



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108267578 A

(43)申请公布日 2018.07.10

(21)申请号 201711475309.6

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 大连医科大学

地址 116000 辽宁省大连市旅顺口区旅顺  
南路西段9号

(72)发明人 李文哲 李志 李明 梁伟  
李雪滢

(74)专利代理机构 大连东方专利代理有限责任  
公司 21212

代理人 刘慧娟 李馨

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测方法

(57)摘要

本发明公开一种血清IgG核心岩藻糖基化水平检测方法,该方法包括利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的步骤,不包括从生物体取样的步骤,所述血清样品是离体样品。所述的凝集素是特异性识别核心岩藻糖基的米曲霉凝集素AOL蛋白(结构域),通过原核表达获得,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;由序列如SEQ ID NO.2所示的F1eA基因片段编码。该方法结合临床抗核抗体滴度检测,在自身免疫性疾病的筛查、自身免疫性疾病的检测方向有潜在的应用价值,为可能的免疫调控干预提供了潜在的治疗手段。

1. 一种检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,该方法包括利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的步骤,所述方法不包括从生物体取样的步骤,所述血清样品是离体样品。

2. 根据权利要求1所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,所述的凝集素是特异性识别核心岩藻糖基的米曲霉凝集素AOL蛋白,通过原核表达获得。

3. 根据权利要求2所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,所述的凝集素AOL蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;由序列如SEQ ID NO.2所示的F1eA基因片段编码。

4. 根据权利要求3所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,所述的利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的方法,包括A或B的步骤:

A凝集素印迹方法检测血清IgG中核心岩藻糖基化水平;

B通过夹心法ELISA方法检测血清IgG样品中核心岩藻糖基化水平。

5. 根据权利要求4所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,所述的夹心法ELISA方法检测血清IgG样品中核心岩藻糖基化的方法是,首先包被protein G或肺炎链球菌多肽(190-384位)、再依次孵育待检血清样品、反应生物素标记的如权利要求1所述的AOL、HRP(辣根过氧化物酶)标记的avidin,最后加入反应底物。

6. 根据权利要求5所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,所述的protein G是肺炎链球菌多肽(190-384)。

7. 根据权利要求4所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,所述的凝集素印迹方法检测血清IgG中核心岩藻糖基化水平的方法是,依次加入待检血清样品SDS-PAGE电泳、转至PVDF膜、反应生物素标记的如权利要求1所述的AOL、HRP(辣根过氧化物酶)标记的avidin,最后ECL显色。

8. 根据权利要求1所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,该方法还包括步骤:

C Western印迹方法检测血清中IgG的表达量;

D检测血清IgG表达量与核心岩藻糖基水平比值。

9. 根据权利要求8所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,Western印迹方法检测血清中IgG的表达量的方法包括步骤:依次加入待检血清样品SDS-PAGE电泳、转至PVDF膜、反应HRP(辣根过氧化物酶)标记的驴抗人IgG抗体,最后ECL显色。

10. 根据权利要求8所述的检测血清IgG核心岩藻糖基化水平的方法,其特征在于,所述的血清IgG核心岩藻糖基水平与IgG表达量比值的方法,是通过Image Lab与Graphpad Prism 6软件进行显著性差异分析。

## 血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质技术领域,涉及糖蛋白的检测,具体涉及血清IgG核心岩藻糖基化的检测。

### 背景技术

[0002] 自身免疫性疾病(autoimmune diseases)是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病。具有以下几个特点:1) 患者有明显的家族倾向性;2) 血液中存在高滴度自身抗体;3) 自身免疫病常呈现反复发作和慢性迁延的过程;4) 自身免疫病后期常伴随肝、肾、肠等重要器官的功能异常及并发症。目前尚无根治方法只能对症处理。如果能在早期发现自身免疫性疾病并监测其发展变化、及时治疗,可以延缓并发症的发生。

[0003] 目前,自身免疫性疾病的筛查手段主要检测抗核抗体(ANA)、类风湿因子(RF)、抗双链DNA(ds-DNA)抗体、抗非组蛋白(ENA)多肽谱。然而,它们的敏感性和特异性普遍不高。因此,找出一种覆盖面广、敏感性高、特异性好、操作便捷的血液学方法用于自身免疫性疾病的早期筛查、预后评估、具有重要的意义。从年龄发病率看,50岁以后发病率上升明显。因此,从40岁开始针对自身免疫性疾病进行筛查,具有很大的社会意义。

[0004] 糖链作为一种生物信息分子,几乎参与了所有生命过程,糖链结构的改变与疾病尤其是自身免疫性疾病、肿瘤、感染等重大疾病的发生、发展紧密相关。IgG是血清中含量最多的免疫球蛋白类型(占人血清Ig的80%),其结晶段(Fc)含有唯一的N-糖基化修饰保守位点,即Asn<sup>297</sup>糖链由于核心七糖上连接的末端糖基不同(图1),存在着种属、组织、年龄和性别特异性。IgG糖基化与功能密切相关。连接在Asn<sup>297</sup>的糖链可维持抗体的四级结构以及Fc段的热稳定性,并通过影响IgG分子与FcRs, C1q以及FcRn的结合而分别调节IgG分子的抗体依赖细胞毒作用(ADCC)、补体依赖的细胞毒作用(CDC)以及半衰期。研究提示IgG的Fc段糖基化修饰状态与多种疾病密切相关,例如随着类风湿性关节炎的发生、发展,IgG低半乳糖基化修饰的程度增加;晚期卵巢癌病人拥有高水平不对称寡糖结构的ConA结合(高甘露糖)的IgG。

[0005] 糖蛋白的加工和识别过程中,N-连接糖蛋白上的核心岩藻糖基化发挥非常重要的作用。核心岩藻糖基转移酶(Fut8)是催化核心岩藻糖基化修饰的唯一的糖基转移酶(图2)。核心岩藻糖出现在N-连接聚糖的不同阶段,并且能影响N-连接2天线寡糖的构象和适应性。我们先前的研究发现,转录生长因子β1(TGFβ-1)受体和或表皮生长因子(EGF)受体上的核心岩藻糖基化缺失后,表现出显著的活化异常,归因于配体对受体亲和力的降低。还有报道,去掉IgG<sub>1</sub>-C<sub>H2</sub>区域上的核心岩藻糖后,ADCC能够增强50-100倍。总而言之,Fut8介导的核心岩藻糖基化对蛋白质翻译后加工非常重要,其调控蛋白质的构象、稳定性及功能。

[0006] 目前,有关文章及专利如下:

[0007] 1. 名称: IgG核心岩藻糖基化水平检测方法及其应用; 公开号: CN102175839A。

[0008] 主要通过LCA凝胶层析法检测IgG核心岩藻糖基化水平,并应用于诊断肝脏疾病。

[0009] 2. 名称: 用于恶性肿瘤相关筛查及评估的产品、应用及方法; 公开号:

CN105277718A。

[0010] 主要通过检测血液中免疫球蛋白G表面双天线复杂型N糖链末端半乳糖变化对恶性肿瘤进行筛查、早期诊断和预后评估等。

[0011] 3. 名称:用于肝癌诊断的甲胎蛋白异质体分离试剂盒及其组成试剂与应用;公开号:CN102879567A。

[0012] 一种用于肝癌诊断的甲胎蛋白异质体分离试剂盒。

## 发明内容

[0013] 本发明属于蛋白质与糖学技术领域,涉及糖蛋白的检测,具体涉及血清IgG核心岩藻糖基化水平检测在自身免疫病诊断中的应用,包括IgG核心岩藻糖基化水平检测。该方法结合临床抗核抗体滴度检测,在自身免疫性疾病的筛查中有很好的应用前景。

[0014] 1. 本发明的目的是提供一种血清IgG核心岩藻糖基化水平检测方法,该方法在自身免疫性疾病的检测方向有潜在的应用价值,如:患者血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测,为可能的免疫调控干预提供了潜在的治疗手段。

[0015] 该方法包括利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的步骤,该方法不包括检测血清样品的感染性;且所述方法不包括从生物体取样的步骤,所述血清样品是离体样品。该方法不包括检测血清样品的除IgG外的其他分子。由于本发明所选择使用的Protein G (Acrobiosystems, RPG-S3140) 和AOL均为原核表达所获得,Protein G和AOL没有糖基化修饰。因此,参与该检测方法的各种分子只有待检血清IgG具有核心岩藻糖基结构。

[0016] 优选的情况下,所述的凝集素是特异性识别核心岩藻糖基的米曲霉凝集素AOL蛋白(结构域),通过原核表达获得。

[0017] 优选的情况下,所述的凝集素AOL蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;由序列如SEQ ID NO.2所示的FleA基因片段编码。

[0018] 优选的情况下,所述的利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的方法。

[0019] 包括A或B的步骤:

[0020] A凝集素印迹方法检测血清IgG中核心岩藻糖基化水平;

[0021] B通过夹心法ELISA方法检测血清IgG样品中核心岩藻糖基化水平。

[0022] 优选的情况下,所述的夹心法ELISA方法检测血清IgG样品中核心岩藻糖基化的方法是,首先包被重组protein G结构域或肺炎链球菌多肽(190-384位)、再依次孵育待检血清样品、反应biotin-AOL(生物素标记的如权利要求1所述的AOL)、HRP-avidin(辣根过氧化物酶标记的avidin),最后加入反应底物。该系统包括夹心法ELISA的开发和酶标仪(Thermo公司),其中酶标仪能将反应液中proteinG/IgG/biotin-AOL/avidin-HRP水平进行分析。夹心法ELISA法高效、特异,适用于临床自身免疫性疾病的筛查。

[0023] 优选的情况下,本发明所使用的重组protein G是Acrobiosystems, RPG-S3140,实际上,特异性地和人IgG结合的蛋白均可使用,例如:肺炎链球菌多肽(190-384位)。

[0024] 优选的情况下,所述的凝集素印迹方法检测血清IgG中核心岩藻糖基化水平的方法是,依次加入待检血清样品SDS-PAGE电泳、转至PVDF膜、反应生物素标记的如权利要求1所述的AOL、HRP(辣根过氧化物酶)标记的avidin,最后ECL显色。

[0025] 优选的情况下,该方法还包括步骤:

- [0026] C Western blot印迹方法检测血清中IgG的表达量；
- [0027] D检测血清IgG表达量与核心岩藻糖基水平比值。
- [0028] 优选的情况下，Western印迹方法检测血清中IgG的表达量的方法包括步骤：依次加入待检血清样品SDS-PAGE电泳、转至PVDF膜、反应HRP（辣根过氧化物酶）标记的驴抗人IgG抗体，最后ECL显色。
- [0029] 优选的情况下，所述的血清IgG核心岩藻糖基水平与IgG表达量比值的方法，该方法进一步包括计算血清IgG核心岩藻糖基水平与IgG表达量比值（AOL/IgG总量的比值）检测。这样，可以直接判断该患者是否有自身免疫性疾病的倾向。其通过Image Lab与Graphpad Prism 6软件进行显著性差异数据分析。
- [0030] 此外，可以依据本发明上文所述的方法，利用上文所述的凝集素，即特异性识别核心岩藻糖基的米曲霉凝集素AOL蛋白（结构域），制备一种用于血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测试剂盒。

### 附图说明

- [0031] 图1血清中IgG分子是一种核心岩藻糖基化的糖蛋白；
- [0032] 图2核心岩藻糖基转移酶催化反应图；
- [0033] 图3生物素标记AOL结构域的原核表达；
- [0034] 图4患者IgG测定结果；
- [0035] 图5患者AOL测定结果；
- [0036] 图6患者AOL/IgG比值统计学分析；
- [0037] 图7患者抗核抗体滴度统计学分析；
- [0038] 图8夹心法ELISA法检测自身免疫性疾病患者血清。

### 具体实施方式

- [0039] 下述非限定性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。
- [0040] 本发明实施例中所使用的原料、试剂或生物材料，如无特殊说明，均可由常规方法制备或通过商业途径获得。
- [0041] 凝胶成像仪（Bio-Rad）能将IgG核心岩藻糖基化水平进行分析。
- [0042] 实施例1
- [0043] 正常对照组和自身免疫性疾病组IgG核心岩藻糖基化水平的检测分析
- [0044] 1. 样品收集
- [0045] 收集2015年9月—2016年9月来大连市中心医院接受治疗并明确诊断为自身免疫性疾病的血清样本37例，其中男11例，女26例，平均年龄 $51.6 \pm 13.2$ 岁。另外选择健康体检者20例作为正常对照组，平均年龄 $51.2 \pm 10.3$ 岁。抽提空腹全血，静置30分钟，3000rpm，10min。吸取上层血清， $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。自身免疫性疾病患者血清中抗核抗体滴度（表1所示）。
- [0046] 表1自身免疫病病人血清样本

[0047]

| 编号 | 性别 | 抗核抗体滴度 | 疾病名称    |
|----|----|--------|---------|
| 1  | 男  | 1:320  | 类风湿性关节炎 |
| 2  | 男  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |
| 3  | 女  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |
| 4  | 女  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |

[0048]

|    |   |             |         |
|----|---|-------------|---------|
| 5  | 男 | 1:320       | 慢性肾小球肾炎 |
| 6  | 女 | 1:320       | 结缔组织病   |
| 7  | 女 | 1:320-1000  | 结缔组织病   |
| 8  | 女 | 1:3200      | 类风湿性关节炎 |
| 9  | 女 | 1:3200      | 系统性红斑狼疮 |
| 10 | 女 | 1:3200      | 多发性硬化   |
| 11 | 女 | 1:3200      | 系统性红斑狼疮 |
| 12 | 女 | 1:100       | 类风湿性关节炎 |
| 13 | 男 | 1:100       | 类风湿性关节炎 |
| 14 | 男 | 1:320       | 结缔组织病   |
| 15 | 男 | 1:320       | 结缔组织病   |
| 16 | 女 | 1:100       | 慢性结肠炎   |
| 17 | 女 | 1:100       | 类风湿性关节炎 |
| 18 | 女 | 1:100       | 类风湿性关节炎 |
| 19 | 女 | 1:100       | 类风湿性关节炎 |
| 20 | 男 | 1:100-320   | 类风湿性关节炎 |
| 21 | 女 | 1:320       | 类风湿性关节炎 |
| 22 | 女 | 1:320       | 慢性结肠炎   |
| 23 | 女 | 1:320       | 重症肌无力   |
| 24 | 女 | 1:320       | 干燥综合征   |
| 25 | 女 | 1:1000-3200 | 干燥综合征   |
| 26 | 女 | 1:320       | 硬皮病     |
| 27 | 男 | 1:320       | 慢性肾小球肾炎 |
| 28 | 女 | 1:100       | 慢性肾小球肾炎 |
| 29 | 女 | 1:320       | 系统性红斑狼疮 |
| 30 | 女 | 1:320-1000  | 系统性红斑狼疮 |
| 31 | 男 | 1:320       | 系统性红斑狼疮 |
| 32 | 女 | 1:100-320   | 系统性红斑狼疮 |
| 33 | 女 | 1:100-320   | 系统性红斑狼疮 |
| 34 | 女 | 1:320       | 系统性红斑狼疮 |

|        |    |   |            |         |
|--------|----|---|------------|---------|
| [0049] | 35 | 男 | 1:1000     | 系统性红斑狼疮 |
|        | 36 | 男 | 1:320-1000 | 系统性红斑狼疮 |
|        | 37 | 女 | 1:1000     | 系统性红斑狼疮 |
|        | 38 | 女 | 1:1000     | 系统性红斑狼疮 |

[0050] 2原核表达特异性结合核心岩藻糖的AOL凝集素,用于后续临床样本核心岩藻糖基化的检测

[0051] 原核表达AOL制备,具体步骤如下:

[0052] a.以提取得到的米曲霉菌RNA为模板,反转录得到cDNA,然后扩增FleA基因片段(编码凝集素AOL蛋白)。所述的凝集素AOL蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;由序列如SEQ ID NO.2所示的FleA基因片段编码。上游引物(5'-CCGGAATTCA TGTCTACTCCTGGCGCCCAA-3')包括EcoR I酶切位点,下游引物(5'-CCGCTCGAGCTACTCAGC CGGAGGGAGAGC-3')包括Xho I酶切位点。PCR产物与pMD19-T载体进行连接,转化Ecoli TOP10感受态细胞,在Amp抗性的平板37℃培养过夜,挑取单菌落培养后进行测序,构建pMD19-T-FleA质粒。

[0053] b.将测序正确的pMD19-T-FleA和pET-28a(+)同时进行EcoR I和Xho I双酶切,回收后进行连接,将连接产物转化大肠杆菌BL21感受态细胞,构建重组表达质粒然后送公司测序。

[0054] 将测序正确的菌液继续培养、诱导表达重组蛋白,即:取1mL接种到50mL LB液体培养基中,37℃,200r/min条件下培养1小时30分钟,加入0.5mM诱导剂IPTG(Isopropylβ-D-1-thiogalactoside),分别培养0、2、4和5h,诱导FleA重组蛋白的表达,SDS-PAGE检测。

[0055] c.将含有原核表达载体,pET20b-AOL的表达菌E.coli BL21在37℃震荡培养(170rpm);表达后的重组菌1%比例接种后扩大培养,相同方法诱导表达,6500rpm离心10min收集细胞,悬浮,超声破碎仪破碎细胞(20%功率,破碎10min),经SDS-PAGE检测。最后通过AKATA仪用镍离子亲和层析柱纯化蛋白。

[0056] 检测结果为:

[0057] 通过PCR扩增并纯化的FleA基因片段与pMD19-T载体连接,构建成pMD19-T-FleA质粒,经EcoR I和Xho I限制性内切酶双酶切处理后,检测到pET-28a(+)载体(5369bp)及FleA基因片段(935bp)(图3A)。IPTG诱导0、2和4h后,表达出AOL蛋白(分子量约34kDa)(图3B)。扩大培养后SDS-PAGE检测的AOL蛋白的纯度接近85%(图3C)。因此,结果证明目的蛋白成功表达,通过纯化后可进行后续实验。

[0058] 3对原核表达的凝集素AOL进行生物素标记;

[0059] a.用DMSO(6mg/ml,6.5mM)制备LCB-NHS(长链生物素NHS酯)溶液;

[0060] b.将10ul LCB-NHS加入1ml 2mg/ml抗体中,并在室温下孵育50分钟;

[0061] c.加入0.5ml 1M Tris-HCl(pH 8.0)终止反应;

[0062] d.用1X PBS透析24-48小时;

[0063] e.加入0.1%(w/v)的NaN<sub>3</sub>;

[0064] 4Western印迹方法分别检测血清样品中自身免疫性疾病组IgG与正常对照组IgG的表达;

[0065] a. 血清样品通过SDS-PAGE电泳后,转至PVDF膜上,用5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭1h;

[0066] b. 室温孵育HRP标记驴抗人IgG抗体(1:10000) 1小时;

[0067] c. TBST洗涤,每次10分钟,洗5次;

[0068] d. 加入ECL反应液(A液、B液1:1混匀);

[0069] e. 通过凝胶成像仪显色,检测蛋白条带;

[0070] 检测结果为:

[0071] 稀释后的血清样品经过SDS-PAGE电泳以后,用驴抗人IgG抗体检测血清中IgG含量。发现与正常对照组相比,自身免疫性疾病组IgG含量显著升高,且差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ) (图4所示)。表明,自身免疫性疾病患者中IgG含量高于正常水平。

[0072] 5凝集素印迹方法分别检测血清IgG中自身免疫性疾病组核心岩藻糖基化与正常对照组核心岩藻糖基化;

[0073] a. 血清样品通过SDS-PAGE电泳后,转至PVDF膜上,用5%牛血清白蛋白(BSA)封闭后,孵育生物素标记AOL(1:10000-1:20000) 4度过夜;

[0074] b. TBST洗涤,每次10分钟,洗5次;

[0075] c. 反应HRP标记Avidin(1:10000) 室温1小时

[0076] d. TBST洗涤,每次10分钟,洗5次;

[0077] e. 加入ECL反应液(A液、B液1:1混匀);

[0078] f. 通过凝胶成像仪显色,检测蛋白条带;

[0079] 检测结果为:

[0080] 自身免疫性疾病组核心岩藻糖基化水平与正常对照组相比显著升高,且差异均具有统计学意义( $P<0.001$ ) (图5所示)。

[0081] 正常对照组的AOL/IgG平均值是0.58,而自身免疫性疾病组的AOL/IgG平均值是1.09,且差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),具有一定的参考检测特异性和灵敏度(图6所示)。

[0082] SLE患者血清中能够检测到高水平的抗核抗体(ANA)。与正常血清样本相比,患者血清(抗核抗体滴度为1:100-1:1000)蛋白核心岩藻糖基化水平显著降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );与正常血清样本相比,患者血清(抗核抗体滴度为1:1000-1:3200)蛋白核心岩藻糖基化水平显著降低,差异均具有统计学意义( $P<0.01$ ) (图7所示)。

[0083] 这些结果显示了高水平核心岩藻糖基化可能对SLE严重程度和发病机制有一定的作用。

[0084] 实施例2

[0085] 夹心法ELISA法检测自身免疫性疾病患者血清

[0086] 1包被

[0087] 用pH 9.6的碳酸盐缓冲液稀释包被protein G,使浓度达到5-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每孔50 $\mu\text{l}$ 包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

[0088] 2洗板

[0089] 甩干包被液,用PBST洗涤,200 $\mu\text{l}$ /孔,每次30s后甩干洗板液,重复三次。

[0090] 3封闭

- [0091] 加入封闭液200 $\mu$ l/孔,37℃湿盒温浴30min。
- [0092] 4加入被检血清样品
- [0093] 加入1:10-1:100倍稀释的正常人血清样品及患者血清样品。37℃反应1h。阴性对照为PBS;阳性对照为确诊患者血清样品。
- [0094] 5洗板
- [0095] 用PBST洗涤,200 $\mu$ l/孔,每次30s后甩干洗板液,重复三次。
- [0096] 6一抗反应
- [0097] 加入1:1000-1:20000倍比稀释的生物素标记的AOL(通过原核表达获得,并用生物素进行了标记)100 $\mu$ l/孔,37℃湿盒温浴1h。
- [0098] 7洗板
- [0099] 甩干一抗,用PBST洗涤,200 $\mu$ l/孔,每次30s后甩干洗板液,重复三次。
- [0100] 8二抗反应
- [0101] 将avidin标记HRP做1:5000-1:10000稀释,100 $\mu$ l/孔加入酶标板,37℃湿盒温浴1h。
- [0102] 9洗板
- [0103] 甩干二抗,用PBST洗涤,200 $\mu$ l/孔,每次30s后甩干洗板液,重复三次。
- [0104] 10底物
- [0105] 加入邻苯二胺(OPD)液100 $\mu$ l/孔,37℃避光反应15min,酶标仪测定OD<sub>492nm</sub>值。
- [0106] 检测结果为:
- [0107] 夹心法ELISA结果显示自身免疫性疾病患者IgG核心岩藻糖基化水平显著高于正常人,如图8。可检测的核心岩藻糖基化IgG浓度范围为0.01~1000pmol/L,检出下限为0.01~0.05pmol/L。本发明大大提高了检测自身免疫性疾病的特异性和敏感性,操作简单、重复性高,本发明检测患者血清中核心岩藻糖基化IgG的表达量,为自身免疫性疾病的筛查提供实验数据。

## 序列表

&lt;110&gt; 大连医科大学

&lt;120&gt; 血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测方法

&lt;130&gt; 2014

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 311

&lt;212&gt; Protein

&lt;213&gt; 凝集素AOL蛋白的氨基酸序列

&lt;400&gt; 1

```

MSTPGAQEVL FRTGIAAVNS TNHLRVYFQD SHGSIRESLY ESGWANGTAK NVIAKAKLGT 60
PLAATSKELK NIRVYSLTED NVLQEAAYS GSGWYNGALA GAKFTVAPYS RIGSVFLAGT 120
NALQLRIYAQ KTDNTIQEYM WNGDGWKEGT NLGVALPGTG IGVTCWRYTD YDGPSIRVWF 180
QTDNLKLVQR AYDPHTGWYK ELTTIFDKAP PRCAIAATNF NPGKSSIYMR IYFVNSDNTI 240
WQVCWDHGQG YHDKRTITPV IQGSEIAIIS WEGPELRLYF QNGTYVSAIS EWTWGKAHGS 300
QLGRRALPPA E 311

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 936

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; FleA基因片段的核苷酸序列

&lt;400&gt; 2

```

atgtctactc ctggcgccca agaagttctt ttccgtaccg gaattgctgc ggtgaactcc 60
accaaccatc tccgtgtcta ctttcaggac tctcacggta gtattcgca gagtctctat 120
gagagtgggt gggcgaaatg tacggcaaag aatgttatcg ccaaggcgaa gcttggtacc 180
cctctcgctg cgacatctaa ggaactgaaa aatattcgtg tctacagtct taccgaagac 240
aacgtccttc aggaagctgc ttatgatagt ggcagcggat ggtacaacgg cgcgctggct 300
ggcgctaaat tcacagttgc tccttactct cgaatcgggt ctgtctttct ggcaggaacg 360
aatgcgttgc agttgcgtat ctatgcccag aaaactgata acacgataca ggagtatatg 420
tggaatggag acggctggaa ggaaggcaca aaccttggag ttgcgcttcc tggcactggt 480
attggagtta cttgctggcg ctacaccgat tacgatggtc caagcattag ggtctggttc 540
caaaccgaca atttgaagct tgtccagcga gcatatgac ccataaccgg atggtataag 600
gaactgacta ccatctttga caaggtcct cctcgctgtg caatcgagc cacgaacttt 660
aaccgccgta aaagtagcat ttacatgcgg atctattttg tcaactctga caacacaatt 720
tggcaagtgt gttgggatca tggccaagga taccatgaca agagaacat tacaccagtc 780
attcagggct cggaaaattgc gatcattagc tgggaagggc ctgagctgcg tctgtacttt 840
caaaatggca catatgtcag tgccattagt gagtggacat ggggcaaagc acacggatcg 900
cagctgggtc gccgggctct ccctccggct gagtag 936

```

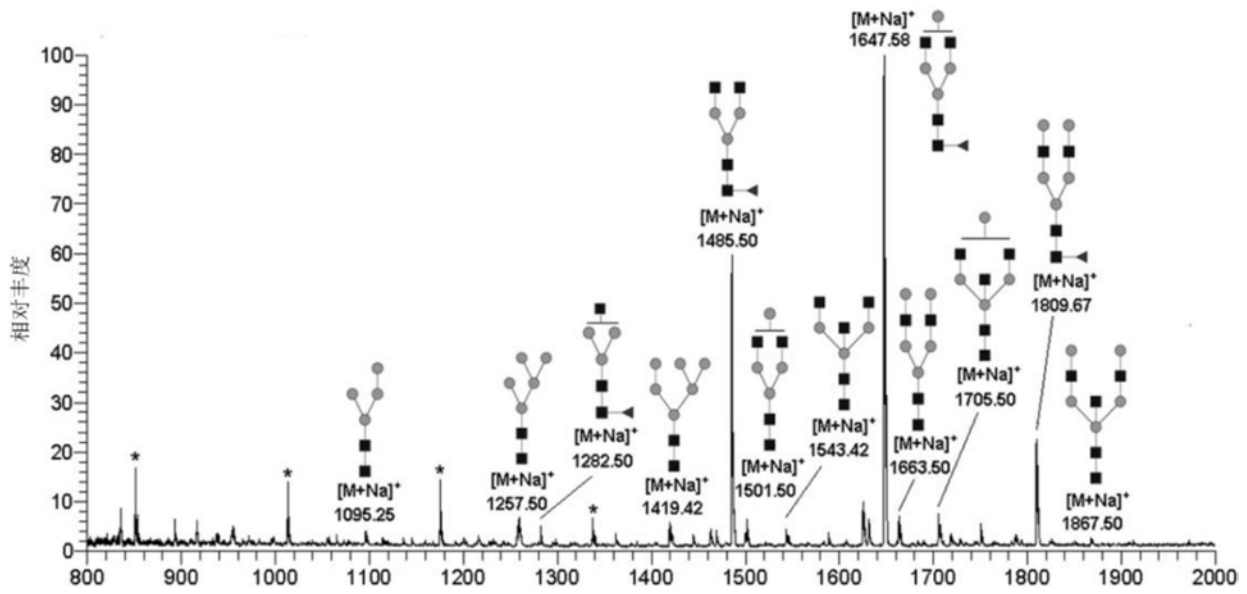


图1

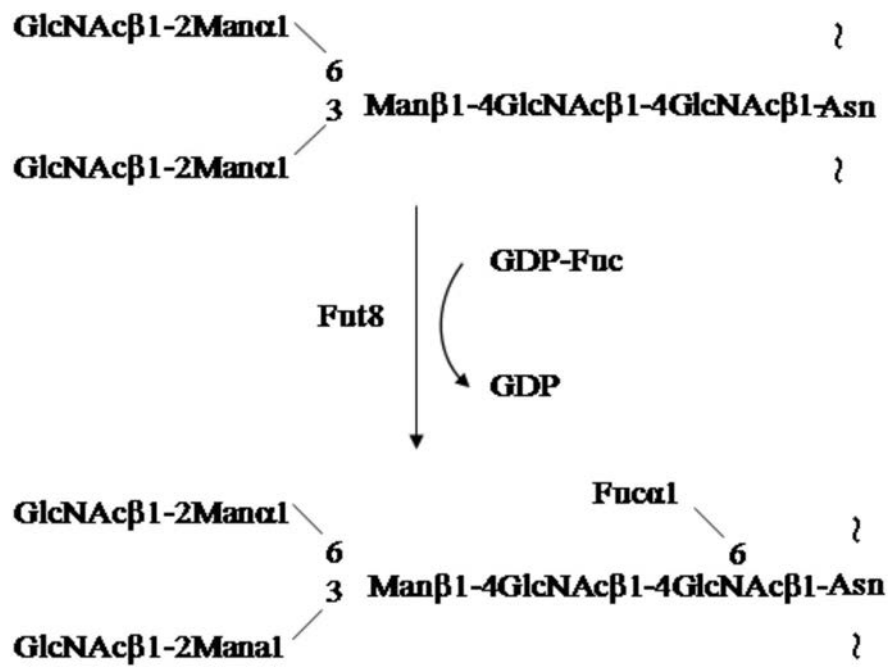


图2

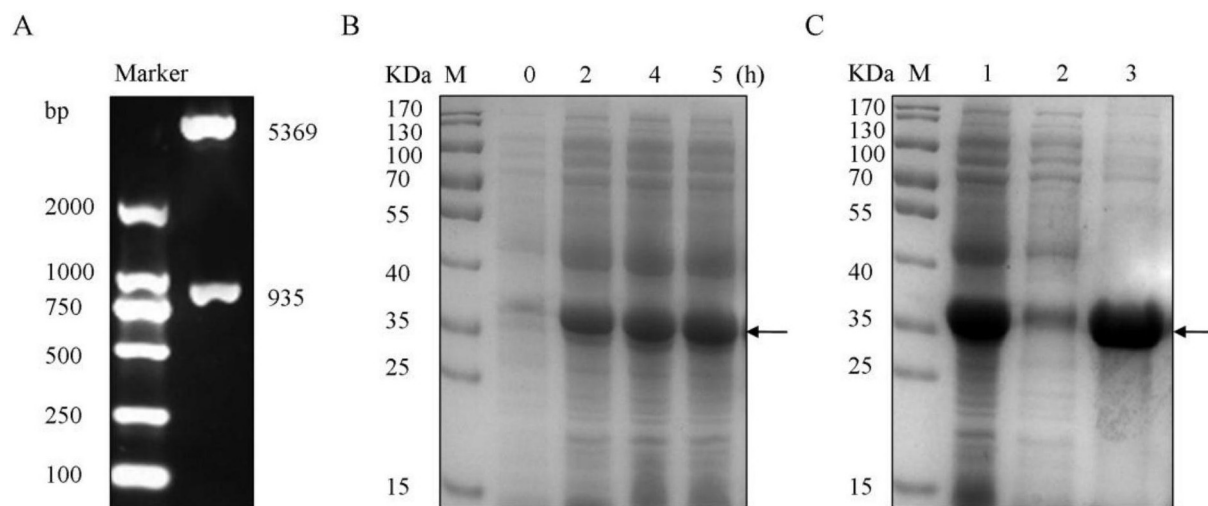


图3

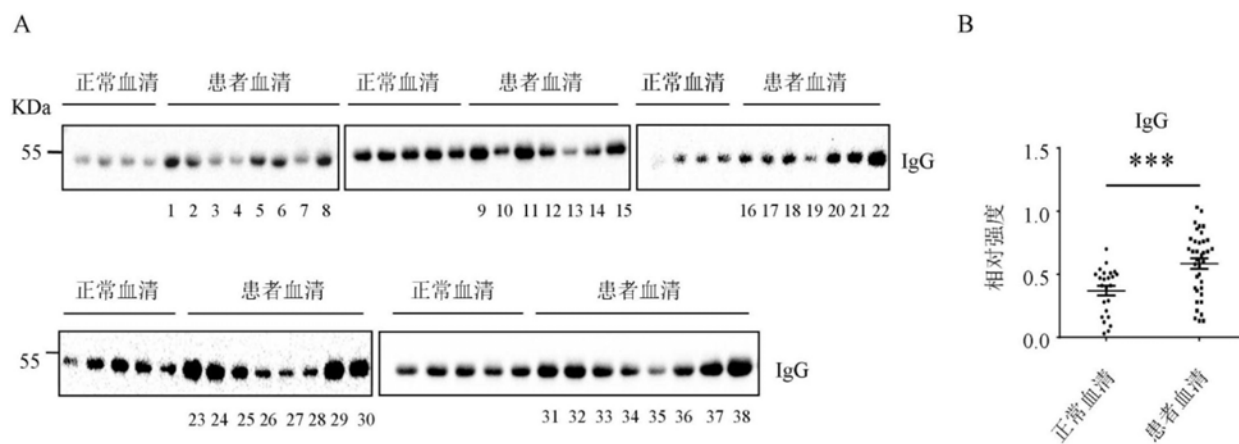


图4

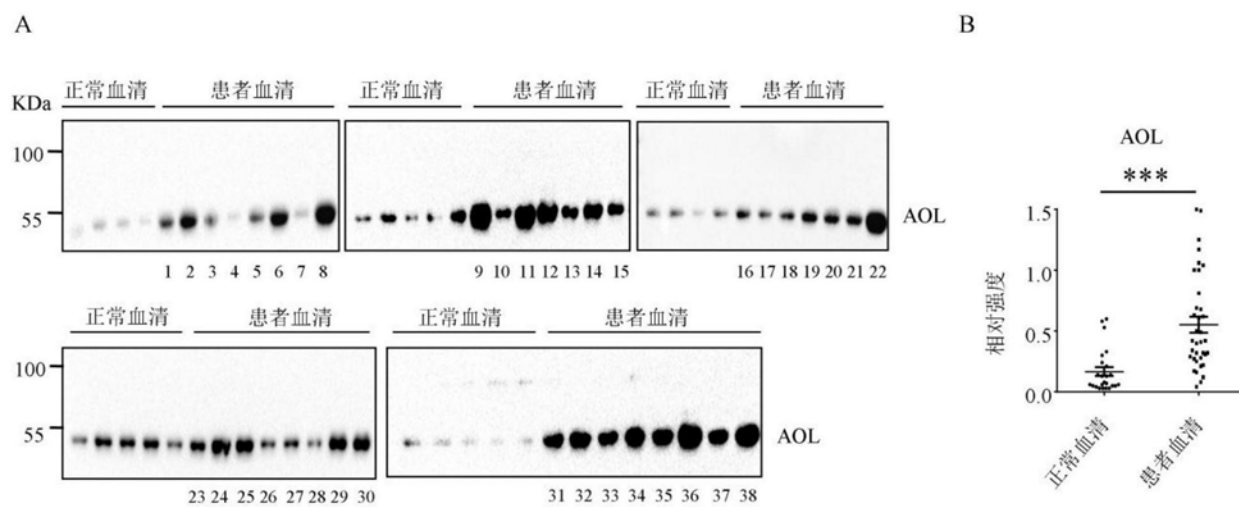


图5

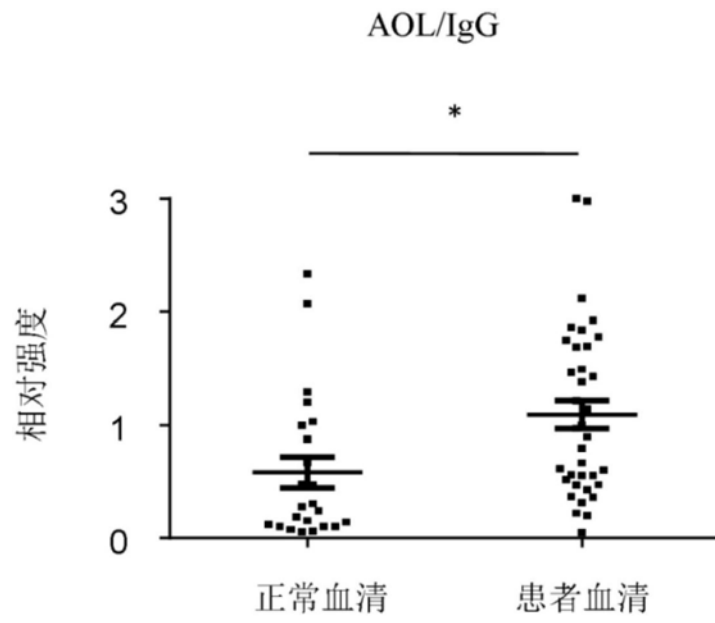


图6

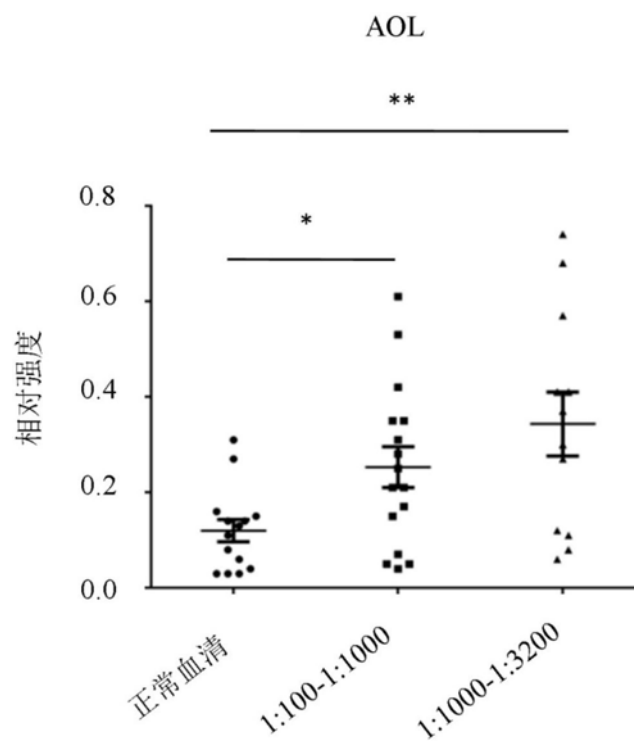


图7

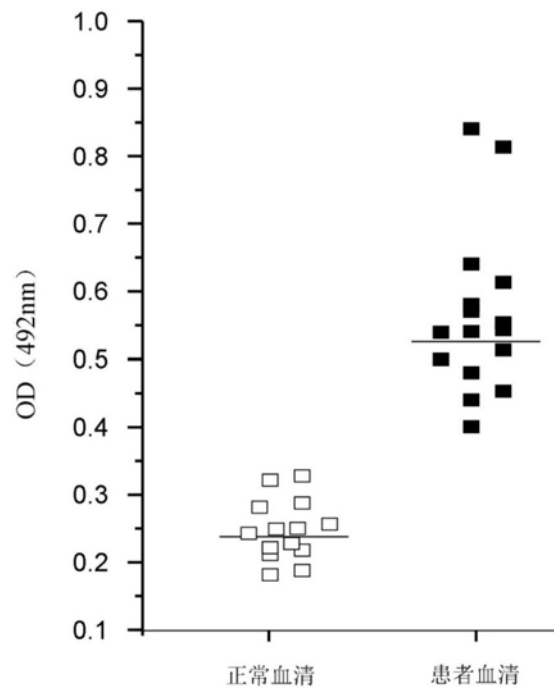


图8

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 血清IgG核心岩藻糖基化水平的检测方法                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108267578A</a>                   | 公开(公告)日 | 2018-07-10 |
| 申请号            | CN2017111475309.6                              | 申请日     | 2017-12-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 大连医科大学                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 大连医科大学                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 大连医科大学                                         |         |            |
| [标]发明人         | 李文哲<br>李志<br>李明<br>梁伟<br>李雪滢                   |         |            |
| 发明人            | 李文哲<br>李志<br>李明<br>梁伟<br>李雪滢                   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/535 C12N15/70                           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/535 C12N15/70                           |         |            |
| 代理人(译)         | 刘慧娟<br>李馨                                      |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开一种血清IgG核心岩藻糖基化水平检测方法，该方法包括利用凝集素特异性识别血清IgG中核心岩藻糖基的步骤，不包括从生物体取样的步骤，所述血清样品是离体样品。所述的凝集素是特异性识别核心岩藻糖基的米曲霉凝集素AOL蛋白(结构域)，通过原核表达获得，其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示；由序列如SEQ ID NO.2所示的FleA基因片段编码。该方法结合临床抗核抗体滴度检测，在自身免疫性疾病的筛查、自身免疫性疾病的检测方向有潜在的应用价值，为可能的免疫调控干预提供了潜在的治疗手段。

| 编号 | 性别 | 抗核抗体滴度 | 疾病名称    |
|----|----|--------|---------|
| 1  | 男  | 1:320  | 类风湿性关节炎 |
| 2  | 男  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |
| 3  | 女  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |
| 4  | 女  | 1:100  | 类风湿性关节炎 |