



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108948174 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810496268.7

(22)申请日 2018.05.22

(71)申请人 北京蛋白质组研究中心

地址 102206 北京市昌平区科学园路33号1
号楼

(72)发明人 于晓波 王红叶

(74)专利代理机构 北京领科知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11690

代理人 张丹

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种瓜氨酸修饰肽及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种瓜氨酸修饰肽抗原及包括瓜氨酸修饰肽抗原的组合物。本发明还提供了瓜氨酸修饰肽抗原或包括瓜氨酸修饰肽抗原的组合物在制备检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具中的用途。本发明所述的瓜氨酸修饰肽抗原用于检测IgG抗体和/或IgA抗体标志物,解决了临床30%的RA患者缺少明确标志物的问题。本发明提供的诊断工具采用新型类风湿关节炎相关生物标志物的自身抗体所对应的抗原,检测人血清中自身抗体,具有特异性好、灵敏度高、准确性好、线性范围广、安全、可靠、易操作的优点,尤其适用当前临床CCP2无法检测的阴性类风湿关节炎患者的筛选和诊断。



1. 一种瓜氨酸修饰肽抗原, 其特征在于, 所述瓜氨酸修饰肽抗原的序列选自下列氨基酸序列中的一种:

- 1) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示序列的全部或部分;
- 2) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性程度的序列;
- 3) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列与SEQ ID NO:1所示序列的差异不超过5、4、3、2或1个氨基酸;
- 4) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为SEQ ID NO:1的变体, 其中所述变体与SEQ ID NO:1的差异包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的序列或至少一个N-/C-末端延伸。

2. 一种编码权利要求1所述瓜氨酸修饰肽抗原的核苷酸序列。

3. 一种包含权利要求2所述的核苷酸序列的基因载体。

4. 一种包含权利要求3所述的基因载体的细胞。

5. 一种组合物, 其特征在于, 所述组合物包括权利要求1所述的瓜氨酸修饰肽抗原和载体。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其特征在于, 所述的载体为固相载体, 所述的固相载体选自酶标板、96孔微孔板、胶体金、微球中的一种或两种以上的组合; 其中, 所述微球选自二氧化硅微球、聚苯乙烯微球、磁性微球或生物大分子聚合物微球中的一种或两种以上的组合。

7. 一种权利要求5或6所述的组合物的制备方法, 其特征在于, 所述的组合物的制备方法包括:

- 1) 载体活化: 将载体加入到活化缓冲液中, 并依次加入Sulfo-NHS溶液, EDC溶液;
- 2) 瓜氨酸修饰肽抗原包被或偶联在载体表面: 向步骤1) 活化后的载体溶液中加入瓜氨酸修饰肽抗原进行包被或偶联。

8. 一种权利要求1所述的瓜氨酸修饰肽抗原或权利要求5-6任一所述的组合物在制备检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具中的用途; 优选的, 所述的瓜氨酸修饰肽抗原或组合物在制备阴性类风湿关节炎的诊断工具中的用途。

9. 一种检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具, 其特征在于, 所述的诊断工具包括权利要求1所述的瓜氨酸修饰肽抗原或权利要求5或6所述的组合物, 其中, 所述的诊断工具选自试剂盒、诊断试剂、基因芯片、蛋白芯片或免疫检测试纸中的一种。

10. 根据权利要求9所述的诊断工具, 其特征在于, 所述的诊断工具为试剂盒, 所述的试剂盒还包括标记有标记物的二抗、封闭缓冲液和/或清洗缓冲液。

一种瓜氨酸修饰肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体涉及抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体血清学检测技术,特别是涉及瓜氨酸修饰肽抗原、诊断工具或其制备方法及在CCP阴性类风湿关节炎患者自身抗体检测中的应用。

背景技术

[0002] 类风湿关节炎(RA,Rheumatoid Arthritis)是最常见的全身性自身免疫疾病之一,世界范围约0.5~1%人群罹患此病。RA是系统性自身免疫疾病,患者常伴随关节慢性炎症反应,遭受疾病慢性过程,可导致进行性关节破坏、骨侵蚀、畸形等。类风湿关节炎RA最重要的血清学发现:患者血清中含有特异识别瓜氨酸修饰蛋白的自身抗体。约70%的RA患者血清中含有识别瓜氨酸修饰蛋白自身抗体(ACPA,Anti-citrullinated protein antibody),这些瓜氨酸修饰蛋白被称为自身抗原。ACPAs抗体检测是RA诊断金标准重要检测指标。

[0003] 研究表明抗瓜氨酸修饰蛋白自身抗体的产生伴随RA患者疾病进程,在临床诊断方面,ACPAs对RA患者有很高的特异性和灵敏度,对RA早期患者也有着较高的灵敏度。对于超早期RA患者,其显示临床症状之前,甚至十几年前,就能检测到瓜氨酸自身抗体存在。同时抗瓜氨酸自身抗体对RA患者预后有重要作用,可预测疾病发展状态。75%类风湿关节炎患者确诊1~2年内,会发生不可逆骨关节侵蚀,ACPAs抗体阳性较ACPAs抗体阴性RA患者骨侵蚀程度更严重,ACPAs抗体水平越高,RA患者发病时间越短。

[0004] 目前临床使用商业化环瓜氨酸肽(CCP,cyclic citrullinated peptide)检测试剂盒作为RA患者辅助诊断检测方法,CCP检测试剂盒可以检测患者血清中抗环瓜氨酸修饰肽自身抗体。第一代瓜氨酸检测试剂盒CCP1,抗原来自丝聚合蛋白原(Profilaggrin),使用Elisa检测方法,包被丝聚合蛋白原瓜氨酸修饰肽作为抗原,检测患者血清中瓜氨酸修饰蛋白自身抗体。基于CCP1检测试剂盒,开发了CCP2检测试剂盒,对CCP1瓜氨酸修饰肽进行改造,将多肽序列中两个丝氨酸替换为半胱氨酸,合成环瓜氨酸修饰肽即CCP(cyclic citrullinated peptide),不仅增加了抗原的稳定性,同时也提高了CCP检测的灵敏度和特异性。CCP2商品化检测试剂盒于2002年上市,并迅速广泛的应用于临床检测,现在仍然是RA检测临床最常用金标准。目前至少有六种常见试剂盒,分别来自Axis-Shield(US)、Euro-Diagnostica(The Netherlands)、Euroimmun(Germany)、Inova(US)、Phadia(Sweden/Germany)、Abbott(US)。CCP2检测试剂盒基于同一种CCP2抗原肽,在检测方面有稍许差别,检测灵敏度为66.7%~77.7%,特异性为86.1%~98.8%。

[0005] CCP抗体作为RA疾病诊断和进展标志物显示了较好的临床应用前景。伴随CCP2检测靶点的研究,出现很多RA患者特异性瓜氨酸修饰蛋白抗体,如Anti-citrullinated fibrinogen antibodies,Anti-citrullinated fibronectin,Anti-citrullinated vimentin/Anti-Sa antibody,Anti-mutated and citrullinated vimentin(MCV)等,但这些标志物尚未广泛应用于临床检测。随着分子诊断技术的发展,RA分子诊断进一步更新,近

几年出现CCP第三代检测试剂CCP3.1 (Inova,US) 得到广泛关注,CCP3.1抗体可检测患者血清抗体IgG及IgA水平,CCP3肽序列未公开,制约了CCP3实验室研究,有研究表明在RA诊断应用方面CCP3.1特异性低于CCP2.Anti-CarP (Anti-Carbamylated protein) 抗体是近几年鉴定出新型RA特异性检测抗体,与CCP抗体相比可识别不同的蛋白翻译后修饰类型,43%的RA患者血清存在抗氨甲酰化抗体。

[0006] CCP2检测试剂盒对RA患者有着很高的特异性和灵敏度,然而丝聚合蛋白在关节处并不表达,因而CCP2不能作为关节特异性抗原。一般认为在RA疾病进程中,表达在关节处的某种抗原引发抗体反应,CCP2模拟了其抗原表位,因而可以被自身抗体所识别,其临床检测灵敏度达70%。

[0007] 一直以来,人们研究的重点大多为CCP抗体阳性RA患者,专利CN1602426A公开了一种从患有类风湿关节炎的患者中检测自身抗体的方法,包括所述的自身抗体与包含XG基序的肽单元,和包含XnonG基序的肽单元接触。专利CN101918432A公开了一种选定的合成肽模拟序列的三维基质,所述的合成肽模拟序列优先被从患有风湿性关节炎的患者中检测到的自身免疫抗体所识别,所述合成肽模拟序列能够提高对症状发生前的患者、表现出风湿性关节炎症状的患者以及确诊为风湿性关节炎阳性患者中的这些自身抗体进行检测的特异性和敏感性。专利CN101957365A公开了一种检测CCP和IgG双特异性抗体的试剂盒,该试剂盒可以检测存在于类风湿关节炎患者血清中的一种天然双特异性抗体,使用方便,简单易行。专利CN102323402A公开了一种CCP抗体体外检测的试剂盒及其制备方法,该试剂盒可应用于类风湿性关节炎的辅助诊断。专利CN102796173A公开了一种类风湿性关节炎的抗原表位及其应用,该抗原表位只与患者血清中的IgG结合,而不与健康人血清反应,可用于制备诊断类风湿性关节炎的药物。

[0008] 但目前临床仍然有约30%类风湿关节炎患者尚未有明确检测指标,这类患者称为抗瓜氨酸阴性 (CCP-) 类风湿关节炎患者。瓜氨酸检测试剂一般靶向单个蛋白分子,对RA某亚型患者有良好特异性。一系列研究表明抗瓜氨酸阳性 (CCP+) 患者与抗瓜氨酸阴性 (CCP-) RA患者有着显著不同的临床表现,对于CCP-类风湿关节炎患者临床诊断信息的缺失,部分受限于目前检测方法体系未能检测出CCP-患者携带的特异性指征,CCP-患者可能是含有特异性瓜氨酸标志物的RA患者亚型。合并多个靶点的多重检测是非常有意义的尝试,可细分RA患者自身抗体类型,从而更好地为临床诊治提供依据。

[0009] 专利CN106950365A公开了一种ACPA阴性的RA诊断标志物及其应用,具体为脱氧辅蛋白双加氧酶即DOHH或其片段在制备用于诊断抗瓜氨酸多肽抗体阴性的类风湿性关节炎疾病的试剂中的用途。专利CN106950366A公开了一种ACPA阴性的RA诊断标志物及其应用,具体为Pentaxin相关蛋白3即PTX3或其片段在制备用于诊断抗瓜氨酸多肽抗体阴性的类风湿性关节炎疾病的试剂中的用途。但这些阴性类风湿性关节炎的诊断特异性仅为90%。

发明内容

[0010] 为解决临床30%的RA患者缺少明确标志物的问题,本发明人鉴定得到瓜氨酸修饰肽,并将其应用到CCP阴性类风湿关节炎患者检测中,同时提供一种灵敏度、特异性好的瓜氨酸抗体检测试剂盒。

[0011] 本发明的第一方面,涉及一种瓜氨酸修饰肽抗原,所述瓜氨酸修饰肽抗原的序列

选自下列氨基酸序列中的一种：

[0012] 1) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示序列的全部或部分；

[0013] 2) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性程度的序列；

[0014] 3) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列与SEQ ID NO:1所示序列的差异不超过5、4、3、2或1个氨基酸；

[0015] 4) 所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为SEQ ID NO:1的变体，其中所述变体与SEQ ID NO:1的差异包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的序列或至少一个N-/C-末端延伸。

[0016] 优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性程度的序列，且所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列的第七位至第九位的氨基酸为L-(Cit)-G；

[0017] 优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列与SEQ ID NO:1所示序列的差异不超过5、4、3、2或1个氨基酸，且所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列的第七位至第九位的氨基酸为L-(Cit)-G；

[0018] 优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列为SEQ ID NO:1的变体，其中所述变体与SEQ ID NO:1的差异包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的序列或至少一个N-/C-末端延伸，且所述瓜氨酸修饰肽抗原的氨基酸序列的第七位至第九位的氨基酸为L-(Cit)-G。

[0019] 进一步优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原序列的氨基酸序列为SEQ ID NO:1：

[0020] NLNGGLL-(Cit)-GIEILNQ

[0021] 优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原序列通过化学合成方法制备。

[0022] 优选的，所述瓜氨酸修饰肽抗原的序列能够结合类风湿关节炎患者自身抗体。进一步优选的，所述自身抗体选自IgG或IgA。

[0023] 优选的，一种检测CCP阴性关节炎患者自身抗体标志物的瓜氨酸修饰肽，包括瓜氨酸修饰肽抗原SEQ ID NO:1所示序列的全部或部分或与SEQ ID NO:1具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性程度的序列或与SEQ ID NO:1所示序列的差异不超过5、4、3、2或1个氨基酸或SEQ ID NO:1的变体，其中所述变体与SEQ ID NO:1的差异包括取代、缺失和/或插入一个或多个氨基酸残基的序列或至少一个N-/C-末端延伸。

[0024] 本发明的第二方面，涉及一种编码第一方面所述瓜氨酸修饰肽抗原的核苷酸序列。

[0025] 本发明的第三方面，涉及包含第二方面所述的核苷酸序列的基因载体。

[0026] 本发明的第四方面，涉及包含第三方面所述基因载体的细胞。

[0027] 本发明的第五方面，涉及一种组合物，所述组合物包括第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原和载体。

[0028] 优选的，所述的载体为固相载体。

[0029] 本发明所述的固相载体选自酶标板、96孔微孔板、胶体金、微球中的一种或两种以上的组合。优选的，所述微球选自二氧化硅微球、聚苯乙烯微球、磁性微球或生物大分子聚

合物微球中的一种或两种以上的组合。最优选的,所述的微球为聚苯乙烯微球。

[0030] 在本发明的具体实施方式中,所述的载体为结合有荧光染料的聚苯乙烯微球。

[0031] 优选的,所述瓜氨酸修饰肽抗原包被至固相载体的量为1-25 μ g/1,000,000个微球。进一步优选的,所述瓜氨酸修饰肽抗原包被至固相载体的量为5 μ g/1,000,000个微球。

[0032] 优选的,所述的组合物的制备方法包括:

[0033] 1) 载体活化:将载体加入到活化缓冲液中,并依次加入Sulfo-NHS溶液,EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) 溶液;

[0034] 2) 瓜氨酸修饰肽抗原包被或偶联在载体表面:向步骤1) 活化后的载体溶液中加入瓜氨酸修饰肽抗原进行包被或偶联。

[0035] 优选的,所述组合物可以作为基于液相芯片CCP阴性风湿关节炎患者自身抗体检测试剂盒。

[0036] 优选的,所述步骤1) 中Sulfo-NHS溶液、EDC溶液的工作浓度为50mg/mL。

[0037] 进一步优选的,所述组合物的制备方法包括:

[0038] a) 微球预处理:微球超声后,弃上清;去离子水重悬微球,弃上清;

[0039] b) 微球活化:用活化缓冲液重悬微球,依次加入Sulfo-NHS溶液、EDC溶液,震荡混匀,室温避光孵育5-30分钟,弃上清;

[0040] c) 瓜氨酸修饰肽抗原与微球偶联:用偶联缓冲液重悬微球,弃上清;加入500 μ L偶联缓冲液,并加入瓜氨酸修饰肽抗原到重悬微球进行偶联反应,室温避光孵育0.5-3小时,弃上清,用清洗缓冲液清洗微球两次后重悬偶联微球,即得组合物。

[0041] 更进一步优选的,所述步骤b) 中室温避光孵育时间为20分钟。

[0042] 更进一步优选的,所述步骤c) 中室温避光孵育时间为2小时;

[0043] 本发明的第六方面,涉及一种本发明第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原或本发明第五方面所述的组合物在制备检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具中的用途,所述的诊断工具至少包括第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原或第五方面所述的组合物。

[0044] 优选的,本发明第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原或本发明第五方面所述的组合物在制备类风湿关节炎的诊断工具中的用途,其中,所述的类风湿关节炎为阴性类风湿关节炎。

[0045] 优选的,为了便于保存,所述的诊断工具中还包括防腐剂。

[0046] 本发明的第七方面,涉及一种检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具,所述的诊断工具至少包括第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原或第五方面所述的组合物,,所述的诊断工具选自试剂盒、诊断试剂、基因芯片、蛋白芯片或免疫检测试纸中的一种。

[0047] 本发明的第八方面,涉及一种检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的试剂盒,所述的试剂盒包括本发明第一方面所述的瓜氨酸修饰肽抗原或本发明第五方面所述的组合物。

[0048] 优选的,所述的试剂盒还包括标记有标记物的二抗、封闭缓冲液、清洗缓冲液。

[0049] 本发明所述试剂盒可以为诊断目的,也可以为非诊断目的。

[0050] 优选的,所述的检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的方法为间接法定性

检测。

[0051] 优选的,所述的检测为间接法定性检测。

[0052] 优选的,所述的试剂盒的使用步骤包括:

[0053] (1) 制备本发明第五方面所述的组合物;优选的,所述组合物中瓜氨酸修饰肽抗原能够结合IgG抗体和/或IgA抗体。进一步优选的,所述IgG抗体和/或IgA抗体为自身抗体。

[0054] (2) 将待检测样本与步骤(1)制备获得的组合物接触;

[0055] (3) 加入标记有标记物的二抗,形成瓜氨酸修饰肽抗原-IgG抗体和/或IgA抗体-标记二抗复合物;

[0056] (4) 洗涤步骤(3)获得的复合物,并针对标记物进行检测。

[0057] 优选的,步骤(2)中所述的待检测样本选自血清、血浆或抗体。进一步优选的,所述待检测样本为血清。

[0058] 优选的,所述步骤(2)中待检测样本与组合物接触前还包括待检测样本稀释。进一步优选的,所述待检测样本稀释倍数为1:20-1:200。更进一步优选的,所述检测样本稀释倍数为1:50。

[0059] 优选的,所述步骤(3)中所述的标记有标记物的二抗选自标记有酶或荧光素的蛋白或抗体及其偶联物。其中,所述的酶为碱性磷酸酶或过氧化物酶或他们的组合。所述的荧光素选自花青素Cy系列荧光素、Alexa Fluor系列荧光素或异硫氰酸荧光素中的一种或两种以上的组合。所述蛋白或抗体及其偶联物选自亲和素、链霉亲和素、地高辛抗体、组氨酸抗体、含Ni亲和分子或荧光分子抗体中的一种或两种以上的组合。

[0060] 进一步优选的,所述标记有标记物的二抗为Alexa555标记的抗人IgG或抗人IgA抗体。

[0061] 优选的,所述的标记有标记物的二抗的加入浓度为1-10 μ g/mL。进一步优选的,所述的标记有标记物的二抗的加入浓度为4 μ g/mL。

[0062] 优选的,所述步骤(4)中所述的检测为信号检测。进一步优选的,所述信号检测选自荧光法检测、显色法检测、电化学检测、力学检测、DNA编码杂交或测序检测中的一种或两种以上的组合。

[0063] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的信号检测为荧光法检测;所述的信号检测为在波长532nm和635nm进行荧光检测。

[0064] 在本发明的一个具体实施方式中,所述血清中的抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体检测方法包括:取96孔微孔板,加入100 μ L封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C封闭1小时;加入瓜氨酸修饰肽抗原偶联微球及检测样本,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;清洗缓冲液洗涤三次;加入荧光标记二抗;清洗缓冲液洗涤三次,检测缓冲液重悬微球,使用仪器检测。

[0065] 本发明所述的瓜氨酸修饰肽抗原用于检测IgG抗体和/或IgA抗体标志物,对于检测类风湿关节炎患者特异性高(98%),尤其适用CCP阴性类风湿关节炎的诊断,并实现一次反应检测三种或三种以上的指标,为临床诊治提供依据。同时本发明提供的诊断工具具有线性范围广、安全、可靠、易操作的优点。

[0066] 本发明所述的“和/或”包括择一列出的项目以及任何数量的项目组合。

[0067] 本发明所述的“包括”是开放式的描述,含有所描述的指定成分或步骤,以及不会实质上影响的其他指定成分或步骤。

[0068] 本发明所述的“诊断”是指以查明患者过去、诊断时或将来是否患有疾病或病症，或者是查明疾病的进展或将来可能的进展，或者是评估患者对治疗的反应。

附图说明

[0069] 以下，结合附图来详细说明本发明的实施例，其中：

[0070] 图1:类风湿关节炎自身抗体检测试剂盒检测示意图；

[0071] 图2:SEQ ID NO:1肽抗原合成质谱检测结果；

[0072] 图3:应用含有SEQ ID NO:1肽抗原的类风湿关节炎检测试剂盒筛选血清实验组检测结果，其中，HC:健康组， α -CCP-_{RA}:瓜氨酸抗体阴性类风湿关节炎患者组，MFI (Median fluorescent intensity):荧光信号值中位数；

[0073] 图4:应用含有SEQ ID NO:1肽抗原的类风湿关节炎检测试剂盒筛选血清验证组检测结果，其中，HC:健康组， α -CCP-_{RA}:瓜氨酸抗体阴性类风湿关节炎患者组，MFI (Median fluorescent intensity):荧光信号值中位数；

[0074] 图5:应用含有SEQ ID NO:1肽抗原的类风湿关节炎检测试剂盒筛选血清实验组的ROC曲线；

[0075] 图6:应用含有SEQ ID NO:1肽抗原的类风湿关节炎检测试剂盒筛选血清验证组的ROC曲线。

具体实施方式

[0076] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明的部分实施例，而不是全部。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0077] 实施例1瓜氨酸修饰肽的合成

[0078] 1、瓜氨酸修饰肽的序列如下：

[0079] NLNGLL-(Cit)-GIEILNQ (SEQ ID NO:1)

[0080] 2、合成顺序：从序列C端到N端，步骤如下：

[0081] 1) 称取0.3g树脂放入玻璃反应器中，加入DCM(二氯甲烷)溶胀30分钟；

[0082] 2) 抽掉DCM，加入氨基酸序列中第一个氨基酸0.6g，加入0.6g DIEA(二异丙基乙胺)、DMF(二甲基甲酰胺)、DCM，氮气鼓泡反应60分钟，抽掉反应液，加入DMF、MeOH洗涤三次；

[0083] 3) 反应器中加入氨基酸序列中第二个氨基酸0.6g，加入HBTH(1-羟基，苯并，三氯唑四甲基六氟磷酸盐)及DIEA，氮气鼓泡反应30分钟，洗掉液体，茚三酮检测，然后用吡啶和乙酸酐封端。最后洗净，加入适量脱帽液去除Fmoc(9-芴甲氧羰基)保护基，洗净，茚三酮检测；

[0084] 4) 依步骤3)，依次加入序列中的氨基酸；

[0085] 5) 树脂氮气吹干后，反应柱中取下。移至10mL离心管，加入6mL切割液(95%TFA，2%乙二硫醇，2%三异丙基硅烷，1%水)，震荡，滤掉树脂；

[0086] 6) 滤液中加入大量乙醚，析出粗产物，然后离心，清洗后即得粗产物；

[0087] 7) 多肽纯化，高效液相色谱将粗品提纯至90%；

[0088] 8) 多肽冻干,纯化后液体放入冻干机进行浓缩,冻干成白色粉末。

[0089] 3、肽合成质谱检测结果

[0090] 合成的SEQ ID NO:1肽抗原质谱结果见图2所示。序列合成正确,且其分子量为1979.38Dalton。

[0091] 实施例2基于微球检测技术瓜氨酸修饰肽在CCP阴性类风湿关节炎患者检测中的应用

[0092] 1、实验材料与试剂

[0093] 1) 活化缓冲液:0.1M NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 6.2;

[0094] 2) EDC溶液:50mg/mL EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, Thermo Fisher Scientific, IL, USA);

[0095] 3) Sulfo-NHS溶液:50mg/ml sulfo-NHS (Thermo Fisher Scientific, IL, USA);

[0096] 4) 偶联缓冲液:50mM MES, pH5.0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

[0097] 5) 磷酸盐缓冲液PBS:2mM KH_2PO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH7.4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

[0098] 6) 检测/清洗缓冲液:0.05% (v/v) Tween 20溶于0.1MPBS缓冲液;

[0099] 7) 封闭缓冲液:PBS-TBN, 1%BSA溶于0.1MPBS缓冲液;

[0100] 8) 检测抗体:Alexa555标记的anti-human IgG or anti-human IgA antibody (4μg/mL) (Jackson ImmunoResearch, PA, USA)。

[0101] 2、实验方法:

[0102] (1) 试剂盒的制备

[0103] 试剂盒包括组合物和防腐剂。

[0104] 组合物(偶联微球)的制备:取1,000,000个三种微球置于1.5mL离心管,微球超声后,离心管置于磁力架1分钟,弃上清;100μL去离子水重悬微球,弃上清;加入80μL活化缓冲液重悬微球,依次加入10μL Sulfo-NHS溶液、EDC溶液,震荡混匀,室温避光孵育20分钟;孵育后,弃上清;加入250μL偶联缓冲液重悬微球,弃上清;加入500μL偶联缓冲液,并加入5μg瓜氨酸修饰肽抗原到重悬微球进行偶联反应,室温避光孵育孵育2小时;弃上清,用清洗缓冲液洗涤微球两次,封闭缓冲液重悬偶联微球;室温孵育30分钟;弃上清,用清洗缓冲液洗涤微球三次,获得的偶联微球即为组合物。流式细胞仪检测耦合微球数量,检测缓冲液将微球浓度调整为2000个/100μL,储存备用。

[0105] (2) 检测步骤

[0106] 取96孔微孔板,加入100μL封闭缓冲液,37℃封闭1小时;150μL清洗缓冲液洗涤1次;每孔加入100μL耦合微球溶液,并加入2μL血清,4℃孵育过夜;清洗缓冲液洗涤三次;加入Alexa555标记的anti-human IgG或anti-human IgA antibody,形成瓜氨酸修饰肽抗原-自身抗体-标记二抗复合物;清洗缓冲液洗涤三次,检测缓冲液重悬微球,使用仪器检测,其中532nm读取荧光标记二抗信号检测值,635nm读取微球ID号。

[0107] 3、实验数据处理

[0108] 读取信号检测值MFI (Median fluorescent intensity),并作图。

[0109] 4、样本信息

[0110] 共收集健康人样本110例,CCP阴性类风湿关节炎患者114例,数据分析将筛选的血

清样本随机分为实验组 (Training) 和验证组 (Validation), 实验组健康人52例, CCP阴性类风湿关节炎患者53例, 验证组健康人58例, CCP阴性类风湿关节炎患者61例。临床样本信息如表1和表2所示, 其中, HC: 健康组, α -CCP- α _RA: 瓜氨酸抗体阴性类风湿关节炎患者。类风湿关节炎自身抗体检测试剂盒检测示意图见图1。

[0111] 表1临床样本信息

	HC	α -CCP- α _RA
例数	52	53
年龄 (Mean \pm SD)	51.8 \pm 4.0	57.2 \pm 16.0
男性 (%)	14(26.9%)	15(28.3%)
女性 (%)	38(73.1%)	38(71.7%)

[0113] 表2临床样本信息

	HC	α -CCP- α _RA
例数	58	61
年龄 (Mean \pm SD)	45.8 \pm 22.7	55.0 \pm 14.1
男性 (%)	12(20.7%)	14(23.0%)
女性 (%)	46(79.3%)	47(77.0%)

[0115] 5、检测结果

[0116] 试剂盒筛选血清实验组和验证组的检测结果见图3和图4, 其中, IgA: IgA自身抗体检测; IgG: IgG自身抗体检测。试剂盒筛选血清实验组和验证组结果ROC曲线的检测结果见图5和图6, 其中, 实验组灵敏度和特异性分别为11.32%、98%, 验证组灵敏度和特异性分别为24.59%、98%。

[0117] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于上述实施方式中的具体细节, 在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0118] 另外需要说明的是, 在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征, 在不矛盾的情况下, 可以通过任何合适的方式进行组合, 为了避免不必要的重复, 本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

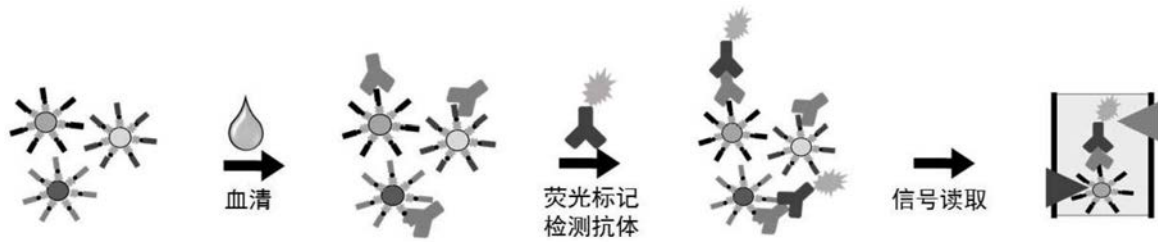


图1

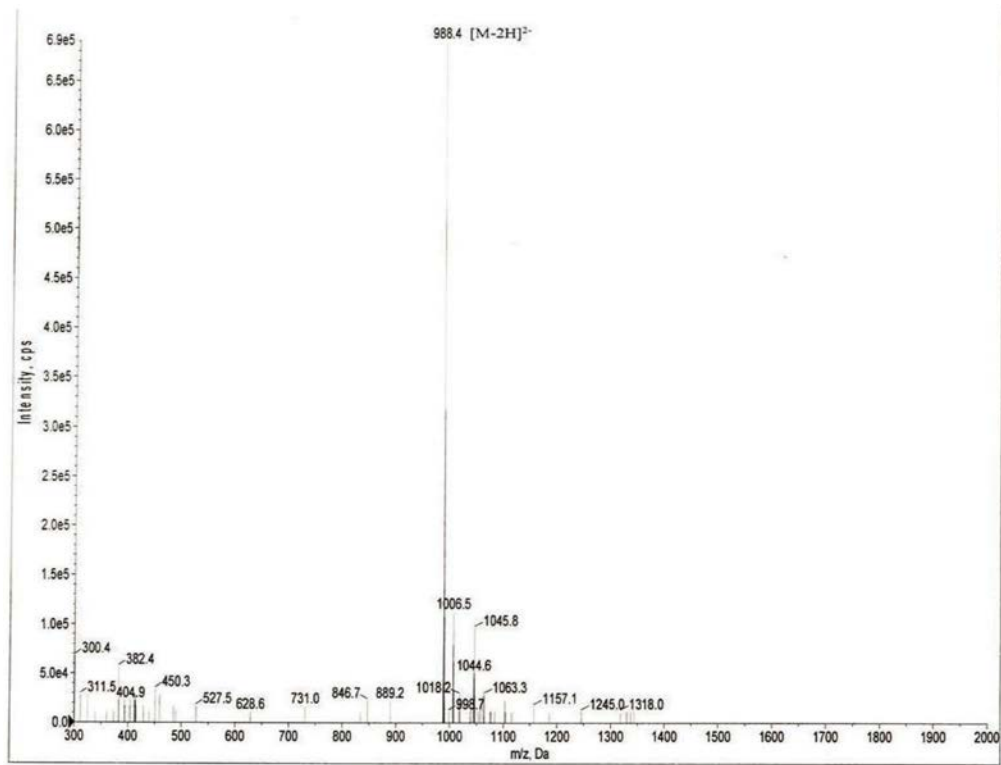


图2

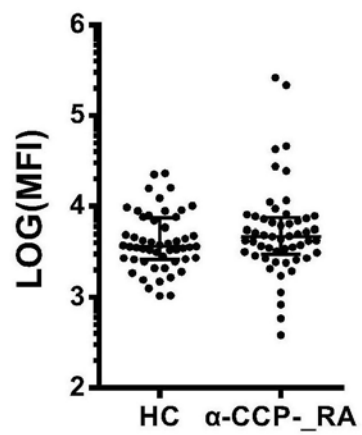


图3

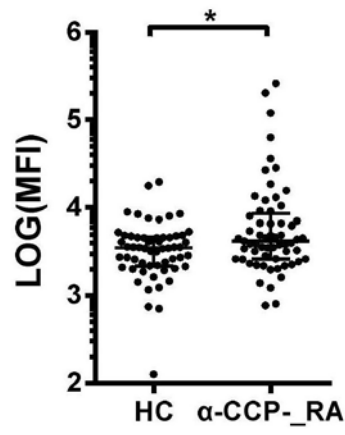


图4

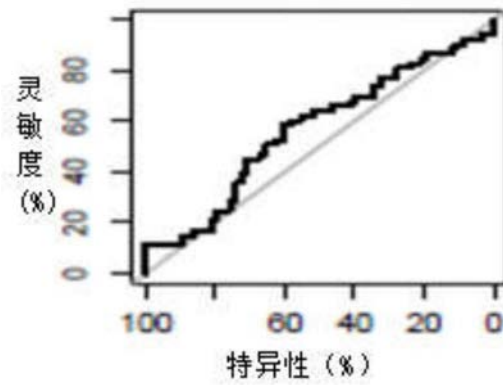


图5

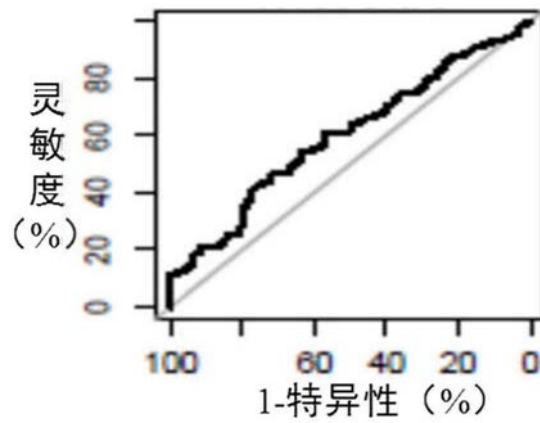


图6

专利名称(译)	一种瓜氨酸修饰肽及其应用		
公开(公告)号	CN108948174A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810496268.7	申请日	2018-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京蛋白质组研究中心		
申请(专利权)人(译)	北京蛋白质组研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	北京蛋白质组研究中心		
[标]发明人	于晓波 王红叶		
发明人	于晓波 王红叶		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/531 G01N33/68 G01N33/564		
CPC分类号	C07K14/4713 G01N33/531 G01N33/564 G01N33/6854 G01N2333/47 G01N2800/102		
代理人(译)	张丹		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种瓜氨酸修饰肽抗原及包括瓜氨酸修饰肽抗原的组合物。本发明还提供了瓜氨酸修饰肽抗原或包括瓜氨酸修饰肽抗原的组合物在制备检测抗瓜氨酸修饰肽IgG抗体和/或IgA抗体的诊断工具中的用途。本发明所述的瓜氨酸修饰肽抗原用于检测IgG抗体和/或IgA抗体标志物，解决了临床30%的RA患者缺少明确标志物的问题。本发明提供的诊断工具采用新型类风湿关节炎相关生物标志物的自身抗体所对应的抗原，检测人血清中自身抗体，具有特异性好、灵敏度高、准确性好、线性范围广、安全、可靠、易操作的优点，尤其适用当前临床CCP2无法检测的阴性类风湿关节炎患者的筛选和诊断。

