



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107022028 A
(43)申请公布日 2017.08.08

(21)申请号 201710096048.0

(22)申请日 2017.02.22

(71)申请人 哈桑·阿拉姆

地址 美国密西根州安娜堡市棉尾兔街3115号

申请人 李永清 崇巍

(72)发明人 哈桑·阿拉姆 李永清 崇巍

(74)专利代理机构 辽宁东来律师事务所 21239

代理人 张成

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

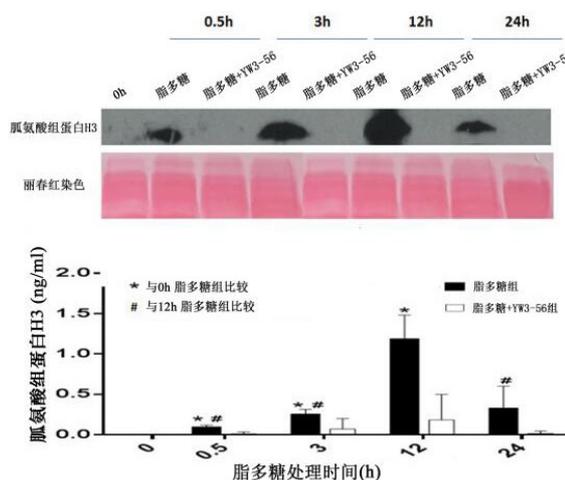
权利要求书2页 说明书7页
序列表5页 附图5页

(54)发明名称

特异性抗CitH3单克隆抗体及其酶联免疫吸附试验试剂盒在脓毒症诊断中的应用

(57)摘要

本发明公开了特异性抗CitH3单克隆抗体以及包含该抗体的定量检测CitH3的ELISA试剂盒。本发明的试剂盒能够高度灵敏和特异地定量测定人CitH3,用于脓毒症早期诊断和治疗及预后评估,降低该病的高病死率。



1. 抗CitH3特异性单克隆抗体,其中所述抗体是用SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的肽制备的。

2. 权利要求1所述的抗体,其包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链CDR1、SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的轻链CDR2、SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR3、SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的重链CDR1、SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR3。

3. 权利要求2所述的抗体,其包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链可变区和/或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的重链可变区。

4. 权利要求3所述的抗体,其氨基酸序列与SEQ ID NO: 18有大于90%的序列同一性。

5. 权利要求4所述的抗体,其氨基酸序列为SEQ ID NO: 18。

6. 权利要求1-5任一项的抗体,其为单克隆抗体。

7. 权利要求1-6任一项的抗体在制备检测生物样品中CitH3的试剂盒中的应用。

8. 权利要求7所述的应用,其中生物样品选自血清学样品、脑脊液、尿液、唾液或腹水。

9. 权利要求7所述的应用,其中生物样品来自人类、非人类灵长动物、啮齿动物、狗。

10. 权利要求7-9任一项所述的应用,其中检测过程包括:

将所述对象的生物样品暴露于权利要求1-6任一项的抗体;对所述样品中存在的CitH3的量进行定量;将所述样品中存在的CitH3的量与已知标准进行比较。

11. 权利要求10所述的应用,其中检测过程包括:

将所述对象的生物样品暴露于权利要求1-6任一项的抗体;对所述样品中存在的被所述抗体结合的CitH3的量进行定量;将所述样品中存在的CitH3的量与:a.已知标准,或b.在较早时间点从所述对象获得的生物样品进行比较;以及确定所属对象的CitH3水平是否提示脓毒症或脓毒性休克的诊断、严重程度、治疗和预后效果。

12. 权利要求11所述的应用,其中a.已知标准为源自于被鉴定为未患脓毒症的对象的CitH3水平,或源自于被鉴定为患有脓毒症或脓毒性休克的对象的CitH3的水平。

13. 一种用于特异性检测胍氨酸组蛋H3 (CitH3) 蛋白的酶联免疫吸附试验试剂盒,该试剂盒含有:权利要求1-6任一项所述的第一抗体;以及至少一种结合CitH3的第二抗体。

14. 根据权利要求13的试剂盒,进一步包含用作标准和用于校准目的的肽。

15. 根据权利要求14的试剂盒,其中所述用作标准和用于校准目的的肽具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

16. 根据权利要求13的试剂盒,其中所述试剂盒用于测定体液样品中CitH3。

17. 根据权利要求16的试剂盒,其中体液样品选自血清学样品、脑脊液、尿液、唾液或腹水。

18. 根据权利要求13-17任一项的试剂盒,其中所述第一或第二抗体之一固定在表面上。

19. 根据权利要求13-18任一项的试剂盒,还包括用于在不使用时容纳所述抗体的容器,和使用说明书。

20. 一种多核苷酸,其编码特异性针对CitH3的抗体,该抗体包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链CDR1、SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的轻链CDR2、SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR3、SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的重链CDR1、SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链

CDR2、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR3。

21. 权利要求20的多核苷酸,其包含SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16的核苷酸序列。

22. 权利要求21的多核苷酸,其包含SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 17的核苷酸序列。

特异性抗CitH3单克隆抗体及其酶联免疫吸附试验试剂盒在脓毒症诊断中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及脓毒症诊断领域,具体地说,本发明提供了瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)特异性抗体以及使用该抗体酶联免疫吸附试验检测CitH3用于诊断脓毒症的方法以及相应的试剂盒。

背景技术

[0002] 脓毒症是严重的全身性炎症性疾病,可进展为脓毒性休克,脓毒性休克是临床重症,具有高病死率。脓毒症的相关病理机制错综复杂,免疫促进和抑制在脓毒症中矛盾存在,并与病情发展同步,呈现出相应的变化。脓毒症早期体征常无特异性且难以察觉,且前驱症状易与非感染性疾病混淆。有效的血培养是诊断脓毒症的金标准。但是,血培养阳性结果获得需48h以上,且由于感染早期血中细菌密度低,血培养常为阴性。因而,那些具有高灵敏度、特异度和预测值的替代性指标,可有助于脓毒症的早期发现、监测脓毒症的进展以及对其的治疗效果。目前发现的生物学标记物已经有很多,包括降钙素原、白介素1 β (IL-1 β),白介素6(IL-6),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,其中许多生物学标志物因循环半衰期短而应用受限,部分已应用于临床的标记物,敏感性和特异性均不理想,既不能对脓毒症进行早期诊断,也难以区分脓毒症和其他非感染性创伤,进而造成不可逆的损伤和死亡。

[0003] 本发明的发明人发现瓜氨酸化组蛋白H3(citrullinated histone H3,CitH3)是一个理想的脓毒症和脓毒性休克诊断标志物。Pan等研究者发现脓毒性休克模型小鼠外周血中的CitH3蛋白,可在损伤早期(0.5h)出现并持续存在,既可用于脓毒症的早期诊断,且可用来评估脓毒症患者的预后和病情的严重程度以及反映治疗效果,参见Pan等,12th Academic Surgical Congress(2017)。

[0004] 现有检测CitH3的方法为蛋白免疫印迹(western blotting),但该方法只能定性检测CitH3,即只能检测样品中是否存在CitH3,但不能检测CitH3实际浓度,且操作上复杂和耗时,这些缺点严重限制CitH3作为脓毒症诊断标志物的实用性。本发明提供的单克隆抗体较现有商业化单克隆抗体对CitH3有更高的亲和性。相比于蛋白免疫印迹,利用本发明所提供的单克隆抗体进行酶联免疫吸附试验(ELISA)能够更灵敏、精准地检测样品中CitH3具体浓度,当患者血中CitH3的浓度超过阈值时,可提示脓毒症的诊断;且此试剂盒可应用于人体样品的检测例如血清学样品(如:全血、血清或血浆)、脑脊液、尿液、唾液或腹水中,因而扩展了CitH3在临床中的应用。

发明内容

[0005] 为克服现有技术中缺乏CitH3 ELISA检测方法及相关检测用抗体的问题:

一方面,本发明提供了一种CitH3特异性抗体,其中所述抗体是用SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的肽制备的。

[0006] 进一步地,该抗体包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链CDR1、SEQ ID NO: 3的

氨基酸序列的轻链CDR2、SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR3、SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的重链CDR1、SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR3。

[0007] 进一步地,该抗体包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的轻链可变区和/或SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的重链可变区。

[0008] 进一步地,该抗体氨基酸序列与SEQ ID NO: 18有大于90%的序列同一性。

[0009] 进一步地,该抗体氨基酸序列为SEQ ID NO: 18。

[0010] 进一步地,该抗体为单克隆抗体。

[0011] 另一方面,本发明提供抗CitH3特异性单克隆抗体在制备检测生物样品中CitH3的试剂盒中的应用。

[0012] 进一步地,生物样品选自血清学样品、脑脊液、尿液、唾液或腹水。

[0013] 进一步地,生物样品来自人类、非人类灵长动物、啮齿动物、狗。

[0014] 进一步地,检测过程包括:

将上述对象的生物样品暴露于前述任一项的抗体;对所述样品中存在的CitH3的量进行定量;将所述样品中存在的CitH3的量与已知标准进行比较。

[0015] 进一步地,检测过程包括:

将上述对象的生物样品暴露于前述任一项的抗体;对所述样品中存在的被所述抗体结合的CitH3的量进行定量;将所述样品中存在的CitH3的量与:a.已知标准,或b.在较早时间点从所述对象获得的生物样品进行比较;以及确定所属对象的CitH3水平是否提示脓毒症或脓毒性休克的诊断、严重程度、治疗和预后效果。

[0016] 进一步地, a.已知标准为源自于被鉴定为未患脓毒症的对象CitH3水平,或源自于被鉴定为患有脓毒症或脓毒性休克的对象CitH3的水平。

[0017] 另一方面,本发明提供了一种用于特异性检测瓜氨酸组蛋白H3(CitH3)蛋白的ELISA免疫测定试剂盒,该试剂盒含有:前述任一项所述的第一抗体;以及至少一种结合CitH3的第二抗体。

[0018] 进一步地,该试剂盒进一步包含用作标准和用于校准目的的肽。

[0019] 进一步地,所述用作标准和用于校准目的的肽具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0020] 进一步地,该试剂盒用于测定体液样品中CitH3。

[0021] 进一步地,体液样品选自血清学样品、脑脊液、尿液、唾液或腹水。

[0022] 进一步地,该试剂盒中所述第一或第二抗体之一固定在表面上。

[0023] 进一步地,该试剂盒还包括用于在不使用时容纳所述抗体的容器,和使用说明书。

[0024] 另一方面,本发明提供了一种多核苷酸,其编码特异性针对CitH3的抗体,该抗体包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的轻链CDR1、SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的轻链CDR2、SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链CDR3、SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的重链CDR1、SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的重链CDR2、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的重链CDR3

进一步地,该多核苷酸含SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16的核苷酸序列。

[0025] 进一步地,该多核苷酸包含SEQ ID NO: 13和SEQ ID NO: 17的核苷酸序列。

[0026] 本发明所提供的抗体可特异结合体液CitH3片段,通过与对照抗体的对比可以证

实这一点,对照抗体由一种肽作为抗原制备而来。该肽选自人来源组蛋白(Histone)H3的氨基末端1到30个位的氨基酸残基,具有SEQ ID NO: 19中描述的氨基酸序列。

[0027] 本发明试剂盒中的第二抗体可选用商业化抗CitH3多克隆抗体(ab5103, Abcam, Cambridge, MA, USA)或其他CitH3抗体;第二抗体特异结合物质可选用商业化过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(111-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)或其他ELISA可用的免疫球蛋白。

附图说明

[0028] 图1显示血清胍氨酸化组蛋白H3(CitH3)和组蛋白H3(H3)可能来源的示意图。

[0029] 图2显示脓毒性休克模型小鼠外周血中的CitH3蛋白在不同时间段的水平(ELISA法)。

[0030] 图3显示小鼠脓毒性休克模型及给予治疗后血清IL-1 β 在不同时间点的水平。

[0031] 图4显示小鼠脓毒性休克模型及给予治疗后血清PCT在不同时间点的水平。

[0032] 图5显示低剂量(SD)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组和高剂量(LD)LPS组小鼠血清TNF- α 水平直方图。

[0033] 图6显示光密度法定量检测CitH3蛋白表达在低剂量(SD)LPS组和高剂量(LD)LPS小鼠模型中的水平。

[0034] 图7显示了健康人、脓毒症患者和创伤患者血浆中的CitH3水平。

[0035] 图8显示了Western blot和ELISA检测到CitH3的结果。

[0036] 图9显示小鼠脓毒性休克模型及给予治疗后血清IL-6在不同时间点的水平。

实施例

[0037] 实施例1

临床研究表明,由因多重感染所致脓毒症患者,其循环中CitH3增加。

[0038] 健康受试者

准入标准:年龄 \geq 18岁;能够应答;平素体健;体重 \geq 110磅(49.9kg)

排除标准:年龄 $<$ 18岁;慢性炎症性疾病患者;急性病患;应用免疫抑制药物;AIDS;恶性疾病患者;过去24小时输过血或血制品;体重 $<$ 110磅(49.9kg)、最近3周有献血史

创伤患者

准入标准:严重创伤患者;损伤严重评分(ISS) $>$ 16;年龄 \geq 18岁;体重 \geq 110磅(49.9kg);

排除标准:年龄 $<$ 18岁;慢性炎症性疾病患者;应用免疫抑制药物;AIDS;恶性疾病患者;体重 $<$ 110磅(49.9kg);有严重失血,如 $>$ 100ml,在过去三周有输血史。

[0039] 脓毒症患者

准入标准:按照美国胸科医师协会及重症医学会指南,临床诊断为脓毒症的患者。

[0040] 排除标准:年龄 $<$ 18岁;慢性炎症性疾病患者;急性病患;应用免疫抑制药物;AIDS;恶性疾病患者;过去24小时输过血或血制品;体重 $<$ 110磅(49.9kg);有严重失血,如 $>$ 100ml,在过去三周有输血史。

[0041] 共收集5份健康志愿者样品,从5位创伤患者处得到5份样品,从6位脓毒症患者处

得到6份样品。

[0042] 制备人胍氨酸化组蛋白3(citrullinated histone H3, CitH3)酶联免疫吸附系统:用本文描述的抗CitH3 单克隆抗体(第一抗体),商业化抗CitH3多克隆抗体(第二抗体),和商业化过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(第二特异结合物质)制备三步酶联免疫吸附实验系统。将第一抗体用碳酸钠/碳酸氢钠(pH 9.6)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)稀释到2ug/ml然后将100ul所得溶液加到免疫板(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)的每个孔中并在4℃过夜。此后,将平板用PBS (pH 7.4)洗涤5次。向每个孔中加100ul不含蛋白质封闭液(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)实现封闭,直至使用。

[0043] 人血清制备:利用常规离心等方法分离血清,置于负80℃存储。使用本试剂盒定性或定量测量血液循环中CitH3时,将浓度为150单位/ml的脱氧核糖核酸酶(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)加入到小鼠和人血清中,同时补充1mM钙离子,在37℃水浴箱中反应一小时。

[0044] CitH3的测定:酶联免疫吸附法使用不含蛋白质的封闭液作为稀释剂,通过稀释血清20倍分别制定正常个体和脓毒症的小鼠和人血清样本。以每孔100ul的样本量加入稀释样本并在室温下反应2小时。反应完全后,将样本用含有0.05%吐温20的PBS洗涤四次,并用封闭液稀释到0.3ug/ml的100ul第二抗体加到每个孔中。在室温下反应2小时后,将平板以和上面相同的方式洗涤4次。并用封闭液稀释到0.02ug/ml的100ul第二特异结合物质加到每个孔中并在室温下反应2小时。反应完成后,将平板以和上面相同的方式洗涤4次并向每孔中加入四甲基联苯胺(TMB, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA),室温下反应20分钟后用0.5M硫酸溶液(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)终止反应并使用平板分光光度计(Spectra max plus 384, molecular devices, Sunnyvale, PA, USA)测量450nm的吸光度。结果如图2所示,能够测定血液中的可溶蛋白,即本发明中定义的CitH3。

[0045] 标准曲线的建立:通过上述所示方法制备了此发明系统,并利用人工合成的人源CitH3的标准制剂,通过此系统建立标准曲线,定量测量CitH3。即利用封闭液制成0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.55, 10和20ng/ml梯度稀释标准制剂,利用上述所示方法,建立标准曲线。

[0046] 此外,在酶联免疫吸附试验中,通过利用过氧化物酶标记的抗体作为备选方法实施测定法。该备选法通过形成抗体-抗原-酶标抗体的三明治复合体实施测定。

[0047] 正常健康人循环中CitH3的水平很低,不易检测。因此,小鼠内毒素休克模型和健康受试者的血样可分别作为阳性对照和阴性对照。

[0048] 如图7所示,CitH3在正常人血液中检测不到,有趣的是失血性休克患者血中同样检测不到CitH3。与正常受试者和失血性患者相比,脓毒症可引起血中CitH3显著增高,提示CitH3在脓症患者中水平增高。此外,上述反应可能是对脓毒症有特异性,因而失血性休克患者中不可见。

[0049]

实施例2

酶联免疫吸附法和Western blot法测定小鼠血清CitH3的比较

实验分以下两组。实验一:利用本声明中描述的特异性CitH3酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),即将96孔板用CitH3单克隆抗体包被过夜,与小鼠

血清共同孵育2小时后,进而与CitH3多克隆抗体和HRP相关抗兔抗体共同孵育。合成的CitH3用于制备标准曲线(0-20ng/ml)。实验二:应用肽基精氨酸脱亚胺基酶4(peptidylarginine deiminase-4, PAD4)抑制剂YW3-56作为干预,将C57BL/6J小鼠随机分成三组(n=7/组),分别予腹腔内注射:(1)二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO);(2)LPS(35 mg/kg)+DMSO;(3)LPS+ YW3-56(5 mg/kg,溶于DMSO,于LPS后注射),收集0h、0.5h、3h、12h和24h的血样,应用Western blot和ELISA检测血浆CitH3水平。采用方差分析进行多重比较,生存率制作Kaplan-Meier曲线。

[0050] 具体实施步骤:

(1)小鼠瓜氨酸化组蛋白3(citrullinated histone H3, CitH3)酶联免疫吸附系统制备:使用本文所描述的抗CitH3 单克隆抗体(第一抗体),商业化抗CitH3多克隆抗体(第二抗体),和商业化过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(第二特异结合物质)制备三步酶联免疫吸附实验系统。将第一抗体用碳酸钠/碳酸氢钠(pH 9.6)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)稀释到2ug/ml然后将100ul所得溶液加到免疫板(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)的每个孔中并在4℃过夜。此后,将平板用PBS (pH 7.4)洗涤5次。向每个孔中加100ul不含蛋白质封闭液(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)实现封闭,直至使用。

[0051] (2)小鼠血清的制备:通过常规采血方法如心脏、外周静脉等从小鼠获取血液,利用常规离心等方法分离血清,置于负80℃存储。使用本试剂盒定性或定量测量血液循环中CitH3时,将浓度为150单位/ml的脱氧核糖核酸酶(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)加入到小鼠和人血清中,同时补充1mM钙离子,在37℃水浴箱中反应一小时。

[0052] (3)ELISA法测定CitH3:ELISA法使用不含蛋白质的封闭液作为稀释剂,通过稀释血清20倍分别制定正常个体和脓毒症的小鼠和人血清样本。以每孔100ul的样本量加入稀释样本并在室温下反应2小时。反应完全后,将样本用含有0.05%吐温20的PBS洗涤四次,并用封闭液稀释到0.3ug/ml的100ul第二抗体加到每个孔中。在室温下反应2小时后,将平板以和上面相同的方式洗涤4次。并用封闭液稀释到0.02ug/ml的100ul第二特异结合物质加到每个孔中并在室温下反应2小时。反应完成后,将平板以和上面相同的方式洗涤4次并向每孔中加入四甲基联苯胺(TMB, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA),室温下反应20分钟后用0.5M硫酸溶液(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)终止反应并使用平板分光光度计(Spectra max plus 384, molecular devices, Sunnyvale, PA, USA)测量450nm的吸光度。结果如图2所示,能够测定血液中的可溶蛋白,即本发明中定义的CitH3。

[0053] 标准曲线的建立:通过上述所示方法制备了此发明系统,并利用人工合成的人源CitH3的标准制剂,通过此系统建立标准曲线,定量测量CitH3。即利用封闭液制成0, 0.32, 0.63, 1.25, 2.55, 10和20ng/ml梯度稀释标准制剂,利用上述所示方法,建立标准曲线。

[0054] (4)Western blot法测定CitH3:在含有15%聚丙烯酰胺凝胶的上进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将等量的血浆分离,随后将蛋白转到硝酸纤维素膜(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)上,再用含有0.05% PBS-Tween (PBST) 和5%的牛奶(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)阻断,在一抗中4℃孵育过夜。然后用辣根过氧化物酶偶联的二抗(含有5%牛奶的PBST中稀释成1:3000)在室温下孵育2h,使之

与一抗结合。加入WestemLighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer LAS, Inc., Boston, Mass.) 用化学发光法检测,在标准拍摄步骤下得到胶片,用VersaDoc Imaging System (BioRad Laboratories, Hercules, Calif.) 对检测到的条带行光密度扫描,进行定量分析。

[0055] 结果如图8所示,Western blot和ELISA均可检测到CitH3升高,但只有ELISA能够精确定量血CitH3的浓度,证明与Western blot相比,本实验室建立的CitH3定量检测方法-特异性CitH3 ELISA,更为可靠和准确。

[0056]

实施例3

CitH3是脓毒性休克理想的早期诊断及治疗标志物

将C57BL/6J小鼠随机分成三组(n=7/10只组),分别予腹腔内注射:(1)二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO);(2)LPS(35 mg/kg)+DMSO;(3)LPS+ YW3-56(5 mg/kg,溶于DMSO,于LPS后注射),收集0h、0.5h、3h、12h和24h的血样,应用本声明中描述的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测血浆CitH3水平,同时用ELISA法检测血样中白介素(IL)-1 β ,IL-6和降钙素原(PCT)的水平。

[0057] 小鼠CitH3酶联免疫吸附系统制备:使用本文所描述的抗CitH3 单克隆抗体(第一抗体),商业化抗CitH3多克隆抗体(第二抗体),和商业化过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(第二特异结合物质)制备三步酶联免疫吸附实验系统。将第一抗体用碳酸钠/碳酸氢钠(pH 9.6)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)稀释到2ug/ml然后将100ul所得溶液加到免疫板(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)的每个孔中并在4 $^{\circ}$ C过夜。此后,将平板用PBS (pH 7.4)洗涤5次。向每个孔中加100ul不含蛋白质封闭液(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)实现封闭,直至使用。

[0058] 小鼠血清的制备:通过常规采血方法如心脏、外周静脉等从小鼠获取血液,利用常规离心等方法分离血清,置于负80 $^{\circ}$ C存储。使用本试剂盒定性或定量测量血液循环中CitH3时,将浓度为150单位/ml的脱氧核糖核酸酶(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)加入到小鼠和人血清中,同时补充1mM钙离子,在37 $^{\circ}$ C水浴箱中反应一小时。

[0059] CitH3的测定:酶联免疫吸附法使用使用不含蛋白质的封闭液作为稀释剂,通过稀释血清20倍分别制定正常个体和脓毒症的小鼠和人血清样本。以每孔100ul的样本量加入稀释样本并在室温下反应2小时。反应完全后,将样本用含有0.05%吐温20的PBS洗涤四次,并用封闭液稀释到0.3ug/ml的100ul第二抗体加到每个孔中。在室温下反应2小时后,将平板以和上面相同的方式洗涤4次。并用封闭液稀释到0.02ug/ml的100ul第二特异结合物质加到每个孔中并在室温下反应2小时。反应完成后,将将平板以和上面相同的方式洗涤4次并向每孔中加入四甲基联苯胺(TMB, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA),室温下反应20分钟后用0.5M硫酸溶液(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)终止反应并使用平板分光光度计(Spectra max plus 384, molecular devices, Sunnyvale, PA, USA)测量450nm的吸光度。结果如图2所示,能够测定血液中的可溶蛋白,即本发明中定义的CitH3。

[0060] 标准曲线的建立:通过上述所示方法制备了此发明系统,并利用人工合成的人源CitH3的标准制剂,通过此系统建立标准曲线,定量测量CitH3。即利用封闭液制成0, 0.32,

0.63, 1.25, 2.55, 10和20ng/ml梯度稀释标准制剂,利用上述所示方法,建立标准曲线。

[0061] 结果如图2-4,9所示,在脓毒性休克发生早期(0.5h),较对照组相比,LPS组CitH3水平升高,并具有显著差异,当给予YW3-56治疗时,血中CitH3可明显降低,能够在早期提示脓毒性休克及其治疗效果,且上述指示作用可维持较长时间(24h)。与CitH3相比,虽可反应YW3-56对于脓毒性休克小鼠的治疗效果,但IL-1 β 不能在疾病发生早期检测到,IL-6不能在每个时间点持续显示治疗进展;PCT作为临床常用感染标志物,在发生脓毒性休克24h内没有显著变化,之后开始显著升高,并进一步可以指导治疗。因而,综上所述,CitH3是诊断和治疗脓毒性休克的理想生物学标志物。

SEQUENCE LISTING

<110> 哈桑·阿拉姆 李永清 崇巍

<120> 特异性抗CitH3单克隆抗体及其酶联免疫吸附试验试剂盒在脓毒症诊断中的应用

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Ala Thr Lys Gln Thr Ala Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro Lys Gln

1 5 10 15

Leu Ala Thr Lys Ala Ala Lys Ser Ala Pro

20 25

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Gln Asp Ile His Lys Tyr

1 5

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

His Thr Ser

1

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 4

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Trp Thr

1 5

<210> 5

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Lys Tyr

20 25 30

Met Ala Trp Tyr Gln Tyr Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

His His Thr Ser Thr Leu

50

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 6

Gly Leu Thr Phe Ser Arg Ser Ile

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 7

Ile Asn Asn Gly Gly Gly Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 8

Ala Arg Val Val Tyr Asp Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 9

Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser

1 5 10 15

Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg

20

25

30

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

caagacattc acaagtat 18

<210> 11

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

cacacatct 9

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

ctacagtatg ataatcttct gtggacg 27

<210> 13

<211> 162

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60

atcacttgca aggcaagcca agacattcac aagtatatgg cttggtacca atacaagcct 120

ggaaaaggtc ctaggctgct catacatcac acatctacat ta 162

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

ggactcactt tcagtaggtc aatc 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

attaataatg gtgggtggtta cacc 24
 <210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 16
 gcaaggggtgg tttatgatga ctactactac ttcgatgtc 39
 <210> 17
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 17
 gtgaagctgg tggagtctgg gggaggetta gtgaggcctg gagggtcct gaaactctcc 60
 tgtgctgcct ctggactcac tttcagtagg 90
 <210> 18
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Lys Tyr
 20 25 30
 Met Ala Trp Tyr Gln Tyr Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 His His Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Ile Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Val Lys Leu Val
 100 105 110
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser
 115 120 125
 Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Arg Ser Ile Met Ser Trp Val
 130 135 140
 Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Asn
 145 150 155 160

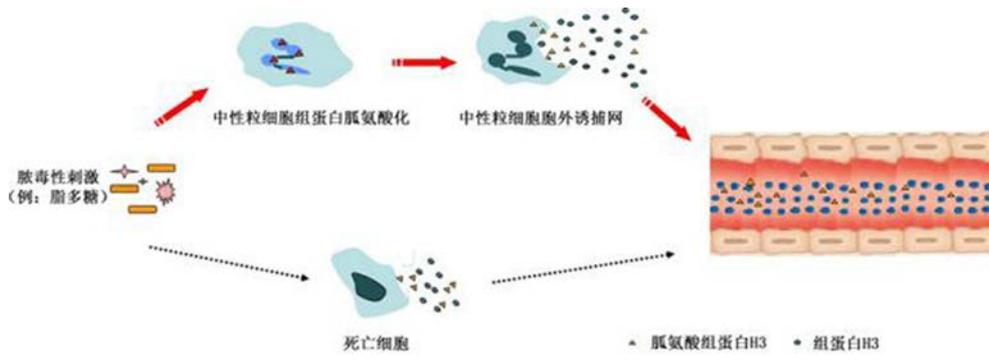


图1

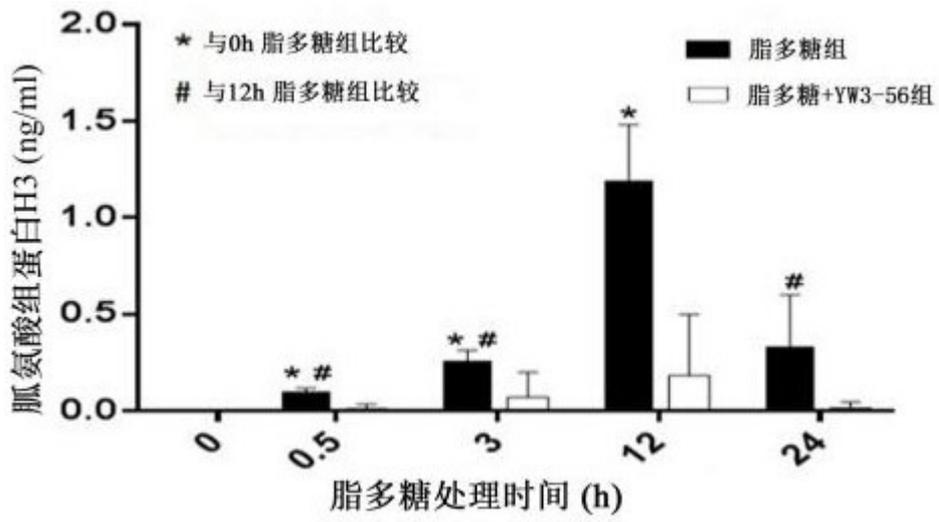


图2

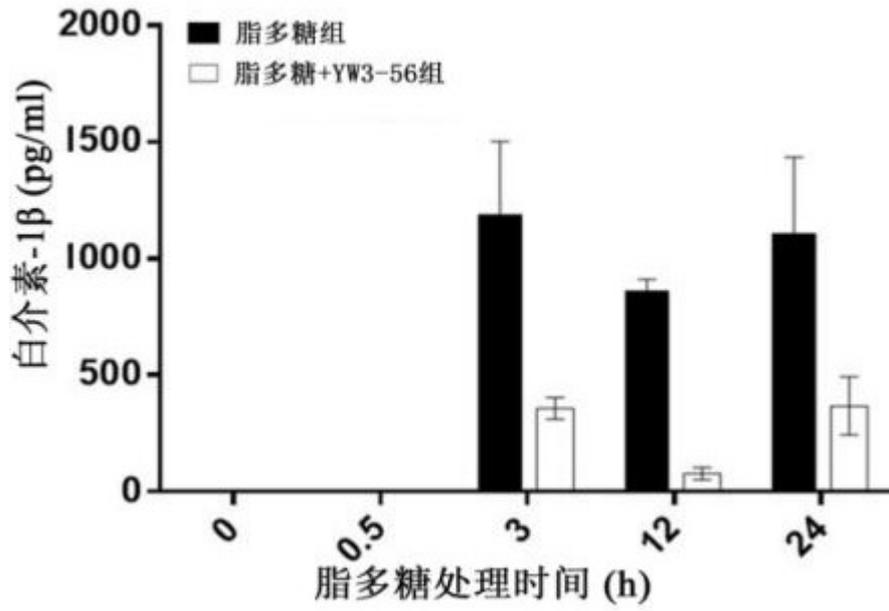


图3

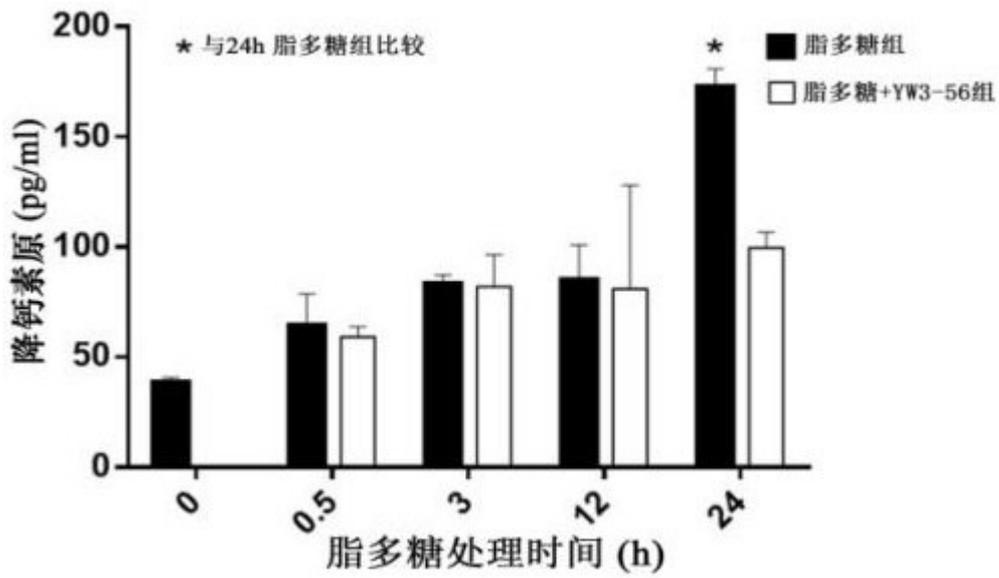


图4

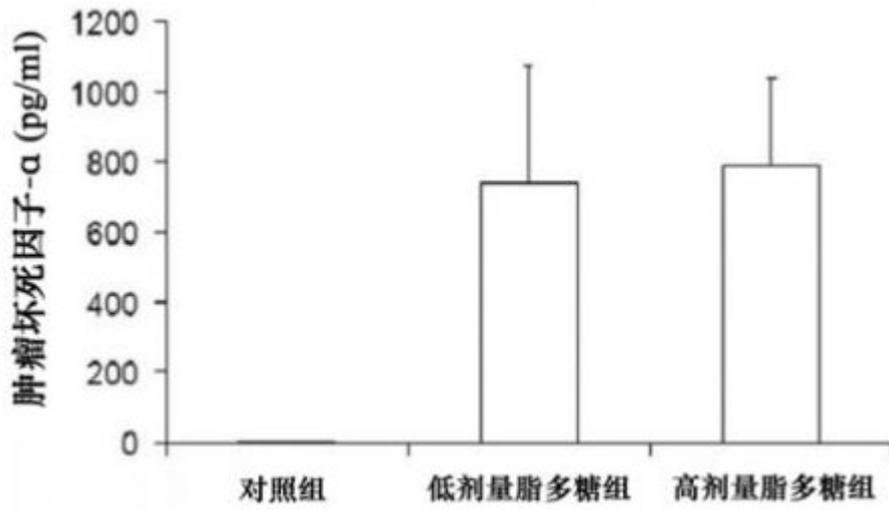


图5

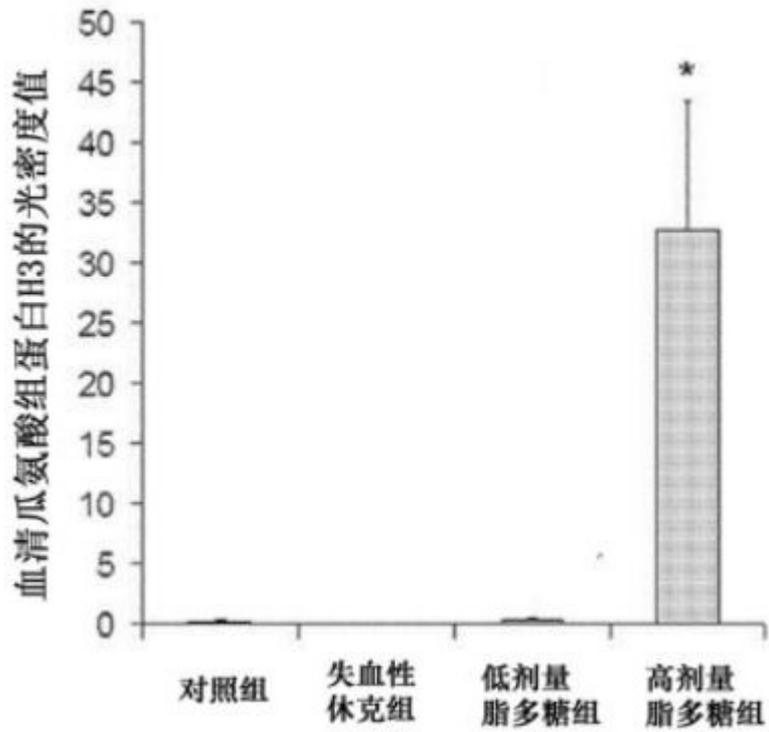


图6

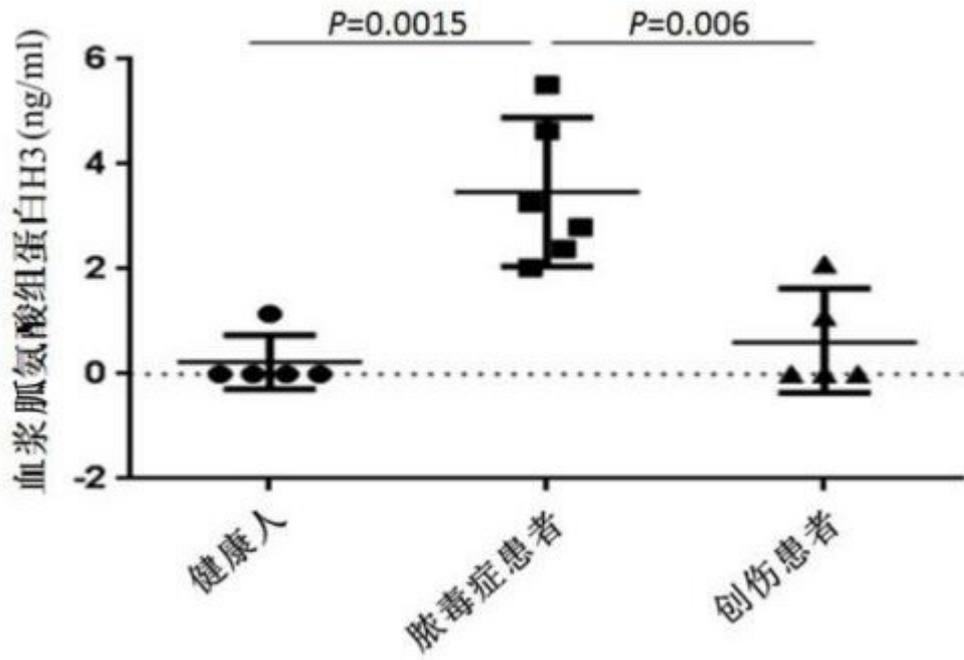


图7

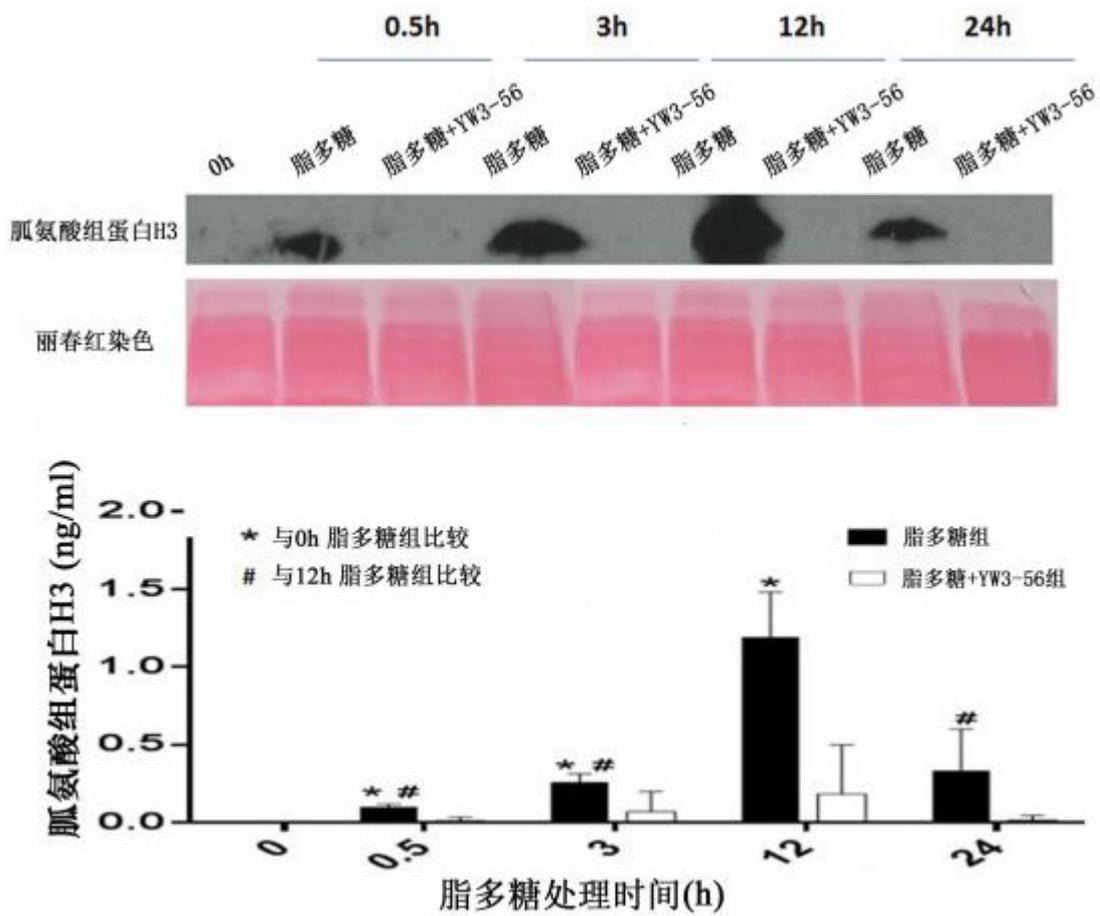


图8

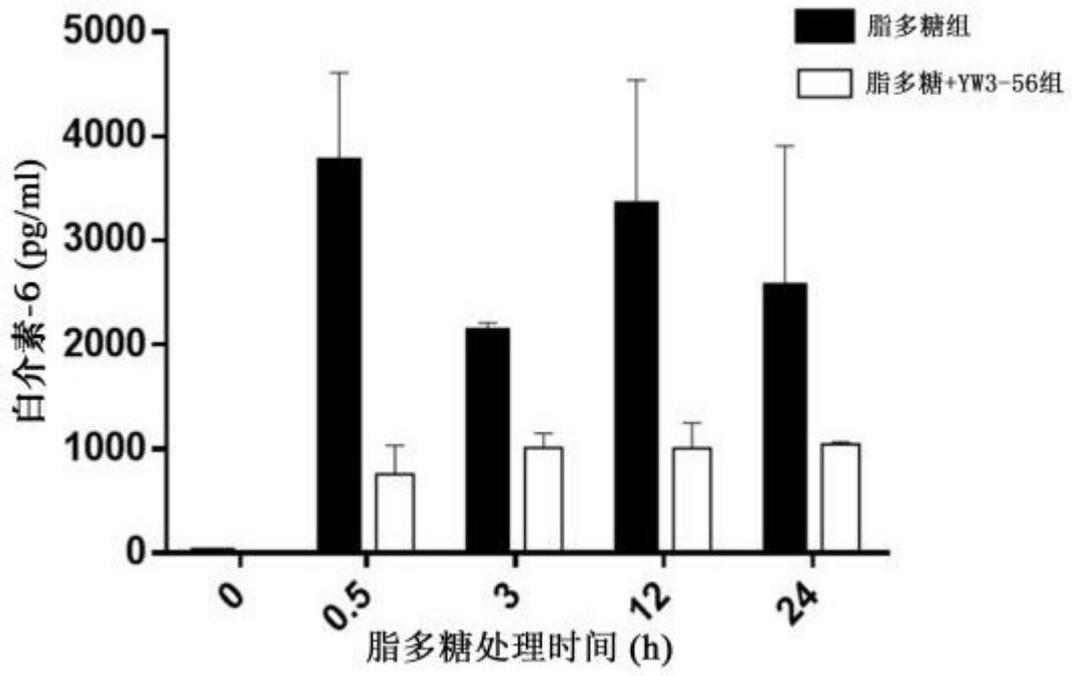


图9

专利名称(译)	特异性抗CitH3单克隆抗体及其酶联免疫吸附试验试剂盒在脓毒症诊断中的应用		
公开(公告)号	CN107022028A	公开(公告)日	2017-08-08
申请号	CN201710096048.0	申请日	2017-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	李永清		
申请(专利权)人(译)	李永清		
当前申请(专利权)人(译)	李永清		
[标]发明人	哈桑阿拉姆 李永清 崇巍		
发明人	哈桑·阿拉姆 李永清 崇巍		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/13 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2800/7095		
代理人(译)	张晟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了特异性抗CitH3单克隆抗体以及包含该抗体的定量检测CitH3的ELISA试剂盒。本发明的试剂盒能够高度灵敏和特异地定量测定人CitH3，用于脓毒症早期诊断和治疗及预后评估，降低该病的高病死率。

