



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103842820 A

(43) 申请公布日 2014.06.04

(21) 申请号 201280039016.2 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2012.08.10 *G01N 33/543* (2006.01)
(30) 优先权数据 *G01N 1/28* (2006.01)
2011-176272 2011.08.11 JP *G01N 33/48* (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *G01N 33/53* (2006.01)
2014.02.10
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2012/070570 2012.08.10
(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/022107 JA 2013.02.14
(71) 申请人 大塚制药株式会社
地址 日本东京都
申请人 国立大学法人东京医科齿科大学
(72) 发明人 佐佐木成 大本安一 森丰树
岩田房子 村口正宏
(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
代理人 杨宏军

权利要求书1页 说明书21页
序列表2页 附图10页

(54) 发明名称

对含有蛋白的生物样品进行预处理的方法

(57) 摘要

本发明提供了在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法。所述方法包括下述步骤:(1)在高于-80℃的温度下、特别是在-70℃或更高的温度下冷冻生物样品;(2)解冻经冷冻的生物样品;和(3)使用表面活性剂对生物样品进行增溶。

1. 在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (1) 在高于 -80°C 的温度下冷冻所述生物样品;
- (2) 解冻经冷冻的生物样品; 和
- (3) 使用表面活性剂对生物样品进行增溶。

2. 在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (2') 对在高于 -80°C 的温度下冷冻的生物样品进行解冻; 和
- (3) 使用表面活性剂对生物样品进行增溶。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的预处理方法, 其中所述生物样品是动物的体液, 所述动物包括人。

4. 根据权利要求 3 所述的预处理方法, 其中所述体液为尿。

5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的预处理方法, 其中用于增溶步骤(3) 中的表面活性剂是非离子性表面活性剂。

6. 根据权利要求 5 所述的预处理方法, 其中所述非离子性表面活性剂是聚氧乙烯(10) 辛基苯基醚。

7. 根据权利要求 1 ~ 6 中任一项所述的预处理方法, 其中所述免疫测定法为 ELISA。

8. 根据权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的预处理方法, 其中所述蛋白质是膜蛋白。

9. 一种免疫测定法, 用于测定生物样品中含有的蛋白质, 其中所述生物样品通过权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的方法被预处理。

10. 根据权利要求 9 所述的免疫测定法, 其为 ELISA。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的免疫测定法, 其中所述生物样品是尿。

12. 根据权利要求 9 ~ 11 中任一项所述的免疫测定法, 其中所述蛋白质是膜蛋白。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫测定法, 其中所述蛋白质是水通道蛋白。

对含有蛋白的生物样品进行预处理的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法。本发明还涉及用于测定通过上述方法预处理的生物样品中含有的蛋白质的免疫测定法。

背景技术

[0002] 近年来,测量生物标志物的方法已被用作为获得可用于诊断多种疾病的信息的方法。“生物标志物”表示“作为对正常生物学过程、病理学过程或对治疗性介入的药理学应答的指标而被客观测量并评价的特性”(a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.) (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP: BIOMARKERS AND SURROGATE ENDPOINTS: PREFERRED DEFINITIONS AND CONCEPTUAL FRAMEWORK. CLIN PHARMACOL THER 2001; 69: 89-95.)。更具体地,生物标志物是生物样品(例如体液(例如血清和尿)及组织)中含有的生物来源的材料。生物标志物被用作为定量检测体内生物学变化的指示物。

[0003] 为测量生物标志物,使用免疫测定法,例如 ELISA (酶联免疫吸附测定法)、RIA (放射免疫测定法) 和免疫色谱法。此类免疫测定法易于通过使用检验试剂盒来进行。

[0004] 另一方面,在对生物标志物的测量中可能产生假阳性和假阴性的问题。特别地,在对作为生物标志物的膜蛋白的测量中,因为检测用抗体所识别的位点被膜覆盖,该位点可能没有充分与抗体反应。因此,上文所述的使用检验试剂盒的方便的方法无法以高精度检测生物标志物,因此一直需要可解决该方法的问题。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法,所述蛋白质特别是具有上述问题的膜蛋白。更优选地,本发明的一个目的是提供一种生物样品预处理方法,其可解决对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中可能产生的假阳性和假阴性的问题,并且可增加测量精确度和 / 或测量灵敏度。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种免疫测定法,其用于测定通过上述方法预处理的生物样品中含有的蛋白质,特别是膜蛋白。

[0007] 当对含有蛋白质(例如不可溶蛋白、特别是膜蛋白)的生物样品进行使用蛋白质作为生物标志物的免疫测定法时,通常在进行免疫测定法之前使用表面活性剂对目标蛋白进行增溶。本发明的发明人进行了锐意研究,以解决对此类生物样品进行的免疫测定法中存在的上述问题,本发明的发明人发现,一旦在高于 - 80°C 的温度、特别是 - 70°C 或更高的温度下冷冻含有蛋白质、特别是不可溶蛋白、例如膜蛋白的生物样品,然后对其进行解冻,就可以解决对蛋白质进行的免疫测定法中可能发生的上述问题,并且可增加测量精确度和

/或测量灵敏度。

[0008] 已通过基于该发现进行的进一步的研究而完成了本发明。本发明包括以下内容。

[0009] (I)对含有蛋白质的生物样品进行预处理的方法

[0010] (I-1)在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法,所述方法包括下述步骤:

[0011] (1)在高于-80°C的温度、特别是-70°C或更高的温度下冷冻所述生物样品;

[0012] (2)解冻经冷冻的生物样品;和

[0013] (3)使用表面活性剂对所述生物样品进行增溶。

[0014] (I-2)在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法,所述方法包括下述步骤:

[0015] (2')对在高于-80°C的温度、特别是-70°C或更高的温度下冷冻的生物样品进行解冻;和

[0016] (3)使用表面活性剂对所述生物样品进行增溶。

[0017] (I-3)根据(I-1)或(I-2)所述的预处理方法,其中所述生物样品是动物的体液,所述动物包括人。

[0018] (I-4)根据(I-3)所述的预处理方法,其中所述体液为尿。

[0019] (I-5)根据(I-1)~(I-4)中任一项所述的预处理方法,其中用于增溶步骤(3)中的表面活性剂是非离子性表面活性剂。

[0020] (I-6)根据(I-5)所述的预处理方法,其中所述非离子性表面活性剂是聚氧乙烯(10)辛基苯基醚。

[0021] (I-7)根据(I-1)~(I-6)中任一项所述的预处理方法,其中所述免疫测定法为ELISA。

[0022] (I-8)根据(I-1)~(I-7)中任一项所述的预处理方法,其中所述蛋白质是膜蛋白。

[0023] (I-9)根据(I-8)中所述的预处理方法,其中所述膜蛋白是水通道蛋白。

[0024] (II)对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法

[0025] (II-1)一种免疫测定法,用于测定生物样品中含有的蛋白质,其中所述生物样品通过(I-1)~(I-9)中任一项所述的方法被预处理。

[0026] (II-2)根据(II-1)所述的免疫测定法,其中所述蛋白质是膜蛋白。

[0027] (II-3)根据(II-1)或(II-2)所述的免疫测定法,其中所述蛋白质是水通道蛋白。

[0028] (II-4)根据(II-1)~(II-3)中任一项所述的免疫测定法,其为ELISA。

[0029] 本发明可提供一种对生物样品的预处理方法,以在对生物样品中含有的蛋白质(特别是膜蛋白)进行的免疫测定法中诱导充分的免疫应答。因此,本发明的方法可以以高准确度和高灵敏度测量生物样品中含有的膜蛋白,而通过使用传统免疫测定法进行测量时无法以足够高的准确度和/或灵敏度对其加以测量。

[0030] 附图简述

[0031] 图1显示了人AQP2基因(hAQP2)与用于对人AQP2基因(hAQP2)进行PCR的hAQP2/前半部分引物(hAQP2N-F、hAQP2N-R)和hAQP2/后半部分引物(hAQP2C-F、hAQP2C-

R) 之间的关系(参考制造例 1 (2))。

[0032] 图 2 显示了对参考制造例 1 (2) 中克隆的 hAQP2N (86 — 749) 质粒 No. 1、2、3、5 和 6 及 hAQP2C (562 — 901) 质粒 No. 1、2、3、4 和 6 的序列与野生型人 AQP2 基因进行的关于基因长度和区域的比较。

[0033] 图 3 显示了在参考制造例 1 (4) 中使用人 AQP2 合成肽抗体(抗人 AQP2 兔血清, PherMingen) 对两种大肠杆菌(No. 2 和 8) 进行的 SDS — PAGE/CBB 染色(上图) 和 Western 印迹分析的结果, 其中, 使用了 IPTG 前样品(诱导前)、IPTG 后样品(诱导后) 和通过对经诱导的大肠杆菌增溶获得的不可溶级分和可溶级分。

[0034] 图 4 (1) 显示了参考制造例 2 中生产在 Sf — 9 昆虫细胞中表达的 His 标签化的人 AQP2 (hAQP2/His/Sf — 9) 的示意图, 图 4 (2) 显示了其分析的结果。

[0035] 图 5 (A) 显示了在参考制造例 3 中第三次免疫后的血清(OPP21401 — 21404) 和对照血清(NRS : 正常兔血清) 针对免疫原(hAQP2/Trx) 的抗体效价, 图 5 (B) 显示了它们针对 Sf — 9 细胞表达的 hAQP2 (hAQP2/Trx/Sf — 9) 的抗体效价。

[0036] 图 6 (A) 显示了在参考制造例 3 中第七次免疫后的血清(OPP21401 — OPP21404) 和对照血清(NRS : 正常兔血清) 针对免疫原(hAQP2/Trx) 的抗体效价, 图 56 (B) 显示了它们针对 Sf — 9 细胞表达的 hAQP2 (hAQP2/Trx/Sf — 9) 的抗体效价。

[0037] 图 7 显示了在参考制造例 3 中通过 Western 印迹分析研究获得的多克隆抗体(OPP21401 — OPP21404) 和对照血清(NRS : 正常兔血清) 与多种抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf — 9 和 Trx/His 对照) 的反应性的结果。

[0038] 图 8 显示了在参考制造例 4 中通过 Western 印迹分析研究获得的多克隆抗体(OPM21401、OPM21402) 和对照血清(NRS : 正常兔血清) 与多种抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf — 9 和 Trx/His 对照) 的反应性的结果。

[0039] 显示了在实验例 1 (1) (1 — 1) 中对不影响检验体系并且在该条件下通过使用多种增溶剂(尿素、Triton X — 100、NP — 40、Tween — 20、盐酸胍(GuCl) 和 SDS) 使 AQP2 从膜被增溶的条件的研究的结果。

[0040] 图 10 显示了在实验例 1 (1) (1 — 2) 中对添加至第一缓冲液(0.2%BSA/10mM EDTA/0.2M Tris — HCl (pH8.0)) 中的稳定剂(尿素、Triton X — 100、NP — 40、Tween — 20、盐酸胍(GuCl) 和 SDS) 的研究的结果。

[0041] 图 11 显示了通过使用单克隆抗体(OPM21401)、以及使用通过参考制造例 1 中所述的方法制造的“Trx 融合 AQP2 蛋白(AQP2/Trx)” 和通过参考制造例 2 中所述的方法制造的“AQP2/Sf9” 作为标准参照蛋白进行 ELISA 获得的标准曲线(实验例 1 (1) (1 — 4))。横坐标上段显示的稀释率表示, 通过将 AQP2/Sf9 悬浮于 PBS 中并使用等体积的增溶剂对悬浮的 AQP2/Sf9 进行增溶而制备的贮液(AQP2/Sf9 裂解液) 被稀释了 2K 倍至 1458K 倍(即, 2 至 1458 × 1000 倍)。

[0042] 图 12 显示了使用经系列稀释的健康人类志愿者(No. 4、5、6 和 9) 的 4 份尿样品作为测试样品相对标准蛋白(Trx 融合 AQP2 蛋白) 的标准曲线的 ELISA 的结果(实验例 1 (1), (1 — 5))。

[0043] 图 13 (A) 显示了通过 Western 印迹分析使用针对人 AQP2 的单克隆抗体(OPM21401)(参考制造例 3) 测量 10 名健康人类志愿者的尿样品中人 AQP2 的量的结果。图

13(B)显示了通过ELISA系统测量的相同的10名健康人类志愿者的尿样品中的人AQP2的量(实验例1(1)(1-6))。

[0044] 图14显示了使用通过参考制造例2中所述的方法制造的“AQP2/Sf9”作为标准蛋白质进行ELISA获得的标准校正曲线。

[0045] 图15显示了实验例2中第一次、第二次、第三次、第四次和第五次试验的结果。

[0046] 图16显示了通过使用实验例1中建立的人AQP2ELISA测量于 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 冷冻了0~56天的人尿中的AQP2的量、并且调查了冷冻期与人尿中的AQP2的量的关系的结果(实验例3)。

[0047] 图17显示了通过使用实验例1中建立的人AQP2ELISA对从两名健康人员获得、并在多种温度(-80°C 、 -30°C 、 -28°C 、 -26°C 、 -20°C 、 4°C)的每种下于黑暗中保存了两周(14天)的尿样品(No. 1和2)中的AQP2的量进行测量、并对冷冻温度与人尿中的AQP2的量的关系进行调查的结果(实验例3)。

具体实施方式

[0048] (I)对含有蛋白质的生物样品进行预处理的方法

[0049] 本发明的方法是在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法。

[0050] 本文中使用的免疫测定法表示通过利用抗原和抗体之间的反应来测定试验样品中目标物质(本发明中为蛋白质)的存在或量的生物化学试验方法。免疫测定法的例子包括但不限于酶免疫测定法(Enzyme Immunoassay, EIA)、放射免疫测定法(Radioimmunoassay, RIA)、酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、凝集法(agglutination)、比浊法(nephelometry)、浊度测定法(turbidimetry)和Western印迹分析(Western blot)。优选ELISA。

[0051] 本发明的目标生物样品的来源和类型没有特别限定,只要该样品含有蛋白质并且可对其进行免疫测定法即可。例如,可使用从动物或植物获得的生物样品。

[0052] 虽然来源动物的类型没有特别限定,可优选使用哺乳动物(包括人)。人以外的哺乳动物包括大鼠、小鼠、豚鼠、兔、猴、狗、牛、马等。人优选被用作来源动物。从此类动物获得的生物样品可举出,含有蛋白质、优选膜蛋白的下述这些:体液,例如尿、血、唾液、汗、粘液、淋巴液、羊水和脑脊液;以及细胞和组织。

[0053] 来源植物的类型没有特别限定,植物的例子包括高等植物(例如种子植物和蕨类植物)和低等植物(例如菌类、苔藓和藻类)。从此类植物获得的生物样品的具体例子可举出,含有蛋白质优选膜蛋白的植物的多种部分(包括其经加工的产品,例如提取物),例如叶、茎、根、花、种子、果实和果皮;分泌物例如汁液;以及细胞和组织。

[0054] 生物样品优选为来源于哺乳动物的样品,特别优选为人的生物样品。为了收集方便的目的,更优选哺乳动物特别是人的尿、唾液和血。特别优选尿。

[0055] 只要测定对象蛋白不发生失活等品质降低或劣化,此类生物样品可新鲜获得,或者可在收集后放置一定时间,即,被收集并贮藏一定时间。

[0056] 收集生物样品的方法没有特别限定,只要该方法不影响生物样品中含有的目标蛋白质、优选膜蛋白即可。

[0057] 此外,可将收集的生物样品原样用于本发明的方法。或者,可从收集的生物样品中提取或分级分离含有目标蛋白质的部分,将提取物用于本发明的方法。

[0058] 本发明的目标蛋白质没有特别限定,只要其是上文所述的动物或植物中含有的蛋白质即可。但是,目标蛋白质优选为膜蛋白。膜蛋白是存在于细胞膜或囊泡膜(vesicle membrane)上的蛋白质。膜蛋白的例子包括但不限于,膜转运蛋白、 Na^+/K^+ 泵和离子通道。例如,膜蛋白优选为水通道蛋白(Aquaporin :AQP),特别优选 AQP2,其为 13 种人 AQP 之一(参见「細胞膜水チャネル,アクアポリン」日医大医会誌(《细胞膜水通道,Aquaporin》日医大医会志)2009;5(2))。

[0059] AQP 是属于 MIP (主要内在蛋白,Major Intrinsic Proteins) 家族的主要膜蛋白之一(Agre P(2006), “The aquaporin water channels”, Proc Am Thorac Soc 3(1):5-13;Agre P 等, (1993), “Aquaporin CHIP:the archetypal molecular water channel” Am. J. Physiol. 265:(4Pt2)F463-76)。水通道蛋白存在于集合管管腔膜中,其为穿梭于细胞膜表面和细胞内囊泡膜之间的水的通过孔(水通道)。水通道蛋白选择性地仅使水通过,因此其与细胞水摄入相关(Gonen T, Walz T(2006), “The structure of aquaporins”, Q. Rev. Biophys. 39(4):361-96)。水通道蛋白的氨基酸序列是已知的。例如,人 AQP2 的氨基酸序列以检录号 No:AAB319999.1 (GI:685001) (SEQ ID NO:1) 登记于 GenBank 中,编码氨基酸序列的核苷酸序列以检录号 No:AH007818.3 (GI:14190630) 登记于 GenBank 中。

[0060] 本发明的方法的一个特征在于所述方法包括下述步骤:

[0061] (1) 在高于 -80°C 的温度、特别是 -70°C 或更高的温度下冷冻所述生物样品(冷冻步骤);

[0062] (2) 解冻经冷冻的生物样品(解冻步骤);和

[0063] (3) 使用表面活性剂对所述生物样品进行增溶(增溶步骤)。

[0064] 每个步骤被描述如下。

[0065] (1) 冷冻步骤

[0066] 这是在高于 -80°C 的温度下对生物样品进行冷冻的步骤。

[0067] 冷冻方法没有特别限定,只要该方法不对生物样品中含有的蛋白造成不利影响、并且目标生物样品可在高于 -80°C 的温度下被冷冻即可。典型地,可通过使用可在上述温度下进行冷冻的冰箱来冷冻生物样品(冰箱温度:高于 -80°C)。

[0068] 冷冻处理温度没有特别限定,只要其如上文所述高于 -80°C 即可。该温度优选为 -70°C 或更高,更优选为 -50°C 或更高,更具体地, -50°C 至 -10°C ,进一步更优选为 -40°C 或更高,并且更具体地,为 -40°C 至 -10°C 。进一步更优选地,该温度高于 -40°C ,更具体地为高于 -40°C 并且低于 -10°C ,更具体地在 -35°C 至 -15°C 的范围内,特别优选在 -30°C 至 -20°C 的范围内。

[0069] 可在步骤(1)之后立即对冷冻的生物样品进行随后的解冻步骤(2)。或者,可将冷冻的生物样品在冷冻状态下保持一定的时间。虽然将样品保持于冷冻状态的时间没有特别限定,但其优选为 1 小时至 1 周,更优选为 12 小时至 24 小时。

[0070] 下文描述的实验例的结果表明,将生物样品冷冻一定时间或更长能够稳定从生物样品获得的蛋白质的免疫测定的值。因此,为以高准确度对生物样品中含有的蛋白质加以定量,优选地,将生物样品在冷冻状态保持一定时间或更长,优选大约 2 周或更长。用于将

生物样品在冷冻状态保持大约 2 周的冷冻温度条件优选在例如 -30°C 至 -20°C 的范围内。

[0071] (2) 解冻步骤

[0072] 这是对在前一步骤中冷冻的生物样品进行解冻的步骤。

[0073] 解冻方法没有特别限定,只要该方法不对生物样品中含有的蛋白质造成不利影响并且能够解冻经冷冻的生物样品即可。此类方法的具体例子包括但不限于,将冷冻的生物样品在装入容器的状态下、保持于室温的方法、应用流动水的方法、浸于水中的方法和在冰上缓慢解冻的方法。

[0074] 上文(1)和(2)中描述的冷冻和解冻处理可以进行一次,或者可以重复超过一次。考虑到处理效率,冷冻和解冻处理通常各进行一次。但是,如下文实验例中所示,重复冷冻和解冻处理并不使免疫测定结果显著恶化,并且认为对待测量的蛋白质没有不利影响。因此,重复多次进行冷冻和解冻不被限制。因此,在未知是否已经进行了冷冻处理的情况下,例如,当无法确认是否已经在高于 -80°C 的温度、特别是 -70°C 或更高的温度下将用于免疫测定法的生物样品冷冻过时,可以再次进行冷冻和解冻。

[0075] 或者,当可获得之前已进行了步骤(1)的生物样品时(例如当获得了被第三方进行了步骤(1)的样品时),可通过进行下述步骤(2')代替步骤(1)和(2)来进行本发明:

[0076] (2')对在高于 -80°C 的温度、特别是 -70°C 或更高的温度下冷冻的生物样品进行解冻。

[0077] 因此,在另一方面,本发明提供了包括上述解冻步骤(2')和增溶步骤(3)的对含有蛋白质的生物样品进行预处理的方法。作为上述步骤(2')中的冷冻温度和冷冻时间,可使用上文“(1)冷冻步骤”的段落中提及的相同的条件。

[0078] (3) 增溶步骤

[0079] 这是使用表面活性剂对将用于免疫测定法的含有蛋白质的生物样品进行增溶的步骤。

[0080] 该步骤中的增溶中,添加表面活性剂的时机没有特别限定,只要生物样品中含有的蛋白质(特别是膜蛋白)被增溶即可。例如,可在解冻生物样品时或之后添加表面活性剂。如果冷冻和解冻不影响表面活性剂的增溶作用、并且表面活性剂不影响冷冻和解冻效果的话,表面活性剂可以在冷冻之前添加至生物样品。

[0081] 用于本发明的表面活性剂为通常的用于增溶蛋白质,特别是膜蛋白的表面活性剂。例如,可优选使用具有优秀的蛋白质增溶效果并且不影响免疫测定结果的非离子性表面活性剂。优选的非离子性表面活性剂的例子包括聚氧乙烯辛基苯基醚(Polyoxyethylene Octylphenyl Ether)和聚氧乙烯山梨糖醇酐单脂肪酸酯。优选地,聚氧乙烯辛基苯基醚的例子包括聚氧乙烯(8)辛基苯基醚(Triton X-114)、聚氧乙烯(9)辛基苯基醚(NP-40)和聚氧乙烯(10)辛基苯基醚(Triton X-100)。聚氧乙烯(10)辛基苯基醚(Triton X-100)是更优选的。

[0082] 优选的聚氧乙烯山梨糖醇酐单脂肪酸酯包括聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(特别地,聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯(Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate, Tween20))、聚氧乙烯山梨糖醇酐单棕榈酸酯(特别地,聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单棕榈酸酯(Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monopalmitate, Tween40))、聚氧乙烯山梨糖醇酐单硬脂酸酯(聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单硬脂酸酯(Polyoxyethylene(20)

Sorbitan Monostearate, Tween60)) 和聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(特别地, 聚氧乙烯(20) 山梨糖醇酐单油酯(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monooleate, Tween80))。这些中, 优选聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯, 特别优选聚氧乙烯(20) 山梨糖醇酐单月桂酸酯(Tween20)

[0083] 这些表面活性剂均可商业获得, 并且可购自例如 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 和 Nacalai Tesque, Inc.。

[0084] 在增溶步骤中添加至含有蛋白质的生物样品的表面活性剂的比例可根据使用的表面活性剂的类型而变动。例如, 可以以使得表面活性剂浓度为相对于 100wt. % 待处理的生物样品而言 0.0001 至 30wt. %、优选 0.01 至 10wt. %、更优选 0.1 至 2wt. % 的量添加表面活性剂。换言之, 相对于生物样品中含有的蛋白质的总量按重量计每 100 份而言, 表面活性剂的量为按重量计 0.01 至 30000 份, 优选为按重量计 10 至 10000 份, 更优选为按重量计 100 至 2000 份。

[0085] 用于增溶步骤的条件没有特别限定, 只要目标蛋白质(特别是膜蛋白)可溶解并且不损失将被测量的免疫活性即可。但是, 所述条件典型地为 4 至 10 的 pH, 优选 6.5 至 8.5 的 pH, 以及 0 至 50°C、优选 4 至 37°C 的温度。

[0086] 可将通过进行步骤(1)~(3)或进行步骤(2')和(3)而获得的生物样品原样用于下文所述的免疫测定法, 或者如果需要的话, 在进行固液分离或者任何分级分离之后用于下文所述的免疫测定法。

[0087] (II) 对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法

[0088] 本发明涉及用于测定在上述步骤(I)中经预处理的生物样品中含有的蛋白质(特别是膜蛋白)的免疫测定法。用于本文中的免疫测定法包括用于对生物样品中含有的蛋白质进行定性检测的方法以及用于对生物样品中含有的蛋白质进行定量检测的方法二者。

[0089] 用于本文中的免疫测定法包括传统的酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、凝集法、比浊法、浊度测定法和 Western 印迹分析。可根据目的对这些方法适当选择。优选 ELISA。

[0090] 上述免疫测定法全部均为本领域中已知的传统方法, 并且可根据(或遵循)教科书类的书籍和文献, 例如石川荣治著“エンザイムイムノアツセイはこう開発する”《酶免疫测定法是这样开发的》(生物化学实验法), 出版社: 学会出版中心(2003/07)容易地进行。为了方便的目的, 可使用可商业获得的产品作为用于此类免疫测定法中的抗体(多克隆抗体、单克隆抗体)。当无法商业获得时, 可根据(或遵循)教科书类的书籍和文献, 例如“タンパク質実験ハンドブック—分離・精製, 質量分析, 抗体作製, 分子間相互作用解析などの基本原理と最新プロトコール総集編!”(蛋白实验手册—分离/纯化、质谱、抗体制造、分子间相互作用分析等的基本原理和最新方案全概括!), 出版社: 羊土社(2003/08)来制备此类抗体。

[0091] 本发明的一种优选的实施方式是下述免疫测定法, 其中使用进行了上述本发明的预处理的来源于人的生物样品(特别是尿)作为目标样品, 并且按照实验例中所述, 测定生物样品中含有的蛋白质的量, 例如膜蛋白, 例如水通道蛋白(AQP), 优选人 AQP2。

[0092] 优选使用 ELISA 作为免疫测定法。例如, 可通过标准方法, 或者参照下文所述的参考制造例 2 和 3, 来制造用于 ELISA 中的针对 AQP 的抗体。使用尿作为试验样品的 ELISA 可

根据下文所述的实验例 1 中所述的方案来进行。如实验例 2 中所述,本发明的预处理可使得能对尿中含有的膜蛋白(例如 AQP)的量进行高准确度和高效的检测。

[0093] 实施例

[0094] 下文中,将基于参考制造例和实验例来描述本发明的构成及其效果。但是,本发明并不被这些实验例等以任何程度限制。

[0095] 参考制造例 1 制造大肠杆菌表达的融合 Trx/His 的人 AQP2

[0096] 克隆人水通道蛋白 2 (AQP2) 基因并将其表达于大肠杆菌中。人 AQP2 蛋白是由 271 个氨基酸构成的五次跨膜蛋白,其蛋白结构域具有大约 30kD 的分子量(Sasaki S, et al., Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human aquaporin of collecting duct. Clin. Invest.. 1994; 93 (3): 1250-1256.)。此处,人 AQP2 蛋白以其 N 末端被 Trx 标签化的状态表达于大肠杆菌中。

[0097] 该方法被如下概括。

[0098] 首先,将对应于人 AQP2 (271 个氨基酸)的基因分为将通过前半部分引物对和后半部分引物对进行 PCR 克隆的两个部分。将 PCR 产物各自并入质粒中,将质粒转化进大肠杆菌,测定它们的核酸序列。然后,选择具有与野生型相同的序列的克隆 1 (前半部分)和克隆 4 (后半部分),在重叠的共有限制性酶位点 (BamHI) 处切割,通过连接酶连接相应的部分,获得基因序列。然后,将 AQP2 基因序列插入 His 标签融合蛋白表达载体,获得想要的融合了 His 标签的 AQP2 表达载体(克隆 8)。但是,因为其不以足够的量表达 AQP2 蛋白,切出缺少 N 一末端部分的 NcoI - BamHI 核酸片段,将其并入硫氧还蛋白(Trx)融合载体。将融合了 Trx 的 AQP2 表达载体(克隆 2 和克隆 8)引入大肠杆菌,使用 IPTG 进行诱导时,发现融合了 Trx 的 AQP2 蛋白大量表达。

[0099] 使用从可商业获得的合成人 C 一末端肽制造的抗体,验证了该人 AQP 蛋白。

[0100] (1) 对人 AQP2 基因的 PCR 扩增和克隆

[0101] 从人 cDNA 文库(QUICK - Clone cDNA Human cDNA, CLONTECH)将人 AQP2 分别作为前半部分(AQP2N:86 - 749)和后半部分(AQP2C:562 - 901)扩增,其中使用对各区域特异性的引物。

[0102] 具体地,如图 1 所示,通过编码人 AQP2 蛋白(271 个氨基酸)的区域(86 - 901)在 HindIII 位点(第 609 位)分为两个部分,即, N 一末端部分和 C 一末端部分,来进行人 AQP2 基因的 PCR。作为针对人 AQP2 基因 N 一末端部分(hAQP2/ 前半部分,下文中称为“hAQP2N”)的 PCR 引物,从起始密码子开始的 22 个碱基(86 - 107)被用作为正向引物(hAQP2N - F : SEQ ID NO. 2), 728 - 749 的 22 个碱基被用作为反向引物(hAQP2N - R : SEQ ID NO. 3)。另一方面,对于人 AQP2 基因 C 一末端部分(hAQP2/ 后半部分,下文中称为“hAQP2C”), 562 - 583 的 22 个碱基被用作为正向引物(hAQP2C - F : SEQ ID NO. 4),直到终止密码子的 21 个碱基(881 - 901)被用作为反向引物(hAQP2C - R : SEQ ID NO. 5)。向 hAQP2N - F 和 hAQP2C - R 的各 5' 末端添加将用于插入进表达载体的限制性酶位点(hAQP2N - F : SphI, hAQP2C - R : BamHI)。图 1 显示了 AQP2 基因和用于前半部分和后半部分的引物的构造。作为 PCR 的结果,获得了估计的 884bp (hAQP2N 部分)和 340bp (hAQP2C 部分)的 PCR 产物。

[0103] 将 AQP2N (86 - 749)PCR 产物并入 pT7 克隆载体,转化进大肠杆菌,由此获得了大肠杆菌菌落 No. 1、2、3、5 和 6。从这些大肠杆菌菌落提取质粒 DNA,以使用特异性的前半部

分引物(NF/NR)进行 PCR。结果验证了想要的 AQP2N (86 - 749)序列插入进了大肠杆菌菌落 No. 1、3 和 5 中。此外,在五种质粒上作用两种限制性酶,以将它们切割为片段。然后,验证了核酸片段具有来源于 AQP2 基因的大小。

[0104] 类似地,还使用特异性后半部分引物,扩增了 AQP2C(562 - 901),检测了大肠杆菌菌落 No. 1 ~ 6,发现基因插入进了所有这些菌落中。除了 No. 5 菌落之外,从 No. 1、2、3、4 和 6 菌落提取了质粒,还使用两种限制性酶检测了插入的基因的大小。通过限制性酶从五种质粒切出的核酸片段的大小为之前所估计的 2200bp。因此,判定包括 AQP2C (562 - 901)的基因并入了质粒中。

[0105] 使用 Beckman - Coulter 公司的 CEQ2000,测定了总共 10 种核酸序列,其为 AQP2N (86 - 749) 质粒 No. 1、2、3、5 和 6 和 AQP2C (562 - 901) 质粒 No. 1、2、3、4 和 6 的核酸序列。然后,将质粒的核酸序列每种与相应的野生型序列相比较(图 2)。如可从图 2 所理解的,选出了与野生型具有相同序列的 AQP2N (86 - 749) 质粒 No. 1 和 AQP2C (562 - 901) 质粒 No. 4,通过连接来自两种质粒的片段制成用于表达的载体。

[0106] (2) 构建融合了 His 标签的人 AQP2 表达载体

[0107] 从 AQP2N (86 - 749) 质粒 No. 1 切出 SphI - BamHI 片段,从 AQP2C (562 - 901) 质粒 No. 4 切出 BamHI - HindIII 片段。然后使用连接酶将这两条片段并入 His 标签融合表达载体(pGL80L),该载体在 SphI 和 HindIII 位点处被开环。使用 F2/R 引物对进行菌落 PCR,验证了片段插入进了大肠杆菌菌落 No. 2 和 No. 8。

[0108] 从大肠杆菌菌落 No. 2 和 No. 8 提取质粒,使用特异于 AQP2 基因的两种限制性酶检测是否存在具有预定的大小的核酸片段(SphI - HindIII :664bp, SphI - BamHI :514bp, BamHI - HindIII :340bp)。结果,在 No. 8 中发现了相同的核酸片段,验证了 AQP2 基因插入其中。使用 Beckman - Coulter 公司的 CEQ2000 再次检测 No. 8,以验证核酸序列,验证了在核酸序列中没有取代或缺失。

[0109] (3) 构建融合了 Trx 的 N-末端缺失的 AQP2 表达载体

[0110] 虽然在上述(2)中获得了想要的融合了 His 标签的 AQP2 表达载体(克隆 8),但其并不以足够的量表达 AQP2 蛋白。因此,从融合了 His 标签的 AQP2 表达质粒 No. 8 切出缺少人 AQP2 蛋白的 N-末端部分的 NcoI - BamHI 片段,使用连接酶将其并入在 NcoI 和 HindIII 位点处开环的融合了 Trx 的表达载体(pET32b)。使用 F2/R 引物对进行菌落 PCR,验证了片段插入进了大肠杆菌菌落 No. 2 和 No. 8 中。

[0111] 从大肠杆菌菌落 No. 2 和 No. 8 提取质粒,使用特异于 AQP2 基因的两种限制性酶检测是否存在具有预定的大小的核酸片段(NcoI - HindIII :686bp)。验证了在 No. 2 和 No. 8 中存在 686bp 的核酸片段,并且其中插入了缺少 N-末端部分的 AQP2 基因。

[0112] (4) 在大肠杆菌中表达融合了 Trx 的 N 末端缺失的 AQP2 蛋白

[0113] 因为在融合了 Trx 的 N 末端缺失的 AQP2 表达载体 No. 2 和 No. 8 的序列中没有错误,对大肠杆菌的每个菌落预培养,加入至 100mL 的 LB 培养基中,并使用 IPTG (异丙基 - β -D- 硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside): β -半乳糖苷酶诱导剂,其被用作用于具有 Lac 启动子或 tac 启动子的表达载体的表达诱导剂)在室温下诱导过夜,由此在大肠杆菌细胞中产生了融合了 Trx 的 N-末端缺失的 AQP2 蛋白。

[0114] 培养了两种(No. 2 和 No. 8)大肠杆菌。制备 IPTG 前样品(诱导前)、IPTG 后样品(诱

导后)和通过对经诱导的大肠杆菌进行增溶而获得的不可溶级分和可溶级分,用于 SDS-PAGE/CBB 染色和 Western 分析。为进行检测,使用可商业获得的合成人 AQP2 肽抗体(抗人 AQP2 兔血清,PharMingen)。如可从图 3 可见的,在 IPTG 诱导前样品 2)和 7)中没有验证到融合了 Trx 的 N-末端缺失的 AQP2 蛋白的表达。但是,在 IPTG 诱导后样品 3)和 8)中验证了大量的融合了 Trx 的 N-末端缺失的 AQP2 蛋白。因为在大肠杆菌不可溶级分 4)和 9)中存在的融合蛋白比在可溶级分 5)和 10)中多,因此发现融合蛋白作为内含体(inclusion body)存在。

[0115] 如上文所述,通过 PCR 从人 cDNA 克隆了人 AQP2 基因,验证了获得的人 AQP2 基因与野生型完全匹配。此外,通过使用该人 AQP2 基因,可有效地表达缺少人 AQP2 蛋白的 N-末端的大约 30 个氨基酸的、融合了 Trx 的 AQP2 蛋白。

[0116] 下文中,将该蛋白称为“大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2 蛋白”或“融合了 Trx 的人 AQP2 蛋白”。

[0117] 参考制造例 2 制造在昆虫细胞 Sf-9 中表达的 His 标签化的人 AQP2(hAQP2/His/Sf-9) (见图 4 (1))

[0118] 将具有添加至 AQP2 的 5'末端的 His 标签化序列的 cDNA 插入供体质粒 pFastBac1 (Donor Plasmid pFastBac1) 的多克隆位点(pFastBac1-AQP2)。使用 pFastBac1-AQP2 转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞。对于在具有添加至其中的 Bluo-gal 和 IPTG 的琼脂平板上呈白色的克隆,通过 PCR 验证杆粒(Bacmid)是否包括 AQP2 的插入(重组 AQP2 杆粒(Recombinant AQP2Bacmid))。提取重组 AQP2 杆粒,纯化,并使用 CELLFECTIN (Invitrogen)转染(Transfection)至 Sf-9 细胞。收集转染后 72 小时时的培养物上清液,将其用作为重组杆状病毒(Recombinant Baculovirus)(rBaculovirus-AQP2)。重复 rBaculovirus-AQP2 向 Sf-9 细胞的感染、扩增、收集和再感染,直到在培养物上清液中获得 rBaculovirus-AQP2 的足够效价(Titer)。用 rBaculovirus-AQP2 感染 Sf-9 细胞,培养 2 至 4 天,收集细胞。使用细胞进行 SDS-PAGE,使用 AQP2 抗体通过 Western 印迹分析验证了 rBaculovirus-AQP2 的表达。图 4 (2) 显示了结果。

[0119] 参考制造例 3 针对人 AQP2 的兔多克隆抗体

[0120] 纯化在参考制造例 1 中制造的融合了 Trx 的人 AQP2 蛋白,将其用于免疫兔(物种/株系:兔/新西兰白(New Zealand White),性别:雌性,重量:3~3.5kg,从 KITAYAMA LABES 获得),以产生多克隆抗体。

[0121] (1) 制备免疫原

[0122] 作为免疫原,使用融合了 Trx 的人 AQP2 蛋白(hAQP2/Trx),其是使用 Ni-NTA 琼脂糖凝胶从在参考制造例 1 中验证了其中人 AQP2 的表达的大肠杆菌纯化的。为进行免疫,使用 PBS(-),将免疫原(hAQP2/Trx)制备为 200 μ g/mL。使用通过三通活栓连接的两个玻璃注射器,将 2.5mL 的免疫原与等体积的完全弗氏佐剂(Complete Freund adjuvant)(DIFCO, Cat No. 263810)混合,以制备乳液。

[0123] (2) 制备多克隆抗体

[0124] (2-1) 免疫

[0125] 将按上文所述制备的免疫原(hAQP2/Trx)每两周于多个位点以 1mL/只皮内注射至兔背部,以进行免疫。第三次免疫后 1 周,从耳垂进行部分采血,通过下文(2-2)描述

的 ELISA 法检查抗体效价。进而,进行更多次免疫,第七次免疫后 1 周,从颈动脉进行完全采血。采集的血液在室温下以 3,000rpm 离心 10 分钟,以收集血清。通过下文(2-2)描述的 ELISA 法检查抗血清的抗体效价,研究了 Western 印迹分析中的反应活性。

[0126] (2-2)通过 ELISA 测量抗体效价

[0127] 将使用 PBS(-) 制备为 $1\mu\text{g/mL}$ 的免疫原(hAQP2/Trx)以 $100\mu\text{L}$ /孔装入 96 孔板中,令其在室温下保持 2 小时或更长时间。另一方面,对于表达 hAQP2/His 的 Sf-9 细胞(hAQP2/His/Sf-9)(参考制造例 2),将已溶于 8M 尿素/ 50mM Tris-HCl (pH8.0)中的表达 hAQP2/His 的 Sf-9 细胞(hAQP2/His/Sf-9)以 $10\mu\text{L}$ /孔装入 96 孔板中,以 $100\mu\text{L}$ /孔向其中添加 PBS(-),令板在室温下保持 2 小时或更长时间。

[0128] 从板中移除免疫原溶液,以 $400\mu\text{L}$ /孔向板中添加 0.1% BSA/PBS(-),在室温下进行 1 小时或更长时间的封闭(涂布有免疫原的板和涂布有 hAQP2/His/Sf-9 的板)。

[0129] 通过部分或完全采血获得的抗血清被 0.1% BSA/PBS(-) 稀释了 1000 倍,并以 3 的公比对其进行 8 级系列稀释(稀释系列:1,000 倍至 2,187,000 倍)。作为对照血清,以相同方式稀释并制备正常兔血清(NRS)(稀释系列:1,000 倍至 2,187,000 倍)。

[0130] 从 96 孔板除去封闭溶液,以 $100\mu\text{L}$ /孔添加上述抗血清或 NRS 的稀释系列,令混合物在室温下反应过夜。

[0131] 第二天,用洗涤液(0.05% Tween-20/ 0.9% NaCl)对 96 孔板洗三次,以 $100\mu\text{L}$ /孔添加使用 0.05% Tween-20/ 0.1% BSA/PBS(-) 稀释了 10,000 倍的辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase) (HRP)-山羊抗兔 IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404),令混合物在室温下反应 2 小时。接着,用洗涤液对板洗五次。然后,以 $100\mu\text{L}$ /孔添加显色溶液,所述显色溶液是通过将 OPD 片(Sigma, Cat. No. P8287)以 1mg/mL 溶解于底物稀释溶液(柠檬酸单水合物 7g/L , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.89g/L , 0.015% H_2O_2)中获得的,使得显色在室温下进行 5 至 10 分钟。以 $100\mu\text{L}$ /孔添加 2N H_2SO_4 ,以终止反应,使用 iEMS Reader MF(Lab systems) 测量 492nm 处的吸光度。

[0132] (2-3)通过 Western 印迹分析研究反应活性

[0133] 使用含有 2-巯基乙醇的电泳用裂解缓冲液将免疫原(hAQP2/Trx)和 Trx/His 对照(通过用 PKD2 蛋白的 C-末端部分 743-968 代替 AQP2 部分获得的,即具有添加至其上的 Trx/His 标签的 PKD2)稀释为 $10\mu\text{g/mL}$,将混合物在 100°C 加热 5 分钟。将该抗原溶液和分子量标志物(Bio-Rad, Cat. No. 161-0373)以 $100\mu\text{L}$ /孔施加至 15% 丙烯酰胺凝胶,通过以 25mA /凝胶进行电泳对样品加以分析。

[0134] 电泳后,通过 CBB G-250 染色(Bio-Rad Cat. No. 161-0786)对一份凝胶加以染色,使用半干印迹仪,于 200mA 将另一份凝胶中的样品转移至 $0.45\mu\text{m}$ 硝酸纤维素膜(Bio-Rad, Cat. No. 162-0115),进行 1 小时。转移后,在室温下将膜浸于 5% 脱脂奶(skim milk)/ 50mM Tris-HCl (pH8.0) 1 小时或更长时间以使其封闭。使用 0.1% BSA/PBS(-) 将抗血清和 NRS 各自稀释 1000 倍,将它们与膜在室温下反应过夜。

[0135] 第二天,用洗涤液洗膜,将其与使用 0.05% Tween-20/ 0.1% BSA/PBS(-) 稀释了 3000 倍的 HRP 山羊抗兔 IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404) 在室温下反应 2 小时。用洗涤液洗膜,将其浸于显色液中进行显色。显色液是通过将 4.84g 三(羟基甲基)氨基甲烷、 5.84g 氯化钠和 3.36mL 浓盐酸溶于 H_2O 中获得 1L 的总体积制备的。为进行使用,向 100mL

该显色溶液中添加 20mL 0.3% 的 4-氯-1-萘酚 / 甲醇和 60 μ L 的 30% H_2O_2 , 并混合。

[0136] (2-4) 多克隆抗体制备的结果

[0137] 图 5 显示了在血清的稀释系列(1,000 倍至 2,187,000 倍)上进行的 ELISA 的结果,所述血清是通过在第三次免疫之后进行的部分采血收集的,所述 ELISA 使用 96 孔板进行,该 96 孔板上已经形成了 hAQP2/Trx 或 Sf-9 细胞表达的 hAQP2 (hAQP2/Trx/Sf-9) 的固相。在图 5 中,(A) 显示了针对免疫原(hAQP2/Trx)的抗体效价,(B) 显示了针对 Sf-9 细胞表达的 hAQP2 (hAQP2/Trx/Sf-9) 的抗体效价。从结果可见,验证了针对免疫原的抗体效价通过对兔的三次免疫充分地增加。

[0138] 图 6 显示了在第七次免疫后进行的完全采血之后以相似的方式进行的 ELISA 测定的结果。图 6 中,(A) 显示了针对免疫原(hAQP2/Trx)的抗体效价,(B) 显示了针对 Sf-9 细胞表达的 hAQP2 (hAQP2/Trx/Sf-9) 的抗体效价。此时获得的各多克隆抗体被命名为 OPP21401、OPP21402、OPP21403 和 OPP21404。抗血清的体积分别为 50mL、52mL、50mL 和 68mL。此外,通过 ELISA 验证了最终的抗体效价,发现 OPP21403 显示了最高的抗体效价。

[0139] 此外,通过 Western 印迹分析研究了每种多克隆抗体针对每种抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf-9 和 Trx/His 对照)的反应活性。具体而言,使转移到硝酸纤维素膜上的每种抗原(hAQP2/Trx、hAQP2/Trx/Sf-9 和 Trx/His 对照)与稀释了 1,000 倍的每种抗血清反应,使用 4-氯-1-萘酚法显色。图 7 显示了结果。如图 7 所示,所有抗体(OPP21401、OPP21402、OPP21403 和 OPP21404) 不仅与 hAQP2/Trx 反应,还与 hAQP2/His/Sf-9 反应。OPP21403 具有最强的与 hAQP2/His/Sf-9 的反应。

[0140] 由此可见,在上文获得的四种多克隆抗体中,认为具有最强的与在 Sf-9 细胞中表达的 hAQP2 的反应的 OPP21403 适合用于检测来源于活的生物体的样品中的 AQP2。

[0141] 表 1

[0142]

抗体名	免疫原	经免疫的动物	形式	反应活性		
				hAQP2/ Trx	hAQP2/ His/Sf- 9	Trx/His 对照
OPP21401	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21402	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21403	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21404	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	兔	血清	+	+	-

[0143] 参考制造例 4 针对人 AQP2 的小鼠单克隆抗体

[0144] 对参考制造例 1 中制造的融合了 Trx 的人 AQP2 蛋白(hAQP2/Trx)进行纯化,并将其腹内注射至小鼠(物种/株系:小鼠/Balb/c,性别:雌性和雄性,从 SLC 获得)进行免疫,通过与小鼠骨髓瘤细胞(细胞系名称:P3U1,从 ATCC 获得)的融合产生了单克隆抗体。

[0145] (1) 制备单克隆抗体

[0146] (1-1) 免疫

[0147] 将参考制造例 3 (1) 中制备的 1mL 免疫原(hAQP2/Trx)腹内注射至 10 只小鼠进行免疫(物种/株系:小鼠/Balb/c,性别:雌性和雄性,从 SLC 获得),每两周进行三次免疫。细胞融合前 3 天,以大约 20 μ g/只注射 hAQP2,作为最后一次免疫,其中不使用佐剂。

[0148] (1-2) 细胞融合

[0149] 在细胞融合前一周以上解冻小鼠骨髓瘤细胞(细胞系名称:P3U1,从 ATCC 获得),将其培养于 10%FCS/RPMI1640 中。在细胞融合当天,在显微镜下验证了小鼠骨髓瘤细胞具有足够的存活率(viability)。

[0150] 使用乙醚麻醉在上述(1-1)中免疫的单只小鼠(雌性),使用 70%的乙醇消毒,然后无菌下取出其脾脏。用剪刀细细切碎脾脏,将其在约 10mL RPMI1640 中通过钢筛以过滤。将该悬浮液转移到 15mL 离心管中并进行离心。然后弃去上清液,通过指弹使沉淀彻底松散。向沉淀中添加 4mL 0.747% NH_4Cl ,通过轻柔吹吸混合物使不需要的红细胞溶血。然后,向其中添加 6 至 7mL 的 RPMI1640,离心混合物。然后,用 RPMI1640 再次洗涤细胞,将其重悬浮于大约 10mL RPMI1640 中。

[0151] 另一方面,将 50~100mL 的 P3U1 培养液转移到 50mL 离心管中,对其进行离心以收集细胞。用 RPMI1640 洗一次细胞,将其重悬浮于 RPMI1640 中。合并脾细胞的悬浮液和 P3U1 的悬浮液至约 30mL 的体积,对混合物进行离心。弃去上清液,通过指弹使沉淀彻底松散。在

良好振荡混合物的同时,在 30 秒内向沉淀中添加 2mL50%PEG 溶液(Sigma, Cat. No. P7181),再吹吸混合物 30 秒。然后,在 2 分钟内向混合物中添加 5mL RPMI1640,再向其中添加 5mL RPMI1640,令混合物于 37℃静置 3 分钟,然后对混合物加以离心。

[0152] 弃去上清液,将细胞重悬浮于大约 100mL 添加了 HAT (ICN, Cat. No. 1680849) 的 10%FCS/RPMI1640 中,将全部细胞涂布于 4 块 24 孔培养板中,以在 5%CO₂ (CO₂ 培养箱; SANYO, MCO - 17AIC) 中于 37℃进行培养。对全部情况而言,离心条件均为室温、1200rpm 和 5 分钟。

[0153] (1 - 3) 抗体筛选

[0154] 细胞融合后 1 周至 10 天,在开始能可视验证每块板的底部形成的菌落的时间点,从每个孔收集一部分培养物上清液,以进行抗体筛选。在第一次筛选中,使用培养物上清液的未经稀释的溶液,在第二次筛选中及之后,使用 0.1%BSA/PBS(-) 将培养物上清液稀释 2.5 倍以使用。

[0155] 从以与参考制造例 3 (2) (2 - 2) 中描述相似的方式制造的涂布有免疫原的板以及涂布 hAQP2/His/Sf - 9 的板中除去封闭液,以 100 μ L/ 孔向每块板中添加培养物上清液,令混合物在室温下反应过夜。

[0156] 第二天,用洗涤液对每块板洗三次,然后以 100 μ L/ 孔的量向板中添加使用 0.05%Tween - 20/0.1%BSA/PBS(-) 稀释了 5,000 倍的 HRP - 山羊抗小鼠 IgG (Bio - Rad, Cat. No. 170 - 6516),令混合物在室温下反应 2 小时。接着,用洗涤液对板洗五次。然后,以 100 μ L/ 孔向板中添加 OPD 片溶解而得的显色溶液,所述显色溶液是以与参考制造例 3 (2) (2 - 2) 中所述相似的方式制备的,令显色在室温下进行 10 至 30 分钟。以 100 μ L/ 孔添加 2N H₂SO₄,以终止反应。然后使用 iEMS Reader MF (Lab systems) 测量 492nm 处的吸光度。

[0157] 选择在涂布免疫原的板和涂布 hAQP2/His/Sf - 9 的板中均为阳性的孔进行克隆。

[0158] (1 - 4) 杂交瘤克隆

[0159] 通过有限稀释方法(limiting dilution method) 进行杂交瘤克隆。

[0160] 使用 70% 乙醇对用乙醚麻醉的免疫小鼠(雄性)进行消毒,然后无菌下取出脾脏。通过与上文(1 - 2) 中所述的脾细胞制备方法相似的操作制备饲养细胞(feeder cells)。将单只小鼠的脾细胞重悬于大约 40mL 的 10% 的 FCS/RPMI1640 中,并以 100 μ L/ 孔的量接种到 96 孔培养板上。根据细胞数对上文(1 - 3) 中阳性孔中的细胞根据细胞数进行系列稀释,并将其以 100 μ L/ 孔的量接种到已经接种了饲养细胞的 96 孔培养板上,在 5%CO₂ 中于 37℃培养细胞。

[0161] 重复若干次克隆和筛选,选出在筛选中为阳性、并且通过显微镜观察验证了其中含有单个克隆(single clone)的孔。通过有限稀释方法再次克隆该克隆。然后,在下一轮筛选中,验证了其中存在细胞的所有孔均为阳性以及其中不存在细胞的孔均为阴性。从该板选择单个克隆,并将其建立为产生单克隆抗体的杂交瘤。

[0162] 在 10%FBS/RPMI1640 中对建立的杂交瘤进行系列培养以扩张,产生了大约 50mL 的细胞培养物溶液(杂交瘤培养物溶液)。将大约 40mL 该溶液转移到 50mL 离心管中,并在室温下于 1200rpm 离心 5 分钟以收集细胞(杂交瘤)。将该细胞悬浮于 3mL 的细胞冻存液(cell banker) (JUJI FIELD, Cat. No. BLC - 1) 中,将悬浮液以各 1mL 分散进三个冻存管

(CryoTube)中,并在液氮中保存。将一部分经离心的上清液保存于 4°C,并对其进行抗体分型(antibody typing)和 Western 印迹分析。

[0163] (1-5) 腹水收集

[0164] 为了获得纯化的抗体用于建立 ELISA 检验系统,将上文获得的杂交瘤注射进小鼠,并收集含有大量抗体的腹水。

[0165] 具体而言,在室温下以 1200rpm 对(3-4)中制备的大约 10mL 细胞培养物溶液(杂交瘤培养物溶液)离心 5 分钟,以收集细胞(杂交瘤)。将用 PBS(-)洗涤了一次的细胞重悬浮于 1.5mL PBS(-)中,将各 0.5mL 的悬浮液试样注射进三只雄性小鼠的腹腔。已在细胞注射前至少三天,预先对每只小鼠以 0.5mL/只腹内注射了异十八烷(pristane)(2,6,10,14-四甲基十五烷;Sigma, Cat. No. T7640)。

[0166] 当注射了细胞的小鼠的腹部大小达到最大值时,收集腹水。无菌下采集单只小鼠的腹水,并在室温下以 1200rpm 离心五分钟,以收集上清液。然后,与饲养细胞的制备时相同地,使用 0.747%NH₄Cl 对沉淀中的红细胞进行溶血。用 RPMI1640 洗细胞,然后将其悬浮于 3mL 细胞冻存液中。将悬浮液以各 1mL 分散进三个冻存管,以在液氮中保存。将另外两只小鼠的腹水在室温下以 3000rpm 离心 10 分钟,以收集上清液。将来源于三只小鼠的上清液保存于 4°C。

[0167] (1-6) 抗体分型

[0168] 使用抗小鼠 Ig(IgG1、G2a、G2b、G3、M、k 链和 l 链)(BIONETICS)抗血清将获得的抗体分类为各亚类和 L 链型。

[0169] 从以与参考制造例 3(2)(2-2)相似的方式制造的涂布了免疫原的板除去封闭液,向其中以 100 μL/孔的量添加(1-4)中获得的培养物上清液,令其在室温下反应过夜。第二天,用洗涤液对板洗三次。使用 0.1%BSA/PBS(-)将抗小鼠 Ig(IgG1、G2a、G2b、G3、M、k 链和 l 链)抗血清中的每种稀释 1,000 倍,将 100 μL 每种稀释液添加至孔。令混合物在室温下反应 2 小时,用洗涤液对板洗三次,以 100 μL/孔添加使用 0.05%Tween-20/0.1%BSA/PBS(-)稀释了 10,000 倍的 HRP-山羊抗兔 IgG,令混合物在室温下反应 2 小时。接着,用洗涤液对板洗五次,以 100 μL/孔的量向其中添加以与参考制造例 3(2)(2-2)中相似的方式制备的溶解了 OPR 片的显色溶液,令显色在室温下进行 10 分钟。添加 100 μL/孔的 2N H₂SO₄ 以终止反应,使用 iEMS Reader MF (Lab Systems)测量 492nm 处的吸光度。

[0170] 显示出最强的反应的那些被确定为抗体的各亚类和 L 链。

[0171] (1-7) 通过 Western 印迹分析研究抗体的特异性

[0172] 以与参考制造例 3(2)(2-3)中相似的方式进行 Western 印迹分析,使经封闭的膜与(1-4)中获得的培养物上清液在室温下反应过夜。第二天,用洗涤液洗每张膜,使膜与使用 0.05%Tween-20/0.1%BSA/PBS(-)稀释了 3,000 倍的 HRP-山羊抗小鼠 IgG 在室温下反应 2 小时。用洗涤液洗膜,使用与参考制造例 3(2)(2-2)中所述相似的方法进行显色。

[0173] (2) 单克隆抗体制备的结果

[0174] 通过上述操作,从十只 hAQP2/Trx 免疫小鼠建立了产生单克隆抗体的杂交瘤的两个克隆。这些杂交瘤被命名为 OPH20401 和 OPH21402,从这些杂交瘤产生的抗体分别被命名为 OPM20401 和 OPM21402。对于 OPM20401 和 OPM21402 中的每种而言,亚类是 IgG1, L 链是

κ 链。

[0175] 通过 Western 印迹分析研究了这些抗体的特异性。如图 8 所示,两种抗体均与 hAQP2/Trx 和 hAQP2/His/Sf - 9 二者反应,但是不与 Trx/His 对照反应。因此认为上文获得的两种单克隆抗体为对人 AQP2 特异性的抗体。

[0176] 表 2

[0177]

抗体名	免疫原	经免疫的动物	形式	反应活性		
				hAQP2/ Trx	hAQP2/ His/ Sf - 9	Trx/His 对照
OPM21401	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	小鼠	腹水	+	+	-
OPM21402	大肠杆菌表达的融合了 Trx/His 的人 AQP2	小鼠	腹水	+	+	-

[0178] (3) 单克隆抗体的纯化

[0179] 向 2mL 上述(1)(1 - 5)中收集的小鼠腹水中添加 4mL 结合缓冲液(Binding Buffer) (3.3M NaCl/1.5M 甘氨酸, NaOH8.5g/L),将混合物在室温下静置 2 小时,然后以 3000rpm、30 分钟和 4°C 的条件进行离心,以收集上清液。将该上清液滤经 0.45 μm 过滤器,并应用至已经预先用上述结合缓冲液平衡过的蛋白质 - A Sepharose 柱。用结合缓冲液洗柱,用洗脱缓冲液(Elution Buffer) (Bio - Rad, Cat. No. 153 - 6162)洗脱,并立即用 2M Tris 中和。将洗脱液对 0.1M NaHCO₃ 渗析,然后测量 280nm 波长处的其吸光度,使用下式获得 IgG 浓度。

[0180] $\text{IgG 浓度 (mg/mL)} = \text{IgG 溶液的 OD}_{280} \text{ 值} \times 0.714$

[0181] 实验例 1 水通道蛋白 2 (AQP2) ELISA 的建立

[0182] 为了正确地监测多囊肾病(Polycystic kidney disease, PKD)的病理病况,检测了水通道蛋白 2 (AQP2)是否可应用作为针对该疾病的生物标志物的一种候选蛋白、使用针对水通道蛋白 2 (AQP2)的抗体的检验体系(ELISA)是否可被建立、以及 PKD 病理病况实际是否可使用该检验体系来监测。

[0183] 对 ELISA 而言,使用了多克隆抗体(抗体名:OPP21403)(见参考制造例 3)和单克隆抗体(抗体名:OPM21401)(见参考制造例 4),它们分别是通过下述方法制造的:克隆人 AQP2 基因,向其 N - 末端添加 Trx 标签,通过在大肠杆菌中表达被 Trx 标签化的基因制造“融合了 Trx 的 AQP2 蛋白”(见参考制造例 1),以及用制造的蛋白免疫兔和小鼠。

[0184] 作为 ELISA 的标准蛋白,使用了在大肠杆菌中表达的“融合了 GST 的 hAQP2 蛋白”。作为对照,使用了在昆虫细胞 Sf - 9 中表达的 His 标签化的人 AQP2 蛋白“hAQP2 - His/Sf - 9”(见参考制造例 2)。

[0185] (1) 用于建立 ELISA 的试验

[0186] (1-1) 对试验样品处理条件的研究

[0187] 因为 AQP2 是嵌于膜中的膜蛋白,研究了使用不影响检验体系的多种增溶剂(尿素、Triton X-100、NP-40、Tween-20、盐酸胍和 SDS)使得 AQP2 从膜中增溶的条件。

[0188] 具体地,将通过将“hAQP2-His/Sf-9”(其是嵌于昆虫细胞的膜中的人 AQP2 蛋白)悬浮于 PBS 中获得的液体(hAQP2-His/Sf-9 悬浮液)与等体积的多种增溶剂(尿素、Triton X-100、NP-40、Tween-20、盐酸胍或 SDS)中的每种混合,使用 10%FBS/0.1%BSA/PBS 将混合物稀释 10 倍,进行 ELISA。然后,以在 492nm 的波长处的吸光度测量了显色。

[0189] 图 9 显示了结果。

[0190] 如可从结果所理解的,验证了较之使用尿素或盐酸胍而言,当使用表面活性剂例如 Triton X-100、NP-40 或 Tween-20(它们是非离子性表面活性剂)或十二烷基硫酸钠(SDS,其是阴离子性表面活性剂)作为增溶剂时,AQP2 可更有效率、且以更高的产率从膜中被增溶。

[0191] (1-2) 对 ELISA 检验系统中稳定剂的研究

[0192] 为能够通过 ELISA 稳定测量增溶对象蛋白质(AQP2),针对用于使用一级抗体的反应中的第一缓冲液,进行了研究。

[0193] 具体地,向第一缓冲液(0.2%BSA/10mM EDTA/0.2M Tris-HCl (pH8.0))中添加的稳定剂在 ELISA 检验体系中是否影响显色是通过下述方法研究的:将每种稳定剂(尿素、Triton X-100、NP-40、Tween-20、盐酸胍和 SDS)以多种浓度(相对于 1%浓度的稀释率:1 倍、1/2 倍、1/4 倍、1/8 倍、1/16 倍、1/32 倍、1/64 倍和 1/128 倍)添加至第一缓冲液;并测量对象蛋白质(AQP2)在 492nm 的波长处的吸光度。

[0194] 通过下述方法制备对象蛋白质:用上文所述的增溶剂 SDS 完全增溶 hAQP2/Sf-9(其是嵌于昆虫细胞的膜中的人 AQP2 蛋白)的悬浮液;并使用 0.1%BSA/PBS 将该混合物稀释 2000 倍,以消除 SDS 的影响。

[0195] 图 10 显示了结果。如图 10 所示,当使用例如 Triton X-100、NP-40 和 Tween-20 等非离子性表面活性剂作为添加至第一缓冲液的稳定剂时,它们在等于或高于 0.063%(稀释率:1/16)的浓度时增加了测量灵敏度,而尿素、盐酸胍和 SDS 则使得显色劣化。因此确定,1%Triton X-100 可有利地用作为添加进第一缓冲液的稳定剂;换言之,确定了 0.2%BSA/10mM EDTA/2%Triton X-100/0.2M Tris-HCl (pH8.0)可有利地用作为用于 ELISA 检验中的第一缓冲液。

[0196] (1-3) 利用夹心 ELISA 的人 AQP2 检验体系

[0197] 在下文所述的(1-4)~(1-6)中,在 ELISA 标准蛋白研究、测试样品研究和与 Western 印迹分析的比较研究中使用下述 ELISA 检验体系。

[0198] (人 AQP2ELISA 检验体系)

[0199] 向 96 微孔板(NUNC)的每个孔中添加 100 μ L 使用 0.1M NaHCO_3 制备为 5 μ g/mL 的浓度的单克隆抗体(一抗:OPM21403),盖上盖子在室温静置 2 小时。从板中除去一抗溶液,以 400 μ L/孔添加封闭液(0.1%BSA/PBS(-)),封闭在室温下进行 1 小时或更长的时间。然后从板(一抗在其上形成为固相)除去封闭液,向每个孔中添加 100 μ L 第一缓冲液(0.2%BSA/2%Triton (注册商标)X-100/10mM EDTA/200mM Tris-HCl (pH8.0)),然后向其中加入 50 μ L 使用 0.1%BSA/PBS(-)制备为各浓度的标准蛋白质或试验样品,对板加以

密封并在室温下振荡过夜。

[0200] 第二天,用洗涤液(0.05%Tween - 20/0.9%NaCl)对板洗三次之后,向每个孔中添加 100 μ L 使用 10% 猪血清(porcine serum)/0.05%Tween - 20/0.1M Tris - HCl(pH8.0) 稀释了 5000 倍的多克隆抗体(二抗 :0PP21403),对板盖上盖子,并在室温下振荡。2 小时的反应后,用洗涤液对板洗三次,然后向板中的每个孔中添加 100 μ L 已使用 0.05%Tween - 20/0.1%BSA/PBS(-) 稀释了 10,000 倍的辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP) - 山羊抗兔 IgG (Biosource, Cat. No. ALI3404),对板盖上盖子,并在室温下振荡。2 小时,用洗涤液对板洗五次,然后向每个孔中添加 100 μ L TMB 显色液(ScyTek, Cat. No. TM4999),以在室温下进行显色。10 分钟后,向板中的每个孔中添加 100 μ L TMB 终止缓冲液(ScyTek, Cat. No. TSB999)以终止反应。使用软纸巾从板的底部擦净污渍和水,然后使用微孔板用吸光度仪(absorptiometer) (iEMS Reader MF, LABSYSTEMS)测定在 450nm 的波长处各孔的吸光度。

[0201] 基于标准蛋白的吸光度值制成标准曲线,基于该标准曲线测定试验样品中含有的 AQP2 的浓度。

[0202] (1 - 4) 对标准蛋白的研究

[0203] 关于标准蛋白,通过使用(1 - 3)中所述的 ELISA 检验体系,评估了来自大肠杆菌的 AQP2 和来自昆虫细胞的 AQP2 中的哪种适合用作为用于 ELISA 检验的标准蛋白。

[0204] 作为来自大肠杆菌的 AQP2,使用了通过参考制造例 1 中描述的方法制造的“融合了 Trx 的 AQP2 蛋白”。作为来自昆虫细胞的 AQP2,使用了通过参考制造例 2 中描述的方法制造并通过增溶剂增溶的“AQP2 - His/Sf9”。

[0205] 图 11 显示了使用上述蛋白质作为标准蛋白通过进行上文(1 - 3)中所述的 ELISA 检验而制成的标准曲线。如图 11 所示,在使用“融合了 Trx 的 AQP2 蛋白”作为标准蛋白以及使用经增溶的“AQP2/Sf9”作为标准蛋白的两种情况下,均观察到与测量的吸光度之间的浓度(剂量)依赖性相关性,并且两种曲线延伸为相互平行。因此,发现任一蛋白可用作为用于人 AQP2ELISA 检验的标准蛋白。

[0206] (1 - 5) 对试验样品的研究

[0207] 作为试验样品,使用从健康人类志愿者收集的、并且已经经过系列稀释的四份尿样(No. 4、5、6 和 9)进行上文(1 - 3)中描述的 ELISA 检验。图 12 显示了其结果(与使用“融合了 Trx 的 AQP2 蛋白”作为标准蛋白而制成的标准曲线一起作图而得的)。

[0208] 如图 12 所示,在用作为试验样品的所有四份尿样中,在稀释率与测量的吸光度之间观察到与标准曲线中相似的相关性。因此,验证了,使用尿作为试验样品时,上述 ELISA 检验体系能够对尿中含有的 AQP2 进行检测和定量。此外,以相似的方式对 10 名健康人类志愿者的尿进行了人 AQP2 测量。尿中的人 AQP2 的浓度在 0.93 ~ 8.84ng/mL 的范围内。此外,验证了上述 ELISA 检验体系中的检测限为 0.01ng/mL。

[0209] 图 13 的(A)显示了对 10 名健康人类志愿者进行的测量的结果,所述测量用于通过使用针对人 AQP2 的单克隆抗体(OPM21401) (参考制造例 3)进行的 Western 印迹分析对尿中的人 AQP2 进行定量。图 13 的(B)显示了针对相同的 10 名健康人类志愿者的尿、通过上述 ELISA 检验体系测量的尿中的人 AQP2 的量。从这些结果验证了,通过本发明的 ELISA 检验体系测量的尿中的人 AQP2 的量与 Western 印迹分析的结果实质上相关。应当注意,

从 Western 印迹分析的结果发现,来源于人的 AQP2 包括具有添加至其上的碳水化合物链的 AQP2 和不具有碳水化合物链的 AQP2。

[0210] (2) AQP2ELISA 方案

[0211] 基于上述研究,建立了具有下述方案的 AQP2ELISA 方法。

[0212] 1、使用 0.1M NaHCO₃ 将抗 AQP2 抗体(单克隆抗体:OPM21401)稀释为 5 μg/mL,将 100 μL 稀释液分散进每个孔,令混合物在室温下静置至少 2 小时。

[0213] 2、从每个孔除去抗 AQP2 抗体,向每个孔中添加 350 μL 的封闭液(0.1%BSA/PBS(-)),将板保持于 4°C 直至使用。

[0214] 3、从其上已经形成了抗体的固相的板除去封闭液,并向每个孔中添加 100 μL 第一缓冲液(0.2%BSA/10mM EDTA/2%Triton X-100/0.2M Tris-HCl (pH8.0))。

[0215] 4、向指定的孔中添加八个浓度水平(0、0.01、0.04、0.12、0.37、1.1、3.3 和 10ng/ml)的 50 μL 人 AQP2 标准品、和待测的 50 μL 试验样品(优选为尿),在室温下对板进行至少 2 小时的振荡。

[0216] 5、洗板,向每个孔中添加 100 μL 抗 AQP2 抗体(多克隆抗体:OPP21403)溶液(稀释了 5000 倍),在室温下对板振荡 2 小时。

[0217] 6、洗板,向每个孔中添加 100 μL 通过将经 HRP 标记的抗兔 IgG 稀释了 10,000 倍而获得的溶液,令反应在室温下进行 2 小时。

[0218] 7、洗板,向每个孔中添加 100 μL TMB 溶液,令反应进行 10 分钟,然后向每个孔中添加 2N 硫酸以终止反应。

[0219] 8、使用吸收分光仪(absorption spectrometer)获得 OD450 值,基于标准校正曲线(见图 14)测定试验样品中的 AQP2 浓度,所述曲线是基于人 AQP2 参照标准产生的。

[0220] 实验例 2 对用于试验样品的预处理条件的研究(No. 1)

[0221] 为研究对将用于实验例 1 中建立的对人 AQP2 蛋白进行的免疫测定法(ELISA)中的试验样品的预处理条件,使用尿作为试验样品进行了下述实验。作为尿,使用从一名健康人类志愿者收集的新鲜尿。

[0222] (1) 第一试验及其结果

[0223] 将新鲜尿以各 5mL 分散进 5 只 10mL 管中,各管在 37°C、23°C、4°C、-30°C 和 -80°C 的条件下(黑暗中)保存 24 小时。保存后,令每份样品在室温静置,以使得样品恢复至室温。

[0224] 使用每份样品作为试验样品,进行实验例 1 中建立的 AQP2ELISA,以测量尿中的人 AQP2 的量。作为对照,对一部分上述新鲜尿在收集之后不保存就立即进行上述 AQP2ELISA,以测量尿中人 AQP2 的量。

[0225] 从上述对照样品获得的人 AQP2 的量被定义为 100,测定了针对每份经保存的样品获得的人 AQP2 的量的相对比例。

[0226] 结果,如图 15 所示,在 37°C、23°C、4°C 和 -80°C 的条件下(黑暗中)保存的尿中的人 AQP2 的量较之对照样品中的人 AQP2 的量显著降低,而在 -30°C 保存的尿中的人 AQP2 的量则与对照样品中的人 AQP2 的量相同,没有观察到量的降低。

[0227] (2) 第二试验及其结果

[0228] 将在第一试验中已经在 37°C、23°C、4°C、-30°C 和 -80°C 的条件下(黑暗中)保存然后恢复至室温的每份尿样分进三根管中,这些管每只保存于 4°C、-30°C 和 -80°C 的条

件下(黑暗中) 24 小时。保存后,令每份样品在室温条件下静置以恢复至室温。

[0229] 使用每份样品作为试验样品,以与上文所述相似的方式测量了尿中的人 AQP2 的量。从在第一试验中保存于 -30°C 的试验样品获得的人 AQP2 的量被定义为 100,测定了针对每份经保存的样品获得的人 AQP2 的量的相对比例。

[0230] 结果,如图 15 所示,在第一试验中于 -30°C 保存的试验样品,在尿中的人 AQP2 的量没有实质性改变,无论样品在第二试验中是否保存于 -30°C 或保存于不是 -30°C 的温度条件(4°C 或 -80°C)。此外,在第一试验中保存于不是 -30°C 的温度条件(37°C 、 23°C 、 4°C 或 -80°C)下的试验样品的情况下,如果试验样品在第二试验中保存于 -30°C ,尿中人 AQP2 的量将变为接近 100。因此,发现对于 AQP2 测量来说将试验样品在 -30°C 保存一次是很重要的

[0231] (3) 第三试验、第四试验和第五试验及它们的结果

[0232] 将在第二试验中于 4°C 的条件下(黑暗中)保存过并且恢复至室温的每份尿样分进三只管,将这些管在 4°C 的条件下(黑暗中)再次保存 24 小时。保存后,令每份样品在室温条件下静置以恢复至室温。然后,从每份样品取一部分(第三试验)。以相似的方式进行第四试验和第五试验。

[0233] 使用这些试验(第三试验、第四试验和第五试验)后的每份样品作为试验样品,以与上文所述相似的方式测量尿中人 AQP2 的量。从在第一试验中保存于 -30°C 的试验样品获得的人 AQP2 的量被定义为 100,测定了针对上述每份试验样品获得的人 AQP2 的值的相对比例。

[0234] 结果,如图 15 所示,在保存条件为 37°C 、 23°C 、 4°C 或 -80°C 的情况下,AQP2 值的相对比例为 5 或更低,因此无法检测到 AQP2。但是,仅在应用了至少一次 -30°C 的条件时,成功检测到了 AQP2。在于第一试验中将试验样品保存于 -30°C 的情况下,无论在第二试验至第五试验的期间其被保存于 -30°C 还是保存于不是 -30°C 的温度条件(4°C 或 -80°C)下,尿中的人 AQP2 的量几乎不降低,保持稳定。此外验证了,甚至在于第一试验或第二试验中是在不是 -30°C 的温度条件(37°C 、 23°C 、 4°C 或 -80°C)下保存试验样品的情况下,如果在第二试验或第三试验后将其保存于 -30°C ,尿中人 AQP2 的量的减少被显著抑制。

[0235] 这些结果表明,当对试验样品(特别是尿)进行人 AQP2 蛋白的免疫测定法(ELISA)时,通过将试验样品在高于 -80°C 、更具体为 -70°C 至 0°C 、特别是 -30°C 或接近 -30°C 的温度(-35°C 至 -15°C)的温度条件下冷冻至少一次,能够以高产率准确地测量人 AQP2。

[0236] 实验例 3 对用于试验样品的预处理条件的研究(No. 2)

[0237] 为研究对将用于实验例 1 中建立的对人 AQP2 蛋白进行的免疫测定法(ELISA)中的试验样品的预处理条件,使用尿作为试验样品进行了下述实验。作为尿,使用从健康人类志愿者的新鲜尿。

[0238] 将各 0.5mL 新鲜尿分散进七只 Eppendorf 管中的每只中,并在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 的温度下(黑暗中)冷冻 1 天、3 天、7 天、15 天、21 天、28 天和 56 天。保存后,令每份样品在室温下静置以使样品恢复至室温。使用每份样品作为试验样品,进行实验例 1 中建立的 AQP2ELISA,以测量尿中人 AQP2 的量。

[0239] 图 16 显示了结果。如图 16 所示,通过 ELISA 成功测量了在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 的温度下冷冻了 3 天、7 天、15 天、21 天、28 天和 56 天的所有尿样中的人 AQP2 的量。验证了:当尿(生

物样品) 在冷冻状态下保持一定时间(例如大约 2 周) 或更长时, 测量的值是稳定的。这些结果表明, 在对试验样品(特别是尿) 中的人 AQP2 蛋白进行的免疫测定法(ELISA) 中, 通过将生物样品保持于冷冻状态大约 2 周或更长的时间, 可以以高准确度定量测量生物样品中的人 AQP2 蛋白。

[0240] 基于上述结果, 冷冻期被设置为 2 周, 研究了冷冻温度的效果(− 80°C、− 30°C、− 28°C、− 26°C、− 20°C、4°C)。

[0241] 更具体地, 使用从两名健康人类志愿者获得的新鲜尿样(No. 1 和 2), 对于各样品, 以各管 0.5mL 分散进六只 Eppendorf 管中的每只中, 并于 − 80°C、− 30°C、− 28°C、− 26°C、− 20°C 和 4°C (黑暗中) 保存 2 周。保存后, 令每份样品于室温静置以使样品恢复至室温。使用每份样品作为试验样品, 进行了实验例 1 中建立的 AQP2ELISA, 以测量尿中的人 AQP2 的量。

[0242] 图 17 显示了结果。如图 17 所示, 保存于 − 80°C 和 4°C (黑暗中) 的尿样中的 AQP2 的量低于检测限, 而在 − 30°C、− 28°C、− 26°C 和 − 20°C (黑暗中) 保存了 2 周的尿样中的 AQP2 的量全部均通过 ELISA 成功检测到。

[0243] 上述结果验证了, 当用于对人 AQP2 蛋白进行的免疫测定法(ELISA) 中的尿在大约 − 30°C 至大约 − 20°C 的冷冻温度条件下冷冻了大约 2 周或更长的时期后, 可以以高产率准确地测量尿中的人 AQP2 蛋白的量。

[0244] 序列表

[0245] SEQ ID NO. 2 和 3 是用于通过 PCR 扩增人 AQP2 基因 N-末端部分(hAQP2/ 前半部分, hAQP2N)的正向引物(hAQP2N-F)和反向引物(hAQP2N-R)的碱基序列。SEQ ID NO. 4 和 5 是用于通过 PCR 扩增人 AQP2 基因 C-末端部分(hAQP2/ 后半部分, hAQP2C)的正向引物(hAQP2C-F)和反向引物(hAQP2C-R)的碱基序列。

[0001]

序列表

<110> 大冢制药株式会社
 <110> 国立大学法人东京医科齿科大学
 <120> 对含有蛋白的生物样品进行预处理的方法
 <130> P12-114
 <150> JP 2011-176272
 <151> 2011-08-11
 <160> 5
 <170> PatentIn 版本 3.4
 <210> 1
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 1
 Met Trp Glu Leu Arg Ser Ile Ala Phe Ser Arg Ala Val Phe Ala Glu
 1 5 10 15
 Phe Leu Ala Thr Leu Leu Phe Val Phe Phe Gly Leu Gly Ser Ala Leu
 20 25 30
 Asn Trp Pro Gln Ala Leu Pro Ser Val Leu Gln Ile Ala Met Ala Phe
 35 40 45
 Gly Leu Gly Ile Gly Thr Leu Val Gln Ala Leu Gly His Ile Ser Gly
 50 55 60
 Ala His Ile Asn Pro Ala Val Thr Val Ala Cys Leu Val Gly Cys His
 65 70 75 80
 Val Ser Val Leu Arg Ala Ala Phe Tyr Val Ala Ala Gln Leu Leu Gly
 85 90 95
 Ala Val Ala Gly Ala Ala Leu Leu His Glu Ile Thr Pro Ala Asp Ile
 100 105 110
 Arg Gly Asp Leu Ala Val Asn Ala Leu Ser Asn Ser Thr Thr Ala Gly
 115 120 125
 Gln Ala Val Thr Val Glu Leu Phe Leu Thr Leu Gln Leu Val Leu Cys
 130 135 140
 Ile Phe Ala Ser Thr Asp Glu Arg Arg Gly Glu Asn Pro Gly Thr Pro
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ile Gly Phe Ser Val Ala Leu Gly His Leu Leu Gly Ile
 165 170 175
 His Tyr Thr Gly Cys Ser Met Asn Pro Ala Cys Ser Leu Ala Pro Ala
 180 185 190
 Val Val Thr Gly Lys Phe Asp Asp His Trp Val Phe Trp Ile Gly Pro
 195 200 205
 Leu Val Gly Ala Ile Leu Gly Ser Leu Leu Tyr Asn Tyr Val Leu Phe

[0002]

210	215	220	
Pro Pro Ala Lys Ser Leu Ser Glu Arg Leu Ala Val Leu Lys Gly Leu			
225	230	235	240
Glu Pro Asp Thr Asp Trp Glu Glu Arg Glu Val Arg Arg Arg Gln Ser			
	245	250	255
Val Glu Leu His Ser Pro Gln Ser Leu Pro Arg Gly Thr Lys Ala			
	260	265	270
<210> 2 <211> 30 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> 正向引物 (hAQP2N-F) <400> 2 ggccatgcat gtggagctc cgtccatag 30			
<210> 3 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> 反向引物 (hAQP2N-R) <400> 3 cgtagttagta gaggaggag cc 22			
<210> 4 <211> 22 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> 正向引物 (hAQP2C-F) <400> 4 cccgtctctc tccatagct tc 22			
<210> 5 <211> 29 <212> DNA <213> 人工的 <220> <223> 反向引物 (hAQP2C-R) <400> 5 ccaagcttcc aggccttggc accccgtgg 29			

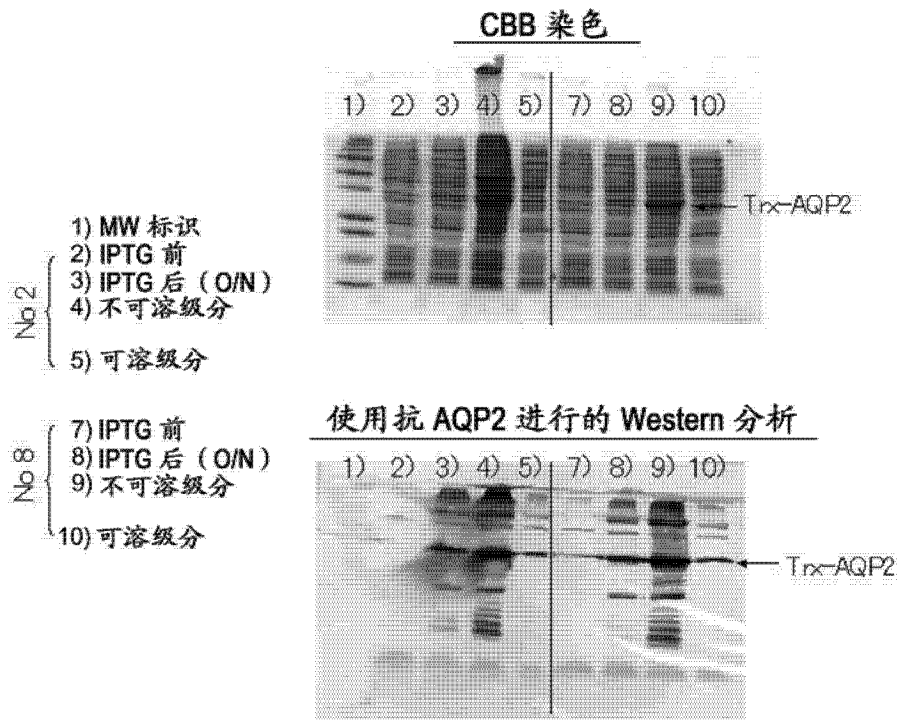
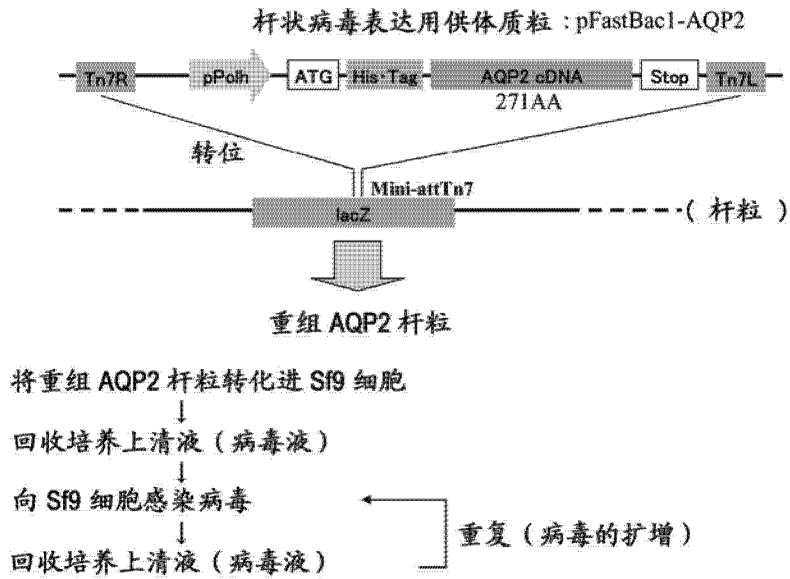


图 3

(1)



(2)

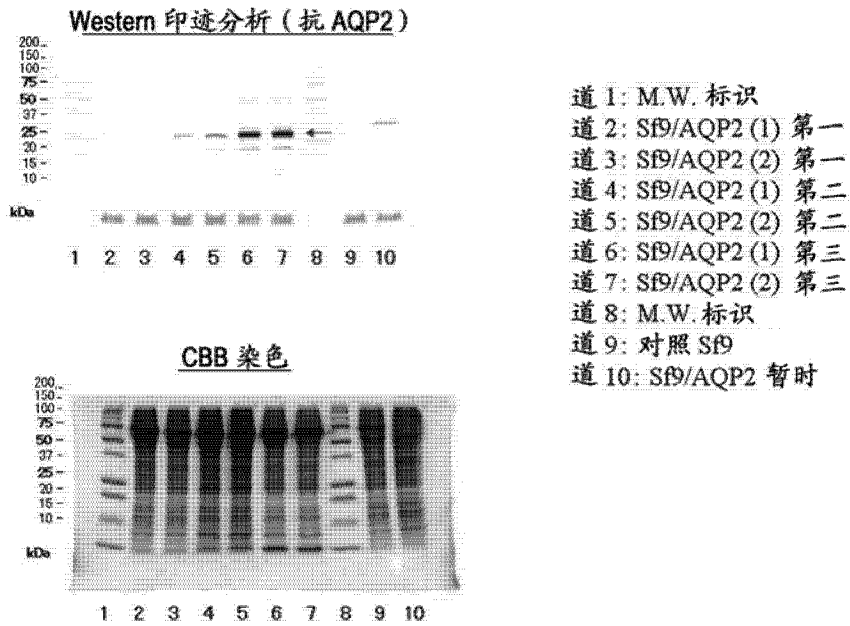


图 4

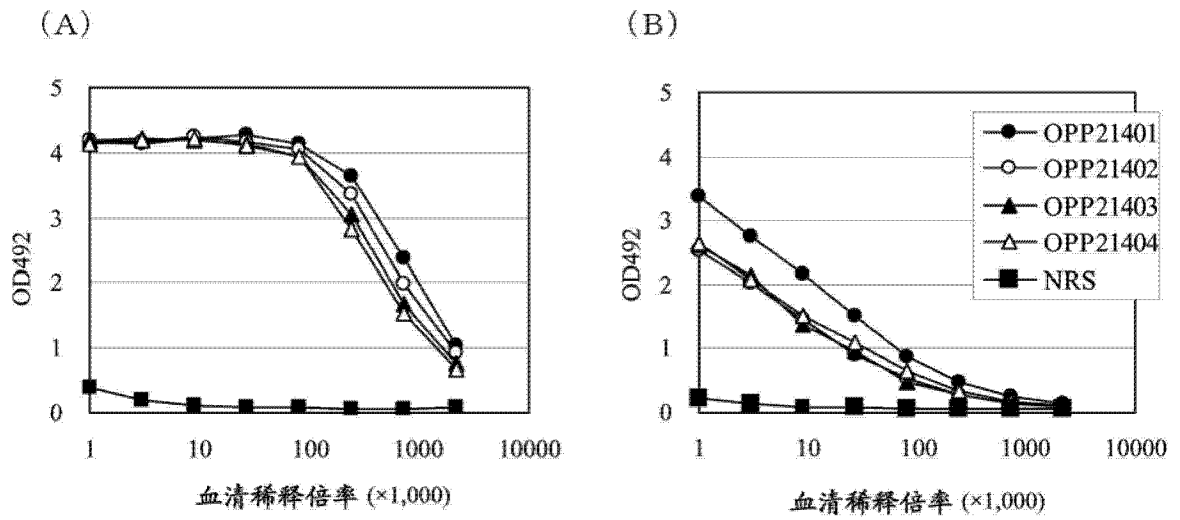


图 5

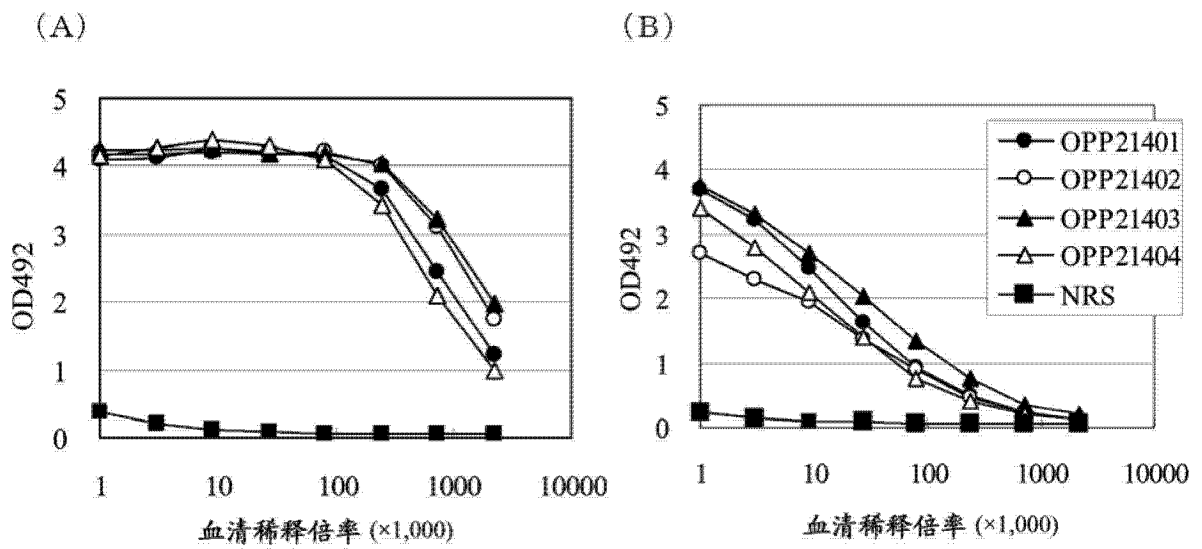


图 6

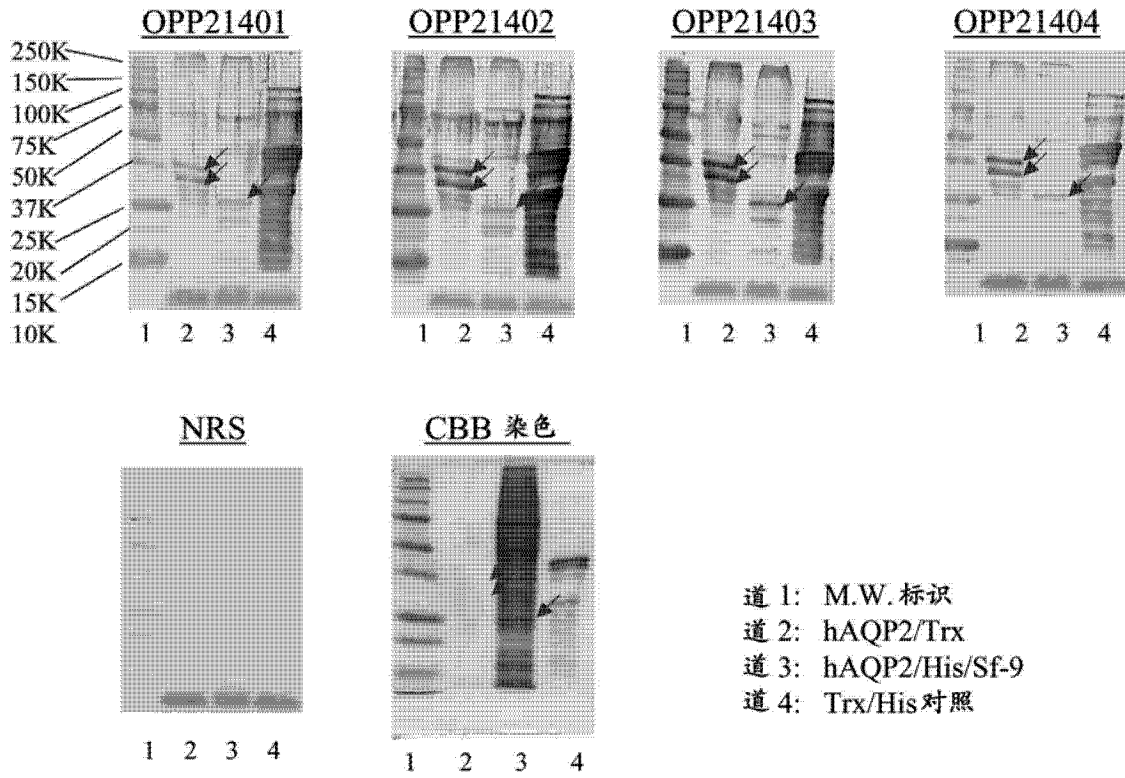


图 7

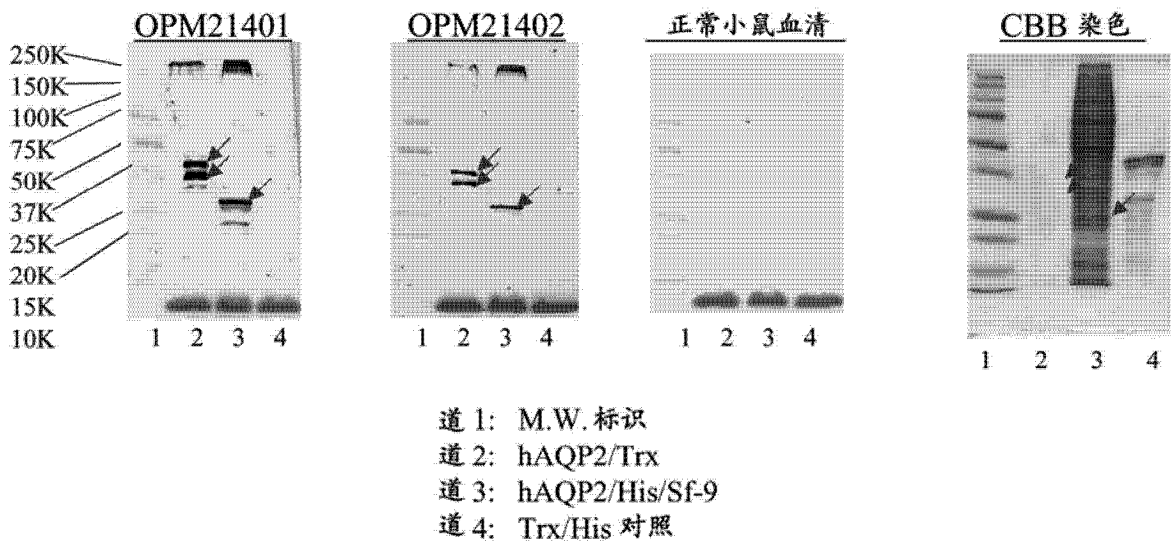


图 8

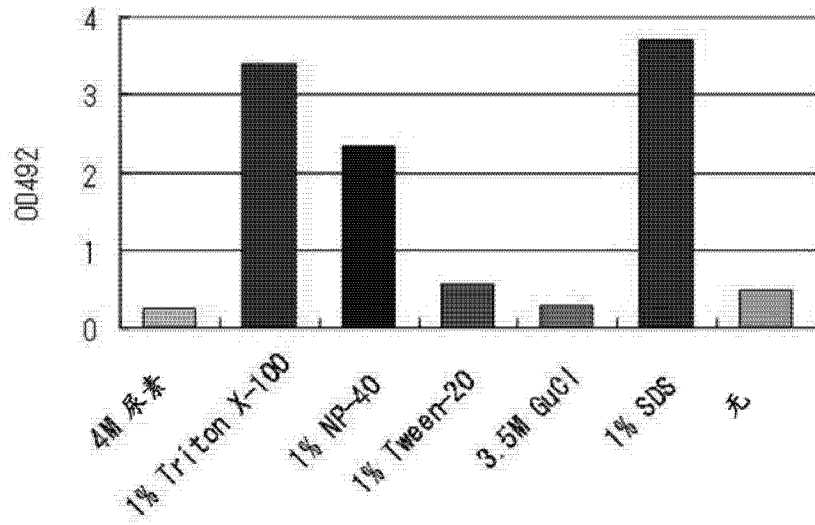


图 9

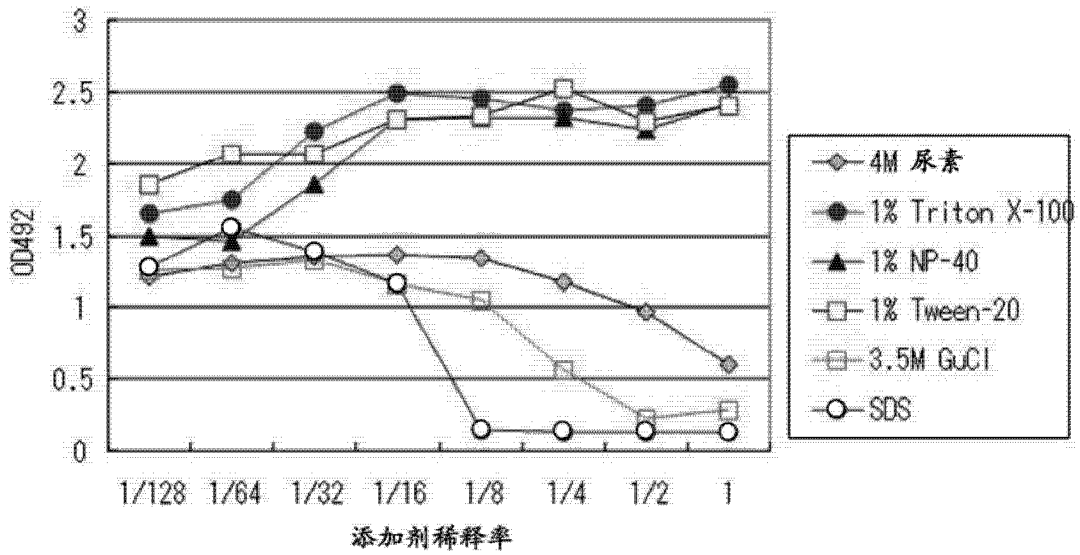


图 10

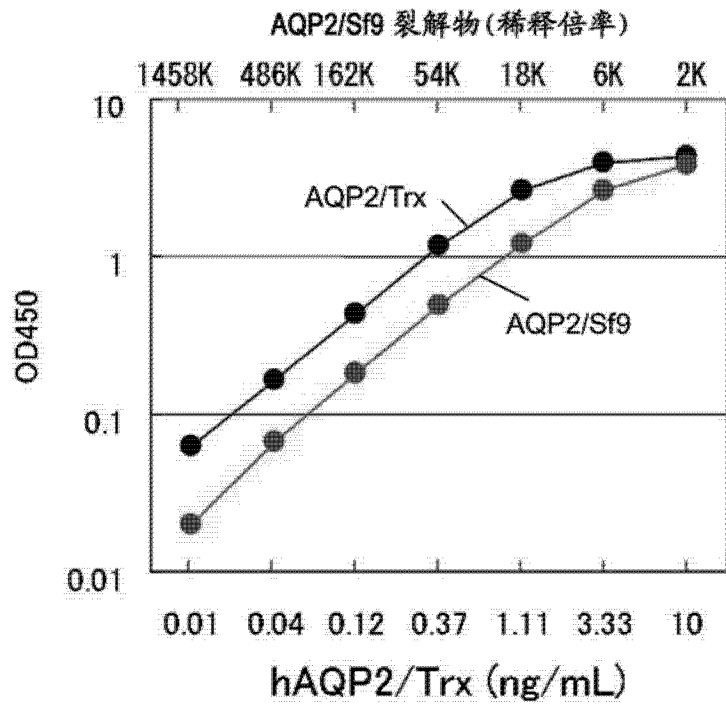


图 11

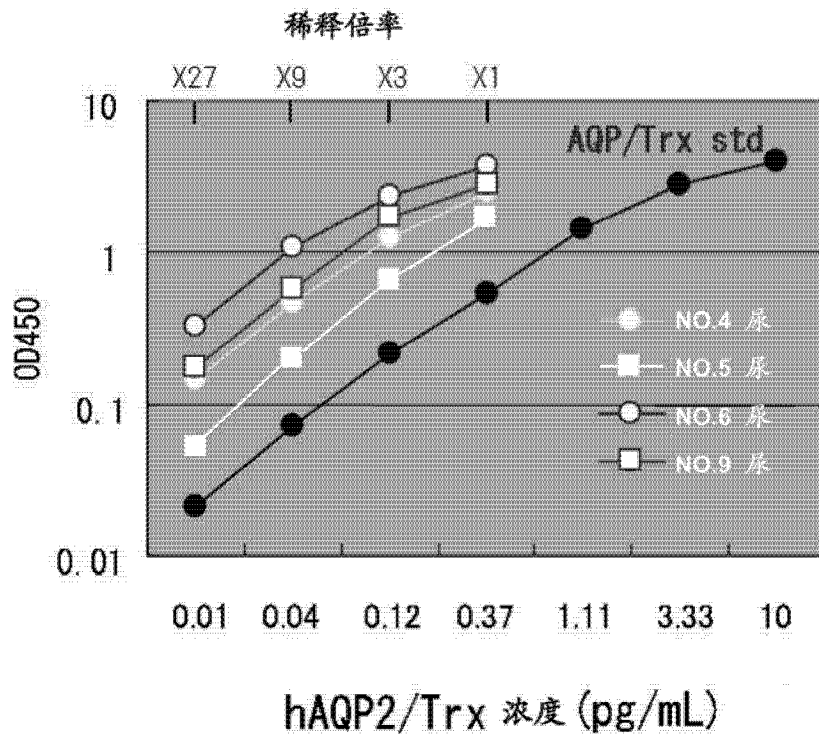


图 12

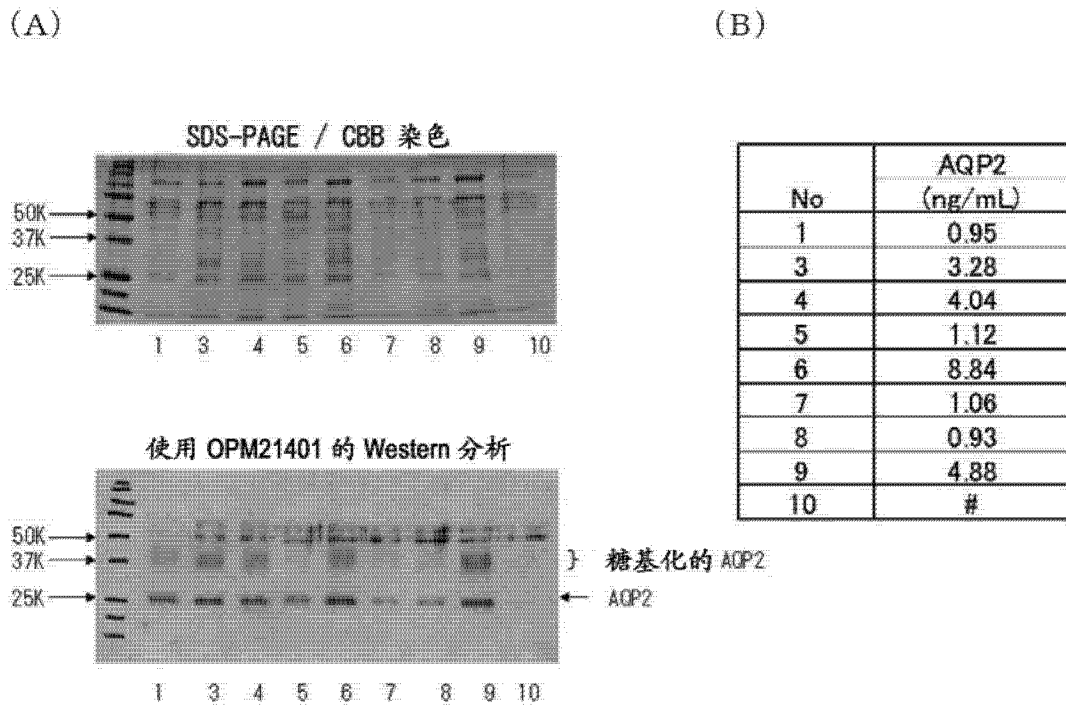


图 13

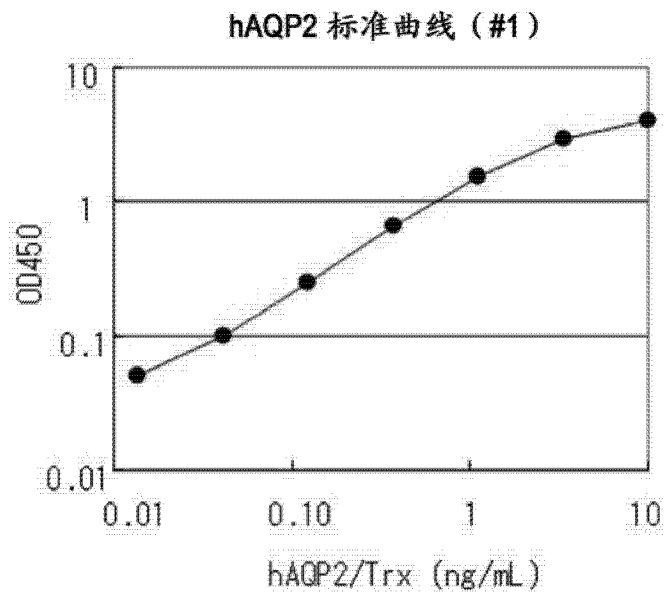


图 14

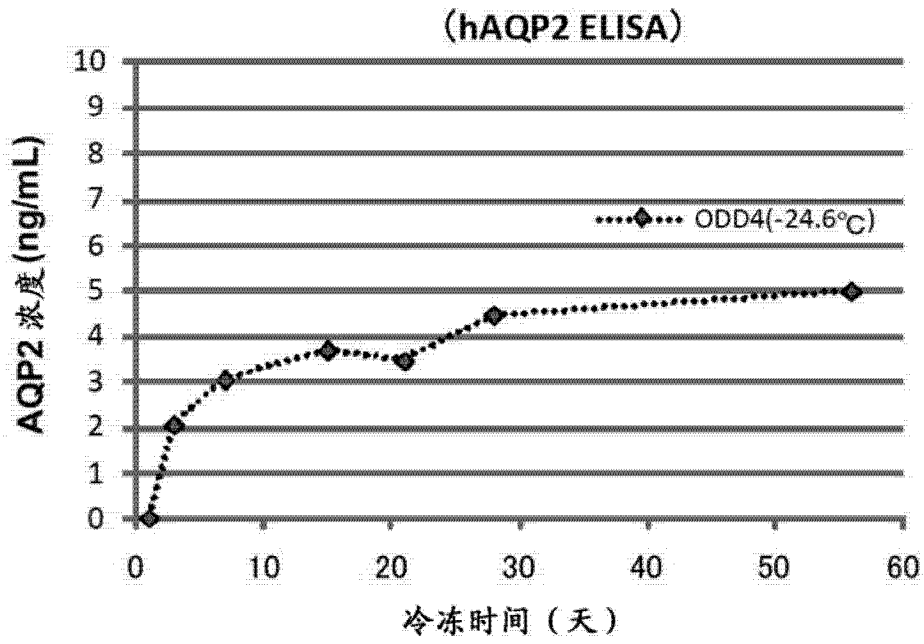


图 16

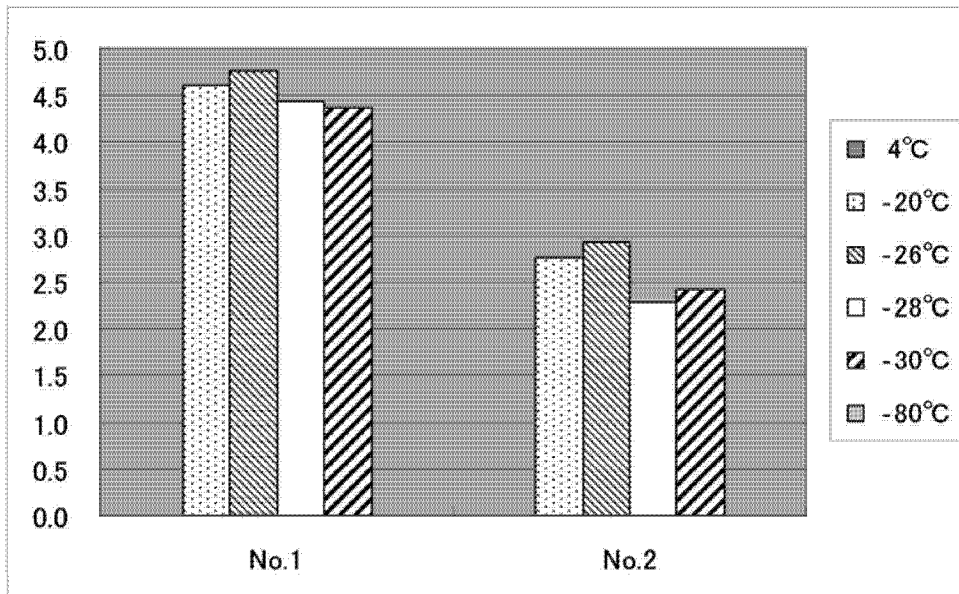


图 17

专利名称(译)	对含有蛋白的生物样品进行预处理的方法		
公开(公告)号	CN103842820A	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201280039016.2	申请日	2012-08-10
申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社 国立大学法人东京医科齿科大学		
当前申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社 国立大学法人东京医科齿科大学		
[标]发明人	佐佐木成 大本安一 森丰树 岩田房子 村口正宏		
发明人	佐佐木成 大本安一 森丰树 岩田房子 村口正宏		
IPC分类号	G01N33/543 G01N1/28 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/42 G01N33/5306 G01N33/6872		
代理人(译)	杨宏军		
优先权	2011176272 2011-08-11 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了在对生物样品中含有的蛋白质进行的免疫测定法中对生物样品进行预处理的方法。所述方法包括下述步骤：(1)在高于-80°C的温度下、特别是在-70°C或更高的温度下冷冻生物样品；(2)解冻经冷冻的生物样品；和(3)使用表面活性剂对生物样品进行增溶。

抗体名	免疫原	经免疫的动物	形式	反应活性		
				hAQP2/Trx	hAQP2/His/Sf-9	Trx/His对照
OPP21401	大肠杆菌表达的融合了Trx/His的人AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21402	大肠杆菌表达的融合了Trx/His的人AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21403	大肠杆菌表达的融合了Trx/His的人AQP2	兔	血清	+	+	-
OPP21404	大肠杆菌表达的融合了Trx/His的人AQP2	兔	血清	+	+	-