации метода ICE с использованием разных типов клеток были применены для решения разнообразных медико-биологических задач, в том числе для скрининга моноклональных антител к поверхностным молекулам Т-клеток человека [8], выявления цитоплазматической экспрессии компонентов процессинга антигенов HLA класса I [9], дифференциальной диагностики туберкулезного и пиогенного менингита [10], определения уровня фосфорилирования TRK (тропонин-связаной киназы) для последующей оценки эффективности ингибиторов TRK как потенциальных лекарственных препаратов [4], выявления аномальных изоформ прионового белка [11], оценки нейротрофной активности в минорных клеточных популяциях гетерогенных монослойных культур сетчатки [12], количественного определения муцина MUC1 в опухолевых клетках эпителиального и нейроэктодермального происхождения [13], определения количества специфических нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 и противовирусной активности потенциальных лекарственных средств [14], количественного определения *Chlamydia trachomatis* и скрининга антибактериальных препаратов [15].

Преимуществами метода ICE являются экономичность, высокая специфичность, чувствительность и воспроизводимость, возможность постановки реакции в тех же лунках культуральных планшетов, в которых были выращены и обработаны клетки, высокая пропускная способность, получение количественных данных с использованием колориметрического, флуоресцентного или инфракрасного методов детекции, отсутствие необходимости в специальном программном обеспечении помимо поставляемого к используемым спектрофотометрам и/или микроскопам для получения и анализа количественных данных. Метод позволяет определить клеточную локализацию исследуемых антигенов (ядерная, цитоплазматическая, мембранная), продемонстрировать стадии дифференцировки клеток, визуализировать их структуры. Может быть использован для мониторинга сигнальных путей, определения динамики клеточного ответа на экзогенные факторы, характеристики интернализации и рециркуляции рецепторов [2, 6, 14, 16].

В настоящей работе была проведена оценка возможности применения клеточного иммуноферментного анализа для скрининга гибридом и отбора наиболее перспективных продуцентов МАТ, которые могут быть использованы при имму-

ногистохимическом исследовании клинического материала и идентификации культивируемых клеток.

1. Материалы и методы

1.1. Реактивы. PBS, PBS-твин, среда для культивирования RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), 8%-ный параформальдегид, 30%-ный H₂O₂, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Substrate Solution, N301, Thermo Fisher Scientific, США), 1%-ный раствор DAB (3,3'-Diaminobenzidine, D800, Sigma-Aldrich, США), набор UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo Fisher Scientific, США).

1.2. Линии клеток. В работе были использованы клеточные линии U373 (глиобластома человека), MCF-7 и ZR-75-1 (рак молочной железы человека), Caco-2 (колоректальная аденокарцинома человека), полученные из банка клеточных культур опухолей НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» [17].

1.3. Клинический материал. Парафиновые срезы аденокарциномы молочной железы и аденокарциномы толстого кишечника, полученные после общепринятой фиксации опухолей нейтральным формалином, были предоставлены лечебно-профилактическими учреждениями г. Москвы.

1.4. Антитела. В качестве первичных применяли оригинальные МАТ, полученные в лаборатории патологии репродукции НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В.Петровского», и коммерческое МАТ к опухолеассоциированным антигенам человека, иммуноглобулину G человека, лизату клеток глиобластомы U373 человека (табл. 1).

Табл. 1

Характеристика использованных антител

Специфичность	Наименование	Вид антител, рабочее разведение	Применение	Производитель
Муцин Muc1	IS32	Мышинные моноклональные, аффинноочищенные, 5 мкг/мл	ИСЕ, ИГХ	ХЕМА-Медика, Россия
Простатоспецифический антиген	PS30	Мышинные моноклональные, аффинноочищенные, 5 мкг/мл	ИСЕ, ИГХ	НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Раково-эмбриональный антиген	РЭ274	Мышинные моноклональные, аффинноочищенные, 5 мкг/мл	ИСЕ, ИГХ	НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Иммуноглобулин G	G27	Мышинные моноклональные, аффинноочищенные, 5 мкг/мл	ИСЕ, ИГХ	НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
Лизат клеток глиобластомы U373	U	Мышинные моноклональные, культуральная среда	ИФА, ИСЕ	НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»

1.5. Культуральный метод. Культивирование проводили в среде RPMI-1640 с глутамином, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки выращивали во флаконах площадью 75 см² (SPL Lifesciences, Южная Корея) в CO₂-инкубаторе (Nuairе, США) в газовой среде, содержащей 5%-ный CO₂, при температуре 37 °С. Пересев культуры проводили на 2–4-е сутки по достижении концентрации 10⁶ клеток/см².

1.6. Гетерогенный ИФА. Анализ проводили по методике непрямого неконкурентного ИФА [18]. В качестве антигена использовали лизат, полученный из разрушенных замораживанием клеток глиобластомы U373 и сорбированный на поверхности лунок (концентрация 10 мкг/мл, объем 50 мкл). Результаты оценивали определением оптической плотности (ОП) субстратно-хромогеновой смеси на планшетном спектофотометре при длине волны 450 нм. Результат считали положительным при ОП ≥ 0.3.

1.7. Клеточный ИФА (ICE). Выполняли по модифицированному протоколу [16, 19] (см. рис. 1).

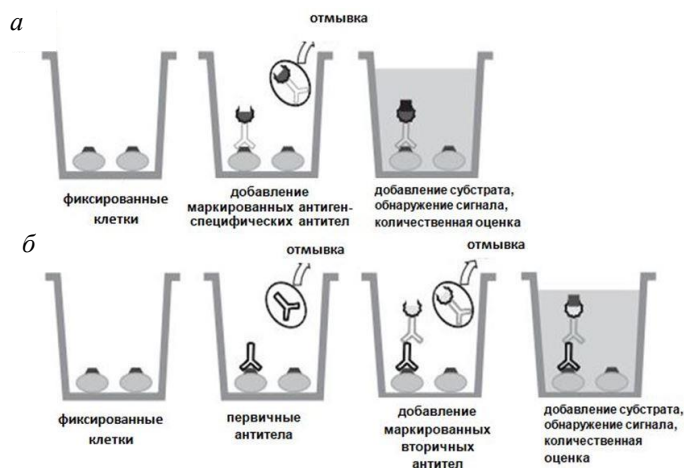


Рис. 1. Прямой и непрямой клеточный ИФА для обнаружения антигенов клеточной поверхности (а) и антител, нацеленных на антиген клеточной поверхности (б), по [16]

Посев клеток. Исследуемые клетки вносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета (SPL Lifesciences, Южная Корея) в количестве 50 тыс. в объеме 100 мкл. После прикрепления клетки культивировали 2–3 дня до образования 80%-ного равномерного монослоя.

Закрепление клеток в лунках планшета. Для фиксации клеток добавили 100 мкл 8%-ного раствора параформальдегида. Инкубировали 15 мин. Промывали лунки раствором PBS.

Пермеабиллизация клеток (при необходимости). Добавляли в лунки 200 мкл 10%-ного раствора Triton X-100 для пермеабиллизации, инкубировали в течение 30 мин. Затем в каждую лунку добавляли 200 мкл 0.5%-ного блокирующего раствора казеина в PBS. Инкубировали в течение 2 ч с использованием планшетного шейкера (~ 300 об./мин). Четырехкратно отмывали раствором PBS, 300 мкл/на лунку.

Инкубация с первичным антителом. Антитела в рабочем разведении вносили по 100 мкл в соответствующие лунки. Инкубацию проводили в закрытом планшете в течение ночи (не менее 10 ч) при 4 °С. Содержимое лунок осторожно удаляли вытряхиванием. Четырехкратно отмывали раствором PBS, 300 мкл/на лунку.

Инкубация с вторичными антителами. Конъюгат вторичных антител с пероксидазой хрена в рабочем разведении добавляли по 100 мкл во все лунки планшета. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием планшетного шейкера (~ 300 об./мин). Содержимое лунок осторожно удаляли вытряхиванием. Четырехкратно отмывали раствором PBS, 300 мкл/на лунку.

Внесение субстратного буфера с хромогеном. После добавления субстратного буфера, содержащего H₂O₂, последняя гидролизует ферментом конъюгата и, окисляя хромоген, окрашивает его. При этом интенсивность реакции пропорциональна концентрации антител, связавшихся с антигенами клеток, находящихся в лунке. Для полуколичественной оценки результатов ICE в каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего раствора субстратного буфера и хромогена. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре при встряхивании на планшетном шейкере. Для остановки реакции в каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего раствора H₂SO₄. Для визуальной полуколичественной оценки результатов ICE в каждую лунку добавляли по 50 мкл 1%-ного раствора DAB в 1 мл PBS с добавлением 5 мкл 30%-ного H₂O₂. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре, встряхивая на планшетном шейкере. Содержимое лунок осторожно удаляли вытряхиванием. В каждую лунку добавляли по 200 мкл PBS с 0.1% NaN₃.

Оценка реакции МАТ с клеточными линиями рака молочной железы и колоректальной аденокарциномы человека. При использовании в качестве хромогена растворимого ТМВ в лунках измеряли ОП продукта реакции с помощью планшетного спектрофотометра TECAN Sunrise A-5082 (Tecan Group Ltd., Швейцария) при длине волны 450 нм. Для дальнейшей работы отбирали МАТ, в реакции с которыми отмечалась наиболее высокая ОП. Параллельно проводили реакцию с теми же МАТ с применением в качестве хромогена DAB, образующего при окислении нерастворимое соединение, выпадающее в осадок в месте реакции антиген – антитело. После докрасивания гематоксилином Майера проводили полуколичественное определение интенсивности реакции в клетках с помощью инвертированного микроскопа Opton (Zeiss, Германия). Основными параметрами оценки реакции МАТ с клетками разных линий были интенсивность окрашивания (негативное, слабое, умеренное или сильное), количество окрашенных клеток (< 25%, 25–75% или > 75%) и субклеточная локализация (ядерная и/или цитоплазматическая/мембранная).

1.8. Иммуногистохимическое исследование. Для проведения ИГХ-анализа гистологические срезы аденокарциномы молочной железы и толстого кишечника депарафинировали, гидратировали, обрабатывали 3%-ным раствором H₂O₂, помещали в цитратный буфер с рН 6.0 и кипятили с целью демаскировки антигенов. Экспозицию с первичными МАТ проводили в течение 24 ч при температуре 4 °С. В качестве системы детекции был взят набор UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Thermo Fisher Scientific, США).

Негативным контролем реакции служили препараты, инкубированные с PBS вместо первичных антител. По окончании ИГХ реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Сравнительная характеристика методов ИСЕ и ИГХ. Сопоставление результатов применения методов ИСЕ и ИГХ показало соответствие по локализации и интенсивности окрашивания клеток опухолевых линий и тканей опухолей МАТ в 100% случаев. Так, при окрашивании МАТ к опухолеассоциированным антигенам IS32, PS30 и PЭ274 более 75% клеток MCF-7, ZR-75-1 и Caco-2 *in vitro* с интенсивностью от умеренной до сильной, с мембранной и цитоплазматической локализацией продукта реакции аналогичная картина наблюдалась и в гистологических препаратах аденокарциномы молочной железы и аденокарциномы толстого кишечника, окрашенных теми же МАТ (рис. 2–5). При использовании МАТ G27 к иммуноглобулину G человека окрашивание отсутствовало как в культивируемых клетках, так и в гистологических препаратах опухолей (рис. 6, 7). Таким образом, совпадение результатов методов ИСЕ и ИГХ демонстрирует возможность отбора антител, реагирующих с целевыми антигенами в фиксированных формалином и заключенных в парафин тканях, для последующей постановки ИГХ, что существенно сокращает длительность тестирования и уменьшает количество расходующихся МАТ.

2.2. Пример использования ИСЕ для отбора гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам клеток глиобластомы U373. Специфичность 192 МАТ, продуцируемых клонами гибридом и полученных при иммунизации лизатом клеток глиобластомы U373 (U_{1-192}), оценивали двумя методами: гетерогенным ИФА с использованием сорбированного на поверхности лунок лизата, полученного из разрушенных замораживанием клеток глиобластомы U373, и ИСЕ с хромогеном DAB на цельных клетках. ОП в ИФА варьировала от 0.124 до 1.928 ед., реакцию считали положительной при ОП ≥ 0.3 . Отрицательную реакцию в ИФА дали 94 МАТ (48%). При этом в ИСЕ с цельными клетками при микроскопировании окрашивание, варьирующее от умеренного до сильного, наблюдали для 178 МАТ, в том числе негативных в ИФА с лизатом глиобластомы U373 (рис. 8). Вероятно, различие результатов двух методов детекции может быть обусловлено небольшим количеством антигена в лизатах, его низкой сорбционной способностью к пластику или возможным разрушением антигена при лизировании клеток.

Одной из задач гибридомной технологии является получение гибридом и селекция антиген-специфических МАТ, перспективных для применения в ИГХ-анализе, широко используемом в научных исследованиях и клинической практике. Высокопроизводительный метод ИСЕ уменьшает расход антител, упрощает экспериментальные процедуры и анализ данных, ускоряет процедуру скрининга большого количества клонов за короткий период времени, позволяет исключить такие трудоемкие этапы, как лизис клеток, гель-электрофорез белков и перенос на мембрану. Выявление белковых мишеней в фиксированных клетках *in situ*

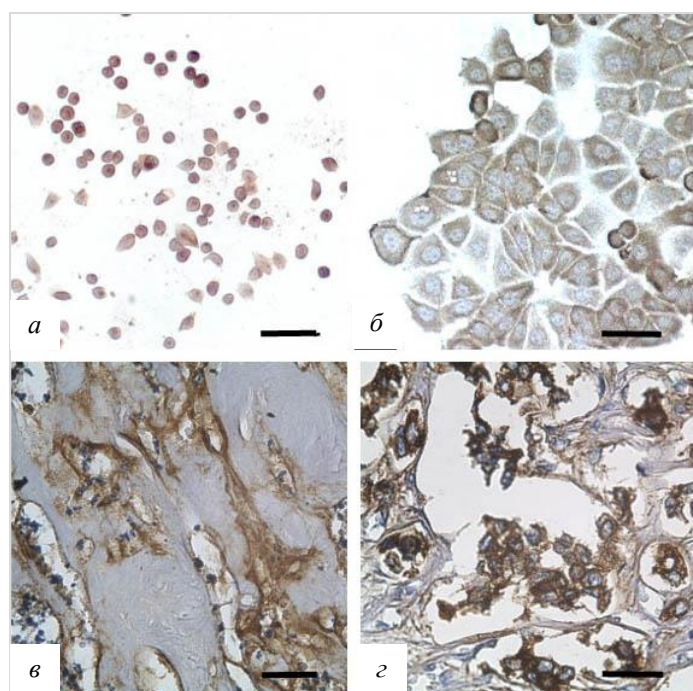


Рис. 2. Применение моноклонального антитела к Muc1 (IS32): *а, б* – ISE-окрашивание мембранное и цитоплазматическое от умеренного до сильного, *в, з* – ИГХ-сильное окрашивание; *а* – ZR-75-1, *б* – MCF-7, *в, з* – препараты аденокарциномы молочной железы. Масштабная линейка 100 мкм

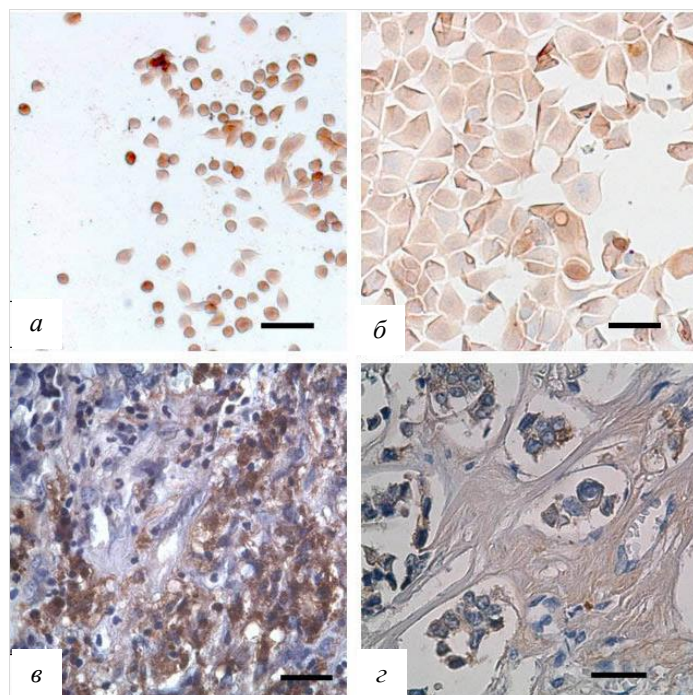


Рис. 3. Применение моноклонального антитела к простатоспецифическому антигену (PS30): *а, б* – ISE-окрашивание цитоплазматическое сильное (*а*), и умеренное (*б*), *в, з* – ИГХ-окрашивание сильное (*в*) и умеренное (*з*); *а* – ZR-75-1, *б* – MCF-7, *в, з* – препараты аденокарциномы молочной железы, $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм

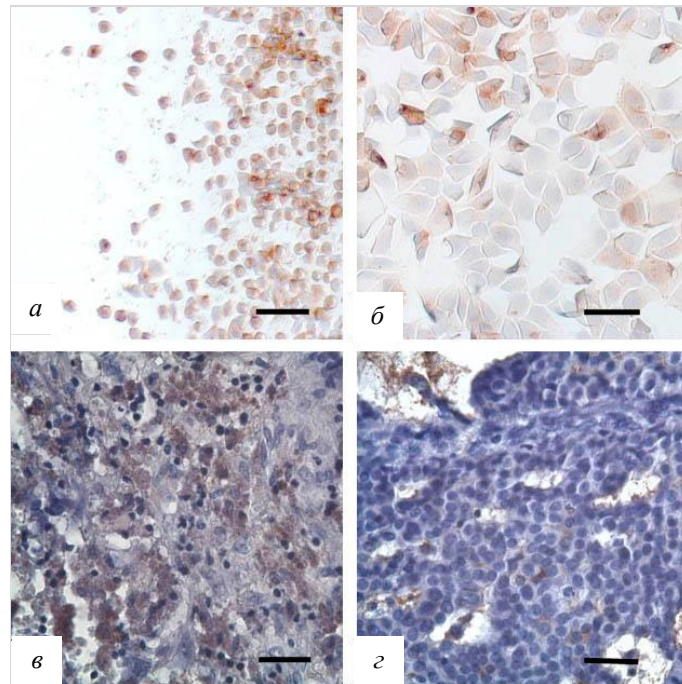


Рис. 4. Применение моноклонального антитела к раково-эмбриональному антигену (РЭ274): *а, б* – IСЕ-окрашивание цитоплазматическое умеренное (*а*) и слабое (*б*), *в, з* – ИГХ-окрашивание цитоплазматическое умеренное (*в*) и слабое (*з*), *а* – ZR-75-1, *б* – MCF-7, *в, з* – препараты аденокарциномы молочной железы. Масштабная линейка 100 мкм

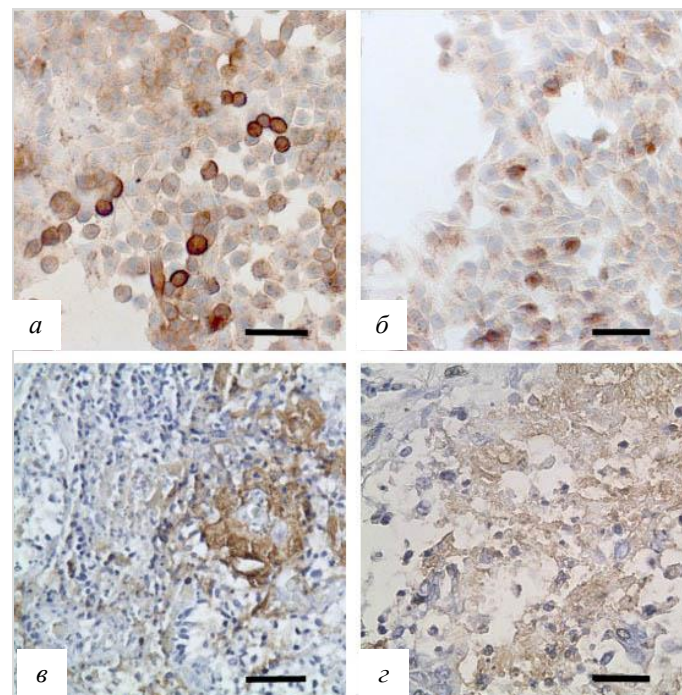


Рис. 5. Применение моноклональных антител к Musc1 (IS32) и раково-эмбриональному антигену (РЭ 274): *а, б* – IСЕ-окрашивание в культуре Caco-2, *в, з* – ИГХ-окрашивание препаратов аденокарциномы толстого кишечника; *а, в* – IS32, окрашивание от умеренного до сильного, *б, з* – РЭ274, умеренное окрашивание. Масштабная линейка 100 мкм

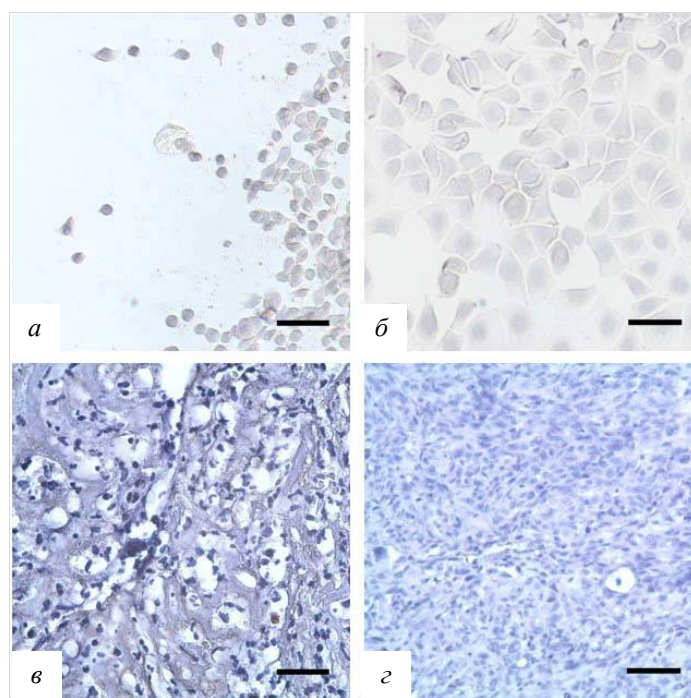


Рис. 6. Применение моноклонального антитела к иммуноглобулину G (G27): *а, б* – ИСЕ-отсутствие окрашивания, *в, з* – ИГХ-отсутствие окрашивания; *а* – ZR-75-1, *б* – MCF-7, *в, з* – препараты аденокарциномы молочной железы. Масштабная линейка 100 мкм

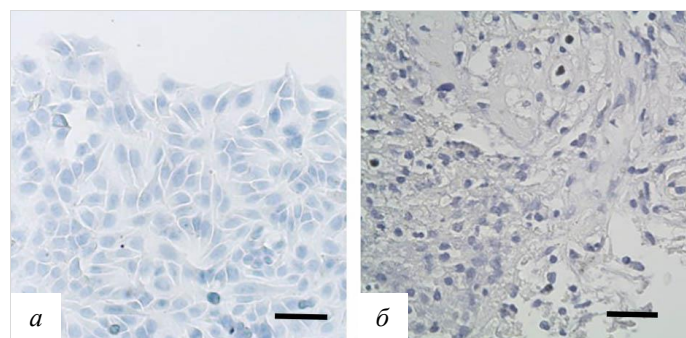


Рис. 7. Применение моноклонального антитела к иммуноглобулину G (G27): *а* – ИСЕ-отсутствие окрашивания, Saso-2, *б* – ИГХ-отсутствие окрашивания, препарат аденокарциномы толстого кишечника. Масштабная линейка 100 мкм

дает возможность локализовать их в клеточных структурах. Метод имеет преимущества перед ИФА с использованием клеточных лизатов, более точен и воспроизводим по сравнению с вестерн-блоттингом и требует меньшего количества клеток, чем метод проточной цитометрии [2, 4, 7, 13]. В работе, посвященной получению МАТ к компонентам механизма процессинга HLA-антигенов, экспрессия которых нарушается в опухолевых клетках, был применен протокол ИСЕ и лишь после отбора положительно реагирующих в ИСЕ специфичных МАТ их тестировали в ИГХ-реакции [20]. Наши данные подтверждают предположение авторов

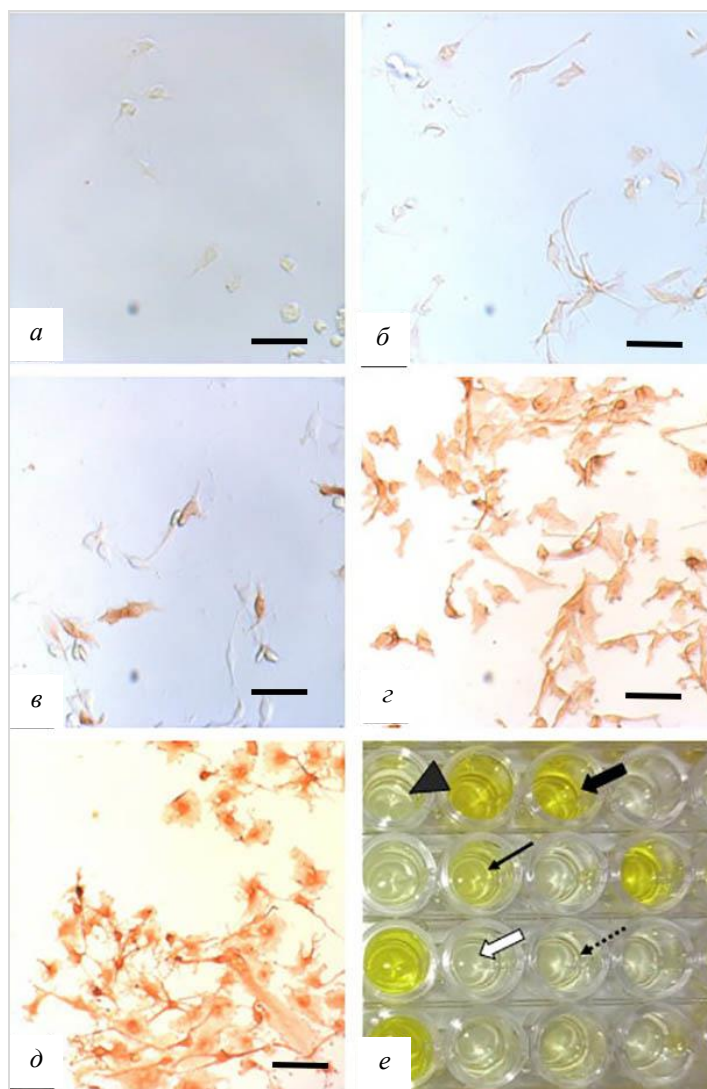


Рис. 8. Сопоставление результатов ИФА с лизатом клеток глиобластомы U373 и ИСЕ с цельными клетками: *a-d* – интенсивность окрашивания в ИСЕ, *e* – единицы оптической плотности (ОП) в ИФА, белая стрелка – ОП ≤ 0.3 , *a* – негативное окрашивание, пунктирная стрелка – ОП ≤ 0.3 , *b* – слабое окрашивание, тонкая стрелка – ОП 0.525, *c* – сочетание слабого, умеренного и негативного окрашивания, жирная стрелка – ОП 1.1, *d* – сильное окрашивание, наконечник стрелки – ОП ≤ 0.3 , *d* – сильное окрашивание. Масштабная линейка 100 мкм

о применимости такого методического подхода для генерации антител к другим антигенным системам и свидетельствуют о целесообразности включения этапа ИСЕ в процесс скрининга и отбора МАТ, способных выявлять целевые антигены в тканях после фиксации формалином и заключения в парафин.

Заключение

Моноклональные антитела, реагирующие в ИСЕ, выявляют также антигены в ИГХ, если структура антигена не меняется в процессе пробоподготовки (забор материала, фиксация ткани, демаскировка антигена) исследуемого образца.

Предварительное тестирование в ИСЕ позволяет экономить дорогостоящие реактивы и расходные материалы для отбора МАТ, необходимых для последующего использования в ИГХ. Количество связавшихся антител зависит от количества антигена и антигенных детерминант, их доступности и локализации в клетке, поэтому ИСЕ в некоторых случаях является более информативным, чем ИФА, для отбора моноклонов, позволяющих идентифицировать культивируемые клетки, в частности нейральные опухолевые клеточные линии.

Литература

1. *Taylor C.R., Burns J.* The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody // *J. Clin. Pathol.* – 1974. – V. 27, No 1. – P. 14–20. – doi: 10.1136/jcp.27.1.14.
2. *Boveia V., Schutz-Geschwender A.* Quantitative analysis of signal transduction with in-cell western immunofluorescence assays // *Kurien B., Scofield R. (Eds.) Detection of Blotted Proteins. Methods in Molecular Biology*, V. 1314. – N. Y.: Humana Press, 2015. – P. 115–130. – doi: 10.1007/978-1-4939-2718-0_13.
3. *Chen H., Kovar J., Sissons S., Cox K., Matter W., Chadwell F., Luan P., Vlahos C.J., Schutz-Geschwender A., Olive D.M.* A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 338, No 1. – P. 136–142. – doi: 10.1016/j.ab.2004.11.015.
4. *Pandre M.K., Shaik Sh., Pratap V.V.V.S., Yadlapalli P., Yanamandra M., Mitra S.* A novel in-cell ELISA method for screening of compounds inhibiting TRKA phosphorylation, using KM12 cell line harboring TRKA rearrangement // *Anal. Biochem.* – 2018. – V. 545. – P. 78–83. – doi: 10.1016/j.ab.2018.01.014.
5. *Bishop G.A., Hwang J.* Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens // *Biotechniques.* – 1992. – V. 12, No 3. – P. 326–330.
6. *Moerke N.J., Hoffman G.R.* Development of in-cell Western assays using far-red fluorophores // *Curr. Protoc. Chem. Biol.* – 2011. – V. 3, No 1. – P. 39–52. – doi: 10.1002/9780470559277.ch100153.
7. *Renukaradhya J.G., Sriram V., Polakova K., Russ G., Brutkiewicz R.R.* Development of a quantitative cell-based intracellular ELISA for the screening of B cell hybridoma supernatants: A novel rapid assay to detect positive clones // *Hybrid Hybridomics.* – 2004. – V. 23, No 6. – P. 373–379. – doi: 10.1089/hyb.2004.23.373.
8. *Grunow R., D'Apuzzo M., Wyss-Coray T., Frutig K., Pichler W.J.* A cell surface ELISA for the screening of monoclonal antibodies to antigens on viable cells in suspension // *J. Immunol. Methods.* – 1994. – V. 171, No 1. – P.93–102. – doi: 10.1016/0022-1759(94)90232-1.
9. *Ogino T., Wang X., Ferrone S.* Modified flow cytometry and cell-ELISA methodology to detect HLA class I antigen processing machinery components in cytoplasm and endoplasmic reticulum // *J. Immunol. Methods.* – 2003. – V. 278, No 1–2. – P. 33–44. – doi: 10.1016/s0022-1759(03)00224-2.
10. *Kashyap R.S., Kainthla R.P., Satpute R.M., Agarwal N.P., Chandak N.H., Purohit H.J., Taori G.M., Dagainawala H.F.* Differential diagnosis of tuberculous meningitis from partially-treated pyogenic meningitis by cell ELISA // *BMC Neurol.* – 2004. – V. 4. – Art. 16, P. 1–6. – doi: 10.1186/1471-2377-4-16.
11. *Shan Z., Yamasaki T., Suzuki A., Hasebe R., Horiuchi M.* Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment // *Prion.* – 2016. – V. 10, No 4. – P. 305–318. – doi: 10.1080/19336896.2016.1189053.

12. Fuhrmann S., Kirsch M., Wewetzer K., Hofmann H.-D. Use of cell ELISA for the screening of neurotrophic activities on minor cell populations in retinal monolayer cultures // *J. Neurosci. Methods.* – 1997. – V. 75, No 2. – P. 199–205. – doi: 10.1016/s0165-0270(97)00073-3.
13. Falahat R., Wiranowska M., Gallant N.D., Toomey R., Hill R., Alcantar N. A Cell ELISA for the quantification of MUC1 mucin (CD227) expressed by cancer cells of epithelial and neuroectodermal origin // *Cell Immunol.* – 2015. – V. 298, No 1–2. – P. 96–103. – doi: 10.1016/j.cellimm.2015.09.009.
14. Schöler L., Le-Trilling V.T.K., Eilbrecht M., Mennerich D., Anastasiou O.E., Krawczyk A., Herrmann A., Dittmer U., Trilling M. A novel In-Cell ELISA assay allows rapid and automated quantification of SARS-CoV-2 to analyze neutralizing antibodies and antiviral compounds // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 11. – Art. 573526, P. 1–11. – doi: 10.3389/fimmu.2020.573526.
15. Filardo S., Di Pietro M., Pasqualetti P., Manera M., Diaco F., Sessa R. In-cell western assay as a high-throughput approach for *Chlamydia trachomatis* quantification and susceptibility testing to antimicrobials // *PLoS ONE.* – 2021. – V. 6, No 5. – Art. e0251075, P. 1–13. – doi: 10.1371/journal.pone.0251075.
16. Kohl T.O., Ascoli C.A. Direct and indirect cell-based enzyme-linked immunosorbent assay // *Cold Spring Harbor. Protoc.* – 2017. – V. 2017, No 5. – doi: 10.1101/pdb.prot093732.
17. Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Цветков И.С., Косырева А.М., Алексеева А.И., Шелков А.Ю., Максименко О.О., Разживина В.А., Гельперина С.Э. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубицина и наносомальной формы PLGA-доксорубицина при лечении экспериментальной глиобластомы // *Клиническая и экспериментальная морфология.* – 2021. – Т. 10, № 1. – С. 58–65. – doi: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65.
18. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice // *Methods Mol. Biol.* – 1995. – V. 42. – P. 1–218. – doi: 10.1385/0-89603-279-5:1.
19. Lourenço E.V., Roque-Barreira M.-C. Immunoenzymatic quantitative analysis of antigens expressed on the cell surface (cell-ELISA) // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V. 588. – P. 301–309. – doi: 10.1007/978-1-59745-324-0-29.
20. Wang X., Campoli M., Cho H.S., Ogino T., Bandoh N., Shen J., Hur S.Y., Kageshita T., Ferrone S. A method to generate antigen-specific mAb capable of staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections // *J. Immunol. Methods.* – 2005. – V. 299, No 1–2. – P. 139–151. – doi: 10.1016/j.jim.2005.02.006.

Поступила в редакцию
27.05.2022

Степанова Ирина Ильдаровна, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»

Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: *i-ste@yandex.ru*

Артемьева Ксения Александровна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»

Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия

E-mail: *artemjeva_ksenia@mail.ru*

Степанов Александр Алексеевич, инженер-исследователь лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»

Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: 9163407056@mail.ru

Богданова Ирина Марковна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»
Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: malaj43@mail.ru

Болтовская Марина Николаевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»
Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: maribolt@mail.ru

Пономаренко Елена Алексеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии воспаления

НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ имени академика Б.В. Петровского»
Абрикосовский переулок, д. 2, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2022, vol. 164, no. 4, pp. 535–550

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.535-550

**Application of In-Cell ELISA Assay
for Hybridoma Screening and Selection of Promising Producers
of Monoclonal Antibodies**

I.I. Stepanova^{*}, *K.A. Artemyeva*^{**}, *A.A. Stepanov*^{***}, *I.M. Bogdanova*^{****},
E.A. Ponomarenko^{*****}, *M.N. Boltovskaya*^{*****}

*Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI
“Petrovsky National Research Center of Surgery”, Moscow, 119991 Russia*

E-mail: ^{*}*i-ste@yandex.ru*, ^{**}*artemjeva_ksenia@mail.ru*,
^{***}*9163407056@mail.ru*, ^{****}*malaj43@mail.ru*, ^{*****}*maribolt@mail.ru*,
^{*****}*ponomarenkoea75@mail.ru*

Received May 27, 2022

Abstract

This study was motivated by the pressing need to obtain monoclonal antibodies (mAb) for research and medical purposes. Screening for mAb-producing hybridomas and evaluating various cell cultures requires a technique that combines the advantages of immunohistochemistry (IHC), heterogeneous enzyme immunoassay (ELISA), and Western blotting. Cellular ELISA (In-Cell ELISA, ICE) is valid for in situ measurement of target analytes in both attached and suspended cells with minimal time, specificity, and

reproducibility of ELISA. This method can be successfully used to detect surface and intracellular antigens, as well as to assess phosphorylation, methylation, and acetylation. ICE is a simple, fast, inexpensive, and highly sensitive alternative to various common cyto- and histochemical methods. Here, we explored the potential of ICE for screening and selecting the most promising hybridomas and mAbs for IHC staining. The experiments were carried out with the help of the cultural method, the method of heterogeneous and cellular ELISA, and IHC staining.

Comparison of ICE and IHC showed a significant agreement in the intensity and localization of staining with the studied mAbs. The most suitable antibodies for subsequent IHC were selected, saving us much time of selection and the number of expensive mAbs. In heterogeneous ELISA, a negative reaction was noted in some cases. In ICE of whole cells, a pronounced response was detected microscopically. With ICE, it is possible to characterize cell cultures by markers that distinguish one cell line from another, show the stages of cell differentiation, and visualize their structures at different stages of cultivation. In some cases, ICE may be more informative than ELISA for selecting monoclonal antibodies that produce specific mAbs. A preliminary ICE run can be used to determine the optimal concentration of working dilutions of primary antibodies in a subsequent IHC run.

Keywords: In-Cell ELISA, hybridoma, monoclonal antibodies, immunohistochemistry

Figure Captions

- Fig. 1. Direct and indirect cellular ELISA for detection of cell surface antigens (*a*) and antibodies targeting the cell surface antigen (*b*), according to [16].
- Fig. 2. Application of monoclonal antibody to Muc1 (IS32): *a, b* – moderate-to-strong ICE membrane and cytoplasmic staining, *c, d* – strong IHC staining; *a* – ZR-75-1, *b* – MCF-7, *c, d* – preparations of mammary adenocarcinoma. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 3. Application of monoclonal antibody to prostate-specific antigen (PS30): *a, b* – ICE cytoplasmic staining is strong (*a*) and moderate (*b*), *c, d* – IHC staining is strong (*c*) and moderate (*d*); *a* – ZR-75-1, *b* – MCF-7, *c, d* – preparations of mammary adenocarcinoma, $\times 200$. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 4. Application of monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen (PE274): *a, b* – ICE cytoplasmic staining is moderate (*a*) and weak (*b*), *c, d* – IHC cytoplasmic staining is moderate (*c*) and weak (*d*), *a* – ZR-75-1, *b* – MCF-7, *c, d* – preparations of mammary adenocarcinoma. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 5. Application of monoclonal antibodies to Muc1 (IS32) and carcinoembryonic antigen (PE 274): *a, b* – ICE staining in Caco-2 culture, *c, d* – IHC staining of colon adenocarcinoma preparations; *a, c* – IS32, moderate-to-strong staining, *b, d* – PE274, moderate staining. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 6. Application of monoclonal antibody to immunoglobulin G (G27): *a, b* – ICE, no staining, *c, d* – IHC, no staining; *a* – ZR-75-1, *b* – MCF-7, *c, d* – preparations of mammary adenocarcinoma. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 7. Application of monoclonal antibody to immunoglobulin G (G27): *a* – ICE, no staining, Caco-2, *b* – IHC, no staining, colon adenocarcinoma preparation. Scale bar, 100 μ m.
- Fig. 8. Comparison of ELISA results with glioblastoma U373 cell lysate and ICE with whole cells: *a–e* – intensity of staining in ICE, *f* – optical density units (OD) in ELISA, white arrow – $OD \leq 0.3$, *a* – negative staining, dotted arrow – $OD \leq 0.3$, *b* – weak staining, thin arrow – $OD = 0.525$, *c* – combination of weak, moderate, and negative staining, bold arrow – $OD = 1.1$, *d* – strong staining, arrow head – $OD \leq 0.3$, *e* – strong staining. Scale bar, 100 μ m.

References

1. Taylor C.R., Burns J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J. Clin. Pathol.*, 1974, vol. 27, no. 1, pp. 14–20. doi: 10.1136/jcp.27.1.14.
2. Boveia V., Schutz-Geschwender A. Quantitative analysis of signal transduction with in-cell western immunofluorescence assays. In: Kurien B., Scofield R. (Eds.) *Detection of Blotted Proteins. Methods in Molecular Biology*. Vol. 1314. New York, Humana Press, 2015, pp. 115–130. doi: 10.1007/978-1-4939-2718-0_13.

3. Chen H., Kovar J., Sissons S., Cox K., Matter W., Chadwell F., Luan P., Vlahos C.J., Schutz-Geschwender A., Olive D.M. A cell-based immunocytochemical assay for monitoring kinase signaling pathways and drug efficacy. *Anal. Biochem.*, 2005, vol. 338, no. 1, pp. 136–142. doi: 10.1016/j.ab.2004.11.015.
4. Pandre M.K., Shaik Sh., Pratap V.V.V.S., Yadlapalli P., Yanamandra M., Mitra S. A novel in-cell ELISA method for screening of compounds inhibiting TRKA phosphorylation, using KM12 cell line harboring TRKA rearrangement. *Anal. Biochem.*, 2018, vol. 545, pp. 78–83. doi: 10.1016/j.ab.2018.01.014.
5. Bishop G.A., Hwang J. Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens. *Biotechniques*, 1992, vol. 12, no. 3, pp. 326–330.
6. Moerke N.J., Hoffman G.R. Development of in-cell Western assays using far-red fluorophores. *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 39–52. doi: 10.1002/9780470559277.ch100153.
7. Renukaradhya J.G., Sriram V., Polakova K., Russ G., Brutkiewicz R.R. Development of a quantitative cell-based intracellular ELISA for the screening of B cell hybridoma supernatants: A novel rapid assay to detect positive clones. *Hybrid Hybridomics*, 2004, vol. 23, no. 6, pp. 373–379. doi: 10.1089/hyb.2004.23.373.
8. Grunow R., D'Apuzzo M., Wyss-Coray T., Frutig K., Pichler W.J. A cell surface ELISA for the screening of monoclonal antibodies to antigens on viable cells in suspension. *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 171, no. 1, pp. 93–102. doi: 10.1016/0022-1759(94)90232-1.
9. Ogino T., Wang X., Ferrone S. Modified flow cytometry and cell-ELISA methodology to detect HLA class I antigen processing machinery components in cytoplasm and endoplasmic reticulum. *J. Immunol. Methods*, 2003, vol. 278, nos. 1–2, pp. 33–44. doi: 10.1016/s0022-1759(03)00224-2.
10. Kashyap R.S., Kainthla R.P., Satpute R.M., Agarwal N.P., Chandak N.H., Purohit H.J., Taori G.M., Dagainawala H.F. Differential diagnosis of tuberculous meningitis from partially-treated pyogenic meningitis by cell ELISA. *BMC Neurol.*, 2004, vol. 4, art. 16, pp. 1–6. doi: 10.1186/1471-2377-4-16.
11. Shan Z., Yamasaki T., Suzuki A., Hasebe R., Horiuchi M. Establishment of a simple cell-based ELISA for the direct detection of abnormal isoform of prion protein from prion-infected cells without cell lysis and proteinase K treatment. *Prion*, 2016, vol. 10, no. 4, pp. 305–318. doi: 10.1080/19336896.2016.1189053.
12. Fuhrmann S., Kirsch M., Wewetzer K., Hofmann H.-D. Use of cell ELISA for the screening of neurotrophic activities on minor cell populations in retinal monolayer cultures. *J. Neurosci. Methods*, 1997, vol. 75, no. 2, pp. 199–205. doi: 10.1016/s0165-0270(97)00073-3.
13. Falahat R., Wiranowska M., Gallant N.D., Toomey R., Hill R., Alcantar N. A Cell ELISA for the quantification of MUC1 mucin (CD227) expressed by cancer cells of epithelial and neuroectodermal origin. *Cell Immunol.*, 2015, vol. 298, nos. 1–2, pp. 96–103. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.09.009.
14. Schöler L., Le-Trilling V.T.K., Eilbrecht M., Mennerich D., Anastasiou O.E., Krawczyk A., Herrmann A., Dittmer U., Trilling M. A novel In-Cell ELISA assay allows rapid and automated quantification of SARS-CoV-2 to analyze neutralizing antibodies and antiviral compounds. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 11, art. 573526, pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2020.573526.
15. Filardo S., Di Pietro M., Pasqualetti P., Manera M., Diaco F., Sessa R. In-cell western assay as a high-throughput approach for *Chlamydia trachomatis* quantification and susceptibility testing to antimicrobials. *PLoS ONE*, 2021, vol. 6, no. 5, art. e0251075, pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0251075.
16. Kohl T.O., Ascoli C.A. Direct and indirect cell-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Cold Spring Harbor Protoc.*, 2017, vol. 2017, no. 5. doi: 10.1101/pdb.prot093732.
17. Kudel'kina V.V., Khalanskii A.S., Makarova O.V., Tsvetkov I.S., Kosyreva A.M., Alekseeva A.I., Shelkov A.Yu., Maksimenko O.O., Razzhivina V.A., Gel'perina S.E. Comparative morphological and biochemical characteristics of the toxic effects of doxorubicin and nanosomal PLGA-doxorubicin form in the experimental glioblastoma treatment. *Klin. Eksp. Morfol.*, 2021, vol. 10, no. 1, pp. 58–65. doi: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65. (In Russian)
18. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. *Methods Mol. Biol.*, 1995, vol. 42, pp. 1–218. doi: 10.1385/0-89603-279-5:1.
19. Lourenço E.V., Roque-Barreira M.-C. Immunoenzymatic quantitative analysis of antigens expressed on the cell surface (cell-ELISA). *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 588, pp. 301–309. doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_29.

20. Wang X., Campoli M., Cho H.S., Ogino T., Bando N., Shen J., Hur S.Y., Kageshita T., Ferrone S. A method to generate antigen-specific mAb capable of staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Immunol. Methods*, 2005, vol. 299, nos. 1–2, pp. 139–151. doi: 10.1016/j.jim.2005.02.006.

Для цитирования: Степанова И.И., Артемьева К.А., Степанов А.А., Богданова И.М., Болтовская М.Н., Пономаренко Е.А. Применение клеточного иммуноферментного анализа для скрининга гибридом и получения перспективных продуцентов моноклональных антител // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 4. – С. 535–550. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.535-550.

For citation: Stepanova I.I., Artemyeva K.A., Stepanov A.A., Bogdanova I.M., Ponomarenko E.A., Boltovskaya M.N. Application of In-Cell ELISA assay for hybridoma screening and selection of promising producers of monoclonal antibodies. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 4, pp. 535–550. doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.535-550. (In Russian)