



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105738631 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201610096309.4

(22)申请日 2016.02.22

(71)申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市碑林区咸宁西路28号

(72)发明人 杨娟 黄辰 宋土生 陈艳妮

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200

代理人 王霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图3页

### (54)发明名称

一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A及其应用

### (57)摘要

本发明公开了一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A及其应用。其氨基酸序列如SEQ. ID. NO. 1所示。该分子称为SERPINA5-A,是丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制A5(SERPINA5)的一个片段,其精确分子量为3886道尔顿SERPINA5-A在孤独症患者血清检测中呈现显著高表达,用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)检测SERPINA5-A或ELISA方法检测SERPINA5的表达水平,可作为孤独症血清的检测方法。

1. 一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ.ID.NO.1所示。
2. 如权利要求1所述的孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A,其特征在于,该血清多肽标志物SERPINA5-A为丝氨酸蛋白酶抑制剂A5SERPINA5的一个片段,分子量为3886道尔顿。
3. 如权利要求1所述的孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A,其特征在于,其血清中的检测参数为2.81~5.11ng/mL。
4. 权利要求1所述的孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A作为孤独症血清诊断药物的靶点的应用。
5. 权利要求1所述的孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A在制备孤独症血清诊断药物中的应用。
6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述孤独症血清诊断药物为ELISA检测孤独症血清多肽分子的药物。
7. 与权利要求1所述的孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A相结合的分子在制备孤独症血清诊断药物中的应用。
8. SERPINA5蛋白作为孤独症血清诊断药物的靶点的应用。
9. 与SERPINA5蛋白相结合的分子在制备孤独症血清诊断药物中的应用。

## 一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于孤独症检测技术领域,涉及一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A及其应用。

### 背景技术

[0002] 孤独症,也称为孤独症谱系障碍(Autism Spectrum Disorders,ASD),是一种以社会功能缺失、言语和非言语沟通异常,以及行为和兴趣刻板局限为主要特征的广泛神经发育障碍,患病率约1%。一般发病于3岁前的幼儿期,并持续终生,男孩发病率是女孩的4~6倍。研究表明,ASD的早期诊断和筛查有助于增加孤独症儿童从早期干预中获益的机会。然而由于缺乏生物标志物,目前对ASD的筛查诊断主要以儿童的行为特征及发育史为基础,因此存在争议,亟需筛选可量化生物学诊断指标。ASD发病率逐年增加,已经引起了学术界的广泛关注。该病的诊断最初起源于对一组病人临床症状的观察,从有孤独症诊断至今,由于缺乏可量化的指标,诊断标准修改过多次。孤独症诊断标准的主要内容均为症状描述,并且其症状存在多样性,学界对其以症状表述为主的诊断标准存在争议。因此,筛查ASD可量化的生物学指标、生物标志物的鉴定、不仅有利于其早期筛查及诊断,对该病发病机制的探讨、诊断标准的制定及治疗药物的研制亦具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A及其应用,该血清多肽标志物分子为丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制A5(SERPINA5)的一个片段,是孤独症血清多肽标志物。

[0004] 本发明是通过以下技术方案来实现:

[0005] 一种孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A,其氨基酸序列如SEQ. ID. NO. 1所示。

[0006] 该血清多肽标志物SERPINA5-A为丝氨酸蛋白酶抑制剂A5SERPINA5的一个片段,分子量为3886道尔顿。

[0007] 所述孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A,其血清中的检测参数为2.81~5.11ng/mL。

[0008] 本发明还公开了孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A作为孤独症血清诊断药物的靶点的应用。

[0009] 本发明还公开了孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A在制备孤独症血清诊断药物中的应用。

[0010] 所述孤独症血清诊断药物为ELISA检测孤独症血清多肽分子的药物。

[0011] 与上述孤独症血清多肽标志物SERPINA5-A相结合的分子在制备孤独症血清诊断药物中的应用。

[0012] SERPINA5蛋白作为孤独症血清诊断药物的靶点的应用。

[0013] 与SERPINA5蛋白相结合的分子在制备孤独症血清诊断药物中的应用。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0015] 本发明公开了一种孤独症患儿的血清标志物及其检测方法。其氨基酸序列如SEQ. ID. NO. 1所示。该分子称为SERPINA5-A,为丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制A5(SERPINA5)的一个片段。其精确分子量为3886道尔顿,在孤独症患儿血清中呈现显著高表达;而在正常对照人群中血清中表达范围为:2.08~3.28ng/mL;在孤独症患儿血清中表达范围为:2.81~5.11ng/mL,且组间具有极显著差异( $p < 0.001$ )。

[0016] 鉴于SERPINA5-A在孤独症血清中显著高表达,那么SERPINA5-A就可以作为孤独症血清诊断标志物;且其母本蛋白SERPINA5在孤独症患儿血清中呈现特异性的高表达,因此,SERPINA5可应用于孤独症患儿血清诊断:用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS)检测SERPINA5-A或ELISA方法检测SERPINA5的表达水平,可作为孤独症患儿检测的方法。而针对ELISA检测孤独症血清诊断,SERPINA5就可以作为ELISA检测药物的新的靶点。

### 附图说明

[0017] 图1为同一孤独症患儿血清样本的三次重复的蛋白多肽图谱(1KDa~10KDa);

[0018] 图2为蛋白多肽峰m/z:3886在孤独症患儿和正常对照组中的蛋白多肽表达差异;

[0019] 图3为SERPINA5-A的MS/MS质谱鉴定图谱;

[0020] 图4为孤独症儿童及正常对照儿童血清中SERPINA5蛋白的表达水平。

### 具体实施方式

[0021] 本发明提供的孤独症血清多肽分子,是一种新筛选的孤独症血清诊断标志物,其表达具有特异性,可应用于孤独症诊断。下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0022] 具体的该孤独症血清诊断标志物的筛选为:

[0023] 首先应用液体蛋白芯片技术分离提取孤独症患儿和正常对照儿童血清蛋白多肽,应用MALDI-TOF-MS捕获孤独症患儿和正常对照人群蛋白多肽图谱,并且采用ClinProTools 2.1软件对比分析孤独症患儿和正常人群血清蛋白多肽谱图差异,找出组间显著差异表达的蛋白多肽分值,在孤独症患儿血清中显著高表达的蛋白多肽峰值中筛出孤独症血清肿瘤标志物。

[0024] 对于所筛选的孤独症血清诊断标志物的验证为:

[0025] 应用HPLC将孤独症患儿血清分离的蛋白多肽混合物分为20~30个组分,在对其进行二级质谱的鉴定,并且对鉴定出的蛋白多肽采用酶联免疫法进行血清回归分析,结果血清回归验证证明其在孤独症患儿血清中显著高表达,具有特异性,可以作为孤独症患儿血清筛查的生物标志物。

[0026] 1、样本的采集与处理:

[0027] 采集自西安交通大学附属儿童医院(2013年1月至2015年12月)的150例(男性130例;女性20例;平均年龄3.5岁)临床确诊的孤独症患儿和150例正常健康对照儿童(男性130例;女性20例;平均年龄3.5岁)。样本考虑年龄、性别、采集时间、储存条件是否一致、有无基础疾病等因素。被采集者晨起空腹采血,用真空采血管(黄帽、有隔离胶)采集全血5mL,室温

静置30min;室温离心5min(3000g),将上层血清分装成100 $\mu$ L/管,立即保存于-80 $^{\circ}$ C,避免反复冻融。

#### [0028] 1.2试剂与仪器

[0029] 血清蛋白的提取采用德国布鲁克公司的磁珠试剂盒“弱阳离子型”(MB-WCX),以及光谱纯(HPLC级)乙腈、三氟乙酸(德国Merck公司)、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)(美国Sigma公司)。

[0030] 磁珠分离器、600/384AnchorChip靶板和AutoFlex III基质辅助激光解析电离飞行时间质谱MALDI-TOF-MS(德国Bruker Daltonics公司)。

#### [0031] 2、血清蛋白样本的制备

[0032] 运用弱阳离子(MB-WCX)磁珠捕获血清蛋白多肽,具体操作步骤如下:

[0033] ①用混匀器完全混匀磁珠悬浮液1min;

[0034] ②加10 $\mu$ L MB-WCX结合液以及10 $\mu$ L MB-WCX磁珠至PCR管,混匀后加5 $\mu$ L血清,混匀至少5次,静置5min;

[0035] ③将PCR管放入磁柱分离器,使磁珠贴壁1min,液体清澈后弃上清液;

[0036] ④加100 $\mu$ L MB-WCX冲洗液,在磁柱分离器上前后移动10次PCR管,磁珠贴壁后弃上清液,重复步骤③、④两次;

[0037] ⑤加5 $\mu$ L MB-WCX洗脱液洗涤贴壁的磁珠,并反复吹打10次,磁珠贴壁2min,将上清液移入干净的离心管;

[0038] ⑥加5 $\mu$ L MB-WCX稳定液至离心管并混匀,提取的蛋白多肽可以用于直接MALDI-TOF-MS检测或者冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱24h之内质谱分析。

#### [0039] 2.2质谱分析

[0040] 将分离收集得到的蛋白样本1 $\mu$ L与10 $\mu$ L的基质 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸混匀,取1 $\mu$ L点在Anchorchip靶板上(德国Bruker公司),每个样本分别点三个靶点以作三次重复。待室温干燥后将靶板放入质谱仪进行分析,采用FlexControl 2.0软件进行标准品校正后开始样本检测,每个样本要经过总共300次激光打靶(5次点靶,每次打靶2 $\times$ 30次)之后生成质谱图,获得由不同质核比(m/z)组成的蛋白多肽谱图。采用ClinProTools 2.1软件结合遗传算法等生物统计学和生物信息学方法分析两组血清样本的蛋白多肽图谱。进行归一化平滑处理总离子流图,消除化学及电物理噪声;分析组间差异蛋白并计算差异大小,按差异大小由大到小排列,找出组间表达具有显著差异的蛋白多肽峰值(P<0.001)。

[0041] 将孤独症患儿组和正常对照组血清样本采用磁珠分离系统处理后,经过MALDI-TOF-MS分析后,对孤独症患儿组和正常对照组的每个样本进行蛋白多肽图谱绘制,在分子量范围1000Da~10000Da共检测到81个蛋白多肽峰图,且每个样本的三次重复稳定性较高,如图1所示。

[0042] 采用ClinProTools 2.1软件对质谱捕获的孤独症患儿和正常对照组的血清蛋白多肽图谱进行分析,将孤独症患儿血清多肽谱图与正常人群进行比较分析,检测到分子量为3886道尔顿的蛋白多肽峰在孤独症患儿血清中显著高表达(孤独症儿童vs健康对照儿童:4.44 $\pm$ 1.07vs 2.53 $\pm$ 0.59,p<0.001)。结果如图2所示,对M/Z:3886在孤独症患儿(红色,峰值在上的曲线)和正常对照(绿色,峰值在下的曲线)中的表达进行比较,发现M/Z:3886的蛋白多肽峰图在孤独症患儿血清中均显著高表达,因此对其进行序列鉴定并作为标

志物的首选进一步鉴定。

[0043] 3、孤独症血清潜在标志物的序列鉴定

[0044] 具体采用液相色谱分离与质谱联用的技术对孤独症血清多肽标志物M/Z:3886进行鉴定,采用Waters公司Nano Acquity UPLC对经磁珠分离收集的质谱上样剩余的血清蛋白多肽进行二维凝胶色谱分离,收集15~30份肽段馏份:在收集液中检测到目的蛋白;再联用Thermo Fisher公司LTQ Orbitrap XL质谱系统对孤独症患者血清中表达上调的蛋白多肽M/Z:3886进行序列鉴定。

[0045] 具体的操作步骤为:

[0046] 3.1样本前处理

[0047] 合并提取后的蛋白样,1300转,10分钟,取上清液,冷冻干燥仪干燥,使终体积在50ul,得到液体A,用安捷伦ziptip萃取柱,浓缩处理液体A。处理方法:①ziptip柱子用100%乙腈吹打5次,活化柱子;②活化好的ziptip在液体1中,反复吹吸10次,尽量避免气泡产生;③50%ACN 0.1%TFA水溶液,洗涤3次ziptip柱子;④、ziptip柱子在0.1%TFA中反复吹吸,使样本洗脱,得到洗脱液2;⑤重复以上1-4步,30次;⑥合并30次的洗脱液2,冷冻干燥至10ul,用于质谱鉴定。

[0048] 3.2色谱分离:

[0049] 原始样品加10ul流动相A,转移至进样瓶中,共20ul。

[0050] 一维超高效液相系统:Waters公司Nano Aquity UPLC(Waters Corporation, Milford,USA)。色谱柱:

[0051] 捕集柱:Symmetry®C18,5µm,180µm×20mm,nanoAcquity™Column

[0052] 分析柱:Symmetry®C18,3.5µm,75µm×150mm,nanoAcquity™Column

[0053] 流动相A:5%乙腈,0.1%甲酸的水溶液

[0054] 流动相B:95%乙腈,0.1%甲酸的水溶液;所有溶液均为HPLC级。

[0055] 捕集流速15µl/min,捕集时间3min,分析流速400nl/min;分析时间60min,色谱柱温度35℃;Partial Loop模式进样,进样体积18µl。

[0056] 梯度洗脱程序:

[0057]

时间	流速	流动相A%	流动相B%
40.0	0.400	95.0	5.0
41.0	0.400	55.0	45.0
45.0	0.400	20.0	80.0
45.50	0.400	95.0	5.0
60.00	0.400	95.0	5.0

[0058] 凝胶色谱分离结果如图3所示。色谱图中横坐标表示样本流出时间,纵坐标代表多肽相对丰度,色谱设定时间为60min,从10min开始收集收集馏分,多肽成分主要在15min后被分离并采用梯度洗脱方式,使洗脱效率提高,设定捕集时间收集馏分:收集15~30份肽段馏份。

[0059] 3.3LTQ-Orbitrap XL质谱分析:

[0060] 使用Thermo Fisher公司LTQ Orbitrap XL质谱分析系统。Nano离子源(Michrom

Bioresources, Auburn, USA), 喷雾电压1.8kV; 质谱扫描时间60min; 实验模式为数据依赖(Data Dependent)及动态排除(Dynamic Exclusion), 在10秒内对母离子进行2次串级之后加入到排除列表内90秒; 扫描范围400-2000m/z; 一级扫描(MS)使用Obitrap, 分辨率设定为100000; CID及二级扫描使用LTQ; 在MS谱图中选取强度最强的10个离子的单一同位素作为母离子进行MS/MS(单电荷排除, 不作为母离子)。检测结果如图3所示。

[0061] 数据分析: 使用数据分析软件Bioworks Browser 3.3.1SP1进行Sequest™检索。母离子误差设定为100ppm, 碎片离子误差设为1Da, 酶切方式为非酶切, 可变修饰为M(Methionine)甲硫氨酸氧化。检索结果参数设定为 $\delta\text{tactn} \geq 0.10$ 。检索结果为:m/z: 3886.84; IPI: IPI00007221.1; Gene Symbol = SERPINA5 Plasma serine protease inhibitor precursor; 序列为SARLNSQRLVFNRPFLMFIVDNNILFLGKVNRP。

[0062] 所分离的M/Z:3886称为SERPINA5-A, 为丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制A5(SERPINA5)的一个片段, 其精确分子量为3886道尔顿, 其氨基酸序列SARLNSQRLVFNRPFLMFIVDNNILFLGKVNRP(如SEQ. ID. NO. 1所示)。

[0063] 因此, 用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)检测SERPINA5-A或ELISA方法检测SERPINA5的表达水平, 可作为孤独症患儿检测的方法。

[0064] SERPINA5-A作为SERPINA5的一个片段, 提示SERPINA5是与孤独症特异性相关的蛋白, 进一步通过ELISA检测来进行验证。

[0065] 4、孤独症血清SERPINA5表达的ELISA血清验证分析:

[0066] 1) 血清样本: 收集孤独症患儿血清48例(男性40例, 女性8例; 平均年龄3.5岁)、正常对照儿童血清40例(男性35例; 女性5例; 平均年龄3.5岁)进行ELISA的血清验证分析。所有血清样本均来自西安交通大学附属儿童医院, 采集时间2014年1月~2015年12月。

[0067] 2) 检测方法: 采用酶联免疫法(ELISA)检测孤独症患儿以及正常对照组的血清SERPINA5的表达水平, 试剂盒购自美国R&D公司。试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA): 往预先包被抗人的SERPINA5蛋白(SERPINA5)抗体的包被微孔中, 依次加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体, 经过温育并彻底洗涤。用底物TMB显色, TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的SERPINA5蛋白呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值), 计算样品浓度。具体实验步骤参照试剂盒说明书, 阳性判定标准按照试剂盒说明书界定。

[0068] 3) 统计方法: 采用GraphPad.Prism.v5.01软件进行单因素方差分析(ANOVA)以及独立样本的T检验。

[0069] 4) 结果分析: 酶联免疫法分析结果表明SERPINA5在孤独症及正常对照检测组中的表达水平为孤独症vs正常对照组:  $3.83 \pm 0.47 (2.81 \sim 5.11)$  vs  $2.42 \pm 0.26 (2.08 \sim 3.28)$ ,  $p < 0.001$ , 组间具有显著性差异, 具体结果如图4所示。

[0070] 对正常对照人群以及孤独症患儿血清中的SERPINA5进行ELISA检测, 结果表明孤独症患儿血清中SERPINA5显著高表达(孤独症vs正常对照组:  $3.83 \pm 0.47$  vs  $2.42 \pm 0.26$ ): 在正常对照儿童血清中表达范围为:  $2.08 \sim 3.28 \text{ ng/mL}$ ; 在孤独症患儿血清中表达范围为:  $2.81 \sim 5.11 \text{ ng/mL}$ , 且组间具有极显著差异( $p < 0.001$ )。这表明: SERPINA5是与孤独症发生密切相关的蛋白, 可作为初步的孤独症检测指标。

[0071] 因此可以通过ELISA实验对待检血清样本的SERPINA5表达初步判定其是否还有孤

独症:孤独症患者(2.81~5.11ng/mL);正常人群(2.08~3.28ng/mL)。

[0072] 综上所述,本发明公开了一种新的孤独症血清多肽分子及其检测方法和应用。其氨基酸序列如SEQ. ID. NO. 1所示。该分子称为SERPINA5-A,是丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制A5 (SERPINA5)的一个片段,其精确分子量为3886道尔顿SERPINA5-A在孤独症患者血清检测中呈现显著高表达,用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)检测SERPINA5-A或ELISA方法检测SERPINA5的表达水平,可作为孤独症血清的检测方法。



氨基酸序列表

<110> 西安交通大学

<120>一种孤独症血清多肽标志物 SERPINA5-A 及其应用

<160> 1

<210> 1

<211>33

<212> PRT

<213>SERPINA5

[0001]

<400> 1

NRP

Ser-Ala-Arg-Leu-Asn-Ser-Gln-Arg-Leu-Val-Phe-Asn-Arg-Pro-Phe

5

10

15

Leu- Met-Phe-Iie-Val- Asp-Asn-Asn-Iie-Leu-Phe-Leu-Gly-Lys-Val

20

25

30

Asn-Arg-Pro

33

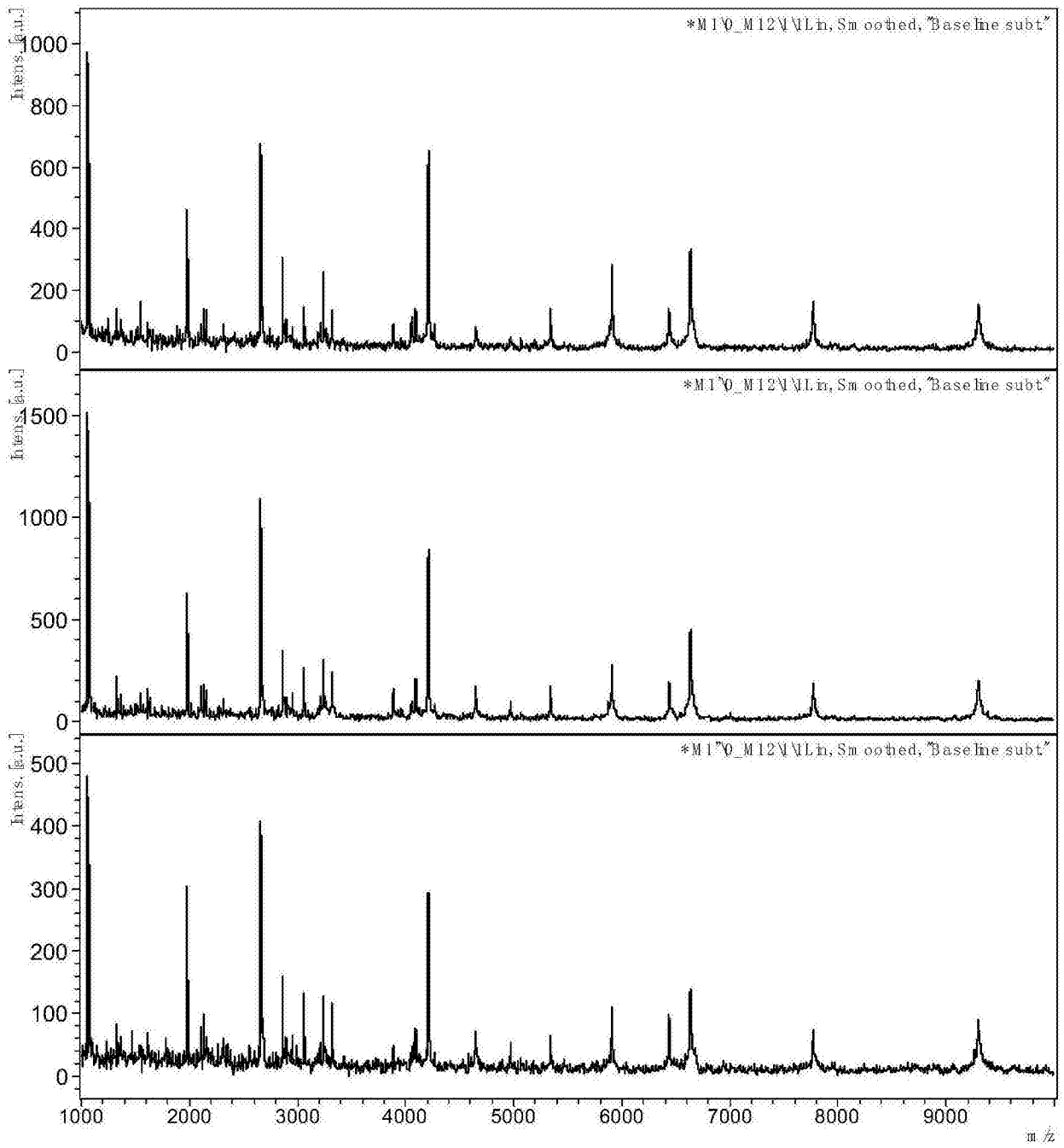


图1

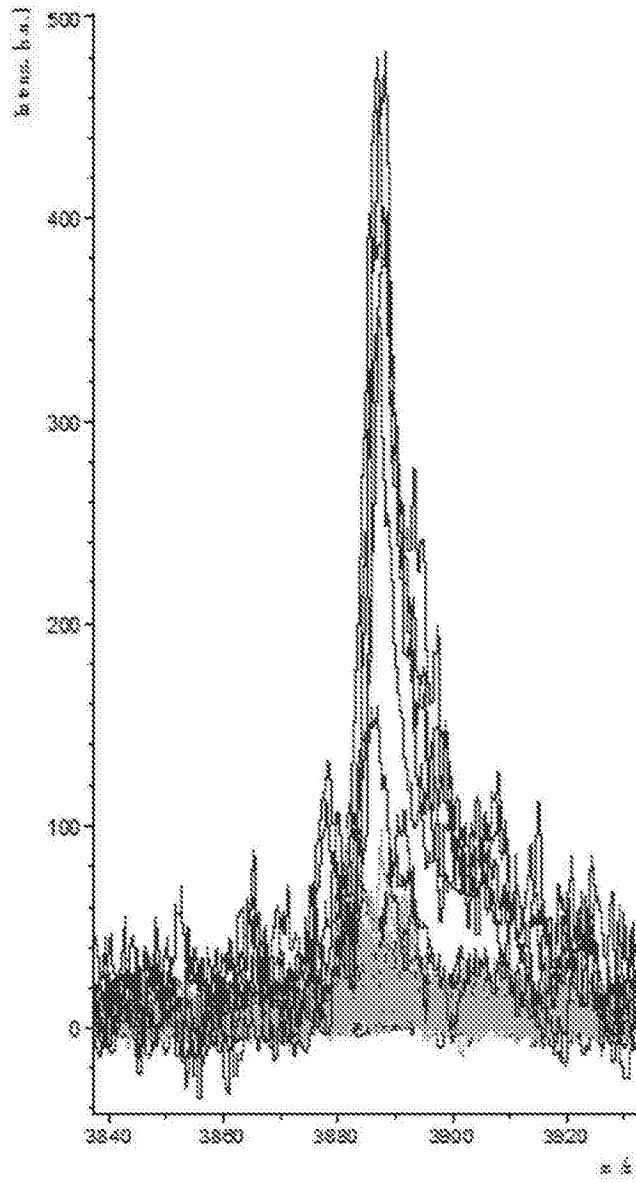


图2

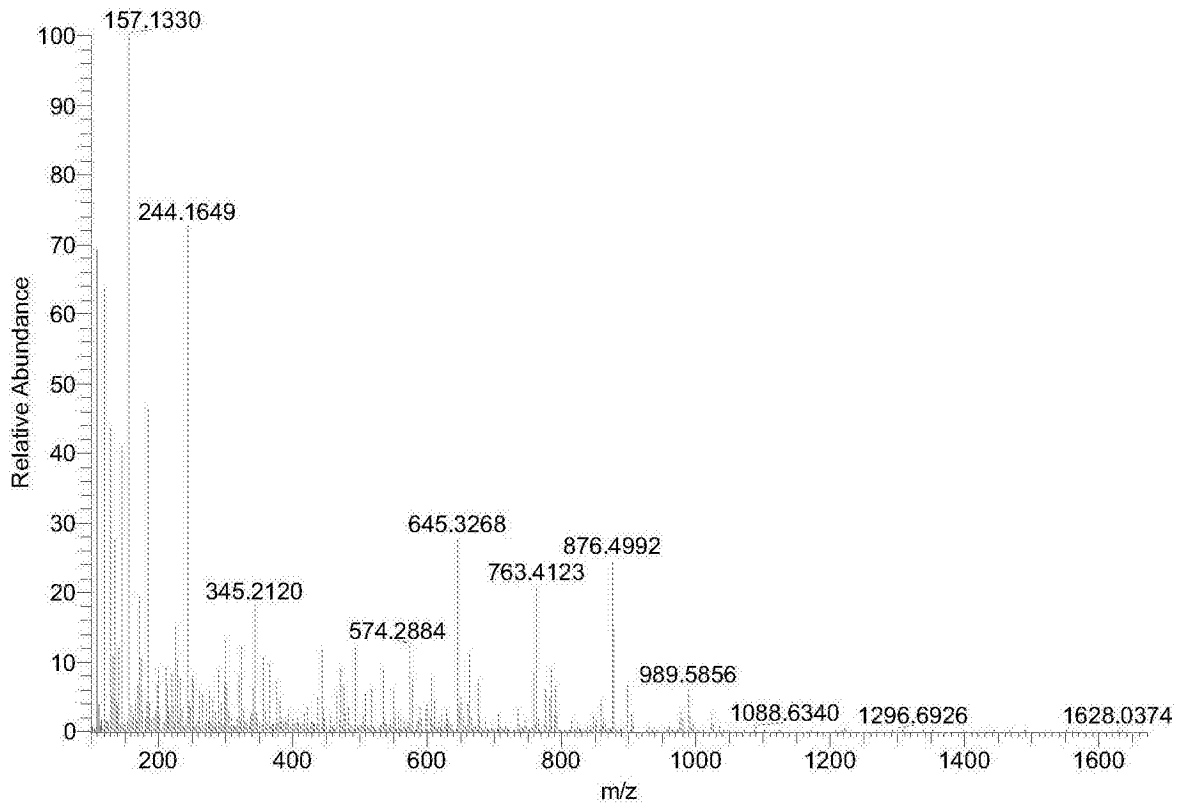


图3

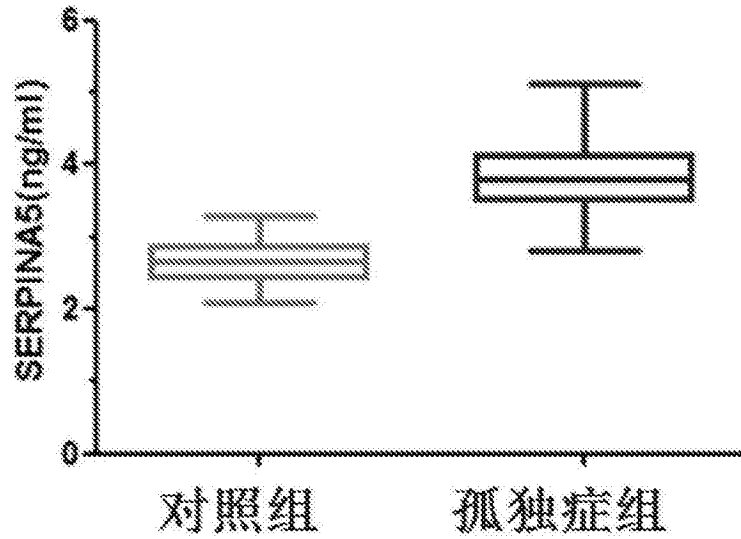


图4