

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610124168.9

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1979165A

[22] 申请日 2006.12.12

[21] 申请号 200610124168.9

[71] 申请人 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 曾令文

[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

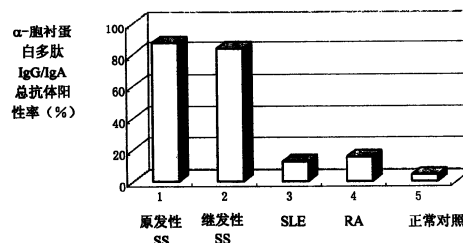
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 4 页

[54] 发明名称

α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物及其应用

[57] 摘要

本发明属于免疫学领域，涉及抗原表位多肽的筛选、免疫学检测方法的建立以及临床诊断试剂的制备及应用，尤其是涉及 α -胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选及 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的设计组成，得到具有诊断意义的两条最佳 α -胞衬蛋白抗原表位多肽对应的氨基酸序列，以及建立检测患者血清中 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的免疫学方法，以及将合成的两条最佳 α -胞衬蛋白抗原表位多肽作为混合抗原在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。



- 1、 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物，其特征在于，包括
- (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与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 抗体反应的抗原表位活性的由 (a) 衍生的多肽；
 - (c)、由 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列组成的多肽；
 - (d)、在 (c) 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与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 抗体反应的抗原表位活性的由 (c) 衍生的多肽。

2、如权利要求 1 所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的筛选方法，其特征在于，包括以下步骤：

A) 选取人 α -胞衬蛋白 ORF 中 1-1680 核酸序列对应的氨基酸序列为对象，通过采用 Standard, Karplus, Emini, Amphiphi, Pellequer 五种国际上关于抗原表位预测的方法，预测分析主要包括与蛋白抗原性相关的二级结构、可及性、亲水性、 β -转角、信号肽切割位点、穿膜螺旋、N-糖基化位点等，通过分析抗原趋势指数，初步确定了上述 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白的抗原决定簇氨基酸残基的分布；

B) 进一步通过合成多肽及免疫学检测分析，得到如权利要求 1 中 (a) 与 (c) 所述的两条各自对应检测抗体敏感性和特异性均很高的抗原表位多肽。

3、一种用于检测干燥综合征患者血清抗体的免疫学方法，其特征在于：将如权利要求 1 所述的 α -胞衬蛋白表位多肽混合物作为混合抗原，采用混合 ELISA 法结合抗体谱 ELISA 法来检测干燥综合征患者血清抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体。

4、根据权利要求 3 所述的免疫学方法，其特征在于：所述的混合 ELISA 法结合抗体谱 ELISA 法中，如权利要求 1 中 (a) 或 (b) 所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽与 (c) 或 (d) 所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽的混合比例为 11 : 14。

5、根据权利要求3所述的免疫学方法，其特征在于：所述的混合ELISA法结合抗体谱ELISA法中，抗原多肽即所述 α -胞衬蛋白表位多肽的包被量为70 ng。

6、根据权利要求3所述的免疫学方法，其特征在于：所述的混合ELISA法结合抗体谱ELISA法中，将业内统一的封闭用正常兔血清经特定处理后作为封闭液，所述的特定处理的具体程序为：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。

7、如权利要求1所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。

8、含有如权利要求1所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的诊断干燥综合征的试剂盒。

α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物及其应用

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、免疫学检测方法的建立以及临床诊断试剂的制备及应用，尤其是涉及 α -胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选及 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的设计组成，得到具有诊断意义的两条最佳 α -胞衬蛋白抗原表位多肽对应的氨基酸序列，以及建立检测患者血清中 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的免疫学方法，以及将合成的两条最佳 α -胞衬蛋白抗原表位多肽作为混合抗原在制备干燥综合征的药物中的应用。

确切地说，本发明涉及一种采用现代生物信息学、免疫学技术筛选获得的人干燥综合征抗原蛋白新的表位多肽及其对应的氨基酸序列，该两条抗原表位多肽可以分别特异性的检测干燥综合征患者血清中的抗 IgG、IgA 抗体。本发明还涉及两条抗原表位多肽优化条件组合进行“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的免疫学方法。另外，本发明提供了该抗原表位多肽混合物在人干燥综合征临床诊断中的应用。

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（pSS）和继发性干燥综合征（sSS）。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，总患病人数已逾 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。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 抗体、SSB 抗体则特异性较差，敏感性也不理想。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。

Hayashi 等于 1997 年发现了一种针对干燥综合征患者唾液腺导管上皮细胞的器官特异性抗原，进一步通过鉴定氨基酸残基确定该抗原为人类骨架蛋白 α -胞衬蛋白，首次提出这种 120KD 的抗原与干燥综合征有关 (Haneji N, Nakamura T, Yakiok K et al, Identification of α -Fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. Science, 1997, 276 (25): 604-606.)。近几年来，国外学者及本发明人继续对干燥综合征相关的 α -胞衬蛋白抗体进行研究，关于该抗体与干燥综合征的发病机制及诊断相关研究及存在问题集中在以下方面：

(1) α -胞衬蛋白抗体的阳性率：由于 α -胞衬蛋白抗原对干燥综合征患者较特异，可应用其纯化抗原，或细胞裂解的 α -胞衬蛋白产物来检测患者血清中的抗体。但目前的研究结果不尽一致。Hayashi 研究小组应用 α -胞衬蛋白融合蛋白—JS-1，利用 Western blot 方法，检测原发性干燥综合征 43 例，继发性干燥综合征 8 例，系统性红斑狼疮 (SLE) 21 例，类风湿关节炎 (RA) 14 例，正常对照 15 例。结果显示， α -胞衬蛋白抗体的阳性率在原发性干燥综合征患者中为 95.35%，继发性干燥综合征患者为 50%，而在 RA，SLE 及正常人群中未检测到 α -胞衬蛋白抗体 (Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG, Caspase-3 is required for alpha-Fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. J Biol Chem, 1998, 273(25):15540-5.)。然而，Masataka 等的研究发现， α -胞衬蛋白抗体在干燥综合征患者的阳性率仅为 50% (42/82)，敏感性为 52%，特异性为 96% (Masataka K, Tetsuroh O, Yoko O, Junichi D, 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)。

(2) 对儿童干燥综合症的检测: Maeno 等应用 Western blot 法检测 15 例干燥综合征患儿血清中的 α -胞衬蛋白抗体, 15 例患儿血清 α -胞衬蛋白抗体均阳性, 而正常儿童均为阴性(Haneji. N, Nakamura. T, Takio. K, et al, Identification of alpha-Fodrin antibodies in Sjogren's syndrome in children. *J Rheumatol*, 2001, 28: 860.)。由此可见, α -胞衬蛋白在成人原发性干燥综合征发病机制中的作用可能在儿童干燥综合征中有相同的意义, 但其确切机制尚需要进一步研究明确。

(3) α -胞衬蛋白的 IgA 和 IgG 抗体亚型: 一般认为, 干燥综合征患者体内异常的免疫球蛋白多是 IgG 亚型。Witte 等首先分别用 IgA 和 IgG 抗体检测原发性干燥综合征 (85 例), 继发于 SLE 的干燥综合征 (15 例) 和继发于 RA 的干燥综合征 (7 例) 患者血清中的 α -胞衬蛋白抗体。结果显示, 64%的原发性干燥综合征, 47%继发于 SLE 的干燥综合征和 86%继发于 RA 的干燥综合征患者的 IgA 抗体阳性。在对照组中, 健康献血者 (1/160), SLE (1/50), RA (2/12) 中 IgA 抗体阳性。以同样的方法测量 IgG 抗体阳性率相对较低, 在原发性干燥综合征, 继发 SLE 的干燥综合征和继发 RA 的干燥综合征中的阳性率分别为 55%, 40%和 43%。健康献血者, SLE, RA 中 IgG 抗体阳性率分别为 3/160, 1/50 和 5/12。因此, 对 IgA 抗体和 IgG 抗体进行比较, IgA 的阳性率和特异性更高, 并且对继发性干燥综合征更为特异 (Witte T, Matthias T, Arnett FC, Deter HH, et al, IgA and IgG autoantibodies against alpha-fodrin as markers for Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2000, 27(11): 2617-20.)。随后, 分别有许多关于 α -胞衬蛋白的 IgA 和 IgG 抗体亚型在干燥综合症检测中的研究, 多数认为 α -胞衬蛋白的 IgA 和 IgG 抗体亚型与干燥综合症相关, 是很好的诊断抗体, 但结果不尽相同, 主要与检测抗原材料来源相关 (Witte T, Matthias T, Oppermann M, et al, Prevalence of antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome: comparison of 2 sets of classification criteria. *J Rheumatol*, 2003, 30(10): 2157-9. Ruffatti A, Ostuni P, Grypiotis P, et al, Sensitivity and specificity for primary Sjogren's syndrome of IgA and IgG anti-alpha-fodrin antibodies detected by ELISA. *J Rheumatol*, 2004, 31(3): 504-7. Kahaly GJ, Bang H, Berg W, et al, Alpha-fodrin as a putative autoantigen in

Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol*, 2005, 140(1): 166-72. Turkcapar N, Olmez U, Tutkak H, et al, The importance of alpha-fodrin antibodies in the diagnosis of Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int*, 2006, 26(4): 354-9. Yavuz S, Toker E, Bicakcigil M, et al, Comparative analysis of autoantibodies against a-fodrin in serum, tear fluid, and saliva from patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 2006, 33(7): 1289-92.)。

(4) α -胞衬蛋白抗原表位多肽的研究：以上研究以表达纯化的蛋白进行抗体检测，检测结果会受纯化蛋白的性质和稳定性的限制，从而对 α -胞衬蛋白在抗体检测中的真实价值和稳定结果影响很大。本发明人及 Shiari R 等人运用表达重叠蛋白片段及免疫分析筛选得到了一些干燥综合征相关的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（或蛋白片断），其敏感性、特异性相比抗核抗体、SSA 抗、SSB 抗体均有所提高，结果也很稳定，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，与抗原表位多肽的独立检测价值还是不符合，加上国外许多研究中病例样本小等，该抗体检测在干燥综合征诊断中的特异性、敏感性仍不尽如人意，更重要的是针对更为有意义的 IgA 抗体检测还没有对应的表位多肽的研究（何菁，李晶，栗占国，陈巧林. 抗 α -胞衬蛋白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 α -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 α -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. Shiari R, Kobayashi I, Toita N, et al, Epitope mapping of anti-alpha-fodrin autoantibody in juvenile Sjogren's syndrome: difference in major epitopes between primary and secondary cases. *J Rheumatol*, 2006, 33(7): 1395-400. Fox RI, Kontinen Yj, Fisher A, Use of Muscarinic Agonists in the Treatment of Sjogren's syndrome. *Clin Immunol*. 2001, 101(3): 249-263.)。

综上所述，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高，而阳性率也高的标志物；缺乏特异性的诊断方法也是问题的核心。在干燥综合症相关抗原—— α -胞衬蛋白领域进行了包括血清抗体检测及抗原表位多肽筛选的探索研究，但仍有多个方面的问题尚待澄清及解决，如：高特异性、强敏感性 α -

胞衬蛋白 IgG、IgA 型抗体检测用的抗原表位多肽尚缺乏深入研究；尚缺乏针对 α -胞衬蛋白 IgG/IgA 型抗体同时检测用的方法。因此，筛选及鉴定新的 α -胞衬蛋白相关抗原表位多肽，寻找一种敏感性高、特异性强而临床又易于检测的抗体，建立更好的诊断方法，对于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，本发明的第一个目的在于提供新的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（包括其衍生物），以及其对应的氨基酸序列。所述的两条 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（包括其衍生物）可以分别特异性地检测干燥综合征患者血清中的抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG、IgA 抗体，两条 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物用于检测 IgG/IgA 总抗体的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。因而所述的两条 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（包括其衍生物）混合物可以被提供作为人干燥综合征临床诊断用混合抗原。

本发明的第二个目的在于提供所述的两条 α -胞衬蛋白抗原表位多肽及其衍生物的筛选方法。本发明采用生物信息学方法结合免疫检测分析方法，筛选获得可作为人干燥综合征混合抗原的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽及其衍生物。

本发明的第三个目的在于提供一种将含有所述 α -胞衬蛋白抗原表位多肽或其衍生物作为混合抗原用于检测干燥综合征患者血清抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的方法，即“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法。本发明对两条抗原表位多肽的最佳混合比例及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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物在制备用于诊断干燥综合征的药物中的应用。该应用是基于所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物测定抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在干燥综合征诊断中的价值评定结果。本发明所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽，包括：

(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能与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 抗体反应的抗原表位活性的由 (a) 衍生的多肽；

(c)、由 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列组成的多肽；

(d)、在 (c) 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能与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 抗体反应的抗原表位活性的由 (c) 衍生的多肽。

SEQ ID NO.1

NH₃-Gln-Asp-Leu-Glu-His-Val-Glu-Val-Leu-Gln-COOH

SEQ ID NO.2

NH₃-Arg-Asp-Leu-Ala-Ser-Val-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Lys-COOH

SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 所示多肽均为 α -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 α -胞衬蛋白 ORF 中 1-1680 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.)，预测分析主要包括与蛋白抗原性相关的二级结构、可及性、亲水性、 β -转角、信号肽切割位点、穿膜螺旋、N-糖基化位点等，通过分析抗原趋势指数，初步确定了上述 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白的抗原决定簇氨基酸残基的分布。进一步通过合成多肽及免疫学检测分析，得到了两条各自对应检测抗体敏感性和特异性均很高的抗原表位多肽，一条可以很好检测患者血清中的抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 型抗体，一条可以很好检测患者血清中的抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 型抗体。同时，经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有能与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG、IgA 抗体反应的抗原表位活性的由这两条多肽序列衍生而来的一系列多肽，也显示很好的抗原抗体结合反应，该两条多肽及其对应的系列衍生物 (多肽) 即为本发明所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽。该发明中的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽单独均可以很好检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 或 IgA 型抗体，其混合物则可

以很好的检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体。迄今为止，国内外尚无关于 α -胞衬蛋白此两条抗原表位多肽（包括筛选到的两条抗原表位多肽及对应的衍生多肽）序列的抗原性、该抗原表位多肽混合物检测血清中对应 IgG/IgA 总抗体的方法及其作为混合抗原在干燥综合征诊断中意义等的研究。

本发明所述的 α -胞衬蛋白抗原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 α -胞衬蛋白 ORF 中 1-1680 nt 基因序列来源于 NCBI (>gi|4507190|ref|NM_003127.1|[4507190] spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin) (SPTAN1), mRNA [Homo sapiens])。

根据发明的第三个目的，本发明建立了含有所述 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）作为混合抗原用于检测干燥综合征患者血清抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的方法（“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法）。

酶联免疫吸附法（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。本发明中所用的拓宽了范围的“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法具体指：运用混合抗原，同时对不同亚型抗体进行检测，而且本发明运用的是同一个微孔中进行不同亚型抗体的检测。

“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测中，首先最重要的是包被抗原（混合物）之间的混合比例，本发明人通过多次摸索，选择 SEQ ID NO.1 序列合成多肽与 SEQ ID NO.2 序列合成多肽的不同配比浓度进行优化实验：1：2，6：7，9：14，5：7，11：14，6：7，13：14。最终确定最佳混合比例为 11：14，以此混合比例混合 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2），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，最终加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗人 IgG/IgA 两

种抗体的混合物（等比例），反应最佳。

其次，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），尤其是在“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测中，对混合抗原与各抗体反应的条件更为精密，本发明人在实验初始阶段，发现混合抗原与不同抗体反应总和比单独反应时相加后要弱很多，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（pH8.0 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。对此本发明人进行了相应的实验，将所述 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）按 11：14 比例混合后经多次不同范围的浓度梯度稀释后进行反应，具体浓度梯度稀释试验中，总的包被量分别为：1 ng、10 ng、100 ng、1000 ng；10 ng、40 ng、60 ng、80 ng、100 ng；60 ng、65 ng、70 ng、75 ng、80 ng。最终确定了检测多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2 多肽混合物）的最佳包被量（70 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，也是任何临床 ELISA 检测试剂能得到很好应用的另一关键因素。本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反应中封闭液（称为：BNRS）（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 α -胞衬蛋白多肽抗体检测的背景（非特异性结合）降到最低。

通过以上条件优化，本发明人将含有所述 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）通过最佳混合比例（11：14），按特定浓度（总量为 70 ng），包被在

固相的聚苯乙烯微孔板上，利用处理好的封闭用正常兔血清进行封闭，然后加入干燥综合征患者血清，最终加入 HRP 标记的抗人 IgG/IgA 抗体混合物（等比例），合并以上优化条件外，其他环节与常规混合 ELISA 相同。本发明经过优化建立的拓宽范围的“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法可以很好的检测临床干燥综合征患者血清的抗 IgG/IgA 总抗体，实验结果显示，该方法得到的干燥综合征患者血清抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的敏感性好、特异性强，完全符合疾病临床诊断的要求。

与现有技术相比，本发明所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽测定抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在干燥综合征诊断中的价值评定有着非常明显的优势，详述如下：

目前，国内外虽然已经针对 α -胞衬蛋白的 IgA 和 IgG 抗体亚型的检测展开了大量研究，但以表达纯化的蛋白进行抗体检测，结果会受纯化蛋白的性质和批次稳定性的限制，从而对 α -胞衬蛋白在抗体检测中的真实作用和结果分析影响很大。对抗原表位多肽（或片断）的研究，迎合了临床产品的需要，提高了检测的稳定性，但以往研究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、敏感性不尽如人意，而且还没有 IgA 抗体检测对应的表位多肽的相关研究。

基于以上研究现状，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 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白的抗原决定簇，进一步通过合成多肽及免疫检测，得到了两条各自对应检测抗体敏感性和特异性均很高的抗原多肽，一条可以很好检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 型抗体，一条可以检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 型抗体。本发明人将该两条多肽作为检测混合抗原，用上述建立好的“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体。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。结果发现该多肽混合物检测到的干燥综合征的抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体具有较高

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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物在制备用于诊断干燥综合征的药物中的应用。

根据上述关于 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物测定抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在干燥综合征诊断中的价值评定结果、 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物测定抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体初步免疫学方法（“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法）以及干燥综合征临床诊断试剂盒的要求，本发明人制备了 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体临床诊断用试剂盒。具体采用的是混合直接固相酶联免疫吸附分析多种抗体法（“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法），用于检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体；所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）按上述条件混合被包被于微孔板上并经封闭，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 个不同的反应阶段并形成混合复合物，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（孔内已包被了上述的混合抗原并完成封闭），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：加入辣根过氧化物酶（HRP）标记山羊抗人 IgG 及 HRP 标记山羊抗人 IgA 等比例抗体混合物，30 分钟孵育后洗涤除去未结合的多余的酶标抗体。步骤 3：加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（简称 TMB）底物，15 分钟孵育后试剂颜色变成蓝色，加入终止液（含 1 mol/L HCl）终止反应，试剂颜色变成黄色。

颜色的深浅与样品中 IgG/IgA 总抗体的浓度成一定比例关系。样品的 IgG/IgA 总抗体含量可根据其 OD 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 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白抗原表位抗原趋势指数分析结果图。横坐标表示 α -胞衬蛋白氨基酸序列的位置，纵坐标表示抗原趋势指数的大小， >1.012 者为可能的抗原表位，而且抗原趋势指数越大，抗原表位的可能性越大。该方法准确性为 75%。

图 2 为混合直接固相酶联免疫吸附分析多种抗体法（“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法）检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体原理示意图。图中，用混合抗原（ α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物）包被微孔板，制成固相载体，并完成封闭。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 α -胞衬蛋白多肽 IgG、IgA 抗体）特异性地与固相载体中存在的抗原结合，形成混合免疫复合物。除去多余物质后，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 和 IgA 抗体混合物，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 3 为本发明所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物建立的“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法的检测程序示意图。

图 4 显示 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在不同疾病的阳性率。由图可见抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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 5 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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的敏感性和特异性明显高于 SSA、SSB 抗核抗体（P 均 <0.01 ）及抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 抗体，敏感性比抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 抗体单独检测也有很大提高，但特异性比其稍低。综合而言，抗 α -胞衬蛋白多肽总抗体在干燥综合征血清学诊断中具重要价值。

具体实施方式

本发明所用术语：

α -胞衬蛋白抗原表位多肽：是指具有 SEQ ID NO.1 序列 QDLEHVEVLQ（即

NH₃-Gln-Asp-Leu-Glu-His-Val-Glu-Val-Leu-Gln-COOH) 的多肽, 以及具有 SEQ ID NO.2 序列 RDLASVQALLRK (即 NH₃-Arg-Asp-Leu-Ala-Ser-Val-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Lys-COOH) 的多肽或将上述两条多肽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能与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG、IgA 抗体反应的抗原表位活性的衍生而来的多肽。

α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物: 是指将具有 SEQ ID NO.1 共同序列的多肽或上述的对应衍生多肽与具有 SEQ ID NO.2 共同序列的多肽或上述的对应衍生多肽进行优化比例混合后形成的混合物。

实施例 1 α -胞衬蛋白抗原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 α -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 α -胞衬蛋白抗体 (IgA 或 IgG), 然后通过特定的方法可以将其检出 (Cheney R, Hirokawa N, Levine J, Willard M, Intracellular movement of Fodrin. Cell Motil, 1983, 3(5-6):649-55. Haneji, N., Nakamura T, Takio K, et al, Identification of α -Fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's Syndrome. Science, 1997, 276:604-7. Watanabe T, Tsuchida T, Kanda N, et al, Anti- α -Fodrin antibodies in Sjogren's Syndrome and lupus erythematosus. Arch Dermatol, 1999, 135:535-539. Witte T, Matthias T, Arnett C F, et al, IgA and IgG autoantibodies against α -Fodrin as marker for Sjogren's Syndrome. J Rheumatol, 2000, 27:2617-20.)。本发明的实验中, 发明人选取 α -胞衬蛋白 ORF 中 1-1680 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 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白的抗原决定簇, 按抗原趋势指数排列, 结果见图 1, 根据结果合成了共计 23 条多肽。选取的 560 aa 长度的 α -胞衬蛋白对应序列及合成的 23 条多肽氨基酸序列分别为:

选取的 α -胞衬蛋白 ORF 中 1-1680 核酸序列对应的 560 aa 序列为(从 NH₃ 端到 COOH 端排序):

MDPSGVKLVLETAEDIQERRQQVLD RYHRFKELSTLRRQKLEDSYRFQFFQRDAEELE
 KWIQEKLQIASDENYKDPTNLQGKLQKHQAFEAEVQANS GAIVKLDETGNLMISEGH
 FASETIRTRLMELHRQWELLLEKMREKGIKLLQAQKLVQYLRECE DVM DWINDKEAI
 VTSEELGQDLEHVEVLQKKFEEFQTDMAAHEERVNEVNQFAAKLIQE QHP EEELIKT
 KQDEVNAAWQRLKGLALQRQGKLF GAAEVQRFNRDVDETISWIK EKEQLMASDDF
 GRDLASVQALLRKHEGLERDLAALEDKVKALCAEADRLQ QSHPLSATQIQVKREELI
 TNWEQIRTLAAERHARLND SYRLQRFLADFRDLTSWVTEMKALINADELASDVAGAE
 ALLDRHQEHKGEIDAHEDSFKSADESGQALLAAGHYASDEVREK LTVLSEERAALLE
 LWELRRQQYEQCMDLQLFYRDTEQVDNWMSKQEAFLLNEDLGDSLDSVEALLKKH
 EDFEKSLSAQEEKITALDEFATKLIQNNHYAMEDVATRRDALLSRRNALHE

合成的 23 条多肽序列为（均为从 NH₃ 端到 COOH 端排序）：

SGVKVLE RRQQVLDR IQEKLQI LQGKLQKHQAFEAEV SGAIVKL
 RQWELL GIKLLQAQKLVQYLRECE D KEAIVTS QDLEHVEVLQ
 NQFAAKLIQE RLKGLALQRQ KLF GAAEV RDLASVQALLRK
 ERDLAALEDKVKALCAE RLQ QSHPLSATQIQVKR YRLQRFLAD
 LASDVAGAEALLDR GQALLAAGH VREK LTVLS RAALLEL
 QYEQCMDLQLFY QEAFLLN LGDFLDSVEALLKK

将上述 23 条合成的 α -胞衬蛋白多肽分别采用单特异性 ELISA 方法检测临床 10 例 α -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和 10 例 α -胞衬蛋白 IgA 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：23 条合成的 α -胞衬蛋白多肽分别用包被缓冲液（1×PBS，pH 8.0）稀释至 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，包被酶标板（100 $\mu\text{l/孔}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时。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，见前述）150 μl ，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，洗板 5 次。抗 α -胞衬蛋白阳性 SS 患者血清标本（包括 IgG 阳性 10 例，IgA 阳性 10 例）各以 PBS 稀释 50 倍后分别加入（100 $\mu\text{l/孔}$ ），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗板 5 次后分别对应加入 PBS 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG、IgA 二抗（Santa Cruz 产品），37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗板 5 次后加入 TMB 显色液显色 15 min，加入 1 mol/L 的 HCL 终止后测定标本在 450 nm 处的吸收值（A 值）。每板同时设空白对照、阳性对

照及阴性对照（均来自德国 BL 公司 alpha-Fodrin 抗体 IgG、IgA 单独定量 ELISA 检测试剂盒）。采用反应 OD 值的平均值，比较 23 条合成多肽与 SS 患者血清 IgG、IgA 的反应强弱，得到的最强反应的多肽认定为 SS（干燥综合征）相关抗体最佳检测抗原—— α -胞衬蛋白抗原表位多肽。

通过以上免疫检测分析，得到了两条反应最强的抗原表位多肽：第 9 条，QDLEHVEVLQ（NH₃-Gln-Asp-Leu-Glu-His-Val-Glu-Val-Leu-Gln-COOH），可以很好检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 型抗体，在 23 条合成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：0.68；第 13 条，RDLASVQALLRK（NH₃-Arg-Asp-Leu-Ala-Ser-Val-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Lys-COOH），可以检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgA 型抗体，在 23 条合成多肽中与干燥综合征阳性血清 IgA 抗体反应最强，OD 平均值为：0.75。结果见表 1。

表 1 23 条 α -胞衬蛋白合成多肽的序列及单特异性 ELISA 检测结果

No	起点	氨基酸序列	终点	IgG 反应 OD 平均值	IgA 反应 OD 平均值
1	4	SGVKVLE	10	0.11	0.09
2	18	RRQQVLDR	25	0.14	0.18
3	60	IQEKLQI	66	0.08	0.06
4	78	LQGKLGKHQAFEAEV	92	0.25	0.16
5	96	SGAIVKL	102	0.09	0.07
6	129	RQWELL	135	0.10	0.07
7	142	GIKLLQAQKLVQYLRECED	160	0.34	0.12
8	168	KEAIVTS	174	0.12	0.09
9	179	QDLEHVEVLQ	188	0.68	0.14
10	209	NQFAAKLIQE	218	0.21	0.31
11	239	RLKGLALQRQ	248	0.31	0.38
12	250	KLFGAAEV	257	0.24	0.21
13	285	RDLASVQALLRK	296	0.23	0.75
14	301	ERDLAALEDKVKALCAE	317	0.28	0.54
15	320	RLQQSHPLSATQIQVKR	336	0.44	0.15
16	361	YRLQRFLAD	369	0.17	0.22
17	389	LASDVAGAEALLDR	402	0.36	0.14
18	424	GQALLAAGH	432	0.23	0.11
19	438	VREKLTVLS	446	0.12	0.13

20	449	RAALLEL	455	0.07	0.07
21	462	QYEQCMDLQLFY	473	0.14	0.36
22	486	QEAFLLN	492	0.06	0.10
23	495	LGDFLDSVEALLKK	508	0.31	0.26

分别将第 9 条多肽和第 13 条多肽标记为 SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2, 为了分析上述筛选得到的 SEQ ID NO.1 多肽及 SEQ ID NO.2 多肽抗原性的普遍稳定性, 对 SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2 序列分别经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸但保证能与抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG、IgA 抗体反应的抗原表位活性的由此衍生出一系列多肽, 重新合成对应的该系列多肽, 利用以上免疫检测方法进行检测, 发现分别可以很好检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG 抗体、IgA 抗体, 分别显示与干燥综合征阳性血清 IgG、IgA 抗体很好的反应, OD 平均值结果见表 2 及表 3。

表 2 10 条 α -胞衬蛋白 SEQ ID NO.1 多肽衍生物的序列及其单特异性 ELISA 检测结果

No	氨基酸序列	IgG 反应 OD 平均值
1	<u>Q</u> DLEHVEVLQ	0.65
2	QDLEHVEVLQ <u>K</u>	0.57
3	<u>ELG</u> QDLEHVEVLQ	0.63
4	QDLEHVEVLQ <u>KKF</u>	0.65
5	<u>ELGQDLEHVEVLQKKF</u>	0.79
6	QDLEPVEVLQ	0.56
7	QDLEPVEVLP	0.53
8	QDLEHVEVL	0.54
9	DLEHVEVLQ	0.51
10	DLEHVEVL	0.45

上表中, 序号为 1-5 的序列是在 SEQ ID NO.1 序列的首末端分别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 序列取代 1 个或多个氨基酸的序列 (用下划线标出); 序号为 8-10 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。

表 3 10 条 α -胞衬蛋白 SEQ ID NO.2 多肽衍生物的序列及单特异性 ELISA 检测结果

No	氨基酸序列	IgA 反应 OD 平均值
1	<u>G</u> RDLASVQALLRK	0.72
2	RDLASVQALLR <u>KH</u>	0.67
3	<u>DFGR</u> DLASVQALLRK	0.72

4	<u>RDLASVQALLRKHEG</u>	0.65
5	<u>DFGRDLASVQALLRKHEG</u>	0.82
6	RDLASVP <u>ALLRK</u>	0.64
7	RDLASVP <u>ALLRP</u>	0.61
8	RDLASVQ <u>ALLR</u>	0.67
9	DLASVQ <u>AJLRK</u>	0.61
10	DLASVQ <u>ALLR</u>	0.60

上表中,序号为 1-5 的序列是在 SEQ ID NO.2 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.2 序列取代 1 个或多个氨基酸的序列(用下划线标出);序号为 8-10 的序列是在 SEQ ID NO.2 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.) 合成了这两条共 22 个氨基酸的 α -胞衬蛋白多肽 (SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2) 及其对应的多肽衍生物。迄今为止,国内外尚无关于该多肽序列 (SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 及其对应的多肽衍生物) 的抗原性、该抗原表位多肽混合物检测血清中对应 IgG/IgA 总抗体的方法及其作为混合抗原在干燥综合征诊断中意义的研究。

实施例 2 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的混合浓度设计

为了满足“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测的需要,本发明中根据 α -胞衬蛋白抗原表位多肽 (SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2) 分别作为单独检测抗原,采用单特异性 ELISA 方法分别检测临床 10 例 α -胞衬蛋白 IgG 抗体检测阳性及 10 例 α -胞衬蛋白 IgA 抗体检测阳性的干燥综合征确诊患者血清抗体的结果。以这两条多肽作为混合抗原,调整两条多肽的不同配比浓度,对这 20 例临床确诊干燥综合征患者血清 IgG/IgA 总抗体进行“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测。通过初步摸索比较结果,进一步选择 SEQ ID NO.1 合成多肽与 SEQ ID NO.2 合成多肽的不同配比浓度(1:2, 6:7, 9:14, 5:7, 11:14, 6:7, 13:14) 进行最终确定实验。

“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测具体步骤是:首先选择上述筛选到的

两条 α -胞衬蛋白抗原表位多肽 (SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2), 分别以上述不同配比浓度比例混合, 每组混合多肽用包被缓冲液 (1×PBS, pH 8.0, 此为之前试验摸索结果, 具体见实施例 3) 稀释至 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 包被酶标板 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 37°C 温育 4 小时。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, 包被量及封闭液均为试验摸索结果, 具体见实施例 3 及前述) 150 μl , 4°C 孵育过夜, 洗板 5 次。前面实验用的 20 例抗 α -胞衬蛋白阳性 SS 患者血清标本 (包括 IgG 阳性 10 例, IgA 阳性 10 例) 分别以 1×PBS 稀释 50 倍后加入各包被孔中 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 37°C 孵育 30 min。洗板 5 次后分组加入 1×PBS 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 二抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgA 二抗 (均为 Santa Cruz 产品) 混合物 (等比例, 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 37°C 孵育 30 min。洗板后加入 TMB 显色液显色 15 min, 加入 1 mol/L 的 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 (均来自德国 BL 公司 alpha-Fodrin 抗体 IgG、IgA 单独定量 ELISA 检测试剂盒)。采用待测标本 A 值 > 正常标本均数 + 2×标准差为阳性域值, 分析两条合成多肽混合物与 SS 患者血清 IgG/IgA 的反应情况。

分析“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测结果并与前面单特异性 ELISA 检测的结果进行比较, 选择最佳的配比浓度。要求得到的两条多肽最佳混合比例满足要求: 以此浓度比例混合两条多肽作为混合抗原, 检测干燥综合征患者血清 IgG/IgA 总抗体具有背景低及阳性反应强。结果见表 4:

表 4 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 不同比例混合多肽抗体反应的 OD 平均值

SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 多肽混合比例	1 : 2	6 : 7	9 : 14	5 : 7	11 : 14	6 : 7	13 : 14
IgG/IgA 反应 OD 平均值	0.81	0.87	0.73	0.98	1.12	0.86	0.84

本发明的实验中最终通过优化条件, 确定了这两条多肽 (SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2) 进行“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的最佳混合配比为 11 : 14, 通过该最佳配比混合在一起进行检测 α -胞衬蛋白多肽

IgG/IgA 总抗体用的抗原（多肽）混合物物称为 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物。

本发明中的实验研究表明：上述 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物具有很好的识别干燥综合征患者血清中的 IgG/IgA 总特异性抗体的作用，对干燥综合征的诊断具有重要意义。

实施例 3 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物对患者血清中抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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混合抗原与抗体反应的情况，经过一系列 pH 值及反应离子浓度的调整后，我们确定了以 pH8.0 的自配 1×PBS 为包被缓冲液；同时也针对包被的多肽混合物混合比例及最佳浓度进行了相应的实验，将该 α -胞衬蛋白多肽 SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2 分别按不同比例进行混合后进行反应，结果显示，用以上 pH 8.0 的自配 1×PBS 包被缓冲液将两条抗原多肽按 11：14 比例混合稀释为 0.7 $\mu\text{g/ml}$ ，每孔加入 100 μl ，37℃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 α -胞衬蛋白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 μl ，4℃温育过夜。

BNRS 的配制：正常兔血清 25 ml（先 62℃灭活 20 分钟），再加入 0.3275 g Tris，0.21915 g NaCl，最后用 HCl 调 pH 至 8.0。

本研究利用上述的 SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2 多肽采用上述经过优化而建立好的酶联免疫吸附法（“混合 ELISA”结合“抗体谱 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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体进行检测，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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）合成干粉，按 11：14 比例称量混合后用包被缓冲液（上述自制 1×PBS 缓冲

液, pH 8.0) 稀释至 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 包被酶标板 (100 $\mu\text{l/孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时。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 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 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 $\mu\text{l/孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。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 二抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgA 二抗混合物 (均为 Santa Cruz 产品, 等比例混合, 200 $\mu\text{l/孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗板后加入 TMB 显色液显色 15 min, 加入 1 mol/L 的 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 (均来自德国 BL 公司 alpha-Fodrin 抗体 IgG、IgA 单独定量 ELISA 检测试剂盒)。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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽 (SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2) 混合物与 SS 患者及对照组血清 IgG/IgA 总抗体的反应情况。

“混合 ELISA” 结合 “抗体谱 ELISA” 法检测原理示意图见图 2。

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。

1. 检测程序概要: 如图 3 所示, 多肽混合稀释后进行包被, 70 ng/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 小时, 洗涤, 加入封闭用正常兔血清缓冲液 (BNRS) 150 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 μl), 在湿盒中孵育 30 分钟/37 $^{\circ}\text{C}$ 。再洗涤, 加入已稀释的酶标记 IgG/IgA 等比例混合溶液 200 μl , 在湿盒中再孵育 30 分钟/37 $^{\circ}\text{C}$, 洗涤, 加入底物溶液 100 μl , 在湿盒中再孵育 15 分钟/37 $^{\circ}\text{C}$, 加入终止液 (100 μl), 在 450 nm 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 及 SEQ ID NO.2 混合物, 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 μl 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/IgA 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 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) 孵育 30 min (± 5 min)。
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 μl 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 200 μl IgG 酶标记抗体及 IgA 酶标记抗体等比例混合物

2. 6 湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) 孵育 30 min (± 1 min)。

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 μl 底物溶液 (包括底物空白孔)

2. 9 湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) 孵育 15 min (± 1 min)。

2. 10 终止反应

每孔内加入 100 μl 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 min 内读取 450 nm 的 OD 值，参考波长范围为 620 nm-690 nm (例如 650 nm)。

本实施例主要通过以下几个方面阐明本发明 α -胞衬蛋白抗原表位多肽（SEQ ID NO.1 及 SEQ ID NO.2）在干燥综合征患者诊断中的意义：

1、 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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之间的比较。

本发明的研究实验中，发明人用“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法检测了 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在干燥综合征、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 5，图 4）。应用统计学比较各组数据，结果显示， α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体的阳性率相近，无统计学差异。

表 5. α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在不同疾病的阳性率

诊断	例数	抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体		p 值
		阳性例数	阳性率(%)	
干燥综合征	182	157	86.3	
原发性	146	127	87.0	
*继发性	36	30	83.3	
系统性红斑狼疮	113	14	12.4	<0.01
类风湿关节炎	136	21	15.4	<0.01
正常人	212	9	4.2	<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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在干燥综合征、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎及正常人血清滴度的比较。

由表 6 可见 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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 6. SS、SLE、RA 及正常人抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体滴度的比较

	OD 值 (M \pm SD)	P 值
原发 SS	0.85 \pm 0.11	
继发 SS	0.82 \pm 0.12	
SLE	0.19 \pm 0.09	<0.01
RA	0.26 \pm 0.09	<0.05

正常人	0.15±0.04	<0.01
-----	-----------	-------

3、抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总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 7，图 5 显示了抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体、 α -胞衬蛋白多肽 IgG、 α -胞衬蛋白多肽 IgA、SSA 抗体、SSB 抗体及 ANA（抗核抗体）在干燥综合症中的敏感性和特异性。其中单特异性 ELISA 法检测抗 α -胞衬蛋白 IgG 或 IgA 抗体：相应检测试剂盒及方法由德国 BL 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 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体特异性和敏感性均明显高于 SSB 抗体、SSA 抗体、ANA 和 α -胞衬蛋白多肽 IgG，比 α -胞衬蛋白多肽 IgA 单特异性抗体敏感性明显提高、但特异性稍低。因此，结合敏感性和特异性，抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体在诊断中的意义优于其他自身抗体。

表 7 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 (%)
α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体	157	86.3	90.5
α -胞衬蛋白多肽 IgG 抗体	119	65.4	71.6
α -胞衬蛋白多肽 IgA 抗体	122	67.0	95.0
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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物作为混合抗原在制备临床干燥综合症诊断试剂盒中的应用

本发明人建立优化的“混合 ELISA”结合“抗体谱 ELISA”法，将所述的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物包被于微孔板上，制备了 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体临床诊断用试剂盒，用于检测抗 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体，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 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物可拆分的微孔板（1×8）12板条1块；

α -胞衬蛋白多肽 IgG 及 IgA 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、IgA 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；

HRP 过氧化物酶标记山羊抗人 IgA 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
- (2) 样本量：每次实验 100 μ l 未稀释样本
- (3) 总孵育：室温下（18-28 $^{\circ}$ C）30 min
- (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 α -胞衬蛋白多肽混合物被包被于微孔板上，制备的 α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物试剂盒仅用于特异性检测的 IgG/IgA 总抗体。

(2) 校正 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体检测系统无国际标准校正。

4. 免疫分析程序

(1) 样品收集，处理和保存

使用血清样本检测 α -胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体，血清用样品稀释缓冲液以 1：

50 的比例稀释 (20 μ l 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, 形成凝结后离心吸取上清。

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。

(2) 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 下至少保存 30 天或标签上的有效期。

(3) 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。

(4) 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 \square l 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。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。

(5) 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。

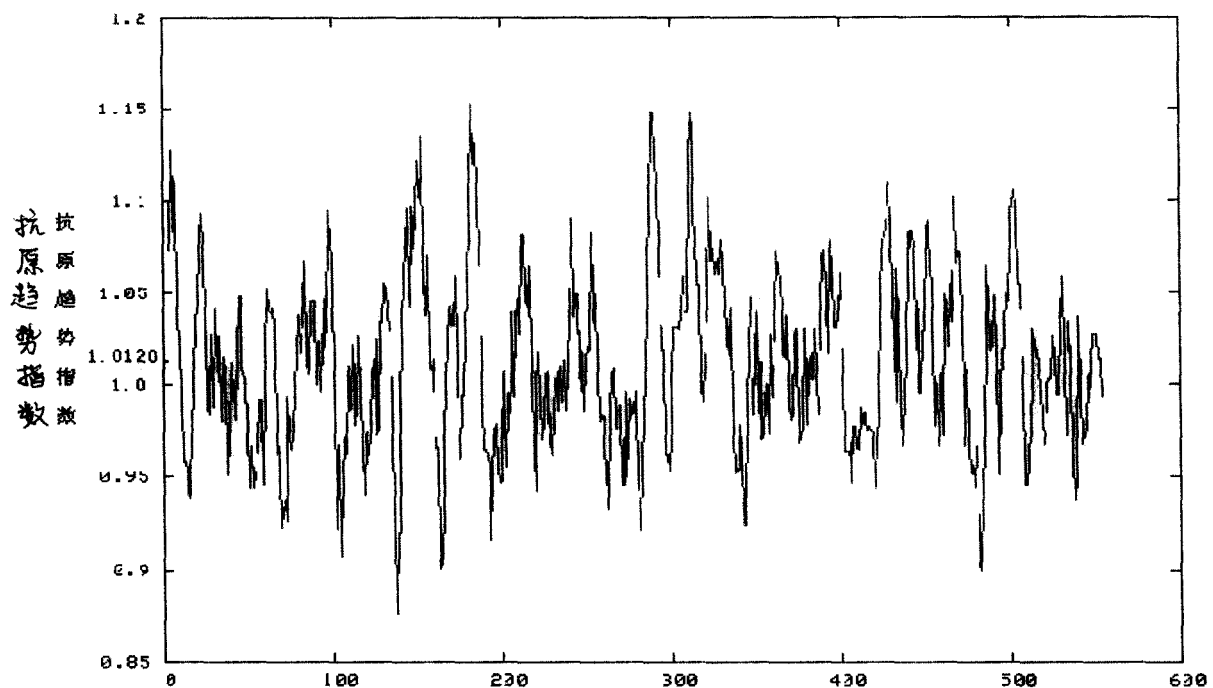
(6) 实验参数

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。



α-胞衬蛋白氨基酸序列
α-胞衬蛋白氨基酸序列

图 1

α -胞衬蛋白抗原表位多肽混合物包被的微孔

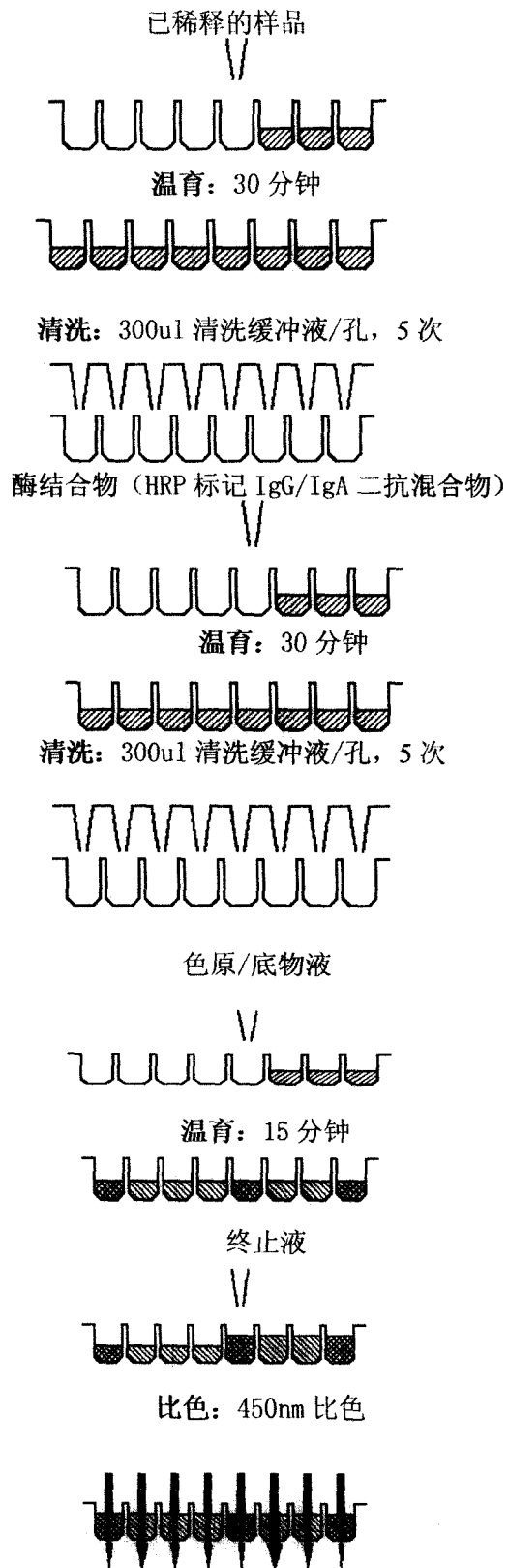


图 2

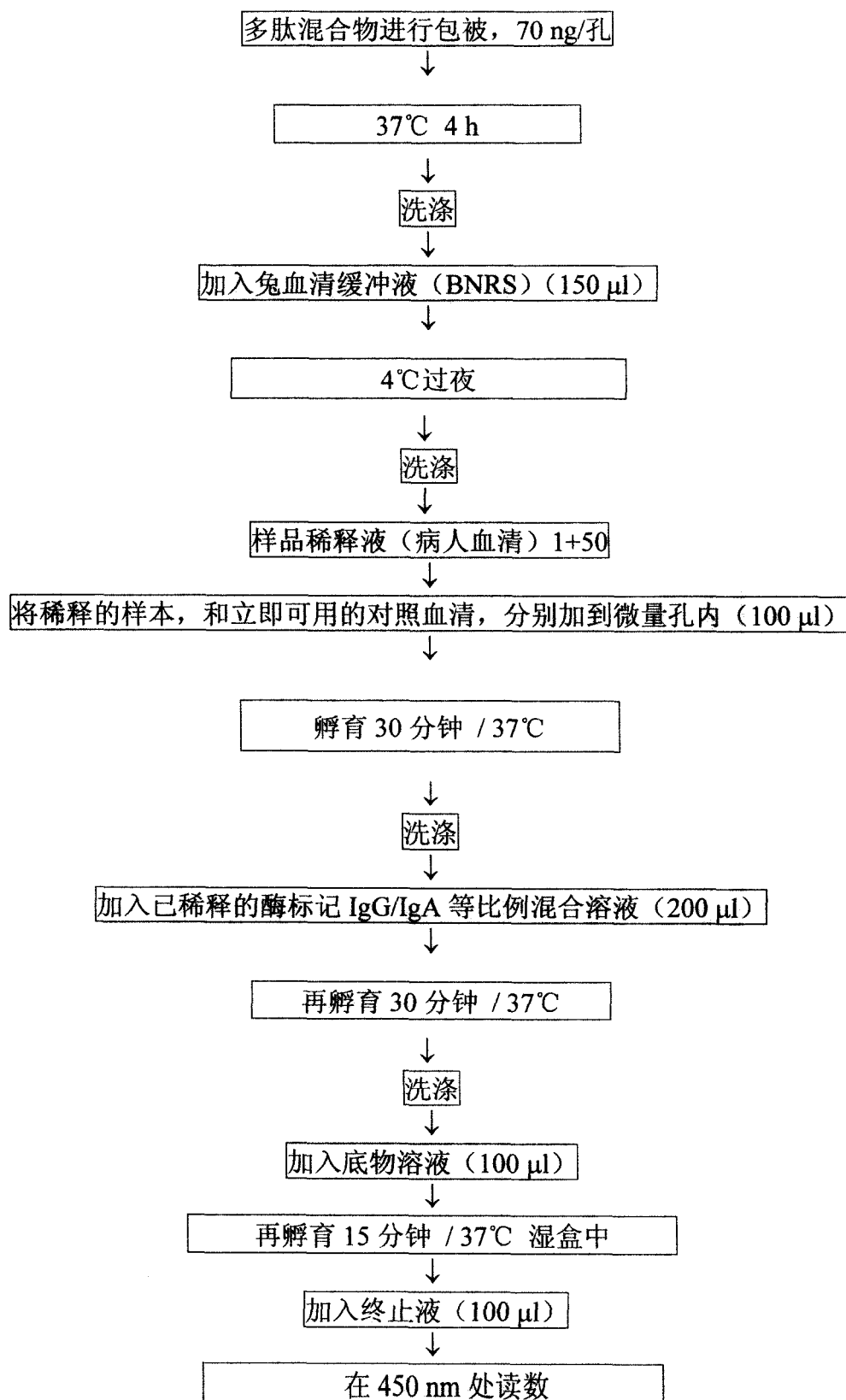


图 3

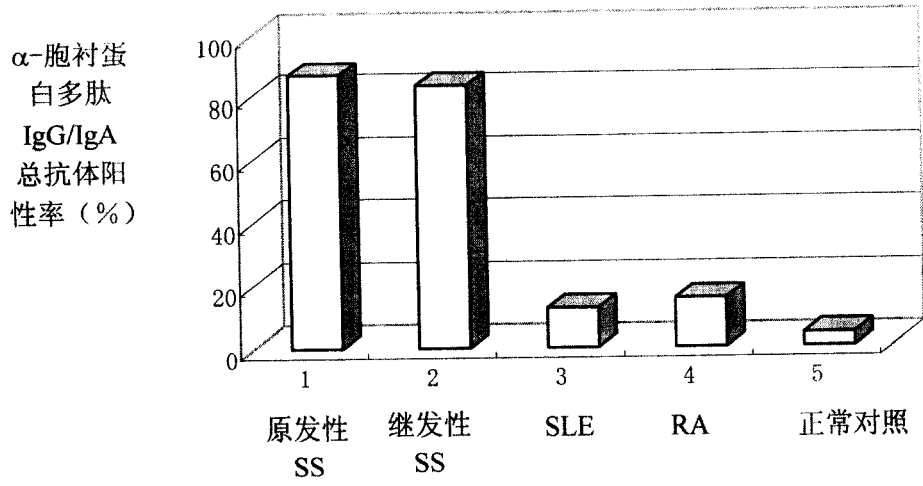


图 4

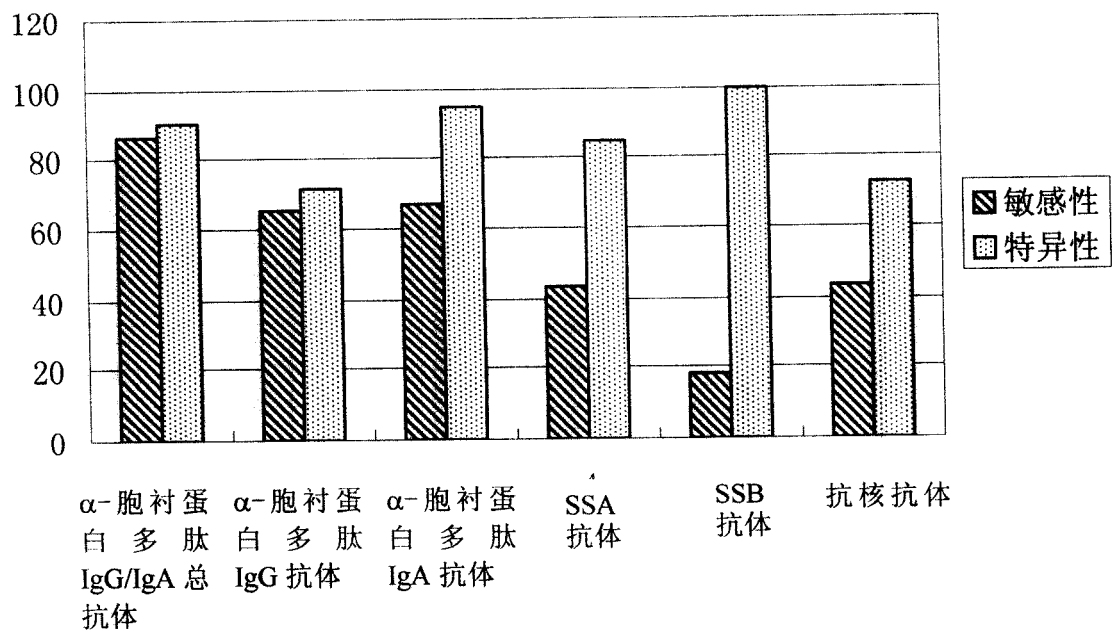


图 5

专利名称(译)	α - 胞衬蛋白抗原表位多肽混合物及其应用		
公开(公告)号	CN1979165A	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	CN200610124168.9	申请日	2006-12-12
[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 曾令文		
发明人	陈巧林 曾令文		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C07K19/00		
其他公开文献	CN1979165B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学领域，涉及抗原表位多肽的筛选、免疫学检测方法的建立以及临床诊断试剂的制备及应用，尤其是涉及α - 胞衬蛋白抗原表位多肽的筛选及α - 胞衬蛋白抗原表位多肽混合物的设计组成，得到具有诊断意义的两条最佳α - 胞衬蛋白抗原表位多肽对应的氨基酸序列，以及建立检测患者血清中α - 胞衬蛋白多肽IgG/IgA总抗体的免疫学方法，以及将合成的两条最佳α - 胞衬蛋白抗原表位多肽作为混合抗原在制备诊断干燥综合征的药物中的应用。

α-胞衬蛋白多肽 IgG/IgA 总抗体阳性率 (%)

