



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101960307 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 200980106328. 9

A61P 9/12(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 02. 27

C12Q 1/37(2006. 01)

G01N 33/48(2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-049198 2008. 02. 29 JP

(56) 对比文件

CN 1867828 A, 2006. 11. 22, 权利要求 1、说明书地 49、95 段 .

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 25

CN 1864067 A, 2006. 11. 15, 全文 .

CN 1945328 A, 2007. 04. 11, 全文 .

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2009/000903 2009. 02. 27

审查员 高宇

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/107398 JA 2009. 09. 03

(73) 专利权人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 海老沼宏幸

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 苗莹 金世煜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

A61K 38/22(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

高分子量脂联素的测定方法

(57) 摘要

本发明提供一种将多聚体脂联素中的高活性型HMW脂联素分级测定的方法。即,一种样品中高分子量脂联素的测定方法,是使用蛋白酶将多聚体脂联素分级并免疫学性测定的方法,其特征在于,使糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品。

1. 一种糜蛋白酶和结合有与脂联素特异性结合的抗体的不溶性载体在制备免疫学测定脂联素的试剂盒中的应用,其特征在于,所述免疫学测定包括使糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品。

2. 如权利要求 1 所述的糜蛋白酶和结合有与脂联素特异性结合的抗体的不溶性载体在制备免疫学测定脂联素的试剂盒中的应用,其中,样品为人、小鼠或大鼠的血清或血浆。

高分子量脂联素的测定方法

[0001] 技术区结构域

[0002] 本发明涉及将生物样品中所含多聚体脂联素内的高分子量 (HMW) 部分分级分离并进行免疫学测定的方法。

背景技术

[0003] 脂联素,是脂肪组织特异性产生、分泌的,具有抗糖尿病作用、抗动脉硬化作用的激素,血中相对富含。近几年,伴随着肥胖、尤其是由内脏脂肪蓄积引起的低脂联素血症被认为与糖尿病、动脉硬化性疾病、高血压的发病紧密相关。

[0004] 脂联素已被报道为在构造上属于 C1q (Complement 1q) 家族,具有作为 C1q 家族特征的胶原样结构域,因而形成以三聚体作为基础的多聚体而存在。最近,由本发明人等已解明人血中存在的多聚体脂联素的形态(包含白蛋白结合型的三聚体、六聚体及 HMW 部分),并且还报道了以促进糖摄取、脂肪酸燃烧的 AMPK (adenosine monophosphate activated protein kinase) 的磷酸化作为指标的多聚体脂联素的活化作用中, HMW 型表现最高的活性(非专利文献 1)。加之还公开了通过向含人来源多聚体脂联素的生物样品作用某种的蛋白酶来选择性地消化测定对象以外的部分,免疫学性测定残留的脂联素,从而直接将 HMW 脂联素浓度、并间接将三聚体、六聚体部分各自分别测定的方法(专利文献 1、非专利文献 2)。

[0005] 并且,还报道了利用本分级分离测定系的糖尿病及冠状动脉疾病组的多聚体脂联素临床研究中,作为胰岛素抵抗性、代谢综合征的预知指标,在总浓度中 HMW 脂联素所占比(HMWR) 具有高于总浓度以上的灵敏度、特异性这样的见解(非专利文献 3)。因此,期待不只是对总浓度,还对各部分进行分级分离测定的临床有用性。

[0006] 另一方面,代谢综合征关联疾病(糖尿病、高血压、高脂血症)的治疗药中存在增加脂联素的作用,引人关注。例如,作为胰岛素抵抗性改善药的噻唑烷衍生物被报道增加 HMW 脂联素(非专利文献 4)。除此之外最近还报道有,被分类于降压剂的血管紧张素受体拮抗剂的某药、高脂血症治疗药的部分的药中也存在增加脂联素的作用(非专利文献 5),期待对代谢综合征疾病组中高频度被确认的胰岛素抵抗性的改善。

[0007] 如上所述,在代谢综合征关联疾病的药物开发中,存在增加脂联素的作用属于有用的附加价值。并且,不仅在药物开发,保健食品领域中也备受瞩目,在全力探索这种具有脂联素增强作用的功能性食品。

[0008] 药品、功能性食品的功效效果,通常先用小鼠、大鼠等实验动物进行,而对于增加脂联素的作用,利用实验动物的血中脂联素浓度的变化作为指标是有用的(如专利文献 2、3)。小鼠、大鼠的脂联素浓度已作为测定试剂盒在市场上销售,可以获得,不过,仅仅测定总量,无法分级分离多聚体脂联素,尤其需要可对高活性型 HMW 脂联素进行分级测定的方法。

[0009] 本发明人等发现了通过对人活体样品中存在的多聚体脂联素作用特定的蛋白酶,从而将多聚体脂联素分级分离测定的方法(专利文献 1,非专利文献 2),并发现将此时所利用的蛋白酶应用到对小鼠来源多聚体脂联素的分级分离测定中的尝试时,发现尤其是对 HMW 部分无法进行正确的测定这一有意思的情况。

[0010] 而 Pajvani 等使用重组表达的小鼠来源脂联素, 报告了胰蛋白酶的消化特异性, 但示出了虽然低分子量部分 (LMW) 消化, 但是中分子量部分 (MMW)、HMW 部分不被消化的情况, 对于 HMW 脂联素的分级测定并不合适 (非专利文献 6)。

[0011] 背景技术文献

[0012] 专利文献 1 : 国际公开 W02005/038457 公报

[0013] 专利文献 2 : 日本特开 2005-232150 号公报

[0014] 专利文献 3 : 日本特开 2006-56836 号公报

[0015] 非专利文献 1 : Hada Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 356 : 487-493, 2007.

[0016] 非专利文献 2 : Ebinuma H, et al. Clinica Chimica Acta. 372 : 47-53, 2006.

[0017] 非专利文献 3 : Hara K, et al. Diabetes Care. 29 : 1357-1362, 2006.

[0018] 非专利文献 4 : Tsuchida A, et al. Diabetes. 54 : 3358-3370, 2005.

[0019] 非专利文献 5 : Nakano S, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 292 : 1213-1222, 2007.

[0020] 非专利文献 6 : Pajvani UB, et al. J Biol Chem. 278 : 9073-85, 2003.

发明内容

[0021] 本发明的目的在于, 提供一种将多聚体脂联素中的高活性型 HMW 脂联素分级测定的方法。

[0022] 本发明人等, 为解决上述课题进行锐意研究的结果, 发现了通过使各种蛋白酶中的糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品, 在小鼠、大鼠等中也能选择性地消化 HMW 部分以外的脂联素, 以及利用糜蛋白酶的消化处理之后, 将残留的 HMW 脂联素进行免疫学性测定, 就可以分级测定 HMW 脂联素。

[0023] 即, 本发明提供一种样品中 HMW 脂联素的分级测定方法, 其特征在于, 是使用蛋白酶将多聚体脂联素分级分离并进行免疫学性测定的方法, 使糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品。

[0024] 根据本发明, 不仅是人, 还可以将小鼠、大鼠等的多聚体脂联素中的 HMW 脂联素分级分离进行测定, 所以更能正确地评价所开发的药、功能性食品等的脂联素增强作用。

附图说明

[0025] 图 1 为表示糜蛋白酶对小鼠来源多聚体脂联素的消化特异性的图。

[0026] 图 2 为表示糜蛋白酶对大鼠来源多聚体脂联素的消化特异性的图。

[0027] 图 3 为表示胰蛋白酶对小鼠、大鼠以及人来源多聚体脂联素的消化特异性的图。A 是小鼠血清, B 是大鼠血清, C 是人血清。

[0028] 图 4 为表示蛋白酶 K 对人和小鼠来源多聚体脂联素的消化特异性的图。A 是人血清, B 是小鼠血清。

[0029] 图 5 为表示糜蛋白酶对人来源多聚体脂联素的消化特异性的图。

[0030] 图 6 为表示利用凝胶过滤分离检测法的小鼠高分子量脂联素的测定结果的图。

[0031] 图 7 为表示 ELISA 测定和凝胶过滤分离检测法之间的相关性的图。

[0032] 图 8 为表示糜蛋白酶处理法和蛋白酶 K 处理法中的人来源高分子量脂联素测定结

果的相关性的图。

具体实施方式

[0033] 作为本发明中能使用的样品,只要含有哺乳类来源多聚体脂联素都可以成为对象,可举出从哺乳类获得的血液、尿等的体液,组织萃取液、组织来源的细胞的培养上清液等。在此,作为哺乳类可举出小鼠、大鼠等的啮齿类以及人等。其中,作为用于对所开发的药品、功能性食品等的脂联素增强作用作更正确评价的样品,优选小鼠或大鼠的血液(血清、血浆),特别优选小鼠的血液。另外,作为用于诊断糖尿病等的样品优选人的血液(血清、血浆)。

[0034] 对将 HMW 脂联素分级分离并免疫测定的方法进行说明。使糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品,消化 HMW 部分以外的脂联素,利用糜蛋白酶的消化处理之后,将残留的 HMW 脂联素用抗脂联素抗体进行免疫学性测定。本发明使用的糜蛋白酶的纯化物可作为市售物购得,也可以使用提纯到本发明可实现程度的物质。并且,即使由基因重组技术获得也没有问题。而且,只要具有糜蛋白酶活性也可以实施化学修饰。

[0035] 生物样品的利用糜蛋白酶的处理优选在磷酸、Tris、Good's 缓冲液等缓冲液中,4~60℃,优选 4~45℃ 下进行 5 分钟~24 小时。糜蛋白酶的使用浓度将考虑反应温度及反应时间等决定,但大概在 0.1~1000u/mL 的范围使用,进而优选在 1~100u/mL 的范围使用。糜蛋白酶处理的糜蛋白酶使用浓度、反应温度和反应时间因样品动物种而不同,所以优选通过预备试验预先确认只不消化样品中 HMW 脂联素的条件。在此所说的糜蛋白酶活性(u)表示,在 pH7.8 的条件下、于 25℃,N-苯甲酰-L-酪氨酰乙酯(BTEE)在每 1 分钟水解 1 μmole 的量。

[0036] 利用糜蛋白酶进行预处理的样品中的多聚体脂联素由糜蛋白酶所消化, HMW 脂联素残留,所以对该样品中的脂联素浓度进行使用抗脂联素抗体的免疫测定就可以仅将 HMW 脂联素分级测定。因此,经糜蛋白酶处理样品的免疫学性测定可使用利用抗脂联素抗体的通常的方法进行。

[0037] 作为以糜蛋白酶处理样品、测定残留 HMW 脂联素的抗体,可使用能识别脂联素的抗体。抗脂联素抗体可以使用单克隆抗体和多克隆抗体的任一个,可通过公知方法对合适的动物进行免疫而获得,也可以作为市售品购入并用于本发明。例如,抗小鼠脂联素抗体可举出“Anti-mouse 脂联素单克隆抗体”和“Anti-mouse 脂联素多克隆抗体, Goat”(R&D Systems 公司)、“Anti-mouse 脂联素, mAd(MADI04)”(AdipoGen 公司)、“Anti-mouse 脂联素单克隆抗体”(CHEMICON 公司)等,抗大鼠脂联素抗体可举出“Anti-rat 脂联素多克隆抗体, Goat”(R&D Systems 公司)、“Anti-rat 脂联素单克隆抗体”、“Anti-rat 脂联素多克隆抗体, Rabbit”(CHEMICON 公司)等。作为抗人脂联素抗体可举出 Goat α human Acrp30 antibody(COSMO BIO 公司, GT 公司), rabbit α hu adiponectin-PoAb(COSMO BIO 公司, chemicon 公司)、hu Acrp30-MoAb(藤泽药品工业公司, BD 公司)、Mouse α hu 脂联素 MoAb(COSMO BIO 公司, chemicon 公司)、抗人 ACRP30 单克隆抗体(AX773, AX741, Ne, Na, 和光纯药工业公司)等。这些的抗体可以各自单独使用或适当组合使用。另外,也可以使用市售的测定脂联素总量的试剂盒。除此之外,还可以利用对生物样品,将还原剂、酸或其盐、表面活性剂以及糜蛋白酶以外的蛋白酶中的至少一个或二个以上的组合作用于

脂联素,使多聚体脂联素转换为规定的形态并进行免疫学性测定的本发明人等开发的方法(WO2005/038458)。

[0038] 作为本发明的免疫学性测定方法可使用将对脂联素特异性结合的抗体结合到不溶性载体,由其捕捉脂联素,对样品中存在的脂联素的有无进行确认(定性)或定量的方法。其中可举出被称为 LTIA(胶乳免疫比浊)法、ELISA(酶联免疫吸附测定)法、CLEIA(化学发光酶免疫分析方法)、RIA(放射免疫分析)等方法。其中,LTIA 法是通过将搭载了与脂联素特异性结合的抗体的不溶性载体、和预先使糜蛋白酶作用而残留的 HMW 脂联素进行混合,由此引发介由脂联素的不溶性载体的交联(凝集),再将由此所产生的浊度进行光学测定,从而对脂联素的有无进行确认(定性)或定量的方法,优选用于简便、迅速且正确地测定 HMW 脂联素。

[0039] 作为本发明使用的不溶性载体,使用通常的免疫学性测定试剂中使用的能工业化大量生产的有机系不溶性载体。在 LTIA 中优选使用抗体吸附性出色且能长期间稳定地保持生物学活性的聚苯乙烯系胶乳颗粒,在 ELISA 中优选使用聚苯乙烯等的 96 孔微孔板。

[0040] 在上述不溶性载体表面搭载抗体的方法已知的有各种各样,可在本发明中适宜利用。例如,作为搭载(致敏)方法可举出不溶性载体表面物理性吸附抗体的方法、在具有官能团的不溶性载体表面通过属于已知方法的物理结合法和化学结合法有效地将抗体致敏的方法。

[0041] 关于搭载了抗体的抗体不溶性载体和脂联素的反应,只要是能进行抗原抗体反应的条件则对其反应条件不特别限定。作为反应液,只要能进行与脂联素的抗原抗体反应的溶液,任何溶液都可以。例如,用于控制 pH 的磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good's 缓冲液等的缓冲成分,用于避免非特异性反应的表面活性剂、氯化钠等,作为稳定剂的牛血清白蛋白、蔗糖、高分子多糖类等,除了控制反应性的上述物质以外还可以适宜添加糊精等的水溶性多糖类、还原剂、酸中和剂、蛋白酶钝化剂等添加剂。

[0042] 作为上述 LTIA、ELISA 中的检测方法,可例举以下的方法。对 LTIA 中的不溶性载体的凝集程度进行测定的方法不特别限定,例如,对凝集进行定性或半定量性的测定时,可通过比较已知浓度样品的浊度程度与测定样品的浊度程度,目测凝集程度进行判断。如果定量性测定该凝集时,从简便性及精度的观点出发,优选光学性测定。作为凝集的光学性测定法,可以利用公知方法。更具体为,例如可利用所谓的比浊法(将凝集块的形成作为浊度增加进行捕捉)、利用粒度分布的测定法(将凝集块的形成作为粒度分布或平均粒径的变化进行捕捉),积分球浊度法(用积分球测定由凝集块的形成而引起的前方散射光的变化,比较与透射光强度的比)等各种的方式。对 ELISA 中的酶标记抗体的酶活性来源的、底物和酶反应生成物的测定方法不特别限定。例如,可以用 96 孔酶标仪在酶反应生成物固有的波长,例如作为底物使用邻苯二胺盐酸盐和过氧化氢检测 HRP 标记抗体的酶活性等时,在 492nm 的吸光度上读取。

[0043] 而且,对生物样品不进行糜蛋白酶处理时,由于可测定脂联素的总量,所以能简单地求出通过糜蛋白酶处理而算出的 HMW 脂联素的比率。

[0044] 实施例

[0045] 接着举出实施例对本发明进行详细说明,但本发明并不受这些的任何限定。

[0046] 实施例 1 对小鼠血清中的多聚体脂联素的消化特异性

[0047] 小鼠血清 10 μ L 中,以 α -糜蛋白酶 (Type I-S; No. C7762, Sigma-Aldrich 公司) 成为 10 u/mL 的方式,添加溶解于 50 mM Tris 盐酸缓冲液 (pH 8.0) 的酶溶液 100 μ L,在 37°C 下加温 20 分钟。向该反应液添加 400 μ L 的 BSA-PBST (含 1% 牛血清白蛋白及 0.05% Tween 20 的 20 mM 磷酸缓冲液, pH 7.2) 之后,用 Superdex 200 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES 公司) 实施了全部重量凝胶过滤层析。洗提液用 PBS (20 mM 磷酸缓冲液, pH 7.2), 分取每 1 mL。作为对照,准备了在上述条件中不含糜蛋白酶以外,同样的条件下实施了凝胶过滤层析的馏分。

[0048] 各馏分中脂联素的检测如下进行。用 PBS 将 Anti-mouse 脂联素单克隆抗体 (R&D Systems 公司) 稀释为 2.5 μ g/mL 之后,向 ELISA 用板的每孔添加 50 μ L,一晚致敏。用 PBST (含 0.05% 的 Tween 20 的 PBS 液, pH 7.4) 洗板后,添加 100 μ L 的 BSA-PBST 进行了封闭 (blocking)。然后,添加了用 BSA-PBST 进行 2 倍稀释的各馏分 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加了用 BSA-PBST 稀释为 1.0 μ g/mL 的 Goat anti-mouse 脂联素多克隆抗体 (R&D Systems 公司) 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加用 BSA-PBST 稀释为 1/2000 倍的 Rabbit anti-goat Ig' s HRP 标记抗体液 (DAKO 公司) 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加底物液 (含 2 mg/mL 邻苯二胺盐酸盐、0.02% 的过氧化氢, 250 mM 柠檬酸缓冲液, pH 5.0) 50 μ L,室温反应 10 分钟,添加停止液 (1.5 N 硫酸, 1 mM EDTA-2Na) 50 μ L,停止反应之后,测定了 492 nm 的吸收。测定结果如图 1 所示。

[0049] 在没实施糜蛋白酶消化处理时,小鼠血清中多聚体脂联素被分离成了 3 个峰。另一方面,小鼠血清经糜蛋白酶处理时,含白蛋白结合型 (Alb-) LMW 的 MMW 脂联素洗脱峰 (第 2 个)、LMW 脂联素洗脱峰 (第 3 个) 消失,而 HMW 脂联素的洗脱峰 (第 1 个) 仍残留。其结果,通过使糜蛋白酶作用于含小鼠来源多聚体脂联素的样品,能够仅使 HMW 脂联素不被消化而残留,所以通过测定该处理液中的脂联素,可算出 HMW 脂联素的浓度。

[0050] 实施例 2 对大鼠血清中多聚体脂联素的消化特异性

[0051] 向大鼠血清 50 μ L,以使 α -糜蛋白酶 (Type I-S; No. C7762, Sigma-Aldrich 公司) 成为 100 u/mL 的方式,添加溶解于 50 mM Tris 盐酸缓冲液 (pH 8.0) 的酶液 100 μ L,37°C 下加温 20 分钟。对该反应液添加 400 μ L 的 BSA-PBST 之后,全量用 Superdex 200 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES 公司),实施了凝胶过滤层析。洗提液用 PBS,分取每 1 mL。作为对照,准备了在上述条件中不含糜蛋白酶以外,同样的条件下实施了凝胶过滤层析的馏分。

[0052] 各馏分中脂联素的检测如下进行。用 PBS 将 Goat anti-rat 脂联素多克隆抗体 (R&D Systems 公司) 稀释为 0.5 μ g/mL 之后,向 ELISA 用板的每孔添加 50 μ L,一晚致敏。用 PBST 洗板后,添加 100 μ L 的 BSA-PBST 进行了封闭。然后,添加了用 BSA-PBST 进行 2 倍稀释的各馏分 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加了用 BSA-PBST 稀释为 1.0 μ g/mL 的 Rabbit anti-mouse 球形的脂联素多克隆抗体 (W02005-038457) 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加了用 BSA-PBST 稀释为 1/2000 倍的 Goat anti-rabbit Ig' s HRP 标记抗体液 (BIOSOURCE 公司) 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加底物液 (含 2 mg/mL 邻苯二胺盐酸盐、0.02% 的过氧化氢, 250 mM 柠檬酸缓冲液, pH 5.0) 50 μ L,室温反应 10 分钟,添加停止液 (1.5 N 硫酸, 1 mM EDTA-2Na) 50 μ L,停止反应之后,测定了 492 nm 的吸收。测定结果如图 2 所示。

[0053] 在没实施糜蛋白酶消化处理时,大鼠血清中多聚体脂联素被分离成了 2 个峰,且表示 HMW 脂联素的洗脱峰 (第 1 个) 非常少。而大鼠血清经糜蛋白酶处理时,含白蛋白结

合型 (A1b-)LMW 的 MMW 脂联素洗脱峰 (第 2 个) 消失, 而 HMW 脂联素洗脱峰 (第 1 个) 仍残留。自其结果可知, 使糜蛋白酶作用于含大鼠来源多聚体脂联素的样品, 能够仅使 HMW 脂联素不被消化而残留, 所以通过测定该处理液中的脂联素, 可算出 HMW 脂联素的浓度。

[0054] 参考例 1 使用胰蛋白酶的多聚体脂联素的消化特异性

[0055] 向小鼠血清、大鼠血清洗脱峰血清各自 10 μ L, 以使胰蛋白酶 (No. T1426, Sigma-Aldrich 公司) 成为 0 ~ 50u/mL 的方式, 添加了溶解于 50mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.0) 的酶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下加温 20 分钟。向该反应液, 添加 400 μ L 的 BSA-PBST。对其一部分用非改性类聚丙烯酰胺电泳 (native-PAGE) 进行分离后, 通过半干转印仪转印到 PVDF 膜之后, 进行了免疫染色。工序为, 用 BSA-PBST 封闭转印膜后, 用 PBST 洗净, 将 Goat anti-mouse 脂联素多克隆抗体 (R&D systems 公司) 0.1 μ g/mL 室温反应 1 小时。PBST 充分洗净后, 利用 Vector ABCkit (Goat) 和 DAB 底物试剂盒 (funakoshi 公司) 进行显色。各血清的免疫染色结果如图 3 (A: 小鼠, B: 大鼠, C: 人) 所示。

[0056] 胰蛋白酶活性为 0u/mL 时, 从泳动距离短的一侧大概分成了 HMW 部分、六聚体 (MMW) 部分、含白蛋白结合三聚体 (A1b-LMW) 的三聚体部分 (LMW) (大鼠血清主要为 MMW 部分, HMW、LMW 部分很少, 未观察到明确的染色带)。以 10 ~ 50u/mL 的胰蛋白酶活性进行消化后观察到虽然 LMW 部分被消化, 但 MMW、HMW 部分未能消化。从该结果可判断出, 胰蛋白酶无法利用于对动物血清中 HMW 脂联素的分级消化测定。

[0057] 参考例 2 使用蛋白酶 K 的多聚体脂联素的消化特异性

[0058] 按照参考例 1 的方法, 并将蛋白酶改为 7.5u/mL 的蛋白酶 K, 进行了人或小鼠血清的消化, 免疫染色了该反应液的一部分 (图 4, A: 人, B: 小鼠)。

[0059] 观察到虽然在人血清中仅有 HMW 部分不被消化残留, 但在小鼠血清中包括 HMW 部分的所有部分均被消化。从该结果可判断出, 蛋白酶 K 无法利用于小鼠血清 HMW 脂联素的分级消化测定。

[0060] 实施例 3 对人血清中多聚体脂联素的消化特异性

[0061] 向人血清 10 μ L, 以糜蛋白酶 (TypeII ;No. C4129, Sigma-Aldrich 公司) 成为 0 ~ 100u/mL 的方式, 添加了溶解于 50mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.0) 的酶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下加温 20 分钟或 60 分钟。对该反应液, 添加 400 μ L 的 BSA-PBST。对其一部分用非改性聚丙烯酰胺电泳 (native-PAGE) 进行分离后, 通过半干转印仪转印到 PVDF 膜之后, 进行了免疫染色。工序为, 用 BSA-PBST 封闭转印膜后, 用 PBST 洗净, 将 Goat anti-human 脂联素多克隆抗体 (R&D systems 公司) 0.1 μ g/mL 室温反应 1 小时。用 PBST 充分洗净后, 利用 Vector ABC kit (Goat) 及 DAB 底物试剂盒 (funakoshi 公司) 进行显色。各血清的免疫染色结果如图 5 所示。

[0062] 糜蛋白酶消化时间为 20 分钟时, 在 25u/mL 的浓度上 MMW 以下的部分稍有残留, 而在 50 ~ 100u/mL 的浓度上, 仅残留 HMW。另一方面, 消化时间为 60 分钟时, 10u/mL 浓度上几乎未进行消化, 而在 25 ~ 50u/mL 的浓度上, 仅残留 HMW。另外, 100u/mL 上, 包括 HMW 的所有部分均被消化。

[0063] 参考例 3 小鼠血清来源多聚体脂联素 (Ms-mAd) 的纯化

[0064] 向抗小鼠球状的脂联素抗体结合树脂 (W02005-038457) 添加小鼠血清 180mL, 以含 0.5M NaCl 的 100mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.5) 充分洗净之后, 再以含 0.5M NaCl 的 100mM

醋酸缓冲液 (pH5.0) 洗净。然后,以 100mM 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH2.5) 洗脱小鼠脂联素部分,向洗脱部分添加 1/10 量的 2M Tris 盐酸缓冲液 (pH8.0) 进行中和。进而将中和了的洗脱部分添加于 Protein A 树脂,将未向 Protein A 树脂的吸附部分作为纯化 Ms-mAd 回收,用 PBS 透析后,利用“小鼠 / 大鼠脂联素 ELISA 试剂盒”(大冢制药社)测定了脂联素含量。

[0065] 参考例 4 抗小鼠脂联素的大鼠单克隆抗体的制备

[0066] 将参考例 3 中得到的纯化 Ms-mAd 50 μ g 与等量的弗氏完全佐剂混合,对大鼠 (F344/Jc1) 隔 2 周进行了 2 次免疫之后,从经免疫的大鼠摘取脾脏和淋巴结细胞,通过使用聚乙二醇的常规法,与 sp2/o 骨髓瘤细胞进行细胞融合。抗小鼠脂联素单克隆抗体产生融合细胞的选择,是通过 ELISA 法选择了与重组小鼠脂联素 (rMs-Ad) (BioVender 公司) 反应性高的孔,接着以有限稀释法进行选择的常规法进行的。抗小鼠脂联素单克隆抗体,是将选择的融合细胞注入经姥鲛烷处理的裸鼠腹腔内并作为腹水回收。从腹水纯化特异抗体 (IgG) 是如下进行,即,回收 50% 饱和硫酸铵沉淀,以 20mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.0) 透析后,附加于 DEAE 离子交换树脂 (Tosoh 公司),利用由 NaCl 浓度迁移 (0 ~ 200mM) 引起的梯度洗脱,得到了纯化 IgG (MoAb83201R)。

[0067] 参考例 5 抗小鼠脂联素的兔多克隆抗体的制备及生物素标记

[0068] 将参考例 3 中调制的纯化 Ms-mAd 120 μ g,与等量的弗氏完全佐剂混合,对兔子隔 2 周进行了 5 次免疫,制造了抗血清。抗血清中的特异抗体 (IgG) 的纯化是用蜜瓜凝胶 (Melon GeD (PIAS 公司)) 通过常规法进行的。并且,向纯化 IgG 混入 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (PIAS 公司),实施了生物素标记 (Biotinylated PoAb)。

[0069] 实施例 4 小鼠脂联素总量及 HMW 的 ELISA 测定和凝胶过滤分离检测法的比较

[0070] 1-1) 样品的预处理

[0071] HMW 测定用:对小鼠血清 (n = 10) 10 μ L,添加含糜蛋白酶 35u/mL 的蛋白酶溶解液 (50mM Tris 盐酸缓冲液, pH8.0) 100 μ L, 37°C 下加温 20 分钟。并且,添加 700 μ L 的样品处理液 (100mM 硼酸缓冲液, pH11.0), 将其作为 HMW 测定用的处理样品液。

[0072] 总量测定用:对小鼠血清 10 μ L,添加不含糜蛋白酶的蛋白酶溶解液 100 μ L,进而,添加 700 μ L 的样品处理液后,作为总量测定用的处理样品液。

[0073] 1-2) ELISA 测定

[0074] 在 ELISA 用板中,将参考例 4 中制造的抗小鼠脂联素单克隆抗体 (83201R) 以 PBS 稀释为 5 μ g/mL 之后,进行了致敏。然后,以 BSA-PBST 封闭后,向板添加了将各处理样品液用 BSA-PBST 进一步稀释成 101 倍的稀释样品液 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板后,添加了参考例 5 中制造的生物素标记抗小鼠脂联素多克隆 (Biotinylated PoAb) 50 μ L,室温反应 1 小时。用 PBST 洗板,进而添加以 BSA-PBST 稀释了 2000 倍的 HRP-Avidin,室温反应 30 分钟。用 PBST 洗板,以 OPD 显色液 (含 2mg/mL 邻苯二胺盐酸盐、0.02% 过氧化氢的 250mM 柠檬酸缓冲液, pH5.0) 进行显色,添加停止液 (1.5N 硫酸, 1mM EDTA-2Na) 停止反应之后,测定了 492nm 的吸收。作为标准物使用了重组小鼠脂联素 (rMs-Ad),进行了样品中的脂联素浓度的计算。

[0075] 2) 凝胶过滤分离检测法

[0076] 与上述 1-1) 相同,对小鼠血清 (n = 10) 各 50 μ L,在与实施例 1 同样的条件下实施凝胶过滤层析,准备了馏分。各馏分中的脂联素的检测是用 BSA-PBST 稀释 21 倍之后,按

照上述 1-2) 的 ELISA 测定实施的 (图 6)。

[0077] 3) 相对于总量的 HMW 所占比例值 (HMWR) 的比较

[0078] 从 1-2) 中求出的 HMW 及总量浓度算出了 HMWR。另一方面,在 2) 中检测到的 3 个脂联素洗脱峰中,最初的峰相当于 HMW,所以将其馏分浓度的总和除以脂联素全馏分的总和浓度而算出了 HMWR。比较各 HMWR 的结果,两法的检测存在极强的相关性且 HMWR 值也大致相同 (图 7)。从该结果可知,通过用本发明的糜蛋白酶处理样品,能进行非常简单且正确的小鼠 HMW 脂联素测定。

[0079] 实施例 5 人血清中 HMW 脂联素分级测定中的糜蛋白酶利用

[0080] 向人血清 ($n = 14$) $10 \mu\text{L}$, 添加含 50u/mL 的糜蛋白酶的蛋白酶溶解液 (50mM Tris 盐酸缓冲液, $\text{pH}8.0$) $100 \mu\text{L}$, 37°C 下加温 20 分钟。进而添加 $700 \mu\text{L}$ 的样品处理液 (100mM 硼酸缓冲液, $\text{pH}11.0$), 将其作为人 HMW 测定用的处理样品液。作为对象,以蛋白酶 7.5u/mL 代替糜蛋白酶,实施了同样的样品处理。各处理样品中的脂联素浓度是将处理样品液以 BSA-PBST 进一步稀释 10 倍后,用与实施例 3 相同的方法测定的。测定结果如图 8 所示。

[0081] 表示被利用于分级测定人血清中 HMW 脂联素的蛋白酶 K 处理后残留的脂联素量的吸光度,和糜蛋白酶处理后测定的吸光度几乎完全一致,所以表明了糜蛋白酶也能利用于人血清中 HMW 脂联素的分级测定。

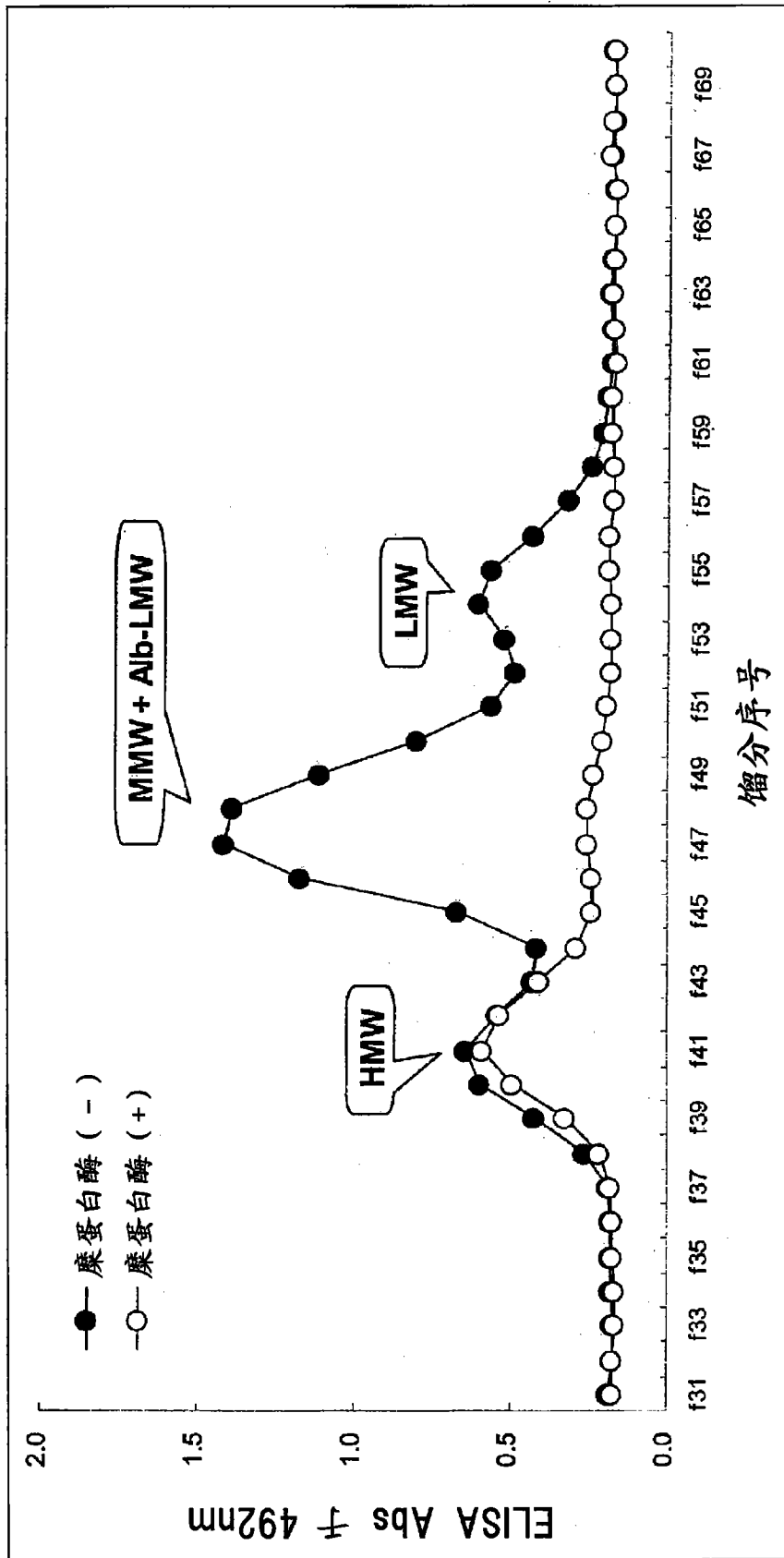


图 1

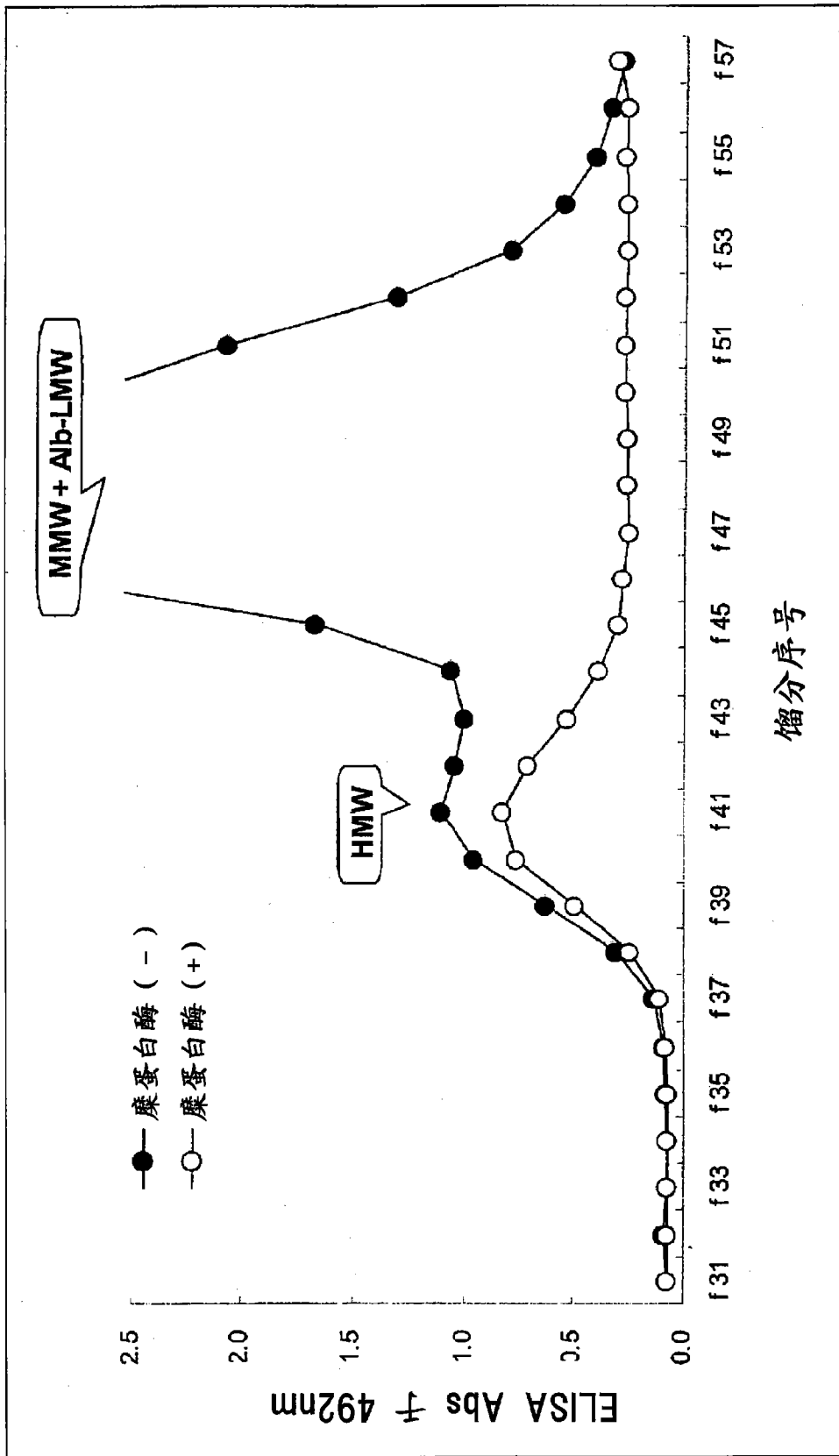


图 2

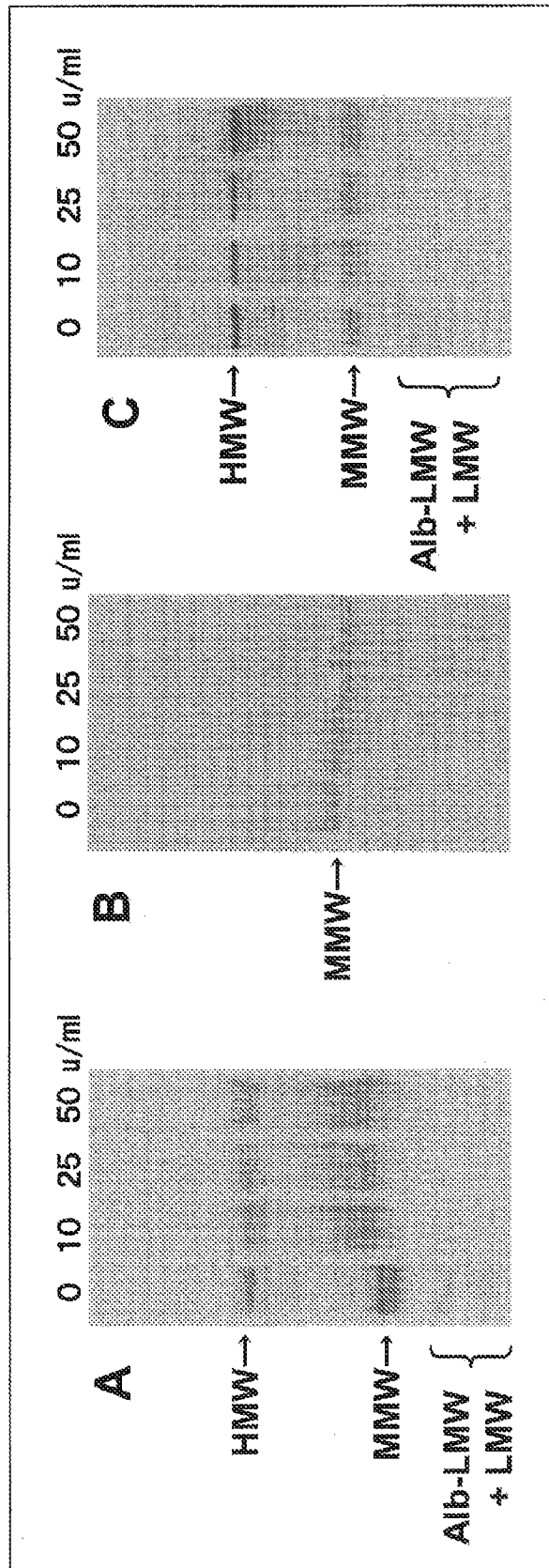


图 3

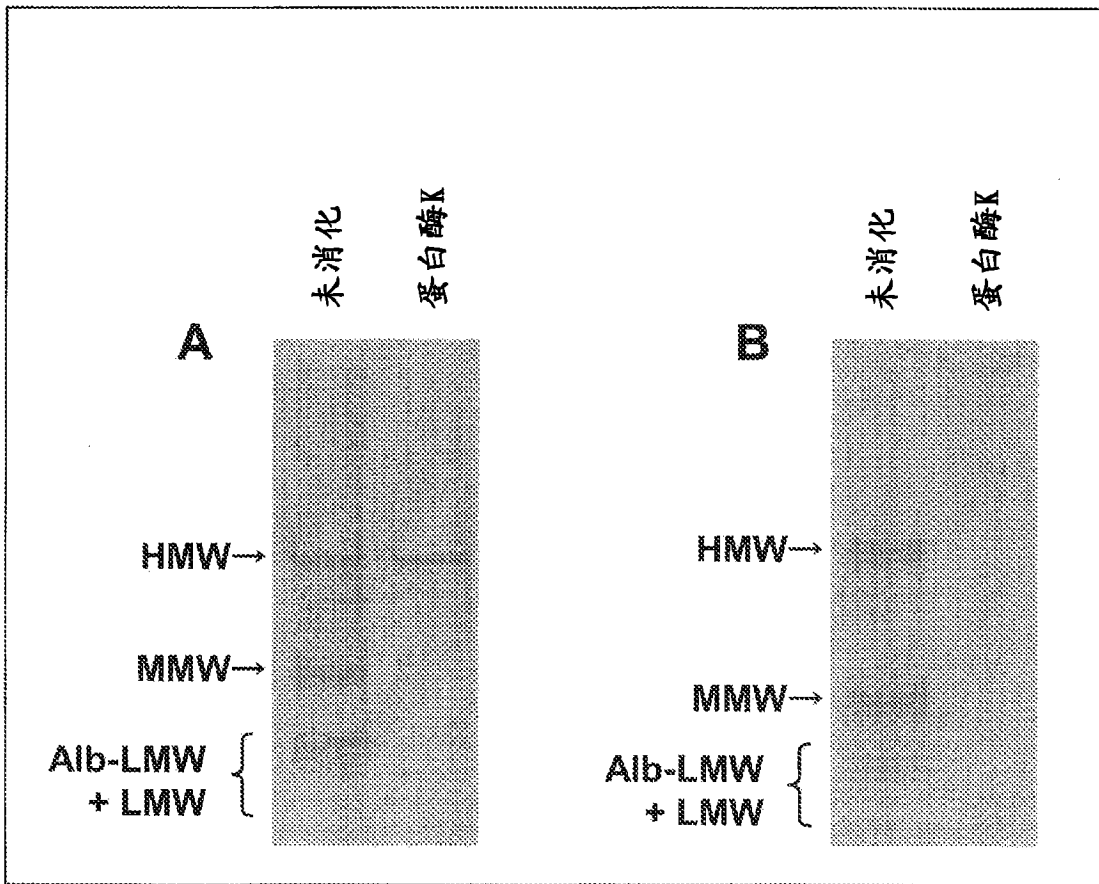


图 4

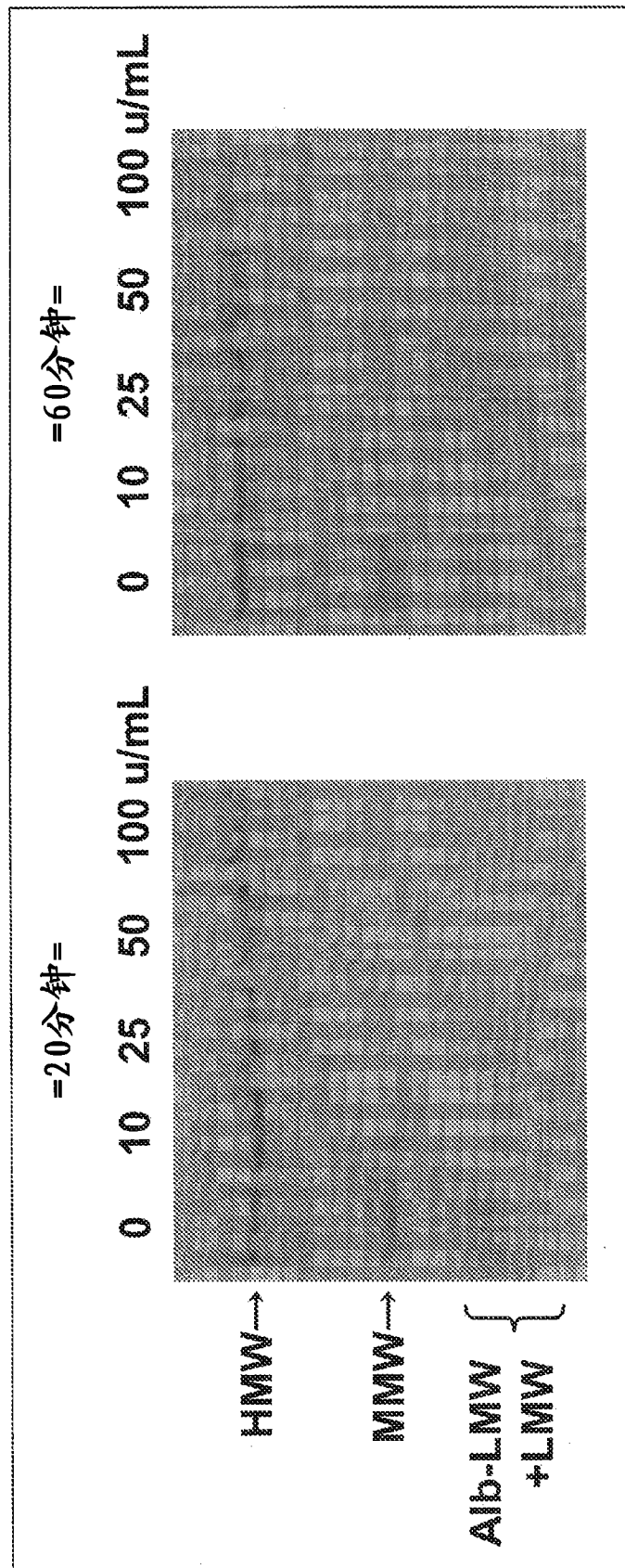


图 5

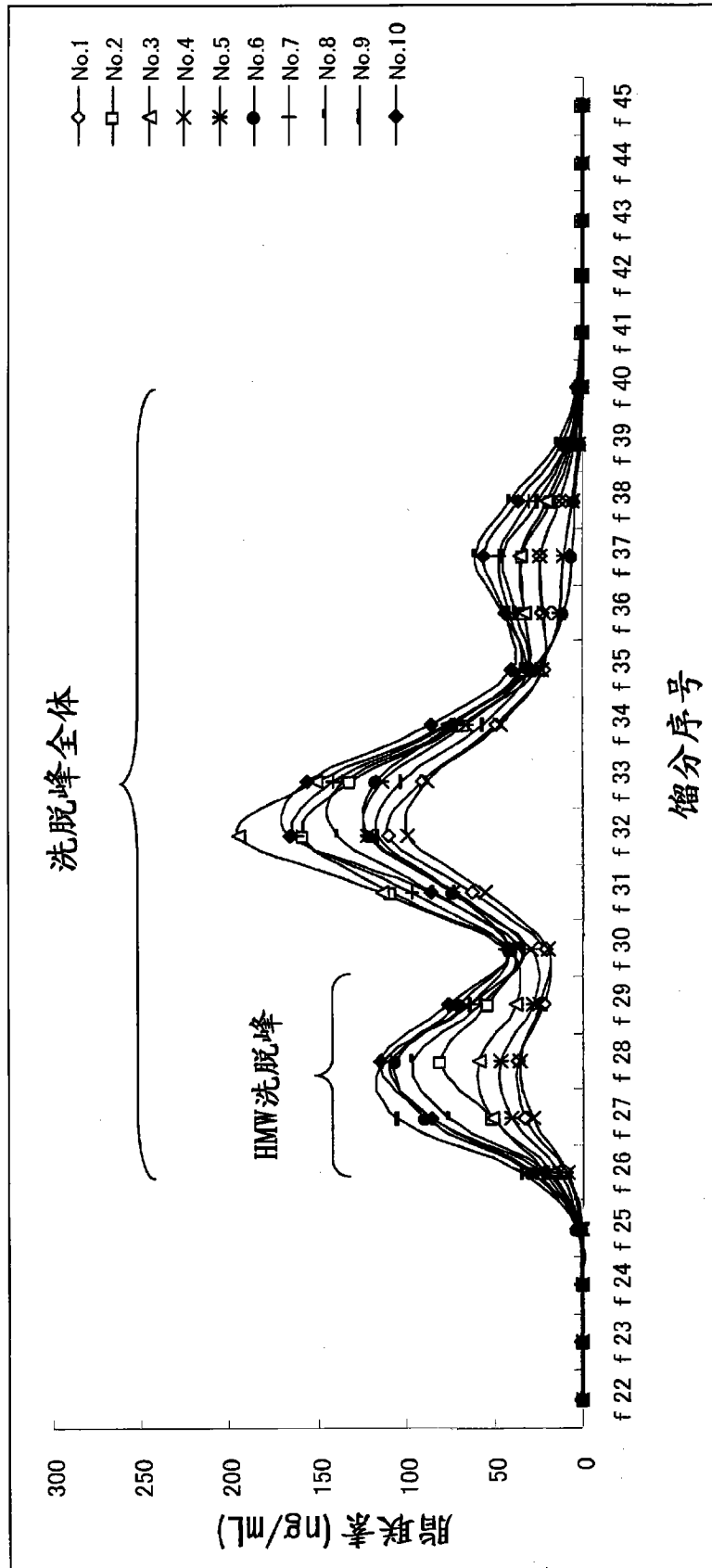


图 6

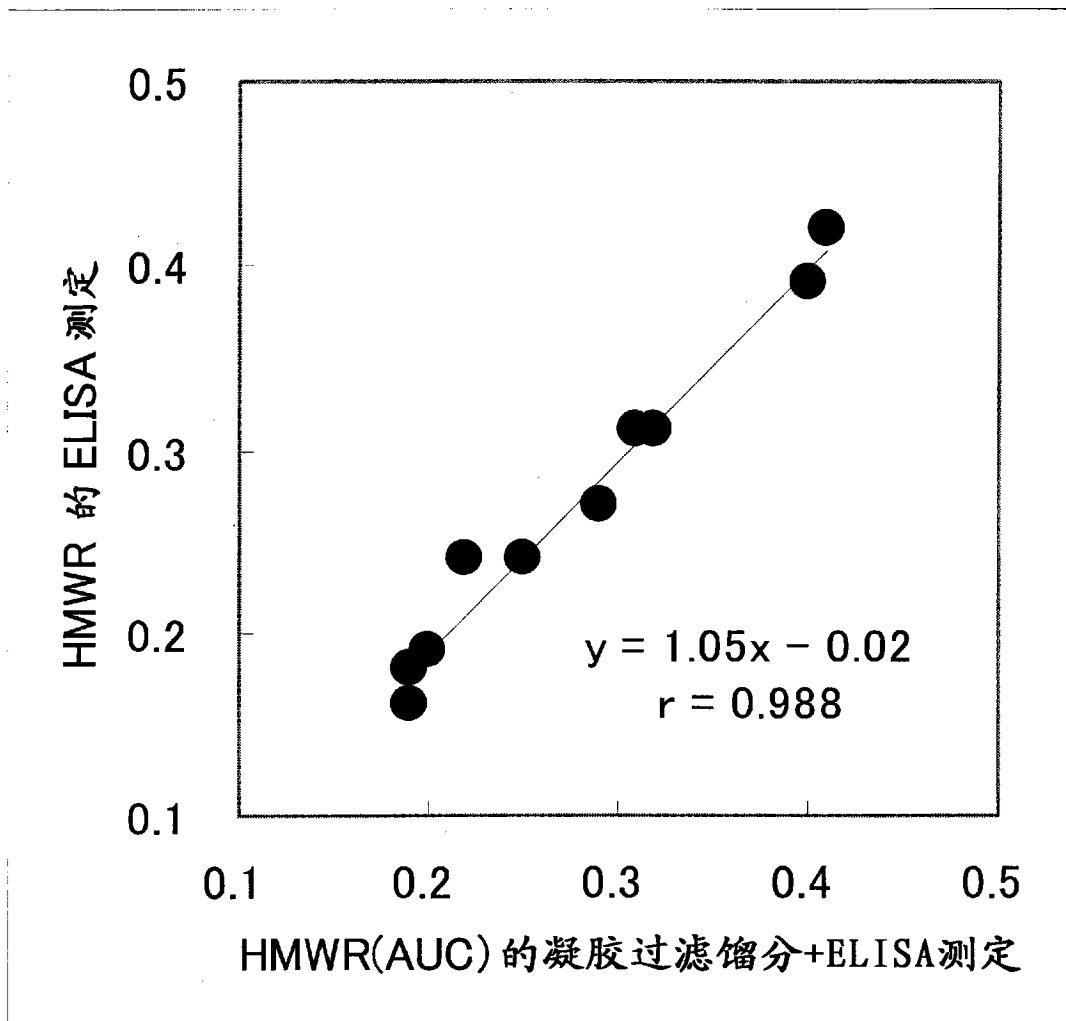


图 7

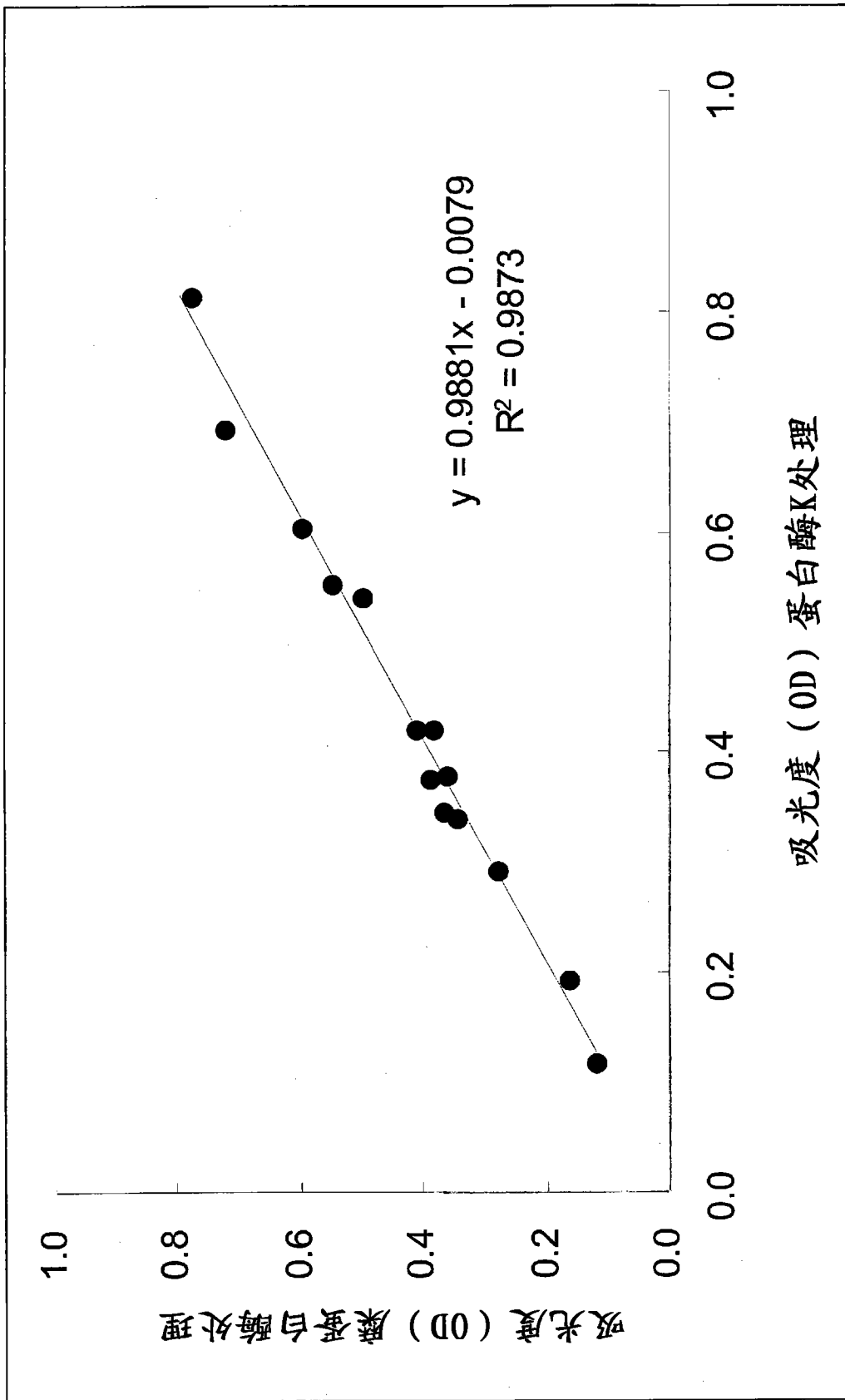


图 8

专利名称(译)	高分子量脂联素的测定方法		
公开(公告)号	CN101960307B	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN200980106328.9	申请日	2009-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
[标]发明人	海老沼宏幸		
发明人	海老沼宏幸		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/22 A61P3/10 A61P9/10 A61P9/12 C12Q1/37 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2333/976		
代理人(译)	苗堃		
审查员(译)	高宇		
优先权	2008049198 2008-02-29 JP		
其他公开文献	CN101960307A		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明提供一种将多聚体脂联素中的高活性型HMW脂联素分级测定的方法。即，一种样品中高分子量脂联素的测定方法，是使用蛋白酶将多聚体脂联素分级并免疫学性测定的方法，其特征在于，使糜蛋白酶作用于含多聚体脂联素的样品。

