



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104017827 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201410135044. 5

(22) 申请日 2014. 04. 04

(71) 申请人 天津医科大学总医院

地址 300052 天津市和平区鞍山道 154 号

(72) 发明人 闫亚平 施福东 李敏淑 金薇娜
齐媛

(74) 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司
12207

代理人 朱红星

(51) Int. Cl.

C12N 15/867(2006. 01)

C12N 15/66(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页

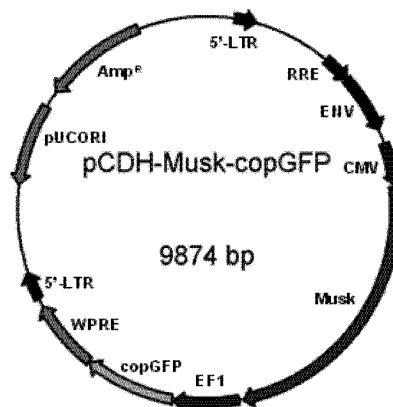
序列表12页 附图4页

(54) 发明名称

一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用。所述慢病毒质粒表达载体为 pCDH-MCS-MuSK-GFP, 其核苷酸序列如序列表如 SEQIDNO. 2 所示。本发明更进一步公开了慢病毒质粒表达载体在制备用于构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体检测方面的应用。本发明通过构建病毒载体建立稳定转染 MuSK 的细胞系, 采用灵敏度和特异性更高的荧光免疫细胞染色结合流式细胞检测技术, 用于临床定性、定量检测 MuSK 抗体, 使检测结果更加稳定, 且极大节约人力和时间成本。该项目的建立将极大提高重症肌无力的诊疗水平, 提高患者的劳动能力和生活质量, 将产生很大的社会效益和经济效益。



1. 一种慢病毒质粒表达载体,其特征在于所述慢病毒质粒表达载体为 pCDH-MCS-MuSK-GFP,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

2. 一种权利要求 1 所述慢病毒质粒表达载体的构建方法,其特征在于按如下的步骤进行:

1) 载体构建:以人肌肉组织 cDNA 为模板,利用引物 MuskF: 5'-CCAGCTAGCATGAGAGAGC TCGTCAACATTCCAC-3' 和 MuskR 5'-CACAGCGGCCGCTTAGACACTCACAGTTCCTCTGCC-3' 扩增 MuSK isoform 2 cDNA 序列,序列表中 SEQ ID NO. 1 所示,具体步骤如下:

向 PCR 反应管中依次加入 DNA 模板 300 ng,引物各终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μL , Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , 终浓度约 5U/ μL , ddH₂O 补到终体积为 50 μL ; PCR 的循环程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 分钟, 98 $^{\circ}\text{C}$ 10s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min, 共循环 32 次, 以确保充分延伸;

2) 应用胶回收试剂盒对扩增片段切胶回收;后连入 T 载体,经测序比对序列正确后将其用 NheI 和 NotI 双酶切,具体步骤如下:

加入 DNA 1 μg 和相应的限制性内切酶 NheI 和 NotI 2 μL , 再加入重蒸水使总体积为 19 μL , 将管内溶液混匀后加入 1 μL 酶液;混匀反应体系后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 2-3 小时,使酶切反应完全,反应完成后制备琼脂糖凝胶,取 10 μL 酶解液与 2 μL 6 $\times$ 载样液混匀,用微量移液枪小心加入样品槽中,加完样后合上电泳槽盖,立即接通电源,控制电压保持在 60-80V, 电流在 40mA 以上,当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时,停止电泳,紫外成像系统观察并测定 DNA 酶切片段大小,鉴定正确后,与经 NheI 和 NotI 双酶切后的 pCDH-MCS-MCS-EF1-copGFP 质粒载体相连接,得到所用的表达 MuSK 和 GFP 的慢病毒质粒载体:pCDH-MCS-MuSK-GFP。

3. 权利要求 1 所述慢病毒质粒表达载体在制备用于构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体检测方面的应用。

4. 权利要求 3 所述构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体检测的应用,其特征之处在于它是由下述步骤组成:

1) 利用 CaCl₂ 法病毒包装表达 MuSK-GFP (pCDH-MCS-Musk-EF1-copGFP) 融合蛋白的慢病毒,收集病毒悬液在 6 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞,1 周后,分选阳性稳定转染细胞。

5. 继续传代培养后进行二次筛选,获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系,培养条件:37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养转染稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞;

具体步骤:待 HEK293 细胞长至 70% 密度时,撤掉旧的培养基,用 PBS 清洗细胞,利用 CaCl₂ 法病毒包装表达 MuSK-GFP 融合蛋白的慢病毒,收集病毒悬液在 6 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 14 小时,第二天换成完全培养基,1 周后,流式细胞术分选阳性稳定转染细胞;继续传代培养后进行二次筛选,获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系;

2) 流式细胞术测定血清 Musk 抗体:

获得待检血清后,用含 1%BSA (Sigma) DMEM-Hepes 洗液稀释待测血清,收集转染及未转染的 HEK293 细胞,按 1:1 的比例混合,总数为 5×10^5 ,用流式 staining 缓冲液(1 $\times$ PBS

含 3% 的马血清及 0.02% 的叠氮钠 NaN_3) 清洗 1 次, 离心后弃去上清, 用 $100\ \mu\text{l}$ 稀释过的血清或人 Ig 对照重悬细胞, 4 度孵育 30min, 然后加入流式 staining 缓冲液清洗 1 次, 离心收集细胞后加入 100ul 稀释后的 Fast blue 标记的山羊抗人 IgG, 4 度避光孵育 30 min, 流式 staining 缓冲液清洗 1 次, 然后用 300ul 流式 staining 缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪双通道检测荧光信号, 以未转染细胞亚群及人 IgG 染色组为对照, 判断 MuSK 抗体阳性样本, 此外, GFP 阳性细胞类群中的 Fast blue 信号强弱可用来标示抗体浓度的相对量;

3) 细胞免疫荧光法测定血清 Musk 抗体, 具体实验方法过程:

对 HEK293 细胞进行培养、传代, 并转入细胞培养瓶中; 利用 PEI 对 EGFP 标记的人 MuSK cDNA (MuSK-GFP) 质粒进行细胞转染; 待转染效率至 70% 以上时, 加入适量细胞裂解缓冲液, 再加入适量蛋白酶抑制剂; 收集细胞裂解液于 EP 管中, 轮转 1 小时, 13000rpm 离心 15min, 收集上清, 即为相应抗原提取液;

解冻待测组血清, 观察滤光离心 5min, 取上清 $10\ \mu\text{l}$, 分别加入已稀释的 $50\ \mu\text{l}$ 抗原提取液, 混合后轮转过夜, 然后加入适量非特异山羊抗人 IgG, 孵育后离心, 弃上清, 收集沉淀, 最后用 1ml 裂解提取缓冲液漂洗沉淀, 重复 3 次; 将沉淀移入 96 孔板中, 在高速多通道连续波长酶标仪上获取荧光吸光度, 以健康对照组荧光均值 +3 倍标准差以上为阳性判断标准, 每份血清检测均双盲, 并重复 3 遍;

4) 统计分析: 使用 GraphPad Prism 4 对数据进行绘图及统计分析。

一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用,具体是慢病毒质粒表达载体及其构建方法和在构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶(muscle specific kinase, MuSK)抗体检测的应用。

背景技术

[0002] 重症肌无力(Myasthenia gravis, MG)是一种由抗体介导的,主要累及神经肌肉接头突触后膜乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR),导致神经肌肉接头传递障碍的自身免疫性疾病。其临床特征为部分或全身骨骼肌易疲劳,呈波动性肌无力,具有在活动后加重,休息后缓解和晨轻暮重等特点。随着医疗诊断水平的不断提高和人们生活环境等因素的变化, MG 的发病率呈逐渐升高的趋势,因此,早期鉴别诊断对指导两种疾病的治疗和评估预后非常重要。

[0003] 重症肌无力因其症状具有波动性的特点且易与其它相似疾病混淆,所以诊断一直是医学上的难点。血清特异性抗体的检测在 MG 的诊断和发病机制研究等方面有重要意义。研究证明 MG 的发病机制可能为体内产生的 AChR-Ab 同 AChR 相结合,在补体参与下与 AChR 发生应答。一方面引起细胞膜溶解,使 AChR 大量破坏;一方面可以使膜表面的 AChR 交联,增加 AChR 的退化速度。但是约 20% 的重症肌无力患者体内不能检测到 AChR-Ab。研究发现, 50% AChR-Ab 阴性患者血清 IgG 能与肌肉特异性 TE671 细胞株结合,而不与表达 AChR 的人囊胚肾细胞(human embryonic kidney cells, HEK293)结合。虽然 AChR-Ab 阴性患者血清能抑制 TE671 细胞株 AChR 的功能,但这些血清中 AChR 的数目并不减少。这些证明 AChR-Ab 阴性患者血清 IgG 抗体结合的不是 AChR,而是同 AChR 有密切联系的,能调节 AChR 的肌蛋白,并证明是抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶(muscle specific kinase, MuSK)。MuSK-Ab 与 MuSK 的细胞外段直接结合,抑制发育中凝集蛋白(Agrin)介导的 AChRs 在细胞突触后膜的聚集。虽然这些抗体在体内引起肌无力的机制还不明确,但是 MuSK-Ab 的出现定义了一组 AChR-Ab 阴性患者亚群。40% -70% AChR-Ab 阴性 MG 患者血清中含有抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体。所以现在将 AChR-Ab 阴性 MG 又分为两部分,一是 MuSK-Ab 阳性;二是 AChR-Ab 和 MuSK-Ab 均阴性,也称为血清抗体阴性重症肌无力(seronegative myasthenia gravis, SNMG)。MuSK-Ab 的发现,有助于进一步研究 MG 的发病机制和总结临床特征。

[0004] MuSK 抗体阳性的患者,多是女性并且中早发型(发病年龄小于 40 岁者)占 70%,临床症状多表现为延髓肌无力、面肌无力,随着病情的发展容易出现肌无力危象,面肌萎缩。胸腺区组织学多正常或轻微不正常,胸腺切除对 MuSK-Ab 阳性 MG 患者疗效无显著意义。MuSK-Ab 阳性 MG 患者通常对抗胆碱酯酶药物疗效差,传统的免疫抑制治疗反应差。MuSK-Ab 只能在 AChR-Ab 阴性的 MG 患者血清中检测出,不存在于 AChR-Ab 阳性 MG 的血清中,而且在其他肌肉相关疾病的患者血清中也不能检测出。MuSK 抗体在 AChR-Ab 阴性 MG 的出现是有特异性的,在检测 AChR-Ab 阴性患者中具有诊断意义。而我国目前对 MuSK-Ab 阳性 MG 的特征认识不足,对 MuSK-Ab 的检测尚处空白。

[0005] 目前国际上检测 MuSK 抗体的技术主要有间接免疫荧光法 (Indirect Immunofluorescence, IIF)、荧光免疫沉淀法 (Fluoroimmunoprecipitation Assay, FIPA)、放射免疫沉淀法 (Radioimmunoprecipitation Assay, RIPA)、荧光免疫细胞染色法 (Cell-Based fluorescent immunostaining Assay, CBA) 及酶联免疫吸附法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)。ELISA 是较常用的方法,但是其敏感性和特异性不高;RIPA 虽然敏感性和特异性高但因放射性物质对环境等的不利影响,其应用受到限制;目前以 CBA 和 FIPA 的敏感性和特异性最为理想。然而,CBA 法平均检测周期超过两天,荧光效率不稳定,而且需要人为观察,费时费力,而且可能会增加检测中的人为误差;FIPA 法同样涉及到同位素的应用,环境危害性大大增加。此外,针对 MuSK 自身抗体的检测国内目前只少数研究者利用 CBA 和 FIPA 做了科研研究,尚未常规应用于临床,因此何种方法作为“金标准”被推荐应用于临床 MuSK 抗体的检测尚待阐明。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用。本发明结合病毒载体构建,转染,荧光免疫染色及流式细胞分析技术,主要应用于重症肌无力临床鉴别诊断,提高重症肌无力诊断水平;能辅助作为用药疗效、病情监测、复发预测的指标;本发明提供一种抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶自身抗体的检测方法,可以克服已有技术的缺陷。将人 MuSK isoform 2 的 cDNA 全长克隆到双表达慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 的多克隆位点区,包装病毒,用病毒侵染 293T 细胞,流式分选稳定转染的细胞,获得稳定表达 MuSK 和 GFP 的细胞系,采用灵敏度和特异性更高的细胞免疫荧光染色结合流式细胞检测技术用于临床定性、定量检测 MuSK-Ab。MuSK-Ab 检测平台的建立能为进一步研究 MuSK 抗体的致病机制提供基础。

[0007] 为实现上述目的为发明公开了如下的技术内容:

本发明的一个目的是提供一种慢病毒质粒表达载体,其特征在于所述慢病毒质粒表达载体为 pCDH-MCS-MuSK-GFP,其核苷酸序列如序列列表 SEQ ID NO. 2 所示。

[0008] 本发明另一个目的是提供一种慢病毒质粒表达载体的构建方法,它包括的步骤:

1) 载体构建:

以人肌肉组织 cDNA 为模板,利用引物 MuskF: 5'-CCAGCTAGCATGAGAGAGCTCGTCAACATTC CAC-3' 和 MuskR 5'-CACAGCGGCCGCTTAGACACTCACAGTTCCCTCTGCC-3' 扩增 MuSK isoform 2 cDNA 序列,序列列表中 SEQ ID NO. 1 所示,具体步骤如下:

向 PCR 反应管中依次加入 DNA 模板 300 ng,引物各终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μl , Taq DNA 聚合酶 0.5 μl , 终浓度约 5U/ μl , ddH₂O 补到终体积为 50 μl 。PCR 的循环程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 分钟,98 $^{\circ}\text{C}$ 10s,68 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min,共循环 32 次,以确保充分延伸。

[0009] 2) 应用胶回收试剂盒对扩增片段切胶回收 (Axygen 公司) 后连入 T 载体,经测序比对序列正确后将其用 NheI 和 NotI 双酶切。具体步骤如下:

加入 DNA 1 μg 和相应的限制性内切酶 NheI 和 NotI 2 μl , 再加入重蒸水使总体积为 19 μl ,将管内溶液混匀后加入 1 μl 酶液。混匀反应体系后,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 2-3 小时,使酶切反应完全。反应完成后制备琼脂糖凝胶,取 10 μl 酶解液与 2 μl 6 $\times$ 载样液混匀,

用微量移液枪小心加入样品槽中,加完样后合上电泳槽盖,立即接通电源。控制电压保持在 60-80V,电流在 40mA 以上,当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时,停止电泳,紫外成像系统观察并测定 DNA 酶切片段大小。鉴定正确后,与经 *NheI* 和 *NotI* 双酶切后的 pCDH-MCS-MCS-EF1-copGFP 质粒载体(上海吉凯基因有限公司)相连接,得到所用的表达 MuSK 和 GFP 的慢病毒质粒载体:pCDH-MCS-MuSK-GFP。构建好的病毒载体的完整序列如序列表中 SEQ ID NO. 2 所示。构建好的病毒载体的完整序列:

```
acgcgtgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcacatggtaacgatgagtttagcaacatgccttaca  
ggagagaaaaagcacccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttatttaggaaggcaacagac  
gggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatatgtatttaagtgccctagctcgataca  
ataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactgcttaagcc  
tcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctca  
gaccttttagtcagtgtggaatctctagcagtgccgccccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagc  
tctctcgacgcaggactcggcttgcgtgaagcgcgacggcaagaggcgagggcgggcgactgggtgagtacgcaaaa  
atcttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcg  
atgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaataaaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagc  
tagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacca  
tccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaaggat  
agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag  
cggccactgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaaagtagt  
aaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgaggaa  
taggagctttgttcccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacag  
gccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgtt  
gcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagc  
tcctggggatttgggggttgctctggaaaactcatttgaccactgctgtgccttgggaatgctagttggagtaataaa  
tctctggaacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacac  
tccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagttt  
gtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtt  
taagaatagtttttgcgtgtactttctatagtgaatagagtttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccac  
ctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccat  
tcgattagtgaacggatctcgacggttaacttttaaaagaaaaggggggattgggggggtacagtgacggggaaagaa  
tagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttatcgat  
actagtattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcategctatt  
accatggtgatgcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagttctcca  
ccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccc  
cattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatc  
gcctggagacgccatccacgtgttttgacctccatagaagattctagagctagcatgagagagctcgtaacattc  
cactggtacatattcttactctggttgccttcagcggaaactgagaaaacttccaaaagctcctgtcatcaccactcct  
cttgaaacagtggtatgccttagttgaagaagtggctactttcatgtgtgcagtggaaatcctacccccagcctgagat  
ttcctggactagaaataaaattctcattaaactctttgacacccgggtacagcatccgggagaatgggcagctcctca
```

ccatcctgagtgtggaagacagtgatgatggcatttactgctgcacggccaacaatggtgtgggaggagctgtggag
agttgtggagccctgcaagtgaagatgaaacctaaaataactcgtcctcccataaatgtgaaaataatagagggtt
aaaagcagtcctaccatgtactacaatgggtaatcccaaaccatcagtgctttggataaaggagacagccctctca
gggaaaattcccgaattgcagttcttgaatctgggagcttgaggattcataacgtacaaaaggaagatgcaggacag
tatcgatgtgtggcaaaaaacagcctcgggacagcatattccaaagtggtagagctggaagttgaggaagaaagtga
accgaacaagataactaaagtttttggcaggatcctgcgggctcctgaatcccaaatgtcacctttggctcctttg
tgacctgcactgtacagcaacaggcattcctgtccccaccatcacctggattgaaaacggaaatgctgtttcttct
gggtccattcaagagagtgtgaaagaccgagtgttgactcaagactgcagctgtttatcaccaagccaggactcta
cacatgcatagctaccaataagcatggggagaagttcagtgactgccaaggctgcagccaccatcagcatagcagaat
ggagagagtactgcttggcagtaaggagctcttctgcgcaaaagaatggctggtaatggaagagaagaccacaga
ggactctacagatccgagatgcat ttgctgtccgtgccagaatgcagcaagcttccagcatgcattgggacccac
ggcctgtgccagactgccacatctagcattcccaccaatgacgtcctcaaagccaagtgtggacattccaaatctgc
cttctcctcctcttcttcttcttctgtctcactacatactccatgactgtaataatctccatcatgtccagcttt
gcaatatttgtgtcttcttaccataactactctctattgtgtccgaagaagaaaacaatggaaaaataagaaaagaga
atcagcagcagtaaccctcaccacactgccttctgagctcttactagatagacttcatccaaccccatgtaccaga
ggatgccgctccttctgaaccccaaattgtctagcctggagtatccaaggaataacattgaaatgtgagagacatc
ggagaggggagcgtttggaagggtgtttcaagcaagggcaccaggcttacttccctatgaacctttcactatggtggc
agtaaagatgtc caaagaagaagcctcggcagatatgcaagcggactttcagagggaggcagccctcatggcagaat
ttgacaaccctaacattgtgaagctattaggagtgtgtgtgtgtcggaagccaatgtgcctgtctttgaatacatg
gcctatggtgacctcaatgagttcctccgcagcatgtccctcacaccgtgtgcagcctcagtcacagtgacttgtc
tatgagggtcaggtctccagccctgggccccccacctctcctgtgtgagcagctttgcattgccaggcaggtgg
cagctggcatggcttacctctcagaacgtaagtttgttcaccgagatttagccaccaggaactgcctggtgggcgag
aacatggtggtgaaaattgccgactttggcctctccaggaacatctactcagcagactactacaaagctaataaaaa
cgacgtatccctatccgttggatgccaccagagtcattttttataaccgctacactacagagtctgatgtgtggg
cctatggcgtggctcctctgggagatcttctcctatggcctgcagccctactatgggatggcccatgaggaggtcatt
tactacgtgcgagatggcaacatcctctccttgccctgagaactgccccgtggagctgtacaatctcatgctctatg
ttggagcaagctgcctgcagacagaccagtttcaccagtattcaccgaattctggaacgcatgtgtgagagggcag
agggaactgtgagtgtctaageggccgcaaggatctgcgatcgctccggtgccgctcagtgggcagagcgacatcg
cccacagtccecgagaagttggggggagggtcggaattgaacgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaaactg
ggaaagtgtgtgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccg
tgaacgtttttttcgcaacgggtttgccgcgagaacacagctgaagcttcgaggggtcgcattctctccttcacgc
gcccgcgccttacctgaggccgcatccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctg
aactgcgtccgcgtctaggttaagtttaaagctcaggtcgagaccgggctttgtccggcgctcccttgagacctac
ctagactcagccggtctccacgctttgcctgacctgtgtgtcaactctacgtttttgtttctgtttctg
cgccgttacagatccaagctgtgaccggcgccctacgttagacgccaccatggagagcgacgagagcgccctgccgc
catggagatcgagtgcgcacatccggcaccctgaacggcgtggagtccgagctggtggggcgggagaggggacccc
ccaagcaggggcgcatgaccaacaagatgaagagcaccaaaaggcgccctgaccttcagccctacctgctgagccac
gtgatgggctacggcttctaccacttcggcacctaccccagcggtacgagaaccccttctgcacgccatcaacaa
cggcggctacaccaacacccgcacatcgagaagtacgaggacggcggtgtgtgcacgtgagcttcagctaccgctacg

aggccggccgcgtgatcggcgacttcaaggtgggtgggcaccggcttccccgaggacagcgtgatcttcaccgacaag
atcatccgcagcaacgccaccgtggagcacctgcaccccatgggcgataacgtgctgggtgggcagcttcgccccgac
cttcagcctgcgcgacggcggtactacagcttcgtgggtggacagccacatgcacttcaagagcgccatccacccca
gcatcctgcagaacgggggccccatgttcgccttccgccgcgtggaggagctgcacagcaacaccgagctgggcac
gtggagtaccagcacgccttcaagacccccatcgcttcgccagatcccgcgctcagtcgtccaattctgccgtgga
cggcaccgcggaaccggctccaccggatctcgctaagtgcacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagat
tgactgggtattcttaactatgttgcctcttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtatt
gcttcccgtatggctttcatcttctcctctgtataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagtgtgtggccgt
tgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtc
agctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgccccgtgc
tggacaggggctcggtgtttgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaaatcatcgctcctttccttggtgct
cgctgtgtttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttc
cttcccgcggcctgctgcggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcccctcagacgagtcggatctccctt
tgggccgctccccgcctgggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaag
aaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaaaataagatctgctttttgcttgtactgggtctctctgg
ttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctg
agtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgt
ggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagag
agttagaggaacttgtttattgcagcttataatgggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagc
atctttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatccc
gcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccctatggctgactaattttttttttttatgcagaggccgagg
ccgcttcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctagacttttgagagacggccca
aattcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccgg
aagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaataagtgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtt
tccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggg
cgctcttccgcttctcgcctcactgactcgctgcgctcggtcggtcggtgcggcgagcgggtatcagctcactcaaa
ggcggttaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcca
ggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgc
tcaagtcagaggtggcgaaaccgcagagactataaagataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgctc
tctgttccgacctgcgcgttacccgataacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagct
cacgtgttaggtatctcagttcggtgttaggtcggtcgctccaagctgggtgtgtgcacgaaccccccggttcagccc
gaccgtgcgccttaccggtaactatcgctcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc
cactggtaacaggatttagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagtcttgaagtgggtggcctaactacggct
acactagaaggacagtatttgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttga
tccggcaaacaaaccacgctggtagcggtgggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatc
tcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtca
tgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatat
gagtaaacttggcttgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgttcac
catagttgcctgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatga

taccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagt
ggctctgcaactttatccgcctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttta
tagtttgcgcaacgttggttgccattgctacaggcatcgtgggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagct
ccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttggtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccg
atcgttggtcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatgggttatggcagcactgcataattctcttactgtcat
gccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcgggcgaccga
gttgctcttgcccggcgtaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcatttgaaaa
cgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcacccaa
ctgatcttcagcatcttttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagg
gaataagggcgacacggaaatgttgaaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttat
tgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttccccgaaa
agtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcggtatcacgaggccctttc
gtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgctgttaa
gcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgc
ggcatcagagcagattgtactgagagtgacccatattgcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaatacc
gcatcaggcgccattcgccattcaggtgcgcaactgttggaaggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgc
cagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttccagtcacgacgttgtaa
aacgacggccagtgccaagctg。

[0010] 本发明再一个目的是提供慢病毒质粒表达载体在制备用于构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶(muscle specific kinase, MuSK)抗体检测方面的应用。其中抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体的检测包括的步骤：

1)利用 CaCl_2 法病毒包装表达 MuSK-GFP (pCDH-MCS-Musk-EF1-copGFP) 融合蛋白的慢病毒,收集病毒悬液在 $6 \mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞,1 周后,分选阳性稳定转染细胞。继续传代培养后进行二次筛选,获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系,培养条件: 37°C 、含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养转染稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞;

具体步骤:待 HEK293 细胞长至 70% 密度时,撤掉旧的培养基,用 PBS 清洗细胞,利用 CaCl_2 法病毒包装表达 MuSK-GFP 融合蛋白的慢病毒,收集病毒悬液在 $6 \mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞, 37°C 培养 14 小时,第二天换成完全培养基,1 周后,流式细胞术分选阳性稳定转染细胞;继续传代培养后进行二次筛选,获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系;

2) 流式细胞术测定血清 Musk 抗体:

获得待检血清后,用含 1%BSA (Sigma) DMEM-Hepes 洗液稀释待测血清,收集转染及未转染的 HEK293 细胞,按 1:1 的比例混合,总数为 5×10^5 ,用流式 staining 缓冲液($1 \times \text{PBS}$ 含 3% 的马血清及 0.02% 的叠氮钠 NaN_3) 清洗 1 次,离心后弃去上清,用 $100 \mu\text{l}$ 稀释过的血清或人 Ig 对照重悬细胞,4 度孵育 30min,然后加入流式 staining 缓冲液清洗 1 次,离心收集细胞后加入 $100 \mu\text{l}$ 稀释后的 Fast blue 标记的山羊抗人 IgG,4 度避光孵育 30 min,流式 staining 缓冲液清洗 1 次,然后用 $300 \mu\text{l}$ 流式 staining 缓冲液重悬细胞,流式细胞仪双通道检测荧光信号,以未转染细胞亚群及人 IgG 染色组为对照,判断 MuSK 抗体阳性样本,此

外, GFP 阳性细胞类群中的 Fast blue 信号强弱可用来标示抗体浓度的相对量;

3) 细胞免疫荧光法测定血清 Musk 抗体, 具体实验方法过程:

对 HEK293 细胞进行培养、传代, 并转入细胞培养瓶中; 利用 PEI 对 EGFP 标记的人 MuSK cDNA (MuSK-GFP) 质粒进行细胞转染; 待转染效率至 70% 以上时, 加入适量细胞裂解缓冲液, 再加入适量蛋白酶抑制剂; 收集细胞裂解液于 EP 管中, 轮转 1 小时, 13000rpm 离心 15min, 收集上清, 即为相应抗原提取液;

解冻待测组血清, 察滤光离心 5min, 取上清 10 μ l, 分别加入已稀释的 50 μ l 抗原提取液, 混合后轮转过夜, 然后加入适量非特异山羊抗人 IgG, 孵育后离心, 弃上清, 收集沉淀, 最后用 1ml 裂解提取缓冲液漂洗沉淀, 重复 3 次; 将沉淀移入 96 孔板中, 在高速多通道连续波长酶标仪上获取荧光吸光度, 以健康对照组荧光均值 +3 倍标准差以上为阳性判断标准, 每份血清检测均双盲, 并重复 3 遍。

[0011] 4) 统计分析: 使用 GraphPad Prism 4 对数据进行绘图及统计分析。

[0012] 将人 MuSK isoform 2 (序列表中 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列) 的 cDNA 全长克隆到双表达慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-CopGFP 的多克隆位点区, 包装病毒, 用病毒侵染 293T 细胞, 流式分选稳定转染的细胞, 获得稳定表达 MuSK 和 GFP 的细胞系, 采用灵敏度和特异性更高的细胞免疫荧光染色结合流式细胞检测技术用于临床定性、定量检测 MuSK-Ab。

[0013] Musk isoform 2 序列 (SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列):

```
atgagagagctcgtcaacattccactggtacatattcttactctggttgccttcagcggaaactgagaaactt
ccaaaagctcctgtcatcaccactcctcttgaaacagtggatgccttagttgaagaagtggctactttcatgtgtgc
agtggaaatcctacccccagcctgagatttcttggaactagaaataaaattctcattaaactctttgacacccggtaca
gcatccgggagaatgggcagctcctcaccatcctgagtggtgaagacagtgatgatggcatttactgctgcacggcc
aacaatggtgtgggaggagctgtggagagttgtggagccctgcaagtgaagatgaaacctaaaataactcgtcctcc
cataaatgtgaaaataatagagggattaaaagcagtcctaccatgtactacaatgggtaatcccaaaccatcagtggt
cttgataaaggagacagccctctcagggaaaattcccgaattgcagttcttgaatctgggagcttgaggattcat
aacgtacaaaaggaagatgcaggacagtatcgatgtgtggcaaaaaacagcctcgggacagcatattccaaagtgtt
gaagctggaagttgaggaagaaagtgaacccgaacaagataactaaagtttttgcaggatcctgcgggctcctgaat
cccacaatgtcacctttggctcctttgtgacctgcaactgtacagcaacaggeattcctgtccccaccatcacctgg
attgaaaacggaaatgctgttttcttctgggtccattcaagagagtggtgaaagaccgagtgattgactcaagactgca
gctgtttatcaccaagccaggactctacacatgcatagctaccaataagcatggggagaagttcagtagtccaagg
ctgcagccaccatcagcatagcagaatggagagagtactgcttggcagtaaggagctcttctgcgcaaaagaatgg
ctggtaatggaagagaagaccacagaggactctacagatccgagatgcatttgcgtccgtgccagaatgcagcaa
gcttcccagcatgcattgggacccccacggcctgtgccagactgccacatctagcattcccacaaatgacgtcctcaa
agccaagtgtggacattccaaatctgccttcctcctcctcttcttctctgtctcactacatactccatgact
gtaataatctccatcatgtccagctttgcaatatttgtgcttcttaccataactactctctattgctgccgaagaag
aaaacaatggaaaaataagaaaagagaatcagcagcagtaaccctcaccacactgccttctgagctcttactagata
gacttcatcccaaccccatgtaccagaggatgccgctccttctgaaccccaaattgctcagcctggagtatccaagg
aataacattgaatatgtgagagacatcgagagggagcgtttggagggtgtttcaagcaaggccaccaggcttact
tcctatgaacctttcactatggtggcagtaaatgctcaaaagaagaagcctcggcagatatgcaagcggactttc
agaggggaggcagccctcatggcagaatttgacaaccctaacattgtgaagctattaggagtgtgtgctgtcggaag
```

ccaatgtgcctgctctttgaatacatggcctatggtgacctcaatgagttcctccgcagcatgtcccctcacaccgt
gtgcagcctcagtcacagtgacttgtctatgagggctcaggtctccagccctgggccccccaccctctcctgtgctg
agcagctttgcattgccaggcaggtggcagctggcatggcttacctctcagaacgtaagtttgttcaccgagattta
gccaccaggaactgcctggtgggcgagaacatggtggtgaaaattgccgactttggcctctccaggaacatctactc
agcagactactacaaagctaatagaaaacgacgctatccctatccgttggatgccaccagagtcattttttataacc
gctacactacagagtctgatgtgtgggcctatggcgtggtcctctgggagatcttctcctatggcctgcagccctac
tatgggatggcccatgaggaggtcatttactacgtgagatggcaacatcctctcctgcctgagaactgccccgt
ggagctgtacaatctcatgcgtctatgttggagcaagctgcctgcagacagaccagtttcaccagtattcaccgaa
ttctggaacgcatgtgtgagagggcagagggaactgtgagtgtctaa

本发明通过构建病毒载体建立稳定转染 MuSK 的细胞系,采用灵敏度和特异性更高的荧光免疫细胞染色结合流式细胞检测技术,用于临床定性、定量检测 MuSK 抗体,使检测结果更加稳定,且极大节约人力和时间成本。MuSK 抗体检测技术的平台的建立,为进一步研究 MuSK 抗体的致病机制提供基础,有利于提高重症肌无力的临床诊疗水平。具有国际认可的检测技术基础上的诊断标准将利于进一步的国内和国际合作,提高我市在国内和国际中枢神经系统脱髓鞘疾病诊治方面的影响和地位。该项目的建立将极大提高重症肌无力的诊疗水平,提高患者的劳动能力和生活质量,将产生很大的社会效益和经济效益。

[0014]

附图说明

[0015] 图 1MuSK 病毒质粒图谱;

图 2HEK293 细胞感染 MuSK 病毒表达载体后 MuSK 基因表达水平示意图;

图 3HEK293 细胞感染 MuSK 病毒表达载体后 MuSK 蛋白表达水平示意图;

图 4 流式细胞术检测待检血清:灰色阴影表示 MuSK(-) 血清标本,灰色实线表示 MuSK(+) 血清标本,黑色实线表示 MuSK 强阳性血清标本;

图 5 流式细胞术检测待检血清,阴性、阳性及强阳性 MuSK 表达定量分析;

图 6 流式结合细胞免疫荧光法及传统 CBA 法检测重症肌无力(MG)组血清 MuSK 抗体表达水平;

图 7 流式结合细胞免疫荧光法及传统 CBA 法检测乙酰胆碱受体抗体阴性的重症肌无力(AchR-Ab⁻ MG)组血清 MuSK 抗体表达水平。

具体实施方式

[0016] 以下实施例将有助于理解本发明,但不能限制本发明的内容。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件以及手册中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0017] 实施例 1

一种慢病毒质粒表达载体为 pCDH-MCS-MuSK-GFP,其核苷酸序列如序列表如 SEQ ID NO. 2 所示,它的构建方法按如下的步骤进行:

1) 载体构建:以人肌肉组织 cDNA 为模板,利用引物 MuskF: 5'-CCAGCTAGCATGAGAGAGCTCGTCAACATTCCAC-3' 和 MuskR 5'-CACAGCGGCCGCTTAGACACTCACAGTTCCTCTGCC-3' 扩增

MuSK isoform 2 cDNA 序列,序列表中 SEQ ID NO. 1 所示,具体步骤如下:

向 PCR 反应管中依次加入 DNA 模板 300 ng,引物各终浓度为 $0.4 \mu\text{mol/L}$, dNTP 终浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$, $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $5 \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 $0.5 \mu\text{L}$, 终浓度约 $5\text{U}/\mu\text{L}$, ddH_2O 补到终体积为 $50 \mu\text{L}$; PCR 的循环程序为: 94°C 变性 4 分钟, 98°C 10s, 68°C 退火 45s, 72°C 延伸 2min, 共循环 32 次, 以确保充分延伸;

2) 应用胶回收试剂盒对扩增片段切胶回收; 后连入 T 载体, 经测序比对序列正确后将其用 NheI 和 NotI 双酶切, 具体步骤如下:

加入 DNA $1 \mu\text{g}$ 和相应的限制性内切酶 NheI 和 NotI $2 \mu\text{L}$, 再加入重蒸水使总体积为 $19 \mu\text{L}$, 将管内溶液混匀后加入 $1 \mu\text{L}$ 酶液; 混匀反应体系后, 37°C 水浴保温 2-3 小时, 使酶切反应完全, 反应完成后制备琼脂糖凝胶, 取 $10 \mu\text{L}$ 酶解液与 $2 \mu\text{L}$ $6\times$ 载样液混匀, 用微量移液枪小心加入样品槽中, 加完样后合上电泳槽盖, 立即接通电源, 控制电压保持在 60-80V, 电流在 40mA 以上, 当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时, 停止电泳, 紫外成像系统观察并测定 DNA 酶切片段大小, 鉴定正确后, 与经 NheI 和 NotI 双酶切后的 pCDH-MCS-MCS-EF1-copGFP 质粒载体相连接, 得到所用的表达 MuSK 和 GFP 的慢病毒质粒载体: pCDH-MCS-MuSK-GFP。

[0018] 实施例 2

构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体检测的应用, 它是由下述步骤组成:

1) 利用 CaCl_2 法病毒包装表达 MuSK-GFP (pCDH-MCS-Musk-EF1-copGFP) 融合蛋白的慢病毒, 收集病毒悬液在 $6 \mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞, 1 周后, 分选阳性稳定转染细胞。继续传代培养后进行二次筛选, 获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系, 培养条件: 37°C 、含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养转染稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞;

具体步骤: 待 HEK293 细胞长至 70% 密度时, 撤掉旧的培养基, 用 PBS 清洗细胞, 利用 CaCl_2 法病毒包装表达 MuSK-GFP 融合蛋白的慢病毒, 收集病毒悬液在 $6 \mu\text{g/ml}$ Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞, 37°C 培养 14 小时, 第二天换成完全培养基, 1 周后, 流式细胞术分选阳性稳定转染细胞; 继续传代培养后进行二次筛选, 获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系;

2) 流式细胞术测定血清 Musk 抗体:

获得待检血清后, 用含 1%BSA (Sigma) DMEM-Hepes 洗液稀释待测血清, 收集转染及未转染的 HEK293 细胞, 按 1:1 的比例混合, 总数为 5×10^5 , 用流式 staining 缓冲液 ($1\times\text{PBS}$ 含 3% 的马血清及 0.02% 的叠氮钠 NaN_3) 清洗 1 次, 离心后弃去上清, 用 $100 \mu\text{L}$ 稀释过的血清或人 Ig 对照重悬细胞, 4°C 孵育 30min, 然后加入流式 staining 缓冲液清洗 1 次, 离心收集细胞后加入 100ul 稀释后的 Fast blue 标记的山羊抗人 IgG, 4°C 避光孵育 30 min, 流式 staining 缓冲液清洗 1 次, 然后用 300ul 流式 staining 缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪双通道检测荧光信号, 以未转染细胞亚群及人 IgG 染色组为对照, 判断 MuSK 抗体阳性样本, 此外, GFP 阳性细胞类群中的 Fast blue 信号强弱可用来标示抗体浓度的相对量;

3) 细胞免疫荧光法测定血清 Musk 抗体, 具体实验方法过程:

对 HEK293 细胞进行培养、传代, 并转入细胞培养瓶中; 利用 PEI 对 EGFP 标记的人 MuSK cDNA (MuSK-GFP) 质粒进行细胞转染; 待转染效率至 70% 以上时, 加入适量细胞裂解缓冲液,

再加入适量蛋白酶抑制剂;收集细胞裂解液于 EP 管中,轮转 1 小时,13000rpm 离心 15min,收集上清,即为相应抗原提取液;

解冻待测组血清,察滤光离心 5min,取上清 10 μ l,分别加入已稀释的 50 μ l 抗原提取液,混合后轮转过夜,然后加入适量非特异山羊抗人 IgG,孵育后离心,弃上清,收集沉淀,最后用 1ml 裂解提取缓冲液漂洗沉淀,重复 3 次;将沉淀移入 96 孔板中,在高速多通道连续波长酶标仪上获取荧光吸光度,以健康对照组荧光均值 +3 倍标准差以上为阳性判断标准,每份血清检测均双盲,并重复 3 遍。

[0019] 4) 统计分析:使用 GraphPad Prism 4 对数据进行绘图及统计分析。

[0020] 实施例 3

实际应用情况:

本发明随机选择 AchR 阳性重症肌无力患者 127 例,年龄 13-80 岁,男性 30 例,女性 37 例;AchR 阴性重症肌无力患者 103 例,年龄 13-80 岁,男性 56 例,女性 71 例。来源于 2008 年至 2013 年在天津医科大学总医院神经内科门诊和病房确诊的重症肌无力患者。重症肌无力最重要的诊断依据是病人的既往史、临床表现和波动性易疲劳的检查发现,特别是具有眼外肌和延髓肌受累表现。我们所纳入患者均表现有病态的波动性的肌疲劳,且至少满足下面一个诊断标准:

1) 抗胆碱酯酶药物—新斯的明试验引出明显的肌力改善;

2) 低频神经重复电刺激运动波幅波幅衰减 >15%;

3) 单纤维肌电图检查出现异常的颤抖和阻滞。对照组为 20 例健康体检者,年龄 20-60 岁,10 例男性,10 例女性,年龄、性别均与待测血清相匹配。

[0021] 人胚肾 HEK293 细胞(市售)由本实验室保存,转染试剂购自 Invitrogen,感受态细胞购自 Tiangen 公司,质粒提取试剂盒质粒快速小提试剂盒购自 Tiangen 公司,质粒快速中提试剂盒购自 Biodev 公司,质粒快速大量提取试剂盒购自 Tiangen、Biodec 公司,DMEM 培养基(高糖,含有青、链霉素)购自 Solarbia 公司,胰蛋白酶购自 Solarbia 公司,胎牛血清(FCS)购自 GIBCO 公司。

[0022] 双表达慢病毒载体 pCDH-MCS-MCS-EF1-copGFP 购自上海吉凯基因有限公司

1、载体构建:

以人肌肉组织 cDNA (人肌肉组织)为模板,利用引物 MuskF: 5'-CCAGCTAGCATGAGAGAG CTCGTCAACATTCCAC-3' 和 MuskR: 5'-CACAGCGGCCGCTTAGACACTCACAGTTCCTCTGCC-3' 扩增 MuSK isoform 2 cDNA 序列(序列表中 SEQ ID NO. 1 所示),具体步骤如下:

向 PCR 反应管中依次加入 DNA 模板 300 ng,引物各终浓度为 0.4 μ mol/L, dNTP 终浓度为 0.2 μ mol/L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l (终浓度约 5U/ μ l), ddH₂O 补到终体积为 50 μ l。PCR 的循环程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 4 分钟, 98 $^{\circ}$ C 10s, 68 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 共循环 32 次。以确保充分延伸。

[0023] 2) 应用胶回收试剂盒对扩增片段切胶回收(Axygen 公司)后连入 T 载体,经测序比对序列正确后将其用 NheI 和 NotI 双酶切。具体步骤如下:加入 DNA 1 μ g 和相应的限制性内切酶(NheI 和 NotI)2 μ l, 再加入重蒸水使总体积为 19 μ l,将管内溶液混匀后加入 1 μ l 酶液。混匀反应体系后,37 $^{\circ}$ C 水浴保温 2-3 小时,使酶切反应完全。反应完成后制备琼脂糖凝胶,取 10 μ l 酶解液与 2 μ l 6 $\times$ 载样液混匀,用微量移液枪小心加入样品槽中,加完样

后合上电泳槽盖,立即接通电源。控制电压保持在 60-80V,电流在 40mA 以上,当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时,停止电泳,紫外成像系统观察并测定 DNA 酶切片段大小。鉴定正确后,与经 *NheI* 和 *NotI* 双酶切后的 pCDH-MCS-MCS-EF1-copGFP 质粒载体相连接,得到所用的表达 MuSK 和 GFP 的慢病毒质粒表达载体。构建好的病毒载体的完整序列(序列表中 SEQ ID NO. 2 所示)。慢病毒质粒表达载体:pCDH-MCS-MuSK-GFP。

[0024] 2、病毒包装及 HEK293 稳定转染细胞系的获得

细胞系及其培养:人胚肾 HEK293 细胞系由本室常规培养。细胞置于含有 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基中,放入 37°C, 5% CO₂ 孵箱,按常规方法培养,取处于对数生长期的细胞用于实验。

[0025] 细胞的复苏和传代:预先向 50ml 离心管中加入 20mL DMEM 培养基,从液氮罐取出冻存的细胞迅速投入 37°C 水浴中并不断摇动使其在最短时间内解冻,用 70% 酒精消毒冻存管外表后,将细胞存储液转移至上述离心管中,1000rpm 离心 10 分钟。弃上清,重悬细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,37°C、5%CO₂、饱和湿度下培养。

[0026] 待 HEK293 细胞长至 70% 密度时,撤掉旧的培养基,用 PBS 清洗细胞,利用 CaCl₂ 法病毒包装表达 MuSK-GFP 融合蛋白的慢病毒(pCDH-MCS-Musk-EF1-copGFP),收集病毒悬液在 6 μg/ml Polybrene 存在的情况下感染 HEK293 细胞,37°C 培养过夜(14 小时),第二天换成完全培养基,1 周后,流式细胞术分选阳性稳定转染细胞。继续传代培养后进行二次筛选,获得 100% 转染过的稳定表达融合蛋白的 HEK293 细胞系。

[0027] 3、细胞免疫荧光染色法结合流式细胞术(FlowCytometry, FCM, 结合流式细胞术操作原理见文献 Nat Methods. 2013 Mar;10(3):228-38.) 测定血清 MuSK 抗体:

获得待检血清后,用含 1%BSA (Sigma)DMEM-Hepes 洗液稀释待测血清,收集转染及未转染的 HEK293 细胞,按 1:1 的比例混合,总数为 5×10^5 ,用流式 staining 缓冲液(1×PBS 含 3% 的马血清及 0.02% 的叠氮钠 NaN₃)清洗 1 次,离心后弃去上清,用 100 μl 稀释过的血清或人免疫球蛋白对照重悬细胞,4 度孵育 30min,然后加入流式 staining 缓冲液清洗 1 次,离心收集细胞后加入 100ul 稀释后的 Fast blue 标记的山羊抗人 IgG,4 度避光孵育 30 min,流式 staining 缓冲液清洗 1 次,然后用 300ul 流式 staining 缓冲液重悬细胞,流式细胞仪双通道检测荧光信号,以未转染细胞亚群及人 IgG 染色组为对照,判断 MuSK 抗体阳性样本。此外, GFP 阳性细胞类群中的 Fast blue 信号强弱可用来标示抗体浓度的相对量。

[0028] 4、细胞免疫荧光法测定血清 MuSK 抗体:

对 HEK293 细胞进行培养、传代,并转入细胞培养瓶中;利用 PEI 对 EGFP 标记的人 MuSK cDNA (MuSK-GFP) 质粒进行细胞转染;待转染效率至 70% 以上时,加入适量细胞裂解缓冲液,再加入适量蛋白酶抑制剂;收集细胞裂解液于 EP 管中,轮转 1 小时,13000rpm 离心 15min,收集上清,即为相应抗原提取液。

[0029] 解冻待测组血清,察滤光离心 5min,取上清 10 μl,分别加入已稀释的 50 μl 抗原提取液,混合后轮转过夜,然后加入适量非特异山羊抗人 IgG,孵育后离心,弃上清,收集沉淀,最后用 1ml 裂解提取缓冲液漂洗沉淀,重复 3 次;将沉淀移入 96 孔板中,在高速多通道连续波长酶标仪上获取荧光吸光度,以健康对照组荧光均值 +3 倍标准差以上为阳性判断标准,每份血清检测均双盲,并重复 3 遍。

[0030] 5、统计分析:使用 GraphPad Prism 4 对数据进行绘图及统计分析。

[0031] 6、结果

MuSK 质粒 DNA 转染 HEK293 细胞的转染效率及亚细胞定位 :DAPI 染核行亚细胞定位分析显示,细胞核染为蓝色,HEK293 细胞表达的 MuSK 抗原蛋白主要表位于细胞膜上。

[0032] 细胞免疫荧光结合流式细胞术测定血清 MuSK 抗体 :MG 组 MuSK 抗体阳性率为 9.1%(21/230) ;健康对照组均为阴性 ;重复三次试验,检测结果相一致。比较分析发现,在 AChR-Ab 阳性的患者血清中没有检出 MuSK 抗体, MuSK 抗体在 AChR-Ab 阴性的 MG 患者中阳性率为 20.4% (21/103)。

[0033] 细胞免疫荧光(CBA)测定血清 MuSK 抗体 :MG 组 MuSK 抗体阳性率为 6.9% (16/230) ;健康对照组均为阴性 ;重复三次试验,检测结果相一致。比较分析发现,在 AChR-Ab 阳性的患者血清中没有检出 MuSK 抗体, MuSK 抗体在 AChR-Ab 阴性的 MG 患者中阳性率为 15.5% (16/103)。

[0034] 细胞免疫荧光结合流式细胞术与传统 CBA 方法对比 :对于 AQP4 抗体, CBA 结合流式法灵敏度为 6.9%, CBA 法灵敏度为 9.1% ;两种方法检测 AQP4 抗体特异性均为 100% (见表 1)。

[0035] 表 1 患者血清 MuSK 抗体阳性率

组别 结果	CBA 阳性/总数	CBA 阳性率	流式阳性/总数	流式阳性率
MG	16/230	6.9%	21/230	9.1%
MG(AchR 阳性)	0/127	0	0/127	0
MG(AchR 阴性)	16/103	15.5%	21/103	20.4%
健康对照组	0/20	0	0/20	0

SEQUENCE LISTING

<110> 天津医科大学总医院

<120> 一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2352

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

atgagagagc tcgtcaacat tccactggta catattctta ctctggttgc cttcagcgga	60
actgagaaac ttccaaaagc tctgtgcatc accactcctc ttgaaacagt ggatgcctta	120
gttgaagaag tggctacttt catgtgtgca gtggaatcct acccccagcc tgagatttcc	180
tggactagaa ataaaattct cattaaactc tttagacacc ggtacagcat ccgggagaat	240
gggcagctcc tcaccatcct gagtgtggaa gacagtgatg atggcattta ctgctgcacg	300
gccacaatg gtgtgggagg agctgtggag agttgtggag ccctgcaagt gaagatgaaa	360
cctaaaataa ctgctcctcc cataaatgtg aaaataatag aggattaaa agcagtccta	420
ccatgtacta caatgggtaa tcccaaacca tcagtgtctt ggataaaggg agacagccct	480
ctcagggaat attcccgaat tgcagttctt gaatctggga gcttgaggat tcataacgta	540
caaaaggaag atgcaggaca gtatcgatgt gtggcaaaaa acagcctcgg gacagcatat	600
tccaaagtgg tgaagctgga agttgaggaa gaaagtgaac ccgaacaaga tactaaagtt	660

tttgccagga tctgcgggc tctgaatcc cacaatgtca cctttggctc ctttgtgacc	720
ctgcactgta cagcaacagg cattcctgtc cccaccatca cctggattga aaacggaaat	780
gctgtttctt ctgggtccat tcaagagagt gtgaaagacc gagtgattga ctcaagactg	840
cagctgttta tcaccaagcc aggactctac acatgcatag ctaccaataa gcatggggag	900
aagttcagta ctgccaaggc tgcagccacc atcagcatag cagaatggag agagtactgc	960
ttggcagtaa aggagctctt ctgcgcaaaa gaatggctgg taatggaaga gaagaccac	1020
agaggactct acagatecga gatgcatttg ctgtccgtgc cagaatgcag caagcttccc	1080
agcatgcatt gggacccac ggctgtgcc agactgccac atctagcatt cccaccaatg	1140
acgtcctcaa agccaagtgt ggacattcca aatctgcctt cctcctctc ttcttcctc	1200
tctgtctcac ctacatactc catgactgta ataatctcca tcatgtccag ctttgcaata	1260
tttgtgcttc ttaccataac tactctctat tgctgccgaa gaagaaaaca atggaaaaat	1320
aagaaaagag aatcagcagc agtaaccctc accacactgc cttctgagct cttactagat	1380
agacttcac ccaaccccat gtaccagagg atgccgctcc ttctgaacce caaattgctc	1440
agcctggagt atccaaggaa taacattgaa tatgtgagag acatcggaga gggagcgttt	1500
ggaagggtgt ttcaagcaag ggcaccaggc ttacttcctt atgaaccttt cactatgggtg	1560
gcagtaaaga tgctcaaaga agaagcctcg gcagatatgc aagcggactt tcagaggag	1620
gcagccctca tggcagaatt tgacaaccct aacattgtga agctattagg agtgtgtgct	1680
gtcgggaage caatgtgcct gctctttgaa tacatggcct atggtgacct caatgagttc	1740
ctccgcagca tgteccctca caccgtgtgc agcctcagtc acagtgaatt gtctatgagg	1800
gtcaggtct ccagecctgg gccccaccc ctctcctgtg ctgagcagct ttgcattgcc	1860

aggcaggtgg cagctggcat ggcttacctc tcagaacgta agtttgttca ccgagattta	1920
gccaccagga actgcctggg gggcgagaac atgggtggtga aaattgccga ctttggcctc	1980
tccaggaaca tctactcagc agactactac aaagctaattg aaaacgacgc tateccctatc	2040
cgttggatgc caccagagtc ctttttttat aaccgctaca ctacagagtc tgatgtgtgg	2100
gcctatggcg tggctcctctg ggagatcttc tcctatggcc tgcagcccta ctatgggatg	2160
gcccattgagg aggtcattta ctacgtgcga gatggcaaca tcctctcctg ccctgagaac	2220
tgccccgtgg agctgtacaa tctcatgcgt ctatgttggg gcaagctgcc tgcagacaga	2280
cccagtttca ccagtattca ccgaattctg gaacgcatgt gtgagagggc agagggaact	2340
gtgagtgtct aa	2352

<210> 2

<211> 9874

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca	60
acatgcctta caaggagaga aaaagcacccg tgcattgccg ttggtggaag taaggtggta	120
cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc	240
tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta	300
agcctcaata aagcttgccg tgagtgcctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact	360
ctggtaacta gagatecctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg	420

cccgaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct	480
tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt	540
gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag	600
aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt	660
aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt	720
agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg	780
atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag	840
gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag	900
taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg	960
acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag	1020
caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag	1080
ctttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcc tcaatgacgc	1140
tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgc gcagcagaac aatttgctga	1200
gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcattc aagcagctcc	1260
aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg	1320
gttgctcttg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata	1380
aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa	1440
ttacacaage ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga	1500
acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa	1560

ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggttag gtttaagaat	1620
agtttttgcgt gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcggt	1680
tcagaccac ctcccaacc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg	1740
tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggttaacttt	1800
taaaagaaaa ggggggattg ggggggtacag tgcaggggaa agaatagtag acataatagc	1860
aacagacata caaactaaag aattacaaaa acaaattaca aaaattcaaa attttatcga	1920
tactagtatt atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac	1980
gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga	2040
tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg	2100
ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg	2160
caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac	2220
cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag attctagacg	2280
tagcatgaga gagctcgta acattccact ggtacatatt ctactctgg ttgccttcag	2340
cggaactgag aaacttccaa aagctcctgt catcaccact cctcttgaaa cagtggatgc	2400
cttagttgaa gaagtggcta ctttcatgtg tgcagtggaa tctaccccc agcctgagat	2460
ttcctggact agaaataaaa ttctcattaa actctttgac acccggtaca gcatccggga	2520
gaatgggcag ctctcacca tcctgagtgt ggaagacagt gatgatggca tttactgctg	2580
cacggccaac aatggtgtgg gaggagctgt ggagagttgt ggagccctgc aagtgaagat	2640
gaaacctaaa ataactcgtc ctcccataaa tgtgaaaata atagagggat taaaagcagt	2700
cctaccatgt actacaatgg gtaatcccaa accatcagtg tcttggataa agggagacag	2760

ccctctcagg gaaaattccc gaattgcagt tcttgaatct gggagcttga ggattcataa	2820
cgtacaaaag gaagatgcag gacagtatcg atgtgtggca aaaaacagcc tcgggacagc	2880
atattccaaa gtggtgaagc tggaagttga ggaagaaagt gaacccgaac aagatactaa	2940
agtttttggc aggatcctgc gggctcctga atcccacaat gtcacctttg gctcctttgt	3000
gaccctgcac tgtacagcaa caggcattcc tgtccccacc atcacctgga ttgaaaacgg	3060
aaatgctgtt tcttctgggt ccattcaaga gagtgtgaaa gaccgagtga ttgactcaag	3120
actgcagctg tttatcacca agccaggact ctacacatgc atagctacca ataagcatgg	3180
ggagaagttc agtactgcca aggctgcagc caccatcagc atagcagaat ggagagagta	3240
ctgcttggca gtaaaggagc tcttctgcgc aaaagaatgg ctggtaatgg aagagaagac	3300
ccacagagga ctctacagat ccgagatgca tttgctgtcc gtgccagaat gcagcaagct	3360
tcccagcatg cattgggacc ccacggcctg tgccagactg ccacatctag cattcccacc	3420
aatgacgtcc tcaaagccaa gtgtggacat tccaaatctg ctttcctcct cctctttctt	3480
cttctctgtc tcacctacat actccatgac tgtaataatc tccatcatgt ccagctttgc	3540
aatatttgtg cttcttacca taactactct ctattgctgc cgaagaagaa aacaatggaa	3600
aaataagaaa agagaatcag cagcagtaac cctcaccaca ctgccttctg agctcttact	3660
agatagactt cateccaacc ccatgtacca gaggatgccg ctctttctga accccaaatt	3720
gctcagcctg gagtatccaa ggaataacat tgaatatgtg agagacatcg gagagggagc	3780
gtttggaagg gtgtttcaag caagggcacc aggcttactt ccctatgaac ctttcactat	3840
ggtggcagta aagatgetca aagaagaagc ctcggcagat atgcaagcgg actttcagag	3900

ggaggcagcc ctcattggcag aatttgacaa ccctaacatt gtgaagctat taggagtgtg	3960
tgctgtcggg aagccaatgt gcctgtctctt tgaatacatg gcctatgggtg acctcaatga	4020
gttcctccgc agcatgtccc ctcacaccgt gtgcagcctc agtcacagtg acttgtctat	4080
gagggtcag gtctccagcc ctgggcccc acccctctcc tgtgtgagc agctttgcat	4140
tgccaggcag gtggcagctg gcatggctta cctctcagaa cgtaagtttg ttcaccgaga	4200
tttagccacc aggaactgcc tgggtgggca gaacatgggtg gtgaaaattg ccgactttgg	4260
cctctccagg aacatctact cagcagacta ctacaaagct aatgaaaacg acgtatccc	4320
tatccgttgg atgccaccag agtccatfff ttataaccgc tacactacag agtctgatgt	4380
gtgggcctat ggctgtgtcc tctgggagat cttctcctat ggctgcagc cctactatgg	4440
gatggcccat gaggaggtea ttactacgt gcgagatggc aacatcctct cctgccctga	4500
gaactgcccc gtggagctgt acaatctcat gcgtctatgt tggagcaage tgctgcaga	4560
cagaccaggt ttcaccagta ttcaccgaat tctggaacgc atgtgtgaga gggcagaggg	4620
aactgtgagt gtctaagcgg ccgcaaggat ctgcgatcgc tccggtgccc gtcagtgggc	4680
agagcgcaca tcgcccacag tccccgagaa gttgggggga ggggtcggca attgaacggg	4740
tgcttagaga aggtggcgcg gggtaaactg ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct	4800
ttttcccgag ggtgggggag aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt	4860
tcgcaacggg ttgcccga gaacacagct gaagcttcga ggggtcgcga tctctccttc	4920
acgcgcccgc cgcctacct gaggccgcca tccagccggg ttgagtcgag ttctgccgcc	4980
tcccgcctgt ggtgcctcct gaactgcgtc cgccgtctag gtaagtttaa agctcaggtc	5040
gagaccgggc ctttgtccgg cgctcccttg gacgtacct agactcagcc ggctctccac	5100

gctttgcctg accctgcttg ctcaactcta cgtctttggt tcgttttctg ttctgcgccg	5160
ttacagatcc aagctgtgac cggcgcctac gctagacgcc accatggaga gcgacgagag	5220
cggcctgccc gccatggaga tcgagtgccg catcaccggc accctgaacg gcgtggagtt	5280
cgagctggtg ggcgggaggag agggcacccc caagcagggc cgcattgacca acaagatgaa	5340
gagcaccaaa ggcgccctga ccttcagccc ctacctgctg agccacgtga tgggctacgg	5400
cttctaccac ttccggcacct accccagcgg ctacgagaac ccttccctgc acgccatcaa	5460
caacggcggc tacaccaaca cccgcattga gaagtacgag gacggcggcg tgctgcacgt	5520
gagcttcagc taccgctacg aggcgcggccg cgtgatcggc gacttcaagg tggtagggcac	5580
cggcttcccc gaggacagcg tgatcttcac cgacaagatc atccgcagca acgccaccgt	5640
ggagcacctg caccctatgg gcgataacgt gctggtgggc agcttcgccc gcaccttcag	5700
cctgcgcgac ggcggtact acagcttcgt ggtggacagc cacatgcact tcaagagcgc	5760
catcacccc agcatctgc agaacggggg ccccatgttc gccttcgccc gcgtggagga	5820
gctgcacagc aacaccgagc tgggcatcgt ggagtaccag cacgccttca agacccccat	5880
cgccttcgccc agatcccgcg ctcatctgc caattctgcc gtggacggca ccgccggacc	5940
cggtccacc ggatctcgt aagtcgacaa tcaacctctg gattacaaaa ttgtgaaag	6000
attgactggt attcttaact atgttgctcc ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat	6060
gcctttgtat catgtattg cttcccgtat ggctttcatt ttctctctt tgtataaatc	6120
ctggttgctg tctctttatg aggagtgtg gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtgggtgtg	6180
cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt gccaccact gtcagctcct	6240

ttccgggact ttcgctttcc cctccctat tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct	6300
tgcccgtgc tggacagggg ctcggctgtt gggcactgac aattccgtgg tgttgctggg	6360
gaaatcatcg tcttttctt ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac	6420
gtcctttctgc tacgtccctt cgccctcaa tccagcggac cttccttccc gcggcctgct	6480
gccggctctg cgccctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct	6540
ttgggccgcc tccccgctg gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc	6600
ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac tggaagggt aattcactcc caacgaaaat	6660
aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc	6720
tctctggcta actagggaa ccaactgctta agcctcaata aagcttgccct tgagtgttc	6780
aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggttaact gagatccctc agaccctttt	6840
agtcagtgtg gaaaatctct agcagtagta gttcatgtca tcttattatt cagtatttat	6900
aacttgcaaa gaaatgaata tcagagagtg agaggaactt gtttattgca gcttataatg	6960
gttacaataa aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt	7020
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcacaaatg tatcttatca tgtctggctc tagctatccc	7080
gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccct ggtgactaa ttttttttat	7140
ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt	7200
ttttggagge ctagactttt gcagagacgg cccaaattcg taatcatggt catagctgtt	7260
tcctgtgtga aattgttate cgctcacaat tccacacaa atacgagccg gaagcataaa	7320
gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact	7380
gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	7440

ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg	7500
ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttate	7560
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag	7620
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca	7680
tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca	7740
ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgcttaccgg	7800
atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag	7860
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt	7920
tcagcccgac cgctgcgct taccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca	7980
cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg	8040
cggtgctaca gatttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	8100
tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta gctcttgatc	8160
cggcaaacia accaccgtg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	8220
cagaaaaaaaa ggtctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagt	8280
gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta	8340
gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg	8400
gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg	8460
ttcatccata gttgctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggttacc	8520
atctggcccc agtgetgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggtc cagatttate	8580

agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc	8640
ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag	8700
tttgcgaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat	8760
ggcttcattc agtccgggtt cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg	8820
caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt	8880
gttatcactc atgggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag	8940
atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg	9000
accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt	9060
aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct	9120
gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac	9180
tttcaccage gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat	9240
aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat	9300
ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca	9360
aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat	9420
tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccttttcgtc tcgcgcgttt	9480
cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtea cagcttgtct	9540
gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg ttggcgggtg	9600
tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg	9660
gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt	9720
caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgtat tacgccagct	9780

ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc 9840

acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgccaa gctg 9874

。

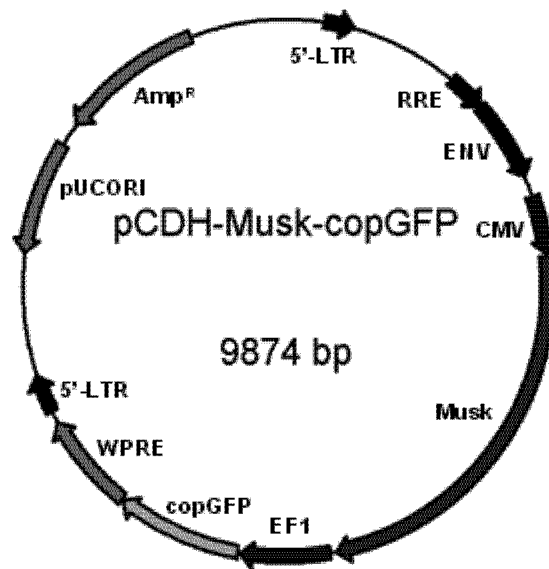


图 1

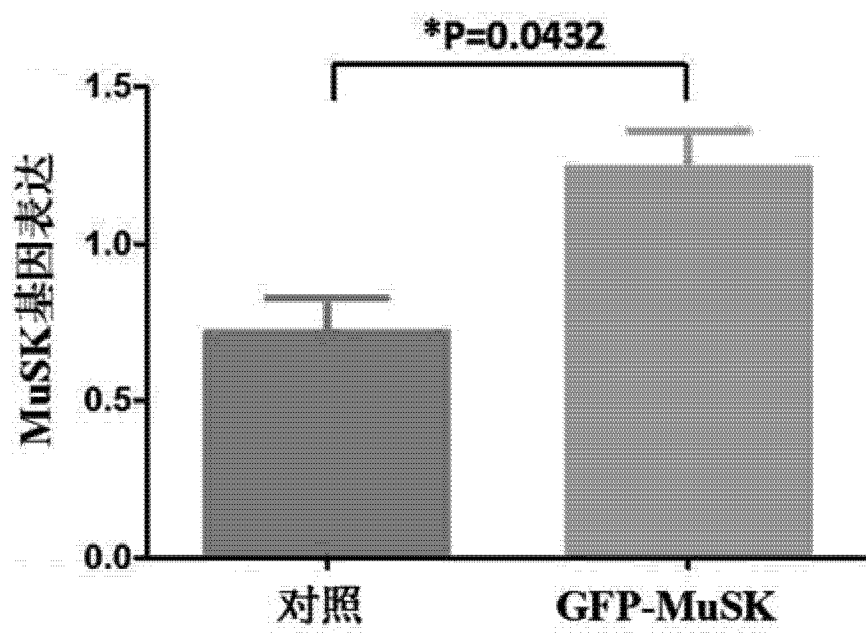


图 2

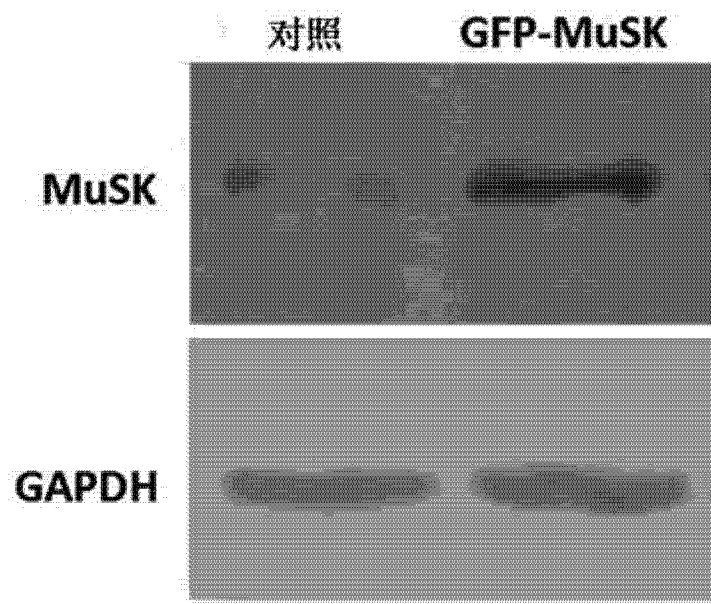


图 3

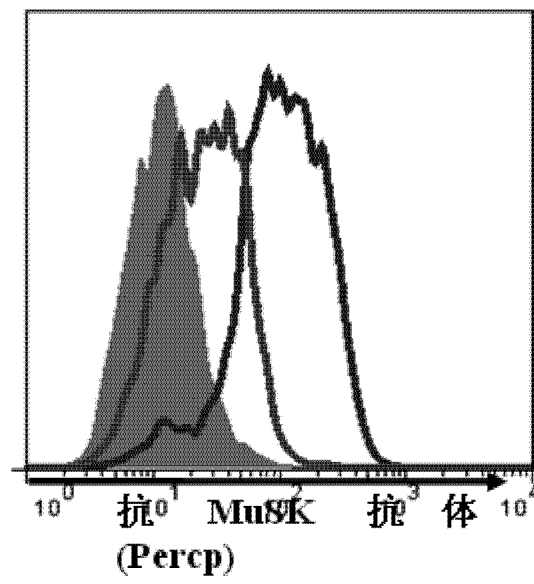


图 4

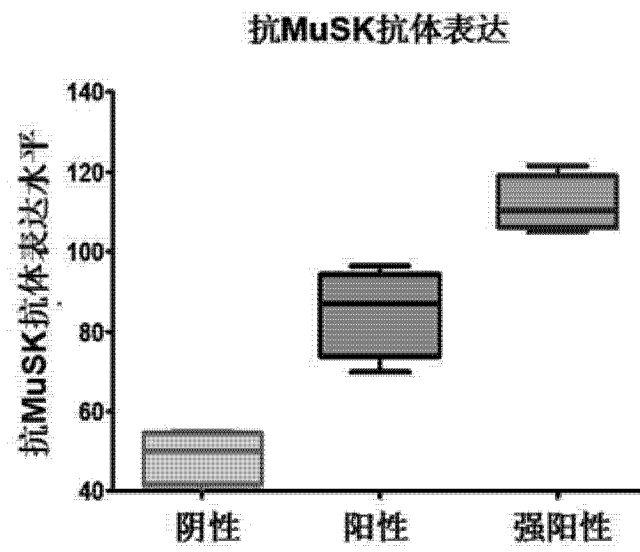


图 5

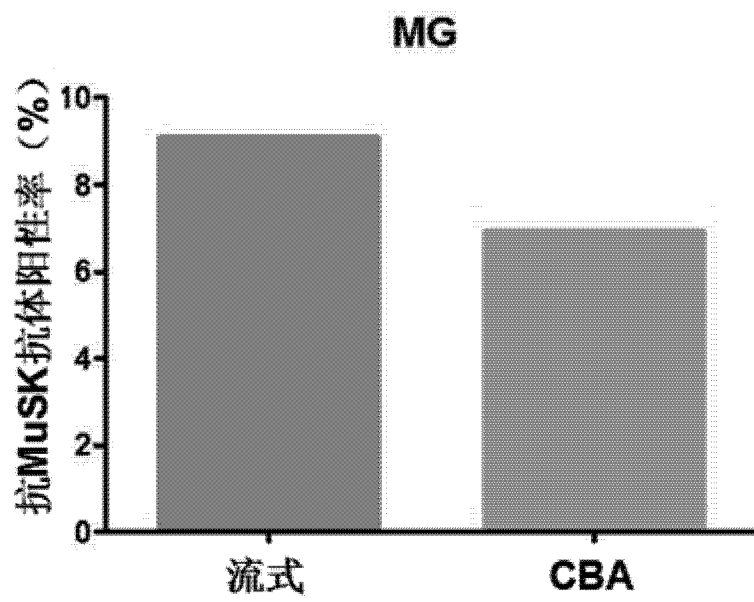


图 6

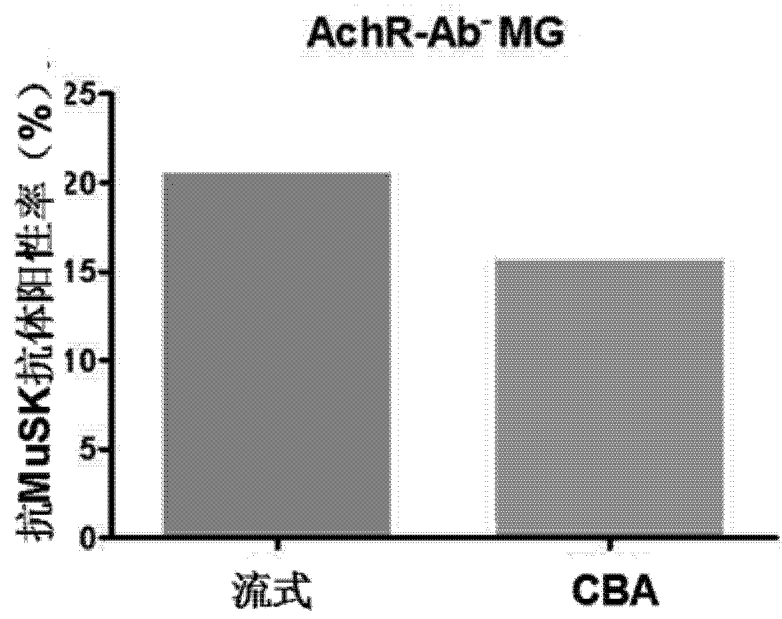


图 7

专利名称(译)	一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用		
公开(公告)号	CN104017827A	公开(公告)日	2014-09-03
申请号	CN201410135044.5	申请日	2014-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	天津医科大学总医院		
申请(专利权)人(译)	天津医科大学总医院		
当前申请(专利权)人(译)	天津医科大学总医院		
[标]发明人	闫亚平 施福东 李敏淑 金薇娜 齐媛		
发明人	闫亚平 施福东 李敏淑 金薇娜 齐媛		
IPC分类号	C12N15/867 C12N15/66 G01N33/53		
代理人(译)	朱红星		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种慢病毒质粒表达载体及其构建方法和应用。所述慢病毒质粒表达载体为pCDH-MCS-MuSK-GFP，其核苷酸序列如序列表如SEQIDNO.2所示。本发明更进一步公开了慢病毒质粒表达载体在制备用于构建抗肌肉特异性受体酪氨酸激酶抗体检测方面的应用。本发明通过构建病毒载体建立稳定转染MuSK的细胞系，采用灵敏度和特异性更高的荧光免疫细胞染色结合流式细胞检测技术，用于临床定性、定量检测MuSK抗体，使检测结果更加稳定，且极大节约人力和时间成本。该项目的建立将极大提高重症肌无力的诊疗水平，提高患者的劳动能力和生活质量，将产生很大的社会效益和经济效益。

