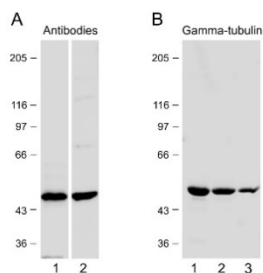


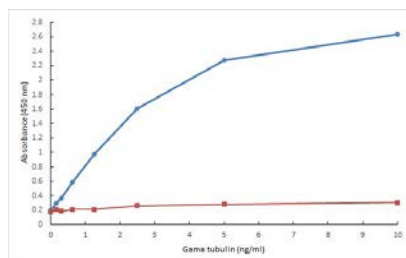
## ELISA test k detekci gama-tubulinu pro diagnostiku nádorových onemocnění

Gama-tubulin je klíčový protein nukleačních komplexů nezbytných pro tvorbu mikrotubulů, složených z alfa/beta-tubulinů. Bylo prokázáno, že gama-tubulin, kódovaný u člověka dvěma geny, je aberantně exprimován v nádorových buňkách a představuje novou značku prognózy gliomů. Některé mikrotubulární proteiny je možné za patologických stavů detegovat v tělních tekutinách. Ve srovnání s ELISA soupravami proti alfa- a beta-tubulinům, které jsou využívány ve vědeckých publikacích, je nabídka souprav pro analýzu solubilního gama-tubulinu velmi omezená. Stanovení koncentrace solubilního gama-tubulinu v tkáňových homogenátech, buněčných lyzátech nebo v tělních tekutinách pomocí ELISA souprav nebylo doposud publikováno. Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., byl připraven panel dobře charakterizovaných monoklonálních protilátek, které specificky interagují s gama-tubulinem. V rámci projektu TAČR-Gama byla určena jejich využitelnost pro přípravu vysoce citlivého ELISA testu pro stanovení gama-tubulinu, který může nalézt uplatnění jak v základním výzkumu při studiu gama-tubulinu, tak i v diagnostice.

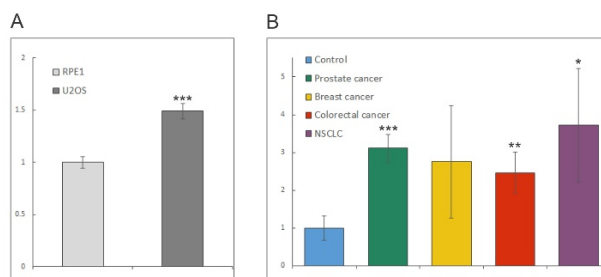
Purifikované monoklonální protilátky byly konjugovány s biotinem a testovány v kombinaci s komerčně dostupnými protilátkami proti fylogeneticky konzervativním epitopům gama-tubulinu a s využitím purifikovaného gama-tubulinového standardu. Po nalezení vhodné kombinace protilátek byly optimalizovány podmínky ELISA testu s ohledem na množství používaných reagensů, způsoby detekce a zesílení signálu. Byl určen cílový epitop rozpoznávaný monoklonální protilátkou. Citlivost a reprodukovatelnost připraveného ELISA testu byla ověřena na různých typech vzorků. Výsledky ukázaly, že vybrané protilátky (afinitně purifikovaná králičí protilátka použitá k imobilizaci gama-tubulinu a biotinem značená myší monoklonální protilátka k detekci vázaného gama-tubulinu) jsou vysoce specifické (**Obr. 1A**) a purifikovaný gama-tubulin neobsahuje kontaminující proteiny (**Obr. 1B**). Sandwich ELISA umožňuje detegovat gama-tubulin v koncentracích menších než 1 ng/ml (**Obr. 2**) a lze stanovit gama-tubulin v komplexních buněčných lyzátech (**Obr. 3A**) i v tělních tekutinách. Orientační analýza vzorku sér od zdravých jedinců a od pacientů s nádorovým onemocněním ukázala, že u různých nádorových onemocnění je zvýšena koncentrace gama-tubulinu (**Obr. 3B**). Výsledky epitopového mapování pomocí syntetických peptidů ukázaly, že monoklonální protilátka rozpoznává fylogeneticky konzervativní epitop, který je přítomen u obou lidských gama-tubulinů (**Obr. 4**). Vzhledem k tomu, že rovněž polyklonální protilátka rozpoznává fylogeneticky konzervativní epitop, lze předpokládat, že ELISA umožní detegovat gama-tubuliny různých druhů. Identické sekvence byly pro obě protilátky nalezeny u gama-tubulinu člověka (*Homo sapiens*), myši (*Mus musculus*), kuřete (*Gallus gallus*) a žáby (*Xenopus laevis*).



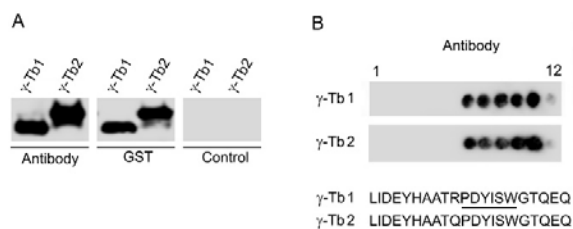
**Obr. 1.** Charakterizace protilátek a gama-tubulinového standardu. (A) Imunoblot lyzátu lidských buněk s protilátkami proti gama-tubulinu. Polyklonální protilátka (1), monoklonální protilátka (2). (B) Gama-tubulinový standard v koncentracích 0,5 mg/ml (1), 0,25 mg/ml (2) a 0,125 mg/ml (3).



**Obr. 2.** Detekce gama-tubulinu v různých koncentracích ELISA testem. Gama-tubulin (modrá linie), kontrola bez imobilizující protilátky (červená linie).



**Obr. 3.** Srovnání koncentrace gama-tubulinů v buněčných lyzátech a sérech. (A) Relativní srovnání koncentrací gama-tubulinu v 1% NP40 extraktech u buněčných linií RPE1 (lidská retina) a U2OS (lidský osteosarkom) (n=3). (B) Relativní srovnání koncentrací gama-tubulinu v sérech zdravých jedinců (Control) a pacientů s různými typy nádorů (n=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Obr. 4.** Identifikace epitopu rozpoznávaného monoklonální protilátkou proti gama-tubulinu. (A) Imunoblotty imobilizovaných GST-značených lidských gama-tubulinových isoform (γ-Tb1 a γ-Tb2) s monoklonální protilátkou proti gama-tubulinu (Antibody) a s protilátkou proti GST. V kontrole je pouze značená anti-myší protilátka. (B) Imobilizované peptidy gama-tubulinových isoform (γ-Tb1 a γ-Tb2) značené monoklonální protilátkou (Antibody). Každý peptid obsahuje 10 AA, překryv je 9 AA, čísla označují pozici peptidů.

**Závěr:** Výsledky ukazují, že citlivý ELISA test k detekci gama-tubulinu má vlastnosti, které jej předurčují pro kvantifikaci gama-tubulinu v různých typech vzorků. ELISA test by mohl najít uplatnění v diagnostice nádorových onemocnění. Protože protilátky rozpoznávají fylogeneticky velmi konzervativní epitopy, lze předpokládat, že umožní kvantifikaci gama-tubulinů různých druhů.

V případě zájmu o další informace anebo zakoupení neexklusivní licence na 1/ hybridom produkující myši monoklonální protilátku, 2/plasmid kódující gama-tubulin a 3/ know-how k provedení sensitivního ELISA testu se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologii**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227 nebo 420-602 892 876).