

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680042575.3

[51] Int. Cl.

C07K 2/00 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 11 月 19 日

[11] 公开号 CN 101309929A

[22] 申请日 2006.9.15

[21] 申请号 200680042575.3

[30] 优先权

[32] 2005. 9. 15 [33] US [31] 60/717,683

[86] 国际申请 PCT/AU2006/001358 2006.9.15

[87] 国际公布 WO2007/030890 英 2007.3.22

[85] 进入国家阶段日期 2008.5.15

[71] 申请人 创源生物科技(武汉)有限公司

地址 中国湖北省武汉市东湖高新技术开发区武大科技园2层7号

[72] 发明人 维克多·沃罗埃利克

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限公司

代理人 唐正玉

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

胎膜早破的一个标志物

[57] 摘要

本发明涉及羊水特异性多肽以及一种检测羊膜破裂的方法;准确地说,本发明就是关于一种胎膜早破(Prolonged Rupture of Membrane,以下简称PROM)的标志物;通过4-15%梯度变性SDS-PAGE法(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离测定,这种标志物由分子量约为75kDa、20kDa和50kDa的三条多肽组成。

1、PROM 的标志物，这种标志物本质上包括在还原条件下根据 4-15% 梯度 SDS-PAGE 法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽。

2. 根据权要求 1 所述的标志物，其中，这一标志物从怀孕的受试人的羊水中分离。

3. 根据权要求 1 所述的标志物，其中，这一标志物本质上包括与从羊水中分离的分子量为 75 (+4)kDa 的多肽。

4. 根据产妇样本（从孕妇体内获取）检测 PROM 的方法，这种方法包括根据 4-15% 梯度变性 SDS-PAGE 法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定产妇样本中是否含有分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中，这一标志物本质上包括分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的蛋白质。分子量为 75 (+4) kDa 的多肽最佳。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法，其中，产妇样本可以从子宫颈分泌物、阴道分泌物、尿液、血浆和血清的组合中选择。

7. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的方法，其中，产妇样本是子宫颈分泌物。

8. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的方法，其中，产妇样本可以用药签或其它的收集装置从受试人体内获取，也可以用适当的缓冲器通过冲洗来获取。

9. 诊断孕妇 PROM 的方法，这种方法包括在还原条件下根据 4-15% 梯度 SDS-PAGE 法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定产妇样本中是否含有分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽。

10. 检测孕妇 PROM 的诊断试剂盒，这种试剂盒包括在还原条件下根据 4-15% 梯度 SDS-PAGE 法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的阳性控制多肽，而这些多肽已经从孕妇体内获取的羊水中分离。

11. 抗体，它可以选择性地与多肽（这种多肽与从孕妇体内获取的羊水中分离）相结合，这种抗体与 4-15% 梯度变性 SDS-PAGE 法（聚丙烯酰胺凝胶电泳）测定的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽反应。

12. 对从孕妇体内获取的羊水中分离的多肽具特异性的抗体，这种抗体与根据 4-15% 梯度变性 SDS-PAGE 法(聚丙烯酰胺凝胶电泳)测定的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽组合进行筛选。

13. 测定哺乳动物 PROM 的方法，这种方法包括以下几个步骤：1) 从怀孕的哺乳动物体内获取产妇样本；2) 用一种或多种抗羊水中发现的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 多肽标志物的抗体与样本反应，以形成抗体和多肽标志物的复合物；3) 检测抗体--标志物的复合物。

14. 用于检测从怀孕的受试人体内提取的产妇样本中是否存在分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 多肽标志物的试剂盒，包括：1) 获取一定数量的产妇样本的方式；2) 粘附一个或多个捕捉抗体的介质，这些抗体可以与在还原条件下根据 4-15% 梯度 SDS-PAGE 法来测定的产妇样本中存在的分子量约为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽形成复合物，多肽标志物是在羊水中发现的，是 PROM 的先兆；3) 多肽标志物和捕捉抗体混合物的测定。

15. 竞争酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒，用来确定怀孕的受试人 PROM 的状况，其中包括对出现在羊水中分子量为 75kDa、20 kDa 和 50 kDa 的多肽 (PROM 的标志物) 特异性的抗体。

胎膜早破的一个标志物

技术领域

本发明涉及羊水特异性多肽以及一种检测羊膜破裂的方法。准确地说,本发明就是关于一种胎膜早破(Prolonged Rupture of Membrane,以下简称PROM)的标志物,通过4-15%梯度变性SDS-PAGE法(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离测定,这种标志物由分子量约为75kDa、20 kDa和50 kDa的三条多肽组成。

背景技术

在宫缩之前诊断羊膜是否破裂是现代妇产科学所面临的一个重要临床难题,因为到目前为止,还没有一种临床检测方法能够准确判定阴道中是否存在羊水(Gregg, (1992), Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 19: p241; Malee, (1992), Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 19: p309; Zlatnic, (1992), Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 19: p353; Davidson, (1991), Clin. Obstet. Gynecol., 34: p715)。

据统计,约6.6%-13.9%的孕妇在分娩前胎膜发生破裂。其中,70%-90%在破膜后的48小时内发生自然分娩(Sacks et al., (1967), Am. J. Obstet. Gynecol. 83: p930; Eastman et al., (1961), Williams Obstetrics, Appleton-Century-Crofts, New York pp.432; Lebherz et al., (1963), Am. J. Obstet. Gynecol., 87: p218)。羊膜在分娩前破裂直接或间接导致了4.5-14%的早产儿以及由其造成的胎儿死亡和畸形发病。(Friedman et al., (1969), Am. J. Obstet. Gynecol. 104: p544); Gibbs et al., (1982), Obstet. Gynecol. 60: p671)。

期待疗法有利于新生儿胚胎器官体系的快速发育。但是,也可能造成胎儿和母体感染。因此,应该同时兼顾考虑两者的利弊。据报道,破膜到出生之间的潜育期从12小时至77天不等;破膜之后约有41%在一个星期内自然分娩(Dowd et al., (1992), Aust. NZ. J. Obstet. Gynaecol. 32: p120)。期待治疗可能造成孕期延长,但是由于胎儿在母体内发育时间延长,提高了新生儿出生时的潜在存活率。但是,羊水的持续漏失导致羊水过少,有可能造成胎儿肺部发育不良和肺部感染(Levine et al., (1991), Nurse Res., 40: p36; Mercer supra; Morales et al., (1993), Am. J. Obstet. Gynecol. 168: p503; Harstad et al., (1993), Am. J. Perinatol. 10: p8)。

分别对109例和111例妊娠病例进行研究,发现在第34周或第34周之前过早破膜、娩前破膜或胎膜早破所造成胎儿的死亡率为16.8-26.6%,畸形发病率为68.8%(Airede, (1992), Ann. Trop. Paediatr. 12: p283; Dale et al., (1989), Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 30: p257)。发生这种情况常常伴随下列并发症:早产,绒毛膜羊膜炎或新生儿败血症,出生时心肺功能衰竭,呼吸窘迫综合症,脑室内出血。

通常,下列因素可能造成感染风险的增加。妊娠年龄、破膜到分娩的时间、母亲的社会经济状况等。24小时潜育期(破膜与分娩之间的期限)后,围产期死亡率将增加至预

期死亡率的两倍, 48小时后, 死亡率将增加至四倍, 14天后, 死亡率将增至十倍 (Overstreet et al., (1966), Am. J. Obstet. Gynecol., 96: p1037; Major, *supra*)。同时, 在这些病例中, 母体发病率和死亡率将随孕育期的延长而增加 (Neuhaus, 1956 and Eastman, *supra*)。

长期以来, 妇产科临床急需一种简单精准的PROM诊断方法。一般情况下, 对PROM的诊断主要依据阴道中突然释放并持续渗漏的羊水。然而, 在很多情况下, PROM并不是很明显, 因此很难辨认羊水是否渗漏, 特别是有尿液和阴道子宫颈内的粘液干扰的情况下。

当前, 诊断PROM主要采用一些无创性检查方法, 主要包括:

- 鉴定胎儿上皮细胞或者胎毛 (Phillip et al., (1929), Zentrabl. Gynakol. 26: p1618); riedman et al., (1969), Am. J. Obstet. Gynecol. 104: p544);
- 判断阴道分泌物的pH值(二硝基苯基偶氮萘酚二磺酸钠试纸)(Minkoff et al., (1987), Am. J. Obstet. Gynecol. 150: p965; International Patent Application No. WO02/054949; US Patent No. 4,357,945)
- 干燥后, 羊水的结晶类型特征判别 (Gorodeski et al., (1982), J. Perinat. Med. 10: p286; Reece et al., (1984), Obstet. Gynecol. 64: p248; Brookes et al., (1986), Aust. NZ. J. obstet. Gynecol. 26: p160);
- 羊水加热试验 (Dalkalitsis et al., (1989), Z. Geburtshilfe. Perinatol. 193: p183)
- ;
- 阴道分泌物中二胺氧化酶活性的测定 (Gahl et al., (1982), Obstet. Gynaecol. 60: p297);
- 阴道分泌物中泌乳素的测定 (Huber et al., (1983), Br. J. Obstet. Gynaecol. 90: p1183);
- 阴道分泌物中甲胎蛋白的测定 (Garite, (1990), Am. J. Obstet. Gynecol. 151: p1001);
- 阴道分泌物中胰岛素样生长因子结合蛋白1的测定 (Rutanen et al., (1993), Clin. Chim. Acta. 214: p73; Woltmann et al., (1995), Z. Geburtshilfe. Neonat. 199: p243; Darj et al., (1998), Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 77: p295; Ragosch et al., (1996), Geburtshilfe Fravenheilkd. 56: p291; US Patent No. 5,554,504; US Patent No. 5,597,700);
- 阴道分泌物中的人胎盘生乳素的测定 (Huber et al., (1983), Br. J. Obstet. Gynaecol. 90: p1183);
- 比色分析 (溴百里酚蓝) (国标专利号: 2353357);
- 抑制素B的测定 (国际专利应用号: WO98/59245);
- 阴道分泌物中胎儿纤连蛋白的测定 (Rutanen *supra*; Ragosch *supra*; Trovo et al., (1998), Minerva Ginecol. 50: p519);
- PROM蛋白的测定 (国际专利应用号: WO94/21687)。

然而, 以上所有的检查方法不能准确判断胎膜是否提前破裂。由于受其他物质的干扰, 以前采用的标志物检测方法所得到的结果往往是假阳性的; 从某种程度上说, 这些干扰物质非常普遍地存在于阴道中, 例如尿液、胎粪、孕妇血清和血液。在多数情况下, 血液

是造成假阳性的一个重要原因,因为在不同个体的母体血液标本中也可能存在不同水平的被检标志物 (Huber J et al., 1981, Br J Obstet Gynaecol, 57:547; Phocas et al., 1989, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 31:133; Broe et al., 1992, Clin Chem., 38:784; Hellemans et al., 1992, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 43:173)。

本发明人发明了一种精确简单的检测羊水是否提前释放的无创性检测方法。

发明内容摘要

本发明人已确定了羊水所独有的特异性多肽,而这种多肽在孕妇血清中含量极低,也可能根本不存在。

本发明人已发现,用SDS-PAGE法来测定标志物时,最主要的多肽的分子量为75 (+4) kDa,还有其他较小的两种多肽分别为20 (+5) kDa、50 (+5) kDa。这些多肽在正常孕妇的血清中没有被发现,而只存在于羊水中。

本发明人进一步确定:这些多肽(尤其是分子量为75 (+4) kDa的多肽)在PROM诊断中非常有用。更深入的研究结果表明:这些多肽是PROM的标志。

第一,本发明提供了PROM的一个标志物,通过4-15%的梯度变性SDS-PAGE法(聚丙烯酰胺凝胶电泳)测定,这种标志物主要由75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽组成。

这种标志物是从孕妇的羊水中分离出来的;更确切地说,这种标志物就是从羊水中分离出来的一种75 (+4) kDa的多肽。

第二,本发明提供了一种检测孕妇PROM标志物的方法,这种检测方法可以确定标本中是否含有用4-15%梯度变性SDS-PAGE法测定的75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽。

具体来说,这些作为标志物的多肽基本上由约为75kDa、20 kDa和50 kDa的蛋白质组成。尤其是分子量为75 (+4) kDa的多肽,最有应用价值。

本发明检测的标本可以是孕妇阴道分泌物,也可以是类似于分泌物的组织或与分泌物发生作用的组织,这样一来,可以在怀孕期间不同的生物位置选取不同状态的分泌物作为标本,例如子宫颈分泌物或阴道分泌物、尿液、血浆和血清,以子宫颈分泌物最好。

液体标本最适用于本发明,专业技术人员可以方便地从孕妇体内获取。例如,产妇样本可以用药签或其它的收集装置直接从受试人体内获取,也可以用适当的缓冲器通过冲洗来获取。

第三,本发明提供了一种诊断孕妇PROM的方法,这种方法包括根据4-15% 梯度变性SDS-PAGE法来测定产妇样本中是否存在75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽。

第四,本发明为孕妇PROM的检测提供了一种诊断试剂盒,这种试剂盒包括根据4-15% 变性梯度SDS-PAGE法来测定的产妇样本中存在75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽阳性对照,这些多肽是从孕妇体内提取的羊水中分离的。

第五,本发明提供了一种或几种抗体,这些抗体可以特异性地结合根据4-15% 梯度变性SDS-PAGE测定的孕妇羊水中75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽。

第六,本发明提供了一种或几种抗体,这些抗体是针对4-15% 梯度变性SDS-PAGE法测定的孕妇羊水中75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽的特异性抗体。

第七,本发明提供了一种检测哺乳动物PROM的方法,方法流程如下: 1) 从怀孕的

哺乳动物体内提取样本；2)用75kDa、20 kDa和50 kDa多肽的一种或多种特异性抗体与样本反应，形成抗体-多肽标志物的复合物；3)检测抗体-标志物的复合物。

第八，本发明提供了一种诊断试剂盒，可以检测从怀孕受试人体内提取的产妇样本中是否存在75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽，这种试剂盒由以下几部分组成：1)从孕妇体内取样的方法说明；2)吸附能与孕妇羊水中75 kDa, 20 kDa 和50 kDa特异性标志物多肽结合的一种或多种捕获抗体的介质；3)多肽和抗体复合物的检测分析体系。

第九，本发明提供了一种竞争性酶联免疫吸附测定(EIA)试剂盒，用来确定受试孕妇是否发生PROM，这种试剂盒含PROM的标志物(羊水中75kDa、20 kDa和50 kDa的多肽)的特异性抗体。

附图说明

图1：免疫印迹和蛋白质染色：样本经4-20%梯度变性凝胶电泳分离后，转印至硝酸纤维素膜，用单抗12D2/C6孵育，之后与ALP结合物反应，用NCIB显色观察结果。泳道1和3分别表示经不同孔径过滤柱过滤并经单位点酶免疫检测(以下简称1-site EIA检测)的AF1片段(AF1a & AF1b)；泳道2为经DEAE处理的AF1；4号泳道为预染蛋白质分子量标准；5号泳道为本发明中经免疫亲和纯化的PROM特异蛋白质。

图2：间接1-Site EIA法检测15例随机羊水(+ve样本)(剖腹产)和15例随机血清(-ve样本)(正常孕妇的妊娠中期和晚期)与单克隆抗体12D2/C6的生物反应活性。

图3：间接1-Site EIA法检测10例随机羊水(剖腹产)和20份不同孕龄(妊娠中期和晚期各10例)随机血清与单克隆抗体12D2/C6的生物反应活性。

图4：间接双位点(夹心)酶免疫测定法(以下简称双位点 EIA法)检测一组随机羊水(剖腹产期间所获取)和孕妇血清(怀孕中期和晚期)与单克隆抗体12D2/C6的反应活性。

图5：双位点EIA法测定0.8% N-乙酰基L-半胱氨酸预处理对12个批次的羊水标本中AMNI-蛋白质含量的影响。

图6：双位点 EIA法测定0.8%N-乙酰基L-半胱氨酸孵育处理对宫颈粘液等8个阴道分泌物样本中AMNI-蛋白质含量的影响。

图7：双位点EIA法测定破膜前后阴道分泌物样本中AMNI-蛋白质的含量水平。

具体发明内容

在详细阐述本发明之前，首先应声明：本发明所用到的细胞培养技术、血清、培养基或方法不仅仅限于文中所提及的例子，也可能有所变化；另外，本文所运用的术语只是为了描述本发明的方便，具有一定限制性，仅限于在本专利中使用。

上下文中提及的所有出版物、专利和专利申请将作为本专利申请参考文献的一部分。引用文献是为了描述本发明所涉及的已经报道的、且本发明可能应用的使用手册和试剂的方便，本文内容不能理解为不允许本发明早于被引用发明公布。

本发明涉及细胞生物学、细胞培养、分子生物学、重组DNA和免疫学等生物学常规技术，这些技术都是本行业内的常规技术，有特殊说明除外。这些技术在所引文献中都有

所描述,例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)。

从广义上来说,本发明为PROM提供了一种标志物。本文中的术语“标志物”指PROM的标志物。PROM标志物可以是本文所述的存在于孕妇羊水水中的多肽标志物或多种多肽组合的任何标志物。一种有效的PROM标志物主要指本文所述的一种分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa和50 (+5) kDa的多肽或多种多肽组合;但是,这种标志物也可以指编码多肽的mRNA或DNA分子。正如本文其它地方所论述的,分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa和50 (+5) kDa的多肽可以从羊水分离出来;这些多肽可以根据4-15% 梯度变性 SDS-PAGE法来测定。

狭义上说,PROM标志物是根据4-15% 梯度变性 SDS-PAGE法所测定的分子量为75 (+4) kDa的多肽。或者说,PROM标志物包括在4-15% 梯度变性 SDS-PAGE法所测定的分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa和50 (+5) kDa的多肽混合物,上述混合物可以从羊水分离得到。

发明人证实:本发明中的PROM标志物,尤其是75 kDa多肽是羊水所特有的,不存在或极少存在于产妇血清中。因此,PROM标志物可以用来评估是否发生了PROM。基本上,本发明人可断言,如果本发明中的一种或多种多肽标志物出现在母体样本中,那么就很可能有羊水存在,提示PROM已经发生。

本文中运用的术语“产妇样本”指从孕妇体内提取的任何样本。

孕妇标本对实施本发明至关重要,其来源并不限于一种,存在于孕妇阴道的液体、或一些与这种液体相临近或在妊娠期特定阶段与该液体发生生化反应的组织中的液体。这些样品也可以说是宫颈中的液体比如宫颈液、阴道液、尿液、血浆,血清等。通常所说的孕妇标本是指存在于孕妇宫颈中的液体。

液体样品标本最好是用传统的方法从孕妇体内获得。比如说我们可以通过用棉拭子或其它合适的工具获取的液样,也可通过用适当的缓冲液洗涤宫颈所获得洗涤液的标本。

从孕妇体内取样后可直接用于检测,也可对样品进行预处理,比如说:过滤、浓缩和pH 值调节,然后再进行检测。具体来讲,母体样品需经过黏液溶解剂预处理以溶解宫颈液。常用的黏液溶解剂有:N-乙酰-L-半胱氨酸衍生物、二硫苏糖醇、凝溶胶蛋白、高渗盐溶液、粘蛋白酶或蛋白水解酶。最好的黏液溶解剂是0.08%~8%N-乙酰半胱氨酸,配制方法:先用PBS溶解,再以1M NaOH 和100mM pH8.4的四硼酸钠调节pH到7.0。经过处理后,便可对样品中的PROM标志物进行检测和定量。

对本发明中的标志物进行检测或量化可以运用免疫学或分子生物学检测等相关检测

方法。当PROM标志物是多肽时,可以采用诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫检测法(RIA)、荧光抗体技术、SDS-PAGE、免疫印迹或免疫结构染色法等免疫学方法进行检测。

当PROM标志物是多聚核苷酸时,例如mRNA,则采用诸如Northern blot技术、斑点杂交法或聚合酶连锁反应(PCR)等分子生物学检测方法进行检测;主要采用作为标志物的多聚核苷酸或其片段(作为引物或探针)来检测或量化mRNA。

一方面,可以根据Laemmli, Nature, 227: 680-685, 1970.,运用浓度为4-20%的聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)法来进行检测或量化。选择4-15%聚丙烯酰胺梯度凝胶配合4%积层凝胶,效果最好。SDS-PAGE凝胶电泳结束后,用商品化的蛋白染料(如,0.25%考马斯亮蓝R250(CBB)溶解于50%甲醇-10%醋酸中)染色,即可显示多肽条带。根据已知的蛋白质分子量标准评估多肽的大小,来确定是否存在本发明中75(+4) kDa、20(+5) kDa 和50(+5) kDa的多肽。

另一方面,也可以通过免疫印迹或ELISA法来定性或定量检测本发明中分子量为75(+4) kDa、20(+5) kDa 和50(+5) kDa的多肽。所有的检测方法和用到的技术都需要用到针对本发明中75(+4) kDa、20(+5) kDa 和/或50(+5) kDa PROM 多肽的抗体。通过应用PROM多肽或其片段的抗体,我们可以对PROM标志物进行定性和定量检测。

本发明中,不论是单克隆抗体还是多克隆抗体,凡是与75(+4) kDa、20(+5) kDa 和50(+5) kDa的多肽标志物相结合的,对本发明的方法和试剂盒都至关重要;抗体的制备参照本发明中的方法。

为了制备多克隆抗体,选取全长多肽或包含分子量为75(+4) kDa、20(+5) kDa和50(+5) kDa的部分多肽作为哺乳动物的免疫原。这些多肽本身或者与合适的载体(例如,牛血清白蛋白、血蓝蛋白或牛甲状腺球蛋白)藕联后可以用作抗原。为了提高抗原的免疫反应效率,可以使用弗氏完全佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)。小鼠、大鼠、兔子、山羊或仓鼠等都是常用的免疫动物。生产多克隆抗体的一种经典方法可以见Lane et al.(抗体:实验手册,第二版(1989)(冷泉港实验室出版社))。简单地说,第一次免疫后,间隔1-2个周,根据抗原性质不同,对免疫动物进行3-10次的免疫即可。

比较合理的抗原免疫剂量为每只动物每次50-100ug。应用多肽作为抗原时,多肽首先要与适当载体通过共价结合到合适的载体上。作为抗原的多肽可以通过基因工程法或多肽合成仪来制备。免疫后3-7天,采血,用EIA法测定血清对抗原的免疫反应,见Igaku-Shoin Ltd.(1976),抗体:实验手册,第二版(1989)(冷泉港实验室出版社)。然后,定期从被免疫动物采血检测,当抗体效价到达足够高的水平,此时,可以用该血清制备多克隆抗体。

多克隆抗体的分离和纯化可以通过色谱方法完成(如离心分离、硫酸铵盐析、辛酸沉降(见抗体:实验手册,第二版(1989)(冷泉港实验室出版社)、DEAE-琼脂糖凝胶柱、阴离子交换柱、蛋白质A柱或G-柱或凝胶过滤器柱等)。

当被免疫动物产生的特异性多克隆抗体的滴度达到一定水平时,就可以用来制备针对本发明中75(+4) kDa、20(+5) kDa和50(+5) kDa多肽的单克隆抗体。操作过程如下:于无菌状态下取被免疫动物的脾脏和淋巴结,通过细胞融合技术将致敏的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞进行融合形成杂交瘤细胞。所用的骨髓瘤细胞建系于小鼠和大鼠。细胞融合方法参照已

知的方法, 如Kohler and Milstein (1975) (Nature, 256, 495-497)

抗原 (75(+4) kDa, 20(+5) kDa 和/或50 (+5) kDa多肽的全长或部分片断))) 免疫大鼠3到7天后, 抗体滴度达到足够水平时, 用大剂量抗原对大鼠进行最后一次加强免疫, 加强免疫后3天, 取脾来制备脾细胞悬液: 将取出的脾脏碾碎并悬浮在MEM 培养液(Nissui Pharmaceutical Co. Ltd)中, 然后1,200 rpm离心沉淀5分钟, 沉淀经Tris氯化铵 (pH 7.65) 缓冲液处理1-2分钟去红细胞, 再用MEM 培养液洗脾细胞三次, 即可作融合细胞使用。

为建立杂交瘤细胞系, 还需要小鼠或大鼠的骨髓瘤细胞。我们通常所用的小鼠骨髓瘤细胞是由BALB/c小鼠 (8-氮鸟嘌呤抗性小鼠) 分离得到的, 如: P3-X63Ag8-U1 (以下简称为P3-U1) (《微生物免疫专题》, 81, 1 (1978)), SP2/0-Ag14 (以下简称为SP-2) (《自然》, 276, 269 (1978))。P3-X63-Ag8653(以下简称为653) (《免疫学杂志》, 123, 1548 (1979)) 或P3-X63-Ag8 (以下简称为X63) (《自然》, 256, 495 (1975))。在含8-氮鸟嘌呤的培养基 (RPMI1640培养基含15g/ml 的8-氮鸟嘌呤, 1.5mM谷氨酸盐, 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇, 10g/ml庆大霉素和10%的胎牛血清 (FCS)) 中对这些细胞株进行传代培养, 培养3到4天后即可用于融合。每次融合取 2×10^7 个或更多的细胞。

用MEM培养液或PBS (即磷酸盐缓冲液) (每升PBS含1.83g磷酸二氢钠、0.21g磷酸氢二钾、7.65g氯化钠, pH7.2) 将杂交瘤细胞和骨髓瘤细胞混合并洗涤, 脾细胞与骨髓瘤细胞的数量之比为1:5 - 1:10, 1,200 rpm离心沉淀5分钟, 弃上清, 将沉淀放在37°C水浴中, 按每108个脾细胞0.2- 1ml的PEG溶液 (含2g PEG-1000、2ml MEM培养液中、0.7mlDMSO) 的比例, 吸取PEG溶液边混匀边加入, 1分钟内加完。然后每1至2分钟加入1-2毫升MEM培养液稀释PEG, 直至溶液终体积为50ml; 将溶液900rpm离心5分钟, 弃上清, 沉淀缓慢溶解于100 ml HAT培养液 (含 10^{-4} M次黄嘌呤、 1.5×10^{-5} M胸腺嘧啶核苷及 4×10^{-7} M氨基蝶呤) 中, 接种96孔培养板, 每孔100ul, 置于37°C、5% CO₂ 中培养7 至14 天。

根据《抗体》(实验操作手册 (1989年第二版) (Cold Spring Harbor Laboratory出版)) , 从杂交瘤细胞分泌的多种抗体中, 可筛选出与26.6 KD多肽特异性反应的抗体。

以上所述的用抗体检测PROM多肽或其中部分肽段的多种方法中, 直接或间接涉及到结合酶, 荧光物质, 放射性同位素及乳胶。例如, 用ELISA或化学发光法检测HRP、ALP, FITC法检测发光氨或GFP (绿色荧光蛋白) 等荧光标记物, RIA法检测¹²⁵I等标记的放射性同位素, 以及乳胶凝集法检测结合的乳胶颗粒。还可以用Western blot或免疫组化染色法, 通过这些方法, 我们可以定量检测75(+4) kDa, 20(+5) kDa 和/或50 (+5) kDa链的多肽或其部分片断。

免疫检测中所用的抗体通常被固定在固相载体介质上, 被捕获的多肽再与标记的二抗结合而被检测。任何能吸附抗体且为专业人员所熟知的物质都可以作为固相载体。比如微量板、硝酸纤维膜、珠子、圆盘、玻璃纤维、以及乳胶、聚苯乙烯、聚氯乙烯等塑料。还可以应用磁性粒子和纤维光学传感器(U.S. Pat. No. 5,359,681)。

上文所述的“固相”是指用吸附等物理方法固定, 或根据抗体与载体上功能团以共价键结合的化学方法来固定。抗体可直接、或通过耦联来与固相载体上的功能团结合。可用物理方法进行固定, 如将适当稀释的抗体结合在载体上, 将微量板或膜在适当的缓冲液中放置适当的时间效果较好。反应时间不是一定的, 它取决于环境温度, 但通常在1小时至1天

之间。在聚苯乙烯、聚氯乙烯等微量板中每孔要加入10 ng 至1g进行包被, 抗体的最佳用量约为100 至200ng。用化学方法固定可通过载体与抗体功能团结合的方式完成, 例如, 载体与双效试剂(与羟基和氨基都发生反应)的反应。例如, 抗体可通过苯醌或醛基和与之配对的胺或活性羟基之间的缩合作用固定于含共价键聚合体的载体上。

固定了抗体的载体, 应对其进行封闭以防止其他多肽的非特异吸附, 常用的封闭剂有牛血清蛋白或吐温-20(Sigma-Aldrich)。固定了的抗体与样品反应, 即本发明的多肽与抗体结合。孕妇的样品应用PBS等适当缓冲液稀释。孕妇的样品与抗体的反应时间应当充分, 以利于从疑似PROM的孕妇样品中检测出本发明的多肽。当至少有95%的多肽结合, 而且结合与未结合的多肽相平衡时, 此时被认为是最适时间。

通过测定不同时间的结合水平, 可以很容易地确定最佳反应时间。用适当的缓冲液如PBS(含0.1%吐温-20)清洗固相载体来去除杂蛋白。标记的二抗与结合到固相载体上的多肽发生反应。二抗标记物通常是酶, 如辣根过氧化物酶或配基、辅助元素、抑制剂、色素、放射性同位元素、燃料或荧光物质。

抗体与标记物的结合采用常规方法。二抗与抗体-多肽复合物的反应需要一定的时间。最适反应时间可通过测定不同时间抗体的结合度来确定。未结合的二抗可用PBS(含0.1%吐温-20)等适当缓冲液清洗固相载体来去除。

检测二抗上的标记物的方法取决于所用标记物的种类。例如, 当用放射性同位素作标记物时, 可用计数仪或射线自动分析仪来检测。而当用色素、彩色物质或荧光物作标记物时, 可用分光光度计来检测。用酶时, 加入酶的底物并反应一定时间后, 再用分光光度计来检测结果。标记物与二抗通过抗生物素-生物素方法可直接或间接结合。当两者间接结合时, 抗生物素-生物素的一部分结合到二抗, 而另一部分则结合到标记物上。75(+4) kDa, 20(+5) kDa 和/或 50(+5) kDa多肽可用层析试纸检测或试纸条检测。

在用层析试纸检测时, 孕妇的样本被加入到固定有抗体的硝酸纤维膜上, 当样品经过抗体线时, 多肽与固定抗体结合并可形成免疫复合物。当含有标记物的二抗溶液经过免疫复合物线时, 就会与其结合。在试纸条测试中, 加入孕妇样本后, 样品跑过标记抗体的区域时, 多肽就会与标记抗体形成免疫复合物。

当孕妇样本经过包被有固相抗体的区域时, 多肽将与免疫复合物结合, 通过定量检测与固定的抗体结合的二抗就可判断孕妇是否发生PROM。

我们可以对本发明中多肽及编码该多肽的多聚核苷酸进行定性或定量检测。编码本发明中PROM标记物核苷酸也可以作为PROM的标志物。编码本发明中75(+4) kDa, 20(+5) kDa and/or 50(+5) kDa的多聚核苷酸可用标准的分子生物技术进行定性、定量检测。

要检测编码该75(+4) kDa、20(+5) kDa 和/或 50(+5) kDa 多肽的核苷酸, 可用探针或引物检测, 该探针或引物是指与编码多聚核苷酸和寡聚核苷酸序列有相同序列的核苷, 以及与该编码序列或其类似物序列互补性的核苷。这种类似物是指相似的一段寡核苷酸, 比如在该段寡核苷酸的磷酸二酯键被转变成磷酸硫酯键或N3'-P5'磷-氨键, 也可能在该段核糖和磷酸二酯键被转变成肽键, 也可能在该段寡核苷酸的尿嘧啶被替换成C-5丙酰尿嘧啶或C-5噻唑尿嘧啶, 还有可能在该段寡核苷酸中胞核嘧啶被替换成C-5丙酰胞核嘧啶或被修饰成吩恶嗪胞嘧啶, 又有可能DNA中的核糖被替换成2'-氧-丙基核糖或2'-甲氧基核糖或

其它。以上所述的多核苷酸是很有用处的，比如可以作基因标记物、或PCR的引物、或杂交的探针等。本发明与编码PROM标志物的部分或全部多核苷酸均有关联。

编码该75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和/或 50 (+5) kDa 多肽的核苷酸序列可以在体外进行分离、测序和在病毒中表达。为此，建立了来自人脑、心脏、骨骼肌、脾、肾、肝、小肠、胎盘组织的正常细胞及人类脐静脉细胞的cDNA 文库，该文库中包括编码本发明中的75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和/或 50 (+5) kDa多肽的多核苷酸。建立该cDNA库的有效方法见《分子克隆》(一本实验操作手册(1989年第二版)(Cold Spring Harbor Laboratory出版))中，以及《分子生物学》(1994版)(Wiley-Interscience)中《Current Protocols》有所阐述。当然也有商业试剂盒，比如cDNA 合成的SuperScript质粒系统和质粒克隆(Invitrogen)，或者ZAP-cDNA合成试剂盒(STRATAGENE)。当得到编码本发明中多肽的cDNA 包括DNA，就可以将其插入到合适的表达载体。将表达载体合适的宿主就可得到转化子。

可以被外源cDNA插入并且可在动物细胞表达的载体都称作表达载体。常用的载体包括:pcDNA1.1, pcDNA1.1/Amp, pCDM8, pREP (Invitrogen), pHM6, pHB6 (Roche Diagnostics), pKK223-3, pGEX (Amersham Pharmacia Bioteque), pET-3, pET-11, pBluescriptII SK(+), pBluescriptII SK(-) (STRATAGENE), pUC19, pTrxFus (Invitrogen), pUC118, pSTV28 (TaKaRa), pMAL-c2X (New England BioLabs), pAGE107 (Cytotechnology, 3 (2), 133-140 (1990).; JP1991-22979), pAGE103 (The Journal of Biochemistry, 101 (5), 1307-1310 (1987).), pAMo, pAMoA (The Journal of Biological Chemistry, 268 (30), 22782-22787 (1993).), pAMoPRSA (JP1993-336963) or pAS3-3 (JP1990-227075).

用专业方法可将连接有编码75 (+4) kDa, 20 (+5) kDa 和/或 50 (+5) kDa多肽链cDNA的表达载体导入最佳宿主细胞中进行表达。当宿主是动物细胞时，可用电穿孔法(Cytotechnology, (1990), 3, 133-140, 磷酸钙法或脂质体转染法(PNAS, USA, (1987), 84, 7413)转导。常用的动物细胞包括淋巴瘤细胞(非洲绿猴的肾原细胞, ATCC: CRL-1432), HCT-15 (人类大肠癌细胞, ATCC: CCL-225), COS-1 (非洲绿猴肾原细胞, ATCC: CRL-1650), COS-7 (非洲绿猴肾原细胞, ATCC: CRL-1651)和 CHO-K1 (中国仓鼠卵巢细胞, ATCC: CCL-61)。

本发明中的转化子用通用的方法培养。适合于转化宿主生长的液体培养基通常包括如下，例如，MEM培养基 (Science, 130, 432 (1959).), D-MEM 培养基 (Virology, 8, 396 (1959).), PRMI 1640 培养基 (The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967).), YT 培养基和BEM培养基当用动物细胞作为转化子宿主时，应向培养基中加入胎牛血清。培养基中最好加入一些的物质(促进转录活性从而增强一个表达载体中启动子的转录活性)。比如，异丙基-1-硫代- β -D-吡喃半乳糖苷(IPTG)。培养基还应该包含其它营养成分比如葡萄糖，氨基酸，蛋白胨，维生素，激素或血清，尤其是胎牛血清，氯化钙或氯化镁。

用于获取编码本发明的多肽链cDNA的方法还包括：多聚核苷酸序列的化学合成，或由提取的mRNA制备。例如，根据本发明中的分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa和50 (+5) kDa的多肽序列，可以确定多聚核苷酸的序列。然后，可以用DNA合成仪、通过硫代亚磷酸盐法(Shimazu公司)或者用392型DNA合成仪、通过亚磷酸胺法(Perkin Elmer公司)

来完成DNA的化学合成。cDNA可以在细胞中由mRNA来制备,以cDNA互补链mRNA为模板来合成编码75 (+4) kDa, 20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽链DNA。

当分离到编码75 (+4) kDa, 20 (+5) kDa 和/或50 (+5) kDa的多肽链的cDNA后,可以在体外表达进行。例如,多聚核苷酸的编码的多肽可以通过亚克隆DNA片段或全长度DNA在一个合适的表达载体的启动子的下游来表达。之后,转移表达载体到原核细胞,酵母,动物细胞,植物细胞或昆虫细胞中进行表达。合适的表达载体包括pBTrp2, pBTac1, pBTac2 (Roche Diagnostics), BluescriptII SK(+), pBluescriptII SK(-) (STRATAGENE), pSTV28, pUC118, pUC19 (TaKaRa), pKK233-2 (Pharmacia), pSE280, pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pTrxFus (Invitrogen), pGEMEX-1 (Promega), pQE-8 (QIAGEN), pGEX (Pharmacia), pETsystem (Novagen), pMAL-c2 (New England BioLabs), pKYP10 (JP1982-110600), pKYP200 (Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984).), pLSA1 (Agricultural Biological Chemistry, 53, 277 (1989).), pGEL1 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 82, 4306(1985).), pEG400 (Journal of Bacteriology, 172, 2392(1990).), pTrs30 (FERM BP-5407), pTrs32 (FERM BP-5408), pGHA2 (FERM BP-400), pGKA2 (FERM BP-6798), pPA1 (JP1987-233798) or pTerm2 (JP1990-22979, U.S. Pat. No. 4,686,191, U.S. Pat. No. 4,939,094, U.S. Pat. No. 5,160,735)。

任何可以在宿主(如大肠杆菌)体内表达的启动子都可以被本发明应用;例如,可以被大肠杆菌或噬菌体使用的有trp 启动子(Ptrp), lac启动子(Plac), PL启动子, PR启动子或PSE启动子, SPO1启动子, SPO2启动子或 penP启动子。

宿主细胞包括原核细胞埃希氏菌属、沙雷氏菌属、杆状菌属、短杆菌属、棒状杆菌属、微杆菌属或假单胞菌属的原核生物。比如,能使用的E. coli系列菌株有XL1-Blue, XL2-Blue, DH1 strain, MC1000, KY3276, W1485, JM109, HB101, No. 49, W3110, NY49, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, HMS174 (DE3) or HMS174 (DE3)。能被用作宿主细胞的酵母细胞包括酵母菌属的酿酒酵母、酵母菌属的裂变酵母、产乳糖酶酵母的K. lacti、丝孢酵母的丛生丝孢酵母、许旺酵母的S. alluvius或毕赤酵母的马斯德毕赤酵母。

任何可将表达载体导入宿主的方法在本发明中都被应用,例如,电转法,脂质体法或离子法。

当宿主是动物细胞时,能使用如下的表达载体: pcDNA1/Amp, pcDNA1, pCDM8, pREP4 (Invitrogen), pAGE 107 (Cytotechnology, 3, 133 (1990).), pAGE 103 (《生物化学杂志》, 101, 1307 (1987).), pAMo, pAMoA (pAMoPRSA) (《生物化学杂志》, 268, 22782-22787 (1993).) 或 pAS3-3 (JP1990-22705)。在宿主中可以表达的任何启动子都可以用作启动子,例如人巨细胞病毒(hCMV)中早期基因的启动子、SV40的早期启动子、Moloney Murine Leukemia病毒的长末端重复启动子、逆转录酶病毒的启动子、HSP启动子、SR [alpha]启动子或金属硫因启动子。人体CMV的IE基因增强子可以和启动子一起使用。作为宿主的动物细胞如下: HEK293 (人体胚胎肾原细胞, ATCC:CRL-1573)、 Namalwa (伯基特淋巴瘤, ATCC:CRL-1432)、 HeLa (子宫颈癌细胞, ATCC:CCL-2)、 HBT5637 (白血病细胞, JP1987-299)、 BALL-1 (白血病细胞) 或人体已确立的细胞的HCT-15 (大肠癌细胞)、 Sp2/0-Ag14 (小鼠骨髓瘤细胞, ATCC:CRL-1581) 或小鼠已确立的细胞的NSO (小鼠骨髓瘤

细胞)、COS-1 (非洲绿猴的肾原细胞(SV40变异细胞)、ATCC:CRL-1650)或COS-7 (非洲绿猴的肾原细胞(SV40变异细胞)、猴子已确立的细胞的ATCC:CRL-1651)、CHO-K1 (中国仓鼠卵巢细胞, ATCC:CCL-61)或仓鼠已确立的细胞的BHK-21 (C-13) (西西里岛仓鼠肾细胞, ATCC:CCL-10)、PC12 (肾上腺嗜铬细胞瘤, ATCC:CRL-1721) 或大鼠已确立的细胞的YB2/0 (大鼠骨髓瘤细胞, ATCC:CRL-1662)。

昆虫细胞也可作为宿主。昆虫细胞被用作宿主时,表达载体可以是pVL1392, pVL1393 或 pBlueBacIII (Invitrogen), 感染的病毒为Vaculovirus (传染甘蓝灯蛾昆虫)、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) Bac-N-Blue DNA。昆虫细胞的转化方法参考《杆状病毒表达载体: 实验手册》(1992) (W.H. Freeman and Company出版社)、《分子克隆法: 实验手册》第二版 (1989) (冷泉港实验室出版社)、《分子生物学实验室指南》(1994) (Wiley-Interscience期刊) 或《生物技术》, 6, 47 (1988)中描述的方法。含有目的基因和感染昆虫的杆状病毒DNA的转化子被加到培养基中, 重组子感染昆虫细胞, 病毒可表达靶基因, 从而在昆虫细胞中实现多肽的表达。

作为宿主的昆虫细胞可以是草地夜蛾 (甘蓝灯蛾) 细胞或粉纹夜蛾细胞。源于草地夜蛾的细胞包括Sf9 (ATCC: CRL-1711, 卵巢细胞)或Sf21 (卵巢细胞)。源于粉纹夜蛾的细胞株, 如High Five细胞或BTI-TN-5B1-4 (卵细胞, Invitrogen)

一旦转化株顺利生长, 则经过培养可以分离并纯化出本发明中分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽。分离/纯化多肽的一种有效方法在Sandler (《酶学方法》, 83, 458)中有所描述。如果表达75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽为分泌型的, 可以用离心法将培养液与细胞分离。如果多肽存在于宿主细胞中, 可以萃取细胞, 并用适当的缓冲液 (如STE溶液) 对细胞进行清洗, 然后用超声波、弗氏细胞压碎器、Manton Gaulin均质机或戴诺磨将其碾碎。然后, 将得到的材料用离心法或过滤法分离。

结合各种分离纯化方法, 可以将靶蛋白从原材料中分离/纯化。这些方法包括溶剂萃取法、硫酸铵盐析法、透析法、有机溶剂沉淀法、超滤法、凝胶过滤法、各种色谱分析法 (如DEAE琼脂糖层析、阴离子层析、运用DIAION HPA-75 (Mitsubishi化学公司)等赖氨酸的离子交换层析、运用S-琼脂糖 FF (Pharmacia)等的阳离子层析、疏水层析法、butylsepharose等亲水层析法)、各种电泳 (如SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或电子对焦电泳)。

可以运用抗75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和/或50 (+5) kDa多肽的抗体来亲和层析纯化表达的靶蛋白。当分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽生成, 且聚集成不可溶解的多肽时, 可以运用上述方法分离细胞, 然后采取适当的方法将其碾碎, 并收集含多肽的那一部分。收集的样本用类似表面活性剂的增溶剂来溶解, 如十二烷基磺酸钠 (SDS) 或十二烷基肌胺酸钠。当溶解液被透析或稀释到不含或几乎不含增溶剂, 且多肽保持常规立体结构时, 可以通过上述分离/纯化法获得纯化样本。

本发明提供了一种测定产妇样本 (从疑似发生PROM的哺乳动物体内获取) 中PROM标志物的方法。如果对PROM进行早期检测, 那么可以减少治疗的时间并降低临床严重并发症的风险。

简单床边诊断试剂盒的原理与常用早孕尿检试纸盒的原理相似, 因为PROM标志物的

快速检测可以让临床医生迅速地诊断是否发生了PROM,从而迅速地制定出有效的治疗措施和预防措施。该试剂盒可以作为预防孕妇发生PROM风险的标准护理产品。

本发明中的方法及试剂盒也提供了一种检测、监测PROM(含状况的变化)的方式。因此,本发明也为临床医生提供了一种用来监测PROM治疗后的病情进展(恶化、好转还是维持原状)的方法。一般情况下,临床医生应该制定在不同阶段收集和分析标本的方案。通常,间期地在规定的期限内收集样本。间期取样的时间间隔可以根据受试人的状况而定,可以从每24小时取一次样到连续取样,比较常见的是从每4小时取样一次到每30分钟取样一次。

运用此处说明的方法和技术,可以对产妇样本中75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽标志物进行定性和定量检测。根据产妇产地状况,临床医生可以选用定性方法或定量方法,或是两者都选。收集到的样本量一般小于1ml,多数不超过10ml。通常,样本量大约是100ul到1ml。

一旦已检测到PROM的迹象、且已开始实施干预和治疗,那么临床医生就可以采用本发明中的方法和试剂盒来监测治疗或干预的情况。通常情况下,当PROM治疗持续进行时,应检测并分析治疗后产妇的一个或多个样本,看是否存在PROM标志物。直到在治疗后产妇样本中未发现该标志物时,治疗才可以停止。因为治疗和干预改善了病情,所以样本中的多肽标志物也会相应减少。因此,治疗的效果可以用多肽标志物在样本中降低的程度来确定。

本方法运用的试剂盒一般包括吸附包被抗体的介质,当产妇样本与该介质相接触时,包被抗体与样本中26.6 kDa的多肽标志物相结合。该试剂盒附有取样方法,可以由某种工具(其表面含介质)组成,如小平匙或简单的棒状物。同时,获取方法还包括收集产妇样本的容器,此容器与血清接触的表面须含有缓冲液。一方面,检测多肽标志物与抗体复合体的方法包括ELISA,可以用来测定产妇样本中多肽标志物的浓度。另一方面,获取方式可以包括含盒子(内装缓冲液)的装置。

可以根据采取业内已知的、用于快速检测生物标本中其它蛋白质或配基的方法 and 试剂盒,来制定本发明中用于检测多肽标志的方法和试剂盒。适合本发明的方法和试剂盒的例子见1997年8月12日May等申请的美国专利5656503、2002年12月31日O'Conner等申请的美国专利6500627、1989年9月26日Smith-Lewis申请的美国专利4870007、1993年12月28日Ahlem等申请的美国专利5273743、1986年12月30日Valkers等申请的美国专利4632901。所有这些引用将作为本发明的参考资料。

本发明中的多肽标志物快速一步检测法可以缩短检测PROM的时间。这一典型方法包括以下步骤:首先从疑似发生PROM的产妇体内收集样本;接着将部分样本与一个或多个检测抗体相混合,以促进检测抗体与样本中的标志物相结合,这些抗体能与一个或多个分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽标志物特异性结合;然后将产妇样本与检测抗体的混合物,与能特异结合多肽标志物的固相包被抗体接触(此固相包被抗体与检测抗体没有交叉反应),从而使检测抗体和分子量为75 (+4) kDa、20 (+5) kDa 和50 (+5) kDa的多肽标志结合物结合,多肽标志物又和捕捉抗体结合在一起,三者连在一起形成可被检测的复合物;最后将未结合的检测抗体和样本从复合物中移除;就可以检测抗体复合

物了。可检测的抗体可以标记上业内已熟知的可检测标志物，如放射性标记、酶、生物染料、磁珠、生物素等。

为了进一步对本发明进行说明，可以参考以下非限定性例子。但是，应明确一点：以下例子只是说明性的，不应该以任何方式将其作为对本发明普遍性的限制。

例1：PROM标志物的鉴别和分离

首先，从剖腹产的孕妇体内收集羊水样本（20-975mL）。将样本经玻璃纤维过滤后依次分装2mL到无菌5mL离心管内。随后，将每份样本用于制备蛋白质的各种不同片断，以供在免疫实验和临床评估中使用。

随机抽取20份2mL羊水，并用于以下程序纯化：用亲和蓝胶（简称AGB [Biorad公司]）对整个羊水进行预处理，以尽可能清除内源白蛋白。纯化前首先要准备AGB，首先将其放入50ml离心管中用PBS进行清洗，并以2000 rpm的速度离心10分钟，弃上清液，然后往凝胶中注入等体积的新鲜缓冲液，进行充分搅拌，接着按如上方法进行离心操作。如此重复5次后，以1:1 [v/v]的比例将AGB加入到抗原池中，颠倒混匀4小时。然后以2000 rpm的速度将溶液离心20分钟，并将上清液收集到新的50mL无菌培养管中。根据国际专利号WO03/018634中所述，对收集到的上清液进行免疫层析。该层析柱包被有从正常孕妇血清中收集的抗体。

清除掉非结合组份后，针对不同组分运用适当pH值（pH值在7-7.5之间）（经pH试纸监测）的10M Tris来洗提出羊水中特异蛋白。经过SDS-PAGE鉴定，将可能含有羊水特异蛋白的那些组分集中并用带有两个不同分子量截留器的超滤离心管对其进行浓缩。用70%乙醇漂洗超滤离心管（分子量分别为300kDa 和100kDa），2,500 rpm离心10分钟用PBS对其进行清洗。将3.5mL的抗原注入到300kDa超滤离心管，2,500 rpm离心90分钟，重复这一程序，直到有一半滤液（约1.7-1.8mL）通过滤膜。接着将PBS加入到原样本池（还剩约1.7-1.8mL）中，2,500 rpm.离心90分钟。之后，再2500 rpm.离心45分钟，然后将含蛋白质组份（MW $\geq$ 300kDa）的上清液转移到无菌15mL的尖底管，并贴上标签“AF1”。

将300kD超滤离心管离心出来的滤液转移到100kD超滤离心管上，2500 rpm离心90分钟，然后将PBS注入到样本池中使容量达到3.5mL（初始体积）。随后，再2500 rpm离心120分钟。离心后，将上清液（“AF2”）和滤液（“AF3”）分装到无菌12mL离心管中。

对收集的3个组份（AF1、AF2和AF3）进行蛋白质浓度测量。每一组份取150-200 μ g与佐剂混合乳化后用于免疫实验。剩余的各组分经分装（每份约含抗原150-200 μ g）后储存于-20 $^{\circ}$ C，供随后的免疫加强使用。

运用12D2/C6免疫亲和柱，进一步对羊水AF1组分进行纯化，经过4-15% SDS-PAGE电泳发现在分子量75 (+4) kDa处有明显条带，且在20 (+5) kDa和50 (+5) kDa处有2个不明显条带，而经同样处理过的产妇血清中却发现这些条带。由此说明这些条带存在于羊水中，但在产妇血清中不存在。

例2：单克隆抗体的制备

从例1中取出已在MPL（1:10 v/v（SIGMA））中乳化的0.15-0.2mg的AF1、AF2和AF3

组份并注射到每只小鼠的皮下,对6只BALB/c小鼠进行初次免疫。激发免疫接种使用相同的方法分别采用0.15-0.2mg经MPL(1:10 v/v (SIGMA))处理过的羊水组份。在免疫接种的三周后进行初始激发,按规定后续激发为7-8天一次,持续6周。在初次免疫接种4周后,眼眶取血来监测抗体水平,之后每周监控一次,持续10周,然后通过间接单位点EIA来测试血清。

在间接单位点EIA实验中, pH值为7.2的Tris-HCL缓冲液稀释的羊水组份(0.2mg/mL), 两种不同羊水(阳性对照)和产妇血清(阴性对照)加入到AGB预处理的96孔微孔板[NUNC 96孔免疫板]的每个孔中, 每孔100 μ L, 并在室温(约25 $^{\circ}$ C)下孵育1小时。用PBS(低盐)/吐温(16g/L 氯化钠(BDH)、1.15g/L的Na₂HPO₄·2H₂O(BDH)、0.2g/L的KH₂PO₄(BDH)和0.2g/L的氯化钾[BDH](含0.5%的卵清蛋白)在室温下洗板3次, 然后用每孔200 μ L PBS(低盐)含0.5%白蛋白在室温封闭2小时。用PBS(低盐)/吐温洗板三次, 加入100 μ L的小鼠血清(用PBS(低盐)稀释成不同浓度)于每一个孔中; 用同样的方法设定空白对照100 μ L/孔, 但是使用的是稀释浓度相同的血清(从未免疫的BALB/c小鼠中采集)。室温下孵育1小时后, 用洗涤缓冲液洗板3次, 把过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG(亲和层析纯化)按1:1000的比例在PBS(低盐)/吐温中稀释后50 μ L/孔加入到孔中, 并在室温下再次孵育1小时。随后再进行4次洗板, 加入能够与0.003% (v/v)过氧化氢反应的100 μ L/孔的ABTS底物缓冲液(5mM柠檬酸(BDH); 5mM三钠柠檬酸盐(BDH); 0.4mM 3-乙基苯并噻唑啉磺酸)磷酸氢二铵盐[SIGMA], 允许反应超过30分钟。用50 μ L/孔3.9%草酸(SIGMA)终止反应, 随后, 在读板仪(分子设备)上测得405nm时的吸光率。

选择一只小鼠进一步处理并用相关羊水组份进行最终皮下加强免疫。四天后, 用二氧化碳使小鼠窒息死亡, 将其脾移到无菌的环境中并放置于60mm的盛有RPMI-1640培养基的有盖培养皿中。利用26号针头在5个不同的地方往脾中注入培养基, 从而强制培养基进入脾以释放细胞。把这些细胞转移到无菌离心管中进行离心(250 g, 10min), 并去掉上清液。细胞用10mL的培养基重悬, 利用库尔特计数器计数。在RPMI-1640/10% FCS中成长的 1×10^7 NS1个细胞, 同样离心, 重悬在10mL RPMI-1640中, 计数。脾的淋巴细胞与NS1骨髓瘤细胞以8:1比率混合于50%PEG1500/4000的RPMI-1640中。在含有HAT(10mM次黄嘌呤、0.04mM氨嘌呤、1.6mM胸苷)(GIBCO)、 2×10^5 饲养细胞/mL、20%FCS(TRACE)、100U/mL青霉素、50U/mL链霉素及50U/mL正大霉素等介质的RPMI-1640选择培养基中(Goding, 1986)让杂合细胞生长。饲养细胞从未免疫的BALB/c小鼠中制备。

得到1023种杂合细胞。按照以上描述, 通过间接单位点酶联免疫法在AF1组份中检测到3株克隆分泌抗体。杂合细胞通过有限稀释法再克隆, 并在培养基中进一步扩大。通过免疫测定, 发现一株克隆体(命名为12D2/C6)显示出很强的反应, 并使用滚子摇瓶装置进一步扩大培养。温度为37 $^{\circ}$ C, 含5%二氧化碳的潮湿大气, 20% FCS、2mM L-谷氨酸盐、100单位/ml 青霉素和100 μ g/ml 链霉素的RPMI-1640环境中培养细胞约40天, 其间再用富含的IgG培养基5-6天补液一次。命名为14A3 和 21B4两个克隆体储存在液氮中, 用于日后研究。

用间接单位点EIA法检测从培养液中纯化的免疫球蛋白, SDS-PAGE法鉴定其纯度。利用小鼠亚型鉴定试剂盒确定免疫球蛋白的亚型为IgG1。

用蛋白质印迹实验分析所制备的单克隆抗体与羊水相关蛋白质的反应活性，并检测这种蛋白质是否为羊水特异性组分。

将包括PROM标志物的AF1浓缩为3mL并装入预校准(2.5cm x 75cm) 聚丙烯酰胺葡聚糖S-300柱进行处理。同样，经免疫亲和纯化PROM标志物也被应用于同样的柱中以估算其天然分子量。收集一系列的2.5mL组份并通过SDS-PAGE电泳确定蛋白质的分子量，发现该蛋白为75kDa。分子量在300-330 kDa范围内的组份中包含估计分子量为320 kDa的蛋白质。因此，根据SDS-PAGE 电泳测得的亚单位分子量75kDa与由多个亚单位组成的天然蛋白质分子量相一致。

根据4-15%梯度凝胶SDS/β-巯基乙醇存在情况下的SDS-PAGE电泳法进行免疫印迹分析图1说明了此结果(1-2号泳道)。发现了一个反应性的主带，与运用12D2/C6免疫亲和柱(1号电泳线)纯化的PROM标志物相同，且在AF1组份中，这一主带被应用于分子筛层析色谱柱(2号电泳线)。这一主带与亚单位的分子量75 (+4) kDa(图1)相一致，与最初从羊水中纯化的蛋白质相同。

例3 间接单位点筛选酶免疫测定

从不同孕妇体内收集羊水样本(n=6~10)和产妇血液(血浆或血清; n=6~10)，将它们混合在一起成50-100mL。用AGB对样本池进行预处理；与羊水的体积比为1:1 (v/v)，与产妇血液采用的体积比为6:1 (v/v)，并将它们混合在一起搅动4个小时。之后，溶液以2000 rpm的速度离心20分钟，将收集的上清液转入新的50mL无菌培养管。

在间接1-Site EIA程序中，100μL羊水(阳性对照)和产妇血液(阴性对照；怀孕第二和第三阶段从孕妇体内收集的血浆或血清)应用于96孔的微孔板(NUNC微孔板: maxisorp)，并在室温下(约25°C)孵育1个小时。当日，每一种检测物有两种不同样品用于免疫测定程序。之后，用PBS (LS)洗板，并在室温下用200μL/孔PBS (LS)/1.0% 卵白蛋白封闭2个小时。用PBS(LS) 洗板三次，并将0.15mL上清液加入到每一孔中；用同样的方法制备空白对照，从生长在与筛选的克隆体同一培养基的NS-1细胞中取200μL/孔培养上清液。孵育2个小时后，用PBS(LS) (含0.2% (v/v) 吐温-20 [PBS(LS)/吐温]) 洗板三次，50μL/孔过氧化物酶偶联的羊抗鼠加入到每一孔里，并在室温下再孵育1个小时。PBS(LS)/吐温洗板四次后，加入100μL ABTS溶液，反应持续30分钟。最后，用3.9%草酸(每孔50μL)终止了反应，测定波长为405nm时的吸光率。

用免疫测定方法对上清液进行首次筛选检测，对那些吸光度值4倍大于空白和阴性的单克隆抗体在免疫测定后7天运用同样的测定方式再次检查，但是所采用的是从孕妇体内新采集的阳性和阴性血清池(n=3)。7天后，运用免疫测定重新检查了另外3个新池(阳性对照和阴性对照)中那些再次对阳性对照出现很强反应性的杂交瘤细胞。运用有限稀释法克隆对阳性标本有特异性反应的杂交瘤细胞。

例4: 单克隆抗体12D2/C6的纯化和鉴定

准备5mL的蛋白质-A(AMERSHAM)柱(1.5 cm x 10 cm)，并用10倍柱床体积的500mM磷酸二钾、25mM甘氨酸缓冲液(pH值为9.1)来平衡。将500mL细胞培养上清液上柱，并

用5倍柱体积的同样缓冲液来清洗未结合的物质。之后,用100mM乙酸钠pH3.5对免疫球蛋白组份进行洗脱,收集到5mL的组份。纯化的免疫球蛋白用SDS-PAGE和直接单位点 EIA 检测。抗体按0.5mL分装,并置-70°C储存。运用商业小鼠亚型鉴定试剂盒 (SIGMA),从细胞培养上清液中确定免疫球蛋白亚型。

在10%和12.5% SDS-PAGE凝胶上进行电泳。电泳在Mini Protean II 系统 [BIORAD] 上,电压为180V条件下运行60分钟。对Towbin法(1984)作稍作修改(例如使用含10%甲醇、pH值为10.4的0.3M Tris作为阳极缓冲液;使用含20%(v/v)甲醇、pH值为9.4的25mM Tris和192mM氨基乙酸作为阴极缓冲液),并据此进行免疫印迹分析。在120mA时,运用半干电泳印迹系统 (Biometra; Fast Blot B33) 电转印90分钟。预染Marker (GIBCO) 同时转膜作为分子量测定的校准。在室温下,将印迹膜放在封闭液(5% [w/v]奶粉)中室温下浸泡过夜,然后用TBS (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5)漂洗3次,每次10分钟。用同样的洗涤缓冲液稀释12D2/C6 单克隆抗体(1/100),并将转印膜浸入其中4°C孵育过夜。用同样的缓冲液(含0.02%吐温-20)清洗转印膜4次,每次10分钟,同时,稀释羊抗鼠ALP结合物 (BIORAD) 或羊抗鼠HRP结合物(DAKO),并将其加入到印迹膜上,孵育4个小时。同前清洗印迹膜,并用过氧化物酶底物(0.025mM DAB [KIMENTEC] 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 含0.02% H₂O₂) 或磷酸酶底物溶液显色10-30分钟。用去离子水终止显色反应。

在BIORAD mini-IEF系统上进行了等电子聚焦。1%琼脂糖(w/v)、3%蔗糖(含不同检测范围的2%两性电解质(BIORAD))制备凝胶。含纯化AMNI-蛋白质和IEF标准品(BIORAD)的样本上在凝胶的上样带上,吸附凝胶5分钟。最初用35%甲醇、13%三羧酸(ICN)和3.5%磺基水杨酸[ICN]对蛋白质固定,30分钟,然后在95%乙醇中悬浮20分钟,最后在热气下烘干凝胶。将干燥的凝胶置于30%甲醇溶液、10%醋酸溶液(含考马斯亮蓝 R-250 (SIGMA [0.2% w/v])) 中20分钟。随后,用30%甲醇、10%醋酸使凝胶脱色,直到本底变得清晰。

只有一条主带与纯化蛋白质的反应性很明显,这符合等电点7.9+0.4。

葡聚糖凝胶S-300装层析柱(2.5cm × 100cm),并且用50mM Tris-HCl (pH值7.4)以1.0mL/分的速度平衡12个小时。柱平衡后(10倍柱体积),上凝胶过滤标准品 [BIORAD] 并建构了标准曲线。上样品羊水(AF1)于免疫亲和层析柱在1%葡聚糖蓝-2000 ([Pharmacia]) 时出现尖峰,加入到柱体后,收集了2mL组份。之后,用单位点 EIA 筛选组份;根据组份(在EIA中显示阳性)的标准曲线,确定分子量。

同时,运用bio-spin柱[Millipore](截留100 kDa或300kDa分子量),对不同分子量的进行分离。装置在2,500g时离心15分钟,渗余物和上清液留样分析。

在EIA测试中发生阳性反应的组份,其分子量约为320kD。但是没有发现其它发生反应的组份。这一分子量与以前蛋白质初次纯化期间发现的分子量一致,并且和最初纯化的、与单克隆抗体12D2/C6发生免疫反应的多肽相一致。

例5 单位点 EIA 方案

在使用前,用PBS(LS)清洗微孔板3次。10例羊水混合在一起,用PBS(LS)/吐温做系列稀释从1/2~1/128,以建立标准曲线。池中PROM标志物的浓度设定为任意值100U/L。为了

进行测定, 样本和标准品设了重复(100 /孔), 并在室温下孵育2个小时。同时, 用PBS(LS) (100 μ L/well)做空白对照。从10-15例羊水中随机挑选了羊水正控制, 并在每个微孔板上设定。用PBS(LS)/吐温再次洗板三次后, 在每一孔中加入50 μ L的纯化PBS(LS)/吐温稀释的12D2/C6 单克隆抗体, 或者100 μ L富含抗体的细胞培养上清液并在室温下孵育2个小时。用PBS(LS)/吐温洗板四次后, 每孔加50 μ LHRP标记的羊抗鼠二抗, 并再次孵育1个小时。用PBS(LS)/吐温洗板四次后, 加入100 μ LABTS溶液使其与酶反应2个小时。用3.9%的草酸终止此反应(每孔50 μ L)。在波长为405nm时, 测定样本的吸光度($OD_{\text{样本}}$)。减去空白值($OD_{\text{空白}}$)后, 根据羊水池制定了校准曲线。根据标准曲线, 可知各个样品的蛋白含量和对照标准品蛋白质的含量。

单位点 ELISA程序用于评估单克隆抗体2D2/C6与羊水的反应特异性。再次检查了剖腹产期间收集的羊水和随机从孕妇体内获取的产妇血清。图2的结果说明: 与接受检查的所有羊水样本均有很强的反应性, 而与检查的所有产妇血清中没有反应。之后, 运用酶免疫测定法对妊娠期第三个月的孕妇($n=600$)血液进一步进行了检查, 结果同样表明: 接受检查的产妇血液样本都不与抗体12D2/C6的反应。

对在剖腹产期间收集的一系列新羊水进一步进行了检查, 并对在第二阶段和第三阶段从孕妇体内获取的血清进行了检查。本研究的结果(图3)说明: 反应性是羊水所特有的, 在处于检查中的所有产妇血清中没有发现反应性。

例6: 溶粘蛋白剂的筛选

为了克服羊水标本中子宫颈分泌物的干扰, 调查了很多与之相关的蛋白剂溶粘性质。在PBS 中制备了浓度为0.08%、0.8%和8% [SIGMA]N-乙酰-L-半胱氨酸(NACC)、浓度为0.1%、1%和5%的二硫苏糖醇, 1M NaOH调节pH值为7.0, pH8.4100mM硼砂。羊水池与两倍体积的溶粘蛋白剂相混合, 在室温下反应5分钟。之后, 用ELISA法对处理的样本进行评估。

例7 PROM标志物参考范围所选择的病人

为了设置标准的参考范围, PROM标志物的浓度用胎膜破裂后的标本来测定, 而这些标本是从以下病人组获取的:

- a) 从剖腹产的孕妇体内收集68例羊水标本。这些羊水用于纯化、EIA研究, 其中包括溶粘蛋白剂对PROM标志物影响的检查, 确定羊水中PROM标志物的浓度;
- b) 在不同的怀孕阶段收集50例羊水标本, 进行羊水诊断, 确定是否存在产科症状。
- c) 从人工破膜前和人工破膜后的孕妇体内收集38例标本, 在此过程中, 观察羊水的流失。用注射器或消过毒的吸液管吸取0.5-2mL羊水标本。八例标本包含黏液, 用于黏液溶解研究。

PROM标志物也可以在血清中进行测定, 这些血清是从600个孕妇的不同怀孕阶段收集的。在怀孕期间, 这些孕妇定期采集血样。

对羊水的一系列物质1:1的比例稀释后, 进行测试, 以检测程序中是否存在潜在的干扰物质。羊水池中PROM标志物的浓度是44U/L, 用硼砂缓冲液中0.8% NACC以1:1的比例

稀释后，浓度是22U/L（见表1）。

表1 用双位点 EIA对AMNI-蛋白活性的潜在干扰物质进行检测

干扰物质	PROM 标志物 平均值 (U/L)	PROM 标志 物范围 (U/L)
羊水 (对照)	20	18-22
产妇血清 (-Alb)	18	16-20
溶血产妇血清	18	16-20
尿液	19	17-21
自来水	19	16-22
前列腺素E2乳膏	19	17-21
脐带血 (-Alb)	19	17-21

例8: 双位点 EIA测定法

在双位点 EIA测定中,在每孔里加入含有200 μ L 0.2% 戊二醛的100mM 磷酸钠缓冲液 (pH值为5.0) 放置两个小时,以活化96孔的微孔板。将微孔板用100mM磷酸钠缓冲液 (pH值为5.0) 清洗三次,同时,用50mM磷酸钠缓冲液 (pH值为8.0) 将纯化的12D2/C6稀释成不同的浓度,每孔加入100 μ L,室温孵育两小时。然后,以PBS清洗微孔板在,每孔加入200 μ L 1%卵清蛋白, 0.02% NaN₃ (w/v) 封闭,并在4℃时保存7天。使用前,用PBS (高盐) HS/吐温清洗缓冲液 (3.2mM Na₂HPO₄、1.5mM KH₂PO₄、2.7mMKCl、0.272MNaCl, pH值为7.4, 含0.5% (v/v)吐温20) 对微孔板进行清洗。

为了进行测定,样本和标准制备双份 (100 μ L/well),并在室温下孵育两个小时。同时设立只含清洗缓冲液的空白对照。用从15例随机羊水中制备羊水控制品检测。用PBS (HS)/吐温再次清洗三次后,往每个孔里加入50 μ L的羊抗小鼠IgG-HRP结合物,并在室温下孵育一个小时。用PBS (HS)/吐温再次清洗四次后,加入100 μ L的ABTS溶液与酶反应30分钟至一个小时。之后,用3.9%的草酸 (每个孔50 μ L) 终止反应。在波长为405nm时,测定样本孔的吸光度。

将从剖宫产收集的25例随机羊水组合起来,用作羊水测定标准,并为其PROM标志物的级别指定为100U/L。

以同样的方式,将8例羊水和产妇血清加到包被有2.25 μ g/孔抗体的ELISA板上。一个双位点 EIA板的结果见图4。在受测的产妇血清 (<10U/L) 中没有发生反应,而受测的所有羊水则显阳性 (>10U/L)。在同样的板上,根据25次分析,计算出池中周期内和周期间的精度,池中的值为50(1.7)平均数(SD),CV为2%。同时,在3个不同的柱里实施24次周期,来估算周期间精度,池中的值为49.4(2.0) 平均数(SD),CV为4%。

约10%随机的阴道分泌物样本中含有粘液,它们很难用吸液管吸取,而且通过阻止PROM标志物与捕捉抗体相结合来干扰检测。为了解决粘液问题,可在样本中加入溶粘蛋白剂并在免疫测定之前孵育五分钟。在针对12例羊水样本和从剖宫产中收集的标准羊水池的检测中,NACC (浓度为0.8%的100mM硼砂,pH值为8.4) 对PROM标志物的影响很小 (图5)。针对8例含粘液的阴道分泌物样本进行了检查,目视检查发现,NACC在溶解粘

液方面很活跃，利于运用夹心免疫分析对PROM标志物的检测，而在没有NACC处理的情况下，夹心免疫分析的结果是阴性（图6）。针对人工破膜前和人工破膜后收集的阴道分泌物样本的微孔板，进一步检查了12D2/C6在双位点测定法中的反应特征。图7所示结果反映了对出现在样本（在人工破膜之后收集）中的PROM标志物的反应，正如所期望的一样，没有发现对人工破膜前样本有反应性。

例9: PROM标志物的序列分析

测序样本与三(羟甲基)甲基甘氨酸样本缓冲液（10%丙三醇（v/v）、20%（w/v）SDS 的2%、0.5%（v/v）2-巯基乙醇、0.002%（w/v）溴酚蓝和33%（v/v）3M三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐[SIGMA]，pH值为8.45）以1:1的比例混合，在100°C下煮沸10分钟。取10μL上样于梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳（4%积层胶，5%-20%的浓缩胶）进行电泳。此外，同一块胶上也加入低分子量蛋白标准[BIORAD, GIBCO]。用电泳缓冲液（200mM Tris, pH值为8.9（阳极）和100mM Tris, 100mM三羟甲基甲基甘氨酸，含0.1%（w/v）SDS（阴极））来平衡凝胶。

用BIORAD Mini-Protean II系统进行电泳。在180V时允许对蛋白质进行1个小时的电泳，或者直到染料接近于凝胶末端。凝胶将转到含20%（v/v）甲醇的阴极缓冲液，并在印迹程序之前平衡15分钟。运用与电泳程序同样的缓冲液配方（但是含20%（v/v）甲醇）进行转膜。电流为120mA时，运用半干转印槽[BIO-METRA]进行了90分钟的电泳转移。根据预染色标准[基准: GIBCO]获得了分子量测定的校准曲线。

膜依照PROM标志物样本在凝胶中的位置被切成条。凝胶末端的两条被用于免疫印迹和AMNI-蛋白质的确认（通过与12D2/C6的反应性），剩余的几条被转到消过毒的皮氏培养皿并保存于-70°C。之后，在室温下将膜条在含5%脱脂奶粉的TBS（200mM Tris-HCl, pH值为7.5, 500mM NaCl）中封闭两小时，TBS含5%的奶粉（w/v）；之后，用TBS连续清洗三次，每次10分钟。以TBS稀释纯化的12D2/C6单抗，加入转印膜，4°C孵育过夜。之后，同前洗膜；用TBST（含吐温(0.02%））按照1: 5000稀释碱性磷酸酶（AP）标记的羊抗小鼠（BIORAD），加入转印膜，在摇床上孵育8个小时。在TBS/吐温中清洗转印膜，并用BCIP/NBT底物(ICN)显色30分钟。将印迹转到蒸馏水中终止显色反应。

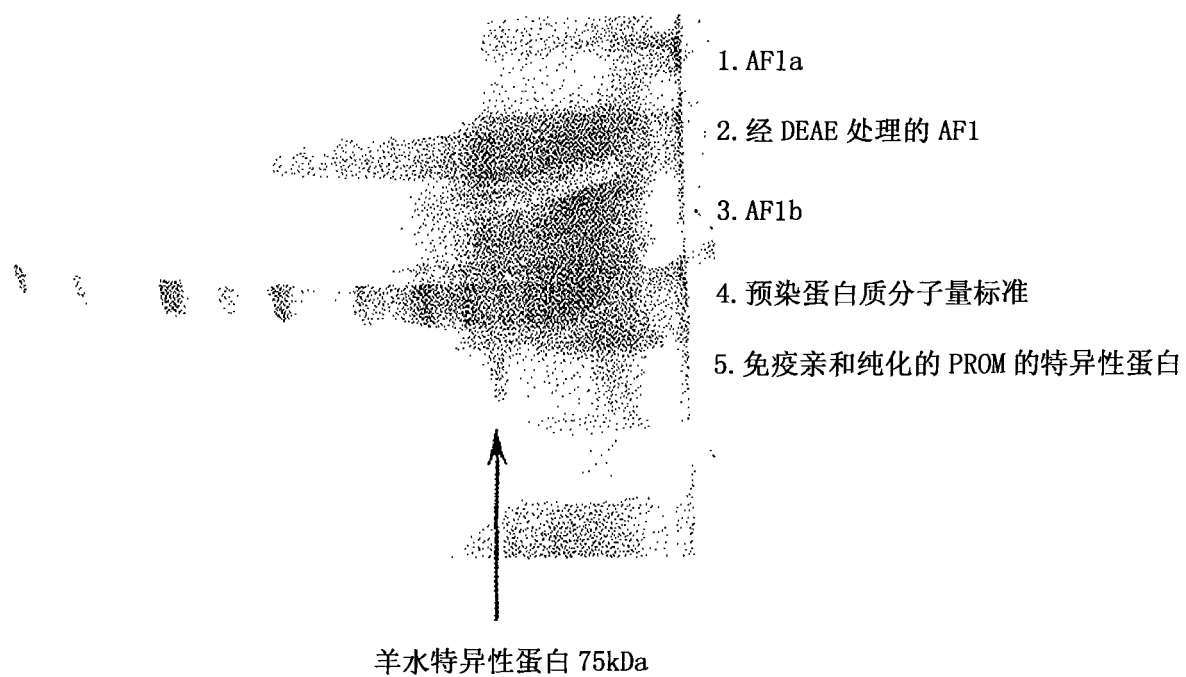


图 1

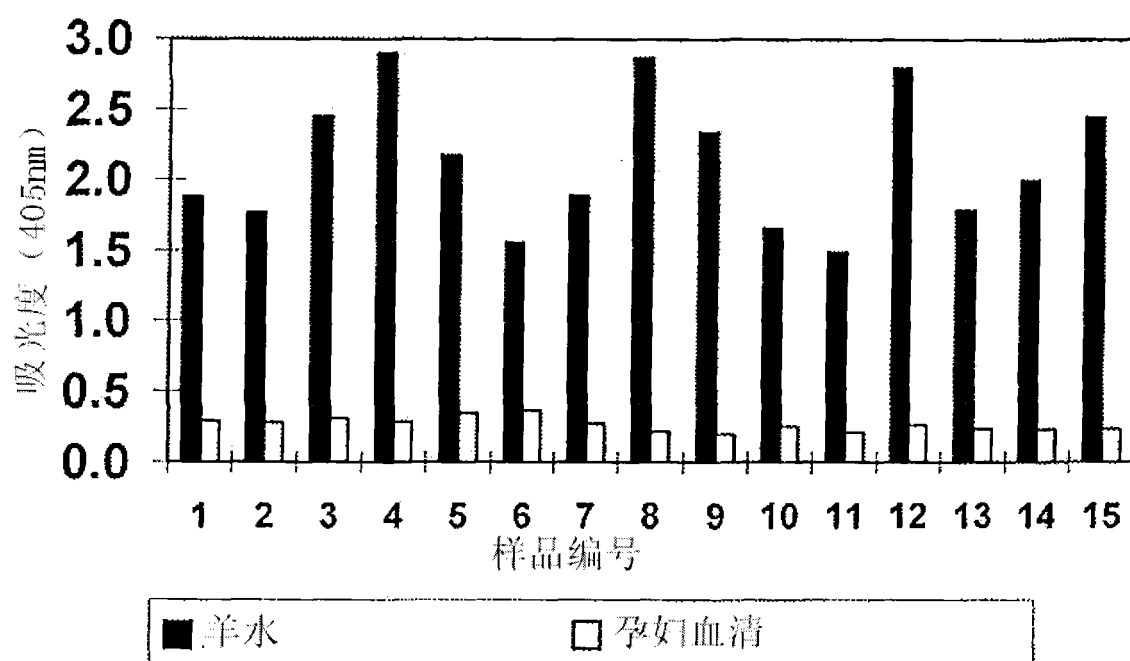


图 2

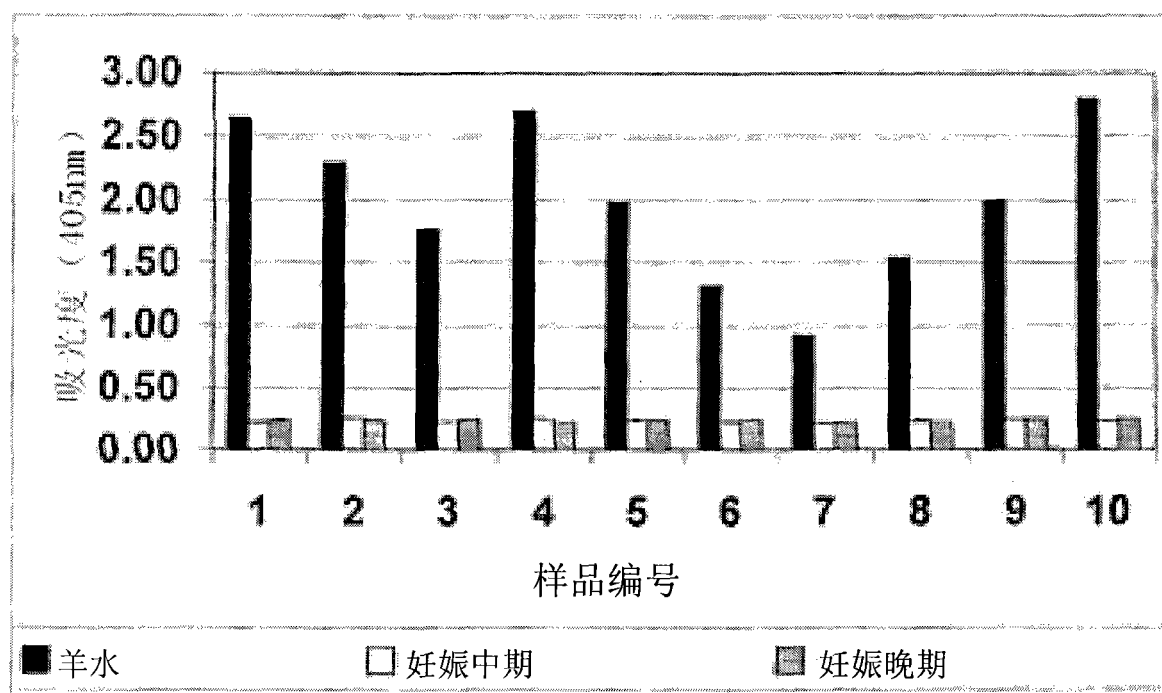


图 3

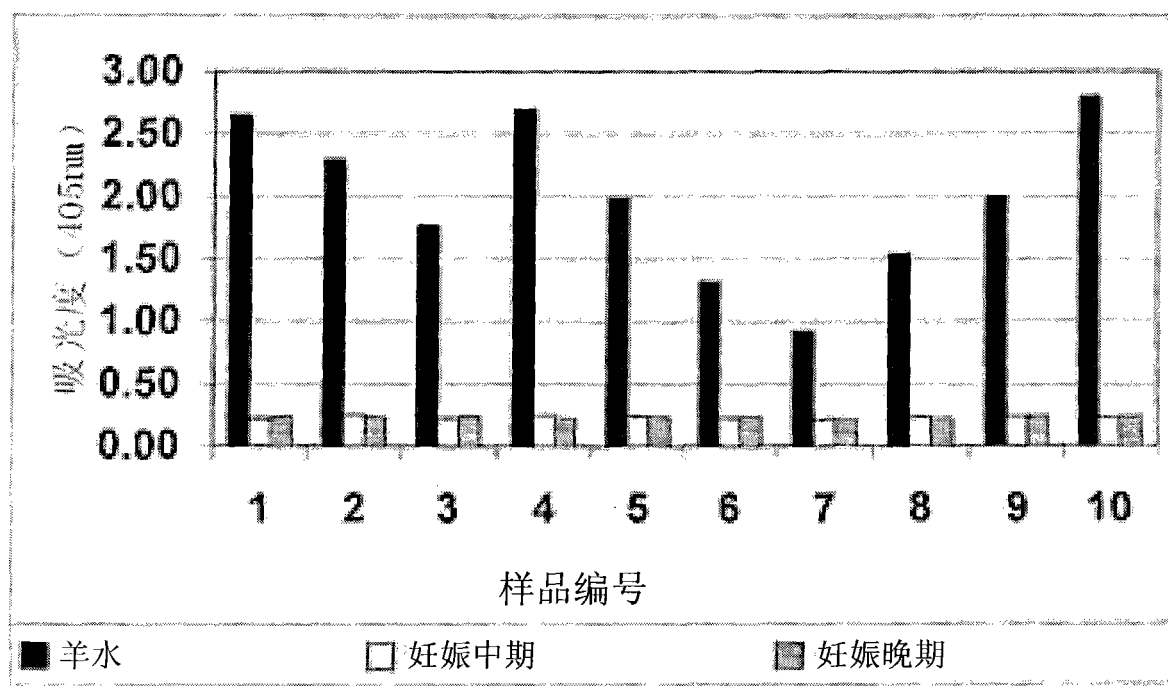


图 4

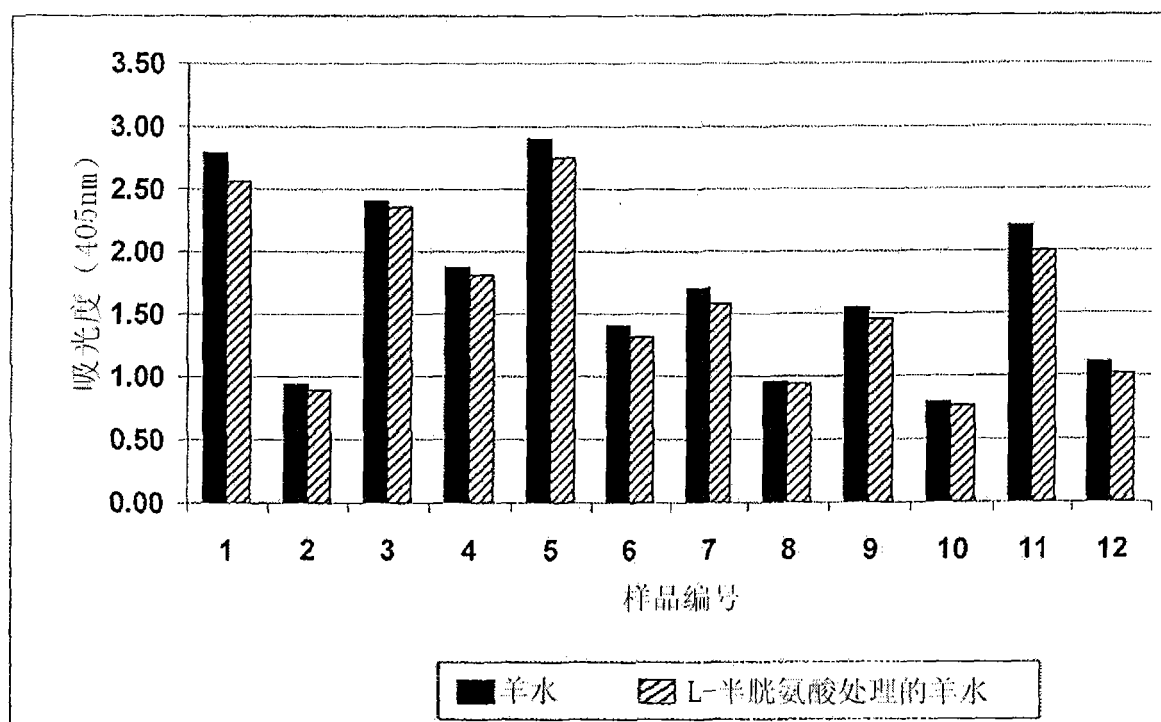


图 5

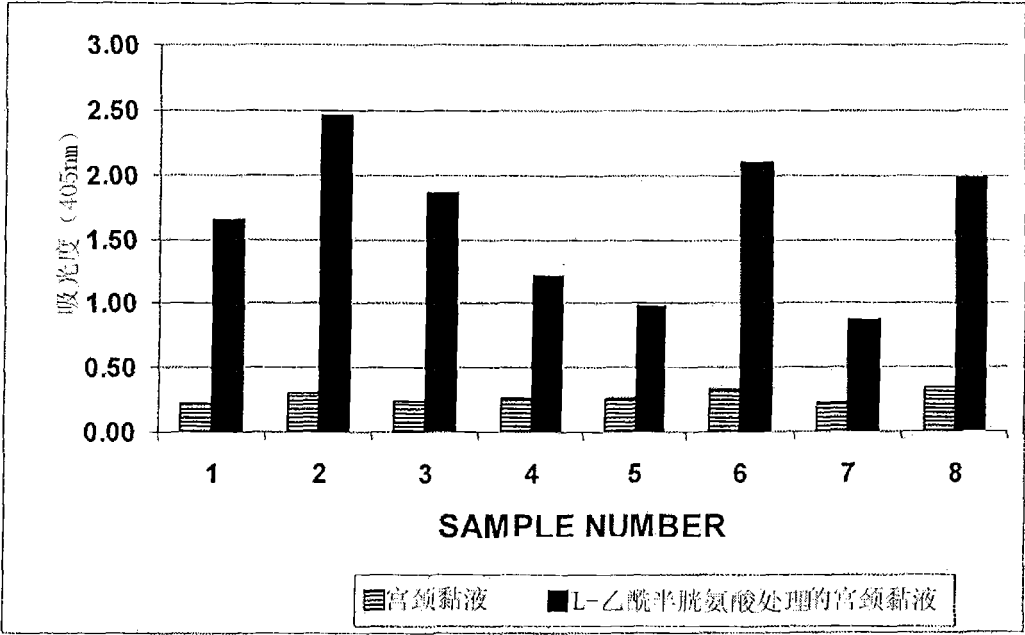


图 6

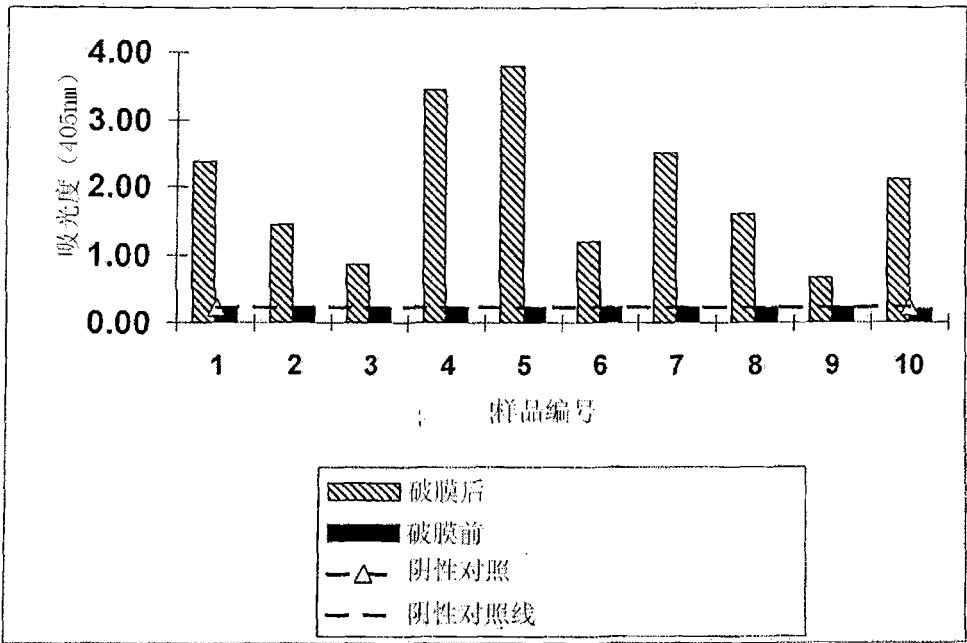


图 7

专利名称(译)	胎膜早破的一个标志物		
公开(公告)号	CN101309929A	公开(公告)日	2008-11-19
申请号	CN200680042575.3	申请日	2006-09-15
[标]发明人	维克多·沃罗埃利克		
发明人	维克多·沃罗埃利克		
IPC分类号	C07K2/00 G01N33/577 C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4715 C07K16/18 G01N33/689		
优先权	60/717683 2005-09-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及羊水特异性多肽以及一种检测羊膜破裂的方法；准确地说，本发明就是关于一种胎膜早破(Prolonged Rupture of Membrane，以下简称PROM)的标志物；通过4 - 15%梯度变性SDS - PAGE法(聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离测定，这种标志物由分子量约为75kDa、20kDa和50kDa的三条多肽组成。

