



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117756918 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202311714721.4

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2023.12.13

G01N 33/577 (2006.01)

(71) 申请人 宁夏回族自治区人民医院(宁夏眼科医院)

地址 750002 宁夏回族自治区银川市金凤区正源北街301号

(72) 发明人 杨绿林 马甲升 汪斌阳 王俊杰 马清

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

专利代理师 黄绮颖

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

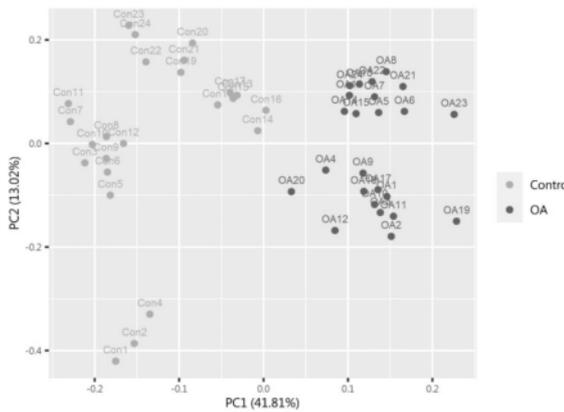
权利要求书1页 说明书12页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种BAFF重组截短蛋白及应用其的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种BAFF重组截短蛋白及应用其的试剂盒。该BAFF重组截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。本发明提供的BAFF重组截短蛋白是从BAFF全长蛋白中获得BAFF截短蛋白并通过抗原表位设计实验对截短蛋白进行氨基酸编辑,使BAFF截短蛋白的第77位的组氨酸突变为精氨酸、第113位的谷氨酸突变为脯氨酸得到的。本发明提供的BAFF重组截短蛋白的肽链结构更加稳定、亲和力和溶解性更好,并且具有更好的亲合力,更加容易包被在酶标板上,也更有利于与BAFF蛋白的特异性抗体的结合,将本发明提供的BAFF重组截短蛋白作为标准品应用于骨关节炎的检测中能够提高检测结果的灵敏度、特异度和精确度。



1. 一种BAFF重组截短蛋白,其特征在于:所述BAFF重组截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。
2. 一种核酸分子,其特征在于:所述核酸分子包含编码如权利要求1所述BAFF重组截短蛋白的核苷酸序列。
3. 一种重组表达载体,其特征在于:所述重组表达载体包括如权利要求2所述核酸分子。
4. 一种BAFF重组全长蛋白,其特征在于:所述BAFF重组全长蛋白包括如权利要求1所述BAFF重组截短蛋白。
5. 如权利要求4所述BAFF重组全长蛋白,其特征在于:所述BAFF重组全长蛋白还包括多肽片段,所述多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
6. 如权利要求5所述BAFF重组全长蛋白,其特征在于:所述BAFF重组全长蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。
7. 如权利要求1所述BAFF重组截短蛋白或权利要求4所述BAFF重组全长蛋白在制备用于检测骨关节炎的试剂盒中的应用。
8. 一种用于检测骨关节炎的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括BAFF标准品;
所述BAFF标准品为如权利要求1所述BAFF重组截短蛋白或权利要求4~6任意一项所述BAFF重组全长蛋白。
9. 如权利要求8所述用于检测骨关节炎的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括检测抗体,所述检测抗体通过以下步骤制备得到:
 - S1. 利用如权利要求1所述BAFF重组截短蛋白或权利要求4~6任意一项所述BAFF重组全长蛋白对小鼠进行免疫后,获取小鼠的脾脏,从小鼠的脾脏中分离得到脾细胞;
 - S2. 将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,筛选得到针对BAFF蛋白的阳性杂交瘤细胞;
 - S3. 对所述阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,筛选得到单克隆细胞株,所述单克隆细胞株经过培养后分泌得到抗BAFF蛋白的单克隆抗体,所述抗BAFF蛋白的单克隆抗体即为所述检测抗体。
10. 如权利要求8所述用于检测骨关节炎的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括ELISA酶标板、洗涤液、稀释液A、稀释液B、底物和终止液;
所述ELISA酶标板为包被有所述检测抗体的聚苯乙烯板;
所述洗涤液为含有0.05% Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L、pH值为7.4;
所述稀释液A为含有1g/L牛血清白蛋白、0.05% Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L、pH值为7.4;
所述稀释液B为辣根过氧化物酶-链霉亲和素溶液;
所述底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液;
所述终止液为硫酸溶液,所述硫酸溶液的浓度为0.2M。

一种BAFF重组截短蛋白及应用其的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及一种BAFF重组截短蛋白及应用其的试剂盒。

背景技术

[0002] 骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨退行性病变和继发性骨质增生为特性的慢性关节疾病,是最常见的成人关节(如手、膝盖、臀部和脊椎等)疾病。OA的特点是进行性关节软骨退化、软骨下骨重塑和滑膜关节器官的衰竭。OA会导致疼痛、慢性身体残疾、永久性残疾以及使个人永久丧失工作能力,进而严重影响人民的生活。OA主要与年龄增长有关,但是其他关键因素包括炎症、肥胖、关节创伤、关节感染、遗传、遗传代谢紊乱和各种骨转换障碍也会参与OA的病因和进展。

[0003] 目前,OA的诊断主要基于临床症状结合影像学检测(如X射线检查),影像学检测已被用来衡量OA晚期的病理特征,包括关节间隙变窄(JSN)、骨硬化和软骨下硬化。然而,如X射线检查是不敏感的,原因在于只有在软骨明显退化后才能在影像学检测时看到相应的症状。虽然磁共振成像(MRI)和超声波检查可以弥补X射线检查的不足,但MRI的成本较高、超声波检查的分辨率较低。现有的OA诊断和检测手段所存在的缺陷使得OA的治疗选择有限。因此,急需寻找一种能够对OA进行有效诊断和检测的方法。

[0004] B淋巴细胞活化因子(B cell activating factor belonging to the TNF family, BAFF), 又称B淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)、肿瘤坏死因子和凋亡配体相关的白细胞表达配体1(TNF and apoptosis leukocyte expressed ligand-1, TALL-10、THANK(TNF homologue that activates apoptosis, NF- κ B and JNK), 是调节B细胞免疫的重要细胞因子。BAFF属于TNF超家族,拥有三种受体,分别为TACI、BCMA和BAFF-R,其中,BAFF对BAFF-R的结合是促进B细胞存活的主要原因。除了能够促进B细胞存活,BAFF还可以协同CD40L增加B细胞的扩增效率。BAFF是一种由309个氨基酸组成的跨膜蛋白,其全长氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,BAFF蛋白需要在蛋白水解酶的作用下才可以释放出具有活性的水溶性片段。

[0005] 发明人通过研究发现,BAFF蛋白在骨关节炎患者和健康人的骨关节的关节滑液中的表达量存在较大差异,因而可以通过对骨关节中的BAFF含量进行检测以区分骨关节炎患者和健康人,进而实现对骨关节炎的有效检测,相较于现有的X射线检查、磁共振成像(MRI)以及超声波检查而言,以BAFF蛋白作为骨关节炎的标志物进行检测的方法更加简便,成本更低,且灵敏度更高。目前,市面上还没有针对BAFF蛋白的骨关节炎检测试剂盒。现有的试剂盒常采用酶联免疫吸附(ELISA)法对待测蛋白进行定量检测,试剂盒中常含有标准品,标准品主要用于制作标准曲线,在对待测蛋白进行检测时,采用抗原与抗体进行结合的方式,然后通过酶与底物产生颜色反应,然后采用分光光度计(酶标仪)对吸光度进行检测,将测得的读数代入标准曲线计算最终得出待测蛋白的含量,从而实现对待测蛋白的定量检测。基于上述内容可知,若要采用上述方式对BAFF蛋白进行定量检测,则需要以BAFF蛋白作为

标准品制备标准曲线,在现有技术中,常采用原核重组表达的方式获取BAFF蛋白,但是,由于原核重组表达的蛋白缺乏糖基化,其稳定性较天然蛋白更差,且在纯化原核重组表达蛋白的过程中容易得到不溶的包涵体,其不易与特异性抗体进行结合,因而,以原核重组表达得到的BAFF蛋白作为试剂盒的标准品对BAFF蛋白进行定量检测时会严重影响检测结果的灵敏度、特异度和精确度。

发明内容

[0006] 为了解决以原核重组表达得到的BAFF蛋白作为标准品时存在的稳定性较差而导致检测结果的灵敏度、特异度和精确度较低的问题,本发明提供一种BAFF重组截短蛋白及应用其的试剂盒。

[0007] 根据本发明的第一个方面,提供一种BAFF重组截短蛋白,该BAFF重组截短蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0008] 本发明通过系统地筛选得出能够可靠地反映骨关节炎状态的标志物,基于BAFF蛋白在骨关节炎中的平均表达水平远远高于健康人及其与炎症相关性,以BAFF蛋白为检测目标,对骨关节炎进行预测、诊断和检测。并且,发明人根据BAFF全长蛋白的三维结构图,将全长BAFF蛋白划分为两个主要区域,一是多肽片段(Arg47-Ser90),二是BAFF截短蛋白(Ile166-Glu290),其中,截短蛋白是从BAFF全长蛋白中选取第166位至290位氨基酸得到的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)得到的,通过抗原表位设计实验对BAFF截短蛋白进行氨基酸编辑,使位于BAFF截短蛋白(SEQ ID NO:3)的第77位的组氨酸(His,大写字母缩写为H)突变为精氨酸(Arg,大写字母缩写为R)、第113位的谷氨酸(Glu,大写字母缩写为E)突变为脯氨酸(Pro,大写字母缩写为P),最终得到本发明要求保护的BAFF重组截短蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0009] 影响蛋白原核表达的因素有很多,如蛋白的亲水性、密码子的稀有性、蛋白毒性等,例如,疏水性过强、稀有密码子过多或多个稀有密码子连在一起会导致全长蛋白的表达更加困难。相较于全长蛋白而言,截短蛋白由于长度更短,将截短蛋白基因片段与载体连接构建得到的重组表达载体导入宿主细胞/菌进行表达时,截短蛋白基因片段的表达更加容易。

[0010] 相较于未经过突变的BAFF截短蛋白(氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)而言,本发明提供的BAFF重组截短蛋白的肽链结构更加稳定,且经过突变的BAFF重组截短蛋白的基因片段在进行表达时得到的重组蛋白在纯化过程中不会产生不溶的包涵体,说明BAFF重组截短蛋白的溶解性更好,并且,BAFF重组截短蛋白具有更好的亲和力,更加容易包被在酶标板上,也更有利于与BAFF蛋白的特异性抗体的结合,将本发明提供的BAFF重组截短蛋白应用于骨关节炎的检测中,一方面,能够作为用于检测骨关节炎的试剂盒中的标准品,用于校准待测样品中的BAFF蛋白的浓度标准曲线,二是能够将BAFF重组截短蛋白用于对动物进行免疫以制备得到检测抗体,将BAFF重组截短蛋白和制得的检测抗体作为用于检测骨关节炎的试剂盒的组分,该试剂盒能够准确地实现对BAFF蛋白的定量检测,且灵敏度、特异度和精确度较高,从而实现对骨关节炎的预测、诊断和检测。

[0011] 根据本发明的第二个方面,提供一种核酸分子,该核酸分子包含编码上述BAFF重组截短蛋白的核苷酸序列。

[0012] 根据本发明的第三个方面,提供一种重组表达载体,该重组表达载体包括上述核酸分子。

[0013] 根据本发明的第四个方面,提供一种BAFF重组全长蛋白,该BAFF重组全长蛋白包括上述BAFF重组截短蛋白。

[0014] 优选地,上述BAFF重组全长蛋白还包括多肽片段,该多肽片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0015] 优选地,上述BAFF重组全长蛋白的氨基酸序列如SEQ NO ID:5所示。

[0016] 根据本发明的第五个方面,提供上述BAFF重组截短蛋白或上述BAFF重组全长蛋白在制备用于检测骨关节炎的试剂盒中的应用。

[0017] 将本发明提供的BAFF重组截短蛋白应用于检测骨关节炎的试剂盒的制备中,该试剂盒能够对骨关节炎患者进行检测,这对骨关节炎的临床诊断具有极其重要的意义,特别是在对早期骨关节炎患者的筛选方面,能够在一定程度上为骨关节炎的早期临床治疗奠定基础。

[0018] 根据本发明的第六个方面,提供一种用于检测骨关节炎的试剂盒,该试剂盒包括BAFF标准品;BAFF标准品为上述BAFF重组截短蛋白或BAFF重组全长蛋白。

[0019] 优选地,上述试剂盒还包括检测抗体,检测抗体通过以下步骤制备得到:

[0020] S1. 利用上述BAFF重组截短蛋白或BAFF重组全长蛋白对小鼠进行免疫后,获取小鼠的脾脏,从小鼠的脾脏中分离得到脾细胞;

[0021] S2. 将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,筛选得到针对BAFF蛋白的阳性杂交瘤细胞;

[0022] S3. 对阳性杂交瘤细胞进行亚克隆,筛选得到单克隆细胞株,单克隆细胞株经过培养后分泌得到抗BAFF蛋白的单克隆抗体,该抗BAFF蛋白的单克隆抗体即为检测抗体。

[0023] 优选地,上述检测抗体为生物素化抗BAFF蛋白的单克隆抗体。

[0024] 优选地,上述试剂盒还包括ELISA酶标板、洗涤液、稀释液A、稀释液B、底物和终止液;ELISA酶标板为包被有检测抗体的聚苯乙烯板;洗涤液为含有0.05% Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L、pH值为7.4;稀释液A为含有1g/L牛血清白蛋白,0.05% Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L、pH值为7.4;稀释液B为辣根过氧化物酶-链霉亲和素溶液;底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液;终止液为硫酸溶液,硫酸溶液的浓度为0.2M。

附图说明

[0025] 图1为骨关节炎患者和健康人的骨关节的滑膜液样本中的50种细胞因子的差异倍数结果图。

[0026] 图2为通过PCA对骨关节炎患者和健康人的骨关节的滑膜液样本中的差异蛋白的阵列数据进行分析的结果图。

[0027] 图3为BAFF全长蛋白的三维结构预测结果图。

[0028] 图4为利用实施例4提供的试剂盒与实施例5提供的试剂盒对骨关节炎进行检测的相关性对比结果图。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施方式对本发明提供的技术方案中的技术特征作进一步清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 实施例1骨关节炎标志物的筛选

[0031] 采用蛋白芯片技术对24例骨关节炎患者(病例均来自于宁夏医科大学总医院)和24例健康志愿者的滑膜液样本中的440种细胞因子的表达水平进行检测,以鉴定骨关节炎相关生物标志物,具体操作步骤如下:

[0032] 分别从24例骨关节炎患者(OA组)和24例健康志愿者(Control组)的骨关节中获取100 μ L滑膜液并加入到人类细胞因子抗体阵列池(RayBiotech,Norcross,GA,USA)中,然后加入440个一抗后于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,洗去未结合的蛋白质,接着将生物素结合的检测抗体混合物加入到阵列池中,再加入花青染料(Cy3)结合的链霉亲和素后并在芯片中孵育2小时,通过InnoScan 300扫描仪(Innopsys,France)将芯片中的荧光信号转换为信号值,得到50个差异蛋白(细胞因子),结果如图1所示,其中,抗体阵列中鉴定的OA相关生物标志物采用moderated t-statistics test,校正后的p值小于0.05,倍数变化 >1.2 或 <0.83 被认为与OA的发病机制显著相关。

[0033] 由图1可知,有50种细胞因子在OA组和Control组的滑膜液中的表达存在显著差异,这50种细胞因子被认为与骨关节炎(OA)的发病机制有关,在这些差异表达的细胞因子中,有20种细胞因子在OA组滑膜液中的表达低于Control组,而有30种细胞因子在OA组滑膜液中的表达高于Control组。

[0034] 为了证明这些细胞因子在骨关节炎患者和健康人群中的表达存在差异,通过主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)对OA组和Control组中的差异细胞因子的阵列数据进行分析,并绘制OA组和Control组的分布区域,结果如图2所示,其中,红色表示的是OA组,蓝色表示的是Control组。由图2可知,本实施例筛选出来的50种细胞因子确实能够将骨关节炎患者和健康人进行区,能够作为骨关节炎检测的标志物。

[0035] 实施例2BAFF重组截短蛋白的制备

[0036] 从实施例1中筛选得到的50个细胞因子中选自了其中一种进行研究,在本实施例中选取的是BAFF蛋白。

[0037] BAFF(B-cell activating factor)属于TNF超家族,拥有三种受体,分别为TACI、BCMA和BAFF-R,其中,BAFF对BAFF-R的结合是促进B细胞存活的主要原因。除了能够促进B细胞存活,BAFF还可以协同CD40L增加B细胞的扩增效率。BAFF是一种由309个氨基酸组成的跨膜蛋白,其全长氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,BAFF蛋白需要在蛋白水解酶的作用下才可以释放出具有活性的水溶性片段。

[0038] 根据如图3所示的BAFF蛋白的三维结构图预测,通过合成得到多肽片段(Arg47-Ser90)和BAFF截短蛋白(Ile166-Glu290),其中,多肽片段(Arg47-Ser90)的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,BAFF截短蛋白(Ile166-Glu290)的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0039] 在采用酶联免疫吸附(ELISA)法对骨关节炎患者的滑膜液样本中的BAFF蛋白进行定量检测时,使用BAFF蛋白标准品校准可以测定BAFF蛋白浓度的标准曲线,获取BAFF蛋白

标准品的方式主要包括以下两种途径：一是从骨关节炎病人的滑膜液样本中提取得到BAFF蛋白,但是该提取方法的步骤复杂且成本较高,且无法大量获得BAFF蛋白,二是通过原核重组表达得到BAFF蛋白,该方法相对较为简单且能够大量制备BAFF蛋白。

[0040] 现有的大量研究发现,由于原核重组表达的蛋白缺乏糖基化,其稳定性较天然蛋白更差,并且,在纯化重组蛋白过程中会得到不溶的包涵体,使表达得到的蛋白不易与特异性抗体结合。目前,在市面上流通的BAFF蛋白标准品普遍存在稳定性不佳的问题。

[0041] 此外,影响蛋白原核表达的因素有很多,如蛋白的亲水性、密码子的稀有性、蛋白毒性等,例如,疏水性过强、稀有密码子过多或多个稀有密码子连在一起会导致全长蛋白的表达更加困难。相较于全长蛋白而言,截短蛋白由于长度更短,将截短蛋白基因片段与载体连接构建得到的重组表达载体导入宿主细胞/菌进行表达时,截短蛋白基因片段的表达更加容易,因而本实施例选择直接表达BAFF重组截短蛋白,而非全长重组蛋白。

[0042] 基于上述提及的现有的BAFF蛋白存在的问题,本实施例选取了BAFF蛋白(其全长氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)的第166位氨基酸至第290位氨基酸的序列(SEQ ID NO:3,即BAFF截短蛋白),通过抗原表位设计实验对BAFF截短蛋白进行氨基酸编辑,使位于SEQ ID NO:3的第77位的组氨酸(His,大写字母缩写为H)突变为精氨酸(Arg,大写字母缩写为R)、第113位的谷氨酸(Glu,大写字母缩写为E)突变为脯氨酸(Pro,大写字母缩写为P),最终得到BAFF重组截短蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0043] 为了得到大量的BAFF重组截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示),本实施例通过设计得到BAFF重组截短蛋白的基因片段(以下简称“BAFF基因片段”),随后通过PCR扩增得到大量的BAFF基因片段,将载体pET-28a及经过琼脂糖凝胶纯化的BAFF基因片段进行双酶切处理以获得酶切产物并进行纯化,并用T4 DNA连接酶将纯化后的酶切产物进行连接,得到重组质粒pET-28a-BAFF,然后将重组质粒pET-28a-BAFF转化进入大肠杆菌DH5 α 中,并将含有重组质粒pET-28a-BAFF的大肠杆菌DH5 α 在含有氨苄青霉素的LB平板(含有LB培养基:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠10g/L)上于37 $^{\circ}$ C下培养12小时后挑选单克隆,小量制备含有BAFF基因片段的质粒,通过双酶切/PCR鉴定筛选出阳性克隆并对其进行测序,测序结果表明重组的BAFF片段与设计的BAFF基因片段的序列完全一致。

[0044] BAFF质粒经测序验证后,转化进入大肠杆菌(BL21)中,并将含有BAFF质粒的大肠杆菌于含有氨苄青霉素的LB培养基中培养,可在LB平板上挑选阳性克隆并进行质粒酶切鉴定,小量制备BAFF质粒,用双酶切PCR鉴定筛选出阳性克隆,最终获得含有BAFF基因片段的重组质粒工程菌。

[0045] 在表达时,将含有BAFF基因片段的重组质粒工程菌于含有100 μ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中培养,待菌液在600nm波长下的吸光度A₆₀₀达到0.5~0.6之间,向LB培养基中加入终浓度为0.5mM的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)并于37 $^{\circ}$ C下诱导4h,将诱导完成后得到的菌液于4000rpm下离心10min,收集菌体,并用PBS缓冲液洗涤沉淀;利用PBS缓冲液重悬沉淀后置于冰浴中,超声破菌后于12000rpm下离心20min,将上清和沉淀分别进行变性聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,结果表明:表达的BAFF重组截短蛋白为胞浆不可溶性表达。

[0046] 将上述经过最终诱导完成后的菌液于4000rpm下离心10min,收集菌体,并用PBS缓冲液洗涤沉淀,然后用20mM Tris-HCl重悬沉淀后置于冰浴中,超声破菌后于12000rpm下离心20min,采用6M尿素变性剂将其溶解,随后将上清层用GE Healthcare公司的His Trap FF

纯化柱将蛋白进行纯化,接着通过PBS缓冲液两次透析去除变性剂,最终获得的蛋白用SDS-PAGE电泳进行分析,并用BCA蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行检测。

[0047] 参照上述原核重组表达方式获得大量未经过突变的BAFF截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)和经过突变得到的BAFF重组截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示),并对二者的肽链的结构稳定性(储藏稳定性)进行研究,具体如下:将未经过突变的BAFF截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)和经过突变得到的BAFF重组截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)分别置于4℃下保存两个星期后取出。

[0048] 未经过突变的BAFF截短蛋白有轻微降解现象,而经过突变得到的BAFF重组截短蛋白未发现蛋白有降解现象,随后分别将未经过突变的BAFF截短蛋白和经过突变得到的BAFF重组截短蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE电泳)实验,结果发现,经过突变得到的BAFF重组截短蛋白进行SDS-PAGE电泳时仅出现一个条带,而未经过突变的BAFF截短蛋白进行SDS-PAGE电泳时出现多个条带,且各个条带所对应的蛋白分子量等于或小于经过突变得到的BAFF重组截短蛋白的分子量。上述结果说明,未经过突变的BAFF截短蛋白的稳定性相对较差,在储藏时蛋白容易出现降解因而SDS-PAGE电泳实验出现多个条带,相较于未经过突变的BAFF截短蛋白而言,经过突变得到的BAFF重组截短蛋白的肽链结构更加稳定,在储藏过程中蛋白不易发生降解,这将有利于其与BAFF特异性抗体的结合,将其作为BAFF标准品用于试剂盒中对骨关节炎进行检测时,能够准确地实现对BAFF蛋白的定量检测。并且,经过突变后的得到的BAFF重组截短蛋白具有更好的亲合力,使得其更加容易包被在酶标板上,有利于进行相关的检测实验。因此,本实施例所制得的BAFF重组截短蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)由于具有更高的稳定性以及亲和力,因而将其作为BAFF标准品应用于检测骨关节炎的试剂盒中。

[0049] 在此,需要说明的是,也可以参照上述方式直接对BAFF全长蛋白中的相关氨基酸进行编辑,经过突变后的BAFF全长蛋白也能够作为BAFF标准品应用于检测骨关节炎的试剂盒中,但是由于全长蛋白的表达比截短蛋白更难,因而,本发明主要以BAFF重组截短蛋白作为标准品以及用于对小鼠进行免疫以生产检测抗体,需要指出的是,以BAFF重组截短蛋白和BAFF重组全长蛋白作为标准品以及用于免疫以生产检测抗体应用于骨关节炎检测试剂盒中,其检测结果基本相同。

[0050] 对比例1

[0051] 通过设计得到的BAFF全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:1所示)或BAFF截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:3所示)的基因片段,参照实施例1提供的步骤利用相同的载体制备以及蛋白表达实验,BAFF全长蛋白或BAFF截短蛋白的基因片段在进行表达时得到的重组全长蛋白在纯化过程中均产生不溶的包涵体,且在利用PBS缓冲液进行透析过程中产生大量沉淀,不能进行后续的抗体制备及ELISA实验,上述结果说明,采用原核重组表达的方式获得的BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:1所示)或BAFF截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:3所示)由于缺乏糖基化,其稳定性较差,在纯化原核重组表达蛋白的过程中容易得到不溶的包涵体,其不易与特异性抗体进行结合,因而,以原核重组表达得到的BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:1所示)或BAFF截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:3所示)作为试剂盒的标准品对BAFF蛋白进行定量检测时会严重影响检测结果的灵敏度、特异度和精确度。

[0052] 实施例3BAFF抗体的制备

[0053] 为了获得BAFF抗体,本实施例分别采用BAFF重组截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:4所示)和BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:5所示)免疫小鼠,具体操作步骤如下:

[0054] 1. 鼠抗BAFF杂交瘤细胞株的建立及单抗亚型的鉴定

[0055] (1) 选用6至8周龄左右且健康的雌性BALB/c小鼠2只,适应性饲养1周后,采集阴性血作为对照用,接着分别采用BAFF重组截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:4所示)和BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:5所示)对小鼠进行免疫,其中,免疫程序采用4次基础免疫和1次加强免疫;

[0056] (2) 采用中程免疫方案(0.3mL/只,2周/次)对小鼠进行首次免疫,在首次免疫过程中,先将免疫原与弗氏完全佐剂等体积混合后搅拌乳化,并按照每只小鼠50 μ g的注射量在小鼠背部皮下多点注射,此后按免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂搅拌乳化进行常规免疫;

[0057] (3) 在随后进行的3次基础免疫过程中,将免疫原与TiterMax佐剂等量混合乳化后,按照每只小鼠50 μ g的注射量在小鼠的背部进行多点注射,7天后测抗体效价,小鼠中的抗体效价明显达到4万以上,准备对其进行加强免疫,在加强免疫过程中不加佐剂仅采用免疫原在小鼠的背部进行多点注射,加强免疫剂量为50 μ g/只,加强免疫后3天,摘眼球采血,分离血清保存,同时取脾脏用于进行后续的细胞融合;

[0058] (4) 在细胞融合的过程中,将脾细胞与骨髓瘤细胞按照体积比4:1进行混合,并在聚乙二醇(PEG,分子量为1450)的促融作用下进行融合,接着将融合细胞于HAT选择性培养液(购自于北京博奥龙免疫技术有限公司,牌号DF08001)中进行培养,10天后通过间接ELISA方法筛选出能与BAFF蛋白反应的阳性杂交瘤细胞,并将初筛得到的阳性杂交瘤细胞扩大培养,两天后进行标签蛋白(His-tag)杂交瘤细胞的排除,以复筛出针对BAFF蛋白而非标签的杂交瘤细胞;

[0059] (5) 利用有限稀释法将获得的阳性杂交瘤细胞连续进行亚克隆两次以上,每次亚克隆用HT选择性培养基(购自于北京百奥莱博科技有限公司,牌号GL0174)进行培养,亚克隆8~10天后进行ELISA筛选,直至单克隆细胞阳性率达到100%为止,获得两株能够稳定分泌抗BAFF蛋白的抗体的单克隆细胞株,分别命名为3D6和6B5,其中,单克隆细胞株3D6和6B5分别为采用BAFF重组截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:4所示)和BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:5所示)对小鼠进行免疫并筛选后得到的单克隆细胞株;

[0060] (6) 应用小鼠单克隆抗体亚型鉴定芯片试剂盒(购自于上海苑试生物技术有限公司,牌号CS-ELISA0984)鉴定单抗亚型,按芯片试剂盒说明书将单克隆细胞株上清分别用DMEM无血清培养基进行稀释80~100倍后加入到阵列中,一个孔含有测定所有亚型的阵列,每个亚型有4次重复,结果显示:3D6和6B5杂交瘤细胞上清的抗体亚型为IgG1,轻链亚型均为 κ 链。

[0061] 2. 鼠抗BAFF的腹水抗体制备及纯化

[0062] (1) 选择8~12周龄雌性健康BALB/c小鼠,按照每只小鼠0.5mL的注射量向小鼠腹腔内注射降植烷,正常饲喂小鼠7~10天后,按照每只小鼠 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个的注射量向小鼠腹腔内注射单克隆杂交瘤细胞,注意吹下细胞或稀释细胞时需用PBS缓冲液或无血清培

培养基;

[0063] (2) 正常饲喂小鼠8天后,收集小鼠腹水并于10000r/min下离心15min,除去细胞成分和其他的沉淀物、脂肪以及油层等,收集中间层,测定抗体效价,分装,置于-70℃下冻存备用。

[0064] (3) 饱和硫酸铵沉淀:吸取5mL处理好的腹水移入小烧杯中,在搅拌条件下,逐滴加入5.0mL经过0.22μm滤膜过滤后的PBS缓冲液,混合均匀后,再逐滴加入10mL饱和硫酸铵溶液(pH7.4),继续缓慢搅拌30min;静置2h后于10000r/min下离心15分钟,弃去上清,沉淀物用经过0.22μm滤膜过滤后的PBS缓冲液进行重悬,然后再利用0.22μm滤膜将该重悬液进行过滤;

[0065] (4) 根据抗体不同亚型,选定不同的纯化柱(GE Healthcare公司):以IgG抗体纯化为例,先用结合缓冲液、洗脱缓冲液及再生缓冲液将柱子进行平衡,通常平衡5个柱体积,然后将重悬的腹水缓冲液以1mL/min的速度上样,上样完成后用结合缓冲液平衡,再用洗脱液洗至基线位置,收集抗体峰,用PBS缓冲液将抗体进行透析,用BCA蛋白定量试剂盒测定抗体浓度,并将抗体分装保存,将制备好的抗体用于进行ELISA测定,结果如表1所示。

[0066] 表1单克隆细胞株3D6和6B5分泌的抗BAFF蛋白的抗体的效价

	抗体稀释度 (1: X)	3D6 效价	6B5 效价
[0067]	5000	1.772	1.508
	10000	1.541	1.277
	20000	0.909	0.735
[0068]	40000	0.423	0.326
	80000	0.227	0.205
	160000	0.226	0.22
	空白对照 (PBS 缓冲液)	0.065	0.055

[0069] 由表1可知,采用BAFF重组截短蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:4所示)对小鼠进行免疫并筛选后得到的单克隆细胞株3D6和采用BAFF重组全长蛋白(氨基酸序列SEQ ID NO:5所示)对小鼠进行免疫并筛选后得到的单克隆细胞株6B5二者分泌的抗BAFF蛋白的抗体的效价均较高,且较为接近。上述结果说明,采用BAFF重组截短蛋白对小鼠进行免疫制备得到的抗BAFF蛋白的抗体也能够作为检测抗体用于对BAFF蛋白进行检测,且相较于BAFF重组全长蛋白而言,BAFF重组截短蛋白的原核重组表达更加容易,使其制备更加简单,能够大量获得,降低了生产成本。

[0070] 实施例4用于检测骨关节炎的试剂盒

[0071] 本实施例提供一种用于检测关节炎的试剂盒,该试剂盒包括以下组分:

[0072] 1. ELISA酶标板:采用预先用封闭液(含有50g/L牛血清白蛋白,0.05%Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为0.15mol/L、pH值为7.4)处理的聚苯乙烯板作为ELISA酶标板;

[0073] 2.检测抗体:在本实施例提供的用于检测骨关节炎的试剂盒中,所采用的检测抗体是生物素化抗BAFF单克隆抗体,稀释浓度为0.13mg/L,具体地,以实施例3所制得的针对BAFF重组截短蛋白的3D6抗体作为检测抗体,可选自单克隆抗体或其抗原结合片段,例如scFv、Fab、Fab'和F(ab')₂;

[0074] 3.洗涤液:含0.1% Tween 20的20X浓缩洗涤液(0.1% Tween-20的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液的浓度为3mol/L、pH值为7.4);

[0075] 4.BAFF标准品:含纯度为95%的蛋白抗原,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;

[0076] 5.稀释液A:用于稀释样本的15mL 5X浓缩稀释液(0.02mol/L pH=7.4的PBS缓冲液,其中含有0.05wt% Tween-20);

[0077] 6稀释液B:用于稀释抗体和HRP-链霉亲和素的15mL 5X浓缩稀释液7.200μL 300X浓缩HRP-链霉亲和素溶液;

[0078] 7.底物:12mL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液;

[0079] 8.终止液:8mL浓度为0.2M的硫酸溶液;

[0080] 本实施例提供的用于检测骨关节炎的试剂盒采用BAFF截短蛋白的突变体作为标准品(纯度大于95%的BAFF重组截短蛋白,其中包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的全长或片段或其与其他基团相偶联的复合物以及其他衍生物),选择溶解度大的BAFF蛋白标准品有利于实验数据的获取,且BAFF蛋白浓度的标准曲线通过使用已知浓度的BAFF蛋白标准品,用ELISA方法测定的浓度和吸光度测定值的对应曲线。另外,在关节滑液中的BAFF蛋白可单独游离存在,也可以与其他体液中的细胞外蛋白相结合的形式存在,本实施例提供的用于检测骨关节炎的试剂以利用BAFF截短蛋白的突变体(即BAFF重组截短蛋白,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)制备得到的针对BAFF截短蛋白的3D6抗体作为检测抗体,检测抗体能够与待测样本(关节滑液)中的BAFF蛋白(目标检测蛋白)进行结合,从而实现BAFF蛋白的定量检测。

[0081] 本实施例提供的用于检测骨关节炎的试剂盒的使用方式如下:

[0082] 1.向ELISA酶标板中加入用稀释液A进行梯度稀释的BAFF标准品与待检测的血清样品,每个样品做两个重复,每孔加入BAFF标准品100μL、待检测的血清样品100μL,于37℃下反应40分钟;

[0083] 2.配置1×洗涤液于洗板机上洗板5次,5次的洗板总时间共10分钟;

[0084] 3.将稀释液B加入经过生物素化的检测抗体和HRP-链霉亲和素混匀后,加入微孔板中于37℃下孵育40分钟;

[0085] 4.参照上述步骤进行再次洗涤,然后向微孔板中加入底物于37℃下反应10分钟,加入终止液进行显色,于酶标板上读数,根据读数计算标准曲线,可以得出读数与标准品之间的线性关系,将样品的OD值代入线性公式(标准曲线)得出样品(BAFF蛋白)的含量。

[0086] 在上述用于检测骨关节炎的试剂盒的使用过程中,整个实验操作过程不超过2个小时。

[0087] 实施例5

[0088] 本实施例提供一种用于检测关节炎的试剂盒,与实施例4相比,构成的区别是:(1)所采用BAFF标准品为全长BAFF蛋白(其氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示);(2)所采用的检测抗体为实施例3所制得的针对BAFF重组全长蛋白的6B5抗体。除上述区别以外,本实施例所

采用的物料、配方配比以及制备操作等均与实施例4严格保持一致。

[0089] 实施例6用于检测骨关节炎的试剂盒的灵敏度检测

[0090] 本实施例的目的旨在对实施例4、实施例5提供的用于检测骨关节炎的试剂盒的检测灵敏度进行检测。

[0091] 实验操作以零校准品(A)当作样品测量20次,计算其均值及标准差,零校准品为BAFF蛋白。以A测定值的均值加上2倍的标准差所得的吸光度值代入标准曲线方程计算得出的浓度为其最低检测量。

[0092] 表2用于检测骨关节炎的试剂盒的灵敏度检测结果

浓度值 (pg/mL)	组别 1	组别 2	组别 3	组别 4
800	2.035	2.009	0.85	0.699
100	1.601	1.542	0.691	0.513
200	1.016	1.022	0.544	0.582
100	0.681	0.582	0.609	0.743
50	0.476	0.459	0.453	0.475
25	0.393	0.365	0.425	0.331
12.5	0.183	0.151	0.074	0.086
0	0.083	0.075	0.088	0.093

[0094] 如表2所示,抗原蛋白(BAFF蛋白)按不同浓度梯度进行稀释,分别得到浓度为0pg/mL,12.5pg/mL,25pg/mL,50pg/mL,100pg/mL,200pg/mL,400pg/mL,800pg/mL的待测蛋白样品,其中,组别1和组别2的试剂盒中采用的检测抗体为抗BAFF单克隆抗体(3D6、6B5),组别3和组别4的试剂盒中采用的检测抗体为无关抗体,作为对照。

[0095] 根据以上数据得出散点图和标准曲线方程 $y = -0.5407x + 4.0171$,R平方值为0.91,抗BAFF单克隆抗体对的最低检测限是12.5pg/mL,可检测的线性范围是:12.5~800pg/mL。上述结果说明,本发明提供的用于检测骨关节炎的试剂盒采用BAFF重组截短蛋白(氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)为BAFF标准品、BAFF截短蛋白的突变体(即BAFF重组截短蛋白,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)制备得到的针对BAFF截短蛋白的3D6抗体作为检测抗体,对待测样本(关节滑液)中的BAFF蛋白(目标检测蛋白)进行定量检测时,检测灵敏度高。

[0096] 实施例7

[0097] 利用本发明实施例4与实施例5提供的用于检测骨关节炎的试剂盒针对同一批临床样本(12例骨关节炎病人样本,编号记为“1~12”;12例健康人样本,编号记为“con1~12”)作对比试验,检测结果如表3所示。

[0098] 表3实施例4与实施例5提供的试剂盒的检测结果比较

编号	实施例 5 提供试剂盒的测试数据 (pg/mL)	实施例 4 提供的试剂盒的测试数据 (pg/mL)
con1	124.6728305	156.0158347
con2	147.8724332	188.5116154
con3	144.5615906	193.0168154
con4	132.2737461	191.3348377
con5	156.2045802	157.8233381
con6	131.8110903	162.7067362
con7	94.91992334	156.6232879
con8	121.575243	149.8105499
[0099] con9	150.6964246	189.345466
con10	125.0969225	148.591582
con11	112.1859971	142.0637097
con12	145.5319356	168.3341558
1	265.5086099	338.2144887
2	251.720136	323.4952566
3	280.2686522	347.2527223
4	273.9537638	359.6796297
5	263.5921094	347.6126477
6	254.9562143	336.8885566
7	227.5042869	239.6198199
8	274.6623599	369.6416197
9	330.6942389	457.7104987
[0100] 10	259.1005963	337.5149695
11	220.6265812	206.2826466
12	262.4984319	323.1278711

[0101] 利用实施例4和实施例5提供的试剂盒对骨关节炎进行检测的相关性对比,结果如图4所示。在图4中,以利用实施例4提供的试剂盒对样本进行测试得到的检测值作为Y轴,以实施例5提供的试剂盒对样本进行测试得到的检测值作为X轴绘制散点图,生成趋势线和公

式,得到R平方值为0.9322,上述结果表明,实施例4提供的用于检测骨关节炎的试剂盒与实施例5提供的试剂盒有很好的相关性,且BAFF标准品采用原核蛋白系统来制备,价格比市面的更加便宜实惠。此外,采用BAFF重组截短蛋白对小鼠进行免疫制备得到的抗BAFF蛋白的抗体也能够作为检测抗体用于对BAFF蛋白进行检测,且相较于BAFF重组全长蛋白而言,BAFF重组截短蛋白的原核重组表达更加容易,使其制备更加简单,能够大量获得,降低了生产成本。

[0102] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细的说明,所属领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,但这些修改或替换均在本发明的保护范围之内。

Protein ID	Entrez ID	Uniprot ID	OA group	Control group	OA/Control	
			Mean \pm SD	Mean \pm SD	p value	Fold change
CXCL14	9547	O95715	1420.6 \pm 534.3	5011.5 \pm 4149.2	<0.001	0.28
TSP-1/THBS1	7057	P07996	10041.0 \pm 6168.5	39594.4 \pm 14580.9	<0.001	0.23
Aggrecan	176	P16112	3518.3 \pm 1912.5	5774.7 \pm 2655.1	0.007	0.61
TIMP-4	7079	Q99727	1697.7 \pm 874.8	4674.2 \pm 2572.1	<0.001	0.35
IL-13 R2	3598	Q14627	304.6 \pm 89.0	507.2 \pm 209.7	0.002	0.60
Cx beta 8-1/CCL23	6368	P55773	307.1 \pm 126.8	519.3 \pm 213.8	0.002	0.59
DNAM-1	10666	Q15762	447.0 \pm 252.2	762.4 \pm 272.8	<0.001	0.59
TRAIL R2	8795	O14763	1778.6 \pm 562.2	2851.5 \pm 1197.4	0.005	0.62
Cadherin-11/CDH11	1009	P55287	461.5 \pm 229.1	690.1 \pm 265.5	0.007	0.67
GITR L	8995	Q9UNG2	461.0 \pm 170.9	697.3 \pm 279.4	0.003	0.66
BMPRII-IA	657	P36894	546.9 \pm 217.7	800.9 \pm 305.0	0.01	0.68
Eotaxin/CCL11	6356	P51671	467.2 \pm 157.1	785.0 \pm 191.8	<0.001	0.60
Osteoactivin/GPNMB	10457	Q14956	3014.5 \pm 1160.1	4298.0 \pm 1318.6	0.005	0.70
WIF-1	11197	Q9Y5W5	895.7 \pm 392.6	1225.9 \pm 257.7	0.005	0.73
Follistatin	10468	P19883	787.3 \pm 245.1	1108.1 \pm 255.8	<0.001	0.71
LYVE-1	10894	Q9Y5Y7	21480.9 \pm 6492.4	31777.9 \pm 10885.0	0.005	0.68
RANK/TNFRSF11A	8792	Q9Y6Q6	1330.4 \pm 446.2	1950.0 \pm 614.7	0.003	0.68
Galectin-7/LGALS7B	3963	P47929	723.5 \pm 268.6	1044.3 \pm 311.8	0.001	0.69
Axl	558	P30530	967.0 \pm 303.5	1367.6 \pm 385.1	0.001	0.71
CEACAM-1	634	P13688	1060.3 \pm 311.2	1343.3 \pm 244.8	0.003	0.79
TGF β 2	7042	P61812	2144.4 \pm 674.5	1521.0 \pm 628.7	0.005	1.41
FSH	2488	P01225	791.5 \pm 263.7	589.3 \pm 231.5	0.022	1.34
Cystatin E M/CST6	1474	Q15828	11996.1 \pm 4530.7	8050.5 \pm 2742.5	0.005	1.49
Fas	355	P25445	3951.2 \pm 1577.4	2731.0 \pm 1248.9	0.016	1.45
Furin	5045	P09958	43017.6 \pm 14291.6	22319.3 \pm 9540.2	<0.001	1.93
Angiogenin	283	P03950	28835.7 \pm 10702.4	18435.1 \pm 11533.1	0.005	1.56
IL-20	50604	Q9NYY1	406.9 \pm 138.1	265.7 \pm 155.4	0.003	1.53
CTLA4	1493	P16410	306.2 \pm 157.0	193.8 \pm 108.3	0.012	1.58
IL-1 F8/IL36B	27177	Q9NZH7	195.5 \pm 58.7	93.7 \pm 34.1	<0.001	2.09
IGFBP-2	3485	P18065	38779.6 \pm 12571.4	25351.4 \pm 14493.2	0.003	1.53
EG-VEGF	84432	P58294	1834.7 \pm 833.7	1072.2 \pm 319.7	<0.001	1.71
Cathepsin S	1520	P25774	12226.2 \pm 9410.6	5405.8 \pm 1676.1	<0.001	2.26
IL-1 F10	84639	Q8WWZ1	163.7 \pm 60.6	118.7 \pm 83.0	0.025	1.38
CD40	958	P25942	1045.6 \pm 225.3	529.2 \pm 216.8	<0.001	1.98
Activin A	3624	P08476	1500.8 \pm 644.3	656.6 \pm 180.9	<0.001	2.29
FGF-4	2249	P08620	1377.4 \pm 699.5	761.3 \pm 370.2	<0.001	1.81
NT-4/NTF4	4909	P34130	1756.8 \pm 720.7	1068.4 \pm 497.4	0.003	1.64
BAFF/TNFSF13B	10673	Q9Y275	1469.3 \pm 409.3	1013.7 \pm 588.6	0.002	1.45
IL-1 F7	27178	Q9NZH6	156.4 \pm 66.3	90.7 \pm 52.7	0.006	1.73
IL-18	3606	Q14116	2322.1 \pm 729.8	1388.5 \pm 703.9	<0.001	1.67
PAI-1/SERPINE1	5054	P05121	12615.1 \pm 5085.6	4951.9 \pm 4478.0	<0.001	2.55
IL-1 R5	8809	Q13478	293.8 \pm 105.1	139.9 \pm 75.4	<0.001	2.10
Prostasin/PRSS8	5652	Q16651	187.1 \pm 122.2	88.0 \pm 65.5	0.012	2.13
PIGF	5228	P49763	3184.8 \pm 3993.3	852.8 \pm 318.9	<0.001	3.73
MCP-2	6355	P80075	3514.2 \pm 1856.6	841.2 \pm 511.2	<0.001	4.18
MIP-3b/CCL19	6363	Q99731	6589.2 \pm 6538.2	1312.6 \pm 395.4	<0.001	5.02
GR0a/CXCL1	2919	P09341	808.1 \pm 1194.2	136.7 \pm 63.4	<0.001	5.91
MMP-1	4312	P03956	32718.3 \pm 20302.9	15950.5 \pm 10101.6	0.016	2.05
IGFBP-3	3486	P17936	11214.2 \pm 5042.2	7258.7 \pm 3502.5	0.016	1.54
SCF/KITLG	4254	P21583	1512.0 \pm 590.0	1066.1 \pm 460.5	0.018	1.42

图1

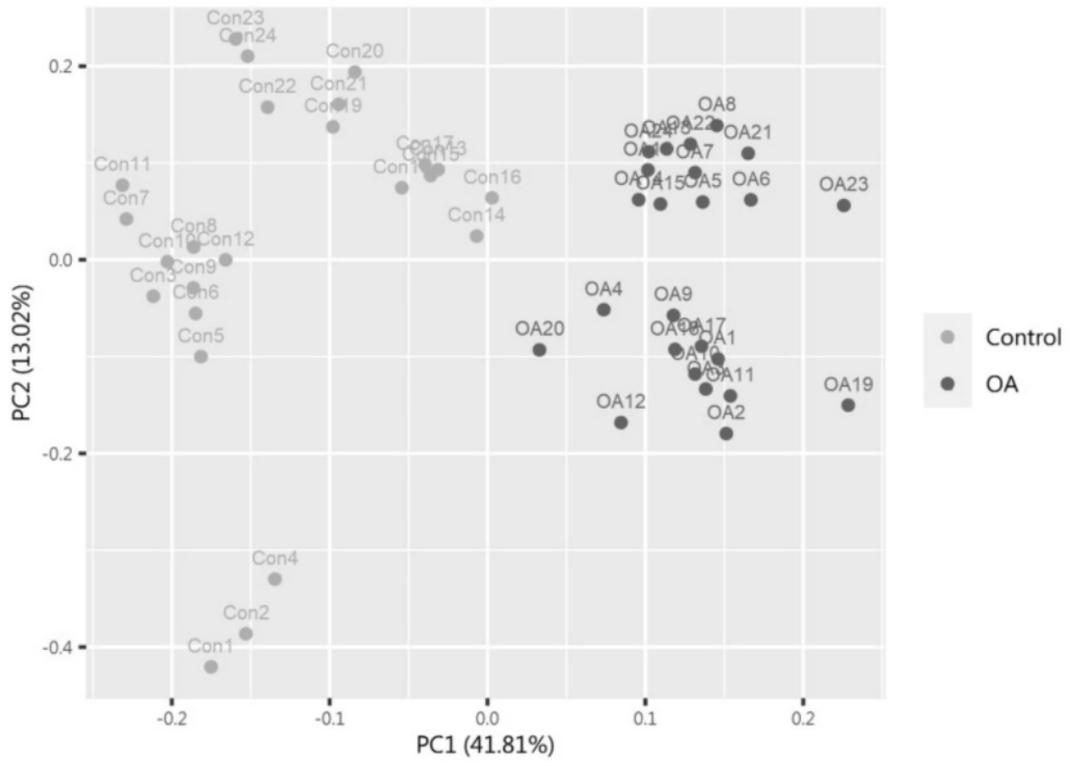


图2



图3

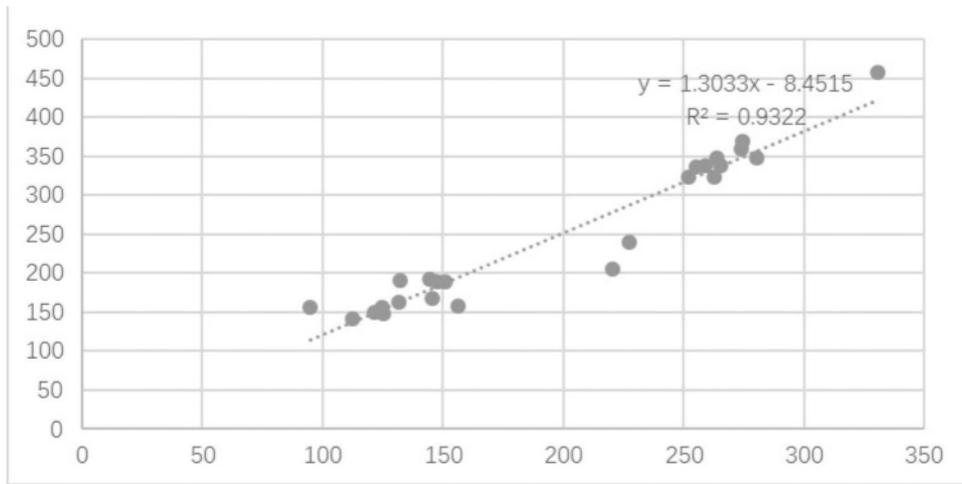


图4