



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610037369.5

[45] 授权公告日 2009年12月23日

[11] 授权公告号 CN 100572391C

[22] 申请日 2006.8.30

[21] 申请号 200610037369.5

[73] 专利权人 中国科学院广州生物医药与健康研究院

地址 510663 广东省广州市广州科学城国际企业孵化器

[72] 发明人 陈巧林

[56] 参考文献

WO03000718A2 2003.1.3

CN1403819A 2003.3.19

Autoantibodies to the Amino - Terminal Fragment of  $\beta$  - Fodrin Expressed in Glandular Epithelial Cells in Patients with Sjogren's Syndrome. Masataka Kuwana et al. The Journal of Immunology, No. 167. 2001

干燥综合征特异性  $\alpha$  - 胞衬蛋白的抗原表位筛选及鉴定. 陈巧林等. 中国免疫学杂志, 第 21 卷. 2005

审查员 黄磊

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司  
代理人 申元林

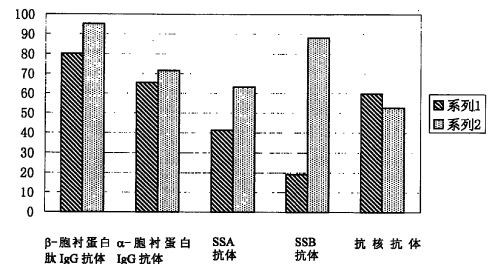
权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 6 页

## [54] 发明名称

$\beta$  - 胞衬蛋白抗原表位多肽及其筛选方法与应用

## [57] 摘要

本发明属于免疫学领域, 涉及  $\beta$  - 胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选, 得到具有诊断意义的最佳  $\beta$  - 胞衬蛋白多肽对应的氨基酸序列。本发明所述的  $\beta$  - 胞衬蛋白抗原表位多肽, 包括如下(a)或(b)的多肽: (a)由 SEQ ID NO. 1 所示的氨基酸序列组成的多肽; (b)在(a)中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由(a)衍生的多肽。所述的  $\beta$  - 胞衬蛋白表位多肽可以特异性地检测干燥综合征患者血清中的抗  $\beta$  - 胞衬蛋白多肽 IgG 抗体, 完全符合临床诊断的需要。本发明还提供了检测患者血清中  $\beta$  - 胞衬蛋白多肽 IgG 抗体的免疫学方法, 以及将其作为抗原在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。



1、 $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽，其特征在于，是如下（a）或（b）的多肽：

（a）由 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列组成的多肽；

（b）在（a）中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由（a）衍生的多肽。

2、如权利要求 1 所述的  $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选方法，其特征在于，包括以下步骤：

A) 选取人全长 7561 nt  $\beta$ -胞衬蛋白基因序列 ORF 核酸序列对应的 2365 aa 长度的氨基酸序列为对象，采用 Standard、Karplus、Emini、Amphiphi、Pellequer 五种关于抗原表位预测的标准方法，全面分析上述 2365 aa 长度的 $\beta$ -胞衬蛋白二级结构，确定其抗原决定簇；

B) 按抗原趋势指数排列，计算分析得出较好的抗原表位序列，合成候选的若干条多肽，通过免疫检测，筛选得到与干燥综合征阳性血清 IgG 抗体反应最强的抗原多肽；

C) 通过添加不同数量的氨基酸重新合成含有该序列的多肽，经免疫检测得到类似于步骤 B 中获得的抗原多肽与干燥综合征阳性血清 IgG 抗体反应的多肽及其衍生物，从而得到具有抗原表位活性的多肽及其对应的衍生物。

3、如权利要求 1 所述的  $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。

4、含有如权利要求 1 所述的  $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽的诊断干燥综合征的试剂盒。

## β-胞衬蛋白抗原表位多肽及其筛选方法与应用

### 技术领域

本发明属于免疫学领域，涉及抗原表位多肽的筛选、免疫学方法的建立以及临床诊断试剂的应用，尤其是涉及β-胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选，得到具有诊断意义的最佳β-胞衬蛋白表位多肽对应的氨基酸序列，以及建立检测患者血清中β-胞衬蛋白表位多肽IgG抗体的免疫学方法，以及将其作为抗原在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。

### 技术背景

干燥综合征（Sjögren Syndrome, SS）是一种以口、眼干燥为主，并累及全身多个系统和器官的全身性自身免疫病，分为原发性和继发性干燥综合征。本病主要表现为唾液腺、泪腺及消化道等外分泌腺的炎性细胞浸润及破坏，导致进行性口干、眼干及内脏受累。由于唾液、泪腺分泌减少或停止，出现口、眼干燥难忍、口唇破裂、龋齿猖獗或反复角膜炎、结膜炎、腮腺肿大及血管炎等（Fox RI, Stern M, Michelson P, Update in Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol, 2002, Sep:12(5):319-8.）。

流行病学调查发现，我国干燥综合征的患病率为 0.77%，而在 50 岁以上人群中的患病率达 5%，甚至明显高于糖尿病（0.67%）、风湿性心脏病（0.19%）及肺源性心脏病（0.47%）的患病率。总患病人数逾 800 万，然而，在临床上，绝大部份（97%）的干燥综合征患者未得到及时的诊断和治疗，52%的患者被误诊为肺间质纤维化、免疫性肝炎及肾炎等，而未能得到正规的治疗或误治，甚至出现因误治出现的器官损害。本病为慢性全身性自身免疫病，未经正确治疗的患者多逐渐出现器官功能异常、衰竭，甚至死亡。淋巴瘤、骨髓瘤等恶性肿瘤在干燥综合征的发生率可高达正常人的 40 倍（Fox RI, Stern M, Michelson P, Update in Sjögren's syndrome. Curr Opin Rheumatol, 2002,

Sep:12(5):319-8.)。

目前，本病的早期诊断是困扰临床医师多年的最大问题。临床诊断上主要靠症状、体征、唇腺活检及非特异的抗核抗体等指标。其中唇腺活检属创伤性检查，且敏感性差，大多数患者不能接受。而抗核抗体、SSA 抗、SSB 抗体则特异性较差，敏感性也不理想（Reichlin M. Antibodies to Ro and La. *Ann Med Interne (Paris)*, 1998, 149: 34-41.）。大部分患者在确诊时已属于中、晚期，往往病情严重，并有多个脏器受损或并发症，治疗上已十分困难。

胞衬蛋白（Fodrin）属于谱蛋白超家族，和红细胞谱蛋白具有同源性，均为重要的细胞膜骨架蛋白。胞衬蛋白广泛分布于神经元、淋巴细胞、肾上腺细胞、肝细胞、上皮细胞等非红细胞细浆膜下，与浆膜平行呈板状分布。胞衬蛋白由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚单位组成，分子量分别为 240kD 和 235kD。 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚单位以边对边的形式反向平行分布，形成松散的异二聚体，这两个异二聚体进一步以头对头的形式形成圆柱状的四聚体，与肌动蛋白相交连形成肌动蛋白胶体，参与构成细胞膜骨架，维持细胞的形态（Glenney JR Jr, Glenney P, Fodrin is the general spectrin-like protein found in most cells whereas spectrin and the TW protein have a restricted distribution. *Cell*, 1983, 34(2): 503-12. Bennett V, Gilligan D M, et al, The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma-membrane. *Annu Rev Cell Biol*, 1993, 9: 27-66.）。研究表明，胞衬蛋白可参与细胞的运动及维持细胞的连接和形态，可能与周围神经，脑，肾脏，肝脏及全身性自身免疫病的发生有关。

近几年来，国外及本发明发明人的前期研究发现干燥综合征相关的 $\alpha$ -胞衬蛋白抗体在本病的发病机制及诊断中有一定意义。本发明人运用重叠蛋白片段表达筛选得到了一条干燥综合征相关的 $\alpha$ -胞衬蛋白抗原表位多肽，虽然其敏感性、特异性相比抗核抗体、SSA 抗、SSB 抗体有所提高，但最终因筛选方法中运用原核表达重叠重组蛋白结合免疫检测分析，局限了抗原表位多肽的独立检测价值，加上国外许多研究中病例样本小等，该抗体在干燥综合征诊断中的特异性、敏感性仍不尽如人意（Rieko A., Naozumi I., Ichiro

S., Yoshio H. et al, Development of Autoimmune Exocrinopathy Resembling Sjogren's syndrome in Adoptively Transferred Mice With autoreactive CD4+ T cells. *Arthritis & Rheum*, 2003, DEC 48(12): 3603-3609. 何菁, 李晶, 栗占国, 陈巧林. 抗 $\alpha$ -胞衬蛋白表位多肽抗体在干燥综合征诊断中的意义, *中华风湿病学杂志*, 2003, 7(10): 600-603. He Jing, Chen Qiaolin, Li Zhanguo, Antibodies to  $\alpha$ -fodrin-derived peptide in Sjogren's Syndrome. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2006, 65(4): 549-550. 陈巧林, 朴海燕, 何菁, 李晶, 栗占国. 干燥综合征抗原 $\alpha$ -胞衬蛋白抗原表位的筛选与鉴定, *中国免疫学杂志*, 2005, 11(21): 864-872. Fox RI, Konttinen Yj., Fisher A, Use of Muscarinic Agonists in the Treatment of Sjogren's syndrome. *Clin Immunol*. 2001, 101(3): 249-263.。

国外学者 Masataka 等人通过对胞衬蛋白(Fodrin)的 $\beta$ -亚单位 $\beta$ -胞衬蛋白进行研究, 选取 $\beta$ -fodrin 全长 cDNA 7561 bp 中的 298-2158 bp 对应的共计 616 aa 为对象, 用得到的重组表达的 616 aa 蛋白为检测抗原, 结果显示抗 $\beta$ -胞衬蛋白抗体在原发性干燥综合征、继发性干燥综合征患者血清中的阳性率为 51%和 84%, 而在红斑狼疮患者、系统性硬化病及正常人血清中的阳性率仅为 6%、19%和 4%。但由于研究中选择的不是在人体内表达的 $\beta$ -胞衬蛋白全长蛋白序列为对象, 而且血清标本的例数不充分, 加上检测抗原为重组表达蛋白, 每批来源不稳定, 使得该抗体的阳性率没有得到真正的提高, 在临床上一一直没有得到应用 (Masataka K, Tetsuroh O, Yoko O, Junichi K, and Yutaka K, Autoantibodies to the Amino-Terminal Fragment of  $\beta$ -Fodrin Expressed in Glandular Epithelial Cells in Patients with Sjogren's Syndrome. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 5449-5456. )。

综上所述, 在该领域进行的多是很初步的探索, 仍有多个方面的问题尚待澄清。目前已知的干燥综合征诊断抗原(蛋白或多肽)中, 尚缺乏一种针对人干燥综合征特异性强, 阳性率高的标志物; 缺乏稳定的抗原来源及特异性的诊断方法也是问题的核心。因此, 筛选及鉴定新的干燥综合征相关抗原(蛋白或多肽等), 寻找一种敏感性高、特异性强而临床又易于检测的抗体, 对干燥综合征的临床诊断具有重要而迫切的意义。

## 发明内容

针对前述研究现状及干燥综合征临床诊断需求,本发明的目的在于提供一种新的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽,以及其对应的氨基酸序列。所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽可以特异性地检测干燥综合征患者血清中的抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体,该抗体检测结果显示在干燥综合征患者(原发、继发)血清中的阳性率高,而其他对照疾病(类风湿关节炎、系统性红斑狼疮)及正常人群血清中阳性率很低,完全符合临床诊断的需要。因而所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽可以被提供作为人干燥综合征临床诊断用抗原。

本发明的第二个目的在于提供所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽的筛选方法。本发明采用新的生物信息学方法结合免疫检测分析方法,筛选获得的可作为人干燥综合征抗原的 $\beta$ -胞衬蛋白的表位多肽。

本发明的第三个目的在于提供一种将含有所述 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽或其衍生物作为抗原用于检测干燥综合征患者血清抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体的方法,即单特异性 ELISA 法。本发明对所述的免疫学检测方法的各种条件均进行了优化,并得到实验验证。

本发明的第四个目的在于提供所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽在制备用于诊断干燥综合征的药物的应用。该应用是基于所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽测定抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征诊断中的价值评定。具体地,本发明所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽可以用于制备干燥综合征的临床诊断试剂盒。

根据本发明的第一个目的,本发明提供了一种 $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽及其对应的氨基酸序列,所述多肽的特征在于含有以下(a)或(b)氨基酸序列:

(a)、由 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列组成的多肽,该氨基酸序列如下:

NH3-Ser-Val-Glu-Thr-Glu-Asp-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Ser-Ala-Lys-COOH

(b)、在(a)中的氨基酸序列经过添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由(a)衍生的多肽。

SEQ ID NO.1 所示多肽为 $\beta$ -胞衬蛋白序列中的部分氨基酸残基。

根据本发明的第二个目的，本发明人选取人全长 7561 nt  $\beta$ -胞衬蛋白基因序列 ORF (311-7405 nt) 核酸序列对应的氨基酸序列为对象，通过采用 Standard, Karplus, Emini, Amphiphi, Pellequer 等 5 种国际上关于抗原表位预测的方法 (Odorico M, Pellequer JL, BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. J Mol Recognit. 2003, Jan-Feb;16(1): 20-22.)，分析了上述 2365 aa 长度的 $\beta$ -胞衬蛋白的抗原决定簇，进一步通过合成多肽及免疫检测，得到了一条敏感性和特异性均很高的抗原多肽，同时，经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由 (a) 序列衍生的多肽，也显示很好的抗原抗体反应，该多肽及其对应的衍生物即为本发明所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽，均可以很好检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 型抗体。迄今为止，国内外尚无关于该多肽 (包括筛选到的抗原表位多肽及衍生多肽) 序列的抗原性、该多肽检测血清中对应抗体的方法及其作为抗原在干燥综合征诊断中意义的研究。

本发明所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽可以用本领域人员所熟知的方法得到，例如：固相合成法等。

上述所选取的人全长 7561 nt  $\beta$ -胞衬蛋白基因序列来源于 NCBI (>gi|4507195|ref|NP\_003119.1| spectrin, beta, non-erythrocytic 1 isoform 1 [Homo sapiens])。

根据发明的第三个目的，本发明建立了含有所述 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 SEQ ID NO.1 作为抗原用于检测干燥综合征患者血清抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体的方法 (单特异性 ELISA)。酶联免疫吸附法 (ELISA) 的原理是：将纯化的、已鉴定生化特性的抗原包被在固相的聚苯乙烯微孔板上；若为抗体阳性，已稀释的血清中的特异性抗体将与包被在固相上的抗原结合；第二步，过氧化物酶标记的抗人抗体与已结合的抗体反应；第三步，结合的标记抗体与色原底物溶液作用后而呈现颜色。颜色的深浅与血清标本中抗体的浓度成正比。

ELISA 检测产品大致可以分为三种：“单特异性 ELISA”试剂盒（包被有单特异性抗原）可提供对一种抗体的定量体外检测；“抗体谱 ELISA”试剂盒可在一条微孔板上对多种不同抗体分别进行半定量体外检测；“混合 ELISA”试剂盒的固相包被有混合抗原，可半定量检测多种抗体，而其单特异性需进一步检测。

ELISA 检测中，由于抗原抗体反应需要必须的结合条件（pH 值、离子浓度和等电点等），本发明中发明人在实验初始阶段，发现抗原抗体反应较弱，后期经过一系列 pH 值及反应离子浓度（包括：pH6.0 1×PBS、pH6.5 1×PBS、pH7.0 1×PBS、pH7.5 1×PBS、pH8.0 1×PBS、pH8.5 1×PBS、pH9.0 1×PBS、pH9.5 1×PBS 等）的调整后，确定了稳定的最佳包被缓冲液（pH9.0 1×PBS）；另外包被抗原的浓度过高和过低都会影响 ELISA 检测的特异性和敏感性，尤其在临床患者血清抗体滴度不平衡的情况下，选择抗原多肽的最佳包被浓度是 ELISA 检测的关键要素。对此本发明发明人进行了相应的实验，将所述β-胞衬蛋白表位多肽经多次不同范围的梯度稀释后进行反应，具体经过 3 次梯度稀释，包被量分别为：1 ng、10 ng、100 ng、1000 ng；10 ng、40 ng、60 ng、80 ng、100 ng；40 ng、45 ng、50 ng、55 ng、60 ng。最终确定了检测多肽的最佳包被量（50 ng），以此包被量进行血清抗体检测，效果最好；再有，关于对血清中抗原抗体非特异性反应的阻止问题，也是临床 ELISA 检测试剂能很好应用的另一关键因素。本发明发明人通过所在研究小组以往的经验，分别采用 1% OVA/PBS、1% BCA/PBS、1% 脱脂奶粉/PBS 及封闭用正常兔血清等，最终通过临床血清样本检测反应背景比对，确定运用业内统一的封闭用正常兔血清经特定处理后作为封闭液（具体程序为：将封闭用正常兔血清先 62℃ 灭活 20 分钟，然后在 25 ml 灭活过的封闭用正常兔血清中加入 0.3275 g Tris、0.21915 g NaCl，再用 HCl 调至 pH 8.0），这样可以使得抗β-胞衬蛋白表位多肽抗体检测的特异性能达到最佳。

通过以上条件优化，本发明中发明人将含有所述β-胞衬蛋白表位多肽（SEQ ID NO.1）按一定浓度，包被在固相的聚苯乙烯微孔板上，然后加入阳性干燥综合征患者血

清，最终加入过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体，除以上优化条件外，其他环节与常规单特异性 ELISA 相同。本发明经过优化建立的单特异性 ELISA 方法可以很好的检测临床干燥综合征患者血清的抗 IgG 抗体，实验结果显示，该方法得到的干燥综合征患者血清抗β-胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体的阳性率高、特异性强，完全符合临床诊断疾病的要求。

与现有技术相比，本发明所述的β-胞衬蛋白表位多肽测定抗β-胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征诊断中的价值评定有明显的优势，详述如下：

国外学者 Masataka 等人利用系统性硬化病继发干燥综合征的患者血清，从 HepG2 细胞 cDNA 文库中，筛选分离出编码β-胞衬蛋白氨基端部分的 cDNA 片段，发现该片段与β-fodrin 全长 cDNA 7561 nt 中的 298-2158 nt 同源。选取该片段核酸对应的共计 616 aa 为对象，重组表达代表该段β-胞衬蛋白的不同大小片段：FOD<sub>1-60</sub>，FOD<sub>1-103</sub>，FOD<sub>1-272</sub>，FOD<sub>1-463</sub>，FOD<sub>1-616</sub>，FOD<sub>273-616</sub>，western blots 鉴定结果显示，32 份抗β-胞衬蛋白抗体阳性的干燥病人血清均能与含有 1-272 氨基酸部分的片段蛋白反应，均不与而不与 FOD<sub>1-60</sub> 及 FOD<sub>273-616</sub> 反应，其中 1 份与 FOD<sub>1-103</sub> 重组蛋白反应。以 FOD<sub>1-616</sub> 为检测抗原来检测干燥综合征患者的血清抗β-胞衬蛋白抗体。结果显示抗β-胞衬蛋白抗体在原发性干燥综合征、继发性干燥综合征患者血清中的阳性率为 51%和 84%，在红斑狼疮患者、系统性硬化病及正常人血清中的阳性率仅为 6%、19%和 4%，该抗体检测对干燥综合征具有一定的价值。但由于研究中选择的不是在人体内表达的β-胞衬蛋白全长蛋白序列为对象，而且血清标本的例数不充分，加上检测抗原为重组表达蛋白，每批来源不稳定，使得该抗体真正的价值没有得到体现，患者抗体检测阳性率没有得到真正的提高，在临床上一直没有得到应用 (Masataka K, Tetsuroh O, Yoko O, Junichi K, and Yutaka K, Autoantibodies to the Amino-Terminal Fragment of β-Fodrin Expressed in Glandular Epithelial Cells in Patients with Sjogren's Syndrome. The Journal of Immunology, 2001, 167: 5449-5456.)。

基于以上研究，本发明人采用 Standard, Karplus, Emini, Amphiphi, Pellequer 等 5 种国际关于抗原表位预测的方法，分析了 2365 aa 长度的β-胞衬蛋白的抗原决定簇，进

一步通过合成多肽及免疫检测，得到了一条敏感性和特异性均很高的抗原多肽，该多肽可以很好检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体。本发明人将该多肽作为检测抗原，用上述建立好的单特异性 ELISA 的方法检测干燥综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及正常人血清中的抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体。本发明研究共检测干燥综合征患者 182 例，系统性红斑狼疮患者 113 例，类风湿关节炎患者 136 例，正常人 212 例。结果发现该多肽对干燥综合征的抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体测定具有较高的敏感性和特异性，可以达到通过血清学的方法诊断干燥综合征的目的，为干燥综合征的临床诊断提供客观的实验室依据。

根据本发明的第四个目的，本发明还提供了所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽在制备用于诊断干燥综合征的药物的应用。

根据上述关于 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽测定抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征诊断中的价值评定结果、 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽测定抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体初步免疫学方法以及临床诊断试剂盒的要求，本发明人制备了 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 临床诊断用试剂盒。具体采用的是夹心法固相酶联免疫吸附分析法（ELISA），用于定量检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体；所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗原被包被于微孔板上，可拆分的微孔板（1×8）共 12 板条，可以完成 96 人份的检测。

本试剂盒经过 3 个不同的反应阶段自身抗体结合并形成夹心复合物，最后产生酶联颜色反应，颜色的深浅与样品中抗体的浓度成一定的比例关系。步骤 1：样品，标准品和质控血清加入微孔板的反应孔内，任何存在的抗体结合在微孔内表面，30 分钟孵育后洗涤除去非反应成分。步骤 2：加入 HRP 过氧化物酶标记山羊抗人 IgG，结合抗原抗体复合物，15 分钟孵育后洗涤除去未结合的多余的酶标。步骤 3：加入 TMB 底物，15 分钟孵育后试剂颜色变成蓝色，加入终止液（含 1 M HCl）终止反应；试剂颜色变成黄色。

颜色的深浅与样品中 IgG 抗体的浓度成一定的比例关系。样品的 IgG 抗体含量可根

据其 O.D.值由标准曲线推断出来。在酶标仪或分光光度计中读取结果。450 nm 作为初始波长，600 至 650 nm（优选为 620 nm）作为参考波长。

### 附图说明

图 1 为 2365 aa 长度的全长 $\beta$ -胞衬蛋白二级结构的分析结果图：分别用 Gamier-Robson 和 Chou-Fasman 法推测二维结构，Kyte-Doolittle 标准分析亲水性 (Hydrophilicity)，Karplus-Schulz 标准推测柔韧性 (Flexible)，Janeson-Wolf 方法预测抗原性指数 (Antigenic index)，Plot-Emini 方法分析表面可及性 (Surface probability)。

图 2 为 2365 aa 长度的全长 $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位预测结果图；横坐标表示的是序列的位置，纵坐标表示的是预测方法的多少，1 是指有 1 种方法预测那个位点是个 epitope (抗原决定簇)，依次类推。该方法准确性大于 75%。

图 3 为单特异性酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体原理示意图。图中，用抗原 ( $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽) 包被微量板孔，制成固相载体。加患者 (干燥综合征及疾病对照组等) 血清到板孔中，其所含的抗体 (抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗体) 特异性地与固相载体中存在的抗原结合，形成免疫复合物。除去多余物质后，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 抗体，使之与上述免疫复合物反应。洗板，除去多余的结合物，加入底物 (TMB)。该反应产生有颜色产物，颜色强度与特异性抗体含量成正比。

图 4 为本发明所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽建立的单特异性 ELISA 法的检测程序示意图；

图 5 显示 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在不同疾病的阳性率；由图可见，抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在原发性和继发性干燥综合征中的阳性率明显高于 SLE、RA 及正常对照 (P 均 $<0.01$ )。

图 6 显示自身抗体在干燥综合征患者血清样本中检测的敏感性和特异性。在干燥综合征患者中，抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗体的敏感性及其特异性明显高于 SSA、SSB 及抗核抗体 (P 均 $<0.01$ )。因此，抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗体在干燥综合征血清学

诊断中具有重要价值。

## 具体实施方式

下面将参照附图结合多种实施例来说明本发明所涉及的发明主题以及应用本发明中的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽及其相应的抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽IgG抗体来实施干燥综合征临床诊断等具体实施方式。

本发明所用术语“ $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽”指具有共同序列 SVETEDNKEKKSAAK (即 NH<sub>3</sub>-Ser-Val-Glu-Thr-Glu-Asp-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Ser-Ala-Lys-COOH) 的多肽或将上述氨基酸序列经过添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由此衍生的多肽。

### 实施例 1 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽的筛选及鉴定

前述的研究工作已经证明，利用基因工程的方法纯化出的 $\beta$ -胞衬蛋白融合蛋白能够特异性的结合干燥综合征患者血清中的抗 $\beta$ -胞衬蛋白抗体，然后通过特定的方法可以将其检出 (Masataka K, Tetsuroh O, Yoko O, Junichi K, and Yutaka K, Autoantibodies to the Amino-Terminal Fragment of  $\beta$ -Fodrin Expressed in Glandular Epithelial Cells in Patients with Sjogren's Syndrome. The Journal of Immunology, 2001, 167: 5449-5456.)。本发明的实验中，发明人选取全长 $\beta$ -胞衬蛋白基因 ORF 核酸序列对应的氨基酸序列为对象，采用 Standard, Karplus, Emini, Amphiphi, Pellequer 等 5 种国际关于抗原表位预测的标准方法，全面分析了上述 2365 aa 长度的 $\beta$ -胞衬蛋白二级结构 (亲水疏水性等)，具体见图 1。

进一步分析上述 2365 aa 长度的 $\beta$ -胞衬蛋白抗原决定簇，结果见图 2，按抗原趋势指数排列，得到并合成了共计 32 条多肽。32 条计算分析得到的较好的抗原表位序列 (均为从 NH<sub>3</sub> 端到 COOH 端排序) 如下：

VDDWDNENSSARLFE	SVETEDNKEKKSAAK	DISVDHPDEKSIITY
EKYESLASDLLEWIE	WERLEKAEHERELAL	NELIRQEKLEQLAR
RLWEYLLELLRAR	FCYQELCQL	GKDLTSMRLL
IVSSSDVGHDEYSTQS	HRFESLEP	EIKAQQDKLNTRWS
EIDNYEEDYQKMRDM	LQQFLRDLDDFQS	QEKVDSIDDRHRKN
ESTTQTKAQRFLFDA	MRLKDNRD LQKFLQDC	

SQEGKSTDEVDSKRLT      KEIQGHQPRIDDIFER      NIVTDSSSLSAEAIHQ  
 MMSEEKAKDEQSAVS      EERRGKLDERHRLF      INSGHSDAATIAEWKD  
 FGRIQDKHKKLPEEL      ADDIQKRENEVLEA      EIDARNDSTTCIELG  
 REIGQSVDEVEKLIKRR      EVRRQEQEEERKRRP      PSPTSDRKAKTALPA  
 EYLFQAKDDEEMNTW      SSAISSDKHEVSASTQ      KREKDKEKDKEKRFSS

将上述 32 条合成的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽采用单特异性 ELISA 方法分别检测临床 10 例 $\beta$ -胞衬蛋白 IgG 抗体检测阳性的干燥综合征确诊患者血清抗体。

具体步骤是：32 条合成的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽分别用包被缓冲液（上述自制的 PBS 缓冲液，pH 9.6）稀释至 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ，包被酶标板（100  $\mu\text{l/孔}$ ），4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。以 0.1% PBS-Tween 洗板 5 次，每孔加入封闭用正常兔血清缓冲液（BNRS）（用前经过处理，见上述）150  $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h，洗板 5 次。抗 $\beta$ -胞衬蛋白阳性 SS 患者血清标本（IgG 阳性 10 例）各以 PBS 稀释 50 倍后加入（100  $\mu\text{l/孔}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。洗板 5 次后对应加入 PBS 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 二抗（Santa Cruz 产品），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗板后加入 TMB 显色液显色 10 min，加入 1 mol/L 的浓 HCL 终止后测定标本在 450 nm 处的 A 值。每板同时设空白对照、阳性对照及阴性对照（均来自 $\beta$ -fodrin 蛋白大规模筛选检测过样本）。采用反应 OD 值的平均值，比较 32 条合成多肽与 SS 患者血清 IgG 的反应强弱，得到的最强反应活性的多肽认定为 SS（干燥综合征）相关抗体最佳检测抗原 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽。

通过分析及免疫检测，得到了一条反应最强的抗原多肽：第 2 条，其序列为 SVETEDNKEKKSAAK（即 NH<sub>3</sub>-Ser-Val-Glu-Thr-Glu-Asp-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys-Ser-Ala-Lys-COOH），可以很好检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体，在 32 条多肽中与干燥综合征阳性血清 IgG 抗体反应最强，OD 平均值为：1.02，结果见表 1。

表 1 32 条 $\beta$ -胞衬蛋白合成多肽的序列及其对应的单特异性 ELISA 检测结果

No	起点*	氨基酸序列	终点	IgG 反应 OD 平均值
1	27	VDDWDNENSSARLFE	41	0.11

2	163	SVETEDNKEKKSAAK	176	1.02
3	255	DISVDHPDEKSIITY	269	0.34
4	305	EKYESLASDLLEWIE	319	0.15
5	396	WERLEKAEHERELAL	410	0.10
6	412	NELIRQEKLEQLAR	425	0.18
7	508	RLWEYLLELLRAR	520	0.24
8	618	FCYQELCQL	626	0.15
9	667	GKDLTSMRLL	677	0.31
10	766	IVSSSDVGHDEYSTQS	781	0.57
11	889	HRFESLEP	896	0.13
12	925	EIKAQQDKLNTRWS	938	0.21
13	1064	LQQFLRDLDDFQS	1076	0.41
14	1110	EIDNYEEDYQKMRDM	1124	0.72
15	1247	QEKVDSIDDRHRKN	1260	0.76
16	1269	MRLKDNRDQLQFLQDC	1284	0.32
17	1366	ESTTQTKAQLFDA	1379	0.48
18	1447	SQEGKSTDEVDSKRLT	1462	0.35
19	1532	KEIQGHQPRIDDIFER	1547	0.16
20	1550	NIVTDSSSLSAEAIQ	1565	0.22
21	1615	MMSEEKAKDEQSAVS	1629	0.55
22	1688	EERRGKLDERHRLF	1701	0.12
23	1766	INSGHSDAATIAEWKD	1781	0.22
24	1818	FGRIQDKHKKLPEEL	1832	0.52
25	1879	ADDIQKRENEVLEA	1892	0.13
26	1959	EIDARNDSTTCIELG	1974	0.25
27	2043	REIGQSVDEVEKLIK	2058	0.14
28	2086	EVRREQEEERKRRP	2100	0.11
29	2168	PSPTSDRKAKTALPA	2182	0.42
30	2284	EYLFQAKDDEEMNTW	2298	0.52
31	2303	SSAISSDKHEVSASTQ	2318	0.10

32	2344	KREKDKEKDKEKRFS	2358	0.73
----	------	-----------------	------	------

同时，为了分析上述筛选得到的 SEQ ID NO.1 多肽抗原性的普遍稳定性，通过对 SEQ ID NO.1 多肽经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由此衍生的多肽，重新合成一系列多肽，通过以上免疫检测步骤，发现均可以很好检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体，均显示与干燥综合征阳性血清 IgG 抗体很好的反应，OD 平均值结果见表 2。

表 2 9 条 $\beta$ -胞衬蛋白 SEQ ID NO.1 多肽衍生物的序列及其对应的单特异性 ELISA 检测结果

No	氨基酸序列	IgG 反应 OD 平均值
1	ISVETEDNKEKKS <u>AK</u>	0.92
2	SVETEDNKEKKS <u>AKD</u>	0.87
3	<u>FOIQDIS</u> SVETEDNKEKKS <u>AK</u>	0.82
4	SVETEDNKEKKS <u>AKDALL</u>	0.85
5	<u>FOIQDIS</u> SVETEDNKEKKS <u>AKDALL</u>	0.79
6	SVETED <u>P</u> KEKKS <u>A</u> K	0.74
7	SVETED <u>P</u> KEKKS <u>SP</u> K	0.65
8	SVETEDNKEKKS <u>A</u>	0.87
9	VETEDNKEKKS <u>A</u> K	0.81

上表中，序号为 1-5 的序列是在 SEQ ID NO.1 序列的首末端添加不同数量氨基酸(用下划线标出)的序列；序号为 6 和 7 的序列是在 SEQ ID NO.1 序列插入 1 个或多个氨基酸(用下划线标出)的序列；序号为 8 和 9 的序列是在 SEQ ID NO.1 序列首末端缺失 1 个或多个氨基酸的序列。

本发明的试验中发明人利用的是 Flechsler 等报道的固相合成法 (Anderson EC, et al, Proc, Natl. Acad. USA 1998, 95:7574-79.)合成了该条共 14 个氨基酸的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 (SEQ ID NO.1) 及其对应的衍生物。迄今为止，国内外尚无关于该多肽序列的抗原

性、该多肽检测血清中对应抗体的方法及其作为抗原在干燥综合征诊断中意义的研究。

## 实施例 2 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽对患者血清中抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体的检测及其价值评定

本发明实验中针对合成多肽的氨基酸特性及其与抗体反应的情况，经过一系列 pH 值及反应离子浓度的调整后，我们确定了以 pH9.6 的自配 PBS 为包被缓冲液；同时也针对包被抗原浓度进行了相应的实验，将该 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 SEQ ID NO.1 进行梯度稀释后进行反应，结果显示，用以上 pH 9.6 的自配 PBS 包被缓冲液将肽稀释为 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 100  $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时后，进行血清抗体检测，效果最好；另外，关于对非特异性反应的阻止问题，通过发明人以往的实验经验，首次运用业内统一的封闭用正常兔血清经特定处理后作为封闭液，使得抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗体检测的特异性能达到最佳。具体操作如下：

封闭：每孔加经处理的封闭用正常兔血清缓冲液（BNRS）150  $\mu\text{l}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。

BNRS 的配制：正常兔血清 25 ml（先 62 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 20 分钟）

Tris	0.3275 g
NaCl	0.21915 g
用 HCl 调 pH 至 8.0	

本研究利用上述的 SEQ ID NO.1 多肽采用上述经过优化而建立好的酶联免疫吸附法（单特异性 ELISA 法）对干燥综合征（SS）、类风湿关节炎（RA）、系统性红斑狼疮（SLE）患者及正常人血清中的抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体进行检测，以评价该多肽抗体在各种疾病中的分布。

具体步骤是：首先选择上述筛选到的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽（SEQ ID NO.1），用包被缓冲液（上述 PBS 缓冲液，pH 9.6）稀释至 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ，包被酶标板（100  $\mu\text{l}$ /孔），4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。以 0.1% PBS-Tween 洗板 5 次，每孔加入经过处理的封闭用兔血清缓冲液（BNRS）（用前经过处理，见上述）150  $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h，洗板 5 次。患者血清标本（包括干燥

综合征患者、系统性红斑狼疮患者、类风湿关节炎患者及正常人)以 pH7.2 PBS 稀释 50 倍后分别加入包被孔中(100  $\mu$ l/孔),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。洗板 5 次后分组加入 pH7.2 PBS 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 二抗 (Santa Cruz 产品), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。洗板后加入 TMB 显色液显色 10 min, 加入 1 mol/L 的浓 HCL 终止后测定标本在 450 nm 处的 A 值。每板同时设空白对照、阳性对照及阴性对照 ((均来自 $\beta$ -fodrin 蛋白大规模筛选检测过样本)。采用待测标本 A 值>正常标本均数+2 $\times$ 标准差为阳性域值,分析 SEQ ID NO.1 多肽与 SS 患者及对照组血清 IgG 的反应情况。

检测原理示意图见图 3。

本发明研究中共检测干燥综合征患者 182 例, 系统性红斑狼疮患者 113 例, 类风湿关节炎患者 136 例, 正常人 212 例。

1. 检测程序概要: 如图 4 所示, 多肽进行包被, 50 ng/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤, 加入封闭用正常兔血清缓冲液 (BNRS) 150 微升, 湿盒中 37 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤。样品稀释液 1:50 稀释临床病人血清, 将稀释的样本, 和立即可用的对照血清, 分别加到微量孔内 (100 微升), 在湿盒中孵育 60 分钟 /37 $^{\circ}$ C。再洗涤, 加入已稀释的酶标记 IgG 溶液 100 微升, 在湿盒中再孵育 60 分钟 /37 $^{\circ}$ C, 洗涤, 加入底物溶液 100 微升, 在湿盒中再孵育 10 分钟 /37 $^{\circ}$ C, 加入终止液 (100 微升), 在 450 纳米处读数

## 2. 检测过程

- 2.1 将检测所需数目的微孔条放到微孔板 (已包被好多肽 SEQ ID NO.1 并已经封闭完成) 框上并准备好一张草签。
- 2.2 在微量孔内分别加入 100 微升的已稀释样本或立即可用的对照血清。留一个孔为底物空白使用, 例如:

IgG 检测微量孔	
孔 A1	底物空白
孔 B1	阴性对照
孔 C1	标本 1.....

2. 3 将样品于湿盒内 37°C (±1°C) 孵育 60 分钟 (±5 分钟)。
2. 4 孵育后以洗液缓冲液洗涤板孔 (使用自动洗板机或手工洗板):
- 吸去或甩去洗液
  - 每孔内加入 300 微升洗液
  - 吸去或甩去洗液
  - 重复洗涤过程 4 次 (共 5 次!)
  - 将微孔板翻转过来在纸巾上拍打, 使微孔中不再含有液体

2. 5 加入酶标记抗体。

于适当孔内 (底物空白除外) 加入 100 微升 IgG 酶标记抗体混合物

2. 6 湿盒内 37°C (±1°C) 孵育 60 分钟 (±1 分钟)。

2. 7 孵育后, 以洗液清洗板孔 (洗涤见上)

2. 8 加入底物

于每孔内加入 100 微升底物溶液 (包括底物空白孔)

2. 9 湿盒内 37°C (±1°C) 孵育 10 分钟 (±1 分钟)。

2. 10 终止反应

每孔内加入 100 微升终止液, 轻微振荡微孔板以混合溶液。

2. 11 读取消光度

以底物空白为空白对照液, 60 分钟内读取 450 纳米的 OD 值, 参考波长范围为 620 纳米-690 纳米 (例如 650 纳米)。

本实施例主要通过以下几个方面阐明本发明 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 (SEQ ID NO.1) 在干燥综合征患者诊断中的意义:

1、 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体阳性率在干燥综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及正常人血清之间的比较。

本发明的研究实验中, 发明人用单特异性 ELISA 方法检测了 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮及正常人血清检测中的阳性率 (表 3, 图 5)。应用统计学比较各组数据, 结果显示,  $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在原发和继发性干燥综合征患者血清检测中的阳性率显著高于类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和正常人, p 值均 $<0.01$ 。原发和继发性干燥综合征的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体的阳性率相近, 无统计学差异。

表 3.  $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在不同疾病的阳性率

诊断	例数	抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽		p 值
		IgG 抗体		
		阳性例数	阳性率(%)	
干燥综合征	182	146	80.2	
原发性	146	116	79.5	
*继发性	36	30	83.3	
系统性红斑狼疮	113	4	3.5	$<0.01$
类风湿关节炎	136	14	10.3	$<0.01$
正常人	212	4	1.9	$<0.01$

\* 包括 SLE 继发 SS 患者 13 例, RA 继发 SS 者 19 例, 皮炎炎继发 SS、未分化结缔组织病继发 SS 患者各 2 例。

2、抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎及正常人血清中滴度的比较。

由表 4 可见 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在干燥综合征的平均滴度明显高于 RA、

SLE 患者及正常人。

表 4. SS、SLE、RA 及正常人抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体滴度的比较

血清样本	OD 值 (M $\pm$ SD)	P 值
原发 SS	0.93 $\pm$ 0.08	
继发 SS	0.98 $\pm$ 0.09	
SLE	0.18 $\pm$ 0.09	<0.01
RA	0.23 $\pm$ 0.09	<0.01
正常人	0.13 $\pm$ 0.04	<0.01

3、抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体与其它自身抗体在干燥综合症的敏感性和特异性的比较。

表 5, 图 6 显示了抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体、SSA 抗体、SSB 抗体及 ANA 在干燥综合症中的敏感性和特异性。其中 ELISA 法检测抗 $\alpha$ -胞衬蛋白抗体: 相应检测试剂盒及方法由德国 IMETEC 生物试剂公司提供; 欧蒙斑点法检测抗 SSA、SSB 抗体: 相应检测试剂盒及方法由德国欧蒙医学实验诊断有限公司提供; 间接免疫荧光法检测抗核抗体 (ANA): 相应检测试剂盒及方法由德国欧蒙医学实验诊断有限公司提供。本发明实验结果显示抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体特异性和敏感性均明显高于抗 $\alpha$ -胞衬蛋白抗体、SSB 抗体、SSA 抗体和 ANA。因此, 结合敏感性和特异性, 抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体在诊断中的意义可能优于其他自身抗体。

表 5. 自身抗体在干燥综合症的敏感性和特异性

抗体类别	阳性例数	敏感性 (%)	特异性 (%)
$\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 抗体	146	80.2	95.2
$\alpha$ -胞衬蛋白抗体	119	65.4	71.6
SSA 抗体	75	41.2	63.3
SSB 抗体	35	19.2	88.1
ANA	109	59.9	52.7

### 实施例3 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽作为抗原在制备临床干燥综合征诊断试剂盒中的应用

本发明人采用夹心法固相酶联免疫吸附分析法(ELISA),将所述的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗原包被于微孔板上,制备了 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 临床诊断用试剂盒,用于定量检测抗 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体,共可以完成96人份的检测。具体内容如下:

#### 1. 试剂盒组成材料

包被了高度纯化 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽可拆分的微孔板(1 $\times$ 8)12板条1块;

$\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 标准品:0/6.3/12.5/25/50/100 U/ml 各1瓶,每瓶1.5 ml;

质控血清(含 IgG 和阴性质控)各1瓶,1.5 ml;

浓缩的样品缓冲液 1瓶,20 ml;

HRP 过氧化物酶标记山羊抗人 IgG 1瓶,15 ml;

TMB 底物 1瓶,15 ml;

终止液(含 1M HCl) 1瓶,15 ml;

浓缩洗涤缓冲液 1瓶,20 ml

#### 2. 技术参数

(1) 样本:血清或血浆

(2) 样本量:每次实验 100  $\mu$ l 未稀释样本

(3) 总孵育:室温下(18-28 $^{\circ}$ C) 60 分钟

(4) 质控范围:0-100 U/ml

(5) 灵敏度:1 U/ml

(6) 储存:2-8 $^{\circ}$ C

(7) 有效期:生产后9个月或标明有效期

(8) 包装规格:96人份

### 3. 试剂盒性能

(1) 特异性 高度纯化的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽抗原被包被于微孔板上, 制备的 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽试剂盒仅用于特异性检测的抗体。

(2) 校正  $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体定量检测系统无国际标准校正。

### 4. 免疫分析程序

#### (1) 自备材料

仪器	酶标仪, 450 nm 波长
	漩涡振荡器
	加样器: 10 ul, 100 ul, 1000 ul
试剂准备	蒸馏水
	量筒: 100 ml, 1000 ml
	装洗涤液的饲料容器
可选择	多通道加样器
	可重复的加样器: 100 ul
	数据分析软件

#### (2) 样品收集, 处理和保存

使用血清或血浆样本检测 $\beta$ -胞衬蛋白表位多肽 IgG 抗体, 血清或血浆用样品稀释缓冲液以 1 : 50 的比例稀释 (20 ul 样本+1 ml 缓冲液), 病人无须禁食, 也不用特别的准备, 静脉穿刺, 取血采样, 形成凝结后离心去除颗粒。

样品如果不直接使用, 2-8 $^{\circ}$ C 下可保存 5 天或-20 $^{\circ}$ C 下可保存 6 个月, 将其分为小部分避免反复冷冻。

胆红素和溶血素对结果无影响。

#### (3) 试剂的准备/储存

除样品缓冲液和洗涤缓冲液外, 全部试剂均为即用型液体; 开盖后试剂 2-8 $^{\circ}$ C 下可

至少保存 30 天或标签上的有效期。

实验中不用的板条立即放回带干燥剂的包装中，2-8℃下密封保存，以免变质。

洗涤缓冲液的准备：蒸馏水 50 倍稀释后装到 1000 ml 容器。稀释后的缓冲液可在 2-8℃下至少保存 30 天或标签上的有效期。

稀释缓冲液的准备：蒸馏水 5 倍稀释后装到 100 ml 容器。稀释后的缓冲液可在 2-8℃下至少保存 30 天或标签上的有效期。

#### (4) 技术要点

质控血清或样本必须每次作为未知分析，以检测实验的可靠性。

加样和样本处理：使用带一次性吸头的微量加样器取样；直接加入微孔底部。为避免交叉污染，每次更换吸头取样。对怀疑高浓度的病人样本应进一步稀释，并在结果计算时调整。

#### (5) 试验过程

不同批号不要混用

全部试剂和样本使用前恢复到室温。

所有病人样本用样品稀释缓冲液以 1：50 的比例稀释（20 ul 样本+1 ml 缓冲液），混合均匀。标准品和质控血清为即用型，不必稀释。

根据样品数量加上标准品和质控决定所需的板条，每个样品，标准品和质控都应做双份。

建议使用的试验方案

	1	2	3	4	5	6
A	标 1	标 1	样 1	样 1		
B	标 2	标 2	样 2	样 2		
C	标 3	标 3	样 3	样 3		
D	标 4	标 4	样 4	样 4		
E	标 5	标 5	样 5	样 5		

F	标 6	标 6	...	...		
G	阳	阳				
H	阴	阴				

每孔加入 100 ul 血清稀释液、标准品和质控血清，室温下孵育 1 小时（18-28℃）；倒空微孔板，每孔用 300 ul 洗涤缓冲液冲洗 3 次；每孔加入 100 ul 酶标液，室温下孵育 60 分钟；倒空微孔板，每孔用 300 ul 洗涤缓冲液冲洗 3 次；每孔加入 100 ul 底物 TMB，室温下黑暗中孵育 10 分钟；每孔加入 100 ul 的终止液，静置 5 分钟；停止反应后 30 分钟内，测定结果，450nm 作为初始波长，620nm（可以用 600 至 690nm）作为参考波长。

#### (6) 结果分析

以吸光度和标准品浓度作标准曲线（直线、半对数或对数坐标纸）。

由标准曲线可直接确定血清的抗体浓度。

#### (7) 实验参数

精度：

批内		
样品	平均值(U/ml)	CV%
1	15.9	4.0
2	59	4.0
3	137	2.2
批间		
样品	平均值(U/ml)	CV%
1	15.7	2.9
2	58.1	1.1
3	144	3.4

灵敏度： 1 U/ml

对应： 在稀释实验中，高抗体浓度的样本用样本缓冲液稀释并检测。结果在全部测试范围内成线性关系。

## SEQUENCE LISTING (序列表)

<110> 中国科学院广州生物医药与健康研究院

<120>  $\beta$ -胞衬蛋白抗原表位多肽及其筛选方法与应用

<140>

<141> 2006-08-30

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Ser Val Glu Thr Glu Asp Asn Lys Glu Lys Lys Ser Ala Lys

1

5

10

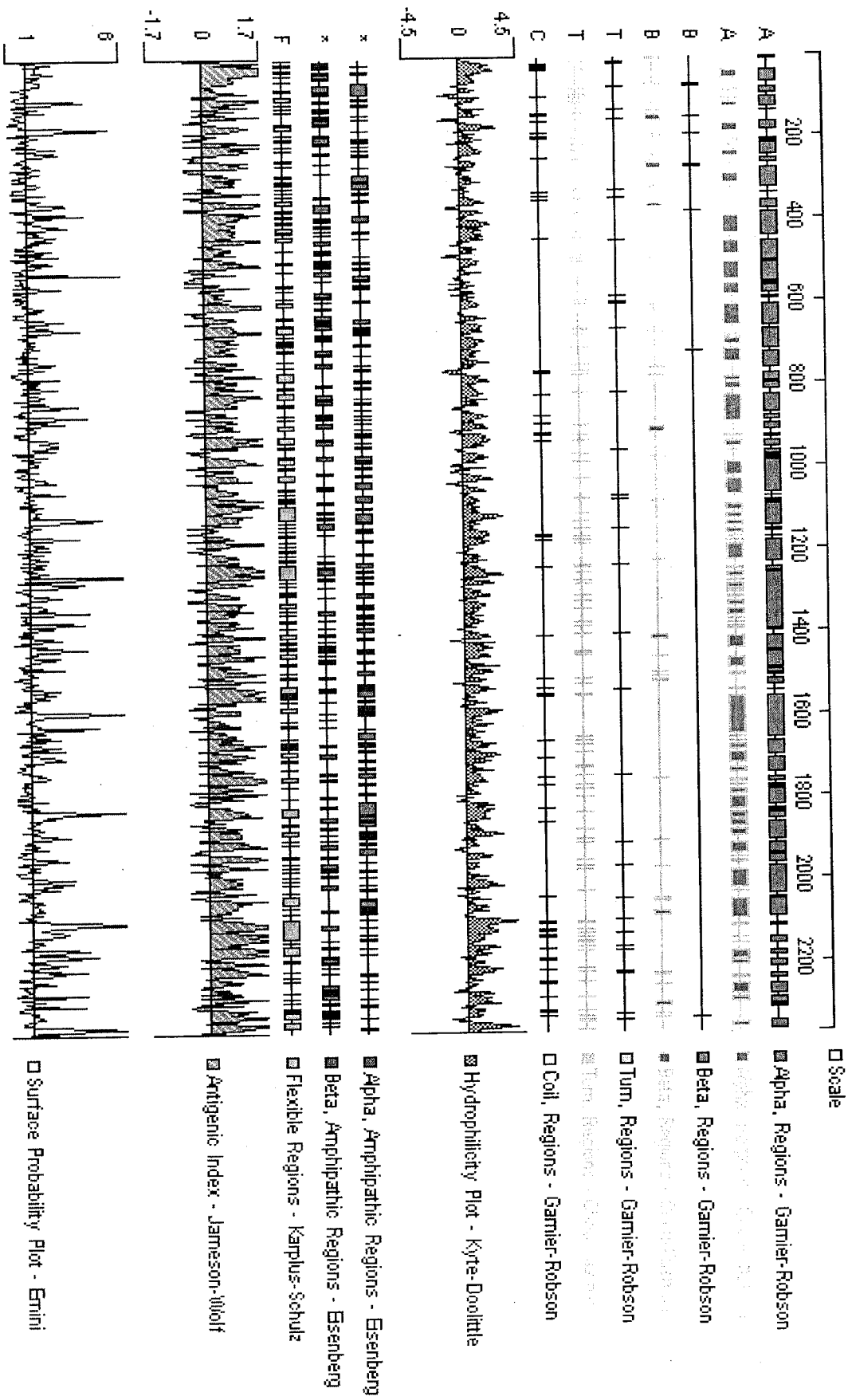
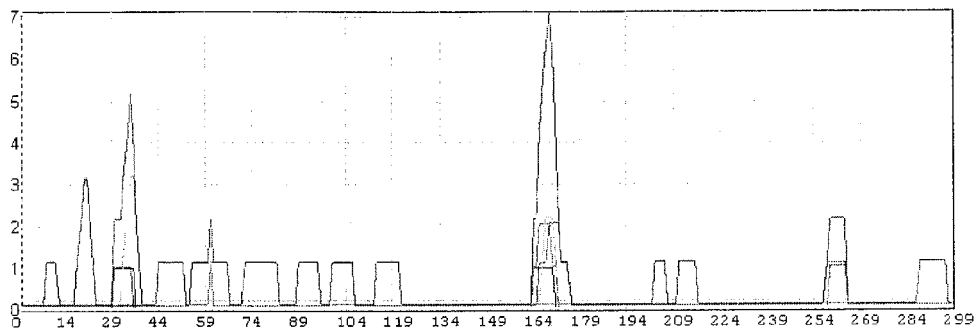


图1

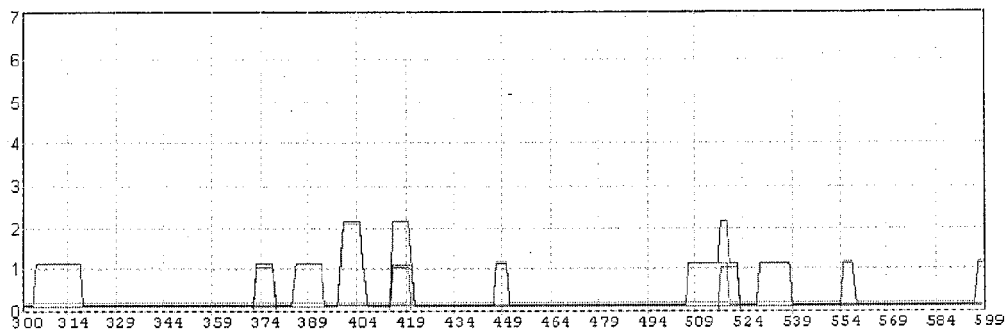
1~300aa

Plot:



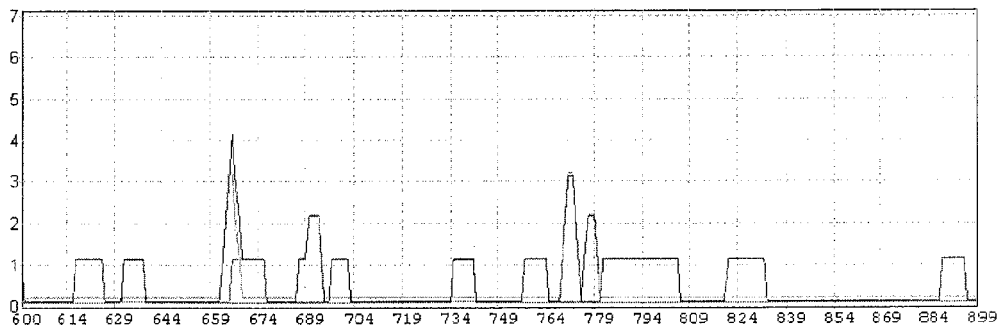
301~600aa

Plot:



601~900aa

Plot:



901~1200aa

Plot:

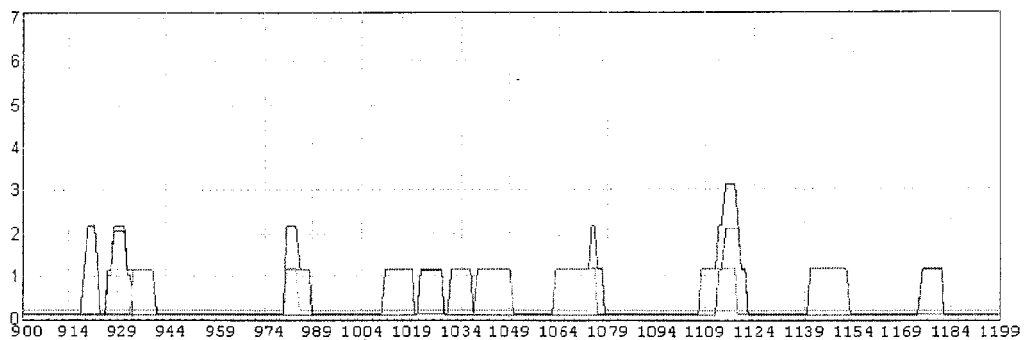
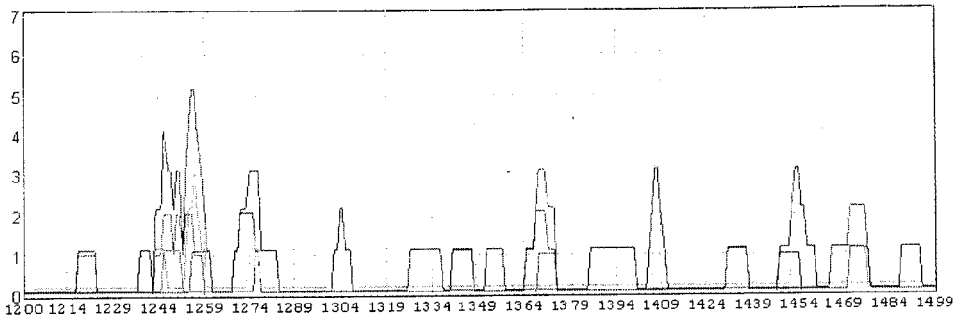


图 2 (转下页)

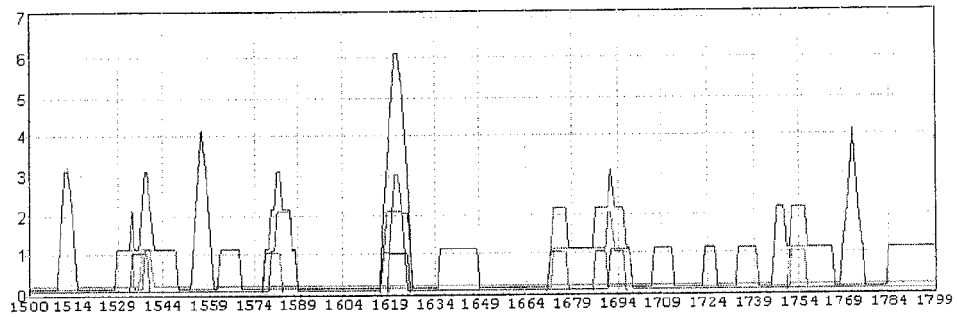
1201~1500aa

Plot:



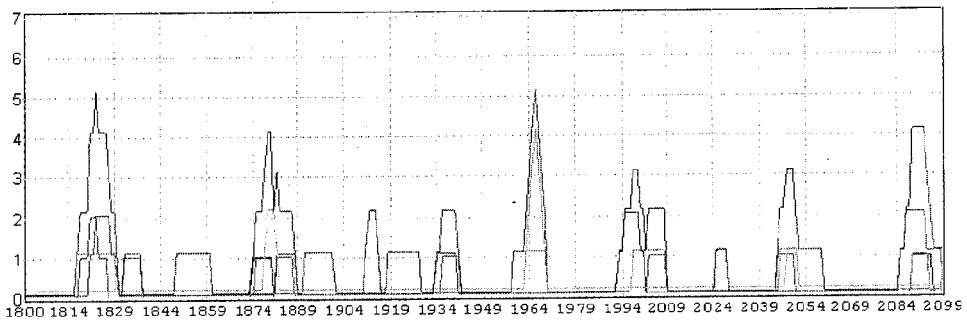
1501~1800aa

Plot:



1801~2100aa

Plot:



2101~2364aa

Plot:

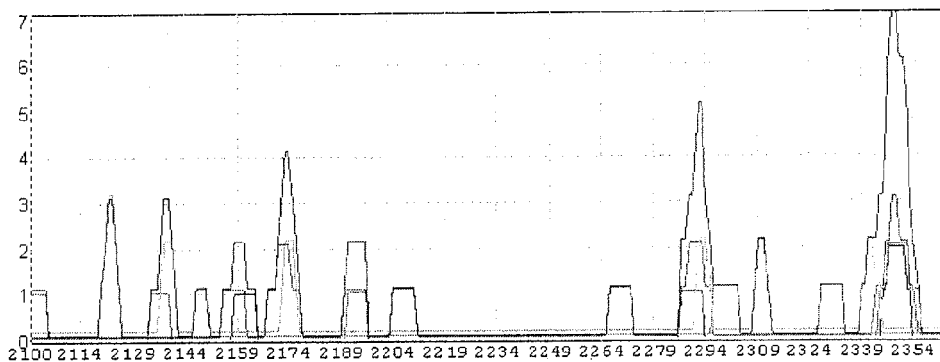


图 2 (续上页)

β-胞衬蛋白多肽包被的微孔(经处理过的兔血清封闭)

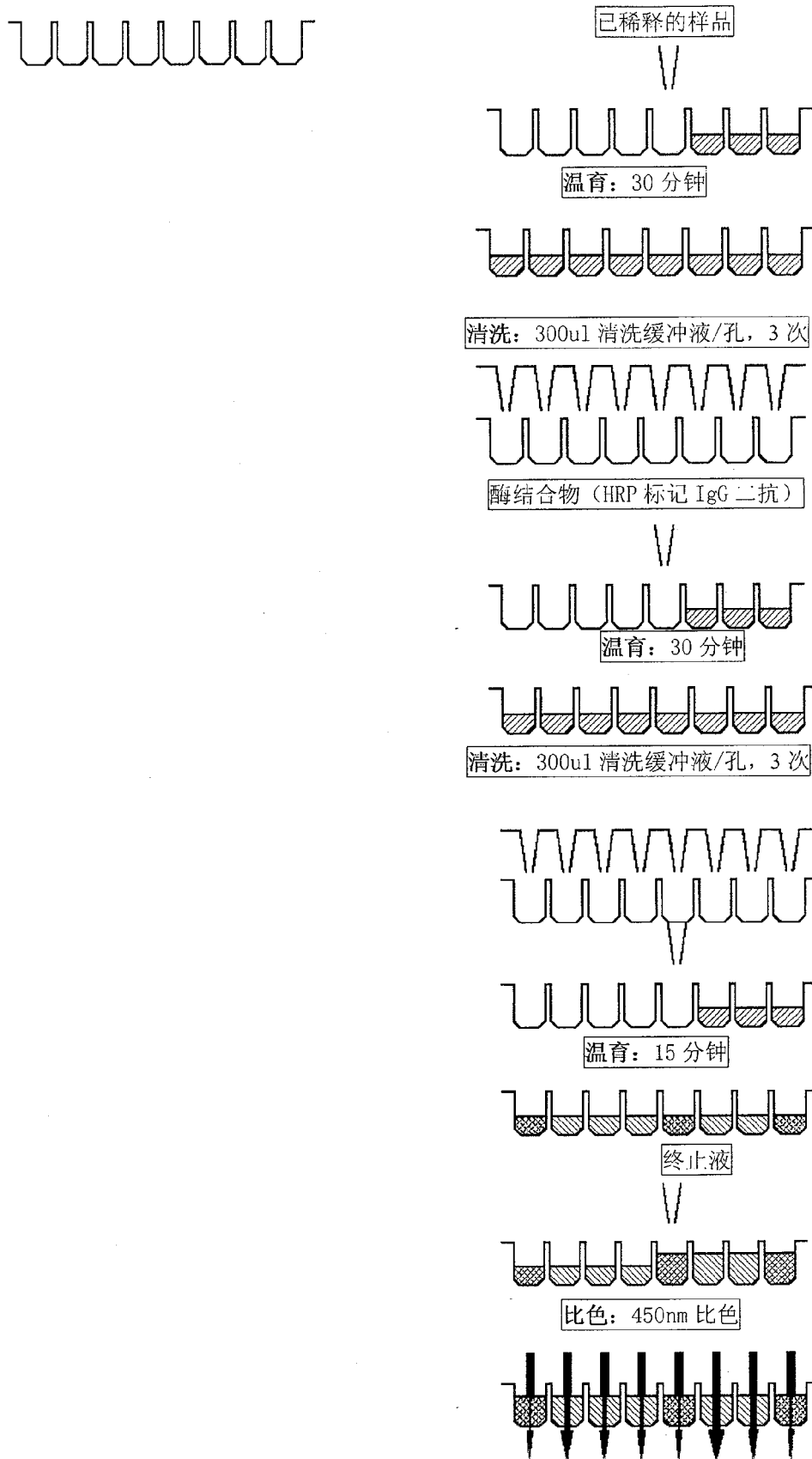


图 3

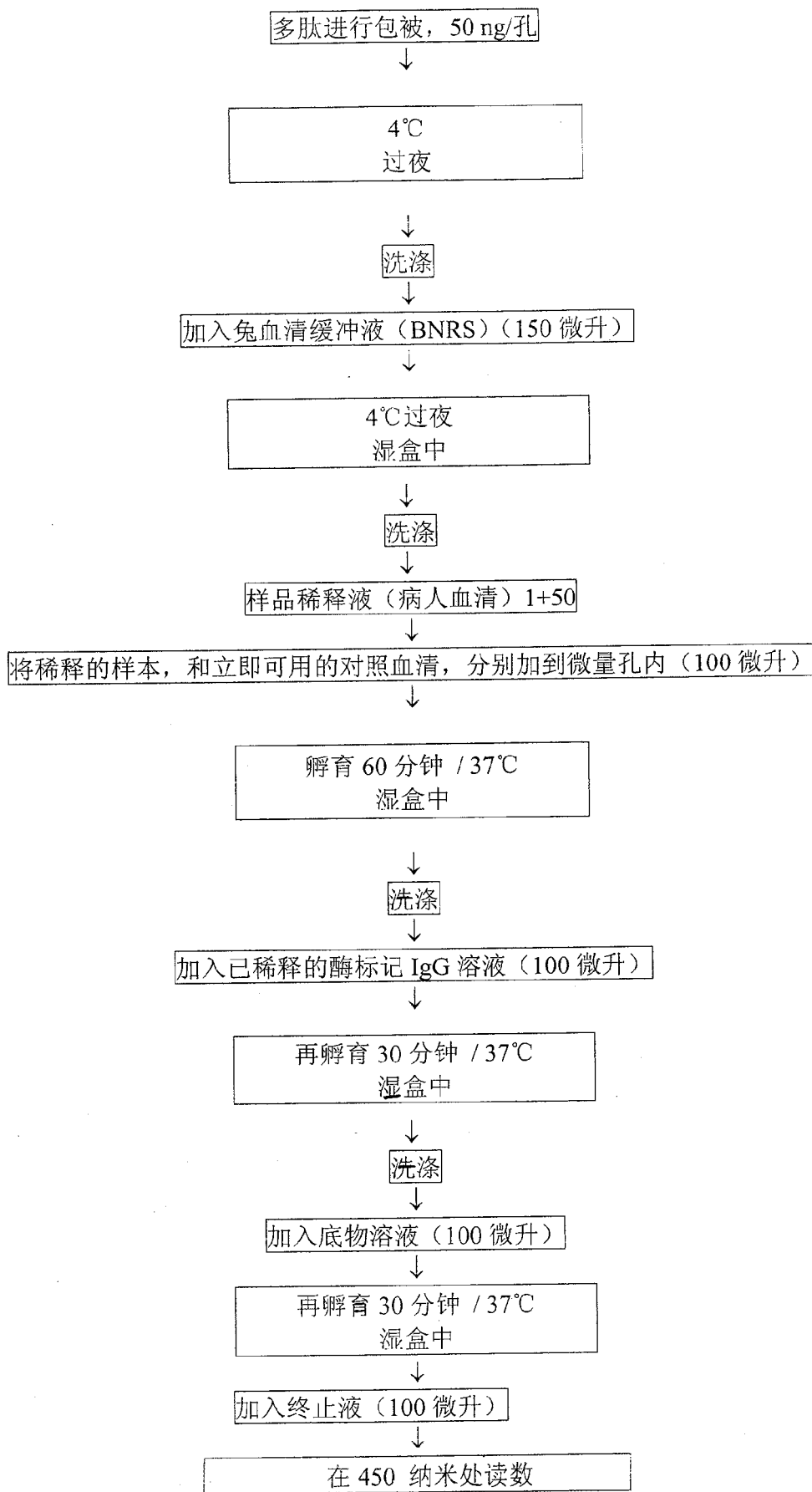


图 4

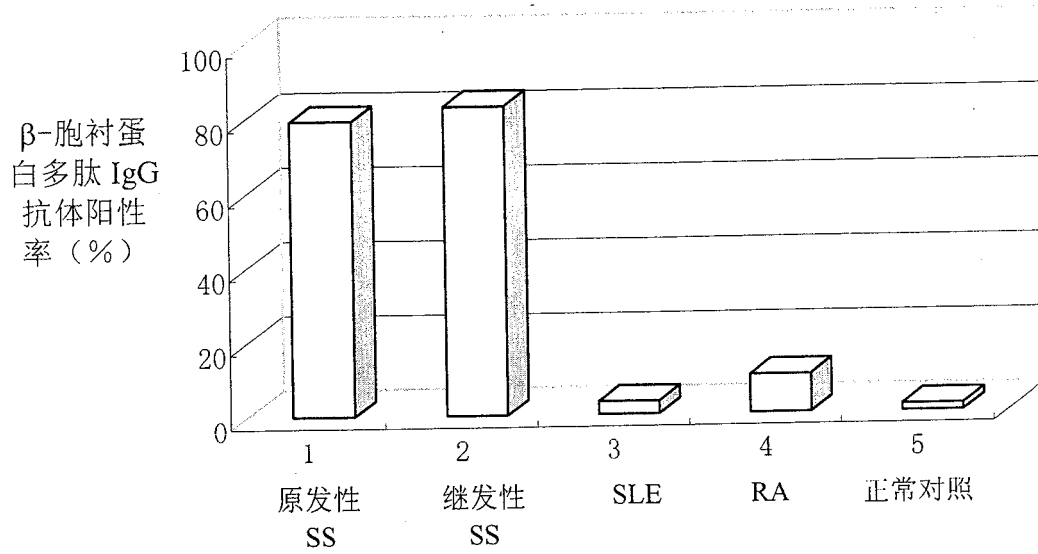


图 5

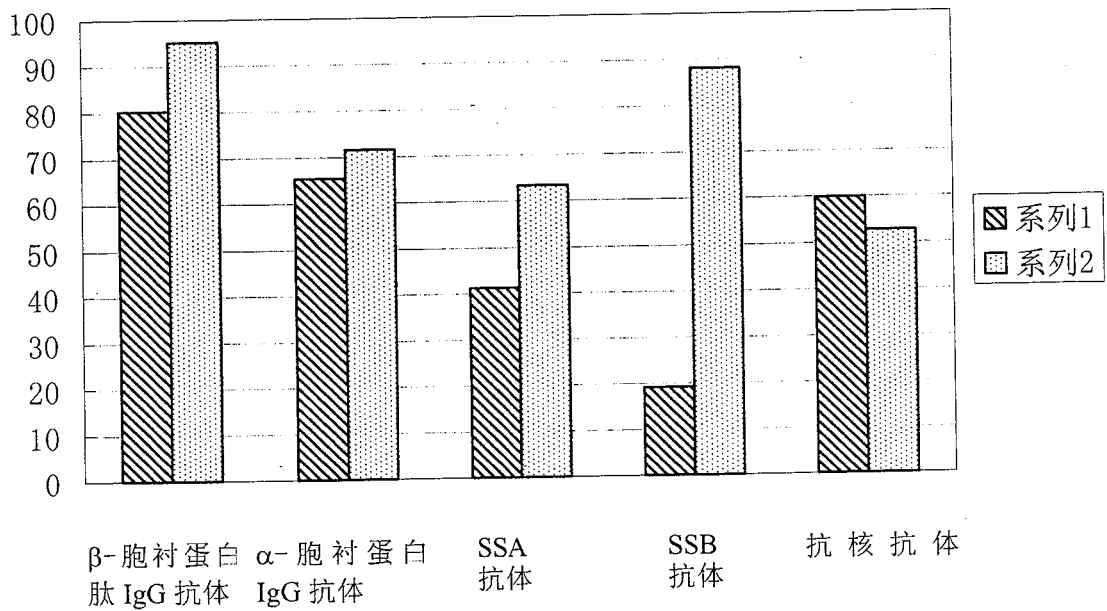


图 6

专利名称(译)	β-胞衬蛋白抗原表位多肽及其筛选方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100572391C</a>	公开(公告)日	2009-12-23
申请号	CN200610037369.5	申请日	2006-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院广州生物医药与健康研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院广州生物医药与健康研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院广州生物医药与健康研究院		
[标]发明人	陈巧林		
发明人	陈巧林		
IPC分类号	C07K14/435 G01N33/53		
审查员(译)	黄磊		
其他公开文献	CN1935837A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于免疫学领域，涉及β-胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选，得到具有诊断意义的最佳β-胞衬蛋白多肽对应的氨基酸序列。本发明所述的β-胞衬蛋白抗原表位多肽，包括如下(a)或(b)的多肽：(a)由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的多肽；(b)在(a)中的氨基酸序列经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有抗原表位功能的由(a)衍生的多肽。所述的β-胞衬蛋白表位多肽可以特异性地检测干燥综合征患者血清中的抗β-胞衬蛋白多肽IgG抗体，完全符合临床诊断的需要。本发明还提供了检测患者血清中β-胞衬蛋白多肽IgG抗体的免疫学方法，以及将其作为抗原在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。

