

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680013920.0

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101184998A

[22] 申请日 2006.2.24
[21] 申请号 200680013920.0
[30] 优先权
 [32] 2005. 2. 25 [33] JP [31] 050497/2005
[86] 国际申请 PCT/JP2006/303415 2006. 2. 24
[87] 国际公布 WO2006/090836 日 2006. 8. 31
[85] 进入国家阶段日期 2007. 10. 25
[71] 申请人 国立大学法人广岛大学
 地址 日本广岛县
 共同申请人 智再如股份有限公司
[72] 发明人 达家雅明

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 封新琴

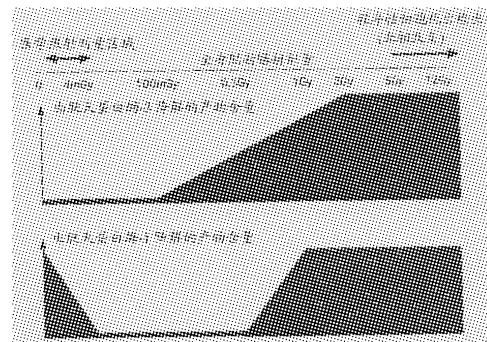
权利要求书 1 页 说明书 13 页 序列表 5 页
附图 5 页

[54] 发明名称

测量电离辐射的曝射剂量的方法

[57] 摘要

一种测量电离辐射的曝射剂量的方法，其包括：(a) 从收集自活体的组织或血液提取蛋白质；和(b) 测定提取的蛋白质中包含的 LyGDI 蛋白的 1 型和 3 型胰天蛋白酶分解产物中至少一种的表达量。



1. 一种测量电离辐射的曝射剂量的方法，其包括如下步骤：
 - (a) 从收集自活体的组织或血液提取蛋白质，和
 - (b) 测定提取的蛋白质中由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的至少一种产物的含量。
2. 根据权利要求 1 测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中测定由胱天蛋白酶-1 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量和由胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量。
3. 根据权利要求 1 或 2 测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中通过免疫印迹方法来测定由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量。
4. 根据权利要求 1 至 3 任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中蛋白质提取自收集的胸腺组织、骨髓组织、脾脏组织、肠上皮组织或血液。
5. 根据权利要求 1 至 3 任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中蛋白质提取自收集的胸腺。
6. 根据权利要求 1 至 3 任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中蛋白质提取自收集的血液。
7. 用于测量电离辐射的曝射剂量的试剂盒，其包含抗体，所述抗体用于通过免疫印迹方法测定蛋白质中由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的至少一种产物的含量，所述蛋白质从收集自活体的组织或血液

测量电离辐射的曝射剂量的方法

技术领域

本发明涉及测量电离辐射的曝射剂量的方法，其中通过利用生物化学反应能够直接得知照射电离辐射或电磁波对于活体的生物学影响。

背景技术

对于电离辐射的曝射剂量的测量，通常使用由电离辐射引起的物理反应，具体而言使用的是胶片辐射剂量计(film badge)、热致发光剂量计(thermoluminescence dosimeter)、携带式剂量计(pocket dosimeter)等(Actual Radiation Control for Chief, revised 2nd edition, p. 140, 1992, Japan Radioisotope Association)。

胶片辐射剂量计包含容纳以照相乳剂(photographic emulsion)涂覆的树脂胶片(resin film)的箱(case)，其中当照相乳剂曝露于电离辐射后，连同照相乳剂的感光作用一起，显示与辐射剂量成比例的黑化作用(blackening action)，并且将这种感光作用用于测定电离辐射的曝射剂量。另一方面，热致发光剂量计是利用以辐射照射的结晶材料加热后引起的发光(荧光)的剂量计，其中当用电子辐射照射之后，结晶内的电子和电子空穴彼此分离，而在通过热刺激相互再组合时，它们产生发光；通过这种发光原理测定电离辐射的曝射剂量。此外，携带式剂量计是一种计量器，其中电离室内封入的气体根据施加于其上的电离辐射剂量而电离，并且由电离引起的电流(electricity)测定电离辐射的曝射剂量。

这些物理测量方法具有高可靠性和稳定性，操作花费低廉并且易于任何人操作，但是存在以下问题：

首先，在上述物理测量方法中，测量吸收入各种测量仪器内的辐射剂量作为使用的电离辐射的剂量。然而，这种剂量与吸收入活体以直接影响活体健康的辐射剂量是否一致是值得怀疑的，特别在低剂量范围内。

此外，与这个问题有关，上述物理测量方法仅用于测量施加于活体表面的辐射剂量，因而无法测量已到达活体内部的照射剂量。例如，胶片辐射剂

量计对暴露于低透过性的³²P伽玛射线有反应,然而这样施加的照射大部分会因屏蔽材料如衣物而减弱。因此,通过上述物理方法测量的曝射剂量并不总是反映活体实际受到曝射的辐射剂量。

更进一步而言,物理测量方法不能准确地反映在RBE (radiation biological effectiveness; 辐射生物学效力)方面不同的辐射对于活体的影响。例如,对于1 Gy的中子辐射和1 Gy的X射线,已知尽管对二者均指定1 Gy的相同剂量,但是前者的生物学效力是后者的2至10倍。然而在上述物理方法中,二者显示具有1 Gy的相同剂量。

众所周知,“有效辐射剂量”的概念存在于物理方法中并且是法律上采用的。然而,为了校准“有效辐射剂量”,应该在计算辐射的曝射剂量之前鉴定辐射质(radiation quality)和暴露于辐射的组织。例如,为了检测辐射对于一个人的影响,曝射剂量应该表示为根据器官的“组织加权因子”通过测定各组织的曝射剂量得到的各组织曝射剂量的总和。然而,各器官权重和“组织加权因子”中存在微妙的个体差异,因而由此测定的有效辐射剂量是否准确反映辐射对于每个人的影响是存在疑问的。

此外,物理测量方法不能用于测量之前未装备测量设备如胶片辐射剂量计的受试者。因此,在一般人偶然暴露于辐射的情况中,例如,在原子能事故中的剂量不能直接测量,因而不可避免进行间接估计。

因此,在物理测量方法中,暴露在活体上的电离辐射的影响通过计算来间接且不可靠地估计,而当存在暴露的可能性时,应该提前给受试者装备测量设备如胶片辐射剂量计。

适当地参考附图,本发明的其它和更多的特征和优势将由以下的描述更加充分地显示。

发明内容

根据本发明,提供以下方法:

(1) 测量电离辐射的曝射剂量的方法,其包括如下步骤:

(a)从收集自活体的组织或血液提取蛋白质,和

(b)测定提取的蛋白质中由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的LyGDI蛋白的至少一种产物的含量;

(2) 根据上述(1)项测量电离辐射的曝射剂量的方法,其中测定由胱天蛋

白酶-1 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量和由胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量;

(3) 根据上述(1)或(2)项测量电离辐射的曝射剂量的方法, 其中通过免疫印迹方法测定由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的产物的含量;

(4) 根据上述(1)至(3)项中任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法, 其中蛋白质提取自收集的胸腺(thymus)组织、骨髓(bonemarrow)组织、脾脏(spleen)组织、肠上皮组织(intestinal epithelium tissue)或血液;

(5) 根据上述(1)至(3)项中任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法, 其中蛋白质提取自收集的胸腺;

(6) 根据上述(1)至(3)项中任一项测量电离辐射的曝射剂量的方法, 其中蛋白质提取自收集的血液; 和

(7) 用于测量电离辐射的曝射剂量的试剂盒, 其包含抗体, 所述抗体用于通过免疫印迹方法测定蛋白质中由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的至少一种产物的含量, 所述蛋白质从收集自活体的组织或血液中提取。

电离辐射对于活体的影响之一是凋亡(apoptosis), 并且从很久以前已在胸腺组织和其它组织中观察到由电离辐射照射引起的凋亡。已知肿瘤抑制基因产物 p53 的功能涉及这种凋亡, 并且在凋亡的诱导中, 还涉及线粒体介导的信号系统、其下游因子即胱天蛋白酶组(caspase group)的蛋白酶及其伴随的 DNA 分解酶的活化, 并且细胞内多种分子的断裂和活化是由凋亡引起的。

就此而论, 作为由上述胱天蛋白酶组切割的蛋白质之一, 已知 LyGDI 蛋白(因子, 其为也称为 GDI-D4、RhoGDI2 或 RhoGDI β 的分子, 并通过从 Rho 家族的 G 蛋白释放 GDP 来抑制活化过程)在血细胞中以高水平表达。已知由 SEQ ID NO: 1 代表的人 LyGDI 蛋白在位置 19 (或由 SEQ ID NO: 2 代表的小鼠 LyGDI 蛋白的位置 18)的天冬氨酸 C 末端侧的肽键处具有胱天蛋白酶-3 切割位点, 并且在位置 55 (或小鼠 LyGDI 蛋白的位置 54)的天冬氨酸 C 末端侧的肽键处具有胱天蛋白酶-1 切割位点, 如图 1 和图 2 所示。

本发明人广泛研究了 LyGDI 蛋白和电离辐射之间的关系, 结果他们发现胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 由电离辐射的照射活化(参见 Radiation Research, 162, pp. 287-295, 2004; Molecular Carcinogenesis, 39, pp. 206-220, 2004 等)。

本发明的发明人在上述研究的基础上继续进一步研究，结果他们发现由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的LyGDI蛋白产物的含量显示取决于电离辐射照射剂量的特有变化，并且发现它们的降解模式(degraded pattern)依赖于组织和血液而改变。基于这些发现完成了本发明。

根据本发明，辐射的曝射剂量能够基于从活体收集的蛋白质的结构改变来测量。

具体而言，通过根据本发明的电离辐射曝射剂量的测量方法，可直接测量电离辐射对于活体的影响，而无需预先具有测量设备。此外，胶片辐射剂量计等在照射时不是必需的，所以即使在不太可能发生的将活体曝露于电离辐射情况中，如在核燃料制造事故中，在原子能工厂的事故中，或核原料自核武器等意外泄露的情况下，能够更准确地得知电离辐射对于活体的影响。

此外，相较于以白细胞变形数为基础的常规测量曝射剂量的方法，根据本发明能够更准确地测量电离辐射的曝射剂量。另外，不能由白细胞的改变来确定的非常低的曝射剂量同样能够根据本发明通过血液检查来测量。

附图简述

图1是显示人LyGDI蛋白结构的示意图。

图2是显示人LyGDI蛋白和小鼠LyGDI蛋白的氨基酸序列和胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3切割位点的示意图。

图3显示从小鼠胸腺组织提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图4示意性地显示小鼠胸腺组织曝露于照射的剂量，和由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的产物含量的变化。

图5显示从小鼠骨髓组织提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图6显示从小鼠脾脏组织提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图7显示从小鼠肠上皮组织提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图8显示从小鼠血液提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图9显示从人外周血白细胞提取的蛋白质的免疫印迹结果。

图10显示从人外周血白细胞提取的蛋白质的免疫印迹结果。

发明最佳实施方式

当将活体曝露于电离辐射时，由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的

LyGDI 产物的模式依赖于曝射剂量而改变。基于此发现，本发明的特征在于测量活体暴露于电离辐射的剂量。

具体而言，根据本发明测量电离辐射曝射剂量的方法包括如下步骤：(a) 从收集自活体的组织或血液提取蛋白质，和(b)测定所提取的蛋白质中由胰天蛋白酶-1 和胰天蛋白酶-3 降解的 LyGDI 蛋白的至少一种产物的含量。以下将详细描述相关事项。

(测量对象)

通过此方法测量电离辐射曝射剂量的对象不具体限定在以组成性表达 LyGDI 蛋白的组织或血液为对象的范围。然而，考虑到容易发生胰天蛋白酶分解反应，对象优选胸腺组织、骨髓组织、脾脏组织、肠上皮组织或血液，其中胸腺组织是优选的，并且血液也可令人满意地用于测量。血液包括含有胸腺衍生细胞(T 细胞)的外周血。此外，待从中收集这些组织或血液的活体包括哺乳动物活体例如小鼠、犬、猫、猪或牛，血液可收集自人，并且组织可以收集自人死体。在血液之中，外周血能够容易地收集。因此，将外周血优选用作待用于根据本发明测量电离辐射曝射剂量的血液。

(组织或血液的收集和蛋白质的提取)

从活体收集组织或血液能够通过常规方法进行；具体而言，组织能够通过外科方法使用外科刀收集，而血液能够通过注射器的吸取收集并且随后通过离心分离血细胞。蛋白质的提取也能够通过常规方法进行，具体而言通过在缓冲液中悬浮组织或血细胞，并且用匀浆器或弗氏压碎器(French press)破坏组织或细胞。就此而论，如有必要可将变性剂、抗氧化剂等添加至缓冲液；并且可将破坏的细胞分散体(disrupted cellular dispersion)中的核酸例如 DNA 和细胞膜中的脂肪去除。

(测定方法)

测定由胰天蛋白酶-1 和胰天蛋白酶-3 降解的产物(在本说明书中也分别称作 $\Delta 55$ -LyGDI 和 $\Delta 19$ -LyGDI)含量的方法可在能够特异性测定某种蛋白质的含量的范围内不带任何具体限制地使用，并且所述测定方法具体而言是通过使用抗原/抗体反应的方法，具体能够使用免疫印迹方法(Western 印迹方法)和 ELISA 方法。作为抗体，可使用对于 LyGDI 蛋白的抗 LyGDI 抗体和对于由胰天蛋白酶-1 和胰天蛋白酶-3 降解的产物的抗体。

现在，对 LyGDI 蛋白和由胰天蛋白酶降解的产物进行描述。

通过实例的方式描述人和小鼠来源的 LyGDI 蛋白。这些蛋白质的氨基酸序列示于图 2 并且通过 SEQ ID NOS: 1 和 2 表示。

LyGDI 蛋白中的胱天蛋白酶-3 切割位点在人的情况下是位置 19 天冬氨酸 C 末端侧的肽键，或在小鼠的情况下是位置 18 天冬氨酸 C 末端侧的肽键。另一方面，LyGDI 蛋白中的胱天蛋白酶-1 切割位点在人的情况下是位置 55 天冬氨酸 C 末端侧的肽键，或在小鼠的情况下是位置 54 天冬氨酸 C 末端侧的肽键。

因此，由胱天蛋白酶-3 降解的人 LyGDI 蛋白产物的氨基酸序列通过 SEQ ID NO: 3 表示；由胱天蛋白酶-3 降解的小鼠 LyGDI 蛋白产物的氨基酸序列通过 SEQ ID NO: 4 表示；由胱天蛋白酶-1 降解的人 LyGDI 蛋白产物的氨基酸序列通过 SEQ ID NO: 5 表示；并且由胱天蛋白酶-1 降解的小鼠 LyGDI 蛋白产物的氨基酸序列通过 SEQ ID NO: 6 表示。

在本文的说明书中，由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物包括具有 SEQ ID NOS: 3 至 6 所示氨基酸序列的蛋白质，其中在 SEQ ID NOS: 3 至 6 中将一个或几个氨基酸缺失、取代和/或添加，并且所述序列被胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解。

当通过免疫印迹方法测定由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量时，可使用本领域已知的免疫印迹方法。具体而言，用含有变性剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)的缓冲溶液提取蛋白质，然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳完成之后，将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜、硝化纤维膜等上，然后用抗 LyGDI 蛋白抗体等显现(visualize)，由此测定由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。

当通过 ELISA 方法测定由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量时，可使用本领域已知的 ELISA 方法。具体而言，将抗 LyGDI 蛋白抗体等结合至固相聚苯乙烯等，将蛋白提取溶液添加至其上，然后通过酶标记的抗体的反应来显现，由此测定结合至固相的由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。

就此而论，从降解 LyGDI 蛋白的观点看，将依赖于电离辐射照射剂量的生物学反应分类为以下两个阶段(phase)。

一个阶段是在 1 Gy 或更高的剂量范围中观察到的阶段，胱天蛋白酶-3 活化伴有细胞内凋亡诱导信号的开启以产生 $\Delta 19$ -LyGDI。另一个阶段是在更低

剂量范围观察到的阶段，其中检测不到凋亡诱导信号的开启，取而代之，不存在 $\Delta 55$ -LyGDI。

如上所述，由胱天蛋白酶-1降解的产物的模式不同于由胱天蛋白酶-3降解的产物的模式，所以在非常低剂量的电离辐射照射后，优选测定两种指标，即由胱天蛋白酶-1降解的 LyGDI 蛋白产物的含量和由胱天蛋白酶-3降解的 LyGDI 蛋白产物的含量，以准确地测量曝射剂量。

如实施例 1-4 和 1-5 所示，依赖于组织和血液的类型，存在由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的任一种产物不存在的情况。此外，如实施例 1-4 所示，存在以下情况，其中随着电离辐射的曝射剂量增加，在提取的蛋白质中观察到全长 LyGDI 和 $\Delta 19$ -LyGDI 的含量减少，而无 $\Delta 19$ -LyGDI 含量的增加。

因此，为了更准确地测量电离辐射的曝射剂量，视情况而定，除了测定提取的蛋白质中由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量之外，优选测定全长 LyGDI 的含量。

在本发明的说明书中，全长 LyGDI 包括，例如，包含 SEQ ID NO: 1 或 2 所示的氨基酸序列的蛋白质，其中在 SEQ ID NO: 1 或 2 中缺失、取代和/或添加一个或几个氨基酸，并且所述序列含有胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 切割位点。

在本发明中，可根据以下方法测定电离辐射的曝射剂量。

首先，制作示意图，所述示意图显示由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物含量响应于电离辐射的曝射剂量的改变，如图 4 所示。然后，基于所述示意图，通过 Western 印迹等测定收集自活体的组织或血液中由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量，并且测定电离辐射的曝射剂量。

在本发明的优选实施方案中，存在以下方法，其中当存在待用于测量电离辐射曝射剂量的大量样品时，通过 ELISA 进行初步筛选，并且通过 Western 印迹仅检测疑似曝露于电离辐射的样品中由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物含量，由此测量电离辐射曝射剂量。

在本发明中，优选测定未曝露于电离辐射时和曝露于电离辐射之后两种情况下，所提取蛋白质中由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。然而，即使在未曝露于电离辐射时由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物含量不能测定的情况下，仅仅通过测定曝露于电离辐射之后的降解产物的含量，当含量的改变显著时，其样品也可为疑似受到电离辐射照射。

用于根据本发明测量电离辐射的曝射剂量的试剂盒包含抗体，该抗体用于通过免疫印迹方法测定由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的LyGDI蛋白至少一种产物的含量。对抗体不作具体限定，只要其是用于免疫印迹方法中并且相对于由胱天蛋白酶-1和胱天蛋白酶-3降解的LyGDI蛋白至少一种产物而产生。

将基于以下给出的实施例进行更详细的描述本发明，但不意味以这些实施例限制本发明。

实施例

实施例 1 在个体小鼠水平的测试

实施例 1-1

(X射线全身照射)

将七周龄的雄性小鼠(C57BL/6NCrj (商品名), Japan Charles River)饲养在常规环境下至8-9周龄,并用来自X射线发生器(Shin-ai Go (商品名), 200 kVp, 25 mA,由 Shimadzu Corporation 制造)的X射线(电离辐射)以0.6 Gy的照射剂量率(exposure dose ratio)进行全身照射。通过改变照射时间来调节照射的量(曝射剂量)。

(组织的收集和胸腺蛋白的提取)

用辐射照射之后,将各个小鼠解剖以收集胸腺组织,将收集的组织通过外科刀切碎并用SDS样品缓冲液溶解以制备溶解的样品。SDS样品缓冲液由5%甘油、25 mM Tris-HCl (pH 6.8)和1% SDS组成。

(电泳)

制备12%聚丙烯酰胺凝胶(分离胶),并且将4%聚丙烯酰胺凝胶(浓缩胶)铺于其上,将上述溶解的样品以每泳道20 μ g的量上样,然后进行电泳(电泳条件如下:浓缩胶中的迁移电流是20 mA;分离胶中的迁移电流是40 mA;所用电泳缓冲液(running buffer)是Tris-甘氨酸缓冲液)。电泳结束之后,将浓缩胶切下,并且将分离胶使用转移缓冲液平衡5分钟(两次)。

就此而论,通过如下方法制备分离胶:混合3 mL的40%丙烯酰胺储液(stock solution)、2.5 mL的Lower凝胶缓冲液(1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.4% SDS)、4.5 mL的灭菌milli Q水、50 μ L的10%过硫酸铵水溶液和10 μ L的N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

通过如下方法制备浓缩胶：混合 0.5 mL 的 40%丙烯酰胺储液、1.25 mL 的 Upper 凝胶缓冲液(0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.4% SDS)、3.25 mL 的灭菌 milli Q 水、30 μ L 的 10%过硫酸铵水溶液和 8 μ L 的 N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

Tris-甘氨酸缓冲液由 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸和 0.1% SDS 组成，而转移缓冲液由 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸和 10%甲醇组成。

(免疫印迹)

将已平衡的胶通过半干方法(semidry method)转移到转移缓冲液中的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride)膜(PVDF, 由 Nippon Eidoh Co., Ltd.制造)上(100 mA, 3 小时)。在转移之后, 将 PVDF 膜用含有 5%脱脂乳的 PBST 进行封闭 1 小时。

在封闭结束之后, 将识别 LyGDI 蛋白 C 末端的抗体(目录号 Sc-604, 由 Santa Cruz 制造)结合至其上一小时, 并且用 PBST 进行两次 5 分钟的洗涤。然后, 将碱性磷酸酶标记的抗小鼠 IgG (H+L) (由 Promega 制造)结合至膜上 1 小时, 然后用 PBST 进行 3 次 5 分钟的洗涤。将膜用 0.1 M Tris 水溶液(pH 9.5)冲洗 5 分钟, 然后在室温与 CDP-Star (注册商标) Western Blot Chemiluminescence Reagent (由 NEN Life Science Products, Inc.制造)一起温育 5 分钟。温育之后, 将其暴露在薄膜(由 Amersham Bioscience 制造)上。

(结果)

结果示于图 3。如图 3(a)所示, 发现由胱天蛋白酶-1 降解的产物(17 kDa)不存在于低范围的曝射剂量(至多 0.1 Gy)中, 但是在 0.5 Gy 或更多的曝射剂量时再次出现。此外, 还发现当全身照射为 5 Gy 或更多时, 存在由胱天蛋白酶-3 降解的大量产物(21 kDa)。另外, 如图 3(b)所示, 即使通过用 4 mGy 的低剂量照射, 也观察到由胱天蛋白酶-1 降解的产物(17 kDa)含量的减少。

从以上的结果, 由胱天蛋白酶-1 或胱天蛋白酶-3 降解的产物含量相对于曝射剂量的改变示意性地示于图 4。从这些图中显而易见的是, 曝射剂量和由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的模式之间存在预定的关联, 并且将由胱天蛋白酶降解的这些产物的含量量化(quantify), 由此能够估计施加于个体受试者的电离辐射量。

就此而论, 通过用识别胱天蛋白酶-3 切割位点的抗体(在切割之后识别长链 N 末端侧的抗体、KLH 偶联物, 其中所述抗体是相对于由氨基酸序列 SKLNYKPPPQKC (SEQ ID NO: 7)组成的寡肽作为抗原产生的单克隆抗体)的

相同 PVDF 膜的免疫印迹,将薄膜上的 21-kDa 条带确认为源自由胱天蛋白酶-3 降解的产物(数据未显示)。此外,用各胱天蛋白酶切割之后预计将存在的 LyGDI 蛋白 N 末端侧片段同样通过使用抗体(目录号 66456E,由 Phamingen 制造)的相同 PVDF 膜的免疫印迹来确认,所述抗体识别 LyGDI 蛋白的 N 末端(数据未显示)。基于这些信息,确认了 17-kDa 条带源自由胱天蛋白酶-1 降解的产物,而 21-kDa 条带源自由胱天蛋白酶-3 降解的产物。

实施例 1-2

(使用骨髓组织的测量)

除使用骨髓组织以外,通过与实施例 1-1 中相同的方法检测由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。结果示于图 5。如该图中所示,由胱天蛋白酶-1 降解的非常少量的产物(17 kDa)恒定存在于未经照射的受试者中,但是所述产物不存在于 1 Gy 或更多的剂量范围内。此外,在 0.5 Gy 或更多的剂量范围内,全长 LyGDI 蛋白的量趋于减少,而在 13 kDa 附近观察到与识别 LyGDI 蛋白 C 末端的小鼠抗体特异性反应的蛋白,其相对于全长 LyGDI 蛋白的减少以反比增加。

实施例 1-3

(使用脾脏组织测量)

除使用脾脏组织以外,通过与实施例 1-1 中相同的方法检测由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。结果示于图 6。如该图中所示,在脾脏组织的情况下恒定观察到由胱天蛋白酶-1 降解的产物(17 kDa)。此外,在 1 Gy 或更多的剂量范围观察到由胱天蛋白酶-3 降解的非常少量的产物(21 kDa)。

实施例 1-4

(使用肠上皮组织测量)

除使用肠上皮组织以外,通过与实施例 1-1 中相同的方法检测由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。结果示于图 7。如该图中所示,在肠上皮组织的情况下由胱天蛋白酶-3 降解的产物(21 kDa)恒定存在于未照射状态(0 Gy)。另一方面,在 5 Gy 或更多的范围未观察到全长 LyGDI 蛋白,并且在 12 Gy 或更多的范围内也观察不到由胱天蛋白酶-3 降解的产物。此外,由胱天蛋白酶-1 降解的产物几乎不存在。这可能是由于用辐射照射使肠上皮细胞脱落。

实施例 1-5

(使用血液测量)

除使用血液以外,通过与实施例 1-1 中几乎相同的方法检测由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的含量。结果示于图 8。如该图中所示,在 12 Gy 或更多的高剂量范围内观察到由胱天蛋白酶-1 降解的产物(17 kDa)。另一方面,由胱天蛋白酶-3 降解的产物几乎不存在。

从实施例 1-1 至 1-5 的结果,能够确认在收集自小鼠的组织 and 血液中由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的模式依赖于电离辐射的曝射剂量而改变;即,能够确定电离辐射的曝射剂量能够通过检测由胱天蛋白酶-1 和胱天蛋白酶-3 降解的产物的模式来测量。

实施例 2 在人水平的试验

实施例 2-1

(使用电离辐射照射)

对受试者(成年男性,49岁)用牙全景放射照相仪器(商品名:auto1000ex,由 Asahi Roentgen Co., Ltd.制造)以常规方式在颌部(顎部)进行一次牙全景放射照相术(dental panoramic radiography)(辐射剂量:约 20 mGy)。在照相期间,受试者穿着铅防护板(lead apron)。

(血液的收集和样品的制备)

在辐射之前和辐射 6 小时之后,收集血液(外周血),从中分离白细胞并且用 SDS 样品缓冲液溶解以确定它们的蛋白质量。

(电泳和 Western 印迹)

通过 SDS-PAGE 分离蛋白质,然后使用以下 4 种抗体进行 Western 印迹:

抗体 1: sc-6047G (商品名,羊多克隆抗体,其表位是 LyGDI 的 C 末端区域,由 Santa Cruz 制造)。

抗体 2: 66586E (商品名,兔多克隆抗体,其相对于全长 LyGDI 作为抗原产生,并且未进行表位作图,由 Pharmingen 制造)

抗体 3: 71-6300 (商品名,兔多克隆抗体,其表位是 LyGDI 的中央部,由 Zymed 制造)

抗体 4: 97A1015 (商品名,小鼠单克隆抗体,其识别 Δ 19-LyGDI 的 N 末

端, 由 Active Motif 制造)

(结果)

结果示于图 9。如图 9(a)、(b)和(c)所示, 照射后 $\Delta 55$ -LyGDI 的含量较未照射时减少。而另一方面, 未照射时 $\Delta 19$ -LyGDI 的含量与照射后无区别。

实施例 2-2

(电离辐射的照射)

通过用于癌症治疗的超高压(linac)照射装置(商品名: Mebatron 67-6300, 由 Siemens AG 制造), 对受试者(携带癌症的患者, 成年男性, 67 岁)在腹部用电离辐射(放射剂量: 约 2 Gy)进行照射。

(血液的收集和样品的制备)

在射线照相术之前和射线照相术 6 小时之后, 收集血液(外周血), 从中分离白细胞并且用 SDS 样品缓冲液溶解, 以确定它们的蛋白质量。

(电泳和 Western 印迹)

通过 SDS-PAGE 分离蛋白质然后用以下 3 中抗体进行 Western 印迹:

抗体 1: sc-6047G (商品名, 由 Santa Cruz 制造)

抗体 2: 66586E (商品名, 由 Pharmingen 制造)

抗体 4: 97A1015 (商品名, 由 Active Motif 制造)

(结果)

结果示于图 10。如图 10(a)、(b)和(c)所示, 照射后 $\Delta 55$ -LyGDI 和 $\Delta 19$ -LyGDI 二者的含量与未照射状态的情况相比均增加。

在前述结果中, 揭示了在用低剂量范围的辐射照射的情况下如在全景射线照相术中, 在电离辐射照射之后 6 小时观察到 $\Delta 55$ -LyGDI 含量的减少。此外, 与小鼠的情况不同, $\Delta 19$ -LyGDI 恒定存在于人外周血的白细胞中, 并且其含量不因全景射线照相术而改变。

另一方面, 在用相对高剂量范围的辐射照射的情况下, 例如在用于癌症治疗的辐射的照射中, 照射后 6 小时 $\Delta 19$ -LyGDI 的含量与 $\Delta 55$ -LyGDI 的含量一起增加。

这些结果显示, 不仅在小鼠中, 而且在人中, 都能够将 LyGDI 衍生片段例如 $\Delta 55$ -LyGDI 和 $\Delta 19$ -LyGDI 作为生物学标记指示电离辐射的曝射, 以及用于考察电离辐射的曝射剂量。

工业适用性

通过根据本发明的测量电离辐射的曝射剂量的方法，能够直接测量电离辐射对于活体的影响而不用提前携带测量设备。此外，胶片辐射剂量计等在照射时并非必需的，所以即使在不太可能发生的将活体曝露于电离辐射的情况下，例如在核燃料制造的事故中，在原子能工厂的事故中，或核原料自核武器等意外泄露的情况下，能够更准确地得知电离辐射对于活体的影响。

虽然通过涉及本发明的实施方案已对本发明进行了描述，但除非特定指出，我们的意图不在于通过描述的任何细节来限制本发明，而是在不违背所附权利要求中所述的精神和范围的前提下对本发明作宽泛的解释。

<110> 国立大学法人广岛大学(Hiroshima University)
 智再如股份有限公司(TWO CELLS CO., Ltd.)
 达家雅明(TATSUKA, Masaaki)

<120> 测量电离辐射的曝射剂量的方法

<130> P26042

<150> JP 2005-50497
 <151> 2005-02-25

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Thr Glu Lys Ala Pro Glu Pro His Val Glu Glu Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Lys Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys Ser Leu
 20 25 30

Lys Glu Leu Gln Glu Met Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu Ile Lys Tyr
 35 40 45

Lys Lys Thr Leu Leu Gly Asp Gly Pro Val Val Thr Asp Pro Lys Ala
 50 55 60

Pro Asn Val Val Val Thr Arg Leu Thr Leu Val Cys Glu Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Thr Met Asp Leu Thr Gly Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys
 85 90 95

Glu Thr Ile Val Leu Lys Glu Gly Ser Glu Tyr Arg Val Lys Ile His
 100 105 110

Phe Lys Val Asn Arg Asp Ile Val Ser Gly Leu Lys Tyr Val Gln His
 115 120 125

Thr Tyr Arg Thr Gly Val Lys Val Asp Lys Ala Thr Phe Met Val Gly
 130 135 140

Ser Tyr Gly Pro Arg Pro Glu Glu Tyr Glu Phe Leu Thr Pro Val Glu
 145 150 155 160

Glu Ala Pro Lys Gly Met Leu Ala Arg Gly Thr Tyr His Asn Lys Ser
 165 170 175

Phe Phe Thr Asp Asp Asp Lys Gln Asp His Leu Ser Trp Glu Trp Asn

<400> 3

Ser Lys Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys Ser Leu Lys Glu Leu
1 5 10 15

Gln Glu Met Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Lys Thr
20 25 30

Leu Leu Gly Asp Gly Pro Val Val Thr Asp Pro Lys Ala Pro Asn Val
35 40 45

Val Val Thr Arg Leu Thr Leu Val Cys Glu Ser Ala Pro Gly Pro Ile
50 55 60

Thr Met Asp Leu Thr Gly Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Glu Thr Ile
65 70 75 80

Val Leu Lys Glu Gly Ser Glu Tyr Arg Val Lys Ile His Phe Lys Val
85 90 95

Asn Arg Asp Ile Val Ser Gly Leu Lys Tyr Val Gln His Thr Tyr Arg
100 105 110

Thr Gly Val Lys Val Asp Lys Ala Thr Phe Met Val Gly Ser Tyr Gly
115 120 125

Pro Arg Pro Glu Glu Tyr Glu Phe Leu Thr Pro Val Glu Glu Ala Pro
130 135 140

Lys Gly Met Leu Ala Arg Gly Thr Tyr His Asn Lys Ser Phe Phe Thr
145 150 155 160

Asp Asp Asp Lys Gln Asp His Leu Ser Trp Glu Trp Asn Leu Ser Ile
165 170 175

Lys Lys Glu Trp Thr Glu
180

<210> 4

<211> 182

<212> PRT

<213> 小鼠脑池内A颗粒

<400> 4

Ser Lys Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys Ser Leu Lys Glu Leu
1 5 10 15

Gln Glu Met Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu Thr Lys Tyr Lys Lys Thr
20 25 30

Leu Leu Gly Asp Val Pro Val Val Ala Asp Pro Thr Val Pro Asn Val
35 40 45

Thr Val Thr Arg Leu Ser Leu Val Cys Asp Ser Ala Pro Gly Pro Ile
50 55 60

Thr Glu

145

<210> 6

<211> 146

<212> PRT

<213> 小鼠脑池内 A 颗粒

<400> 6

Val Pro Val Val Ala Asp Pro Thr Val Pro Asn Val Thr Val Thr Arg
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Val Cys Asp Ser Ala Pro Gly Pro Ile Thr Met Asp Leu
 20 25 30

Thr Gly Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Asp Thr Phe Val Leu Lys Glu
 35 40 45

Gly Ile Glu Tyr Arg Val Lys Ile Asn Phe Lys Val Asn Lys Asp Ile
 50 55 60

Val Ser Gly Leu Lys Tyr Val Gln His Thr Tyr Arg Thr Gly Met Arg
 65 70 75 80

Val Asp Lys Ala Thr Phe Met Val Glv Ser Tyr Glv Pro Arg Pro Glu
 85 90 95

Glu Tyr Glu Phe Leu Thr Pro Val Glu Glu Ala Pro Lys Glv Met Leu
 100 105 110

Ala Arg Gly Thr Tyr His Asn Lys Ser Phe Phe Thr Asp Asp Asp Lys
 115 120 125

Gln Asp His Leu Thr Trp Glu Trp Asn Leu Ala Ile Lys Lys Asp Trp
 130 135 140

Thr Glu

145

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠脑池内 A 颗粒

<400> 7

Ser Lys Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys Cys
 1 5 10

LyGDI

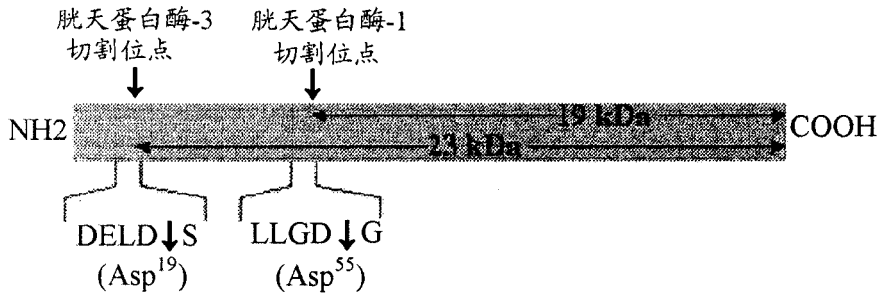


图 1

	1	...	60	120	180	200										
人 LyGDI 蛋白	MTEKAP	PHVEED	DDDELD	DSKLN	YKPPQ	SKLKE	LQEMDK	DDSLIK	YKKTLL	GDGP	VVIT	60				
小鼠 LyGDI 蛋白	MTEKDA	QPLLEA	DDDL	DSKLN	YKPPQ	SKLKE	LQEMDK	DDSLIK	YKKTLL	GDGP	VVVA	59				
人 LyGDI 蛋白	61	DPKAP	NVWTR	LTLV	QESAP	GPITM	DLTGD	LEALK	KEEIT	IVLKE	GSYR	VKIHF	KVNR	DIV	120	
小鼠 LyGDI 蛋白	60	DPTVP	PNVTR	LTLV	QESAP	GPITM	DLTGD	LEALK	KEEIT	IVLKE	GSYR	VKIHF	KVNR	DIV	119	
人 LyGDI 蛋白	121	SGLKY	VQHTY	RTG	VKVD	KATF	MVGS	YGRPE	EYEF	LTPVE	EAPK	GMLA	RGTY	HNKS	FFTD	180
小鼠 LyGDI 蛋白	120	SGLKY	VQHTY	RTG	MRVD	KATF	MVGS	YGRPE	EYEF	LTPVE	EAPK	GMLA	RGTY	HNKS	FFTD	179
人 LyGDI 蛋白	181	DDKQD	HLIS	WEWNL	S	IKKE	WTE									201
小鼠 LyGDI 蛋白	180	DDKQD	HLIT	WEWNL	A	IKK	WTE									200

图 2

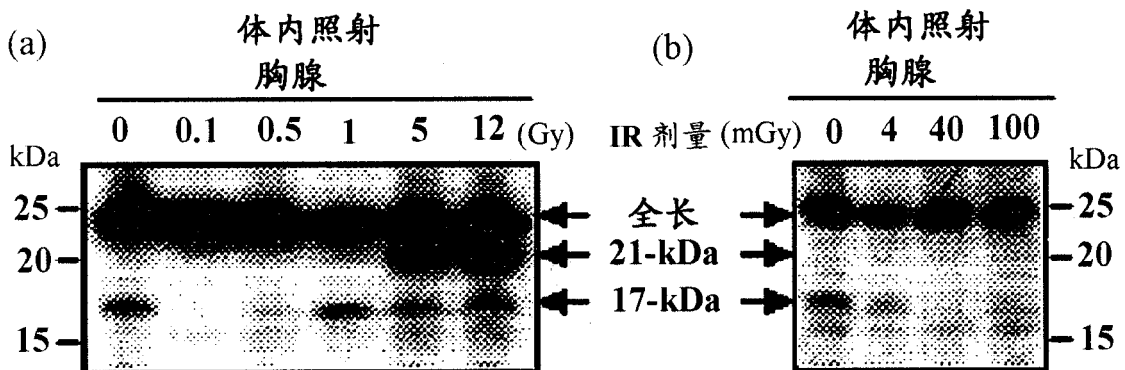


图 3

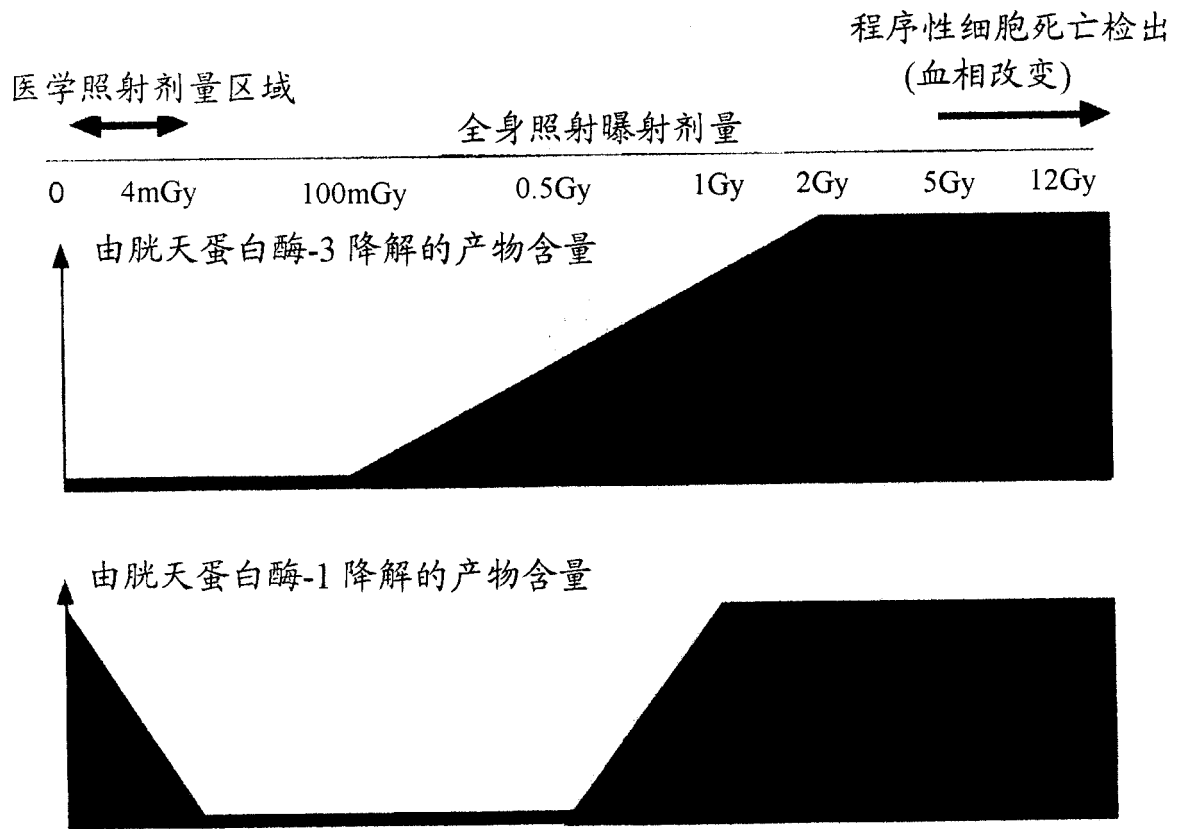


图 4

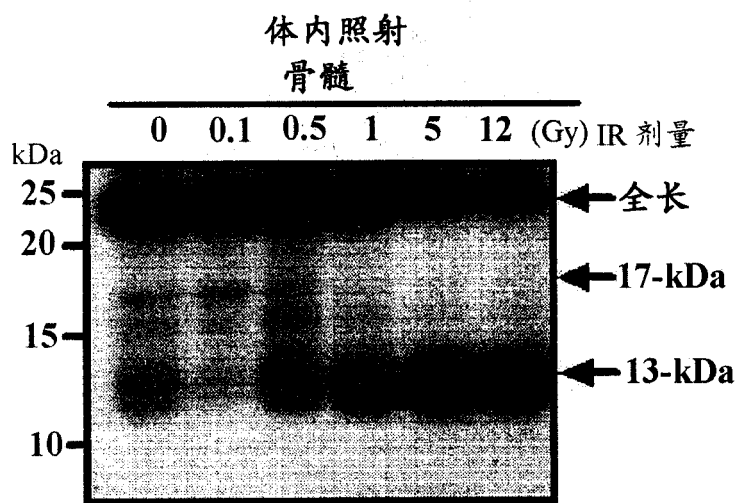


图 5

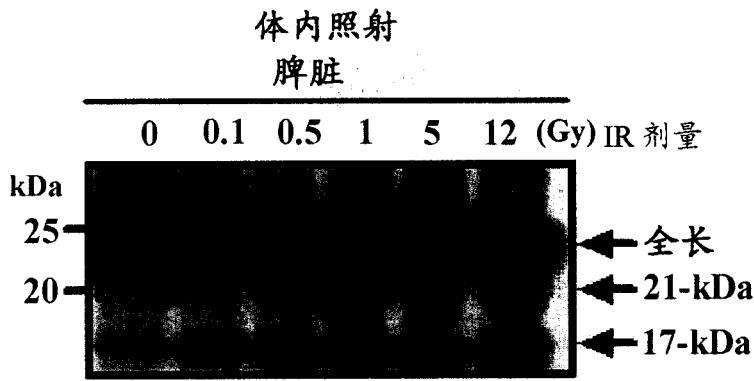


图 6

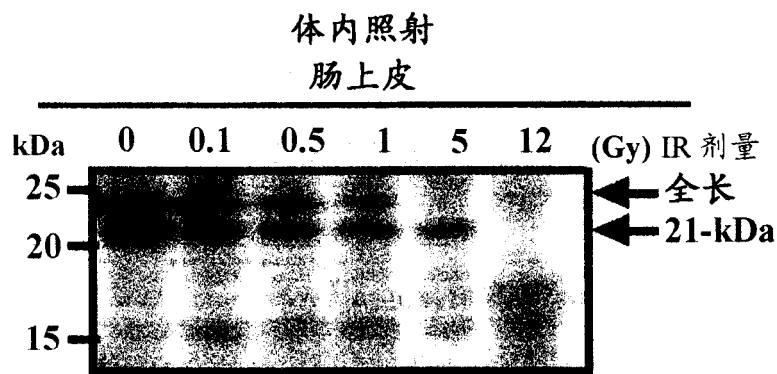


图 7

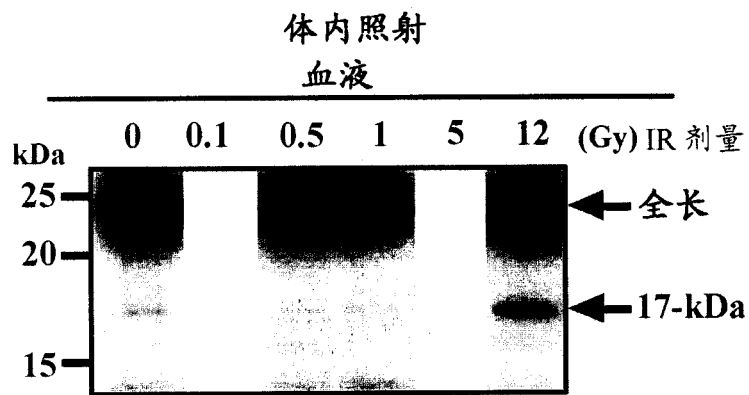


图 8

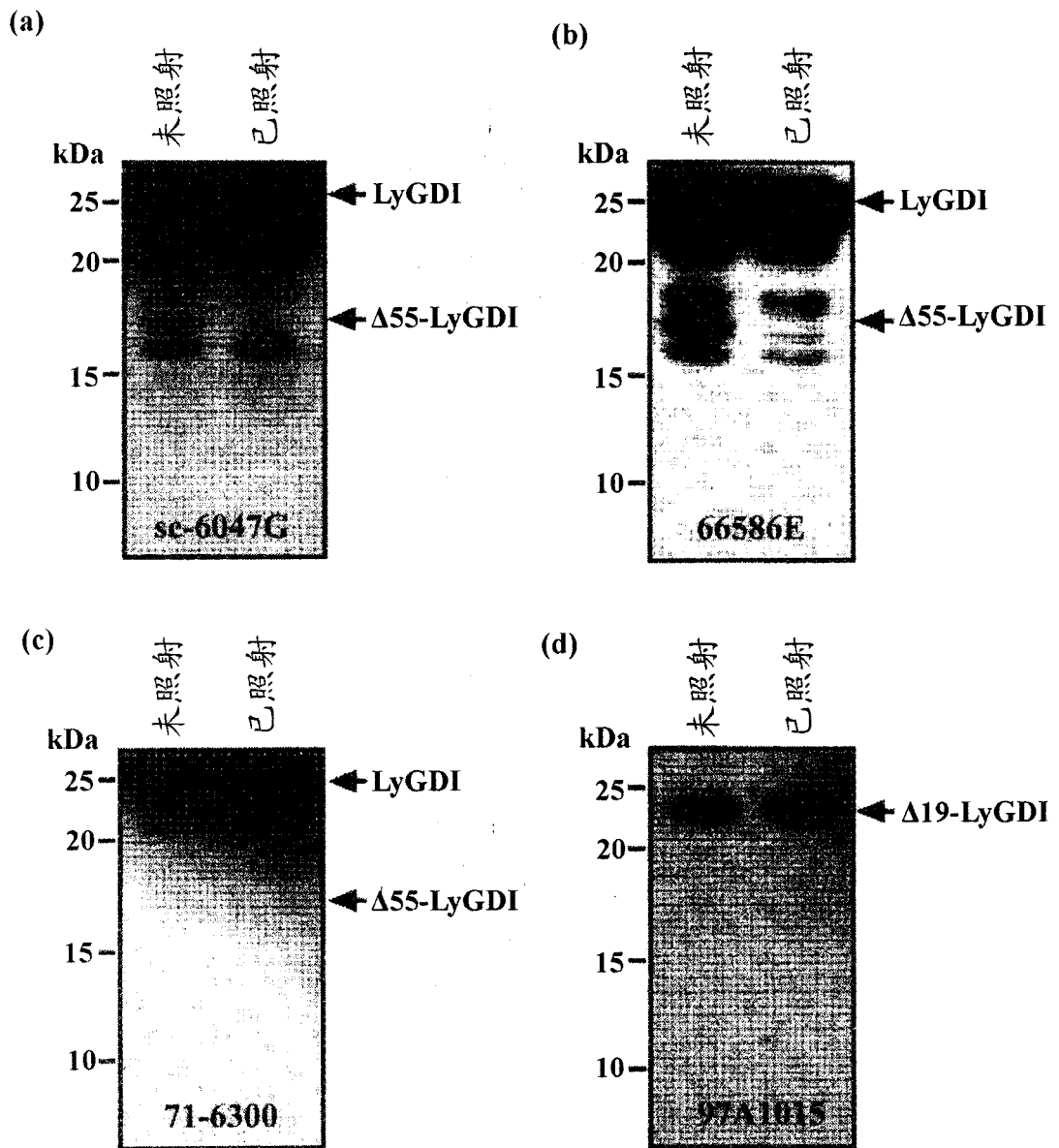


图 9

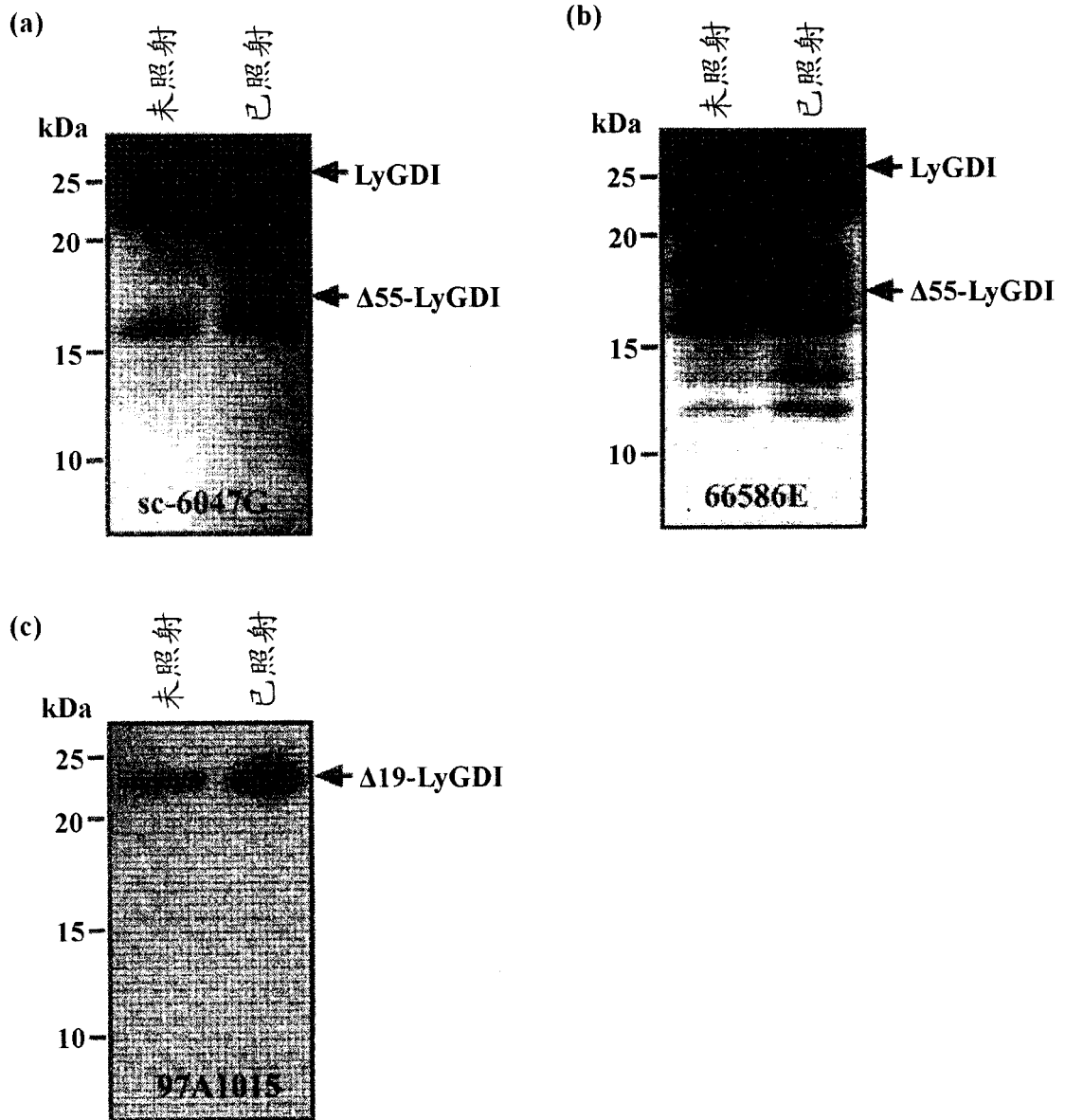


图 10

专利名称(译)	测量电离辐射的曝射剂量的方法		
公开(公告)号	CN101184998A	公开(公告)日	2008-05-21
申请号	CN200680013920.0	申请日	2006-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	智再如股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人广岛大学 智再如股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人广岛大学 智再如股份有限公司		
[标]发明人	达家雅明		
发明人	达家雅明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/6842 G01N2333/96466		
优先权	2005050497 2005-02-25 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种测量电离辐射的曝射剂量的方法，其包括：(a)从收集自活体的组织或血液提取蛋白质；和(b)测定提取的蛋白质中包含的LyGDI蛋白的1型和3型胱天蛋白酶分解产物中至少一种的表达量。

