

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710099001.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 101299044A

[22] 申请日 2007.5.8

[21] 申请号 200710099001.6

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础
医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

[72] 发明人 夏 晴 卢 锋 闫惠平 沈倍奋
胡美茹

[74] 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理有
限公司

代理人 胡长远

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 6 页

[54] 发明名称

一种多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上
的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种多肽的新用途，该多肽是人
延胡索酸脱氢酶及其衍生物或类似物。该多肽主要
用于自身免疫性肝炎的诊断、鉴别诊断和作为自身
免疫性肝炎药物治疗与疫苗研究的新靶点。用该多
肽诊断自身免疫性肝炎特异性强，可靠性高。

1、一种抗原多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用，其所述的多肽具有(a)或(b)的氨基酸序列：

(a) 具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的多肽；

(b) 将 SEQ ID NO:1 氨基酸序列通过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加突变所产生的多肽，且该多肽与(a)的多肽具有相似的功能。

2、根据权利要求1所述的多肽，其特征在于该多肽是具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的多肽。

3、一种多核苷酸，其特征在于，它选自下组：

(a). 编码权利要求1所述多肽的多核苷酸；

(b). 与多核苷酸(a)完全互补的多核苷酸。

4、按照权利要求3所述的核苷酸，其特征在于它具有 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

5、一种载体，其特征在于，它含有权利要求3所述的多核苷酸。

6、一种宿主细胞，其特征在于，它含有权利要求5所述的载体。

7、权利要求1或2所述多肽的制备方法，包括以下步骤：

(1)、利用PCR扩增、重组或人工合成方法获得权利要求1或2所述多肽的多核苷酸；

(2)、将多核苷酸片断克隆并转导或转化进合适的宿主细胞；

(3)、在合适的培养基中培养宿主细胞；

(4)、从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质，即得本发明多肽。

8、一种抗人延胡索酸脱氢酶自身抗体点印迹检测试剂盒，其特征在于硝酸纤维素膜上所点抗原是人延胡索酸脱氢酶。

9、一种抗延胡索酸脱氢酶抗体 ELISA 检测试剂盒，其特征在于包被于酶联板上的包被原为人延胡索酸脱氢酶。

一种多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用

技术领域

本发明涉及一种多肽的新用途，具体地说涉及一种多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用。

背景技术

自身免疫性肝炎(Autoimmune hepatitis, 简称 AIH)是一种不明原因的免疫性肝病。以桥接炎症、门脉淋巴细胞浸润，高丙种球蛋白(γ -globulin)血症，血清中查及高滴度自身抗体，激素治疗有效为特征。自身免疫性肝炎可发作于任何年龄，大约 70%的患者为女性。自身免疫性肝炎通常是慢性疾病，隐性发作，如不及时治疗，将进行性恶化，40%的患者将发展为肝硬化，终至肝衰。自身免疫性肝炎在西欧和北美白人的患病率为 0.1~0.2/10 万，日本人为 0.08~0.15/10 万，北欧的高加索人中较高，为 16.9/10 万，占欧洲肝移植病因的 2.6~5.9%。我国是慢性肝炎的高发区，虽然以病毒性肝炎为主，但约有 10%为病毒感染指标阴性患者，近年来随着国内肝病学术界对该病认识的不断深入以及诊断水平的提高，相当一部分原隐源性慢性肝炎被证实为自身免疫性肝炎。由于大多数自身免疫性肝炎对免疫抑制治疗有效，所以尽早识别自身免疫性肝炎就非常重要，尤其是把自身免疫性肝炎从合并有自身免疫现象的慢性病毒性肝炎中区别出来就更为重要，因为免疫抑制可能加重丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, 简称 HCV)感染的肝病，而使用 α -干扰素治疗可使自身免疫性肝炎恶化。

目前尚无单一的临床或实验室指标可以确诊自身免疫性肝炎。国际自身免疫性肝炎协作研究组提出并于1999年修正了自身免疫性肝炎积分诊断标准。自身免疫性肝炎需要综合临床、实验室(生化及免疫学)和肝脏病理学检查几方面的分析才能作出诊断：(1)、排除遗传性肝脏疾病(Wilson病、遗传性血色素沉积症、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏综合症)；病毒感染性肝病(甲-戊型肝炎病毒)；酒精或药物诱导性肝病。(2)、肝脏病理学改变为界面性肝炎，且无胆管损坏、肉芽肿或提示其它疾病的病变；(3)、血清转氨酶(AST、ALT)明显升高、球蛋白、 γ 球蛋白或IgG \geq 正常上限1.5倍；(4)、自身抗体阳性。

从上述自身免疫性肝炎的诊断标准可以看出，自身抗体的检测是目前自身

免疫性肝炎诊断的重要依据。同时自身免疫性肝炎与其它病毒性肝炎，特别是合并自身免疫现象的丙型肝炎的鉴别一直是困扰临床工作者的难题。而对原因不明的肝炎患者及时检测自身抗体将有助于疾病的鉴别诊断。目前已有具有鉴别价值的自身抗体如 HCV 特异性自身抗体：抗-GOV 抗体。而抗-Glucuronosyltransferases 可以鉴别自身免疫性肝炎和其它病毒性肝炎。

现在应用于实验诊断的自身抗体检测最主要的方法是间接免疫荧光法 (Indirect immune infuorence, 简称IIF)。该方法以人喉癌上皮细胞(Hep-2)、或各种组织(猴肝脏和心肌组织、大鼠肝、肾和胃组织)的冰冻切片作为抗原，进行相关抗体的检测。IIF得到的结果是形态学描述水平的，自身抗体在报告时根据荧光模式的不同，可具体分型为颗粒型、核点型、核仁型核膜型，抗平滑肌抗体、抗高尔基体、抗线粒体抗体等。IIF 检测自身抗体在自身免疫性肝炎诊断上的应用存在着两个主要的问题：一是由于IIF很难实现标准化，实验结果的判断易受人为因素影响，同一受检者的检测结果在不同的实验室，不同的检测者间常常存在差异，可比性、可重复性差，常常给诊断带来困难。二是不同的自身抗体常常具有相同的荧光模式，无法用IIF区分。而自身抗体靶抗原分子分子本质明确后，则可据此建立更为准确、可靠、便捷的自身抗体检测方法：如以基因工程手段表达纯化抗原，建立点印迹或ELISA方法进行检测。

自身抗体检测对于自身免疫性肝炎的诊断具有重要价值，但其抗体异质性大，大量的靶抗原尚未明确分子本质，临床上急需发现明确新的自身免疫性肝炎特异性自身抗体，建立准确、可靠、便捷的检测方法，从而为自身免疫性肝炎的诊断、鉴别诊断以及患者预后疗效的判断提供新的指标。

发明内容

本发明的目的在于利用新发现的对自身抗体具有特异性的多肽提供一种抗原多肽在制备诊断试剂上的应用，该抗原多肽与抗体的特异性反应强，以其为基础作为诊断试剂可定量反映血清中自身抗体的水平，方法简单快捷，可标准化，重复性好，并且可以对自身免疫性肝炎与病毒性肝炎进行鉴别诊断。

本发明提供了一种抗原多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用，其所述的多肽具有(a)或(b)的氨基酸序列：

(a) 具有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的多肽；

(b) 将 SEQ ID NO:1 氨基酸序列通过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加突变所产生的多肽，且该多肽与(a)的多肽具有相似的功能。

本发明提供一种多核苷酸，该多核苷酸包含一个核苷酸序列，该核苷酸序列与下述的一种核苷酸序列至少有 75% 的相同性：

- (a). 编码上述多肽的多核苷酸；
- (b). 与多核苷酸(a)完全互补的多核苷酸。

上述多核苷酸，具有 SEQ ID NO:2 所示的序列。

本发明所述的多核苷酸序列(a)，其在基因文库中登录号为：gi|32880021。

本发明还提供一种含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或者转导的宿主细胞或者被上述多核苷酸直接转化或者转导的宿主细胞。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或者是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主（如细菌、酵母等）中产生。

本发明抗原多肽的制备方法，包括以下步骤：

- (1)、利用PCR扩增法、重组法或人工合成方法获得编码上述抗原多肽的多核苷酸；
- (2)、将多核苷酸片断克隆并转导或转化进合适的宿主细胞；
- (3)、在合适的培养基中培养宿主细胞；
- (4)、从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明的目的是通过如下技术方案实现：

- (1). 自身免疫性肝炎靶抗原的筛选和确定：

本发明中自身免疫肝炎靶抗原多肽是利用蛋白质组血清学的方法，即以人肝癌细胞HepG2为抗原基质，通过双向电泳分离后，转印到PVDF膜上，然后该膜与明确诊断的AIH患者血清进行免疫印迹，发现在14.29%的自身免疫性肝炎患者血清中有一特征性的抗原抗体阳性反应，对应的蛋白抗原斑点的表观分子量为52.49kDa，等电点为7.85，切取双向电泳凝胶上该位置的蛋白质斑点，经胶内酶切提取肽段后通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析鉴定为延胡索酸脱氢酶，基因文库登陆号为gi|32880021。并且该鉴定结果进一步通过钠升电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱(Nano-ESI-MS/MS)测序得到进一步证实。同时用商品化的抗延胡索酸脱氢酶抗体为一抗，通过Western blot分析，证实了质谱分析结果的可靠性和延胡索酸脱氢酶的自身抗原特性。

- (2). 自身免疫性肝炎自身抗原—人延胡索酸脱氢酶的制备方法：

- a. 自身免疫性肝炎靶多肽—人延胡索酸脱氢酶编码序列的获得：

人延胡索酸脱氢酶的编码序列可用 PCR 法从人肝癌细胞 HepG2 的 cDNA 文库中获得的, 人延胡索酸脱氢酶的编码序列全长 1533 个碱基对, 含有编码人延胡索酸脱氢酶的 510 个氨基酸残基的序列, 其 DNA 序列及其编码的氨基酸残基序列见序列表 (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:1); 在设计 PCR 引物时, 分别在其 5' 端添加内切酶 Nde I 识别序列 (其中含起始密码 ATG), 在其 3' 末端添加内切酶 Xho I 的识别序列。

b. 人延胡索酸脱氢酶编码序列的克隆与表达:

按常规分子克隆方法, 将 PCR 扩增的人延胡索酸脱氢酶编码基因片断克隆至大肠杆菌的表达载体 pET22b(+) 中, 所得的表达质粒称为 pET22b(+) - FH。pET22b(+) 为长度 5493bp 双链环状 DNA 质粒, 在多克隆位点上游的调控区内含有噬菌体 T7 启动子, 受 T7RNA 聚合酶的诱导而启动其下游基因的转录, 该质粒含有一氨苄青霉素抗性基因, 可转化以大肠杆菌 BL21 (DE3) 为代表的一系列宿主细胞;

用 pET22b(+) - FH 表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 并筛选出表达 FH 的表达株, 称为 E. coli BL21 (DE3) /pET22b(+) - FH。在 LB 培养基中呈可溶性高表达重组基因目的蛋白—人延胡索酸脱氢酶。

c. 人延胡索酸脱氢酶的纯化:

通过发酵培养带有人延胡索酸脱氢酶基因片断的重组表达质粒的大肠杆菌工程菌 E. coli BL21 (DE3) /pET22b(+) - FH, 可获得大量的人重组延胡索酸脱氢酶融合蛋白, 经过一些简单的纯化步骤, 如镍螯合琼脂糖凝胶亲和层析、超滤等的结合应用, 可获得成分均一的具有高纯度 (95%) 的人延胡索酸脱氢酶。

通过原核表达纯化获得 FH 重组蛋白, 并且建立检测血清抗-延胡索酸脱氢酶自身抗体水平的 ELISA 和点印迹的检测方法, 自身免疫性肝炎患者该自身抗体水平显著高于正常人, 并且与病毒性肝炎, 如慢性乙型病毒性肝炎 (HBV)、慢性丙型病毒性肝炎 (HCV), 以及其它自身免疫性疾病, 如原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis, PBC), 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE), 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 有显著统计学差异 ($p < 0.05$)。本发明抗-FH 的检测具有自身免疫性肝炎特异性, 可以鉴别自身免疫性肝炎与其他病毒性肝炎和自身免疫性疾病。

(3). 抗人延胡索酸脱氢酶自身抗体点印迹检测试剂盒的制备方法:

将纯化的重组融合蛋白定量后, 用小号加样枪头, 小心点在硝酸纤维素膜

上,待自然干燥后,重复一次;也可以是用手术刀背面压在硝酸纤维素膜上,呈均匀细线。硝酸纤维素膜自然干燥后,使用或-20℃冷藏待用。

使用时脱脂奶粉封闭后,待测血清适当稀释后,室温孵育1小时,洗涤后,碱性磷酸酶标记二抗稀释液室温孵育30min, NBT/BCIP底物溶液显色判读。

上述抗人延胡索酸脱氢酶自身抗体点印迹检测试剂盒,其硝酸纤维素膜上所点抗原是人延胡索酸脱氢酶。

(4). 抗人延胡索酸脱氢酶自身抗体 ELISA 检测试剂盒的制备方法:

将纯化的重组融合蛋白定量后,用20mmol/L的碳酸盐溶液(Ph9.6)1:10倍稀释后包被酶联板,4℃过夜;次日用10%BSA封闭液,待检血清用PBS稀释后,分别加至封闭后的酶联板孔中,每孔100ul,37℃反应1小时,洗板,加辣根过氧化物酶标记的抗人二抗,37℃反应30min,洗板;加OPD底物溶液,37℃避光显色10min,加100ul2N硫酸混匀终止反应,用酶联仪测定A490值。

上述抗延胡索酸脱氢酶抗体 ELISA 检测试剂盒,其包被于酶联板上的包被原为人延胡索酸脱氢酶。

在本发明中,术语“抗原多肽”、“抗原蛋白”或“融合蛋白”等可互换使用,都指编码本发明中用于检测自身免疫性肝炎的抗原氨基酸序列的蛋白或多肽。

本发明具有的优点和有益效果:(1)、本发明为自身免疫性肝炎的诊断提供了新的指标,提供了一种新的途径;(2)、本发明为自身免疫性肝炎和病毒性肝炎的鉴别诊断提供了新的指标;(3)、本发明对自身免疫性肝炎抗体的特异性强,诊断可靠性高;(4)、本发明可用高效表达的大肠杆菌系统生产,生产方法简单,适于大规模生产,且成本低;(5)、本发明提供的诊断试剂使用简单快捷,操作过程易统一,判读客观,结果以定量和/或半定量的形式报告,并易于标准化和质控;(6)、可以通过对该自身抗体的检测,对自身免疫性肝炎的复发、疗效、预后等进行判断。

附图说明

图1为HepG2全细胞裂解液双向凝胶电泳免疫印迹图。

- A. HepG2全细胞裂解液经双向电泳分离后转印到PVDF膜上,后者与自身免疫性肝炎患者血清进行免疫印迹反应图;
- B. HepG2全细胞裂解液经双向电泳分离后,凝胶上蛋白质斑点通过考马斯亮蓝染色图。

C. 为 A 图中方框的局部放大图, 图中 1, 2, 3 抗体阳性反应点。

D. 为 PVDF 膜直接考染的结果。

E. 为 B 图中方框的局部放大图。

图 2 为 MALDI-TOF-MS 分析对人延胡索酸脱氢酶的鉴定图谱。

图 3 为 Nano-ESI-MS/MS 分析对人延胡索酸脱氢酶的鉴定图谱。

图 4 为验证人延胡索酸脱氢酶的抗原性的双向电泳图。

A. 为自身免疫性肝炎患者血清与 HepG2 蛋白的双向电泳免疫印迹图。

B. 为抗延胡索酸脱氢酶 (santa, SC27995) 与 HepG2 蛋白的双向免疫印迹图。方框内 F、G、H 点显示出现了阳性斑点; 经过质谱鉴定为延胡索酸脱氢酶;

C. 为对应 A 图局部放大结果;

D. 为对应 B 图局部放大结果。

图 5 为从 HepG2 中 PCR 扩增人延胡索酸脱氢酶基因片段电泳检测图。

1. 1530bp 的 FH 基因片段;

M. 核酸标准分子量 (TaKaRa DL2000)。

图 6 为人延胡索酸脱氢酶的重组质粒构建流程图。

图 7 为琼脂糖凝胶电泳检测转化子的双酶切鉴定电泳图。

1. 分子量为 1530bp 左右的酶切片段;

M. 核酸标准分子量 (TaKaRa DL2000)。

图 8 为表达带 6*his 标签的人延胡索酸脱氢酶融合蛋白重组菌的 SDS-PAGE 分析结果

M. 蛋白质分子量标准 (Fermentas, SM0431);

1. 为空载体诱导;

2~7. 为不同 IPTG 浓度 (0.0mM、0.2 mM、0.4 mM、0.6 mM、0.8mM、1.0 mM), 诱导 5h, 重组子表达融合蛋白情况。重组菌均表达相对分子量为 52000 的融合蛋白, 即图内箭头所示的位置。

图 9 为表达带 6*his 标签的人延胡索酸脱氢酶融合蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析结果。

M. 蛋白质分子量标准 (Fermentas, SM0431);

1. 为穿过峰;

2~5. 为 100mM 咪唑洗脱峰;

6~7. 为 200mM 咪唑洗脱峰。

图 10 为通过 Western blot 方法检测纯化后的本发明抗原多肽与自身免疫性肝炎病人血清反应的结果：表达纯化后延胡索酸脱氢酶抗原性的确定。

M. 蛋白质分子量标准 (Fermentas, SM0431);

1. 纯化后本发明的融合蛋白 SDS-PAGE 电泳后考染结果;

2. 纯化后本发明的融合蛋白与商品化抗-延胡索酸脱氢酶多克隆抗体反应的结果;

3~5. 纯化后本发明的融合蛋白与自身免疫性肝炎患者血清反应的结果;

6~8. 纯化后本发明的融合蛋白与正常人血清反应的结果。

图 11 为通过点印迹方法检测的纯化后的本发明多肽与自身免疫性肝炎病人血清反应的结果电泳图:

1. 纯化后本发明多肽与商品化抗延胡索酸脱氢酶多克隆抗体反应的结果;

2~3. 纯化后本发明多肽与自身免疫性肝炎患者血清反应的结果;

4~5. 纯化后本发明多肽与正常人血清反应的结果。

图 12 为通过 ELISA 方法检测的纯化后的本发明多肽与 AIH、PBC、HBV、HCV、SLE、RA 及正常人各组别试验血清的结果电泳图。

具体实施方式

实施例1

自身免疫性肝炎靶抗原蛋白的筛选和鉴定, 按照以下步骤进行:

(1). 双向电泳分析: 培养的人肝癌细胞 HepG2 (国际标准株, 由军事医学科学院基础医学研究所保存) 按常规方法收集和裂解后, 用 Bradford 方法测定蛋白质的浓度。按照 IPG 胶条说明书要求上样、胶条重泡涨、等电聚焦和第二向 SDS SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。然后将聚丙烯酰胺凝胶用考马斯亮蓝染液在摇床上染色 30min 后, 凝胶脱色液脱色至蛋白点清晰可见 (30min~40min), 双蒸水漂洗 3-5 次后保存 (见图 1B、E)。

(2). Western blot 分析与阳性点位置的确定: 将双向电泳后的聚丙烯酰胺凝胶按常规方法转膜, 转印条件为 40V, 1 小时 30 分钟 (电流约为 0.3A); 转膜结束后, 取出杂交膜 (PVDF 膜); 于含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T (Tween-20, 0.02%)

封闭液中室温下封闭 1h；加入 1:400 倍稀释的自身免疫性肝炎病人血清（血样由北京佑安医院提供，参照 1999 年国际自身免疫性肝炎小组修订的评分系统及临床特征进行诊断，正常对照者血清样品为健康体检者），室温孵育 1h 后，TBS/T 洗膜 3 次。二抗为辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗人多抗。ECL 显色，于暗室进行 X 光片曝光，冲洗后观察结果（见图 1A, C）。显影后的 PVDF 膜用考马斯亮蓝染色（见图 1D），通过比较，以确定阳性斑点在二向聚丙烯酰胺凝胶中的位置（见图 1E），其表观分子量为 52.49kDa，等电点为 7.85。

(3). MALDI-TOF-MS 分析与 nano-ESI-MS/MS 分析对阳性蛋白点的鉴定：将比对后的阳性蛋白点从二向聚丙烯酰胺凝胶中切出，用双蒸水反复洗 3 次；用含 50%乙腈、25mmol/L NH_4HCO_3 的溶液 100 μl 脱色胶粒，真空干燥后，加入胰蛋白酶（胰酶为 Roche 产品）酶液，4 $^\circ\text{C}$ 放置 15min；补加 5 μl 25mmol/L 的 NH_4HCO_3 溶液保湿，37 $^\circ\text{C}$ 温浴 12h—16h。收集酶切后的上清液做 MALDI-TOF-MS 分析（20kV、阳离子模式下在 Bruker REFLEX III 型 MALDI-TOF-MS (Bruker-Franzen, Bremen, 德国) 质谱仪上获取数据。质谱峰的质量精确度以胰酶的自切峰为内标进行校正。质谱数据用 Mascot (<http://www.matrixscience.co.uk>) 软件在 SwissProt 和 NCBI nr 数据库内进行检索（检索参数允许 $\pm 0.1\text{Da}$ 的误差、一处漏切、甲硫氨酸的甲酰化和部分氧化）与 nano-ESI-MS/MS 分析（串联质谱分析均用 Q-TOF2 型质谱仪 (Micromass)，在阳离子模式下进行。质谱仪的校正用 Glu-fib 的串联质谱碎片进行的，质量准确度小于 0.1Da。雾化气为氮气，碰撞气体为氩气。测定后的数据经 ProteinLynx (Micromass) 软件处理，经 ProteinLynx Global Server 自动查询数据库即可给出结果。进行 nano-ESI-MS/MS 分析时，毛细管电压为 800–1000V，调节碰撞能量和碰撞气体的大小使得得到一个好的串联质谱图。该质谱图经 Micromass 的专用软件 MaxEnt3 处理后，可用 Spectrum List 查询数据库通过 Mascot 查询 NCBI, SWISSPROT, OWL 等数据库而对蛋白进行鉴定），结果分别见图 2 和图 3，数据库检索同时证实该蛋白为延胡索酸脱氢酶。

(4). 人延胡索酸脱氢酶的抗原性验证：以商品化的抗延胡索酸脱氢酶（抗延胡索酸脱氢酶抗体 (santa, SC27995) 为一抗，辣根过氧化物酶标记的羊抗人多抗为二抗，将双向电泳后的聚丙烯酰胺凝胶按照常规方法进行免疫印迹实验，其结果显示：质谱鉴定后的阳性反应斑点 F、G、H 与商品化抗延胡索酸脱氢酶 (santa, SC27995) blot 所得到的斑点完全一致，即证明了质谱鉴定结果的可靠性，同时也证明了延胡索酸脱氢酶具有抗原性（见图 4B），可诱导机体产生自身

抗体。

实施例 2

人延胡索酸脱氢酶融合蛋白的融合表达

(1). 人延胡索酸脱氢酶的基因克隆, 按照如下步骤进行:

根据已知人延胡索酸脱氢酶的 cDNA 序列, 设计并合成 (由北京奥科公司合成) 两个引物, 上游引物为:

5'GGAATTCCATATGTACCGAGCACTTCGGCTCCTCGCGCGCTC3';

下游引物为:

5'CCGCTCGAGCTTTGGACCCAGCATGTCCTTAGGTTTTACCC3'; 在上、下游引物上 5' 端分别加上 Nde I 和 Xho I 酶切位点 (下划线部分)。以人肝癌细胞 HepG2 的 cDNA 文库为模板, 用上述两个引物经 PCR 扩增出 1533 个碱基对长的人延胡索酸脱氢酶 DNA 片断。PCR 反应条件为: 人肝癌细胞 HepG2cDNA 文库 0.2 微克, 上述两个引物各 0.1 微克, 2.5mM dNTPs 1 微升, 10×PCR 缓冲液 2 微升, pyrobest DNA 聚合酶 0.5 个单位, 加水至最终体积 20 微升, PCR 反应在 PCR 仪器按以下温度循环进行, 第一循环: 95℃5 分钟, 第 2 至第 30 循环: 94℃50 秒、58℃50 秒, 72℃1 分钟 30 秒, 最后一个循环: 94℃50 秒、58℃50 秒, 72℃7 分钟。取 PCR 产物 5 μl, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果扩增出 1530bp 左右的 FH 基因片段 (见图 5)。电泳回收 (从琼脂糖凝胶内回收 DNA 片段的试剂盒为北京奥科公司产品), 纯化扩增的基因片段, 溶于 30 μl 的去离子水中, -20℃保存。

(2). 表达人延胡索酸脱氢酶表达载体的构建

提取质粒 pET22b(+), 用 Nde I 和 Xho I 双酶切 (限制性内切酶 Nde I、Xho I 为 TaKaRa 公司产品), 电泳后回收酶切的质粒大片段, 溶于 30 μl 的去离子水中。用 Nde I 和 Xho I 双酶切人延胡索酸脱氢酶基因片段, 其 5' 端和 3' 端分别形成粘性末端, 电泳回收后溶于去离子水中。取上述酶切后 DNA 片段, 按等摩尔浓度混匀, 在同一离心管内用 T4DNA 连接酶 (T4DNA 连接酶 TaKaRa 公司产品) 连接 (16℃过夜)。使 FH 的基因片段插入到载体 pET22b(+) (表达载体 pET22b(+) 为美国 Novagen 公司产品。) 内的 Nde I 和 Xho I 位点之间, 重组质粒构建流程图见图 6。

(3). 重组质粒的筛选

将上述连接的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) (宿主菌 BL21(DE3) 为美

国 Novagen 公司产品), 转化产物涂布含氨苄青霉素 ($60 \mu\text{g/ml}$) 的固体 LB 培养基上, 置 37°C 培养过夜。次日随机挑取 6 个转化子菌落和一个含 pET22b(+) 质粒的对照菌, 分别接种到含 2ml 液体 LB 培养基(含氨苄青霉素 $60 \mu\text{g/ml}$) 的试管内, 置 37°C 振摇培养 12h, 取菌液 1ml, 按质粒提取试剂盒要求提取质粒后做 Nde I 和 Xho I 双酶切 (37°C , 6h)。取酶切液 $10 \mu\text{l}$ 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 有一转化子结果显示两条带, 其中一条为 FH 基因片段, 约 1530bp 左右(见图 7)。

(4). 表达人延胡索酸脱氢酶工程菌的筛选鉴定

将上述双酶切鉴定为阳性的转化子分别接种至 6 支含 5ml LB 培养基(含氨苄青霉素 $60 \mu\text{g/ml}$) 的试管内 (2-7 泳道), 37°C 振摇 3h, 分别加 IPTG (IPTG 为 Promega 公司产品) 至终浓度 0mM、0.2mM、0.4mM、0.6mM、0.8mM、1mM, 继续振摇 5h, 同时设空载体作为对照 (见图 8 泳道 1) (IPTG 0.4mM, 诱导 5h)。离心收集菌体进行 SDS-PAGE 检测。电泳检测显示 (见图 8), 鉴定阳性的重组子, 在 IPTG 诱导下均表达相对分子量约为 52kDa 的融合蛋白 (见图 8 泳道 3~7), 而空载体菌和未诱导菌 (见图 8 泳道 2) 均无此蛋白带。证明获得了表达重组人延胡索酸脱氢酶蛋白的工程菌。

实施例 3

表达重组人延胡索酸脱氢酶融合蛋白的纯化, 包括以下步骤:

(1). 将实施例 2 所得的表达人延胡索酸脱氢酶融合蛋白工程菌的超声破碎: 将培养的表达人延胡索酸脱氢酶融合蛋白的工程菌离心 (8000rpm , 10min, 4°C), 弃上清, 菌体重悬于原培养液 1/10 体积的缓冲液中 (20mM 磷酸盐缓冲液, pH7.4, 500mM NaCl), 液氮反复冻融 3 次, 冰浴超声 10min, 离心 (12000rpm , 20min, 4°C), 收集上清。

(2). 镍螯合琼脂糖凝胶亲和层析纯化: 将镍柱连接到常压层析系统 (螯合琼脂糖凝胶亲和层析柱为 pharmacia 公司产品), 先用缓冲液 (20mM 磷酸盐缓冲液, pH7.4, 500mM NaCl) 冲洗平衡, 然后将上步获得的裂解上清直接上样。上样流速为 1ml/min 。上样后用平衡液冲洗 10 个柱体积, 收集穿过峰。然后依次用含 15、20、50、100、200、300、400mM 咪唑的缓冲液进行阶段洗脱, 收集各洗脱峰蛋白, 用 12% SDS-PAGE 检测穿过峰该峰和各洗脱峰蛋白, 确定哪个组份内含有融合蛋白。

(3) 镍螯合琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化人延胡索酸脱氢酶融合蛋白, 将穿过

峰及不同浓度咪唑洗脱的各峰蛋白进行 SDS-PAGE 分析显示(见图 9), 延胡索酸脱氢酶融合蛋白(分子量约 52000)主要存在于 200mM 咪唑洗脱峰内, 有很高的纯度; 在 100mM 咪唑洗脱峰中亦有延胡索酸脱氢酶融合蛋白, 但含有其它蛋白。

实施例 4

人延胡索酸脱氢酶融合蛋白抗原性的鉴定

取适量(本实验每泳道用 $2\mu\text{g}$) 实施例 3 所得的重组人延胡索酸融合蛋白与上样缓冲液混匀后煮沸 5min, 离心(12000rpm, 5min)取上清。12%SDS-PAGE 电泳分离后, 常规转膜和封闭。以合适稀释度的抗延胡索酸脱氢酶或受试者血清(1: 400 稀释)为一抗, 室温孵育 1h, 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的多克隆抗体。ECL 显色, 于暗室进行 X 光片曝光, 冲片观察。结果(见图 10 泳道 1~5)显示自身免疫性肝炎病人血清能与所得的重组延胡索酸脱氢酶融合蛋白特异性反应, 与商品化抗体相比较, 可见相同的目标条带, 分子量为 52kDa 左右, 而健康人血清未见相应的条带(图 10 泳道 6~8)。证明本发明所得到的人延胡索酸脱氢酶融合蛋白有很好的抗原性, 能比较特异的与相应的抗体反应。

实施例 5

采用纯化重组人 FH 融合蛋白建立点印迹法检测自身免疫性肝炎患者血清

取浓度为 $400\mu\text{g/ml}$ 的实施例 3 所得纯化后人延胡索酸脱氢酶融合蛋白, 点样于 $0.45\mu\text{m}$ 硝酸纤维素膜(sigma 公司产品)上。经过含 1%BSA 的 TBS 封闭(25℃孵育 1h), 加入 1: 200 的自身免疫性肝炎患者血清(北京市佑安医院提供)反应, 对照组加入 1: 200 的健康者血清(对照者血清来自健康体检者)反应。患者与对照血清均经过细菌吸收处理, 然后用 TBST 充分漂洗 3 次, 每次 5 分钟, 然后加入 1: 10000 稀释度的羊抗人 IgG-碱性磷酸酶反应(25℃孵育 1h), 用 TBST 充分漂洗 3 次, 每次洗 5 分钟, 最后再用 TBS 漂洗 1 次, NBT/BCIP 显色 2 分钟, 结果见图 11, 32 例自身免疫性肝炎患者血清标本中有 15 例呈现阳性显色反应, 而 37 例健康受试者中阳性仅 2 例, 经 χ^2 检验, 两组的阳性率差异有显著性 ($\chi^2=15.893$, $p<0.001$)。

实施例 6

采用纯化重组人延胡索酸酶融合蛋白建立 ELISA 法检测自身免疫性肝炎患者血清

采用间接 ELISA 检测自身免疫性肝炎患者血清及其它各受试组血清, 包括

自身免疫性肝病 (PBC)、其它自身免疫性疾病 (SLE、RA)、病毒性肝炎 (HCV、HBV) 患者血清 (血样由北京佑安医院和中国人民解放军 302 医院提供), 以及健康受试者血清中抗延胡索酸酶抗体水平。具体步骤为: 将纯化的实施例 3 所得重组融合蛋白与已知不同浓度的牛血清白蛋白共同进行 SDS-PAGE 电泳, 考染显色后比较, 确定纯化后重组融合蛋白浓度约为 0.2mg/ml。用 20mmol/L 碳酸盐溶液 (pH9.6) 1:10 倍实施例 3 所得重组蛋白, 然后包被酶联板, 每孔 100ul, 4℃过夜, 次日用封闭液 (10mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.4, 5%BSA) 封闭, 每孔 200ul, 37℃2~3 小时, 用 PBST 液 (10mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.4, 0.2%吐温-20) 洗 3 遍后, 拍干。将待检血清用 PBS 1: 400 稀释后, 分别加至封闭后的酶联板孔中, 每孔 100ul, 每个样品加 3 孔, 37℃反应 1 小时, 用 PBST 液洗 5 遍后, 加 1: 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人多抗 (购自 sigma 公司), 37℃反应 30min, 用 PBST 液洗 5 遍, 加底物 OPD 溶液 100ul, 37℃避光显色 10min, 加 100ul 2N 硫酸混匀终止反应, 用酶联仪测定 A490 值 (见图 12)。同时根据 cut off 值 (正常对照组 A490 值算术平均数+2*标准差) 计算各组的阳性率, 经 X^2 检验, 结果 (见表 1) 显示, 自身免疫性肝炎组与各组相比都有显著性差异 ($p<0.05$), 进一步证明重组人延胡索酸酶融合蛋白对自身免疫性肝炎有较好的特异性, 可通过建立间接 ELISA 法用于自身免疫性肝炎的鉴别诊断。

表 1 纯化融合蛋白 ELISA 实验后各组别的阳性率结果

组 别	阳性人数	受试人数	阳性率 (%)
AIH	20	32	62.5
PBC	9	46	19.57
SLE	3	23	13.04
RA	0	19	0
N. C	1	37	2.70
HCV	3	60	5.0
HBV	5	30	16.67

序列表

SEQ ID NO:1

<110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

<120> 一种多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Tyr Arg Ala Leu Arg Leu Leu Ala Arg Ser Arg Pro Leu Val Arg
1           5           10           15
Ala Pro Ala Ala Ala Leu Ala Ser Ala Pro Gly Leu Gly Gly Ala Ala
           20           25           30
Val Pro Ser Phe Trp Pro Pro Asn Ala Ala Arg Met Ala Ser Gln Asn
           35           40           45
Ser Phe Arg Ile Glu Tyr Asp Thr Phe Gly Glu Leu Lys Val Pro Asn
           50           55           60
Asp Lys Tyr Tyr Gly Ala Gln Thr Val Arg Ser Thr Met Asn Phe Lys
65           70           75           80
Ile Gly Gly Val Thr Glu Arg Met Pro Thr Pro Val Ile Lys Ala Phe
           85           90           95
Gly Ile Leu Lys Arg Ala Ala Ala Glu Val Asn Gln Asp Tyr Gly Leu
           100          105          110
Asp Pro Lys Ile Ala Asn Ala Ile Met Lys Ala Ala Asp Glu Val Ala
           115          120          125
Glu Gly Lys Leu Asn Asp His Phe Pro Leu Val Val Trp Gln Thr Gly
           130          135          140
Ser Gly Thr Gln Thr Asn Met Asn Val Asn Glu Val Ile Ser Asn Arg
145           150           155           160

```

Ala Ile Glu Met Leu Gly Gly Glu Leu Gly Ser Lys Ile Pro Val His
 165 170 175
 Pro Asn Asp His Val Asn Lys Ser Gln Ser Ser Asn Asp Thr Phe Pro
 180 185 190
 Thr Ala Met His Ile Ala Ala Ala Ile Glu Val His Glu Val Leu Leu
 195 200 205
 Pro Gly Leu Gln Lys Leu His Asp Ala Leu Asp Ala Lys Ser Lys Glu
 210 215 220
 Phe Ala Gln Ile Ile Lys Ile Gly Arg Thr His Thr Gln Asp Ala Val
 225 230 235 240
 Pro Leu Thr Leu Gly Gln Glu Phe Ser Gly Tyr Val Gln Gln Val Lys
 245 250 255,
 Tyr Ala Met Thr Arg Ile Lys Ala Ala Met Pro Arg Ile Tyr Glu Leu
 260 265 270
 Ala Ala Gly Gly Thr Ala Val Gly Thr Gly Leu Asn Thr Arg Ile Gly
 275 280 285
 Phe Ala Glu Lys Val Ala Ala Lys Val Ala Ala Leu Thr Gly Leu Pro
 290 295 300
 Phe Val Thr Ala Pro Asn Lys Phe Glu Ala Leu Ala Ala His Asp Ala
 305 310 315 320
 Leu Val Glu Leu Ser Gly Ala Met Asn Thr Thr Ala Cys Ser Leu Met
 325 330 335
 Lys Ile Ala Asn Asp Ile Arg Phe Leu Gly Ser Gly Pro Arg Ser Gly
 340 345 350
 Leu Gly Glu Leu Ile Leu Pro Glu Asn Glu Pro Gly Ser Ser Ile Met
 355 360 365
 Pro Gly Lys Val Asn Pro Thr Gln Cys Glu Ala Met Thr Met Val Ala
 370 375 380
 Ala Gln Val Met Gly Asn His Val Ala Val Thr Val Gly Gly Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly His Phe Glu Leu Asn Val Phe Lys Pro Met Met Ile Lys Asn Val

	405	410	415
Leu His Ser Ala Arg Leu Leu Gly Asp Ala Ser Val Ser Phe Thr Glu			
420	425	430	
Asn Cys Val Val Gly Ile Gln Ala Asn Thr Glu Arg Ile Asn Lys Leu			
435	440	445	
Met Asn Glu Ser Leu Met Leu Val Thr Ala Leu Asn Pro His Ile Gly			
450	455	460	
Tyr Asp Lys Ala Ala Lys Ile Ala Lys Thr Ala His Lys Asn Gly Ser			
465	470	475	480
Thr Leu Lys Glu Thr Ala Ile Glu Leu Gly Tyr Leu Thr Ala Glu Gln			
485	490	495	
Phe Asp Glu Trp Val Lys Pro Lys Asp Met Leu Gly Pro Lys			
500	505	510	

SEQ ID NO:2

<210> 2

<211> 1533

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgtaccgag cacttcggct cctcgcgcgc tcgcgtcccc tcgtgcgggc tccagccgca 60
gccttagctt cggtcccggt cttgggtggc gcggccgtgc cctcgttttg gcctccgaac 120
gcggctcgaa tggcaagcca aaattccttc cggatagaat atgatacctt tggtgaacta 180
aaggtgccaa atgataagta ttatggcgcc cagaccgtga gatctacgat gaactttaag 240
attggaggtg tgacagaacg catgccaacc ccagttatta aagcttttgg catcttgaag 300
cgagcggccg ctgaagtaaa ccaggattat ggtcttgatc caaagattgc taatgcaata 360
atgaaggcag cagatgaggt agctgaaggt aaattaaatg atcattttcc tctcgtggta 420
tggcagactg gatcaggaac tcagacaaat atgaatgtaa atgaagtcac tagcaataga 480
gcaattgaaa tgtaggagg tgaacttggc agcaagatac ctgtgcatcc caacgatcat 540
gttaataaaa gccagagctc aaatgatact tttccacag caatgcacat tgctgctgca 600
atagaagttc atgaagtact gttaccagga ctacagaagt tacatgatgc tcttgatgca 660

```

aatccaaag agtttgcaca gatcatcaag attggacgta ctcatactca ggatgctggt 720
ccacttactc ttgggcagga atttagtggt tatgttcaac aagtaaaata tgcaatgaca 780
agaataaaag ctgccatgcc aagaatctat gagctcgag ctggaggcac tgctgttggt 840
acaggtttaa atactagaat tggctttgca gaaaagggtg ctgcaaaagt ggctgcactt 900
acaggcttgc cttttgtcac tgctccgaat aaatttgaag ctctggctgc tcatgacgct 960
ctggttgagc tcagtggagc catgaacact actgcctgca gtctgatgaa gatagcaaat 1020
gatattcgat ttttgggttc tggtcctcgg tcaggctcgg gagaattgat cttgcctgaa 1080
aatgaaccag gaagcagtat catgccaggc aaggatgaacc ctactcagtg tgaagcaatg 1140
accatgggtg cagcccaagt catggggaac catgttgctg tcaactgtcgg aggcagcaat 1200
ggacattttg agttgaatgt tttcaagcca atgatgatta aaaatgtggt acactcagcc 1260
aggctgctgg gggatgcttc agtttccttt acagaaaact gcgtggtggg aatccaggcc 1320
aatacagaaa ggatcaacaa gctgatgaat gagtctctaa tgttggtgac agctctcaat 1380
cctcatatag ggtatgacaa ggcagcaaag attgctaaga cagcacacaa aatggatca 1440
accttaaagg aaactgctat cgaacttggc tatctcacag cagagcagtt tgacgaatgg 1500
gtaaaaccta aggacatgct gggtccaaag tga 1533

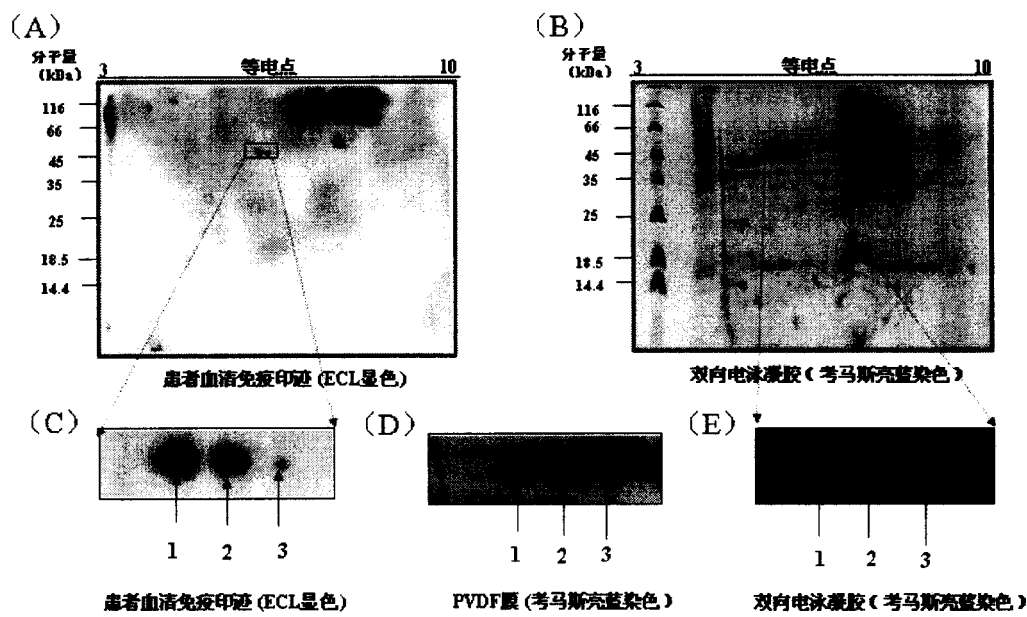


图 1

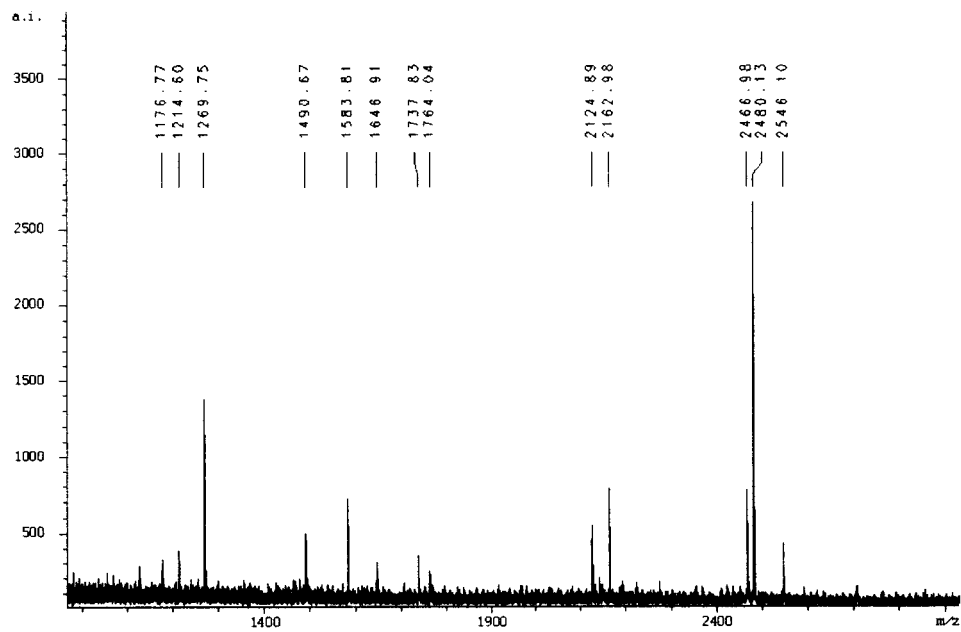


图 2

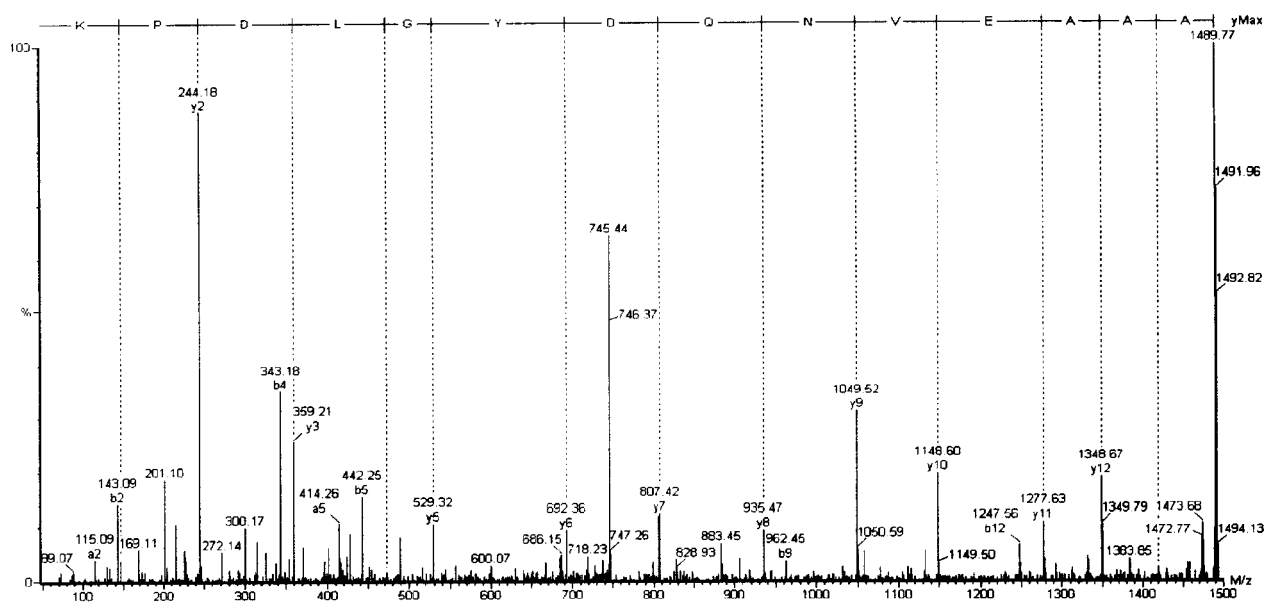


图 3

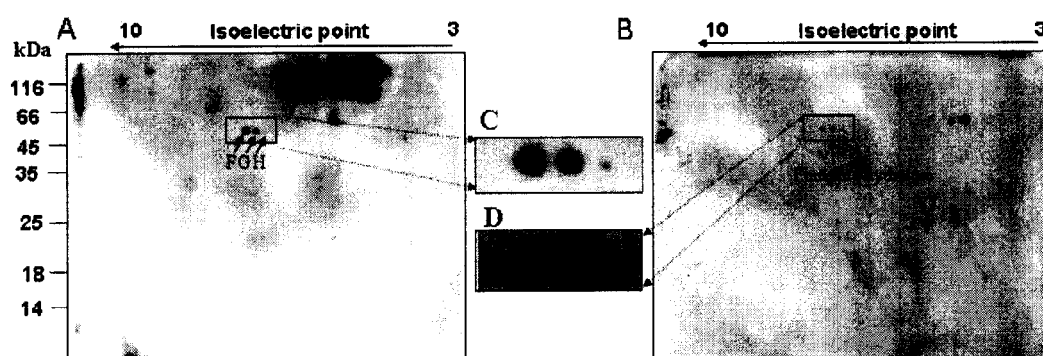


图 4

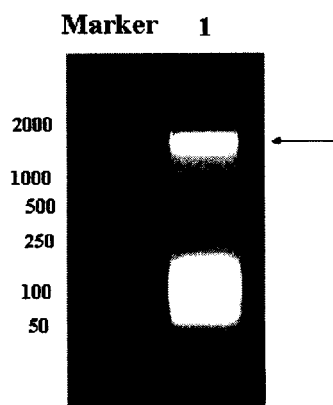


图 5

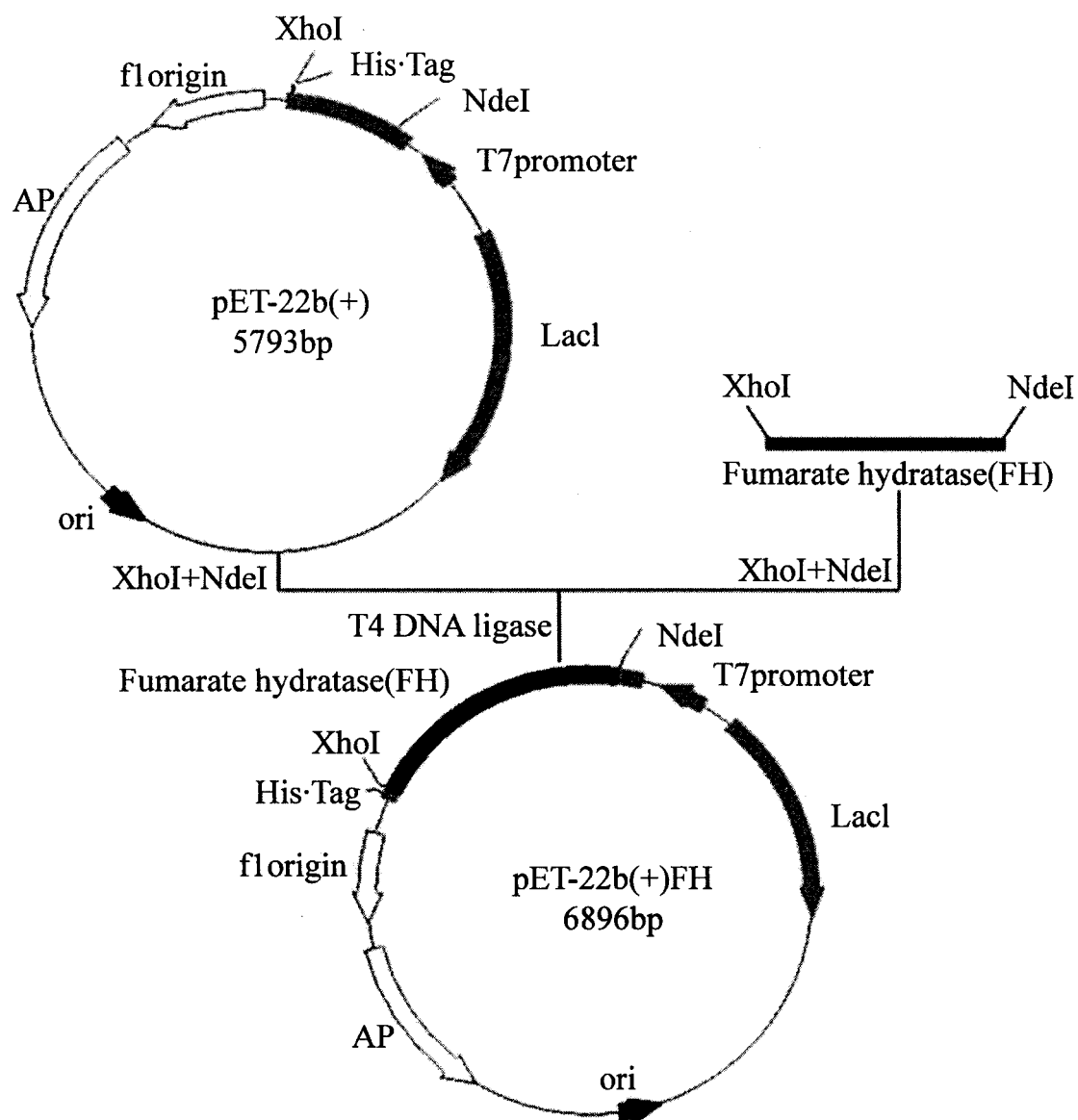


图 6

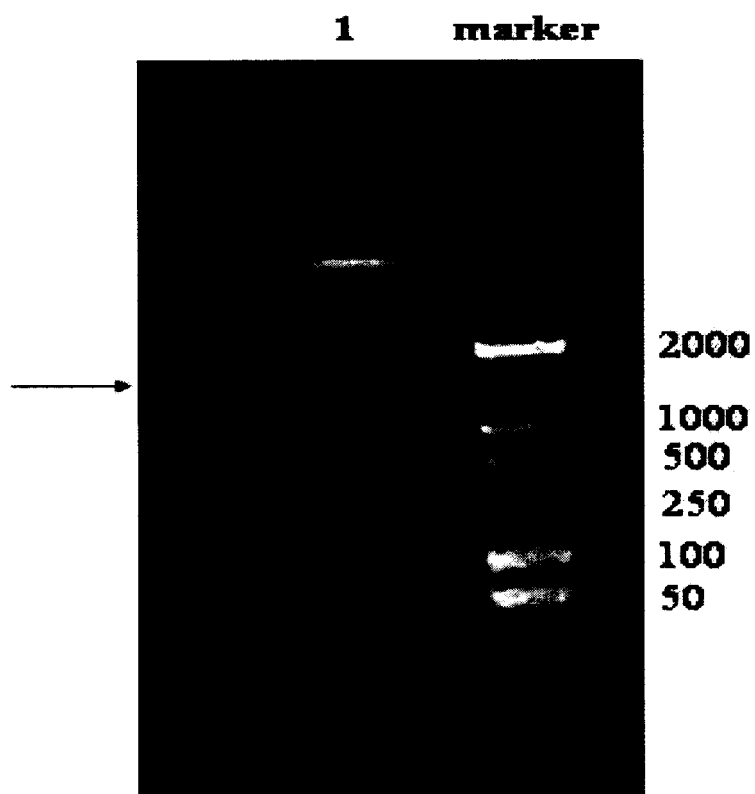


图 7

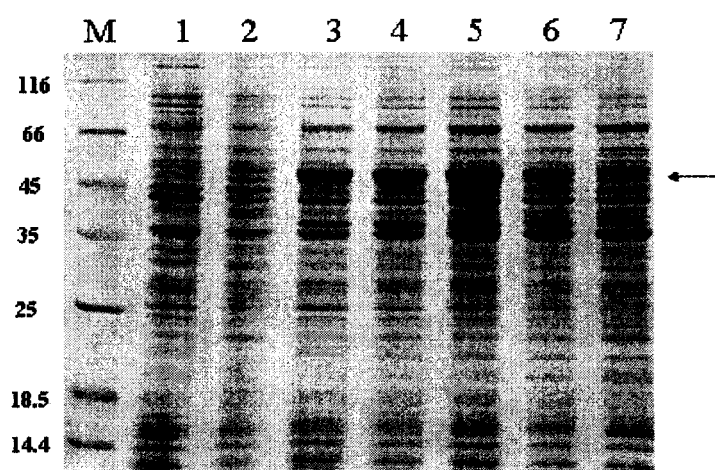


图 8

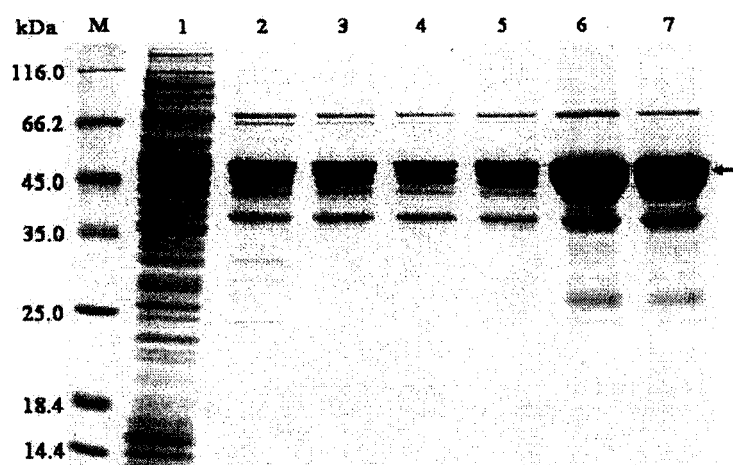


图 9

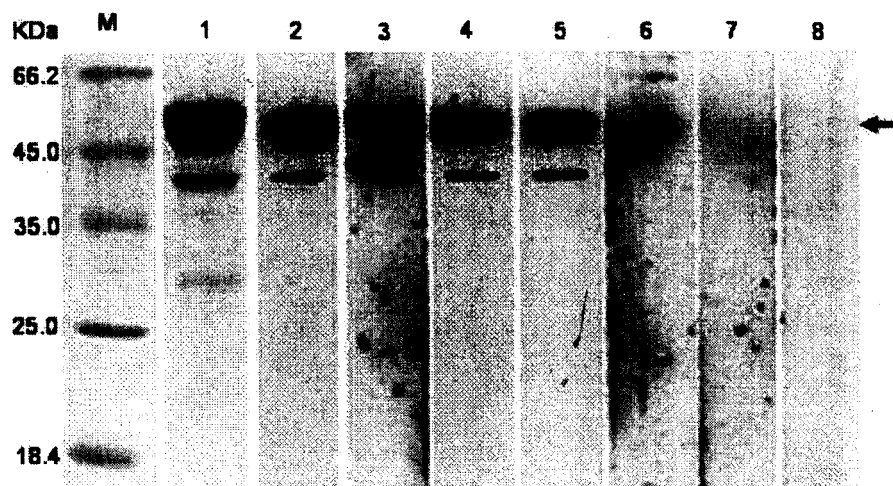


图 10

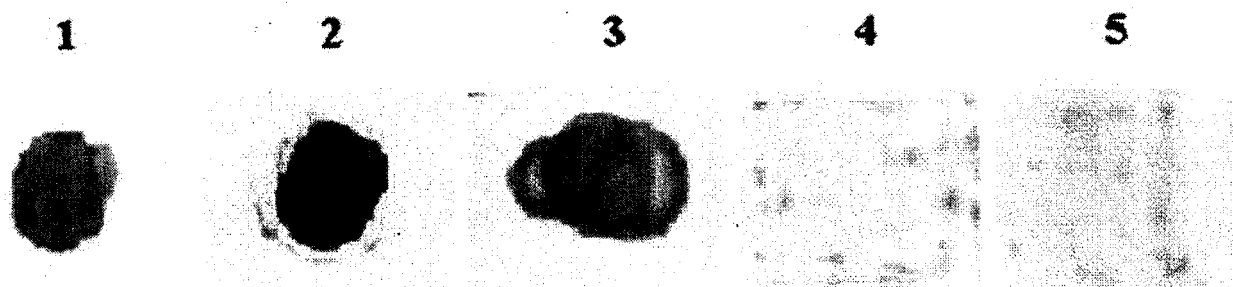


图 11

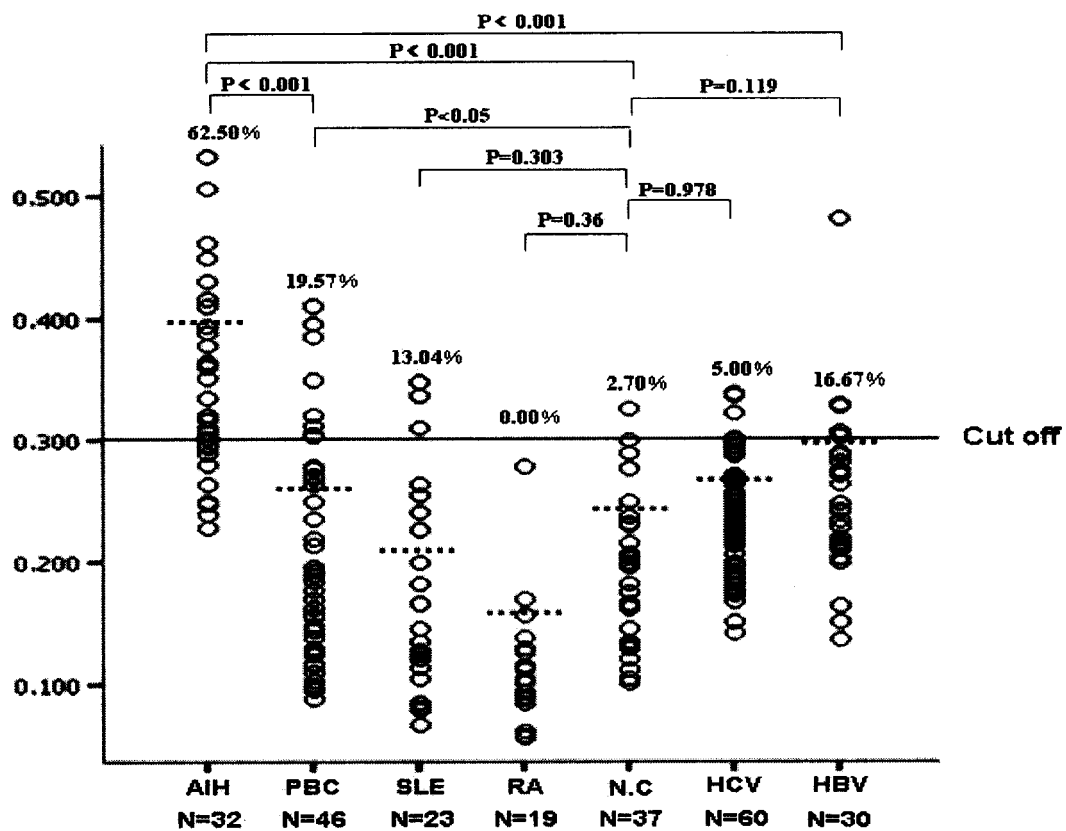


图 12

专利名称(译)	一种多肽在制备自身免疫性肝炎诊断试剂上的应用		
公开(公告)号	CN101299044A	公开(公告)日	2008-11-05
申请号	CN200710099001.6	申请日	2007-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	夏晴 卢锋 闫惠平 沈倍奋 胡美茹		
发明人	夏晴 卢锋 闫惠平 沈倍奋 胡美茹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/576		
代理人(译)	胡长远		
其他公开文献	CN101299044B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多肽的新用途，该多肽是人延胡索酸脱氢酶及其衍生物或类似物。该多肽主要用于自身免疫性肝炎的诊断、鉴别诊断和作为自身免疫性肝炎药物治疗与疫苗研究的新靶点。用该多肽诊断自身免疫性肝炎特异性强，可靠性高。

