



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102961760 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 13

(21) 申请号 201110257620. X

(22) 申请日 2011. 09. 01

(71) 申请人 姜石松

地址 100124 北京市朝阳区广渠路 28 号院 C
区 503 号楼 2 单元 101 室

(72) 发明人 姜石松

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 祝莲君 王昕

(51) Int. Cl.

A61K 49/00 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

序列表 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

重叠肽作为制备皮肤试验和检测特异性细胞
免疫的试剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及重叠肽作为制备皮肤试验和检测
特异性细胞免疫的试剂及其应用。具体地, 本发
明提供了一种重叠肽的用途, 所述重叠肽可以引
起皮肤免疫反应和特异性细胞免疫反应, 因此重
叠肽可以用于皮肤试验, 迅速准确地检测细菌、病
毒、肿瘤引起的细胞特异性免疫反应疾病。

1. 一种重叠肽的用途,其特征在于,所述重叠肽用于制备检测特异性细胞免疫的试剂。
2. 如权利要求 1 所述重叠肽的用途,其特征在于,所述检测是通过皮肤试验检测特异性细胞免疫。
3. 如权利要求 1 所述的重叠肽的用途,其特征在于,所述重叠肽为一组衍生自疾病靶蛋白的短肽,且各短肽都与其前一短肽重叠 5-29 个氨基酸。
4. 如权利要求 1 所述重叠肽的用途,其特征在于,所述的特异性细胞免疫是疾病相关的细胞免疫。
5. 一种皮肤试验方法,其特征在于,包括步骤:
 - (a) 向受试个体免疫重叠肽 ;和
 - (b) 观察免疫重叠肽个体的皮肤反应。
6. 一种检测个体特异性细胞免疫的方法,其特征在于,包括步骤:
 - (i) 向受试个体免疫重叠肽 ;和
 - (ii) 对免疫重叠肽的实验个体进行特异性细胞学免疫反应检测。
7. 如权利要求 6 所述的特异性细胞免疫的方法,其特征在于,所述特异细胞免疫反应的抗原选自下组:
CD4+、CD8+、Th1、Th2、Th25,或其组合。
8. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于,免疫方法为皮下或皮内。
9. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于,免疫对象为人或非人的哺乳动物。
10. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:
第一容器及位于第一容器内的重叠肽。

重叠肽作为制备皮肤试验和检测特异性细胞免疫的试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,具体地,本发明涉及重叠肽作为制备皮肤试验和检测特异性细胞免疫的试剂及其应用。

背景技术

[0002] 免疫是指机体免疫系统对一切异物或抗原性物质进行非特异或特异性识别和排斥清除的一种生理学功能。生物体依靠这种功能识别“自己”和“非己”成分,从而破坏和排斥进入生物体的抗原物质,或生物体本身所产生的损伤细胞和肿瘤细胞等,以维持生物体的健康。

[0003] 细胞免疫是免疫的一个重要分支。T细胞受到抗原刺激后,增殖、分化、转化为致敏T细胞(包括辅助T细胞及效应T细胞),当相同抗原再次进入机体的细胞中时,致敏T细胞(辅助及效应T细胞)对抗原的直接杀伤作用及致敏T细胞所释放的细胞因子的协同杀伤作用,统称为细胞免疫。由于细胞免疫在控制和清除细菌、病毒及肿瘤中起着不可忽视的作用,因此细胞免疫的监测对疾病的治疗、预后以及评价疫苗的有效性至关重要。

[0004] 目前最常见的检测细胞免疫的方法是酶联免疫斑点法(Elispot),其步骤包括:从样本中(或被检测人体、动物体)取血,分离淋巴细胞;体外用抗原刺激淋巴细胞;最后检测由激活的淋巴细胞所分泌的伽玛干扰素($\text{IFN-}\gamma$)来鉴定是否存在激活的细胞免疫。总的来说,虽然酶联免疫斑点法是离体或体外研究细胞免疫的常用方法,但是该方法变异系数很大,比如:在实际操作中放入细胞数的多少、细胞培养的时间、酶底物的质量以及读点机的设定及仪器的可靠性等等,并且在实际应用时,有价格昂贵、检测所需时间长的缺点。

[0005] 一个简便诊断细胞免疫的方法至关重要,由于迟发性皮肤反应的机理主要是由特异的细胞免疫所引起,因此简单的皮肤试验应可以作为诊断细胞免疫的方法。一个诊断细胞免疫的成熟可靠的皮肤试验必须证明以下几点:

[0006] (1) 皮肤反应不是由于I型过敏反应所引起(如皮肤划痕试验);

[0007] (2) 皮肤反应(硬结及红肿)与伽玛干扰素($\text{IFN-}\gamma$)酶联斑点反应相关;

[0008] (3) 皮肤反应不是由免疫佐剂激活的IV型过敏反应所引起。

[0009] 结核病是由结核杆菌感染引起的慢性传染病,结核菌可能侵入人体全身各种器官。在历史上,结核病曾经夺去数亿人的生命。结核病的诊断是预防和治疗的前提手段,全球每年用于诊断结核的费用累计达到10亿美元。目前中低收入国家由于受经济能力所限,诊断结核主要靠痰涂片及胸片,在发达国家,结核菌素皮肤试验是最常用的结核诊断方法。结核菌素皮肤试验的机理是结核菌素蛋白作为抗原,使得机体产生IV型过敏反应,而IV型过敏反应是由细胞免疫所引起的。因此结核菌素皮肤试验在一定程度上代表了结核菌素特异的细胞免疫反应。然而该方法尚不完善,比如不能区分结核与卡介苗接种等。

[0010] 另有一种依据伽玛干扰素酶联斑点试验为基础的诊断及试剂盒,但是价格昂

贵,检测时间长且结果变异较大。

[0011] 目前本领域尚缺乏经济有效的检测细胞免疫尤其是结核的试剂及方法,因此急需开发针对多种抗原的、快速有效的、用于诊断细胞免疫的试剂(盒)及皮肤试验方法。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供重叠肽用于皮肤试验和检测特异性细胞免疫的用途及方法。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种用于检测皮肤试验和特异性细胞免疫反应的试剂(盒)。

[0014] 在本发明的第一方面,提供了一种重叠肽的用途,所述重叠肽用于制备检测特异性细胞免疫的试剂。

[0015] 在另一优选例中,所述检测是通过皮肤试验检测特异性细胞免疫。

[0016] 在另一优选例中,所述重叠肽为一组衍生自疾病靶蛋白的短肽,且各短肽都与其前一短肽重叠 5-29 个氨基酸。

[0017] 在另一优选例中,所述重叠肽包括的短肽覆盖了靶蛋白至少 70%,较佳地 90%,更加地 100%的氨基酸序列。

[0018] 在另一优选例中,所述各短肽的长度为 5-30 个氨基酸,较佳地 8-25 个氨基酸。

[0019] 在另一优选例中,所述重叠肽为重组合成或全人工合成。

[0020] 在另一优选例中,所述靶蛋白为成熟蛋白。

[0021] 在另一优选例中,所述的特异性细胞免疫是疾病相关的细胞免疫。

[0022] 在另一优选例中,所述疾病选自:细菌相关疾病、病毒相关疾病、肿瘤相关疾病或其组合。

[0023] 在另一优选例中,所述细菌选自:人结核杆菌、牛结核杆菌。

[0024] 在另一优选例中,所述病毒选自:艾滋病病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、人乳头瘤病毒、疱疹病毒。

[0025] 在另一优选例中,所述肿瘤选自:胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌。

[0026] 在本发明的第二方面,提供了一种皮肤试验方法,包括步骤:

[0027] (a) 向受试个体免疫重叠肽;和

[0028] (b) 观察免疫过重叠肽个体的皮肤反应。

[0029] 在另一优选例中,所述观察时间为免疫后的 24h-72h,较佳地 48h。

[0030] 在另一优选例中,皮肤注射部位出现红肿硬结的直径 ≥ 0.5 厘米为阳性受试者。

[0031] 在本发明的第三方面,提供了一种检测个体特异性细胞免疫的方法,所述方法包括步骤:

[0032] (i) 向受试个体免疫重叠肽;和

[0033] (ii) 对免疫过重叠肽的实验个体进行特异性细胞学免疫反应检测。

[0034] 在另一优选例中,观察时间为免疫后的 24h-72h,较佳地 48h。

[0035] 在另一优选例中,所述特异细胞免疫反应的抗原选自下组:CD4+、CD8+、Th1、Th2、Th25,或其组合。

[0036] 在另一优选例中,免疫方法为皮下或皮内。

[0037] 在另一优选例中,免疫对象为人或非人的哺乳动物。

[0038] 在本发明的第四方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:

[0039] 第一容器及位于第一容器内的本发明第一方面所述的重叠肽。

[0040] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括:标签或说明书,所述的标签或说明书注明所述试剂盒用于皮肤试验或检测特异性细胞免疫。

[0041] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括免疫佐剂。

[0042] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括测定皮肤反应的卡尺。

[0043] 在另一优选例中,所述试剂盒用于检测个体是否感染结核。

[0044] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0045] 图1显示重叠肽皮肤反应结果。重叠肽免疫组的小鼠皮肤反应较大,而对照组(只注射佐剂组以及空白无注射组)均无皮肤反应。

[0046] 图2显示用 INF- γ 免疫酶联斑点试验验证重叠肽引起特异性细胞免疫反应结果, HIV Nef 蛋白相关重叠肽免疫组的小鼠在免疫后出现 HIV Nef 特征性的细胞免疫,而对照(只注射佐剂)则无此反应。

具体实施方式

[0047] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次意外地发现并证实,将疾病相关靶蛋白设计的一组重叠肽作为抗原,进行皮肤免疫实验,能够刺激机体产生皮肤反应,这种皮肤反应是特异性细胞免疫反应。将重叠肽作为制备检测特异性细胞免疫反应的试剂(盒),能够广泛应用于各种细菌、病毒和肿瘤引起的特异性疾病检测。在此基础上完成了本发明。

[0048] 变态反应

[0049] 变态反应也叫超敏反应,是机体对某些抗原初次应答后,在此受到相同的抗原刺激后,发生的一种以机体生理功能紊乱或组织细胞损伤为主的特异性免疫应答。变态反应有四种类型,即 I 型:速发型;II 型:细胞毒型;III 型:免疫复合物型;IV 型:迟发型或细胞介导型。I-III 型均由抗体所介导,IV 型由细胞因子所介导。

[0050] I 型变态反应由 IgE 介导,肥大细胞和嗜碱粒细胞等效应细胞以释放生物活性介质的方式参与反应;其特点是发生快,消退亦快;常表现为生理功能紊乱,而无严重的组织损伤;有明显的个体差异和遗传倾向。

[0051] II 型变态反应是由抗体(多属 IgG、少数为 IgM、IgA)首先同细胞本身抗原成分或吸附于膜表面成分相结合,然后再通过溶解、吞噬、破坏等方式杀伤靶细胞。

[0052] III 型变态反应又称血管炎型超敏反应,由游离抗原与相应抗体结合形成免疫复合物(IC),若 IC 不能被及时清除,即可在局部沉积,并激活补体,并在血小板、中性粒细胞及其他细胞参与下,引发一系列连锁反应而致组织损伤。

[0053] IV 型变态反应与上述由特异性抗体介导的三型变态反应不同,IV 型变态反应是由特异性致敏效应 T 细胞介导的,其局部炎症变化出现缓慢,接触抗原 48-72h 后才出现高峰反应,故称迟发型变态反应。机体初次接触抗原后,T 细胞转化为致敏淋巴细胞,使机体

处于过敏状态,当相同抗原再次进入时,致敏 T 细胞识别抗原,出现分化、增殖,并释放出许多淋巴因子,吸引、聚集并形成以单核细胞浸润为主的炎症反应,甚至引起组织坏死。

[0054] 结核菌素实验

[0055] 结核菌素实验用于检测结核菌感染所致 IV 型超敏反应,是检测机体有无感染过结核杆菌的方法之一。凡感染过结核杆菌的机体,会产生相应的致敏淋巴细胞,具有对结核杆菌的识别能力,当再次遇到少量的结核杆菌或结核菌素时,致敏 T 淋巴细胞受相同抗原再次刺激会释放出多种可溶性淋巴因子,导致血管通透性增加,巨噬细胞在局部集聚,导致浸润,约在 24-72 小时内,局部出现红肿硬节的阳性反应,若受试者未感染过结核杆菌,则皮试局部无变态反应发生。

[0056] 靶蛋白

[0057] 如本文所用,术语“靶蛋白”可以是任何蛋白,可以根据所治疗、预防的疾病进行选择。通常情况下,所述靶蛋白是指引起待检测和治疗疾病的细菌、病毒或肿瘤的特征性蛋白,如病毒的外壳蛋白或病毒特有的酶。例如,在 HIV 感染中,HIVNef 蛋白或者 HIV Gag 蛋白可以被选为靶蛋白;在流感中,靶蛋白可以是凝血素、神经氨酸酶;在结肠癌中,靶蛋白可以是癌胚抗原;在乳腺癌中,靶蛋白可以是 Her2/neu 抗原。

[0058] 重叠肽

[0059] 如本文所用,术语“重叠肽”、“寡肽混合物”、“重叠肽家族”、“短肽混合物”、可互换使用,指一组包括 5-30 个氨基酸,较佳地 8-25 个短肽的混合物,其中各短肽的长度为 5-30 个氨基酸(较佳地 8-25 个氨基酸),且各短肽相互重叠,重叠部分的长度为 5-29 个氨基酸,较佳地 8-15 个氨基酸。一组重叠肽共同构成靶蛋白的氨基酸序列,较佳地构成 75% 以上的靶蛋白氨基酸序列,更佳地构成 100% 的靶蛋白完整氨基酸序列。一组设计自 HIV Nef 蛋白的相关重叠肽可参见表 1。

[0060] 重叠肽的制备

[0061] 重叠肽可以用重组或全人工法合成。

[0062] 本领域的技术人员可以使用通用的方法进行重叠肽的全人工合成,如用自动合成仪进行固相化学合成,所述技术是昂贵、缓慢,低产率的,并且不能适用于快速扩增。

[0063] 重叠肽的生产优选用重组法进行制备,所述制备方法包括步骤:确定靶蛋白;合成编码融合蛋白的核酸序列;在适当的表达载体中表达所述核酸序列;收获与核酸序列相应的蛋白;针对酶切位点有选择地消化蛋白;获得所述重叠肽。

[0064] 本领域的技术人员可以使用常规的技术手段构建插入了酶切位点的编码靶蛋白目标序列的核酸载体,也可以通过商业上可获得的技术进行合成,例如:GeneArt™、GeneMaker™、GenScript™ 等。

[0065] 如本文所用,术语“融合蛋白”包含来自靶蛋白的目标部分的重叠肽,其中插入蛋白酶酶切位点,此种蛋白可以单独或与蛋白酶结合作为疫苗使用给人或者动物。

[0066] “酶切位点”可以是蛋白酶选择性消化的任何氨基酸序列,优选的蛋白酶酶切位点是 Xa 因子消化位点,也就是序列 Ile-Glu-Gly-Arg-,酶切位点在精氨酸(Arg)的 C 端。其他蛋白酶包括但不限于:HRV3C 蛋白酶,其在谷氨酰和甘氨酰残基之间酶切序列 Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro-;HIV 蛋白酶;金属蛋白酶;类胰蛋白酶以及其他蛋白酶等。

[0067] 如本文所用,术语“核酸序列”是指本技术领域人员用各种已知方法获得的编码融合蛋白的核酸。这些方法例如但不限于:PCR, DNA 人工合成等,具体的方法可参见 J. 萨姆布鲁克,《分子克隆实验指南》等。

[0068] 如本文所用,术语“引物”指的是在与模板配对,在 DNA 聚合酶的作用下能以其为起点进行合成与模板互补的 DNA 链的寡核苷酸的总称。引物可以是天然的 RNA、DNA,也可以任何形式的天然核苷酸。引物甚至可以是非天然的核苷酸如 LNA 或 ZNA 等。引物“大致上”(或“基本上”)与模板上一条链上的一个特殊的序列互补。引物必须与模板上的一条链充分互补才能开始延伸,但引物的序列不必与模板的序列完全互补。比如,在一个 3' 端与模板互补的引物的 5' 端加上一段与模板不互补的序列,这样的引物仍大致上与模板互补。只要有足够长的引物能与模板充分的结合,非完全互补的引物也可以与模板形成引物-模板复合物,从而进行扩增。

[0069] 如本文所用,术语“表达载体”是指包含编码本发明融合蛋白的序列以及与之操作性相连的表达调控序列。所述的“操作性相连”或“可操作地连于”指这样一种状况,即线性 DNA 序列的某些部分能够调节或控制同一线性 DNA 序列其它部分的活性。例如,如果启动子控制序列的转录,那么它就是可操作地连于编码序列。

[0070] 本领域技术人员可以根据宿主细胞来选择合适的表达载体。当 Xa 因子被用于蛋白消化时,优选的用于扩增的表达载体是原核表达载体 pET16,其他的表达系统可以是其他原核表达载体,如 pET 系列载体、pGEX、pGEMT7,哺乳动物表达载体,例如 pEGFP、pcDNA3、pCDM7,或者昆虫表达载体,例如 Bac-To-Bac、BaculoDirect 等。

[0071] 根据已知空载表达载体的酶切图谱,本领域技术人员可按照常规方法通过限制性酶剪切与拼接,将本发明的融合蛋白的编码序列插入合适的限制性位点,制得本发明的重组表达载体。

[0072] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指含有且能够表达目的蛋白的细胞,例如,用于原核表达的大肠杆菌 BL21,用于哺乳动物表达的 HEK239T 细胞、HeLa 细胞、用于昆虫的 sf9 细胞等,这些宿主细胞可以良好地表达融合蛋白,有助于获得结合活性和稳定性良好的融合蛋白。

[0073] 将所述编码序列导入宿主细胞可采用本领域的多种已知技术,包括但不限于:磷酸钙沉淀,原生质体融合,脂质体转染,电穿孔,微注射,反转录法,噬菌体转导法,碱金属离子法等。

[0074] 可将上述制备获得的融合蛋白纯化为基本均一的性质。当重组蛋白为分泌表达时,可以采用商品化的超滤膜(例如 Millipore、Pall 公司产品)来分离所述蛋白,首先将表达上清浓缩,采用凝胶层析的方法或采用离子交换层析的方法将浓缩液进一步纯化。也可以使用阴离子交换层析(DEAE 等)或阳离子交换层析分离所述蛋白,凝胶基质可为琼脂糖、葡聚糖、聚酰胺等常用于蛋白纯化的基质,Q- 或 SP- 基团是较为理想的离子交换基团。可利用含有所述融合蛋白的特异性抗体、受体或配体的亲和层析柱对表达的融合蛋白进行纯化,根据所使用的亲和柱的特性,利用常规的方法如高盐缓冲液、改变 pH 等方法洗脱结合在亲和柱上的融合性多肽,可选择地,所述的融合蛋白的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段,作为蛋白标签,任何合适的标签都可以用于本发明,如所述的标签可以是 FLAG, HA, HA1, c-Myc, 6-His 或 8-His 等。还可利用羟基磷灰石吸附层析、金属螯合层

析、和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 等方法对上述纯化产物进一步精制纯化。上述所有纯化步骤可利用不同的组合, 最终使蛋白纯度达到基本均一。

[0075] 免疫佐剂

[0076] 如本文所用, 术语“免疫佐剂”是指非特异性免疫增生剂, 其本身不具抗原性, 但同抗原一起或预先注射到机体内能增强免疫原性或改变免疫反应的类型。佐剂还可以改变抗原的物理性状, 延缓抗原的降解和排除, 延长抗原在体内的滞留时间, 避免频繁注射从而更有效地刺激免疫系统。较佳的佐剂包括但不限于: (1) 铝盐 (alum), 如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等; (2) ISA720 佐剂; (3) 福氏佐剂等。

[0077] 药物组合物和施用方式

[0078] 如本文所用, 术语“药物组合物和施用方式”是指将本发明重叠肽配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 这类载体包括 (但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、矿物油或其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 1 微克 / 千克体重 - 约 5 毫克 / 千克体重。此外, 重叠肽还可与其他治疗剂一起使用。可选择地, 本发明重叠肽可以与免疫佐剂相混合。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括 (但并不限于): 瘤内、瘤旁、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内等。这些都是熟练医师技能范围内的。

[0079] 检测方法和试剂盒

[0080] 本发明还提供了一种用重叠肽进行皮肤试验和检测特异性细胞免疫的方法, 包括步骤: 用特异蛋白相关重叠肽作为抗原对动物或人进行免疫, 一段时间 (较佳地 2 个星期或 4 个星期) 后对每个实验对象加强免疫, 并设置进注射佐剂或无注射的对照。测定是否出现特异性皮肤反应和特异性细胞免疫反应。

[0081] 在本发明的一个优选例中, 用福氏完全佐剂 (CFA) 和 NIV Nef 蛋白相关重叠肽混合, 皮下免疫 ($10 \mu\text{g}$ / 肽) 近交系小鼠 BALB/c, 两周后将同样的重叠肽与福氏非完全佐剂 (IFA) 加强免疫该小鼠, 两周后再次加强免疫。检测是否出现皮肤反应, 用酶联免疫斑点实验测定样本中是否存在特异性细胞免疫反应。

[0082] 本发明还提供了一种检测试剂盒, 它含有设计自特定疾病靶蛋白的一组重叠肽, 还可以包括辅剂 (较佳地佐剂, 矿物油)、用来测定皮肤反应程度的卡尺和说明书。所述试剂盒用来进行皮肤试验和检测特异性的细胞免疫反应。

[0083] 本发明的主要优点包括:

[0084] (a) 重叠肽靶蛋白来源丰富, 可以是任一已知序列的蛋白, 该蛋白是引起待检测疾病的细菌、病毒或肿瘤的特征性蛋白。

[0085] (b) 重叠肽皮肤试验代表了体内特异性的细胞免疫状况, 检测结果准确。

[0086] (c) 重叠肽皮肤试验和特异性细胞试验检测迅速、简单、经济, 易于推广, 有广泛的应用前景。

[0087] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列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。除非另外说明,否则百分比和份数为重量百分比和重量份数。

[0088] 实施例 1.

[0089] 重组合成 HIV Nef 蛋白相关重叠肽

[0090] 1. 设计及合成基因序列

[0091] 靶蛋白为人类免疫缺陷病毒(HIV)的 Nef 蛋白,本发明人设计一系列的包含 10 个氨基酸重叠的 20 元肽,中间插入 Xa 因子的酶切位点 Ile-Glu-Gly-Arg-,并对由此产生的人工基因进行优化以适应于大肠杆菌的表达,并且在肽段的两个末端分别加入 NdeI 和 BamHI 的酶切位点,用于随后的亚克隆以及表达。完成设计的序列由 GeneArt 公司(德国雷根斯堡)进行商业合成。

[0092] 2. 将目标基因亚克隆至 pET16b 表达载体

[0093] 将 pPCR-Script 克隆载体中的合成的目标基因用 NdeI 和 BamHI 进行限制性消化。经过琼脂糖电泳后,在紫外光下切下正确的电泳条带,并且用 QIAquick 凝胶提取试剂盒(购于德国 Qiagen 公司)纯化 DNA。

[0094] 用相同的限制性酶消化 pET 载体(购于德国 Novagen 公司),用虾碱性磷酸酶(购于英国罗氏公司)对末端去磷酸化,然后将载体用与目标基因相同的方式进行凝胶电泳纯化。

[0095] 用 T₄DNA 连接酶(购于英国 New England Biolabs 公司)将载体 DNA 与目标基因相连,并将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中,过夜培养。挑取单克隆,在含有 100mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中继续培养。用 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒(购于德国 Qiagen 公司)提取质粒 DNA,并进行测序以确认插入的序列正确。

[0096] 3. HIV Nef 融合蛋白的诱导表达

[0097] 将表达载体转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中,挑取单菌落接种到低盐 LB 培养液中并于 37℃ 过夜培养,在低盐 LB 培养液中 1 : 100 稀释培养物并 37℃ 震荡培养至 OD₆₀₀ = 0.5,此时细菌达到指数生长阶段。加入 1mmol 的 IPTG 进行蛋白的诱导表达,继续于 37℃ 或 28℃ 震荡培养 5 小时。收集菌液,于 4000rpm 离心,收集沉淀,并在磷酸缓冲液中重悬,用超声法裂解细胞,离心收集含有表达蛋白的包涵体。

[0098] 4. 蛋白纯化

[0099] 将表达的蛋白通过 Ni-NTA 纯化试剂盒(购于德国 Qiagen 公司)进行纯化。简单地说,在变性缓冲液(8M 尿素的 Tris 缓冲液)中重悬包涵体,使其通过 Ni-NTA 纯化柱,组氨酸标记的蛋白质结合到柱子上,经过充分的洗涤,蛋白质被洗脱缓冲液洗脱下来。

[0100] 5. 蛋白酶消化及重叠肽的制备

[0101] 将缓冲液更换为 Xa 因子消化缓冲液(含有 5mM CaCl₂ 的 Tris 缓冲液),消化缓冲液中的蛋白质用 Centriprep YM10(购于美国 Milipore 公司)进行浓缩,然后用蛋白酶 Xa 因子(购于美国 New England Biolabs 公司)在室温下进行完全消化,约需 20min。最终得到 20 种重叠肽(寡肽),各个重叠肽的序列见表 1。

[0102] 表 1

[0103]

SEQ ID NO.	序列
1	mggkwsksv vgwpavrerm
2	vgwpavrerm rraepaadgv
3	rraepaadgv gavsrdlekh
4	gavsrdlekh gaitssntaa
5	gaitssntaa tnadcawlea
6	tnadcawlea qeeevgfpv
7	qeeevgfpv tpqvplrpmt
8	tpqvplrpmt ykaavdlshf
9	ykaavdlshf lkekGGLEGL
10	lkekGGLEGL ihsqrrqdil
11	ihsqrrqdil dlwiyhtqgy
12	dlwiyhtqgy fpdwqnytpe
13	fpdwqnytpe pgvrypltfg
14	pgvrypltfg wcyklvpvpe
15	wcyklvpvpe dkveeankge
16	dkveeankge ntrllhpvs1
17	ntrllhpvs1 hgmddperev
18	hgmddperev lewrfdsr1a
19	lewrfdsr1a fhhvarelhp
20	fhhvarelhp ey

[0104]

[0105] 6. 寡肽浓缩及纯化

[0106] 通过苯甲脒琼脂糖（购于美国 Amersham Biosciences 公司）或仅通过 YM10 过滤管出去蛋白酶，并且用 Ni-NTA 琼脂糖除去游离的组氨酸标记。由此得到的寡肽混合物被浓缩，将缓冲液更换为磷酸缓冲液，放置于 4℃ 备用。

[0107] 实施例 2.

[0108] 用 HIV Nef 蛋白相关重叠肽免疫 BALB/c 小鼠

[0109] 1. 免疫方式：

[0110] 用 NIV Nef 蛋白相关重叠肽皮下免疫近交系小鼠 BALB/c, 进行致敏, 每只小鼠加入福氏完全佐剂 (CFA) 和 NIV Nef 蛋白相关重叠肽 (平均 $10 \mu\text{g}/\text{肽}$)。

[0111] 两周后用同样的重叠肽与福氏非完全佐剂 (IFA) 对该小鼠加强免疫, 缓释重叠肽。

[0112] 两周后再一次加强免疫, 缓释重叠肽。

[0113] 对照小鼠仅注射佐剂 (CFA-IFA-IFA), 或无注射。

[0114] 2. 皮肤反应结果：

[0115] 在重叠肽免疫的小鼠中, 在第二次和第三次免疫过夜后, 出现皮肤硬结和红肿。而对照组 (只注射佐剂或无注射) 则无此皮肤反应, 见图 1。这说明重叠肽能够引起皮肤反应, 并且皮肤反应发生在注射重叠肽过夜之后, 早期 (20 分钟左右) 无皮肤反应, 属于延迟型变态反应。因此表明, 皮肤反应不是 I 型过敏反应 (速发型) 引起的。

[0116] 3. IFN- γ 免疫酶联斑点测试结果：

[0117] 酶联免疫斑点实验使用来自 BD PharminGen 公司的酶联免疫斑点实验试剂盒进行。简而言之, IFN- γ 预涂板上的脾细胞用 $1 \mu\text{M}$ 的重组的重叠肽刺激过夜, 弃去脾细胞, 加入生物素化的抗 IFN- γ 抗体 37°C 培养 1 小时, 然后用酶标记的抗生物素抗体在 37°C 下再温育 1 小时, 待颜色稳定后, 由斑点计数仪进行斑点计数。

[0118] IFN- γ 免疫酶联斑点实验 (图 2) 证明, NIV Nef 蛋白相关重叠肽免疫组的小鼠在三次免疫后出现 HIV Nef 特征性的细胞免疫, 而对照 (只注射佐剂) 则无此反应。

[0119] 实施例 3

[0120] 检测试剂盒

[0121] 一种进行皮肤试验和检测特异性的细胞免疫反应试剂盒, 包括组分：

[0122] 重叠肽 $10 \mu\text{g}/\text{肽}$ ；

[0123] 矿物油 $200 \mu\text{l}$ ；

[0124] 卡尺用来测量皮肤反应直径；

[0125] 与使用说明书一起置于一盒中, 构成试剂盒。

[0126] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 姜, 石松

<120> 重叠肽作为制备皮肤试验和检测特异性细胞免疫的试剂及其应用

<130> P2011-0049

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Val Gly Trp Pro Ala Val

1 5 10 15

Arg Glu Arg Met

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Val Gly Trp Pro Ala Val Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala

1 5 10 15

Ala Asp Gly Val

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg Asp

1 5 10 15

[0002]

Leu Glu Lys His
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 4

Gly Ala Val Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser
1 5 10 15

Asn Thr Ala Ala
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5

Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Thr Asn Ala Asp Cys Ala
1 5 10 15

Trp Leu Glu Ala
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 6

Thr Asn Ala Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val
1 5 10 15

Gly Phe Pro Val
20

[0003]

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 7

Gln Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu
1 5 10 15

Arg Pro Met Thr
20

<210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 8

Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val Asp
1 5 10 15

Leu Ser His Phe
20

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 9

Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly
1 5 10 15

Leu Glu Gly Lcu
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 10

[0004]

Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg Arg

1 5 10 15

Gln Asp Ile Leu

20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Ile His Ser Gln Arg Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Ile Tyr His

1 5 10 15

Thr Gln Gly Tyr

20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Asp Leu Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn

1 5 10 15

Tyr Thr Pro Glu

20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Glu Pro Gly Val Arg Tyr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Phe Gly

[0005]

20

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 14

Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr Lys Leu Val
1 5 10 15

Pro Val Glu Pro
20

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 15

Trp Cys Tyr Lys Leu Val Pro Val Glu Pro Asp Lys Val Glu Glu Ala
1 5 10 15

Asn Lys Gly Glu
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 16

Asp Lys Val Glu Glu Ala Asn Lys Gly Glu Asn Thr Arg Leu Leu His
1 5 10 15

Pro Val Ser Leu
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT

[0006]

<213> 人工序列

<400> 17

Asn Thr Arg Leu Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro
1 5 10 15

Glu Arg Glu Val
20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp
1 5 10 15

Ser Arg Leu Ala
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 19

Lcu Glu Trp Arg Phe Asp Scr Arg Lcu Ala Phe His His Val Ala Arg
1 5 10 15

Glu Leu His Pro
20

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Phe His His Val Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr
1 5 10

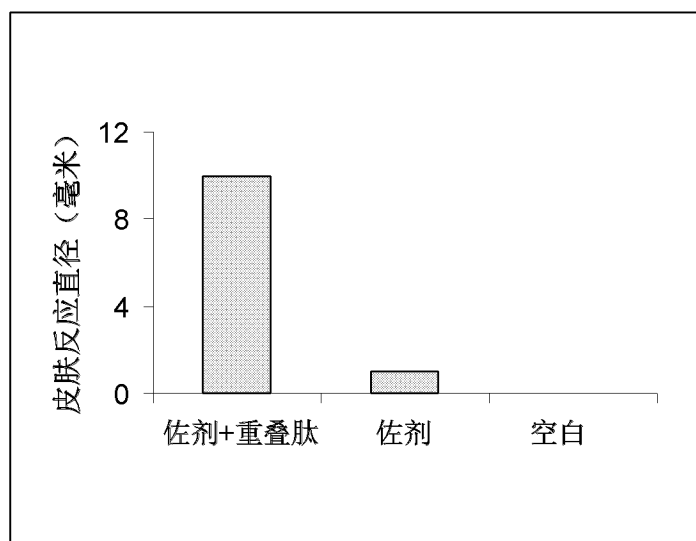


图 1

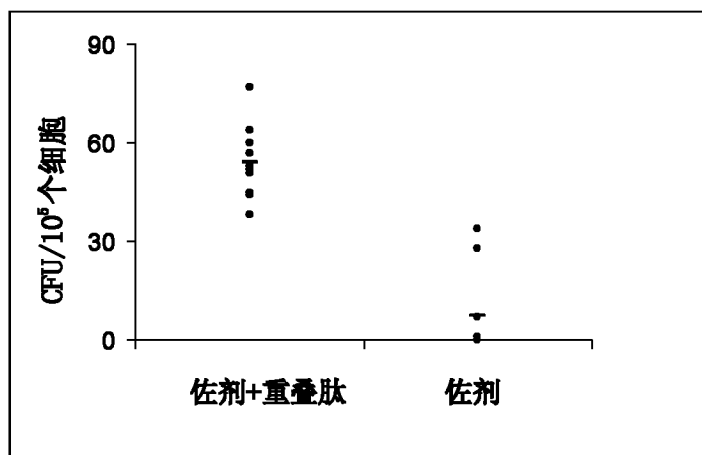


图 2