



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107022548 A

(43)申请公布日 2017.08.08

(21)申请号 201710175642.9

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2017.03.22

(71)申请人 陕西脉元生物科技有限公司

地址 710065 陕西省西安市高新区科技加
速器1期8号楼1c-2-2,1c-2-3

(72)发明人 闫亚平 柴单单 李科

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任
公司 61200

代理人 岳培华

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制
备方法

(57)摘要

本发明提供了一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法,先获取M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,将其染入HEK293细胞中,构建出表达M1、M23亚型AQP4的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞;再提取上述细胞中的AQP4-细胞膜复合物;最后将AQP4-细胞膜复合物固化在载体上,即得到人体抗AQP4自身抗体检测材料。本发明以提取的AQP4-细胞膜复合物作为检测材料,可以降低造成背景着色的内源蛋白量,较目前使用细胞为检测材料进行的免疫荧光检测的方法进一步增加了检测灵敏度和特异性,使检测结果判读更加容易明确,能够简便快速的用于检测患者AQP4自身抗体。

1. 一种人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 获取M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,通过pCI-neo质粒载体将目的基因分别转入HEK293细胞中,构建出表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞;

2) 提取HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的AQP4-细胞膜复合物;

3) 将提取的AQP4-细胞膜复合物固化在载体上,得到人体抗AQP4自身抗体检测材料。

2. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述步骤1)具体包括以下步骤:

1.1) 通过人工合成或PCR方法获得M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,并在目的基因两端加设NotI/NheI酶切位点;

1.2) 将带有酶切位点的两种目的基因分别插入pCI-neo质粒载体中,插入位点为NotI/NheI,得到两种带有目的基因的质粒,分别命名为pCI-neo-M1-AQP4和pCI-neo-M23-AQP4;

1.3) 分别取pCI-neo-M1-AQP4质粒和pCI-neo-M23-AQP4质粒,按PEI转染试剂转染方法转染培养好的HEK293细胞,得到表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞。

3. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述步骤2)的具体步骤为:首先通过离心分别去除HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞核,然后加入去垢剂,4℃作用30~60分钟,再离心去除未溶解部分,上清即为可溶性的AQP4-细胞膜复合物;其中去垢剂为5~20mmol/L的CHAPS或体积分数为0.5~1%的Triton X-100。

4. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述步骤2)的具体步骤为:先通过物理研磨、超声或低温冻融分别使HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜破碎,释放细胞胞浆内容物,然后离心,弃上清胞浆蛋白,向得到的沉淀中加入高渗溶液,4℃作用15~30分钟,再次离心,弃上清胞核蛋白,最终得到的沉淀即为不可溶性的AQP4-细胞膜复合物。

5. 根据权利要求4所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述高渗溶液由Tris-HCl、NaCl、MgCl₂和EDTA配制而成,高渗溶液中Tris-HCl的浓度为20mmol/L、NaCl的浓度为300mmol/L、MgCl₂的浓度为2mmol/L、EDTA的浓度为2~5mmol/L,高渗溶液的pH=8。

6. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述步骤2)的具体步骤为:先通过物理研磨、超声或低温冻融分别使HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜破碎,释放细胞胞浆内容物,然后离心,弃上清胞浆蛋白,向得到的沉淀中加入Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液,再次离心,然后静置,形成二个液态相,上部液态相中即含有AQP4-细胞膜复合物。

7. 根据权利要求6所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液由Dextran、PEG和Na₃PO₄配制而成,Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液中Dextran的体积分数为20%,PEG的浓度为1.03g/mL,Na₃PO₄的浓度为0.2mol/L,Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液的pH=6.5。

8. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述载体为硝酸纤维素膜、PVDF膜、尼龙膜、具有蛋白吸附能力的玻片、塑料材质的细胞培养皿或培养板。

9. 根据权利要求1所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,其特征在于,所述步骤3)的具体步骤为:用 $1 \times$ TBS缓冲液稀释AQP4-细胞膜复合物,配制成AQP4-细胞膜复合物的稀释液,AQP4-细胞膜复合物的稀释液中AQP4的浓度为 $0.1 \sim 1\text{mg/mL}$,然后用划膜仪将AQP4-细胞膜复合物的稀释液按圆形或线性印迹在载体上,然后放入 37°C 烘箱内烘干,再使用固定液固定 $10 \sim 20$ 分钟,然后用PBS缓冲液洗去固定液,最后用质量分数为1%的BSA封闭液于室温条件下封闭1小时或 4°C 封闭 $16 \sim 20$ 小时,沥干封闭液并用双蒸水清洗干净,在 $20 \sim 28^\circ\text{C}$ 下晾干,即得到人体抗AQP4自身抗体检测材料,于 -20°C 密封保存待用;其中固定液为质量分数为4%多聚甲醛、冰甲醇或体积分数为95%的乙醇。

10. 权利要求1-9中任意一项所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法制得的人体抗AQP4自身抗体检测材料,其特征在于,该检测材料为固化在载体上的AQP4-细胞膜复合物,其中AQP4-细胞膜复合物由表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞提取得到。

一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法,制得的检测材料能够用于检测人体抗AQP4自身抗体。

背景技术

[0002] 人体自身抗体作为自身免疫疾病的重要血清标志物,其快速的检测对于自身免疫性疾病的诊断、治疗措施和预后有重要的应用价值。随着自身抗体检测的灵敏度和特异性提高,相关自身免疫性疾病的诊断标准也在相应更新调整。

[0003] 视神经脊髓炎(neuromyelitis,NMO)是一种严重的中枢神经系统脱髓鞘疾病,约90%的NMO和一半以上的患者水通道蛋白4(aquaporin,AQP4)抗体阳性。2004年水通道蛋白4抗体的发现,为NMO成为独立疾病提供了客观证据,并在2015年被纳入改版的NMO诊断标准。

[0004] 目前,患者血清或脑脊液内的AQP4自身抗体检测方法包括以下几类:1、使用高表达该抗原的神经组织切片进行免疫学实验(间接免疫荧光法,Indirect Immunofluorescence Assay,IIF),来检测针对AQP4的自身抗体。此方法由于神经组织切片的制备较复杂,批次间的差异较大,难以质控;并且对检验人员的要求较高,需要检验人员有丰富的神经生理学知识,才能准确识别切片中阳性信号所在的部位及意义,因此实现商品化的难度较大。2、利用高表达抗原的细胞进行免疫荧光检测或流式细胞术(cell-based assay,CBA)。但此类检测方法的主要缺陷在于:(1)细胞内多种蛋白可能引起背景着色问题。在具体检测过程中,尽管有空转对照细胞做对比,在外源抗原表达量较低时,部分检测结果仍不易明确判读。(2)操作过程复杂,各步骤是否准确操作直接影响检测结果,这非常依赖监测人员的经验,另外进行免疫荧光或流式细胞术实验时,需要特殊仪器,如荧光显微镜或流式细胞仪。3、使用重组抗原蛋白进行酶联免疫吸附法(ELISA)。AQP4做为膜蛋白,正确跨膜形成的空间构象结构对自身抗体的识别至关重要,在重组蛋白的表达过程中往往因为折叠翻译不正确,形成错误的构想,影响检测的特异性。另外,重组蛋白尤其是膜蛋白的分离纯化工作相当耗时、耗力。此外还有几种检测AQP4自身抗体的方法,此处不再例举。

[0005] 目前,IIF和CBA法是抗AQP4自身抗体的常规检测方法。IIF法较CBA法敏感性及其特异性相对较低,推测可能是因其反应底物存在种属间的差异引起。而CBA法通过构建稳定高表达人AQP4的细胞株做为底物,一方面避免了种属之间的差异,提高了该法的敏感性和特异性,另一方面检测材料的获取相对也容易。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法,该检测材料在基于细胞检测方法高灵敏性和特异性的前提下,能够进一步降低非特异信号,使检测结果判读更加容易明确,能够简便快速的用于检测患者AQP4自身抗体。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0008] 一种人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 获取M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,通过pCI-neo质粒载体将目的基因分别转入HEK293细胞中,构建出表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞;

[0010] 2) 提取HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的AQP4-细胞膜复合物;

[0011] 3) 将提取的AQP4-细胞膜复合物固化在载体上,得到人体抗AQP4自身抗体检测材料。

[0012] 所述步骤1) 具体包括以下步骤:

[0013] 1.1) 通过人工合成或PCR方法获得M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,并在目的基因两端加设NotI/NheI酶切位点;

[0014] 1.2) 将带有酶切位点的两种目的基因分别插入pCI-neo质粒载体中,插入位点为NotI/NheI,得到两种带有目的基因的质粒,分别命名为pCI-neo-M1-AQP4和pCI-neo-M23-AQP4;

[0015] 1.3) 分别取pCI-neo-M1-AQP4质粒和pCI-neo-M23-AQP4质粒,按PEI转染试剂转染方法转染培养好的HEK293细胞,得到表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞。

[0016] 所述步骤2) 的具体步骤为:首先通过离心分别去除HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞核,然后加入去垢剂,4℃作用30~60分钟,再离心去除未溶解部分,上清即为可溶性的AQP4-细胞膜复合物;其中去垢剂为5~20mmol/L的CHAPS或体积分数为0.5~1%的Triton X-100。

[0017] 所述步骤2) 的具体步骤为:先通过物理研磨、超声或低温冻融分别使HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜破碎,释放细胞胞浆内容物,然后离心,弃上清胞浆蛋白,向得到的沉淀中加入高渗溶液,4℃作用15~30分钟,再次离心,弃上清胞核蛋白,最终得到的沉淀即为不可溶性的AQP4-细胞膜复合物。

[0018] 所述高渗溶液由Tris-HCl、NaCl、MgCl₂和EDTA配制而成,高渗溶液中Tris-HCl的浓度为20mmol/L、NaCl的浓度为300mmol/L、MgCl₂的浓度为2mmol/L、EDTA的浓度为2~5mmol/L,高渗溶液的pH=8。

[0019] 所述步骤2) 的具体步骤为:先通过物理研磨、超声或低温冻融分别使HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜破碎,释放细胞胞浆内容物,然后离心,弃上清胞浆蛋白,向得到的沉淀中加入Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液,再次离心,然后静置,形成二个液态相,上部液态相中即含有AQP4-细胞膜复合物。

[0020] 所述Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液由Dextran、PEG和Na₃PO₄配制而成,Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液中Dextran的体积分数为20%,PEG的浓度为1.03g/mL,Na₃PO₄的浓度为0.2mol/L,Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液的pH=6.5。

[0021] 所述载体为硝酸纤维素膜、PVDF膜、尼龙膜、具有蛋白吸附能力的玻片、塑料材质的细胞培养皿或培养板。

[0022] 所述步骤3) 的具体步骤为:用1×TBS缓冲液稀释AQP4-细胞膜复合物,配制成AQP4-细胞膜复合物的稀释液,AQP4-细胞膜复合物的稀释液中AQP4的浓度为0.1~1mg/mL,

然后用划膜仪将AQP4-细胞膜复合物的稀释液按圆形或线性印迹在载体上,然后放入37℃烘箱内烘干,再使用固定液固定10~20分钟,然后用PBS缓冲液洗去固定液,最后用质量分数为1%的BSA封闭液于室温条件下封闭1小时或4℃封闭16~20小时,沥干封闭液并用双蒸水清洗干净,在20~28℃下晾干,即得到人体抗AQP4自身抗体检测材料,于-20℃密封保存待用;其中固定液为质量分数为4%多聚甲醛、冰甲醇或体积分数为95%的乙醇。

[0023] 所述的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法制得的人体抗AQP4自身抗体检测材料,该检测材料为固化在载体上的AQP4-细胞膜复合物,其中AQP4-细胞膜复合物由表达M1亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和表达M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞提取得到。

[0024] AQP4-细胞膜复合物的主要成分为具有生物活性、保持其原有空间构象的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜,同时可能包含一些在分离细胞膜过程中不能除尽的细胞器等物质,但其中起到对抗AQP4自身抗体检测作用的是HEK293/pCI-neo-M1-AQP4和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞的细胞膜。

[0025] 相对于现有技术,本发明的有益效果为:

[0026] 本发明提供的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法,先获取M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,通过pCI-neo质粒载体将目的基因转染入HEK293细胞中,构建出表达M1、M23亚型AQP4基因的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞;再提取HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞中的AQP4-细胞膜复合物;最后将提取的AQP4-细胞膜复合物固化在载体上,即得到人体抗AQP4自身抗体检测材料。本发明以提取的AQP4-细胞膜复合物作为用于检测人体抗AQP4自身抗体的检测材料,可以减低造成背景着色的内源蛋白量,较目前CBA法使用细胞为检测材料进行的免疫荧光检测的方法进一步增加了检测灵敏度和特异性,能够进一步降低非特异信号,使检测结果判读更加容易明确。而且本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料的使用方法也比较简单,对检验人员要求低,整个检测流程耗费时间短,所需仪器简单,能够简便快速的用于检测患者AQP4自身抗体。

[0027] 本发明制得的人体抗AQP4自身抗体检测材料,是将保持空间构象的AQP4细胞膜复合物固化在载体上得到的,在基于细胞检测方法高灵敏性和特异性的前提下,能够进一步降低非特异信号,使检测结果判读更加容易明确,能够简便快速的用于检测患者AQP4自身抗体。

[0028] 进一步的,本发明提供的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法中,其关键点在于获取保持空间构象的AQP4细胞膜复合物。在本发明提取AQP4-细胞膜复合物的整个过程中,能够保持膜蛋白构象不被破坏,使膜蛋白抗原性不被损失。丢弃细胞胞浆和胞核成分,提取的AQP4-细胞膜复合物作为检测材料,可以减低造成背景着色的内源蛋白量,增加了检测灵敏度和特异性。另外本发明中AQP4-细胞膜复合物的提取方法简便,不需要特殊仪器,较纯化膜蛋白的成本和技术要求大大降低。

附图说明

[0029] 图1为本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料的示意图,其中A区域包被M23-AQP4细胞膜复合物;B区域包被pCI-neo细胞膜复合物。

[0030] 图2为本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料检测NMO患者及正常人血清中抗AQP4抗体结果,其中a为检测血清为已知的NMO病人血清,b为检测血清为已知的正常血清。

具体实施方式

[0031] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0032] 本发明提供的人体抗AQP4自身抗体检测材料的制备方法具体包括以下步骤:

[0033] 一、人工合成或通过PCR方法获的AQP4全长目的基因,构建稳定或瞬时表达M1、M23亚型的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4、HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞,并空转HEK293/pCI-neo细胞作为对照组。其具体步骤如下:

[0034] 1. 质粒构建

[0035] 1.1目的基因获取:通过人工合成或PCR方法获得M1、M23亚型的AQP4全长目的基因,两端加设NotI/NheI的酶切位点。

[0036] 1.2将得到的两种目的基因分别插入载体pCI-neo质粒,插入位点为NotI/NheI,将得到的两种质粒分别命名为pCI-neo-M1-AQP4和pCI-neo-M23-AQP4,测序正确后提取质粒进行后续实验。具体方法如下:

[0037] a.取pCI-neo质粒的甘油菌种接种于氨苄抗性的3mL, LB液体培养基,置37℃恒温培养箱,220r/min,过夜摇菌。

[0038] b.第二日吸取菌液500μL保存菌种,剩余2.5mL菌液用质粒小提试剂盒提取,测浓度。

[0039] c.pCI-neo载体酶切:40μL酶切体系,2μg载体,NotI,NheI酶各1μL,10x酶切Buffer 4μL,ddH₂O补齐至40μL,37℃恒温箱酶切2h。

[0040] d.酶切产物回收,0.8%琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,按照凝胶回收试剂盒说明书进行载体片段回收。

[0041] e.目的基因与载体片段连接:20μL连接体系,50ng pCI-neo载体,150ng M23-AQP4,T4连接酶1μL,ddH₂O补齐至20μL,4℃连接过夜。

[0042] f.将装有M23-AQP4基因片段的pCI-neo-M23-AQP4质粒或装有M1-AQP4基因片段的pCI-neo-M1-AQP4质粒转化入大肠杆菌DH5α中,涂氨苄固体LB培养板,37℃过夜,第二日挑取5个菌株,接种与氨苄抗性的液体LB培养基,37℃过夜培养。次日,各管吸取500μL菌液,-20℃保存,剩余菌液质粒小提,酶切鉴定正确的菌株送测序再次鉴定。测序鉴定正确的菌株留取菌种,-80℃保存。

[0043] g.测序正确的带有目的基因菌种及载体菌种扩大培养进行质粒大提,测浓度。

[0044] 2. AQP4表达293T细胞构建

[0045] 2.1HEK293细胞培养,DMEM高糖培养基与FBS按9:1比例配制成10%FBS-DMEM高糖培养基,待细胞融合至90%按1:3传代,继续培养传代至第3代,待第3代细胞长满至80-90%时,0.05%胰蛋白酶消化用完全培养基制成细胞悬液接种于10cm细胞培养皿,接种 1.5×10^6 个细胞,加入完全培养基至10mL,置37℃,5%CO₂的细胞培养箱中培养。

[0046] 2.2待10cm培养皿中HEK293细胞长至培养皿底面积70-80%,更换新鲜培养基继续培养4h,按PEI转染试剂转染方法进行转染,取pCI-neo-M1-AQP4质粒或pCI-neo-M23-AQP4

质粒30 μ g, PEI为45 μ g。转染后6h后更换新鲜培养液, 转染72h后收集细胞, 得到稳定或瞬时表达M1、M23亚型的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4、HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞。

[0047] 2.3将pCI-neo质粒转染HEK293细胞, 得到HEK293/pCI-neo细胞作对照。

[0048] 二、AQP4-细胞膜复合物的获取。

[0049] 收集HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞高表达目的AQP4蛋白及空转的HEK293/pCI-neo细胞, 提取AQP4-细胞膜复合物, 获取AQP4-细胞膜复合物包括但不限于以下几种方法:

[0050] a: 用去垢剂方法获得可溶性的AQP4-细胞膜复合物。此处去垢剂可使用5-20mmol/L CHAPS, 0.5-1% Triton X-100等。首先将细胞低速离心去除核, 然后加入去垢剂低温作用30-60分钟, 再通过低速离心去除未溶解部分, 上清为可溶性的AQP4-细胞膜复合物。

[0051] b: 用逐步去除细胞核及胞浆的细胞膜提取方法, 获取不可溶性的AQP4-细胞膜复合物。首先通过物理研磨、超声或低温冻融使细胞膜破碎, 释放细胞胞浆内容物。高速离心弃上清胞浆蛋白, 沉淀中加入高渗溶液: 20mmol/L Tris-HCl, 300mmol/L NaCl, 2mmol/L MgCl₂, 2-5mmol/L EDTA, pH 8, 低温作用15-30分钟, 12000-15000rpm, 10分钟, 弃上清胞核蛋白, 沉淀即为不可溶性的AQP4-细胞膜复合物。

[0052] c: 用细胞膜液态二相离心分离法获取AQP4-细胞膜复合物。破碎细胞, 去除胞浆及核蛋白参考b方法, 此处高速离心得到的沉淀中还含有一些细胞器, 沉淀中加入Dextran-PEG-Na₃PO₄液体二相混合液(20%Dextran, 103g PEG, 0.2mol/L Na₃PO₄, pH 6.5), 2000-3000g, 4 $^{\circ}$ C, 10分钟。稍静置, 形成二个液态相, 上部液态相中主要含细胞膜片段。

[0053] 以采用b方法获取M23-AQP4-细胞膜复合物为例, 具体步骤如下:

[0054] 转染72h后, 收集HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞, 500 μ L低渗溶液重悬细胞, 玻璃匀浆器匀浆50次, 使细胞膜破碎, 释放细胞胞浆内容物。12000rpm, 4 $^{\circ}$ C离心10min弃上清胞浆蛋白, 沉淀中加入高渗溶液: 20mmol/L Tris-HCl, 300mmol/L NaCl, 2mmol/L MgCl₂, 2mmol/L EDTA, pH 8, 低温作用30min, 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min, 弃上清胞核蛋白, 沉淀即为细胞膜复合物, 1xTBS充分重悬混匀。

[0055] 三、固化AQP4-细胞膜复合物作为人体抗AQP4自身抗体检测材料。

[0056] 所使用的固化载体可为硝酸纤维素膜, PVDF膜, 尼龙膜, 及具有蛋白吸附能力的玻片, 塑料材质的细胞培养皿, 培养板等。通过调整单位面积包被的AQP4-细胞膜复合物数量, 使实验组和阴性对照组的AQP4抗原蛋白量(或密度)均一化。用点膜仪, 划膜仪将AQP4-细胞膜复合物的稀释液按圆形或线性印迹在载体上, 将膜置于37 $^{\circ}$ C温箱内30-60分钟。使用固定液如: 4%多聚甲醛, 冰甲醇, 95%无水乙醇等固定10-20分钟, 用洗涤液洗涤干净固定液。封闭液于室温条件下封闭1小时或4 $^{\circ}$ C封闭16-20小时, 沥干封闭液用双蒸水清洗, 在20-28 $^{\circ}$ C条件下晾干, 于-20 $^{\circ}$ C密封保存。

[0057] 以固化M23-AQP4-细胞膜复合物为例, 具体步骤如下:

[0058] 用BCA测定提取的M23-AQP4-细胞膜复合物中M23-AQP4抗原蛋白浓度, 用1xTBS调整其最终浓度至1mg/mL。用点膜仪将M23-AQP4细胞膜复合物稀释液及pCI-neo细胞膜复合物稀释液按圆形状印迹在硝酸纤维素膜上, 室温稍晾干, 将膜置于37 $^{\circ}$ C温箱内30分钟。待膜完全干透后使用4%多聚甲醛固定10分钟, PBS洗涤膜3次, 3分钟/次。1%BSA封闭液于室温条件下封闭1小时, 双蒸水清洗3次, 3分钟/次。在20-28 $^{\circ}$ C条件下晾干, 于-20 $^{\circ}$ C密封保存。

[0059] 本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料可用于显色检测。包被有正确空间构象的M1-AQP4-细胞膜复合物或M23-AQP4-细胞膜复合物的检测材料,可结合稀释样品中针对AQP4线性表位或构象表位的自身抗体IgG,结合到检测材料上的抗体被酶标抗人IgG二抗识别,最后通过显色反应来判断样品中是否存在抗AQP4的自身抗体。

[0060] 具体检测步骤如下:

[0061] a) 将本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料置于12孔板,包被AQP4抗原的一面朝上。

[0062] b) 血清孵育:检测样品按1:500稀释后加至孔内,1mL/孔。将12孔板置于水平摇床(频率约为30次/分钟),室温孵育40分钟。

[0063] c) 洗涤:去除孔内的血清孵育液,加入洗涤液,1mL/孔,置于摇床(频率约为30次/分钟),室温3-5分钟,弃去孔内的洗涤液。重复清洗共3次。

[0064] d) 二抗孵育:去除孔内的洗涤液,加入1:100稀释的AP标记羊抗人IgG抗体,1mL/孔。置于摇床(频率约为30次/分钟),室温孵育30分钟。

[0065] e) 洗涤:去除孔内的二抗孵育液,加入洗涤液,1mL/孔,置于摇床(频率约为30次/分钟),室温3-5分钟,弃去孔内洗涤液。重复洗涤共3次。

[0066] f) 显色。去除孔内的洗涤液后,加入底物的稀释液(底物:反应缓冲液=1:49),1mL/孔。室温避光静置2-5分钟,可每隔1分钟查看一次。

[0067] g) 终止显色。弃去孔内的底物稀释液,并用蒸馏水漂洗本发明的检测材料1-2次,将其取出晾干或37℃-45℃烘干,分析结果。

[0068] 检测结果判读如下:

[0069] 阳性结果判读:本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料的AQP4抗原包被区呈现明显的色斑,形状近似圆形,浅蓝灰色至深蓝黑色,颜色较其周边区域及阴性对照区深(如图2a所示)。

[0070] 阴性结果判读:本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料的AQP4抗原包被区颜色浅于阴性对照区,或等同于阴性对照区(如图2b所示)等,均判定为阴性结果。

[0071] 图1为本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料的示意图,其中A区域包被M23-AQP4细胞膜复合物;B区域包被pCI-neo细胞膜复合物,作为阴性对照。

[0072] 图2为用本发明制备的人体抗AQP4自身抗体检测材料检测NMO患者及正常人血清中抗AQP4抗体结果,其中图2a为检测血清为已知的NMO病人血清,经显色反应,A区域AQP4-细胞膜复合物包被区较B区域阴性对照组出现较为明显的颜色,此种情况,认定为检测血清中含有抗AQP4抗体;图2b为检测血清为已知的正常血清,经显色反应,A区域AQP4-细胞膜复合物包被区较B区域阴性对照组未出现较为明显的颜色,两者呈现相同的颜色,此种情况,认定为检测血清中不含抗AQP4抗体。

[0073] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效结构变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围内。

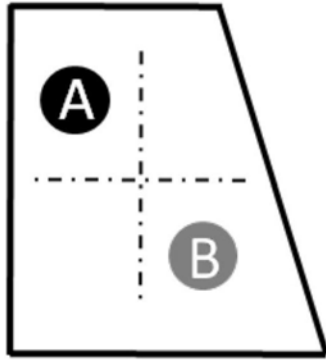


图1

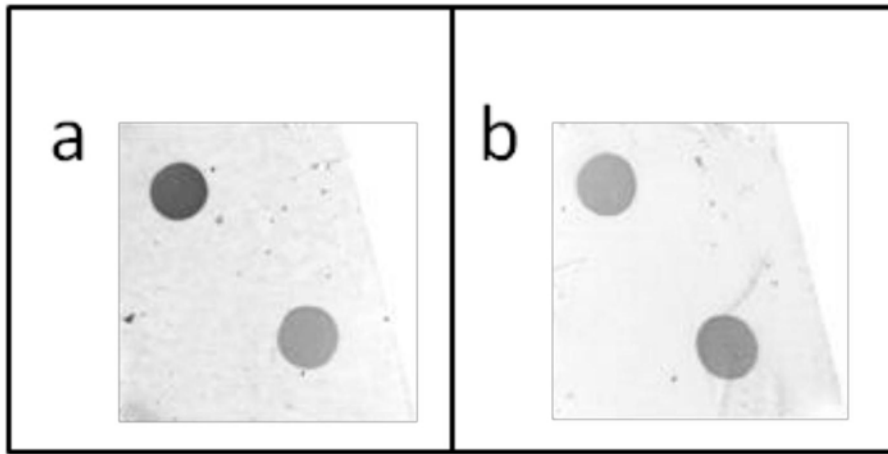


图2

专利名称(译)	一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法		
公开(公告)号	CN107022548A	公开(公告)日	2017-08-08
申请号	CN201710175642.9	申请日	2017-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	陕西脉元生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西脉元生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西脉元生物科技有限公司		
[标]发明人	闫亚平 柴单单 李科		
发明人	闫亚平 柴单单 李科		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/85 C07K14/47 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/47 C12N15/85 G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/6893 G01N2333/47 G01N2800/28		
其他公开文献	CN107022548B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人体抗AQP4自身抗体检测材料及其制备方法，先获取M1、M23亚型的AQP4全长目的基因，将其染入HEK293细胞中，构建出表达M1、M23亚型AQP4的HEK293/pCI-neo-M1-AQP4细胞和HEK293/pCI-neo-M23-AQP4细胞；再提取上述细胞中的AQP4-细胞膜复合物；最后将AQP4-细胞膜复合物固化在载体上，即得到人体抗AQP4自身抗体检测材料。本发明以提取的AQP4-细胞膜复合物作为检测材料，可以降低造成背景着色的内源蛋白量，较目前使用细胞为检测材料进行的免疫荧光检测的方法进一步增加了检测灵敏度和特异性，使检测结果判读更加容易明确，能够简便快速的用于检测患者AQP4自身抗体。

