

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C08B 37/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03806690.4

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100526884C

[22] 申请日 2003.2.28 [21] 申请号 03806690.4
[30] 优先权

[32] 2002. 2.28 [33] GB [31] 0204797.5

[32] 2002. 7.18 [33] GB [31] 0216808.6

[32] 2002.12.19 [33] GB [31] 0229614.3

[86] 国际申请 PCT/GB2003/000858 2003.2.28

[87] 国际公布 WO2003/073106 英 2003.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.22

[73] 专利权人 米克罗森拜奥菲哲有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 A·R·莱恩 C·J·斯坦利

S·M·威尔森

[56] 参考文献

Characterization and polyanion – binding properties of purified recombinant prion protein. BRI-MACOMBE DEBBIE B ET AL. BIOCHEMICAL JOURNAL, Vol. 342 . 1999

Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. XIONG LIANG. WEN ET AL. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, Vol. 79 . 2001

审查员 杨 玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 5 页 说明书 56 页 附图 1 页

[54] 发明名称

病理形式朊病毒蛋白的结合

[57] 摘要

在正常形式蛋白存在情况下，在选择性结合条件下应用一种聚离子结合剂，选择性地结合感染的聚集形式蛋白，诸如 PrP、淀粉状蛋白和 τ 蛋白，所述结合剂诸如为葡聚糖硫酸酯或戊聚糖（阴离子），或者为聚胺化合物，诸如 pDADMAC（阳离子），所述选择性结合条件包括在轻度碱性 pH 下应用 n-月桂酰肌氨酸，然后可测定这种感染的聚集形式的蛋白。

1、在一种蛋白的非聚集正常形式存在的情况下选择性结合此蛋白聚集异常形式的方法，它包括在选择性结合条件下使一种含有所述蛋白聚集异常形式和蛋白非聚集正常形式的物质与一种结合剂接触，此结合剂为聚阴离子多糖苷、聚乙烯亚胺或聚胺。

2、一种权利要求 1 的方法，其中所述聚胺是聚酰胺胺或聚季铵。

3、一种权利要求 1 要求的方法，其中所述的选择性结合条件包括溶液中存在一种竞争剂，此竞争剂具有离子基团，此基团对此异常形式蛋白的结合亲和力低于结合剂。

4、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中结合剂是抗蛋白酶的。

5、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中在所述结合过程中存在蛋白酶，或者其中在被结合后使所述的蛋白暴露于一种蛋白酶的作用。

6、一种权利要求 1 或 2 所要求的方法，其中聚阴离子多糖苷为一种聚磺化多糖苷。

7、一种权利要求 6 所要求的方法，其中聚阴离子多糖苷为一种聚阴离子戊聚糖或葡聚糖。

8、一种权利要求 6 所要求的方法，其中聚磺化多糖苷为戊聚糖聚硫酸酯或葡聚糖硫酸酯。

9、一种权利要求 1 或 2 所要求的方法，其中所述结合剂为溴化己二甲胺、PAMAM 树突状聚合物、聚 L-赖氨酸、pDADMAC 或聚乙烯亚胺。

10、一种权利要求 3 所要求的方法，其中竞争剂离子基团的密度低于此结合剂。

11、一种权利要求 10 所要求的方法，其中此竞争剂是阴离子的。

12、一种权利要求 11 所要求的方法，其中此竞争剂为一种阴离子去污剂。

13、一种权利要求 11 所要求的方法，其中此竞争剂为一种脂肪酸的氨基酸酰胺。

14、一种权利要求 13 所要求的方法，其中此竞争剂为 n-月桂酰肌氨酸。

15、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中此 pH 值为 8~9。

16、一种权利要求 15 所要求的方法，其中此 pH 值为 8.2~8.6。

17、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中存在一种去污剂，它促进结合剂与此异常形式蛋白的结合。

18、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中所述结合剂在与所述聚集异常形式蛋白结合后，用一种固定的俘获剂俘获此结合剂。

19、一种权利要求 18 所要求的方法，其中所述俘获剂为一种凝集素或一种可与所述结合剂反应的抗体。

20、一种权利要求 18 所要求的方法，其中提供的所述结合剂具有选择性可结合标记部分，而且所述俘获剂与所述标记部分结合。

21、一种权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中在此结合剂暴露于所述异常形式蛋白之前，将此结合剂固定在一种固体介质上。

22、一种权利要求 21 所要求的方法，其中介质为一种所述结合剂包被在其上的底物。

23、一种权利要求 21 所要求的方法，其中提供的结合剂具有一种选择性可结合标记部分，并且通过所述标记部分将此结合剂固定在所述固体介质上。

24、权利要求 20 或权利要求 23 中所要求的方法，其中所述的可结合标记部分为生物素、荧光素、二硝基苯酚、异羟洋地黄毒苷元、核酸或核酸类似物序列或 His6。

25、权利要求 1-3 任一项所要求的方法，其中为固体形式的所述结合剂提供一种表面，此表面具有所述的结合亲和力。

26、一种权利要求 25 所要求的方法，其中此表面是一种具有离子基团的聚合物的表面，这些离子基团是在此聚合物结构内共价结合的，或者是通过修饰此聚合物的表面基团而产生的。

27、一种测定方法，它用于测定样品中异常聚集形式蛋白的存在，所述方法包括按照上述任一权利要求，结合所述异常形式蛋白，然后测定此蛋白与结合剂的结合的存在或结合量。

28、一种权利要求 27 所要求的方法，其中通过对此蛋白聚集形式进行免疫测定，定性或定量地测定所述结合。

29、一种权利要求 27 或 28 所要求的方法，其中在正常非聚集形式蛋白存在的情况下，选择性地进行蛋白异常聚集形式的结合，然后从非结合正常形式蛋白中分离结合的聚集形式的蛋白，此后测定所述结合的存在或量。

30、一种权利要求 27 或 28 要求的方法，其中所述异常形式的蛋白为 PrP^{Sc} ，所述正常形式的蛋白为 PrP^{C} 。

31、一种从 PrP^{C} 中分离 PrP^{Sc} 的方法，它包括在一种脂肪酸的氨基酸酰胺存在下，选择性地将 PrP^{Sc} 结合于一种为聚离子物质的结合剂。

32、一种权利要求 31 所要求的方法，其中脂肪酸的氨基酸酰胺为 N-月桂酰肌氨酸。

33、一种权利要求 31 的方法，此方法在 pH 为 8~9 下进行。

34、一种选择性结合剂，它是一种缀合于可结合的标记部分的聚阴离子多糖苷，缀合于可结合的标记部分的己二甲胺，或者是一种缀合于可结合的标记部分的聚阳离子结合剂，结合剂可被固定在固体介质上，由此通过所述可结合标记部分与所述固体介质上的俘获剂结合。

35、一种权利要求 34 所要求的选择性结合剂，其中此结合剂为聚磺化多糖苷。

36、一种权利要求 34 所要求的选择性结合剂，其中此结合剂为聚阴离子戊聚糖或葡聚糖。

37、一种权利要求 34 所要求的选择性结合剂，其中此结合剂为一种聚阳离子物质，它选自溴化己二甲胺、PAMAM 树突状聚合物、聚 L-赖氨酸、pDADMAC 或聚乙烯亚胺。

病理形式朊病毒蛋白的结合

发明领域

本发明涉及抗蛋白酶结合剂的应用，典型地涉及聚离子物质，诸如聚阴离子物质或聚阳离子物质，聚阴离子物质包括戊聚糖聚硫酸酯、葡聚糖硫酸酯或其它聚阴离子多糖苷，聚阳离子物质包括溴化己二甲胺、polyamidoamine 树突状聚合物或聚（氯化二丙烯二甲铵），任选在选择性条件下俘获病理或劣种形式朊病毒蛋白 PrP^c，以及类似于聚集的异常形式蛋白的蛋白，此蛋白在正常形式下是不聚集的。

发明背景

朊病毒疾病也称为传染性海绵状脑病或 TSEs，仅仅是最近才对它有所认识。牛海绵状脑病(BSE)首次报告于1985年。首例变异 Creutzfeldt Jakob 病(vCJD)报告于1996年。vCJD 在人类是一种致命性神经变性疾病，相信它是由消费 BSE 污染的肉类引起的。在人类，从感染至出现临床症状的潜伏期可为许多年。

朊病毒的唯一识别的组分是 PrP^{Sc}，它是引起朊病毒疾病的原因，它是一种异常的 PrP^c 同种型（PrP^{Sc} 也称为 PrP^{res}，PrP^c 也称为 PrP^{Sen}）。先前已经注意到 PrP^{Sc} 与 PrP^c 不同，因为它是比较抗蛋白酶的。但是最近，发表的文献称存在一种蛋白酶敏感形式的 PrP^{Sc}，即存在一种感染性 PrP，它是蛋白酶敏感的。

此感染的，但蛋白酶敏感的 PrP^{Sc} 可能可以聚集（即本质上是聚集的），但是尚未聚集，或者至少仅是部分聚集。

除了上下文中指明特定的其中之一的含意外，蛋白酶不敏感和蛋白

酶敏感形式的 PrP^{Sc} 及部分蛋白酶消化后留下的 PrP^{Sc} 核心部分（经常在现有技术中被看作是 PrP^{27-30} ）在此都被认为是 PrP^{Sc} 。另外，名词“聚集蛋白”用以包括聚集的抗蛋白酶 PrP^{Sc} 和其它蛋白的类似形式，以及感染性非聚集或部分聚集形式的 PrP^{Sc} 或其它蛋白，其中可包括最近观察到的蛋白酶敏感感染性 PrP^{Sc} 。

PrP^{C} 是一种功能不明的 GPI 锚定糖蛋白。尽管朊病毒疾病其它一些标志已经提示 PrP^{Sc} 不仅仅是一种必须的朊病毒组分，而且也是这类疾病唯一可靠而普遍接受的标志。

目前受推崇的测定 PrP^{Sc} 存在的方法学是：应用蛋白酶 K 使样品进行蛋白水解，此过程持续足够的时间，以破坏 PrP^{C} ，然后通过一种免疫测定法测定留下的 PrP^{Sc} ，这种免疫测定法中应用一种抗体，它对于 PrP^{C} 存在下的 PrP^{Sc} 不是选择性的 (Serban 等, Neurology, Vol. 40, No. 1, Jan 1990)。在蛋白水解步骤中，应用蛋白酶自然地排除了作为俘获剂或检测剂的抗体。在可引入抗体之前，必须除去此蛋白酶，或使其失活。避免对操作的这种限制将是十分有利的。

这种方法依赖于完全除去 PrP^{C} ，以避免假阳性，而且还依赖于不产生降解 PrP^{Sc} 的情况，以避免假阴性。需要为每种类型的待测样品开发这种选择性蛋白水解的条件。所得测定法的敏感性是有限的。例如，在牛脑组织的测定中，其敏感性仅可能是如此，以便大约在此动物可能将表现出 BSE 临床可见症状时，可获得可靠的阳性结果。因此，此测定法的敏感性限度在 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内，相当于 10^4 - 10^5 朊病毒感染单位。

对于朊病毒疾病，需要更灵敏更特异的诊断试验。特别是，需要应用血液或其它类型样品的死前试验，来评价特定动物的疾病状态。没有这种方法的情况下，一旦在一群动物中明确一个感染动物，则需要广泛地屠宰家畜。至关重要的是开发一种诊断试验，以筛选人群，并保护个

体，避免受到捐献血液、外科手术及器官和组织移植的潜在感染。

US5977324 和 US6221614 两者均描述了应用磷钨酸(PTA)结合 PrP^{Sc} 的方法。PTA 是一种非特异性蛋白沉淀剂，除了它不与 PrP^{Sc} 结合外，它可与广泛的蛋白结合，并使其沉淀。样品中蛋白的浓度也将极大地影响应用 PTA 的回收。

有报告称，对于 PrP^C 而言，纤溶酶原可与 PrP^{Sc} 选择性地结合，并提出纤溶酶原可用于诊断分析(Fischer et al. Nature, 2000, Nov 23, 408 (6811): 479-83)。但是，还没有充分地证明此方法可应用于实践中。在相关公开内容，即 US 2002/0004586 中，也认为纤溶酶原是一种与 PrP^{Sc} 选择性结合的因子。

按照 US 6419916 及相关的公开内容，聚胺化合物 Superfect™ (一种支链聚胺混合物，它是通过 PAMAM 树突状聚合物的热诱导降解产生的)及其它类似的支链聚胺可在体外清除细胞中的 PrP^{Sc}。其机理不清楚。据推测，这些化合物可与按淀粉状蛋白排列并暴露阴性带电部分的 PrP^{Sc} 直接结合，而且在酸性条件下诱导构象改变。据说此结果不能简单地涉及与 PrP^C 的结合和抑制 PrP^{Sc} 的合成，因为存在的 PrP^{Sc} 已被清除了。假如 pH 低于 4，则发现此聚胺可使 PrP^{Sc} 蛋白酶敏感。推测在体外 PrP^{Sc} 清除实验中，此聚胺在酸性细胞隔室中起作用。

从此项工作中得出，可推论这些聚胺与 PrP^{Sc} 结合。还提出了许多其它的可能性。表明或提示与 PrP^{Sc} 无选择性结合超过了 PrP^C。另外，可以推断，所发生的任何结合仅仅是短暂的，只是用于改变 PrP^{Sc} 的构象，以使蛋白酶进行攻击。另外，这些聚胺的作用需要低 pH 值。事实上，我们自己的研究表明在如此低的 pH 值下，这种树突状聚合物聚胺不与 PrP^{Sc} 结合。

戊聚糖聚硫酸酯（聚- β -木糖-2,3-二磺酸酯，PPS）是一系列大聚磺酸盐多糖苷（PGs）（MW 8,000-12,000）中的一种。它产自山毛榉木，是一种廉价的化合物，已作为类似于肝素的抗凝剂应用了多年，还有 PG。PGs 包括 PPS 和其它聚阴离子，已知它可与 PrP^c 和重组 PrP（recPrP）两者结合。例如参见 Brimacombe DB et al, Biochem J, 1999 Sep 15; 342 pt 3, 605-13。因此，已提出 PPS 可用作潜在的治疗剂，以预防和治疗 TSE 疾病。然而没有表明在体内或体外中除去已存在的 PrP^{sc}。

在生产过程中，提取山毛榉木的锯屑，以生产木糖的可溶性糖聚合物（一种五元环的糖），它称为戊聚糖。然后应用氯磺酸和吡啶的混合物，对此聚合物进行硫酸化反应，这样导致所有 4 个糖环羟基中的 3 个上加有硫酸酯。然后硫酸酯总含量按重量计约为 50-55%，此含量大于肝素中的含量，肝素中的含量约为 30-35%。接近这种高程度硫酸化的其它唯一类似的分子是葡聚糖硫酸酯（40-45%）。戊聚糖的 MW 非常低，为 3.5-7.0 K。

曾有报告，对 PrP^c 结合而言，通过 PrP^{sc} 聚阴离子或聚阳离子结合没有选择性。令人惊奇的是，我们现在建立了条件，在此条件下，聚离子物质与聚集改变的蛋白，比如 PrP^{sc} 结合，另外还建立了其它条件，在此条件下这些聚阴离子与这些异常形式结合，但不与它们的非聚集正常形式，比如 PrP^c 结合，这种结合足够强，而且是在优选的条件下进行，为了可用于测定聚集改变蛋白（例如 PrP^{sc}）的存在，对这种条件进行了充分地选择。

发明内容

因此，本发明的第一个方面是提供一种方法，此方法用于在一种蛋白的非聚集正常形式存在的情况下，选择性结合此蛋白聚集性异常形式，它包括在选择性结合条件下使一种含有所述异常和正常形式的物质与一种聚离子物质接触，当样品中存在所述的此蛋白聚集形式时，此聚

离子物质对其具有结合亲合力。这种结合条件可包括溶液中存在一种竞争剂，此竞争剂与此异常形式蛋白的结合亲合力低于此聚离子物质。

这种聚离子物质可在溶液中，或者可提供一种具有离子表面基团的表面。在后一种情况中，此表面可为一种聚合物的表面，该聚合物具有所述的离子型基团，此基团是在该聚合物的结构内共价结合的，或者是通过对该聚合物的表面基团修饰而产生的。聚阴离子聚合物适宜的实例为 Nafion，它是一种全氟化磺酸化烃聚合物，可用作珠或片。也可应用聚阳离子聚合物。

可选择的是，此表面为一种底物的表面，该底物上包被有或在其中结合有具有所述离子基团的物质。具有这种表面基团的适宜聚合物的实例为未带电塑料表面，应用马来酸酐对其进行活化，并用 TRIS 衍化而产生表面羧基，或者带有聚阳离子物质。也可将聚阳离子和聚阴离子被动地涂在诸如聚苯乙烯的聚合物上。

在聚阴离子物质条件下，无论是用在溶液中，还是涂在固体表面，这种聚阴离子物质优选可为一种聚阴离子多糖苷。

通常，竞争剂离子基团的密度比聚离子物质低。未受到理论的限制，可能在此详述的发现归因于聚集性异常形式的蛋白，此蛋白比非聚集正常形式的相同蛋白具有更多的结合位点，以与离子基团进行相互作用。具有一个或一些离子基团的竞争剂可以以一定的亲合力，既与聚集形式的蛋白相互作用，也可与非聚集形式蛋白相互作用，然而聚离子物质则可以同时通过许多离子基团与此聚集形式的蛋白结合，这样可使它对聚集形式蛋白的亲合力比对非聚集形式蛋白更高。

被感染牛脑的实验结果提示，固定的聚阴离子（诸如葡聚糖硫酸酯）和聚阳离子（诸如聚乙烯亚胺）能够俘获脑均浆中异常形式的朊病毒蛋

白 PrP^{Sc} 。应用抗朊病毒蛋白抗体/酶缀合物获得的信号，在最佳聚阳离子俘获表面的比最佳聚阴离子俘获表面约高 3~5 倍。

在两种情况下，当使用非特异性抗朊病毒蛋白抗体时，去污剂 Sarkosyl (N-月桂酰肌氨酸)可充当竞争剂，以利于提高俘获异常蛋白的特异性，并避免正常朊病毒蛋白的信号。另外，当应用聚阳离子，或者应用聚阴离子时，用胰蛋白酶部分消化此样品基本上可增强 PrP^{Sc} 的信号，但对特异性没有任何影响（此提示，在所用的这种条件下，胰蛋白酶除去了 PrP^{Sc} 聚离子结合的抑制剂，而不是优选地消化 PrP^{C} ，这与从蛋白酶 K 所观察到的一样）。

科学文献中有报告称， PrP^{Sc} 天然地与聚阴离子相关联，此聚阴离子诸如为类肝素。可能这些阴性带电聚合物与 PrP^{Sc} 结构的阳性带电区相互作用，并且可能存在与这种聚集蛋白的多种相互作用。

我们提出，诸如葡聚糖硫酸酯或戊聚糖聚硫酸酯的聚阴离子，它可与 PrP^{Sc} 结构结合，其亲合力比天然类肝素更高，而且这样可替代内源性化合物。因此，固定至表面的高阴性带电聚合物可特异性地俘获异常朊病毒蛋白。正常朊病毒蛋白是非聚集性的，而且与内源性类肝素或诸如葡聚糖硫酸酯的聚阴离子都没有如此高亲合力的作用。在所选择的这种测定条件下，较低亲和性阴离子诸如去污剂 Sarkosyl 的存在，通过与固定的聚阴离子竞争较低亲和性 PrP^{C} 作用位点，可进一步提高俘获的特异性。

相反，我们提出，根据 PrP^{Sc} 结构，聚阳离子不能替代内源性类肝素。我们提出，它反而必须与内源性类肝素/ PrP^{Sc} 聚集体直接络合 - 与类肝素上的自由阴性电荷形成离子相互作用。这样，在这种构型中，天然完整的类肝素/ PrP^{Sc} 复合体与固定的聚阳离子稳固地结合，然而在固定的聚阴离子条件下，非天然“代替的” PrP^{Sc} 结构则被俘获。这说明

应用最佳的聚阳离子俘获表面获得的信号较高，因为聚阴离子竞争内源性类肝素不可能 100%有效，而且不是所有的 PrP^{Sc}聚集体都被阴性带电聚合物结合。

当不期望聚集性蛋白被天然类肝素天然地结合时，例如当样品是血液或者血清等而不是组织时，可优选离子俘获剂。

除了所提到的离子相互作用外，这种 PrP^{Sc}聚集体的其它区域与所用的这些聚合物之间可能还存在其它的疏水性结合。这些将进一步增强这种结合的相互作用。

此处所用的“亲合力”是指具有许多结合位点的分子与多价结合剂的总结合强度，而“亲合性”的意思是此分子的每单个结合位点和结合剂之间的结合强度。

如果使用竞争剂，则此竞争剂优选为脂肪酸的氨基酸酰胺，诸如 n-月桂酰肌氨酸。这些物质具有去垢特性，但在本说明书中它们通过其末端 COO⁻基团，仅仅充当单价结合剂，或者通过胶束形成而充当部分多价剂。

在另一个方面，本发明提供一种方法，该方法用于在一种蛋白的非聚集正常形式存在的情况下，选择性结合此蛋白的聚集性异常形式，它包括：在诸如提供所述异常形式的选择性结合的条件下，使含有所述异常和正常形式的物质与聚阴离子多糖苷接触。

本发明每个方面的优选实施方式中，所述蛋白的异常形式为 PrP^{Sc}，而且其正常形式为 PrP^C。但是，本发明在其所有形式中，可广泛地应用于蛋白异常聚集形式的选择性结合。

可应用的聚阳离子选择性结合剂包括：聚乙烯亚胺；聚胺，它包括聚赖氨酸、polyamidoamines、例如 PAMAM 树突状聚合物；聚季铵，诸如聚（氯化二丙烯二甲铵）和 1,5-二甲基-1,5-二氮十一撑聚甲溴化物（亦即溴化己二甲胺或溴化己二甲胺）。

优选的聚阴离子多糖苷为聚磺酸化多糖苷。但是，也可应用或替代使用其它的阴离子位点，诸如羧酸基团或者磷酸基团。

这种聚磺酸化多糖苷优选为戊聚糖聚硫酸酯（PPS）或葡聚糖硫酸酯。

其它聚阴离子戊聚糖或葡聚糖衍生物也可用作这种聚阴离子多糖苷。

优选高水平磺化作用（或其它阴离子基团）。

角叉胶、葡聚糖和戊聚糖的磺化水平高。如果低比例潜在磺化位点实际上被硫酸基团占据，那么可能会发现这些化合物不与 PrP^{Sc} 上的结合位点选择性地相互作用。

适宜的阴离子选择性结合剂可包括：

戊聚糖聚硫酸酯（MW 3500-5000）、葡聚糖硫酸酯 500（MW 500,000）、 ι -角叉菜聚糖、 λ -角叉胶和角叉菜聚糖，例如 κ -角叉菜聚糖、肝素和类肝素、葡聚糖硫酸酯 8（MW 8,000）、诸如岩藻依聚糖的磺酸化多糖苷、硫酸角蛋白、透明质酸聚硫酸酯、多聚乙酰神经氨酸（细菌聚唾液酸）、III 型角叉菜聚糖和 IV 型角叉菜聚糖、硫酸皮肤素、硫酸类肝素、帚叉藻胶、硫酸化的市售多糖，例如多乙氧基醚、西吡喃、黄原胶、淀粉、纤维素化合物、果胶、胃粘蛋白、ceratonia、琼脂、阿拉伯胶、硫酸

化葡萄糖苷 1、硫酸化葡萄糖苷 2、N-乙酰-D-葡萄糖胺或者硫酸皮肤素 L-艾杜糖醛酸。

可选择这种聚离子物质使具有此能力：在非选择性条件下，可与蛋白的聚集性改变的形式或劣种形式结合，也可与此蛋白非聚集性正常形式结合，而且还具有在适宜条件下与聚集形式选择性结合的能力。

通过适当调节反应条件，可获得所需要的选择性，特别是竞争剂的存在和浓度、pH 和去污力。因此优选地选择 pH，以获得所述的选择性结合。

优选 pH 为 5.6~9，例如 7~9，更优选 8~9，例如 8.2~8.6，尤其是 8.4，特别是在应用下面所述的去污剂时。适宜的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂和 Tris 缓冲剂。

此盐的浓度优选不高于 250mM，而且优选显著更低，例如不超过 100mM。

优选应用去污剂，无论是借助于去污力，还是充当竞争剂，它都可促进所述的选择性结合。

为了此目的，特别优选去污剂为一种脂肪酸的氨基酸酰胺，例如 n-月桂酰肌氨酸或其它脂肪酸肌氨酸。当选择性结合剂是聚阴离子时，尤其优选这种去污剂/竞争剂。

优选此去污剂的浓度至少为 0.05%重量计，更优选至少为 0.1%，优选至少 0.2%，例如 0.2~2%，更优选 0.5~1.5%，但是也可应用更大的量。

可应用具有类似作用的其它去污剂, 包括 CHAPS、Brij、辛基- β -糖苷、Tween 20、Triton X-100 和 Nonidet P-40。但不希望使用高浓度十二烷基硫酸钠 (SDS)。n-月桂酰肌氨酸 (或类似的物质) 和其它去污剂的组合物是适宜的, 优选含有 0.5 ~ 2%, 例如约 1% 肌氨酸去污剂, 例如与 0.5 ~ 2% 上面列举去污剂中的一种, 例如约 1%, 特别是 Triton X-100 或 Nonidet P-40。

我们发现胰蛋白酶、糜蛋白酶、蛋白酶 K 或另一种这样的蛋白酶的存在有助于防止不明物质的抑制作用, 此抑制作用可抑制聚集性蛋白与聚阴离子或聚阳离子选择性结合剂的结合。当样品中含有相当高水平的其它蛋白时尤其如此, 如果用 PrP^{Sc} 阴性脑材料稀释 PrP^{Sc} 阳性脑样品时情况就是这样。通过包括具有降解性质的其它酶可防止另外的基质抑制作用, 这些酶包括 DNase 和胶原酶。

与所述的此蛋白聚集性异常形式结合后, 这种选择性结合剂可被固定的俘获剂俘获, 而且可测定所述选择性结合剂和所述俘获剂之间形成的络合物的存在和量。

所述俘获剂可为外源凝集素 (在此结合剂适宜的, 例如为多糖苷) 或者一种可与所述选择性结合剂反应的抗体。所述选择性结合剂可具有选择性可结合的标记部分, 然后所述俘获剂可与所述标记部分结合。

可选择和可替代地, 在暴露于所述样品之前, 将这种选择性结合剂固定在固体介质上。此选择性结合剂可具有选择性可结合标记部分, 而且通过此标记, 可将它固定在所述固体介质上。

当存在可结合标记部分时, 例如它可为生物素、荧光素、二硝基苯酚、异羟洋地黄毒苷元 (digoxigenin) 或 (His) 6。

可将此选择性结合剂直接固定在固体上，而不是通过可结合标记。例如，当使用例如用环氧基或乙烯砜基衍化的固体相时，通过此 PG 剩余的羟基经共价偶合，可直接偶合 PG。

在本发明的各个方面，无论异常蛋白的结合发生在选择性结合剂的固定和俘获之前或之后，优选对固定的选择性结合剂/异常蛋白络合物进行冲洗步骤，以除去正常蛋白，而提高选择性。此冲洗步骤中优选使用含有所述竞争剂的溶液，它可为去污剂溶液，其中优选还包括去污剂，此去污剂或者凭借其去污力或者其它方面而促进选择性结合。这优选为脂肪酸的氨基酸酰胺，例如 n-月桂酰肌氨酸或者另一种脂肪酸肌氨酸。优选地，冲洗步骤中此肌氨酸去污剂的浓度至少为 0.05%，优选至少为 0.1%，更优选至少为 0.2%，例如 0.2 ~ 2%，优选 0.5 ~ 1.5%。也可使用其它去污剂，而且优选将此冲洗液 pH 缓冲至 5.6 ~ 8.4。

将结合 PrP^{Sc} 从未结合 PrP^{Sc} （或其它正常形式蛋白）分离后，进行 PrP^{Sc} （或其它聚集性蛋白）的免疫测定，可定性或定量测定所述 PrP^{Sc} （或其它异常蛋白）的结合。

另外，一旦聚集形式的蛋白被选择性结合，而且可选择的在除去正常形式蛋白后，可将另外的聚阴离子物质，例如阴离子多糖苷（用标记物或可检测的标志适当标记的）与已经结合的聚集性蛋白结合，而形成一种夹心（例如多糖苷-聚集性蛋白-多糖苷标记），然后可对其进行定量测定或检测。当进行第二部分夹心形成时，选择性结合条件可不是必需的。

如上所述，在与改变的蛋白接触前或者之后，可将选择性结合剂固定在一种固体物质上。然后从此固体物质上分离样品，以从此测定中除去正常形式的蛋白，仅留下改变形式的蛋白进行下一步测定。

在本说明书中，固体支持物质不仅包括宏观或可控制物质，诸如微量滴定板、测量尺和层流仪，而且还包括微珠和超顺磁性微珠，可通过过滤或者磁性俘获而将它们分离。通过标准的化学方法，可将生物素或其它标记物缀合至葡聚糖硫酸酯或 PPS 等物质上。PPS 中约十分之一的糖主链残基是糖醛酸甲基酯，而且这样为通过它们的羧基残基进行偶合提供了一个途径。其它已知进行偶合的途径是羟基（在硫酸化反应后还有四分之一是游离的），或者是还原糖的末端基团。生物素是适宜的可结合标记部分，它可用于将聚阴离子物质或者其它选择性结合剂结合到一种固体物质上，此固体物质是用抗生物素蛋白或者具有抗生物素蛋白结合特性的物质衍化的，这里的具有抗生物素蛋白结合特性的物质诸如为链霉抗生物素蛋白、Neutravidin 或 Captavidin。

适宜用作可结合标记部分的其它分子将包括所有容易和聚离子物质缀合，而且有助于被适宜的俘获剂俘获的那些分子。例如，诸如荧光素的分子可与 PPS 或类似分子缀合，这是在碳二亚胺 EDC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)-碳二亚胺)存在下，通过将一种氨基荧光素衍生物与戊聚糖聚硫酸酯的糖醛酸和侧链反应进行的，而且可用一种适宜的易于获得的抗体将这种分子俘获，这种抗体可固定在固体物质上。适用于此过程中抗体俘获的其它标记物包括二硝基苯酚 DNP、异羟洋地黄毒苷元、核酸或核酸类似序列和 (His) 6。除了抗体，也可应用结合剂，例如互补核酸或核酸类似序列。

但是，可选择的是，可应用可选择性地与此聚离子物质本身，而不是通过标记部分结合的俘获剂。例如，可通过适宜的凝集素或适宜的抗体结合多糖苷。例如 Kongtawelert et al; J. Immunol. Methods 1990, Jan 24; 126(1) ; 39-49 公开的结合 PPS 的抗体。固定这些抗体的标准技术是本领域技术人员所熟知的。

一旦此凝集形式被选择性结合剂选择性地结合，而且适当地通过固

定结合的形式，冲洗掉剩余未结合的形式，而将未结合正常形式蛋白分离开，任何已知或未来将设计出的可用于测定被凝集的或凝集改变的蛋白的方法，可用来测定此凝集形式的存在或量，这种改变的蛋白诸如为 PrP^{Sc} （不需要选择性地排除正常的形式，诸如 PrP^{C} ）。这些方法包括已知的 ELISA、RIA、IRMA 和其它类型的免疫测定法，例如 Bio-Rad Platelia™ BSE 检测试剂盒中包含的方法和 Serban 等描述的方法。

根据所用测定法的类型，在测定之前可要求或需要从选择性结合剂上洗脱被俘获的异常形式蛋白。在这种洗脱步骤中，诸如硫氰酸胍的离液剂所要求的浓度至少为 1M，优选 2~6M，例如 4~6M。也可应用包括尿素的离液剂。

另外或可选择的，具有较高亲合力的竞争剂可用于替代来自选择性结合剂的蛋白。十二烷基硫酸钠（SDS）适用于此，其应用的浓度优选为 0.5~1%重量计，更优选大于 0.75%。

按照本发明可被选择性结合和测定的其它蛋白包括 β -淀粉样蛋白和 τ 蛋白，它们形成阿耳茨海默病中的蚀斑。

不欲受到下面理论的限制，认为 PPS 和类似分子在本发明中发挥作用，它是通过成对阴性硫酸基与相关蛋白中成对阳性氨基酸（赖氨酸和精氨酸）结合，或者通过此蛋白的聚组氨酸金属结合位点而发挥作用。与聚集形式结合可更牢固，这归因于聚集蛋白所提供结合位点的数目增多。适宜的阴离子去污剂，可更有效的竞争与非聚集形式进行的结合，以提高选择性。适宜地，所获得的选择性是如此，以致与聚集蛋白结合的亲合力至少是正常形式的 3 倍，优选至少为 10:1。

在另一方面，本发明包括分离 PrP^{Sc} 与 PrP^{C} 的方法，它包括在脂肪酸的氨基酸酰胺存在的情况下，选择性地将 PrP^{Sc} 与结合剂结合。这种

结合的优选条件如上详述，而且可按照所述来测定这种结合的蛋白。

通过下面的实施例可进一步对本发明进行描述和举例说明，此实施例涉及下面附图，其中：

附图简述

附图 1 显示实施例 9 中获得的稀释曲线。

具体实施方式

实施例 1: 应用生物素化戊聚糖聚硫酸酯以及随后的亲和俘获从劣种朊病毒蛋白中分离正常朊病毒

介绍

应用标准的化学方法，将生物素与戊聚糖聚硫酸酯缀合。使这种生物素化戊聚糖聚硫酸酯与脑均浆中劣种朊病毒蛋白结合，结合后，应用链霉抗生物素蛋白衍化的超顺磁珠俘获戊聚糖聚硫酸酯/朊病毒复合物。然后从这些珠上洗脱被俘获的劣种朊病毒，并用基于免疫的 Bio-Rad Platelia™ BSE 检测试剂盒进行测定；此试剂盒不能区分正常和劣种朊病毒蛋白，而且可给出两种蛋白的信号。对一组两个 BSE 感染和两个非感染牛脑进行研究，用于举例说明在所述的特殊条件下，可应用戊聚糖聚硫酸酯特异性的俘获脑均浆中劣种朊病毒蛋白。

方法

制备超顺磁珠

1、仅在使用前，在 3 个连续的 1ml 体积的 TBST (50mM Tris、150mM NaCl, pH 7.5, 0.05% (v/v) Tween20 [Sigma-Aldrich Company Ltd.,

P-7949]) 中, 通过磁性俘获冲洗 400 μ l 链霉抗生物素蛋白超顺磁珠 (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) 。

2、最后在 400 μ l TBST 中再悬浮这些珠。

3、在 4 个试管中制备 100 μ l 等份, 并除去流体。然后准备这些珠备用。

制备脑均浆

1、将每种 300-500mg 的脑组织加入包含研磨珠的研磨试管中, 同时将这些试管装入 BSE Purification Kit (Bio-Rad) 中。在使用前抽取试剂盒内这些试管中最初装入的流体, 并将其弃去。

2、将经过计算的 150mM NaCl 加入每个试管中, 它可产生均化后的 50% (w/v) 脑均浆。

3、在 ribolyzer (从 Bio-Rad 购得) 上将这些试管均化 45 秒, 速度设定在 6.5。

4、用 150mM NaCl 稀释这些均浆。

5、将每种 50 μ l 的均浆置于分离试管中。

Rogue 朊病毒蛋白的特异性俘获

6、将 10 μ l 20% (w/v) N-月桂酰肌氨酸 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-9150) 加入含均浆的每个试管中, 并混合。

7、然后将 50 μ l 生物素化戊聚糖聚硫酸酯（在无菌蒸馏水中，浓度为 10 μ g/ml）加入每个试管中，混合，在室温下孵育 30 分钟。

8、然后将每种反应物加入冲洗的链霉抗生物素蛋白超顺磁珠的试管中，在室温下孵育 30 分钟。

9、然后在 3 个 1ml TBST 中通过磁性俘获冲洗这些珠。

Rogue 朊病毒蛋白的洗脱和免疫测定

1、最后，在最终的冲洗后，将每个反应中的珠再悬浮在 10 μ l C1（与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供）中。

2、将 5 μ l 0.2% (w/v) SDS 加入每种珠悬浮液中，混合。

3、在每种珠悬浮液中加入 5 μ l 1M 硫氰酸胍（Sigma-Aldrich Company Ltd. , G-9277），并混合。

4、将此反应在 100℃加热 5 分钟。

5、然后加入 100 μ l R6（与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供），并混合。

6、然后将每种 100 μ l 的洗脱物用于 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒，并使用此试剂盒一起提供的方案和试剂。简要地，这种试剂盒包括正常和/或劣种朊病毒蛋白的免疫俘获，以及应用辣根过氧化物酶缀合抗体的免疫测定。

结果

在基于微量滴定平板的 Platelia™ 测定中进行免疫测定后，应用 ELISA 读数器，在波长 450nm 下测量每个孔中的信号。

所用的脑均浆	OD ₄₅₀
感染 BSE 的牛脑样品 1	0.229
感染 BSE 的牛脑样品 2	0.208
正常牛脑样品 1	0.061
正常牛脑样品 2	0.047

这两种感染 BSE 脑均浆含有劣种朊病毒，它们的信号显著高于未感染的正常脑均浆的信号。

讨论

这种 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒不能区别正常或劣种朊病毒蛋白。正常情况下，应用蛋白酶 K 进行预消化，蛋白酶 K 除去对蛋白酶敏感的正常朊病毒蛋白，这样获得劣种朊病毒蛋白的特异性。样品中的任何劣种朊病毒蛋白对蛋白酶消化的抵抗性更高，并存留下来，而且随后可通过 Platelia™ 测定对其进行检测。在此实验中，我们证明了一种可替代样品蛋白酶消化的方法。应用设定好的条件，在此条件下溶液中生物素化戊聚糖聚硫酸酯可特异性地与样品中的劣种朊病毒蛋白结合。然后应用链霉抗生物素蛋白超顺磁珠俘获劣种朊病毒/戊聚糖聚硫酸酯复合物。冲洗后，随后可洗脱此劣种朊病毒蛋白，并在免疫测定中对其进行检测。通过这种方案，正常朊病毒蛋白未被俘获，并被冲洗掉，因此，在免疫测定中未检测到正常朊病毒蛋白。我们证明通过应用这种技术，可准确地测定两种感染 BSE 牛脑中的劣种朊病毒蛋白，而且在两种正常牛脑中未观察到任何信号。

实施例 2: 应用固定的生物素化戊聚糖聚硫酸酯分离正常朊病毒和劣种朊病毒蛋白

介绍

应用标准化学方法, 将生物素与戊聚糖聚硫酸酯缀合。使用这种生物素化戊聚糖聚硫酸酯包被链霉抗生物素蛋白衍化的超顺磁珠。然后应用包被的珠特异地俘获脑均浆中的劣种朊病毒蛋白。随后, 从这些珠上洗脱俘获的劣种朊病毒蛋白, 并应用基于免疫的 Bio-Rad Platelia™ BSE 检测试剂盒对其进行检测; 此试剂盒不能区别正常和劣种朊病毒蛋白, 并可给出两种蛋白的信号。对一组 3 种感染 BSE 和 3 种未感染牛脑进行研究, 并用于证明在所述的特殊条件下, 戊聚糖聚硫酸酯可特异地俘获这些脑均浆中的劣种朊病毒蛋白。

方法

制备包被戊聚糖聚硫酸酯的磁性珠

1、在 3 个连续的 1ml TBS (50mM Tris、150mM NaCl, pH 7.5) 中, 通过磁性俘获冲洗 600 μ l 链霉抗生物素蛋白超顺磁珠 (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415)。

2、最后在 540 μ l TBS 中再悬浮这些珠, 并加入 60 μ l 含 10mg/ml 生物素化戊聚糖聚硫酸酯的 TBS。在室温下将这些珠孵育 1 小时, 同时轻轻摇动, 以使戊聚糖聚硫酸酯包被这些珠。

3、包被后, 在 3 个连串的 1ml 5% (w/v) 牛白蛋白 (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906)、pH8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液中, 通过磁性俘获冲洗这些珠, 最后将它们再悬浮在 60 μ l 的相同缓冲液中。然后将

这些珠备用。

制备脑均浆

1、将每种 300-500mg 的脑组织加入包含研磨珠的研磨试管中，同时将这些试管装入 BSE Purification Kit (Bio-Rad) 中。在使用前抽取试剂盒内这些试管中最初装入的流体，并将其弃去。

2、将经过计算的 150mM NaCl 加入每个试管中，它可产生均化后的 50% (w/v) 脑均浆。

3、在 ribolyzer (从 Bio-Rad 购得) 上将这些试管均化 45 秒，速度设定在 6.5。

4、用 5% (w/v) 牛白蛋白、pH 8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液将此均浆稀释 5 倍。

5、将每种 45 μ l 的均浆置于分离试管中。

6、将 5 μ l 20% (w/v) SDS(十二烷基硫酸钠)(Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-5750) 加入每个试管中，并充分混合。

7、然后在每个试管中加入 450 μ l 5% (w/v) 牛白蛋白、pH 8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液，并混合。

8、然后加入 50 μ l 20% (w/v) N-月桂酰肌氨酸 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-9150)，并混合。

特异性俘获劣种朊病毒蛋白

1、将 10 μ l 制备好的包被戊聚糖聚硫酸酯的超顺磁珠加入每种稀释的脑均浆中，在室温下孵育 1 小时，同时进行摇动。

2、然后用 3 $\times$ 100 μ l TBS，通过磁性俘获冲洗每种反应物。

Rogue 朊病毒蛋白的洗脱和免疫测定

1、将来自每种反应的珠再悬浮于 10 μ l C1(与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供)中。

2、将 5 μ l 0.2% (w/v) SDS 加入每种珠悬浮液中，并混合。

3、在每种珠悬浮液中加入 5 μ l 1M 硫氰酸胍 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , G-9277)，并混合。

4、将此反应在 100℃加热 5 分钟。

5、然后加入 100 μ l R6 (与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供)，并混合。

6、然后将每种 100 μ l 的洗脱物用于 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒，并使用此试剂盒一起提供的方案和试剂。简要地，这种试剂盒包括正常和/或劣种朊病毒蛋白的免疫俘获，以及应用辣根过氧化物酶缀合抗体的免疫测定。

结果

在基于微量滴定平板的 Platelia™ 测定中进行免疫测定后，应用

ELISA 读数器，在波长 450nm 下测量每个孔中的信号。

所用的脑均浆	OD ₄₅₀
感染 BSE 的牛脑样品 1	0.465
感染 BSE 的牛脑样品 2	0.382
感染 BSE 的牛脑样品 3	0.437
正常牛脑样品 1	0.060
正常牛脑样品 2	0.074
正常牛脑样品 2	0.066

这三种含有劣种朊病毒蛋白的感染 BSE 脑均浆的信号显著高于未感染的正常脑均浆的信号。

讨论

这种 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒不能区别正常或劣种朊病毒蛋白。正常情况下，应用蛋白酶 K 进行预消化，蛋白酶 K 除去对蛋白酶敏感的正常朊病毒蛋白，这样获得劣种朊病毒蛋白的特异性。样品中的任何劣种朊病毒蛋白对蛋白酶消化的抵抗性更高，并存留下来，而且随后可通过 Platelia™ 测定对其进行检测。在此实验中，我们证明了一种可替代样品蛋白酶消化的方法。应用设定好的条件，在此条件下戊聚糖聚硫酸酯可特异性俘获与样品中的劣种朊病毒蛋白。洗脱这种俘获的劣种朊病毒蛋白，并在免疫测定中对其进行检测。正常朊病毒蛋白未被戊聚糖聚硫酸酯俘获，并被冲洗掉，因此，在免疫测定中未检测到正常朊病毒蛋白。我们证明通过应用这种技术，可准确地测定这三种感染 BSE 牛脑中的劣种朊病毒蛋白，而且在三种正常牛脑中未观察到任何信号。

实施例 3: PPS 的生物素化

此方法的原理

用糖醛酸残基取代戊聚糖硫酸酯的聚木糖主链中约十分之一的糖残基，接着用甲基酯在某些羧基上对其进行取代，因此在此分子中存在大量自由羧基，可用碳二亚胺对它们进行衍化，以形成活性的酯。接着可用氨基类对这些进行取代，以产生一种酰胺键。在这种特别的情况下，选择 EDC 和 NHS 而形成活性酯，选择生物素酰肼作为氨基类。进行两个反应，第一步反应中，最初存在生物素酰肼，没有加入任何 NHS，在第二步反应中，使 NHS/EDC 与 PS 和生物素酰肼同时反应。

材料

戊聚糖硫酸酯 (Norton Healthcare) 由 Stephen Dealler 赠送。

生物素酰肼 100mg, Pierce #21339 mw 258.33 批号 AH41461

EDC [1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺甲碘化物] Sigma #16, 534-4, 1g,

NHS [N-羟基琥珀酰亚胺] Sigma #H7377 5g mw 115.1

渗析管 mwco 3.5k Pierce #68035

DMSO Sigma

方法

应用下面两种版本的方案进行这两种反应，使用和未使用 NHS:

在玻璃瓶中，将 100mg 生物素酰肼溶解于 6ml DMSO 中，这可能需要加热和超声粉碎。因此其终浓度为 16.7mg/ml 或 65mM。取 1000mg 戊聚糖硫酸酯，将其溶解在 10ml DMSO 和水的 50/50 混合物中，这个可在一种塑料通用容器中进行。在玻璃瓶中将 100mg EDC 溶解在 1ml DMSO 中，它可能需要加热。将 NHS（约 40-50mg）溶解在 1.0 ml 水中。

在锥形底聚苯乙烯通用容器中进行此反应，在此容器的磁性搅拌器底部具有一个小的环状磁性搅拌器棒（直径约 10mm），并且还安装有一种直径 12mm（或更小）的联合 pH 电极。

实施例 3a：未使用 NHS 的反应

将 5.0ml 戊聚糖硫酸酯溶液置于反应器皿中，加入 1.0ml 生物素酰肼溶液，充分搅拌，记录 pH 值。期望 pH 值可为 7-8。加入 0.2ml EDC 溶液，在连续搅拌的同时，记录 pH 值，并且通过一个玻璃微注射器和针头加入 10 μ l 等份的 1N HCl，在每次添加后均记录 pH 值。连续加入酸，直至 pH 在 5-6 中。因为此反应产生 OH 离子，所以这是必须的。此反应物应当保持澄清，而且始终无色。如果产生一些生物素酰肼的白色沉淀，那么 DMSO 的浓度应当升高，此靶值 $\geq 50\%$ 。在室温下使反应进行 2-3 小时（或过夜，如果这样更方便）。

记录此反应混合物的终 pH 值。加入等量的 1M NaCl，将 DMSO 稀释至 25%，并替换离子性结合的酰肼，并将整个内容物转移至长度为 35cm，直径为 2.2cm 的渗析管中。注意将 DMSO 浓度降低至 25%，以避免破坏此渗析管，还应当在使用前用水试验此渗析管，以检测任何小孔，而且应当只充满至 1/3，这样可在渗析时允许膨胀。对 2L 水渗析过夜，并这样重复数次，渗析次数越多，戊聚糖硫酸酯可更强地保留碱离子，这是借助其强烈的阴电荷，通过非共价离子相互作用进行的。冻干这种渗析溶液，并记录干重量。最终产物应当是一种坚硬的白色块状物。产量可

有一些变化,但典型的是 50-60%,大部分损耗发生在渗析时,这是由于戊聚糖硫酸酯 MW 的不均匀性,以及 MW 小于 3500 的种类丢失造成的。

实施例 3b: 应用 NHS 的反应

基本上按照上面所述进行此反应,除了在加入启动反应的 EDC 试剂前加入 1.0 ml (44mg)的 NHS 外。起始 pH 值为 6~7,并应当用 1N HCl 将其调节至大约 5-6。

质量控制

计算从干燥重量的回收率后,在水中形成一种 10mg/ml 的溶液,并扫描其光谱为 200 至 400nm。峰值应当在 260 和 280nm,尽管有一个或两者都可为不清晰的肩峰。这种吸附归因于吡啶残基,它在硫酸化步骤中被加入此分子中。它们可用于,例如在色谱法过程中监测戊聚糖硫酸酯的浓度。可通过在 260nm 的 UV 吸收,或者在较低的浓度下通过 Toluidine Blue 异染试验,来监测戊聚糖。

实施例 4: 血浆中朊病毒蛋白的去除

Rogue 朊病毒蛋白的去除

1、将 100 μ l 制备好的戊聚糖聚硫酸酯包被的超顺磁珠加入新近制备的人血浆等份的两个中的一个,此血浆中掺加了 PrP^{sc}。将两个等份血浆在室温下均孵育 1 小时,同时摇动。

2、然后通过磁性俘获将这些珠从此掺料的血浆等份中除去。然后检测这种上清液以及剩余血浆等份中的劣种朊病毒蛋白。

检测掺料等份中的劣种朊病毒蛋白

1、用蛋白酶 K 处理这两种血浆等份，其处理条件是我们已指出的消化正常朊病毒蛋白，而使劣种蛋白完整保留的条件。可凭经验很容易地确定这些条件。然后应用基于免疫的 Bio-Rad Platelia™ BSE 检测试剂盒，检测这些蛋白酶 K 处理样品中的劣种朊病毒蛋白。

结果

在基于微孔板 Platelia™ 测定法中进行免疫检测后，应用 ELISA 读数器在波长 450nm 下测定每个孔中的信号。在尚未用戊聚糖聚硫酸酯处理的掺料血清样品中，可方便地检测劣种朊病毒蛋白。相反，在此试验中，戊聚糖聚硫酸酯处理的样品中没有任何信号，此表明在这种样品中没有留下任何可检测的劣种朊病毒蛋白。

讨论

此实验表明应用戊聚糖聚硫酸酯可有效地除去所研究样品中的劣种朊病毒蛋白。

实施例 5：使戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白特异性结合的去污剂条件的研究

介绍

应用标准化学方法，将生物素与戊聚糖聚硫酸酯缀合。使用这种生物素化戊聚糖聚硫酸酯包被链霉抗生物素蛋白衍化的超顺磁珠。然后应用这些包被的珠建立去污剂的条件，在此条件下戊聚糖聚硫酸酯可与劣种朊病毒蛋白结合，而不与正常细胞朊病毒蛋白结合。

方法

制备包被戊聚糖聚硫酸酯的磁性珠

1、在 3 个连串的 1ml TBS (50mM Tris、150mM NaCl, pH 7.5) 中, 通过磁性俘获冲洗 600 μ l 链霉抗生物素蛋白超顺磁珠 (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415)。

2、最后在 540 μ l TBS 中再悬浮这些珠, 并加入 5% (w/v) 牛白蛋白 (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) 和 60 μ l 含 10mg/ml 生物素化戊聚糖聚硫酸酯的 TBS。在室温下将这些珠孵育 1 小时, 同时轻轻摇动, 以使戊聚糖聚硫酸酯包被这些珠。

3、包被后, 在 3 个连串的 1ml 5% (w/v) BSA、pH8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液中, 通过磁性俘获冲洗这些珠, 最后将它们再悬浮在 60 μ l 的相同缓冲液中。然后这些珠便可使用了。

制备脑均浆

1、将每种 300-500mg 的感染 BSE 的牛脑组织和正常牛脑组织加入包含研磨珠的研磨试管中, 同时将这些试管装入 BSE Purification Kit (Bio-Rad) 中。在使用前抽取试剂盒内这些试管中最初装入的流体, 并将其弃去。

2、将经过计算的 150mM NaCl 加入每个试管中, 它可产生均化后的 50% (w/v) 脑均浆。

3、在 ribolyzer (从 Bio-Rad 购得) 上将这些试管均化 45 秒, 速

度设定在 6.5。

4、用 5% (w/v) 牛白蛋白、pH 8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液将此均浆稀释 5 倍。

5、将等份的每种 45 μ l 的均浆置于分离试管中。

6、将 5 μ l 20% (w/v) SDS(十二烷基硫酸钠)(Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-5750) 加入每个试管中, 并充分混合。

7、然后在每个等份中加入 450 μ l 5% (w/v) 牛白蛋白、pH 8.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液, 并混合。

8、然后将不同去污剂浓度的 50 μ l N-月桂酰肌氨酸(Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-9150) 加入各种等份, 并混合。一组(一个感染 BSE 的和一个未感染的脑组织) 中不加入任何 N-月桂酰肌氨酸。

俘获朊病毒蛋白

1、将 10 μ l 制备好的包被戊聚糖聚硫酸酯的超顺磁珠加入每种稀释的脑均浆中, 在室温下孵育 1 小时, 同时进行摇动。

2、然后用 3 $\times$ 100 μ l TBS, 通过磁性俘获冲洗每种反应物。

朊病毒蛋白的洗脱和免疫测定

1、将来自每种反应的珠再悬浮于 10 μ l Cl(与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供) 中。

2、将 5 μ l 0.2% (w/v) SDS 加入每种珠悬浮液中，并混合。

3、在每种珠悬浮液中加入 5 μ l 1M 硫氰酸胍 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , G-9277)，并混合。

4、将此反应在 100℃加热 5 分钟。

5、然后加入 100 μ l R6 (与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供)，并混合。

6、然后将每种 100 μ l 的洗脱物用于 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒，并使用此试剂盒一起提供的方案和试剂。简要地，这种试剂盒包括正常和/或劣种朊病毒蛋白的免疫俘获，以及应用辣根过氧化物酶缀合抗体的免疫测定。

结果

在基于微量滴定平板的 Platelia™ 测定中进行免疫测定后，应用 ELISA 读数器，在波长 450nm 下测量每个孔中的信号。

珠俘获缓冲液中 N-月桂酰肌氨酸的终浓度	所用的牛脑	OD ₄₅₀
2%	感染 BSE 的脑	0.52
2%	正常脑	0.14
1%	感染 BSE 的脑	0.33
1%	正常脑	0.13
0.5%	感染 BSE 的脑	0.45
0.5%	正常脑	0.13
0.2%	感染 BSE 的脑	0.41
0.2%	正常脑	0.09
0%	感染 BSE 的脑	0.24
0%	正常脑	0.86

在所有 N-月桂酰肌氨酸的浓度下,感染 BSE 的脑组织和正常脑组织之间存在差别。0.2% N-月桂酰肌氨酸是最佳的去污剂浓度,它可使戊聚糖聚硫酸酯结合并俘获劣种朊病毒蛋白,而不结合或俘获正常朊病毒蛋白。在没有 N-月桂酰肌氨酸的情况下,即使存在 SDS 去污剂,戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白结合和与正常朊病毒蛋白结合之间没有差异。在这些条件下戊聚糖聚硫酸酯与正常和劣种朊病毒蛋白两者都结合。

讨论

1、在这些特殊试验条件下,戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白结合的特异性有赖于 N-月桂酰肌氨酸或类似去污剂的存在。没有这种去污剂,戊聚糖聚硫酸酯与正常和劣种朊病毒蛋白两者都结合。

实施例 6: 使戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白特异性结合的 pH 条件的研究

介绍

应用标准化学方法,将生物素与戊聚糖聚硫酸酯缀合。使用这种生物素化戊聚糖聚硫酸酯包被链霉抗生物素蛋白衍化的超顺磁珠。然后应用这些包被的珠建立 pH 的条件,在此条件下戊聚糖聚硫酸酯可与劣种朊病毒蛋白结合,而不与正常细胞朊病毒蛋白结合。

方法

制备包被戊聚糖聚硫酸酯的磁性珠

1、在 3 个连串的 1ml TBS (50mM Tris、150mM NaCl, pH 7.5) 中,

通过磁性俘获冲洗 1ml 等份链霉抗生物素蛋白超顺磁珠 (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415)。

2、最后在 1ml TBS 中再悬浮每等份的珠，并加入 5% (w/v) 牛白蛋白 (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) 和 100 μ l 含 10mg/ml 生物素化戊聚糖聚硫酸酯的 TBS。在室温下将这些珠孵育 1 小时，同时轻轻摇动，以使戊聚糖聚硫酸酯包被这些珠。

3、包被后，在 3 个连串的 1ml 5% (w/v) BSA、pH8.4 的 50mM Tris 缓冲液中，通过磁性俘获冲洗每等份的珠。

4、然后将此等份的珠再悬浮在 pH5.7、7.5、8.4 和 9.6 的缓冲液中，这些缓冲液均含有 5% (w/v) BSA。

在不同 pH 的缓冲液中制备脑均浆

1、将每种 300-500mg 的感染 BSE 的牛脑组织和正常牛脑组织加入包含研磨珠的研磨试管中，同时将这些试管装入 BSE Purification Kit (Bio-Rad) 中。在使用前抽取试剂盒内这些试管中最初装入的流体，并将其弃去。

2、将经过计算的 150mM NaCl 加入每个试管中，它可产生均化后的 50% (w/v) 脑均浆。

3、在 ribolyzer (从 Bio-Rad 购得) 上将这些试管均化 45 秒，速度设定在 6.5。

4、在均含有 5% (w/v) BSA，pH 为 5.7、7.5、8.4 和 9.6 的缓冲液中，将 50 μ l 的每种均浆稀释 5 倍。

5、将每种稀释的 45 μ l 的均浆置于分离试管中。

6、将 5 μ l 20% (w/v) SDS(十二烷基硫酸钠)(Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-5750) 加入每个试管中, 并充分混合。

7、然后在每个中加入 450 μ l 与起始稀释缓冲液 pH 相同的缓冲液, 它们均含有 5% (w/v) 牛白蛋白, 并混合。

8、然后加入 50 μ l 20%N-月桂酰肌氨酸 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , L-9150), 并混合。

脑均浆的珠俘获

1、将在相应 pH 值的缓冲液中的 10 μ l 制备好的包被戊聚糖聚硫酸酯的超顺磁珠加入每种稀释的脑均浆中, 在室温下孵育 1 小时, 同时进行摇动。

2、然后用 3 $\times$ 100 μ l TBS, 通过磁性俘获冲洗每种反应物。

劣种朊病毒蛋白的洗脱和免疫测定

1、将来自每种反应的珠再悬浮于 10 μ l Cl(与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供) 中。

2、将 5 μ l 0.2% (w/v) SDS 加入每种珠悬浮液中, 并混合。

3、在每种珠悬浮液中加入 5 μ l 1M 硫氰酸胍 (Sigma-Aldrich Company Ltd. , G-9277), 并混合。

4、将此反应在 100℃加热 5 分钟。

5、然后加入 100μl R6（与 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒一起提供），并混合。

6、然后将每种 100μl 的洗脱物用于 Bio-Rad 的 Platelia™ BSE 检测试剂盒，并使用此试剂盒一起提供的方案和试剂。简要地，这种试剂盒包括正常和/或劣种朊病毒蛋白的免疫俘获，以及应用辣根过氧化物酶缀合抗体的免疫测定。

结果

在基于微量滴定平板的 Platelia™ 测定中进行免疫测定后，应用 ELISA 读数器，在波长 450nm 下测量每个孔中的信号。

所用缓冲液的 pH 值	所用的牛脑	OD ₄₅₀
5.7	感染 BSE 的脑	0.79
5.7	正常脑	0.30
7.5	感染 BSE 的脑	1.57
7.5	正常脑	1.25
8.4	感染 BSE 的脑	0.42
8.4	正常脑	0.04
9.6	感染 BSE 的脑	0.08
9.6	正常脑	0.04

PH 为 7.5 和更低时，此包被戊聚糖聚硫酸酯的珠可与正常和劣种朊病毒蛋白都结合。PH 为 9.6 和更高时，此包被戊聚糖聚硫酸酯的珠不能与这两种形式的朊病毒蛋白结合。PH 为 8.4 时，此包被戊聚糖聚硫酸酯的珠俘获劣种朊病毒蛋白，但不俘获正常朊病毒蛋白。在这种 pH 下，此戊聚糖聚硫酸酯显示出与劣种朊病毒蛋白结合的特异性。

讨论

在此试验条件下，戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白结合的特异性有赖于 pH。PH 为 8.4 时，戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白结合，但不能与正常朊病毒蛋白结合。PH 为 7.5 和更低时，戊聚糖聚硫酸酯可与正常和劣种朊病毒蛋白两者都结合，而 PH 为 9.6 和更高时，戊聚糖聚硫酸酯不能与劣种或正常朊病毒蛋白结合。因此，为了在这些条件下使戊聚糖聚硫酸酯与劣种朊病毒蛋白特异性结合，所应用的 pH 值应当接近 8.4。

实施例 7：应用竞争性较低电荷密度聚阴离子将 PrP^{res} (PrP^{Sc}) 特异性俘获至高电荷密度聚阴离子配体，以选择性抑制 PrP^{C} 的结合的论证

背景技术

PrP 可结合于固定的聚阴离子。俘获缓冲液中无竞争性聚阴离子存在的情况下， PrP^{res} 和 PrP^{Sc} 均可被俘获。通过在俘获缓冲液中包括一种聚阴离子，其电荷密度低于俘获聚阴离子的电荷密度，这样可获得特异性的 PrP^{res} 俘获。在此实施例中，葡聚糖硫酸酯用作高电荷密度俘获聚阴离子，N-月桂酰肌氨酸（它形成多分子去污剂胶束）和戊聚糖聚硫酸酯或岩藻依聚糖用作较弱电荷密度竞争聚阴离子。

方法

1、按照标准步骤，用葡聚糖硫酸酯（500000 mwt）包被 Maxisorp 微量滴定孔。

2、将 100 μl 含有 1mg 脑组织、pH 8.3 的 50mM Tris、1% (w/v) BSA、1% (v/v) Triton X-100 的脑均浆加入此包被的孔中。在某些情况下，

这种俘获缓冲液也可含有 1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸、岩藻依聚糖、葡聚糖硫酸酯或各种浓度的戊聚糖聚硫酸酯。

3、孵育 2 小时，以进行朊病毒蛋白的俘获，然后用 50mM Tris pH 8.3、1% (w/v) BSA、1% (v/v) Triton X-100 将此孔冲洗 3 遍。

4. 然后用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍。

5、将 100 μ l 5M 硫氰酸胍加入每个孔中，并在 4℃ 孵育 5 分钟。

6、用 PBS 将孔冲洗 3 遍，然后应用 Bio-rad Platelia™ BSE 检测试剂盒的抗朊病毒蛋白缀合物，按照此试剂盒的方案，检测俘获的朊病毒蛋白。

7、在 OD450 下，在 ELISA 读数器中测定显影的信号。

结果

所用的竞争性聚阴离子	感染 BSE 或正常的脑	OD ₄₅₀
无	感染 BSE 的脑	0.10
无	正常脑	0.15
1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸	感染 BSE 的脑	0.95
1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸	正常脑	0.03
1mg/ml 戊聚糖聚硫酸酯	感染 BSE 的脑	0.26
1mg/ml 戊聚糖聚硫酸酯	正常脑	0.03
0.1mg/ml 戊聚糖聚硫酸酯	感染 BSE 的脑	0.14
0.1mg/ml 戊聚糖聚硫酸酯	正常脑	0.07
1mg/ml 岩藻依聚糖	感染 BSE 的脑	0.13
1mg/ml 岩藻依聚糖	正常脑	0.03
1mg/ml 葡聚糖硫酸酯	感染 BSE 的脑	0.02
1mg/ml 葡聚糖硫酸酯	正常脑	0.03

讨论

在俘获缓冲液中没有竞争性聚阴离子存在的情况下，所有信号较低，而且感染脑或正常脑的信号没有差别，即不存在 PrP^{res} 的特异性俘获。但是，在俘获缓冲液中包括一种竞争性聚阴离子后，感染脑的信号则得到提高，而相应正常或未感染脑的信号却被抑制。在这个实施例中，在俘获缓冲液中应用 1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸，感染脑和正常脑之间则可获得最佳的区别。另外，应用岩藻依聚糖或戊聚糖聚硫酸酯也可获得感染脑和正常脑之间的区别。应用戊聚糖聚硫酸酯时，通过将俘获缓冲液中竞争性聚阴离子戊聚糖聚硫酸酯的浓度从 0.1 提高到 1 mg/ml，则可增大这种区别。比较而言，如果俘获缓冲液中包括葡聚糖硫酸酯，则如所期望的那样，此信号被降低到背景值，因为它竞争并抑制 PrP 与固定的葡聚糖硫酸酯结合。

实施例 8：将 PrP^{res} 特异性俘获至高电荷密度聚阴离子包被表面的论证

背景技术

在这个实验中，证明可将 PrP^{res} 特异性俘获至一种聚阴离子表面。在此实例中，所提供的表面为衍化的马来酸酐聚苯乙烯。对照物为不带电的 polysorp 和 maxisorp 孔。在其它实验中，已证明可用聚阴离子葡聚糖硫酸酯衍化这些不带电的表面，然后它们可结合 PrP^{res}。

方法

1、在室温下，用 TBS 5% (w/v) BSA 将马来酸酐活化的聚苯乙烯微量平板孔 (Perbio Science UK Ltd., Cheshire) 衍化 60 分钟。这样

在这种塑料上产生一种羧基带电表面（参见产品文献）。也研究作为不带电对照物的 polysorp 和 maxisorp 孔 (Nunc)。另外，按照实施例 9 中所述的步骤，也用聚阴离子葡聚糖硫酸酯配体包被 maxisorp 孔。

2、将 100 μ l 脑均浆加入此孔中，其中脑均浆在 50mM Tris pH 8.3、1% (w/v) BSA、1% (v/v) Triton X-100、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸中含有 1mg 感染或未感染的脑组织。

3、孵育 2 小时，以俘获朊病毒，然后用 50 mM Tris pH 8.3、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸将这些孔冲洗 3 遍。

4、然后用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍。

5、在每个孔中加入 100 μ l 5M 硫氰酸胍，并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 5 分钟。

6、用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍，然后应用 Bio-Rad PlateliaTM BSE-检测试剂盒的抗朊病毒缀合物，按照此试剂盒中的方案检测俘获的朊病毒。

7、在 OD450 下，在 ELISA 读数器中测定增强的信号。

结果

所用孔的类型	感染 BSE 或正常的脑	OD ₄₅₀
阴离子	感染 BSE 的脑	0.2
阴离子	正常脑	0.03
Polysorp	感染 BSE 的脑	0.05
Polysorp	正常脑	0.03
Maxisorp	感染 BSE 的脑	0.02
Maxisorp	正常脑	0.02
用葡聚糖硫酸酯包被的 Maxisorp	感染 BSE 的脑	1.0
用葡聚糖硫酸酯包被的 Maxisorp	正常脑	0.02

讨论

在本实验所用的条件下，此阴离子聚苯乙烯表面特异性俘获 PrP^{res}。不带电塑料没有这种作用，除非用聚阴离子配体包被它。

实施例 9：在阴性样品中稀释阳性脑样品的作用的研究

材料

阳性样品：已知 PrP^{Sc} 阳性脑均浆的 25% 悬浮液

阴性样品：已知 PrP^{Sc} 阴性脑均浆的 25% 悬浮液

制备

按照下面包被方案包被 Maxisorb 平板。在 pH7.4 的碳酸盐缓冲液中，将 1mg 溴化己二甲胺包被在这些平板上，并使其过夜后，用 PBS 冲洗 3 遍。然后用含 1mg 葡聚糖硫酸酯的 PBS 包被这些平板，6 小时后，用 PBS 将这些平板冲洗 3 遍，然后通过加入 400 μ l 5% BSA 溶液并保持 30 分钟，用 5% BSA 将其封阻。然后用 PBS 将这些平板冲洗 3 遍，并使其干燥。

样品制备

在阴性脑中稀释样品的制备

样品	方法
纯 阳性	40 μ l 阳性样品
1/5	8 μ l 阳性样品+32 μ l 阴性样品
1/10	5 μ l 阳性样品+45 μ l 阴性样品
1/100	6 μ l 稀释 1/10 的阳性样品+54 μ l 阴性样品
1/250	20 μ l 稀释 1/100 的阳性样品+30 μ l 阴性样品
1/1000	10 μ l 稀释 1/250 的阳性样品+30 μ l 阴性样品
纯 阴性	25 μ l 阴性样品

在水中稀释样品的制备

样品	方法
纯 阳性	40 μ l 阳性样品
1/5	8 μ l 阳性样品+32 μ l 水
1/10	5 μ l 阳性样品+45 μ l 水
1/100	6 μ l 稀释 1/10 的阳性样品+54 μ l 水
1/250	20 μ l 稀释 1/100 的阳性样品+30 μ l 水
1/1000	10 μ l 稀释 1/250 的阳性样品+30 μ l 水

进行测定前样品的制备

将 40 μ l 样品与 60 μ l 水和 25 μ l 俘获缓冲液混合,此缓冲液含 pH 8.4 的 Tris 250 mM, 5% BSA, 5% Triton X-100, 5% Sarkosyl, 1.25 mg/ml 胰蛋白酶。

按照下面的测定方案进行测定:

- 1、将 100 μ l 样品加至平板上，并在室温下孵育 120 分钟。
- 2、用 50mM Tris pH8.4+1% Sarkosyl 冲洗 3 遍，并用 PBS 冲洗 3 遍。
- 3、加入 100 μ l 含 4M GuSCN 的 20%PEG，并在 2-8℃孵育 10 分钟。
- 4、用 PBS 冲洗 3 遍。
- 5、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™ 酶抗体缀合物，并在 2-8℃孵育 60 分钟。
- 6、用 Bio-Rad Platelia™ 洗涤剂冲洗 5 遍。
- 7、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™ 底物，并在黑暗中孵育 30 分钟。
- 8、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™ 终止溶液，并读数。

平板布置图

	1	1
A	纯 阳性	1/10 在水中
B	1/5 在阴性脑中	1/100 在水中
C	1/10 在阴性脑中	1/250 在水中
D	1/100 在阴性脑中	1/1000 在水中
E	1/250 在阴性脑中	
F	1/1000 在阴性脑中	
G	纯 阴性	
H	1/5 在水中	

所得结果如下:

在阴性脑组织中稀释 10mg 脑均浆

样品标签	阴性脑的量 mg	阳性脑的量 mg	稀释因子	OD
纯 阳性	0.00	10.00	1	4
1/5	8.00	2.00	5	1.992
1/10	9.00	1.00	10	1.252
1/100	9.90	0.10	100	0.175
1/250	9.96	0.04	250	0.077
1/1000	9.99	0.01	1000	0.039
纯 阴性	10.00	0.00	0	0.021

在水中稀释 10mg 脑均浆

样品标签	阴性脑的量 mg	阳性脑的量 mg	稀释因子	OD
纯 阳性	0.00	10.00	1	4
1/5	0.00	2.00	5	2.377
1/10	0.00	1.00	10	1.395
1/100	0.00	0.10	100	0.145
1/250	0.00	0.04	250	0.053
1/1000	0.00	0.01	1000	0.016

总结

阳性脑的量 mg	OD	
	在阴性脑中稀释	在水中稀释
10.00	4	4
2.00	1.992	2.377
1.00	1.252	1.395
0.10	0.175	0.145
0.04	0.077	0.053
0.01	0.039	0.016
0.00	0.021	-----

附图 1 是这些结果的图示，它显示分别用水和阴性脑组织稀释阳性脑组织的稀释曲线。这两个曲线基本上是相同的，表明阴性脑组织材料的存在未干扰此测定。

实施例 10: 阿耳茨海默脑中的聚集 τ 蛋白和正常年龄相当对照物的俘获

我们已表明，在设定的条件下，不同选择性俘获剂对聚集的病原性朊病毒蛋白是特异的，这样不会俘获正常未聚集朊病毒。这种聚集的朊病毒蛋白具有一种伸展的 β -折叠片结构，而正常的朊病毒在结构上大部分为 α 螺旋。这个实施例表明其它聚集的 β -折叠片蛋白，诸如阿耳茨海默病中发现的 τ 聚集体可类似地被选择性俘获。

方法

1、在蒸馏水中制备阿耳茨海默病脑组织和年龄相当对照脑组织的 25% (w/v) 的脑均浆。

2、在俘获缓冲液 (50mM Tris pH 8.4、1% (v/v) Triton X-100、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸、1% (w/v) BSA) 中将 4 μ l 脑均浆制成 100 μ l。

3、在含有 25 μ g 胰蛋白酶的俘获缓冲液中，将 25 μ l 脑均浆制成 100 μ l。

4、将按照上面步骤 2 和 3 制备的双份 100 μ l 等份脑均浆加入葡聚糖硫酸酯包被的微量滴定孔中，并在室温下孵育 2 小时。

5、然后用 50mM Tris pH 8.4、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸将这些孔冲洗 3 遍。

6、用一种在 PBS 0.1% (v/v) Tween20 中的抗 τ 单克隆抗体孵育这些样品。

7、在室温下 1 小时后，用 PBS 0.1% (v/v) Tween20 将这些孔冲洗 3 遍。

8、按照标准步骤，用一种抗鼠 IgG 辣根过氧化物缀合物检测固定的主要抗体。

结果

抗 τ 抗体的结果

脑组织	1mg 脑组织 无胰蛋白酶	10mg 有胰蛋白酶
阿耳茨海默病 1	1.32	1.26
阿耳茨海默病 2	0.85	0.62
对照 1	0.56	0.20
对照 2	0.97	0.51

讨论

已知大部分老年个体的脑组织含有聚集 τ 蛋白，但在阿耳茨海默病中这些聚集体比年龄相当的对照者更多。在这里，选择性俘获剂俘获这些聚集体。在本实施例中，胰蛋白酶的消化作用减少了此蛋白的结合，并降低了信号，但在这些条件下，不能将其降低至背景值。在阿耳茨海默病中，胰蛋白酶处理后信号与未处理的信号的比率比对照更高。这提示，与年龄相当的对照者相比，阿耳茨海默病的脑组织中存在更多的抵

抗蛋白酶的 τ 蛋白聚集体。

实施例 11: 在 PrP^{Sc} 阳性样品上滴定胰蛋白酶的作用

方法

包被葡聚糖硫酸酯的平板:

将 1mg 溴化己二甲胺 (溴化己二甲胺) (100 μ l 在 pH 7.4 碳酸盐缓冲液中含 10mg/ml) 包被在 Maxisorb 平板上, 在室温下使其过夜。

然后用 PBS 将每个平板冲洗 3 遍, 并用 1mg 葡聚糖硫酸酯 (MW500000) (在 pH 8.6 的 Tris 缓冲液中含 10mg/ml) 包被这些平板, 并在室温下保持 4 小时。

然后用 PBS 将这些平板冲洗 3 遍, 然后用 300 μ l 含 5% BSA 溶液的 TBS 封阻, 并在室温下保持 30 分钟。

然后用 PBS 将平板冲洗 3 遍。

俘获缓冲液

pH8.4 的 250mM Tris 缓冲液, 它含有 5% BSA、5% Sarkosyl、5% Triton。

样品

按照以下处理弱和强阳性的脑 BI63 和 SV10 (25%均浆), 以提供用于测定的样品。

25 μ l 脑均浆+25 μ l 俘获缓冲液+65 μ l 水, 此缓冲液含 250 mM Tris pH 8.4、5% BSA、5% Triton X-100、5% Sarkosyl。

将 10 μ l 不同浓度的胰蛋白酶加入样品中。

冲洗缓冲液

50mM Tris pH8.4 +1%Sarkosyl

方法

测定方案

- 1、将 100 μ l 样品加至平板上, 并在室温下孵育 120 分钟。
- 2、用 50mM Tris pH8.4 +1%Sarkosyl 冲洗 3 遍, 并用 PBS 冲洗 3 遍。
- 3、加入 100 μ l 4MGuSCN (在 20% PEG 中), 在 2-8℃孵育 10 分钟。
- 4、用 PBS 冲洗 3 遍。
- 5、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™酶抗体缀合物, 并在 2-8℃孵育 60 分钟。
- 6、用 Bio-Rad Platelia™洗涤剂冲洗 5 遍。
- 7、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™底物, 并在黑暗中孵育 30 分钟。

8、加入 100 μ l Bio-Rad Platelia™ 终止溶液，并读数。

结果

5mg 阳性脑 Bi63

胰蛋白酶 (μ g)	OD
1000	0.135
100	0.14
25	0.169
10	0.173
1	0.068
0	0.068

5mg 阳性脑 SV10

胰蛋白酶 (μ g)	OD
25	2.858
0	0.894

结论

胰蛋白酶的存在似乎可增强此信号。还有，似乎所用胰蛋白酶的浓度范围可以宽泛，这对测定没有不良的影响。

实施例 12：通过聚阳离子对 PrP^{Sc} 特异性结合的论证

方法

本实施例证明应用不同的聚阳离子进行 PrP^{Sc} 的特异性结合。或者将此配体被动地包被在聚苯乙烯微量平板上，或者适当地，主动地将其包被在马来酸酐平板上（即结合）。

选择性结合剂固定

在 16-25℃，以浓度为 10μg/ml，将所有选择性结合剂固定在 pH 9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液中，过夜。固定后，用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍，然后用含 5% (w/v) BSA 的 PBS 封阻 30 分钟。封阻后，在使用前用 PBS 将这些孔冲洗 2 遍。将 PAMA 树突状聚合物 starbust、聚 L-赖氨酸和聚乙烯亚胺包被在 Maxisorp 和马来酸酐微量平板两者上，而将 polybreen 和 pDADMAC 只包被在 Maxisorp 板上。

PrP^{Sc} 的俘获

1、按照市售规定的方案，在蒸馏水中均化感染 BSE 牛脑和未感染牛脑。

2、在总量为 100μl 的 50mM Tris pH8.3、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸、1% (v/v) Triton X-100、1% (w/v) BSA、0.5mg/ml 胰蛋白酶(猪胰腺)中，于包被配体的孔中俘获 0.5 mg 均化脑组织。

3、在 18-25℃俘获 2 小时后，用 50mM Tris pH 8.3、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸将这些孔冲洗 3 遍。

4、然后用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍，并在 4-8℃，用 100μl 4M 硫氰酸胍、20% PEG 8000 将这些孔孵育 10 分钟。

5、用 PBS 冲洗这些孔 3 遍，然后用一种抗朊病毒单克隆抗体辣根

过氧化物缀合物孵育这些孔。

6、60 分钟后，用 PBS，0.1% (v/v) Tween20 将这些孔冲洗 5 遍，并加入 100 μ l TMB 底物。

7、30 分钟后，测定每个反应的 OD450，并记录（见下表）。

结果

结合剂	被动吸附		主动吸附	
	阳性	阴性	阳性	阴性
PAMA 树突状聚合物 starburst	0.938	0.030	0.097	0.026
Polybreen	0.019	0.016	ND	ND
聚 L-赖氨酸	0.070	0.017	0.001	0.001
pDADMAC*	1.828	0.037	ND	ND
聚乙烯亚胺	0.118	0.030	0.402	0.055

* Aldrich 40903-0-mw 400,000-500,000

讨论

当将 pDADMAC 和 PAMA 树突状聚合物 starburst 聚阳离子被动地包被在聚苯乙烯微量平板上时，它们很好地充当了 PrP^{Sc} 特异性配体。在这一系列结合剂中 pDADMAC 作用最佳。当将聚乙烯亚胺固定在马来酸酐微量平板上时，它通过氨基发挥一定程度的作用。

这个实验表明，在给定的俘获缓冲液条件下，不同聚阳离子可用于特异性俘获感染脑组织中的 PrP^{Sc}。可将这些结合剂被动或主动地固定在聚乙烯亚胺表面。其它实验已经表明，在俘获缓冲液中具有 1% (w/v)

N-月桂酰肌氨酸时,可获得 20mg 阳性脑组织的最大信号;没有 N-月桂酰肌氨酸时,此信号减小。这表明在规定的缓冲条件下这些俘获剂作用最佳。

实施例 13: 通过聚阳离子结合剂,俘获阿耳茨海默病脑组织和正常年龄相当对照物中的聚集 β 淀粉状蛋白和 τ 蛋白

背景技术

在规定的条件下,已显示出 pDADMAC 可特异地俘获聚集的病原性朊病毒蛋白;而正常非聚集朊病毒未被俘获。这种聚集的朊病毒蛋白具有一种伸展的 β -折叠片结构,而正常的朊病毒在结构上大部分为 α 螺旋。假定此结合剂可识别其它聚集的 β -折叠片蛋白,诸如阿耳茨海默病中发现的 β -淀粉状蛋白和 τ 蛋白聚集体。进行下面的实验,以研究此假说。

方法

1、在蒸馏水中制备阿耳茨海默病脑组织和年龄相当对照脑组织的 25% (w/v) 的脑均浆。

2、在俘获缓冲液 (50mM Tris pH 8.4、1% (v/v) Triton X-100、1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸、1% (w/v) BSA) 中将 80 μ l 脑均浆制成 100 μ l, 并将其加至包被聚阳离子的微孔 (通过用聚(氯化二烯丙基二甲铵) (pDADMAC) 包被这些孔而形成, (Aldrich Chemical Company Inc., 产品目录号 40,903-0)) 上。

3、在室温下孵育 2 小时后,用 50mM Tris pH 8.4, 1% (w/v) N-月桂酰肌氨酸将这些孔冲洗 3 遍,然后用一种在 PBS 0.1% (v/v) Tween20 中的抗 τ 单克隆抗体进行孵育。

- 4、在室温下 1 小时后，用 PBS 0.1% (v/v) Tween20 将这些孔冲洗 3 遍。
- 5、按照标准步骤，用抗鼠 IgG 辣根过氧化物缀合物检测固定的主要抗体。

结果

脑组织	脑库分类	OD450
67/97	阳性	1.85
73/97	阳性	0.80
163/97	阳性	0.61
149/97	阳性	0.45
97/97	阴性	0.05
98/98	阴性	0.08

讨论

这些聚阳离子结合剂可俘获 τ 聚集体。当用抗 τ 抗体检测俘获的 τ 蛋白时，阿耳茨海默病的脑组织的阳性信号均高，而阴性对照脑组织则为低的阴性信号。总之，在指定条件下用聚阳离子进行俘获，可将阿耳茨海默病脑组织和未患病的脑组织区分开。

实施例 14：不同蛋白酶和 DNase 对 pDADMAC 俘获 PrP^{Sc} 的基质抑制的影响

背景技术

研究不同蛋白酶对俘获 PrP^{Sc} 效力的影响，此俘获是将 PrP^{Sc} 俘获在

聚阳离子包被的平板（通过用聚（氯化二烯丙基二甲铵）（pDADMAC）包被这些孔而形成，（Aldrich Chemical Company Inc.，产品目录号 40,903-0））上。

方法

- 1、加入 20 μ l 俘获缓冲液（250mM Tris pH 8.3、5%（v/v）Triton X-100、5%（w/v）N-月桂酰肌氨酸、5%（w/v）BSA），将 80 μ l 脑均浆制成 100 μ l，此缓冲液中含有不同的蛋白酶和/或 DNase。
- 2、然后将这些均浆加至聚阳离子包被的微孔上。
- 3、在室温下孵育 2 小时后，用 PBS 将这些孔冲洗 6 遍。
- 4、将 100 μ l 4M 硫氰酸胍、20%（w/v）PEG 加至每个孔中。
- 5、在室温下孵育 10 分钟后，用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍。
- 6、加入 100 μ l 抗朊病毒蛋白辣根过氧化物缀合物（在 PBS 0.1%（v/v）Tween 20 和 5%（w/v）BSA 中稀释为 1:1500）。
- 7、在室温下 1 小时后，用 PBS 0.1%（v/v）Tween20 将这些孔冲洗 5 遍。
- 8、按照标准方案，用 TMB 溶液检测固定的缀合物。

结果

评价俘获缓冲液中糜蛋白酶、胰蛋白酶、DNase 和蛋白酶 K 的作用

所用的蛋白酶或 DNase	感染的牛脑组织
无蛋白酶或 DNase	0.122
糜蛋白酶/胰蛋白酶 (浓度均为 6.25mg/ml)	0.139
DNase/胰蛋白酶 (DNase 浓度 1mg/ml, 胰蛋白酶浓度 6.25mg/ml)	0.639
糜蛋白酶/DNase (DNase 浓度 1mg/ml, 糜蛋白酶浓度 6.25mg/ml)	0.616
糜蛋白酶/DNase/胰蛋白酶 (DNase 浓度 1mg/ml, 糜蛋白酶和胰蛋白酶浓度均为 6.25mg/ml)	0.460
胰蛋白酶 (浓度为 6.25mg/ml)	0.568
糜蛋白酶 (浓度为 6.25mg/ml)	0.171
DNase (浓度为 1mg/ml)	0.180
蛋白酶 K (浓度为 1mg/ml)	0.531
链霉蛋白酶 (浓度为 1.25mg/ml)	0.222
链霉蛋白酶 (浓度为 6.25mg/ml)	0.178

滴定俘获缓冲液中胰蛋白酶和糜蛋白酶的浓度

所用的蛋白酶	感染的牛脑组织
胰蛋白酶 6.25mg/ml	0.732
胰蛋白酶 1.25mg/ml	0.726
糜蛋白酶 3.125mg/ml	0.568
糜蛋白酶 0.625mg/ml	0.433

讨论

已证明, 在某些条件下聚阳离子配体可特异性地结合 PrP^{Sc}。但是, 脑均浆的构成产生的基质作用可减小此信号, 这种基质作用可干扰结

合，并减小信号。应用蛋白酶可减小这种基质作用，并增大感染脑组织中的信号。此研究表明胰蛋白酶、糜蛋白酶和蛋白酶 K 在去除基质抑制方面是有效的；链霉蛋白酶（在研究的浓度下）的有效性较低。浓度 6.25-1.15 mg/ml 的胰蛋白酶，其有效性是相等的；而随着浓度升高，糜蛋白酶的有效性则更高。在去除基质抑制方面，DNase 具有可论证的作用，但此作用较小。

实施例 15: pH 和盐对 pDADMAC 俘获朊病毒蛋白的影响

背景技术

研究 pH 和盐浓度对俘获 PrP^{Sc} 效力的影响，此俘获是将 PrP^{Sc} 俘获在聚阳离子包被的平板（通过用聚（氯化二烯丙基二甲铵）（pDADMAC）包被这些孔而形成，（Aldrich Chemical Company Inc.，产品目录号 40,903-0））上。

方法

1、加入 20 μ l 俘获缓冲液（250mM Tris，pH 见表、5% (v/v) Triton X-100、5% (w/v) N-月桂酰肌氨酸、5% (w/v) BSA 和 6.25mg/ml 胰蛋白酶），将 80 μ l 脑均浆制成 100 μ l，此缓冲液中含有不同浓度的盐，且被调节至不同的 pH。

2、然后将这些均浆加至聚阳离子包被的微孔上。

3、在室温下孵育 2 小时后，用 PBS 将这些孔冲洗 6 遍。

4、将 100 μ l 4M 硫氰酸胍、20% (w/v) PEG 加至每个孔中。

5、在室温下孵育 10 分钟后，用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍。

6、加入 100 μ l 抗朊病毒蛋白辣根过氧化物缀合物（在 PBS 0.1% (v/v) Tween 20 和 5% (w/v) BSA 中稀释为 1:1500）。

7、在室温下 1 小时后，用 PBS 0.1% (v/v) Tween20 将这些孔冲洗 5 遍。

8、按照标准方案，用 TMB 溶液检测固定的缀合物，并测定此反应的 OD450。

结果

pH 的影响

俘获缓冲液 pH 值	感染的牛脑组织	阴性的牛脑组织
5	0.177	0.119
6	0.082	0.1
7	0.093	0.045
8.4	0.226	0.039
9	0.24	0.038
10	0.25	0.037

盐的影响

俘获缓冲液	感染的牛脑组织	未感染的牛脑组织
20mM NaCl	0.476	0.038
100mM NaCl	0.361	0.039
250mM NaCl	0.191	0.028
1M NaCl	0.06	0.024

讨论

当俘获缓冲液的 pH 值下降时，未感染脑组织的信号升高，但感染脑组织的信号却下降。当 pH 值大于 8.0 时，获得最佳的阳性/阴性信号比。

当俘获缓冲液中的盐浓度升高时，感染脑的信号逐渐下降。这表明对于 PrP^{Sc} 俘获，低盐浓度或没有盐是最佳的条件。

实施例 16: 不同的 N-月桂酰肌氨酸和蛋白酶的浓度对 pDADMAC 俘获 PrP^{Sc} 的影响

背景技术

研究胰蛋白酶存在或不存在情况下，不同 N-月桂酰肌氨酸浓度对俘获 PrP^{Sc} 效力的影响，此俘获是将 PrP^{Sc} 俘获在聚阳离子包被的平板（通过用聚（氯化二烯丙基二甲铵）（pDADMAC）包被这些孔而形成，（Aldrich Chemical Company Inc.，产品目录号 40,903-0））上。

方法

1、加入 20 μ l 俘获缓冲液（250mM Tris pH8.3、5% (v/v) Triton X-100、5% (w/v) BSA），将 80 μ l 感染的脑均浆制成 100 μ l，此缓冲液中含有不同浓度的蛋白酶和 N-月桂酰肌氨酸。

2、然后将这些均浆加至聚阳离子包被的微孔上。

3、在室温下孵育 2 小时后，用 PBS 将这些孔冲洗 6 遍。

4、将 100 μ l 4M 硫氰酸胍、20% (w/v) PEG 加至每个孔中。

5、在室温下孵育 10 分钟后，用 PBS 将这些孔冲洗 3 遍。

6、加入 100 μ l 抗朊病毒蛋白辣根过氧化物缀合物（在 PBS 0.1% (v/v) Tween 20 和 5% (w/v) BSA 中稀释为 1:1500）。

7、在室温下 1 小时后，用 PBS 0.1% (v/v) Tween20 将这些孔冲洗 5 遍。

8、按照标准方案，用 TMB 溶液检测固定的缀合物。

结果

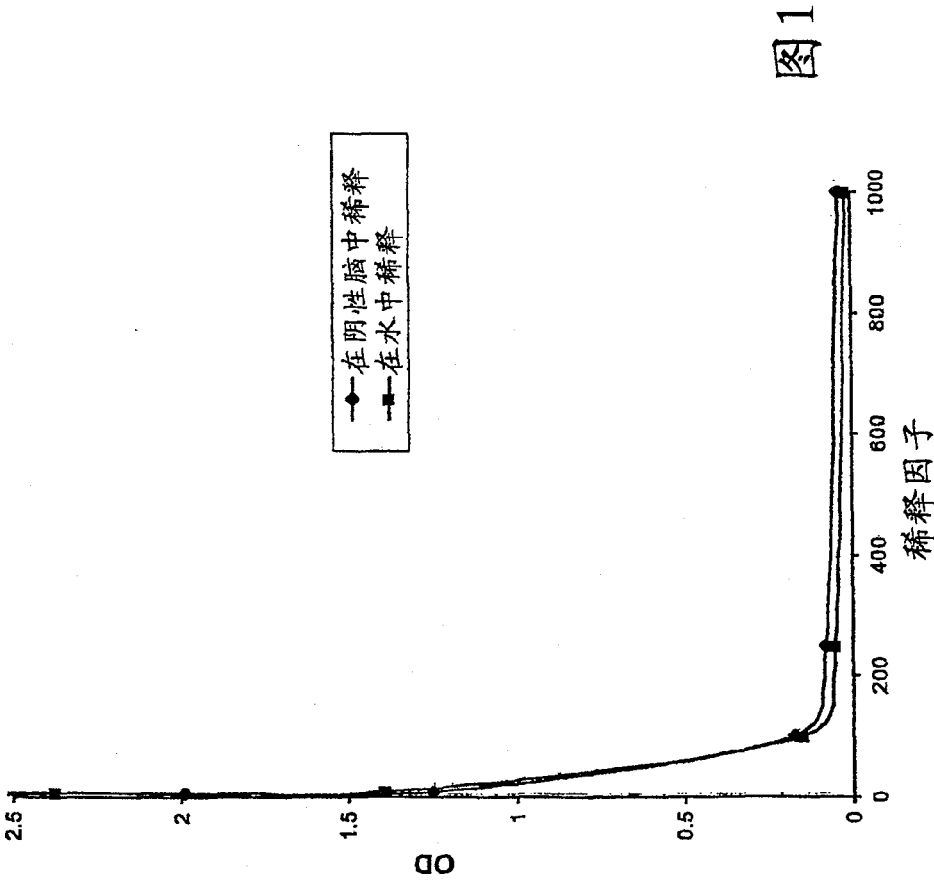
俘获缓冲液中所用的去污剂和蛋白酶	所用试剂的浓度	OD450
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	0	0.08
	1.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	2.5%	1.181
	1.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	5%	2.267
	1.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	10.0%	2.628
	1.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	0	0.171
	6.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	2.5%	2.384
	6.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	5%	2.725
	6.25mg/ml	
N-月桂酰肌氨酸 胰蛋白酶	10.0%	2.883
	6.25mg/ml	

讨论

在没有 N-月桂酰肌氨酸的情况下,具有低浓度胰蛋白酶的感染脑组织没有信号。但是,在较高浓度的胰蛋白酶下,不含 N-月桂酰肌氨酸的脑组织恢复一些信号。

尽管通过优选的实施方式对本发明进行了特别的描述,但将会理解到对本发明的许多修改和改变是可能在本发明的一般范围内。如权利要求详述的,按照相同方法产生相同结果的对本发明的任何改变是在申请人所给予的保护范围内。

在本说明书中,除非特意地另作说明,术语“或”用作运算符,当任一或两者所述的条件符合时,它返回一个真值,这与运算符“异或”相反,“异或”运算符需要只有其中一个条件符合。术语“包括”的意思是“包括”,而不是“由...组成”的意思。



专利名称(译)	病理形式朊病毒蛋白的结合		
公开(公告)号	CN100526884C	公开(公告)日	2009-08-12
申请号	CN03806690.4	申请日	2003-02-28
[标]发明人	A R 莱恩 CJ斯坦利 SM威尔森		
发明人	A·R·莱恩 C·J·斯坦利 S·M·威尔森		
IPC分类号	G01N33/68 C08B37/02 C07K1/22 C07K14/47 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2800/2828 G01N2333/968 G01N33/68 G01N33/54326 G01N33/6896 G01N33/6803		
代理人(译)	李华英		
审查员(译)	杨玲		
优先权	2002016808 2002-07-18 GB 2002029614 2002-12-19 GB 2002004797 2002-02-28 GB		
其他公开文献	CN1643381A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

在正常形式蛋白存在情况下，在选择性结合条件下应用一种聚离子结合剂，选择性地结合感染的聚集形式蛋白，诸如PrP、淀粉状蛋白和τ蛋白，所述结合剂诸如为葡聚糖硫酸酯或戊聚糖(阴离子)，或者为聚胺化合物，诸如pDADMAC(阳离子)，所述选择性结合条件包括在轻度碱性pH下应用n-月桂酰肌氨酸，然后可测定这种感染的聚集形式的蛋白。

所用的脑均浆	OD ₄₅₀
感染 BSE 的牛脑样品 1	0.229
感染 BSE 的牛脑样品 2	0.208
正常牛脑样品 1	0.061
正常牛脑样品 2	0.047