



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815590.7

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1666106A

[22] 申请日 2003.7.4 [21] 申请号 03815590.7

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 4 [33] DE [31] 10230141.7

[86] 国际申请 PCT/DE2003/002249 2003.7.4

[87] 国际公布 WO2004/005920 德 2004.1.15

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.30

[71] 申请人 普里昂泰普两合公司

地址 德国莱比锡

共同申请人 凯瑟琳·施勒斯纳

[72] 发明人 克劳迪娅·恩格曼 卡特加·霍施勒

乔尔格·莱曼 乔尔格·加伯特

乌尔里克·克鲁姆莱

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

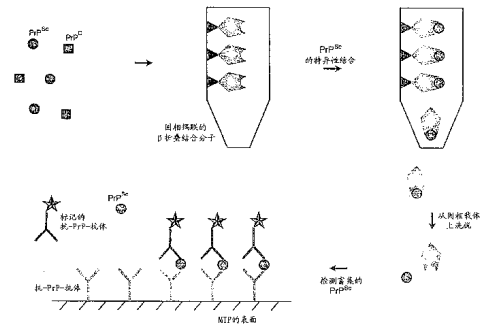
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 10 页 序列表 3 页
附图 4 页

[54] 发明名称 富集和检测病理学改变的朊病毒蛋白质 (PrP^{Sc}) 的方法

[57] 摘要

本发明涉及富集和检测活生物体的病理学改变的朊病毒蛋白质 (PrP^{Sc}) 的方法。



1. 检测病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})的方法, 包括以下步骤:
 - a) 将样品和固相载体一同温育, 其中所述固相载体与 β -折叠结合分子
- 5 偶联;
 - b) 去除不与 β -折叠结合分子结合的样品成分; 和
 - c) 检测与 β -折叠结合分子结合的样品成分。
2. 权利要求 1 的方法, 其中在步骤 a) 前对所述样品进行蛋白酶处理。
3. 前述权利要求之一的方法, 其中所述固相载体是球形聚合物, 塑料
- 10 界面, 硅胶包被的载玻片, 毛细管或膜。
4. 前述权利要求之一的方法, 其中所述 β -折叠结合分子是具有 3-30 个氨基酸残基的寡肽或者经过取代的杂环芳香族。
5. 权利要求 4 的方法, 其中所述寡肽提供根据 SEQ ID NO: 1-10 的氨基酸序列。
- 15 6. 前述权利要求之一的方法, 其中所述检测通过免疫检测法进行。
7. 检测病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})的试剂盒, 包括至少一种与 β -折叠结合分子偶联的固相载体, 洗涤溶液, 洗脱溶液和检测系统。
8. 权利要求 7 的试剂盒, 其中所述检测系统是免疫检测系统, 并包含用抗 PrP 抗体包被的第二固相载体, 酶标记的第二抗体, 底物溶液和终止溶
- 20 液。
9. 权利要求 7 或 8 的试剂盒, 其中一种固相载体包装在一次性柱中, 并且所述第二固相载体是微量滴定板。

富集和检测病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})的方法

5 技术领域

本发明涉及检测活生物体的病理学改变的朊病毒蛋白质的方法。

背景技术

可传播的海绵样脑病(Transmissible Spongiform Encephalopathies) (TSE) 10 是传染性的,通常是致命的,中枢神经系统的退行性病变。这些疾病中出现的脑内组织病理学改变与病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})(其是天然存在的细胞朊病毒蛋白质(PrP^C)的构象异构体)的累积有关。出现在病程中的朊病毒的复制,是 PrP^{Sc} 和 PrP^C 之间直接相互作用的结果,其中病理性 PrP^{Sc} 的构象被强加到 PrP^C 上。通过与 PrP^C 进行对比, PrP^{Sc} 的特征为 β 折叠的含量 15 增加以及对蛋白酶(例如蛋白酶 K)的高度抗性。

PrP^{Sc} 的这种抗性目前用于检测牛海棉样脑病(BSE)的体外诊断中。目前的检验系统的原则是将来自脑干(脑干区)的组织部分进行匀浆,并且用蛋白酶 K 进行处理。蛋白酶处理将正常 PrP^C 完全分解,但来自感染了 BSE 的动物的 PrP^{Sc} 只缩短了几个氨基酸,从而将其相对分子量从 33-35 kDa 降低到 20 27-30 kDa。随后,通过 Western 印迹或者 ELISA 技术用单克隆抗体显示保留的 PrP。

这一检验系统的重要缺点是其低敏感性。在感染 BSE 的牛中 PrP^{Sc} 的浓度的高度仅高到使得在检验系统只能存在中枢神经系统(CNS)中,并因此,目前诊断只限于死亡后检查,并依赖于感染生物体的至少 18 个月到几年的 25 潜伏期(incubation period)。

除了上述检测 PrP^{Sc}, 诊断 TSE 还有两种方法:在 CNS 中检测典型的海绵样变的组织病理学方法,和一种生物试验,其显示了小鼠模型中样品的感染力。这两种方法也都有重要的缺点。该组织病理学方法不适于临床前诊断,因为脑内的结构改变只出现在潜伏晚期,即在临床期前不久。此外, 30 用这种方法进行诊断是在死亡后进行的,这是因为必需的脑组织不能从活生物体中获得。在理论上,生物试验能够检测单个感染单元,但这种方法

需要至少几个月或者甚至几年。

为了在可能的感染之后和/或在仍存活的生物体中尽快进行诊断，前一检测方法的敏感性必须在实质上得到提高，而且除在 CNS 中可以进行检测以外，必须还有可能在组织/体液中进行检测。

5 病理性 PrP^{Sc} 与人血清蛋白例如纤溶酶原(plamsinogen)的结合已经由 Fischer 等描述[Fischer, MB; Roeckl, C; Parizek, P; Schwarz, HP; Aguzzi, A (2000); "Binding of disease-associated prion proteins to plasminogen". Nature, 408: 479-483]。朊病毒蛋白质与纤溶酶原的结合有赖于所述蛋白的构像，因为 PrP^C 不能进行结合。血纤维蛋白原也能和 PrP^{Sc} 结合，但是缺乏 Ca²⁺ 离子时则不能。

10 根据 WO 02/00713, PrP^{Sc} 与人纤溶酶原的特异性结合用于将 PrP^{Sc} 从 CNS 物质中分离出来。为此，将人纤溶酶原固定在磁性颗粒上。然而，这种方法仅适合检测体液和组织(不含纤溶酶原)中的 PrP^{Sc}，但不适合，例如，检测血清中的 PrP^{Sc}。这一方法的其它缺点是其费用昂贵以及载有纤溶酶原
15 (plasminogen-loaded)的磁性颗粒的蛋白结合能力有限。

本发明的目的因此为提供一种可增加敏感性并使得能在活生物体中诊断 TSE 的方法。

本发明的目的通过专利权利要求中限定的主题实现。

20 附图说明

图 1 图示了本发明使用固相偶联的 β -折叠结合分子进行 PrP^{Sc} 的富集和检测的方法原理。

25 图 2 图示了微量滴定板模型(microtitre-plate format)(MTP) 中的 PrP^{Sc} 结合实验的结构(实施例 1)。各种 β -折叠分解物(breaker)(BSB)肽被固定在载体上作为有效的 β -折叠结合分子以及 PrP^{Sc} 捕获物；与样品物质共同温育后，结合的 PrP^{Sc} 使用单克隆抗-PrP 抗体显示。

30 图 3 显示来自 BSE 阳性牛的脑匀浆中的 PrP^{Sc} 与 KLVFF 琼脂糖结合以后，各级分(fraction)中所含 PrP^{Sc} 的洗脱曲线。各级分中所含 PrP^{Sc} 的量是以半定量的方式，使用 Platelia® BSE 检测试剂盒测定的，并表示为光密度[OD]值。

图 4 显示对来自 BSE 阳性牛的房水和脑脊液样品中的 PrP^{Sc} 的检测的

评估。在该实例中，肽 KLVFF 用于 ELISA 模型中作为 PrP^{Sc} 的捕获分子。所述检验是用针对 PrP^{Sc} 的单克隆抗体 VB52 (r-Biopharm, Darmstadt) 和多克隆过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体进行的。

5 发明内容

本文术语“ β -折叠结合分子(β -pleated-sheet-binding molecule)”描述了一种有机分子，因其三维结构和/或其物理性质，所述分子能够与蛋白质中的 β -折叠结构，例如病理学改变的单体/寡聚体朊病毒蛋白质中的 β -折叠结构相互作用，并且能够基于这种相互作用与它们结合。示例性 β -折叠结合分子显示在 SEQ ID NO: 1-10 中。

本文术语“ β -折叠分解物(BSB)”描述了短肽，其不仅与 β -淀粉样蛋白(Alzheimer's 病中的蛋白聚集物)的 β -折叠结构结合，而且还与淀粉样蛋白样结构结合，但也可阻断或逆转它们的异常折叠。

本文术语“病理学改变的朊病毒蛋白质”指 PrP^{Sc}。PrP^{Sc} 可以以单体和/或寡聚体的形式存在，也可以以原纤维状的(fibrillary)，淀粉样蛋白聚集体的形式存在。

于死后检测其脑干组织中的蛋白酶 K-抗性 PrP^{Sc} 的牛在本文定义为“BSE 阳性牛”。

本发明涉及检测病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})的方法，包括以下步骤：

- a) 将样品和固相载体一同温育，其中所述固相载体与 β -折叠结合分子偶联；
- b) 除去没有和 β -折叠结合分子结合的样品组分；和
- c) 检测与 β -折叠结合分子结合的病理学改变的朊病毒蛋白质(PrP^{Sc})。

根据本发明的方法，体液、细胞裂解物或身体组织中所含的单体和/或寡聚体病理学改变的朊病毒蛋白质被富集，使得可以显示甚至是最小的、至今不可检测的浓度的 PrP^{Sc}。结果，活的动物或人在即使感染了激发 TSE(TSE-triggering)的朊病毒后不久，就可定为感染。这在以前是不可能的，因为无法获得这样敏感的检验，且此外，所述检测只能在死后对脑组织进行，其中 PrP^{Sc} 的浓度足够高。此外，由于其高敏感性，该方法在身体组织

例如脑匀浆中出现感染以后基本上较早的时间提供了结果，而现有的检测方法只有在感染已经进展到明显程度时才显示结果。

待研究的样品可以是体液，例如血液，血清，血浆，脑脊液，房水，泪液，尿液，唾液，淋巴液，乳汁，或细胞裂解物，例如来自白细胞或者来自淋巴组织的细胞的裂解物)，或组织匀浆(例如来自中枢神经系统组织，或来自淋巴组织(例如脾，扁桃体，淋巴结)或其它器官。

温育以前，样品可选地经过样品准备阶段。这对组织样品而言尤其必要。这些样品可以在加入适当的缓冲溶液(例如 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.5)之后，例如使用超声或者核糖裂解物(ribolyser)处理，进行机械粉碎，然后进行匀浆，从而将其组分转变成溶液或者悬液。为了分离通过机械处理所得的组织或者细胞悬液中的固体组分，或者存在于体液中的固体组分，所述样品也可通过离心和/或过滤阶段。

经过或者不经过上述样品准备，所述样品可选地，附加地或者唯一地，可以经过蛋白酶处理以在温育之前通过蛋白水解分解 PrP^C。这主要是在待检测的 PrP^{Sc}，例如单体和/或寡聚体形式的 PrP^{Sc}，将是用抗体进行检测时进行，所述抗体仅能在蛋白酶处理之后从 PrP^C 中分辨 PrP^{Sc}。为此，使用蛋白酶处理所述样品物质，例如蛋白酶 K。所述蛋白酶消化可以在各蛋白酶的标准条件下进行，或者根据制造商产品说明进行，优选在 37°C 进行 1 小时。使用的酶浓度可在大约 10 µg/ml 到大约 1 mg/ml，这与样品物质有关，优选用大约 50 µg/ml 的酶处理含有大约 0.5 到大约 10 mg/ml 蛋白的样品物质。

固相载体可以是球形聚合物(例如琼脂糖凝胶，琼脂糖，或者乳胶)，塑料界面(例如微量滴定板)，硅胶包被的玻璃板(例如薄层层析)，毛细管或者膜。球形聚合物可以用作柱层析或者批量加工中的载体(例如磁性珠)。如果所述聚合物用于柱层析，它们优选用于预装好的(pre-packed)一次性柱。除了所列出的固相载体，任何可用于偶联 β-折叠结合分子的固相载体都适合。

所述样品可以和固相载体所述固相载体例如玻璃板，微量滴定板在封闭的容器中一同温育大约 5 到约 120 分钟，其中温度范围从约 4°C 到约 50°C。所述温育优选在低转动频率(例如 80rpm)的温育摇床中在 37°C 进行 1 小时。通过将样品和固相载体一同温育，样品中所含 PrP^{Sc} 和固定在所述固相载体上的 β-折叠结合分子结合。如果所述固相载体，例如球形聚合物，

用于聚合物层析中，温育可在柱中进行。温育期根据柱而不同，与柱和仪器之间的连接以及样品的流通速率有关。

偶联于固相载体的 β -折叠结合分子与 PrP^{Sc} 结合的亲合力比与 PrP^{C} 结合亲合力的高得多，并且根据本发明能够捕获液体中出现的可溶的以及单体和/或寡聚物形式的 PrP^{Sc} 。根据本发明， β -折叠结合分子是由3到大约30个氨基酸组成的寡肽，优选由4, 5或6个氨基酸组成的寡肽。这些肽可以在C末端和/或N末端经过修饰，例如为了获得改善的溶解性。除了其结合 PrP^{Sc} 的性质， β -折叠结合分子也可提供 β -折叠分解物[BSB]的特性。然而，除了这些BSB性质，本发明的 β -折叠结合分子提供对 PrP^{Sc} 的结合特性(亲合力，结合的可逆性)，使其能够从溶液中捕获并富集 PrP^{Sc} 。BSB肽与 β -折叠结构结合过紧，或者以不可逆的方式结合，从而阻碍洗脱，所述BSB肽不适合作为 β -折叠结合分子。BSB与 PrP^{Sc} 的结合亲合力太低，或者以非持久的方式结合(例如 β -折叠结构分解后，从BSB中释放 PrP^{Sc})，其也不合适作为 β -折叠结合分子。尤其优选的 β -折叠结合分子在表1中显示，并列于SEQ ID NO: 1-10。 β -折叠结合分子也可以是被取代的杂环芳香族，优选类黄酮(flavonoid)，例如硫代黄素(thioflavin)T，黄芩苷(baicalin)或槲皮素(quercitrin)。

β -折叠结合分子优选通过共价键固定在固相载体上。 β -折叠结合分子上的功能基团，例如氨基，羧基，或羟基用来实现与载体的偶联。如果 β -折叠结合分子是肽，所述偶联优选通过在N末端的氨基或者C末端的羧基实现。如果寡肽是具有序列KLVFF (SEQ ID NO:2)的五肽，所述偶联优选通过C末端的羧基形成，这是如果通过氨基进行偶联，多肽也可被固定在赖氨酸残基的侧链，从而导致 PrP^{Sc} 结合的位置阻现象。

将样品与固相载体一同温育之后，去除不与 β -折叠结合分子结合的样品组分，优选在洗涤阶段进行。具有适当的严谨度渐增的添加物的缓冲溶液用作洗涤溶液。洗涤溶液的pH值在中性范围以内，优选大约pH 7.5。优选，使用50 mM的磷酸盐缓冲液以缓冲所述溶液。另外，可在中性范围内调节pH值的任何缓冲液都适合。严谨度渐增的添加物可以是无机盐，例如NaCl，清洁剂(detergent)，例如SDS, Triton X 100 或 Tween 20，或离液剂，例如尿素，盐酸胍，或异硫氰酸胍。具有1-4 M的NaCl的缓冲溶液优选用作洗涤溶液。

根据载体物质表面的性质,与 β -折叠结合分子结合的 PrP^{Sc}可选地从固相载体(例如在柱层析中使用球形聚合物时)洗脱出来。使用其它载体,例如膜或塑料界面,可直接在固相载体上检测 PrP^{Sc}。然而,在这种情况下如需要也可进行洗脱。

- 5 为将 PrP^{Sc}从 β -折叠结合分子中洗脱,并相应地从所述固体载体上洗脱,使用极小体积的洗脱溶液冲洗所述载体。为了获得适合所用检测系统的敏感性的浓度作用,洗脱体积应该比样品体积小得多。

- 含有可分解 PrP^{Sc}和捕获分子之间的连接的添加物的缓冲溶液用作洗脱溶液。洗脱溶液的 pH 值在大约 pH6 到大约 pH8.5 的范围内,优选大约 7.5。
- 10 优选使用 50 mM 磷酸盐缓冲液缓冲所述溶液。或可在上述范围内,优选在中性范围内调节 pH 的任何缓冲液是适合的。所述添加物可以,例如是清洁剂,例如 SDS, Triton X 100 或 Tween 20, 离液剂(例如尿素,盐酸胍,或异硫氰酸胍),无机盐例如 NaCl。洗脱溶液优选含有清洁剂,例如 5% 的 SDS。

- 随后,在前述阶段中富集的 PrP^{Sc}可被检测。为此,可用免疫化学检测方法(例如 ELISA, Western 印迹,免疫沉淀);生物物理检测法(例如质谱法,荧光关联光谱法(fluorescence correlation spectroscopy));生物化学检测法(例如生化参数的测定,如相对摩尔质量, N 末端或 C 末端氨基酸序列,结合配偶体的结合和解离常数);或者生物检测法(例如细胞毒性实验)。
- 15

- 优选,所述检测使用可快速检测 PrP^{Sc}的方法进行。所述方法可以是,例如免疫检测法,优选夹心-ELISA。使用已知的方法进行夹心 ELISA。本文中,检测抗体例如酶(例如辣根过氧化物酶),可用染过色的化合物,荧光染料(例如荧光素),金颗粒或者核酸(例如 DNA 或 RNA 寡核苷酸)进行标记。
- 20

- 在酶标记的情况下,在底物转化之后通过光度计记录染料的强度,并且所述强度与样品中所含的 PrP^{Sc}的量成正比。如果抗体标志是染色的化合物或者荧光染料,染料的强度或者其各自的荧光可直接测定。如果抗体标志是核酸,结合的抗体量可通过 DNA 或 RNA 标志的吸收而测定,其中所述信号使用 PCR 进行扩增(例如实时(real-time)PCR)。
- 25

- 本发明还涉及用于检测体液,细胞裂解物,组织匀浆或者其它液体中的 PrP^{Sc}的试剂盒。根据本发明,所述检验试剂盒含有用于富集 PrP^{Sc}的固相载体,免疫检测系统,溶解、洗涤和洗脱缓冲液浓缩物,各种对照,酶标抗 PrP 抗体,和相应的底物以及终止溶液。
- 30

所用固相载体优选是亲合力层析物质，例如琼脂糖凝胶，其可用于一次性柱中，或者塑料界面上(如微量滴定板)，根据本发明所述载体与 β -折叠结合分子偶联。如果固相载体是具有本发明所述偶联的亲合力层析物质，其可包含于悬液中，以干的形式存在，或者已经装到检验试剂盒的一次性柱中。

免疫检测系统优选是夹心 ELISA，其中第二固相载体，例如微量滴定板由 PrP 的特异性抗体包被，优选由单克隆抗 PrP 抗体包被，具体为小鼠抗 PrP 抗体。具体地，检测试剂盒中的固相载体以真空包装的形式提供。

以重组方式生产的 PrP 和/或 PrP 肽优选用作对照。辣根过氧化物酶优选用于标记抗体。

本发明的方法和试剂盒允许使用大量样品进行的大范围研究，例如用于医药和农业。在具有适当设备的实验室中，检测方法的自动化是可能的。通过与前述方法进行对比，本发明的方法也适合对活动物或人的 TSE 诊断。

15 具体实施方式

本发明将参考以下实施例具体说明：

实施例 1: 使用 MTP 形式的不同肽从脑匀浆中分离 PrP^{Sc}

微量滴定板(MTP) (Nunc-ImmunoTM Plate MaxisorpTM Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Denmark)), 用表 1 中所列的肽进行包被(见图 2)。所述包被通过每孔与 100 μ l 肽溶液(10 μ g/ml, 0.1 M 碳酸盐缓冲液中, pH 9.6)在 4°C 共同温育 16 小时进行。将液体通过真空吸出, 并使用 300 μ l 洗涤缓冲液(PBS (10 mM 磷酸盐缓冲液, 0.15 M NaCl, pH 7.2); 0.05% Tween 20))洗涤各孔三次。游离结合位置通过与含 0.5% 的酪蛋白的洗涤缓冲液在室温共同温育 1 小时而封闭。

25 经过洗涤阶段以后 (300 μ l 洗涤缓冲液/每孔), 经包被的 MTP 用箔覆盖, 并与 100 μ l 含 PrP^{Sc} 样品/每孔(来自 BSE 阳性动物的脑匀浆, 其在 Platelia[®]中 OD > 4.0; 通过脑组织的免疫组织学研究确认为阳性发现)在 37°C 共同温育 1 小时。非结合的样品物质通过真空吸出, 并使用 300 μ l 洗涤缓冲液/每孔洗涤 3 次。根据制造商产品说明, 将具有检测抗体(Platelia[®] BSE Detection, Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)的培养物在室温温育 30 1 小时。通过 300 μ l 洗涤缓冲液/每孔洗涤五次以去除多余的检测抗体。加

入底物溶液 (N-四甲联苯胺(Tetramethylbenzidine)[TMB], Platelia® BSE Detection Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)后 30 分钟时, 通过加入 1M H₂SO₄ 终止染色的进行, 并通过在 450nm 进行消光度测定(对照 620nm) 记录染色强度。

- 5 测定的消光度和与肽结合的 PrP^{Sc} 的量成正比, 并因此可测定捕获分子的效力。检测肽的相对结合效率总结在表1中, 来自最佳β-折叠结合分子(肽 2)的信号设定为100%。

表 1: 各种肽的 PrP^{Sc} 结合效率比较

No.	序列	效率	
肽 1	Arg-Val-Val-Ile-Ala	54.7	SEQ ID NO: 1
肽 2	Lys-Leu-Val-Phe-Phe	100.0	SEQ ID NO: 2
肽 3	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp	46.6	SEQ ID NO: 3
肽 4	丙酰基-Ile-Ile-Gly-Leu	55.1	SEQ ID NO: 4
肽 5	丙酰基-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu	58.1	SEQ ID NO: 5
肽 6	Gly-Val-Val-Ile-Ala	64.5	SEQ ID NO: 6
肽 7	丙酰基-DArg-DArg-DA1a-DPhe-DPhe-DVal-酰胺	76.5	SEQ ID NO: 7

10

实施例 2: 与 MTP 模型中的 KLVEF 结合的 PrP^{Sc} 的洗脱

PrP^{Sc} 与捕获分子之间的结合非常强, 并且需要相对强烈的条件来从固相载体中洗脱 PrP^{Sc}。洗脱条件使用 MTP 模型检测。

- 如实施例 1, 用肽 2(KLVEF) 包被 MTP, 并充满含 PrP^{Sc} 的脑匀浆
 15 (Platelia® 中 OD > 3.0)。使用 300 μl 洗涤缓冲液 (PBS; 0.05 % Tween 20) / 每孔
 洗涤 3 次后, 每孔加入 100 μl 强效 (potential) 洗脱缓冲液 (见表 2), 并在室温温
 育 5 分钟。随后, 去除液体, 并使用 Platelia® BSE Detection Kit (Bio-Rad
 Laboratories, Hercules, USA) 测定洗脱缓冲液中洗脱的 PrP^{Sc} 的量 and 留在 MTP
 20 上的 PrP^{Sc} 的量。对比洗脱效率 (表 2) 显示只有含清洗剂的缓冲液 (含 5% SDS)
 适合完全从捕获分子洗脱 PrP^{Sc}。在存在离液剂 (例如 6M 尿素) 的条件下,
 PrP^{Sc} 只部分被洗脱。如果是具有低 pH 值 (例如 pH 3) 或者高离子强度 (例如 2M
 NaCl) 的洗脱溶液, PrP^{Sc} 几乎完全保持与捕获分子结合。

表 2: 不同洗脱条件的对比

洗脱液	缓冲组合物	洗脱效率
-----	-------	------

A	2 M NaCl	20 mM 磷酸缓冲液, 2M NaCl, pH 7.4	+/-
B	pH 3	100 mM 甘氨酸/HCl 缓冲液, pH 3.0	+/-
C	6 M 尿素	20 mM 磷酸缓冲液, 6M 尿素, pH 7.4	+
D	5 % SDS	20 mM 磷酸缓冲液, 5% SDS, pH 7.4	+++

实施例 3: 肽 KLVFF 与 EAH 琼脂糖凝胶的共价结合

如果通过氨基结合, 所述肽将固定于 N 末端和侧链(Lys), 这样可破坏三维结构。为此, β -折叠结合分子 KLVFF 与固相载体的特异性结合可通过所述肽 C 末端的羧基实现。EAH-琼脂糖凝胶 4B(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 用作载体物质。

为准备结合反应, 用 0.5M NaCl 洗涤 EAH-琼脂糖凝胶, 并且完全去除任何多余的液体。配体是具有 KLVEF 序列的五肽, 其溶于水, 终浓度为 5 mg/ml, 并用 HCl 将 pH 调节到 4.5。将凝胶重悬于配体溶液中(1 份凝胶+2 份配体溶液), 并加入 EDC (N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺)使其终浓度为 0.1M。结合反应在室温进行 24 小时同时轻轻搅动(rotation)。随后, 将上清完全从凝胶沉淀中去除。根据制造商产品说明, 存在的任何游离结合位点在存在 0.1M EDC 的条件下, 用 1M 乙酸封闭。充满 KLVFF 的凝胶被置于层析柱中(床体积 1 ml), 并交替用 3x 2 ml 缓冲液 A (0.1M 乙酸钠, 0.5M NaCl, pH 4)和 3x 2 ml 缓冲液 B (0.1M tris/HCl, 0.5M NaCl, pH 8) 洗涤, 最后用 10x 2 ml H₂O 进行洗涤。

实施例 4: 通过 KLVEF 琼脂糖从脑匀浆中分离 PrP^{Sc}

为证明 KLVEF-琼脂糖适合作为 β -折叠结合分子, 来自 BSE 阳性牛的脑匀浆的 PrP^{Sc} 与柱物质结合, 并随后再次洗脱。使用 BSE 纯化试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)根据产品说明制备脑物质。样品物质根据制造商产品说明溶解于样品稀释缓冲液 R6 中 (Platelia[®] BSE Detection Kit, Bio-Rad 实验室, Hercules, USA) (Platelia[®] 中的 OD 为 6.0)。

使用 1 ml KLVFF-琼脂糖如实施例 3 所述制备 drip column, 并在室温用 PBS 充满和平衡。加入样品(250 μ l)后, 用 2 ml PBS 洗涤柱, 并分别收集洗出物作为级分。结合的 PrP^{Sc} 随后由含 1.5 ml 5 % SDS 的 PBS 洗出。每个级分中所得的 PrP^{Sc} 量使用 Platelia[®] BSE 检测试剂盒通过免疫方法进行检测。

图 3 显示该实验的洗脱图线, 并记录 KLVFF-琼脂糖可逆性结合 PrP^{Sc}, 的能力, 并从而获得该基质将从大体积的样品中选择性富集 PrP^{Sc} 的能力。在本文中, 洗出物中所含的 PrP^{Sc} 是由于加样超过了该柱的适应能力, 因为所用脑样品具有很高的 PrP^{Sc} 含量(Platelia®中的 OD 为 6.0)。洗脱中所得的
5 信号由于洗脱缓冲液中 SDS 的 ELISA 中的干扰作用而降低。

实施例5: 通过MTP模型中的KLVEF从体液中分离PrP^{Sc}(朊病毒型体内 BSE实验(Priortype in-vivo BSE-test))

MTP (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ Surface, F96 (Nunc, Roskilde, Denmark))用肽KLVFF包被(图2)。所述包被是通过与100 μl 肽溶液(10 μg/ml,
10 0.1M碳酸盐缓冲液中, pH 9.6)/每孔在4 °C温育16小时进行的。随后, 液体用真空吸出, 并且用300 μl洗涤缓冲液 (PBS; 0.05 % Tween 20; pH 7.2)/每孔洗涤3次。游离的结合位置通过与含0.5%的酪蛋白的洗涤缓冲液在室温温育1小时而被封闭。洗涤阶段 (300 μl 洗涤缓冲液/每孔, 3次)后, 包被的MTP用箔覆盖, 并与100 μl 含PrP^{Sc}的样品/每孔在室温温育1小时。

15 在该实验中, 研究了来自9只BSE阳性牛和5只BSE阴性牛的房水样品, 以及来自6只BSE阳性牛和13只BSE阴性牛的脑脊液样品。所有样品已经经过BSE纯化试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)准备。非结合的样品物质通过真空吸出, 并且使用300 μl洗涤缓冲液/每孔洗涤MTP三次。在室温与检测抗体 (含5 μg/ml V5B2的洗涤缓冲液, r-Biopharm, Darmstadt)温育1小
20 时。随后, 再次用300 μl洗涤缓冲液洗涤该板三次, 并在室温和山羊抗小鼠IgG过氧化物酶偶联物(1:20000, 洗涤缓冲液中, Jackson, USA)温育一小时。通过用300 μl洗涤缓冲液/每孔洗涤5次去除多余的偶联物。加入底物溶液(TMB)后15分钟, 通过加入1M H₂SO₄终止染色, 并通过测定450nm的消光度(以620nm为对照)记录染色强度。测定的消光度与和肽结合的PrP^{Sc} 的量成
25 正比。如图4所示, 与BSE阴性动物相比, 从BSE阳性动物所得的值 (t-检验)明显升高。房水样品中的阳性和阴性样品的之间的差异基本上比脑脊液样品之间的差异明显。这可以通过存在于相应体液中的PrP^{Sc} 浓度解释。根据这些结果, 房水比脑脊液更优选作为检测活动物体液内的PrP^{Sc}样品物质。

<110> 普里昂泰普两合公司 (Priontype GmbH & Co. KG)
凯瑟琳.施勒斯纳 (SCHLEUSSNER, Cathrin)

<120> 富集和检测病理学改变的朊病毒蛋白质 (PrP^{Sc}) 的方法

<130> LAB-001 PCT

<140> PCT/DE 03/02249

<141> 2003-07-04

<150> 102 30 141.7

<151> 2002-07-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> β -折叠结合肽

<400> 1

Arg Val Val Ile Ala

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> β -折叠结合肽

<400> 2

Lys Leu Val Phe Phe

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> β -折叠结合肽

<400> 3

Leu Pro Phe Phe Asp

1 5

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> 丙酰

<400> 4

Ile Ile Gly Leu
1

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> 丙酰

<400> 5

Arg Ile Ile Gly Leu
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<400> 6

Gly Val Val Ile Ala
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<220>
<221> LIPID
<222> (1).. (1)
<223> 丙酰

<220>
<221> MOD.RES
<222> (6).. (6)
<223> 酰胺化

<400> 7

Arg Arg Ala Phe Phe Val
1 5

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<400> 8

Ile Ile Gly Leu
1

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<400> 9

Arg Ile Ile Gly Leu
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> β -折叠结合肽

<400> 10

Arg Arg Ala Phe Phe Val
1 5

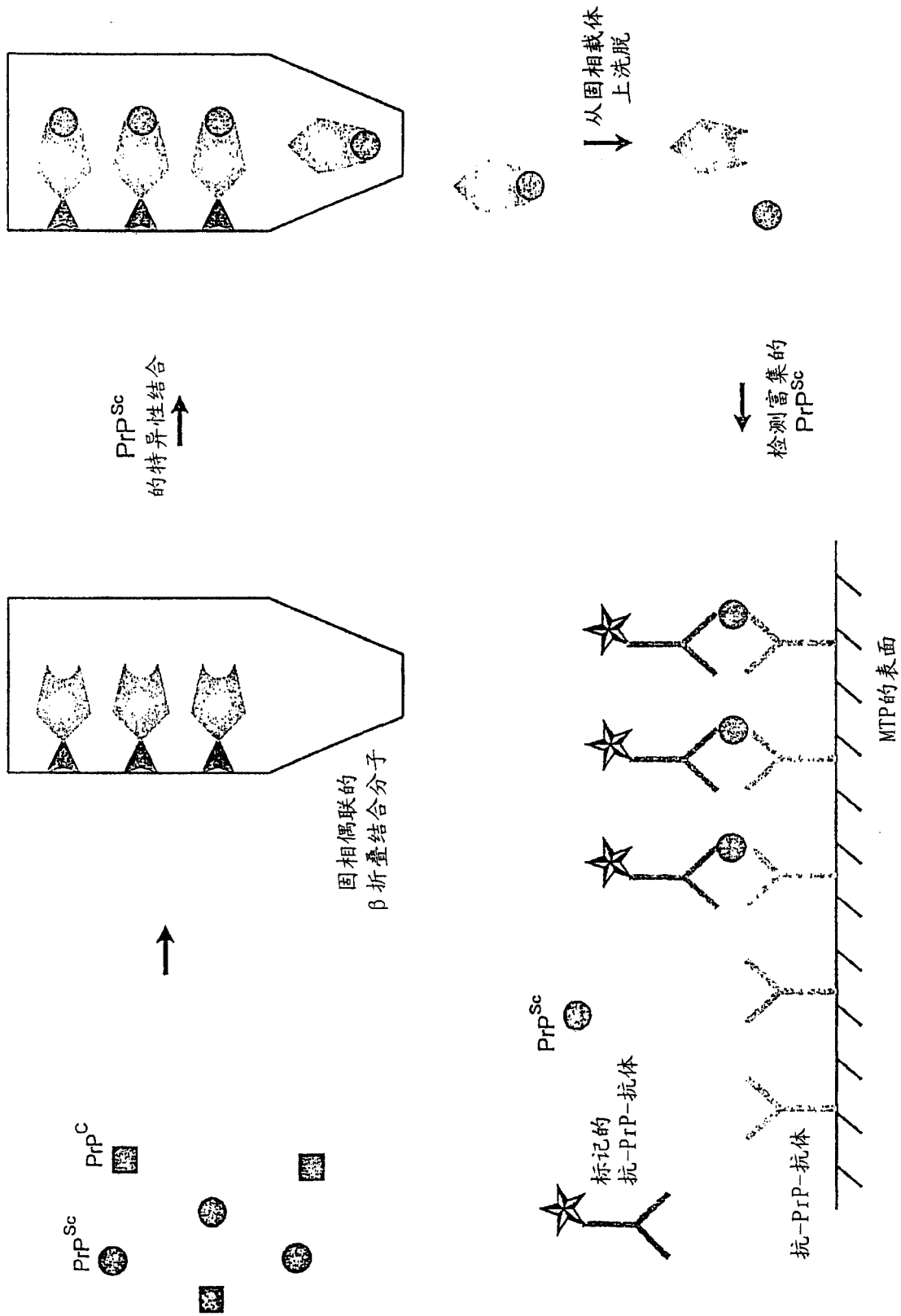


图 1

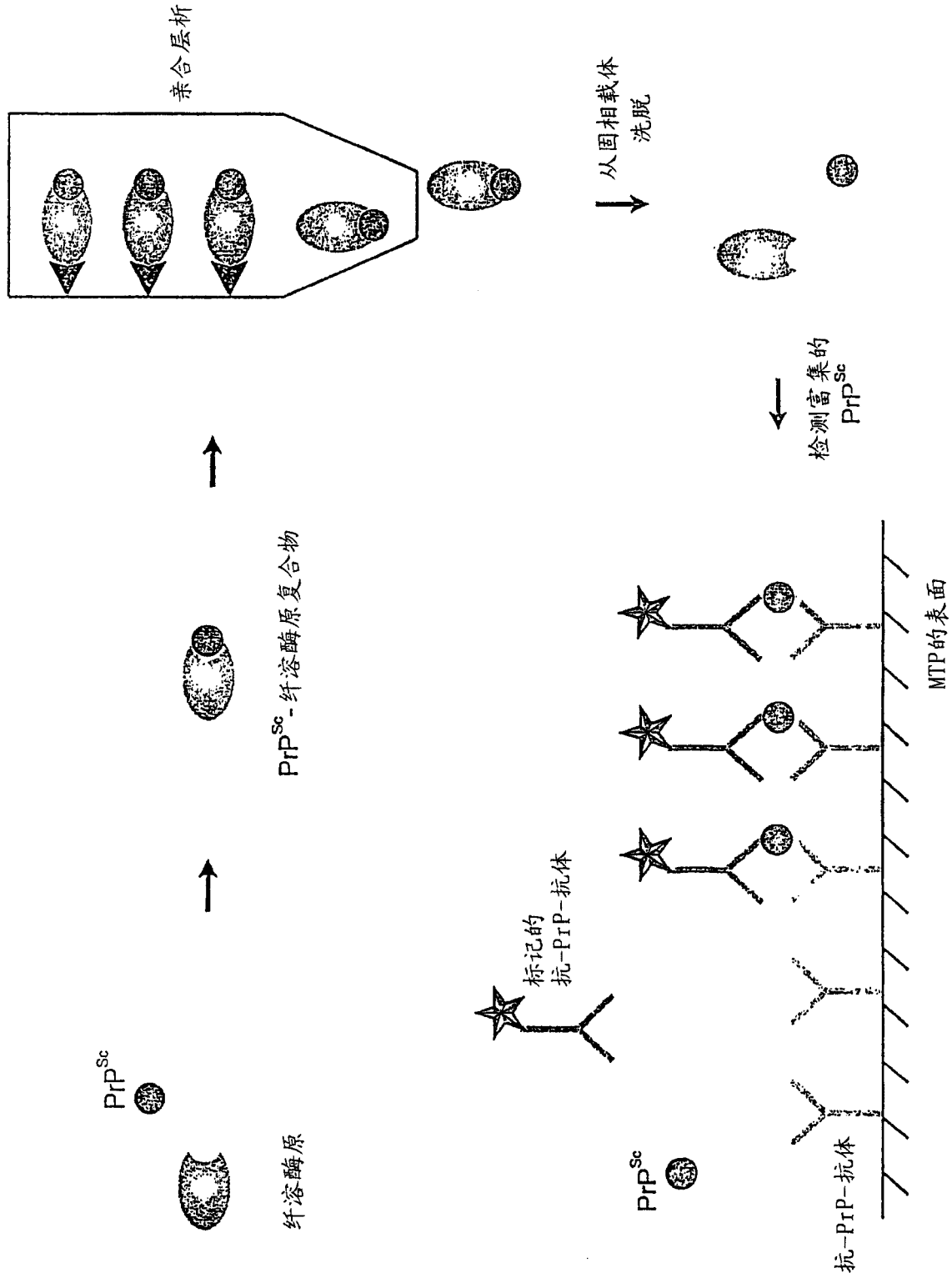


图 2

KLVFF-琼脂糖凝胶的PrP洗脱图

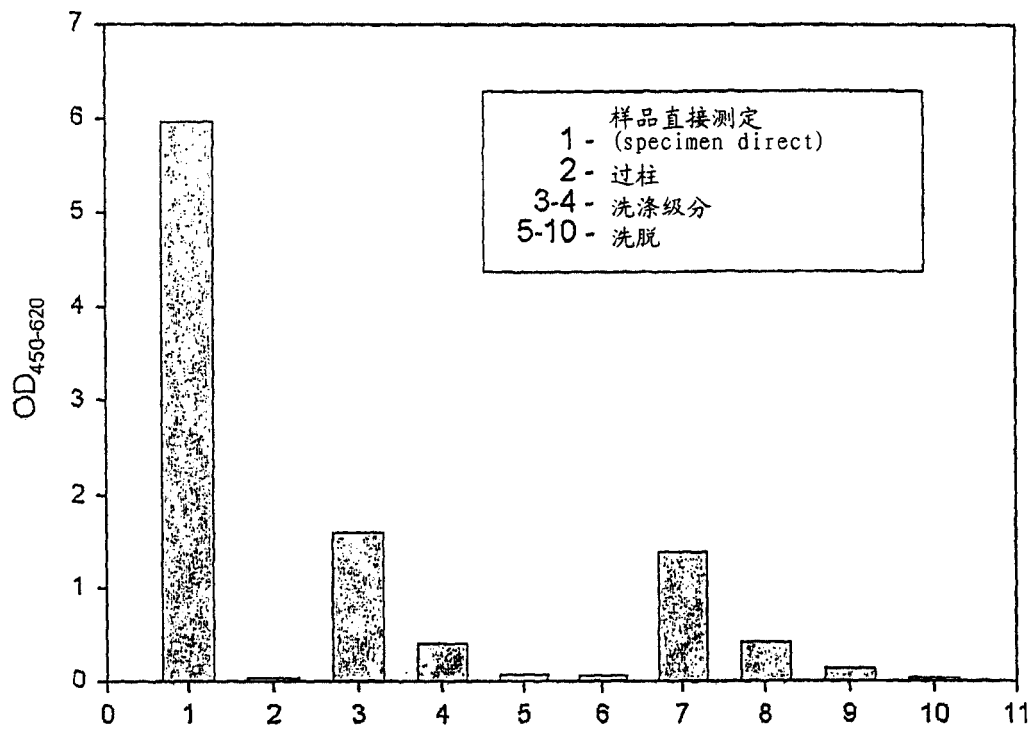


图 3

利用 Priontype™ 体内BSE试验检测 PrP^{Sc}

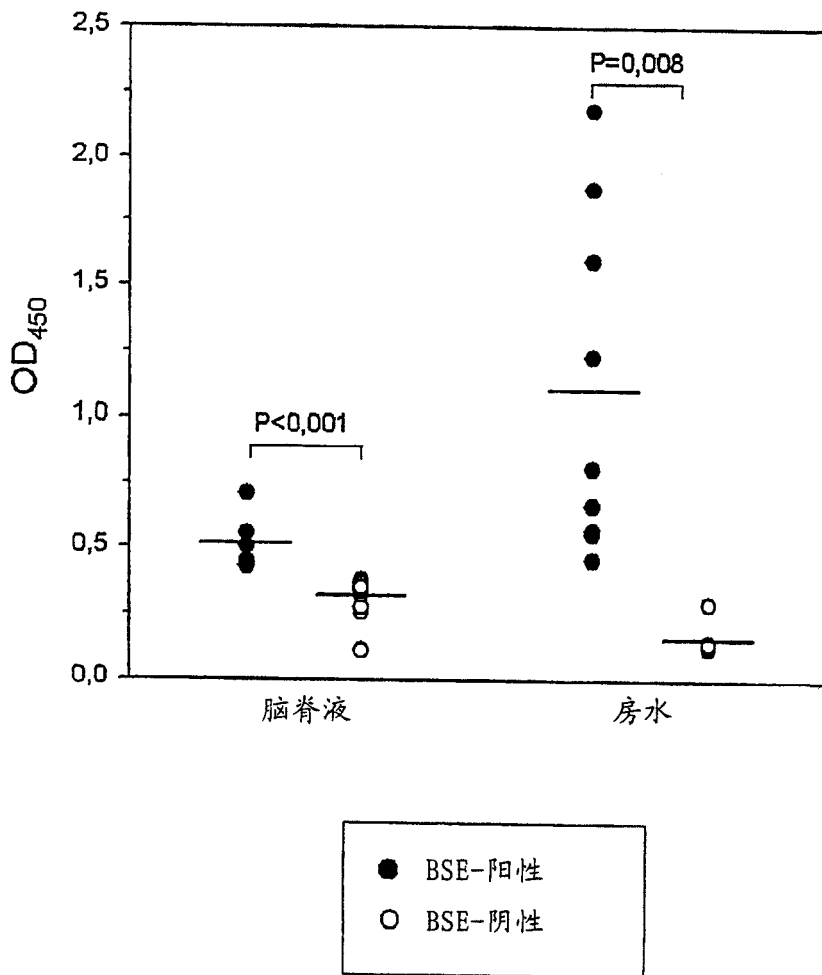


图 4

专利名称(译)	富集和检测病理学改变的朊病毒蛋白质(PrPsc)的方法		
公开(公告)号	CN1666106A	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	CN03815590.7	申请日	2003-07-04
[标]发明人	克劳迪娅·恩格曼 卡特加·霍施勒 乔尔格·莱曼 乔尔格·加伯特 乌尔里克·克鲁姆莱		
发明人	克劳迪娅·恩格曼 卡特加·霍施勒 乔尔格·莱曼 乔尔格·加伯特 乌尔里克·克鲁姆莱		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/02 C07K7/06 C12Q1/37 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/68 G01N33/547		
CPC分类号	G01N2800/2828 G01N33/54313 G01N2333/968 G01N33/6896		
优先权	10230141 2002-07-04 DE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及富集和检测活生物体的病理学改变的朊病毒蛋白质(PrPsc)的方法。

