[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 1/34 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410101522.7

[43] 公开日 2006 年 7 月 5 日

[11] 公开号 CN 1796995A

[22] 申请日 2004.12.21

[21] 申请号 200410101522.7

[71] 申请人 财团法人工业技术研究院

地址 台湾省新竹县

[72] 发明人 曾镏翎 郑平福

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄 健

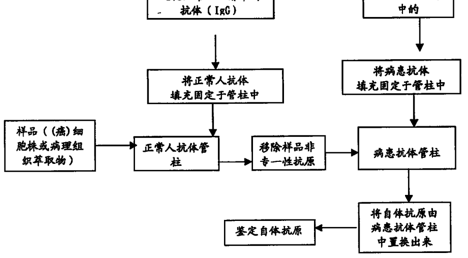
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 5 页

[54] 发明名称

自体抗原筛选方法

[57] 摘要

本发明提供了关于自体抗原筛选的方法，其先将疾病相关的(癌)细胞株或病理组织萃取物样品注入填充有正常人抗体的管柱中去除样品中非专一性的抗原，再将已去除非专一性抗原的样品注入填充有病患抗体的管柱获得专一性的自体抗原，并结合质谱技术鉴定自体抗原，以达到快速精确筛选疾病生物标记分子的目的。



1. 一种自体抗原筛选方法，其中包含以下步骤:

分别纯化正常人及病患的抗体;

将正常人及病患的抗体分别填充固定于不同管柱之中，以制得正常人抗体管柱及病患抗体管柱;

取一样品;

将样品通入正常人抗体管柱;

将通过正常人抗体管柱的样品通入病患抗体管柱;

将滞留于病患抗体管柱中的抗原由管柱中置换出来; 及

鉴定病患抗体管柱纯化所得的抗原。

2. 如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述纯化正常人及病患的抗体为利用可捕捉抗体的亲和力管柱，由正常人及病患的血清样品中分别纯化得到的正常人及病患的抗体。

3. 如权利要求 2 所述的自体抗原筛选方法，其中所述可捕捉抗体的亲和力管柱为蛋白质 G 亲和力管柱或蛋白质 A 亲和力管柱。

4. 如权利要求 3 所述的自体抗原筛选方法，其中所述可捕捉抗体的亲和力管柱为蛋白质 G 亲和力管柱。

5. 如权利要求 2 所述的自体抗原筛选方法，其中所述抗体选自下列群组: 免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 G 或免疫球蛋白 M。

6. 如权利要求 2 所述的自体抗原筛选方法，其中所述病患的血清样品为单一病患的血清样品。

7. 如权利要求 2 所述的自体抗原筛选方法，其中所述病患的血清样品为复数个病患血清的混合样品。

8. 如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述抗体填充固定于管柱之中是指血清纯化出来的抗体与管柱中的化学官能基形成化学键结固

定于管柱中。

9. 如权利要求 8 所述的自体抗原筛选方法，其中所述化学官能基包含羟琥珀酰亚胺基、溴化氰基或环氧基。

10.如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述样品为（癌）细胞株或病理组织的萃取物。

11.如权利要求 10 所述的自体抗原筛选方法，其中所述样品通入管柱前可进一步增加样品前处理步骤。

12.如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述鉴定纯化所得的抗原是利用质谱技术进行蛋白质定性或定量分析。

13.如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述将样品通入正常人抗体管柱的目的，是藉由正常人抗体管柱捕捉移除非专一性的抗原。

14.如权利要求 1 所述的自体抗原筛选方法，其中所述将通过正常人抗体管柱的样品通入病患抗体管柱的目的，是藉由病患抗体管柱辨识捕捉样品中的自体抗原。

自体抗原筛选方法

技术领域

本发明提供了一种自体抗原筛选的方法，是指利用正常人抗体去除非专一性的抗原，再利用病患抗体获得专一性的自体抗原，并结合质谱仪鉴定自体抗原的方法。

背景技术

免疫系统若功能不健全，便会产生免疫性疾病，我们身体许多疾病的根本原因常可追究于免疫系统的功能不健全。一般可分为三种情况：第一种是抵抗力降低，身体的免疫细胞活力下降，或生产免疫细胞的数量不足以抵抗入侵的细菌、病毒或霉菌，因此易被感染流行病，伤风、感冒、肺炎、肠炎甚至肝炎、爱滋病等，都属于这一类；第二种的免疫不全是免疫系统反应过度，这种情况起因于入侵的物质并不是细菌而只是小花粉或是食物中大分子蛋白质，免疫系统就释出大量的抗体加以对抗，而攻势就发生在我们的细胞中，如此引起一连串的反应，也被称为过敏症，而这时候若果真有细菌，病毒，或霉菌这类真的病原来侵犯时，免疫系统已无余力抵抗了；第三种情况是免疫细胞攻击自体的正常细胞，也就是自体免疫疾病，例如：类风湿性关节炎，红斑性狼疮或疱疹等等，这种免疫系统疾病起因于病患本身免疫辨识系统发生问题，病患的免疫系统对于本身的某些物质会产生自体抗体（autoantibody），进而破坏身体组织造成病痛。

目前已知，并非是只有自体免疫疾病才有自体抗体的存在，越来越多的相关研究指出人类对癌症所发生的免疫反应，部分存在着肿瘤自体抗原（autoantigen）与人类自体抗体的情形，因此对于发现这些可以引起人体反应的肿瘤自体抗原在癌症检测、诊断或建立预后上有一定的方向和应用性，进而应用于疾病的免疫治疗上。

利用西方点渍法（Western blotting），以病患血清中的抗体和（癌）细胞株或病理组织萃取物反应来找出和病患有反应的物质，是常用于寻找自体抗原的方法，但由于电泳技术对极酸或极碱、极大或极小、表现量极少以及细胞膜蛋白质的灵敏度与再现性均不佳，使其在特定蛋白质分离纯化与鉴定上有使用上的限制。在美国专利 5723343 中，利用后天副甲状腺机能不足（AH）病患的血清（含有自体抗体）和新鲜的人类过多副甲状腺细胞萃取物，利用免疫印迹法（immunoblotting）的方式筛选自体抗原，但因为缺乏与正常人的对照，专一性低，且病患的组织检体相当有限，无法大量筛选而易有遗漏的自体抗原，发现自体抗原的机率较低。此外，此法直接由复杂的细胞萃取物中取下有反应的蛋白，再送入质谱仪分析，在自体抗原的鉴定方面因为样品的高复杂度而造成困难，所以开发一套有系统、有效率的自体抗原筛选方法，便成为重要的课题。

发明内容

本发明提供一种利用病患体内的自体抗体来筛选自体抗原的方法，其利用自体抗体制备层析管柱，透过自体抗体与自体抗原间的亲和性，搭配疾病所对应的（癌）细胞株或病理组织萃取物，达到建立筛选自体抗原的平台系统。

本发明的目的在于提供一种自体抗原筛选方法，其利用正常人及病患的抗体去除非专一性的抗原，再利用该抗体获得专一性的自体抗原。

本发明提供了一种自体抗原筛选方法，其包含以下步骤：分别纯化正常人及病患的抗体；将正常人及病患的抗体分别填充固定于不同管柱之中，制得正常人抗体管柱及病患抗体管柱；取一样品；将样品通入正常人抗体管柱；将通过正常人抗体管柱的样品通入病患抗体管柱；将滞留于病患抗体管柱中的抗原由管柱中置换出来；鉴定病患抗体管柱纯化所得的抗原。

本发明的上述方法先利用正常人的抗体管柱来去除非专一性抗原后，

再通入病患的抗体管柱来得到和病患自体抗体具亲和性的自体抗原，可使自体抗体辨识自体抗原的专一性得到提高，对后续的质谱鉴定也提供了较佳的分析条件。

前述纯化正常人及病患的抗体是利用可捕捉抗体的亲和力管柱，由正常人及病患人群的血清样品中分别纯化，得到正常人及病患的抗体；所述可捕捉抗体的亲和力管柱为蛋白质 G 亲和力管柱（Protein G affinity column）或蛋白质 A 亲和力管柱（Protein A affinity column），优选为蛋白质 G 亲和力管柱（Protein G affinity column）。

所述抗体选自下列群组：免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG)或免疫球蛋白 M(IgM)。

所述病患血清样品为单一病患的血清样品或复数病患血清的混合样品。

所述抗体填充固定于管柱之中是将由血清纯化出来的抗体与管柱中的化学官能基形成化学键结固定于管柱中；该化学官能基包含羟琥珀酰亚胺基（N-hydroxysuccinimide-、NHS-）、溴化氰基（CNBr-）或环氧基（Epoxy-）。

所述样品为（癌）细胞株或病理组织的萃取物。

样品通入管柱前也可进一步增加样品前处理的步骤。

样品通入正常人抗体管柱的目的，是藉由正常人抗体管柱捕捉移除样品中非专一性的抗原；所述样品通入病患抗体管柱的目的，是藉由病患抗体管柱辨识捕捉样品中的自体抗原。

所述鉴定纯化所得的抗原是指利用质谱技术进行的抗原的蛋白质定性或定量分析。

将来自（癌）细胞株或病理组织萃取物的样品通入正常人抗体管柱时，可藉由正常人抗体的专一亲和力将非专一性的抗原捕捉而滞留于管柱之中，通过管柱的样品将不含非专一性抗原，这个程序其实可视为利用病患抗体管柱筛选检体中自体抗原的样品前处理，经移除样品中非专一性的抗原，样品组成便剩下特有的抗原，此时再将样品通入含病患抗体的管柱中，

藉由病患所具有的自体抗体来进一步筛选疾病相关的自体抗原。由于已先藉由正常人的血清抗体去除非专一性的抗原，所以利用病患的自体抗体筛选所得到的自体抗原会具有较高的专一性。

由病患抗体管柱中置换而出的自体抗原，利用质谱技术进行鉴定，所述鉴定是将质谱讯号透过数据库比对，以取得自体抗原的信息。

本发明藉由结合免疫亲和性层析法、疾病对应的细胞株，再搭配日趋成熟的蛋白质质谱鉴定技术构筑的自体抗原筛选方法，与现有技术相比具有更快速的筛选效率，由于细胞株可源源不绝地提供，因此不会有遗漏的自体抗体，发现自体抗原的机会可显著提高，而本发明先利用正常人的抗体管柱来去除非专一性抗原后，再通入病患的抗体管柱来得到和病患自体抗体具亲和性的自体抗原，不仅可使自体抗体辨识自体抗原的专一性提高，对后续的质谱鉴定也提供了较佳的分析条件，若使用复数病患血清混合的检体，将具有加强自体抗原数量的效果（enriching high incidence of autoantigen），利用该方法发现的自体抗原，其与该疾病相关且共同存在于病患样本中，这样的自体抗原将更适合做为检测的工具。

附图说明

图 1：本发明的自体抗原筛选方法的流程图；

图 2：由血清纯化自体抗体的流程图；

图 3：制备含有自体抗体的管柱的流程图；

图 4：本发明的由细胞萃取物中纯化鉴定自体抗原的流程图；

图 5：利用本发明自体抗原筛选方法进行肝硬化细胞萃取物筛选的正常人抗体管柱及病患抗体管柱的层析图。其中上图为正常人抗体管柱层析图，下图为病患抗体管柱的层析图。

具体实施方式

以下实施例用于进一步了解本发明的优点，并非用于限制本发明。

实施例 1： 利用本发明的自体抗原筛选方法进行肝癌自体抗原的筛选

血清纯化自体抗体：

由血清纯化自体抗体的步骤如图 2 所示，将血清用键结缓冲液（binding buffer：20 mM PBS，pH 7.0）以 1：10 的比例稀释后，以 0.45 μm 孔径的滤膜过滤，避免后续层析步骤造成管柱堵塞；接着以 10 倍管柱体积的键结缓冲液，在 1 ml/min 的流速下清洗 Protein G 亲和力管柱，之后将前述经滤膜过滤的血清样本以 0.2 ml/min 的流速通入 Protein G 亲和力管柱中，使抗体得以藉由与管柱的亲和力滞留于管柱中；再取 5-10 倍管柱体积的键结缓冲液以 1 ml/min 的流速清洗 Protein G 亲和力管柱，移除血清样品中不与管柱发生亲和力键结的物质，然后取 2-5 倍管柱体积的洗脱缓冲液（elution buffer：0.1 M Glycine-HCl，pH 2.7）以 1 ml/min 的流速将抗体自管柱中洗脱出并收集，收集抗体的试管中需预先加入 60-200 μl 的 Tris-HCl 溶液（1 M，pH 9.0），最后将样品置换于耦合缓冲液（coupling buffer：0.2 M $NaHCO_3$，0.5 M NaCl，pH 8.3）中，即完成血清中自体抗体（IgG）的纯化。

由于本发明需要填充有正常人 IgG 及病患 IgG 的管柱各一，故需取正常人及病患血清分别进行前述纯化步骤。

制备含有自体抗体的管柱：

制备含有自体抗体的管柱其步骤如图 3 所示，取 NHS-activated 管柱一只，移除上端盖子后滴一滴酸化溶液（acidification solution：1 mM HCl（需冰浴））以避免气泡生成，接着将此管柱上端与注射器（syringe）或泵（pump）连接后移除下端扭转处，再以 2 倍管柱体积的酸化溶液将管柱中的异丙醇清洗出来，重复此清洗步骤 3 次后，将含有自体抗体的样品注入管柱中。前述的含有自体抗体的样品由 Protein-G 亲和力管柱纯化血清得到的含有自体抗体的耦合缓冲液，经配制后成为总体积约为 1 倍管柱体积，浓度为 0.5-10 mg/ml。将前述含有自体抗体的样品通入管柱后则将管柱密封，在 25℃中反应 15-30 分钟，或者在 4℃中反应 4 小时，使抗体得以与管柱产生化学键

结固定于管柱之中。

自体抗体与管柱完成键结反应后，先利用 2 倍管柱体积的封阻缓冲液（blocking buffer: 0.5 M ethanolamine，0.5 M NaCl，pH 8.3）洗脱管柱，重复此步骤 3 次，再利用 2 倍管柱体积的清洗缓冲液（washing buffer: 0.1 M acetate，0.5 M NaCl，pH 4）清洗管柱，同样重复 3 次，接着再换回封阻缓冲液以 2 倍管柱体积洗脱管柱 3 次后，让管柱反应 15-30 分钟，使管柱中未键结自体抗体的官能基被封阻而失去活性，待封阻反应完成后以 2 倍管柱体积的清洗缓冲液清洗管柱，重复 3 次，接着以 2 倍管柱体积的封阻缓冲液洗脱管柱，重复 3 次，确保所有未键结自体抗体的官能基都能被封阻，再以 2 倍管柱体积的清洗缓冲液清洗管柱，重复 3 次后，最后以 2-5 倍管柱体积的一般中性 pH 缓冲液洗脱管柱后，完成含有自体抗体的管柱制备。

由肝硬化细胞萃取物中纯化鉴定自体抗原:

如图 4 所示步骤，首先将移除培养基的肝硬化细胞（HepG2 C3A cells）2.68 mg 以冰浴的 Tris saline 溶液（50 mM Tris pH 7.5，150 mM NaCl，1.5 mM PMSF，Phosphatase inhibitors）清洗两次后，加入 Triton Extraction 溶液 1ml（15 Mm Tris pH 7.5，120 mM NaCl，25 mM KCl，2 mM EGTA，0.1 mM DTT，0.5% Triton X-100，10μg/ml leupeptin，0.5 Mm PMSF，Phosphatase inhibitors），置于 4℃30 分钟，此时细胞开始分解释出蛋白质，然后利用桌上型离心机于 4℃以 14,000 rpm 的转速离心 15 分钟，移除固态不溶的细胞结构，收集上层液进行后续的免疫亲和层析。

经收集得到的细胞萃取液与键结缓冲液（binding buffer）以 1:10 的比例稀释后，利用 0.45μm 孔径的滤膜过滤，以避免后续通入管柱后造成管柱的阻塞，而在将样品注入具有抗体（IgG）的管柱前，需先以 10 倍管柱体积的键结缓冲液，在 1 ml/min 的流速下清洗正常人及病患的抗体管柱，之后将前述经滤膜过滤的细胞萃取液以 0.2 ml/min 的流速通入正常人抗体管柱中，再取 5-10 倍管柱体积的键结缓冲液以 1 ml/min 的流速洗脱正常人

抗体管柱，此时细胞萃取液中所含有的正常人抗体具辨识捕捉的抗原会滞留其中，此步骤的目的在于捕捉移除肝硬化细胞中非专一性的抗原（Non-specific antigen），所以经管柱层析后的细胞萃取液中将不含非专一性的抗原；将此细胞萃取液收集导入病患抗体管柱，取 5-10 倍管柱体积的键结缓冲液以 1 ml/min 的流速洗脱病患抗体管柱，此时肝硬化细胞萃取液中所具有的自体抗原将被管柱中病患的自体抗体所捕捉而滞留于管柱之中，如图 5 所示，细胞萃取液通过正常人抗体管柱时，一般正常人抗体可辨识捕捉的抗原将被滞留于管柱中，而将不含前述正常人抗体可辨识捕捉的抗原的细胞萃取液导入病患抗体管柱时，只有病患抗体管柱可辨识捕捉的抗原被滞留于管柱之中，这些滞留于病患抗体管柱中的抗原，藉由 2-5 倍管柱体积的洗脱缓冲液（elution buffer）以 1 ml/min 的流速将自体抗原由病患抗体管柱中洗脱出并收集，接着使用胰蛋白酵素（Trypsin）进行蛋白质水解反应，将被水解的自体抗原之胜肽以质谱技术进行分析，所得的图谱可藉由数据库比对获知蛋白质的信息。

综上所述，本发明利用病患体内的自体抗体来筛选自体抗原的方法，其以自体抗体制备层析管柱，透过自体抗体与自体抗原间的亲和性，搭配疾病所对应的（癌）细胞株，达到建立筛选自体抗原的平台系统，可应用于各种疾病以筛选出和该疾病相关的具特异性自体抗原(specific-autoantigen)，所筛选出的具特异性自体抗原对于疾病的检测、诊断及免疫疾病的治疗上应有很大的应用空间。

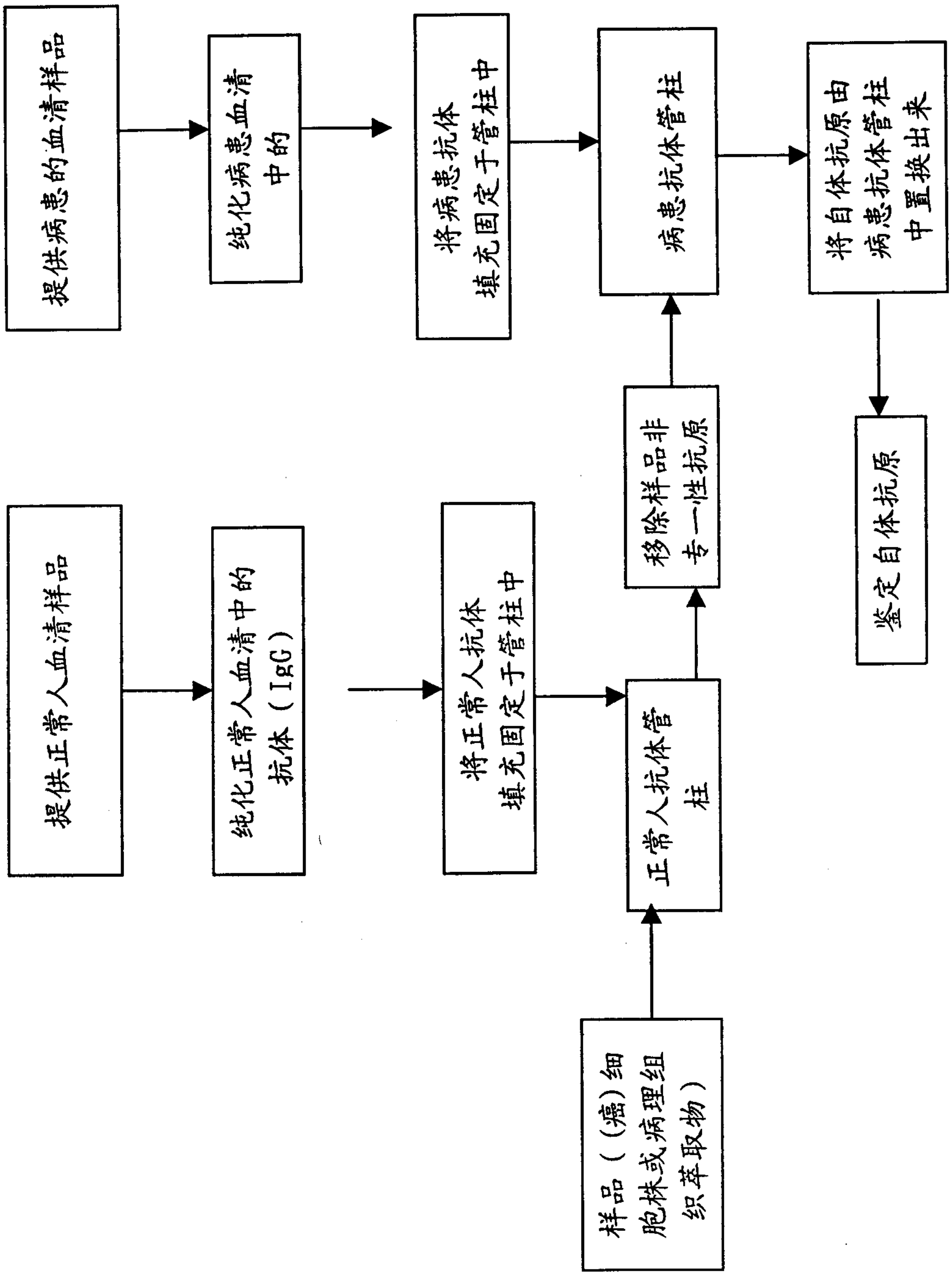

提供病患的血清样品
纯化病患血清中的
将病患抗体填充固定于管柱中
病患抗体管柱
将自体抗原由病患抗体管柱中置换出来
鉴定自体抗原
提供正常人血清样品
纯化正常人血清中的抗体（IgG）
将正常人抗体填充固定于管柱中
正常人抗体管柱
移除样品非专一性抗原
样品（(癌)细胞株或病理组织萃取物）

图1

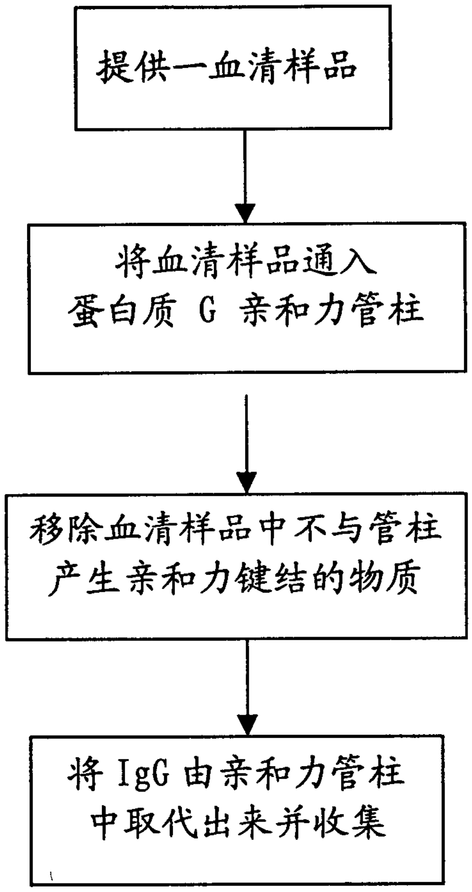

提供一血清样品
将血清样品通入
蛋白质 G 亲和力管柱
移除血清样品中不与管柱
产生亲和力键结的物质
将 IgG 由亲和力管柱
中取代出来并收集

图 2

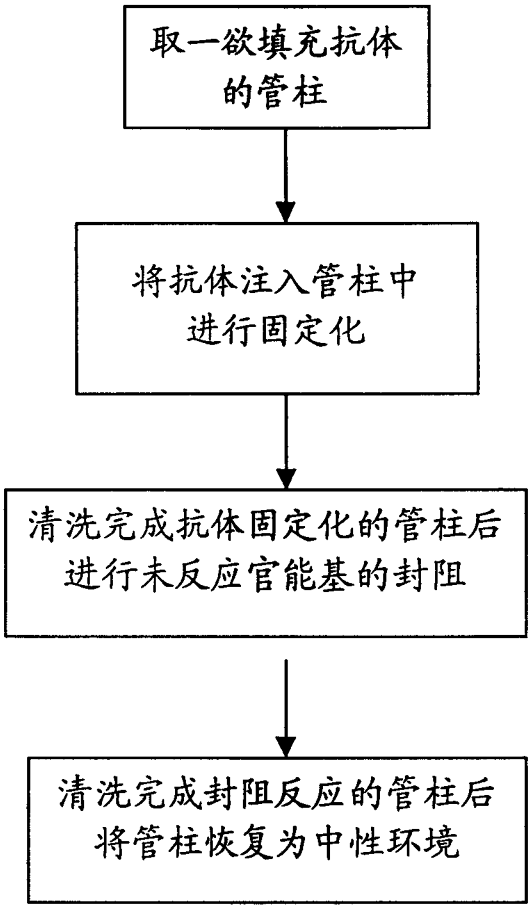

取一欲填充抗体
的管柱
将抗体注入管柱中
进行固定化
清洗完成抗体固定化的管柱后
进行未反应官能基的封阻
清洗完成封阻反应的管柱后
将管柱恢复为中性环境

图 3

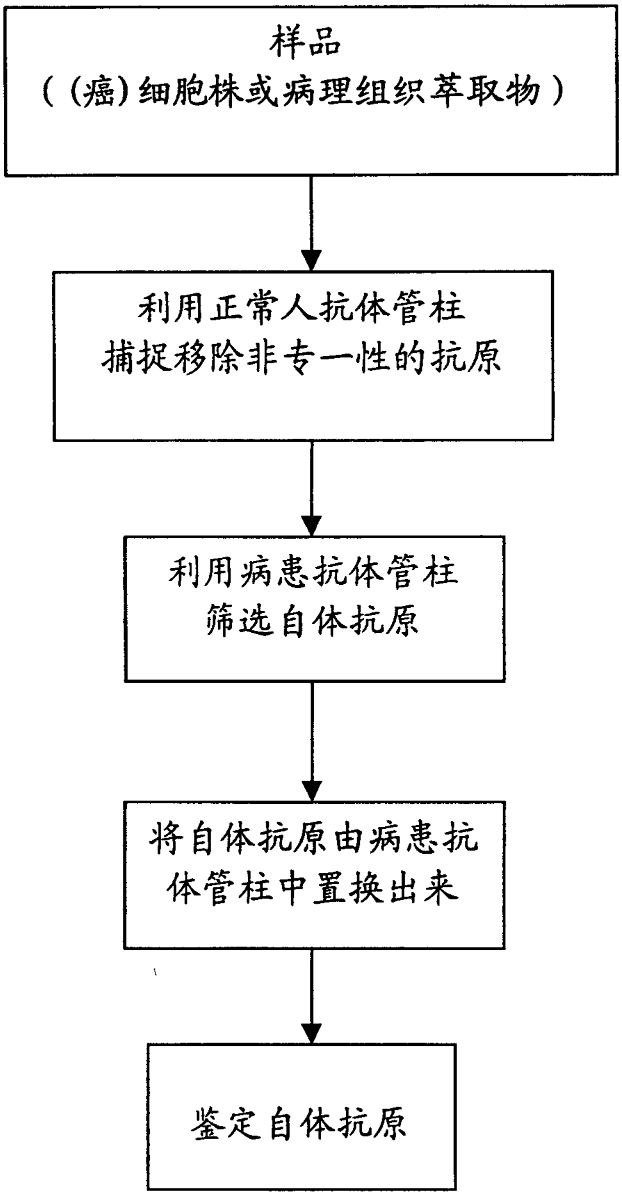

样品
((癌)细胞株或病理组织萃取物)
利用正常人抗体管柱
捕捉移除非专一性的抗原
利用病患抗体管柱
筛选自体抗原
将自体抗原由病患抗
体管柱中置换出来
鉴定自体抗原

图 4

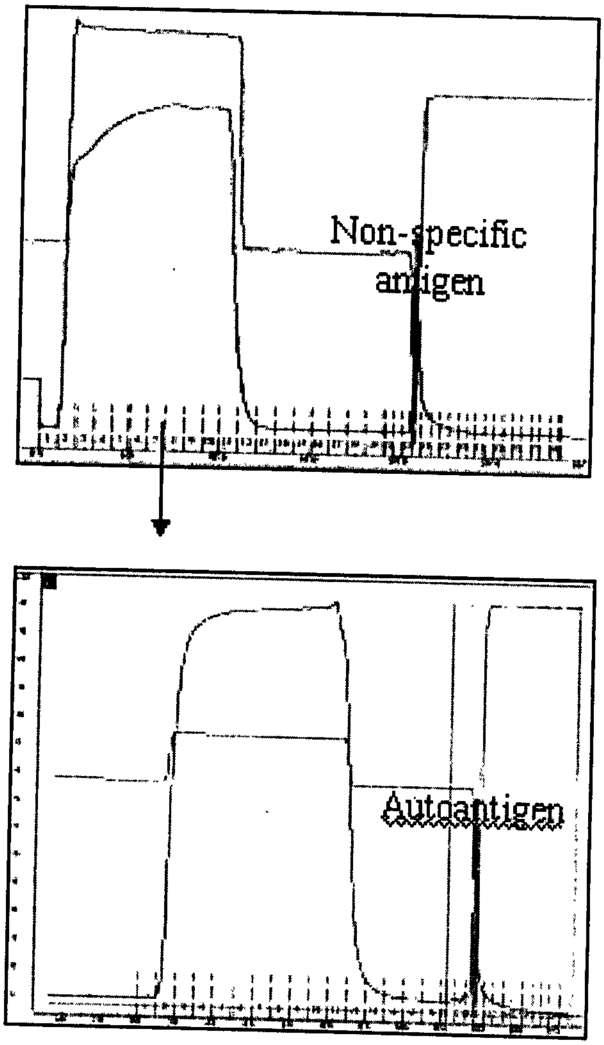
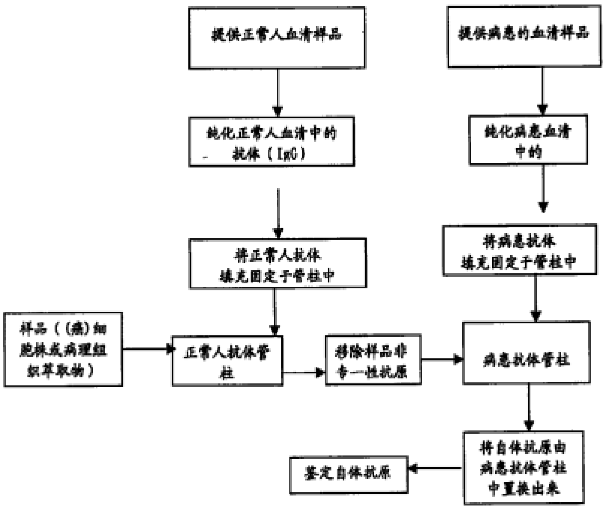


图 5

专利名称(译)	自体抗原筛选方法		
公开(公告)号	CN1796995A	公开(公告)日	2006-07-05
申请号	CN200410101522.7	申请日	2004-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人工业技术研究院		
[标]发明人	曾锱翎 郑平福		
发明人	曾锱翎 郑平福		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/34		
代理人(译)	黄健		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了关于自体抗原筛选的方法，其先将疾病相关的(癌)细胞株或病理组织萃取物样品注入填充有正常人抗体的管柱中去除样品中非专一性的抗原，再将已去除非专一性抗原的样品注入填充有病患抗体的管柱获得专一性的自体抗原，并结合质谱技术鉴定自体抗原，以达到快速精确筛选疾病生物标记分子的目的。