



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103175952 A

(43) 申请公布日 2013.06.26

(21) 申请号 201110435317.4

(22) 申请日 2011.12.22

(71) 申请人 兰风华

地址 350025 福建省福州市鼓楼区西二环北路156号(总院实验科)

(72) 发明人 兰风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用于检测免疫不育相关自身抗体的新型抗原

(57) 摘要

一种用于检测免疫不育相关自身抗体的新型抗原,该发明属生殖免疫学免疫不孕领域。目前,免疫不育者的实验室诊断主要是针对抗精子抗体。然而,精子抗原是一种复合性抗原,其中的大部分与不育无关。精子特异性乳酸脱氢酶是与不育有密切关系的精子抗原的一种。本研究利用分子克隆的方法构建了人精子特异性乳酸脱氢酶重组载体,将此载体转化 *E. coli* BL21 后在异丙基硫代- β -D-半乳糖苷诱导下,此转化菌可高效表达 rhLDHC4 蛋白,纯化后以此蛋白建立了人血清抗 LDH-C4 抗体(IgG 型)检测的间接 ELISA 方法。实验结果表明:用此方法检测已育者血清和不明原因不育者血清。两者阳性率差别具有显著统计学意义。

1. 本研究将从人睾丸 λ TripEx cDNA 文库中克隆的人精子特异性乳酸脱氢酶 (sperm-specific lactate dehydrogenases, LDH-C4) 与高效原核表达载体 pET-28a(+) 连接, 构建了 pET-28(a+)-hLDHC 重组质粒, 将此质粒转化入大肠杆菌 Eco1. BL21 (DE3)plysS 溶原菌中表达, 在 0.1mM IPTG 诱导下可高效表达可溶性的 rhLDH-C4 蛋白, 经 Ni²⁺-NTA 亲和层析法纯化并用透析带浓缩后, 浓度可达 1.0mg/ml, 1000ml 菌液共可获得目的蛋白约 1.5mg; 以此纯化蛋白作为包被抗原建立人血清抗 LDH-C4 抗体 (IgG 型) 检测的间接 ELISA 方法, 为准确的检测不育患者体内的自身抗体 (LDH-C4 抗体) 提供一种可靠的临床参考指标; 故要求如下:

- (1) pET-28(a+)-hLDHC 原核重组载体的保存及使用。
2. (2) rhLDH-C4 重组蛋白的诱导表达及纯化技术。
3. (3) rhLDH-C4 纯化蛋白在临床上的应用以及以此为原料开发新的试剂盒。

一种用于检测免疫不育相关自身抗体的新型抗原

技术领域

[0001] 生殖免疫学包括生殖道粘膜免疫调节、生育免疫调节、母—胎免疫调节以及生殖内分泌—免疫调节 4 个方面。生殖免疫学认为人类的生殖腺与生殖细胞及其产生的激素都具有抗原性,可导致免疫反应,产生自身抗体,影响生殖过程的各个环节。正常人血清中有多种自身抗体,但其效价很低,不足以引起破坏作用,故称之为“生理性抗体”;但当其效价明显升高后,即引起自身免疫性疾病。1900 年,Meichnikoff 发现精子具有抗原性并能诱导特异性免疫应答的产生。1954 年 Wilson 和 Rumke 首先在男性不育患者血清中发现了抗精子抗体(antisperm antibody, AsAb)。1994 年 Marshburn 等通过众多研究提出:血清和生殖道内的 AsAb 可影响人类的生育能力。有研究指出:由 AsAb 引起的不育占总体不育者的 10%-30%。然而精子抗原是一种复合性抗原,并非所有的抗精子抗体都与不育有关,只有那些针对在受精过程中起关键作用的精子靶抗原的抗精子抗体才有可能影响生育。精子上的与生育无关的无效抗原,可能会降低检测敏感性及特异性,给病人的治疗带来不必要的麻烦。因此,分离纯化精子特异性靶抗原作为包被抗原,是建立准确的检测影响生育的抗精子抗体的方法。

背景技术

[0002] 免疫性不育,在临床上通常是指排除器质性病变之外的“不明原因不育”的病因之一,对于免疫性不育的实验室诊断,目前主要是针对抗精子抗体进行测定。采用的技术包括传统抗原抗体反应、补体结合试验、免疫荧光、免疫珠、酶联免疫吸附法、混合抗球蛋白反应等,检测的临床标本包括血清、宫颈粘液、精浆等。然而,人类精子抗原相当复杂,约有 100 多种,按其特异性分为精子特异性抗原和精子非特异性抗原。它们所诱导产生的抗精子抗体对生育的影响力不尽相同。精子特异性乳酸脱氢酶(sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C4)特异地存在于鸟类和哺乳动物的睾丸和精子中,可催化丙酮酸和乳酸的转化,为精子的运动和存活提供能量,雌性动物和雄性动物的免疫系统均可将其识别为异己成份,作为自身抗原、异型抗原或同种异型抗原,诱导机体产生免疫应答反应。将纯化的 LDHC4 蛋白、经化学修饰的 LDHC4 多肽或构建的 LDHC4-DNA 疫苗免疫实验动物,在动物的血清或生殖道分泌液中均可检测到特异性抗体的存在,且动物的生育率明显降低,说明 LDHC4 抗体可能是抗精子抗体中与生殖密切相关的一种抗体。

发明内容

[0003] (一) 目的

原核表达并纯化制备重组人精子特异性乳酸脱氢酶(rhLDH-C4)抗原,并以此抗原为包被抗原,建立人血清抗 LDH-C4 抗体(IgG 型)检测的间接 ELISA 方法,为更准确的检测免疫性不育患者体内的自身抗体建立一种可靠的方法。并探讨人血清抗 LDH-C4 抗体与不育症的具体关系。

[0004] (二) 技术路线

1 pET-28(a+)-hLDHC 重组载体的构建及鉴定

目的片段的扩增及回收:依据 GenBank 登录的人 LDH-C mRNA (GI:187065) 全长序列,采用 OMIGA 软件,自行设计针对人 LDH-C 全长编码序列两端的引物,并委托上海博亚公司合成。P1 (上游引物): 5' -CCGAAGCTTGCACCAT

GTCAACTGTCAAGGAGCAGC-3',带一个 Hind III 酶切位点(划线处)。P2 (下游引物)序列为 5' -CCGCTCGAGTTAAAATATTAGATCCTTT-

TGAATATTCC-3' 带一个 XhoI I 酶切位点(划线处)。以人睾丸 λ TripEx cDNA 文库为模板,进行编码序列的 PCR 扩增 反应总体积为 50 μ l。体系如下:10 \times PCR 缓冲液 5 μ l,dNTP 混合液 4 μ l,cDNA 模板 1 μ l,上下游引物各 1 μ l,Taq 聚合酶(5U/ μ l) 0.5 μ l, ddH₂O 37.5 μ l。混匀后,94 $^{\circ}$ C 预变性 4 分 30 秒,按下列参数:94 $^{\circ}$ C 30sec,55 $^{\circ}$ C 30sec,72 $^{\circ}$ C 2min,扩增。共 30 个循环。最后一个循环结束后继续在 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min。产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳,切割含预期区带的凝胶块,上海华舜公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收 DNA。具体方法如下:将切下的凝胶块,放入 eppendorf 管中,每 100mg 凝胶块加入 300 μ l S1 缓冲液,置 50 $^{\circ}$ C 水浴 10min 使胶溶解;将溶液移入吸附柱,13000r/min 离心 30s;弃离心液,加入 500 μ l 洗涤缓冲液 W1,13000r/min 离心 15sec。重复此步骤一次;13000r/min 离心 1min 后,将吸附柱放入一新的 1.5ml eppendorf 管中,加入 30 μ l 超纯水,室温静置 1min 后,13000r/min 离心 2min,收集管中离心液。

[0005] 重组载体的构建:将回收的 PCR 产物按如下体系进行限制性内切酶酶切:10 \times 酶切缓冲液 5 μ l,PCR 回收产物(71 μ g /ml)25 μ l,Hind III(10U/ μ l)1 μ l,XhoI I (10U/ μ l)1 μ l, ddH₂O 18 μ l。将原核表达载体(pET-28a 质粒)按如下体系进行限制性内切酶酶切:10 \times 酶切缓冲液 5 μ l,pET-28a 质粒(265 μ g/ml)10 μ l,Hind III(10U/ μ l)2 μ l,XhoI I (10U/ μ l)2 μ l, ddH₂O 31 μ l。

[0006] 将上述反应体系分别混匀后,37 $^{\circ}$ C 水浴箱中反应 3h。酶切后产物与酶切前产物同时做 DNA 凝胶电泳,判断酶切是否完全。在紫外灯下用刀片切下含预期区带的凝胶块,用上海华舜公司 DNA 凝胶回收试剂盒从中回收 DNA。具体方法同前。将回收后的双酶切的 PCR 产物和 pET-28a 质粒按如下体系进行连接:10 \times 连接缓冲液 1 μ l,pET-28a 质粒(38 μ g /ml) 2 μ l,PCR 产物(36 μ g /ml) 3 μ l,T4 DNA 连接酶 0.5 μ l, ddH₂O 3.5 μ l。反应总体积为 10 μ l, 16 $^{\circ}$ C 过夜。

[0007] 表达菌及克隆菌的制备和鉴定:用 CaCl₂ 处理法,制备 E. coli BL21(DE3) plysS 感受态细胞作为表达菌,具体步骤如下:(1)无菌条件下从 37 $^{\circ}$ C 培养的新鲜 E. coli BL21(DE3) plysS 平板中挑取单个菌落接种于 3ml 不含抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床摇菌过夜。(2)将 0.1mol/L CaCl₂ 和 1.5ml eppendorf 管放在冰浴盒内冰浴。(3)取上述过夜菌液 30 μ l 接种于 3ml 不含抗生素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 摇床上剧烈振摇 2h。(4)将菌液移至冰预冷的 1.5ml eppendorf 管中,置冰浴盒内冰浴 5 min。(5)在 4 $^{\circ}$ C 条件下,13000r/min 离心 30s。(6)弃上清,加入冰预冷的 500 μ l 0.1mol/L CaCl₂ 轻轻重悬菌液,使其成均匀混悬状,置冰浴盒内冰浴 5 min。(7)在 4 $^{\circ}$ C 条件下,13000r/min 离心 30s。(8)弃上清,加入冰预冷的 200 μ l 0.1mol/L CaCl₂ 轻轻重悬菌液,4 $^{\circ}$ C 放置 24 h。(9)取出上述感受态细胞,加入 10 μ l 连接产物,轻轻混悬菌液,置冰浴盒内冰浴 30 min。(10)42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 90 s(其间不要摇动 EP 管,休克时间一定要准确),快速将 EP 管放入冰浴盒内冰浴 5min,使

细胞冷却。(11)加入 37℃预温的 LB 液体培养基 900 μ l,37℃摇床温和摇菌 45 min,使细胞复苏。(12)13000r/min 离心 30s,弃去 700 μ l 上清液。(13)用移液器将转化菌轻轻混悬,全部滴加到预温的含 100mg/L 卡那霉素(Kan⁺)的 LB 培养板上,用无菌的弯头玻璃棒均匀涂布。37℃孵箱放置待转化产物完全被培养基吸收后,倒置过夜。(14)次日观察菌落生长情况。按上述制备表达菌的方法制备 E. coli JM109 克隆菌。

[0008] 无菌条件下从 37℃培养的新鲜平板中挑取单个菌落接种于 3ml 不含抗生素的 LB 液体培养基中,37℃摇床摇菌过夜。使用上海华舜公司质粒提取纯化试剂盒抽提重组质粒,具体方法如下:(1) 将过夜培养的 3ml 菌液 13000r/min 离心 1min,弃上清;(2) 加入 250 μ l P1 液,振荡至彻底悬浮;(3) 加入 250 μ l P2 液,立即温和颠倒 eppendorf 管 5~8 次以混匀,室温静置 4 min;(4) 加入 350 μ l P3 液,立即温和颠倒 eppendorf 管 5~8 次以混匀,13000r/min 离心 10min,小心移上清至吸附柱,13000r/min 离心 15sec,弃离心液;(5) 加入 500 μ l B1 液,13000r/min 离心 15sec,弃离心液;(6) 加入 500 μ l W1 液,13000r/min 离心 15sec,弃离心液;(7) 重复步骤(6)一次,13000r/min 离心 1min,将吸附柱放在新的 eppendorf 管上;(8) 加入 50 μ l T1 液,室温静置 1 min,13000r/min 离心 1min,收集离心管中液体;(9) 取适量分别进行 DNA 定量与 Hind III /XhoI I 双酶切鉴定(反应体系如前),以观察是否含有目的片断。重组质粒委托上海博亚生物技术有限公司测序。

[0009] 2 rhLDH-C4 蛋白抗原的原核表达及纯化

重组蛋白抗原的表达:无菌条件下从 37℃培养的新鲜平板中挑取单个转化的表达菌落接种于 3ml 不含抗生素的 LB 液体培养基中,37℃摇床摇菌过夜。取 30 μ l 过夜菌接种于 3ml 含 Kan 的 LB 培养基中,37℃振荡培养至 A600 为 0.4-0.6,加入 IPTG 至终浓度 0.1mM,另一支不加 IPTG 作为诱导前对照,30℃诱导 5h。然后各取 0.5ml 菌液,13000 rpm 离心 3min,弃上清,加入 80 μ l 1 \times PBS 重悬沉淀,再加入 5 \times SDS 凝胶上样缓冲液 20 μ l 混匀,100℃煮沸 5min。5000rpm 离心 10min,取上清在 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳(12%SDS-PAGE)。200V 电压下电泳 55min 后,小心取出凝胶在考马斯亮蓝染色液中染色 2-3h,脱色至背景清楚,在 Flour-S 成像系统中成相并保存。

[0010] 重组蛋白抗原的纯化:按上述诱导表达条件,取诱导后的重组菌液 1000ml 离心,收集菌体,重悬于 10ml 结合缓冲液中。加入 Triton X-100 100 μ l (终浓度为 1%)和溶菌酶(10mg/ml)100 μ l,并加入适量 DNA 酶-I,在液氮中与 37℃(恒温水浴箱中)条件下反复冻融 4 次裂解菌体。4℃条件下,14000rpm \times 10min 离心收集上清。按照 His-融合蛋白纯化试剂盒(Qiagen 公司产品)说明书所述方法进行条件优化后,用 Ni⁺-NTA 亲和层析法对上清中可溶性的 rhLDH-C4 蛋白进行分离纯化。、具体过程如下:(1)取菌体裂解后所得上清 10ml 与 1ml 50% Ni⁺-NTA 混匀。4℃条件下,反复温和振荡使其充分结合后,装 Ni⁺柱;(2) 打开 Ni⁺柱盖子,使柱内液体自然流出,收集穿柱液。(3)用 25ml 洗涤缓冲液洗涤 Ni⁺柱 3 次,收集过柱洗涤液。(4)用洗脱缓冲液过柱洗脱蛋白,每次 1ml,收集每次洗脱液,监测洗脱液乳酸脱氢酶活性,适时终止洗脱。在纯化过程中,用 OLYMPUS AU2700 自动生化分析仪监测纯化前菌体上清及穿柱液、洗涤液、洗脱液中的乳酸脱氢酶活性。将未诱导菌体、诱导后菌体及穿柱液、洗涤液、洗脱液等进行 12%SDS-PAGE 鉴定其内蛋白质成分。

[0011] 纯化蛋白的浓缩及定量:将上述纯化所得的重组蛋白液,装入一透析带中,两端用线扎紧,经 PBS 透析平衡后,埋入装有蔗糖的平皿中。待液体浓缩至理想体积时,用蛋白定

量试剂盒(PIERCE 公司产品)进行蛋白定量,具体方法如下:(1)用试剂盒提供标准品制备蛋白浓度与吸光度标准曲线,输入微量核酸-蛋白定量仪备用。(2)将试剂盒提供的 A 液与 B 液按照 50:1 比例混合,即为工作液。(3)将 25 μ l 待测样品加入 200 μ l 工作液中,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。(4)冷却至室温,在波长 562nm 处测吸光度,微量核酸-蛋白定量仪自动换算蛋白浓度。25 μ l PBS 加入 200 μ l 工作液中作为空白对照调零。取一定量浓缩定量后的纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色后观察电泳区带,以此鉴定纯化蛋白的纯度。1000ml 菌液共可获得目的蛋白约 1.5mg。

[0012] 3 人血清抗 LDH-C4 抗体(IgG 型)间接 ELISA 方法的建立

酶标抗体最适工作浓度的确定:(1)用 100ng/ml 人 IgG 包被酶标板(4 $^{\circ}$ C 18-24h),PBS 洗涤 3 次,每次 5min。(2)将 HRP 标记鼠抗人 IgG 用 1% BSA-PBS 稀释液作一系列稀释(1:2500-1:80000),分别加入 IgG 包被孔内,每孔 100 μ l,室温下反应 2h 后,PBS 洗涤 3 次,每次 5min。(3)加入底物 H₂O₂/TMB,37 $^{\circ}$ C 孵育 20min,加入 2M H₂SO₄ 终止反应后测 OD 值。(4)依据文献,以 OD₄₉₅ 值为 1.0 时的酶标鼠抗人 IgG 抗体稀释度(1:20000)为最适工作浓度。

[0013] 抗原最适包被浓度的确定:(1)将 rhLDH-C4 抗原以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释为 0.000、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 和 4.000 μ g/ml 等一系列浓度,然后加到酶标板的微量孔中,每个浓度的抗原各包被 6 孔,每孔 100 μ l。(2)将酶标板置 4 $^{\circ}$ C 包被过夜(18-24h)。(3)取出板,以 PBS 洗涤 3 次,每次 3min,扣干。(4)每孔加 200 μ l 的封闭液,将酶标板置湿盒内,于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h。(5)取出板,以 PBS 洗涤 3 次,每次 3min,扣干。(6)每一包被浓度分别加 1:100 稀释的阳性对照血清(PC)、阴性对照血清(NC)及稀释液(空白对照),各 2 孔,每孔 100 μ l。(7)将酶标板置湿盒内,于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。以 0.05%Tween-20-PBS 洗涤 5 次,每次 3min,扣干。(8)每孔加 1:20000 稀释的酶标抗体,每孔 100 μ l。置湿盒内,于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。(9)PBS 洗涤 5 次,每次 3min,扣干。每孔加 100 μ l 的底物液,37 $^{\circ}$ C 作用 20min。(10)以 2M H₂SO₄ 终止反应,每孔 50 μ l。(11)在 495nm 的波长下读取各孔 OD 值,以 OD 阳性对照/OD 阴性对照比值最大者为最适抗原包被浓度(1.000 μ g/ml)。

[0014] 临界值(cut-off)的确定:以确定的最适抗原包被浓度及酶标抗体工作浓度,测定 25 份处女(小于 10 岁)血清标本 OD 值,计算其均数()及标准差(SD)。以处女血清标本 OD 值的平均值加 3 个标准差作为阳性血清标本的判定临界值(cut-off),即 cut-off=+3SD;OD 值 \geq cut-off 判定为阳性,OD 值< cut-off 判定为阴性。

[0015] 重复性检测:取建立的 ELISA 法检测阳性和阴性的血清标本各一份,分别同时测定 4 孔,计算其批内变异系数;不同时间点先后 4 次测定同一份阴性血清标本和同一份阳性血清标本,计算其批间差异;当批间及批内差异均小于 10%时,说明所建立的 ELISA 方法稳定性良好。

[0016] (三)效果

以 100ng/ml 人 IgG 包被酶标板,与一系列稀释的鼠抗人 IgG(HRP)酶标抗体反应后确定 1:20000 为酶标抗体最适工作浓度,1 μ g/ml 为 rhLDH-C4 抗原最适包被浓度,判定临界值(CUT-OFF)确定为 0.110,重复性检测显示批内,批间差异均小于 10%,说明所建立的间接 ELISA 方法重复性良好。应用本实验建立的方法与 ASA 免疫胶体金检测试剂盒同时检测 47 份血清标本,ASA 免疫胶体金检测试剂盒阳性率为 21.28%。而抗 LDH-C4 抗体检测的间接 ELISA 方法检测阳性率为 40.43%,SPSS 12.0 统计软件计算,卡方值(χ^2)为 4.27,

$P < 0.05$, 说明两种检测方法检测结果存在明显差异。究其原因可能是:免疫胶体金检测试剂盒检测的是复合 ASA, 其所用的包被抗原是一种复合抗原(即可溶性精子膜抗原), 其抗原成分复杂, 其中大部分抗原与不育无关, 甚至一部分与不育密切相关的抗原成分由于制作工艺的缺陷而丢失或含量降低, 故其检测结果经常不可靠, 缺乏临床参考价值。而本实验建立的 ELISA 方法是以单一精子特异性 rhLDH-C4 作为包被抗原, 仅针对血清 LDH-C4 抗体进行检测, 它避免了包被抗原中可能混有其它非特异蛋白成分对结果造成的干扰, 大大地提高了检测的敏感性及特异性。

[0017] 四 具体实施方式

用本研究建立的间接 ELISA 方法检测 74 份已育者血清标本和 177 份不明原因不育者血清标本。结果显示:不育者血清标本阳性率为 30.51%, 已育者血清标本阳性率仅为 9.46%。应用 SPSS 12.0 统计软件计算, 卡方值(χ^2)为 12.57, $P < 0.005$, 说明两者阳性率差别具有显著统计学意义, 已育者血清标本出现阳性可能是由于:生育后由于各种原因, 已育夫妇体内发生了免疫性不育, 而取样时仍将其当成可育。

专利名称(译)	一种用于检测免疫不育相关自身抗体的新型抗原		
公开(公告)号	CN103175952A	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201110435317.4	申请日	2011-12-22
[标]发明人	兰风华		
发明人	兰风华		
IPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测免疫不育相关自身抗体的新型抗原，该发明属生殖免疫学免疫不孕领域。目前，免疫不育者的实验室诊断主要是针对抗精子抗体。然而，精子抗原是一种复合性抗原，其中的大部分与不育无关。精子特异性乳酸脱氢酶是与不育有密切关系的精子抗原的一种。本研究利用分子克隆的方法构建了人精子特异性乳酸脱氢酶重组载体，将此载体转化E.coliBL21后在异丙基硫代-β-D-半乳糖苷诱导下，此转化菌可高效表达rhLDHC4蛋白，纯化后以此蛋白建立了人血清抗LDH-C4抗体(IgG型)检测的间接ELISA方法。实验结果表明：用此方法检测已育者血清和不明原因不育者血清。两者阳性率差别具有显著统计学意义。