



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102827921 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201110159475. 1

审查员 童欣

(22) 申请日 2011. 06. 14

(73) 专利权人 李凌松

地址 100083 北京市海淀区学院路 38 号北
京大学干细胞研究中心

专利权人 周士新
文锦华

(72) 发明人 李凌松 周士新 文锦华

(74) 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限
责任公司 11223

代理人 王明霞

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

C90RF135 基因、其编码的蛋白及其抗体的应用

(57) 摘要

本发明涉及基因 C90RF135 的应用, 具体讲涉及基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体的应用及其试剂盒。本发明提出基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在诊断、检测或治疗精子畸形中的应用, 在作为男性避孕药的潜在靶点中的应用、在诊断、检测或治疗衰老引起的精子活力下降及精子畸形中的应用, 以及在检测胚胎干细胞分化中的应用, 本发明还提出用于检测精子畸形的试剂盒、用于筛选男性避孕药物的试剂盒、用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒及其使用方法。

1. 一种用于诊断或检测精子畸形的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为定量 PCR 的试剂盒,含有:提取精子 RNA 的试剂盒、正常参比组的 RNA、逆转录试剂、C9ORF135 基因的引物、内参的引物,SYBR 荧光试剂盒,所述内参采用鱼精蛋白 1。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 C9ORF135 基因前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,C9ORF135 基因后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示;鱼精蛋白 1 前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示,鱼精蛋白 1 后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

3. 一种用于诊断或检测精子畸形的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒采用免疫检测法,含有:提取精子蛋白质的试剂盒、C9ORF135 抗体包被的孔板、C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体、作为浓度参比标准的 C9ORF135 纯化蛋白、第二抗体、ELISA 显色试剂,用于检测的酶标仪,其中,C9ORF135 抗体为单抗或多抗。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中的 C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体为兔源,所述的第二抗体选自辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法为:将 C9ORF135 抗体包被的 96 孔板,加入提取的精子蛋白质,再加入 C9ORF135 抗体混合,温育,洗去非特异性吸附的蛋白,加入二抗和显色剂;用原核表达的 C9ORF135 蛋白作为参考的标准品,按浓度从高到低倍比稀释,绘制标准曲线;通过测定待测精子蛋白质的吸光度,计算其含量;其中,C9ORF135 抗体为单抗或多抗。

6. 基因 C9ORF135 所编码蛋白的抗体在检测胚胎干细胞分化中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述的检测方法包括定量 PCR 检测法、ELISA 免疫检测法。

8. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,当采用定量 PCR 检测法时,当待测组的基因 C9ORF135 的水平不低于胚胎干细胞组 50% 时,判定为未分化;当采用免疫检测法时,当待测组的基因 C9ORF135 编码的蛋白质的水平不低于胚胎干细胞组 50% 时,判定为未分化。

9. 一种用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒,所述试剂盒含有:RNA 提取试剂盒、正常参比组的 RNA、逆转录试剂、C9ORF135 基因的引物、内参的引物、SYBR 荧光试剂盒,所述内参采用 GAPDH。

10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 C9ORF135 基因前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,C9ORF135 基因后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示;内参 GAPDH 前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示,后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。

11. 一种用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒,所述试剂盒含有:蛋白质提取试剂盒、C9ORF135 抗体包被的 96 孔板、C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体、作为浓度参比标准的 C9ORF135 纯化蛋白、第二抗体、ELISA 显色试剂,用于检测的酶标仪,其中,C9ORF135 抗体为单抗或多抗。

C90RF135 基因、其编码的蛋白及其抗体的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因 C90RF135 的应用,具体讲,涉及基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体的应用及其试剂盒。

背景技术

[0002] 新基因 C90RF135 位于人类第 9 号染色体,编码蛋白区(CDS)长度 690 个核苷酸,编码 229 个氨基酸,经过 SWISSPORT 工具分析氨基酸残基的序列,发现有一个单跨膜结构域,将该蛋白分为胞外区、跨膜区和胞内区,并且有 1 个潜在的 N-糖基化位点(表 1),其中文献 Liu T, Qian W. -J., Gritsenko M. A., et al. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. J. Proteome Res. 4:2070-2080 (2005) 提示该蛋白为糖基化蛋白。该蛋白的结构域的预测如下表所示。

[0003] 表 1C9orf135 编码蛋白质(NP_001010940)的可能结构域

	Feature key	Position(s)	Length	Description
[0004]	Topological domain	1-123	123	Extracellular
	Transmembrane	124-140	17	Helical
	Topological domain	141-229	89	Cytoplasmic
	Glycosylation	75	1	N-linked (GlcNAc...)

[0005] 而在现有技术的报道中,还没有该基因及其编码的蛋白质的功能的报道,为了进一步研究该基因及其编码的蛋白质的功能,发明人进行了深入的研究。

发明内容

[0006] 本发明的首要发明目的在于提供基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在诊断或检测精子畸形中的应用。

[0007] 本发明的第二发明目的在于提供一种用于在诊断或检测精子畸形的试剂盒。

[0008] 本发明的第三发明目的在诊断、检测或治疗衰老引起的精子活力下降及精子畸形的试剂盒。

[0009] 本发明的第四发明目的在于提供基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在作为男性避孕药的潜在靶点中的应用。

[0010] 本发明的第五发明目的在于提供基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在检测胚胎干细胞分化中的应用。

[0011] 本发明的第六发明目的在于提供一种用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒。

[0012] 为了完成本发明的第一发明目的,采用的技术方案为:本发明涉及基因 C90RF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在诊断或检测精子畸形中的应用。

[0013] 本发明该方案的第一优选技术方案为：所述的检测方法包括定量 PCR 检测法、ELISA 免疫检测法、免疫印迹法；优选 ELISA 免疫检测法。

[0014] 本发明该方案的第二优选技术方案为：采用定量 PCR 法检测基因 C9ORF135 的表达，用定量 PCR 仪检测，当待测组的基因 C9ORF135 水平低于正常参比组基因 C9ORF13 水平 1/3 时，判定为精子畸形；

[0015] 采用 ELISA 免疫检测法检测 C9ORF135 编码的蛋白时，当待测组的基因 C9ORF135 编码的蛋白质水平低于正常参比组基因 C9ORF135 水平一半时，判定为精子畸形。

[0016] 为了完成本发明的第二发明目的，采用的技术方案为：一种用于检测精子畸形的试剂盒，所述试剂盒为定量 PCR 的试剂盒，包括：提取精子 RNA 的试剂盒、正常参比组的 RNA、逆转录试剂、C9ORF135 基因的引物、内参的引物，SYBR 荧光试剂盒，所述内参采用鱼精蛋白 1。

[0017] 所述的 C9ORF135 基因的引物：前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；鱼精蛋白 1 的前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0018] SEQ ID NO:1 :5' -TATCAGCCACATGCTTATCC-3'；

[0019] SEQ ID NO:2 :5' -TGCCAAATCTTTTAGAACCA-3'；

[0020] SEQ ID NO:3 :5' -GCCAGGTACAGATGCTGTCGCAG-3'；

[0021] SEQ ID NO:4 :5' -TTAGTGTCTTCTACATCGCGGTCTG-3'。

[0022] 本发明还涉及一种用于检测精子畸形的试剂盒，所述试剂盒采用免疫检测法，包括：提取精子蛋白质的试剂盒、C9ORF135 抗体包被的 96 孔板、C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体、作为浓度参比标准的 C9ORF135 纯化蛋白、第二抗体、ELISA 显色试剂，用于检测的酶标仪，其中，C9ORF135 抗体为单抗或多抗。

[0023] 本发明该方案的第一优选技术方案为：所述的试剂盒中的 C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体为兔源，所述的第二抗体选自辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG。其中，所述的显色剂为邻苯二胺溶液（底物），临用前配制 0.1M 柠檬酸 (2.1g/100ml)，6.1ml 0.2M Na₂HPO₄·12H₂O (7.163g/100ml) 6.4ml，蒸馏水 12.5ml，邻苯二胺 10mg，溶解。

[0024] 所述试剂盒的使用方法为：将 C9ORF135 抗体包被的 96 孔板，加入提取的精子蛋白质，再加入 C9ORF135 抗体混合，温育，洗去非特异性吸附的蛋白，加入二抗和显色剂；用原核表达的 C9ORF135 蛋白作为参考的标准品，按浓度从高到低倍比稀释，绘制标准曲线；通过测定待测精子蛋白质的吸光度，计算其含量；

[0025] 其中，C9ORF135 抗体为单抗或多抗，试剂盒中的 C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体为兔源，所述的第二抗体选自辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG；所述的显色剂为邻苯二胺溶液（底物），临用前配制 0.1M 柠檬酸 (2.1g/100ml)，6.1ml 0.2M Na₂HPO₄·12H₂O (7.163g/100ml) 6.4ml，蒸馏水 12.5ml，邻苯二胺 10mg，溶解。

[0026] 其中，包被抗原条件为：37℃ 温育 1 小时后，4℃ 冰箱放置 16 ~ 18 小时；抗原和抗体作用的时间为 37℃ 2 小时；洗液为含 0.05% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液 (0.01mol/L pH7.4 PBS)，常温洗涤 3 次，每次 5 分钟。

[0027] 为了完成本发明的第三发明目的，采用的技术方案为：一种用于诊断或检测衰老引起的精子活力下降及精子畸形的试剂盒，其试剂盒组成与用于检测精子畸形的试剂盒相

同。

[0028] 为了完成本发明的第四发明目的,采用的技术方案为:基因 C9ORF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在作为男性避孕药的潜在靶点中的应用。

[0029] 本发明该方案的第一优选技术方案为:通过比较待测化合物对正常精子的 C9ORF135 表达水平有无抑制作用,从而判定待测化合物是否有药效。

[0030] 本发明该方案的第二优选技术方案为:在筛选男性避孕药的化合物时,当待测化合物作用下的正常精子的 C9ORF135 表达水平低于正常对照组 C9ORF135 表达水平的一半时,判定该待测化合物有效。

[0031] 为了完成本发明的第五发明目的,采用的技术方案为:基因 C9ORF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在检测胚胎干细胞分化中的应用。

[0032] 本发明该方案的第一优选技术方案为:所述的检测方法包括定量 PCR 检测法、ELISA 免疫检测法。

[0033] 本发明该方案的第二优选技术方案为:当采用定量 PCR 检测法时,当待测组的基因 C9ORF135 的水平不低于胚胎干细胞组 50% 时,判定为未分化;当采用免疫检测法时,当待测组的基因 C9ORF135 编码的蛋白质的水平不低于胚胎干细胞组 50% 时,判定为未分化。

[0034] 为了完成本发明的第六发明目的,采用的技术方案为:一种用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒,所述试剂盒包括:RNA 提取试剂盒、正常参比组的 RNA、逆转录试剂、C9ORF135 基因的引物、内参的引物,SYBR 荧光试剂盒,所述内参采用 GAPDH。

[0035] 本发明该方案的第一优选技术方案为:所述的 C9ORF135 基因的前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。内参 GAPDH 的前引物如 SEQ ID NO:5 所示,后引物如 SEQ ID NO:6 所示;

[0036] SEQ ID NO:5: 5' -GCGACAGGAAGCAACTGG-3' ;

[0037] SEQ ID NO:6: 5' -ACACCAACACCGGCTTCG-3' 。

[0038] 本发明还提出一种用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒,所述试剂盒包括:蛋白质提取试剂盒、C9ORF135 抗体包被的 96 孔板、C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体、作为浓度参比标准的 C9ORF135 纯化蛋白、第二抗体、ELISA 显色试剂,用于检测的酶标仪,其中,C9ORF135 抗体为单抗或多抗。试剂盒中的 C9ORF135 的单克隆或多克隆抗体为兔源,所述的第二抗体选自辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG;显色剂为邻苯二胺溶液(底物),临用前配制 0.1M 柠檬酸(2.1g/100ml),6.1ml 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (7.163g/100ml)6.4ml,蒸馏水 12.5ml,邻苯二胺 10mg,溶解。

附图说明

[0039] 图 1 为图 1C9ORF135 编码蛋白在人 ES 细胞的定位,图上为自制抗体染色,图下部为阴性对照;

[0040] 图 2 为 C9ORF135 基因连上 Flag 标签后在 HEK293T 细胞中过表达,后用 Flag 抗体检测过表达的蛋白的共聚焦显微镜结果;

[0041] 图 3 多肽抗体检测人 ES 细胞各组分蛋白质的 Western Blot 结果;

[0042] 图 4 为胚胎发育中 C9ORF135 的表达,柱状图表示 C9ORF135 基因的相对表达量,点表示基因表达芯片所有的基因中所占的百分比位次;

[0043] 图 5 精子发育的基因表达芯片结果分析,柱状图表示 C90RF135 基因的相对表达量,点表示要基因表达芯片所有的基因中所占的百分比位次;

[0044] 图 6 正常精子和畸形精子的基因表达芯片结果分析,柱状图表示 C90RF135 基因的相对表达量,点表示要基因表达芯片所有的基因中所占的百分比位次;

[0045] 图 7 正常精子和畸形精子的定量 PCR 结果比较;方点表示正常精子(normal)组,圆点为畸形精子(TZ, teratozoospermia)组。

[0046] 下面对本发明的技术方案做进一步的解释和说明,但并不限定本发明的范围,本发明所用的试剂均为市售。

具体实施方式

[0047] 实施例 1 制备基因 C90RF135 的多克隆抗体

[0048] 用该基因编码的具有保守性的氨基酸序列,制备多克隆抗体(兔源)。

[0049] 1. 抗体制备

[0050] 1.1 合成短肽,氨基酸序列:VERKGS�TLRSHHKY,作为抗原。

[0051] 1.2 抗原注射以前需要收集一些兔的正常血清,已备检测抗体时作为阴性对照。待兔子在新环境中稳定,大概需要四天左右时间,可以进行耳动脉取血,取血量约 5ml。

[0052] 1.3 纯化免疫用的抗原,抗原经 FCA 或 FIA 充分乳化后才能注射。将抗原液与佐剂等比例混合后,置于混合器上使之剧烈振荡使抗原充分乳化,振荡后,1000rpm 离心一分钟,如水相和油相不分层即可注射。首次免疫用 FCA,以后都用 FIA。

[0053] 弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA) Sigma F-5881

[0054] 弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA) Sigma F-5506

[0055] 1.4 免疫方法采用背部多点注射法。即于家兔脊柱两旁选 4~6 点皮下注射,每点注 0.1ml,间隔 2 周后再于上述部位选不同点注射。每次免疫的抗原量约 100 μ g,免疫次数在四五次即可。

[0056] 1.5 免疫一周后,可以耳动脉取血检测抗体效价。在三次免疫后,可以获得较高效价的抗体,每次取血量可以在 40ml,最后一次取血可以采用颈动脉放血,一般一只家兔可放血 100~120ml。

[0057] 2. 抗体的纯化

[0058] 2.1 准备蛋白 A sepharose CL-4B 亲和柱

[0059] 通常准备 5ml 或 10ml 蛋白 A sepharose CL-4B 填料,在真空瓶中将等体积的填料和 TBS 缓冲溶液混合,搅拌。抽真空约 15 分钟以除去填料中的气泡,否则在柱中形成的气泡影响柱子的容量和分离效果。将蛋白 A sepharose CL-4B 填料缓慢加入玻璃柱中,利用泵控制填充速度为 1ml/分-2ml/分,避免柱干,利用 10 倍于床体积并经过预冷的 TBS 缓冲溶液平衡柱子。2.2 制备抗血清

[0060] 将抗血清放入冰水或 4 $^{\circ}$ C 冰箱中缓慢解冻以避免蛋白质的聚集。在蛋白质解冻过程中出现的聚集可通过 37 $^{\circ}$ C 预热而溶解。加入固体叠氮化钠至浓度为 0.05%,4 $^{\circ}$ C, 15,000xg 离心 5 分钟,移出澄清的抗血清再经过滤器过滤除去多余的脂肪。

[0061] 2.3 亲和层析

[0062] 将抗体用 TBS 缓冲溶液以 1:5 的比例进行稀释,再用过滤器进行过滤。以每分钟

0.5ml 的速度将抗血清上到柱上,为保证抗血清与填料的结合,需连续上柱 2 次并保留上样流出液。用 TBS 缓冲溶液清洗柱子至 $A_{\lambda 280\text{nm}} < 0.008$ 后加 pH2.7 洗脱缓冲溶液,以 0.5ml/min 的速度洗脱至所有蛋白均流下来。用已经加入 100u1 中和缓冲溶液的 1.5ml EP 管分管收集洗脱液,混匀后用 pH 试纸检查洗脱液的 pH,如果 pH 低于 7 可利用中和缓冲液调至约 pH7.4 以防止抗体的变性。

[0063] 在柱中加入 10ml, pH1.9 洗脱缓冲溶液,按上述方法收集洗脱液至 $A_{\lambda 280\text{nm}} < 0.008$ 。

[0064] 利用分光光度计测定各管中蛋白质的含量。若蛋白浓度低于 0.5mg/ml 可加入 10% 的甘油以便保存,将纯化的抗体分装后在 2°C ~ 8°C 保存。用含 0.05% 叠氮化钠的 TBS 缓冲溶液清洗柱子后将柱子储存在 2°C ~ 8°C 环境。

[0065] 实施例 2 制备基因 C9ORF135 的单克隆抗体

[0066] 1. 动物的选择与免疫

[0067] 1.1 动物的选择

[0068] 纯种 BALB/C 小鼠,较温顺,离窝的活动范围小,体弱,食量及排污较小,一般环境洁净的实验室均能饲养成活。目前开展杂交瘤技术的实验室多选用纯种 BALB/C 小鼠。

[0069] 1.2 免疫方案

[0070] 初次免疫:抗原 1 ~ 50 μg 加福氏完全佐剂小鼠皮下多点注射或脾内注射(一般 0.8 ~ 1ml, 0.2ml/点);

[0071] 第二次免疫:剂量同上,加福氏不完全佐剂皮下或腹腔内注射(腹腔内剂量不宜超过 0.5ml)。

[0072] 2. 细胞融合

[0073] 2.1 细胞融合前准备

[0074] 2.1.1 骨髓瘤细胞系的选择:

[0075] 选用小鼠的骨髓瘤细胞,采用 DMEM 培养基。

[0076] 2.1.2 饲养细胞:

[0077] 在组织培养中,单个或少数分散的细胞不易生长繁殖,若加入其它活细胞,则可促进这些细胞生长繁殖,所加入的这种细胞数被称为饲养细胞。在制备 McAb 的过程中,许多环节需要加饲养细胞,如在杂交瘤细胞筛选、克隆化和扩大培养过程中,加入饲养细胞是十分必要的。采用的饲养细胞为小鼠腹腔巨噬细胞。饲养细胞的细胞数为一般为 2×10^4 或 10^5 细胞/孔。

[0078] 2.2 细胞融合的步骤

[0079] 2.2.1 制备免疫脾细胞

[0080] 最后一次加强免疫 3 天后小鼠拉颈处死,取 10^8 脾淋巴细胞悬液备用;

[0081] 2.2.2 制备骨髓瘤细胞;

[0082] 2.2.3 融合

[0083] ①将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:10 或 1:5 的比例混合在一起,在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次,离心,1200rpm, 8min;弃上清,用吸管吸净残留液体,以免影响聚乙二醇(PEG)浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略松动。

[0084] ② 90s 内加入 37°C 预温的 1ml45%PEG(分子量 4000)溶液,边加边轻微摇动。37°C 水浴作用 90s。

[0085] ③加 37。C 预温的不完全培养液以终止 PEG 作用,每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml。

[0086] ④离心,800rpm,6min。

[0087] ⑤充上清,用含 20% 小牛血清 HAT 选择培养液重悬。

[0088] ⑥将上述细胞,加到已有饲养细胞层的 96 孔板内,每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。

[0089] ⑦将培养板置 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养。

[0090] 3 选择杂交瘤细胞及抗体检测

[0091] 3.1HAT 选择杂交瘤细胞

[0092] 脾细胞和骨髓瘤细胞经 PEG 处理后,形成多种细胞的混合体,只有脾细胞与骨髓细胞形成的杂交瘤细胞才有意义。杂交瘤细胞在 HAT 选择培养液可以生长繁殖。

[0093] 在用 HAT 选择培养 1~2 天内,将有大量瘤细胞死亡,3~4 天后瘤细胞消失,杂交细胞形成小集落,HAT 选择培养液维持 7~10 天后应换用 HT 培养液,再维持 2 周,改用一般培养液。在上述选择培养期间,杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时,开始检测特异性抗体,筛选出所需要的杂交瘤细胞系。

[0094] 3.2 抗体的检测

[0095] 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)对 McAb 进行检测。

[0096] 4. 单克隆抗体的大量生产

[0097] 腹水的制备:常规是先腹腔注射 0.5ml Pristane 降植烷或液体石蜡于 BALB/C 鼠,1~2 周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞,接种细胞 7~10 天后可产生腹水,密切观察动物的健康状况与腹水征象,待腹水尽可能多,而小鼠濒于死亡之前,处死小鼠,用滴管将腹水吸入试管中,一般一只小鼠可获 5~10ml 腹水。也可用注射器抽提腹水,可反复收集数次。腹水中单克隆抗体含量可达到 5~10mg/ml。

[0098] (六) 单克隆抗体的鉴定

[0099] 对制备的单克隆抗体(McAb)的鉴定:

[0100] 1. 抗体特异性的鉴定:除用免疫原(抗原)进行抗体的检测外,还应该用与其抗原成分相关的其它抗原进行交叉试验,方法可用 ELISA、IFA 法。例如我们制备抗黑色素瘤细胞的 McAb,除用黑色素瘤细胞反应外,还应该用其它脏器的肿瘤细胞和正常细胞进行交叉反应,以便挑选肿瘤特异性或肿瘤相关抗原的单克隆抗体。另外用酶标或荧光素标记的第二抗体确定抗体的 Ig 类型,用标准抗亚类血清系统作双扩或夹心 ELISA 来确定。

[0101] 2. McAb 中和活性的鉴定:用动物或细胞的保护实验来确定 McAb 的生物学活性。用抗体和病毒同时接种于易感的动物或敏感的细胞,来观察动物或细胞是否得到抗体的保护。

[0102] 3. McAb 亲合力的鉴定:用 ELISA 或 RIA 竞争结合试验来确定 McAb 与相应抗原结合的亲合力。

[0103] 实施例 3 亚细胞定位

[0104] 采用实施例 1 制备的基因 C9ORF135 的克隆抗体(兔源),检测人胚胎干细胞(ES)中内源蛋白的表达,通过细胞免疫荧光和 Western Blot 试验检测人胚胎干细胞(ES)结果,证实 C9ORF135 新基因编码的是人 ES 细胞的膜蛋白。其中图 1 为 C9ORF135 编码蛋白在人 ES

细胞的定位,上图为自制抗体染色,下图为阴性对照,从左向右依次为 DAPI 染色的细胞核、C9ORF135 编码蛋白荧光染色、前两者的合成图。

[0105] 将新基因 C9ORF135 连上 Flag 标签,通过 HEK293T 细胞中过表达,然后用 Flag 抗体检测过表达的蛋白,图 2 为共聚焦显微镜结果。其中,从左向右依次为 DAPI 染的细胞核、带 Flag 标签的 C9ORF135、前两者合成图;提示新基因编码的蛋白在细胞膜和细胞质里表达。

[0106] 应用细胞各组分蛋白提取试剂盒(Perkin Elmer, Cellular protein fraction kit),分别提取人 ES 细胞的细胞膜、细胞质、细胞核和细胞骨架各组分蛋白质。提示人 ES 细胞中该蛋白质主要定位于细胞膜和细胞质中。用 beta actin 作为对照,用多肽抗体检测人 ES 细胞总蛋白和各组分蛋白质,结果显示多肽抗体可以特异性地检测内源性新基因的表达,该新蛋白主要在细胞膜和细胞质中表达,图 3 多肽抗体检测人 ES 细胞各组分蛋白质的 Western Blot 结果。

[0107] 实施例 4:胚胎发育

[0108] 在人胚胎发育过程中, C9ORF135 基因表达芯片分析,结果提示,人 ES 细胞 C9ORF135 表达相对较高,形成类胚体(embryoid body)后,其表达水平迅速下降,至形成心肌细胞,表达水平非常低或不表达。表达谱分析的方法:在 www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ 下载人 ES 细胞及各发育阶段的基因芯片数据,用内参对各芯片的信号值进行标准化,方法为 MAS5.0 (Affymetrix 公司提供)。

[0109] 分析中采用了人 ES 细胞向心肌细胞发育的基因芯片数据,如图 4 所示,结果从两方面显示,一是 C9ORF135 基因在心肌各发育阶段的相对表达量,取 log10 的对数值(图 4 中的柱状图),二是该基因表达值在所有的信号值中所占的位次,100% 为最高,0 为最低(图 4 中的方点)。作图的方法以 GEO 自带的工具实现。

[0110] 实施例 5:精子发育的基因表达芯片分析

[0111] C9ORF135 除了在人 ES 细胞表达水平较高外,在人睾丸组织、精子发育表达水平也很高,从精子发育的基因表达芯片分析结果显示,在精子发育的多个阶段,该基因均有较高的表达。与其他组织相比,在睾丸生精小管、精子细胞、睾丸间质细胞、leydig 细胞的表达均较高,如图 5 所示。

[0112] 通过正常精子和畸形精子的基因表达芯片结果分析(如图 6 所示)可知,比较形态正常的精子(normal)与畸形精子(teratozoospermia) C9ORF135 的基因表达,正常组 C9ORF135 的表达水平显著地高于畸形精子组。

[0113] 实施例 6

[0114] 从北医三院收集正常人和畸形精子病人的精子标本,按试剂盒操作提取精子,提取精子的 RNA 的试剂盒为 Qiagen RNeasy Mini Kit(货号:74104),完全按照试剂盒的方法操作(<http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rneasyystem/rneasymini.aspx>)。

[0115] 1. 用 Qiagen 试剂盒提取精子的 RNA,逆转录为 cDNA,逆转录的步骤为:

[0116] 逆转录酶:Invitrogen superscrip II

[0117] cDNA 第一链的合成(反转录)

	反应物	反应量	实验操作
Step1:	总 RNA	0.1~1 μ g	65°C 温浴 5min
	RNase-free 水	补至 10.4 μ l	离心片刻, 置冰上
	Poly T	加入 1 μ l	置冰上
[0118] Step2:	5 \times first strand buffer	4 μ l	混匀, 37°C 温浴 2min
	DTT (0.1M)	2 μ l	
	dNTP (6.25mM)	1.6 μ l	
Step3:	superscrip II RT (200U/ μ l)	1 μ l	混匀, 37°C 温浴 1hr

[0119] 反应总体积为 20 μ l。

[0120] 2. 用 SYBR 定量 PCR 检测正常精子和畸形精子组的 C9ORF135 的表达情况：

[0121] 其中, C9ORF135 基因前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示, 后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示; 以鱼精蛋白 1 作为内参, 鱼精蛋白 1 的前引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示, 后引物的核苷酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0122] SYBR 定量 PCR: 反应体系 15 μ l, 缓冲液和 SYBR 为大连宝生物工程公司生产。退火温度 57°C, 40 个循环。

[0123] 结果见图 7, 正常精子组 (normal) C9ORF135 的相对表达量显著高于畸形精子组 (TZ)。

[0124] 实施例 7C9ORF135 与畸形精子分子诊断

[0125] C9ORF135 的亚细胞定位于细胞膜, 是一种膜蛋白, 该蛋白可能与精子发育和成熟精子的完整性相关, 可以作为潜在的畸形精子分子诊断和治疗的靶标; 从分子诊断方面来看, 显示正常精子组的 C9ORF135 表达水平平均高于畸形精子组, 但相差幅度不一, 从 3 倍~47 倍不等, 均数为 21 倍, 从检测的 18 例中, 如图 7 所示, 有 16 例 C9ORF135 的表达相差 5 倍以上, 占 88.9%, 两者相差比较大, 可以作为潜在的分子诊断的指标。

[0126] 通过对正常和病例各 100 例的 C9ORF135 的基因水平和蛋白水平进行检测后, 用统计学 95% 可信区间的方法初步设定一个正常值范围, 从而在分子水平上实现精子畸形的初步诊断。

[0127] 用定量 PCR 仪检测, 当待测组的基因 C9ORF135 水平低于正常参比组基因 C9ORF135 水平 1/3 时, 判定为精子畸形;

[0128] 采用 ELISA 免疫检测法检测 C9ORF135 编码的蛋白时, 当待测组的基因 C9ORF135 编码的蛋白质水平低于正常参比组基因 C9ORF135 水平的一半时, 判定为精子畸形。

[0001]

核苷酸序列表

<110>李凌松、周士新、文锦华

<120> C9ORF135 基因、其编码的蛋白及其抗体的应用

<160>4

<170>patent version 2.1

<210>1

<211>20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<400>1

TATCAGCCACATGCTTATCC

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<400>2

TGCCAAATCTTTTAGAACCA

<210>3

<211>23

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<400>3

GCCAGGTACAGATGCTGTCGCAG

<210>4

[0002]

<211>25

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<400>4

TTAGTGTCTTCTACATCGCGGTCTG

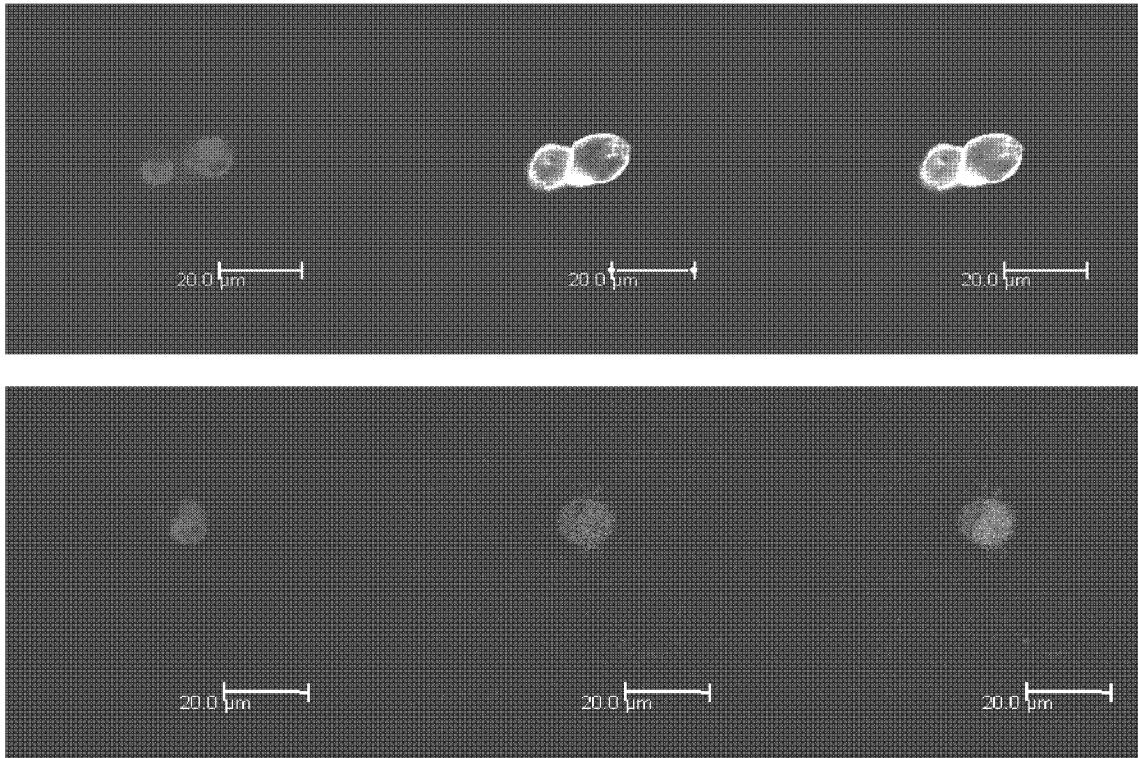


图 1

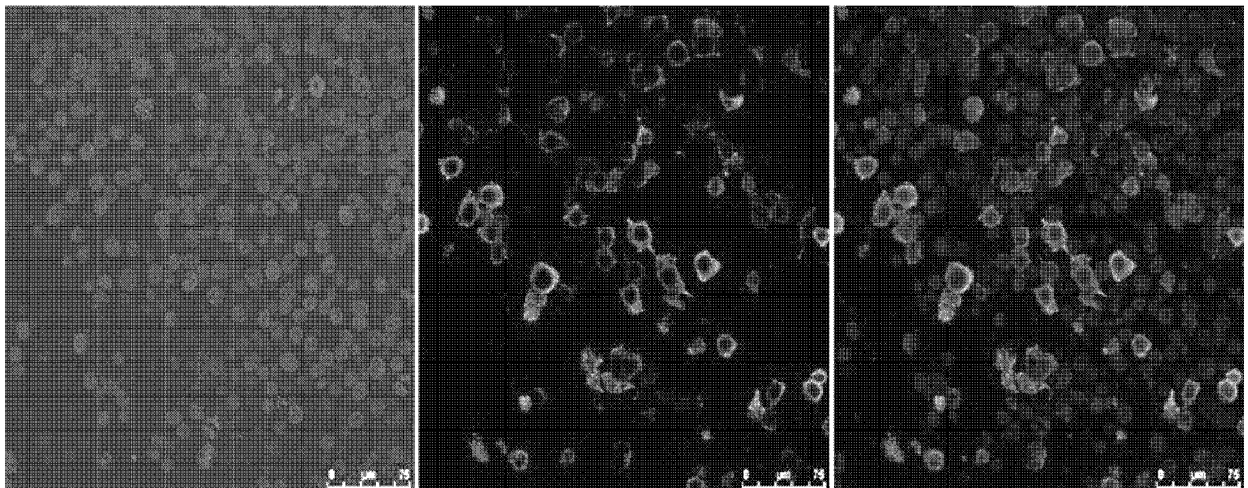


图 2

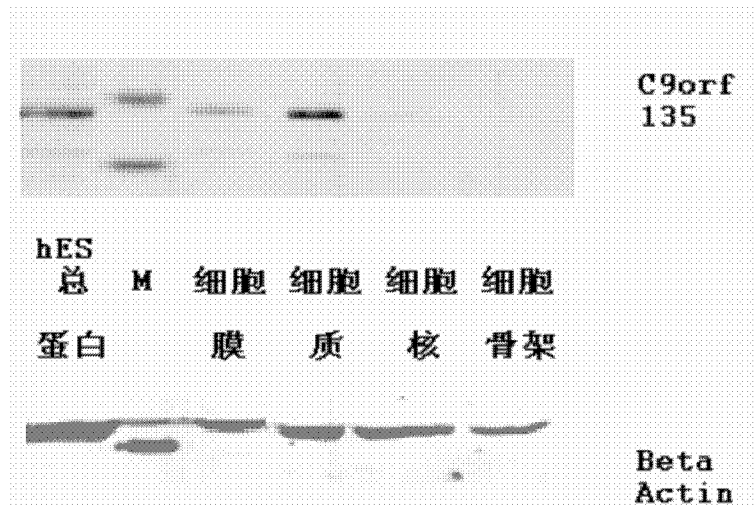


图 3

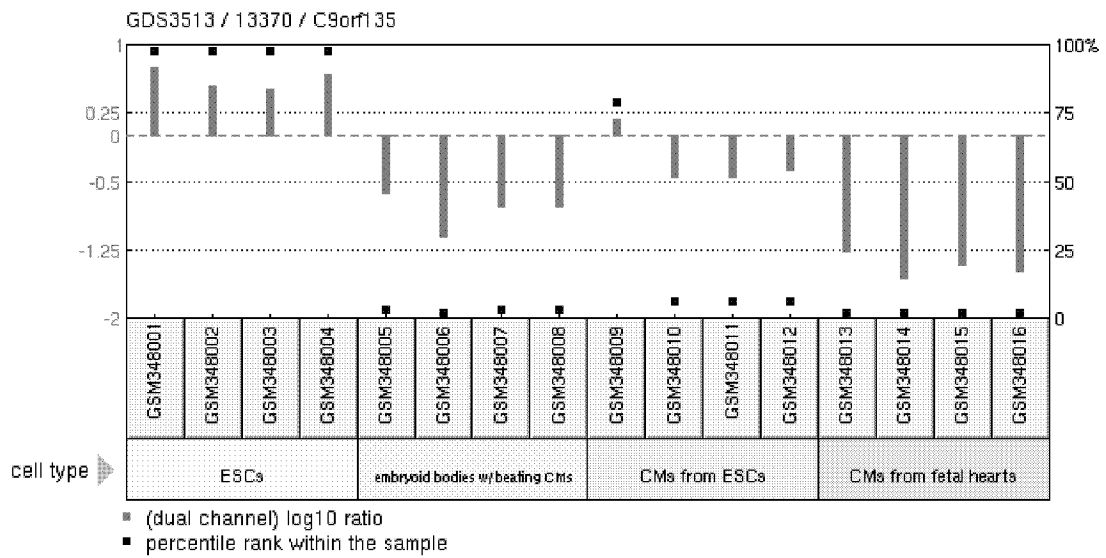


图 4

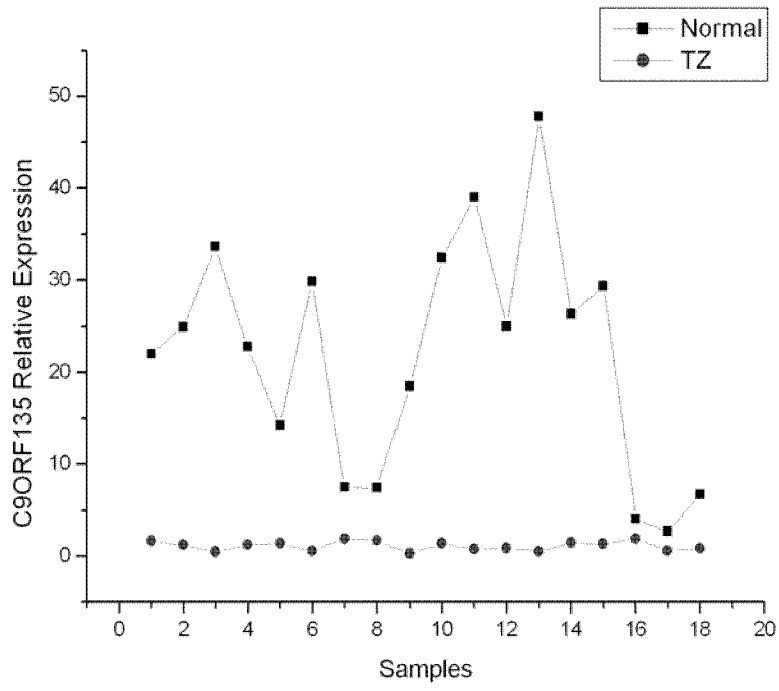


图 7

专利名称(译)	C9ORF135基因、其编码的蛋白及其抗体的应用		
公开(公告)号	CN102827921B	公开(公告)日	2014-04-09
申请号	CN201110159475.1	申请日	2011-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	李凌松 周士新 文锦华		
申请(专利权)人(译)	李凌松 周士新 文锦华		
当前申请(专利权)人(译)	李凌松 周士新 文锦华		
[标]发明人	李凌松 周士新 文锦华		
发明人	李凌松 周士新 文锦华		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/577 G01N21/31		
代理人(译)	王明霞		
审查员(译)	董欣		
其他公开文献	CN102827921A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基因C9ORF135的应用，具体讲涉及基因C9ORF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体的应用及其试剂盒。本发明提出基因C9ORF135、其编码的蛋白以及该蛋白的抗体在诊断、检测或治疗精子畸形中的应用，在作为男性避孕药的潜在靶点中的应用、在诊断、检测或治疗衰老引起的精子活力下降及精子畸形中的应用，以及在检测胚胎干细胞分化中的应用，本发明还提出用于检测精子畸形的试剂盒、用于筛选男性避孕药物的试剂盒、用于检测胚胎干细胞分化的试剂盒及其使用方法。

Feature key	Position(s)	Length	Description
Topological domain	1-123	123	Extracellular
Transmembrane	124-140	17	Helical
Topological domain	141-229	89	Cytoplasmic
Glycosylation	75	1	N-linked (GlcNAc...)