



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101446585 B

(45) 授权公告日 2012.06.06

(21) 申请号 200810220523.1

列表.

(22) 申请日 2008.12.29

WO 2005070959 A2, 2005.08.04, 第 5 页, 序
列表.

(73) 专利权人 中山大学

地址 510080 广东省广州市中山二路 74 号

审查员 黄琦

(72) 发明人 赖小敏 董涛 方毅敏

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 程跃华

(51) Int. Cl.

C07K 14/35(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12N 15/31(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C07K 7/08(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005070959 A2, 2005.08.04, 第 5 页, 序

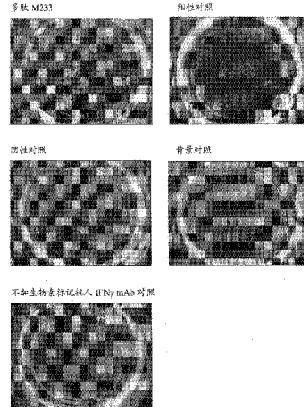
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种体外检测结核杆菌感染的试剂和方法

(57) 摘要

一种体外检测结核杆菌感染的试剂和方法，
包含 SEQ ID No. 1 所代表的 M233 多肽；通过使用
M233 多肽或其类似物，与结核杆菌宿主的 T 细胞
相接触，检测从 T 细胞释放的细胞因子，确定 T 细
胞是否识别 M233 多肽或其类似物。它具有灵敏度
高、不受 BCG 疫苗及非结核分枝杆菌干扰、特
异性好、既能检测活动性的肺结核患者、又能检测
潜伏感染的病人、还能用于检测健康的结核分枝
杆菌接触者的优点。本发明尤其适用于对中国人
种结核病和 / 或其潜伏感染的检测。



B

CN 101446585

1. 一种体外检测结核杆菌感染的试剂盒,包括 SEQ ID No. 1 M233 多肽,以及一种检测 T 细胞对蛋白或多肽识别的工具,所述工具包含 IFN- γ 抗体。
2. 根据权利要求 1 所述的一种体外检测结核杆菌感染的试剂盒,其特征在于其中的 T 细胞来源于血液、肺泡灌洗液、胸水、脑脊液、淋巴结。

一种体外检测结核杆菌感染的试剂和方法

【技术领域】

[0001] 本发明属于生物医学检验领域,涉及细胞免疫学检验方法,具体地说,涉及一种检测结核分枝杆菌感染的试剂和方法。

【背景技术】

[0002] 由人结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 所引起的结核病是严重危害人类健康的传染病。近二、三十年来由于人口流动,耐药结核菌传播,艾滋病等因素影响,结核病疫情在全球范围内回升。如今已成为所有传染病中的最大死亡原因(已经超过了狂犬病),成为青年人的第一杀手。全球 1/3 的人口(约 20 亿)已感染了结核菌,95% 发生在发展中国家。其中,2000 万是活动性结核病患者,每年新增加 800 ~ 1000 万肺结核患者,其中,75% 的人年龄在 15 ~ 50 岁。全球每天有 8000 人、每年有 200 ~ 300 万人死于结核病,其中,发展中国家占 98%。我国疫情也相当严重,是全球 22 个结核病高负担的国家之一。结核病人数位居世界第二,仅次于印度。全国超过 1/3 的人口(5 亿)感染了结核菌,其中 10% 的人发生结核病。如果得不到有效控制,在未来 10 年里,可能有 3000 万人发生结核病。

[0003] 由于存在早期诊断困难,在全国实施直接督导治疗(DOTS)策略后,中国的结核发病率并没有预期地出现明显下降,这与潜在的大量未被诊断出的潜伏感染以及痰菌阴性结核病人未被及时诊断有关,这些感染者成为一个巨大的结核病源,DOTS 计划能针对发病的肺结核患者,而对于控制潜伏感染的病人或者痰菌阴性的症状不典型的患者没有贡献。

[0004] 现有的临床实验诊断方法包括以结核菌素(PPD)试验检测 *Mtb* 感染者的迟发性超敏反应、痰涂片抗酸染色寻找 *Mtb*、*Mtb* 的分离培养、血清抗体检测及核酸成分检测等。这些方法在结核的实验诊断和研究中发挥了重要作用。但也还存在一些不足,如难以早期诊断及很好地预测预后、培养法耗时长,需要 4 ~ 8 周时间;痰涂片抗酸染色等不能诊断肺外结核且敏感性差;难以准确了解机体实际感染及免疫状态;而艾滋病合并结核时 PPD 试验常常为阴性,出现典型结核临床表现时病人一般已进入终末期;由于 PPD 试验和抗体检测采用的大多为多成分抗原,并不能将 *Mtb* 感染者与卡介苗(BCG)接种者和非结核分枝杆菌(如艾滋病人群常感染的鸟-胞内分枝杆菌等)感染者区分开。因此,为解决现有的临床实验诊断方法的局限性,研究灵敏度高、特异性好的细胞免疫学临床实验诊断方法非常必要。

[0005] 特异性抗原诊断一直是确认和评估病原体感染及感染状况较为可靠的方法,且有早期诊断价值,已经在 HBV、HCV、HIV 等疾病的诊断方面获得了广泛的应用。由于人体在对抗结核杆菌的感染中,细胞免疫起到了关键性的作用,所以寻找结核杆菌特异性的 T 细胞抗原和检测 T 细胞免疫反应已经成为近年来研究的热点。国际上已有报道的 T-SPOT 试剂正是使用结核杆菌的特异性蛋白抗原 ESAT-6 和 CFP-10 中的一些多肽,以 ELISPOT 方法(如 T-SPOT.TB 试剂)诊断结核早期感染(专利号 CN 1350546A)。但有研究显示 T-SPOT.TB 试剂在一些国家的效果并不理想,推测可能与这些国家人群的主要组织相容性抗原有不同而所使用的多肽主要是针对欧洲国家人群筛选而出、以及这些国家人群非结核分枝杆菌感染

率高等有关。另外 T-SPOT. TB 试剂价格昂贵,每一人份约合 80 美元,在发展中国家难以推广。

【发明内容】

[0006] 本发明的目的就是为了提供一种检测结核分枝杆菌感染的试剂,它具有灵敏度高、不受 BCG 疫苗及非结核分枝杆菌干扰、特异性好、既能检测活动性的肺结核患者、又能检测潜伏感染的病人、还可以检测健康的结核分枝杆菌接触者的优点。

[0007] 本发明的目的还在于提供一种检测结核分枝杆菌感染的方法。

[0008] 本发明的目的还在于进一步提供基于上述多肽的诊断试剂盒及其应用。

[0009] 为实现上述目的,本发明采取以下设计方案:

[0010] 以 Overlap(重叠)方法设计 Mtb 特有而其他分枝杆菌(包括卡介苗和非结核分枝杆菌等)不具有的早期分泌抗原靶位-6(ESAT-6)21 条多肽,每一条多肽含 14 或 15 个氨基酸,以 ELISPOT 对 PPD 阳性结核病人淋巴细胞进行检测,筛选出 1 条与 T-SPOT. TB 试剂所使用不同的特异性 T 细胞反应性 Mtb 多肽:多肽 M233 氨基酸序列为 SEQ ID No. 1,本发明也可以是其类似物,所述的类似物是指具有 80% 以上同源性的氨基酸序列,优选 90% 以上同源行序列。

[0011] 本发明的另一个方面,提供一种检测结核杆菌感染的方法,通过使用 M233 多肽或其类似物,与结核杆菌宿主的 T 细胞相接触,检测从 T 细胞释放的细胞因子,确定 T 细胞是否识别 M233 多肽。

[0012] 所述宿主通常指人,也可以是其他哺乳动物,如牛、羊、猪、啮齿动物等。

[0013] 所述结核杆菌感染,通常指的是患有活动性或潜伏性结核杆菌感染的人群,也可以是健康的接触者,其已是暴露于结核杆菌中。因此此方法可用于调查健康接触人群受结核感染情况。

[0014] 上述方法中所述的 T 细胞通常在体内被来自结核杆菌的抗原预先致敏,这些 T 细胞可在宿主的外周血液、肺泡灌洗液、胸水、脑脊液、淋巴结及其它包含 T 细胞组织中被检出。此 T 细胞主要是 CD4⁺T 细胞,也可以是 CD8⁺T 细胞等。

[0015] 方法中所述的识别,通常是通过测定 T 细胞与蛋白或多肽接触后两者的结合或状态的变化来确定的。状态变化主要由于 MHC/ 肽复合物与 TCR(T 细胞受体)特异的结合而诱发的 T 细胞的激活,它可以是 T 细胞开始分泌细胞因子或分泌量的增加,可以是 T 细胞摄入物质量的增加,也可以是 T 细胞大小、数量(增殖)或表面标志的改变。所述 T 细胞因子包括 IFN-γ、IL-2、TNF-α 等。

[0016] 具有代表性的是采用预先加入的抗体与分泌的细胞因子相结合,通过测定抗体或抗体复合物的存在来检测所述的因子。所述的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,也可以是商品化购买的或者使用标准技术制备的。测定细胞因子的方法选自 ELISA、ELISPOT、细胞内细胞因子染色、四聚体染色、Immunoblotting、T 细胞增殖试验等。

[0017] 检测蛋白 / 多肽与 T 细胞的结合也可以通过细胞内细胞因子染色与四聚体染色技术以及流式细胞仪(FACS 仪)分析来进行。通常在已接触抗原的 T 细胞的出现频率是 $10^{-3} \sim 10^{-6}$,如果被分选细胞的频率高于正常对照值,则可定量确定细胞已接触此抗原。

[0018] 方法中所述 T 细胞可以是体外分离的,也可以是未加工过的或者是体内的。在一

个实施方案中,从血液或其他样本中分离单核细胞 (PBMC),其中将包括 T 细胞和抗原递呈细胞 (APC)。APC 可将抗原肽递呈给 T 细胞。APC 可以是天然生成的或者是人工 APC。典型的 APC 是在体外新分离的细胞或经过培养的细胞。

[0019] 在一个实施方案中,将多肽加入包含了 T 细胞和 APC 的实验中一同孵育。此处 APC 参与了递呈抗原多肽到 T 细胞的过程。如使用可以被 T 细胞识别而无需由 APC 递呈的肽时,APC 不是必需的,如前一种肽的类似物 --MHC/ 肽的四聚体。

[0020] 蛋白或多肽与 T 细胞接触的时间长短可以根据所测定的识别方法有所变化。具有代表性的是,实验中加入 $10^4 \sim 10^7$ 的分离单核细胞 (PBMC) 或 50 ~ 500u1 的全血。加入蛋白或多肽的浓度是 0.1 ~ 100ug/ml。T 细胞与蛋白或多肽一起孵育的典型时间是 6 ~ 36 小时。在一个实施方案中,将 5×10^5 体外分离的 PBMC 与终浓度 10ug/ml 多肽在 37°C 5% CO₂ 培养箱中孵育 22 小时。

[0021] 也可以在体内检查以确定 T 细胞对蛋白或多肽的识别。具有代表性的是,体内注射此抗原物质或施给肽的类似物如 MHC/ 肽四聚体或施给表达此抗原物质的多核苷酸。可以通过 DTH 反应的出现来指示肽在体内的识别,例如检查硬化、红斑或水肿等。

[0022] 本发明的再一个方面,提供了表达 M233 多肽的核苷酸序列和 M233 多肽的制备方法。

[0023] 所述的 M233 多肽可以是天然分离的,也可以是人工合成的。一种具有代表性的方法是,由较长的融合蛋白制备 M233 多肽,此融合蛋白代表性的包含 M233 多肽,具有代表性的是 MHC/ 肽融合蛋白。

[0024] 所述肽也可以由多肽经过物理或化学裂解所产生。

[0025] 所述的多肽是由固相甲酰基化合成仪合成的。

[0026] 所用的融合蛋白是经过果蝇 S2 (Schneider 2) 重组蛋白,在每个蛋白的 N 端添加一小段 His-tag 以方便纯化。

[0027] 具体包括如下步骤:

[0028] 1) 表达 M233 多肽或肽的类似物的基因扩增和克隆,具有代表性的是肽 /MHC Class II α 或 β 链融合基因的扩增和克隆;

[0029] 2) 构建 pMT 重组载体;

[0030] 3) M233 多肽或融合蛋白真核诱导表达;

[0031] 4) M233 多肽或融合蛋白的分离纯化。

[0032] 方法中所述的扩增可以使用 PCR、重组法或人工合成方法获得。所用的表达载体是真核表达载体 pMT (Invitrogen),也可以是其它真核或原核表达载体,如昆虫杆状病毒表达系统、酵母表达系统和大肠杆菌表达系统等。

[0033] M233 多肽的类似物可以采用相同的方法获取。

[0034] 本发明的再一个方面,提供实施此检测方法的试剂盒,所述的试剂盒包括 M233 多肽或其类似物,以及一种检测 T 细胞对蛋白或多肽类似物识别的工具。

[0035] 试剂盒中还包括阳性对照和阴性对照,阳性对照所选用的抗原对大多数个体的 T 细胞均能产生应答,如市售的 PMA、Ionomycin。阴性对照不加入抗原成份,选用培养基或其他缓冲液。

[0036] 本发明还提供 M233 多肽的应用,用以产生 M233 多肽特异的抗体。此抗体可通过

抗原对宿主动物免疫,经纯化产生的抗体。该抗体能够特异地与抗原物质结合,通常可根据来源分为单克隆抗体或多克隆抗体。产生抗体的方法是本领域内公知的,多克隆抗体通常包括使用抗原(蛋白或多肽)免疫宿主动物,一段时间后从血清中分离免疫球蛋白,如 IgG 等;产生单克隆抗体的方法包括无限增殖产生目的抗体的细胞,通常将来自被接种实验动物的脾细胞与肿瘤细胞融合,来产生杂交瘤细胞(具体参见 Kohler and Milstein, 1975 Nature 256, 495 ~ 497)。适用于产生单克隆或多克隆抗体的实验动物包括山羊、兔、大鼠或小鼠等。

[0037] 本发明能有效地体外检测结核病和 / 或其潜伏感染,同时不受 BCG 疫苗及非结核分枝杆菌的干扰,具有价廉、灵敏度高和特异性好的优点。本发明克服了 T-SPOT. TB 试剂在一些国家的效果不理想的缺点,尤其适用于对中国人种结核病和 / 或其潜伏感染的检测。

【附图说明】

[0038] 图 1 为 ELISPOT 结果判定实例,其中左上为 M233 的检测结果;右上为阳性对照;左中为阴性对照;右中为背景对照;左下为不加生物素标记的抗人 IFN-γ mAb 对照。

【具体实施方式】

[0039] 实施例 1M233 多肽的制备

[0040] 以 ELISPOT 对 PPD 阳性结核病人淋巴细胞进行检测,筛选以 Overlap(重叠)方法设计的早期分泌抗原靶位-6(ESAT-6)21 条多肽(每个多肽含 14 或 15 个氨基酸),筛选出 1 条特异性 T 细胞反应性 MtB 多肽,包括以下步骤:

[0041] (1) 以 Overlap 方法设计多肽,每个多肽含 14 或 15 个氨基酸(AA),得到 21 条多肽序列,通过固相甲酰基化合成仪按合成仪说明书的实验条件合成。多肽以 DMSO 溶解,配置成 10mg/ml 的储存液。临用前以 RPMI1640 培养液稀释至使用浓度 10ug/ml。

[0042] (2) 从广州市胸科医院收集 PPD 阳性结核病人血液,每份约 2 ~ 5ml。

[0043] (3) 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离末梢血单核细胞(PBMC),PBMC 重悬于 R10 培养液(RPMI1640 培养液中含 10% 小牛血清)备用。

[0044] (4) 选择带 PVDF 膜 96 孔板作为反应板,用抗人 γ- 干扰素(IFN γ)单克隆抗体(mAb)包被过夜,第二天加入 5×10^5 PBMC 和目标多肽,每一测定设立 3 孔,孵育 18h。设立下列对照孔:PMA 和 Ionomycin 作为阳性对照,不加多肽作阴性对照,不加细胞作背景对照,并作一组不加生物素标记抗人 IFN γ mAb 对照。第三天,依次加入生物素标记抗人 IFN γ mAb,链霉亲合素 - 碱性磷酸酶作反应,BCIP/NBT 显色。结果在 ELISPOT Reader 上读取。以 SFC(Spot-forming cells)/ 10^6 PBMC > 50 作为判断为阳性。结果见图 1。

[0045] (5) 筛选得到 1 条特异性 T 细胞反应性 MtB 多肽 M233。M233 的序列为 SEQ ID No. 1:IHSLLDEGKQSLTKL。

[0046] 实施例 2 以 ELISPOT 对 47 例 PPD 阳性结核病人淋巴细胞进行检测

[0047] 1 材料与方法

[0048] 1.1 实验材料从广州市胸科医院收集 47 例 PPD 阳性结核病人血液,每份约 2 ~ 5ml。

[0049] 1.2 结核病人 PBMC 分离用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离 PBMC,PBMC 重悬于 R10 培

养液 (RPMI1640 培养液中含 10% 小牛血清) 备用。

[0050] 1.3 ELISPOT 分析选择带 PVDF 膜 96 孔板作为反应板, 用抗人 γ -干扰素 (IFN γ) 单克隆抗体 (mAb) 包被过夜, 第二天加入 5×10^5 PBMC 和多肽 M233, 每一测定设立 3 孔, 孵育 18h。设立下列对照孔:PMA 和 Ionomycin 作为阳性对照, 不加多肽作阴性对照, 不加细胞作背景对照, 并作一组不加生物素标记抗人 IFN γ mAb 对照。第三天, 依次加入生物素标记抗人 IFN γ mAb, 链霉亲合素 - 碱性磷酸酶作反应, BCIP/NBT 显色。结果在 ELISPOTReader 上读取。以 SFC(Spot-forming cells)/ 10^6 PBMC > 50 作为判断为阳性。

[0051] 2 结果 47 例标本阳性检出 35 例, 阳性率 74%, SFC(Spot-forming cells)/ 10^6 PBMC 平均在 60 以上。

[0052] 对照实验表明, 无一健康对照者 (0/10) 对 M233 产生阳性应答, 即其特异性为 100%。且未发现 BCG 疫苗使用健康人群和鸟 - 胞内分枝杆菌感染患者出现阳性反应。

[0053] SEQUENCE LISTING

[0054] <110> 中山大学

[0055] <120> 一种体外检测结核杆菌感染的试剂和方法

[0056] <130>

[0057] <160>1

[0058] <170> Patent In version 3.4

[0059] <210>1

[0060] <211>15

[0061] <212>PRT

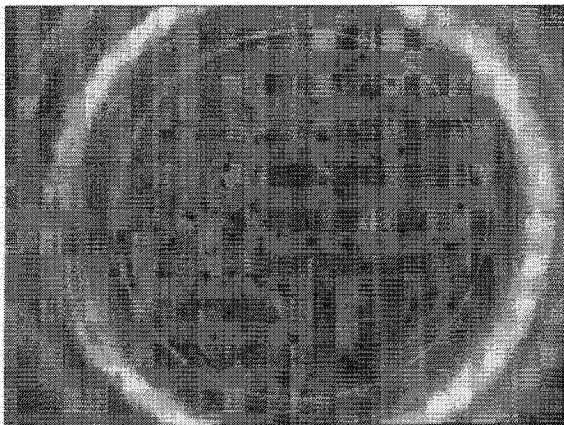
[0062] <213> 结核分枝杆菌

[0063] <400>1

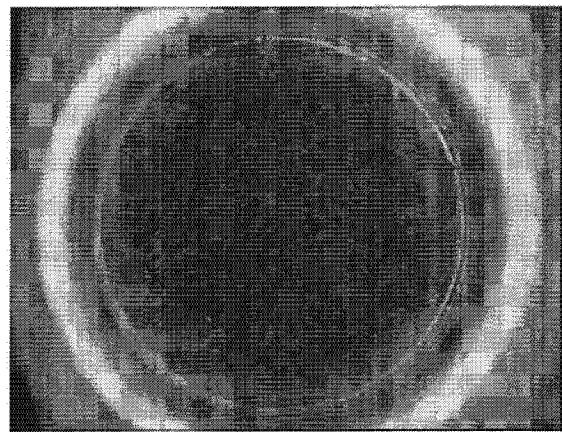
[0064] Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu

[0065] 1 5 10 15

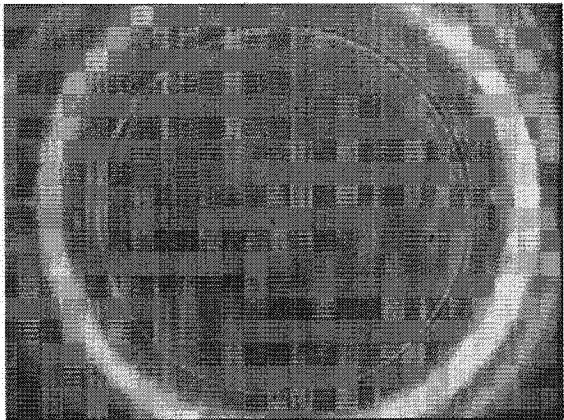
多肽 M233



阳性对照



阴性对照



背景对照

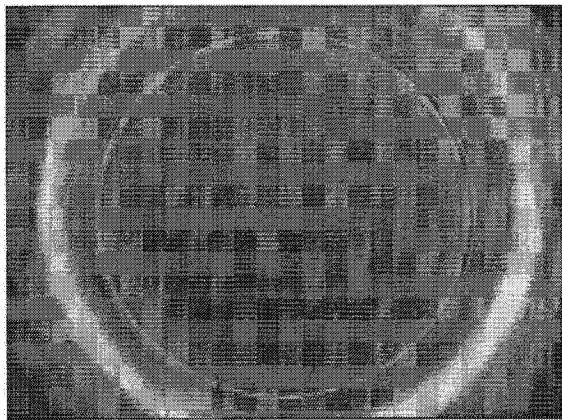
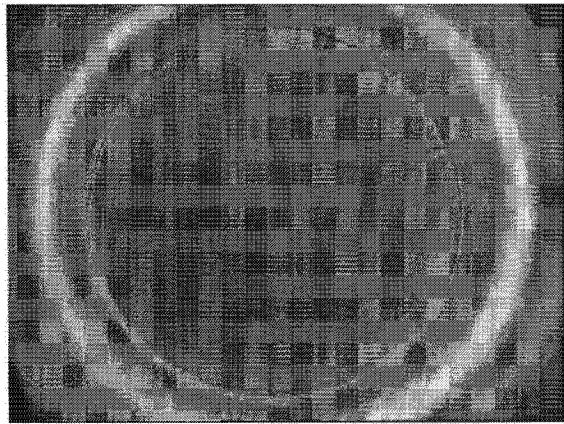
不加生物素标记抗人 IFN γ mAb 对照

图 1