

(11) Patento numeris: **6770** (51) Int. Cl. (2020.01): **C07K 16/00**

(21) Paraiškos numeris: **2020 503**

(22) Paraiškos padavimo data: **2020-01-06**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2020-09-10**

(45) Patento paskelbimo data: **2020-10-12**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

**Yipeng XU, CN
Xiaoping YU, CN
Guangfu LIU, CN
Xuping SHENTU, CN
Pengjun ZHANG, CN**

(73) Patento savininkas:

**China Jiliang University, No. 258, Xueyuan Street, Xiasha Higher Education
Zone, Hangzhou, Zhejiang, CN**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Reda ŽABOLIENĖ, METIDA, Verslo centras „VERTAS“, Gynėjų g. 16, LT-01109
Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

***Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidas ir jam specifinio polikloninio antikūno
gamybos būdas**

(57) Referatas:

Šis išradimas aprašo *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą ir polikloninio antikūno prieš jį gavimo būdą. PCE3 polipeptido aminorūgščių seka yra RRALPKENSKEANP. Polikloninio antikūno paruošimas apima šiuos veiksmus: pirmiausia sintetinamas *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidas; susintetintas polipeptidas sujungiamas su baltymu-nešikliu tam, kad būtų sudarytas sudėtinis baltymas, gyvūnai imunizuojami sudėtinio baltymo, paruošiamas antiserumas iš imunizuotų gyvūnų kraujo, ir iš antiserumo išskiriamas bei išgryninamas antikūnas, tam, kad būtų gautas antikūnas prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą. Šiame išradime gautas polikloninis antikūnas prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą turi gerą specifiskumą ir aukštą grynumą, todėl gali specifiškai sąveikauti su *Nilaparvata lugens* PCE3 baltymu sukeldamas reakcijas, ir gali būti naudojamas susijusiuose su *Nilaparvata lugens* PCE3 baltymu tyrimuose.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas susijęs su polipeptidu ir gamybos būdu jam specifinio antikūno, kuris daugiausia naudojamas gamtinio baltymo antigenui nustatyti, ypač gamybos būdu triušio polikloninio antikūno prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą.

TECHNIKOS LYGIS

PCE3, vadinamas koaguliaciją skatinančio fermento 3 neaktyvia forma (en. *proclotting enzyme* 3), vaidina gyvybiškai svarbų vaidmenį vabzdžių dauginimosi procese, tokių kaip kiaušinių vystymesi ir kt. *Nilaparvata lugens* yra svarbus žemės ūkio kenkėjas. *Nilaparvata lugens* PCE3 tyrimai ir nustatymas turi didelę reikšmę *Nilaparvata lugens* prevencijai ir kontrolei.

CN104974245A paraiškoje aprašomas *Nilaparvata lugens* VgR polipeptidas ir jo polikloninio antikūno gavimo būdas.

IŠRADIMO ESMĖ

Šio išradimo tikslas yra pateikti *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą, o jo aminorūgščių seka yra RRALPKENSKEANP.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti triušio antikūno prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą gamybos būdą. Antikūnas, gautas šiuo metodu, pasižymi dideliu specifiškumu bei aukštu grynumu ir gali specifiškai atpažinti gamtinį PCE3 baltymą audiniuose ar ląstelėse.

Triušio antikūno prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą gamybos būdas, kur pirmiausia sintetinamas *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidas, kurio aminorūgščių seka yra RRALPKENSKEANP; susintetintas modifikuotas polipeptidas kryžminiais ryšiais sujungiamas su baltymu-nešikliu tam, kad būtų sudarytas sudėtinis baltymas, gyvūnai imunizuojami sudėtinio baltymo, paruošiamas antiserumas iš imunizuotų gyvūnų kraujo, ir iš antiserumo išskiriamas bei išgryninamas antikūnas.

Toliau, baltymas-nešiklis yra moliuskos limfos hemocianinas (KLH) arba galvijų serumo albuminas (BSA); modifikuoto polipeptido sulfhidrilo grupė ir baltymo-nešiklio aminogrupė yra kovalentiškai sujungiamos kryžminio sujungimo agentu tam, kad būtų sudarytas sudėtinis baltymas.

Paskiau, sudėtinis baltymas, sumaišius jį su imunoadjuvantu ir paruošus

emulsiją, sušvirkščiamas į triušio nugaros poodį, po pirminės imunizacijos tris kartus atliekama pakartotina imunizacija tam, kad būtų gautas antiserumas.

Be to antiserumas gryninamas peptidų giminingumo chromatografijos būdu tam, kad būtų gautas aukšto grynumo triušio antikūnas prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą.

Tiksliau, aukščiau aprašytas paruošimo būdas apima šiuos veiksmus:

1 pakopa: prijungiamas cisteinas prie C galo tam, kad būtų lengviau sujungti su baltymu-nešikliu, kai sintetinama *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptido seka, sintetinas PCE3 modifikuotas polipeptidas polipeptidų autosintetinio įrenginiu, po gryninimo PCE3 modifikuotas polipeptidas yra prijungiamas prie baltymo-nešiklio KLH tam, kad susidarytų PCE3 modifikuoto polipeptido-KLH sudėtinis baltymas;

2 pakopa: emulsifikuoto PCE3 modifikuoto polipeptido-KLH sudėtinio baltymo sušvirkštimas į triušio nugaros poodį, ir tris kartus atliekama pakartotina imunizacija po pirminės imunizacijos;

3 pakopa: surenkamas ir atskiriamas serumas, kuriame yra triušio antikūnas prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 modifikuotą polipeptidą;

4 pakopa: atliekamas antiserumo gryninamas peptidų giminingumo principu, naudojant PCE3 peptido giminingumo chromatografijos kolonėlę tam, kad būtų gautas PCE3 polipeptido antikūnas;

5 pakopa: atliekamas PCE3 polipeptido antikūno titravimo testas;

6 pakopa: nustatomas PCE3 polipeptido antikūno specifiškumas imunoblotingo metodu.

Šio išradimo polikloninis antikūnas pasižymi geru specifiškumu ir aukštu grynumu, o taip pat gali specifiškai atpažinti gamtinį PCE3 baltymą audiniuose arba ląstelėse.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 parodytas imunoblotingo rezultatas. Tikslinė juosta ant imunoblotingo membranos sutampa su apie 50 kDa dydžiu ir atitinka PCE3 baltymo teorinę molekulinę masę (52,2 kDa).

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas bus papildomai aprašytas žemiau su konkrečiais įgyvendinimo variantais. Reikėtų suprasti, kad šie įgyvendinimo variantai yra naudojami tik šio išradimo paaiškinimui ir nėra skirti apriboti šio išradimo apimtį. Nenukrypstant nuo šio išradimo techninio sprendimo, bet kokia šio išradimo modifikacija ar pakeitimas, kuriuos lengvai galėtų padaryti atitinkamos srities specialistas, patenka į šio išradimo apibrėžties apsaugos apimtį.

1 pavyzdys. *Nilaparvata lugens* PCE3 sekos analizė, ir PCE3 polipeptido modeliavimas bei sintezė

Atsižvelgiant į *Nilaparvata lugens* PCE3 seką (prieigos numeris MN586815) „GenBank“ duomenų banke, *Nilaparvata lugens* PCE3 baltymo seka sudaryta iš 460 aminorūgščių. *Nilaparvata lugens* PCE3 baltymo charakteristikos buvo analizuojamos naudojant „Protean“ programos modulį DNR programinėje įrangoje "be klaidų", siekiant gauti baltymą su molekuline mase (52,2 KDa). Toliau buvo analizuojamos baltymo aminorūgščių sekos savybės, tokios kaip antigeniškumas, hidrofiliškumas, paviršiaus tikimybė, ir polipeptido seka RRALPKENSKEANP buvo atrinkta bei panaudota kaip antigenas. Tam, kad būtų palengvintas sujungimas su baltymu-nešikliu ir padidintas polipeptido imunogeniškumas, buvo prijungtas cisteinas C prie aukščiau minėto polipeptido C galo, taigi galutinė sintetinio polipeptido seka buvo RRALPKENSKEANPC. Polipeptido sintezė buvo atlikta automatinio peptidų sintetinio įrenginio. Susintetino polipeptido grynumas buvo nustatytas HPLC sistema, o gautas rezultatas buvo 94,97%. Polipeptido molekulinė masė buvo nustatyta masės spektrometru, o gautas rezultatas buvo 1712,70.

2 pavyzdys. Polipeptido sujungimas su baltymu-nešikliu

Baltymas-nešiklis KLH buvo sujungiamas skersiniais ryšiais su susintetintu PCE3 polipeptidu, naudojant MBS kaip kryžminio sujungimo agentą: KLH buvo tirpinama iki 10 mg/ ml kryžminio sujungimo buferyje; MBS buvo tirpinamas DMF iki 10 mg/ ml; ištirpinto KLH tirpalas ir MBS tirpalas buvo sumaišomi santykiu 10: 1 (m/ m), ir KLH buvo aktyvuojamas 30 minučių kambario temperatūroje; aktyvuotas KLH tirpalas buvo gryninamas Sephadex G-25 pagalba; aktyvuotas KLH tirpalas buvo sumaišomas su PCE3 polipeptido tirpalu santykiu 1: 1 (m/ m) tam, kad 3 valandas kambario temperatūroje vyktų reakcija; aukščiau pateiktas reakcijos tirpalas buvo

dializuojamas prieš PBS per naktį 4 °C temperatūroje tam, kad būtų gautas PCE3 polipeptido-KLH sudėtinis baltymas.

3 pavyzdys. Eksperimentinių gyvūnų imunizacija

Imunizacijai buvo atrinkti atitinkamo amžiaus Naujosios Zelandijos triušių patinai. Prieš imunizaciją iš triušių ausų venų buvo surenkama 2 - 3 ml kraujo ir panaudojama kaip neigiama kontrolė vėlesniam ELISA tyrimui. Pirmos imunizacijos metu 0,5 mg PCE3 polipeptido-KLH sudėtinio baltymo buvo ištirpinama 0,5 ml PBS tirpalo ir paruošiama emulsija, panaudojant tokį patį kiekį Freundo pilno adjuvanto, o po to įšvirkščiamą į poodį daugelyje triušių kūno vietų. Po 2 savaičių buvo atliekama pirmoji pakartotina imunizacija. 0,5 mg PCE3 polipeptido-KLH sudėtinio baltymo buvo ištirpinama 0,5 ml PBS tirpalo, sumaišoma su tokiu pat kiekiu Freundo nepilno adjuvanto, ir paruošiama emulsija, o po to įšvirkščiamą į poodį daugelyje kūno vietų. Po to kas 3 savaites, iš viso 3 kartus, buvo atliekama tokia pati pakartotina imunizacija. Praėjus savaitei po kiekvienos pakartotinos imunizacijos, iš triušių ausų venų buvo paimamas nedidelis kraujo kiekis, ir netiesioginės ELISA metodu buvo nustatomas imuninis serumo titras. Kai titras būdavo didesnis nei 1: 20 000, iš miego arterijos buvo paimamas triušio kraujas tam, kad iš jo būtų paruoštas serumas.

4 pavyzdys. Antikūnų valymas PCE3 polipeptido giminingumo kolonėlėje

Į chromatografijos kolonėlę buvo įšvirkščiamą 1 ml aktyvuotos gelio suspensijos. Po to, kai nuo kolonėlės nusekdavo skystis, kolonėlei plauti buvo pridedami 5 ml sujungimo buferio. Susintetintas PCE3 polipeptidas buvo ištirpinamas 1 ml sujungimo buferio ir užnešamas ant chromatografijos kolonėlės, po to į kolonėlę buvo įpilama 1 ml sujungimo buferio, sukama ir maišoma 4 °C temperatūroje per naktį. Chromatografijos kolonėlė buvo praplaunama 8 ml sujungimo buferio, po to 1 valandą blokuojama 3 ml blokuojančio tirpalo kambario temperatūroje. Tam, kad būtų paruošta PCE3 polipeptidus surišanti chromatografinė kolonėlė, chromatografijos kolonėlė buvo 3 kartus praplaunama surišimo buferiu, kol nuo kolonėlės nusekdavo skystis. Į kolonėlę buvo įpilamas surišimo buferis, kuriame yra PCE3 antikūno serumo, 1 valandą maišoma kambario temperatūroje, ir tada kolonėlė buvo plaunama 30 ml plovimo buferiu, kol ištekančio skysčio absorbcijos smailė, esant 280 nm bangos ilgiui, stabilizuojasi. Kolonėlė buvo plaunama 15 ml plovimo buferio tam, kad būtų gautas išgrynintas PCE3 antikūnas.

5 pavyzdys. Antikūnų titro nustatymas netiesioginės ELISA metodu

ELISA plokštelė padengiama PCE3 polipeptido-KLH junginiu 4 °C temperatūroje per naktį, ir blokuojama 5 % nugriebto pieno miltelių tirpalu 2 valandas kambario temperatūroje; PCE3 antikūnas buvo praskiedžiamas skirtingais santykiais 1: 1000, 1: 2000, 1: 4000, 1: 8000, 1: 16000, 1: 32000, 1: 64000, 1: 128000, 1: 256000, 1: 512000, ir inkubuojamas kambario temperatūroje 2 valandas arba 4 °C temperatūroje per naktį; ir tada pridedama krienų peroksidaze pažymėto ožkos anti-triušio antrinio antikūno, ir inkubuojama kambario temperatūroje 2 valandas. Buvo pridedama TMB chromogeninei reakcijai, po to, kai reakcija nutraukiama sieros rūgštimi, buvo matuojama absorbcija, esant 450 nm bangos ilgiui. Kai mėginio absorbcijos santykis su neigiamo serumo buvo didesnis nei 2,1, buvo apskaičiuotas antikūnų titras. Po tyrimo išgryninto PCE3 antikūno titras siekė 1: 512000.

6 pavyzdys. PCE3 antikūno specifiškumo nustatymas imunoblotingo metodu

SDS-PAGE gelis buvo paruoštas standartiniu metodu. Į vertikalaus elektroforezės rezervuaro mėginių šulinėlius buvo įpilama 10 µl audinio lizato, kurio baltymų koncentracija 5 mg/ ml, ir atliekama elektroforezė. Elektroforezė buvo nutraukiama, kai bromfenolio mėlynojo indikatorius visiškai išeidavo iš skiriamąjo gelio. Baltymas buvo perkeliamas ant NC membranos, naudojant drėgnojo perkėlimo metodą, esant pastoviai 100 V įtampai, 90 minučių. 4 pavyzdyje gautas PCE3 antikūnas buvo panaudotas kaip pirminis antikūnas, praskiedus santykiu 1: 500, hibridizuotas su drėgnojo perkėlimo NC membrana kambario temperatūroje 2 valandas, o po to hibridizuotas su HRP pažymėtu ožkos anti-triušio antikūnu kambario temperatūroje 2 valandas. Šio pavyzdžio eksperimentiniai rezultatai parodė, kad PCE3 buvo universaliai ekspresuojamas *Nilaparvata lugens* kiaušidėse.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1 Sintetinis *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidas, kurio aminorūgščių seka yra RRALPKENSKEANP.

2. Triušių antikūnų prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą gamybos būdas, kuriame pirmiausia sintetinamas *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidas, kurio aminorūgščių seka yra RRALPKENSKEANP; susintetintas modifikuotas polipeptidas sujungiamas su baltymu-nešikliu sudėtinio baltymo sukūrimui, gyvūnai imunizuojami sudėtinio baltymu, paruošiamas antiserumas iš imunizuotų gyvūnų kraujo, ir iš antiserumo išskiriamas bei išgryninamas antikūnas.

3. Būdas pagal 2 punktą, kur baltymas-nešiklis yra moliuskos limfos hemocianinas (KLH) arba galvijų serumo albuminas (BSA); modifikuoto polipeptido sulfhidrilo grupė ir baltymo-nešiklio aminogrupė yra kovalentiškai sujungtos kryžminio sujungimo agentu tam, kad būtų sudarytas sudėtinis baltymas.

4. Būdas pagal 3 punktą, kur sumaišius sudėtinį baltymą su imunoadjuvantu ir paruošus emulsiją, sudėtinis baltymas sušvirkščiamas į triušio nugaros poodį; po pirminės imunizacijos tris kartus atliekama pakartotina imunizacija tam, kad būtų gautas antiserumas.

5. Būdas pagal 4 punktą, kur antiserumas yra išgryninamas, naudojant peptidų giminingumo chromatografiją, siekiant gauti išgrynintą triušio antikūną prieš *Nilaparvata lugens* PCE3 polipeptidą.

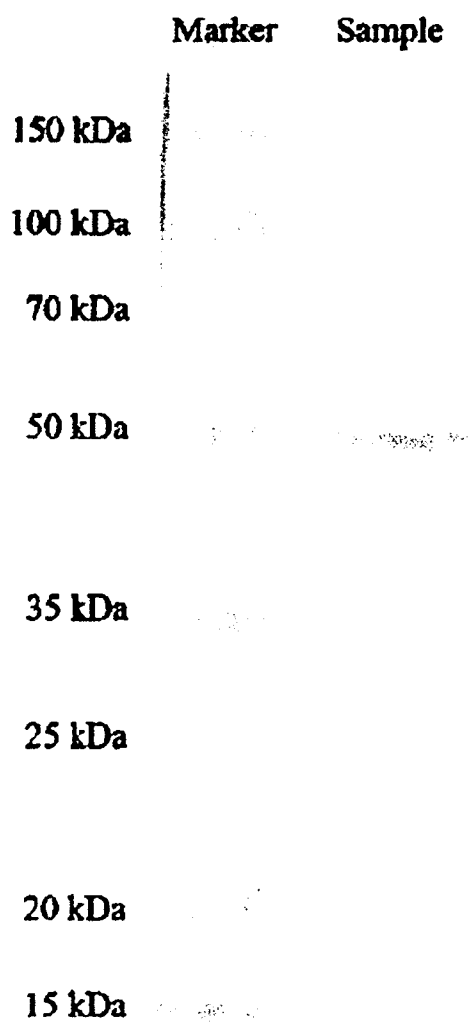


Fig. 1