



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102775486 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110123239. 4

(22) 申请日 2011. 05. 12

(71) 申请人 李锐

地址 200030 上海市徐汇区中漕路 111 号 2
号楼 707 室

(72) 发明人 蔡逸强 闵洪中 李锐

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006. 01)

C07K 19/00 (2006. 01)

C07K 16/18 (2006. 01)

C12N 15/12 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

监测肾损伤的新型试剂和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及监测肾损伤的新型试剂和试剂盒。本发明人从全长的 NGAL 鉴定出关键的抗原决定簇,以含有这些关键抗原决定簇的短肽混合物作为免疫原,获得了特异性抗 NGAL 的多克隆抗体。本发明提供的抗原片段及其多克隆抗体,制备方法简单,效价高,特异性强,灵敏度高。

1. 一种分离的多肽,其特征在于,它是如 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽,所述的多肽来源于嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白。
2. 一种分离的多核苷酸,其特征在于,它编码权利要求 1 所述的多肽。
3. 一种多肽混合物,其特征在于,其由 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽混合而成。
4. 如权利要求 3 所述的多肽混合物,其特征在于,SEQ ID NO :1 和 SEQ IDNO :2 所示氨基酸序列的多肽混合的比例按照重量比为 1 : 5 ~ 5 : 1。
5. 权利要求 3 或 4 所述的多肽混合物的用途,用于制备特异性抗嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白的抗体。
6. 一种用于检测肾损伤的抗体,其是由权利要求 3 或 4 所述的多肽混合物免疫动物而获得。
7. 如权利要求 6 所述的抗体,其特征在于,所述的抗体是多克隆抗体。
8. 一种制备抗体的方法,其特征在于,所述方法包括:
以权利要求 3 或 4 所述的多肽混合物免疫动物,从免疫后的动物体内分离出特异性抗嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白的抗体。
9. 一种用于检测肾损伤的试剂盒,其特征在于,包括:
固相载体,以及位于固相载体上的多克隆抗体,该多克隆抗体由权利要求 3 或 4 所述的多肽混合物免疫动物而获得。
10. 如权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述的固相载体是包被板、试纸和 / 或微球。

监测肾损伤的新型试剂和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和免疫性领域；更具体地，本发明涉及监测肾损伤的新型试剂和试剂盒。

背景技术

[0002] 嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白 (NGAL) 以往作为一种中性粒细胞激活标志为人们所知，当入侵微生物引起中性粒细胞脱颗粒和颗粒蛋白胞吐时，NGAL 被释放到血液中。后来，NGAL 被报导可作为尿生物标记，用来检测肾小管细胞损伤的早期发作。美国专利申请 2005/0272101 公开了血清中 NGAL 用于同样的目的。PCT 申请 W02006/066587 公开了怎样利用尿或血浆或血清中的 NGAL 进行检测。因此，NGAL 已经作为一种疾病发作的标记物被人们研究和应用。人 NGAL 共包括 198 个氨基酸。

[0003] 尽管 NGAL 作为疾病诊断的标志物已经为人们所了解，然而由于它的全长蛋白本身免疫原性并不理想，免疫获得抗体的过程中还存在抗体效价差，不稳定的缺陷。

[0004] 因此，本领域还有必要进一步优化针对以上检测 NGAL 的抗体，以期提高肾损伤诊断的准确率。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种监测肾损伤的新型试剂和试剂盒。

[0006] 在本发明的第一方面，提供一种分离的多肽，它是如 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽，所述的多肽来源于嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白 (NGAL)。

[0007] 在本发明的另一方面，提供一种分离的多核苷酸，它编码所述的多肽。

[0008] 在本发明的另一方面，提供一种多肽混合物，其由 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽混合而成。

[0009] 在一个优选例中，SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽混合的比例按照重量比为 1 : 5 ~ 5 : 1。

[0010] 较佳地，SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽混合的比例按照重量比为 1 : 3 ~ 3 : 1。

[0011] 在本发明的另一方面，提供所述的多肽混合物的用途，用于制备特异性抗嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白的抗体。

[0012] 在本发明的另一方面，提供一种用于检测肾损伤的抗体，其是由所述的多肽混合物免疫动物而获得。

[0013] 在一个优选例中，所述的抗体是多克隆抗体。

[0014] 在本发明的另一方面，提供一种制备抗体的方法，所述方法包括：以所述的多肽混合物免疫动物，从免疫后的动物体内分离出特异性抗嗜中性粒细胞明胶酶相关性脂运蛋白的抗体。

[0015] 在本发明的另一方面，提供一种用于检测肾损伤的试剂盒，包括：

[0016] 固相载体,以及位于固相载体上的多克隆抗体,该多克隆抗体由所述的多肽混合物免疫动物而获得。

[0017] 在一个优选例中,所述的固相载体是包被板、试纸和 / 或微球。

[0018] 在另一优选例中,所述的检测试剂盒还包括:标记的检测抗体,显色剂,洗涤液,终止液和 / 或使用说明书。

[0019] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0020] 图 1、ELISA 反应后,在 A405nm 测酶标板上各孔的吸光度,所获得的读数。其中 A、B 行微孔中包被 SEQ ID NO:1 多肽;在 C、D 行微孔中包被 SEQ ID NO:2 多肽。1、2 列为 #YZ2391 号兔子 1 : 1000 稀释度的血清(多抗);3、4 列为 #YZ2391 号兔子 1 : 10,000 稀释度的血清;5、6 列为 #YZ2391 号兔子 1 : 100,000 梯度稀释血清;7、8 列为 #YZ2392 号兔子 1 : 1000 稀释度的血清;3、4 列为 #YZ2392 号兔子 1 : 10,000 稀释度的血清;5、6 列为 #YZ2392 号兔子 1 : 100,000 梯度稀释血清。A、C 孔加入预免疫血清;B、D 孔加入最终获得的血清。

[0021] 图 2、SEQ ID NO:1(上图)、SEQ ID NO:2(下图)分别免疫 #YZ2392 号兔子后不同稀释度的抗体的滴度(效价)测定结果。

具体实施方式

[0022] 在本领域人员的实践中经常发现,由于蛋白的抗原决定簇易于被包埋在蛋白空间结构的内部,因此难以找到一种特异性高的抗体。针对上述技术难题,为了高效获得检测 NGAL 肾损伤标志物的特异性抗体,本发明人经过深入的研究,从全长的 NGAL 上分别鉴定出关键的抗原决定簇,以含有这些关键抗原决定簇的短肽混合物作为免疫原,分别获得了特异性抗 NGAL 的多克隆抗体。本发明提供的抗原片段及其多克隆抗体,制备方法简单,效价高,特异性强,灵敏度高。

[0023] 本发明中,“分离的多肽”是指多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质,本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化该多肽,基本上纯的多肽在非还原聚丙烯酰胺凝胶上产生单一的主带。

[0024] 本发明的 SEQ ID NO:1-2 任一所述的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽,优选合成多肽。本发明所述的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如,细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。

[0025] 编码所述的多肽的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。

[0026] 编码本发明的多肽的多核苷酸通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法,可根据本发明所公开的核苷酸序列,尤其是开放阅读框序列来设计引物,并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板,扩增而得有关序列。一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明的多肽的 DNA 序列。

[0027] 本发明还提供了一种多肽混合物,其由 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的多肽混合而成。

[0028] 多肽制备成混合物联合用于作为免疫原进行动物免疫,可获得高效价的抗体,免疫的效果显著优于单条多肽的免疫。

[0029] 本发明还提供了可特异性识别 NGAL 的抗体。这里,“特异性”是指抗体能识别和结合于 NGAL 蛋白,但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。

[0030] 本发明更优选多克隆抗体,本发明中,所用的术语“多克隆抗体”(多抗)指一组与抗原具有特异性结合能力的球蛋白,其是由抗原刺激机体,产生免疫学反应后,由机体的浆细胞合成并分泌的。抗原通常是由多个抗原决定簇组成的,由一种抗原决定簇刺激机体,由一个 B 淋巴细胞接受该抗原所产生的抗体称之为单克隆抗体。由多种抗原决定簇刺激机体,相应地就产生各种各样的单克隆抗体,这些单克隆抗体混杂在一起就是多克隆抗体。多克隆抗体的好处在于它们的效价高,特异性高,亲和力强,灵敏度好,便于人为处理和质量控制,此外,多克隆抗体制备相对容易,更为经济。

[0031] 多克隆抗体可用本领域技术人员熟知的各种方法来制得。本发明的多肽混合物,可被施用于动物(如兔,小鼠,大鼠等;较佳地是兔)以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达本发明的多肽的细胞也可用来免疫动物来生产抗体。多克隆抗体可以用淋巴结注射法,皮下多点注射法,多途径联合注射法等免疫方法制得。实施例中采用多肽混合物与弗氏佐剂混合后,背部皮下多点注射,免疫新西兰兔;并进行加强免疫;最终获得高效价的多克隆抗体。

[0032] 利用本发明的多肽混合物,也可以生产单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, *Nature* 256 :495, 1975; Kohler 等人, *Eur. J. Immunol.* 6 : 511, 1976; Kohler 等人, *Eur. J. Immunol.* 6 :292, 1976; Hammerling 等人, *In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N. Y., 1981)。

[0033] 多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。

[0034] 本发明还提供了检测样品中是否存在 NGAL 的方法,是利用本发明制备的抗 NGAL 的特异性多克隆抗体进行检测,它包括:将样品与抗 NGAL 的特异性多克隆抗体接触;观察是否形成抗体复合物,形成了抗体复合物就表示样品中存在 NGAL。抗 NGAL 的特异性多克隆抗体用于检测 NGAL 蛋白,可以用本领域技术人员熟知的各种按照抗原抗体体外特异性结合的原理设计的方法来达到,例如蛋白免疫印迹实验,免疫共沉淀实验等。

[0035] 本发明还提供了一种检测肾损伤试剂盒,其中含有本发明的抗体,较佳地是多克隆抗体。较佳地,所述的检测试剂盒包括:

[0036] 固相载体,以及位于固相载体上的多克隆抗体,该多克隆抗体由所述的多肽混合物免疫动物而获得。

[0037] 所述的固相载体可以是包被板、试纸和/或微球。从而通过免疫检测试纸,胶体金等技术来进行检测。

[0038] 此外,所述的检测试剂盒还包括:标记的检测抗体,显色剂,洗涤液,终止液和/或使用说明书。可根据检测方法的不同来调整这些试剂。

[0039] 本发明的主要优点在于:

[0040] (1) 本发明首次鉴定到了 NGAL 蛋白序列中的关键抗原决定簇,以含有这些关键抗原决定簇的短肽混合物作为免疫原,获得的抗体效价高,识别抗原的特异性好。

[0041] (2) 利用短肽来制备多克隆抗体,短肽合成方法简单。

[0042] (3) 本发明提供的抗原片段及其多克隆抗体,制备方法简单,效价高,特异性强,灵敏度高。

[0043] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,科学出版社,2002 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0044] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0045] 实施例 1、特异的 NGAL 氨基酸片段序列及其产物的混和物作为免疫原

[0046] NGAL 蛋白的全长氨基酸序列如下:

[0047] NGAL 蛋白的全长氨基酸(人源,198aa),序列如下(SEQ ID NO :3):

[0048] MPLGLLWLGL ALLGALHAQA QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFQGK

[0049] WYVVGLAGNA ILREDKDPQK MYATIYELKE DKSYNVTSVL FRKKKCDYWI

[0050] RTFVPGCQPG EFTLGNIKSY PGLTSYLVRV VSTNYNQHAM VFFKKVSQNR

[0051] EYFKITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG

[0052] 由于全长序列作为免疫原存在合成难且免疫原性不强的缺点,本发明人根据以上全长序列,采用常规方法人工合成各种长度的序列片段,以片段作为免疫原,反复测试各种免疫原的免疫效果。最终,获得了适合的免疫原,其包括来自 NGAL 的两个多肽片段,序列(N → C 端)如下:

[0053] CREDKDPQKMYATIYELKEDKS(SEQ ID NO :1);

[0054] CYNQHAMVFFKKVSQNR(EY)(SEQ ID NO :2)。

[0055] 两条多肽片段以质量比 1 : 1 进行混合,获得多肽混合物。以该混合物作为生产特异性多克隆抗 NGAL 抗体的特异免疫原。以这两个片段的混和物免疫动物后,可获得有高效价、高免疫原性(即高抗原性)的特异性多克隆抗体。

[0056] 实施例 2、特异性多克隆抗 NGAL 抗体的产生

[0057] 分别以上述实施例 1 制备的特异性多肽的混和物作为免疫原与血蓝蛋白(KLH)偶联,免疫新西兰大白兔而产生的免疫血清。动物免疫的方法和程序如下:

[0058] 1) 免疫两只新西兰雄兔(#YZ2391 ;#YZ2392),采集免疫前血清并 -20℃ 存贮。

[0059] 2) 首次免疫取与血蓝蛋白(KLH)偶联好的免疫原与等量弗氏完全佐剂乳化抗原(抗原:弗氏完全佐剂=1 : 1(v/v)),背部多点注射。首次免疫的注射量是 400 μg 多肽混和物。

[0060] 3) 14 天后,用弗氏完全佐剂乳化抗原(抗原:弗氏完全佐剂=1 : 1(v/v)) 重复背部多点注射加强免疫。加强免疫的注射量是 400 μg 多肽混和物。

[0061] 4) 28 天后,使用同样剂量多肽与等体积的不完全弗氏佐剂混合,背部多点注射加强免疫。

- [0062] 5) 42 天后, 同步步骤 4) 背部多点注射加强免疫。
- [0063] 6) 70 天后, 同步步骤 4) 背部多点注射加强免疫。
- [0064] 7) 77 天后, 颈动脉采血取血清, -70°C 存放。
- [0065] 获取特异性抗体后, 进行 ELISA 以及 WESTERN BLOT 验证抗体的效价以及识别抗原的性能。
- [0066] ELISA 方法如下:
- [0067] 采用直接法, 将合成多肽包被在 96 孔酶标板中, 加入免疫后血清, 对照为免疫前血清。按照。
- [0068] 材料:
- [0069] 1、包被抗原: 将多肽抗原包被在 96 孔酶标板中, $0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /孔;
- [0070] 其中在酶标板的 A、B 行微孔中包被 SEQ ID NO:1 多肽; 在 C、D 行微孔中包被 SEQ ID NO:2 多肽。
- [0071] 2、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体;
- [0072] 3、抗体或酶交联物的稀释: 用含 0.05% (v/v) 吐温 20 的 $1\times\text{PBS}$ 溶液配制 1.0% (v/v) BSA 溶液, 其中含有正常山羊 IgG, 浓度为 $0.1\text{mg}/\text{ml}$;
- [0073] 4、洗脱液: 含 0.05% (v/v) 吐温 20 的 PBS 溶液;
- [0074] 5、ABTS 底物。
- [0075] 方法:
- [0076] 1、在酶标板每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 10 倍比稀释的本实施例上述制备的多克隆抗体, 在 37°C 下孵育 30 分钟;
- [0077] 2、洗脱: 用缓冲液加入 96 孔酶标板内, $300\text{--}360 \mu\text{l}$ /孔, 3min 后, 将洗液轻轻甩出, 倒置于纸上拍干, 重复二次;
- [0078] 3、每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 (1 : 2000), 在 37°C 下孵育 30 分钟;
- [0079] 4、洗脱, 将洗脱液加入 96 孔酶标板内, $300\text{--}360 \mu\text{l}$ /孔, 3min 后, 将洗脱液轻轻甩出, 倒置于纸上拍干, 重复二次;
- [0080] 5、每孔加入 $100 \mu\text{l}$ ABTS 底物溶液, 在室温下孵育 10-20 分钟;
- [0081] 6、酶标仪分析: 在 405nm 波长下读数。
- [0082] 图 1 为酶标板上各孔的读数。
- [0083] ELISA 结果显示, 所获得的多克隆抗体可以特异性地识别 NGAL 的两个多肽片段。图 2 为 SEQ ID NO:1(上图)、SEQ ID NO:2(下图) 分别免疫 #YZ2392 兔子后不同稀释度的抗体的滴度(效价) 实验结果。结果显示, 免疫后血清中抗体滴度均非常高。也即, 该多克隆抗体效价可达到 1 : 100,000。
- [0084] WESTERN BLOT 结果显示, 所获得的多克隆抗体可以特异性地结合全长的 NGAL 以及 NGAL 的两个多肽片段。
- [0085] 实施例 3、试剂盒
- [0086] 所述的试剂盒包括:
- [0087] 容器 1, 以及装于容器的前述实施例 2 制备的多克隆抗体;
- [0088] 容器 2, 以及装于容器的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 多克隆抗体。

[0089] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 李, 锐

<120> 监测肾损伤的新型试剂和试剂盒

<130> 112700

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 1

Cys Arg Glu Asp Lys Asp Pro Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu
 1 5 10 15

Leu Lys Glu Asp Lys Ser
 20

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 2

Cys Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys Lys Val Ser Gln Asn
 1 5 10 15

Arg Glu Tyr

<210> 3

<211> 198

<212> PRT

<213> 智人(Homo Sapiens)

<400> 3

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro

[0002]

	20		25		30
Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln					
	35		40		45
Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu					
	50		55		60
Asp Lys Asp Pro Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu					
	65		70		80
Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys					
		85		90	95
Asp Tyr Trp Ile Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe					
		100		105	110
Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val					
		115		120	125
Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys					
		130		135	140
Lys Val Ser Gln Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg					
		145		150	155
Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser					
		165		170	175
Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile					
		180		185	190
Asp Gln Cys Ile Asp Gly					
		195			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.179	0.168	0.144	0.146	0.147	0.139	0.128	0.132	0.124	0.126	0.121	0.127
B	2.229	1.920	0.769	0.551	0.315	0.241	2.562	2.434	1.897	1.814	0.758	0.773
C	0.084	0.073	0.075	0.076	0.080	0.083	0.092	0.092	0.103	0.093	0.075	0.068
D	0.216	0.177	0.095	0.091	0.083	0.086	0.462	0.417	0.126	0.119	0.096	0.079
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

图 1

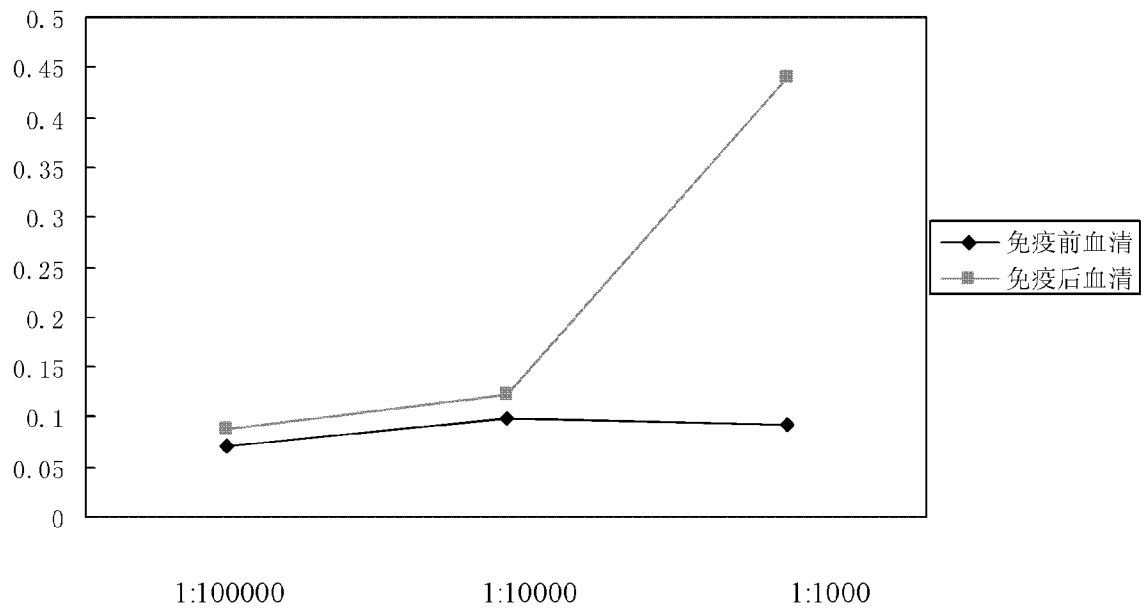
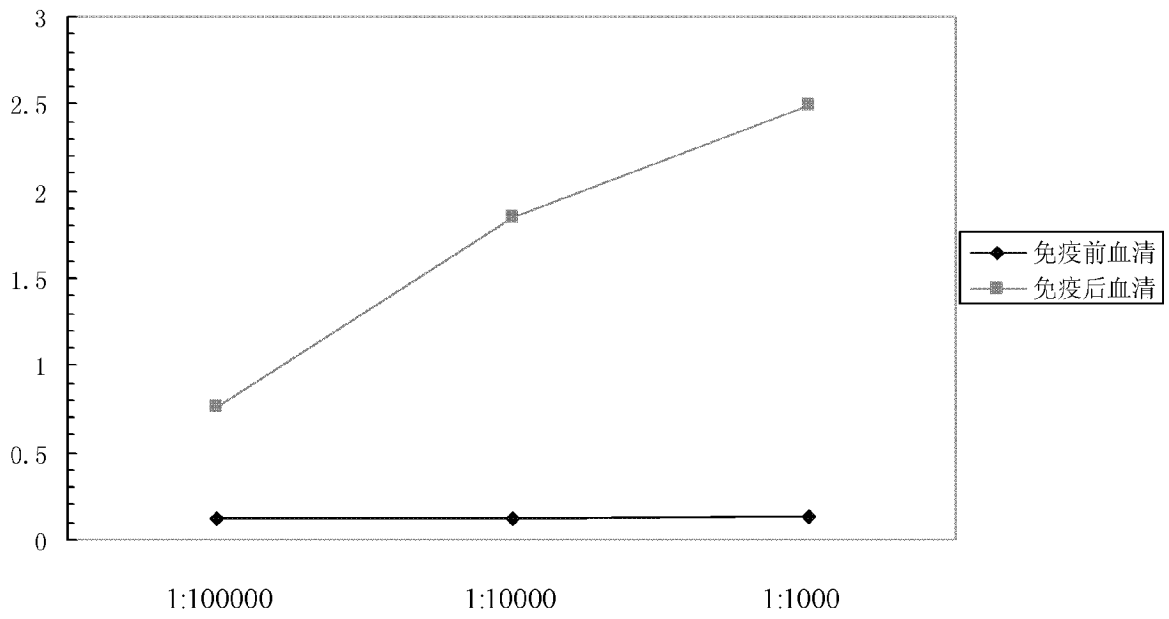


图 2

