



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884309 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201711500427.8

(22)申请日 2017.12.25

(71)申请人 苏州和锐生物科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖
街218号B2-313室

(72)发明人 李振军 陈菲

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

C07K 14/195(2006.01)

C07K 17/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

肠道菌多肽、抗体捕获器件及试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种SEQ ID:1所示肠道菌多肽的核心序列、含核心序列的肠道菌多肽、抗体捕获器件、试剂盒及检测方法,属于免疫学技术领域。本发明的技术方案是克隆表达含有SEQ ID:1核心序列的肠道菌多肽,通过固相载体及其上含核心序列的多肽捕获样本中的抗体,达到辅助诊断克罗恩病的作用。

1. 一种SEQ ID:1所示肠道菌多肽,其特征在于,包含3个核心序列及连接序列xxx。
2. 权利要求1所述的肠道菌多肽,其特征在于,连接序列xxx可变异,优选地,为SEQ ID:2、SEQ ID:3或SEQ ID:4多肽。
3. 一种抗体捕获器件,其特征在于,固相载体及其上包被的权利要求1~2所述的肠道菌多肽。
4. 权利要求3所述的固相载体,其特征在于,包括但不限于荧光微球、乳胶微球、树脂微球、磁性微球、胶体金颗粒、微孔板、薄膜、微孔膜、硝酸纤维素膜。
5. 一种克罗恩病检测试剂盒及方法,其特征在于,包括权利要求1~2所述的多肽或者权利要求3~4所述的抗体捕获器件,其方法包括步骤:
 - (1) 将样本作用于抗体捕获器件;
 - (2) 通过标记物测定样本中抗肠道菌多肽抗体的含量。
6. 权利要求5所述的样本,其特征在于,血清、血浆、全血、尿液或粪便。
7. 权利要求5所述的标记物,其特征在于,包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、吖啶酯、稀土元素、胶体金、彩色乳胶。

肠道菌多肽、抗体捕获器件及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肠道菌多肽的核心序列,及其包含多肽的抗体捕获器及试剂盒,属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一种自体免疫性肠病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)和克罗恩病(Crohn's disease,CD),近10多年来在我国发病率呈逐步增高趋势。IBD的临床表现复杂多样,不仅有消化道症状,还可有肠外表现。由于症状为腹痛、腹泻、便血等非特异性肠炎表现,CD与UC,以及IBD与结核性肠炎等其他肠道慢性疾病很难鉴别诊断。血清学指标有助于鉴别CD与UC,以及IBD与非IBD。

[0003] IBD的发病机理复杂,其中之一的机制是由于遗传、环境等因素影响,使肠道粘膜的屏障功能障碍,免疫系统对正常肠道存在的抗原产品免疫反应,表现为体内可检测到对肠道微生物抗原及代谢物的抗体。通过对这些抗体的检测,可辅助诊断自体免疫学肠病包括IBD。目前已明确的具有IBD辅助诊断作用的抗微生物抗体包括抗CBir1抗体、抗Fla-X抗体、抗 4aFla-2抗体等细菌鞭毛抗体,以及抗荧光假单胞菌I2抗体和抗大肠杆菌外膜孔道蛋白OmpC 抗体等。由于微生物基因的易变异性和多态性,新的微生物抗原不断出现,其中一些参与肠道粘膜的免疫调节。本发明所公布的肠道菌多肽与现有报道的IBD相关抗原多肽差异显著,但经过序列分析,发现与肠道菌多肽自身抗体产生有关的是某些核心序列,含有该核心序列的肠道菌多肽经临床确诊的患者样本验证,具有鉴别健康人与克罗恩病的能力。

发明内容

[0004] 本发明的第一方面,公布SEQ ID:1所示的肠道菌多肽及核心序列,连接核心序列之间的氨基酸序列可有多种变异。

[0005] 一个优选例中,所述多肽包含三个核心序列,为SEQ ID:2所示。

[0006] 另一个优选例中,所述多肽包含其中两个核心序列,为SEQ ID:3和SEQ ID:4所示。

[0007] 本发明的第二方面,提供一种抗体捕获器件的制备方法,把所述的肠道菌多肽直接或间接固定在固相载体上,用于捕获样本中的抗肠道菌抗体。

[0008] 固相载体包括微孔板、荧光微球、乳胶微球、树脂微球、磁性微球、薄膜、微孔膜、硝酸纤维素膜等。

[0009] 一个优选例中,固相载体为微孔板,另一个优选例中为磁性微球,第3个优选例中同时选了荧光微球和硝酸纤维素膜,第4个优选例中为胶体金。

[0010] 多肽固定在固相载体的方法是直接包被或通过载体蛋白间接包被,优选地,载体蛋白为 BSA,或者生物素-链酶亲和素。

[0011] 一个优选例中,把所述多肽与BSA偶联,然后再包被在固相载体上。

[0012] 另一个优选例中,先把多肽与生物素反应,然后把生物素化的多肽与链霉亲和素

偶联,形成多肽与链亲合素的复合物,再把复合物包被在固相载体上。

[0013] 本发明的第三方面,公开由前述的抗体捕获器件组成的试剂盒及在克罗恩病诊断中的应用,本发明所述的应用是基于免疫学反应,对样本中抗肠道菌抗体的测定方法,包括如下步骤:(1)待检测样本作用于抗体捕获器件,使样本中的抗肠道菌抗体与抗体捕获器件上的多肽结合;(2)通过标记物测定样品中抗肠道菌多肽抗体的含量。

[0014] 肠道菌抗原或抗原表位偶联物可通过目前任何一种免疫学检测方法检测样本中的抗肠道菌抗体,比如ELISA、板式化学发光、化学发光、免疫层析、免疫渗滤等等,所对应的标记物分别为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、吖啶酯、稀土元素和胶体金等。

[0015] 实施例4提供两种抗肠道菌抗体的酶促板式检测方法,肠道菌多肽包被在微孔板上,与样本中的抗体反应形成抗原-抗体复合物,把抗人IgG和IgA酶标记,所用的酶为辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶,所用的样本为粪便和尿液。

[0016] 实施例5提供一种吖啶酯标记的化学发光检测方法,所述肠道菌多肽生物素化后通过与链亲合素包被在磁性微球上,与血浆样本中的待检抗体反应形成抗原抗体复合物,清洗后用吖啶酯标记的抗人抗体对抗原抗体复合物进行定量检测。该检测方法具有灵敏度高、检测时间短、全自动检测等优点。

[0017] 实施例6提供一种抗肠道菌多肽抗体的荧光免疫层析方法,所述方法是把肠道菌多肽直接或通过生物素-链亲合素包被到含稀土元素的荧光微球上,同时把多肽包被到检测线T线上,形成双抗原夹心法检测血清样本中的抗肠道菌抗体含量。该检测方法具有快速、检测时间短、灵敏度高等优点。

[0018] 实施例7提供一种抗肠道菌多肽抗体的胶体金或彩色乳胶层析方法,所述方法是把肠道菌多肽用胶体金颗粒或彩色乳胶微球标记,喷在样品垫上,同时把多肽包被在检测线T线上,形成双抗原夹心法检测全血样本中抗肠道菌多肽抗体。该检测方法可肉眼观察结果,具有快捷、仪器成本小等优点。

[0019] 与现有技术相比,本发明提供的肠道菌多肽及抗体捕获器件,用于克罗恩病时,具有灵敏度高、性能稳定、操作简单等优点。

附图说明

[0020] 图1化学发光定量检测标准曲线

[0021] 图2化学发光定量检测的特异性与灵敏度

[0022] 图3荧光免疫层析试剂标准曲线

具体实施方式

[0027] 本发明所用的生物素、羊抗人IgG、羊抗人IgA购自Sigma和Abcam。亲和素购自盘古基因。磁性微球及预包被有链霉亲和素的磁性微球购自南京迪格诺斯。微孔板购自苏州海狸。乳胶微球、彩色乳胶微球、树脂微球购自天津赛尔群。稀土元素荧光微球及时间分辨荧光阅读器购自深圳微测。其他试剂购自国药试剂和上海生工。

[0028] 下面结合具体实施例和附图,进一步阐述本发明。

[0029] 实施例1 肠道菌多肽的制备

[0030] 1、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4多肽制备

[0031] SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4全基因组序列由金唯智合成。

[0032] 1) 试剂

[0033] 克隆载体pCR2.1 T-vector,表达质粒pET28a(+),转染大肠杆菌宿主菌DH5 α 、BL21 (DE3), DNA聚合酶rTaq,T4DNA连接酶,DNA聚合酶rTaq、LA Taq以及限制性内切酶BamH I、Hind III和EcoR I、BamH I,DL2000DNA Marker、T4DNA连接酶,低分子量标准蛋白,DNA胶回收试剂盒,IPTG等

[0034] 2) 仪器

[0035] 普通摇床SCS-24;隔水式恒温电热培养箱;Biophotometer分光光度计、台式冷冻离心机Centrifuge5810R、台式离心机MiniSpin;高速冷冻离心机;蛋白质电泳仪以及凝胶成像系统;PCR仪;超声裂解仪;恒温金属浴;HIS蛋白纯化柱等。

[0036] 2. 实验方法

[0037] 1) 载体构建:

[0038] 设计引物,从模板DNA中PCR扩增出SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4片段,胶回收试剂盒回收片段后连接到pCR2.1克隆载体进行测序鉴定。将鉴定正确的序列克隆至表达载体pET28a(+)中,酶切位点为EcoR I、BamH I,同时载体上有6 $\times$ HIS标签,便于后续的蛋白纯化。

[0039] 2) 表达

[0040] 将得到的质粒转化至大肠杆菌BL21 (DE3),通过抗性筛选阳性表达菌株。将筛选出来的阳性菌液按1:1000的比例接种加有Kan抗性的LB培养基中,每个菌接种两管,一管用于诱导,另一管用于非诱导对照,同时要接种一管空质粒菌作对照。37 $^{\circ}$ C过夜培养至OD600值约为0.4-0.6时,诱导管和空质粒对照管加入IPTG至终浓度为1mmol/L,非诱导对照不加,最终选择表达能力高的两个菌,用于大量的蛋白的表达。并按照常规的SDS-PAGE方法对表达产物进行鉴定。

[0041] 3) 纯化

[0042] 将表达的产物用HIS蛋白纯化柱纯化蛋白,并透析脱盐,纯化后的SEQ ID:2、SEQ ID:3 和SEQ ID:4低温保存备用。

[0043] 实施例2 制备抗肠道菌多肽抗体

[0044] 1. 动物免疫

[0045] 分别用SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4免疫小鼠,免疫剂量为50 μ g/只。产生阳性血清后,加强免疫一次后进行细胞融合。

[0046] 如需要制备多克隆抗体,可同样方法免疫山羊或兔子,取血清获得多克隆抗体。

[0047] 2. 细胞融合

[0048] PEG1500预温,吸取 1×10^7 个SP2/0骨髓瘤细胞悬液和 5×10^7 个免疫后的小鼠脾脏B淋巴细胞悬液(细胞数1:5)与预温的50%PEG1500溶液融合,离心弃上清,加入10ml HAT (SIGMA) 培养基重悬细胞,接种至已铺有滋养细胞的96孔细胞培养板进行培养。

[0049] 3. 筛选和克隆

[0050] 融合细胞培养10-14天后,用SEQ ID:2、SEQ ID:3或SEQ ID:4包被微孔板进行筛选,阳性孔进行有限稀释,然后再培养10~14天,如此反复3~4次,获得抗SEQ ID:2单抗细胞株、抗SEQ ID:3单抗细胞株以及抗SEQ ID:4单抗细胞株。

[0051] 4.腹水制备

[0052] 单克隆细胞接种小鼠腹腔,待小鼠腹水积聚后收集腹水。将腹水在4℃条件下,10000转/分钟离心10分钟,去除脂类物质。离心后吸取上清,并用0.45μm膜过滤。protein G 进行纯化。纯化后的单抗浓度测定、分装、冻存储备用。

[0053] 实施例3 抗肠道菌抗体捕获器件制备

[0054] 1、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4包被微孔板

[0055] 用磷酸盐缓冲液配制SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4的浓度约为5ug/mL,每孔100uL 包被96孔微孔板,4℃过夜,弃去包被液,洗板一次,用含1%小牛血清的封闭缓冲液每孔 200uL,37℃孵育2小时,拍干,烘干备用。

[0056] 2、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4包被磁性微球

[0057] 取适量氨基磁性微球,以PBS缓冲液清洗并重悬,加入5%戊二醛溶液,室温搅拌反应1 小时;以PBS缓冲液清洗并重悬,超声分散后,按100μg/mg磁性微球加入SEQ ID:2、SEQ ID:3 或SEQ ID:4后室温反应6小时;以PBS缓冲液清洗并重悬,加入1%BSA封闭30分钟后,再加入1%甘氨酸封闭30分钟后以PBS缓冲液清洗后重悬,即得SEQ ID:2磁性微球、SEQ ID:3 磁性微球和SEQ ID:4磁性微球。

[0058] 3、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4生物素化

[0059] 取生物素、二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于DMF中,室温磁力搅拌反应3小时,离心收集上清液;将上清液逐滴加入到SEQ ID:2、SEQ ID:3或SEQ ID:4溶液中,2-8℃搅拌反应6小时;将反应液取出用磷酸盐缓冲液透析,得到生物素化SEQ ID:2、生物素化SEQ ID:3和生物素化SEQ ID:4。

[0060] 4、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4包被荧光微球和检测线T线

[0061] 1) 荧光微球、彩色乳胶微球和树脂微球标记

[0062] 取荧光微球、彩色乳胶微球或树脂微球200μl (210nm) (1%原液),13000rpm,4℃离心10min,弃上清,加入400ul去离子水超声10S混匀;离心,加入MES buffer (50mM,PH6.0) 400μl,超声混匀;离心,加入EDC溶液,室温反应15分钟;离心,加入标记抗体(SEQ ID:2~4和兔抗鸡IgY) 100ug,室温摇床中速反应2小时;离心,加入封闭液,冰水超声混匀,室温摇床中速反应1小时;离心,加入400μl硼酸盐缓冲液(20mM PH8.0),冰水超声混匀,4℃保存待用。

[0063] 2) 检测线T线包被

[0064] 用磷酸盐缓冲液将SEQ ID:2~4多肽分别稀释至1mg/ml,按1μl/cm划液量,用喷金划膜仪均匀的划至NC膜上制备T线;将划好的NC膜放置于37℃干燥箱中,干燥16h。

[0065] 5、SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4标记胶体金

[0066] 取胶体金10ml,加入适量0.1M K₂CO₃调节pH。混匀后加入适量SEQ ID:2、SEQ ID:3 或SEQ ID:4,继续搅拌30min;加入10%BSA至其终浓度为1%,继续搅拌30min;10000rpm 4℃离心20min,收集沉淀,以胶体金稀释液(0.2M BB,1%BSA,3%海藻糖,0.03%procline300) 定容至1ml,即得SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4胶体金复合物。

[0067] 实施例4 肠道菌多肽用于制备酶促板式检测试剂盒

[0068] 1、SEQ ID:2~4多肽包被微孔板

[0069] (1) SEQ ID:2~4缓冲液稀释至5μg/ml,包被到微孔板上,每孔100μl,4℃孵育16h

或37℃孵育2h。

[0070] (2) 以PBST洗涤3次,甩干;

[0071] (3) 用含有1%牛血清白蛋白的蛋白溶液进行封闭,每孔加入200uL封闭液,37℃反应2h,弃去孔内封闭液,甩干;

[0072] (4) 将包被板置于37℃烘箱4h,即完成包被,以铝箔袋密封,存放于-20℃保存备用。

[0073] 2、抗多肽IgG抗体检测

[0074] (1) 将10例健康人粪便和10例克罗恩病患者粪便样本以样本稀释液稀释后加入到包被好的微孔板中,室温反应1h,洗板4次;

[0075] (2) 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG,37℃反应0.5h,洗板4次;

[0076] (3) 加辣根过氧化物酶底物显色;

[0077] (4) 终止,读数。

[0078] 3、抗多肽IgA抗体检测

[0079] (1) 将10例健康人尿液和10例克罗恩病患者尿液以样本稀释液稀释后加入到包被好的微孔板中,室温反应1h,洗板4次;

[0080] (2) 加入碱性磷酸酶标记的羊抗人IgG,37℃反应0.5h,洗板4次;

[0081] (3) 加碱性磷酸酶底物显色;

[0082] (4) 终止,读数。

[0083] 4、数据分析

[0084] 计算10例健康人样本的平均OD值,2.5倍的OD值作为区分阴性和阳性的数值,高于此值的为阳性(+),低于或等于此值的为阴性(-),统计10例患者粪便样本和尿液样本的检测数据,结果提示,克罗恩病患者的粪便中抗SEQ ID:2~4多肽的抗体阳性率分别为20%、20%和30%(见表1);尿液样本中的阳性率分别为10%、10%和20%。

[0085] 表1 肠道菌多肽抗体在粪便样本的检测结果

	SEQ ID:2		SEQ ID:3		SEQ ID:4	
	健康人	病患	健康人	病患	健康人	病患
1	0.045	-	0.088	-	0.124	-
2	0.027	-	0.29	-	0.11	-
3	0.054	+	0.16	-	0.255	-
4	0.068	-	0.125	-	0.126	+
5	0.035	-	0.068	+	0.056	-
6	0.029	-	0.019	-	0.102	-
7	0.018	+	0.255	+	0.023	-
8	0.044	-	0.344	-	0.09	+
9	0.046	-	0.159	-	0.008	+
10	0.097	-	0.112	-	0.104	-
	0.0598	20%	0.162	20%	0.0998	30%

[0087] 实施例5 用于制备吡啶酯标记化学发光检测试剂盒

[0088] 全自动化学发光仪以及标记吡啶酯的羊抗人IgG和IgA由南京迪格诺斯提供。

[0089] 本实验所用SA预包被磁性微球及吡啶酯标记的羊抗人IgG和IgA均为市售产品。

[0090] 可有两种不同的实现方法:

[0091] 第一种：(1) 按实施例3的步骤2方法，把SEQ ID:2~4直接包被在磁性微球上，此微球溶液为R1；(2) R2为吖啶酯标记的羊抗人IgG/IgA抗体。检测时把待检测样本与R1反应，之后磁性分离去除样本杂质，清洗3次，与R2反应，形成含有抗原-抗体-抗抗体夹心复合体，复合物进行吖啶酯荧光定量分析。

[0092] 第二种：(1) 按实施例3的步骤3方法，把SEQID:2~4生物素化，此溶液为R1；(2) R2为预包被SA的磁性微球；(2) R3为吖啶酯标记的羊抗人IgG/LgA抗体。检测时可用一步法或二步法，前者把代检样本、R1和R2同时反应；后者先把SA磁性微球与生物素化的 R1反应，磁性分离并洗涤后加入代检样本。两种方法同样有效。一步法或二步法形成含有抗原-抗体-抗抗体夹心复合体，复合物进行吖啶酯发光定量分析。

[0093] 1) 标准曲线制作

[0094] 把吖啶酯标记的羊抗人IgG或IgA抗体稀释5个浓度，分别：把吖啶酯标记的羊抗人IgG 和IgA抗体各稀释5个浓度，分别为0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、400ng/ml。用上述第一种和第二种检测方法制作标准曲线，其中第二种方法的抗人IgG和IgA标准曲线见图1， R^2 值分别为0.9981和0.9956。

[0095] 2) 样本检测

[0096] 用上述第一种和第二种方法检测100例健康人血浆或血清及100例克隆恩病患者血浆或血清，两种检测方法的灵敏度以第二种为优，其中第二种方法检测的ROC曲线见图2。如表2所示，SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4抗人IgG的曲线下面积分别为0.702、0.612和0.735，说明用于诊断克罗恩病时，SEQ ID:4的检测灵敏度与特异性最佳，其次是SEQ ID:2和SEQ ID:3。

[0097] 表2 抗SEQ ID:2~4的IgG曲线下面积

检验结果 变量	面积	标准误 ^a	渐进 Sig. ^b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
SEQID2	0.702	0.037	0.000	0.629	0.775
SEQID3	0.612	0.040	0.006	0.534	0.691
SEQID4	0.735	0.038	0.000	0.661	0.809

[0099] 实施例6 肠道菌多肽用于制备稀土元素荧光免疫层析检测试剂盒

[0100] 本实验所用抗体标准品为实施例2方法制备的抗SEQ ID:2单抗、抗SEQ ID:3单抗以及抗SEQ ID:4单抗。兔抗鸡IgY为市售产品。稀土元素标记的荧光微球及时间分辨荧光阅读器购自深圳微测公司。

[0101] 1、荧光免疫层析试剂盒的制备

[0102] (1) 荧光微球的标记和检测线T线包被

[0103] SEQ ID:2~4多肽标记荧光微球的方法见实施例3步骤4。

[0104] (2) 样品垫和结合垫的制备

[0105] 玻璃纤维素膜用含有表面活性剂的缓冲液(配方:100mM pH 7.4PB,其中含有2% NaCl, 2%BSA、0.5%酪蛋白、0.1%吐温-20、0.5%S9和5%蔗糖)浸泡进行预封闭后,37℃干燥过夜,制备得到样品垫;

[0106] 取制备好的样品垫,用喷金划膜仪将标记有荧光微球的SEQ ID:2~4多肽和兔抗

鸡IgY 抗体按照5 μ l/cm的量喷至预处理过宽为1cm的样品垫上,37℃干燥5h,制备得到结合垫。

[0107] (3) 硝酸纤维素膜(NC膜)的包被

[0108] 用磷酸盐缓冲液将SEQ ID:2~4多肽分别稀释至1mg/ml,用于制备T线;将鸡IgY抗体稀释至0.5mg/ml,用于制备C线;按1 μ l/cm划液量,用喷金划膜仪将上述两种溶液均匀的划至NC膜上制备T线和C线;将划好的NC膜放置于37℃干燥箱中,干燥16h。

[0109] (4) 组装

[0110] 将步骤2)得到的结合垫叠压在步骤3)得到的硝酸纤维素膜的一端,并将吸水垫固定叠压在硝酸纤维素膜的另一端,最后将步骤2)得到的样品垫叠压在结合垫另一端,用微电脑自动斩切机按每条5.5mm的宽度进行裁剪,并装入层析条壳体中,即得成品。

[0111] 2、标准曲线

[0112] 用实施例2制备的抗SEQ ID:2单抗、抗SEQ ID:3单抗以及抗SEQ ID:4单抗分别稀释5个浓度,分别:0ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml,将50 μ l以上校准品分别滴加到加样孔上,15分钟后用荧光检测仪检测,可在检测线T和质控线C位置上采集到荧光。以样品浓度与T/C值进行二次多项式拟合,绘制标准曲线,SEQ ID:2~4的 R^2 分别为0.9940、0.9908和0.9993(见图3)。根据对200例健康人血清样本的检测,90%的健康人抗SEQ ID:2~4抗体判断为阴性的cut-off值分别是30ng/ml、35ng/ml和30ng/ml。

[0113] 3. 样品检测

[0114] 取50 μ l的待检血样,滴加到加样孔上,15分钟后用荧光检测仪检测,如果检测线出现条带,说明样品中含抗肠道菌多肽抗体,其含量可依据标准曲线计算公式获得。20例样本的检测结果见表3,SEQ ID:2~4的检测特异性分别为80%、80%和90%,灵敏度分别为50%、40%和50%。

[0115] 表3 荧光免疫层析测试结果

	SEQ ID:2		SEQ ID:3		SEQ ID:4	
	健康	病患	健康	病患	健康	病患
1	11	23	17	31	29	12
2	56	19	36	30	36	27
3	29	31	19	22	24	20
4	25	13	61	11	18	36
[0116] 5	15	13	21	73	13	18
6	20	17	28	19	12	17
7	15	229	27	207	28	35
8	14	45	23	46	19	42
9	37	69	30	19	25	91
10	22	116	23	122	13	37
	80%	50%	80%	40%	90%	50%

[0117] 实施例7 肠道菌多肽用于制备金标定性检测试剂盒

[0118] 1、SEQ ID:2~4金标试剂卡制备

[0119] 1) 胶体金的制备

[0120] 在圆底烧瓶中加入100ml 0.01%氯金酸溶液,置于电热套上加热至沸腾,立刻加入2ml 1%柠檬酸三钠溶液,继续搅拌15min,自然冷却后4℃保存备用。

[0121] 2) 胶体金标记

[0122] 见实施例3步骤5。

[0123] 3) 样品垫和金标垫的制备

[0124] 玻璃纤维素膜用处理液液(配方:100mM pH 7.4PB,其中含有2%BSA、0.5%吐温-20、0.5%S9和5%蔗糖)浸泡进行预封闭后,37℃干燥过夜,制备得到样品垫;

[0125] 取制备好的样品垫,用喷金划膜仪将标记有SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4的金标复合物和兔抗鸡IgY抗体标记的金标复合物按照5 μ l/cm的量喷至预处理过宽为1cm的样品垫上,37℃干燥5h,制备得到金标垫。

[0126] 4) 硝酸纤维素膜(NC膜)的包被

[0127] 用磷酸盐缓冲液将SEQ ID:2、SEQ ID:3和SEQ ID:4多肽稀释至1mg/ml,用于制备T线;将鸡IgY抗体稀释至0.5mg/ml,用于制备C线;按1 μ l/cm划液量,用喷金划膜仪将上述两种溶液均匀的划至NC膜上制备T线和C线;将划好的NC膜放置于37℃干燥箱中,干燥16h。

[0128] 5) 组装

[0129] 将上述金标垫、样品垫、包被好的NC膜以及吸水垫等辅料组装成金标试剂盒。

[0130] 2、试剂盒检测

[0131] (1) 检测方法

[0132] 取样本以样本稀释液(BB,0.5% s9,1%BSA)稀释后取100 μ l,直接加入层析条中样品窗口;15min后,目测观察结果。

[0133] (2) 结果判定

[0134] 阴性结果(-):仅出现质控线,无检测线;

[0135] 阳性结果(+):质控线与检测线同时出现;

[0136] 无效结果:质控线不出现,表明操作错误或试剂盒失效。

[0137] (3) 检测

[0138] 取100 μ l实施例5配制的标准品及20例全血样本分别加入层析条中样品窗口;15min后,目测观察结果(表4),SEQ ID:2~4用于判断克罗恩病的特异性分别为80%、80%和90%,灵敏度分别为40%、30%和50%。

[0139] 表4 金标试剂测试结果

[0140]

	SEQ ID:2		SEQ ID:3		SEQ ID:4	
	健康	CD	健康	CD	健康	CD
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	+	-
3	-	+	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	+
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	+	-	+
8	-	-	-	+	-	+
9	+	+	-	-	-	+
10	-	+	-	-	-	+
	80%	40%	80%	30%	90%	50%

<110> 苏州和锐生物科技有限公司
<120> 肠道菌多肽、抗体捕获器件及试剂盒
<140> 201711500427.8
<141> 2017-11-05
<160> 4
<170> SIPOSequenceListing 1.0

SEQ ID:1

<210> 1
<211> 34
<212> PRT
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum
<400> 1

Met Val Val Gln His Asn Leu Xaa Xaa Xaa Lys Ser Thr Glu Lys Leu
[0001] 1 5 10 15
Ser Ser Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Asn Gln Gly Val Leu Gln Leu Leu Xaa
20 25 30
Xaa Xaa

SEQ ID: 2

<210> 2
<211> 494
<212> PRT
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 2

Met Val Val Gln His Asn Leu Thr Ala Met Asn Ser Asn Arg Met Leu
1 5 10 15

Gly Leu Thr Thr Ala Ser Gln Ala Lys Ser Thr Glu Lys Leu Ser Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Lys Ile Asn Arg Ala Ala Asp Asp Ala Ala Gly Leu Ser Ile
 35 40 45
 Ser Glu Lys Ser Arg Asn Met Gln Ile Arg Gly Leu Thr Gln Ala Ser
 50 55 60
 Thr Asn Ala Glu Asp Gly Ile Ser Ser Val Gln Thr Ala Glu Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Thr Glu Val His Asp Met Leu Gln Arg Met Asn Glu Leu Ala Ile
 85 90 95
 Gln Ala Ala Asn Gly Thr Asn Ser Glu Asp Asp Arg Ser Tyr Ile Gln
 100 105 110
 Asp Glu Ile Asp Gln Leu Thr Gln Glu Ile Asp Arg Val Ala Glu Thr
 115 120 125
 Thr Lys Phe Asn Glu Thr Tyr Leu Leu Lys Gly Asp Thr Lys Asn Val
 [0002] 130 135 140
 Asp Ala Met Asp Tyr Thr Tyr Ser Tyr Lys Ala Val Thr Thr Asn Thr
 145 150 155 160
 Val Ala Arg Ala Ser Val Leu Ala Ala Glu Asn Thr Ala Thr Gly Met
 165 170 175
 Ser Val Ser Ile Ser Phe Ala Ala Asn Ser Gly Lys Val Thr Ala Ala
 180 185 190
 Asp Ser Asn Asn Leu Ala Lys Ala Ile Arg Asp Gln Gly Phe Thr Ile
 195 200 205
 Thr Thr Ser Thr Gln Asn Gly Lys Val Val Tyr Gly Leu Glu Leu Asn
 210 215 220
 Gly Ser Asp Ala Lys Ala Asn Tyr Thr Val Ser Thr Val Ser Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Gly Thr Phe Lys Ile Leu Asn Ser Asn Lys Gln Val Val Ala Ser
 245 250 255

Val Thr Ile Ser Thr Thr Ala Ser Phe Lys Lys Val Ser Gly Met Ser
 260 265 270
 Gln Ile Val Thr Ala Tyr Ser Val Ser Ala Ala Tyr Ala Thr Gly Asp
 275 280 285
 Val Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Asp Gly Asn Ala Ile Ser Ala Asn Lys
 290 295 300
 Leu Asp Lys Tyr Phe Thr Ala Gly Gly Ala Thr Glu Ala Gly Gly Ile
 305 310 315 320
 Ala Thr Thr Leu Ser Ala Asn Ser Gly Val Pro Lys Val Tyr Asp Val
 325 330 335
 Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Val Ser Ile Ala Ser Thr Leu Val Thr
 340 345 350
 Ala Val Lys Asp Lys Thr Ala Ala Leu Lys Met Asn Phe His Val Gly
 355 360 365
 [0003] Ala Asp Gly Thr Asp Asn Asn Lys Ile Lys Ile Asn Ile Glu Ala Met
 370 375 380
 Thr Ala Lys Ser Leu Gly Val Asn Gly Leu Lys Val Ser Gly Ser Ser
 385 390 395 400
 Gly Thr Asn Ala Thr Asn Ala Ile Glu Ile Ile Ala Gly Ala Ile Lys
 405 410 415
 Lys Val Ser Thr Gln Arg Ser Ala Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Leu
 420 425 430
 Glu His Thr Ile Asn Asn Leu Asp Asn Ile Val Glu Asn Thr Thr Ala
 435 440 445
 Ala Glu Ser Gly Ile Arg Asp Thr Asp Met Ala Thr Glu Met Val Lys
 450 455 460
 Tyr Ser Asn Ala Asn Ile Leu Ser Gln Ala Gly Gln Ser Met Leu Ala
 465 470 475 480
 Gln Ser Asn Gln Ser Asn Gln Gly Val Leu Gln Leu Leu Gln
 485 490

SEQ ID:3

<210> 3

<211> 222

<212> PRT

<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum

<400> 3

Met Val Val Gln His Asn Leu Thr Ala Met Asn Ser Asn Arg Met Leu

1 5 10 15

Gly Leu Thr Thr Ala Ser Gln Ala Lys Ser Thr Glu Lys Leu Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Lys Ile Asn Arg Ala Ala Asp Asp Ala Ala Gly Leu Ser Ile

35 40 45

Ser Glu Lys Ser Arg Asn Met Gln Ile Arg Gly Leu Thr Gln Ala Ser

50 55 60

[0004] Thr Asn Ala Glu Asp Gly Ile Ser Ser Val Gln Thr Ala Glu Gly Ala

65 70 75 80

Leu Thr Glu Val His Asp Met Leu Gln Arg Met Asn Glu Leu Ala Ile

85 90 95

Gln Ala Ala Asn Gly Thr Asn Ser Glu Asp Asp Arg Ser Tyr Ile Gln

100 105 110

Asp Glu Ile Asp Gln Leu Thr Gln Glu Ile Asp Arg Val Ala Glu Thr

115 120 125

Thr Lys Phe Asn Glu Thr Tyr Leu Leu Lys Gly Asp Thr Lys Asn Val

130 135 140

Asp Ala Met Asp Tyr Thr Tyr Ser Tyr Lys Ala Val Thr Thr Asn Thr

145 150 155 160

Val Ala Arg Ala Ser Val Leu Ala Ala Glu Asn Thr Ala Thr Gly Met

165 170 175

Ser Val Ser Ile Ser Phe Ala Ala Asn Ser Gly Lys Val Thr Ala Ala

	180	185	190
	Asp Ser Asn Asn Leu Ala Lys Ala Ile Arg Asp Gln Gly Phe Thr Ile		
	195	200	205
	Thr Thr Ser Thr Gln Asn Gly Lys Val Val Tyr Gly Leu Glu		
	210	215	220
SEQ ID:4			
<210> 4			
<211> 480			
<212> PRT			
<213> 2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum			
<400> 4			
Met Leu Gly Leu Thr Thr Ala Ser Gln Ala Lys Ser Thr Glu Lys Leu			
1 5 10 15			
Ser Ser Gly Tyr Lys Ile Asn Arg Ala Ala Asp Asp Ala Ala Gly Leu			
[0005] 20 25 30			
Ser Ile Ser Glu Lys Ser Arg Asn Met Gln Ile Arg Gly Leu Thr Gln			
35 40 45			
Ala Ser Thr Asn Ala Glu Asp Gly Ile Ser Ser Val Gln Thr Ala Glu			
50 55 60			
Gly Ala Leu Thr Glu Val His Asp Met Leu Gln Arg Met Asn Glu Leu			
65 70 75 80			
Ala Ile Gln Ala Ala Asn Gly Thr Asn Ser Glu Asp Asp Arg Ser Tyr			
85 90 95			
Ile Gln Asp Glu Ile Asp Gln Leu Thr Gln Glu Ile Asp Arg Val Ala			
100 105 110			
Glu Thr Thr Lys Phe Asn Glu Thr Tyr Leu Leu Lys Gly Asp Thr Lys			
115 120 125			
Asn Val Asp Ala Met Asp Tyr Thr Tyr Ser Tyr Lys Ala Val Thr Thr			
130 135 140			

Asn Thr Val Ala Arg Ala Ser Val Leu Ala Ala Glu Asn Thr Ala Thr
 145 150 155 160
 Gly Met Ser Val Ser Ile Ser Phe Ala Ala Asn Ser Gly Lys Val Thr
 165 170 175
 Ala Ala Asp Ser Asn Asn Leu Ala Lys Ala Ile Arg Asp Gln Gly Phe
 180 185 190
 Thr Ile Thr Thr Ser Thr Gln Asn Gly Lys Val Val Tyr Gly Leu Glu
 195 200 205
 Leu Asn Gly Ser Asp Ala Lys Ala Asn Tyr Thr Val Ser Thr Val Ser
 210 215 220
 Met Glu Ala Gly Thr Phe Lys Ile Leu Asn Ser Asn Lys Gln Val Val
 225 230 235 240
 Ala Ser Val Thr Ile Ser Thr Thr Ala Ser Phe Lys Lys Val Ser Gly
 245 250 255
 Met Ser Gln Ile Val Thr Ala Tyr Ser Val Ser Ala Ala Tyr Ala Thr
 [0006] 260 265 270
 Gly Asp Val Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Asp Gly Asn Ala Ile Ser Ala
 275 280 285
 Asn Lys Leu Asp Lys Tyr Phe Thr Ala Gly Gly Ala Thr Glu Ala Gly
 290 295 300
 Gly Ile Ala Thr Thr Leu Ser Ala Asn Ser Gly Val Pro Lys Val Tyr
 305 310 315 320
 Asp Val Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Val Ser Ile Ala Ser Thr Leu
 325 330 335
 Val Thr Ala Val Lys Asp Lys Thr Ala Ala Leu Lys Met Asn Phe His
 340 345 350
 Val Gly Ala Asp Gly Thr Asp Asn Asn Lys Ile Lys Ile Asn Ile Glu
 355 360 365
 Ala Met Thr Ala Lys Ser Leu Gly Val Asn Gly Leu Lys Val Ser Gly
 370 375 380

[0007]

Ser Ser Gly Thr Asn Ala Thr Asn Ala Ile Glu Ile Ile Ala Gly Ala
385 390 395 400
Ile Lys Lys Val Ser Thr Gln Arg Ser Ala Leu Gly Ala Val Gln Asn
405 410 415
Arg Leu Glu His Thr Ile Asn Asn Leu Asp Asn Ile Val Glu Asn Thr
420 425 430
Thr Ala Ala Glu Ser Gly Ile Arg Asp Thr Asp Met Ala Thr Glu Met
435 440 445
Val Lys Tyr Ser Asn Ala Asn Ile Leu Ser Gln Ala Gly Gln Ser Met
450 455 460
Leu Ala Gln Ser Asn Gln Ser Asn Gln Gly Val Leu Gln Leu Leu Gln
465 470 475 480

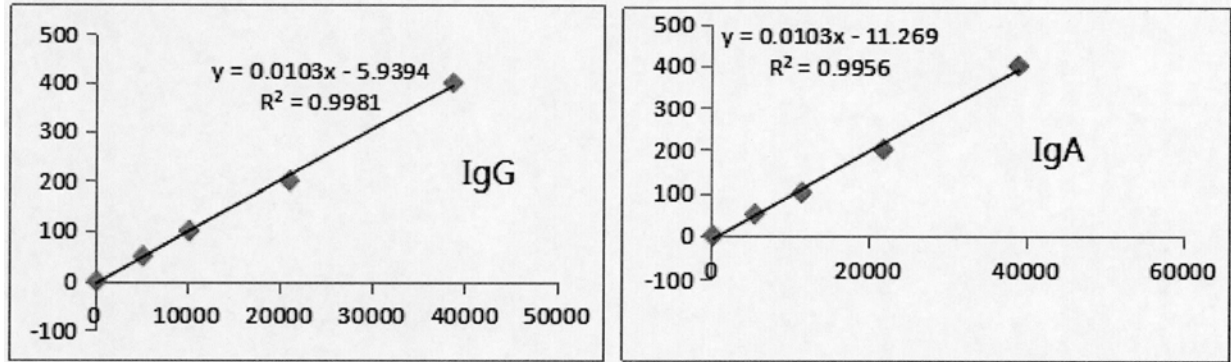


图1

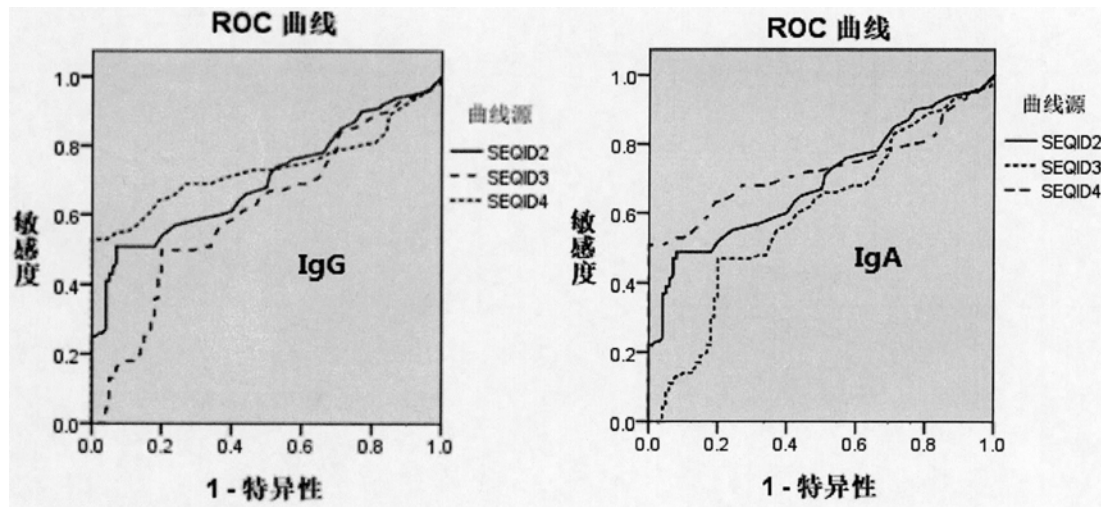


图2

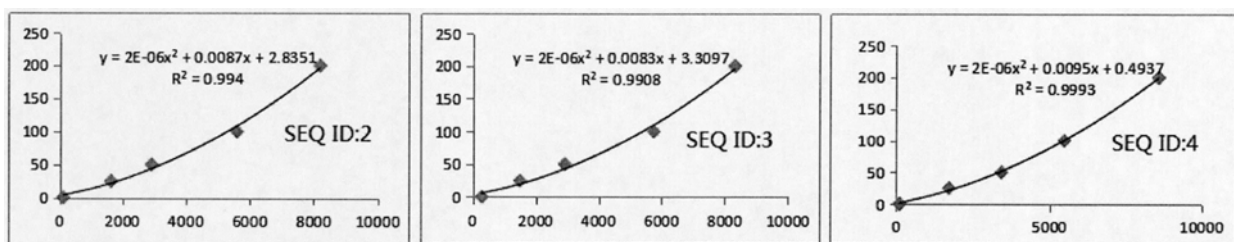


图3

专利名称(译)	肠道菌多肽、抗体捕获器件及试剂盒		
公开(公告)号	CN109884309A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201711500427.8	申请日	2017-12-25
[标]发明人	李振军 陈菲		
发明人	李振军 陈菲		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/558 C07K14/195 C07K17/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种SEQ ID : 1所示肠道菌多肽的核心序列、含核心序列的肠道菌多肽、抗体捕获器件、试剂盒及检测方法，属于免疫学技术领域。本发明的技术方案是克隆表达含有SEQ ID : 1核心序列的肠道菌多肽，通过固相载体及其上含核心序列的多肽捕获样本中的抗体，达到辅助诊断克罗恩病的作用。

	SEQ ID:2		SEQ ID:3		SEQ ID:4	
	健康人	病患	健康人	病患	健康人	病患
1	0.045	-	0.088	-	0.124	-
2	0.027	-	0.29	-	0.11	-
3	0.054	+	0.16	-	0.255	-
4	0.068	-	0.125	-	0.126	+
5	0.035	-	0.068	+	0.056	-
6	0.029	-	0.019	-	0.102	-
7	0.018	+	0.255	+	0.023	-
8	0.044	-	0.344	-	0.09	+
9	0.046	-	0.159	-	0.008	+
10	0.097	-	0.112	-	0.104	-
	0.0598	20%	0.162	20%	0.0998	30%