



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110747171 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201910877381.4

(22)申请日 2019.09.17

(83)生物保藏信息

CCTCC C2019186 2019.08.13

CCTCC C2019185 2019.08.13

(71)申请人 华南理工大学

地址 510000 广东省广州市天河区五山路

申请人 广州天宝颂原生物科技开发有限公司

(72)发明人 王小明 卢艳华 周志伟 张雷  
夏坤(74)专利代理机构 佛山帮专知识产权代理事务  
所(普通合伙) 44387

代理人 曾凤云

(51)Int.Cl.

C12N 5/20(2006.01)

C07K 16/26(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

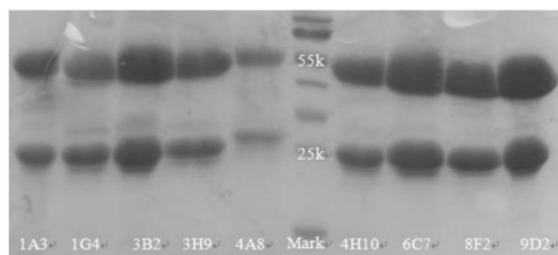
权利要求书1页 说明书14页 附图3页

## (54)发明名称

可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株与抗降钙素原单克隆抗体及其用途

## (57)摘要

本发明涉及单克隆抗体技术领域,具体涉及可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株,其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体,以及该抗降钙素原单克隆抗体在制备用于检测样品中降钙素原的试剂盒中的用途。使用本发明筛选配对的3H9标记/4H10包被抗体制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒产品,其样本加样量可低至10微升,反应时间只需10min;分析性能指标中的空白限为0.01ng/mL,检出限为0.03ng/mL,可见完全满足临床需求。因此,本发明所述的杂交瘤细胞株及其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体具有广阔的应用前景与不菲的市场价值。



1. 可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株,其特征为,分别为:

鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019185;

鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019186。

2. 抗降钙素原单克隆抗体,其特征为,所述抗降钙素原单克隆抗体由根据权利要求1所述的一对杂交瘤细胞株分泌产生。

3. 根据权利要求2所述的抗降钙素原单克隆抗体在制备用于检测样品中降钙素原的试剂盒中的用途。

4. 根据权利要求3所述的用途,其特征为,所述样品为血清或血浆或全血。

5. 一种微量血荧光免疫层析试剂盒,其特征为,包含:

作为标记抗体的抗降钙素原单克隆抗体3H9和作为包被抗体的抗降钙素原单克隆抗体4H10;

其中,所述抗降钙素原单克隆抗体3H9由鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9分泌,所述鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9保藏于中国典型培养物保藏中心且其保藏编号为CCTCC NO:C2019185;

其中,所述抗降钙素原单克隆抗体4H10由鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10分泌,所述鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10保藏于中国典型培养物保藏中心且其保藏编号为CCTCC NO:C2019186。

6. 根据权利要求5所述的微量血荧光免疫层析试剂盒的制备方法,其特征为,包括:

使用二甲基甲酰胺和生物素对所述标记抗体进行共价结合,并用标记稀释液调整浓度至1.5mg/mL,然后喷于硝酸纤维素膜以制备成结合垫,该结合垫上同时喷有链霉亲和素荧光蛋白;

用包被稀释液调整所述包被抗体的浓度至0.4mg/mL,然后划于该硝酸纤维素膜;

烘干处理后,与其它辅助材料按照样品垫、结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜、吸水纸的顺序进行组装,上述每种材料相互搭接贴于PS底板,以制备成PCT微量血荧光免疫层析试剂大板;然后,将所述PCT微量血荧光免疫层析试剂大板切成试纸条,再将切好的试纸条装入卡壳中,压壳成形,即制得所述微量血荧光免疫层析试剂盒。

## 可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株与抗降钙素原单克隆抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体技术领域,具体涉及可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株,其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体,以及该抗降钙素原单克隆抗体在制备用于检测样品中降钙素原的试剂盒中的用途。

### 背景技术

[0002] 降钙素原(Procalcitonin,下文缩写为PCT)是由116个氨基酸组成的蛋白质,分子量大约为12.7kD。健康人血PCT含量低于0.05ng/mL,老年人、慢性疾病的患者、以及不足10%的健康人血PCT含量高于0.05ng/mL,但不高于0.1ng/mL。当发生感染性疾病时,PCT会明显升高至0.25ng/mL以上,最早2h就可以检测到,在6到12h内可以达到峰值,PCT含量几乎不受激素治疗和肾功能状态的影响。

[0003] 基于上述特性,如今,PCT指标已在临床中得到了广泛应用,主要包括:(1)用于区分细菌感染和病毒感染,使初始的经验性抗感染治疗具有一定的针对性;(2)用于细菌感染的诊断、分层、治疗监测和预后评估,改善预后效果,降低脓毒症死亡率;(3)指导规范抗生素的使用,并用于监测抗生素治疗效果,减少抗生素滥用;(4)用于评估外科术后和创伤及器官移植等发生并发症的风险概率。

[0004] 由于PCT指标在早期临床诊断细菌感染具有高的特异性和敏感性,市场已发展出很多PCT检测方法,主要包括酶联免疫吸附法、化学发光法、胶体金试纸条法,荧光免疫层析法。然而随着PCT的作用不断被发掘以及在各医疗机构、各个科室的应用普及,目前PCT检测技术并不足以满足临床需求,存在的主要问题如下:

[0005] 酶联免疫吸附法检测所需时间较长,不能实现快速检测,并且操作人员技术水平要求高,因此不适用于门诊及科室对病人即时检测;化学发光仪器体积庞大,价格昂贵,同时对操作人员专业水平要求高,不适合在基层医院普及;胶体金免疫层析试纸条法只能实现定性或半定量检测,且检测低浓度不够准确,所以无法监测PCT变化;荧光免疫层析法操作简便,通常可在10分钟左右出检测报告,然而现实中的样本量均需25微升以上,可见其要求较高,因此在临床使用中存在诸多不便,特别是婴幼儿取样过程的影响,会导致准确度不足,灵敏度欠佳。

[0006] 与此不同,理想的POCT(即时检验)类的PCT微量血荧光免疫层析试剂操作简单,小型便携,可在各级医疗机构应用,并且只需要采集低至10微升的血样就可立即检测,无需样本周转时间,现场即可快速出具结果,为患者进行合理分流,从而提升治疗效果和诊断效率。

[0007] 然而,现有的商品化的抗PCT单克隆抗体制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂分析性能并不理想,特别是,抗体的亲和力不足导致试剂空白限和检出限无法满足临床实际需求,这阻碍了微量血荧光免疫层析产品的开发和应用。

[0008] 目前,商品化的抗PCT单克隆抗体细胞株及其分泌抗体主要是通过ELISA方法筛

选和亲和力测定,而ELISA法筛选和亲和力测定存在两个弊端:①筛选效率低,反应步骤多;②ELISA法中抗原抗体结合位点与免疫层析中抗原抗体结合位点不完全一致,ELISA法筛选检测得到的单克隆抗体用于免疫层析方法时效效果不理想,主要体现为试剂空白限和检出限不足。

[0009] 因此,为了PCT临床检测应用,临床上亟需寻找到一种高亲和力的单克隆抗体,特别是能适用于微量血荧光免疫层析法的抗PCT单克隆抗体。

## 发明内容

[0010] 本发明旨在提供一种抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株、该细胞株分泌的单克隆抗体、以及含有上述单克隆抗体的试剂盒,并且将该试剂盒成功应用于降钙素原的检测。此外,通过系统性评价证实,本发明所提供的抗PCT抗体在各方面均有优异的表现,尤其是具备高亲和力,从而适合作为PCT免疫检测试剂的核心原料。

[0011] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0012] 本发明第一方面提供了可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株,分别为:

[0013] 鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019185;

[0014] 鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10,保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC NO:C2019186。

[0015] 同时,本发明第二方面提供了上述一对杂交瘤细胞株分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体。

[0016] 并且,本发明第三方面提供了第二方面所述的抗降钙素原单克隆抗体在制备用于检测样品中降钙素原的试剂盒中的用途。

[0017] 优选地,在上述用途中,所述样品为血清或血浆或全血。

[0018] 此外,本发明第四方面还提供了一种微量血荧光免疫层析试剂盒,其包含:

[0019] 作为标记抗体的抗降钙素原单克隆抗体3H9和作为包被抗体的抗降钙素原单克隆抗体4H10;

[0020] 其中,所述抗降钙素原单克隆抗体3H9由鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9分泌,所述鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株3H9保藏于中国典型培养物保藏中心且其保藏编号为CCTCC NO:C2019185;

[0021] 其中,所述抗降钙素原单克隆抗体4H10由鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10分泌,所述鼠抗人降钙素原杂交瘤细胞株4H10保藏于中国典型培养物保藏中心且其保藏编号为CCTCC NO:C2019186。

[0022] 本发明第五方面提供了所述微量血荧光免疫层析试剂盒的制备方法,包括:

[0023] 使用二甲基甲酰胺和生物素对所述标记抗体进行共价结合,并用标记稀释液调整浓度至1.5mg/mL,然后喷于硝酸纤维素膜以制备成结合垫,该结合垫上同时喷有链霉亲和素荧光蛋白;

[0024] 用包被稀释液调整所述包被抗体的浓度至0.4mg/mL,然后划于该硝酸纤维素膜;

[0025] 烘干处理后,与其它辅助材料按照样品垫、结合垫、滤血膜、硝酸纤维素膜、吸水

纸的顺序进行组装,上述每种材料相互搭接贴于PS底板,以制备成PCT 微量血荧光免疫层析试剂大板;然后,将所述PCT微量血荧光免疫层析试剂大板切成试纸条,再将切好的试纸条装入卡壳中,压壳成形,即制得所述微量血荧光免疫层析试剂盒。

[0026] 本发明所提供的技术方案利用降钙素原免疫肽(66-79aa)和重组PCT蛋白混合免疫小鼠,融合后通过荧光免疫层析法筛选阳性克隆,再将得到的阳性克隆经过有限稀释法克隆至少5次,直到得到单克隆,从得到的单克隆中筛选亲和力高的细胞株;进一步使用荧光免疫层析法进行配对,最终得到两株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株,这一对杂交瘤细胞株被分别记作3H9、4H10。然后,将筛选配对的两株杂交瘤细胞株分泌的抗体应用于PCT微量血荧光免疫层析试剂盒,并对该试剂盒的性能进行系统性评估,主要评估了空白限、检出限、准确度、不同样本类型检测准确度、线性范围、稳定性指标,从而确认本发明所制得的抗降钙素原单克隆抗体在用于降钙素原微量血荧光免疫层析试剂时能够达到行业标准并满足临床需求。

[0027] 总之,本发明所提供的技术方案与现有技术相比至少具备以下有益效果:

[0028] ①所述抗降钙素原单克隆抗体纯度大于90%,满足试剂盒产品开发原材料要求;

[0029] ②本发明成功提供了一种抗体制备筛选方法,包括初筛获得了9种抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株,其中,四种单克隆抗体(3B2、3H9、4H10、9D2)的亲和力优于现有的商品化抗体Hytest Ltd 16B5( $3.37 \times 10^8$ )、Hytest Ltd 42( $1.09 \times 10^7$ )、MedixMAB 4005( $1.93 \times 10^8$ )、MedixMAB 4008( $0.81 \times 10^6$ )、菲鹏生物PCT-Ab7#( $1.63 \times 10^7$ )、菲鹏生物PCT-Ab4#( $3.15 \times 10^7$ );因此,本发明筛选得到的单克隆抗体比商品化抗体更适用于荧光免疫层析产品;

[0030] ③实验检测50ng/mL类似物和血清常见干扰物为阴性,说明本发明提供的配对抗体与类似物和干扰物无非特异性反应;

[0031] ④使用本发明筛选配对的3H9标记/4H10包被抗体制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒产品,其样本加样量可低至10微升,反应时间只需10min;分析性能指标中的空白限为0.01ng/mL,检出限为0.03ng/mL,可见完全满足临床需求。

[0032] 因此,本发明所述的杂交瘤细胞株及其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体具有广阔的应用前景与不菲的市场价值。

## 附图说明

[0033] 图1为抗降钙素原抗体的纯度检测SDS-PAGE电泳图,其显示了纯化后的9种细胞株单克隆抗体的纯度;

[0034] 图2为抗降钙素原单克隆抗体对类似物和干扰物的交叉反应性检测结果图;

[0035] 图3为不同试剂盒产品方法学比对结果相关性图;

[0036] 图4为不同样本类型检测结果相关性图;

[0037] 图5为线性范围检测结果回归分析图。

## 具体实施方式

[0038] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,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,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动的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。

[0039] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0040] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,但不作为本发明的限定。

[0041] 实施例1抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备

[0042] (1) 制备PCT免疫原

[0043] PCT多肽偶联物与重组PCT按1:1质量比混合后作为免疫原免疫小鼠。根据PCT蛋白的亲疏水性以及可能的表位位点,选择免疫性较强的PCT蛋白 96-115位氨基酸(DMSSDLERDHRPHVSM PQNA)肽偶联血蓝蛋白。重组降钙素原蛋白使用修饰后的基因序列进行合成,将基因序列连接至原核表达载体 pet32a中,经过IPTG诱导表达,收集破碎后的菌体上清,上清经过Ni亲和层析柱纯化,用BCA法以及SDS-PAGE测定浓度以及回收蛋白纯度,回收蛋白纯度大于90%;然后,用PBS缓冲液透析并调整蛋白浓度至2mg/mL。

[0044] (2) 免疫小鼠

[0045] 首次免疫时取50 $\mu$ g免疫原、300 $\mu$ l生理盐水和400 $\mu$ l弗氏完全佐剂进行乳化,将乳化后的免疫原在小鼠身上进行皮下多点注射。间隔3周后进行第二次免疫,免疫原剂量和方法同首次免疫,差别在于乳化时加入不完全弗氏佐剂,再间隔3周后进行第三次免疫,免疫剂量和方法完全同第二次免疫。第三次免疫间隔10天后尾部采血检测效价,效价大于1:106时立即安排加强免疫,加强免疫注射位置为小鼠腹腔,其它与第二次免疫一致;加强免疫3天后取脾脏进行融合。

[0046] (3) 细胞融合与培养

[0047] 细胞融合前准备好骨髓瘤细胞、饲养细胞及免疫小鼠脾细胞。骨髓瘤细胞经过复苏使其处于对数生长期,复苏5天后除去培养瓶中液体,加入一些培养基将贴壁细胞吹下吸入离心管,离心后,用培养基稀释10倍并计数;饲养细胞有益于杂交瘤细胞的生长,取1ml基础液至饲养小鼠腹腔,混匀吸取混合液备用;按程序在无菌环境中取出免疫小鼠脾脏,并将脾脏研磨成细胞,将脾脏细胞离心后用培养基稀释10倍进行计数。

[0048] 将准备好的骨髓瘤细胞和免疫脾脏细胞以1:10比例混合,离心去除上清,将混合细胞放置于37 $^{\circ}$ C水浴中并在1分钟内滴加PEG1500,静置1分钟后加入基础培养液终止融合。最后加入5mL HAT培养基,轻轻吹吸沉淀细胞,使其悬浮并混匀,然后补加HAT培养基至35mL,以0.1mL每孔的量将细胞混合液加入96孔细胞培养板,再放置于培养箱内培养。3天后用HAT培养基换出1/2培养基;7-10天后用HT培养基换出HAT培养基。经常观察杂交瘤细胞生长情况,待细胞覆盖面积1/10以上时吸出上清,检测是否存在抗体。

[0049] (4) 筛选抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株

[0050] 使用荧光免疫层析法对融合细胞上清液进行筛选。首先,制备荧光免疫层析检测卡,用包被稀释液将PCT抗原调整至10-50ng/mL浓度,以1 $\mu$ L/cm划线浓度将抗原划于PVC底板的NC膜(即硝酸纤维素膜)上。用标记稀释液将羊抗鼠-荧光蛋白调整至1mg/mL浓度,以3.9 $\mu$ L/cm喷膜浓度将羊抗鼠-荧光蛋白喷于样品垫上。将NC膜放置于50 $^{\circ}$ C条件下干燥5小时,将样品垫放置于湿度为(30 $\pm$ 5)%的环境中干燥15-16小时。材料处理完毕后按样品垫、NC膜、吸水纸的顺序搭接材料组成PVC大板,按4mm的宽度将大板切割成试纸条,并装

入卡壳制成检测卡。其次,检测细胞上清液,在细胞培养板上,按从上到下 从左到右的顺序依次吸取100 $\mu$ L细胞上清液,每孔的细胞上清液加入一个对应的 检测卡中,在抗原抗体反应10分钟后,将检测卡放入荧光免疫分析仪中读取信 号,当检测信号值为阴性值的5倍以上时为阳性孔。最后,采用荧光免疫层析法 筛选出9个阳性克隆。

[0051] (5) 使用有限稀释法进行亚克隆

[0052] 筛选所得阳性孔进行亚克隆,细胞计数按1000(第一次亚克隆)、800(第 二次亚克隆)、600(第三、四、五次亚克隆)的计数法取细胞。将取好的细胞 加入6mLHT培养基中,混合均匀后,在96孔板A、B两排加入200 $\mu$ L/孔的培 养基;补5mLHT培养基在C、D两排再加入200 $\mu$ L/孔;补5mLHT培养基在E、F两排再加入200 $\mu$ L/孔,最后补液至4.8mL,将培养基加至G、H两排即完成 有限稀释法亚克隆。在培养箱中培养7-10天后出现肉眼可见的克隆,在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的孔,取上清用间接ELISA法作抗体检测, 重复上述过程,直至整板阳性单克隆孔出现;取亚克隆后的阳性孔细胞扩大培养, 并将细胞株冻存,最终得到9种抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 杂交瘤细胞株1A3、1G4、3B2、3H9、4A8、4H10、6C7、8F2和9D2。

[0053] 实施例2抗PCT单克隆抗体的制备

[0054] 单克隆抗体的制备方法主要包括:将杂交瘤细胞株接种于小鼠腹腔中诱导产 生大量腹水,同时分泌大量抗体于腹水中。选择适龄BALB/c小鼠,注射0.5mL 灭菌石蜡油至腹腔,一周后注射 $5 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^6$ 杂交瘤细胞至腹腔;7d~14d后 小鼠腹部明显增大,采集腹水,将腹水进行离心去除脂质、细胞沉淀以及其它残 渣、小颗粒物质得到腹水上清,加入1 $\mu$ L P300防腐剂于2mL腹水上清后,保 存于2-8 $^{\circ}$ C条件下待检效价。

[0055] 腹水上清中的抗体纯度和浓度较低,所以无法直接用于免疫层析产品,同时 由于腹水中的酶活性,会影响抗体稳定性,所以需要提纯抗PCT单克隆抗体以 供后面性能鉴定及应用。在此实施例中,采用硫酸铵沉淀法提纯,首先将腹水用 0.05M的醋酸钠缓冲液稀释2倍,在5分钟内滴加腹水1/10体积量的正辛酸, 搅拌30分钟后离心并过滤,接着,取滤液加入腹水1/10体积量的10 $\times$ PBS,用 0.1M氢氧化钠调PH至7.5,最后加入饱和硫酸铵溶液至45%,静置过夜后离 心取沉淀,在沉淀中加入1mL的PBS复溶,并用PBS透析24h,得到纯化后的 抗体。各抗体纯度请参见图1,可见所述抗PCT单克隆抗体纯度大于90%, 适用于免疫诊断试剂开发和临床使用。

[0056] 实施例3抗PCT单克隆抗体杂交瘤细胞株及抗体评估配对

[0057] 为了保证生产的不同批抗PCT单克隆抗体质量一致且稳定,需要对杂交瘤 细胞株进行稳定性鉴定。将筛选后的9种抗PCT杂交瘤细胞株连续32代培养, 并置于液氮冷冻保存一年后,取出对细胞染色体进行检测,结果显示9种细胞株 包含染色体数目均在92-98条之间,该数据接近于小鼠脾脏细胞以及骨髓瘤细胞 中染色体的包含数量,因此表明所述杂交瘤细胞株保有分泌单克隆抗体的能力, 同时具有无限增殖能力。

[0058] 由于抗体最终需要应用于微量血荧光免疫层析法,所以除了用传统的间接 ELISA测定抗体亲和常数,还使用微量血荧光免疫层析法测定抗体亲和常数;通 过亲和常数选择亲和力高的抗体进行筛选配对。其中,ELISA测定亲和常数方法 同传统方法,荧光免疫层析法检测抗体的亲和常数主要包括:使用倍比稀释的抗 原划于NC膜,然后用12个梯度的抗体进行检测,绘制抗体与荧光值的曲线, 计算荧光50%的抗体浓度;将不同包被抗原浓度下

的荧光50%抗体浓度代入公式计算 $K_a$ 。抗体亲和常数测定结果见下表1:

[0059] 表1抗体亲和常数

细胞株名称	ELISA 检测亲和常数	荧光免疫层析检测亲和常数	商品化抗体	ELISA 检测亲和常数	荧光免疫层析检测亲和常数
1A3	$1.27 \times 10^6$	$1.36 \times 10^7$	16B5	$2.13 \times 10^9$	$3.37 \times 10^8$
1G4	$2.69 \times 10^8$	$2.4 \times 10^7$	42	$2.88 \times 10^9$	$1.09 \times 10^7$
3B2	$5.65 \times 10^7$	$5.34 \times 10^9$	4005	$2.12 \times 10^9$	$1.93 \times 10^8$
3H9	$2.73 \times 10^9$	$1.55 \times 10^9$	4008	$0.7 \times 10^9$	$0.81 \times 10^6$
4A8	$1.30 \times 10^7$	$1.79 \times 10^7$	PCT-Ab7#	$1.07 \times 10^9$	$1.63 \times 10^7$
4H10	$2.65 \times 10^6$	$1.76 \times 10^9$	PCT-Ab4#	$2.41 \times 10^9$	$3.15 \times 10^7$
6C7	$2.37 \times 10^9$	$2.09 \times 10^6$			
8F2	$3.90 \times 10^7$	$3.24 \times 10^7$			
9D2	$1.25 \times 10^8$	$5.71 \times 10^9$			

[0061] 从表1中可以看出,通过荧光免疫层析法检测亲和常数得知3B2、3H9、4H10、9D2的亲合力最强,但是,ELISA检测亲和常数并不一定最高;ELISA 检测结果中亲和常数高的,也并不一定适合荧光免疫检测。

[0062] 人血中PCT含量是非常少的,需要灵敏度达到0.25ng/mL的试剂才能准确检测临床样本中的PCT含量。使用微量血PCT荧光免疫层析试剂筛选配对抗体,并通过检测低浓度抗原,筛选出灵敏度高的配对抗体。

[0063] 将筛选得到的抗体亲和力较高的4株单克隆抗体进行两两配对,制备成PCT 微量血荧光免疫层析试剂检测10ng/mL、0.25ng/mL浓度样品,计算中浓度和低浓度的荧光信号比值作为灵敏度参数,并以商品化抗体对Hytest (16B5-42)、MedixMAB (4005-4008)、菲鹏生物 (Ab7#-Ab4#) 为对照,灵敏度检测结果 见表2,结果显示3H9标记/4H10包被抗体对具有最高的灵敏度。

[0064] 表2荧光免疫层析法筛选匹配抗体对检测中低浓度样品灵敏度

标记抗体 包被抗体	3B2	3H9	4H10	9D2	16B5	4005	Ab7#
3B2		8.59	5.79	4.75			
3H9	4.75		9.70	3.46			
4H10	3.11	12.42		5.15			
9D2	3.13	8.61	7.91				
42					6.61		
4008						6.39	
Ab4#							5.97

[0066] 此外,抗PCT单克隆抗体可能与类似物降钙素 (CT),样本干扰物胆红素、甘油三



酯、胆固醇进行非特异性反应而影响检测结果导致假阳性。为此,发明人以降钙素(CT)、胆红素、10×胆红素、100×胆红素、15mg/mL甘油三酯、30mg/mL甘油三酯、15mg/mL胆固醇、20mg/mL胆固醇进行交叉反应性检测,结果显示,所选择灵敏度较高的5组抗体对与类似物和干扰物无非特异性反应,具体结果参见图2。

[0067] 实施例4PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的制备和性能评估

[0068] 本发明所提供的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒(包含PCT微量血荧光免疫层析试剂,即荧光免疫层析试纸条),主要利用双抗夹心原理和免疫层析原理进行检测,当加入待测样品至检测孔,由于毛细管作用,样品向前移动至结合垫,样品中待测物与结合垫中的标记抗体形成(PCT—Mab—PCT\*Flu)复合物,在层析作用下复合物前进至检测区域,被NC膜上包被的抗体捕获形成复合物沉积在T区(Mab—PCT—PCT—Mab—PCT\*Flu);并且,在激发光源作用下,荧光物质发射特定波长的荧光信号,荧光免疫分析仪俘获荧光信号,通过信号转化及设定的定标曲线自动转化为定量数值,从而计算出样品中的浓度。

[0069] 该PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的核心关键原料是标记抗体和包被抗体,使用抗降钙素原单克隆抗体3H9作标记抗体,标记抗体通过二甲基甲酰胺和生物素进行共价结合,已标记抗体用标记稀释液调整至1.5mg/mL,然后喷于硝酸纤维素膜制备成结合垫,该结合垫上同时喷有链霉亲和素荧光蛋白;使用抗降钙素原单克隆抗体4H10作包被抗体,包被抗体用包被稀释液调整至0.4mg/mL,然后划于NC膜。上述材料经过烘干处理与其它辅助材料按照样品垫、结合垫、滤血膜、NC膜、吸水纸的顺序进行组装,每种材料相互搭接贴于PS底板,制备成PCT微量血荧光免疫层析试剂大板,用切条机将大板切成4mm宽度的试纸条,再将切好的试纸条按一定方向装入卡壳中,压壳成形,以完成PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的制作。

[0070] 根据中华人民共和国卫生行业标准《临床检验方法检出能力的确立和验证》WS/T 514-2017、《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》WS/T 492-2016及行业其它相关方法对该PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的空白限、检出限、准确度、精密度、线性范围、稳定性进行系统的性能评估。结果表明用本发明这两种单抗制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒空白限0.01ng/mL,检出限0.03ng/mL;并且,与化学发光代表产品罗氏PCT化学发光试剂、酶联免疫代表产品梅里埃PCT试剂比较检测结果一致性好,准确度无显著差异;与荧光免疫层析代表产品南京基蛋PCT试剂盒比较灵敏度更高,准确度更接近主流产品;三种不同类型样本检测结果具有一致性,表明无干扰;精密度结果显示三种不同浓度样本的变异系数分别是6.5%,7.4%,5.7%,可见均小于15%;线性范围结果显示,在试剂盒标示的检测范围内有良好的线性梯度,并且在500ng/mL才产生钩状效应;稳定性结果显示试剂可在常温下保存一年。由此可见,使用本发明所述的抗降钙素原单克隆抗体制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的分析性能满足行业标准和临床需求。具体实验结果如下:

[0071] (1) 空白限和检出限

[0072] 使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒,对PCT为0ng/mL浓度的5个阴性样本连续3天重复测量4次,测量方法为:使用配套取样器吸取10μl样本至稀释液中,混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数,总共60个测试结果。根据空白估计值,设定5个低值标本,并对5个低值标本连续3天重复测量4次,总共60个测试结果。阴性样本和

低值样本所有检测结果 见下表3:

[0073] 表3阴性样本和低值样本检测结果 (ng/mL)

天数	重复次数	空白 1	空白 2	空白 3	空白 4	空白 5
1	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
	2	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	4	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
2	1	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01
	2	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
	3	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00
	4	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
3	1	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	2	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	3	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01
	4	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01
天数	重复次数	低值 1	低值 2	低值 3	低值 4	低值 5
1	1	0.04	0.04	0.05	0.06	0.12
	2	0.02	0.04	0.08	0.08	0.11
	3	0.04	0.03	0.05	0.09	0.12
	4	0.02	0.05	0.07	0.06	0.10
2	1	0.02	0.05	0.07	0.09	0.11
	2	0.05	0.03	0.08	0.06	0.09
	3	0.04	0.04	0.06	0.09	0.09
	4	0.01	0.04	0.07	0.07	0.10
3	1	0.03	0.05	0.06	0.07	0.10
	2	0.04	0.03	0.05	0.09	0.09
	3	0.01	0.04	0.08	0.10	0.11
	4	0.04	0.03	0.06	0.10	0.10

[0075] 其中,空白限采用非参数统计方法,将检测结果按从低到高的顺序排列,计算 95%分位点数据作为空白限。空白限等于排列位置58所对应的检测结果,空白限 (LOB) = 0.01ng/mL。检出限采用参数统计方法:计算5个低值样本的 $SD_L$ , 检出限 (LOD) = LOB +  $1.653 \times SD_L = 0.01 + 1.653 \times 0.0121 = 0.03\text{ng/mL}$ 。

[0076] 空白限和检出限与罗氏化学发光PCT和梅里埃PCT试剂接近,说明本发明提供的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒产品灵敏度较高,特别是抗PCT单克隆抗体灵敏度高亲和力强,使用该抗体制备的免疫检测试剂满足临床检验需求。

[0077] 同时使用三对商品化抗体对按上述方法制备成微量血荧光免疫层析试剂盒并检测试剂的空白限和检出限,结果见表4、表5、表6,统计得出Hytest的空白限和检出限分别为0.05ng/mL、0.16ng/mL;MedixMAB的空白限和检出限分别为0.08ng/mL、0.25ng/mL;菲鹏生物空白限和检出限分别为0.06 ng/mL、0.18ng/mL;结果表明,现有的商品化抗体制备的微量血荧光免疫层析试剂的空白限和检出限无法满足临床需求。

[0078] 表4 Hytest抗体对试剂阴性样本和低值样本检测结果 (ng/mL)

[0079]

天数	重复次数	空白 1	空白 2	空白 3	空白 4	空白 5
1	1	0.04	0.01	0.05	0.00	0.00
	2	0.00	0.02	0.04	0.01	0.01
	3	0.01	0.03	0.01	0.01	0.04
	4	0.04	0.01	0.00	0.03	0.00
2	1	0.04	0.00	0.04	0.03	0.05
	2	0.01	0.02	0.03	0.01	0.05
	3	0.04	0.00	0.04	0.02	0.01
	4	0.04	0.05	0.01	0.01	0.01
3	1	0.02	0.01	0.03	0.02	0.03
	2	0.04	0.05	0.03	0.00	0.02
	3	0.04	0.02	0.02	0.04	0.02
	4	0.01	0.01	0.05	0.04	0.03
天数	重复次数	低值 1	低值 2	低值 3	低值 4	低值 5
1	1	0.19	0.21	0.14	0.20	0.11
	2	0.27	0.09	0.15	0.09	0.16
	3	0.08	0.27	0.25	0.13	0.24
	4	0.16	0.17	0.25	0.27	0.12
2	1	0.07	0.26	0.17	0.27	0.26
	2	0.14	0.10	0.11	0.18	0.14
	3	0.21	0.16	0.13	0.28	0.18
	4	0.16	0.06	0.25	0.26	0.22
3	1	0.14	0.10	0.27	0.15	0.12
	2	0.14	0.13	0.14	0.08	0.21
	3	0.16	0.26	0.11	0.27	0.06
	4	0.08	0.21	0.18	0.20	0.07

[0080]

表5 MedixMAB抗体对试剂阴性样本和低值样本检测结果 (ng/mL)

[0081]

天数	重复次数	空白 1	空白 2	空白 3	空白 4	空白 5
1	1	0.05	0.08	0.02	0.04	0.06
	2	0.03	0.08	0.03	0.08	0.02

[0082]		3	0.01	0.07	0.06	0.04	0.05
		4	0.05	0.04	0.01	0.04	0.01
	2	1	0.07	0.00	0.04	0.07	0.01
		2	0.01	0.04	0.07	0.06	0.04
		3	0.02	0.02	0.08	0.02	0.05
		4	0.07	0.03	0.03	0.00	0.06
	3	1	0.08	0.05	0.02	0.05	0.05
		2	0.01	0.00	0.07	0.05	0.08
		3	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01
		4	0.05	0.06	0.08	0.05	0.07
	天数	重复次数	低值 1	低值 2	低值 3	低值 4	低值 5
	1	1	0.01	0.07	0.18	0.13	0.38
		2	0.03	0.18	0.26	0.37	0.38
		3	0.11	0.08	0.16	0.29	0.35
		4	0.12	0.19	0.14	0.26	0.84
	2	1	0.09	0.02	0.16	0.37	0.70
		2	0.05	0.17	0.06	0.18	0.77
		3	0.15	0.16	0.20	0.09	0.64
		4	0.06	0.19	0.05	0.29	0.65
	3	1	0.09	0.18	0.09	0.18	0.76
		2	0.09	0.07	0.24	0.40	0.61
		3	0.08	0.17	0.16	0.15	0.35
		4	0.10	0.16	0.04	0.38	0.71
[0083]	表6菲鹏生物抗体对试剂阴性样本和低值样本检测结果 (ng/mL)						
[0084]	天数	重复次数	空白 1	空白 2	空白 3	空白 4	空白 5
	1	1	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01
		2	0.04	0.05	0.05	0.05	0.03
		3	0.06	0.02	0.01	0.04	0.04
		4	0.01	0.00	0.03	0.04	0.02
	2	1	0.01	0.04	0.06	0.03	0.05
		2	0.01	0.05	0.02	0.03	0.06
		3	0.00	0.01	0.02	0.04	0.04
		4	0.05	0.06	0.00	0.04	0.05
	3	1	0.00	0.02	0.05	0.05	0.06
		2	0.04	0.06	0.01	0.04	0.04
		3	0.02	0.05	0.02	0.05	0.01
		4	0.02	0.05	0.00	0.06	0.01
	天数	重复次数	低值 1	低值 2	低值 3	低值 4	低值 5
	1	1	0.13	0.08	0.06	0.24	0.36
		2	0.11	0.13	0.10	0.36	0.60
		3	0.14	0.20	0.06	0.39	0.44

[0085]	2	4	0.13	0.11	0.15	0.22	0.44
		1	0.08	0.10	0.16	0.24	0.35
		2	0.07	0.12	0.08	0.26	0.37
		3	0.04	0.13	0.11	0.33	0.45
		4	0.06	0.05	0.17	0.39	0.46
	3	1	0.15	0.04	0.16	0.35	0.54
		2	0.12	0.20	0.18	0.38	0.32
		3	0.14	0.16	0.06	0.21	0.29
		4	0.02	0.14	0.08	0.35	0.69

[0086] (2) 准确度

[0087] 使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒与主流试剂盒产品检测临床样本以进行方法学比对,共20份均匀分布于线性测量范围的临床样本,每个样本测量一次,测量方法为:使用配套取样器吸取10 $\mu$ l样本至稀释液中,混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数得出检测结果,对检测结果进行线性相关性分析,结果表明PCT微量血荧光免疫层析试剂与化学发光代表产品罗氏PCT化学发光试剂、酶联免疫代表产品梅里埃PCT试剂比较检测结果一致性好,准确度无显著差异;与荧光免疫层析代表产品南京基蛋PCT试剂盒比较有更高的灵敏度,准确度更接近主流产品。具体检测结果及分析见表7和图3。

[0088] 表7四种PCT试剂检测临床样本的结果

[0089]	样本编号	微量血 PCT	罗氏 PCT	梅里埃 PCT	基蛋 PCT
	1	57.46	51.88	60.25	22.43
	2	1.40	1.76	1.04	0.70
	3	88.71	80.96	90.43	34.28
	4	32.26	32.57	36.96	13.91
	5	0.54	0.50	0.47	0.14
	6	78.63	71.00	75.58	29.31
	7	68.55	75.20	71.88	29.42
	8	41.33	41.73	44.94	17.33
	9	10.08	9.10	9.49	3.72
	10	2.02	2.29	2.19	0.90
	11	18.15	15.68	19.38	7.01
	12	65.52	67.43	68.07	27.10
	13	57.46	60.25	60.81	24.21
	14	100.81	109.61	86.13	39.15
	15	19.15	17.11	19.53	7.33
	16	67.54	70.82	62.29	26.62
	17	12.10	11.74	13.27	5.00
	18	8.06	8.85	8.69	3.51
[0090]	19	6.75	7.74	6.69	2.89
	20	42.34	41.93	47.27	17.84

[0091] 注:其中的“微量血PCT”指本发明提供的PCT微量血荧光免疫层析试剂。

[0092] 并且,临床样本包括血清、血浆、全血类型,由于单克隆抗体可能对不同样本类型物质产生非特异性结果,可能导致不同样本类型结果不具有可比性。为此,使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂检测同20例病人血清、血浆、全血样本,测量方法为:使用配套取样器吸取10 $\mu$ l样本至稀释液中,混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数得出检测结果,对检测结果进行线性相关性分析,三种不同类型样本检测结果具有一致性,这表明抗PCT单克隆抗体与样本中的干扰物无非特异性结合。具体的检测结果及分析见表8和图4。

[0093] 表8不同样本类型检测结果

样本编号	全血	血清	血浆
1	14.11	16.03	15.54
2	56.45	53.03	53.67
3	77.7	79.19	75.95
4	5.04	5.48	5.37
5	9.07	9.95	9.34
6	149.4	155.63	153.36
7	5.65	5.81	5.87
8	38.31	41.28	41.28
9	26.21	24.68	23.42
[0094] 10	0.75	0.78	0.69
11	16.13	17.54	16.82
12	3.93	4.12	3.95
13	1.13	1.54	1.7
14	1.01	1.15	1.06
15	8.67	9.6	9.4
16	0.56	0.55	0.53
17	84.68	83.03	80.49
18	4.03	4.15	4.02
19	3.51	3.19	3.59
20	7.86	7.94	7.94

[0095] (3) 精密度

[0096] 使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒,检测浓度为 0.5ng/mL、5ng/mL、50ng/mL的企业内部参考品,每个浓度重复检测10次,测量方法为:使用配套取样器吸取10 $\mu$ l样本至稀释液中,混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数得出检测结果,计算检测结果的精密度、标准差和变异系数,具体的检测及统计结果见下表9:

[0097] 表9精密度测试和统计结果

	检测次数	样本 1	样本 2	样本 3
[0098]	1	0.50	5.04	53.34
	2	0.50	4.67	51.37
	3	0.55	5.18	51.01
	4	0.44	5.28	49.29
	5	0.45	5.43	52.03
	6	0.44	4.61	55.32
	7	0.48	5.04	47.92
	8	0.56	5.66	53.09
	9	0.55	5.39	51.42
	10	0.53	5.09	56.18
	平均值 (A)	0.50	5.14	52.10
	标准差(SD)	0.049	0.327	2.518
	变异系数(CV)	9.8%	6.4%	4.8%

[0099] 结果显示三种不同浓度样品的变异系数分别为9.8%,6.4%,4.8%,均小于15%,因此满足行业标准要求及临床检测对产品精密度要求,检测结果稳定性好。

[0100] (4) 线性范围

[0101] 使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒,检测由高值样本梯度稀释的9个线性范围内样本(100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0.25ng/mL、0ng/mL),每个样本测4次,重复测定,测量方法为:使用配套取样器吸取10μl样本至稀释液中,混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数得出检测结果,分别计算检测结果的均值,以理论浓度为自变量,检测均值为因变量进行相关性回归分析,结果显示在0-100ng/mL范围内,相关系数r大于0.99,满足行业标准和临床要求,在检测时人为配制一个高浓度样本(1000ng/mL)用于验证产品钩状效应,结果显示当检测浓度大于500ng/mL时呈现钩状效应。检测结果及回归分析见表10和图5。

[0102] 表10线性范围检测结果

	样本浓度	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	平均值
[0103]	1000	501.4	512.4	498.6	503.1	503.88
	100	106.11	109.62	103.01	108.42	106.79
	50	51.35	53.96	50.00	53.81	52.28
	25	27.20	26.58	25.18	27.28	26.56
	5	5.44	4.94	5.02	5.50	5.23
	2.5	2.69	2.68	2.51	2.48	2.59
[0104]	1	1.09	1.02	1.05	1.01	1.04
	0.5	0.55	0.54	0.50	0.54	0.53
	0.25	0.26	0.27	0.27	0.27	0.26
	0	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00

[0105] (5) 稳定性

[0106] 使用上述方法制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒,在常温条件下放置1年后进行成品检验,检测3例质控品,测量方法为:使用配套取样器吸取10μl样本至稀释液中,

混匀后加入检测试纸条,反应10分钟后上机读数得出检测结果,结果显示产品精密度、准确度均符合要求,成品质量未发生变化。具体的检测结果见下表11:

[0107] 表11常温保存一年后性能检测结果

	检测次数	样本 1	样本 2	样本 3
	1	0.50	4.99	46.17
	2	0.52	4.99	48.65
	3	0.47	5.11	45.14
	4	0.47	4.98	48.70
	5	0.47	5.38	45.09
	6	0.46	5.18	48.74
[0108]	7	0.48	5.31	44.86
	8	0.49	5.53	47.12
	9	0.51	5.18	45.32
	10	0.50	5.19	45.00
	理论浓度	0.50	5.00	50.00
	检测浓度均值	0.49	5.18	46.48
	准确度	-3%	4%	-7%
	精密度	4.2%	3.5%	3.6%

[0109] 总之,由上述对PCT微量血荧光免疫层析试剂盒的性能评估可知,通过荧光免疫层析筛选配对得到的3H9标记/4H10包被抗体对应用于微量血荧光免疫层析试剂时的分析性能中的空白限、检出限、准确度、不同样本类型检测准确度、线性范围、稳定性均达到临床应用标准,与大型仪器试剂产品分析性能相当,并且优于同类型POCT类产品性能。

[0110] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。



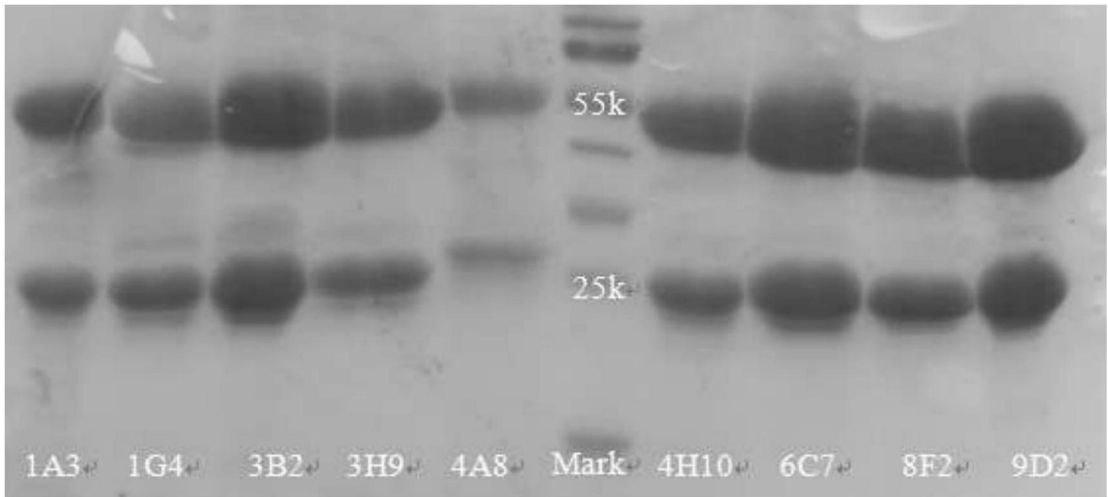


图1

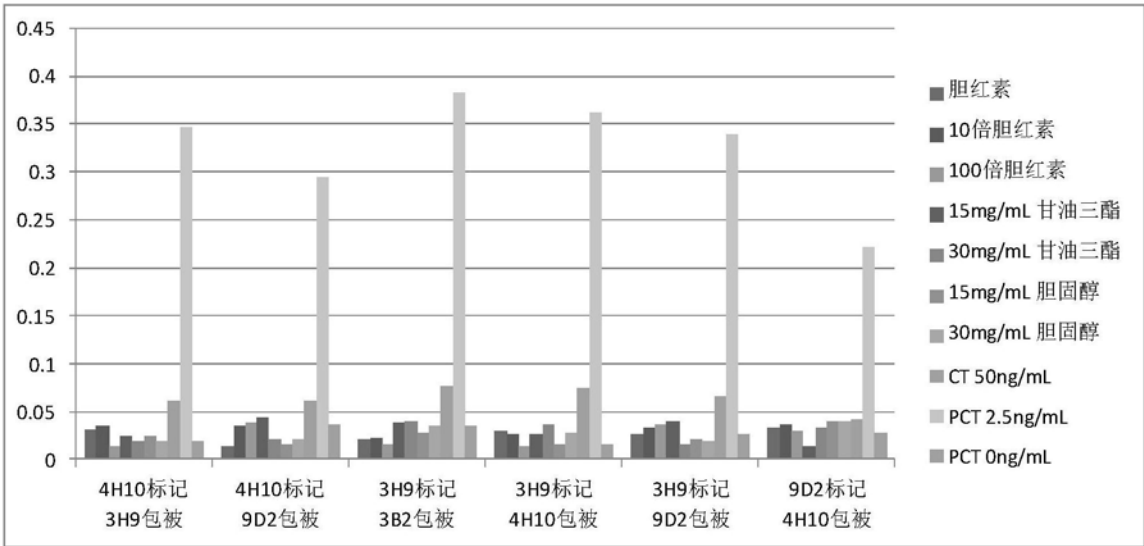


图2

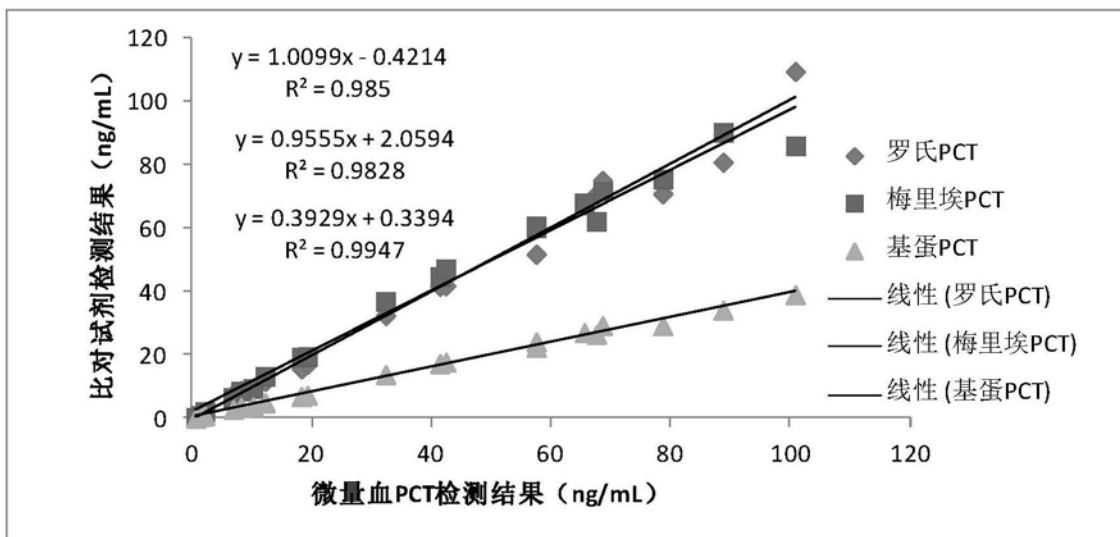


图3

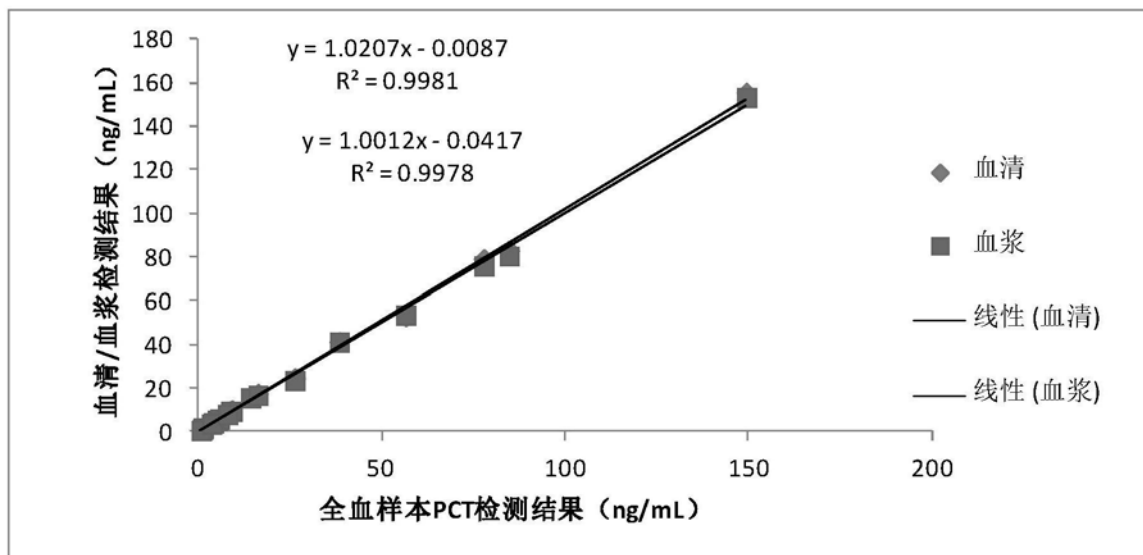


图4

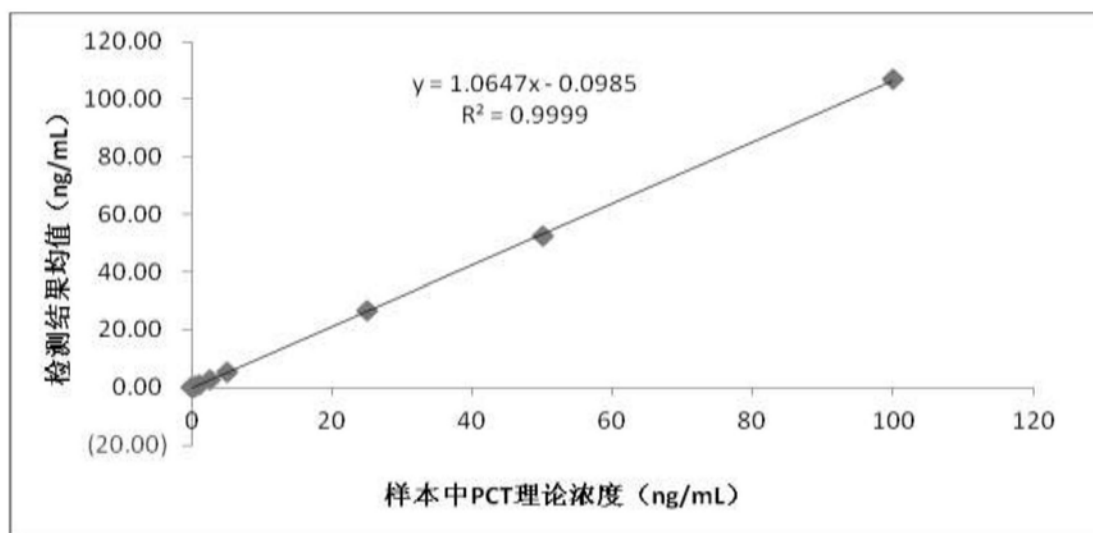


图5

专利名称(译)	可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株与抗降钙素原单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN110747171A</a>	公开(公告)日	2020-02-04
申请号	CN201910877381.4	申请日	2019-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	华南理工大学 广州天宝颂原生物科技开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	华南理工大学 广州天宝颂原生物科技开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华南理工大学 广州天宝颂原生物科技开发有限公司		
[标]发明人	王小明 卢艳华 周志伟 张雷 夏坤		
发明人	王小明 卢艳华 周志伟 张雷 夏坤		
IPC分类号	C12N5/20 C07K16/26 G01N33/74 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	C07K16/26 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/585		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及单克隆抗体技术领域，具体涉及可分泌抗降钙素原单克隆抗体的一对杂交瘤细胞株，其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体，以及该抗降钙素原单克隆抗体在制备用于检测样品中降钙素原的试剂盒中的用途。使用本发明筛选配对的3H9标记/4H10包被抗体制备的PCT微量血荧光免疫层析试剂盒产品，其样本加样量可低至10微升，反应时间只需10min；分析性能指标中的空白限为0.01ng/mL，检出限为0.03ng/mL，可见完全满足临床需求。因此，本发明所述的杂交瘤细胞株及其分泌产生的抗降钙素原单克隆抗体具有广阔的应用前景与不菲的市场价值。

