



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201035547 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：098135792

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/02 (2006.01)

G01N33/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/24

美國

61/108,315

2009/02/12

美國

12/370,469

(71)申請人：美強生營養品公司 (美國) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY (US)
美國

(72)發明人：瑞 蓋恩 RAI, GYAN P. (IN)；羅薩爾 法蘭西柯 ROSALES, FRANCISCO J.
(GT)；朱尼 寨娜 JOUNI, ZEINA (US)；瓦沃倫圖 羅莎琳 WAWORUNTU,
ROSALINE (ID)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：1 共 46 頁

(54)名稱

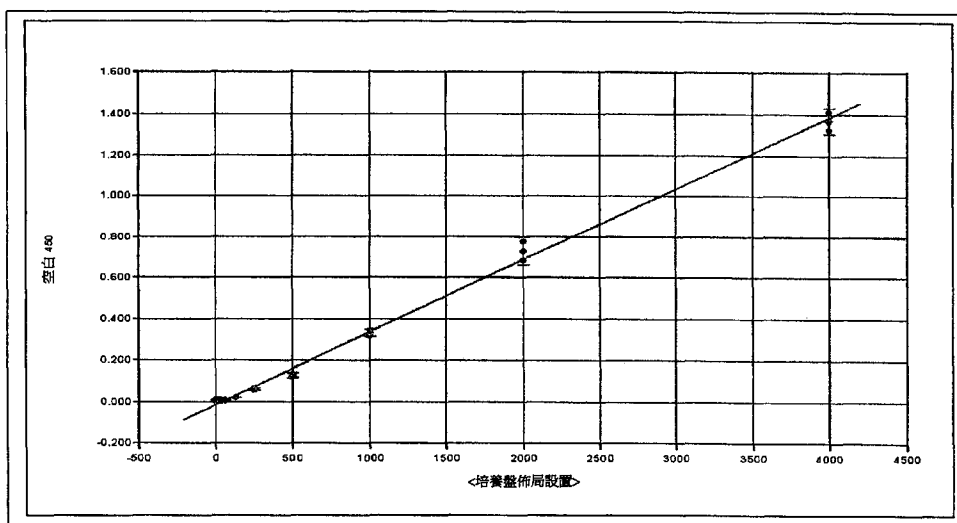
測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法

METHODS FOR DETERMINING THE LEVELS OF TGF- β IN A COMPOSITION

(57)摘要

本發明提供用於測定乳汁、未加工之蛋白質來源、或營養組成物之樣本中的 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度之新穎方法。在某些情況中，該方法涉及重構成該樣本；在某些情況中，該方法涉及將樣本離心；使用樣本：酸：鹼之特定比例以活化該樣本；使用樣本：緩衝劑之特定比例以稀釋該樣本；以及，使用 ELISA 檢定法測定樣本中之 TGF- β 1 的濃度。

標準曲線





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201035547 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：098135792

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/02 (2006.01)

G01N33/04 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/24

美國

61/108,315

2009/02/12

美國

12/370,469

(71)申請人：美強生營養品公司 (美國) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY (US)
美國

(72)發明人：瑞 蓋恩 RAI, GYAN P. (IN)；羅薩爾 法蘭西柯 ROSALES, FRANCISCO J.
(GT)；朱尼 寨娜 JOUNI, ZEINA (US)；瓦沃倫圖 羅莎琳 WAWORUNTU,
ROSALINE (ID)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：1 共 46 頁

(54)名稱

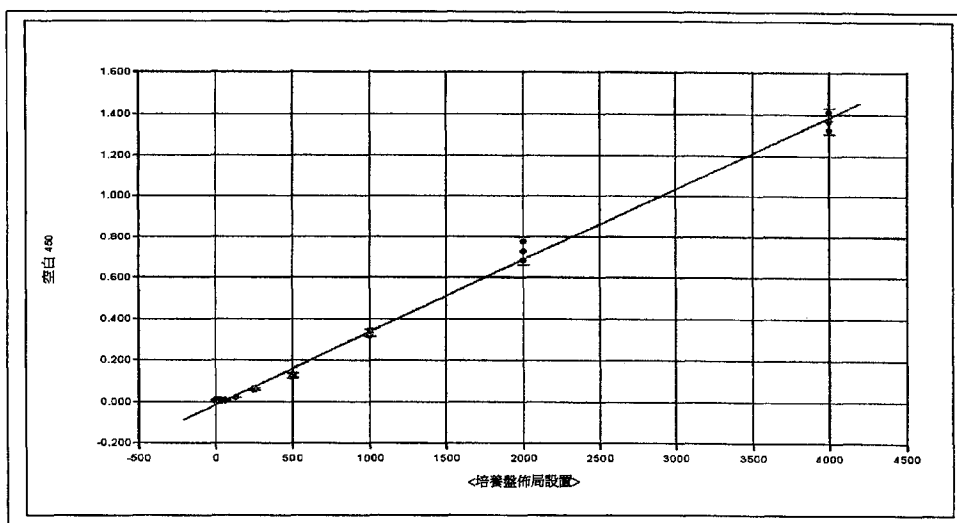
測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法

METHODS FOR DETERMINING THE LEVELS OF TGF- β IN A COMPOSITION

(57)摘要

本發明提供用於測定乳汁、未加工之蛋白質來源、或營養組成物之樣本中的 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度之新穎方法。在某些情況中，該方法涉及重構成該樣本；在某些情況中，該方法涉及將樣本離心；使用樣本：酸：鹼之特定比例以活化該樣本；使用樣本：緩衝劑之特定比例以稀釋該樣本；以及，使用 ELISA 檢定法測定樣本中之 TGF- β 1 的濃度。

標準曲線



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大致上關於測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法。

發明之揭示內容

於一較佳體系中，本發明針對用於測定乳汁樣本中 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟 (a) 之上清液重複進行步驟 (a)；

c. 收集步驟 (b) 所得之樣本的水相上清液並利用步驟 (b) 之上清液重複進行步驟 (a)；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2) 以活化樣本；

e. 使用緩衝溶液 (其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：2) 以稀釋該樣本；

f. 測定該樣本中之 TGF- β 1 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 1 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 1 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 1 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定乳汁樣本中 TGF- β 2 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟（a）之上清液重複進行步驟（a）；

c. 收集步驟（b）所得之樣本的水相上清液並利用步驟（b）之上清液重複進行步驟（a）；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

e. 測定該樣本中之 TGF- β 2 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 2 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 2 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀營養產物之樣本中 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：4）以稀釋該樣本；

e. 測定樣本中之 TGF- β 1 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 1 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 1 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 1 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀營養產物之樣本中 TGF- β 2 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之

比例約為 1 : 0.2 : 0.2) 以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1 : 8）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 TGF- β 2 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 2 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 2 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1 : 0.2 : 0.225）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1 : 2）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 TGF- β 1 濃度，其包含下列步驟

:

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：9）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 形成複

合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

再於另一較佳體系中，本發明針對用於測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 TGF- β 的套組，該套組包含：TGF- β 結合物；TGF- β 標準物；稀釋劑；清洗緩衝劑；至少一種呈色劑；及終止溶液。

【發明內容】

進行本發明之最佳模式

以下為本發明之較佳體系的詳細參考，其一或多個實例列於下。各實例係用於解釋本發明，而非限制本發明。事實上，熟習本技藝之人士可清楚明白本發明可有多種不同之修改及變化而不背離本發明之範圍或精神。例如：所說明或描述之作為一種較佳體系之一部分的特性可用於另一較佳體系中以產生另一較佳體系。

因此，本發明欲涵蓋在本發明之附屬申請專利範圍以及彼之同等物的範圍內之這類修改和變化。本發明之其他目的、特性及觀點揭示於下列詳細說明中或可由此清楚得知。本技藝之一般技術人士可了解本討論僅描述示範之較佳體系，並不欲限制本發明之更寬廣的觀點。

如上述，本發明大致上關於用於測定不同樣本中的

TGF- β 之量的方法。關於這類方法之參考資料包括美國專利案第 6,194,208。

轉型生長因子 β (TGF- β) 為一種多肽族之通稱，其成員具有多功能性調控活性。三種經差別調控之哺乳動物同功型（稱為 TGF- β 1、TGF- β 2 及 TGF- β 3）在發育之胚胎、嬰兒、兒童及成人中的眾多過程中扮演著重要角色。TGF- β 為一種已知可傳介免疫系統內及系統性之多效性功能（Pleiotropic function）的 25-kDa 同質雙體細胞活素。TGF- β 表現在小腸黏膜中之數種細胞類型（包括淋巴細胞、上皮細胞、巨噬細胞和基質細胞）中且由 T 細胞、中性細胞、巨噬細胞、上皮細胞、纖維母細胞、血小板、骨母細胞、破骨細胞，等表現出。另外，TGF- β 存於母乳中且可能影響數方面之嬰兒健康和發育。

TGF- β 係以大型前驅蛋白之形式合成，前驅蛋白係由胺基端前結構區（pro-domain）（包含信號序列及潛伏相關複合體（latency-associated complex））及成熟之羧基端次單位所組成。生物活性之 TGF- β 為由二個完全相同之經二硫鍵聯結的成熟次單位組成的同質雙體。TGF- β 同質雙體自潛伏相關複合體釋出對於 TGF- β 在標靶細胞上發揮生物活性是必要的。潛伏相關複合體之性質及負責釋出 TGF- β 之機制為了解 TGF- β 在活體內之生物活性的關鍵。在人類腸道中，此可能藉由蛋白質分解酶、極度 pH 值、熱、鈣、及/或機械撕扯之作用達成。

根據 TGF- β 所提供之數種益處，讓生長因子存在於

或補充在不同營養產物中通常很重要。例如：在營養產物中之某些蛋白質來源可提供 TGF- β 之來源。或者，若營養產物本身不含有 TGF- β ，則可將生長因子補充在產品中。然而，如上述所指，TGF- β 係以去活化形式釋出。存於營養產物之蛋白質來源中或加入那些營養產物中的 TGF- β 亦以其去活化形式存在。其再在人類腸道中藉由酶、極度 pH 值及 / 或撕扯被活化。

根據 TGF- β 所提供之數種益處，讓生長因子存在於或補充在不同液態營養產物中通常很重要。然而，直到本發明前並無用於測定乳汁、營養產物、或未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）之樣本中的 TGF- β 之生物活性的有效方法。部分而言，這可能是因為報告這些組成物之 TGF- β 生物活性的各研究中或各研究之間的變化多。再者，關於影響所報告之乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源的生物活性之因子的知識非常少。

因此，欲藉本發明解決之技術問題係提供正確且可複製之用於測定組成物中 TGF- β （包括 TGF- β 1 及 TGF- β 2）之濃度的方法。根據本發明，本發明者發現用於測定乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中的 TGF- β 之濃度的新穎方法。

如上述，本發明方法可用於測定乳汁來源中之 TGF- β 之濃度。於此較佳體系中，該乳汁可為人乳、牛乳、山羊乳、綿羊乳、或任何源自哺乳動物之其他乳汁。

於另一較佳體系中，本發明方法可用於測定營養產物

中之 $\text{TGF-}\beta$ 之濃度。該營養產物可為嬰兒配方。於某些較佳體系中，該營養產物可為嬰兒配方。“嬰兒配方”一詞適用於需要時欲以液態或粉末形式使用，以作為滿足嬰兒之正常營養需求的人乳替代品（母乳替代品）之組成物。於一分別之較佳體系中，該營養產物可為人乳強化營養品，意指其為添加在人乳中以增加人乳之營養價值的組成物。作為人乳強化營養品，本組成物可為粉末或液態形式。

於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為較大嬰兒配方。此處所使用之“較大嬰兒配方”係指欲以斷奶飲食之液態部分的形式供 6 個月以上之嬰兒及幼兒使用的食品。再於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為兒童之營養組成物。此處所使用之“兒童”一詞意指 3 歲以上，青春前期前之人們。再於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為成長乳品。“成長乳品”一詞係指廣大類別之欲作為多樣化飲食之一部分，以支持 1 至 6 歲兒童正常生長及發育的以乳汁為底之強化飲品。

於一些較佳體系中，該組成物為經酸化之產品。如此處所使用者，“經酸化之產品”一詞係指完成平衡時其 pH 值為 4.6 或更低且水活性大於 0.85 之營養組成物。再於另一較佳體系中，該營養產物可為醫用食品。“醫用食品”一詞之定義為配製成在醫師之監督下經由腸道食入或投服之食品，且其係欲用於疾病或病況之特殊飲食管理（其特殊之營養需求係根據被認可之科學原則，經由醫療評估設立）中。一般而言，產品必須（至少）符合下列標準

才能被視為醫用食品：該產品必須為用於口服或管灌之食品；該產品必須經標示成用於有特殊營養需求之特殊醫學失調、疾病或病況的飲食管理；且該產品必須在醫學監督下使用。

再於另一較佳體系中，本發明方法可用於測定未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物、脫脂奶粉或酪蛋白）中的 $\text{TGF-}\beta$ 之濃度。

本發明之組成物可以本技藝已知之任何形式提供，諸如粉末、凝膠、懸浮液、糊狀物、固體、液體、液態濃縮物或立即可用之產品。

酶聯免疫吸附試驗（“ELISA”）套組通常用於測量細胞培養上清液、血清、血漿及/或尿中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的濃度。這些目的中通常係使用來自 R&D 系統之 ELISA 套組，Quantikine 1（目錄編號 DB100B）係用於測量 $\text{TGF-}\beta 1$ ，Quantikine 2（目錄編號 DB250）係用於測量 $\text{TGF-}\beta 2$ 。然而，目前並無可用於正確測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的 ELISA 套組商品。

一般而言，ELISA 為一種涉及酶（催化生化反應之蛋白質）及抗體或抗原（免疫分子）之快速免疫化學試驗。本發明中，所使用之抗體將特異於 $\text{TGF-}\beta$ （抗原）。ELISA 法涉及使用附著於固體表面之抗體。此抗體對所欲物質（如：存於組成物中之 $\text{TGF-}\beta$ ）具親和力（將佔據之）。將純化之連接（結合）酶的 $\text{TGF-}\beta$ 與測試樣本的

混合物加入測試系統。每一步驟間通常係以溫和之清潔劑溶液清洗培養盤，以移除未被特異結合之任何蛋白質或抗體。若測試樣本中無 TGF- β 存在，則僅有與酶連接之 TGF- β 將結合抗體。存於測試樣本中之 TGF- β 愈多時，與酶連接之 TGF- β 結合抗體的量愈少。然後，加入該酶所作用之物質並以某種方式（諸如溶液顏色之變化）測量產品之量。

● ELISA 試驗通常具高度敏感性及特異性，與放射免疫分析試驗相較下較有利。其具有不需要放射同位素或計算放射線之儀器的附加優點。

於本發明之一些較佳體系中，ELISA 檢定法可使用本技藝中一般技術人士所了解之定量性三明治酶免疫分析技術。一般而言，可將特異於 TGF- β 1 或 TGF- β 2 之單株抗體預先塗覆在微量盤上。本發明中，此單株抗體可為純化之老鼠單株抗體抗-TGF- β 。可封閉任何剩餘之結合部位。● 然後，可將標準、對照組及樣本以移液管吸入微量盤之槽中。於本發明之一些較佳體系中，所使用之標準為豬 TGF- β 標準或重組之人 TGF- β 標準。

然後，將標準、對照組及樣本與經生物素標示之偵測抗體（其結合 TGF- β 之不同抗原決定部位）一起培育，完成該三明治。於一較佳體系中，該偵測抗體可為生物素化之親和性純化的山羊 IgG。

在各步驟之間，以溫和之清潔劑溶液清洗培養盤，以移除未被特異結合之任何蛋白質或抗體。與合適之酶受質

一起培育後，再以偵測試劑偵測與 $\text{TGF-}\beta$ 結合之偵測抗體的量。於一較佳體系中，該偵測試劑可為抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化酶。以微量盤讀計測量樣本中與 $\text{TGF-}\beta$ 之量相關之可目視的信號。信號越強，整個標準曲線範圍內之 $\text{TGF-}\beta$ 的濃度愈高。

本發明之 ELISA 試驗的較佳體系列於下方流程圖中。

ELISA 流程圖：

以 2 微克/毫升純化之老鼠單株抗-TGF- β 2 塗覆培養盤，100 微升/槽
(培養盤 1：40 微升 mAb，其係在 9960 微升 CBC 緩衝劑中)

在 4°C 培育 O/N



清洗培養盤 3 次



以 270 微升/槽之 SEA 封閉緩衝劑封閉培養盤
在室溫下培育 1 小時



清洗培養盤 3 次



加入 100 微升/槽之標準物及樣本，以 PBS 稀釋之
在室溫下培育 1.5 小時並一邊搖動(± 500 rpm)



清洗培養盤 3 次



加入 100 微升/槽；75 奈克/毫升抗-TGF- β 2 生物素化之 pAb
(培養盤 1：15 微升，其係在 10 毫升 PBS 中)
在室溫下培育 2 小時並一邊搖動



清洗培養盤 3 次



加入 100 微升/槽之 HRP 溶液(PIERCE)
(在培養盤 1 方面：在 10 毫升 PBS 中 1 滴試劑 A 及 1 滴試劑 B)
在室溫下培育 1 小時，一邊搖動
此時，平衡 TMB-Ultra 溶液



清洗培養盤 3 次



加入 100 微升/槽之 TMB-Ultra，等待 ± 5 分鐘
以 100 微升/槽之 1N H₂SO₄ 終止反應
在 A₄₅₀/A₆₅₂ 讀取數值

該三明治方法不必是本發明中所使用之唯一的 ELISA 方法。任何 ELISA 分析技術（如此處所修改者）均可用於本發明之方法中。

在 ELISA 分析之前可先將粉末狀樣本重構成。例如：可將粉末狀營養補充品（諸如嬰兒配方）或粉末狀未加工之蛋白質來源重構成液態形式。本發明中發現包含未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）的樣本可以與營養產物（諸如嬰兒配方）不同之方式重構成。因此，本發明中可將營養產物（諸如嬰兒配方）重構成濃度介於約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升。於另一較佳體系中可將該營養產物重構成約 166 毫克/毫升。於一特殊之較佳體系中，重構成營養產物包含將約 0.5 克之粉末狀營養產物溶解在約 3 毫升水中。

然而，在加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物或脫脂奶粉）方面可將該樣本重構成介於約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升之濃度。於一特殊之較佳體系中可將該樣本重構成約 100 毫克/毫升。此可經由將約 0.5 克粉末溶解在約 5 毫升水中來取得。爲了讓樣本從懸浮液移至溶液，此重構成之濃度對未加工之蛋白質來源而言是必要的。

在製備用於 ELISA 試驗之樣本時，通常將樣本離心，以將該樣本脫脂並收集用於測試之水相上清液（即，乳清部分）。本發明中，本發明者發現人乳可在 10,000rpm 下離心約三次，每次約 15 分鐘。此方法可有效地自乳汁去除脂質層。然而，在營養產物（諸如嬰兒配方）或未加

工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）方面，本發明者已發現應避免離心步驟。事實上，離心步驟被發現會降低樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的濃度約 5% 至約 30%。雖然不欲受限於此一或任何理論，咸信，這類損失可能促成去脂作用及酪蛋白結合作用。因此，在製備用於 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 之 ELISA 試驗的營養產物或未加工之蛋白質來源時應完全避免該離心步驟。

爲了活化潛伏 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 使其成爲可經由本發明測量之免疫反應形式，必須以酸活化並中和 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。雖然所有樣本之酸化及中和的活化程序均同，本發明者發現用於乳汁、營養產物及未加工之蛋白質來源之樣本：酸：鹼的比例均不同。此外，樣本：酸：鹼之比例根據被分析者爲 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 而有不同。

於一較佳體系中，對乳汁樣本經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。於另一較佳體系中，對未加工之蛋白質來源經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。

於一分別之較佳體系中，對包含未加工之蛋白質來源的樣本經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.225 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 。於另一較佳體系中，對包含未加工之蛋白質來源的樣本中經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之

TGF- β 2。

一種活化程序本身的實例（不欲作為限制）：稱 1 克重之營養組成物或未加工之蛋白質來源的樣本，並將其置於 50 毫升試管中。以 5 毫升水或磷酸鹽緩衝液（PBS）將樣本重構成。以塑膠棒輕輕攪拌混合物。在混合物中加入一些 1N HCl 使 pH 值介於約 2 至約 3。可再以塑膠棒攪拌混合物。然後，將混合物在室溫培育 15 分鐘。接著，可在混合物中加入 1N NaOH 使 pH 值介於約 7 至約 8。可再以塑膠棒攪拌混合物。若該混合物尚未被重構成其最終濃度，則可將其轉移至 10 毫升之容量瓶中，加入水或 PBS 使其成為最終之重構成濃度。

另一實例：液態乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源之液態樣本可經由將 1 毫升之液態樣本轉移到 2 毫升之低吸附試管中活化。在樣本中加入濃鹽酸以使其 pH 值介於約 2 至約 3。將樣本震盪混合，再在約室溫下培育約 15 分鐘。然後，以 50% NaOH 中和樣本以使最終 pH 值介於約 7 至約 8。再次將樣本震盪混合。該活化步驟中可使用其他酸或鹼。

於一較佳體系中，本發明中可使用聚丙烯試管和培養盒，因為活性 TGF- β 為高度疏水性且可能黏在玻璃儀器上。本發明方法中所使用之酸和鹼可為任何本技藝所已知者。於一較佳體系中，該酸可為 HCl 且該鹼可為 NaOH。

本發明中係使用緩衝溶液稀釋樣本。任何本技藝中已知之緩衝溶液均可用於此較佳體系中。Quantikine®套組

(目錄編號 DB100B) 提供用於定量 $\text{TGF-}\beta 1$ 之二種緩衝溶液。該緩衝溶液包含 RD1-21 (帶有防腐劑之經緩衝的蛋白質溶液) 及 RD1-73 (帶有防腐劑之經緩衝的蛋白質溶液)。本發明者意外發現 RD1-73 (RD1-21 則不) 顯示出具最大斜度的線性來正確定量 $\text{TGF-}\beta 1$ ，以及寬廣之濃度範圍，以使樣本稀釋倍數最大。此效果在乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源的樣本中顯著。因此，於一較佳體系中，用於稀釋之緩衝溶液可為 RD1-73。

在 $\text{TGF-}\beta 2$ 方面，若使用用於定量 $\text{TGF-}\beta 2$ 之 Quantikine®套組 (目錄編號 DB250)，可使用分析稀釋劑 RD1-17。

此外，本發明者發現樣本之原始稀釋比係取決於所測量者為 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。再者，原始稀釋比亦取決於該樣本為乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源。

例如，於一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：2 至約 1：5。於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：2 至約 1：3。再於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。於一特殊之較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：2。

於一較佳體系中，測量乳汁來源中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 不需稀釋。於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 2$ 時，乳汁樣本之初

始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：3 至約 1：5。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：4。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：4。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：5 至約 1：10。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：7 至約 1：9。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：8。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：8。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：1 至約 1：3。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：2。再於另一特殊之較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：5

至約 1 : 10。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1 : 8 至約 1 : 10。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1 : 9。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1 : 9。



然後，將稀釋劑以正確之稀釋比加入分析槽中。再將標準物、對照組或活化之樣本加入各槽中。然後，輕拍微量盤以將其混合，蓋上黏封條並在室溫下培育約 2 小時。

吸出每一個槽內之液體並清洗之，重複此過程 3 次，共清洗 4 次。使用噴出瓶、多支管分注器或自動清洗器在每一槽中填入緩衝劑以清洗培養槽。最後一次清洗後，藉由吸出或輕輕倒出來移出任何剩餘之緩衝液。然後，將培養盤倒置，以乾淨之紙巾將其吸乾。



於一較佳體系中，再將 TGF- β 1 或 TGF- β 2 結合物分別加入含有 TGF- β 1 或 TGF- β 2 樣本之每一個槽中。然後，以新的黏封條覆蓋培養槽並在室溫下培育約 2 小時。然後，可重複上述之吸出/清洗步驟。

然後，將受質溶液（著色劑）加入各槽中，並在室溫下、黑暗中培育約 30 分鐘。然後，可在各槽中加入酸終止液（諸如 H₂SO₄），輕拍微量盤以確保完全混合。

在約 30 分鐘內使用微量盤讀計（設定在 450nm）測定每一培養槽之光學密度。若需要校正波長，可設定在

540nm 或 570nm。若無法校正波長則應將 450nm 處之讀值減去 540nm 或 570nm 處之讀值。

然後，使用者可將每一個標準物、對照組及樣本之二次讀值平均並減去平均之零標準物的光學密度。經由使用能產生四參數對數曲線擬合之電腦軟體將數據簡化來產生標準曲線。或者，可將各標準物之平均吸收標繪在 y 軸，將濃度標繪在 x 軸上，通過圖上之點劃出最佳擬合曲線，以建構標準曲線。將 TGF- β 1 濃度之對數相對於 O.D. 之對數標繪以將數據線性化，而最佳擬合線可藉由迴歸分析決定。若在活化步驟中稀釋樣本，則應將測得之濃度乘以最終稀釋因子。

使用本發明方法評估 NIBSC/WHO 引用參數 89/518（天然之牛）及 90/696（重組之人類）。TGF- β 1 及 TGF- β 2 方法之劑量反應與 Quantikine®標準曲線相似。使用下列方程式將以 Quantikine® TGF- β 2 套組取得之樣本值轉換成相等之 NIBSC 單位。

NIBSC（89/518）當量值（U/毫升）=0.0551x
Quantikine®TGF- β 2 值（皮克/毫升）。

NIBSC（90/696）當量值（U/毫升）=0.0272x
Quantikine®TGF- β 2 值（皮克/毫升）。

本發明方法有利於將在分析性回收試驗期間於嬰兒配方中所觀察到之矩陣移位效果減至最低。因此，本發明克服促成高估或低估乳汁樣本、營養產物或未加工之蛋白質來源中真正之 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度的矩陣位移。

本發明進一步包括用於測定人類乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的生物活性的套組。該套組可包括 RD1-73 緩衝劑及/或分析稀釋劑 RD1-17 及豬 $\text{TGF-}\beta$ 標準物。該套組可選擇性地進一步包括一或多種 $\text{TGF-}\beta$ 結合物、 $\text{TGF-}\beta$ 微量盤、校正稀釋液、著色劑及/或清洗緩衝劑濃縮物，包含在套組內的還有根據此處所描述之方法製備樣本的指示。



下列實例描述本發明之不同較佳體系。熟習本技藝之人士考量此處所揭示之本發明的專利說明書或練習可清楚明白此處之申請專利範圍內的其他較佳體系。本專利說明書與實例僅欲用於示範，本發明之範圍及精神係由接續在實例後之申請專利範圍指明。於實例中，除非另外指明，所有百分比均以重量計。

【實施方式】



實例 1

此實例說明本發明之一種較佳體系。

設備和試劑

試管：

a. 50 毫升聚丙烯管

b. 10 毫升容量瓶

c. 2 毫升離心管：（Protein LoBind 2.0 毫升試管 - Eppendorf 022431102）

微量盤及附件：

a. NUNC-Immuno MaxiSorp StarWell 96-槽盤 NUNC

441653

b. 密封膠帶 96-槽 Pierce 15036

c. 試劑保存庫 Pierce 15075

微量盤讀計及附件：

a. 微量盤清洗器 Bio-Tek ELx405

b. SynergyTMHT 多次偵測微量盤讀計 Bio-Tek SIAFR

c. Gen5 數據分析軟體 Bio-Tek 594718

d. 吉特巴微量盤搖動器 (Microplate Shaker The Jitterbug)
模型 130000 (Boekel Scientific)

移液管：單一管道：

a. 0.5-10 微升 Eppendorf 022471902，吸頭 Eppendorf
2249152-1

b. 20-200 微升 Eppendorf 022472054，吸頭 Eppendorf
2249154-7

c. 100-1000 微升 Eppendorf 022472101，吸頭 Eppendorf
2249155-5

d. 0.5-5 毫升 Eppendorf 022472151，吸頭 Eppendorf
2249198-9

多管道：

a. 20-300 微升 Eppendorf 022461460，吸頭 Eppendorf
2249154-7

b. 50-1200 微升 Eppendorf 022461478，吸頭 Eppendorf
2249196-2

緩衝劑：

- a. BupH 磷酸鹽緩衝液 (PBS) Pierce 28372
- b. BupH 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝劑 Pierce 28382
- c. Surfact Amp 20 Pierce 28320

抗原標準物：

- a. 重組之人類 TGF- β 2 標準物 (R&D 系統 302-B2)

封閉緩衝劑：SEA Block Pierce 37527

抗體：

- a. 抗-TGF- β 2；純化之老鼠單株 IgG_{2B} (R&D 系統 MAB612)
- b. 抗-TGF- β 2；生物素化之 TGF- β 2 親和性純化的山羊 IgG (R&D 系統 BAF302)

ELISA 偵測套組：

- a. 免疫純化超敏感 ABC 過氧化酶 (Immunopure ultra-sensitive ABC peroxidase) (Pierce 32050)
- b. 1-步驟 超-TMB-ELISA 試劑 (Pierce 34028)

終止溶液：

- a. 1M H₂SO₄

奈米純水

緩衝劑之製備方法：

CBC 緩衝劑

- a. 將一小包 Pierce BupH 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝劑溶解在 500 毫升水中。

- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

PBS

- a. 將一小包 Pierce BupH 磷酸鹽緩衝液溶解在 500 毫升水中。
- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

PBST

- a. 將一小瓶（10 毫升）Pierce Surfact Amp 20 加入 2 升之 PBS 中。
- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

捕捉抗體：抗 TGF- β 2，純化之老鼠單株 IgG_{2B}

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 2 微克/毫升抗體。

抗原標準物：重組之人類 TGF- β 2 標準物：

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 0-4000 皮克/毫升抗體。

偵測抗體：抗-TGF- β 2；生物素化之親和性純化的山羊 IgG：

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 100 奈克/毫升抗體。

Pierce ABC 試劑溶液：

- a. 在 10 毫升 PBS 方面，將 1 滴（45 微升）試劑 A

加入 1 滴（45 微升）試劑 B 中。

b. 新鮮製備該溶液並貯存在 4℃，直到使用時。

樣本之製備方法：

使用下列議定計劃活化在粉末狀營養產物之樣本中的 TGF- β 2。

1. 稱 1 克重之樣本並將其置於 50 毫升試管中。
2. 以 5 毫升 PBS 將樣本重構成。
3. 以塑膠棒將樣本輕輕混合。
4. 將 1N HCl 加入樣本中以使樣本之 pH 值介於 2 至 3。然後，以塑膠棒將樣本混合。
5. 將樣本在室溫培育 15 分鐘。
6. 將 1N NaOH 加入樣本中以使其 pH 值介於 7 至 8。然後，以塑膠棒將樣本混合。
7. 將樣本轉移至 10 毫升容量瓶中，加入 PBS 使之達到最終體積（最終濃度：100 毫克/毫升）。

使用下列議定計劃活化液態乳汁樣本中之 TGF- β 2。

1. 將 1 毫升液態樣本轉移入 2 毫升之低吸附管中。
2. 加入濃 HCl 以使 pH 值介於 2 至 3。將混合物震盪混合。
3. 將混合物在室溫培育 15 分鐘。
4. 加入 50%/50%濃 NaOH/H₂O 以使 pH 值介於 7 至 8。將樣本震盪混合。

表 1. 標準物之系列稀釋

rhTGF- β 2 標準貯存液 濃度 (皮克/毫升)	貯存液/先前稀 釋液之體積 (微升)	緩衝劑 (PBS) (微升)	最終 濃度 (皮克/毫升)
2,000,000	4 (貯存液)	1996	4000
	1000	1000	2000
	1000	1000	1000
	1000	1000	500
	1000	1000	250
	1000	1000	125
	1000	1000	62.5
	1000	1000	31.25
	0	2000	0

表 2. 樣本之系列稀釋

樣本之起始 濃度 (毫克/毫升)	起始/先前稀 釋液之體積 (微升)	緩衝劑 (PBS) (微升)	最終 濃度 (微克/毫升)
100	1000 (貯存液)	0	100,000
	500	500	50,000
	500	500	25,000
	500	500	12,500
	500	500	6,250
	500	500	3,125
	500	500	3,125

表 3. 96 槽盤之佈置：

STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	CTL	CTL	空白
STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	CTL	CTL	空白
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6

程序

1. 以移液管將 100 微升之捕捉抗體溶液移至各槽中並以密封膠帶覆蓋之。
2. 將樣本在 4℃ 培育一整夜。
3. 以 PBST 清洗培養盤三次。
4. 以移液管將 270 微升之封閉緩衝劑移至培養盤中並以密封膠帶覆蓋該培養盤。
5. 將培養盤在室溫 (RT) 下培育 1 小時。
6. 以 PBST 清洗培養盤三次。
7. 以移液管將 100 微升之標準物移入樣本中，再以密封膠帶覆蓋之。
8. 然後，將混合物在室溫培育 1 小時 30 分鐘。
9. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。
10. 以移液管將 100 微升之偵測抗體移至培養盤中並以密封膠帶覆蓋該培養盤。
11. 將樣本在室溫培育 2 小時並一邊搖動。
12. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。
13. 然後，以移液管將 100 微升之 ABC 試劑移入樣本中並以密封膠帶覆蓋樣本。
14. 將樣本在室溫下培育 1 小時並一邊搖動。
15. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。
16. 以移液管將 100 微升之色原體 (chromogen) (Pierce Ultra-TMB) 受質移入樣本中並在室溫培育數分鐘。在 5 分鐘內逐漸產生顏色。

17. 將 100 微升之 1M H_2SO_4 加入樣本中以終止反應，並使用微量盤讀計測量 ($A_{450}/A_{652\text{nm}}$) 樣本。

表 3. 標準曲線

曲線名稱	曲線公式	A	B	R	R ²
曲線	$Y = A \cdot X + B$	0.000349	-0.0137	0.999	0.998

第 1 圖說明標準曲線。

表 4. 結果

槽ID	名稱	槽	濃度/ 稀釋液	空白 450	濃度	計數	平均值	標準差	CV (%)
樣本 1		C6	1.00E+05	0.907	2633.964	3	2572.918	372.903	14.493
		D6	1.00E+05	1.004	2911.532				
		E6	1.00E+05	0.746	2173.259				
		C5	50000	0.655	1912.861	3	1853.723	70.636	3.81
		D5	50000	0.607	1775.508				
		E5	50000	0.641	1872.8				
		C4	25000	0.379	1123.082	3	1085.882	42.153	3.882
		D4	25000	0.369	1094.467				
		E4	25000	0.35	1040.098				
		C3	12500	0.17	525.024	3	527.886	13.113	2.484
		D3	12500	0.176	542.193				
		E3	12500	0.167	516.44				
		C2	6250	0.079	264.626	3	256.995	6.608	2.571
		D2	6250	0.075	253.18				
		E2	6250	0.075	253.18				
		C1	3125	0.039	150.165	3	121.55	24.946	20.523
		D1	3125	0.023	104.381				
		E1	3125	0.025	110.104				
樣本 2		F6	1.00E+05	0.605	1769.785	3	1807.939	116.388	6.438
		G6	1.00E+05	0.586	1715.416				
		H6	1.00E+05	0.664	1938.615				
		F5	50000	0.384	1137.389	3	1165.051	52.945	4.544
		G5	50000	0.382	1131.666				
		H5	50000	0.415	1226.096				
		F4	25000	0.203	619.454	3	668.1	50.138	7.505
		G4	25000	0.238	719.607				
		H4	25000	0.219	665.239				
		F3	12500	0.094	307.549	3	339.025	28.183	8.313
		G3	12500	0.113	361.918				
		H3	12500	0.108	347.61				
		F2	6250	0.046	170.196	3	184.503	17.87	9.686
		G2	6250	0.049	178.78				
		H2	6250	0.058	204.534				
		F1	3125	0.023	104.381	3	92.935	15.142	16.293
		G1	3125	0.013	75.766				
		H1	3125	0.021	98.658				

計 算

$$\text{等式1 抗原濃度(ppm)} = \frac{(\text{測量之濃度以皮克 / 毫升計})}{(\text{樣本稀釋液以微克 / 毫升計})}$$

表 5. 濃度

樣本	濃度 (微克/毫升)	TGF-B2 (皮克/毫升)	CV (%)	TGFB2 (皮克/微克) ppm	從先前 濃度開 始之% 變化	平均 TGF-B2 (皮克/微克) ppm
樣本 1	1.00E+05	2572.918	14.493	0.0257		
	50000	1853.723	3.81	0.0371	144.09	
	25000	1085.882	3.882	0.0434	117.16	
	12500	527.886	2.484	0.0422	97.23	0.0409
	6250	256.995	2.571	0.0411	97.37	
	3125	121.55	20.523	0.0389	94.59	
樣本 2	1.00E+05	1807.939	6.438	0.0181		
	50000	1165.051	4.544	0.0233	128.88	
	25000	668.1	7.505	0.0267	114.69	0.0227
	12500	339.025	8.313	0.0271	101.49	
	6250	184.503	9.686	0.0295	108.84	
	3125	92.935	16.293	0.0297	100.74	

本專利說明書中所列舉之所有參考資料（包括但不限於所有論文、刊物、專利、專利申請書、描述、文本、報告、手稿、書冊、書本、網路貼文、雜誌文章、期刊，等）之全部內容併為本專利說明書之參考資料。此處之參考資料的討論僅欲摘要其作者之主張且並不承認任何參考資料構成先前技術。本申請者保留挑戰所列之參考資料的準確性及適當性的權利。

雖然本發明之較佳體系已利用特定名詞、裝置及方法描述，這類描述僅用於說明。所使用之文字為描述之文字而非限制用。需了解，本技藝之一般技術人士可做些改變及變化而不背離列於接下去之申請專利範圍中之本發明的精神或範圍。此外，需了解，不同較佳體系之觀點可全部或部分交換。例如：雖然已示範用於製造根據那些方法製造之無菌液態營養補給品之商品的方法，亦可考慮其他用

途。因此，附屬之申請專利範圍的精神及範圍不應受限於其中所包含之較佳變體的描述。

【圖式簡單說明】

第 1 圖說明標準曲線。

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98135792

※申請日：98 年 10 月 22 日

※IPC 分類：

G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/04 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法

Methods for determining the levels of TGF- β in a composition

二、中文發明摘要：

本發明提供用於測定乳汁、未加工之蛋白質來源、或營養組成物之樣本中的 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度之新穎方法。在某些情況中，該方法涉及重構成該樣本；在某些情況中，該方法涉及將樣本離心；使用樣本：酸：鹼之特定比例以活化該樣本；使用樣本：緩衝劑之特定比例以稀釋該樣本；以及，使用 ELISA 檢定法測定樣本中之 TGF- β 1 的濃度。

三、英文發明摘要：

A novel method for determining the levels of TGF- β 1 or TGF- β 2 in a sample of milk, raw protein source, or nutritional composition is provided. The method involves, in some cases, reconstituting the sample; in some cases, centrifuging the sample; activating the sample using particular ratios of sample:acid:base; diluting the sample using particular ratios of sample:buffer agent; and determining the concentration of TGF- β 1 in the sample using an ELISA assay.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於測定乳汁樣本中 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該樣本在約 $10,000\text{rpm}$ 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟 (a) 之上清液重複進行步驟 (a)；

c. 收集步驟 (b) 所得之樣本的水相上清液並利用步驟 (b) 之上清液重複進行步驟 (a)；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 $1:0.2:0.2$ ）以活化該樣本；

e. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 $1:2$ ）以稀釋該樣本；及

f. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的量。

2. 一種用於測定乳汁樣本中 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 濃度之方法，

該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟 (a) 之上清液重複進行步驟 (a)；

c. 收集步驟 (b) 所得之樣本的水相上清液並利用步驟 (b) 之上清液重複進行步驟 (a)；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2) 以活化該樣本；及

e. 測定該樣本中之 TGF- β 2 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 2 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 2 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

3. 一種用於測定粉末狀營養產物之樣本中 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：4）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度，其包含下列步驟：

○

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

○

4.如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該營養產物係重構成濃度為約 166 毫克/毫升。

5. 一種用於測定粉末狀營養產物之樣本中 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少

約 1 : 8) 以稀釋該樣本 ;

e. 測定該樣本中之 TGF- β 2 濃度 , 其包含下列步驟 :

i. 將該含有未知量之 TGF- β 2 的樣本固定在固體載體上 ;

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 2 形成複合物 ;

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號 ; 及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法 , 其中該營養產物係經重構成濃度為約 166 毫克 / 毫升。

7. 一種用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 TGF- β 1 濃度之方法 , 該方法包含 :

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克 / 毫升至約 105 毫克 / 毫升 ;

b. 避免離心步驟 ;

c. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本 : 酸 : 鹼之比例約為 1 : 0.2 : 0.225) 以活化該樣本 ;

d. 使用緩衝溶液 (其中樣本 : 緩衝劑之比例為至少約 1 : 2) 以稀釋該樣本 ;

e. 測定該樣本中之 TGF- β 1 濃度 , 其包含下列步驟 :

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該未加工之蛋白質來源係經重構成濃度為約 100 毫克/毫升。

9. 一種用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：9）以稀釋該樣本；及

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 2$ 形成複

合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該未加工之蛋白質來源係經重構成濃度為約 100 毫克/毫升。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以酸將該樣本酸化至 pH 值介於約 2 至約 3 以活化該樣本。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以鹼將該樣本中和至 pH 值介於約 7 至約 8 以活化該樣本。

13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以酸將該樣本酸化至 pH 值介於約 2 至約 3，再以鹼中和至 pH 值介於約 7 至約 8 以活化該樣本。

14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含比較豬標準物中 TGF- β 濃度與該樣本中 TGF- β 濃度的步驟。

15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該偵測抗體包含經生物素親和純化之山羊 IgG。

16. 一種用於測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中 TGF- β 的套組，該套組包含：

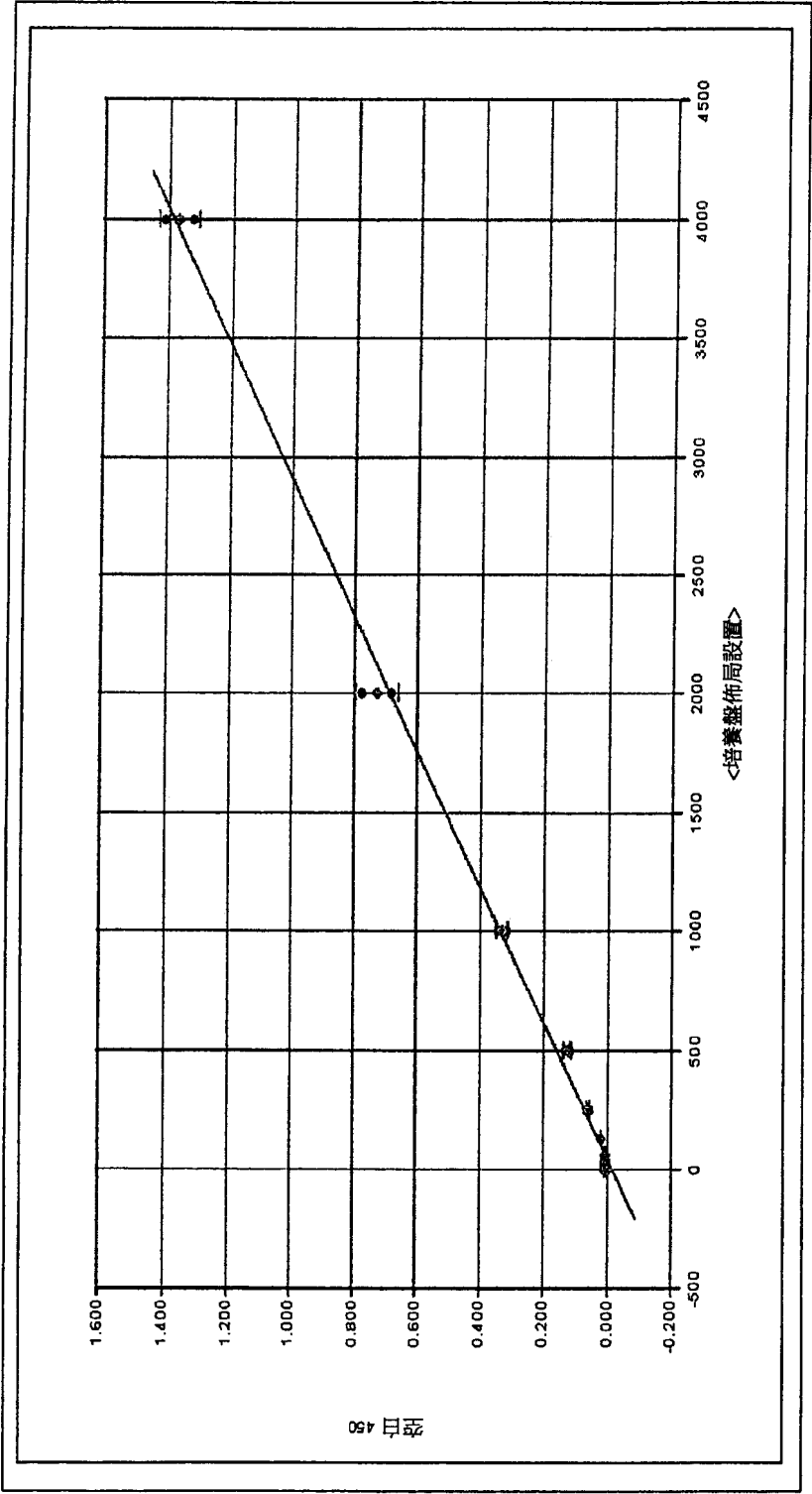
a. TGF- β 結合物；

b. TGF- β 標準物；

c. 稀釋劑；

- d. 清洗緩衝劑；
- e. 至少一種呈色劑；及
- f. 終止溶液。

第1圖
標準曲線



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

0

0

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

民國 99 年 6 月 10 日呈

860557

中華民國 99 年 6 月 10 日

補充

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98135792

※申請日：98 年 10 月 22 日

※IPC 分類：

G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/04 (2006.01)
G01N 33/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法Methods for determining the levels of TGF- β in a composition**二、中文發明摘要：**

本發明提供用於測定乳汁、未加工之蛋白質來源、或營養組成物之樣本中的 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度之新穎方法。在某些情況中，該方法涉及重構成該樣本；在某些情況中，該方法涉及將樣本離心；使用樣本：酸：鹼之特定比例以活化該樣本；使用樣本：緩衝劑之特定比例以稀釋該樣本；以及，使用 ELISA 檢定法測定樣本中之 TGF- β 1 的濃度。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大致上關於測定組成物中轉型生長因子 β （ $\text{TGF-}\beta$ ）之濃度的方法。

【先前技術】

本發明大抵關於測定組成物中轉型生長因子 β （ $\text{TGF-}\beta$ ）之濃度的方法。與該方法有關之先前技術文獻可包括 US 6,194,208、US 7,094,550 及 EP 0 759 029。

US 6,194,208 提供一種製備多種經修飾之牛乳生長因子之方法，其包含分離牛乳蛋白混合物及令該混合物經短暫酸化作用以得到經酸化之促進生長萃取物。

US 7,094,550 提供一種測定樣品中 $\text{TGF-}\beta$ 之存在和含量以鑑定病患罹患動脈粥樣硬化之風險的方法和套組。該套組提供能與 $\text{TGF-}\beta$ 結合之捕獲部分及能與 $\text{TGF-}\beta$ 結合之偵測部分，其中該偵測部分含有可偵測之標記或對可偵測之標記的結合部位。

EP 0 759 029 教示一種自牛乳或牛乳產物萃取經修飾之生長因子之改良方法。

本發明提供一種測定牛乳樣品、營養產品或粗蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮液）中 $\text{TGF-}\beta$ 之生物活性的有效方法。本發明提供一種測定組成物中 $\text{TGF-}\beta$ （包括 $\text{TGF-}\beta 1$ 和 $\text{TGF-}\beta 2$ ）之濃度的精確且可重複實施之方法。依據本發明，本案發明人揭露一種測定牛乳樣品、營養產品或

粗蛋白質來源中 TGF- β 之濃度的新穎方法。

【發明內容】

於一較佳體系中，本發明針對用於測定乳汁樣本中 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟（a）之上清液重複進行步驟（a）；

c. 收集步驟（b）所得之樣本的水相上清液並利用步驟（b）之上清液重複進行步驟（a）；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化樣本；

e. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：2）以稀釋該樣本；

f. 測定該樣本中之 TGF- β 1 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 1 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 1 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF-

$\beta 1$ 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定乳汁樣本中 TGF- $\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟 (a) 之上清液重複進行步驟 (a)；

c. 收集步驟 (b) 所得之樣本的水相上清液並利用步驟 (b) 之上清液重複進行步驟 (a)；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

e. 測定該樣本中之 TGF- $\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- $\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- $\beta 2$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- $\beta 2$ 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀營養產物之樣本中 TGF- $\beta 1$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約

170 毫克 / 毫升 ;

b. 避免離心步驟 ;

c. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本 : 酸 : 鹼之比例約為 1 : 0.2 : 0.2) 以活化該樣本 ;

d. 使用緩衝溶液 (其中樣本 : 緩衝劑之比例為至少約 1 : 4) 以稀釋該樣本 ;

e. 測定樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度 , 其包含下列步驟 :

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上 ;

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物 ;

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號 ; 及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

於一較佳體系中 , 本發明針對用於測定粉末狀營養產物之樣本中 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法 , 該方法包含 :

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克 / 毫升至約 170 毫克 / 毫升 ;

b. 避免離心步驟 ;

c. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本 : 酸 : 鹼之比例約為 1 : 0.2 : 0.2) 以活化該樣本 ;

d. 使用緩衝溶液 (其中樣本 : 緩衝劑之比例為至少約 1 : 8) 以稀釋該樣本 ;

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 2$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.225）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：2）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

於一較佳體系中，本發明針對用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：9）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 2$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

再於另一較佳體系中，本發明針對用於測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 TGF- β 的套組，該套組包含：TGF- β 結合物；TGF- β 標準物；稀釋劑；清洗緩衝劑；至少一種呈色劑；及終止溶液。

進行本發明之最佳模式

以下為本發明之較佳體系的詳細參考，其一或多個實例列於下。各實例係用於解釋本發明，而非限制本發明。事實上，熟習本技藝之人士可清楚明白本發明可有多種不同之修改及變化而不背離本發明之範圍或精神。例如：所說明或描述之作為一種較佳體系之一部分的特性可用於另一較佳體系中以產生另一較佳體系。

因此，本發明欲涵蓋在本發明之附屬申請專利範圍以及彼之同等物的範圍內之這類修改和變化。本發明之其他目的、特性及觀點揭示於下列詳細說明中或可由此清楚得知。本技藝之一般技術人士可了解本討論僅描述示範之較佳體系，並不欲限制本發明之更寬廣的觀點。

如上述，本發明大致上關於用於測定不同樣本中的 TGF- β 之量的方法。關於這類方法之參考資料包括美國專利案第 6,194,208。

轉型生長因子 β (TGF- β) 為一種多肽族之通稱，其成員具有多功能性調控活性。三種經差別調控之哺乳動物

同功型（稱為 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 、 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 及 $\text{TGF-}\beta\ 3$ ）在發育之胚胎、嬰兒、兒童及成人中的眾多過程中扮演著重要角色。 $\text{TGF-}\beta$ 為一種已知可傳介免疫系統內及系統性之多效性功能（Pleiotropic function）的 25-kDa 同質雙體細胞活素。 $\text{TGF-}\beta$ 表現在小腸黏膜中之數種細胞類型（包括淋巴細胞、上皮細胞、巨噬細胞和基質細胞）中且由 T 細胞、中性細胞、巨噬細胞、上皮細胞、纖維母細胞、血小板、骨母細胞、破骨細胞，等表現出。另外， $\text{TGF-}\beta$ 存於母乳中且可能影響數方面之嬰兒健康和發育。

$\text{TGF-}\beta$ 係以大型前驅蛋白之形式合成，前驅蛋白係由胺基端前結構區（pro-domain）（包含信號序列及潛伏相關複合體（latency-associated complex））及成熟之羧基端次單位所組成。生物活性之 $\text{TGF-}\beta$ 為由二個完全相同之經二硫鍵聯結的成熟次單位組成的同質雙體。 $\text{TGF-}\beta$ 同質雙體自潛伏相關複合體釋出對於 $\text{TGF-}\beta$ 在標靶細胞上發揮生物活性是必要的。潛伏相關複合體之性質及負責釋出 $\text{TGF-}\beta$ 之機制為了解 $\text{TGF-}\beta$ 在活體內之生物活性的關鍵。在人類腸道中，此可能藉由蛋白質分解酶、極度 pH 值、熱、鈣、及/或機械撕扯之作用達成。

根據 $\text{TGF-}\beta$ 所提供之數種益處，讓生長因子存在於或補充在不同營養產物中通常很重要。例如：在營養產物中之某些蛋白質來源可提供 $\text{TGF-}\beta$ 之來源。或者，若營養產物本身不含有 $\text{TGF-}\beta$ ，則可將生長因子補充在產品中。然而，如上述所指， $\text{TGF-}\beta$ 係以去活化形式釋出。存

於營養產物之蛋白質來源中或加入那些營養產物中的 TGF- β 亦以其去活化形式存在。其再在人類腸道中藉由酶、極度 pH 值及 / 或撕扯被活化。

根據 TGF- β 所提供之數種益處，讓生長因子存在於或補充在不同液態營養產物中通常很重要。然而，直到本發明前並無用於測定乳汁、營養產物、或未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）之樣本中的 TGF- β 之生物活性的有效方法。部分而言，這可能是因為報告這些組成物之 TGF- β 生物活性的各研究中或各研究之間的變化多。再者，關於影響所報告之乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源的生物活性之因子的知識非常少。

因此，欲藉本發明解決之技術問題係提供正確且可複製之用於測定組成物中 TGF- β （包括 TGF- β 1 及 TGF- β 2）之濃度的方法。根據本發明，本發明者發現用於測定乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中的 TGF- β 之濃度的新穎方法。

如上述，本發明方法可用於測定乳汁來源中之 TGF- β 之濃度。於此較佳體系中，該乳汁可為人乳、牛乳、山羊乳、綿羊乳、或任何源自哺乳動物之其他乳汁。

於另一較佳體系中，本發明方法可用於測定營養產物中之 TGF- β 之濃度。該營養產物可為嬰兒配方。於某些較佳體系中，該營養產物可為嬰兒配方。“嬰兒配方”一詞適用於需要時欲以液態或粉末形式使用，以作為滿足嬰兒之正常營養需求的人乳替代品（母乳替代品）之組成物

。於一分別之較佳體系中，該營養產物可為人乳強化營養品，意指其為添加在人乳中以增加人乳之營養價值的組成物。作為人乳強化營養品，本組成物可為粉末或液態形式。於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為較大嬰兒配方。此處所使用之“較大嬰兒配方”係指欲以斷奶飲食之液態部分的形式供 6 個月以上之嬰兒及幼兒使用的食品。再於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為兒童之營養組成物。此處所使用之“兒童”一詞意指 3 歲以上，青春前期前之人們。再於另一較佳體系中，本發明之營養產物可為成長乳品。“成長乳品”一詞係指廣大類別之欲作為多樣化飲食之一部分，以支持 1 至 6 歲兒童正常生長及發育的以乳汁為底之強化飲品。

於一些較佳體系中，該組成物為經酸化之產品。如此處所使用者，“經酸化之產品”一詞係指完成平衡時其 pH 值為 4.6 或更低且水活性大於 0.85 之營養組成物。再於另一較佳體系中，該營養產物可為醫用食品。“醫用食品”一詞之定義為配製成在醫師之監督下經由腸道食入或投服之食品，且其係欲用於疾病或病況之特殊飲食管理（其特殊之營養需求係根據被認可之科學原則，經由醫療評估設立）中。一般而言，產品必須（至少）符合下列標準才能被視為醫用食品：該產品必須為用於口服或管灌之食品；該產品必須經標示成用於有特殊營養需求之特殊醫學失調、疾病或病況的飲食管理；且該產品必須在醫學監督下使用。

再於另一較佳體系中，本發明方法可用於測定未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物、脫脂奶粉或酪蛋白）中的 $\text{TGF-}\beta$ 之濃度。

本發明之組成物可以本技藝已知之任何形式提供，諸如粉末、凝膠、懸浮液、糊狀物、固體、液體、液態濃縮物或立即可用之產品。

酶聯免疫吸附試驗（“ELISA”）套組通常用於測量細胞培養上清液、血清、血漿及/或尿中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的濃度。這些目的中通常係使用來自 R&D 系統之 ELISA 套組，Quantikine 1（目錄編號 DB100B）係用於測量 $\text{TGF-}\beta 1$ ，Quantikine 2（目錄編號 DB250）係用於測量 $\text{TGF-}\beta 2$ 。然而，目前並無可用於正確測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的 ELISA 套組商品。

一般而言，ELISA 為一種涉及酶（催化生化反應之蛋白質）及抗體或抗原（免疫分子）之快速免疫化學試驗。本發明中，所使用之抗體將特異於 $\text{TGF-}\beta$ （抗原）。ELISA 法涉及使用附著於固體表面之抗體。此抗體對所欲物質（如：存於組成物中之 $\text{TGF-}\beta$ ）具親和力（將佔據之）。將純化之連接（結合）酶的 $\text{TGF-}\beta$ 與測試樣本的混合物加入測試系統。每一步驟間通常係以溫和之清潔劑溶液清洗培養盤，以移除未被特異結合之任何蛋白質或抗體。若測試樣本中無 $\text{TGF-}\beta$ 存在，則僅有與酶連接之 $\text{TGF-}\beta$ 將結合抗體。存於測試樣本中之 $\text{TGF-}\beta$ 愈多時，

與酶連接之 $\text{TGF-}\beta$ 結合抗體的量愈少。然後，加入該酶所作用之物質並以某種方式（諸如溶液顏色之變化）測量產品之量。

ELISA 試驗通常具高度敏感性及特異性，與放射免疫分析試驗相較下較有利。其具有不需要放射同位素或計算放射線之儀器的附加優點。

於本發明之一些較佳體系中，ELISA 檢定法可使用本技藝中一般技術人士所了解之定量性三明治酶免疫分析技術。一般而言，可將特異於 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 之單株抗體預先塗覆在微量盤上。本發明中，此單株抗體可為純化之老鼠單株抗體抗- $\text{TGF-}\beta$ 。可封閉任何剩餘之結合部位。然後，可將標準、對照組及樣本以移液管吸入微量盤之槽中。於本發明之一些較佳體系中，所使用之標準為豬 $\text{TGF-}\beta$ 標準或重組之人 $\text{TGF-}\beta$ 標準。

然後，將標準、對照組及樣本與經生物素標示之偵測抗體（其結合 $\text{TGF-}\beta$ 之不同抗原決定部位）一起培育，完成該三明治。於一較佳體系中，該偵測抗體可為生物素化之親和性純化的山羊 IgG。

在各步驟之間，以溫和之清潔劑溶液清洗培養盤，以移除未被特異結合之任何蛋白質或抗體。與合適之酶受質一起培育後，再以偵測試劑偵測與 $\text{TGF-}\beta$ 結合之偵測抗體的量。於一較佳體系中，該偵測試劑可為抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化酶。以微量盤讀計測量樣本中與 $\text{TGF-}\beta$ 之量相關之可目視的信號。信號越強，整個標準曲線範圍內

之 TGF- β 的濃度愈高。

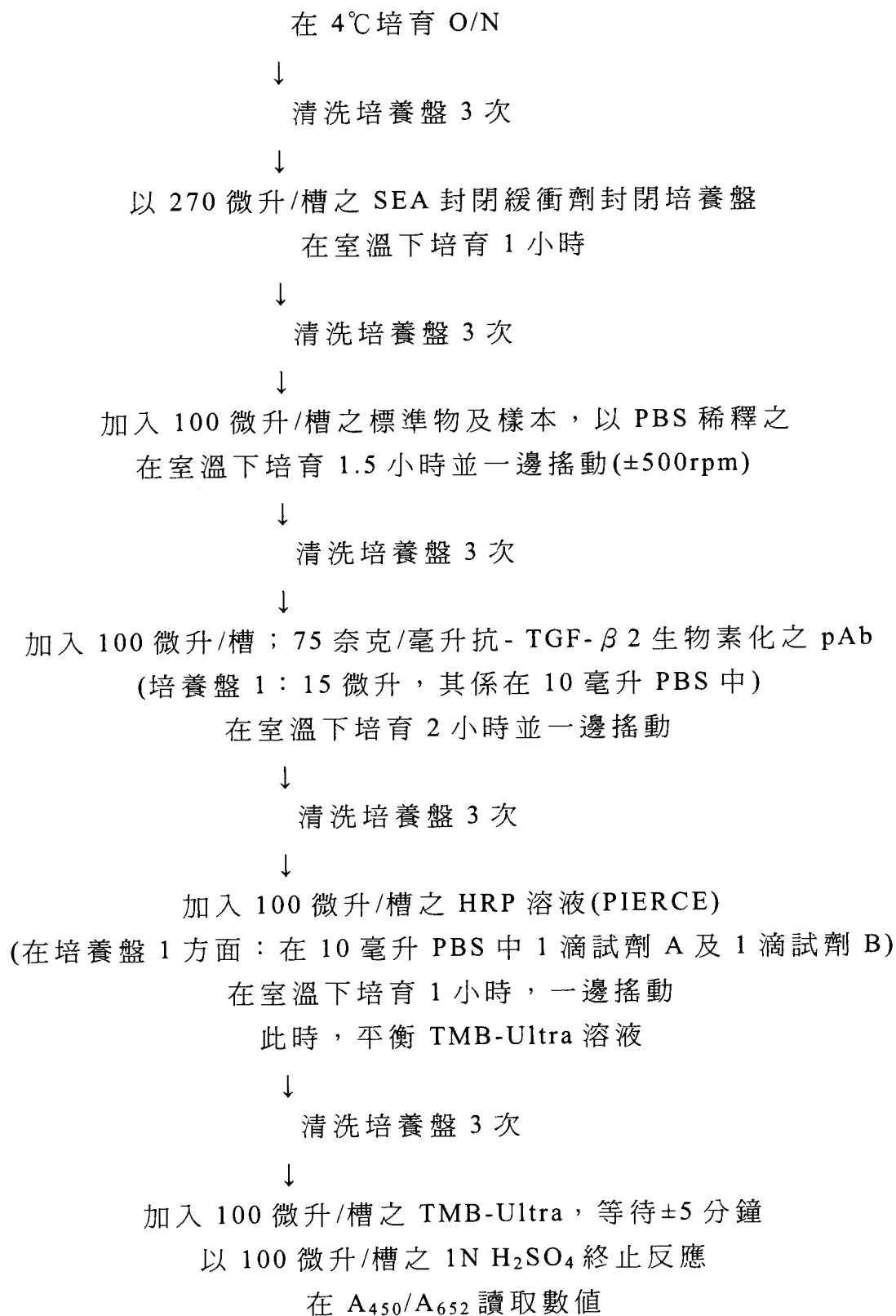
本發明之 ELISA 試驗的較佳體系列於下方流程圖中。

0

0

ELISA 流程圖：

以 2 微克/毫升純化之老鼠單株抗-TGF- β 2 塗覆培養盤，100 微升/槽
(培養盤 1：40 微升 mAb，其係在 9960 微升 CBC 緩衝劑中)



該三明治方法不必是本發明中所使用之唯一的 ELISA 方法。任何 ELISA 分析技術（如此處所修改者）均可用於本發明之方法中。

在 ELISA 分析之前可先將粉末狀樣本重構成。例如：可將粉末狀營養補充品（諸如嬰兒配方）或粉末狀未加工之蛋白質來源重構成液態形式。本發明中發現包含未加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）的樣本可以與營養產物（諸如嬰兒配方）不同之方式重構成。因此，本發明中可將營養產物（諸如嬰兒配方）重構成濃度介於約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升。於另一較佳體系中可將該營養產物重構成約 166 毫克/毫升。於一特殊之較佳體系中，重構成營養產物包含將約 0.5 克之粉末狀營養產物溶解在約 3 毫升水中。

然而，在加工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物或脫脂奶粉）方面可將該樣本重構成介於約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升之濃度。於一特殊之較佳體系中可將該樣本重構成約 100 毫克/毫升。此可經由將約 0.5 克粉末溶解在約 5 毫升水中來取得。爲了讓樣本從懸浮液移至溶液，此重構成之濃度對未加工之蛋白質來源而言是必要的。

在製備用於 ELISA 試驗之樣本時，通常將樣本離心，以將該樣本脫脂並收集用於測試之水相上清液（即，乳清部分）。本發明中，本發明者發現人乳可在 10,000rpm 下離心約三次，每次約 15 分鐘。此方法可有效地自乳汁去除脂質層。然而，在營養產物（諸如嬰兒配方）或未加

工之蛋白質來源（諸如乳清蛋白濃縮物）方面，本發明者已發現應避免離心步驟。事實上，離心步驟被發現會降低樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 的濃度約 5% 至約 30%。雖然不欲受限於此一或任何理論，咸信，這類損失可能促成去脂作用及酪蛋白結合作用。因此，在製備用於 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 之 ELISA 試驗的營養產物或未加工之蛋白質來源時應完全避免該離心步驟。

爲了活化潛伏 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 使其成爲可經由本發明測量之免疫反應形式，必須以酸活化並中和 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。雖然所有樣本之酸化及中和的活化程序均同，本發明者發現用於乳汁、營養產物及未加工之蛋白質來源之樣本：酸：鹼的比例均不同。此外，樣本：酸：鹼之比例根據被分析者爲 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 而有不同。

於一較佳體系中，對乳汁樣本經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。於另一較佳體系中，對未加工之蛋白質來源經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。

於一分別之較佳體系中，對包含未加工之蛋白質來源的樣本經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.225 以活化樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 。於另一較佳體系中，對包含未加工之蛋白質來源的樣本中經由加入酸和鹼，使樣本：酸：鹼之比例約爲 1：0.2：0.2 以活化樣本中之

TGF- β 2。

一種活化程序本身的實例（不欲作為限制）：稱 1 克重之營養組成物或未加工之蛋白質來源的樣本，並將其置於 50 毫升試管中。以 5 毫升水或磷酸鹽緩衝液（PBS）將樣本重構成。以塑膠棒輕輕攪拌混合物。在混合物中加入一些 1N HCl 使 pH 值介於約 2 至約 3。可再以塑膠棒攪拌混合物。然後，將混合物在室溫培育 15 分鐘。接著，可在混合物中加入 1N NaOH 使 pH 值介於約 7 至約 8。可再以塑膠棒攪拌混合物。若該混合物尚未被重構成其最終濃度，則可將其轉移至 10 毫升之容量瓶中，加入水或 PBS 使其成為最終之重構成濃度。

另一實例：液態乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源之液態樣本可經由將 1 毫升之液態樣本轉移到 2 毫升之低吸附試管中活化。在樣本中加入濃鹽酸以使其 pH 值介於約 2 至約 3。將樣本震盪混合，再在約室溫下培育約 15 分鐘。然後，以 50% NaOH 中和樣本以使最終 pH 值介於約 7 至約 8。再次將樣本震盪混合。該活化步驟中可使用其他酸或鹼。

於一較佳體系中，本發明中可使用聚丙烯試管和培養盒，因為活性 TGF- β 為高度疏水性且可能黏在玻璃儀器上。本發明方法中所使用之酸和鹼可為任何本技藝所已知者。於一較佳體系中，該酸可為 HCl 且該鹼可為 NaOH。

本發明中係使用緩衝溶液稀釋樣本。任何本技藝中已知之緩衝溶液均可用於此較佳體系中。Quantikine®套組

(目錄編號 DB100B) 提供用於定量 $\text{TGF-}\beta 1$ 之二種緩衝溶液。該緩衝溶液包含 RD1-21 (帶有防腐劑之經緩衝的蛋白質溶液) 及 RD1-73 (帶有防腐劑之經緩衝的蛋白質溶液)。本發明者意外發現 RD1-73 (RD1-21 則不) 顯示出具最大斜度的線性來正確定量 $\text{TGF-}\beta 1$ ，以及寬廣之濃度範圍，以使樣本稀釋倍數最大。此效果在乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源的樣本中顯著。因此，於一較佳體系中，用於稀釋之緩衝溶液可為 RD1-73。

在 $\text{TGF-}\beta 2$ 方面，若使用用於定量 $\text{TGF-}\beta 2$ 之 Quantikine® 套組 (目錄編號 DB250)，可使用分析稀釋劑 RD1-17。

此外，本發明者發現樣本之原始稀釋比係取決於所測量者為 $\text{TGF-}\beta 1$ 或 $\text{TGF-}\beta 2$ 。再者，原始稀釋比亦取決於該樣本為乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源。

例如，於一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：2 至約 1：5。於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：2 至約 1：3。再於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。於一特殊之較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 1$ 時，乳汁樣本之初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：2。

於一較佳體系中，測量乳汁來源中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 不需稀釋。於另一較佳體系中，測量 $\text{TGF-}\beta 2$ 時，乳汁樣本之初

始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：3 至約 1：5。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：4。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：4。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：5 至約 1：10。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：7 至約 1：9。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：8。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，營養產物之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：8。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：1 至約 1：3。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1：2。再於另一特殊之較佳體系中，測量 TGF- β 1 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1：2。

於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1：5

至約 1 : 10。於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑介於約 1 : 8 至約 1 : 10。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑約 1 : 9。再於另一較佳體系中，測量 TGF- β 2 時，未加工之蛋白質來源之樣本的初始稀釋可為樣本：稀釋劑至少約 1 : 9。

然後，將稀釋劑以正確之稀釋比加入分析槽中。再將標準物、對照組或活化之樣本加入各槽中。然後，輕拍微量盤以將其混合，蓋上黏封條並在室溫下培育約 2 小時。

吸出每一個槽內之液體並清洗之，重複此過程 3 次，共清洗 4 次。使用噴出瓶、多支管分注器或自動清洗器在每一槽中填入緩衝劑以清洗培養槽。最後一次清洗後，藉由吸出或輕輕倒出來移出任何剩餘之緩衝液。然後，將培養盤倒置，以乾淨之紙巾將其吸乾。

於一較佳體系中，再將 TGF- β 1 或 TGF- β 2 結合物分別加入含有 TGF- β 1 或 TGF- β 2 樣本之每一個槽中。然後，以新的黏封條覆蓋培養槽並在室溫下培育約 2 小時。然後，可重複上述之吸出/清洗步驟。

然後，將受質溶液（著色劑）加入各槽中，並在室溫下、黑暗中培育約 30 分鐘。然後，可在各槽中加入酸終止液（諸如 H₂SO₄），輕拍微量盤以確保完全混合。

在約 30 分鐘內使用微量盤讀計（設定在 450nm）測定每一培養槽之光學密度。若需要校正波長，可設定在

540nm 或 570nm。若無法校正波長則應將 450nm 處之讀值減去 540nm 或 570nm 處之讀值。

然後，使用者可將每一個標準物、對照組及樣本之二次讀值平均並減去平均之零標準物的光學密度。經由使用能產生四參數對數曲線擬合之電腦軟體將數據簡化來產生標準曲線。或者，可將各標準物之平均吸收標繪在 y 軸，將濃度標繪在 x 軸上，通過圖上之點劃出最佳擬合曲線，以建構標準曲線。將 TGF- β 1 濃度之對數相對於 O.D. 之對數標繪以將數據線性化，而最佳擬合線可藉由迴歸分析決定。若在活化步驟中稀釋樣本，則應將測得之濃度乘以最終稀釋因子。

使用本發明方法評估 NIBSC/WHO 引用參數 89/518 (天然之牛) 及 90/696 (重組之人類)。TGF- β 1 及 TGF- β 2 方法之劑量反應與 Quantikine® 標準曲線相似。使用下列方程式將以 Quantikine® TGF- β 2 套組取得之樣本值轉換成相等之 NIBSC 單位。

NIBSC (89/518) 當量值 (U/ 毫升) = 0.0551x
Quantikine® TGF- β 2 值 (皮克 / 毫升) 。

NIBSC (90/696) 當量值 (U/ 毫升) = 0.0272x
Quantikine® TGF- β 2 值 (皮克 / 毫升) 。

本發明方法有利於將在分析性回收試驗期間於嬰兒配方中所觀察到之矩陣移位效果減至最低。因此，本發明克服促成高估或低估乳汁樣本、營養產物或未加工之蛋白質來源中真正之 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度的矩陣位移。

本發明進一步包括用於測定人類乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中之 TGF- β 1 或 TGF- β 2 的生物活性的套組。該套組可包括 RD1-73 緩衝劑及/或分析稀釋劑 RD1-17 及豬 TGF- β 標準物。該套組可選擇性地進一步包括一或多種 TGF- β 結合物、TGF- β 微量盤、校正稀釋液、著色劑及/或清洗緩衝劑濃縮物，包含在套組內的還有根據此處所描述之方法製備樣本的指示。

下列實例描述本發明之不同較佳體系。熟習本技藝之人士考量此處所揭示之本發明的專利說明書或練習可清楚明白此處之申請專利範圍內的其他較佳體系。本專利說明書與實例僅欲用於示範，本發明之範圍及精神係由接續在實例後之申請專利範圍指明。於實例中，除非另外指明，所有百分比均以重量計。

【實施方式】

實例 1

此實例說明本發明之一種較佳體系。

設備和試劑

試管：

a. 50 毫升聚丙烯管

b. 10 毫升容量瓶

c. 2 毫升離心管：（Protein LoBind 2.0 毫升試管 - Eppendorf 022431102）

微量盤及附件：

a. NUNC-Immuno MaxiSorp StarWell 96-槽盤 NUNC
441653

b. 密封膠帶 96-槽 Pierce 15036

c. 試劑保存庫 Pierce 15075

微量盤讀計及附件：

a. 微量盤清洗器 Bio-Tek ELx405

b. SynergyTMHT 多次偵測微量盤讀計 Bio-Tek SIAFR

c. Gen5 數據分析軟體 Bio-Tek 594718

d. 吉特巴微量盤搖動器 (Microplate Shaker The Jitterbug
) 模型 130000 (Boekel Scientific)

移液管：單一管道：

a. 0.5-10 微升 Eppendorf 022471902，吸頭 Eppendorf
2249152-1

b. 20-200 微升 Eppendorf 022472054，吸頭 Eppendorf
2249154-7

c. 100-1000 微升 Eppendorf 022472101，吸頭 Eppendorf
2249155-5

d. 0.5-5 毫升 Eppendorf 022472151，吸頭 Eppendorf
2249198-9

多管道：

a. 20-300 微升 Eppendorf 022461460，吸頭 Eppendorf
2249154-7

b. 50-1200 微升 Eppendorf 022461478，吸頭 Eppendorf
2249196-2

緩衝劑：

- a. BupH 磷酸鹽緩衝液 (PBS) Pierce 28372
- b. BupH 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝劑 Pierce 28382
- c. Surfact Amp 20 Pierce 28320

抗原標準物：

- a. 重組之人類 TGF- β 2 標準物 (R&D 系統 302-B2)

封閉緩衝劑：SEA Block Pierce 37527

抗體：

- a. 抗-TGF- β 2；純化之老鼠單株 IgG_{2B} (R&D 系統 MAB612)
- b. 抗-TGF- β 2；生物素化之 TGF- β 2 親和性純化的山羊 IgG (R&D 系統 BAF302)

ELISA 偵測套組：

- a. 免疫純化超敏感 ABC 過氧化酶 (Immunopure ultra-sensitive ABC peroxidase) (Pierce 32050)
- b. 1-步驟 超-TMB-ELISA 試劑 (Pierce 34028)

終止溶液：

- a. 1M H₂SO₄

奈米純水

緩衝劑之製備方法：

CBC 緩衝劑

- a. 將一小包 Pierce BupH 碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝劑溶解在 500 毫升水中。

- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

PBS

- a. 將一小包 Pierce BupH 磷酸鹽緩衝液溶解在 500 毫升水中。
- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

PBST

- a. 將一小瓶（10 毫升）Pierce Surfact Amp 20 加入 2 升之 PBS 中。
- b. 將溶液貯存在室溫。
- c. 此溶液可保持穩定數個月。

捕捉抗體：抗 TGF- β 2，純化之老鼠單株 IgG_{2B}

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 2 微克/毫升抗體。

抗原標準物：重組之人類 TGF- β 2 標準物：

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 0-4000 皮克/毫升抗體。

偵測抗體：抗-TGF- β 2；生物素化之親和性純化的山羊 IgG：

- a. 每一個分析均新鮮製備在 PBS 中之 100 奈克/毫升抗體。

Pierce ABC 試劑溶液：

- a. 在 10 毫升 PBS 方面，將 1 滴（45 微升）試劑 A

加入 1 滴（45 微升）試劑 B 中。

b. 新鮮製備該溶液並貯存在 4℃，直到使用時。

樣本之製備方法：

使用下列議定計劃活化在粉末狀營養產物之樣本中的 TGF- β 2。

1. 稱 1 克重之樣本並將其置於 50 毫升試管中。
2. 以 5 毫升 PBS 將樣本重構成。
3. 以塑膠棒將樣本輕輕混合。
4. 將 1N HCl 加入樣本中以使樣本之 pH 值介於 2 至 3。然後，以塑膠棒將樣本混合。
5. 將樣本在室溫培育 15 分鐘。
6. 將 1N NaOH 加入樣本中以其 pH 值介於 7 至 8。然後，以塑膠棒將樣本混合。
7. 將樣本轉移至 10 毫升容量瓶中，加入 PBS 使之達到最終體積（最終濃度：100 毫克/毫升）。

使用下列議定計劃活化液態乳汁樣本中之 TGF- β 2。

1. 將 1 毫升液態樣本轉移入 2 毫升之低吸附管中。
2. 加入濃 HCl 以使 pH 值介於 2 至 3。將混合物震盪混合。
3. 將混合物在室溫培育 15 分鐘。
4. 加入 50%/50%濃 NaOH/H₂O 以使 pH 值介於 7 至 8。將樣本震盪混合。

表 1. 標準物之系列稀釋

rhTGF- β 2 標準貯存液 濃度 (皮克/毫升)	貯存液/先前稀 釋液之體積 (微升)	緩衝劑 (PBS) (微升)	最終 濃度 (皮克/毫升)
2,000,000	4 (貯存液)	1996	4000
	1000	1000	2000
	1000	1000	1000
	1000	1000	500
	1000	1000	250
	1000	1000	125
	1000	1000	62.5
	1000	1000	31.25
	0	2000	0

表 2. 樣本之系列稀釋

樣本之起始 濃度 (毫克/毫升)	起始/先前稀 釋液之體積 (微升)	緩衝劑 (PBS) (微升)	最終 濃度 (微克/毫升)
100	1000 (貯存液)	0	100,000
	500	500	50,000
	500	500	25,000
	500	500	12,500
	500	500	6,250
	500	500	3,125

表 3.96 槽盤之佈置：

STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	CTL	CTL	空白
STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	CTL	CTL	空白
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 1; 稀釋液 6	樣本 1; 稀釋液 5	樣本 1; 稀釋液 4	樣本 1; 稀釋液 3	樣本 1; 稀釋液 2	樣本 1; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 1	樣本 3; 稀釋液 2	樣本 3; 稀釋液 3	樣本 3; 稀釋液 4	樣本 3; 稀釋液 5	樣本 3; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6
樣本 2; 稀釋液 6	樣本 2; 稀釋液 5	樣本 2; 稀釋液 4	樣本 2; 稀釋液 3	樣本 2; 稀釋液 2	樣本 2; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 1	樣本 4; 稀釋液 2	樣本 4; 稀釋液 3	樣本 4; 稀釋液 4	樣本 4; 稀釋液 5	樣本 4; 稀釋液 6

程序

1. 以移液管將 100 微升之捕捉抗體溶液移至各槽中並以密封膠帶覆蓋之。

2. 將樣本在 4℃ 培育一整夜。

3. 以 PBST 清洗培養盤三次。

4. 以移液管將 270 微升之封閉緩衝劑移至培養盤中並以密封膠帶覆蓋該培養盤。

5. 將培養盤在室溫 (RT) 下培育 1 小時。

6. 以 PBST 清洗培養盤三次。

7. 以移液管將 100 微升之標準物移入樣本中，再以密封膠帶覆蓋之。

8. 然後，將混合物在室溫培育 1 小時 30 分鐘。

9. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。

10. 以移液管將 100 微升之偵測抗體移至培養盤中並以密封膠帶覆蓋該培養盤。

11. 將樣本在室溫培育 2 小時並一邊搖動。

12. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。

13. 然後，以移液管將 100 微升之 ABC 試劑移入樣本中並以密封膠帶覆蓋樣本。

14. 將樣本在室溫下培育 1 小時並一邊搖動。

15. 然後，以 PBST 清洗培養盤三次。

16. 以移液管將 100 微升之色原體 (chromogen) (Pierce Ultra-TMB) 受質移入樣本中並在室溫培育數分鐘。在 5 分鐘內逐漸產生顏色。

17. 將 100 微升之 1M H_2SO_4 加入樣本中以終止反應，並使用微量盤讀計測量 ($A_{450}/A_{652\text{nm}}$) 樣本。

表 3. 標準曲線

曲線名稱	曲線公式	A	B	R	R ²
曲線	$Y = A \cdot X + B$	0.000349	-0.0137	0.999	0.998

第 1 圖說明標準曲線。

表 4. 結果

槽ID	名稱	槽	濃度/ 稀釋液	空白 450	濃度	計數	平均值	標準差	CV (%)
樣本 1		C6	1.00E+05	0.907	2633.964	3	2572.918	372.903	14.493
		D6	1.00E+05	1.004	2911.532				
		E6	1.00E+05	0.746	2173.259				
		C5	50000	0.655	1912.861	3	1853.723	70.636	3.81
		D5	50000	0.607	1775.508				
		E5	50000	0.641	1872.8				
		C4	25000	0.379	1123.082	3	1085.882	42.153	3.882
		D4	25000	0.369	1094.467				
		E4	25000	0.35	1040.098				
		C3	12500	0.17	525.024	3	527.886	13.113	2.484
		D3	12500	0.176	542.193				
		E3	12500	0.167	516.44				
		C2	6250	0.079	264.626	3	256.995	6.608	2.571
		D2	6250	0.075	253.18				
		E2	6250	0.075	253.18				
		C1	3125	0.039	150.165	3	121.55	24.946	20.523
		D1	3125	0.023	104.381				
		E1	3125	0.025	110.104				
樣本 2		F6	1.00E+05	0.605	1769.785	3	1807.939	116.388	6.438
		G6	1.00E+05	0.586	1715.416				
		H6	1.00E+05	0.664	1938.615				
		F5	50000	0.384	1137.389	3	1165.051	52.945	4.544
		G5	50000	0.382	1131.666				
		H5	50000	0.415	1226.096				
		F4	25000	0.203	619.454	3	668.1	50.138	7.505
		G4	25000	0.238	719.607				
		H4	25000	0.219	665.239				
		F3	12500	0.094	307.549	3	339.025	28.183	8.313
		G3	12500	0.113	361.918				
		H3	12500	0.108	347.61				
		F2	6250	0.046	170.196	3	184.503	17.87	9.686
		G2	6250	0.049	178.78				
		H2	6250	0.058	204.534				
		F1	3125	0.023	104.381	3	92.935	15.142	16.293
		G1	3125	0.013	75.766				
		H1	3125	0.021	98.658				

計 算

$$\text{等式1 抗原濃度(ppm)} = \frac{(\text{測量之濃度以皮克/毫升計})}{(\text{樣本稀釋液以微克/毫升計})}$$

表 5. 濃度

樣本	濃度 (微克/毫升)	TGF-B2 (皮克/毫升)	CV (%)	TGFB2 (皮克/微克) ppm	從先前 濃度開 始之% 變化	平均 TGF-B2 (皮克/微克) ppm
樣本 1	1.00E+05	2572.918	14.493	0.0257		
	50000	1853.723	3.81	0.0371	144.09	
	25000	1085.882	3.882	0.0434	117.16	
	12500	527.886	2.484	0.0422	97.23	0.0409
	6250	256.995	2.571	0.0411	97.37	
	3125	121.55	20.523	0.0389	94.59	
樣本 2	1.00E+05	1807.939	6.438	0.0181		
	50000	1165.051	4.544	0.0233	128.88	
	25000	668.1	7.505	0.0267	114.69	0.0227
	12500	339.025	8.313	0.0271	101.49	
	6250	184.503	9.686	0.0295	108.84	
	3125	92.935	16.293	0.0297	100.74	

本專利說明書中所列舉之所有參考資料（包括但不限於所有論文、刊物、專利、專利申請書、描述、文本、報告、手稿、書冊、書本、網路貼文、雜誌文章、期刊，等）之全部內容併為本專利說明書之參考資料。此處之參考資料的討論僅欲摘要其作者之主張且並不承認任何參考資料構成先前技術。本申請者保留挑戰所列之參考資料的準確性及適當性的權利。

雖然本發明之較佳體系已利用特定名詞、裝置及方法描述，這類描述僅用於說明。所使用之文字為描述之文字而非限制用。需了解，本技藝之一般技術人士可做些改變及變化而不背離列於接下去之申請專利範圍中之本發明的精神或範圍。此外，需了解，不同較佳體系之觀點可全部或部分交換。例如：雖然已示範用於製造根據那些方法製造之無菌液態營養補給品之商品的方法，亦可考慮其他用

途。因此，附屬之申請專利範圍的精神及範圍不應受限於其中所包含之較佳變體的描述。

【圖式簡單說明】

第 1 圖說明標準曲線。

0

0

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98135792

※申請日：98 年 10 月 22 日

※IPC 分類：

G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/04 (2006.01)
G01N 33/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)測定組成物中轉型生長因子 β (TGF- β) 之濃度的方法Methods for determining the levels of TGF- β in a composition**二、中文發明摘要：**

本發明提供用於測定乳汁、未加工之蛋白質來源、或營養組成物之樣本中的 TGF- β 1 或 TGF- β 2 濃度之新穎方法。在某些情況中，該方法涉及重構成該樣本；在某些情況中，該方法涉及將樣本離心；使用樣本：酸：鹼之特定比例以活化該樣本；使用樣本：緩衝劑之特定比例以稀釋該樣本；以及，使用 ELISA 檢定法測定樣本中之 TGF- β 1 的濃度。

三、英文發明摘要：

A novel method for determining the levels of TGF- β 1 or TGF- β 2 in a sample of milk, raw protein source, or nutritional composition is provided. The method involves, in some cases, reconstituting the sample; in some cases, centrifuging the sample; activating the sample using particular ratios of sample:acid:base; diluting the sample using particular ratios of sample:buffer agent; and determining the concentration of TGF- β 1 in the sample using an ELISA assay.

七、申請專利範圍：

1. 一種用於測定乳汁樣本中 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 濃度之方法，
該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟（a）之上清液重複進行步驟（a）；

c. 收集步驟（b）所得之樣本的水相上清液並利用步驟（b）之上清液重複進行步驟（a）；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

e. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：2）以稀釋該樣本；及

f. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta\ 1$ 的量。

2. 一種用於測定乳汁樣本中 $\text{TGF-}\beta\ 2$ 濃度之方法，

該方法包含：

a. 將該樣本在約 10,000rpm 之離心力下離心約 15 分鐘；

b. 收集該樣本之水相上清液並利用步驟 (a) 之上清液重複進行步驟 (a)；

c. 收集步驟 (b) 所得之樣本的水相上清液並利用步驟 (b) 之上清液重複進行步驟 (a)；

d. 對該樣本經由加入酸和鹼 (其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2) 以活化該樣本；及

e. 測定該樣本中之 TGF- β 2 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 TGF- β 2 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 TGF- β 2 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

3. 一種用於測定粉末狀營養產物之樣本中 TGF- β 1 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：4）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該營養產物係重構成濃度為約 166 毫克/毫升。

5. 一種用於測定粉末狀營養產物之樣本中 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該營養產物重構成濃度為約 160 毫克/毫升至約 170 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少

約 1 : 8) 以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 2$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的量。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該營養產物係經重構成濃度為約 166 毫克/毫升。

7. 一種用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1 : 0.2 : 0.225）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1 : 2）以稀釋該樣本；

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 1$ 形成複合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 1$ 的量。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該未加工之蛋白質來源係經重構成濃度為約 100 毫克/毫升。

9. 一種用於測定粉末狀未加工之蛋白質來源的樣本中的 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度之方法，該方法包含：

a. 將該未加工之蛋白質來源重構成濃度為約 95 毫克/毫升至約 105 毫克/毫升；

b. 避免離心步驟；

c. 對該樣本經由加入酸和鹼（其中樣本：酸：鹼之比例約為 1：0.2：0.2）以活化該樣本；

d. 使用緩衝溶液（其中樣本：緩衝劑之比例為至少約 1：9）以稀釋該樣本；及

e. 測定該樣本中之 $\text{TGF-}\beta 2$ 濃度，其包含下列步驟：

i. 將該含有未知量之 $\text{TGF-}\beta 2$ 的樣本固定在固體載體上；

ii. 加入至少一種偵測抗體以與 $\text{TGF-}\beta 2$ 形成複

合物；

iii. 加入至少一種酶催化受質以產生可目視之信號；及

iv. 偵測該可目視之信號以測定該樣本中之 TGF- β 2 的量。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該未加工之蛋白質來源係經重構成濃度為約 100 毫克/毫升。

11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以酸將該樣本酸化至 pH 值介於約 2 至約 3 以活化該樣本。

12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以鹼將該樣本中和至 pH 值介於約 7 至約 8 以活化該樣本。

13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係以酸將該樣本酸化至 pH 值介於約 2 至約 3，再以鹼中和至 pH 值介於約 7 至約 8 以活化該樣本。

14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含比較豬標準物中 TGF- β 濃度與該樣本中 TGF- β 濃度的步驟。

15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該偵測抗體包含經生物素親和純化之山羊 IgG。

16. 一種用於測量乳汁、營養產物或未加工之蛋白質來源中 TGF- β 的套組，該套組包含：

- a. TGF- β 結合物；
- b. TGF- β 標準物；
- c. 稀釋劑；

- d. 清洗緩衝劑；
- e. 至少一種呈色劑；及
- f. 終止溶液。

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

0

0

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無