



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108546293 A

(43)申请公布日 2018.09.18

(21)申请号 201810261499.X

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.03.28

(71)申请人 天津市湖滨盘古基因科学发展有限公司

地址 300300 天津市东丽区东丽湖景湖科技园4号楼

(72)发明人 张耀洲 吴玉乾 冯建华 李冬梅
张树军 陈玉皎 王文雅

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C12N 15/12(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C12Q 1/6883(2018.01)

C40B 40/08(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用,通过将大量免疫系统疾病患者作为研究病例,对病例进行基因检测并分析,确定出人的精子抗原-36的突变蛋白,根据该人的精子抗原-36的突变蛋白制备基因芯片、单克隆抗体和ELISA试剂盒,为免疫系统疾病的基因诊断提供指引作用,并为疾病的诊断和治疗提供一定的理论基础。



1. 一种人的精子抗原-36的突变蛋白,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种人的精子抗原-36突变蛋白的编码基因,其特征在于,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。
3. 一种基因芯片,其特征在于,包括:固相载体和固定在该载体上的核苷酸探针;所述核苷酸探针根据所述人的精子抗原-36突变蛋白的核苷酸序列,与人的精子抗原-36正常蛋白的核苷酸序列的比对结果确定。
4. 根据权利要求3所述的基因芯片,其特征在于,所述核苷酸探针为SEQ ID NO:3所示的碱基序列。
5. 一种特异性识别人的精子抗原-36突变蛋白的单克隆抗体,其特征在于,其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示。
6. 一种用于检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述ELISA试剂盒包括:包被有权利要求5所述单克隆抗体的ELISA酶标板、酶标二抗、检测对象的精子抗原-36蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、ELISA酶标板洗涤液、显色液和终止液。
7. 根据权利要求6所述用于检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的ELISA试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗为稀释的HRP辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG。
8. 一种基于权利要求6或7所述ELISA试剂盒检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的方法,其特征在于,包括:
 - a、使用所述包被缓冲液对权利要求5所述单克隆抗体进行稀释,并将稀释后的所述单克隆抗体加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育;
 - b、使用所述样品稀释液将检测对象的精子抗原-36蛋白稀释成不同浓度梯度,并将不同浓度梯度的精子抗原-36蛋白分别加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育;
 - c、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;
 - d、加入所述酶标二抗,并室温孵育;
 - e、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;
 - f、加入所述显色液,室温避光孵育,并加入所述终止液终止反应;
 - g、在酶标仪上测定波长为450nm处的吸光值。
9. 根据权利要求8所述ELISA试剂盒检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的方法,其特征在于,进一步包括:空白对照实验。

一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基因工程领域,尤其涉及一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 精子抗原成分十分复杂,精子抗原-36(sperm antigen-36)就是其中一种。精子抗原除存在于精子膜表面的多种糖蛋白抗原外,还包括其本身结构抗原、血型抗原组织相容性抗原及精子内部的多种酶类抗原等。

[0003] 人的精子抗原基因发生突变会对人类健康造成严重影响。在对某些免疫系统疾病,如红斑狼疮和免疫性肾病患者进行基因测序的过程中,均发现患者的精子抗原-36发生了突变,因此,对人的精子抗原-36突变的检测对判断人体是否患有免疫系统疾病具有一定的指引作用。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用。

[0005] 本发明技术方案包括:

[0006] 第一方面,提供一种人的精子抗原-36突变蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 第二方面,提供一种人的精子抗原-36突变蛋白的编码基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0008] 第三方面,提供一种基因芯片,包括:固相载体和固定在该载体上的核苷酸探针;所述核苷酸探针根据所述人的精子抗原-36突变蛋白的核苷酸序列,与人的精子抗原-36正常蛋白的核苷酸序列的比对结果确定。

[0009] 优选地,所述核苷酸探针为SEQ ID NO:3所示的碱基序列。

[0010] 第四方面,提供一种特异性识别人的精子抗原-36突变蛋白的单克隆抗体,其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示。

[0011] 第五方面,提供一种用于检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的ELISA试剂盒,所述ELISA试剂盒包括:包被有上述单克隆抗体的ELISA酶标板、酶标二抗、检测对象的精子抗原-36蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、ELISA酶标板洗涤液、显色液和终止液。

[0012] 优选地,所述酶标二抗为稀释的HRP辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG。

[0013] 第六方面,提供一种基于上述任一所述ELISA试剂盒检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的方法,包括:

[0014] a、使用所述包被缓冲液对上述单克隆抗体进行稀释,并将稀释后的所述单克隆抗体加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育;

[0015] b、使用所述样品稀释液将检测对象的精子抗原-36蛋白稀释成不同浓度梯度,并将不同浓度梯度的精子抗原-36蛋白分别加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育;

- [0016] c、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;
- [0017] d、加入所述酶标二抗,并室温孵育;
- [0018] e、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;
- [0019] f、加入所述显色液,室温避光孵育,并加入所述终止液终止反应;
- [0020] g、在酶标仪上测定波长为450nm处的吸光值。
- [0021] 优选地,进一步包括:空白对照实验。
- [0022] 本发明提供了一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用,将大量免疫系统疾病患者作为研究病例,对病例进行基因检测并分析,确定出人的精子抗原-36的突变蛋白,根据该人的精子抗原-36突变蛋白制备基因芯片、单克隆抗体和ELISA试剂盒,为免疫系统疾病的基因诊断提供指引作用,为疾病的诊断和治疗提供一定的理论基础。
- [0023] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

- [0024] 图1是本发明实施例一提供的一种比对结果示意图;
- [0025] 图2是本发明实施例一提供的另一种比对结果示意图;
- [0026] 图3是本发明实施例一提供的又一种比对结果示意图;
- [0027] 图4是本发明实施例一提供的一种基因芯片布局图;
- [0028] 图5是本发明实施例二提供的一种显色结果示意图;
- [0029] 图6是本发明实施例二提供的另一种显色结果示意图;
- [0030] 图7是本发明实施例五提供的为蛋白含量的标准曲线;
- [0031] 图8是本发明实施例五提供的Westernblot检测结果示意图;
- [0032] 图9是本发明实施例六提供的为蛋白含量的标准曲线;
- [0033] 图10是本发明实施例六提供的Westernblot检测结果示意图。

具体实施方式

- [0034] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0035] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0036] 实施例一、基因芯片的制备
- [0037] 首先,可以根据申请号为“201710429915.8”、专利名称为“一种突变蛋白的检测方法及装置”的中国发明专利中描述的检测方法,确定出人的精子抗原-36突变蛋白的编码基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示;相应地,根据该编码基因确定出人的精子抗原-36突变蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
- [0038] 其次,根据人的精子抗原-36突变蛋白及其编码基因,按照如下方式实现基因芯片的制备。
- [0039] 1、核苷酸探针的设计
- [0040] (1)核苷酸探针的设计:核苷酸探针根据人的精子抗原-36突变蛋白的核苷酸序列,与人的精子抗原-36正常蛋白的核苷酸序列的比对结果来确定,并根据如下探针的设计原则,设计出针对人的精子抗原-36突变蛋白的特异性的核苷酸探针。

[0041] 其中,核苷酸探针设计的原则如下:

[0042] ①核苷酸探针T_m值应接近整个基因组的平均T_m值,上下波动5℃;

[0043] ②核苷酸探针分子内重复的单一碱基连续不超过4个;

[0044] ③G+C含量为40%-60%,减少非特异性杂交保证杂交的特异性;

[0045] ④核苷酸探针序列中与探针分子内部稳定二级结构配对的碱基长度应少于4bp,这样可以保证不会因核苷酸探针内部稳定的二级结构而影响杂交效率;

[0046] ⑤经同源比较与其他序列的相似性小于40%;

[0047] ⑥经对比与非探针备选序列的同源片段连续不超过20个碱基。

[0048] 其中,人的精子抗原-36突变蛋白对应的氨基酸序列与人的精子抗原-36正常蛋白对应的氨基酸序列的比对结果请参考图1,其中,图1中的Query序列是人的精子抗原-36突变蛋白对应的氨基酸序列,Sbjct序列是人的精子抗原-36正常蛋白对应的氨基酸序列,Query序列与Sbjct序列之间的序列为比对结果,根据图1可知,人的精子抗原-36突变蛋白相对于人的精子抗原-36正常蛋白,有部分氨基酸序列发生了突变。根据SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列,以及图1的比对结果,为了能够特异性识别待检测对象的精子抗原-36是否发生了突变,那么在选取核苷酸探针时,可以将包含有突变位置核苷酸的一条核苷酸序列作为核苷酸探针。

[0049] 在本实施例中,根据SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列以及根据上述核苷酸探针设计原则,按照上述方式设计一种优选地核苷酸探针如SEQ ID NO:3所示,该核苷酸探针为:
aagggtacac aggcaaga

[0050] (2)核苷酸探针的合成:通过核苷酸序列合成上述设计好的核苷酸探针。

[0051] 在将人的精子抗原-36突变蛋白在NCBI中比对时,比对上了猕猴的葡萄糖-6-磷酸异构酶正常蛋白,其比对结果请参考图2,图2中Query序列是人的精子抗原-36突变蛋白对应的氨基酸序列,Sbjct序列是猕猴的葡萄糖-6-磷酸异构酶正常蛋白对应的氨基酸序列,Query序列与Sbjct序列之间的序列为比对结果。

[0052] 同时,在将人的精子抗原-36突变蛋白在NCBI中比对的过程中,得到了与东非狒狒的葡萄糖-6-磷酸异构酶正常蛋白的比对结果,请参考图3,图3中Query序列是人的精子抗原-36突变蛋白对应的氨基酸序列,Sbjct序列是东非狒狒的葡萄糖-6-磷酸异构酶正常蛋白对应的氨基酸序列,Query序列与Sbjct序列之间的序列为比对结果。

[0053] 2、检测人的精子抗原-36是否发生突变的基因芯片的制备

[0054] 为了保证检测对象样品的质量,还需在基因芯片上设计空白对照、阳性对照和阴性对照。其中,该基因芯片的布局至少可以为如图4所示的一种布局。在图4中,□为空白对照,○为阴性对照,⬡为阳性对照,☆为实验组。

[0055] 其中,实验组的位置即为核苷酸探针的点样位置。

[0056] 对于空白对照、阴性对照所需点样的阴性内参质控探针、以及阳性对照所需点样的阳性内参质控探针设计如下:

[0057] 空白对照:是不含任何基因片段的空白点样液作为芯片制备过程中的污染监控指标。

[0058] 阴性内参质控探针:是一段与检测基因没有同源性的其他基因片段,作为杂交过程中非特异性杂交的监控指标,阴性内参质控探针包括的核苷酸个数可以与核苷酸探针的

碱基个数相同,也可以不同。本发明实施例中,基因芯片所需的阴性内参探针序列可以为:tgatgctgat aattgcat。

[0059] 阳性内参质控探针:是一段与检测基因有同源性的其他基因片段,在人的精子抗原-36突变蛋白中,选择与核苷酸探针对应的序列不同,且可以与核苷酸探针碱基的个数相同,也可以与核苷酸探针碱基的个数不同的一段核苷酸序列作为阳性内参质控探针。优选地,选取核苷酸个数与核苷酸探针碱基的个数相同的阳性内参质控探针。本发明实施例中,基因芯片所需的阳性内参探针序列可以为:gatgccaca aggaccgc。

[0060] 需要说明的是,在基因芯片的点样过程中,按照基因芯片的布局点入阴性内参探针和阳性内参探针溶液;空白对照所用的试剂为1倍的点样缓冲液(10%海藻糖溶液)。

[0061] 实施例二、基因芯片的应用

[0062] 1、样品处理

[0063] (1) 采集检测对象的血液1-3mL。

[0064] (2) 取DEPC处理的1.5mL EP管,将其作为被检测样品处理管,在被检测样品处理管中加入检测对象的血液300μL,再加入Trizol 700μL,充分混匀,室温放置10min。

[0065] (3) 加入140μL的氯仿,盖紧管盖,用力震荡,室温放置3-5min,置于离心机中,12000r/min,4℃离心15min,小心吸取离心管中上清,将吸取的上清转移到干净的离心管中。

[0066] (4) 在储存有步骤(3)中上清的离心管中加入等体积异丙醇,轻轻颠倒离心管充分混匀液体,室温放置10min,12000r/min,4℃离心15min,小心吸去所有上清。

[0067] (5) 用1mL 75%的乙醇清洗一次,7500r/min,4℃离心15min,小心吸去所有上清,在超净台中干燥15min,加入10μL DEPC处理水溶解。

[0068] (6) 所得产物为RNA,如果总RNA的纯度不高,会影响探针的标记效率和芯片杂交结果。所以使用QIAGENRNeasy®Kit纯化总RNA。

[0069] 2、cDNA第一链和第二链一步法合成

[0070] (1) 取2μg RNA于1.5mL的离心管中配置如下反应溶液:

[0071]

总RNA	2μg最多6.5μL
T7 Promotor primer	5μL
RNase-free Water	XμL
总体积	11.5μL

[0072] 其中,RNase-free Water的加入量XμL,是根据总体积11.5μL减去T7Promotor primer的加入量5μL,再减去总RNA的加入量计算得来的。

[0073] (2) 在65℃下保温10min,并冰浴5min,将5×First Strand Buffer在65℃下预热5min。

[0074] (3) 配置如下cDNA合成体系:

[0075]

5×First Strand Buffer	4μL
0.1M DTT	2μL
10mM dNTP mix	1μL

MMLV RT	1μL
RNase OUT	0.5μL
总体积	8.5μL

[0076] (4) 将上述8.5μL混合均匀后加入变性后冰浴的RNA中。

[0077] (5) 用枪头混匀之后离心。

[0078] (6) 40℃反应2h。

[0079] 3、aaUTP标记cRNA合成

[0080] NTP的配置：

[0081]

100mM ATP	250μL
100mM GTP	250μL
100mM CTP	250μL
100mM UTP	187.5μL
RNase free H ₂ O	62.5μL
总体积	1000μL

[0082] 分装成10管备用，注：50%PEG (聚乙二醇) 使用之前40℃保温1min。同时按如下操作配置Transcriptionmix；

[0083] (1) 配置Transcriptionmix

[0084]

RNase-free Water	5.7μL
4×Transcription Buffer	20μL
NTP	16μL
0.1M DTT	6μL
50%PEG	6.4μL
aa-UTP (25mM)	4μL
Inorganic Pyrophosphatase	0.6μL
T7 RNA Polymerase	0.8μL
总体积	60μL

[0085] (2) 加入60μL Transcription mix并混匀。

[0086] (3) PCR仪中热盖60℃, 40℃反应2h。

[0087] 4、cRNA纯化

[0088] QIAGEN RNeasy Mini kit纯化cRNA, 具体方法可参见QIAGEN公司随试剂盒提供的操作手册。

[0089] (1) 加入20μL RNase free水, 加入350μL Buffer RLT并充分混匀。

[0090] (2) 加入250μL无水乙醇, Tip头充分混匀。

[0091] (3) 将共计700μL含总RNA的溶液转入套在2mL离心管内的RNeasy柱子内≥8000g离心15-30s, 弃去滤过液。

[0092] (4) 吸取500μL Buffer RPE到RNeasy mini柱子内≥8000g离心洗涤15-30s弃去滤过液再用500μL Buffer RPE在≥8000g离心洗涤2min弃去滤过液和2mL的套管将

RNeasymini柱子转入一新的1.5mL Eppendorf管中。

[0093] (5) 吸取30 μ L RNase free的水静置1min, $\geq 8000g$ 离心洗脱1min。

[0094] (6) 重复步骤(5)一次。

[0095] 5、cRNA浓度测定

[0096] 用分光光度计分析cRNA浓度。需要测定260nm和280nm处的吸光值来确定样品的浓度和纯度, A260/A280应接近2.0为较纯的cRNA (比值在1.9-2.1也可)。

[0097] 6、cRNA样品荧光标记;

[0098] (1) 取上述cRNA4 μ g并浓缩至6.6 μ L。

[0099] (2) 加10 μ L DMSO混匀。

[0100] (3) 加3.4 μ L的0.3M pH为9.0的碳酸氢钠(NaHCO₃)并混匀。

[0101] (4) 将上述20 μ L cRNA混合物加入到荧光染料Cy3中并混匀。25℃保温1h。

[0102] (5) 加9 μ L的4M Hydroxylamine混匀后25℃保温15min。

[0103] 7、荧光标记cRNA样品纯化

[0104] 具体步骤同本实施例的步骤4中cRNA纯化的过程, 本步骤不在赘述。

[0105] 8、cRNA样品片段化和芯片杂交4x44Kmicroarrays

[0106] (1) 按下表配制片段化混合液然后在60℃温浴30min进行片段化。

[0107]

Cy3 cRNA绿色荧光	875ng
10 \times Blocking Agent	11 μ L
25 \times Fragmentation Buffer	2.2 μ L
Nuclease-free water	X μ L
总体积	55 μ L

[0108] (2) 加入55 μ L 2 \times GEx HybridizationBuffer。

[0109] (3) 取100 μ L杂交液滴加到芯片皿上, 同时按芯片布局如图4所示分别滴加在空白、阴性、阳性、实验组位置上。盖上芯片并密封于杂交盒中, 60℃滚动杂交16h。

[0110] 9、芯片洗涤

[0111] 洗液1 (1L) 配置:

[0112]

DEPC-H ₂ O	700mL
20 \times SSPE	300mL
20%N-Lauroylsarcosine	0.25mL

[0113] 洗液2 (1L) 配置:

[0114]

DEPC-H ₂ O	997mL
20 \times SSPE	3.0mL
20%N-Lauroylsarcosine	0.25mL

[0115] 洗液3:Stabilization and Drying Solution

[0116] (1) 取出芯片于洗液1中洗涤1min;

[0117] (2) 再将芯片放入洗液2中洗涤1min (37℃);

[0118] (3)最后将芯片于洗液3中洗涤30s。

[0119] 10、芯片扫描

[0120] 将芯片在扫描仪中进行扫描,根据扫描结果确定检测对象的精子抗原-36蛋白是否发生了突变。请参考图5和图6,图5所示的结果中,阴性对照无绿色荧光,阳性对照为绿色荧光,表明采集检测对象的样品质量是没有问题的,而实验组为绿色荧光,那么表明检测对象的精子抗原-36蛋白发生了突变。图6所示的结果中,阴性对照为无色荧光,阳性对照为绿色荧光,表明采集检测对象的样品质量是没有问题的,而实验组无绿色荧光,那么表明检测对象的精子抗原-36蛋白未发生突变。

[0121] 实施例三、特异性识别人的精子抗原-36突变蛋白的单克隆抗体的制备

[0122] 1、根据人的精子抗原-36突变蛋白的碱基序列(如SEQ ID NO:2所示)设计上游引物如SEQ ID NO:4所示,以及,下游引物如SEQ ID NO:5所示:

[0123] 上游引物(F):atggccgctc tcacccgg

[0124] 下游引物(R):tcttgccctgt gtaccctt

[0125] 2、检测对象的DNA为模板进行PCR扩增

[0126]

10×Buffer	5uL
dNTP	2uL
Ex Taq	1uL
ddH ₂ O	5uL
模板DNA	1uL
引物(F)	3uL
引物(R)	3uL
总体系	20uL

[0127] 以检测对象的DNA为模板进行PCR扩增,获得人的精子抗原-36突变蛋白基因完整片段,并连接pMD19-TVector (Takara公司),进行测序。然后由专门的生物公司制备抗体,是一种人源化或嵌合型抗体。将制备的抗体采用ELISA法测定含量。

[0128] 实施例四、用于检测人的精子抗原-36突变蛋白的抗体的ELISA试剂盒

[0129] 本实施例中,ELISA试剂盒的组成为:包被有实施例三所述单克隆抗体的ELISA酶标板、酶标二抗、检测对象的精子抗原-36蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、ELISA酶标板洗涤液、显色液和终止液。

[0130] 其中,上述各个组成的参数至少可以为如下一种参数:

[0131] ELISA酶标板可以为96孔的ELISA酶标;

[0132] 酶标二抗可以是稀释的HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗人IgG;其中,稀释倍数可以是8000倍。

[0133] 包被缓冲液可以是1×PBS,pH:7.4;

[0134] ELISA酶标板洗涤液可以是含0.05%Tween-20的1×PBS溶液;

[0135] 显色液可以是3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

[0136] 终止液可以是2mol/L的硫酸溶液。

[0137] 实施例五

[0138] 在本发明实施例中,将红斑狼疮患者作为检测对象,并利用ELISA试剂盒检测该红斑狼疮患者的精子抗原-36蛋白是否发生了突变,该方法至少可以包括如下一种:

[0139] a、使用所述包被缓冲液将实施例三制备的单克隆抗体进行稀释,例如,稀释成2.0ug/mL,并将稀释后的单克隆抗体加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育1-2h。

[0140] b、使用样品稀释液将红斑狼疮患者的精子抗原-36蛋白稀释成不同浓度梯度,并将不同浓度梯度的精子抗原-36蛋白分别加样至ELISA酶标板的孔中,并室温孵育1-2h;

[0141] c、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;

[0142] d、加入所述酶标二抗,并室温孵育1-2h;

[0143] e、甩去各孔中的液体,加入ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;

[0144] f、加入所述显色液,室温避光孵育10-20min,加入所述终止液终止反应;

[0145] g、在酶标仪上测定波长为450nm处的吸光值。

[0146] h、制作标准曲线:以标准品浓度为横坐标,标准品测定的吸光值为纵坐标,作出标准曲线;计算标准曲线回归系数 R^2 ,当 $R^2 > 0.99$ 时本次测定有效;其中,可以使用ELISA Calc软件绘制该标准曲线,根据该ELISA Calc软件可以获知回归系数 $R^2 = 0.99907$,因此,本次测定有效。将检测得到的波长为450nm处的吸光值代入标准曲线即可求得红斑狼疮患者的精子抗原-36蛋白的浓度。利用建立的ELISA方法检测红斑狼疮患者血清样品中精子抗原-36蛋白的含量。并用Western blot进行鉴定。请参考图7,为吸光值的标准曲线。其中,X轴为吸光值,Y轴为对应的浓度。

[0147] i、Westernblot鉴定

[0148] 1、制胶

[0149] (1) 清洗玻璃板并擦干;

[0150] (2) 参考分子克隆方法配制SDS-PAGE胶:

[0151] A. 下层分离胶配制体系 (Total Volum:15mL)

[0152]	ddH ₂ O	5.9 mL
	30%丙烯酰胺混合液	5.9 mL

[0153]	1.5 mol/L Tris (PH 8.8)	3.8 mL
	10% SDS	0.15 mL
	10%过硫酸铵	0.15 mL
	TEMED	0.006 mL

[0154] B. 上层积层胶浓缩配制体系 (Total Volum:8mL)

[0155]

ddH ₂ O	5.5mL
30%丙烯酰胺混合液	1.3mL
1.0mol/L Tris (PH6.8)	1.0mL
10%SDS	0.08mL

10%过硫酸铵	0.08mL
TEMED	0.008mL

[0156] (3) 在每个胶板中加入相应体积的下层分离胶,再加入1mL的无菌ddH₂O,压平分离胶,待分离胶凝固后,用滤纸吸干制胶板中剩余的水分,而后加入上层浓缩胶,插入梳子后等待上层浓缩胶凝固。

[0157] 2、蛋白上样电泳:

[0158] (1) 拔下梳子,做好孔道标记,加入5×SDS电泳缓冲液,随后给蛋白样品中加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×),沸水浴加热3-5min,上样;

[0159] (2) 先用80V电压进行电泳,待条带跑过浓缩胶之后,换用100V电压跑大约100min。

[0160] 3、转膜及孵育:

[0161] (1) 先把PVDF膜在甲醇中活化约30s。分别将凝胶、海绵垫和PVDF膜预先在电转移缓冲液中平衡30min。按滤纸-胶-膜-滤纸的顺序夹好,按照黑面对黑面的原则放入转膜器中,加入制冷器(冰袋),在冰中以150mA的电流跑约120min;

[0162] (2) 完成后将膜取出,立刻放入5%的脱脂牛奶中,摇床上轻轻室温封闭1h;

[0163] (3) PBST清洗已封闭的膜,清洗3次,每次10min;

[0164] (4) 加入稀释到相应倍数的一抗,4℃摇床过夜孵育;

[0165] (5) 回收一抗,PBST清洗膜3次,每次10min;

[0166] (6) 二抗(用3%的牛奶以1:5000-1:10000稀释)室温孵育膜2h;

[0167] (7) 用PBST清洗膜3次,每次10min;

[0168] (8) Pierce ECL Western Blotting Substrate试剂盒A、B液等体积混匀后,逐滴滴加在PVDF膜上;

[0169] (9) FluorChem E FE0511中曝光成像,实验用Image J分析。

[0170] 其中,一抗是公司制备的人的精子抗原-36突变蛋白单克隆抗体,二抗是辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG。

[0171] j、Western blot检测结果分析:按照Western blot实验步骤显示结果,如图8所示,其中,图8中的Marker用于表征标记蛋白的大小。与空白对照相比,仅在实验组36KD附近出现明显条带,其中,精子抗原-36突变蛋白分子量大约为36KD,表明该红斑狼疮患者的精子抗原-36蛋白确实存在突变。

[0172] 实施例六

[0173] 在本发明实施例中,将免疫性肾病患者作为检测对象,并利用ELISA试剂盒检测该免疫性肾病患者的精子抗原-36蛋白是否发生了突变,该方法至少可以包括如下一种:

[0174] a、使用所述包被缓冲液将实施例三制备的单克隆抗体进行稀释,例如,稀释成2.0ug/mL,并将稀释后的单克隆抗体加样至ELISA酶标板的孔中,室温孵育1-2h;

[0175] b、使用样品稀释液将检测对象的精子抗原-36蛋白稀释成不同浓度梯度,并将不同浓度梯度的精子抗原-36蛋白分别加样至ELISA酶标板的孔中,并室温孵育1-2h;

[0176] c、甩去各孔中的液体,加入所述ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;

[0177] d、加入所述酶标二抗,并室温孵育1-2h;

[0178] e、甩去各孔中的液体,加入ELISA酶标板洗涤液,洗涤并甩干;

[0179] f、加入所述显色液,室温避光孵育10-20min,加入所述终止液终止反应;

[0180] g、在酶标仪上测定波长为450nm处的吸光值。

[0181] h、制作标准曲线：以标准品浓度为横坐标，标准品测定的吸光值为纵坐标，作出标准曲线；计算标准曲线回归系数 R^2 ，当 $R^2 > 0.99$ 时本次测定有效；其中，可以使用ELISA Calc软件绘制该标准曲线，根据该ELISA Calc软件可以获知回归系数 $R^2 = 0.99854$ ，因此，本次测定有效。将检测得到的波长为450nm处的吸光值代入标准曲线即可求得样品中免疫性肾病患者的精子抗原-36蛋白的浓度。利用建立的ELISA方法检测免疫性肾病患者血清样品中精子抗原-36蛋白的含量。并用Westernblot进行鉴定。请参考图9，为吸光值的标准曲线。其中，X轴为吸光值，Y轴为对应的浓度。

[0182] i、Westernblot鉴定

[0183] j、Westernblot检测结果分析

[0184] 其中，步骤i和步骤j与实施例五中的相同，在此不再赘述，请参考图10，图10中的Marker用于表征标记蛋白的大小。本实施例的实验显示结果，与空白对照相比，仅在实验组36KD附近出现明显条带，其中，精子抗原-36突变蛋白分子量大约为36KD，表明该免疫性肾病患者的精子抗原-36蛋白确实存在突变。

[0185] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，并不用于限制本发明，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明技术原理的前提下，还可以做出若干改进和变型，这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 天津市湖滨盘古基因科学发展有限公司

<120> 一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 147

<212> PRT

<213> 智人种 (Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

145

<210> 2

<211> 441

<212> DNA

<213> 智人种 (Homo sapiens)

<400> 2

```

atggccgctc tcacccggga cccccagttc cagaagctgc agcaatggta ccgcgagcac 60
cgctccgagc tgaacctgcg ccgcctcttc gatgccaaca aggaccgctt caaccacttc 120
agcttgaccc tcaacaccaa ccatgggcat atcctggtgg attactccaa gaacctggtg 180

```

acggaggacg tgatgcggat gctggtggac ttggccaagt ccaggggcgt ggaggccgcc 240
cgggagcgga tgttcaatgg tgagaagatc aactacaccg agggtcgagc cgtgctgcac 300
gtggctctgc ggaaccggtc aaacacaccc atcctggtag acggcaagga tgtgatgcca 360
gaggtcaaca aggttctgga caagatgaag tctttctgcc agcgtgtccg gagcggtgac 420
tggaagggtg cacaggcaag a 441

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

aagggtacac aggcaaga 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

atggccgctc tcacccgg 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

tcttgccctgt gtaccctt 18

sperm antiger-36 [Homo sapiens]

Sequence ID:gb|AAF22645.1|AF187554_1 Length:558 Number of Matches:1

Related Information

Range 1: 1 to 147 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
301 bits(772)	3e-98	Compositional matrix adjust.	143/147 (97%)	144/147 (97%)	0/147 (0%)

Query 1 MAAL TRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTLNTNHGHILVDYSKNLV 60

MAAL TRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTLNTNHGHILVDYSKNLV

Sbjct 1 MAAL TRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTLNTNHGHILVDYSKNLV 60

Query 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP 120

TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP

Sbjct 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP 120

Query 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKGTQAR 147

EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKG +

Sbjct 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKGYTGK 147

图1

PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase [Macaca mulatta]

Sequence ID:ref|XP_014979005.1| Length:291 Number of Matches:1

Related Information

Range 1: 1 to 147 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
297 bits(760)	5e-100	Compositional matrix adjust.	140/147 (95%)	143/147 (97%)	0/147 (0%)

Query 1 MAAL TRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTLNTNHGHILVDYSKNLV 60

MAAL TRDPQFQKLQQWYREH SELNLRRLFDA+KDRFNHFSLTLNTNHGHIL+DYSKNLV

Sbjct 1 MAAL TRDPQFQKLQQWYREHSELNLRRLFDADKDRFNHFSLTLNTNHGHILLDYSKNLV 60

Query 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP 120

TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP

Sbjct 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTP ILVDGKD VMP 120

Query 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKGTQAR 147

EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKG +

Sbjct 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRSGDWKGYTGK 147

图2

PREDICTED: glucose-6-phosphate isomerase [Papio anubis]

Sequence ID:ref|XP_009192379.1| Length:326 Number of Matches:1

Related Information

Gene-associated gene details

Map Viewer-aligned genomic context

Range 1: 1 to 147 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
297 bits(761)	1e-99	Compositional matrix adjust.	140/147 (95%)	143/147 (97%)	0/147 (0%)

Query 1 MAALTRDPQFQKLQQWYREHRSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTNTNHGHILVDYSKNLV 60

MAALTRDPQFQKLQQWYREH SELNLRRLFDA+KDRFNHFSLTNTNHGHIL+DYSKNLV

Sbjct 1 MAALTRDPQFQKLQQWYREHGSSELNLRRLFDADKDRFNHFSLTNTNHGHILLDYSKNLV 60

Query 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTPILVDGKD VMP 120

TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTPILVDGKD VMP

Sbjct 61 TEDVMRMLVDLAKSRGVEAARERMFNGEKINYTEGRAVLHVALRNRSNTPILVDGKD VMP 120

Query 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRS GDWKG TQAR 147

EVNKVLDKMK SFOQRVRS GDWKG +

Sbjct 121 EVNKVLDKMK SFOQRVRS GDWKG YTGK 147

图3



图4

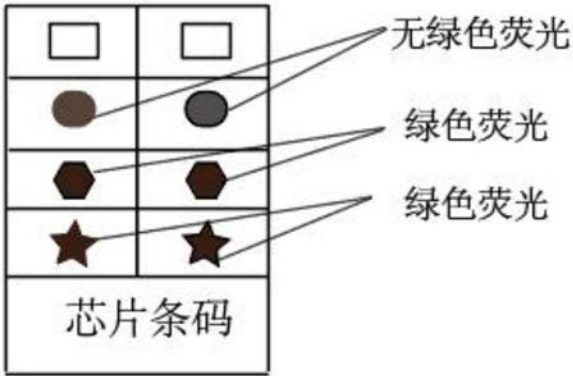


图5

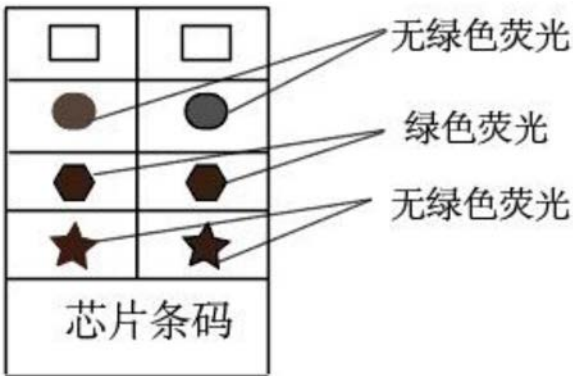


图6

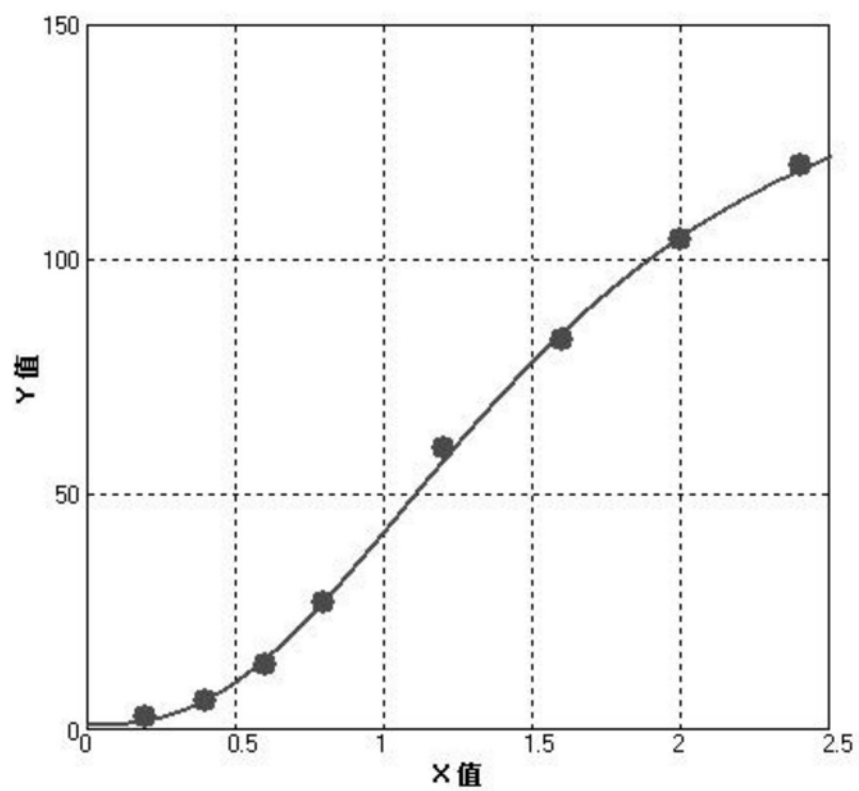


图7

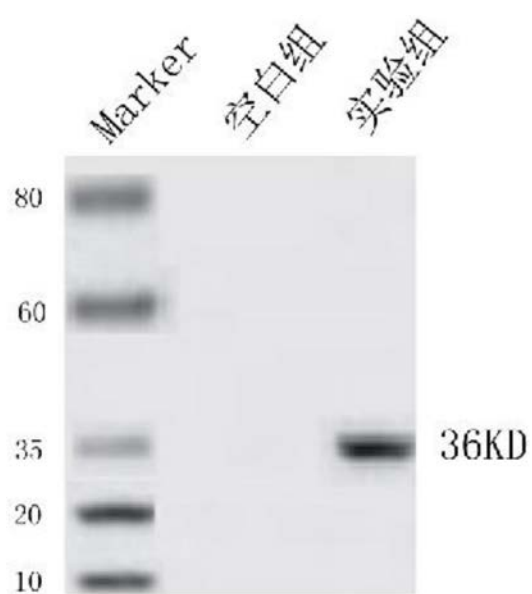


图8

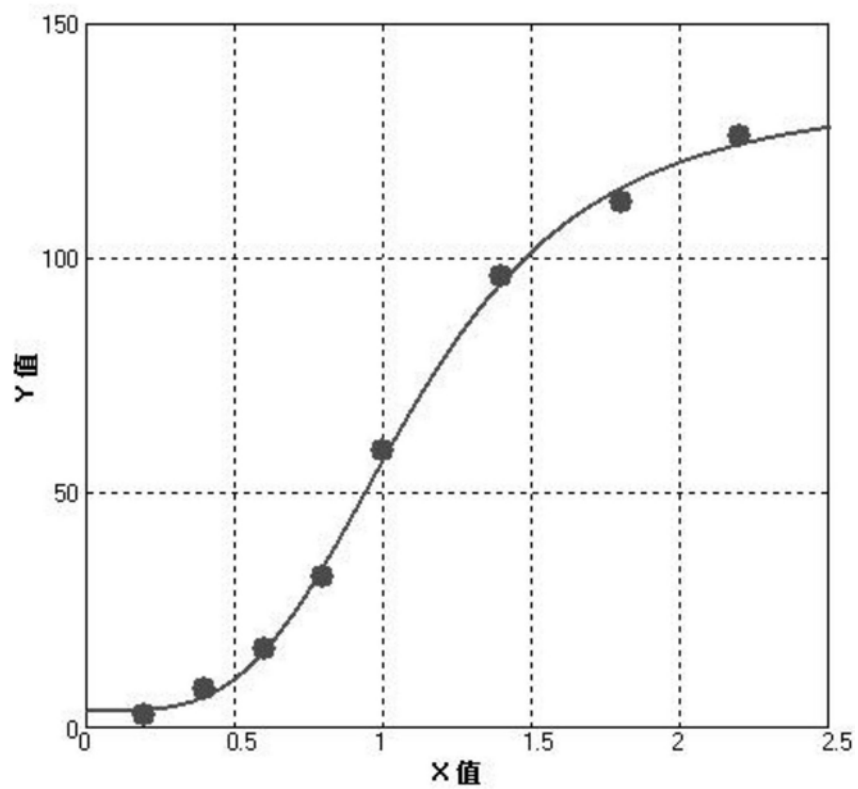


图9

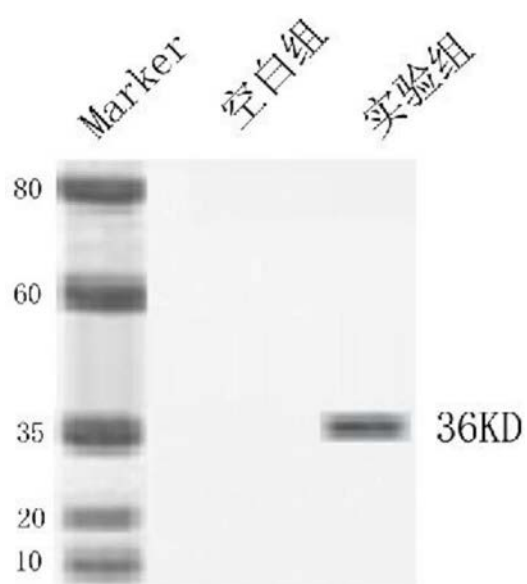


图10

专利名称(译)	一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN108546293A	公开(公告)日	2018-09-18
申请号	CN201810261499.X	申请日	2018-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	天津市湖滨盘古基因科技发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津市湖滨盘古基因科技发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津市湖滨盘古基因科技发展有限公司		
[标]发明人	张耀洲 吴玉乾 冯建华 李冬梅 张树军 陈玉皎 王文雅		
发明人	张耀洲 吴玉乾 冯建华 李冬梅 张树军 陈玉皎 王文雅		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/12 C07K16/18 C12Q1/6883 C40B40/08 G01N33/535 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C40B40/08 G01N33/535 G01N33/574 G01N33/577 G01N2800/24		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种人的精子抗原-36突变蛋白及其应用，通过将大量免疫系统疾病患者作为研究病例，对病例进行基因检测并分析，确定出人的精子抗原-36的突变蛋白，根据该人的精子抗原-36的突变蛋白制备基因芯片、单克隆抗体和ELISA试剂盒，为免疫系统疾病的基因诊断提供指引作用，并为疾病的诊断和治疗提供一定的理论基础。

