



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107957494 A

(43)申请公布日 2018.04.24

(21)申请号 201710899862.6

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2017.09.28

G01N 21/76(2006.01)

(66)本国优先权数据

201710730185.5 2017.08.23 CN

(71)申请人 武汉菲思特生物科技有限公司

地址 430205 湖北省武汉市东湖新技术开发区关南科技工业园 II-6号地块5栋102室

(72)发明人 陈立波 张豹

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司

公司 31253

代理人 熊娴 冯子玲

(51)Int. Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

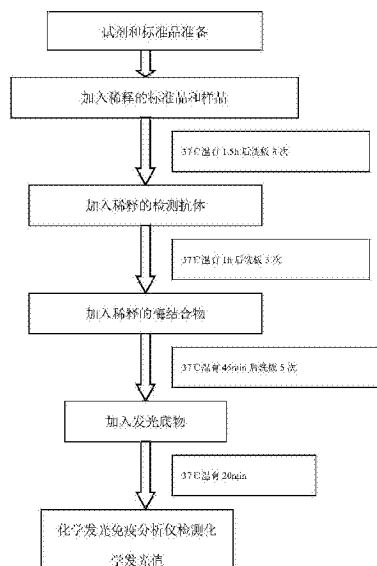
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用

(57)摘要

本发明公开了一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)化学发光检测试剂和检测试剂盒,所述检测试剂包括包被抗体、检测抗体和酶促发光试剂组,其中包被抗体和检测抗体为兔抗人PCSK9单克隆抗体,且分别连接待测蛋白样品成双抗体夹心结构;酶促发光试剂组包括酶和酶对应的发光液,酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或黄嘌呤氧化酶;酶与检测抗体结合后,催化发光液发光,检测发光强度以获得待测蛋白含量。本发明采用化学发光法反应简单快速,且抗体夹心法不会减少反应产生的光子量,反应灵敏度高,检测结果准确。该试剂盒采用的原料廉价易得且环境友好,具有高灵敏度、高准确度的特点,适用于各种样本中的PCSK9检测,具有广泛的推广价值。



1. 一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂,其特征在于,所述检测试剂包括包被抗体、检测抗体和酶促发光试剂组,其中:

包被抗体和检测抗体为兔抗人PCSK9单克隆抗体,且分别连接待测蛋白样品成双抗体夹心结构;

酶促发光试剂组包括酶和酶对应的发光液,酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或黄嘌呤氧化酶。

2. 根据权利要求1所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂,其特征在于:包被抗体为重链修饰的兔抗人PCSK9单克隆抗体,包被抗体修饰后的修饰段氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

3. 根据权利要求1所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂,其特征在于:酶促发光试剂组为辣根过氧化物酶(HRP)和HRP发光剂。

4. 根据权利要求1所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂,其特征在于:所述检测试剂还包括反应底物,反应底物为辣根过氧化物酶标记链霉亲和素,检测抗体为生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体。

5. 一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括如下试剂:包被抗体、反应板、检测抗体、反应底物和发光剂,其中:包被抗体预结合在反应板上,检测抗体与反应底物结合,反应底物与发光剂反应后发光,通过检测化学发光强度获得待测蛋白样品的检测结果。

6. 根据权利要求5所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒,其特征在于:包被抗体为重链修饰的兔抗人PCSK9单克隆抗体,包被抗体修饰后的修饰段氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

7. 根据权利要求5所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒,其特征在于:检测抗体为生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体。

8. 根据权利要求5所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒,其特征在于:反应底物为辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素。

9. 根据权利要求5~8任一所述的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒的使用方法,其特征在于,使用方法按如下步骤进行:

a) 上样:取已被包被的反应板,上样孔每孔分别加入50 μ L血清样品,每组样品做3个复孔,并设置空白孔和标准孔,空白孔加稀释液50 μ L,标准孔加标准品50 μ L,37 $^{\circ}$ C温育90min;

b) 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔若干次,每孔300 μ L,每次浸泡1-2min,弃去孔内液体使孔内无残留液体;

c) 加入检测抗体:每孔加入50 μ L稀释过的生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体,反应板上覆膜,37 $^{\circ}$ C温育1h;

d) 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔若干次,每孔300 μ L,每次浸泡1-2min,弃去孔内液体使孔内无残留液体;

e) 加入酶结合物:每孔加入50 μ L稀释的HRP标记的链霉亲和素,反应板上覆膜,37 $^{\circ}$ C温育30min;

f) 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔若干次,洗涤过程同步骤b。

g) 发光:将发光液各50 μ L混匀后加入反应板,反应板上覆膜,37 $^{\circ}$ C避光温育20min;

h) 检测:反应结束后立即用化学发光免疫分析仪测定各孔的化学发光值。

10. 一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂或试剂盒的应用,其特征在
于,采用如权利要求1~9任一项所述的检测试剂或试剂盒用于辅助判断血液中PCSK9的含
量。

一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用,属于领域,尤其是领域。

背景技术

[0002] 一、前蛋白转化酶枯草溶菌素 (PCSK9) 概述

[0003] 前蛋白转化酶枯草溶菌素 (PCSK9) 是分泌型枯草杆菌蛋白酶家族的蛋白酶K亚家族成员。PCSK9主要来源于人体的肝脏、肾脏和小肠。PCSK9前体蛋白主要在内质网中合成可溶性PCSK9酶原,并在内质网或高尔基体中经过自身催化裂解产生成熟的蛋白酶并分泌到血液中。目前研究表明只有肝脏分泌的PCSK9可分泌进入血液中,并与肝细胞表面的低密度脂蛋白受体 (LDLR) 结合,介导LDLR的降解,从而调节血清胆固醇水平。作为LDLR的负调节剂,过量的PCSK9在肝细胞表面结合LDLR并导致其降解,从而导致LDLR对低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 的结合和降解能力减弱,进而增加血清LDL-C水平,最终导致血液中胆固醇水平升高。因此,PCSK9抗体药成为治疗高胆固醇血症的最新方法。

[0004] 高胆固醇血症分为家族性和非家族性,均属于脂质代谢异常,是冠状动脉疾病发生的独立危险因素。他汀类药物是目前临床上应用最广泛的降脂药物,其机制为抑制肝脏胆固醇合成过程中的限速酶3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶 (HMG-CoA还原酶) 的活性从而达到降脂目的。但对于有些LDL水平过高或者对他汀类药物不耐受的患者,其脂质始终不能降低到正常水平。因此,还需要开发新型降脂药物单独或与他汀类药物协同使用治疗高胆固醇血症。抗PCSK9药物已成为治疗高胆固醇血症的一种新型治疗方法。目前,国外已研发中多种PCSK9单克隆抗体药物,其中安进Repatha和赛诺菲Praluent已经上市且临床疗效良好。

[0005] 由于PCSK9与高胆固醇血症有着对应的比例关系,因此检测人血清中PCSK9蛋白的水平,可以作为使用PCSK9抗体药物治疗高胆固醇血症和冠心病的用药指导和病情监测。

[0006] 二、PCSK9的检测现状

[0007] 现有的PCSK9的检测方法主要是依靠酶联免疫显色法,但是酶联免疫显色法显色反应步骤多,显色酶与检测抗体结合检测结果不稳定准确率低,连接底物富集放大检测显色会增加检测步骤。显色法需要加入终止液终止反应,终止前后反应体系颜色不同,依据颜色的改变进行检测,其中显色的时间长短和显色的条件对检测结果均有一定的影响,而这些问题是显色法中无法避免的问题。

[0008] 三、化学发光法检测法概述

[0009] 化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CLIA), 是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。是继放射性免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。

[0010] 由于化学发光检测手段的不断提高,使得采用化学发光法检测各类样本的灵敏度较现有技术均有较大幅度的提高,提高检测的灵敏度,意味着可以减少样本的提取量,并保证了检测精度和准确度。目前的化学发光法根据不同原理的发光标记分为酶促化学发光法和非酶促化学发光法两种。非酶促化学发光法通常采用吖啶酯作为标记物,该反应过程中不需要催化剂,激发成本低,背景发光低信噪比高,并且检测后光子产率不减少,检测稳定性高,检测结果准确,但由于在发光过程中标记物被消耗,发光剂含量不足,导致发光剂很快被消耗,检测重复性较差。

[0011] 酶促发光法有辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶两种,碱性磷酸酶在检测过程中,底物到达平台期的时间长,底物成本高,导致被检测者的负担很重。碱性磷酸酶由于检测成本高,对应的检测发展受限,辣根过氧化物酶(HRP)逐渐成为了酶促发光法的主要研究对象。

[0012] 现有的采用化学发光法进行检测的检测试剂盒种类较少,多数仅停留在实验室阶段,并未商业化,发明人率先打破这种技术僵局,基于对PCSK9蛋白的多年研究和临床检测经验,设计开发了一组采用酶促化学发光法的PCSK9化学发光检测试剂。

发明内容

[0013] 针对现有技术存在的上述问题,本发明的目的是以现有酶联免疫法的检测手段为基础,改进检测方法,获得一种检测效果好的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用。

[0014] 为实现上述发明目的之一,本发明采用的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂具体如下:

[0015] 检测试剂包括包被抗体、检测抗体和酶促发光试剂组,其中:

[0016] 包被抗体和检测抗体为兔抗人PCSK9单克隆抗体,且分别连接待测蛋白样品成双抗体夹心结构;

[0017] 酶促发光试剂组包括酶和酶对应的发光液,酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或黄嘌呤氧化酶。酶与检测抗体结合后,催化发光液发光,检测发光强度以获得待测蛋白含量。

[0018] 优选地,包被抗体为重链修饰的兔抗人PCSK9单克隆抗体,包被抗体修饰后的修饰段氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

[0019] 包被抗体与检测抗体均为兔抗人PCSK9单克隆抗体,本发明仅对包被抗体进行修饰,将PCSK9单抗重链恒定区CH3序列第79位的苏氨酸取代为丝氨酸,并以修饰段为基础制备完整的兔抗人PCSK9单克隆抗体作为包被抗体。克服了现有的检测试剂盒中检测结果不稳定、检测精度不高的问题。本发明修饰后的包被抗体与酶标版的结合更稳定,且与待测样品结合后不会在后续步骤中脱板造成样品损失,使得检测结果更准确也更稳定,一次检测即可得到真实检测数据,大大降低了现有检测中的检测时间和检测成本。包被抗体结合反应板上的反应孔,结合待测蛋白,待测蛋白结合检测抗体,形成了一个稳定的双抗体夹心结构,便于对待测蛋白进行检测且检测结果准确。

[0020] 优选地,包被抗体与反应区域结合形成固相抗体。蛋白之间反应需要一个较为稳定的环境,不仅可以保证反应稳定进行,而且可以保证反应结果便于检测,反应区域为蛋白

反应营造了这样的环境。

[0021] 优选地,本发明中的检测试剂一般反应环境为反应板,反应板上设有若干反应孔,包被抗体与反应板的反应孔结合后形成固相抗体结合蛋白样品,检测抗体也与蛋白样品结合,形成双抗体夹心。

[0022] 优选地,酶促发光试剂组分别为辣根过氧化物酶(HRP)和HRP发光剂,使用时等比例加入。

[0023] 酶促化学发光法的酶系种类较多,各有优缺点,本发明优选辣根过氧化物酶作为催化酶,辣根过氧化物酶具有分子量小,标记方法简单,性质稳定等优点,是良好的蛋白检测用酶,检测准确稳定,对化学发光体系有着重要影响。

[0024] 优选地,HRP发光剂为过氧化氢溶液和发光氨溶液。发光氨溶液也就是鲁米诺溶液,过氧化氢溶液经HRP催化,生成单氧和水,单氧可以氧化鲁米诺溶液产生蓝光,鲁米诺溶液发光持久且不需要终止反应,蓝光可见易检测。

[0025] 酶与抗体的联合方式有直接结合,也就是酶标记检测抗体;以及间接结合,也就是一种生物标记体标记检测抗体,另一种生物标记体被酶标记,通过两种生物标记体的联合,间接达到酶与检测抗体结合的目的。

[0026] 优选地,检测抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体,加入HRP发光剂,酶催化发光剂反应后发光。该方法为酶与标记抗体的直接结合。

[0027] 优选地,检测抗体与辣根过氧化物酶(HRP)结合,加入HRP发光剂,酶催化发光剂反应后发光。该方法为酶与标记抗体的间接结合。

[0028] 作为一种间接结合的优选方式,检测抗体为生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体,反应底物为辣根过氧化物酶标记链霉亲和素,生物素与链霉亲和素结合,使得酶与标记蛋白间接结合。

[0029] 更优选地,双抗体夹心可以通过加入与检测抗体结合的反应底物的方式对蛋白样品进行检测,检测可以是定量的也可以是定性的,定量检测需要辅助标准曲线,定性检测只需观察发光强度的强弱即可。

[0030] 检测试剂所采用的具体的发光检测方法和未提及部分步骤可以参照现有技术,在此不做赘述。

[0031] 本发明的第二个目的在于提供一种采用上述任一种检测试剂的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂的试剂盒,所述试剂盒包括如下试剂:包被抗体、反应板、检测抗体、反应底物和发光剂,其中:包被抗体预结合在反应板上,检测抗体与反应底物结合,反应底物与发光剂反应后发光,通过检测发光强度获得待测蛋白样品的检测结果。

[0032] 优选地,所述包被抗体为重链修饰的包被抗体,包被抗体经修饰后的修饰段氨基酸序列如序列表SEQ ID NO:1所示。

[0033] 优选地,本发明中的化学发光检测试剂盒还包括反应底物和发光剂,形成双抗体夹心后的检测抗体经过与反应底物反应,发光,以获得待测蛋白样品的发光值。反应底物的选择多样,只要与检测蛋白结合后可以被检测即可。

[0034] 优选地,检测抗体为生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体,反应底物为辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,生物素与链霉亲和素结合,生物素与链霉亲和素具有良好的结合能力,链霉亲和素被辣根过氧化物酶标记后,起到酶连放大的富集作用,使得检测结果更加

准确。

[0035] 优选地,发光剂为过氧化氢溶液和发光氨溶液。

[0036] 优选地,试剂盒还包括已经制备好的蛋白浓度标准曲线,蛋白浓度标准曲线以蛋白标准品的蛋白浓度为纵坐标,发光值为横坐标。

[0037] 更优选地,本发明中的蛋白标准曲线公式为: $y=0.0488x$,公式的 R^2 值可以达到0.9998,说明公式的线性良好,可以作为参考使用。

[0038] 更优选地,为了去除实验中的设备和人为误差,也可以在检测时制备标准曲线,此时,试剂盒中还包括蛋白标准品,蛋白标准品稀释为浓度梯度进行检测,检测可以单独进行,也可以与待测蛋白样品的检测一同进行。

[0039] 待测蛋白样品浓度根据测得的相对光度值代入蛋白浓度标准曲线计算即可获得。

[0040] 为了试剂盒的检测准确性,每次检测之前建议都进行标准曲线的制备,以保证检测结果的准确性和可靠性。标准曲线的制备条件与样品检测条件一致。这样可以保证待测蛋白样品的浓度数据可以直接根据标准曲线计算获得,减少人为误差。

[0041] 包被抗体由抗体稀释液稀释至反应浓度。所述稀释液为pH 9.6的碳酸盐缓冲液(CBS),其中CBS缓冲液是每升含有1.59g Na_2CO_3 和2.93g NaHCO_3 的双蒸水溶液。修饰后的包被抗体由于亲和力好,所以无需采用过量的一抗包被反应板,适量即可,本发明中采用的兔抗人PCSK9单克隆抗体包被反应孔的反应浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0042] 检测抗体由封闭液稀释至反应浓度,所述封闭液为含有1%BSA的PBST溶液。

[0043] 优选地,检测抗体为生物素标记的兔抗人PCSK9单克隆抗体,检测抗体结合待测蛋白样品时的反应浓度为 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0044] 反应底物为辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素,检测时使用封闭液稀释到终浓度为 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0045] 优选地,发光剂包括发光A液和发光B液,发光A液含有过氧化物和增强剂;发光B液含有鲁米诺和发光增强剂。

[0046] 本发明的第三个目的是提供一种采用上述PCSK9化学发光检测试剂盒的使用方法,所述方法按如下步骤进行:

[0047] 1. 样品处理:采集患者血液5mL置于室温放置2h后于1000g离心20min,取上清,待检血清做1:120倍稀释使用。

[0048] 2. 上样:上样孔每孔分别加入50 μL 稀释过的血清样品,每组样品做3个复孔,并设置空白孔和标准孔,空白孔加稀释液50 μL ,标准孔加标准品50 μL ,注意不要有气泡,加样时将样品加于反应板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;37 $^{\circ}\text{C}$ 温育90min。

[0049] 3. 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔3次,每次浸泡1-2min,大约300 μL /每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0050] 4. 加入检测抗体(二抗):弃去孔内液体,甩干,每孔加入50 μL 稀释过的生物素标记的二抗,反应板上覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1h。

[0051] 5. 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔3次,每次浸泡1-2min,大约300 μL /每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0052] 6. 加入酶结合物:每孔加入50 μL 稀释的HRP标记的链霉亲和素,反应板上覆膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30min。

- [0053] 7. 洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔5次,洗涤过程同步骤3。
- [0054] 8. 发光:将发光液A液和B液各50 μ L混匀后加入反应板,反应板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C避光温育20min。
- [0055] 9. 检测:反应结束后立即用化学发光免疫分析仪测定各孔的化学发光值。
- [0056] 上述步骤中,洗涤步骤以无溶液残留为准,上述洗涤次数仅为本发明中的优选方案,不应作为对本发明的限制。
- [0057] 优选地,为了减少人为操作误差或进行定量检测,本方法还包括标准曲线制备步骤,具体如下:采用人PCSK9蛋白标准品制备标准曲线,蛋白标准品为干粉状态,使用稀释液进行倍比稀释至终浓度为0、125、250、500、1000、2000、4000pg/mL,进行标准曲线测定。
- [0058] 如需进行定量实验,需要根据读取的待测样品相对发光值带入蛋白浓度标准曲线进行计算,得到待测样品的浓度检测结果。定性实验则不需要。
- [0059] 本发明的第四个目的在于提供一种上述人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂或检测试剂盒的应用,该试剂盒可以检测PCSK9的血液含量,PCSK9的检测结果可以辅助判断高胆固醇血症,为下一步的高胆固醇血症的诊断与治疗提供一定的参考。
- [0060] 与现有技术相比,本发明采用重链修饰的PCSK9单克隆抗体,通过对兔单抗的重链恒定区CH3序列进行修饰提高了其与反应板的亲和能力,亲和度更好的包被抗体使得待测样本的脱板游离概率大大降低,从而提高了检测结果的准确性与稳定性。化学发光法反应简单快速,并且抗体夹心法不会减少反应产生的光子量,反应灵敏度高,检测结果准确。该试剂盒采用的原料廉价易得且环境友好,具有高灵敏度、高准确度的特点,适用于各种样本中的PCSK9检测,具有广泛的推广价值。

附图说明

- [0061] 图1兔抗人PCSK9单克隆抗体修饰前后重链恒定区CH3序列图;
- [0062] 图2是本发明提供的试剂盒检测流程示意图;
- [0063] 图3是本发明提供的试剂盒蛋白浓度标准曲线图。

具体实施方式

[0064] 下面结合实施例对本发明提供的人前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (PCSK9) 化学发光检测试剂盒作进一步详细、完整地说明。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0065] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的实验材料如无特殊说明,均为市场购买得到。

[0066] 一、单克隆抗体的制备与检测

[0067] 1.1单克隆抗体的制备

[0068] 本发明为改善单抗与反应版的亲和力问题,设计制备了一款修饰后的PCSK9单克隆抗体,修饰方法为将PCSK9单抗重链恒定区CH3序列第79位的苏氨酸取代为丝氨酸(如图1中方框和序列下划线所示),修饰后的兔抗人PCSK9蛋白单抗重链恒定区CH3区氨基酸序列如序列SEQ ID NO:1所示:

[0069] PKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGSDSYFLYNKLSVPT

SEWQRGDFVSCSVMHEALHNHYTQKSIS

[0070] 编码该段重链恒定区的DNA序列如序列表SEQ ID NO:2所示:

ccgaaggtct acaccatggg ccctccccgg gaggagctga gcagcaggtc ggtcagcctg 60

acctgcatga tcaacggctt ctacccttcc gacatctcgg tggagtggga gaagaacggg 120

[0071] **aaggcagagg acaactacaa gaccacgccg gccgtgctgg acagcgacgg ctctacttc 180**

ctctacagca agctctcagt gccacagagt gagtggcagc ggggcgacgt cttctcctgc 240

tccgtgatgc acgaggcctt gcacaaccac tacacgcaga agtccatctc ccgctctccg 300

[0072] 上述DNA序列和氨基酸序列由艾博抗(上海)贸易有限公司(Abcam)受申请人委托制备,由本申请涉及的抗体基因不可变区的序列,嵌合重链可变区和轻链可变区,即可获得全长的抗体分子作为检测靶标,用于PCSK9的检测。具体制备过程同PCT专利申请W02017071513A对于PCSK9单抗的重链可变区或轻链可变区的制备过程,在此不做赘述。

[0073] 1.2单克隆抗体的亲和力检测

[0074] 采用BIacore3000测定全抗体的亲和力,将修饰后的PCSK9单克隆抗体偶联于CM5芯片,单抗终浓度为2 μ g/mL。稀释人PCSK9至合适的浓度,设置一系列的浓度梯度(50、40、32、25、20、12.5、6.25、3.125、1.5625和0.78125nmoI/L)流经固定相表面,测定各单抗结合的动力学常数。

[0075] 以现有的市售PCSK9试剂盒武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司人前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)化学发光吸附测定试剂盒E-EL-H1579c作为对照,在相同检测环境下检测市售PCSK9试剂盒与人PCSK9结合的动力学常数。具体的检测结果如下表1所示。

[0076] 表1与PCSK9结合的动力学常数比较

[0077]

	动力学常数 K_D-1	动力学常数 K_D-2	动力学常数 K_D-3
修饰单抗	3.47×10^{-11}	3.73×10^{-11}	4.23×10^{-11}
市售单抗	1.25×10^{-10}	1.17×10^{-10}	1.41×10^{-10}

[0078] 由上述检测实验可知,本发明经过对单抗重链的氨基酸进行修饰,大大提高了单抗的动力学常数,且与市售单抗相比,提高了3倍以上。

[0079] 二、人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂盒

[0080] 2.1试剂盒组成

[0081] 本实施例中的检测试剂盒包括盒体、设在盒体内可拆卸的反应板以和设在盒体内的试剂。其中,所述反应板的每个孔使用修饰的兔抗人PCSK9单克隆抗体进行包被,所述试剂包括人PCSK9蛋白标准品、阴性对照液,生物素标记的兔抗人PCSK9蛋白二抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素,洗涤液PBST、发光液(A液)和发光液(B液)。其中:

[0082] 所述稀释液为pH9.6的碳酸盐缓冲液(CBS),其中CBS缓冲液是每升含有1.59g Na_2CO_3 ,2.93g NaHCO_3 的双蒸水溶液。

[0083] 所述用于包被反应板的抗人PCSK9蛋白单抗被稀释到包被浓度为2 μ g/mL。

[0084] 所述PBST为含有Tween 20体积百分比为0.1%,pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)。其中PBS缓冲液是每升含有8g NaCl ,0.4g KH_2PO_4 ,5.6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.4gKCl的双蒸水溶液。

[0085] 所述封闭液为含有1%BSA的PBST溶液。

[0086] 所述生物素标记的兔抗人PCSK9蛋白二抗使用封闭液稀释到终浓度为0.5 μ g/mL。

[0087] 所述HRP标记的链霉亲和素使用封闭液稀释到终浓度为0.05 μ g/mL。

[0088] 所述发光A液购买自罗氏,其中含有鲁米诺和发光增强剂。

[0089] 所述发光B液购买自罗氏,其中含有过氧化物和增强剂。

[0090] 2.2反应板的制备

[0091] 反应板的制备过程为:将抗人PCSK9蛋白单抗用稀释液稀释后加入反应板各孔,每孔加50 μ L,置于4 $^{\circ}$ C条件下,温育过夜;除去孔内液体,每孔加350 μ L PBST洗板两次,拍干后分别向每孔加300 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C封闭2h。PBST洗板3次,拍干后即得到抗人PCSK9蛋白抗体包被的反应板。

[0092] 2.3标准曲线的制备

[0093] 所述人PCSK9蛋白标准品为干粉状态,使用样品和标准品稀释液进行倍比稀释至终浓度为0、125、250、500、1000、2000、4000pg/mL,进行标准曲线测定。本检测试剂盒标准曲线图如图3所示。

[0094] 所述样品和标准品稀释液为含有0.5%BSA的PBST溶液。

[0095] 三、人血清中PCSK9蛋白的检测方法

[0096] 如图2中的试剂盒检测流程所示,待测样本的检测过程如下:

[0097] 1.样品处理:采集患者血液5mL置于室温放置2h后于1000 \times g离心20min,取上清,待检血清做1:120倍稀释使用。

[0098] 2.上样:取已被包被抗体(一抗)包被的反应板,上样孔每孔分别加入50 μ L稀释过的血清样品,每组样品做3个复孔,并设置空白孔和标准孔,空白孔加稀释液50 μ L,标准孔加标准品50 μ L,注意不要有气泡,加样时将样品加于反应板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;37 $^{\circ}$ C温育90min。

[0099] 3.洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔3次,每次浸泡1-2min,大约300 μ L/每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0100] 4.加入检测抗体(二抗):弃去孔内液体,甩干,每孔加入50 μ L稀释过的生物素标记的兔抗人PCSK9蛋白二抗,反应板上覆膜,37 $^{\circ}$ C温育1h。

[0101] 5.洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔3次,每次浸泡1-2min,大约300 μ L/每孔,甩干并在吸水纸上轻拍将孔内液体拍干。

[0102] 6.加入酶结合物:每孔加入50 μ L稀释的HRP标记的链霉亲和素,反应板上覆膜,37 $^{\circ}$ C温育30min。

[0103] 7.洗涤:用PBST洗涤反应板各反应孔5次,洗涤过程同步骤3。

[0104] 8.发光:将发光液A液和B液各50 μ L混匀后加入反应板,反应板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C避光温育20min。

[0105] 9.检测:反应结束后立即用化学发光免疫分析仪测定各孔的化学发光值。

[0106] 四、对比例

[0107] 将本试剂盒与市售试剂盒武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司人前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)化学发光吸附测定试剂盒E-EL-H1014c进行灵敏度对比分析。取相同的反应板分别包被市售试剂盒与本试剂盒中的兔抗人PCSK9单抗,包被浓度分别为2 μ g/mL、5 μ g/mL和10 μ g/mL,其他条件与本试剂盒相同。检测结果统计数据如下表2:

[0108] 表2

[0109]

PCSK9 蛋白 浓度 (pg/ml)	不同浓度包被抗体所测相对光度值 (试剂盒 E-EL-H1014c)			不同浓度包被抗体所测相对光度 值 (本试剂盒)		
	2ug/ml	5ug/ml	10ug/ml	2ug/ml	5ug/ml	10ug/ml
0	40	40	40	50	50	50
62.5	316	586	769	1367	1472	1782
125	735	1297	1605	2694	2965	3554
250	1836	2695	3129	5186	5986	7308
500	4151	5271	6386	10514	11468	14216
1000	8735	10354	12425	20386	23694	28461
2000	18089	21076	25137	40208	46458	55899
4000	36016	41418	49701	82417	94779	113734

[0110] 由检测结果可知:在本试剂盒的兔抗人PCSK9单抗的包被浓度(2ug/ml)下,本试剂盒的灵敏度明显高于市售试剂盒武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司人前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)化学发光吸附测定试剂盒E-EL-H1014c。

[0111] 最后有必要在此说明的是:以上实施例只用于对本发明的技术方案作进一步详细地说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,本领域的技术人员根据本发明的上述内容作出的一些非本质的改进和调整均属于本发明的保护范围。

序列表

<110>武汉菲思特生物科技有限公司

<120>一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用

<130> 2017

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (1)..(97)

[0112]

<223> 兔抗人 PCSK9 重链恒定区氨基酸序列

<400> 1

Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg

1 5 10 15

Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

20 25 30

Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr

35 40 45

Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys

50 55 60

Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Ser Cys

65 70 75 80

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile

85 90 95

Ser

<210> 2
<211> 300
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(300)

[0113]

<223> 兔抗人 PCSK9 重链恒定区基因序列

<400> 2

```
ccgaaggtct acaccatggg ccctccccgg gaggagctga gcagcaggtc ggtcagcctg 60
acctgcatga tcaacggctt ctacccttcc gacatctcgg tggagtggga gaagaacggg 120
aaggcagagg acaactacaa gaccacgccg gccgtgctgg acagogaagg ctctacttc 180
ctctacagca agctctcagt gcccacgagt gagtggcagc ggggcgacgt cttctcctgc 240
tcegtgatgc acgaggectt gcacaaccac tacacgcaga agtccatctc ccgtctcgg 300
```

序列表

<110> 武汉菲思特生物科技有限公司
 <120> 一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用
 <130> 2017
 <160> 2
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (1) .. (97)
 <223> 兔抗人PCSK9重链恒定区氨基酸序列
 <400> 1
 Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 20 25 30
 Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr
 35 40 45
 Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys
 50 55 60
 Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Ser Cys
 65 70 75 80
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
 85 90 95
 Ser
 <210> 2
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (300)
 <223> 兔抗人PCSK9重链恒定区基因序列
 <400> 2
 ccgaaggtct acaccatggg ccctccccgg gaggagctga gcagcaggtc ggtcagcctg 60

acctgcatga tcaacggctt ctacccttcc gacatctcgg tggagtggga gaagaacggg 120
aaggcagagg acaactacaa gaccacgccg gccgtgctgg acagcgacgg ctctacttc 180
ctctacagca agctctcagt gccacgagt gaggggcagc ggggcgacgt cttctctgc 240
tccgtgatgc acgaggcctt gcacaaccac tacacgcaga agtccatctc ccgctctccg 300

```

      10      20      30      40      50      60
1  CCGAAGGTCCTACACCATGGGCOCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGGTCAGCCTG
1  P K V Y T M G P P R E E L S S R S V S L

      70      80      90      100     110     120
61 ACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGG
21 T C M I N G F Y P S D I S V E W E K N G

      130     140     150     160     170     180
121 AAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTC
41 K A E D N Y K T T P A V L D S D G S Y F

      190     200     210     220     230     240
181 CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTCCCGTGC
61 L Y S K L S V P T S E W Q R G D V F T C

      250     260     270     280     290     300
241 TCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCG
81 S V M H E A L H N H Y T Q K S I S R S P

```

```

      10      20      30      40      50      60
1  CCGAAGGTCCTACACCATGGGCOCTCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGGTCCGGTCAGCCTG
1  P K V Y T M G P P R E E L S S R S V S L

      70      80      90      100     110     120
61 ACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGAGAAGAACGGG
21 T C M I N G F Y P S D I S V E W E K N G

      130     140     150     160     170     180
121 AAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTC
41 K A E D N Y K T T P A V L D S D G S Y F

      190     200     210     220     230     240
181 CTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTCCCGTGC
61 L Y S K L S V P T S E W Q R G D V F S C

      250     260     270     280     290     300
241 TCCGTGATGCACGAGGCCTTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCG
81 S V M H E A L H N H Y T Q K S I S R S P

```

图1

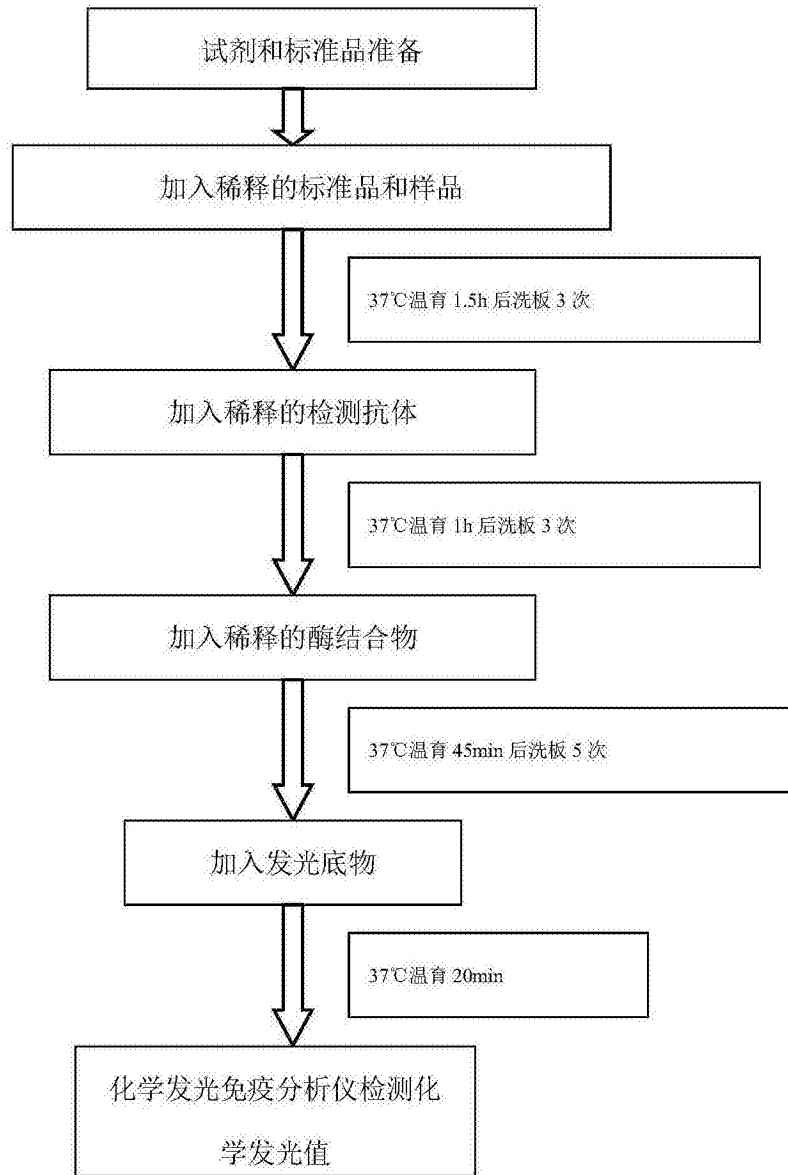


图2

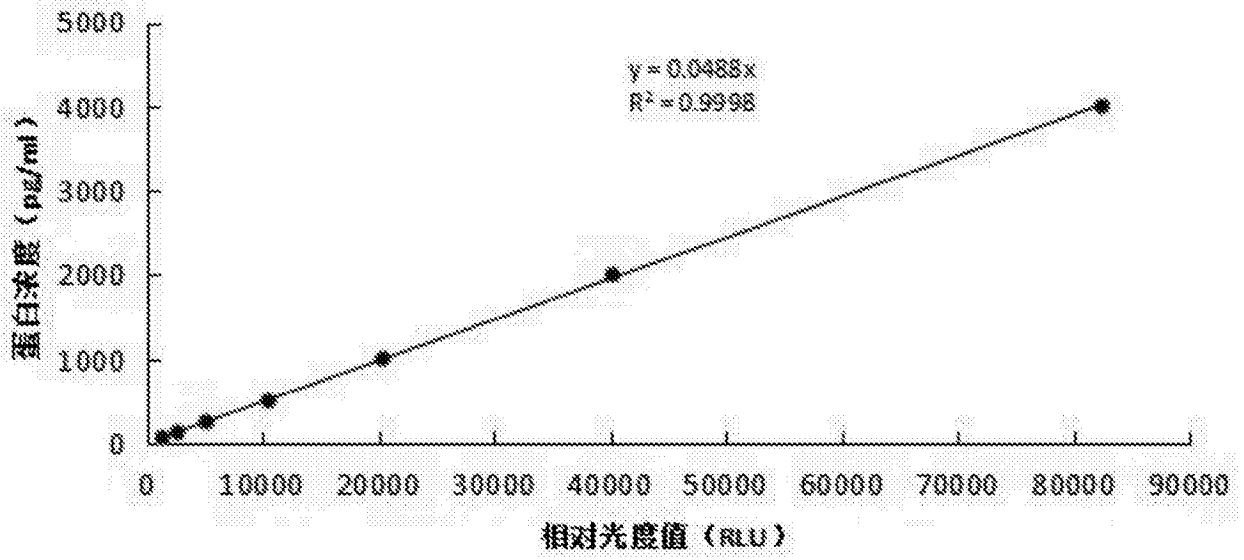


图3

专利名称(译)	一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9化学发光检测试剂和检测试剂盒与应用		
公开(公告)号	CN107957494A	公开(公告)日	2018-04-24
申请号	CN2017110899862.6	申请日	2017-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	武汉菲思特生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉菲思特生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉菲思特生物科技有限公司		
[标]发明人	陈立波 张豹		
发明人	陈立波 张豹		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/535 G01N33/577 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N21/763 G01N33/535 G01N33/54393 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2333/90 G01N2800/04 G01N2800/324		
优先权	201710730185.5 2017-08-23 CN		
其他公开文献	CN107957494B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人前蛋白转化酶枯草溶菌素9(PCSK9)化学发光检测试剂和检测试剂盒，所述检测试剂包括包被抗体、检测抗体和酶促发光试剂组，其中包被抗体和检测抗体为兔抗人PCSK9单克隆抗体，且分别连接待测蛋白样品成双抗体夹心结构；酶促发光试剂组包括酶和酶对应的发光液，酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或黄嘌呤氧化酶；酶与检测抗体结合后，催化发光液发光，检测发光强度以获得待测蛋白含量。本发明采用化学发光法反应简单快速，且抗体夹心法不会减少反应产生的光子量，反应灵敏度高，检测结果准确。该试剂盒采用的原料廉价易得且环境友好，具有高灵敏度、高准确度的特点，适用于各种样本中的PCSK9检测，具有广泛的推广价值。

