



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203119 A

(43) 申请公布日 2011.09.28

(21) 申请号 200980138401.0 *C07K 16/18*(2006.01)
(22) 申请日 2009.09.08 *C12N 15/62*(2006.01)
(30) 优先权数据 *C12Q 1/48*(2006.01)
61/100576 2008.09.26 US *G01N 33/536*(2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2011.03.25
(86) PCT申请的申请数据
PCT/CN2009/001011 2009.09.08
(87) PCT申请的公布数据
W02010/034183 EN 2010.04.01
(71) 申请人 香港大学
地址 中国香港薄扶林道
(72) 发明人 何树良 D·B·拉姆斯登 何永乐
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 李进 郭文洁
(51) Int. Cl.
C07K 7/08(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页
序列表 4 页 附图 9 页

(54) 发明名称
人儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)测定

(57) 摘要
本文公开了定量样品中儿茶酚胺-O-甲基转移酶(COMT)蛋白的量的测定(测定法),所述样品为例如来自细胞培养物、体液、组织的提取物以及环境样品。其在竞争性ELISA系统中将新型试剂(抗-NE、COMT-NE或COMT-表位-NE)与先前所述的两种试剂(抗-COMT和COMT)联合使用以实现此目的。

1. 一种分离的多肽,所述多肽包含
 - (1) 具有 TKENPRSNQEESYDDNES 的氨基酸序列的 NE- 表位,或者
 - (2) 与针对 NE- 表位的抗体结合的 NE- 表位变体,其中所述 NE- 表位变体与 NE- 表位的序列具有至少约 60% -80%、优选约 80% -90%、更优选约 90% -95%的序列同一性;或者所述 NE- 表位变体通过氨基酸序列中的一个或数个氨基酸的取代、缺失或插入衍生自 NE- 表位。
2. 权利要求 1 的多肽,所述多肽包含 NE- 表位。
3. 权利要求 1 的多肽,所述多肽还包含 COMT- 表位。
4. 权利要求 3 的多肽,所述多肽为 MB-COMT-NE。
5. 权利要求 3 的多肽,所述多肽为 S-COMT-NE。
6. 一种针对如权利要求 1 所限定的 NE- 表位或其变体的抗体。
7. 一种包括权利要求 6 的抗体的测定。
8. 一种包括权利要求 1 的多肽的测定。
9. 一种包括权利要求 2 的多肽的测定。
10. 一种包括权利要求 3 的多肽的测定。
11. 一种包括权利要求 4 的多肽的测定。
12. 一种包括权利要求 5 的多肽的测定。
13. 一种分离的多核苷酸,所述多核苷酸包含
 - (1) 编码具有 TKENPRSNQEESYDDNES 氨基酸序列的 NE- 表位的核酸序列,
 - (2) 编码与针对 NE- 表位的抗体结合的 NE- 表位变体的核酸序列,其中所述 NE- 表位变体与 NE- 表位的序列具有至少约 60% -80%、优选约 80% -90%、更优选约 90% -95%的序列同一性;或所述 NE- 表位变体通过氨基酸序列中的一个或数个氨基酸的取代、缺失或插入衍生自 NE- 表位,或者
 - (3) 以下核酸序列:其在严格条件下与(1)或(2)中限定的核酸序列杂交,并且编码与针对 NE- 表位的抗体结合的 NE- 表位变体。
14. 权利要求 13 的多核苷酸,所述多核苷酸包含编码 NE- 表位的序列。
15. 权利要求 13 的多核苷酸,所述多核苷酸还包含编码 COMT- 表位的序列。
16. 权利要求 13 的多核苷酸,所述多核苷酸包含编码 MB-COMT-NE 的序列。
17. 权利要求 13 的多核苷酸,所述多核苷酸包含编码 S-COMT-NE 的序列。
18. 一种用于检测样品中的 COMT 的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求 6 的抗体和所述抗体的使用说明书。
19. 一种用于检测样品中的 COMT 的试剂盒,所述试剂盒包含权利要求 2 的多肽和所述多肽的使用说明书。
20. 一种用于定性或定量检测样品中的儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)的方法,所述方法包括
 - a) 提供用预定量的抗-COMT 抗体包被的表面;
 - b) 使样品与所述包被表面接触,以使样品中可能存在的 COMT 结合至所述包被表面;
 - c) 使预定量的可检测标记的标准重组 COMT-NE 缀合物(S-COMT-NE)与所述包被表面接触,以结合至所述包被表面;

d) 使抗-NE 抗体与所述包被表面接触,其中当 S-COMT-NE 已预先结合至所述包被表面的抗-COMT 抗体时,抗-NE 抗体结合至 S-COMT-NE 上的 NE 表位;

e) 使所述包被表面与酶标记抗体接触,其中当抗-NE 抗体已预先结合至与抗-COMT 抗体结合的 S-COMT-NE 时,所述酶标记抗体结合至抗-NE 抗体;

f) 使所述包被表面与指示结合至所述包被表面的所述酶标记抗体的存在情况的化学酶标记指示剂接触;以及

g) 基于结合至所述包被表面的酶标记抗体的存在情况或量,确定样品中 COMT 的存在情况或样品中存在的 COMT 的量。

21. 权利要求 1-5 中任一项的分离的多肽或权利要求 6 的抗体在制备用于检测样品中的 COMT 的试剂盒中的用途。

人儿茶酚-O-甲基转移酶 (COMT) 测定

[0001] 发明背景

[0002] COMT 为存在于人体许多组织中的酶。其主要功能为使起激素和神经递质作用的肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺（儿茶酚胺）失活，从而促进从身体移除这些物质。本发明人以前已表明该酶的细胞水平由雌激素——雌二醇调节。许多化学物质（人造的和天然存在的）都可模拟或抑制雌二醇的作用。如果进入人体，这样的化学物质可导致对雌二醇正常作用的干扰，并在人生命的各个阶段都引起健康问题。这些化学物质以及影响其它激素作用和新陈代谢的其它化学物质统称为内分泌干扰物。影响雌二醇作用的化学物质很可能是内分泌干扰物中最重要的一类。它们与西方男性的精子数下降以及常见癌症例如乳腺癌和卵巢癌的成因有关。

[0003] 本发明人已表明，多氯联苯 (PCB；公认对人类健康和较大范围的环境具有极其严重的威胁) 和各种增塑剂及相关化学物质能够调节 COMT 蛋白表达水平。这些化学物质都不与雌二醇密切相关，但它们都通过与雌二醇相同的机理调节 COMT 水平 (Ho 等, 2008a, b)。因而，测定暴露于这样的化学物质的细胞中的 COMT 蛋白是对该化学物质雌激素活性的一种衡量。从未对存在于或者可能被引入环境中的大量化学物质评估过它们干扰内分泌的雌激素潜能。这是因为作为公认的内分泌干扰试验的二代大鼠试验很耗时间且非常昂贵。欧盟颁布的法规指出存在大约 30,000 种必须检验的化学物质。如上所述，COMT 蛋白测定可能提供干扰雌激素内分泌潜能的衡量。测定 COMT 蛋白的现有方法慢、工作量大，且受限于样品处理能力。例如，目前人 COMT 蛋白浓度的测定通过使用聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) / 蛋白质印迹测定法实现。SDS-PAGE 涉及使用包含丙烯酰胺和双丙烯酰胺（它们为神经毒的）以及十二烷基硫酸钠（它为肺刺激物和致敏物）的缓冲液和凝胶。尽管许多实验室使用商用预制凝胶和制备好的缓冲液，以使工作人员暴露于这些化学物质的程度最小，但是它们存在于实验室环境内，并且需要执行合适的安全规程以确保安全操作和处理。SDS-PAGE / 蛋白质印迹法耗时、繁琐、难以准确定量、相对受限于其处理样品的能力，因而也是高成本的。

[0004] 评估 COMT 浓度的备选方法为测定 COMT 活性并推断结果。这涉及利用所述酶的放射性底物，以及伴随它们的附带危险和处理污染物的难题。因此，需要一种简单、廉价并可处理很多样品的 COMT 测定法。下文所述测定法克服了这些难题，因为其易于使用、廉价并具有高样品处理能力。因此，其特别适合作为潜在雌激素内分泌干扰物的初始筛选系统。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明提供用于测定生物培养物、生物组织、生物液体和环境样品中 COMT 蛋白水平的简单、准确、廉价且快速的方法。

[0007] 本发明的其它方面为新型抗体、多肽和多核苷酸。在另外的方面，本发明提供包含可用于测定的材料的试剂盒。

[0008] 附图简述

[0009] 图 1 描述新型表位 (NE) 构建体的线性结构。

[0010] 图 2 阐述 COMT 测定的实施方案可如何进行。

[0011] 图 3 显示 COMT 测定的实施方案如何运作。该测定中的颜色强度与标准样品和未

知浓度样品中的 COMT 浓度成反比。

[0012] 图 4 提供新型表位 (NE) 的预测二级结构。

[0013] 图 5 显示通过抗 -NE 抗体和抗 -COMT 抗体检测 HEK293 细胞中的重组 MB-COMT-NE 蛋白。

[0014] 图 6 显示通过抗 -NE 抗体和抗 -COMT 抗体免疫沉淀 (IP) 和检测 HEK293 细胞中重组 MB-COMT-NE 蛋白的结果。

[0015] 图 7 显示大肠杆菌中的重组 MB-COMT-NE 蛋白的考马斯蓝蛋白染色。

[0016] 图 8 显示通过抗 -NE 抗体、抗 -COMT 抗体和抗 -GST 抗体检测重组 GST-MB-COMT-NE 蛋白。

[0017] 图 9 显示测定抗 -NE 抗体亲和结合至修饰 NE 表位的斑点印迹测定结果。还显示了保守 (类别内) 氨基酸取代的实例的表格, 可进行所述取代以产生潜在具有基本相同抗原特性 (例如结合抗 -NE- 表位) 的其它 NE- 表位变体。

[0018] 图 10 显示在 MCF-7 细胞裂解物中的 COMT 竞争性 ELISA 测定的实例。

[0019] 图 11 显示 COMT EIA 试剂盒的标准曲线的实例。

[0020] 序列简述

[0021] SEQ ID NO :1 为 18 个氨基酸的新型表位 (NE)。

[0022] SEQ ID NO :2 为用于含 BamHI 限制位点的人 S-COMT cDNA 的正向引物。

[0023] SEQ ID NO :3 为用于含 BamHI 限制位点的人 MB-COMT cDNA 的正向引物。

[0024] SEQ ID NO :4 为用于编码 NE 序列和 EcoRI 限制位点的 S-COMT 和 MB-COMT 的反向引物。

[0025] SEQ ID NO :5 为用于含 BamHI 限制位点的 COMT- 表位的正向引物。

[0026] SEQ ID NO :6 为用于 COMT- 表位并编码 NE 序列和 EcoRI 限制位点的反向引物。

[0027] SEQ ID NO :7 为人 COMT 的残基 80-98, 其为 MB- 同工型和 S- 同工型所共有。

[0028] SEQ ID NO :8 为 18 个氨基酸的新型表位 (NE) 的变体 #1。

[0029] SEQ ID NO :9 为 18 个氨基酸的新型表位 (NE) 的变体 #2。

[0030] SEQ ID NO :10 为 18 个氨基酸的新型表位 (NE) 的变体 #3。

[0031] 发明详述

[0032] COMT 为在镁 (Mg) 存在下催化甲基从辅酶 S- 腺苷 -L- 甲硫氨酸 (SAM) 转移至儿茶酚的一个羟基上的遍在酶。其正常生理作用是儿茶酚胺 (例如内分泌剂、神经递质剂和升压剂)、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素的甲基化, 而甲基化是这些化合物分解代谢的一部分。以前, 本发明人确认了人 COMT 基因的转录由雌二醇以涉及雌二醇 α - 受体的非经典方式强而有效地调节 (Xie 等, 1999 ;Jiang 等, 2003)。COMT 可能在包括雌激素诱导的癌症、帕金森病、抑郁症、精神分裂症和高血压 (Bonifácio 等, 2007 ;Tom 等, 1998 ;Lewandowski, 2007 ;Houston, 2007) 在内的不同人类病症的病理生理学中起重要。这是因为 COMT 甲基化其它底物, 例如儿茶酚雌激素 (例如致癌的 4- 羟基雌二醇)、黑色素新陈代谢中的吲哚中间体、生物异源儿茶酚 (例如致癌的类黄酮) 以及药物 (例如左旋多巴)。

[0033] 另外, COMT 的表达不仅受雌二醇的影响, 还受化学结构差异很大但具有模拟或拮抗雌二醇作用的能力的化合物的影响。在该类别中的化合物为例如多氯联苯 (PCB) 和增塑剂例如邻苯二甲酸二异己基酯以及相关化合物例如辛基苯酚 (Ho 等, 2008a, b)。此外, 应注

意到的是,人基因的转录调节通常是复杂的,且其它非雌激素物质也可能通过其它直接和间接途径来充分调节 COMT 基因的转录。在动物和人的不同生理状态下都发现 COMT 活性的改变。COMT 在肿瘤形成中可能起病因作用 (Ho 等,2008a, b ;Thompson 等,2000)。

[0034] 该测定可用于测量来自各种组织和细胞的提取物以及体液中的人 COMT 蛋白浓度。因为各种 COMT 诱导物和抑制剂 (例如异源雌激素 (xenoestrogen) 和现有药物 (例如用于治疗帕金森病的恩他卡朋 (Entacapone) 和托卡朋 (Tolcapone))) 以及作为不良事件影响 COMT 表达的药物可影响 COMT 表达,所以该测定可用于评估这样的化合物的作用。如上所述,作为环境污染物存在的多种化合物例如 PCB、增塑剂和异源雌激素影响 COMT 表达 (Ho 等,2008a, b)。因而该测定还可用于评估这样的化合物的作用。此外,环保主义者对工业污染物影响日益增加的担忧已促使欧盟通过立法 (生效于 2008 年 (REACH 法规)) 要求制造商评估其工艺中所用化学物质干扰内分泌的作用。目前,名单达到约 30,000 种化学物质。COMT 测定连同表达 COMT 和雌二醇受体的人细胞系 (例如 MCF-7 细胞) 将提供廉价的雌激素活性初筛。

[0035] 本发明人的研究使 COMT 测定以及对人 COMT 基因调节的详细研究 (Xie 等,1999 ; Jiang 等,2003) 与阐明涉及自发性帕金森病病因的因素相关联,以试图解释与女性相比该疾病发病率稍微偏向男性的原因。这已引起对使用 COMT 测定以评估内分泌干扰物潜能的可能性的认识 (Ho 等,2008a, b)。

[0036] 本发明的 ELISA 易于使用。其具有高度的特异性和灵敏度,测定内和测定间变异系数小,并且利用对人类健康风险低且容易处理的化学物质。因此,其成本效益比低。其在样品处理方面灵活,并且可用于处理少量或大量的样品。

[0037] 这实现首次获得以低成本且简单而准确地在大量样品中测量人 COMT 蛋白表达的能力。

[0038] 本发明中,设计了与任何人类蛋白均不具有同源性 (< 30%) 的新型 18 个氨基酸的肽序列 (新型表位,NE) (图 1),并将其作为蛋白检测的标记克隆至天然 COMT 中。关于测定如何运作的实例示于图 2 和图 3 中。已制备了两种抗体 (抗 -COMT 和抗 -NE) (其中一种为独特的 (抗 -NE)) 和两种蛋白 (COMT 和 COMT-NE) (其中一种为独特的 (COMT-NE))。使用 COMT-NE 的备选方式是使用 COMT- 表位 -NE。用于洗涤和显色的各种化学物质以及带有缀合至抗体的酶的第三抗体 (例如 HRP 缀合的抗 -IgG) 可购自许多供应商。它们为通常可获得的。测定的优选实施方案可使用塑料 96 孔板,其中用预定固定量的抗 -COMT 包被孔,所述抗 -COMT 结合至各个孔的底部。在 8 个孔中加入预定固定量的 COMT 和固定量的 COMT-NE,使得可从这些孔得到的结果制定标准曲线。在剩余的孔中加入固定量的 COMT-NE 和未知 COMT 浓度的样品。标准 COMT 孔显现的颜色使剩余孔中 COMT 的未知浓度得以被测定。进行测定的步骤示于图 2。显示的颜色强度与样品中的 COMT 蛋白浓度成反比 (图 3)。

[0039] 在某些实施方案中,用于定性或定量检测样品中的儿茶酚 -O- 甲基转移酶 (COMT) 的方法包括:

[0040] a) 提供带有预定量的抗 -COMT 抗体的包被表面;

[0041] b) 使样品与包被表面接触,以使样品中可能存在的 COMT 结合至包被表面;

[0042] c) 使预定量的可检测标记的标准重组 COMT-NE 缀合物 (S-COMT-NE) 与包被表面接触,以结合至包被表面;

[0043] d) 使抗-NE 抗体接触包被表面,其中当 S-COMT-NE 已预先结合至包被表面的抗-COMT 抗体时,抗-NE 抗体结合至 S-COMT-NE 上的 NE 表位;

[0044] e) 使包被表面与酶标记抗体接触,其中当抗-NE 抗体已预先结合至与抗-COMT 抗体结合的 S-COMT-NE 时,酶标记抗体结合至抗-NE 抗体;

[0045] f) 使包被表面与指示结合至包被表面的酶标记抗体的存在情况的化学酶标记指示剂接触;以及

[0046] g) 基于结合至包被表面的酶标记抗体的存在情况或量,确定样品中 COMT 的存在情况或样品中存在的 COMT 的量。

[0047] 由于 COMT 蛋白水平可被 COMT 诱导物和抑制剂以及其它化合物例如异源雌激素、PCB 和增塑剂改变 (Ho 等, 2008a, b), 因此本发明可用于以快速且简单的方式测定这样的化合物的作用。

[0048] 本发明的方法可使用用于定性或定量检测样品中 COMT 的诊断试剂盒进行。作为实例,试剂盒可包含 COMT 特异性结合剂(例如抗体)。试剂盒还可包含一种或多种其它组分,例如固相支持体(例如微量滴定多孔板)、标准品、测定稀释液、洗涤缓冲液、粘合盖板和/或使用试剂盒实施本发明方法的说明书(例如印刷资料或压印的)。在某些实施方案中,试剂盒包含抗-NE 和/或 COMT-NE 以及抗-NE 和/或 COMT-NE 的使用说明书。

[0049] 本发明的试剂盒还可在一个或多个容器中包含用于本文所述方法的试剂。试剂盒可单独或组合地包含特定的内部对照和/或探针(probe)、缓冲液和/或赋形剂。每种试剂以适于存量储存的固体形式或液体缓冲液提供。试剂盒还可包含用于从例如宿主生物体或环境样品获得样品的工具。

[0050] 本发明提供用于测定目标样品例如生物培养物、组织提取物、生物液体和环境样品中的 COMT 蛋白水平的简单、准确、廉价且快速的方法。目前测定人 COMT 浓度的方法包括繁琐的聚丙烯酰胺电泳/蛋白质印迹测定法和放射性酶学测定法。本新型 ELISA 测定法将代替这些复杂且耗时的现有方法。

[0051] 实施例 1:免疫肽(新型表位, NE)的设计和制备

[0052] 1. 产生随机的 18-氨基酸肽序列,其在氨基末端以“酪氨酸(Tyr)”开始,并由以下所列 10 种亲水氨基酸组成:苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)、脯氨酸(Pro)。

[0053] 2. 使用可获得自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606> 的公众可用的程序(BLAST)进行基于计算机的搜索,以确保所产生的肽序列与任何人蛋白均不具有同源性(至少< 30%)。

[0054] 3. 使用可获得自 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, France) 的计算机程序“HNN Secondary Structure Prediction Method(HNN 二级结构预测法)”对肽可能的二级结构进行预测,以寻找具有最无序二级结构的肽(图 4)。选择具有以下序列的 18-聚肽:“TKENPRSNQEESYDDNES”(SEQ ID NO :1)。

[0055] 4. 通过“Alta Bioscience, United Kingdom”合成并纯化具有设计序列的肽用于免疫以产生和纯化特异性抗体,并将该肽命名为 NE(新型表位)。

[0056] 5. 将对应于 NE 的 cDNA 序列遗传地缀合至真核系统或细菌系统的蛋白表达载体中

的目标人 COMT 基因中。

[0057] 实施例 2 :COMT 和 NE 抗体生产

[0058] i. 免疫接种动物产生 NE 抗体

[0059] 在动物（例如新西兰兔）中针对全长新型合成表位（NE）产生 NE 抗体。如（Kyte 和 Doolittle,1982）所述，利用蛋白的亲水性分析选择这些表位。使用多位点注射方案用该抗原多赖氨酸肽和弗氏佐剂注射动物。在初次免疫 6 周后从动物中取全血样品，并检验 NE 抗体的存在情况。以每月一次的间隔重复注射，直至产生假定的抗体。

[0060] ii. 人 COMT 抗体的免疫接种和亲和纯化

[0061] 如我们先前的出版物（Jiang 等,2003）中所述，在动物（例如绵羊）中针对人 COMT 肽的线性表位产生 COMT 抗体。利用蛋白的亲水性图（Kyte 和 Doolittle,1982）选择对应于残基 80-98(DTYCEQKEWAMNVGDKKGGK) (SEQ ID NO :7) 的寡肽，该寡肽为 COMT 的 MB- 同工型和 S- 同工型所共有。

[0062] 1. 使用多位点注射方案用在赖氨酸网（lysine web）上的该抗原肽和弗氏佐剂注射绵羊。

[0063] 2. 在初次免疫 2 个月从绵羊中取全血样品，并在单向放射免疫 - 扩散测定中使用该线性抗原肽作为参比抗原检验 COMT 抗体的存在情况。以每月一次的间隔重复注射，直至产生抗体。

[0064] 3. 自动物中收集抗血清后，将其用 pH 8.0、含 25mM NaCl 和 0.02% NaN_3 的 20mM Tris-HCl 透析过夜。于室温恒定搅拌下，将所产生的抗血清与抗原肽一起在受控孔玻璃珠（1ml）上保温 1 小时。

[0065] 4. 将珠粒与抗血清注入小色谱柱（5ml）中。在从珠粒中排出液体后，将柱用 pH 5.3 的磷酸缓冲盐溶液（100ml）洗脱，直至洗脱液中检测不到蛋白。

[0066] 5. 最后，将柱用 10×1ml 等分的 0.1M pH 2.3 的甘氨酸缓冲液洗脱。立即调节每毫升的洗脱液至 pH 7，然后将具有最高蛋白浓度的流分合并。

[0067] iii. NE 抗体的提取和纯化

[0068] 1. 在从动物中收集抗血清后，将其用 pH 8.0、含 25mM NaCl 和 0.02% NaN_3 的 20mM Tris-HCl 透析过夜。将透析后的抗血清上样到 DEAE 柱中，每个柱的大小为血清体积的 5 倍。将 DEAE 柱用 3 倍床体积的 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 25mM NaCl 和 0.02% NaN_3 洗涤。收集 IgG 峰（在 280nm 吸光度下从柱中出现的首个峰）。

[0069] 2. 于室温恒定搅拌下，将等分的兔 IgG（10ml）与合成的抗原肽一起在受控孔玻璃珠（1ml）上保温 1 小时（hr）。

[0070] 3. 将珠粒和兔 IgG 注入小柱（5ml）中。在从珠粒中排出所有液体后，将珠粒用 pH 7.0 的 PBS（100ml）洗涤，直至洗脱液的 UV 吸光度（280nm）类似于 PBS 的。

[0071] 4. 最后，将柱用 10×1ml 等分的 pH 2.5 的 0.1M 甘氨酸洗脱。立即用 1M Tris 调节每个洗脱流分至 pH 7.0。将含最高蛋白浓度的流分合并。

[0072] iv. NE 抗体的表征

[0073] 以两种方式实现抗体的表征。首先，在兔中产生抗体，因此该抗体最初与该动物在其寿命期间所产生的所有其它抗体一起存在于血清中。如上节所述，通过其与附着于控制孔玻璃珠的 NE 抗原结合的能力，将该抗体从该高度复杂的抗体混合物中纯化出来。这种至

抗原的结合与彻底洗脱同时发生,彻底洗脱除去包括其它非 NE 抗体的其它血清蛋白。

[0074] 其次,通过 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹法检验纯化的抗体。将纯化的抗-NE 用作第一检测抗体,对来自两种类型的 HEK293 细胞的提取物进行 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹。第一种类型的 HEK293 细胞为普遍可获得的野生型。这些细胞容易表达 COMT 蛋白,其易被在 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹中用作第一抗体的抗-COMT 抗体检测到 (Jiang 等,2003)。第二种类型的 HEK293 细胞已被遗传改造为表达 COMT-NE 蛋白。当将纯化的抗-NE 用作第一检测抗体时,在蛋白质印迹上仅检测到 COMT-NE 蛋白,而检测不到存在于正常 HEK293 提取物中的 COMT 或任何其它蛋白 (图 5)。

[0075] NE 抗体的特异性通过免疫吸附后对 COMT 和 NE 表位的交叉检测来评估。由连接至琼脂糖蛋白 G 的抗-COMT 抗体结合的蛋白与抗-NE 发生交叉反应,反之亦然。将来自过表达 COMT-NE 的 HEK293 细胞的总细胞裂解物与 COMT 抗体在 4°C 下保温过夜以形成免疫复合物,从而捕获内源性 COMT 和 COMT-NE 蛋白两者。来自无 COMT-NE 表达的野生型 HEK293 细胞的裂解物作为阴性对照平行进行。当该 COMT-NE 蛋白从琼脂糖蛋白 G-抗-COMT 解吸附后,在利用 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹对其进行分析时,该 COMT-NE 蛋白与抗-NE 交叉反应 (图 6)。

[0076] 最后,当将来自未用 NE 抗原免疫接种的兔的兔抗体用作 SDS-PAGE/ 蛋白质印迹中的第一检测抗体时,使用正常 HEK293 提取物或遗传改造的 HEK293 提取物检测不到条带。

[0077] 因此,当暴露于 HEK293 细胞提取物中存在的所有蛋白时,纯化的兔抗体仅检测 COMT-NE,并且如上所述,只有来自用 NE 抗原免疫的兔的抗体才能检测改造为具有 NE 的 COMT 蛋白。

[0078] 实施例 3 : 人 COMT-NE 重组蛋白的制备

[0079] 1 COMT 是指全长的 S-COMT 和 MB-COMT 两者 ;

[0080] 2 COMT- 表位是指抗-COMT 抗体所识别的 19- 氨基酸片段 (SEQ ID NO :7)。

[0081] i. 全长人 COMT-NE 的分子克隆

[0082] 按照制造商的方案,使用专门为在人 COMT 的 3' - 端插入 NE cDNA 片段设计的引物对,通过一步 RT-PCR (Titan One Tube RT-PCR Kit, Roche) 由分离自人成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系 (CRL-2266 ; 美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection (ATCC))) 的总 RNA 产生全长人 COMT cDNA。

[0083] 为产生用于定向克隆到表达质粒 (pcDNA3.1(+); Invitrogen 或 pGEX-6p1 ; GE Healthcare) 中的 BamHI-COMT-NE-EcoRI cDNA 片段,通过二次 PCR 插入限制酶切位点 (BamHI 和 EcoRI),所述二次 PCR 使用用于含 BamHI 限制位点的人 S-COMT 的正向引物 (5'-CGCGATCCGCCACCATGGGTGACACCAAGGAGCAGCGC-3') (SEQ ID NO :2) 或用于人 MB-COMT 的正向引物 (5'-CGCGATCCGCCACCATGCCGAGGCCCGCCTCTGC-3') (SEQ ID NO :3) 以及含 NE 序列和 EcoRI 限制位点的反向引物 (5'-CTGGAATTCTCAGCTTTCGTTATCATCATAGCTTCTTCTGCTT GCTACGCGGGTTTTCTTTGGTGGGCCCTGCTTCGCTGCCTGGGC-3') (SEQ ID NO :4)。

[0084] 将 COMT DNA 插入物 (BamHI-COMT-NE-EcoRI) 和空载体 (pcDNA3.1(+)) 或 pGEX-6p1) 分别通过过量限制酶 (BamHI 和 EcoRI) 于 37°C 下消化 1hr。在这之后,将消化的混合物通过 1.3% 琼脂糖凝胶电泳在 100V 下持续 1hr 进行分析。将对应于 COMT-NE 的所得片段切下并纯化 (Gel Extraction Kit, Viogene),然后使用 T4DNA 连接酶连接至

pcDNA3.1(+) 或 pGEX-6p1 载体。在 4℃ 下保温过夜进行连接反应。

[0085] ii. COMT- 表位 -NE 的分子克隆

[0086] 通过 PCR 从人 COMT cDNA 产生用于定向克隆到表达质粒 (pGEX-6p1 ;GE Healthcare) 中的 COMT- 表位 -NE 插入物 (BamHI-COMT- 表位 -NE-EcoRI), 所述人 COMT cDNA 来自从人成神经细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系分离的总 RNA。通过二次 PCR 插入限制酶切位点 (BamHI 和 EcoRI), 所述二次 PCR 使用用于含 BamHI 限制位点的 COMT- 表位的正向引物 (5' -CGCGGATCCAGCGTGCTGGAGGCCATTGAC-3') (SEQ ID NO :5) 和含 NE 序列和 EcoRI 限制位点的反向引物 (5' -CTGGAATTCTCAGCTTTCGTTATCATCATAGCTTCTTCTGCTGTTGCTACGCGGGTTTCTTTGGTAATCACGGCGTCCACGATCTTGCC-3') (SEQ ID NO :6)。COMT- 表位对应于人 COMT 残基 80-98 (DTYCEQKEWAMNVGDKKKGK) (SEQ ID NO :7), 其为 MB- 同工型和 S- 同工型所共有。理想的是, 使用 NE- 表位 -“TKENPRSNQEESYDDNES”(SEQ ID NO :1), 但任选的是, 可使用变体, 只要抗 -NE- 表位仍结合变体即可。这样的变体可通过本领域熟知的方法产生, 并且特征在于具有保守氨基酸取代, 其不会特异地改变 18- 聚体的抗原特性。例如, 在蛋白和肽中不常见或从未出现的氨基酸以及合成氨基酸可取代 NE- 表位的氨基酸, 只要具有取代氨基酸的 NE- 表位基本上仍保留与氨基酸未被取代的 NE- 表位相同的抗原特性即可。在蛋白和肽中不常见或从未出现的氨基酸以及合成氨基酸的实例通常包括但不限于鸟氨酸、瓜氨酸、羟脯氨酸、高丝氨酸、苯基甘氨酸、牛磺酸、碘化酪氨酸、2,4- 二氨基丁酸、 α - 氨基异丁酸、4- 氨基丁酸、2- 氨基丁酸、 γ - 氨基丁酸、 ϵ - 氨基己酸、6- 氨基己酸、2- 氨基异丁酸、3- 氨基丙酸、正亮氨酸、正缬氨酸、肌氨酸、高瓜氨酸、半胱磺酸、 τ - 丁基甘氨酸、 τ - 丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β - 丙氨酸、氟代氨基酸、设计氨基酸 (designer amino acid) (例如 β - 甲基氨基酸、C- 甲基氨基酸、N- 甲基氨基酸) 以及氨基酸类似物。在蛋白和肽中不常见或从未出现的氨基酸以及合成氨基酸还包括具有衍生侧基的氨基酸。此外, 蛋白中的任何氨基酸可为 D(右旋) 型或 L(左旋) 型。本发明 NE- 表位的蛋白序列的等位变体也包括在本发明范围之内。

[0087] 氨基酸通常可分成以下类别: 非极性、不带电荷的极性、碱性和酸性。其中本发明 NE- 表位的某一类别的氨基酸被相同类别的另一种氨基酸置换的保守取代落入本发明的范围内, 只要具有取代的 NE- 表位基本上仍保留与不具有取代的 NE- 表位相同的抗原特性 (例如结合至抗 -NE- 表位) 即可。在本发明范围之内考虑编码在序列中具有一个或多个氨基酸取代的 NE- 表位的分离多核苷酸。在一个实施方案中, 编码 NE- 表位变体的分离的多核苷酸包括以下核酸序列: 其能在严格条件下与编码 NE- 表位的核酸序列杂交, 并且编码与针对 NE- 表位的抗体结合的 NE- 表位变体。

[0088] 下表 1 提供属于各个类别的氨基酸实例的列表。

[0089]

表 1	
氨基酸类别	氨基酸实例
非极性	Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp
不带电荷的极性	Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln
酸性	Asp、Glu
碱性	Lys、Arg、His

[0090] 与多肽“NE-表位”或编码 NE-表位的多核苷酸具有基本同一性或同源性的变体可用于本发明的实施。这样的序列可称为变体或修饰序列。换言之,多核苷酸序列可经修饰但仍保留编码表现出所需抗原特性(例如与抗 NE 抗体结合的能力)的多肽的能力。因此,这样的变体为功能等价体。一般而言,变体包含与天然序列至少约 60% -80%、优选约 80% -90%、更优选约 90% -95% 的序列同一性。任选的是,变体可通过在氨基酸序列中的一个或数个氨基酸的取代、缺失或插入衍生自 NE-表位。设计了具有含以下序列的修饰 NE 序列的三种新型肽变体:“TKENPRTNQEESYDDNES”(SEQ ID NO :8)、“TKENPRSNQDES YDDNES”(SEQ ID NO :9) 和“TKENPRSNQPPSYDDNES”(SEQ ID NO :10)。作为实例检测了这三种修饰 NE 序列 (SEQ ID NO :8-10) 针对 NE-抗体的免疫反应性。

[0091] 两种或更多种核酸或多核苷酸之间的序列关系通常定义为序列同一性、序列同一性百分比和基本同一性。在测定序列同一性中,“参比序列”用作序列比较的基础。参比可为特定序列的亚类或全部。换言之,参比序列可为全长基因序列或基因序列片段。

[0092] 用于比较的序列比对方法为本领域所熟知。参见例如 Smith 等 (1981) Adv. Appl. Math. 2 :482 ;Needleman 等 (1970) J. Mol. Biol. 48 :443 ;Pearson 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85 :2444 ;PC/Gene Program 中的 CLUSTAL, Intelligenetics, Mountain View, California ;威斯康辛遗传学软件包 (Wisconsin Genetics Software Package) 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA。优选的计算机比对方法还包括 BLASTP、BLASTN 和 BLASTX 算法。参见 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215 :403-410。

[0093] 关于核酸或多肽序列的“序列同一性”或“同一性”是指当在特定比较窗 (comparison window) 内比对最大一致性时两条序列中相同的核酸碱基或残基。“序列同一性百分比”是指通过比较窗内比较两条最佳比对的序列所确定的值,其中当与参比窗 (reference window) 比较时,多核苷酸序列在比较窗内的部分可包含用于两条序列的最佳比对的插入或缺失。百分比通过如下方法计算:确定在两条序列中都存在的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以得到匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗内位置总数,然后将结果乘以 100 得到序列同一性百分比。

[0094] 具有“基本同一性”的多核苷酸序列为使用上述比对程序之一与参比序列进行比较,具有至少约 50% -60% 的序列同一性、通常至少 70% 的序列同一性、优选至少 80%、更优选至少 90% 以及最优选 95% 的序列。优选的是,使用程序确定的默认参数测定序列同一性。氨基酸序列的基本同一性通常意指至少 60%、更优选至少 70%、至少 80%、至少 90% 以及最优选至少 95% 的序列同一性。

[0095] 如果两个分子在严格条件下相互杂交,则核苷酸序列通常具有基本同一性。一般

而言,严格条件选为在限定离子强度和 pH 下比特定序列的热熔点低约 5℃。如果它们编码的多肽具有基本同一性,则在严格条件下不相互杂交的核酸分子仍可能具有基本同一性。这可在例如利用遗传密码所允许的最大密码子简并性产生核酸拷贝时出现。

[0096] 如所述,序列的杂交可在严格条件下进行。“严格条件”意指以下条件,在该条件下,与杂交至其它序列相比,探针以更高的可检测程度杂交至其靶序列。严格条件为序列依赖性的,并且在不同情形下不同。通常,严格条件为以下条件:其中盐浓度在 pH 7.0-8.3 条件下低于约 1.5M Na 离子,通常约 0.01-1.0M Na 离子浓度(或其它盐),并且温度对于短探针(例如 10-50 个核苷酸)为至少约 30℃,而对于长探针(例如大于 50 个核苷酸)为至少约 60℃。还可加入去稳定剂例如甲酰胺达到严格条件。例示性的严格条件包括在 37℃ 下的 30-35% 甲酰胺,1.0M NaCl,1% SDS(十二烷基硫酸钠)的缓冲溶液中杂交,并在 50-55℃ 下于 1X-2X SSC(20X SSC = 3.0M NaCl/0.3M 柠檬酸三钠)中洗涤。公认的是,可改变温度、盐和洗涤条件以提高或降低严格条件。对于杂交后洗涤,重要的因素包括最终洗液的离子强度和温度。参见 Meinkoth 和 Wahl(1984) *Anal. Biochem.* 138 :267-284。

[0097] 实施例 4:重组质粒的转化

[0098] 将来自连接反应的重组产物转化进化学感受态大肠杆菌细胞(BL21)中。详细步骤如下:

[0099] 1. 将储藏在 -70℃ 冰箱中的感受态细胞(100 μl)置于冰上 5 分钟。

[0100] 2. 将等分的连接溶液(2-5 μl)加至感受态细胞(100 μl),并将全部混合物轻轻地涡旋数次,然后储存在冰上 30 分钟。然后将管转移至放置在预热至 42℃ 的循环水浴中的支架上,并静置 45 秒。注意不要晃动管。

[0101] 3. 将管迅速转移至冰浴并冷却 2 分钟。将 SOC 培养基(500 μl)加入每根管。将管转移至振荡培养箱(225rpm/min),并在 37℃ 下温育 1hr,以使细菌恢复并表达由质粒编码的抗生素抗性标记。

[0102] 4. 将适当体积(每个 90-mm 平板最多 250 μl)的转化感受态细胞转移到含氨苄西林(50 μg/ml)的 LB 琼脂上,通过无菌弯玻璃棒涂布在琼脂平板的表面上。

[0103] 5. 倒置平板并在 37℃ 下温育。菌落出现于 12-18hr 内。

[0104] 实施例 5:含重组质粒的细菌菌落的鉴定

[0105] 挑出至少 10 个单独菌落,然后用 Mini-prep 纯化试剂盒(Qiagen™)提取质粒 DNA。用 BamHI 和 EcoRI 消化质粒,并在 1.3% 琼脂糖凝胶中于 100V 下 45 分钟使之显现。通过测序验证含正确 COMT-NE 或 COMT-表位-NE 插入物的所得质粒 DNA。

[0106] 实施例 6:重组人 COMT-NE 的细菌表达

[0107] 为了在大肠杆菌(BL21)中表达重组人 COMT-NE 蛋白,将阳性克隆培养于补加氨苄西林(50 μg/ml)的 LB 肉汤中,并于 37℃ 剧烈振荡条件下培养,直至细菌培养物的光密度读数达约 0.6(在 λ = 600nm 下)。将培养物用异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(终浓度为 0.1-1mM)诱导,并再培养 4hr。通过离心收集细胞,然后在补加 5mM 1,4-二硫苏糖醇(DTT)和 1mM 苯甲基磺酰氟(PMSF)的冰冷裂解缓冲液(50mM Tris-Cl, pH7.5, 200mM NaCl)中超声处理。使来自细菌裂解物的表达 COMT-NE 或 COMT-表位-NE 重组蛋白流过市售谷胱甘肽-S-转移酶(GST)-纯化柱(GSTrap™ FF, GE Healthcare)来纯化。在考马斯蓝染色后,靶蛋白带在 SDS-PAGE 中显现,然后通过蛋白质印迹表征(图 7 和 8)。

[0108] 实施例 7:抗-NE 抗体对修饰 NE- 表位的非特异性结合亲和力的测定

[0109] 与多肽“NE- 表位”或编码 NE- 表位的多核苷酸具有基本同源性的变体可用于本发明的实施中。也就是说,多核苷酸序列可经修饰但仍保留编码表现出结合至 NE- 抗体的所需抗原特性的多肽的能力。作为实例通过斑点印迹法检验了三种修饰 NE 序列 (SEQ ID NO: 8-10) 针对 NE- 抗体的免疫反应性。

[0110] 进行斑点印迹试验的步骤如下所述,结果示于图 9。

[0111] 1. 由商业公司 (Alta Bioscience, Birmingham UK) 合成和纯化包含修饰 NE 序列的肽。

[0112] 2. 将 10ng 每种肽溶解于 PBS 中,然后使用尖嘴移液管尖端点到硝酸纤维素膜上。将膜风干。

[0113] 3. 将膜用含 5% BSA 的 TBS-T 封闭 1hr,然后与在 BSA/TBS-T 中稀释的抗-NE 抗体一起在室温下保温 2hr。

[0114] 4. 在保温之后,将膜用 TBS-T 洗涤三次,然后与缀合了 HRP 的第二抗体 (抗-兔; DAKO) 一起在室温下保温 1hr。

[0115] 5. 将膜用 TBS-T 洗涤三次,然后与 ECL 试剂一起保温 1 分钟。

[0116] 6. 在暗室内将膜暴露于 X 射线胶片,并比较来自不同样品的信号。信号的强度与各种肽针对抗-NE 抗体的结合亲和力水平成比例。

[0117] 根据图 9 所示结果,NE 肽显示出针对抗-NE 抗体的强结合亲和力。三种修饰 NE 肽之一 (SEQ ID NO. 8) 显示出与 NE 抗体的结合 (但具有比 NE 低的亲和力),但另外两种肽 (SEQ ID NO. 9、10) 并不保留针对 NE 抗体的显著免疫反应性 (图 9)。

[0118] 实施例 8:COMT 酶免疫测定 (EIA) 系统的构建

[0119] 制备了两种独特抗体 (抗-COMT 和抗-NE)、两种蛋白 (COMT 和 COMT-NE) 和人工构建的肽“COMT- 表位-NE”。新合成的表位 (NE) 由具有以下序列的 18 个氨基酸组成:“TKENPRSNQEE SYDDNES” (SEQ ID NO:1),并用作检测靶蛋白的标记。

[0120] 如上文实施例 2 所述,产生并亲和纯化 COMT 抗体。

[0121] 用于洗涤和显色的各种化学药品以及在抗体上缀合有酶的第三抗体 (抗-抗-NE 或抗兔 IgG 抗体) 购自许多供应商。它们为通常可得到的。

[0122] 测定要求用预定固定量的抗-COMT 包被含 96 孔的塑料板中的孔,所述抗-COMT 结合至各个孔的底部。

[0123] 在 8 个孔中加入预定固定量的 COMT 和固定量的 COMT-NE,以便可从这些孔的所得结果产生标准曲线。在剩余孔中加入固定量的 COMT-NE 和未知 COMT 浓度的样品。标准 COMT 孔所显现的颜色使剩余孔中 COMT 的未知浓度得以被测定。

[0124] 进行 COMT ELISA 测定实施方案的步骤如下所述,并示于图 2 中。

[0125] 1. 在 4°C 下,将透明的 96- 孔塑料板用 0.1 μ g COMT 抗体包被过夜。

[0126] 2. 在室温下,将板用 1% BSA 预封闭 1hr。

[0127] 3. 将不同浓度的重组 COMT-NE 标准品与固定量的裂解物样品混合,然后加至各个孔中,并在室温下保温 2hr。

[0128] 4. 在用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤之后,将板与抗-NE 在室温下保温 2hr。

[0129] 5. 将板再次洗涤,然后与第二抗体 (抗-兔; DAKO) 在室温下保温 1hr。

[0130] 6. 用 H_2O_2 以 1 : 1 比例制备 TMB 底物 (TMB 底物 ;Pierce,#34021) 用于比色形成,并在黑暗中于室温下保温 15 分钟。

[0131] 7. 通过加入少量 2M H_2SO_4 至各个孔中停止显色反应。

[0132] 8. 用分光光度计在 450nm 测量吸光度。显现的颜色强度与 COMT 浓度成反比。(图 3)

[0133] 实施例 9 :COMT 酶免疫测定 (EIA) 试剂盒的应用

[0134] 试验原理

[0135] COMT EIA Kit (COMT 酶免疫测定试剂盒) 为基于竞争性结合原理的固相酶联免疫吸附测定 (ELISA)。将微量滴定孔用针对 COMT 分子上的抗原位点的多克隆抗体包被。样品中的内源 COMT 蛋白与标准重组 COMT-NE 缀合物竞争结合至包被抗体。在保温后,将未结合的 COMT-NE 蛋白洗掉。将抗 -NE 连接至结合的标准重组 COMT-NE,并将过量的抗 -NE 洗掉,然后将与产色酶 (在这种情况下为辣根过氧化物酶) 缀合的抗 -兔 IgG 连接至结合的抗 -NE,并将过量的洗掉,然后通过加入产色酶的合适底物显色。结合的产色 (colorogenic) 缀合物 (在该情况下为与辣根过氧化物酶缀合的驴抗 -兔 IgG) 的量与样品中 COMT 的浓度成反比。在加入底物溶液后,显色强度与样品中 COMT 的浓度成反比。

[0136] 然而,应理解的是,上文描述仅为阐述性的,并且可对试剂作出各种修改或改变而不会改变测定的基本原理。本文所提供的 ELISA 法,每一种包括多个步骤,而上文是对进行那些步骤所用普通方法的描述。然而,该描述不应理解为限制本发明,因为可对本发明方法作出微小调整和 / 或改变而不会背离本文公开的本发明范围。尤其应该注意的是,本发明应理解为包括以下情形:本领域的技术人员可使用与本文公开的不同但等效的底物类型、动物抗体类型、酶标记、酶标记指示剂、包被溶液、封闭液和洗液。例如,应注意的是,产生本文所用三种抗体的物种并不是关键的。测定的原理依赖于三种抗体不会交叉反应的事实。这最容易通过使用三种不同的物种实现 (本情形中为绵羊、兔和驴)。同样可使用在其它物种中产生的针对三种抗原 (COMT、NE 和抗 NE 免疫球蛋白) 的抗体。还应注意的是,产色酶和底物可由其它这样的酶和底物代替。此外,应注意的是,用于检测结合至捕获 COMT-NE 的抗 -NE 的量的其它系统可代替本文所述的显色系统 (例如使用荧光或冷光)。还应注意的是,产色酶或用于检测结合至捕获 COMT-NE 的抗 -NE 的量的其它检测系统可直接缀合至抗 -NE。

[0137] 材料:

[0138] 1. 样品蛋白 (MCF-7 细胞)

[0139] 2. 竞争品 (S-COMT-NE, 1mg/ml)

[0140] 3. 标准品 (S-COMT-FLAG, 1mg/ml)

[0141] 4. 检测抗体 (兔抗 -NE 抗体)

[0142] 5. 绵羊抗 -兔 IgG-HRP

[0143] 6. TMB 底物和终止液

[0144] 7. 样品稀释液

[0145] 8. 洗液

[0146] 9. 96-孔板

[0147] 样品提取步骤:

[0148] MCF-7 (HTB-22) 细胞获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 该细胞几乎只表达 S-COMT。在含 10% 热灭活的胎牛血清、抗生素 (100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素) 和 1 μ g/ml 胰岛素的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 中于潮湿的 5% CO₂ 37°C 下, 使细胞生长。通过暴露于胰蛋白酶使细胞 (0.5ml; 含约 1×10^6 个细胞) 脱离培养皿、板或孔的表面, 接着加入新鲜培养基 (0.8ml)。然后将细胞悬液转移至 1.5ml 离心管中。将管以 1,300r.p.m. 的速度离心 5 分钟, 然后弃掉上清液。重悬细胞沉淀物并用 0.5ml PBS 洗涤, 然后以 1,300r.p.m. 的速度再次离心 5 分钟。弃掉上清液, 然后加入冰冷的双蒸水 (0.2ml) 以重悬细胞沉淀物。将细胞悬液在冰上超声处理 10 秒。将裂解物于 4°C 以 14,000r.p.m. 的速度离心 15 分钟。将上清液转移至新的 1.5ml 离心管中以测定总蛋白浓度, 然后储存于 -70°C 备用。

[0149] 试验步骤:

[0150] 优选每一轮包括标准曲线。确定架上抗体包被的微量滴定孔的所需数量。通过将 200 μ l 含 1% BSA 的 PBS 加至各个孔中来封闭板, 然后在室温下保温 1hr。用样品稀释液稀释竞争品 (S-COMT-NE) 以得到 10 μ g/ml 浓度。如表 2 所概括, 制备标准反应混合物 (竞争品 + 标准品) 的系列稀释液 (用新的一次性尖端将每种 100 μ l 加入合适的孔中)。

[0151]

表 2	+竞争品 (S-COMT-NE, 10 μ g/ml)						
标准品	80 μ g/ml	40 μ g/ml	20 μ g/ml	10 μ g/ml	5 μ g/ml	2.5 μ g/ml	0 μ g/ml

[0152] 将样品稀释液中的蛋白样品 (例如 MCF-7 总裂解物) 稀释, 然后以 50-200 μ g 总蛋白 / 孔 (100 μ l) 的浓度加至各个合适的孔中。在将标准品和样品 (每种 100 μ l) 上样至合适的孔中后, 将板在室温下保温 2hr。在保温后, 将孔中的内含物轻快地抖掉, 然后将孔用稀释的洗液 (每孔 200 μ l) 漂洗 5 次。将孔剧烈地敲在吸水纸上以除去残余小液滴。加入 100 μ l / 孔的检测抗体 (兔抗 -NE), 并在室温保温 1hr。将孔中的内含物抖掉并彻底洗涤 5 次。然后, 将 100 μ l / 孔的抗 - 兔 IgG-HRP 加至各个孔中, 并在室温下保温 1hr。再次将孔中的内含物抖掉并彻底洗涤 5 次。为了显色, 通过混合等体积的 TMB 底物将 100 μ l 的底物溶液加至各个孔中, 并在室温下保温 15 至 30 分钟或直至预期颜色显现。通过加入 100 μ l 的终止液至各个孔中终止酶促反应。在加入终止液后的 10 分钟内, 用微量滴定板读数器记录在 450 \pm 10nm 的光密度 (OD)。

[0153] 绘制校正曲线:

[0154] 通过将 对数标度上的标准品 (S-COMT-FLAG) 浓度相对每个校准品线性标度上的 OD₄₅₀ 作图而得到校正曲线。可使用有效的统计学软件制作最佳拟合数据的标准曲线。(图 11)

[0155] 样品分析:

[0156] 用实验样品代替 COMT 标准品, 但确保总样品体积与用于产生标准曲线的相等。根据标准曲线计算实验样品中 COMT 的量。下表 3 列出根据 COMT EIA 试剂盒 4 个蛋白样品每个的计算 COMT 浓度, 以微克 (μ g) COMT / 毫克 (mg) 总细胞蛋白为单位。

[0157]

样品(总蛋白 (μg))	平均吸光度	标准差	计算 COMT 浓度	COMT/mg 总细 胞蛋白
样品 # 1 (200 μg)	0.7845	0.0344	3.9188	19.59 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白
样品 # 2 (100 μg)	0.8475	0.0303	1.8393	18.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白
样品 # 3 (50 μg)	0.8955	0.0274	1.0515	21.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白
样品 # 4 (25 μg)	0.8970	0.0104	0.3118	12.47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白

[0158] 结论：

[0159] 每孔 50–200 μg 之间的蛋白样品 (MCF-7 细胞裂解物) 产生的 OD 读数在标准曲线的动态范围之内。蛋白样品中的 COMT 浓度可根据按照标准曲线所产生的公式得到。COMT 水平表示为微克 (μg)COMT/ 毫克 (mg) 总细胞蛋白。

[0160] 因此, 使用人细胞培养系统和本文所述的 COMT 测定法可形成用于雌激素模拟物的有效筛选系统, 雌激素模拟物具有广泛的人类健康危害和环境危害。COMT 竞争性 ELISA 测定法的实例示于图 10 中。简而言之, 将人 MCF-7 细胞用 17 β -雌二醇处理 48hr。收集总细胞裂解物, 然后通过 COMT 竞争性 ELISA 测定法测定 COMT 蛋白表达水平。结果显示, 在暴露于 17 β -雌二醇后, MCF-7 细胞中的 COMT 蛋白水平与未处理的对照相比降低了。在该测定中, 将来自过表达 COMT-NE 的 HEK293 细胞的裂解物用作阳性对照, 其与对照相比, 显示出 COMT 蛋白水平增加。

[0161] 本文所提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物都通过引用而以它们的整体 (包括所有图和表格) 结合到本文中, 其程度直到它们与本说明书的明确描述不一致。

[0162] 应理解的是, 本文所述实施例和实施方案仅为阐述性目的, 根据其作出的各种修改或改变将提示本领域技术人员, 且都包含在本申请的精神和范围之内。

[0163] 参考文献

[0164] Bonifácio MJ, Palma PN, Almeida L, Soares-da-Silva P. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease (在帕金森病中的儿茶酚-O-甲基转移酶和其抑制剂). CNS Drug Rev. 2007, 13(3) :352–379. 综述.

[0165] Ho PWL, Chu ACY, Kwok KHH, Liu HF, Kung MHW, Ramsden DB, Ho SL. Effects of Plasticisers and Related Compounds on the Expression of the Soluble Form of Catechol-O-methyltransferase in MCF-7 Cells (增塑剂和相关化合物对 MCF-7 细胞中儿茶酚-O-甲基转移酶可溶形式表达的影响). Curr. Drug Metab. 2008a, 9(4) :276–9.

[0166] Ho PWL, Garner CE, Ho JWM, Leung KC, Kwok KHH, Chu ACY, Kung MHW, Burka LT, Ramsden DB, Ho SL. Estrogenic phenol and catechol metabolites of PCBs downregulate catechol-O-methyltransferase via the estrogen receptor: potential contribution to cancer risk (PCB 的雌激素酚和儿茶酚代谢物通过雌激素受体减量调节儿茶酚-O-甲基转移酶: 对癌症风险的潜在贡献). Curr. Drug Metab. 2008b, 9(4) :304–9.

[0167] Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular

disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction(重金属汞和镉在血管疾病、高血压、冠心病和心肌梗死中的作用). *Altern. Ther. Health Med.* 2007, 13(2) :S128-133.

[0168] Jiang H, Xie T, Ramsden DB, Ho SL. Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol(通过雌二醇减量调节人儿茶酚-O-甲基转移酶). *Neuropharmacology.* 2003, 45, 1011-1018.

[0169] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein(用于展示蛋白亲水特征的简单方法). *J. Mol. Biol.* 1982, 157(1) :105-132.

[0170] Lewandowski KE. Relationship of catechol-O-methyltransferase to schizophrenia and its correlates:evidence for associations and complex interactions(儿茶酚-O-甲基转移酶与精神分裂症及其相关疾病的关系:关联和复杂相互作用的证据). *Harv. Rev. Psychiatry.* 2007, 15(5) :233-244.

[0171] Thompson PA, Ambrosone C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer(在人乳腺癌中雌激素代谢酶的遗传多态性的分子流行病学). *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2000, 125-134.

[0172] Tom T, Cummings JL. Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment(帕金森病中的抑郁症。药理学特征和治疗). *Drugs Aging.* 1998, 12(1) :55-74.

[0173] Xie T, Ho SL, Ramsden DB. Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription(人儿茶酚-O-甲基转移酶基因转录的雌激素减量调节的表征和含义). *Mol. Pharmacol.*, 1999, 56, 31-38.

[0001]

CPCH1160008P

序 列 表

<110> 香港大学

<120> 人儿茶酚-O-甲基转移酶(COMT)测定

<130> UHK.114XC1

<150> 61/100, 576

<151> 2008-09-26

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的, 不与任何生物体相关

<400> 1

Thr	Lys	Glu	Asn	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Glu	Glu	Ser	Tyr	Asp	Asp	Asn
1			5					10						15	

Glu Ser

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

cgcggatecgg ccaccatggg tgacaccaag gagcagcgc

39

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> 人

[0002]

<400> 3		
cgcggatccg ccaccatgcc ggaggecccg cctctgc		37
<210> 4		
<211> 89		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> 其它特征		
<223> 合成的(嵌合序列)		
<400> 4		
ctggaattct cagctttcgt tatcatcata gctttcttcc tggttgctac ggggttttc		60
tttggtgggc cctgcttgc tgcctgggc		89
<210> 5		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> 其它特征		
<223> 合成的(嵌合序列)		
<400> 5		
cgcggatcca gcgtgctgga ggccattgac		30
<210> 6		
<211> 90		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> 其它特征		
<223> 合成的(嵌合序列)		
<400> 6		
ctggaattct cagctttcgt tatcatcata gctttcttcc tggttgctac ggggttttc		60
tttgtaatc acggcgtcca cgatcttgcc		90
[0003]		

<210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Asp Thr Tyr Cys Glu Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Lys
 1 5 10 15

Lys Gly Lys

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的, 不与任何生物体相关

<400> 8

Thr Lys Glu Asn Pro Arg Thr Asn Gln Glu Glu Ser Tyr Asp Asp Asn
 1 5 10 15

Glu Ser

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的, 不与任何生物体相关

<400> 9

[0004]

Thr	Lys	Glu	Asn	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Asp	Glu	Ser	Tyr	Asp	Asp	Asn
1				5					10					15	

Glu Ser

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的，不与任何生物体相关

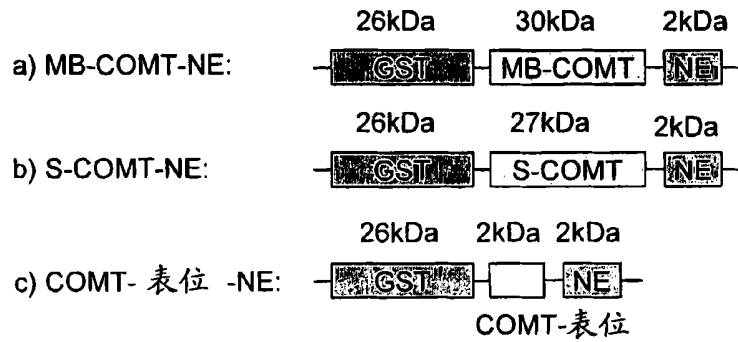
<400> 10

Thr	Lys	Glu	Asn	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Pro	Pro	Ser	Tyr	Asp	Asp	Asn
1				5					10					15	

Glu Ser

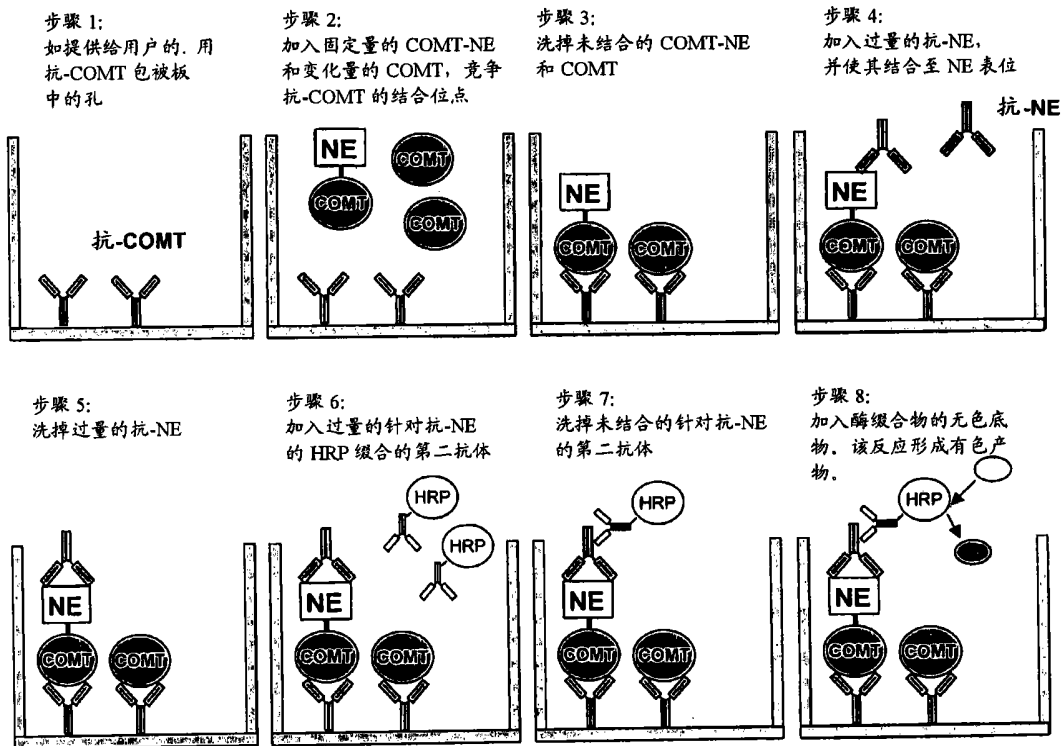
新型表位(NE)序列：“TKENPRSNQEESYDDNES”

新型表位(NE)构建体的结构



GST: 谷胱甘肽 S-转移酶
 COMT: 儿茶酚-O-甲基转移酶
 NE: 新型表位

图 1



形成的有色产物的量与 COMT 浓度成反比

图 2

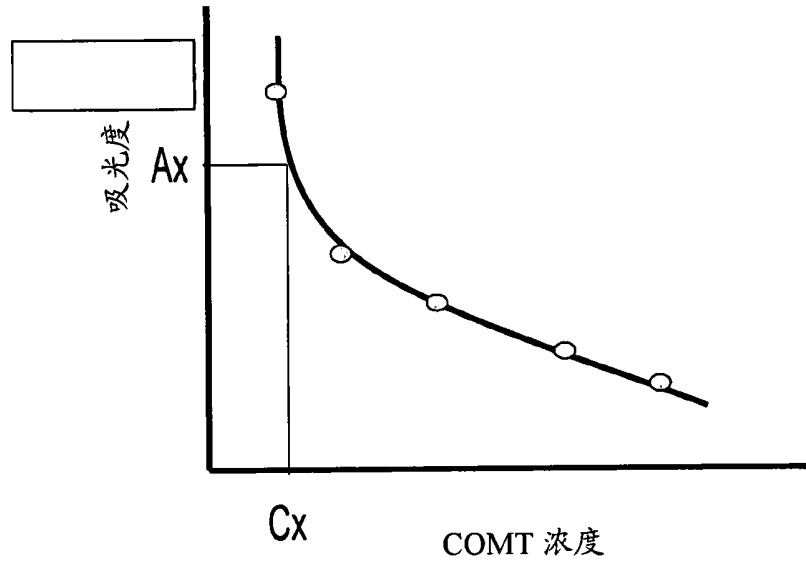


图 3

NE 序列中的 10 种亲水氨基酸的列表:

- | | |
|-----------|-----------|
| 苏氨酸(Thr) | 丝氨酸(Ser) |
| 天冬氨酸(Asp) | 天冬酰胺(Asn) |
| 谷氨酸(Glu) | 谷氨酰胺(Gln) |
| 精氨酸(Arg) | 赖氨酸(Lys) |
| 酪氨酸(Tyr) | 脯氨酸(Pro) |

NE 二级结构预测	
α 螺旋: 0 %	β 转角: 0 %
3 ₁₀ 螺旋: 0 %	弯曲区: 0 %
π 螺旋: 0 %	无规卷曲: 100 %
β 桥: 0 %	不确定状态: 0 %
伸展链: 0 %	其它状态: 0 %

图 4

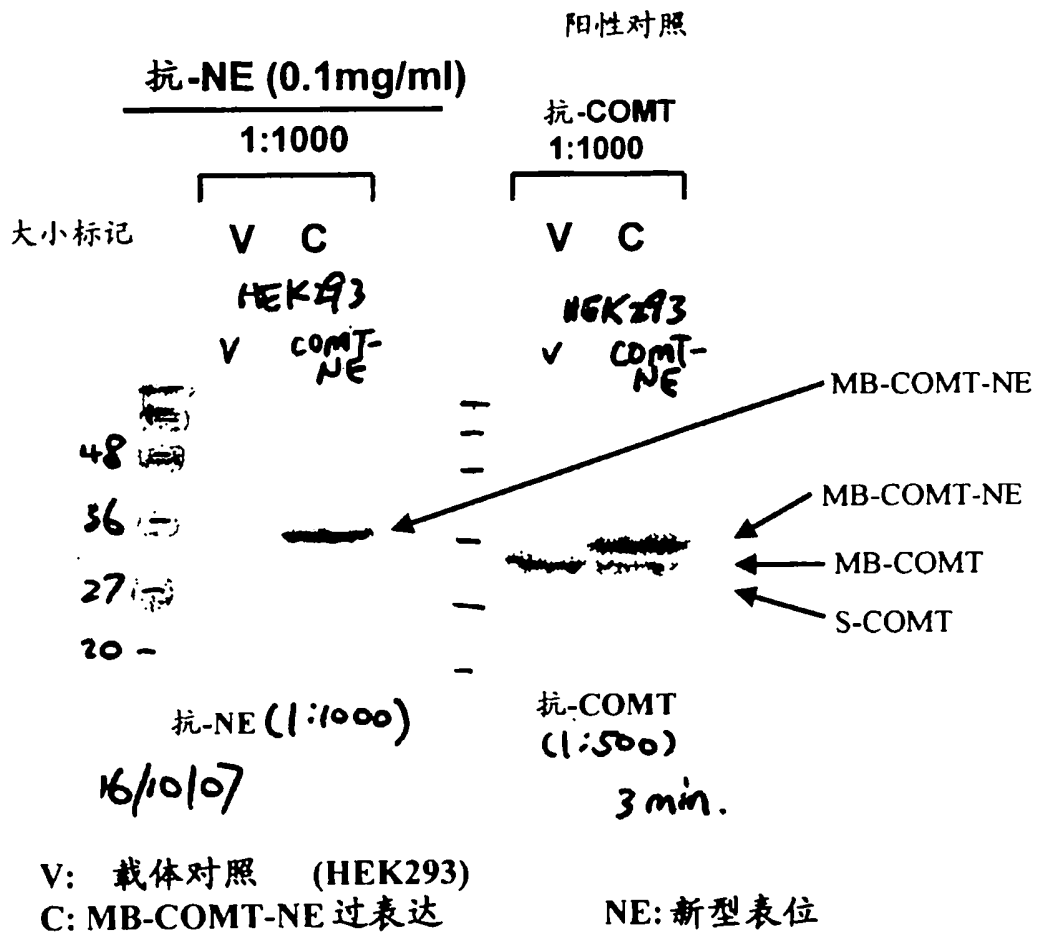


图 5

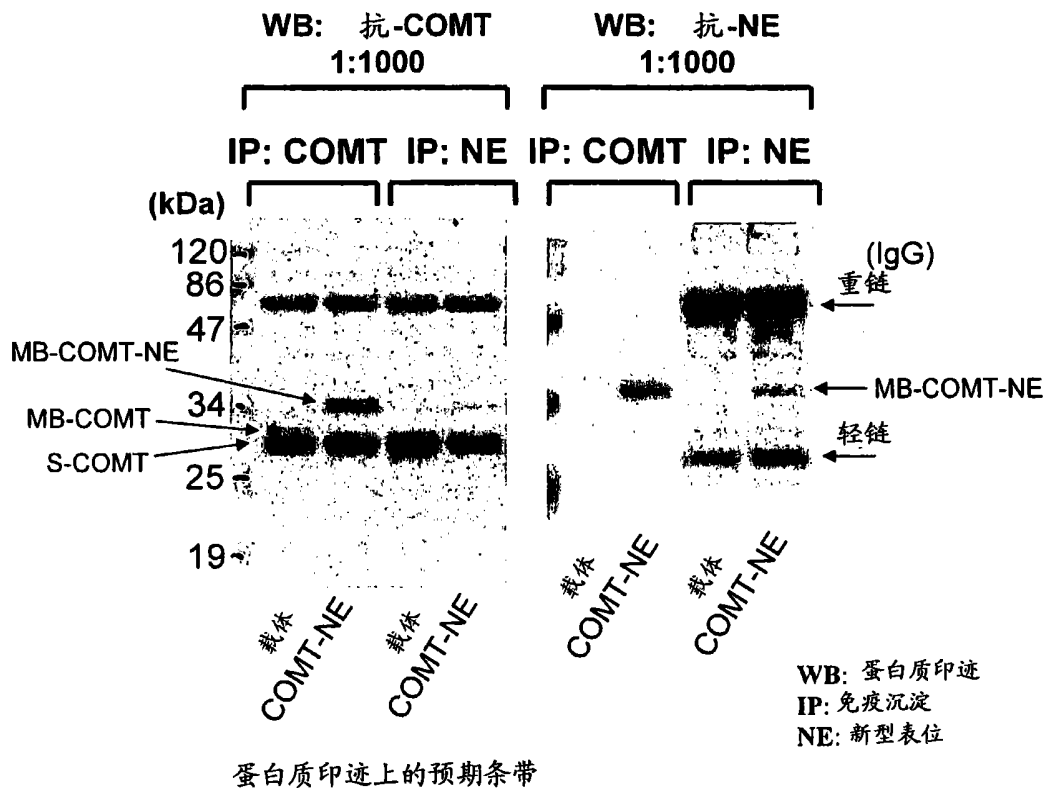


图 6

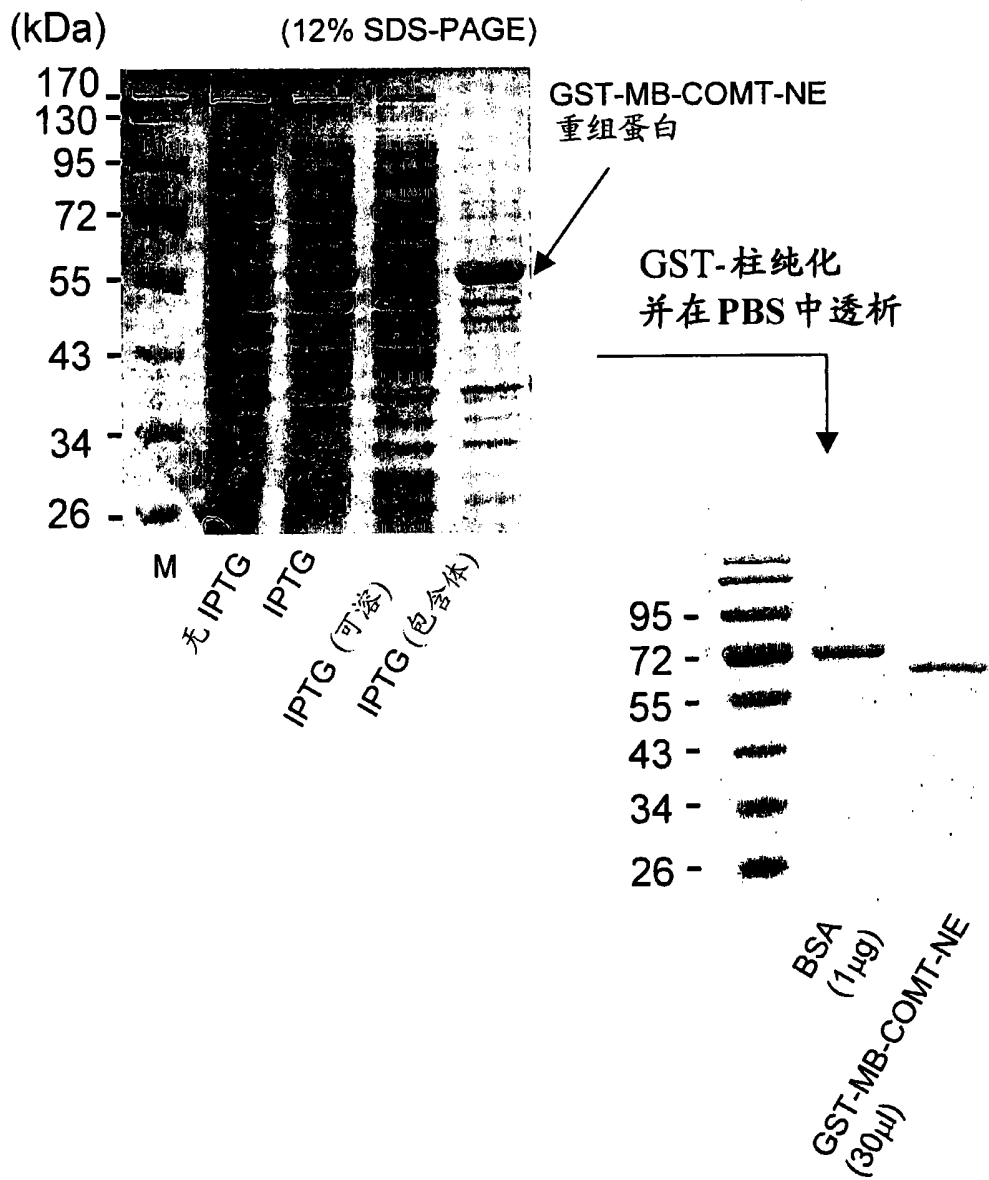
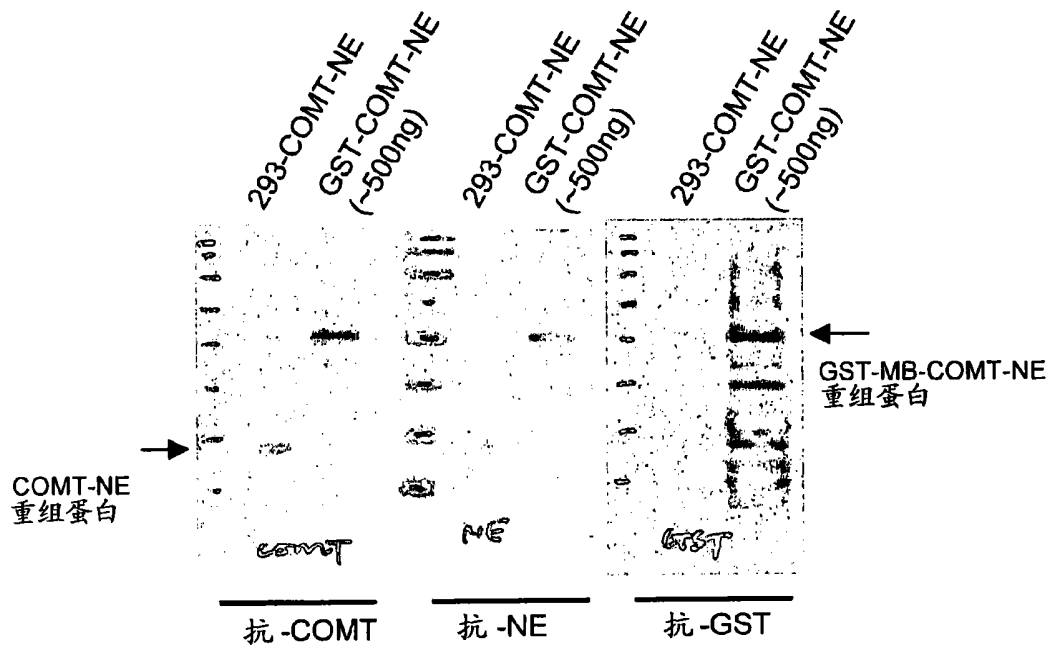


图 7



293-COMT-NE:来自过表达 COMT-NE 的 HEK293 细胞的阳性对照裂解物
GST-MB-COMT-NE:来自大肠杆菌的纯化的重组 GST-MB-COMT-NE 蛋白

图 8

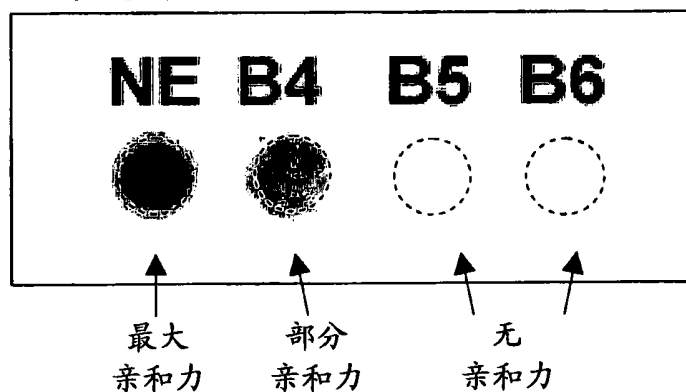
NE: TKENPRSNQEESYDDNES

B4: TKENPRTNQEESYDDNES : Ser (S) → Thr (T))

B5: TKENPRSNQDESYDDNES : 谷氨酸(E) → 天冬氨酸(D)

B6: TKENPRSNQPPSYDDNES : 2 谷氨酸(EE) → 2 脯氨酸(PP)

抗-NE



氨基酸类别	氨基酸实例
非极性	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
不带电荷的极性	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
酸性	Asp, Glu
碱性	Lys, Arg, His

图 9

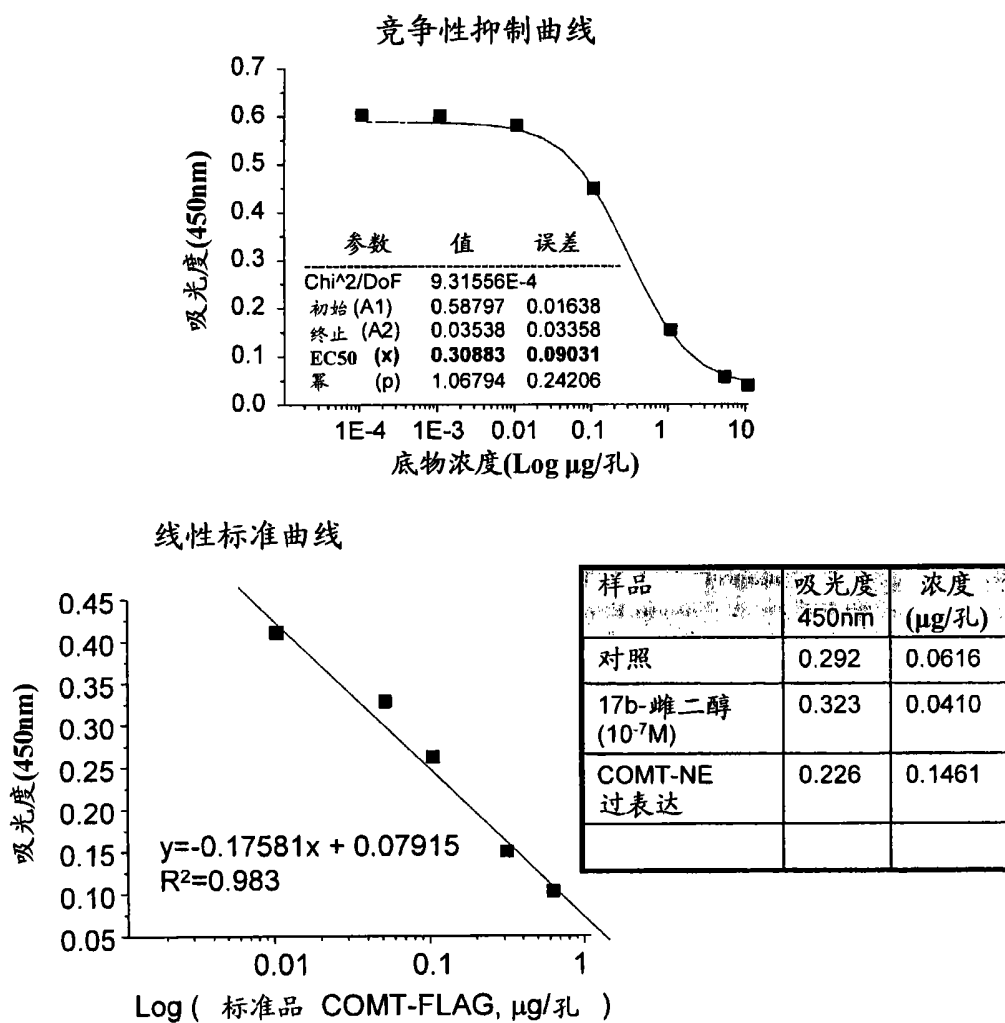
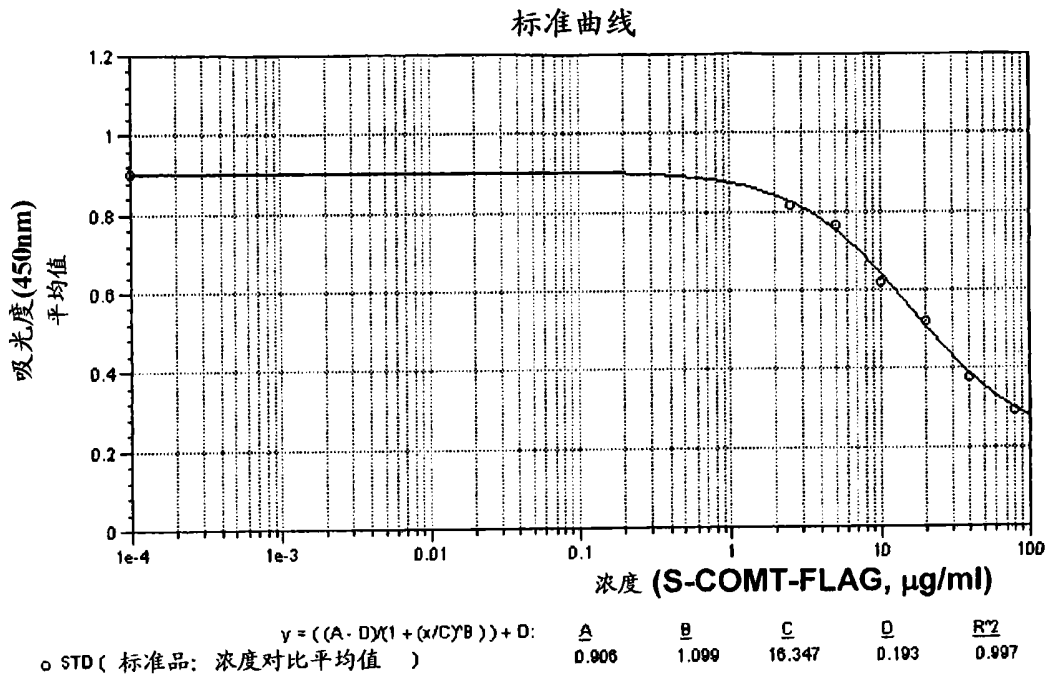


图 10



标准品	吸光度(405nm)		样品(总蛋白)	吸光度(405nm)			
空白	0.162	0.168	样品 #1 (200µg)	0.828	0.780	0.786	0.744
无标准品	0.924	0.888	样品 #2 (100µg)	0.840	0.882	0.810	0.858
80µg/ml	0.312	0.288	样品 #3 (50µg)	0.882	0.864	0.912	0.924
40µg/ml	0.390	0.372	样品 #4 (25µg)	0.900	0.882	0.906	0.900
20µg/ml	0.528	0.522					
10µg/ml	0.654	0.594					
5µg/ml	0.774	0.762					
2.5µg/ml	0.834	0.810					

图 11