



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105259353 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510665932. 2

(22) 申请日 2015. 10. 15

(71) 申请人 北京市心肺血管疾病研究所

地址 100029 北京市朝阳区安贞路 2 号北京
安贞医院心肺血管疾病研究所

(72) 发明人 杜杰 王媛 檀鑫

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

一种主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者血液中
可溶性 ST2 的检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者血液中可溶性 ST2 的检测试剂盒及检测方法。本发明利用一对识别 sST2 不同表位的抗体, 组装得到了双抗体夹心 ELISA 和免疫胶体金试纸条, 实现对可溶性 sST2 的定量和定性检测。通过试验证明: 本发明的 ELISA 试剂盒和胶体金试纸条对人主动脉瘤标志物 - 人可溶性 ST2 蛋白具有较高的特异性和灵敏度, 操作简单, 可用于科研及临床中主动脉瘤和主动脉夹层等疾病的检测, 起到辅助诊断、指导治疗、预后判断的作用。

1. 检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质在制备诊断或辅助诊断待测患者是否患有主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的产品中的应用 ;

或检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质在制备检测或辅助检测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的产品中的应用 ;

或检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质在制备预测或辅助预测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者术后的死亡风险状态的产品中的应用 ;

所述可溶性 ST2 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在於 :

所述主动脉瘤和 / 或主动脉夹层为慢性主动脉夹层动脉瘤、急性主动脉夹层动脉瘤或急性主动脉瘤无夹层。

3. 根据权利要求 1 或 2 的应用,其特征在於 :所述物质为如下 1)-3) 所示 :

1) 可溶性 ST2 蛋白抗体 ;

2) 含有 1) 的酶联免疫试剂盒 ;

3) 含有 1) 的胶体金试纸条。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用,其特征在於 :所述酶联免疫试剂盒还包括经酶或化合物标记的可溶性 ST2 蛋白抗体 ;

所述酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶 ;所述化合物为生物素分子或荧光分子 ;所述荧光分子为 Cy3、Cy5 或异硫氰酸盐。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的应用,其特征在於 :所述胶体金试纸条中的可溶性 ST2 蛋白抗体为胶体金标记的可溶性 ST2 蛋白抗体。

6. 可溶性 ST2 蛋白在作为检测或辅助检测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的标志物中的应用。

7. 一种检测待测样品中可溶性 ST2 蛋白含量的酶联免疫试剂盒,包括权利要求 3 中所述的可溶性 ST2 蛋白抗体。

8. 一种检测待测样品中是否含有可溶性 sST2 蛋白的胶体金试纸条,包括权利要求 3 中所述的可溶性 ST2 蛋白抗体。

9. 一种可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体,其为如下 1) 或 2) :

1) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 5 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 6 所示 ;

2) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 9 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 10 所示。

10. 根据权利要求 6 所述的应用或权利要求 7 所述的酶联免疫试剂盒或权利要求 8 所述的胶体金试纸条或权利要求 9 所述的单克隆抗体,其特征在於 :所述可溶性 ST2 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

一种主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者血液中可溶性 ST2 的检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者血液中可溶性 ST2 的检测试剂盒及检测方法,具体涉及一种可快速定量或定性检测人全血、血清和 / 或血浆主动脉瘤和 / 或主动脉夹层标志物 - 可溶性 ST2 含量的免疫学检测试剂盒。

背景技术

[0002] 可溶性 ST2 (sST2) 又称为 IL1RL1, 是 Toll- 样受体超家族的成员, 但与其他成员不同, sST2 不能通过活化 NF- κ B 引发感染反应。作为白介素 -1 的受体家族成员, ST2 蛋白具有两种形态, 可溶性形式 (sST2, soluble ST2) 和膜结合受体形式 (membrane-bound receptor form, ST2receptor)。ST2 的功能性配体为 IL-33, 心肌细胞和纤维原细胞受到机械牵张后, ST2 和 IL-33 含量增加。近年研究发现 sST2 在血液中的含量水平可反映心脏的负荷状况。通过测定急性心肌梗死患者外周血 ST2 发现 30 天内死亡和发生心衰的患者外周血 ST2 水平显著升高。Januzzi 等对 593 例急性呼吸困难患者的研究发现, 心衰患者 ST2 的中位数高于非心衰患者, 并且 1 年内死亡的患者 ST2 中位数也高于存活的患者, ST2 水平的升高是 1 年死亡率的独立和强力预测指标。对慢性心衰患者的研究发现, ST2 水平的升高和心衰严重程度相关并预测心脏猝死的发生, 并且严重心衰患者升高 ST2 在 2 周时的变化也是死亡和需要心脏移植的独立预测指标。

[0003] 主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是主动脉病理性的扩张的结果, 可以超过正常血管直径的 50%。主动脉夹层 (acute aortic dissection, AAD) 是指由于内膜局部撕裂, 受到血液冲击, 内膜逐步剥离、扩展, 在动脉内形成真、假两腔。从而导致一些列包括撕裂样疼痛的表现, 如果不进行恰当和及时的治疗, 破裂的机会非常大, 死亡率也非常高。对主动脉瘤和主动脉夹层的诊断主要通过影像学方法, 如胸、腹部 X 线照像, CT 血管造影 (CTA) 和磁共振血管造影 (MRA) 检查以及动脉造影等方法。在分子标志物方面, C 反应蛋白、D-二聚体、平滑肌肌球蛋白重链、钙调蛋白等一系列生物标记物可能与急性主动脉夹层的发生有关联, 对于主动脉瘤的诊断, 一些免疫反应上调的细胞因子如白介素 -1 β 、IL-6、IL-8 及肿瘤坏死因子 - α (tumour necrosis factor- α) 以及 CC 类趋化因子都引起了研究者的注意, 对于基质金属蛋白酶, 特别是 MMP-9 和其他蛋白 tPA、Fibrinogen 以及 D-dimer 与主动脉瘤的发生之间的关联也有报道, 但由于缺乏特异性、半衰期短或受到假腔血栓化的局限等因素均未能能在临床诊治中得到广泛应用。

发明内容

[0004] 本发明的第一个目的是提供检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质的新用途。

[0005] 本发明提供了检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质在制备诊断或辅助诊断待测患者是否患有主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的产品中的应用。

[0006] 本发明还提供了检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质

在制备检测或辅助检测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的产品中的应用。

[0007] 本发明还提供了检测可溶性 ST2 蛋白含量的物质在制备预测或辅助预测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层患者术后的死亡风险状态的产品中的应用。

[0008] 所述可溶性 ST2 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

[0009] 上述应用中,所述主动脉瘤和 / 或主动脉夹层为慢性主动脉夹层动脉瘤、急性主动脉夹层动脉瘤或急性主动脉瘤无夹层。

[0010] 上述应用中,所述物质为如下 1)-3) 所示 :

[0011] 1) 可溶性 ST2 蛋白抗体 ;

[0012] 2) 含有 1) 的酶联免疫试剂盒 ;

[0013] 3) 含有 1) 的胶体金试纸条。

[0014] 上述应用中,所述可溶性 ST2 蛋白抗体为可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体或可溶性 ST2 蛋白多克隆抗体 ;所述可溶性 ST2 蛋白抗体具体为可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体 ;

[0015] 所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体,其为如下 1) 或 2) :

[0016] 1) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 5 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 6 所示 ;

[0017] 2) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 9 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 10 所示。

[0018] 上述应用中,

[0019] 1) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 3 所示 ;

[0020] 1) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 4 所示 ;

[0021] 2) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 7 所示 ;

[0022] 2) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 8 所示 ;

[0023] 所述酶联免疫试剂盒还包括经酶或化合物标记的可溶性 ST2 蛋白抗体。

[0024] 上述应用中,

[0025] 所述酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶 ;所述化合物为生物素分子或荧光分子 ;所述荧光分子为 Cy3、Cy5 或异硫氰酸盐。

[0026] 上述应用中,

[0027] 所述胶体金试纸条中的可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体为胶体金标记的可溶性 ST2 蛋白抗体。

[0028] 本发明的第二个目的是提供可溶性 ST2 蛋白的新用途。

[0029] 本发明提供了可溶性 ST2 蛋白在作为检测或辅助检测主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的标志物中的应用 ;

[0030] 所述可溶性 ST2 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

[0031] 本发明的第三个目的是提供一种检测待测样品中可溶性 ST2 蛋白含量的酶联免疫试剂盒。

[0032] 本发明提供的检测待测样品中可溶性 ST2 蛋白含量的酶联免疫试剂盒包括上述可溶性 ST2 蛋白抗体。

[0033] 本发明的第四个目的是提供一种检测待测样品中是否含有可溶性 sST2 蛋白的胶体金试纸条。

[0034] 本发明提供的检测待测样品中是否含有可溶性 sST2 蛋白的胶体金试纸条的包括上述可溶性 ST2 蛋白抗体。

[0035] 本发明的第五个目的是提供可溶性 ST2 蛋白的单克隆抗体。

[0036] 本发明提供的可溶性 ST2 蛋白的单克隆抗体,其为如下 1) 或 2) :

[0037] 1) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 5 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 6 所示 ;

[0038] 2) 所示的可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 9 所示 ;所述可溶性 sST2 蛋白的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列如序列表中序列 10 所示。

[0039] 上述单克隆抗体中,

[0040] 1) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 3 所示 ;

[0041] 1) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 4 所示 ;

[0042] 2) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 7 所示 ;

[0043] 2) 中所述可溶性 ST2 蛋白单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列如序列表中序列 8 所示 ;

[0044] 上述应用或上述试剂盒或上述试纸条或上述单克隆抗体中,所述可溶性 ST2 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。

[0045] 本发明提供了一种人主动脉瘤和主动脉夹层的生物标志物可溶性 ST2 (sST2) 蛋白分子及其在人全血、血清或血浆的快速检测方法,并利用一对识别 sST2 不同表位的抗体组装得到双抗体夹心 ELISA 和免疫胶体金试纸条,实现对可溶性 sST2 的定量和定性检测。通过试验证明:本发明的 ELISA 试剂盒和胶体金试纸条对人主动脉瘤标志物 - 人可溶性 ST2 蛋白具有较高的特异性和灵敏度,操作简单,可用于科研及临床中主动脉瘤和主动脉夹层等疾病的检测,起到辅助诊断、指导治疗、预后判断的作用。

附图说明

[0046] 图 1 为 sST2 免疫胶体金试纸条的组成。

[0047] 图 2 为 ELISA 检测试剂盒的标准曲线。

[0048] 图 3 为主动脉瘤主动脉夹层患者的 sST2 在血浆中的分布。

[0049] 图 4 为 9 例主动脉夹层动脉瘤患者手术治疗后 4-108 小时血浆中 sST2 的水平监

测。

[0050] 图 5 为重组 sST2 的表达与纯化。Marker 为蛋白质分子量标记 ;1 :未诱导的 B121 全菌蛋白超生物结果 ;2 :诱导表达的 B121 全菌蛋白超生结果 ;3 :60mM 咪唑的洗脱结果 ;4 :300mM 咪唑的洗脱结果。

具体实施方式

[0051] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0052] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0053] 实施例 1、sST2 单克隆抗体的制备

[0054] 一、免疫原的制备

[0055] 1、引物的设计

[0056] 利用蛋白质序列和二级结构分析软件对人可溶性 ST2 蛋白的序列进行分析,根据其结构域 / 序列的表面可及性、亲疏水性、二级结构和氨基酸构成,选择适宜重组表达的区域,设计了如下所示的上下游引物,经生工生物工程(上海)股份有限公司合成:ST2-F: 5' -CCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCGCCGCCACCATGGACTTTGGGCT CAGCTTGG-3'; ST2-R: 5' -CAAGGATCCTTGCTTCTGGGCAGCCAAGGG-3'。

[0057] 2、st2 基因的获得

[0058] 取人肝脏细胞系 HepG2 (购自 ATCC, HB-8065), Trizol 法提取 RNA 后,以 Poly-T 引物进行逆转录,获得 cDNA ;以获得的 cDNA 为模板,采用步骤 1 设计的 ST2-F 和 ST2-R 引物进行 PCR 扩增,得到 PCR 产物。

[0059] PCR 反应体系 (30 μ L) :上游引物 ST2-F 和下游引物 ST2-R 各 3 μ L (5 μ mol/L)、10 \times PCR buffer 3 μ L、2mM 的 dNTP 3 μ L、cDNA 1 μ L (约 1 μ g)、1U 热启动 DNA 聚合酶 EZ-Taq 0.2 μ L (自北京华大蛋白质研发中心有限公司),补充双蒸水至 30 μ L ;

[0060] PCR 反应扩增条件 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟 ;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒,共进行 25 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟 ;

[0061] PCR 产物在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,柱离心式 DNA 胶回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 回收目的片段,得到大小为 1003bp 的 st2 基因片段,其核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。

[0062] 3、重组载体的获得

[0063] 用限制性内切酶 NcoI 和 XhoI (购自大连宝生物工程公司) 将步骤 2 获得的 st2 基因片段进行双酶切,得到大小约为 995bp 的 st2 基因片段 ;用限制性内切酶 NcoI 和 XhoI 将 pET30a 载体 (Invitrogen) 进行双酶切,回收大小为 5329bp 的骨架载体,连接 st2 基因片段和骨架载体,得到重组载体 pET30a-ST2。

[0064] 将重组载体 pET30a-ST2 进行测序验证,结果表明 :重组载体 pET30a-ST2 为将 pET30a 载体的 NcoI 和 XhoI 酶切位点间的 DNA 序列替换为序列表中序列 1 所示的 st2 基因,且保持 pET30a 载体的其他序列不变得到的载体,表达 ST2 蛋白,ST2 蛋白的氨基酸序列为序列 2。

[0065] 4、重组菌的获得

[0066] 将测序正确的重组载体 pET30a-ST2 转化大肠杆菌 B121 (DE3) 中,得到重组菌

B121-pET30a-ST2。

[0067] 5、重组 ST2 蛋白的诱导表达

[0068] 按 1:100 的比例将过夜培养的 B121-pET30a-ST2 菌转接至 100ml LB 培养基,加入终浓度为 50 μ g/ml 的卡那霉素,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀为 0.6 ~ 0.8 ;加入 0.1mol/L 的 IPTG,25 $^{\circ}$ C 震荡培养 8h,收菌后超声破碎 ;收集上清液 (含有重组 sST2 蛋白),使用 Ni 柱进行蛋白质的亲和纯化 ;再用不同浓度的咪唑溶液进行洗脱后,将各组分分别上样进行 SDS-PAGE 分离检测。

[0069] 检测结果如图 5 所示 :重组 sST2 蛋白的分子量大小为 35.24kDa ;sST2 的蛋白的纯度在 90%以上,浓度约为 1mg/mL,可以满足免疫动物和抗体筛选与鉴定的要求。

[0070] 二、动物免疫

[0071] 使用弗氏非完全佐剂 (Sigma 公司) 将步骤一获得的免疫原 (重组 ST2 蛋白) 乳化,剂量为 30 μ g/ 只,得到乳化后的免疫原 ;用乳化后的免疫原免疫 4-6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司),腹部皮下注射每只小鼠 6 点,剂量为 60 μ g/ 只 ;每 14 天加强免疫一次。

[0072] 三、杂交瘤融合及筛选

[0073] 1、杂交瘤融合

[0074] 第 3 次加强免疫后 7 天以间接 ELISA (波长 450nm) 检测小鼠血清中抗免疫原的多抗效价。选取效价最高的小鼠以尾静脉注射冲击免疫,抗原用生理盐水混匀,剂量为 50 μ g/ 只,并取效价最高的小鼠的脾细胞悬液与小鼠骨髓瘤细胞 sp2/0 (ATCC) 以 5:1 比例混合,离心 1500rpm,5min。弃上清后离心管放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中,在 1 分钟内缓慢加入 1mL 的 PEG1500 (Roche 公司),并搅动细胞。在温水中静置 1min 后,加入 10mL 无血清的 IMDM (Sigma 公司),混匀,离心 1000rpm,5min。弃上清后,加入 10mL 血清 (PAA 公司) 小心的将细胞吹打起来,并加入 5mL 混合 10xHAT (Sigma 公司) 的胸腺细胞,混匀。再加入 25mL 含有 2.1% 硝基纤维素 (Sigma 公司) 的半固体培养基充分混匀,然后均匀的倒入 20 个细胞培养皿中。将细胞培养皿放入到湿盒中,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。融合后 7 天克隆细胞团大小密度适中,在解剖镜下,吸取圆、实、大的克隆团打入事先准备好培养基的 96 孔培养板中,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养。

[0075] 上述间接 ELISA (波长 450nm) 检测小鼠血清中抗免疫原的多抗效价的方法如下 :用重组 sST2 蛋白,2 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C 包被过夜 ;以 2% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h ;取小鼠尾部血,将血清从 200 倍开始 2 倍梯度稀释,空白对照 (blank) 为 PBS,阴性对照 (negative) 为阴性血清 200 倍稀释。均为 100 μ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 孵箱,1h ;后用洗液洗涤 3 次。加入 PBS 稀释 20000 倍的 HRP 酶标羊抗鼠 IgG 作为二抗,100 μ L/ 孔,37 $^{\circ}$ C 孵箱,1h ;取出后用洗液洗涤 3 次。每孔加入显色液 100 μ L,显色时间为 5min 左右。每孔加入 50 μ L 终止液 (2M H₂SO₄) 终止。双波长 (450,630) 测吸光值,记录保存数据,OD 值为最大值二分之一时的稀释倍数即为该抗体的效价。

[0076] 2、杂交瘤细胞株的筛选

[0077] 培养 3 天后,细胞量大约占底面积 2/3,取 100 μ l 上清用免疫原和合成多肽分别进行 ELISA 筛选。阳性克隆完全换液,加入 200 μ l 含饲养细胞和 1% HT (Sigma 公司) 的完全培养基。两天后进行第二次 ELISA 筛选,阳性克隆转入事先准备好培养基 (含饲养细胞

和 HT) 的 24 孔板培养。五天后取 100 μ l 上清进行第三次 ELISA 筛选, 阳性克隆逐次转入 6 孔板和细胞培养瓶扩大培养并冻存备用, 经过筛选编号为 67186-6 和 67186-15 的两株杂交瘤细胞株具有良好的结合活力和极高的特异性。

[0078] 3、抗体的可变区序列测定

[0079] 1、RNA 的提取

[0080] 采用 Trizol 法提取上述步骤 2 获得的编号为 67186-6 的杂交瘤细胞 (1×10^6 个) 和 67186-15 的杂交瘤细胞 (1×10^6 个) 的总 RNA。

[0081] 2、cDNA 的获得

[0082] 取 9 μ l 步骤 1 获得的总 RNA, 加入 2.5 μ l oligo (dT) 12-18 primer (10mM), 及 5 μ l dNTPs, 混合均匀后, 70 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟, 再置冰上 5 分钟。随后加入 5 μ l RT buffer (5X), 2.5 μ l DTT (0.1M) 及 1 μ l 逆转录酶, 42 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。70 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟以终止反应, 得到 cDNA。

[0083] 3、测序

[0084] 将上述步骤 2 获得的 cDNA 为模板, 采用下述引物进行 PCR 扩增, 在 50 μ l 反应体系中加入引物各 25pmol, 重链可变区和轻链可变区扩增用引物的序列按照沈倍奋主编的《重组抗体》(科学出版社, 2005 年出版) 一书中鼠单抗引物序列设计和合成。

[0085] 用于扩增重链可变区的引物如下, 其中 MHV. B1 直至 MHV. B12 的 11 条引物为上游引物, 可分别与重链下游引物 MHC. F 组合用于扩增重链可变区基因。

[0086] MHV. B1 :5' -GATGTGAAGCTTCAGGAGTC-3' ;

[0087] MHV. B2 :5' -CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC-3' ;

[0088] MHV. B3 :5' -CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC-3' ;

[0089] MHV. B4 :5' -AGGTTACTCTGAAAGAGTC-3' ;

[0090] MHV. B5 :5' -GAGGTCCAGCTGCAACAATCT-3' ;

[0091] MHV. B6 :5' -GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC-3' ;

[0092] MHV. B7 :5' -CAGGTCCAAGCTGCAGCAGCCT-3' ;

[0093] MHV. B8 :5' -GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC-3' ;

[0094] MHV. B9 :5' -GAGGTGAAGCTGGTGAATC-3' ;

[0095] MHV. B10 :5' -GATGTGAAGCTTGAAGTGTC-3' ;

[0096] MHV. B12 :5' -GAGGTGCAGCTGGAGGAGTC-3' ;

[0097] MHC. F :5' -GGCCAGTGGATAGTCAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC-3' 。

[0098] 用于扩增轻链可变区的引物如下, 其中 MKV. B1 直至 MKV. B10 的 10 条引物为上游引物, 可分别与轻链下游引物 MKC. F 组合用于扩增 Kappa 轻链的可变区基因。

[0099] MKV. B1 :5' -GATGTTTTGATGACCCAAACT-3' ;

[0100] MKV. B2 :5' -GATATTGTGATGACGCAGGCT-3' ;

[0101] MKV. B3 :5' -GATATTGTGATAACCCAG-3' ;

[0102] MKV. B4 :5' -GACATTGTGCTGACCCAATCT-3' ;

[0103] MKV. B5 :5' -GACATTGTGATGACCCAGTCT-3' ;

[0104] MKV. B6 :5' -GATATTGTGCTAACTCAGTCT-3' ;

[0105] MKV. B7 :5' -GATATCCAGATGACACAGACT-3' ;

[0106] MKV. B8 :5' -GACATCCAGCTGACTCAGTCT-3' ;

[0107] MKV. B9 :5' -CAAATTGTTCTCACCCAGTCT-3' ;

[0108] MKV. B10 :5' -GACATTCTGATGACCCAGTCT-3' ;

[0109] MKC. F :5' -GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'。

[0110] 其余 dNTPs 及缓冲液均按照常规加入,最后加入 cDNA 模板 1 μ L 和 1U 热启动 Taq DNA 聚合酶。设置 PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 40 秒,52 $^{\circ}$ C 40 秒,72 $^{\circ}$ C 40 秒,进行 20 至 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟,产物可置于 4 $^{\circ}$ C 备用或直接电泳。取 20 μ L PCR 产物进行电泳分析,在 1.5% 琼脂糖凝胶上分离切胶回收,将所得重链可变区和轻链可变区分别克隆至 pMD18T 质粒载体 (TaKaRa) 进行测序。

[0111] 测序结果显示,本发明的杂交瘤细胞株 67186-6 分泌的单克隆抗体的重链和轻链可变区的核苷酸序列分别如序列表中序列 3 和序列 4 所示,其对应的可变区的氨基酸序列分别如序列表中序列 5 和序列 6 所示;杂交瘤细胞株 67186-15 分泌的单克隆抗体的重链和轻链可变区的核苷酸序列分别如序列表中序列 7 和序列 8 所示,其对应的可变区氨基酸序列分别如序列表中序列 9 和序列 10 所示。

[0112] 四、sST2 抗体的制备和纯化

[0113] 分别用步骤三筛选获得的编号为 67186-6 的杂交瘤细胞株和编号为 67186-15 的杂交瘤细胞株制备抗体,分别得到 sST2 捕获抗体和 sST2 检测抗体。具体步骤如下:

[0114] 1、腹水制备

[0115] 取健康 BALB/c 雌性小鼠,每只腹腔注射液体石蜡油 0.5mL ;1 ~ 2 周后每只腹腔注射 1ml 浓度为 5×10^5 个 /ml 的杂交瘤细胞株细胞悬液 ;7 天后开始收集腹水。

[0116] 2、sST2 抗体的纯化

[0117] 将收集的腹水于 4 $^{\circ}$ C 离心 4000rpm,10min,小心吸出中间的腹水收集于离心管中,4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。用 HiTrapProtein A FF (GE 公司) 亲和层析法按说明书从腹水中纯化 sST2 抗体。并用 SDS-PAGE 胶鉴定 sST2 抗体纯度,Bradford 法测定 sST2 抗体浓度。纯化的 sST2 抗体保存于 -20 $^{\circ}$ C,用于下述试剂盒的组装。

[0118] 实施例 2、一种检测 sST2 含量的双抗夹心 ELISA 试剂盒及其检测方法

[0119] 一、试剂盒的组成

[0120] 本发明的双抗夹心 ELISA 试剂盒包括包被于酶标板的实施例 1 制备的 sST2 捕获抗体、经辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 sST2 检测抗体以及 sST2 蛋白标准品 (R&D system, DST200)、样本稀释液、封闭液、显色液及终止液构成。

[0121] 经辣根过氧化物酶标记的 sST2 检测抗体的制备方法:

[0122] 1、称取 6mg HRP (辣根过氧化物酶,购自于 Sigma) 溶于 1mL 三蒸水中,每 mL 溶液逐滴缓慢加入 0.30mL 新配的 0.1M NaIO_4 溶液,4 $^{\circ}$ C 避光搅拌 35min,活化 HRP,颜色由棕色变为绿色。上述溶液装入透析袋中,用 0.01M, pH 为 4.4 的醋酸钠缓冲液,4 $^{\circ}$ C 透析过夜,颜色变为棕绿色。观察是否有沉淀,并分析沉淀性状,10000r/min,4 $^{\circ}$ C,10min,离心去除沉淀。得到透析后的 HRP。

[0123] 2、将实施 1 筛选出的 sST2 检测抗体用 0.05M, pH 为 9.5 的碳酸缓冲液 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。观察是否有沉淀,并分析沉淀性状,10000r/min,4 $^{\circ}$ C,10min,离心去除沉淀,得到透析后的抗体。

[0124] 3、将透析后的HRP加入0.16M乙二醇(每mg酶加0.1mL),4℃避光搅拌1h,然后加入透析后的抗体;两者混匀后用0.05M,pH为9.5的碳酸缓冲液4℃透析过夜,得到HRP-抗体混合液。

[0125] 4、向HRP-抗体混合液中加入0.1mL的5mg/mL NaBH₄溶液(每mg酶加0.1-0.2mg的NaBH₄),4℃避光搅拌3h。逐滴加入等体积饱和硫酸氨,4℃避光搅拌2h。4℃,10000rpm离心10min,弃上清。PBS溶解沉淀,得到经辣根过氧化物酶标记的sST2检测抗体。

[0126] 二、sST2含量的检测方法

[0127] 1、以pH为9.6的Na₂CO₃、NaHCO₃包被sST2捕获抗体(2μg/mL),作为捕获抗体,在96孔酶标板中每孔加入100μL,4℃包被12h,使其与酶标板紧密结合。

[0128] 2、包被后用洗涤液(PBST)洗板6次,每孔再加300μL的2%牛血清蛋白作为封闭液,37℃温育3h。封闭结束在酶标板孔内加入待测蛋白提取物溶液(以待测样品与PBS缓冲液的体积比为稀释倍数)和sST2蛋白标准品(每孔5μg/mL,以1:5梯度稀释到10pg/mL,每个样品做三个重复),100μL/孔,37℃孵育1h。

[0129] 3、接着加入辣根过氧化物酶标记的抗sST2检测抗体,100μL/孔,37℃孵育1h。

[0130] 4、最后在形成的复合物中加入显色剂TMB溶液,每孔100μL,室温孵育3min,在辣根过氧化物酶作用下,显色剂发生颜色变化,加入2M, H₂SO₄, 50μL/孔终止反应,根据OD₄₅₀值大小判定样品中sST2蛋白的存在及浓度大小。

[0131] 结果判定:以sST2蛋白标准品的浓度取对数做横坐标,OD₄₅₀值为纵坐标制作标准曲线(图2),得到计算公式,根据待测样品的OD值计算待测样品中的sST2含量。

[0132] 实施例3、sST2免疫胶体金试纸条的制备

[0133] 1、胶体金的制备

[0134] 用5毫升微量移液器取3毫升1%四氯金酸于500毫升的圆底烧瓶中,量取297毫升的超纯水亦加入烧瓶中,配制成0.01%的四氯金酸反应液,充分搅拌混匀,置于磁力加热搅拌器上,加热煮沸。充分搅拌后快速加入3毫升柠檬酸铵溶液,氯金酸水溶液由金色变为灰色,约2分钟后变成紫红色,继续煮沸5分钟后停止加热,待胶体金冷却后,分装于玻璃试剂瓶中。

[0135] 2、免疫金的制备

[0136] 根据需标记的胶体金的总量计算出所需要的待标记蛋白质质量。用0.1M的碳酸钾或0.1M盐酸调节胶体金的pH值为7.8,在电磁搅拌器下,将实施例1筛选出的sST2检测抗体逐滴加入胶体金溶液中,抗体和胶体金反应约5分钟后,在磁力搅拌器下加入终浓度为1%的牛血清蛋白(BSA),10分钟后,加入终浓度为0.3%的PEG2000。继续反应1小时。将标记好的胶体金溶液于2000rpm,4℃离心10分钟,取上清在10000r/min,4℃离心30分钟,弃去上清,将沉淀以原体积的0.01MPBS pH8.2溶解,重复离心三次,最后一次小心弃去上清,沉淀溶于原体积的1/50PBS(内含1%BSA)中,得到免疫金。

[0137] 3、试纸条制备

[0138] 将实施例1制备的sST2捕获抗体装入蛋白微量喷膜系统,在硝酸纤维素膜上按1μL/cm的量划线,得到检测线;将羊抗鼠IgG抗体(Sigma,M4280)包被液装入蛋白微量喷膜系统,在硝酸纤维素膜上按1μL/cm的量划线,得到质控线,37℃包被2小时,37℃封闭30分钟,包被后的硝酸纤维素膜放入真空干燥器内干燥20小时,密闭保存待用。

[0139] 制备结合垫时,调整免疫金的 OD 值为 30,将免疫金加入机器左边的塑料容器内,将免疫金喷涂在玻璃纤维结合垫上,喷完结合垫后,置于 37℃烘箱中干燥 30 分钟,将标记后玻璃纤维放入真空干燥器内干燥 20 小时,取出密闭保存待用。

[0140] 制备检测卡时,在塑料底板的中央撕去覆于上面的胶带,贴上包被好抗体的硝酸纤维素膜,撕去塑料板中央下面的宽为 5 毫米的胶带,贴上喷上胶体金的结合垫,结合垫前端的硝酸纤维素膜重叠 2 毫米,撕去塑料板最下面宽为 20 毫米的胶带,贴上经过预处理的样品垫,样品垫的前端与结合垫重叠约 5 毫米,撕去塑料底板的最上端约为 25 毫米的胶带,贴上吸水纸,吸水纸与硝酸纤维素膜重叠约 2 毫米,组装完成后,将各配件压实,将组装好的大卡用切条机切成 3 毫米宽的试纸条,装入测试卡中,得到 sST2 免疫胶体金试纸条(图 1)。

[0141] 实施例 4、sST2 在检测主动脉瘤主动脉夹层中的应用

[0142] 一、用上述实施例 2 的方法和试剂盒对总共 207 例主动脉瘤和主动脉夹层患者及 615 例健康人群的血浆样本(血浆样本来源于北京安贞医院,患者知情)中 sST2 的含量进行检测。207 例主动脉瘤和主动脉夹层患者信息参见表 1,其中,21 名为慢性主动脉夹层动脉瘤患者;113 名为急性主动脉瘤无夹层患者;73 名为急性主动脉夹层动脉瘤患者。

[0143] 检测结果如表 1 和图 3 所示:健康人群的中值为 4.99ng/mL;慢性主动脉夹层动脉瘤患者的中值为 7.77ng/mL;急性主动脉瘤无夹层患者的中值为 11.84ng/mL;急性主动脉夹层动脉瘤患者的中值为 18.87ng/mL。和健康人群 sST2 含量 (ng/mL) 的中值相比,慢性主动脉夹层动脉瘤患者、急性主动脉瘤无夹层患者和急性主动脉夹层动脉瘤患者的 sST2 含量 (ng/mL) 明显增加。说明 sST2 可以成为供主动脉瘤和 / 或主动脉夹层的诊断(阳性或阴性诊断)、病程和进展的监测以及 CHF 治疗的监测与控制水平之用的生物标志物候选物。

[0144] 表 1、检测人群血浆 sST2 的含量分布情况

[0145]

| | 健康人群 | 慢性主动脉夹层动脉瘤患者 | 急性主动脉瘤无夹层患者 | 急性主动脉夹层动脉瘤患者 |
|--------------|------|--------------|-------------|--------------|
| 患者数 | 615 | 21 | 73 | 113 |
| 中值 | 4.99 | 7.77 | 11.84 | 18.87 |
| 均值 | 5.08 | 12.12 | 34.64 | 48.63 |
| 低于95% CI 的均值 | 4.87 | 7.03 | 25.58 | 35.34 |
| 高于95% CI 的均值 | 5.28 | 17.19 | 43.70 | 61.92 |

[0146] CI = 置信区间

[0147] 二、用实施例 2 所述的方法和试剂盒检测 9 例主动脉夹层动脉瘤患者手术治疗后 4-108 小时血浆(血浆样本来源于北京安贞医院,患者知情,患者手术前均患有主动脉夹层动脉瘤)中 sST2 的含量,通过检测术后患者血浆中的 sST2 的含量来判断患者的死亡风险状态大小。

[0148] 结果如图 4 所示:术后 24 小时后,2、3、9 例患者的 sST2 含量均超过阈值 (64ng/mL),判断其具有病死的高风险状态;1、4、5、6、7、8 例患者的 sST2 含量均低于阈值 (5ng/mL),判断其死亡风险非常低。结果表明:待测患者术后的 sST2 含量与主动脉夹层动脉瘤患者的术后的死亡风险状态大小相关,通过检测待测患者术后的 sST2 含量可以判定患者的

死亡风险状态。

[0149] 以上试验结果说明主动脉瘤和夹层发病急慢性及严重程度与血浆中 sST2 含量有密切的相关性,这使得 sST2 成为供主动脉瘤和夹层的诊断(阳性或阴性诊断)、病程和进展的监测以及 CHF 治疗的监测与控制水平之用的生物标志物候选物。

[0001]

序列表

<110> 北京市心肺血管疾病研究所
 <120> 一种主动脉瘤和/或主动脉夹层患者血液中可溶性 ST2 的检测试剂盒及检测方法
 <160> 10

<210> 1
 <211> 987bp
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1

```

atggggtttt ggatettage aattetcaca attctcatgt attccacage agcaaagttt      60
agtaaacaat catggggcct ggaaaatgag gcttaattg taagatgtcc tagacaagga      120
aaacctagtt acaccgtgga ttggtattac tcacaaacaa acaaaagtat tcccactcag      180
gaaagaaatc gtgtgtttgc ctcaggccaa cttctgaagt ttctaccage tgcagttgct      240
gattctggta ttatacctg tattgtcaga agteccacat tcaataggac tggatatgcg      300
aatgtcacea tatataaaaa acaatcagat tgcaatgttc cagattattt gatgtattea      360
acagtatctg gatcagaaaa aaattccaaa atttattgtc ctaccattga cctctacaac      420
tggacagcac ctcttgagtg gtttaagaat tgtcaggctc ttcaaggatc aaggtaacagg      480
gcgcacaaat catttttggc catfgataat gtgatgactg aggacgcagg tgattacacc      540
tgtaaattta tacacaatga aaatggagcc aattatagtg tgacggcgac caggtecttc      600
acggtcgaagg atgagcaagg cttttctctg tttccagtaa teggagcccc tgcacaaaat      660
gaaataaagg aagtggaaat tggaaaaaac gcaaacctaa ctfgctctgc ttgttttggga      720
aaaggcactc agttcttggc tgccgtctctg tggcagctta atggaacaaa aattacagac      780
tttgggtgaac caagaattca acaagaggaa gggeaaaate aaagtttcag caatgggctg      840
gcttgtctag acatggtttt aagaatagct gacgtgaagg aagaggattt attgetgcag      900
taeactgtc  tggccctgaa tttgcatggc ttgagaaggc acaccgtaag actaagtagg      960
aaaaatccaa gtaaggagtg tttctga.                                         987

```

<210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 2

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

[0002]

<210> 3
 <211> 351bp
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 3
 gaggtgcaac tgcaggagtc tggacctgag ctgaagaagc etggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca agttctggga taaactggat gaggcaggct 120
 ccaggaaagg ttttaagtg gatgggetgg ataaacactt acaactggagt accaacatat 180
 gctgatgact teaagggacg gtttgccctc tctttgaaa catctgccag cactgectat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acgggtacat atttctgtgc acgattacce 300
 tactatggta tggactactg gggteaagga acctcagtea cegtctctc a 351

<210> 4
 <211> 339bp
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 4
 gatatcttgc tgacceaac tccactctcc ctgctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagaaacg gaaacaccta tttacactgg 120
 tacctgcagg agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt 180
 tctggggctc cagacaggtt cagtggcagt ggatecagga cagatttcae actcaagate 240
 agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tattctgtct ctcaaagtgc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser

[0004]

20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Lys Val Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Glu Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Ala His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 7

<211> 348bp

<212> DNA

[0005]

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

```
gaggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggcaagac ctgggacttc agtgaggttg      60
tcctgcaaga cttctggcta cacctttact aattactgga tgcagtggat aaaacagggg      120
cctggacagg gtctggaatg gattggggct attatcctg gagatgggtg tactacctac      180
actcagaagt tcaggggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac      240
atgcaactea gcagcttggc atctgaggac tetgegtct attactgtgc aagageggac      300
ttcggagctt tttactgggg ccaagggact ctggctactg tctctgca      348
```

<210> 8

<211> 336bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

```
gataatcttgc tgaccctaac tccactctct ttgtcggtta ccattggaca accagctctc      60
atctcttgcga agtcaggtea gagectctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg      120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctggtgtc taaactggac      180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagattcac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtae acattttcct      300
cagacgttgc gtggaggcac caagctggaa atcaaa      336
```

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 9

```
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1           5           10           15
Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Trp Met Gln Trp Ile Lys Gln Gly Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Val Thr Thr Tyr Thr Gln Lys Phe
           50           55           60
```

[0006]

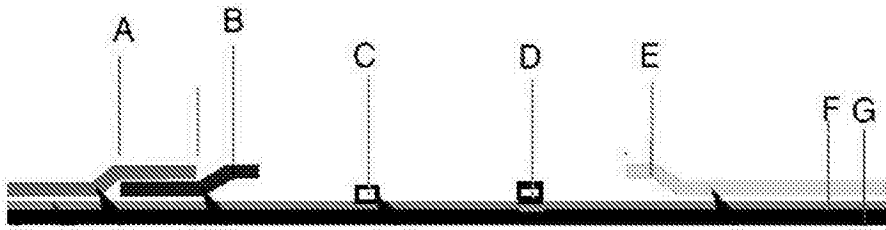


图 1

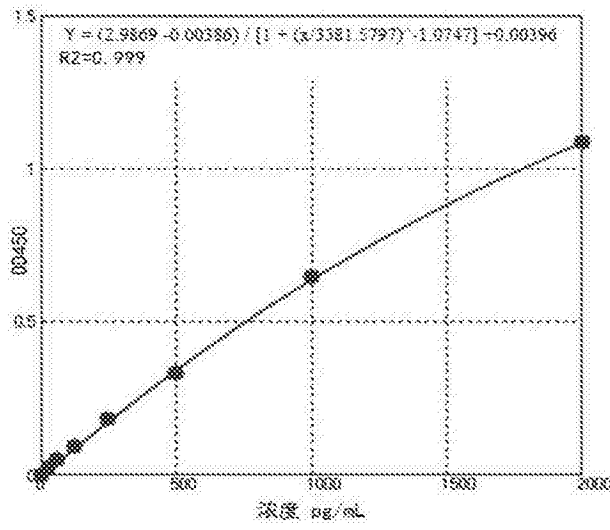


图 2

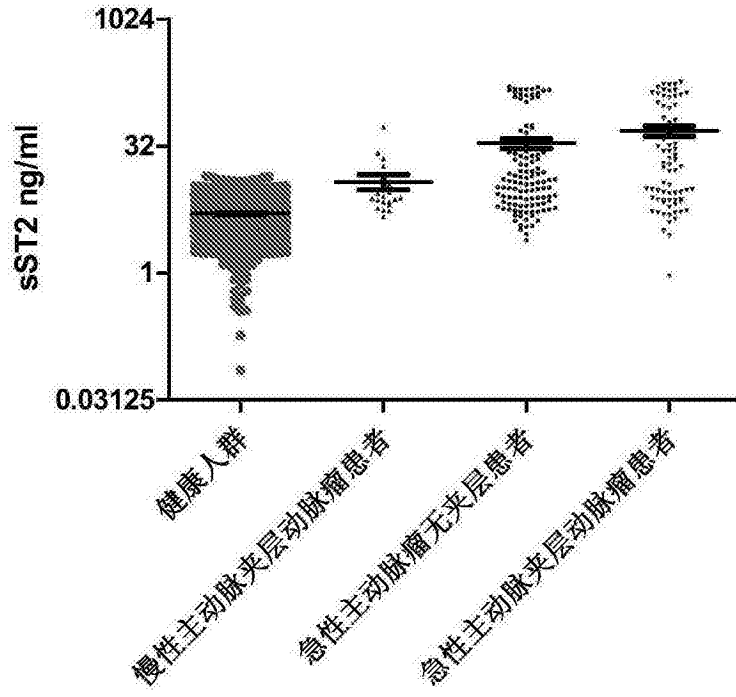


图 3

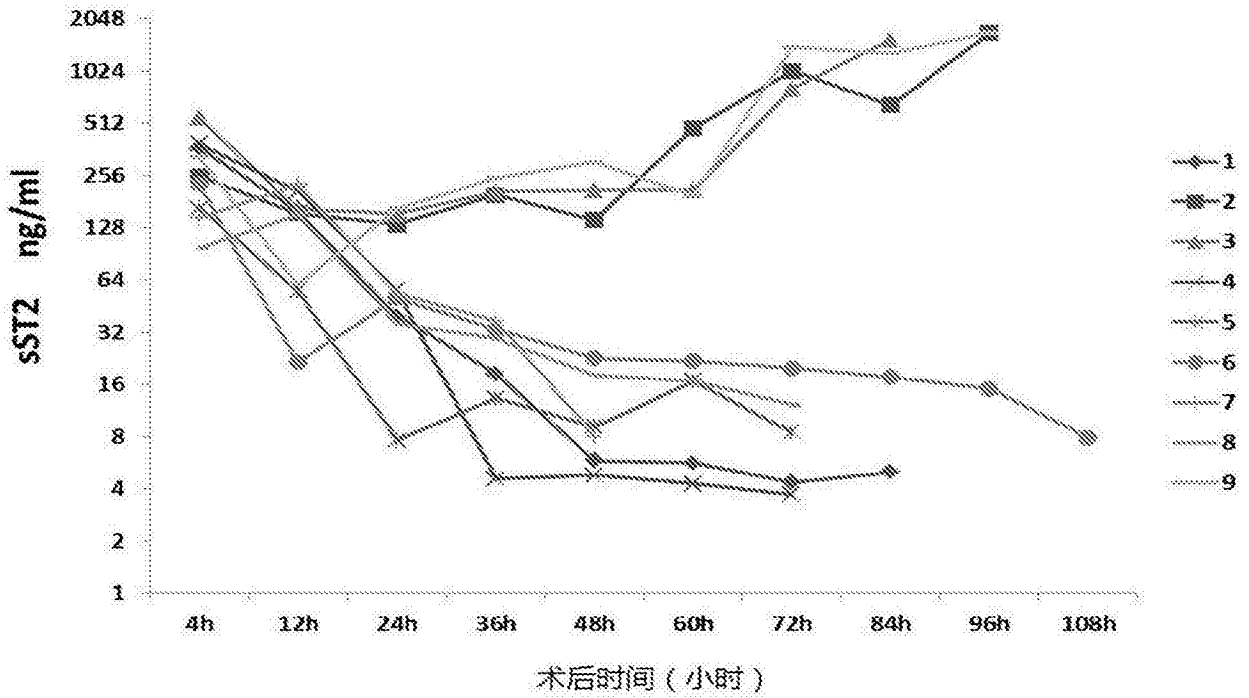


图 4

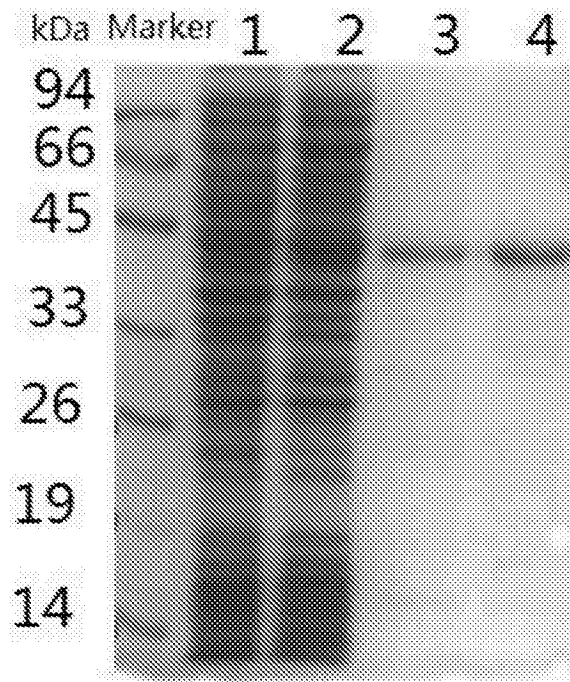


图 5

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种主动脉瘤和/或主动脉夹层患者血液中可溶性ST2的检测试剂盒及检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN105259353A | 公开(公告)日 | 2016-01-20 |
| 申请号 | CN201510665932.2 | 申请日 | 2015-10-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京市心肺血管疾病研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 北京市心肺血管疾病研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 北京市心肺血管疾病研究所 | | |
| [标]发明人 | 杜杰 王媛 檀鑫 | | |
| 发明人 | 杜杰 王媛 檀鑫 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/574 G01N33/535 C07K16/28 | | |
| CPC分类号 | C07K16/2866 G01N33/535 G01N33/57484 G01N33/6893 G01N2333/7155 G01N2800/329 | | |
| 代理人(译) | 关畅 白艳 | | |
| 其他公开文献 | CN105259353B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种主动脉瘤和/或主动脉夹层患者血液中可溶性ST2的检测试剂盒及检测方法。本发明利用一对识别sST2不同表位的抗体，组装得到了双抗体夹心ELISA和免疫胶体金试纸条，实现对可溶性sST2的定量和定性检测。通过试验证明：本发明的ELISA试剂盒和胶体金试纸条对人主动脉瘤标志物-人可溶性ST2蛋白具有较高的特异性和灵敏度，操作简单，可用于科研及临床中主动脉瘤和主动脉夹层等疾病的检测，起到辅助诊断、指导治疗、预后判断的作用。

| | 健康人群 | 慢性主动脉夹层动脉瘤患者 | 急性主动脉瘤无夹层患者 | 急性主动脉夹层动脉瘤患者 |
|--------------|------|--------------|-------------|--------------|
| 患者数 | 615 | 21 | 73 | 113 |
| 中值 | 4.99 | 7.77 | 11.84 | 18.87 |
| 均值 | 5.08 | 12.12 | 34.64 | 48.63 |
| 低于95% CI 的均值 | 4.87 | 7.03 | 25.58 | 35.34 |
| 高于95% CI 的均值 | 5.28 | 17.19 | 43.70 | 61.92 |