

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 509**
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-03-12**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2022-09-26**

(71) Pareiškėjas:
Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(72) Išradėjas:
Gintautas ŽVIRBLIS, LT
Aistė SLIŽIENĖ, LT
Milda PLEČKAITYTĖ, LT
Mindaugas ZAVECKAS, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Monokloniniai antikūnai prieš paprastojo karpio beta enolazę

(57) Referatas:

Išradimas priklauso baltymų biotechnologijos sričiai. Čia aprašomi nauji monokloniniai antikūnai prieš paprastojo karpio β -enolazę ir juos produkuojančios hibridomos ląstelės. Monokloniniai antikūnai gali būti panaudojami karpio ir kitų žuvų baltymų aptikimui maisto produktuose, bei komercinių karpio ekstraktų identifikavimui.

MONOKLONINIAI ANTIKŪNAI PRIEŠ PAPRASTOJO KARPIO β -ENOLAZĘ

Technikos sritis

Išradimas priskirtinas baltymų biotechnologijos sričiai. Jis aprašo naujų monokloninių antikūnų prieš paprastojo karpio β -enolazę, sukūrimą.

Technikos lygis

Enolazė (fosfopiruvato hidratazė, EC 4.2.1.11) yra metalofermentas, dalyvaujantis gliukozės metabolizme, kurio metu katalizuoja 2-fosfoglicerato vartimą fosfoenolpiruvatu [Nakagawa and Nagayama. Comp. Biochem. Physiol. 1991, 98B, pp. 355-359; Díaz-Ramos et al. J Biomed Biotechnol. 2012]. Fermentas yra aptinkamas mikroorganizmuose ir žinduoliuose, o jo aminorūgščių seka tarp skirtingų rūšių sutampa daugiau nei 50 % [Witkowska et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005, 45, pp. 53-62]. Enolazė yra tyrinėta ir išgryninta iš įvairių organizmų: iš žmogaus, vištos, triušio, vaivorykštinio upėtakio, žiurkės raumenų; iš mielių: *Saccharomyces cerevisiae*; iš augalų: bulvių ir špinatų, ir išskirtingų bakterijų: *Escherichia coli*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Thermus aquaticus* ir kitų [Van der Straeten et al. Plant Cell. 1991, 3, pp. 719-735; Nakagawa and Nagayama. Comp. Biochem. Physiol. 1991, 98B, pp. 355-359; Zadvornyy et al. Front BioengBiotechnol. 2015, 3]. Stuburiniuose gyvūnuose enolazė yra aktyvus dimeras (subvieneto molekulinė masė apie 50 kDa) ir yra aptinkama trijų izoformų: α , β ir γ [Kleine-Tebbe and Jakob, Springer. 2015, pp.383-384]. α -enolazė (Eno1) yra ekspresuojama daugelyje audinių, β -enolazė (Eno3) daugiausia randama raumenų audiniuose ir γ -enolazė (Eno2) aptinkama neuronuose ir neuroendokrininiuose audiniuose [Díaz-Ramos et al. J Biomed Biotechnol. 2012]. 1983 m. iš paprastojo karpio buvo pirmą kartą išgryninta ir apibūdinta β -enolazė [Pietkiewicz et al. Comp. Biochem. Physiol. 1983, 75B, pp. 693-698].

Žuvis yra vienas iš pagrindinių maisto alergenų, sukeliančių alergijas daugiau nei 1 % viso pasaulio gyventojų. Yra žinoma, kad pacientai gali būti alergiški vienai specifiniam žuviai arba įsijautrinę kelioms skirtingoms žuvų rūšims. Alergijos simptomai (dilgėlinė, viduriavimas, vėmimas, bronchų susiaurėjimas ir kt.) gali paveikti pacientų odą, kvėpavimo takus ir virškinamąjį traktą ne tik suvalgius žuvies bet ir gaminant žuvies patiekalus. Yra atvejų, kuomet žuvis gali sukelti žmogui ir sunkią alerginę reakciją – anafilaksiją. Žuvų alergenai yra parvalbuminai, enolazės, aldolazės, kolagenas, tropomiozinai ir vitelogeninai [Kleine-Tebbe and Jakob. Springer. 2015, pp. 381-394; Matricardi et al. John Wiley & Sons Ltd. 2016, pp. 173-177]. 2003 m. β -enolazė (50 kDa) ir aldolazė (40 kDa) buvo apibūdinti kaip nauji žuvies alergenai, išgryninti iš Atlantinės menkės, lašišos ir tuno. Kaip parvalbuminai, jie buvo aptikti žuvies raumenyse ir pasirodė esantys jautrūs terminiam apdorojimui.

Taikant imunofermentinės analizės (IFA) metodą buvo atliktas imunoglobulino E (IgE) inhibicijos eksperimentas, kuris parodė galimą tarp rūšinį kryžminį reaktyvumą tarp atrastų β -enolazių ir aldolazių [Kuehn et al. Clinical Et Experimental Allergy. 2013, pp. 811-822]. Šiuo metu yra žinomos penkios β -enolazės, išskirtos iš Atlantinės menkės (Gad m 2), vištos (Gal d 9), dryžuoto šamo (Pan h 2), Atlantinės lašišos (Sal s 2) ir geltonpelekio tuno (Thu a 2), kurie yra pripažinti alergenais Pasaulio sveikatos organizacijos ir Tarptautinės imunologinių draugijų sąjungos.

Gydant alergiją žuviai pacientams yra patariama visiškai vengti žuvies valgymo, nors dalis jų galėtų valgyti tik tam tikras žuvų rūšis. Svarbus žingsnis, siekiant pagerinti kiekvieno paciento gyvenimo kokybę, yra nustatyti konkrečią žuvį ir jos specifinį alergeną, kuriam pacientas yra alergiškas [Kleine-Tebbe and Jakob. Springer. 2015, pp. 381-94]. Asmuo, kuris buvo įsijautrinęs menkei ir Nilo ešeriui, galėjo toleruoti lašišą ir tuną, kadangi jis buvo alergiškas tik menkės ir Nilo ešerio β -enolazėms ir aldolazėms [Kuehn et al. Letter Ann Allergy Astma Immunol. 2014]. Žuvų ekstraktai yra baltymų mišiniai, išskirti iš žuvies raumens, filė ar visos žuvies. Šie ekstraktai yra naudojami odos dūrio testuose, nustatant pacientams įsijautrinimą žuviai [Ruethers et al. Allergy. 2019, 74, 1352-1363]. Tačiau tokie natūralūs ekstraktai pasižymi keliais trūkumais, lemiančiais jų prastą kokybę: sudėtyje yra neištirtų nealerginių medžiagų, teršalų, proteazių, nedidelė pagrindinio alergeno koncentracija ir t.t. Išsamesnis alergeno ekstrakto apibūdinimas ir standartizuotas jo paruošimas iš natūralaus šaltinio galėtų pagerinti ekstrakto saugumą ir efektyvumą alergijos diagnostikoje [Valenta et al. J Allergy Clin Immunol Pract. 2018, 6, pp. 1845–1855].

Hibridomų technologija yra plačiai taikomas metodas skirtas monokloninių antikūnų (MAk) kūrimui. MAk gebėjimas atpažinti ir prisijungti prie specifinės antigeno srities, leidžia juos pritaikyti vėžio, autoimuninių ligų ir alerginių ligų (astma ir atopinis dermatitas) terapijoje [Landolina and Levi-Schaffer. Br J Pharmacol. 2016, 173(5), pp. 793-803; Chandrasekaran and Sivakumaran. International Journal of Scientific and Research Publications. 2018, 8, pp. 319-338]. MAk, sukurti prieš konkretų alergeno komponentą, galėtų būti pritaikyti alergeno ekstrakto standartizavimui, t.y. aptikti ir įvertinti komponento kiekį pačiame ekstrakto. Keliems šakotosios sienžolės (lot. *Parietaria judaica*) alergeno komponentams specifiniai MAk buvo panaudoti siekiant standartizuoti iš šakotosios sienžolės išskirtą ekstraktą. Tuo tarpu MAk prieš Der p 1 ir Der f 1 buvo pritaikyti įvertinant šių komponentų kiekį komerciniuose namų dulkių erkių, atitinkamai, *Dermatophagoides pteronyssinus* ir *Dermatophagoides farinae* ekstraktuose [Afferni et al. Biologicals. 1995, 23, pp. 239–247, Chapman et al., J Allergy Clin Immunol. 1987, 80(2), pp. 184-194]. Taip pat alergenams specifiniai MAk gali būti pritaikyti alergenų, tokių kaip β -laktoglobulino, kazeino, ovalbumino, lizocimo, parvalbumino, tropomiozino ir kt., aptikimui maisto produktuose, kurie galėtų sukelti gyvybei pavojingą reakciją (anafilaksinį šoką) jautresniems asmenims [Sharma et al. Food and Drug Administration Papers. 2017, 6, pp. 65-121]. Kalbant apie alergiją žuviai, polikloniniai antikūnai prieš

Atlantinės menkės parvalbuminą buvo pritaikyti kuriant dviepitopę IFA sistemą, skirtą žuvies nustatymui maisto produktuose [Fæste and Plassen. Journal of Immunological Methods. 2018, 329, pp. 45-55]. Keletas komercinių IFA rinkinių yra sukurti kiekybiniam žuvies parvalbumino įvertinimui maisto produktuose, tokiuose kaip vyne, sriuboje, padažuose, krekeriuose, surime ir kt.

Paprastasis karpis (lot. *Cyprinus carpio*) yra viena iš dažniausiai valgomų ir studijuojamų žuvies rūšių. Buvo parodyta, kad karpio parvalbuminas turi tam tikrus IgE epitopus, kurie yra aptinkami ir kitų rūšių žuvyse, todėl manoma, kad šis alergenai galėtų būti pritaikytas *in vitro* ir *in vivo* žuvies alergijos nustatymui [Sharp and Lopata. Clin Rev Allergy Immunol. 2014, 46(3), pp. 258-271, Swoboda et al. J Immunol. 2002, 168, pp. 4576-4584]. Nors parvalbuminai yra laikomi pagrindiniais žuvų alergenais, tyrimai parodė, kad pacientai yra įsijautrinę ir kitiems žuvų alergenams: β-enolazei ir aldolazei [Kuehn et al. Clinical Et Experimental Allergy. 2013, pp. 811-822]. Neseniai paprastojo karpio β-enolazė oficialiai pripažinta alergenu ir užregistruota **Cyp c 2** pavadinimu WHO/IUIS alergenų nomenklatūros duomenų bazėje <http://www.allergen.org/index.php>.

Nėra informacijos apie monokloninių antikūnų prieš paprastojo karpio β-enolazę kūrimą. Sukurti MAK yra prieš žmogaus α-enolazę [US9382331B2, publ. 2016], prieš *Aspergillus fumigatus* ląstelių paviršiuje esančią enolazę [Yadav and Shukla. FEMS Microbiology Letters. 2019, 366], prieš streptokoko paviršiaus enolazę [Fontán et al. J Infect Dis. 2000, 182, pp. 1712-1721], prieš pjautuvinio plazmodijaus (lot. *Plasmodium falciparum*) enolazę [Pal-Bhowmick et al. J Vect Borne Dis. 2006, 43, pp. 43–52], prieš *Chaetomium globosum* enolazę [Green-BJ. Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy. 2014, 33] ir prieš žmogaus neuronams būdingą enolazę (NSE, γ-enolase) [Frikke et al. Brain Res. 1987, 417, pp. 283-292; Seshi and Bell CE. Hybridoma. 1985, 4 pp. 13-25].

Aukščiau pateikta informacija siūlo, kad MAK prieš paprastojo karpio β-enolazę kūrimas galėtų tapti įrankiu, skirtu išsamesniam alergeno apibūdinimui ir būti pritaikytam standartizuoti natūralius karpio ir kitų žuvų ekstraktus ar maisto produktus, naudojamus nustatant pacientų alergiją žuviai.

Išradimo esmė

Išradimo tikslas buvo sukurti naujas hibridinių ląstelių linijas, sekretuojančias monokloninius antikūnus prieš paprastojo karpio β-enolazę.

Šis išradimas pateikia dvi naujas hibridinių ląstelių linijas: 14F3 ir 6E4, kurios sekretuoja MAK prieš β-enolazę. Antikūnai atpažįsta rekombinantinę paprastojo karpio β-enolazę, sulietą su maltoze surišančiu baltymu (MBP), susintetintą *E. coli* bakterijose. MAK 6E4 taip pat sąveikauja su β-enolaze,

esančia komerciniuose karpio ir kitų žuvų rūšių ekstraktuose, bei laboratorijos sąlygomis paruoštame karpio ekstrakte.

Pateikiamas išradimas, kuriame monokloniniai antikūnai atpažįsta tokią aminorūgščių seką SEQ ID: Nr.1

MSISKIHAREILDSRGNPTVEVDLYTAKGRFRAAVPSGASTGVHEALELRDGDKTRYLGKGTQKAV
DHAVNKEIAPKLEKKFSVVEQEKIDKFMLELDGTENKSKFGANAILGVSLAVCKAGAAEKGVPYRHI
ADLAGNKDVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAKNFHEAMRIGAEVYHNLKNVIKAKY
GKDATNVGDEGGFAPNILENNEALELLKSAIEKAGYPDKIIIGMDVAASEFFKNGKYDLDFKSPDDP
KRHITGDQLGDLYKSFKNYPVQSIEDPFDQDDWENWSKFTGSVDIQVVGDDLTVTNPKRIQQACE
KKACNCLLLKVNQIGSVTESIQACKLAQSNWGVMSVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPC
RSERLAKYNQLMRIEEELGDKAKFAGKDFRHPKL

arba panašias aminorūgščių sekas, kurių identiškumas yra daugiau nei 60 %, pageidautina bent 95%.

Tinkamiausias šio išradimo įgyvendinimo variantas pateikia išsamesnį β-enolazės, kaip alergeno, apibūdinimą, naujai sukurtais monokloniniais antikūnais.

Kitas pageidaujamas šio išradimo įgyvendinimo variantas yra monokloninių antikūnų pritaikymas β-enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose.

Pabaigai, išradimas pateikia galimą monokloninių antikūnų pritaikymą kuriant diagnostinį rinkinį, skirtą β-enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose.

Šiame išradime siūlomi monokloniniai antikūnai yra nauji ir skiriasi nuo analogų iš kitų šaltinių bei anksčiau aprašytų monokloninių antikūnų.

Toliau išradimas yra aprašomas išsamiau, su nuorodomis į pridedamus paveikslus ir pavyzdžius.

Trumpas paveikslų aprašymas

1 pav. pavaizduotas PGR klonų analizės vaizdas.

2 pav. pavaizduotas baltymų elektroforezės gelio vaizdas, gautas išanalizavus mėginius po MBP-Eno raiškos indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose ir patikrinus tirpią ir netirpią ląstelių lizato frakcijas.

3 pav. pavaizduotas baltymų elektroforezės vaizdas, gautas išanalizavus išgrynintą rekombinantinį MBP-Eno baltymą, naudojant MBP Trap HP kolonėlę su „Dextrin Sepharose High Performance“ sorbentu.

4 pav. pavaizduotas imunoblotingo vaizdas, gautas su rekombinantiniu paprastojo karpio MBP-Eno baltymu, rekombinantiniu Eno (atskeltas nuo MBP-Eno su TEV proteaze) baltymu, rekombinantiniu MBP baltymu ir *E. coli* Tuner (DE3) ląstelių lizatu, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

5 pav. pavaizduotas imunoblotingo vaizdas, gautas su komerciniais žuvų ekstraktais, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

6 pav. pavaizduotas imunoblotingo vaizdas, gautas su rekombinantiniu paprastojo karpio MBP-Eno baltymu, komerciniu karpio ekstraktu (DST), laboratorijoje paruoštu natūraliu karpio ekstraktu ir rekombinantiniu MBP baltymu, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

7 pav. pavaizduotas imunoblotingo vaizdas, gautas su MBP-Eno mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose, MBP-Eno-C1 mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose, MBP-Eno-C2 mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose ir rekombinantiniu MBP baltymu, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

Detalus išradimo aprašymas

Rekombinantinė paprastojo karpio β -enolazė, sulieta su MBP, buvo susintetinta *E. coli* bakterijose, išgryninta ir panaudota kuriant naujas hibridomas. Procedūros buvo atliktos šios srities specialistams, naudojant patvirtintus protokolus, parašytus pagal anksčiau aprašytą hibridomų technologijos metodą [Köhler and Milstein. Nature. 1975, 256, pp. 495-497].

- 1) Imunizacija – rekombinantinė paprastojo karpio β -enolazė, sulieta su MBP, sutrumpintai MBP-Eno, buvo suleidžiama BALB/c linijos pelėms po oda. Prieš injekciją, MBP-Eno (antigenas) tirpalas buvo lygiu tūriu sumaišomas su pilnu Freund'o adjuvantu.
- 2) Praėjus 4 savaitėms pelėms dar kartą buvo suleidžiamas toks pat antigeno tirpalo kiekis, prieš tai antigeno tirpalą sumaišius su nepilnu Freund'o adjuvantu.
- 3) Dar po 4 savaičių pelėms buvo suleidžiamas toks pat antigeno kiekis be adjuvanto. Imunizacijų metu buvo keletą kartų tikrinama, ar imunizuotų pelių kraujo serume atsirado antikūnų prieš antigeną. Tikrinimui buvo naudojamas imunofermentinės analizės (IFA) metodas.
- 4) Pakartotinė imunizacija – praėjus 4 savaitėms po trečios imunizacijos, pasirinktai pelei buvo suleidžiamas toks pat antigeno kiekis be adjuvanto.
- 5) Praėjus 3 dienoms po pakartotinės imunizacijos, pelės blužnies ląstelės buvo sulietos su pelės mielomos Sp 2/0 ląstelėmis, suliejimo agentu buvo naudotas polietilenglikolis (PEG, Sigma).

- 6) Sukurtų hibridinių ląstelių klonų (hibridomų) specifiškumas buvo tikrinamas IFA metodu. Šio tyrimo metu buvo nustatoma, ar hibridomos sekretuoja antikūnus prieš β -enolazę.
- 7) Hibridomos buvo apibūdintos nustatant jų sekretuojamų MAK poklasį ir ištiriant jų specifiškumą IFA ir imunoblotingu metodais.
- 8) Identifikavus hibridomas, kurios sekretuoja antikūnus prieš β -enolazę, buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolimesniam saugojimui.
- 9) Hibridomų sekretuojami antikūnai buvo apibūdinti metodais:
 - a. IFA ir imunoblotingu, naudojant kaip antigenus rekombinantinę paprastojo karpio β -enolazę, sulietą su MBP (MBP-Eno), rekombinantinį Eno (atskeltą nuo MBP-Eno su TEV proteaze) baltymą ir rekombinantinį MBP baltymą.
 - b. Imunoblotingu, naudojant bakterijų *E. coli* Tuner (DE3) ląstelių lizatą.
 - c. IFA ir imunoblotingu, naudojant kaip antigenus komercinius karpio ir kitų žuvų rūšių ekstraktus.
 - d. Imunoblotingu, naudojant laboratorijos sąlygomis paruoštą karpio ekstraktą.
 - e. IFA ir imunoblotingu, naudojant kaip antigenus rekombinantinį MBP-Eno baltymą, rekombinantinį MBP-Eno-C1 baltymą, rekombinantinį MBP-Eno-C2 baltymą ir rekombinantinį MBP baltymą.

Taigi, atlikus pelių BALB/c imunizacijas rekombinantiniu MBP-Eno ir suliejus pasirinktos imunizuotos pelės blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis, buvo sukurtos hibridomos, sekretuojančios monokloninius antikūnus prieš β -enolazę. Ištyrus gautų MAK savybes buvo parodyta, kad MAK 14F3 sąveikauja tik su rekombinantiniu MBP-Eno baltymu, o MAK 6E4 atpažįsta natyvią β -enolazę iš *E. coli* bakterijų ir žuvų ekstraktų.

Hibridomas 14F3 ir 6E4 apibūdina šie požymiai.

Morfologiniai požymiai. Hibridinių ląstelių klonai yra sferinės formos, turi stambų branduolį. Auginami suspensijoje pasižymi silpna adhezija ant plastiko paviršiaus.

Ląstelių kultūros kilmė. Hibridomos gautos suliejus imunizuotos BALB/c linijos pelės blužnies ląsteles su pelės mielomos ląstelių linija Sp 2/0.

Ląstelių kultūros požymiai. Hibridomų kultivavimo sąlygos standartinės: augimo terpė yra Dulbecco modifikuota Eagle terpė su 2 mM L-glutamino, 200 μ g/mL gentamicino ir 15 % embrioninio veršiuko serumo. Hibridomos kultivuotos plastiko induose, skirtuose ląstelių kultūrų auginimui. Ląstelės persėjamos kas 3–4 dienas, 50–100 tūkstančių ląstelių mililitre terpės. Hibridomos auginamos inkubatoriuje, kurio atmosferoje yra 5 % CO₂, esant 37 °C temperatūrai. Ilgalaikiam saugojimui hibridinės ląstelės užšaldomos embrioniniame veršiuko serume su 10 % dimetilsulfoksido (DMSO) ir laikomos skystame azote. Užšaldymo sąlygos: 1 x 10⁶–2 x 10⁶ ląstelių mililitre, temperatūros režimas:

-1 °C per minutę iki - 70 °C. Praėjus 24 val. ampulės su užšaldytais ląstelėmis perkeliama į skystą azotą. Kultūrų atgaivinimui ampulės atšildomos 37 °C temperatūros augimo terpėje be serumo, centrifuguojamos 5 min. 200 x g greičiu ir dar kartą suspenduojamos ląstelių augimo terpėje su serumu. Ląstelių gyvybingumas po atšildymo 70–80 %.

Kontaminacija. Bakterijų ir grybelių hibridomų kultūrose nerasta, mikoplazmos testas neigiamas.

Hibridomų produktyvumas. Monokloninių antikūnų sekrecijos lygis augimo terpėje yra 10–30 µg/ml. Antikūnų sekrecijos stabilumas iki 5 ląstelių kultūros persėjimų.

Produktų charakteristika. Hibridomos 14F3 ir 6E4 sekretuoja IgG klasės, IgG2b poklasio MAK, kurie specifiniai paprastojo karpio β-enolazei.

Buvo nustatyta, kad hibridomų 14F3 ir 6E4 sekretuojami monokloniniai antikūnai atpažįsta karpio β-enolazės aminorūgščių seką SEQ ID Nr.1.

Ši aminorūgščių seka atitinka paprastojo karpio β-enolazės aminorūgščių seką, kuri buvo nustatyta Vilniaus universitete Gyvybės mokslų centre Biotechnologijos institute (AWS00995.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AWS00995.1>).

Kitos žuvų rūšys irgi ekspresuoja β-enolazę, kurių pirminė seka gali keliomis aminorūgštimis skirtis nuo sekos SEQ ID Nr. 1.

Atlikus papildomus imunoblotingo eksperimentus su MAK 6E4 ir trumpesniais rekombinantiniais β-enolazės variantais (MBP-Eno-C1 ir MBP-Eno-C2), buvo patikslintas (susiaurintas) β-enolazės aminorūgščių sekos regionas (SEQ ID Nr. 2), kurį atpažįsta hibridomos 6E4 sekretuojami antikūnai. SEQ ID Nr. 2:

KDVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAKNFHEAMRIGAEVYHNLKNVIKAKYGKDATN
VGDEGGFAPNILENNEALELLKSAIEKAGYPDKIIIGMDVAASEFFKNGKYDLDFKSPDDPKRHITGD
QLGDLYKSFIKNYPVQSIEDP

Anksčiau aprašytas monokloninis antikūnas anti-ENO1 skiriasi nuo MAK, susintetintų hibridomų 14F3 ir 6E4, kadangi jis specifinis žmogaus α-enolazei [US9382331B2]. Tuo tarpu MAK 8304 EB11.6A19L10, 8304 CF5.5L2, 8304 AD9.1L3, 8304 AG4.5A1, 8304 CE9.3A1, 8304 EB11.3A1 ir 8304 EF7.6A1 reaguoja su žmogaus neuronams būdinga enolaze. Anksčiau aprašytas monokloninis antikūnas R-5 yra sukurtas prieš *Aspergillus fumigatus* ląstelių paviršiuje esančią enolazę, o MAK 1A10 ir 5F3 prieš streptokoko paviršiaus enolazę ir reaguoja su žmogaus α-enolaze. Anksčiau aprašytas monokloninis antikūnas 1C7 yra specifinis *Chaetomium globosum* enolazei.

Išradimo įgyvendinimo variantai

Toliau pateikiama informacija apie konkrečius rekombinantinės karpio β -enolazės, sulietos su maltozę surišančiu baltymu (MBP), klonavimu, sinteze *E. coli* bakterijose ir gryninimu. Taip pat informacija apie konkrečius naujų MAK sukūrimo ir jų savybių pavyzdžius. Šie pavyzdžiai ir lentelės pateikiami iliustraciniais tikslais ir neapriboja šio išradimo esmės.

1 pavyzdys.

Karpio β -enolazės klonavimas ir raiška *E. coli* bakterijose

Visa (totalinė) mRNR buvo izoliuota iš karpio skeleto raumenų naudojant rinkinį „Quick-RNA Miniprep Kit“ (R1054, Zymo Research) pagal gamintojo rekomendacijas. Pirmosios grandinės kopijinė DNR (kDNR) buvo paruošta naudojant rinkinį „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (K1631, Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Enolazę koduojanti kDNR buvo amplifikuota naudojant tokius pradmenis:

5'-GAGATCTATGTCCATCAGTAAGATTCACGCTCG (SEQ ID Nr. 3) ir

5'-CGTCGACTCAGAGTTTGGGGTGGCGGAA (SEQ ID Nr. 4), turinčius atitinkamai BglII ir Sall skėlimo sekas (pabraukta). Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) atlikta naudojant rinkinį „Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix“ (F548S, Thermo Fisher Scientific) 25 μ L reakcijos tūryje.

Amplifikacijos reakcija apima pradinės denatūracijos etapą 98 °C temperatūroje 10 sek. 35 amplifikacijos ciklus, sudarytus iš denatūracijos 1 sek. 98 °C, užsodinimo 5 sek. 54 °C ir sintezės 30 sek. 72 °C etapų. Gautas PGR fragmentas yra 1316 bazių porų (bp) dydžio.

PGR fragmentai klonuoti į pJET 1.2 vektorių (K1231, Thermo Fisher Scientific) ir rekombinantiniai klonai identifikuoti naudojant PGR su tokiais pradmenimis: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC (SEQ ID Nr. 5) ir 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG (SEQ ID Nr. 6). Amplifikacijos reakcija apima pradinės denatūracijos etapą 94 °C temperatūroje 2 min. 30 amplifikacijos ciklus sudarytus iš denatūracijos 30 sek. 94 °C, užsodinimo 20 sek. 60 °C ir sintezės 1 min. 72 °C etapų. Gauti fragmentai analizuoti elektroforeze 1 % agarozės gelyje (1 pav.).

1 pav. atkartoja PGR klonų analizės vaizdą. Takeliai 1–15. Penkiolika rekombinantinių klonų išanalizuota elektroforeze 1 % agarozės gelyje. Takelis 16: DNR standartų rinkinys „GeneRuler Ladder mix“ (SM0331, Thermo Fisher Scientific) (šalia pažymėti fragmentų dydžiai tūkstančiais bazių porų).

Insertai iš penkių rekombinantinių plazmidžių (1 pav. takeliai Nr. 3, 6, 11, 12 ir 13) buvo sekvenuoti. Klono Nr.11 seka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH255788.1>) buvo pakankamai artima β -enolazės dalinės sekos duomenims, publikuotiems kaip seka GenBank: LHQP01000860.1, *Cyprinus*

carpio isolate UL-001 Contig859 ir dalinė seka GenBank: LHQP01019434.1, *Cyprinus carpio* isolate UL-001 Contig19452. Insertas iš analizuoto klonu Nr.11 buvo pasirinktas raiškai *E. coli* bakterijose.

DNR fragmentas iš rekombinantinio klonu Nr. 11 plazmidės buvo iškirptas naudojant fermentus BglII ir Sall ir klonuotas į pET28-MBP-TEV plazmidę (#69929, Addgene), kuri buvo perkirpta fermentais BamHI ir XhoI. Atrinkti rekombinantiniai klonai buvo identifikuoti restrikcinės ir PGR analizės pagalba.

Raiškos plazmidė pET28-MBP-TEV-Eno-11 buvo transformuota į bakterijų *E. coli* Tuner (DE3) kamieną. β -enolazės biosintezė buvo indukuota pridėdant 0,1 mM IPTG esant ląstelių optikai $OD_{600} = 0,8$ ir toliau kultyvuojant ląsteles dar 3–3,5 val. dviejose temperatūrose: 25 °C ir 37 °C. Ląstelės buvo suardytos naudojant ultragarsą (Bandelin Sonopuls HD 3100, Bandelin Electronic). Tirpi ir netirpi ląstelių lizato frakcijos buvo atskirtos centrifuguojant bei išanalizuotos naudojant 12 % natrio dodecilsulfato poliakrilamidinį gelį redukuojančiomis sąlygomis (2 pav.).

2 pav. atkartoja baltymų elektroforezės gelio vaizdą, gautą po MBP-Eno raiškos indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose ir išanalizavus tirpią ir netirpią ląstelių lizato frakcijas.

1 takelis: ląstelių lizatas ($OD_{600} = 0,8$) prieš indukciją.

2 ir 5 takeliai: tirpi ląstelių lizato frakcija po indukcijos kultivuotų atitinkamai 25 °C ir 37 °C.

3 ir 6 takeliai: netirpi ląstelių lizato frakcija po indukcijos kultivuotų atitinkamai 25 °C ir 37 °C.

4 ir 7 takeliai: visa ląstelių lizato frakcija po indukcijos kultivuotų atitinkamai 25 °C ir 37 °C.

8 takelis: baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

2 pavyzdys.

Rekombinantinės karpio β -enolazės, sulietos su maltozę surišančiu baltymu (MBP), gryninimas

1 g indukuotos *E. coli* biomasės buvo suspenduota 5 ml 20 mM natrio fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 7,4), kartu su 200 mM natrio chlorido (NaCl), 1 mM etilendiamintetraacto rūgštimi (EDTA), šviežiai pridėtu 1 mM ditionitritoliu (DTT) ir 1 mM fenilmetilsulfonilchlorido (PMSF) tirpalu. Suspensija buvo patalpinta į ledo vonią ir veikama 15 sek. ultragarso impulsais (bendras sonikavimo laikas mėginiui yra 2 min.). Biomasės lizatas centrifuguotas 20 min., 20000 × g. Supernatantas praskiestas santykiu 1:6 su 20 mM natrio fosfatiniu buferiniu tirpalu (pH 7,4), turinčiu 200 mM NaCl ir 1 mM EDTA. Prieš chromatografiją praskiestas supernatantas filtruotas per 0,45 μ m porų filtrą (Millex-HV, Merck Millipore).

Chromatografinis gryninimas buvo atliktas su AKTA purifier 100 chromatografine sistema, naudojant mėginio pompą P-960 ir frakcijų kolektorių Frac-920 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) ir 1 ml MBP Trap HP kolonėlę su „Dextrin Sepharose High Performance“ sorbentu (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Tekėjimo greitis 1 ml/min. (0,5 ml/min. mėginio užnešimo metu). Kolonėlė nulygsvarinta su mažiausiai 10 kolonėlės tūrių (CV) surišimo buferiniu tirpalu (20 mM natrio fosfatinis buferis (pH 7,4), su 200 mM NaCl ir 1 mM EDTA). Supernatantas, turintis rekombinantinį MBP-Eno baltymą, buvo užneštas ant kolonėlės, kuri po to buvo praplauta su mažiausiai 10 CV surišimo buferiniu tirpalu. Eliucija atlikta su 5 CV eliucijos buferiniu tirpalu (turinčiu 10 mM maltozės), buvo renkamos chromatografinės eliucijos frakcijos.

Bendra baltymo koncentracija surinktose frakcijose nustatyta Bradfordo metodu naudojant serumo albumino standartą. Chromatografijos frakcijos, turinčiomis MBP-Eno baltymą, buvo išanalizuotos redukuojančiomis sąlygomis 12 % poliakrilamido gelyje, atliekant natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezę (SDS-PAGE). Baltymai gelyje nudažyti su rinkiniu „PageBlue™ Protein Staining Solution“ (24620, Thermo Fisher Scientific).

MBP-Eno frakcijų analizė SDS-PAGE parodyta 3 pav. Frakcijos, turinčios MBP-Eno baltymą (molekulinė masė 91,7 kDa), yra atkabinamos nuo sorbento su 10 mM maltozės buferiniu tirpalu. Prašokimo frakcijose MBP-Eno baltymo kiekis yra nedidelis. MBP-Eno kiekis eliucijos frakcijose buvo nustatytas Bradfordo metodu, iš 1 g pradinės biomasės gauta apie 5 mg MBP-Eno.

3 pav. atkartoja baltymų elektroforezės vaizdą, gautą išanalizavus išgrynintą rekombinantinį MBP-Eno baltymą, naudojant MBP Trap HP kolonėlę su „Dextrin Sepharose High Performance“ sorbentu.

1 takelis: baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

2 takelis: biomasės lizato supernatantas.

3 ir 4 takeliai: prašokimo frakcijos.

5–10 takeliai: eliucijos frakcijos su 10 mM maltozės buferiniu tirpalu.

3 pavyzdys.

Hibridinių ląstelių linijų, sekretuojančių monokloninius antikūnus prieš rekombinantinį paprastojo karpio MBP-Eno, sukūrimas

BALB/c linijos pelės buvo imunizuojamos išgrynintu rekombinantiniu paprastojo karpio MBP-Eno (antigenu), susintetintu bakterijose *E. coli*. Pelės buvo imunizuojamos suleidžiant joms po oda 50 µg antigeno mišinio su pilnu Freund'o adjuvantu. Praėjus 4 savaitėms po pirmosios imunizacijos, pelėms

buvo antrą kartą suleista 50 µg antigeno mišinio su nepilnu Freund'o adjuvantu. Dar po 4 savaitių pelės buvo imunizuojamos suleidžiant 50 µg antigeno mišinio be adjuvantu. Imunizacijų metu buvo tikrinamas antigenui specifinių antikūnų titras imunofermentinės analizės (IFA) metodu. Hibridizacija buvo atlikta praėjus 3 dienoms po paskutinės papildomos antigeno injekcijos pasirinktai pelei.

Imunizuotos pelės blužnies ląstelės buvo sulietos su pelės mielomos Sp 2/0 ląstelėmis, neturinčiomis hipoksantin-guanin-fosforiboziltransferazės, neaugančios selektyvioje hipoksantino-aminopterino-timidino (HAT) terpėje (10^{-4} M hipoksantino, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidino, 4×10^{-7} M aminopterino) ir nesekretuoja imunoglobulinų. Suliejimas buvo atliekamas inkubuojant ląsteles 5 min. su polietilenglikolio (PEG) tirpalu Dulbecco modifikuotoje Eagl'o terpėje (DMEM) su 2 mM L-glutaminu, 200 µg/mL gentamicinu. Mielomos ir blužnies ląstelių santykis hibridizacijos metu – 1:4,5. Po hibridizacijos ląstelės buvo atplaunamos beserumine DMEM terpe, suspenduojamos selektyvioje HAT terpėje ir išsėjamos į plokšteles (po $2,6 \times 10^5$ ląstelių į šulinėlį). Hibridiniai klonai užaugo praėjus 5–10 dienų po suliejimo. Netiesioginės IFA metodu buvo tikrinama ląstelių augimo terpė, nustatant ar klonai gamina antigenui specifinius antikūnus. Kas 4–5 dienas buvo pakeičiama pusė ląstelių augimo terpės. Pirmą kartą HAT terpė buvo keičiama į hipoksantino-timidino (HT) terpę, turinčią 10^{-4} M hipoksantino ir $1,6 \times 10^{-4}$ M timidino. Vėliau HT terpė buvo palaipsniui keičiama į įprastą augimo terpę. Klonai užaugo praėjus 4–7 dienoms po klonavimo (ribinio praskiedimo metodu) ir buvo tikrinami netiesioginės IFA metodu. Atrinkti klonai buvo padauginami, kultivuojami *in vitro* ir užšaldomi ilgesniam saugojimui skystame azote. Sukurtos dvi hibridinių ląstelių linijos, sekretuojančios monokloninius antikūnus prieš MBP-Eno: 14F3 ir 6E4.

4 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų specifiškumo tyrimas ir poklasio nustatymas

IFA ir imunoblotingo metodai buvo pritaikyti įvertinti antikūnų specifiškumą, kuriuos sintetina hibridomų klonai 14F3 ir 6E4. Antikūnų poklasis buvo nustatytas IFA metodu, naudojant poklasio nustatymo rinkinį (550487, BD Biosciences).

Tyrimų metu buvo nustatyta, kad MAK yra IgG klasės, IgG2b poklasio ir atpažįstą rekombinantinę β-enolazę (4 pav.). Imunoblotingo metodu buvo parodyta, kad monokloninis antikūnas 6E4 reaguoja su 50 kDa baltymu, esančiu įvairių žuvų ekstraktuose ir bakterijų *E. coli* Turner (DE3) lizate, kuris pagal molekulinę masę atitinka β-enolazę (4 ir 5 pav.).

Taigi, sukurti monokloniniai antikūnai yra specifiniai β-enolazei.

Hibridomų klonai	Poklasis	Reakcija su skirtingais antigenais					
		IFA		Imunoblotingas			
		MBP-Eno	MBP	MBP-Eno	Eno	MBP	<i>E. coli</i> lizatas
14F3	IgG2b	+	-	-	-	-	-
6E4	IgG2b	+	-	+	+	-	+

1 lentelė. Pateikiami duomenys apie hibridomų 14F3 ir 6E4 sekretuojamų antikūnų specifiškumą ir poklasisius.

4 pav. atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu paprastojo karpio MBP-Eno baltymu, rekombinantiniu Eno (atskeltas nuo MBP-Eno su TEV proteaze) baltymu, rekombinantiniu MBP baltymu ir *E. coli* Tuner (DE3) ląstelių lizatu, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

1 takelis – rekombinantinis išgrynintas Eno baltymas.

2 takelis – rekombinantinis išgrynintas MBP-Eno baltymas.

3 takelis – rekombinantinis išgrynintas MBP baltymas.

4 takelis – bakterijų *E. coli* Tuner (DE3) ląstelių lizatas.

M – baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

Išsamesniam monokloninio antikūno, sekretuojamo hibridomos 6E4 kloną, apibūdinimui buvo nustatytos antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių aminorūgščių sekos (Synbio Technologies).

Imunoglobulino sunkiosios grandinės aminorūgščių seka (SEQ ID Nr. 7):

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFIDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAI DPETGGTAYNQKFK
GKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSPTLQGDYWGQGTTLTVSS

Imunoglobulino lengvosios grandinės aminorūgščių seka (SEQ ID Nr. 8):

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFGSGVPD
RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHLPWTFGGGTKVEIK

5 pavyzdys.

Monokloninių antikūnų kryžminio specifiškumo tyrimas

IFA ir imunoblotingo metodu ištirtas hibridomų 14F3 ir 6E4 sekretuojamų antikūnų kryžminis specifiškumas, t.y. reakcija su karpio ir kitų žuvų rūšių komerciniais ekstraktais (DST).

Atlikus tyrimą buvo nustatyta, kad gautas MAK 14F3 reaguoja tik su lašišos ekstraktu, o MAK 6E4 – reaguoja su visais ekstraktais. Tai rodo, kad tiek MAK 14F3, tiek MAK 6E4 yra specifiniai ne tik rekombinantinei paprastojo karpio β -enolazei, bet atpažįsta ir kitų žuvų rūšių β -enolazę.

Hibridomų klonai	Reakcija su skirtingais antigenais							
	IFA				Imunoblotingas			
	Ekstraktai							
	Menkės	Karpio	Silkės	Lašišos	Menkės	Karpio	Silkės	Lašišos
14F3	-	-	-	+	-	-	-	-
6E4	+	+	+	+	+	+	+	+

2 lentelė. Pateikiami duomenys apie hibridomų 14F3 ir 6E4 sekretuojamų antikūnų specifiškumą skirtingiems žuvų rūšių ekstraktams.

5 pav. atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su komerciniais žuvų ekstraktais, naudojant hibridomos 6E4 klonu sekretuojamus monokloninius antikūnus.

1 takelis – komercinis silkės ekstraktas (f21, DST)

2 takelis – komercinis lašišos ekstraktas (f41, DST)

3 takelis – komercinis karpio ekstraktas (f233, DST)

4 takelis – komercinis menkės ekstraktas (f3, DST)

M – baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

Imunoblotingo metodu ištirtas hibridomos 6E4 sekretuojamų antikūnų pritaikomumas β -enolazės aptikimui karpio ekstrakto, paruošto Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorijoje. Ekstraktas išskirtas iš karpio filė (~ 4 g), naudojant fosfatinį buferinį tirpalą (pH 7,4), turintį 0,15 M NaCl.

Eksperimento metu buvo parodyta, kad MAK 6E4 reaguoja su β -enolaze, esančia tiek naujai paruoštame ekstrakto, tiek komerciniame karpio ekstrakto (f233, DST) ir gali būti taikomas skirtingų gamintojų karpio ekstraktų apibūdinimui.

6 pav. atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su rekombinantiniu paprastojo karpio MBP-Eno baltymu, komerciniu karpio ekstraktu (DST), laboratorijoje paruoštu natūraliu karpio ekstraktu ir rekombinantiniu MBP baltymu, naudojant hibridomos 6E4 klonu sekretuojamus monokloninius antikūnus.

1 takelis – rekombinantinis išgrynintas MBP-Eno baltymas.

2 takelis – komercinis karpio ekstraktas (f233, DST).

3 takelis – iš karpio filė išskirtas ekstraktas.

4 takelis – rekombinantinis išgrynintas MBP baltymas.

M – baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

6 pavyzdys.

Monokloninio antikūno, sekretuojamo hibridomos 6E4, epitopo nustatymas.

IFA ir imunoblotingo metodu ištirtas hibridomos 6E4 sekretuojamų antikūnų specifiškumas trumpesniems rekombinantiniams β -enolazės variantams (MBP-Eno-C1 ir MBP-Eno-C2). Rekombinantiniai baltymai susintetinti *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose, kaip ir rekombinantinis MBP-Eno baltymas. Sintezė atlikta Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos laboratorijoje.

MBP-Eno (836 aminorūgštys) baltymo seka atitinka SEQ ID Nr. 9.

MBP-Eno-C1 (698 aminorūgštys) yra trumpesnis rekombinantinio MBP-Eno baltymo variantas (sutrumpintas MBP-Eno baltymo C-galas). Baltymo aminorūgščių seka atitinka SEQ ID Nr. 10.

MBP-Eno-C2 (543 aminorūgštys) yra trumpesnis rekombinantinio MBP-Eno baltymo variantas (sutrumpintas MBP-Eno baltymo C-galas). Baltymo aminorūgščių seka atitinka SEQ ID Nr. 11.

Atlikus imunoblotingą buvo nustatyta, kad MAK 6E4 reaguoja su rekombinantiniu MBP-Eno baltymu, rekombinantiniu MBP-Eno-C1 baltymu, bet nereaguoja su MBP-Eno-C2 baltymu.

7 pav. atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su MBP-Eno mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose, MBP-Eno-C1 mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose, MBP-Eno-C2 mėginiu po indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamieno bakterijose ir rekombinantiniu MBP baltymu, naudojant hibridomos 6E4 kloną sekretuojamus monokloninius antikūnus.

1 takelis – MBP-Eno mėginys po indukcijos.

2 takelis – MBP-Eno-C1 mėginys po indukcijos.

3 takelis – MBP-Eno-C2 mėginys po indukcijos.

4 takelis – rekombinantinis išgrynintas MBP baltymas.

M – baltymų molekulinio svorio standartas (#26616, Thermo Fisher Scientific).

Palyginus visų rekombinantinių baltymų aminorūgščių sekas tarpusavyje (8 pav.), buvo nustatyta β -enolazės aminorūgščių seka (544-698 aminorūgštys), kurią atpažįsta MAk 6E4 monokloninis antikūnas ir kurioje yra tikėtinas šio antikūno epitopas (SEQ ID Nr. 12).

SEQUENCE LISTING

<110> Vilniaus Universitetas

<120> MONOKLONINIAI ANTIKŪNAI PRIEŠ PAPRASTOJO KARPIO BETA-ENOLAZE

<130> V83-80

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 433

<212> PRT

<213> Cyprinus carpio

<400> 1

Met	Ser	Ile	Ser	Lys	Ile	His	Ala	Arg	Glu	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Gly
1				5					10					15	

Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Val	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Arg
			20					25					30		

Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	His	Glu	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			

Leu	Arg	Asp	Gly	Asp	Lys	Thr	Arg	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr	Gln	Lys
50						55					60				

Ala	Val	Asp	His	Val	Asn	Lys	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys
65					70					75				80	

Lys	Phe	Ser	Val	Val	Glu	Gln	Glu	Lys	Ile	Asp	Lys	Phe	Met	Leu	Glu
			85						90					95	

Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Ala	Asn	Ala	Ile	Leu
			100					105					110		

Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Cys	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Glu	Lys	Gly	Val
		115					120					125			

Pro	Leu	Tyr	Arg	His	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Gly	Asn	Lys	Asp	Val	Ile
	130						135					140			

Leu	Pro	Val	Pro	Ala	Phe	Asn	Val	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	His	Ala	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

145		150		155		160
Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Lys						
		165		170		175
Asn Phe His Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu						
		180		185		190
Lys Asn Val Ile Lys Ala Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly						
		195		200		205
Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Asn Glu Ala Leu						
		210		215		220
Glu Leu Leu Lys Ser Ala Ile Glu Lys Ala Gly Tyr Pro Asp Lys Ile						
		225		230		235
Ile Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Lys Asn Gly Lys						
		245		250		255
Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Lys Arg His Ile Thr						
		260		265		270
Gly Asp Gln Leu Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asn Tyr Pro						
		275		280		285
Val Gln Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Glu Asn Trp						
		290		295		300
Ser Lys Phe Thr Gly Ser Val Asp Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu						
		305		310		315
Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Gln Gln Ala Cys Glu Lys Lys Ala						
		325		330		335
Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu						
		340		345		350
Ser Ile Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ser Asn Gly Trp Gly Val Met						
		355		360		365
Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu						

370

375

380

Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400

Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Met Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415

Leu Gly Asp Lys Ala Lys Phe Ala Gly Lys Asp Phe Arg His Pro Lys
 420 425 430

Leu

<210> 2
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Cyprinus carpio*

<400> 2

Lys Asp Val Ile Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly
 1 5 10 15

Ser His Ala Gly Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro
 20 25 30

Val Gly Ala Lys Asn Phe His Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val
 35 40 45

Tyr His Asn Leu Lys Asn Val Ile Lys Ala Lys Tyr Gly Lys Asp Ala
 50 55 60

Thr Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn
 65 70 75 80

Asn Glu Ala Leu Glu Leu Leu Lys Ser Ala Ile Glu Lys Ala Gly Tyr
 85 90 95

Pro Asp Lys Ile Ile Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe
 100 105 110

Lys Asn Gly Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Lys
 115 120 125

Arg His Ile Thr Gly Asp Gln Leu Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile
130 135 140

Lys Asn Tyr Pro Val Gln Ser Ile Glu Asp Pro
145 150 155

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer1

<400> 3
gagatctatg tccatcagta agattcacgc tcg
33

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer2

<400> 4
cgtcgactca gagtttgggg tggcggaa
28

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer3

<400> 5
cgactcacta tagggagagc ggc
23

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer4

<400> 6
 aagaacatcg attttccatg gcag
 24

<210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Pro Thr Leu Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 836
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 9

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Gly Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30

Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly
 35 40 45

Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro
 50 55 60

Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly
 65 70 75 80

Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln
 85 90 95

Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys

100

105

110

Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile
 115 120 125

Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp
 130 135 140

Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp
 145 150 155 160

Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln
 165 170 175

Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala
 180 185 190

Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp
 195 200 205

Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys
 210 215 220

Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala
 225 230 235 240

Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp
 245 250 255

Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro
 260 265 270

Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala
 275 280 285

Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu
 290 295 300

Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala

325

330

335

Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu
 340 345 350

Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg
 355 360 365

Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala
 370 375 380

Leu Lys Asp Ala Gln Thr Arg Ile Thr Lys Gly Glu Asn Leu Tyr Phe
 385 390 395 400

Gln Gly Ser Met Ser Ile Ser Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Leu Asp
 405 410 415

Ser Arg Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly
 420 425 430

Arg Phe Arg Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu
 435 440 445

Ala Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Thr Arg Tyr Leu Gly Lys Gly
 450 455 460

Thr Gln Lys Ala Val Asp His Val Asn Lys Glu Ile Ala Pro Lys Leu
 465 470 475 480

Ile Glu Lys Lys Phe Ser Val Val Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Phe
 485 490 495

Met Leu Glu Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn
 500 505 510

Ala Ile Leu Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Ala Glu
 515 520 525

Lys Gly Val Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Lys
 530 535 540

Asp Val Ile Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser

545		550		555		560									
His	Ala	Gly	Asn	Lys	Leu	Ala	Met	Gln	Glu	Phe	Met	Ile	Leu	Pro	Val
			565						570					575	
Gly	Ala	Lys	Asn	Phe	His	Glu	Ala	Met	Arg	Ile	Gly	Ala	Glu	Val	Tyr
			580					585					590		
His	Asn	Leu	Lys	Asn	Val	Ile	Lys	Ala	Lys	Tyr	Gly	Lys	Asp	Ala	Thr
		595					600					605			
Asn	Val	Gly	Asp	Glu	Gly	Gly	Phe	Ala	Pro	Asn	Ile	Leu	Glu	Asn	Asn
	610					615					620				
Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Ser	Ala	Ile	Glu	Lys	Ala	Gly	Tyr	Pro
625					630					635					640
Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Gly	Met	Asp	Val	Ala	Ala	Ser	Glu	Phe	Phe	Lys
				645					650					655	
Asn	Gly	Lys	Tyr	Asp	Leu	Asp	Phe	Lys	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Lys	Arg
			660					665					670		
His	Ile	Thr	Gly	Asp	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu	Tyr	Lys	Ser	Phe	Ile	Lys
		675					680						685		
Asn	Tyr	Pro	Val	Gln	Ser	Ile	Glu	Asp	Pro	Phe	Asp	Gln	Asp	Asp	Trp
	690					695					700				
Glu	Asn	Trp	Ser	Lys	Phe	Thr	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Gly
705					710					715					720
Asp	Asp	Leu	Thr	Val	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Ile	Gln	Gln	Ala	Cys	Glu
				725					730					735	
Lys	Lys	Ala	Cys	Asn	Cys	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Asn	Gln	Ile	Gly	Ser
			740					745					750		
Val	Thr	Glu	Ser	Ile	Gln	Ala	Cys	Lys	Leu	Ala	Gln	Ser	Asn	Gly	Trp
		755					760					765			
Gly	Val	Met	Val	Ser	His	Arg	Ser	Gly	Glu	Thr	Glu	Asp	Thr	Phe	Ile

770

775

780

Ala Asp Leu Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala
 785 790 795 800

Pro Cys Arg Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Met Arg Ile
 805 810 815

Glu Glu Glu Leu Gly Asp Lys Ala Lys Phe Ala Gly Lys Asp Phe Arg
 820 825 830

His Pro Lys Leu
 835

<210> 10
 <211> 698
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Gly Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30

Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly
 35 40 45

Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro
 50 55 60

Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly
 65 70 75 80

Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln
 85 90 95

Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys
 100 105 110

Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile
 115 120 125

Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	130	135	140
Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys	Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	145	150	155
Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	165	170	175
Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro	Leu	Ile	Ala	Ala	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ala	180	185	190
Phe	Lys	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Asp	Ile	Lys	Asp	Val	Gly	Val	Asp	195	200	205
Asn	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	210	215	220
Asn	Lys	His	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala	Glu	Ala	Ala	225	230	235
Phe	Asn	Lys	Gly	Glu	Thr	Ala	Met	Thr	Ile	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Trp	245	250	255
Ser	Asn	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Asn	Tyr	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Pro	260	265	270
Thr	Phe	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	275	280	285
Gly	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro	Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	290	295	300
Glu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Asp	305	310	315
Lys	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	325	330	335
Lys	Asp	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	Thr	Met	Glu	Asn	Ala	Gln	Lys	Gly	Glu	340	345	350

Ile	Met	Pro	Asn	Ile	Pro	Gln	Met	Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ala	Val	Arg	
355						360						365				
Thr	Ala	Val	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	
370						375						380				
Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	
385						390						395				
Gln	Gly	Ser	Met	Ser	Ile	Ser	Lys	Ile	His	Ala	Arg	Glu	Ile	Leu	Asp	
			405						410						415	
Ser	Arg	Gly	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Val	Asp	Leu	Tyr	Thr	Ala	Lys	Gly	
			420						425						430	
Arg	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	His	Glu	
			435						440						445	
Ala	Leu	Glu	Leu	Arg	Asp	Gly	Asp	Lys	Thr	Arg	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gly	
450						455						460				
Thr	Gln	Lys	Ala	Val	Asp	His	Val	Asn	Lys	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	Leu	
465						470						475			480	
Ile	Glu	Lys	Lys	Phe	Ser	Val	Val	Glu	Gln	Glu	Lys	Ile	Asp	Lys	Phe	
			485						490						495	
Met	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Ala	Asn	
			500						505						510	
Ala	Ile	Leu	Gly	Val	Ser	Leu	Ala	Val	Cys	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Glu	
515						520						525				
Lys	Gly	Val	Pro	Leu	Tyr	Arg	His	Ile	Ala	Asp	Leu	Ala	Gly	Asn	Lys	
530						535						540				
Asp	Val	Ile	Leu	Pro	Val	Pro	Ala	Phe	Asn	Val	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	
545						550						555			560	
His	Ala	Gly	Asn	Lys	Leu	Ala	Met	Gln	Glu	Phe	Met	Ile	Leu	Pro	Val	
			565						570						575	

Gly Ala Lys Asn Phe His Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr
 580 585 590

His Asn Leu Lys Asn Val Ile Lys Ala Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr
 595 600 605

Asn Val Gly Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Asn
 610 615 620

Glu Ala Leu Glu Leu Leu Lys Ser Ala Ile Glu Lys Ala Gly Tyr Pro
 625 630 635 640

Asp Lys Ile Ile Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Lys
 645 650 655

Asn Gly Lys Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Lys Arg
 660 665 670

His Ile Thr Gly Asp Gln Leu Gly Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys
 675 680 685

Asn Tyr Pro Val Gln Ser Ile Glu Asp Pro
 690 695

<210> 11

<211> 543

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 11

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Gly Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30

Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly
 35 40 45

Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro
 50 55 60

Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly
65 70 75 80

Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln
85 90 95

Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys
100 105 110

Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile
115 120 125

Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp
130 135 140

Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp
145 150 155 160

Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln
165 170 175

Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala
180 185 190

Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp
195 200 205

Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys
210 215 220

Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala
225 230 235 240

Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp
245 250 255

Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro
260 265 270

Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala
275 280 285

Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu
 290 295 300

Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala
 325 330 335

Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu
 340 345 350

Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg
 355 360 365

Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala
 370 375 380

Leu Lys Asp Ala Gln Thr Arg Ile Thr Lys Gly Glu Asn Leu Tyr Phe
 385 390 395 400

Gln Gly Ser Met Ser Ile Ser Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Leu Asp
 405 410 415

Ser Arg Gly Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly
 420 425 430

Arg Phe Arg Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Val His Glu
 435 440 445

Ala Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Thr Arg Tyr Leu Gly Lys Gly
 450 455 460

Thr Gln Lys Ala Val Asp His Val Asn Lys Glu Ile Ala Pro Lys Leu
 465 470 475 480

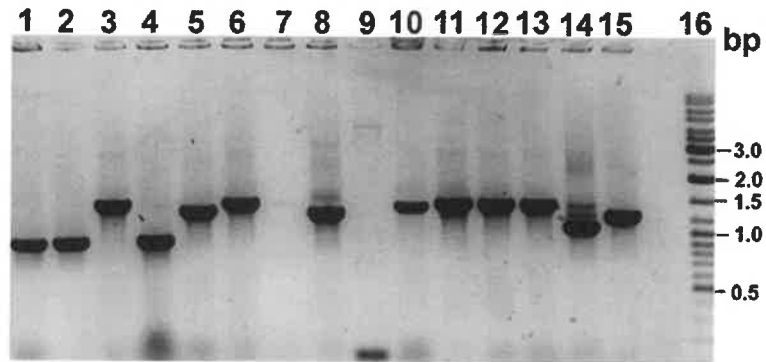
Ile Glu Lys Lys Phe Ser Val Val Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Phe
 485 490 495

Met Leu Glu Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn
 500 505 510

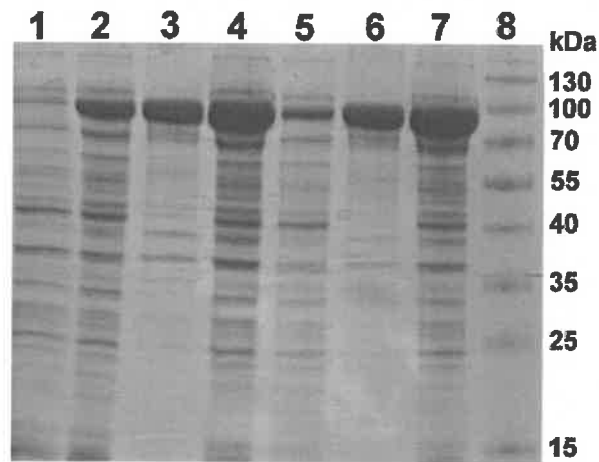
Lys Asn Tyr Pro Val Gln Ser Ile Glu Asp Pro
145 150 155

Išradimo apibrėžtis

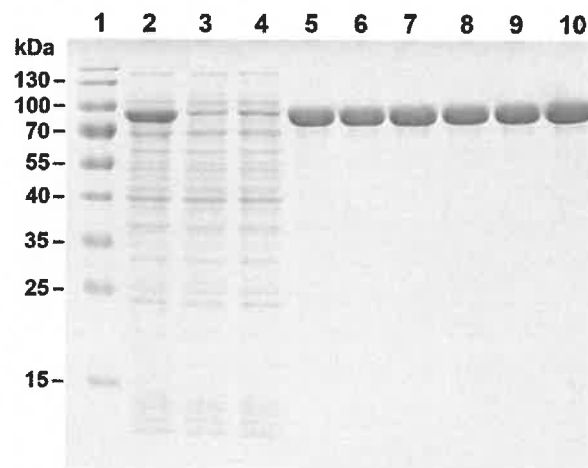
1. Monokloninis antikūnas, besiskiriantis tuo, kad atpažįsta aminorūgščių seką SEQ ID Nr. 1 arba į ją panašią seką, kurios identiškumas yra bent 95 %.
2. Hibridomos 14F3 ląstelių linija, produkuojanti monokloninius antikūnus pagal 1 punktą, kuri deponuota BCCM ir kurios deponavimo numeris yra LMBP 13806CB.
3. Hibridomos 6E4 ląstelių linija, produkuojanti monokloninius antikūnus pagal 1 punktą, kuri deponuota BCCM ir kurios deponavimo numeris LMBP 13805CB.
4. Hibridomos ląstelių linija, pasirinkta iš grupės, susidedančios iš 14F3 ir 6E4, produkuojanti monokloninius antikūnus pagal 1 punktą prieš paprastojo karpio β -enolazę.
5. Monokloninis antikūnas pagal 1 punktą, produkuojamas hibridomos ląstelių linijos pagal bet kurį vieną iš 2–3 punktų, kuris yra IgG klasės.
6. Monokloninis antikūnas pagal 5 punktą, kuris yra pelės monokloninis antikūnas.
7. Monokloninio antikūno pagal 1 punktą arba 5 punktą panaudojimas β -enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose.
8. Diagnostinis rinkinys β -enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose, apimantis bent monokloninį antikūną pagal 1 arba 5 punktą.



1 pav.

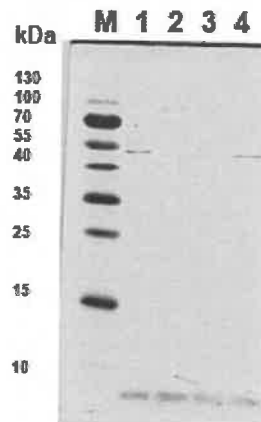


2 pav.

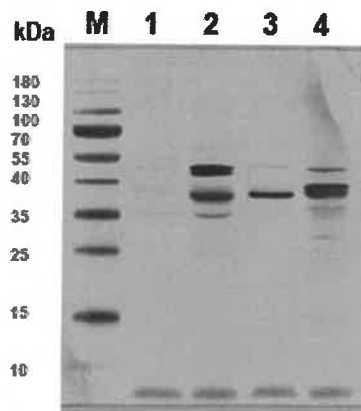


3 pav.

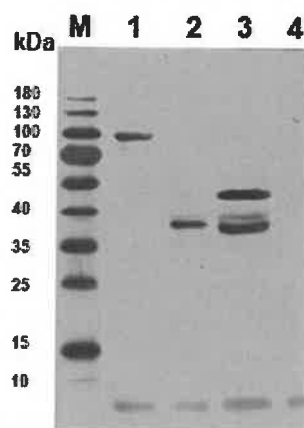
19



4 pav.

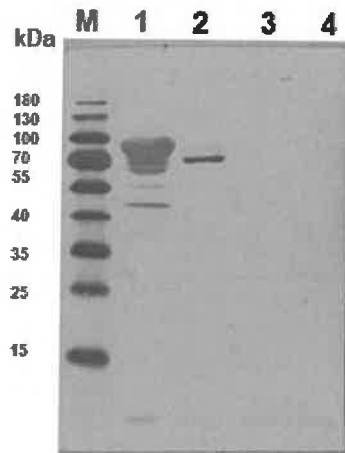


5 pav.

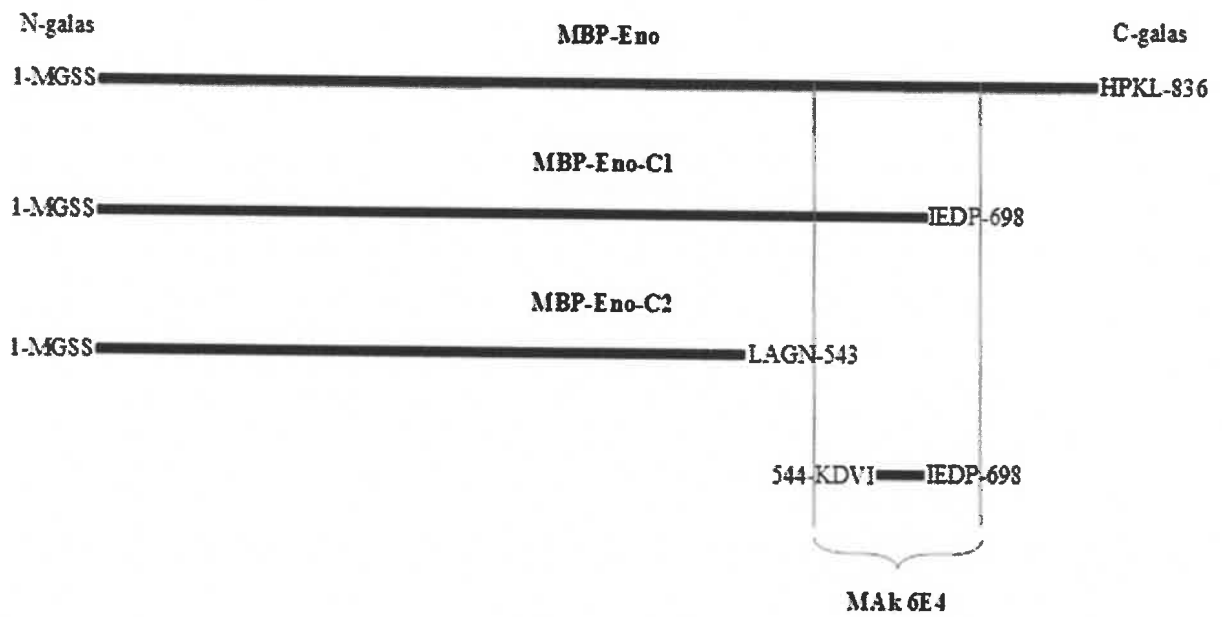


6 pav.

20



7 pav.



8 pav.