

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00805979.9

[43] 公开日 2002 年 9 月 11 日

[11] 公开号 CN 1368888A

[22] 申请日 2000.8.10 [21] 申请号 00805979.9

[30] 优先权

[32] 2000.2.8 [33] KR [31] 2000/5808

[86] 国际申请 PCT/KR00/00882 2000.8.10

[87] 国际公布 WO01/58482 英 2001.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.8

[71] 申请人 金晓骏

地址 韩国京畿道安山市

[72] 发明人 金晓骏 曹基胜 李相旻

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

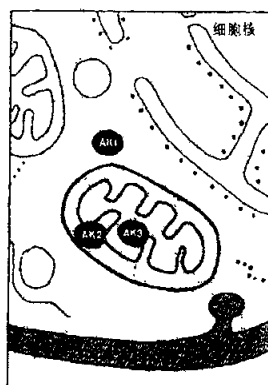
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图页数 9 页

[54] 发明名称 用于心脏病的抗人线粒体腺苷酸激酶同工酶抗体, 诊断制剂和诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及利用人线粒体腺苷酸激酶同工酶的用于心脏病的免疫制剂和诊断试剂盒。本发明提供了用于心脏病的免疫制剂和诊断试剂盒, 其特征在于利用了存在于肌肉细胞中的心肌细胞但不存在于骨骼肌细胞中的腺苷酸激酶同工酶作为心脏病的诊断标记, 因此能够更正确和容易地诊断心脏病。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 人线粒体腺苷酸激酶同工酶 AK2 和 AK3 特异性的免疫球蛋白和其部分，其特征在于所述免疫球蛋白是由与包括人线粒体腺苷酸激酶同工酶和其部分的免疫原有反应性的动物种类产生的。

5

2. 根据权利要求 1 的免疫球蛋白，其中从人器官得到的或遗传重组形式得到的所述人线粒体腺苷酸激酶同工酶是人线粒体腺苷酸激酶同工酶 2 (AK2) 或人线粒体腺苷酸激酶同工酶 3 (AK3)。

10

3. 根据权利要求 1 或 2 的免疫球蛋白，其中所述免疫球蛋白选自 IgA、IgG、IgM、IgD、IgE、IgY、 Fab、Fab' 或 F(ab)'₂ 的片段。

15

4. 根据权利要求 1 或 2 的免疫球蛋白，其中所述动物种类是多克隆的。

5. 根据权利要求 1 或 2 的免疫球蛋白，其中所述动物种类是单克隆的。

20

6. 用于诊断心脏病的免疫制剂，由权利要求 1 的免疫球蛋白和检测标记组成。

25

7. 根据权利要求 6 用于诊断心脏病的免疫制剂，其中所述检测标记选自放射性同位素标记、酶、化学发光化合物、荧光素、藻胆蛋白、稀土螯合剂、荧光物质例如 rodamine、辅酶、链霉抗生物素蛋白和生物素。

30

8. 用于检测生物样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，其中将权利要求 6 的免疫制剂与生物样品接触以检测所述结合的免疫球蛋白标记。

9. 根据权利要求 6 用于检测生物样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，其中所述生物样品是尿、血液或从人体分离的血清或血浆。

5 10. 用于诊断心脏病的诊断试剂盒，含有可药用载体和与检测标记偶联的权利要求 1 的免疫球蛋白。

10 11. 根据权利要求 10 的用于心脏病的诊断试剂盒，其中所述检测标记选自放射性标记、酶、金颗粒、化学发光化合物、荧光素、藻胆蛋白、稀土螯合剂、荧光物质例如 rodamine、辅酶、链霉抗生物素蛋白和生物素等。

12. 根据权利要求 10 的用于心脏病的诊断试剂盒，其中还另外包括阳性和阴性对照。

15 13. 用于检测待检样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，该方法包括下列(a)、(b)和(c)步骤：

(a) 通过分别将检测样品和对照样品与抗腺苷酸激酶同工酶抗体或其部分反应而产生免疫复合物；

20 (b) 检测在所述步骤(a)中得到的免疫复合物；和

(c) 比较检测样品和对照样品的检测结果。

25 14. 根据权利要求 13 的检测待检样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，其中所述人线粒体腺苷酸激酶同工酶是人线粒体腺苷酸激酶同工酶 2 (AK2) 或人线粒体腺苷酸激酶同工酶 3 (AK3)。

30 15. 根据权利要求 13 或 14 的检测待检样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，其中所述检测步骤用选自免疫荧光抗体法、酶-底物颜色显色法、化学发光化合物结合法和金颗粒复合物法中的任一种方法完成。

16. 根据权利要求 13 或 14 的检测待检样品中腺苷酸激酶同工酶的方法，其中对照样品是通过免疫荧光抗体法、酶-底物颜色显色法、化学发光化合物结合法和金颗粒复合物法中的任一种方法检测为阳性的血清。

5

说明书

用于心脏病的抗人线粒体腺苷酸激酶同工酶抗体，
诊断制剂和诊断试剂盒

5

技术背景

本发明涉及利用人线粒体腺苷酸激酶同工酶的免疫制剂和诊断试剂盒，更具体地说，涉及用于心脏病的免疫制剂和诊断试剂盒，其特征在于利用具有心肌特异性表达的腺苷酸激酶同工酶 AK3 作为包括心
10 肌梗死、心绞痛等在内的心脏病的诊断标记，由此能够更正确和容易地诊断心脏病而不会造成因极小的诊断区别导致的误诊。

背景技术

心脏病如急性心肌梗死作为一种成年人疾病主要在 40 岁以上的人群中发生，发病率超过 50%，世界上死于心脏病的患者逐年增加。
15 在国内的综合性医院中为了诊断心脏病每个月要完成平均 200 或更多的检测。在美国，每年有 100 多万患胸痛的人进入医院急诊室。

过去诊断胸痛病人是否患心脏病的一般方法是利用心电图（ECG 或声波术）。用 ECG 诊断心肌梗死时，通过 ECG 的异常 ST-T 波和 Q 波的改变来确定心肌梗死。但是，50% 或更多的进入医院的心肌梗死患者被误诊，约 5% 的患者被送回家，16% 的患者因误诊而导致死亡。
20

为了解决这些问题，开发了心肌梗死的生物学标记物。理想的心肌梗死生物学标记物应符合下列要求。
25

首先，所述标记应仅存在于心肌细胞并随肌细胞的坏死而被释放到血液中。

30

第二，在心肌受损后，所述标记应被迅速释放到血液中，这取决于所述生物学标记的细胞分布和分子大小。

5 第三，心脏受损程度与释放的生物学标记的数量之间应呈线性关系。

第四，进行检测不需要特殊的培训和技巧，检测所用试剂的成本应能够持续保持低廉。

10 第五，患者感觉胸痛后，血液中生物化学标记的病理学浓度应增加。

第六，释放的生物学标记应能够被迅速取出，以便确定持续的心肌梗死。

15 但是，遗憾的是，目前还没有得到满足上述这些要求的生物学标记。

20 目前，用肌酸激酶（CK）质谱检测和肌钙蛋白检测作为心肌梗死诊断的生物化学标记。CK 在肌肉组织中为 MM 型，在脑和骨髓中为 BB 型，在骨骼肌或心肌中为杂种 MB 型，它们的血清浓度作为心脏组织损伤的指标。具体地说，已知 CK-MB 为一种可以表明急性心肌梗死程度的酶，在所有肌肉疾病例如烧伤、创伤、心脏和骨骼肌疾病中，其血液效能（potency）有约 5% 的变化幅度。但是，利用 CK-MB 诊断心肌梗死存在很多限制：有约 20% 的假信号，从而降低了检测精确度，因此不能够作为一种可靠的诊断方法。目前，世界卫生组织（WHO）提出的心肌梗死的诊断标准是：（1）传统胸痛，（2）ECG 的 Q 波异常，（3）生物化学标记物应超过参考范围。如果一个患者符合至少上述两项标准，则应将其最终确诊为心肌梗死患者。所
25 30 述的生物化学标记物应属于诊断急性心肌梗死的急性压塞之症的一部

分。

另外，Boyce N 等开发了一种心脏肌钙蛋白 T(cTnT)检测以减少因使用肌酸激酶(CK-MB)作为常规心脏损伤指标而引起的误诊[参考《临床实验室新闻》Clinical Laboratory News,22(1),1-14(1996)]。美国食品药物管理局(FDA)批准了该检测，并由 Boehringer Mannheim Diagnostics Co., Ltd.将其商业化为一种产品。自 1996 年 11 月，美国已开始使用该产品，现在使用肌钙蛋白 I 检测，因为据证实它与骨骼肌衍生的肌钙蛋白 T 发生交叉反应。但是，cTnT 和 cTnI 都是在胸痛后 12—24 小时内释放的，因此不能作为早期指标。[参考“Eisenbrey 等,(1995) The Journal of American Medical Association, 74, 1343-1344”]。因此，这些检测不是令人满意的可供选择的检测。因此，它们仅被用作 CK-MB 检测的辅助方法。仅在少数综合性医院有限地使用所属诊断方法，因为它们需要昂贵的检测装置、心脏专家和受过培训的人员，因此增加了昂贵的诊断成本。此外，需要持续检测的患者很难使用肌钙蛋白，因为在韩国医疗保险仅允许使用一次肌钙蛋白。

如上所述，就 AMI 发作后的诊断精确度和诊断时间而言，现有的用于诊断心脏病的生物学指标不能令人满意。因此，需要一种诊断心肌损伤的新的诊断指标，它能够更精确迅速地诊断而不需要昂贵的检测装置，并且可对小规模临床和个人进行心脏病诊断。

本发明公开

本发明的目的是将人线粒体腺苷酸激酶用于诊断心脏病和心肌梗死的能够提供极佳的精确度和灵敏度的免疫制剂和诊断试剂盒，其特征在于能够满足心肌梗死理想生物学标记物所有要求的诊断指标候选物特异性地存在于心肌组织，而且使用具有不同亚细胞分布的并能够特异性识别人线粒体腺苷酸激酶同工酶的抗-AK 抗体。

也就是说，本发明提供一种人线粒体腺苷酸激酶同工酶(AK)

的特异性免疫球蛋白和其部分，其特征在于所述免疫球蛋白是用包括人线粒体腺苷酸激酶同工酶（AK）和其部分作为免疫原在动物体内产生的。

5 本发明还提供了包括免疫球蛋白和检测标记物的组合在内的免疫制剂。

 本发明还提供了用于心脏病的诊断试剂盒，包括结合检测标记物的本发明所述的免疫球蛋白和可药用的载体。

10 本发明还提供了在检测样品中检测人线粒体腺苷酸激酶同工酶 3（AK3）的方法，该方法包括步骤(a)、(b)和(c)：

 (a) 通过分别将检测样品和对照样品与抗腺苷酸激酶同工酶 3（AK3）抗体或其部分进行免疫反应，从而产生免疫复合物；

15 (b) 检测在所述步骤(a)中得到的免疫复合物；和

 (c) 比较检测样品和对照样品的检测结果。

附图简述

 图 1 是说明细胞中腺苷酸激酶同工酶的亚细胞分布的示意图。

20 图 2 是说明腺苷酸激酶同工酶 3（AK3）的 PCR 产物的电泳图；

 图 3 是 PCR2.1-AK3 的基因图谱。

 图 4 是通过特异性限制酶消化的质粒图。

 图 5 是限制酶消化图。

 图 6 是 pQE 30-AK3 的基因图谱。

25 图 7a 是 AK3 的 SDS-PAGE 结果图。

 图 7b 是 AK3 Western 印迹分析结果图。

 图 8a 是 AK1 的 SDS-PAGE 的结果图；

 图 8b 是 AK1 Western 印迹分析结果图；

 图 9a 是 AK2 的 SDS-PAGE 的结果图；

30 图 9b 是 AK2 Western 印迹分析结果图；

图 10 是抗 AK3 兔抗体的纯化过程图；

图 11 是 AK 同工酶的纯化重组体图；

图 12 是纯化的抗 AK 同工酶抗体间的交叉反应结果图；

图 13 是 AK 同工酶的组织分布图；

5 图 14 是在取代或非取代条件下，用心肌梗死患者血清的抗 AK2 抗体和抗 AK3 抗体得到的 Western 印迹分析结果；

图 15 是 AK 和人血清的天然凝胶电泳迁移图；

图 16 检测患者血清中 AK3 的 Western 印迹分析结果图；

图 17 是实施例 6 中 AK3 的 Western 印迹结果图。

10

完成本发明的最佳方式

以下参考附图详细描述本发明的优选实施方案。

15 本文术语“生物学样品”指从人体分离的体液或其部分，例如尿液、血液、血清和血浆。

20 本文术语“检测标记物”指用于检测免疫复合物的标记物，例如放射性同位素标记、金颗粒、酶、化学发光化合物、荧光素、藻胆蛋白、稀土螯合剂、荧光物质例如 rodamine、辅酶、生物素、链霉抗生物素蛋白等。

25 本文术语“单克隆”指从一种克隆的杂交瘤细胞系统和能够产生单一种类抗体的系统衍生的免疫球蛋白细胞，所述抗体是通过细胞融合例如杂交瘤细胞系产生的。

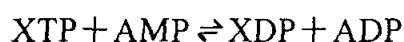
本文术语“多克隆”指能够产生免疫球蛋白的系统，所述免疫球蛋白衍生于对免疫原有一般多亲和性的多种细胞，其中“免疫球蛋白”通常指在具有所需免疫的动物中合成的免疫球蛋白。

30 本文术语“线粒体腺苷酸激酶同工酶”指线粒体腺苷酸激酶同工

酶本身例如线粒体腺苷酸激酶同工酶 2 (AK2) 和线粒体腺苷酸激酶同工酶 3 (AK3), 其基因重组蛋白和人工突变体以及天然突变体。

5 本文术语“线粒体腺苷酸激酶同工酶的部分”指消化的或截短的线粒体腺苷酸激酶同工酶的肽片段, 包括线粒体腺苷酸激酶同工酶的抗体反应性部分。

腺苷酸激酶 (AK) 是通过催化细胞中 XTP、ADP 和 AMP 的可逆的磷酸转移反应保持腺苷酸核苷酸间的快速动力平衡的酶 (如下反应所示):



(其中, XTP 代表 ATP 或 GTP)

15 所述酶是磷酸化反应所需的一种酶, 磷酸化反应与细胞代谢活性和信号转移有关。还已知所述酶参与能量代谢、细胞程序死亡、肿瘤产生等, 而且据报道在生物系统中包括约 40 种同工酶[参考 Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii, T., Fujii,., Miwa, S., Sakurai, M., & Nakazawa, A. (1989) J. Biol. Chem. ,264, 10148-20 10152]。

如图 1 所示, 脊椎动物细胞有 3 种亚型的同工酶, 即胞质中的 AK1(EC 2.7.4.3), 线粒体膜间隙中的 AK2 和线粒体基质中的 AK3 (EC2.7.4.10) [参考 Kuby, S.A., Palmieri, R. H., frischat, A., Wu, L.H., Maland, L., & Manship, M.(1984) Biochemistry 23, 2392-2399; Sachsenheimer, W., & Schulz, G.E.(1997) J. Mol.Biol.114, 23-36; Egner, U., tomasselli, A.G., & Schulz, G.E. (4978)J. Mol.Biol.195,649-658]。基于与牛和鼠 AK3 的相似性鉴定了推测的人 AK3。但是, 人 AK3 cDNA 与新鉴定的鼠 AK4 基因更相关, 因此, 人 AK3 已被重新命名为 AK4

25

30 [Yoneda, T., Sato, M., Maeda, M., Takagi, H. (1998) Identification of a

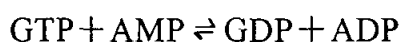
novel adenylate kinase system in brain; cloning of the fourth adenylate kinase. Mol. Brain. Res., 62,187-195]。

5 在本文中，我们将使用 AK3 的名称，而不是 AK4，因为鼠 AK4 是一种脑型同工酶，但在人脑中不标的 AK3。在人中，最近鉴定 AK5 为脑型同工酶。

10 已克隆了人 AK2 基因 (hAK2) 的两种亚型基因, AK2A 和 AK2B。此外，已在许多组织例如心肌、骨骼肌、肝等组织中证实了存在 hAK1 和 hAK2 的 mRNA[参考 Lee, Y., J.W. Kim, L.A. Lee, H.B. Kang, Y. K. Choe, H.G. Lee, J.S. Lim, H.J. Kim, C.K. Park, and I.S. Choe,(1996) Biochem. Mol. Biol. International, 39(4), 833-842]。这些遗传产物有组织特异性表达的。据报道 AK1 在心肌和骨骼肌中表达，但 AK2 在骨骼肌中不表达[参考 Lee, Y., .W. Kim, S.M. Lee, H.J. Kim, K.S.Lee, C. Park, &i.S.Choe(1998) J. Biochem.-tokyo, 123, 47-54]。

20 人腺苷酸激酶同工酶 3 (AK3) 是由 223 个氨基酸组成的磷酸转移酶，也称为“核苷三磷酸—腺苷酸磷酸转移酶”。Xu 等[参考 Xu, G., O'Connell, P., Stevens, J. And White, R.(1992)Characterization of human adenylate kinase 3(AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogene to an intron of the NF1 gene. Genomics 13; 537-542]确定了人基因 AK3 的排列和一级氨基酸排列。在本文所附的序列表中序列 1 中列出了人 AK3 氨基酸序列。

25 人腺苷酸激酶同工酶 3 催化下列反应 2:



[参考 Chiga, M., Rogers, A.E., Paut, G.W.E(1961)J. Biol. Chem.,236,1800; Albrecht, G. J., (1970) biochemistry, (9:2426)]。

30 与其他酶相比，对 AK3 酶的研究还尚未全面展开，也未报道过

人体中 AK3 酶的组织特异性。

已发现人体中 AK 酶的遗传缺陷会引起遗传性溶血贫血（参考
“Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii,
5 T., Fujii,., Miwa, S., Sakurai, M., & Nakazawa, A. (1989) J. Biol.
Chem. ,264, 10148-10152”），而且在肌肉和脑组织中，通过肌酸激
酶和 AK 的协作生物合成硫胺素焦磷酸。

本发明人第一次发现 AK3 与 AK2 一样在心肌中表达，但在骨骼
10 肌中不表达，他们利用这些事实诊断心脏病如心肌梗死。

本发明人从人肌肉组织中克隆了 AK2(hAK2)和 AK3(hAK3)基因
的线粒体同工酶，构建了 pQE-AK2 和 pQE-AK3 表达载体，然后通过
培养转化的大肠杆菌得到 1.1 mg AK2/升和 9.8 mg AK3/升培养液的重
15 组大肠杆菌表达系统，由此得到大量分离纯化的重组 AK2 和 AK3。

通过氨基酸组分分析已确定了重组 hAK 同工酶。已确定了 hAK2
的比活性和 pI 值分别为 1000 U/mg 和 6.6，hAK3 的比活性和 pI 分别
为 400 U/mg 和 >11.7。所述生理化学特性与从牛肝中分离的 AK3 同
20 工酶的相似。

为了考察组织特异性表达以发现 AK 同工酶的生理功能，用
hAK1、hAK2 和 hAK3 衍生兔的多克隆抗血清，通过除去其间交叉识
别同工酶的抗体得到抗-AK1、抗-AK2 和抗-AK3 抗体。利用所述
25 抗体用石蜡植入的组织得到免疫组织化学结果，在所有组织中均检测
到 hAK1，但 hAK2 仅在肝、脑、心肌、肾和肺中检测到，hAK3 仅在
肝、心肌、肾和肺中检测到。具体地说，已证实在两种组织中均检测
到 AK1，甚至用 Western 印迹分析在脑、心肌和骨骼肌中也检测到，
但 AK2 和 AK3 在骨骼肌中并不表达，因此表明有心脏特异性表达。
30 因此，取决于人器官，特别是心肌和骨骼肌间的腺苷酸激酶同工酶的

不同分布图证明所述腺苷酸激酶同工酶作为用于心细胞损伤的临床标记的可能性很高。

5 本发明的免疫球蛋白的特征在于是从与免疫原有反应性的动物系统产生的，所述免疫原含有人线粒体腺苷酸激酶同工酶（AK）和其部分。所述人线粒体腺苷酸激酶同工酶优选是人线粒体腺苷酸激酶同工酶 2（AK2）和人线粒体腺苷酸激酶同工酶 3（AK3）。本发明所用的所述免疫球蛋白（单克隆或多克隆的）限于 IgA、IgG、IgM、IgD、IgE 或 IgY，所有免疫球蛋白均可使用。没必要必需使用完全抗体，可以使用包括抗原结合区的抗体片段，例如 Fab、Fab' 或 F(ab)'₂ 片段。

10 所述腺苷酸激酶同工酶特异性的免疫球蛋白得自纯化后的腺苷酸激酶同工酶免疫的动物血清、通过融合脾淋巴细胞和骨髓瘤细胞而产生的杂交瘤细胞或者体外转化的淋巴细胞。更具体地说，通过本领域熟知的融合方法[参考 Kohler and Milstein(1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519]可产生腺苷酸激酶同工酶特异性单克隆抗体。于 2000 年 5 月 19 日将所述单克隆抗体保藏于汉城国立大学医学院的癌症研究中心内的韩国细胞系研究所（KCLRF）（地址：Youn-geon-dong, Chongro-ku, 汉城，韩国），保藏号为 KCLRF-BP-00030。在上述方法中，将产生分泌抗体的“杂交瘤”的融合的一种细胞之一用作免疫适宜的动物宿主例如用腺苷酸激酶同工酶注射的小鼠细胞，将另一种细胞作为癌症或骨髓瘤细胞系相融合。用聚乙二醇等本领域熟知的方法将上述两种细胞融合。通过标准组织培养使生产抗体的细胞增殖。用有限稀释技术通过亚克隆得到同种细胞，然后通过标准技术大量在体内或体外培养可产生腺苷酸激酶同工酶特异性免疫球蛋白的杂交瘤。

25 不用纯化就可使用上述方法得到的单克隆抗体，但也可以用常规方法纯化后以高纯度使用所述单克隆抗体。所述纯化方法包括，例如盐沉淀、离子交换层析和亲和层析。

5 通过常规方法可生产本发明所用的多克隆抗体，其中给动物注射纯化的腺苷酸激酶同工酶 2 或腺苷酸激酶同工酶 3，然后得到从所述动物收集的含抗体的血清。通过本领域的任一常规方法可纯化所述多克隆抗体，可从山羊、兔、绵羊、猴、马、猪、牛、狗等任一动物宿主中生产所述多克隆抗体。

10 根据本发明，在用常规方法分离后或者用常规遗传工程技术生物合成其多种片段后使用腺苷酸激酶同工酶。或者通过有机-蛋白质合成方法化学合成腺苷酸激酶同工酶 3 肽。

15 在本发明的另一实施方案中，提供了本发明免疫球蛋白与检测标记结合的免疫制剂。为了得到免疫制剂，检测标记可选自放射性标记、金颗粒、酶、化学发光化合物、荧光物质、辅酶、链霉抗生物素蛋白、生物素等。

20 根据本发明，用腺苷酸激酶同工酶特异性抗体检测包括血液或其他体液的生物样品中的腺苷酸激酶同工酶。具体地说，通过检测将本发明免疫制剂于所述生物样品接触而得到的所述结合的免疫球蛋白，可确定所述生物样品中的腺苷酸激酶同工酶。对本发明所用的检测方法没有具体的限制，例如有两种方法，一种是夹心酶联免疫吸附检测（ELISA），其中抗体黏附于微滴定板或 96 孔平板以便与血清样品反应，二级抗体黏附于其上以便进行酶学颜色显色，另一种方法是其中将通过在聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离的蛋白质印迹在硝酸纤维素或 PVDF 膜上以便与抗体反应。

30 根据本发明，诊断心脏病的试剂盒包括本发明的免疫球蛋白和可药用载体。由于诊断试剂盒仅需放置蛋白质组分，因此，本发明试剂盒可作成块或条型。例如，本发明用于心脏病的诊断试剂盒可分别包括腺苷酸激酶同工酶抗体和每个检测样品中所含的腺苷酸激酶同工

酶。可将腺苷酸激酶同工酶和腺苷酸激酶同工酶特异性抗体固定在膜的固相上并加以标记。当使用酶标记时，本发明的试剂盒可包括酶底物。在用二级抗体标记免疫复合物的检测中，本发明试剂盒可包括抗腺苷酸激酶同工酶抗体或腺苷酸激酶同工酶特异性二级抗体。另外，
5 本发明试剂盒还包括适宜的标准、阳性或阴性对照以及其他所需物质。

在本发明的其他实施方案中，提供了检测待测样品中的腺苷酸激酶（AK）的方法，所述方法包括下列步骤：

- 10 (a)通过分别将检测样品和对照样品与抗腺苷酸激酶同工酶（AK）抗体或其部分反应产生免疫复合物；
(b)检测在所述步骤(a)中得到的免疫复合物；和
(d) 比较检测样品和对照样品的检测结果。

15 在所述方法中，通过免疫荧光抗体法、酶底物颜色显色法、化学发光化合物结合法或金颗粒复合物法开始所述检测步骤。就所述对照样品来说，可以使用通过免疫荧光抗体法、酶底物颜色显色法、化学发光化合物结合法、金颗粒复合物法检测的血清。但是，本发明所用的检测方法不限于上述方法，可使用任何一种常规检测方法。

20 通过下列不以任何方式限制本发明范围的实施例来详细描述本发明的优选实施方案。

实施例 1：AK3 基因的克隆

25 （从人骨骼肌中提取总 RNA）

为了分离 RNA，将 1ml RNAzol(4M 硫氰酸胍，25 mM 柠檬酸钠，0.5% salcosyl，0.1 M 2-巯基乙醇)加到 100 mg 肌肉组织中，然后匀浆，向其中加入 100 微升氯仿，振荡 15 秒，在冰上放 15 分钟。将细胞溶解物溶液以 12,000 xg 离心 15 分钟以除去不溶的细胞碎片。将上清液
30 转移到新鲜试管中，向其中加入等量异丙醇，然后彼此混合得到混合

物，将混合物在-70℃培养 15 分钟。然后，在 4℃，将混合物以 12,000 xg 离心 15 分钟以使 RNA 颗粒沉淀。将 RNA 颗粒用 75% 乙醇洗涤，干燥，然后向其中加入 100 微升 DEPC-处理的水以提取总 RNA。

5 (通过 RT-PCR 制备 AK3 cDNA)

将上述分离的 10.5 微升总 RNA 与 1 微升 500 ng/微升寡聚 dT, 1.5 微升 2.5 mM dNTPs, 1 微升 100 mM DTT, 1 微升 200 单位/微升 MMLV 反转录酶, 6 微升 5X 反转录酶缓冲液和 9 微升 DEPC 处理的水混合, 得到 30 微升的总体积, 在 42℃反应 30 分钟, 然后在 75℃失活 30 分钟。为了组成 PCR 混合物, 用上述合成的 cDNA 作为模板 cDNA。向其中加入 8 微升 2.5 mM dNTPs, 1 微升 5 单位/微升 Ex taqDNA 聚合酶, 10 微升 10 x DNA 聚合酶缓冲液, 1 微升有义引物和 1 微升反义引物 (100 pmol/微升), 然后向其中加入蒸馏水以达到 100 微升的总体积。将该混合物在 98℃变性 10 秒, 在 55℃退火 30 秒, 在 72℃延伸 40 秒, 将所述聚合酶链反应重复 35 个循环。在该过程中, 使用两个引物即 5'-GGATCCATGGCTTCCAAACTCCTGC-3' (有义) 和 5'-CAGGGTCAATATGCTTCTTTGG-3' (反义), 用 1% 琼脂糖凝胶监测 PCR 产物 (参考附图 2)。

20 (构建 AK3 亚克隆载体(pCR2.1-AK3))

用凝胶提取试剂盒从琼脂糖凝胶中纯化 680 bp 的 AK3 PCR 产物, 然后 pCR2.1(Invitrogen)PCR 克隆试剂盒克隆 (参考附图 3)。为了得到连接混合物, 将 1 微升 50 ng 线性 pCR2.1 载体、5 微升 PCR 产物、1 微升 4 单位/微升 T4 DNA 连接酶, 1 微升 10X 连接酶缓冲液和 2 微升 dH₂O 混合, 达到 10 微升总体积, 然后在 16℃反应 12 小时。用大肠杆菌 JM109 作为宿主细胞, 用构建的 pCR2.1-AK3 质粒转化。将 2 微升连接混合物加到 50 微升 JM109 感受态细胞中, 在冰上放 30 分钟, 在 42℃热休克 45 秒, 在冰中浸 2 分钟。向其中加入 250 微升 SOC 培养基, 在 37℃培养, 转速 225 rpm, 1 小时。将 100 微升培养基铺在含 X-gal 和 IPTG 的 LB/氨苄青霉素平板上, 然后在 37℃培养

过夜。从产生的白色菌落中选出 10 个菌落，分别加到含 50 微克/毫升氨苄青霉素的 LB 培养基中，然后在 37°C 培养过夜。为了得到培养产物，用质粒制备试剂盒分离质粒 DNA。将 5 微升分离的质粒 DNA 与 1 微升 EcoRI、1 微升 EcoRI 反应缓冲液和 3 微升 dH₂O 混合，反应 1 小时，然后在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。证实亚克隆了 PCR 产物（参考附图 4）。用自动 DNA 测序仪确定插入 PCR 产物的质粒的碱基序列以便了解正确的亚克隆。此时，用 M13 反引物（有义）和 T7 启动子引物（反义引物）作为引物。

5

10

实施例 2：构建 AK3 表达载体并分离和纯化重组 AK3

pCR2.1-AK3 载体亚克隆后，用 BamHI 和 XhoI 双消化 AK3 基因，从琼脂糖凝胶上洗脱插入片段。用 BamHI 和 SalI 消化质粒 pQE30(由 Quiagene 制造的)，从琼脂糖凝胶上洗脱大片段以构建 AK3 表达载体。用 3 微升 pQE30 大片段、5 微升消化的 AK3 片段、1 微升 T4 DNA 连接酶和 1 微升 10X 连接酶缓冲液，通过在 16°C 培养过夜完成 DNA 片段的连接。转化中所用的宿主细胞是大肠杆菌 M15。在 LB 培养基中将通过在含氨苄青霉素和卡那霉素的平板上铺展所得的菌落培养过夜。分离质粒并用 EcoRI 消化，然后确定插入片段的存在（参考附图 5 和 6）。将经证实存在基因插入的菌落在含 100 微克/毫升氨苄青霉素的 50 毫升 LB 培养基中培养过夜，将 50 毫升培养的产物接种到另一 1 升的 LB 培养基中。在 37°C 振荡培养 1 小时后，通过在 0.5-0.7 在 600 nm 可见光吸收值监测重组菌的生长。在此刻，加入 IPTG 以便终浓度为 1 mM，再培养 4 小时以诱导重组蛋白的表达。将诱导的培养液以 4,000 xg 离心 20 分钟以得到细胞沉淀，然后将细胞沉淀悬浮在 50 毫升缓冲液（结合缓冲液：5mM 咪唑，0.5M NaCl，含 0.1% 吐温 20 的 20 mM Tris/HCl, pH7.9）中，保持在 -20°C。将融解的悬浮液经 30 秒 5 次超声破碎，然后经 1 分钟中止循环。在 4°C 将产物以 10,000xg 离心 30 分钟。取上清液得到含可溶性蛋白质的粗提取物。

15

20

25

30

用螯合剂树脂(Pharmacia)纯化表达的 AK3，其中将所述树脂装在

用于床体积的柱中，用 5 个柱体积的蒸馏水洗涤。除去乙醇，用 5 个柱体积的电荷缓冲液（含 0.1% 吐温 20 的 NiSO_4 ）使 Ni^+ 与螯合剂树脂结合，用 3 个柱体积的蒸馏水洗涤，然后用 5 个柱体积的结合缓冲液平衡。将上述制备的粗提取物上样，用 10 个柱体积的结合缓冲液洗涤，用 5 个柱体积的洗涤缓冲液（20 mM Tris/HCl, pH7.9, 含 60 mM 咪唑，0.5 M NaCl 和 0.1% 吐温 20）洗涤以除去非特异性结合，用 5 个柱体积的洗脱缓冲液（10 mM Tris/HCl, pH7.9, 含 0.5 M NaCl, 1 M 咪唑和 0.1% 吐温 20）洗脱。此时，在所有步骤中的流速为 1 ml/分钟。从洗脱的 AK3 中，用透析缓冲液（含 0.1% 吐温 20 的 10 mM Tris/HCl, pH7.9）除去盐，交换该缓冲液 3 次，12 小时，然后用 PEG 8000 浓缩。用 BCA 蛋白质定量分析试剂盒定量检测蛋白质的浓度，在表 1 中列出了计算的纯化产率，将纯化的 AK3 用于抗体的 SAS-PAGE 检测（图 7）或纯化和生产。

15

表 1
重组 AK3 的纯化

纯化步骤	总蛋白质(mg)	纯化产率 (%)
匀浆	949.05	100
可溶性部分	178.75	18
Ni-螯合剂亲和层析	14.3	1.5

实施例 3: 抗-AK3 兔抗体的生产和纯化

通过乳化剂注射器将 1 毫升纯化的 AK3 蛋白质和 1 毫升弗氏完全佐剂（FCA）混合得到乳液。将所述乳液静脉内或皮内注射给 2 kg 重的 NZW 兔（雄性）。在第一周，在兔的数个部位初次注射 50-100 微克/毫升抗原乳液皮内。对下一次注射来说，以每隔 2 周的间隔将用不完全弗氏佐剂（IFA）乳化的 100 微克/毫升抗原经皮内加强注射 2 次。最后接种 1 周后，从兔的耳静脉收集血液以检测抗体的诱导，用点印迹分析检测抗体生产。在第 5 周，皮内注射 100 微克蛋白质。在第 6 周，经静脉内加强注射与无佐剂混合的蛋白质溶液（20 微克/毫

25

升)。然后，将兔禁食 24 小时，通过心脏针刺从心脏收集血液，然后从所述血液中制备血清。

在玻璃容器中将收集的血液在室温放置 1 小时以便凝结，然后在 4°C 放置 6 小时。在 4°C 以 2,500 xg 离心 30 分钟 除去凝结的部分，分离血清。用下列抗体纯化方法得到从分离的血清中纯化的多克隆抗 AK3 抗体，以消除与高度同源 AK3 的同工酶 AK1 和 AK2 的交叉反应的抗体。将各 500 微升的血清小样贮存于 -80°C，然后用于生物化学分析以筛选患者的血清。

抗 AK3 多克隆抗体的纯化过程如下文所述。将分离的兔血清加到具有高度抗体回收率的 CM Affi-凝胶蓝亲和层析上。用含 1.4 M NaCl 和 40% 异丙醇和二级蒸馏水的 0.1 M 乙酸(pH3.0)洗涤 CM Affi-凝胶蓝亲和树脂。用 PBS 平衡该柱。收集抗血清负载到柱上后第一次出现的完整峰的洗脱液。在 45% 饱和度的硫酸铵下，通过硫酸铵沉淀法沉淀在上述洗脱液中的免疫球蛋白。为了得到所述免疫球蛋白中具有 AK3 特异性而与 AK1 和 AK2 没有交叉反应性的抗 AK3 抗体，将纯化的 AK1 (图 8) 和 AK2 (图 9) 与 affi-凝胶 15(Bio-Rad)结合，将 AK3 与 affi-凝胶 10(Bio-Rad)结合以制备亲和柱层析。将分别负载有 AK1、AK2 和 AK3 的亲和柱层析依次连接，用含 0.5M NaCl 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH7.5)平衡。为了除去非特异性结合的抗体，用含 1 M KCl 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液(pH7.5)洗涤。最后，用 0.1 M glycine/HCl(pH2.5)洗脱 AK3 特异性抗体 (参考图 10)。将洗脱液直接加到 1/20 体积的 2 M Tris/HCl(pH7.5)中以中和强酸。将上述纯化的 AK3 特异性多克隆抗体用 PBS 透析，于 4°C 贮存，然后用于 Western 印迹分析。制备腺苷酸激酶同工酶抗体 (抗 AK1 Ab、抗 AK2 Ab 和抗 AK3 Ab) 的 AK1、AK2 和 AK3 抗原按下列方法进行 Western 印迹分析，并证实所述抗体彼此没有交叉反应性 (参考图 11 和图 12)。在将纯化的重组 AK 电泳的情况下，完成普通的 Laemmli 法的 SDS-PAGE，在未取代的情况下，完成改性天然凝胶电泳。在完成改性天然凝胶电泳的 SDS-PAGE 后，

转移具有下列排列顺序的垫片，其中在完成 SDS-PAGE 或改性天然凝胶电泳后一纤维被放在凝胶支持物上，将纤维纸放在其上，用乙醇预处理的 PVDF 胶片放在其上，再将凝胶放在其上，然后再在其上覆盖纤维。将转移夹心放在配有冷却装置的缓冲液箱中，施加 2 小时恒定的电流 (90V,0.8A)。检测预染的标记物转移后，从凝胶支持物上取出 PVDF 胶片，浸在含 5%脱脂牛奶的 TBST 阻断溶液中，然后稍微振荡 2 分钟。将蛋白质印迹的 PVDF 胶片浸在具有足够浓度的抗 AK3 抗体溶液中，然后在室温振荡 1 小时。用 TBST 将抗体结合的胶片洗涤 2 次以除去非特异性结合的抗体。在 37°C 用辣根过氧化物酶结合的抗兔抗体溶液将洗涤的 PVDF 膜处理 1 小时。然后用 TBST 彻底洗涤膜。从胶片上完全除去 TBST 后，用 ECL Western 印迹分析试剂盒使其反应，然后通过暴露于 X 射线胶片而显色。

实施例 4: 从患者血清中检测 AK3

根据 Western 印迹分析，AK3 在骨骼肌和心肌中的组织分布证实 AK1 存在于骨骼肌和心肌中，AK2 和 AK3 仅存在于心肌中（参考图 13）。由于 AK2 和 AK3 的心脏组织特异性，从而表明了可用其作为能够诊断疾病例如心肌梗死的生物学标记的可能性。无论在还原和非还原条件下，电泳后是否可通过 Western 印迹分析从心肌梗死患者的血清中检测到 AK2 和 AK3，这种可能性都得到证实（参考图 14）。由此，由于与血清蛋白的非特异性结合，因此在这些取代条件下通过 Western 印迹分析并不能确定 AK2 和 AK3 的存在。在 SDS-PAGE 的条件下，用 Western 印迹分析不能确定 AK2 的存在。对于 AK3 来说，由于与非特异性带重叠，因此在于纯化 AK3 相同的区域，可从心肌梗死患者的血清中确定所述带。但是，由于总是可以检测到许多非特异性带，因此开发了可以仅检测 AK3 的新电泳方法。所述新电泳方法是当开始常规丙烯酰胺凝胶电泳时，让电流以不同于一般方向的相反方向流过，其中天然凝胶由 2 毫升单体溶液（40%T 5%Cbis）、2.5 ml 4x 分离凝胶缓冲液（158 mM Tris, 0.256 N H₃PO₄, pH6.9）、4.25 ml 水、1.25 m 催化剂（0.06%硫酸铵、0.02%核黄素磷酸）和 20 微升 TEMED

组成。通过将 1 微升血清、8 微升 DW 和 1 微升样品缓冲液（50%蔗糖、0.1%溴酚蓝）混合负载样品，用反向方法在池缓冲液（25 mM Tris, 5.5% 甘氨酸）中通过 2 小时 20mA 的电流。按上述方法，通过在凝胶上负载纯化的 Aks、患者血清和正常血清鉴定 AK1、AK2 和 AK3 的迁移方向。证实强碱性 AK3 在凝胶中扩展，AK1 和 AK2 扩散到池缓冲液中（参考图 15）。

实施例 5: 抗 AK2 和抗 AK3 单克隆抗体的生产

为了得到抗 AK3 和抗 AK2 单克隆抗体，首先将 50 微克抗原蛋白质溶液与相同体积弗氏完全佐剂混合得到的乳液(0.1 ml)注射给 4 周龄 Balb/c (H-2d 半型) 小鼠的足垫，以 10 天的间隔接种 2 次。从第二次开始加强注射，此时免疫佐剂使用不完全弗氏佐剂。证实小鼠血清中产生抗体后，取淋巴结，用含胎牛血清、IL-2、青霉素-链霉素的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基 (DMEM) 肉汤制备细胞悬浮液，通过 PEG 处理融合在该细胞悬浮液中的 B 淋巴细胞和预先制备的是同样小鼠株的肿瘤细胞的 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系。各取 1.5×10^8 免疫细胞和 Sp2 细胞，在离心管中以 400 xg 离心 10 分钟以形成沉淀，取出上清液，在 37°C 向其中加入 1 毫升 50% PEG1500，用移液管尖混合 1 分钟，仔细搅拌。在 37°C 经 1 分钟向其中加入不含胎牛血清的 1 毫升培养基，向其中连续加入无血清培养基同时搅拌，逐渐稀释 PEG 不溶的细胞。最后，向其中加入 7 毫升无血清培养基，搅拌 3 分钟。将细胞洗涤后，加入 20 毫升肉汤充分分散细胞，将各 0.1 ml 分散液加到 96 孔组织培养平板中，在 37°C，7%CO₂ 保温箱中保温 24 小时，得到主平板。按在次黄嘌呤-氨嘌呤-胸苷(HAT)培养基中的存活率不同将杂种细胞分类。细胞融合后的第二天，向每孔中加入 0.1 ml HAT 培养基。在第 2、3、5、8、和 11 天，吸出一半培养基，部分更换 0.1 ml 新鲜 HAT 培养基。然后，以 3 或 4 天的间隔重复与上述相同的过程，4 周后分别筛选含存活细胞的孔，取出其上清液，用 AK3 包被的 96 孔微滴定板完成 ELISA。在该分析中，用 1 毫升培养物仅筛选在 405 nm 吸收值为 0.3 或更高的孔。将筛选的细胞转移到 24 孔组织培养板中，

在 HT 培养基，而不是 HAT 中用 Balb/c 衍生的饲喂细胞（在 Balb/c 的脾细胞的红细胞溶解后用丝裂霉素处理的细胞悬浮液）以 1 毫升的规模分别经 15 天增殖 2 毫升和 10 毫升。在该过程中，通过限制稀释法试图克隆杂交瘤细胞。以 5 细胞/孔的密度稀释在 96 孔微滴定板上的 36 个孔，以 1 细胞/孔的密度稀释另 36 个孔，以 0.5 细胞/孔的密度稀释剩余的 24 个孔。温育后 5 天和 12 完成细胞传代，然后按上述 1 毫升培养规模增殖。筛选其中可能产生单克隆抗体的孔的培养上清液，完成用于抗体筛选的 ELISA。在该过程中，除去与 AK1 和 AK2 有交叉反应性的克隆，严格筛选仅特异性识别 AK3 的杂交瘤细胞并分成抗 AK3 单克隆一生产细胞系。将最终筛选的杂交瘤转移到 5 毫升培养烧瓶中，进行增殖培养。为了从产生的细胞系中生产单克隆抗体 (mAb)，在用添加物（10%胎牛血清，HAT，青霉素和 G418）补充的 RPMI 1640 中培养杂交瘤细胞，所述细胞将单克隆抗体分泌到培养基中。从培养基中分离并纯化（25 微克抗体/毫升培养液）单克隆抗体。或者，从鼠腹水中诱导单克隆抗体。在存在 5%二氧化碳的条件下，在 DMEM 肉汤中培养杂交瘤细胞，3 天后，收集健康的 2×10^6 融合细胞，腹膜内注射到 Balb/c 小鼠中，引起肿瘤增殖，然后从腹水中产生抗体。用 AK3 亲和柱层析以 0.8 mg/ml 的产率分离并所述抗体。

20 实施例 6：用 AK3 抗体诊断心肌梗死以及 AK3 作为心肌梗死的生物化学指标的用途

25 参考图 13，AK3 的肌肉组织表达是心肌特异性的。考虑到由于心肌损伤，AK3 可能被释放到血液中，在本实施例中，用从综合性医院急诊室门诊病人收集的血清样品完成 AK3 作为心肌梗死诊断指标的试验。

使用 30 名个体的血清样品，在表 2 中记录了疾病的名称。其中 5 名心肌梗死患者，急性患者 4 人，慢性患者 1 人。在临床病理实验室中检测各血清的 CKMB 单位。健康人的 CKMB 单位低于正常值 7。

30

用抗 AK3 抗体按上述通过 Western 印迹分析检测检测 29 名患者的血清。结果在心肌梗死患者中，检测到 AK3 于 CKMB 浓度相同（参考图 16）。但是，对于有腿骨骨折手术的患者，CKMB 为 44 单位，是假阳性，但未检测到 AK3（参考图 16，B 组，第 8 泳道）。对于进行了脑出血手术的患者（表 2 中的第 22 名患者），CKMB 值高达 56.3，但未检测到心脏异常。在本实施例中，未检测到 AK3。本试验的结果证明用抗 AK3 抗体的 AK3 检测比 CKMB 更能准确地诊断心肌梗死。因此，在急性或慢性心肌梗死的诊断中，使用抗 AK3 抗体的免疫制剂或诊断试剂盒比使用肌球蛋白的 CKMB 更准确。因此，显然使用本发明抗体的诊断试剂盒在临床上心肌特异性的。

表 2

患者编号	疾病名称	性别/年龄	CKMB 值	AK3 检测
0	正常对照血清	M/26		-
1	稳定的心绞痛	M/62	2.7	-
2	不稳定的心绞痛	M/53	4.6	-
3	腹膜炎手术	M/54	7.3	-
4	急性心肌梗死	M/56	22.1	+
5	盲肠炎手术	F/32	3.0	-
6	心房纤颤	M/45	3.3	-
7	出血性心肌病(有心肌梗死既往病的人)	M/78	2.8	-
8	食管癌	M/55	1.1	-
9	腿骨折手术	M/25	44.0	-
10	不稳定心绞痛	M/67	3.6	-
11	心室间隔缺损手术	M/34	8.5	-
12	哮喘	M/76	9.2	-
13	急性心肌梗性	M/40	40.4	+
14	不稳定的心绞痛	M/67	2.5	-
15	不稳定的心绞痛	M/58	5.8	-

16	心室间隔缺损手术	M/34	12.8	-
17	腹膜炎手术	M/85	5.6	-
18	心肌梗死	M/41	18.0	+
19	重症肌无力	F/45	6.2	-
20	不稳定的心绞痛	M/67	0.7	-
21	肺癌	M/79	2.7	-
22	脑出血手术	M/25	56.3	-
23	肠爆炸手术	M/64	4.3	-
24	心肌肥大, 糖尿病	M/67	2.9	-
25	节律障硬	F/52	2.7	-
26	多肢骨折	M/18	3.9	-
27	糖尿病, 高血压, 心房纤颤	F/91	2.4	-
28	躯体化失调(精神病)	M/28	3.1	-
29	急性心肌梗死	M/34	56.3	+

图 16 表示检测患者血清中 AK3 的 Wester 印迹分析结果。在下列表 3 和 4 中提供了图 16 待测血清的资料。

5 图 16 待测血清的资料 (A 组的描述)

表 3

泳道号	疾病名称	CKMB 单位 ^{a)}	表 2 中的患者号
1	急性心肌梗死	22.1	4
2	急性心肌梗死	40.4	13
3	急性心肌梗死	18	18
4	急性心肌梗死	56.3	29
S	人心脏组织样品		
N	正常血清		
Ak2	纯化的重组 Ak2		
P	纯化的重组 Ak3		

a) 正常血清的 CKMB 低于 7 个单位。

图 16 待测血清的资料 (B 组的描述)

5

表 4

泳道号	疾病名称	CKMB 单位	表 2 中的患者号
5	稳定的心绞痛	2.7	1
6	食管癌	1.1	8
7	心房纤颤	3.3	6
8	腿骨折	44.0	9
9	心室间隔缺损手术	12.8	16
10	腹膜炎手术	5.6	17
11	肺癌	2.7	21
N	正常血清	n.d. ^{a)}	
P	AK3		

a) n.d.未确定的

实施例 7: 用 AK3 抗体诊断心肌梗死以及用于心肌梗死的临床特异性检测

10

在本试验中, 为了证实 AK3 作为诊断心脏病的生物化学标记的临床特异性, 从韩国大学附属的 Guro 综合性医院循环内科住院并最终被诊断为心肌梗死的患者收集待测血清。测定 CKMB 的浓度, 完成 ECL-Western 印迹分析和抗 AK3 的夹心 ELISA。

15

根据 ELISA, 将亲和纯化的兔抗 AK3 多克隆抗体 (450 ng/孔) 黏附于 96 孔平板, 向其中加入 100 微升血清, 在 30°C 反应 1 小时。用磷酸缓冲的盐 (PBS) 充分洗涤反应物, 然后与生物素化的兔抗 AK3 多克隆抗体进行二级反应, 处理后以结合与链霉抗生物素蛋白融合的 HRP 结合, 然后结合发色底物。用 ELISA 检测仪确定光吸收值。

20

在本试验中, 作为标准物质, 使用本发明人分离和纯化的遗传重组

AK3。下列表 5 中列出了用 CKMB 和 AK3 抗体的急性心肌梗死 (AMI) 诊断结果。

表 5

	样品号	疾病名称	CKMB ^{a)} (ng/ml)	AK3		评述 (年龄/性别)
				Western 印迹分析 ^{d)}	夹心 ELISA ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	
1	417	心肌梗死	406.6	++	2.0	75/M
2	436	"	123.8	++	10.0	58/M
3	464	"	230.9	+++	4.7	67/M
4	474	"	47.23	++	11.6	65/M
5	481	"	378.6	+	2.0	53/M
6	487	"		+	3.0	
7	503	"	51.1	+	7.3	56/M
8	514	"	33.2	++	7.6	53/F
9	526	"	2.15	++	3.3	57/F
10	547	"	314.2	+++	7.0	60/M
11	548	"	71.79	+	4.2	63/M
12	553	"	175.4	+++	5.8	52/M
13	565(6)	"	>500.0	+++	4.7	61/M
14	578	"	176.7	+	8.1	57/M
15	606	"	1.55	+	1.2	64/M
16	607	"		+++	10.0	
17	614	"	19.84	+	n.d. ^{e)}	62/M
18	616	"	97.93	++	n.d.	45/M
19	621	"	1.79	+	n.d.	66/M
20	625	"	1.85	+	n.d.	51/M
21	626	"	1.62	++	5.0	41/M

5 a) 在韩国大学附属的 Ansan 综合性医院中完成 CKMB 分析。

b) 在夹心 ELISA 中，健康人血清的光吸收值为： $A_{490} < 0.02$ 。在从 6 个健康人分离的所有样品中，其光吸收值均低于参考值。

c) 由于没有血清未完成检测。

d) 所有均是 AK3 阳性。

5

图 17a 和 17b 是使用 ECL 底物的 AK3 Western 印迹分析结果。

从上述表 5 可以看出，用从韩国大学附属的 Guro 综合性医院循环内科的共 60 名患者收集的血清样品（其中包括从最终被诊断为心肌梗死患者收集的 21 份样品）和从韩国大学附属的 Hanyang 大学综合性医院的住院心肌梗死患者收集的 10 份样品进行 CKMB 和 AK3 的诊断指标分析，证实检测 AK3 的准确率为 100%。甚至在现在作为代表性的最佳心肌梗死诊断指标的 CKMB 检测中被诊断为假阴性的所有患者用 AK3 分析也可被确定为阳性。因此，本发明的免疫制剂在诊断中更精确，而且对于病理学—生物学分析有高度的特异性和高度的临床特异性。

10

15

工业实用性

20

在上述描述后，显而易见的是人线粒体腺苷酸激酶同工酶，特别是在本发明中与众不同地使用的 AK3 有下列特征：

(1) 因心肌特异性损伤而被释放到循环血液中；

(2) 在心肌损伤后立即被释放；

25

(3) 由于其在循环系统中有实质性的生命期，所以连续增加的数量表明心肌损伤的持续性（在表 2 第 7 号样品的情况下，在有心肌梗死既往症的人的需求中未检测到 AK3）。因此，AMI 发作后 AK3 的异常病理浓度与时间有线性关系；以及

(4) 证实在胸痛开始后 2 小时内血清浓度增加（图 16，3 道）。

30

因此，本发明的免疫制剂或诊断试剂盒使得有可能早期诊断心脏病例如心肌梗死；而无需特殊技术或培训就可得到适宜的临床分析结

5 果；使自动分析更容易。此外，待测样品稳定且便宜，没有干扰。它们比在目前临床病理学中主要使用的 CKMB 的常规标准诊断更准确。另外，还可将本发明的诊断试剂盒制成块型和条型试剂盒，由此提供快速简单的诊断。由于现有的诊断方法需要昂贵的设备和高水平的诊断技术，或者 POCT 快速试剂盒需要同时检测多个指标，以昂贵的成本重复检测，因此它们仅在有限的几个综合性医院中使用，而本发明诊断试剂盒廉价且容易使用，甚至在小医院中以及由个人使用。此外，预期可节约对昂贵的外国诊断试剂和试剂盒的进口。

序列表

<110> 金晓骏
李相旻
曹基胜

<120> 用于心脏病的抗人线粒体腺苷酸激酶同工酶抗体，诊断制剂和诊断试剂盒

<130> 00-pct-3

<150> KR 2000-5808

<151> 2000-02-08

<160> 1

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Ala Ser Lys Leu Leu Arg Ala Val Ile Leu Gly Pro Pro Gly Ser

1 5 10 15

Gly Lys Gly Thr Val Cys Gln Arg Ile Ala Gln Asn Phe Gly Leu Gln

20 25 30

His Leu Ser Ser Gly His Phe Leu Arg Glu Asn Ile Lys Ala Ser Thr

35 40 45

Glu Val Gly Glu Met Ala Lys Gln Tyr Ile Glu Lys Ser Leu Leu Val

50 55 60

Pro Asp His Val Ile Thr Arg Leu Met Met Ser Glu Leu Glu Asn Arg
65 70 75 80

Arg Gly Gln His Trp Leu Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Leu Gly Gln
 85 90 95

Ala Glu Ala Leu Asp Lys Ile Cys Glu Val Asp Leu Val Ile Ser Leu
 100 105 110

Asn Ile Pro Phe Glu Thr Leu Lys Asp Arg Leu Ser Arg Arg Trp Ile
 115 120 125

His Pro Pro Ser Gly Arg Val Tyr Asn Leu Asp Phe Asn Pro Pro His
 130 135 140

Val His Gly Ile Asp Asp Val Thr Gly Glu Pro Leu Val Gln Gln Glu
145 150 155 160

Asp Asp Lys Pro Glu Ala Val Ala Ala Arg Leu Arg Gln Tyr Lys Asp
 165 170 175

Val Ala Lys Pro Val Ile Glu Leu Tyr Lys Ser Arg Gly Val Leu His
 180 185 190

Gln Phe Ser Gly Thr Glu Thr Asn Lys Ile Trp Pro Tyr Val Tyr Thr
 195 200 205

Leu Phe Ser Asn Lys Ile Thr Pro Ile Gln Ser Lys Glu Ala Tyr
 210 215 220

说明书附图

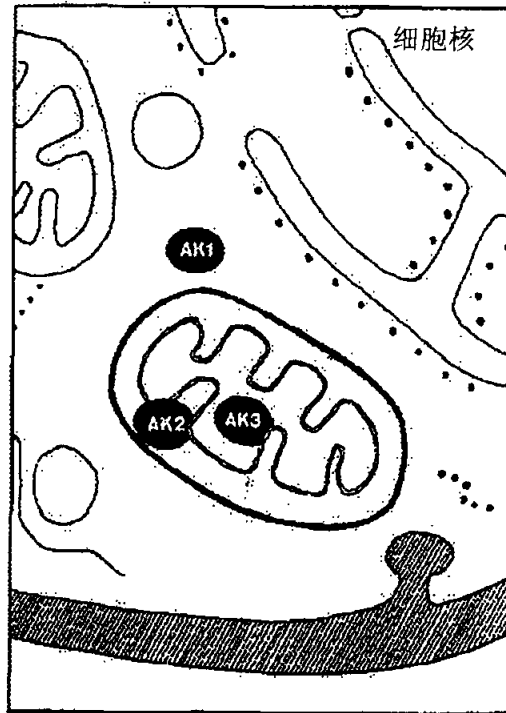


图 1

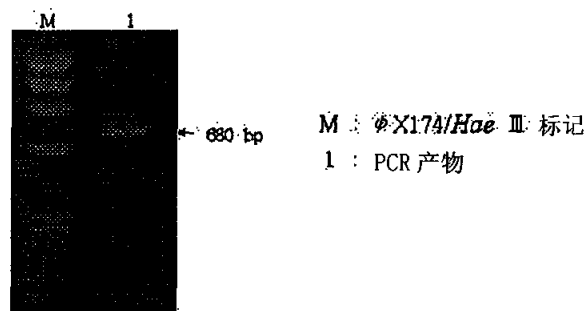


图 2

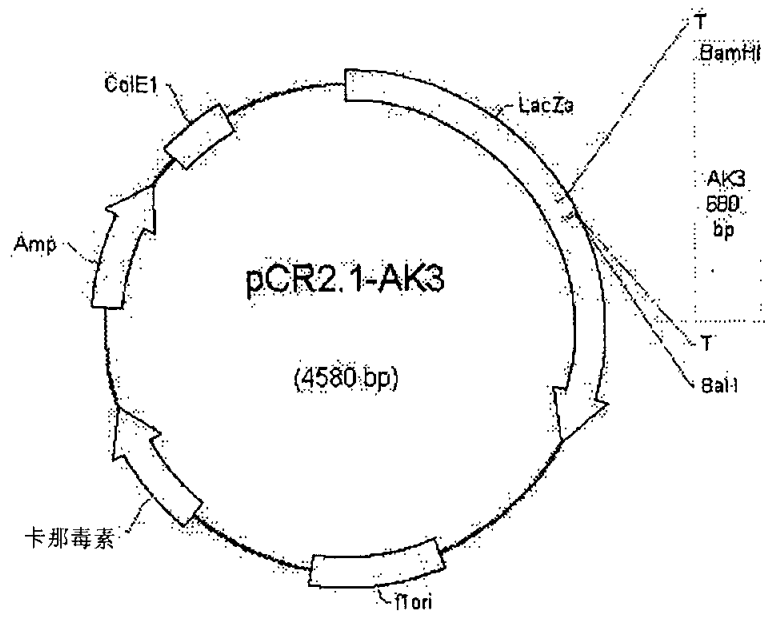


图 3

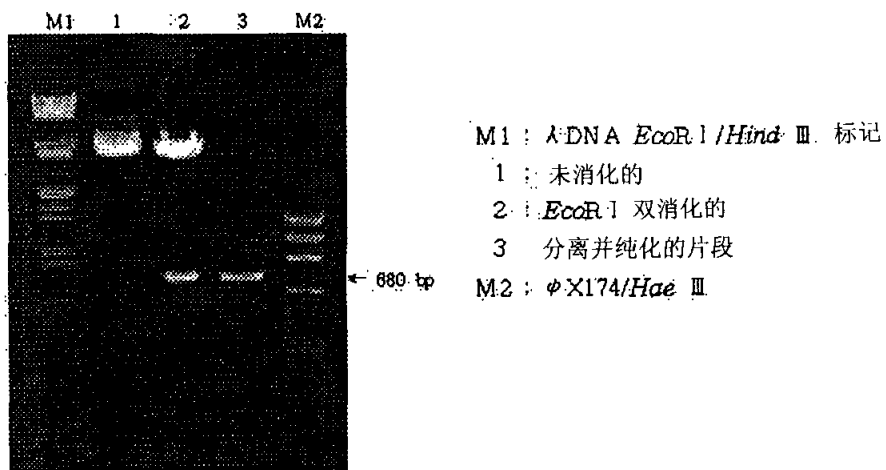
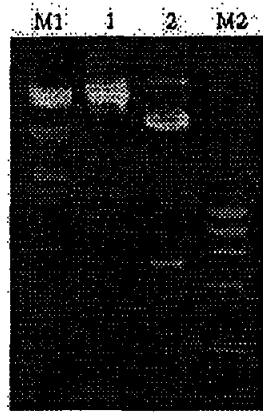


图 4



M1: λ DNA/*EcoR*.I + *Hind* III 标记
 1: pQE30-AK3
 2: pQE30-AK3/*Bam*H I & *EcoR*.I
 M2: ϕ X174/*Hae* III

图 5

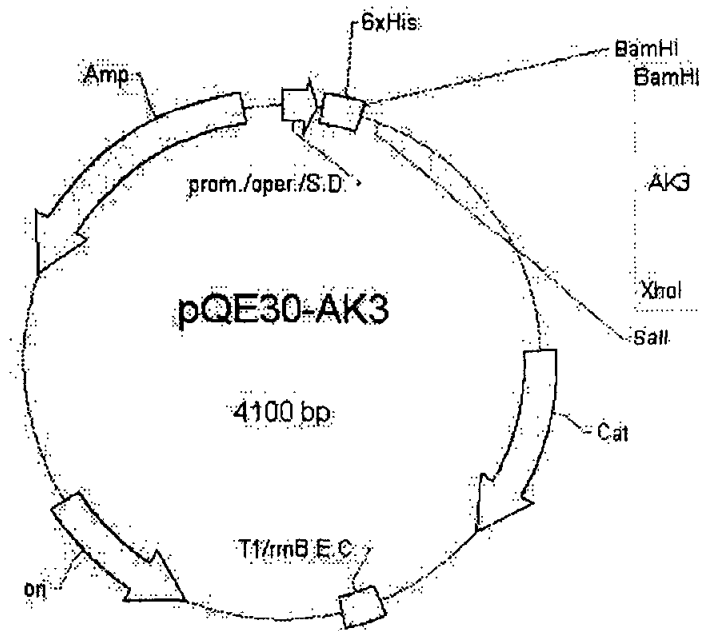


图 6

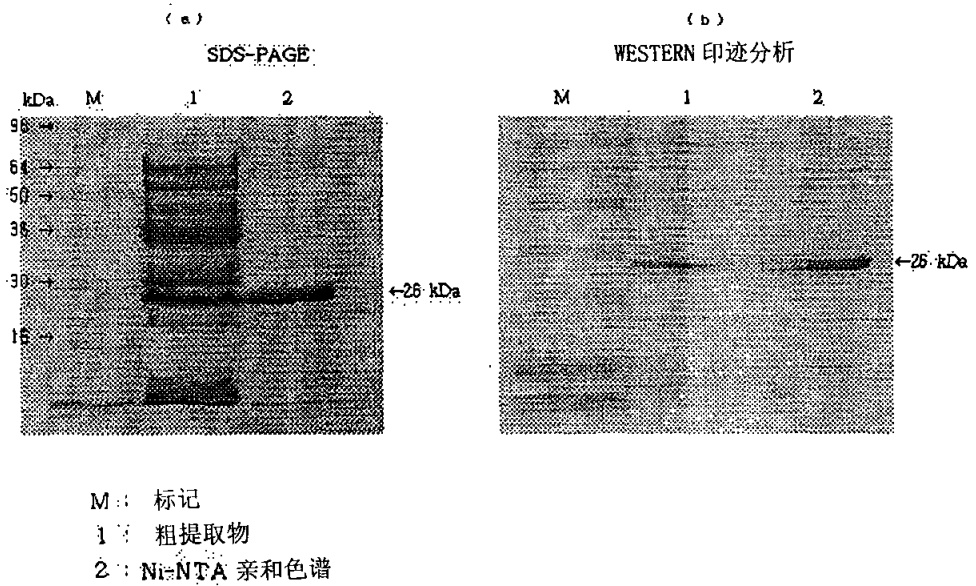


图 7

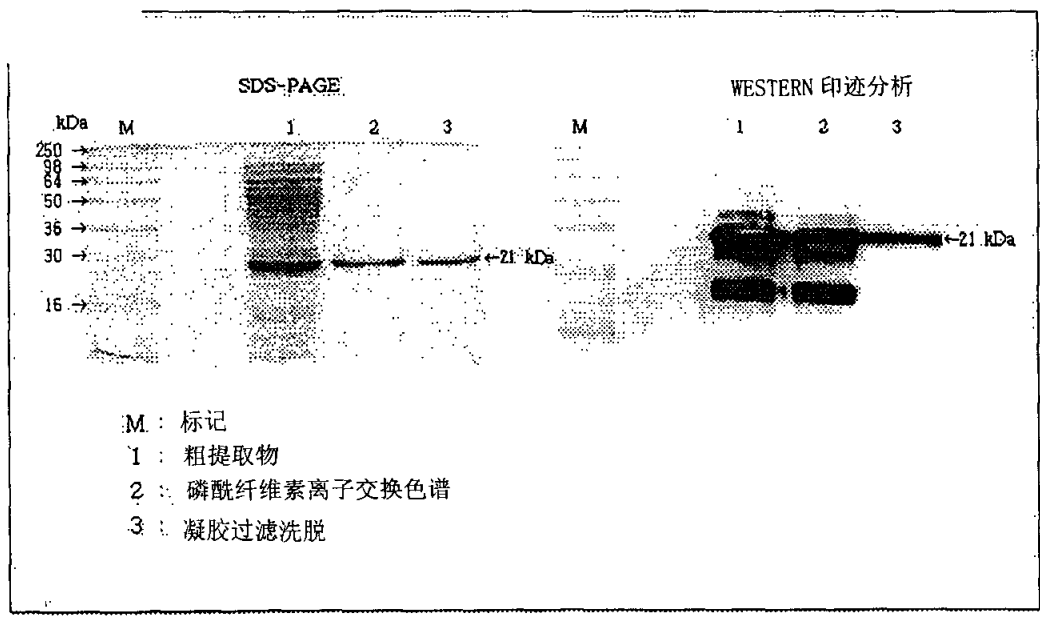


图 8

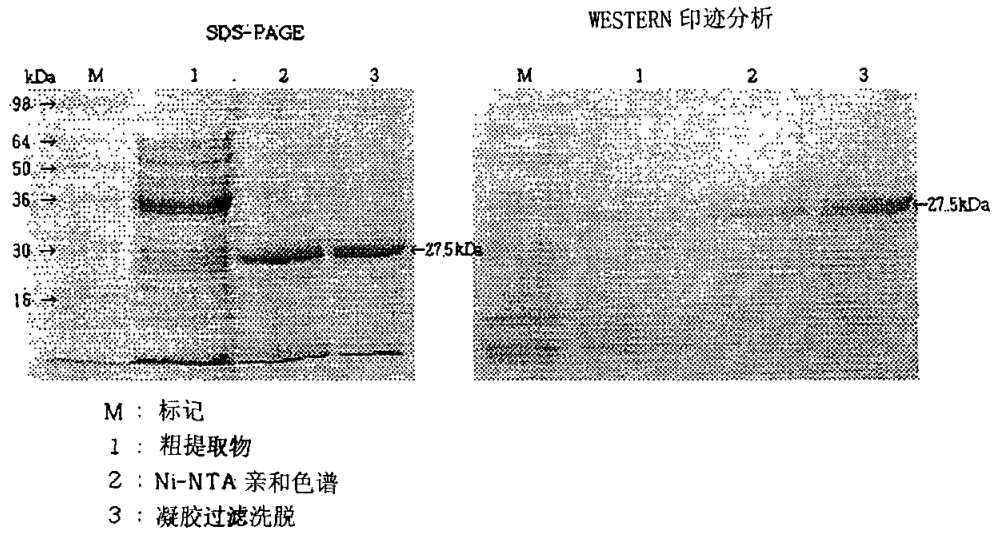


图 9

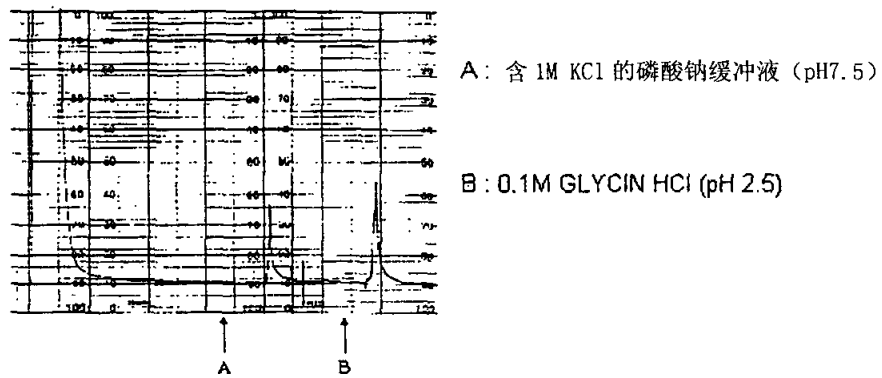
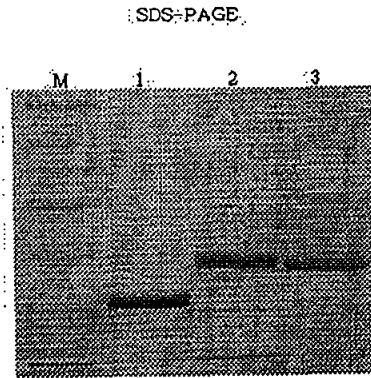
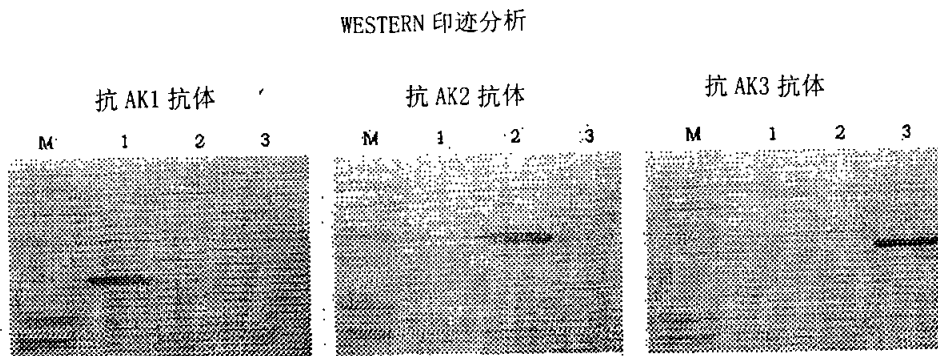


图 10



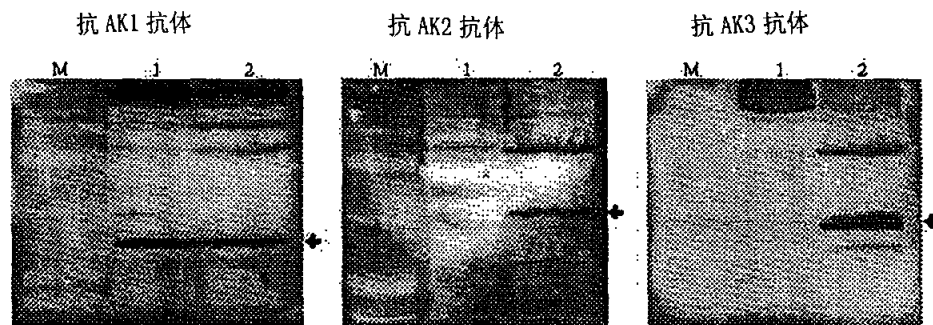
M : 标记
 1 : 纯化的重组 AK1
 2 : 纯化的重组 AK2
 3 : 纯化的重组 AK3

图 11



M : 标记
 1 : 纯化的重组 AK1
 2 : 纯化的重组 AK2
 3 : 纯化的重组 AK3

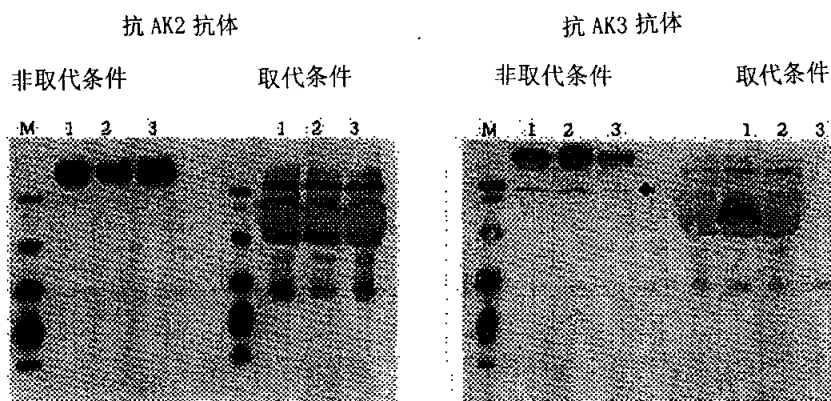
图 12



M : 标记
1 : 骨骼肌
2 : 心肌

图 13

WESTERN 印迹分析



M : BCL 标记
1 : 心肌梗死患者血清
2 : 心肌梗死患者血清
3 : 心肌梗死患者血清

图 14

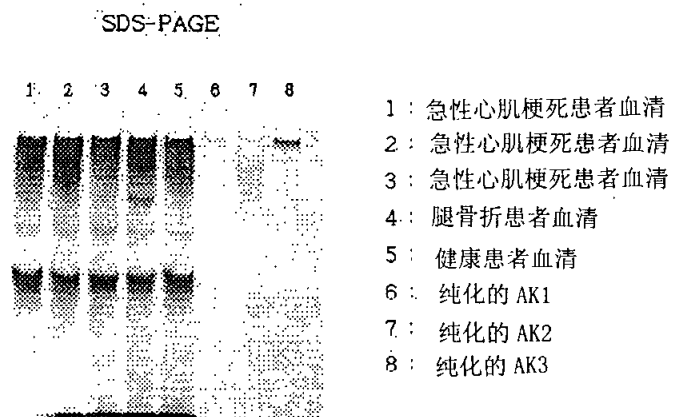


图 15

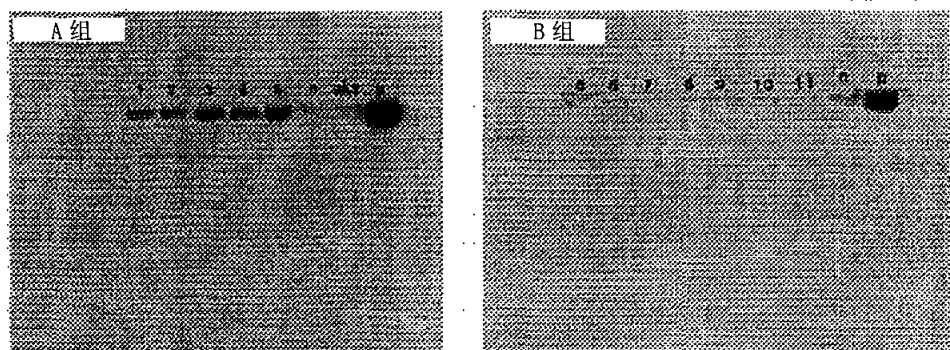


图 16

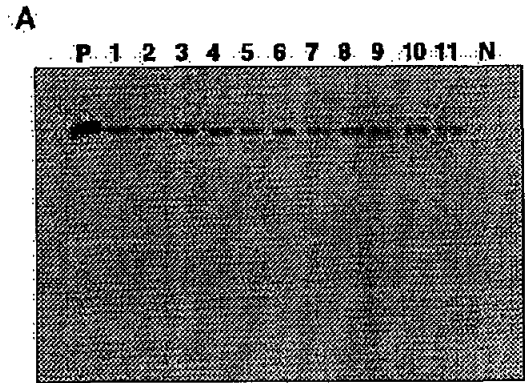


图 17a

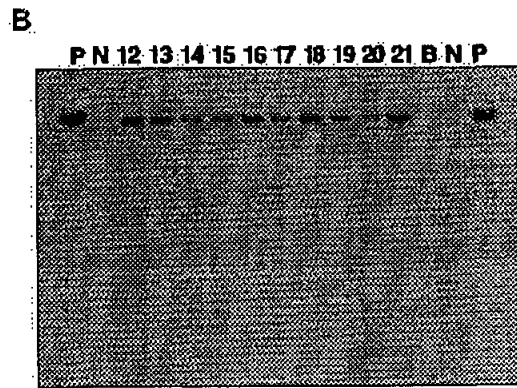


图 17b

专利名称(译)	用于心脏病的抗人线粒体腺苷酸激酶同工酶抗体, 诊断制剂和诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN1368888A	公开(公告)日	2002-09-11
申请号	CN00805979.9	申请日	2000-08-10
[标]发明人	金晓骏 曹基胜 李相旻		
发明人	金晓骏 曹基胜 李相旻		
IPC分类号	G01N33/573 A61K35/00 C07K16/00 C07K16/40 C12M1/40 C12N9/12 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/48 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/395		
CPC分类号	C12N9/1229 C07K16/40		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	1020000005808 2000-02-08 KR		
其他公开文献	CN1368888B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及利用人线粒体腺苷酸激酶同工酶的用于心脏病的免疫制剂和诊断试剂盒。本发明提供了用于心脏病的免疫制剂和诊断试剂盒,其特征在于利用了存在于肌肉细胞中的心肌细胞但不存在于骨骼肌细胞中的腺苷酸激酶同工酶作为心脏病的诊断标记,因此能够更正确和容易地诊断心脏病。

