



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110606881 A

(43)申请公布日 2019.12.24

(21)申请号 201910738465.X

(22)申请日 2019.08.12

(71)申请人 陕西脉元生物科技有限公司

地址 710003 陕西省西安市高新区草堂高
新科技企业加速器8号楼

(72)发明人 闫亚平 黎培 李科

(74)专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216

代理人 李婷 金艳婷

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备
方法及应用

(57)摘要

本发明公开了人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备方法及应用,本发明将MOG抗原包被于NC膜上制成抗MOG受体检测材料,人血清和脑脊液中的特异性MOG抗体会与抗原结合,利用碱性磷酸酶底物-配体反应进行显色,并在显色反应中加入本发明的封闭材料,可用通过肉眼观察直接判断检测样品中是否含有MOG抗体。该方法具有灵敏度高,操作简便,快速检测等优点,有助于抗MOG受体脑炎的认识和诊断。



1. 人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,获取MOG的CDS序列作为目的基因,将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,得到重组质粒载体17T2A-MOG;

其中,17T2A质粒载体包括含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列、原核复制子pUC Ori序列、病毒复制子SV40 Ori序列、RSV启动子、慢病毒5' LTR、慢病毒3' LTR、Gag顺式元件、RRE顺式元件、env顺式元件、cPPT顺式元件、eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件、CMV启动子、MCS多克隆位点以及T2A元件;

步骤2,将重组质粒载体17T2A-MOG转染入293T细胞中,得到17T2A-MOG-293T细胞;

步骤3,使用免疫亲和层析法提取17T2A-MOG-293T细胞中的膜蛋白-细胞膜复合物;

步骤4,将步骤3提取得到的MOG抗原固化在载体膜上,得到人体液中抗MOG自身抗体的检测材料。

2. 如权利要求1所述的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,其特征在于,所述的步骤1具体包括以下步骤:

步骤1.1:通过人工合成或者PCR方法获得MOG的CDS序列作为目的基因,在目的基因两端加设SalI/NotI的酶切位点;

步骤1.2:将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,插入位点为SalI/NotI,得到重组质粒,将该重组质粒命名为17T2A-MOG;

步骤1.3:对重组质粒17T2A-MOG进行测序,将测序正确的带有目的基因的菌种扩大培养后进行质粒提取,得到重组质粒载体17T2A-MOG。

3. 如权利要求1所述的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,其特征在于,所述的步骤2中使用PEI转染方法、lipofectamin2000、lipofectamin3000、lipA或电转法将17T2A-MOG转染入293T细胞中,其中,电转条件为1500V~2000V、25 μ F、200 Ω 。

4. 如权利要求1所述的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,其特征在于,所述的步骤3具体包括以下步骤:

步骤3.1,将预处理后的凝胶微珠与等体积的抗MOG一抗偶联混合,置于4 $^{\circ}$ C缓慢颠倒混匀1h,14000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清;加入500 μ l由1XPBS和0.1%~1%BSA组成的稀释液中,置于4 $^{\circ}$ C缓慢颠倒混匀5min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清;

步骤3.2,将偶联产物加入封闭溶液中,其中,封闭溶液为20~25mmol/L的DMP和0.1~0.5mol/L的三乙醇胺溶液按照体积比为1:1的混合溶液;

步骤3.3,将封闭后产物与MOG粗蛋白溶液混合,室温环境下缓慢颠倒混匀1~2h,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,弃上清;加入200 μ l的1XPBS洗涤2次,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,弃上清;

步骤3.4,在沉淀中加入80~100 μ l洗脱液,室温缓慢摇晃5~10min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,收上清,所得上清液即为膜蛋白-细胞膜复合物。

5. 如权利要求1所述的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,其特征在于,所述的载体膜为硝酸纤维素膜、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。

6. 权利要求1至5任一项所述的制备方法制备的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料,其特征在于,该检测材料包括载体膜和固化在载体膜上的从17T2A-MOG-293T细胞提取的膜

蛋白-细胞膜复合物。

7. 将权利要求1至6任一项所述的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料用于检测样品中的MOG抗体。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,检测样品中的MOG抗体的检测过程具体包括:将待检测样品和封闭材料混合后孵育,孵育后加入到权利要求1至6任一项所述的抗MOG自身抗体的检测材料中再次孵育,洗涤后加入AP标记羊抗人IgG二抗孵育后进行底物显色;

其中,封闭材料包括经过处理的载体膜和固化在处理载体膜上的17T2A-293T细胞蛋白;所述的载体膜的处理过程为:将载体膜加入蔗糖与葡萄糖按照体积摩尔浓度比为1:1比例混合的混合试剂中,在100℃烘干20-30min或者37℃烘干8~16h。

人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备方法及应用。

背景技术

[0002] 抗髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein,MOG)脑炎是一种神经系统自身免疫病。据MOG脑炎国际诊断共识(简称国际共识),基于免疫学、神经病理学、血清学及人群研究各方面证据表明,MOG脑炎是区别于经典MS和AQP4-IgG阳性的视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSD)的一种独立疾病实体,现被称为MOG-IgG阳性相关脑脊髓炎(MOG-IgG-associated encephalo myel-itis,MOG-EM)。现有的血清MOG-IgG检测方法中,使用线性化或变性MOG肽作为抗原的酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中的MOG-IgG,结果表明MOG抗体与多发性硬化(MS)有相关性,但近来新一代基于细胞的检测方法中,用全长、构象完整的MOG抗原检测自身MOG-IgG抗体,结果表明血清MOG-IgG阳性的患者与视神经炎(ON)(多为复发性)、脊髓炎、脑干脑炎以及急性播散性脑脊髓炎(ADEM)样表现等密切相关,而非经典的MS。2018版MOG脑炎国际共识,将通过使用全长人类MOG蛋白作为靶抗原的基于细胞的测定法检测到的MOG-IgG血清阳性作为MOG脑炎诊断标准之一。

[0003] 目前,以完整、具有空间构象的MOG蛋白作为抗原的检测方法主要为基于细胞的检测方法(cell-Based assay,CBA),包括免疫荧光法和流式细胞法,但此类检测方法的主要缺陷在于耗时长、操作复杂、需特殊仪器、抗体需求量大、成本高、及灵敏度不高,利用这些方法很难一次性对大批量样本同时检测。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的是提供一种对MOG自身抗体进行检测的检测材料、该材料的制备方法及应用,解决现有的检测方法检测耗时长、步骤繁琐、抗体需求量大、成本高、灵敏度低等问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案予以实现:

[0006] 人体液中抗MOG自身抗体的检测材料的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤1,获取MOG的CDS序列作为目的基因,将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,得到重组质粒载体17T2A-MOG;

[0008] 其中,17T2A质粒载体包括含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列、原核复制子pUC Ori序列、病毒复制子SV40 Ori序列、RSV启动子、慢病毒5' LTR、慢病毒3' LTR、Gag顺式元件、RRE顺式元件、env顺式元件、cPPT顺式元件、eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件、CMV启动子、MCS多克隆位点以及T2A元件;

[0009] 步骤2,将重组质粒载体17T2A-MOG转染入293T细胞中,得到17T2A-MOG-293T细胞;

[0010] 步骤3,使用免疫亲和层析法提取17T2A-MOG-293T细胞中的膜蛋白-细胞膜复合物;

[0011] 步骤4,将步骤3提取得到的MOG抗原固化在载体膜上,得到人体液中抗MOG自身抗体的检测材料。

[0012] 具体的,所述的步骤1具体包括以下步骤:

[0013] 步骤1.1:通过人工合成或者PCR方法获得MOG的CDS序列作为目的基因,在目的基因两端加设SalI/NotI的酶切位点;

[0014] 步骤1.2:将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,插入位点为SalI/NotI,得到重组质粒,将该重组质粒命名为17T2A-MOG;

[0015] 步骤1.3:对重组质粒17T2A-MOG进行测序,将测序正确的带有目的基因的菌种扩大培养后进行质粒提取,得到重组质粒载体17T2A-MOG。

[0016] 优选的,所述的步骤2中使用PEI转染方法、lipofectamin2000、lipofectamin3000、lipA或电转法将17T2A-MOG转染入293T细胞中,其中,电转条件为1500V~2000V、25μF、200Ω。

[0017] 具体的,所述的步骤3具体包括以下步骤:

[0018] 步骤3.1,将预处理后的凝胶微珠与等体积的抗MOG一抗偶联混合,置于4℃缓慢颠倒混匀1h,14000rpm、4℃、1min离心,弃上清;加入500μl由1XPBS和0.1%~1%BSA组成的稀释液中,置于4℃缓慢颠倒混匀5min,3000rpm、4℃、1min离心,弃上清;

[0019] 步骤3.2,将偶联产物加入封闭溶液中,其中,封闭溶液为20~25mmol/L的DMP和0.1~0.5mol/L的三乙醇胺溶液按照体积比为1:1的混合溶液;

[0020] 步骤3.3,将封闭后产物与MOG粗蛋白溶液混合,室温环境下缓慢颠倒混匀1~2h,3000rpm、4℃、5~8min离心,弃上清;加入200μl的1XPBS洗涤2次,3000rpm、4℃、5~8min离心,弃上清;

[0021] 步骤3.4,在沉淀中加入80~100μl洗脱液,室温缓慢摇晃5~10min,3000rpm、4℃、5~8min离心,收上清,所得上清液即为膜蛋白-细胞膜复合物。

[0022] 优选的,所述的载体膜为硝酸纤维素膜、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。

[0023] 本发明还公开了上述制备方法制备的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料,该检测材料包括载体膜和固化在载体膜上的从17T2A-MOG-293T细胞提取的膜蛋白-细胞膜复合物。

[0024] 本发明还公开了上述人体液中抗MOG自身抗体的检测材料用于检测样品中的MOG抗体。

[0025] 具体的,检测样品中的MOG抗体的检测过程具体包括:将待检测样品和封闭材料混合后孵育,孵育后加入到权利要求1至6任一项所述的抗MOG自身抗体的检测材料中再次孵育,洗涤后加入AP标记羊抗人IgG二抗孵育后进行底物显色;

[0026] 其中,封闭材料包括经过处理的载体膜和固化在处理载体膜上的17T2A-293T细胞蛋白;所述的载体膜的处理过程为:将载体膜加入蔗糖与葡萄糖按照体积摩尔浓度比为1:1比例混合的混合试剂中,在100℃烘干20~30min或者37℃烘干8~16h。

[0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0028] (1) 本发明选用改造后的慢病毒载体17T2A,利用病毒表达系统将MOG蛋白表达于293T细胞膜上,该载体不包含荧光基因,更大限度的减少了载体的大小,更有助于目的基因

的表达。同时本发明利用复合提取液提取MOG蛋白-细胞膜复合物,获得了结构更完整的MOG蛋白-细胞膜复合物。因此,本发明制备方法可获得浓度更高的MOG蛋白-细胞膜复合物,用本发明的检测材料检测体液中MOG抗体,具有更高的灵敏性和特异性。

[0029] (2) 目前的MOG抗体的检测方法主要有间接免疫荧光法、流式细胞术、酶联免疫吸附法、蛋白质免疫印迹法,其中间接免疫荧光法与蛋白质免疫印迹法均均有操作复杂,操作技巧强(需专业人士或有经验人士操作),且检测时长较长(需两天);酶联免疫吸附法与流式细胞术检测成本高,同时需要特殊设备及需要有经验人士操作。而本发明的检测方法具有操作简单,不需要专业的设备辅助,且检测周期短,整个实验流程仅需1小时左右。

[0030] (3) 本发明在检测过程中单独制备了封闭材料,该封闭材料来源于与检测材料同源的对照细胞,将该封闭材料应用于MOG抗体的检测能有效的降低杂质蛋白带来的污染,增加检测灵敏度,强阳性血清稀释千倍以上,中等强度阳性血清稀释百倍以上倍,弱阳性血清稀释10倍以上,仍可检测出抗体。

附图说明

[0031] 图1是本发明制备的检测材料用于检测样品时的显色反应检测过程。

[0032] 图2是本发明的17T2A质粒载体图谱。

[0033] 图3是实施例1的提取物的检测结果图。

[0034] 图4是实施例3的检测结果,其中,图4a为检测材料的示意图,其中A区域包被MOG细胞膜复合物,B区域包被对照细胞膜复合物;图4b为阳性判读结果;图4c为阴性判读结果;图4d为阴性判读结果。

[0035] 图5是实施例3和对比例1获得的检测结果。

[0036] 图6是实施例3和对比例2获得的检测结果。

[0037] 图7是实施例3和对比例3获得的检测结果。

具体实施方式

[0038] 以下给出本发明的具体实施例,需要说明的是以下实施例仅是本发明的较佳实施例,本发明并不局限于以下具体实施例中,凡在本申请技术方案基础上做的等同变换均落入本发明的保护范围。

[0039] 本发明下列实施例中的pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP载体购于SBI公司,293T细胞购买于ATCC公司,PLP1质粒、PLP2质粒、PMDG质粒均购于SBI公司,所使用的载体膜如NC膜、PVDF膜、尼龙膜、硝酸纤维素膜、玻璃纤维垫等均购买于MILLIPORE公司。

[0040] 实施例1

[0041] 步骤1,质粒构建:获取MOG的CDS序列作为目的基因,将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,得到重组质粒载体17T2A-MOG,测序正确后提取质粒进行后续实验,本实施例的质粒载体构建具体包括以下步骤:

[0042] 步骤1.1:通过PCR方法(也可选人工合成法)获得MOG的CDS序列作为目的基因,并在目的基因两端加设SalI/NotI的酶切位点;

[0043] 步骤1.2:将带有酶切位点的目的基因插入17T2A质粒载体中,插入位点为SalI/NotI,得到重组载体,将该重组载体命名为17T2A-MOG;

[0044] 其中,17T2A质粒载体是在pCDH-CMV-MCS-EF1a-copGFP载体的基础上删除copGFP元件,同时以T2A元件替换FE1启动子,改造后的质粒载体图谱如图2所示。具体的,17T2A质粒载体包括含氨苄青霉素抗性基因AmpR序列、原核复制子pUC Ori序列、病毒复制子SV40 Ori序列、RSV启动子、慢病毒5' LTR、慢病毒3' LTR、Gag顺式元件、RRE顺式元件、env顺式元件、cPPT顺式元件、eWPRE增强型土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件、CMV启动子、MCS多克隆位点以及T2A元件;

[0045] 其中,17T2A质粒载体的制备步骤为:

[0046] (1) 合成引物从pCDH-CMV-MCS-T2A-puromycin载体扩增获得NotI-T2A-puromycin-SalI片段,将PCR产物使用NotI和SalI酶进行双酶切。

[0047] (2) pCDH-CMV-MCS-EF1a-copGFP载体通过NotI和SalI双酶切去除EF1a-copGFP。

(3) 将NotI-T2A-puromycin-SalI连入酶切后的pCDH-CMV-MCS-EF1a-copGFP载体,获得17-T2A。

[0048] 步骤1.3:对重组质粒17T2A-MOG进行测序,将测序正确的带有目的基因的菌种与载体菌种(即17T2A载体)扩大培养后进行质粒提取,得到重组载体17T2A-MOG。

[0049] 在本实施例中,取17T2A质粒的甘油菌种接种于氨苄青霉素抗性的3mLLB液体培养基,置37℃恒温培养箱,220r/min,过夜摇菌。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。

[0050] 17T2A载体酶切:50μL酶切体系,3μg载体,SalI、NotI酶各1μL,10x酶切Buffer 5μL,ddH₂O补齐至50μL,37℃水浴酶切2h。

[0051] 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。

[0052] 目的基因与载体片段连接:20μL连接体系,50ng 17T2A载体,200ngMOG基因片段,T4连接酶1μL,ddH₂O补齐至20μL,16℃连接过夜。

[0053] 将上述连接产物质粒分别转化入大肠杆菌DH5α中进行同源重组,涂布于氨苄青霉素固体LB培养板,37℃过夜,第二日挑取5个菌株,接种于氨苄青霉素(25ug/ml)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。

[0054] 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。最终得到重组质粒载体17T2A-MOG。

[0055] 步骤2,慢病毒的扩增及感染:

[0056] 将重组质粒载体17T2A-MOG转染入293T细胞中,得到慢病毒17T2A-MOG-293T细胞,同时,该步骤还同时设置有对照组17T2A质粒(PS)的扩增及感染,具体包括以下步骤:

[0057] 步骤2.1,293T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,将293T细胞培养加入高糖培养基中,待细胞融合至90%按1:5传代,置37℃,5%CO₂的细胞培养箱中培养。

[0058] 慢病毒包装:待T-25培养瓶中293细胞长至培养皿底面积70%~80%,更换无血清DMEM高糖培养基继续培养2h,取步骤1得到的17T2A-MOG重组载体和17T2A载体(PS)总量15μg,与辅助质粒PLP1质粒、PLP2质粒、PMDG质粒涡旋混合,其中,PLP1质粒:PLP2质粒:PMDG质粒的质量比为6.5:2.5:3.5,PEI 82.5μg,按着PEI转染方法分别转染17T2A-MOG重组载体和

17T2A载体,6h后更换新鲜培养液,12h后再次更换培养基。

[0059] 其中,转染方法还可以使用lipofectamin2000、lipofectamin3000、lipA或电转(电转选用低场强0.4cm电转杯,电转条件1500V~2000V、25 μ F、200 Ω)。

[0060] 2.3,慢病毒感染:转染24h后收集细胞培养液,加入到另一皿293T细胞中(细胞密度约为50%~60%),培养24h后加入嘌呤霉素进行抗生素压力筛选,终浓度为6~8 μ g/mL。筛选24h后进行细胞传代,培养基中添加3 μ g/mL嘌呤霉素,经过3~5次传代后获得稳定表达MOG蛋白的细胞系(以下简称MOG细胞)和稳定表达17T2A的对照细胞系(以下简称17T2A细胞,PS),准备下一步提取蛋白。

[0061] 步骤3:采用免疫亲和层析法提取17T2A-MOG-293T细胞的膜蛋白-细胞膜复合物,具体包括以下步骤:

[0062] MOG粗蛋白溶液制备:取准备好的17T2A-MOG-293T细胞,弃细胞培养液,用CaMg Buffer (CaCl₂ 2mmol/L, MgCl₂ 10mmol/L, KCl 60mmol/L, NaCl 15mmol/L) 清洗细胞1~2次,加入1.2~1.6ml低渗裂解液(ddH₂O, 1xPI, 0.25~0.5x CaMgBuffer),置于摇床上5~10min。用细胞刮板刮下全部细胞,收集细胞及悬液至2mL EP管中,枪头吹打20~30次,250~300g,4 $^{\circ}$ C, 3min,收集上清至新的2mL EP管中;

[0063] 基质的预处理:取500 μ l商业化凝胶微珠,加入500 μ l稀释液(0.1mol/L PBS, 0.1~1%BSA),置于4 $^{\circ}$ C、缓慢颠倒混匀30min。3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。再次500 μ l加入稀释液(1XPBS, 含0.1~1%BSA)重悬

[0064] 偶联:预处理的基质中加入等体积的商业化的抗MOG一抗(用稀释液1:200稀释),置于4 $^{\circ}$ C缓慢颠倒混匀1h。14000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。加入500 μ l稀释液(1XPBS, 含0.1~1%BSA),置于4 $^{\circ}$ C缓慢颠倒混匀5min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。

[0065] 封闭:(1)将偶联产物中加入1ml封闭溶液,室温下缓慢颠倒混匀30min,再加入500 μ l三乙醇胺溶液(1X PBS, 0.1~0.5mol/L三乙醇胺, 50mmol/L Tris-HCL调节pH为8.0~9.0),室温缓慢颠倒混匀5min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。此步骤重复2次。

[0066] 其中,封闭溶液为体积比为1:1的DMP(20~25mmol/L)和三乙醇胺溶液(1X PBS, 0.1~0.3mol/L三乙醇胺, 20mmol/L Tris, pH=8.0~9.0)的混合溶液。

[0067] (2)加入1ml封闭交联剂(1XPBS, 30~60mmol/L乙醇胺, PH 8.0~9.0),室温缓慢颠倒混匀5min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。再加入1ml封闭交联剂,室温颠倒混匀1~2h, 3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。然后加入0.5~1ml 1XPBS,室温颠倒混匀,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。

[0068] 洗涤:将封闭后的产物中加入与等体积的洗脱液(0.05~0.2mol甘氨酸, HCl调节PH为2.5~3.0),室温缓慢颠倒5~10min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。此步骤重复1次。加入0.5~1ml 1XPBS重悬,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、1min离心,弃上清。

[0069] 上样:将经过洗涤处理的产物加入1~2ml提取的MOG粗蛋白溶液,室温环境下缓慢颠倒混匀1~2h,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,弃上清。加入200 μ l 1XPBS洗涤2次,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,弃上清。

[0070] 洗脱:加入80~100 μ l洗脱液(0.1~0.2mol/L甘氨酸, HCl调节PH为2.5~3),室温缓慢摇晃5~10min,3000rpm、4 $^{\circ}$ C、5~8min离心,收上清,重复2次。所得上清液即为膜蛋白-细胞膜复合物,如图3所示为利用MOG抗体,通过Western Blot技术在27KD处出现明确条带,说明

提取的样品包含MOG蛋白。

[0071] 重悬:加入Tris-HCL (50mmol/L, PH=9) 调节溶液的PH至6.8-7.5,再加入重悬液(4-8%NP40:25%BSA体积比为2:1) 4℃,保存。

[0072] 步骤4,取稀释至合适浓度的膜蛋白-细胞膜复合物,取0.8μL,使用移液枪以圆形印记将其点在载体膜(载体一般选择NC膜)上,于37℃烘箱中烘烤10min,即可得到人体液中抗MOG自身抗体的检测材料,于4℃密封保存。

[0073] 在将上述实施例中制备的抗MOG自身抗体检测材料用于检测样品中的MOG抗体时,本发明首先制备了一种新的封闭材料。由于人血清和脑脊液中存在的某些蛋白,在检测过程中会和抗原进行非特异性结合干扰检测结果,本发明使用一种封闭材料对检测样本进行封闭,实施效果发现可显著降低样本背景,以下给出本发明的封闭材料制备的具体实施例。

[0074] 实施例2

[0075] 本实施例公开了一种封闭材料的制备方法,具体包括:

[0076] 1) 将载体膜(本实施例选择玻璃纤维垫)裁成0.5cm×0.5cm的小正方形块,每小块玻璃纤维垫上点15μL 1.9M蔗糖和1.9M葡萄糖的混合液,100℃烤20min,室温放置备用;

[0077] 2) 17T2A细胞(PS)蛋白的提取:刮板刮取上述实施例步骤2.3中获得的17T2A细胞,将17T2A细胞收集于15ml离心管中,1000rpm,5min,室温,弃上清。沉淀加入1mL1×PBS(或生理盐水),吹打混匀将液体转移至1.5ml EP管中,700g,5min,室温,弃上清。加入1/2细胞团块体积的封闭蛋白提取液(1.25%脱氧胆酸钠,0.25%Triton X-100,0.75%CHAPS,20mM NaCl,2×PI),吹打混匀将液体转移至2ml EP管中,涡旋震荡数秒后,静置数分钟直至管中有明显团块生成。补加1/2细胞团块体积0.8%NaCl,吹打,4000g,5min,收集上清,弃沉淀。上清与1/4体积25%BSA混合,即为17T2A细胞蛋白液。

[0078] 3) 在每小块经1)处理过的玻璃纤维垫上点12μL 17T2A细胞蛋白液,75℃烤20min,得到封闭材料,4℃放置备用。

[0079] 封闭材质为玻璃纤维,将对照细胞的蛋白通过高温烘干固定在封闭材料上,使用时加入到血清或脑脊液稀释液中,蛋白可释放到液体中对检测样本中的干扰抗原发生反应,从而达到封闭效果。

[0080] 实施例3

[0081] 将实施例1制备的人体液中抗MOG自身抗体的检测材料用于检测样品中的MOG抗体,具体的,检测样品中的MOG抗体的检测过程包括:

[0082] 1) 将上述实施例步骤4中获得的膜蛋白-细胞膜复合物检测材料置于24孔板中,包被膜蛋白抗原的一面朝上。

[0083] 2) 血清封闭:待检测样品按1:250,用工作液(1×PBS,0.5%TritonX-100,0.04%EDTA)稀释后,每250μL稀释血清中加入一片实施例4制备的封闭材料,室温静置2min后,涡旋震荡数秒,再室温静置5min。

[0084] 3) 血清孵育:将封闭好的血清加入含有膜蛋白-细胞膜复合物检测材料的24孔板中,250μL/孔,将24孔板置于水平摇床(频率约为20次/min),室温孵育25min。

[0085] 4) 洗涤:去除孔内的血清孵育液,加入工作液,500μL/孔,置于摇床(频率约为40次/min),室温3min,弃去孔内工作液,重复清洗共3次。

[0086] 5) 二抗孵育:去除孔内的工作液,加入1:1000稀释的AP标记羊抗人IgG抗体,300μ

L/孔。置于摇床(频率约为20次/min),室温孵育25min。

[0087] 6) 洗涤:去除孔内的二抗孵育液,加入洗涤液(0.8%NaCl,0.5%Triton X-100),500 μ L/孔,置于摇床(频率约为40次/min),室温3min,弃去孔内洗涤液。重复洗涤共3次。

[0088] 7) 显色:去除孔内的洗涤液后,加入底物稀释液(底物:反应缓冲液=1:49)300 μ L/孔,室温避光静置2~5分钟,获得显色结果。

[0089] 8) 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。

[0090] 其中,显色反应检测过程示意图如图1所示。图4所示为本实施例中的检测结果,其中,图4a为本发明制备的人体抗MOG自身抗体检测材料的示意图,其中A区域包被MOG细胞膜复合物;B区域包被对照细胞膜复合物,作为阴性对照;图4b为阳性判读结果;图4c为阴性判读结果;图4d为阴性判读结果。

[0091] 阳性结果判读:本发明制备的膜蛋白-细胞膜复合物检测材料的膜蛋白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4b所示)。

[0092] 阴性结果判读:本发明制备的膜蛋白-细胞膜复合物检测材料的膜蛋白抗原包被区颜色浅于阴性对照区(如图4c所示),或等同于阴性对照区(如图4d所示)等,判定为阴性结果。

[0093] 对比例1

[0094] 本对比例与实施例1的区别在于:步骤3.1中所使用的提取液为10mmol/L CHAPS。

[0095] 检测过程同实施例3,分别对三个已经明确为MOG阳性的血清(1号,2号,3号)进行检测,结果见图5。实施例3组均能正确检出阳性结果,然而对比例1组三个阳性血清均未能检测阳性结果。说明本发明方法中的复合提取液能获得更好的检测效果。

[0096] 对比例2

[0097] 本对比例的检测材料的制备同实施例1,血清的检测过程与实施例3的区别在于:检测过程中不加入实施例2制备的封闭材料,不进行实施例3中的“2) 血清封闭”步骤。

[0098] 两种不同的制备方法分别对三个已经明确为MOG阳性的血清(1号,2号,3号)进行检测,结果见图7。实施例3组均能正确检出阳性结果,然而对比例2组三个阳性血清均未能检测阳性结果。说明本发明方法中的封闭材料的使用能获得更好的检测效果。

[0099] 对比例3

[0100] 本对比例按照申请号201710175642.9的方法进行检测材料制备以及血清样品检测,具体步骤为:

[0101] 1) 通过人工合成获取MOG的CDS序列,并在目的基因两端加设NotI/NheI酶切位点;

[0102] 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,得到带有目的基因的质粒,命名为MOG;按PEI转染试剂转染方法转染培养好的HEK293细胞,得到表达MOG基因的HEK293/pCI-neo-MOG细胞。

[0103] 3) 通过离心去除HEK293/pCI-neo-MOG细胞的细胞核,然后加入5~20mmol/L的CHAPS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MOG-细胞膜复合物。

[0104] 4) 用1×TBS缓冲液稀释MOG-细胞膜复合物,配制成MOG-细胞膜复合物的稀释液,

MOG-细胞膜复合物的稀释液中MOG的浓度为0.1~1mg/mL,然后用划膜仪将MOG-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,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;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MOG自身抗体检测材料,于-20℃密封保存待用;

[0105] 5) 用于检测样品中的MOG抗体,具体检测过程为:

[0106] 制备的人体抗MOG自身抗体检测材料置于12孔板,包被MOG抗原的一面朝上;

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 两种不同的制备方法分别对三个已经明确为MOG阳性的血清(1号,2号,3号)进行检测,结果见图7,实施例3组均能正确检出阳性结果,然而对比例3组三个阳性血清均未能检测阳性结果。



图1

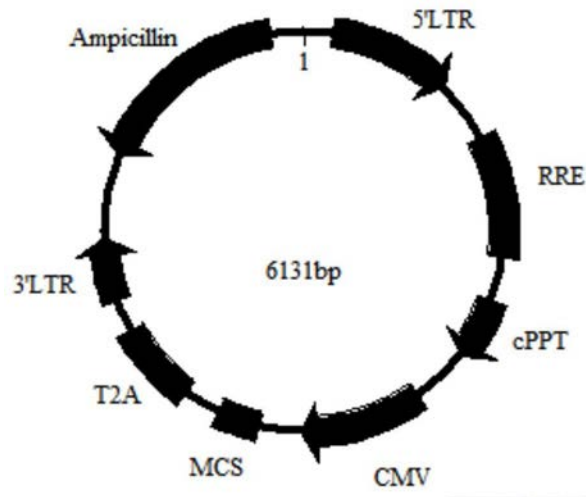


图2

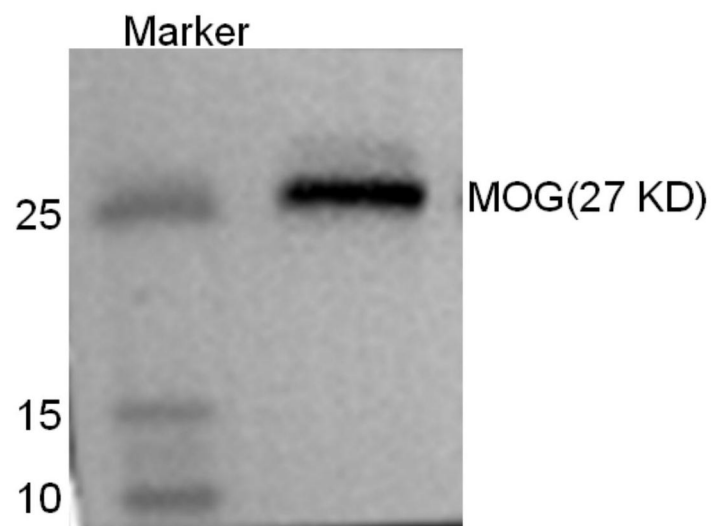


图3

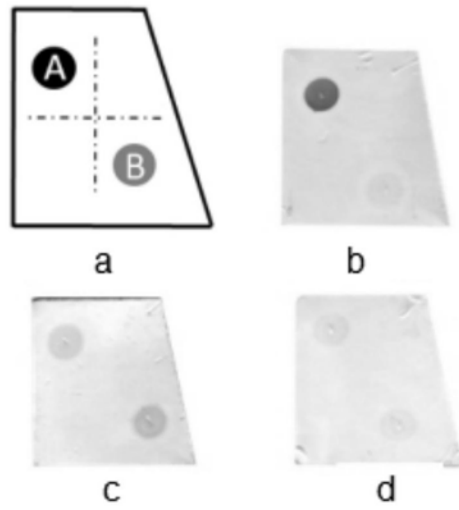


图4

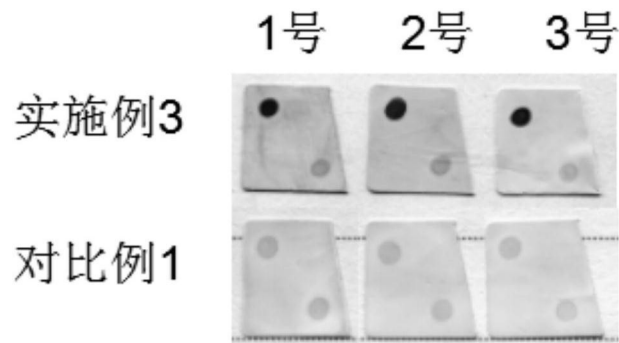


图5

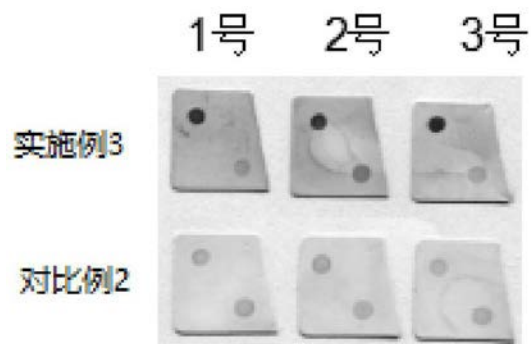


图6

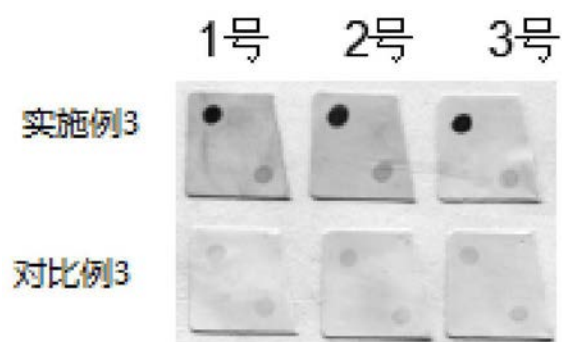


图7

专利名称(译)	人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110606881A	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN201910738465.X	申请日	2019-08-12
[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 李科		
发明人	闫亚平 黎培 李科		
IPC分类号	C07K14/47 C07K11/14 C12N15/867 G01N33/531 G01N33/564		
CPC分类号	C07K14/4713 C12N15/86 C12N2740/15043 C12N2800/107 G01N33/531 G01N33/564 G01N2333/47 G01N2800/28		
代理人(译)	李婷 金艳婷		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了人体液中抗MOG自身抗体的检测材料、制备方法及应用，本发明将MOG抗原包被于NC膜上制成抗MOG受体检测材料，人血清和脑脊液中的特异性MOG抗体会与抗原结合，利用碱性磷酸酶底物-配体反应进行显色，并在显色反应中加入本发明的封闭材料，可用通过肉眼观察直接判断检测样品中是否含有MOG抗体。该方法具有灵敏度高，操作简便，快速检测等优点，有助于抗MOG受体脑炎的识别和诊断。

