

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-132987

(P2004-132987A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/447	GO 1 N 27/26 3 O 1 A	2 GO 4 5
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/483 F	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 27/26 3 1 5 F	
	GO 1 N 27/26 3 1 5 G	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-351978 (P2003-351978)	(71) 出願人	597070264
(22) 出願日	平成15年10月10日 (2003.10.10)		アベンティス・ベーリング・ゲゼルシャフ
(31) 優先権主張番号	10247876.7		ト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツン
(32) 優先日	平成14年10月14日 (2002.10.14)		グ
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国デー 3 5 0 0 2 マルブ
			ルク. ポストファハ 1 2 3 0
		(74) 代理人	100091731
			弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100080355
			弁理士 西村 公佑
		(74) 代理人	100127926
			弁理士 結田 純次
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血漿タンパク質のマルチマー測定方法

(57) 【要約】

【課題】 ゲル電気泳動によりフィブリノゲンおよびフォンウィルブランド因子のマルチマーの定性的および定量的測定方法の提供。

【解決手段】 フォンウィルブランド因子(vWF)またはフィブリノゲンを含有する試料が、連続的、均質な、塊を含まないアガロースゲルを使用したサブマリン電気泳動により分画され、そしてマルチマーバンドが、ブロッティング膜上の特異抗体-酵素結合体によるウェスタンブロット分析の後に免疫化学的にか、又はゲルにおいて適切な色素により、好ましくはブルー染色を用いて、可視化することから成る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フォンウィルブランド因子(vWF)またはフィブリノゲンを含む試料が、連続的、均質な、塊を含まないアガロースゲルを使用したサブマリン電気泳動により分画され、そしてマルチマーバンドが、ブロッティング膜における特異抗体-酵素結合体によるウェスタンブロット分析の後に免疫化学的にか、又はゲルにおける適切な色素により好ましくはブルー染色を用いて、可視化される、ゲル電気泳動によりマルチマー形成治療タンパク質のマルチマーの定性的および定量的測定方法。

【請求項 2】

マルチマー形成治療タンパク質がフィブリノゲンである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

マルチマー形成治療タンパク質がフォンウィルブランド因子(vWF)である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

1.6～3 重量%、好ましくは 1.8～2.4 重量%のアガロース濃度であるアガロースゲルがフィブリノゲンマルチマーを分離するために使用される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

0.7～1.8 重量%、好ましくは 0.8～1.2 重量%のアガロース濃度であるアガロースゲルが vWF マルチマーを分離するために使用される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

ゲル電気泳動が 6℃～14℃、好ましくは 8～12℃の温度で実施される、請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

免疫染色がブロッティング膜上のマルチマーバンドを染色するために使用される、請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

色素クマシーブルーがゲルにおけるマルチマーバンドのブルー染色のために使用される、請求項 1～6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

バックギングシート上のアガロースゲルがゲルにおけるブルー染色のために使用される、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 10】

バックギングシートなしのアガロースゲルがブロッティング膜上の免疫染色のために使用されるか、またはそのバックギングシートがブロッティングプロセス前にゲルから除去される、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

バンドがデンストメトリーにより定量される、請求項 1～10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

バンドがゲルのブルー染色の後に定量される、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

バンドがブロッティング膜の免疫染色の後に定量される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

ゲルが染色の後のラミネート加工により保存される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 15】

ブロッティング膜が免疫染色の後のラミネート加工により保存される、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ゲル電気泳動による血漿タンパク質のマルチマーの定性的及び定量的測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

凝固にも重要である血漿の成分は、血漿中でモノマー形態だけでなくマルチマー分子としてもまた存在することが知られている。場合によって、異なる治療効果は、個々のモノマーによるものとする事ができる。このようなマルチマー形成治療タンパク質の例は、フィブリノゲンおよびフォンウィルブランド因子である。マルチマーの定量的および定性的測定は、一方で凝固欠陥の原因を診断するのに非常に重要であるが、他方で凝固産物の特性を同定するためにもまた非常に重要である。従って、フィブリノゲンおよびフォンウィルブランド因子マルチマーの測定は、特に注目に値する。 10

【0003】

フィブリノゲンは、止血に極めて必須の機能を有する。このフィブリノゲンは、トロンビンの作用を介してフィブリンに変換され、このフィブリンは架橋してXIII因子によって安定化される微細な(fine)フィブリンファイバーを与える。止血を確実にする血餅は、それから形成される。フィブリノゲンの完全性および構造が止血効果に非常に重要である。

【0004】

フィブリノゲン自体は重合する傾向はないが、適当な条件下、例えば高濃度、低イオン強度および4℃での長期インキュベーションにおいてもまた、フィブリンに類似のフィブリノゲンマルチマーを形成する。このタイプのフィブリノゲンは、国際特許出願W0 01/12 244に記載されるウェスタンブロッティングおよび免疫化学染色を用いたSDSアガロースゲル電気泳動により分析および可視化することができる。 20

【0005】

SDSアガロースゲル電気泳動によるフィブリノゲンマルチマーを分離する方法は、Connaghanら(1)およびProiettiら(2)により紹介された。次いでこれらの方法は、国際特許出願W0 01/12244に記載される方法により改善され、ここでRainesら(3)により記載されるフォンウィルブランドマルチマーを分離するための方法は、フィブリノゲン電気泳動のために変更されそして利用された。本発明は、基本的に(3)において記載されるように実施される水平電気泳動、および基本的に(2)に記載されるように実施されるフィブリノゲンマルチマーの検出を伴う。 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、W0 01/12244の電気泳動方法は、かなり複雑であり、時間がかかり、かつとても特別な経験を要する。さらに、3つの異なるゲル、すなわちスタッキングゲル(70mMトリスに溶解された1%アガロース、4mM EDTA、4% SDS)、カソードゲル(100mMトリスに溶解された1.6%アガロース、150mMグリシン、0.1% SDS)および分離ゲル(200mMトリスに溶解された2%アガロース、100mMグリシン、0.4% SDS)を要し、これらは50℃を超える温度で注型され、そして重合のために少なくとも2時間放置しなければならない。試料を1レーンあたり0.6~0.9μlロードする。電気泳動は、600~650Vおよび16℃の温度で、フラットベッドの装置において実施される。このランニングバッファは、電極バッファ中に浸漬されたある長さの4~8枚のろ紙上のゲルに接続される。 40

【0007】

異なる3つのアガロースゲルの調製には、アガロースが膨潤過程を水の沸点近くで行わなければならないことから、かなりの経験が必要とされる。さらに、一方ではもはや塊(固体残留物)が存在しなくなるようアガロースを十分に溶解し、そして他方ではアガロースがガラスの上部、冷たいヘリで沈殿物としてもう再び堆積しない、最適な時間を見つけることが必須である。ゲルを注型するには、特別な技術、特にローディングウェルの導入に技術を要する。冷却して固まったゲルからローディングウェルを形成するのに必要なコ 50

ームを除去する際、たやすくアガロースゲルに損傷を与えてしまい、従って注型ゲルが使用できなくなってしまう。

【0008】

類似の困難がまた、フォンウィルブランド因子(vWF)マルチマーを分画するための現在までの慣用の方法においても起こる。

【0009】

糖タンパク質である機能的なフォンウィルブランド因子は、マルチマーと呼ばれる多様な分子量分布を伴って血流中を循環し、このマルチマーは、500kD~20,000kDまでの分子量分布を有することができる。その最も最小な単位は、約550kDの分子量を有するダイマーであり、これはジスルフィド架橋により共に連結される2つのモノマーからなる。20,000kDまでの分子量を伴うマルチマーと呼ばれるポリマーは、さらにジスルフィド架橋によりこれらのダイマーから産生される。 10

【0010】

フォンウィルブランド疾患の臨床兆候は非常に異質であり、そして軽い型、例えばタイプ1から、タイプ3における出血を自然に起こす非常に重篤な欠損状態までにわたる。出血しやすさは、vWFの2つの主な機能：血小板同士の接着および損傷した血管壁への接着を仲介することならびにVIII凝固因子の安定化、の定量的および／または定性的欠陥により引き起こされる。従って、初期の一次止血およびより開始の遅い二次止血の両方の機能が低下する可能性がある。

【0011】

しかし、VIII因子欠損により引き起こされる二次凝固欠陥において、VIII因子は必ずしも低下せず、逆に、凝固欠陥が、フォンウィルブランド因子の定量的および／または定性的欠陥の発現でありうる。 20

【0012】

凝固欠陥の複雑さに起因して、フォンウィルブランド疾患を種々の重篤性の程度に診断および分類することが、全ての凝固研究における課題である。正確な診断、すなわちサブタイプの決定は、患者自身にとって重要な結果を有する。なぜならこのとき、最適な治療を選択することを可能とするだけでなく、遺伝的欠陥の場合にはより詳細なアドバイスを与えることが可能だからである。従って、タイプ1疾患に目立って効果のあるデスマプレシンによる治療は、タイプ3の重篤なフォンウィルブランド疾患およびタイプ2型の多く 30
に対しては不適切であり、または禁忌でありさえし、その結果vWF含有VIII因子濃縮物が、これらの場合に与えられなければならない。優れた治療効果は、これらの場合、特に大きいvWFマルチマーを含むVIII因子濃縮物により示される。

【0013】

vWFは、血漿凝固タンパク質(VIII又はIX因子のような)ではないが、損傷した血管壁と1次止血の重要な成分としての血小板との間に架橋を形成することにより、およびいわゆる血小板に対する接着剤として作用する。さらに、vWFはVIII因子を安定化し、そうでなければすばやく分解されてしまうVIII因子を、vWFに結合することなくほんの非常に短い時間で血液中を循環することが可能となる。

【0014】

vWF分子における構造変化についての情報は、SDSアガロースゲル電気泳動を使って、ウェスタンブロット免疫染色分析を用いるか(SAGE-WISA)またはゲルのクマシーブルー染色により(SAGE-CB)、マルチマーを可視化することによって本発明に従って得られる。次いで、マルチマーの電気泳動による可視化は、構造的特性について結論を導くことを可能とする。コラーゲン結合アッセイを使用して、大きいマルチマーが存在しないvWF分子を非常に高い感度で検出可能であるばかりでなく、マルチマー分析は、遺伝性だけでなく特に後天性のvWFにおける変化を有する患者にとって重要な診断試験である。マルチマー組成物の確立もまた、VIII因子凝固産物を評価するために非常に重要である。 40

【0015】

SAGE-WISAによるvWFマルチマー分析は、本技術分野で知られたものであり 50

、そしてMetznerら(4)によって記載されている。しかし、そこに記載されている方法は、複雑でありかつ時間がかかる。さらに、再現性の欠如という問題があり、マルチマーバンドの確実な定量化を困難にしている。またさらに、塊のない均質なアガロースゲルを注型する困難およびいくつかの異なるアガロースゲルを使用する必要性が存在する。(4)の方法および類似の方法(5,6,7)の両方において、常にそれら方法で異なる分離ゲルおよびスタッキングゲルを必要とする。例えば、(4)は、0.9%アガロース分離ゲルおよび0.8%アガローススタッキングゲルを使用し、一方(5)は、2%アガロース分離ゲルおよび1%アガローススタッキングゲルを用いる。

【0016】

さらに、異なるアガロースタイプが、スタッキングゲルおよび分離ゲルに対して指定される。従って(4)は、スタッキングゲルに関してHGT(高ゲル化温度)アガロースおよび分離ゲルに対してLGT(低ゲル化温度)アガロースを指定する一方、他のアガロースタイプは、他の公知の分離方法において使用される。

10

【0017】

従来のゲル電気泳動分離方法によりしばしば生じるさらなる困難は、アガロースゲルが浮かぶ傾向を示すことである。この場合、アガロースゲルは、電気泳動チャンバの底との接着を失い、傾斜して歪んだレーンパターンの形成を生じるか、又はゲルの外にタンパク質が電気泳動時に移動してしまうことさえあり、従ってタンパク質バンドが失われてしまう。ゲルのカタマラン様の重しによりアガロースゲルの浮きを防ぐことが可能であるが、これはゲルを圧迫し、次にバンドの分離を損なうかまたは各ゲルにおいて使用することが

20

【課題を解決するための手段】

【0018】

今般、前述の困難は、フォンウィルブランド因子(vWF)またはフィブリノゲンを含む試料を、8℃～12℃まで冷却しながら、塊のない連続的で均質なアガロースゲルを使用してサブマリン電気泳動により分画し、そしてブロッティング膜における特異抗体-酵素結合体によるウェスタンブロット分析の後に免疫化学的に、またはゲルにおける適切な色素、好ましくはブルー染色によりマルチマーバンドを可視化する、ゲル電気泳動によるフィブリノゲンのマルチマーまたはフォンウィルブランド因子のマルチマーの定性的および定量的測定方法により解決することができた。

30

【0019】

本発明により使用される塊のない均質なアガロースゲルの自作は、十分な経験から可能であるが、一般的にそれらは例えばElchromまたはBio-Radから購入される。DNA又はRNA試料を分画するために現在までほぼ例外なく使用されてきたこの種のアガロースゲルには、均一のアガロース濃度を有する分離ゲルのみがあり、分離スタッキングゲルを必要としない。この場合の分離は、以下の方法で実施される。

【0020】

A. vWFマルチマーの分画

vWFマルチマーを分離するために用いられるアガロースゲルは、0.7～1.8重量%、好ましくは0.8～1.2重量%のアガロース濃度を有した。(例えばBio-Radの)バックキング(backing)なしのアガロースゲルは、後のウェスタンブロット免疫染色分析(WISA)に特に有利であることがわかった。クマシーブルー染色に特に有利であるとわかったアガロースゲルは、(例えば、Elchrom Scientific AGの)バックキングシートに適用されるゲルであった。なぜならこれは、アガロースを、高温、好ましくは30℃～50℃でより良く乾燥し、そしてこの目的のために特に好ましい色素であるクマシーブルーでより迅速に染色することを可能とするからである。

40

【0021】

サブマリン電気泳動を、10℃まで冷却し、SEA 2,000 HIPER電気泳動チャンバ(Elchrom Scientific, Cham, Switzerland)において、0.8～1.5%アガロースゲルおよび例えば0.1%SDS(混合物: 12.12gのトリス、57.8gのグリシンお

50

よび2 gのSDSを、脱イオン水により2,000 mlにした)を含むトリスーグリシンバッファーからなる電気泳動バッファーを用いて行った。電気泳動チャンバに2,000 mlの電気泳動バッファーを装荷した。次いで、ゲルを挿入しそして予備の電気泳動において再平衡化した。この予備の電気泳動は、25 V/最大ワット/0.5時間(できるかぎり迅速にゲルの再平衡化を行うために循環ポンプを運転する)で行った。

【0022】

この電気泳動に関して、ゲルは、ロードする場所が陰極に向けられるように電気泳動チャンバに置かれ、そしてこのゲルは電気泳動の間中使用される電圧に対して水平かつ面平行に置かれる。温度が電気泳動の間8℃以下にならないよう、そして14℃を超えないように気をつけた。

10

【0023】

試料のロードは、予備の電気泳動の後に行った。試料を、試料バッファー(好ましくは、例えばAnamedまたはNovexのSDS-およびブROMフェノールブルー含有試料バッファー)中においてウォーターバスで3分間ボイルし、そして1レーンあたり20 µlに分けてゲルウェルにロードした。

【0024】

試料電気泳動は、25 V/最大ワット/0.5時間で行った。これにより、ゲルマトリックスへの試料の浸透が引き起こされた。

メインの電気泳動は、50 V/最大パワーでブROMフェノールブルーの前方がゲルの終わりに到達するまで行った(試料電気泳動の後すぐ)。

20

【0025】

クマシーブルー染色(SAGE-CB)に関して、ゲル(好ましくはシート上のアガロースゲル)を、例えばエタノール、酢酸および水の混合物(25/3/72; v/v)中で0.5時間固定した。次いでゲルを、アガロースが濁って見えるようになるまで(約2~3時間)ろ紙の層で圧力下に(例えば10 Lの中が満たされた実験用ボトルを置くことにより)圧縮し、次いでアガロースが透き通って見えるまで(約1~2時間)40℃の乾燥オーブン中でさらに乾燥した。その後、このゲルを、一晚、40℃で穏やかに振盪しながらクマシーブルーで染色した(0.01% Serva blue G、6% 硝酸アンモニウム、0.2% 酢酸ナトリウム、4 ml/l 65% HNO₃)。翌朝、ゲルを水で一度簡単にリンスした。ゲル支持体に付着した色素をアルコールを染み込ませたる紙上にバック側を外すことにより除去した。次いでこのゲルを再度アガロースゲルが濁るまで(約1時間)圧力下に圧縮し、次いでアガロースが透き通って見えるまで(約1~2時間)40℃の乾燥オーブンでさらに乾燥した。

30

【0026】

最後に、乾燥したゲルを評価並びに長期間のドキュメンテーションおよび保管するためにそれを保存するため、特別なフィルム中に密封するか又はラミネート加工した。

【0027】

ウェスタンブロット免疫染色(SAGE-WISA)に関して、ここではバックのないアガロースゲルが好ましくは用いられ、ブロットバッファーが分析の日の朝に新しく作製され(35.6 g Na₂HPO₄×2H₂O、6.9 g NaH₂PO₄×H₂Oおよび10 mlの20%濃度のSDS水溶液は、脱イオン水を用いて5,000 mlにした)、冷蔵庫で+12℃~+14℃に冷却され(約3時間の期間)、次いでブロットチャンバーおよび反応皿に入れられた。ブロットチャンバーの冷却を+8℃に調整した。膜(ニトロセルロースまたは一好ましくはPVD膜、好ましくはMilliporeのImmobilon-P 0.45 µmトランスファーマンブレン)および100×100 mmにカットされた1枚のペーパーボード(例えば165×65, Sarstedt AG)を、少なくとも0.5時間穏やかに振盪する間にブロットバッファーでのブロットイング前に平衡化した。

40

【0028】

完全なブロットサンドイッチを、以下のように、ブロットバッファーで満たされたブロットバッファーディッシュ中で組み立てた：

50

1. プロットフレーム(マイナスフレーム)
2. 薄いスポンジシート
3. ペーパーボード(100×100mm)
4. プロット保護膜
5. (好ましくは2つのフィルターストリップ(100×10mm)がゲルの左右に各場合置かれ)泡が除去されたアガロースゲル
6. プロット膜(0.45μm)
7. ペーパーボード(100×100mm)
8. プロットフレーム(プラスフレーム)。

【0029】

10

ゲル下の気泡は、指(保護手袋)で除去した。

ブロッティングは、75分間、20Vプラス最大パワーで、8±2℃に冷却および攪拌しながら、当業者に本質的に公知の方法により行った。

【0030】

次いで、プロットサンドイッチを分解し、プロット膜をブロッキング溶液と共に反応皿に置いた(ゲル上に置かれた側が上でなければならない)。プロット膜を15分間振盪しながらBSAバッファー(トリス-緩衝化生理食塩水、pH8.0中に1%ウシ血清アルブミン(BSA))中でブロックした。次いで免疫染色を実施した。

【0031】

1. 1次抗体(0.5%BSAバッファー中の50μlのウサギ抗-vWF(例えばウサギ抗-ヒト/ヒト、DAKO))と一緒に45分間インキュベーション。 20

2. 脱塩水で簡単に膜を3回リンス。

3. 0.5%BSAバッファーを含む50mlのトリス-緩衝化生理食塩水で15分間洗浄。

4. 2次抗体(例えば50mlの0.5%BSAバッファー中50μlのヤギ抗-ウサギIgG-Ap(アルカリフォスファターゼ標識; Sigma)と一緒に45分間インキュベーション。

5. 脱塩水で簡単に膜を3回リンス。

6. 50mlのBSAバッファーで15分間洗浄。

7. タブ中で膜を50mlの基質溶液(50mlの0.5%BSAバッファーまで2錠のBCIP/NPT(Sigma))と一緒に室温で15分間インキュベーション。 30

8. 脱塩水を用いて数回洗浄することにより反応を停止。

9. +40℃まで加熱されたホットプレート上にブロッティング膜を置き、1枚のペーパーボードで覆い、そしてローラーを用いて余分な水分を除去。

10. 最後に、プロット膜を、評価並びに長期間のドキュメンテーションおよび保管のためにそれを保存するため、特別なフィルム中に密封するかまたはラミネート加工した。

【0032】

プロットまたはクマシーブルーで染色されたゲルのドキュメンテーションは、ラミネート加工形態で原物としてまたは写真もしくは走査により行った。

【0033】

40

(ラミネート加工された)染色されたゲルまたは(ラミネート加工された)免疫染色されたプロット膜をスキャナーに通し、適切なソフトウェア(例えばPharmaciaの「1-D-Elite」, Version Image Master 4.10ソフトウェアを使用)を用いてデンシトメトリーにより評価し、そして例えば以下のような通常の方法で判断した:

—バンド1~5、6~10および11以上の含量(content)を評価ソフトウェアにより総計し、そしてこれを、100%基準として使用されるコンプリートレーンに対し、各場合において百分率含量として関連づけた。

—各サンプルのバンド11以上の含量は、標準ヒト血漿(=100%)のバンド11以上に対し、百分率含量として関連づけた。

【0034】

50

B. フィブリノゲンマルチマーの測定

フィブリノゲンマルチマーを分離するために使用されるアガロースゲルは、1.6～3.0重量%、好ましくは1.8～2.4重量%のアガロース濃度を有した。(例えばBio-Radの)バックキングなしのアガロースゲルは、後のウェスタンブロット免疫染色分析(WISA)に特に有利であることがわかった。クマシーブルー染色に特に有利であることがわかったアガロースゲルは、バックキングシートに適用される(例えばElchrom Scientific AGの)ゲルであった。なぜならこれは、アガロースを、高温、好ましくは30℃～50℃でより良く乾燥し、そしてクマシーブルーでより速く染色することを可能にするからである。

【0035】

サブマリン電気泳動は、SEA 2,000 HIPER電気泳動チャンバー(Elchrom Scientific, Cham, Switzerland)において、1.6～3重量%、好ましくは1.8～2.4重量%のアガロースゲルおよび、例えば0.1% SDSを含むトリス-グリシンバッファーからなる電気泳動バッファー(混合物:12.12gのトリス、57.8gのグリシンおよび2gのSDSを脱イオン水で2,000mlにした)を用い、10℃に冷却して行った。電気泳動セルに2,000mlの電気泳動バッファーを装荷した。次いでゲルを挿入し、予備の電気泳動において再平衡化した。この予備的電気泳動は、25V/最大ワット/0.5時間(できるかぎり迅速にゲルを再平衡化するために循環ポンプを運転する)で行った。

【0036】

この電気泳動に関して、ゲルは、ロードする場所が陰極に向けられるように電気泳動チャンバーに置かれ、そしてそのゲルは電気泳動の間中使用される電圧に対して水平かつ面平行に置かれる。温度が電気泳動の間8℃以下にならずそして14℃を超えないように気をつけた。

【0037】

試料のロードは、予備の電気泳動の後に行った。試料を、試料バッファー(好ましくは、例えば、AnamedまたはNovexからのSDS-およびブROMフェノールブルー含有試料バッファー)中においてウォーターバスで3分間ボイルし、そして1レーンあたり20μlに分けてゲルウェルにロードした。

【0038】

試料電気泳動は、25V/最大ワット/0.5時間で行った。これにより、ゲルマトリックスへの試料の浸透が引き起こされた。

メインの電気泳動は、50V/最大パワー/0.5時間;次いで75V/最大ワットでブROMフェノールブルーの前方がゲルの終わりに到達するまで行った(試料電気泳動の後すぐ)。

【0039】

クマシーブルー染色に関して、ゲル(好ましくは例えばElchrom Scientificのシート上のアガロースゲル)を、例えばエタノール、酢酸および水の混合物(25/3/72; v/v)中で0.5時間固定した。次いでゲルを、アガロースが濁って見えるようになるまで(約2～3時間)ろ紙の層で圧力下に圧縮した。次いでそのゲルをアガロースが透き通って見えるまで(約1～2時間)40℃の乾燥オーブン中でさらに乾燥した。その後、このゲルを、一晚40℃で穏やかに振盪しながらクマシーブルーで染色した(0.01% Serva blue G、6% 硝酸アンモニウム、0.2% 酢酸ナトリウム、4ml/165% HNO₃)。翌朝、ゲルを水で一度簡単にリンスした。ゲル支持体に付着した色素をアルコールを染み込ませたろ紙上でバックキング側を外すことにより除去した。次いでこのゲルを再度アガロースが濁るまで(約1時間)圧力下に圧縮し、次いでアガロースが透き通って見えるまで(約1～2時間)40℃の乾燥オーブンでさらに乾燥した。

【0040】

最後に、乾燥したゲルを評価並びに長期間のドキュメンテーションおよび保管するためにそれを保存するため、特別なフィルム中に密封するか又はラミネート加工した。

【0041】

ウェスタンブロット免疫染色(SAGE-WISA)に関して、ここではバックキングのないアガロ

10

20

30

40

50

ースゲルが好ましくは用いられ、ブロットバッファーが分析の日の朝に新しく作製され(35.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 、6.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ および10 mlの20%強度のSDS水溶液は、脱イオン水を用いて5,000 mlにした)、冷蔵庫で+12℃～+14℃に冷却され(約3時間の期間)、次いでブロットチャンバーおよび反応皿に入れられた。ブロットチャンバーの冷却を+8℃に調整した。膜(ニトロセルロースまたは一好ましくは-PVDF膜、好ましくはMilliporeのImmobilon-P 0.45 μm トランスファーマンブレン)および100×100 mmにカットされた1枚のペーパーボード(例えば165×65, Sarstedt AG)を、少なくとも0.5時間穏やかに振盪する間にブロットバッファーでのブロッティング前に平衡化した。

【0042】

10

完全なブロットサンドイッチを、以下のように、ブロットバッファーで満たされたブロットバッファーディッシュ中で組み立てた：

1. ブロットフレーム(マイナスフレーム)
2. 薄いスポンジシート
3. ペーパーボード(100×100 mm)
4. ブロット保護膜
5. (好ましくは2つのフィルターストリップ(100×10 mm)がゲルの左右に各場合置かれ)泡が除去されたアガロースゲル
6. ブロット膜(0.45 μm)
7. ペーパーボード(100×100 mm)
8. ブロットフレーム(プラスフレーム)。

20

【0043】

ゲル下の気泡は、指(保護手袋)で除去した。

ブロッティングは、75分間、最大パワーにおいて20 Vで、 $8 \pm 2^\circ\text{C}$ に冷却および攪拌しながら、当業者に本質的に公知の方法により行った。

【0044】

次いで、ブロットサンドイッチを分解し、ブロット膜をブロッキング溶液と共に反応皿に置いた(ゲル上に置かれた側が上でなければならない)。膜を15分間振盪しながらBSAバッファー(トリス-緩衝化生理食塩水、pH 8.0中に1%ウシ血清アルブミン(BSA))中でブロックした。次いで免疫染色を実施した。

30

【0045】

1. 1次抗体(0.5% BSA バッファー中の50 μl のウサギ抗-フィブリノゲン(例えばウサギ/抗-ヒト/ヒト、DAKO))と一緒に45分間インキュベーション。

2. 脱塩水で簡単に膜を3回リンス。

3. 0.5% BSA バッファーを含む50 mlのトリス-緩衝化生理食塩水で15分間洗浄。

4. 2次抗体(例えば50 mlの0.5% BSA バッファー中50 μl のヤギ抗-ウサギ IgG-Ap (アルカリフォスファターゼ標識; Sigma)と一緒に45分間インキュベーション。

5. 脱塩水で簡単に膜を3回リンス。

40

6. 50 mlのBSA バッファーで15分間洗浄。

7. タブ中で膜を50 mlの基質溶液(50 mlの0.5% BSA バッファーまで2錠のBCIP/NPT (Sigma))と一緒に室温で15分間インキュベーション。

8. 脱塩水を用いて数回洗浄することにより反応を停止。

9. +40℃まで加熱されたホットプレート上にブロッティング膜を置き、1枚のペーパーボードで覆い、そしてローラーを用いて余分な水分を除去。

10. 最後に、ブロット膜を、評価並びに長期間のドキュメンテーションおよび保管のためにそれを保存するため、特別なフィルム中に密封するかまたはラミネート加工した。

【0046】

ブロットまたはクマシーブルーで染色されたゲルのドキュメンテーションは、ラミネー

50

ト加工形態で原物としてまたは写真もしくは走査により行った。

【0047】

(ラミネート加工された)染色されたゲルまたは(ラミネート加工された)免疫染色されたブロット膜をスキャナーに通し、適切なソフトウェア(例えばPharmaciaの「1-D-Elite」, Version Image Master 4.10ソフトウェアを使用)を用いてデンシトメトリーにより評価した。

【0048】

C. vWFマルチマーの画分の評価

【実施例1】

【0049】

Bio-Radプレキャスト1%アガロースゲルにおける標準ヒト血漿の連続希釈物のSAGE-WISA
標準ヒト血漿(Dade Behring)を連続幾何学的希釈において脱塩水を用いて希釈した。この希釈物を、図1で示される最終濃度が得られるように、1:1 (v/v)で試料バッファーと混合した。この試料を、試料バッファー(好ましくは、例えばAnamedまたはNovexの、SDSおよびブロモフェノールブルー含有の試料バッファー)中においてウォーターバスで3分間ボイルし、そしてゲルウェルに1レーンあたり20 µlに分けてロードした。染色されたブロッティング膜のスキャンが図1に示され、そしてそのデンシトメトリー評価が図2に示される。そのピーク群が、(4)と同様に定量された。

10

【実施例2】

【0050】

Bio-Radプレキャスト1%アガロースゲルにおけるHaemate-HS^(R)の連続希釈物のSAGE-WISA

20

Haemate-HS^(R)(Aventis Behring)を、連続幾何学的希釈で脱塩水を用いて希釈した。この希釈物を、図3で示される最終濃度が得られるように、1:1 (v/v)で試料バッファーと混合した。この試料を、ウォーターバスで3分間ボイルし、そしてゲルウェルに1レーンあたり20 µlに分けてロードした。染色されたブロッティング膜のスキャンが図3に示され、そしてそのデンシトメトリー評価が図4に示される。そのピーク群が、(4)と同様に定量された。

【実施例3】

【0051】

Elchrom Scientific AGプレキャスト1%アガロースゲルにおけるHumate-P^(R)およびHaemate-HS^(R)のSAGE-CB

30

Humate-P^(R)およびHaemate-HS^(R)を、図5で示される濃度に試料バッファーを用いて希釈し、ウォーターバスで3分間ボイルし、そしてゲルウェルに1レーンあたり20 µlに分けてロードした。染色されたゲルのスキャンが図5に示され、そしてそのデンシトメトリー評価が図6に示される。そのピーク群が、(4)と同様に定量された。

図4(ブロット膜)および図6(ゲルのブルー染色)からのvWF試料のデンシトメトリー評価の比較は、ウェスタンブロットにおけるバンド11以上の百分率含量は約18%であるが、ブルー染色ではほとんど2倍近く大きい、約40%であることを示す。この所見は、高分子量バンドがあまりよくブロットされないという(8)に開示されている観察を強調する。Perutelliは、放射性抗体結合体(オートラジオグラフィーまたはルミノグラフィー)を使用してゲルにおけるマルチマーバンドの直接的染色によりこのウェスタンブロットの弱点を克服している。それに対して、本発明により使用されたブルー染色は、感度が弱い、全く害を及ぼさないという利点を有する。

40

【0052】

D. フィブリノゲンマルチマーの画分の評価

【実施例4】

【0053】

Elchrom Scientific AGプレキャスト2%アガロースゲルにおけるフィブリノゲンのSAGE-CB

50

試料を、試料バッファーと1:1 (v/v)で混合し、ウォーターバスで3分間ボイルし、そしてゲルウェルに1レーンあたり20 µl (360 µgフィブリノゲン; 18 mg/ml)に分けてロードした。クマシーブルーで染色されたゲルのスキャンが図7に示される。

【実施例5】

【0054】

Elchrom Scientificプレキャスト2%アガロースゲルにおけるフィブリノゲンのSAGE-WISA

フィブリノゲン試料(90 g/l)を、脱塩水で1:100 (v/v)に希釈し、次いで試料バッファーで1:12 (v/v)に希釈し、ウォーターバスで3分間ボイルし、そしてゲルウェルに1レーンあたり20 µlに分けてロードした。

免疫染色プロットティング膜のスキャンが図8に示される。この場合、このアガロースゲルは、プロットティングのためにバックキングシートから取り外される。

【実施例6】

【0055】

Elchrom Scientificプレキャスト2%アガロースゲルにおけるHumate-P^(R)のSAGE-WISA

Humate試料を実施例2と同様にMQ水で予備希釈し、そして図3、レーン2で示される最終濃度が得られるように(0.1 IU/ml)、1:1で試料バッファーと混合した。このHumate試料をウォーターバスで3分間ボイルし、そしてElchrom Scientificの2%アガロースゲルにおいて、ゲルウェル2~7において1レーンあたり20 µlに分け、標準ヒト血漿(レーン1およびレーン8)と対比して測定した。メインの電気泳動は、1%ゲルにおける測定と比較して3~4.5時間増加させた。プロットティングおよびゲル染色は、実施例2と同様に行った。レーン1~4の低分子量領域の、染色されたプロットティング膜のスキャンおよびデンシトメトリー評価が、図9に示される。この場合、アガロースゲルはプロットティングのためのバックキングシートから外された。標準ヒト血漿と比較して、Humate-Pの低分子量マルチマーバンドは、微細な構造(ダブルバンドへの分割)を示した。

【0056】

参考文献リスト:

1. Connaghan, D.G., Francis, C.W., Lane, D.A.; Marder, V.J. (1985) Specific identification of fibrin polymers, fibrinogen degradation products and crosslinked fibrin degradation products in plasma and serum with a new sensitive technique. Blood 65 (3) 589 - 97.
2. Proietti, A.B.; McGuire, M.; Bell, W. (1990) Specific identification of fibrin(ogen) degradation products in plasma and serum using blotting and peroxidase labeled antiserum. American Journal of Hematology 34 (4) 270 - 4.
3. Raines, G.; Aumann, H.; Sykes, S.; Street A. (1990) Multimeric analysis of von Willebrand factor by molecular sieving electrophoresis in sodium dodecyl sulphate agarose gel. Thrombosis Research 60 (3) 201 - 12.
4. Metzner, H.J.; Hermentin, P.; Cuesta-Linker, T.; Langner, S.; Mueller, H.-G. and Friedebold, J. (1998) "Characterization of factor VIII/von Willebrand factor concentrates using a modified method of von Willebrand factor multimer analysis" Haemophilia (1998), 4 (Suppl. 3), 25 - 32.
5. Coon and Bayer (1995) Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis 1, 31-3
6. Tatewaki et al., (1989) Thromb. Res. 56, 191 - 9
7. Ruggeri and Zimmermann (1981) Blood 57: 1140 - 3
8. Perutelli, P., Haematologica 2002; 87:223-224

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】標準ヒト血漿の連続希釈物におけるSAGE-WISAで染色されたプロットティング膜のスキャンである。

【図2】標準ヒト血漿の連続希釈物におけるSAGE-WISAのデンシトメトリー評価である。

【図 3】 Haemate-HS^(R) の連続希釈物における SAGE-WISA で染色されたブロットニング膜のスクリーンである。

【図 4】 Haemate-HS^(R) の連続希釈物における SAGE-WISA のデンシトメトリー評価である。

【図 5】 Humate-P^(R) および Haemate-HS^(R) における SAGE-CB で染色されたゲルのスクリーンである。

【図 6】 Humate-P^(R) および Haemate-HS^(R) における SAGE-CB のデンシトメトリー評価である。

【図 7】 フィブリノゲンの SAGE-CB で染色されたゲルのスクリーンである。

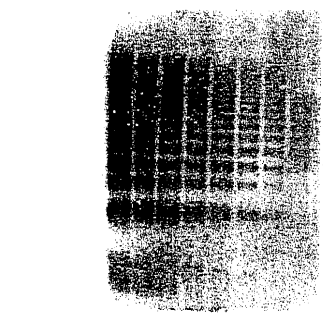
【図 8】 フィブリノゲンの SAGE-WISA で染色されたブロットニング膜のスクリーンである。

【図 9】 Humate-P^(R) の SAGE-WISA のデンシトメトリー評価である。

10

【図 1】

実施例 1 の染色されたブロットニング膜のスクリーン



レーン 1 2 3 4 5 6 7 8
最終希釈 1:10 20 40 80 160 320 640 1280

【図 2】

最終希釈	1:10
1 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	40
6-10	30
11...	30

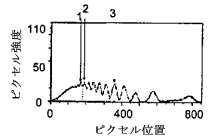
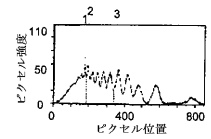
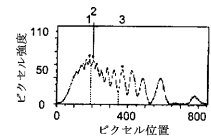
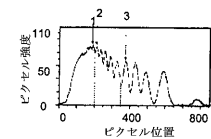
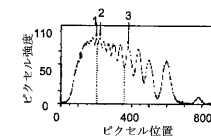
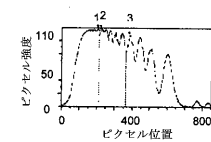
最終希釈	1:20
2 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	38
6-10	33
11...	29

最終希釈	1:40
3 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	36
6-10	31
11...	33

最終希釈	1:80
4 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	38
6-10	32
11...	30

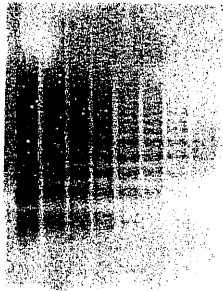
最終希釈	1:160
5 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	41
6-10	35
11...	24

最終希釈	1:320
6 標準ヒト血漿	
バンド (%)	
1-5	40
6-10	33
11...	27



【図 3】

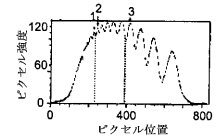
実施例 2 の染色されたプロットング膜のスクリーン



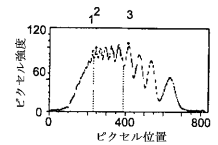
レーン	1	2	3	4	5	6	7	8	
最終希釈 (1/ml)		1: 0.2	2: 0.1	3: 0.05	4: 0.025	5: 0.0125	6: 0.006	7: 0.003	8: 0.0015

【図 4】

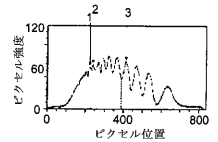
最終希釈	0.2 IU/ml
1	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	47
6-10	35
11...	18



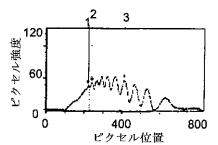
最終希釈	0.1 IU/ml
2	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	44
6-10	37
11...	18



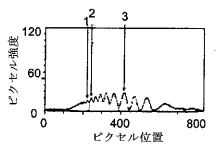
最終希釈	0.05 IU/ml
3	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	42
6-10	39
11...	19



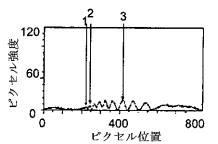
最終希釈	0.025 IU/ml
4	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	41
6-10	43
11...	16



最終希釈	0.0125 IU/ml
5	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	47
6-10	38
11...	16

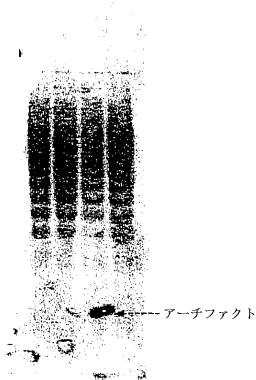


最終希釈	0.006 IU/ml
6	Haemate HS
バンド (%)	
1-5	81
6-10	3
11...	16



【図 5】

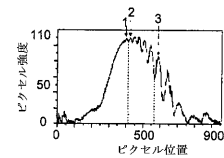
実施例 3 のクマシーブルー染色されたゲルのスクリーン



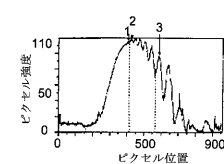
5	Humate-P (150 μ l サンプル + 50 μ l バッファー)
6	Humate-P (200 μ l サンプル + 50 μ l バッファー)
7	Haemate-HS (150 μ l サンプル + 50 μ l バッファー)
8	Haemate-HS (200 μ l サンプル + 50 μ l バッファー)

【図 6】

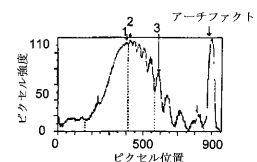
レーン	5
Humate-P	
バンド (%)	
1-5	23
6-10	40
11...	38



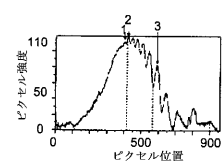
レーン	6
Humate-P	
バンド (%)	
1-5	25
6-10	40
11...	36



レーン	7
Haemate-HS	
バンド (%)	
1-5	19
6-10	40
11...	41

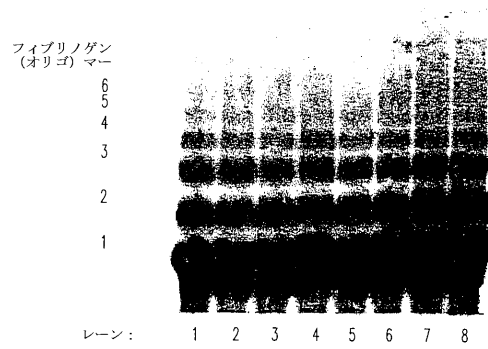


レーン	8
Haemate-HS	
バンド (%)	
1-5	20
6-10	38
11...	43



【図 7】

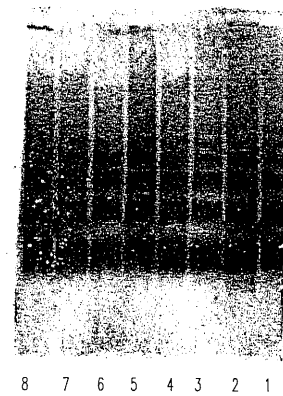
実施例4のクマシーブルー染色されたゲルのスキャン



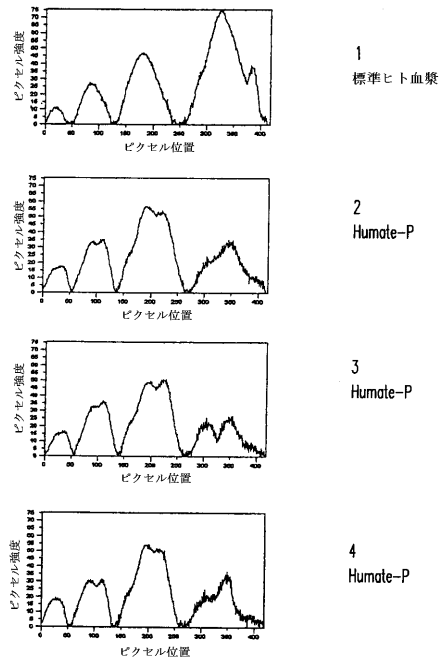
【図 8】

実施例5の免疫染色されたブロッティング膜のスキャン

レーン1 および 8: フィブリノゲン対照サンプル
 レーン2-7: 種々のフィブリノゲンパッチ



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード (参考)
G O 1 N 27/26 3 1 5 J

(72)発明者 ペーター・ヘルメンティン
ドイツ連邦共和国 3 5 0 4 1 マルブルク、フォイアードルンヴェーク 8
(72)発明者 トーマス・クヴェイスターリンカー
ドイツ連邦共和国 3 5 0 8 3 ヴェッター、ザウレヘッケ 7
(72)発明者 カールーハインツ・シュミット
ドイツ連邦共和国 3 5 0 9 6 ヴァイマル (ラーン)、エルベルトスヴァルト 7
F ターム (参考) 2G045 DA36 FB03 FB05

专利名称(译)	测量血浆蛋白多聚体的方法		
公开(公告)号	JP2004132987A	公开(公告)日	2004-04-30
申请号	JP2003351978	申请日	2003-10-10
申请(专利权)人(译)	安万特灵公司GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ペーターヘルメンティン トーマスクヴェイスタリンカー カールハインツシュミット		
发明人	ペーターヘルメンティン トーマスクヴェイスタリンカー カールハインツシュミット		
IPC分类号	G01N33/483 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/561 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/86 G01N27/44739 G01N2333/75 G01N2333/755		
FI分类号	G01N27/26.301.A G01N33/483.F G01N33/53.D G01N27/26.315.F G01N27/26.315.G G01N27/26.315.J G01N27/447.301.A G01N27/447.315.F G01N27/447.315.G G01N27/447.315.J		
F-TERM分类号	2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	10247876 2002-10-14 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过凝胶电泳定性和定量测量纤维蛋白原和血管性血友病因子多聚体的方法。 解决方案：使用连续，均匀，无聚集的琼脂糖凝胶通过海底电泳分离含有血管性血友病因子（vWF）或纤维蛋白原的样品，并在印迹膜上分离多聚体带用特异性抗体 - 酶缀合物进行的Western印迹分析，通过免疫化学或通过合适的染料，优选在凝胶中，优选蓝色染色。 【选择图】无

特開2004-132 (P2004-1329 (43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4			
(51) Int. Cl. ⁷ G01N 27/447 G01N 33/483 G01N 33/53	FI GOIN 27/26 301A GOIN 33/483 F GOIN 33/53 D GOIN 27/26 315F GOIN 27/26 315G	テーマコード (参考) 2G045	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 15 頁) 最終頁に			
(21) 出願番号 特願2003-351978 (P2003-351978) (22) 出願日 平成15年10月10日 (2003.10.10) (31) 優先権主張番号 10247876.7 (32) 優先日 平成14年10月14日 (2002.10.14) (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)	(71) 出願人 597070264 アベンティス・ベアリング・ゲゼルシ ト・ミット・バシュレンクテル・ハフ グ ドイツ連邦共和国デー 35002マ ルク・ポストファハ1230 (74) 代理人 100091731 弁理士 高木 千嘉 (74) 代理人 100080355 弁理士 西村 公佑 (74) 代理人 100127926 弁理士 結田 純次 (74) 代理人 100105290 弁理士 結田 純次		