(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 2 月 14 日 (14.02.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/029083 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/558* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/116588

(22) 国际申请日: 2017 年 12 月 15 日 (15.12.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710678761.6 2017年8月10日 (10.08.2017) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 张键 (ZHANG, Jian); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 李梦霞 (LI, Mengxia); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 陈杰 (CHEN, Jie); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。 肖天霞 (XIAO, Tianxia); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** TEST STRIP FOR DETECTING CHEMERIN AND DERIVED POLYPEPTIDE THEREOF, AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) **发明名称:** 一种趋化素及其衍生多肽的检测测试条及其制备方法

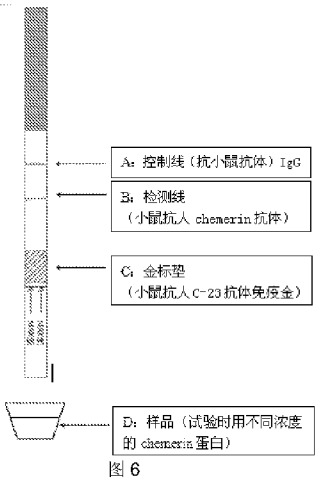


图 6

A: Control line (anti-mouse antibody) IgG
B: Detection line (mouse anti-human chemerin antibody)
C: Gold-labeling pad (mouse anti-human C-23 antibody immunogold)
D: Sample (different concentrations of chemerin protein used during tests)

(57) **Abstract:** A test strip for detecting chemerin and a derived polypeptide thereof, and a preparation method therefor; the test strip comprises a detection membrane, a binding zone containing a first antibody that is labeled with a label being provided upstream of the detection membrane, and a sample application zone being provided upstream of the binding zone; the detection membrane is further provided with a detection zone and a control zone, the control zone being located downstream of the detection zone; the detection zone is coated with a second antibody, and the control zone is coated with a secondary antibody comprising an anti-first antibody; both the first antibody and the second antibody specifically bind to a chemerin.

(57) **摘要:** 一种趋化素及其衍生多肽的检测测试条及其制备方法; 测试条包括检测膜, 检测膜的上游设置有含有以标记物标记的第一抗体的结合区, 结合区上游设置有加样区; 检测膜还设置有检测区和控制区, 控制区位于检测区下游; 检测区包被第二抗体, 控制区包被含有抗第一抗体的二抗; 第一抗体和第二抗体均能与趋化素特异性结合。

WO 2019/029083 A1

[见续页]

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种趋化素及其衍生多肽的检测测试条及其制备方法

技术领域

本发明涉及医学检验领域，具体涉及一种趋化素的检测测试条及其制备方法。

背景技术

趋化素 chemerin 是新发现的脂肪因子，它主要以自分泌或旁分泌的形式由脂肪组织分泌，主要表达于白色脂肪组织、肝脏和肺，在肾上腺、胰腺、胎盘、卵巢、皮肤等也有表达。chemerin 可通过与其受体结合，募集炎性细胞参与炎症反应，调节胰岛素的敏感性和脂肪细胞分化，从而对糖脂代谢产生影响，在肥胖及代谢综合征中起重要作用。此外，chemerin 被报道对性腺激素分泌表现出抑制作用，因此，chemerin 也可能在与肥胖和代谢异常相关的生殖疾病（妊娠糖尿病、多囊卵巢综合征、子痫前期等）的类固醇合成和激素分泌过程中发挥重要的调节作用，且有可能成为相关疾病预防和治疗的新靶点。

近年来，快节奏的工作和生活方式，高消费的压力，方方面面都挑战着婚育年龄的女性。因此，女性的健康，尤其是女性的生殖健康是不容忽视的社会问题。大量研究表明，子痫、肥胖、脂肪肝、妊娠糖尿病及多囊卵巢综合征患者血清中 chemerin 蛋白的含量要明显高于普通人。有报道显示，在对肥胖和代谢综合征患者的研究中发现，非肥胖健康人群血清中的 chemerin 含量为 150±11 ng / ml ~191±14 ng / ml，体质指数（BMI）超过 28 的肥胖症患者血清 chemerin 含量为 300±16 ng / ml ~353.8±18.0ng/ml，而脂肪肝患者血清 chemerin 含量甚至高达 674.7ng/ml（Sell H et al，2010）。在对相关生殖疾病患者的研究中发现，健康孕妇血清中的 chemerin 的含量为 152±13 ng / ml ~199.96±28.05ng/ml（Cetin O et al,2017），妊娠糖尿病患者血清 chemerin 含量为 230ng/ml±17 ng / ml~300ng/ml±15 ng / ml (Pfau D et al,2010)；多囊卵巢综合征患者血清中 chemerin 含量为 311.07±141.87ng/ml (Wang L et al,2014)；重度子痫患者血清中的 chemerin 含量为 364.72±20.01ng/ml~394.72±25.01ng/ml，轻度子痫患者血清中的 chemerin 含量也高达 322.11±37.6ng/ml (Cetin O et al,2017)，等等。

子痫（Eclampsia）

子痫是一个胎源性的疾病，但胎盘具体如何诱导 PE 发病的机制不清楚。胎盘在 PE 发病中起主导地位表现在：（1）在葡萄胎妊娠中，没有胎儿的存在，仍可发生子痫；（2）宫外孕子痫病例中，取出子痫症状仍然存在，只有取出胎盘之后症状才会消失；（3）产后子痫病例是由于在子宫内残留的胎盘所造成的病症。另外，娩出胎盘是子痫唯一而有效的治疗方式。虽然病例机制不清，但子痫患者胎盘有字样细胞侵入浅表、螺旋动脉重塑不完全和螺旋动脉的“急性动脉粥样硬化”的典型病例变化。研究表明脂肪因子 chemerin 在肥胖、糖尿病、高血压和代谢综合征中和子痫中均高表达。chemerin 在子痫孕妇血清中的含量比正常孕妇明显升高。上述研究表明 chemerin 的高表达和受体 CMKLR1 通路可能为上述各病症共有的发病因素。另有研究表明，chemerin 与肿瘤的恶性程度相关。

肥胖、脂肪肝（fatty liver ）

肥胖症是一种由多种因素引起的慢性代谢性疾病，以体内脂肪细胞的体积和细胞数增加致体脂占体重的百分比异常增高并在某些局部过多沉积脂肪为特点。单纯性肥胖患者全身脂肪分布比较均匀，没有内分泌紊乱现象，也无代谢障碍性疾病，其家族往往有肥胖病史。

肥胖是体内脂肪，尤其是甘油三酯积聚过多而导致的一种状态。肥胖可分为单纯性肥胖和继发性肥胖两大类。平时我们所见到的肥胖多属于前者，单纯性肥胖所占比例高达 99%。

肥胖者的死亡率比正常体重者有明显的增高，随着体重的增加，死亡率也有所增加。研究表明，肥胖者因糖尿病而死亡者比正常体重组明显增高为 38.3%（男性）及 37.2%（女性）；其次是肝硬化、阑尾炎、胆石症患者的死亡率，肥胖者也增加一倍左右；心血管、肾病及意外事故的死亡率也较高。

非酒精性脂肪肝病(Non-alcoholic fatty liver disease NAFLD)是目前常见的肝脏疾病是一系列非酒精损肝因素所致的、以肝实质细胞脂肪堆积为主要特征的疾病，可从单纯性脂肪肝，经非酒精性脂肪肝炎（nonalocholic steatohepatitis，NASH），发展为肝纤维化，甚至导致肝硬化（liver cirrhosis）。肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）或肝功能衰竭等终末期肝病。近年来，随着生活水平的提高及饮食结构的改变，我国的 NAFLD 呈升高的趋势，NAFLD 在我国已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病，但具体的发病机制还未探明，从而使药物的开发及临床治疗受阻。流行病学调查，成人脂肪肝发病率 17%~33%，

其中 1/3~1/2 为 NAFLD，后者 10 年内肝硬化发生率为 15%~25%，其中 30%~40%将会死于肝癌、肝衰和移植肝复发。NAFLD 已成为全球性慢性肝病和肝酶异常的首要病因。NAFLD 并非不治之症，但不加以重视、未采取合理的治疗措施，将会影响预后，其病变的发展过程从单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化发展为肝硬化。而肝癌多发生于肝硬化患者，目前已被医学公认。所以应遵循继续深入探索 NAFLD 的发病机制、早期诊断、早期干预、长期坚持、整体治疗与个体化用药相结合的方案。目前已有文献报道，多种脂肪因子（Adipokine）如：脂联素（adiponectin）、瘦素（leptin）、抵抗素（resistin）与胰岛素抵抗（Insulin Resistance，IR）和 NAFLD 的发生发展有关。chemerin 是 2007 年新确认的脂肪因子。chemerin 也称作他扎罗汀又到基因 2 或者视黄酸受体反应蛋白 2。chemerin 的受体之一，称作类趋化因子受体-1（chemokine receptor-like 1,CMKLR1），或者 ChemR23 和 DEZ。除了 CMKLR1，chemerin 还有其他两种受体，分别是 CCRL2 和 GPR1。研究显示，chemerin 与三种受体结合，但作用很不相同。新近发现，NAFLD 患者的 chemerin 水平比正常人的水平高，NAFLD 中肝脏 chemerin 及其受体 CMKLR1 的表达有变化，提示：chemerin 及其受体可能参与 NAFLD 的发病。

妊娠糖尿病

孕妇在妊娠期出现或首次被检查到出现糖耐量受损，即被确诊为妊娠糖期尿病（GDM）。妊娠糖期尿病是孕妇在妊娠期常见的一种病，妊娠糖尿病常伴随的并发症包括新生婴儿超重或婴儿脏器过大，围产儿死亡率上升，并提高了妊娠糖尿病患者及后代患二型糖尿病的风险。根据国际糖尿病联盟（IDF）统计，2013 年妊娠糖期尿病的发病率达到 16.8%，超过了 2002 年统计的发病率 10%左右。妊娠糖期尿病发病率的快速上升，及带来的许多的严峻问题，对于研究妊娠糖期尿病发病机制，寻找治疗靶点非常迫切。

GDM 患者糖代谢多数于产后能恢复正常，但将来患 II 型糖尿病机会增加。糖尿病孕妇的临床经过复杂，母子都有风险，应该给予重视。GDM 患者体内 chemerin 水平明显上升，与 IR 和胰岛 β 细胞功能存在一定的相关性（妊娠糖尿病患者血清 FABP4、chemerin、Nesfatin-1 与胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能的关系分析）。

多囊卵巢综合征

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome ，PCOS) 是育龄妇女常见的内分泌紊乱行疾病，发病率占育龄期妇女的 6~10%，其主要表现为月经稀发或闭经、不孕、卵巢多囊性变、肥胖、多毛、高雄激素血症等。它既是一组因下丘脑-垂体-卵巢轴的平衡失调引起的综合征，也是一种代谢紊乱行疾病。这种生殖功能和代谢机能的系统失调疾病，通常还伴随着二型糖尿病，内膜癌和肥胖等其他疾病（Dunaif，1997）。在 PCOS 中高度表达的雄激素水平，也会刺激体内累计的过多脂肪组织，引起代谢性疾病如肥胖、胰岛素抵抗和相关的高胰岛素血症等病症。目前 PCOS 的药物治疗已取代手术治疗作为一线治疗方法。chemerin 就是一个新发现的与能量代谢，肥胖，免疫及生殖功能调控功能相关的脂肪因子（Iannone and Lapadula，2011）。2008 年在对于正常妇女和多囊卵巢综合征妇女血清中脂肪因子的比较中发现，多囊卵巢综合征妇女的血清中 chemerin 的浓度较高，并且其含量随 insulin 浓度增加而增加（Bozaoglu et al.,2009;Tan et al,，2009）。

现如今检测人体血液与尿液中的 chemerin 含量方法只有酶联免疫吸附测定。该方法较繁琐，用时较长。

现在的测定人体血液或尿液中趋化素 Chemerin 含量的方法主要使用人 Chemerin 酶联免疫吸附测定（ELISA）法进行测定，其缺点也是显而易见的：

1）步骤较繁琐。要按照操作步骤进行，一般需要几个小时至一天左右。

2）耗时。Elisa 板一般是 96 孔板，整板的价格昂贵，要等凑够多个病人的样本一起整板检测比较经济，不适合单个或几个病人样本的检测，等待多个病人的时间不确定；

3）不方便。要通过特定仪器读取信号，只能在有条件的场所，如医院和社康进行检测。

4）昂贵。ELISA 板的成本高，需要低温储存环境，需要借助仪器读取结果。

发明内容

为了克服上述问题，亟需对趋化素的检测方法进行改进和突破。本发明利用免疫胶体金技术以及层析原理进行设计，利用了双抗夹心法的原理，设计测试条来检测样品中趋化素 chemerin 蛋白的浓度。

本发明一个方面提供了一种检测趋化素的测试条，其包括检测膜，检测膜的

上游设置有含有以标记物标记的第一抗体的结合区，结合区上游设置有加样区，其中，检测膜上设置有检测区和控制区，控制区位于检测区下游；其中所述检测区上包被有第二抗体，所述控制区包被有抗第一抗体的二抗；所述第一抗体和第二抗体均能与趋化素特异性结合。

在本发明的技术方案中，结合区中包含以标记物标记的第一抗体，所述标记物选自胶体金、胶体银、胶体黑或染色的乳胶颗粒，优选为胶体金。

在本发明的技术方案中，结合区中包含的第一抗体选自趋化素功能性片段的抗体，优选为 C-23 多肽的抗体，其中 C-23 多肽的序列为:

CLRVQRAGEDPHSFYFPGQFAFS SEQ ID No.1 。

在本发明的技术方案中，所述第二抗体选自趋化素抗体。优选为趋化素单克隆抗体。

在本发明的技术方案中，所述抗第一抗体的二抗选自抗小鼠抗体 IgG。

在本发明的技术方案中，所述检测膜的下游设置有吸水垫。

在本发明的技术方案中，所述检测膜选自硝酸纤维素膜，优选为粒径为 5-20 μm，爬速为 80-250 s/4cm；更优选为 6-15 μm，爬速为 80-225 s/4cm；最优选为①Sartorius CN95，粒径为 15 μm，爬速约为 90-135s/4cm ②Sartorius CN140，粒径为 8 μm，爬速约为 110-165 s/4cm ③Pall Vivid 170，粒径为 6 μm，爬速为 150-225 s/4cm ④whatman AE99，粒径为 8 μm，爬速约为 120-160 s/4cm。

在本发明的技术方案中，所述结合区的以标记物标记的第一抗体的用量为 0.2μg/cm^2 以上，优选为 0.24μg/cm^2 以上。即结合区单位面积上以标记物标记的第一抗体的质量。

在本发明的技术方案中，所述检测区包被的第二抗体的用量为 0.15-5.67μg/cm。

在本发明的一个技术方案中，所述检测膜选自 Startorius CN95，所述检测区包被的第二抗体的用量为 0.15-1.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为 500-60ng/ml。

在本发明的一个技术方案中，所述检测膜选自 Startorius CN140，所述检测区包被的第二抗体的用量为 4.15-5.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为

500-60ng/ml。

在本发明的一个技术方案中，所述检测膜选自 Pall Vivid 170，所述检测区包被的第二抗体的用量为 1.15-2.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为500-60ng/ml。

在本发明的一个技术方案中，所述检测膜选自 Whatman AE99，所述检测区包被的第二抗体的用量为 1.15-2.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为500-60ng/ml。在本发明的技术方案中，所述检测膜选自 Startorius CN95，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -322.23X + 360.79，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意整数。

在本发明的技术方案中，所述检测膜选自 Startorius CN140，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y= -317.51X + 1628.6，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意整数。

在本发明的技术方案中，所述检测膜选自 Pall Vivid 170，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -309.64X + 665.17；最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意整数。

在本发明的技术方案中，所述检测膜选自 Whatman AE99，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限用量关系为 Y = -316.91X + 668.99，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意整数。

在优选的技术方案中，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±10%）μg/cm；在更优选的技术方案中，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±5%）μg/cm。

在优选的技术方案中，所述检测线用量选自 80-400 的任意整数；在更优选的技术方案中，所述检测线用量选自 100-300 的任意整数；

在本发明的技术方案中，所述检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限如表 a 所示。

表 2a

检测膜型号	检测区第二抗体用量（μg/cm）	待测样品最低显色检测限 D（ng/ml）
Startorius CN95	1.500~1.667	60
	0.733~0.900	100
	0.500~0.667	160
	0.433~0.600	200
	0.333~0.467	240
	0.167~0.190	300
	0.15~0.167	500
Startorius CN140	5.500~5.667	60
	4.733~4.900	100
	4.567~4.667	160
	4.467~4.533	200
	4.333~4.433	240
	4.167~4.193	300
	4.150~4.163	500
Pall Vivid 170	2.500~2.667	60
	1.733~1.933	100
	1.567~1.667	160
	1.467~1.533	200
	1.333~1.433	240
	1.170~1.187	300
	1.150~1.167	500
Whatman AE99	2.533~2.667	60
	1.767~1.867	100
	1.533~1.633	160
	1.433~1.500	200
	1.300~1.400	240
	1.173~1.193	300
	1.153~1.170	500

在本发明的技术方案中，所述控制区包被的第一抗体的二抗的用量为 0.8μg/cm 以上，更优选为 1.0μg/cm 以上。即以第一抗体的二抗进行划膜形成时划膜的单

位长度上第一抗体的二抗的用量。

在本发明的技术方案中，所述检测线与控制线之间的间隔为 3-7mm，优选为 4-6mm，更优选为 5mm。

本发明另一个方面提供了一种检测趋化素的测试条的制备方法，其包括如下步骤：

（1）制备加样区，以样品垫处理液处理加样区；

（2）制备结合区：以标记物标记的第一抗体，并将其涂布在结合区；

（3）制备检测膜：稀释第二抗体及第一抗体的二抗，分别包被在检测膜上，形成检测区和控制区，干燥后以封闭液进行封闭；

（4）组装测试条：依次将加样区、结合区、检测区和吸水垫组装至底板上。在步骤（1）中，以惰性蛋白、表面活性剂、防腐剂以及缓冲液制备样品垫处理液，将加样区浸泡于样品垫处理液后，干燥过夜。

进一步地，在步骤（1）中，以 0.5%卵清蛋白，0.01% teen-20，0.02%叠氮化钠防腐剂，0.01M pH7.0 的 PBS，制成样品垫处理液，将加样区浸泡于样品垫处理液后，37℃干燥过夜，室温密封保存。

在步骤（2）中，以标记物标记的第一抗体在 pH 在 8.2-8.6 之间，第一抗体最终浓度为 40-70μg/ml。

进一步地，在步骤（2）中，标记物标记的第一抗体溶液涂布在结合区的用量为 0.2μg/cm^2 以上。

在步骤（3）中，以惰性蛋白和缓冲液制备封闭液。并以表 a 所示用量将第二抗体包被在检测区。以 1μg/cm 以上的用量将第一抗体的二抗包被在控制区。

进一步地，在步骤（3）中，以 2%的牛血清蛋白、2%脱脂奶粉和 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液制备封闭液。

本发明再一个方面提供了一种检测趋化素的测试条在制备检测待测样品中趋化素的试剂盒中的用途。

本发明再一个方面提供了一种检测趋化素的测试条在制备评估或诊断肥胖、脂肪肝、非酒精性脂肪肝病、肝纤维化、子痫、妊娠糖尿病、糖尿病及多囊卵巢综合征的试剂盒中趋化素的试剂盒中的用途。

本发明再一个方面提供了一种检测趋化素的方法，采用本发明的测试条，将待测样品加到加样区，5-15 分钟内根据测试条的显色判断结果。

本发明再一个方面提供了一种趋化素检测组合物，其中包含 2 条以上本发明的不同最低显色检测浓度的测试条。

本发明所述的检测趋化素的方法已离体样品为检测样品。

本发明所述的检测趋化素的方法可以为诊断和治疗目的，或非诊断和治疗目的进行检测。

如果控制线无色，则测试条失效，需重新检测；如果控制线与检测线均出现红色条带，则结果为样品中 chemerin 浓度超过该试纸条最低显色检测限 D 的阈值，提示风险预警，若检测线颜色较浅，则提示样品中 chemerin 浓度高，为高风险预警，若检测线颜色较深，则提示样品中 chemerin 浓度较高，为超高风险预警；若控制线出现红色条带，检测线无色，则结果为样品中 chemerin 浓度低于该试纸条最低显色检测限 D 的阈值，提示安全、低风险。

所述检测测试条由底板、硝酸纤维素膜、含有金标抗体的金标垫、样品垫和吸水垫组成。所述的硝酸纤维素膜设置在底板的中部，硝酸纤维素膜的一侧底板上依次贴有含金标抗体的金标垫和样品垫，硝酸纤维素膜另一侧的底板上贴有吸水垫，所述硝酸纤维素膜中部有一条含有趋化素 Chemerin 抗体的检测线和一条含有抗小鼠抗体 IgG 的控制线。

在本发明中待测样品是指将要分析其是否包含趋化素的任何材料。待测样品的形式优选为液体形式，代表性的样品包括单不限于体液，例如，全血、血浆、血清、唾液、组织液或尿液。待测样品也可以是固体，但应在测试前溶解或者提取。

在本发明中，测试条是指能够用来检测待测样品中是否含有趋化素的装置。测试条至少包括具有检测区和控制区的检测膜。测试条可以放置在外壳，例如塑料壳中，或者，测试条也可以没有外壳。

在本发明中，检测膜是一种固体支持物，其包括检测区和控制区。检测膜可以使任何固体支持物，优选为硝酸纤维素膜。

在本发明中，检测区、检测带和检测线可以互换使用，都是指检测膜上包被有结合趋化素的抗体的区域。

在本发明中，控制区、控制带、控制线或控制线可以互换使用，是指检测膜上包被有金标垫中包含的以标记物附着的第一抗体的二抗的区域。

在本发明中，任选地，结合区上游设置有样品预处理膜，所述样品预处理膜

能够对待样品中的可能影响实验结果的杂质。样品预处理膜可以为滤血膜。

在本发明中，抗体为其最宽含义，包括例如，但不限于完整抗体及单链抗体、抗体片段和嵌合抗体。

本发明结合医学、生物学和免疫学理论知识，利用双抗夹心法胶体金免疫技术及测试条层析原理，开发出能够检测血清、唾液、尿液或组织液中趋化素（chemerin）蛋白浓度的测试条，为肥胖、脂肪肝、先兆子痫、妊娠糖尿病及多囊卵巢综合征等 chemerin 分泌异常的代谢和生殖疾病的监测和早期预防提供新的工具。

有益效果

1、本发明的测试条使用方便、快捷。使用时仅需将测试条有箭头标志的一段垂直浸入装有样品的溶液中纸质箭头下端标记横线处，至少 3 秒，当红色液体移行至测试区时，取出平放与干净的非吸附材料的平面，开始计时，5-15 分钟内根据试条的显色即可判断结果

2、本发明的测试条可以实现半定量。通过表 2 中已经设定的免疫金与检测线抗体的量的配比，若测试条 A 线 B 线均显色，则提示样品中 chemerin 的浓度为高于对应检测限 D 以上的风险值，利用不同最低显色检测限的试纸条，可以半定量测出被检样品中 chemerin 的含量范围。

3、本发明的测试条经济，不需要借助额外仪器，仅根据显色判定结果；常温保存，可以家用。

附图说明

图 1：两种抗体 Dot-blot 结果。

图 2：两种抗体 Western-blot 结果。

图 3：测试条结构示意图，其中 1、样品垫，2、金标垫，3、底板，4、硝酸纤维素膜，5、检测区，6、控制区，7、吸水垫。

图 4：使用方法示意图，其中样品浸入深度不能超过标记横线。

图 5：检测结果说明图。

图 6：测试条各组分的位置、成分及代号，其中，A 为控制线，抗小鼠抗体 IgG，B 为检测线，小鼠抗人趋化素抗体，C 为金标垫，小鼠抗人 C-23 抗体免疫金，D 为待测样品。

具体实施方式

下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解，这些实施 例仅用于说明本发明，而不是用来限制本发明的范围。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。

主要实验材料：样品垫、硝酸纤维素(NC)膜、胶体金垫、吸水纸、底板均购自上海杰一生物科技有限公司；C-23 多肽为 Chemerin 蛋白中的一段功能性序列（CLRVQRAGEDPHSFYFPGQFAFS SEQ ID No.1），由深圳先进技术研究院生殖健康研究室发现，并由强耀生物科技有限公司合成，重组 Chemerin 蛋白由深研科技有限公司合成，金标试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。本发明所用试验材料均可通过市售途径获得。

实施例 1 C-23 抗体及重组 Chemerin 蛋白抗体的制备：

（1）使用 ReadiLink KLH Conjugation Kit（AAT BIOQUEST， 5502）试剂盒分别偶联 C-23 多肽及重组 Chemerin 蛋白，制备 KLH-蛋白偶联物，并纯化该偶联物。

（2）分别使用上述 KLH-蛋白偶联物免疫 6-8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，免疫 4 次后，无菌取小鼠脾脏细胞进行细胞融合。

（3）细胞融合前 2 周复苏骨髓瘤细胞，前 1-2 天制备并培养小鼠腹腔巨噬细胞，将所得脾细胞与骨髓细胞共培养于含腹腔巨噬细胞的 HAT 培养基内培养，经常观察杂交细胞瘤情况，待其长至孔底面积 1/10 以上时吸出上清供抗体检测。

（4）酶联免疫吸附剂测定方法检测所得两种抗体的效价。

（5）酶联免疫吸附剂测定方法鉴定阳性的杂交瘤细胞株上清用 Protein A 亲和层析法纯化抗体。将收集的抗体溶液冻干。

（6）使用免疫斑点法及蛋白质印迹法验证两种抗体。结果见附图 1、附图 2。

实施例 2 胶体金标记的 C-23 抗体的制备：

使用 Gold-in-a-box Conjugation Kit 金标试剂盒制备胶体金

（1）将金溶胶涡旋重悬，将 0.5ml 裸金溶胶放在 10 个干净的 Ep 管中；

（2）将 pH1-10 的标签贴在 Ep 管上，使用 pH 值的图表（表 1），在每个试管中添加不同量试剂盒中所配的缓冲液，涡旋混匀；

（3）将每个 Ep 管低速涡旋，加入 C-23 抗体溶液 14μl（2.5mg/ml），室温放置 30min 使反应完全；

（4）加 Blocking Stabilizer Soltion 50μl 停止反应，在室温下终止反应 16h。

（5）为了有效地干燥胶体金，添加 0.05ml 干燥缓冲液，彻底混合。涂布在胶体金膜上，将其放在 37℃孵化一晚。

（6）经检验，pH=8.4 的胶体金较稳定，所得最终抗体浓度为 56μg/ml。

表 1 胶体金试剂盒 pH 图表

EP 管编号	pH	缓冲液 A	缓冲液 B
1	5.4	9μl	1μl
2	6.6	8μl	2μl
3	7.3	6μl	4μl
4	7.8	4μl	6μl
5	8.2	2μl	8μl
EP 管编号	pH	缓冲液 C	缓冲液 D
6	8.4	10μl	0μl
7	8.8	8μl	2μl
8	9.2	6μl	4μl
9	9.6	4μl	6μl
10	10.1	2μl	8μl

实施例 3 制作过程

（1）样品垫的制备：0.5%卵清蛋白，0.01% teen-20，0.02%叠氮化钠防腐剂，0.01M pH7.0 的 PBS，制成样品垫处理液，将样品垫浸泡于样品垫处理液后，37℃干燥过夜，室温密封保存。

（2）金标垫的制备：使用 Gold-in-a-box Conjugation Kit 金标试剂盒（20nm）制备免疫金，pH 值为 8.4，浓度为 56μg/ml，稀释该免疫金到 50μg/ml，并涂布于胶体金结合垫上，用量约为 0.24 μ g/cm^2，37℃干燥，4℃保存备用。

（3）固相硝酸纤维素膜(NC)的制备：2%的牛血清蛋白、2%脱脂奶粉和 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液混合后用 0.45μm 滤膜过滤得到的封闭液。用 pH=7.4 的 PBS 缓冲液稀释小鼠抗人 Chemerin 抗体及抗小鼠二抗，以不同的蛋白浓度点样于硝酸纤维素膜上作为检测线和控制线，室温干燥后用封闭液封闭

NC 膜 1 小时，37℃干燥备用。以趋化素 Chemerin 重组蛋白为检测样品进行层析试验，观察显色情况，优化点样蛋白浓度。以不同的 NC 膜，并调节测试条上的控制线（A）、检测线（B）、金标抗体的浓度（C），测试其对样品检测线的影响。

（4）测试条的组装在底板上依次将包被有蛋白的硝酸纤维素膜、金标垫与玻璃纤维素膜制成的样品垫、吸水纸制成的吸收垫按图 3 组装，在底板上依次设置样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜以及吸水纸，其中，硝酸纤维素膜上设置有检测区和控制区。

组装好的纸板按纵向剪切，裁成宽度为 3 mm 的条状，即为抗体检测测试条成品。

不同 NC 膜型号以及控制线（A）、检测线（B）、金标抗体浓度（C）对样品检测限的影响。以表 2 所示的 NC 膜，抗小鼠抗体 IgG，小鼠抗人 Chemerin 抗体，小鼠抗人 C-23 抗体免疫金的用量制备不同的测试条，并配制不同浓度的样品，以检测样品中趋化素的检测限。

表 2 NC 膜型号、控制线、检测线、免疫金、可检测样品最低浓度检测限 D 各项配比

NC 膜型号	抗小鼠抗体 IgG 的量 A（μg/cm）	小鼠抗人 Chemerin 抗体的量 B（μg/cm）	小鼠抗人 C-23 抗体免疫金的量 C（μg/cm^2）	样品最低显色检测限 D（ng/ml）
Startorius CN95	1	1.500~1.667	0.24	60
	1	0.733~0.900	0.24	100
	1	0.500~0.667	0.24	160
	1	0.433~0.600	0.24	200
	1	0.333~0.467	0.24	240
	1	0.167~0.190	0.24	300
	1	0.15~0.167	0.24	500
Startorius CN140	1	5.500~5.667	0.24	60
	1	4.733~4.900	0.24	100
	1	4.567~4.667	0.24	160
	1	4.467~4.533	0.24	200

	1	4.333~4.433	0.24	240
	1	4.167~4.193	0.24	300
	1	4.150~4.163	0.24	500
Pall Vivid 170	1	2.500~2.667	0.24	60
	1	1.733~1.933	0.24	100
	1	1.567~1.667	0.24	160
	1	1.467~1.533	0.24	200
	1	1.333~1.433	0.24	240
	1	1.170~1.187	0.24	300
	1	1.150~1.167	0.24	500
Whatman AE99	1	2.533~2.667	0.24	60
	1	1.767~1.867	0.24	100
	1	1.533~1.633	0.24	160
	1	1.433~1.500	0.24	200
	1	1.300~1.400	0.24	240
	1	1.173~1.193	0.24	300
	1	1.153~1.170	0.24	500

通过实验结果，对小鼠抗人 Chemerin 抗体的量与样品最低显色检测限 D 用量之间的关系进行统计可知：

当检测膜选自 Startorius CN95 时，最低显色检测线在 100-300ng/ml 范围内，小鼠抗人 Chemerin 抗体的量 B 为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限 D 为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -322.23X + 360.79。

当检测膜选自 Startorius CN140 时，最低显色检测线在 100-300ng/ml 范围内，小鼠抗人 Chemerin 抗体的量 B 为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限 D 为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -317.51X + 1628.6。

当检测膜选自 Pall Vivid 170 时，最低显色检测线在 100-300ng/ml 范围内，小鼠抗人 Chemerin 抗体的量 B 为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限 D 为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -309.64X + 665.17。

当检测膜选自 Whatman AE99 时，最低显色检测线在 100-300ng/ml 范围内，小鼠抗人 Chemerin 抗体的量 B 为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限 D 为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -316.91X + 668.99。

实施例 4 测试条的使用方法

（1）持测试条将箭头标志的一段垂直浸入装有待测液的容器中直至箭头下端标记横线处，浸入时间为 3~5 秒，或者将样品滴加到样品垫上；

（2）当红色液体移行至测试区时，取出平放于干净的非吸附材料的平面。

（3）5-15 分钟内判断结果，15 分钟后判定无效。

检测结果说明

（1）预警值：控制线（A）和检测线（B）均出现红色条带，表示样本中 chemerin 浓度在该试纸条检测限以上，为高风险值。如附图 5 所示，若检测线（B）颜色较浅，则表明样品中 chemerin 浓度高，提示为高风险预警；若检测线（B）颜色较深，则表明样品中 chemerin 浓度较高，提示为超高风险预警。

（2）安全值：控制线（A）出现红色条带，检测线（B）颜色无色，表示样本中 chemerin 浓度在该试纸条检测限以下，为低风险值。

（3）无效：控制线（A）没有红色条带出现，表示测试无效。在此情况下，应重新测试。

本发明还可以采用多条不同最低检测线的试制条进行组合使用，例如，组合使用两条最低显色检测线不同的试制条，当最低显色检测线为 240 ng/ml 的测试条的检测线（B）出现红色条带，而最低显色检测线为 300ng/ml 的测试条的检测线（B）未出现红色条带时，证明待测样品的中趋化素的浓度位于 240ng/ml-300ng/ml 之间，从而可以进一步达到半定量的目的。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权 利 要 求 书

1、一种检测趋化素的测试条，其包括检测膜，检测膜的上游设置有含有以标记物标记的第一抗体的结合区，结合区上游设置有加样区，其中，检测膜上设置有检测区和控制区，控制区位于检测区下游；其中所述检测区上包被有第二抗体，所述控制区包被有抗第一抗体的二抗；所述第一抗体和第二抗体均能与趋化素特异性结合。

2、根据权利要求 1 所述的检测趋化素的测试条，结合区中包含的第一抗体选自趋化素功能性片段的抗体；优选为 C-23 抗体；更优选为 C-23 单克隆抗体，其中，C-23 的序列如 SEQ ID No.1 所示

CLRVQRAGEDPHSFYFPGQFAFS SEQ ID No.1。

3、根据权利要求 1-2 任一项所述的检测趋化素的测试条，所述第二抗体选自趋化素抗体。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的检测趋化素的测试条，所述检测膜选自硝酸纤维素膜，优选为粒径为 5-20 μm，爬速为 80-250 s/4cm；更优选为 6-15 μm，爬速为 80-225 s/4cm；最优选为①Sartorius CN95，粒径为 15 μm，爬速约为 90-135s/4cm ②Sartorius CN140，粒径为 8 μm，爬速约为 110-165 s/4cm ③Pall Vivid 170，粒径为 6 μm，爬速为 150-225 s/4cm ④whatman AE99，粒径为 8 μm，爬速约为 120-160 s/4cm。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的检测趋化素的测试条，所述检测区包被的第二抗体的用量为 0.15-5.67μg/cm；

优选地，所述检测膜选自 Startorius CN95，所述检测区包被的第二抗体的用量为 0.15-1.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为 500-60ng/ml；或者

所述检测膜选自 Startorius CN140，所述检测区包被的第二抗体的用量为 4.15-5.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为 500-60ng/ml；或者

所述检测膜选自 Pall Vivid 170，所述检测区包被的第二抗体的用量为 1.15-2.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为 500-60ng/ml；或者

所述检测膜选自 Whatman AE99，所述检测区包被的第二抗体的用量为

1.15-2.67μg/cm，待测样品最低显色检测限分别为 500-60ng/ml；

更优选地，所述检测膜选自 Startorius CN95，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -322.23X + 360.79，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意数值；或者

所述检测膜选自 Startorius CN140，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y= -317.51X + 1628.6，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意数值；或者

所述检测膜选自 Pall Vivid 170，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μg/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限关系为 Y = -309.64X + 665.17；最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意数值；或者

所述检测膜选自 Whatman AE99，所述检测区包被的第二抗体的用量为（X±15%）μ g/cm，最低显色检测限为 Y ng/ml，检测区包被的第二抗体的用量与最低显色检测限用量关系为 Y = -316.91X + 668.99，最低显色检测线 Y 选自 60-500 的任意数值；

最优选地，所述检测区的第二抗体的用量、检测膜型号与最低显色检测限如表 a 所示：

表 2a

检测膜型号	检测区第二抗体用量（μg/cm）	待测样品最低显色检测限 D（ng/ml）
Startorius CN95	1.500~1.667	60
	0.733~0.900	100
	0.500~0.667	160
	0.433~0.600	200
	0.333~0.467	240
	0.167~0.190	300
	0.15~0.167	500
Startorius CN140	5.500~5.667	60

	4.733~4.900	100
	4.567~4.667	160
	4.467~4.533	200
	4.333~4.433	240
	4.167~4.193	300
	4.150~4.163	500
Pall Vivid 170	2.500~2.667	60
	1.733~1.933	100
	1.567~1.667	160
	1.467~1.533	200
	1.333~1.433	240
	1.170~1.187	300
	1.150~1.167	500
Whatman AE99	2.533~2.667	60
	1.767~1.867	100
	1.533~1.633	160
	1.433~1.500	200
	1.300~1.400	240
	1.173~1.193	300
	1.153~1.170	500

。

6、权利要求 1-5 所述的检测趋化素的测试条的制备方法，其包括如下步骤：

（1）制备加样区，以样品垫处理液处理加样区；

（2）制备结合区：以标记物标记的第一抗体，并将其涂布在结合区；

（3）制备检测膜：稀释第二抗体及第一抗体的二抗，分别包被在检测膜上，形成检测区和控制区，干燥后以封闭液进行封闭；

（4）组装测试条：依次将加样区、结合区、检测区和吸水垫组装至底板上。

7、权利要求 1-5 所述的检测趋化素的测试条在制备检测待测样品中趋化素的试剂盒中的用途。

8、权利要求 1-5 所述的检测趋化素的测试条在制备评估或诊断肥胖、脂肪

肝、非酒精性脂肪肝病、肝纤维化、子痫、妊娠糖尿病、糖尿病及多囊卵巢综合征的试剂盒中趋化素的试剂盒中的用途。

9、一种检测趋化素的方法，采用 1-5 任一项所述的测试条，将待测样品加到加样区，5-15 分钟内根据测试条的显色判断结果；

如果控制线无色，则测试条失效，需重新检测；如果控制线与检测线均出现红色条带，则结果为样品中趋化素浓度超过该试纸条最低显色检测限的阈值；若控制线出现红色条带，检测线无色，则结果为样品中趋化素浓度低于该试纸条最低显色检测限的阈值。

10、一种趋化素检测组合物，其中包含 2 条以上权利要求 1-5 任一项所述的测试条，所述测试条的最低显色检测浓度不同。

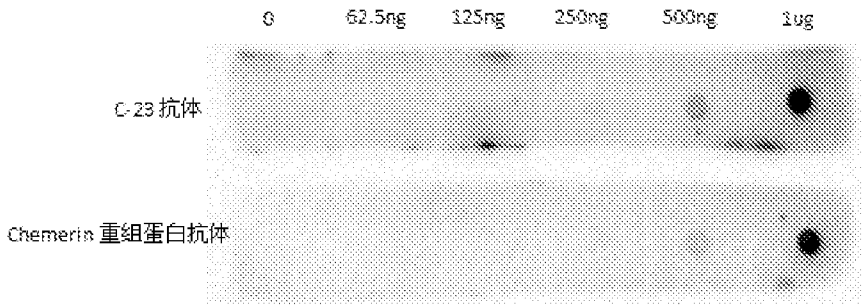

0
62.5ng
125ng
250ng
500ng
1ug
C-23 抗体
Chemerin 重组蛋白抗体

图 1

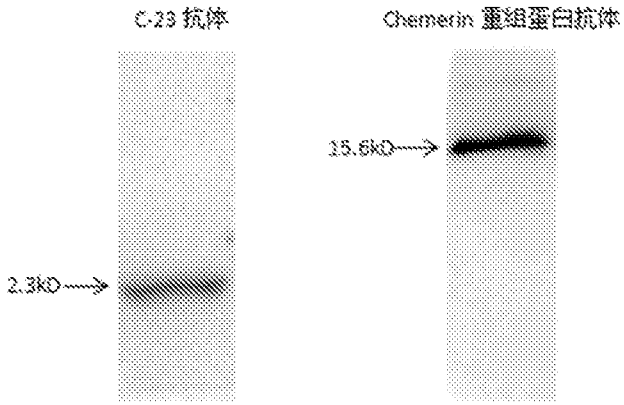

C-23 抗体
Chemerin 重组蛋白抗体
15.6kD
2.3kD

图 2

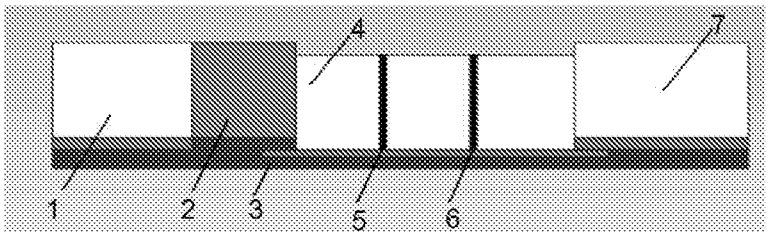

1
2
3
4
5
6
7

图 3

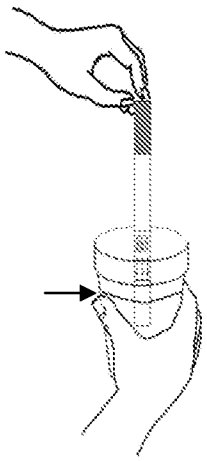


图 4

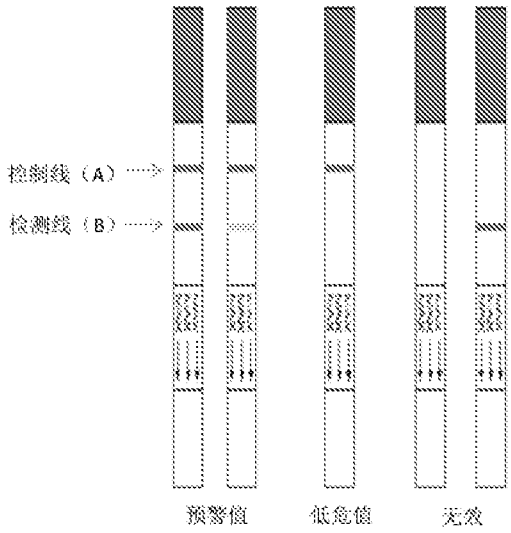

控制线（A）
检测线（B）
预警值
低危值
无效

图 5

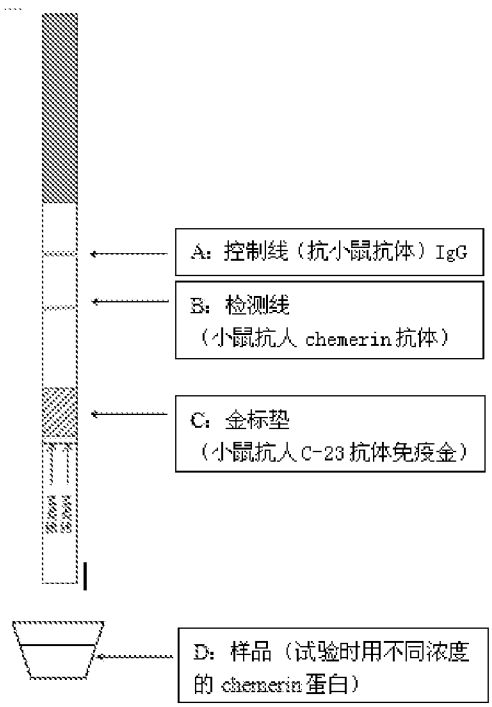

A：控制线（抗小鼠抗体）IgG
B：检测线
（小鼠抗人 chemerin 抗体）
C：金标垫
（小鼠抗人 C-23 抗体免疫金）
D：样品（试验时用不同浓度的 chemerin 蛋白）

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/116588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68 (2006.01) i; G01N 33/558 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N; C12Q; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNABS; VEN; CNKI; WANFANG; ISI; GOOGLE; BAIDU; Patentics; DUXIU; BSRS; NCBI; EBI; STN, and Key Word: 趋化素, 视黄酸受体反应蛋白 2, 他扎罗汀诱导基因 2, 趋化因子样受体 1, 配体, chemerin, retinoic acid receptor responder protein 2, RARRES2, tazarotene induced gene 2 protein, TIG2, chemokine like receptor 1, CMKLR1, ChemR23, ligand, 脂肪因子, 脂肪细胞因子, adipokine, adipocytokine, 试纸, 试剂盒, 试剂条, 试剂纸, 试条, kit, test+, paper, reagent, agent, strip, 抗体, 第一, 第二, 二抗, 用量, antibody, first, second, amount, 加样, 上样, 检测, 控制, sample, load, test, detect, control, 膜, 粒径, 爬速, membrane, particle size, climbing speed, CN95, CN140, Vivid170, AE99

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 107449920 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 08 December 2017 (08.12.2017), claims 1-10	1-10
Y	CN 106872694 A (TIANJIN NEWSCEN COAST BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 20 June 2017 (20.06.2017), description, paragraphs [0011], [0016]-[0019] and [0025], and figure 4	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 April 2018	02 May 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer FENG, Xiaoliang Telephone No. (86-10) 53961927

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/116588

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102772782 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CAS) 14 November 2012 (14.11.2012), description, paragraphs [0005], [0011], [0022], [0023], [0035] and [0060]	1-10
Y	CN 101038289 A (CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES SHANGHAI INSTITUTE OF DOMESTIC ANIMAL PARASITOLOGY et al.) 19 September 2007 (19.09.2007), description, page 1, lines 18-21 and page 5, lines 10-14	4-10
A	CN 102816209 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 12 December 2012 (12.12.2012), entire document	1-10
A	CN 101017169 A (ABON BIOPHARM HANGZHOU CO., LTD.) 15 August 2007 (15.08.2007), entire document	1-10
A	WO 2008114037 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 25 September 2008 (25.09.2008), entire document	1-10
A	BOBBERT, T. et al. Chemerin and Prediction of Diabetes Mellitus Type 2. CLINICAL ENDOCRINOLOGY., 31 December 2015 (31.12.2015), pages 1-6	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/116588

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☐ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/116588

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 107449920 A	08 December 2017	None	
CN 106872694 A	20 June 2017	None	
CN 102772782 A	14 November 2012	WO 2012152063 A1	15 November 2012
		CN 102772782 B	22 April 2015
CN 101038289 A	19 September 2007	CN 101038289 B	02 May 2012
CN 102816209 A	12 December 2012	None	
CN 101017169 A	15 August 2007	CN 101017169 B	18 July 2012
WO 2008114037 A1	25 September 2008	AU 2008228012 A1	25 September 2008
		US 2015320826 A1	12 November 2015
		EP 2131852 A1	16 December 2009
		US 8906865 B2	09 December 2014
		GB 0705488 D0	02 May 2007
		JP 2010522228 A	01 July 2010
		US 2010150990 A1	17 June 2010
		DK 2465522 T3	17 November 2014
		EP 2465522 B1	13 August 2014
		CN 102838658 A	26 December 2012
		CA 2684382 A1	25 September 2008
		CN 101641114 A	03 February 2010
		WO 2008114037 A8	16 July 2009
		CN 102838658 B	05 October 2016
		CN 101641114 B	12 March 2014
		ES 2523511 T3	26 November 2014
		AU 2008228012 B2	30 January 2014
		EP 2131852 B1	01 November 2017
		JP 2014237663 A	18 December 2014
		EP 2465522 A1	20 June 2012
		JP 5934298 B2	15 June 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/116588

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		EP 2465522 B8	19 November 2014

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/116588

A. 主题的分类

G01N 33/68(2006.01)i；G01N 33/558(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N；C12Q；C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

数据库：CNABS；VEN；CNKI；万方；ISI；GOOGLE；BAIDU；Patentics；读秀；生物序列检索系统；NCBI；EBI；STN，和关键词：趋化素，视黄酸受体反应蛋白2，他扎罗汀诱导基因2，趋化因子样受体1，配体，chemerin，retinoic acid receptor responder protein 2，RARRES2，tazarotene induced gene 2 protein，TIG2，chemokine like receptor 1，CMKLR1，ChemR23，ligand，脂肪因子，脂肪细胞因子，adipokine，adipocytokine，试纸，试剂盒，试剂条，试剂纸，试条，kit，test+，paper，reagent，agent，strip，抗体，第一，第二，二抗，用量，antibody，first，second，amount，加样，上样，检测，控制，sample，load，test，detect，control，膜，粒径，爬速，membrane，particle size，climbing speed，CN95，CN140，Vivid170，AE99

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 107449920 A (深圳先进技术研究院) 2017年 12月 8日 (2017-12-08) 权利要求1-10	1-10
Y	CN 106872694 A (天津中新科炬生物制药股份有限公司) 2017年 6月 20日 (2017-06-20) 说明书第11，16-19，25段，图4	1-10
Y	CN 102772782 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2012年 11月 14日 (2012-11-14) 说明书第5，11，22-23，35，60段	1-10
Y	CN 101038289 A (中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所等) 2007年 9月 19日 (2007-09-19) 说明书第1页第18-21行，第5页第10-14行	4-10
A	CN 102816209 A (深圳先进技术研究院) 2012年 12月 12日 (2012-12-12) 全文	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2018年 4月 19日	2018年 5月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 冯晓亮 电话号码 86-(10)-53961927

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/116588

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101017169 A (艾博生物医药杭州有限公司) 2007年 8月 15日 (2007-08-15) 全文	1-10
A	WO 2008114037 A1 (ISIS INNOVATION LIMITED) 2008年 9月 25日 (2008-09-25) 全文	1-10
A	BOBBERT, T.等. "Chemerin and prediction of Diabetes mellitus type 2." CLINICAL ENDOCRINOLOGY., 2015年 12月 31日 (2015-12-31), 第1-6页	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/116588

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/116588

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	107449920	A	2017年 12月 8日	无			
CN	106872694	A	2017年 6月 20日	无			
CN	102772782	A	2012年 11月 14日	WO	2012152063	A1	2012年 11月 15日
				CN	102772782	B	2015年 4月 22日
CN	101038289	A	2007年 9月 19日	CN	101038289	B	2012年 5月 2日
CN	102816209	A	2012年 12月 12日	无			
CN	101017169	A	2007年 8月 15日	CN	101017169	B	2012年 7月 18日
WO	2008114037	A1	2008年 9月 25日	AU	2008228012	A1	2008年 9月 25日
				US	2015320826	A1	2015年 11月 12日
				EP	2131852	A1	2009年 12月 16日
				US	8906865	B2	2014年 12月 9日
				GB	0705488	D0	2007年 5月 2日
				JP	2010522228	A	2010年 7月 1日
				US	2010150990	A1	2010年 6月 17日
				DK	2465522	T3	2014年 11月 17日
				EP	2465522	B1	2014年 8月 13日
				CN	102838658	A	2012年 12月 26日
				CA	2684382	A1	2008年 9月 25日
				CN	101641114	A	2010年 2月 3日
				WO	2008114037	A8	2009年 7月 16日
				CN	102838658	B	2016年 10月 5日
				CN	101641114	B	2014年 3月 12日
				ES	2523511	T3	2014年 11月 26日
				AU	2008228012	B2	2014年 1月 30日
				EP	2131852	B1	2017年 11月 1日
				JP	2014237663	A	2014年 12月 18日
				EP	2465522	A1	2012年 6月 20日
				JP	5934298	B2	2016年 6月 15日
				EP	2465522	B8	2014年 11月 19日