



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117031014 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202311020465.9

(22) 申请日 2023.08.14

(71) 申请人 陕西脉元生物科技有限公司

地址 710000 陕西省西安市高新区科技加  
速器1期8号楼

(72) 发明人 李科 张哲玮 柴单单 任妮

王瑜 席倩 刘慧 孙敏敏 杨梓  
刘柯欣 郝文斌 刘瑞曼

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任  
公司 61200

专利代理师 范巍

(51) Int. Cl.

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

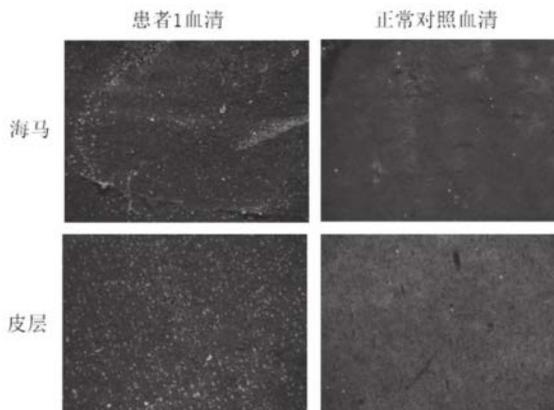
权利要求书2页 说明书9页  
序列表(电子公布) 附图4页

### (54) 发明名称

抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用及试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用及试剂盒,属于生物医药技术领域。本发明首次通过实验证实MATR3可作为中枢神经系统自身免疫疾病相关自身抗体的识别抗原之一,尤其是MS相关疾病,抗MATR3自身抗体的试剂能够实现中枢神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。



1. 一种自身免疫性疾病标志物在制备用于中枢神经系统自身免疫疾病诊断的检测试剂或检测试剂盒中的应用,其特征在於,所述自身免疫性疾病标志物为与MATR3蛋白结合的自身抗体,在检测时是检测样品与MATR3蛋白结合的自身抗体。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述MATR3蛋白的氨基酸序列包括a)~c)中的任意一种:

a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列;

c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列。

3. 如权利要求2所述的应用,其特征在於,编码所述MATR3蛋白的核苷酸序列包括I)~III)中的任意一种:

I) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;

II) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的10%~80%,且编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列;

III) I)或II)中的核苷酸序列突变后,且编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

4. 如权利要求2所述的应用,其特征在於,所述中枢神经系统自身免疫疾病包括中枢神经系统脱髓鞘疾病。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,所述中枢神经系统脱髓鞘疾病包括多发性硬化症。

6. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述中枢神经系统自身免疫疾病的症状表现肢体远端感觉异常、肢体无力、肢体易疲劳、视力障碍、四肢僵硬、步态异常、眩晕、情感障碍、膀胱控制困难、认知障碍、情感障碍、抑郁和癫痫中的一种或多种。

7. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,检测样品为全血、血清和脑脊液的一种或几种。

8. 一种检测自身免疫性疾病的蛋白在制备用于中枢神经系统自身免疫疾病诊断的检测试剂或检测试剂盒中的应用,其特征在於,所述检测自身免疫性疾病的蛋白为衍生自MATR3蛋白的一个或多个表位,或者为融合其他氨基酸的融合蛋白;其中,MATR3蛋白的氨基酸序列包括a)~c)中的任意一种:

a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列;

c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

9. 一种检测中枢神经系统自身免疫疾病的试剂盒,其特征在於,包括检测抗MATR3抗体的试剂和标记抗体;其中:

所述检测抗MATR3抗体的试剂包括MATR3蛋白、表达MATR3蛋白的细胞、表达MATR3蛋白的组织和含有MATR3蛋白的裂解物中的一种或多种;

所述标记抗体为能够与人IgG的Fc片段结合的抗体。

10. 根据权利要求8所述的检测神经系统相关疾病的试剂盒,其特征在於,所述MATR3蛋

白的氨基酸序列包括a)～c)中的任意一种：

- a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列；
- b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%～80%，且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列；
- c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后，且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

## 抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用及试剂盒。

### 背景技术

[0002] 中枢神经系统(central nervous system,CNS)自身免疫性疾病是以自身免疫细胞、自身抗体及其他免疫分子直接或间接攻击神经系统(包括神经元、胶质细胞、髓鞘)为主要致病机制的自身免疫性疾病,包括中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病、自身免疫性脑炎(autoimmune encephalitis,AE)和CNS血管炎等,发病机制复杂,致残率高,疾病种类繁多,自身抗体在自身免疫性脑炎和CNS炎性脱髓鞘疾病的诊断与鉴别诊断中起着非常重要的作用。

[0003] 临床较为常见的中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病包括视神经脊髓炎谱系疾病(neuromyelitis optic spectrum disorder,NMOSD)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白抗体相关疾病(myelin oligodendrocyte glycoprotein-IgG associated disorders,(MOGAD)、多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)以及急性播散性脑脊髓炎(acute disseminated encephalomyelitis,ADEM)。其中,多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)是由脑和脊髓中神经元周围髓鞘上的免疫系统攻击所引起的,最易侵犯脑干、小脑以及脑室周围白质,这种病会导致神经元之间的通信不佳以及轴突弱化,中枢神经系统各个部位均可受累,临床表现多样。MS常见症状包括肢体运动障碍、肢体感觉障碍、易疲劳、共济失调、视力下降、复视、膀胱或直肠功能障碍等。临床分型包括复发缓解型MS,继发进展型MS,原发进展型MS和其他类型,目前MS的发病机制尚不清楚,可能与自身免疫反应、病毒感染、遗传因素或者环境因素有关。

[0004] MATR3(Martin-3)又名ALS21或VCPDM,编码一种核基质蛋白,该蛋白普遍表达于大脑,甲状腺及肌肉中,具有两个RNA识别结构域和两个锌指结构域,可以结合RNA和/或DNA。MATR3具有多种不同的RNA相关调控功能,包括转录调控、mRNA稳定、选择性剪接、超编辑RNA的核保留和基因沉默。MATR3还与DNA损伤修复、细胞存活、神经干细胞的维持和肌肉形成有关。Matrin 3在包括神经系统和肌肉在内的多个组织中发挥作用。

[0005] 现有研究发现,MATR3基因突变不仅与远端肌病有关,还与肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)和额颞叶痴呆(FTD)有关。但目前尚未发现关于MATR3自身抗体在中枢神经系统自身免疫疾病方面,尤其是MS方面的报道。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用。

[0007] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案予以实现:

[0008] 本发明公开了一种自身免疫性疾病标志物在制备用于中枢神经系统自身免疫疾病诊断的检测试剂或检测试剂盒中的应用,所述自身免疫性疾病标志物为与MATR3蛋白结合的自身抗体,在检测时是检测样品与MATR3蛋白结合的自身抗体。

[0009] 优选地,所述MATR3蛋白的氨基酸序列包括a)~c)中的任意一种:

[0010] a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

[0011] b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列;

[0012] c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列。

[0013] 进一步优选地,编码所述MATR3蛋白的核苷酸序列包括I)~III)中的任意一种:

[0014] I) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列;

[0015] II) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的10%~80%,且编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列;

[0016] III) I)或II)中的核苷酸序列突变后,且编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

[0017] 进一步优选地,所述中枢神经系统自身免疫疾病包括中枢神经系统脱髓鞘疾病。

[0018] 更进一步优选地,所述中枢神经系统脱髓鞘疾病包括多发性硬化症。

[0019] 优选地,所述中枢神经系统自身免疫疾病的症状表现肢体远端感觉异常、肢体无力、肢体易疲劳、视力障碍、四肢僵硬、步态异常、眩晕、情感障碍、膀胱控制困难、认知障碍、情感障碍、抑郁和癫痫中的一种或多种。

[0020] 优选地,检测样品为全血、血清和脑脊液的一种或几种。

[0021] 本发明还公开了一种检测自身免疫性疾病的蛋白在制备用于中枢神经系统自身免疫疾病诊断的检测试剂或检测试剂盒中的应用,所述检测自身免疫性疾病的蛋白为衍生自MATR3蛋白的一个或多个表位,或者为融合其他氨基酸的融合蛋白;其中,MATR3蛋白的氨基酸序列包括a)~c)中的任意一种:

[0022] a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

[0023] b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列;

[0024] c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

[0025] 本发明还公开了一种检测中枢神经系统自身免疫疾病的试剂盒,包括检测抗MATR3抗体的试剂和标记抗体;其中:

[0026] 所述检测抗MATR3抗体的试剂包括MATR3蛋白、表达MATR3蛋白的细胞、表达MATR3蛋白的组织和含有MATR3蛋白的裂解物中的一种或多种;

[0027] 所述标记抗体为能够与人IgG的Fc片段结合的抗体。

[0028] 优选地,所述MATR3蛋白的氨基酸序列包括a)~c)中的任意一种:

[0029] a) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

[0030] b) 如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序列;

[0031] c) 经a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,且识别MATR3自身抗体的氨基酸序

列。

[0032] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0033] 本发明提供了抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测神经系统自身免疫疾病的产品中的应用,通过实验证实MATR3可作为中枢神经系统自身免疫疾病相关自身抗体的识别抗原之一,尤其是MS相关疾病,抗MATR3自身抗体的试剂能够实现中枢神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

#### 附图说明

[0034] 图1为患者1和正常对照血清在大鼠脑组织冰冻切片上的染色结果;

[0035] 图2为患者1血清与神经元marker NeuN抗体共染结果;

[0036] 图3为患者1和正常对照血清在过表达MATR3细胞爬片染色结果;

[0037] 图4为患者1血清与MATR3抗体在过表达细胞上共染结果;

[0038] 图5为患者1血清与MATR3抗体在大鼠脑组织切片上共染结果;

[0039] 图6为MATR3抗体在WB上验证过表达蛋白结果;

[0040] 图7为血清中和实验在过表达细胞上验证患者血清所检信号;

[0041] 图8为血清回收样品在过表达细胞爬片上的染色结果;

[0042] 图9为血清回收样品在大鼠脑组织切片上的染色结果;

[0043] 图10为筛出3例阳性患者染色结果。

#### 具体实施方式

[0044] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。需要说明的是,本发明的说明书和权利要求书中的术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含,例如,包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0045] 术语解释:

[0046] 根据本发明,“细胞”是能够转入载体的任何原核或真核宿主细胞。例如,细胞可以是细菌细胞(如大肠杆菌细胞)或真核细胞(如永生化人细胞,昆虫细胞,酵母)。这样的细胞包括HEK293细胞、HeLa细胞、CHO、毕赤酵母、酿酒酵母、sf9、BL21、Rosetta等本领域技术人员常用的细胞。

[0047] 本发明范围内的“固定”指这样的分子,其与水溶液中不可溶的固态载体结合、更优选地借助共价键、静电相互作用、囊化或包埋或借助疏水相互作用,最优选地借助一个或多个共价键结合。例如载玻片、聚苯乙烯板、玻璃板、膜(尼龙膜、硝酸纤维素膜或PVDF膜)、磁珠、柱色谱介质、生物芯片、聚丙烯酰胺凝胶等。

[0048] 在本发明中,“载体”包括插入物(例如编码所需蛋白质的原始或突变核酸序列)和其它特征(启动子、多克隆位点、筛选标记、复制子等)的环状或线性核酸序列。这样的载体

包括pTriEx载体家族、pCDNA3家族、pET系列、pBac系列等其他商品化的真核表达系统或原核表达系统的载体。

[0049] 下面结合附图对本发明做进一步详细描述：

[0050] 本发明提供了检测抗MATR3自身抗体的试剂在制备检测中枢神经系统自身免疫疾病的产品中的应用。

[0051] 在本发明中，所述产品优选包括试剂盒。

[0052] 在本发明中，所述中枢神经系统自身免疫疾病的症状包括肢体远端感觉异常、肢体无力、肢体易疲劳、视力障碍、四肢僵硬、步态异常、眩晕、情感障碍、膀胱控制困难、认知障碍、情感障碍、抑郁和癫痫中的一种或多种；

[0053] 所述中枢神经系统自身免疫疾病优选包括中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病；所述中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病优选包括多发性硬化症。

[0054] 在本发明中，所述检测抗MATR3自身抗体的试剂优选包括MATR3蛋白，或所述MATR3蛋白的同系物，或所述MATR3蛋白的衍生物，或能够表达所述MATR3蛋白的载体或细胞，或含所述MATR3蛋白的组织，进一步优选为MATR3蛋白。

[0055] 在本发明中，所述MATR3蛋白的氨基酸序列优选包括a)～c)中的任意一种：

[0056] a) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列；

[0057] b) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%～80%，且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列；

[0058] c) a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后，且具有识别MATR3自身抗体功能的氨基酸序列。

[0059] 在本发明中，编码所述MATR3蛋白的核苷酸序列优选包括I)～III)中的任意一种：

[0060] I) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列；

[0061] II) SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的10%～80%，并且可编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列；

[0062] III) I)或II)中的核苷酸序列突变后，并且可编码识别MATR3自身抗体的氨基酸序列。

[0063] 本发明实施例中的患者血清均为医院赠予，已经过本人同意，健康受试者血清来自于医院体检中心赠送的健康体检者血清，已经过体检者本人同意，患者信息如下：

[0064] 患者1：性别女，年龄31岁，无既往病史，无明显诱因双侧肢体无力，以左侧为著，伴麻木感，行走困难，步态不稳，尚能持物，无头痛、头晕，饮水呛咳，吞咽困难，尿便障碍，急性左眼凝视起病，无痛复视。查体：生命体征平稳，意识清楚，言语流利，血常规正常，血生化正常，风湿免疫各项指标均正常，脑脊液IgG增高，血清AQP4-IgG阴性。医生怀疑其患有中枢神经系统自身免疫性疾病，将其样本送往检验科，该样本检测中枢神经系统炎性脱髓鞘病变6项(AQP4、MBP、MOG、GFAP、AQP1、Flotillin1/2)抗体阴性，自身免疫性脑炎6项(包括NMDAR、AMPA1、AMPA2、LGI1、CASPR2、GABABR)抗体阴性，副肿瘤14项(包括Ri、Hu、Yo、CV2、Ma2、Amphiphysin、Titin、Mal、SOX1、Tr、Zic4、PKC $\gamma$ 、Recoverin、GAD65)抗体阴性。后经综合检查诊断该病例患有多发性硬化症。

[0065] 实施例1大鼠脑组织切片的间接免疫荧光法筛出患者血清

[0066] (1)大鼠脑组织冰冻切片的制备

[0067] 选取成年大鼠进行麻醉,待老鼠四肢硬化后打开腹腔,暴露出心尖,从左心尖灌注PBS,以便全身循环;取出脑组织,甲醇固定10~30min,将样本移入30%蔗糖溶液中进行脱水,4℃放置至组织块沉底;将少量包埋剂OCT滴加到标本台,置入-20℃冷冻切片(厂家:LEICA型号:CM1950)的冷冻台,待组织略微发白时用OCT在标本表面涂一薄层,继续冷冻20min,进行切片。

[0068] (2) 血清孵育

[0069] 使用PBS将患者1的血清和正常对照血清按1:10进行稀释,分别孵育至步骤(1)制备的大鼠脑组织冰冻切片上,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;加入1:200稀释的FITC标记的羊抗人IgG二抗(厂家:Jackson货号:109-095-170),室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;显微镜下观察,结果如图1所示。

[0070] 根据图1可以看出,患者1血清在大鼠脑组织冰冻切片上的海马和皮层部位出现阳性信号,而正常对照血清在此部位未出现阳性信号,提示患者血清中可能存在识别神经元细胞抗原的抗体。

[0071] (3) 抗体共染

[0072] 使用1:200稀释的神经元特异性Marker NeuN抗体(厂家:武汉三鹰货号:26975-1-AP)孵育步骤(2)血清孵育过的大鼠脑组织冰冻切片,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;加入1:200稀释的Alexa Fluor 594标记的羊抗兔IgG(厂家:Jackson货号:115-585-144)室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;显微镜下观察结果,结果如图2所示。

[0073] 根据图2可以看出,患者1血清在海马和皮层部位出现的信号与神经元特异性Marker NeuN抗体信号出现重叠,表明患者1血清中抗体识别的抗原位于神经元细胞上。

[0074] 实施例2目标抗原的筛选与鉴定

[0075] 查找已报道过的有关神经系统自身抗体的靶抗原,制备过表达目标抗原细胞爬片,并将多种过表达目标抗原的细胞爬片组装成生物检测芯片材料,对患者样本进行免疫荧光染色,具体方法如下:

[0076] (1) 查找到60种已报道的有关神经系统自身抗体靶抗原,(包括DPPX、IgLON5、GlyR、GABAAR $\alpha$ 1、GABAAR $\gamma$ 2、GABAAR $\beta$ 3、mGluR5、D2R、Neurexin3 $\alpha$ 、AQP4、MBP、MOG、GFAP、AQP1、Flotillin1/2、homer3、ITPR1、MGLUR5、Ca/ARHGAP26、kcna4/kv1.4、ATP1A3、NCDN、Septin5、NrCAM、Gliomedin、KLHL11、Gephyrin、ca8/CA-VIII、TGM2、TGM6、Trib2、tpo、ak5、GRIA3/GLUR3、MUNC18-1、KCTD16、GRM1/MGLUR1、CACNA2D1/CaV $\alpha$ 2 $\delta$ 、RYR1、PLP1、PDE10A、adam22、ROCK2、mGluR2/GRM2、rab6b、TG、AChR、LRP4、MuSK、MAG、NF155、NF186、CNTN1、CNTN2、CASPR1、mGluR1、GABAARAP、agrin、map1b、Nae,)从NCBI上查找编码上述60种蛋白的基因序列并送往测序公司进行基因合成,获得对应基因的重组载体,然后将重组载体转染至293T细胞获得重组细胞,制备成过表达目标抗原的生物检测芯片材料,通过免疫荧光法检测患者血清/脑脊液是否能与该生物检测芯片孵育后发生免疫反应,探索患者血清/脑脊液中是否含有该系列基因的特异性自身抗体,具体步骤如下:

[0077] a. 重组载体构建:通过PCR或人工合成的方法,将上述60种基因分别通过分子克隆方法连至pCDNA3.1上,得到60种重组载体,构建好的重组载体经测序正确后大提备用;

[0078] b. 目的基因转染:使用10%FBS-DMEM高糖培养基于37℃,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养皿底铺有6cm×6cm爬片的293T细胞,共计61皿,待细胞密度达到30%~40%时,使用PEI

转染试剂(厂家:thermo,货号:BMS1003)将60种对应基因的重组载体和空载pCDNA3.1分别转染至293T细胞中,并进行标记;

[0079] c.细胞爬片固定:转染后生长48h的细胞用PBS洗涤2次,加入丙酮固定5min,PBS洗涤2次,45℃干燥30min,将爬片裁成2.5mm×2.5mm大小,并将61种2.5mm×2.5mm的细胞爬片贴在载玻片上,制备成筛选目标抗原的生物检测芯片备用;

[0080] d.免疫荧光染色:使用PBST将患者1血清和健康受试者血清(对照)分别按照1:10的比例稀释后孵育至生物检测芯片上,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人二抗,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察发现患者1血清与60种生物检测芯片均未发生信号明显强于健康受试者血清(对照)的显色反应,但根据实施例1中的大鼠脑组织切片染色结果可知,患者1血清在神经元海马部位和皮层部位染色结果明显,因此怀疑患者1血清中可能存在不同于以往报道的可识别神经元细胞的新的自身抗体。

[0081] (2)从the human protein atlas(<https://www.proteinatlas.org/>)中查找在人大脑海马和皮层部位表达量相对较高的100种蛋白(现有文献并未报道这些蛋白为神经系统自身免疫疾病的自身抗体所识别),参考实施例2步骤(1)制备生物检测芯片,通过免疫荧光法检测患者1血清或脑脊液是否能与该生物检测芯片孵育后发生免疫反应,探索患者1血清或脑脊液中是否含有不同于以往报道的可识别神经元细胞的新的自身抗体,具体步骤如下:

[0082] a.生物检测芯片制备:从NCBI上查找编码各蛋白的基因序列,并送往测序公司将基因合成至pcDNA3.1上,将合成好的重组载体转化至克隆菌TOP10中进行扩增,然后大提质粒备用。将上述重组载体使用PEI转染试剂分别转染至生长在6cm×6cm爬片上的293T细胞中,转染48h后经洗涤、固定及干燥后,将6cm×6cm的细胞爬片裁剪成2.5mm×2.5mm大小备用,将这些细胞爬片制备好后粘贴至载玻片上进行样本的检测。

[0083] b.免疫荧光染色:使用PBST将患者1血清和健康受试者血清(对照)分别按照1:10的比例稀释后孵育至生物检测芯片上,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人二抗,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察结果,结果如图3所示。

[0084] 根据图3可以看出,患者1血清与生物检测芯片上的一种抗原发生了明显强于健康受试者血清(对照)的显色反应,产生了阳性信号,而健康受试者血清(对照)与生物检测芯片上的所有抗原均未产生信号。经查证,此目标抗原为MATR3(matrin-3,登录号:NM\_199189.3),氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,其编码序列如SEQ ID NO.2所示。

[0085] 实施例3商业化抗体在过表达细胞和大鼠脑组织中验证患者血清所检信号

[0086] (1)商业化抗体验证血清在过表达细胞爬片上所检的MATR3信号

[0087] 使用PBST将商业化MATR3抗体(厂家:proteintech)1:200稀释,孵育至实施例2中患者1血清孵育过的MATR3过表达细胞爬片,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min,加入1:200稀释的Alexa Fluor 594标记的羊抗兔IgG(厂家:Jackson,货号:115-585-144),室温孵育30min,PBST洗2次,每次5min;显微镜下观察,结果如图4所示。

[0088] 根据图4可以看出,患者血清在过表达MATR3细胞爬片上出现的染色信号与商业化MATR3抗体在过表达MATR3细胞爬片上出现的染色信号重叠,表明患者1血清中抗体与过表

达MATR3细胞爬片上的MATR3蛋白特异性识别。

[0089] (2)商业化抗体验证血清在大鼠脑组织切片上所检的MATR3信号

[0090] a. 参考实施例1步骤(1)制备大鼠脑组织切片;

[0091] b. 使用PBST将患者血清1:10稀释, 孵育大鼠脑组织切片, 室温孵育1h, PBST洗3次, 每次5min; 加入1:200稀释的FITC标记的羊抗人IgG(厂家: Jackson), 室温孵育30min, PBST洗3次, 每次5min; 使用1:200稀释的商业化MATR3抗体(厂家: proteintech)进行共染, 室温孵育30min, PBST洗3次, 每次5min, 加入1:200稀释的Alexa Fluor 594标记的羊抗兔IgG(厂家: Jackson, 货号: 115-585-144), 室温孵育30min, PBST洗2次, 每次5min; 显微镜下观察, 结果如图5所示。

[0092] 根据图5可以看出, 患者1血清在大鼠脑组织切片上出现的染色信号与商业化MATR3抗体在大鼠脑组织切片上出现的染色信号重叠, 表明患者1血清中抗体与大鼠脑组织切片上的MATR3蛋白特异性识别。

[0093] 实施例4血清中和实验验证患者血清所检信号

[0094] (1)中和蛋白的制备

[0095] 根据实施例2步骤(2)收集1皿过表达MATR3的293T细胞和空载pCDNA3.1细胞, 室温800rpm离心去上清, 加入200 $\mu$ L PBS, 超声破碎(破碎条件为: 10%功率, 破碎3s, 停6s, 共超声1min), 作为MATR3中和蛋白; 以转染空载pCDNA3.1的细胞制备对照蛋白, 制备条件与方法与MATR3中和蛋白的制备相同;

[0096] (2)中和蛋白的鉴定

[0097] 将收获的MATR3中和蛋白和对照蛋白作为上样样品, 测定浓度后各取40 $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 电泳结束后采用转膜条件为300mA, 90min进行湿法转膜; 5%的脱脂奶粉室温封闭1h; 使用TBST将商业化MATR3抗体进行1:1000稀释, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 次日, TBST洗3次, 每次5min; 加入HRP标记的羊抗兔二抗(厂家: Jackson), 室温孵育1h; TBST洗3次, 每次5min; 加入化学发光液显色拍照, 结果如图6所示。

[0098] (3)血清中和实验在过表达MATR3细胞爬片上验证患者血清所检信号

[0099] 使用PBST共制备3份1:10稀释的患者1血清, 每份100 $\mu$ L, 分别加入20 $\mu$ LPBST、20 $\mu$ L MATR3中和蛋白和20 $\mu$ L对照中和蛋白室温孵育30min, 分别用其孵育制备好的过表达MATR3的细胞爬片, 室温孵育1h, PBST洗3次, 每次5min; 加入1:200稀释的FITC标记的羊抗人二抗(厂家: Jackson 货号: 109-095-170), 室温孵育30min, PBST洗3次, 每次5min, 荧光显微镜下观察, 结果如图7所示。

[0100] 由图6可以看出, 过表达MATR3蛋白显色明显强于对照蛋白, 因此认为MATR3蛋白成功在293T细胞上过表达; 由图7可以看出, 在过表达MATR3细胞爬片上, 患者血清信号被MATR3中和蛋白封闭, 而对照蛋白未封闭住过表达MATR3细胞爬片上出现的信号, 表明该信号为特异性识别MATR3抗原的信号。

[0101] 实施例5回收患者血清中自身抗体验证患者血清所检信号

[0102] (1)患者血清回收实验

[0103] a. 目的基因转染: 使用CD05培养基(厂家: 奥普迈)于100mL培养瓶中培养293F悬浮细胞20mL, 共计2瓶, 置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>细胞培养摇床中。待细胞密度达到3 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL时, 使用PEI转染试剂(厂家: thermo, 货号: BMS1003)将pCDNA3.1-MATR3重组载体和空载pCDNA3.1分

别转染至293F细胞中,并进行标记,第二天离心换液;

[0104] b. 细胞固定:转染后生长96h的两瓶悬浮细胞分别离心后用PBS洗涤2次,使用5mLPBS重悬,加入无水乙醇固定10min,离心去乙醇,PBS洗涤2次,置于2mL EP管中加入1mLPBS重悬;

[0105] c. 抗体洗脱:分别取12 $\mu$ L患者1血清加入到两管固定后的细胞中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日,离心后用PBS重悬重复洗4次,每次5min;洗涤结束后,每管加入500 $\mu$ L pH=3的0.1M甘氨酸洗脱液,室温旋转摇床洗脱15min,洗脱结束后离心收集洗脱液,向洗脱液中加入10 $\mu$ L 1M的Tris中和至洗脱液pH为7.0-8.0,加入1/10体积的PBS,共得到2份500 $\mu$ L血清回收样品,其中一份是患者1血清与过表达MATR3结合后的回收样品;另一份是患者1血清与对照pCDNA3.1结合后的回收样品。

[0106] (2) 过表达细胞爬片上验证血清回收样品

[0107] 参考实施例2,制备过表达MATR3蛋白细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片,使用步骤(1)中的2份样品洗脱液孵育细胞爬片,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人IgG,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察结果,结果如图8所示。

[0108] 根据图8可以看出,与过表达MATR3悬浮细胞结合的血清回收样品在过表达MATR3细胞爬片上有阳性信号,而对照血清回收样品没有,表明与过表达MATR3悬浮细胞结合的血清回收样品可特异性识别过表达细胞爬片上的MATR3抗原,这份样品可作为自身抗体洗脱液(即为阳性样本),与pCDNA3.1结合的回收样品可作为对照洗脱液(即为阴性样本)。

[0109] (3) 血清回收样品在大鼠脑组织切片上验证目标抗原

[0110] 参考实施例1步骤(1)制备大鼠脑组织冰冻切片,使用实施例5步骤(2)得到的自身抗体洗脱液和对照洗脱液分别孵育大鼠脑组织切片,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人IgG,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察结果,结果如图9所示。

[0111] 根据图9可以看出,自身抗体洗脱液在大鼠脑组织切片上有阳性信号,而对照洗脱液没有,表明自身抗体洗脱液可特异识别大鼠脑组织切片上表达的MATR3抗原。

[0112] 实施例6抗MATR3自身抗体在疑似自身免疫性神经系统疾病样本中的检出率

[0113] 取2758例具有神经系统疾病患者样本,这些患者表现出的症状有:疑似脑炎、副肿瘤综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎。使用实施例2中的过表达MATR3的细胞爬片进行检测,筛选MATR3自身抗体阳性血清样本,共筛选出8例MATR3自身抗体阳性样本(部分患者结果如图10所示),抗MATR3抗体的检出率为0.29%,并且经临床医生确诊,检出抗MATR3抗体的患者患有多发性硬化症,其中一例MS患者合并ALS疾病。本发明为实现多发性硬化症的诊断提供了待测的与自身抗体结合的新抗原,说明该抗体对多发性硬化症诊断具有辅助作用。

[0114] 实施例7基于细胞的免疫荧光法验证抗MATR3自身抗体的特异性

[0115] 选取100例神经系统自身免疫疾病患者和50例健康对照的血清,使用实施例2中制备好的过表达MATR3的细胞爬片进行免疫荧光检测,具体操作步骤参考实施例2,其中100例患者血清中存在AQP4、MBP、MOG、GFAP、AQP1、PLP1、Flotillin-1/2、NF155、NF186、CNTN1、CNTN2、CASPR1、Hu、Yo、CV2、Ma2、Amphiphysin、Ma1、SOX1、NMDAR、AMPA1、AMPA2、LGI1、

CASPR2、GABABR、DPPX、IgLON5、D2R、Neurexin3、KCNA4、GABAAR  $\gamma$  2、ATP1A3、Homer3、ARHGAP26、ITPR1/2、mGluR1、CARP VIII、AP3B2、septin5、GM1、GD1b、GQ1b、Sulfatides、GT1b、GT1a、GD3、GD2、GD1a、GM4、GM3和GM2中的至少一种自身抗体。

[0116] 免疫荧光检测结果显示,所选取的100例神经系统自身免疫病患者和50例健康对照的血清均不与过表达MATR3细胞爬片产生类似于实施例6中筛出的8例患者血清相似的细胞形态。患有本发明描述的神经系统自身免疫疾病的患者具有针对MATR3蛋白的自身抗体,而另一些患有神经系统自身免疫疾病的患者和健康受试者样本没有这种抗体。本发明为实现神经系统疾病的诊断提供了待测的与自身抗体结合的新抗原。

[0117] 综上所述,用患有本发明描述的神经系统疾病的患者血清和健康人血清孵育大鼠脑组织切片,通过荧光二抗放大信号,并与神经元特异性Marker抗体共染的方式,发现相比健康人血清,患者血清中存在自身抗体MATR3,并且通过将患者血清与过表达目标抗原悬浮细胞孵育并对血清有效抗体成分进行回收的方式,制备含抗体洗脱液和对照洗脱液,孵育过表达细胞爬片和大鼠脑组织切片验证了目标抗原的真实性和特异性,表明MATR3蛋白在大鼠脑组织中表达且出现明显的信号,MATR3可作为中枢神经系统自身免疫疾病相关自身抗体的识别抗原之一,尤其是MS相关疾病,抗MATR3自身抗体的试剂能够实现中枢神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

[0118] 以上内容仅为说明本发明的技术思想,不能以此限定本发明的保护范围,凡是按照本发明提出的技术思想,在技术方案基础上所做的任何改动,均落入本发明权利要求书的保护范围之内。

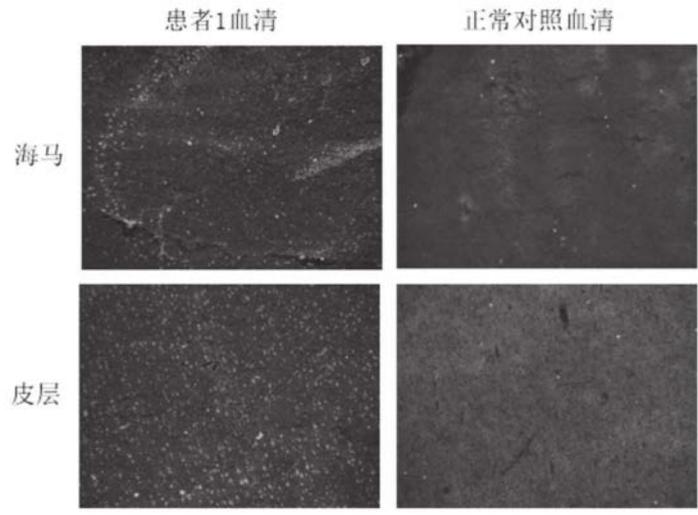


图1

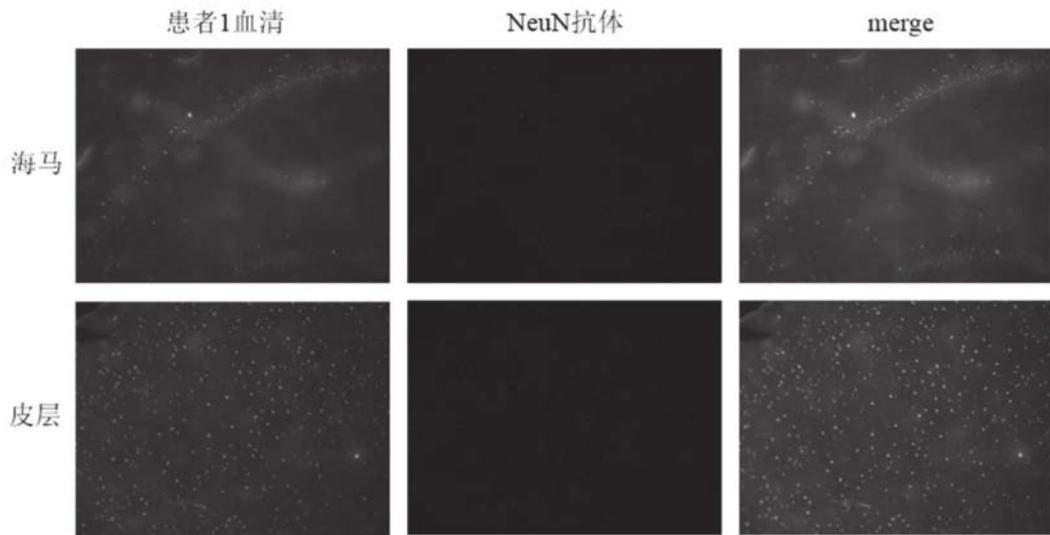


图2

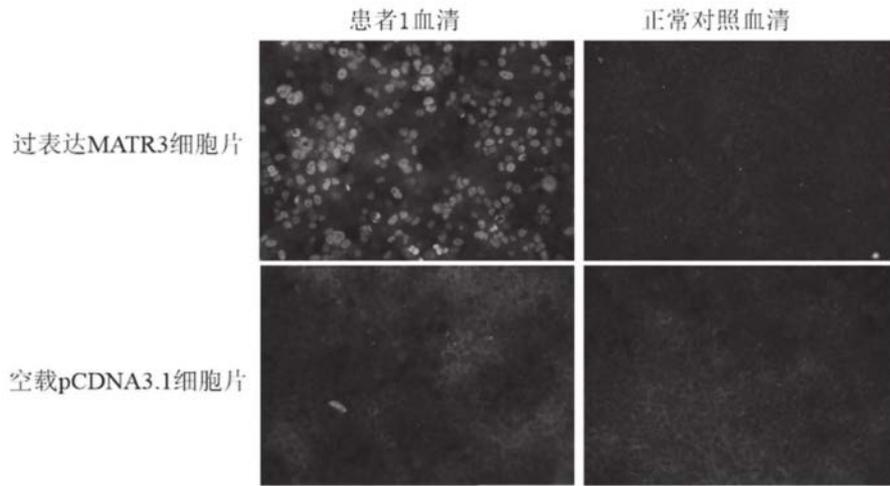


图3



图4

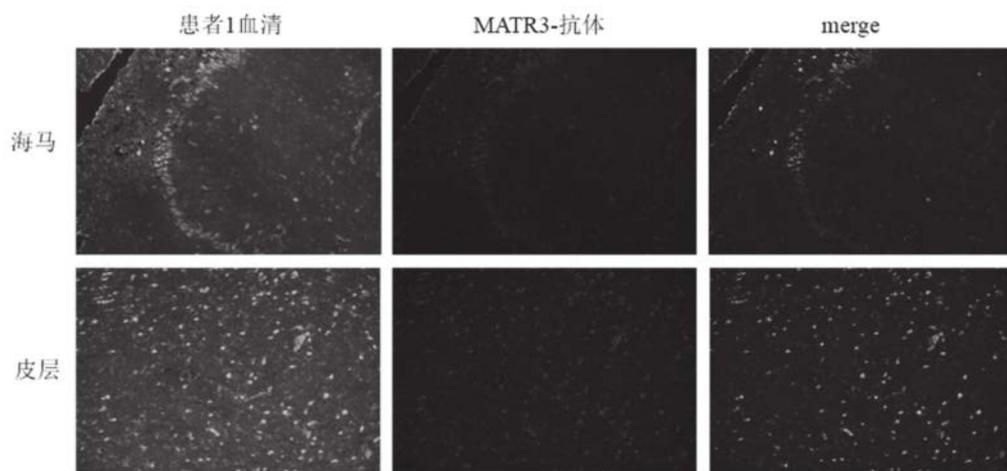


图5

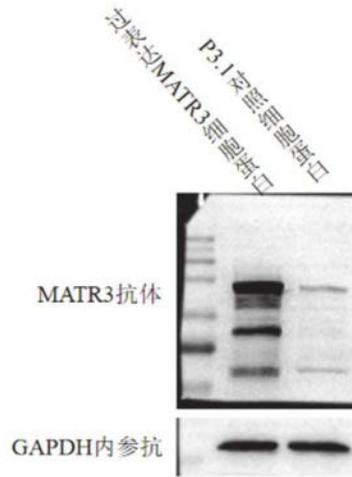


图6

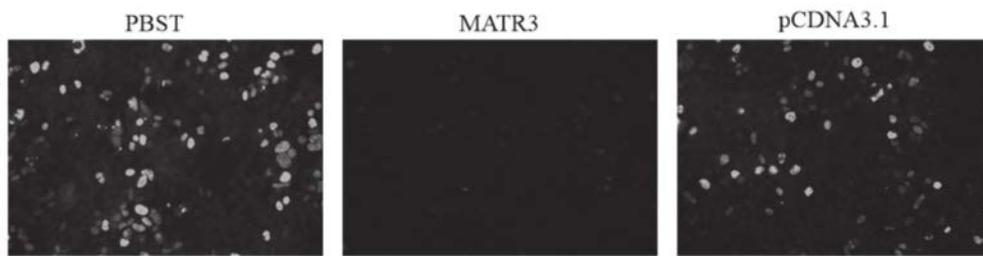


图7

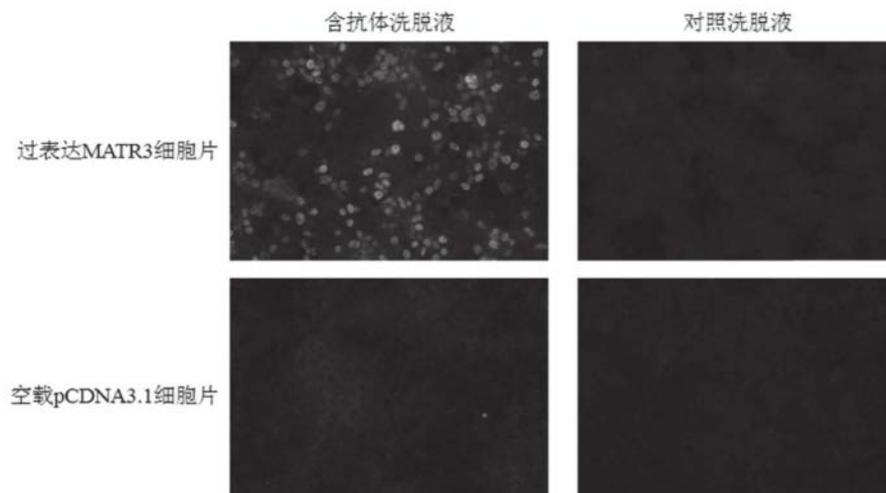


图8

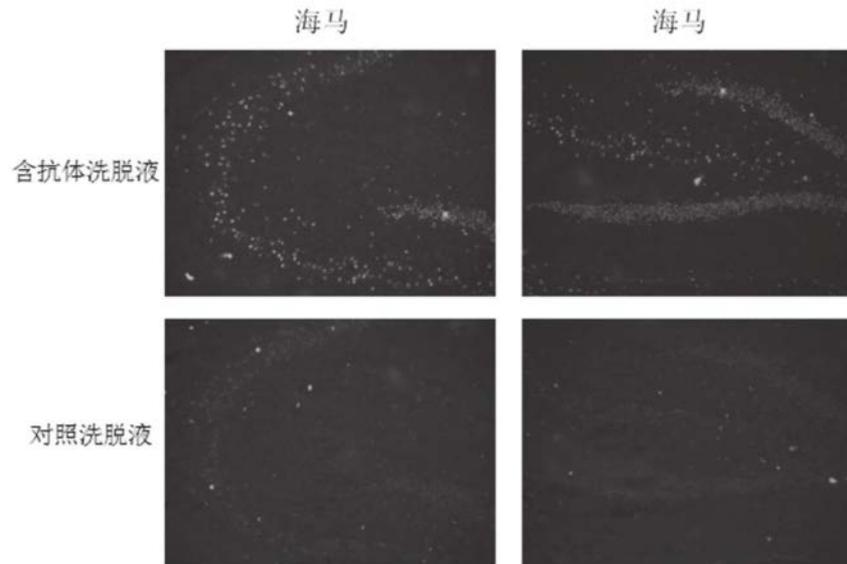


图9

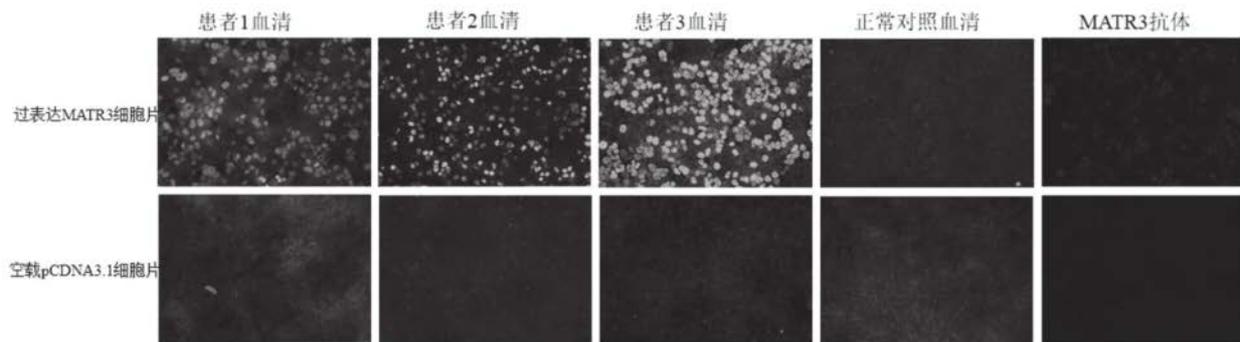


图10