

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

G01N 33/74 C12Q 1/68

C12N 15/85



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00814035.9

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1159585C

[22] 申请日 2000.10.5 [21] 申请号 00814035.9

[30] 优先权

[32] 1999.10.10 [33] IL [31] 132313

[86] 国际申请 PCT/IL2000/000621 2000.10.5

[87] 国际公布 WO2001/027319 英 2001.4.19

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.8

[71] 专利权人 耶达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特市

[72] 发明人 M·鲁宾斯坦 B·科恩

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 余 颖

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 检测瘦素的方法

[57] 摘要

本发明提供一种测定样品中瘦素的方法，所依据的是对某些细胞或细胞系，例如 Swiss 3T3 F442A 鼠前脂肪细胞或人骨髓基质细胞系 hMS2-12 内瘦素诱导的血管生成素-2 表达的检测。瘦素的检测为：用含有血管生成素-2 启动子调控下的报道基因（例如绿色荧光蛋白（GFP））的载体转染细胞。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测瘦素或瘦素样物质存在的方法，其特征在于包括将样品与对瘦素产生应答而表达血管生成素-2的细胞或细胞系接触，并测定培养基中的血管生成素-2、编码血管生成素-2的细胞RNA或血管生成素-2启动子的活化。
5
2. 根据权利要求1所述的方法，其中采用真核细胞或细胞系。
3. 根据权利要求2所述的方法，所述真核细胞或细胞系为哺乳动物细胞或细胞系。
4. 根据权利要求3所述的方法，所述细胞系选自分化的鼠脂肪细胞系。
- 10 5. 根据权利要求4所述的方法，所述细胞系是Swiss 3T3 F442A鼠前脂肪细胞。
6. 根据权利要求3所述的方法，所述细胞系选自人细胞系。
7. 根据权利要求6所述的方法，其中细胞系是人骨髓基质细胞系hMS2-12。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，用免疫试验在培养基中按
15 常规方式测定血管生成素-2。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，用使用抗血管生成素-2单克隆和多克隆抗体的酶联免疫吸附试验在培养基中按常规方式测定血管生成素-2。
10. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法，其中，用逆转录聚合酶链反
20 应以常规方式测定培养细胞或细胞系中血管生成素-2 RNA的存在。
11. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法，其中，如下测定血管生成素-2启动子的活化：构建一个载体，该载体包括含一个启动子和至少一个瘦素应答元件的血管生成素-2启动子区域和与启动子区域操作性连接的报告基因；转染能对瘦素产生应答而表达血管生成素-2的宿主细胞；与样品一起培养；以常规方式
25 测定报告基因的表达。
12. 一种载体，包括编码含一个启动子和至少一个瘦素应答元件的血管生成素-2启动子区域的核苷酸序列，以及有效地连接于启动子区域的报告基因。

检测瘦素的方法

5 发明领域

本发明是关于瘦素活性系统,更具体地,本发明是关于体外检测瘦素或拟瘦素生物活性的物质,本检测法适用于分子文库的高效筛选。

发明背景

10 肥胖,定义为相对于瘦体形人群来说身体脂肪过多,肥胖与重要的精神性疾病与内科疾病有关,后者包括高血压、高血脂及II型糖尿病或非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)。在美国有600-1000万NIDDM患者,65岁人群占18%(Kamel, HK, et al, Clin Geriatr. Med., 1999, 15, 265)。在NIDDM肥胖患者中,男性约45%,女性70%。通过减轻体重,他们的糖尿病症状得到基本改善或消除(Harris 1991, Diabetes
15 Care, 14, 639)。

瘦素(leptin)是肥胖基因的产物(Zhang, Y., et al. 1994, Nature 372, 425),作为一种外周信息可传递至调节摄食与能量代谢的脑区,瘦素被认为通过其受体OB-R在下丘脑部位发挥作用(Tartaglia, L.A., et al, 1995, Cell 83, 1263)。啮齿动物的基因突变阻碍了瘦素或全长瘦素受体OB-R的正常表达,造成深度肥胖、糖尿病、代谢率降低(Coleman D.L. 1978, Diabetologia 14, 141,.)。然而,在人类,并未显示肥胖与编码瘦素或OB-R基因的突变相关(Considine, R.V., et al. 1995, J. Clin. Invest. 95, 2986; Considine, R.V., et al, 1996, Diabetes 19, 992)。虽然发生肥胖基因突变的小鼠在给予重组的瘦素后,可恢复正常体重(Pelleymounter, M.a., et al. 1995, Science 269, 540 Halaas, J.L., et al, 1995, Science 269, 543; Campfield, L.A., et
25 al, Science 269, 546),但这一方法看来不能在肥胖的人中获得成功,因为肥胖人血清中的瘦素水平长期较高(Maffei, M., et al, 1995, Nature Med. 1, 1155; Considine, R.V., et al., 1996, N. Engl. J. Med. 334, 292; Sinha, M.K., et al., 1996, J. Clin. Invest. 98, 1277),因此肥胖的人表现为“瘦素抗性”(Maffei, M., et al, 1995, Nature Med. 1, 1155; Flier, J.S. & Elmquist, J.k. 1997, Nature Biotech. 15, 20; Campfield, L.A., et
30 al, 1996, Horm. Metab. Res. 28, 619),在肥胖人中并不产生与血清瘦素水平相对应的信号。也许是由于瘦素通过血脑屏障的传输缺陷(Caro, J.F., et al 1996, Lancet 348, 159)或缺乏适当的OB-R应答。对OB-R信号通路分析显示。肥胖人接受选择

性治疗,可提高 OB-R 的应答,可克服瘦素抗性并使肥胖逆转。瘦素与 OB-R 分别是四螺旋束细胞因子和受体大家族的成员(Tartaglia,L.A.,et al,1995,Cell 83,1263;Madej,T.,et al,1995,FEBS Lett.373,13)。OB-R 与信号传递受体的糖蛋白 gp130 密切相关, gp130 被白介素-6 与亲胆碱能神经元因子(CNTF)所激活,该
5 信号传递通路已被重点研究(Kishimoto,T.,et al,1992,Science 256,593;Stahl, N.&Yancopoulos, G.D.1994,J.Neurobiology 25,1454)。

瘦素受体被翻译为具有不同细胞区域的几种剪接产物(Tartaglia, L.A.,et al,1995, Cell 83,1263; Lee,G-H.,et al 1996, Nature379, 632; Chen,H.,et al,1996, Cell 84,491; Cioffi,J.A.,et al, 1996, Nature Med.2, 585; Wang M.Y.,et al,1996, FEBS
10 Lett.392,87),但是,仅有一种称为长形或 OB-Rb 的异构形式显示能介导瘦素的体重控制效应(Lee,G-H.,et al 1996, Nature379,632;Chen,H.,et al,1996,Cell 84,491;Ghilardi,N.,et al, 1996, Proc. Natl.Acad.Sci.USA93,6231; Baumann, H., et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,8374)。糖尿病肥胖(db)小鼠的 OB-R 发生突变,阻碍了 OB-R 长片段异构形式的表达,而使它们不能适当地介导瘦素的作用
15 (Lee,G-H.,et al 1996, Cell 84,491)。

发现新的具生物活性的分子用作治疗威胁生命疾病的药物,这种发现包括两个基本操作:(1)多少带有随机性的分子选择,或经化学合成或从自然源中分离制备;(2)检测候选分子的性质。发明过程的重复性是无法预料的,一直到具理想性质的分子被确定。在大多数情况下,用于检测所选择的分子类型属于相当狭窄的
20 化学类型。例如新的肽激素的发现包括了对肽的研究,新的治疗用类固醇的发现包括类固醇核的研究,新的功能性分子的发现,特别在自然界,主要靠“运气”,极大地耗费时间、辛勤的工作、昂贵的经费,并且是不可预知的。

生物学活性的现代理论阐述,生物学活性及生理学状态是分子识别的结果。例如:核苷酸能够形成互补的碱基对,这样互补的单链分子杂交,导致形成双链
25 或三链的螺旋结构,它们似乎与基因表达的调节有关。另一个例子是:称为配体的生物活性分子与另一分子(通常是称为配体的受体的大分子(例如受体或酶))相结合,这种结合形成的分子反应链最后导致产生一种生理状态,例如导致正常细胞生长、分化;导致癌瘤形成的异常细胞生长;血压调节;产生神经脉冲与传播。配体与配体受体的结合具几何学的特点,有非常高的特异性,涉及合适的三维结
30 构排列和化学相互作用。

目前,开发用于治疗疾病的药物的有效策略包括发现生物受体、酶或与相应的大分子相结合的配体形式,它们模拟配体增强(激动)、或抑制(拮抗)受体产生的

活性。寻找理想配体的工作传统地一直在进行，或是通过随机地筛选相关分子(通过化学合成或从自然来源中进行分离，例如见 K.Nakanishi,Acta Pharm.,1992,4,319-328.)，或通过所谓“合理的”途径进行，包括对主导结构(通常是天然配体)的鉴别，经历多次结构再设计和生物学测试，使其性质最优化，(例如，见 Testa, B.&Kier, L.B. Med. Res.1991, 11, 3548: Rotstein, S.H.&Mureko, M.A.,J. Med. Chem. 1993, 36, 1700)。由于发明最有用的药物不是通过“合理的”途径，而是通过对化合物随机的筛选，近来出现一种寻找药物的混合途径，即以组合化学法构建随机形成的化学结构物的巨大文库，再从中筛选特异生物活性(Brenner, S&Lerner, R.A.Proc. Natl. Acad.Sci. USA 1992,89,5381)，从如此巨大的随机形成的化学结构文库中进行筛选，需要有成本合算的生物学测试方法，并使这种测试法自动化。

传统的体内检测瘦素的方法是给 Ob/Ob 小鼠进行注射，观察小鼠体重减轻情况。该生物学测定方法麻烦、费时，且无重复性，也不适于对含有数百万化合物的文库进行高通量(high throughput)的筛选。但还是有一些较简单的检测系统。例如含 YXXQ 序列的长 OB-R 的发现(Tartaglia, L.A.,et al,1995, Cell 83,1263)，该序列是可激活 STAT3 的基序(Stahl, N.,et al1995, Science 267,1349)，提高了 STAT3 介导瘦素应答的可能性，最近的结果证明 STAT3 既可在培养的细胞中(Ghilardi,N.,et al.,(1996) Proc.Natl.Acad.Sci. USA93,6231; Baumann,H.,et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,8374; Rosenblum, C.I.,et al.,(1996) Endocrinology 137,5178)，也可在活体内(Vaisse,C., et al.,(1996) Nature Gen.14,95)被长 OB-R 而非短 OB-R 或发生 YXXQ 基序突变的长 OB-R(Baumann, H.,et al.,(1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,8374; White, D.W.,et al.,(1997),J.Biol.Chem.272,4065)激活。PCT 专利申请，NO.WO9857177 建议利用 STAT3 的活化作为体外瘦素简易生物检定法的基础。但是，STAT3 可被很多其他因子如激素和细胞因子激活，包括 IL-6、CNTF、IFN- α 、IFN- β 、生长激素及许多细胞因子和多肽激素。因此，STAT3 的活化不能用作瘦素活性的特异标志。

PCT 申请 WO9740380 公开了称为“瘦素应答元件”的 DNA 盒，将这一 DNA 盒附着于启动子(如胸苷激酶启动子)与报道基因如荧光素酶上，以提供合适的报道载体。以报道载体转染表达瘦素受体 OB-Rb 的细胞。以这种细胞作为体外检测瘦素的工具。但 PCT 申请 WO9740380 所建议的“瘦素应答元件”是与“ γ -激活序列”相一致的， γ -激活序列是众所周知的，可被许多其他细胞因子激活，特别是 IFN- γ ，IFN- α 与 IFN- β 。因此根据 γ 激活序列的试验，并不能区分是拟瘦

素活性，还是拟干扰素活性。

另一体外检测法以嵌合受体为基础，该受体由融合于跨膜功能区的 OB-R 细胞外功能区和报道受体(如白介素-3 受体)的细胞内功能区组成。已证明表达所述嵌合受体的白介素-3 依赖性细胞能用来检测促进细胞增殖的瘦素。因此，当接触瘦素后，所述细胞发生增殖，其增殖可经 MTT 染色或放射标记胸苷的掺入加以测定 (Verploegen SA, et al.1997, FEBS Lett.405,237)。这个检测系统是可靠的，对检测瘦素有用，并可用于高通量筛选。但根据该试验，经高通量筛选出的分子可能完全不是瘦素类物质。例如，已显示，在高流通量筛选时发现的真正的胰岛素类物质通过与胰岛素受体的胞质功能区交叉反应而起作用(Zhang B., et al.,1999, Science 284,974)。因此，通过例如瘦素-白介素-3 嵌合体这样的嵌合受体来选择的分子会与嵌合体的胞质白介素-3 来源的功能区互相作用，因此被认为是白介素-3 的类似物而不是瘦素类似物，所以用这种试验筛选瘦素类物质是不可靠的。

瘦素是肥胖基因在脂肪细胞中的表达产物。瘦素通过下丘脑受体 OB-Rb 调节摄食和能量代谢，缺乏瘦素，如在 ob/ob 小鼠或缺乏 OB-Rb 的情况下，会象 db/db 小鼠那样导致病态肥胖。然而，人肥胖最常见的原因与瘦素缺乏并无联系，事实上血清瘦素与体质指数有关。因此，肥胖者其血清中有高水平的瘦素。由这种相关性形成了肥胖与某种形式的瘦素抗性有关这一概念。一种可能的瘦素抗性机理是：瘦素不能有效地透过血脑屏障。事实上，给啮齿动物脑室内给予瘦素显然较外周给予瘦素更有效地减少脂肪组织质量。

开发能透过血脑屏障的瘦素类物质可解决瘦素抗性问题的，为此，筛选低分子量物质组成的文库有益于鉴别显示拟瘦素活性的物质，这种筛选需要一种简单、特异的瘦素活性测定的生物检定法。到目前为止，如上所述，瘦素的生物学活性仅能用动物试验来测定，这样的测定是繁锁的，因此也不适合于筛选含有数百万不同物质的文库。虽已有几种体外测定方法的叙述，但并非是瘦素特异性的。因此有必要建立一种简单而特异性的瘦素活性测定法，使这种测定法易于自动化。

发明概述

本发明提供检测瘦素或瘦素样物质存在的方法，包括将样品与对瘦素产生应答而表达 Ang-2(Angiopoietin-2, 血管形成素-2)的细胞或细胞系接触，测定培养基中 Ang-2，编码 Ang-2 的细胞 RNA 或 Ang-2 启动子的激活。

本发明方法以采用真核细胞或细胞系为宜，更好的是哺乳动物细胞或细胞系。合适的细胞系为，例如，分化的鼠脂肪细胞，如 Swiss 3T3 F442A 鼠前脂肪

细胞，或人细胞系，如人骨髓基质细胞系 hMS2-12。

按照本发明，用使用抗 Ang-2 的单克隆抗体或多克隆抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)以常规方法检测培养基中的 Ang-2 含量，这种 ELISA 方法可用于现代筛选方法，如大量样品的筛选。采取常规的逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)

5 测定培养细胞或细胞系中的 Ang-2 RNA。

按照本发明，检测 Ang-2 启动子的活化为：先构建一个构建物，包括含一个启动子和至少一个瘦素应答元件的 Ang-2 启动子区域以及与启动子区域操作性连接的报道基因，它们最好处于一合适载体中，然后转染对瘦素应答时能表达 Ang-2 的宿主细胞，然后与样品一起培养，并用常规方法检测报道基因的表达。

10 发明还提供了一种载体，该载体包含编码含一个启动子与至少一个瘦素应答元件的 Ang-2 启动子区域的核苷酸序列，及与该启动子区域有效连接的报道基因。

本发明的详细描述

本发明揭示了一种瘦素的测定方法。该方法适用于瘦素样物质的高流通量筛选。15 本发明揭示：瘦素特异性地诱导培养的脂肪细胞中血管生成素-2(angiotensin-2)基因的表达。用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定瘦素诱导分泌的血管生成素-2(Ang-2)，从而达到瘦素样物质的高流通量筛选。或者，通过测定连接于报道基因并插入培养的脂肪细胞的 Ang-2 启动子的活性也可评估瘦素的活性。

本发明揭示了一种瘦素的体外测定法。该方法也适用于瘦素样物质的高流通量筛选。20 申请日为 1999 年 9 月 5 日的以色列待批专利申请 No. 131739 揭示：瘦素特异性地诱导培养的脂肪细胞中 Ang-2 的表达。在缺乏瘦素的培养脂肪细胞中无 Ang-2 的表达，瘦素诱导 Ang-2 的作用强、特异性高。因此，用不同剂量瘦素或瘦素样物质处理合适的真核细胞，并测量培养基中的 Ang-2，编码 Ang-2 的细胞 mRNA，或测定 Ang-2 启动子的活化，可测得瘦素或瘦素样物质的活性。所述25 合适的哺乳动物细胞可以是对瘦素产生应答而表达 Ang-2 的细胞或细胞系。一般来说，优选的宿主细胞是合适地培养的真核细胞，更佳为哺乳动物细胞，特别优选的细胞系是 Swiss 3T3 F442A 鼠前脂肪细胞(Green, H., Kehinde, O., 1975, Cell 5,19)，将融合细胞在补充有 10%胎牛血清(FBS)的培养基中维持 6 天，这些细胞分化为成熟的脂肪细胞。另一更加优选的细胞系是人骨髓基质细胞系 hMS2-12，30 该细胞系表达瘦素受体，并可被诱导分化为脂肪细胞(Thomas T., et al., 1999, Endocrinology 140, 1630)。

本领域技术人员可采用很多合适的方法测定培养基中的 Ang-2，编码 Ang-2

的细胞 mRNA，或测定 Ang-2 启动子的活化。本发明的一个实施方案中，开发了用于鼠 Ang-2 定量测定的酶联免疫吸附试验(ELISA)。该 ELISA 需要产生小鼠单克隆抗体，以将 Ang-2 捕获于 ELISA 板上。将纯化单克隆抗体用作 ELISA 板的第一包被层，以便从培养上清液中捕获 Ang-2。在宿主动物(例如家兔)中产生抗 Ang-2 的多克隆抗体。应当注意，用于产生抗体的 Ang-2 与其被瘦素诱导所用的细胞系应该来自相同的种。为进行该测定，将对瘦素产生应答而表达 Ang-2 的细胞培养在 96 孔板上。将瘦素(阳性对照)或推测为瘦素样物质的样品加在培养物中，连续培养 24~96 小时。然后取出一份份培养基，转移到 ELISA 板上，用对 Ang-2 特异性的捕获单克隆抗体将 ELISA 板预包装。将 ELISA 板培养 1~16 小时，洗涤，加上所述 Ang-2 多克隆抗体。将 ELISA 板培养 1~16 小时，洗涤，加上酶-抗体偶联物。典型的偶联物是与过氧化物酶或与碱性磷酸酶偶联的山羊抗家兔免疫球蛋白。将 ELISA 板培养 1~16 小时，洗涤，加适当的底物显色。所述 ELISA 适合于自动高通量筛选。

本发明的另一个实施方案中，在用瘦素或瘦素样物质处理的所述培养细胞中测定 Ang-2 mRNA。用逆转录聚合酶联反应(RT-PCR)可测定特异性鼠 Ang-2 mRNA。例如，用特异性“分子信号”，可设计高通量 RT-PCR(Research Genetics, Huntsville Alabama, USA)。这些分子信号是分别在其 5'和 3'端含荧光染料和淬灭剂染料的单股寡核苷酸。该寡核苷酸设计成具有与 Ang-2 cDNA 序列互补的发夹环序列。该寡核苷酸还设计成具有发夹主干结构，从而当分子信号不连接于有待 PCR 扩增的 Ang-2 cDNA 时，经能量转移，荧光基团被 3'端淬灭剂染料淬灭而不发生荧光。但是，如果加入经 PCR 扩增的 Ang-2 cDNA，则分子信号的互补环形成带有靶 PCR 产物的比主干强的区带。这种杂交导致使主干分离和产生荧光的构象变化(Tyagi S., 和 Kumar F.R., 1996, Nature Biotech., 16 49)。

为了进行测定，将对瘦素产生应答而表达 Ang-2 的细胞培养在例如 96 孔板上。在培养物中加入瘦素(阳性对照)或推定的瘦素样物质的样品，继续培养 24~96 小时。将板洗涤，从细胞单层提取总 RNA。用随机引物将 RNA 逆转录，所得 cDNA 用特异性 Ang-2 引物作定量 PCR。Ang-2 mRNA 的量反映在靶 PCR 产物的量中，借助所述分子信号测量该量。此测定法的所有步骤均适合于自动高通量筛选。

在另一个优选的实施方案中，用本领域的已知技术从基因组 DNA 鉴定和克隆人或鼠 Ang-2 启动子。将所述启动子和报告基因串联连接到可复制的哺乳动物表达载体中。但是，可以存在访问(interviewing)序列，如果它们不干扰 Ang-2 启动子的功能化的话。报告基因可以是编码易于检测的肽、或者使转录或翻译易于

检测的任何基因。它通常编码非天然存在于宿主细胞或只被宿主细胞少量产生的蛋白质。公知的报道基因包括例如氯霉素乙酰基转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、荧光素酶(细菌的或萤火虫的)及其他基于酶的检测系统,如 β -半乳糖苷酶、碱性酸磷酸酶,等等。在一个特别优选的实施方案中,报道基因是荧光素酶基因。

5 报道基因构建物包括: a) 包含一个启动子和至少一个瘦素应答元件的 Ang-2 启动子区域, 和 b) 与启动子区域操作性连接的报道基因。它最好处于转染宿主细胞用的合适载体中。载体可以是任何已知的载体, 包括可在选定的宿主细胞中起作用的质粒、粘粒和病毒载体。这样的载体也形成本发明的另一方面。宿主细胞可以是对瘦素产生应答而表达 Ang-2 的任何细胞或细胞系。这种的细胞被所述
10 报道载体稳定或临时转染。一般来说, 较佳的宿主细胞是易于培养的真核细胞, 更佳为哺乳动物细胞, 特别好的实施例是分化的鼠脂肪细胞。最佳的细胞系是 Swiss 3T3 F442A 鼠前脂肪细胞(Green, H, 和 Kehinde, O, 1975, Cell 5, 19), 将融合细胞在补充有 10%胎牛血清(FBS)的培养基中维持 6 天, 于是分化为成熟的脂肪细胞。

15 为了进行测定, 将对瘦素产生应答而表达 Ang-2 的细胞或细胞系用所述报道载体稳定或临时转染。所述细胞在 96 孔板上生长和分化。在培养物中加入瘦素(阳性对照)或推定的瘦素样物质, 继续培养。24-96 小时后测定孔中报道基因产物的水平。在本测定法中, 通过测定所述报道基因构建物的基因产物来测定 Ang-2 启动后的活化。因此, 基因产物的水平对应于瘦素或瘦素样物质的活性水平。

20 实施例 1 用 Ang-2 的 ELISA 测定瘦素和瘦素样物质

鼠 Swiss3T3 F442A 细胞在 96 孔板上生长、分化。在培养物中加入瘦素(阳性对照)或推定的瘦素样物质至终浓度 $1\mu\text{g/ml}$, 继续培养 24 小时。然后, 取出一份份瘦素诱导或瘦素样物质诱导的培养基, 转移至以鼠 Ang-2 特异性捕获单克隆抗体预包被的 ELISA 板上。将微量滴定板(Dynatech 或 Maxisorb, by Nunc)用抗小鼠
25 鼠 Ang-2 单克隆抗体(无血清杂交瘤上清液或腹水免疫球蛋白)于 4°C 包被过夜。用含 BSA(0.5%)和吐温 20(0.05%)的 PBS 洗板, 并用同一溶液于 37°C 阻断至少 2 小时。然后取出瘦素诱导或瘦素样物质诱导的培养基, 转至 ELISA 板($100\mu\text{l/孔}$)上, 37°C 4 小时。将板用含吐温 20(0.05%)的 PBS 洗涤三次, 再加入家兔抗小鼠 Ang-2 血清(1: 1000, $100\mu\text{l/孔}$), 4°C 培养过夜。将板洗涤三次, 加入山羊抗家
30 兔辣根过氧化物酶共轭物(HRP, Jackson Labs, 1: 10000, $100\mu\text{l/孔}$), 室温下 2 小时。将板洗涤 4 次, 用 ABTS(2,2'-连氮一双(3-乙基苯基噻唑啉-6-磺酸, Sigma)显色, 以 H_2O_2 为底物。用 ELISA 自动读数仪对板读数。

实施例 2 用 Ang-2 RT-PCR 测定瘦素和瘦素样物质

鼠 Swiss 3T3F442A 细胞在 96 孔板上生长、分化。在用瘦素刺激前将细胞于低血清(0.5%)中维持 16 小时。在培养物中加入瘦素(1 μ g/ml, 阳性对照)或推定的瘦素样物质, 继续培养 24 小时。倒去板上的水, 用 TRI 试剂盒(Molecular Research Center Inc.)分离总 RNA。用 RNAaseH 逆转录酶(Super Script II, GIBCO-BRL)和 1 μ g(N)₆ 随机引物(New England Biolabs, USA), 在 20 μ l 体积中进行逆转录。逆转录产物的等分物(2 μ l)用于 PCR, 采用 VENT DNA 聚合酶(New England Biolabs, USA), 有义和反义引物分别为: muAng-2mRNA, AF4326.gb-ro, 核苷酸 637-657 和 1147-1167。在饱和前终止 PCR 反应, 分离 PCR 产物, 在 IM NaCl 中 37 $^{\circ}$ C 变性, 于 52 $^{\circ}$ C 与如下结构的分子信号杂交:

5'若丹明-GCTGAG-CTGGAGAAGAAGCTGGTGACA-CTCAGC-3'-dabcyl.

此环相应于鼠 Ang-2 mRNA 的核苷酸 898-918, 基因库保藏号 No.AF004326, 主干一环结构的 T_m 为 61.6 $^{\circ}$ C。荧光样品代表通过表达 Ang-2 mRNA 对瘦素产生应答的那些结构。

15 实施例 3 用报道载体测定瘦素和瘦素样物质

用鼠 Ang-2 全部启动子区域后接绿色荧光蛋白(GFP)基因而组成的报道载体稳定转染鼠 Swiss3T3 F442A 前脂肪细胞。细胞在 96 孔板上生长、分化。在培养物中加入瘦素(阳性对照)或推定的瘦素样物质的样品, 继续培养。绿色荧光的出现表明细胞培养物接触到了瘦素或瘦素样物质。

20 实施例 4 用报道载体测定瘦素和瘦素样物质

用鼠 Ang-2 全部启动子区域后接绿色荧光蛋白(GFP)基因而组成的报道载体稳定转染人 hMS2-12 基质前脂肪细胞。细胞在 96 孔板上生长、分化。在培养物中加入瘦素(阳性对照)或推定的瘦素样物质的样品, 继续培养。绿色荧光的出现表明细胞培养物接触到了瘦素或瘦素样物质。

专利名称(译)	检测瘦素的方法		
公开(公告)号	CN1159585C	公开(公告)日	2004-07-28
申请号	CN00814035.9	申请日	2000-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	耶达研究发展有限公司		
[标]发明人	M鲁宾斯坦 B科恩		
发明人	M·鲁宾斯坦 B·科恩		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/74 C12N15/85		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/6893 C12Q2600/158 C12Q1/6883 C12Q2600/136		
代理人(译)	余颖		
优先权	132313 1999-10-10 IL		
其他公开文献	CN1378648A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种测定样品中瘦素的方法，所依据的是对某些细胞或细胞系，例如Swiss 3T3 F442A鼠前脂肪细胞或人骨髓基质细胞系hMS2-12内瘦素诱导的血管生成素-2表达的检测。瘦素的检测为：用含有血管生成素-2启动子调控下的报道基因(例如绿色荧光蛋白(GFP))的载体转染细胞。