



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103172707 A

(43) 申请公布日 2013.06.26

(21) 申请号 201110439824.5

C12Q 1/68 (2006.01)

(22) 申请日 2011.12.23

G01N 33/68 (2006.01)

(71) 申请人 上海市公共卫生临床中心

地址 201508 上海市金山区漕廊公路 2901 号

(72) 发明人 张丽军 贾小芳 马芳 姚亚敏
卢洪洲

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

艾滋病病毒感染的诊断标记 Talin 1 片段及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,涉及一种艾滋病病毒感染的诊断标记。本发明首次提供了可以作为艾滋病病毒感染诊断标记的 Talin-1 片段及其试剂盒,所述的 Talin 1 片段如 SEQ ID NO 1 或者 SEQ ID NO 2 所示。本发明还提供了相应的试剂盒及其应用。使用该诊断标记或者试剂盒筛选艾滋病病毒感染患者,方法简单,操作方便,成本低廉,通俗易懂,能够较快的提供诊断结果,帮助感染患者尽早了解病情,制定治疗方案,控制病情。尤其适于检测艾滋病病毒病毒载量低的样本。本发明的诊断标记可以与其他诊断方法或者诊断标记联合使用,以进一步提高诊断的准确率和敏感性。

1. 一种艾滋病病毒感染的诊断标记,其特征在于,所述的诊断标记是 Talin 1 片段;所述的 Talin 1 片段如 SEQ ID NO 1 或者 SEQ ID NO 2 所示。
2. 如权利要求 1 所述的诊断标记,其特征在于,所述的诊断标记由 SEQ ID NO 1 所示的多肽和 SEQ ID NO 2 所示的多肽组成。
3. 一种艾滋病病毒感染的诊断标记,其特征在于,所述的诊断标记是 Talin 1 片段的 DNA 编码序列;所述的 Talin 1 片段如 SEQ ID NO 1 或者 SEQ ID NO 2 所示。
4. 如权利要求 3 所述的诊断标记,其特征在于,所述的诊断标记由 SEQ ID NO 1 所示氨基酸序列的 DNA 编码序列和 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的 DNA 编码序列组成。
5. 权利要求 1-4 中任意一种诊断标记的应用,其特征在于,将样本与权利要求 1-4 中任意一种诊断标记进行对比,检测样本中是否含有权利要求 1-4 中任意一种诊断标记。
6. 权利要求 1-4 中任意一种诊断标记的应用,其特征在于,检测样本中含有所述诊断标记的数量。
7. 权利要求 1 所述诊断标记的应用方法,其特征在于,该方法依次包括如下步骤:
 - (1) 收集待测外周血样本;
 - (2) 分离、培养外周血单个核细胞;
 - (3) 取蛋白样品;
 - (4) 利用免疫印迹分析方法检测其中 Talin 1 片段的含量。
8. 一种诊断艾滋病病毒感染的试剂盒,其特征在于,该试剂盒含有权利要求 1-4 中任意一种的诊断标记。
9. 如权利要求 8 所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还含有分子量标记试剂。
10. 如权利要求 8 所述试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还含有 Talin 1 片段的抗体。

艾滋病病毒感染的诊断标记 Talin 1 片段及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种艾滋病病毒感染的诊断标记。具体而言,涉及一种以 Talin 1 片段为核心的艾滋病诊断标记及其试剂盒。本发明还提供了相应试剂盒的使用方法和应用。

背景技术

[0002] 艾滋病,即获得性免疫缺陷综合症(又译:后天性免疫缺陷症候群),英语缩写 AIDS(Acquired Immune Deficiency Syndrome)的音译。分为两型:HIV-1 型和 HIV-2 型,是人体注射感染了“人类免疫缺陷病毒”(HIV-human immunodeficiency virus)(又称艾滋病病毒)所导致的传染病。艾滋病被称为“史后世纪的瘟疫”,也被称为“超级癌症”和“世纪杀手”。

[0003] 艾滋病,是种人畜共患疾病,由感染“HIV”病毒引起。HIV 是一种能攻击人体免疫系统的病毒。它把人体免疫系统中最重要 T4 淋巴组织作为攻击目标,大量破坏 T4 淋巴组织,产生高致命性的内衰竭。这种病毒在地域内终生传染,破坏人的免疫平衡,使人体成为各种疾病的载体。

[0004] 艾滋病病毒感染者从感染初期算起,要经过数年、甚至长达 10 年或更长的潜伏期后才会发展成艾滋病病人。艾滋病病人因抵抗能力极度下降会出现多种感染,如带状疱疹、口腔霉菌感染、肺结核,特殊病原微生物引起的肠炎、肺炎、脑炎,念珠菌,肺囊虫等多种病原体引起的严重感染等,后期常常发生恶性肿瘤,直至因长期消耗,全身衰竭而死亡。

[0005] 艾滋病严重地威胁着人类的生存,已引起世界卫生组织及各国政府的高度重视。艾滋病在世界范围内的传播越来越迅猛,严重威胁着人类的健康和社会的发展,已成为威胁人们健康的第四大杀手。联合国艾滋病规划署 2006 年 5 月 30 日宣布自 1981 年 6 月首次确认艾滋病以来,25 年间全球累计有 6500 万人感染艾滋病毒,其中 250 万人死亡。

[0006] 虽然全世界众多医学研究人员付出了巨大的努力,但至今尚未研制出根治艾滋病的特效药物,也没有可用于预防的有效疫苗。目前,这种病死率几乎高达 100%的“超级癌症”已被我国列入乙类法定传染病,并被列为国境卫生监测传染病之一。故此我们把其称为“超级绝症”。

[0007] 艾滋病病毒属于 RNA 病毒,由于 RNA 是单链,它不如 DNA 双链那样稳定,所以艾滋病病毒的突变频率极高,给研制疫苗带来巨大的困难。而且艾滋病病毒是逆转录病毒,所谓逆转录病毒是它在侵入宿主细胞后,以自己的单链 RNA 为模板,按照碱基互补配对原则,在逆转录酶的作用下,合成 cDNA,新合成的 cDNA 插入宿主的核 DNA 中,随宿主 DNA 复制、转录、翻译达到扩增目的病毒。

[0008] 艾滋病的治疗方法有:营养治疗、干细胞骨髓移植、水果治疗、抗 HIV 病毒药、免疫调节药物、手术治疗、疫苗疗法等等。但是,目前尚无预防艾滋病的有效疫苗。

[0009] 艾滋病检测原则,是指采用实验室方法对人体血液、其他体液、组织器官、血液衍生物等进行艾滋病病毒、艾滋病病毒抗体及相关免疫指标检测。

[0010] 艾滋病的诊断依据主要以病毒抗体阳性为主,辅以下列任何一项者,可为实验确诊艾滋病病人。

[0011] (1) 近期内(3-6个月)体重减轻10%以上,且持续发热达38℃一个月以上。

[0012] (2) 近期内(3-6个月)体重减轻10%以上,持续腹泻(每日达3-5次)一个月以上。

[0013] (3) 卡氏肺囊虫肺炎(PCR)。

[0014] (4) 卡波济肉瘤KS。

[0015] (5) 明显的霉菌或其他条件致病感染。

[0016] 艾滋病病毒在人体内的潜伏期平均为8年至9年,在发展成艾滋病病人以前,病人外表看上去正常,他们可以没有任何症状地生活和工作很多年。HIV本身并不会引发任何疾病,而是当免疫系统被HIV破坏后,人体由于抵抗能力过低,丧失复制免疫细胞的机会,并感染其它的疾病导致各种疾病复合感染而死亡。如何较早的确诊艾滋病病毒感染者是本领域的重要课题之一。

发明内容

[0017] 本发明要解决的问题提供一种艾滋病病毒载量检测的诊断标记,帮助诊断艾滋病病毒感染者,尤其是针对潜伏期、病毒载量较低的患者。

[0018] 本发明要解决的另一个问题提供一种艾滋病病毒感染的诊断试剂盒。

[0019] 本发明基于下面的发明构思:研究表明,talin 1蛋白质的分子量较低片段在HIV感染者中上调,且目的片段位于C端,说明Talin-1的片段化与HIV的感染紧密相关。通过检测HIV感染者和健康志愿者的单个核细胞中蛋白质组,发现HIV感染者体内约38Kda大小的Talin-1片段表达量增加显著,而且该Talin-1片段的表达量与病毒载量负相关。这种负相关性提示,新生成的片段化的Talin-1可以作为一个新型艾滋病感染初期的临床监测指标。在此基础上进一步完成本发明。

[0020] 本发明提供了一种艾滋病病毒感染的诊断标记,所述的诊断标记是Talin 1片段;所述的Talin 1片段如SEQ ID NO 1或者SEQ ID NO 2所示。

[0021] 所述的诊断标记可以由SEQ ID NO 1所示的多肽和SEQ ID NO 2所示的多肽组成。这两条多肽链各自为一个独立的单位,既可以各自为独立的多肽链,也可以从属于同一条多肽链,即以先后顺序连接于同一条多肽链上,中间间隔一个或者若干个氨基酸残基。

[0022] 所述的诊断标记也可以是Talin 1片段的DNA编码序列;所述的Talin 1片段如SEQ ID NO 1或者SEQ ID NO 2所示。

[0023] 所述的诊断标记可以由SEQ ID NO 1所示多肽的DNA编码序列和SEQ ID NO 2所示多肽的DNA编码序列组成。这两条DNA链各自为一个独立的单位,既可以各自处于独立的DNA链,也可以从属于同一条DNA链,即以先后顺序连接于同一条多肽链上,两者中间间隔一个或者若干个核苷酸。

[0024] 本发明还提供了上述诊断标记的应用,简而言之,将样本与上述任意一种诊断标记进行对比,检测样本中是否含有上述诊断标记。

[0025] 较好的,可以进一步检测样本中含有上述诊断标记的数量。

[0026] 在本发明的一个实施例中,检测Talin 1片段的方法如下:收集外周血,分离培养

外周血单个核细胞,取蛋白样品,利用免疫印迹分析方法检测其中 Talin 1 片段的含量。

[0027] 本发明提供了一种诊断艾滋病的试剂盒,该试剂盒含有上述任意一种的诊断标记。

[0028] 所述的试剂盒还含有分子量标记试剂。此外,还可以含有缓冲液,小分子量的蛋白或者核酸标记,内参试剂或者说明书,等。

[0029] 本发明的一方面,提供了一种分离的 Talin 1 片段多肽,它包括:具有 SEQ ID NO:1h 或者 2 的氨基酸序列的多肽、或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。较佳地,该多肽是具有 SEQ ID NO:1 或者 2 的氨基酸序列的多肽。

[0030] 本发明的另一方面,提供了一种分离的 Talin 1 片段多肽的多核苷酸编码序列,它包括:具有 SEQ ID NO:1 或者 2 的氨基酸序列的多核苷酸编码序列及其简并序列。该简并序列是指,有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性,所以与 SEQ ID NO:1 或者 2 的核苷酸编码序列同源性低至约 70% 的简并序列也能编码出 SEQ ID NO:1 或者 2 所述的氨基酸序列。

[0031] 实践中,可以根据 Talin 1 片段多肽的氨基酸序列人工合成该多肽。也可以将本发明的 Talin 1 片段多肽的编码序列与载体连接,用于扩增或者表达 Talin 1 片段多肽。

[0032] 在本发明的另一方面,提供了一种产生具有 Talin 1 片段多肽的方法,该方法包括:

[0033] (a) 将编码 Talin 1 片段多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,形成 Talin 1 片段多肽表达载体,所述的 Talin 1 片段多肽与 SEQ ID NO:1 或者 2 的氨基酸序列相同;

[0034] (b) 将步骤 (a) 中的表达载体转入宿主细胞,形成 Talin 1 片段多肽的重组细胞;

[0035] (c) 在适合表达 Talin 1 片段多肽的条件下,培养步骤 (b) 中的重组细胞;

[0036] (d) 分离出具有 Talin 1 片段多肽活性的多肽。

[0037] 在本发明的另一方面,提供了一种检测艾滋病病毒感染的方法,该方法包括:收集待检测者的血样或者体液,检测其中 Talin 1 片段多肽的含量。

[0038] 在一个实施例中,提供了待测样本是否存在 Talin 1 片段多肽的方法,它包括步骤:将待测样品与抗 Talin 1 片段多肽的特异性抗体接触;检测是否形成了免疫复合物,形成免疫复合物就表示该待测样本含有 Talin 1 片段多肽。

[0039] 实践中,还可以通过检测样本中是否存在 Talin 1 多肽的核酸编码序列,它包括步骤:用 Talin 1 片段多肽编码序列的特异性引物,用 RT-PCR 法扩增该样本的 mRNA;检测是否有预计 Talin 1 片段多肽扩增产物,存在扩增产物就表示该样本发生了艾滋病病毒感染。

[0040] 在另一实施例中,该方法是通过检测样本中是否存在 Talin 1 片段多肽的转录本,它包括步骤:用 Talin 1 片段多肽核酸编码序列的特异性探针,与该样本的 cDNA 样品杂交;检测是否有杂交产物,存在杂交产物就表示该样本发生了艾滋病病毒感染。

[0041] 在本发明的另一方面,还提供了一种检测艾滋病病毒感染的试剂盒,它含有:(1) 特异性扩增 Talin 1 片段核酸编码序列的引物对,(2) 任选的逆转录 mRNA 所需的试剂。另一种检测艾滋病病毒感染的试剂盒,含有针对 Talin 1 片段多肽的特异性的抗体。另一种检测艾滋病病毒感染的试剂盒,含有可特异性地与 Talin 1 片段多肽的 mRNA 杂交的探针。

[0042] 在本发明中,可选用本领域已知的各种载体,如市售的载体。比如,选用市售的载体,然后将编码本发明多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,可以形成蛋白表达载体。

[0043] 如本文所用,“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影响同一线性 DNA 序列其他部分的活性。例如,如果信号肽 DNA 作为前体表达并参与多肽的分泌,那么信号肽(分泌前导序列)DNA 就是可操作地连于多肽 DNA;如果启动子控制序列的转录,那么它是可操作地连于编码序列;如果核糖体结合位点被置于能使其翻译的位置时,那么它是可操作地连于编码序列。一般,“可操作地连于”意味着相邻近,而对于分泌前导序列则意味着在阅读框中相邻。

[0044] 在本发明中,术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞,昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地,该宿主细胞是真核细胞,如 CHO 细胞、COS 细胞等。

[0045] 另一方面,本发明还包括对 Talin 1 片段多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体,尤其是单克隆抗体。这里,“特异性”是指抗体能结合于 Talin 1 片段多肽。较佳地,指那些能与 Talin 1 片段多肽结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制 Talin 1 片段多肽的分子,也包括那些并不影响 Talin 1 片段多肽功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的 Talin 1 片段多肽结合的抗体。

[0046] 本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体,而且还包括具有免疫活性的抗体片段,如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段;抗体重链;抗体轻链;遗传工程改造的单链 Fv 分子(Ladner 等人,美国专利 No. 4, 946, 778);或嵌合抗体,如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

[0047] 本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如,纯化的 Talin 1 片段多肽或者其具有抗原性的片段,可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的,表达 Talin 1 片段多肽或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人,Nature 256:495,1975;Kohler 等人,Eur. J. Immunol. 6:511,1976;Kohler 等人,Eur. J. Immunol. 6:292,1976;Hammerling 等人,In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断 Talin 1 片段多肽功能的抗体以及不影响 Talin 1 片段多肽功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用 Talin 1 片段多肽的片段或功能区,通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与 Talin 1 片段多肽的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 E. Coli)中生产的基因产物来免疫动物而产生;与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽),可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

[0048] 本发明首次提供了可以作为艾滋病病毒感染诊断标记的 Talin-1 片段及其试剂盒。使用该诊断标记或者试剂盒筛选艾滋病病毒感染患者,方法简单,操作方便,成本低廉,通俗易懂,能够较快的提供诊断结果,帮助感染患者尽早了解病情,制定治疗方案,控制病情。尤其适于检测艾滋病病毒病毒载量低的样本。本发明的诊断标记可以与其他诊断方法

或者诊断标记联合使用,以进一步提高诊断的准确率和敏感性。

附图说明

[0049] 图 1 是 HIV 患者中 Talin-1 片段化的电泳局部放大图。其中, N1, N2, 和 N3 表示健康人血浆的三次重复实验, H1, H2 和 H3 表示未经 HAART 治疗的艾滋病患者标本。图中的 TLN1 基本发明的 Talin-1。

[0050] 图 2 是质谱鉴定 talin-1 的 38KDa 片段信息。

[0051] 图 3 是在 11 个健康志愿者和 12 个艾滋病患者的 PBMC 中免疫印迹分析 talin 1 的 38KDa 片段的表达。

[0052] 图 4 是 38KDa 附近的 Talin-1 片段的量与病毒载量负相关图。

[0053] 图 5 是 MRM 定量检测 Talin-1C 端肽段。其中 1-4 为低病毒载量标本, 5-7 为正常标本, 8-10 为高病毒载量标本。

[0054] 图 6 是 HIV 假病毒感染 TZM-bl 细胞后 Talin-1 的片段化及对应阶段的细胞凋亡检测。

[0055] 图 7 是病毒载量相关的细胞凋亡检测。对 3.2 中的细胞模型通常进行 caspase 的免疫印迹实验, 结果表明: 整个假病毒刺激过程中细胞均未发生明显的凋亡。

具体实施方式

[0056] 实施例 12DE-MS 在 HIV 感染者中首次发现 Talin-1 片段化

[0057] 采用 2DE-MS 的技术路线检测未经 HAART 治疗的 HIV 感染者和健康志愿者的单个核细胞中蛋白质组, 发现 talin 1, vinculin, filamin A 等蛋白质的分子量较低片段在 HIV 感染者中上调(见图 1), 且目的片段位于 C 端。图中的 TLN1 基本发明的 Talin-1。

[0058] 这一结果提示: 在经过 HAART 治疗的 HIV 感染者中, Talin-1 在其 C 端发生了片段化, 并且在临床样本中得到了很好的验证。

[0059] 实施例 2 生物信息学验证 Talin 1 及其相互作用蛋白质与 HIV 蛋白质的相关性

[0060] 采用 STRING 8.0 软件 (<http://string.embl.de>) 以及 HIV 与宿主细胞相互作用的数据库 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/HIVInteractions.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/HIVInteractions)) 分析了 talin 1 与 HIV 蛋白质和宿主细胞蛋白质的相互作用, 发现 talin 1 参与了 HIV 的 pol 和 vif 基因调控的网络。这与图 1 的结果一致: 这个网络中的几个蛋白质都在 HIV 感染者中有表达上调的片段(见图 1)。表明: Talin-1 的片段化并非是一种独立的偶然现象, 而是位于一个复杂的相互作用网络之中。因此其片段化非常有可能是一种宿主面对 HIV 入侵采取的主动反应, 从而影响病毒的进一步感染。

[0061] 实施例 3 在临床标本中检查 talin-1 片段与 HIV 病毒载量的关系

[0062] 3.1. Western Blotting 检测 Talin-1 片段与 HIV 病毒载量的关系

[0063] 收集经 HAART 治疗 6 个月后病毒载量低于 50 或高于 70 的患者 EDTA 抗凝全血, 分离 PBMC, 等量蛋白质 (50 μ g) 上样, 用抗 talin-1 的一抗进行免疫印迹实验。

[0064] 结果显示: 38KDa 附近的 Talin-1 片段的量与病毒载量负相关(图 4)。

[0065] 3.2MRM 实验定量 talin 1 的片段

[0066] A. 非冗余肽段筛选

[0067] 根据质谱鉴定的肽段,初步预测 38kDa 片段为 talin 1 的 C-端片段。然后分析并最终选择了 VGAIPANALDDGQWSQGLISAAR(SEQ ID NO 1) 和 LAQAAQSSVATITR(SEQ ID NO 2) 这两个 Talin-1 的 unique peptide 作为对 Talin-1 进行质谱定量检测的依据。

[0068] B. 多肽的定量分析

[0069] 采用戴安纳升液相色谱 Ultra3000 串联布鲁克离子阱质谱 HCT 进行 Talin-1MRM 定量检测。取 4 个 HIV 病毒载量 < 50 艾滋病人、3 个健康人和 3 个 HIV 病毒载量 > 50 的艾滋病人 PBMC 标本,提取全细胞蛋白质,测定蛋白含量后,各取 50ug 进行一维 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后进行考马斯亮蓝染色。切取 38kDa 的条带,脱色脱水冻干后,用 DTT 和 IAA 进行还原烷基化,每管中加入约 20 μ l 胰酶 (0.02 μ g/ μ l)。37 $^{\circ}$ C 酶解过夜 (16 ~ 18h)。酶切肽段进行萃取后,通过戴安纳升级液相色谱 Ultimate 3000 串联大容量离子阱质谱 (LC-MS/MS) 进行 MRM 定量检测。肽段样品先经过 C18 预柱 (300 μ m id x5mm,5 μ m) 脱盐,流速为 20 μ L/min,流动相为 2% ACN 和 0.1% FA。然后以 300nL/min 的流速经 C-18 反向柱 (75 μ m 内径 x 15cm 长度,3 μ m) 进行分离,色谱的梯度为 4-48%,梯度时间为 60min。通过 C18 色谱柱分离的肽段由纳流喷针进入 HCT 质谱进行实时的离子化分析检测。选取 Talin-1C 端肽段 m/z770.8(序列为 VGAIPANALDDGQWSQGLISAAR) 和 m/z 708.9(序列为 LAQAAQSSVATITR) 进行 MRM 的定量检测,相应的子离子分别为 y4(m/z 404.2) 和 y5(m/z 561.3),设定色谱梯度运行到 20-28min 时质谱 MRM 检测离子对 770.8/404.2,30.5-42min 时 MRM 检测 708.9/561.3。

[0070] 结果见图 5。

[0071] 结果表明,HIV 病毒载量 < 50 的 4 个标本均能检测到两条 Talin-1 肽段,3 个正常标本中只有 1 个可以检测到 Talin-1 肽段,而病毒载量 > 50 的 3 个标本中也仅有 1 个标本可以同时检测到两条 talin-1 肽段。

[0072] 该结果说明了 Talin-1 片段化与病毒载量呈负相关。

[0073] MRM 结合 Western Blotting 结果表明,Talin-1 的片段化与 HIV 病毒载量呈现强烈的负相关性,为本发明提供了有力的佐证。因为如果 Talin-1 的片段化只是毫无意义的单纯蛋白质降解引起或者是促进病毒在宿主体内的增殖,那么,其片段化应该与病毒载量呈正相关。

[0074] 而恰是这种负相关性暗示,新生成的片段化的 Talin-1 很可能是具备抑制 HIV 效应的功能肽段,可以作为一个新型艾滋病感染初期的临床监测指标。

[0075] 实施例 4 在细胞模型中验证 Talin-1 发生片段化的时间节点

[0076] 首先在 293T 细胞中包装获得功能性 HIV 假病毒,获得假病毒后经滴度测定,用活性 HIV 假病毒攻毒 TZM-b1 细胞系,分别在共孵育后 0.5,1,2,4,8,12,24,48 和 72 小时收集等量细胞,裂解获得细胞总蛋白,随即进行 talin 1 的 Western Blotting。实验结果显示 38kDa 片段的表达从 2h 开始增加,2 到 48 小时保持基本不变,72 小时后表达量相对减少(图 6)。

[0077] 这个结果提示:Talin1 的片段化可能在病毒入侵细胞阶段已经发生。此外,整个感染过程未检测到凋亡发生,表明 Talin-1 片段化并非凋亡诱导切割所致。

[0078] 实施例 5 Talin-1 片段化并非由细胞凋亡引起

[0079] 为了了解片段化是由否由于病毒感染导致的细胞凋亡所致,对实施例 3 中用到的

临床样品,进行凋亡程度检测,根据 caspase 中 35 和 17KDa 两条免疫印迹杂交带的强弱进行判断。

[0080] WB 分析 Caspase-3 切割与 HIV-1 载量的关系,结果显示,虽然在病毒载量低于 50 个拷贝 /ml 时,仍然能检测到 Caspase-3 的切割,但在更高的病毒拷贝含量样本中,可以检测到更多的 Caspase-3 切割,提示高病毒载量样本中的低 Talin-1 片段化不是由于凋亡增多引起的蛋白广泛降解所导致(图 7)。

[0081] 对实施例 4 中的细胞模型通常进行 caspase 的免疫印迹实验,结果表明:整个假病毒刺激过程中细胞均未发生明显的凋亡(见图 6)。

[0082] 根据上述实验结果认为,Talin-1 的片段化与细胞凋亡之间没有明显的相关性。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海市公共卫生临床中心

<120> 艾滋病病毒感染的诊断标记 Talin 1 片段及其应用

<130> 201191

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Val Gly Ala Ile Pro Ala Asn Ala Leu Asp Asp Gly Gln Trp Ser Gln
 1 5 10 15

Gly Leu Ile Ser Ala Ala Arg
 20

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 2

Leu Ala Gln Ala Ala Gln Ser Ser Val Ala Thr Ile Thr Arg

1

5

10

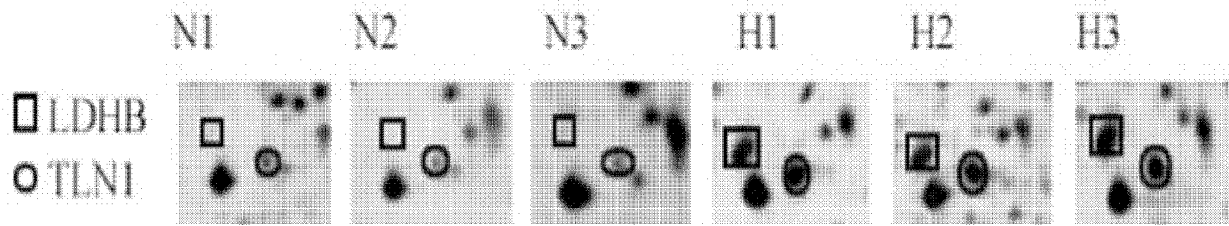


图 1

```

2101 AAGKVGDDPA VWQLKNSAKV MVTNVTSLLK TVKAVEDEAT KGTRALEATT
2151 EHIRQELAVF CSPEPPAKTS TPEDFIRMTK GITMATAKAV AAGNSCRQED
2201 VIATANLSRR AIADMLRACK EAAYHPEVAP DVRLRALHYG RECANGYLEL
2251 LDHVLLTLQK PSPELKQQLT GHSKRVAGSV TELIQAAEAM KGTEWVDPED
2301 PTVIAENELL GAAAIEAAA KKLEQLKPRK KPKEADESLN FEEQILEAAK
2351 SIAAATSALV KAASAAQREL VAQGVGAIP ANALDDGQWS QGLISAARMV
2401 AAATNNLCEA ANAAVQGHAS QEKLISAKQ VAASTAQLLV ACKVKADQDS
2451 EAMKRLQAAG NAVKRASDNL VKAAQKAAAF EEQENETVVV KEKMGVGGIAQ
2501 IIAAQEEMLR KERELEEARK KLAQIRQQOY KFLPSELRDE H
    
```

图 2

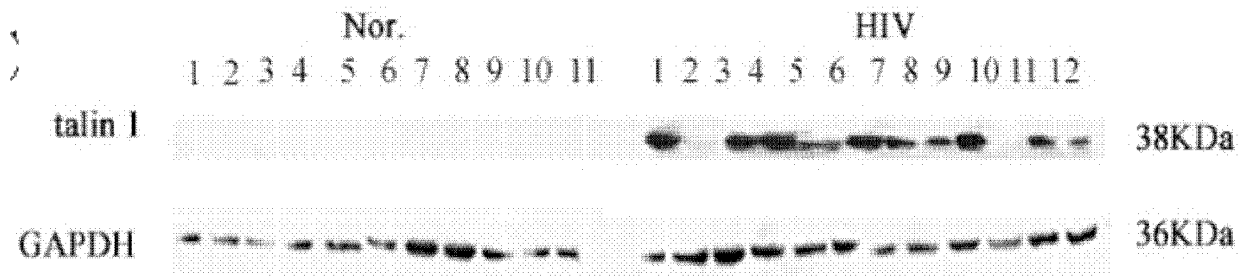


图 3

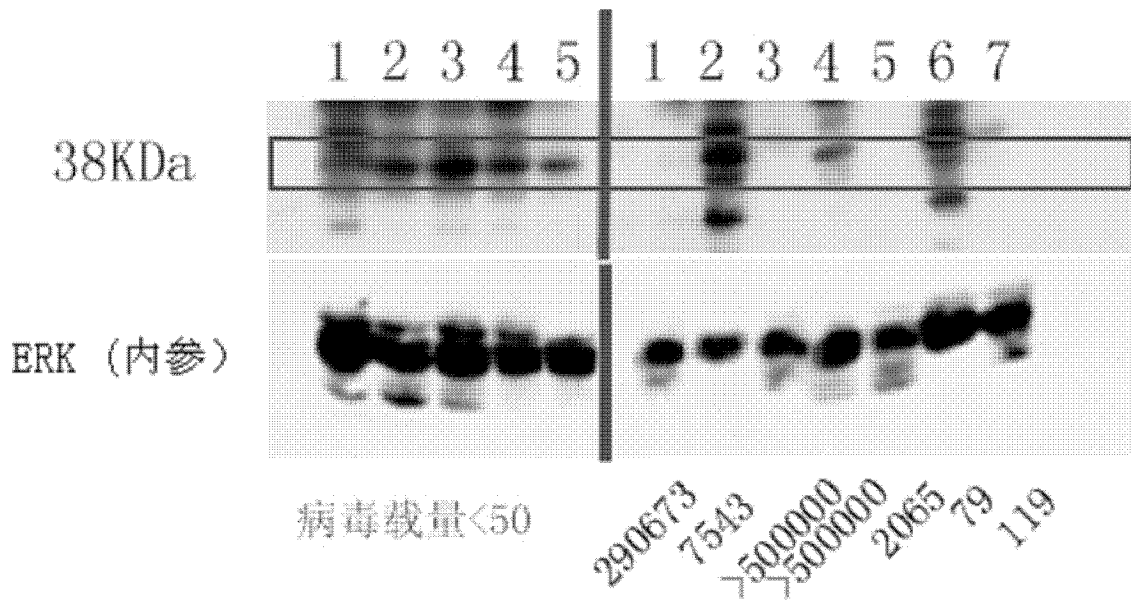


图 4

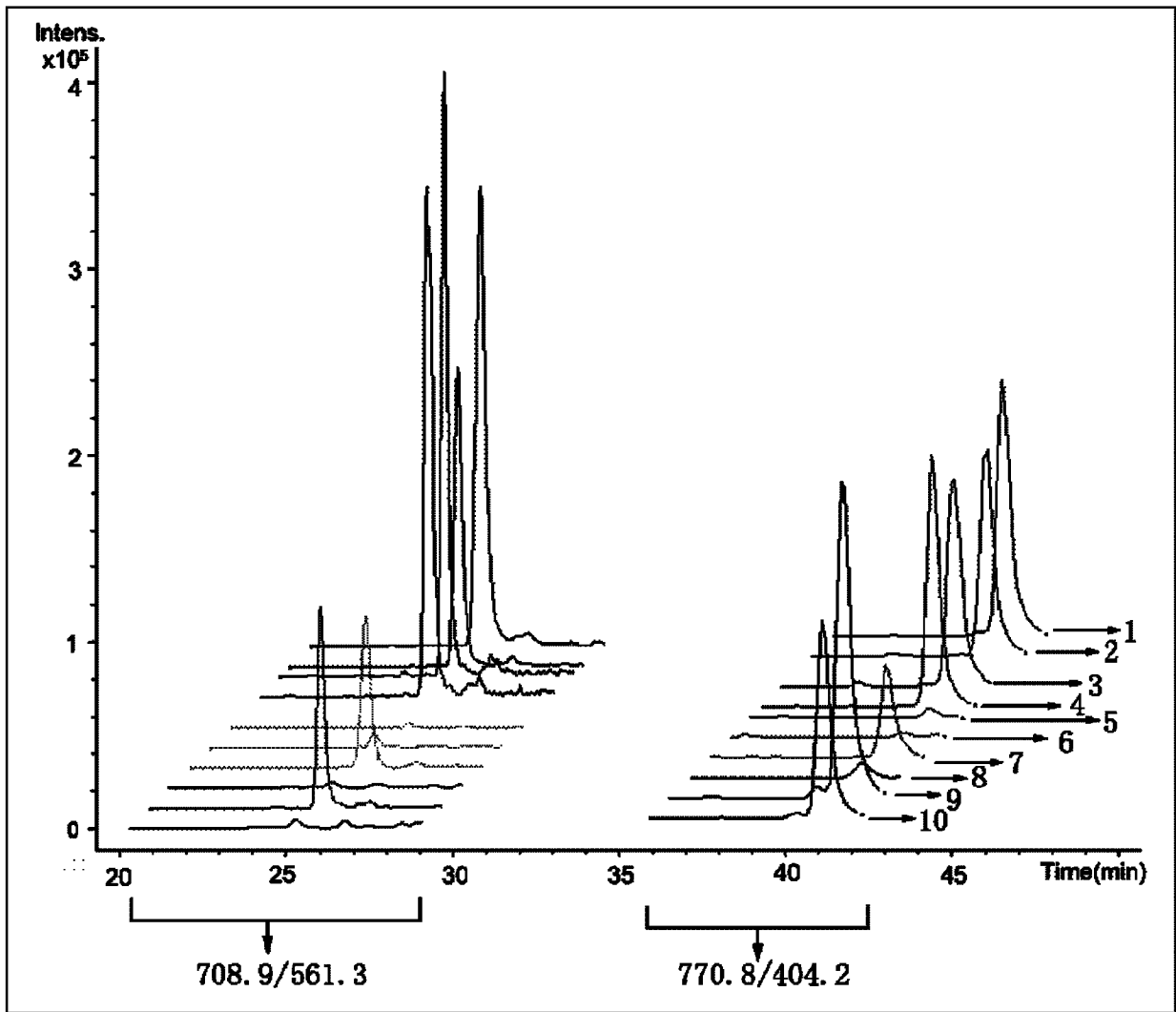


图 5

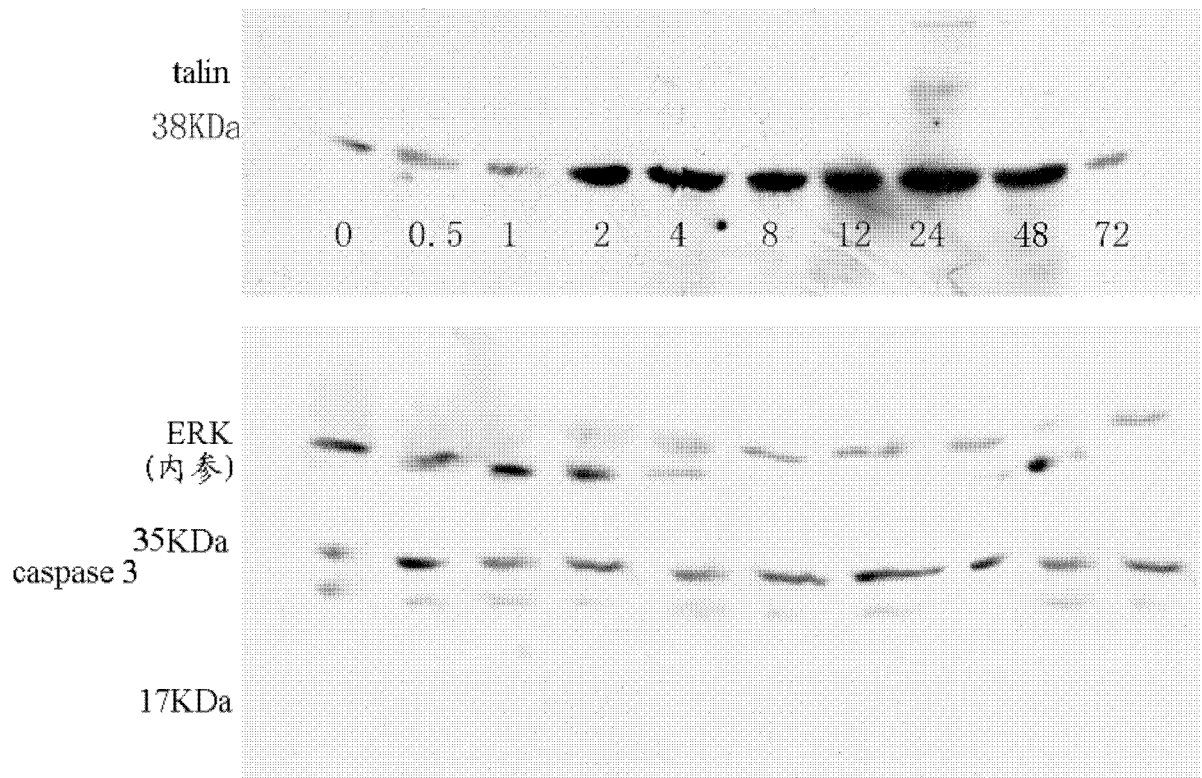


图 6

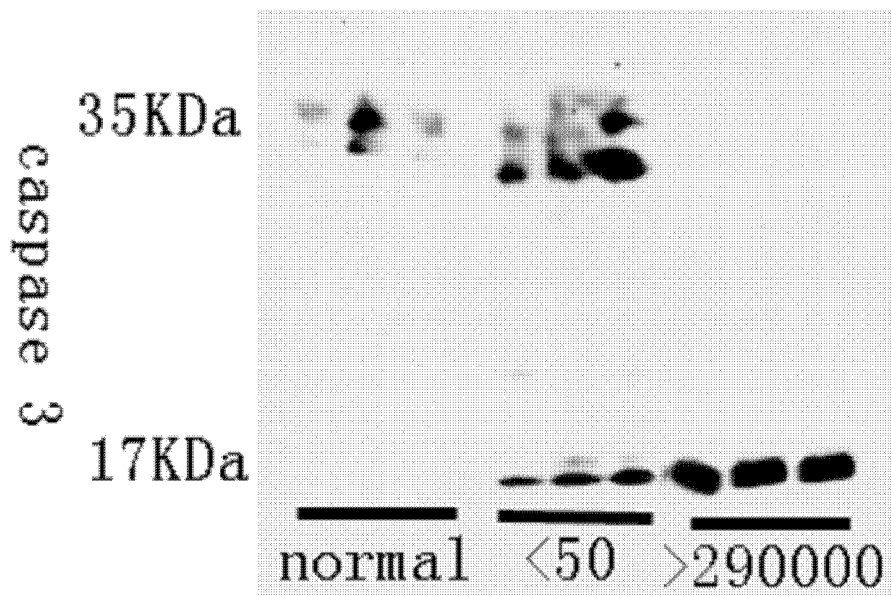


图 7