



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105987997 B

(45)授权公告日 2017.12.29

(21)申请号 201510050985.3

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2015.01.30

审查员 王在竹

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105987997 A

(43)申请公布日 2016.10.05

(73)专利权人 江苏众红生物工程创药研究院有
限公司

地址 213125 江苏省常州市新北区云河路
518号

专利权人 常州京森生物医药研究所有限公
司

(72)发明人 马永 时振华 高云霞 丁娜
徐春林 陈一飞

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页
序列表8页 附图7页

(54)发明名称

人组织激肽释放酶1荧光定量检测试纸卡

(57)摘要

本发明涉及检测人组织激肽释放酶1(hK1)荧光定量检测试纸卡及其相关抗体。本发明制备了多种单克隆抗体,并进行配对筛选,获得灵敏度及特异性均能满足需求的抗体组合(A24及A32);同时其方便大量生产,可满足日后大规模临床应用的需求。对上述抗体组合进行检测体系的调试优化工作,获得操作简便,灵敏度,特异性及相关检测性能都较好的人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

1. 人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,包括样品吸收垫、荧光微球垫、反应膜和吸水垫;所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗体A32或A24,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有抗体A24或A32;所述试剂盒还含有样本稀释液;

当荧光微球垫喷涂抗体A24时,检测带位置包被抗体A32;当荧光微球垫喷涂抗体A32时,检测带位置包被抗体A24;

所述抗体A24是抗人组织激肽释放酶1单链抗体,包括:

重链可变区,其氨基酸序列含有以下的互补决定区:如序列SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:2所示的HCDR2和如序列SEQ ID NO:3所示的HCDR3;

以及其轻链可变区,其氨基酸序列含有以下的互补决定区:如序列SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:5所示的LCDR2和如序列SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

所述抗体A32是抗人组织激肽释放酶1单链抗体,包括:

重链可变区,其氨基酸序列含有以下的互补决定区:如序列SEQ ID NO:9所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:10所示的HCDR2和如序列SEQ ID NO:11所示的HCDR3;

以及其轻链可变区,其氨基酸序列含有以下的互补决定区:如序列SEQ ID NO:12所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:13所示的LCDR2和如序列SEQ ID NO:14所示的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征在于所述抗体A24重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

3. 根据权利要求1所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述抗体A24为单链抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。

4. 根据权利要求3所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述抗体A24中不含由六个组氨酸构成的HIS标签。

5. 根据权利要求1所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述抗体A32重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

6. 根据权利要求1所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述抗体A32为单链抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。

7. 根据权利要求6所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述抗体A32中不含由六个组氨酸构成的HIS标签。

8. 根据权利要求6所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述样本稀释液含有0.1%BSA,0.025%吐温-20,0.01%安替比林,0.02% proclin300和0.05mol/L pH8.0硼酸缓冲液。

9. 根据权利要求6所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是所述荧光微球标记抗体时使用的封闭液是含10%BSA0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液;荧光微球标记抗体时使用的荧光抗体稀释液是含1%BSA、10%蔗糖、0.025%吐温-20、0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液。

10. 根据权利要求6所述的抗人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,其特征是检测带位置包被抗体时使用的包被抗体稀释液含1%蔗糖,3%甲醇的0.025mol/LpH7.5的PBS。

人组织激肽释放酶1荧光定量检测试纸卡

技术领域

[0001] 本发明属于免疫化学技术领域,具体的涉及检测人组织激肽释放酶1(hK1)荧光定量检测试纸卡及其相关抗体。

背景技术

[0002] 心脑血管疾病是严重危害人类健康的主要慢性非传染性疾病。其中冠心病及脑卒中是最常见的死亡原因。在我国,随着人口的老龄化,以冠心病,脑卒中为代表的心脑血管疾病的发病率,致死率及致残率呈逐年上升的趋势。但是,80%的脑卒中是可以预防的。糖尿病肾病是糖尿病最常见的并发症,严重危害糖尿病患者的生命质量和医疗消费质量。若不从循证医学的高度采取积极的干预措施,糖尿病肾病就会在较短的时间内发展为不可逆转的终末期肾病,严重威胁患者的生存寿命。因此,积极寻找有效的方法,早期诊断脑卒中、糖尿病肾病以进行有效的防护直接关系到患者的生命质量及生存寿命。

[0003] 激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system,KKS)又称激肽系统,广泛存在于动物体内的多个系统,尤其是在心血管系统内分布更为密集。该系统有广泛生物学活性,并且和凝血系统、肾素-血管紧张素系统以及多种血管活性因子系统等存在密切的联系和交叉对话,共同维护人体多器官正常的生理机能和参与各种复杂的病理生理过程,具有调节心血管、肾脏、神经系统和葡萄糖代谢,舒张血管、参与炎症反应、疼痛刺激和休克反应。近年来关于激肽系统的临床研究主要集中在心血管、肾脏、中枢神经系统疾病中的作用。

[0004] 人组织激肽释放酶是激肽系统最重要的组成部分,是一组分泌型丝氨酸蛋白酶,包含15个成员。在所有已知的组织激肽释放酶中,只有人组织激肽释放酶1(胰/肾激肽释放酶,Human kallikrein 1,hK1,KLK1,又称激肽原酶,Kininogenase)能有效水解低分子量激肽原(LMWK),释放具有活性的激肽,进而发挥心血管系统及肾脏功能的调节作用。基础研究表明,在多种高血压动物模型中已证实,hK1具有降低血压,减轻肾脏和心脏肥大及纤维化的作用;其在进行心脏重塑,减轻肾脏损害,降低脑梗死发生率以及降低神经损伤危害等方面的作用。同时,通过外源性给药的方法,亦证明了hK1在防止中风,心脑血管以及肾脏疾病方面的作用。近些年来,进一步的研究表明,hK1水平在人的心脑血管疾病的发生发展的过程中具有重要的临床意义,可能作为预测脑卒中发病率的指标。hK1水平可预测脑卒中的发病及五年无事件性生存率,可让患者早期预防并采取相应的措施,从而一定程度上降低脑卒中的发生概率。另外,hK1较尿微量白蛋白排泄率可更早的诊断早期糖尿病肾病。综上所述,hK1的水平对于人的心脑血管疾病及糖尿病肾脏疾病具有重要的预测价值。因此,准确测定hK1的水平,在临床及科研中均具有重要的意义。

[0005] 鉴于hK1在心脑血管疾病及糖尿病肾脏疾病中的治疗及预测作用,制备hK1定量检测试剂盒具有重要临床的应用价值。国内外已有hK1科研用定量检测试剂盒:其中部分试剂盒采用竞争法,抗体为多克隆抗体,其操作繁杂,计算繁琐且易出现非特异性结合而导致检测结果误差较大;部分试剂盒采用多克隆抗体的夹心法检测模式,亦存在非特异性结合的

影响；另外一些试剂盒采用多克隆抗体及单克隆抗体的双抗体夹心的模式，其检测性能有待进一步验证。双抗体夹心法的检测模式可有效避免上述问题。因此，多表位，高灵敏度，特异性的抗体的制备是高质量的人组织激肽释放酶1定量检测试剂盒的关键因素之一。天然hK1存在多个糖基化位点，因而重组表达hK1在糖基化位点等其他构象方面可能与天然蛋白存在较大的差异。在特异性抗体筛选时采用重组hK1进行筛选就会出现筛选的特异性抗体不能有效识别天然hK1的问题。本发明采用天然hK1进行抗体的筛选工作，可有效避免上述情况的发生，且已证实其与天然hK1的结合力。

[0006] 同时，为满足市场的不同应用需求，本发明制备了三种hK1定量检测试剂盒：人组织激肽释放酶1ELISA定量检测试剂盒，可满足一般小型综合医院的应用需求，且日后可发展升级为化学发光法定量检测（全自动），满足大型综合医院的全自动检测的应用需求。人组织激肽释放酶1胶体金定量检测试纸卡及人组织激肽释放酶1荧光定量检测试纸卡，均可满足快速检测及床边检测的需求。其中胶体金定量检测法灵敏度和准确度虽不如荧光定量检测法，但其使用方便易于推广且成本较低，可基本满足疾病指标的定量检测，适合于基层医疗系统中的即时检测。荧光定量具备更高的检测灵敏度，适用于检测要求较高的检验中心或大型医院临床科室的床边诊断的应用需求。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供能有效的、特异性结合人组织激肽释放酶1的抗体。更具体地说：

[0008] 本发明的第一目的在于提供两种抗人组织激肽释放酶1抗体。

[0009] 第一种抗人组织激肽释放酶1抗体（A24），

[0010] 其重链可变区含有以下的互补决定区：氨基酸序列如序列SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:2所示的HCDR2和/或如序列SEQ ID NO:3所示的HCDR3；

[0011] 以及其轻链可变区序列含有以下的互补决定区：氨基酸序列如序列SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:5所示的LCDR2和/或如序列SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0012] 优选的是本发明中的抗体A24的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示，轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0013] 第二种抗人组织激肽释放酶1抗体（A32），

[0014] 其重链可变区含有以下的互补决定区：氨基酸序列如序列SEQ ID NO:9所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:10所示的HCDR2和/或如序列SEQ ID NO:11所示的HCDR3；

[0015] 以及其轻链可变区序列含有以下的互补决定区：氨基酸序列如序列SEQ ID NO:12所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:13所示的LCDR2和/或如序列SEQ ID NO:14所示的LCDR3。

[0016] 优选的是本发明中的抗体A32的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

[0017] 本发明第二个目的是提供两种单链抗体，所述单链抗体A24的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示；所述单链抗体A32的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示。优选的，所述单链抗体A24、A32中不含由六个组氨酸构成的HIS标签。

[0018] 本发明第三个目的是提供两种编码上述单链抗体的核苷酸序列，编码单链抗体A24的核苷酸序列如SEQ ID NO:19所示，和编码单链抗体A32的核苷酸序列如SEQ ID NO:20

所示。

[0019] 本发明第四个目的是提供一种含有上述核苷酸序列的表达载体。

[0020] 本发明第五个目的是提供一种含有上述表达载体的重组宿主细胞。所属宿主细胞可以是大肠杆菌、酵母或哺乳动物细胞,优选为毕赤酵母。

[0021] 本发明第六个目的是提供一种生产上述单链抗体的方法,包括:

[0022] 1) 在合适的条件下培养上述重组宿主细胞表达抗体;

[0023] 2) 然后从宿主细胞中纯化、收集抗体。

[0024] 本发明的第七个目的在于提供上述抗人组织激肽释放酶1抗体在检测人组织激肽释放酶1含量中的应用。

[0025] 本发明的第八个目的在于提供一组可进行配对并检测人组织激肽释放酶1的抗体对组合;该抗体对组合的检测灵敏度高,特异性好。

[0026] 本发明的第九个目的在于提供一种利用所述抗人组织激肽释放酶1抗体检测人组织激肽释放酶1的酶联免疫定量检测试剂盒,包括包被了A24或A32抗体的酶标板、样品稀释液、标准品、含有酶标抗体A32或A24的检测液、洗涤液、显色液及终止液。其检测步骤主要包括:

[0027] (1) 向包被A24或A32抗体的酶标板中加入样本稀释液后,再加入样本稀释液稀释的标准品、阴性对照及血清或血浆等待检样本;

[0028] (2) 加入样本稀释液稀释的检测液;

[0029] (3) 加入显色液

[0030] (4) 加入终止液并读取OD值。

[0031] 所述酶标抗体A32或A24是辣根过氧化物酶标记的抗体A32或A24 (A32-HRP或A24-HRP) 或者碱性磷酸酶标记的抗体A32或A24 (A32-AP或A24-AP);所述标准品为中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达重组人组织激肽释放酶1的纯化蛋白。

[0032] 本发明的第十个目的在于提供一种利用所述抗人组织激肽释放酶1抗体检测人组织激肽释放酶1的胶体金免疫层析定量检测卡,包括样品吸收垫、金标垫、反应膜和吸水垫;所述金标垫喷涂有胶体金颗粒标记的抗体A32或A24,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有抗体A24或A32,质控带位置包被抗His标签抗体或Protein L。

[0033] 本发明第十一个目的在于提供一种利用所述抗人组织激肽释放酶1抗体检测人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,包括样品吸收垫、荧光微球垫、反应膜和吸水垫;所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的上述所述抗体A32或A24,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有上述所述抗体A24或A32,质控带位置包被抗His标签抗体或Protein L。

[0034] 所述反应膜优选硝酸纤维素膜。所述抗His标签抗体优选鼠抗His抗体。

[0035] 本发明制备了多种抗体,并进行配对筛选,获得灵敏度及特异性均能满足需求的抗体组合(A24及A32);同时其方便大量生产,可满足日后大规模临床应用的需求。对上述抗体组合进行检测体系的调试优化工作,获得操作简便,灵敏度,特异性及相关检测性能可满足临床样本检测的人组织激肽释放酶1的酶联免疫定量检测试剂盒、人组织激肽释放酶1的胶体金免疫层析定量检测卡及人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

附图说明

[0036] 图1. 抗体重链及轻链可变区基因电泳图。Lane 1为标准DNA, Lane 2为抗体A24重链可变区DNA, Lane 3为抗体A24轻链可变区DNA, Lane 4为抗体A32重链可变区DNA, Lane 5为抗体A32轻链可变区DNA。

[0037] 图2. 单链抗体结构示意图。 V_H 表示重链可变区序列, V_L 表示轻链可变区序列, His标签为六个组氨酸。

[0038] 图3. 单链抗体表达PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图。图(a)为A24基因PCR产物;图(b)为A32基因PCR产物。

[0039] 图4. 重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液鉴定图。图4(a)为抗体A24重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液鉴定图;图4(b)为抗体A32重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液鉴定图。上述左图为SDS-PAGE电泳鉴定图、右图为Western blot鉴定图。

[0040] 图5. 单链抗体纯化效果图(SDS-PAGE)。图(a)为抗体A24,图(b)为抗体A32。

[0041] 图6. 抗体A24及A32的Western Blot鉴定图。泳道1为尤瑞克林(UK);泳道2为酵母表达hK1;泳道3为大肠杆菌表达hK1;泳道4为CHO表达hK1。图(a)为A32抗体Western Blot结果;图(b)为A24抗体Western Blot结果。

[0042] 图7. 本发明酶联免疫检测试剂盒标准曲线。其中横坐标为蛋白浓度(ng/mL);纵坐标为检测OD450; r 表示检测相关系数,为0.99980322。

[0043] 图8. 本发明酶联免疫检测试剂盒检测特异性。横坐标为检测物浓度(ng/mL);纵坐标为检测OD值。UK表示尤瑞克林,是从人尿液中提取的人组织激肽释放酶1;KLK2表示人组织激肽释放酶2;KLK3表示人组织激肽释放酶3。

[0044] 图9. 本发明胶体金免疫层析定量检测卡及时间分辨免疫荧光层析定量检测卡结构示意图。1为样品垫、2为反应膜、3为吸收垫、4为质控线(C线)、5为检测线(T线)、6为金标垫或荧光结合垫、7为PVC片材。

[0045] 图10. 本发明胶体金免疫层析定量检测卡标准曲线。其中横坐标为蛋白浓度(ng/mL);纵坐标为T/C值; r^2 为0.992。

[0046] 图11. 本发明时间分辨免疫荧光层析定量检测卡标准曲线。其中横坐标为蛋白浓度(ng/mL);纵坐标为检测值; r^2 为0.9952。

[0047] 图12. 时间分辨免疫荧光层析定量检测与酶联免疫检测结果相关性

具体实施方式

[0048] 定义

[0049] “抗体”又称免疫球蛋白,是一类由B淋巴细胞分泌的大型Y形蛋白质,能够通过Y形的其中两个分叉顶端的互补位点(抗原结合位)特异性结合靶抗原的免疫球蛋白分子,所述靶抗原如蛋白质、糖、多核苷酸、脂、多肽、小分子化合物等。

[0050] “单链抗体”(scFv)指的是抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)通过15~20个氨基酸短肽(linker)连接形成的单一链融合蛋白,用于连接的linker通常富含甘氨酸和丝氨酸,以利于单链抗体的稳定性与柔韧性。连接方式可将 V_L 的N端连接至 V_H 的C末端,或者相反。尽管去除了恒定区并引入linker,单链抗体依然保留了抗体对抗原的特异性,且其具有

分子量小、穿透力强和抗原性弱等特点。

[0051] 互补决定区 (complementarity-determining region, CDR), 也叫做高变区。成型于抗体单体氨基酸的末端, 是靶抗原与抗体结合的最关键区域, 在免疫网络理论中, 每个抗体的互补决定区又被称为独特型或者基因型。

[0052] 以下实施例中所用标准品均为CHO系统表达重组hK1 (1mg/mL, 制备方法见专利201310746269.X)

[0053] 实施例1. 抗人组织激肽释放酶1杂交瘤细胞株的制备

[0054] 1. 动物免疫

[0055] 以重组人组织激肽释放酶1 (中国仓鼠卵巢细胞表达, 制备方法见专利201310746269.X) 按照一般免疫程序免疫BALB/c雌性小鼠 (购自常州卡文斯实验动物有限公司)。具体免疫情况参见《抗体制备与使用实验指南》。采用间接ELISA法跟踪免疫小鼠血清滴度, 选取血清效价最高的免疫小鼠, 将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合实验。

[0056] 2. 细胞融合

[0057] (1). 脾脏细胞的制备

[0058] 将免疫小鼠, 摘眼球取血, 经断颈椎处死后置于75% (v/v) 的酒精中浸泡10分钟, 于无菌操作台中取出其脾脏, 置于细胞筛网中, 充分研磨细胞, 过筛网, 用无菌1640培养基 (购自Gibco公司) 离心洗涤数次后, 重悬细胞以制成单细胞悬液, 并计数, 备用。

[0059] (2). 饲养细胞的制备

[0060] 取8~10周龄的雌性BALB/c小鼠一只, 摘眼球获取阴性血清, 经断颈椎处死后置75% (v/v) 酒精中浸泡10分钟; 无菌揭开腹部皮肤, 暴露腹膜, 用注射器将约10mL 1640HT培养基 (购自SIGMA公司) 注入小鼠腹腔, 轻轻按摩腹部并吹打数次。吸取含有巨噬细胞的培养基注入20% 1640HAT培养基中备用;

[0061] 取2~3周龄的雌性BALB/c小鼠一只, 经断颈椎处死后置于75% (v/v) 酒精中浸泡10分钟; 无菌取胸腺于细胞筛网中, 研磨, 过筛网, 获得胸腺细胞置于上述含有巨噬细胞的20% 1640HAT培养基中, 备用。

[0062] (3). 细胞融合

[0063] 选择处于对数生长期的鼠骨髓瘤细胞株SP2/0, 收集并计数。取约 10^8 个上述脾细胞与 2×10^7 个上述SP2/0细胞株加入融合管中混合, 1000rpm离心10分钟后弃上清 (尽量弃净), 将融合管置手掌上来回轻轻摩擦以使沉淀松散。60秒内先慢后快地加入1mL预热的PEG1450 (聚乙二醇1450, 购自SIGMA公司), 加入1640HT培养基30mL终止, 1000rpm离心10分钟, 去上清, 轻轻摩擦使沉淀松散, 加入步骤2所获得的20%的1640HAT培养基中。

[0064] 将上述HAT培养基充分混匀后, 以200 μ L/孔分装至96孔细胞培养板中, 置37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂的细胞培养箱中培养。一周后用10% 1640HT培养基替换20% 1640HAT培养基, 3天后取上清进行检测。

[0065] 3. 抗人组织激肽释放酶1特异性杂交瘤细胞株筛选

[0066] (1). 检测板的准备: 用CB包被液稀释尤瑞克林 (UK, 购买于广东天普生化医药公司) 至1 μ g/mL, 包被96孔ELISA酶标板, 100 μ L/孔, 2~8 $^{\circ}$ C包被过夜, 洗涤一次拍干; 含2% 酪蛋白的PBST缓冲液封闭 (200 μ L/孔), 37 $^{\circ}$ C封闭2小时; 拍干, 备用。

[0067] (2). 阳性克隆的筛选: 将待检细胞培养上清100 μ L/孔加入上述检测板中, 于37 $^{\circ}$ C

作用30分钟后洗涤并拍干,加入100 μ L/孔的HRP标记的羊抗鼠IgG,于37 $^{\circ}$ C作用30分钟后洗涤并拍干,加入100 μ L/孔的TMB显色液,于37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟,每孔加入50 μ L的2M H₂SO₄终止反应,并于OD450处读取数值。阳性孔确定原则:OD450值/阴性对照值 \geq 2.1。选取阳性克隆株进行细胞克隆化筛选。经过三至四轮的克隆化筛选后,单克隆细胞株阳性率100%即确定为稳定细胞株,对细胞株进行定株。杂交瘤细胞株C24及C32均具有较高的效价,遂后续进一步对上述杂交瘤细胞株进行抗体可变区序列测序分析。

[0068] 实施例2. 杂交瘤细胞株抗体可变区序列的测定

[0069] 对上述杂交瘤细胞株C24及C32抗体可变区序列进行测定。

[0070] a. RNA的提取:参照细胞总RNA抽提试剂盒(购自Roche公司)说明书对上述杂交瘤细胞株C24及C32进行总RNA提取并立即进行反转录;

[0071] b. RNA反转录成为DNA:参照Thermo Scientific Reverted First strand cDNA Synthesis Kit (购自Thermo公司)对上一步骤中所提取的总RNA进行反转录,制得cDNA,冻存于-20 $^{\circ}$ C备用;

[0072] c. 可变区序列的PCR扩增及回收:以上一步骤中所得cDNA为模板,以鼠IgG亚型单克隆抗体可变区序列通用引物为引物,对重链及轻链的可变区序列进行PCR扩增,将PCR产物经DNA胶回收试剂盒(购自TIANGEN公司)进行回收,见附图1;

[0073] d. 可变区序列的克隆和序列测定:按照克隆载体pMD18-T kit (购自Takara公司)说明书,将重链和轻链可变区基因分别与pMD18-T载体进行连接,转化大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆,交由InvitrogenTM公司进行测序。

[0074] 测序得到杂交瘤细胞株C24的抗体重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示、轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。Vbase2数据库分析上述序列,其重链可变区的各互补决定区的氨基酸序列分别是:如序列SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:2所示的HCDR2和/或如序列SEQ ID NO:3所示的HCDR3;其轻链可变区的各互补决定区的氨基酸序列是:如序列SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:5所示的LCDR2和/或如序列SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0075] 测序得到杂交瘤细胞株C32的抗体重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。Vbase2数据库分析上述序列,其重链可变区的各互补决定区的氨基酸序列分别是:如序列SEQ ID NO:9所示的HCDR1、如序列SEQ ID NO:10所示的HCDR2和/或如序列SEQ ID NO:11所示的HCDR3;其轻链可变区的各互补决定区的氨基酸序列是:如序列SEQ ID NO:12所示的LCDR1、如序列SEQ ID NO:13所示的LCDR2和/或如序列SEQ ID NO:14所示的LCDR3。

[0076] 实施例3. 单链抗体的重组表达及纯化

[0077] 根据实施例2中测序结果,分别将杂交瘤细胞株C24及C32的抗体重链及轻链可变区之间加入连接肽(GGGGS)₃,引入六个组氨酸,并将其全基因按照毕赤酵母表达系统的偏爱性进行密码子优化的方法,进行单链抗体的重组表达。所表达得到的抗体分别命名为抗体A24和抗体A32,其结构组成如附图2所示。上述单链抗体的重组表达具有如下:

[0078] 1. 融合蛋白基因的表达质粒构建

[0079] 密码子优化后的抗体A24的基因序列如SEQ ID NO:19所示、氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示;密码子优化后的抗体A32的核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示、氨基酸序列如SEQ

ID NO:18所示。将优化后的抗体A24及A32全基因合成的片段上游引入pPICZ α 载体中XhoI序列后DNA序列,下游引入XbaI酶切位点,构建到pMD19-T Simple Vector质粒(购自Invitrogen公司)中,得到一种长期保存质粒,质粒记为pMD19-A24、pMD19-A32。进行PCR扩增,其中上游引物P1为CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC GAC;下游引物P2为:AGCGGATAACAATTTACACAGGA。常规PCR程序后,琼脂糖凝胶电泳分析(附图3),显示两种产物大小与预期大小(790bp、800bp)一致。将PCR获得基因产物回收纯化后,采用XhoI(#R0146S,购自New England Biolabs公司)和XbaI(#R0145V,购自New England Biolabs公司)双酶切,用T4连接酶连接到pPICZ α (V19520,购自Invitrogen)质粒中,转化到DH5 α 感受态细胞中,在含有Zeocin(R250-01,购自Invitrogen公司)的LB平板中37℃培养过夜。第二天筛选阳性克隆菌测序,比对,与预期序列完全一致,即得到抗体A24及A32的表达质粒,分别记为pPICZ α -A24、pPICZ α -A32。

[0080] 2. 融合蛋白基因在毕赤酵母宿主工程菌株的构建、筛选及表达

[0081] 毕赤酵母感受态细胞、YPDS固体培养基、BMGY培养基、BMMY培养基:均购自Invitrogen公司。

[0082] 将pPICZ α -A24及pPICZ α -A32质粒,用SacI限制性内切酶酶切线性化。乙醇沉淀后将线性化载体,分别电转化进入到X-33感受态酵母细胞,分别涂布到含有Zeocin的YPDS固体培养基,30℃培养3-5天,就有阳性克隆产生。

[0083] 挑取上述获得的单克隆于5mL BMGY培养基中,30℃培养至OD₆₀₀=2.0~6.0时,取1mL保存菌种,并将剩余菌液重悬后转移到BMMY中小量诱导表达,每隔24h补加甲醇至终浓度为1%(v/v)。一周后,离心收集菌液上清,通过SDS-PAGE凝胶电泳和蛋白免疫印迹分析(Western blot),观察目标蛋白表达情况(附图4)。Western blot中一抗为抗His-Tag抗体(His-Tag(2A8) Mouse mAb, M20001, 购于艾比玛特生物医药(上海)有限公司)。

[0084] 将上述获得的A24及A32重组融合蛋白基因工程菌株分别接种于BMGY培养基中,30℃,220rpm培养至菌体密度到OD₆₀₀=2.0~6.0,每隔24小时补加甲醇至终浓度为1.0%(v/v)。一周后,收集发酵培养液。

[0085] 3. 融合蛋白纯化

[0086] 采用组氨酸标签亲和柱纯化抗体A24及抗体A32融合蛋白,预装柱子选择为HisTrap HP,具体步骤如下:

[0087] (1) 发酵液的除杂预处理:将上述表达得到抗体A24及A32融合蛋白发酵液上清,离心收集上清,并加入结合缓冲液,使得上清终浓度为300mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 10mM Imidazole, 调pH7.5, 0.45 μ m滤膜过滤。

[0088] (2) HisTrap HP亲和柱纯化:运用全自动智能蛋白纯化系统(AKTA avant150, 购自GE healthcare公司)对预处理获得的抗体A24及抗体A32融合蛋白发酵液进行亲和纯化,柱子为HisTrapHP(17-5248-02, 购自GE healthcare公司)。结合缓冲液为300mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 10mM Imidazole, pH7.5, 洗脱缓冲液为300mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄, 500mM Imidazole, pH7.5。洗脱时进行线性洗脱,并收集各个洗脱峰。通过SDS-PAGE电泳鉴定纯度,由附图5可知,两种纯化后的蛋白纯度均达到95%以上;合并符合要求的收集管,更换缓冲液为PBS溶液并超滤浓缩(1mg/ml),过滤除菌于-20℃保存备用。

[0089] 本领域技术人员知晓,重组蛋白可以不带标签,也可带其他标签,也可加入其他形

式的连接肽。无论是否带标签或者带不同形式的标签都可采用Capto L纯化。

[0090] 实施例4. 抗体的性能评价

[0091] 1. 抗体A24及A32的Western blot鉴定

[0092] a. 聚丙烯酰胺凝胶电泳:配置12%分离胶、5%浓缩胶,分别上样标准蛋白质、尤瑞克林(UK)、毕赤酵母表达hK1、大肠杆菌表达hK1以及CHO系统表达hK1,恒压下电泳1小时;

[0093] b. 转膜:恒流(35mA/膜)条件下转膜1小时,将两块聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质分别转移至两张硝酸纤维素膜上。考马斯亮蓝G250对完成转膜的SDS-PAGE胶进行染色,观察蛋白的残留情况;

[0094] c. 封闭:含5%脱脂奶的TBST缓冲液封闭(封闭液),4℃过夜;封闭后洗涤液(TBST,详见TaKaRa公司TBST buffer)洗涤一次,10分钟;

[0095] d. 抗原抗体反应:封闭液稀释(按1:400体积比)辣根过氧化物酶标记A24(A24-HRP,1mg/mL,本公司采用经典过碘酸钠法标记,下同)及辣根过氧化物酶标记A32(A32-HRP,1mg/mL,本公司采用经典过碘酸钠法标记,下同),分别加入上述两张硝酸纤维素膜中,室温反应1小时;TBST洗涤5次,每次10分钟;

[0096] e. 显色及拍照:吸干硝酸纤维素膜上残留液体,每张硝酸纤维素膜分别加入2mL稳定型过氧化物酶溶液(1mL)与鲁米诺/增强剂溶液(1mL)的混合液(购买于Thermo公司),均匀润湿硝酸纤维素膜的表面,室温避光反应一分钟后于凝胶成像系统(购买于GE公司)拍照,留取结果。

[0097] 实验结果(附图6)表明,本发明两种抗体均可与四种来源的hK1反应,证明了本发明两种抗体的反应性,且证明其与天然hK1均有较好的反应。另外,实验结果可见,四种来源hK1的分子量均与理论值相符:UK为天然hK1,糖基化程度最高,故其分子量最大;大肠杆菌表达hK1糖基化程度最低,故分子量最小;CHO系统表达hK1糖基化程度稍低于天然蛋白但高于酵母表达hK1,故其分子量介于UK及酵母表达hK1之间。

[0098] 2. 抗体A24及A32在ELISA检测平台的性能评价

[0099] 将上述制备例中抗体进行配对组合,分别作为包被抗体或标记抗体进行配对检测标准品,检测步骤如下:

[0100] 1) 采用20mM PH7.4的PB缓冲液将Y0(非相关单链抗体,作为阴性对照,制备方法参加申请人在先申请:201410020156.6)、A24或A32(作为包被抗体)分别稀释至8ug/mL,分装至酶标板中(100uL/孔),4℃,过夜(16小时);

[0101] 2) PBST(含0.05%Tween-20的20mM PB7.4,下同)洗涤一次(200uL/孔)后拍干;

[0102] 3) 封闭液(含质量体积比为2%BSA的PBST)封闭(200uL/孔),37℃,2小时;弃去封闭液后拍干;

[0103] 4) 样本稀释液稀释标准品,至浓度(ng/mL)为200、100及0。分别将上述浓度溶液加入至步骤3)获得的包被有A24及A32的酶标板中(100uL/孔),37℃反应1小时;PBST洗涤5次(200uL/孔)后拍干;

[0104] 5) 按照1:2000体积比稀释HRP标记A24(A24-HRP)或A32(A32-HRP)(作为标记抗体);向步骤4)所获酶标板中分别加入稀释的A32-HRP或A24-HRP,37℃反应30分钟;PBST洗涤5次后拍干;

[0105] 6) 加入TMB显色液(购买于湖州英创公司),100uL/孔,37℃反应15分钟;

[0106] 7) 加入2M H₂SO₄终止液, 50uL/孔, 立即于酶标仪 (购买于Thermo公司) 读取OD450。

[0107] 结果如下表:

	包被抗体	A24	A32	A24	A32	Y0	
	标记抗体	A32	A24	A24	A32	A32	
[0108]	标准品浓度 (ng/mL)	200	2.7059	2.5376	0.4311	0.1275	0.0876
		100	1.9301	1.6432	0.3606	0.0936	0.0900
		0	0.1173	0.1073	0.3872	0.0814	0.0719

[0109] 由上述结果可知, A32、A24组成的双抗体夹心检测系统可应用于酶联免疫检测平台, 且A24 (包被) -A32 (标记), A32 (包被) -A24 (标记) 两种配对均有较好的检测效果。与非相关抗体无非特异性反应。

[0110] 3. 抗体A24及A32在胶体金检测平台的评价

[0111] 用样本稀释液稀释标准品至浓度为200ng/ml, 100ng/ml, 将这两个浓度和0.025mol/L pH7.5的PBS分别添加50uL到胶体金检测卡中 (A24包被-A32标记或A32包被-A24标记, 具体制备参见实施例6), 10-15min内将检测卡放在读数仪上进行检测。检测结果如下:

	包被抗体	A24	A32	
	标记抗体	A32	A24	
[0112]	标准品浓度 (ng/mL)	200	1.646	1.489
		100	0.835	0.845
		0	0.177	0.252

[0113] 上述结果可见, A32、A24组成的双抗体夹心检测系统可应用于胶体金检测平台, 且A24 (包被) -A32 (标记), A32 (包被) -A24 (标记) 两种配对均有较好的检测效果。

[0114] 4. 抗体A24及A32在时间分辨荧光检测平台的评价

[0115] 用0.025mol/L pH7.5的PBS将A24或A32稀释至1mg/ml, 划线于硝酸纤维素膜上; 用0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球标记的A32或A24稀释20倍, 喷点于结合垫上; 按附图9所示贴膜、切条、装卡 (具体制备参见实施例7)。将检测卡分别检测浓度含量为200、100ng/ml的标准品和0.025mol/L pH7.5的PBS, 检测结果如下:

	包被抗体	A24	A32	
	标记抗体	A32	A24	
[0116]	标准品浓度 (ng/ml)	200	1.609	1.536
		100	0.838	0.849
		0	0.045	0.027

[0117] 由上述结果可知, A32、A24组成的双抗体夹心检测系统可应用于时间分辨荧光检测平台, 且A24 (包被) -A32 (标记), A32 (包被) -A24 (标记) 两种配对均有较好的检测效果。

[0118] 实施例5. 抗体A24及A32在酶联免疫定量检测试剂盒中的应用

[0119] 本检测方法采用双抗体夹心法的原理。

[0120] 1. 材料:

[0121] 包被缓冲液: 0.02M PH7.4的PB缓冲液; 封闭液: 含2% BSA (质量体积比, 下同) 的PBST缓冲液; 洗涤液: PBST缓冲液; 样本稀释液: 含1% BSA、0.5% 酪蛋白、5% 山羊血清、0.02% Procline 300及0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲液 (PH7.4); 标准品: CHO系统表达重组hK1 (1mg/mL, 制备方法见专利201310746269.X); 显色液: TMB (购买于湖州英创公司); 终止液: 2M H₂SO₄。

[0122] 2. 仪器:

[0123] 酶标仪(购买于Thermo公司),通用型微生物培养箱(购买于Thermo公司),全自动洗板机(购买于深圳汇松公司)

[0124] 3. 方法:

[0125] (1) 检测板的制备:包被缓冲液将抗体A24稀释至8ug/mL,100uL/孔加入至酶标板中,4°C放置过夜(16小时);PBST洗涤一次后拍干;200uL/孔封闭液封闭,37°C放置2小时后拍干,抽干过夜(16小时),铝箔袋真空包装,4°C保存备用;

[0126] (2) 样本稀释液的制备:含1%BSA、0.5%酪蛋白、5%山羊血清、0.02%Procline 300及0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(20mM,PH7.4),按照上述成分比例配置样本稀释液,于4°C保存备用;

[0127] (3) 标准品的制备:将10uL标准品加入至19.99mL样本稀释液中,充分混匀后于4°C保存备用;

[0128] (4) 检测液的制备:将辣根过氧化物酶(HRP)偶联至抗体A32(A32-HRP,1mg/ml);将5uL A32-HRP加入至9.995mL的样本稀释液中,充分混匀后于4°C保存备用.

[0129] 4. 人激肽释放酶1酶联免疫检测试剂盒的使用方法

[0130] (1) 于4°C取出真空包装的检测酶标板及相关试剂于室温平衡后备用;

[0131] (2) 标准品的稀释:将10uL标准品加入至490uL样本稀释液中,充分混匀后即得10ng/mL标准品溶液;将10ng/mL标准品溶液倍比稀释,分别获得终浓度(ng/mL)为5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625及0.078125的标准品溶液;以样本稀释液为阴性对照,即0ng/mL;

[0132] (3) 酶标板中分别加入50uL/孔的样本稀释液;再向酶标板中加入标准品、阴性对照以及待检样本(50uL/孔);37°C放置60分钟;PBST洗涤5次后拍干;

[0133] (4) 检测孔中加入检测液,100uL/孔,37°C放置30分钟;PBST洗涤5次后拍干;

[0134] (5) 检测孔中加入显色液,100uL/孔,37°C放置15分钟;

[0135] (6) 检测孔中加入终止液,50uL/孔,立即于酶标仪读取OD450.

[0136] 按照标准品各浓度对应的OD450读值,采用CurveExpert 1.3软件以浓度为横坐标,OD值为纵坐标进行标准曲线的绘制,获得标准曲线方程;将检测样本的OD值代入标准曲线方程后计算出待检样本的浓度(ng/mL)。

[0137] 5. 检测性能评价:

[0138] 根据上述检测条件进行本发明所述检测方法的性能评价。

[0139] (1) 添加回收率:

[0140] 回收率是验证检测准确性的指标,遂本发明对基于A24及A32的检测试剂盒进行添加回收率的验证。

[0141] 将20份血浆混合后获得混合血浆,采用本发明的方法测量混合血浆B中的hK1含量为C₀;将浓度分别为5ng/mL、2.5ng/mL、1.25ng/mL以及0.625ng/mL的标准品(A液)加入到混合血浆B中,所加入A液与血浆B之间的体积比为1:9,根据公式(1)计算出各个添加量的回收率。

[0142]
$$R = \frac{Cx(v_0+v)-C_0 \times v_0}{V \times C_S} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

[0143] 式中:R为回收率;

[0144] V为加入A液的体积;

[0145] V_0 为混合血浆样本B的体积;

[0146] C为混合血浆样本B加入A液后的检测浓度;

[0147] C_0 为血浆样本B的检测浓度;

[0148] C_S 为A液的浓度。

[0149] 本发明检测标准曲线(附图7)可见,该检测具有良好的线性关系($r=0.99$)且具有高灵敏度(156pg/mL)及阴性本底值($OD=0.0525$)。根据上述添加回收率计算方法,计算结果见下表:

[0150]	添加量 (ng/mL)	5	2.5	1.25	0.625
	添加回收率	92.88%	108.01%	102.87%	100.93%

[0151] 表中可见,上述四个浓度添加回收率平均值为101.17%,各浓度添加回收率与回收率均值相差小于等于8.29%,证明本检测方法准确性高。

[0152] (2) 特异性:

[0153] 经蛋白序列比对可见,人组织激肽释放酶1与人组织激肽释放酶家族中的人组织激肽释放酶2(KLK2)及人组织激肽释放酶3(KLK3)的同源性分别达到66%及60%,遂本实验主要考察本发明所建立的检测方法对KLK2及KLK3的检测特异性。检测方法如上所述,分别加入样本稀释液梯度稀释后的尤瑞克林(UK),KLK2(购买于R&D公司)及KLK3(购买于R&D公司),最终检测该检测方法的特异性。检测结果(附图8)可见,本发明所述的人组织激肽释放酶1酶联免疫定量检测法特异性好。

[0154] (3) 重复性

[0155] 将三份具有代表性的血浆样本分别重复检测10次,计算10次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 得出变异系数CV,结果如下:

[0156]	样本	血浆 1	血浆 2	血浆 3
	CV	6.70%	7.80%	7.90%

[0157] 上述结果可见,三份血浆检测 $CV < 10\%$,本发明ELISA检测试剂盒具有较好的重复性。

[0158] 6. 本发明尝试多种试剂盒制备方法,下表展示几种不同制备方式(表中未列出的步骤、参数等同本实施例所述)及相应试剂盒的检测性能。

制备条件	制备例 2	制备例 3	制备例 4	制备例 5
包被浓度	2ug/mL	2ug/mL	8ug/mL	8ug/mL
样本稀释液	10%蔗糖+0.5%酪蛋白 +1%TritonX-100+ 20mM 磷酸盐缓冲液 (PH6.5)	0.5%酪蛋白+2% 小牛血清 +1%Tween-20+20 mM 磷酸盐缓冲液 (PH7.4)	10%蔗糖+0.5%酪蛋白 +1%TritonX-100+ 20mM 磷酸盐缓冲液 (PH6.5)	0.5%酪蛋白+2% 小牛血清 +1%Tween-20+20 mM 磷酸盐缓冲液 (PH7.4)
标记抗体稀释比例	1: 800	1:2000	1: 800	1:2000
灵敏度	0.15625ng/mL	0.625ng/mL	0.15625ng/mL	0.15625ng/mL
阴性 OD 值	0.1250	0.0620	0.1783	0.0616
回收率范围	66%~90%	83%~207%	36%~58%	44%~88%

[0160] 实施例6. 抗人组织激肽释放酶1的胶体金免疫检测卡的制备

[0161] 1. 胶体金的标记

[0162] 抗体A32的胶体金标记:用K₂CO₃调节胶体金pH值(每1ml胶体金中加入5uL 0.2M K₂CO₃),向胶体金溶液中缓慢加入以0.2M的PBS稀释的抗体A32(每1ml胶体金中加入30ug抗体A32),低速搅拌30分钟;加入封闭液(1%BSA)至其终浓度为10%(质量百分比),搅拌20分钟;静置30min后12000rpm离心30min;去上清用金标抗体复溶液0.01M PB PH7.4+1%BSA+0.025%Tween 20+5%蔗糖)复溶即得胶体金标记的A32抗体。

[0163] 2. 金标垫及反应膜制备

[0164] 将A32金标抗体稀释好后,喷涂在金标垫6上,干燥备用;将抗体A24和抗His标签抗体分别用包被抗体稀释液(3%甲醇+25mM PBS缓冲液(pH7.5))稀释好后,分别包被在反应膜2(硝酸纤维素膜)的T线5,C线4位置,干燥后备用。

[0165] 3. 贴膜、切膜、组装

[0166] 将样品垫1、金标垫6、包被有抗体的硝酸纤维素膜2、吸水垫3从左至右依次设置(如图9所示),且两两之间应少许接触,所述包被有抗体的硝酸纤维素膜的T线5在左、C线4在右,并根据外壳大小进行切割,装入外壳,完成检测卡制备。

[0167] 4. 试剂盒组装

[0168] 将组装好的检测卡,干燥剂,滴管装入铝箔袋中,热封机封口,贴标签。

[0169] 5. 抗人组织激肽释放酶1的胶体金免疫检测卡的使用方法

[0170] 1) 样本稀释液(10mM PH7.4的PB缓冲液)恢复至室温,震荡混匀备用;

[0171] 2) 检测样本稀释:在洁净的离心管加入1mL样本稀释液,再精确吸取10uL血清/血浆样本,加入到离心管中,振荡充分混匀。

[0172] 3) 加样及判读:用移液枪吸取50uL稀释后的样本慢慢加入加样孔中,开始计时,10~15分钟内将检测卡放置在读数仪上进行检测,仪器将对检测卡进行扫描,并将结果显示在读数仪的屏幕上。超过15min判定,结果无效。

[0173] 6. 抗人组织激肽释放酶1的胶体金免疫检测卡检测效果评估

[0174] 1) 线性范围检测

[0175] 测定不同浓度的标准品(0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16ng/ml),绘制标准曲线,线性检测范围,结果如附图10所示。检测卡灵敏度为0.125ng/ml。

[0176] 2) 重复性检测

[0177] 同一批次检测卡对1ng/ml、4ng/ml样本进行重复检测10次,计算变异系数CV,

[0178] $CV = \text{标准差SD} / \text{平均数M} \times 100\%$

[0179]

浓度 (ng/ml)	1	4
CV	5.4%	8.9%

[0180] 3) 准确度检测(添加回收率)

[0181] 用于评估该检测试剂盒准确测定加入纯分析物的能力。将混合血清分为体积相同的3份,在其中2份中加入标准品,制成5ng/ml,1.25ng/ml浓度的回收样本,在另一份样本中加入同样量的无被测物的PH7.4的PB缓冲液,制成基础样本。

[0182]

浓度 (ng/ml)	1.25	5
回收率	92.3%	89%

[0183] 7.除上述最优制备方式外,本发明还尝试了多种制备方案,例如下表的4种制备例:

[0184]

参数	制备例 2	制备例 3	制备例 4	制备例 5
封闭液	1%BSA	10%BSA	10%BSA	10%BSA
金标抗体复溶液	1%BSA+5%蔗糖 +0.025%吐温 20+100mM PB 缓冲液 (pH7.4)	0.1%BSA+5%蔗糖 +0.025%吐温 20+100mM PB 缓冲液 (pH7.4)	1%BSA+5%蔗糖 +0.025%吐温 20+100mM PB 缓冲液 (pH7.4)	1%BSA+5%蔗糖 +0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
包被抗	3%甲醇+25mM PBS	3%甲醇+25mM PBS	0.3%甲醇+25mM	3%甲醇+25mM PBS

[0185]

体稀释液	缓冲液 (pH7.5)	缓冲液 (pH7.5)	PBS 缓冲液 (pH7.5)	缓冲液 (pH7.5)
样本稀释液	0.1%BSA+10mM PB 缓冲液 (pH7.4)	0.1%BSA + 10mM PB 缓冲液 (pH7.4)	0.1%BSA + 10mM PB 缓冲液 (pH7.4)	0.1%BSA + 50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
灵敏度	1ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml

[0186] 实施例7.人组织激肽释放酶1的时间分辨荧光免疫检测卡的制备

[0187] 本检测方法采用双抗体夹心免疫层析法的原理。

[0188] 1、溶液配制

[0189] 0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液制备:取0.1mol/L的 H_3BO_3 70ml,用0.025mol/L的 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 调节pH至8.0,并定容至100ml,置于4℃备用,有效期3个月。

[0190] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,购自SIGMA公司)溶液制备:1.5gEDC加入100ml去离子水,配成水溶液置于4℃备用,有效期3个月。

[0191] 封闭液的制备:含10%BSA(所述百分比均为质量体积比),0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,用0.22um滤膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0192] 荧光抗体稀释液制备:含1%BSA,10%蔗糖,0.025%吐温-20,0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,用0.22um膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0193] 包被抗体稀释液制备:含1%蔗糖,3%甲醇0.025mol/L pH7.5的PBS,用0.22U膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0194] 样本稀释液:含0.1%BSA,0.025%吐温-20,0.01%安替比林,0.02%proclin300,0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,10-30℃保存有效期1年。

[0195] 2、人组织激肽释放酶1荧光检测卡制备

[0196] 1)时间分辨荧光微球标记

[0197] A32抗体标记方法如下(以500uL反应体系为例):加400uL硼酸缓冲液于2ml离心管中,加入100uL浓度1%粒径200nm的空载荧光微球(购自Thermo公司),漩涡振荡混匀。再加入10uLEDC溶液,室温振荡15min。14000rpm 10℃离心10min,去上清,沉淀用0.5ml硼酸缓冲液溶解,超声分散,功率100W,时间1min(超声3s间隔3s)。

[0198] 活化后的微球中加入浓度1mg/ml的A32抗体50uL,250r/min20℃恒温震荡反应2h;加入55uL封闭液,恒温震荡反应4h。14000rpm 10℃离心15min,洗涤2次,去上清,沉淀用0.5ml硼酸缓冲液溶解,最后一次离心后沉淀用荧光抗体稀释液溶解并超声分散,置于4℃恒温保存。

[0199] 2)荧光结合垫的喷点

[0200] A32抗体荧光结合垫喷点方法如下：用荧光抗体稀释液将上述制备的A32荧光抗体稀释20倍，喷点于整条结合垫上。

[0201] 3) 硝酸纤维素膜的包被

[0202] 硝酸纤维素膜包被方法如下：取0.5ml浓度4mg/ml的A24抗体，加到5ml刻度离心管中，加包被抗体稀释液至1ml，包被于硝酸纤维素膜2的T线5位置。取0.5ml浓度为4mg/ml抗HIS抗体，加到离心管中，加包被抗体稀释液至1ml，包被于硝酸纤维素膜2的C线4位置。

[0203] 4) 贴膜、切条、装卡

[0204] 样品垫1、荧光结合垫6、包被有A24抗体的硝酸纤维素膜(反应膜)2、将吸水垫3从左至右依次设置，且两两之间少许接触，所述硝酸纤维素膜的T线5在左、C线4在右(如附图9所示)，并根据卡壳大小进行切割，装入卡壳，完成检测卡制备。

[0205] 5) 试剂盒组装

[0206] 取铝箔袋和干燥剂；打开热封机，预热；将检测卡、干燥剂装入铝箔袋中；用热封机封好铝箔袋；贴上标签。

[0207] 同时，申请人也采用A24抗体做荧光标记、采用A32抗体包被在硝酸纤维素膜(反应膜)2T线处，其余步骤、参数不变，进行荧光检测卡制备。

[0208] 3、人组织激肽释放酶1荧光检测卡的使用方法

[0209] 1) 稀释待测样本：在洁净的离心管加入1mL样本稀释液，再精确吸取10 μ L血清/血浆样本，加入到离心管中，振荡充分混匀。

[0210] 2) 加样及判读：用移液枪吸取50 μ L稀释后的样本慢慢加入加样孔中，开始计时，10~15分钟内用荧光免疫层析仪定量判定结果。超过15分钟判定，结果无效。

[0211] 4、人组织激肽释放酶1荧光检测卡检测效果评估

[0212] 1) 精密性：将A32(包被)-A24(标记)检测卡检测0.25、1、4ng/ml的标准品各25次重复测定，剔除离群值后计算检测卡精密性。实验结果显示三个浓度检测结果变异系数CV<15%。

[0213]

浓度点 (ng/ml)	0.25	1	4
CV	14%	13%	9%

[0214] 将A24(包被)-A32(标记)检测卡重复上述实验，结果如下表，

[0215]

浓度点 (ng/ml)	0.25	1	4
CV	18%	16%	14%

[0216] 2) 检测线性：将A32(包被)-A24(标记)检测卡检测不同浓度的标准品：0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、32ng/ml，标准曲线及线性关系(如附图11)。检测卡检测灵敏度为0.0625ng/ml。

[0217] A24(包被)-A32(标记)检测卡灵敏度为0.0625ng/ml。

[0218] 3) 准确度—回收率：将A32(包被)-A24(标记)检测卡检测添加量分别为1、5、20ng/ml的标准品，检测结果如下表。

[0219]

浓度点 (ng/ml)	1	5	20
-------------	---	---	----

回收率	112%	94%	104%
-----	------	-----	------

[0220] 将A24(包被)-A32(标记)检测卡重复上述实验,结果如下表,

[0221]

浓度点 (ng/ml)	1	5	20
回收率	116%	108%	89%

[0222] 5、准确度方法学比对:

[0223] 上述结果显示A32(包被)-A24(标记)的检测卡性能较优,因此将其作方法学比对验证。选择20份临床病人标本,按1到20的顺序编号,用ELISA(实施例5制备)和荧光检测法同时进行实验,按照1,2,3,.....18,19,20,20,19,18,.....3,2,1的样本顺序进行测定。ELISA和荧光检测法检测结果的相关系数 $R^2=0.98$,说明荧光检测法与ELISA检测结果有较好的相关性(如附图12)。

[0224] 6、配方的对比:

[0225] 除上述最优制备例1外,申请人还尝试多种制备方案,例如下面5组检测卡制备及应用结果如下表:

[0226]

参数	制备例 2	制备例 3	制备例 4	制备例 5
封闭液	1%BSA+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	10%BSA+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	10%BSA+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	10%BSA+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
荧光抗体稀释液	1%BSA+10%蔗糖+0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.1%BSA+1%蔗糖+0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	1%BSA+10%蔗糖+0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	1%BSA+10%蔗糖+0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
包被抗体稀释液	3%甲醇+1%蔗糖+0.025%吐温 20+25mM PBS 缓冲液 (pH7.5)	3%甲醇+1%蔗糖+0.025%吐温 20+25mM PBS 缓冲液 (pH7.5)	0.3%甲醇+0.1%蔗糖+0.025%吐温 20+25mM PBS 缓冲液 (pH7.5)	3%甲醇+1%蔗糖+0.025%吐温 20+25mM PBS 缓冲液 (pH7.5)
样本稀释液	0.1%BSA+0.01%安替比林+0.025%吐温 20+0.02%proclin 300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.1%BSA+0.01%安替比林+0.025%吐温 20+0.02%proclin 300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.1%BSA+0.01%安替比林+0.025%吐温 20+0.02%proclin 300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.025%吐温 20+0.02%proclin300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
精密性	14-18%	18-32%	17-20%	25-30%
灵敏度	0.5ng/ml	0.125ng/ml	0.125ng/ml	0.0625ng/ml

[0227] 在此说明书中,本发明已参照其特定的实施例作了描述。但是,很显然仍可以作出各种修改和变换而不背离本发明的精神和范围。因此,说明书和附图应被认为是说明性的而非限制性的。

<213> Mouse

 <400> 4

 Ser Ser Val Asn Tyr
 1 5

 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 5

 Ala Thr Ser
 1

 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mouse
 [0002]

 <400> 6

 Gln Gln Trp Asn Ser Lys Ser Tyr Thr
 1 5

 <210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mouse

 <400> 7

 Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

<213> Mouse

<400> 10

Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser
1 5

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Ala Asn Leu Arg Leu Leu Ser Pro Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

[0004] <213> Mouse

<400> 12

Ser Ser Val Ser Phe
1 5

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Asp Thr Ser
1

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Ile Pro Leu Thr
1 5

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Phe Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Val Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Asn Leu Arg Leu Leu Ser Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ala
115

[0005]

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 16

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Met Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Ile Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Ile Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 17
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Pichia pastoris*

<400> 17

[0006]

Gln Phe Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Phe Thr Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Ser Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Arg Ser Trp Asp Val Lys Arg Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Leu Ile Leu Ser Gln Ser
 130 135 140
 Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys
 145 150 155 160
 Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 165 170 175
 Gly Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile His Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 Gln Gln Trp Asn Ser Lys Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg His His His His His His

[0008]

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 19

```

cagttccaat tggttcaate cgggccagag ttgaagaaac caggtgagac tgtaagatc 060
tctgtgaaga cttccgggta cactttcact aactacgggt ttaactgggt taagcagtcc 120
ccaggtcaag gtttgaaatg gatgggttgg atcaacacat tcaactgggt gccaatctac 180
gctgacgact tcaagggtag attcgcttcc tccttgaaa cttccgcttc cactgcttac 240
ttgcagatca acaacttgaa gaacgaggac actgcttcct acttttgtgc taagttgaga 300
tcttgggacg ttaagagagc ttacttcgac tactgggggc aggggtactac tttgactggt 360
tctgctgggt gtgggtggatc aggtgggtgg ggttctgggt gtgggtggatc tcaattgatt 420
ttgtcccagt cccctgctat cttgtctgct tctccagggt aaagagttac tatgacttgt 480
agagctactt cctccgtaa ctacatgaac tggatcagc agaagtccgg tacttcccca 540
aagccatgga ttcacgctac ttctaacttg gcttctgggt ttccagctag attctctgggt 600
tctggatctg gtacttcta ctcttgact atctcaagag ttgaggctga agatgctgct 660
acttactact gtcaacagtg gaactccaag tctacactt tcggtggtgg tactaagttg 720
gagattaaga gacaccatca tcaccaccac taatag 756

```

<210> 20

<211> 744

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 20

```

gaagttcaat tgcaacagtc cgggtgctgaa ttcgttaagc caggtgcttc tgtaagttg 060
tctgtactg cttccgggtt caacatcaag gacacttaca tgcactgggt taagcaaaga 120
ccagagcaag gtttgagatg gatcggtaga gttgatccag ctaacggtaa ctccaactac 180
gacccaaagt tccagggtaa ggctactatt actgctgaca ctctctcaa cactgcttac 240
ttgcaattgt cctccttgac ttccgaggac actgctgttt acttttgtgc taacttgaga 300
ttgttgtecc caatggacta ctgggggtcaa ggtacttccg ttactgttcc tgctgggtgga 360
ggtggatcag gtgggtgggtg ttctgggtgg ggtggatctc aaatcgtttt gacacagtcc 420
ccagctatca tgtctgcttc tccagggtgag aaggttacta tgacttgctc tgcttctcc 480
tccgtttcct ttatgactg gtatcaacag aagtcgggtc ctcccctaa gagatggatg 540
tacgatactt ccaagttggc ttccgggtgt ccagctagat tttctggctc tggatccgga 600
acttctact ccttgacaat ttcttccatc gaggctgaag atgctgctac ttactactgt 660
caacagtggg cctccatccc attgactttt ggtgctggta ctaagttgga gatcaagaga 720
caccaccatc accaccacta atag 744

```

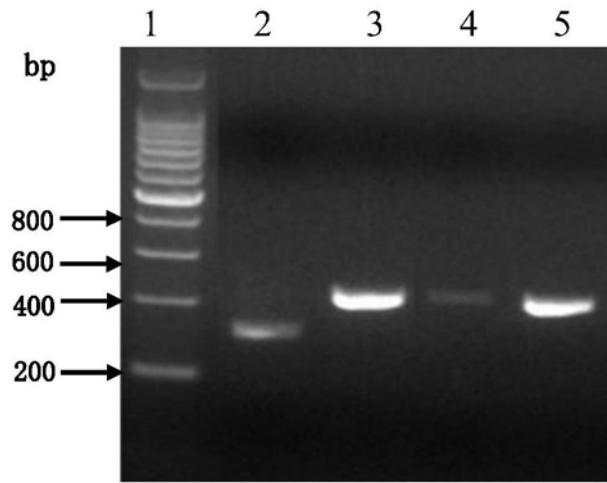


图1



图2

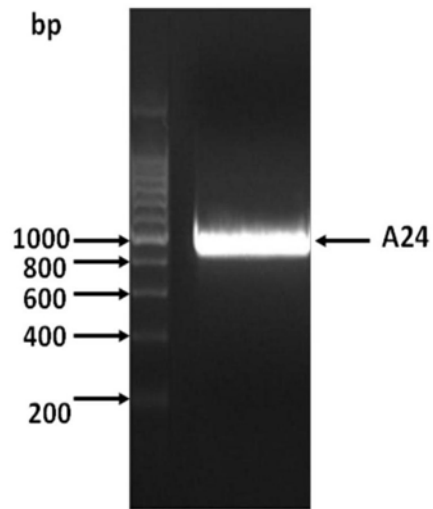


图3 (a)

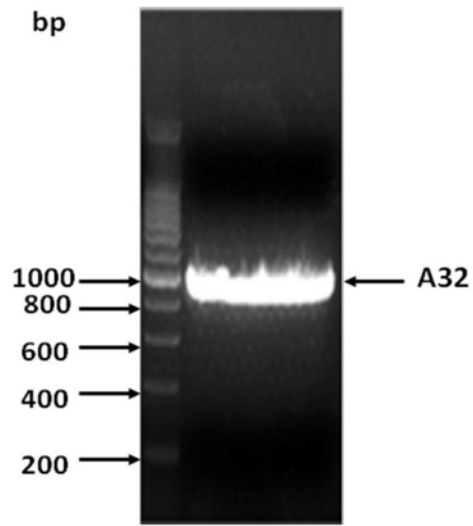


图3 (b)

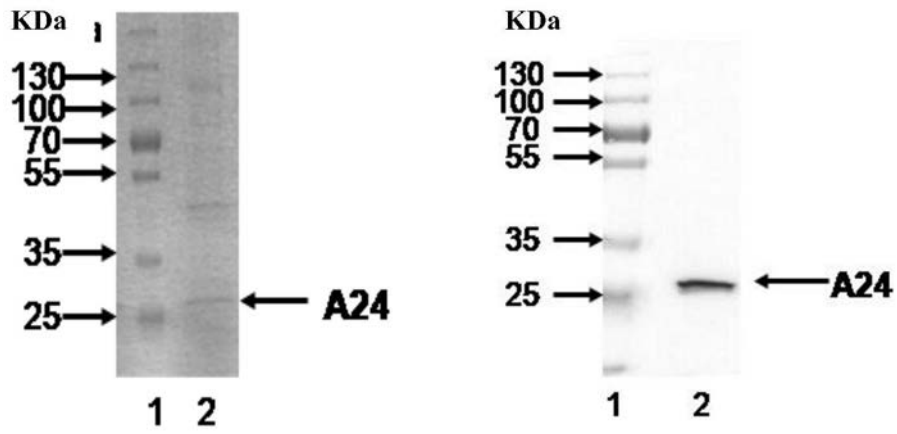


图4 (a)

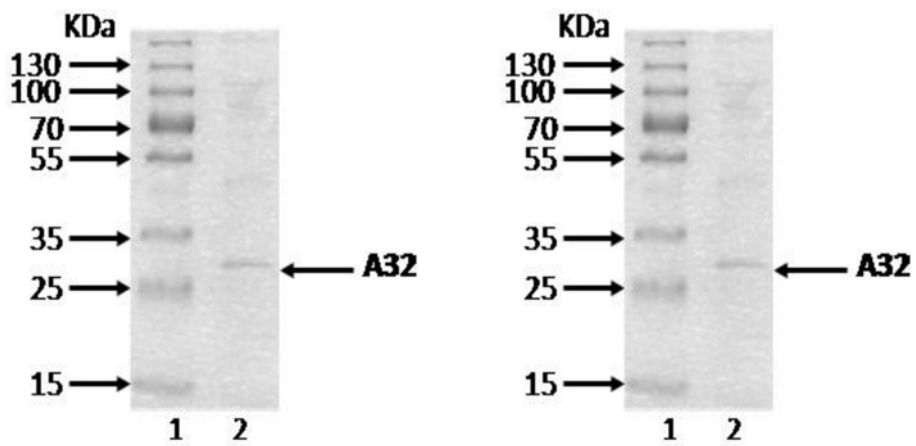


图4 (b)

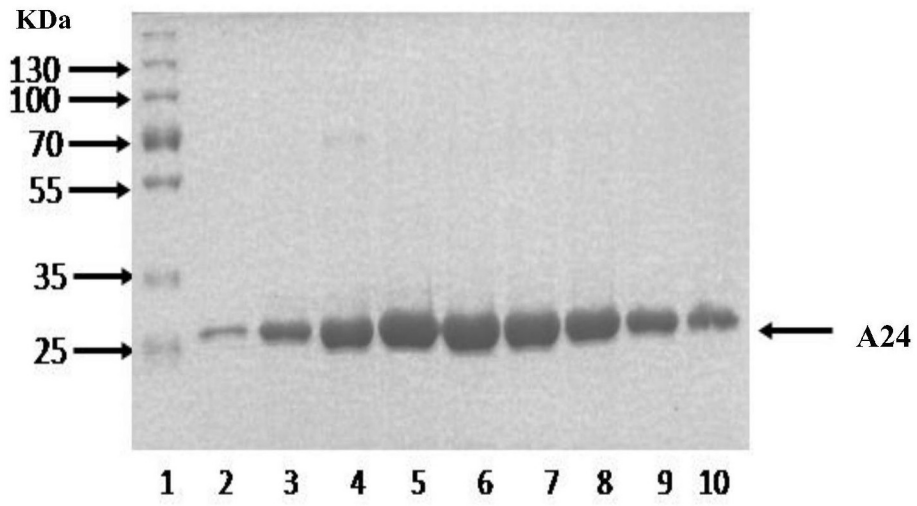


图5 (a)

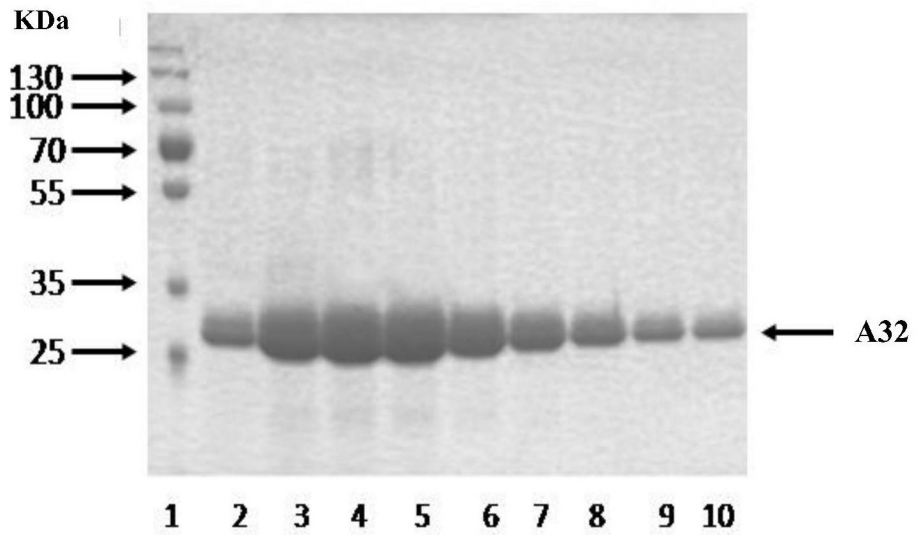


图5 (b)

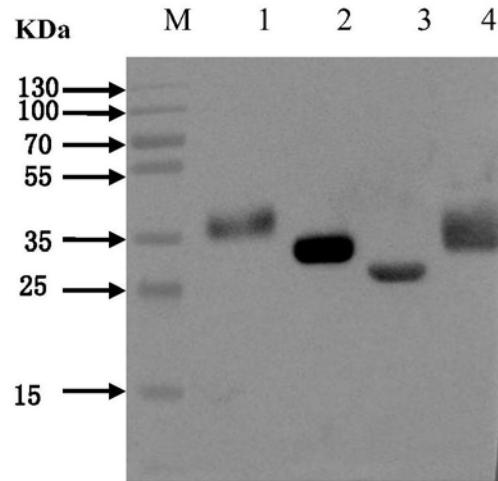


图6 (a)

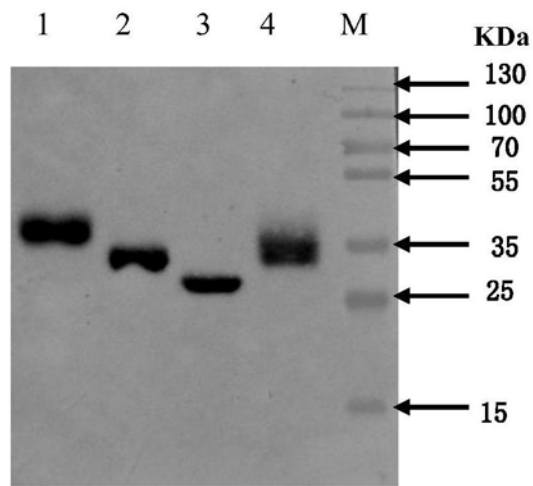
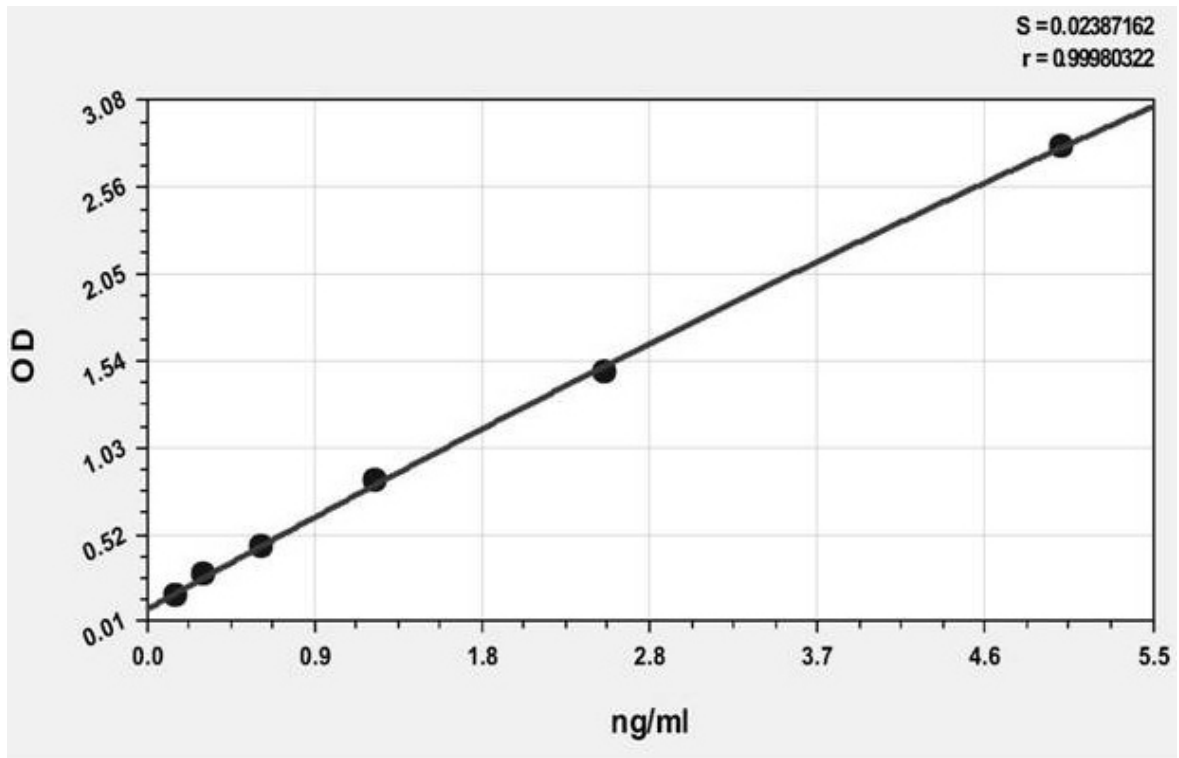


图6 (b)



Exponential Association (3): $y=a(b-\exp(-cx))$
Coefficient Data: $a = 14.688297$; $b = 1.005775$; $c = 0.040713579$

图7

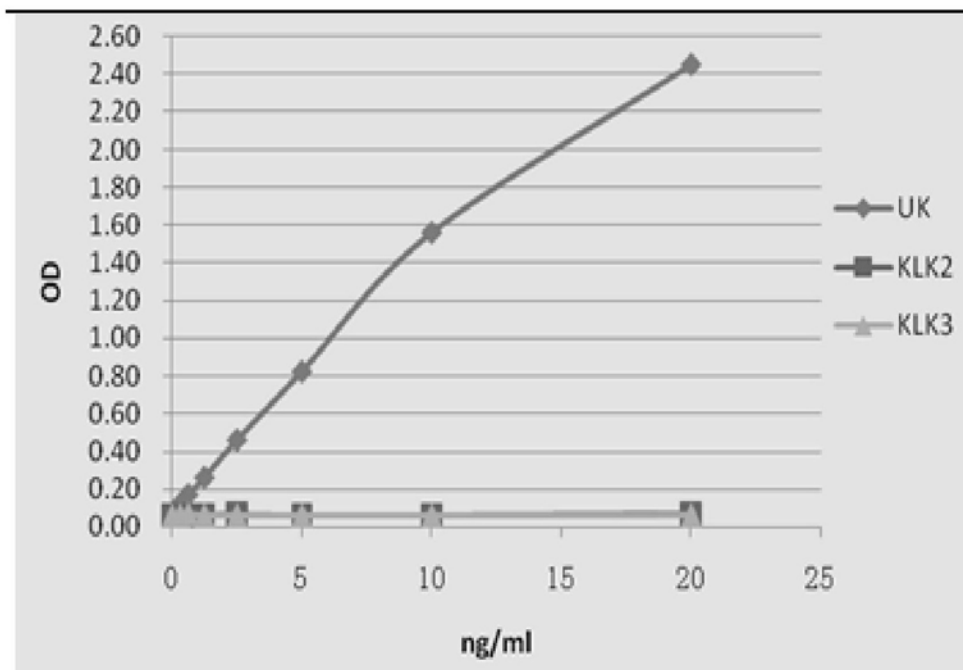


图8

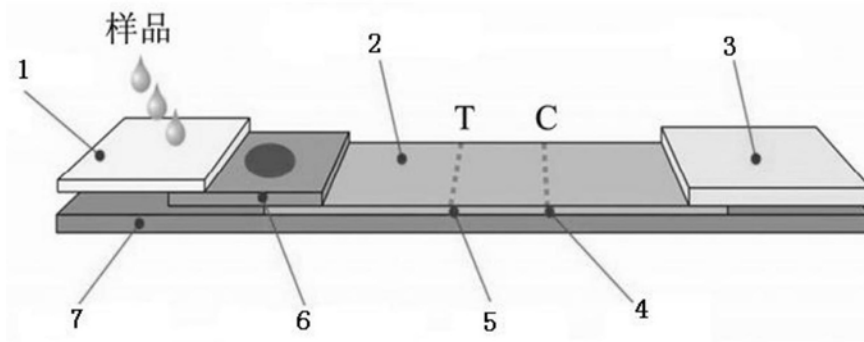


图9

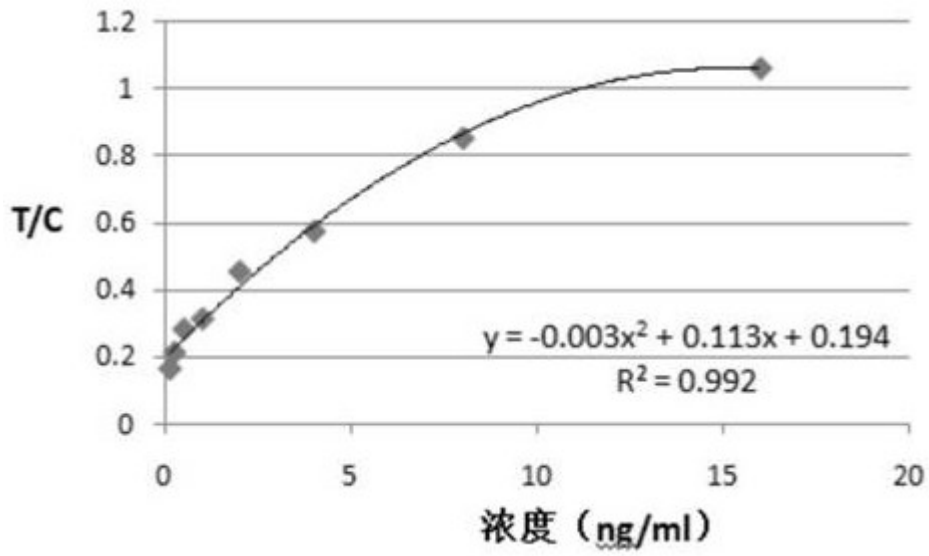


图10

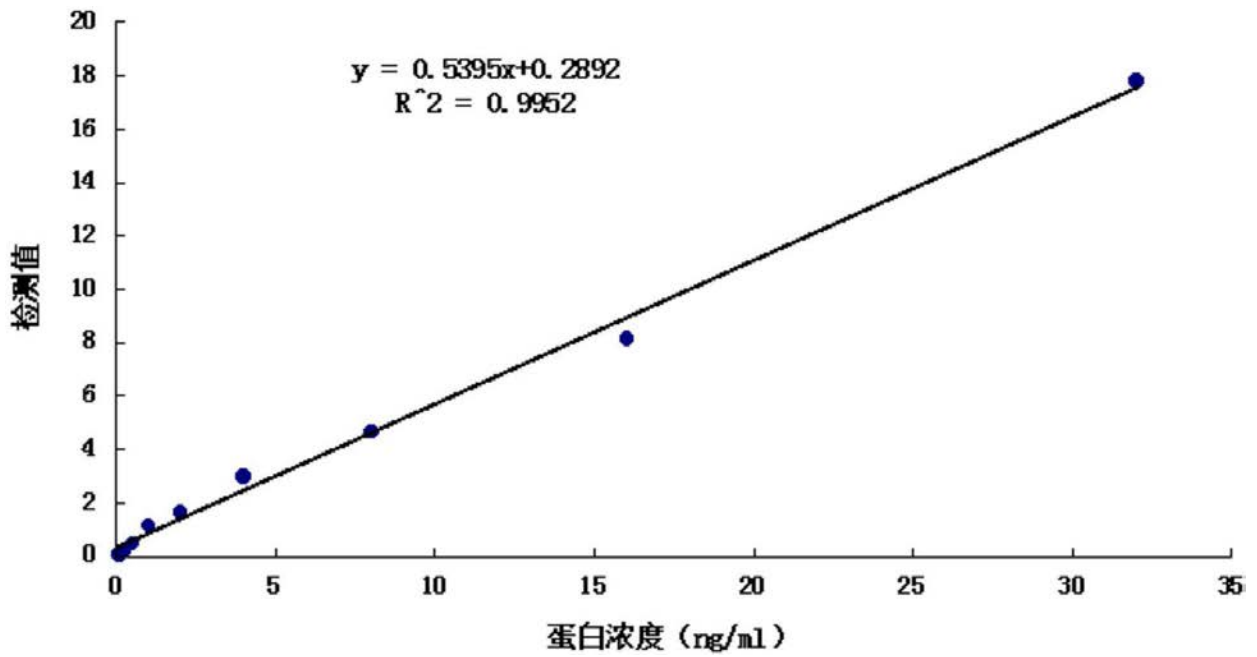


图11

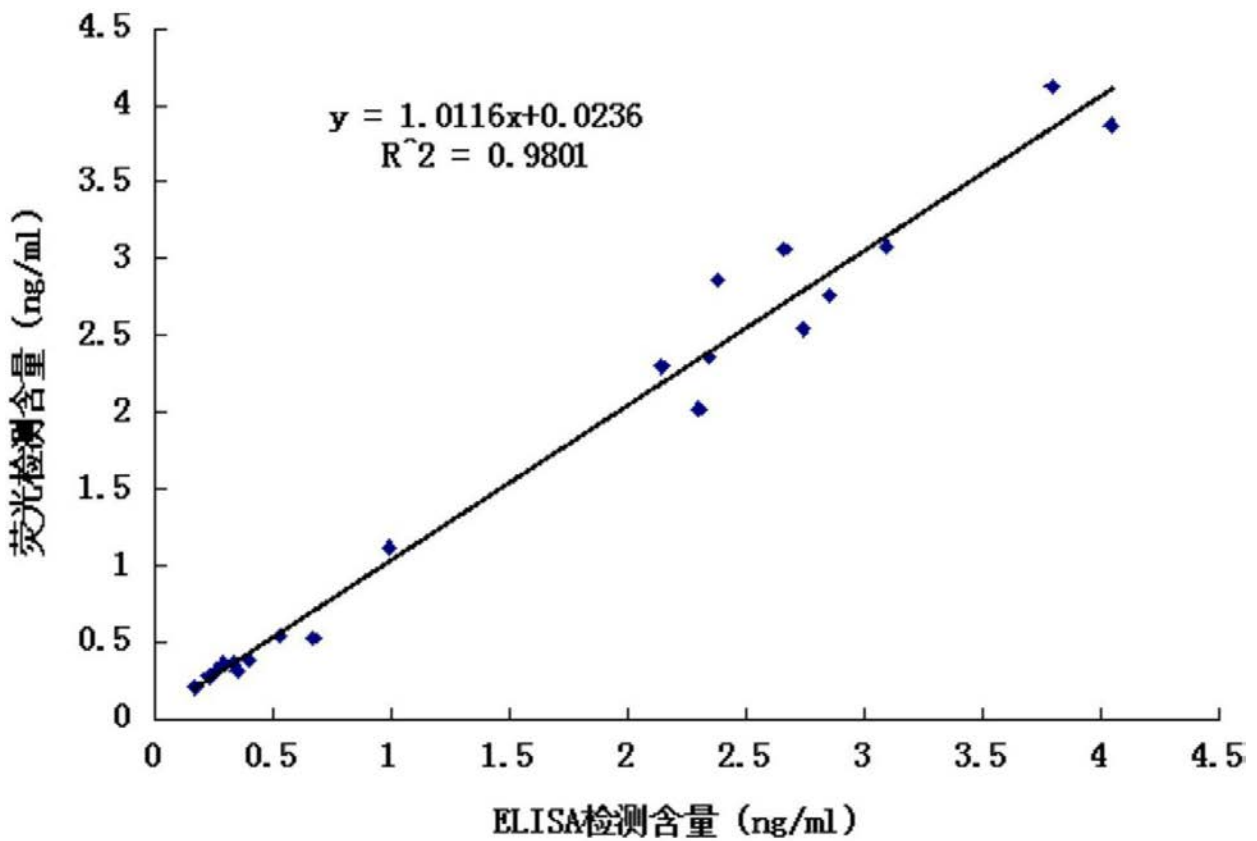


图12

专利名称(译)	人组织激肽释放酶1荧光定量检测试纸卡		
公开(公告)号	CN105987997B	公开(公告)日	2017-12-29
申请号	CN201510050985.3	申请日	2015-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	江苏众红生物工程创药研究院有限公司 常州京森生物医药研究所有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏众红生物工程创药研究院有限公司 常州京森生物医药研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏众红生物工程创药研究院有限公司		
[标]发明人	马永 时振华 高云霞 丁娜 徐春林 陈一飞		
发明人	马永 时振华 高云霞 丁娜 徐春林 陈一飞		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/533		
其他公开文献	CN105987997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测人组织激肽释放酶1(hK1)荧光定量检测试纸卡及其相关抗体。本发明制备了多种单克隆抗体，并进行配对筛选，获得灵敏度及特异性均能满足需求的抗体组合(A24及A32)；同时其方便大量生产，可满足日后大规模临床应用的需求。对上述抗体组合进行检测体系的调试优化工作，获得操作简便，灵敏度，特异性及相关检测性能都较好的人组织激肽释放酶1的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

