

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 509**

(22) Paraiškos padavimo  
data: **2021-03-12**

(41) Paraiškos  
paskelbimo data: **2022-09-26**

(45) Patento paskelbimo  
data: **2022-12-12**

(73) Patento savininkas:

**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  $\beta$ -enolazę ir juos produkuojančios hibridomos ląstelės. Monokloniniai antikūnai gali būti panaudojami karpio ir kitų žuvų baltymų aptikimui maisto produktuose, bei komercinių karpio ekstraktų identifikavimui.

## TECHNIKOS SRITIS

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

## TECHNIKOS LYGIS

Enolazė (fosfopiruvato hidratazė, EC 4.2.1.11) yra metalofermentas, dalyvaujantis gliukozės metabolizme, kurio metu katalizuoja 2-fosfoglicerato virtimą 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:  $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$  [Kleine-Tebbe and Jakob, Springer. 2015, pp.383-384].  $\alpha$ -Enolazė (Eno1) yra ekspresuojama daugelyje audinių,  $\beta$ -enolazė (Eno3) daugiausia randama raumenų audiniuose ir  $\gamma$ -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  $\beta$ -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.  $\beta$ -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  $\beta$ -enolazių ir aldolazių [Kuehn et al. Clinical Et Experimental Allergy. 2013, pp. 811-822]. Šiuo metu yra žinomos penkios  $\beta$ -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  $\beta$ -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 ekstrakte. 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  $\beta$ -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 alergenas 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:  $\beta$ -enolazei ir aldolazei [Kuehn et al. Clinical Et Experimental Allergy. 2013, pp. 811–822]. Neseniai paprastojo karpio  $\beta$ -enolazė oficialiai pripažinta alergenų 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  $\beta$ -enolazę kūrimą. Sukurti MAK yra prieš žmogaus  $\alpha$ -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,  $\gamma$ -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  $\beta$ -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 ESME

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

Šis išradimas pateikia dvi naujas hibridinių ląstelių linijas: 14F3 ir 6E4, kurios sekretuoja MAk prieš  $\beta$ -enolazę. Antikūnai atpažįsta rekombinantinę paprastojo karpio  $\beta$ -enolazę, sulietą su maltoze surišančiu baltymu (MBP), susintetintą *E. coli* bakterijose. MAk 6E4 taip pat sąveikauja su  $\beta$ -enolaze, esančia komerciniuose karpio ir kitų žuvų rūšių ekstraktuose, bei laboratorijos sąlygomis paruoštame karpio ekstrakto.

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

```
MSISKIHAREILDSRGNPTVEVDLYTAKGRFRAAVPSGASTGVHEALELRDG
DKTRYLGKGTQKAVDHVNKEIAPKLIEKKFSVVEQEKIDKFMLELDGTENKSKFGAN
AILGVSLAVCKAGAAEKGVPYRHIADLAGNKDVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQ
EFMILPVGAKNFHEAMRIGAEVYHNLKNVIKAKYGKDATNVGDEGGFAPNILENNEA
LELLKSAIEKAGYPDKIIIGMDVAASEFFKNGKYDLDFKSPDDPKRHITGDQLGDLYK
SFIKNYPVQSIEDPFDQDDWENWSKFTGSVDIQVVGDDLTVTNPKRIQQACEKKAC
NCLLLKVNQIGSVTESIQACKLAQSNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIK
TGAPCRSERLAKYNQLMRIEEELGDKAKFAGKDFRHPKL
```

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

Tinkamiausias šio išradimo įgyvendinimo variantas pateikia išsamesnį  $\beta$ -

enolazės, kaip alergeno, apibūdinimą, naujai sukurtais monokloniniais antikūnais.

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

Pabaigai, išradimas pateikia galimą monokloninių antikūnų pritaikymą kuriant diagnostinį rinkinį, skirtą  $\beta$ -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 klonu sekretuojamus monokloninius antikūnus.

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

#### DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Rekombinantinė paprastojo karpio  $\beta$ -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].

Imunizacija – rekombinantinė paprastojo karpio  $\beta$ -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.

Praėjus 4 savaitėms pelėms dar kartą buvo suleidžiamas toks pat antigeno tirpalo kiekis, prieš tai antigeno tirpalą sumaišius su nepilnu Freund'o adjuvantu.

Dar po 4 savaitių 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.

Pakartotinė imunizacija – praėjus 4 savaitėms po trečios imunizacijos, pasirinktai pelei buvo suleidžiamas toks pat antigeno kiekis be adjuvanto.

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).

Sukurtų hibridinių ląstelių klonų (hibridomų) specifiškumas buvo tikrinamas IFA metodu. Šio tyrimo metu buvo nustatoma, ar hibridomos sekretuoja antikūnus prieš  $\beta$ -enolazę.

Hibridomos buvo apibūdintos nustatant jų sekretuojamų MAK poklasį ir ištiriant

jų specifiškumą IFA ir imunoblotingo metodais.

Identifikavus hibridomas, kurios sekretuoja antikūnus prieš  $\beta$ -enolazę, buvo klonuojamos, padauginamos ir užšaldomos tolimesniam saugojimui.

Hibridomų sekretuojami antikūnai buvo apibūdinti metodais:

IFA ir imunoblotingu, naudojant kaip antigenus rekombinantinę paprastojo karpio  $\beta$ -enolazę, sulietą su MBP (MBP-Eno), rekombinantinį Eno (atskeltą nuo MBP-Eno su TEV proteaze) baltymą ir rekombinantinį MBP baltymą.

Imunoblotingu, naudojant bakterijų *E. coli* Tuner (DE3) ląstelių lizatą.

IFA ir imunoblotingu, naudojant kaip antigenus komercinius karpio ir kitų žuvų rūšių ekstraktus.

Imunoblotingu, naudojant laboratorijos sąlygomis paruoštą karpio ekstraktą.

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  $\beta$ -enolazę. Ištyrus gautų MAK savybes buvo parodyta, kad MAK 14F3 sąveikauja tik su rekombinantiniu MBP-Eno baltymu, o MAK 6E4 atpažįsta natyvią  $\beta$ -enolazę iš *E. coli* bakterijų ir žuvų ekstraktų.

Hibridomas 14F3 ir 6E4 apibūdina nurodyti 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  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub>, esant 37 °C temperatūrai. Ilgalaikiam saugojimui hibridinės ląstelės užšaldomos embrioniniame veršiuko serume su 10% dimetilsulfoksido (DMSO) ir laikomos skystame azote. Užšaldymo sąlygos:  $1 \times 10^6$ – $2 \times 10^6$  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 × 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 VU 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:

KDVILPVPAFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAKNFHEAMRIGAEVYHNLKNVIK  
AKYGKDATNVGDEGGFAPNILENNEALELLKSAIEKAGYPDKIIIGMDVAASEFFKNG

## KYDLDFKSPDDPKRHITGDQLGDLYKSFIKNYPVQSIEDP

Anksčiau aprašytas monokloninis antikūnas anti-ENO1 skiriasi nuo MAk, susintetintų hibridomų 14F3 ir 6E4, kadangi jis specifinis žmogaus  $\alpha$ -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  $\alpha$ -enolaze. Anksčiau aprašytas monokloninis antikūnas 1C7 yra specifinis *Chaetomium globosum* enolazei.

## IŠRADIMO ĮGYVENDINIMO VARIANTAI

Toliau pateikiama informacija apie konkrečius rekombinantinės karpio  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\mu$ 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  $\beta$ -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 klono Nr.11 buvo pasirinktas raiškai *E. coli* bakterijose.

DNR fragmentas iš rekombinantinio klono Nr. 11 plazmidės buvo iškirptas naudojant fermentus BglII ir Sall ir klonuotas į pET28-MBP-TEV plazmidę (Nr. 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.  $\beta$ -enolazės biosintezė buvo indukuota pridedant 0,1 mM IPTG esant ląstelių optikai OD<sub>600</sub> = 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 (Nr. 26616, Thermo Fisher Scientific).

## 2 pavyzdys

Rekombinantinės karpio  $\beta$ -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 ledą vonią ir veikiama 15 sek. ultragarso impulsais (bendras sonikavimo laikas mėginiui yra 2 min.). Biomasės lizatas centrifuguotas 20 min., 20000  $\times$  g. Supernatantas praskiestas santykiu 1:6 su 20 mM natrio fosfatinio buferiniu tirpalu (pH 7,4), turinčiu 200 mM NaCl ir 1 mM EDTA. Prieš chromatografiją praskiestas supernatantas filtruotas per 0,45  $\mu$ 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 kolonėle 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 (Nr. 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 savaičių pelės buvo imunizuojamos suleidžiant 50 µg antigeno mišinio be adjuvanto. 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,  $4 \times 10^{-7}$  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 dienom 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  $\beta$ -enolazę (4 ir 5 pav.).

Taigi, sukurti monokloniniai antikūnai yra specifiniai  $\beta$ -enolazei.

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

| 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    | +                                  | -   | +              | +   | -   | +                      |

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 (Nr. 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):

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFIDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIIDPETG  
GTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSPTLQGDYWGQGTTLT  
VSS

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

DVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYKV  
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHIPWTFGGGTKVEIK

### 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  $\beta$ -enolazei, bet atpažįsta ir kitų žuvų rūšių  $\beta$ -enolazę.

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

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

5 pav. atkartoja imunoblotingo vaizdą, gautą su komerciniais žuvų ekstraktais, naudojant hibridomos 6E4 kloną 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 (Nr. 26616, Thermo Fisher Scientific).

Imunoblotingo metodu ištirtas hibridomos 6E4 sekretuojamų antikūnų

pritaikomumas  $\beta$ -enolazės aptikimui karpio ekstrakto, paruoštame 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  $\beta$ -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 (Nr. 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  $\beta$ -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 klonu 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 (Nr. 26616, Thermo Fisher Scientific).

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

## SEKOS

<110> Vilniaus Universitetas  
 <120> MONOKLONINIAI ANTIKŪNAI PRIEŠ PAPRASTOJO KARPIO BETA-ENOLAZĘ  
 <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

## LT 6962 B

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  
 225 230 235 240

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  
 305 310 315 320

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

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  
 cgctcgactca 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

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 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

## LT 6962 B

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

## LT 6962 B

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                  160

## LT 6962 B

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

## LT 6962 B

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

## LT 6962 B

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

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  
530 535 540

<210> 12  
<211> 155  
<212> PRT

&lt;213&gt; Cyprinus carpio

&lt;400&gt; 12

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

## 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.

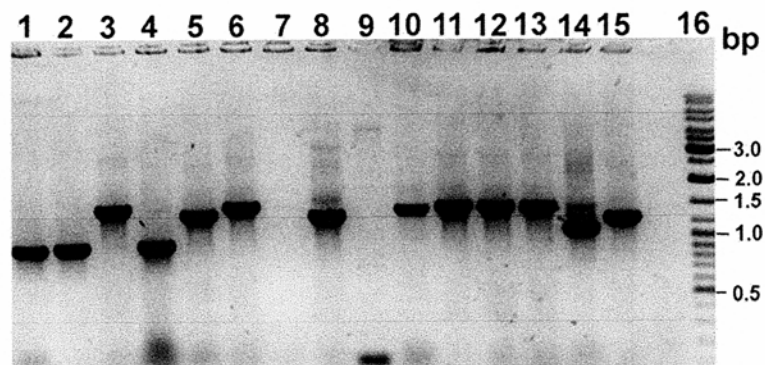
4. Hibridomos ląstelių linija, pasirinkta iš grupės, susidedančios iš 14F3 ir 6E4, produkuojanti monokloninius antikūnus pagal 1 punktą prieš paprastojo karpio  $\beta$ -enolazę.

5. Monokloninis antikūnas pagal 1 punktą, produkuojamas hibridomos ląstelių linijos pagal bet kurį vieną iš 2–3 punktų, kuris yra IgG klasės.

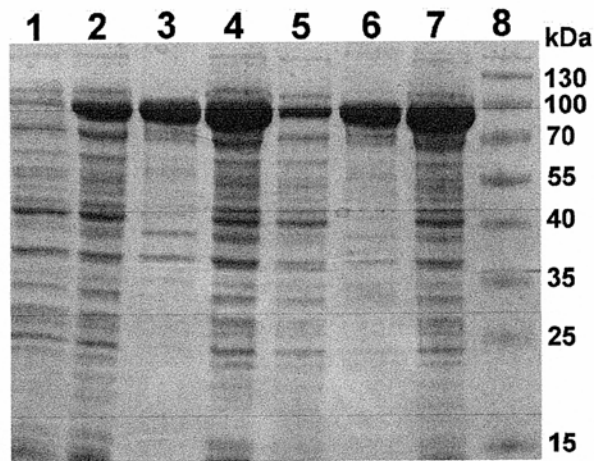
6. Monokloninis antikūnas pagal 5 punktą, kuris yra pelės monokloninis antikūnas.

7. Monokloninio antikūno pagal 1 punktą arba 5 punktą panaudojimas  $\beta$ -enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose.

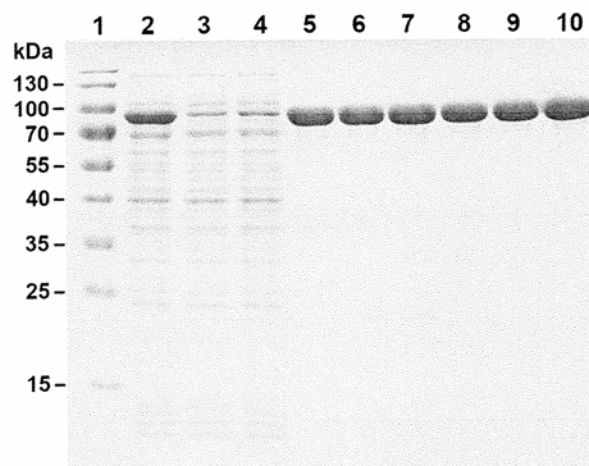
8. Diagnostinis rinkinys  $\beta$ -enolazės aptikimui maisto produktuose arba komerciniuose karpio ekstraktuose, apimantis bent monokloninį antikūną pagal 1 arba 5 punktą.



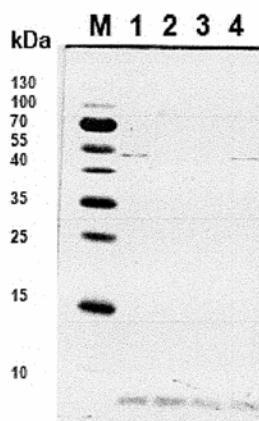
1 pav.



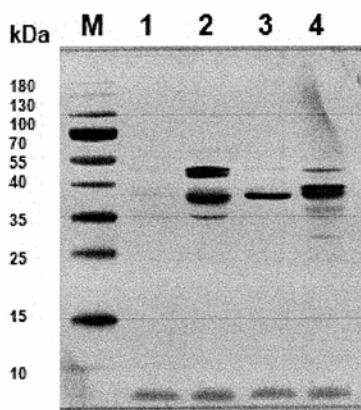
2 pav.



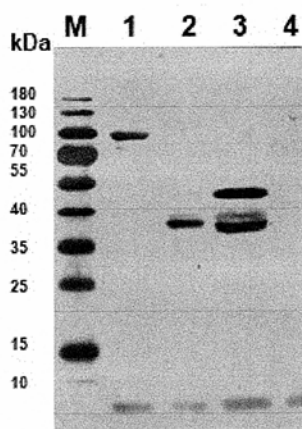
3 pav.



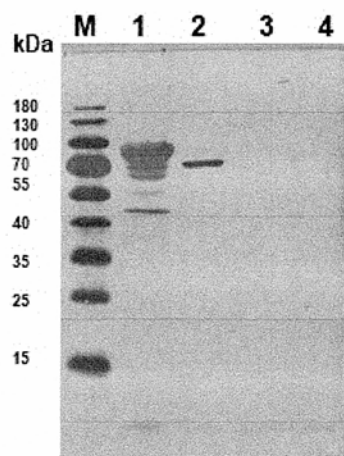
4 pav.



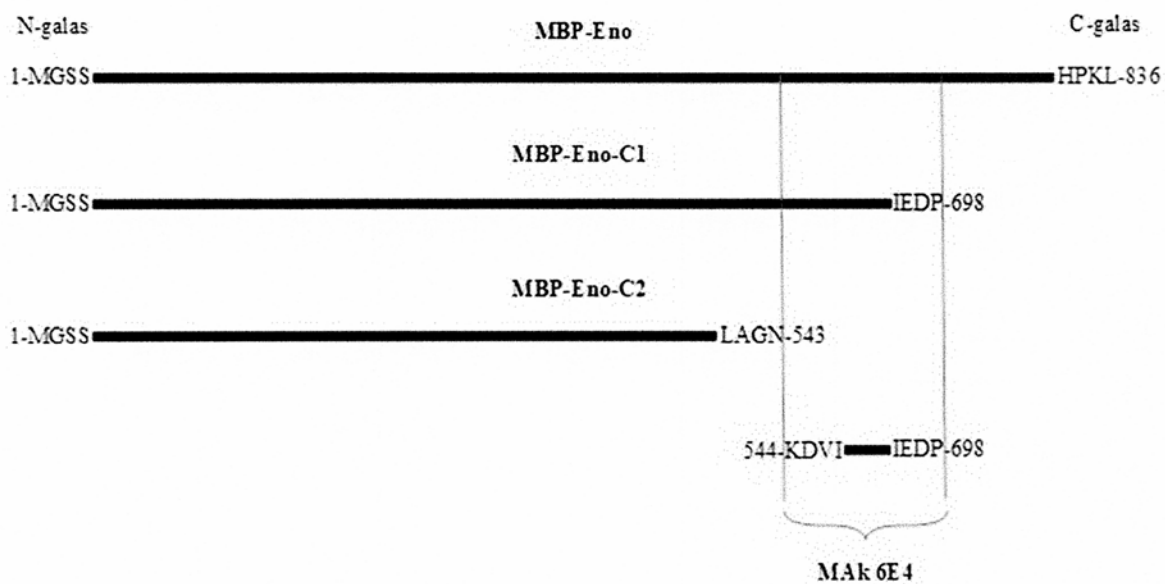
5 pav.



6 pav.



7 pav.



8 pav.