



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101367867 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200710075744.X

卷(第4期), 346-351.

(22) 申请日 2007.08.14

审查员 潘浩

(73) 专利权人 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 深圳新创友知识产权代理有
限公司 44223

代理人 罗瑶

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件

US 6436409 B1, 2002.08.20, 全文.

邱丽华. 结核感染 / 结核病诊断新技术—
ELISPOT. 《中国防痨杂志》. 2006, 第 28 卷 44-47.

朱义鑫等. 替换 HIV-1 衣壳蛋白基因 SHIV 的
构建及其活性测定. 《中国病毒学》. 2005, 第 20

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

特异性检测结核杆菌感染的多肽及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种具有结核杆菌免疫原性多肽, 所述多肽的氨基酸序列如序列表中 Seq ID No. 2 所示。本发明还公开了包含上述多肽的试剂盒。采用本发明的多肽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:所述多肽的氨基酸序列如序列表中 Seq ID No. 2 所示。
2. 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,所述多肽的氨基酸序列如序列表中 Seq ID No. 2 所示。

特异性检测结核杆菌感染的多肽及试剂盒

技术领域

[0001] 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及试剂盒。

背景技术

[0002] 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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 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。

[0007] 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

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0011] 本发明公开了一种具有结核杆菌免疫原性的多肽,所述多肽的氨基酸序列如序列表中 Seq ID No. 2 所示。

[0012] 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,所述多肽的氨基酸序列如序列表中 Seq ID No. 2 所示。

[0013] 由于采用了以上技术方案,使本发明具备了以下有益效果:

[0014] 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

[0015] 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-1051-70 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 isoforma(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。

[0016] 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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 下面通过具体的实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0023] 实施例 1

[0024] 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。

[0025] 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(PubMed15297485) 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 DKW51-70(Seq ID No. 2)。

[0026] 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。

[0027] 实施例 2

[0028] 选择 23 名临床诊断为结核病患者的病人。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。

[0029] 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(PubMed15297485) 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 DKW51-70(Seq ID No. 2)。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 序列表

专利名称(译)	特异性检测结核杆菌感染的多肽及试剂盒		
公开(公告)号	CN101367867B	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	CN200710075744.X	申请日	2007-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市达科为生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市达科为生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市达科为生物技术有限公司		
[标]发明人	朱义鑫		
发明人	朱义鑫		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/535 G01N33/569		
代理人(译)	罗瑶		
审查员(译)	潘浩		
其他公开文献	CN101367867A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种具有结核杆菌免疫原性多肽，所述多肽的氨基酸序列如序列表中Seq ID No.2所示。本发明还公开了包含上述多肽的试剂盒。采用本发明的多肽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。