



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645750 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611226603.9

(22)申请日 2016.12.27

(71)申请人 中国人民解放军第四军医大学
地址 710032 陕西省西安市新城区长乐西路169号

(72)发明人 李博 陈书强 王晶晶

(74)专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 胡乐

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其用途

(57)摘要

本发明提出一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其用途。该试剂盒包括以下组分：酶标板、标准品、阴性对照品、阳性对照品、样品稀释液、洗涤缓冲液、二抗、抗体稀释液、显色液和终止液；所述酶标板由一种特定的添加有生物素标签的人源性asprosin蛋白的多克隆抗体包被，并用封闭缓冲液封闭；二抗能够与作为一抗的多克隆抗体进行特异性的结合。该试剂盒能够快速检测人或者动物标本中的asprosin蛋白含量，耗时少，使用简便，而且结果特异性强、敏感度高。基于此，本发明还构建了用于辅助诊断多囊卵巢综合征(PCOS)的检测设备体系，该检测设备体系只需再配置37℃温箱、移液器和酶标仪。

1. 一种人源性asprosin蛋白的多克隆抗体在制备该蛋白的ELISA检测试剂盒中的用途,在制备所述人源性asprosin蛋白的多克隆抗体的过程中采用了说明书表1中限定的优化后基因序列和引物进行PCR扩增。

2. 根据权利要求1中所述的用途,其特征在于:所述人源性asprosin蛋白的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

步骤一,根据asprosin基因序列,以及大肠杆菌原核蛋白表达的偏好,在保证asprosin基因的氨基酸序列一致的前提下,设计得到所述优化后基因序列和引物,进行PCR扩增;以下asprosin简称A;

步骤二,将PCR扩增到的A基因和载体质粒pET15b和分别用Nde I和Xho I双酶切并分别回收,之后将A基因的酶切产物连接到酶切后的pET15b载体质粒上,得到pET15b-A重组质粒,转化到大肠杆菌DH5 α 感受态菌株,37 $^{\circ}$ C培养过夜后,挑取菌落进行培养后抽提质粒DNA,进行Nde I和Xho I双酶切鉴定和DNA测序鉴定,获得序列正确的pET15b-A重组质粒进行保存;

步骤三,将步骤二所述的测序正确的pET15b-A重组质粒转化至大肠杆菌BL21表达宿主菌体中,优化重组A蛋白的诱导条件;

步骤四,超声破碎步骤三所述的BL21表达宿主菌体,12000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心20min,收集沉淀后用包涵体溶解液进行重溶,之后采用12%的SDS-PAGE胶检测重组A蛋白的表达情况;

步骤五,采用Ni-琼脂糖亲和层析法,纯化步骤四所述的重组A蛋白,采用12%的SDS-PAGE胶检测重组A蛋白的纯化效果;

步骤六,用步骤五纯化得到的A蛋白免疫健康雌性新西兰大白兔,初免蛋白剂量为0.5mg/只,二免、三免、四免蛋白剂量为0.25mg/只,初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化;

步骤七,四免后,耳静脉采血1ml,ELISA检测抗体效价,效价达到要求,第二天颈动脉终放血收集抗血清;

步骤八,亲和层析法纯化抗血清中的抗体,ELISA检测纯化后所得抗体的效价,确定最佳的抗体稀释比。

3. 根据权利要求2中所述的用途,其特征在于:步骤三优化的诱导条件,确定为在菌液OD值达到0.6时,添加终浓度为0.5mM的IPTG,220rpm,37 $^{\circ}$ C诱导4h。

4. 根据权利要求2中所述的用途,其特征在于:在待用的多克隆抗体上添加生物素标签。

5. 一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒,其特征在于:包括以下组分:

酶标板、标准品、阴性对照品、阳性对照品、样品稀释液、洗涤缓冲液、二抗、抗体稀释液、显色液和终止液;所述酶标板采用权利要求1或2中所述的多克隆抗体包被、且该多克隆抗体上添加有生物素标签,并用封闭缓冲液封闭;所述二抗能够与作为一抗的添加有生物素标签的多克隆抗体进行特异性的结合。

6. 根据权利要求5所述的人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述酶标板为96孔酶标板,具体采用美国Corning的聚苯乙烯塑料板。

7. 根据权利要求5所述的人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒,其特征在于:所述二抗为HRP标记的链霉亲和素。

8. 根据权利要求5所述的人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒,其特征在于:

所述封闭缓冲液由3%牛血清白蛋白(BSA)、3%的脱脂奶粉和0.05%的PBST组成,37°C条件封闭1h;

所述样品稀释液:样品为血浆、血清时,样品稀释液为pH 7.4的1×PBS;或者样品为细胞上清液时,样品稀释液为无血清培养基;

所述洗涤缓冲液为pH 7.4的0.05%PBST;

所述抗体稀释液为5%的脱脂奶粉;

所述显色液为底物四甲基联苯胺(TMB)溶液;

所述终止液为2M的硫酸。

9. 权利要求5至8任一所述人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒在构建用于辅助诊断多囊卵巢综合征(PCOS)的检测设备体系方面的用途,该检测设备体系还包括37°C温箱、移液器和酶标仪。

一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒。

背景技术

[0002] 多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome,PCOS)是一种最常见的生殖障碍和代谢性综合征,一直以其高发生率(5%~10%)、多系统广泛迁延以及各年龄段持续深远的病理影响而成为妇科内分泌领域的研究热点和难点之一。目前PCOS病因和发病机制仍不明确,胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)和高雄激素血症(hyperandrogenemia,HA)是其主要的病理特征,也常伴有肥胖、糖代谢异常、心血管疾病等合并症的发生。由于PCOS的异质性、临床表现的多态性,给临床诊断和治疗带来极大困难,PCOS的诊断一直是极具争议的话题。

[0003] 目前,国际上先后有三个PCOS诊断标准被广泛应用。第一个是来源于由NIH(美国国立卫生研究院)于1990年4月举行的专家会议的报告。报告中指出PCOS的主要诊断标准应包括:雄激素过多症和/或高雄激素血症,月经失调,并排除其它已知疾病。这一调查把PCOS定义为是一种经过排除诊断后的雄激素过量性疾病,伴有卵巢的原因和/或结果。

[0004] 第二个是成形于2003年5月在鹿特丹召开的欧洲生殖和人类胚胎学会和美国生殖医学会举办的专家会议。会议中提出PCOS的定义需至少满足以下3个特点中的2个:①稀发和/或无排卵;②雄激素过多症的临床和/或生化表现;③多囊卵巢。诊断PCOS前也需要首先排除其它雄激素过量或相关疾病。

[0005] 2006年,AES(美国雄激素过多协会)提出第三个PCOS诊断标准,指出PCOS诊断必需满足高雄激素这一特点,而排卵障碍和多囊卵巢存在二者之一即可诊断。

[0006] 三种标准从不同出发点给出了PCOS的定义,也凸显出了对疾病不完全相同的认识,多个诊断标准的并存给临床工作造成较大困难。

[0007] 一项涵盖106项研究共15129例受试者的Meta分析显示,PCOS患者发生超重、肥胖和中心性肥胖的风险比分别为1.95、2.77和1.73。对于糖耐量受损、糖尿病和代谢综合征的识别在PCOS治疗选择时也有重要意义。数据表明与正常对照相比,PCOS患者上述三种代谢改变的发生风险分别增加2.48、4.43、2.88倍。多中心大数据的研究显示,肥胖和糖代谢异常可作为PCOS的辅助诊断标准。

[0008] 对于初诊的PCOS患者,临床一般是通过B超检测、雄激素水平进行排除性诊断,国内外尚缺乏针对肥胖和糖代谢异常的PCOS诊断标志物。

[0009] Asprosin是2016年4月《CeII》期刊报道的一种新型的葡萄糖调控蛋白质激素,由白色脂肪组织分泌、释放并运输至肝脏。研究发现,Asprosin可与肝细胞表面受体结合,通过激活G蛋白-cAMP-PKA信号通路来增加肝细胞中葡萄糖的释放。同时Asprosin的作用是跟胰岛素功能亢进相关,Asprosin含量的增加会导致胰岛素的耐受性,进一步提高血糖的含量。

[0010] 上述研究表明,asprosin的含量和肥胖及高血糖呈正相关。可能成为肥胖及糖代谢异常的标志物,亦可能成为PCOS的生物标志物,并作为辅助检测来确诊PCOS。

[0011] 目前,对Asprosin的研究仅有2016年《CeII》期刊上的一篇文章报道,国内外尚无对其应用价值的报道,也无任何关于定量检测人源性Asprosin含量的报道。其他研究中心获悉asprosin及其意义后,虽然可能考虑也研制针对asprosin的ELISA试剂盒,但此试剂盒的研发和验证不仅需要复杂的分析、实验,还需要大量的样本数据支持,常规的有限实验很难完成这一探究过程,实现其临床价值及推广应用。

发明内容

[0012] 本发明的初衷是克服目前PCOS患者尚无明确诊断的问题,提出一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其应用。该试剂盒能够快速检测人或者动物标本中的asprosin蛋白含量,耗时少,使用简便,而且结果特异性强、敏感度高。

[0013] 本发明的技术方案如下:

[0014] 本发明利用ELISA技术建立了检测人源性asprosin蛋白的试剂盒,并首次证实在PCOS患者的血浆中,asprosin蛋白的含量显著高于正常人群。

[0015] 本发明第一方面,提供了一种人源性asprosin蛋白的多克隆抗体制备方法,步骤如下:

[0016] 步骤一,根据asprosin基因(以下简称为A基因)序列,以及大肠杆菌原核蛋白表达的偏好,在保证A基因的氨基酸序列一致的前提下,优化A基因的原始密码子,并设计引物,进行PCR扩增(原始密码子、优化后的密码子、引物见表1);

[0017] 步骤二,将PCR扩增到的A基因和载体质粒pET15b和分别用Nde I和Xho I双酶切并分别回收,之后将A基因的酶切产物连接到酶切后的pET15b载体质粒上,得到pET15b-A重

[0018] 组质粒,转化到大肠杆菌DH5 α 感受态菌株,37 $^{\circ}$ C培养过夜后,挑取菌落进行培养后抽提质粒DNA,进行Nde I和Xho I双酶切鉴定和DNA测序鉴定,获得序列正确的pET15b-A重组质粒进行保存;

[0019] 步骤三,将步骤二所述的测序正确的pET15b-A重组质粒转化至大肠杆菌BL21表达宿主菌体中,优化重组A蛋白的诱导条件;

[0020] 步骤四,超声破碎步骤三所述的BL21表达宿主菌体,12000rpm,4 $^{\circ}$ C,离心20min,收集沉淀后用包涵体溶解液进行重溶,之后采用12%的SDS-PAGE胶检测重组A蛋白的表达情况;

[0021] 步骤五,采用Ni-琼脂糖亲和层析法,纯化步骤四所述的重组A蛋白,采用12%的SDS-PAGE胶检测重组A蛋白的纯化效果;

[0022] 步骤六,用纯化得到的asprosin免疫健康雌性新西兰大白兔(4月龄,2.1kg),初免蛋白剂量为0.5mg/只,二免、三免、四免蛋白剂量为0.25mg/只,初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化,二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化;

[0023] 步骤七,四免后(第56天)耳静脉采血1ml,ELISA检测抗体效价,效价达到要求,第57天,颈动脉终放血收集抗血清。

[0024] 步骤八,亲和层析法纯化抗血清中的抗体,ELISA检测纯化后所得抗体的效价,确

定最佳的抗体稀释比。

[0025] 优化的,为了提高目的蛋白的表达水平,优化其诱导条件,最终确定为在菌液OD值达到0.6时,添加终浓度为0.5mM的IPTG,220rpm,37℃诱导4h。

[0026] 优化的,为了提高ELISA检测asprosin蛋白浓度的灵敏度,针对此抗体添加生物素标签,用于将来ELISA检测时与二抗进行特异性结合,从而提高ELISA的灵敏度。

[0027] 本发明第二方面,提供了一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒,包括以下组分:酶标板、标准品、阴性对照品、阳性对照品、样品稀释液、洗涤缓冲液、二抗、抗体稀释液、显色液和终止液;所述酶标板采用上述添加有生物素标签的多克隆抗体包被,并用封闭缓冲液封闭;所述二抗能够与作为一抗的所述添加有生物素标签的多克隆抗体进行特异性的结合。

[0028] 优化的,二抗选择HRP标记的链霉亲和素,效果最佳。

[0029] 优化的,酶标板为96孔酶标板,具体采用美国Corning的聚苯乙烯塑料板。

[0030] 优化的,所述封闭缓冲液由3%牛血清白蛋白(BSA)、3%的脱脂奶粉和0.05%的PBST组成,37℃条件封闭1h;所述样品稀释液:样品为血浆、血清时,样品稀释液为pH 7.4的1×PBS;或者样品为细胞上清液时,样品稀释液为无血清培养基;所述洗涤缓冲液为pH 7.4的0.05%PBST;所述抗体稀释液为5%的脱脂奶粉;所述显色液为底物四甲基联苯胺(TMB)溶液;所述终止液为2M的硫酸。

[0031] 基于以上ELISA检测试剂盒,本发明构建了用于辅助诊断多囊卵巢综合征(PCOS)的检测设备体系,该检测设备体系还包括37℃温箱、移液器和酶标仪。

[0032] 上述ELISA检测试剂盒的使用步骤如下(实验开始前,各试剂均应平衡至室温):

[0033] 步骤一,标本的采集及保存:

[0034] 血清:全血标室温放置30分钟或4℃过夜后,室温,1000g离心10min,取上清即可检测,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融;

[0035] 血浆:可用EDTA或肝素作为抗凝剂,标本采集后30分钟内,室温,1000g离心10min,取上清即可检测,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融;

[0036] 其它生物标本:请2000g离心10分钟,取上清即可检测,或将标本放于-20℃或-80℃保存,但应避免反复冻融。

[0037] 步骤二,加样:实验时依次添加标准品、阴性对照品、阳性对照品和1:10稀释的待测样品100uI(用样品稀释液1:10进行稀释),酶标板加盖,37℃孵育1小时(加样将样品加于酶标板孔底部,注意不要有气泡,尽量不触及孔壁。为保证实验结果有效性,每次实验必须使用标准品溶液、阴性对照品、阳性对照品),甩去各孔中的液体,加入洗涤缓冲液每孔200uI,洗涤3次,甩干;

[0038] 步骤三,将HRP标记的链霉亲和素二抗用抗体稀释液按1:1000稀释,100uI/孔加入酶标板中,37℃孵育1小时,甩去各孔中的液体,加入洗涤缓冲液每孔200uI,洗涤3次,甩干;

[0039] 步骤五,加入显色液100uI/孔,室温避光反应15min,最后加入50uI终止液以停止反应,酶标仪(波长450nm)测定OD值。

[0040] 优选的,所述的96孔酶标板为美国Corning的聚苯乙烯塑料板(表面经过特殊处理,有利于样品的吸附),且为了减少操作时间,用生物素标记的A蛋白抗体提前包被96孔酶标板,制成固相抗体=并用优化封闭缓冲液进行封闭,实验时依次添加标准品、阴性对照

品、阳性对照品和待测样品即可；且96孔酶标板可拆卸，可以根据样品数确定孔数，可用于多次实验，减少浪费。

[0041] 优选的，为了便于操作，本试剂盒提供稀释好的标准品（A蛋白浓度为100ng/mL，50ng/mL，25ng/mL，10ng/mL，3ng/mL，0ng/mL），阴性对照品（A蛋白浓度为2.32ng/mL），阳性对照品（A蛋白浓度为24.65ng/mL）。

[0042] 本发明的有益效果：

[0043] 1) 准确：目前市场上无商业化的人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒，经文献检索没有定量检测人源性asprosin蛋白含量的方法，因此对于人血浆中asprosin蛋白无法精确定量。此ELISA试剂盒可准确检测人血浆中asprosin蛋白的含量，结果由酶标仪定量分析，排除了免疫组化、免疫荧光、Western blot等半定量方法的主观性。且重组A蛋白与抗体的反应具有良好的浓度依赖关系，成明显的线性关系($y=0.0206x-0.0105R^2=0.9851$)，如图5所示。

[0044] 2) 灵敏度高：本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中Asprosin水平，为Asprosin抗体进行生物素标签，从而可以标记有亲和素二抗形成生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin-System, BAS)，其高亲和力的牢固结合可以起到生化反应多级放大的效应，使BAS免疫标记和有关示踪分析更加灵敏，用该方法检测到的Asprosin蛋白最低可至500ng/mL，敏感性明显高于普通的western blot和免疫组化等半定量方法，敏感性实验见附图4。

[0045] 3) 简单方便：本方法中所用试剂和实验耗材均为商业化产品，容易获得；检测中仅需移液器、37℃温箱、酶标仪进行加样、孵育和读数，普通的实验室均可开展此项检测。

[0046] 4) 通用性：本发明也可用于肥胖、2型糖尿病、高血脂等病人标本中A蛋白含量的检测，基础研究中各种生物学样品（如脂肪干细胞培养上清液、动物血浆中的）A蛋白含量检测。

[0047] 5) 实用价值高：本发明检测时不需要复杂仪器，易于在科研院校和医疗机构中推广应用，可大规模检测临床标本，快速获得A蛋白相关的海量数据和信息，为A相关的基础和临床医学研究推波助澜，具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

附图说明

[0048] 图1为融合蛋白小试SDS-PAGE分析图。

[0049] 图2为镍琼脂糖亲和层析纯化SDS-PAGE分析图。

[0050] 图3为蛋白最终纯化SDS-PAGE分析图。

[0051] 图4为PCOS患者血浆样本的Western blot分析图。

[0052] 图5为重组A蛋白浓度测定的标准曲线图。

[0053] 图6为本试剂盒中所提供的酶标板样品分布图。

[0054] 图7为ELISA试剂盒检测不同体重女性血浆中A蛋白浓度分析图。

[0055] 图8为ELISA试剂盒检测2型糖尿病患者血浆中A蛋白浓度分析图。

具体实施方式

[0056] 根据A蛋白的基因序列，以及大肠杆菌原核蛋白表达的偏好，在保证A基因的氨基

酸序列一致的前提下,优化A基因的原始密码子,并设计引物,原始密码子、优化后的密码子、引物见表1;

[0057] 表1.Asprosin蛋白基因及氨基酸序列

[0058]

	序列	备注
原始 基因 序列(原 始密 码 子)	AGCACAAACGAAACTGATGCCTCCAATATCGAGGATCAGTCTGAG ACAGAAGCCAATGTGAGTCTTGCAAGTTGGGATGTTGAGAAGAC AGCCATCTTTGCTTTCAATATTTCCCACGTCAGTAACAAGGTTCGA ATCCTAGAACTCCTTCCAGCTCTTACAACCTCTGACGAATCACAAC AGATACTTGATCGAATCTGGAAATGAAGATGGCTTCTTTAAAATCA ACCAAAAGGAAGGGATCAGCTACCTCCACTCACAAGAAGAAG CCAGTGGCTGGAACCTATTATTACAAATCAGTAGTACTCCACTTT ATAAAAAGAAAAGAACTTAACCAACTAGAAGACAAATATGACAAA GACTACCTCAGTGGTGAACCTGGGTGATAATCTGAAGATGAAAATC CAGGTTTTGCTTCATTAA	末尾 TAA 为终止 密码子
优化后 基因 序列(原 始密 码 子)	TCTACTAACGAGACTGACGCATCTAACATCGAGGACCAATCTGAG ACTGAAGCTAACGTCTCTCTGGCATCTTGGGATGTTGAAAAGACG GCTATCTTCGCGTTCAACATTAGCCACGTATCCAACAAAGTTTCGTA TCCTGGAAGTCTGCGCTGCGCTGACCACCCTGACCAATCATAATC GCTATCTGATTGAATCCGGTAACGAAGATGGTTTTTCAAATCAA CCAGAAAGAAGGCATCAGCTACCTGCACTTCACCAAAAAAAAAAAC CGGTGGCCGGTACCTATAGCCTGCAGATTAGCTCCACCCCACTGTA CAAAAAAGAAAGAACTGAACCAGCTGGAAAGACAAATACGACAAA GATTACCTGTCCGGCGAACTGGGCGATAACCTGAAAATGAAAATC CAGGTGCTGCTGCACTAA	末尾 TAA 为终止 密码子
氨基酸 序列	STNETDASNIEDQSETEANVSLASWDVEKTAIFA FNISHVSNKVRILE LLPALTTLTNHNRYLIESGNEDGFFKINQKEGISYLHF TKKKPVAGTY SLQISS TPLYKKKELNQLEDKYDKDYLSGELGDNLKMKIQVLLH*	*代表终止密 码子,不编码氨基酸
上游 引物	<u>CATATGTCTACTAACGAGACTGA</u>	<u>CATATG</u> 为 Nde I 酶切位点
下游 引物	<u>CTCGAGCACGTCGTCGGGACCTA</u>	<u>CTCGAG</u> 为 Xho I 酶切位点

[0059] 图1是A蛋白不同条件下诱导后进行SDS-PAGE分析,其中M代表蛋白Marker;泳道1为诱导前表达的总蛋白;泳道2为20℃诱导过夜后,菌体破碎后上清中的蛋白;泳道3为20℃诱导过夜后,菌体破碎后沉淀中的蛋白;泳道4为37℃诱导4h后,菌体破碎后上清中的蛋白;泳道5为37℃诱导4h后,菌体破碎后沉淀中的蛋白。

[0060] 图2是asprosin蛋白经镍琼脂糖亲和和层析纯化后各流出组分进行SDS-PAGE分析,其中M代表蛋白Marker;泳道1为上柱前的蛋白样品;泳道2为从镍柱直接流出后收集的蛋白样品;泳道3为经过20mM咪唑洗脱后收集的蛋白样品;泳道4为经过50mM咪唑洗脱后收集的蛋白样品;泳道5为经过500mM咪唑洗脱后收集的蛋白样品。

[0061] 图3是最终纯化得到的asprosin蛋白SDS-PAGE分析,asprosin蛋白分子量约为20KDa,SDS-PAGE电泳分析在相应位置出现明显条带,表明asprosin蛋白成功得到了纯化,

且纯度很高。其中M代表蛋白Marker；泳道1为最终纯化得到的asprosin蛋白。

[0062] 特异性试验：

[0063] 用所建立的ELISA方法随机检测100例不孕女性的血浆样本，将重组A蛋白作为阳性对照，根据所得OD值将血浆样本分为PCOS患者组（总计6名疑似为PCOS患者，临床诊断是8名确诊为PCOS，此ELISA方法的PCOS检出率为75%）和非PCOS患者组，进一步用Western blot方法对此6名PCOS患者的血浆样本进行验证。如图4所示，Western blot结果虽然能检测出A蛋白，但是由于其血浆中含量较低，因此A蛋白条带非常模糊，不能用于临床的诊断分析。

[0064] 敏感性试验：

[0065] 将重组标准A蛋白（200ng/ml）用1×PBS作2倍比连续稀释，并排设置3个复孔，得出标准蛋白各个稀释点的平均OD值与空白组OD值有统计学差异的最高稀释倍数。结果发现，重组标准A蛋白稀释256倍后的OD值与空白组OD值仍有统计学差异，表明可检测的可溶型CD74蛋白最低浓度为782pg/ml。

[0066] 将重组标准A蛋白按比例进行稀释，100ng/ml，50ng/ml，25ng/ml，10ng/ml，3ng/ml，0ng/ml，每个样品设置3个复孔，100uI/孔，按照上述所述的双抗体夹心ELISA方法进行检测，并重复检测3次，结果相似，如图5所示，重组A蛋白与抗体的反应具有良好的浓度依赖关系，且成明显的线性关系， $y=0.0206x-0.0105R^2=0.9851$ 。

[0067] 本试剂盒应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定血浆中A蛋白的含量。用生物素标记的A蛋白抗体包被96孔酶标板，制成固相抗体，实验时按图6依次添加标准品、阴性对照品、阳性对照品和待测样品（S是待测样品Sample的缩写），待测样品设置3个复空，此酶标板最多每次可检测24人，另外，96孔酶标板可拆卸，可以根据样品数确定孔数，可用于多次实验，减少浪费。

[0068] 选取已经确诊为PCOS的不孕患者200人，同时选取健康人群200人，两组在年龄、体重指数上匹配。收集两组的基本资料，并对其血浆中的A蛋白含量进行ELISA检测，结果以Mean±SD表示，采用SPSS 17.0统计学软件进行分析，采取配对样本的t检验， $P<0.01$ 为结果有极显著差异。研究结果如表2所示，两组在年龄、体重指数上无统计学差异，但是PCOS患者的A蛋白含量极显著高于健康组，具有统计学意义。此实验也指明血浆中A蛋白含量高于12.83ng/mL，可作为不孕患者疑似为PCOS的辅助诊断标准。

[0069] 表2

[0070]

	健康组 (n=200)	PCOS患者 (n=200)	P值
年龄	29.45±5.16	30.38±4.65	0.285
体重指数	24.16±1.87	25.24±1.43	0.112
A蛋白含量 (ng/mL)	3.51±2.35	12.83±4.07	0.008

[0071] 体重指数 (Body Mass Index, 简称BMI)，是用体重公斤数除以身高米数平方得出的数字，是目前国际上常用的衡量人体胖瘦程度以及是否健康的一个标准。随机选取身体健康的人群总计200人，根据中国的BMI标准，将其分为偏瘦组 $BMI \leq 18.5 \text{kg/m}^2$ ，正常体重组 ($18.5-24 \text{kg/m}^2$)，偏胖组 ($24-28 \text{kg/m}^2$)，肥胖组 ($BMI \geq 28 \text{kg/m}^2$)。

[0072] 结果以Mean±SD表示，采用SPSS 17.0统计学软件进行分析，采取配对样本的t检

验, *: $P < 0.05$ 为结果有显著差异, **: $P < 0.01$ 为结果有极显著差异。图7是ELISA方法检测4组人群血浆中A蛋白浓度结果, 研究发现, 偏瘦组血浆中A蛋白浓度显著低于正常体重组, 偏胖组血浆中A蛋白浓度显著高于正常体重组, 肥胖组血浆中A蛋白浓度极显著高于正常体重组, 且血浆中A蛋白浓度与BMI指数呈正相关趋势。

[0073] 糖尿病是由于胰岛素的缺陷(绝对量的缺少或相对量的不足), 使得机体糖类、脂类、蛋白质、水及电解质代谢出现紊乱, 从而导致血糖慢性升高, 最终成为一种多病因的复杂代谢疾病。糖尿病诊断和分型专家委员会在1997年更新了分型标准, 将糖尿病分为1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病和其他特殊类型糖尿病(包括各种遗传的、内分泌的、药物引起和感染性疾病导致), 其中95%的糖尿病患者为2型糖尿病。2型糖尿病的症状与代谢紊乱有关的表现, 尤其是“三多一少”, 表现为多尿、多饮、多食但体重下降。

[0074] 近年来, 随着社会经济的发展、人们生活方式的改变(能量摄入增加和运动减少等)及人口老龄化, 2型糖尿病发病率在全球范围内呈逐年增高趋势, 尤其在发展中国家增加速度将更快(预计到2025年可能增加170%), 呈现流行态势。糖尿病现已成为继心血管病和肿瘤之后, 第3位威胁人们健康和生命的非传染性疾病。

[0075] 目前普遍认为, 胰岛素抵抗(IR)是2型糖尿病的主要病因之一, 而脂代谢异常所导致的脂肪异常分布、过度堆积则是胰岛素抵抗的主要因素, 因此血浆中A蛋白的含量可以作为2型糖尿病的辅助诊断标准。

[0076] 本研究选取已经确诊为2型糖尿病的患者100人, 同时选取健康人群100人, 两组在年龄、体重指数上匹配。收集两组的基本资料, 两组在年龄、体重指数上无统计学差异, 对其血浆中的A蛋白含量进行ELISA检测, 结果以Mean \pm SD表示, 采用SPSS 17.0统计学软件进行分析, 采取配对样本的t检验, $P < 0.01$ 为结果有显著差异。研究结果如图8所示, 2型糖尿病患者血浆中A蛋白含量极显著高于健康组, 具有统计学意义。此实验也指明血浆中A蛋白含量高于18.06ng/mL, 可作为伴有“三多一少”症状的患者疑似为2型糖尿病的辅助诊断标准。

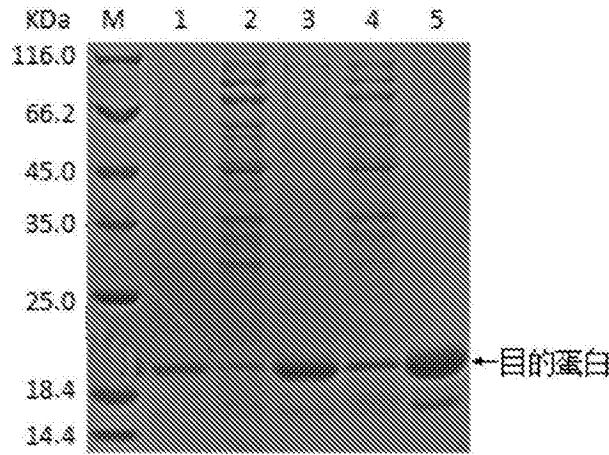


图1

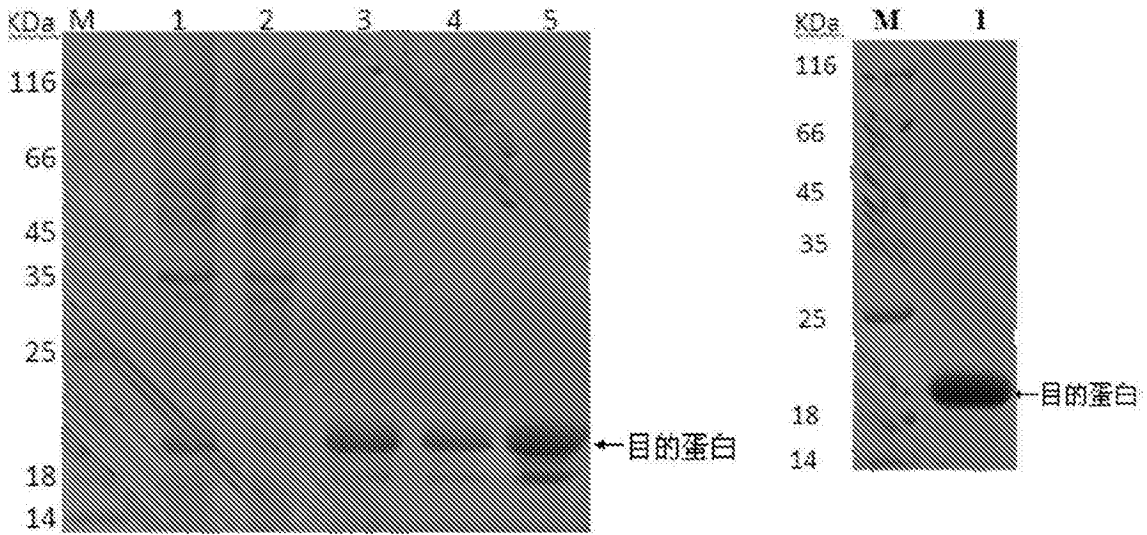


图2

图3

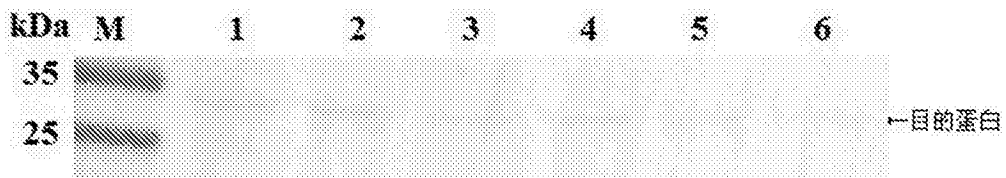


图4

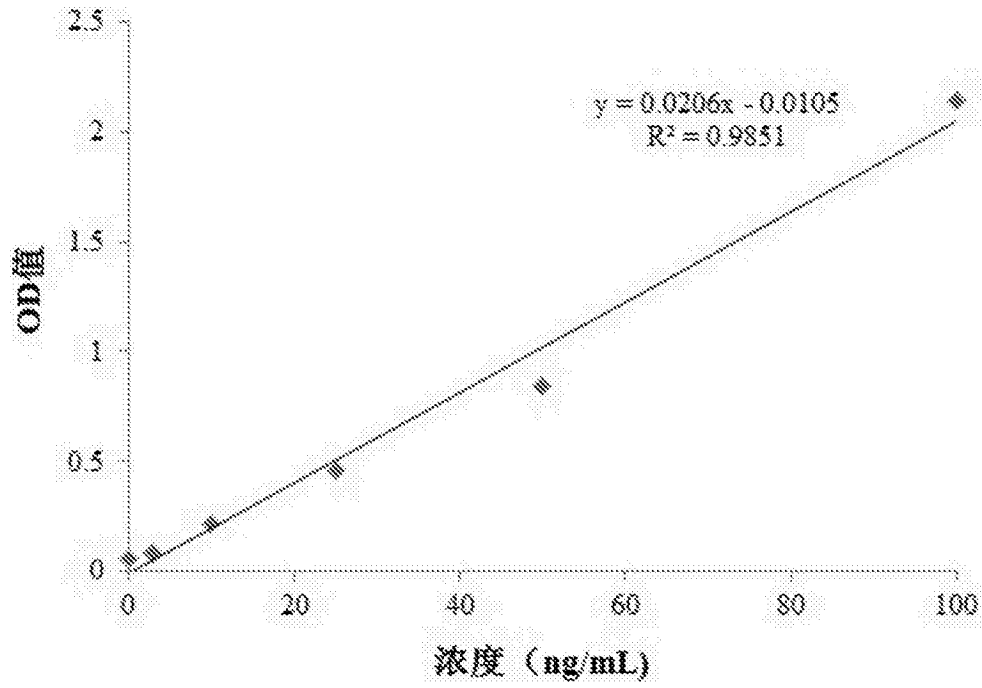


图5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	3	3	3	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	10	10	10	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	25	25	25	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E	50	50	50	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	100	100	100	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G	阴	阴	阴	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H	阳	阳	阳	S	S	S	S	S	S	S	S	S

图6

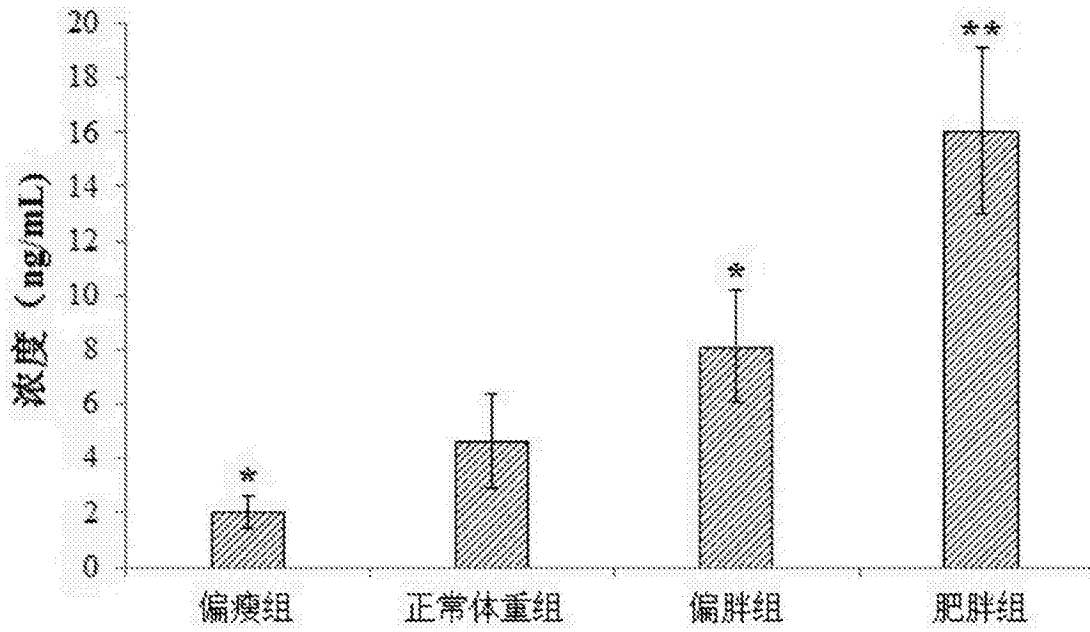


图7

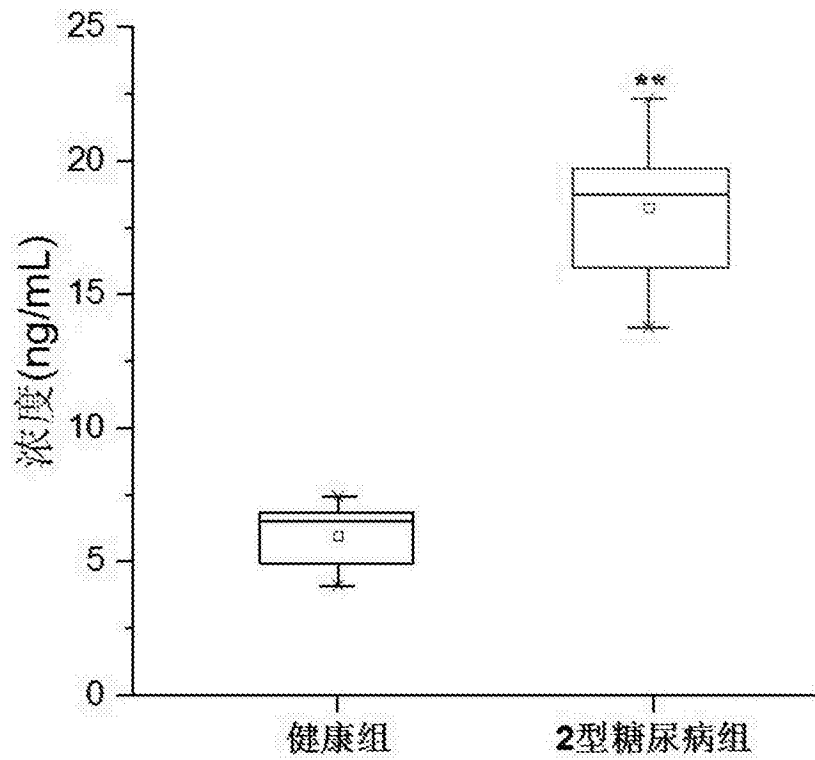


图8

专利名称(译)	一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其用途		
公开(公告)号	CN106645750A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611226603.9	申请日	2016-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
[标]发明人	李博 陈书强 王晶晶		
发明人	李博 陈书强 王晶晶		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/6893		
代理人(译)	胡乐		
其他公开文献	CN106645750B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出一种人源性asprosin蛋白的ELISA检测试剂盒及其用途。该试剂盒包括以下组分：酶标板、标准品、阴性对照品、阳性对照品、样品稀释液、洗涤缓冲液、二抗、抗体稀释液、显色液和终止液；所述酶标板由一种特定的添加有生物素标签的人源性asprosin蛋白的多克隆抗体包被，并用封闭缓冲液封闭；二抗能够与作为一抗的多克隆抗体进行特异性的结合。该试剂盒能够快速检测人或者动物标本中的asprosin蛋白含量，耗时少，使用简便，而且结果特异性强、敏感度高。基于此，本发明还构建了用于辅助诊断多囊卵巢综合征(PCOS)的检测设备体系，该检测设备体系只需再配置37℃冰箱、移液器和酶标仪。

	序列	备注
原始基因序列(原始密码子)	AGCACAAACGAAACTGATGCTCCAATATCGAGGATCAGTCTGAGACAGAAAGCCAATGTGAGTCTTGAAGTTGGGATGTTGAGAAGACAGCCATCTTTGCTTTCAATATTTCCACGTCAGTAACAAGGTTCCGATCTAGAACTCCTCCAGCTCTTACAACCTGACGAATCACAACAGATACTTGATCGAATCTGGAATGAAGATGGCTCTTTAAAAATCACCAAAAGGAAGGGATCAGTACCTCCACTTCAAAAAGAAAGCCAGTGGCTGGAACTATTATTACAATCAGTAGTACTCCACTTATAAAAAGAAAGAACTTAACCAACTAGAAGACAAATGACAAA GACTACCTCAGTGGTGAACCTGGGTGATAATCTGAAGATGAAAAATC CAGGTTTTGCTTCATTA	末尾 TAA 为终止密码子
优化后基因序列(原始密码子)	TCTACTAACGAGACTGACGCATCTAACATCGAGGACCAATCTGAGACTGAAAGCTAACGCTCTCTGGCATCTTGGGATGTTGAAAAGACG GCTATCTTCGGGTTCAACATTAGCCAGTATCCAACAAGATTGTA TCTGGAACTGCTGCTGCGCTGACCACTGACCAATCATAATC GCTATCTGATTGAATCCGGTAACGAAGATGGTTTTTCAAAATCAA CCAGAAAGAAGGATCAGTACCTGCACTTACCAAAAAAATC CCGTGGCCGTACTATAGCTGCTGAGATTAGCTCCACCCCACTGTA CAAAAAGAAGGAAGTGAACCAAGTGAAGACAAATACGACAAA GATTACTGTCCGGCGAAGTGGGCGATAACCTGAAAAATGAAAAATC CAGGTGCTGCTGACTAA	末尾 TAA 为终止密码子
氨基酸序列	STNETDASNIEDQSETEANVSLASWDVEKTAIFAFNISHVSNKVRILELLPALTTLNHNRYLIESGNEDGFFKINQKEGISYLHFTKKKPVAGTYSLQISSTPLYKKKELNQLQEDKYDKDYLSELGDNLMKIQVLLH*	*代表终止密码子, 不编码氨基酸
上游引物	CATATGCTACTAACGAGACTGA	CATATG 为 Nde I 酶切位点
下游引物	CTCGACACGTCGTCGGGACCTA	CTCGAG 为 Xho I 酶切位点