



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109470853 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201710806341.1

(22)申请日 2017.09.08

(71)申请人 广州市丹蓝生物科技有限公司

地址 510220 广东省广州市广州开发区国际生物岛标准产业园3期二幢102单元

(72)发明人 林当 胡海 马毅 樊辉 彭伟
袁士翔 许勇 黄璐

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 林青中 万志香

(51)Int.Cl.

G01N 33/564(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

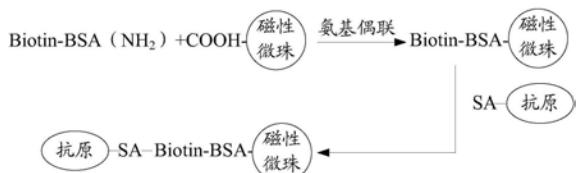
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒
及制作方法

(57)摘要

本发明涉及一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法。该液相蛋白芯片包括磁性微珠以及固定在所述磁性微珠表面的自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白，所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病抗原以及连接在所述自身免疫疾病抗原的N端的标签蛋白。通过将自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白连接在磁性微珠的表面，每个磁性微珠表面偶联的抗原可达100个。不同的抗原可通过不同荧光的磁性微珠加以区别。与传统的固相芯片检测技术相比，本发明的液相蛋白芯片及试剂盒的制作方法具有制作技术稳定可靠的优点，可实现高通量的检测，检测灵敏度高，所需要血清样品少。



1. 一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片，其特征在于，包括磁性微珠以及固定在所述磁性微珠表面的自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白，所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病抗原以及连接在所述自身免疫疾病抗原的N端的标签蛋白。

2. 如权利要求1所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片，其特征在于，所述磁性微珠的表面连接有生物素化的牛血清白蛋白，所述自身免疫疾病抗原的C端连接有链霉亲和素，所述磁性微珠与所述重组融合蛋白通过生物素和链霉亲和素连接。

3. 如权利要求2所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片，其特征在于，所述生物素化的牛血清白蛋白是通过氨基偶联试剂连接在羧基化的所述磁性微珠表面。

4. 如权利要求1～3中任一项所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片，其特征在于，所述标签蛋白是Myc和Histag。

5. 如权利要求4所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片，其特征在于，所述Myc位于所述Histag的N端，所述Histag的C端与所述自身免疫疾病抗原的N端连接。

6. 如权利要求1～3中任一项所述的自身免疫疾病诊断用的重组DNA片段，其特征在于，所述自身免疫疾病抗原包括系统性红斑狼疮抗原、干燥综合征抗原、系统性硬化症抗原、混合性结缔组织病抗原、原发性胆汁性肝硬化抗原、多发性肌炎抗原、皮肌炎抗原和类风湿性关节炎抗原。

7. 一种自身免疫疾病诊断用试剂盒，其特征在于，含有如权利要求1～6中任一项所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片。

8. 如权利要求7所述的自身免疫疾病诊断用试剂盒，其特征在于，还含有标准品、质控参比品以及荧光标记二抗中的至少一种试剂。

9. 如权利要求8所述的自身免疫疾病诊断用试剂盒，其特征在于，所述标准品及所述质控参比品均为Anti-Myc嵌合抗体试剂；所述荧光标记二抗为抗人IgG-Fc-PE抗体。

10. 一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法，其特征在于，包括如下步骤：

在避光震荡条件下，在羧基化的磁性微珠表面通过氨基偶联试剂连接上生物素化的牛血清白蛋白，得到磁性微珠-BSA-Biotin；

在避光震荡条件下，将所述磁性微珠-BSA-Biotin与自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白混合，所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病相关抗原以及与所述自身免疫疾病相关抗原连接的链霉亲和素，混合后链霉亲和素与生物素连接，即得包被有自身免疫疾病相关抗原的液相蛋白芯片。

自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病诊断和治疗领域,尤其是涉及一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法。

背景技术

[0002] 自身免疫疾病是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病。目前自身免疫疾病分子诊断试剂盒普遍采用的是免疫荧光法,如间接免疫荧光、ELISA等,这些方法是将抗原固定在固相支持物表面,也称为固相芯片技术。固相芯片技术制作工艺复杂、芯片稳定性差、检测通量低、重复性差。

发明内容

[0003] 基于此,有必要提供一种高通量、速度快且所需样品量少的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法。

[0004] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下。

[0005] 一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片,包括磁性微珠以及固定在所述磁性微珠表面的自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白,所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病抗原以及连接在所述自身免疫疾病抗原的N端的标签蛋白。

[0006] 在其中一个实施例中,所述磁性微珠的表面连接有生物素化的牛血清白蛋白,所述自身免疫疾病抗原的C端连接有链霉亲和素,所述磁性微珠与所述重组融合蛋白通过生物素和链霉亲和素连接。

[0007] 在其中一个实施例中,所述生物素化的牛血清白蛋白是通过氨基偶联试剂连接在羧基化的所述磁性微珠表面。

[0008] 在其中一个实施例中,所述标签蛋白是Myc和Histag。

[0009] 在其中一个实施例中,所述Myc位于所述Histag的N端,所述Histag的C端与所述自身免疫疾病抗原的N端连接。

[0010] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病抗原包括系统性红斑狼疮抗原、干燥综合征抗原、系统性硬化症抗原、混合性结缔组织病抗原、原发性胆汁性肝硬化抗原、多发性肌炎抗原、皮肌炎抗原和类风湿性关节炎抗原。

[0011] 一种自身免疫疾病诊断用试剂盒,含有上述任一实施例所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片。

[0012] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病诊断用试剂盒还含有标准品、质控参比品以及荧光标记二抗中的至少一种试剂。

[0013] 在其中一个实施例中,所述标准品及所述质控参比品均为Anti-Myc嵌合抗体试剂;所述荧光标记二抗为抗人IgG-Fc-PE抗体。

[0014] 一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法,包括如下步骤:

[0015] 在避光震荡条件下,在羧基化的磁性微珠表面通过氨基偶联试剂连接上生物素化

的牛血清白蛋白,得到磁性微珠-BSA-Biotin;

[0016] 在避光震荡条件下,将所述磁性微珠-BSA-Biotin与自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白混合,所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病相关抗原以及与所述自身免疫疾病相关抗原连接的链霉亲和素,混合后链霉亲和素与生物素连接,即得包被有自身免疫疾病相关抗原的液相蛋白芯片。

[0017] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法还包括所述重组融合蛋白的制备过程,包括如下步骤:

[0018] 合成自身免疫疾病相关抗原的DNA片段以及链霉亲和素对应的DNA片段,并将所述链霉亲和素对应的DNA片段连接在自身免疫疾病相关抗原的DNA片段上,得到抗原-SA的目的重组融合DNA片段;

[0019] 将所述目的重组融合DNA片段克隆入重组表达载体中,转化细菌;

[0020] 挑取阳性转化克隆进行目的重组融合DNA片段的诱导表达;

[0021] 破碎菌体,离心收集含重组融合蛋白的包涵体沉淀,纯化后得到自身免疫疾病相关抗原-SA的重组融合蛋白。

[0022] 在其中一个实施例中,将所述链霉亲和素对应的DNA片段连接在自身免疫疾病相关抗原的DNA片段上是通过overlap PCR方法将相应的DNA片段连接。

[0023] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病相关抗原的DNA片段中编码氨基酸的密码子为细菌密码子;所述重组表达载体是pET30b (+);所述细菌是BL21大肠杆菌。

[0024] 在其中一个实施例中,所述挑取阳性转化克隆进行重组融合DNA片段的诱导表达包括如下步骤:挑取阳性转化克隆,在LB培养基中培养至OD 600至0.6,加入终浓度为2mM的IPTG诱导表达,4小时后离心收集菌体。

[0025] 在其中一个实施例中,所述破碎菌体,离心收集含重组融合蛋白的包涵体沉淀,纯化后得到自身免疫疾病相关抗原-SA的重组融合蛋白包括如下步骤:

[0026] 超声波震荡破碎菌体,离心收集沉淀,沉淀为含有目的重组融合蛋白的包涵体;

[0027] 使用浓度为8M的尿素溶解沉淀,在4℃下放置12小时以上,离心去除不溶物,与Ni亲和层析柱混合结合1小时;

[0028] 结合后装柱,采用pH6.5的8M尿素洗涤层析柱20倍柱体积,然后采用pH5.9的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集,最后采用pH4.5的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集;

[0029] 洗脱各组分分别上样进行SDS-PAGE分析,选择目的重组融合蛋白所在的组分进行复性;

[0030] 将重组融合蛋白所在的组分合并后调整蛋白浓度至0.25mg/ml,对含2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.02M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对不含尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时;

[0031] 采用PEG20000吸水浓缩的方法浓缩,离心去沉淀,获得目的重组融合蛋白。

[0032] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法还包括在避光震荡条件下,将制得的多种包被自身免疫疾病相关抗原重组蛋白的磁性微珠混合,并在震荡条件下分装的步骤,对应不同抗原的磁性微珠的颜色不同。

[0033] 在其中一个实施例中,所述自身免疫疾病包括系统性红斑狼疮、干燥综合征、系统

性硬化症、混合性结缔组织病、原发性胆汁性肝硬化、多发性肌炎、皮肌炎和类风湿性关节炎。

[0034] 一种自身免疫疾病诊断用试剂盒的制作方法,包括如下步骤:

[0035] 按照上述任一实施例所述的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法制作液相蛋白芯片;

[0036] 配制标准品、质控参比品及荧光标记二抗,其中,所述标准品及所述质控参比品均为Anti-Myc嵌合抗体试剂,所述荧光标记二抗为抗人IgG-Fc-PE抗体;

[0037] 将所述液相蛋白芯片、所述标准品、所述质控参比品及所述荧光标记二抗封装。

[0038] 上述液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法通过将自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白连接在磁性微珠的表面,每个磁性微珠表面偶联的抗原可达100个。不同的抗原可通过不同荧光的磁性微珠加以区别。与传统的固相芯片检测技术相比,本发明的液相蛋白芯片及试剂盒的制作方法具有制作技术稳定可靠的优点,可实现高通量的检测,检测灵敏度高,所需要血清样品少。

[0039] 更进一步,通过将自身免疫疾病分子诊断用的抗原通过重组融合蛋白的形式,带上链霉亲和素、Myc和Histag标签、并在细菌中大量表达并纯化,极大的方便了相关抗原的生产以及后续与磁性微珠的偶联过程,便于液相芯片的制作,从而为自身免疫疾病的诊断提供了新的技术支持。

附图说明

[0040] 图1为本发明一实施方式的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作流程示意图;

[0041] 图2为实施例1中的重组融合蛋白的结构示意图;

[0042] 图3为使用图2所示重组融合蛋白的蛋白芯片检测原理示意图;

[0043] 图4为PCNA融合蛋白抗原的表达纯化结果示意图;PCNA融合蛋白 (Histag-Myc-PCNA-SA) 在大肠杆菌中通过IPTG (2mM) 诱导表达后,融合蛋白形成包涵体沉淀,经过尿素溶解后,结合到镍 (Ni) 亲和层析柱上,然后通过不同pH值洗脱液洗脱,不同组分洗脱液经SDS-PAGE胶鉴定,混合含有目的蛋白的组分,再经PEG20000脱水浓缩。

具体实施方式

[0044] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0045] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0046] 如图1所示,一实施方式的自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法,包括如下步骤:

[0047] 步骤一:在避光震荡条件下,在羧基化的磁性微珠表面通过氨基偶联试剂连接上生物素化的牛血清白蛋白,得到磁性微珠-BSA-Biotin;

[0048] 步骤二:在避光震荡条件下,将磁性微珠-BSA-Biotin与自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白混合,重组融合蛋白包括自身免疫疾病相关抗原以及与自身免疫疾病相关抗原连接的链霉亲和素,混合后链霉亲和素与生物素连接,即得包被有自身免疫疾病相关抗原的液相蛋白芯片。

[0049] 在其他实施方式中,该液相蛋白芯片中的重组融合蛋白也可以通过其他方式连接在磁性微珠的表面,相应的重组融合蛋白在自身免疫疾病抗原的N端连接有Myc和Histag等标签蛋白。

[0050] 进一步,在本实施方式中,该自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法还包括重组融合蛋白的制备过程,包括如下步骤:

[0051] 合成自身免疫疾病相关抗原的DNA片段以及链霉亲和素对应的DNA片段,并将链霉亲和素对应的DNA片段连接在自身免疫疾病相关抗原的DNA片段上,得到抗原-SA的目的重组融合DNA片段;

[0052] 将目的重组融合DNA片段克隆入重组表达载体中,转化细菌;

[0053] 挑取阳性转化克隆进行目的重组融合DNA片段的诱导表达;

[0054] 破碎菌体,离心收集含重组融合蛋白的包涵体沉淀,纯化后得到自身免疫疾病相关抗原-SA的重组融合蛋白。

[0055] 优选的,在合成自身免疫疾病相关抗原的DNA片段时,在该DNA片段的5'端连接Myc和Histag对应的DNA片段,得到Myc-Histag-抗原的重组融合DNA片段,后续使用该Myc-Histag-抗原的重组融合DNA片段与链霉亲和素对应的DNA片段连接,得到Myc-Histag-抗原-SA的目的重组融合DNA片段。Myc的氨基酸序列为EQKLISEEDL,具体如SEQ ID No.1所示。Myc-Histag的DNA序列为GAGCAGAAACTCATCTGAAGAGGATCTGCATCA CCATCACCACATCAC,具体如SEQ ID No.2所示,其中,Histag的DNA序列为CATCACCACATCACATCAC。

[0056] 所述将链霉亲和素对应的DNA片段连接在自身免疫疾病相关抗原的DNA片段上是通过overlap PCR方法将相应的DNA片段连接。进一步,在overlap PCR连接DNA片段时,还可以在外侧的引物两端加上限制性内切酶的酶切位点,如两端分别加上Nde I和Xho I酶切位点。

[0057] 优选的,自身免疫疾病相关抗原的DNA片段中编码氨基酸的密码子为细菌密码子,以适合于在细菌中表达;重组表达载体是pET30b (+);细菌是BL21大肠杆菌。自身免疫疾病相关抗原的DNA片段是通过基因合成的方式获得。

[0058] 所述挑取阳性转化克隆进行重组融合DNA片段的诱导表达包括如下步骤:挑取阳性转化克隆,在LB培养基中培养至OD 600至0.6,加入终浓度为2mM的IPTG诱导表达,4小时后离心收集菌体。

[0059] 所述破碎菌体,离心收集含重组融合蛋白的包涵体沉淀,纯化后得到自身免疫疾病相关抗原-SA的重组融合蛋白包括如下步骤:

[0060] 超声波震荡破碎菌体,离心收集沉淀,沉淀为含有目的重组融合蛋白的包涵体;

[0061] 使用浓度为8M的尿素溶解沉淀,在4℃下放置12小时以上,离心去除不溶物,与Ni亲和层析柱混合结合1小时;

[0062] 结合后装柱,采用pH6.5的8M尿素洗涤层析柱20倍柱体积,然后采用pH5.9的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集,最后采用pH4.5的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集;

[0063] 洗脱各组分分别上样进行SDS-PAGE分析,选择目的重组融合蛋白所在的组分进行复性;

[0064] 将重组融合蛋白所在的组分合并后调整蛋白浓度至0.25mg/ml,对含2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.02M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对不含尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时;

[0065] 采用PEG20000吸水浓缩的方法浓缩,离心去沉淀,获得目的重组融合蛋白。

[0066] 更进一步,在本实施方式中,该自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法还包括在避光震荡条件下,将制得的多种包被自身免疫疾病相关抗原重组蛋白的磁性微珠混合,并在震荡条件下分装的步骤,对应不同抗原的磁性微珠的颜色不同。

[0067] 本实施方式所述的自身免疫疾病包括系统性红斑狼疮、干燥综合征、系统性硬化症、混合性结缔组织病、原发性胆汁性肝硬化、多发性肌炎和皮肌炎。表1示出了多种自身免疫疾病和对应的自身抗体。

[0068] 表1

[0069]

自身免疫疾病	自身免疫疾病对应的自身抗体
系统性红斑狼疮	抗双链 DNA 抗体 IgG 抗体, 抗核小体抗体, 抗组蛋白抗体 抗 Sm 抗体 抗增殖细胞核抗原抗体 (PCNA) 抗核糖体 P 蛋白 (PO)
干燥综合征/系统性红斑狼疮	抗 SS-A/R060 抗体 抗 SSA/R052 抗体 抗 SSB/La 抗体
系统性硬化	抗着丝点 B 抗体 (CENP-B) 抗 Scl-70 抗体 (Scl-70)
混合性结缔组织病 (MCTD)	抗 nRNP 抗体 (U1-snRNP)
原发性胆汁性肝硬化	抗线粒体抗体 M2 型 (AMA-M2)
多发性肌炎、皮肌炎	抗 JO-1 抗体 (JO-1) 抗 PM-Scl 抗体 抗 Mi 抗体 (Mi-2) 抗 Ku 抗体 (Ku)
类风湿性关节炎 (RA)	AKA (抗角质蛋白抗体) 抗 RA33

[0070]

抗 CCP (抗环瓜氨酸肽抗体)

[0071] 本实施方式还提供了一种自身免疫疾病诊断用试剂盒的制作方法,其包括如下步

骤：

- [0072] 按照上述自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片的制作方法制作液相蛋白芯片；
- [0073] 配制标准品、质控参比品及荧光标记二抗，其中，标准品及质控参比品均为Anti-Myc嵌合抗体试剂，荧光标记二抗为抗人IgG-Fc-PE抗体；
- [0074] 将液相蛋白芯片、标准品、质控参比品及荧光标记二抗封装。
- [0075] 标准品为系列梯度浓度的抗体试剂以用于绘制标准曲线；质控参比品试剂为特定浓度的抗体试剂。
- [0076] 在检测过程中，在清洗步骤中，可使用磁铁吸附磁性微珠以对磁性微珠进行清洗。当磁性微珠包被完成后，加入被检血样品与磁性微珠混合孵育，使得被检血样品中的与目的抗原对应的抗体与磁性微珠表面的抗原结合，从而间接地吸附于磁性微珠表面。再经通常免疫学技术采用的各种洗涤剂洗去非特异吸附的杂蛋白，在磁性微珠表面留下相应的人抗体。最后，将磁性微珠分别与含有荧光物质标记的二抗（如抗人IgG Fc-PE）混合孵育，使得荧光物质标记的二抗与磁性微珠表面的抗体结合。可采用流式分选的方法探测与上述不同抗原反应的血清抗体，流式分选仪红色光源（如635nm光源）测量包被不同抗原的磁性微珠，绿色光源（如532nm光源）探测与抗原结合的血清抗体，结合抗原的血清抗体可通过二抗的荧光强度来定量。单个抗原结合的血清抗体是否为阳性，根据荧光定量的读数，血清抗体稀释倍数和标准品绘制的曲线加以判断。确定单个抗原是否为阳性后，可联合分析多种抗原对应的自身抗体的结果，计算总的抗原阳性的个数，再与相应的判断标准进行比较，凡大于规定标准值者即可判断为有相应地自身免疫疾病的可能，再综合结合其他检测结果可最终判断为是否有自身免疫疾病。
- [0077] 通过将自身免疫疾病分子诊断用的抗原通过重组融合蛋白的形式，带上链霉亲和素、Myc和Histag标签、并在细菌中大量表达并纯化，极大的方便了相关抗原的生产以及后续与磁性微珠的偶联过程，便于液相蛋白芯片的制作，从而为自身免疫疾病的诊断提供了新的技术支持。
- [0078] 该液相蛋白芯片的制作方法可以将连接有链霉亲和素的自身免疫疾病相关抗原通过链霉亲和素与磁性微珠表面的生物素连接而固定在磁性微珠的表面，偶联的抗原可达100个。不同的抗原可通过不同荧光的磁性微珠加以区别。与传统的固相芯片检测技术相比，本发明的液相蛋白芯片及试剂盒的制作方法具有制作技术稳定可靠的优点，可实现高通量的检测，检测灵敏度高，所需要血清样品少。
- [0079] 以下主要结合含有系统性红斑狼疮的增殖细胞核抗原（PCNA）的重组融合蛋白的液相蛋白芯片及试剂盒的制作过程进行具体说明。
- [0080] 一、Myc-Histag-PCNA-SA重组融合蛋白的生产方法如下：
- [0081] 1. PCNA的氨基酸序列为MFEGRLVQGSILKKVLEALKDLINEACWDISSSGVNLQSMDSHVSLVQLTLRSEGFDTYRCDRNLAMGVNLTSMSKILKCAGNEDIITLRAEDNADTLALVFEAPNQEKVSDYEMKLMQLDVEQLGIPEQEYSCVVKMPSGEFARICRDLHIGDAVVISCAKDGVKFSASGELGNGNIKLSQTSNVDKEEEAVTIEMNEPVQLTFALRYLNFFTAKATPLSSTVTLSMSADVPLVVEYKIADMGHLKYNLAPKIEDEEGS，具体如SEQ ID No.3所示。
- [0082] 选 用 的 编 码 P C N A 的 D N A 片 段 的 序 列 为：
- ATGTTGAGGGTCGTCTGTTAGGGTTCTATTCTAAAAAGTTCTTGAGGCTCTAAAGATCTTATTAATGAGGC

TTGCTGGATATTCTTCTGGTAACTCTCAGTCTATGGATTCTCATGTTCTCTGTCAGCTACTCTCGTTCTGAGGGTTTGATACTTATCGTGCATCGTAATCTGCTATGGGTAAATCTTACTCTATGCTAAATTCTTAAATGCGCTGGTAATGAGGATATTACTCTCGTGCAGGATAATGCTGATACTCTGCTCTGTTTGAGGCTCCTAACAGGAGAAAGTTCTGATTATGAGATGAAACTTATGGATCTGATGTTGAGCAGCTGGTATTCCTGAGCAGGAGTATTCTGCGTTAAAATGCCTCTGGTGAGTTGCTCGTATTGCCGTGATCTTCTCATATTGGTATGCTGTTATTCTGCGCTAAAGATGGTAAATTTCTGCTCTGGTGAGCTGGTAATGGTAATATAAAACTTCTCAGACTCTAATGTTGATAAAAGAGGAGGAGGCTTTACTATTGAGATGAATGAGCCTGTCAGCTTACCTTGCTCTCGTTACTAAAGCTACTCCTCTTACTGTTACTCTTCTATGCTGCTGATGTTCCCTCTGTTGAGTATAAAATTGCTGATATGGTCATCTAAATATAATCTGCTCCTAAATTGAGGATGAGGAGGGTCT, 具体如SEQ ID No. 4所示。

[0083] 2. 在华大基因合成Myc-Histag-PCNA的重组DNA片段。

[0084] 3. 通过overlap PCR方法将链霉亲和素的DNA片段连接至Myc-Histag-PCNA的重组DNA片段的3'端, 构成Myc-Histag-PCNA-SA的重组DNA片段。

[0085] 具体的overlap PCR所用的引物序列如下:

[0086] 1[#]: 5' CATATG ATGGAACAAAATGATTTC3' (下划线为NdeI序列) (SEQ ID.5)

[0087] 2[#]: 5' CTCGAGTC ACTGCTGTACCGCGTCCAGCGG3' (下划线为XhoI序列) (SEQ ID.6)

[0088] 3[#]: 5' GATGAGGAGGGTTCTGGCGATCCGTCCAAGGA3' (SEQ ID.7)

[0089] 4[#]: 5' TCCTGGACGGATGCCAGAACCCCTCCTCATC3' (SEQ ID.8)

[0090] overlap PCR体系如下表2所示。

[0091] 表2

[0092]

PCR 各组分	终浓度
10× buffer	1×
dNTP	1 mM
25 mM MgSO ₄	1 mM
Primer 1 [#] -4 [#]	各 0.3 μM
Template DNA	PCNA,SA 两段 DNA 各 50ng
Pfu or Taq polymerase	1.0 U/50μL
Total volume	加 H ₂ O 至 50μL

[0093] overlap PCR的反应步骤:

[0094] 1) 95°C, 2min;

[0095] 2) 95°C, 45Sec;

[0096] 3) 50°C, 30Sec;

[0097] 4) 72°C, 1min;

[0098] 5) 回到步骤2), 30个循环;

[0099] 6) 72°C, 10min。

- [0100] 送Invitrogen测序公司测序,测序序列与构建序列一致,结果准确可靠。
- [0101] 4. 将Myc-Histag-PCNA-SA的重组DNA片段采用Nde I和Xho I酶克隆在pBluescript SK (+/-) 原核克隆载体(来源:Stratagen公司)中;
- [0102] NdeI和Xho I双酶切重组表达载体pET30b (+) (来源Novagen公司),回收双酶切片段备用;
- [0103] Nde I和Xho I双酶切含各抗原片段基因的pBluescript SK (+/-) 载体,回收抗原相应的双酶切片段,分别克隆入回收的pET30b (+) 表达载体中;
- [0104] 再分别采用Nde I和Xho I双酶切筛选重组克隆,将酶切片段送英捷基(Invitrogen)测序公司测序,经验证,测序序列与构建序列一致,结果准确;
- [0105] 采用碱裂解法大量提取质粒,以0.1μg的DNA转化BL21大肠杆菌;
- [0106] 挑取转化克隆,在LB培养基中培养至OD 600约0.6,加入终浓度为2mM的IPTG诱导表达,4小时以后离心收获菌体;
- [0107] 超声波震荡破碎菌体,离心收集沉淀,沉淀为含有目的抗原蛋白的包涵体;
- [0108] 8M尿素溶解沉淀,4℃放置12小时以上,离心去除不溶物,与Ni亲和层析柱混合结合1小时;
- [0109] 结合后装柱,采用pH 6.5的8M尿素洗涤层析柱20倍柱体积,然后采用pH5.9的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集,最后采用pH 4.5的8M尿素洗脱层析柱10倍柱体积,分部收集;
- [0110] 洗脱各组分分别上样进行SDS-PAGE分析,选择目的蛋白所在的组分进行复性。
- [0111] 将目的蛋白所在的组分合并后调整蛋白浓度至0.25mg/ml,对含2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.2M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对含0.02M尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时,再对不含尿素的缓冲液透析,4℃透析12小时;
- [0112] 采用PEG20000吸水浓缩的方法浓缩各抗原至最终浓度为1mg/ml;离心去沉淀,测定蛋白含量,获得目的重组融合蛋白,结果如图4所示。
- [0113] 二、制作液相蛋白芯片
- [0114] 1. 在避光震荡条件下,在羧基化的磁性微珠表面通过氨基偶联试剂连接上生物素化的牛血清白蛋白,得到磁性微珠-BSA-Biotin。
- [0115] 1.1 磁珠氨基试剂及仪器:旋涡振荡仪、旋转混合仪、超声清洗机、磁性分离器、Luminex磁珠氨基偶联试剂盒及BSA-biotin;
- [0116] 1.2 磁珠氨基偶联步骤:
- [0117] 1) 将偶联试剂盒从冰箱取出,放置20~30min以恢复室温;
- [0118] 2) 重悬磁珠:如果使用1mL小瓶保存的磁珠,涡旋小瓶10s,超声10s;如果使用4mL小瓶保存的磁珠,15~30rpm旋转混合小瓶15min;
- [0119] 3) 根据期望偶联的磁珠数量,吸取适量的磁珠体积(原始浓度 12.5×10^6 个/mL)于偶联反应管,以 5×10^6 个磁珠为例,吸取400μl磁珠用于后续偶联反应;
- [0120] 注:一个反应管最大反应量为 12.5×10^6 个磁珠;
- [0121] 4) 将反应管置于磁性分离器1~2min(或置于离心机,>8000g、1~2min),保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清;
- [0122] 5) 往反应管中加入500μl Activation buffer,涡旋反应管10s,超声10s;

- [0123] 6) 重复步骤5~6一次；
- [0124] 7) 将反应管置于磁性分离器1~2min,保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清；
- [0125] 8) 如果磁珠数量大于 5×10^6 个,往反应管内加入400 μ l Activation buffer;如果磁珠数量小于等于 5×10^6 个,加入480 μ l Activation buffer;
- [0126] 9) 将反应管涡旋10s,超声10s；
- [0127] 10) 将Sulfo-NHS用最低转速涡旋10s；
- [0128] 11) 如果磁珠数大于 5×10^6 个,往反应管中加入50 μ l的Sulfo-NHS;如果磁珠数小于等于 5×10^6 个,往反应管加入10 μ l的Sulfo-NHS；
- [0129] 12) 用250 μ l Activation buffer溶解10mg EDC于一离心管,上下颠倒离心管数次,涡旋离心管10~12s以确保EDC完全溶解均匀；
- [0130] 注:EDC溶解后应尽快使用,一次性使用；
- [0131] 13) 如果磁珠数大于 5×10^6 个,往反应管中加入50 μ l的EDC;如果磁珠数小于等于 5×10^6 个,往反应管加入10 μ l的EDC；
- [0132] 14) 最低转速涡旋反应管10s,铝箔包住反应管避光,置于旋转混合仪,15~30rpm、20min；
- [0133] 15) 将反应管置于磁性分离器1~2min,保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清；
- [0134] 16) 往管内加入500 μ l Activation buffer,涡旋10s,超声10s；
- [0135] 17) 重复15~16步骤两次；
- [0136] 18) 将反应管置于磁性分离器1~2min,保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清；
- [0137] 19) 加入待偶联的BSA-biotin:8ug/1×10*6个磁珠;计算反应总体积:如果磁珠数大于 5×10^6 个,往反应管中加入Activation buffer至总体积为1000 μ l;如果磁珠数不大于 5×10^6 个,往反应管加入Activation buffer至总体积为500 μ l；
- [0138] 20) 最低转速涡旋反应管10s,铝箔包住反应管避光,置于旋转混合仪,15~30rpm、2h；
- [0139] 21) 将反应管置于磁性分离器1~2min,保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清；
- [0140] 22) 往管内加入500 μ l Wash buffer,涡旋10s,超声10s；
- [0141] 23) 重复21~22步骤两次；
- [0142] 24) 将反应管置于磁性分离器1~2min,保持反应管置于磁性分离器,用滴管小心移除上清；
- [0143] 25) 往反应管中加入1mL Wash buffer,涡旋10s,超声10s,2~8℃避光保存待用。
- [0144] 2. 在避光震荡条件下,将磁性微珠-BSA-Biotin与Myc-Histag-PCNA-SA重组融合蛋白混合,重组融合蛋白包括自身免疫疾病相关抗原以及与自身免疫疾病相关抗原连接的链霉亲和素,混合后链霉亲和素与生物素连接,即得包被有自身免疫疾病相关抗原的液相蛋白芯片。
- [0145] 3. 偶联验证

- [0146] 偶联上的BSA-biotin,可以用荧光二抗SA-PE进行检测。检测步骤如下：
- [0147] 1) 取一块96孔反应板,标记两个孔,其中一孔用于阴性对照;往阴性对照孔加入100 μ l PBS,另一孔加入100 μ l 200倍稀释的SA-PE;
- [0148] 2) 往各孔加入约5000个偶联BSA-biotin的磁珠,将96孔反应板置于96孔板孵育器,37℃、500rpm/min避光反应30min;
- [0149] 3) 将96孔板取出,固定于96孔磁力板,小心移去孔内液体,加入100 μ l PBST,500rpm/min,震荡96孔板1min,取出96孔板,固定于96孔磁力板,移去孔内液体;
- [0150] 4) 重复步骤3)共3次;
- [0151] 5) 往各孔加入100 μ l PBS,1000rpm/min、3min重悬磁珠,立即上机检测;
- [0152] 判断标准:阴性对照孔荧光值IF≤100,实验孔荧光值IF≥2000,即可认为偶联成功。
- [0153] 经过检测,阴性对照孔的荧光值为89,实验组的荧光值为2320,说明偶联成功。
- [0154] 三、制作试剂盒
- [0155] 各种稳定液(如PBS)、稀释液(如PBS)、洗涤液(如PBS或者PBST):在液体配制室和工作液配制室完成配制,在液体分装室除菌、分装,在包装、贴签室贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。其中,PBS及PBST的配方如下:
- [0156] Phosphate-buffered saline (PBS): NaCl 137mM; KCl 2.7mM; Na₂HP0₄ 10mM; KH₂PO₄ 1.8mM;
- [0157] Phosphate-buffered saline Tween 20 (PBST): NaCl 137mM; KCl 2.7mM; Na₂HP0₄ 10mM; KH₂PO₄ 1.8mM; 0.1% (v/v) Tween 20。
- [0158] 各标准品溶液(标准曲线):采用特定稀释液,配制指定系列梯度浓度的Anti-Myc嵌合抗体,在液体配制室和工作液配制室完成配制,在液体分装室除菌、分装,在包装、贴签室贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0159] 质控参比品:采用特定稀释液,配制指定浓度的Anti-Myc嵌合抗体,在液体配制室和工作液配制室完成配制,在液体分装室除菌、分装,在包装、贴签室贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0160] 荧光标记二抗:采用特定稳定液,配制指定浓度的抗人IgG Fc-PE抗体,在液体配制室和工作液配制室完成配制,在液体分装室除菌、分装,在包装、贴签室贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0161] 避光96反应孔板:在包装、贴签室普通密封包装、贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0162] 说明书:在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0163] 封口胶片:在包装、贴签室普通密封包装、贴签,在试剂盒包装室包装入试剂盒的完整包装。
- [0164] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。
- [0165] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来

说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 广州市丹蓝生物科技有限公司
 <120> 自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法
 <160> 8
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 2
 gagcagaaac tcatctctga agaggatctg catcaccatc accatcac 48
 <210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 3
 Met Phe Glu Gly Arg Leu Val Gln Gly Ser Ile Leu Lys Lys Val Leu
 1 5 10 15
 Glu Ala Leu Lys Asp Leu Ile Asn Glu Ala Cys Trp Asp Ile Ser Ser
 20 25 30
 Ser Gly Val Asn Leu Gln Ser Met Asp Ser Ser His Val Ser Leu Val
 35 40 45
 Gln Leu Thr Leu Arg Ser Glu Gly Phe Asp Thr Tyr Arg Cys Asp Arg
 50 55 60
 Asn Leu Ala Met Gly Val Asn Leu Thr Ser Met Ser Lys Ile Leu Lys
 65 70 75 80
 Cys Ala Gly Asn Glu Asp Ile Ile Thr Leu Arg Ala Glu Asp Asn Ala
 85 90 95
 Asp Thr Leu Ala Leu Val Phe Glu Ala Pro Asn Gln Glu Lys Val Ser
 100 105 110
 Asp Tyr Glu Met Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu Gly Ile

115	120	125
Pro Glu Gln Glu Tyr Ser Cys Val Val Lys Met Pro Ser Gly Glu Phe		
130	135	140
Ala Arg Ile Cys Arg Asp Leu Ser His Ile Gly Asp Ala Val Val Ile		
145	150	155
Ser Cys Ala Lys Asp Gly Val Lys Phe Ser Ala Ser Gly Glu Leu Gly		
165	170	175
Asn Gly Asn Ile Lys Leu Ser Gln Thr Ser Asn Val Asp Lys Glu Glu		
180	185	190
Glu Ala Val Thr Ile Glu Met Asn Glu Pro Val Gln Leu Thr Phe Ala		
195	200	205
Leu Arg Tyr Leu Asn Phe Phe Thr Lys Ala Thr Pro Leu Ser Ser Thr		
210	215	220
Val Thr Leu Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val Val Glu Tyr Lys		
225	230	235
Ile Ala Asp Met Gly His Leu Lys Tyr Asn Leu Ala Pro Lys Ile Glu		
245	250	255
Asp Glu Glu Gly Ser		
260		
<210> 4		
<211> 783		
<212> DNA		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 4		
atgtttgagg gtcgtttgt tcagggttct attctaaaa aagttcttga ggctctaaa	60	
gatcttattt atgaggcttg ctggatatt tcttcttctg gtgttaatct tcagtcata	120	
gattcttctc atgtttctct tgttcagctt actttcggtt ctgagggttt tgatacttat	180	
cgttgcgatc gtaatcttgc tatgggttt aatcttactt ctatgtctaa aattctaaa	240	
tgcgctggta atgaggatat tattacttctt cgtgctgagg ataatgctga tactcttgct	300	
cttgggttttgg aggctcctaa tcaggagaaa gtttctgatt atgagatgaa acttatggat	360	
cttgcgttgc agcagcttgg tattcctgag caggagtatt cttgcgttgc taaaatgcct	420	
tctgggtgatc ttgcgttatc ttgcgttatc ttgcgttatc ttgggtgatgc tgggttatt	480	
tcttgcgcta aagatgggtt taaattttct gcttctgggt agcttggtaa tggtaatatt	540	
aaactttctc agacttctaa tgttgataaa gaggaggagg ctgttactat tgagatgaat	600	
gagcctgttc agettacttt tgcttctgt tatcttaatt tttttactaa agctactcct	660	
ctttcttctc ctgttactct ttctatgtct gctgatgttc ctcttgggt tgagtataaa	720	
attgctgata tgggtcatct taaatataat cttgcctta aaattgagga tgaggagggt	780	
tct		783
<210> 5		

<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	5	
	catatgatgg aacaaaaact gatttc	26
<210>	6	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	6	
	ctcgagtcac tgctgtacccg cgtccagcgg	30
<210>	7	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	7	
	gatgaggagg gttctggcga tccgtccaag ga	32
<210>	8	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)	
<400>	8	
	tccttggacg gatgccaga accctcctca tc	32

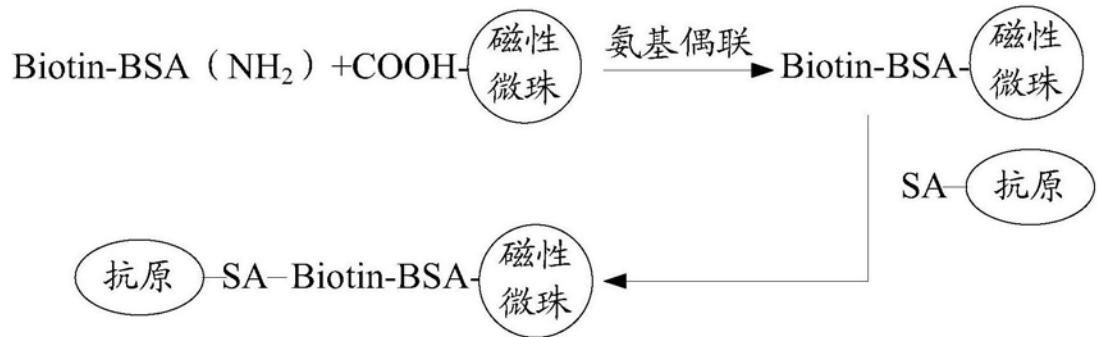


图1

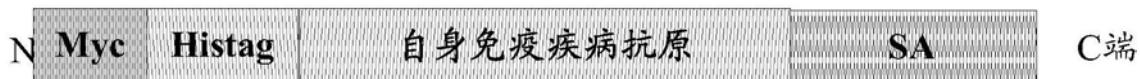


图2

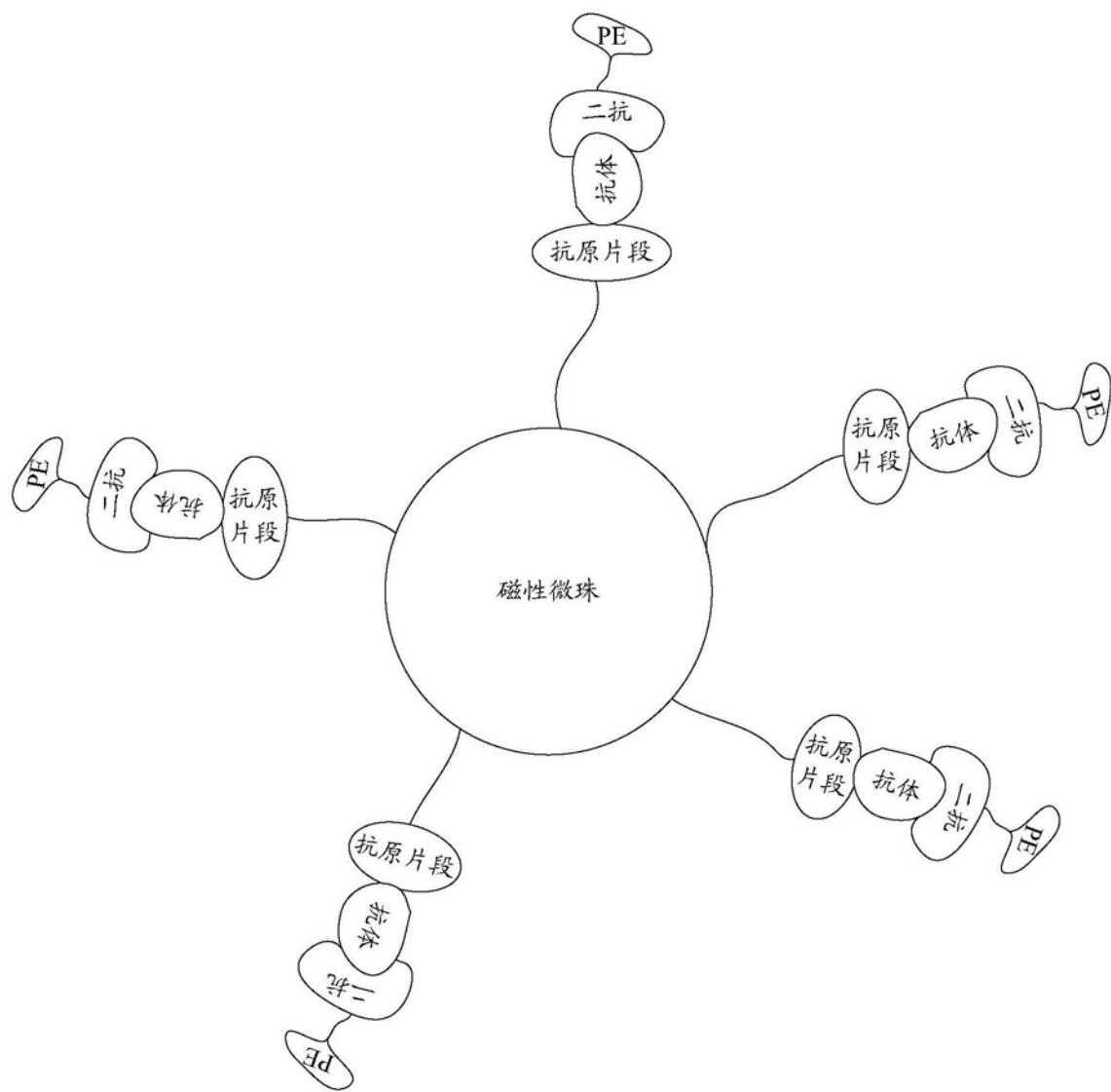


图3

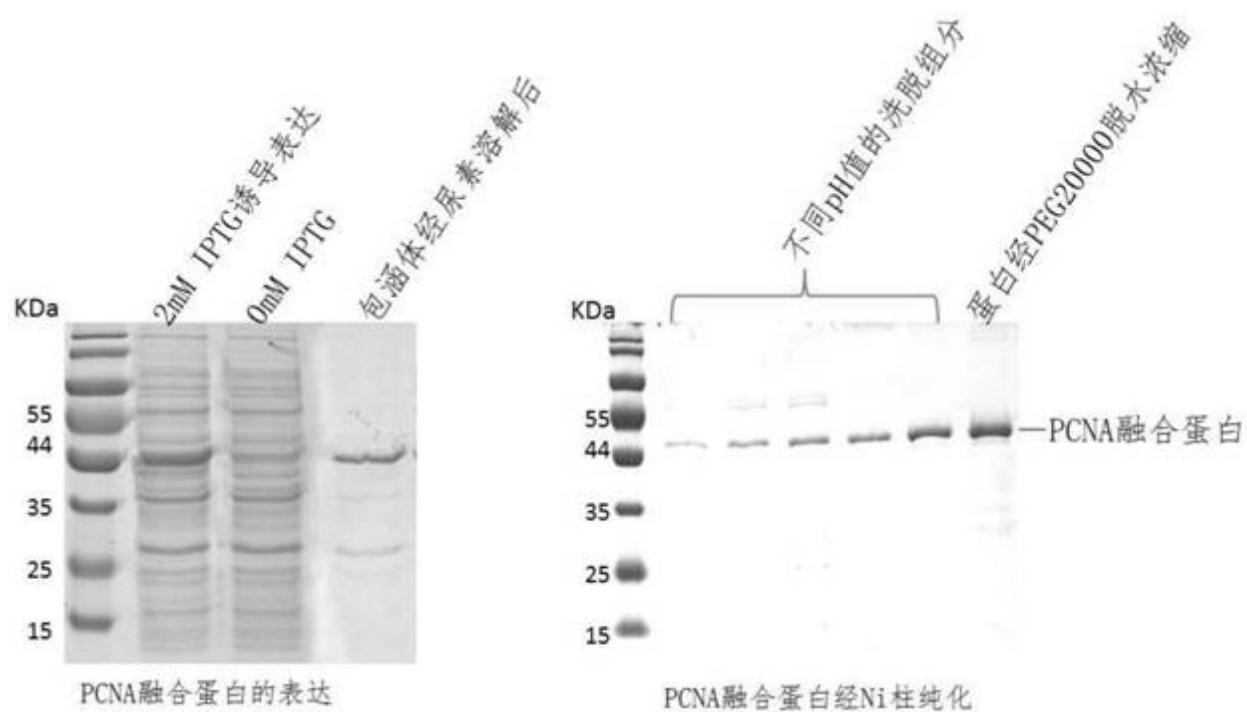


图4

专利名称(译)	自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法		
公开(公告)号	CN109470853A	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201710806341.1	申请日	2017-09-08
[标]发明人	林当 胡海 马毅 樊辉 彭伟 许勇 黄璐		
发明人	林当 胡海 马毅 樊辉 彭伟 袁士翔 许勇 黄璐		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/533 G01N33/54326 G01N2446/90 G01N2800/104 G01N2800/24		
代理人(译)	林青中		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种自身免疫疾病诊断用液相蛋白芯片、试剂盒及制作方法。该液相蛋白芯片包括磁性微珠以及固定在所述磁性微珠表面的自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白，所述重组融合蛋白包括自身免疫疾病抗原以及连接在所述自身免疫疾病抗原的N端的标签蛋白。通过将自身免疫疾病相关抗原的重组融合蛋白连接在磁性微珠的表面，每个磁性微珠表面偶联的抗原可达100个。不同的抗原可通过不同荧光的磁性微珠加以区别。与传统的固相芯片检测技术相比，本发明的液相蛋白芯片及试剂盒的制作方法具有制作技术稳定可靠的优点，可实现高通量的检测，检测灵敏度高，所需要血清样品少。

