

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/557 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[21] 申请号 200510093271.7

[43] 公开日 2006年3月1日

[11] 公开号 CN 1740196A

[22] 申请日 2005.8.23

[21] 申请号 200510093271.7

[71] 申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区永昌北路3号707

共同申请人 中国医学科学院北京协和医院

[72] 发明人 姚志建 唐福林 朱材忠 陈华
彭鲲鹏

[74] 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司

代理人 何文彬

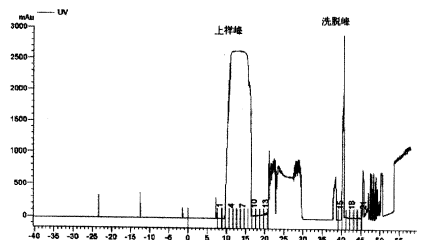
权利要求书2页 说明书14页 附图3页

[54] 发明名称

可用于多发性肌炎/皮肌炎诊断的抗原提纯工艺方法及应用

[57] 摘要

本发明涉及一种可用于多发性肌炎/皮肌炎诊断的抗原 Jo-1 抗原的提纯工艺方法, 所述方法为免疫亲和色谱与其它蛋白质提纯技术的特定组合。本发明同时涉及 Jo-1 免疫亲和色谱柱的制备方法。本发明还涉及通过所述方法制备的、以合宜生物组织为原料的 Jo-1 抗原。本发明同时进一步涉及高效率亲和色谱分离条件的建立。本发明也包括用纯化的 Jo-1 抗原制造可供临床推广的免疫测定试剂盒及应用。此外, 本发明也为其他自身免疫性疾病特异性抗体的检测方法提供了一种制造工艺途径。



1、一种可用于多发性肌炎或皮肤炎或抗-Jo-1 抗体综合症诊断的 Jo-1 抗原的提纯方法，包括下列步骤：

A：将哺乳动物组织，例如猪、牛、兔、羊、鼠等的脾脏、肝脏、胸腺等，特别是猪的脾脏置于盐水缓冲液中，用匀浆器制成匀浆，匀浆液离心后收集上清液，制成可提取性核抗原；

B：可提取性核抗原对结合缓冲液透析后上样到经结合缓冲液平衡的免疫亲和色谱柱上，然后用洗脱缓冲液洗脱，收集洗脱组分，此即 Jo-1 抗原。

2、权利要求 1 的提纯方法，进一步在步骤 A 和 B 之间包括：

向可提取性核抗原溶液中加入预冷丙酮，制成可提取性核抗原丙酮粉；
免疫亲和柱用 3-5M 的氯化镁做为洗脱缓冲液。

3、根据权利要求 1 的提纯方法，其中免疫亲和色谱柱通过下列步骤来制备：

A：把水洗过的琼脂糖凝胶置于水中，加入环氧氯丙烷和氢氧化钠进行环氧法活化凝胶基质；

B：将活化后的琼脂糖凝胶水洗后置于溶有配体的偶联缓冲液中偶联配体；

C：必要时，偶联配体的凝胶清洗后放乙醇（例如 20%乙醇）中保存。

4、根据权利要求 1 的提纯方法，其中免疫亲和色谱柱的制备包括如下步骤：

A：把水洗过的琼脂糖凝胶置于水中，加入环氧氯丙烷和氢氧化钠进行环氧法活化凝胶基质；

B：将活化后的琼脂糖凝胶水洗后置于溶有配体的偶联缓冲液中偶联配体；

C：必要时，偶联配体的凝胶清洗后放乙醇中保存；

D：向色谱柱注入占柱体积 1/2 以上的结合缓冲液，打开柱的下端出口使液体流出；

E：偶联有配体的凝胶悬浮于结合缓冲液中，把凝胶混悬液从色谱柱的上端入口加入色谱柱中；

F：继续用结合缓冲液清洗色谱柱至 5 倍柱床体积以上。

5、根据权利要求 3 或 4 的提纯方法，其中所述配体为特异性 Jo-1 抗血清。

6、一种检测多发性肌炎或皮肤炎或抗-Jo-1 抗体综合症的方法，其特征在于使用由权利要求 1-4 的任一项的方法获得的抗原检测生物样本中的 Jo-1 抗

体。

7、一种可用于检测多发性肌炎或皮肌炎或抗-Jo-1 抗体综合症的斑点印迹试剂盒，其特征在于包括硝酸纤维素膜和膜上包被的由权利要求 1-4 的任一项的方法获得的 Jo-1 抗原。

8、一种可用于检测多发性肌炎或皮肌炎或抗-Jo-1 抗体综合症的酶联免疫吸附试验试剂盒，其特征在于包括微量孔酶联免疫吸附试验板，孔中包被的由权利要求 1-4 的任一项的方法获得的 Jo-1 抗原。

9、由权利要求 1-4 的任一项的方法获得的高纯度 Jo-1 抗原。

10、一种可用于提纯 Jo-1 抗原的免疫亲和预装柱，它通过下列步骤制备：

A：把水洗过的琼脂糖凝胶置于水中，加入环氧氯丙烷和氢氧化钠进行环氧法活化凝胶基质；

B：将活化后的琼脂糖凝胶水洗后置于溶有配体的偶联缓冲液中偶联配体；

C：必要时，偶联配体的凝胶清洗后放乙醇中保存；

D：向色谱柱注入占柱体积 1/2 以上的结合缓冲液，打开柱的下端出口使液体流出；

E：偶联有配体的凝胶悬浮于结合缓冲液中，把凝胶混悬液从色谱柱的上端入口加入色谱柱中；

F：继续用结合缓冲液清洗色谱柱至 5 倍柱床体积以上。

可用于多发性肌炎/皮肌炎诊断的抗原提纯工艺方法及应用

技术领域

本发明涉及一种可用于对自身免疫性疾病多发性肌炎(PM)/皮肌炎(DM)和抗-Jo-1 抗体综合症(Anti-Jo-1 Antibody Syndrome)进行特异性诊断的 Jo-1 抗原的方便高效的提纯工艺,用该工艺方法制备的 Jo-1 抗原用于制造可供临床使用的特异性地诊断多发性肌炎/皮肌炎和抗-Jo-1 抗体综合症的免疫测定方法,如发展成斑点印迹(DB)或酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断试剂盒等。

背景技术

多发性肌炎以对称性四肢近端不同程度的肌力下降为临床特征,也可累及颈项肌等除表情肌以外的各部位骨骼肌,绝大部分同时伴有血中骨骼肌酶类肌原性损害的肌电图改变,如肌酸激酶(CK)、醛缩酶(aldolase)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)等。皮肌炎除有上述表现外,还同时有特征性的皮疹,如 Gottron 疹、“技工手”、向阳疹、“V”字征和“披肩征”等。多发性肌炎多以隐匿性或亚急性起病,皮肌炎常因皮疹出现,较早就诊而被发现。目前还没有多发性肌炎/皮肌炎确切的发病率统计,按 1975 年 Bohan 和 Peter 提出的诊断标准(参见:Bohan A 和 Peter JB, N Engl J Med., 292: 344-47, 403-07, 1975),估计在 0.6-7 例/十万人口。资料也表明,多发性肌炎/皮肌炎病人并发恶性肿瘤较普通人群高(张海云主编:现代自身免疫病,人民军医出版社,1996, p. 212-223)。多发性肌炎/皮肌炎在任何年龄均可发病,高发年龄出现在 5-14 岁和 40-60 岁,呈双峰分布,女性患者是男性的 2 倍。多发性肌炎/皮肌炎病因和发病机理都不太明了,根据现有资料,推测在遗传易感性的基础上因病毒感染等环境因素导致机体免疫功能紊乱,通过分子模拟的方式引起发病。在多发性肌炎肌肉组织病理标本上,肌纤维细胞有 MHC-I 类抗原表达,肌细胞和肌膜下有大量 CD8(+)T 淋巴细胞浸润。皮肌炎的肌肉或皮肤病理组织主要表现为小血管炎,可见血管内皮增生,血栓形成,管腔狭窄甚至闭塞,免疫病理发现有补体介导的膜攻击复合物(MAC)在血管壁沉积。

对称性肌无力、肌活检异常、肌酶升高及肌电图改变对肌炎的诊断有重要意义。在肌炎诊断中需要注意与其他累及肌肉的疾病进行鉴别,这些疾病包括重症肌无力,嗜酸粒细胞升高性筋膜炎,进行性肌营养不良、流行性肌痛症、肌球蛋白尿症,药物所致的肌炎和风湿性多肌痛等。作为自身免疫性疾病的多

发性肌炎/皮肌炎，针对疾病特异性抗体的检测在疾病的确诊中具有重要的作用。

多发性肌炎/皮肌炎和/或抗-Jo-1 抗体综合症患者血清中存在多种自身抗体，有些抗体对诊断具有特异性意义，被称为肌炎特异性抗体(MSAs)，其中出现率最高，临床意义最大的是所谓 Jo-1 抗体。这个抗体是 1980 年 Nishikai. M 和 Reichlin. M 在多发性肌炎/皮肌炎患者中发现的，他们用免疫双扩散(DID)的方法建立了 Jo-1 抗原/抗体系统，而且发现 Jo-1 抗体对诊断多发性肌炎/皮肌炎具有高度特异性(参见：Nishikai M 和 Reichlin M, 关节炎和风湿病, 23: 881-8(1980)。)，此后，其他学者用免疫双扩散和/或对流免疫电泳(CIE)的方法研究 Jo-1 抗体和多发性肌炎/皮肌炎关系时发现，Jo-1 抗体在多发性肌炎/皮肌炎中的阳性率在 30%左右，并且几乎仅见于多发性肌炎/皮肌炎患者(参见：Arnett FC 等, 风湿病杂志, 8: 925-30(1981)。)，因此，Jo-1 抗体被一致认为为是多发性肌炎/皮肌炎的标志性抗体。

抗-Jo-1 抗体综合症原是指多发性肌炎/皮肌炎患者中，血中 Jo-1 抗体阳性，同时有间质性肺病(ILD)，雷诺现象，“技工手”，非侵袭性多关节炎，发热等。随着对该综合症认识的不断深入，部分抗-Jo-1 抗体综合症的患者并不以肌炎为首发，甚至在病程中多发性肌炎/皮肌炎表现不明显甚至缺如。有些患者仅有间质性肺病和血中 Jo-1 抗体阳性。对于这两组患者，Jo-1 抗体的检测对确立诊断至关重要。

Jo-1 抗体的临床意义包括：(1) 帮助确立多发性肌炎/皮肌炎和/或 Jo-1 抗体综合症综合症的诊断；(2) 血中 Jo-1 抗体滴度与疾病活动度相关，因此，Jo-1 抗体检测可用于监测病情变化；(3) Jo-1 抗体阳性和阴性的多发性肌炎/皮肌炎和/或 Jo-1 抗体综合症的患者对激素的治疗反应不同，且对各类免疫抑制剂治疗的敏感性也存在差异，因而，Jo-1 抗体检测结果对药物选择具有提示意义；(4) Jo-1 抗体与多发性肌炎/皮肌炎的预后有一定的相关性，Jo-1 抗体阳性患者预后相对较差；(5) Jo-1 抗体还与某些人类白细胞抗原(HLA)等位基因相关，提示 Jo-1 抗原/抗体系统在多发性肌炎/皮肌炎和/或抗-Jo-1 抗体综合症的发病中发挥重要作用。

1983 年 Mathews MB 等用放射性同位素 ^{32}P 和 ^{35}S 标记 HeLa 细胞提取物结合酶活性抑制实验证实了 Jo-1 抗体的靶抗原是组氨酰-tRNA 合成酶(参见：Mathews MB 和 Bernstein RM, 自然, 304 (14): 177-9(1983)。)。随着对 Jo-1 抗原/抗体系统研究的深入，有充足的数据表明组氨酰-tRNA 合成酶只分布在细胞浆中(参见：Shi MH 等, J Reumatol., 18:252-8(1991); Kamei H, 自身免疫杂志, 22(3): 201-10(2004)。)，而 Nishikai. M 和 Reichlin. M 建立 Jo-1 抗原/抗

体系统时的抗原来源是细胞核或整个细胞,并用间接免疫荧光法(IIF)证明 Jo-1 抗原在小鼠脾细胞的细胞核中。而后 Reichlin. M(参见: Reichlin M 和 Arnett FC Jr, 关节炎和风湿病, 27: 1150-6(1984)。)和其他学者(参见: Shi MH 等, 风湿病学杂志, 18:252-8, 1991; Kamei H, J Autoimmun., 22: 201-10, 2004; Vazquez-Abad D 等, Cell Tissue Res., 286: 487-91, 1996)。更深入的细胞间接免疫荧光研究表明 Jo-1 抗原在细胞核和细胞浆都有分布,没有细胞种类和细胞周期特异性。综合 20 多年来从不同角度对 Jo-1 抗原/抗体系统的研究资料,有足够的理由认为基于凝胶免疫沉淀技术建立起来的 Jo-1 抗原/抗体系统,其抗原可能不是单一组分,组氨酰-tRNA 合成酶只是这个复杂抗原结构中的一种成分。

对某一特定疾病的确认应基于以下三个方面:患者的临床表现、病理学和血清学特征。1975 年 Bohan 和 Peter 的多发性肌炎/皮肌炎诊断标准没有把免疫血清学因素考虑进去,近来提出来的一些标准在这方面做了努力(参见: Tanimoto K 等, 风湿病学杂志, 22: 668-74 (1995)。)。由于 Jo-1 抗原/抗体系统在多发性肌炎/皮肌炎和抗-Jo-1 抗体综合症临床中的重要作用,一直以来免疫风湿病临床和实验室工作者都非常重视 Jo-1 抗体的检测,现在临床中用于检测 Jo-1 抗体的技术主要有免疫双扩散、对流免疫电泳、免疫印迹(IB)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和斑点印迹(DB)。免疫双扩散、对流免疫电泳、免疫印迹的抗原主要来源于牛肝、牛胸腺或兔胸腺的盐水粗提物。免疫双扩散为检测 Jo-1 抗体的经典方法,阳性结果特异性强,但敏感性低,假阴性较多,操作耗时较长;对流免疫电泳和免疫双扩散一样也是基于凝胶免疫沉淀技术,但需作参比电泳,技术操作较复杂,稳定性不够好,一般不单独用于 Jo-1 抗体检测;国内临床实验室虽然广泛应用免疫印迹检测 Jo-1 抗原,但其结果可靠性差,对临床诊断多发性肌炎/皮肌炎的帮助不大。免疫酶法(EIA)中的酶联免疫吸附试验和斑点印迹是近年来发展起来检测 Jo-1 抗体的方法,它们的抗原来源大部分是基因工程重组的组氨酰-tRNA 合成酶,少部分是从人源细胞株(如 Hep-2 等)中纯化的组氨酰-tRNA 合成酶,一方面,重组的组氨酰-tRNA 合成酶常混有宿主蛋白,并且可能有不同的表达后折叠和修饰,因而重组的组氨酰-tRNA 合成酶与天然的组氨酰-tRNA 合成酶在抗原表位上也可能不完全一样;更重要的另一方面,正如前述一样,组氨酰-tRNA 合成酶只是 Jo-1 抗原的一部分。因而用重组的组氨酰-tRNA 合成酶制成的酶联免疫吸附试验或斑点印迹试剂盒因抗原表位不全面,而使其敏感性并没有象期待的那样明显高于免疫双扩散,也因为混有杂蛋白和蛋白表达后折叠、修饰的差异,特异性比免疫双扩散明显低。用纯化的 Jo-1 抗原制备酶联免疫吸附试验或斑点印迹试剂盒基本保持了 Jo-1 抗原的特性,可制成

更加特异的试剂盒。

20多年来,许多作者在 Jo-1 抗原的纯化上作了很多努力,但提纯工艺复杂,产率低,成本高,耗时长,难于大规模生产来满足临床实验室诊断应用的需要。少量亲和色谱成功纯化组氨酰-tRNA 合成酶(参见: Targoff IN 和 Reichlin M, J Immunol., 138: 2874-82, 1987), 仅见于实验室应用,并未用于大规模纯化 Jo-1 抗原中。

为进一步提高多发性肌炎/皮肌炎和/或抗-Jo-1 抗体综合症中 Jo-1 抗体的检出率,同时保证阳性结果对诊断多发性肌炎/皮肌炎和/或抗-Jo-1 抗体综合症保留象免疫双扩散一样的高度特异性,简便地制备表位全面、纯度高能满足免疫酶法检测 Jo-1 抗体的 Jo-1 抗原是首要和亟待解决的问题。为了使免疫酶法检测 Jo-1 抗体能确实有效地用于临床诊断,解决高纯度的 Jo-1 抗原供应是关键。发明人创立了一个方便有效的 Jo-1 抗原提纯方法,这个工艺方法筛选出来源丰富的生物原料、改进了免疫亲和色谱柱的制备、发现了高效率的色谱分离条件、并有机结合应用了其它蛋白质纯化方法,建立了大量提纯制造 Jo-1 抗原的工艺方法。

应用本工艺方法提纯制造的 Jo-1 抗原已用于制造酶联免疫吸附试验检测试剂盒及其他免疫检测试剂盒,临床检验表明其检验结果与现有临床检测方法相比显著地提高了敏感性和特异性并降低了检测时间。

发明内容

发明人建立了免疫亲和色谱结合其它蛋白质提纯技术制备 Jo-1 抗原的工艺方法。这其中包括找到来源丰富的生物原料;改进免疫亲和色谱柱的制备;高效率色谱分离条件的建立;及色谱分离与其它蛋白提纯技术的合理结合等。方法简便、重复性好、产量较高。

本工艺方法是用磷酸钠-盐水缓冲液从来源丰富的新鲜和/或冻存的动物组织中抽提可溶性核抗原(ENA),用构建的亲合色谱法进一步从可溶性核抗原中批量化地提纯出 Jo-1 抗原。免疫亲和色谱柱的基质是环氧活化的琼脂糖(Sephrose 4B),配体来源于从单一特异性 Jo-1 抗血清中提纯的 IgG。使用的动物组织包括但不限于猪、牛、兔、羊、鼠、猴、狗、马等的脾脏、肝脏、胸腺等动物组织。

本方法进一步提供了将纯化的 Jo-1 抗原用于制备酶联免疫吸附试验板或斑点印迹膜的方法,并经临床样品的检测和应用。临床检测的血清标本包括:多发性肌炎、皮肌炎、系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎(RA)例、原发性干燥综合症(1° SS)、其它结缔组织病及正常人。结果表明酶联免疫吸附试验和/或斑点印迹检测 Jo-1 抗体的特异性与免疫双扩散结果一致。在一组多发性肌炎/皮肌炎病例中,Jo-1 抗体检出率为 30%,符合 Jo-1 抗体在多发性肌炎/皮肌炎

病人中出现的频率；而且特异性为 100%。因此，本发明提供了一种制造高纯度 Jo-1 抗原的技术工艺，该工艺为盐水缓冲液提取和免疫亲和色谱的结合运用纯化蛋白质的工艺。

本发明还提供了可提取性核抗原制造工艺之一盐水抽提法及可提取性核抗原保存和初步浓缩方法之一的丙酮沉淀法。

本发明进一步提供了免疫亲和色谱柱的制造工艺之一环氧活化琼脂糖凝胶偶联蛋白质配体和湿法装柱。

本发明还提供了盐水缓冲液提取和免疫亲和色谱所涉及各步骤所用的缓冲液、溶液的配方和配制方法。

本发明还提供了由上述方法获得的高纯度 Jo-1 抗原。

本发明还提供了一种检测 Jo-1 抗体的方法之一斑点印迹试剂盒以及上述试剂盒在检测 Jo-1 抗体中的应用。

本发明还进一步提供了一种检测 Jo-1 抗体的方法之一酶联免疫吸附试验试剂盒以及上述试剂盒在检测 Jo-1 抗体中的应用。

根据本发明的一个方面，本发明提供了一种制造 Jo-1 抗原的技术工艺，该技术工艺为盐水缓冲液提取和免疫亲和色谱的结合运用纯化 Jo-1 抗原。

具体地说，包括以下步骤：

A：将哺乳动物组织，例如猪、牛、兔、羊、鼠、猴、狗、马等的脾脏、肝脏、胸腺等，特别是猪的脾脏（冻存的先解冻复苏）置于盐水缓冲液中，用匀浆器制成匀浆，匀浆液离心后收集上清液，上清液就是可提取性核抗原；

B：可提取性核抗原溶液与结合缓冲液透析后上样到免疫亲和色谱柱上，在结合缓冲液平衡亲和柱后用洗脱缓冲液洗脱，收集洗脱组分，此即 Jo-1 抗原；

如实施例 4 所述，可以用酶联免疫吸附试验和/或斑点印迹检测 Jo-1 抗体，具体包括以下步骤：

C：把 Jo-1 抗原包被酶联免疫吸附试验板或制造斑点印迹膜，检测 Jo-1 抗体。

另一方面，本发明还提供了可提取性核抗原制造工艺之一盐水抽提法及可提取性核抗原保存和初步浓缩方法之一的丙酮沉淀法。具体步骤如下：

A：将猪脾脏等动物组织（冻存的先解冻复苏）置于盐水缓冲液中，用匀浆器制成匀浆，匀浆液离心后收集上清液，上清液就是可提取性核抗原；

B：向可提取性核抗原溶液中加入预冷丙酮，离心除去丙酮，所得沉淀晾干，收集可提取性核抗原丙酮粉。

根据本发明的又一方面，本发明进一步提供了免疫亲和色谱柱的制造工艺之一环氧活化琼脂糖凝胶偶联蛋白质配体和湿法装柱。包括以下步骤：

A: 把水洗过的琼脂糖凝胶置于水中, 加入环氧氯丙烷和氢氧化钠进行环氧法活化凝胶基质;

B: 将活化后的琼脂糖凝胶水洗后置于溶有配体的偶联缓冲液中偶联配体;

C: 必要时, 偶联配体的凝胶清洗后乙醇(例如 20%的乙醇)中保存;

如实施例 2 中所述, 偶联有配体的凝胶可进一步装到柱子里, 制造免疫亲和色谱柱, 包括如下步骤:

D: 向色谱柱注入占柱体积 1/2 以上的结合缓冲液, 打开柱的下端出口使液体流出;

E: 偶联有配体的凝胶悬浮于结合缓冲液中, 把凝胶混悬液从色谱柱的上端入口加入色谱柱中;

F: 继续用结合缓冲液清洗色谱柱至 5 倍柱床体积以上。

依据本发明的另一方面, 本发明同时还提供了盐水缓冲液提取和免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原所涉及各步骤所用的缓冲液、溶液的配方和配制方法。具体地说, 本发明涉及的缓冲液和/或溶液配方及其配制方法示例而非限制性地如下所示:

A: 匀浆缓冲液: 0.01M 磷酸钠-盐水(PBS)缓冲液, PH 7.0, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA) 0.01M, 苯甲基磺酰氟(PMSF) 1.5 mM, 二巯基苏糖醇(DTT) 1mM, 胰蛋白酶抑制剂 4 μ g/ml, 亚硫酸氢钠 1.5 mM;

B: 制造配体结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠盐缓冲液 (PB), pH 7.0-7.5;

C: 制造配体洗脱缓冲液: 0.1M 柠檬酸钠缓冲液, pH 3.0-4.0;。

D: 制造配体收集缓冲液: 1-2M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液;

E: 琼脂糖环氧活化缓冲液: 0.4 M 氢氧化钠水溶液;

F: 配体偶联缓冲液: 0.5 M 碳酸钠水溶液;

G: Jo-1 抗原纯化结合缓冲液: 0.01 M 磷酸钠-盐水缓冲液, pH 7.2, 含氯化钠(NaCl) 0.5 M 或: 0.05 M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸-盐水缓冲液(TBS), pH 7.2, 含氯化钠 0.5 M;

H: Jo-1 抗原纯化洗脱缓冲液: 3-4M 氯化镁;

I: 斑点印迹洗膜缓冲液: 20 mM 三羟甲基氨基甲烷-盐酸-盐水-吐温-20 (TBS-T), pH 值 7.5, 含 0.15 M 氯化钠, 吐温-20(Tween-20)浓度为 0.05%;

J: 斑点印迹封闭液: 5%脱脂奶粉, 溶媒为洗膜缓冲液;

K: 酶联免疫吸附试验包被缓冲液: 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液, pH8.5- 9.5;

L: 酶联免疫吸附试验封闭缓冲液: 5%脱脂奶粉, 溶媒为包被缓冲液;

M: 酶联免疫吸附试验漂洗缓冲液: 0.01M 磷酸钠-盐水-吐温-20(PBS-T),

吐温-20 浓度 0.05%，pH=7.5。

盐水缓冲液抽提猪脾脏等动物组织中的可提取性核抗原，100g 组织可得 1.0-1.5g 蛋白质，丙酮沉淀可得到 5-7g 干丙酮粉，丙酮粉中蛋白质含量为 20-24%。丙酮粉在低温中长期保存（如 3-5 年），其中抗原活性不会降低。

根据本发明的另一方面，依照本发明制造 Jo-1 免疫亲和色谱柱，1g 琼脂糖干胶溶胀后能够得到 3.0-3.5 ml 凝胶，Jo-1 配体与凝胶的最适比例是 5-10 mg/ml，配体与凝胶偶联的偶联率为 98%以上。可提取性核抗原经过 Jo-1 免疫亲和色谱柱纯化，可以得到抗原表位全面、纯度高的 Jo-1 抗原，纯化倍数约是 1900 倍。经过亲和色谱柱的保留组分在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上存在 5 条带，但在免疫印迹上只有 50 千道尔顿 (KD) 的条带具有与 Jo-1 抗体发生免疫反应的抗原活性。斑点印迹和/或酶联免疫吸附试验结果表明亲和纯化的保留峰只和 Jo-1 抗血清发生免疫反应，不与其他自身免疫性疾病中常见的抗血清，如 Sm/RNP、SSA (Ro)/SSB (La)、Scl-70 等抗血清发生免疫反应。

本发明还进一步提供了一种检测对肌炎/皮肤炎和抗-Jo-1 抗体综合症有特异性诊断价值的抗体之一 Jo-1 抗体的斑点印迹和/或酶联免疫吸附试验试剂盒，在斑点印迹试剂盒中，有一张硝酸纤维素 (NC) 膜，膜上有一个高纯度 Jo-1 抗原点或一条 Jo-1 抗原线。在酶联免疫吸附试验试剂盒中，有一块微量孔酶联免疫吸附试验板，孔中包被有抗原表位全面的高纯度 Jo-1 抗原，与之同时提供的可以是经政府药物管理机构审核批准的、有关药品或生物制品制造、使用及销售的信息。本领域的技术人员已知，以上组分仅是检测 Jo-1 抗体的核心关键成分，与这些关键组分共同提供的还将有封闭缓冲液、漂洗缓冲液或它们的配方，以及酶标记的二抗、显色所需的底物及其缓冲液或它们的配方。例如，封闭缓冲液可以是 5%的脱脂奶粉或 1-5%的牛血清白蛋白 (BSA)，漂洗缓冲液可以是含 0.05%吐温-20 的磷酸钠盐水缓冲液，酶标记的二抗可以是辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (ALP) 标记的羊或兔抗人免疫球蛋白 (Ig) 或 Ig Fc 段的抗体。对于辣根过氧化物酶标记的二抗，斑点印迹的显色底物可以用 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB)/4 氯芬 (4-Chloronaphthol, 4-CN)+过氧化氢 (H₂O₂)，底物缓冲液是 0.05M 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液，pH 7.6。酶联免疫吸附试验的显色底物可以是邻苯二胺 (OPD) 或 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB)，底物先用而四甲基亚砷 (DMSO) 溶解后再用底物缓冲液枸橼酸-乙酸钠缓冲液 (pH=5-6) 稀释。对于碱性磷酸酶标记的二抗，显色底物是对硝基苯磷酸钠 (p-NPD)，底物缓冲液为二乙醇胺溶液 (pH= 9.8)。本领域的技术人员还已知，上述斑点印迹和/或酶联免疫吸附试验检测过程的相关缓冲液和显色系统只是可选择的方法之一。

其使用方法说明如下：

斑点印迹检测

1) 检测膜与抗血清反应

把检测膜用洗膜缓冲液漂洗 3-5 分钟, 弃去洗膜缓冲液, 封闭缓冲液封闭 0.5-1 小时, 洗膜缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入待测抗血清室温孵育 1-2 小时;

2) 检测膜与酶标二抗反应

洗膜缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入酶标二抗室温孵育 0.5-1 小时;

3) 显色与结果观察

洗膜缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入底物液显色, 结果满意后加入终止液终止显色反应, 将结果与阳性、阴性和空白对照比对, 读取和记录检测结果。

酶联免疫吸附试验检测

1) 与抗血清反应

用洗涤缓冲液漂洗酶联免疫吸附试验板 3-5 分钟/次×2 次, 封闭缓冲液室温封闭 1-2 小时, 洗涤缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入稀释待测抗血清室温孵育 1-2 小时;

2) 与酶标二抗反应

洗涤缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入酶标二抗室温孵育 0.5-2 小时;

3) 显色

洗涤缓冲液漂洗 3-5 分钟/次×3 次, 加入底物液显色, 结果满意后加入终止液终止显色反应;

4) 酶标仪读取吸光值并记录结果

将酶联免疫吸附试验板放入酶标仪中, 按厂家说明书操作, 进行检测, 记录检测结果。

对检测结果的可靠性, 本领域的普通技术人员应该已经知道, 斑点印迹和/或酶联免疫吸附试验检测待测血清, 应该同时有阳性、阴性和空白对照, 这样检测结果才准确可靠。

本发明同时还提供了斑点印迹和酶联免疫吸附试验在多发性肌炎/皮肌炎和抗-Jo-1 抗体综合症特异性抗体之一的 Jo-1 抗体血清学检测中的应用。用本发明制造的 Jo-1 抗原制成的斑点印迹和/或酶联免疫吸附试验试剂盒, 显著提高了 Jo-1 抗体在诊断多发性肌炎/皮肌炎和抗-Jo-1 抗体综合症中敏感性和特异性, 尤其为不典型病例的诊断提供了可靠的诊断手段, 从而提高了多发性肌炎/皮肌炎和抗-Jo-1 抗体综合症临床诊断的准确性, 为及时治疗和诊疗中的正确药物选择提供了可靠的依据。

最后，本发明也为其它自身免疫性疾病的自身抗体所针对的靶抗原提纯开辟了新的思路和有效可行的技术路线。例如，其它的常见的自身抗体也能够按本发明的制造工艺制造出纯度高、抗原表位全面并能满足免疫酶法检测抗体的抗原。

附图说明

图 1 显示 rProtein A 纯化 Jo-1 IgG 的色谱图。本图为用 rProtein A 预装柱从多发性肌炎患者的单一特异性 Jo-1 抗血清中纯化出 IgG 的色谱图。图中横坐标是流过色谱柱的溶液体积，纵坐标紫外 (UV₂₈₀) 吸光值 (单位 mAU)，非保留峰和保留峰图中分别在峰顶标有“上样峰”和“洗脱峰”。

图 2 显示 rProtein A 纯化 Jo-1 IgG 各组分在 SDS-PAGE 上的电泳图 (考马斯亮蓝染色)。图中各泳道的上面分别注明色谱分离的各组分，“M”表示“Marker”即蛋白质分子量标记，胶的右侧标注的数字是各蛋白质标记的分子量，单位是千道尔顿 (KD)。血清、上样峰、洗脱峰的蛋白质上样量分别为 11 μg、13 μg 和 5 μg。

图 3 显示免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原的色谱图。图中横坐标表示流过色谱柱的溶液流量 (单位 ml)，纵坐标表示紫外 (UV₂₈₀) 吸光值 (单位 mAU)，蓝色曲线是紫外曲线，红色曲线是电导曲线，非保留峰和保留峰图中分别在峰右旁标有“上样峰”和“洗脱峰”。

图 4 显示免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原各组分在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上的电泳图 (硝酸银染色)，图中各泳道的上面分别注明色谱分离的各组分，“M”表示“Marker”即蛋白质分子量标记，胶的左侧标注的数字是各蛋白质标记的分子量，单位是千道尔顿 (KD)。粗抗原、上样峰和洗脱峰的蛋白质上样量分别是 4 μg、5 μg 和 0.5 μg。

图 5 显示免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原各组分免疫印迹图。图中各泳道的上面分别注明色谱分离的各组分，“M”表示“Marker”即蛋白质分子量标记，膜的偏右侧标注的数字是各蛋白质标记的分子量，单位是千道尔顿 (KD)。粗抗原、上样峰和洗脱峰的蛋白质上样量分别是 8 μg、8 μg 和 0.8 μg。箭头所指为免疫反应条带。

图 6 显示免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原各组分代表性的斑点印迹结果，膜上端分别注明色谱分离的各组分。粗抗原、上样峰和洗脱峰第一行上样量分别为 2 μl、16 μl 和 1 μl；由上往下依次倍比稀释；Jo-1 阳性抗血清的稀释度为 1 : 25。粗抗原、上样峰和洗脱峰中蛋白质浓度 (UV₂₈₀ 表示) 分别是 24.886 AU、7.488 AU 和 0.0016 AU。

具体实施方式

实施例 1

可提取性核抗原的提取和可提取性核抗原丙酮粉的制造

1 取新鲜或-80℃冻存猪脾脏等动物组织，冻存组织需置 4℃过夜（12 小时以上）解冻复苏；

2 称量猪脾脏等组织 100g，加入 200ml 匀浆缓冲液（0.01M PBS, PH 7.0, 乙二胺四乙酸二钠 0.01 M, 苯甲基磺酰氟 1.5 mM, 二巯基苏糖醇 1 mM, 胰蛋白酶抑制剂 4 μg/ml, 亚硫酸氢钠 1.5 mM），低速匀浆，30 秒/次，间隔 2 分钟/次，共十次；

3 组织匀浆液磁力搅拌 1-2 小时；

4 离心, 4℃, 10,000G, 1 小时；

5 弃沉淀，取上清离心, 4℃, 100,000G, 1 小时；

6 弃沉淀，将上清液置于烧杯中，边搅拌边徐徐加入 5 倍预冷丙酮；

7 4℃, 10,000 G, 离心 30 分钟；

8 弃上清，沉淀置烧杯中，用 200 ml 预冷丙酮悬浮漂洗沉淀，磁力搅拌 30 分钟；

9 重复步骤 7；

10 弃上清，沉淀晾干即为可提取性核抗原丙酮粉，称重，计算回收率，-20℃密闭干燥保存。

结果分析

100 g 组织可制得 5-7 g 可提取性核抗原丙酮粉，丙酮粉中的蛋白含量为 20-24%。免疫双扩散和免疫印迹结果显示可提取性核抗原中的 Jo-1 抗原活性好。

实施例 2

免疫亲和色谱柱的制造

1 琼脂糖的环氧活化

1) 将琼脂糖干胶用去离子水(200 ml/g)分 3 次漂洗，在布氏漏斗上抽干；

2) 把洗过的凝胶转入氢氧化钠水溶液中，接着加入环氧氯丙烷，它们在活化体系中的终浓度分别是：凝胶 30%(v/v)，环氧氯丙烷 5%(v/v)，氢氧化钠 0.4 M；

3) 使上述混悬液在温和条件下震荡，40℃的条件下反应 2-3 小时；

4) 将活化后的凝胶转入布氏漏斗中抽干，用去离子水分次漂洗凝胶，待用。

2 配体的制造

1) 把单一特异性 Jo-1 抗血清用等量结合缓冲液(20 mM 磷酸钠缓冲液，

pH=7.0)混匀,用0.45 μm 滤器过滤;

- 2) 将上述处理后的抗血清上样到 rProtein A 亲和柱上,分管收集上样峰;
- 3) 用结合缓冲液平衡 5-10 个柱体积;
- 4) 洗脱缓冲液(柠檬酸钠缓冲液, pH=3-4)3-5 个柱体积洗脱,分管收集洗脱峰,及时用收集缓冲液(1-2 M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, pH=9-10)中和。
- 5) 用结合缓冲液平衡 5-10 个柱体积;
- 6) 测定、分析色谱分离各组分蛋白浓度及 Jo-1 抗体(IgG)滴度。

结果分析

从色谱图上可见,在洗脱时,洗脱峰呈现单峰,上升支急速上升,下降支回落迅速,没有拖尾,呈现典型锐利的亲和色谱洗脱峰,如图 1 所示。洗脱峰在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上,血清和保留组份均可看到浓染的 IgG 重链(58KD)和轻链(29KD),而非保留组分虽然上样量较血清还大,但在 IgG 的重链和轻链位置几乎看不到条带存在,如图 2 所示。免疫双扩散结果显示洗脱峰在最低蛋白浓度 5.5 mg/ml 时,出现单一沉淀线,该沉淀线仅与 Jo-1 参比抗血清的沉淀线光滑融合,不与其他自身抗体参比抗血清的沉淀线相连。

3 配体与基质的偶联

- 1) 将 Jo-1 IgG 溶于偶联缓冲液(0.5 M 碳酸钠缓冲液, pH=11.9)中;
- 2) 向上述溶液中加入活化后的琼脂糖凝胶,配体/凝胶=5-10 mg/ml;
- 3) 25℃水浴震荡偶联 24 小时;
- 4) 测定偶联前后偶联体系中 Jo-1 IgG 浓度,计算偶联率;
- 5) 偶联配体的凝胶转入布氏漏斗中抽干,用去离子水洗凝胶,直至中性,此时,凝胶可装柱或放 20%乙醇中保存。

结果分析

偶联前后偶联体系中的 IgG 浓度分别为 1.50 mg/ml 和 0.39 mg/ml,偶联率(%)=(偶联前蛋白浓度-偶联后蛋白浓度)/偶联前蛋白浓度=74%。

4 装柱

- 1) 偶联了配体的凝胶混悬于结合缓冲液(0.01 M 磷酸钠盐水缓冲液, pH 7.2, 含氯化钠 0.5 M 或 0.05 M 三羟甲基氨基甲烷-盐酸盐水缓冲液(TBS), pH 7.2, 含氯化钠 0.5 M)中;
- 2) 色谱柱中注入 1/2 以上柱体积的结合缓冲液;
- 3) 打开色谱柱的下端出口,在液体流出的同时,从色谱柱的上端入口加入凝胶混悬液;
- 4) 按如下顺序向色谱柱泵入缓冲液:结合缓冲液-洗脱缓冲液-结合缓冲

液，每种液体各 5-10 柱体积；

5) 装好的色谱柱可注入 20%的乙醇后保存于 4℃或直接用于纯化 Jo-1 抗原。

实施例 3

免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原

1) 可提取性核抗原溶液对结合缓冲液透析 16-24 小时，透析过程至少换液 5 次，如果是可提取性核抗原丙酮粉，先用提取缓冲液抽提丙酮粉中的可提取性核抗原，再透析；

2) 用 0.45 μm 滤器把可提取性核抗原溶液过滤，

3) 将可提取性核抗原溶液上样到已准备好的 Jo-1 免疫亲和色谱柱上，分管收集上样峰；

4) 用结合缓冲液平衡亲和柱 5-10 柱体积；

5) 用洗脱缓冲液 (3-5 M MgCl₂) 5-10 柱体积洗脱，分管收集洗脱峰；

6) 用结合缓冲液平衡亲和色谱柱 5-10 柱体积；

结果分析

从色谱图上可见，在洗脱时，洗脱峰呈现单峰，上升支急速上升，下降支回落迅速，虽然稍有拖尾仍然呈现亲和色谱的洗脱峰，如图 3 所示。将各色谱组分进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及免疫印迹分析发现，洗脱峰在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳上有 5 个条带，集中在 45-60 千道尔顿之间，如图 4 所示；但在免疫印迹上只有大约 50 千道尔顿条带与 Jo-1 抗血清起免疫反应，如图 5 所示。斑点印迹和酶联免疫吸附试验显示，洗脱峰只和 Jo-1 抗血清反应，不与其他自身抗体阳性血清起免疫反应。从上述结果可以看出，洗脱峰就是 Jo-1 抗原。

实施例 4

免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原在检测 Jo-1 抗体中的应用—斑点印迹检测 Jo-1 抗体

1) 在硝酸纤维膜上用铅笔画上所需数量小方格；

2) 将 Jo-1 抗原点在硝酸纤维膜的小方格内；

3) 将加好样的硝酸纤维膜放在室温下晾干；

4) 封闭：用封闭缓冲液室温封闭 0.5-1 小时；

5) 洗膜：用洗膜缓冲液漂洗 5 分钟/次×3；

6) 加入 1:25 (v/v) 的抗血清 (封闭缓冲液稀释)，室温孵育 1-2 小时；

- 7) 洗膜: 同“5)”;
- 8) 加入辣根过氧化物标记兔抗人 IgG 二抗 (按说明书用封闭缓冲液稀释), 室温孵育 0.5-1 小时;
- 9) 洗膜: 同“5)”;
- 10) 显色: 加入新鲜配制的底物液 (溶于 0.05M 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, pH 7.6 的 DAB+H₂O₂), 显色清楚后, 加入磷酸钠盐水缓冲液终止反应;
- 11) 观察记录结果, 用保鲜膜将膜包好, 保存。

用斑点印迹在一组自身免疫性疾病和正常对照中检测 Jo-1 抗体的检测结果如表 1 所示。

表 1 斑点印迹检测 Jo-1 抗体的结果

分类	阳性	阴性	合计	阳性率(%)
多发性肌炎	6	14	20	30
皮炎	0	11	11	0
类风湿关节炎	0	13	13	0
系统性红斑狼疮	0	14	14	0
干燥综合症	0	8	8	0
其它结缔组织病	0	3	3	0
健康对照	0	23	23	0

斑点印迹在这一组血清中的检测结果显示 Jo-1 抗体在多发性肌炎中的阳性率是 30%, 其它自身免疫性疾病和健康对照中 Jo-1 抗体都是阴性。

实施例 5

免疫亲和色谱纯化 Jo-1 抗原在检测 Jo-1 抗体中的应用—用酶联免疫吸附试验

- 1) 包被抗原: 用包被缓冲液稀释免疫亲和色谱纯化的 Jo-1 抗原, 抗原的终浓度为 0.5 μg/100 μl。取前述抗原溶液包被微量 96 孔酶联免疫吸附试验板, 100 μl /孔, 4℃过夜;
- 2) 漂洗: 用漂洗缓冲液漂洗 3 分钟/次×2, 200 μl /孔;
- 3) 封闭: 用封闭缓冲液室温封闭 1-2 小时, 200 μl /孔;
- 4) 漂洗: 用漂洗缓冲液漂洗 3 分钟/次×3, 200 μl /孔;
- 5) 一抗反应: 加入用稀释缓冲液 (10 mM, pH=7.5 磷酸钠-盐水缓冲液溶解的 5%脱脂奶粉) 稀释待测血清, 稀释度 1:100, 100 μl /孔, 室温孵育 2 小时;
- 6) 漂洗: 同“4)”;
- 7) 二抗反应: 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人二抗, 100 μl /孔, 室温

孵育 2 小时；

8) 漂洗：同“4)”；

9) 显色：加入底物缓冲液(枸橼酸-乙酸钠, pH=5-6)稀释的 TMB(10 mg/ml, 溶于 DMSO), 100 μ l /孔, 显色满意后用终止缓冲液(2 M H₂SO₄)终止显色反应；

10) 读板和记录：双波长(450 nm/630 nm)酶标读数仪读吸光值, 记录结果并进行结果分析。

结果如表 2 所示。

分类	阳性	阴性	合计	阳性率(%)
多发性肌炎	4	19	23	17.4
皮炎	2	11	13	15.4
类风湿关节炎	0	15	15	0
系统性红斑狼疮	0	13	13	0
干燥综合症	0	6	6	0
其它结缔组织病	0	2	2	0
健康对照	0	9	9	0

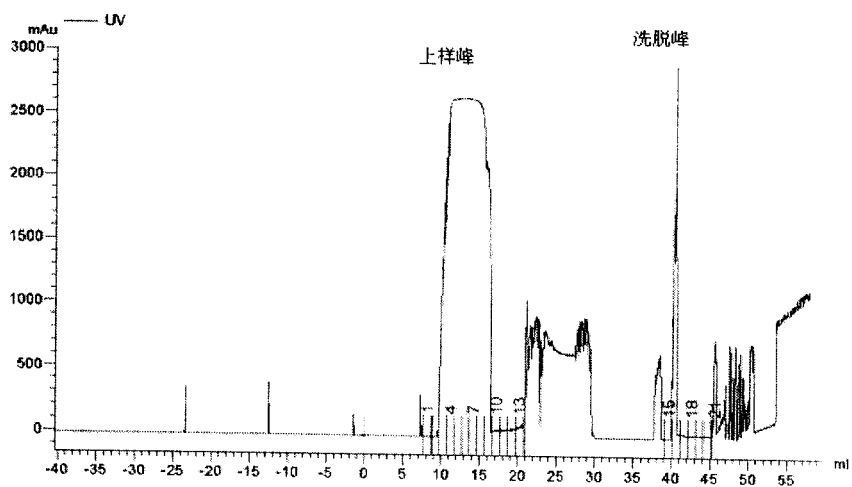


图 1

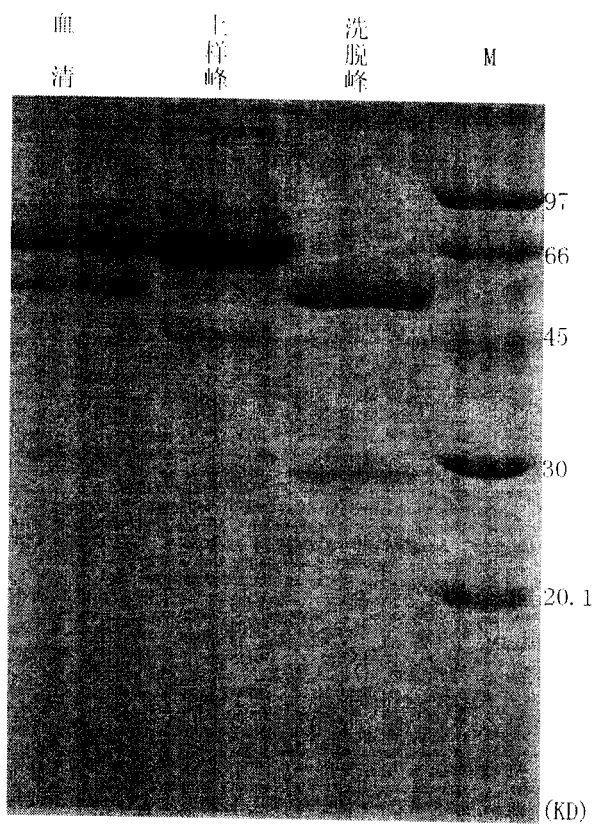


图 2

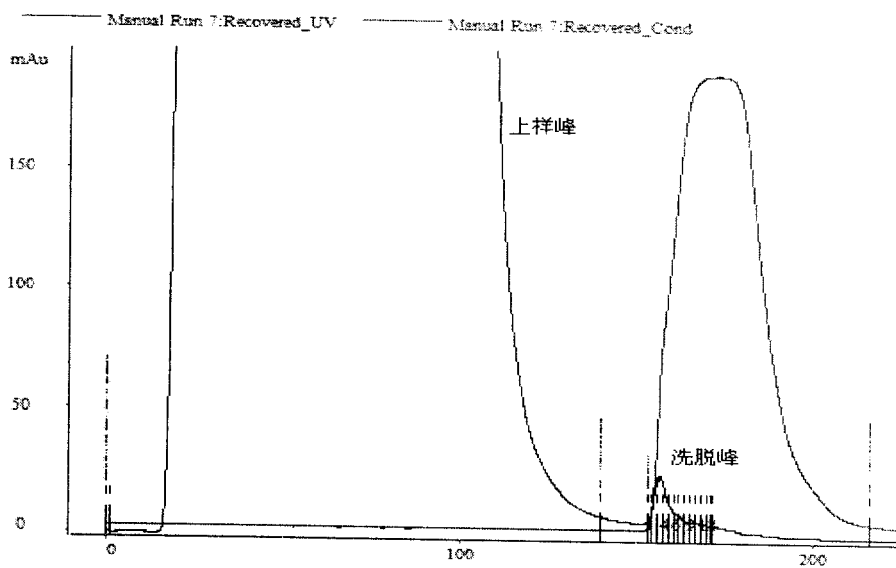


图 3

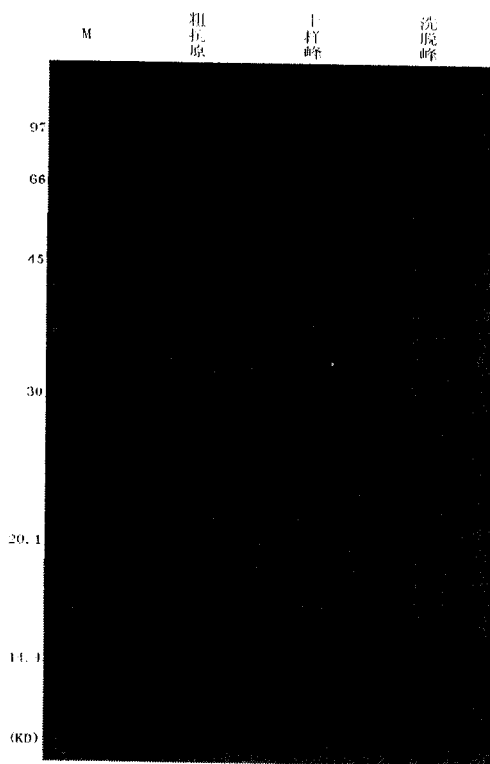


图 4

粗抗原 上样峰 洗脱峰 M

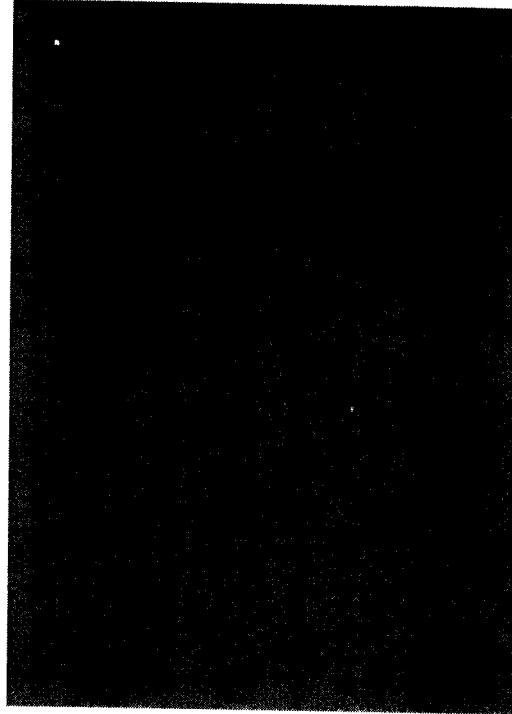


图 5



图 6

专利名称(译)	可用于多发性肌炎/皮肌炎诊断的抗原提纯工艺方法及应用		
公开(公告)号	CN1740196A	公开(公告)日	2006-03-01
申请号	CN200510093271.7	申请日	2005-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院北京协和医院		
申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院北京协和医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司 中国医学科学院北京协和医院		
[标]发明人	姚志建 唐福林 朱材忠 陈华 彭鲲鹏		
发明人	姚志建 唐福林 朱材忠 陈华 彭鲲鹏		
IPC分类号	C07K14/47 C07K1/22 G01N33/557 G01N33/535		
CPC分类号	Y02P20/582		
代理人(译)	何文彬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可用于多发性肌炎/皮肌炎诊断的抗原Jo - 1抗原的提纯工艺方法, 所述方法为免疫亲和色谱与其它蛋白质提纯技术的特定组合。本发明同时涉及Jo - 1免疫亲和色谱柱的制备方法。本发明还涉及通过所述方法制备的、以合宜生物组织为原料的Jo - 1抗原。本发明同时进一步涉及高效率亲和色谱分离条件的建立。本发明也包括用纯化的Jo - 1抗原制造可供临床推广的免疫测定试剂盒及应用。此外, 本发明也为其他自身免疫性疾病特异性抗体的检测方法提供了一种制造工艺途径。

