

[illegible]

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法であって：
下記工程、

- (a) 該体液試料に、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、及び還元剤を含む試薬 2 を加えて混合し、ついで有機溶媒 90%以上含む試薬 3 に滴下して、混合する工程；
- (b) 工程(a) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；
- (c) 工程(b) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を除去する工程；
- (d) (c) で得られた沈降物に有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を加えて混和する工程；
- (e) 工程(d) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；及び
- (f) 工程(e) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を回収する工程、
を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

さらに、(g) 工程(f) で回収した上清を凍結乾燥する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記試薬 2 の還元剤が、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、トリスカルボキシルホスフィン(TCEP HCl)、トリブチルホスフィン(TBP)、2-メルカプトエタノール(2-ME)、2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

20

【請求項 4】

前記体液試料が、血清、又は血漿である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】

試薬 1 における濃度が尿素 1 ~ 8 M、かつチオ尿素 0.5 ~ 3 M であり、かつ試薬 2 における還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 20 mM となる濃度である、請求項 1、2 又は 3 記載の方法。

【請求項 6】

試薬 1 における濃度が尿素 3 ~ 8 M、かつチオ尿素 1 ~ 3 M である請求項 5 記載の方法。

30

【請求項 7】

試薬 2 における還元剤が、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、2-メルカプトエタノール(2-ME)又は2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 5 mM ~ 20 mM となる濃度であり、該還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP HCl)又はトリ-n-ブチルホスフィン(TBP)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 10 mM となる濃度である、請求項 5 又は 6 記載の方法。

【請求項 8】

40

試薬 3 の有機溶媒が、アセトン、エタノール、メタノール、2プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものである、請求項 1、2 又は 3 記載の方法。

【請求項 9】

試薬 3 の有機溶媒がアセトンである、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

試薬 3 の有機溶媒濃度が 95%以上である、請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

試薬 3 の有機溶媒濃度が 98%以上である、請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 12】

50

試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものであり、かつ前記酸は、塩酸、トリフルオロ酢酸(T F A)、ギ酸、酢酸、及びトリクロロ酢酸(T C A) からなる群から選ばれたものであり、かつ該有機溶媒の濃度が 5 0 ~ 9 9 % である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリルである、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

試薬 4 の酸が、塩酸であり、その濃度が 5 m M ~ 5 0 0 m M である、請求項 1 2 又は 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

試薬 4 における有機溶媒の濃度が 6 0 ~ 8 0 % である、請求項 1 2、1 3 又は 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

試薬 4 における有機溶媒の濃度が 6 5 ~ 7 5 % である、請求項 1 2、1 3 又は 1 4 記載の方法。

【請求項 1 7】

工程(b)において、工程(a)で得られた混合溶液を - 2 0 ~ 1 0 の低温下で、1 分以上攪拌する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】

工程(b)において、工程(a)で得られた混合溶液を 0 ~ 5 の低温下で、6 0 分以上攪拌する、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

工程(e)において、工程(d)で得られた混合溶液を - 5 ~ 2 0 の低温下で 1 分以上攪拌する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

工程(e)において、工程(d)で得られた混合溶液を 0 ~ 5 の低温下で 6 0 分以上攪拌する、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

請求項 2 記載の方法で得られた凍結乾燥物に、T F A、塩酸、ギ酸、酢酸、及び T C A からなる群から選ばれた成分を含有する試薬 5 を加えることを含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成方法。

【請求項 2 2】

試薬 5 が、T F A を 0 . 1 ~ 2 0 % 含む、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

試薬 5 が、ギ酸、酢酸、T C A、又はこれらの混合物を 0 . 1 ~ 2 0 % 含む、請求項 2 1 又は 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮用キットであって、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、還元剤を含む試薬 2、有機溶媒 9 0 % 以上含む試薬 3、及び有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を含む、前記キット。

【請求項 2 5】

試薬 1 における濃度が尿素 1 ~ 8 M、かつチオ尿素 0 . 5 ~ 3 M であり、試薬 2 における還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 m M ~ 2 0 m M となる濃度であり、試薬 3 の有機溶媒が、アセトン、エタノール、メタノール、2プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものであり、試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものでその濃度が 5 0 ~ 9 9 % であり、かつ前記酸は、塩酸、T F A、ギ酸、酢酸、及び T C A からなる群から選ばれたものである、請求項 2 4 記載のキット。

【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

試薬 1 における濃度が尿素 3 ~ 8 M、かつチオ尿素 1 ~ 3 M であり、試薬 2 における還元剤がジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、2-メルカプトエタノール

(2-ME)又は2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)である場合は、

試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 5 mM ~ 20 mMとなる濃度であり、該還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP HCl)又はトリ-n-ブチルホスフィン(TBP)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 10 mMとなる濃度であり、試薬 3 の有機溶媒がアセトンであって、その濃度が 98 % 以上であり、試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリルであり、かつその濃度が 60 ~ 80 % である、請求項 24 記載のキット。

10

【請求項 27】

尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、還元剤を含む試薬 2、有機溶媒 90 % 以上含む試薬 3、及び有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を含み、さらに請求項 2 記載の濃縮方法で得られた凍結乾燥物に加える、TFA、塩酸、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれた成分を含有する試薬 5 を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトを含む哺乳動物の体液試料、特に血清又は血漿中における低分子量タンパク質、及びペプチドの濃縮方法、及び該濃縮方法に用いるキットに関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

近年、ポストゲノム研究として、プロテオーム的手法を用いた研究が盛んに行われるようになってきた。これは、遺伝子産物であるタンパク質が遺伝子よりも疾患の病態に直接関連していると考えられるので、プロテオーム解析は、ゲノム解析では発見できなかった病因タンパク質や疾患関連因子を多く発見できると期待されているからである。例えば、該プロテオーム解析により、特定の疾患によって誘導あるいは消失するバイオマーカータンパク質の発見が容易になり、該バイオマーカーは、病態に関連して挙動するため、診断のマーカー、及び創薬ターゲットとなる可能性が高い。さらに、該バイオマーカーは、薬剤応答性

30

【0003】

最近になり、質量分析装置(mass spectrometer:MS)の性能が向上し、MALDI-飛行時間型質量分析計(Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS))、MS/MS質量分析計(タンデム質量分析計:Tandem mass spectrometer)、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS質量分析計)などが実用化されている。これに伴い、プロテオーム解析は、タンパク質等の高速構造分析とともに、ポリペプチドのハイスループット超微量分析、従来、検出出来なかった極微量タンパク質の同定が可能となり、疾患関連因子の探索に強力なツールとなってきている。

【0004】

40

しかし、体液試料、特に血清ならびに血漿のプロテオーム解析は臨床的に大きな利点があるにもかかわらず、生体組織を対象としたプロテオーム解析に比べて遅れている。この理由は、例えば、アルブミン、グロブリンなどの主要なタンパク質の存在量が血清ならびに血漿中の全タンパク質の約 99 % を越えており(非特許文献 1)、これらタンパク質の除去に伴い、低分子量タンパク質、及びペプチド成分が大きく損失するためである。

【0005】

これまで、血清ならびに血漿中の主要タンパク質を除去する前処理技術が開発されてきた。例えば、微量成分の検出に対し妨害となる過剰なタンパク質を除去した溶液を得る方法(特許文献 1 及び 2)、タンパク質の分画処理された溶液を複数の電極を用いて濃縮する方法(特許文献 3)、有機溶媒を使用して大きなタンパク質を沈殿させ、小分子タンパ

50

ク質を解離させる、血清の主要タンパク質の除去方法（非特許文献 2）がある。

【 0 0 0 6 】

しかし、主要タンパク質の除去に伴いそれらのタンパク質に相互作用している低分子量タンパク質、ペプチドも損失してしまうため、依然、タンパク質の影響を受けず、高効率で再現性良く、体液試料、特に血清ならびに血漿中の低分子量タンパク質及びペプチドを濃縮する方法の開発が求められていた。

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 5 - 1 2 6 3 7 6

【特許文献 2】特開 2 0 0 5 - 1 5 6 2 4 9

【特許文献 3】特開 2 0 0 7 - 1 3 9 7 5 9

10

【非特許文献 1】Tirumalai et.al., Mol. Cell. Proteomics 2.10, 1096-1103, 2003

【非特許文献 2】Merrell. et.al., Journal of Biomolecular Techniques 15: 238-248, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明は、存在量の多いタンパク質の影響を受けず、高効率で再現性が良く、体液試料、特に血清ならびに血漿中の低分子量タンパク質及びペプチドを濃縮する方法、及び該方法に使用するキットの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

20

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、疾患関連ペプチドの探索法の開発を行い、組織中のペプチド成分を高効率で再現性よく濃縮する方法を確立した。この方法は 2 段階の行程からなり、正常組織と疾病組織中に含まれる 300 ~ 500 種類の主要ペプチドを抽出し、2 次元 HPLC で分離して定量的に比較することを可能にした。これによって糖尿病モデルマウスの腎皮質中に存在する糖尿病特異的なペプチドを単離、同定することに成功した。しかし、ヒト疾患への応用を考えた場合、組織を対象とし、例え組織中の診断マーカが発見できたとしても、検査における患者の苦痛や負担が大きく、実際の応用は困難である。これに対して、体液試料、特に血清ならびに血漿中の診断マーカを発見すれば、採血するだけで、ほとんど苦痛を伴わず診断ができ、さらに、健康診断への応用が可能となり、その結果、疾患の早期発見につながる可能性が高い。

30

【 0 0 1 0 】

そこで前記組織ペプチド分析法の確立によって得たノウハウをもとに、血清を対象とした低分子量タンパク質ならびにペプチド濃縮法の開発を行った。該方法の開発において最も大きな問題点は、タンパク質の除去に伴い、低分子量タンパク質やペプチド成分も大きく損失する点である。これは低分子量タンパク質等が血清中の主要成分であるアルブミン、グロブリンなどのキャリアタンパク質と結合しているためと考えられる。そこで発明者らは様々な条件検討の結果、キャリアタンパク質の影響を受けずに高効率で再現性が良く、血清ならびに血漿中の低分子量タンパク質等を濃縮する方法の開発に成功した。

【 0 0 1 1 】

40

したがって、本発明は、下記工程 (a) ~ (f) を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法を提供する。

(a) 該体液試料に、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、及び還元剤を含む試薬 2 を加えて混合し、ついで有機溶媒 90 % 以上含む試薬 3 に滴下して、混合する工程；

(b) 工程 (a) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；

(c) 工程 (b) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を除去する工程；

(d) (c) で得られた沈降物に有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を加えて混和する工程；

(e) 工程 (d) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；及び

(f) 工程 (e) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を回収する工程である。

【 0 0 1 2 】

50

本発明は、さらに、(g) 工程(f)で回収した上清を凍結乾燥する工程を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの前記濃縮方法を提供する。

また、本発明は、前記濃縮方法で得られた凍結乾燥物に、TFA、塩酸、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれた成分を含有する試薬5を加えることを含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成方法を提供する。

さらに、本発明は、尿素及びチオ尿素を含む試薬1、還元剤を含む試薬2、有機溶媒90%以上含む試薬3、及び有機溶媒及び酸を含む試薬4を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮用キットを提供する。

【0013】

(定義)

本明細書中において、「低分子量タンパク質」とは、分子量30,000以下、好ましくは分子量20,000以下のタンパク質をいう。また、特に断らない限り「低分子量タンパク質等」とは、低分子量タンパク質、及びペプチドの双方を意味する。例を挙げると、極微量存在するペプチドホルモン、インターロイキン、サイトカイン等の生理活性タンパク質、特に機能が無い極微量のバイオマーカータンパク質、及びペプチドなどがある。これらは腎臓を通過して尿中に一部排泄されるため、血液のみならず尿を検体として測定することも可能な場合もある。

【0014】

本明細書中において、「血漿」とは、EDTA又はヘパリンなどを加えて遠心分離した血液凝固系が作用し難い、又は作用しない上清をいう。

本明細書中において「血清」とは、血液から凝固成分を取り除いた部分である。新鮮な血液を放置すると血液凝固がおこり、ついで血球ならびにフィブリンは塊状に収縮し、透明な琥珀色の血清を遊離する。その成分はほぼ血漿からフィブリノゲンを除いたものにあたる。

【0015】

本明細書中において、血清等の「主要タンパク質」及び「キャリアタンパク質」とは、血清中の比較的分子量の大きいタンパク質をいう。例を挙げると、アルブミン(分子量66kDa)、免疫グロブリン(150~190kDa)、トランスフェリン(80kDa)、ハプトグロビン(>85kDa)、リボタンパク質(数100kDa)などがある。

【0016】

本明細書中において、「SDS」とは、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate)を意味する。

本明細書中において、「PAGE」とは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(polyacrylamide gel electrophoresis)を意味する。

【発明の効果】

【0017】

本発明は、体液試料、特に血清及び血漿に含まれる、比較的分子量の大きいタンパク質を除去し、低分子量タンパク質、及びペプチドを効率的、かつ再現性良く濃縮することができる。さらに、本発明は、試薬1~4では除去されない中分子量から高分子量(分子量20,000~100,000以上)のタンパク質を、アルブミン等の高含量主要タンパク質から分離し、電気泳動、プロテオーム解析などにより検出可能、及び/又は定量可能な形態にすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明における体液試料とは、哺乳動物の血清、血漿、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、腹水、胸水、及び各種細胞から得られる溶液等であって、低分子量タンパク質及び/又はペプチドを含む溶液をいい、特に血清、及び血漿が好ましい。

本発明の工程(a)は、前記体液試料に、尿素及びチオ尿素を含む試薬1、及び還元剤を含む試薬2を加えて混合し、ついで有機溶媒90%以上含む試薬3に滴下して、混合する工程である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

該試薬 1 における濃度は、尿素が 1 ~ 8 モル/リットル (以下、M と略す。)、好ましくは 3 ~ 8 M、チオ尿素が 0.5 ~ 3 M、好ましくは 1 ~ 3 M である。また、該試薬 2 における還元剤の濃度は、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 20 mM となる濃度とするのが好ましい。したがって、試薬 2 における還元剤の濃度は、少なくとも該混合物中の濃度の 10 倍 ~ 100 倍に、例えば、該還元剤濃度を 10 mM ~ 200 mM、10 mM ~ 1 M、10 mM ~ 2 M、又は 10 mM ~ 10 M とするのが好ましい。

なお、該試薬 2 の還元剤は、通常、タンパク質等生体物質の還元を用いるものであれば特に制限なく使用することができる。例を挙げると、ジチオスレイトール(Dithiothreitol: DTT)、ジチオエリスリトール (Dithiothreitol: DTE)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (Tris(2-carboxyethyl)phosphine HCl: TCEP HCl)、トリ-n-ブチルホスフィン (Tri-n-butylphosphine: TBP)、2-メルカプトエタノール (2-Mercaptoethanol:

10

2-ME) 及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものがある。

該試薬 2 における還元剤がジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、2-メルカプトエタノール

(2-ME) 又は 2-メルカプトエタノールアミン (2-MEA) である場合は、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中で 5 mM ~ 20 mM となる濃度とするのが好ましい。したがって、該試薬 2 における該還元剤の濃度は 50 mM ~ 10 M、好ましくは 50 mM ~ 1 M、より好ましくは 50 mM ~ 100 mM である。該試薬 2 における還元剤がトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP HCl) 又はトリ-n-ブチルホスフィン (TBP) である場合には、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中で 1 mM ~ 10 mM となる濃度とするのが好ましい。したがって、該試薬 2 における該還元剤の濃度は 10 mM ~ 10 M、好ましくは 10 mM ~ 1 M、より好ましくは 10 mM ~ 200 mM である。

20

【 0 0 2 0 】

試薬 3 は、アセトン、エタノール、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒、好ましくはアセトンを含む溶液である。該有機溶媒の濃度は、通常 90 % 以上、好ましくは 95 % 以上、さらに好ましくは 98 % 以上である。

【 0 0 2 1 】

30

滴下する試薬 3 の容量は、体液試料と試薬 1 及び 2 の混合溶液の少なくとも 10 倍以上、好ましくは 20 倍以上、特に好ましくは 30 倍以上である。

該工程(a)では、試薬 1 及び 2 を加えて液体試料中のタンパク質及びペプチドを処理した後、従来のアセトン法におけるアセトンの濃度 50 ~ 70 % より、かなり高い 90 % 以上の有機溶媒を含む試薬 3 に滴下する。これにより、体液試料中の主要タンパク質は変性し、従来の構造が壊れる。一方、有機溶媒 90 % 以上の試薬 3 であっても、低分子量タンパク質及びペプチドは変性がないか、又は変性の度合いが小さい。これにより、低分子量タンパク質等と主要な高分子タンパク質が解離しやすい状態で沈殿するものと考えられる。

【 0 0 2 2 】

40

本発明の工程(b)は、工程 (a) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程である。

該工程(b)における低温とは、試料中のタンパク質等の成分が安定であれば特に制限はないが、例えば -20 ~ -10、好ましくは 0 ~ 5 である。また該攪拌は、1 分以上、好ましくは 60 分 ~ 120 分間、さらに好ましくは 60 分 ~ 90 分間行う。また、攪拌は各種ボルテックスミキサー及びスター等の攪拌機を用いて行うことができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の工程(c)とは、工程(b)で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を除去する工程である。

該工程(c)における低温とは、試料中のタンパク質等の成分が安定であれば特に制限はないが、例えば 0 ~ 10、好ましくは 0 ~ 5 である。該遠心分離は、体液試料中

50

のタンパク質、及びペプチドを沈降させ得る条件、例えば、 $3000 \times g \sim 30000 \times g$ 、好ましくは $10000 \times g \sim 25000 \times g$ で、1分間以上、好ましくは5分間～30分間行う。

【0024】

本発明の工程(d)は、工程(c)で得られた沈降物に有機溶媒及び酸を含む試薬4を加えて混和する工程である。

該試薬4の有機溶媒は、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれたもの、好ましくはアセトニトリルである。該有機溶媒の濃度は、50～99%、好ましくは60～80%である。また、該酸は、塩酸、TFA、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれたものであり、好ましくは塩酸である。また、該酸の濃度は、前記主要タンパク質を酸変性させ溶解し難くさせる濃度である。例えば、塩酸を用いる場合、その濃度は、通常1mM以上、好ましくは1mM～300mM、好ましくは5mM～500mM、さらに好ましくは5mM～25mMである。また、ここで前記体液試料1容量部に対し、試薬4を0.1～500容量部、好ましくは1～200容量部、さらに好ましくは10～100容量部加えることができる。

【0025】

本発明の工程(e)は、工程(d)で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程である。

該工程(e)における低温とは、試料中のタンパク質等の成分が安定であれば特に制限はないが、例えば-20～-10℃、好ましくは0～-5℃である。また該攪拌は、1分以上、好ましくは60分～120分間、さらに好ましくは60分～90分間行う。また、攪拌は各種ボルテックスミキサー及びスタラー等の攪拌機を用いて行うことができる。

【0026】

工程(d)で試薬4を加え、工程(e)で攪拌することにより、低分子量タンパク質及びペプチドは溶解するが、体液試料、特に血清および血漿などの高含量タンパク質は溶解しない。これは、先に述べたように、工程(a)で有機溶媒90%以上の試薬3により、主要タンパク質は変性し、従来の構造が壊れ、一方、低分子量タンパク質及びペプチドは変性がないか、又は変性の度合いが小さいため、双方が解離しやすい状態になるものと考えられる。ここで試薬4を加え処理することで、主要タンパク質は溶解せず、低分子量タンパク質等は溶解して、双方を分離することが可能になる。なお、工程(a)及び(d)の試薬1～4で不溶化しない中高分子～高分子タンパク質も、高含量の主要タンパク質から解離されるので、解析することが可能になる。

【0027】

本発明の工程(f)とは、工程(e)で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を回収する工程である。

該工程(f)における低温とは、試料中のタンパク質等の成分が安定であれば特に制限はないが、例えば0～-10℃、好ましくは0～-5℃である。該遠心分離は、体液試料中のタンパク質、及びペプチドを沈降させ得る条件、例えば、 $3000 \times g$ 以上、好ましくは $10000 \times g \sim 25000 \times g$ で、1分間以上、好ましくは5分間～30分間行うことができる。

【0028】

該工程(f)で得られた上清が、本発明の方法で得られた体液試料の低分子量タンパク質等の濃縮物であり、このままプロテオーム解析等に用いることができる。

本発明の工程(g)は、付加的な工程であって、工程(f)で回収した上清を凍結乾燥する工程である。該凍結乾燥を行うことにより、体液試料の低分子量タンパク質等を安定的に保存できるとともに、分析方法に応じて所望の溶媒に、所望の濃度で溶かして解析を行うことができる。なお、該凍結乾燥は、本発明で濃縮する低分子量タンパク質等を壊さないものであれば、特に制限なく使用することができる。

【0029】

本発明は、さらに前記方法で得られた凍結乾燥物に、TFA、塩酸、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれた成分を含有する試薬5を加えることを含む、体液試料中に

含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成方法を提供する。好ましくは、試薬 5 は、TFA を 0.1 ~ 20 % 含む。好ましくは、試薬 5 は、ギ酸、酢酸、TCA、又はこれらの混合物を 0.1 ~ 20 % 含む。試薬 5 は、水、エタノール、メタノール、アセトニトリル、プロパノール、アセトン、又はこれらの混合物を含む種々の溶媒とすることができる。該作成方法では、前記体液試料 1 容量部に対し、試薬 5 を 0.01 ~ 100 容量部、好ましくは 0.1 ~ 100 容量部、さらに好ましくは 5 ~ 100 容量部加えることができる。

【0030】

さらに、本発明は、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮用キットを提供する。該キットは、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、還元剤を含む試薬 2、
10 有機溶媒 90 % 以上含む試薬 3、及び有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を含む。該キットで用いる試薬は、これまで説明した本発明の方法で用いる試薬 1 ~ 4 と同じである。

【0031】

すなわち、本発明のキットは、濃度が尿素 1 ~ 8 M、かつチオ尿素 0.5 ~ 3 M の試薬 1、還元剤を先に記載した濃度で含む試薬 2 であり、アセトン、エタノール、メタノール、2プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒を 90 % 以上、好ましくは 95 % 以上含む試薬 3、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒 50 ~ 99 %、及塩酸、TFA、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれた酸を含む試薬 4 を含むものである。
20

【0032】

さらに、本発明のキットは、濃度が尿素 3 ~ 8 M、かつチオ尿素 1 ~ 3 M の試薬 1、還元剤の濃度が 10 ~ 300 mM の試薬 2、有機溶媒がアセトンであって、その濃度が 98 % 以上である試薬 3、有機溶媒がアセトニトリルであり、かつその濃度が 60 ~ 80 % である試薬 4 を含むものである。hosi

【0033】

さらに、本発明は、前記試薬 1 ~ 4、及び試薬 5、すなわち濃縮された低分子量タンパク質等の凍結乾燥物に加える、TFA、塩酸、ギ酸、酢酸、及びTCAからなる群から選ばれた成分を含有する試薬 5 を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料作成用キットを提供するものである。
30

【0034】

次に、実施例に基づき本発明を詳細、かつ具体的に説明する。なお、下記実施例は本発明の説明を意図するものであって、いかなる意味においても本発明の保護範囲を制限するものではない。本発明の保護範囲は、本件出願の特許請求の範囲の記載により限定されるものである。

【実施例】

【0035】

(実施例 1) 低分子量タンパク質等の濃縮

本実施例では、ヒト血清を用いて本発明の低分子量タンパク質等の濃縮を行った。図 1 に、本実施例の実施手順のフローチャートを示す。なお、ここに記載された「低分子量タンパク質等」とは、分子量 2 万以下のタンパク質、ペプチド、及び本発明の方法では除去されない中分子量 ~ 高分子量タンパク質を意味し、血清中におけるアルブミン等の主要高分子タンパク質のほとんど含まない。
40

【0036】

本実施例では、体液試料として血清 20 μ l を用い、試薬 1 (7M 尿素, 2M チオ尿素) 36 μ l と 試薬 (200mM DTT) 4 μ l / を加え、Vortex で混和した。その際、該血清、試薬 1、及び試薬 2 は全て 4 $^{\circ}$ C に冷やして使用した。ついで該混合溶液に、4 $^{\circ}$ C に冷却した高純度アセトンからなる 1.8 ml の試薬 3 に滴下し、該滴下後すぐに vortex を用いて混和し、ついで 4 $^{\circ}$ C の環境で 1 時間攪拌した。該攪拌後、該混合溶液を冷却遠心機により 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し (19,000 $\times$ g)、得られた上清を完全に除去した。ついで、残留沈殿物に 4 $^{\circ}$ C の試薬 4
50

(アセトニトリル70%, 塩酸12 mM、残部水) 400 μ lを加え、4 で1時間撹拌したのち、該混合溶液を冷却遠心機を用いて4 で15分間遠心分離し(19,000 $\times$ g)、得られた上清を低分子量タンパク質等の濃縮溶液として回収した。

【0037】

次いで、該濃縮を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物に試薬5 (99.9% H₂O, 0.1% TFA) 80 μ lを加えて溶解した。

同様の方法で、血清 5 μ l と SPM 4 μ g の混合物、血清 10 μ l、及び血清 5 μ lを処理して解析用サンプルを得た。なお、処理する血清量を変えたので、血清量20 μ lの場合と溶媒1～溶媒5の量が同じ比になるように変化させた。例えば、血清量が10 μ lの場合の試薬1～試薬5の量は、試薬1を18 μ l, 試薬2を2 μ l, 試薬3を0.9ml, 試薬4を200 μ l, かつ試薬5を80 μ lとした。

10

【0038】

(実施例2) Tricine-SDS-PAGEによる本発明の評価

実施例1で得られた濃縮溶液の試料として評価を、低分子用電気泳動(Tricine-SDS-PAGE)で分離し、クーマシー染色することで行った。

使用したサンプルは、実施例1の方法で得られた血清濃縮溶液、未処理の血清、標準ペプチド混合物(SPM)、未処理血清とSPMの混合液である。ここで用いたSPMは、馬心臓グロブリンの臭化シアンによる分解物であって、分子量16,949、14,404、10,700、8,159、6,214、及び2,512の6種類のペプチド断片を含む混合物である。電気泳動における分子量マーカとして用いられる、GEヘルスケアバイオサイエンス社製の試薬である。

20

【0039】

前記Tricine-SDS-PAGEで用いたゲルの組成は下記表1に記載したとおりである。

【表 1】

Tricine-SDS-PAGE ゲルの組成

分離ゲル(下層)	
1.5M Tris - HCl pH8.45	3.3 ml
48% アクリルアミド (3% ビスアクリルアミド)	3.3 ml
グリセロール	1.0 ml
蒸留水	2.4 ml
TEMED	3.4 μ l
10%APS	50 μ l

分離ゲル(中層)	
1.5M Tris - HCl pH8.45	0.835 ml
48% アクリルアミド (3% ビスアクリルアミド)	0.5 ml
蒸留水	1.165 ml
TEMED	1.0 μ l
10%APS	12.5 μ l

濃縮ゲル(上層)	
1.5M Tris - HCl pH8.45	1.24 ml
48% アクリルアミド (3% ビスアクリルアミド)	0.4 ml
蒸留水	3.36 ml
TEMED	3.4 μ l
10%APS	50 μ l

【 0 0 4 0 】

また、該Tricine-SDS-PAGEは次の条件でおこなった(参考文献 7)。

次いで、サンプルを展開したゲルを取りだし、クーマシー染色を行った。クーマシー染色の試薬ならびに方法は以下の通りである。

試薬 1 (染色液：

30%メタノール、10%酢酸、0.1% [w/v] Coomassie R-350, 残部水)

試薬 2 (脱色液：30%メタノール、10%酢酸、
残部水)

【 0 0 4 1 】

染色手順は、電気泳動後にゲル板からゲルを外し、表面が平滑で清浄な容器に移した。次いで、ゲルが浸る程度に試薬 1 を加え、20分間振とうし、振とう後の試薬 1 を除去した。その後、試薬 2 をゲルが浸る程度加え、適度にバックグラウンドが薄くなるまで振とうした。

【 0 0 4 2 】

得られた結果を図2に示す。レーン(a)はSPM 4 μ g、レーン(b)は未処理血清 0.5 μ l、レ

ーン(c)は血清 5 μ lとSPM 4 μ g の混合物を実施例 1 の方法で処理したもの、レーン(d)は血清5 μ lを実施例 1 の方法で処理したもの、レーン(e)は血清10 μ lを実施例 1 の方法で処理した結果である。電気泳動パターンの上の表に血清量、SPM量、実施例 1 の処理をしたか否かを示している。

【 0 0 4 3 】

レーン(d) はレーン(b) の10倍量の血清5 μ lを分析しているが、本発明の方法で処理しているため、タンパク質成分がほとんど除去されていることがわかる。また、レーン(d)はレーン(b) と比較して低分子量タンパク質等の成分が濃く検出され、レーン(d)の2倍量の血清を本発明の方法で処理したレーン(e)の結果では低分子量タンパク質等の成分がレーン(d)の約2倍の濃さで検出された。レーン(c)はレーン(a) と等量のSPM 4 μ gと血清5 μ lの混合物を実施例 1 により濃縮した結果である。レーン(c)とレーン(a)のSPMのバンドを比較して、すべてのバンドがほぼ同じ濃さで検出された。このことより、低分子量タンパク質等の濃縮効率がほぼ100%に近いことが確認できた。かかる結果から、本発明の方法はSPMを効率よく回収でき、高効率に血清中の低分子量タンパク質等を濃縮することができた。また、濃縮する血清量を2倍することで、低分子量タンパク質等の成分も約2倍に濃縮できたことから、試料中のペプチドの量的な情報を維持したまま濃縮できていると考えられる。従って、本発明の方法はキャリアタンパク質の影響を受けず、量的な情報を維持したまま高効率で低分子量タンパク質等を濃縮できる方法であることが判る。

【 0 0 4 4 】

(実施例 3) 逆相HPLCによる本発明の評価

実施例 1 の方法により濃縮した低分子量タンパク質等のサンプルを逆相 HPLCで分析した結果を図 3 に示す。(A)は溶出時間 20~70 分の分析結果、(B) は (A) の溶出時間 30~40 分のクロマト強度を5 倍に拡大した結果である。また、黒色のクロマトは未処理血清0.5 μ l、灰色のクロマトは血清5 μ lを実施例 1 の方法で処理したサンプルを分析したものである。該逆相HPLCでは、溶出時間が早い方(40分以前)に低分子量タンパク質等が濃縮され、溶出時間の遅い方(40分以降)に分子量の高いタンパク質等が濃縮される傾向がある。

【 0 0 4 5 】

灰色のクロマトは黒色のクロマトの10倍量の血清5 μ lを実施例 1 の方法により低分子量タンパク質等を濃縮した結果である。(A)の灰色と黒色のクロマトを比較して、灰色のクロマトは溶出時間40分以降のピークがほとんどなくなっている。この結果から、アルブミン等の主要高分子タンパク質等がほとんど除去されたことがわかる。また、(B) では黒色のクロマトではほとんどピークが検出できていないが、灰色のクロマトでは沢山のピークが検出できている。この結果から血清中の低分子量タンパク質等が濃縮されていることがわかる。

【 0 0 4 6 】

(実施例 4) 本発明の方法の再現性の確認

本発明の方法による低分子量タンパク質等の濃縮再現性を確認するために、同一血清各10 μ lを実施例 1 の手順で独立して6回濃縮し、それぞれTricine-SDS- PAGEで分析した。その結果を図 4 に示す。図 4 からわかるように、すべてのレーンで共通のバンドが確認でき、個々のバンドがほぼ同じ濃さならびに太さで検出された。この結果から、本発明の方法は高い再現性で低分子量タンパク質等を濃縮できることが確認できた。

【 0 0 4 7 】

(実施例 5) 本発明の方法で濃縮された低分子量タンパク質等の同定

実施例 1 の方法で濃縮した低分子量タンパク質等をTricine-SDS-PAGEを用いて展開し、明確にバンドとして確認できる主要なペプチド、及び除去されなかったタンパク質の同定を行った。以下にその方法と結果を示す。

【 0 0 4 8 】

(低分子量タンパク質等の分離)

まず、サンプルとした血清10 μ lを実施例 1 の方法で処理して得た濃縮溶液をTricine-S

DS-PAGEで分離し、クーマシー染色後、同定するバンドを切り出して複数のゲル片を得た。該ゲル片をアセトニトリル50%含有50mM重炭酸アンモニウム溶液で完全に脱色した。該ゲル片を蒸留水で洗浄後、100%アセトニトリル中にて15分脱水し、遠心エバポレーターで60分乾燥した。乾燥したゲル片に、25 mM Tris-HCl (pH 9.0)に溶かした0.5 ng/ μ lのトリプシン(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) 10~30 μ lを加えて氷中で45分吸収させた。その後、余分なトリプシン溶液を除去し、50 mM Tris-HCl pH 9.0 をゲルが浸る程度まで加えて、37 °Cで18時間ゲル内消化を行った。酵素消化終了後、ゲル片のまわりの溶液を完全に回収し、氷中で一時保存した。さらに、まだゲル内に残っているペプチド断片を回収するために、50% アセトニトリル含有5%ギ酸溶液を該ゲルが浸る程度加え、室温で20分攪拌した。攪拌後、その上清を先に得て保存しておいた溶液に加えた。該溶液をLC-MS*装置で測定し、タンパク質同定用ソフトウェア (SEQUENT SEARCH: サーマフィッシャー株式会社)を用いてデータベース検索を行った。

10

*LC-MS: Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

Liquid Chromatography : Nanospace SI-2 (株式会社資生堂)

Mass Spectrometry : LCQ-DECA (サーモフィッシャー株式会社製)

【 0 0 4 9 】

(解析の結果)

図 5 に、分離した低分子量タンパク質等のバンドを示し、表 2 に同定した結果を示す。図 5 の左側には各バンドの低分子量タンパク質等の分子量、右側に同定したバンド番号を示す。表 2 のバンド番号は図 5 のバンド番号と対応し、その分子量は同定されたタンパク質、及びペプチドのデータベース上の分子量を示し、タンパク質等の名称は同定されたタンパク質、及びペプチド名を示している。図 5 のTricine-SDS-PAGEの結果から判るように、分子量20,000以上のタンパク質と、分子量 20,000 以下の低分子量タンパク質等が同定されている。

20

【 0 0 5 0 】

【表 2】

血清中のペプチド等の 同定結果

バンド 番号	分子量	タンパク質等の名称等
1	77050	トランスフェリン / トランスフェリン前駆体 / セロトランスフェリン 前駆体(トランスフェリン)(シ デロフィリン)(ベータ-1-金属結合グロブリン)(PRO1400)
2	66472	A鎖, ワルファリンのS- (-) 鏡像異性体及びミリスチン酸と複合したヒト血清アルブミン
	69226	血清アルブミン前駆体
	69084	血清アルブミン
3	46723	セリン(又はシステイン)プロテイナーゼ阻害剤, クレードA(アルファ-1 抗プロテイナーゼ, 抗ト リプシン), メンバー 1
	46721	PRO0684
4	66036	ミリスチン酸とトリヨード安息香酸と複合したヒト血清アルブミン
	65221	A鎖, ヒト血清アルブミンと複合したGAモジュールの結晶構造
	71705	ALBタンパク質
5	45371	アポリポタンパク質 A-IV 前駆体
	45399	アポリポタンパク質 A-IV
6	36154	プレアポリポタンパク質 E / アポリポタンパク質 E 前駆体 / アポリポタンパク質 E
7	30778	アポリポタンパク質 A-I / アポリポタンパク質 A-I, 前駆体 / プレプロアポリポタンパク質 A-I / プロアポリポタンパク質
	23404	D鎖, ヒト アポリポタンパク質 A-Iの結晶構造
8	45205	ハプトグロビン / ハプトグロビン アルファ(2FS)-ベータ 前駆体 / ハプトグロビン前駆体
	41525	Hp2-アルファ
	20820	PREDICTED: ハプトグロビン前駆体に類似, 対立遺伝子
9	15873	TTR
	13761	D鎖, ジエチルステルベストロールと複合したトランスサイレチンの単斜晶構造
	15771	D鎖, デオキシ
	15887	トランスサイレチン (プレアルブミン, アミロイドーシス タイプI)
10	45205	ハプトグロビン / ハプトグロビン アルファ(2FS)-ベータ 前駆体 / ハプトグロビン前駆体
	41525	Hp2-アルファ
	23305	A鎖, トリプシン阻害剤複合体
	15877	D鎖, Tヒトヘモグロビン四次構造と一酸化窒素との相互作用の結晶解析, 好気条件下に曝さ れていないヘモグロビン
	14807	血清アミロイドA4 / 血清アミロイドA-4タンパク質前駆体
11	10852	アポリポタンパク質C-III / アポリポタンパク質C-III前駆体 / プレアポリポタンパク質C-III / アポリポタンパク質
	47009	発生的に制御されたタンパク質TPO1
	11585	血清 アミロイドAタンパク質ベータ デス-Arg(pI5.6)
12	41525	Hp2-アルファ
	45205	ハプトグロビン / ハプトグロビン アルファ(2FS)-ベータ前駆体 / ハプトグロビン前駆体
	13894	プロ-血小板塩基性タンパク質前駆体 / 血小板塩基性タンパク質 / 白血球由来成長因子 / 結合組織活性化ペプチド III / PPBP
	10852	アポリポタンパク質C-III / アポリポタンパク質C-III前駆体 / プレアポリポタンパク質C-III / アポリポタンパク質
13	8927	A鎖, ミセルと複合したヒトアポリポタンパク質C-IIの球状構造及び動態
	11284	アポリポタンパク質C-II / アポリポタンパク質C-II前駆体
	8915	A鎖, ドデシルホスホコリン中のヒトアポリポタンパク質C-IIの構造 / A鎖, SDS存在下でのヒ トアポリポタンパク質 C-IIのNMR構造
14	11184	アポリポタンパク質
	27993	アポリポタンパク質 D
	11288	アポリポタンパク質 A-II
15	6631	アポリポタンパク質 C-1
	11184	アポリポタンパク質
	27993	アポリポタンパク質 D

【 0 0 5 1 】

なお、図 5 で一つのバンドとして示されているが、表 2 に記載されているように、切り出した各ゲル片中には、実際に同定された複数のタンパク質、及びペプチドが存在した。この結果、得られた濃縮物中には、数多くの低分子量タンパク質等が含まれていると考え

られる。また、図5のバンド番号11は、右側の分子量から見積もと分子量約11,000である。しかし、同定された複数のタンパク質中に見積もりの分子量より明らかに大きい分子量47,000のタンパク質が含まれていた。これは、タンパク質の切れた断片が同定されたこと示している。この結果、低分子量タンパク質等の領域のほとんどのバンドにタンパク質の切れた断片が含まれていることがわかった。該タンパク質の断片には細胞の壊死、アポトーシスによって血流に放たれるものが含まれる（参考文献2）。そのため、生体内の様々な情報を反映していると考えられる。

【0052】

図5の番号2のバンドは、該バンドの濃さから約2 μ gであり、含まれるタンパク質はアルブミンと同定された。該アルブミンは健常者の血清10 μ l中に約600 μ g存在する（参考文献2）。この結果、タンパク質の代表であるアルブミンの約99.7%が除去されたことがわかった。また、表2の低分子量タンパク質等の領域の番号13のバンドのアポリポタンパク質C-IIは健常者血清10 μ l中に約0.3 μ gしか存在しない（参考文献3）。従って、アポリポタンパク質C-IIは血清の主要成分ではない(図1参照)。該血清中のアルブミンとアポリポタンパク質C-IIの濃度を比較すると、アルブミンはアポリポタンパク質C-IIの約2,000倍濃度で存在する。本発明の方法を用いて濃縮を行った結果、濃度差が約2,000倍のアルブミンとアポリポタンパク質C-IIが電気泳動で同時に検出できた。このことは、アルブミンがほとんど除去され、アポリポタンパク質C-IIが効率よく濃縮されたことを示している。

【0053】

（比較例1） 従来法との比較・アセトン沈殿法

本発明の方法と比較して、従来の一般的なペプチド抽出法（濃縮法）である（1）アセトン沈殿法と（2）限外ろ過法のタンパク質の除去効率とペプチドの抽出効率の評価を行った。

【0054】

（アセトン沈殿法）

アセトン沈殿法では、アセトンの溶媒和によってタンパク質分子表面の水和水を奪うため、結果としてタンパク質の溶解度が減少し、タンパク質同士が結合し沈殿する。タンパク質は溶媒との水和により安定な立体構造を形成しているため高濃度の有機溶媒により沈殿し易い。これに対してペプチドは一般的に立体構造を持たないで溶解しているため沈殿しにくい。アセトン沈殿法はこの有機溶媒存在下における溶解度の違いを利用し、ペプチドだけを可溶性画分として抽出する方法である。従って、血清をアセトン溶媒に滴下すると、タンパク質は沈殿し、ペプチドのみを可溶性画分として回収することができる。

【0055】

（アセトン沈殿法の手順）

本比較例において、アセトン沈殿法は松尾やChertovらの方法を参考にして行った（参考文献4及び5）。図6にアセトン沈殿法のフローチャートを示す。

サンプルとして、ペプチドの抽出効率を評価するためにSPMを混合した血清と混合していない血清を使用した。まず、血清と7M尿素 / 2Mチオ尿素を1:1で混合し血清を希釈した。該希釈血清10 μ lを4に冷やした75%アセトン90 μ lにゆっくり滴下し、4で1時間攪拌した。その後、19,000 $\times$ g, 4で15分間遠心分離を行い、可溶性画分を回収し凍結乾燥した。該凍結乾燥物をPAGE用サンプル緩衝液20 μ lで溶解し、Tricine-SDS-PAGEで解析した。なお、前記PAGE用サンプル緩衝液の組成は50mM Tris-HCl(pH6.8), 50mM DTT, 0.5% SDS, 10% グリセロールとした。

【0056】

血清を7M尿素 / 2Mチオ尿素で希釈することで、タンパク質が変性する。このことにより、プロテアーゼも失活し、その影響を軽減できる（参考文献5）。また、キャリアタンパク質も変性し、キャリアタンパク質と結合したペプチドを回収できると考えた。

【0057】

（結果と評価）

アセトン沈殿法により血清から抽出したペプチドをTricine-SDS-PAGEで分離し、クーマシー染色した結果を図7に示す。レーン(a)はSPM 8 μ g、レーン(b)は未処理血清 0.5 μ l、レーン(c)は血清 5 μ lとSPM 8 μ gの混合物をアセトン沈殿法で処理したもの、レーン(d)は血清 5 μ lをアセトン沈殿法で処理したもの、レーン(e)はSPM 8 μ gをアセトン沈殿法で処理したものを分析した結果である。電気泳動パターンの上に血清量、SPM量、アセトン沈殿法の処理をしたか否かを示した。

【0058】

レーン(d)はレーン(b)の10倍量の血清5 μ lを分析した結果であるが、アセトン沈殿法で処理したため、タンパク質(分子量 20,000以上)がほとんど除去されている。さらに、レーン(d)はレーン(b)と比較してペプチド成分(分子量 20,000以下)が濃く検出されたことからペプチド成分が濃縮されたことがわかる。しかし、一方ではレーン(b)で分子量14,000から17,000に観測されていた2本のバンドがアセトン沈殿により消失している。また、レーン(a)、レーン(c)、レーン(e)は等量のSPM 8 μ gを含み、レーン(c)のサンプルにのみ血清 5 μ lを加えた。SPMのみをアセトン沈殿法で処理したレーン(e)はSPMすべての成分が効率よく回収できた。しかし、SPMに血清を加えたレーン(c)はSPM中の分子量6,000の成分以外がアセトン沈殿法により損失され検出されていない。このことから、7 M 尿素 / 2M チオ尿素で血清を希釈しているにもかかわらず、SPMはキャリアタンパク質と結合して一緒に除去されたと考えられる。

【0059】

以上、図5から明なように、アセトン沈殿法を用いてペプチド抽出すると、血清中の2種類のメジャーペプチド(分子量14,000、17,000)が損失し、かつあらかじめ血清に加えたSPMが損失したことから、キャリアタンパク質に結合しているペプチドの抽出はできないと考えられる。つまり、血清中に存在するペプチドの量的な情報を維持したままでペプチドを抽出することは困難であることがわかった。

【0060】

(比較例2) 従来法との比較・限外ろ過法

限外ろ過法とは、一定サイズ以下の分子を通し、それ以上のサイズの分子を通さない限外ろ過膜を用いてペプチドを抽出する方法である。血清を限外ろ過膜でろ過すると、理想的にはタンパク質は、ろ過膜を通過できずに濃縮され、ペプチドだけが通過する。従って、ペプチド成分だけをろ液として分離することが可能である。限外ろ過法はハイスルー

【0061】

(限外ろ過法の手順)

本比較例において、限外ろ過法はTirumalaiらやHarperらの方法を参考にして行った(参考文献2及び6)。図8に限外ろ過法のフローチャートを示す。

限外ろ過膜は洗浄後に使用した。該洗浄は25mM 重炭酸アンモニウム / 20% アセトニトリルを、限外ろ過膜(MICROCON YM-30, Millipore社製: 阻止分子量 30,000)にのせ、軽く攪拌した後、3,000 $\times$ g で5分間遠心し、ろ液を除去することで行った。

【0062】

サンプルとして、ペプチドの濃縮効率を評価するためにSPMを混合した血清と混合していない血清を使用した。該血清と25mM 重炭酸アンモニウム / 20% アセトニトリルを1:5で混ぜて血清を希釈した。該希釈血清を洗浄後の限外ろ過膜にのせ、3,000 $\times$ g、4 で15分間遠心分離し、得られたろ液を回収して凍結乾燥した。該凍結乾燥物をPAGE用サンプル緩衝液20 μ lで溶解し、Tricine-SDS-PAGEで分析した。該PAGE用サンプル緩衝液の組成は50mM Tris-HCl(pH6.8), 50mM DTT, 0.5% SDS, 10% グリセロールとした。該血清を25mM 重炭酸アンモニウム / 20% アセトニトリルで希釈する理由は血清の粘性を下げて、ペプチドのろ過膜への吸着を軽減するためである(参考文献6)。

【0063】

(結果と評価)

前記限外ろ過法により、血清から抽出したペプチドをTricine-SDS-PAGEで分析した結果を図9に示す。(A)はクーマシー染色した結果、(B)は銀染色した結果である。該銀染色はクーマシー染色の20～30倍の感度である。レーン(A1)、及びレーン(B1)はSPM 4 µg、レーン(A2)及びレーン(B2)は未処理血清 0.5 µl、レーン(A3)は血清 5 µl と SPM 4 µg の混合物を限外ろ過法で処理したもの、レーン(A4) 及びレーン(B3)は血清 5 µl を限外ろ過法で処理したもの、レーン(A5)及びレーン(B4)は血清 10 µl を限外ろ過法で処理したもの、レーン(A6)及びレーン(B5)は血清 100 µl を限外ろ過法で処理したサンプルを分析した結果である。該電気泳動パターンの上に血清量、SPM量、限外ろ過法の処理をしたか否かを示している。

【0064】

10

(A) クーマシー染色による評価

レーン(A3)は、レーン(A1)と等量のSPM 4 µgとレーン(A2)の10倍量の血清5 µlの混合物を限外ろ過で処理した結果である。タンパク質とSPMがともに検出されなかったことから、タンパク質が完全に除去されたと共にSPMも完全に除去されることがわかる。また、レーン(A4)、レーン(A5)、及びレーン(A6)は、それぞれ5 µl、10 µl、100 µlの血清を限外ろ過法で処理した結果である。レーン(A4)、レーン(A5)、及びレーン(A6)のすべてにタンパク質とペプチドの両方が検出されなかった。これらの結果から、限外ろ過法はタンパク質の除去効率が非常に高いが、ペプチドの抽出効率は非常に悪いことがわかった。

【0065】

20

(B) 銀染色による評価

レーン(B3)、レーン(B4)、及びレーン(B5)は、それぞれ5 µl、10 µl、100 µlの血清を限外ろ過法で処理した結果である。レーン(B5)の血清100 µlの処理物のみにペプチドが検出された。

そのレーン(B5)と未処理血清0.5 µlのレーン(B2)を比較すると、タンパク質が完全に除去されていることがわかる。また、ペプチド成分を比較すると血清の量が1 / 200のレーン(B2)の方が多くのバンドが検出され、ペプチドの抽出効率が0.5%以下であることがわかる。

【0066】

上記(A)と(B)の結果から、限外ろ過法は、タンパク質の完全除去が可能であるが、ペプチドの抽出効率は0.5%以下で非常に悪いことがわかった。

30

従来から限外ろ過膜とタンパク質が吸着してタンパク質が損失することが知られている。このことから、限外ろ過法によるペプチドの抽出効率が悪い原因は、ろ過膜とペプチドの吸着、さらにはキャリアタンパク質に結合したペプチドがキャリアタンパク質と共に膜上で濃縮され、大部分のペプチドがろ過膜を通過できないためと考えられる。

【0067】

考察 (本発明の方法、アセトン沈殿法、及び限外ろ過法の比較)

血清とSPMの混合物をペプチド抽出後にTricine-SDS PAGE で分析し、ペプチド抽出法のタンパク質の除去効率を調べるとともに、SPMの残量でペプチドの抽出効率を評価した。従来法のアセトン沈殿法と限外ろ過法は共にタンパク質の除去効率は高かったが、両方法共にSPMを大部分損失した(唯一、アセトン沈殿法でSPM中の分子量6,000のペプチドだけが抽出された)。SPMの損失の理由として、アセトン沈殿法ではキャリアタンパク質に吸着しているペプチドが回収できないこと、限外ろ過法はこれに加えてろ過膜によるペプチドの損失が大きいことが原因と考えられる。

40

【0068】

これらの問題点を解決するために本発明の方法を開発し、(1) Tricine-SDS-PAGE, (2) 逆相 HPLC を用いてタンパク質の除去効率、ペプチドの抽出効率を評価した。また、(3) Tricine-SDS-PAGEを用いて再現性を評価した。さらに、(4)本発明の方法で濃縮された主要なペプチドの同定をした。(1) Tricine-SDS-PAGEの結果からタンパク質の除去効率は高く、従来法では回収できなかったSPMのすべてを回収できた。このことからキャリアタンパク質の影響を受けずに高効率にペプチドを濃縮できることがわかった。(2) 逆相HPLCの

50

結果からも本発明の方法はタンパク質の除去効率は高く、多くのペプチドピークが検出でき効率よくペプチドが濃縮できることが確認できた。また、(3) Tricine-SDS-PAGEの結果から、本発明の方法は高い再現性でペプチドを抽出できていることがわかった。さらに(4) 本発明の方法で濃縮された主要なペプチドの同定の結果から、本発明の方法で得た濃縮物中には、主要成分だけでも多くのペプチドが存在し、その中に生体内の様々な情報を持つタンパク質の断片が含まれていることがわかった。さらに、血清タンパク質の主成分であるアルブミンの99.7%が除去でき、血清中にアルブミンの1 / 2,000量しか存在しないアポリボタンパク質C-IIを効率よく濃縮できていることがわかった。本方法は有機溶媒と酸を使っているため本方法によりタンパク質が切断されてその断片が人為的に生成されることも懸念されるが、SPMが非常に効率よく抽出できていることから考えるとその可能性は無い。また、試薬4の塩酸による影響が考えられるが塩酸濃度120mMでも切断は確認されなかった。

10

【0069】

これらの結果から、本発明により、タンパク質の除去効率が高く、キャリアタンパク質に吸着しているペプチドも含めて、量的な情報を維持したまま高効率で再現性よくペプチドを濃縮できる方法が得られたと考えられる。

これらの結果を図10に要約した。レーン3、8、及び13の比較から明らかなように、本発明の方法では、SPMも効率よく回収されている。これに対し、アセトン沈殿法(A)、及び限外ろ過法(F)では、SPMはほとんど回収されていない。また、アセトン沈殿法、及び限外ろ過法では、血清中のキャリアタンパク質に吸着されたSPMが、キャリアタンパク質とともに除去されたものと考えられる。また、SPM以外の血清由来のペプチドも本発明の方法により最も多く濃縮されていることが分かる。また、レーン4、9、及び14の比較より、本発明の方法は、アセトン沈殿法、及び限外ろ過法に比べて血清由来のペプチドの回収率が非常に高いことが分かる。

20

【0070】

(参考文献)

- [1] Fukutomi et.al. "A simple method for peptide purification as a basis for peptidome analysis", (J. Electrophoresis 49:15, 2005)
- [2] Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. "Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome." (Mol. Cell. Proteomics 2003; 2:1096-103)
- [3] 古賀 俊逸
日本臨床 53 - 増 - 654 1995
- [4] 松尾寿之、西望
新生化学実験講座1 タンパク質I 分離・精製・性質
第3章 特殊なタンパク質の抽出法、第7章 分別沈殿
- [5] Chertov O, Biragyn A, Kwak LW, Simpson JT, Boronina T, Hoang VM, Prieto DA, Conrads TP, Veenstra TD, Fisher RJ. "Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry." (Proteomics 2004; 4: 1195-203)
- [6] Harper RG, Workman SR, Schuetzner S, Timperman AT, Sutton JN. "Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry." (Electrophoresis 2004; 25:1299-306)
- [7] Schagger H, von Jagow, G. "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". (Anal. Biochem. 1987; 166: 368-379)

30

40

【産業上の利用可能性】

50

【 0 0 7 1 】

本発明の方法により、濃縮することが困難なキャリアタンパク質に結合した低分子量タンパク質、及びペプチドを効率よく濃縮することが出来る。したがって、本発明の方法により、液体試料、特に血清及び血漿中の低分子量タンパク質などを、各種クロマトグラフィー、質量分析、電気泳動、NMR、ESR、各種分光法などにより分析することが可能になる。すなわち、本発明の方法は、血清ならびに血漿等の低分子量タンパク質などを対象とした診断、診断マーカのスクリーニング、医薬品開発などの医療分野で、幅広く応用することができる。また、本発明の方法は、自動化が容易であり、血液中の低分子量タンパク質等の自動分析装置の開発を可能にするものである。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 7 2 】

【図 1】実施例 1 の実施手順を示すフローチャートである。

【図 2】実施例 1 で得られた濃縮溶液をTricine-SDS-PAGEで分離し、クーマシー染色を行った結果を示す写真である。

【図 3】実施例 1 の方法により濃縮したサンプルを逆相HPLCで分析した結果を示すデータである。

【図 4】本発明の方法の濃縮再現性を示す、Tricine-SDS-PAGEの結果を示す写真である。

【図 5】サンプル血清を実施例 1 の方法で処理して得た濃縮溶液を、Tricine-SDS-PAGEで分離し、クーマシー染色した写真である。それぞれのバンドについてペプチド等が同定された。

20

【図 6】比較例 1 で実施したアセトン沈殿法のフローチャートを示す。

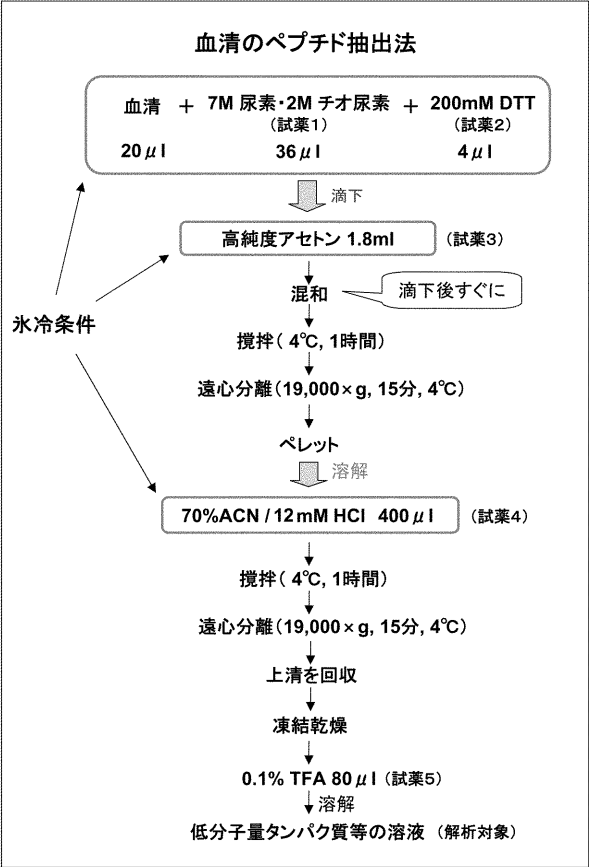
【図 7】アセトン沈殿法により血清から抽出したペプチドをTricine-SDS-PAGEで分離し、クーマシー染色した結果を示す写真である。

【図 8】比較例 2 で実施した限外ろ過法のフローチャートを示す。

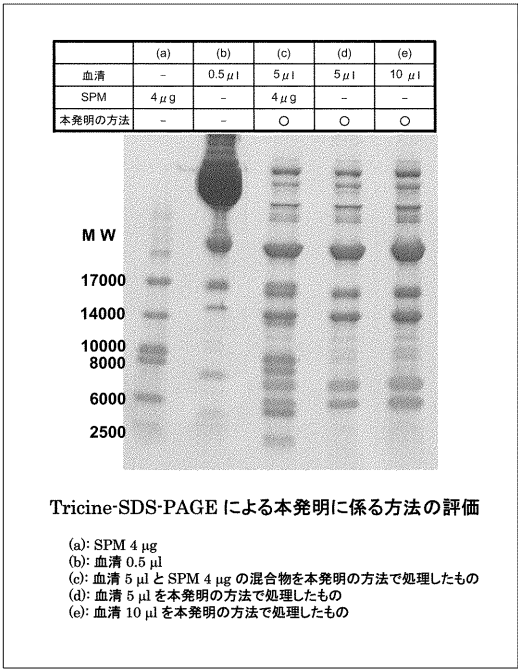
【図 9】限外ろ過法により、血清から抽出したペプチドをTricine-SDS-PAGEで分離し、クーマシー染色した結果を示す写真である。

【図 10】本発明の方法、アセトン沈殿法及び限外ろ過法の効果を、Tricine-SDS-PAGEの結果から比較したものである。

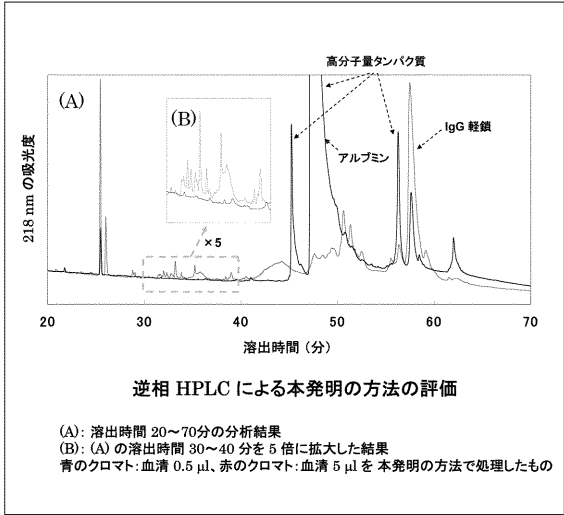
【 図 1 】



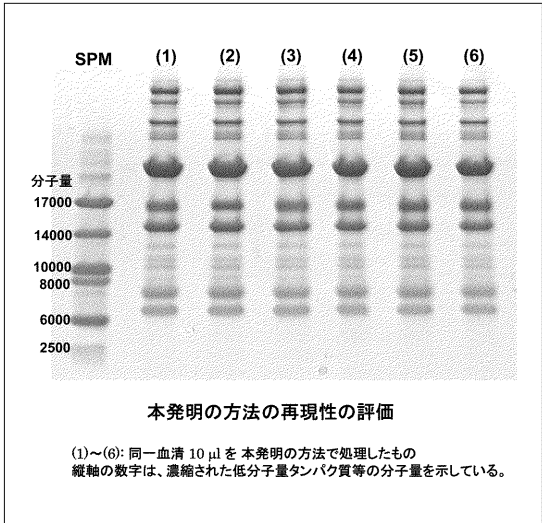
【 図 2 】



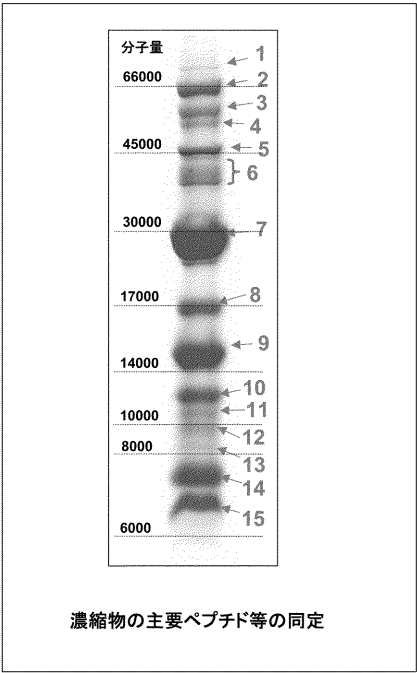
【 図 3 】



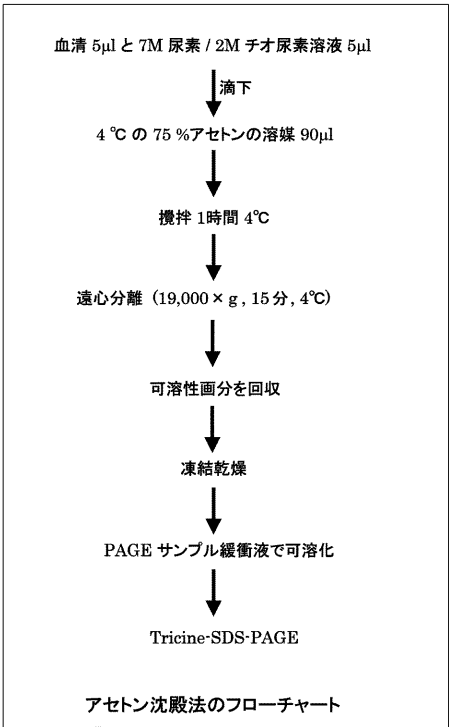
【 図 4 】



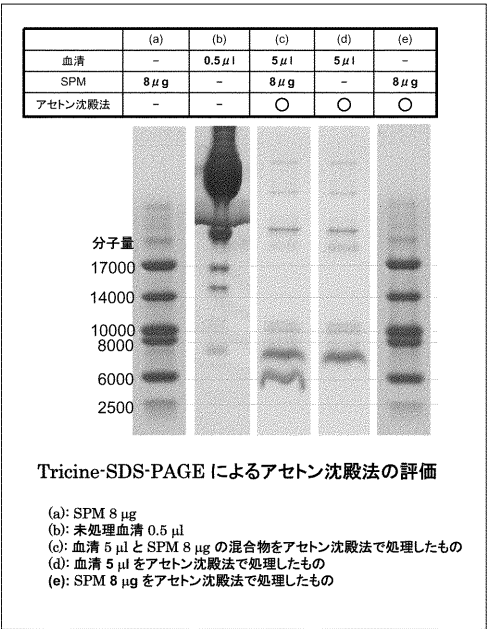
【 図 5 】



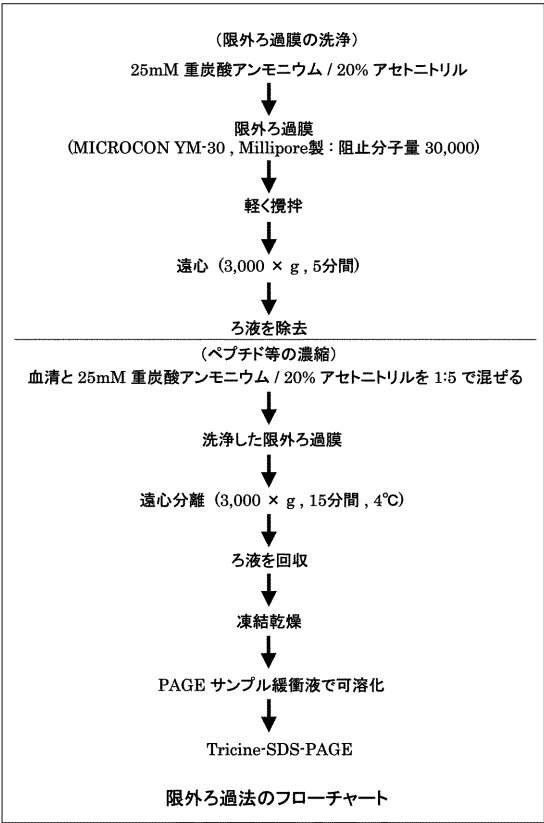
【 図 6 】



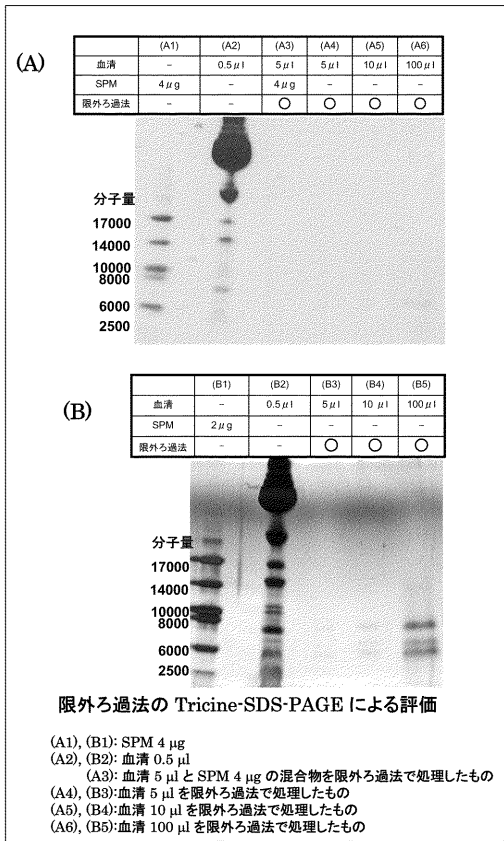
【 図 7 】



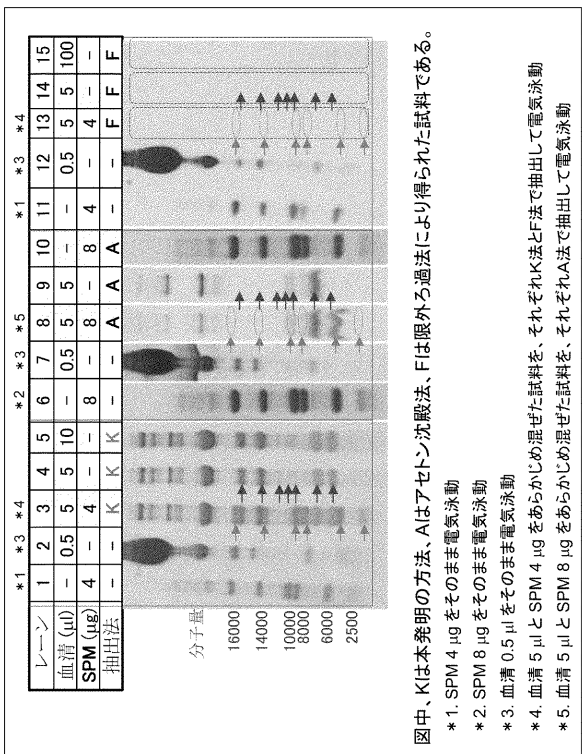
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成22年3月10日 (2010.3.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮方法であって：

下記工程、

(a) 該体液試料に、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、及び還元剤を含む試薬 2 を加えて混合し、ついで、アセトン、エタノール、メタノール、 γ -プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒を 90%以上含む試薬 3 に滴下して、混合する工程；

(b) 工程 (a) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；

(c) 工程 (b) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を除去する工程；

(d) (c) で得られた沈降物に、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒、並びに酸を含む試薬 4 を加えて混和する工程；

(e) 工程 (d) で得られた混合溶液を低温下で攪拌する工程；及び

(f) 工程 (e) で得られた攪拌溶液を低温下で遠心分離し、上清を回収する工程、を含む、前記方法。

【 請求項 2 】

さらに、(g) 工程 (f) で回収した上清を凍結乾燥する工程を含む、請求項 1 記載の方法

。

【請求項 3】

前記試薬 2 の還元剤が、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、トリスカルボキシルホスフィン(TCEP HCl)、トリブチルホスフィン(TBP)、2-メルカプトエタノール(2-ME)、2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものである、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記体液試料が、血清、又は血漿である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】

試薬 1 における濃度が尿素 1 ~ 8 M、かつチオ尿素 0.5 ~ 3 M であり、かつ試薬 2 における還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 20 mM となる濃度である、請求項 1、2 又は 3 記載の方法。

10

【請求項 6】

試薬 1 における濃度が尿素 3 ~ 8 M、かつチオ尿素 1 ~ 3 M である請求項 5 記載の方法

。

【請求項 7】

試薬 2 における還元剤が、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、2-メルカプトエタノール(2-ME)又は2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 5 mM ~ 20 mM となる濃度であり、該還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP HCl)又はトリ-n-ブチルホスフィン(TBP)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 10 mM となる濃度である、請求項 5 又は 6 記載の方法。

20

【請求項 8】

試薬 3 の有機溶媒がアセトンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

試薬 3 の有機溶媒濃度が 95 % 以上である、請求項 1 又は 8 記載の方法。

【請求項 10】

試薬 3 の有機溶媒濃度が 98 % 以上である、請求項 1 又は 8 記載の方法。

【請求項 11】

30

アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれた前記酸は、塩酸、トリフルオロ酢酸(TFA)、ギ酸、酢酸、及びトリクロロ酢酸(TCA)からなる群から選ばれたものであり、かつ前記試薬 4 の有機溶媒の濃度が 50 ~ 99 % である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリルである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

試薬 4 の酸が、塩酸であり、その濃度が 5 mM ~ 500 mM である、請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 14】

40

試薬 4 における有機溶媒の濃度が 60 ~ 80 % である、請求項 1、12 又は 13 記載の方法。

【請求項 15】

試薬 4 における有機溶媒の濃度が 65 ~ 75 % である、請求項 1、12 又は 13 記載の方法。

【請求項 16】

工程(b)において、工程(a)で得られた混合溶液を -20 ~ -10 の低温下で、1分以上攪拌する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

工程(b)において、工程(a)で得られた混合溶液を 0 ~ 5 の低温下で、60分以上

50

攪拌する、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

工程(e)において、工程(d)で得られた混合溶液を - 5 ~ 2 0 の低温下で 1 分以上攪拌する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】

工程(e)において、工程(d)で得られた混合溶液を 0 ~ 5 の低温下で 6 0 分以上攪拌する、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項 2 記載の方法で得られた凍結乾燥物に、T F A、塩酸、ギ酸、酢酸、及び T C A からなる群から選ばれた成分を含有する試薬 5 を加えることを含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成方法。

10

【請求項 2 1】

試薬 5 が、T F A を 0 . 1 ~ 2 0 % 含む、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

試薬 5 が、ギ酸、酢酸、T C A、又はこれらの混合物を 0 . 1 ~ 2 0 % 含む、請求項 2 0 又は 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの濃縮用キットであって、尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、還元剤を含む試薬 2、アセトン、エタノール、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒を 9 0 % 以上含む試薬 3、並びにアセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を含む、前記キット。

20

【請求項 2 4】

試薬 1 における濃度が尿素 1 ~ 8 M、かつチオ尿素 0 . 5 ~ 3 M であり、試薬 2 における還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 2 0 mM となる濃度であり、試薬 3 の有機溶媒が、アセトン、エタノール、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものであり、試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれたものでその濃度が 5 0 ~ 9 9 % であり、かつ前記酸は、塩酸、T F A、ギ酸、酢酸、及び T C A からなる群から選ばれたものである、請求項 2 3 記載のキット。

30

【請求項 2 5】

試薬 1 における濃度が尿素 3 ~ 8 M、かつチオ尿素 1 ~ 3 M であり、試薬 2 における還元剤がジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、2-メルカプトエタノール(2-ME)又は2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)である場合は、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 5 mM ~ 2 0 mM となる濃度であり、該還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP HCl)又はトリ-n-ブチルホスフィン(TBP)である場合には、試薬 2 における該還元剤の濃度が、体液試料、試薬 1、及び試薬 2 の混合物中 1 mM ~ 1 0 mM となる濃度であり、試薬 3 の有機溶媒がアセトンであって、その濃度が 9 8 % 以上であり、試薬 4 の有機溶媒が、アセトニトリルであり、かつその濃度が 6 0 ~ 8 0 % である、請求項 2 3 記載のキット。

40

【請求項 2 6】

尿素及びチオ尿素を含む試薬 1、還元剤を含む試薬 2、アセトン、エタノール、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒を 9 0 % 以上含む試薬 3、並びにアセトニトリル、メタノール、エタノール、イソプロパノール及びこれらの混合物からなる群から選ばれた有機溶媒及び酸を含む試薬 4 を含み、さらに請求項 2 記載の濃縮方法で得られた凍結乾燥物に加える、T F A、塩酸、ギ酸、酢酸、及び T C A からなる群から選ばれた成分を含有する試薬 5 を含む、体液試料中に含まれる、低分子量タンパク質及びペプチドの分析試料の作成用キット。

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/48(2006.01)i, C07K1/36(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N1/34(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/48, C07K1/36, G01N1/28, G01N1/34, G01N27/447, G01N33/68, G01N27/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jiye A., Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome, Anal. Chem., 2005, Vol.77, p8086-8094, Abstract, Experimental section	1-27
A	Hiroshi OKUSA et al., "P-227 Nyotanpaku Proteome Kaiseki no Tamenno Aratana Senryaku", The Japanese Journal of Nephrology, 2006, Vol.48, No.3, page 280	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 09 September, 2008 (09.09.08)

Date of mailing of the international search report
 22 September, 2008 (22.09.08)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/002168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 62-65695 A (Cetus Corp.), 24 March, 1987 (24.03.87), Claims & US 4748234 A & US 5248769 A & EP 206828 A2 & DE 3683961 A & DE 3683961 C & MX 171171 B & NO 861932 A & AU 5924286 A & FI 862711 A & CA 1329308 A & DK 304886 A & AT 72817 T & AU 591910 B & AT 72817 E & FI 862711 A0	1-27

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 0 2 1 6 8	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, C07K1/36(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N1/34(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N33/48, C07K1/36, G01N1/28, G01N1/34, G01N27/447, G01N33/68, G01N27/62			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	Jiye A., Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome, Anal. Chem., 2005, Vol. 77, p8086-8094 Abstract, Experimental section 等参照	1-27	
A	大草洋他, P-227 尿蛋白プロテオーム解析のための新たな戦略, 日本腎臓学会誌, 2006, 第48巻第3号, 280ページ	1-27	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 09.09.2008		国際調査報告の発送日 22.09.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 加々美 一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/002168
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 62-65695 A (シタス コーポレイション) 1987.03.24, 特許請求の範囲等参照 & US 4748234 A & US 5248769 A & EP 206828 A2 & DE 3683961 A & DE 3683961 C & MX 171171 B & NO 861932 A & AU 5924286 A & FI 862711 A & CA 1329308 A & DK 304886 A & AT 72817 T & AU 591910 B & AT 72817 E & FI 862711 A0	1-27

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T
R),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,
BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,K
G,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT
,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 2G052 AA30 AB18 AD28 AD48 ED01 ED17 FD18 GA24
4H045 AA20 CA42 EA20 EA50 GA01 GA05 GA15 GA31

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	在体液样品中浓缩低分子量蛋白质和肽的方法		
公开(公告)号	JPWO2009019889A1	公开(公告)日	2010-10-28
申请号	JP2009526346	申请日	2008-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所		
[标]发明人	小寺義男 前田忠計 川島祐介		
发明人	小寺 義男 前田 忠計 川島 祐介		
IPC分类号	G01N1/28 G01N1/34 C07K1/36 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/34 C07K1/145 C07K1/30 C07K1/36 G01N1/4044 Y10T436/107497 Y10T436/25 Y10T436/25375 Y10T436/255		
FI分类号	G01N1/28.J G01N1/34 C07K1/36 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G052/AA30 2G052/AB18 2G052/AD28 2G052/AD48 2G052/ED01 2G052/ED17 2G052/FD18 2G052/GA24 4H045/AA20 4H045/CA42 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/GA01 4H045/GA05 4H045/GA15 4H045/GA31		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2007206602 2007-08-08 JP		
其他公开文献	JP4571228B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 提供了一种用于浓缩包含在体液样品中，特别是血清或血浆中的低分子量蛋白质和肽的方法。[解决方案] 一种方法，包括以下步骤 (a) 至 (e) ： (a) 在体液样品中添加含有尿素和硫脲的试剂1和含有还原剂的试剂2并混合，然后滴下含有90%以上的有机溶剂的试剂3并进行混合的步骤。(b) 在低温下搅拌步骤 (a) 中获得的混合溶液； (c) 将步骤 (b) 中获得的搅拌溶液在低温下离心以除去上清液的步骤； (d) 在 (c) 中得到的沉淀物中添加并混合含有有机溶剂和酸的试剂4的工序。(e) 在低温下搅拌步骤 (d) 中获得的混合溶液；和 (f) 这是将步骤 (e) 中获得的搅拌溶液在低温下离心并收集上清液的步骤。[选择图]无