



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101133085 B

(45) 授权公告日 2012.06.27

(21) 申请号 200680006980.X
 (22) 申请日 2006.02.28
 (30) 优先权数据
 059221/2005 2005.03.03 JP
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2007.09.03
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/JP2006/303682 2006.02.28
 (87) PCT申请的公布数据
 W02006/093115 JA 2006.09.08
 (73) 专利权人 大鵬药品工业株式会社
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 坂本一树 杉本芳一
 (74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
 代理人 龙淳

Monoclonal Antibodies to Human Placental UMP synthase and the purification of Human UMP synthase. JOURNAL OF CELL BIOLOGY 107 6.1988, 85(9), 全文.
 CARREYE. A. 等. Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa. REPRODUCTION 123. 2002, 85(9), 全文.
 SUTTLE D. P. 等. Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 85. 1988, 85(9), 全文.
 FURUSE H. 等. Orotate phosphoribosyl transferase in bladder cancer. GAN TO KAGAKU RYOH 31 9. 2004, 85(9), 全文.

审查员 唐慧

(51) Int. Cl.
 C07K 16/40 (2006.01)
 G01N 33/537 (2006.01)
 (56) 对比文件
 LIVINSTONE L. R. 等. The Production of

权利要求书 1 页 说明书 8 页
 序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称
 人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的测定方法

(57) 摘要
 本发明建立一种人 OPRT 免疫测定测定方法。本发明提供一种人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的测定方法, 将识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体和识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体进行组合使用。

CN 101133085 B

1. 一种人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质测定用试剂盒,其特征在于,含有:
识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体;和
识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体,
测定方法为夹心 ELISA 法。

人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种针对人乳清酸磷酸核糖基转移酶的新的抗体以及使用该抗体测定人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 乳清酸磷酸核糖基转移酶 (orotate phosphoribosyl transferase ;EC2. 4. 2. 10, 以下简称为“OPRT”) 是催化由乳清酸生成尿苷一磷酸 (UMP) 的反应的酶, 具有供给核酸合成中必需的嘧啶核苷酸的作用, 是一种核酸前体供给途径的主要限速酶之一。因此, 已知其在细胞增殖旺盛的肿瘤组织或消化道上皮中活性很高。

[0003] 另外, 已知 5- 氟尿嘧啶类的抗癌剂由于发挥出将 OPRT 作为限速酶活化的抗肿瘤效果, 对于在肿瘤细胞中 OPRT 量多的患者其效果是比较大的, 被认为具有显著的延长生命的效果, 但对于 OPRT 量少的患者则效果很小 (参照非专利文献 1)。因此, 在例如对肿瘤患者进行治疗时, 预先测定摘除肿瘤中的 OPRT 量就成为确定治疗方法、选择给药的抗癌剂的指标, 其重要性是非常高的。

[0004] 目前, 组织中的人 OPRT 的定量是通过测定 mRNA 的量或酶活性来进行的。可是, 由于转录后的调节机制等原因, 有可能 mRNA 量的测定并不能充分反映蛋白质的量和酶活性。另外, 通过测定酶活性进行的定量由于主要采用放射性标记的底物, 其操作非常繁杂。将人 OPRT 的定量法应用于临床诊断或治疗时, 简便而且正确是非常重要的, 因此, 迫切希望开发出这样的定量方法。

[0005] 非专利文献 1 :Br. J. Cancer. , 2003, Oct, 20 ;89 (8) :1486-92.

发明内容

[0006] 本发明的目的在于 :提供一种简便并且正确地测定人 OPRT 的方法。

[0007] 本发明人制备了针对人 OPRT 整体的多克隆抗体和针对人 OPRT 氨基酸序列中的各种寡肽的抗体, 设计将这些抗体进行组合的测定系统, 研究发现, 将识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗体与识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗体进行组合的人 OPRT 免疫测定系统, 相比于使用其它抗体的测定系统, 其灵敏度显著升高, 可以简便且正确地测定人 OPRT 蛋白质。从而完成了本发明。

[0008] 即, 本发明提供一种识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体。

[0009] 另外, 本发明还提供一种识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体。

[0010] 另外, 本发明还提供一种含有识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体和识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体的人 OPRT 蛋白质测定用试剂盒。

[0011] 进一步,本发明还提供一种将识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体和识别人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体进行组合使用的人 OPRT 蛋白质的测定方法。

[0012] 另外,人 OPRT 蛋白质的氨基酸序列为按照文献 Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 85, No. 6, 1988, 1754-1758 上记载的序列。

[0013] 发明效果

[0014] 根据本发明的方法,相比于使用将人 OPRT 整体作为抗原的抗体的情况,和使用识别人 OPRT 从 N 末端第 428 位~第 446 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体的情况,可以简便且正确地定量人 OPRT 蛋白质。进一步,通过利用本发明的测定方法对检体的人 OPRT 蛋白质进行定量,不但可以进行癌症的诊断、治疗效果预测,而且还可以选择治疗方法、决定可否给与抗癌剂。

附图说明

[0015] 图 1 为表示抗 OPRT 抗体的 Western blotting 的结果的图。

[0016] 图 2 为表示将抗 OPRT-A 抗体、抗 OPRT-B 抗体和抗 OPRT-C 抗体中的 2 种进行组合使用的夹心 ELISA 系统的结果。图中 A-B:抗 OPRT-A 抗体固定化-抗 OPRT-B 抗体检测。图中 B-A:抗 OPRT-B 抗体固定化-抗 OPRT-A 抗体检测。图中 B-C:抗 OPRT-B 抗体固定化-抗 OPRT-C 抗体检测。图中 C-A:抗 OPRT-C 抗体固定化-抗 OPRT-A 抗体检测。图中 C-B:抗 OPRT-C 抗体固定化-抗 OPRT-B 抗体检测。

[0017] 图 3 为表示使用抗 OPRT-C 抗体作为固定化抗体、使用抗 OPRT-A 抗体作为检测抗体的 ELISA 系统的标准曲线的图。

具体实施方式

[0018] 作为本发明中的识别人 OPRT 蛋白质从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体的抗原,可以使用具有人 OPRT 蛋白质从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位的氨基酸序列或者含有该氨基酸序列的连续 80% 以上的氨基酸序列的合成肽。在后述中,将使用该抗原得到的抗体称为抗 OPRT-A 抗体。

[0019] 作为本发明中的识别人 OPRT 蛋白质从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸区域存在的表位的抗人 OPRT 抗体的抗原,可以使用具有人 OPRT 蛋白质从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位的氨基酸序列或者含有该氨基酸序列的连续 80% 以上的氨基酸序列的合成肽。在后述中,将使用该抗原得到的抗体称为抗 OPRT-C 抗体。

[0020] 当使用上述合成肽作为抗原时,为了促进免疫应答,可以将 Freund 佐剂等佐剂与抗原混合使用,也可以使牛甲状腺球蛋白、BSA(Bovine Serum Albumin:牛血清白蛋白)、KLH(Keyhole limpet hemocyanine:匙孔血蓝蛋白)等载体与抗原结合使用。

[0021] 本发明中的抗人 OPRT 抗体只要能够识别所述氨基酸序列的区域存在的所述表位就可以,可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体。

[0022] 当采用上述抗原制备抗人 OPRT 多克隆抗体时,可以按以下制备。按照常规方法,将所述抗原以必要的次数免疫给兔、大鼠、小鼠、山羊等各种动物,通过采血获得含有抗人

OPRT 多克隆抗体的抗血清。优选将上述合成肽与 KLH 结合的结合物作为抗原按 3 周以 2 次的比例免疫给兔子,为了从抗血清中纯化抗 OPRT 抗体,可以按照抗体纯化的常规方法,通过亲和层析、硫酸铵盐析、离子交换柱层析、分子筛柱层析(凝胶过滤)、蛋白质 A 柱层析等进行。而且,出于提高抗体纯度的目的,既可以组合这些纯化方法,也可以重复进行。

[0023] 进行亲和层析(抗原固定化柱)时,将上述合成肽固定于柱子中,填充抗血清,在抗 OPRT 抗体吸附于柱子上以后,使用洗脱液洗脱掉抗 OPRT 抗体,通过回收,可以获得高纯度的抗 OPRT 抗体。

[0024] 采用上述抗原制备抗人 OPRT 单克隆抗体时,可以按以下方式,通过制备生产抗人 OPRT 单克隆抗体的杂交瘤而得到。例如将上述抗原免疫给小鼠、大鼠等哺乳动物或鸟类后,将其脾脏细胞与小鼠、大鼠等哺乳动物的骨髓瘤细胞按照 Koler 和 Milstein 的基本方法(参照 Nature、第 256 卷、495 页(1975))进行细胞融合,通过在选择性培养基中培养,可以获得上述杂交瘤。此时的免疫方法可以通过例如将制备好的抗原溶解于磷酸缓冲液、生理食盐水等中,必要时混合佐剂,对动物的皮下、脾脏内、腹腔、静脉等处每 1~3 周进行数次接种,直到抗体效价(antibody titer)充分升高。细胞融合中所使用的骨髓瘤细胞可以列举小鼠 P3-NS-1/1Ag4.1、P3-X63-Ag8.653、Sp2/0Ag14、大鼠 YB2/0 等。细胞融合时的融合促进剂可以使用聚乙二醇、仙台病毒等。也可以使用电脉冲。细胞融合中使用的骨髓细胞为 8-氮杂鸟嘌呤耐性株,由于在核苷酸(nucleotide)生物合成的回收合成(salvage)途径中缺乏必要的次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖基转移酶,在 HAT 培养基(含有次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidine)的培养基)中不能合成核苷酸,无法生存。因此,细胞融合以后,通过在 HAT 培养基培养 1 周~2 周,能够只选择脾细胞与骨髓瘤融合的杂交瘤细胞。

[0025] 这样得到的本发明的抗人 OPRT 抗体可以用于人 OPRT 蛋白质的免疫学测定。例如,用于夹心 ELISA 法、由竞争法进行的放射性免疫分析(competitive radioimmunoassay)、酶免疫测定(enzymeimmunoassay)、免疫层析法(immunochromatography)等。其中,夹心 ELISA 法是特别优选的。

[0026] 本发明的人 OPRT 蛋白质测定用试剂盒含有抗 OPRT-A 抗体和抗 OPRT-C 抗体。使用这两种抗体进行夹心 ELISA 法时,将一个抗 OPRT 抗体固定在支撑体(固定化抗体),将另一个抗 OPRT 抗体作为标记抗体(检测抗体)。优选的组合是将抗 OPRT-C 抗体作为固定化抗体,将抗 OPRT-A 抗体作为检测抗体。

[0027] 进行免疫测定例如进行夹心 ELISA 法时,将一个抗 OPRT 抗体固定在 ELISA 用平板等支撑体上,接着,使被检体反应,进一步再使标记抗 OPRT 抗体反应,然后进行清洗,测定夹心免疫反应产生的标记量。

[0028] 本发明所采用的被检体只要是 OPRT 能够存在的人组织、体液即可,例如肿瘤组织、消化道组织、血液、淋巴液等。特别优选肿瘤组织。

[0029] 本发明中所采用的支撑体例如可以列举琼脂糖、纤维素等不溶性多糖类、硅树脂、聚苯乙烯树脂、聚丙烯酰胺树脂、尼龙树脂、聚碳酸酯树脂等合成树脂、玻璃等不溶性支撑体等。这些支撑体可以采用球珠或平板等形状,当为球珠时,可以采用填充这些球珠的柱子等。当为平板时,可以使用多孔板(96 孔的多孔板等)、生物传感芯片等。抗 OPRT 抗体和支撑体的结合可以通过化学结合或物理吸附等通常采用的方法进行结合。这些支撑体可以使

用市售品。

[0030] 抗 OPRT 抗体与被检体的反应通常在缓冲液中进行。缓冲液可以使用磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、柠檬酸缓冲液、硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液等。而且，孵育 (incubation) 条件例如可以在 4℃~室温孵育 1 小时~24 小时。孵育后的清洗可以是任何清洗方法，只要不影响被检体中的人 OPRT 蛋白质与抗 OPRT 抗体的结合即可。例如，可以使用含有 Tween20 等表面活性剂的缓冲液等。

[0031] 在本发明的人 OPRT 蛋白质测定方法中，除欲检测出人 OPRT 蛋白质的被检体以外，还可以设置对照试样。对照试样有不含有人 OPRT 蛋白质的阴性对照试样和含有人 OPRT 蛋白质的阳性对照试样等。通过比较使用不含有人 OPRT 蛋白质的阴性对照试样得到的结果和使用含有人 OPRT 蛋白质的阳性对照试样得到的结果，可以检测出被检体中的人 OPRT 蛋白质。而且，还可以制备浓度呈阶梯变化的一系列对照试样，将对各对照试样的检测结果作为数值，制成标准曲线，由被检体的数值，基于标准曲线，可以定量检测出被检体中含有的 OPRT 蛋白质。

[0032] 抗 OPRT 抗体的标记可以采用通常的方法进行。标记物质可以使用荧光色素、酶、辅酶、化学发光物质、放射性物质等本领域技术人员公知的标记物质。具体可以列举放射性同位素 (^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 等)、荧光素、罗丹明 (rhodamine)、丹磺酰氯 (dansyl chloride)、伞形酮 (umbelliferone)、荧光素酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、辣根过氧化物酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶 (saccharide oxidase)、微过氧化物酶 (microperoxidase)、生物素等。使用生物素作为标记物质时，在添加生物素标记抗体后，优选再添加结合碱性磷酸酶等酶的抗生物素蛋白 (avidin)。标记物质与抗 OPRT 抗体的结合可以使用戊二醛法、顺丁烯二酰亚胺法、二硫代吡啶法 (pyridyl disulfide method)、过碘酸法等公知的方法进行。

[0033] 具体地讲，将含有一种抗 OPRT 抗体的溶液加于平板等支撑体上，将该抗 OPRT 抗体固定于支撑体上。清洗平板以后，为了防止蛋白质的非特异性结合，例如可以用 BSA、明胶、白蛋白等进行封闭。再次清洗，将被检体加到平板上。孵育后，进行清洗，加入另外一种标记抗 OPRT 抗体。适度孵育以后，清洗平板，检测残留在平板上的标记抗 OPRT 抗体。检测可以根据本领域技术人员公知的方法进行，例如，当用放射性物质进行标记时，可以用液体闪烁计数法或 RIA 法检测。当用酶进行标记时，加入底物，酶引起的底物的变化例如用光度计检测显色。底物的具体例子可以列举 2,2'-连氮二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS)、邻苯二胺、3,3',5',5'-四甲基联苯胺 (TME) 等。为荧光物质时，则用荧光光度计进行检测。

[0034] 实施例

[0035] 下面，举出实施例对本发明进行更详细的说明，但本发明并不限于这些实施例。

[0036] 比较例 (由使用抗 rhOPRT 抗体的 ELISA 法进行的 OPRT 定量)

[0037] (1) 制备抗原

[0038] 使用培养大肠杆菌而得到的重组人 OPRT (rhOPRT) 作为抗原。其制备方法如下：用 PCR 克隆人 OPRT 的全长 cDNA，为了表达谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和 rhOPRT 的融合蛋白质制作质粒 (plasmid)，将该质粒导入大肠杆菌 BL21，在 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素 (ampicillin) 存在下，在 100mL 的 LB 培养基 (和光纯药工业公司制造) 中 37℃ 振荡培养一晚。将该培

养液 10mL 移入装有 1L 的 LB 培养基的三角烧瓶中,37℃ 下进一步培养 4 小时。离心而集菌后,在 100mL 的集菌缓冲液 (50mM Tris、8M Urea、1mM PMSF、5mM EDTA、5mM DTT、pH7.4) 中悬浮菌体,在 4℃ 缓慢搅拌 30 分钟。将悬浮液在 4℃ 超声破碎后,在 15000×g、4℃ 进行 30 分钟的离心处理。然后,通过透析处理将上清中的尿素的浓度慢慢降至 1M,进行重折叠 (refolding) 处理,通过装有 2mL 谷胱甘肽 (GSH)-Sepharose (Sigma 公司制造) 的柱子,用 10mL 清洗液 (20mM Tris、1M Urea、5mM EDTA、pH7.4) 进行清洗,利用洗脱用缓冲液 (50mM GSH、50mM Tris、pH9.6) 洗脱 GST-rhOPRT,得到 rhOPRT 溶液。

[0039] (2) 免疫

[0040] 以 GST-rhOPRT 作为免疫原,另外使用 Freund 的完全佐剂 (FCA) 或者 Freund 的不完全佐剂 (FIA),按以下对兔子 (white 日本白色种) 进行免疫。

[0041] 第 1 次 :GST-rhOPRT0.2mg+FCA S. C.

[0042] 第 2 次~第 8 次 :GST-rhOPRT0.5mg+FIA S. C.

[0043] (3) 抗血清的纯化

[0044] 回收免疫的兔子的全血,在 1500×g、4℃ 离心 5 分钟,分离血清。将得到的抗血清 20mL 用 PBS(-) 稀释 2 倍成为 40mL,将该抗血清稀释液添加到 GST 蛋白的固定化柱子中,在吸附 GST 反应性的抗体后,将流通 (flow-through) 溶液通过蛋白 A 固定化柱子,使其结合抗体 (IgG),使用 PBS(-),一直清洗到 280nm 的吸光度消失为止。然后,将 0.2M 的 Glycine-HCl pH2.5 通过柱子,使吸附于抗原上的抗体被洗脱。另外,此时为了中和 pH,在接收洗脱的抗体的试管中预先添加 1MTris,以防止回收的抗体变质。将得到的抗体组分用 PBS(-) 在 4℃ 透析一晚,得到纯化抗体。

[0045] (4) 通过夹心 ELISA 法进行人肿瘤细胞中的 OPRT 定量

[0046] 将抗 rhOPRT 抗体用 0.1mM 碳酸缓冲液 pH9.6 调制成 5.0 μg/mL,按 0.1mL 分注于 96 孔的 ELISA 用板上,密封以后在 4℃ 的孵化器内包覆一晚,得到抗体固定化载体。将 96 孔板用含有 0.05% Tween 20 的 PBS(-) 清洗 2 次,加入含有 0.1% BSA 的 PBS(-)0.1mL,以封闭非特异性吸附。用清洗液清洗 2 次后,添加 0.1mL 的 3、9、27 倍稀释的来源于人胃癌的细胞 TMK1 细胞的组织匀浆 (homogenate) (由 5×10⁶ 个细胞制备 0.2mL 的蛋白提取液),室温下反应 1 小时。用清洗液清洗 5 次后,分注 0.1mL 用稀释液稀释成 0.5 μg/mL 的过氧化物酶标记抗 rhOPRT 抗体,室温下反应 30 分钟。用清洗液清洗 7 次后,加入 0.1mL 的含有 1.3mg/mL 的邻苯二胺、0.01% 的过氧化氢水和 1mM EDTA 的 0.1M 的磷酸-柠檬酸缓冲液 pH5.1 (显色液),在室温暗处进行 30 分钟的酶反应。最后,加入 0.1M 硫酸 0.1mL,停止反应,测定 492nm 的吸光度。结果如表 1 所示。

[0047] 表 1

[0048] 通过使用抗 rhOPRT 抗体的夹心 ELISA 法检测 OPRT

[0049] 稀释倍率 吸光度 (492nm)

[0050] 1/3 0.085

[0051] 1/9 0.055

[0052] 1/27 0.15

[0053] 因为吸光度 (492nm) 很低,并不能完全认为其与稀释倍率的相关性,因此证明了采用 OPRT 全长 cDNA 制备的抗 rhOPRT 抗体并不适合于夹心 ELISA 法。

[0054] 实施例 1 (抗体的制备)

[0055] 按以下操作,得到抗 OPRT 多克隆抗体。

[0056] (1) 肽合成

[0057] 合成具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位氨基酸序列的肽、具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 428 位~第 446 位氨基酸序列的肽、以及具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位氨基酸序列的肽,得到由以下氨基酸序列组成的人工肽。

[0058] 具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 86 位~第 108 位氨基酸序列的肽(抗原名: OPRT-A)

[0059] Cys-Ser-Thr-Asn-Gln-Ile-Pro-Met-Leu-Ile-Arg-Arg-Lys-Glu-Thr-Lys-Asp-Tyr-Gly-Thr-Lys-Arg-Leu(序列号 1)

[0060] 具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 428 位~第 446 位氨基酸序列的肽(抗原名: OPRT-B)

[0061] Cys-Leu-Gly-Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Pro-Gln-Glu-Val-Ile-Gly-Lys-Arg-Gly-Ser-Asp-Ile(序列号 2)

[0062] 具有人 OPRT 从 N 末端开始的第 454 位~第 474 位氨基酸序列的肽(抗原名: OPRT-C)

[0063] Cys-Ile-Ser-Ala-Ala-Asp-Arg-Leu-Glu-Ala-Ala-Glu-Met-Tyr-Arg-Lys-Ala-Ala-Trp-Glu-Ala-Tyr(序列号 3)

[0064] (2) 抗原结合物的制备

[0065] 使用 4mg 由上述得到的人工肽和 2mg 顺丁烯二酰亚胺活化 KLH(Pierce) 分别针对各肽制成肽-KLH(conjugate) 结合物。

[0066] (3) 免疫

[0067] 将人工肽-KLH 作为免疫原,还使用 Freund 的完全佐剂(FCA) 或者 Freund 的不完全佐剂(FIA),按以下对兔子(white 日本白色种)进行免疫。

[0068] 第 1 次:Peptide-KLH 0.5mg+FCAS. C.

[0069] 第 2 次~第 8 次:Peptide-KLH 0.5mg+FIA S. C.

[0070] (4) 抗血清的纯化

[0071] 回收免疫的兔子的全血,在 $1600 \times g$ 、 4°C 下离心 5 分钟,分离血清。将得到的抗血清 20mL 用 PBS(-) 稀释 2 倍成为 40mL,将该抗血清稀释液添加到抗原肽柱子中,使其结合抗体(IgG),使用 PBS(-),一直清洗到 280nm 的吸光度消失为止。然后,将 0.2M 的 Glycine-HCl pH2.5 通过柱子,使吸附于抗原上的抗体被洗脱。另外,此时为了中和 pH,在接收洗脱的抗体的试管中预先添加 1M Tris,以防止回收的抗体变质。将得到的抗体组分用 PBS(-) 在 4°C 透析一晚,得到纯化抗体。

[0072] (5) 通过 Western blotting 法确认抗 OPRT 抗体的特异性

[0073] 将来源于人肺癌的细胞 LC-11 细胞的组织匀浆(蛋白质浓度为 20mg/mL)与电泳用试样调制液(4%的 SDS、10%的 β -巯基乙醇、20%的甘油、125mM Tris、pH6.8)等量混合,进行 2 分钟的煮沸处理,取 $10 \mu\text{L}$ 用于电泳。试样经 10%聚丙烯酰胺电泳以后,在 PVDF 膜上进行电转移,浸于 Block ace(封闭剂,大日本制药公司制造)中进行封闭。将用 20mM PBS(-) 调制成 $1.2 \mu\text{g/mL}$ 的各多克隆抗体作为一次抗体,反应 1 小时,用含有 500mM 氯化钠

和 0.5% Tween20 的 20mM Tris pH7.0 (清洗液) 清洗膜后,将碱性磷酸酶标记的葡聚糖聚合物结合抗兔多克隆抗体 (Dako Cytomation) 作为二次抗体,反应 1 小时,接着,用清洗液清洗膜,使用化学发光试剂 (CDP-star、Tropix) 进行酶反应,从而检测出 OPRT。其结果如图 1 所示,可以确认本发明的抗人 OPRT 抗体都仅特异性识别 OPRT。

[0074] 实施例 2 (通过夹心 ELISA 法对人 OPRT 进行定量)

[0075] (1) 使用培养大肠杆菌获得的 rhOPRT 作为标准。其制法如下:用 PCR 克隆人 OPRT 的全长 cDNA,制备表达谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和 rhOPRT 的融合蛋白的质粒,将该质粒导入大肠杆菌 BL21,在 100 μ g/mL 氨苄青霉素存在下,在 100mL 的 LB 培养基 (和光纯药工业公司制造) 中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养一晚。将该培养液 10mL 移入加有 1L 的 LB 培养基的三角烧瓶中,37 $^{\circ}$ C 再培养 4 小时。离心集菌后,在 100mL 的集菌缓冲液 (50mM Tris、8M Urea、1mM PMSF、5mM EDTA、5mM DTT、pH7.4) 中悬浮菌体,在 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌 30 分钟。将悬浊液在 4 $^{\circ}$ C 超声破碎后,在 15000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟。然后,通过透析处理将上清中的尿素的浓度慢慢降至 1M,进行重折叠 (refolding) 处理,通过填充 2mL 谷胱甘肽 (GSH)-Sepharose (Sigma 公司制造) 的柱子,用 10mL 清洗液 (20mM Tris、1M Urea、5mM EDTA、pH7.4) 进行清洗。在结合有该融合蛋白的谷胱甘肽 (GSH)-Sepharose 中加入 600U 的 thrombin,在 2.5mM 氯化钾存在下在 4 $^{\circ}$ C 反应一晚,切断 GST-OPRT 融合蛋白的结合部位。将 thrombin 与 rhOPRT 的混合物通过 Benzamidine-Sepharose 柱子,得到目的 rhOPRT 溶液。按照 Bradford 法进行的蛋白质定量的结果为,得到 20 μ g/mL 浓度的 rhOPRT 14mL。

[0076] (2) 抗 OPRT 抗体组合的比较

[0077] 将抗 OPRT-A 抗体、抗 OPRT-B 抗体、抗 OPRT-C 抗体用 0.1mM 碳酸缓冲液 pH9.6 调制成为 5.0 μ g/mL,按 0.1mL 分注于 96 孔的 ELISA 用板上,密封以后在 4 $^{\circ}$ C 的孵化器内包覆一晚,得到抗体固定化载体。将 96 孔板用含有 0.05% Tween20 的 PBS(-) 清洗 2 次,加入 0.1mL 含有 0.1% BSA 的 PBS(-) 以封闭非特异性吸附。用清洗液清洗 2 次以后,添加 0.1mL 浓度为 1.88ng/mL 的 rhOPRT 溶液,室温下反应 1 小时。用清洗液清洗 5 次后,分别加入 0.1mL 的用稀释液 (含有 0.1% BSA、0.05% Tween 20 的 PBS(-)) 稀释成 0.5 μ g/mL 的抗 OPRT-A 抗体、抗 OPRT-B 抗体、抗 OPRT-C 抗体的过氧化物酶标记抗体,室温下反应 30 分钟。用清洗液清洗 7 次后,加入 0.1mL 含有 1.3mg/mL 的邻苯二胺、0.01% 的过氧化氢水和 1mM EDTA 的 0.1M 的磷酸-柠檬酸缓冲液 pH5.1 (显色液),在室温暗处进行 30 分钟的酶反应。最后,加入 0.1M 硫酸 0.1mL,终止反应,测定 492nm 的吸光度。结果如图 2 所示。

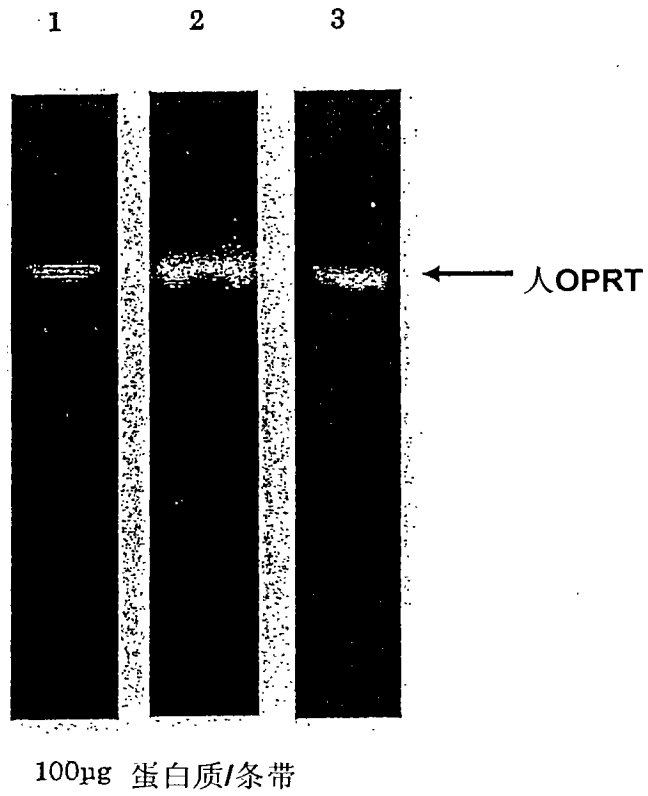
[0078] 使用抗 OPRT-B 抗体,任意组合均得不到充分的吸光度。而组合抗 OPRT-A 抗体和抗 OPRT-C 抗体时,可以最高灵敏度地测得 rhOPRT 的浓度。

[0079] (3) 夹心 ELISA 法对人 OPRT 量的定量性

[0080] 用 0.1mM 碳酸缓冲液 pH 9.6 将抗 OPRT-C 抗体调制成为 5.0 μ g/mL,按 0.1mL 分注于 96 孔的 ELISA 用板上,密封后在 4 $^{\circ}$ C 的孵化器内包覆一晚,得到抗体固定化载体。将 96 孔板用含有 0.05% Tween20 的 PBS(-) 清洗 2 次,加入 0.1mL 含有 0.1% BSA 的 PBS(-),封闭非特异性吸附。用清洗液清洗 2 次后,添加 0.1mL 浓度为 0.47、0.94、1.88、3.75、7.5ng/mL 的 rhOPRT 溶液,室温下反应 1 小时。用清洗液清洗 5 次后,分别加入 0.1mL 用稀释液稀释成 0.5 μ g/mL 的过氧化物酶标记的抗 OPRT-A 抗体,室温下反应 30 分钟。用清洗液清洗 7 次后,加入 0.1mL 的含有 1.3mg/mL 的邻苯二胺、0.01% 的过氧化氢水和 1mM EDTA 的 0.1M

的磷酸-柠檬酸缓冲液 pH5.1 (显色液), 在室温暗处进行 5 分钟的酶反应。最后, 加入 0.1M 硫酸 0.1mL, 终止反应, 测定 492nm 的吸光度。结果如图 3 所示。

[0081] 使用抗 OPRT-C 抗体作为固定化抗体, 使用抗 OPRT-A 抗体作为检测抗体时, 可以定量地测定 rhOPRT 的浓度, 由此建立了夹心 ELISA 系统。



1:抗 OPRT-A 抗体
2:抗 OPRT-B 抗体
3:抗 OPRT-C 抗体

图1

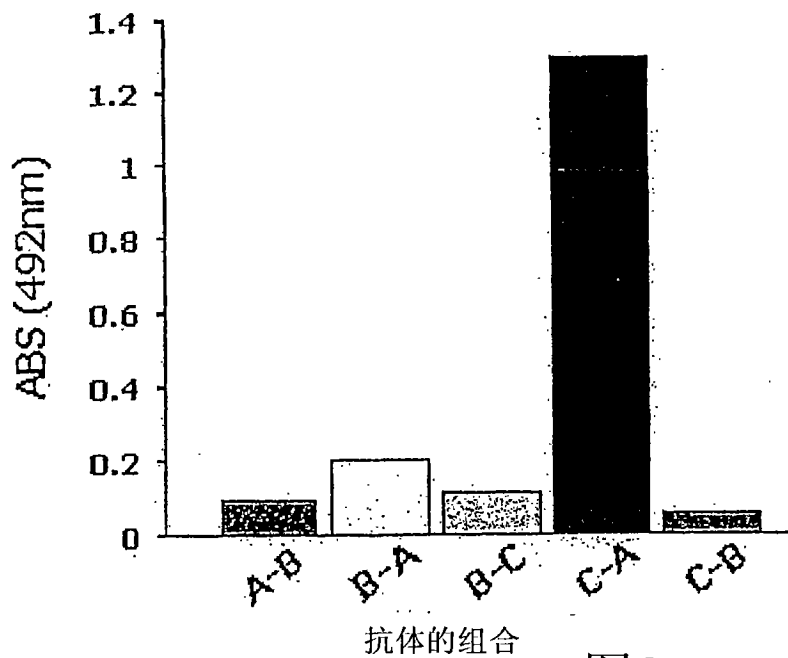


图2

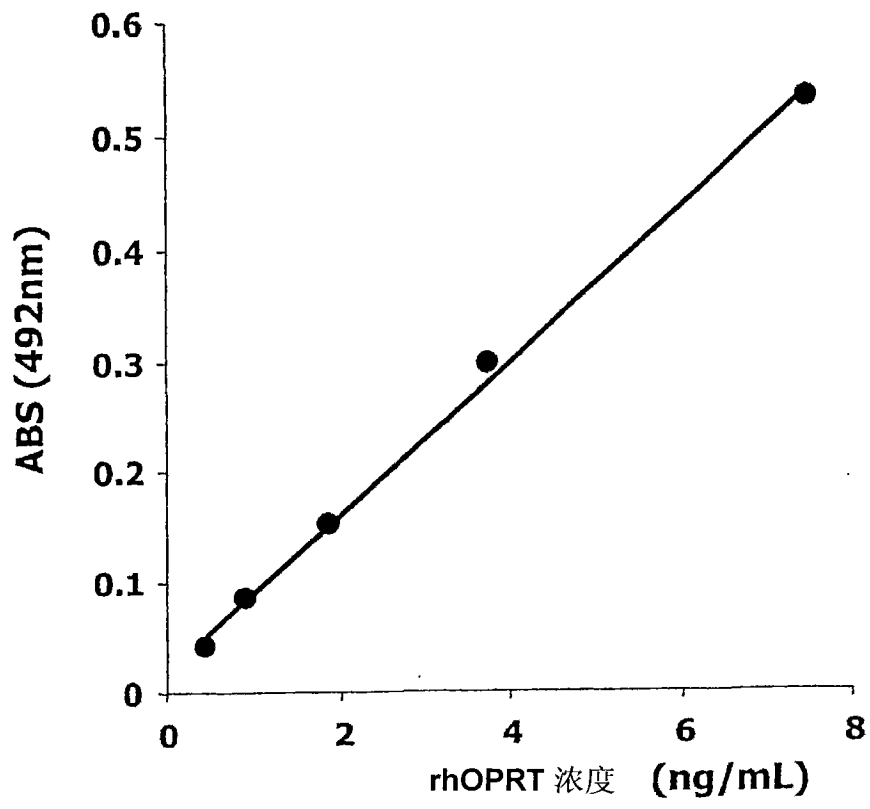
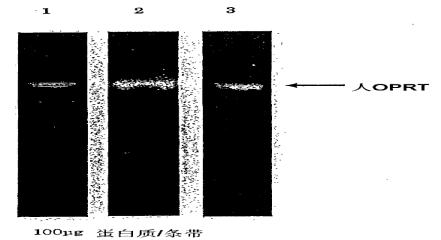


图3

专利名称(译)	人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的测定方法		
公开(公告)号	CN101133085B	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN200680006980.X	申请日	2006-02-28
申请(专利权)人(译)	大鹏药品工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大鹏药品工业株式会社		
[标]发明人	坂本一树 杉本芳一		
发明人	坂本一树 杉本芳一		
IPC分类号	C07K16/40 G01N33/537		
CPC分类号	C12Q1/48 C07K16/40 G01N2333/91142		
审查员(译)	唐慧		
优先权	2005059221 2005-03-03 JP		
其他公开文献	CN101133085A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明建立一种人OPRT免疫测定测定方法。本发明提供一种人乳清酸磷酸核糖基转移酶蛋白质的测定方法，将识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从N末端开始的第86位～第108位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体和识别人乳清酸磷酸核糖基转移酶从N末端开始的第454位～第474位的氨基酸区域存在的表位的抗人乳清酸磷酸核糖基转移酶抗体进行组合使用。



1:抗 OPRT-A 抗体
2:抗 OPRT-B 抗体
3:抗 OPRT-C 抗体

