



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110068676 A

(43)申请公布日 2019. 07. 30

(21)申请号 201910223298.5

(22)申请日 2019.03.22

(71)申请人 同济大学

地址 200092 上海市杨浦区四平路1239号

(72)发明人 李觉 李延飞 沈君炜 骆小莉
武佳雯

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 杨元焱

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

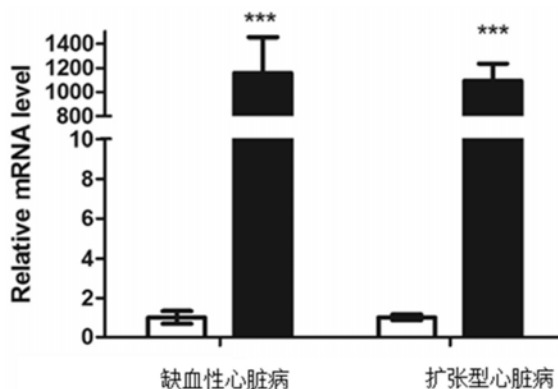
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

分泌蛋白Serpine A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种分泌蛋白Serpine A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,所述的分泌蛋白Serpine A3由与其对应的基因SERPINA3编码而成。与现有技术相比,本发明提出了一个新的预测心肌损伤的分泌蛋白,此前未在心血管领域提及它的作用,分泌蛋白Serpine A3是一个良好的心肌损伤预测标志物。对照由实验确定心肌损伤程度与分泌蛋白Serpine A3的检测浓度范围的对应关系,可判断受试者的心肌损伤情况。



1. 分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,分泌蛋白Serpín A3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,其特征在于,心肌损伤后,外周血中分泌蛋白Serpín A3含量增加。

3. 根据权利要求2所述的分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,其特征在于,外周血中分泌蛋白Serpín A3含量由酶联免疫吸附实验获得。

4. 根据权利要求3所述的分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,其特征在于,所述的免疫吸附实验中采用Serpín A3作为抗原。

5. 根据权利要求3所述的分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,其特征在于,所述的免疫吸附实验中使用的Serpín A3浓度为10~20 μ g/ml。

6. 根据权利要求3所述的分泌蛋白Serpín A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,其特征在于,所述的免疫吸附实验中通过酶标仪测试吸光度来获得分泌蛋白Serpín A3的浓度。

分泌蛋白Serp in A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物医学领域,尤其是涉及分泌蛋白Serp in A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用。

背景技术

[0002] 目前急性心肌梗死(AMI)检测的主要生化标志物有肌酸磷酸激酶同工(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白(cTnT)和心肌肌钙蛋白I(cTnI)等。CK-MB、LDH广泛分布于体内,因此特异性较低,许多疾病都可导致它们的升高,且在血液中维持时间较短;cTnT与骨骼肌肌钙蛋白T(sTnT)同源性较高,容易发生交叉反应。而cTnI具有特异性高、出现时间早、敏感度高和在血液中持续时间长等优点,可作为AMI早期诊断指标,所以目前的试剂盒检测方式主要围绕心肌肌钙蛋白I(cTnI)。

[0003] 心肌肌钙蛋白I(cTnI)的检测方法,包括酶联免疫吸附测定(ELISA)免疫分析纸条检测等。尽管心肌肌钙蛋白I(cTnI)特异性更高,但它的对于心肌损伤的预见性不高。免疫分析试纸条检测,该方法主要采用胶体金免疫层析法或荧光免疫层析法的原理,操作简单、方便快捷但灵敏度较低,准确性低易出现漏检情况。

发明内容

[0004] 本发明的目的就是为了克服上述现有技术存在的缺陷而提供一种分泌蛋白Serp in A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用。

[0005] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0006] 分泌蛋白Serp in A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,所述的分泌蛋白Serp in A3由SERPINA3编码而成,分泌蛋白Serp in A3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。该蛋白质的名称还可为Alpha-1-antichymotrypsin或ACT,中文名称可翻译为 α -1-抗胰凝乳蛋白酶,其氨基酸序列详见附件。以下均由Serp in A3代表该分泌蛋白,SERPINA3代表其编码所用到的基因。

[0007] 参见图4,由Gene card上得到的Serp in A3的亚细胞定位情况可知,Serp in A3主要存于细胞核、溶酶体与胞外。心肌损伤发生后,细胞核内SERPINA3的表达下降,外周血中的SERPINA3的表达上升,即细胞内部的分泌蛋白Serp in A3浓度减小,外周血中的分泌蛋白Serp in A3浓度增加,参见图4。而以上分泌蛋白Serp in A3是心肌损伤时释放到外周血中并被检测到的蛋白质,符合心肌损伤标志物的特性。

[0008] 由基因表达数据库(GEO)中的数据集/Cr:GSE57338可以生成缺血性心脏病患者与正常人的差异基因表达的火山图,参见图5,由该火山图可以得出,细胞内部的SERPINA3编码的分泌蛋白Serp in A3显著降低,即SERPINA3表达下调显著,而造成此结果的原因。另一方面,由扩张型心脏病与正常患者的差异基因表达的火山图同样可以得到以上结论,参见图6。

[0009] 由动物实验同样印证了以上结论,用Elisa法检测模型小鼠外周血,心衰小鼠

SERPINA3基因表达量高于对照组,参见图3,可见心衰小鼠外周血中的分泌蛋白Serpina3远高于对照组,该现象原因是细胞中的分泌蛋白Serpina3排出细胞外造成的。

[0010] 本发明中外周血中分泌蛋白Serpina3含量由酶联免疫吸附实验获得,其中免疫吸附实验中采用Serpina3作为抗原,使用的Serpina3浓度为10~20 μ g/ml,并通过酶标仪测试吸光度来获得对应的分泌蛋白Serpina3的浓度。以吸光度OD值为纵坐标(Y),相应的待测物质标准品浓度为横坐标(X),做得相应的曲线,样品的待测物质含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。最后对照由实验确定心肌损伤程度与分泌蛋白Serpina3的检测浓度范围的对应关系,可判断受试者的心肌损伤情况。

[0011] 与现有技术相比,本发明有助于早期诊断,可以反映心肌损伤的严重程度,可以作为心血管事件预测指标,并且检测方法较为简单易操,并且具有较好的检测灵敏度,具有较小的系统误差,可将SERPINA3基因编码的的分泌蛋白Serpina3在心肌损伤诊断试剂中进行广泛的推广。

附图说明

[0012] 图1为基因表达数据库中获得的心脏病患者与正常对照组的Serpina3表达程度对比;

[0013] 图2为心衰小鼠的代偿性左心室壁增厚对比数据图;

[0014] 图3为Elisa法获得的SERPINA3基因在细胞外的表达程度;

[0015] 图4为亚细胞定位示意图;

[0016] 图5为缺血性心脏病与正常患者的差异基因表达的火山图;

[0017] 图6为扩张型心脏病与正常患者的差异基因表达的火山图。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0019] 实施例

[0020] 分泌蛋白Serpina3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用,所述的分泌蛋白Serpina3由SERPINA3基因编码而成,分泌蛋白Serpina3的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,其中SERPINA3为分泌蛋白Serpina3对应的基因片段。

[0021] 由Gene card上得到的serpina3的亚细胞定位情况可知,serpina3主要存于细胞核、溶酶体与胞外,参见图4。心肌损伤发生后,细胞核内SERPINA3的表达下降,外周血的SERPINA3的表达上升,即细胞内部的分泌蛋白serpina3浓度减小,外周血中的分泌蛋白serpina3浓度增加。分泌蛋白serpina3是心肌损伤时释放到外周血中并被检测到的蛋白质,符合心肌损伤标志物的特性。

[0022] 患者数据拟合:由基因表达数据库(GEO)中的数据集/Cr:GSE57338可以生成缺血性心脏病患者与正常人的差异基因表达的火山图,参见图5,由该火山图可以得出,细胞内部的基因SERPINA3对应的分泌蛋白Serpina3显著降低,即基因SERPINA3表达下调显著,而造成此结果的原因。另一方面,由扩张型心脏病与正常患者的差异基因表达的火山图同样可以得到以上结论,参见图6。

[0023] 将图5与图6中的数据结合,基因表达数据库中获得的心脏病患者与正常对照组的

基因SERPINA3表达程度对比,参见图1,无填充图表为患者分泌蛋白serpinA3对应的mRNA基于细胞内部的表达程度,黑色填充图表为正常人分泌蛋白serpinA3对应的mRNA基于细胞内部的表达程度,可见两种心脏病患者均表现出了几乎相同的基因SERPINA3表达程度,与对照组相比其数量级的差距也基本上相同,再次验证了分泌蛋白Serp in A3流向细胞外的事实。

[0024] 动物实验建模:参见图2,图中LVID代表左心室内径,s代表收缩期,d代表舒张期,由图可见心衰组的左心室内径大于对照组,差异有显著性。提示心衰小鼠出现心功能受损引起的代偿性左心室壁增厚,模型构建成功。

[0025] 动物实验:由动物实验同样印证了以上结论,用Elisa法检测模型小鼠外周血,心衰小鼠对应分泌蛋白Serp in A3对应的mRNA在细胞外的表达量高于对照组,参见图3,可见心衰小鼠外周血中的分泌蛋白Serp in A3远高于对照组,该现象原因是细胞中的分泌蛋白Serp in A3排出细胞外造成的。

[0026] 具体的检测过程:

[0027] 外周血中分泌蛋白Serp in A3含量由酶联免疫吸附实验获得,其中免疫吸附实验中采用Serp in A3作为抗原,使用的Serp in A3浓度为10~20 μ g/ml,并通过酶标仪测试吸光度来获得对应的分泌蛋白Serp in A3的浓度。

[0028] a. 包被抗原

[0029] 1) 用50mM的碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6)溶解抗原,使抗原浓度为10~20 μ g/ml,加100 μ l/孔到96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C放置过夜。

[0030] 2) 第二天弃去包被液后,用PBST洗涤3次,每孔加入150 μ l 1%BSA 37 $^{\circ}$ C封闭1小时。

[0031] 3) PBST洗涤3次后,每孔加入100 μ l不同倍比稀释度的血清,并加入对照样品,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0032] 4) PBST洗涤5次后,加入100 μ l稀释后的HRP标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0033] 5) PBST洗涤5次后,显色剂显色20min后,酶标仪上读取A405吸收值。

[0034] b. 包被细胞

[0035] 1) 在96孔培养板上接种细胞数为 1×10^4 cells/well,37 $^{\circ}$ C过夜培养。

[0036] 2) 第二天用PBS洗涤培养板2~3次。

[0037] 3) 加入125 μ l/well 10%Forma lin(1:10稀释),室温下固定15min。

[0038] 4) 用ddH₂O洗涤培养板3次,并晾干,储藏在2~8 $^{\circ}$ C备用。

[0039] 5) 用PBST洗涤3次,每孔加入150 μ l 1%BSA 37 $^{\circ}$ C封闭1小时。

[0040] 6) PBST洗涤3次后,每孔加入100 μ l不同倍比稀释度的血清,并加入对照样品,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0041] 7) PBST洗涤5次后,加入100 μ l稀释后的HRP标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

[0042] 8) PBST洗涤5次后,显色剂显色20min后,酶标仪上读取A405吸收值。

[0043] 9) 以吸光度OD值为纵坐标(Y),相应的待测物质标准品浓度为横坐标(X),做得相应的曲线,样品的待测物质含量可根据其OD值由标准曲线换算出相应的浓度。

[0044] 最后对照由实验确定心肌损伤程度与分泌蛋白Serp in A3的检测浓度范围的对应关系,可判断受试者的心肌损伤情况。

[0045] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 同济大学

<120> 分泌蛋白Serpin A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 423

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Arg Met Leu Pro Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Gly
1           5           10           15
Phe Cys Pro Ala Val Leu Cys His Pro Asn Ser Pro Leu Asp Glu Glu
           20           25           30
Asn Leu Thr Gln Glu Asn Gln Asp Arg Gly Thr His Val Asp Leu Gly
           35           40           45
Leu Ala Ser Ala Asn Val Asp Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Lys Gln Leu
           50           55           60
Val Leu Lys Ala Pro Asp Lys Asn Val Ile Phe Ser Pro Leu Ser Ile
65           70           75           80
Ser Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ala His Asn Thr Thr Leu
           85           90           95
Thr Glu Ile Leu Lys Gly Leu Lys Phe Asn Leu Thr Glu Thr Ser Glu
           100          105          110
Ala Glu Ile His Gln Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln
           115          120          125
Ser Ser Asp Glu Leu Gln Leu Ser Met Gly Asn Ala Met Phe Val Lys
           130          135          140
Glu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Arg Phe Thr Glu Asp Ala Lys Arg Leu
145          150          155          160
Tyr Gly Ser Glu Ala Phe Ala Thr Asp Phe Gln Asp Ser Ala Ala Ala
           165          170          175
Lys Lys Leu Ile Asn Asp Tyr Val Lys Asn Gly Thr Arg Gly Lys Ile
           180          185          190
Thr Asp Leu Ile Lys Asp Leu Asp Ser Gln Thr Met Met Val Leu Val
           195          200          205
Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys Trp Glu Met Pro Phe Asp Pro Gln
210          215          220

```

Asp Thr His Gln Ser Arg Phe Tyr Leu Ser Lys Lys Lys Trp Val Met			
225	230	235	240
Val Pro Met Met Ser Leu His His Leu Thr Ile Pro Tyr Phe Arg Asp			
	245	250	255
Glu Glu Leu Ser Cys Thr Val Val Glu Leu Lys Tyr Thr Gly Asn Ala			
	260	265	270
Ser Ala Leu Phe Ile Leu Pro Asp Gln Asp Lys Met Glu Glu Val Glu			
	275	280	285
Ala Met Leu Leu Pro Glu Thr Leu Lys Arg Trp Arg Asp Ser Leu Glu			
	290	295	300
Phe Arg Glu Ile Gly Glu Leu Tyr Leu Pro Lys Phe Ser Ile Ser Arg			
305	310	315	320
Asp Tyr Asn Leu Asn Asp Ile Leu Leu Gln Leu Gly Ile Glu Glu Ala			
	325	330	335
Phe Thr Ser Lys Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr Gly Ala Arg Asn Leu			
	340	345	350
Ala Val Ser Gln Val Val His Lys Ala Val Leu Asp Val Phe Glu Glu			
	355	360	365
Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser			
	370	375	380
Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu			
385	390	395	400
Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr Gln Asn Ile Phe Phe Met Ser Lys			
	405	410	415
Val Thr Asn Pro Lys Gln Ala			
	420		

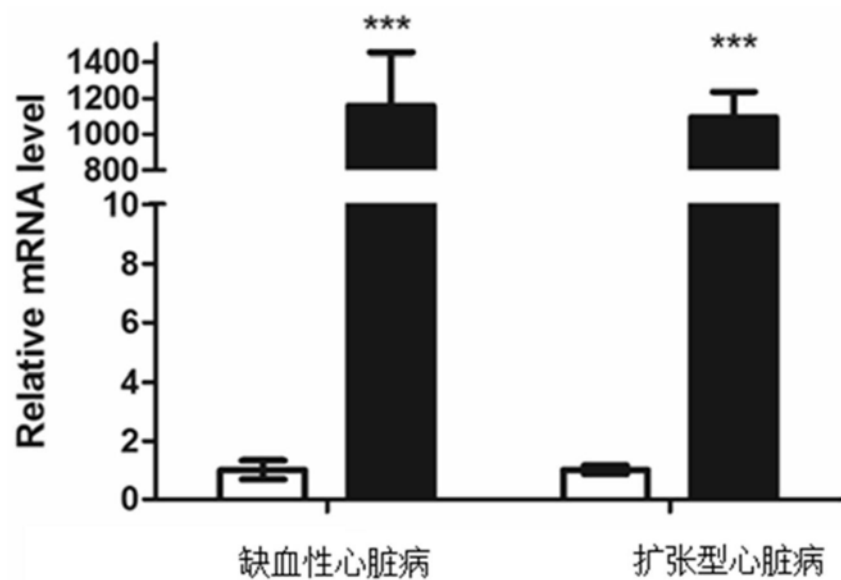


图1

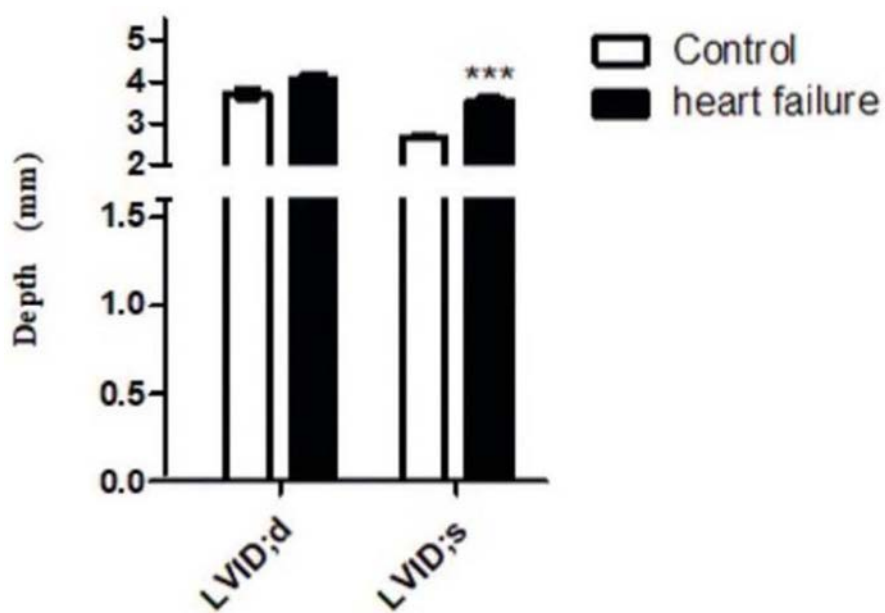


图2

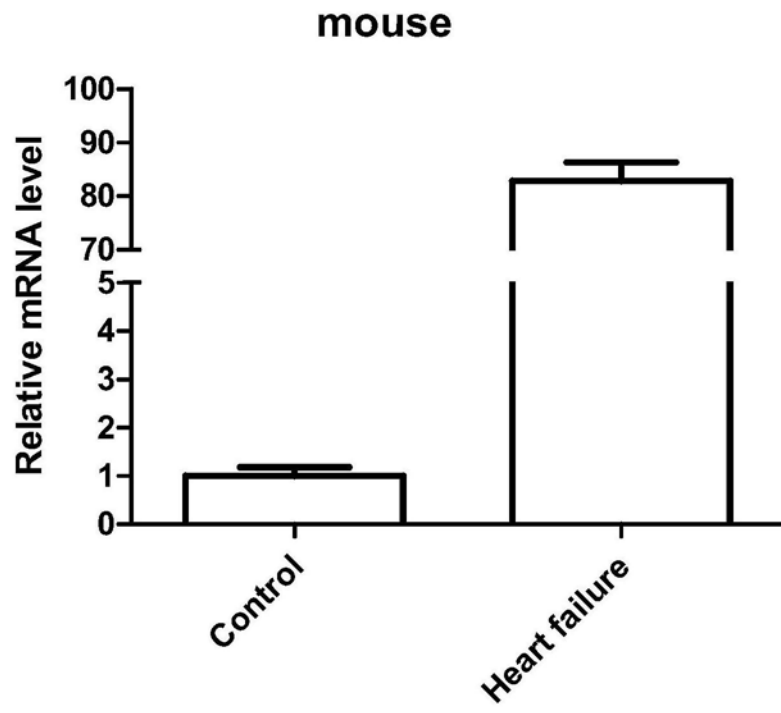


图3

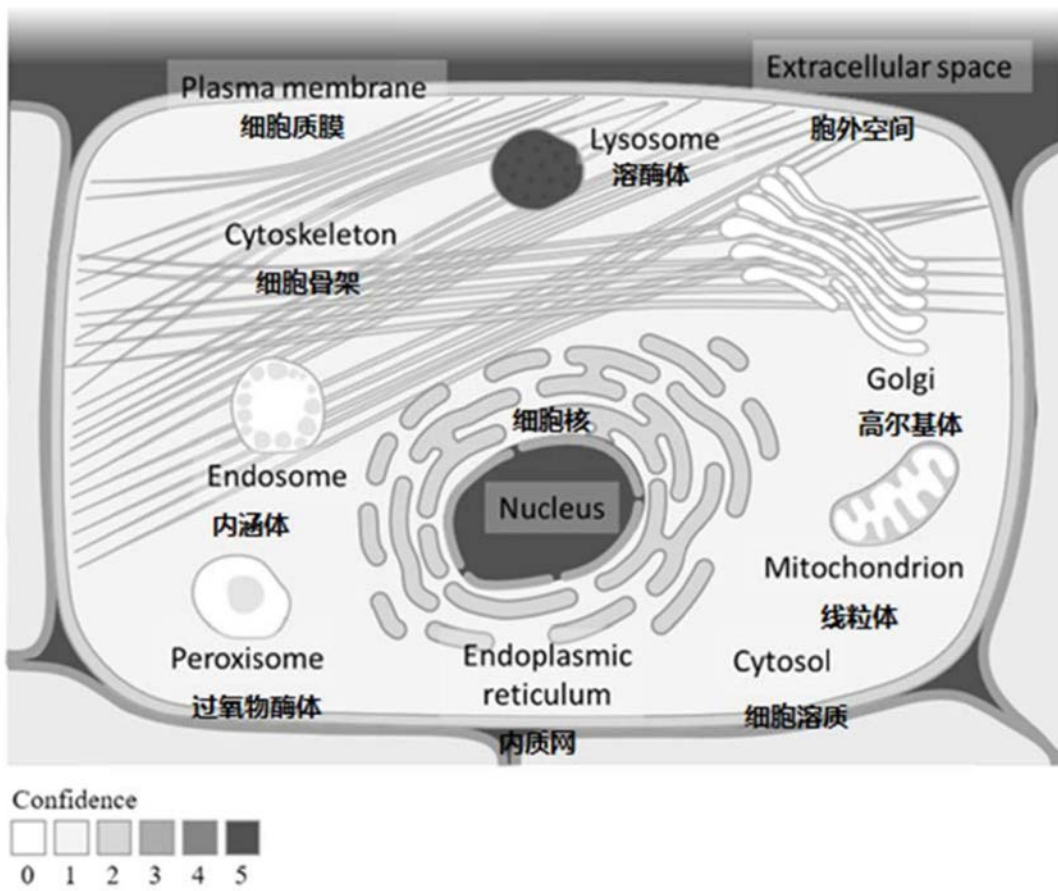


图4

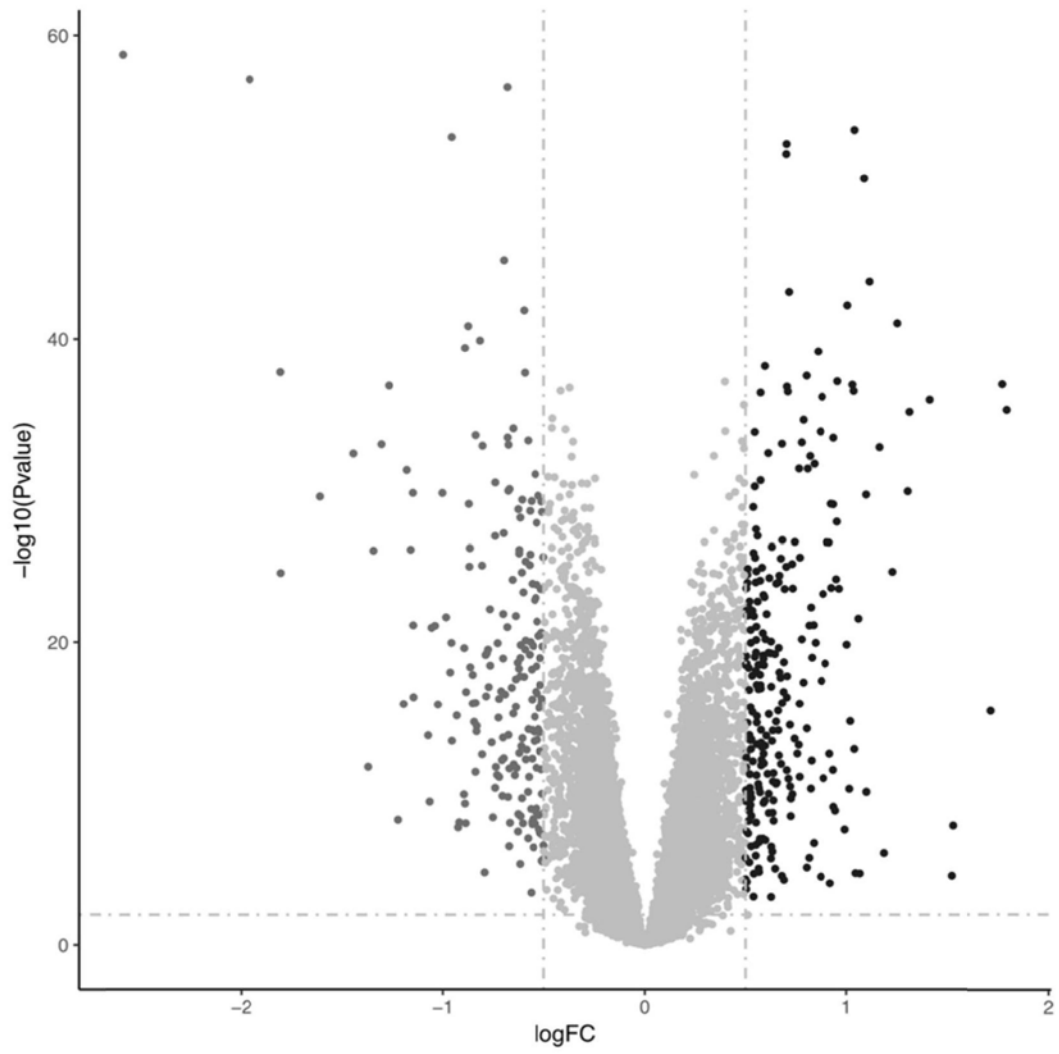


图5

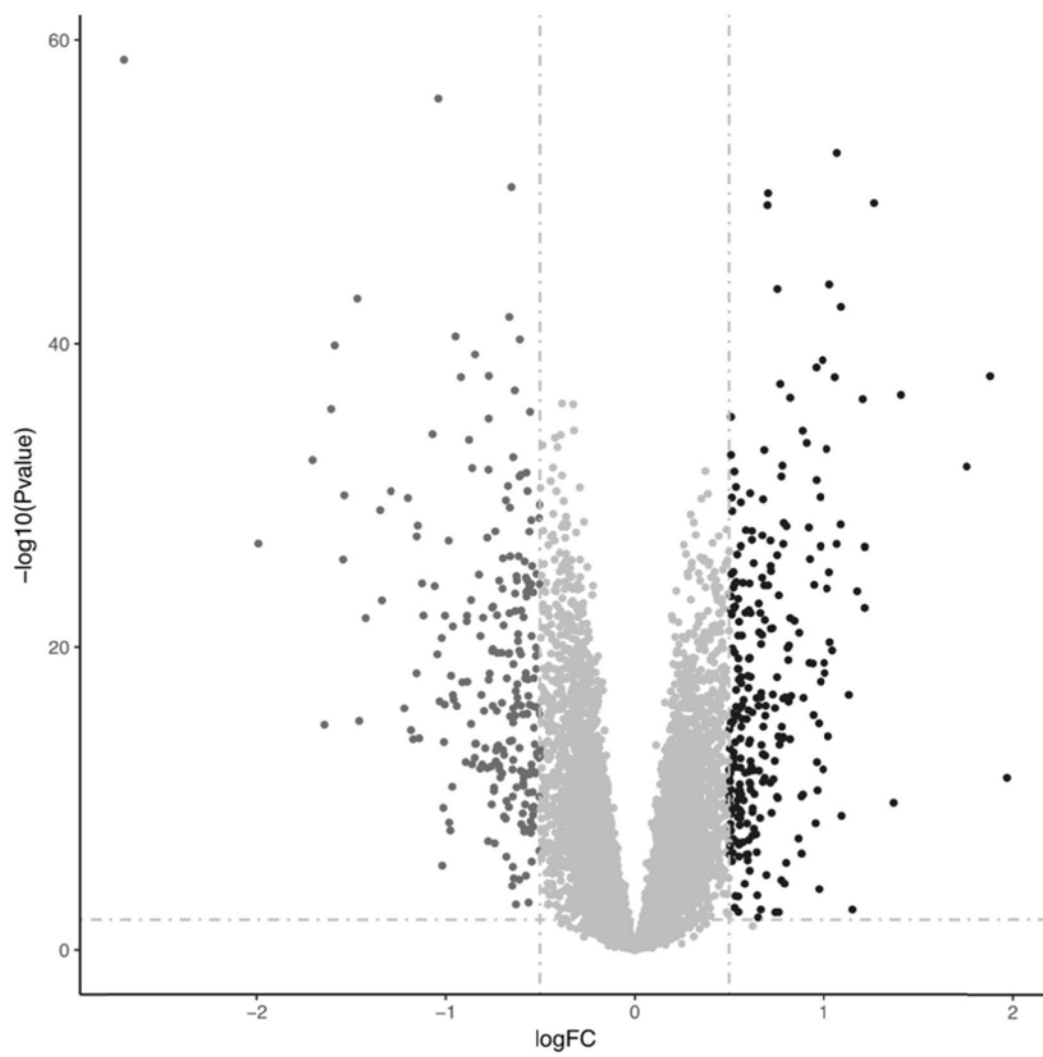


图6

专利名称(译)	分泌蛋白Serpin A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用		
公开(公告)号	CN110068676A	公开(公告)日	2019-07-30
申请号	CN201910223298.5	申请日	2019-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	同济大学		
申请(专利权)人(译)	同济大学		
当前申请(专利权)人(译)	同济大学		
[标]发明人	李觉 李延飞 沈君炜		
发明人	李觉 李延飞 沈君炜 骆小莉 武佳雯		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/68 G01N2800/324		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种分泌蛋白Serpin A3在预测心肌损伤诊断试剂中的应用，所述的分泌蛋白Serpin A3由与其对应的基因SERPINA3编码而成。与现有技术相比，本发明提出了一个新的预测心肌损伤的分泌蛋白，此前未在心血管领域提及它的作用，分泌蛋白Serpin A3是一个良好的心肌损伤预测标志物。对照由实验确定心肌损伤程度与分泌蛋白Serpin A3的检测浓度范围的对应关系，可判断受试者的心肌损伤情况。

