



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085656 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510555637. 1

A61P 37/02(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 09. 01

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号基础医学研究所

(72) 发明人 王仁喜 肖鹤 韩根成 陈国江 黎燕 沈倍奋 侯春梅 王小茜 魏寅祥 刘晓玲 张玉

(74) 专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司 11279

代理人 孟祥斌 朱萍

(51) Int. Cl.

C07K 14/54(2006. 01)

C12P 21/02(2006. 01)

C07K 16/24(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

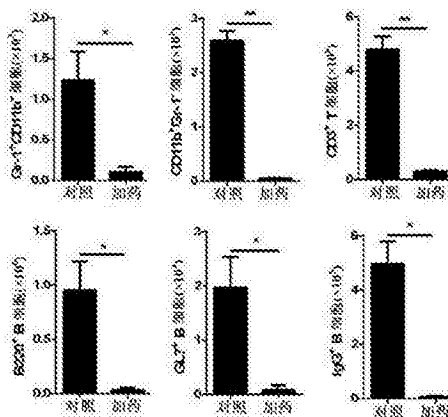
权利要求书1页 说明书17页
序列表7页 附图4页

(54) 发明名称

P19/Ebi3 复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊治中的应用

(57) 摘要

本发明公开了 P19/Ebi3 复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊断、治疗中的用途。实验证明,与正常小鼠相比,系统性红斑狼疮小鼠中的 P19/Ebi3 复合物高水平表达,且使用抗 P19/Ebi3 蛋白的多克隆抗体可以降低小鼠体内抗体的表达水平及免疫细胞的数目,表明可以通过制备抗 P19/Ebi3 的抗体来治疗系统性红斑狼疮,因此 P19/Ebi3 复合物及其抑制剂用于制备诊治系统性红斑狼疮药物,具有良好的开发前景。



1. 一种分离的P19/Ebi3复合物,其特征在于,所述复合物是由P19和Ebi3蛋白组成的异二聚体。
2. 一种权利要求1所述的P19/Ebi3复合物的制备方法,包括下列步骤:
 - (a) 培养宿主细胞;
 - (b) 从培养物中分离出P19/Ebi3复合物。
3. 一种抗体,所述抗体特异性识别和/或结合权利要求1所述的P19/Ebi3复合物。
4. 根据权利要求3所述的抗体,其特征在于,所述的抗体是多克隆抗体。
5. 一种制备权利要求3或4所述的抗体的方法,其特征在于,所述方法包括:以权利要求1所述的复合物免疫动物,从免疫后的动物体内分离出特异性抗权利要求1所述的复合物的抗体。
6. P19/Ebi3复合物在制备抑制B细胞向浆细胞分化药物中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的浆细胞是由B细胞分化的GL7⁺浆细胞。
8. P19/Ebi3复合物在制备诊断系统性红斑狼疮产品中的应用。
9. P19/Ebi3复合物抑制剂在制备治疗系统性红斑狼疮药物中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述的复合物抑制剂是权利要求3或4所述的抗体。

P19/Ebi3 复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊治中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,本发明涉及 P19/Ebi3 复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊断、治疗中的用途。

背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 是一种严重威胁人类健康与生命的自身免疫性疾病,有较高的致死率和致残率。其病因与发病机制尚不明了,普遍认为是环境因素作用于一定遗传背景的机体 (包括组织相容性、细胞因子、细胞因子受体等表达的不同型别) 而形成的结果。其免疫病理特征是体内产生多种高低度、致病性自身抗体,同时淋巴细胞凋亡。释放出大量细胞核内容物及核糖小体而成为自身抗原;抗原抗体结合形成免疫复合物,免疫复合物的沉积可导致靶细胞损伤和炎症,导致各个组织和器官发生病变。在该病理过程中,B 细胞处于高度活化状态,且该过程与 T 细胞密切相关,有 T 细胞依赖性。

[0003] 复杂的细胞因子网络调节 T 细胞和 B 细胞的生长、分化和功能,这些细胞因子可以分为两大类:Th1 型 (主要诱导细胞免疫) 和 Th2 型 (主要促进抗体产生)。白细胞介素 12 (IL-12) 在细胞因子网络调节中起着重要的作用,它主要由单核巨噬细胞分泌产生。IL-12 家族由一个 α -链 (P19, P28 或 P35) 和一个 β -链 (P40 或 Ebi3) 异二聚体亚基组成 (图 1),其与一些自身免疫疾病,尤其是 Th1 细胞介导的自身免疫病的发病有关。

[0004] 目前对于系统性红斑狼疮的临床诊断主要依靠临床表现、实验室检查、组织病理学和影像学检查。由于 SLE 临床表现病症因人而异,有时会出现误诊。而治疗系统性红斑狼疮的常规方法是使用抗疟疾药、抗炎药和免疫抑制药,当症状难以控制时,对非甾体抗炎剂补充以皮质激素;虽然在控制病情、阻止疾病发展中有显著作用,但多有明显不良反应,且对部分患者疗效不佳。B 细胞和 T 细胞在 SLE 的发病机制中起着重要的作用,针对免疫细胞的生物学疗法将成为治疗 SLE 的焦点。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种可用于系统性红斑狼疮诊治的复合物 P19/Ebi3 及其多克隆抗体。相比传统的系统性红斑狼疮的诊断和治疗方法,使用多克隆抗体与导致自体抗体过度产生的病理性免疫响应相互作用或将其纠正的特异性治疗将更有优势,如具有较高的特异性与准确性,较低的副作用,从而实现治愈系统性红斑狼疮和 / 或在长期基础上改善患者的生活品质的病因性治疗。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种分离的 P19/Ebi3 复合物。

[0008] 进一步,上面所提到的复合物是由 P19 和 Ebi3 两个亚基组成的。

[0009] 进一步,上面所提到的 P19 亚基包括如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列的蛋白,或

其保守性变异蛋白。

[0010] 进一步,上面所提到的 Ebi3 亚基包括如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的蛋白,或其保守性变异蛋白。

[0011] 进一步,上面所述的亚基是由多核苷酸编码的,所述的 P19 亚基的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;所述的 Ebi3 亚基的核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0012] 本发明提供了一种重组载体,它含有上面所述的多核苷酸序列。

[0013] 进一步,所述的重组载体中还含有与所述的多核苷酸序列操作性相连的表达调控序列。

[0014] 本发明所述携带基因的载体是本领域已知的各种载体,如市售的载体、包括质粒、粘粒、噬菌体、病毒等。

[0015] 病毒载体可以是任何适当的载体,包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺病毒相关病毒载体、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒、痘苗病毒及 EB 病毒)载体、甲病毒载体。

[0016] 真核表达载体可以是任何适当的表达载体,包括但不限于 pCMV-Myc 表达载体、pcDNA3.0 表达载体、pcDNA3.1 表达载体、pEGFP 表达载体、pEFBos 表达载体、pTet 表达载体、pTRE 表达载体、pReceiver-Lv18 表达载体、pZE-LV122X 表达载体或者在公知表达载体的基础上经改造的载体,比如 pBin438、pCAMBIA1301 等。

[0017] 优选地,所述表达载体为真核表达载体。优选地,所述真核表达载体为 pReceiver-Lv18 和 pEZ-LV122X 表达载体。

[0018] 本发明提供了一种宿主细胞,它含有所述的重组载体,或其基因组中整合有所述的多核苷酸。

[0019] 优选地,所述宿主细胞为 CHO 细胞。

[0020] 本发明提供了一种 P19/Ebi3 复合物的制备方法,它包括下列步骤:

[0021] (a) 培养所述的宿主细胞;

[0022] (b) 从培养物中分离出所述的复合物。

[0023] 本发明提供了一种抗体,所述抗体特异性识别和/或结合所述的复合物。

[0024] 优选地,所述的抗体为多克隆抗体。

[0025] 本发明提供了一种制备抗体的方法,所述方法包括:以所述的复合物免疫动物,从免疫后的动物体内分离出所述复合物的特异性抗体。

[0026] 优选地,所述抗体为多克隆抗体,用以下所述方法制备:

[0027] 用所述的复合物与完全弗氏佐剂混合(按照体积比 1:2 ~ 2:1 混合,优选地按照体积比 1:1 混合)后免疫小鼠,2 周后用所述的复合物与不完全弗氏佐剂混合(按照体积比 1:2 ~ 2:1 混合,优选地按照体积比 1:1 混合)后强化免疫小鼠,按照相同的方式再次强化免疫 2-3 次,1-2 周后从血清中分离出多克隆抗体。

[0028] 本发明提供了 P19/Ebi3 复合物在制备抑制 B 细胞向浆细胞分化药物中的应用。

[0029] 进一步,所述浆细胞为 B 细胞分化的 (GL7⁺) 浆细胞。

[0030] 进一步, P19/Ebi3 复合物的特异性抗体、基于 P19/Ebi3 复合物的肿瘤疫苗、用于抑制 P19/Ebi3 复合物活性的蛋白质,抑制 P19/Ebi3 复合物活性的化合物。

[0031] 本发明提供了一种 P19/Ebi3 复合物在制备诊断系统性红斑狼疮产品中的应用。

[0032] 进一步,上面所提到的诊断产品包括:通过免疫检测、免疫共沉淀、ELISA 或芯片来检测 P19/Ebi3 复合物的水平以诊断系统性红斑狼疮的产品。

[0033] 进一步,所述用免疫检测来诊断系统性红斑狼疮的产品包括:与 P19/Ebi3 复合物特异性结合的抗体;所述用免疫共沉淀来诊断系统性红斑狼疮的产品包括:与 P19/Ebi3 复合物中两个亚基同时特异性结合的抗体;所述用 ELISA 来诊断系统性红斑狼疮的产品包括:ELISA 试剂盒;ELISA 试剂盒包括与 P19/Ebi3 复合物特异性结合的抗体;所述用芯片来诊断系统性红斑狼疮的产品包括:蛋白芯片;其中蛋白芯片包括与 P19/Ebi3 复合物特异性结合的抗体。

[0034] 优选地,所述产品包括试剂盒和芯片。

[0035] 本发明提供了 P19/Ebi3 复合物抑制剂在制备治疗系统性红斑狼疮药物中的应用。

[0036] 进一步,本发明所述抑制剂包括:P19/Ebi3 复合物的特异性抗体、基于 P19/Ebi3 复合物的肿瘤疫苗、用于抑制 P19/Ebi3 复合物活性的蛋白质,抑制 P19/Ebi3 复合物活性的化合物。

[0037] 进一步,所述 P19/Ebi3 复合物的特异性抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体。所述 P19/Ebi3 复合物的特异性抗体包括完整的抗体分子、抗体的任何片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等。只要所述片段能够保留与 P19/Ebi3 复合物的结合能力即可。

[0038] 优选地,所述 P19/Ebi3 复合物的特异性抗体为多克隆抗体。

[0039] 进一步,所述的药物包括所述的抗体或其活性片段。

[0040] 进一步,本发明的药物还包括药学上可接受的载体,这类载体包括(但并不限于):稀释剂、赋形剂如水等、填充剂如淀粉、蔗糖等;粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮;湿润剂如甘油;崩解剂如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收促进剂季铵化合物;表面活性剂如十六烷醇;吸附载体如高岭土和皂粘土;润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙和镁、聚乙二醇等。

[0041] 本发明的药物还可与其他治疗系统性红斑狼疮的药物联用,多种药物联合使用可以大大提高治疗的成功率。

[0042] “P19/Ebi3 复合物”包括 P19/Ebi3 复合物以及 P19/Ebi3 复合物的任何功能等同物。所述功能等同物包括 P19/Ebi3 复合物保守性变异蛋白质、或其活性片段,或其活性衍生物,等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨条件下能与 P19/Ebi3 的 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白质。

[0043] 优选地,P19/Ebi3 复合物是具有下列氨基酸序列的蛋白质:

[0044] (1) 由序列表中 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0045] (2) 将 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且与 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有相同功能的由 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列衍生的蛋白质。取代、缺失或者添加的氨基酸的个数通常为 1-50 个,较佳地 1-30 个,更佳地 1-20 个,最佳地 1-10 个。

[0046] (3) 与 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列具有至少 80% 同源性

(又称为序列同一性),更优选地,与 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列至少约 90% 至 95% 的同源性,常为 96%、97%、98%、99% 同源性的氨基酸序列构成的多肽。

[0047] 在本发明的具体实施方案中,所述 P19/Ebi3 复合物是具有 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的蛋白质。

[0048] 通常,已知的是,一个蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能。本领域技术人员会认可改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸或对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入、替换是保守修饰,其中蛋白质的改变产生具有相似功能的蛋白质。提供功能相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。

[0049] 通过添加一个氨基酸或多个氨基酸残基修饰的蛋白质,只要所得的蛋白保留 P19/Ebi3 复合物的生物学活性即可。

[0050] 本发明的 P19/Ebi3 复合物也包括对 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的非保守修饰,只要经过修饰的蛋白质仍然能够保留 P19/Ebi3 复合物的生物学活性即可。在此类修饰蛋白质中突变的氨基酸数目通常是 10 个或者更少,例如 6 个或者更少,例如 3 个或者更少。

[0051] 本发明的优点和有益效果:

[0052] 本发明首次发现了 P19/Ebi3 复合物及其与系统性红斑狼疮的关系,通过检测受试者中 P19/Ebi3 复合物的水平,可以判断其是否患有系统性红斑狼疮,从而指导从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0053] 本发明发现了 P19/Ebi3 复合物特异性抗体可以治疗系统性红斑狼疮,相比现有的治疗手段,该方法准确性高、副作用低,有利于实现治愈系统性红斑狼疮和 / 或在长期基础上改善患者的生活品质的病因性治疗。

附图说明

[0054] 图 1 显示 IL-12 家族分子亚基配对情况;

[0055] 图 2 显示了人 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成复合物;

[0056] 图 3 显示了小鼠 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成 P19/Ebi3 复合物;图 4 显示了小鼠 P19/Ebi3 复合物的纯化和质谱鉴定;左图显示了纯化蛋白的考马斯亮蓝染色;右图显示了纯化蛋白的质谱分析;

[0057] 图 5 显示了小鼠 P19/Ebi3 复合物生物活性研究;左图免疫印迹分析了纯化的 Ebi3-Flag/P19-His 能刺激 B 细胞中 STAT1 的磷酸化;右图免疫印迹分析了纯化的 Ebi3-Flag/P19-His 能刺激 B 细胞中 STAT3 的磷酸化;

[0058] 图 6 显示了 LPS 活化的 B 细胞高表达 P19/Ebi3;

[0059] 图 7 显示了 LPS 活化的 B 细胞分泌高水平的 P19/Ebi3;左图显示了使用 ELISA 方法检测 LPS 刺激的 B 细胞分泌抗体的情况;右图显示了使用双抗夹心 ELISA 方法检测 LPS 刺激的 B 细胞分泌抗体的情况;

[0060] 图 8 显示了向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞高表达 P19/Ebi3;

[0061] 图 9 显示了 SLE 小鼠模型中向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞和 (CD138⁺) 细胞高表达 P19/Ebi3;

[0062] 图 10 显示了 P19/Ebi3 多克隆抗体的鉴定;

- [0063] 图 11 显示了抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠尿蛋白；
 [0064] 图 12 显示了抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠脾肿大；
 [0065] 图 13 显示了抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠抗体水平；
 [0066] 图 14 显示了抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠淋巴细胞数目。

[0067] 具体的实施方式

[0068] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。本发明的实施例仅用于解释本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0069] 下述实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0070] 下述实施例中所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0071] 实施例 1 人 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成 P19/Ebi3 复合物

[0072] 一、材料

[0073] 人 Ebi3 蛋白购自 Origene 公司 (货号 TP723769)、人 P19 蛋白购自 Origene 公司 (货号 TP309680)、抗 Ebi3 抗体购自 SantaCruzBiotech 公司 (货号 sc-32869)、抗 P40 抗体购自 SantaCruzBiotech 公司 (货号 sc-7926)、抗 P19 抗体购自 SantaCruzBiotech 公司 (货号 sc-50303)、抗 c-Jun 抗体购自 SantaCruzBiotech 公司 (货号 sc-44)

[0074] 二、方法

[0075] 1、免疫沉淀

[0076] 1) Agrose-proteinA/G 清洗：取 60 μ l Agrose-proteinA/G 到 EP 管中 (剪枪头)，加入 500 μ l 预冷的 PBS，4 $^{\circ}$ C、5000rpm 离心 2min (洗两遍)。

[0077] 2) 抗体和 Agrose-proteinA/G 预孵育：将 1 μ g 抗 Ebi3 抗体、抗 p40 抗体、抗 P19 抗体、抗 c-Jun 抗体分别加入到洗好的 15 μ l Agrose-proteinA/G 中，4 $^{\circ}$ C 翻转 1h。

[0078] 3) 将 5ng/ml 人 Ebi3 蛋白与 5ng/ml 人 P19 蛋白在 PBS 中混匀。

[0079] 4) 将 1 μ g 抗 Ebi3 抗体、抗 P40 抗体、抗 P19 抗体、抗 c-Jun 抗体分别与 30 μ l proteinA/G-beads 加入到步骤 3) 所述的混合液中，4 $^{\circ}$ C 缓慢摇晃孵育过夜。

[0080] 5) 抗原抗体孵育：步骤 4) 后进行离心 (5000rpm, 2min)，将 Ebi3 抗体、P40 抗体、P19 抗体、c-Jun 抗体分别加入到含预孵育好的相应抗体和 Agrose-proteinA/G 的 EP 管中，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

[0081] 6) 洗 IP 复合物：5000rpm，离心 2min，吸掉上清，加入 IP 裂解液 (一般不用加抑制剂) 500 μ l，弹匀后 4 $^{\circ}$ C 摇转 5min，重复 6 次。

[0082] 7) 加入 SDS 60 μ l 检测。

[0083] 2、免疫印迹分析

[0084] 1) 配胶

[0085] 表 1 10%分离胶和 4%浓缩胶

[0086]

	10%分离胶	4%浓缩胶
超纯水	4.85ml	3.16ml

40% Acr/Bic(37.5:1)	2.5ml	0.5ml
1.5mol/LTris·HCl(PH8.8)	2.5ml	---
0.5mol/LTris·HCl(PH6.8)	---	1.26ml
10% SDS	100 μ l	50 μ l
10% AP(过硫酸铵)	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

[0087] 加 TEMED 后,立即混匀即可灌胶。

[0088] 先用 1ml 枪头小心铺 10% 分离胶,上加少许异丙醇,待分离胶干凝后,盗取异丙醇,用水洗去多余未聚合的胶,滤纸吸干。再铺 4% 浓缩胶,注意不要产生气泡,斜插上梳子,待胶干后备用,拔去梳子。

[0089] 2) 上样

[0090] 取出上样样品至 0.5ml 离心管中。加入 5 \times SDS 上样缓冲液至终浓度为 1 \times SDS。(上样总体积一般不超过 15 μ l,加样孔的最大限度为 20 μ l 样品)。上样前要将样品于沸水中煮 5min 使蛋白变性。

[0091] 加足够的电泳液开始准备上样。用微量加样器贴壁吸取样品,注意不要产生气泡。将加样器针头插至加样孔缓慢加入样品。加入下一个样品时,进样器需在外槽电泳缓冲液中洗涤 3 次,以免交叉污染。

[0092] 3) 电泳

[0093] 100V,溴酚兰走到分离胶底部后,约 1.5h 后电泳结束。

[0094] 4) 转膜

[0095] 小心取下凝胶,把预先在转膜缓冲液中平衡过的滤纸及硝酸纤维素膜切成与凝胶同样大小,按次序叠放在一起,在 4 $^{\circ}$ C、100V 电压转膜 1h,取出硝酸纤维素膜,用 1 \times 立春红染液染 5min(于脱色摇床上摇)。然后用 TBST 漂洗至膜发白。

[0096] 5) 封闭

[0097] 称取脱脂奶粉 1g,用 1 \times TBS 溶解到 20ml,使脱脂奶粉浓度为 5%。将硝酸纤维素膜浸在 20ml 封闭液中,室温摇 2h。

[0098] 6) 一抗杂交孵育

[0099] 将一抗用含 5% 脱脂奶粉的 1 \times TBS 溶液稀释,使抗体浓度为 1:1000;将封闭过的膜放在一抗稀释液中,4 $^{\circ}$ C 过夜;而后吸弃一抗稀释液,用 1 \times TBST 洗 3 次,每次 5min。

[0100] 7) 二抗杂交孵育

[0101] 将辣根过氧化物酶连接的二抗用含 5% 脱脂奶粉的 1 \times TBS 溶液稀释,使浓度为 1:2000,并加入辣根过氧化物酶连接的抗生物素抗体(浓度为 1:1000),将膜置于二抗稀释液中,室温振荡孵育 1h;而后吸弃二抗稀释液,用 1 \times TBST 洗 3 次,每次 5min。

[0102] 8) 显影

[0103] 将膜置入 10ml LumiGLO 溶液中(配方:0.5ml 20 \times LumiGLO、0.5ml

20×Peroxide、9.0ml Milli-Qwater), 室温轻摇 1min, 注意避光操作; 在暗室中剪下与膜同样大小的胶片, 压在暗盒中, 约 1min; 将胶片放在显影液中冲洗 1-5min; 水冲洗; 定影液中洗 2-5min; 水冲洗, 可在相应位置见到目的条带。

[0104] 9) 凝胶图像分析

[0105] 将胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

[0106] 三、结果

[0107] 实验结果如图 2 所示, 免疫印迹分析发现, 人 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成 P19/Ebi3 复合物。

[0108] 实施例 2 小鼠 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成 P19/Ebi3 复合物

[0109] 一、材料

[0110] 质粒与菌株:

[0111] P19/pReceiver-Lv18、Ebi3/pEZ-LV122X 表达质粒, JM109 菌株

[0112] 二、方法

[0113] 1、引物设计

[0114] 扩增 P19/Ebi3 复合物中 P19ORF 引物

[0115] 正义链: 5' -ATGCTGGATTGCAGAGCAGT-3' (SEQ ID NO:5)

[0116] 反义链: 5' -GTAAGCTGTTGGCACTAAGG-3' (SEQ ID NO:6)

[0117] 加上 EcoRI 位点和保护碱基后的正义链:

[0118] 5' -CCGGAATTCATGCTGGATTGCAGAGCAGT-3' (SEQ ID NO:7)

[0119] 加上 XhoI 位点和保护碱基后的反义链:

[0120] 5' -CCGCTCGAGGTAAGCTGTTGGCACTAAGG-3' (SEQ ID NO:8)

[0121] 扩增 P19/Ebi3 复合物中 Ebi3ORF 引物

[0122] 正义链: 5' -ATGTCCAAGCTGCTCTTCCT-3' (SEQ ID NO:9)

[0123] 反义链: 5' -TCAGGGCTTATGGGGTGCAC-3' (SEQ ID NO:10)

[0124] 加上 EcoRI 位点和保护碱基后的正义链:

[0125] 5' -CCGGAATTCATGTCCAAGCTGCTCTTCCT-3' (SEQ ID NO:11)

[0126] 加上 XhoI 位点和保护碱基后的反义链:

[0127] 5' -CCGCTCGAGTCAGGGCTTATGGGGTGCAC-3' (SEQ ID NO:12)

[0128] 2、P19、Ebi3、P19/Ebi3 基因克隆与重组质粒的构建

[0129] 1) 总 mRNA 的提取

[0130] 通过过 CD11c 免疫磁珠 (美天旎公司) 从 9 周龄 C57BL/6 小鼠体内分选出 DC 细胞, 每 1×10^7 细胞中加入 1ml 的 TRIZOL, 将标本转移到 1.5ml 的 EP 管中, 在 15-30°C 放置 5min。

[0131] 加入 0.2ml 的氯仿, 剧烈摇晃 15s, 在 15-30°C 放置 2-3min, 2-8°C, 12,000g 离心 15min。

[0132] 将上层水相转移到另一干净的 EP 管中, 加入 0.5ml 异丙醇, 室温静置 10min, 2-8°C, 12,000g 离心 10min。

[0133] 去上清, 加入 1ml 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 振荡器混匀, 2-8°C, 12,000g 离心 5min。

[0134] 用无 RNase 水或 0.5% SDS 溶液重悬 RNA 沉淀,用枪头反复吹打几次,于 55-60℃ 下静置 10min。测浓度后 -20℃ 保存。

[0135] 甲醛变性琼脂糖电泳,确定抽提 RNA 完整性和 DNA 污染情况。

[0136] 2) RT-PCR 扩增 P19/Ebi3 复合物中 P19 和 Ebi3ORF 序列

[0137] 表 2 RT 反应体系 (第一步):约 20min

[0138]

	体积
RNA 抽提物	5 μ l
Radome 引物	2 μ l
RNAsin	0.5 μ l

[0139] 65℃ 15min 后立即放入冰浴

[0140] 表 3 RT 反应体系 (第二步):约 2h

[0141]

	体积
RNAsin	0.5 μ l
10mM dNTP	1 μ l
5 \times RT 缓冲液	4 μ l
25mM MgCl ₂	4 μ l
AMV 逆转录酶	3 μ l

[0142] 37℃ 1.5h ;94℃ 5-10min ;反应物保存于 -20℃ 或进行 PCR

[0143] 表 4 PCR 反应体系 :约 4.5h

[0144]

	体积
25mM MgCl ₂	2 μ l
10 \times PCR 缓冲液	5 μ l
10mM dNTP	1 μ l
上下游引物 10pmol/ μ l	2.5 μ l \times 2
cDNA 模板	2.5 μ l

ddH ₂ O	34 μ l
Taq 酶	0.5 μ l
轻质石蜡油	50 μ l

[0145] 94°C 2min, 55°C 1min, 72°C 2min

[0146] 94°C 45s, 55°C 40s, 72°C 1min, 30 个循环

[0147] 72°C 10min, 4°C 5min。

[0148] -20°C 保存或电泳

[0149] 电泳检测 P19 和 Ebi3 基因片段

[0150] 3) 重组表达载体的构建

[0151] P19/Ebi3 复合物中 P19 和 Ebi3ORF 通过 EcoRI 和 XhoI 酶切位点分别插入到 pReceiver-Lv18 和 pEZ-LV122X 载体上

[0152] 表 5 EcoRI 和 XhoI 双酶切时间及其体系：

[0153]

	体积
EcoRI	1 μ l
XhoI	1 μ l
10×Buffer	2 μ l
质粒或 PCR 产物	5 μ l
ddH ₂ O	11 μ l

[0154] 37°C 反应 20h, 用 TAKARA 的纯化柱试剂盒纯化双酶切产物。

[0155] 酶切、回收后的 PCR 产物与载体的连接

[0156] 转化：

[0157] a、全量 (10 μ l) 加入至 100 μ l JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30min。

[0158] b、42°C 加热 45s 后, 再在冰中放置 1min。

[0159] c、加入 890 μ l AMP 阴性培养基, 37°C 振荡培养 60min。

[0160] d、取 100 μ l 铺板。

[0161] e、经 PCR 和酶切鉴定阳性克隆用于测序。

[0162] 3、小鼠重组 P19、Ebi3、P19/Ebi3 复合物的诱导表达

[0163] P19/pReceiver-Lv18 和 Ebi3/pEZ-LV122X 表达载体共转染 CHO 细胞

[0164] 1) 将 0.5-2×10⁵ 个细胞接种到 24 孔培养板中, 并加入 500 μ l 无抗生素培养基, 培养 24h。

[0165] 2) 把 P19/pReceiver-Lv18 和 Ebi3/pEZ-LV122X 加入到 50 μ l 无血清 Opti-MEM1 低血清培养基中 (或是其它无血清培养基) 进行稀释, 并轻轻混匀。

[0166] 3) 把轻轻混匀的 Lipofectamine™2000 取相应的量加入到 Opti-MEM 培养基中进行稀释, 室温下静置 5min。

[0167] 4) 混合 Lipofectamine™2000 和 DNA 的稀释液。轻轻混匀并在室温下静置 20min。

[0168] 5) 吸去培养板中的培养基, 并用无血清培养基洗两次。

[0169] 6) 将混合物 100 μ l 加入培养孔, 并前后摇动培养孔使分布均匀。

[0170] 7) 转染 24h 后将细胞以 1:10 (或更高的稀释度) 转移到新鲜的生长培养基中。

[0171] 8) 在选择培养基 Puromycin (P19/pReceiver-Lv18 载体带有) 和 Neomycin (Ebi3/pEZ-LV122X 载体带有) 中共表达 P19/Ebi3 的 CHO 细胞。

[0172] 9) 共表达 P19/Ebi3 的 CHO 细胞于 37°C、CO₂ 培养箱中培养 48-72h, 收集上清用进行蛋白纯化。

[0173] 4、免疫沉淀和免疫印迹分析

[0174] 实验过程如实施例 1 所述

[0175] 三、结果

[0176] 免疫印迹分析结果如图 3 所示, 小鼠 IL-12 家族细胞因子亚基 P19 和 Ebi3 可组成 P19/Ebi3 复合物。

[0177] 实施例 3 小鼠 P19/Ebi3 复合物纯化和质谱鉴定

[0178] 一、方法

[0179] 1、小鼠 Ebi3-Flag/P19-His 的共表达

[0180] 实验过程参照实施例 2。

[0181] 2、Ebi3-Flag/P19-His 的纯化

[0182] 1) 镍柱处理

[0183] 将 1ml 镍柱吸入空层析管中, 待其中的液体流完后加入平衡缓冲液 3ml。

[0184] 2) 将 10ml 上清加到已平衡过的镍柱上, 并将过柱的样品重复上样 3 次, 取 20 μ l 过柱后的样品, 以备跑胶。

[0185] 3、考马斯亮蓝染色

[0186] 1) 将纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE, 实验过程如实施例 1 所述。把凝胶浸泡在固定液中至少 30min。

[0187] 2) 将固定后的凝胶在热的染色液 (0.29g 考马斯亮蓝溶解在 250ml 脱色液中, 使用前边搅拌变加热至 60°C) 中浸泡 10min, 然后用蒸馏水将凝胶淋洗一次。

[0188] 3) 多次变换脱色液 (250ml 乙醇, 80ml 冰醋酸, 加蒸馏水至 1L), 直至凝胶背景脱净, 为加快脱色, 可略加温度; 以上各步骤均放在摇床上操作。

[0189] 4) 为了防止凝胶干燥后龟裂, 脱去背景色的凝胶在保存液中浸泡 30min。然后将凝胶放在玻璃板上, 再用保存液浸湿玻璃纸包住凝胶在室温下晾干。

[0190] 4、质谱鉴定

[0191] 二、结果

[0192] 实验结果如图 4 所示, (左图) 尽管有杂蛋白带, P19/Ebi3 纯度在 70% 以上; (右图) 质谱鉴定显示 P19-His 分子量约为 18KD, Ebi3-Flag 分子量约为 36KD, Ebi3-Flag/P19-His 分子量约为 53.5KD。

[0193] 实施例 4 小鼠 P19/Ebi3 复合物可诱导 B 细胞 STAT3 和 STAT1 磷酸化

[0194] 一、材料

[0195] 从 CellSignalTechnology 公司 购买 p-STAT1、p-STAT3、p-STAT4、p-STAT5、p-STAT6、STAT1、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6、 β -actin(货号分别为 9167、9145、4134、9314、9364、9172、4904、2653、9363、9362、4967)

[0196] 二、方法

[0197] 1、Ebi3-Flag、P19-His、Ebi3-Flag/P19-His 蛋白的表达和纯化

[0198] 2、B220 免疫磁珠分选 B 细胞

[0199] 1) 清洗免疫磁珠

[0200] 在瓶子里重悬免疫磁珠 (涡旋不少于 30s) ;

[0201] 转移适量体积的免疫磁珠到管子里 ;

[0202] 加入等体积的分离缓冲液或至少 1ml,重悬 ;

[0203] 把管子置于磁体中 1min,弃掉上清 ;

[0204] 把管子从磁体中移开,用和上述步骤中相同体积的分离缓冲液重悬洗过的磁珠。

[0205] 2) 准备样品

[0206] 准备单个细胞悬浮液 (淋巴器官),使用分离缓冲液使得细胞的终浓度为 1×10^7 个/ml。

[0207] 3)B 细胞的分选

[0208] 向管子中加入 1ml 的细胞,然后加入 25 μ l 步骤 1) 中的免疫磁珠 ;

[0209] 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 20min,置于摇床上轻轻摇晃 ;

[0210] 把管子置于磁体 2min ;

[0211] 小心地弃掉上清 ;

[0212] 把管子从磁体中取出,向其中加入 1ml 分离缓冲液,吹打 2-3 次 (或涡旋 2-3s),再把该管子置于磁场中 2min,小心地弃掉上清 ;

[0213] 重复上一步至少一次,清洗和磁珠连接的 B 细胞。

[0214] 3、B 细胞的活化反应

[0215] LPS 刺激 B 细胞

[0216] 准备单个 B 细胞的悬浮液,用 RPMI1640 完全培养基培养调整 B 细胞密度为 1×10^6 个/ml,加入到 96 孔板中,加入 10ug/ml LPS,37 $^{\circ}$ C 培养 72-96h。

[0217] 4、免疫印迹分析

[0218] 三、结果

[0219] 实验结果如图 5 所示,纯化的 Ebi3-Flag/P19-His 蛋白具有生物学活性,它能有效地刺激 B 细胞中 STAT1、STAT3 的磷酸化。

[0220] 实施例 5LPS 活化的 B 细胞高表达 P19/Ebi3

[0221] 一、材料

[0222] 抗 P19 抗体购自 eBioscience 公司 (货号 50-7023-82)、抗 P28 抗体购自 eBioscience 公司 (货号 12-7285-80)、抗 P35 抗体购自 eBioscience 公司 (货号 50-7352-80)、抗 P40 抗体购自 eBioscience 公司 (货号 12-7123-81)、抗 Ebi3 抗体购自 R&D 公司 (货号 IC18341C)

[0223] 二、方法

- [0224] 1、LPS 刺激 B 细胞
- [0225] 2、阻断 Fc 受体：(用于消除非特异性的结合染色)
- [0226] 使用纯化的 FcII/III 受体的抗体 (CD16/32)，按照 $1 \mu\text{g}/10^6$ 细胞的用量，在染色缓冲液中 4°C 孵育 15min，PBS 清洗后，直接进行下一步染色。
- [0227] 3、细胞内因子染色及检测
- [0228] 1) 固定：加入 ICFix/Perm Buffer $100 \mu\text{l}$ ，混匀，室温孵育 20min。
- [0229] 2) 用 $1\times$ PermWashBuffer 1ml 洗涤 1 次 (2000rpm, 10min)，倾倒后滤纸吸干管口液体。
- [0230] 3) 破膜：加入 $1\times$ PermWashBuffer 1ml，混匀， 4°C 孵育 45min。
- [0231] 4) 离心 (2000rpm, 10min)，倾倒后滤纸吸干管口液体。
- [0232] 5) 加入细胞因子抗体， 4°C 孵育 45min。
- [0233] 6) 用 $1\times$ PermWashBuffer 1ml 洗涤 1 次，倾倒后，加入 $300 \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞。
- [0234] 7) 上机检测。
- [0235] 三、结果
- [0236] 实验结果如图 6 所示，LPS 活化的 B 细胞表达少量 P28, P35, P40，而高表达 P19/Ebi3。
- [0237] 实施例 6 LPS 活化的 B 细胞能分泌高水平的 P19/Ebi3
- [0238] 一、材料
- [0239] 购自 SantaCruzBiotech 公司的抗 Ebi3 抗体 (货号 sc-32869)、抗 P40 抗体 (货号 sc-7926)、抗 P19 抗体 (货号 sc-50303)、抗 P28 抗体 (货号 sc-27490)、抗 P35 抗体 (货号 sc-9350)
- [0240] 二、方法
- [0241] 1、B 细胞的活化
- [0242] 2、ELISA 实验
- [0243] 1) 包被过程 (注意设置空白对照，阴性对照)
- [0244] 将所用抗原用包被稀释液稀释到适 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔抗原加入 $100 \mu\text{l}$ ，置于 37°C ，4h 或 4°C 过夜；可包被 BSA 溶液或只加包被液作为空白对照。
- [0245] 2) 封闭酶标反应孔
- [0246] 弃去孔内液体，每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 湿盒封闭 6h 或 4°C 过夜，结束后用洗涤液洗涤 3-5 次，并于吸水纸上轻轻拍干。
- [0247] 3) 加入待检测样品
- [0248] 加一定稀释的待检样品 $100 \mu\text{l}$ 于上述已包被的反应孔中，加 PBST 作为空白对照。置 37°C ，孵育 45min。然后洗涤 3-5 次，并于吸水纸上轻轻拍干。
- [0249] 4) 加入酶标抗体
- [0250] 于各反应孔中，加入新鲜稀释的酶标抗体 (经滴定后的稀释度：1:1000 以上稀释) $100 \mu\text{l}$ 。 37°C 孵育 45min，洗涤 3 次，并于吸水纸上轻轻拍干。
- [0251] 5) 加入底物液 (现用现配)
- [0252] 于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 $100 \mu\text{l}$ ， 37°C ，10 ~ 30min。
- [0253] 6) 终止反应

[0254] 于各反应孔中加入 2M 硫酸 50 μ l, 于 20min 内测定实验结果。

[0255] 7) 结果判断

[0256] 用 Bio-Rad 酶标仪于 450nm 以空白对照孔调零后测各孔 OD 值, 若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍, 即为阳性 (数值的大小依具体检测要求而定)。

[0257] 3、双抗夹心 ELISA 实验

[0258] 参照上述实验步骤。

[0259] 三、结果

[0260] 实验结果如图 7 所示, (左图) LPS 活化的 B 细胞分泌少量 P28, P35, P40, 而分泌高水平的 P19、Ebi3; (右图) LPS 活化的 B 细胞分泌少量 IL-23, IL-27, 而分泌高水平 P19/Ebi3。

[0261] 实施例 7 向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞高表达 P19/Ebi3

[0262] 一、方法

[0263] 实验操作参照实施例 5 的方法。

[0264] 二、结果

[0265] 实验结果如图 8 所示, 从图中我们可以看出向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞高表达 P19/Ebi3。

[0266] 实施例 8 系统性红斑狼疮 (SLE) 小鼠模型中向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞和浆细胞 (CD138⁺) 细胞高表达 P19/Ebi3

[0267] 一、材料

[0268] 系统性红斑狼疮自发性模式小鼠: 雌性 MRL/MpJ/lpr/lpr (MRL/lpr) 小鼠购自南京模式生物研究所; MRL/MpJ/+/+ (MRL/++) 小鼠购自医科院基础医学研究所。

[0269] 二、方法

[0270] 向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞、浆细胞 (CD138⁺) 的获取及计数

[0271] 1、系统性红斑狼疮小鼠脾脏细胞的获取

[0272] 1) 取小鼠脾脏, 放入盛有 5ml Hanks 液的培养皿中。

[0273] 2) 轻轻研磨脾脏 (顺同一方向), 用吸管吸取脾细胞悬液, 放入试管中。

[0274] 3) 镜下细胞计数: 40 倍镜头, 观察脾细胞。

[0275] 2、淋巴细胞的分选

[0276] 1) 稀释脾细胞 (脾细胞: 稀释液 = 1:2)。

[0277] 2) 在离心管中加入 Ficoll, 沿倾斜的管壁缓缓加入稀释的外周血 (Ficoll: 稀释脾细胞 = 1:2), 20°C, 1500rpm, 离心 30min。

[0278] 3) 沿管壁周缘轻轻吸取 PBMC 层移入另一试管中。

[0279] 4) 加足量稀释液充分洗涤, 1800rpm 离心 10min, 弃上清。

[0280] 5) 重复洗涤一次, 1400rpm 离心 10min, 弃上清。

[0281] 6) 适量的培养基重悬细胞, 即是小鼠脾淋巴细胞悬液。

[0282] 3、淋巴细胞的计数

[0283] 稀释细胞, 计数板放到显微镜下进行计数。

[0284] 4、细胞流式技术分析 GL7⁺ 和 CD138⁺ 细胞

[0285] 1) 在每个流式检测管中加入适量的预稀释好的一抗 (荧光标记抗 B220、GL7、

CD138 抗体);在空白管或同型对照管中加入与抗体相同量的对照试剂。然后各管避光冰浴或在 4℃冰箱中孵育 30min。

[0286] 2) 加入至少 2ml CellStainingBuffer, 然后 350g 离心 5min 后弃去上清液;重复洗涤两次。

[0287] 3) 用 0.5ml Cell Staining Buffer 重悬细胞, 冰上孵育 3-5min。

[0288] 5、上机检测并分析结果。

[0289] 二、结果

[0290] 实验结果如图 9 所示, 系统性红斑狼疮 (SLE) 小鼠模型中向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞和浆细胞 (CD138⁺) 细胞及高表达 P19/Ebi3 的向浆细胞分化 (GL7⁺) 的 B 细胞和浆细胞 (CD138⁺) 细胞数目显著升高。

[0291] 实施例 9 抗 P19/Ebi3 多克隆抗体制备与鉴定

[0292] 一、方法

[0293] 1、P19/Ebi3 的制备与纯化

[0294] 实验操作参照实施例 3。

[0295] 2、多克隆抗体的制备

[0296] 1) 免疫动物的选择: 10 只 7-9 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠。

[0297] 2) 免疫原: 使用经镍柱纯化的 P19/Ebi3 复合物。每次免疫 100-200 μg。

[0298] 3) 待小鼠在新环境中培养 3 ~ 4 天后, 取 0.1ml 尾静脉血作为阴性对照。

[0299] 4) 小鼠的免疫

[0300] 用纯化的 P19/Ebi3 复合物与完全弗氏佐剂等体积混合后采用背部多点注射法免疫小鼠, 每次注射 100 μl, 2 周后用所述的复合物与不完全弗氏佐剂等比例混合后强化免疫小鼠 (于上述部位不同点注射), 按照相同的方式再次强化免疫 2-3 次, 1 周后尾静脉取血检测抗体效价。

[0301] 5) 血清的分离

[0302] 将离心管放置于 37℃烘箱中 2h, 4℃过夜, 10000RCF 离心 10min。在血清中加入 NaN₃至终浓度 0.02%, 分装后 -20℃保存。

[0303] 6) 抗体的纯化 (抗原亲和层析)

[0304] 交联: 使用 Na₂CO₃-NaHCO₃体系, 10mg/ml P19/Ebi3 抗原连接到 beads, 室温反应 4h。将结合有抗原的 beads 装柱。为了保证连接效率, 用含有氨基的小分子化合物尿素进行封闭, 封闭完成后, 除去封闭液, 用 PBS 洗柱三次。

[0305] 连接效果的评估使用考马斯亮蓝法 (Bradford 法)。

[0306] 过柱: 将预先处理过的血清 (10,000g 离心 5min, 通过 0.45 μm 滤膜过滤) 用 PBS 稀释一倍, 然后加入连好抗原柱子里。

[0307] 洗脱: 用 pH2.5 左右的 HCl (含 150mM NaCl) 洗脱。一台紫外监测仪检测流出组分以便即时监控, 洗脱过程尽量在低温完成, 洗脱下的组分应该在冰盒上放置, 洗脱下来后的成份用 Na₂HPO₄缓冲液。

[0308] 抗体保存: 纯化后的抗体置于相对接近体液的缓冲体系中 (PBS+0.02% 叠氮钠 +5% BSA), -20℃保存。

[0309] 3、多克隆抗体的鉴定

[0310] 实验过程参照实施例 6

[0311] 二、结果

[0312] 实验结果如图 10 所示,P19/Ebi3 复合物免疫小鼠获得的多克隆抗体,能够有效的抗 P19 蛋白,且效果比阳性对照 IL-23P19 的抗体效果好。

[0313] 实施例 10 抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠尿蛋白

[0314] 一、方法

[0315] 1、取 16 支试管,1 支作空白,3 支留作未知样品,其余试管分为两组按表 6 中顺序,分别加入样品、水和试剂,即用 1.0mg/ml 的标准蛋白质溶液给各试管分别加入 :0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1ml,然后用无离子水补充到 0.1ml。最后各试管中分别加入 5.0ml 考马斯亮兰 G—250 试剂,每加完一管,立即在旋涡混合器上混合(注意不要太剧烈,以免产生大量气泡而难于消除)。未知样品的加样量见下表中的第 8、9、10 管。

[0316] 表 6 不同试管的加样量

[0317]

试管编号 试剂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA(μ L)	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1			
样品(μ L)								0.04	0.04	0.04

[0318] 2、加完试剂 2-5min 后,用比色皿在分光光度计上测定各样品在 595nm 处的光吸收值 A595,空白对照为第 1 号试管,即 0.1ml H₂O 加 5.0ml G—250 试剂。注意:不可使用石英比色皿(因不易洗去染色),可用塑料或玻璃比色皿,使用后立即用少量 95% 的乙醇荡洗,以洗去染色。塑料比色皿决不可用乙醇或丙酮长时间浸泡。

[0319] 二、结果

[0320] 实验结果如图 11 所示,在第七天时,抗 P19/Ebi3 多克隆抗体能显著地降低系统性红斑狼疮小鼠尿蛋白量。

[0321] 实施例 11 抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠脾肿大

[0322] 一、方法

[0323] 1、抗 P19/Ebi3 多克隆抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠

[0324] 1) 实验动物的选择和分组

[0325] 发病的 8 月龄的雌性系统性红斑狼疮 MRL/lpr 小鼠 20 只, PBS 治疗组 10 只;抗 P19/Ebi3 抗体治疗组 10 只。

[0326] 2) 多克隆抗体的准备

[0327] 采用免疫小鼠并经亲和层析方法获得高效价抗 P19/Ebi3 多克隆抗体,使用 PBS 配制成 4mg/ml。

[0328] 3) 使用多克隆抗体治疗患病小鼠

[0329] 每只小鼠注射 0.1ml 抗体或 PBS,每周注射两次,一共注射 4 次。治疗后 1 周,检测抗体治疗效果。

[0330] 2、获取实验小鼠的脾脏组织,比较大小

[0331] 二、结果

[0332] 实验结果如图 12 所示,采用抗 P19/Ebi3 抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠,从根本上恢复了脾大小,这样有助于脾功能的恢复。

[0333] 实施例 12 抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠抗体水平

[0334] 一、方法

[0335] 1、抗 P19/Ebi3 多克隆抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠

[0336] 2、小鼠体内抗体水平的检测(双抗夹心 ELISA 法)

[0337] 1) 摘除小鼠的眼球采血。

[0338] 2) 将离心管中的血置于 37℃ 温箱或水浴 1h,也可室温 2h,再置 4℃ 冰箱内 3 ~ 4h 或过夜。

[0339] 3) 血液凝固血块收缩后,4000rpm 离心 10min。

[0340] 4) 取上清于干净的离心管中,保存于 -20℃ 或加入防腐剂置 4℃ 冰箱中保存备用。

[0341] 5) IgM 和 IgG ELISA 检测:

[0342] 包被:用 0.05M PH9 的包被缓冲液将捕获 IgM 或 IgG 抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 μ g/ml。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 100 μ l,4℃ 过夜。弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3min。

[0343] 加样:加一定稀释的待检样品 100 μ l 于上述已包被之反应孔中,置 37℃ 孵育 1h,然后洗涤。(同时做空白孔,阴性对照孔及阳性对照孔)。

[0344] 加酶标抗体:于各反应孔中,加入新鲜稀释的酶标检测 IgM 或 IgG 抗体(经滴定后的稀释度)100 μ l。37℃ 孵育 0.5 ~ 1h,洗涤。

[0345] 加底物液显色:于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 100 μ l,于 37℃ 下反应 10 ~ 30min。

[0346] 终止反应:于各反应孔中加入 2M 硫酸 50 μ l。

[0347] 测 OD 值:在 ELISA 检测仪上,于 450nm 处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即为阳性。

[0348] 二、结果

[0349] 实验结果如图 13 所示,采用抗 P19/Ebi3 抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠能够显著地降低小鼠体内的抗体水平。

[0350] 实施例 13 抗 P19/Ebi3 多克隆抗体降低系统性红斑狼疮小鼠淋巴细胞数目

[0351] 一、方法

[0352] 1、抗 P19/Ebi3 多克隆抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠

[0353] 2、小鼠体内免疫细胞的检测

[0354] 实验步骤参照实施例 8,细胞流式技术分析时,每个流式检测管中加入的一抗为荧光标记抗 CD11b,Gr-1, CD3, B220, GL7, IgG, IgM 抗体。

[0355] 二、结果

[0356] 实验结果如图 14 所示,采用抗 P19/Ebi3 抗体治疗系统性红斑狼疮小鼠能有效地降低先天免疫细胞如中性粒细胞(CD11b⁺Gr-1⁺)、巨噬细胞(CD11b⁺Gr-1)、T 细胞(CD3⁺)、B 细胞(B220⁺)、活化的 B 细胞(GL7⁺B220⁺)、抗体分泌细胞(IgG⁺或 IgM⁺)的水平。

[0357] 上述实施例的说明只是用于理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本

领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也将落入本发明权利要求的保护范围内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所
- <120> P19/Ebi3 复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊治中的应用
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 177
- <212> PRT
- <213> 人源
- <400> 1

Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys Gln Gln

1 5 10 15

Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala Pro Ala

20 25 30

Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr Lys Asn

35 40 45

Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu

50 55 60

Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly Leu Ala

65 70 75 80

Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu Pro Ala

85 90 95

[0002]

Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu Leu Gly

100

105

110

Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr Gln Gln

115

120

125

Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu Leu Arg

130

135

140

Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala Arg

145

150

155

160

Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val Pro Thr

165

170

175

Ala

<210> 2

<211> 210

<212> PRT

<213> 人源

<400> 2

Tyr Thr Glu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Gln Pro Arg Val Gln Cys

1

5

10

15

His Ala Ser Arg Tyr Pro Val Ala Val Asp Cys Ser Trp Thr Pro Leu

20

25

30

Gln Ala Pro Asn Ser Thr Arg Ser Thr Ser Phe Ile Ala Thr Tyr Arg

35

40

45

Leu Gly Val Ala Thr Gln Gln Gln Ser Gln Pro Cys Leu Gln Arg Ser

50

55

60

[0003]

Pro Gln Ala Ser Arg Cys Thr Ile Pro Asp Val His Leu Phe Ser Thr
 65 70 75 80
 Val Pro Tyr Met Leu Asn Val Thr Ala Val His Pro Gly Gly Ala Ser
 85 90 95
 Ser Ser Leu Leu Ala Phe Val Ala Glu Arg Ile Ile Lys Pro Asp Pro
 100 105 110
 Pro Glu Gly Val Arg Leu Arg Thr Ala Gly Gln Arg Leu Gln Val Leu
 115 120 125
 Trp His Pro Pro Ala Ser Trp Pro Phe Pro Asp Ile Phe Ser Leu Lys
 130 135 140
 Tyr Arg Leu Arg Tyr Arg Arg Arg Gly Ala Ser His Phe Arg Gln Val
 145 150 155 160
 Gly Pro Ile Glu Ala Thr Thr Phe Thr Leu Arg Asn Ser Lys Pro His
 165 170 175
 Ala Lys Tyr Cys Ile Gln Val Ser Ala Gln Asp Leu Thr Asp Tyr Gly
 180 185 190
 Lys Pro Ser Asp Trp Ser Leu Pro Gly Gln Val Glu Ser Ala Pro His
 195 200 205
 Lys Pro
 210
 <210> 3
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> 人源

[0004]

<400> 3	
atgctggatt gcagagcagt aataatgcta tggctgltgc cctgggtcac tcagggcctg	60
gctgtgecta ggagtagcag tectgactgg gctcagtgcc agcagctctc teggaatctc	120
tgcattgctag cctggaacgc acatgcacca gcgggacata tgaatctact aagagaagaa	180
gaggatgaag agactaaaaa taatgtgcc cgtatccagt gtgaagatgg ttgtgaccca	240
caaggactca aggacaacag ccagttctgc ttgcaaagga tccgccaagg tctggctttt	300
tataagcacc tgettgactc tgacatcttc aaaggggagc ctgctctact cctgatagc	360
ccccatggagc aacttcacac ctccctacta ggactcagcc aactctcca gccagaggat	420
cacccccggg agaccecaaca gatgccagc ctgagttcta gtcagcagtg gcagcgeccc	480
ctctccgtt ccaagatcct tcgaagctc caggcctttt tggccatagc tgcccgggic	540
tttgcacaag gacagcaac tctgactgag cccttagtgc caacagetta a	591
<210> 4	
<211> 687	
<212> DNA	
<213> 人源	
<400> 4	
atgccaagc tgccttctc gtcacttgc cctgggcca gccgctcccc tggftaact	60
gaaacagctc tcgtggtct aagccagccc agagtgaat gccatgcttc teggtatccc	120
gtggccgtgg actgctctg gactctctc cagctccca actccaccag atccagctc	180
ttcattgcca cttacaggct cgggtgtggc acccagcagc agagccagcc ctgcctaaa	240
cggagccccc aggcctcccc atgcaccatc cccgacgtgc acctgttctc cacggtgccc	300
tacatgctaa atgtcactgc agtgcacca ggcggcgcca gcagcagcct cctagccttt	360
gtggctgagc gaatcatcaa gccggacct ccggaaggcg tgcgcctgcg cacagcggga	420

[0005]

cagcgectgc aggtgetctg gcatccccct gcttcctgge ccttcccgga catcttctct	480
ctcaagtacc gactccgeta ccggcgccga ggagcctctc acttccgcca ggtgggaccc	540
attgaagcca cgactttcac cctcaggaac tcgaaacccc atgccaagta ttgcatccag	600
gtgtcagctc aggacctcac agattatggg aaaccaagtg actggagcct ccctgggcaa	660
gtagaaagtg caccccataa gccctga	687
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
atgctggatt gcagagcagt	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
gtaagctgtt ggcactaagg	20
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
ccggaattca tgctggattg cagagcagt	29
<210> 8	

[0006]

- <211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 8
ccgctcgagg taagctgttg gcacaaagg 29
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 9
atgtccaagc tgctcttct 20
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 10
tcagggtta tggggtgcac 20
<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 11
ccggaattca tgtccaagct gctcttct 29
<210> 12

[0007]

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

ccgctcgagt caggccttat ggggtgcac

29

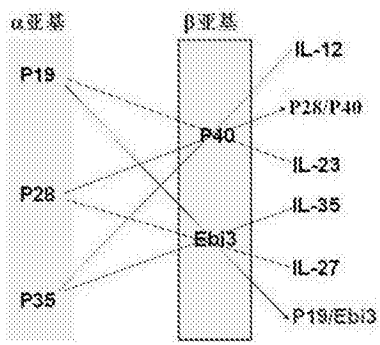


图 1

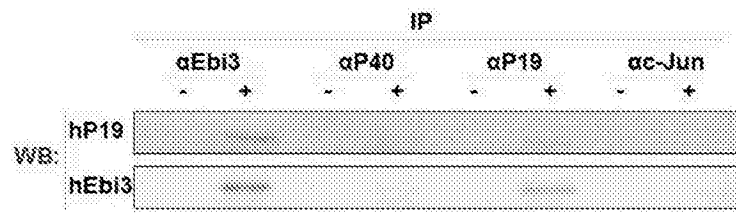


图 2



图 3

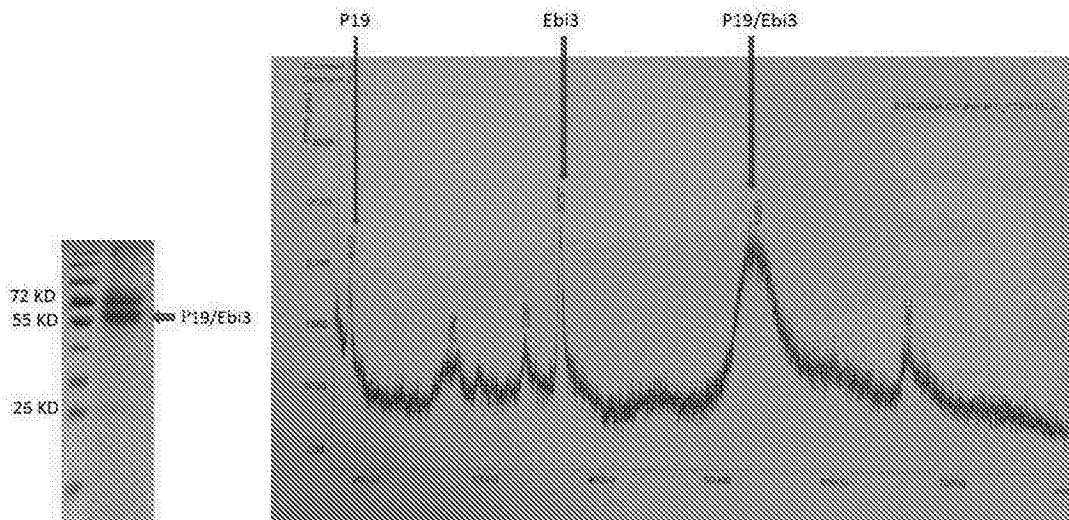


图 4

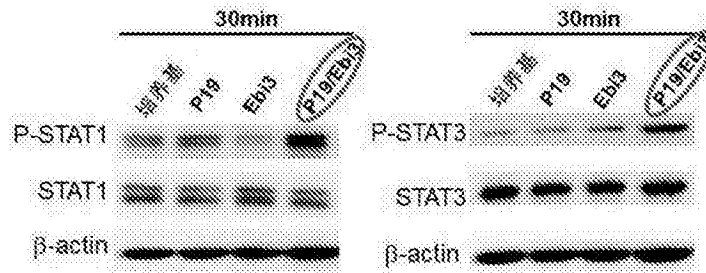


图 5

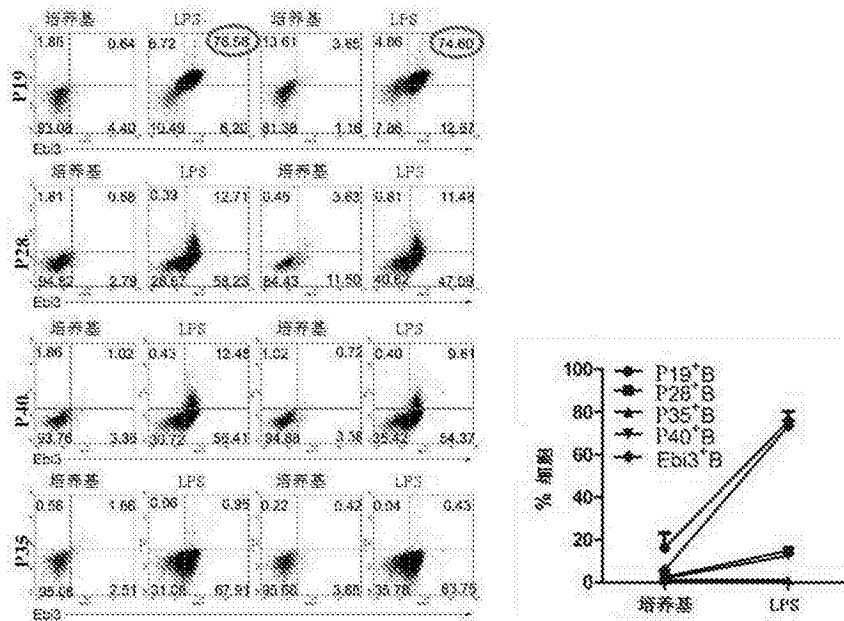


图 6

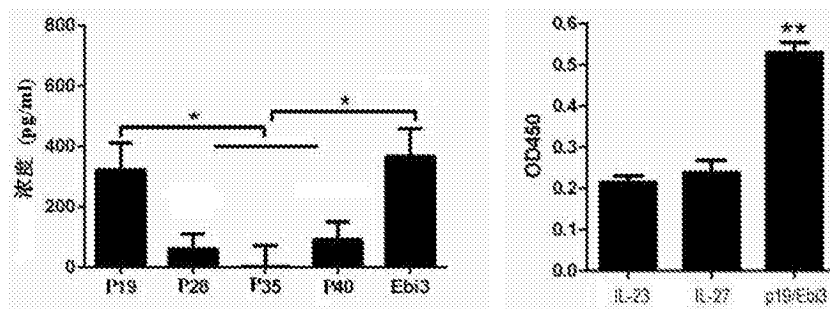


图 7

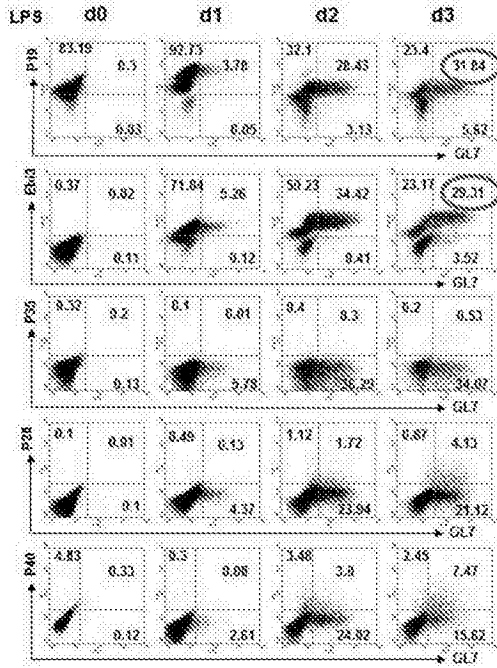


图 8

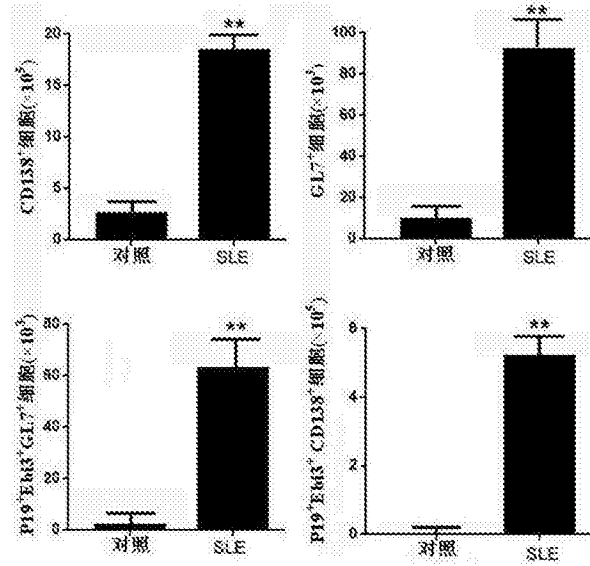


图 9

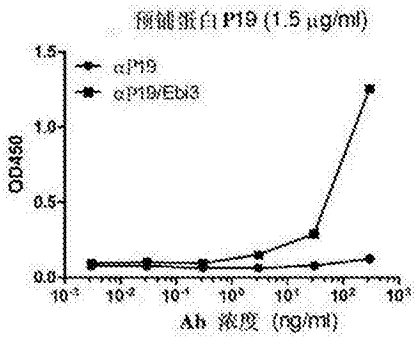


图 10

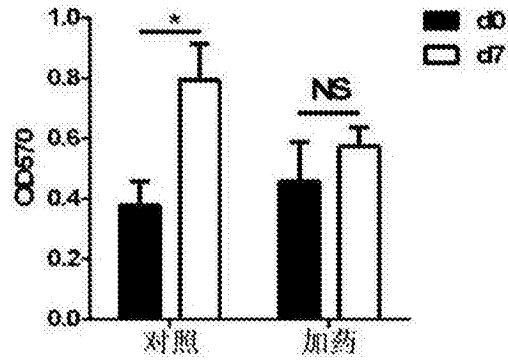


图 11



图 12

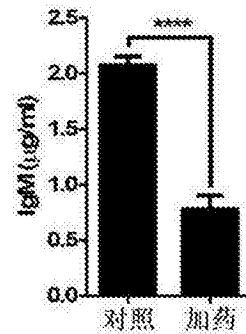


图 13

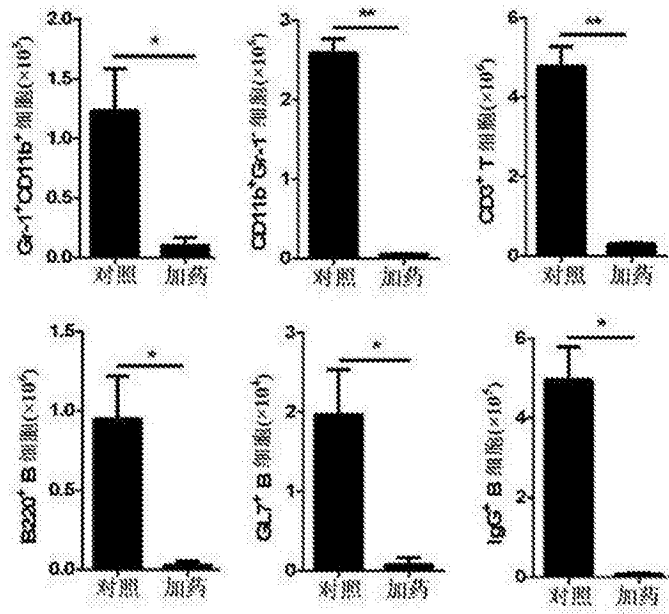


图 14

专利名称(译)	P19/Ebi3复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊治中的应用		
公开(公告)号	CN105085656A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201510555637.1	申请日	2015-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	王仁喜 肖鹤 韩根成 陈国江 黎燕 沈倍奋 侯春梅 王小茜 魏寅祥 刘晓玲 张玉		
发明人	王仁喜 肖鹤 韩根成 陈国江 黎燕 沈倍奋 侯春梅 王小茜 魏寅祥 刘晓玲 张玉		
IPC分类号	C07K14/54 C12P21/02 C07K16/24 G01N33/53 A61K39/395 A61P37/02		
CPC分类号	A61K39/39516 C07K14/54 C07K16/244 G01N33/53		
代理人(译)	孟祥斌 朱萍		
其他公开文献	CN105085656B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了P19/Ebi3复合物及其多克隆抗体在系统性红斑狼疮诊断、治疗中的用途。实验证明，与正常小鼠相比，系统性红斑狼疮小鼠中的P19/Ebi3复合物高水平表达，且使用抗P19/Ebi3蛋白的多克隆抗体可以降低小鼠体内抗体的表达水平及免疫细胞的数量，表明可以通过制备抗P19/Ebi3的抗体来治疗系统性红斑狼疮，因此P19/Ebi3复合物及其抑制剂用于制备诊治系统性红斑狼疮药物，具有良好的开发前景。

