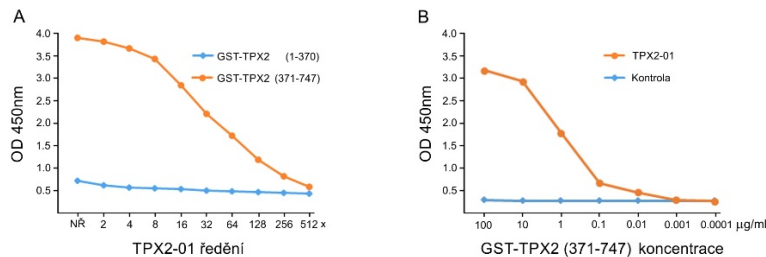
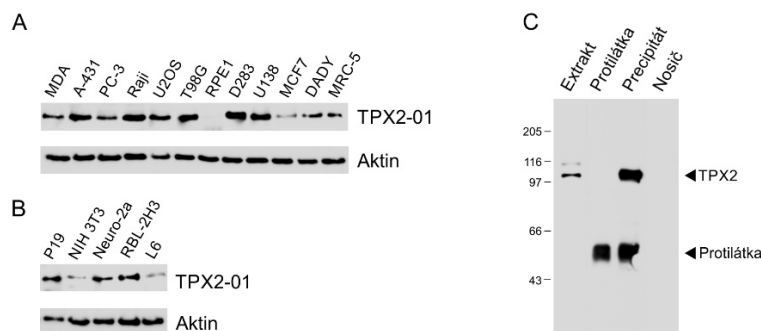


Monoklonální protilátka anti-TPX2 pro diagnostiku nádorových onemocnění

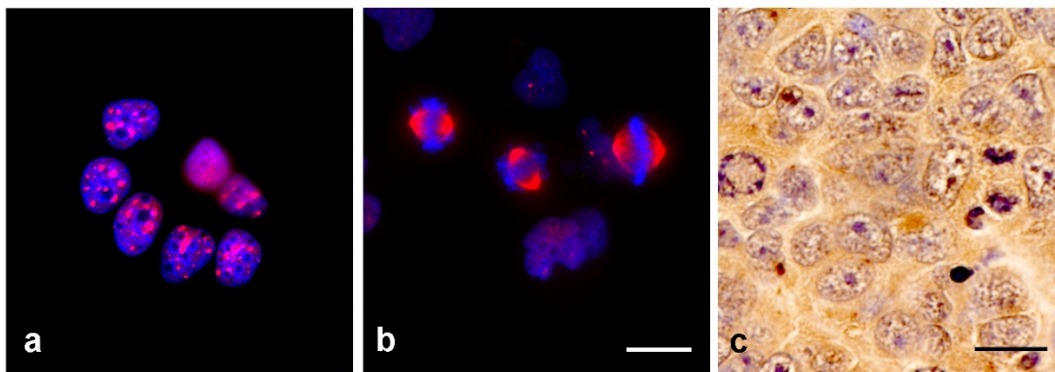
Protein TPX2 je regulátor buněčného dělení asociovaný s mikrotubuly. Bylo prokázáno, že TPX2 je často aberantně exprimován v nádorových buňkách a představuje nový marker pro diagnózu a prognózu různých typů nádorů. Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. byla připravena protilátka, která v imunoblotingu reaguje specificky s lidským TPX2. Pro širší využitelnost této protilátky byla v rámci projektu TAČR-Gama stanovena její reaktivita a specifita v dalších testech. Byla rovněž určena sekvence rozpoznávaného epitopu. Výsledky ukázaly, že myší monoklonální protilátka TPX2-01 (IgG1, kapa) je použitelná pro ELISA testy (**Obr. 1A a 1B**), imunobloting na buněčných liniích různého druhového a tkáňového původu (**Obr. 2A a 2B**) a imunoprecipitaci (**Obr. 2C**). Protilátka značí TPX2 jak v imunofluorescenční mikroskopii (**Obr. 3a-b**), tak na parafinových řezech (**Obr. 3c**). Pomocí “pulldown” experimentů byla určena oblast vazby protilátky na molekule proteinu (**Obr. 4A**). Pomocí imobilizovaných syntetických peptidů bylo v této oblasti určeno vazebné místo pro protilátku. (**Obr. 4B**). Protilátka TPX2-01 rozpoznává sekvenci 636EPFVPKKEKKS646 (**Obr. 4C**), která je exponována na povrchu TPX2 molekuly.



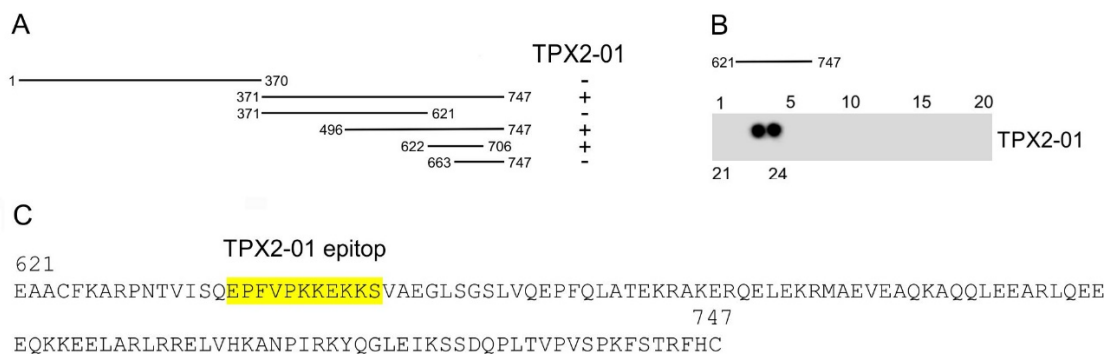
Obr. 1. ELISA testy s TPX2-01. (A) Titrační analýza vazby protilátky ve formě supernatantu z hybridomových buněk na imobilizovaný TPX2 protein. Domény 371-747 (obsahuje cílový epitop) a 1-370 (negativní kontrola) byly imobilizovány v koncentraci 20 µg/ml. NŘ, neředěná protilátka. (B) Detekce imobilizovaného GST-TPX2 proteinu pomocí TPX2-01 a protilátky proti tubulinu (negativní kontrola). Protilátky byly použity ve formě supernatantu.



Obr. 2. Analýza exprese TPX2 proteinu v buněčných liniích (A-B) a jeho imunoprecipitace (C) s využitím protilátky TPX2-01. (A) Imunoblot celkových buněčných lyzátů, solubilizovaných v SDS-vzorkovém pufru, lidských linií. (B) Imunoblot buněčných lyzátů myších (P19, NIH 3T3, Neuro-2a) a krysích (RBL-2H3, L6) linií. Aktin, kontrola nanášky buněčných lyzátů. (C) Imunoprecipitace z extraktu jader lidských buněk HEK293 v RIPA pufru. Protilátka, imobilizovaná protilátka bez extraktu; Nosič, protein G bez protilátky inkubovaný s extraktem. K imunoprecipitaci i imunoblotingu byla použita protilátka TPX2-01.



Obr. 3. Lokalizace TPX2 v lidské glioblastomové linii T98G (a-b) a v nádoru mozku (c) pomocí protilátky TPX2-01. (a-b) Nepřímá imunofluorescence na buňkách fixovaných formaldehydem a extrahovaných Tritonem X-100. DNA je značena pomocí DAPI. V interfázních buňkách je protein v jádře (a), v mitóze na mitotickém vřeténku (b). (c) Řez lidským gliomem v myším mozku (orthotopic xenograft, lidské U87MG glioblastomové buňky). Materiál byl fixován formaldehydem a poté zalit do parafinu. Detekce protilátky pomocí avidin-biotin peroxidázového komplexu a DAB. Dobarvení jader hematoxylinem. Úsečka je 20 μ m.



Obr. 4. Identifikace epitopu rozpoznávaného TPX2-01. (A) Analýza reaktivity protilátky s GST-konstrukty TPX2 proteinu (+) lokalizovala cílový epitop do oblasti 622-662 AA. (B) Epitopové mapování s využitím imobilizovaných syntetických peptidů pokrývajících oblast 621-747 AA (15-mer, překryv 10 AA). (C) Pozice epitopu rozpoznávaného TPX2-01.

Závěr: Výsledky ukazují, že myší monoklonální protilátka TPX2-01 (IgG1, kapa) má vlastnosti, které ji předurčují pro užití v ELISA testech, imunoblotingu, imunoprecipitaci, imunocytochemických i histochemických experimentech. U protilátky TPX2-01 byla identifikována sekvence rozpoznávaného epitopu.

V případě zájmu o další informace anebo zakoupení neexklusivní licence na hybridom produkující protilátku TPX2-01 se obraťte na **Centrum pro Transfer Technologíí**, ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. (420-241 063 227 nebo 420-602 892 876).