

## **PRIPRAVA S PEROKSIDAZO KONJUGIRANIH MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI KOKOŠJIM IMUNOGLOBULINOM RAZREDA G (IGY)\***

Mateja REJC<sup>a)</sup>, Mojca NARAT<sup>b)</sup>, Dušan BENČINA<sup>c)</sup> in Franc HABE<sup>č)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija.

<sup>b)</sup> Isti naslov, doc., dr., mag., e-pošta: [mojca.narat@bfro.uni-lj.si](mailto:mojca.narat@bfro.uni-lj.si).

<sup>c)</sup> Isti naslov, znanst. svetnik, dr., mag.

<sup>č)</sup> Isti naslov, prof., dr.

Delo je prispelo 30. marca 2000, sprejeto 10. julija 2000.

Received March 30, 2000, accepted July 10, 2000.

### **IZVLEČEK**

V intenzivni perutninski proizvodnji so okužbe s patogenimi mikroorganizmi relativno pogoste in lahko povzročajo veliko gospodarsko škodo. Večino okužb z bakterijami in virusi je mogoče ugotoviti posredno z dokazom specifičnih protiteles. Največ se uporabljajo posredni imunoencimski preskusi, v katerih se v serumu dokazujejo specifična protitelesa iz razreda imunoglobulinov Y (IgY), ki so ptičji homolog sesalskemu razredu G (IgG). V takih preskusih so poleg specifičnih antigenov potrebna tudi z encimom označena protitelesa, ki se vežejo na IgY. Iz rumenjaka kokošnjega jajca smo izolirali IgY, z njimi imunizirali miš BALB/c in pripravili monoklonska protitelesa (mAb) proti kokošjim IgY ter jih označili kot mAb M2. Mab M2 so reagirala s kokošnjimi, puranjimi, fazanjimi in pavjimi IgY. Determinanta, ki jo prepoznavajo mAb M2, je na težki verigi IgY molekule in verjetno ni glikozilirana. Pridobljenim mAb M2 smo določili optimalno pH vrednost, optimalno delovno koncentracijo v neposrednem imunoencimskem preskusu in ocenili afiniteto vezave. MAb M2 smo konjugirali s hrenovo peroksidazo in preizkusili delovanje konjugata, imenovanega M2-p. M2-p se je vezal na kokošje IgY v pH območju 3-11, kar kaže na visoko afiniteto vezanja. Dosedanji rezultati kažejo, da je M2-p primeren za imunoencimske preskuse s katerimi dokazujejo specifična protiteles razreda IgY pri kokoših, puranih, fazanih in pavih.

Ključne besede: perutnina / imunologija / imunoglobulini Y / monoklonska protitelesa / konjugacija / peroksidaza / konjugirana protitelesa

## **PREPARATION OF PEROXIDASE CONJUGATED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST G CLASS OF CHICKEN IMMUNOGLOBULINS (IGY)†**

### **ABSTRACT**

Infections of poultry with pathogen microorganisms are relatively frequent and can cause great economic loss. Most of bacterial or virus infections can be indirectly detected by demonstration of specific antibodies. The most frequently used are indirect immunoenzyme assays where specific serum immunoglobulins of class Y (IgY), which is an avian homologue of mammals' class G (IgG), are demonstrated. Beside the appropriate antigen in such assays, the secondary antibodies against chicken IgY, conjugated with enzyme are necessary. IgY isolated from

---

\* Prispevek je del diplomske naloge (zagovor 22. junija 1999), mentor prof. dr. Franc Habe, somentorica doc. dr. Mojca Narat.

† The paper is a part of graduation thesis (justification June 22, 1999), supervisor prof. Franc Habe, Ph.D., co-advisor ass.prof. Mojca Narat, Ph.D.

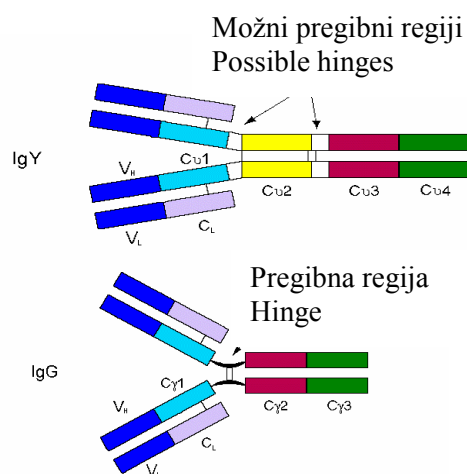
chicken egg yolk were used for immunization of BALB/c mice and monoclonal antibodies (mAb), designated M2 were designed and conjugated with horseradish peroxidase (M2-p). MAb M2 recognized determinants on chicken, turkey, pheasant and peacock IgY. Determinant is a part of heavy chain of chicken IgY and is probably not glycosylated. For use of conjugate M2-p in direct immuno-enzyme assays pH optimum, optimal working dilution and affinity were determined. Very wide range of pH (from 3 to 11) values, where mAb M2 reacts with IgY indicates a high affinity of binding. Results obtained so far indicate that our conjugate M2-p is appropriate for use in immunoenzyme assays for detection of specific antibodies IgY in chicken, turkey, pheasant and peacock.

Key words: poultry / immunology / immunoglobulins Y / monoclonal antibodies / conjugation / peroxidase / conjugated antibodies

## UVOD IN PREGLED OBJAV

Imunoglobulini razreda Y (IgY) so tipični imunoglobulini (Ig) pri pticah, plazilcih in dvoživkah in najverjetneje tudi pri ribah pljučaricah. Predstavljajo 30% vseh beljakovin v rumenjaku oz. 5,3% celotnega rumenjaka (Bell in Freeman, 1971a; Bell in Freeman, 1971b). Iz seruma kokoši se IgY prenesejo v rumenjak in preko rumenjakeve vrečke v krvni obtok zarodka. Koncentracija maternalnih IgY v serumu potomca v prvih dneh po izvalitvi narašča, po dveh do treh tednih po izvalitvi pa materini IgY izginejo. To je bilo ugotovljeno za piščance in purančke in morda velja tudi za druge ptice. Piščanec začne proizvajati lastne IgY 2.-7. dan, IgM 2.-4. dan, IgA pa 6.-13. dan po izvalitvi (Kaspers in sod., 1991). Razpolovna doba IgY v rumenjaku je zaradi časa, ki je potreben, da zarodek popolnoma absorbira rumenjaka, dvakrat daljša od razpolovne dobe IgY v serumu odrasle kokoši. Identičnost Ig iz kokošnjega seruma in Ig iz rumenjaka so dokazali z dvojno difuzijo po Ouchterlonyju (Pastoret in sod., 1998). Iz seruma se v rumenjaku prenašajo izključno IgY, v beljaku pa so poleg IgY dokazali tudi nizke koncentracije IgA in IgM (Rose in sod., 1974). Koncentracija IgY v rumenjaku je 10-15 mg/ml (Shade in sod., 1991) in je približno dvakrat večja od koncentracije IgY v kokošnjem serumu (5-7 mg ml<sup>-1</sup>) (Toivanen, A. in Toivanen, T., 1987).

Molekula IgY je sestavljena iz dveh težkih ( $\nu$ ) in dveh lahkih ( $\lambda$ ) verig in ima molekulsko maso 180 kDa. Pri primerjavi konstantnih regij kokošnjih IgY in IgG primatov se je pokazalo, da so si domene Cv3 in Cv4 verige  $\nu$  in C $\gamma$ 2 in C $\gamma$ 3 verige  $\gamma$  zelo sorodne (slika 1).



Slika 1. Struktura kokošnjih IgY in IgG primatov (Warr in sod., 1995).

Figure 1. Structure of chicken IgY and primate IgG (Warr *et al.*, 1995).

Kokošja jajca so bogato skladišče IgY in za pridobitev le teh ni potrebno žrtvovati živali. Za preučevanje strukture, različnih lastnosti, funkcije, ontogenetskega in filogenetskega razvoja kokošjih IgY so zelo primerno orodje protitelesa proti kokošjim IgY. Prav tako so takšna protitelesa nepogrešljiva za izvedbo seroloških diagnostičnih tehnik, s katerimi ugotavljamo koncentracije specifičnih IgY in tako posredno okužbe z različnimi mikroorganizmi.

Protitelesa proti kokošjim IgY so lahko poliklonskega (pAb) ali monoklonskega (mAb) izvora. Encimsko označena kunčja protitelesa proti kokošjim IgY so uporabili za preverjanje vsebnosti kokošjih IgY v vzorcih iz jajčnega rumenjaka. Z različnimi metodami so kokošje IgY izolirali iz rumenjaka, beljakovine ločili z elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS) in prenesli na membrano. Po inkubaciji v kunčjih protitelesih proti kokošjim IgY, konjugiranih s peroksidazo oz. fosfatazo, so preverili navzočnost kokošjih IgY oz. delov, dobljenih po encimski obdelavi kokošjih IgY, v vzorcih iz jajčnega rumenjaka (Shade in sod., 1991; Bhanushali in sod., 1994; Akita in Nakai, 1992; Akita in Nakai, 1993).

S pomočjo encimsko označenih poliklonskih protiteles, specifičnih za različne kokošje celice in tkiva, so v zamrznjenih tkivnih rezinah ugotavljali filogenetske sorodnosti in razlike kokoši z drugimi pticami. Specifična protitelesa proti kokošjim celicam T pomagalkam, limfocitom B, ki na površini izražajo in v citoplazmo izločajo IgM in IgY ter enojedrnim fagocitom, so prepoznala te celice tudi v tkivnih rezinah puranov in prepelic. Rezultati so pokazali največjo sorodnost kokoši s purani in prepelicami, kokošim manj sorodne pa so race (Jeurissen in Janse, 1998).

Čeprav je proizvodnja mAb dražja od pridobivanja poliklonskih protiteles, je zelo pomembna, saj omogoča oblikovanje specifičnosti protiteles po želji proizvajalca, vir vedno enakih protiteles pa je stalen.

S pomočjo mAb proti kokošjim IgY so ugotavljali reaktivnost z Ig iz puranjega seruma. Z imunoencimskim preskusom so pokazali, da so pridobljena mAb proti kokošjim IgY prepoznavala tudi epitope na IgY iz puranjega seruma in iz tega sklepali na filogenetsko sorodnost obeh ptičjih vrst (Nerom in sod., 1997). MAb proti kokošjim Ig omogočajo tudi oblikovanje specifičnega imunoencimskega preskusa (»sendvič« ELISA) z možnostjo odkrivanja nanogramskih količin kokošjih IgY v vzorcih (Erhard in sod., 1992).

## MATERIAL IN METODE

### Izolacija IgY

Po navodilih proizvajalca (gamma Yolk Instructions) kita gammaYolk<sup>TM</sup> (Pharmacia Biotech, Code No 17-1451-01) smo iz kokošjega rumenjaka izolirali kokošje IgY .

### Imunizacija

Pri prvi imunizaciji smo miši BALB/c (IRB, Zagreb) intraperitonealno (ip) vbrizgali 200 µl mešanice, pripravljene iz izoliranih kokošjih IgY (80 µg) in kompletnega Freundovega adjuvansa v enakih volumskih razmerjih. Druga in tretja imunizacija, izvedeni 18 in 38 dni po prvi, sta bili prav tako izvedeni ip z 200 µl enako pripravljene mešanice, le da je vsebovala nekompletni Freundov adjuvans.

### Posredni imunoencimski preskus (IDIBA, Indirect dot-immunobinding assay)

Po vsaki imunizaciji smo v mišjem serumu preverili vsebnost specifičnih protiteles proti kokošjim IgY z IDIBA na nitrocelulozni membrani (Benčina in sod., 1994). Na membranske

trakove smo nanесли po 2  $\mu$ l kokošnjih IgY, izoliranih iz rumenjaka in zredčenih v PBS (pH= 7,2) 1:100, membrano blokiralі s PBS z 0.5% Tween 20 (0,5% PBST), in posamezne trakove inkubiralі v kozjih protitelesih proti mišnjim IgG, konjugiranih s peroksidazo, redčenih v PBS 1:2000. Po dodatku substrata (TRUE BLUE, Kirkegaard & Perry L.) so se v primeru pozitivnih reakcij na ustreznih mestih pojavili modro obarvani produkti.

## **Fuzija**

Po standardnem postopku (Goding, 1986) smo s polietilenglikolom izvedli fuzijo med vraničnih celic imunizirane miši z mielomskimi celicami linije NS-0. Hibridomske celice smo vzgajali v selektivnem mediju HAT z 20% telečjim serumom in po dohranjevanju pridobili stabilne klone hibridomov.

## **Izbor hibridomov**

Z IDIBA smo v vseh supernatantih stabilnih klonov preverili vsebnost mAb proti kokošnjim IgY. Preskus smo izvedli na že opisan način (Benčina in sod., 1994), le da smo v tem primeru namesto v redčinah mišjega seruma membranske trakove inkubiralі v posameznih supernatantih hibridomov, zredčenih v PBS 1:5. V primerih, ko smo ugotovili prisotnost mAb proti kokošnjim IgY, smo dodatno preverili, če ta mAb prepoznavajo tudi epitope na puranjih in fazanjih IgY. Poleg preskusa na membranah smo uporabili tudi posredni imunoperoksidazni preskus na kolonijah celic mikoplazem (IIPA), ki se uporablja za dokazovanje specifičnih protiteles v serumih perutnine, ki je bila okužena z mikoplazmami (Benčina in sod., 1991, Narat in sod., 1998).

Izbrane klone hibridomov smo kloniralі z metodo razredčevanja (Goding, 1986). Mab M2 smo izoliralі iz supernatanta klona hibridomov s hidroksiapatitno kromatografijo (Bukovsky in Kennett, 1987) in jih označili s hrenovo peroksidazo (Avrameas in Ternynick, 1969). Konjugat smo označili kot M2-p.

Z neposrednim imunoencimskim preskusom na membrani (DIBA), kjer smo kot sekundarna (s proksidazo označena) protitelesa uporabili naš konjugat M2-p, smo preverili, če pridobljena mAb morebiti reagirajo tudi z Ig iz serumov drugih vrst ptic in nekaterih sesalcev (preglednica 1, slika 2).

## **Značilnosti mAb proti kokošnjim IgY**

Specifičnost s peroksidazo konjugiranih mAb proti kokošnjim IgY (mAb M2-p) smo preverili z SDS-elektroforezo in imunoblotom. Za ločevanje težkih in lahkih verig kokošnjih IgY smo izvedli SDS elektroforezo v poliakrilamidnem gelu (PhastGel, Gradient 8-25) z dodatkom reducirajočega agensa merkaptetanola po navodilih proizvajalca (PhastSystem, User Manual, 1991, Pharmacia, LKB). Ločene beljakovine smo z uporabo PhastSystem z gela prenesli na membrano Immobilon P (Milipore) (Benčina in sod., 1994). Membrano smo najprej inkubiralі v raztopini mAb proti lahkim verigam kokšnjih IgY in nato v raztopini ustreznih sekundarnih protiteles (proti mišnjim IgG), označenih s peroksidazo. Po dodatku substrata DAB, ki daje rjavo obarvane produkte, smo opazovali nastanek pozitivne reakcije. Po spiranju smo isto membrano inkubiralі še v raztopini mAb M2-p in po dodatku substrata TRUE BLUE, ki daje modro obarvane produkte, spet opazovali nastanek pozitivne reakcije.

Z DIBA smo mAb M2-p določili optimalno delovno razredčino, območje pH za vezavo mAb na kokošje IgY, čas inkubacije v direktnem imunoencimskem preskusu in dokazali uporabo mAb pri določanju koncentracije IgY v različnih vzorcih. DIBA preskuse smo izvedli tako, da smo na membranske trakove nanесли po 2  $\mu$ l kokošnjih IgY, izoliranih iz rumenjaka, zredčenih v PBS (pH= 7.2) 1:50. Po blokadi v 0.5% PBST smo trakove inkubiralі v redčinah mAb-M2-p v PBS

(1:100, 1:500, 1:1000-10000). Reakcijo smo ocenili po spiranju v 0,05% PBST in nanosu substrata.

Pri izvedbi direktnega imunoencimskega preskusa za določitev območja pH smo mAb M2-p zredčili v PBS z različnimi vrednostmi pH (3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12).

Pri določanju časa inkubacije, ki je potreben za pozitivno reakcijo mAb M2-p, smo trakove, na katere smo nanесли kokošje IgY, inkubirali v mAb M2-p 5, 10, 15, 20, 25 ali 30 minut.

Izvedli smo tudi primerjalni preskus komercialnega konjugata (kunjci IgG proti kokošjim IgY, označeni s proksidazo, Sigma A-9046) in pridobljenega konjugata mAb M2-p. Na trakove smo nanесли dvakratne redčine kokošnjega seruma v PBS (1:100-1:12800), alantoino tekočino, izpirke iz oviduktov, sapnikov, tekočino podočesnega sinusa (fazana), rumenjaka in beljak kokošnjih jajc in tekočine kokošnjih zarodkov (amnionska tekočina, žolč, krvna plazma, črevesna tekočina).

### **Značilnosti epitopa na kokošnjih IgY**

Z obdelavo kokošnjih IgY s perjodno kislino smo ugotavljali, če so sladkorji del antigenske determinante, proti kateri so usmerjena pridobljena mAb M2-p (Woodward in sod., 1985).

## **REZULTATI IN RAZPRAVA**

Z uporabo specifičnih protiteles, ki so bila označena s peroksidazo, smo dokazali, da vzorci beljakovin, izoliranih iz rumenjaka, vsebujejo kokošje IgY. Iz 10 ml rumenjaka smo izolirali 12,94 mg kokošnjih IgY.

Čistost kokošnjih IgY smo preverili z SDS-elektroforezo v reducirajočih pogojih. V preiskovanem vzorcu razen IgY nismo zasledili drugih beljakovin (slika 3, steza A, 2).

Z IDIBA smo v serumu imunizirane miši (zredčenem v PBS 1:100) dokazali protitelesa proti kokošnjim IgY.

Po fuziji vraničnih celic imunizirane miši in mielomskimi celicami linije NS-0 smo v selektivnem mediju vzgojili stabilne hibridome v 53 luknjicah. Z IDIBA in IIPA smo v 15 celičnih supernatantih dokazali protitelesa proti kokošnjim IgY in da so v 4 od teh 15 supernatantih protitelesa, ki prepoznavajo poleg epitopov na kokošnjih IgY tudi epitope na puranjih in fazanjih IgY. Od teh štirih smo izbrali hibridome v luknjici 1F5, jih dvakrat klonirali, preskušali aktivnost mAb in na koncu izbrali klon 1F5/3G2. MAb, ki jih je ta klon sintetiziral, smo poimenovali mAb M2.

S setom specifičnih protiteles za določanje izotipa mišjih Ig (Sigma, ISO-2) smo ugotovili, da so mAb M2, ki jih izločajo hibridomi 1F5/3G2, izotip IgG<sub>1</sub>.

V direktnem imunoencimskem preskusu (sobna temperatura, čas inkubacije 30 min) je bila največja redčitev konjugata M2-p v PBS s pH 7,2, ki je še dala pozitivno reakcijo 1:6000.

V primerjalnem indirektnem imunoencimskem preskusu so mAb M2-p reagirala vsaj tako dobro kot poliklonska Ab proti kokošnjim IgY, označena s peroksidazo.

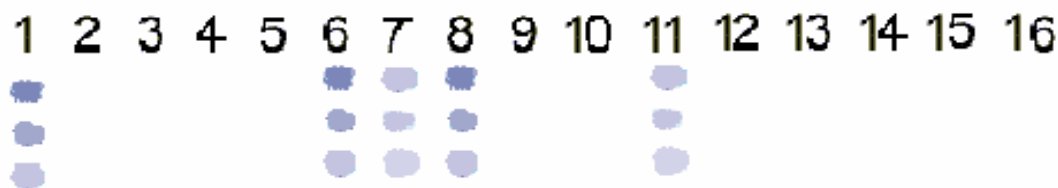
Pri preverjanju reaktivnosti mAb M2-p z IgY drugih vrst ptic in Ig nekaterih sesalcev, prikazanih v preglednici 1, so pozitivno reagirali IgY iz seruma kokoši (št. 1), seruma 1 dan starega piščanca (št.6), serumov fazana (št. 7), purana (št.8) in pava (št.11). Mab M2-p niso reagirali z IgY iz serumov vrabca, papige, kanarčka, goloba in preskušanih sesalcev (Slika 2). V podobnem preskusu smo dokazali, da mAb M2-p ne reagirajo z IgY iz rumenjaka prepelice, japonske prepelice, race, gosi, jerebice in noja.

Preglednica 1. Shema direktnega imunoencimskega preskusa na membrani za preverjanje reakcije mAb M2-p z Ig v serumih drugih vrst ptic in sesalcev

Table 1. Direct DIBA for the reaction of mAb M2-p with Ig in serum of different birds and mammals

Ag (serum )		Kokoš / hen	Vrabc / sparrow	Papiga / parrot	Kanarček / canary	Golob / pigeon	Piščanec /chicken	Fazan / pheasant	Puran / turkey	Kunec / rabbit	Svinja / pig	Pav / peacock	Noj / ostrich	Človek / human	Govedo / cattle	Konj / horse	Miš / mouse
Pozicija position		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Redčine seruma	1:25	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	1:50	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Dilution of serum	1:100	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

+ pozitivna reakcija / positive reaction; - negativna reakcija / negative reaction



Slika 2. Reakcija mAb M2-p z Ig v serumu drugih vrst ptic in sesalcev v direktnem imunoencimskem preskusu na membrani.

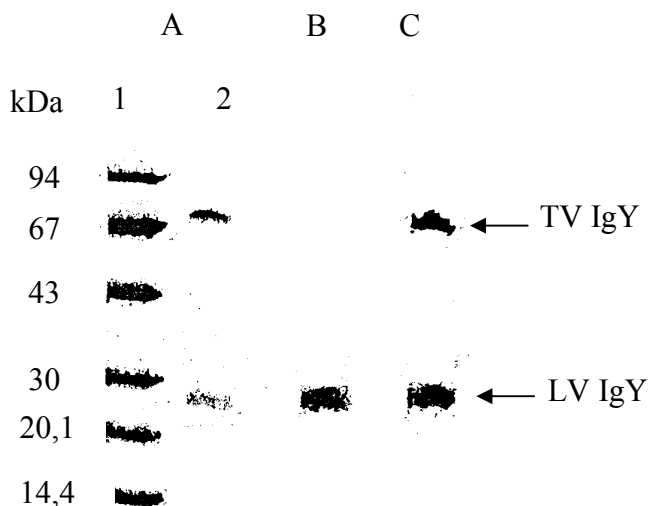
Figure 2. Reaction of mAb M2-p with Ig in serum of different birds and mammals in DIBA.

Na kokošje IgY so se mAb M2-p vezala v območju z vrednostmi pH od 3 do 10,5, kar kaže na visoko afiniteto vezanja mAb M2-p na kokošje IgY.

Z neposrednim imunoencimskim preskusom smo ugotovili, da 15 minutna inkubacija kokošjih IgY v mAb M2-p zadošča za pozitivno reakcijo, podaljševanje časa pa na vezavo ne vpliva bistveno.

Membrano Immobilon P, na katero smo z gela prenesli ločene verige kokošjih IgY, smo zaporedno inkubirali v raztopinah dveh različnih mAb in vsakič uporabili drug substrat. Najprej smo inkubirali v mAb proti lahkim verigam kokošjih IgY (Sigma) in v kozjih Ab proti mišjim IgG (sekundarna protitelesa), konjugiranih s peroksidazo (Sigma, A-9046), ter uporabili substrat DAB, ki se ob pozitivni reakciji obarva rjavo. Rjavo obarvana proga je bila na položaju, ki glede na molekularne označevalce ustreza velikosti manj kot 30 kDa, kar je ustrezalo lahkim verigam kokošjih IgY (slika 3, steza B).

V drugi fazi smo isto membrano inkubirali v mAb M2-p in substratu TRUE BLUE, ki pri pozitivni reakciji da modro barvo. Pri približno 70 kDa se je modro obarvala proga, za katero sklepamo, da predstavlja težke verige kokošjih IgY (slika 3, steza C).



Slika 3. SDS elektroforeza in imunoblot kokošjih IgY. **A**, beljakovine, uporabljene kot označevalci za molekulske mase (steza 1) in IgY iz rumenjaka kokošjega rumenjaka (redčeni 1:15) (steza 2) po SDS-elektroforezi in barvanju s Coomassie. **B**, imunoblot steze 2: po inkubaciji z mAb proti lahkim verigam kokošjih IgY (primarna protitelesa) in s peroksidazo konjugiranimi Ig proti mišjim IgG, kjer so se po reakciji z DAB reagirale lahke verige. **C**, ista membrana po zaporednem inkubiranju z M2-p in TRUE BLUE, kjer so se modro obarvale beljakovine težkih verig IgY. Puščici kažeta težke verige (modro obarvane, TV IgY, več kot 67 kDa) in na lahke verige (rjavo obarvane, LV IgY, manj kot 30 kDa)

Figure 3. SDS PAGE and immunoblot of hen IgY. **A**, molecular mass markers (lane 1) and IgY from hen egg yolk (1:15) (lane 2), separated with SDS PAGE and stained with Coomassie. **B**, immunoblot of lane 2: after incubation with mAb against light chains of hen IgY (primary antibodies) and with mAb against mouse IgG conjugated with peroxidase (secondary antibodies) substrate DAB was used to develop positive reaction of light chains. **C**, the same membrane after additional incubation with M2-p and TRUE BLUE. Blue band represents heavy chains of hen IgY. Arrows indicate heavy chain (blue colour, TV IgY, more than 67 kDa) and light chains (brown colour, LV IgY, less than 30 kDa).

Z imunoblotom smo dokazali, da mAb M2 prepoznavajo determinanto na težki verigi v kokošjih IgY (slika 3, steza C). Po inkubaciji membrane, na katero so bile prenesene beljakovinske podenote kokošjih IgY, z mAb M2-p, se je razvila reakcija na položaju 67-70 kDa, ki je značilna za težke verige kokošjih IgY (Warr in sod., 1995).

MAb M2-p so zaradi visoke afinitete vezanja in prepoznavanja IgY kokoši, puranov, fazanov in pavov uporabna pri teh vrstah perutnine v diagnostiki bolezni za dokaz specifičnih IgY, ki se sintetizirajo v protitelesnem odzivu ptic. Z njimi lahko posredno dokažemo najrazličnejše okužbe ali pa spremljamo učinkovitost cepljenja, npr. po cepljenju proti kokošji kugi, kjer je preiskovanje učinkovitosti cepljenja predpisano po zakonskih določilih.

Z uporabo Ab M2-p smo skrajšali čas izvedbe seroloških preskusov, ker preskus poteka v eni stopnji namesto v dveh.

MAb M2-p omogočajo določitev relativnih koncentracij IgY in dokaz specifičnih IgY tudi v vzorcih, ki jih v rutinski serološki diagnostiki zelo redko preiskujemo. Rezultati določanja relativnih koncentracij IgY v alantoični, amnijski tekočini in drugih vzorcih z uporabo mAb M2-p so bili enaki ali zelo podobni tistim, ki smo jih dobili z uporabo kupljenih označenih pAb proti kokošjim IgY.

Mab M2-p so bila zelo uporabna tudi za analize IgY proti beljakovinam mikoplazem in virusa atipične kokošje kuge. Profili barvanja beljakovin so pokazali, da mAb M2 reagirajo le z IgY, saj so mAb proti kokošjim IgA in IgM v primerjalnih imunoblotih pokazali drugačen profil prepoznavanja beljakovin *M. gallisepticum* (neobjavljeni podatki).

MAb M2 so primerna tudi za ločevanje IgY od drugih Ig v imunoafinitetni kromatografiji. Po vezavi mAb M2 na primeren nosilec pa lahko iz različnih vzorcev izoliramo tudi Ag iz imunskega kompleksa (Ag-kokošji IgY), ki bi se preko kokošjih IgY vezal na mAb M2 na nosilcu. Teoretično bi se namreč pri izpiranju kolone s pufrom s pH 3 v imunskem kompleksu prekinila manj stabilna vez med Ag in kokošjimi IgY, Ag bi se iz kolone izpral, medtem ko bi imobilizirana mAb M2 v koloni zadržala kokošje IgY, ker se ta vez prekine šele pri pH < 3.

Klon 1F5/3G2, ki proizvaja mAb M2, je stabilen, saj smo zamrzovanje in tajanje večkrat ponovili. Vsakokrat je po nekaj dneh gojenja dosegel optimalno rast in izločal mAb z istimi lastnostmi. Ta in ostali izbrani kloni so shranjeni v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete. Tako lahko mAb M2 še naprej pridobivamo v večjih količinah in jih na dovolj enostaven način označimo tudi s fluorokromom (M2-f) (Goding, 1976) ali drugim encimom (npr. alkalno fosfatazo) (Avrameas in Ternynck, 1969), ki se tudi uporabljajo v diagnostiki perutninskih bolezni (Whiteman, 1996).

## SUMMARY

Anti chicken IgY peroxidase conjugated monoclonal antibodies were prepared in our laboratory to study immunodominant proteins of *Mycoplasmas*. Chicken IgY were isolated from egg yolk using Gamma Yolk<sup>TM</sup> kit (Pharmacia) and used for the immunisation of BALB/c mice. Three days after the last immunisation the fusion between mice spleen cells and NS-0 myeloma cells was performed using polyethylene glycol. Supernatants of stable hybrid clones were tested for the presence of specific antibodies against chicken, turkey and pheasant IgY. The most stable clone, 1F5/3G2 was used for the production of mAb named M2, while some other useful clones were frozen in liquid nitrogen.

Monoclonal antibodies M2 produced by 1F5/3G2 clone were isolated from the cell culture supernatant using hydroxiapatit chromatography and conjugated to horseradish peroxidase. The specificity of peroxidase conjugated mAb M2-p was tested using SDS electrophoresis and immunoblotting. MAb M2-p recognised determinants on heavy chains of chicken, turkey, pheasant and peacock serum IgY. They did not react with IgY of phylogenetically distant species as ducks, geese, ostriches, quails, Japanese quails, partridges, pigeons, canaries, sparrows, parrots. IgY determinants recognised by mAb M2-p were located in constant regions of heavy v chains, which are not changed during the glycosilation.

Results of immunoency assays on membrane using our mAb M2-p correlated with the results of the same assays using commercially available peroxidase conjugated polyclonal antibodies against chicken IgY.

Some other characteristics, such as temperature and pH optimum, time of incubation with antigen, affinity, optimal dilution, of M2-p, important for the use of this antibody in direct immunoenzyme tests were also determined.

## VIRI

- Akita, E.M./ Nakai, S. Comparison of four purification methods for production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E.coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, 160(1993), 207-214.
- Akita, E.M./ Nakai, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science*, 57(1992), 629-634.
- Avrameas, S./ Ternynck, T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry*, 6(1969), 53-66.
- Bell, D.J./ Freeman, B.M. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Vol. 3, London, Academic Press, 1971a, 1385-1391.



- Bell, D.J./ Freeman, B.M. Physiology and biochemistry of the domestic fowl. Vol. 4. London, Academic Press, 1971b, 330-332.
- Benčina, D./ Kleven, S.H./ Elfaki, M.G./ Snoj, A./ Dovč, P./ Dorrer, D./ Russ, I. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. Avian Pathology, 23(1994), 19-36.
- Benčina, D./ Svetlin, A./ Dorrer, D./ Tadina-Jakšič, T. Humoral and local antibodies in chickens with mixed infection with three Mycoplasma species. Avian Pathology, 20(1991), 325-334.
- Bhanhushali, J./ Gilbert, J.M./ Mc Dougald, P.O. Simple method to purify chicken immunoglobulin G. Poultry Science, 73(1994), 1158-1161.
- Bukovsky, J./ Kennett, R.H. Simple and rapid purification of monoclonal antibodies from cell culture supernatants and ascites fluids by hydroxyapatite chromatography on analytical and preparative scales. Hybridoma, 6(1987), 219-228.
- Erhard, M.H./ Von Quistorp, I./ Schraner, I./ Jüngling, A./ Kaspers, B./ Schmidt, P./ Kühlmann, R. Development of specific enzyme-linked immunosorbent antibody assay system for the detection of chicken immunoglobulins G, M and A using monoclonal antibodies. Poultry Science, 71(1992), 302-310.
- Goding, J.W. Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modification to the standard methods. Journal of Immunological Methods, 13(1976), 215-226.
- Goding, J.W. Monoclonal antibodies: principle and practise. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press, 1986, 25-34.
- Jeurissen, S.H./ Janse, E.M. The use of chicken-specific antibodies in veterinary research involving three other avian species. Veterinary Quarterly, 20(1998), 140-143.
- Kaspers, B./ Schraner, I./ Losch, U. Distribution of immunoglobulins during embryogenesis in the chicken. Zentralblatt für Veterinärmedizin, 38(1991), 73-79.
- Narat, M./ Benčina, D./ Kleven, S.H./ Habe, F. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. Infections and Immunity, 66(1998), 6004-6009.
- Nerom, A.V./ Ducatelle, R./ Haesebrouck, F./ Arnouts, S./ Goddeeris, B./ Davison, T.F./ Kaspers, B. Monoclonal and polyclonal antibodies to chicken immunoglobulin isotypes specifically detect turkey immunoglobulin isotypes. Veterinary Immunology and Immunopathology, 57(1997), 305-314.
- Pastoret, P./ Griebel, P./ Bazin, H./ Govaerts, A. Handbook of vertebrate immunology. San Diego, Academic Press. 1998, 73-117.
- Rose, M.E./ Orleans, E./ Butress, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: Their segregation in yolk and white. European Journal of Immunology, 4(1974), 521-523.
- Shade, R./ Pfister, C./ Halatsch, R./ Henklein, P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk - an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. ATLA, 19(1991), 403-419.
- Toivanen, A./ Toivanen, P. Avian immunology: basis and practise. Vol. 1, New York, CRC Press, Inc. 1987, 115.
- Warr, G.W./ Magor, K.E./ Higgins, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunology today, 16(1995), 392-398.
- Whiteman, C. Whiteman and Bickfords avian disease manual. 4<sup>th</sup> ed. Kennett Square, American Association of Avian Pathologists, 1996, 154-163.
- Woodward, M.P./ Young jr., W.W./ Bloodgood, R.A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. Journal of Immunological Methods, 78(1985), 143-153.