

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201792118 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.03.30

(51) Int. Cl. C07K 16/14 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.03.24

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО IgA ДЛЯ МИКОТОКСИНОВ, ЛИНИЯ
ГИБРИДОМНЫХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО, И ЕГО
КОНКРЕТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИЗАХ

(86) PCT/IB2015/052150

(87) WO 2016/151361 2016.09.29

(71) Заявитель:
ТЮБИТАК (TR)

(72) Изобретатель:
Озтюрк Селма, Эртекин Озлем,
Пиринчджи Шерифе Шейда,
Коджаага Харун (TR)

(74) Представитель:
Жевлакова Т.В. (KZ)

(57) Настоящее изобретение относится к антителу класса IgA и его применению в иммуноанализах. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению антитела класса IgA в диагностических системах для обнаружения и/или определения количества микотоксинов, в частности афлатоксинов.

A1

201792118

201792118

A1

ОПИСАНИЕ

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО IgA ДЛЯ МИКОТОКСИНОВ, ЛИНИЯ ГИБРИДОМНЫХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО, И ЕГО КОНКРЕТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИЗАХ

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителу класса IgA и его применения в иммуноанализах. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению антитела класса IgA в системах диагностики для обнаружения и/или определения количества микотоксинов, особенно афлатоксинов.

Уровень техники

Ключевыми признаками антитела, используемого в аналитических системах, являются аффинность, авидность и специфичность. Структурный характер антитела является важнейшим параметром при построении иммуноанализов. Широко известно, что существует 4 основных класса антител, секретированных из В-клеток систем млекопитающих; иммуноглобулина М (IgM), иммуноглобулина G (IgG), иммуноглобулина А (IgA) и иммуноглобулина Е (IgE). Созревание аффинности представляет собой процесс, при котором в клетки продуцируют антитела с увеличенной аффинностью к антигену. Аффинность изоформа IgM антител, как правило, не является созревшей, тогда как другие изоформы антитела имеют более высокие аффинности к антигену. Эти антитела также отличаются валентностью, где IgG и IgE являются дивалентными, IgA является тетравалентным, а IgM является декавалентным [Murphy et al., Garland Science New York, NY, USA; 2012]. Изоформ IgA представляет собой мультивалентное антитело, которое претерпевает сохранение аффинности в направлении антигена. Антитела изоформы IgG являются наиболее распространенным классом иммуноглобулина у млекопитающих, и в исследованиях моноклонального антитела они являются разработанными наиболее главным образом. Благодаря своим высоким значениям аффинности, распространенности и легкости очистки, антитела

изотипа IgG являются наиболее широко используемыми антителами в иммуноанализах. Антитела IgM широко используют в исследованиях агглютинации, однако их низкая аффинность делает их относительно плохим выбором для иммуноанализов. Однако существует ограниченное количество отчетов в отношении применения IgA в системах обнаружения на основе антитела [US 4,791,067; US 5,534,411]. Ранее известные анти-афлатоксиновые антитела в большинстве являются антителами изотипа IgG [US 20100062542 A1, US 8,153,767 B2, US 20140057294 A1], где в ограниченном количестве исследований используется класс IgM антител [US 4,818,687]. Однако до сегодняшнего дня не было известно моноклональное анти-микотоксиновое антитело для использования в аналитических системах.

Ориентация антитела является важнейшим фактором, когда антитела иммобилизованы для поддержания, поскольку должны быть подвержены воздействию антиген-связывающие переменные области для обеспечения функциональности. Как правило, когда антитела иммобилизованы на твердой подложке, менее 30% ориентированы корректно и, следовательно, являются функциональными. В результате, это приводит к необходимости в очищенных растворах антител для концентрированного связывания с иммуносорбентной поверхностью, большому количеству иммуносорбентного материала и/или средствам ориентирования антитела, так чтобы антиген-связывающие сайты были свободными [US 6,194,552]. Применение мультивалентных антител может быть решением данной проблемы, поскольку будут иметь место свободные антиген-связывающие сайты, будучи функциональными даже если некоторые заблокированы во время иммобилизации. Более того, применение мультивалентных антител обеспечит возможность реакции агглютинации, которая может быть использована в качестве средства для обнаружения и определения количества [US 4,791,067].

Афлатоксины являются гепатотоксичными микотоксинами, продуцируемыми *Aspergillus* spp. Афлатоксин B1, B2, G1, G2 представляют собой четыре общих аналога афлатоксинов природного происхождения, а афлатоксин M1 является растворимым в воде аналогом афлатоксина, находящимся в молоке и продуцируемым

посредством животного метаболизма. Высокий уровень подверженности афлатоксинам приводит в результате к острой токсичности, что может привести к смерти, а хроническая подверженность часто приводит к заболеваниям печени, в том числе раку печени у людей [Kensler et al., Toxicological Sciences, 2010, 120 (Supplement 1): S28-S48; Shephard, Analytical and bioanalytical chemistry. 2009, 395(5): 1215-1224; Robens et al. Reviews of environmental contamination and toxicology. 1992; 127:69].

Уровни афлатоксина в еде и пище устанавливаются во многих странах ввиду их токсичных эффектов и было разработано несколько способов для удовлетворения требованиям, такие как способы, основанные на тонкопленочной хроматографии, жидкостной хроматографии, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (ЖХ/МС); а также методы иммунологических испытаний на основе ферментов, в том числе иммуноферментный анализ (ИФА) [Shephard, Analytical and bioanalytical chemistry. 2009, 395(5): 1215-1224; Boutrif, Natural toxins, 1995, 3(4):322-326; Commission E. Commission Regulation (EC) No 1525/98 of 16 July 1998, amending Regulation (EC) No 194/97 of 31 January 1997; Official Journal of the European Communities L. 1998;201:436]. Международно признанные способы определения точного количества афлатоксина включают инструментальный анализ с ВЭЖХ или ЖХ/МС и ИФА. Инструментальный анализ афлатоксина требует ряда этапов, в том числе забор образцов, гомогенизация, экстрагирование, очистка экстракта и обнаружение. Этап очистки образца содержит технологии очистки на основе аффинности, в частности, иммуноаффинную хроматографию, для концентрации и удаления афлатоксинов из сложной матрицы экстракта [Uchigashima et al., Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 57(19):8728-8734]. Как иммуноаффинные колонки, так и системы ИФА, используют способность анти-афлатоксинового антитела к специфическому связыванию с афлатоксинами. Следовательно, до настоящего времени было разработано большое количество антител, специфических к афлатоксинам.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу класса IgA и его применению в

иммуноанализах, в том числе системах диагностики. Предпочтительно, настоящее изобретение относится к применению антитела класса IgA в системах диагностики для обнаружения и/или определения количества митотоксинов, в частности, афлатоксинов.

Техническая задача

Антитела относительно афлатоксинов обычно требуются для измерения 4 изотипов афлатоксина природного происхождения и одного растворимого в воде метаболита в еде и пище. Используемые способы требуют, чтобы антитело было иммобилизовано на иммуносорбентной поверхности и функционально взаимодействовало с афлатоксинами на поверхности, в извлеченных из образцов веществах, подлежащих анализу, в органическом растворителе. Бивалентные антитела, использовавшиеся до настоящего времени, обладают недостатком, заключающимся в том, что для полной активности антитела, антитело должно быть ориентировано перед иммобилизацией для компенсации потери активности, являющейся результатом стерического несоответствия во время иммобилизации. Однако целью настоящего изобретения является разработка новых мышинных моноклональных антител класса IgA, которые не требуют ориентации перед иммобилизацией на иммуносорбентной поверхности.

Большинство антител должны быть очищены перед применением. Этап очистки как увеличивает производственные затраты, так и влияет на активность антитела. Другой целью настоящего изобретения является создание антитела, которое может быть использовано без очистки после концентрации антитела.

Антитело, являющееся специфичным к афлатоксину, может быть использовано в иммуноаналитических системах для обнаружения и/или определения количества примесей афлатоксина в еде и пище. Анализ афлатоксина часто проводят с жидким экстрактом образца, подлежащего анализу. Приготовление жидких экстрактов твердых образцов достигается за счет применения органических растворителей. Во время процесса экстракции, несколько метаболитов образца совместно экстрагируют с афлатоксинами. Для эффективного использования антитела при анализе афлатоксина, должны быть надежно определены его

резистентность к растворителю и перекрестная реактивность экстракта. Кроме того, альтернативные протоколы экстрагирования с высокой ионной силой или кислотными буферами могут быть использованы для увеличения выхода экстракта. Вариации pH и ионной силы в буферах также могут быть использованы для увеличения специфичности антитела путем предотвращения связывания неафлатоксиновых компонентов экстракта. Таким образом, другой целью настоящего изобретения является создание антител, которые отображают желаемую резистентность к растворителю, кислотную и соляную стабильность, а также не обладают перекрестной реактивностью к другим токсинам.

Техническое решение

Настоящее решение относится к антителу класса IgA и его применения в иммуноанализах, в том числе системах диагностики. Предпочтительно, настоящее изобретение относится к применению антитела класса IgA в системах диагностики для обнаружения и/или определения количества митотоксинов, в частности, афлатоксинов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к новому мышинному моноклональному антителу класса IgA или его фрагменту, обладающему высокой аффинностью относительно афлатоксина B1, B2, G1, G2 и M1, и может быть использован в иммуноанализах для обнаружения афлатоксина.

Следовательно, целью настоящего изобретения является создание мышинного моноклонального антитела изотипа IgA, которое обладает аффинностью относительно изотипов афлатоксина B1, B2, G1, G2 и M1, однако не проявляет перекрестной реактивности к другим токсинам. Другой целью настоящего изобретения является разработка такого антитела, которое может быть резистентным к органическим растворителям, pH кислоты и растворам с высокой ионной силой во время очистки антитела различными способами экстракции и/или диагностических иммуноанализов на различных матрицах, которые рассматривают в качестве жидких экстрактов образца, подлежащего анализу. В этом отношении, другой целью настоящего изобретения является разработка системы диагностики, которая включает применение описанных антител.

Другой целью настоящего изобретения является разработка клона гибридомы, способного к продуцированию антитела класса IgA, в соответствии с настоящим изобретением. В данном отношении, одной из целей настоящего изобретения является обеспечение способа выращивания клона гибридомы, продуцирующего антитела класса IgA в клеточной культуре.

Кроме того, разработанное антитело должно быть очищено от супернатанта клеточной культуры. С этой целью, требуется экстрагирование антитела из клеточной среды. В данном отношении, другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа очистки антитела от супернатанта клеточной культуры.

В другой перспективе, настоящее изобретение обеспечивает новое применение антител, в соответствии с настоящим изобретением, в иммуноанализах. Указанные иммуноанализы включают, без ограничения, иммуноаффинную колонку, иммуноферментный анализ или иммунохроматографический анализ, исследованиях агглютинации и разработку иммунобиосенсора.

Описание чертежей

На фиг. 1 изображено испытание ингибирования микотоксина, отображающий специфичность антитела D12E2.

На фиг. 2 изображена хроматограмма ионного обмена ДЭАЭ (диэтиламиноэтил) для очистки антитела D12E2.

На фиг. 3А изображен электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS PAGE) при условиях окрашивания серебром и восстановлении, нагруженный так, как описано в Ряде Примера 1: маркер SDS PAGE (thermo Scientific 26616), Ряде 2: 0,2 мкг BSA (Sigma, B2518), Ряде 3: 3,5 мкг образца белка из первого пика хроматографии, Ряде 4: 0,5 мкг образца белка из второго пика хроматографии.

На фиг. 3В изображен анализ с вестерн-блоттингом и иммуноблоттингом

подобным образом нагруженного геля SDS PAGE, как описано в примерах. Ряд 1: маркер SDS PAGE (thermo Scientific 26616), Ряд 2: 0,2 мкг BSA (Sigma, B2518), Ряд 3: 3,5 мкг образца белка из первого пика хроматографии, Ряд 4: 0,5 мкг образца белка из второго пика хроматографии.

На фиг. 4 изображена резистентность антитела D12E2 к водным растворам метанола, ацетонитрила, ацетона и этанола при изменяющихся концентрациях.

На фиг. 5 изображена стабильность pH антитела D12E2.

На фиг. 6 изображена соляная стабильность антитела D12E2.

На фиг. 7 изображена кривая ингибирования афлатоксина B1 антитела D12E2 в присутствии экстрактов лесного ореха, красного перца и кукурузы.

На фиг. 8 изображены стандартные кривые испытания ИФА.

Осуществление изобретения

Настоящее решение относится к антителу класса IgA и его применения в иммуноанализах, в том числе системах диагностики. В предпочтительном варианте реализации, настоящее изобретение относится к применению антитела класса IgA в системах диагностики для обнаружения и/или определения количества митотоксинов, в частности, афлатоксинов.

Положительные эффекты

Настоящее изобретение также относится к моноклональным антителам IgA, специфическим к афлатоксинам B1, B2, G1, G2 и M1. Антитело, в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется его изотипом IgA, который является тетравалентным и эффективным образом связывается с афлатоксином в различных матрицах, таких как экстракты кукурузы, красного перца и лесного ореха без необходимости в дополнительных этапах очистки. Антитело может быть эффективно использовано в иммуноаффинной колонке, наборе ИФА и разработке

биосенсора. В применении иммуноаффинной колонки, антитело, раскрытое в настоящем изобретении, продемонстрировало высокие скорости восстановления афлатоксина при 5 нг каждого афлатоксина, причем скорости удержания были $104,9 \pm 5,4\%$ для афлатоксина В1, $82,4 \pm 4,8\%$ для афлатоксина В2, $85,5 \pm 6,9\%$ для афлатоксина G1 и $70,7 \pm 7,1\%$ для афлатоксина G2.

Резистентность антитела, разработанная для различных растворителей, очень высока для их использования при обнаружении афлатоксина и уровни резистентности удовлетворяют требованиям международных аналитических стандартов. Более того, резистентность антитела должна поддерживаться в кислотных условиях, причем без прерывания взаимодействия антитело-антиген. Резистентность является полезной для получения антитела высокой чистоты путем аффинной хроматографии, где конъюгат афлатоксин-белок иммобилизуют с аффинной колонкой, и также предоставит указание для регенерации поверхностей активного биосенсора после анализа. Таким образом, антитело, в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется его резистентностью к 40% (по весу) метанола, 20% (по весу) ацетонитрила, 30% (по весу) ацетона и 40% (по весу) этанола; и его стабильностью при 1000 ммоль NaCl и кислотной pH, пониженной до pH 4.

Настоящее изобретение также обеспечивает клон гибридомы, способный продуцировать антитело, в соответствии с настоящим изобретением, а также способ выращивания указанного клона в клеточной культуре.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, раскрыт способ очистки антитела от супернатанта клеточной культуры линии клеток гибридомы.

В другом аспекте, настоящее изобретение обеспечивает применение антител, в соответствии с настоящим изобретением, в том числе, но без ограничения, в иммуноаффинной колонке, иммуноферментном анализе или иммунохроматографическом анализе, исследованиях агглютинации и разработке иммунобиосенсора.

В данном отношении, настоящее изобретение относится к способу иммунологического обнаружения афлатоксинов, причем указанный способ включает ферментный иммуноанализ, разработанный путем использования антитела или его фрагмента, в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении также раскрыт способ определения количества и/или обнаружения афлатоксинов путем использования иммунобиосенсоров, разработанных с помощью антитела в соответствии с настоящим изобретением, иммобилизованных на поверхности распознавания для использования в способах, в том числе, но без ограничения, в электрохимическом, оптическом, калометрическом, массочувствительном (пьезоэлектрическом/акустическом) или магнитном преобразователе.

Антитело, раскрытое в настоящем изобретении, не требует дополнительных этапов очистки после того, как супернатант клеточной культуры концентрирован способом фракционирования сульфатом аммония, когда антитело будет использовано в иммуноаффинной колонке. С другой стороны, если желательным является проведение испытания ИФА с антителом, в соответствии с настоящим изобретением, настоящим изобретением обеспечивается упрощенный способ очистки антитела от супернатанта клеточной культуры гибридомы, который характеризуется использованием способа хроматографии с ионным обменом ДЭАЭ по меньшей мере с чистотой 80%.

Более конкретно, в настоящем изобретении раскрыто моноклональное антитело D12E2 класса IgA, специфическое к афлатоксину B1, B2, G1, G2 и M1, причем указанное антитело содержит полипептид с тяжелой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид с легкой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.

Настоящее изобретение будет описано более подробно в связи с конкретными вариантами реализации и различными аспектами со ссылкой на сопроводительные чертежи. Если контекстом не требуется иное, термин «афлатоксин», используемый во всем описании и формуле изобретения, относится к одному или всем из

афлатоксина В1, В2, G1, G2 и M1; а термин «антитело D12E2» относится к моноклональному антителу типа IgA, продуцированному клоном гибридомы D12E2 или его фрагментом, содержащим SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Термин «иммуноаналитические способы» относится к обычным иммуноаналитическим способам, которые широко известны из уровня техники, включающим иммуноаффинную хроматографию, ИФА, иммунобиосенсоры и т.д.

Термин «резистентность к органическому растворителю» указывает на способность антитела к связыванию со своим антигеном при специфической концентрации метанола, этанола, ацетонитрила или ацетона при конкретной длительности без потери не более, чем 70% своей активности.

Термин «перекрестная активность антитела» относится к аффинности антитела к антигенам, отличным от афлатоксинов, в том числе, но без ограничения, другим микотоксинам и пищевым экстрактам.

Настоящее изобретение будет далее описано более подробно со ссылкой на примеры, которые не предназначены для ограничения технического объема настоящего изобретения.

A. Разработка антитела

Способ разработки анти-афлатоксинового антитела включает следующие этапы:

1. Приготовление конъюгатов афлатоксина

Разработка мышинных моноклональных антител изначально требует сильного гуморального иммунного ответа от мышей. Афлатоксины представляют собой гаптены, которые являются слишком малыми для того, чтобы быть иммуногенными, и они должны быть конъюгированы с иммуногенными молекулами-носителями для вызова ответа антитела, специфического к гаптена. Конъюгация афлатоксинов с необходимыми носителями также необходима для иммобилизации гаптенных на твердой подложке в иммуноанализах, в том числе, но

без ограничения, непрямого ИФА, конкурирующего непрямого ИФА или испытаниях биосенсора. Гаптен, используемый для продуцирования раскрытого антитела, представлял собой афлатоксин В1 или его производное. Термин «носитель», используемый в настоящем документе, включает природные белки немышиного происхождения. Конъюгаты афлатоксина В1, предлагаемые в настоящем изобретении, включают афлатоксин В1 – апотрансферрин человека (АТФЧ) и афлатоксин В1 – овальбумин (ОВА), которые использовались в качестве иммуногена афлатоксина при иммунизациях мышей, и афлатоксин В1 – альбумин бычьей сыворотки (АБС), который использовался в качестве антигена твердой фазы, подлежащего использованию при испытаниях не прямой и конкурирующей непрямого ИФА.

Конъюгация афлатоксин-белок была достигнута реакцией Манниха. Для данной реакции, носитель белка был сперва модифицирован этилендиамином, так что аминовые группы белка были обогащены. Аминовые группы полученных в результате катионизированных белков были конденсированы формальдегидом и смежным с α -водородом карбонилем в афлатоксинах при модификации способа, описанного Zhou et al., 2007. Конъюгаты афлатоксин-белок сохраняли небольшими aliquотами при -20°C .

2. Иммунизация

Мышей Balb/c интраперитонеально иммунизировали 100 мкг конъюгатов афлатоксин В1-ТФЧ. При первой дозе инъекции использовали полный адъювант Фрейнда. Последующие дозы готовили с неполным адъювантом Фрейнда. Ответ антитела мышей изначально оценивали путем непрямого ИФА с лунками, покрытыми афлатоксином В1-АБС. Для обеспечения того, чтобы антитела, продуцированными мышами, иммунизированными афлатоксином, конъюгированным белком, были способны к связыванию со свободными афлатоксинами, проводили конкурирующий не прямой ИФА с афлатоксином В1. 5 доз конъюгата вводили мышам с помощью инъекции до достижения желаемого ответа антитела. Бустер-иммунизация с 50 мкг конъюгата афлатоксина В1-ОВА вводили внутривенно мышам с наиболее сильным ответом антитела,

специфического к афлатоксину.

3. Слияние и селекция клеток

Селезенку мышей с иммунной отвечаемостью использовали в качестве источника лимфоцитов В, способных к продуцированию антитела против афлатоксинов. Продолжительность жизни *in vitro* лимфоцитов В ограничена, таким образом, получение достаточного количества молекул антитела, подлежащих использованию в иммуноанализах, не представляется возможным. Однако эти клетки могут быть immortalizированы путем их слияния с клеткой плазмы, полученной способом клеток миеломы с гибридомой. Immortalizированные клетки подвергали скринингу и селекции по их эффективности продуцирования анти-афлатоксинового антитела путем непрямого ИФА с планшетами, покрытыми АФВ1-АБС. Положительные клоны, продуцирующие антитело, были выбраны и перенесены на культуральные планшеты с 24 лунками, так что супернатанты культуры будут собраны для дальнейшего испытания. Супернатанты клонов гибридомы, продуцирующих антитело, были испытаны на их перекрестную реактивность с белками, использованными при иммунизациях, путем непрямого ИФА. Клоны и субклоны с негативными результатами испытания на перекрестную реактивность белка подвергали дальнейшей оценке на специфичность к афлатоксину путем испытания ингибирования микотоксинов. Иммунизации были выполнены с иммобилизованным афлатоксином В1, так что целью первичного испытания ингибирования микотоксинов было испытание реактивности антител со свободными афлатоксинами. Клоны, продуцирующие антитела, ингибированные свободным афлатоксином В1, В2, G1, G2 и М1 были дополнительно испытаны на связывания с другими микотоксинами, такими как охратоксин А, зеараленон и фумонизин В1, для оценки специфичности. Специфические к афлатоксину клоны были выбраны и их изотипы были определены с помощью коммерчески доступных наборов для моноклонального субизотипирования мышей, в соответствии с инструкциями производителя. Клоны, продуцирующие антитела изотипа IgA, были субклонированы до линий моноклональных клеток. Клетки были клонированы путем ограничения растворения и отдельные клоны были выбраны путем непрямого ИФА. Фазу клонирования и селекции повторяли 3 раза до получения

стабильной линии гибридных клеток D12E2. Результаты испытания ингибирования микотоксина для антитела D12E2 представлены на фиг. 1.

B. Preparation and Characterization of the D12E2 monoclonal antibody

Антитело D12E2 было получено из супернатантов клеточной культуры линии гибридных клеток D12E2. Условия культивирования стабильной линии гибридных клеток D12E2, продуцирующих IgA, были оптимизированы так, что клетки D12E2 были выращены в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), содержащей 5% ФБС (фетальной бычьей сыворотки), и продуцировали функциональные антитела. Клетки D12E2 были заморожены и разморожены, сохраняя свою эффективность продуцирования антитела. Замороженные клетки хранили в морозильной камере при -150°C. Параллельный запас удерживали в жидком азоте.

Супернатанты культуры частично очищали и концентрировали в 20-ти кратном размере путем фракционирования сульфатом аммония. Применение антитела без необходимости в дополнительной очистке существенным образом уменьшит производственные затраты испытательных систем. Таким образом, все исследования свойств проводили с раствором антитела, фракционированным сульфатом аммония. Осадки сульфата аммония или очищенные образцы антитела D12E2 могут быть использованы для иммуноаналитических применений антитела. Антитело использовали в иммуноаффинных колонках без дополнительной очистки. Способ очистки за один этап путем хроматографии с ионным обменом ДЭАЭ, который дает в результате на 80% очищенное антитело, оптимизировали для антитела, подлежащего использованию в испытательной системе ИФА.

Целлюлозную колонку ДЭАЭ использовали для очистки антитела по модифицированным стандартным протоколам (Bruck et al., Journal of Immunological Methods, 1982, 53: 313-319). Антитело, фракционированное сульфатом аммония, загружали в колонку при pH 7 с 150 ммоль NaCl, причем большинство плазменных белков промывали и антитело связывалось с колонкой.

Связанное антитело промывали в том же буфере с концентрацией NaCl 350 ммоль. На фиг. 2 показана хроматограмма процедуры очистки. Получаемые в результате два пика анализировали с помощью SDS PAGE и вестерн-блоттинга с последующим иммуноблоттинговым нацеливанием для визуализации антител, перенесенных на мембрану. При анализе с SDS PAGE и вестерн-блоттингом, 3,5 мкг белка загружали из первого пика и 0,5 мкг белка загружали из второго пика в их соответствующие лунки для того, чтобы подтвердить отсутствие антитела в первом пике с иммуноблотом. Анализ SDS PAGE, представленный на фиг. 3А, демонстрирует в точности то же количество белка, который был передан на ПВДФ (поливинилиденфторидную) мембрану при иммуноблоттинговом анализе, представленном на фиг. 3В. Иммуноблоттинговый анализ продемонстрировал, что, несмотря на существенное различие в количестве загруженного белка, сигнал антитела наблюдался только во втором пике, который виден в ряде 4 мембраны вестерн-блоттинга, указывая на то, что антитело было концентрировано во втором пике. Анализ SDS PAGE продемонстрировал 80% чистоту антитела путем процедуры очистки в один этап после фракционирования сульфатом аммония.

Антитело D12E2 было разработано для применения в иммуноаналитических системах для обнаружения и/или определения количества примесей афлатоксина в еде и пище. Резистентность антитела к растворителю оценивали непрямым испытанием ИФА. Исследовали стабильности антитела D12E2 к метанолу, ацетонитрилу, ацетону и этанолу. Антитело растворялось в 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% и 70% водных растворах метанола, ацетонитрила, ацетона и этанола. Непрямой ИФА проводили с антителами, растворенными в растворителях на лунках, покрытых афлатоксином В1-АБС. Результаты, демонстрирующие способность антитела D12E2 к связыванию с конъюгатом афлатоксин В1-АБС в растворах с увеличением концентраций растворов, показаны на фиг. 4. Антитело D12E2 сохраняло полную активность в 40% растворе метанола. Антитело продемонстрировало высокую резистентность к ацетонитрилу, при этом в 20% растворе ацетонитрила не наблюдалось потерь активности. Антитело D12E2 не утратило своей активности в 20% растворе ацетона и сохраняло 80% активности в 30% водном растворе ацетона. Этанол не влиял на активность антитела D12E2 при концентрации вплоть до 30% и был на

70% активен в 40% водном растворе этанола. Таким образом, было продемонстрировано, что антитело D12E2 является резистентным к 40% метанола, 20% ацетонитрила, 30% ацетона и 40% этанола.

Кислотную и соляную стабильность антитела D12E2, связывающегося с афлатоксином В1, оценивали непрямым ИФА. Антитело инкубировали на планшетах для ИФА, покрытых афлатоксином В1-АБС. Связанное антитело подвергали воздействию буферных растворов с различным значением pH и концентрациям соли на протяжении 5, 10 и 20 минут. Лунки промывали и оставшееся связанное антитело визуализировали непрямым ИФА. Результаты, демонстрирующие стабильность pH антитела при значении pH 7, 6, 4 и 2, представлены на фиг. 5. Согласно данным результатам, связывание антитела D12E2 с афлатоксином стабильно до снижения значения pH вплоть до 4. При значении pH 2, 50 % связанного антитела отъединялось от афлатоксина. Соляная стабильность антитела при концентрациях NaCl 0, 300 ммоль, 500 ммоль и 1000 ммоль при нейтральном pH представлены на фиг. 6. Результаты продемонстрировали, что взаимодействие антиген-антитело было стабильно при всех примененных концентрациях, в том числе при 1000 ммоль NaCl.

Для оценки интерференционного эффекта матрицы на связывание антитела D12E2 с афлатоксином В1, оценивали экстракты кукурузы, красного перца и лесного ореха. Сравнивали кривые ингибирования связывания антитела D12E2 с афлатоксином В1 в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) и в присутствии пищевых экстрактов. В чистые экстракты кукурузы, красного перца и лесного ореха вносили афлатоксин В1. Экстракты после внесения и ФСБР с внесенным афлатоксином В1 предварительно инкубировали антителом D12E2 и оценивали матричные эффекты путем непрямого конкурирующего ИФА. Полученные в результате кривые ингибирования связывания представлены на фиг. 7. Результаты продемонстрировали, что антитело D12E2 эффективным образом связывается с афлатоксином В1 в различных матрицах.

Результат, полученный после исследования свойств антитела D12E2, продемонстрировал, что антитело было хорошим кандидатом для использования

в иммуноаналитических системах. Применения антитела D12E2 в иммуноаффинной колонке, ИФА и биосенсорах было описано в качестве части настоящего изобретения с примерами, которые послужили в качестве доказательства эффективности антитела в иммуноаналитических системах.

С. Работка иммуноаффинной колонки афлатоксина с антителом D12E2

Иммуноаффинные колонки могут быть приготовлены путем конъюгирования антитела с твердофазной подложкой, способной к связыванию с молекулой белка посредством ее реагирующих фрагментов. Твердофазной подложкой, используемой в контексте настоящего изобретения для иллюстрации применения антитела в системах с иммуноаффинной колонкой, является сефароза, активированная бромистым цианогеном (CnBr). Иммуноаффинные колонки приготавливали путем конъюгирования раствора антитела D12E2, фрагментированного сульфатом аммония, содержащего 60 мкг антитела, с сефарозой, активированной CnBr, способами, очевидными для специалистов в данной области техники. Необходимость в ориентировании или дополнительной очистки антитела отсутствовала. Полученные в результате иммуноаффинные колонки оценивали по двум параметрам: способность к связыванию с афлатоксином и способность к связыванию с ограниченным количеством афлатоксинов.

Способность колонок к связыванию с афлатоксином оценивали посредством измерения перелива. 500 нг афлатоксина B1, афлатоксина B2, афлатоксина G1 и афлатоксина G2 в 20 ммоль 20% раствора метанол-вода загружали в колонки отдельными действиями и вычисляли общую способность колонок к связыванию путем анализа методом ВЭЖХ для каждого изотипа афлатоксина. Результаты измерения перелива продемонстрировали, что иммуноаффинные колонки, приготовленные посредством частично очищенного антитела D12E2, были способны к связыванию с $111 \pm 6,5$ нг афлатоксина B1, $70 \pm 4,9$ нг афлатоксина B2, $114 \pm 5,8$ нг афлатоксина G1 и $73 \pm 2,4$ нг афлатоксина G2. Испытание повторяли с экстрактом кукурузы. Для афлатоксинов B1, G1 и G2 наблюдали уменьшение общей способности к связыванию с афлатоксином на 34-41%, а для афлатоксина

В2 наблюдали снижение на 18%.

Испытание на граничное связывание проводили с использованием 16% раствора метанол-вода, в который была подмешана смесь афлатоксина В1, афлатоксина В2, афлатоксина G1 и афлатоксина G2, так что в колонки было загружено по 5 нг каждого токсина. Процентное содержание высвобожденных афлатоксинов использовали для оценки. Результаты испытания на граничное связывание продемонстрировали, что эффективность связывания иммуноаффинных колонок, приготовленных посредством частично очищенного антитела D12E2, составила $104,9 \pm 5,4\%$ для афлатоксина В1, $82,4 \pm 4,8\%$ для афлатоксина В2, $85,5 \pm 6,9\%$ для афлатоксина G1 и $70,7 \pm 7,1\%$ для афлатоксина G2.

D. Разработка испытания ИФА афлатоксина с антителом D12E2

Система для испытания ИФА, основанная на прямом конкурирующем ИФА, для быстрого, легкого обнаружения и определения количества афлатоксина В1 на месте была разработана с применением очищенного антитела D12E2. Разработанная система для испытания включает иммобилизацию антитела D12E2 с планшетом ИФА без какой-либо необходимости в ориентации. Определение количества основывалось на конкуренции конъюгата афлатоксин В1-белок, меченного ферментом, с различными концентрациями афлатоксина в растворе. Конъюгат афлатоксин В1-белок был мечен HRP (пероксидазой хрена) способом с использованием глутеральдегида. Испытание обеспечивает возможность определения количества афлатоксина В1 в экстрактах кукурузы, красного перца и лесного ореха. Диапазон обнаружения набора в экстрактах с афлатоксином В1 определен, как от 1 до 50 частей на миллиард. Обнаружение в этих пределах обеспечивает возможность контроля всех съедобных и пищевых продуктов за исключением продуктов детского питания и каш для младенцев, которые требуют обнаружения при значении менее 0,1 частей на миллиард. Снижение измеренной активности фермента ввиду конкуренции свободного афлатоксина В1 в количестве 50 частей на миллиард в присутствии 25% экстрактов кукурузы, красного перца и лесного ореха, составляет 68%, 81,5% и 73% соответственно.

Е. Наилучший вариант реализации настоящего изобретения

Пример 1: Приготовление катионизированных белков

Альбумин бычьей сыворотки (АБС), овальбумин (ОВА) и апотрансферрин человека (АТФЧ) катионизировали при приготовлении иммуногенов для разработки антитела. 670 мкл этилендиамина (ЭДА) добавляли в 5 мл буфера MES (0,1 м, pH: 4,8). Значение pH раствора регулировали до 4,8 с помощью HCl. 25 мг белка растворяли в 5 мл раствора ЭДА. Реакцию катионизации начинали с добавления 18 мг 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]-карбодиимид гидрохлора (ЭДК). Полученный в результате раствор перемешивали на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Реакцию останавливали путем добавления 150 мкл ацетата натрия (4М; pH: 4,8). Непрореагировавшие ЭДА и ЭДК удаляли путем диализа против дистиллированной воды. Эффективность катионизации испытывали с помощью ВЭЖХ с использованием сильной катионообменной колонки (Agilent Bio 1EX SCX NP5). Белки загружали в колонку при нейтральном значении pH с 50 ммоль трис-HCl pH:7, причем катионизированные белки оставались в колонке, а непрореагировавшие белки – нет. Оставшиеся катионизированные белки промывали при более высоком значении pH и соли с помощью 5 ммоль трис-HCl pH:10,4, 1 моль NaCl. Белки обнаруживали с помощью флуоресцентного детектора (возбуждение: 280 нм, эмиссия: 350 нм). Колонку регенерировали с помощью нейтрального буфера (50 ммоль трис-HCl). Было обнаружено, что эффективность катионизации составляла более 95%. Полученные в результате белки лиофилизировали и хранили при -20 °C до использования.

Пример 2: Приготовление конъюгатов афлатоксина

Конъюгат афлатоксина В1 с катионизированными белками, приготовленные в примере 1, получали с помощью реакции Манниха модифицированным способом, предложенным Zhou *et al.*, Journal of Immunological Methods, 2007, 328(1-2), 79-88. 50 мкг катионизированного белка растворяли в 753 мкл буфера MES (0,1 моль pH 4,8). 47 мкл 2 мг/мкл афлатоксина В1 в диметилформамиде (ДМФ) и 50 мкл формальдегида добавляли в раствор белка. Полученный в результате раствор перемешивали на протяжении 24 часов при 37°C. Конъюгат афлатоксин В1-белок очищали по меньшей мере пять раз с помощью устройств фильтрующей

центрифуги при значении MWCO, составляющем 10 кДа. Эффективность конъюгации оценивали спектроскопическим способом на основе закона Бэра-Ламберта по следующей формуле.

$$C(\text{афлатоксин})/C(\text{АБС}) = A_{360} \times \varepsilon_{P280} / (A_{280} \times \varepsilon_{\text{афлатоксинВ1}_{360}} - \varepsilon_{\text{афлатоксинВ1}_{280}} \times A_{360})$$

где A_{360} : Коэффициент поглощения конъюгата при 360 нм, A_{280} : Коэффициент поглощения конъюгата при 280 нм, ε_{P280} : Коэффициент экстинкции катионизированного белка при 280 нм, $\varepsilon_{\text{афлатоксинВ1}_{360}}$: Коэффициент экстинкции афлатоксина В1 при 360 нм, $\varepsilon_{\text{афлатоксинВ1}_{280}}$: Коэффициент экстинкции афлатоксина В1 при 280 нм.

Конъюгаты афлатоксин-белок хранили при -20°C небольшими аликвотами до использования в мышинной иммунизации и покрытии планшета для ИФА.

Пример 3: Иммунизация мышей

3 мышей Balb/c женского пола возрастом 8 недель интраперитонеально иммунизировали 100 мкг конъюгатов афлатоксин В1-АТФЧ. Первую дозу инъекции готовили путем эмульгирования раствора афлатоксина В1-АТФЧ равным объемом полного адъюванта Фрейнда. Последующие иммунизации готовили путем смешивания раствора антигена с равным объемом неполного адъюванта Фрейнда. Мышей иммунизировали 5 раз в дни 0, 14, 36, 56 и 78. У мышей брали кровь в день 12 после каждой иммунизации и сыворотку собирали посредством центрифугирования. Титр анти-афлатоксиновых антител оценивали с помощью непрямого ИФА. Конъюгатом афлатоксин В1-АБС покрывали планшеты для ИФА для проведения анализа, так что мог наблюдаться только ответ антитела против афлатоксина В1 без помех со стороны анти-АТФЧ антител. Сыворотку мышей с иммунным ответом анти-афлатоксин испытывали с помощью анализа ингибирования афлатоксина В1 для подтверждения реактивности сыворотки со свободным афлатоксином В1. Мышь с наиболее сильным иммунным ответом анти-афлатоксин выбирали и подвергали внутривенной бустер-иммунизации с 50 мкг конъюгата афлатоксин В1-ОВА за 3 дня перед слиянием, так что В-клетки, продуцирующие специфичные к афлатоксину антитела, могли быть селективно обогащены.

Пример 4: Контроль иммунизаций непрямым способом ИФА

Конъюгат афлатоксин В1-АБС использовали в качестве антигена обнаружения при непрямом ИФА. Антиген растворяли до 5 мкг/мл в физиологическом растворе с фосфатным буфером (ФСБР, 10 ммоль, 150 ммоль NaCl, pH: 7,2) и 10 мкл полученного в результате раствора разливали в каждую лунку 96-луночного планшета для ИФА для покрытия лунок 500 нг антигена. Некоторые лунки инкубировали ФСБР в качестве негативного контроля. Планшет инкубировали на протяжении ночи при +4°C. Лунки промывали три раза с помощью 0,2% твин-ФСБР и блокировали 200 мкл 1% раствора сепарированного молока в ФСБР на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Лунки промывали три раза с помощью 0,2% твин-ФСБР. Мышиную сыворотку растворяли в 10000-кратном размере с помощью ФСБР и 100 мкл растворенной сыворотки разливали в специально предназначенные лунки. Неиммунизированную мышиную сыворотку подобным образом растворяли и использовали в качестве негативного контроля. По прошествии 1 часа инкубации при комнатной температуре, лунки промывали три раза. Конъюгированное алкален фосфатазой (АФ) кроличье антимышиное поливалентное антитело, разработанное против мышинового IgG, IgM и IgA растворяли в 2000-кратном размере в ФСБР и разливали по 100 мкл на лунку. Планшет ИФА инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа и лунки промывали 5 раз с помощью 2% твин-ФСБР. АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата растворяли в субстратном буфере (1 ммоль ZnCl₂, 1 ммоль MgCl₂, 0,1 моль глицина, pH 10,4) с концентрацией 1 мг/мл и 100 мкг на лунку разливали и инкубировали на протяжении 60 мин при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 5: Контроль иммунизаций с помощью анализа ингибирования афлатоксина

Планшеты для ИФА покрывали 500 нг конъюгата афлатоксина В1-АБС и блокировали 1% раствором сепарированного молока, как разъяснено. Готовили 20 мкг/мл раствора афлатоксина В1 в ФСБР. 50 мкл мышиную сыворотку, растворенной в 50-ти кратном размере, смешивали с 50 мкл раствора афлатоксина В1, содержащего 1 мкг афлатоксина В1, и инкубировали на протяжении 60 минут

при 37°C. Подобным образом растворенную мышиную сыворотку, смешанную с ФСБР, использовали в качестве негативного контроля. 10 мкл предварительно инкубированной сыворотки разливали в лунки. После 1 часа инкубации при комнатной температуре, лунки тщательно промывали, как указано выше. Конъюгированное АФ кроличье антимышиное поливалентное антитело, растворенное в 2000-кратном размере в ФСБР, разливали по 100 мкл на лунку. Планшет для ИФА инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа и лунки промывали. 100 мкл АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата в количестве 1 мг/мл, растворенного в субстратном буфере, добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 60 минут при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 6: Разработка линии гибридных клеток, продуцирующей моноклональное антитело

Линию мышинных миеломных клеток F0 использовали для продуцирование гибридомы. Хранящуюся при низкой температуре клеточной линии F0 восстанавливали за 10 дней перед слиянием и культивировали для 3-4 прохождений, так что $2-3 \times 10^8$ клеток, которые находятся в логарифмической фазе своего роста с более чем 90% вариабельностью, получали в день слияния. 10 культуральных планшетов, подлежащих использованию для дисперсии клеток после слияния наслаивали с помощью питающих клеток в день перед слиянием для обеспечения подложки для новых слитых гибридных клеток. Питающие клетки готовили из перинотальных клеток неиммунизированной мыши Balb/C, которую умерщвляли путем цервикальной дислокации. Мышь, выбранную по ее высоко специфическому к афлатоксину титру антитела, подвергали бустер-иммунизации за три дня перед слиянием, как разъяснено в примере 3. В день слияния иммунизированную мышь умерщвляли путем цервикальной дислокации. Клетки селезенки извлекали из мыши, а миеломные клетки брали из культуральных планшетов. Клетки промывали три раза с помощью 30 мл ФСБР. Клетки селезенки и клетки F0 смешивали с соотношением клеток F0 к клеткам селезенки 1:3. Слияния достигали путем добавления 1 мл 50% раствора ПЭГ 4000 в клетки при 37°C. Слитые клетки суспендировали последующим добавлением свободной от сыворотки DMEM и DMEM, содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки. По прошествии одного

часа инкубации клетки собирали путем центрифугирования, повторно суспендировали в DMEM, содержащей 20% фетальной бычьей сыворотки и 2% гипоксантин-аминоптерин-тимидиновая (ГАТ) среды, и разливали в питающие засеянные культуральные планшеты. Через 10 дней после слияния, гибридные клоны подвергали скринингу на продуцирование специфического к афлатоксину антитела непрямым способом для ИФА, разъясненным в примере 4, при котором культуральный супернатант замещали растворенной мышиной сыворотки. Выбранные клоны испытывали на специфичность к афлатоксину путем непрямого способа для ИФА, описанного в примере 4, путем замещения покрывающего антигена 100 нг АБС, АТФЧ или ОВА и иммунной сыворотки – нерастворенным супернатантом клеточной культуры. Клоны, которые не демонстрировали перекрестной реактивности с перечисленными белками, обследовали на реактивность к афлатоксину с помощью анализа ингибирования микотоксина.

Пример 7: Определение специфичности антитела с помощью анализа ингибирования микотоксина

Планшеты для ИФА покрывали 500 нг конъюгатом афлатоксина В1-АБС и блокировали 1% раствором сепарированного молока, как разъяснено в примере 4. 20 мкг/мл запаса афлатоксинов В1, В2, G1, G2, М1, охратоксина А, зеараленона и фумонизина В1 готовили в ФСБР. 50 мкл супернатанта клеточной культуры смешивали отдельно с 50 мкл каждого указанного раствора микотоксина, содержащего 1 мкг микотоксина и инкубировали на протяжении 30 минут при 37°C. Супернатанты клеточной культуры смешивали с ФСБР использовали в качестве негативного контроля. 100 мкл предварительно инкубированной сыворотки разливали в лунки. После 1 часа инкубирования при комнатной температуре лунки тщательно промывали, как указано выше. Конъюгированное АФ кроличье антимышиное поливалентное антитело, растворенное в 2000-кратном размере в ФСБР, разливали по 100 мкл на лунку. Планшет для ИФА инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа и лунки промывали. 100 мкл АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата в количестве 1 мг/мл, растворенного в субстратном буфере, добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 60 минут при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с

помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 8: Продуцирование антитела D12E2

Линию клетки D12E2 культивировали в DMEM с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 0,1% гентамицина при 37°C в присутствии 5% CO₂ с 90% влажности. Клеточная линия сохранила способность к продуцированию антитела даже при добавлении 3% фетальной бычьей сыворотки, однако, вариабельность клетки была существенным образом снижена. Было обнаружено, что клетки суспендировались во время культивирования в кюветах 300 см².

Клетки D12E2 успешно заморозили и регенировали. Для приготовления замороженных запасов клеток, 2-3x10⁶ клеток брали из кюветов клеточной культуры и суспендировали в 1 мл замораживающей среды (10% диметилсульфоксид (ДМСО), 20% фетальной бычьей сыворотки, 70% DMEM). Криопробирку, содержащую указанные клетки, постепенно охлаждали до -150°C и сохраняли в морозильной камере при -150°C или в жидком азоте.

Замороженные клетки размораживали путем быстрого нагревания при 37°C. Размороженные клетки промывали дважды в ФСБР и переносили в кюветы 25 см² в 5 мл 10% фетальной бычьей сыворотки, содержащей DMEM. Клетки переносили в предварительно определенную культуральную среду после одного прохождения.

Супернатанты клеточной культуры частично очищали путем фракционирования сульфатом аммония. Посредством данного способа, собранные супернатанты смешивали с равным объемом насыщенного сульфата аммония и смешивали на протяжении ночи при +4°C. Осадок, содержащий антитело, собирали путем центрифугирования и растворяли в ФСБР. Раствор антитела тщательно диализировали против ФСБР. Процедура дала 20-ти кратную концентрацию антитела относительно супернатанта клеточной культуры. Остатки сульфата аммония D12E2 сохраняли при -20°C в аликвотах 2 мл до использования.

Антитело D12E2 очищали путем хроматографии с ионным обменом с использованием целлюлозной матрицы ДЭАЭ. 20 мл целлюлозной колонки ДЭАЭ готовили в соответствии с рекомендациями поставщика и промывали загрузочным буфером (10 ммоль KPO₄, 150 ммоль NaCl, pH:7). Антитело D12E2,

осажденное в 2 ммоль сульфата аммония, загружали в колонку для хроматографии. Колонку промывали 2-3 колоночными объемами загрузочного буфера и связанное антитело D12E2 промывали 10 ммоль KPO_4 , 350 ммоль NaCl , pH:7. Скорость потока во время процедуры составляла 30-40 мл/ч. Фракции по 1,5 мл собирали во время хроматографии и промывание белка подвергали мониторингу путем измерения коэффициента поглощения при 280 нм. В хроматографии наблюдали два пика. Выбранные фракции из данных пиков были подвергнуты скринингу на активность антитела путем непрямого способа для ИФА. Очитку пиков оценивали путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга.

Для анализа SDS-PAGE, образцы белка из хроматографических пиков денатурировали β -меркаптоэтанолом и загружали на непрерывную гелеобразную систему с 5% (мас/об) полиакриламидного загрузочного геля и 12% (мас/об) сепарирующего геля способами, известными из уровня техники. Использовали маркер SDS PAGE, состоящий из белков в диапазоне молекулярной массы от 10 до 170 кДа (thermo Scientific 26616). 0,2 мкг очищенного АБС (Sigma, B2518), основной компонент бычьей сыворотки и основная примесь в растворе антитела загружали в гель в качестве контроля. 3,5 и 0,5 мкг белка из первого и второго пика, соответственно, загружали и сравнивали. Электрофорез проводили с помощью гелевого устройства «Mini-PROTEAN Tetra Cell» от компании «Bio-Rad» при непрерывном напряжении 120 В. Гели окрашивали серебром способами, известными специалистам в данной области техники. При анализе вестерн-блоттингом белки на гелях переносили на мембрану ПВДФ в метанол-содержащем буфере для блоттинга (0,02 моль основания Trizma, 0,15 моль глицина, 0,0003% SDS и 20% метанола) с использованием устройства для полусухого вестерн-блоттинга («Trans-Blot Turbo Transfer System» от компании «Bio-Rad») на протяжении 30 минут при 200 мА. После этого, мембрану блокировали на протяжении 1 ч в блокирующем буфере, содержащем 1 х ФСБР, 1% сухого обезжиренного молока. Для иммуоблоттингового анализа 1:5000 растворенного промаркированного АФ кроличья антимышиного поливалентного антитела инкубировали с мембраной на протяжении 1 ч. После промывания 0,2 % твин-ФСБР, реплики визуализировали на мембране с помощью АФ субстрата

(Sigma B5655).

Пример 9: Устойчивость антитела D12E2 к растворителю

Планшеты покрывали 500 нг конъюгатом афлатоксина В1-АБС и блокировали 1% раствором сепарированного молока. Готовили %, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% и 70% растворы метанола, ацетонитрила, ацетона и этанола. Антитело D12E2, осажденное на сульфате аммония, растворяли в 500-кратном размере в данных растворах и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 5 минут. 100 мкл растворов антитела при различии концентраций раствора загружали в специально предназначенные лунки планшета для ИФА и инкубировали на протяжении 20 минут при комнатной температуре. Лунки тщательно промывали и конъюгированное АФ кроличье антимышиное поливалентное антитело, растворенное в 2000-кратном размере в ФСБР, разливали по 100 мкл на лунку. Планшет для ИФА инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа и лунки промывали. 100 мкл АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата в количестве 1 мг/мл, растворенного в субстратном буфере, добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 60 минут при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 10. Кислотная и соляная резистентность антитела

Планшеты для ИФА покрывали 500 нг конъюгата афлатоксин В1-АБС и блокировали 1% раствором сепарированного молока. 100 мкл растворенного в 1000-кратном размере аммоний-сульфатного осадка антитела D12E2 инкубировали на лунках на протяжении 1 ч при комнатной температуре. Готовили буфер с 0,1 моль глицина HCl при pH: 7, 6, 4 и 2. Готовили 0,1 моль глицинового буфера при pH: 6, содержащего 0, 300 ммоль, 50 ммоль и 1000 ммоль NaCl. 100 мкл каждого приготовленного буфера разливали в специально предназначенные лунки планшета для ИФА и инкубировали на лунках на протяжении 5, 10 или 20 минут при комнатной температуре. Лунки промывали и количество антител, связанных с лунками после применения, определяли путем визуализации АФ-конъюгированного вторичного антитела. Конъюгированное АФ кроличье антимышиное поливалентное антитело, растворенное в 5000-кратном размере, разливали по 100 мкл на лунку. Планшет для ИФА инкубировали при 37°C на

протяжении 1 часа и лунки промывали. 100 мкл АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата в количестве 1 мг/мл, растворенного в субстратном буфере, добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 60 минут при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 11: Оценка интерференционного эффекта матрицы путем конкурирующего непрямого ИФА

Планшеты для ИФА покрывали 500 нг конъюгата афлатоксин В1-АБС и блокировали 1% раствором сепарированного молока. Осажденное D12E2, растворенное в 1000-кратном размере в сульфате аммония, готовили в ФСБР. 1 мл растворенного антитела предварительно инкубировали с 0, 1, 5, 10, 50 и 100 мл 91 частей на миллиард экстрактов кукурузы, красного перца и лесного ореха с добавленным афлатоксином В1 и 10 нг афлатоксина В1 в ФСБР на протяжении 30 минут при 37°C. 100 мкл из каждой инкубации добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Лунки тщательно промывали и конъюгированное АФ кроличье антимышиное поливалентное антитело, растворенное в 2000-кратном размере в ФСБР, разливали по 100 мкл на лунку. Планшет для ИФА инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа и лунки промывали. 100 мкл АФ субстрат 4-нитрофенил фосфата в количестве 1 мг/мл, растворенного в субстратном буфере, добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 60 минут при комнатной температуре. Коэффициент поглощения при 405 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

Пример 12: Приготовление иммуноаффинной колонки

Сефарозу (Sigma C9142), активированную CnBr, активировали в кислотном pH. Осадок антитела D12E2 в сульфате аммония 10 раз растворяли в связывающем буфере (0,1 моль NaHCO₃, 0,5 моль NaCl, pH 8,3). 1 мл раствора с растворенным антителом использовали для связывания с 1 мл сефарозы. Несвязанные фрагменты на сефарозе блокировали 1 моль этаноламина, pH: 8. Использовали по 400 мкл каучука на колонку.

Производительность колонки оценивали испытаниями на перелив и ограничение связывания. Результаты обоих испытаний оценивали путем анализа ВЭЖХ. Для

derivatизации афлатоксинов использовали клеточный способ CoBrA. 20 мкл образца загружали в колонку 250/4,6 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel 720014.46) при скорости потока 1 мл/мин при комнатной температуре. 55% буфера KBr-HNO₂ + 27% метанола + 18% ацетонитрила использовали в качестве подвижной фазы. Токсины обнаруживали с помощью детектора флуоресценции при длине волны возбуждения, составляющей 360 нм, и длине волны эмиссии, составляющей 430 нм. Устройство калибровали по сертифицированным стандартам афлатоксина для точного определения количества.

Для испытания на перелив, в экстракт, содержащий 20% метанол-воды или 20% метанола, добавляли 25 частей на миллиард афлатоксина B1, B2, G1 или G2. 20 мл каждого раствора загружали в колонки со скоростью 3 мл/мин и колонки промывали 20 мл дистиллированной воды с такой же скоростью потока. Связанный афлатоксин промывали 1 мл метанола. Концентрацию афлатоксина вычисляли путем анализа ВЭЖХ с соотношением элюата к дистиллированной воде 1:1.

Испытание на ограничение связывания проводили путем добавления 0,25 частей на миллиард каждого афлатоксина B1, B2, G1 или G2 в 16% раствора метанола-воды. 20 мл смеси с таким добавлением загружали в колонки со скоростью потока 3 мл/мин и колонки промывали 20 мл дистиллированной воды с такой же скоростью потока. Связанный афлатоксин промывали 1 мл метанола. Концентрацию афлатоксина вычисляли путем анализа ВЭЖХ с соотношением элюата к дистиллированной воде 1:1.

Пример 13: Система для испытаний ИФА

Афлатоксин В1-АБС конъюгировали с пероксидазой хрена (ПХ) способами (способа с глютеральдегидом), известными специалистам в данной области техники. Каждую лунку планшета для ИФА покрывали 700 нг очищенного антитела в ФСБР путем инкубации на протяжении ночи при +4°C. Лунки промывали три раза 0,2% твин-ФСБР и блокировали с помощью 400 мл 1% раствора сепарированного молока в ФСБР на протяжении 2 часов при комнатной температуре. 400 нг конъюгата афлатоксин В1-АБС-ПХ смешивали с варьирующимися концентрациями неконъюгированного афлатоксина в 17,5% метанола, 25%

экстракта лесного ореха, красного перца и кукурузы. Для устранения фонового сигнала использовали буфер 0,1 моль KPO_4 , 1 моль NaCl с pH 8 для растворов при определении количества афлатоксина В1 в экстракте красного перца. ФСБР использовали для растворения других экстрактов. Конкурирование с чистым экстрактом использовали в качестве негативного контроля. Каждый образец/стандарт изучали дважды. После 20 минут инкубации при комнатной температуре, лунки промывали пять раз 0,2% твин-ФСБР. ТМБ ПХ субстрат добавляли в лунки и инкубировали на протяжении 20 минут. Реакцию останавливали после инкубации с 2 моль H_2SO_4 . Коэффициент поглощения при 450 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов.

По стандартной кривой построен график путем использования средних % значений (фиг. 8).

Ф. Перечень последовательностей

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> TUBITAK
Ozturk, Selma; Ertekin, Ozlem; Pirincci, Serife Seyda; Kocaaga, Harun

<120> МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО IGA ДЛЯ МИКОТОКСИНОВ, ЛИНИЯ ГИБРИДОМНЫХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО, И ЕГО КОНКРЕТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИЗАХ

<130> TUBITAK

<160> 2

<170> Patentin версии 3.5

<210> 1
<211> 390
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 1
ggagatgggtg ggattttctcg cagactctga ggagacgggtg accgtgggtcc ctgcgccccca 60
gacatcgaag taccagtagc cccagttggg tctagcacag taatagacgg cagtgtcctc 120
agatgtcagg ctgctgagct gcaggtaggc tgtgttgagg gaagtgtctg cagtgcagct 180
ggccttggtcc tggaaattct ggacatataa agtatgacca ttgcaggat caatccttcc 240
aatccactcc aggccctgtt caggcctctg cttcacccag tgaatatagt tgtctctaatt 300
gttaaagcca gaagctgtgc aggacaactt gactgaggcc ccaggcctca caagctcagc 360
ccctgactcc tgcagcttca cctccggaag 390

<210> 2
<211> 350
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 2
ggtggataca gttggtgcag catcagcccg tttcagctcc agcttgggtcc cagcaccctaa 60
cgtgaggcca gctgttactc tgttgacaga aatacattcc aaaatcttca gtctccacac 120
tgttgatact gagagtgaag tatgtccctg atccactgcc actgaacctg gaggggatcc 180
cagagatgga ctgggaagca aacttcatga gaagccttgg agactcatgt gatttttgtt 240
gataaccagt taggaagttg ctaatacttt gactggccct gcaggaaaga ctgactctat 300
ctcctggagt catagacagg gtggctggag tctgggtcat cacaatgtcc 350

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ТЮБИТАК
Озтюрк, Селма; Эртекин, Озлем; Пиринчджи, Шерифе Шейда; Коджаага, Харун

<120> МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО IGA ДЛЯ МИКОТОКСИНОВ, ЛИНИЯ ГИБРИДОМНЫХ КЛЕТОК, ПРОДУЦИРУЮЩИХ УКАЗАННОЕ АНТИТЕЛО, И ЕГО КОНКРЕТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОАНАЛИЗАХ

<130> ТЮБИТАК

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 390

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 1

ggagatggtg ggatttctcg cagactctga ggagacggtg accgtggtcc ctgcgcccc	60
gacatcgaag taccagtagc cccagttggg tctagcacag taatagacgg cagtgtcctc	120
agatgtcagg ctgctgagct gcaggtaggc tgtgttggag gaagtgtctg cagtgcacgt	180
ggccttgtcc tggaaattct ggacatataa agtatgacca ttcgcaggat caatccttcc	240
aatccactcc aggcctgtt caggcctctg cttcaccag tgaatatagt tgtctcta	300
gttaaagcca gaagctgtgc aggacaactt gactgaggcc ccaggcctca caagctcagc	360
ccctgactcc tgcagcttca cctccggaag	390

<210> 2

<211> 350

<212> ДНК

<213> Mus musculus

<400> 2

ggtggataca gttggtgcag catcagcccc tttcagctcc agcttgggtcc cagcacccaa	60
cgtgaggcca gctgttactc tgttgacaga aatacattcc aaaatcttca gtctccacac	120
tgttgatact gagagtgaag tatgtccctg atccactgcc actgaacctg gaggggatcc	180
cagagatgga ctgggaagca aacttcatga gaagccttgg agactcatgt gatttttgtt	240
gataccagtg taggaagttg ctaatacttt gactggccct gcaggaaaga ctgactctat	300
ctcctggagt catagacagg gtggctggag tctgggtcat cacaatgtcc	350

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела класса IgA или его фрагмента в иммуноанализе для обнаружения и/или определения количества микотоксинов.
2. Применение по п. 1, в котором указанный иммуноанализ представляет собой иммуноанализ типа, выбранного из группы, включающей иммуноаффинную колонку, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, исследование агглютинации и анализ иммунобиосенсора.
3. Применение по п. 2, в котором указанный иммуноанализ предназначен для обнаружения и/или определения количества микотоксинов.
4. Применение по п. 1, в котором указанное антитело представляет собой мышинное моноклональное антитело класса IgA или его фрагмент.
5. Применение по п. 1, в котором указанный микотоксин выбран из группы, состоящей из афлатоксина В1, В2, G1, G2 и М1.
6. Применение по п. 1, в котором указанное антитело является резистентным к 40% (по весу) метанола, 20% (по весу) ацетонитрила, 30% (по весу) ацетона и 40% (по весу) этанола.
7. Применение по п. 1, в котором указанное антитело содержит полипептид тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид с легкой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.
8. Антитело класса IgA или его фрагмент, содержащее SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.
9. Антитело по п. 8, где указанное антитело содержит полипептид тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид с легкой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.
10. Клон гибридомы, способный продуцировать антитело по п. 8 или 9.
11. Линия клеток, содержащая клон гибридомы по п. 10.

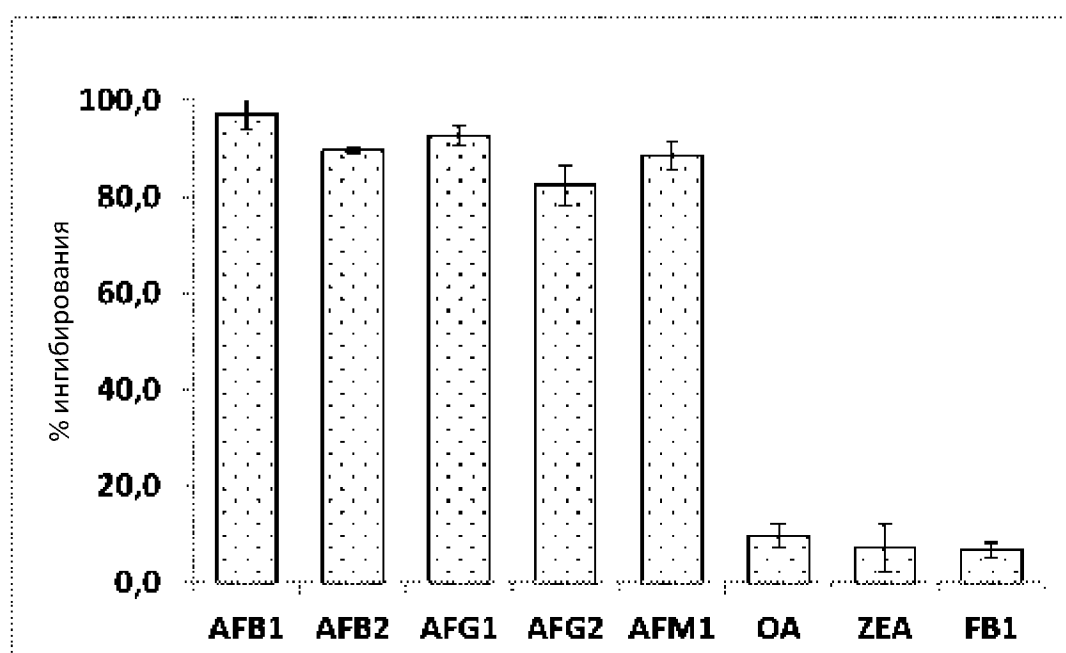
- 12.** Способ очистки антитела по п. 8 или 9, включающий концентрирование супернатанта клеточной культуры из линии гибридных клеток способом фракционирования сульфатом аммония и его очистки путем использования хроматографии с ионным обменом ДЭАЭ.
- 13.** Применение антитела по п. 8 или 9 для обнаружения и/или определения количества афлатоксина, выбранного из группы, состоящей из В1, В2, G1, G2 и М1 в пищевых продуктах.
- 14.** Применение по п. 13, в котором пищевой продукт содержит матрицу кукурузы, красного перца или лесного ореха.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

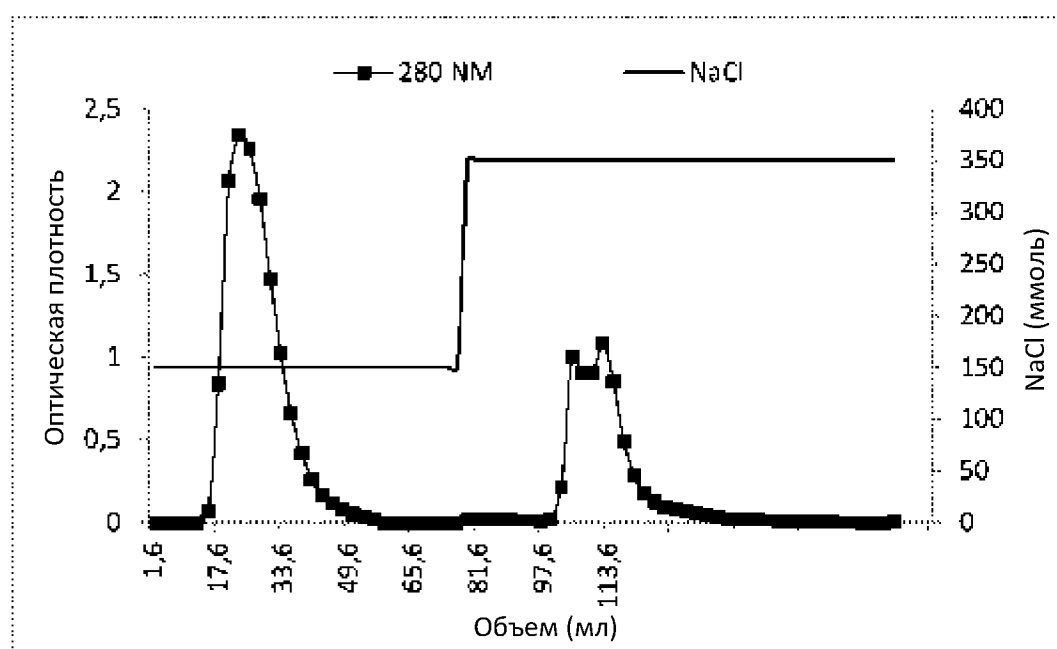
1. Применение мышинового моноклонального антитела класса IgA, причем указанное антитело содержит полипептид тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид с легкой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, в иммуноанализе для обнаружения и/или определения количества афлатоксинов B1, B2, G1, G2 и M1.
2. Применение по п. 1, в котором указанный иммуноанализ представляет собой иммуноанализ типа, выбранного из группы, включающей иммуноаффинную колонку, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, исследование агглютинации и анализ иммунобиосенсора.
3. Применение по п. 1, в котором указанное антитело представляет собой мышинное моноклональное антитело класса IgA или его фрагмент, связывающийся с афлатоксином.
4. Применение по п. 1, в котором указанное антитело является резистентным к 40% (по весу) метанола, 20% (по весу) ацетонитрила, 30% (по весу) ацетона и 40% (по весу) этанола.
5. Антитело класса IgA или его фрагмент, связывающийся с афлатоксином, содержащее SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.
6. Антитело по п. 5, где указанное антитело содержит полипептид тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO:1, и полипептид с легкой цепью, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.
7. Линия гибридомных клеток D12E2, способная продуцировать антитело по п. 5 или 6 для обнаружения и/или определения количества афлатоксинов B1, B2, G1, G2 и M1.
8. Способ очистки антитела по п. 5 или 6, включающий концентрирование супернатанта клеточной культуры из линии гибридомных клеток D12E2 способом фракционирования сульфатом аммония и его очистки путем

использования хроматографии с ионным обменом ДЭАЭ.

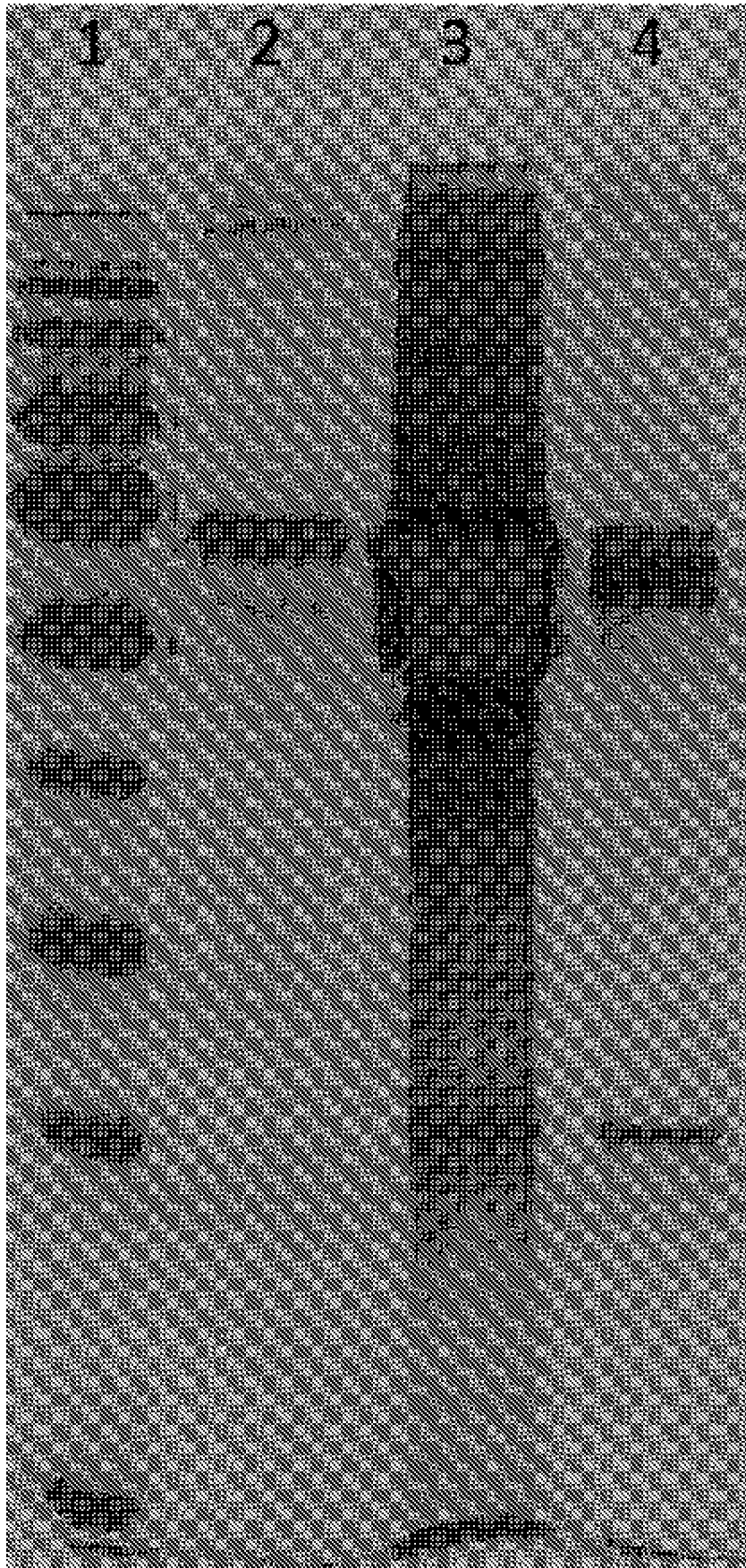
- 9.** Применение антитела по п. 5 или 6 для обнаружения и/или определения количества афлатоксина В1, В2, G1, G2 и М1 в пищевых продуктах.
- 10.** Применение по п. 9, в котором пищевой продукт содержит матрицу кукурузы, красного перца или лесного ореха.
- 11.** Применение мышинового моноклонального антитела класса IgA, содержащего SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO: 2, или его фрагмента, связывающегося с афлатоксином, в иммуноанализе для обнаружения и/или определения количества афлатоксинов В1, В2, G1, G2 и М1.



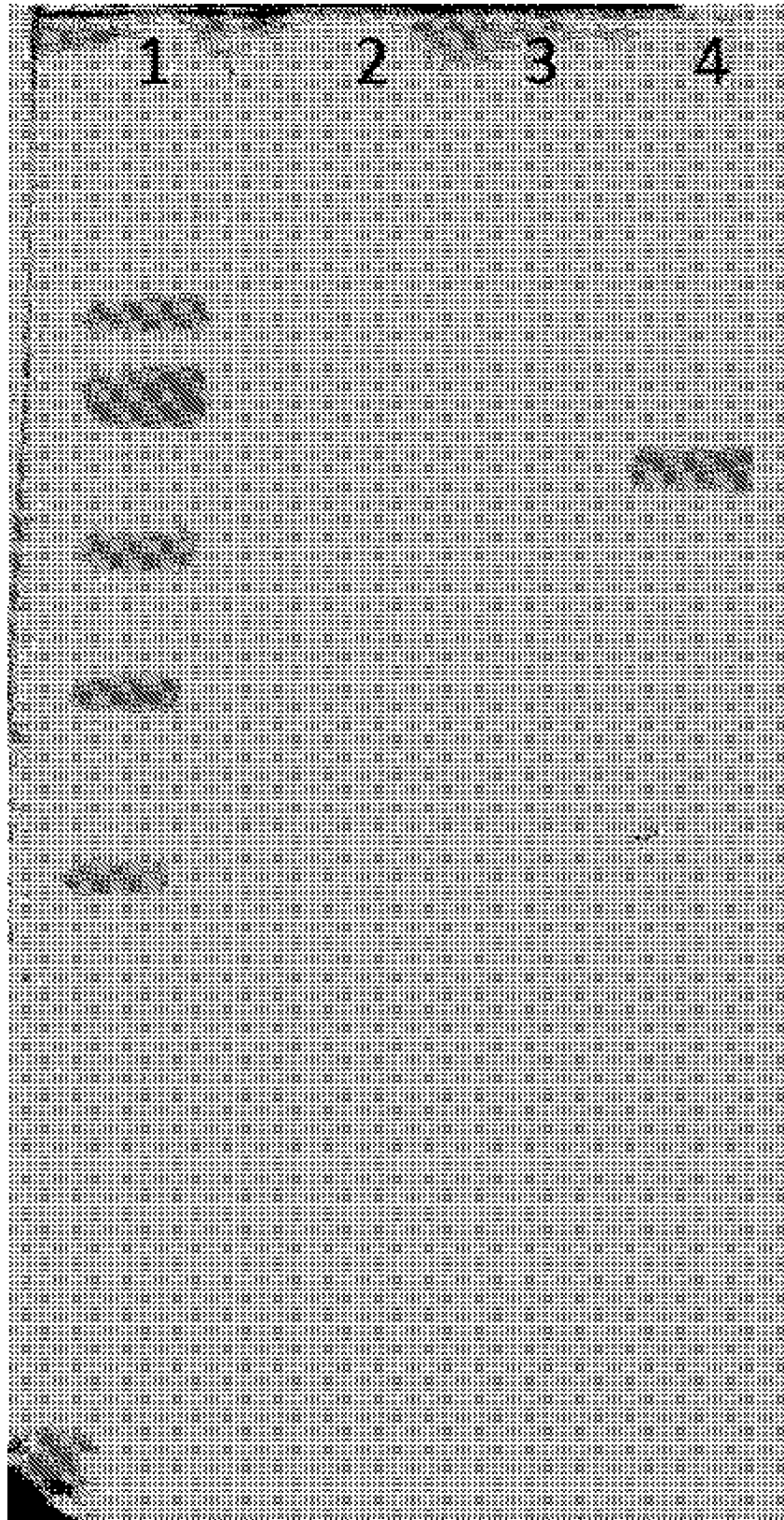
Фиг. 1



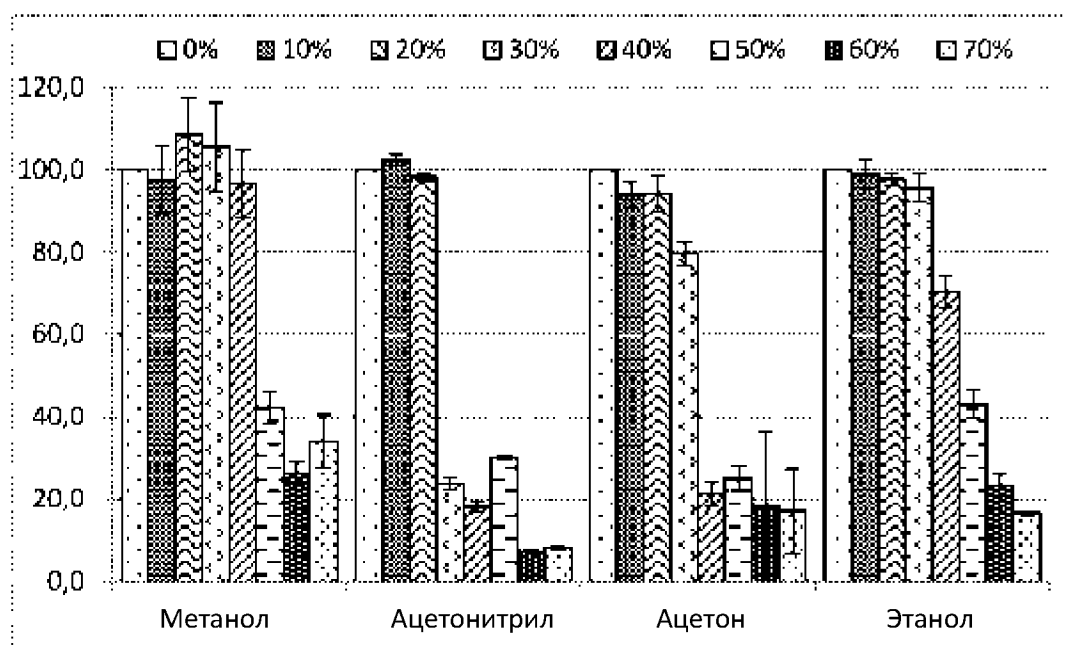
Фиг. 2



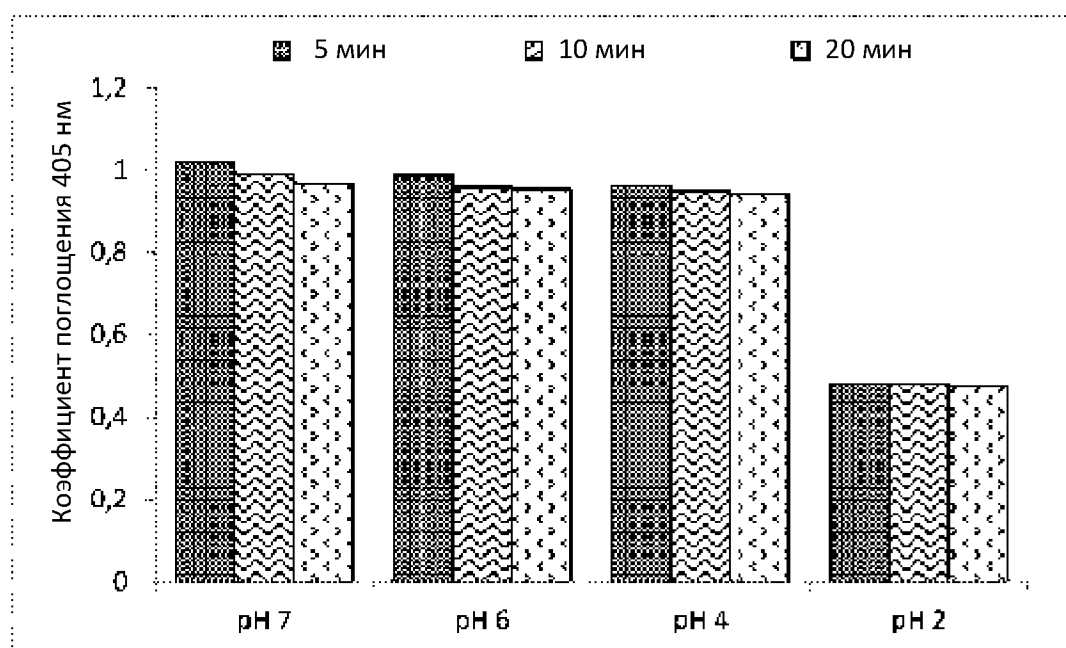
Фиг. 3А



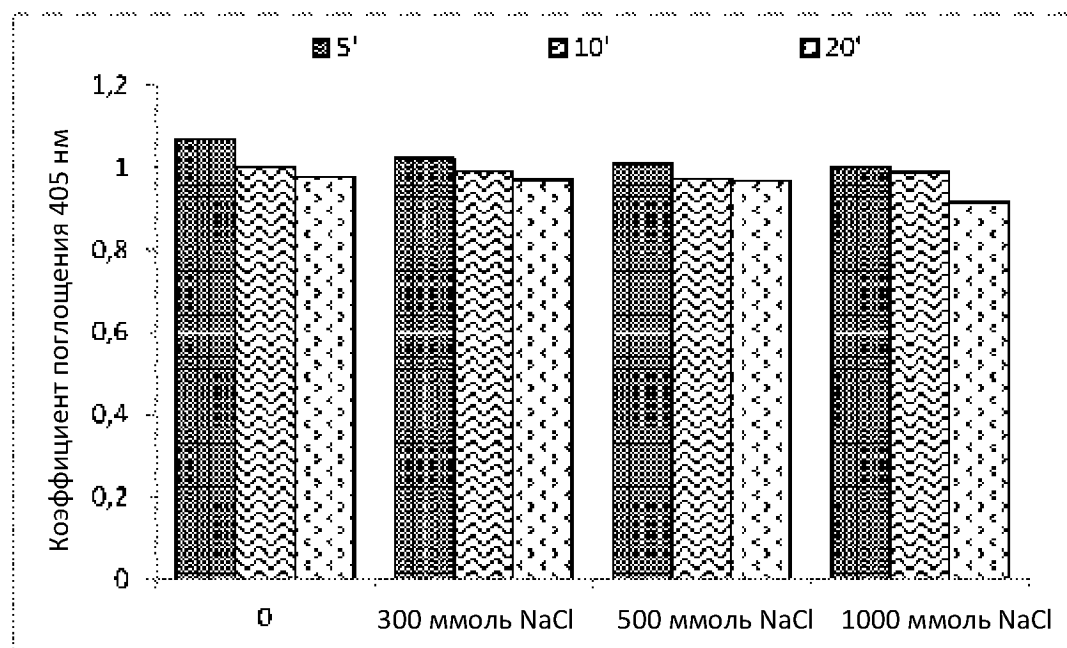
Фиг. 3В



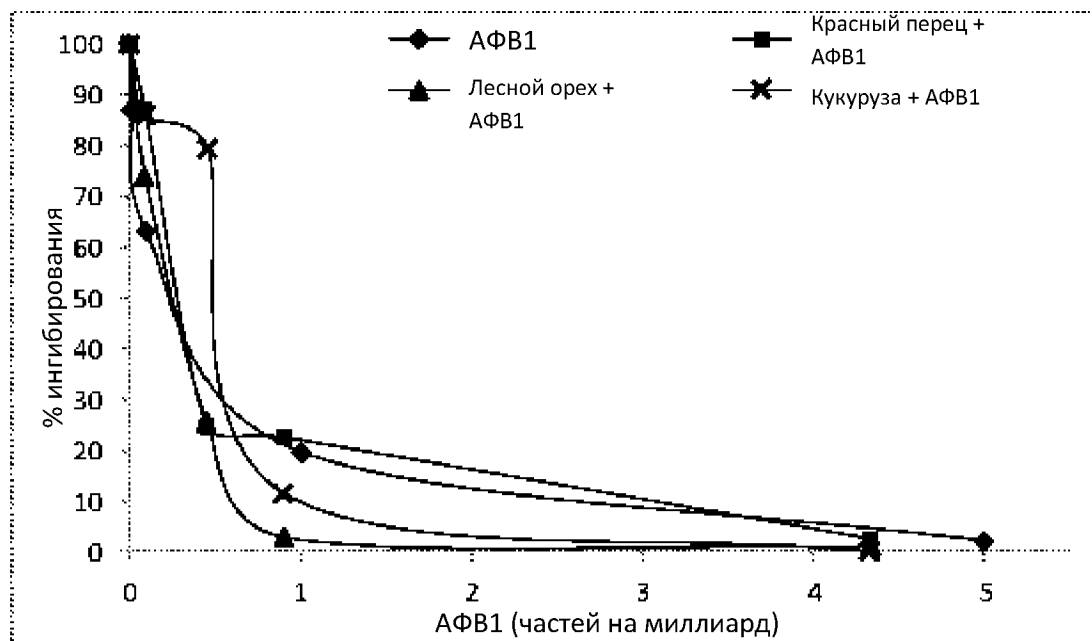
Фиг. 4



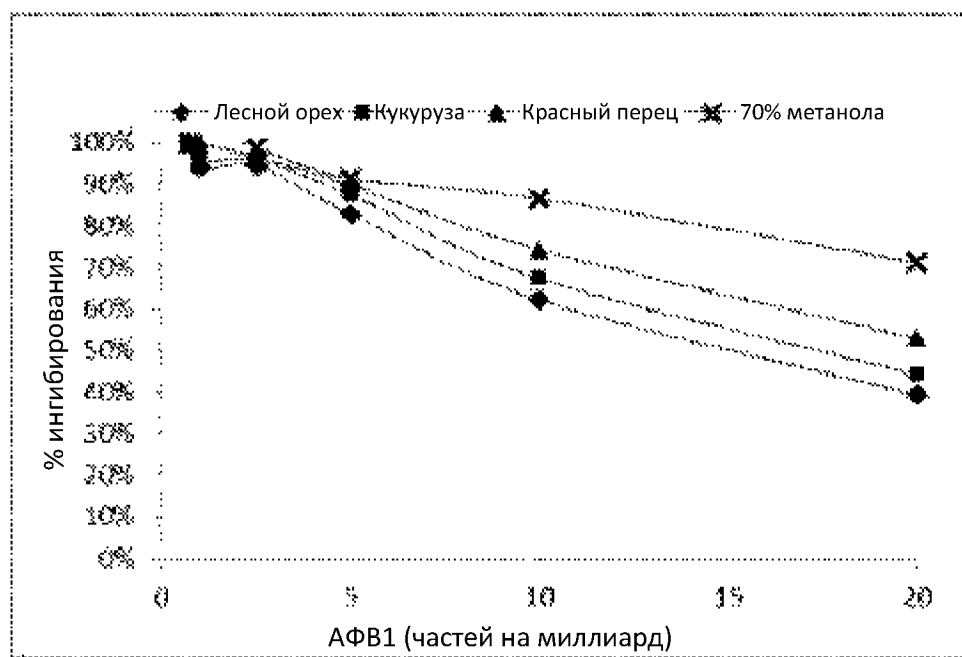
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8