



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101868726 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200880116624. 2

C07K 1/22(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 20

C07K 14/79(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 17/02(2006. 01)

2007-300388 2007. 11. 20 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/003396 2008. 11. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/066454 JA 2009. 05. 28

(71) 申请人 森永乳业株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 岩丸祥史 久原彻哉

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

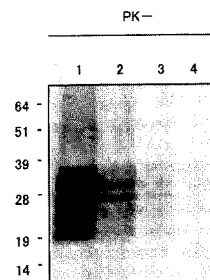
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 2 页

(54) 发明名称

异常型朊病毒蛋白结合剂和异常型朊病毒蛋白的检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种能够简便、迅速且以高灵敏度定量地从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶 K 进行酶处理的方法;以及在该方法中使用的试剂。本发明提供一种包含乳铁蛋白的异常型朊病毒蛋白结合剂;以及使用异常型朊病毒蛋白结合剂来检测异常型朊病毒蛋白的方法。



PK-

1 2 3 4

64 -
51 -
39 -
28 -
19 -
14 -

1. 感染脑乳剂(异常型朊病毒蛋白)
2. 稀释感染脑乳剂(x10)
3. 稀释感染脑乳剂(x100)
4. 非感染脑乳剂(正常型朊病毒蛋白)

1. 一种异常型朊病毒蛋白结合剂,其包含乳铁蛋白。
2. 根据权利要求 1 所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其中,乳铁蛋白被固定在载体上。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其为异常型朊病毒蛋白检测剂。
4. 一种异常型朊病毒蛋白的检测方法,其包括如下工序:
使权利要求 2 所述的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序;
从与试样接触的该异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序;
检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序是通过免疫学检测法检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。
6. 一种异常型朊病毒蛋白的分离方法,其包括如下工序:
使权利要求 2 所述的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序;
从与试样接触的该异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序。

异常型朊病毒蛋白结合剂和异常型朊病毒蛋白的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及异常型朊病毒蛋白结合剂和异常型朊病毒蛋白的检测方法。

背景技术

[0002] 所谓的朊病毒病正成为严重的社会问题。作为该朊病毒病, 已知的有传染性海绵状脑病 (TSE), 例如羊瘙痒症 (scrapie)、牛海绵状脑病 (BSE)、克罗伊茨费尔特 - 雅各布病 (CJD) 等。

[0003] 由各种证据可知, 这些朊病毒病是由于感染性朊病毒蛋白 (异常型朊病毒蛋白) (PrP^{Sc}) 而引起的。

[0004] 因此, 为了避免人和动物传染朊病毒病、并确保医药品和食品的安全性, 对试样中的感染性朊病毒蛋白 (异常型朊病毒蛋白) 的检测进行了各种尝试。

[0005] 然而, 人和动物在生物体内本来就具有不引起朊病毒病的非感染性朊病毒蛋白 (正常型朊病毒蛋白) (PrP^{C})。并且, 令人惊奇的是, 该正常型朊病毒蛋白与异常型朊病毒蛋白具有相同的氨基酸序列 (一级结构), 其不同之处仅在于由相同的氨基酸序列所形成的高级结构。

[0006] 通常, 作为区分并检测两种蛋白质的方法, 有使用能够区分这些蛋白质的特异性抗体的方法。然而, 也许是因为如上所述氨基酸序列相同, 至今也没有获得能够区分异常型朊病毒蛋白和正常型朊病毒蛋白的特异抗体。即, 使用特异性抗体来检测试样中的感染性朊病毒蛋白 (异常型朊病毒蛋白) 的方法尚未有实用化的可能性。

[0007] 因此, 目前, 异常型朊病毒蛋白的检测方法仅限于下面的大致 2 种方法。

[0008] 一种方法为: 将疑含有异常型朊病毒蛋白 (感染性朊病毒蛋白) 的试样注入到试验动物的脑内, 然后进行长时间的饲养, 确认所得到的脑标本在神经病理学上的变化。

[0009] 该方法虽然为能够信赖的方法, 但令人遗憾的是, 由于需要花费大量的时间和费用, 因而除了作为各种检测方法的校准试验使用之外, 尚未成为常用的检测方法。

[0010] 另一种方法为使用蛋白酶 K 的方法。也许是因为其高级结构的原因, 已知正常型朊病毒蛋白容易被蛋白酶 K 分解 (敏感性), 另一方面, 异常型朊病毒蛋白难以被蛋白酶 K 分解 (耐受性)。因此, 利用这种对于被蛋白酶 K 分解的敏感性 (耐受性) 的不同, 例如, 在蛋白酶 K 处理后, 若能通过使用了多克隆抗体的免疫印迹法等检测到与处理前位置相同的条带, 则判断蛋白质为异常型朊病毒蛋白, 若对应的条带消失 (没有检测到), 则判断为正常型朊病毒蛋白, 从而能够进行检测。

[0011] 使用了该蛋白酶 K 的检测方法目前正被广泛使用, 并提出了许多变形 (专利文献 1: 日本特开平 10-267928 号公报, 专利文献 2: 日本特开平 11-32795 号公报, 专利文献 3: 日本特开 2003-121448 号公报)。

[0012] 然而, 该方法必须进行酶处理, 因而必须准备适于酶反应的条件, 从这点来看非常繁杂, 而且进行酶反应需要花费时间, 其结果, 在原理上存在迅速性和简易性不充分、作为试剂需要比较昂贵的酶等缺点。

- [0013] 专利文献 1 :日本特开平 10-267928 号公报
[0014] 专利文献 2 :日本特开平 11-32795 号公报
[0015] 专利文献 3 :日本特开 2003-121448 号公报

发明内容

[0016] 发明要解决的问题

[0017] 因此,要求一种能够简便、迅速且以高灵敏度定量地从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶 K 进行酶处理的方法。

[0018] 即,本发明的目的在于提供一种能够简便、迅速且以高灵敏度定量地从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶 K 进行酶处理的方法;以及在该方法中使用的检测剂。

[0019] 另外,为了在这种检测方法中使用,要求一种不与正常型朊病毒蛋白结合、而与异常型朊病毒蛋白特异性结合的试剂(结合剂)。

[0020] 即,本发明的目的还在于提供一种不与正常型朊病毒蛋白结合、而与异常型朊病毒蛋白特异性结合的试剂(结合剂)。

[0021] 用于解决问题的方案

[0022] 本发明人等为了达到上述目的,对异常型朊病毒蛋白的特异性检测方法进行了深入研究,结果发现,属于来源于哺乳动物乳的蛋白质的乳铁蛋白,具有不与正常型朊病毒蛋白结合、而仅与异常型朊病毒蛋白特异性结合的性质,由此完成了本发明。

[0023] 即,乳铁蛋白即为长久以来一直要求的、不与正常型朊病毒蛋白结合而与异常型朊病毒蛋白特异性结合的试剂(结合剂),如果使用该乳铁蛋白,则能够从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶 K 进行酶处理。

[0024] 另外,通过利用乳铁蛋白的与异常型朊病毒蛋白特异性结合的性质,不仅能够进行异常型朊病毒蛋白的特异性检测,还能够进行异常型朊病毒蛋白的特异性分离(包括纯化和浓缩)、异常型朊病毒蛋白的特异性固定、异常型朊病毒蛋白的自缔合的特异性抑制,提供在利用蛋白酶 K 的酶处理的方法中不可能实现的新型的用途。即,本发明的异常型朊病毒蛋白结合剂具有这种有用的用途。

[0025] 因此,本发明包含以下 [1] ~ [2]。

[0026] [1] 一种异常型朊病毒蛋白结合剂,其包含乳铁蛋白。

[0027] [2] 一种异常型朊病毒蛋白结合剂,其具有由乳铁蛋白构成的异常型朊病毒蛋白结合部位。

[0028] 另外,若将乳铁蛋白固定在载体上而使用的话,特别适合进行:仅将异常型朊病毒蛋白从正常型朊病毒蛋白中分离(包括纯化和浓缩)而获得;与异常型朊病毒蛋白结合而将其固定;检测异常型朊病毒蛋白。

[0029] 因此,本发明还包括以下 [3] ~ [6]。

[0030] [3] 根据 [1] ~ [2] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其中,乳铁蛋白被固定在载体上。

[0031] [4] 根据 [1] ~ [2] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其中,乳铁蛋白作为异常型朊病毒蛋白结合部位被固定在载体上。

- [0032] [5] 根据 [3] ~ [4] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其中,载体为珠。
- [0033] [6] 根据 [5] 所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其中,珠为能够磁性化的珠。
- [0034] 这种异常型朊病毒蛋白结合剂能够在检测异常型朊病毒蛋白的用途中使用。
- [0035] 因此,本发明还包括以下 [7] ~ [9]。
- [0036] [7] 根据 [1] ~ [6] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其为异常型朊病毒蛋白检测剂。
- [0037] [8] 根据 [1] ~ [6] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其为具有由乳铁蛋白构成的异常型朊病毒蛋白结合部位的异常型朊病毒蛋白检测剂。
- [0038] [9] 根据 [1] ~ [6] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂,其为包含由乳铁蛋白构成的异常型朊病毒蛋白结合部位、和标记部位的异常型朊病毒蛋白检测剂。
- [0039] 此外,本发明还包括:使用异常型朊病毒蛋白结合剂、或异常型朊病毒蛋白检测剂来检测、结合、分离(包括纯化的方法和浓缩的方法)、固定异常型朊病毒蛋白的方法;或使用异常型朊病毒蛋白结合剂、或异常型朊病毒蛋白检测剂来抑制异常型朊病毒蛋白的自缔合的方法。
- [0040] 因此,本发明还包括以下 [10] ~ [18]。
- [0041] [10] 一种异常型朊病毒蛋白的检测方法,其包括如下工序:
- [0042] 使 [3] ~ [6] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序;
- [0043] 从与试样接触的该异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序;
- [0044] 检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。
- [0045] [11] 根据 [10] 所述的方法,其中,检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序是通过免疫学检测法检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。
- [0046] [12] 根据 [11] 所述的方法,其中,免疫学检测法为蛋白质印迹(western blot)法、ELISA(酶联免疫分析,Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)法、或免疫沉淀法。
- [0047] [13] 一种异常型朊病毒蛋白的分离方法,其包括如下工序:
- [0048] 使 [3] ~ [6] 中任一项所述的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序;
- [0049] 从与试样接触的该异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序。
- [0050] [14] 根据 [10] ~ [13] 中任一项所述的方法,其中,乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂为乳铁蛋白固定化珠。
- [0051] [15] 根据 [10] ~ [13] 中任一项所述的方法,其中,异常型朊病毒蛋白结合剂为使用能够磁性化的珠的乳铁蛋白固定化珠。
- [0052] [16] 根据 [10] ~ [15] 中任一项所述的方法,其中,试样为在动物组织中添加表面活性剂并使其均匀化而获得的液体试样。
- [0053] [17] 根据 [16] 所述的方法,其中,动物组织为哺乳动物的脑、脊髓、眼和/或小肠。
- [0054] [18] 根据 [10] ~ [17] 中任一项所述的方法,其中,分离所结合的成分的工序通过用含有乳铁蛋白的溶液使其溶出来进行。
- [0055] 此外,本发明还包括以下 [19] ~ [22]。
- [0056] [19] 一种异常型朊病毒蛋白的检测方法,其包括如下工序:
- [0057] 使乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白结合的工序;
- [0058] 检测与异常型朊病毒蛋白结合的乳铁蛋白的工序。

- [0059] [20] 一种异常型朊病毒蛋白的检测方法,其包括如下工序:
- [0060] 使具有标记部位的乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白结合的工序;
- [0061] 检测与异常型朊病毒蛋白结合的乳铁蛋白的标记部位的工序。
- [0062] [21] 一种通过使乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白结合来抑制异常型朊病毒蛋白的自缔合的方法。
- [0063] [22] 一种异常型朊病毒蛋白的自缔合抑制剂,其包含乳铁蛋白。
- [0064] 此外,本发明还包括乳铁蛋白、具有标记部位的乳铁蛋白、或被固定在载体上的乳铁蛋白的、用于与异常型朊病毒蛋白结合的用途 (use)。
- [0065] 此外,本发明还包括乳铁蛋白、具有标记部位的乳铁蛋白、或被固定在载体上的乳铁蛋白的、用于检测异常型朊病毒蛋白的用途 (use)。
- [0066] 此外,本发明还包括乳铁蛋白、具有标记部位的乳铁蛋白、或被固定在载体上的乳铁蛋白的、用于分离异常型朊病毒蛋白的用途 (use)。
- [0067] 此外,本发明还包括乳铁蛋白、具有标记部位的乳铁蛋白、或被固定在载体上的乳铁蛋白的、用于抑制异常型朊病毒蛋白的自缔合的用途 (use)。

[0068] 发明的效果

[0069] 如本发明首次公开的那样,乳铁蛋白不与正常型朊病毒蛋白结合而仅与异常型朊病毒蛋白特异性结合,因此根据基于该见解的本发明,能够简便、迅速且以高灵敏度定量地从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶 K 进行酶处理。

[0070] 即,根据本发明,不需要为了从正常型朊病毒蛋白中区分异常型朊病毒蛋白而利用蛋白酶 K 进行酶处理,因而不存在必须准备适于酶反应的条件繁杂性,而且不需要用于进行酶反应的时间。其结果,根据本发明,在原理上不会出现在利用蛋白酶 K 进行酶处理时所产生的迅速性和简易性不充分、作为试剂需要比较昂贵的酶等缺点。

[0071] 因此,根据本发明,对于使用了来源于动物的原材料的饮食品和医药品,能够比以往更简便、迅速且以高灵敏度定量地、以更低成本进行异常型朊病毒蛋白(感染性朊病毒蛋白)所致的污染的检查。另外,能够比以往更简便、迅速且以高灵敏度定量地、以更低成本进行人和动物的朊病毒病的诊断。由此,能够顺应对人和动物的朊病毒病的感染防止和早期诊断等社会要求。

[0072] 此外,根据本发明,能够从正常型朊病毒蛋白中分离回收并获得异常型朊病毒蛋白,由此,能够实现异常型朊病毒蛋白的分离、浓缩和纯化。因此,通过对其进行组合,能够更有效地进行上述异常型朊病毒蛋白(感染性朊病毒蛋白)所致的污染的检查、以及人和动物的朊病毒病的诊断。

附图说明

[0073] 图 1 为表示异常型朊病毒蛋白在乳铁蛋白固定化珠上特异性结合的免疫印迹的结果。

[0074] 图 2 为表示利用现有方法即蛋白酶 K 处理来识别异常型朊病毒蛋白的免疫印迹的结果。

具体实施方式

[0075] 接下来,详细说明本发明的优选的实施方式。然而,本发明不限于以下的优选的实施方式,可以在本发明的范围内自由变更。另外,本说明书中,如果没有特别说明则百分率表示的是质量百分率。

[0076] 在优选的实施方式中,本发明的异常型朊病毒蛋白的检测方法,可以作为包含以下工序的方法来实施:

[0077] 使乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序;

[0078] 从与试样接触的异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序;

[0079] 检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。

[0080] 根据该方法,利用固定在异常型朊病毒蛋白结合剂中的乳铁蛋白,能够特异性结合(吸附)试样中所含的异常型朊病毒蛋白,接下来,能够将与固定在异常型朊病毒结合剂中的乳铁蛋白结合的异常型朊病毒蛋白分离、回收,然后通过检测这样分离的异常型朊病毒蛋白,能够将异常型朊病毒蛋白与正常型朊病毒蛋白区分、检测。

[0081] 检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序优选是通过免疫学检测法检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序。

[0082] 作为优选的免疫学检测法,可列举出蛋白质印迹法、ELISA 法、或免疫沉淀法。

[0083] 在检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序中进行的检测,只要是包括上述免疫学检测法在内的、能够检测异常型朊病毒蛋白的方法即可,即便是无法区分异常型朊病毒蛋白和正常型朊病毒蛋白的方法,也当然可以使用。这是因为,在本发明中,通过在其之前的工序中进行与乳铁蛋白的结合,从而已经确保了对于异常型朊病毒蛋白的特异性。因此,在上述免疫学检测法中,即便是无法区分异常型朊病毒蛋白和正常型朊病毒蛋白的抗体,也当然可以使用。

[0084] 乳铁蛋白(lactoferrin;以下,有时简称为 LF。)是指主要包含在母乳中的分子量约 80kDa 的铁结合性糖蛋白,已知的是其是一种对大肠杆菌、念珠菌、梭菌、葡萄球菌等有害微生物具有抗菌作用且具有免疫激活作用、抗肿瘤作用等各种作用的乳蛋白质。由于乳铁蛋白为来源于乳的糖蛋白质,因而安全性高,能够长期连续使用,且其自身也基本上无臭无味,作为各种食品、医药品、饲料的添加物的通用性较高。然而,至今还不了解其与异常型朊病毒蛋白的特异性结合能力。

[0085] 在本发明中使用的乳铁蛋白,可以使用:市售的乳铁蛋白、或如下制得的乳铁蛋白:以哺乳动物(例如,人、牛、山羊、绵羊、马等。)的初乳、过渡乳、成熟乳、末期乳、或这些乳的处理物即脱脂乳、乳清等为原料,通过例如离子交换色谱法等常规方法,由前述原料分离而得到的乳铁蛋白。其中,优选使用以工业规模制造的市售的乳铁蛋白(例如,森永乳业公司制)。此外,也能够使用利用基因工程的方法通过微生物、动物细胞、转基因动物等生产的乳铁蛋白。来源于牛乳的乳清能作为乳制品制造的副产物而稳定且大量地获得,由于该优点,因而尤其优选作为在本发明中使用的乳铁蛋白的原料。

[0086] 其中,以下示出乳铁蛋白的调制(从乳等原料中分离、纯化乳铁蛋白)方法的一个例子。首先,将离子交换体(例如 CM-Sepharose FF(商品名,Amersham pharmacia 公司制))填充到柱中,通入盐酸,并水洗,以平衡离子交换体。接着,将冷却到 4℃ 的 pH6.9 的脱脂牛乳通入柱中,回收透过液,再次同样地将液体通入柱中。接着,向柱中通入蒸馏水,通入

食盐水,得到吸附到离子交换体上的碱性蛋白质的洗脱液。向该洗脱液中添加饱和度 80% 的硫酸铵,使蛋白质沉淀,离心分离而回收沉淀物。用饱和度 80% 的硫酸铵溶液洗涤所回收的沉淀物,添加去离子水进行溶解,使用超滤膜组件(例如 SLP0053(商品名,旭化成公司制))将所得到的溶液脱盐,冷冻干燥,得到粉末状牛乳铁蛋白。这样,得到纯度在 95 质量% 以上的牛乳铁蛋白。另外,本说明书中的乳铁蛋白的纯度为通过液相色谱法测定所得的值。

[0087] 乳铁蛋白与许多蛋白质同样地,当然其基因会根据种、属、个体等的差异而存在 1 个或多个位置上的 1 个或多个碱基的置换、缺失、插入、添加或倒位等突变,具有这种突变的基因所编码的蛋白质的氨基酸中有时也会产生突变。在能够用于本发明的乳铁蛋白中,在不损害与异常型朊病毒蛋白的特异性结合性的范围内,还包括包含这种突变的乳铁蛋白。

[0088] 能够用于调制将乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂的乳铁蛋白的固定方法,只要是不损害与异常型朊病毒蛋白的特异性结合性的方法即可,可以使用通常的固定方法。作为这种方法,例如,可列举出与多肽的伯氨基直接形成共价键的方法;与多肽的硫氢基(巯基)直接形成共价键的方法等。

[0089] 在将乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂中,固定有乳铁蛋白的载体只要是在所期望的条件下能够作为固体层操作的载体即可,只要是蛋白质被固定而使用的一般的载体则都能够使用。作为这种载体,例如,可列举出在表面具有亲水性或疏水性的树脂的载体,作为其形状,例如,可列举出颗粒状(珠状)、膜状、纤维状、中空纤维状、网状等。作为优选的载体,可列举出形状为珠状(颗粒状)的载体。珠(颗粒)的粒径(直径)可以根据目的来选择,例如,通常可以使用 0.5 ~ 200 μm 、优选为 1.0 ~ 100 μm 、进一步优选为 1.0 ~ 50 μm 、进一步优选为 1.0 ~ 20 μm 、进一步优选为 1.0 ~ 10 μm 、尤其优选为 1.0 ~ 5.0 μm 的范围的粒径(直径)。

[0090] 在优选的方式中,作为载体,可以使用表面具有疏水性或亲水性的树脂的珠(颗粒),此时,乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合活性载体为乳铁蛋白固定化珠。若使用这种载体的话,一方面能在液体中悬浮并使其分散,另一方面也容易根据操作上的需要而使其沉降并回收。

[0091] 在进一步优选的方式中,作为载体,可以使用:在表面具有疏水性或亲水性的树脂的珠(颗粒)、且其内部(中心部)包含能够磁性化的材料的载体,此时,乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合活性载体为使用能够磁性化的珠的乳铁蛋白固定化珠。若使用这种载体的话,一方面能在液体中悬浮并使其分散,另一方面也容易根据操作上的需要而利用磁体使其沉降并回收。本领域技术人员可以根据操作上的要求,在将乳铁蛋白固定化珠与试样接触的工序、分离所结合的成分的工序等工序中或者在该工序的前后进行这种操作。

[0092] 试样可以使用疑存在异常型朊病毒蛋白(感染性朊病毒蛋白)的所有液体试样,但在存在异常型朊病毒蛋白的情况下,优选被充分分散而成的试样。在检查对象为动物组织的情况下,优选其被充分增溶。作为这样增溶的试样,例如可列举出在动物组织中添加表面活性剂并均匀化而得到的液体试样。这种液体试样的 pH 优选为中性附近,通常可以优选使用 pH5.5 ~ 7.8、优选为 pH6.0 ~ 7.7、尤其优选为 pH6.5 ~ 7.6 的范围的 pH,但不限于此。作为用于调制这种液体试样而使用的表面活性剂,只要是通常用于使动物组织增溶

而使用的表面活性剂则都能够使用,但从增溶与保持朊病毒蛋白的高级结构的观点来看,优选使用非离子性表面活性剂,作为能够优选使用的表面活性剂,例如可列举出 tween20、tritonX-100、NP-40,优选为 tween20、tritonX-100、NP-40,尤其优选为 tween20、NP-40。为了确保乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白的特异性结合性,优选在后述那样的条件下,将试样调制成能够与异常型朊病毒蛋白结合活性载体接触的液体试样。

[0093] 为了确保乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白的特异性结合性,异常型朊病毒蛋白结合活性载体与试样的接触通常适合在 pH5.5 ~ 7.8、优选为 pH6.0 ~ 7.7、尤其优选为 pH6.5 ~ 7.6 的范围内,通常在 3 ~ 30°C、优选为 3°C ~ 20°C、尤其优选为 3 ~ 5°C 的范围的温度下,通常在 5 ~ 300 分钟、优选为 10 ~ 180 分钟、尤其优选为 15 ~ 90 分钟的范围的接触时间的条件下进行,但不限于这些条件。

[0094] 作为被增溶的动物组织,可以使用疑存在异常型朊病毒蛋白(感染性朊病毒蛋白)的所有动物组织,但为了早期诊断,优选已知异常型朊病毒蛋白的蓄积较多的、哺乳动物的脑、脊髓、眼和 / 或小肠。

[0095] 在从与试样接触的异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序中,可以用在通常用于蛋白质-蛋白质的相互作用的解离中的条件之中比较强的解离条件进行解离,并分离和溶出所结合的成分。作为这种条件,例如,可列举出在中性附近的 pH 下、通过含有表面活性剂的溶液在 3 ~ 30°C 的范围的温度下进行的条件。另外,为了使乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白的特异性结合解离,可以通过用含有乳铁蛋白的溶液使其溶出来进行。

[0096] 在优选的实施方式中,在使乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂与试样接触的工序之后、且在从与试样接触的异常型朊病毒蛋白结合剂分离所结合的成分的工序之前,可以设置洗涤与试样接触的异常型朊病毒蛋白结合剂的工序。当存在主要是进行非特异性吸附的成分时,该洗涤是为了将其从与试样接触的异常型朊病毒蛋白结合剂中除去而进行的,可以根据以这种目的所进行的常规方法进行,例如,可以使用用于调制与异常型朊病毒蛋白结合剂接触的试样而使用的、不含被增溶的动物组织等的溶液来进行洗涤,但不限于此。

[0097] 此外,本发明还包括异常型朊病毒蛋白的分离方法,关于本发明的异常型朊病毒蛋白的分离方法,在优选的实施方式中,可以作为包含以下工序的方法来实施:

[0098] 使乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂与动物组织被增溶的试样接触的工序;

[0099] 从实施了试样接触处理工序的异常型朊病毒蛋白结合活性载体分离所结合的成分的工序。

[0100] 根据该方法,能够利用被固定在异常型朊病毒结合剂中的乳铁蛋白来特异性结合(吸附)试样中所含的异常型朊病毒蛋白,接下来,能够将与固定在异常型朊病毒结合剂中的乳铁蛋白结合的异常型朊病毒蛋白分离、回收。由此,能够分离、浓缩、和纯化异常型朊病毒蛋白。

[0101] 上述本发明的异常型朊病毒蛋白的分离方法的实施方式能够如下实施:在作为本发明的异常型朊病毒蛋白的检测方法的优选实施方式而说明的工序中,除了检测所分离的成分中所含的异常型朊病毒蛋白的工序以外,以同样的工序来实施。因此,在异常型朊病毒蛋白的检测方法的优选实施方式中已经记载过的内容,在异常型朊病毒蛋白的分离方法的

实施方式中能够直接适用。

[0102] 本发明的包含乳铁蛋白的异常型朊病毒蛋白结合剂,除了能够作为将乳铁蛋白固定在载体上而成的异常型朊病毒蛋白结合剂而在上述那样的实施方式中使用以外,还能够在以下那样的实施方式中使用。

[0103] 即,作为本发明的异常型朊病毒蛋白结合剂的优选使用方式,可列举出包含以下工序的异常型朊病毒蛋白的检测方法:

[0104] 使乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白结合的工序;

[0105] 检测与异常型朊病毒蛋白结合的乳铁蛋白的工序。

[0106] 根据该异常型朊病毒蛋白的检测方法,能够使用乳铁蛋白作为异常型朊病毒蛋白结合剂而不需要进行特别的修饰。异常型朊病毒蛋白的检测能够通过所结合的乳铁蛋白的检测来进行。

[0107] 作为乳铁蛋白的检测法,可以使用通常使用的所有检测方法,例如,可以使用利用了针对乳铁蛋白的抗体的免疫学检测法。

[0108] 另外,作为本发明的异常型朊病毒蛋白结合剂的优选使用方式,可列举出包含以下工序的异常型朊病毒蛋白的检测方法:

[0109] 使具有标记部位的乳铁蛋白与异常型朊病毒蛋白结合的工序;

[0110] 检测与异常型朊病毒蛋白结合的乳铁蛋白的标记部位的工序。

[0111] 根据该异常型朊病毒蛋白的检测方法,使乳铁蛋白预先带有标记部位,并使用具有该标记部位的乳铁蛋白作为异常型朊病毒蛋白结合剂。异常型朊病毒蛋白的检测能够通过乳铁蛋白上带有的标记部位的检测来进行。

[0112] 作为标记部位,只要是通常对于生物高分子使用的标记部位则都能够使用。作为这种标记部位,例如,可列举出荧光标记、放射线标记、酶标记。作为荧光标记,例如,可列举出 AlexaFluor(注册商标)(Becton, Dickinson and Company 制)系列的染料、和 Cy5Dye(注册商标)(Becton, Dickinson and Company 制)系列的染料,例如,可列举出 Alexa Fluor(注册商标)488 和 AlexaFluor(注册商标)647、或者 Cy3、Cy5.5 和 Cy7 作为优选的例子。作为放射线标记,例如,可列举出使用了 ^{14}C 和 ^{35}S 的标记。作为酶标记,例如,可列举出使用了辣根过氧化物酶(HRP, HorseRadish Peroxydase)或碱性磷酸酶(ALP, Alkaline Phosphatase)的标记。

[0113] 本发明还包括使用异常型朊病毒蛋白结合剂来抑制异常型朊病毒蛋白的自缔合的方法、和异常型朊病毒蛋白的自缔合抑制剂。目前相信异常型朊病毒蛋白的多个分子会自缔合而形成多聚体、以及也许是因为这个原因而提高了朊病毒病的病原性,但本发明的异常型朊病毒蛋白结合剂能够与异常型朊病毒蛋白特异性结合,从而抑制该自缔合。另一方面,本发明的异常型朊病毒蛋白结合剂由于不与正常型朊病毒蛋白结合,因而不必担心其对正常型朊病毒蛋白所具有的未知的生物体功能造成不良影响。

[0114] 实施例

[0115] 以下举出实施例来详细说明本发明。但本发明不限于以下的实施例。

[0116] [实施例 1]

[0117] [利用乳铁蛋白固定化珠从感染脑检测异常型朊病毒蛋白]

[0118] 使用异常型朊病毒蛋白感染后的小鼠脑,如下所述利用乳铁蛋白固定化珠进行异

常型朊病毒蛋白的检测。

[0119] (乳铁蛋白固定化珠的制作)

[0120] 用 1mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对 1mL 的 Dynabeads M-280Tosylactivated 进行 2 次洗涤后,向其中加入将 1mg 乳铁蛋白溶解到 1mL 0.1M 硼酸缓冲液中而得到的溶液,在 37°C 下颠倒混合 24 小时。除去上清,用 1mL 的 PBS 洗涤 Dynabeads 2 次,向 Dynabeads 中加入含有 0.1% 乳铁蛋白的 0.2M Tris 盐酸缓冲液 (pH8.5) 1mL,在 37°C 下颠倒混合 4 小时。

[0121] 接下来,除去上清,用 1mL 的含有 0.1% 乳铁蛋白的 PBS 洗涤 Dynabeads 1 次,接着用含有 0.1% Tween 20 的 PBS 洗涤 1 次。

[0122] 接下来,除去上清,用 1mL 的含有 0.1% 乳铁蛋白的 PBS 洗涤 Dynabeads 1 次,除去上清,用 1mL 的含有 0.1% 乳铁蛋白的 PBS 保存如此获得的乳铁蛋白结合 Dynabeads (以下,也称为乳铁蛋白结合珠、或乳铁蛋白固定化珠)。

[0123] (将脑组织增溶的试样(脑乳剂)的调制)

[0124] 从感染异常型朊病毒蛋白的小鼠中取出脑。将异常型朊病毒蛋白感染的小鼠脑(以下,也称为感染脑)放入均质器 (BioMasher) 中,以 10,000×g 离心分离 2 分钟,向回收的颗粒 (pellet) 中加入 NP-40 RIPA 制成 10% (w/v) 脑乳剂。将其在 4°C 下孵育 15 分钟后,搅拌混合,以 10,000×g 离心分离 2 分钟,回收上清。向回收的上清中加入 NP-40 RIPA,调制 2% (w/v) 脑乳剂(将脑组织增溶的试样)。这样,获得了感染脑的脑乳剂(以下也称为感染脑乳剂)。

[0125] (利用乳铁蛋白固定化珠分离异常型朊病毒蛋白)

[0126] 向脑乳剂 500 μl 中加入乳铁蛋白结合 Dynabeads 20 μl,在 4°C 下颠倒混合 1 小时。之后,用 1mL 的 NP-40 RIPA 将珠洗涤 10 分钟,洗涤 3 次,进而用 1mL 的 NP-40 RIPA 通宵洗涤。

[0127] 回收洗涤后的乳铁蛋白结合 Dynabeads,加入 20 μl 中性缓冲液 (NuPAGE LDS 样品缓冲液 (4×), Invitrogen 公司制),在 95°C 下加热 10 分钟制成试验试样。

[0128] 另外,由于珠为磁性体的珠,因而珠的回收在操作中使用适当的磁体来进行。

[0129] (利用免疫印迹法的检测)

[0130] 对所调制的试验试样通过免疫印迹法进行朊病毒蛋白质的检测。

[0131] 即,对试验试样使用 NuPAGE 凝胶进行电泳 (40mA 恒定电流,70 分钟),接着,使用槽式转印 (Tank blotter) 装置向 PVDF 膜转印 (220mA 恒定电流,60 分钟) 凝胶中的蛋白质。

[0132] 转印后的 PVDF 膜使用 Block Ace (大日本制药) 在 4°C 下封闭 30 分钟,接着,将以包含 0.1% Tween20 的 Block Ace 稀释至 5,000 倍的含有 HRP 结合抗朊病毒蛋白单克隆抗体 (T2-HRP) 的溶液添加到 PVDF 膜上,在 4°C 下孵育 1 小时。

[0133] 与抗体反应的 PVDF 膜用含有 0.1% Tween20 的 PBS 洗涤 10 分钟,洗涤 3 次,用化学发光检测试剂展开膜,使用图像分析装置检测化学发光。

[0134] [比较例 1]

[0135] [利用乳铁蛋白固定化珠从非感染脑检测异常型朊病毒蛋白]

[0136] 使用正常的小鼠脑(以下,也称为正常脑或非感染脑),如下所述利用乳铁蛋白固定化珠进行异常型朊病毒蛋白的检测。

[0137] (乳铁蛋白固定化珠的制作)

[0138] 与实施例 1 同样进行。

[0139] (将脑组织增溶的试样(脑乳剂)的调制)

[0140] 代替感染异常型朊病毒蛋白的小鼠,使用从正常的小鼠(非感染小鼠)中取出的脑,除此之外与实施例 1 同样进行,获得了正常脑的脑乳剂(以下也称为正常脑乳剂、或非感染脑乳剂)。

[0141] (利用乳铁蛋白固定化珠分离异常型朊病毒蛋白)

[0142] 代替感染脑乳剂,使用非感染脑乳剂,除此之外与实施例 1 同样进行,得到试验试样。

[0143] (利用免疫印迹法的检测)

[0144] 代替来源于感染脑乳剂的试验试样,使用来源于非感染脑乳剂的试验试样,除此之外与实施例 1 同样进行。

[0145] (结果)

[0146] 图 1 为表示实施例 1 和比较例 1 中得到的免疫印迹的结果的图。所有泳道均未实施蛋白酶 K 处理(PK-)。

[0147] 泳道 1、2 和 3 为对感染脑乳剂利用乳铁蛋白固定化珠进行了异常型朊病毒蛋白的分离而得的试验试样(实施例 1)。将泳道 1 的试样稀释 10 倍而进行免疫印迹的泳道为泳道 2,泳道 1 的 100 倍稀释为泳道 3。泳道 4 为对非感染脑乳剂利用乳铁蛋白固定化珠进行了异常型朊病毒蛋白的分离而得的试验试样(比较例 1)。

[0148] 在泳道 1、2 和 3 中,呈浓度依赖性地观察到朊病毒蛋白的条带,在泳道 1 的 100 倍稀释即泳道 3 中也明确地观察到朊病毒蛋白的条带。根据试样的来源,这表示异常型朊病毒蛋白。即,通过与乳铁蛋白固定化珠的结合,来源于感染脑的异常型朊病毒蛋白被分离并被检测到。

[0149] 另一方面,在泳道 4 中,虽然在操作上为与泳道 1 同等程度的浓度的试样,但没有观察到朊病毒蛋白的条带。即,通过与乳铁蛋白固定化珠的结合,来源于非感染脑的正常型朊病毒蛋白没有被回收、且没有被检测到。

[0150] 由以上内容可知,来源于感染脑的异常型朊病毒蛋白与乳铁蛋白固定化珠特异性结合,来源于非感染脑的正常型朊病毒蛋白不与乳铁蛋白固定化珠结合。此外,使用乳铁蛋白固定化珠,能够从正常型朊病毒蛋白分离回收并获得异常型朊病毒蛋白,由此,可知能够检测异常型朊病毒蛋白。

[0151] [比较例 2]

[0152] [使用蛋白酶 K 来检测异常型朊病毒蛋白]

[0153] 根据使用蛋白酶 K 而进行的现有方法,如下所述进行从正常型朊病毒蛋白区分并检测异常型朊病毒蛋白的实验(比较例 2)。

[0154] (脑乳剂的调制)

[0155] 准备感染了异常型朊病毒蛋白的小鼠的脑(以下也称为感染脑)和非感染小鼠(正常小鼠)的脑(以下也称为非感染脑或正常脑),将这些小鼠脑分别放入均质器中,以 $10,000 \times g$ 离心分离 2 分钟,向回收的颗粒中加入 NP-40 RIPA 制成 10% (w/v) 脑乳剂。将其在 4°C 下孵育 15 分钟后,搅拌混合,以 $10,000 \times g$ 离心分离 2 分钟,回收上清。向回收的

上清中加入 NP-40 RIPA, 调制 0.5% (w/v) 脑乳剂, 获得感染脑乳剂和非感染脑乳剂。

[0156] (利用蛋白酶 K 的酶分解处理)

[0157] 向这些脑乳剂 500 μ l 中添加蛋白酶 K, 使最终浓度为 20 μ g/ml, 在 37°C 下孵育 30 分钟。反应后, 加入蛋白酶 K 抑制剂 (Pefablock) 5 μ l, 进而加入丁醇-甲醇溶液 250 μ l, 搅拌混合后, 以 20,000 \times g 离心分离 10 分钟。离心分离后, 向颗粒中加入 50 μ l 中性缓冲液 (NuPAGE LDS 样品缓冲液 (4 \times), Invitrogen 公司制), 在 95°C 下加热 10 分钟, 分别获得来源于感染脑乳剂的试样和来源于非感染脑乳剂的试样。

[0158] (利用免疫印迹法的检测)

[0159] 对于如上所述获得的、利用蛋白酶 K 进行了酶分解处理的感染脑乳剂 (蛋白酶 K 处理感染脑乳剂)、利用蛋白酶 K 进行了酶分解处理的非感染脑乳剂 (蛋白酶 K 处理非感染脑乳剂)、以及没有利用蛋白酶 K 进行酶分解处理的感染脑乳剂 (原本的感染脑乳剂)、没有利用蛋白酶 K 进行酶分解处理的非感染脑乳剂 (原本的非感染脑乳剂) 这 4 种试样, 通过免疫印迹法进行朊病毒蛋白质的检测。

[0160] 即, 对试样使用 NuPAGE 凝胶进行电泳 (40mA 恒定电流, 70 分钟), 接着, 使用槽式转印装置向 PVDF 膜转印 (220mA 恒定电流, 60 分钟) 凝胶中的蛋白质。

[0161] 转印后的 PVDF 膜使用 Block Ace (大日本制药) 在 4°C 下封闭 30 分钟, 接着, 将以包含 0.1% Tween20 的 Block Ace 稀释至 5,000 倍的含有 HRP 结合抗朊病毒蛋白单克隆抗体 (T2-HRP) 的溶液添加到 PVDF 膜上, 在 4°C 下孵育 1 小时。

[0162] 与抗体反应的 PVDF 膜用含有 0.1% Tween20 的 PBS 洗涤 10 分钟, 洗涤 3 次, 用化学发光检测试剂展开膜, 使用图像分析装置检测化学发光。

[0163] (结果)

[0164] 图 2 为表示比较例 2 中得到的免疫印迹的结果的图。泳道 1 和 2 为没有利用蛋白酶 K 进行酶分解处理的泳道 (PK-), 泳道 3 和 4 为利用蛋白酶 K 进行了酶分解处理的 (PK+) 泳道。

[0165] 泳道 1 为以没有利用蛋白酶 K 进行酶分解处理的感染脑乳剂 (原本的感染脑乳剂) 为试样的泳道。泳道 2 为以没有利用蛋白酶 K 进行酶分解处理的非感染脑乳剂 (原本的非感染脑乳剂) 为试样的泳道。泳道 3 为以利用蛋白酶 K 进行了酶分解处理的感染脑乳剂 (蛋白酶 K 处理感染脑乳剂) 为试样的泳道。泳道 4 为以利用蛋白酶 K 进行了酶分解处理的非感染脑乳剂 (蛋白酶 K 处理非感染脑乳剂) 为试样的泳道。

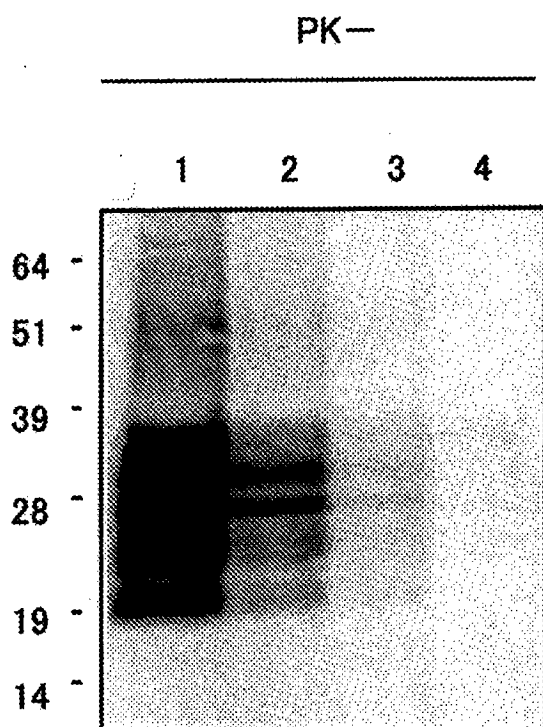
[0166] 在泳道 1 和 2 中显示, 通过免疫印迹法检测到了朊病毒蛋白质的条带, 在蛋白酶 K 未处理的状态下, 无论是异常型朊病毒蛋白 (泳道 1), 还是正常型朊病毒蛋白 (泳道 2), 均被检测到。与此相对, 在泳道 3 和 4 中, 通过免疫印迹法仅在异常型朊病毒蛋白 (泳道 3) 中检测到了条带, 在正常型朊病毒蛋白 (泳道 4) 中没有检测到条带, 由此显示, 通过蛋白酶 K 处理, 能够区分异常型朊病毒蛋白与正常型朊病毒蛋白, 仅检测异常型朊病毒蛋白。

[0167] 将以上所示的比较例 2 的结果 (图 2) 与实施例 1 和比较例 1 中得到的结果 (图 1) 进行比较, 获得了以下见解。即, 可知利用乳铁蛋白固定化珠的异常型朊病毒蛋白与正常型朊病毒蛋白的辨别, 具有与使用蛋白酶 K 的现有方法相比更高的准确性和可靠性。

[0168] 产业上的可利用性

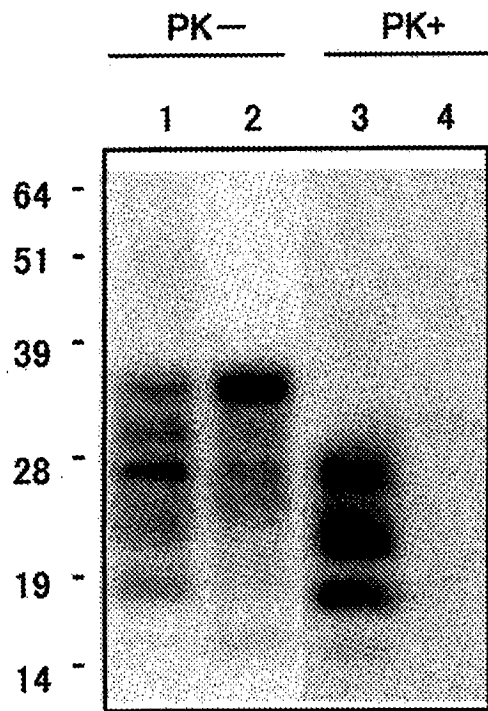
[0169] 根据本发明, 对于使用了来源于动物的原材料的饮食品 and 医药品, 能够比以往更

简便、迅速且以高灵敏度定量地、以更低成本进行异常型朊病毒蛋白（感染性朊病毒蛋白）所致的污染的检查。另外，能够比以往更简便、迅速且以高灵敏度定量地、以更低成本进行人和动物的朊病毒病的诊断。由此，能够顺应对人和动物的朊病毒病的感染防止和早期诊断等社会要求。这样，本发明具有产业上的可利用性。



1. 感染脑乳剂（异常型朊病毒蛋白）
2. 稀释感染脑乳剂（ $\times 10$ ）
3. 稀释感染脑乳剂（ $\times 100$ ）
4. 非感染脑乳剂（正常型朊病毒蛋白）

图 1



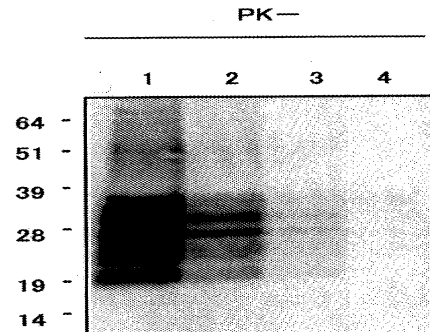
1. 蛋白酶K未处理感染脑乳剂（异常型朊病毒蛋白）
2. 蛋白酶K未处理非感染脑乳剂（正常型朊病毒蛋白）
3. 蛋白酶K处理感染脑乳剂（异常型朊病毒蛋白）
4. 蛋白酶K处理非感染脑乳剂（正常型朊病毒蛋白）

图 2

专利名称(译)	异常型朊病毒蛋白结合剂和异常型朊病毒蛋白的检测方法		
公开(公告)号	CN101868726A	公开(公告)日	2010-10-20
申请号	CN200880116624.2	申请日	2008-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	森永乳业株式会社		
申请(专利权)人(译)	森永乳业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	森永乳业株式会社		
[标]发明人	岩丸祥史 久原彻哉		
发明人	岩丸祥史 久原彻哉		
IPC分类号	G01N33/53 C07K1/22 C07K14/79 C07K17/02		
CPC分类号	G01N2800/2828 C07K14/79 G01N2333/79 G01N33/6896 C07K17/08		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2007300388 2007-11-20 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种能够简便、迅速且以高灵敏度定量地从正常型朊病毒蛋白中区分并检测出异常型朊病毒蛋白而不需要利用蛋白酶K进行酶处理的方法；以及在该方法中使用的试剂。本发明提供一种包含乳铁蛋白的异常型朊病毒蛋白结合剂；以及使用异常型朊病毒蛋白结合剂来检测异常型朊病毒蛋白的方法。



1. 感染脑乳剂（异常型朊病毒蛋白）
2. 稀释感染脑乳剂（×10）
3. 稀释感染脑乳剂（×100）
4. 非感染脑乳剂（正常型朊病毒蛋白）