



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869078 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201410075379.2

(22) 申请日 2014.03.04

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府  
大道 999 号

(72) 发明人 梅林 熊文诚 张斌 沈承勇  
罗时文

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有  
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图7页

(54) 发明名称

利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断  
组合物

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,公开了利用聚集  
蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物,包括  
聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位。本发明组合物能  
对神经传递障碍疾病进行诊断,具有良好的效果,  
市场前景广阔。

1. 利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物,包括聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位。
2. 根据权利要求1所述的诊断组合物,其特征在于还进一步包括LRP4、乙酰胆碱受体、乙酰胆碱受体模拟表位、肌肉特异性酪氨酸激酶的任一种或几种。
3. 根据权利要求1所述的诊断组合物,其特征在于所述神经传递障碍疾病包括重症肌无力,肌肉萎缩症,或者先天性肌无力综合征CMS。
4. 利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断试剂盒,包括权利要求1所述的诊断组合物。
5. 根据权利要求4所述的诊断试剂盒,其特征在于诊断组合物中聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位上有可检测的标签。
6. 根据权利要求4所述的诊断试剂盒,其特征在于所述标签为 $^{125}\text{I}$ 。
7. 根据权利要求4所述的诊断试剂盒,其特征在于通过有色颗粒免疫测定法检测抗原-抗体复合物。
8. 一种检测聚集蛋白抗体的方法,所述方法包括检测由权利要求1所述的诊断组合物与样品接触后所形成的抗原-抗体复合物。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于所述的方法选自:BIACORE分析、FACS、免疫荧光、免疫细胞化学、免疫印记、放射性免疫分析、ELISA、免疫沉淀反应、沉淀素反应、胶扩散沉淀反应。

## 利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及诊断组合物。

### 背景技术

[0002] 神经传递障碍疾病重症肌无力是一种自身免疫疾病,将导致神经肌肉接头的功能紊乱。70%患有重症肌无力的病人都携带乙酰胆碱受体的自身抗体,另外10%病人携带MuSK的自身抗体。但是,20%的病人在血清中检测不到乙酰胆碱受体或MuSK的自身抗体。因此,需要一种针对神经肌肉相关的疾病如重症肌无力的诊断组合物。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种针对神经传递障碍疾病的诊断组合物。

[0004] 具体技术方案:

利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物,包括人低密度脂蛋白受体相关蛋白4聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位。

[0005] 为了达到更好的效果,所述的诊断组合物,还进一步包括LRP4、LRP4模拟表位、乙酰胆碱受体、乙酰胆碱受体模拟表位、肌肉特异性酪氨酸激酶的任一种或几种。

[0006] 所述神经传递障碍疾病包括重症肌无力,肌肉萎缩症,或者先天性肌无力综合征(CMS)。

[0007] 本发明还涉及利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断试剂盒,前述诊断组合物。

[0008] 为了更好的达到检测的效果,诊断组合物中聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位上有可检测的标签。这样检测结果会更加直观,便于观察。

[0009] 所述标签可以为<sup>125</sup>I。

[0010] 所述的诊断试剂盒,还可以通过有色颗粒免疫测定法检测抗原-抗体复合物。同样具有直观的结果呈现效果。

[0011] 本发明还一种检测聚集蛋白抗体的方法,所述方法包括检测由前述的诊断组合物与样品接触后所形成的抗原-抗体复合物。

[0012] 这种检测聚集蛋白抗体的方法,选自:BIACORE分析、FACS、免疫荧光、免疫细胞化学、免疫印记、放射性免疫分析、ELISA、免疫沉淀反应、沉淀素反应、胶扩散沉淀反应。

[0013] 本发明的有益效果是:提供了一种效果良好的利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物,填补了目前研究及市场的空缺,具有广阔的市场前景。

### 附图说明

[0014] 图1:采用ELISA方法检测针对LRP4的自身抗体。

[0015] 图2:重症肌无力的病人血清中检测不到抗乙酰胆碱受体/MuSK的抗体,但是能检测到LRP4的自身抗体。

[0016] 图 3:免疫 LRP4 胞外端重组蛋白诱发小鼠产生 LRP4 自身抗体,并引起小鼠重症肌无力症状,肌电图动物电位不能持续维持。

[0017] 图 4:注射 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠神经肌肉接头形态出现异常,包括乙酰胆碱受体染色呈碎片,突触前运动神经元退化,突触小泡密度下降。

[0018] 图 5:注射 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠血清能够抑制 MuSK 蛋白的酪氨酸磷酸化,减少 LRP4 细胞表面定位以及聚集蛋白诱导的乙酰胆碱受体聚集,并部分激活补体反应。

[0019] 图 6:注射抗 LRP4 兔免疫球蛋白 IgG 的小鼠具有重症肌无力症状。

[0020] 图 7:采用 ELISA 方法检测针对聚集蛋白的自身抗体。

[0021] 图 8:聚集蛋白自身抗体阳性的重症肌无力病人血清能够识别外源表达的聚集蛋白。

[0022] 图 9:聚集蛋白自身抗体阳性的重症肌无力病人血清能够抑制聚集蛋白引起的乙酰胆碱受体在肌肉细胞中的聚集。

### 具体实施方式

[0023] 实施例 1 LRP4 自身抗体存在于重症肌无力病人血液,能够诱发重症肌无力

自发性免疫疾病重症肌无力是一种常见的神经突触疾病,10 万人中约有 10-20 个患者。其中约有 80% 的病人其体内的抗体能够结合肌肉的乙酰胆碱受体,这些抗体使乙酰胆碱受体数目减少或是失去功能,从而导致神经肌肉传递中的肌无力。尽管大部分的重症肌无力都是由于自身抗体结合乙酰胆碱受体引发的,但是约有 20% 的病人体内检测不到乙酰胆碱受体的抗体。2001 年,在乙酰胆碱受体抗体阴性的病人中,有约 4-50% 的病人可以检测出 MuSK 抗体。用 MuSK 胞外区免疫兔后可导致重症肌无力,乙酰胆碱受体的数目减少。尽管一系列的实验证明了乙酰胆碱受体和 MuSK 的抗体导致了重症肌无力,但是还有 10% 的病人血清中鉴定不到这些抗体。

[0024] 本实例证明在乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体双阴性的病人中,约有 9.2% 的病人检测出 LRP4 的抗体。LRP4 胞外区域的抗体能明显的抑制 LRP4 的功能,是乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体阴性的重症肌无力病人致病原因。本实例证明免疫 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠,能够检测到血清中产生 LRP4 自身抗体。小鼠诱发重症肌无力症状,包括体重减轻,爪握力下降,神经递质传递出现障碍,肌肉复合动作电位(CMAP)不能持续。形态学上发现神经肌肉接头聚集的乙酰胆碱受体下降并出现碎片,不能完全和神经末端重合。将免疫有 LRP4 胞外端重组蛋白的重症肌无力兔子血清注射到小鼠上,也能引发重症肌无力,证明了 LRP4 自身抗体的致病性。因此,检测 LRP4 抗体是临床上检测和诊断重症肌无力的一种新方法,制备 LRP4 自身抗体引起的自身免疫病动物模型是作为探索治疗重症肌无力的新模型。

[0025] 实验步骤:

实验材料:Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及各种限制性内切酶购自 Promega 公司。各种辣根过氧化物酶链接的羊抗鼠和羊抗兔抗体与用于 WB 的 ECL 试剂购自 Amersham 公司。R-BTX 购自 Molecular Probes 公司。寡聚核苷酸由 Operon Biotechnologies 公司合成。除非个别提到的特例,其他所有试剂都购自 Sigma-Aldrich 公司。

[0026] 各种抗体购置于 Sigma 公司(Flag M2, F3165);Upstate Biotechnology (4G10, 05-1050);Novus ( $\beta$ -actin, NB600-501)。各种兔抗 MuSK 抗体在之前文献中有描述(Luo

et al., 2002, *Neuron*; 35:489-505)。鼠抗乙酰胆碱  $\alpha$  亚基抗体为 mAb35。

[0027] 构建材料: 构建 Flag-ecto-LRP4-His 时, 在含有 LRP4 胞外结构域的 pFlag-ecto-LRP4-CMV 载体中的 SalI 和 EcoRV 酶切位点之间, 通过 PCR 技术引入 His 肽段标签 (Wu et al., 2012, *Neuron*; Shen et al. 2013, *J. Clin. Invest.*)。

[0028] 细胞培养与转染: HEK293 细胞系和小鼠 C2C12 肌肉细胞系的维持和转染在之前的文献中有描述 (Zhang et al., 2007, *J Neurosci*; 27:3968-3973)。在一些实验中, 肌管是由 lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-019) 转染的。转染过程中, 细胞培养在 DNA、脂质体和无血清培养基的混合物中, 持续 8 小时后, 换为融合培养基。在混合物中 DNA 与脂质体的比例为  $1 \mu\text{g}:2 \mu\text{l}$ 。在 10 厘米培养皿中培养优化条件为 1ml 转染混合物, 其中含有  $10 \mu\text{g}$  DNA 质粒。

[0029] 重组蛋白的表达及其纯化: 表达重组蛋白时, HEK293 细胞由相应的质粒转染。转染 24 小时后, 细胞培养基换为含有 0.05% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。24 小时后收集细胞培养基和细胞, 利用 Talon 柱纯化 LRP4 胞外端重组蛋白, 具体方法参见 (Shen et al. 2013, *J. Clin. Invest*; Zhang et al. 2011. *JAMA Neuro*)。

[0030] 小鼠免疫实验: 将 100  $\mu\text{l}$  含有 25ug 的混有完全弗氏佐剂的 LRP4 抗原蛋白乳液注射到小鼠背部皮下, 一个月后注射相同含量的非完全弗氏佐剂 /LRP4 抗原蛋白乳液, 两周后重复注射以提高抗体滴度。期间抽取小鼠血液用 Elisa 检测 LRP4 抗体是否阳性, 具体方法参见 (Shen et al. 2013, *J Clin. Invest*)。

[0031] 酶联免疫吸附实验 (ELISA): 具体方法参见文献 (Shen et al. 2013, *J Clin. Invest*; Zhang et al. 2011. *Arch Neuro*)。纯化的 Flag-LRP4 过夜包被 Maxi-Sorp Immunology Plates (Nunc), 然后用含有 1%BSA 的 PBS 孵育以去除非特异结合。包被完毕的培养板中加入经 LRP4 免疫的小鼠血清以检测 LRP4 抗体, 按照 1:100 稀释并重复三组。一抗采用辣根过氧化物酶连接的羊抗小鼠耳朵 IgG 检测, 实验中的非特异性吸附被扣除。

[0032] 免疫染色 - 小鼠膈肌经剥离后用 4% 的多聚甲醛固定 1 天以上, 用 0.1M Glycine 处理 1 小时。1.0% Triton-x-100/PBS 穿孔过夜, 加入含有 1.0% 胎牛血清, 0.5% 羊血清的抗体封闭液 2 小时。加入 Neurofilament 和 synaptophysin 抗体过夜。用 1.0% Triton-x-100/PBS 洗 3 以上, 每次 1 小时。加入含有对应的荧光二抗和 R-BTX (tetramethylrhodamine-conjugated  $\alpha$ -bungarotoxin, 以标记乙酰胆碱受体)。用 1.0% Triton-x-100/PBS 洗 3 以上, 每次 1 小时, 封片显微镜下观察。

[0033] 电镜实验: 具体染色参见以前报道 (Shen et al. 2013, *J Clin. Invest*)。小鼠膈肌用 2% 戊二醛和 2% 多聚甲醛室温固定 1 小时, 再在 1% 锇酸处理 1 小时。经 30%, 50%, 70%, 80%, 90% and 100% 酒精脱水后包埋, 切片成 1-2  $\mu\text{m}$ 。用 3% uranyl acetate 和 2.6% lead citrate 显色, 用 JEOL 100CXII 拍照。

[0034] 免疫共沉淀、免疫印迹和乙酰胆碱受体聚合实验: 这些实验按照之前文献的描述进行操作 (Luo et al., 2002, *Neuron*; 35:489-505; Zhang et al., 2007, *J Neurosci*; 27:3968-3973; Zhu et al., 2008, *J Neurosci*; 28:1688-1696)。除特别说明外, 用于刺激肌肉细胞的重组神经聚集蛋白的终浓度都为 1 nM。免疫印迹的条带亮度通过 ImageJ software 进行分析。

[0035] 统计学分析: 多组实验数据用 ANOVA 软件根据 student-Newman-Keuls test 进行

分析。Two-tailed Student's t test 用于比较分析两组数据。各组数据差异显著性的判别标准是  $P < 0.05$ 。在图表中的数值和误差线分别表示平均值和标准误。

[0036] 结果：

重症肌无力病人中约有 10-15% 为乙酰胆碱受体以及肌肉特异的酪氨酸激酶抗体阴性，由于病人不同的确诊方法和实际真实值无法估计。为了建立一种新的诊断方法和进行流行病学分析，病人的血浆和血清采用 ELISA 方法分析其和 LRP4 或聚集蛋白的结合。如图 1 所示，LRP4 采用 ELISA 方法检测，在 217 个重症肌无力病人血清中，共有 12 个病人检测到 LRP4 抗体阳性。在 120 个血清为乙酰胆碱受体以及肌肉特异的酪氨酸激酶抗体双阴性的重症肌无力病人中，发现 11 个 LRP4 抗体阳性。通过比对发现鼠源和人源 LRP4 同源率为 98%，在 1905 个氨基酸中只有 68 个不同。尽管目前检测 LRP4 的灵敏度较高，如果在将来的检测中采用人源的 LRP4 其灵敏度能得到进一步的提升。

[0037] 乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体阴性的重症肌无力病人的血浆采用鼠源的 LRP4 检测。五个血清为乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体阴性的重症肌无力病人的血浆在稀释 50 倍后能结合到细胞膜上的 LRP4，但是健康人血浆不能结合 LRP4。如图 10 所示，乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体阴性病人的血浆结合 LRP4。乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体阴性病人的血浆能够结合 HEK293 上表达的全长 LRP4，健康人血浆抗体不能结合。图 2：重症肌无力的病人血清中检测不到抗乙酰胆碱受体 /MuSK 的抗体，但是能检测到 LRP4 的自身抗体。

[0038] 如图 3 所示，本实例证明免疫 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠，能够检测到血清中产生 LRP4 自身抗体。小鼠诱发重症肌无力症状，包括体重减轻，爪握力下降。而且神经接头递质传递出现障碍，肌肉复合动作电位 (CMAP) 不能持续。图 4 所示，形态学上发现注射 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠神经肌肉接头形态出现异常，神经肌肉接头聚集的乙酰胆碱受体下降并出现碎片，不能完全和神经末端重合，突触前运动神经元退化，突触小泡密度下降。注射 LRP4 胞外端重组蛋白的小鼠血清能够抑制 MuSK 蛋白的酪氨酸磷酸化，减少 LRP4 细胞表面定位以及聚集蛋白诱导的乙酰胆碱受体聚集，并部分激活补体反应(如图 5 所示)。将免疫有 LRP4 胞外端重组蛋白的重症肌无力兔子血清注射到小鼠上，也能引发重症肌无力，证明了 LRP4 自身抗体的致病性(图 6)。因此，检测 LRP4 抗体是临床上检测和诊断重症肌无力的一种新方法，制备 LRP4 自身抗体引起的自身免疫病动物模型是作为探索治疗重症肌无力的新模型。

[0039] 实施例 2 重症肌无力患者自身抗体结合聚集蛋白 agrin

一部分重症肌无力患者病人的血清，呈现乙酰胆碱受体抗体 /MuSK 抗体 /LRP4 抗体阴性，这可能提示还有新的未知自身抗体存在。本发明证明了在这些病人血清中含有聚集蛋白 agrin 的抗体。本实例证明在 93 个重症肌无力病人中，7 个血清为聚集蛋白抗体阳性(约为 7~8%)，而在健康人或其他病人对照中，并没有发现聚集蛋白抗体阳性。此发明说明聚集蛋白抗体是重症肌无力患者的新致病原。

[0040] 实验证明聚集蛋白抗体血清能够识别聚集蛋白，而且能够抑制聚集蛋白诱导的 MuSK 蛋白磷酸化，并能够抑制聚集蛋白对乙酰胆碱受体的聚集。此发明证明聚集蛋白抗体和乙酰胆碱受体抗体，MuSK 抗体和 LRP4 抗体一样，同样是引起重症肌无力的致病原因。因此，检测聚集蛋白抗体是临床上检测和诊断重症肌无力的一种新方法。

[0041] 方法：

病人 - 样品来源于男性或是女性重症肌无力病人。病人都通过肌电图经一部证实了神经肌肉传递缺陷或是对抗胆碱酯酶的检测结构呈阳性。另外一些血清来自正常的志愿者,来源于他免疫相关的神经性疾病或正常人血清。

[0042] 神经聚集蛋白的表达 - 构建方法在实例 1 中有详细描述。构建后的质粒瞬时转染到 HEK293 细胞中。为了获得可溶性的聚集蛋白,转染后的第二天将细胞转移至低血清培养基,含有聚集蛋白的培养基在 24 小时后收集并采用 Western blotting 方法检测蛋白表达。

[0043] 免疫染色 - COS7 细胞在转染后的第二天转移到培养皿中。两天后细胞用 4% 的多聚甲醛固定染色。重症肌无力病人以及正常病的血浆按照稀释成不同的比例用来分析。一抗后连接 FITC 作为显色二抗。

[0044] Elisa 方法检测聚集蛋白抗体 - 来自转染有聚集蛋白或空载体的 HEK293 细胞的培养培养基用 PH9.5 的 NaHCO<sub>3</sub> (PH=9.5) 溶液按照 1:1 稀释后加入 ELISA 板上过夜。血浆按照 1:100 稀释并重复三组。一抗采用碱性磷酸酶连接羊抗人的 IgM+IgG+IgA 检测,实验中的非特异性吸附被扣除。

[0045] 结果

为了建立一种新的诊断方法和进行流行病学分析,病人的血浆和血清采用 ELISA 方法分析聚集蛋白抗体的存在。如图 7 所示,聚集蛋白采用 Elisa 方法检测。本实例证明在 93 个重症肌无力病人中,7 个血清为聚集蛋白抗体阳性(约为 7~8%),而在健康人或其他病人对照中,并没有发现聚集蛋白抗体阳性。在 6 个乙酰胆碱受体抗体阴性 /MuSK 抗体阳性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,没有检测到聚集蛋白抗体阳性,说明 MuSK 抗体阳性的病人很可能是聚集蛋白抗体阴性。在 83 个乙酰胆碱受体抗体阳性 /MuSK 抗体阴性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,5 个呈现聚集蛋白抗体阳性,比例约为 6%。而在 4 个乙酰胆碱受体抗体阴性 /MuSK 抗体阴性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,2 个为聚集蛋白抗体阳性,比例高达 50%。此发明说明聚集蛋白抗体很可能是乙酰胆碱受体 /MuSK/LRP4 抗体三阴性病人的新致病原。

[0046] 如图 8 所示,聚集蛋白阳性的病人血清能够结合 HEK293 上表达的全长聚集蛋白,而健康人血浆抗体不能结合。而且如图 9 所示,聚集蛋白阳性的病人血清能够抑制聚集蛋白引起的 MuSK 蛋白的磷酸化,和对乙酰胆碱受体的聚集。

[0047] 实施例 3 LRP4 自身抗体检测试剂盒的制备方法和检测过程

自发性免疫疾病重症肌无力是一种常见的神经突触疾病,10 万人中约有 10-20 个患者。其中约有 80% 的病人其体内的抗体能够结合肌肉的乙酰胆碱受体,这些抗体使乙酰胆碱受体数目减少或是失去功能,从而导致神经肌肉传递中的肌无力。而在乙酰胆碱受体抗体阴性的病人中,有约 4-50% 的病人可以检测出 MuSK 抗体。尽管一系列的实验证明了乙酰胆碱受体和 MuSK 的抗体导致了重症肌无力,但仍有 10% 的病人血清中检测不到这些抗体。本实例描述了 LRP4 自身抗体酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒的制备方法,以及用该试剂盒在乙酰胆碱受体以及 MuSK 抗体双阴性的病人中检测 LRP4 抗体的过程。

[0048] 试剂盒的制备:

构建材料:构建 Flag-ecto-LRP4-His 时,在含有 LRP4 胞外结构域的 pFlag-ecto-LRP4-CMV 载体中的 SalI 和 EcoRV 酶切位点之间,通过 PCR 技术引入 His 肽段标签 (Wu et al., 2012, Neuron; Shen et al. 2013, J. Clin. Invest)。

[0049] 细胞培养与转染:HEK293 细胞系的维持和转染在之前的文献中有描述 (Zhang et

al., 2007, J Neurosci; 27:3968-3973)。转染过程中,细胞培养在 DNA、脂质体和无血清培养基的混合物中,持续 8 小时后,换为融合培养基。在混合物中 DNA 与脂质体的比例为  $1\mu\text{g}:2\mu\text{l}$ 。在 10 厘米培养皿中培养优化条件为 1ml 转染混合物,其中含有  $10\mu\text{g}$  DNA 质粒。

[0050] 重组蛋白的表达及其纯化:表达重组蛋白时,HEK293 细胞由 Flag-ecto-LRP4-His 质粒转染。转染 24 小时后,细胞培养基换为含有 0.05% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。24 小时后收集细胞培养基和细胞,利用 Talon 柱纯化 LRP4 胞外端重组蛋白,具体方法参见 (Shen et al. 2013, J. Clin. Invest; Zhang et al. 2011. Arch Neurol)。

[0051] 酶联免疫板的包被:纯化的 Flag-LRP4 用碳酸缓冲液 (PH=9.5) 稀释后加入 ELISA 板 (Maxi-Sorp Immunology Plates (Nunc)) 上  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。然后用含有 1%BSA 的 PBS 封闭以阻断非特异结合位点。包被好的酶联免疫板可以长期保存。

[0052] LRP4 抗体的检测:

病人样品 患者血清来源于男性及女性重症肌无力病人。病人经肌电图确诊,或已检测出抗乙酰胆碱受体抗体。对照血清来自正常的志愿者以及其他免疫相关的神经性疾病患者。

[0053] ELISA 检测:包被好的酶联免疫板中加入经 1:100 稀释的血清样品,每个样品重复三组。经孵育清洗后,向板中加入碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgM+IgG+IgA 二抗检测,实验中的非特异性吸附被扣除。

[0054] 统计学分析:多组实验数据用 ANOVA 软件根据 student-Newman-Keuls test 进行分析。Two-tailed Student's t test 用于比较分析两组数据。各组数据差异显著性的判别标准是  $P<0.05$ 。

[0055] 结果:

重症肌无力病人中约有 10-15% 为乙酰胆碱受体以及肌肉特异的酪氨酸激酶抗体阴性。由于病人不同的确诊方法,实际真实值无法估计。为了建立一种新的诊断方法和进行流行病学分析,病人的血浆和血清采用 ELISA 方法分析其中 LRP4 抗体的存在。如图 1 所示,在 217 个重症肌无力病人中,我们用在此描述的方法共检测到 12 位 LRP4 抗体阳性的病人。如图 2 所示,120 个乙酰胆碱受体以及肌肉特异的酪氨酸激酶抗体双阴性的重症肌无力病人中共发现 11 位 LRP4 抗体阳性。通过蛋白序列比对发现鼠源和人源 LRP4 同源率为 98%,在 1905 个氨基酸中只有 68 个不同。尽管目前检测 LRP4 的灵敏度较高,如果在将来的检测中采用人源的 LRP4 其灵敏度能得到进一步的提升。

[0056] 综上所述,检测 LRP4 抗体是临床上检测和诊断重症肌无力的一种新方法。

[0057] 实施例 4 聚集蛋白自身抗体检测试剂盒的制备方法和检测过程

在一部分重症肌无力患者病人的血清中,无法检测到乙酰胆碱受体抗体 /MuSK 抗体 /LRP4 抗体,这可能提示还有新的未知自身抗体存在。本实例描述了聚集蛋白自身抗体酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测试剂盒的制备方法,以及用该试剂盒在乙酰胆碱受体 /MuSK 抗体 /LRP4 抗体三阴性的病人血清中检测 LRP4 抗体的过程,证明了在这部分病人血清中存在聚集蛋白的抗体。

[0058] 试剂盒的制备:

构建材料 构建 pFlag-agrin 时,在 Flag 标签和聚集蛋白序列之间通过 PCR 技术引入

His 肽段标签 (Zhang et al., 2007, J Neurosci )。

[0059] 细胞培养与转染 HEK293细胞系的维持和转染在之前的文献中有描述(Zhang et al., 2007, J Neurosci; 27:3968-3973)。转染过程中,细胞培养在 DNA、脂质体和无血清培养基的混合物中,持续 8 小时后,换为融合培养基。在混合物中 DNA 与脂质体的比例为  $1\mu\text{g}:2\mu\text{l}$ 。在 10 厘米培养皿中培养优化条件为 1ml 转染混合物,其中含有  $10\mu\text{g}$  DNA 质粒。

[0060] 重组蛋白的表达及其纯化 表达重组蛋白时,HEK293 细胞由 pFlag-agrin 质粒转染。转染 24 小时后,细胞培养基换为含有 0.05% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。24 小时后收集细胞培养基和细胞,利用 Talon 柱纯化 agrin 重组蛋白,具体方法参见 文献(Shen et al. 2013, J. Clin. Invest; Zhang et al. 2011. Arch Neurol)。

[0061] 酶联免疫板的包被 纯化的 Flag-agrin 用碳酸缓冲液(PH=9.5) 稀释后加入 ELISA 板(Maxi-Sorp Immunology Plates (Nunc)) 上  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。然后用含有 1%BSA 的 PBS 封闭以阻断非特异结合位点。包被好的酶联免疫板可以长期保存。

[0062] 聚集蛋白抗体的检测:

病人样品 患者血清来源于男性及女性重症肌无力病人。病人经肌电图确诊,或已检测出抗乙酰胆碱受体抗体 /MuSK 抗体。对照血清来自正常的志愿者以及其他免疫相关的神经性疾病患者。

[0063] ELISA 检测 包被好的酶联免疫板中加入经 1:100 稀释的血清样品,每个样品重复三组。经孵育清洗后,向板中加入碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgM+IgG+IgA 二抗检测,实验中的非特异性吸附被扣除。

[0064] 统计学分析 多组实验数据用 ANOVA 软件根据 student-Newman-Keuls test 进行分析。Two-tailed Student's t test 用于比较分析两组数据。各组数据差异显著性的判别标准是  $P<0.05$ 。

[0065] 结果:

为了建立一种新的诊断方法和进行流行病学分析,病人的血浆和血清采用 ELISA 方法分析聚集蛋白抗体的存在。如图 7 所示,聚集蛋白采用 ELISA 方法检测。本实例证明在 93 个重症肌无力病人中,7 个血清为聚集蛋白抗体阳性(约为 7~8%),而在健康人或其他病人对照中,并没有发现聚集蛋白抗体阳性。在 6 个乙酰胆碱受体抗体阴性 /MuSK 抗体阳性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,没有检测到聚集蛋白抗体阳性,说明 MuSK 抗体阳性的病人很可能是聚集蛋白抗体阴性。在 83 个乙酰胆碱受体抗体阳性 /MuSK 抗体阴性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,5 个呈现聚集蛋白抗体阳性,比例约为 6%。而在 4 个乙酰胆碱受体抗体阴性 /MuSK 抗体阴性 /LRP4 抗体阴性的病人血清中,2 个为聚集蛋白抗体阳性,比例高达 50%。此发明说明聚集蛋白抗体很可能是乙酰胆碱受体 /MuSK/LRP4 抗体三阴性病人的新致病原,检测聚集蛋白抗体是临床上检测和诊断重症肌无力的一种新方法。

[0066] 实施例 5 含 LRP4 和 / 或聚集蛋白的多价抗体检测试剂盒

多数重症肌无力病人体内具有抗乙酰胆碱受体的抗体,而在乙酰胆碱受体抗体阴性的病人中,有约 4-50% 的病人可以检测出 MuSK 抗体。本发明提供了一种检测和治疗神经传递以及神经发育过程中相关疾病的新方法,这些疾病包括但不限于重症肌无力。本发明提供的检测方法可检测针对 LRP4,聚集蛋白(agrin)或是相关的抗原的自身抗体。在上述实

施例 3 和 4 中我们描述了约 3% 的乙酰胆碱受体抗体阴性 /MuSK 抗体阳性的病人血清呈现 LRP4 抗体阳性, 而约 6% 的乙酰胆碱受体抗体阳性 /MuSK 抗体阴性 /LRP4 抗体阴性的病人血清呈现聚集蛋白抗体阳性。这些多价抗体阳性的病人可能具有与单价抗体阳性的病人不同的发病机理和病理特征, 需要更有针对性的治疗方案。

[0067] 因此我们要求涵盖含 LRP4 或 LRP4 模拟表位、聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位以及乙酰胆碱受体、乙酰胆碱受体模拟表位、肌肉特异性酪氨酸激酶的任一种或几种的多价抗体检测试剂盒。该试剂盒可能在重症肌无力及其他神经传递障碍疾病的诊断分型和预后中有重要的应用。

#### [0068] 实施例 6

本发明利用 LRP4 作为抗原检测 LRP4 抗体, 利用聚集蛋白检测聚集蛋白抗体进而检测是否为重症肌无力患者。可以利用这个原理依照常规方法如 ELISA, 做成试剂盒。现举例如下:

试纸条的制备: 用具有塑料背板的硝酸纤维素膜作为主要结构固定抗原, 在硝酸纤维素膜较低的位置沉积有金偶联抗体的玻璃纤维素膜(偶联体垫), 和位于硝酸纤维素膜两端, 彼此相连, 吸附有过量溶液的纤维素膜(样品垫和吸附垫)。玻璃纤维膜在系统较低的位置, 由于其较高的吸附能力它不仅很快吸收样品, 而且可以通过延长其向上不迁移的保留时间, 诱导待测材料和溶解胶体金有效的反应。在免疫试纸条的中部, 检测待测样品的抗原(检测线或捕捉线)和能检测胶体金的特定抗体(对照线)分别被固定, 而且纤维素膜位于免疫试纸条的上不(吸附垫)以快速吸附过多的样品。

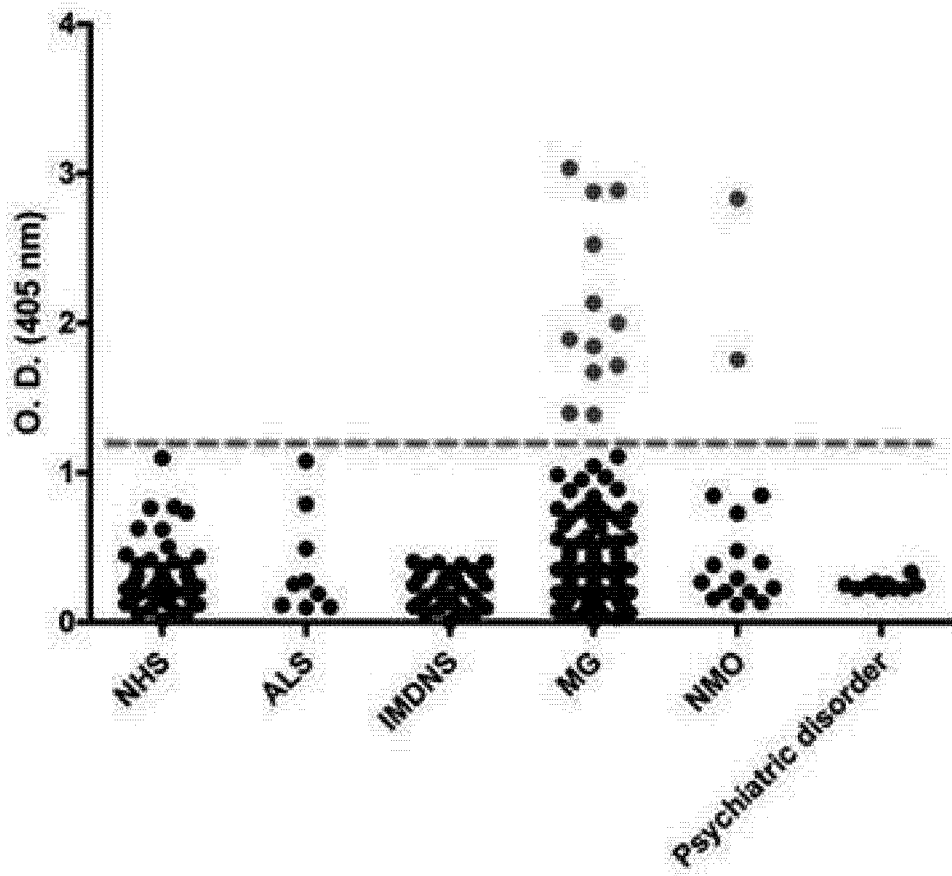


图 1

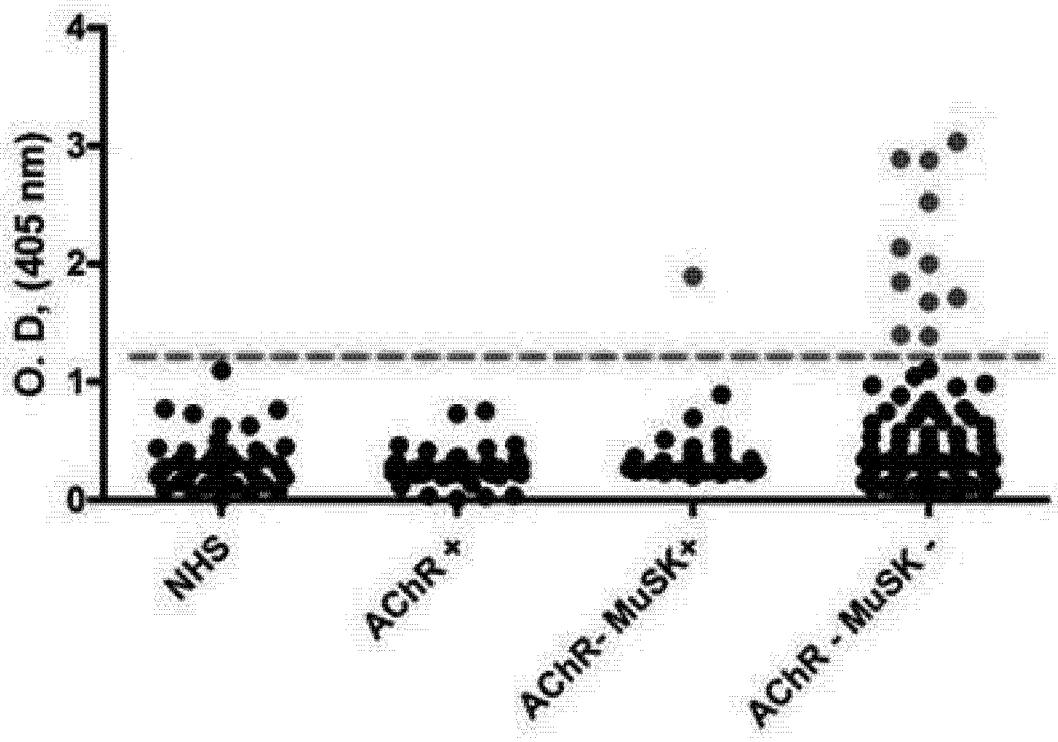


图 2

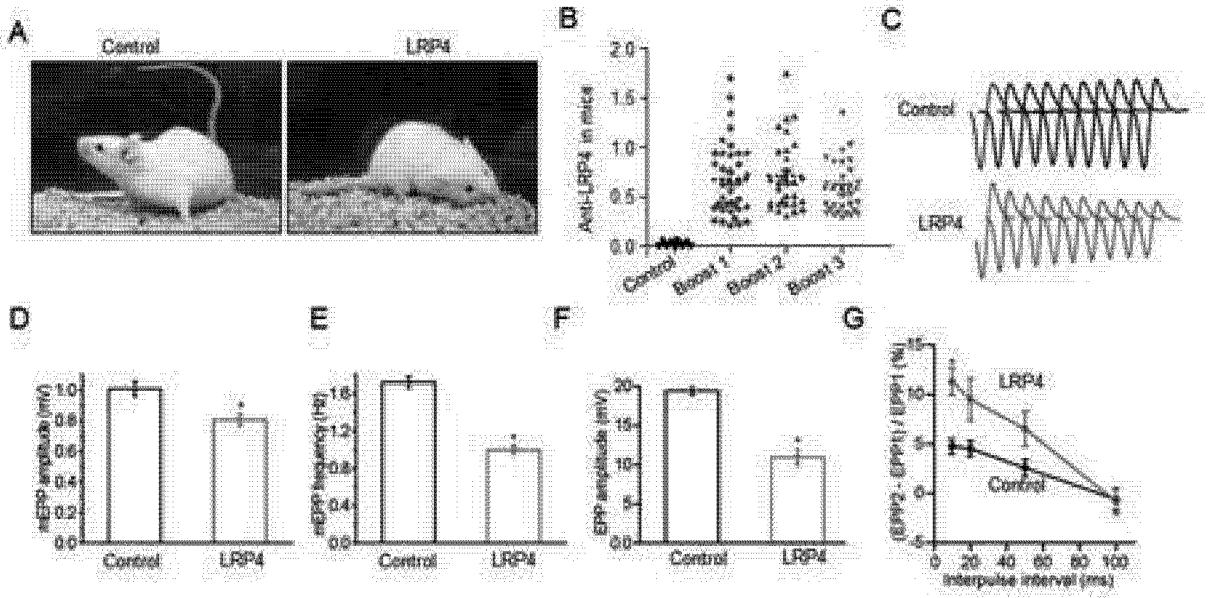


图 3

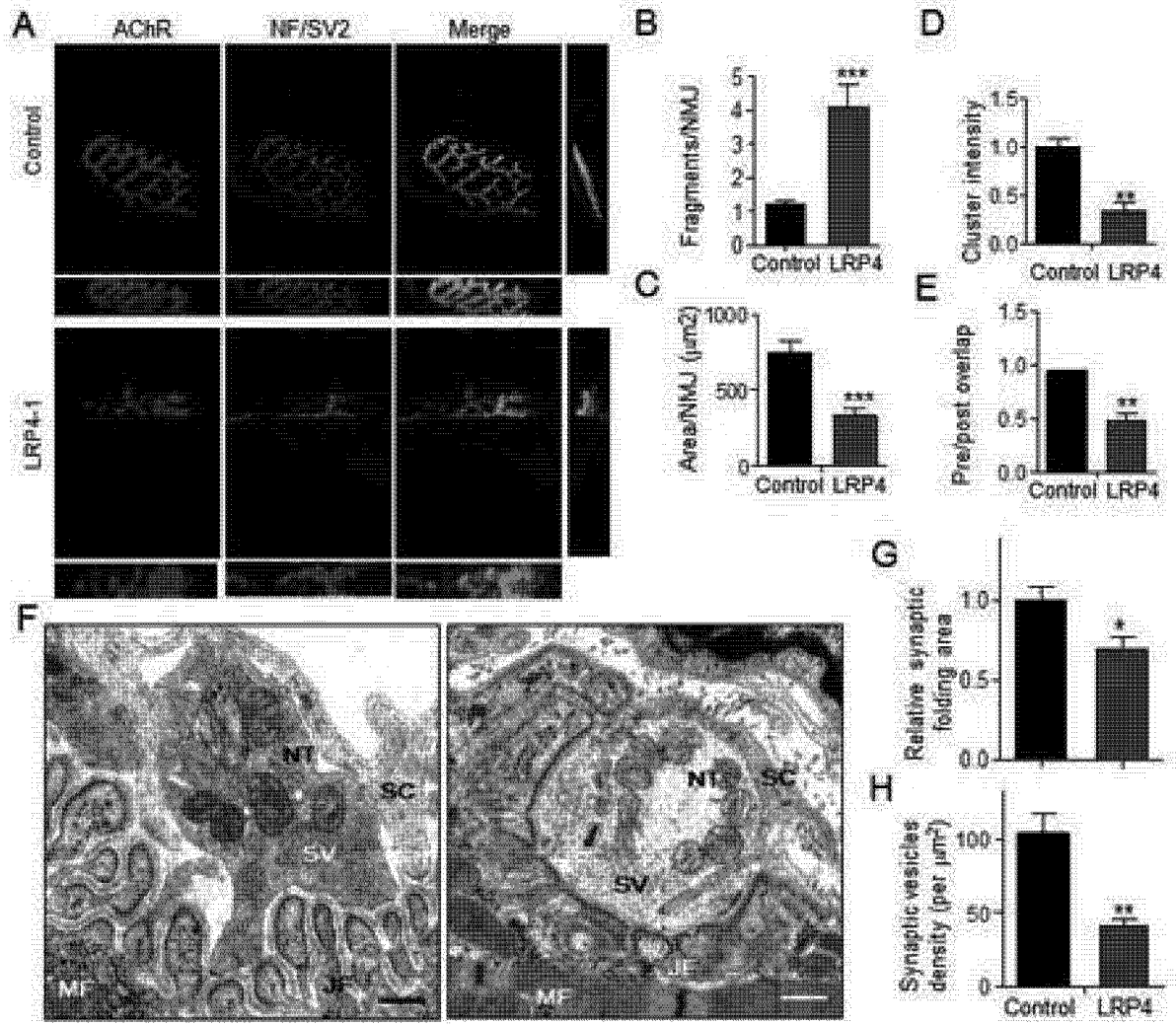


图 4

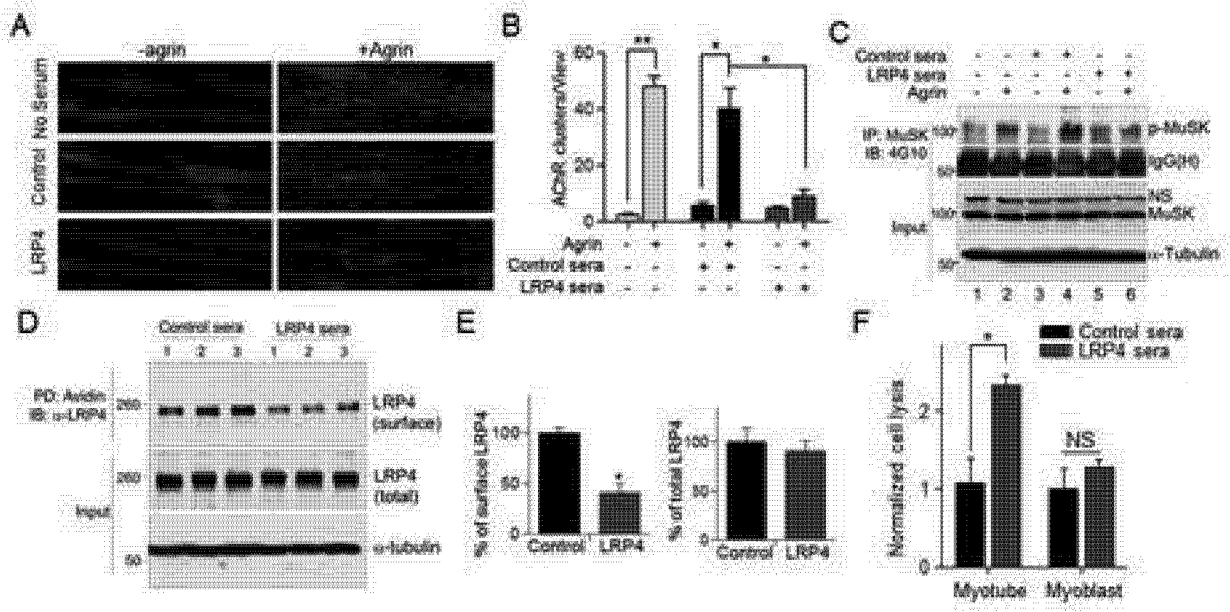


图 5

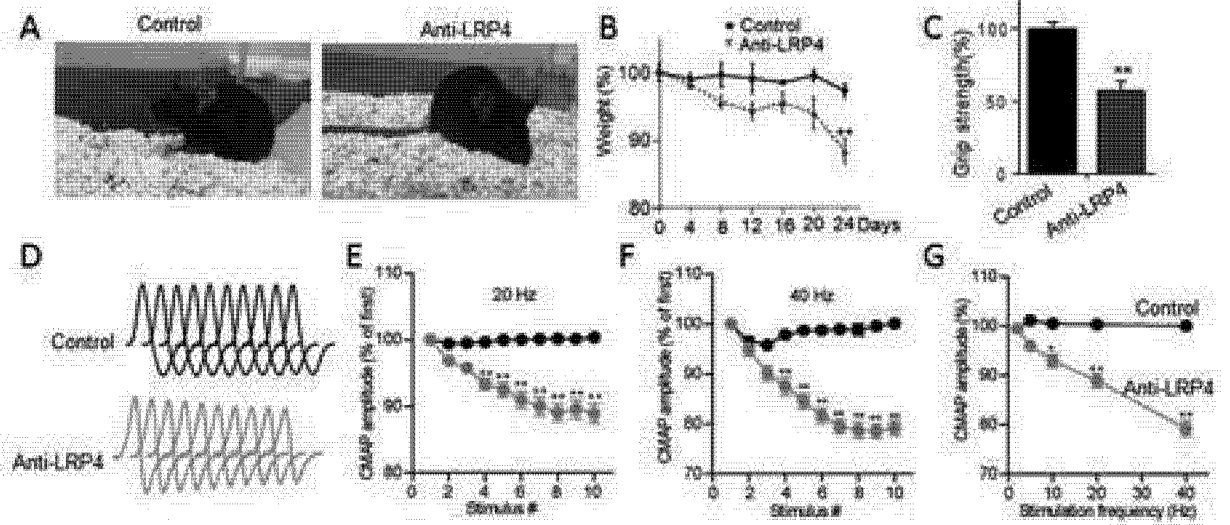


图 6

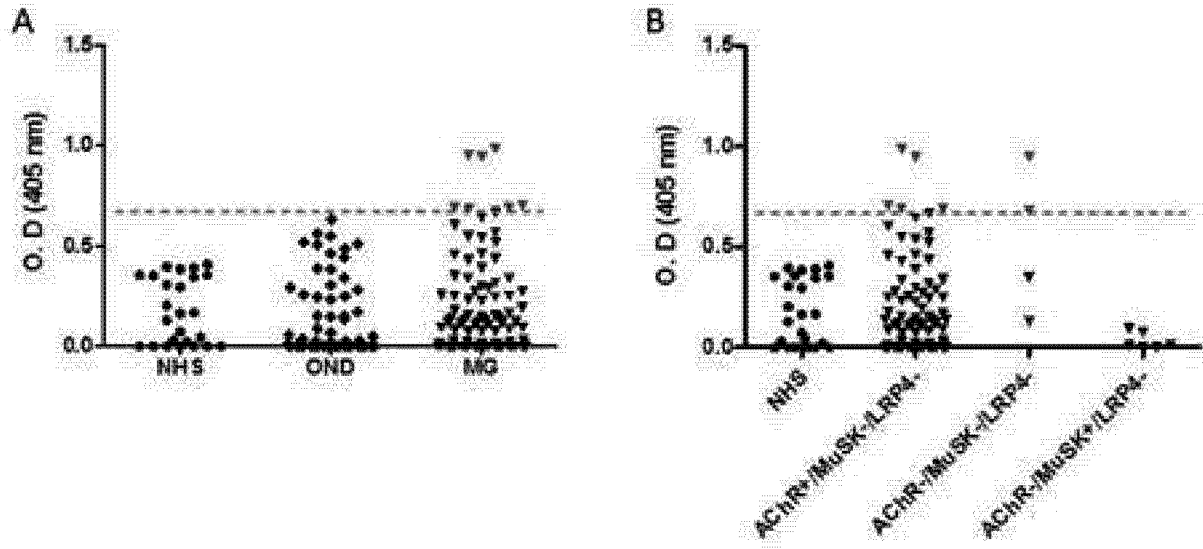


图7

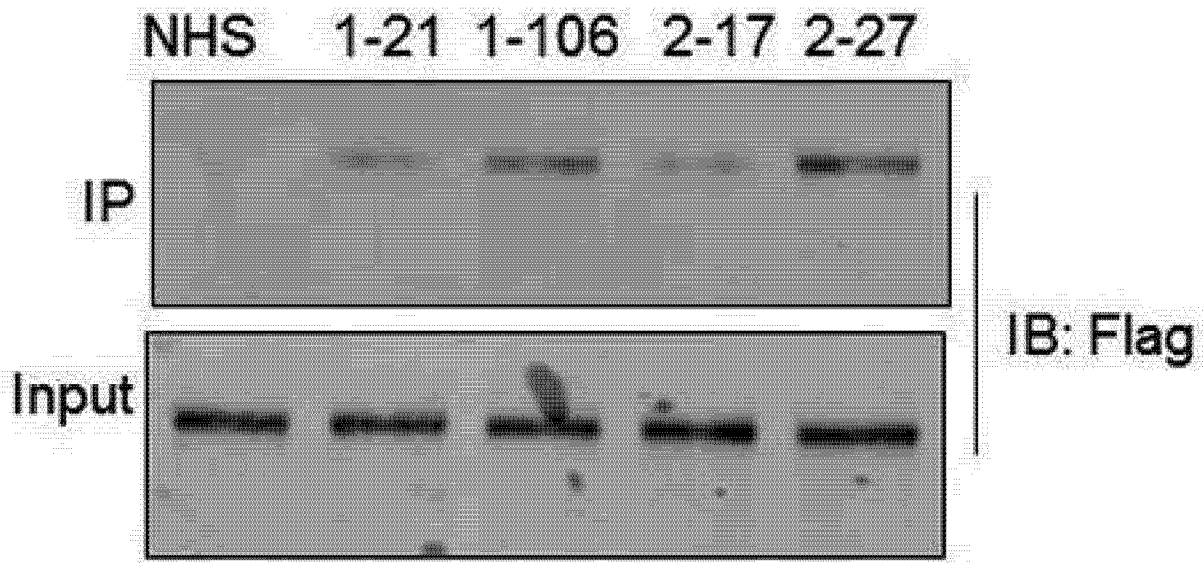


图8

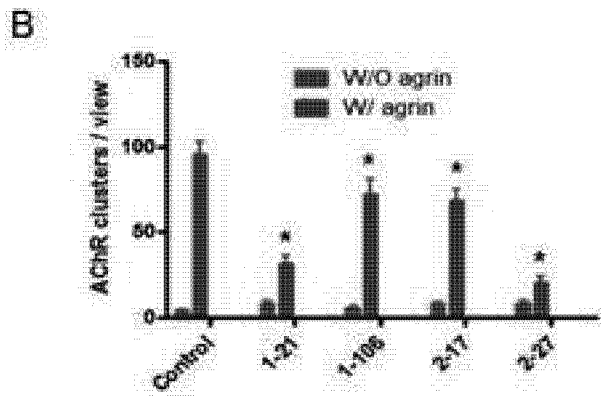
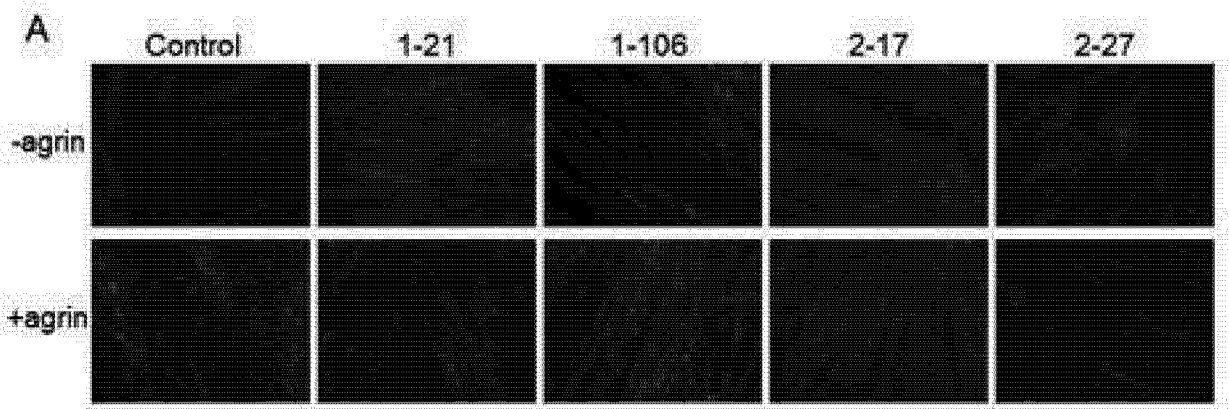


图9

专利名称(译)	利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN103869078A</a>	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410075379.2	申请日	2014-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	梅林 熊文诚 张斌 沈承勇 罗时文		
发明人	梅林 熊文诚 张斌 沈承勇 罗时文		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/6896 G01N2800/28		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，公开了利用聚集蛋白针对神经传递障碍疾病的诊断组合物，包括聚集蛋白或聚集蛋白模拟表位。本发明组合物能对神经传递障碍疾病进行诊断，具有良好的效果，市场前景广阔。

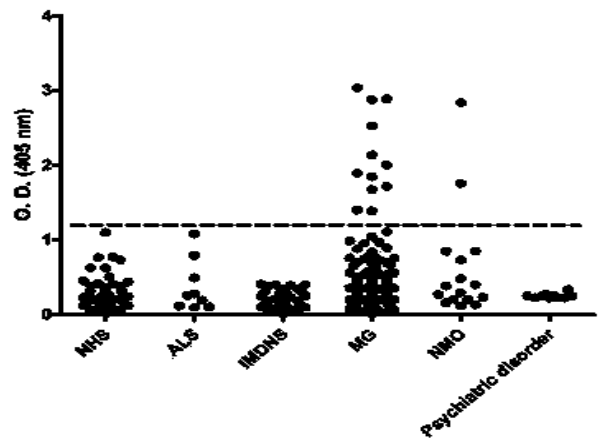


图 1