

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **232358**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **409081**

(22) Data zgłoszenia: **04.08.2014**

(51) Int.Cl.

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(54) **Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec deaminazy adenozynowej
oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

08.06.2015 BUP 12/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.06.2019 WUP 06/19

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARCIN SIEŃCZYK, Wrocław, PL

AGNIESZKA ŁUPICKA-SŁOWIK, Milicz, PL

RENATA GRZYWA, Wrocław, PL

MACIEJ WALCZAK, Wrocław, PL

KAMILA BOBREK, Łaziska Górne, PL

PATRYCJA SMOK, Bielawa, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 232358 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec cieleńcego białka deaminazy adenozykowej oraz ich zastosowanie.

Przeciwciała IgY stanowią główną klasę immunoglobulin występujących u ptaków, gadów, płazów oraz prapłazcokształtnych. Przeciwciała klasy IgY pełnią w organizmach ptaków funkcje analogiczne do ssaczych przeciwciał IgG [Warr GW, Magor KE and Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*, **1995**, 16, 392–8]. Strukturalnie przeciwciała IgY różnią się od przeciwciał IgG ssaków głównie ze względu na obecność dodatkowej domeny w łańcuchu ciężkim oraz brak regionu zawiasowego odpowiadającego za giętkość przeciwciał IgG [Dias da Silva W, Tambourgi DV. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2010, 135, 173–80]. Immunoglobuliny Y transportowane są z krwi do żółtka jaja dzięki czemu mogą być izolowane z jaj kurzych w sposób nieinwazyjny dla zwierząt i w znacznie większych ilościach niż w przypadku izolacji immunoglobulin z krwi ssaków. Przeciwciała IgY stanowią cenną alternatywę dla powszechnie stosowanych w immunodiagnostyce ssaczych przeciwciał IgG ze względu na brak reaktywności wobec czynnika reumatoidalnego jak również komponentów układu dopełniacza. W przypadku stosowania ssaczych IgG takie interakcje mogą prowadzić do fałszywie pozytywnych wyników [Larsson A, Karlssonparra A, Sjoquist J. Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors. *Clin Chem.*, **1991**, 37, 411–4]. W literaturze naukowej opisanych zostało wiele metod izolacji przeciwciał IgY z żółtka jaj ptaków, jak również znanych jest wiele przykładów wykorzystania ich jako źródła specyficznych immunoglobulin [Tan S. Mohamedali HA, Kapur A, Lukjanenko L, Baker MS. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. *J Immunol Methods*, **2012**, 380, 73–6].

Opisane w literaturze i dostępne handlowo przeciwciała anty-ADA pochodzą z organizmów ssaków i należą do klasy IgG. Wśród nich w literaturze naukowej opisane zostały przeciwciała IgG, izolowane z krwi królików, specyficzne względem natywnej, cieleńcej oraz ludzkiej deaminazy adenozykowej [Franco R, Aran JM, Colomer D, Matutes E, Vives-Corrons JL. Association of adenosine deaminase with erythrocyte and platelet plasma membrane: an immunological study using light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* **1990**, 38, 653–8] oraz specyficzne względem izozymu 2 królicze przeciwciała anty-ADA IgG otrzymane z krwi zwierząt immunizowanych rekombinowanym antygenem [O'Connell MA, Krause S, Higuchi M, Hsuan JJ, Totty NF, Jenny A, Keller W. Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biol.* **1995**, 15, 1389–97]. Komercyjnie dostępne przeciwciała anty-ADA otrzymane zostały przez immunizację królików natywnym białkiem izolowanym ze śledziony cieleńcej (produkt firmy Merck Millipore) lub peptydowymi epitopami deaminazy adenozykowej (produkty firm: Fitzgerald, Abcam, Abgent), oraz przez immunizację myszy ludzkim, rekombinowanym antygenem (produkt firmy Abcam).

Dotychczas nie opisano ani w literaturze naukowej ani patentowej przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec deaminazy adenozykowej.

Deaminaza adenozykowa jest enzymem katalizującym deaminację adenozyminy oraz deoksyadenozyminy do inozyminy oraz deoksyinozyminy. Podwyższony poziom deaminazy adenozykowej obserwowany jest w przypadku nowotworów piersi [Aghaei M, Karami-Tehrani F, Salami S, Atri M. Diagnostic value of adenosine deaminase activity in benign and malignant breast tumors. *Arch Med Res.*, **2010**, 41, 14–8], pęcherza moczowego [Pirinççi N, Geçit I, Güneş M, Yuksel MB, Kaba M, Tanik S, Demir H, Aslan M. Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. *Clinics*, **2012**, 67, 1443–6], jajników [Pragathi P, Bharath Kumar PV, Amar Kumar P, Ramakanth Reddy M, Sravani V, Neeraja J, Reeba Mary E, Gopalakrishna K. Evaluation of serum adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities as probable markers in ovarian cancer. *Indian J Clin Biochem.*, **2005**, 20, 195–7] oraz języka [Rai B, Kaur J, Jacobs R, Anand SC. Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Oral Investig.*, **2011**, 15, 347–9]. Dodatkowo, zanotowano korelację pomiędzy poziomem deaminazy adenozykowej a wielkością i stadium nowotworu, co czyni ją potencjalnie wartościowym markerem w diagnostyce chorób nowotworowych. Ludzka deaminaza adenozykowa występuje w postaci dwóch izozymów ADA1 (40 kDa) oraz ADA2 (110 kDa) różniących się powinowactwem wobec adenozyminy oraz lokalizacją w komórce [Ratech H, Thorbecke GJ, Meredith G, Hirschhorn R. Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in Aves and humans. *Enzyme*, 1981, 26, 74–84]. Analiza homologii sekwencji ludzkiej (ADA1)

i cielęcej deaminazy adenozynowej wykazała identyczność obu sekwencji na poziomie 89% (322/363 reszt) oraz podobieństwo dla 94% (342/363) reszt.

Istotą wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec izozymu 1 cielęcej deaminazy adenozynowej (ADA1) zdolne do specyficznej detekcji ludzkiej deaminazy adenozynowej.

Korzystnie przeciwciała mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec izozymu 1 cielęcej deaminazy adenozynowej (ADA1) jako środka diagnostycznego in vitro, korzystnie do diagnozy chorób nowotworowych w szczególności nowotworów języka, piersi, jajników i pęcherza moczowego.

Wyizolowane przeciwciała według wynalazku poddaje się ewaluacji biochemicznej w celu określenia ich czystości, stężenia, miana przeciwciał, specyficzności wobec antygeny oraz awidności. W trakcie procesu immunizacji analizę przeciwciał przeprowadzi się dla każdego pobranego jaja w okresie 22 tygodni. Odpowiedź organizmu w postaci produkcji specyficznych przeciwciał IgY pojawia się po 6 tygodniach od momentu pierwszej immunizacji.

Przeciwciała według wynalazku znajdują zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych w szczególności nowotworów języka, piersi, jajników i pęcherza moczowego. Wykorzystanie otrzymanych przeciwciał anty-ADA IgY w diagnostyce polega na ich zdolności do specyficznego wiązania z ludzką deaminazą adenozynową. Dzięki związaniu przeciwciał IgY do antygeny (zarówno cielęcej jak i ludzkiej deaminazy adenozynowej) możliwa jest bezpośrednia detekcja białka przy użyciu specyficznych przeciwciał IgY zawierających dowolny znacznik (np. biotyna, fluoresceina, peroksydaza chrzanowa, alkaiczna fosfataza).

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach jego wykonania oraz na rysunku na którym:

- fig. 1 przedstawia analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE, 4–12%) w warunkach nieredukujących otrzymanych przeciwciał IgY specyficznych wobec białka ADA. Barwienie wykonano przy użyciu barwnika Coomassie R 250,
- fig. 2 przedstawia wykres przedstawiający odpowiedź w postaci produkcji przeciwciał IgY specyficznych wobec białka ADA. Abs* – przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY,
- fig. 3 przedstawia detekcję białka ADA przez specyficzne przeciwciała IgY w trakcie procesu immunizacji,
- fig. 4 przedstawia wykres przedstawiający awidność otrzymanych przeciwciał anty-ADA IgY w czasie procesu immunizacji. Abs* – przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY,
- fig. 5 przedstawia wykres mianowania przeciwciał IgY do detekcji białka ADA,
- fig. 6 przedstawia Analiza miana przeciwciał IgY specyficznych wobec deaminazy adenozynowej. * klgY – kontrolne przeciwciała IgY,
- fig. 7 przedstawia limit detekcji cielęcej deaminazy adenozynowej przez specyficzne przeciwciała anty-ADA IgY,
- fig. 8 przedstawia limit detekcji białka ADA określony techniką Western blot. * klgY – kontrolne przeciwciała IgY,
- fig. 9 przedstawia izolacja przeciwciał IgY specyficznych wobec cielęcej deaminazy adenozynowej. Frakcje (1 µg/ml): UP – nieoczyszczone przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozynowej, W1, W10 – frakcje po przemyciu złoza 0,1% buforem PBST; K1, K2 – frakcje po przemyciu złoza buforem cytrynianowym,
- fig. 10 przedstawia reaktywność przeciwciał IgY specyficznych wobec cielęcej deaminazy adenozynowej wobec ludzkiego homologu białka. cADA – ludzka deaminaza adenozynowa; hADA – bydlęca deaminaza adenozynowa,
- fig. 11 przedstawia Test ELISA typu „sandwich” do detekcji deaminazy adenozynowej.

P r z y k ł a d 1

1.1. Przygotowanie antygeny do immunizacji

Cielęcą deaminazę adenozynową (izolowaną z jelita) rozpuszcza się tuż przed wykonaniem iniekcji w mieszaninie sterylnego roztworu soli fizjologicznej i pełnego adiuwantu Freund’a (1:1, v/v) przy pierwszej immunizacji oraz niepełnego adiuwantu Freund’a (1:1, v/v) dla dawek przypominających.

1.2. Immunizacja zwierząt

Kury hodowlane rasy White leghorn immunizuje się przez podanie domięśniowe antygeny w ilości 100 µg/zwierzę (300 µl). Immunizację powtarza się po 4 i 8 tygodniach stosując antygen w ilości 100 µg/zwierzę. Kurczęta wchodzące w skład grupy kontrolnej otrzymują iniekcję roztworu soli fizjologicznej zawierającej jedynie pełny adiuwant Freund'a (1:1, v/v, 300 µl/zwierzę). Jaja kolekcjonuje się codziennie począwszy od następnego dnia po immunizacji przez 22 tygodnie i przechowuje w temperaturze 4°C do momentu izolacji przeciwciał.

Przykład 2. Izolacja przeciwciał IgY

Jaja przemycia się 50% roztworem izopropanolu, a następnie oddziela żółtko od białka. Po usunięciu błony białkowej otaczającej worek żółtkowy płynną zawartość żółtka rozcieńcza się pięciokrotnie buforem fosforanowym (PBS, 10 mM, pH 7,4) z dodatkiem glikolu polietylenowego 6000 (PEG 6000) do końcowego stężenia PEG 6000 wynoszącego 3,5%. Po dokładnym wymieszaniu całość wiruje się przy 11 000 rpm przez 15 min w temp. 4°C a otrzymany supernatant filtruje się przez sącze bibułowy. Do supernatantu dodaje się PEG 6000 do końcowego stężenia 12%. Po dokładnym wymieszaniu całość ponownie wiruje się przy 11 000 rpm przez 15 min w temp. 4°C. Supernatant odrzuca się, a osad zawierający przeciwciała klasy IgY rozpuszcza się w 10 ml buforu PBS (10 mM, pH 7,4) i dodaje PEG 6000 do końcowego stężenia 12%. Wytrącony osad zawierający przeciwciała IgY po odwirowaniu i odrzuceniu supernatantu rozpuszcza się w 5 ml buforu fosforanowego (10 mM, pH 7,4). Roztwór przechowuje się w temperaturze -20°C. Stężenie otrzymanych białek określa się poprzez pomiar spektrofotometryczny (A_{280}). Czystość wyizolowanych przeciwciał zawiera się w zakresie 85–95% (Fig. 1).

Przykład 3. Analiza odpowiedzi immunologicznej na podany antygen (deaminaza adenozynowa) w czasie procesu immunizacji

3.1. Analiza odpowiedzi immunologicznej zwierząt na podany antygen w teście ELISA

W celu wykonania analizy odpowiedzi immunologicznej immunizowanych kur na podany antygen wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA. Płytki mikrotitracyjne 96-cio dołkowe pokryto antygenem ADA (50 ng/100 µl) rozpuszczonym w buforze węglanowym (50 mM, pH 9,6) i inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C. Po wypłukaniu płytki wolne miejsca zablokowano przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym (10 mM, pH 7,4) z 0,05% (v/v) dodatkiem detergentu Tween-20 (PBST) w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Po odmyciu czynnika blokującego na płytkę opłaszczoną antygenem dodano przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozynowej oraz przeciwciała kontrolne rozcieńczone stukrotnie w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBST i inkubowano godzinę w temperaturze 37°C. Detekcję kompleksów ADA-przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylendiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika mikropłytek przy długości fali 490 nm. Dla każdego tygodnia immunizacji pomiar przeprowadzono dla czterech izolatów przeciwciał anti-ADA IgY (Fig. 2).

3.2. Analiza odpowiedzi immunologicznej zwierząt na podany antygen w teście Western blot

Specyficzność przeciwciał IgY wobec białka ADA w trakcie procesu immunizacji określono wykonując analizę Western blot. Po rozdziale elektroforetycznym białka ADA (50 ng białka/studzienkę) przeprowadzonym w warunkach redukujących (SDS PAGE, 4–12%) przeprowadzono elektrotransfer na membranę nitrocelulozową. Blokowanie wolnych miejsc wiążących na membranie wykonano przy użyciu 5% roztworu odtłuszczonego mleka w buforze PBST przez 12 godzin w temperaturze 4°C. Po trzykrotnym przemyciu membrany buforem PBST przeciwciała IgY specyficzne wobec białka ADA oraz przeciwciała kontrolne rozcieńczone stukrotnie w 0,5% roztworze odtłuszczonego mleka w buforze PBST inkubowano z membraną przez 1 godzinę w 37°C. Po trzykrotnym płukaniu membrany w buforze PBST przeprowadzono detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał IgY przy użyciu króliczych przeciwciał anti-IgY skoniugowanych z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (Fig. 3).

Przykład 4. Analiza awidności przeciwciał anti-ADA IgY podczas procesu immunizacji w teście ELISA

W celu określenia awidności otrzymanych przeciwciał anti-ADA wykorzystano immunoenzymatyczny test ELISA. W tym celu studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono natywnym białkiem ADA w ilości 50 ng/studzienkę. Po inkubacji (3 godziny, 37°C) i zablokowaniu wolnych miejsc 5% roztworem mleka odtłuszczonego w PBST na studzienki płytki mikrotitracyjnej naniesiono przeciwciała IgY specyficzne wobec białka ADA lub przeciwciała kontrolne rozcieńczone w stosunku 1:100 w 0,5% roztworze

odtłuszczonego mleka w PBST. Po wypłukaniu płytki mikrotitracyjnej studzienki, dla każdego z badanych przeciwciał, inkubowano z 6M roztworem mocznika lub PBST przez 10 min w temperaturze pokojowej. Detekcję kompleksów ADA-przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenilenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika mikroplitek przy długości fali 490 nm (Fig. 4).

Przykład 5. Miano przeciwciał anti-ADA IgY

5.1. Miano otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec antygenu ADA w teście ELISA

Płytkę mikrotitracyjną opłaszczono roztworem białka ADA w buforze węglanowym w ilości 100 ng/studzienkę. Następnie zablokowano wolne miejsca przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBST w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Po odmyciu czynnika blokującego dodano przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozykowej oraz kontrolne IgY w rozcieńczeniach od 50 µg/ml do 0,005 µg/ml w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBST i inkubowano godzinę w temperaturze 37°C. Detekcję kompleksów ADA- przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenilenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika mikroplitek przy długości fali 490 nm (Fig. 5).

5.2. Miano przeciwciał specyficznych wobec deaminazy adenozykowej w teście Western blot.

Po transferze białek (50 ng białka/studzienkę) na membranę nitrocelulozową i blokowaniu wolnych miejsc przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBST paski membrany inkubowano z roztworami przeciwciał specyficznych wobec deaminazy adenozykowej w rozcieńczeniach od 50 do 0,01 µg/ml oraz przeciwciał kontrolnych o stężeniu 50 µg/ml. Po wypłukaniu pasków membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (Fig. 6).

Przykład 6. Limit detekcji deaminazy adenozykowej

6.1. Limit detekcji deaminazy adenozykowej przez specyficzne przeciwciała IgY w teście ELISA

W celu określenia limitu detekcji białka ADA przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY wykorzystano test immunosorpcyjny fazy stałej ELISA. Płytkę mikrotitracyjną opłaszczono roztworem białka ADA w buforze węglanowym w zakresie stężeń od 100 ng/studzienkę do 0,5 ng/studzienkę. Następnie zablokowano wolne miejsca przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBST w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Po odmyciu czynnika blokującego dodano przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozykowej oraz kontrolne IgY w stężeniu 25 µg/ml w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBST i inkubowano godzinę w temperaturze 37°C. Detekcję kompleksów ADA-przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenilenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano za pomocą czytnika mikroplitek przy długości fali 490 nm (Fig. 7).

6.2. Limit detekcji deaminazy adenozykowej przez specyficzne przeciwciała IgY w teście Western blot.

Wykonano rozdział elektroforetyczny deaminazy adenozykowej w zakresie stężeń od 50 do 0,1 ng/studzienkę. Po transferze białek na membranę nitrocelulozową i blokowaniu wolnych miejsc przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBST membranę inkubowano z roztworami przeciwciał specyficznych wobec deaminazy adenozykowej oraz przeciwciał kontrolnych o stężeniu 10 µg/ml. Po wypłukaniu membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (Fig. 8).

Przykład 7. Oczyszczanie specyficznych wobec cielęcej deaminazy adenozykowej przeciwciał IgY.

7.1. Przygotowanie kolumny powinowactwa do oczyszczania przeciwciał anti-ADA IgY

Jako stałego nośnika w metodzie chromatografii powinowactwa użyto sefarozy aktywowanej CNBr. Po aktywacji nośnika roztworem HCl (1 mM, pH 3,0) na złożo naniesiono cielęcą deaminazę adenozykową (71,5 nmol/ml) w buforze do sprzęgania (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Złożo przepłukano buforem do sprzęgania, a następnie inkubowano 2 h w temp. pokojowej z buforem Tris-HCl (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 8,0). W następnym

etapie złoże przemywano naprzemiennie buforem o niskim pH (0,1 M CH₃COOH, 0,1 M CH₃COONa, pH 4) oraz buforem o wysokim pH (0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0). Kolumnę ze złożem przechowuje się w buforze fosforanowym (10 mM PBS, pH 7,4).

7.2. Izolacja specyficznych przeciwciał *anty-ADA* metodą chromatografii powinowactwa

Na przygotowane złoże nanosi się mieszaninę przeciwciał IgY specyficznych wobec cielęcej deaminazy adenozykowej (150 µl) z buforem fosforanowym (10 mM PBS, pH 7,4, 150 µl), inkubuje 1 h w temperaturze pokojowej a następnie przemywa buforem PBST. Po wypłukaniu całości niezwiązanych przeciwciał buforem PBS-T (10 mM PBS, 0,1% Tween-20) na szczyt kolumny nanosi się bufor cytrynianowy (20 mM, pH 2,5) w ilości 500 µl i neutralizuje każdą frakcję przy użyciu 1 M Tris-base (pH 8,5). Obecność przeciwciał w zebranych frakcjach potwierdza się przy zastosowaniu elektroforezy (SDS PAGE, warunki nieredukujące) oraz barwienia srebrem.

7.3. Analiza immunoreaktywności przeciwciał *anty-ADA* IgY oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa

W celu określenia immunoreaktywności otrzymanych przeciwciał wobec białka ADA wykonuje się test Western blotting w sposób opisany powyżej. Na studzienki żelu poliakrylamidowego nanosi się białko ADA w ilości 100 ng/studzienkę. Po przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym przeprowadza się półsuchy transfer białek na membranę nitrocelulozową i wolne miejsca wiążące blokuje się 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBST (4°C, 12h). Po wypłukaniu membrany buforem PBST detekcję białka ADA przeprowadza się przy użyciu otrzymanych oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa oraz nieoczyszczonych przeciwciał IgY o specyficzności *anty-ADA*. W tym celu paski membrany inkubuje się z roztworami przeciwciał IgY (1 µg/ml) z poszczególnych frakcji zebranych w trakcie oczyszczania, przygotowanych w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze PBST. Po wypłukaniu membrany buforem PBST detekcję związanych z białkami specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego *anty-IgY* skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (Fig. 9).

P r z y k ł a d 8. Reaktywność przeciwciał IgY specyficznych wobec cielęcej deaminazy adenozykowej względem homologicznej ludzkiej deaminazy adenozykowej

Reaktywność przeciwciał IgY *anty-ADA* wobec ludzkiej deaminazy adenozykowej określono z zastosowaniem techniki Western blot. Wykonano rozdział elektroforetyczny cielęcej deaminazy adenozykowej (1 ng/studzienkę) oraz ludzkiej deaminazy adenozykowej. Po transferze białek na membranę nitrocelulozową i zablokowaniu wolnych miejsc przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBST membranę inkubowano z roztworami przeciwciał specyficznych wobec deaminazy adenozykowej oraz przeciwciał kontrolnych rozcieńczonymi 500-krotnie. Po wypłukaniu membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenami specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego *anty-IgY* skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (Fig. 10).

P r z y k ł a d 9. Test ELISA typu „sandwich” do detekcji białka ADA

9.1. Otrzymywanie koniugatów IgY-Bt

W pierwszym etapie roztwór specyficznych wobec białka ADA przeciwciał IgY, oczyszczonych techniką chromatografii powinowactwa, poddaje się dializie wobec buforu fosforanowego (PBS, 10 mM, pH 7,4). Tak przygotowane przeciwciała poddaje się reakcji koniugacji z estrem NHS-LC-biotyna (38-krotny nadmiar). W tym celu do 0,57 nM specyficznych przeciwciał IgY w PBS (pH 7,4) dodano 22 nM roztworu biotyny w DMSO. Całość delikatnie miesza się w temperaturze pokojowej przez 1 h po czym mieszaninę reakcyjną poddaje się dializie wobec buforu fosforanowego (10 mM PBS, pH 7,4) w celu usunięcia niezwiązanych cząsteczek biotyny.

9.2. Przygotowanie testu diagnostycznego typu „sandwich” ELISA do detekcji białka ADA

Przygotowano test ELISA podwójnego wiązania (typu „sandwich”) do detekcji białka ADA. W tym celu płytkę mikrotitracyjną opłaszczono roztworem przeciwciał IgY specyficznych wobec białka ADA oraz przeciwciał kontrolnych w buforze octanowym (25 µg/ml, pH 4,2; 20 mM kwas octowy, 6 mM octan sodu) i inkubowano przez noc w 4°C. Następnie inkubowano z 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% (v/v) Tween-20 (przez noc w 4°C). Po odmyciu czynnika blokującego na studzienki płytki mikrotitracyjnej nałożono białko ADA w rozcieńczeniach od 100 do 5 ng/ml w buforze PBS, pH 7,4 i inkubowano przez godzinę w 37°C. Po wypłukaniu płytkę inkubowano z roztworem przeciwciał IgY znakowanych biotyną specyficznych wobec białka ADA, w stężeniu

10 µg/ml w PBST. Detekcję kompleksów białka ADA z przeciwciałami IgY przeprowadzono przy użyciu streptawidyny skoniugowanej z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylendiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czynnika mikropłytek.

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec izozymu 1 cielęcej deaminazy adenozykowej (ADA1) zdolne do specyficznej detekcji ludzkiej deaminazy adenozykowej.
2. Przeciwciała według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.
3. Zastosowanie przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec izozymu 1 cielęcej deaminazy adenozykowej (ADA1) jako środka diagnostycznego in vitro.
4. Zastosowanie według zastrz. 3 **znamiennie tym**, że diagnozuje się choroby nowotworowe w szczególności nowotwory języka, piersi, jajników i pęcherza moczowego.

Rysunki

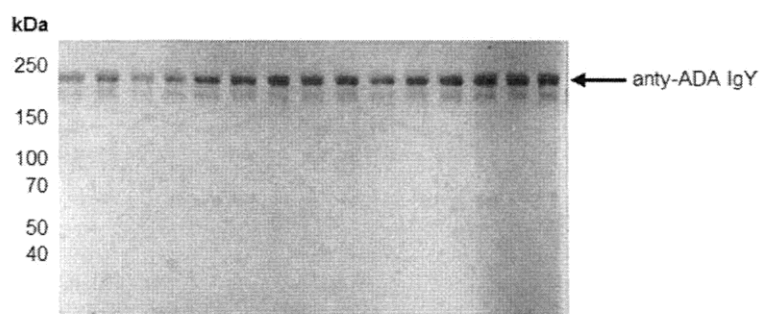


Fig. 1

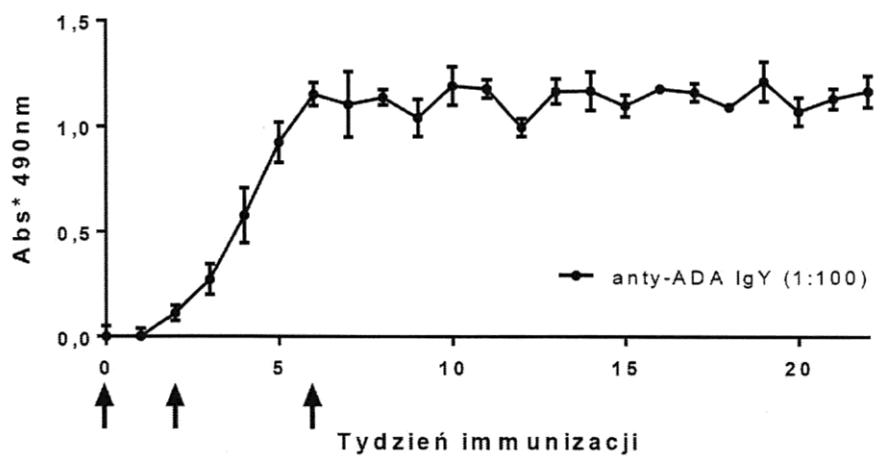


Fig. 2

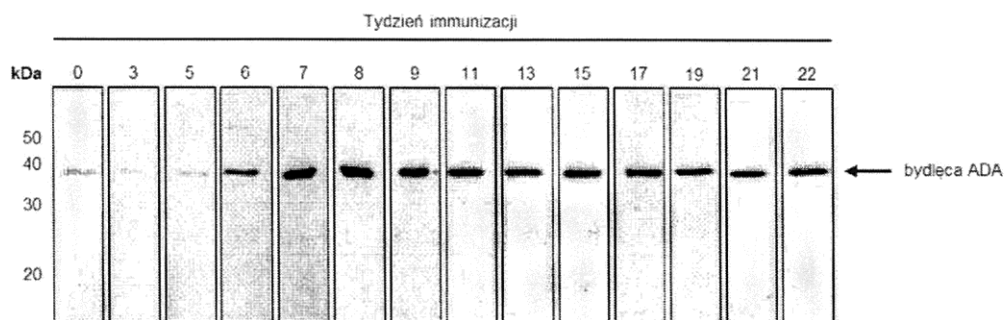


Fig. 3

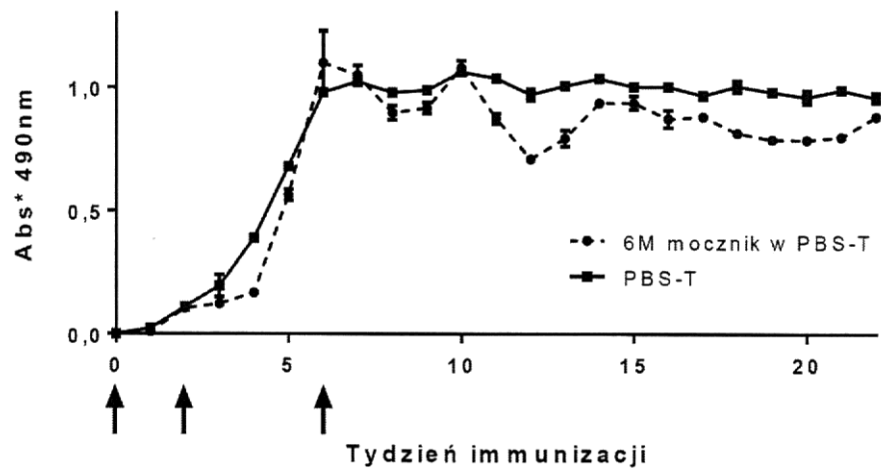


Fig. 4

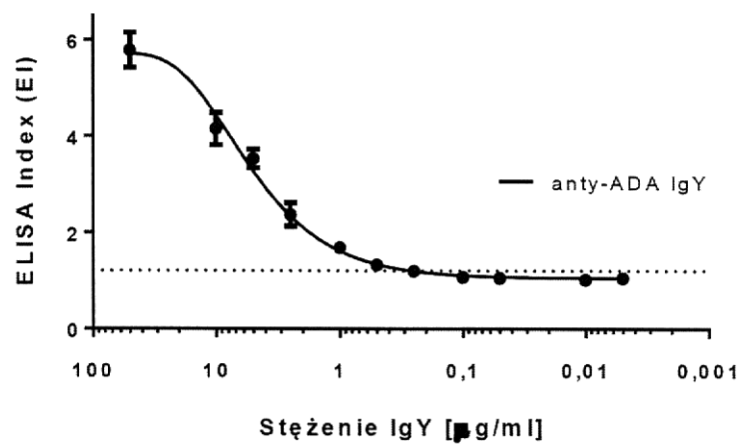


Fig. 5

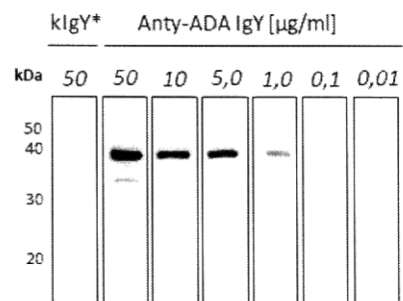


Fig. 6

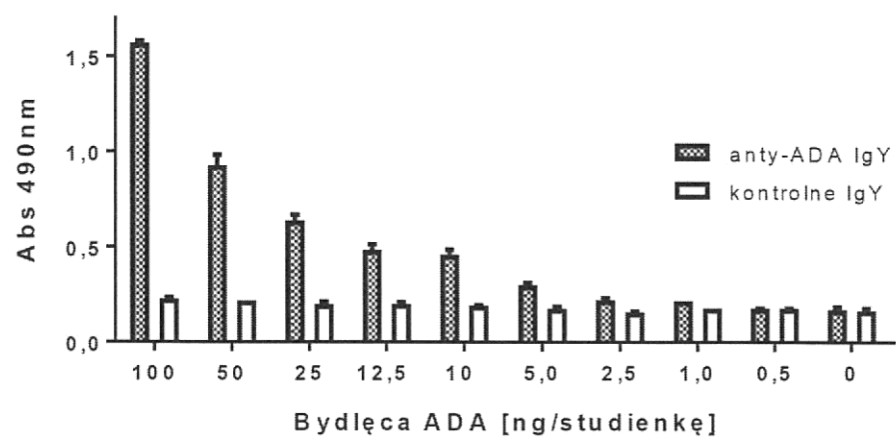


Fig. 7

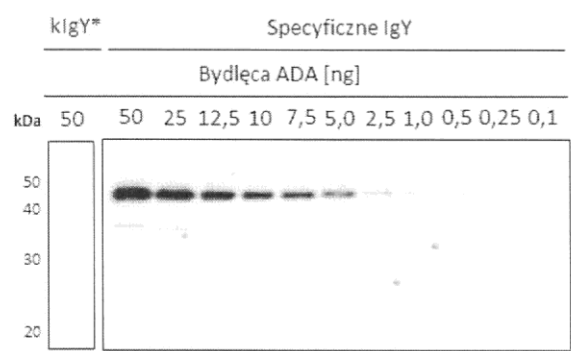


Fig. 8

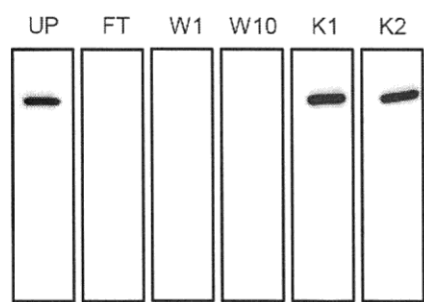


Fig. 9

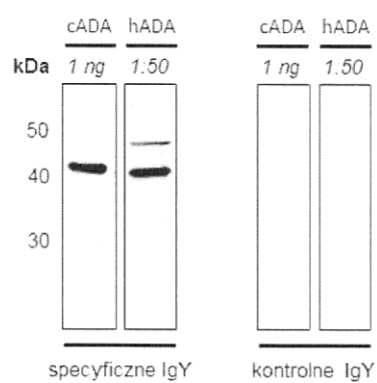


Fig. 10

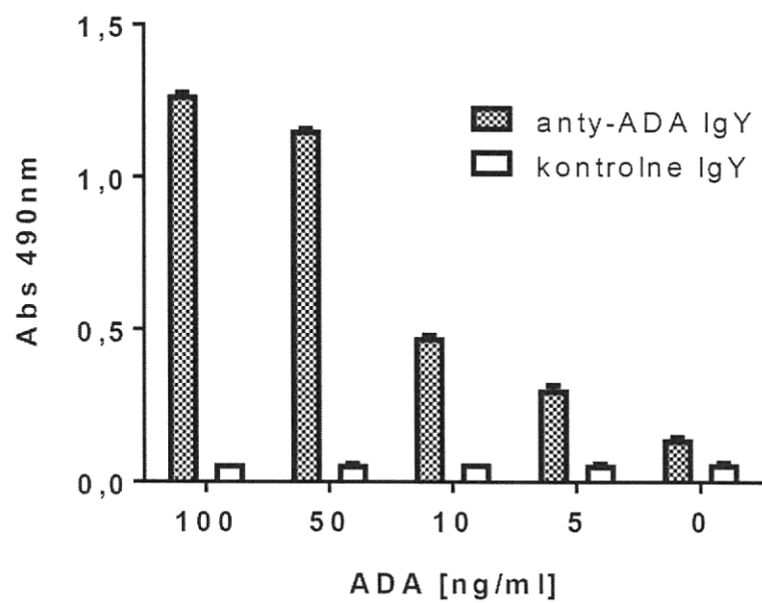


Fig. 11

