

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480029684.2

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 22 日

[11] 公开号 CN 1867828A

[22] 申请日 2004.10.15
[21] 申请号 200480029684.2
[30] 优先权
[32] 2003.10.15 [33] JP [31] 354930/2003
[86] 国际申请 PCT/JP2004/015260 2004.10.15
[87] 国际公布 WO2005/038457 日 2005.4.28
[85] 进入国家阶段日期 2006.4.10
[71] 申请人 第一化学药品株式会社
地址 日本东京
共同申请人 株式会社东京大学 TLO
[72] 发明人 海老沼宏幸 矢后弘和 秋元优夏
宫崎修 门脇孝 山内敏正 原一雄

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 沙永生

权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 5 页

[54] 发明名称

脂连蛋白多聚体的分离测定方法

[57] 摘要

本发明提供分离在生物体试样中形成各种多聚体存在的脂连蛋白进行免疫学测定的方法，以及通过分离测定、获得只通过脂连蛋白的总量测定无法得到的信息、更准确地评价疾病与脂连蛋白的关系的方法。生物体试样中的脂连蛋白多聚体的分离测定方法，其特征在于，使用蛋白酶和/或抗体将作为测定对象的脂连蛋白多聚体与其它脂连蛋白分离，进行免疫学测定。

1. 生物体试样中的脂连蛋白多聚体的分离测定方法，其特征在于，使用蛋白酶和/或抗体将作为测定对象的脂连蛋白多聚体与其它脂连蛋白分离，进行免疫学测定。

2. 如权利要求1所述的测定方法，其特征还在于，使用蛋白酶和/或抗体与其它脂连蛋白分离的方法是使蛋白酶与除了分离测定的对象之外的脂连蛋白作用，对残留的作为测定对象的脂连蛋白进行免疫学测定。

3. 如权利要求1所述的测定方法，其特征还在于，使用蛋白酶和/或抗体与其它脂连蛋白分离的方法是使蛋白酶与作为分离测定的对象的脂连蛋白作用，对其消化产物进行免疫学测定。

4. 如权利要求1~3中的任一项所述的测定方法，其特征还在于，脂连蛋白多聚体来源于人血。

5. 如权利要求1~4中的任一项所述的测定方法，其特征还在于，使用蛋白酶和/或抗体将下述4种来源于人血中的脂连蛋白多聚体中的一种或两种与其它脂连蛋白分离，进行免疫学测定：

(1) ULMW-Ad: 将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率最大、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在100kDa附近的脂连蛋白；

(2) LMW-Ad: 将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率仅次于ULMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在150kDa附近、并与白蛋白以二硫键结合的脂连蛋白；

(3) MMW-Ad: 将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率次于LMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在250kDa附近的脂连蛋白；

(4) HMW-Ad: 将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率最小、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量至少在300kDa以上的脂连蛋白；

白。

6. 如权利要求1~5中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,抗体为抗白蛋白抗体和/或抗脂连蛋白抗体。

7. 如权利要求5或6所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为ULMW-Ad和/或LMW-Ad。

8. 如权利要求5或6所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为MMW-Ad、HMW-Ad或这两种的组合。

9. 如权利要求5、6或8中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为HMW-Ad,用于分离测定的方法为使蛋白酶与除了HMW-Ad之外的3种脂连蛋白作用。

10. 如权利要求5、6、8或9中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,在HMW-Ad的测定之前,使蛋白酶与除了HMW-Ad之外的3种脂连蛋白作用。

11. 如权利要求5、6或8中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为MMW-Ad,用于分离测定的方法为对ULMW-Ad和LMW-Ad进行蛋白酶处理,算出残留的HMW-Ad量和MMW-Ad量的合计量,再从该合计量中减去HMW-Ad量来算出MMW-Ad量。

12. 如权利要求5~7中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为LMW-Ad,用于分离测定的方法为组合抗白蛋白抗体和抗脂连蛋白抗体。

13. 如权利要求5~7中的任一项所述的测定方法,其特征还在于,分离测定的对象为ULMW-Ad,用于分离测定的方法为对ULMW-Ad和LMW-Ad进行蛋白酶处理,算出残留的HMW-Ad量和MMW-Ad量的合计量,从另外测定的脂连蛋白总量中减去该合计量和LMW-Ad量来算出ULMW-Ad量。

14. 疾病或病态的评价方法,其特征在于,使用蛋白酶和/或抗体将下述4种来源于人血的脂连蛋白多聚体中的一种或两种与其它脂连蛋白分离,进行免疫学测定,基于其结果获得关于疾病或病态的信息:

(1)ULMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率最大、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在100kDa附近的脂连蛋白;

(2)LMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率仅次于ULMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在150kDa附近、

并与白蛋白以二硫键结合的脂连蛋白；

(3)MMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率次于LMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在250kDa附近的脂连蛋白；

(4)HMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后，作为主要的染色条带检出的4种条带中，迁移率最小、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量至少在300kDa以上的脂连蛋白。

15. 如权利要求14所述的评价方法，其特征还在于，通过ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad中的1种以上的量的变动进行评价。

16. 如权利要求14所述的评价方法，其特征还在于，求出ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad及脂连蛋白总量中的至少两个量的比值来进行评价。

17. 如权利要求14所述的评价方法，其特征还在于，根据其它的指标与ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad中的1种以上的量的关系，或者与ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad及脂连蛋白总量中的至少两个量的比值的关系来进行评价。

18. 如权利要求14所述的评价方法，其特征还在于，疾病或病态为II型糖尿病、动脉硬化性疾病、肾疾病、肝疾病或肥胖症、代谢综合征。

19. 如权利要求14所述的评价方法，其特征还在于，对II型糖尿病、动脉硬化性疾病、肾疾病、肝疾病或肥胖症、代谢综合征的发病、诊断、进展、预测和治疗效果进行评价。

脂连蛋白多聚体的分离测定方法

技术领域

本发明涉及分离生物体试样中所含的各种脂连蛋白多聚体并进行免疫学测定的方法。

背景技术

脂连蛋白(脂联素)是由脂肪细胞特异性分泌的使胰岛素增敏的激素,在血液中以较高浓度($5\sim 10\mu\text{g/mL}$)存在。关于脂连蛋白的生理作用,由本发明者报告了,脂连蛋白量的减少是肥胖导致的II型糖尿病和脂肪萎缩性糖尿病中引起糖·脂类代谢异常的原因之一(非专利文献1);关于医学上的应用,提出了在糖代谢异常的诊断、特别是作为胰岛素抗性改善药的噻唑烷衍生物的治疗效果的监控上的应用(专利文献1),利用抑制肝星形细胞的活化和增殖、抑制细胞外基质产生等作用的肝纤维化抑制剂(专利文献2)。

脂连蛋白被报道,在结构上属于C1q(补体1q)家族,由于具有作为C1q家族的特征的胶原样结构域,形成主要是三聚体的多聚体而存在(非专利文献2、3)。

关于脂连蛋白的结构上的差异与生理作用、活性等的关系,Tsao等报告了,对于NF- κ B的活化作用,只在超过三聚体的脂连蛋白多聚体中发现活性,在三聚体和胶原样结构域缺失的球状(globular)结构域中没有发现活化作用。此外,Utpal等报告了,通过投与胰岛素或葡萄糖,只有高分子部分的脂连蛋白显著地下降,将胶原样结构域的半胱氨酸转变为丝氨酸的脂连蛋白和经还原处理了的脂连蛋白的降血糖作用强,而未经还原处理的和球状的脂连蛋白几乎不表现出降血糖作用(非专利文献4)。

然而,这些报告中用于研究的脂连蛋白是通过大肠杆菌等的基因重组来表达的,可能无法准确反映生物体内分泌的脂连蛋白的特征和作用。此外,已知血液中脂连蛋白的浓度存在性别差异,报告了女性与男性相比其值显著较高(非专利文献5);另一方面,也报告了根据小鼠血清的数据,特别是高分子部分的脂连蛋白的含量较高(非专利文献4)。

对于脂连蛋白的结构上的差异与生理作用、疾病与脂连蛋白的关系，由于存在只通过脂连蛋白总量的测定无法获得的信息，需要可以分离生物体试样中存在的各种脂连蛋白多聚体并进行测定的方法。

作为测定脂连蛋白的方法，揭示有在将测定用的试样预先在十二烷基硫酸钠(SDS)的存在下进行煮沸处理后、进行免疫学测定的方法(专利文献3)。该方法是通过前述处理使立体结构上隐藏的抗体识别位点暴露、对脂连蛋白的总量进行免疫学测定的方法，无法分离各种多聚体来进行测定。

此外，还揭示有将测定试样中的脂连蛋白不进行SDS变性处理或热变性处理而进行测定的方法(专利文献2中称为天然型的测定)(专利文献2)，但关于分离测定没有记载，无法应用。

专利文献1:国际公开W0 03/016906公报

专利文献2:日本专利特开2002-363094公报

专利文献3:日本专利特开2000-304748公报

非专利文献1:Yamauchi T.等, Nat Med., 7, 941-946, 2001

非专利文献2:Nakano Y.等, J.Biochem., 120, 803-812, 1996

非专利文献3:Tsao T-S.等, J.Biol.Chem., 277, 29359-29362, 2002

非专利文献4:Utpal B.等, J.Biol.Chem., 278, 9073-9085, 2003

非专利文献5:Yamamoto Y.等, Clin.Sci., 103, 137-142, 2002

发明的揭示

发明要解决的课题

本发明的目的在于提供分离在生物体试样中形成各种多聚体而存在的脂连蛋白并进行测定的方法，其目的还在于提供通过分离测定获得只通过测定脂连蛋白总量无法得到的信息、更准确地对脂连蛋白的生理作用和疾病与脂连蛋白的关系进行评价的方法。

解决课题的方法

本发明者为了解决上述课题而认真研究后发现，血液中的脂连蛋白存在根据按凝胶过滤色谱法估计的分子量，能够以150kDa以上200kDa以下(主要在160kDa附近)(以下记作LMW-Ad)、超过200kDa未满400kDa(主要在260kDa附近)(以下记作MMW-Ad)和400kDa以上800kDa以下(主要在450kDa附近)(以下记作HMW-Ad)区分的3种，进一步研究后，从人血液中成功得到了4种脂连蛋白多

聚体的分离纯化样品。这4种成分可以通过采用非变性系统的聚丙烯酰胺(2-15%)的电泳(以下也记作“PAGE(2-15%)”)进行分离,从迁移率大的一侧依次记作ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad进行区别。这4种中,LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad分别对应于前述血清中的3种脂连蛋白。而且发现,LMW-Ad在脂连蛋白三聚体中与白蛋白以二硫键结合,通过至少组合抗脂连蛋白抗体和抗白蛋白抗体的使用,可以分离测定LMW-Ad,并了解到根据分子内交联后采用SDS-聚丙烯酰胺(2-15%)的电泳(以下在方法中也记作“SDS-PAGE”)算出的分子量,ULMW-Ad是脂连蛋白的三聚体,进而推测MMW-Ad约为6-9聚体, HMW-Ad形成了MMW-Ad的2倍以上的缔合体。

基于这些知识进一步发现,通过使适当的蛋白酶与含有脂连蛋白的试样作用,可以消化除HMW-Ad之外的脂连蛋白,发现采用蛋白酶的消化处理后,对残留的HMW-Ad可以使用抗脂连蛋白抗体进行分离测定。

另外发现,通过对ULMW-Ad和LMW-Ad进行蛋白酶处理,算出残留的HMW-Ad量和MMW-Ad量的合计量,再从该合计量减去HMW-Ad量,可以算出MMW-Ad量;通过对ULMW-Ad和LMW-Ad进行蛋白酶处理,算出残留的HMW-Ad量和MMW-Ad量的合计量,从另外测定的脂连蛋白总量中减去HMW-Ad量和MMW-Ad量的合计量和LMW-Ad量,可以算出ULMW-Ad量。本发明是基于这些知识而完成的。

即,本发明提供生物体试样中的脂连蛋白多聚体的分离测定方法,其特征在于,使用蛋白酶和/或抗体将脂连蛋白多聚体与其它脂连蛋白分离,进行免疫学测定。

本发明还提供生物体试样中的脂连蛋白的测定方法,其特征在于,使用蛋白酶和/或抗体将下述4种来源于人血中的脂连蛋白多聚体中的一种或两种与其它脂连蛋白分离,进行免疫学测定。

(1)ULMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率最大、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在100kDa附近的脂连蛋白。

(2)LMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率仅次于ULMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在150kDa附近、并与白蛋白以二硫键结合的脂连蛋白。

(3)MMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚

丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率次于LMW-Ad、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量在250kDa附近的脂连蛋白。

(4)HMW-Ad:将从人血清或人血浆中纯化的脂连蛋白在非变性条件下用聚丙烯酰胺凝胶(2-15%)电泳后,作为主要的染色条带检出的4种条带中,迁移率最小、且基于分子内交联后的SDS-PAGE的分子量至少在300kDa以上的脂连蛋白。

此外,本发明提供疾病或病态的评价方法,其特征在于,将上述4种脂连蛋白中的一种或两种,使用蛋白酶和/或抗体与其它脂连蛋白分离,进行免疫学测定,基于其结果获得关于疾病或病态的信息。

发明的效果

若采用本发明,则由于可以分离测定ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad,可以更准确地评价脂连蛋白的生理作用和疾病或病态,特别是II型糖尿病、动脉硬化性疾病、肾疾病、肝疾病、肥胖症、代谢综合征(metabolic syndrome)的发病、诊断、进展、预测和治疗效果。

附图的简单说明

[图1]实施例1中的脂连蛋白多聚体的凝胶过滤色谱图。

[图2]实施例1中分别对LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad进行PAGE(2-15%)并经CBB蛋白染色后的电泳图。

[图3]实施例2中分别对LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad进行SDS-PAGE(2-15%)并经CBB蛋白染色后的电泳图。

[图4]实施例5中对人血清中的脂连蛋白通过蛋白质印迹法分析的图。

[图5]实施例6中对LMW-Ad(白蛋白结合型脂连蛋白)通过免疫测定法进行测定的结果的图。

[图6]实施例3中分别对来源于人的ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad的纯化产物进行PAGE(2-15%)并经CBB蛋白染色后的电泳图。

[图7]实施例4中分别对来源于人的ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad的纯化产物在非还原条件下进行SDS-PAGE(2-15%)并经CBB蛋白染色后的电泳图。

[图8]实施例4中分别对来源于人的ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad的

纯化产物在分子内交联后进行SDS-PAGE(2-15%)并经蛋白质印迹分析的电泳图。

[图9]实施例7中对LMW-Ad(白蛋白结合型脂连蛋白)通过免疫测定法进行测定的结果的图。

[图10]表示实施例13中的蛋白酶K对脂连蛋白多聚体的消化特异性的图。

[图11]表示实施例13中的蛋白酶A“アマノ”对脂连蛋白多聚体的消化特异性的图。

实施发明的最佳方式

作为本发明中可以使用的生物体试样，只要是含有脂连蛋白多聚体，都可以成为对象，可以例举从人类、猴、山羊、绵羊、兔、小鼠、大鼠、豚鼠及其它哺乳动物获得的血液、尿等体液，组织提取液和来源于组织的细胞的培养上清液等。其中，作为用于准确评价脂连蛋白的生理作用、疾病或病态的试样，较好是血液(血清、血浆)。考虑到要进行分离测定，试样的采集方法只要是不对存在于试样中的脂连蛋白产生影响的方法都可以使用。例如，将人血液作为试样的情况下，根据评价的目的，较好是适当选择空腹时采血、药物投与后采血等。

对用于分离LMW-Ad进行免疫测定的方法进行说明。该方法是通过识别LMW-Ad的抗体捕集LMW-Ad、进行检测的方法。

由于LMW-Ad是脂连蛋白三聚体和白蛋白的复合体，所以通过识别LMW-Ad的抗体捕集LMW-Ad、进行检测的方法中所使用的抗体只要可以识别该复合体并捕集・检测，可以不受特别限制的使用。作为这样的抗体的优选例，可以例举识别脂连蛋白的抗体和识别白蛋白的抗体的组合、或者特异性识别脂连蛋白与白蛋白的复合体的抗体。分别识别脂连蛋白、白蛋白、脂连蛋白与白蛋白的复合体的多克隆抗体和单克隆抗体可以通过公知的方法对适当的动物进行免疫来获得。这些抗体也能作为市场上销售的产品获得，可以将其用于本发明。例如，作为抗人脂连蛋白抗体，可以例举山羊抗人Acrp30抗体(コスモバイオ公司、GT公司)、兔抗人脂连蛋白多克隆抗体(コスモバイオ公司、chemicon公司)、人Acrp30单克隆抗体(藤泽药品工业公司、BD公司)、小鼠抗人脂连蛋白单克隆抗体(コスモバイオ公司、chemicon公司)、抗人Acrp30单克隆抗体(AX773、AX741、Ne, Na, 和光纯药工业公司)等。作为抗人白蛋白抗体，可以例举山羊

抗人白蛋白抗体(コスモバイオ公司、BET、ACD、BMD)、小鼠抗人白蛋白抗体(コスモバイオ公司、NBT、ZYM、MED)、兔抗人白蛋白抗体(コスモバイオ公司、CL、ACM)、山羊抗人白蛋白抗体(フナコシ公司、ANT)等。

作为本发明具体的免疫学测定方法,可以使用ELISA(酶联免疫吸附测定法)、CLEIA(化学发光酶免疫测定法)、RIA(放射免疫测定法)、LTIA(胶乳免疫比浊法)等公知的方法。ELISA的情况下,可以例举例如组合结合了识别脂连蛋白的抗体的不溶性载体和识别白蛋白的抗体作为酶标记抗体的方法,通过结合了识别脂连蛋白与白蛋白的复合体的抗体的不溶性载体捕集脂连蛋白与白蛋白的复合体、组合识别脂连蛋白的抗体或识别白蛋白的抗体作为酶标记抗体的方法等。按照测定步骤进一步进行说明。使含有脂连蛋白与白蛋白的复合体的试样与结合了识别脂连蛋白的抗体的不溶性载体接触、混合,将脂连蛋白与白蛋白的复合体捕集在前述不溶性载体上。接着,通过接触、混合酶标记了的识别白蛋白的抗体,形成不溶性载体-脂连蛋白与白蛋白的复合体-酶标记抗体的三元复合体。然后,使标记抗体中的酶与适当的该酶的底物进行反应,通过对反应结果产生的反应生成物的吸光度变化进行光学测定,定性地或定量地测定脂连蛋白与白蛋白的复合体。LTIA的情况下,通过将承载了与脂连蛋白与白蛋白的复合体特异性结合的抗体的不溶性载体与脂连蛋白与白蛋白的复合体混合,通过脂连蛋白与白蛋白的复合体而发生不溶性载体的交联(凝集),对所产生的浑浊进行光学测定,可以定性地或定量地测定脂连蛋白与白蛋白的复合体。LTIA适合于简便、迅速且准确地对脂连蛋白与白蛋白的复合体进行测定。

作为本发明所使用的不溶性载体,使用通常的免疫学测定试剂所使用的、工业上可大量生产的有机类不溶性载体。ELISA中,较好是使用抗体的吸附性良好、且可以长期稳定地保持生物学活性的聚苯乙烯等的96孔微孔板,LTIA中较好是聚苯乙烯类的胶乳粒子。

已知多种在上述不溶性载体的表面承载抗体的方法,本发明中可以适当采用。例如,作为承载(敏化)方法可以例举使抗体物理吸附于不溶性载体表面的方法、通过作为已知方法的物理结合法或化学结合法将抗体在具有官能团的不溶性载体表面高效地敏化的方法。

承载了抗体的抗体不溶性载体和/或酶标记抗体同脂连蛋白与白蛋白的复合体的反应只要是可以发生抗原抗体反应的条件,对其反应条件没有特别限定。作为反应液,只要是可以发生同脂连蛋白与白蛋白的复合体的抗原抗体反

应的溶液即可。例如，除了可以适当溶解用于控制pH的磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、顾氏缓冲液(Goods buffer)等缓冲成分，用于避免非特异性反应的表面活性剂和氯化钠等，作为稳定剂的牛血清白蛋白(BSA)、蔗糖、高分子多糖类等，除了控制反应性的前述物质之外，还可以适当溶解葡聚糖等水溶性多糖类、酶的抑制剂等添加剂。

ELISA中的酶标记抗体可以通过公知的方法制备。例如，可以按照石川等的方法(马来酰亚胺法：“酶联免疫吸附测定法 第3版 医学书院”)等，将抗体直接、或者根据需要用适当的蛋白酶将抗体经部分分解成 $F(ab')_2$ 或 Fab' 后，用酶进行标记。作为用于标记的酶，可以例举过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶等。另外，为了测定酶活性要使用底物，并需要使用显色剂。作为酶使用过氧化物酶的情况下，作为底物使用过氧化氢，作为显色剂可以使用邻苯二胺、3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-连氮基二(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)铵盐等；酶使用碱性磷酸酶的情况下，作为底物可以使用磷酸对硝基苯酯等；酶使用 β -D-半乳糖苷酶的情况下，作为底物可以使用 β -D-吡喃半乳糖苷等；酶使用葡萄糖氧化酶的情况下，在过氧化物酶共存的条件下，作为葡萄糖氧化酶底物可以使用 β -D-葡萄糖，作为显色剂可以使用酶为过氧化物酶时使用的显色剂等。

ELISA中测定来源于酶标记抗体的酶活性的底物与酶的反应生成物的方法没有特别限定。例如，在酶为过氧化物酶、底物为过氧化氢、显色剂为邻苯二胺的情况下，酶反应生成物的固有波长492nm下的吸光度可以通过96孔微量板阅读仪(Microplate Reader)读取。

LTIA中测定不溶性载体的凝集程度的方法没有特别限定。例如，对凝集性地、甚至半定量地进行测定时，也可以由已知浓度试样的浊度程度与测定试样的浊度程度进行比较，通过目测判定凝集的程度。此外，定量地测定该凝集的情况下，从简便性和精度的角度来看，较好是进行光学测定。凝集的光学测定法可以采用公知的方法。更具体来说，可以采用例如所谓比浊法(根据浊度的增加判断凝集块的形成)、基于粒度分布的测定法(根据粒度分布或平均粒径的变化判断凝集块的形成)、积分球浊度法(用积分球测定凝集块的形成引起的前方散射光的变化，比较与透射光强度的比值)等各种方式。

对用于分离HMW-Ad进行免疫测定的方法进行说明。使适当的蛋白酶与含有脂连蛋白的试样作用，消化除HMW-Ad之外的脂连蛋白，在采用蛋白酶的消化处

理后，对残留的HMW-Ad用抗脂连蛋白抗体进行测定。作为用于分离测定HMW-Ad的蛋白酶，只要是不消化HMW-Ad而消化其它的脂连蛋白，可以没有限制地使用。蛋白酶的来源可以是微生物、动物、植物等，没有特别限定，较好是使用来源于麦轴梗霉属(*Tritirachium*)的蛋白酶K，曲霉属、芽孢杆菌属等微生物来源的蛋白酶。作为来源于曲霉属的蛋白酶的市场上销售的产品的例子，可以例举蛋白酶P“アマノ”、蛋白酶A“アマノ”、ウマミザイム(アマノエンザイム公司)、スミチームMP、スミチームFP(新日本化学工业公司)等；作为来源于芽孢杆菌属的蛋白酶的市场上销售的产品的例子，可以例举蛋白酶N“アマノ”(アマノエンザイム公司)、プロチンPC(大和化成公司)等。这些蛋白酶也可以通过基因重组技术获得。此外，可以进行化学修饰。蛋白酶处理的条件根据使用的蛋白酶不同而不同，较好是在磷酸、Tris、顾氏等缓冲液中，于4~60℃进行5分钟~24小时。蛋白酶的使用浓度根据蛋白酶的比活性、反应温度和反应时间等决定，大致在0.01~100u/mL或0.01~100mg/mL的范围内使用。

作为用于对用这些蛋白酶处理生物体试样残留的HMW-Ad进行测定的抗体，可以使用识别脂连蛋白的抗体。抗脂连蛋白-多克隆抗体和单克隆抗体可以通过公知的方法对适当的动物进行免疫来获得，也能作为市场上销售的产品获得，可以将其用于本发明。例如，作为抗人脂连蛋白抗体，可以例举山羊抗人Acrp30抗体(コスモバイオ公司、GT公司)、兔抗人脂连蛋白多克隆抗体(コスモバイオ公司、chemicon公司)、人Acrp30单克隆抗体(藤泽药品工业公司、BD公司)、小鼠抗人脂连蛋白单克隆抗体(コスモバイオ公司、chemicon公司)、抗人Acrp30单克隆抗体(AX773、AX741、Ne, Na, 和光纯药工业公司)等。此外，也可以使用市场上销售的测定脂连蛋白总量的试剂盒，可以例举例如“人脂连蛋白ELISA试剂盒”(大塚制药公司)等。另外，也可以采用本发明者开发的方法(要求了日本专利特愿2003-354715的优先权的国际申请)：在生物体试样中加入还原剂、酸或其盐、表面活性剂和蛋白酶中的至少一种与脂连蛋白作用，使脂连蛋白多聚体转变为一定的形态，进行免疫学测定。

对用于分离MMW-Ad进行免疫测定的方法进行说明。通过与特异性消化ULMW-Ad和LMW-Ad的蛋白酶作用，求得没有消化而残留的MMW-Ad和HMW-Ad的合计量，再从该合计量减去HMW-Ad量，可以算出MMW-Ad量。作为该方法中使用的蛋白酶，只要是仅特异性消化ULMW-Ad和LMW-Ad，可以没有限制地使用。蛋白酶的来源可以是微生物、动物、植物等，没有特别限定，较好是使用来源于芽

孢杆菌属、曲霉属、葡萄球菌属等微生物来源的蛋白酶，可以使用例如蛋白酶S“アマノ”、蛋白酶A“アマノ”（アマノエンザイム公司），スミチームFP、スミチームLP50D（新日本化学工业公司），蛋白酶V8（生化学工业公司）等市场上销售的产品。这些蛋白酶也可以通过基因重组技术获得。此外，可以进行化学修饰。残留的MMW-Ad和HMW-Ad的合计量可以通过使用市场上销售的测定脂连蛋白总量的试剂盒等来求得。减去的HMW-Ad含量可以通过如上例举的方法进行测定。

生物体试样的蛋白酶处理方法根据使用的蛋白酶不同而不同，较好是在磷酸、Tris、顾氏等缓冲液中，于4~60℃进行5分钟~24小时。蛋白酶的使用浓度根据蛋白酶的比活性、反应温度和反应时间等决定，大致在0.01~100u/mL或0.01~100mg/mL的范围内使用。免疫测定法可以参考前述的关于对LMW-Ad进行分离测定的方法的记载采用ELISA或LTIA。

另外，使用HMW-Ad的分离测定方法的项中所述的蛋白酶，将ULMW-Ad、LMW-Ad和MMW-Ad的合计量作为转化物的总量算出，通过从该量减去与前述的可特异性消化ULMW-Ad、LMW-Ad的蛋白酶作用、作为转化物的总量算出的量，可以算出MMW-Ad的量。免疫测定法可以参考前述的关于对LMW-Ad或HMW-Ad进行分离测定的方法的记载采用ELISA或LTIA。

对用于分离ULMW-Ad进行免疫测定的方法进行说明。通过从脂连蛋白总量中减去前述测定的LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad的合计量，可以算出ULMW-Ad的量。作为具体例子，可以与特异性消化ULMW-Ad和LMW-Ad的蛋白酶作用，求得没有消化而残留的MMW-Ad和HMW-Ad的总和，从另外测定的脂连蛋白总量中减去该总和和LMW-Ad量，可以算出ULMW-Ad量。

若采用本发明，则可以分别分离测定人血液中存在的4种人脂连蛋白。其结果，可以对II型糖尿病、动脉硬化性疾病、肾疾病、肝疾病、肥胖症、代谢综合征的发病、诊断、进展、预测和治疗效果进行评价。作为评价的方法，可以例举将ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad中的一种以上的量的变动或者ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad和脂连蛋白总量中至少两个量的比值设为基准值进行观察的方法，对同一个体中的经时变动进行观察的方法。另外，还可以例举根据发生特定的疾病或病态时公知的其它指标（例如II型糖尿病中的胰岛素、动脉硬化性疾病中的HDL胆固醇等）与ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad中的一种以上的量或者与ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad和脂连蛋

白总量中至少两个量的比值的关系来进行评价的方法。

实施例

以下，例举实施例对本发明进行详细说明，但本发明并不局限于这些实施例。

〈试剂和材料〉

实施例和参考例中所使用的试剂和材料如下。

- a. 抗体结合树脂用的洗涤液:含0.5M NaCl的0.1M NaHCO₃-NaOH(pH8.3)。
- b. 抗体结合树脂用的洗脱液:0.1M 甘氨酸-HCl(pH2.5)。
- c. 抗体结合树脂用的中和液:2M Tris-HCl(pH8.0)。
- d. ELISA用板:96孔微孔板(NUNC公司)。
- e. ELISA用的抗体的敏化溶液:PBS(pH7.4)。
- f. ELISA用的缓冲液:含1%牛血清白蛋白、0.1% Tween 20的PBS(Ph7.4)。
- g. Vector ABC试剂盒(小鼠):フナコシ公司, 目录号PK-6102。
- h. DAB底物试剂盒(蛋白质印迹显色底物):フナコシ公司, 目录号SK-4100。
- i. 抗人脂连蛋白-单克隆抗体(hu Acrp30-MoAb): 藤泽药品工业公司、BD Transduction Laboratories公司, 商品编号A12820。
- j. 山羊抗人脂连蛋白-多克隆抗体(Goat α human Acrp30 antibody): コスモバイオ公司、GT公司, 目录号421065。
- k. 山羊抗小鼠IgG HRP标记抗体: コスモバイオ公司、capple公司。
- l. ELISA用的洗涤液:含0.05% Tween 20的PBS。
- m. ELISA用的缓冲液2:含1% BSA、0.05% Tween 20的PBS。
- n. 山羊抗人白蛋白-多克隆HRP标记抗体(HRP-Gt抗HAS抗体):PARIS公司。
- o. HRP-抗生物素蛋白:PIERCE公司。

参考例1. 大肠杆菌重组 小鼠球状脂连蛋白(rMgAd)的制备

将小鼠脂连蛋白的基因序列(NCBI 登录号U37222)的球状结构域序列(相当于104-247残基)插入到含有6×His标记的pQE30质粒的BamH I、HindIII中, 整合到大肠杆菌中。从表达重组 小鼠球状脂连蛋白(rMgAd)的大肠杆菌的rMgAd的纯化通过以下操作进行。即, 将大肠杆菌的可溶部分添加到Ni-NTA琼脂糖(QIAGEN公司), 在4℃下、16小时使rMgAd结合后, 通过咪唑梯度洗脱, 回收含脂连蛋白的部分, 用PBS(pH7.4)进行透析3天。得到的rMgAd的蛋白质浓度用Bio-Rad DC蛋白质试剂盒求得。

参考例2. 抗rMgAd抗体的制作

将50 μ g参考例1中制备的rMgAd与等量的弗氏完全佐剂混合，对两只兔以两周的间隔免疫6次，制成抗血清。抗血清中的特异性抗体(IgG)的纯化使用蛋白质A树脂通过常规方法进行(抗rMgAd抗体)。

参考例3. 来源于人血的脂连蛋白多聚体(mAd)的纯化

将500mg参考例2中制作的抗rMgAd抗体与50mL CNBr活化的Sephacryl 4B(Amersham Bioscience公司)结合，制成抗rMgAd抗体结合Sephacryl 4B树脂。将2.5L人血清添加到抗rMgAd抗体结合Sephacryl 4B树脂中，用抗体结合树脂用的洗涤液充分洗涤后，用抗体结合树脂用的洗脱液将人血清脂连蛋白部分(mAd)洗脱，在洗脱部分中以1/10的量添加抗体结合树脂用的中和液进行中和。再将中和了的洗脱部分添加到蛋白质A树脂中，将蛋白质A树脂未吸附部分作为纯化mAd回收，用“人脂连蛋白ELISA试剂盒”(大塚制药公司)测定脂连蛋白含量。

参考例4. 抗人脂连蛋白单克隆抗体的制作

将20 μ g参考例3中得到的纯化mAd与等量的弗氏完全佐剂混合，对两只小鼠以两周的间隔免疫3或4次后，于细胞融合的3天前再次进行投与。从免疫的小鼠摘出脾脏细胞，通过使用聚乙二醇的常规方法进行与P3U1骨髓瘤细胞的细胞融合。产生抗人脂连蛋白单克隆抗体的融合细胞的选择如下进行：选择通过ELISA法与mAd的反应性高的孔，接着通过用极限稀释法选择的常规方法进行。将选择的融合细胞投与到经降植烷处理了的小鼠腹腔内，以腹水的形式回收抗人脂连蛋白单克隆抗体。来自腹水的特异性抗体(IgG)的纯化使用蛋白质A树脂通过常规方法进行。根据上述得到以识别编号:64401~64411识别的11份产生抗人脂连蛋白单克隆抗体的融合细胞和单克隆抗体。

实施例1 来源于人血的脂连蛋白多聚体的分离纯化(1)

将参考例3中得到的纯化mAd用20mM磷酸缓冲液(pH7.0)透析、脱盐后，使其吸附在Gelatin-Cellulofine(生化学工业公司)柱，用分别含有0、100、200、300和500mM的NaCl的20mM磷酸缓冲液(pH7.0)进行梯度洗脱。得到的各NaCl浓度的洗脱部分中混杂有分子量不同的脂连蛋白。将得到的各洗脱部分浓缩，对各洗脱部分再进行使用Sephacryl S-300(分离分子量:10~1500kDa，平均粒径47 μ m, Amersham Bioscience公司)的凝胶过滤色谱分离。洗脱液使用含150mM的NaCl的20mM磷酸缓冲液(pH7.0)。Sephacryl S-300柱的分子量校准使用凝胶

过滤校准试剂盒(Amersham Bioscience公司)进行。各色谱中的脂连蛋白的检测通过“人脂连蛋白ELISA试剂盒”(大塚制药公司)进行。

凝胶过滤色谱的色谱图如图1所示。将得到的洗脱部分区分为150kDa以上200kDa以下(主要在160kDa附近)、超过200kDa未满400kDa(主要在260kDa附近)、400kDa以上800kDa以下(主要在450kDa附近)3部分进行收集,制成脂连蛋白多聚体分离纯化产物。各脂连蛋白多聚体分离纯化产物中,150kDa以上200kDa以下的称作LMW-Ad,超过200kDa未满400kDa的称作MMW-Ad,400kDa以上800kDa以下的称作HMW-Ad。

前一步骤中得到的3种脂连蛋白多聚体分离纯化产物LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad分别用聚丙烯酰胺凝胶电泳(聚丙烯酰胺浓度2-15%)(以下记作PAGE(2-15%))进行分离,进行采用CBB(考马斯亮蓝)的蛋白质染色。染色了的电泳图如图2所示。

对于LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad都发现了除主要的染色条带之外的条带,但相对于主要的染色条带检出的程度很低,确认实现了分离、纯化。如前所述,由于脂连蛋白形成以三聚体为主的多聚体,因此对于LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad,凝胶过滤得到的分子量与PAGE中估计的分子量未必一致。

实施例2 来源于人血的脂连蛋白多聚体(LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad)的结构分析

1) 基于SDS-PAGE的分析

将实施例1中得到的脂连蛋白多聚体分离纯化产物在非还原条件下用SDS-PAGE(2-15%)进行分离,进行采用CBB的蛋白质染色。染色了的电泳图如图3所示。

LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad在60kDa附近都发现明显的染色条带。该染色条带根据报告了的脂连蛋白的结构和分子量推测为脂连蛋白的二聚体。对于LMW-Ad,除了前述60kDa之外,在90kDa附近发现未鉴定的明显的染色条带。

2) SDS-PAGE(2-15%)中在90kDa附近泳动的未鉴定脂连蛋白的分析

切下前述1)中检出的90kDa附近的未鉴定的染色条带的凝胶,使用エレクトロエリ्यूター型号422(バイオラッド公司)抽提蛋白质。将抽提的蛋白质用含有2-巯基乙醇的处理液煮沸,进行还原处理,再用SDS-PAGE(2-15%)进行分离后,转移到PVDF膜上,进行CBB蛋白质染色后,发现在60kDa附近和30kDa附近的两条染色条带。

分别对前述60kDa附近和30kDa的条带中的蛋白质进行N末端氨基酸序列分析后,发现60kDa附近的条带中的蛋白质的N末端氨基酸序列与人白蛋白的N末端氨基酸序列一致。另一方面,30kDa附近的条带中的蛋白质的N末端氨基酸序列与脂连蛋白的氨基酸序列的第19位起的序列一致。

由以上的事实知道,对LMW-Ad进行SDS-PAGE(2-15%)时检出的90kDa附近的蛋白质是1分子白蛋白和1分子脂连蛋白以二硫键结合的异二聚体。因此,知道了LMW-Ad部分的脂连蛋白的结构为脂连蛋白三聚体和白蛋白以二硫键结合的结构。

实施例3 来源于人血的脂连蛋白多聚体的分离纯化(2)

将按照参考例3的方法再次制备的纯化mAd用20mM磷酸缓冲液(pH7.0)透析、脱盐后,使其吸附在Gelatin-Cellulofine(生化学工业公司)柱,用分别含有0、100、200和500mM的NaCl的20mM磷酸缓冲液(pH7.0)进行梯度洗脱。由于得到的100mM NaCl洗脱部分中混杂了ULMW-Ad、LMW-Ad和MMW-Ad,200mM NaCl洗脱部分中混杂了MMW-Ad和HMW-Ad,500mM NaCl洗脱部分中只有HMW-Ad,因此将500mM NaCl洗脱部分作为HMW-Ad的分离纯化产物。接着,按照上述参考例3的方法,制作山羊抗人ALB抗体结合Sepharose4B树脂后,添加100mM NaCl洗脱部分,得到非吸附部分和吸附部分。非吸附部分混杂了ULMW-Ad和MMW-Ad,吸附部分只有LMW-Ad,将其作为LMW-Ad的分离纯化产物。再浓缩非吸附部分,通过使用Sephacryl S-300(分离分子量:10~1500kDa,平均粒径47 μ m,Amersham Bioscience公司)的凝胶过滤色谱分离ULMW-Ad和MMW-Ad。将得到的各部分分别作为ULMW-Ad的分离纯化产物和MMW-Ad的分离纯化产物。

基于实施例1的分离纯化中得到的信息,进一步改良分离纯化条件后,该方法中除了LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad这3种之外,新分离出1种(作为ULMW-Ad)。

前一步骤中得到的4种脂连蛋白多聚体分离纯化产物ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad分别在非变性条件下用PAGE(2-15%)进行分离,进行CBB蛋白质染色。染色了的电泳图如图6所示。

实施例4 来源于人血的脂连蛋白多聚体(ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad)的结构分析

1) 基于SDS-PAGE的分析

将实施例3中得到的脂连蛋白多聚体各分离纯化产物在非还原条件下用SDS-PAGE(2-15%)进行分离,进行CBB蛋白质染色。染色了的电泳图如图7所示。

ULMW-Ad、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad在60kDa附近都发现明显的染色条带。该染色条带根据报告了的脂连蛋白的结构和分子量推测为脂连蛋白的二聚体。对于LMW-Ad,除了前述60kDa之外,在90kDa附近发现未鉴定的明显的染色条带。此外,对于ULMW-Ad除了二聚体之外还发现了单体的染色条带,所以推测为三聚体。由图7的电泳图发现,LMW-Ad的染色条带有两条,一起成为白蛋白结合了的脂连蛋白。

2) 基于分子内交联的分子量的推定

实施例3中得到的脂连蛋白多聚体各分离纯化产物用100mM磷酸缓冲液(pH8.0)稀释到5~10 μ g/mL左右,与另外用精制水稀释到20mg/mL的作为交联剂的双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸盐(商品名BS³:PIERCE公司制)的溶液等量混合后,在室温下放置30分钟。再向混合液中等量添加100mM Tris盐酸缓冲液(pH8.0),在室温下放置15分钟。将这些处理液在非还原条件下分别用SDS-PAGE(2-15%)进行分离,通过半干印迹法转移到PVDF膜上后,进行免疫染色。步骤为,将转移膜用含有5%脱脂乳和0.1% NaN₃的PBS进行封闭后,用含有0.1% Tween 20的PBS洗涤,与1 μ g/mL抗人脂连蛋白单克隆抗体(hu Acrp30-MoAb)在室温下反应1小时。用含有0.1% Tween 20的PBS充分洗涤后,使用Vector ABC试剂盒(小鼠)和DAB底物试剂盒进行显色。

其结果如图8所示。通过分子量标记进行分子量校准后,ULMW-Ad在约100kDa附近发现染色条带,根据报告了的脂连蛋白的结构和分子量,确认为三聚体。LMW-Ad在约150kDa附近发现染色条带,为如上得到的白蛋白结合了的三聚体,从分子量也得到确认。MMW-Ad在250kDa附近发现染色条带,推测为形成了6或9聚体的脂连蛋白。HMW-Ad在非常高分子的位置发现染色条带,分子量相当大,推测至少在300kDa以上,推定约为12聚体或18聚体,准确形态不明。

实施例5 人血清中的脂连蛋白的蛋白质印迹分析

将8个健康人的血清每人0.2 μ L,用PAGE(2-15%)进行分离,通过半干印迹法转移到PVDF膜上后,进行免疫染色。步骤为,将转移膜用含有5%脱脂乳和0.1% NaN₃的PBS(pH7.4)进行封闭后,用含有0.1% Tween 20的PBS(pH7.4)洗涤,与1 μ g/mL抗人脂连蛋白单克隆抗体(hu Acrp30-MoAb,藤泽药品工业公司、BD Transduction Laboratories公司)在室温下反应1小时。用含有0.1% Tween 20的PBS(pH7.4)充分洗涤后,使用Vector ABC试剂盒(小鼠)和DAB底物试剂盒(フナコシ公司)进行显色。

在与实施例1中制备的LMW-Ad、MMW-Ad和HMW-Ad部分同样的位置发现作为主条带显色，因此确认这3种脂连蛋白是存在于血中的主要的形式(图4)。

此外，对于ULMW-Ad，可能是存在量少或其它不明的原因，几乎没有发现染色条带(图4)。

实施例6 白蛋白结合型脂连蛋白的测定(1)

在ELISA用板上将山羊抗人脂连蛋白多克隆抗体(Goat α human Acrp30 antibody)用ELISA用的抗体的敏化溶液稀释至 $1\mu\text{g/mL}$ ，进行敏化。用ELISA用的缓冲液进行封闭后，将实施例1中制备的LMW-Ad用ELISA用的缓冲液稀释至1、0.1、0.01 $\mu\text{g/mL}$ (以Ad含量计)的浓度，在室温下反应1小时。用ELISA用的缓冲液洗涤板后，与用ELISA用的缓冲液稀释至1/2000倍的抗人白蛋白-单克隆抗体(日本专利特开2001-337092)溶液在室温下反应1小时后，用ELISA用的缓冲液洗涤板，与用ELISA用的缓冲液稀释至1/1000倍的山羊抗小鼠(Goat α mouse) IgG HRP标记抗体液在室温下反应1小时。用ELISA用的缓冲液洗涤板后，通过使用TMB(四甲基联苯胺)和过氧化氢底物的HRP酶反应进行显色，添加2N硫酸使反应停止后，测定450nm的吸收。测定结果如图5所示。

观察到浓度依赖性的吸光度的增加，由三明治免疫测定法的建立，明确了LMW-Ad为在脂连蛋白上结合了白蛋白的形式(白蛋白结合型脂连蛋白)。此外，还明确了通过本实施例的方法可以对LMW-Ad进行分离测定。

实施例7 白蛋白结合型脂连蛋白的测定(2)

(1) 稀释线性

在ELISA用板上将用ELISA用的抗体的敏化溶液稀释至 $5\mu\text{g/mL}$ 的抗脂连蛋白单克隆抗体(64402)进行敏化。接着，用含有20%山羊血清的ELISA用的缓冲液进行封闭后，将实施例3中制备的LMW-Ad纯化产物用ELISA用的缓冲液稀释至0~20 ng/mL (以Ad含量计)的浓度范围，在室温下反应1小时。用ELISA用的洗涤液洗涤板后，与用ELISA用的缓冲液稀释了1000倍的HRP标记的山羊抗人白蛋白(HRP-Gt抗HSA)抗体液在室温下反应1小时后，用ELISA用的洗涤液洗涤板，通过OPD显色液(含有2mg/mL邻苯二胺盐酸盐、0.02%过氧化氢的250mM柠檬酸缓冲液，pH5.0)进行显色，添加终止液(1.5N硫酸、1mM EDTA-2Na)使反应停止后，测定492nm的吸收。测定结果如图9所示。

观察到浓度依赖性的吸光度的增加，由三明治免疫测定法的建立，再次确认了LMW-Ad为在脂连蛋白上结合了白蛋白的形式(白蛋白结合型脂连蛋白)。

(2) 添加回收试验

在将人血清用ELISA用的缓冲液2稀释至100~800倍的溶液中，在0~50ng/mL的浓度范围内添加实施例3中制备的LMW-Ad纯化产物，通过与前述(1)同样的ELISA系统进行测定后，求得由添加量和实测值得到的回收率。其结果如表1所示。

[表1]

血清稀释倍数	纯化Ad添加量(ng/ml)→	10	5	2.5	1.25	0
100	理论值(ng/ml)	13.75	8.75	6.25	5.00	3.75
	实测值(ng/ml)	15.22	9.78	6.48	5.08	3.75
	回收率(%)	111	112	104	102	100
200	理论值(ng/ml)	11.97	6.97	4.47	3.22	1.97
	实测值(ng/ml)	12.13	7.13	4.42	3.31	1.97
	回收率(%)	101	102	99	103	100
400	理论值(ng/ml)	11.00	6.00	3.50	2.25	1.00
	实测值(ng/ml)	11.72	6.02	3.60	2.35	1.00
	回收率(%)	106.5	100.4	102.7	104.6	100
800	理论值(ng/ml)	10.53	5.53	3.03	1.78	0.53
	实测值(ng/ml)	10.83	5.44	3.07	1.81	0.53
	回收率(%)	103	98	101	102	100

所有的情况都得到良好的回收率，明确了通过本实施例的方法可以对LMW-Ad进行分离测定。

实施例8 蛋白酶处理(1)

在50mM磷酸缓冲液(pH8.0)中添加参考例3中得到的纯化mAd和各种市场上销售的蛋白酶，在37℃下加热60分钟。将该处理液用PAGE(2-15%)进行分离，以未添加蛋白酶的试样作为对照，用CBB蛋白质染色图比较对各部分的作用(表2)。

通过处理条件1~2中使用的蛋白酶处理，确认LMW-Ad消失，MMW-Ad和HMW-Ad残留。另外，没有发现明显的转化物。另一方面，通过处理条件3~4中使用的蛋白酶处理，确认LMW-Ad消失，MMW-Ad和HMW-Ad残留，而且发现在低分子量区域出现来源于LMW-Ad的转化物的新染色条带。另外，通过处理条件5~6中使用的蛋白酶处理，确认LMW-Ad和MMW-Ad消失，HMW-Ad残留，而且发现在低分子量区域出现来源于LMW-Ad的转化物的新染色条带。这些转化物的PAGE(2-15%)下的染色条带的检出位置根据使用的蛋白酶不同而会稍有不同，在30-42kDa的范围内被检出。由该结果可知，通过采用处理条件1和2的处理，可以测定MMW-Ad和HMW-Ad的合计量，通过采用处理条件3和4的处理，可以测定

单独的LMW-Ad或者MMW-Ad和HMW-Ad的合计量，通过采用处理条件5和6的处理，可以测定单独的HMW-Ad或者MMW-Ad和HMW-Ad的合计量。

[表2]

处理条件		1	2	3	4	5	6
蛋白酶		蛋白酶S “アミノ”	蛋白酶V8	蛋白酶A “アミノ”	スミチ-ΔFP	蛋白酶P “アミノ”	ウミサザイム
脂连蛋白 多聚体	HMW-Ad	+	+	+	+	+	+
	MMW-Ad	+	+	+	+	—	—
	LMW-Ad	—	—	—	—	—	—
转化物		—	—	+	+	+	+

(—)=消失 (—)=不变或生成转化物

实施例9 蛋白酶处理(2)

在50mM磷酸缓冲液(pH8.0)中以1mg/mL添加实施例3中分析的纯化mAd和各种市场上销售的蛋白酶，在37℃下加热30分钟。将该处理液用PAGE(2-15%)进行分离，以未添加蛋白酶的试样作为对照，用CBB蛋白质染色图比较蛋白酶对各部分的作用(表3)。

通过处理条件7~9中使用的蛋白酶处理，确认ULMW-Ad和LMW-Ad消失，MMW-Ad和HMW-Ad残留。另外，发现在低分子量区域出现来源于ULMW-Ad和LMW-Ad的转化物的新染色条带。另外，通过处理条件10~12中使用的蛋白酶处理，确认ULMW-Ad、LMW-Ad和MMW-Ad消失，HMW-Ad残留，而且发现在低分子量区域出现来源于ULMW-Ad、LMW-Ad和MMW-Ad的转化物的新染色条带。这些转化物的PAGE(2-15%)下的染色条带的检出位置根据使用的蛋白酶不同而会稍有不同，在30-40kDa的范围内被检出。由该结果可知，通过使用处理条件7~9中所用的蛋白酶，可以分离测定残留的MMW-Ad和HMW-Ad的合计量，或者通过测定新生成的Ad转化生成物，可以分离测定ULMW-Ad和LMW-Ad的合计量。此外，通过使用处理条件10~12中所用的蛋白酶，可以分离测定残留的HMW-Ad量，或者ULMW-Ad、LMW-Ad和MMW-Ad的合计量。

[表3]

处理条件		7	8	9	10	11	12
蛋白酶		蛋白酶A “アマノ”	スミチ-ΔFP	スミチ-Δ LP50D	蛋白酶K	蛋白酶P “アマノ”	蛋白酶N “アマノ”
脂连蛋白 多聚体	HMW-Ad	++	++	++	++	++	++
	MMW-Ad	++	++	++	—	—	—
	LMW-Ad	—	—	—	—	—	—
	ULMW-Ad	—	—	—	—	—	—
转化物		+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+)=减少 (++)=不变 (+++)=增加或生成转化物
(-)=消失或未生成转化物

实施例10 HMW-Ad测定用的蛋白酶处理

在参考例3中得到的抗体结合树脂非吸附部分(以下称作“去Ad血浆”)中添加实施例3中得到的各脂连蛋白多聚体分离纯化产物,使最终浓度达到10 μg/mL左右,制成研究用试样。此外,在50mM Tris盐酸缓冲液(pH8.0)中溶解蛋白酶K,使浓度达到5~10u/mL,制成预处理用的酶液。在10 μL各研究用试样中加入90 μL预处理用的酶液,在37℃下反应10~30分钟后,加入400 μL 100mM柠檬酸缓冲液(pH3.0、含2% SDS),使酶反应(预处理)停止。在20 μL该反应液中添加1.0mL ELISA用的缓冲液2进行稀释,制成经预处理的试样。使用该经预处理的试样,通过后述的脂连蛋白测定用的ELISA系统,算出残留的脂连蛋白含量。

实施例11 测定MMW-Ad和HMW-Ad的合计量用的蛋白酶处理

与实施例10同样地,在去Ad血浆中添加实施例3中得到的各脂连蛋白多聚体的分离纯化产物,使最终浓度达到10 μg/mL左右,制成研究用试样。此外,在50mM Tris盐酸缓冲液(pH8.0)中溶解蛋白酶A“アマノ”,使浓度达到0.6~1.0mg/mL,制成预处理用的酶液。在10 μL各研究用试样中加入90 μL预处理用的酶液,在37℃下反应10~30分钟后,加入400 μL 100mM柠檬酸缓冲液(pH3.0、含2% SDS),使酶反应(预处理)停止。在20 μL该反应液中添加1.0mL ELISA用的缓冲液2进行稀释,制成经预处理的试样。使用该经预处理的试样,通过后述的脂连蛋白测定用的ELISA系统,算出残留的脂连蛋白含量。

实施例12 脂连蛋白总量测定用的试样的制备

根据在生物体试样中加入还原剂、酸或其盐、表面活性剂和蛋白酶中的至少一种与脂连蛋白作用,使脂连蛋白多聚体转化成一定的形态进行免疫学测定的本发明者开发的方法(要求了日本专利特愿2003-354715的优先权的国际申

请), 采用了用酸和表面活性剂进行预处理的方法。即, 在10 μ L人血浆或人血清中加入490 μ L 100mM柠檬酸缓冲液(pH3.0、含2% SDS), 充分搅拌, 在20 μ L该混合液中添加1.0mL ELISA用的缓冲液2进行稀释, 制成经预处理的试样。使用该经预处理的试样, 通过后述的脂连蛋白测定用的ELISA系统, 算出脂连蛋白总量。

实施例13 脂连蛋白测定用的ELISA系统

在ELISA用板上将用PBS稀释至5 μ g/mL的抗人脂连蛋白单克隆抗体(64405)进行敏化。接着, 用ELISA用缓冲液2进行封闭后, 添加实施例10或11中制备的各经预处理的试样, 在室温下反应1小时。用ELISA用的洗涤液洗涤板后, 与用ELISA用的缓冲液2稀释了2000倍的生物素标记抗人脂连蛋白单克隆抗体(64404)在室温下反应1小时后, 添加用ELISA用的缓冲液2稀释了2000倍的HRP-抗生物素蛋白, 在室温下反应30分钟。用ELISA用的洗涤液洗涤板, 通过OPD显色液(含有2mg/mL邻苯二胺盐酸盐、0.02%过氧化氢的250mM柠檬酸缓冲液, pH5.0)进行显色, 添加终止液(1.5N硫酸、1mM EDTA-2Na)使反应停止后, 测定492nm的吸收。在90 μ L预处理用的酶液和400 μ L 100mM柠檬酸缓冲液(pH3.0、含2% SDS)的混合液中加入10 μ L研究用试样, 制成标准试样, 同样地进行ELISA测定, 将得到的显色值定为100%, 对实施例10和11的各研究试样的显色值进行%换算。把换算成%的显色值按各条件进行平均, 实施例10的试样如图10所示, 实施例11的试样如图11所示。

由图10的结果知道, 通过采用蛋白酶K的蛋白酶处理, 血浆中除HMW-Ad以外的Ad多聚体被消化, 可以特异性地测定HMW-Ad。由图11的结果知道, 通过采用蛋白酶A “アマノ” 的蛋白酶处理, 血浆中除MMW-Ad和HMW-Ad以外的Ad多聚体被消化, 可以特异性地测定MMW-Ad和HMW-Ad的合计量。对于MMW-Ad的浓度, 可以通过从MMW-Ad和HMW-Ad的合计量减去HMW-Ad的浓度来算出。

由以上的事实可知, 通过在进行实施例12的预处理后测定试样中的脂连蛋白总量, 从脂连蛋白总量中减去通过实施例6或7的方法求得的LMW-Ad浓度与通过实施例11和13的方法求得的MMW-Ad和HMW-Ad的合计量, 也可以算出ULMW-Ad浓度。由此, 可以得到存在于人血中的4种Ad多聚体的总量并进行分离测定。

实施例14 与动脉硬化性疾病的关系

在298名未进行胰岛素治疗的II型糖尿病患者中, 将通过冠状动脉造影检查(CAG)发现器质性病变的90名分在冠状动脉疾病(CAD)组, 将剩下的208名分

在非冠状动脉疾病(NCAD)组,使用前述实施例中列举的方法,进行患者血浆中的总脂连蛋白(T. Ad)含量测定和各脂连蛋白多聚体的分离测定。即,用实施例12和13的方法求得T. Ad,用实施例10和13的方法求得HMW-Ad含量,通过实施例11和13的方法算出MMW-Ad和HMW-Ad的合计量,再减去HMW-Ad含量,求得MMW-Ad含量。通过从T. Ad含量中减去MMW-Ad和HMW-Ad的合计量求得ULMW-Ad和LMW-Ad的合计量。通过求得的各个值,使用t测验进行CAD组和NCAD组间的显著性差异测验。

其结果如表4所示。对于T. Ad含量,CAD组和NCAD组间没有发现显著性差异,对于HMW-Ad含量发现显著性差异($p < 0.05$)。另外,HMW-Ad含量相对于T. Ad含量的比值(%)发现明显的显著性差异($p < 0.0001$)。该结果显示,相比T. Ad含量,HMW-Ad含量、特别是其在T. Ad含量中所占的比例(%)更准确地反映CAD。

[表4]

	CAD		NCAD		p值
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	
血浆中的T. Ad含量($\mu\text{g/mL}$)	9.64	6.73	9.92	6.15	0.726
血浆中的HMW-Ad含量($\mu\text{g/mL}$)	3.00	2.70	3.76	3.11	0.046
血浆中的MMW-Ad含量($\mu\text{g/mL}$)	4.32	3.06	4.02	2.41	0.374
血浆中的ULMW及LMW-Ad含量的和($\mu\text{g/mL}$)	2.34	1.92	2.18	1.60	0.463
血浆中的HMW-Ad/T. Ad(%)	27.0	10.2	34.2	10.9	<0.0001
血浆中的MMW-Ad/T. Ad(%)	43.6	11.5	42.0	11.8	0.260

实施例15 与代谢综合征的关系

对实施例14中提到的298人,根据总脂连蛋白量(T. Ad)和HMW-Ad量在T. Ad量中占的比例、即 $\text{HMW-Ad/T. Ad} \times 100\%$ (HMW-R),按以下所示的标准分成4组。首先,分别算出T. Ad的平均值和HMW-R的平均值,结果分别为 $9.8 \mu\text{g/mL}$ 和32%。接着,将T. Ad值和HMW-R值均未达到平均值的患者分为A组,将T. Ad值未达到平均值、HMW-R值在平均值以上的患者分为B组,将T. Ad值在平均值以上、HMW-R值未达到平均值的患者分为C组,将T. Ad值和HMW-R值均在平均值以上的患者分为D组。再在各组内,对照美国的成人治疗专家组III(Adult Treatment Panel、ATPIII)所建议的代谢综合征的诊断标准(JAMA, 285:2486, 2001),分成在5项危险因素中有两项以上超过基准值的患者和不到两项的患者这两个小组(原来,在ATPIII的诊断标准中,将有3项以上超过基准值的情况定为代谢综合征,但这里将其视为更严格的条件)。其结果如表5所示。

由Kruskal-Wallis检验的结果知道“代谢综合征诊断标准项目数与T. Ad值和HMW-R值在统计学上存在显著的相关性”(p值=0.001)。另外发现,HMW-R值

在平均值以下的A组和C组中，代谢综合征诊断标准项目数在2项以上的患者比例高。该结果显示，与T.Ad值相比，HMW-R值是在表现与代谢综合征的关系方面更适合的指标。即，测定HMW-R值用作代谢综合征的指标对于代谢综合征的预测和预防是有效的，这是第一次发现这一点。

[表5]

	不到两项	两项以上
A组	44	92
B组	29	21
C组	6	13
D组	50	43

(人)

由以上的结果可知，仅将总脂连蛋白含量作为指标无法进行疾病和病态的评价时，通过测定Ad多聚体的特定部分和参考特定的部分在总脂连蛋白含量中所占的比例，可以预测或预防疾病，把握病态。

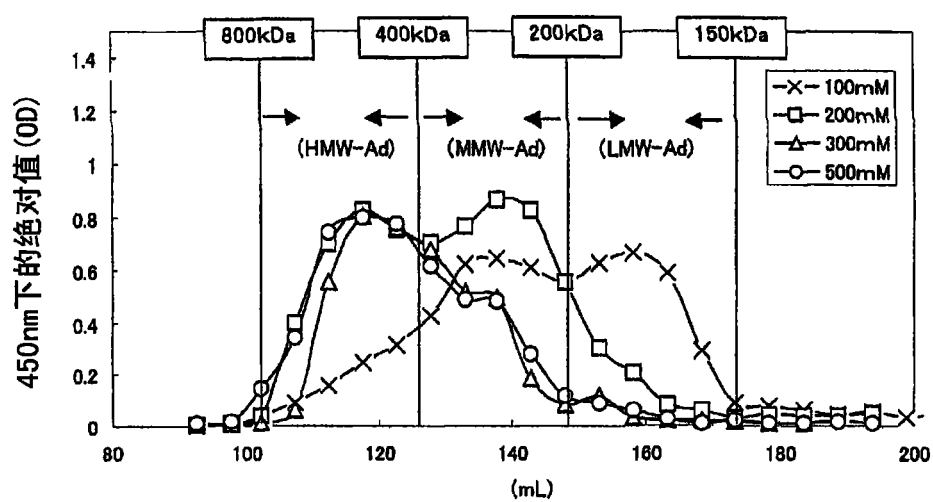


图 1

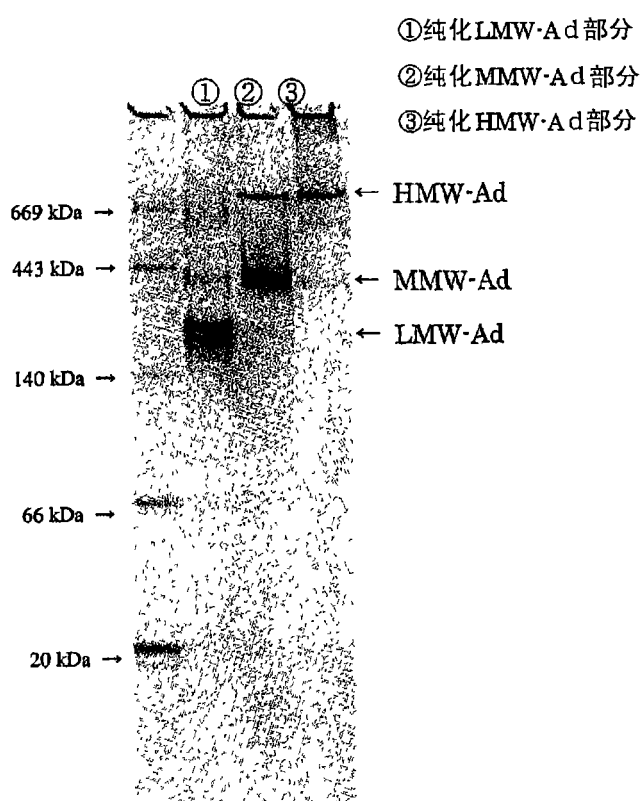


图 2

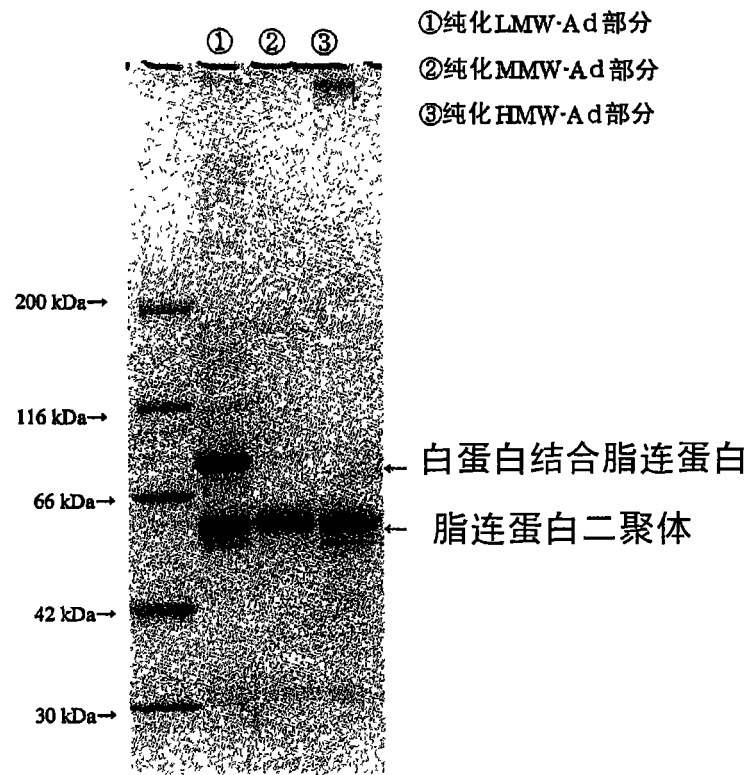


图 3

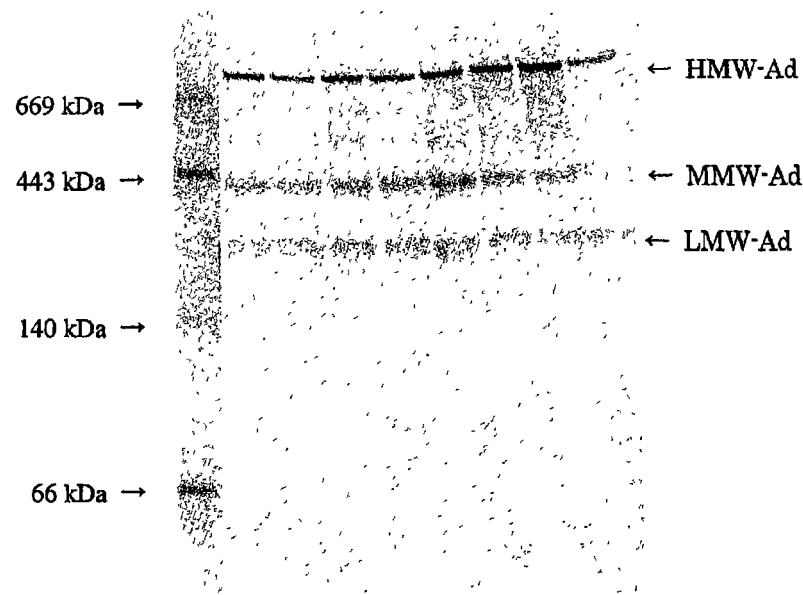


图 4

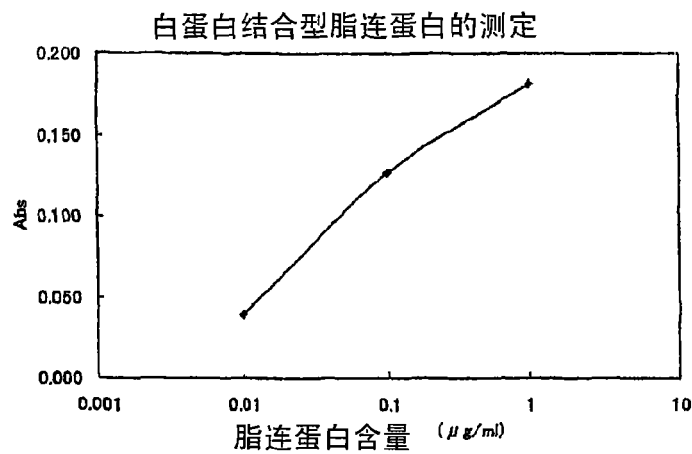


图 5

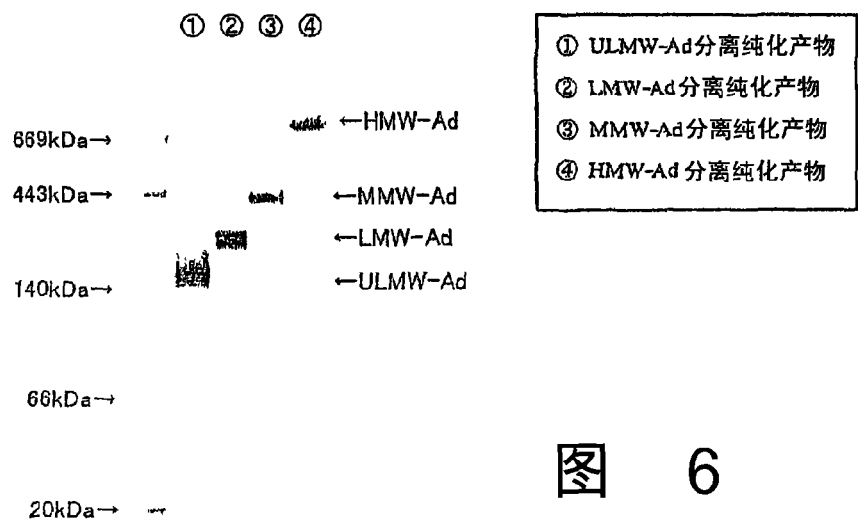


图 6



图 7

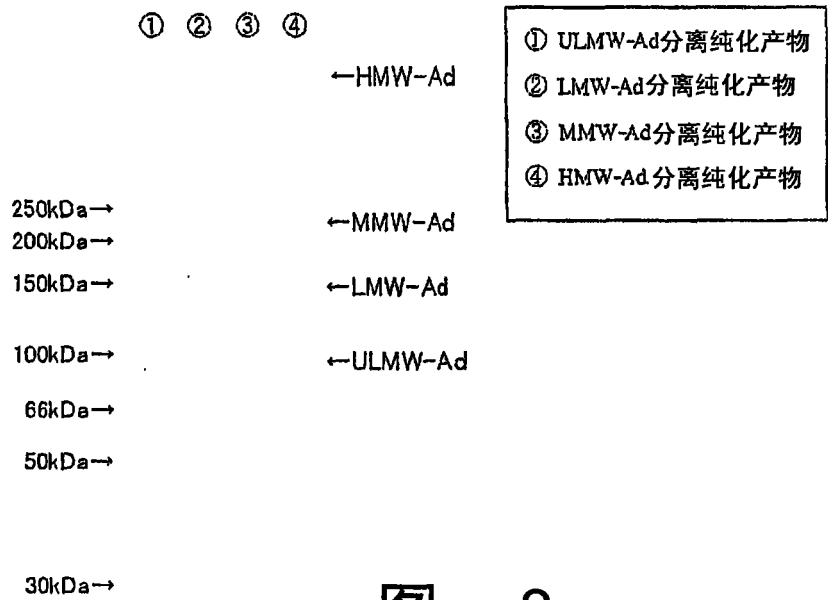


图 8

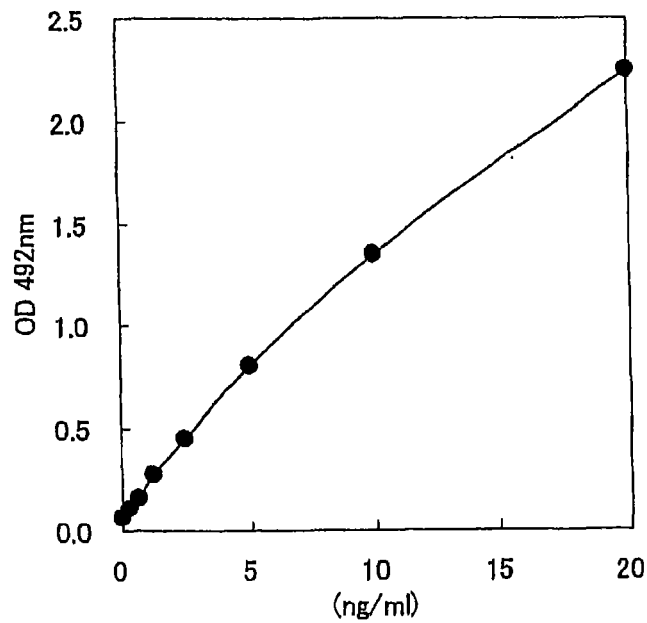


图 9

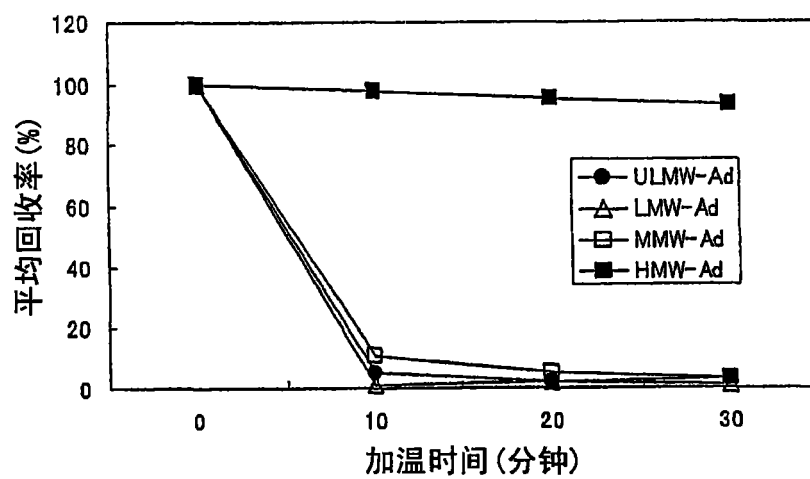


图 10

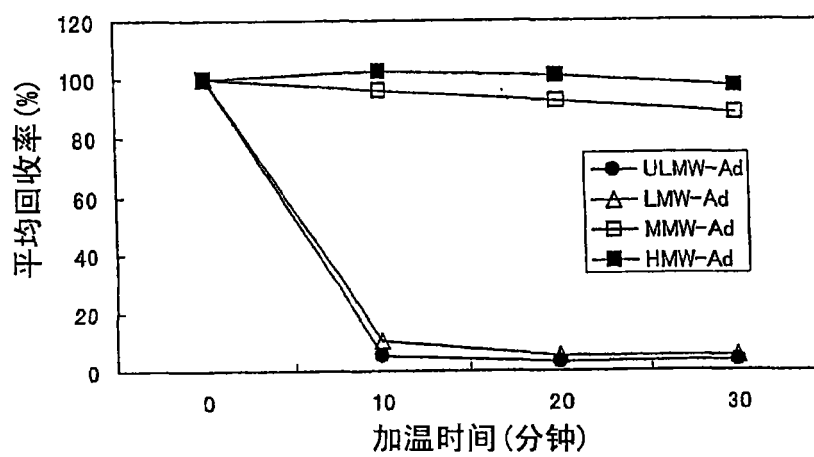


图 11

专利名称(译)	脂连蛋白多聚体的分离测定方法		
公开(公告)号	CN1867828A	公开(公告)日	2006-11-22
申请号	CN200480029684.2	申请日	2004-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社 株式会社东京大学TLO		
申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社 株式会社东京大学TLO		
当前申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社 株式会社东京大学TLO		
[标]发明人	海老沼宏幸 矢后弘和 秋元优夏 宫崎修 门脇孝 山内敏正 原一雄		
发明人	海老沼宏幸 矢后弘和 秋元优夏 宫崎修 门脇孝 山内敏正 原一雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2800/042 G01N2800/32		
优先权	2003354930 2003-10-15 JP		
其他公开文献	CN1867828B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供分离在生物体试样中形成各种多聚体存在的脂连蛋白进行免疫学测定的方法，以及通过分离测定、获得只通过脂连蛋白的总量测定无法得到的信息、更准确地评价疾病与脂连蛋白的关系的方法。生物体试样中的脂连蛋白多聚体的分离测定方法，其特征在于，使用蛋白酶和/或抗体将作为测定对象的脂连蛋白多聚体与其它脂连蛋白分离，进行免疫学测定。

