

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 1/14

C07K 1/02 G01N 33/53



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00804405.8

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1135235C

[22] 申请日 2000.1.7 [21] 申请号 00804405.8

[30] 优先权

[32] 1999. 1. 8 [33] US [31] 60/115272

[32] 1999. 10. 19 [33] US [31] 09/420850

[86] 国际申请 PCT/US00/00457 2000. 1. 7

[87] 国际公布 WO00/40966 英 2000. 7. 13

[85] 进入国家阶段日期 2001. 8. 29

[71] 专利权人 美国政府农业部

地址 美国华盛顿

共同专利权人 安德鲁·J·阿尔珀特

[72] 发明人 安德鲁·J·阿尔珀特

M·J·施梅尔

审查员 石剑平

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

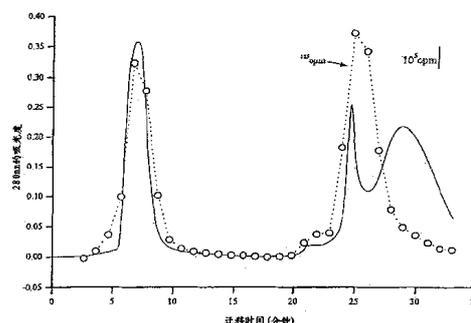
代理人 张广育 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 2 页

[54] 发明名称 提取朊病毒蛋白的方法和试剂盒

[57] 摘要

一种用于从生物材料如动物组织或动物产品中提取朊病毒蛋白的方法。在特定的实施例中，用六氟-2-丙醇从匀浆化的绵羊脑组织中提取到异常朊病毒蛋白。通过增加水溶液的离子强度可使六氟-2-丙醇与脑组织水制备物分离。可将有机提取物中的朊病毒蛋白进一步纯化，或者借助于例如免疫测定法测定此提取物中是否存在朊病毒蛋白，特别是异常朊病毒蛋白。此提取方法使之有可能测定是否存在异常朊病毒蛋白，可用于例如诊断传染性海绵状脑炎(TSE)。上面的图显示如通过放射性(由圆圈表示的)和通过在 280nm 的吸光度(由曲线图中的实线表示的)检测的<sup>125</sup>I-朊病毒蛋白的 HILIC 层析图谱。



ISSN 1008-4274

1. 一种用于从怀疑含有异常朊病毒蛋白的生物材料中提取异常朊病毒蛋白的方法，此方法包括：

5 (a) 温育提取溶剂与生物材料的等渗或低渗水制备物的混合液，其中该提取溶剂是：

(i) 该异常朊病毒蛋白可溶入其中的极性有机溶剂，并且是

(ii) 与非感胶离子水溶液可混溶的，但与感胶离子水溶液不可混溶的，

10 (b) 增加此混合液的感胶离子活性，以便使该提取溶剂与生物材料水制备物分离开，得到含有来自该生物材料的任何异常朊病毒蛋白的提取溶剂。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述的提取溶剂是六氟-2-丙醇。

3. 权利要求 1 的方法，其中的生物材料是来自脊椎动物的组织或生物液体。

15 4. 权利要求 3 的方法，其中的组织是脑组织。

5. 权利要求 3 的方法，其中的生物液体选自脑脊液、血液、血浆和血清。

6. 权利要求 3 的方法，其中的生物液体是人的血液。

20 7. 权利要求 1 的方法，其中是在大约 20℃ - 100℃ 的温度范围内温育所述的混合液。

8. 权利要求 7 的方法，其中的温育是在大约 56℃ 进行。

9. 权利要求 1 的方法，其中是通过对所提混合液加入大约 1 : 1 比例（体积/体积）的 0.5M 硫酸钠来增加所述的感胶离子活性。

25 10. 权利要求 1 的方法，其中是用蛋白酶 K 处理生物材料的等渗或低渗水制备物中的生物材料。

11. 权利要求 1 的方法，进一步包括 (c) 干燥含有异常朊病毒蛋白的提取溶剂以便形成提取物沉淀。

12. 权利要求 11 的方法，还进一步包括 (d) 将所述干燥的提取物沉淀溶于水中并纯化所述的异常朊病毒蛋白。

30 13. 权利要求 12 的方法，其中所述的纯化包括选自亲水相互作用层析和毛细管电泳的方法。

14. 一种检测生物样品中是否存在异常朊病毒蛋白的方法，该方法包括：

(a) 温育提取溶剂与生物材料的等渗或低渗水制备物的混合液，其中该提取溶剂是：

5 (i) 该异常朊病毒蛋白可溶入其中的极性有机溶剂，并且是

(ii) 与非感胶离子水溶液可混溶的，但与感胶离子水溶液不可混溶的，

(b) 增加此混合液的感胶离子活性，以便使该提取溶剂与生物材料水制备物分离开，得到含有来自该生物材料的任何异常朊病毒蛋白的提取溶剂，

10 (c) 通过可以测定所述异常朊病毒蛋白存在的方法测定步骤 (b) 的分离提取溶剂中的异常朊病毒蛋白。

15 15. 权利要求 14 的方法，其中的测定法包括对异常朊病毒蛋白的免疫测定法。

16. 权利要求 14 的方法，其中的生物样品是来自脊椎动物的组织或生物液体。

17. 权利要求 16 的方法，其中的组织是脑组织。

18. 权利要求 16 的方法，其中的生物液体选自脑脊液、血液、血浆和血清。

20 19. 权利要求 16 的方法，其中的生物液体是人的血液。

20. 一种用于从怀疑含有异常朊病毒蛋白的生物材料中提取异常朊病毒蛋白的方法，该方法包括：

25 (a) 在能有效地将来自生物材料的异常朊病毒蛋白提取进入六氟-2-丙醇的条件下，温育大约等量六氟-2-丙醇与生物材料非感胶离子水制备物的混合液，

(b) 对该混合液加入大约等体积 0.5M 硫酸钠溶液，以便使该六氟-2-丙醇与该生物材料水制备物分离，形成含有来自该生物材料的任何异常朊病毒蛋白的提取溶剂。

30 21. 一种用于从生物样品中分离异常朊病毒蛋白的试剂盒，该试剂盒包括：

(a) 一种提取溶剂，其中此提取溶剂是：

(i) 异常朊病毒蛋白可溶于其中的极性有机溶剂，并且是

(ii) 与低渗或等渗水溶液可混溶的，但与感胶离子水溶液不可混溶的，

(b) 一种感胶离子盐或感胶离子盐水溶液，将被加入生物材料水制备物中，致使该有机溶剂变成与该水制备物不可混溶。

5 22. 权利要求 21 的试剂盒，进一步包括用于生物样品水制备物的带有容量指示的样品容器，其中所述极性有机溶剂和感胶离子盐或感胶离子盐水溶液按预先测定的单位量连同该样品容器一起被提供使用。

23. 权利要求 21 的试剂盒，进一步包括用于处理所述生物样品水制备物的蛋白酶 - K。

10 24. 一种用于检测生物样品中是否存在异常朊病毒蛋白的试剂盒，该试剂盒包括：

(a) 一种提取溶剂，此提取溶剂是

(i) 异常朊病毒蛋白可溶于其中的极性有机溶剂，并且是

(ii) 与非感胶离子水溶液可混溶的但与感胶离子水溶液不可混

15 溶的，

(b) 一种感胶离子盐或感胶离子盐水溶液，将其加入生物材料水制备物中，致使该提取溶剂变成与该水制备物不可混溶

(c) 一种检测异常朊病毒蛋白的测定工具。

## 提取朊病毒蛋白的方法和试剂盒

## 发明背景

## 5 发明领域

本发明是关于一种用于提取来自生物材料如动物组织或生物液体中朊病毒蛋白的方法。这种提取方法使有可能测定异常朊病毒蛋白的存在，例如用于诊断传染性海绵状脑炎。

10

## 发明背景

朊病毒病或传染性海绵状脑炎 (TSE) 引起中枢神经系统渐进的退化性病症而导致死亡 (Prusiner, 医学研究述评, 16:487, 1996; Weissman, FEBS 通讯, 289: 3, 1996)。200 多年前首次描述了绵羊 TSE 病, 瘙痒病 (Pattison, 兽医研究, 123: 661, 1988)。瘙痒病是这类疾病的原型。对这类疾病还没有已知的治疗方法, 也不知道在动物死亡之前如何检测是否存在这种疾病。朊病毒病是由于宿主正常朊病毒蛋白的构象改变成为形成聚集体的异常结构而引起的。因为最近在英国爆发流行牛海绵状脑炎, 以及这种 TSE 与其新的变异形式, 一种人 TSE 病 Creutzfeld - Jakob 相关联 (Bruce 等, 自然, 389: 498, 1997), 所以需要有可能灵敏和准确诊断 TSEs 的新方法。理想地是, 这种诊断方法可以在动物显示临床病征之前, 并且在它们进入人类食物链或成为人用药物制品之前用于对动物进行检查。

15

20

## 对现有技术的描述

25

用于制备和纯化 TSE 致病性作用物的方法大多数都包括酶和去污剂处理以及离心处理的复杂程序 (Bolten 等, 病毒学杂志, 53: 596, 1985)。异常的朊病毒蛋白质在通常的生物缓冲液中可溶性很差。用于获得纯化异常朊病毒蛋白的一种方法是亲水性相互作用层析法 (HILIC) (Plpert, J, 层析, 499: 177, 1990), 此方法是反相层析法的逆转形式。通常是

30 以 70 - 85% 的有机溶剂开始, 对逐渐降低的有机梯度液进行层析。按照从最小极性到最大极性的顺序进行洗脱。HILIC 的大部分有机移动相与

游离在水性溶液中非正常存在的蛋白质是相容的，例如膜蛋白（Jeno 等，动物生物化学，215：292，1993）， $\beta$ -淀粉状蛋白肽（1-43）（Alpert 等，蛋白质学会第八届讨论会，1994 年 7 月，圣地亚哥，CA）和组蛋白（Lindner 等，层析学杂志，A. 782：55，1997）。表面活性剂和其它的变性剂都是在外水体积或者接近外水体积中被洗脱，而蛋白质和肽一般被良好地保留。

通过 HILIC 纯化之后，可应用毛细管电泳免疫测定法（Schmerr 和 Jenny，电泳，19：409，1998）或者通过毛细管等电聚集法（Schmerr 等，层析学杂志，A. 802：135，1998）检测朊病毒蛋白。

如上面所提到的，一般是在动物死亡之后应用这些分析方法检测异常朊病毒蛋白，因此需要在动物死亡前检测异常朊病毒蛋白。此外，还需要一种不借助于超离心步骤分离异常朊病毒蛋白的方法，超离心所需的仪器设备对于兽医诊断实验室是不易获得的。离心要求异常朊病毒蛋白以聚集体的形式存在，它的大尺寸有助于在离心管内形成沉淀。但在随后的步骤中这种聚集体很难被溶解和检测。应用离心法还有可能检测单体的异常朊病毒蛋白，而可能降低任何测定法的灵敏度。现在更加紧迫地需要快速、可靠的野外检测法，例如定性的免疫检测法，以便检测家畜是否感染了 TSE。因此，本领域需要有一种简便有效的方法用于提取异常朊病毒蛋白。

另外，除了对天然异常朊病毒蛋白产生的抗体之外，其余已产生的抗体是针对单体形式的异常朊病毒蛋白（Korth 等，自然，390：74，1997）。从而必须用强去污剂或变性剂使异常朊病毒蛋白解聚集，然后在实施大多数免疫检测法之前又必须除去这些变性剂。因此，本领域需要有一种快速简便的方法，提取出与去污剂或变性剂分离的朊病毒蛋白用于免疫测定法分析。

本发明提供了一种新颖的方法，用于提取所有大小的异常朊病毒蛋白，不论是聚集体形式或单体形式的异常朊病毒蛋白。本发明使之有可能应用例如免疫测定法检测来自活动物样品中的异常朊病毒蛋白。例如，可根据血液样品进行诊断，这将便于检测活的动物，有助于从禽群和畜群中除去感染的动物，防止有可能污染消费产品。

#### 发明概述

本发明提供了一种方法，用于从怀疑含有异常朊病毒蛋白的生物材

料中提取异常朊病毒蛋白。此方法包括在可从生物材料中有效地提取异常朊病毒蛋白进入提取溶剂的条件下，温育提取溶剂与等渗或低渗的生物材料水制备物的混合液。该提取溶剂是异常朊病毒蛋白可溶于其中的一种极性有机溶剂，并且它与低渗或等渗的水溶液是可混溶的，但与感胶离子（lyotropic）水溶液是不混溶的。可使该混合物的感胶离子活性增加，以致使提取溶剂分离成与生物材料水制备物截然不同的相，从而形成含有来自生物材料的任何异常朊病毒蛋白的提取溶剂。

本发明还进一步提供了检测动物中是否存在异常朊病毒蛋白的方法，包括对如上所述制备分离的提取溶剂测定其中的异常朊病毒蛋白。

还提供了一种试剂盒，用于分离来自生物样品中的异常朊病毒蛋白。此试剂盒包括一种具有上述特征的提取溶剂和一种感胶离子盐或感胶离子盐水溶液，此盐或其水溶液将被加入生物样品的水制备物中，致使该有机溶剂变成与此水制备物不能混溶。在本发明的另一实施方案中，该试剂盒包括一种对朊病毒蛋白的检测法，优选地是用于异常朊病毒蛋白的检测法。

因此，本发明的目标是提供一种从生物样品中分离异常朊病毒蛋白的快速方法。

本发明还有一个目标是对感染了异常朊病毒蛋白的生物体提供一种早期检测法。

本发明的进一步目标是提供一种溶剂提取技术，用于从生物样品中分离异常朊病毒蛋白。

本发明还有另一目标是简化对来自动物或人的生物材料中是否存在异常朊病毒蛋白的分析测定。

本发明还有一个目标是为进一步测定或纯化提供含有异常朊病毒蛋白的提取物。

在本发明的附图和详述中将更加详细地呈现本发明的这些目标或另一些目标。

#### 附图简述

图 1，通过放射活性（圆圈）和通过在 280 nm 的吸光度（实线）检测得到的  $^{125}\text{I}$ -朊病毒蛋白的 HILIC 层析图谱。

图 2， $^{125}\text{I}$ -朊病毒蛋白的 HILIC 级分的抗体结合。

## 发明详述

本发明提供了一种用于从生物材料中提取异常朊病毒蛋白的方法。借助于免疫测定法可检测此被提取产品中的异常朊病毒蛋白。这种异常朊病毒蛋白的提取方法连同一种免疫测定法，可用于诊断活生物体是否感染了 TSE，并且将可用于在全世界检测 TSE 感染的动物和人。因此，本发明促使在缺乏昂贵离心机的临床和兽医实验室有可能进行朊病毒蛋白检测，并进一步使之有可能在野外进行检测。

将生物材料的水制备物与提取溶剂合并形成混合物。此提取溶剂是异常朊病毒蛋白可溶于其中的极性有机溶剂，并且此溶剂与非感胶离子等渗水溶剂混溶，但与感胶离子水溶液不可混溶。在特别优选的实施方案中，此提取溶剂是六氟-2-丙醇（也被称为六氟异丙醇或 HFIP）。虽然在下面的实施例中提取缓冲液体积和生物材料水制备物的体积是大致相等，但是如在下面所述的，可以使用能形成不同两相的任何比例。

在优选的实施方案中，是在大约 20℃ - 100℃ 的温度范围内温育该混合物。尽管如此，使提取溶剂和生物材料的水制备物都处于同一液相中的任何温度，即冰点与沸点之间的温度都可以使用。

在可有效地将来自生物材料中的异常朊病毒蛋白提取进入提取溶剂的条件下温育该提取溶剂-生物材料混合物。温育之后，增加该混合物的感胶离子活性，致使提取溶剂与水制备物分离开。可从生物材料的水制备物中分离出含有朊病毒蛋白的提取溶剂。

按照本发明，通过加入感胶离子盐可增加提取溶剂-水制备物的感胶离子活性。这种盐可作为固体被直接加入混合物，或者作为浓缩的水溶液被加入。感胶离子盐的优选实例包括硫酸钠和硫酸铵。在下面例证性的特定实施方案中，是通过以大约 1 : 1 的比例（体积/体积）将 0.5M 硫酸钠加入混合物中来增加其离子强度。

因为不需要从尸体解剖检查获得材料所以本发明特别方便。按照本发明，生物材料可以是来自活动物的样品。本发明的方法提供从生物液体或器官活组织检查材料提取异常朊病毒蛋白用于分析测定。另一方面，可以从例如某些动物产品的尸体解剖检查获得生物材料，这些动物产品将被用于食品、药物、化妆品、或者为人或其它动物使用的其它产品。在进一步的实施方案中，可将本发明的方法用于从这些材料中除去朊病毒蛋白，以便确保感染性朊病毒不被传播。

本发明的提取方法既可用于提取正常的朊病毒蛋白又可用于提取异常的朊病毒蛋白。通过用蛋白酶-K 预处理生物材料，正常朊病毒蛋白可被消化。因此，当只需要异常朊病毒蛋白时，可以在与提取溶剂混合之前先用蛋白酶-K 预处理生物材料的水制备物。

5 可将含有任何朊病毒蛋白的提取液干燥而形成提取物干块。借助于例如亲水性相互作用层析法可将溶液或提取物干块中的朊病毒蛋白进一步纯化。

通过测定分离的提取物干块材料，可检测动物中是否存在异常朊病毒蛋白。该测定法优选地是一种对异常朊病毒蛋白的免疫测定法。可在  
10 分离朊病毒蛋白之前用蛋白酶-K 处理样品，致使不会分离出正常朊病毒蛋白。

另一方面，本发明提供了用于从生物样品中分离异常朊病毒蛋白的试剂盒。在一个实施方案中，此试剂盒包含提取溶剂例如六氟-2-丙醇。该试剂盒另外还包含感胶离子盐或感胶离子盐的水溶液，用于加入生物  
15 样品水制备物中致使提取溶剂变成与水制备物不混溶。

本发明还进一步提供了一种试剂盒用于检测是否存在来自生物样品的异常朊病毒蛋白。除了上述的试剂盒成分之外，此检测试剂盒还包括用于异常朊病毒蛋白的检测法。用于检测异常朊病毒蛋白是否存在的优选检测法是免疫测定法。

20 虽然此提取法和试剂盒已被发展主要用于诊断瘙痒病（绵羊 TSE），但是它们也可用于诊断其它脊椎动物的 TSE，特别是哺乳动物和鸟类，例如人、牛、猪、麋鹿、鹿、家禽和啮齿动物。早在感染后 2 周就可以在动物和人的组织中检测出异常朊病毒蛋白。本发明方法的一个重要应用是检测人血液中的异常朊病毒蛋白。此项技术还可用于从待加工原料  
25 中提取异常朊病毒蛋白，这些原料将被用于生产人用药物或打算人用的其它产品，包括食品添加物。

如在此所使用的名词“大约”或“大致”意指在所给定值或范围的 20% 之内，优选地在 10% 之内，而更优选地在 5% 之内。

### 30 生物材料

本发明使之有可能从生物材料中提取朊病毒蛋白。如上面论述的，通常发现朊病毒蛋白存在于脊椎动物中。因此在大多数情况下生物材料

来自动物或人类。在真核细胞的发酵过程中也可以产生朊病毒蛋白。它可作为重组朊病毒蛋白被表达。具有较大意义的是，已被重组修饰表达另一种蛋白的细胞可能偶尔地表达内源性朊病毒蛋白。如果是神经来源的细胞如 PC12 细胞，则很可能发生这种可能性。在这种情况下，生物材料可以是发酵产物例如重组蛋白质。

来自动物的生物材料实例包括但决不是局限于组织如脑、肌肉（包括心脏）、肝、盲肠、胰腺、胃肠道器官和皮肤组织，以及淋巴样组织如胸腺、脾、扁桃腺和淋巴结等。另一方面，生物材料也可以是生物液体。名词生物液体意指脑脊液、血液、血清、血浆、乳液、尿、唾液、眼泪、粘液分泌物、汗水、精液以及含有这些成分的体液。它还意指用于产生重组蛋白质的培养液（或培养基），或者移植前悬液中所包含的细胞。被名词“生物材料”包含的还有由动物器官或组织制成的产品，包括血清蛋白（如白蛋白和免疫球蛋白）、激素、食品和加工的食物产品、营养添加物、骨粉、动物饲料、细胞外基质蛋白、胶原蛋白以及用于制造食品或用作最后食品的其他一些动物副产品。

当生物材料是固体组织或固体产物时，必须首先使它溶解或混悬于水溶液，以致使它适合于该提取过程。例如，以重量对体积 10% 的比例将脑组织混悬于蔗糖液中（例如 0.32M 蔗糖液）。其它的低渗液或等渗液包括 5% 葡萄糖、磷酸缓冲盐水、tris-缓冲盐水、HEPES-缓冲盐水，或者上述任何一种缓冲液。还可以将水溶液中的生物材料匀浆、研磨处理，也就是说被粉碎瓦解，使提取溶剂与生物材料之间有最大的接触。但是如果生物材料是生物液体，很可能就不必加入液体，除非为了适合提取溶剂的可混溶性而稀释此生物液体的离子强度。

## 25 朊病毒蛋白

在此所使用的名词“朊病毒蛋白”指的是在神经组织特别是脑组织和在较低级的淋巴样组织以及所有其它组织中表达的一种天然蛋白质。在某些情况下，朊病毒蛋白采取一种在此被称为异常朊病毒蛋白的致病性构象。一些个体中朊病毒基因的某些突变似乎使朊病毒蛋白易采取这种致病性构象。但生物体暴露于可传播的感染性病原朊病毒，也可以诱发导致病理状态的构象改变。

与正常朊病毒蛋白相比较，异常朊病毒蛋白对蛋白水解作用迟钝很

多。用蛋白酶，特别是蛋白酶-K处理生物材料可消化正常朊病毒蛋白，但不消化异常朊病毒蛋白。

5 在下面的特定实施例中，借助于本发明的方法提取了山羊异常朊病毒蛋白（PrP<sup>sc</sup>），但是应用本发明的方法也可以提取来自特别是上述其它动物种类的其它朊病毒蛋白。

异常朊病毒蛋白的种类包括在神经退化性疾病 Kuru、Creutzfeld - Jakob 病（CJD）、Gerstmann - Straussler 综合症（GSS）和致死的家族性失眠症中发现的人类朊病毒蛋白。CJD 和 GSS 的某些情况与朊病毒基因的已知突变有关。CJD 还与暴露于 TSE 有关。例如如上面指出的，  
10 已证明人 CJD 与牛海绵状脑炎有关系。本发明是首次使有可能在尸体剖检之前对人提取异常朊病毒蛋白。检测被提取的异常朊病毒蛋白可用于诊断这些疾病中的任何一种疾病。

瘙痒病（绵羊、山羊）和牛海绵状脑疾（cows）是动物的异常朊病毒病。在鸡、貂、猪、小鼠、仓鼠和豚鼠体内也已分离出朊病毒蛋白。  
15 而且通过暴露于从人或其它动物来源的朊病毒，小鼠、仓鼠和豚鼠可引发海绵状脑炎。借助于本发明的方法可以检测或提取来自这些来源中任何一种的朊病毒蛋白。

#### 提取溶剂和条件

用于本发明的提取溶剂在感胶离子状态下必须能够分离成与水或水  
20 溶液不同的相。同时，朊病毒蛋白在此提取溶剂中必须是可溶解的。某些极性有机溶剂符合这些标准。优选的极性有机溶剂是六氟-2-丙醇。可使用的其它溶剂包括异丙醇、1,1,1-三氟-2-丙醇（TFIP）、2,2,3,3-四氟-1-丙醇（tetFIP）、全氟-叔-丁醇（PFtBA）、1,1,1,3,3,3-六氟丙醇（HFA）、三氟乙酸（TFA）、2,2,2-三氟-1-乙醇（TFE）、  
25 2,2,3,3,4,4,4-七氟-2-丙醇（HFB）、1,1,1,3,3,4,4,4-八氟-2-丁醇（OFIB）、1-甲基-2-吡咯烷酮（NMP），见 Wille 等，分子生物学杂志，259：608，1996。其它可能有用的溶剂包括 DMSO 和四氢呋喃等。另外还可使用与水不混溶，但朊病毒蛋白可溶于其中的溶剂。

30 在特定的实施方案中，该溶剂在例如生理离子强度（等渗水溶液）或低于生理离子强度时（低渗水溶液）与水是混溶的。但是，当其缓冲液含有以高于阈值浓度（或离子强度）存在的感胶离子盐时，该提取溶剂不能溶于水溶液：此二相分离成为提取溶剂层和水溶液层。这种情况

在此被称为“感胶离子状态”。达到感胶离子状态的水溶液感胶离子盐离子强度值是可变的，取决于所选择的提取溶剂和所使用的盐。通过滴定或感胶离子盐浓度的其它系统改变，并测定提取溶剂与此水溶液的可混溶性或不可混溶性，可容易地确定此离子强度值。如在此使用的，具有在此离子强度下提取溶剂与水分离的感胶离子盐离子强度的水溶液被称为感胶离子水溶液。含有较低浓度感胶离子盐或生理盐的水溶液如等渗缓冲液，可被认为是非感胶离子溶液。

5 通常是將大約等體積的提取溶劑和生物材料水製備物用於溶劑提取過程。但是，提取溶劑對水製備物的比例可以在大約 5:1-1:5 的範圍之內，優先地在大約 3:1-1:3。

10 在提取溶劑與水製備物混合之後，可在特定的溫度下將此混合物溫育一段時間，以便促進將朊病毒蛋白提取進入提取緩衝液中。溫育時間可在 1 分鐘至幾小時內變化，可通過分析被提取的材料中朊病毒蛋白的存在量來確定。如在實施例中所述，應用層析法或免疫測定法或者應用  
15 這二種方法，測定提取材料中朊病毒蛋白的含量對時間達到高峰值之後，更多的溫育時間不會影響朊病毒蛋白的提取率。

此外，還可以調整溫育的溫度以便增加提取的效率，只要在所選擇的溫育下提取溶劑和水溶液二者都是液體。較熱的溫度即高於室溫的溫度是優先的，因為它們可增加朊病毒蛋白在提取溶劑中的溶解度。特別  
20 有用的是在大約 50℃-60℃ 範圍之內的溫度。正如其它的變量例如水製備物的離子強度和溫育時間一樣，最佳溫度也可以通過常規的實驗和測定來確定。

### 相分離

25 多種感膠離子鹽可用於增加該水溶液的離子強度，從而誘導相分離。優先的鹽是具有感膠離子的硫酸鈉和硫酸銨。這二者所使用的濃度都遠遠低於沉淀蛋白質的濃度。例如在特定的實施方案中，是將 0.5M 硫酸鈉溶液加入等體積的提取溶劑/水製備物混合液中，形成硫酸鈉的最後濃度為 0.25M。此濃度足以導致 HFIP 與水發生相分離。也可以使用其它的  
30 鹽，只要它們在可溶解的濃度能達到必需的感膠離子活性。在此使用的名詞“感膠離子活性”意指感膠離子鹽溶液的結構形成特性。通過達到足夠的感膠離子鹽濃度來形成感膠離子活性，以便導致有機相與水相

的相分离。避免使用感胶离子盐的蛋白质沉淀浓度。

“感胶离子”盐或“结构形成性”盐也被称为 kosmotropes，这种盐可促进水溶液有序化从而排除有机溶剂。如果此有机溶剂是提取溶剂则发生相分离。如果它是蛋白质则此蛋白质从溶液中被盐析出。良好的结构-形成性盐包括硫酸、磷酸和柠檬酸等的钠盐或铵盐（Washabaugh 和 Collins，生物化学杂志，261：12477，1986）。（结构-破坏性盐，或 chaotropes，包括盐酸胍盐、高氯酸钠、溴化钠等。这些盐具有相反的作用，它们驱使有机溶剂进入水溶液）。水溶液的离子强度是溶液中离子总数的函数，无论它们是结构-形成性或结构-破坏性离子。名词“离子强度”意指盐的浓度。

如上面所论述的，可以作为固体或浓缩液的形式加入感胶离子盐，只要最后的感胶离子盐浓度可有效地导致相分离。优选的是，在增加该混合液的感胶离子活性之后提取溶剂对水相（水相包括生物材料的水制备物任何一种盐溶液）的最后比例是大约 1：10-10：1，优选地（以及如下面所例证说明的）是大约 1：3-3：1，只要在此提取溶剂对水相的较低比例下，最后的盐浓度仍然足够高而可以导致相分离。

在增加感胶离子活性之后，提取溶剂与水制备物分离，现在此提取溶剂含有存在于生物材料中的任何朊病毒蛋白。分离过程花费几分钟，当二相澄清并在它们之间看到不连续的分层，表示分离过程完成。一旦二相已完全分离，例如可以通过用吸管或注射器抽取，或者用分液瓶取出或回收现在已含有任何朊病毒蛋白的提取溶剂。

通过例如蒸发、冷冻干燥或其它浓缩可使含有任何朊病毒蛋白的提取溶剂（在此称为“提取物”）干燥，从而形成高度浓缩的或干燥的提取物。该提取物可能含有其它一些成分，包括细胞脂质，脂质膜结合的蛋白质以及其它一些更疏水性的细胞成分。如果需要，借助于例如在下面例证说明的亲水性相互作用层析，或者其它一些层析技术（阳离子交换层析、凝胶渗透层析、反相层析以及例如在抗体柱上的亲和层析）可除去这些成分，分离或纯化朊病毒蛋白。

另一方面，如下面所述对浓缩或干燥的提取材料可直接进行分析，检测异常朊病毒蛋白。

### 朊病毒蛋白检测器；免疫测定法

本领域已知多种朊病毒蛋白的检测方法，包括用于选择性地检测异常朊病毒蛋白的测定法，都是分析朊病毒蛋白的有效工具。已证明毛细管凝胶电泳是异常朊病毒蛋白的有效分析工具（Schmerr 和 Jenny，电泳，  
5 19：409，1998）。优选的方法是例如在上文文献中 Schmerr 和 Jenny 所述的免疫测定法。在此文献中所述的抗血清是对异常朊病毒蛋白特异性的，因为发现它在蛋白质印迹试验中与瘙痒病-感染的脑组织反应，但与正常的脑组织不反应。与朊病毒蛋白起反应的其它抗血清是本领域熟知的。优选的免疫测定法是微量滴定板 ELISA（例如 Grathwohl 等，  
10 病毒学方法杂志，64：205，1997）。

因此在某些情况下，检测是否存在朊病毒蛋白，而特别是异常朊病毒蛋白，是基于朊病毒蛋白的生物物理和生物化学特征。这些特征包括蛋白酶抗性（特别是对蛋白酶-K）和消化方式（是否可用蛋白水解酶、糖酵解酶、化学药品、加热、变性剂等消化）。这类处理对表现分子量  
15 和等电点的作用以及各种结合测定法都可以被评价。借助于层析法，凝胶电泳和其它分子量敏感的技术可以检测其蛋白酶抗性和消化方式。应用毛细管等电聚集（IEF）或凝胶等电聚集法都可以测定等电点，尽管毛细管 IEF 比大多数凝胶 IEF 能够更有效地测定朊病毒 pI，而且，通过离子交换层析可以对全部电荷（酸性或碱性）作定性测定。本领域已知的其它一些生物物理技术也可被用于鉴定朊病毒蛋白。  
20

用于检测朊病毒蛋白的测定法实例包括在加热、溴化氰裂解和神经氨酸等酶等处理后（Bolton 等，病毒学杂志，53：596，1985）以及在糖苷酶处理和外源凝集素结合后（Somerville 和 Ritchie，普通病毒学杂志，  
25 71：883，1992）测定该蛋白质的近似分子量和等电点，还包括测定其蛋白酶-K 抗性（Race 等，美国兽医研究杂志，53：883，1992）以及免疫测定法（Farquhar 等，病毒学方法杂志，24：215，1989）。

另外，对被提取的，优选地是被纯化的朊病毒蛋白进行测序或微测序使有可能对它作出明确肯定的鉴定。

借助于本领域如下已知的技术测定其在适当生理样品中的浓度可完  
30 成对朊病毒蛋白的免疫测定：例如放射免疫测定法，ELISA（酶联免疫吸附试验），“夹心”免疫测定法，免疫放射测量试验，凝胶扩散沉淀反应，免疫扩散试验，原位免疫测定法（例如用胶体金、酶或放射性同

位素标记), 蛋白质印迹分析法, 沉淀反应, 凝集试验(例如凝胶凝集试验, 红细胞凝集试验), 补体固定试验, 免疫荧光测定法, 蛋白 A 和蛋白 G 测定法, 免疫电泳试验等。在一个实施方案中, 是通过检测第一抗体上的标记物来检测抗体的结合。在另一实施方案中, 是通过检测第二抗体或试剂对第一抗体的结合来检测第一抗体。

本发明的提取方法提供了一种可用于产生补充抗体的廉价朊病毒蛋白来源。而且, 因为本发明的提取条件完全不同于常规的提取条件, 所以按照本发明提取的朊病毒蛋白可能具有不同的构象, 并且如果用于免疫接种将诱发不同的抗体群。

10 本方法将提取时间缩短至 1-2 小时。而且因为方法简单而可以自动化。本方法提取所有分子大小的朊病毒蛋白, 所以它不受限制。它还使异常朊病毒蛋白溶解, 这样大多数免疫测定法可用于检测这种蛋白。而且重要的是, 本方法降低了异常朊病毒蛋白的传染性, 使操作过程比较安全。

15

### 试剂盒

可以以试剂盒的形式方便地提供用于实施本发明的组成成分。在其最简单的实施方案中, 本发明的试剂盒提供了提取溶剂, 优选地是 HFIP, 以及感胶离子盐(或浓缩的感胶离子盐溶液), 用于增加提取溶剂-水制备物混合液的感胶离子活性。可预先计算每种成分的量, 以便提供特定的测定次数。在进一步的实施方案中, 该试剂盒包括样品容器, 优选地是由塑料或经处理的材料制成的容器, 以避免朊病毒蛋白的非特异性结合。

25 如在此使用的, 名词容器具有其最广泛的含义, 用于容纳材料或试剂的容器。它可由通常用于容纳试剂的玻璃、塑料、陶瓷、金属或其它任何材料制成。但是, 允许使用的材料应该不与打算容纳的内含物起反应。

该试剂盒还可包含用于消化生物样品中正常朊病毒蛋白的蛋白酶-K。

30 在进一步的实施方案中, 该试剂盒还包含用于生物样品水制备物的带有容积刻度的样品容器。在此实施方案中, 极性有机溶剂和感胶离子盐按预先测定的单位量连同样品容器一起以最佳的方式被提供使用。可

将生物样品制备物置于样品容器内。加入预先测定的单位量提取溶剂，随之混匀。然后可加入预先测定的单位量感胶离子盐，诱使提取溶剂和水发生相分离。在更进一步的实施方案中，试剂盒内提供了用于处理生物样品水制备物的蛋白酶-K，优选地是按预先测定的单位量被提供。

5 用于从组织样品中提取朊病毒蛋白的试剂盒可包括稀释缓冲液，如0.32M 蔗糖溶液或磷酸缓冲盐水，用于匀浆化组织，制成生物材料水制备物。

在另一实施方案中，其中该试剂盒是用于检测生物材料或样品中是否存在异常朊病毒蛋白的试剂盒，此试剂盒提供了如上面所述的异常朊病毒蛋白检测器或测定法。用于检测按照本发明提取的异常朊病毒蛋白，  
10 如上面所述的免疫测定法是优选的。

在另一个更进一步的实施方案中，该试剂盒包含一种免疫层析膜或支持物。可将含有任何朊病毒蛋白的提取溶剂直接施加于支持物上，或者可在例如增溶作用之后施加干燥的提取物。在适当的条件下，朊病毒蛋白可流过支持物。可以通过例如固定化的抗-朊病毒抗体捕获它，并可检测固定化的朊病毒蛋白。本领域已知的许多用于免疫层析测定法的方法和装置都可应用于本发明。免疫层析测定法在不便获得实验室设备的野外条件下特别有用。在如下美国专利中提供了这种测定法的实例：  
15 No. 5, 248, 619；No. 5, 451, 504；No. 5, 500, 375；No. 5, 624, 809；和 No. 5, 658, 801。  
20

本发明的试剂盒优选地还包括包装材料和附于包装盒上或插入包装中的使用说明书。

参考下面被提供作为本发明例证的非限制性实施例可以更好地理解本发明。  
25

### 实施例 1

分析从感染的绵羊脑和淋巴节中提取的异常朊病毒蛋白

在 10% 十二烷基肌氨酸钠中将来自二只瘙痒病感染绵羊的脑或淋巴节组织制备匀浆，并用蛋白酶-K 处理以便消化正常宿主的朊病毒蛋白。  
30 将等体积 (0.5 mM) 的匀浆和 HFIP 混合在一起，在 56°C 温育 5 分钟。对此混合液加入 0.5 mM 0.5M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ，并将此混合液再温育 5 分钟。在这些条件下 HFIP 层与水层分层。吸出 HFIP 层并作离心干燥。将此

干燥的样品再混悬于 25  $\mu\text{l}$  蒸馏水中并使之混匀。将 10  $\mu\text{l}$  样品与 5  $\mu\text{l}$  20% SDS 缓冲液混合均匀，在 100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 分钟。

在 10% 至 15% 梯度聚丙烯酰胺凝胶上进行蛋白质印迹分析。在标准条件下从聚丙烯酰胺凝胶将此蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。然后通过  
5 与 5% 鱼明胶液共温育对此硝酸纤维素膜作封闭处理，再用 Tris-Tween 缓冲液洗膜。使此硝酸纤维素膜与兔抗-朊病毒蛋白（针对全朊病毒蛋白产生的抗体，作 1-2500 倍稀释；Kascak 等，免疫学研究，26: 259, 1997；也可见 Miller 等，兽医诊断研究，5: 309；Kascak 等，病毒学杂志，59: 676, 1986）共温育过夜。在与抗-朊病毒抗体共温育之后，用  
10 Tris-Tween 洗此硝酸纤维素膜，然后与抗-兔 IgG-HRP（辣根过氧化物酶）偶联物反应，温育 1 小时。然后再充分洗此硝酸纤维素膜，并用化学发光试剂（Pierce UltraSuperSignal<sup>®</sup>）显影。应用化学发光显像仪（Chemi-Imager-4000；Alpha, Innotech）检测过氧化物酶活性。

含有 2.75  $\mu\text{l}$  材料、来自二只瘙痒病感染绵羊的提取物产生了指示脑  
15 组织和淋巴结组织中都存在异常朊病毒蛋白的印迹带。来自一只瘙痒病感染绵羊的含有 1.5  $\mu\text{l}$  材料的脑组织提取物也产生了指示异常朊病毒蛋白的印迹带。来自正常（未感染的）绵羊的相似提取物的蛋白质印迹分析未产生指示异常朊病毒蛋白的任何印迹带。

20

### 实施例 2

分析从感染的绵羊脑和淋巴结组织中提取和纯化的异常朊病毒蛋白

此实施例显示应用亲水性相互作用层析法（HILIC）进一步纯化和  
分析异常（瘙痒病）朊病毒蛋白（PrP<sup>sc</sup>）。如前所述用去污剂和蛋白酶  
K 处理包含绵羊脑和淋巴结的组织样品。将形成的提取物施加于 HILIC  
25 柱，用在 0.1% 三氟乙酸和 50 mM 六氟-2-丙醇中配制的逐渐降低的乙腈梯度液洗脱。如用放射性碘化的朊病毒蛋白测定的，从层析柱得到的回收率是大约 75%。干燥之后将所收集的峰值组分再混悬于水中，用对朊病毒蛋白特异性的抗体进行检测。此方法使其有可能有效地纯化朊病毒蛋白以及借助于免疫测定法进行检测，因为已除去了干扰性去污剂。

30

### 实施例 3

对从感染的绵羊脑中提取的异常朊病毒蛋白的分析

### 制备绵羊脑组织材料

从野外的病羊获得瘙痒病感染的绵羊脑组织，蛋白质印迹分析已证明这些病羊为异常朊病毒蛋白阳性 (Race 等, 美国兽医研究杂志, 53: 883, 1992)。制成三个阳性脑的混合物。此相同的混合物被用于在此所提供的  
5 5 提供的所有实验。正常脑组织来自无瘙痒病畜群的绵羊，蛋白质印迹分析为异常朊病毒蛋白阴性。用修改的 Bolton 等 (病毒学杂志, 53: 596, 1985) 的方法制备脑组织材料用于层析试验。简单地说，切除脑干，称重，并置于 0.32M 蔗糖 (10% v/v) 浴中。然后应用 0.7 cm 不锈钢匀浆器，以最高转速将此脑组织材料与 Brinkman Polytron (Kinematica AG,  
10 10 Lucerne Switzerland) 一起匀浆 60 秒钟。以 10000 g 将此匀浆离心 20 分钟除去颗粒，并将形成的上清液以 230000 g 离心 1 小时。然后使此沉淀物经受多次洗涤并如上超速离心。用含有 10% 十二烷基硫酸钠和蛋白酶 K (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 10 mM Tris pH 7.4 处理样品。完成超离心后，样品重悬于 10mM Tris pH 7.4 中 (200  $\mu\text{l}/\text{g}$  的初始脑样品)。

### 15 亲水性相互作用层析 (HILIC)

以 100 $^{\circ}\text{C}$  加热 10 分钟使该样品溶解于含有 2 mM EDTA, 5% SDS 和 10% 六氟-2-丙醇的 pH 8.00 0.01M Tris HCl 液中。用 SDS 处理之后，将此样品置于含有 0.1% TFA 酸和 50 mM 六氟-2-丙醇的由 100% 乙腈组成的溶剂中 (缓冲液 A)，并施加于亲水性相互作用柱。所用的层析液全部来自 PolyLC 公司 (Columbia, MD, USA)，尺寸规格为 200 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300 磅。对三种装填物进行了评价，聚蜡 LPTM (阴离子交换材料)，聚羟乙基 ATM (中性材料) 和聚磺乙基 ATM (强阳离子交换材料) (三个商标的所有权都属于 PolyLC 公司)。流速为 0.5 ml/分钟。用于洗脱 PrP<sup>sc</sup> 的条件是 100% A 洗脱 8 分钟，然后是用含有  
20 20 0.1% 三氟乙酸和 50 mM 六氟-2-丙醇的直至 100% 水的线性梯度液 (缓冲液 B) 洗脱 15 分钟。最后用 100% B 洗脱 10 分钟。收集峰值组分，在真空离心机 (Savant 仪器公司, NY, USA) 内干燥。将这些组分再混悬于 10  $\mu\text{l}$  无离子水中，将免疫印迹试验 PrP<sup>sc</sup> 阳性的组分用于毛细管电泳测定。

### 30 以 $^{125}\text{I}$ 标记朊病毒蛋白

使用 IODOGEN<sup>TM</sup> (Pierce, Rockford, IL, USA) 以  $^{125}\text{I}$  标记 PrP<sup>sc</sup>。使标记材料通过一个固相提取柱，可将标记的蛋白质从游离的  $^{125}\text{I}$  中分

离出来,此提取柱包含已用缓冲液 A 平衡过的聚蜡 LP™(PolyLC 公司)。用缓冲液 B 从提取柱中洗脱出标记的 PrP<sup>sc</sup>。未结合的 <sup>125</sup>I 遗留在提取柱中,可作为固体放射性废物被遗弃。在真空离心机中干燥含有标记 PrP<sup>sc</sup> 的组分,溶解于水中,用缓冲液 A 作 1:10 稀释,然后对 HPLC 柱加样。

#### 5 斑点印迹试验

将来自 HILIC 层析的峰值组分 1 μl 等分量滴加于硝酸纤维素纸片上,干燥后在含有 500 mM NaCl、0.05% 吐温 20 (TTBS) 和 5% 明胶的 pH 7.5 20 mM Tris 液中温育 1 小时。用 TTBS 洗印迹斑点 2 次,然后与针对朊病毒蛋白肽产生的, 1:500 稀释的抗体 (针对肽 142-154 的兔抗体) 在 25℃ 共温育 3 小时。温育之后用 TTBS 洗印迹斑点 2 次,然后与生物素化的蛋白 G (Bio-Rad 实验室, Hercules, CA, USA) 共温育 1 小时。同上再洗此印迹斑点。将偶联于亲和素 (NeutrAvidin™, Pierce, Rockford, IL, USA) 的辣根过氧化物酶滴加于此印迹斑点上, 25℃ 温育 1 小时。温育后用 TTBS 洗印迹斑点 6 次。然后在 SuperSignal® 15 底物 (Pierce) 系统中温育印迹斑点 10 分钟,最后对 Kodak X-OMAT AR (Eastman Kodak 公司, Rochester, NY, USA) X-射线胶片暴光 15 秒钟。

#### <sup>125</sup>I PrP<sup>sc</sup> 的结合测定法

测定了来自聚蜡 LP 提取柱的含有 <sup>125</sup>I 的组分对抗体的结合活性, 20 此抗体是针对相当于朊病毒蛋白氨基酸残基 142-154 的肽产生的。在 Savant 真空离心机中以 42℃ 干燥装有放射活性材料的试管,并再混悬于 10 μl 水中,然后用含有 0.1% BSA 的缓冲盐水稀释。以溶于 pH 9.0 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 液中的该抗体包被 PVC 微量培养板。用上面的缓冲液洗此培养板之后,加 100 μl <sup>125</sup>I-PrP<sup>sc</sup> 于此培养板上,在 37℃ 温育 2 小时,然后 25 在 4℃ 温育过夜。洗此培养板,并切割成单个的孔池,作放射性计数。从孔池中的 cpm 扣除本底 cpm。

#### 毛细管电泳的条件

在 Beckman P/ACE 5500 型电泳仪 (Beckman 仪器公司, Fullerton, CA, USA) 上实施游离区带毛细管电泳 (Schmerr 和 Jenny, 电泳, 19: 30 409, 1998)。应用空气冷却的氦气激光器进行激光诱发发光 (LIF) 检测,在 488 nm 激发, 520 nm 发射。从 Beckman 仪器公司获得未修改的毛细管。20 cm (至检测器的长度) × 201 μm I. D 的毛细管与 pH 8.0 200

mM Tricine 液一起使用。这种缓冲液含有 0.1% 辛糖苷 (Boehringer Mannheim GmbH, Indianapolis, IN, USA)。在分离制备中用 0.25 M NaOH 漂洗此毛细管 1 分钟, 用水漂洗 2 分钟, 然后用缓冲液漂洗 2 分钟。分离条件是在 20°C 30 KV 3 分钟。电流为约 20  $\mu$ A。注入样品 15 秒钟, 随之注入漂洗缓冲液 5 秒钟。样品体积大约为 0.95 nl。在高压下进行漂洗, 在低压下进行样品注入。

#### 免疫复合物和朊病毒结合测定

将含有大约 2 pm 荧光标记肽的 15  $\mu$ l 荧光素标记肽与亲和纯化的兔 IgG 混合, 以便证明抗体对荧光素标记肽的结合。对此待测定物加入 1  $\mu$ l 来自 HILIC 层析的峰值组分。混匀这些成分之后, 在 25°C 温育此样品 10 分钟。

#### 结果

纯化和碘化之后 PrP<sup>sc</sup> 的层析图谱被显示在图 1 中。来自 <sup>125</sup>I-标记朊病毒蛋白的放射活性 (cpm) 与在 280 nm 的吸光度相吻合, 仅吸光度测定的最后一个吸收峰不一致。根据装载在层析柱上的 <sup>125</sup>I cpm 回收率, 异常蛋白的产率是大约 76%。cpm 峰值和 A 280 吸光度与在结合测定中显示抗体活性的峰值相一致 (图 2)。结合测定在大约 25 分钟的主峰值与图 1 中在 25 分钟的 <sup>125</sup>I-PrP 峰值和 A 280 吸光度峰值相一致。对于来自提取 (未纯化的) 瘙痒病感染的绵羊脑组织的层析图谱 (未被显示) 得到了类似的结果。对于异常朊病毒蛋白, 文献中已报导了一个宽范围的 pI 值 (Schmerr 和 Jenny, 同上; Safar 等, 美国国家科学院学报, 87: 6373, 1990; Somerville 等, 普通病毒学杂志, 70: 25, 1989)。这种蛋白质的 pI 值会影响这种蛋白质对柱填充物的结合。在带正电荷的聚蜡 LP 柱和中性聚羧乙基 A 柱上其保留时间没有明显的差异。这表示此蛋白质可能是酸性蛋白质。含有 SDS 的异常朊病毒蛋白样品以很宽的范围从带负电荷的聚磺乙基 A 柱上洗脱出。因此, 在聚蜡 LP 柱上纯化的异常朊病毒蛋白在聚磺乙基 A 柱上被再次层析。它在外水体积中或接近外水体积中被洗脱表明它确是酸性的。通过凝胶等电聚焦和毛细管等电聚焦都证实了这点 (Schmerr 等, 层析, A. 802: 135, 1998)。pI 值的范围为 3-6, 大部分在 3.00。这些结果表明, 在亲水性相互作用层析中必须使用中性的或阴离子交换材料。

在应用 HILIC 纯化样品毛细管免疫电泳中, 形成的电泳图谱 (未显

示)表明,来自感染绵羊的样品确实起反应,而来自正常(未感染)绵羊的样品不起反应。因为 SDS 抑制包括毛细管电泳测定法在内的典型免疫测定法,所以,为了实行这种测定法必须除去 SDS。可以在 HILIC 层析之后对样品实施应用毛细管电泳的竞争性测定法,因为 SDS 被洗脱进入外水体积中或接近外水体积中(Jeno 等,分析生物化学,215:292,1993)。

#### 实施例 4

分析从感染的绵羊血液中提取的异常朊病毒蛋白

10 用 Tris 缓冲盐水稀释来自 TSE-感染绵羊血液样品的表面淡黄色离心组分(10%组织:90%缓冲液)。然后用蛋白酶处理此样品,以便消化正常宿主朊病毒蛋白,但不消化被改变的朊病毒蛋白的异常形式。消化处理之后,使被处理的样品与等体积六氟-2-丙醇(HFIP)混合,并在 56℃温育 5 分钟。加入等体积 0.5M 硫酸钠,允许其进行相分离。  
15 取出含有 HFIP 的液层,真空离心干燥样品。

将此沉淀物再混悬于水中,并将此悬液置于含有 95%乙腈,5%水,0.1%三氟乙酸和 50 mM HFIP 的层析有机流动相中。将此流动相施加于聚羟乙基天冬酰胺™(PolyLC 公司)固相提取柱。用 100%水、0.1%三氟乙酸和 50 mM HFIP 从此支持载体中洗脱出异常朊病毒蛋白,然后干燥,并再混悬于水中。  
20

通过毛细管免疫电泳发现存在异常朊病毒蛋白。在未感染 TSE 的对照血液样品的电泳图谱中未检测出异常朊病毒蛋白。

#### 实施例 5

25 分析从感染的黑尾鹿血液中提取的异常朊病毒蛋白

以来自 TSE-感染的黑尾鹿血液样品重复实施例 4 的步骤。通过毛细管免疫电泳发现存在异常朊病毒蛋白。在未感染 TSE 的对照血液样品的电泳图谱中未检测出异常朊病毒蛋白。

30 实施例 6

分析从感染的麋鹿血液中提取的异常朊病毒蛋白

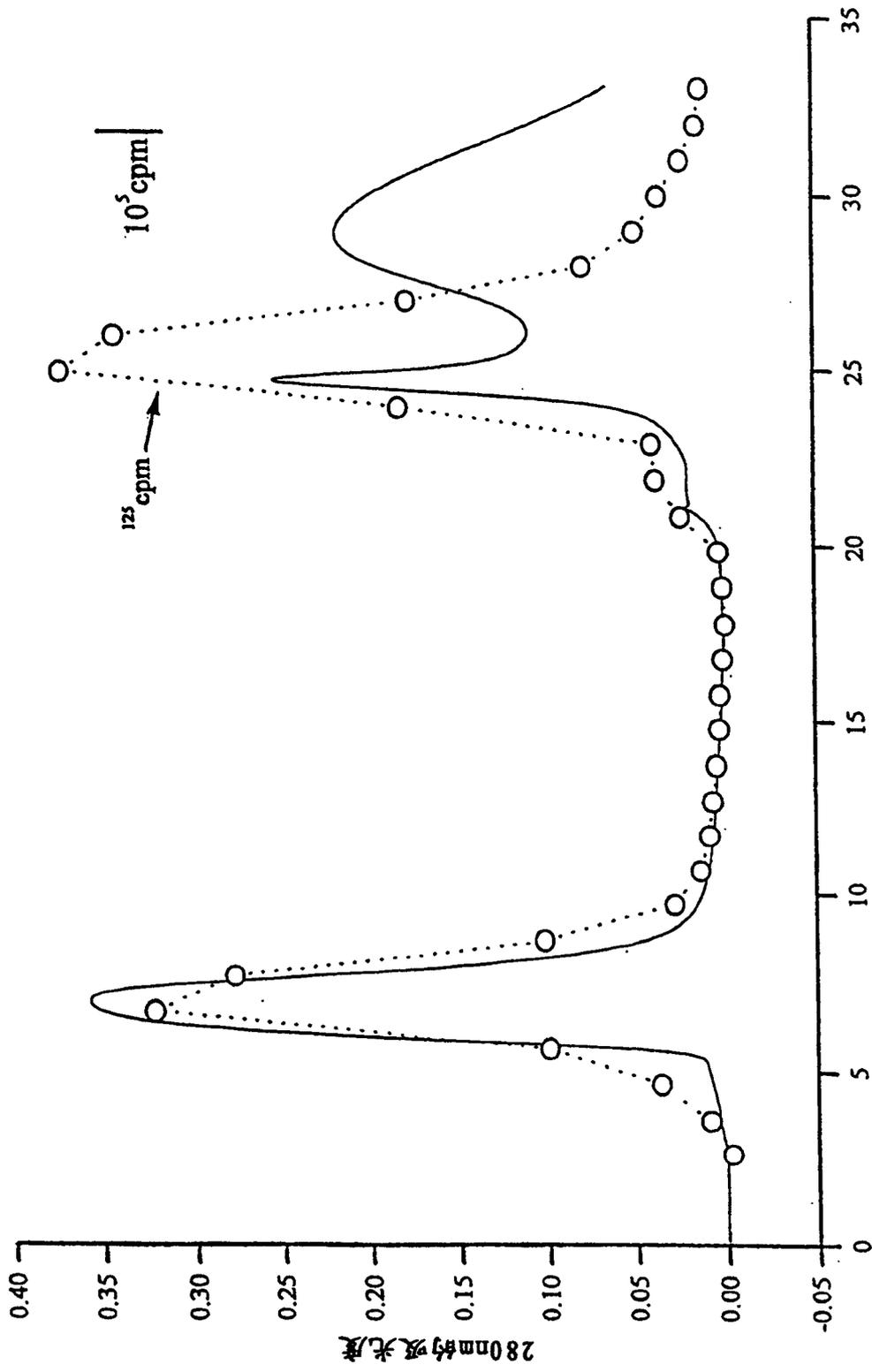
以来自 TSE-感染的麋鹿血液样品重复实施例 4 的步骤。通过毛细

管免疫电泳发现存在异常朊病毒蛋白。在未感染 TSE 的对照血液样品的电泳图谱中未检测出异常朊病毒蛋白。

\* \* \*

5 在此引用的所有专利、专利申请、试验方案和出版物均以其完整形式被引入作为参考。

本发明不受在此所述的特定实施方案范围的限制。其实，根据前面的论述和附图，除了在此所述之外本发明的多种修改形式对于本领域的技术人员将是显而易见的。旨在将这些修改形式归属于所附权利要求的范围之内。



迁移时间(分钟)

图 1

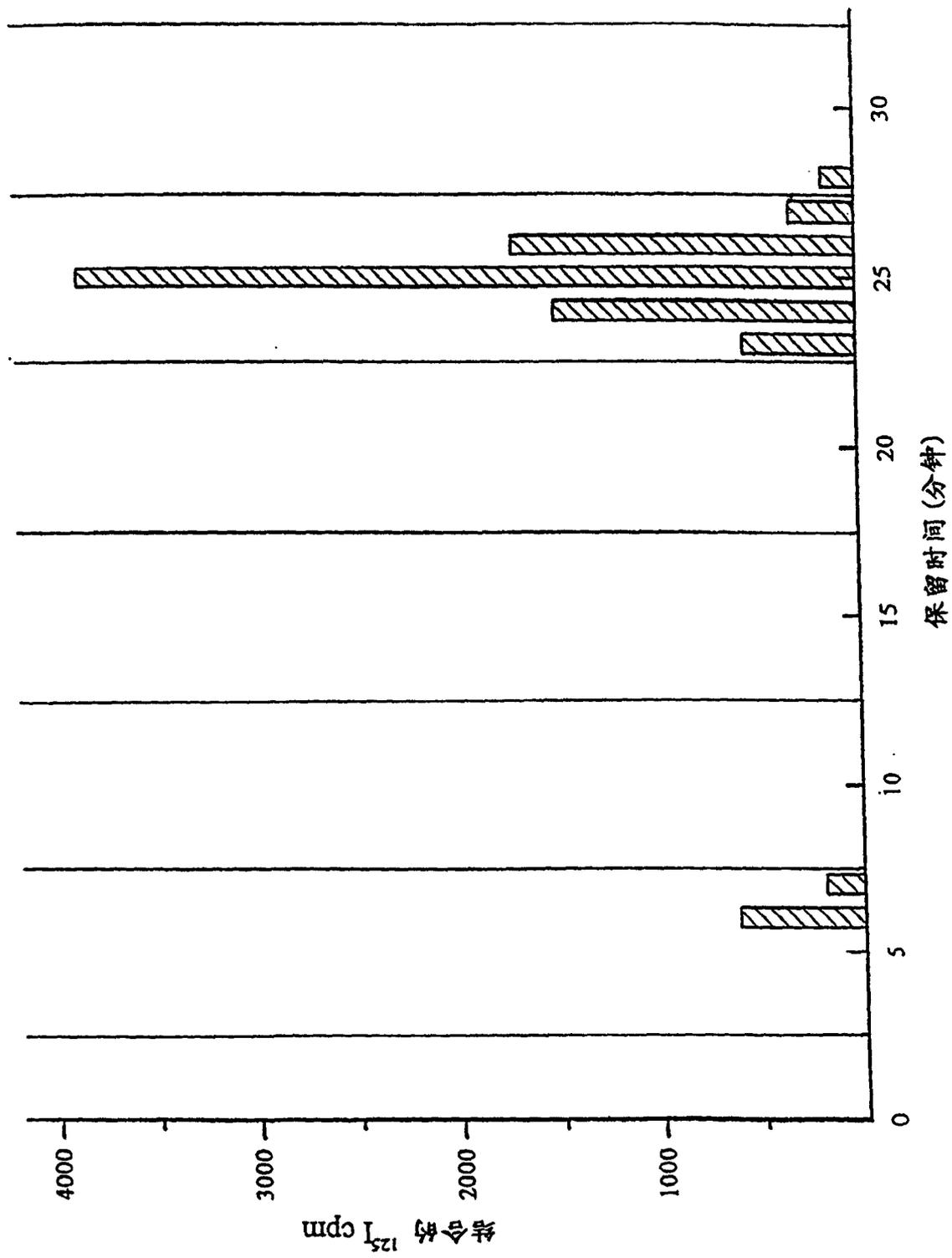


图 2

专利名称(译)	提取朊病毒蛋白的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1135235C</a>	公开(公告)日	2004-01-21
申请号	CN00804405.8	申请日	2000-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
当前申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
[标]发明人	安德鲁J阿尔珀特 MJ施梅尔		
发明人	安德鲁· J· 阿尔珀特 M· J· 施梅尔		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47 C12P21/00 C07K1/14 C07K1/02		
CPC分类号	Y10S435/962 C07K14/47		
代理人(译)	姜建成		
优先权	09/420850 1999-10-19 US 60/115272 1999-01-08 US		
其他公开文献	CN1342266A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于从生物材料如动物组织或动物产品中提取朊病毒蛋白的方法。在特定的实施例中，用六氟-2-丙醇从匀浆化的绵羊脑组织中提取到异常朊病毒蛋白。通过增加水溶液的离子强度可使六氟-2-丙醇与脑组织水制备物分离开。可将有机提取物中的朊病毒蛋白进一步纯化，或者借助于例如免疫测定法测定此提取物中是否存在朊病毒蛋白，特别是异常朊病毒蛋白。此提取方法使之有可能测定是否存在异常朊病毒蛋白，可用于例如诊断传染性海绵状脑炎(TSE)。上面的图显示如通过放射性(由圆圈表示的)和通过在280nm的吸光度(由曲线图中的实线表示的)检测的<sup>125</sup>I-朊病毒蛋白的HILIC层析图谱。

