



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105259353 B

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201510665932.2

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2015.10.15

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105259353 A

CN 102830234 A, 2012.12.19, 权利要求1-11, 说明书第0009-0017段.

CN 204514934 U, 2015.07.29, 说明书第0021-0031段.

(43)申请公布日 2016.01.20

(73)专利权人 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

CN 103487586 A, 2014.01.01, 权利要求1-10.

CN 103926406 A, 2014.07.16, 说明书第0008-0017, 0029段.

(72)发明人 杜杰 王媛 檀鑫

CN 103154027 A, 2013.06.12, 权利要求32-34, 说明书第0156-0164段.

(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

CN 103796669 A, 2014.05.14, 全文.

US 2015268251 A1, 2015.09.24, 全文.

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

审查员 张绚

权利要求书2页 说明书9页

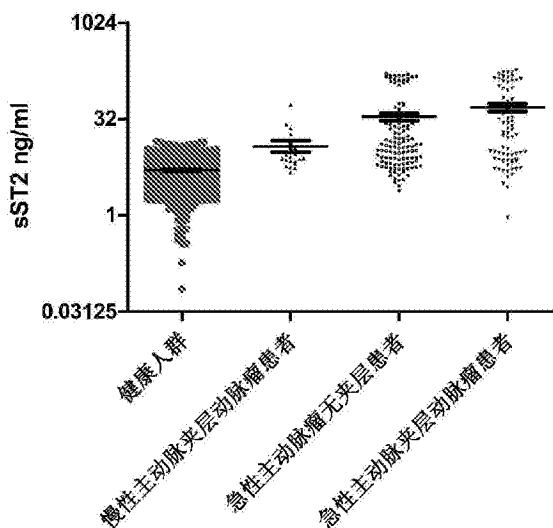
序列表6页 附图2页

(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)所示的任意一种:

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3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。

5. 根据权利要求3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. 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;

所述可溶性ST2蛋白抗体为可溶性ST2蛋白单克隆抗体;

所述可溶性ST2蛋白的单克隆抗体,其为如下1)或2):

1)所述的可溶性ST2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ST2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)所述的可溶性ST2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ST2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。

7. 一种检测待测样品中是否含有可溶性ST2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;

所述可溶性ST2蛋白抗体为可溶性ST2蛋白单克隆抗体;

所述可溶性ST2蛋白的单克隆抗体,其为如下1)或2):

1)所述的可溶性ST2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ST2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)所述的可溶性ST2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ST2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。

8. 一种可溶性ST2蛋白的单克隆抗体,其为如下1)或2):

1)所述的可溶性ST2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ST2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)所述的可溶性ST2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ST2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。

9.根据权利要求6所述的酶联免疫试剂盒或权利要求7所述的胶体金试纸条或权利要求8所述的单克隆抗体,其特征在于: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1L1RL1,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- $\kappa$ 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1L-33,心肌细胞和纤维原细胞受到机械牵张后,ST2和1L-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 $\beta$ 、1L-6、1L-8及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumour necrosis factor- $\alpha$ )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 $\mu$ L):上游引物ST2-F和下游引物ST2-R各3 $\mu$ L(5 $\mu$ mol/L)、10 $\times$ PCR buffer 3 $\mu$ L、2mM的dNTP 3 $\mu$ L、cDNA 1 $\mu$ L(约1 $\mu$ g)、1U热启动DNA聚合酶EZ-Taq 0.2 $\mu$ L(自北京华大蛋白质研发中心有限公司),补充双蒸水至30 $\mu$ 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Nco1和Xho1(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Nco1和Xho1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Nco1和Xho1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 $\mu$ g/ml的卡那霉素,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD<sub>600</sub>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 $\mu$ 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Ba1b/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 $\mu$ 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 $\mu$ 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1MDM(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%CO<sub>2</sub>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%CO<sub>2</sub>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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L,显色时间为5min左右。每孔加入50 $\mu$ L终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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( $1 \times 10^6$ 个)和67186-15的杂交瘤细胞( $1 \times 10^6$ 个)的总RNA。

[0081] 2、cDNA的获得

[0082] 取9 $\mu$ L步骤1获得的总RNA,加入2.5 $\mu$ L oligo(dT)12-18primer(10mM),及5 $\mu$ 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 $\mu$ L RT buffer(5X),2.5 $\mu$ L DTT(0.1M)及1 $\mu$ 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 $\mu$ 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'-GAGGTGAAGCTGGTGGAAATC-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 $\mu$ L和1U热启动Taq DNA

聚合酶。设置PCR扩增程序为94℃40秒,52℃40秒,72℃40秒,进行20至25个循环,最后72℃延伸3分钟,产物可置于4℃备用或直接电泳。取20μL 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 $5 \times 10^5$ 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℃离心4000rpm,10min,小心吸出中间的腹水收集于离心管中,4℃或-20℃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℃,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<sub>4</sub>溶液,4℃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℃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℃,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℃透析过夜。观察是否有沉淀,并分析沉淀性状,10000r/min,4℃,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 NaBH<sub>4</sub>溶液(每mg酶加0.1-0.2mg的NaBH<sub>4</sub>),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 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 包被sST2捕获抗体( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ),作为捕获抗体,在96孔酶标板中每孔加入 $100\mu\text{L}$ , $4^\circ\text{C}$ 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 $300\mu\text{L}$ 的2%牛血清蛋白作为封闭液, $37^\circ\text{C}$ 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 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ,以1:5梯度稀释到 $10\text{pg}/\text{mL}$ ,每个样品做三个重复), $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37^\circ\text{C}$ 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, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37^\circ\text{C}$ 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 $100\mu\text{L}$ ,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 $2\text{M}$ , $\text{H}_2\text{SO}_4$ , $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应,根据 $\text{OD}_{450}$ 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, $\text{OD}_{450}$ 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, $4^\circ\text{C}$ 离心10分钟,取上清在10000r/min, $4^\circ\text{C}$ 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 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ 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 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ 的量划线,得到质控线, $37^\circ\text{C}$ 包被2小时, $37^\circ\text{C}$ 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 $37^\circ\text{C}$ 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。



Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu  
 20 25 30  
 Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg  
 50 55 60  
 Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg  
 85 90 95  
 Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn  
 100 105 110  
 Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn  
 115 120 125  
 Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro  
 130 135 140  
 Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala  
 165 170 175  
 [0002] Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr  
 180 185 190  
 Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe  
 195 200 205  
 Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu  
 210 215 220  
 Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr  
 245 250 255  
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln  
 260 265 270  
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg  
 275 280 285  
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu  
 290 295 300  
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg  
 305 310 315 320  
 Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe  
 325

[0003]

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 351bp

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

```

gaggtgcaac tgcaggagtc tggacctgag ctgaagaage ctggagagac agtcaagatc      60
tcttgcgaagg cttctgggta taccttcaaca agttctggga taaactggat gaggcaggct    120
ccaggaaagg ttttaagtg gatgggctgg ataaacactt acaactggagt accaacatat    180
gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa catctgceag cactgcctat    240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acgggtacat atttctgtgc acgattacc    300
tactatggta tggactactg gggteaagga acctcagtea cegtctecte a                351

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 339bp

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

```

gatattcttgc tgaccctaac tccactctcc ctgctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgc gatctagtc gagcttcta cacagaaacg gaaacaccta tttacctgg      120
tacctgcagg agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtct caaccgattt    180
tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttca acatcaagatc    240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtgc acatgttccg    300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 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

```

	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>

[0004]

<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





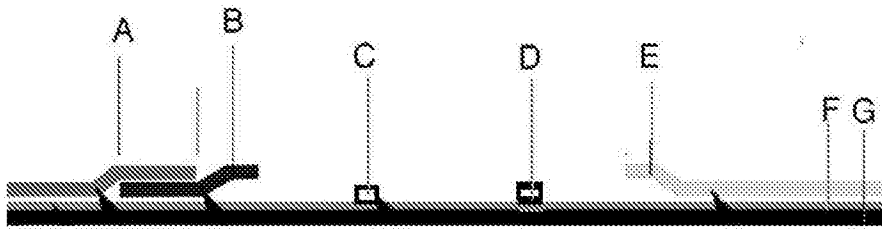


图1

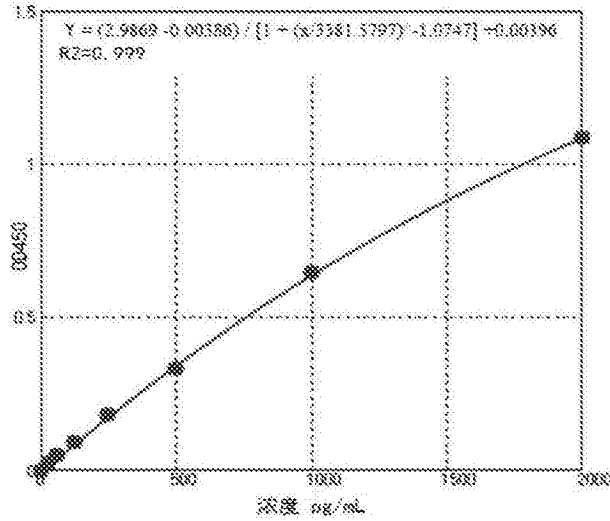


图2

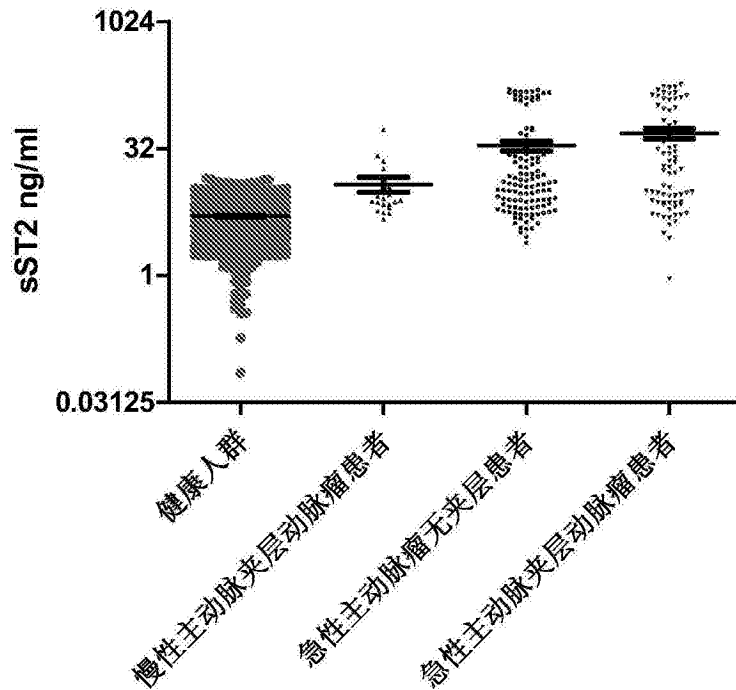


图3

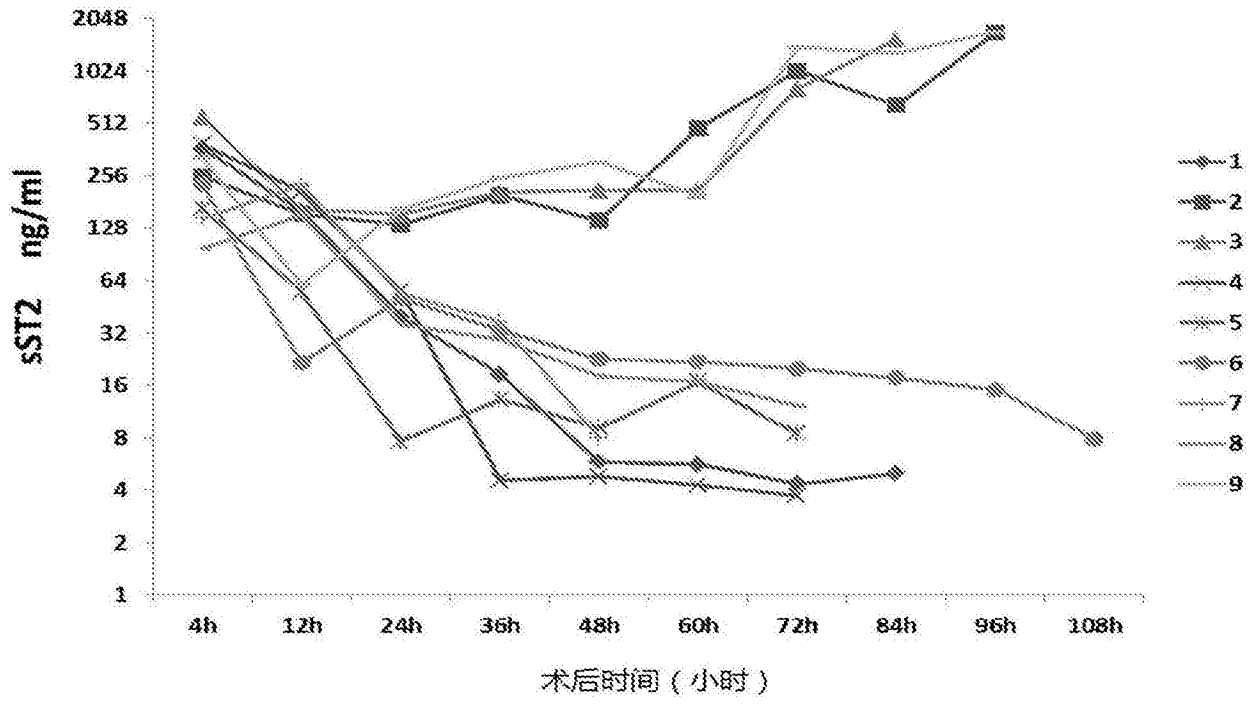


图4

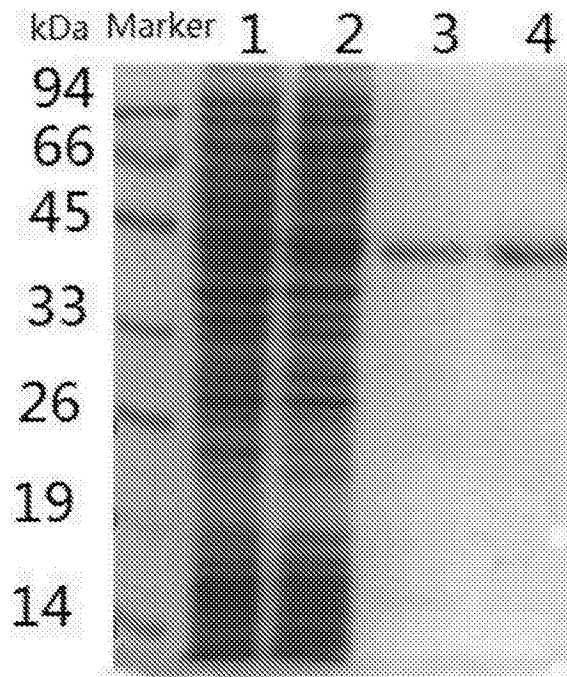


图5

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	<a href="#">CN105259353B</a>	公开(公告)日	2017-03-22
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	C07K16/28 G01N33/68 G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	C07K16/2866 G01N33/535 G01N33/57484 G01N33/6893 G01N2333/7155 G01N2800/329		
代理人(译)	关畅 白艳		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN105259353A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 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