



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **429144**

(22) Data zgłoszenia: **04.03.2019**

(51) Int.Cl.
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/02 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(54) **Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
07.09.2020 BUP 19/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.10.2021 WUP 29/21

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MARCIN SIEŃCZYK, Wrocław, PL
AGNIESZKA ŁUPICKA-SŁOWIK, Milicz, PL
RENATA GRZYWA, Wrocław, PL
WERONIKA WYKRĘTOWICZ, Wrocław, PL
MARIA ŁĘCKA, Wrocław, PL
KRZYSZTOF PYRĆ, Kraków, PL
ALEKSANDRA MILEWSKA, Kraków, PL
AGNIESZKA DĄBROWSKA, Kraków, PL
KAMILA BOBREK, Łaziska Górne, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika znajdujące zastosowanie w badaniach biologicznych pozwalających na poznanie mechanizmu działania proteazy oraz w diagnostyce wirusa Zika.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika.

Wirus Zika z rodzaju *Flavivirus*, rodziny *Flaviviridae* został zidentyfikowany po raz pierwszy podczas badań przesiewowych dotyczących żółtej febry wśród małp (makak królewski) w 1947 roku w Ugandzie. Pięć lat później obecność wirusa stwierdzono w próbkach pochodzących od ludzi zamieszkujących tereny Ugandy oraz Tanzanii. Patogen jest przenoszony przez komary rodzaju *Aedes*. Symptomy rozwijającej się infekcji postępującej po zakażeniu wirusem Zika obserwuje się przez 2–7 dni i przypominają one objawy charakterystyczne dla infekcji wywołanych wieloma innymi arbowirusami, takimi jak wirus żółtej febry czy denga (gorączka, ból mięśni i stawów, ból głowy, wysypka skórna, zapalenie spojówek). Przez wiele lat ignorowano zakażenia wirusem Zika ze względu na stosunkowo łagodny przebieg infekcji. Sytuacja zmieniła się po rozpowszechnieniu się zakażeń wirusem, włączając w to początkowe wybuchy choroby w roku 2007 oraz 2013 w rejonie wysp Pacyfiku oraz epidemie w 2015 roku na terenie obu Ameryk. Uzyskane dane wskazywały na możliwość występowania dodatkowych komplikacji autoimmunologicznych oraz neurologicznych na skutek zakażenia wirusem Zika, ponieważ zauważono związek pomiędzy zachorowaniami a występowaniem neuropath zapalnej – zespołu Guillaina-Barrégo. Ponadto, w przypadku zakażeń u kobiet w ciąży znacznie zwiększył się odsetek przypadków mikrocefalii u płodów.

Genom wirusa Zika jest w dużym stopniu podobny do genomów innych flawiwirusów. Koduje on trzy białka strukturalne (białko kapsydowe, glikoproteinę membranową, wirusowe białko otoczki) oraz siedem białek nie strukturalnych (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) istotnych dla replikacji wirusa, odpowiadających za modulację środowiska wewnątrzkomórkowego i odpowiedzi immunologicznej.

Białko NS3 (~ 70 kDa) jest białkiem wielodomenowym i wielofunkcyjnym. C-końcowa domena NS3 wykazuje aktywność NTPazy/helikazy, natomiast N-końcowa domena wykazuje aktywność proteazy serynowej. Aktywność proteolityczna białka NS3 jest uwarunkowana obecnością białka NS2B – kofaktora który stabilizuje aktywną konformację proteazy, pomagając w utrzymaniu struktury trzeciorzędowej przypominającej chymotrypsynę. Podobną sytuację obserwuje się dla białek NS3 i NS2B wirusa Zachodniego Nilu (WNV).

Otrzymywanie specyficznych antygenowo przeciwciał IgY, w przeciwieństwie do izolacji przeciwciał ssaczych klasy G, nie wymaga skrwawiania zwierząt, ponieważ przeciwciała izolowane są z żółtek kurzych jaj. Immunizacja ptaków pozwala na indukcję silnej i trwałej odpowiedzi immunologicznej utrzymującej się przez całe życie zwierzęcia przy użyciu relatywnie małej ilości antygeny. Średnia ilość przeciwciał możliwa do uzyskania w czasie dwóch tygodni od jednej kury wynosi około 1120 mg (z czego 2–10% to przeciwciała o pożądanej specyficzności). W tym samym czasie z jednego królika możliwe jest wyizolowanie około 200 mg przeciwciał, w tym 5% specyficznych). Ze względu na funkcję, przeciwciała klasy IgY stanowią odpowiednik przeciwciał IgG u ssaków, jednak ze względu na strukturę są bardziej zbliżone do przeciwciał klasy IgE. Analogicznie do przeciwciał ssaczych, immunoglobuliny Y posiadają dwa łańcuchy ciężkie kowalencyjnie związane z dwoma łańcuchami lekkimi poprzez mostki disiarczkowe. Przeciwciała IgY charakteryzują się większą masą cząsteczkową (~ 167 kDa) w porównaniu do IgG (~ 147 kDa), ponieważ posiadają dodatkową domenę w regionie Fc łańcucha ciężkiego. W skład łańcucha ciężkiego kurzych przeciwciał IgY wchodzi cztery domeny stałe (Cv1, Cv2, Cv3, Cv4), oraz jedna domena zmienna (V_H). Łańcuch lekki immunoglobulin Y tworzy jedna domena stała (C_L) i jedna domena zmienna (V_L). Immunoglobuliny Y nie posiadają regionu zawiasowego (ang. hinge region) przez co charakteryzują się mniejszą giętkością w porównaniu z przeciwciałami IgG.

Istotą wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika izolowane z żółtek jaj drobiu immunizowanego antygenem w postaci rekombinowanej proteazy NS2B-NS3.

Korzystnie proteaza ma postać konstruktu 6xHis-NS2B (45–96 aa)-linker G4SG4-NS3 (1–184 aa) lub postać nukleotydomową 6xHis(19–36 bp)-NS2B(40–195 bp)-linker(196–222 bp)-NS3 (223–774 bp) o wzorze 1.

Korzystnie przeciwciała poliklonalne klasy IgY mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.

Sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika polega na tym, że immunizuje się drób antygenem w postaci białka NS2B-NS3 o sekwencji przedstawionej wzorem 2, przy czym immunizację prowadzi się w czterech osobnych dawkach, a jako adiuwantu używa się pełnego adiuwantu Freund'a, po czym znaną metodą izoluje się przeciwciała z wydajnością 80–150 mg/jajko i czystością 85–95%.

Korzystnie jako drób immunizuje się kury ras hodowlanych.

Istotą wynalazku są również przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika opisane powyżej do zastosowania w diagnostyce *in vitro* chorób wywołanych przez wirusa Zika.

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

fig. 1 przedstawia wykres obrazujący produkcję specyficznych przeciwciał IgY anty-NS2B-NS3 (-●-) oraz dojrzewanie awidności (-■-) w trakcie procesu immunizacji. Grotami zaznaczono tygodnie immunizacji,

fig. 2 przedstawia analizę elektroforetyczną przeciwciał IgY anty-NS2B-NS3 (Fig. 2A) po oczyszczeniu z wykorzystaniem techniki chromatografii powinowactwa oraz analizę Dot-blot potwierdzającą wzbogacenie próbek w przeciwciała specyficzne antygenowo (Fig. 2B). Frakcja FT – zebrana po inkubacji surowego izolatu przeciwciał ze złożem, rozcieńczona 25-krotnie; frakcje W1 – W20 – kolejne płukania złoża buforem fosforanowym, frakcje K1–K3 – próbki uzyskane po nałożeniu na złożo buforu o niskim pH,

fig. 3 przedstawia wykres dotyczący limitu detekcji proteazy NS2B-NS3 przez specyficzne przeciwciała IgY (surowy izolat, -●-) oraz specyficzne przeciwciała IgY oczyszczone z wykorzystaniem techniki chromatografii powinowactwa (apIgY, -■-) w teście immunoenzymatycznym na podłożu stałym,

fig. 4 przedstawia limit detekcji proteazy NS2B-NS3 przez specyficzne przeciwciała IgY oczyszczone z wykorzystaniem techniki chromatografii powinowactwa oraz przeciwciała kontrolne w teście Western Blot,

fig. 5 przedstawia wykres przedstawiający miano przeciwciał anty-NS2B-NS3 (surowy izolat, -●-) oraz specyficzne przeciwciała IgY oczyszczone z wykorzystaniem techniki chromatografii powinowactwa (apIgY, -■-) w teście immunoenzymatycznym na podłożu stałym,

fig. 6 przedstawia miano przeciwciał anty-NS2B-NS3 w teście Western Blot.

P r z y k ł a d 1

1.1 Przygotowanie antygeny użytego do immunizacji

Gen kodujący proteazę NS2B/NS3 wirusa Zika został zsyntetyzowany (GeneArt; Thermo Fisher Scientific) z metką His-tag na końcu 5'. Konstrukt został wklonowany do plazmidu ekspresyjnego pETDuet-1 (Novagene), a jego poprawność została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie. Ekspresja białka została przeprowadzona w bakteriach *E. coli* szczep BL21 (Thermo Fisher Scientific). Bakterie po transformacji hodowano w temperaturze 37°C w pożywce LB (Bioshop) z dodatkiem ampicyliny (Bioshop) do gęstości optycznej (OD) 0,6. Ekspresja białka została rozpoczęta poprzez suplementację pożywki 1 mM IPTG (Melford) i prowadzona była przez 2 h w 37°C. Bakterie zostały zebrane poprzez wirowanie (20 min, 5000 x g, 4°C), rozcieńczone w 50 mM roztworze Tris-HCl z dodatkiem 20 mM imidazolu (pH 8,0), poddane homogenizacji oraz lizie z wykorzystaniem aparatu Emulsi-Flex-C3 (Avestin) oraz 1 minutowej sonikacji (Vibra-Cell, Sonics & Materials). Lizat został oczyszczony poprzez wirowanie, a nadsącz został wykorzystany do izolacji białka na złożu wysyconym jonami niklu (GE Healthcare). Po płukaniu, białko eluowano z wykorzystaniem 50 mM roztworu Tris-HCl z dodatkiem najpierw 50 mM, a następnie 100 mM imidazolu (pH 8,0). Proteaza została następnie poddana drugiemu etapowi oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej (Mono Q 4.6/100 PE; GE Healthcare). Bufor został zmieniony na drodze dializy. Obecność białka została potwierdzona poprzez Western blot oraz rozdział elektroforetyczny białka.

1.2 Immunizacja kurcząt

Kury hodowlane rasy White leghorn immunizowano poprzez domięśniowe podanie antygeny w ilości 100 µg/zwierzę (w postaci roztworu pełnego adiuwantu Freund'a w soli fizjologicznej w stosunku

1:1 (v/v), 300 μ l). Immunizację powtarzano po 4, 9 i 13 tygodniach (100 μ g/zwierzę, dawki przypominające). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, które otrzymały iniekcję roztworu pełnego adiuwantu Freund'a w soli fizjologicznej w stosunku 1:1 (v/v).

1.3 Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego

Jaja kolekcjonowano codziennie od momentu immunizacji przez 20 tygodni. Do momentu izolacji jaja przechowywano w temperaturze 4°C.

1.4 Izolacja przeciwciał IgY

Przeciwciała izolowano metodą precypitacyjną z wykorzystaniem glikolu polietylenowego PEG 6000 jako czynnika strącającego.¹⁹ Jaja przemyto 50% roztworem izopropanolu a następnie oddzielono żółtko od białka. Po nakłuciu woreczka żółtkowego zebrano płynną zawartość żółtka i rozcieńczono pięciokrotnie buforem fosforanowym (PBS, 10 mM, pH 7,4) zawierającym 4,375% glikolu polietylenowego PEG 6000. Mieszaninę dokładnie wymieszano na kołyszce laboratoryjnej a następnie poddano wirowaniu (4750 x g, 4°C, 15 min). Uzyskany supernatant przefiltrowano (Whatman nr 1) a następnie dodano PEG 6000 do końcowego stężenia 12%. Po całkowitym rozpuszczeniu glikolu roztwór ponownie wirowano. Uzyskany osad rozpuszczono w buforze PBS (5 ml) i przechowywano w -20°C.

Przykład 2

Analiza odpowiedzi immunologicznej zwierząt na podany immunogen.

Celem wykonania analizy odpowiedzi immunologicznej zwierząt na podany antygen zastosowano test immunoenzymatyczny typu ELISA. W tym celu, studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono roztworem antygeny (50 ng/100 μ l) w buforze węglanowym (50 mM, pH 9,6) i inkubowano 120 min w temperaturze 37°C. Wolne miejsca wiążące na powierzchni płytki mikrotitracyjnej zablokowano 5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze PBS zawierającym 0,05% Tween-20 (v/v; PBS-T) prowadząc inkubację w temperaturze 4°C przez noc. Po odmyciu czynnika blokującego na studzienki płytki mikrotitracyjnej naniesiono przeciwciała IgY w stukrotnym rozcieńczeniu w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBS-T i inkubowano 60 min w temperaturze 37°C. Po odmyciu roztworów przeciwciał prowadzono inkubację z 6 M roztworem mocznika w PBS-T lub buforem PBS-T (15 min, temperatura pokojowa), a następnie na studzienki nałożono królicze przeciwciała detekcyjne anti-IgY IgG-HRP (rozcieńczenie 1:5000 w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w PBS-T) i inkubowano 60 min w temperaturze 37°C. Jako chromogenicznego substratu użyto o-fenylo-diaminy. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Wyniki wyrażono jako wartość absorbancji (Abs* 490 nm) po normalizacji do wartości absorbancji otrzymanej dla przeciwciał kontrolnych (fig. 1).

Przykład 3

Wzbogacenie roztworu przeciwciał IgY w immunoglobuliny specyficzne antygenowo.

W celu wzbogacenia roztworu przeciwciał w immunoglobuliny specyficzne antygenowo, przeciwciała wyizolowane z żółtek jaj immunizowanych kur poddano oczyszczaniu techniką chromatografii powinowactwa. Złoże (CNBr-sefaroza, 50 mg) aktywowano przy użyciu 1 mM roztworu HCl (pH 3,0), a następnie przemywano buforem do sprzęgania (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3). Na złoże naniesiono ligand (50 μ g) i inkubowano 60 min w temperaturze pokojowej (delikatnie mieszając), a następnie przez noc w 4°C. Złoże przemyto buforem Tris-HCl (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) i inkubowano (delikatnie mieszając) przez 120 min w temperaturze pokojowej. Złoże kilkakrotnie przemyto buforem o niskim pH (100 mM CH₃COOH, 100 mM CH₃COONa, 500 mM NaCl, pH 4,0) oraz wysokim pH (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) a następnie buforem PBS. W celu izolacji specyficznych przeciwciał na przygotowane złoże naniesiono surowy izolat przeciwciał IgY anti-NS2B-NS3 oraz bufor PBS w stosunku 1:3. Kolumnę inkubowano 60 min w temperaturze pokojowej (delikatnie mieszając), a następnie złoże kilkakrotnie płukano buforem PBS-T oraz PBS. Elucję specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu buforu cytrynianowego (20 mM, pH 2,5). Zebrane frakcje natychmiast neutralizowano buforem Tris-Base (1 M, pH 8,5). Obecność przeciwciał w zebranych frakcjach analizowano techniką SDS-PAGE, wykonując barwienie żelu srebrem (fig. 2A), natomiast efektywność wzbogacenia roztworu przeciwciał IgY w przeciwciała anti-NS2B-NS3 określono techniką Dot-blot (fig. 2B).

Przykład 4

Limit detekcji proteazy NS2B-NS3 w teście ELISA.

W celu określenia limitu detekcji proteazy NS2B-NS3 przez specyficzne przeciwciała IgY wykorzystano test immunoenzymatyczny fazy stałej. W tym celu 96-cio dołkową płytkę mikrotitracyjną opłaszczono roztworem białka NS2B-NS3 w buforze węglanowym w stężeniu od 2,5 μ g/ml do 0,001 μ g/ml (100 μ l/studzienkę). Po zablokowaniu wolnych miejsc wiążących z użyciem roztworu 5% mleka

odtłuszczonego w PBST, na studzienki nałożono roztwory przeciwciał IgY (0,5% mleko odtłuszczone w PBS-T): specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 otrzymanych po izolacji metodą strąceniową, przeciwciał oczyszczonych techniką chromatografii powinowactwa oraz przeciwciał kontrolnych. W każdym roztworze stężenie białka wynosiło 2 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl /studzienkę). Detekcję powstałych kompleksów prowadzono przy użyciu przeciwciał anti-IgY IgG-HRP. Jako chromogenicznego substratu użyto o-fenylo-diaminy. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Wyniki wyrażono w postaci Indeksu ELISA (EI), gdzie $\text{EI} = \text{A490}_{\text{próbki}}/\text{A490}_{\text{kontroli}}$ (fig. 3).

Przykład 5

Określenie limitu detekcji proteazy NS2B-NS3 w teście Western Blot.

W celu określenia limitu detekcji proteazy NS2B-NS3 techniką Western Blot wykonano rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE, 4–12%) białka w warunkach redukujących w zakresie od 25 do 0,5 ng/studzienkę. Po elektrotransferze białek z żelu na błonę nitrocelulozową zablokowano wolne miejsca membrany przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBS-T (4°C, noc). Następnie wypłukano czynnik blokujący (3 płukania PBS-T, 37°C, 15 min) i prowadzono inkubację membrany z przeciwciałami IgY specyficznymi wobec NS2B-NS3 oczyszczonymi techniką chromatografii powinowactwa (2 $\mu\text{g/ml}$, roztwór w 0,5% mleku w PBS-T) oraz przeciwciałami IgY kontrolnymi (2 $\mu\text{g/ml}$, roztwór w 0,5% mleku w PBS-T). Po godzinnej inkubacji w 37°C i wypłukaniu membrany w buforze PBS-T, prowadzono detekcję kompleksów proteazy NS2B-NS3 z przeciwciałami 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. 4).

Przykład 6

Miano przeciwciał IgY specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 – test immunoenzymatyczny fazy stałej.

Miano przeciwciał specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 określono przy użyciu testu ELISA. W tym celu płytkę mikrotitracyjną opłaszczono antygenem w ilości 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl /studzienkę) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnie zablokowano wolne miejsca wiążące przy użyciu roztworu 5% mleka odtłuszczonego w PBS-T (4°C, przez noc). Po odpłukaniu czynnika blokującego, na studzienki płytki mikrotitracyjnej nałożono roztwory przeciwciał IgY: specyficznych, specyficznych oczyszczonych techniką chromatografii powinowactwa oraz przeciwciał kontrolnych w zakresie stężeń od 10 do 0,001 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl /studzienkę). Detekcję powstałych kompleksów prowadzono przy użyciu przeciwciał anti-IgY IgG-HRP. Jako chromogenicznego substratu użyto o-fenylo-diaminy. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Wyniki wyrażono w postaci Indeksu ELISA (EI), gdzie $\text{EI} = \text{A490}_{\text{próbki}}/\text{A490}_{\text{kontroli}}$ (fig. 5).

Przykład 7

Miano przeciwciał IgY specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 w teście Western Blot.

Białko NS2B-NS3 poddano rozdziałowi elektroforetycznemu SDS-PAGE (4–12%, warunki redukujące, 25 ng/studzienkę). Po elektrotransferze białek z żelu na błonę nitrocelulozową zablokowano wolne miejsca membrany przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w PBS-T (4°C, noc). Następnie wypłukano czynnik blokujący (3 płukania PBS-T, 37°C, 15 min) i prowadzono inkubację membrany z przeciwciałami IgY specyficznymi wobec NS2B-NS3 oczyszczonymi techniką chromatografii powinowactwa w zakresie stężeń od 5 do 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (roztwory w 0,5% mleku w PBS-T). Po godzinnej inkubacji w 37°C i wypłukaniu membrany w buforze PBS-T, prowadzono detekcję kompleksów proteazy NS2B-NS3 z przeciwciałami 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. 6).

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika izolowane z żółtek jaj drobiu immunizowanego antygenem w postaci rekombinowanej proteazy NS2B-NS3.
2. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY według zastrz. 1 **znamiennie tym**, że proteaza ma postać konstruktu 6xHis-NS2B (45–96 aa)-linker G4SG4-NS3 (1–184 aa) lub ma postać nukleotydową 6xHis(19–36 bp)-NS2B(40–195 bp)-linker(196–222 bp)-NS3 (223–774 bp) o wzorze 1.

3. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY według zastrz. 1 **znamiennie tym**, że mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.
4. Sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika **znamiennie tym**, że immunizuje się drób antygenem w postaci białka NS2B-NS3 o sekwencji przedstawionej wzorem 2, przy czym immunizację prowadzi się w czterech osobnych dawkach, a jako adiuwantu używa się pełnego adiuwantu Freund'a, po czym znaną metodą izoluje się przeciwciała z wydajnością 80–150 mg/jajko i czystością 85–95%.
5. Sposób według zastrz. 4 **znamiennie tym**, że jako drób immunizuje się kury ras hodowlanych.
6. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec proteazy NS2B-NS3 wirusa Zika opisane w zastrz. 1–3 do zastosowania w diagnostyce in vitro chorób wywołanych przez wirusa Zika.

Rysunki

```

CCATGGATGCGTGGTAGCCATCATCATCACCATCATGGTAGCGGTAAAAGCG
TGGATATGTATATTGAACGTGCCGGTGATATTACCTGGGAAAAAGATGCAGA
AGTGACCGGTAATAGTCCGCGTCTGGATGTTGCACTGGATGAAAGCGGTGAT
TTAGCCTGGTTGAAGAGGATGGTCCGCCTATGCGTGAAGGTGGTGGTGGCA
GCGGTGGTGGCGGTAGTGGTGCCTGTGGGATGTTCCGGCACCGAAAGAAGT
TAAAAAAGGCGAAACCACCGATGGTGTATATCGTGTTATGACCCGTCGTCTGC
TGGGTAGCACCCAGGTTGGTGTGGTGTATGCAAGAAGGTGTTTTTCATACC
ATGTGGCATGTTACCAAAGGTGCAGCACTGCGTAGCGGTGAAGGTCGTCTGG
ATCCGTATTGGGGTGATGTTAAACAGGATCTGGTTAGCTATTGTGGTCCGTGG
AACTGGATGCAGCATGGGATGGTCTGAGCGAAGTTCAGCTGCTGGCAGTTC
CGCCTGGTGAACGTGCGCGTAATATTCAGACCCTGCCTGGTATCTTTAAAACC
AAAGATGGTGATATTGGTGCAGTGGCACTGGATTATCCGGCAGGCACCAGCG
GTAGCCCGATTCTGGATAAATGTGGTCTGTATTGGTCTGTATGGTAATGGT
GTGGTGATTA AAAACGGTAGCTATGTTAGCGCAATTACCCAGGGTAAACGTG
AAGAAGAAACACCGGTTGAATGTTTTGAACCGAGCATGCTGTA ACTCGAG

```

Wzór 1

```

PWMRGSHHHHHHGSGKSVDMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDF
SLVEEDGPPMREGGGSGGGSGALWDVPAPKEVKKGETTDGVYRVMTRRL
GSTQVGVGVMQEGVFHTMWHVTKGAALRSGEGRDPYWGDVKQDLVSYCGP
WKLDAAWDGLSEVQLLAVPPGERARNIQTLPGIFKTKDGDIGAVALDYPAGTSG
SPILDKCGRVIGLYGNGVVIKNGSYVSAITQGKREEETPVECFEPSML

```

Wzór 2

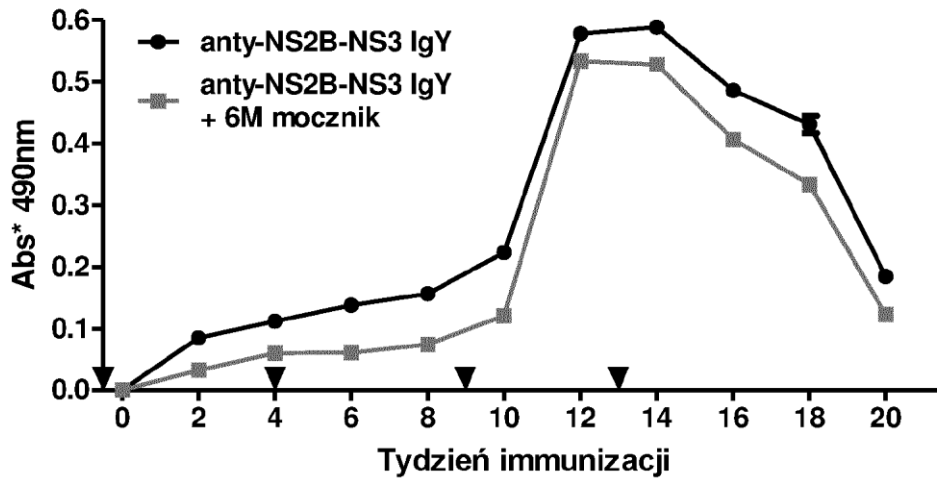


fig. 1

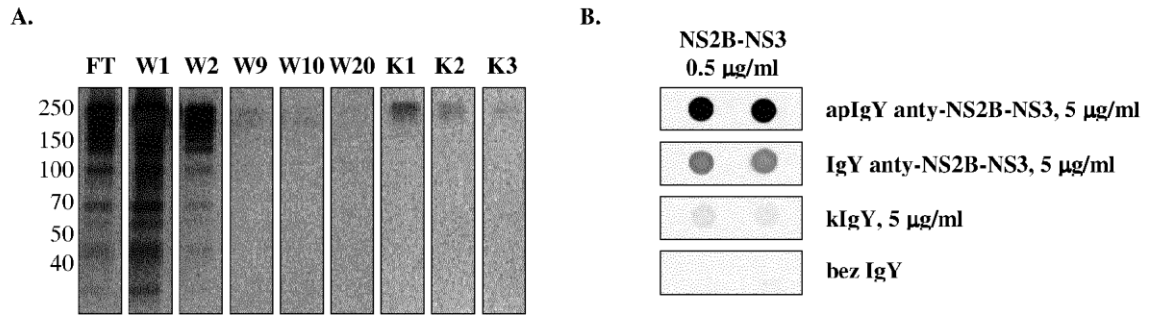


fig. 2

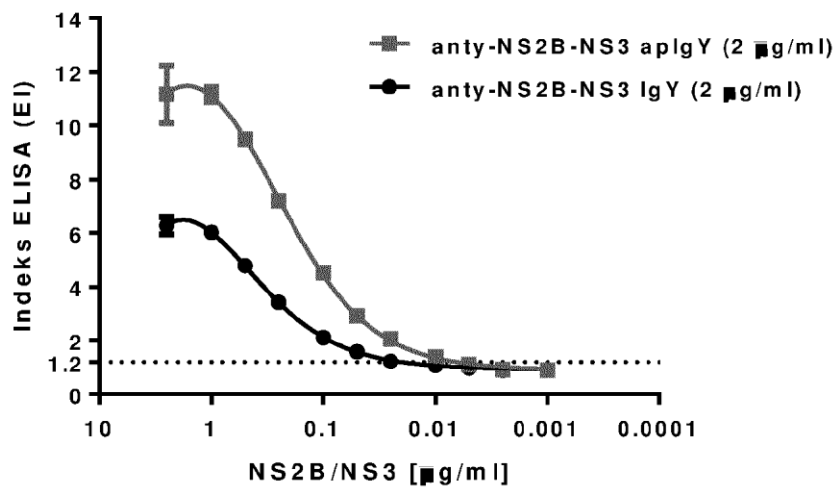


fig. 3

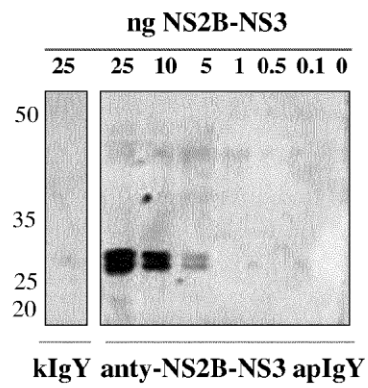


fig. 4

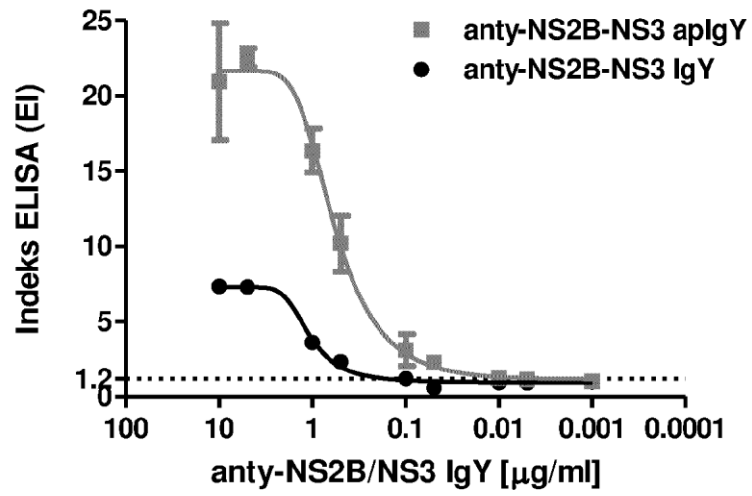


fig. 5

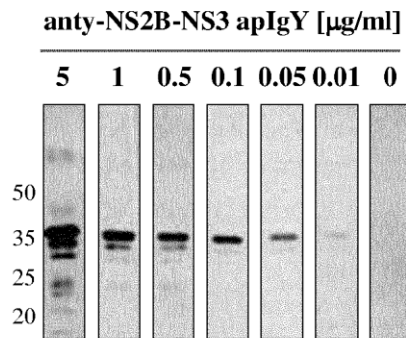


fig. 6