



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107192817 B

(45)授权公告日 2018.04.24

(21)申请号 201710364877.2

G01N 33/553(2006.01)

(22)申请日 2017.05.22

G01N 33/532(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107192817 A

G01N 33/531(2006.01)

(43)申请公布日 2017.09.22

(73)专利权人 广州华弘生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业

开发区科学城伴河路84号自编二栋

101

(72)发明人 陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥

母润红 王涛 苏焱

(74)专利代理机构 广州胜沃园专利代理有限公司

44416

代理人 张帅

(56)对比文件

CN 102565405 A,2012.07.11,权利要求1-9,说明书第2-78段.

CN 101419234 A,2009.04.29,全文.

CN 103364567 A,2013.10.23,全文.

CN 106366195 A,2017.02.01,全文.

WO 2015172128 A1,2015.11.12,全文.

CN 105579471 A,2016.05.11,全文.

马薇等.PD\_L1和PD\_1在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义.《实用医学杂志》.2011,第27卷(第9期),第1551-1554页.

审查员 周洋

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页

(54)发明名称

一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明属于医学检验技术领域,具体涉及一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法。本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒包括发光底物溶液I,发光底物溶液II,浓缩洗涤液,PD-L1标准品,PD-L1质控品,抗体吡啶酯标记物和磁珠免疫复合物。本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有检测时间短、用量少、高效、灵敏度高、特异性强、稳定的重复性和可靠性等优点。

1. 一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括发光底物溶液 I,发光底物溶液 II,浓缩洗涤液,PD-L1标准品,PD-L1质控品,抗体吡啶酯标记物和磁珠免疫复合物;

所述抗体吡啶酯标记物的制备包括以下步骤:

1.1 取PD-L1单克隆抗体,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL,得溶液A;

1.2 取吡啶酯,加入二甲基甲酰胺使吡啶酯的浓度至2mg/mL,得溶液B;

1.3 将步骤1.2所得溶液B加入到步骤1.1所得溶液A中,吡啶酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为14~22:1,室温反应,反应时间为25~50min,得反应液;

1.4 将步骤1.3所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h,加入与上述反应液等体积的甘油,置-25℃保存,即得;

所述磁珠免疫复合物的制备包括以下步骤:

取100μL浓度为10mg/mL的链霉亲和素磁珠,用250μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,加入50μL生物素化PD-L1单克隆抗体,置于37℃恒温气浴摇床中振荡,振荡速度为100r/min,12~16min后取出,用200μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,然后,重新置于上述恒温气浴摇床中,加入1mL含体积分数为2%BSA的pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液进行封闭反应,封闭反应时间为15~22min,取出,磁性分离,去上清,用200μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,加入pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液配成1mg/mL的磁珠免疫复合物,置于4℃避光保存,即得;

其中,浓缩洗涤液的制备方法为:向pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20,使Tween-20的体积分数为5%;

所述链霉亲和素磁珠的制备包括以下步骤:

2.1 配制pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液,灭菌,灭菌温度为120℃,灭菌时间为18min,将1mg的链霉亲和素溶于1mL上述磷酸盐缓冲液中,得链霉亲和素溶液,取400μL链霉亲和素溶液装于EP管中;

2.2 取5mL修饰的壳聚糖磁性微球,加入4.5mL戊二醛,室温震荡反应,反应时间为4h,进行磁分离,用水清洗除去多余的戊二醛后,将磁性微球重新悬浮在5mL pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中,得磁性微球液;

2.3 将步骤2.2所得磁性微球液加入到步骤2.1装有400μL链霉亲和素溶液的EP管中,室温震荡培养4h,磁分离,得固体物,将所得固体物分散在10mL pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中,使固体物的浓度为10mg/mL,得链霉亲和素磁珠;

步骤2.2所述的修饰的壳聚糖磁性微球的制备包括以下步骤:

3.1 称取4.02g无水乙酸钠,加入2.9mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入去离子水稀释至500mL,得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液;

3.2 称取2.5g壳聚糖,加入1.5mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入250mL去离子水以及250mL步骤3.1所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液,摇匀,得壳聚糖乙酸缓冲液;

3.3 称取4.7g硫酸亚铁铵和9.67g硫酸铁铵,研磨混匀,加入250mL步骤3.1所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液以及100mL步骤3.2所得壳聚糖乙酸缓冲液,混合均匀,得混合液;

3.4在氮气保护的密闭体系环境下,向三颈瓶中加入100mL浓度为6M的氢氧化钠溶液,搅拌,加热升温至60℃,平均分三次加入步骤3.3所得混合液,每次加入的时间间隔为30分钟,加完后维持反应45min,用去离子水反复洗涤所得产物,直至上层液体变澄清,用试剂AgNO<sub>3</sub>检查硫酸根离子至无沉淀为止,磁分离,得固体产物,将所得固体产物冷冻干燥得壳聚糖磁性纳米粒子;

3.5取0.5g步骤3.4所得壳聚糖磁性纳米粒子,加入10mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液,超声分散,得内水相,称取0.6g甲氧基聚乙二醇-聚乳酸溶于15mL二氯甲烷中,得油相,将上述内水相和油相混合,超声乳化,超声乳化时间为16min,得复乳;

3.6将步骤3.5所得复乳加入到20mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液中,均质乳化,均质乳化速度为6000r/min,均质乳化时间为18min,将二氯甲烷挥发完全,得产物,将所得产物用去离子水反复洗涤,磁分离,得固体产物,向所得固体物中加入pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液,使固体产物的浓度为20mg/mL,得修饰的壳聚糖磁性微球;

所述生物素化PD-L1单克隆抗体的制备包括以下步骤:

4.1取PD-L1单克隆抗体,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL,得溶液A;

4.2将生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶于二甲基甲酰胺中,生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1:1:1.2,于50℃水浴中磁力搅拌反应,反应时间为12h,滤去反应液中生成的白色沉淀二环己基脒,收集滤液,加入乙醚至沉淀不再增加,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,得活性生物素酯粗品,将上述活性生物素酯粗品用热异丙醇溶解,置于冰浴中,放置时间为3h,过滤收集结晶,用二甲基甲酰胺溶解后加入乙醚,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,真空干燥,得活性生物素酯;

4.3向步骤4.1所得溶液A中加入步骤4.2所得活性生物素酯,活性生物素酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为11~14:1,室温反应,反应时间为35~50min,得反应液;

4.4 将步骤4.3所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h,加入与上述反应液等体积的甘油,置-25℃保存,即得。

2.如权利要求1所述的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,其特征在于,所述发光底物液I的制备方法为:用双蒸水和硝酸配制成浓度为0.1M的稀硝酸溶液,加入过氧化氢,使过氧化氢的浓度为0.08M;所述发光底物液II的制备方法为:用双蒸水和氢氧化钠配制成浓度为0.2M的氢氧化钠溶液,加入TritonX-100,使TritonX-100的质量浓度为2%;浓缩洗涤液的制备方法为:向pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20,使Tween-20的体积分数为5%。

3.如权利要求1所述的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,其特征在于,所述PD-L1标准品的制备包括以下步骤:用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4,浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液,将PD-L1配制成浓度分别为100pg/mL、250pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL、3000pg/mL、5000pg/mL的标准液,即得。

4.如权利要求1所述的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,其特征在于,所述PD-L1质控品的制备包括以下步骤:用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4,浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液,将PD-L1配制成浓度分别为1500pg/mL、4000pg/mL的溶液,即

得。

## 一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验技术领域,具体涉及一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0002] PD-1全称程序性死亡受体1,英文名字为programmed death 1,是一种重要的免疫抑制分子,为CD28超家族成员。以PD-1为靶点的免疫调节在抗肿瘤、抗感染、抗自身免疫性疾病及器官移植存活等方面均有重要的意义。其配体PD-L1也可作为靶点,相应的抗体也可以起到相同的作用。PD-L1全称程序性死亡-配体1,英文名字programmed cell death-Ligand 1,是大小为40kDa的第一型跨膜蛋白。正常情形下免疫系统会对聚集在淋巴结或脾脏的外来抗原产生反应,促进具有抗原特异性的T细胞增生。而程序性死亡受体1(PD-1)与程序性死亡-配体1(PD-L1)结合,可以传导抑制性的信号,减低T细胞的增生。肿瘤细胞逃避T细胞摧毁的一种途径是通过在它表面产生PD-L1,当免疫细胞T细胞表面的PD-1识别PD-L1后,可以传导抑制行信号,T细胞就不能发现肿瘤细胞和向肿瘤细胞发出攻击信号。

[0003] 中国专利申请CN105579471A提供了特异性结合人PD-L1的分离的抗体以及此类抗体的抗原结合片段,以及包含所述抗PD-L1抗体或结合片段和一组用于检测结合人PD-L1的所述抗体或其抗原结合片段的复合物的试剂的试剂盒。中国专利申请CN105274104A公开了一种预测抗PD-L1抗体药物药效的检测试剂盒,其中包括检测POLD蛋白和POLE蛋白纠正DNA合成错误的结构域对应的基因位点的引物及探针。

[0004] 癌症包括范围广泛的疾病,癌症的负面影响的严重性是深刻的,普遍影响到了医疗保险以及社会。由于多种类型的癌症标志是恶性细胞的快速和不受调控的增殖,因此改善针对癌症的方法的一个决定性难题是对早期检测和诊断的需求。PD-L1是一种在多种肿瘤细胞、抗原提呈细胞和其他免疫细胞中动态、广泛表达的标志物。临床实验研究表明,阻断PD-L1可以有效地治疗或抑制肿瘤生长。因此,临床上需要简便易行的检测手段筛选出肿瘤组织或细胞高度表达PD-L1的肿瘤患者,为个性化地进行阻断PD-L1的治疗提供指导和依据。而现有的用于检测PD-L1的试剂盒存在灵敏度较低,以及特异性不高等缺点。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法。本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有检测时间短、用量少、高效、灵敏度高、特异性强、稳定的重复性和可靠性等优点。

[0006] 本发明的技术方案是:

[0007] 一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,所述试剂盒包括发光底物溶液I,发光底物溶液II,浓缩洗涤液,PD-L1标准品,PD-L1质控品,抗体吡啶酯标记物和磁珠免疫复合物。

[0008] 所述发光底物液I的制备方法为:用双蒸水和硝酸配制成浓度为0.1M的稀硝酸溶液,加入过氧化氢,使过氧化氢的浓度为0.08M。

[0009] 所述发光底物液Ⅱ的制备方法为：用双蒸水和氢氧化钠配制成浓度为0.2M的氢氧化钠溶液，加入TritonX-100，使TritonX-100的质量浓度为2%。

[0010] 所述浓缩洗涤液的制备方法为：向pH为7.4，浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20，使Tween-20的体积分数为5%。

[0011] 所述PD-L1标准品的制备包括以下步骤：用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4，浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液，将PD-L1配制成浓度分别为100pg/mL、250pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL、3000pg/mL、5000pg/mL的标准液，即得。

[0012] 所述PD-L1质控品的制备包括以下步骤：用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4，浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液，将PD-L1配制成浓度分别为1500pg/mL、4000pg/mL的溶液，即得。

[0013] 所述抗体吡啶酯标记物的制备包括以下步骤：

[0014] (1) 取PD-L1单克隆抗体，用浓度为0.05mol/L，pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL，得溶液A；

[0015] (2) 取吡啶酯，加入二甲基甲酰胺使吡啶酯的浓度至2mg/mL，得溶液B；

[0016] (3) 将步骤(2)所得溶液B加入到步骤(1)所得溶液A中，吡啶酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为14~22:1，室温反应，反应时间为25~50min，得反应液；

[0017] (4) 将步骤(3)所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内，用浓度为0.05mol/L，pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h，加入与上述反应液等体积的甘油，置-25℃保存，即得。

[0018] 所述磁珠免疫复合物的制备包括以下步骤：

[0019] 取100μL浓度为10mg/mL的链霉亲和素磁珠，用250μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次，加入50μL生物素化PD-L1单克隆抗体，置于37℃恒温气浴摇床中振荡，振荡速度为100r/min，12~16min后取出，用200μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次，然后，重新置于上述恒温气浴摇床中，加入1mL含体积分数为2%BSA的pH为7.4，浓度为1M的磷酸盐缓冲液进行封闭反应，封闭反应时间为15~22min，取出，磁性分离，去上清，用200μL浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次，加入pH为7.4，浓度为1M的磷酸盐缓冲液配成1mg/mL的磁珠免疫复合物，置于4℃避光保存，即得；

[0020] 其中，所述浓缩洗涤液的制备方法为：向pH为7.4，浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20，使Tween-20的体积分数为5%。

[0021] 上述磁珠免疫复合物的制备中，所述链霉亲和素磁珠的制备包括以下步骤：

[0022] a. 配制pH为7.0，浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液，灭菌，灭菌温度为120℃，灭菌时间为18min，将1mg的链霉亲和素溶于1mL上述磷酸盐缓冲液中，得链霉亲和素溶液，取400μL链霉亲和素溶液装于EP管中；

[0023] b. 取5mL修饰的壳聚糖磁性微球，加入4.5mL戊二醛，室温震荡反应，反应时间为4h，进行磁分离，用水清洗除去多余的戊二醛后，将磁性微球重新悬浮在5mLpH为7.0，浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中，得磁性微球液；

[0024] c. 将步骤b所得磁性微球液加入到步骤a装有400μL链霉亲和素溶液的EP管中，室温震荡培养4h，磁分离，得固体物，将所得固体物分散在10mLpH为7.0，浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中，使固体物的浓度为10mg/mL，得链霉亲和素磁珠。

[0025] 上述链霉亲和素磁珠的制备中,步骤b所述修饰的壳聚糖磁性微球的制备包括以下步骤:

[0026] A称取4.02g无水乙酸钠,加入2.9mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入去离子水稀释至500mL,得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液;

[0027] B称取2.5g壳聚糖,加入1.5mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入250mL去离子水以及250mL步骤A所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液,摇匀,得壳聚糖乙酸缓冲液;

[0028] C称取4.7g硫酸亚铁铵和9.67g硫酸铁铵,研磨混匀,加入250mL步骤A所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液以及100mL步骤B所得壳聚糖乙酸缓冲液,混合均匀,得混合液;

[0029] D在氮气保护的密闭体系环境下,向三颈瓶中加入100mL浓度为6M的氢氧化钠溶液,搅拌,加热升温至60℃,平均分三次加入步骤C所得混合液,每次加入的时间间隔为30分钟,加完后维持反应45min,用去离子水反复洗涤所得产物,直至上层液体变澄清,用试剂AgNO<sub>3</sub>检查硫酸根离子至无沉淀为止,磁分离,得固体产物,将所得固体产物冷冻干燥得壳聚糖磁性纳米粒子;

[0030] E取0.5g步骤D所得壳聚糖磁性纳米粒子,加入10mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液,超声分散,得内水相,称取0.6g甲氧基聚乙二醇-聚乳酸溶于15mL二氯甲烷中,得油相,将上述内水相和油相混合,超声乳化,超声乳化时间为16min,得复乳;

[0031] F将步骤E所得复乳加入到20mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液中,均质乳化,均质乳化速度为6000r/min,均质乳化时间为18min,将二氯甲烷挥发完全,得产物,将所得产物用去离子水反复洗涤,磁分离,得固体产物,向所得固体物中加入pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液,使固体产物的浓度为20mg/mL,得修饰的壳聚糖磁性微球。

[0032] 上述磁珠免疫复合物的制备中,所述生物素化PD-L1单克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0033] I取PD-L1单克隆抗体,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL,得溶液A;

[0034] II将生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶于二甲基甲酰胺中,生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1:1:1.2,于50℃水浴中磁力搅拌反应,反应时间为12h,滤去反应液中生成的白色沉淀二环己基脲,收集滤液,加入乙醚至沉淀不再增加,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,得活性生物素酯粗品,将上述活性生物素酯粗品用热异丙醇溶解,置于冰浴中,放置时间为3h,过滤收集结晶,用二甲基甲酰胺溶解后加入乙醚,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,真空干燥,得活性生物素酯;

[0035] III向步骤I所得溶液A中加入步骤II所得活性生物素酯,活性生物素酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为11~14:1,室温反应,反应时间为35~50min,得反应液;

[0036] IV将步骤III所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内,用浓度为0.05mol/L,pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h,加入与上述反应液等体积的甘油,置-25℃保存,即得。

[0037] 另外,本发明还提供了所述用于检测PD-L1的快速检测试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0038] S1将待测样本进行预处理,取上清液,25℃平衡10分钟;

[0039] S2在每一平底试管中加入25μLPD-L1校准品、PD-L1质控品或待测样本,37℃温育

10分钟,加入25 $\mu$ L磁珠免疫复合物,混匀后,37 $^{\circ}$ C温育10分钟;

[0040] S3将平底试管在磁分离器上静置,静置时间为3分钟,去上清液,将平底试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍打3次,使孔中的液体完全除去,每一平底试管中加入200 $\mu$ L浓缩洗涤液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置,静置时间为3分钟,去上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干拍打3次,重复两次;

[0041] S4向平底试管中加入抗体吡啶酯标记物,抗体吡啶酯标记物的加入量为每平底试管50 $\mu$ L,混匀后置37 $^{\circ}$ C孵育15分钟;

[0042] S5重复步骤S3的操作;

[0043] S6向平底试管中加入发光底物溶液I,发光底物溶液I的加入量为每平底试管50 $\mu$ L,1S后加入发光底物溶液II,发光底物溶液II的加入量为每平底试管50 $\mu$ L;

[0044] S7用化学发光仪检测每管的发光值,根据各标准溶液发光值绘制标准曲线,即可得出待测样本中PD-L1的浓度。

[0045] 本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒的原理是:采用双抗体夹心法。本发明以链霉亲和素磁珠作为固相载体,通过链亲和素-生物素的亲和作用,将生物素标记的PD-L1单克隆抗体偶联在链霉亲和素磁珠表面,制备得到磁珠免疫复合物。利用连接于固相载体链霉亲和素磁珠上的生物素标记的PD-L1单克隆抗体,以及抗体吡啶酯标记物分别与样品中被检测抗原分子上两个抗原决定簇结合,形成固相抗体-抗原-抗体夹心复合物。由于反应系统中固相抗体和吡啶酯标记的抗体的量相对于待测抗原是过量的,因此复合物的形成量与待测抗原的含量成正比。测定复合物中的吡啶酯作用于加入的底物后的发光值,即可确定待测抗原含量。

[0046] 与现有技术相比,本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有以下优势:

[0047] (1) 本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有稳定的重复性和可靠性。

[0048] (2) 本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有高效、灵敏度高、特异性强的特点,不与其它可溶性结构类似物交叉反应。

[0049] (3) 本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒适用血清、血浆、组织匀浆液、细胞培养上清液、尿液等等多种标本类型。

[0050] (4) 本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒检测时间短、用量少。

[0051] (5) 在使用本发明试剂盒进行检测时,不需要用离心的方式对检测体系中多余的杂质进行分离,只需在外加磁场的作用下即可达到快速分离杂质和固相抗体-抗原-抗体复合物的目的,使复合物从复杂的环境中高效分离出来,达到分离特异性抗原的目的,另外,还能够减少环境对检测的干扰因素。

## 具体实施方式

[0052] 以下通过具体实施方式的描述对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制,本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0053] 本发明程序性死亡-配体1抗体可购自上海诚凛生物科技有限公司,货号CL-1103T,壳聚糖可购自上海联硕生物科技有限公司,货号448877,链霉亲和素可购自上海嵘崑达实业有限公司,货号21122,甲氧基聚乙二醇-聚乳酸可购自西安瑞禧生物科技有限公

司,货号32423,聚乙烯醇可购自上海美梦佳化工科技有限公司,货号2099,程序性死亡-配体1 (PD-L1)可购自杭州联科生物技术股份有限公司,货号70-EK1261S。

[0054] 实施例1、本发明用于检测PD-L1的快速检测试剂盒的组成与制备

[0055] 本发明所述的试剂盒包括以下组分:

[0056] (1) 发光底物溶液I; (2) 发光底物溶液II; (3) 浓缩洗涤液; (4) PD-L1标准品; (5) PD-L1质控品; (6) 抗体吡啶酯标记物和 (7) 磁珠免疫复合物。

[0057] 本发明试剂盒中各试剂的制备包括以下步骤:

[0058] (1) 发光底物溶液I的制备:

[0059] 制备方法:用双蒸水和硝酸配制成浓度为0.1M的稀硝酸溶液,加入过氧化氢,使过氧化氢的浓度为0.08M。

[0060] (2) 发光底物溶液II的制备:

[0061] 制备方法:用双蒸水和氢氧化钠配制成浓度为0.2M的氢氧化钠溶液,加入TritonX-100,使TritonX-100的质量浓度为2%。

[0062] (3) 浓缩洗涤液的制备:

[0063] 制备方法:向pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20,使Tween-20的体积分数为5%。

[0064] (4) PD-L1标准品的制备:

[0065] 制备方法:用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4,浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液,将PD-L1配制成浓度分别为100pg/mL、250pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL、2000pg/mL、3000pg/mL、5000pg/mL的标准液,即得。

[0066] (5) PD-L1质控品的制备:

[0067] 制备方法:用含有体积分数为1%BSA、体积分数为0.05%硫柳汞的pH为7.4,浓度为0.05M的磷酸盐缓冲液,将PD-L1配制成浓度分别为1500pg/mL、4000pg/mL的溶液,即得。

[0068] (6) 抗体吡啶酯标记物的制备:

[0069] 制备方法:

[0070] (1) 取PD-L1单克隆抗体,用浓度为0.05mol/L, pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL,得溶液A;

[0071] (2) 取吡啶酯,加入二甲基甲酰胺使吡啶酯的浓度至2mg/mL,得溶液B;

[0072] (3) 将步骤(2)所得溶液B加入到步骤(1)所得溶液A中,吡啶酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为14~22:1,室温反应,反应时间为25~50min,得反应液;

[0073] (4) 将步骤(3)所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内,用浓度为0.05mol/L, pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h,加入与上述反应液等体积的甘油,置-25℃保存,即得。

[0074] (7) 磁珠免疫复合物的制备:

[0075] ①修饰的壳聚糖磁性微球的制备:

[0076] A称取4.02g无水乙酸钠,加入2.9mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入去离子水稀释至500mL,得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液;

[0077] B称取2.5g壳聚糖,加入1.5mL冰醋酸,搅拌至完全溶解,加入250mL去离子水以及250mL步骤A所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液,摇匀,得壳聚糖乙酸缓冲液;

[0078] C称取4.7g硫酸亚铁铵和9.67g硫酸铁铵,研磨混匀,加入250mL步骤A所得浓度为0.1M的乙酸钠缓冲液以及100mL步骤B所得壳聚糖乙酸缓冲液,混合均匀,得混合液;

[0079] D在氮气保护的密闭体系环境下,向三颈瓶中加入100mL浓度为6M的氢氧化钠溶液,搅拌,加热升温至60℃,平均分三次加入步骤C所得混合液,每次加入的时间间隔为30分钟,加完后维持反应45min,用去离子水反复洗涤所得产物,直至上层液体变澄清,用试剂AgNO<sub>3</sub>检查硫酸根离子至无沉淀为止,磁分离,得固体产物,将所得固体产物冷冻干燥得壳聚糖磁性纳米粒子;

[0080] E取0.5g步骤D所得壳聚糖磁性纳米粒子,加入10mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液,超声分散,得内水相,称取0.6g甲氧基聚乙二醇-聚乳酸溶于15mL二氯甲烷中,得油相,将上述内水相和油相混合,超声乳化,超声乳化时间为16min,得复乳;

[0081] F将步骤E所得复乳加入到20mL质量浓度为0.1%的聚乙烯醇溶液中,均质乳化,均质乳化速度为6000r/min,均质乳化时间为18min,将二氯甲烷挥发完全,得产物,将所得产物用去离子水反复洗涤,磁分离,得固体产物,向所得固体物中加入pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液,使固体产物的浓度为20mg/mL,得修饰的壳聚糖磁性微球。

[0082] ②链霉亲和素磁珠的制备:

[0083] a. 配制pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液,灭菌,灭菌温度为120℃,灭菌时间为18min,将1mg的链霉亲和素溶于1mL上述磷酸盐缓冲液中,得链霉亲和素溶液,取400μL链霉亲和素溶液装于EP管中;

[0084] b. 取5mL修饰的壳聚糖磁性微球,加入4.5mL戊二醛,室温震荡反应,反应时间为4h,进行磁分离,用水清洗除去多余的戊二醛后,将磁性微球重新悬浮在5mL pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中,得磁性微球液;

[0085] c. 将步骤b所得磁性微球液加入到步骤a装有400μL链霉亲和素溶液的EP管中,室温震荡培养4h,磁分离,得固体物,将所得固体物分散在10mL pH为7.0,浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液中,使固体物的浓度为10mg/mL,得链霉亲和素磁珠。

[0086] ③生物素化PD-L1单克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0087] I取PD-L1单克隆抗体,用浓度为0.05mol/L, pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液调整PD-L1单克隆抗体的浓度为1mg/mL,得溶液A;

[0088] II将生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺溶于二甲基甲酰胺中,生物素、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1:1:1.2,于50℃水浴中磁力搅拌反应,反应时间为12h,滤去反应液中生成的白色沉淀二环己基脲,收集滤液,加入乙醚至沉淀不再增加,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,得活性生物素酯粗品,将上述活性生物素酯粗品用热异丙醇溶解,置于冰浴中,放置时间为3h,过滤收集结晶,用二甲基甲酰胺溶解后加入乙醚,置于冰浴中,放置时间为1h,过滤收集沉淀,真空干燥,得活性生物素酯;

[0089] III向步骤I所得溶液A中加入步骤II所得活性生物素酯,活性生物素酯与PD-L1单克隆抗体的摩尔比为11~14:1,室温反应,反应时间为35~50min,得反应液;

[0090] IV将步骤III所得反应液移至截留分子量为7500~95000的透析袋内,用浓度为0.05mol/L, pH为9.5的碳酸盐缓冲溶液透析24h,加入与上述反应液等体积的甘油,置-25℃保存,即得。

[0091] ④磁珠免疫复合物的制备:

[0092] 取100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的链霉亲和素磁珠,用250 $\mu$ L浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,加入50 $\mu$ L生物素化PD-L1单克隆抗体,置于37 $^{\circ}$ C恒温气浴摇床中振荡,振荡速度为100r/min,12~16min后取出,用200 $\mu$ L浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,然后,重新置于上述恒温气浴摇床中,加入1mL含体积分数为2%BSA的pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液进行封闭反应,封闭反应时间为15~22min,取出,磁性分离,去上清,用200 $\mu$ L浓缩洗涤液按照1:100稀释得到的溶液洗涤4次,加入pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液配成1mg/mL的磁珠免疫复合物,置于4 $^{\circ}$ C避光保存,即得;

[0093] 其中,所述浓缩洗涤液的制备方法为:向pH为7.4,浓度为1M的磷酸盐缓冲液中加入Tween-20,使Tween-20的体积分数为5%。

[0094] 实施例2、采用本发明用于检测PD-L1的快速检测试剂盒进行PD-L1检测

[0095] S1将待测样本进行预处理,取上清液,25 $^{\circ}$ C平衡10分钟;

[0096] S2在每一平底试管中加入25 $\mu$ L PD-L1校准品、PD-L1质控品或待测样本,37 $^{\circ}$ C温育10分钟,加入25 $\mu$ L磁珠免疫复合物,混匀后,37 $^{\circ}$ C温育10分钟;

[0097] S3将平底试管在磁分离器上静置,静置时间为3分钟,去上清液,将平底试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍打3次,使孔中的液体完全除去,每一平底试管中加入200 $\mu$ L浓缩洗涤液,混匀后,将平底试管在磁分离器上静置,静置时间为3分钟,去上清液,将试管及磁分离器一同倒置在吸水纸上拍干拍打3次,重复两次;

[0098] S4向平底试管中加入抗体吡啶酯标记物,抗体吡啶酯标记物的加入量为每平底试管50 $\mu$ L,混匀后置37 $^{\circ}$ C孵育15分钟;

[0099] S5重复步骤S3的操作;

[0100] S6向平底试管中加入发光底物溶液I,发光底物溶液I的加入量为每平底试管50 $\mu$ L,1S后加入发光底物溶液II,发光底物溶液II的加入量为每平底试管50 $\mu$ L;

[0101] S7用化学发光仪检测每管的发光值,根据各标准溶液发光值绘制标准曲线,即可得出待测样本中PD-L1的浓度。

[0102] 对比例1、试剂盒的组成与制备

[0103] 对比例1试剂盒的组成和制备与实施例1试剂盒的组成和制备基本相同,区别在于,所述磁珠免疫复合物由链霉亲和素磁珠和生物素化PD-L1单克隆抗体制备而成,其中,链霉亲和素磁珠的制备中将修饰的壳聚糖磁性微球替换为壳聚糖磁性纳米粒子。

[0104] 试验例一、用于检测PD-L1的快速检测试剂盒的稳定性

[0105] 1、加速破坏稳定性

[0106] 为了考核试剂盒的加速破坏稳定性,分别对放置4 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C保存10天的实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒进行性能测试,测试试剂盒的性能指标。加速破坏稳定性结果如表1所示。

[0107] 表1:试剂盒加速破坏稳定性结果

[0108]

检测指标		要求	检测结果 (4℃)	检测结果 (37℃)
线性		$\geq 0.9900$	0.9994	0.9993
灵敏度		$< 2\text{pg/mL}$	0.95pg/mL	0.98pg/mL
准确性		$\pm 15\%$	1.76%	2.33%
精密性	批内	$< 15\%$	1.98%	2.17%
	批间	$< 15\%$	2.14%	2.59%

[0109] 依据加速破坏试验推算试剂盒有效期的经验方法,37℃下加速破坏10天,相当于有效期1年半,可以满足试剂盒一年的有效期要求。由表1可以看出,本发明用于检测PD-L1的快速检测试剂盒在4℃、37℃保存10天后,试剂盒的灵敏度、准确性及精密性等均满足要求。

[0110] 2、冻融稳定性

[0111] 为模拟试剂盒在运输过程中,低温环境下试剂盒各组分反复冻融对试剂盒稳定性的影响,将实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒在-20℃的低温下冷冻过夜,然后在室温下复溶,然后再置于-20℃的低温下冷冻过夜,如此反复冻融5次。结果如表2所示。

[0112] 表2:试剂盒冻融稳定性结果

[0113]

检测指标		要求	冻融 5 次
线性		$\geq 0.9900$	0.9992
灵敏度		$< 2\text{pg/mL}$	0.87pg/mL
准确性		$\pm 15\%$	1.96%
精密性	批内	$< 15\%$	1.83%
	批间	$< 15\%$	2.47%

[0114] 由表2可以看出,本发明用于检测PD-L1的快速检测试剂盒经反复冻融5次后,试剂盒的灵敏度、准确性及精密性等均满足要求。这说明,本发明试剂盒具有较好的冻融稳定性。

[0115] 3、模拟运输稳定性

[0116] 为模拟试剂盒在运输过程中,车辆的颠簸以及高温环境对试剂盒稳定性的影响,将实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒固定在微量振荡器上,放置于37℃恒温箱振荡7天。结果如表3所示。

[0117] 表3:试剂盒模拟运输稳定性结果

[0118]

检测指标		要求	37℃运输 7 天
线性		$\geq 0.9900$	0.9994
灵敏度		$< 2\text{pg/mL}$	0.85pg/mL
准确性		$\pm 15\%$	1.84%
精密性	批内	$< 15\%$	1.68%
	批间	$< 15\%$	2.43%

[0119] 由表3可以看出,本发明用于检测PD-L1的快速检测试剂盒放置于37℃恒温箱振荡7天后,试剂盒的灵敏度、准确性及精密性等均满足要求。

[0120] 试验例二、对比例1试剂盒和本发明实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒对PD-L1进行检测的结果比较

[0121] 使用对比例1制备的试剂盒和实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,对样本进行检测,检测的方法参考实施例2具体的步骤。

[0122] 分别采用对比例1制备的试剂盒和实施例1制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒,同时对肺癌患者血清样本100份(PD-L1阳性率为100%)进行检测,结果如表4所示。

[0123] 表4:检测结果比较

[0124]

试剂盒		实施例 1 试剂盒	对比例 1 试剂盒
线性		0.9996	0.9854
灵敏度		0.1pg/mL	10pg/mL
精密性	批内	$< 2.7\%$	$< 4.6\%$
	批间	$< 4.9\%$	$< 6.7\%$

[0125] 由表4可以看出,使用对比例1制备的试剂盒对血清中PD-L1检测的灵敏度降低,批内和批间精密性降低。这说明,本发明制备的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒可显著提高检测灵敏度和检测精密性。

专利名称(译)	一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107192817B</a>	公开(公告)日	2018-04-24
申请号	CN2017110364877.2	申请日	2017-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州华弘生物科技有限公司		
[标]发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
发明人	陈立国 邹伟权 张亚丽 李庆祥 母润红 王涛 苏焱		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/553 G01N33/532 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/553		
代理人(译)	张帅		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN107192817A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于医学检验技术领域，具体涉及一种用于检测PD-L1的快速检测试剂盒及其检测方法。本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒包括发光底物溶液I，发光底物溶液II，浓缩洗涤液，PD-L1标准品，PD-L1质控品，抗体吡啶酯标记物和磁珠免疫复合物。本发明提供的用于检测PD-L1的快速检测试剂盒具有检测时间短、用量少、高效、灵敏度高、特异性强、稳定的重复性和可靠性等优点。

检测指标	要求	检测结果 (4℃)	检测结果 (37℃)
线性	≥0.9900	0.9994	0.9993
灵敏度	<2pg/mL	0.95pg/mL	0.98pg/mL
准确性	±15%	1.76%	2.33%
精密性	批内	<15%	1.98%
	批间	<15%	2.14%