

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780037078.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

C12M 1/16 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101535807A

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 3/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.7.27

[21] 申请号 200780037078.9

[30] 优先权

[32] 2006.9.6 [33] US [31] 11/516,385

[86] 国际申请 PCT/US2007/016907 2007.7.27

[87] 国际公布 WO2008/030305 英 2008.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.3

[71] 申请人 石溪麻醉师协会 U. F. P. C.

地址 美国纽约州

[72] 发明人 斯里尼瓦斯·N·庞亚拉

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

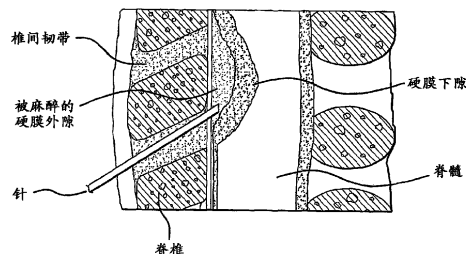
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 7 页

[54] 发明名称

检测样品中脑脊液的方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及对样品中是否存在脑脊液(CSF)的检测,特别涉及对CSF蛋白脂质运载蛋白型前列腺素D2合酶(L-PGDS)的分析。本发明提供了用于分析PGDS以指示样品中是否存在CSF的测定。



- 1.一种检测样品中是否存在脑脊液的方法，所述方法包括以下步骤：
 - (1) 提供来自受试者的样品；
 - (2) 分析所述样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶；
和
 - (3) 将所述脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的存在与否与所述样品中所述脑脊液的存在与否相关联。
- 2.根据权利要求 1 所述的方法，其中所述分析步骤包括差异性抗体结合。
- 3.根据权利要求 1 所述的方法，其中所述分析步骤包括原位免疫测定。
- 4.一种用于检测样品中是否存在脑脊液的装置，其包含：
吸收膜，其中包含：
 - 样品区，其包含抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶之第一单克隆抗体，所述第一单克隆抗体与可移动颗粒相缀合；
 - 测试区，其包含固定于所述膜上的抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶之第二抗体；以及
 - 对照区，其包含固定化兔抗小鼠抗体。
- 5.根据权利要求 4 的装置，其中所述吸收膜为尼龙膜。
- 6.根据权利要求 4 的装置，其中所述可移动颗粒包括有色胶乳。
- 7.根据权利要求 4 的装置，其中所述可移动颗粒包括金。
- 8.根据权利要求 4 的装置，其中所述第一单克隆抗体与发色指示剂相缀合。
- 9.根据权利要求 8 的装置，其中所述发色指示剂为荧光分子。
10. 根据权利要求 4 的装置，其中所述第二抗体为多克隆抗体。
11. 根据权利要求 4 的装置，其中所述第二抗体为单克隆抗体。

检测样品中脑脊液的方法和试剂盒

发明背景

技术领域

本发明涉及对样品中是否存在脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 的检测, 特别涉及对 CSF 蛋白脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶 (lipocalin-type prostaglandin D2 synthase, L-PGDS) 的分析。本发明提供了用于分析 L-PGDS 以指示样品中是否存在 CSF 的测定。

相关领域的简要说明

神经阻滞与许多并发症有关。其中最可怕的是未意识到的对包含脑脊液 (CSF) 的神经系统区室的意外穿透。如果没有立即注意到 CSF 的穿透, 或是如果没有得到正确诊断, 那么随后的药物施用可能导致瘫痪或死亡。尽管现有的在神经阻滞过程中或之后检测 CSF 的方法在手术、分娩和缓解疼痛中广泛使用, 但是这些方法不可靠、昂贵并且耗时。

接受硬膜外麻醉和镇痛的患者具有特别的被针刺入 CSF 的风险。在阻滞前通过对注射器注入空气或者含盐或含糖水溶液之阻力的丧失而辨认出硬膜外隙。将针置于硬膜外隙, 随后注入一系列增量的溶解于含糖或含盐水溶液中的药物。如果准备维持一段长时间的硬膜外阻滞, 那么可以将导管插入针中以连续及间歇式注入包含药物的溶液。由于在任何步骤中都可能会有硬膜穿透及意外进入 CSF, 所以常规观察所述针和导管的 CSF 被动引流 (passive drainage), 并在每次操作和药物施用前抽吸以回收液体。如果存在 CSF 的话, 可能需要重新定位针和导管以避免由于药物注射造成脊髓阻滞而非硬膜外阻滞 (epidural blockade)。

尽管明确鉴定引流或吸出的 CSF 是安全实施硬膜外麻醉所必要的, 但是护理人员经常不确定可能存在的液体的来源。CSF 是清澈的水样液体, 因而与注射的含糖或含盐溶液以及药物混合物非常相似。过去, 将 CSF 与注射液体或积累液体区分开来的努力依赖于一些物理性质例如温度, 或者在体外与第二化合物沉淀, 或者对可疑液体中可能的化学成分 (例如葡萄糖、蛋白质或离子水平) 的测定。然而, 由于样品为混合物、测试准确性

的变异性以及测试阈值的不一致性，这些方法没什么帮助并且很少使用。

目前，测定样品中的 β -2-转铁蛋白是唯一用于临床实践能够明确鉴别 CSF 的实验室测试方法，但是它的使用在多个方面受到限制。每个样品都必须提供多达 1-2 mL 样品/测定的体积。将结果返回给护理人员需要长达 4 天的周转时间。因为测定 β -2-转铁蛋白必须使用免疫固定电泳，所以该测定价格昂贵 (230-300 美元/样品)，并且在样品处理、归档、运输和储存时需要数倍的附加费用。而且，为了确保测试的准确性和可靠性，需要特殊的技术以及经验丰富的技术人员，这使得 β -2-转铁蛋白的测定需要由专业的实验室实施。

显然，非常需要快速、耐用、成本有效的并且准确的方法来明确鉴定神经阻滞过程中和阻滞后期临床所获得样品中的 CSF。相信本发明满足该需求。

发明内容

本发明涉及对样品中是否存在脑脊液的检测，特别地涉及对 CSF 蛋白质脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶 (L-PGDS) 的分析。本发明提供了分析 L-PGDS 以指示样品中是否存在 CSF 的测定。

因此，在一些实施方案中，本发明提供了检测样品中脑脊液的方法，所述方法包括提供来自受试者的样品，并检测所述样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶。在一些实施方案中，单独检测一种或多种另外的化合物，或者与脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶检测相组合。在一些实施方案中，检测 β -2-转铁蛋白。在一些实施方案中，受试者患有自发性耳漏或鼻漏。在另一些实施方案中，受试者经历过外伤。在另一些实施方案中，受试者经历过手术。在一些优选实施方案中，受试者正在经历或已经历过神经阻滞。

本发明还提供了一种方法，其中脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的量与已知值相关联以确定样品中是否存在脑脊液。在一些优选实施方案中，样品中是否存在脑脊液包括确定样品中脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的量。在一些实施方案中，脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶以低于约 2.0 mg/L 的浓度存在。在另一些实施方案中，脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶以约 2.0 到约 6.0 mg/L 之间的浓度存在。在又一些实施方案中，脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶以约 6.0 到约 10.0 mg/L 之间的浓度存在。在再一些实施方案中，脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶以高于约 10.0

mg/L 的浓度存在。

本发明还提供了一种确定样品中是否存在脑脊液的方法，所述方法包括确定血清中脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶与样品中脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的比值。在一些实施方案中，该比值小于 10。在另一些实施方案中，该比值在 10 到 20 之间。在另一些实施方案中，该比值大于 20。

本发明还提供了当样品获得自身体表面开口处时检测该样品中脑脊液的方法。在另一些实施方案中，样品获得自身体中的针。在又一些实施方案中，样品是自由流动的。在另一些实施方案中，样品是被吸出的。在另一些实施方案中，样品获得自导管。在另一些实施方案中，样品是从导管中自由流出的。在另一些实施方案中，样品是从导管中吸出的。在另一些实施方案中，样品是在导管已就位期间以一系列时间间隔获得的。在一些优选实施方案中，样品在设置导管前获得。在一些特别优选的实施方案中，样品在设置导管后获得。

在一些实施方案中，样品在施用液体 (fluid) 前获得。在另一些实施方案中，样品在施用液体后获得。在一些优选的实施方案中，样品在药物施用前获得。在一些特别优选的实施方案中，样品在药物施用后获得。

在一些实施方案中，受试者是哺乳动物。在另一些实施方案中，受试者是人。在另一些实施方案中，受试者正经历手术。在另一些实施方案中，受试者正经历急性疼痛治疗。在一些优选实施方案中，受试者正经历术后疼痛治疗。在另一些实施方案中，受试者正经历外伤后疼痛治疗。在一些特别优选的实施方案中，受试者正经历分娩时的疼痛治疗。在一些实施方案中，受试者正经历慢性疼痛治疗。在另一些实施方案中，所述疼痛包括癌性疼痛 (malignant pain)。在另一些实施方案中，疼痛包括非癌性疼痛 (non-malignant pain)。

当神经阻滞包括区域镇痛时，本发明还提供了用于检测来自正经历神经阻滞的受试者的样品中是否存在脑脊液的方法。在一些实施方案中，区域镇痛包括脊髓镇痛。在一些实施方案中，脊髓镇痛包括单次药物给药。在另一些实施方案中，脊髓镇痛为通过导管连续镇痛。在一些优选地实施方案中，区域镇痛包括硬膜外镇痛。在一些实施方案中，硬膜外镇痛包括单次药物给药。在另一些实施方案中，硬膜外镇痛为通过导管连续镇痛。在另一些实施方案中，区域镇痛是联合的脊髓镇痛和硬膜外镇痛。在另一

些实施方案中，区域镇痛包括外周神经阻滞。在另一些实施方案中，区域镇痛包括神经丛阻滞 (plexus neural blockade)。在另一些实施方案中，区域镇痛包括植入的药物递送系统。在另一些实施方案中，区域镇痛包括神经刺激器 (stimulator)。

本发明提供了检测样品中脑脊液的方法，所述方法包括提供来自受试者的样品以及使用任何合适的方法检测所述样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶。在一些实施方案中，检测包括差异性抗体结合。在一个优选的实施方案中，检测包括原位免疫测定。在一个特别优选的实施方案中，检测包括使用胶体金标记的原位免疫测定。在另一些实施方案中，差异性抗体结合包括 Western 印迹。在另一些实施方案中，差异性抗体结合包括浊度测定。在另一些实施方案中，采用色谱检测方法检测样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶。在另一些实施方案中，用酶检测方法检测样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶。在另一些实施方案中，采用光谱检测法检测样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶。

本发明还提供试剂盒，其包含在神经阻滞前、阻滞过程中或阻滞后检测样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的试剂。在一些实施方案中，所述试剂盒还包含使用该试剂盒检测样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的使用说明。在一些实施方案中，所述使用说明包括美国食品及药物管理局对体外诊断试剂盒所要求的使用说明。在一些实施方案中，该试剂盒还包含根据所述样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶来诊断样品中是否存在脑脊液的使用说明。在一些实施方案中，所述试剂包括一种或多种抗体。在另一些实施方案中，所述试剂包括一种或多种酶、酶抑制剂或酶激活剂。在另一些实施方案中，所述试剂包括一种或多种色谱化合物。在另一些实施方案中，所述试剂包括用于制备光谱检测样品的一种或多种化合物。在另一些实施例中，该试剂盒包含用于比较的参比物质以根据指示剂的强度、可见光谱或其它物理性质来分析出脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶是否存在。

因此，一方面，本发明涉及检测样品中是否存在脑脊液的方法，所述方法包括以下步骤：(1) 提供来自受试者的样品；(2) 分析样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶；以及 (3) 将脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶存在与否与样品中脑脊液的存在与否相关联。

另一方面，本发明涉及检测样品中是否存在脑脊液的装置，其包含：

包含样品区、测试区和对照区的吸收膜 (absorbant membrane), 所述样品区包含抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的第一单克隆抗体, 所述测试区包含固定在所述膜上的抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的第二单克隆或多克隆抗体, 以及所述对照区包含固定化兔抗小鼠抗体。

附图说明

图 1 示出了脊椎解剖图以及针头在硬膜外隙内的放置。CSF 围绕并保护着脊髓和脊髓圆锥。导管或针的引流物或吸出物中存在 CSF 表明硬膜穿透。由于药物活性剂分布的不同, 将相同的药物和剂量施用进硬膜外和脊髓区室内具有差异很大的动力学 (例如起始时间、效果持续时间) 和生理后果 (例如运动、感觉和自主神经阻滞的程度)。

图 2 示出了 CSF 和其它体液中抗体介导的 PGDS 检测。图 2A 示出了抗 PGDS 抗体对来自 CSF 源的 PGDS 的特异性结合, 以及来自其它来源的样品中不存在 PGDS。图 2B 示出了用抗 PGDS 抗体检测来自 12 个不同人来源的 CSF 样品中的 PGDS。图 2C 示出了在硬膜外流出液 (eluate) 中不存在 PGDS, 但是通过抗 PGDS 的抗体结合检测来自 2 和 3 受试者的样品分别在 CSF 中存在 PGDS。

图 3 示出了设置成吸收性浸棒 (dipstick) 形式的床旁 (bedside) 抗 PGDS 原位抗体介导的对 PGDS 的检测。浸泡后在固相中存在胶体金指示剂条带表明测试样品中存在 CSF。

图 4 示出了本发明装置的一个实施方案; 以及

图 5A 和 5B 示出了本发明装置的作用机制。

发明详述

CSF 为清澈的液体, 外观上与水相似, 组成上与血浆相似。CSF 使得脑和脊髓处于漂浮状态并对其进行保护。临床、手术以及意外事件都可能造成 CSF 突破其生理屏障。CSF 泄漏可能会随着由于麻醉和镇痛而设置针头及导管、外伤、颅骨骨折、颅内手术、感染、脑积水、先天性畸形、肿瘤以及自发性鼻漏和耳漏而发生。

在硬膜外麻醉和镇痛时, 硬膜穿孔和进入 CSF 的风险特别高。最常见硬膜外阿片样物质以及局部麻醉剂注射在腰部或胸部区域。用于硬膜外神经阻滞的针从脊柱椎骨之间穿过进入硬膜外隙。硬膜外隙内通常没有液

体，其间距很小（图 1）。如果硬膜外针进入的太深，就会刺穿容纳了脊髓、脊神经和 CSF 的硬膜。硬膜上的洞可能会使 CSF 泄漏到硬膜外隙而造成严重的头疼。在颅内压增高的患者中，在硬膜外隙定位时发生的意外硬膜穿孔会具有由于 CSF 的损失而发生小脑或幕疝形成的风险。其它严重的并发症包括永久性瘫痪、心搏停止和死亡。

由不希望地药物施用进 CSF 而造成的脊髓阻滞是麻醉医师很关注的。如果用于硬膜外隙的药物错误地施用到脊髓液中就可能发生这种情况，造成突然或深度的低血压，下肢瘫痪、呼吸受损和心率失调。为了预防和诊断这些情况，麻醉医师仔细地评价并监测患者对麻醉或镇痛药物之测试剂量的反应。然而，目前还没有快速且可靠的方法来评价在例如这些每天都要实施数千次的手术中硬膜穿孔和 CSF 泄漏的发生。

检测硬膜穿孔的最优方法是检测是否存在 CSF。作为测定液体是否是 CSF 的方法，对液体进行葡萄糖、蛋白质、钾盐或钠盐的化学分析是不可靠的。放射线研究在证明小的或延迟的 CSF 泄漏中仅仅取得了间歇的成功，该方法笨拙、昂贵、耗时并且有暴露于辐射和放射性同位素染料的风险。对怀疑 CSF 来源的液体进行电泳并结合免疫固定来检测 CSF 蛋白组分 β -2-转铁蛋白已显示出是一种特异性的并且可普遍接受的 CSF 检测方法。然而， β -2-转铁蛋白测定需要多个获取和处理步骤的协调，该方法对于在神经阻滞过程中和阻滞后使用来说非常耗时（4 天），而且费用昂贵（300 美元/测定）。

脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶（L-PGDS），也被称作 β -微量蛋白（beta-trace protein），在中枢神经系统的脉络丛、软脑膜和少突细胞中产生后被分泌到 CSF 中。L-PGDS 催化前列腺素 H2 异构化为作为内源性睡眠促进化合物的前列腺素 D2（PGD）。与转铁蛋白相比（对于转铁蛋白，只有 β -2 同工型对 CSF 是特异性的），PGDS 的整个结构对 CSF 来说是特异性的。因此，在本发明中，优选使用 L-PGDS 作为确定 CSF 是否存在的快速且特异的指示剂。

本发明开发过程中所进行的实验表明 L-PGDS 是 CSF 的可靠标志物，并且比传统方法便宜且节省时间。本发明提供了快速检测神经阻滞前、阻滞中和阻滞后获得的样品中 CSF 的方法和试剂盒。本发明的使用确保更加安全的实施神经阻滞，并且降低了一些威胁生命的并发症的发生率和严重程度。

定义

为了帮助理解本发明，下面对多个术语进行定义。

如本文中所使用的，术语“受试者”涵盖了无论是否住院的人和动物。

如本文中所使用的，术语“L-PGDS”或“脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶”用于表示在中枢神经系统的脉络丛、软脑膜和少突细胞中产生后被分泌到 CSF 中的特定蛋白质，它催化前列腺素 H₂ 异构化为前列腺素 D₂，其与 CSF 是否存在相关联。以上对 L-PGDS 的定义用于将该蛋白与造血类型的 PGDS 区别开。

如本文中所使用的，“神经阻滞”指出于干扰神经元传导的目的，在接近目标神经元结构的地方直接施用细胞受体激动剂和拮抗剂。神经阻滞包括，但不限于，区域麻醉（例如，脊髓、硬膜外、外周或神经丛麻醉）和区域镇痛（例如，脊髓、硬膜外、外周或神经丛镇痛）。

如本文中所使用的，使用术语“正经历”表示正经受神经阻滞。

如本文中所使用的，术语“癌性疼痛”是指由癌或肿瘤源所引起的疼痛，包括压迫、缺血、坏死、阻塞以及肿瘤定位和生长的其它后果。

如本文中所使用的，术语“非癌性疼痛”是指由除癌症之外的其它原因引起的疼痛。

如本文中所使用的，术语“区域镇痛”在有关神经阻滞的情况下使用时是指在不直接干扰意识的情况下用于降低或消除身体某区域处疼痛的药剂和过程。

如本文所使用的，术语“连续”在有关神经阻滞的情况下使用时是指其中药物通过导管不间断地输注到期望的作用部位。

如本文所使用的，术语“脊髓”在有关神经阻滞的情况下使用时是指药物施用到硬膜之下并进入脑脊液中。

如本文所使用的，术语“硬膜外隙”在有关神经阻滞的情况下使用时是指药物在神经系统硬膜之外的硬膜外隙内施用。

如本文中所使用的，术语“外周”在有关神经阻滞的情况下使用时是指药物直接施用到中枢神经系统之外的外周神经的临近区域。

如本文中所使用的，术语“神经丛”在有关神经阻滞的情况下使用时是指药物直接施用到中枢神经系统之外的神经丛的临近区域。

如本文所使用的，术语“植入的药物递送系统”用于指能够连续输注或者能够根据患者的需求向神经系统提供药物（例如通过导管）的设置于体内的装置。

如本文中所使用的，术语“神经刺激器”用于表示设置于体内能够提供连续或间断的电流或电压用于缓解癌性和非癌性疼痛的装置。

本文中所列举的“氨基酸序列”是指天然蛋白分子的氨基酸序列，“氨基酸序列”等术语，如“多肽”或“蛋白质”并不意味着将氨基酸序列限于与所述蛋白质分子相关的完整天然氨基酸序列。

本文中所使用的术语“片段”或“部分”是指与天然蛋白质相比具有氨基端和/或羧基端缺失的多肽，但是剩下的氨基酸序列与从全长 cDNA 序列所推出的氨基酸序列的相应位置一致。片段典型地至少长四个氨基酸，优选地至少长 20 个氨基酸，经常至少长 50 个氨基酸或更长，并且跨越了（本发明权利要求书中要求保护的）组合物与其多种配体和/或底物进行分子间结合所需的多肽部分。

如本文所使用的，术语“纯化的”或“纯化”指从样品中除去污染物。例如，通过除去污染的非免疫球蛋白类蛋白质来纯化 PGDS 抗体；还通过除去不与 PGDS 结合的免疫球蛋白来纯化 PGDS 抗体。去除非免疫球蛋白类蛋白质和/或去除不与 PGDS 结合的免疫球蛋白导致样品中 PGDS 反应性免疫球蛋白百分比的提高。在另一实施例中，在细菌宿主细胞中表达重组 PGDS 多肽，并且通过除去宿主细胞蛋白纯化该多肽；由此提高样品中重组 PGDS 多肽的百分比。本文中所使用的术语“重组 DNA 分子”是指包含通过分子生物学技术连接在一起的 DNA 片段的 DNA 分子。

本文中所使用的术语“重组蛋白”或“重组多肽”指从重组 DNA 分子表达的蛋白质分子。

本文中所使用的术语“天然蛋白质”是指不包含载体序列所编码氨基酸残基的蛋白质；也就是所述天然蛋白质只包含在自然界中的蛋白质中所发现的那些氨基酸。可通过重组的方式生产天然蛋白质或者可从天然来源中分离天然蛋白质。

术语“Western 印迹”指对固定于支持物（如硝酸纤维素或膜）上的蛋白质（或多肽）的分析。这些蛋白质在丙烯酰胺凝胶上进行分离，随后将这些蛋白质从凝胶转移到固相支持物上，例如硝酸纤维素或尼龙膜。接着将固定化的蛋白质暴露于对目的抗原具有反应活性的抗体。可以通过多

种方法检测抗体的结合，所述方法包括使用放射性标记的抗体。

本文中所使用的术语“抗原决定簇”指与特定抗体接触的抗原部分（即表位）。当蛋白质或蛋白质片段用于免疫宿主动物时，该蛋白质的多个区域可诱导产生特异性结合所述蛋白质上给定区域或三维结构之抗体；这些区域或结构被称作抗原决定簇。抗原决定簇可以与完整的抗原（即用于引起免疫应答的“免疫原”）竞争与抗体的结合。

如本文所使用的，术语“浊度测定”用于指 Dade Behring (Liederbach, Germany) 所开发的测定方法，其由用来自兔抗人 PGDS 的经免疫亲和纯化的多克隆抗体所包裹的聚苯乙烯颗粒组成。通过激光吸收测定由凝集所造成的光散射的升高。

本文中所使用的术语“样品”以其最广泛的含义使用。怀疑包含蛋白质的样品可包含细胞或不包含细胞、可以是组织的一部分、是包含一种或多种蛋白的提取物、体液等。“自由流动的”样品指来自针、导管或穿透身体区室的其它器具的体液被动引流物。

如本文中所使用的，当与测定有关时所使用的术语“应答”指可检测信号的产生（例如报告蛋白的积累、离子浓度的升高以及可检测化学产物的积累）。

如本文所使用的，术语“使用所述试剂盒进行在所述生物样品中是否存在 PGDS 多肽之所述检测的使用说明”包含使用所述试剂盒中所包含的试剂来检测 PGDS 多肽的使用说明。在一些实施方案中，该使用说明还包含美国食品及药物管理局（FDA）对体外诊断产品标签所要求的预定用途的说明。FDA 将体外诊断剂分类为医疗器械，并要求它们通过 510(k)程序的认证。根据 510(k)的申请书所要求的信息包括：1) 体外诊断剂产品名称，包括装置的商品名及专有名、通用名或常用名、以及分类名；2) 产品的预定用途；3) 递交 510(k) 申请书的所有人或经办人的注册号（如可用）；根据 FD&C 法案的第 513 部分体外诊断产品所处的类别（如果已知），其适合的分组，或者如果所有人或经办人根据该部分判定该装置尚未被分类，对此判定的声明以及判定该体外诊断产品尚未分类的基础；4) 建议标签、足够描述体外诊断产品的标签和公告、其预定用途以及使用说明，在可能的情况下，应提供照片或工程制图；5) 指出该装置相似于和/或不同于在美国商业流通中其它可比较类型体外诊断产品的声明，并附以支持该声明的数据；6) 实质等同判定所依据的安全性和有效性数据的 510(k)

总结；或在书面请求 30 天内任何人均可获得的支持 FDA 实质等同认定的 510 (k) 安全性和有效性信息的声明；7) 提交者尽其所知地确信在上市前通告中所提交的所有数据和信息是真实准确的并且没有省略任何重要事实的声明；8) FDA 作出实质等同判定所必需的有关体外诊断产品所需的任何附加信息。附加信息在美国食品及药物管理局的网页上可以获得。

如本文所使用的，术语“表面开口”指体表上天然的或后天的孔。

如上所述，本发明涉及检测样品中是否存在脑脊液的方法，所述方法包括以下步骤：(1) 提供来自受试者的样品；(2) 分析样品中是否存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶 (L-PGDS)；以及 (3) 将脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的存在与否与样品中脑脊液的存在与否相关联。每个这些步骤将在随后逐一详细解释。

如上所述，以最广泛的含义定义本发明方法中所提供的样品，包括细胞提取物或无细胞提取物、组织的一部分、包含一种或多种蛋白质的提取物、体液等。样品可以通过来自针、导管或其它穿透身体区室之器具的体液被动引流物获得自受试者。

L-PGDS 蛋白质的检测

如上所述，开发了一种检测或分析 CSF 是否存在的新方法。因此，本发明提供了检测来自受试者之样品中 L-PGDS 的方法，所述受试者包括经历或已经历神经阻滞的受试者。可以采用任何合适的方法检测或分析 L-PGDS 多肽。例如，在一些实施方案中，应用色谱方法，其中 L-PGDS 的存在产生可检测的颜色变化。在另一些实施方案中，应用酶方法，其中 L-PGDS 的存在引发可检测到的酶活化。在另一些实施方案中，通过原子吸收或原子发射光谱检测样品中 L-PGDS 的存在。

在本发明的一些实施方案中，L-PGDS 蛋白（也称作“前列腺素-H2 D-异构酶”和“ β -微量蛋白”）是分子量约 26 kDa 的糖蛋白 (EC 5.3.99.2)，其属于分泌性蛋白质的脂质运载蛋白家族。在一些优选的实施方案中，L-PGDS 蛋白催化 PGH₂ 的异构化产生 PGD₂。在另一些实施方案中，人 PGDS 的 cDNA 编码了带有 22 个氨基酸残基之 N-末端信号肽的 190 个氨基酸残基。在一些特别优选的实施方案中，PGDS 蛋白是具有脑特异性之 N-糖基化寡糖链的“脑型”同工型。

在一个本发明的优选实施方案中，使用抗体来确定样品中是否包含指

示 CSF 是否存在的 L-PGDS (参见下文 L-PGDS 抗体的产生)。采用本领域已知的技术检测抗体结合 (例如, 放射性免疫测定、ELISA (酶联免疫吸附测定)、“夹心法”免疫测定、免疫放射性测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定 (例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记)、Western 印迹法、沉淀反应、凝集测定 (例如, 凝胶凝集测定、红细胞凝集测定等)、补体固定测定、免疫荧光测定、蛋白 A 测定以及免疫电泳测定等。

在一个实施方案中, 通过检测第一抗体上的标记来检测抗体结合。在另一个实施方案中, 通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合来检测第一抗体。在另一个实施方案中, 第二抗体是带标记的。在本领域中用于在免疫测定法中检测结合的多种方法是已知的并在本发明的范围之内。

在一些实施方案中, 采用自动检测测定。免疫测定的自动化方法包括在美国专利 No. 5885530、4981785、6159750 和 5358691 中所描述的那些, 其每个通过引用并入本文。在一些实施方案中, 结果的分析 and 显示也是自动化的。例如, 在一些实施方案中, 采用基于免疫测定结果产生将样品中 PGDS 的存在情况与 CSF 可能性相关联的得分的软件。

在另一些实施方案中, 免疫测定如美国专利 No. 5599677 和 5672480 中所述, 其每个通过引用并入本文。

L-PGDS 抗体的产生

本发明提供了分离的抗体或抗体片段 (例如, Fab 片段、Fab₂ 片段等)。可产生抗体以检测 PGDS 蛋白。可使用多种免疫原制备抗体。在一个实施方案中, 免疫原为人 L-PGDS 肽以产生识别人 L-PGDS 的抗体。此类抗体包括, 但不限于: 多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段、Fab 表达文库或重组 (例如, 嵌合的、人源化的等) 抗体, 只要它可以识别所述蛋白质即可。可以根据常规抗体或抗血清制备方法使用本发明蛋白质作为抗原产生抗体。

本领域已知的多种方法都可以用于生产针对 PGDS 的多克隆抗体。对于抗体的生产, 可以通过注射对应于 L-PGDS 表位的肽免疫多种宿主动物, 所述动物包括但不限于兔、小鼠、大鼠、绵羊、山羊等。在一个优选的实施方案中, 所述肽与免疫原载体 (例如, 白喉毒素、牛血清白蛋白 (BSA) 或钥孔帽贝血蓝素 (KLH)) 缀合。根据宿主种类, 可以使用多种佐剂以提高免疫应答, 所述佐剂包括但不限于弗氏试剂 (完全和不完全)、矿物

质凝胶（例如氢氧化铝）、表面活性物质（例如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油脂乳化剂、钥孔帽贝血蓝素、二硝基酚以及潜在有用的人佐剂例如 BCG（卡介苗）和短棒状杆菌（*Corynebacterium parvum*））。

对于针对 L-PGDS 的单克隆抗体的制备，考虑通过连续细胞系培养生产抗体分子的任何技术可用于本发明（参见，例如 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.）。这些包括但不限于 Kohler 和 Milstein 最先开发出的杂交瘤技术（Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975），以及三源杂交瘤、人 B-细胞杂交瘤技术（参见，例如，Kozbor et al., *Immunol. Tod.*, 4:72, 1983）以及生产人类单克隆抗体的 EBV 杂交瘤技术（Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985）。

在本发明另一个实施方案中，利用如 PCT/US90/02545 中所述的技术在无菌动物中产生单克隆抗体。另外，考虑通过人杂交瘤（Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030 [1983]）或通过用 EBV 病毒体外转化人 B-细胞（Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96 [1985]）产生人抗体。

另外，考虑所描述的用于产生单链抗体的技术（美国专利 No. 4,946,778；其通过引用并入本文）可用于产生 L-PGDS 特异性单链抗体。本发明另一个实施方案利用用于构建 Fab 表达文库（Huse et al., *Science* 246:1275-1281, 1989）的技术来进行快速方便地具有所需 L-PGDS 特异性的单克隆 Fab 片段鉴定。

在另一些实施方案中，本发明考虑了抗 L-PGDS 的重组抗体或其片段。重组抗体包括但不限于人源化抗体和嵌合抗体。产生重组抗体的方法在本领域中是已知的（参见，例如，美国专利 No.6,180,370 和 6,277,969 以及 "Monoclonal Antibodies" H. Zola, BIOS Scientific Publishers Limited 2000. Springer-Verlay New York, Inc., N.Y.; 其每个都通过引用并入本文）。

考虑适合产生抗体片段的任何技术可用于产生包含抗体分子独特型（抗原结合区）的抗体片段。例如，这些片段包括但不限于：可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段；可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab' 片段，以及可通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产

生的 Fab 片段。

在抗体生产过程中，考虑通过本领域已知的技术（例如放射性免疫法、ELISA（酶联免疫吸附反应）、“夹心法”免疫测定、免疫放射性测定、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、原位免疫测定（例如使用胶体金、酶或放射性同位素标记）、Western 印迹法、沉淀反应、凝集测定（例如，凝胶凝集测定、红细胞凝集测定等）、补体固定测定、免疫荧光测定、蛋白 A 测定以及免疫电泳测定等）完成所需抗体的筛选。

在一个实施方案中，通过检测第一抗体上的标记来检测抗体结合。在另一个实施方案中，通过检测第二抗体或试剂与第一抗体的结合来检测第一抗体。在另一个实施方案中，第二抗体是带标记的。在本领域中用于在免疫测定中检测结合的多种方法是已知的并在本发明的范围之内。如本领域中所公知的，应提供不包含任何免疫方案中所用之载体分子的免疫原性肽。例如，如果所述肽与 KLH 缀合，那么在筛选测定中它可以与 BSA 缀合也可以直接使用。

先前所述抗体可以在与 L-PGDS 的定位和结构（例如用于 Western 印迹法）、在合适的生物样品中测定其水平等相关领域的已知方法中使用。抗体可用于检测来自个体的生物样品中的 L-PGDS。生物样品可以是生物液体，例如但不限于血液、血清、血浆、间质液、尿液、脑脊液等。

然后，可以使用适当的策略（例如 ELISA 或放射性免疫测定）和形式（例如微孔、浸棒（例如，如国际专利公开 WO 93/03367 中所述的）等）直接测定生物样品中是否存在人 PGDS。或者，可以将样品中的蛋白质根据大小进行分离（例如在存在或不存在十二烷基硫酸钠（SDS）时通过聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）进行），并通过免疫印迹法（Western 印迹）检测是否存在 L-PGDS。通常使用由蛋白质表位所对应肽产生的抗体时免疫印迹技术更有效，因此，其特别适合本发明。

上文所提及的关联步骤可以在例如荧光或比色测定中定性或定量的完成。在本发明的方法和装置中，由于只在脑脊液中发现了脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶，样品中存在脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的任何指示可以直接与该样品中存在脑脊液相关联。

分析 CSF 存在与否的试剂盒和装置

本发明还提供了确定样品是否含有 PGDS 的试剂盒和装置。用多种方

式生产所述诊断试剂盒和装置。在一些实施方案中，所述试剂盒和装置包含至少一种特异性地检测 L-PGDS 蛋白的试剂。在一些优选的实施方案中，所述试剂盒和装置包含检测 L-PGDS 蛋白的多种试剂。在一些特别优选的实施方案中，该试剂为优先结合 L-PGDS 蛋白质的抗体。

在一些实施方案中，所述试剂盒和装置包含用于确定样品中是否含有 L-PGDS 的使用说明。在一些优选的实施方案中，该使用说明描述了通过检测来自受试者样品中是否存在 L-PGDS 来确定是否存在 CSF，其中受试者正经历或已经历了神经阻滞。

样品中是否存在 L-PGDS 可用于作出治疗性或其它医学决定。例如，可以根据获得自导管的样品中是否存在含有 L-PGDS 的 CSF 来决定是使用已就位的现有导管还是在神经阻滞过程中或阻滞后再重新放置导管。

在一些实施方案中，所述试剂盒和装置包括辅助试剂，例如缓冲剂、蛋白稳定剂以及信号产生系统（例如荧光产生系统，如 FRET 系统）。测定试剂盒或装置可以以任何合适的方式包装，通常根据需要将要素装于单一容器或者多个容器内，并附上实施所述测定的使用说明书。在一些实施方案中，所述试剂盒或装置也优选地包括阳性对照样品。在另一些实施方案中，该试剂盒或装置包含用于比较的参比物质以根据指示剂的强度、可见光谱或其它物理性质来分析出脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶是否存在。

对可用于在医疗中诊断 CSF 泄漏的快速、可重复、灵敏且简单的测定的需要是非常重要的。该测定与现有的实验室测定方法（即免疫固定电泳、酶联免疫吸附反应（ELISA）以及免疫印迹法）相比具有明显的优势，因为本发明测定可以立刻在患者旁边实施并在几分钟内就可得到结果，而不是送到实验室进行分析花费数天的时间。可以使用侧向流免疫色谱测试制造用于检测生物液体中 CSF 的诊断试剂盒。

所述测试装置包括任选地带有塑料测试盒的测试条（图 4）。将抗体附着在膜的三个不同区域：包含抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的第一单克隆抗体的样品区（S）；包含固定在膜上的抗脂质运载蛋白型前列腺素 D2 合酶的第二单克隆或多克隆抗体的测试区（T）；以及包含例如固定化兔抗小鼠抗体的对照区（C）。样品（S）区中的第一单克隆抗体可以与可移动颗粒（如有色胶乳颗粒或金颗粒）相缀合。或者，所述第一单克隆抗体可以与发色团指示物相缀合，例如荧光分子或标签（绿色荧光蛋白

(GFP)、Alexa、得克萨斯红 (Texas Red) 等)。

基于两种单克隆抗体的使用, 利用免疫色谱测试实现本发明装置。如图 5A 和 5B 中所示, 将样品添加到 S-区, 如果 PGDS 存在, 它与第一单克隆抗体结合形成 PGDS-缀合复合物。此复合物通过色谱法在膜上迁移, 当它遇到 T-区中固定化抗体时, 发生凝集并形成蓝色条带。

简单地说, 在一个实施方案中, 第一单克隆抗体与可移动颗粒 (例如金或胶乳珠) 缀合。这些珠具有本身的红色 (对于金来说) 或呈现不同的颜色 (如果使用胶乳珠的话)。当样品被施加到 “S-区” 时, 如果标志物 L-PGDS 存在于样品中, 则结合与所述珠相缀合的第一单克隆抗体, 接着由于其中放置有珠的侧向流吸附垫, 该复合物 (珠+抗体+PGDS (如果存在于样品中)) 侧向迁移。一旦该复合物到达在所述条上固定有第二抗体的 “T-区”, 则正在与该复合物一起迁移的标志物结合到所述第二固定化抗体上。由于所述第二抗体是静止的/固定的/固定化的, 因此整个复合物被捕获, 并且由于该复合物现在包含有色珠, 因此该固定化 T-区线根据所使用的珠显现出颜色 (金为红色的, 如果使用胶乳珠的话则为不同的颜色 (如蓝色))。过量的复合物样品迁移到所述条的末端, 在 “C-区” 固定化的/固定的/静止的兔抗小鼠抗体捕获与所述珠缀合的所述第一抗体并显示出有色线, 标志测定完成。因此, 有色条带表示阳性结果 (图 5A)。T-区中没有条带对阴性结果来说具有显著性 (图 5B)。C-区中的固定化多克隆抗体与阳性和阴性样品的胶乳缀合物都结合。该蓝色条带确保了测试正确的实施。

实际上, 本发明的试剂盒和装置可以在多种临床背景下使用以确定样品中 CSF 的存在情况, 所述背景包括颅骨骨折、各种手术 (例如内窥镜鼻内手术、神经外科手术) 后的 CSF 泄漏、硬膜外导管设置、自发性颅内低血压、炭疽诱导的颅内低血压、或者与如鼻漏和耳漏等情况有关的 CSF 泄漏、脑积水、颅内肿瘤、先天神经畸形等。

实施例

为了证明和进一步说明本发明的某些优选实施方案以及一些方面, 提供了下列实施例和操作方案, 不能将这些实施例和操作方案理解为对本发明范围的限制。

方法

从 SUNY Stony Brook 大学医院产科的患者获得硬膜外流出液以及 CSF 样品。从 SUNY Stony Brook 大学医院血液学和化学实验室获得体液。使用脂质运载蛋白 PGDS 特异性的多克隆抗体 (CAYMAN CHEMICAL CO. Ann Arbor Mich.) 分析样品中的 PGDS。

硬膜外流出液

在签署知情同意书 (IRB 许可的) 和主治产科医师许可之后, 设置硬膜外导管并施用常规硬膜外药物 (3 cc 的 1.5%利多卡因和 1:200,000 肾上腺素; 以及 10 cc 的 0.125%丁哌卡因和 50 μ g 芬太尼)。以 10 cc/小时的流速对患者连续硬膜外输注 0.0625% 丁哌卡因和 1.6 ug/cc 芬太尼。出于本研究的目的, 硬膜外导管在硬膜外设置后 1 到 4 小时之间抽吸两次。通过 PGDS 免疫印迹法检测抽出液体中 CSF 的存在情况。

脊椎液

在签署知情同意书 (IRB 许可的) 和主治产科医师许可后, 实施常规脊髓麻醉的择期剖宫产患者自愿捐献少量脊髓液。用 25 G pncan 脊椎针定位蛛网膜下腔后, 在注射麻醉用药物前先吸出 1 mL 的 CSF。因此, 通过免疫印迹法使用通常被丢弃或重新注射回患者的 CSF 来评价 PGDS 的存在情况。

体液

从 SUNY Brook University Hospital, Stony Brook, N.Y. 的临床实验室获得本研究中测试的其它体液。在进行了主治医师要求的对所述液体的临床分析之后, 通常将这些体液样品丢弃。在 IRB 的许可下, 使用这些样品通过免疫印迹法评价 CSF 标志物 PGDS 的存在情况, 而不是将它们丢弃。

免疫印迹

对 CSF 样品 (5-20 μ l) 以及来自其它来源的体液进行 SDS-PAGE 然后电转移到 PVDF 膜上。用含 5%奶粉的 TBS 封闭所述膜, 然后先用抗前列腺素 D2 合酶 (抗 PGDS) 抗体 (CAYMAN CHEMICAL CO. Ann Arbor Mich.) 再用 HRP 标记的第二抗体进行检测。接着用增强型化学发光试剂 (ECL-Amersham) 对印迹进行显影。

实施例 1

基于免疫印迹法多克隆抗 PGDS 抗体可靠且特异性地检测到 CSF 中存在的 PGDS，而在其它体液中不存在（图 2A）。小到 5 μ L 的样品体积就适用于准确的分析。

实施例 2

多克隆抗 PGDS 抗体可靠地检测来自 12 个不同人来源的 CSF 样品中的 PGDS，表明抗体介导的 CSF 中 PGDS 的检测是抗原特异性的而非患者特异性的（图 2B）。

实施例 3

多克隆抗 PGDS 抗体可靠地区分了从不同身体区室抽吸的液体。在来自脊髓来源的液体样品中观察到强的抗 PGDS 结合，然而在来自硬膜外隙中导管的流出液中没有观察到 PGDS 的结合（图 2C）。

这些结果表明体液样品中 PGDS 的存在与否可靠且特异性地预测了该液体的来源，并因此将脊髓、硬膜外和其它体液区室来源区分开。

实施例 4: 将 PGDS 克隆到细菌表达载体

将包含 PGDS 基因的质粒 pDNR-LIB (125-225 ng) 与 pLB-ProTet-6 \times HN 接受载体（约 200 ng）在 Cre 重组酶反应（20 μ L）中孵育。将反应终止，接着将其用于转化感受态 DH5- α 和 BL21 细菌细胞，接着将这些细胞涂布于包含 30 μ g/mL 氯霉素和 7% 蔗糖的 LB 琼脂平板上。PGDS 基因还被克隆到 pet15b 载体上并且在其 C 末端带有组氨酸标记，将其用于转化 DH5- α 和 BL21 细菌细胞。从选择的克隆中提取质粒 DNA，用限制性酶线性化，然后进行琼脂糖凝胶电泳。

实施例 5: 用亲和色谱纯化 rPGDS

提取 BL21 E. coli 的（用带有 PGDS 基因的 Pro-Tet R 或 pet15b 载体转染）细胞溶胶级分到 Sigma Lytic II 提取缓冲液中并将样品上样于 BD-TALON His-Arg 亲和柱或镍-NTA 柱上，用咪唑洗脱结合的 rPGDS。将样品施加到 SDS-PAGE 上并用 PGDS 抗体进行免疫印迹。

实施例 6: 单克隆抗体的产生

采用标准方案（Lipsich et al, 1983）产生抗 PGDS 的单克隆抗体。每两周注射 PGDS 肽来免疫三只小鼠，共注射四次，并通过 ELISA 检测血

清。基于具有 1: 1000 的抗所述抗原之抗体效价选择小鼠进行融合, 并用抗原再次加强, 四天后进行脾细胞融合。以 10: 1 的脾细胞: 骨髓瘤细胞比例, 通过在添加了 10% Fetal Clone I (HyClone)、非必需氨基酸 (Gibco) 以及青霉素和链霉素 (Gibco) 的 DMEM 培养基 (Gibco) 中以 1000rpm 使其沉淀 5 分钟使分离的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/O 融合。使这些沉淀重悬于含有 35% PEG 1500 (Roche) 的 DMEM 培养基中, 然后立即在 1000 rpm 的转速下离心 5 分钟。抽吸出 PEG, 然后将融合的细胞悬于添加 15% Fetal Clone I、10% NCTC 109 (Gibco)、非必需氨基酸、青霉素和链霉素、 10^{-4} M 次黄嘌呤、 4×10^{-7} M 氨喋呤、 1.6×10^{-5} M 胸腺嘧啶以及 10% 巨噬细胞条件培养基的 DMEM glutamax 培养基 (Gibco) 中, 并置于 10 个 96 孔板中。按照经过修改的 (Sugasawara et al, 1985) Rathejan et al, 1985 中所述方法制备巨噬细胞条件培养基。简言之, 在装有添加了 10% 马血清 (HyClone) 的 DMEM 培养基的转瓶 (spinner flask) 中培养 J774.A1 (美国典型培养物保藏中心)。在所述转瓶中加入脂多糖 (E. coli LPS 055:B5, Cal Biochem) 至 5 ug/mL, 孵育细胞 20 小时。接着以 1000 rpm 转速收集细胞 10 分钟, 并在二分之一体积的 PBS 中清洗。在 1000 rpm 下离心 10 分钟, 然后弃去上清液, 将细胞重悬于不含马血清的 Iscoves modified Dulbecco's 培养基 (IMDM, Gibco) 中并转移到转瓶中。接着细胞在 37 摄氏度下孵育 48 小时。在 1500 rpm 下离心 10 分钟, 使细胞从培养基中沉淀下来从而收集培养基。接着过滤巨噬细胞条件培养基并在 4 摄氏度下保存。在融合后两周, 通过与卵清蛋白缀合的抗 PGDS 肽的 ELISA 筛选小孔。筛选前一天, 从 10 个 96 孔融合板的每个孔中取出 0.1 mL 培养基, 并在每个孔中加入 0.1 mL 新鲜培养基作为替换。第二天, 通过 ELISA 再次筛选既表现出 ELISA 阳性反应又表现出细胞生长的孔以确认该反应。扩增在再次测试中仍显示阳性反应的细胞, 并在培养物中生长至 30 mL, 将 3 个 10 mL 等分试样沉淀, 然后重悬于冷冻培养基 (10% 二甲基亚砜, 90% Fetal Clone I) 以进行冷冻储存。通过抗 CSF 和 rPGDS 的点印迹筛选阳性样品, 通过限制稀释法选择克隆用于亚克隆。通过 ELISA 进行亚克隆, 并选择亚克隆进行进一步研究, 将其在 T-175 培养瓶中添加了 10% 胎牛血清和抗生素的 DMEM 中扩增并培养至 1000 mL 体积。将亚克隆转移到无血清 DMEM 中并继续孵育三天。通过在 1500 rpm 下离心 10 分钟沉淀细胞来收集上清液, 并在 4 摄氏度下保存。

融合后 10 到 14 天, 作为起始筛选, 通过 ELISA 检测了来自 4000 个孔的克隆。用 ELISA 再次测试阳性克隆, 另外, 在两天或三天内进行第二

筛选测试，例如点印迹。用点印迹设备将重组 PGDS 转移到 PVDF 膜上，用来自单克隆抗体生产方案中所产生杂交瘤的腹水作为探针检测。

实施例 7: CSF 中天然和变性 PGDS 的检测

使用 Bio-Rad 点印迹设备将 CSF (10 μ l) 转移至 PVDF (天然蛋白) 或 CSF 进行电泳并被转移到 PVDF 膜 (变性蛋白)，并用 PGDS 抗体作为探针进行检测。使用 ECL 检测试剂盒使所述膜显影。结果表明使用 L-PGDS 特异抗体检测到蛋白质。

实施例 8: 评价硬膜外操作中所获得样品中 PGDS 的存在情况并鉴定由于 CSF 泄漏造成的 Wet-Taps

评价了经 IRB 许可后由合作的临床医师在硬膜外操作中所获得样品中 CSF 标志物 (PGDS) 的存在情况。在分析样品之前，此研究是不知情的，随后与指定的样品相关联。指定的脊髓样品显示大量存在 CSF 标志物，而指定的硬膜外样品中不含标志物。

实施例 9: 重组蛋白和 IgG 的放大和纯化

将使用亲和色谱技术对来自所选亚克隆中的重组蛋白和抗体进行纯化。

1、rPGDS 的大规模纯化

在 Super 液体培养基中培养用带有含 HN 标签 PGDS 基因的表达载体 Pro-Tet6 \times -HN 或带有含 His 标签 PGDS 基因的 pet15b 载体转化的大肠杆菌 BL-21PRO 细胞。可以在 20-23 摄氏度下通过当细胞密度 (A_{600}) 达到 0.6-0.7 时向 800 ml 细菌培养物中添加 8 ml 的 100 mM 脱水四环素诱导蛋白表达。可将细菌细胞重悬于结合缓冲液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、100 mM NaCl, 10%甘油, 1 mM 苯甲磺酰氟以及 pH 7.9 的 1 mM 咪唑) 中, 随后进行超声。根据生产厂家的方案 (BD Life Sciences, Franklin Lakes, N.J. 或 ClonTech, Mountain View, CA), 用 TALON 或 Ni-NTA 树脂对带标签的重组 L-PGDS 进行纯化。离心 (39000 \times g) 后, 将细胞提取物与 300 μ L (床体积) 的 TALON 或 Ni-NTA 树脂在 4 摄氏度一起孵育 1 到 2 小时。用 10 ml 清洗缓冲液 (除含有 10 mM 咪唑外其余与结合缓冲液相同) 清洗珠三次。可以用 300-500 μ L 洗脱缓冲液 (除含有 100 mM 咪唑外其余与结合缓冲液相同) 洗脱蛋白。如上所述, 通过 SDS-PAGE 和免疫印迹法分析洗脱样品。可以用微量浓缩器 (Amicon) 将纯化的蛋白浓缩到 1-2 mg/ml,

这些样品可用于通过 ELISA 或等温滴定量热法来确定所选抗体的特异性。

2、单克隆抗体的大规模生产（体外腹水（in vitro ascites）-“IVA”）

选择一系列阳性克隆（它们具有通过 ELISA、点印迹或免疫印迹的方法鉴定天然和变性抗原的能力）用于大规模生产体外腹水。细胞在用膜隔成不同区室的反应器 CeLLine 内使用添加了增强抗体生产之添加剂的无血清培养基生长至高密度，CeLLine 是由 Integra Biosciences（Zurich, Switzerland）所生产的。

3、单克隆抗体的纯化

单克隆抗体的纯化可以如（David Lane, 1999）所述的通过在装填于 1×10 cm Econocolumns (Bio-Rad) 的 1 ml 蛋白 G-琼脂糖柱（Sigma）上的亲和色谱完成。通常用 1/10 体积的 1 M Tris-Cl (pH 8.0) 稀释 500 ml 含血清上清液。以由蠕动泵 P-1 (Pharmacia LKB) 所控制的 0.8 ml/分流速使样品通过所述柱，接着用 10 倍柱体积的 0.1 M Tris (pH 8.0) 和 10 倍柱体积的 10 mM Tris (pH 8.0) 在 0.8 ml/分的流速下清洗。用 0.5ml 的 50 mM 甘氨酸 (pH 3.0) 级分将抗体洗脱至 1/10 体积的 1 M Tris (pH8.0) 中。通过观察 280 nm 下的光密度鉴定含抗体级分，并用 SDS-PAGE 确认，接着将其汇集，然后用 PBS 进行透析，其中更换两次缓冲液，并在 4 摄氏度下过夜。用 Bradford 蛋白检测法（Bio-Rad）确定蛋白产率。

实施例 10: 纯化 IgG 的表征和质量控制

利用等温滴定量热法和 ELISA，通过抗体与重组蛋白结合等温线的性质可以表征抗体。

1、等温滴定量热法

分析抗体产品质量的常用方法，如电泳或色谱法表征了分子结构但不提供有关结合活性的信息。在评价抗体功能不同批次间的变化时尤其如此。等温滴定量热法（Isothermal Titration Calorimetry, ITC）提供了更加简便和更为准确的抗体和抗体产品质量控制及表征的方法。ITC 可用于快速有效的测量广泛的物理性质，例如抗体亲和力 (K_a)、抗原结合热 (ΔH) 以及抗体或抗原上活性结合位点的表观数 (n)。结构的变化（断裂、部分变性以及偶联剂修饰）可以与结合亲和力的变化相关联。另外，结合热可用作体内和体外抗体-抗原反应的预测因子。

ITC 中，在恒定温度下用结合伴侣的溶液来滴定配体溶液。随时间检测由于它们相互作用所释放的热 (ΔH)。随着连续量的配体滴定进小室中，吸收或释放的热与发生结合的量成正比。当系统达到饱和时，信号减小直到仅仅观察到稀释热。然后从来自每次注射的热量相对小室中配体与结合伴侣之比作图中获得结合曲线。按照标准方案用 ITC 确定纯化抗体的特异性和敏感性 (Sawas et al., 2004)。

2、用于抗原检测的 ELISA

在 4 摄氏度下用碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (PH 9.6) 中 1 μ g/ml (100 μ l/孔) 的纯化重组抗原 (PGDS) 包被聚苯乙烯 96 孔微滴定板过夜。用 PBST 清洗两次所述板，接着用含有 0.05% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液中 1% 脱脂乳 (PH 7.4) 在 37 摄氏度下封闭 1 小时。将培养上清中不同稀释度的单克隆抗体添加到孔中 (100 μ l/孔)，并将板在室温下孵育 1.5 小时，再在室温下孵育 30 分钟。接着用 PBST 清洗所述板五遍，加入 100 μ l 抗小鼠 HRPO (在 PBST 中 1: 1000)，并将板在 37 摄氏度下再孵育 30 分钟。在重复上述清洗步骤之后，通过在室温下与 100 μ l/孔的 TMB 过氧化物酶底物 (Bio-Rad) 一起孵育 15 分钟测定酶活力。在加入 25 μ l/孔的 2.5 N H₂SO₄ 终止反应后，用自动微滴定板读数仪测定 450 nm 下的光密度。

实施例 11: 鉴定临床样品中 CSF 的侧向流装置

利用基于使用两种单克隆抗体的免疫色谱测定实现本发明的装置。测试装置包含带有塑料测试盒的测试条 (例如 0.8cm-6.2cm) (图 4)。所述抗体附着在膜上的三个不同的区域: 样品区 (S)、测试区 (T) 和对照区 (C)。与胶乳颗粒缀合的 PGDS-mAb1 附着在 S-区。PGDS-mAb2 永久性固定于 T 区，兔抗小鼠抗体固定到 C-区。

1、PGDS-mAb1 与胶乳颗粒的结合

在一个实施方案中，本发明的装置利用与可移动颗粒相缀合的 PGDS 单克隆抗体，所述可移动颗粒例如胶乳颗粒 (Magsphere Inc, Pasadena CA) 或金颗粒 (Bioassay Works, Ijamsville, MD)。所述胶乳颗粒优选地染成蓝色并由直径 0.3 μ m 的聚苯乙烯制成。在室温下将胶乳颗粒 (50 ml, 10% 的溶液) 在 50 mM 的，pH 5.5 的 2-吗啉乙磺酸 (MES) 缓冲液中清洗一次。沉淀重悬于 600ml 的，pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS, Sigma) 中，并与 300 mg PGDS-mAb1 混合。在室温下将悬液混合两小时。

用 100mM 的, pH8.0 的含 0.2%牛血清白蛋白 (BSA) 的三羟甲基氨基甲烷清洗抗体-胶乳悬液两次。接着将沉淀重悬于 500 ml Tris 缓冲液中并在 4 摄氏度下保存。用自动气刷系统 (Bio-Dot Inc., Irvine, CA) 将缀合的悬液 (100ml) 施加到缀合垫 (0.5 cm-30 cm) 上并在室温下干燥 60 分钟。

2、PGDS-Mab2 和兔抗小鼠抗体的固定

在本发明装置中还使用了第二 PGDS 单克隆抗体 (PGDS-mAb2) 和兔抗小鼠抗体。可以用两个自动气刷系统 (Bio-Dot) 将浓度为 5 mg/ml 的 PGDS-mAb2 和兔抗小鼠抗体以分开的两行施加到孔径为 5 mm 的商购尼龙膜上 (4 cm-30 cm)。可以将所述膜干燥 30 分钟并用 pH7.4 的, 含有 0.25%酪蛋白的 PBS (Sigma) 在摇床上封闭 15 分钟。该膜在 37 摄氏度下干燥 60 分钟并储存在盛有干燥剂的密封袋中 (Esfandiari and Klingeborn, 2000)。

3、测试程序

现在参见图 5, 将含有少量 PGDS 的样品加到 S 区。如图 5A 中所示, 存在于样品中的 PGDS 将会结合到胶乳缀合物上并形成 PGDS-缀合物-复合物, 并以色谱的方式在膜上迁移。当复合物遇到 T 区的固定化抗体时, 珠-标志物-Mab1 复合物被捕获在由固定化 Mab2 构成的 T 区上并形成蓝色条带。结果为抗原-抗体复合物与有色胶乳或金珠在“T-区”上凝集, 进而由于珠被捕获造成有色线的显现。T-区上 3-5 分钟内显示出的蓝色条带标志着阳性结果 (图 5A)。T-区没有条带对于阴性结果来说是显著的 (图 5B)。C-区的固定化多克隆抗体与阳性和阴性样品的胶乳缀合物均会结合。此蓝色条带确保测试的正确实施。

4、CSF 检测装置的用途

本发明的装置可以用于多种临床环境以确定样品中脑脊液 (CSF) 的存在情况。本装置的用途可用于下列情况中 CSF 检测 (但不限于此):

具有 CSF 泄漏的颅骨骨折 (主要是颅底骨折)

内窥镜鼻内手术后的 CSF 泄漏

神经外科手术后的 CSF 泄漏

硬膜外插管后的 CSF 泄漏

CSF 泄漏后的自发性颅内低血压

具有 CSF 泄漏的炭疽引起的颅内低血压

与 CSF 泄漏有关的鼻漏和耳漏

与 CSF 泄漏有关的脑积水

与 CSF 泄漏有关的颅内肿瘤

与 CSF 泄漏有关的先天性神经畸形

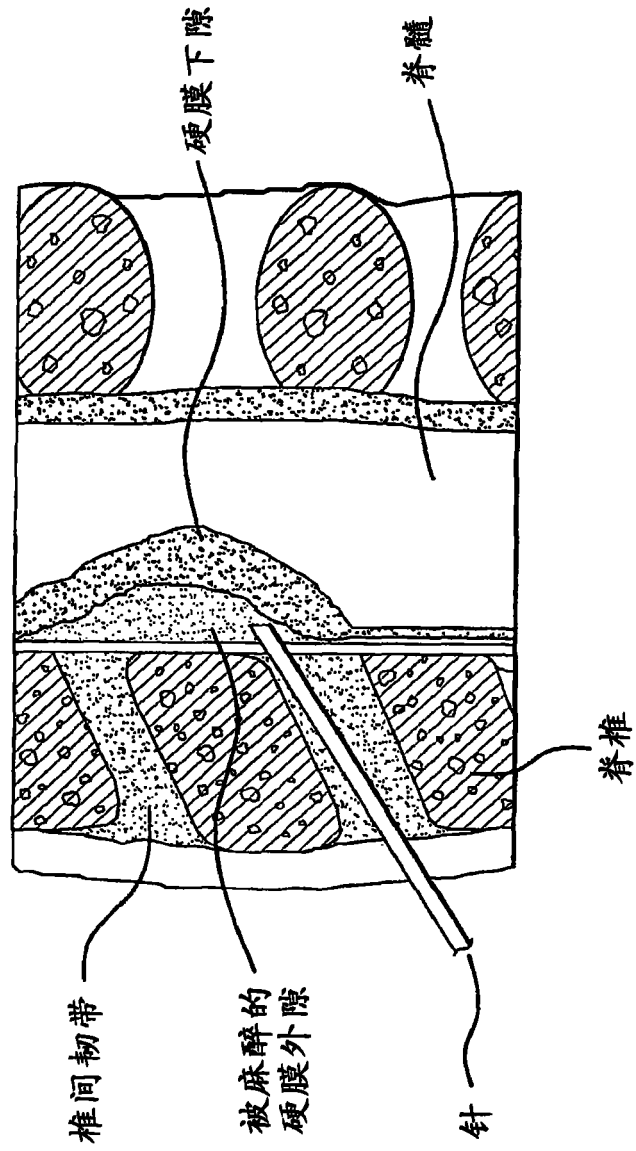


图1

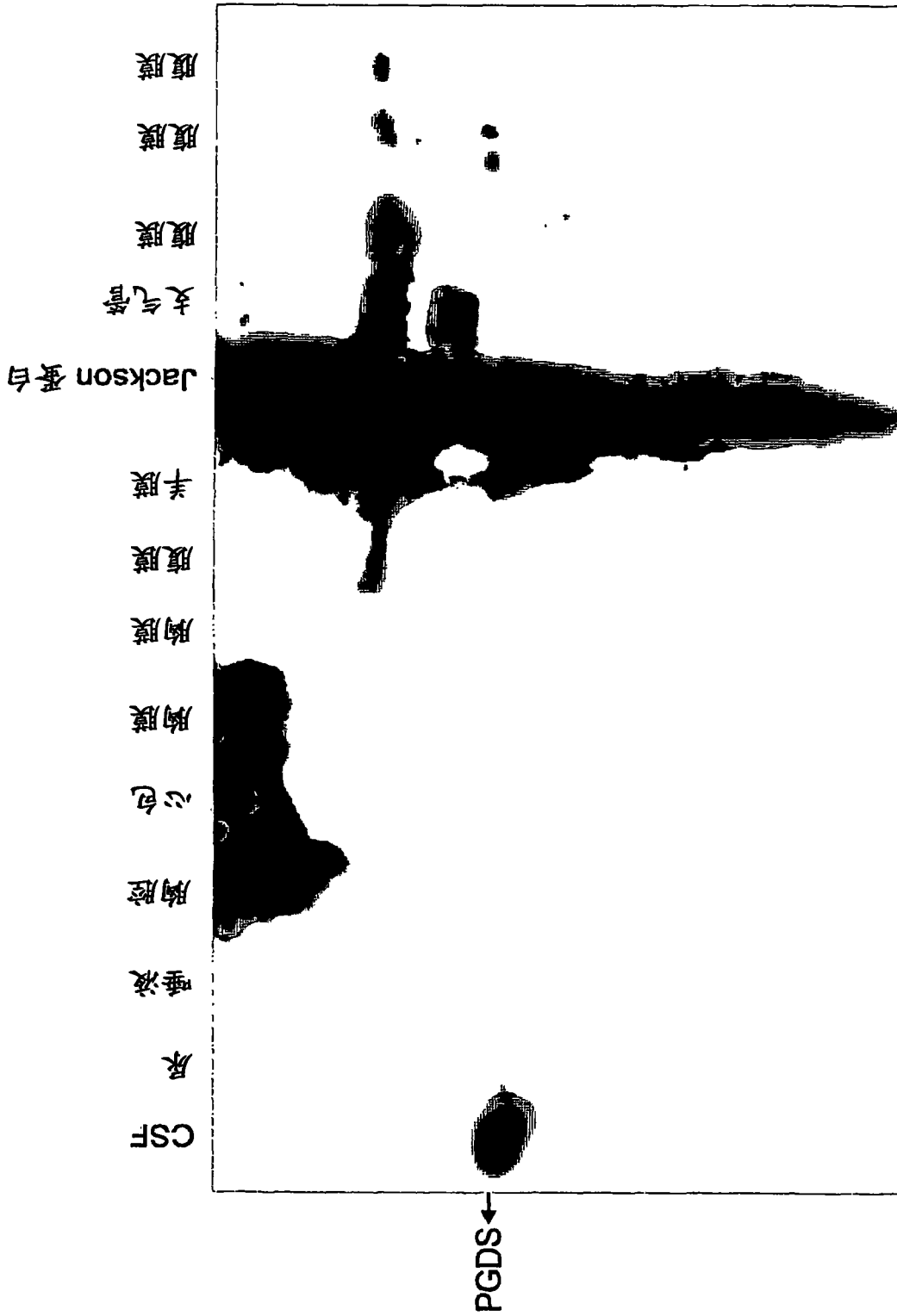


图 2A

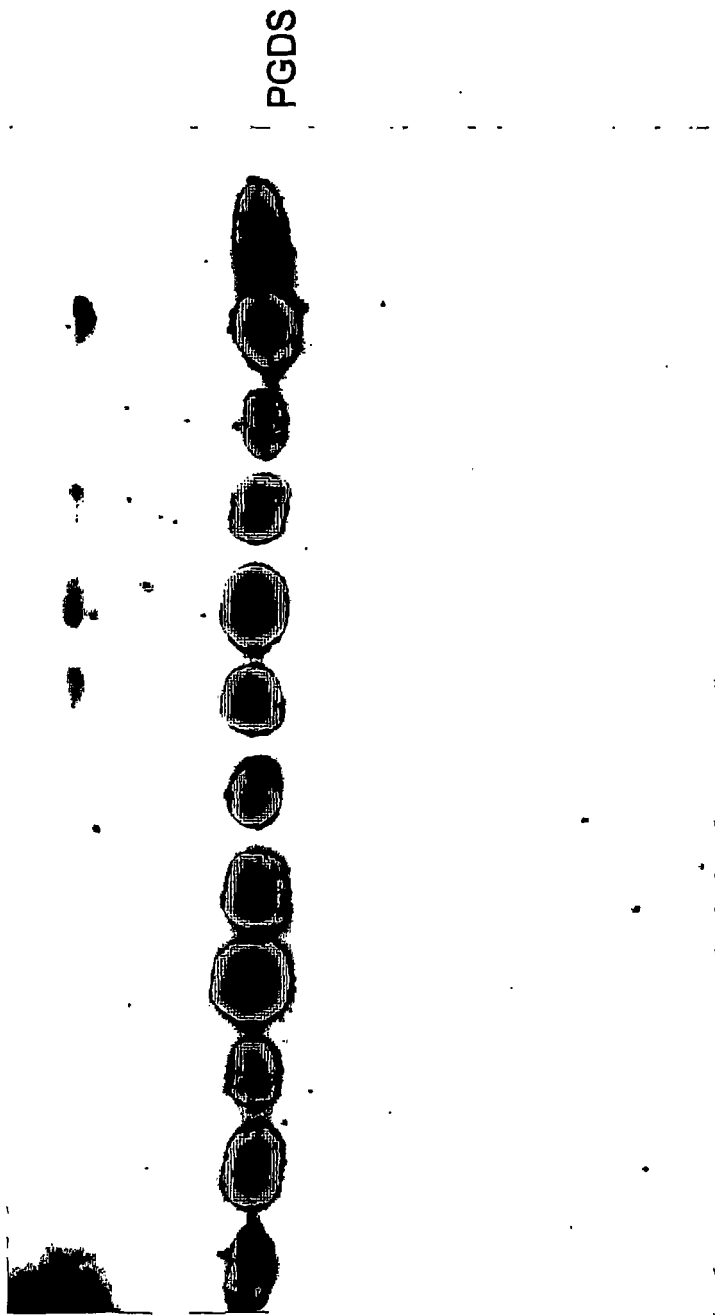


图 2B

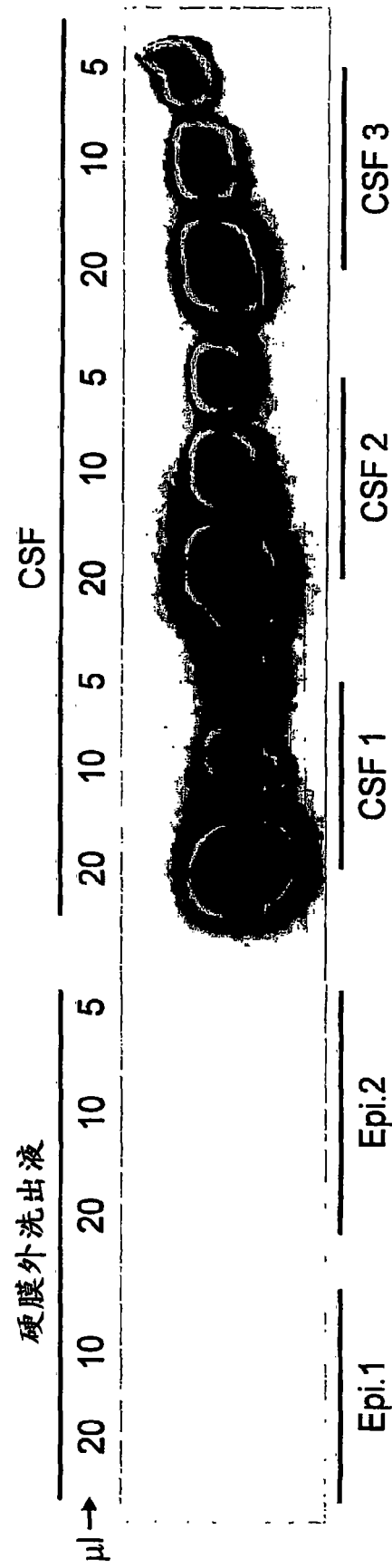


图2C

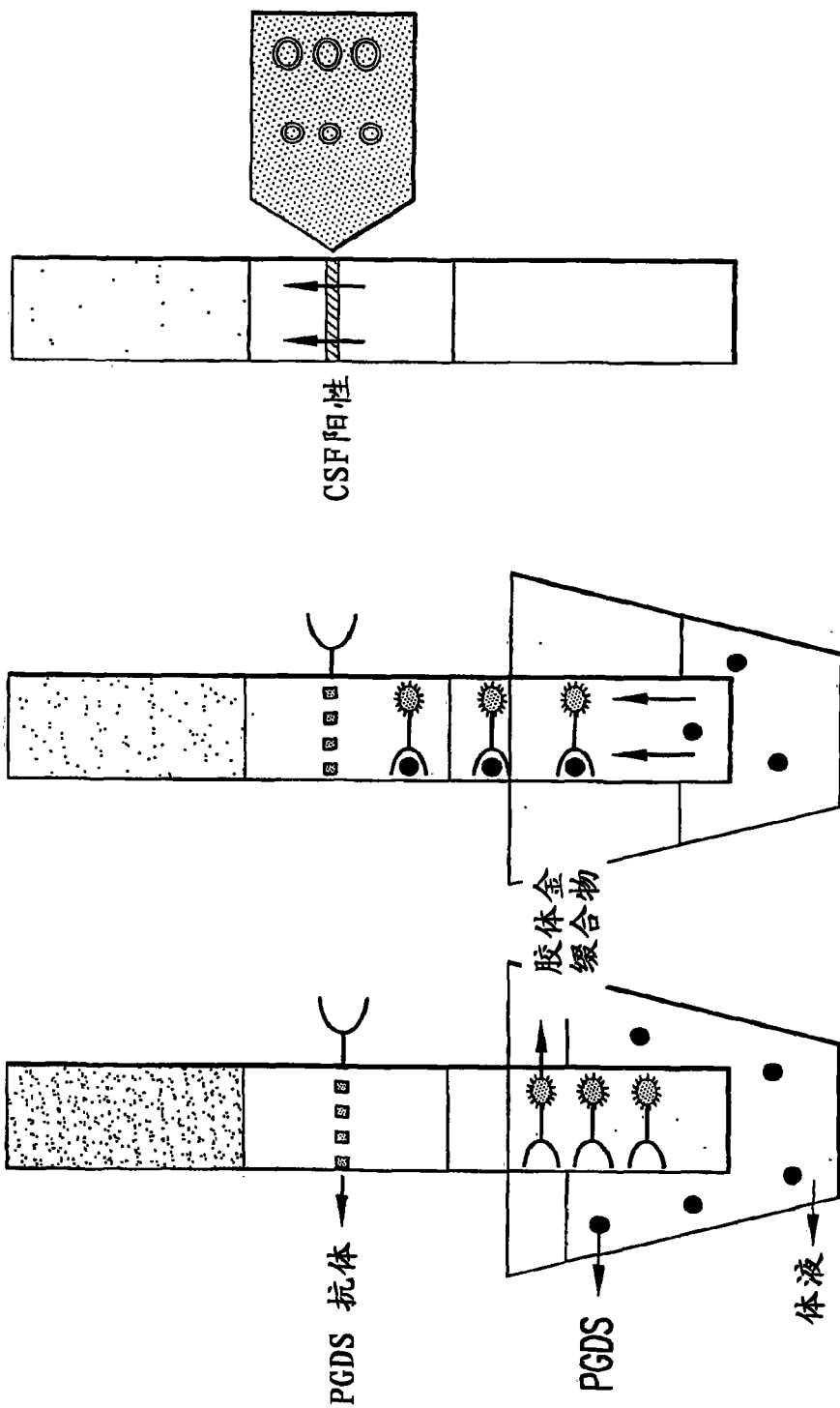


图3

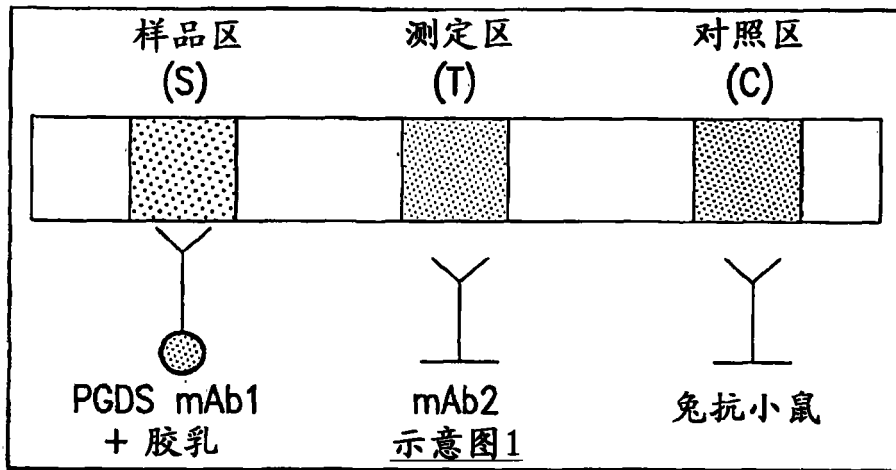


图4

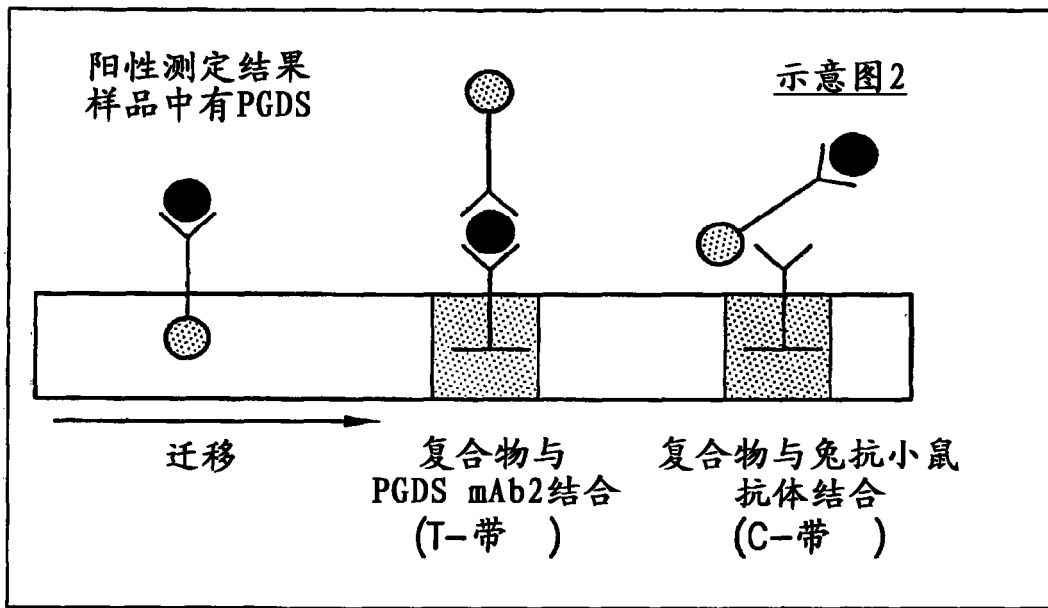


图 5A

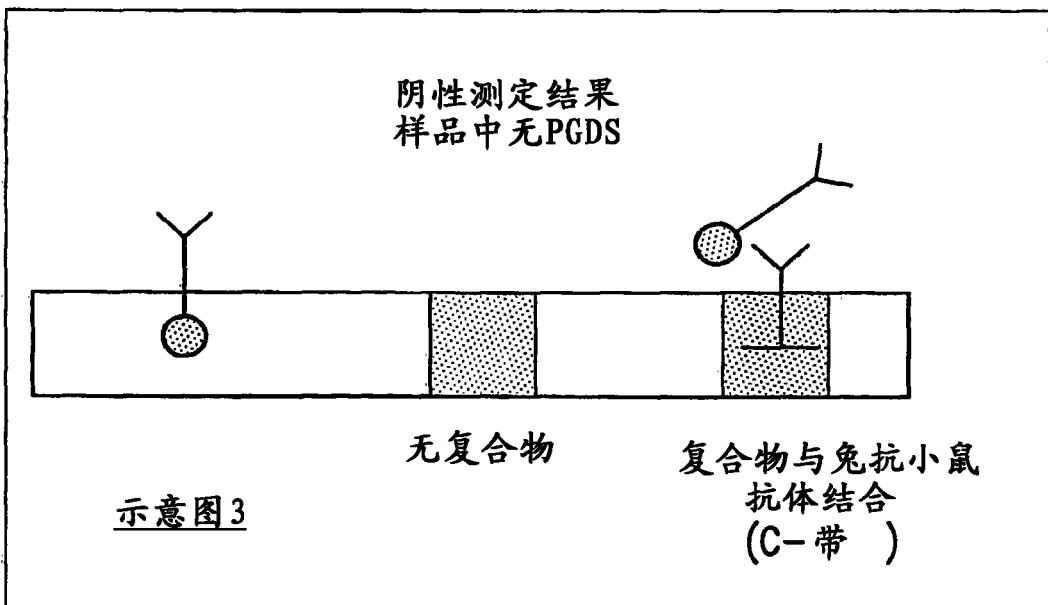


图 5B

专利名称(译)	检测样品中脑脊液的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN101535807A	公开(公告)日	2009-09-16
申请号	CN200780037078.9	申请日	2007-07-27
[标]发明人	斯里尼瓦斯N庞亚拉		
发明人	斯里尼瓦斯·N·庞亚拉		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/546 G01N33/53 G01N33/48 G01N21/00 C12M1/16 C12Q3/00 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/558 G01N33/6896 G01N2333/99		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	11/516385 2006-09-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及对样品中是否存在脑脊液(CSF)的检测，特别涉及对CSF蛋白脂质运载蛋白型前列腺素D2合酶(L - PGDS)的分析。本发明提供了用于分析PGDS以指示样品中是否存在CSF的测定。

