

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710075744.X

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101367867A

[22] 申请日 2007.8.14

[21] 申请号 200710075744.X

[71] 申请人 深圳市达科为生物技术有限公司

地址 518067 广东省深圳市南山区蛇口工业  
六路科健大厦四楼

[72] 发明人 朱义鑫

[74] 专利代理机构 深圳创友专利商标代理有限公司  
代理人 罗 瑶

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

特异性检测结核杆菌感染的多肽、方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种具有结核杆菌免疫原性多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No. 2 所示的序列。本发明还公开了利用上述多肽检测生物样品是否感染结核杆菌的 ELISPOT 方法，以及包含上述多肽的试剂盒。采用本发明的多肽、方法及试剂盒进行结核杆菌感染性检测时，假阳性率大大降低，而真阳性率保持不变。

1、一种具有结核杆菌免疫原性的多肽，其特征在于：所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

2、根据权利要求 1 所述的一种具有结核杆菌免疫原性的多肽，其特征在于：所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

3、一种采用酶联免疫斑点试验（ELISPOT）检测生物样品是否感染结核杆菌的方法，所述方法包括分离生物样品的淋巴细胞，并用结核杆菌特异性抗原进行刺激，其特征在于：所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

5、一种用于检测生物体是否感染结核杆菌的试剂盒，所述试剂盒中包含结核杆菌特异性抗原，其特征在于：所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

6、根据权利要求 5 所述的试剂盒，其特征在于：所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

## 特异性检测结核杆菌感染的多肽、方法及试剂盒

### 技术领域

本发明涉及免疫学领域，特别是涉及能够特异性检测结核杆菌感染的多肽、方法及试剂盒。

### 背景技术

结核病（包括肺结核）是一种严重威胁人类健康的传染性疾病。诊断结核病的方法有痰涂片检查、病原体培养、结核菌素皮下注射等传统方法和新兴的ELISPOT免疫诊断方法。新兴的ELISPOT诊断方法能将结核杆菌的感染者与仅仅是注射了卡介苗的人相区别，所以比起传统的方法，在灵敏度与特异性上都有很大的提高。

ELISPOT方法诊断结核病的技术原理如下：取被诊断者的血液，分离出血液中的淋巴细胞，然后用结核杆菌特异性的抗原刺激这些细胞。如果被诊断者是结核病感染者，那它的细胞就会在体外对结核杆菌抗原表现出阳性反应，这种阳性反应可以通过ELISPOT技术以一系列的斑点（spot）的方式显示出来。否则就是阴性反应，不会出现斑点。

因此，决定结核病ELISPOT诊断技术特异性的物质就是用于刺激的结核杆菌抗原，它必须是结核杆菌特有的抗原，并且不能与人类自身抗原产生交叉反应。否则，应用该方法诊断的特异性会降低，假阳性与假阴性会增加。

目前，常见的采用ELISPOT方法诊断结核病的方案有两种，一种是英国Immunotec公司的商业化的结核病诊断试剂盒TB-SPOT；另一种是以意大利科学家Paolo Scarpellini为代表的科研用途的结核病诊断方案，该方案在文献Selected Pool of Peptides from ESAT-6 and CFP-10 Proteins for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection（该文献的PubMed号为15297485）中有详细的说明。

这两种方案都使用了结核杆菌的两个蛋白ESAT-6和CFP-10上的多肽片段作为结核杆菌抗原，用作诊断用的ELISPOT刺激物。CFP-10上的多肽片段51-70（即取自该蛋白的第51-70氨基酸组成的多肽，序列为AQAAVVRFQEAANKQKQELD）（序列表中Seq ID No.1）以其强烈的细

胞免疫原性，是目前所有结核病 ELISPOT 诊断方案中的必选多肽。在其它多肽的选择上，这两种方案有些多肽相同，有些有差别。

但是，我们在实际的研究中，发现作为刺激物的多肽 CFP-10 51-70 的特异性不够理想，具体表现为假阳性偏高。也就是说，容易把非结核菌感染者诊断为结核病人。但是如果去掉这条多肽，剩下的多肽的刺激强度又不够，容易漏检真正的结核病人，也就是说假阴性偏高。因此，面对现有结核病 ELISPOT 诊断技术这一缺点，迫切需要开发新的技术来解决这一问题。

### 发明内容

本发明的目的就是针对现有技术的上述问题，提供一种既能够大大降低检测的假阳性率同时保证检测准确性的结核杆菌特异性抗原多肽。

本发明的另一目的在于提供一种利用上述多肽，采用酶联免疫斑点试验（ELISPOT）检测生物样品是否感染结核杆菌的方法。

本发明的再一目的在于提供一种包含上述多肽并用于检测生物体是否感染结核杆菌的试剂盒。

为实现上述目的，本发明采用了以下技术方案：

本发明公开了一种具有结核杆菌免疫原性的多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

优选的，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

本发明进一步公开了一种采用酶联免疫斑点试验（ELISPOT）检测生物样品是否感染结核杆菌的方法，所述方法包括分离生物样品的淋巴细胞，并用结核杆菌特异性抗原进行刺激，所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

优选的，所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

本发明还公开了一种用于检测生物体是否感染结核杆菌的试剂盒，所述试剂盒中包含结核杆菌特异性抗原，所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

优选的，所述结核杆菌特异性抗原包含一种多肽，所述多肽含有序列表中 Seq ID No.2 所示的序列。

由于采用了以上技术方案，使本发明具备了以下有益效果：

由于选用了特定的抗原性多肽，采用本发明的多肽、方法及试剂盒进行结核杆菌感染性检测时，假阳性率大大降低，而真阳性率保持不变。

### 具体实施方式

经过精细的生物信息学研究和反复的临床验证实验，我们找到了结核杆菌多肽CFP-10 51-70作为刺激物的特异性差的真正原因。因为CFP-10 51-70的局部序列与人类基因组中的一个蛋白家族myosin 18A高度相似，进而导致二者存在细胞免疫学意义上的交叉反应。CFP-10 51-70中的第10-19个氨基酸的序列为：EAANKQKQEL，而人类myosin 18A蛋白家族的isoform a (gi:28416946) 及isoform b (gi:42794779) 的第1784-1793个氨基酸的序列为EEANKEKQEL。可以看到，在这个局部的epitope上，9个氨基酸中，竟有7个完全相同。生物信息学的研究表明，二者的结构非常相似。

Myosin基因家族是人类细胞中表达量极其丰富的一个蛋白家族，比如组成肌肉的肌球蛋白就是它的成员myosin 2。另有Myosin 1、2、5都存在于非肌细胞中，2型参与形成应力纤维和胞质收缩环，1、5型结合在膜上与膜泡运输有关，神经细胞富含myosin 5。目前对myosin 18A的研究还不是很充分，不知道它的具体功能。但是有一点非常明确，myosin 18A也是一种在细胞中大量表达的蛋白。

根据独特型免疫网络学说理论，为了维持人类免疫系统的平衡，每一种人类自身抗原都会产生相应的自身抗体或者自身抗原致敏的T细胞。由于二者之间能保持一种恰当的平衡，这些自身免疫拮抗不仅没有害，而且对于维持免疫系统的正常功能是必须的。正是由于这类对自身myosin 18A蛋白致敏的T淋巴细胞的存在，如果用灵敏度极高的ELISPOT技术，采用和人类自身myosin 18A蛋白有交叉反应的CFP-10 51-70多肽作为刺激物，可以在正常人也检测出弱阳性反应。这就是现在结核病ELISPOT诊断中特异性不高（具体表现为假阳性偏高）的真正原因。

本发明就是要消除这种交叉反应，提高结核病 ELISPOT 诊断中的特异性。

由于我们找到了导致现有结核病ELISPOT诊断方法特异性不高的真正原因，所以我们可以采取正确的措施来消除这种细胞免疫学上的交叉反应，从而提高诊断的特异性。经过研究，我们采用了氨基酸保守替代法，即对

多肽CFP-10 51-70上的关键氨基酸进行保守替代, 让其在保持结核杆菌免疫原性的同时, 消除与人类myosin 18A蛋白抗原的交叉反应。

经过反复的研发与临床实验, 我们将CFP-10 51-70上的第17个氨基酸谷氨酰胺 (Q) 替换成谷氨酸(E), 从而获得了一条既能保持结核杆菌免疫原性, 又能消除与人类myosin 18A蛋白抗原的交叉反应的新刺激物, 我们命名为DKW 51-70, 其序列为AQAAVVRFQEAANKQKEELD (序列表中Seq ID No.2)。生物信息学的研究表明, 这个氨基酸的替换发生在引起交叉反应的7个相同氨基酸序列的核心部位, 使得二者被混合识别而产生交叉反应的概率大大降低。同时, 用谷氨酸代替谷氨酰胺又属于同源替换, 替换之后仍然可以代表结核杆菌的抗原 (但是已经不能代表人类基因myosin 18A的抗原了), 仍然可以有效刺激结核病人的T淋巴细胞。

我们的临床实验也证实了这种替换带来的积极效果。采用新刺激物DKW 51-70 替换掉原来的 CFP-10 51-70 之后, 结核病 ELISPOT 诊断试剂盒的假阳性率明显下降, 而真阳性率维持不变。

下面通过具体的实施例对本发明作进一步的详细描述。

### 实施例 1

选择58名健康志愿者, 经过传统的结核杆菌素皮试检测均为阴性反应。采用常规方法提取每一健康志愿者血液中的淋巴细胞, 并把他们的淋巴细胞分作两部分, 分别做结核病ELISPOT检查。

具体步骤按照文献Selected Pool of Peptides from ESAT-6 and CFP-10 Proteins for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection (PubMed 15297485) 所列的方法进行。其中第一部分使用的刺激多肽库完全采用该文献中所列的多肽库, 即含有多肽CFP-10 51-70 (Seq ID No.1)。第二部分使用同样的多肽库, 但将其中的CFP-10 51-70替换为本发明的多肽DKW 51-70 (Seq ID No.2)。

健康志愿者都不应该出现阳性反应, 凡是出现阳性反应的都属于假阳性。结果使用CFP-10 51-70的试剂组, 有12名出现假阳性反应, 假阳性率22%; 使用DKW 51-70的试剂组只有7名出现假阳性反应 (其中5名CFP-10 51-70也诊断为阳性), 假阳性率12%。由此看出, 采用本发明的多肽进行结核杆菌感染性检测, 假阳性率明显降低。

## 实施例 2

选择23名临床诊断为结核病患者的人。采用常规方法提取病人血液中的淋巴细胞，并把他们的淋巴细胞分作两部分，分别做结核病ELISPOT检查。

具体步骤按照文献Selected Pool of Peptides from ESAT-6 and CFP-10 Proteins for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection (PubMed 15297485) 所列的方法进行。其中第一部分使用的刺激多肽库完全采用该文献中所列的多肽库，即含有多肽CFP-10 51-70 (Seq ID No.1)。第二部分使用同样的多肽库，但将其中的CFP-10 51-70替换为本发明的多肽DKW 51-70 (Seq ID No.2)。

结果两个试剂组中，都有20名出现阳性反应，诊断的灵敏度完全相同，都是87%。这说明，对于结核病患者，本发明的多肽DKW 51-70 (Seq ID No.2) 与现有的CFP-10 51-70 (Seq ID No.1) 相比，可以获得完全相同的刺激效果，真阳性率保持不变。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。



