



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110333355 A

(43)申请公布日 2019.10.15

(21)申请号 201910423631.7

G01N 30/06(2006.01)

(22)申请日 2019.05.21

G01N 30/02(2006.01)

(71)申请人 泰达国际心血管病医院

地址 300000 天津市滨海新区经济技术开发区第三大街61号

(72)发明人 何国伟 袁超 侯海涛 杨沁
陈焕新 王君

(74)专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司 12107

代理人 李蕊

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图3页

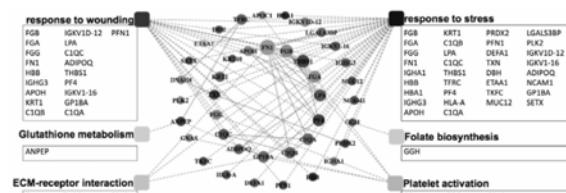
(54)发明名称

多蛋白组合物及应用与先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒

(57)摘要

先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压是危害人类特别是儿童讲的重要疾病。本发明利用现代生物学技术和生物信息学分析对脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的检测及功能进行研究并发现联合应用高浓度的丙氨酰膜氨基肽酶,脂联素和多巴胺 β -羟化酶具有预测先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压(以先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压为例)的用途,可应用于制备靶向药物来早期干预相关疾病,还可应用于制备先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒,所述试剂盒通过对三种蛋白浓度测定后建模,对先天性心脏病肺动脉高压这种疾病有着较好的评价效能和潜在的巨大应用价值,并且为进一步研究脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的生物学功能奠定了基础。

CN 110333355 A



1. 一种多蛋白组合物,其特征在于:由脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶组成。

2. 权利要求1所述多蛋白组合物在制备先天性心脏病肺动脉高压靶向药物或器械方面的应用。

3. 根据权利要求2所述多蛋白组合物的应用,其特征在于:所述疾病为先天性心脏病为肺动脉高压。

4. 根据权利要求2所述多蛋白组合物的应用,其特征在于:所述器械为先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒。

5. 一种应用上述多蛋白组合物的先天性心脏病筛查试剂盒,其特征在于:包含3种蛋白检测组:

第一检测组包括:包被有脂联素抗体的多孔板、脂联素纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、生物素标记抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液、样本稀释液、洗涤液、底物溶液和终止液,其中,

所述脂联素标准品浓度为0,1.56,3.125,6.25,12.5,25,50,100ng/ml;

所述生物素标记抗体为生物素化的抗脂联素抗体;

所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;

所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH 7.2;

所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.20.05%硫柳汞;

所述样本稀释液为86%氯化钠、4.5%磷酸氢二钠、3.5%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7;

所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml;

所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述终止液:2mol/L硫酸;

第二检测组包括:包被有丙氨酰膜氨基肽酶抗体的多孔板、丙氨酰膜氨基肽酶纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、生物素标记抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液、样本稀释液、洗涤液、底物溶液和终止液,其中,

所述丙氨酰膜氨基肽酶标准品浓度为0,31.25,62.5,125,250,500,1000,2000pg/ml;

所述生物素标记抗体为生物素化的抗丙氨酰膜氨基肽酶抗体;

所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;

所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH7.2;

所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.20.05%硫柳汞;

所述样本稀释液为85%氯化钠、5%磷酸氢二钠、4%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7;

所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml;

所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述终止液:2mol/L硫酸;

第三检测组包括:包被有多巴胺 β -羟化酶抗体的多孔板、多巴胺 β -羟化酶纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、洗涤液、底物溶液和终止液,其中,

所述多巴胺 β -羟化酶标准品浓度为0,2.5,10,40,125,500ng/ml;

所述生物素标记抗体为生物素化的抗多巴胺 β -羟化酶抗体；
所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素；
所述洗涤液：NaCl 9.0g, 0.5% 吐温20 6ml, 加蒸馏水至1000ml；
所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺；
所述终止液：2mol/L硫酸。

多蛋白组合物及应用与先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,尤其是多蛋白组合物的应用及先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒。

背景技术

[0002] 出生缺陷是导致婴儿和儿童死亡的第一位原因,而先天性心脏病(先心病)已经成为我国出生缺陷的首位病种,不仅影响儿童生长发育,而且影响成年人的长期生存质量,严重地制约了我国人口、环境资源的可持续发展,影响着我国国民经济的发展。

[0003] 先心病相关性PAH(pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease,以下简称为先心病PAH)是PAH的主要类型之一。国外报告先心病PAH占各种PAH的11%-24%。根据《中国心血管病报告2013》,在我国31家三级甲等医院调查表明,PAH的病因构成比中,先心病PAH高达49.6%。说明先心病PAH在我国是危害人民健康的重要疾病。

[0004] 肺动脉高压是以肺小动脉的血管痉挛、内膜增生和血管重构为主要特征的疾病,病理变化为血管收缩、血管壁重建及原位血栓形成,这三种因素共同作用导致肺血管阻力进行性升高,最终将可能导致心功能衰竭和死亡。

[0005] 先心病PAH的发生机制及病理改变极其复杂,牵涉到基因突变,蛋白质表达异常,代谢通路的异常,肺血管内皮细胞的损伤和增生以及功能障碍引起的肺血管重建。先天性心脏病室间隔缺损并发肺动脉高压是先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压的代表,故而我们以先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压为例研究先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压。近年来对PAH发病机制的研究主要包括:细胞代谢功能异常、氧化应激、性激素水平、免疫功能障碍以及细胞外基质信号通路。

[0006] 与PAH有关的病因学及基因学研究虽然已开展较多,但是与疾病相关的蛋白物质与疾病之间的关系并未有较多且深入全面的研究,远远没有达到人们的预期效果。寻找与疾病相关的关键蛋白,更深入、全面、直接的阐明疾病发生机理,在一定程度上可以为临床指导用药、评估治疗效果及预后提供科学证据。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种多蛋白组合物。

[0008] 本发明所要解决的另一技术问题在于提供上述多蛋白组合物的应用。

[0009] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压(以先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压为例)筛查试剂盒。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是:

[0011] 一种多蛋白组合物,由脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶组成。

[0012] 上述多蛋白组合物在制备先天性心脏病肺动脉高压靶向药物或器械方面的应用。

[0013] 优选的,上述多蛋白组合物的应用,所述疾病为先天性心脏病为肺动脉高压。

- [0014] 优选的,上述多蛋白组合物的应用,所述器械为先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒。
- [0015] 一种应用上述多蛋白组合物的先天性心脏病筛查试剂盒,包含3种蛋白检测组:
- [0016] 第一检测组包括:包被有脂联素抗体的多孔板、脂联素纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、生物素标记抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液、样本稀释液、洗涤液、底物溶液和终止液,
- [0017] 其中,
- [0018] 所述脂联素标准品浓度为0,1.56,3.125,6.25,12.5,25,50,100ng/ml;
- [0019] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗脂联素抗体;
- [0020] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;
- [0021] 所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH7.2;
- [0022] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.2 0.05%硫柳汞;
- [0023] 所述样本稀释液为86%氯化钠、4.5%磷酸氢二钠、3.5%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7;
- [0024] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml;
- [0025] 所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;
- [0026] 所述终止液:2mol/L硫酸。
- [0027] 上述内容通过常规方法即可制备得到。
- [0028] 上述内容的具体操作方法为:
- [0029] 1)取离体血浆样本,检测前在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min,用样本稀释液进行1:500倍稀释后进行检测;
- [0030] 2)标准品制备:将2份标准品离心30s后,用样品稀释液1ml充分溶解标准品(S8),使用移液器反复吹打至少5次,取1.5ml离心管7枚(S1-S7),各加入250μl样本稀释液,吸取250μl标准品S8到第一个离心管中(S7),轻轻吹打混匀;从S7中吸取250μl到第二个EP管中(S6),轻轻吹打混匀;以此类推进行标准品的倍比稀释;S1为样本稀释液;
- [0031] 3)操作步骤:
- [0032] a)针对设置的标准品孔、待测样本孔,每孔分别加标准品或待测样本100μl,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育2.5小时;
- [0033] b)弃去孔内液体,甩干;
- [0034] c)每孔加生物素标记抗体100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1.5小时;
- [0035] d)弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡2分钟,每孔加200μl,甩干;
- [0036] e)每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素标记亲和素工作液100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1小时;
- [0037] f)弃去孔内液体,甩干,按第5步方法洗板3次,甩干;
- [0038] g)每孔加底物溶液90μl,37摄氏度避光显色20分钟;
- [0039] h)每孔加终止液50μl,终止反应;
- [0040] i)反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值);
- [0041] 4)数据处理:
- [0042] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适

的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。

[0043] 第二检测组包括:包被有丙氨酰膜氨基肽酶抗体的多孔板、丙氨酰膜氨基肽酶纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、生物素标记抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液、样本稀释液、洗涤液、底物溶液和终止液,其中,

[0044] 所述丙氨酰膜氨基肽酶标准品浓度为0,31.25,62.5,125,250,500,1000,2000pg/ml;

[0045] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗丙氨酰膜氨基肽酶抗体;

[0046] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;

[0047] 所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH7.2;

[0048] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.2 0.05%硫柳汞;

[0049] 所述样本稀释液为85%氯化钠、5%磷酸氢二钠、4%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7;

[0050] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml;

[0051] 所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

[0052] 所述终止液:2mol/L硫酸。

[0053] 上述内容通过常规方法即可制备得到。

[0054] 上述内容的具体操作方法为:

[0055] 1) 血浆样本检测前在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min。

[0056] 2) 标准品制备:将2份标准品离心30s后,用样品稀释液1ml充分溶解标准品(S8),使用移液器反复吹打至少5次,取1.5ml离心管7枚(S1-S7),各加入250μl样本稀释液,吸取250μl标准品S8到第一个离心管中(S7),轻轻吹打混匀。从S7中吸取250μl到第二个EP管中(S6),轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S1为样本稀释液。

[0057] 3) 操作步骤:

[0058] a) 设标准品孔,待测样本孔。每孔分别加标准品或待测样本100μl,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育2.5小时;

[0059] b) 弃去孔内液体,甩干;

[0060] c) 每孔加生物素标记抗体100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1小时;

[0061] d) 弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡3分钟,每孔加200μl,甩干;

[0062] e) 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素标记亲和素工作液100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育90分钟;

[0063] f) 弃去孔内液体,甩干,按第5步方法洗板3次,甩干;

[0064] g) 每孔加底物溶液90μl,37摄氏度避光显色25分钟;

[0065] h) 每孔加终止液50μl,终止反应;

[0066] i) 反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值)。

[0067] 4) 数据处理:

[0068] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。

[0069] 第三检测组包括:包被有多巴胺β-羟化酶抗体的多孔板、多巴胺β-羟化酶纯品作为标准品、生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记亲和素、洗涤液、底物溶液和终止液,其

中，

[0070] 所述多巴胺 β -羟化酶标准品浓度为0,2.5,10,40,125,500ng/ml；

[0071] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗多巴胺 β -羟化酶抗体；

[0072] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素；

[0073] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 6ml,加蒸馏水至1000ml；

[0074] 所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺；

[0075] 所述终止液:2mol/L硫酸。

[0076] 上述内容通过常规方法即可制备得到。

[0077] 上述内容的具体操作方法为：

[0078] 1) 血浆样本检测前在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min。

[0079] 2) 操作步骤：

[0080] a) 设标准品孔,待测样本孔。每孔分别加相应浓度标准品或待测样本50 μ l；

[0081] b) 立即加入辣根过氧化物酶标记亲和素50 μ l,再按同样顺序加入生物素标记抗体50 μ l,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育60分钟；

[0082] c) 弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡2分钟,每孔加200 μ l,甩干；

[0083] d) 每孔加底物溶液100 μ l,37摄氏度避光显色15分钟；

[0084] e) 每孔加终止液50 μ l,终止反应；

[0085] f) 反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值)。

[0086] 3) 数据处理：

[0087] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。

[0088] 先天性心脏病肺动脉高压预测模型建立,具体操作方法如下：

[0089] 1) 按照浓度不同,对脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的血浆浓度进行分层并赋值：

[0090] a) 脂联素:<111.10ng/ml赋值1,111.10-140ng/ml赋值2, \geq 140ng/ml赋值3；

[0091] b) 丙氨酰膜氨基肽酶:<299.80pg/ml赋值1,299.80-500pg/ml赋值2, \geq 500pg/ml赋值3；

[0092] c) 多巴胺 β -羟化酶:<28.80ng/ml赋值1,28.80-45ng/ml赋值2, \geq 45ng/ml赋值3；

[0093] 2) 将三种蛋白所对应的赋值求和,命名为危险评分。危险评分结果提示:7-9分的先天性心脏病室间隔缺损极易出现肺动脉高压;5-6分的先天性心脏病室间隔缺损可能出现肺动脉高压;3-4分的先天性心脏病室间隔缺损不易出现肺动脉高压先天性心脏病室间隔缺损。(见图4)

[0094] 3) 该模型对先天性心脏病室间隔缺损的肺动脉高压发生诊断效能接近90%。(见图5)

[0095] 4) 先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压的发生与其他左向右分流的先天性心脏病合并肺动脉高压的机理类似。该模型以室间隔缺损肺动脉高压为例研究先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压。

[0096] 本发明的有益效果是：

[0097] 本发明利用现代生物学技术和生物信息学分析对脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多

巴胺 β -羟化酶的检测及功能进行了初步研究,高浓度的脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶具有预测先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压的用途,可应用于制备靶向药物来早期干预;同时,依赖三种蛋白浓度分层分析还可应用于制备先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压筛查试剂盒,所述试剂盒通过对三种蛋白浓度测定后建模,对先天性心脏病肺动脉高压这种疾病有着较好的评价效能和潜在的巨大应用价值,并且为进一步研究脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的生物学功能奠定了基础。

附图说明

- [0098] 图1是蛋白质组学检测到的含有脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的网络互作图;
- [0099] 图2是ELISA检测的脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶在先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压患儿,单纯先天性心脏病室间隔缺损及正常对照中的含量;
- [0100] 图3是在人体内脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶在先天性心脏病肺动脉高压(以室间隔缺损为例)的作用机制。
- [0101] 图4是先天性心脏病肺动脉高压预测模型(以室间隔缺损为例)及具体赋值情况。
- [0102] 图5是先天性心脏病肺动脉高压预测模型(以室间隔缺损为例)诊断效能评价结果。

具体实施方式

[0103] 为了使本领域的技术人员更好的理解本发明的技术方案,下面结合附图及具体实施方式对本发明所述技术方案作进一步的详细说明。

- [0104] 实施例1
- [0105] 1. 人体血浆样本的收集
 - [0106] 所有先天性心脏病室间隔缺损(实验组及疾病对照组)及正常对照儿童(健康对照组)均在手术前一天早晨,禁食>10h的情况下进行血样采集。每位患者自周围静脉采全血2ml,立即于2500rpm离心10分钟,分离上层血浆。再将分离的血浆分为数等份,置于血浆收集管中,置于-80摄氏度冰箱冻存待检。
 - [0107] 2. 蛋白质组学检测
 - [0108] 1) 血浆蛋白质组检测
 - [0109] 采用iTRAQ联合多维液相色谱-质谱联用技术(LC-MS/MS) (Applied Biosystems, Foster City, CA) 检测两组各混合样本中的蛋白质。
 - [0110] 2) 样品制备
 - [0111] a) 购买高丰度蛋白去除试剂盒(ProteoExtractTM Albumin/IgG Removal Kit, CALBIOCHEM, USA),去除高丰度蛋白。
 - [0112] b) 加入5倍体积的丙酮,-20℃沉淀1小时。4℃,10000g离心10分钟,
 - [0113] 收集沉淀。
 - [0114] c) 将干燥后的粉末溶解液于样品裂解液中,30℃恒温水浴充分溶解蛋白。
 - [0115] d) 将溶液在室温下15000g离心15min,取上清,并再次离心取上清,充分去除不容性杂质。

[0116] e) 上清即为组织的总蛋白溶液,进行蛋白浓度测定并分装后储存于-80℃备用或直接用于iTRAQ分析。

[0117] 3) 样品定量

[0118] 样品按定量原理:BCA (bicinchoninic acid) 与二价铜离子的硫酸铜

[0119] 等其他试剂组成的试剂,混合一起即成为苹果绿,即BCA工作试剂。在碱性条件下,BCA与蛋白质结合时,蛋白质将Cu²⁺还原为Cu⁺,一个Cu⁺螯合二个BCA分子,工作试剂由原来的苹果绿形成紫色复合物,该水溶性的复合物在562nm处显示最大吸光性,吸光度和蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系,因此根据吸光值可以推算出蛋白浓度。

[0120] 按照BCA方法定量样品中蛋白质。实验步骤如下:

[0121] a) 以标准蛋白浓度为横坐标,OD562为纵坐标制作标准曲线图,求出

[0122] 回归方程。

[0123] b) 用OD562的值对BSA浓度做标准曲线。

[0124] c) 取适量体积的待测样品稀释10倍,检测样品吸光度,计算其平均

[0125] OD562,代入回归方程,最后计算出待测样品的测得浓度,测得浓度乘以10后即为样品的真实浓度。

[0126] 4) SDS-PAGE电泳样品检测实验

[0127] a) 每个样品取10μg,采用12% SDS-PAGE进行分离。

[0128] b) 分离后的凝胶采用考马斯亮兰染色法进行染色。具体操作如下:固定2小时;染色12小时;水洗至背景清晰。

[0129] c) 染色后的凝胶应用ImageScanner扫描仪进行扫描,扫描模式为灰度

[0130] 模式,光密度值为300dpi。

[0131] 5) 蛋白还原烷基化及酶解

[0132] 具体步骤如下:

[0133] a) 蛋白定量后每个样品各取100μg,采用5倍体积预冷丙酮进行沉淀,-20℃放置1小时,充分沉淀蛋白。

[0134] b) 4℃,12,000rpm离心10分钟,取沉淀真空冷冻干燥。

[0135] c) 采用50μl iTRAQ试剂盒中的Dissolution Buffer充分溶解蛋白沉淀,加入4μl Reducing Reagent,60℃反应1小时。

[0136] d) 加入2μl Cysteine-Blocking Reagent,室温反应10分钟,将还原烷基化后的蛋白溶液加入10K的超滤管中,12,000rpm离心20分钟,弃掉收集管底部溶液。

[0137] e) 加入100μl Dissolution Buffer,12,000rpm离心20分钟,弃掉收集管底部溶液,重复3次。

[0138] f) 更换新收集管,在超滤管中加入50μl浓度为50ng/μl的测序级胰蛋白酶溶液,37℃反应12小时。

[0139] g) 12,000rpm离心20分钟,收集酶解后肽段,在超滤管中再加入50μl

[0140] Dissolution Buffer,12000rpm离心20分钟,收集管底溶液并与前次溶液合并。

[0141] 6) 蛋白标记及质谱预实验

[0142] a) 从冰箱中取出iTRAQ试剂,平衡到室温;

[0143] b) 将iTRAQ试剂离心至管底;

- [0144] c) 用150 μ l异丙醇溶解iTRAQ试剂；
- [0145] d) 取50 μ l样品(100 μ g酶解产物)转移到新的离心管中,加入iTRAQ试剂后室温反应2小时；
- [0146] e) 加入100 μ l水终止反应；
- [0147] f) 混合所有标记样品,涡旋振荡,离心至管底；
- [0148] g) 真空冷冻干燥样品,留作iTRAQ分离鉴定。
- [0149] 7) 2D-LC-MSMS分析反相色谱分离
- [0150] a) 冷冻干燥后的样品用110 μ L流动相A溶液溶解；
- [0151] b) 肽段分离在Agilent 1200HPLC上进行,购买色谱柱Agilent公司色谱柱,具体参数为:保护柱:Analytical Guard Column 4.6*12.5mm 5-Micron. 分离柱:Narrow-Bore 2.1*150mm 5 μ m,检测波长:紫外210nm和280nm;流速:0.3ml/min,非线性二元梯度。
- [0152] 肽段色谱分离流动相比例时间表见表1。
- [0153] 表1
- [0154]

时间 (min)	0	3	3.01	40	50	50.01	60	60.01	65
%	2	2	6	25	38	90	90	2	2

- [0155] c) 0-5分钟丢弃,6-45分钟每4.5分钟收集1管,46-50分钟收集成1管,总共10管样品溶液,然后将每管溶液彻底冷冻干燥。得到一维分离色谱图。

- [0156] 反向色谱-TripleTOF分析
- [0157] a) 将阳离子交换分离后冻干的多肽样品重新溶解于Nano-RPLC Buffer A中。
- [0158] b) 在线Nano-RPLC液相色谱在Eksigent nanoLC-UltraTM2D系统(AB SCIEX)进行,溶解后的样品以2 μ L/min的流速上样到C18预柱上(100 μ m \times 3cm,C18,3 μ m,150 \AA),然后保持流速冲洗脱盐10min。
- [0159] c) 分析柱是C18反相色谱柱(75 μ m x 15cm C18-3 μ m 120 \AA , ChromXP Eksigent),实验所用梯度为70min内流动相B由5%升高至35%。
- [0160] d) 质谱采用TripleTOF5600系统(AB SCIEX)结合纳升喷雾III离子源(AB SCIEX, USA),喷雾电压为2.5kV,气帘气压为30PSI,雾化气压为5PSI,加热器温度为150 $^{\circ}$ C,质谱扫描方式为信息依赖的采集工作模式下(IDA, Information Dependent Analysis),一级TOF-MS单张图谱扫描时间为250ms,每次IDA循环下最多采集35个电荷为2+到5+且单秒计数大于150的二级图谱,每次循环时间固定为2.5秒,碰撞室能量设定适用于所有前体离子碰撞诱导解离(CID),动态排除设置为18秒,约等于色谱半峰宽。
- [0161] 8) 数据库检索
- [0162] 数据处理采用含Paragon algorithm算法的Protein Pilot Software v.5.0(AB SCIEX, USA)软件进行,本次实验使用的数据库为人数据库,数据库来源于Uniprot。蛋白质鉴定主要是通过实验串联质谱数据与数据库模拟得到的理论质谱数据进行匹配,从而得到

蛋白质鉴定结果。设置参数如下：

- [0163] 蛋白质组质谱检索参数
- [0164] Sample Type:iTRAQ 8plex (Peptide Labeled)
- [0165] Cys.Alkylation:Iodoacetamide
- [0166] Digestion:Trypsin
- [0167] Instrument:TripleTOF 5600
- [0168] Database:Homo Sapiens.fasta
- [0169] Search Effort:Thorough
- [0170] User Modified Parameter Files:No
- [0171] 蛋白质组学检测到的含有脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺β-羟化酶的网络互作图见图1。
- [0172] 实施例2
- [0173] 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
- [0174] 采用ELISA法在验证组血浆样本中对蛋白质组学结果中筛选出的脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺β-羟化酶进行验证。实验原理:待测蛋白的抗体预埋于96孔板底部,标准品和样品加入后,其中的待测蛋白会与抗体结合。在去除未结合的基他底物后,加入待测蛋白的生物素共轭抗体。冲洗,加入抗生物素共轭辣根过氧化物酶标记抗体 (HRP) ,通过冲洗去除未结合的HRP。加入显色剂,终止反应后,测量液体的吸光度。
- [0175] 验证脂联素蛋白实验,包含:
- [0176] 包被有脂联素抗体的多孔板
- [0177] 脂联素纯品作为标准品
- [0178] 生物素标记抗体
- [0179] 辣根过氧化物酶标记亲和素
- [0180] 生物素标记抗体稀释液
- [0181] 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液
- [0182] 样本稀释液
- [0183] 洗涤液
- [0184] 底物溶液
- [0185] 终止液
- [0186] 其中
- [0187] 所述脂联素标准品浓度为0,1.56,3.125,6.25,12.5,25,50,100ng/ml;
- [0188] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗脂联素抗体;
- [0189] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;
- [0190] 所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH7.2;
- [0191] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.2 0.05%硫柳汞;
- [0192] 所述样本稀释液为86%氯化钠、4.5%磷酸氢二钠、3.5%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7;
- [0193] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml;
- [0194] 所述底物溶液为3,3',5,5' -四甲基联苯胺;

[0195] 所述终止液:2mol/L硫酸。

[0196] 具体操作方法为:

[0197] 1) 检测前血浆样本在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min,用样本稀释液进行1:500倍稀释后进行检测。

[0198] 2) 标准品制备:将2份标准品离心30s后,用样品稀释液1ml充分溶解标准品(S8),使用移液器反复吹打至少5次,取1.5ml离心管7枚(S1-S7),各加入250μl样本稀释液,吸取250μl标准品S8到第一个离心管中(S7),轻轻吹打混匀;从S7中吸取250μl到第二个EP管中(S6),轻轻吹打混匀;以此类推进行标准品的倍比稀释;S1为样本稀释液。

[0199] 3) 操作步骤:

[0200] a) 针对设置的标准品孔、待测样本孔,每孔分别加标准品或待测样本100μl,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育2.5小时;

[0201] b) 弃去孔内液体,甩干;

[0202] c) 每孔加生物素标记抗体100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1.5小时;

[0203] d) 弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡2分钟,每孔加200μl,甩干;

[0204] e) 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素标记亲和素工作液100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1小时;

[0205] f) 弃去孔内液体,甩干,按第5步方法洗板3次,甩干;

[0206] g) 每孔加底物溶液90μl,37摄氏度避光显色20分钟;

[0207] h) 每孔加终止液50μl,终止反应;

[0208] i) 反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值);

[0209] 4) 数据处理:

[0210] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。结果见附图2。

[0211] 验证丙氨酰膜氨基肽酶,包含:

[0212] 包被有丙氨酰膜氨基肽酶抗体的多孔板

[0213] 丙氨酰膜氨基肽酶纯品作为标准品

[0214] 生物素标记抗体

[0215] 辣根过氧化物酶标记亲和素

[0216] 生物素标记抗体稀释液

[0217] 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液

[0218] 样本稀释液

[0219] 洗涤液

[0220] 底物溶液

[0221] 终止液

[0222] 其中:

[0223] 所述丙氨酰膜氨基肽酶标准品浓度为0,31.25,62.5,125,250,500,1000,2000pg/ml;

[0224] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗丙氨酰膜氨基肽酶抗体;

- [0225] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素；
[0226] 所述生物素标记抗体稀释液为:0.05%叠氮钠,0.01M磷酸缓冲液pH7.2；
[0227] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液:0.01M磷酸缓冲液pH7.2 0.05%硫柳汞；
[0228] 所述样本稀释液为85%氯化钠、5%磷酸氢二钠、4%磷酸二氢钠、5%山羊血清,1%Proclin-300,pH值为6-7；
[0229] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 5ml,加蒸馏水至1000ml；
[0230] 所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺；
[0231] 所述终止液:2mol/L硫酸。
[0232] 具体操作方法为：
[0233] 1) 血浆样本检测前在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min。
[0234] 2) 标准品制备:将2份标准品离心30s后,用样品稀释液1ml充分溶解标准品(S8),使用移液器反复吹打至少5次,取1.5ml离心管7枚(S1-S7),各加入250μl样本稀释液,吸取250μl标准品S8到第一个离心管中(S7),轻轻吹打混匀。从S7中吸取250μl到第二个EP管中(S6),轻轻吹打混匀。以此类推进行标准品的倍比稀释。S1为样本稀释液。
[0235] 3) 操作步骤：
[0236] a) 设标准品孔,待测样本孔。每孔分别加标准品或待测样本100μl,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育2.5小时；
[0237] b) 弃去孔内液体,甩干；
[0238] c) 每孔加生物素标记抗体100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育1小时；
[0239] d) 弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡3分钟,每孔加200μl,甩干；
[0240] e) 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素标记亲和素工作液100μl,贴上贴膜,37摄氏度温育90分钟；
[0241] f) 弃去孔内液体,甩干,按第5步方法洗板3次,甩干；
[0242] g) 每孔加底物溶液90μl,37摄氏度避光显色25分钟；
[0243] h) 每孔加终止液50μl,终止反应；
[0244] i) 反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值)。
[0245] 4) 数据处理：
[0246] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。结果见附图2。
[0247] 验证多巴胺β-羟化酶,包含：
[0248] 包被有多巴胺β-羟化酶抗体的多孔板
[0249] 多巴胺β-羟化酶纯品作为标准品
[0250] 生物素标记抗体
[0251] 辣根过氧化物酶标记亲和素
[0252] 洗涤液
[0253] 底物溶液
[0254] 终止液
[0255] 其中：

- [0256] 所述多巴胺 β -羟化酶标准品浓度为0,2.5,10,40,125,500ng/ml;
- [0257] 所述生物素标记抗体为生物素化的抗多巴胺 β -羟化酶抗体;
- [0258] 所述辣根过氧化物酶标记亲和素为链霉亲和素;
- [0259] 所述洗涤液:NaCl 9.0g,0.5%吐温20 6ml,加蒸馏水至1000ml;
- [0260] 所述底物溶液为3,3',5,5'-四甲基联苯胺;
- [0261] 所述终止液:2mol/L硫酸。
- [0262] 上述内容通过常规方法即可制备得到。
- [0263] 上述内容的具体操作方法为:
- [0264] 1) 血浆样本检测前在4摄氏度环境下过夜融化,2500rpm离心10min。
- [0265] 2) 操作步骤:
- [0266] a) 设标准品孔,待测样本孔。每孔分别加相应浓度标准品或待测样本50 μ l;
- [0267] b) 立即加入辣根过氧化物酶标记亲和素50 μ l,再按同样顺序加入生物素标记抗体50 μ l,轻轻晃动混匀,贴上版贴,37摄氏度温育60分钟;
- [0268] c) 弃去孔内液体,甩干,用洗涤液洗板3次,每次浸泡2分钟,每孔加200 μ l,甩干;
- [0269] d) 每孔加底物溶液100 μ l,37摄氏度避光显色15分钟;
- [0270] e) 每孔加终止液50 μ l,终止反应;
- [0271] f) 反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm处测量各孔的光密度(OD值)。
- [0272] 3) 数据处理:
- [0273] 使用CurveExpert (version 1.4) 软件对OD值进行处理,使用标准品OD值绘制合适的标准曲线并得到相应函数后,将各样品孔OD值代入函数后得到各孔样本浓度值。结果见附图2。
- [0274] 实施例3
- [0275] 先天性心脏病肺动脉高压预测模型(以室间隔缺损为例)建立,具体操作方法如下:
- [0276] 1) 在实施例2中,按照检测的脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的血浆浓度进行分层并赋值:
- [0277] a) 脂联素:<111.10ng/ml赋值1,111.10-140ng/ml赋值2, \geq 140ng/ml赋值3;
- [0278] b) 丙氨酰膜氨基肽酶:<299.80pg/ml赋值1,299.80-500pg/ml赋值2, \geq 500pg/ml赋值3;
- [0279] c) 多巴胺 β -羟化酶:<28.80ng/ml赋值1,28.80-45ng/ml赋值2, \geq 45ng/ml赋值3;
- [0280] 2) 将三种蛋白所对应的赋值求和,命名为危险评分。危险评分结果提示:7-9分的先天性心脏病室间隔缺损极易出现肺动脉高压;5-6分的先天性心脏病室间隔缺损可能出现肺动脉高压;3-4分的先天性心脏病室间隔缺损不易出现肺动脉高压先天性心脏病室间隔缺损。(见图4)
- [0281] 3) 该模型对先天性心脏病室间隔缺损的肺动脉高压发生诊断效能接近90%。(见图5)
- [0282] 综上通过实施例1,发现先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压患儿血浆中脂联素的浓度高于单纯室间隔缺损患儿。脂联素通过AMPK信号通路可一方面抑制血管平滑肌迁移,另一方面促进肺动脉血管平滑肌的糖酵解参与肺动脉高压的形成。多巴胺 β -羟化酶参

与cAMP通路中GPCR配体的生成,参与cAMP通路调节,参与肺动脉高压管壁增厚。丙氨酰膜氨基肽酶同样有报道参与血管生成这一病理生理学过程,可能参与肺动脉高压。图3为脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶参与肺动脉高压的形成的过程。

[0283] 针对实施例1中蛋白质组学对于先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压筛查诊断的结果,实施例2采用ELSI A方法再次证实了肺动脉高压患儿血浆中脂联素,丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的浓度高于单纯先天性心脏病室间隔缺损。结果与实施例1一致,见图2。

[0284] 针对实施例3中的蛋白质浓度进行分组并赋值,通过求和得到先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压的危险评分,发现7-9分的先天性心脏病室间隔缺损极易出现肺动脉高压;5-6分的先天性心脏病室间隔缺损可能出现肺动脉高压;3-4分的先天性心脏病室间隔缺损不易出现肺动脉高压先天性心脏病室间隔缺损(见图4)。该评分对先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压的发生率具有较好的诊断效能。(见图5)

[0285] 上述参照具体实施方式对该多蛋白组合物的应用及先天性心脏病筛查试剂盒进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

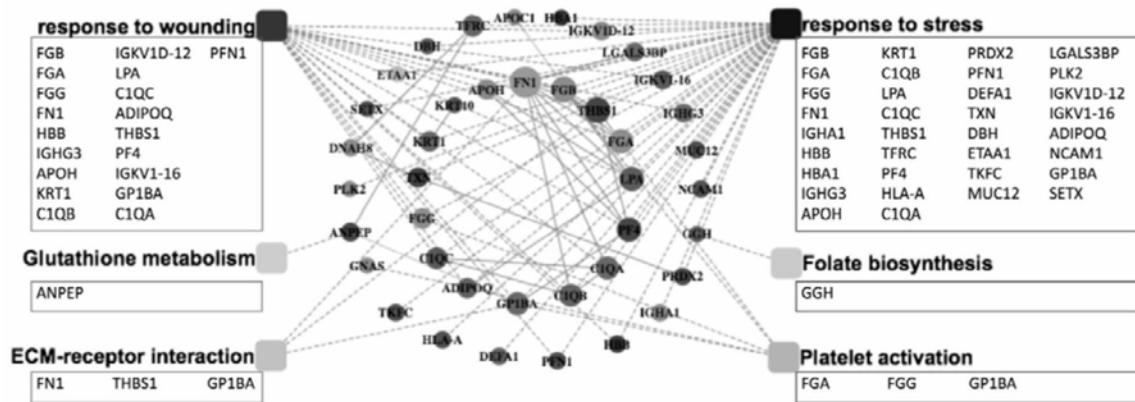


图1

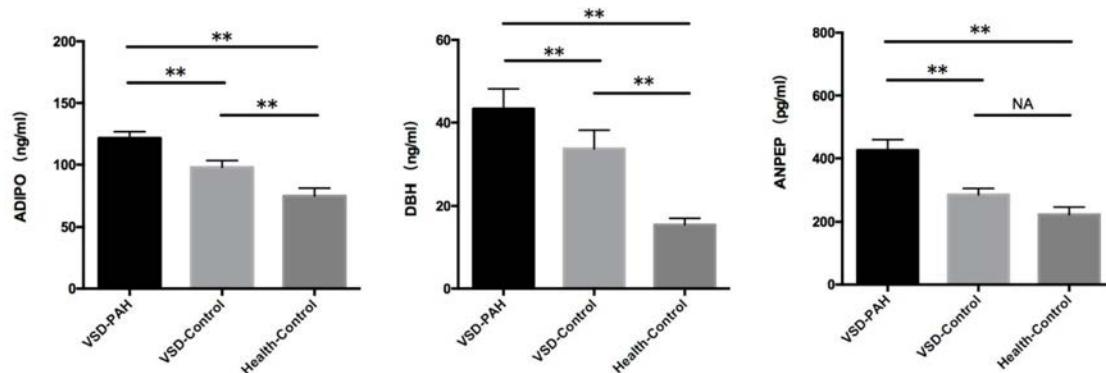


图2

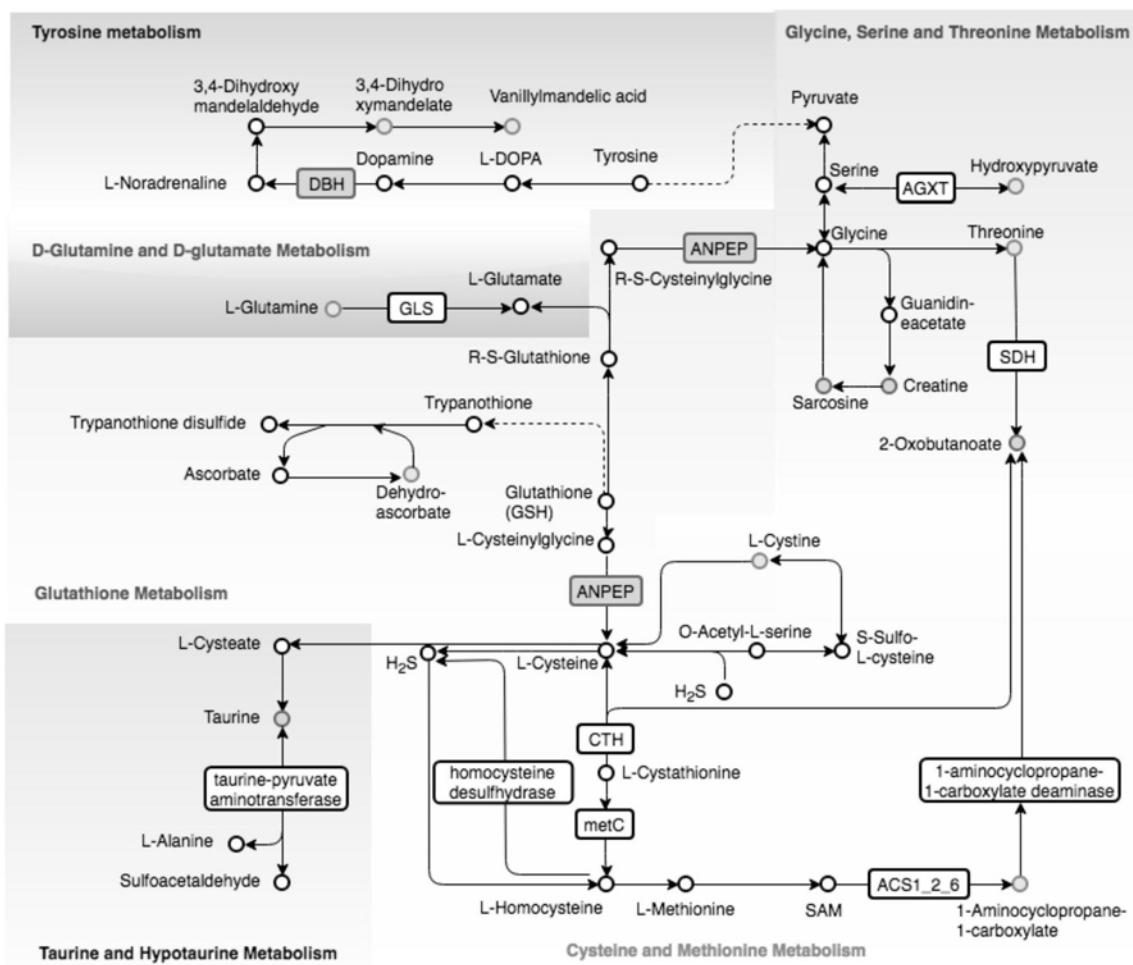
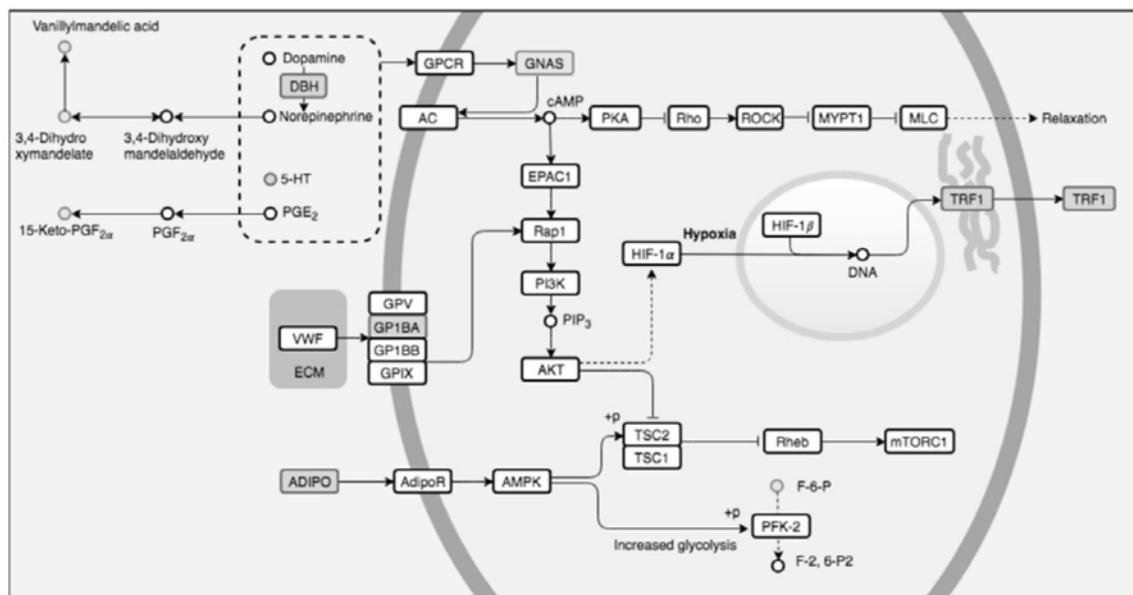


图3

	DBH1	DBH2	DBH3	
ADIPO3	7	8	9	
ADIPO2	6	7	8	ANPEP3
ADIPO1	5	6	7	
ADIPO3	6	7	8	
ADIPO2	5	6	7	ANPEP2
ADIPO1	4	5	6	
ADIPO3	5	6	7	
ADIPO2	4	5	6	ANPEP1
ADIPO1	3	4	5	

图4

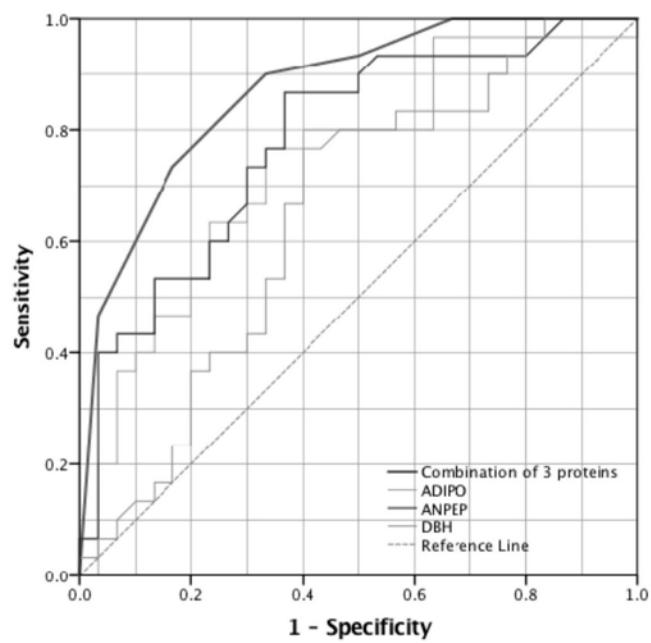


图5

专利名称(译)	多蛋白组合物及应用与先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒		
公开(公告)号	CN110333355A	公开(公告)日	2019-10-15
申请号	CN201910423631.7	申请日	2019-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	泰达国际心血管病医院		
申请(专利权)人(译)	泰达国际心血管病医院		
当前申请(专利权)人(译)	泰达国际心血管病医院		
[标]发明人	何国伟 袁超 侯海涛 杨沁 陈焕新 王君		
发明人	何国伟 袁超 侯海涛 杨沁 陈焕新 王君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/573 G01N30/72 G01N30/06 G01N30/02		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N30/724 G01N33/535 G01N33/573 G01N33/68 G01N33/6848 G01N2030/027 G01N2560/00 G01N2800/32		
代理人(译)	李蕊		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压是危害人类特别是儿童讲的重要疾病。本发明利用现代生物学技术和生物信息学分析对脂联素，丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的检测及功能进行研究并发现联合应用高浓度的丙氨酰膜氨基肽酶，脂联素和多巴胺 β -羟化酶具有预测先天性心脏病(左向右分流)合并肺动脉高压(以先天性心脏病室间隔缺损肺动脉高压为例)的用途，可应用于制备靶向药物来早期干预相关疾病，还可应用于制备先天性心脏病肺动脉高压筛查试剂盒，所述试剂盒通过对三种蛋白浓度测定后建模，对先天性心脏病肺动脉高压这种疾病有着较好的评价效能和潜在的巨大应用价值，并且为进一步研究脂联素，丙氨酰膜氨基肽酶和多巴胺 β -羟化酶的生物学功能奠定了基础。

