(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1864067 B
(45)授权公告日 2011.07.06

(21)申请号 200480029098.8

(22)申请日 2004.10.15

(30)优先权数据
354715/2003 2003.10.15 JP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.04.05

(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2004/015261 2004.10.15

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/038458 JA 2005.04.28

(73)专利权人 积水医疗株式会社
地址 日本东京
专利权人 株式会社东京大学 TLO

(72)发明人 海老沼宏幸 矢后弘和 秋元优夏 宫崎修 门脇孝 山内敏正

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 沙永生

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/92(2006.01)

(56)对比文件
CN 1379235 A,2002.11.13, 全文.
US 4828986 ,1989.05.09, 全文.
JP 2000-304748 A,2000.11.02, 全文.
hironori waki et al.Impaired multimerization of human adiponectin mutantsassociated with diabetes.The journal of biological chemistry278 41.2003,278(41),40353-40355 页.

审查员 边昕

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 2 页

(54)发明名称

试样的前处理方法及使用该方法的免疫学测定方法

(57)摘要

提供了为了通过免疫学测定法可简便、迅速且正确测定混存有各种多聚体的生物体试样中的脂联素的前处理方法。它是用于免疫学测定试样中的脂联素总量的脂联素测定用试样的前处理方法,其特征在于,使含有脂联素的试样与还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少1种作用。

CN 1864067 B

1. 脂联素测定用试样的前处理方法，所述前处理方法是用于免疫学测定试样中脂联素总量的脂联素测定用试样的前处理方法，其特征在于，

向试样中添加选自还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少 1 种试剂；不用煮沸所述试样和试剂的混合物而使所述试剂与试样反应，所述试样包含多聚体脂联素。

2. 如权利要求 1 所述的前处理方法，其特征还在于，蛋白酶是来自微生物的蛋白酶或通过基因重组而得到的蛋白酶。

3. 如权利要求 2 所述的前处理方法，其特征还在于，微生物是选自杆菌属、链霉菌属及曲霉属的微生物。

4. 试样中脂联素总量的测定方法，其特征在于，向试样中加入选自还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少 1 种试剂，不用煮沸试样和试剂的混合物而使所述试剂与试样反应，之后进行免疫学测定脂联素试样，所述试样包含多聚体脂联素。

5. 如权利要求 4 所述的测定方法，其特征还在于，免疫学测定方法是利用负载有抗脂联素抗体的不溶性载体的方法。

6. 如权利要求 4 或 5 所述的测定方法，其特征还在于，蛋白酶是来自微生物的蛋白酶或通过基因重组技术而得的蛋白酶。

7. 如权利要求 6 所述的测定方法，其特征还在于，微生物是选自杆菌属、链霉菌属及曲霉属的微生物。

试样的前处理方法及使用该方法的免疫学测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过免疫学测定法简便、迅速且正确测定试样中脂联素的总量的前处理方法以及利用该方法的脂联素总量的免疫学测定方法。

背景技术

[0002] 脂联素 (adiponectin)(非专利文献 1 ～ 4) 是白色脂肪组织中特异性且表达最丰富的分泌蛋白质之一,是由 244 个氨基酸构成的约 30kDa 的属 Clq 家族的血浆蛋白质。

[0003] 脂联素具有三聚体结构,该三聚体结构是由 N 末端侧的胶原样区和 C 末端侧的球状 (globular :球状) 区形成的单聚体,通过胶原样区中的 Gly-X-Y 重复结构形成的三螺旋 (triple helix) 的三聚体结构。有报道显示,在血中存在该三聚体之间再结合而形成的各种多聚体 (以下,有时总称为“各种多聚体”)。

[0004] 近年,有报告显示脂联素在人血中以 5 ～ 10μg/mL 的高浓度存在,具有各种生理活性。特别是由于可抑制平滑肌细胞的增殖以及可抑制单核细胞对内皮细胞的黏附,因此认为有抑制动脉硬化的效果 (非专利文献 5)。另有报告显示,如果向 2 型糖尿病或脂肪萎缩性糖尿病的病态小鼠给予脂联素,则胰岛素抵抗性和高 FFA(游离脂肪酸) 血症、高 TG(中性脂肪) 血症得到改善,其作为胰岛素敏感性激素具有改善糖尿病的效果 (非专利文献 6)。另外,还有报道显示,脂联素血中浓度低下的肾功能不全患者的心血管并发症发症率高、生存率下降,对胰岛素抵抗性或 2 型糖尿病高发病率的皮马印地安人 (Pima Indian) 的研究中,发现血中脂联素高值群中 2 型糖尿病的发病受到抑制 (非专利文献 7)。

[0005] 这些报告提示,脂联素可能是与内脏脂肪的过剩蓄积和胰岛素抵抗性发病直接相关的内分泌因子,认为血中脂联素浓度的测定作为糖尿病或动脉硬化等发病预测因子,可能成为生活习惯病的良好指标。

[0006] 作为在各种多聚体混存的血液试样中测定脂联素总量的方法,有进行在十二烷基硫酸钠 (SDS) 的存在下煮沸,使各种多聚体中立体结构上隐藏的抗体的识别部位 暴露出的处理之后,进行免疫学测定的方法 (专利文献 1) 的报道。但是,该方法中存在需要用于煮沸 (100℃) 处理的装置、从煮沸处理到免疫学测定的两个工序实现自动化实际上是很困难的等问题。

[0007] 另外,虽然市售有 LINCO RESEARCH, INC. 的 HUMAN ADIPONECTIN RIAKIT(Cat.#HADP-61HK),但是由于该试剂盒是利用使 ^{125}I 标记的小鼠脂联素和人脂联素竞争来用抗脂联素 - 多克隆抗体捕捉的双抗体 /PEG 法,因此操作繁杂,并在安全性、特异性或试剂品质等方面存在问题。要使以竞争反应作为原理的本法的特异性一定,则必须使抗脂联素 - 多克隆抗体与用 ^{125}I 标记的小鼠脂联素以及各种多聚体人脂联素的反应性为一定的,但是如上述,由于生物体试样中混存有各种多聚体,以及各多聚体的存在比例不固定,因此存在不能正确测定脂联素总量的问题。

[0008] 还有关于识别未经 SDS 或热的变性处理的、保持特定立体结构的脂联素 (专利文献 2 说明书中称为天然型) 的单克隆抗体以及利用其的测定方法 (专利文献 2) 的报告,但

是由于试样中脂联素的存在形态（有多少种三聚体，以何种形式聚集等）而与上述单克隆抗体的反应性不同，因此存在不能正确测定各多聚体的存在比例不固定的生物体试样中的脂联素总量的问题。

[0009] 对于脂联素的存在形态，不是研究生物体试样中的脂联素而是使用重组的脂联素来研究。由此有关于通过低 pH 的、二硫苏糖醇 (DTT) 处理（非专利文献 8）或者胰蛋白酶处理（非专利文献 9）来使脂联素形态变化的报道，但是没有关于处理后的脂联素的免疫学测定的记载。

[0010] 如上所述，在试样中的脂联素总量的免疫学测定中，必须进行使各多聚体（三聚体以及三聚体之间再结合形成的各种多聚体）之间与所用抗体的反应性一定的前处理，但是还未提出过简便且可实现从前处理到免疫学测定的两工序自动化的方法。

[0011] 【专利文献 1】日本专利特开 2000-304748 公报

[0012] 【专利文献 2】国际公开 WO 03/016906 公报

[0013] 【非专利文献 1】Scherer P.E.，et al，J.Biol.Chem.270，26746-26749，1995

[0014] 【非专利文献 2】Hu E.，et al，J.Biol.Chem.271，10697-10703，1996

[0015] 【非专利文献 3】Maeda K.，et al，Biochem.Biophys.Res.Commun.221，286-289，1996

[0016] 【非专利文献 4】Nakano Y.，et al，J.Biochem.120，803-812，1996

[0017] 【非专利文献 5】Ouchi N，et al，Circulation，102，1296-1301，2000

[0018] 【非专利文献 6】Yamauchi T，et al，Nature Med.7，941-946，2001

[0019] 【非专利文献 7】Lindsay R.S，et al，Lancet，360，57-58，2002

[0020] 【非专利文献 8】Utpal B.Pajvani，et al.J.Biol.Chem.278，9073-9085，2003

[0021] 【非专利文献 9】Fruebis，J，et al.Proc.Natil.Acad.Sci.98，2005-2531，2001

[0022] 发明的揭示

[0023] 发明要解决的课题

[0024] 本发明的目的是提供用于通过免疫学测定法，简便、迅速且正确测定混存有三聚体及三聚体之间再结合形式的各种多聚体的生物体试样中的脂联素总量的的前处理方法以及利用该处理方法的脂联素总量的免疫学测定方法。

[0025] 解决课题的方法

[0026] 本发明者为了解决上述课题经过认真的研究，结果确认了用还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种处理三聚体及三聚体相互再结合形成的各种多聚体，再用聚丙烯酰胺凝胶电泳（聚丙烯酰胺浓度 2-15％）（以下，记为 PAGE(2-15％)）分析，由此处理前存在的各种多聚体的染色带消失或者减少的同时，在与任一处理前存在的染色带相比的低分子侧出现了被染色检出的来自脂联素的变换物（以下，称为变换物）。确认了该变换物具有与抗脂联素抗体的反应性以及使用抗脂联素抗体可测定该变换物。

[0027] 本发明者进一步研究上述发现，结果发现如用含有还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种的前处理剂处理试样后，进行免疫学测定，则试样与前处理剂无需经煮沸处理，就可测定出各种多聚体混在的生物体试样中的脂联素总量，籍此完成了本发明。

[0028] 即，本发明提供了脂联素测定用试样的前处理方法，它是为免疫学测定试样中的

脂联素总量的脂联素测定用试样的前处理方法，其特征在于，向含有脂联素的试样中加入还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种，不用与试样一起煮沸就发生作用。

[0029] 另外，本发明还提供了前处理剂，该前处理剂是含有还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种的、脂联素总量的免疫学测定用试样的前处理剂，是不用煮沸试样进行前处理的前处理剂。

[0030] 另外，本发明还提供了试样中脂联素总量的测定方法，其特征在于，向含有脂联素的试样中加入还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种，不需与试样一起煮沸而使发生作用后免疫学测定脂联素。

[0031] 另外，本发明还提供了免疫学测定试剂，该试剂是由第一试剂和第二试剂组成，该第一试剂含有还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种，该第二试剂含有不溶性载体，该不溶性载体负载有用于测定脂联素的抗体，其中，试样与第一试剂的反应不用煮沸。

[0032] 发明的效果

[0033] 通过本发明，可简便、迅速且正确地测定混存有各种多聚体的生物体试样中的脂联素总量。

[0034] 附图的简单说明

[0035] 【图 1】通过 western blotting 法的人血清中脂联素的分析图。

[0036] 【图 2】显示 LTIA 试剂与蛋白酶处理的脂联素的反应性的图。

[0037] 【图 3】显示 ELISA 试剂与蛋白酶处理的脂联素的反应性的图。

[0038] 【图 4】使参考例 3 的自人血清精制的脂联素用 PAGE(2-15％）分离，用 CBB 蛋白染色而得的电泳图。

[0039] 实施发明的最佳方式

[0040] 如上述，在生物体试样中的脂联素中存在各种多聚体，但是各多聚体的存在比例（比率）却不固定。由此认为在免疫学测定时，测定中使用的抗体与各种多聚体之间的反应性不同，这样情况时认为难测定特定的多聚体。另外，在夹心免疫测定系中，假设测定试样中各存在一分子的六聚体和三聚体，则在试样中存在 9 个单体，作为测定结果认为，在测定结果上不能区别存在 2 分子三聚体的情况和存在 2 分子六聚体的情况。任一种情况均不能得到反应脂联素总量的测定结果。另外，利用在 SDS 共存下煮沸分解多聚体的前处理的方法中，虽可得到反应脂联素总量的测定结果，但是前处理繁杂，接着要进行免疫学测定，难以对两工序进行自动化。

[0041] 通过上述认识，本发明者发现，如果在进行免疫学测定时，测定使用的抗体与测定试样中的各种多聚体的反应性一定，不用煮沸试样而使各种多聚体变为可得到反应脂联素的总量的测定结果的一定形态，就可以解决上述课题。

[0042] 作为以上述目的为目标的测定试样中的各种脂联素的前处理方法，可例举如向含有脂联素的试样中添加选自还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶的至少 1 种，不用和试样一起煮沸而使其作用的处理方法。通过这些前处理方法所得的变换物的性状可以是各前处理方法间相同，也可以不同。各种多聚体，包括全是单聚体的情况、全是三聚体的情况、全是特定的多聚体的情况。另外，通过前处理，也可以是限制在某分子量范围的变换物。从另一方面来看，为构筑免疫学测定系而选的抗体较好是具有能以一定的反应性识别的性

状。

[0043] 作为本发明中使用的试样，可例举如来自人、猴、山羊、绵羊、兔、小鼠、大鼠、豚鼠以及其他哺乳动物的血液、尿等体液、组织提取液或来自组织的细胞的培养上清液等含有各种脂联素的多聚体的生物体试样。其中，较好为由于与糖尿病或动脉硬化性疾病的相关信息而受到关注的血液（血清·血浆）。试样的采取方法，考虑到测定脂联素总量的目的，如是不影响试样中存在的脂联素的方法就可以使用。

[0044] 作为在本发明的前处理方法、前处理剂、免疫学测定方法、免疫学测定试剂中使用的还原剂，只要是具有可打开脂联素的二硫键的还原能力、对免疫学测定没有实质影响的物质，就可没有特别限定地使用。可例举如 DTT（二硫苏糖醇）、2- 巯基乙醇、半胱胺、硫甘油等硫醇化合物；硼氢化物或膦类等。使用的浓度可为得到希望的变换物而适宜选择来决定。例如是硫醇化合物时，较好使用 DTT 或 2- 巯基乙醇。作为用还原剂处理的条件，较好为 4 ～ 60℃、5 分钟～ 24 小时。

[0045] 作为酸或其盐，只要是可解离各种多聚体的脂联素的结合的有机酸、无机酸，就可无限定地使用。可例举如醋酸、枸橼酸、盐酸、甲酸、酒石酸、草酸等。使用的浓度可为得到希望的变换物而适宜选择来决定，较好为 1 ～ 1000mM，更好为 10 ～ 200mM。另外也可用作缓冲液。用作缓冲液时的 pH，较好为 pH 在 4 以下。作为用酸或其盐处理的条件，较好为 4 ～ 60℃、5 分钟～ 24 小时。

[0046] 作为表面活性剂，是作用于各种多聚体，使其变化为在免疫学测定时反映脂联素总量的形态的物质，如果可维持脂联素与特异抗体的反应性，则没有离子性或非离子性等的限制，均可使用。其中，较好为阴离子性表面活性剂，十二烷基硫酸盐等烷基硫酸盐或十二烷基苯磺酸盐等烷基苯磺酸盐等较为适宜。这些表面活性剂可单独使用也可将多个组合使用。使用浓度大致为 0.01 ～ 10％，更好为 0.1 ～ 5％。更好为与酸或其盐的处理组合使用。

[0047] 作为蛋白酶，如果是作用于各种多聚体，可使各种多聚体变化为在免疫学测定中反映脂联素总量的形态的蛋白酶，则可无特别限制地使用。使用的浓度也可为了得到希望的变换物而适宜选择来决定。蛋白酶的来源无特别的限定，可如来自微生 物、来自动物、来自植物等，较好为使用来自杆菌属、链霉菌属或曲霉属等微生物的蛋白酶。作为来自杆菌属的蛋白酶的市售品，可例举如蛋白酶 X 型 (Proteasetype X)（シグマ公司）、肌球吸附蛋白 (Protin)AC、肌球吸附蛋白 (Protin)PC（均来自大和化成公司）、蛋白酶 S“アマノ”（アマノエンザイム公司）、スミチーム CP（新日本化学工业公司）等。作为来自链霉菌属的蛋白酶的市售品，可例举如 ProteasetypeXIV（シグマ公司）、链霉蛋白酶（ロシユ公司）、アクチナーゼ AS（科研制药公司）等。另外，作为来自曲霉属的蛋白酶的市售品，可例举如蛋白酶 A“アマノ”、蛋白酶 P“アマノ”、ウマミザイム（均来自アマノエンザイム公司）、スミチーム MP（新日本化学工业公司）等。这些蛋白酶也可以是通过基因重组技术得到的。另外，也可实施化学修饰。生物体试样的蛋白酶处理条件，随使用的蛋白酶不同而不同，较好为在磷酸、Tris、Good’s 等缓冲液中，于 4 ～ 60℃进行 5 分钟～ 24 小时。蛋白酶的使用浓度可考虑反应温度及反应時间来决定，大致在 0.01 ～ 100mg/ml 的范围内。

[0048] 这些还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶的使用方法也没有特别的限定。可以单独使用也可组合使用。例如，可使还原剂或酸与含有脂联素的试样作用后，再进行蛋白酶

处理。另外，使用这些还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶时，为了调整这些物质与脂联素作用的环境，以及提高这些物质的保存稳定性，也可适宜添加磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good's 缓冲液等缓冲成分；不与各种多聚体作用的表面活性剂、牛血清白蛋白 (BSA)、蔗糖、防腐剂（叠氮化钠等）、盐浓度调整剂（氯化钠等）等。

[0049] 本发明的免疫学测定方法中使用的抗体如果是在使选自还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少一种不需进行煮沸处理与各种多聚体脂联素作用之后，可测定脂联素总量的话，则可无特别限制地使用。所述抗体中，多克隆抗体是含有与呈一定形态的脂联素中存在的多个表位特异结合的，多个抗体的多克隆抗体。多克隆抗体可通过对适当的动物，例如兔子、山羊、绵羊、马、牛、小鼠、大鼠等动物，通过自身公知的方法进行脂联素免疫而得。另一方面，单克隆抗体是与呈一定形态的脂联素特异结合的 1 种以上的不同的单克隆抗体。单克隆抗体可以通过在细胞融合技术领域中，适当选择自身公知的方法，或组合这些方法形成产生单克隆抗体的融合细胞株，利用该细胞株而得。另外，与呈一定形态的脂联素特异性结合的多克隆抗体或单克隆抗体，也可以从市售品得到，可在本发明中使用。例如，可根据脂联素的形态，适宜利用 Goat α human Acrp30 antibody（コスモバイオ公司、GT 公司）、rabbit α hu adiponectin-PoAb（コスモバイオ公司、chemicon 公司）、huAcrp30-MoAb（藤泽药品工业公司、BD 公司）、Mouse α hu Adiponectin MoAb（コスモバイオ公司、chemicon 公司）、抗人 ACRP30 单克隆抗体 (AX773、AX741、Ne，Na、和光纯药工业公司）等。

[0050] 作为用于得到本发明所用抗体的抗原，可以使用按照通常方法，由试样精制、单离的脂联素。也可使用由含有还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶中的至少 1 种的前处理液，不经煮沸进行处理后的脂联素。另外，该抗原也可是根据其蛋白质的基因序列信息，通过通常的基因学方法而制得的重组蛋白。

[0051] 作为本发明的免疫学测定方法，可使用使与变换成一定形态的脂联素特异结合的抗体与不溶性载体结合，通过这样捕捉变化成一定形态的脂联素，从而确定在试样中有无存在脂联素（定性）或定量的方法，其中，可例举如 LTIA（胶乳免疫比浊法）、ELISA（酶联免疫吸附测定法）、CLEIA（化学发光酶免疫测定法）、RIA（放射免疫分析法）等方法。其中，LTIA 较好，它是通过混合不溶性载体和变化成一定形态的脂联素，该不溶性载体上负载有可与变化成一定形态的脂联素特异结合的抗体，由此通过变化成一定形态的脂联素引起不溶性载体的交联（凝集），通过光学测定该结果生成的混浊，从而确定脂联素的有无（定性）或者定量的方法，可简便、迅速且正确地测定脂联素。

[0052] 作为本发明所使用的不溶性载体，使用在通常的免疫学测定试剂中所使用的可工业大量生产的有机系不溶性载体。在 LTIA 中，较好为抗体的吸附性优良且可长期稳定保持生物学活性的聚苯乙烯系的胶乳粒子，在 ELISA 中较好为聚苯乙烯等的 96 孔微量培养板。

[0053] 使抗体负载在上述不溶性载体的表面上的方法已知有很多种，在本发明中可适宜利用。例如，作为担持（敏化）方法，可例举如使抗体物理吸附在不溶性载体表面的方法、在具有官能基的不溶性载体表面上通过已知的物理结合法或化学结合法高效地敏化抗体的方法。

[0054] 负载有抗体的抗体不溶性载体与变化成一定形态的脂联素的反应，如果是可引起抗原抗体反应的条件，则该反应条件没有特别的限定。作为反应液，只要是可引起与经前处

理后的变化成一定形态的脂联素之间的抗原抗体反应的溶液，均可使用。例如，其中可适宜溶解下列物质：作为控制 pH 的缓冲成分的磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液、Good's 缓冲液等；避免非特异反应的表面活性剂或氯化钠等；作为稳定剂的牛血清白蛋白 (BSA)、蔗糖、高分子多糖类等；除控制反应性的 上述物质之外的右旋糖酐等水溶性多糖类；中和前处理剂中的还原剂或酸的中和剂；蛋白酶的钝化剂等添加剂。

[0055] 作为上述 LTIA 或 ELISA 中的检测方法，可例举如下方法。LTIA 中测定不溶性载体的凝集程度的方法没有特别的限定。例如，定性或者半定量测定凝集时，通过比较已知浓度试样的混浊程度与测定试样的混浊程度，可肉眼判断凝集的程度。另外，定量测定该凝集时，从简便性以及精确度的角度，较好为光学测定。作为凝集的光学测定法，可使用公知的方法。更具体地讲，例如可利用所说的比浊法（将浊度增加视为凝集块形成）、通过粒度分布的测定法（将粒度分布或平均粒径的变化视为凝集块的形成）、积分球浊度法（使用积分球测定凝集块形成引起的前方散射光的变化，比较与透光强度的比）等各种方法。ELISA 中测定来自酶标记抗体的酶活性的，基质与酶的反应生成物的方法没有特别的限定。例如，在酶反应生成物固有波长，例如作为 492nm 的吸光度，可通过 96 孔微量培养板酶标仪读取。

[0056] 实施例

[0057] 以下，例举实施例详细说明本发明，但是本发明不限定于此。

[0058] 实施例以及试验例中使用的试剂及材料如下所示。

[0059] < 试剂以及材料 >

[0060] a. 抗体结合树脂用清洗液：含 0.5M NaCl 的 0.1M $NaHCO_3$-NaOH(pH 8.3)。

[0061] b. 抗体结合树脂用提取液：0.1M Glycine-HCl(pH 2.5)。

[0062] c. 抗体结合树脂用中和液：2M Tris-HCl(pH 8.0)。

[0063] d. 胶乳：平均粒径 0.2μm 的聚苯乙烯粒子胶乳（固形分 10% (w/v)、积水化学工业公司）。

[0064] e. 负载的抗体胶乳调制用缓冲液：20mM Tris-HCl(pH 8.0)。

[0065] f. 阻断用缓冲液：含 2% BSA 的 20mM Tris-HCl(pH 8.0)。

[0066] g.LTIA 用缓冲液 (R1)：含 0.15% BSA、0.15M NaCl 的 20mM Tris-HCl(pH 8.0)。

[0067] h.ELISA 用板：96 孔微量培养板 (NUNC 公司）。

[0068] i.ELISA 用抗体敏化溶液：PBS(pH 7.4)。

[0069] j.ELISA 用缓冲液：1% BSA，含 0.1% Tween 20 的 PBS(pH 7.4)。

[0070] k.Goat α human Acrp30 antibody：コスモバイオ公司、GT 公司、Cat No.421065（抗人脂联素 - 多克隆抗体的市售品）。

[0071] l.hu Acrp30-MoAb：藤泽药品工业公司、BD Transduction Laboratories 公司、商品编号 A12820（抗人脂联素 - 单克隆抗体的市售品）。

[0072] m.Goat α rabbit IgG HRP 标记抗体：コスモバイオ公司、capple 公司。

[0073] n.ELISA 用清洗液：含 0.05% Tween 20 的 PBS(pH7.4)。

[0074] o.ELISA 用缓冲液 2：1% BSA，含 0.05% Tween 20 的 PBS(pH7.4)。

[0075] 参考例 1. 大肠菌重组小鼠球状脂联素 (rMgAd) 的调制

[0076] 在含有 6×His 标记的 pQE30 载体的 BamHI、HindIII 中插入小鼠脂联素的基因序列 (NCBI accession #U37222) 的球状区序列（相当于 104-247 残基），植入到大肠菌中。对

表达重组小鼠球状脂联素 (rMgAd) 的大肠菌，按照如下方法进行 rMgAd 的精制。即，在 4℃、16 小时的条件下将大肠菌的可溶成分添加到 Ni-NTA 琼脂糖 (QIAGEN 公司) 中，使 rMgAd 结合后，通过咪唑逐步提取，回收含有脂联素的成分，在 3 日内用 PBS 进行透析。所得的 rMgAd 的蛋白质浓度使用 Bio-Rad DC protein assay kit 求得。

[0077] 参考例 2. 抗 rMgAd 抗体的调制

[0078] 将上述 1 得到的 rMgAd50μg 与等量的弗氏的完全佐剂混合，对 2 只兔子以 2 周为间隔免疫 6 次制作抗血清。抗血清中的特异抗体 (IgG) 的精制可使用 Protein A 树脂通过常用方法进行 (抗 rMgAd 抗体)。

[0079] 参考例 3. 来自人血中的脂联素 (mAd) 的精制

[0080] 使由上述参考例 2 制作的抗 rMgAd 抗体 500mg 与 CNBr-activated Sepharose 4B(アマシヤムバイオサイエンス公司)50mL 结合，制作抗 rMgAd 抗体结合 Sepharose4B 树脂。向抗 rMgAd 抗体结合 Sepharose 4B 树脂中添加人血清 2.5L，用抗体结合树脂用清洗液充分清洗后，用抗体结合树脂用提取液提取人血清脂联素 (mAd) 成分，向提取成分中加入 1/10 容量的抗体结合树脂用中和液进行中和。再将经中和的提取成分添加到 Protein A 树脂中，将对 Protein A 树脂的非吸附成分作为精制 mAd 进行回收，通过人脂联素 ELISA 试剂盒 (大塚制药公司) 测定脂联素含量。

[0081] 参考例 4. 抗人脂联素单克隆抗体制作

[0082] 将由上述参考例 3 所得的精制 mAd20μg 与等量的弗氏完全佐剂混合，对 2 只小鼠以 2 周为间隔进行 3 或 4 次免疫，在细胞融合 3 日前再次给予。从该免疫小鼠提取脾脏细胞，使用聚乙二醇通过常用方法进行与 P3U1 骨髓瘤细胞的细胞融合。产生抗人脂联素单克隆抗体的融合细胞的选择，是通过如下的常用方法进行，即，经 ELISA 法选择与 mAd 的反应性高的孔，接着用极限稀释法进行选择。抗人脂联素单克隆抗体是将选择的融合细胞给予经降植烷 (pristane) 处理的小鼠腹腔内，再作为腹水回收 。来自腹水的特异抗体 (IgG) 的精制可使用 Protein A 树脂通过常用方法来进行。通过上述，得到用识别编号 :64401-64411 识别的 11 个产生单克隆抗体的融合细胞和单克隆抗体。

[0083] 参考例 5. 抗体变应化胶乳的调制

[0084] 在 1 体积的胶乳液中混入 4 体积的负载抗体胶乳调制用缓冲液，调制稀释胶乳液。另一方面，通过用负载抗体胶乳调制用缓冲液稀释使抗 rMgAd 抗体或抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 至 1mg/mL 来调制稀释抗体液。一边搅拌 1 体积上述稀释胶乳液，一边分别添加・混合上述 2 种稀释抗体液，再次搅拌之后，再添加阻断用缓冲液 2 体积，继续搅拌。得到的抗体变应化胶乳分别作为负载抗 rMgAd 抗体胶乳原液以及负载抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 胶乳原液。

[0085] (试验例 1) 通过 Western blotting 对人血清中的多聚体脂联素的解析

[0086] 使用 PAGE(2-15％) 分别分离来自 8 名健常者的血清 0.2μL，通过半干转移装置 (semi-dry blotting) 复制至 PVDF 膜后，进行免疫染色。免疫染色的顺序如下。首先，用含有 5％脱脂乳及 0.1％ NaN_3 的 PBS 液 (pH7.4) 阻断复制后的膜，用含有 0.1％ Tween20(pH7.4) 的 PBS 液清洗，使之与市售的抗人脂联素 - 单克隆抗体 (huAcrp30-MoAb ; 藤泽药品工业公司、BD Transduction Laboratories 公司)1μg/mL 在室温下反应 1 小时。接着，用含 0.1％ Tween20 的 PBS 液 (pH7.4) 充分清洗后，用 Vector ABC kit(Mouse) 及 DAB

基质试剂盒（フナコシ公司）使其显色。结果，作为主要的条带的3种条带被染色检出。这样清楚了血中存在的各种多聚体脂联素主要有3种（图1）。相当于这3种染色带的脂联素，从电泳图的上部（高分子侧）开始，分别是HMW-Ad、MMW-Ad以及LMW-Ad成分。

[0087] 实施例1 精制mAd的由还原剂、酸或其盐以及蛋白酶的处理

[0088] 将由参考例3所得的精制mAd作为试样，使还原剂、酸或其盐以及蛋白酶单独或组合发生作用来进行处理，观察精制mAd的形态变化。

[0089] 1）还原剂、酸处理

[0090] 对含有精制mAd的50mM各种缓冲液（Tris-HCl pH8.5、醋酸钠pH3.0以及pH4.0），在添加10mM DTT作为还原剂或不添加的条件下，在37℃保持60分钟。处理后的液体用PAGE(2-15％）分离，通过CBB进行蛋白染色。以Tris-HCl pH8.5、不添加DTT（处理条件1）的染色图作为对照，观察在各处理条件下的相当于HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad各成分的条带的增减以及新的变换物条带的生成（表1）。

[0091] 结果，在不添加还原剂的处理条件下，在pH3.0及pH4.0的醋酸钠缓冲液（处理条件3、5）时，确认HMW-Ad成分的染色带消失，增加MMW-Ad成分。在添加还原剂的处理条件下，当pH3.0及pH4.0的醋酸钠缓冲液（处理条件4、6）时，确认HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad3成分均染色带消失，同时各成分的变换物的新染色带出现。在Tris-HCl(pH8.5)（处理条件2）时，确认各成分的变换物的新染色带出现，但HMW-Ad成分没有完全消失。

[0092] 以上确认了，使多聚体脂联素（HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad）与还原剂、酸或其盐作用，由多聚体脂联素生成新的变换物。通过上述处理生成的变换物推测是三聚体脂联素。

[0093] 【表1】

处理条件		1	2	3	4	5	6
缓冲液		Tris-HCl	Tris-HCl	醋酸-NaOH	醋酸-NaOH	醋酸-NaOH	醋酸-NaOH
pH		8.5	8.5	3.0	3.0	4.0	4.0
还原剂		－	添加	－	添加	－	添加
多聚体脂联素	HMW-Ad	＋＋	＋	－	－	－	－
	MMW-Ad	＋＋	－	＋＋＋	－	＋＋＋	－
	LMW-Ad	＋＋	－	＋＋	－	＋＋	－
	变换物	－	＋＋＋	－	＋＋＋	－	＋＋＋

[0094] (+) ＝减少 (++) ＝不变 (+++) ＝增加或生成变换物

[0095] (-) ＝消失或未生成变换物

[0096] 2）蛋白酶处理

[0097] 向50mM磷酸缓冲液(pH8.0)中添加精制mAd及各种蛋白酶（均是市售品），在37℃保持60分钟。用PAGE(2-15％）分离处理后的液体，通过CBB进行蛋白染色。以Tris-HCl(pH8.5)、不添加DTT（处理条件1）的染色图作为对照，观察在各处理条件下，相当于HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad各成分的条带的增减以及新变换物条带的生成（表2）。

[0098] 在处理条件7～9中确认了HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad3成分均染色带消失，同时在低分子量域出现了各成分的变换物的新染色带。在处理条件10～12中，确认了LMW-Ad及MMW-Ad成分消失，在低分子量域出现各成分的变换物的新染色带。这时，HMW-Ad成分的染色带未见变化。

[0099] 以上确认了，通过使多聚体脂联素(HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad)与蛋白酶作用，由多

聚体脂联素生成了新变换物。这些变换物在PAGE(2-15％）上的染色带检出位置，随作用的蛋白酶而不同，但是在 30 ～ 42kDa 的范围内。

[0100] 另外，关于处理条件 10 ～ 12 的蛋白酶可知，不进行酸或其盐的处理，使 HMW-Ad 成分变换成 MMW-Ad 成分后，通过进行蛋白酶处理，所有的成分均可变换成新的变换 物。

[0101] 【表 2】

处理条件	7	8	9	10	11	12
蛋白酶	蛋白酶 XIV 型	蛋白酶 X 型	肌球吸附蛋白 AC	蛋白酶 P“アマノ”	蛋白酶 A“アマノ”	ウマミザイム
多聚体脂联素 HMW-AdMMW-AdLMW-Ad 变换物	---+++	---+++	---+++	++---+++	++---+++	++---+++

[0102] (+) ＝减少 (++) ＝不变 (+++) ＝增加或生成变换物

[0103] (-) ＝消失或未生成变换物

[0104] 实施例 2 胶乳试剂与各脂联素的反应性

[0105] 使用 ELISA 用缓冲液 1/5、1/25 倍稀释经蛋白酶处理的精制 mAd，将其作为检体。另外，将在参考例 5 中调制的各种胶乳原液用负载抗体胶乳调制用缓冲液稀释至 1/10 倍，将其作为试剂 2 在测定中使用，在如下的测定条件：检体量：10μL、试剂 1(LTIA 用缓冲液 (R1))：100μL、试剂 2：100μL、测定波长：570nm、测光点 (point)：18-34，用生化学自动分析装置日立 7170 形（日立制作所公司）进行测定。测定结果示于图 2。

[0106] 抗 rMgAd 抗体及抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 的胶乳试剂的吸光度依赖于人血清脂联素的浓度而变化，该人血清脂联素是经 Protin AC、蛋白酶 X 型的蛋白酶处理的。

[0107] 确认了肌球吸附蛋白 (Protin)AC、蛋白酶 X 型的蛋白酶可使多聚体脂联素以保持抗 rMgAd 抗体及抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 所识别的抗体识别部位的状态，变换成新的变换物，也确认了它们可以使用于为测定试样中的脂联素总量的前处理中。

[0108] 实施例 3 ELISA 试剂与各脂联素的反应性

[0109] 在 ELISA 板中用 ELISA 用抗体变应化溶液稀释 Goat α human Acrp30 antibody 或者抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 至 1μg/mL 后、进行变应化。用 ELISA 用缓冲液阻断后，将使用 ELISA 用缓冲液 1/2、1/20、1/200 倍稀释经蛋白酶处理的 mAd 而得的检体在室温下反应 1 小时。用 ELISA 用缓冲液清洗板之后，将使用 ELISA 用缓冲液 1/10000 倍稀释的抗 rMgAd 抗体液在室温下反应 1 小时后，用 ELISA 用缓冲液清洗板，将使用 ELISA 用缓冲液 1/1000 倍稀释的 Goat α rabbit IgG HRP 标记体液在室温反应 1 小时。使用 ELISA 用缓冲液清洗板之后，通过使用 TMB（四甲基联苯胺）和过氧化氢的 HRP 酶反应使其显色，添加 2N 硫酸使反应停止后，测定 450nm 的吸光度。测定结果 示于图 3。

[0110] 抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 与抗 rMgAd 抗体的组合以及 Goat α humanAcrp30 antibody 与抗 rMgAd 抗体组合的 ELISA 试剂的吸光度依赖于经肌球吸附蛋白 (Protin)AC、蛋白酶 X 型的蛋白酶处理的人血清脂联素的浓度而变化。

[0111] 明确了肌球吸附蛋白 (Ptotin)AC、蛋白酶 X 型的蛋白酶可使多聚体脂联素在保持 Goat α human Acrp30 antibody、抗人脂联素单克隆抗体 (64401) 及抗 rMgAd 抗体所识别的抗体识别部位的状态下，变换成新的变换物，也确认了它们可用于为测定试样中的脂联素总量的前处理中。

[0112] （试验例 2）来自人血中的多聚体脂联素的解析

[0113] 用 PAGE(2-15％）分离按照参考例 3 新调制的精制 mAd，通过考马斯亮蓝 (CBB) 蛋白染色（图 4）。再通过与试验例 1 相同的操作，使用市售的抗人脂联素 - 单克隆抗体

(huAcrp30-MoAb) 进行免疫染色。自染色图的分析结果明确了，自人血清精制的多聚体脂联素中，除试验例 1 中确认的 3 种以外，还有 1 种被检出虽然是量非常少，即，至少存在 4 种。相当于这 4 种 CBB 染色带的脂联素自电泳图的上部开始（高分子侧），分别是 HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad 及 ULMW-Ad 成分。

[0114] 实施例 4 精制 mAd 的由还原剂、酸或其盐、表面活性剂及蛋白酶的处理

[0115] 将在试验例 2 中解析的精制 mAd 作为试样，使还原剂、酸或其盐、表面活性剂以及蛋白酶单独或组合发生作用来进行处理，观察精制 mAd 的形态变化。

[0116] 1) 还原剂、酸处理的组合

[0117] 对于含有精制 mAd 的 100mM 的各种缓冲液 (Tris-HCl pH8.5、枸橼酸钠 pH3.0 ～ 6.0)，在添加 10mM 2- 巯基乙醇作为还原剂或不添加的条件下，于 37℃保持 30 分钟。用 PAGE(2-15％) 分离处理后的溶液，通过 CBB 进行蛋白染色。将 Tris-HCl pH8.5、不添加 2- 巯基乙醇（处理条件 13) 的染色图作为对照，观察在各处理条件下，相当于 HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad、ULMW-Ad 各成分的条带的增减以及新的变换物条带的生成（表 3)。

[0118] 结果、在不添加还原剂的处理条件下，pH4.0 以上的枸橼酸钠缓冲液（处理条件 15,17,19) 时确认了，HMW-Ad 成分的染色带随着枸橼酸钠缓冲液的酸性化显示消失的趋势，且 MMW-Ad 成分有增加。在 pH3.0（处理条件 21) 下，新确认了比 ULMW-Ad 电泳距离长的变换物的染色带。另一方面，在添加还原剂的处理条件下，在 pH6.0 以上（处理条件 14,16) 时，HMW-Ad 的染色带残存，但是在 pH5.0 及 4.0 的处理条件 18,20 下，所有成分的染色带均消失，在与 ULMW-Ad 几乎相同的位置，新确定了宽染 色带。另外，在 pH3.0（处理条件 22) 下，在与处理条件 21 几乎相同的位置上，新确认了变换物的宽的条带。

[0119] 通过以上确认了，使多聚体脂联素 (HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad 及 ULMW-Ad) 与还原剂、酸或其盐作用，则由多聚体脂联素生成新的变换物。分别推定，在处理条件 21 所生成的变换物是二聚体、在添加还原剂的条件 (14,16,18,20) 下生成的变换物为三聚体、在处理条件 22 生成的变换物为单体。通过切出条带的解析确认了 ULMW-Ad 为三聚体、LMW-Ad 是与白蛋白结合的三聚体脂联素。

[0120] 【表 3】

处理条件		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
缓冲液		Tris-HCl		枸橼酸-NaOH		枸橼酸-NaOH		枸橼酸-NaOH		枸橼酸-NaOH	
PH		8.5		6.0		5.0		4.0		3.0	
还原剂		－	添加	－	添加	－	添加	－	添加	－	添加
多聚体脂联素	HMW-Ad	++	+	++	+	+	－	－	－	－	－
	MMW-Ad	++	－	++	－	+++	－	+++	－	－	－
	LMW-Ad	++	－	++	－	++	－	++	－	－	－
	ULMW-Ad	++	－	++	－	++	－	++	－	－	－
	变换物	－	+++	－	+++	－	+++	+++	+++	+++	+++

[0121] (+) ＝减少 (++) ＝不变 (+++) ＝增加或生成变换物

[0122] (-) ＝消失或未生成变换物

[0123] 2) 蛋白酶处理

[0124] 向 50mM 磷酸缓冲液 (pH8.0) 中添加精制 mAd 及各种蛋白酶（均是市售品）至 1mg/ml，在 37℃保持 60 分钟。用 PAGE(2-15％) 分离处理后的溶液，通过 CBB 进行蛋白染色。将 Tris-HCl(pH8.5)、不添加 DTT（处理条件 1) 的染色图作为对照，观察在各处理条件下相

当于 HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad 及 ULMW-Ad 的各成分的条带的增减及新的变换物色带的生成（表 4）。

[0125] 在处理条件 23 ～ 25 中，确认了 HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad 及 ULMW-Ad4 成分所有的染色带均消失，同时在低分子量域出现了各成分的变换物的新染色带。在处理条件 26 ～ 28 中，确认了 ULMW-Ad、LMW-Ad 及 MMW-Ad 成分消失，同时在低分子量域出现了各成分的变换物的新染色带。此时，HMW-Ad 成分的染色带未见变化。

[0126] 通过上述，确认了使多聚体脂联素 (HMW-Ad、MMW-Ad、LMW-Ad 及 ULMW-Ad) 与蛋白酶作用，则由多聚体脂联素生成新的变换物。这些变换物的在 PAGE(2-15％) 上的染色带的检出位置，虽然会随作用的蛋白酶而有所不同，但是在 30 ～ 42kDa 的范围。通过将这些变换物的凝胶切出进行氨基酸分析结果明确了，它们为球状脂联素。

[0127] 另外，关于处理条件 26 ～ 28 的蛋白酶可知，不进行酸或其盐的处理，使 HMW-Ad 成分变换成 MMW-Ad 成分后，通过进行蛋白酶处理，所有的成分均可变换成新的变换 物。

[0128] 【表 4】

处理条件		23	24	25	26	27	28
蛋白酶		蛋白酶 XIV 型	蛋白酶 X 型	肌球吸附蛋白 AC	蛋白酶 P“アマノ”	蛋白酶 N“アマノ”	蛋白酶 K
多聚体脂联素	HMW-Ad	-	-	-	++	++	++
	MMW-Ad	-	-	-	-	-	-
	LMW-Ad	-	-	-	-	-	-
	ULMW-Ad	-	-	-	-	-	-
	变换物	+++	+++	+++	+++	+++	+++

[0129] (+) ＝减少 (++) ＝不变 (+++) ＝增加或生成变换物

[0130] (-) ＝消失或未生成变换物

[0131] 实施例 5 组合酸处理、表面活性剂的血中脂联素总量的测定

[0132] (1) 前处理液的调制

[0133] 作为酸处理的条件，选择 100mM 枸橼酸钠缓冲液 (pH3.0)，在其中添加市售的各种表面活性剂。作为添加的表面活性剂，可使用作为阴离子性表面活性剂的 SDS 及 NEOPELEX F65（花王公司制）；作为阳离子性表面活性剂的 QUARTAMIN 24P 及 QUARTAMIN 86P（花王公司制）；作为非离子性表面活性剂的 Triton X-100 及 Tween 20。添加浓度除 SDS 为 2％之外，其余均为 0.5％。

[0134] (2) 检体的处理

[0135] 向从 8 名志愿者采取的血清检体各 10μL 中添加上述各种前处理液 490μL 添加，充分搅拌后，不煮沸，用 ELISA 用缓冲液 2 稀释 5250 倍。为了比较效果，在上述各血清 10μL 中添加作为前处理液的 50mM Tris-HCl(pH6.8，2％ SDS) 溶液 490μL，充分搅拌后，煮沸处理，用 ELISA 用缓冲液 2 稀释 5250 倍作为对照。作为计算浓度的标准品使用将试验例 2 中解析的精制 mAd 在 50mM Tris-HCl(pH6.8，2％ SDS) 溶液中煮沸处理，再用 ELISA 用缓冲液 2 系列稀释所得的溶液。

[0136] (3) 脂联素总量测定

[0137] 在 ELISA 用板中用 PBS 稀释抗人脂联素单克隆抗体 (64405) 至 5μg/mL 后，变应化。接着，用 ELISA 用缓冲液 2 阻断后，添加上述标准品及血清处理液，在室温下反应 1 小

时。用 ELISA 用清洗液清洗板后，让使用 ELISA 用缓冲液 2 稀释 2000 倍的 Biotin 标记抗人脂联素单克隆抗体 (64404) 在室温反应 1 小时后，再添加用 ELISA 用缓冲液 2 稀释 2000 倍的 HRP-Avidin，在室温下反应 30 分钟。用 ELISA 用清洗液清洗板，通过 OPD 显色液（含有 2mg/ml 邻苯二胺盐酸盐、0.02％过氧化氢的 250mM 枸橼酸酸缓冲液，pH5.0）使之显色，添加停止液 (1.5N 硫酸、1mM EDTA-2Na) 使反应停止后，测定 492nm 的吸收。从标准品的显色值，换算经各前处理液的血清中的脂联素总量（浓度），与经 50mM Tris-HCl(pH6.8，2％ SDS) 溶液煮沸处理的条件对照，进行相关分析（表 5）。

[0138] 结果可知，不添加表面活性剂的酸处理条件中，相关系数良好，回归式中的斜率为 0.45，与对照的换算值相比为低值。在表面活性剂共存的情况下，相关系数提高的同时，测定值具有接近于对照的换算值的倾向。特别是，阴离子性表面活性剂共存的情况，该效果显著，如使用本发明的前处理方法，则不用煮沸试样，就可能测定试样中的脂联素总量。

[0139] 【表 5】

	不添加表面活性剂	阴离子性	阴离子性	阳离子性	阳离子性	非离子性	非离子性
		2%SDS	0.5 % NEOPELEX F65	0.5 % QUARTAMIN 24P	0.5 % QUARTAMIN 86P	0.5 % Triton X-100	0.5 % Tween 20
斜率	0.45	0.88	0.83	0.58	0.57	0.6	0.59
截距	0.9	0.3	-0.6	0.4	0.2	0.1	0.2
相关系数(r^2=)	0.966	0.994	0.996	0.984	0.993	0.992	0.986

[0140] （对照）50mM Tris-HCl pH6.8(2％ SDS) 煮沸处理

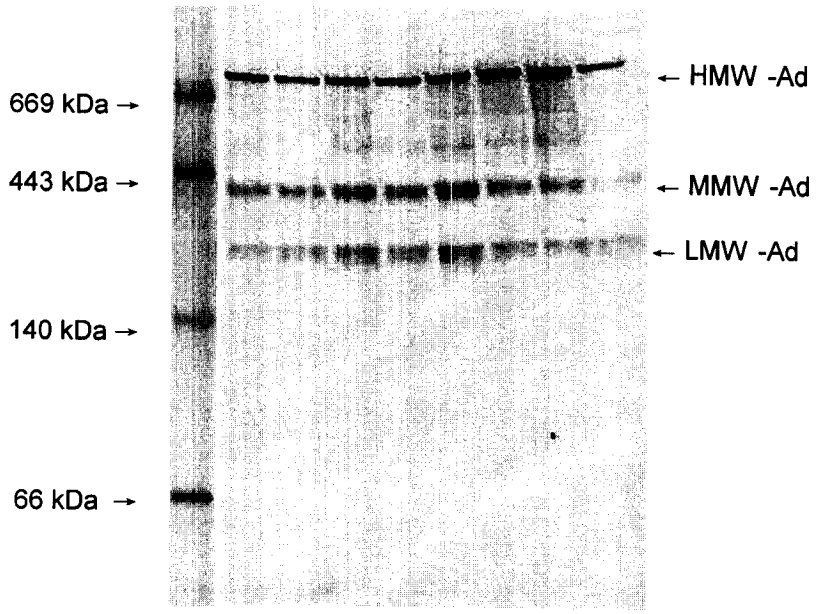

669 kDa →
443 kDa →
140 kDa →
66 kDa →
← HMW -Ad
← MMW -Ad
← LMW -Ad

图 1

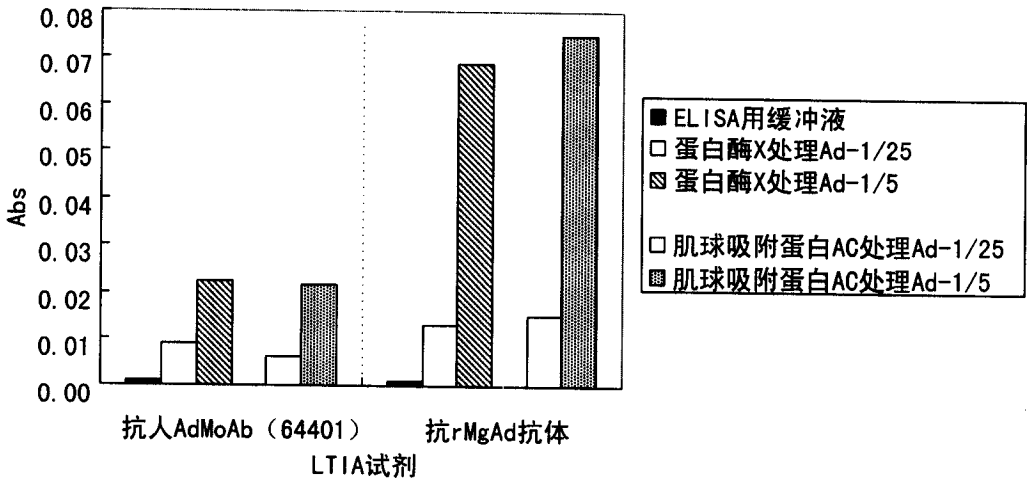

0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Abs
抗人AdMoAb（64401）
抗rMgAd抗体
LTIA试剂
ELISA用缓冲液
蛋白酶X处理Ad-1/25
蛋白酶X处理Ad-1/5
肌球吸附蛋白AC处理Ad-1/25
肌球吸附蛋白AC处理Ad-1/5

图 2

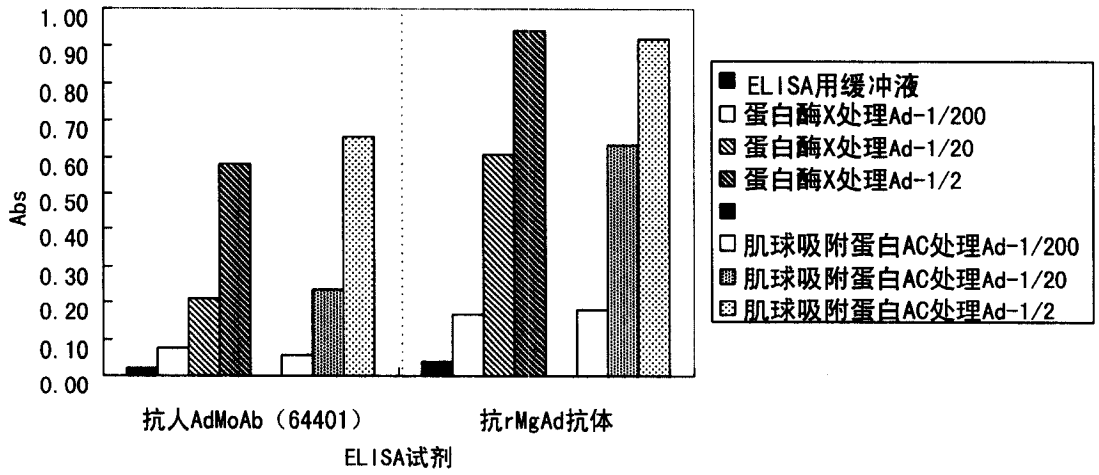

1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Abs
抗人AdMoAb（64401）
抗rMgAd抗体
ELISA试剂
ELISA用缓冲液
蛋白酶X处理Ad-1/200
蛋白酶X处理Ad-1/20
蛋白酶X处理Ad-1/2
肌球吸附蛋白AC处理Ad-1/200
肌球吸附蛋白AC处理Ad-1/20
肌球吸附蛋白AC处理Ad-1/2

图 3

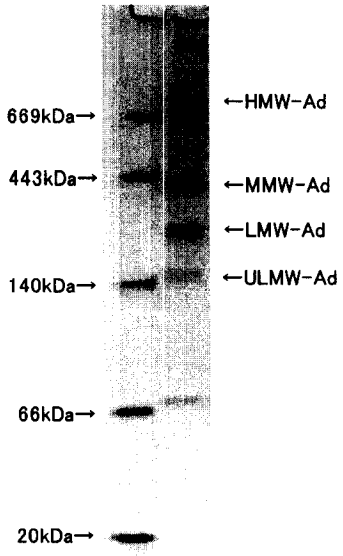

669kDa→
443kDa→
140kDa→
66kDa→
20kDa→
←HMW-Ad
←MMW-Ad
←LMW-Ad
←ULMW-Ad

图 4