



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104109197 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

---

(21) 申请号 201310571300. 0

(22) 申请日 2013. 11. 13

(71) 申请人 叶森

地址 210000 江苏省南京市浦口区高新技术  
开发区星火路 10 号人才大厦 E 栋

(72) 发明人 叶森

(51) Int. Cl.

*C07K 14/46* (2006. 01)

*G01N 33/532* (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图4页

---

(54) 发明名称

一种双识别抗体片段的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及医药卫生领域,提供了一种双识别抗体片段的制备方法。本发明得到的抗体由两个不同单抗的 Fab' 片段组成,一端可识别待测抗原,另一端识别运载示踪物的无关蛋白。通过结合高比例示踪物的无关蛋白,放大检测信号,提高检测灵敏度。通过本发明提供的方法制备的抗体,可应用于化学发光、荧光、酶联免疫分析领域。

1. 一种双识别抗体的制备方法及应用,其特征在于其可同时识别两种不同抗原,当待测物质中存在抗原时,此抗体片段会和待测抗原以及另外一株针对该抗原的捕获抗体反应形成夹心复合物,此时携带高比例示踪物无关蛋白也会通过免疫反应介入到夹心复合物中,由于其结合了高比例的示踪物,从而保证了检测信号极大幅度的增强,同时解决了示踪物对抗体识别能力的影响,根据标记物质的不同选择特定的示踪方法,再结合标准曲线计算出待测物质中抗原的含量。

2. 根据权利要求1所述的双识别抗体片段,其特征在于其具有两端不同的Fab'区域,可同时识别两种不同抗原,其中一端Fab'-a识别待测抗原,另一端Fab'-b识别运载示踪物的无关蛋白,Fab'-a及Fab'-b铰链区的巯基经氧化形成二硫键,从而构成的重组抗体片段。

3. 根据权利要求1所述的示踪物,其特征在于其可以在特定的示踪方法下发射信号,包含吖啶酯、ABEI、luminol、HRP、AP、Cy3、Cy5、647、FITC等物质中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的另外一株针对该抗原的捕获抗体,是指可以与双识别抗体配对检测的一株待测抗原的单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的待测物质,其特征在于包括人或动物体尿液、脑脊液、血液、唾液等体液或其他形式的待检样本。

6. 根据权利要求2所述的Fab'-a抗体片段,其特征在于其是一株针对待测抗原的单克隆抗体的 $F(ab')_2$ -a通过适当浓度的还原剂只打开铰链区的二硫键得到的抗体片段。

7. 根据权利要求2所述的Fab'-b抗体片段,其特征在于其是一株针对无关蛋白的单克隆抗体的 $F(ab')_2$ -b通过适当浓度的还原剂只打开铰链区的二硫键得到的抗体片段。

8. 根据权利要求1、2、4、6所述的待测抗原,其特征于是降钙素原、心肌肌钙蛋白I、心肌肌钙蛋白T或N-端脑钠肽前体等生物标志物。

9. 根据权利要求6所述的 $F(ab')_2$ -a,其特征在于其是由胃蛋白酶消化完整的待测抗原的单克隆抗体得到的抗体片段。

10. 根据权利要求1和7所述的无关蛋白,其特征在于其是牛血清白蛋白、卵清白蛋白等天然或重组蛋白,分子量在10KDa到300KDa之间的,与待测抗原无相互作用的,能标记示踪物的蛋白。

11. 根据权利要求7所述的 $F(ab')_2$ -b,其特征在于其是由胃蛋白酶消化完整的无关蛋白的单克隆抗体得到的抗体片段。

12. 权利要求6、7所述的还原剂,其特征在于包含 $\beta$ -巯基乙醇、二硫苏糖醇等可以打开二硫键的试剂。

## 一种双识别抗体片段的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及到一种双识别抗体抗体的制备方法,通过该方法得到的双识别抗体,可广泛应用于化学发光免疫法检测、荧光免疫层析法检测、酶联免疫法检测等领域,能够大幅度提高原有方法学的检测灵敏度。

### 背景技术

[0002] 传统的免疫分析法如化学发光免疫法、酶联免疫法以及荧光免疫层析法都是将示踪物直接标记抗体或抗原用于免疫检测,而示踪物与抗原、抗体的偶联,会在一定程度上影响原物质的活性,从而对检测敏感性造成一定的影响。酶联免疫吸附剂测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)简称酶联免疫法,其中心是让抗原或抗体与酶连接形成酶标抗体,通过显色来检测。这种酶标抗原或者抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。但在标记的过程中,首先过碘酸钠氧化酶形成醛化酶,醛化酶再与抗体或抗原分子氨基相连,该过程中过碘酸钠会对抗体或抗原的免疫活性造成影响,同样会影响免疫灵敏度。同样,化学发光免疫法标记到抗体上的吡啶酯、异鲁米诺等发光物以及荧光免疫层析法中标记到抗体上的荧光物 Cy3、Cy5,当标记比例小的时候不影响抗体的活性,但是发光或者荧光的信号比较小,导致试剂的灵敏度不够高,但标记比例大的时候这些示踪物会结合到抗体识别抗原的 Fv 区域,从而导致其识别能力下降。因此,一种既能高效识别抗原又能携带高比例示踪物的改造抗体便成为了解决上述种种矛盾的必需。

[0003] 以降钙素原(Piocalcitonin, PCT)为例,PCT作为近些年来新发现的炎症指标,目前已经发现它在细菌感染时升高,并且其升高程度与感染严重程度、病情预后密切相关。近年来随着研究的深入,发现在细菌感染初期,已经有PCT低水平的升高,当PCT水平大于50pg/mL而小于250pg/ml时,预示着病人有局部感染,当PCT水平大于0.25ng/mL时,建议进行抗生素治疗。正常人体内PCT的含量极低,小于50pg/mL。因此在感染初期,尤其是呼吸道感染的病人,大部分为轻微感染,普通的检测方法很难及时的测定PCT的含量变化,从而会给医生的判断带来困惑,耽误了及时的治疗方案。

[0004] 本发明利用被胃蛋白酶消化后的抗体中铰链区的二硫键比Fab'中连接H链和L链的二硫键容易断裂为基础,利用低浓度的还原剂进行切割,从而制备两种识别不同抗原的抗体Fab',将两种Fab'按一定比例混合并让其铰链区的二硫键氧化重新形成二硫键,从而构成重组抗体片段F(ab')<sub>2</sub>。这种重组抗体,一端识别待测抗原,另一端识别运载示踪物的无关蛋白,无关蛋白上携带高比例的示踪物,进而相当于间接的将示踪物标记到检测用的抗体上,高比例的示踪信号保证了检测信号极大幅度的增强,同时解决了示踪物对抗体识别能力的影响。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种双识别抗体片段的制备方法,该方法能够应用于化学发光免疫法检测、荧光免疫层析法检测、酶联免疫法检测等领域,能够大幅度提高原有方法学

的检测灵敏度。

[0006] 所述的双识别抗体片段,可同时识别两种不同抗原,其中一端 Fab'-a 识别待测抗原,另一端 Fab'-b 识别运载示踪物的无关蛋白,无关蛋白上携带高比例的示踪物,进而相当于间接的将示踪物标记到检测用的抗体上,当待测物质中存在抗原时,此抗体片段会和待测抗原以及另外一株针对该抗原的捕获抗体反应形成夹心复合物,此时介入到夹心复合物中的无关蛋白,由于其结合了高比例的示踪物,从而保证了检测信号极大幅度的增强,同时解决了示踪物对抗体识别能力的影响,根据标记物质的不同选择特定的示踪方法,再结合标准曲线计算出待测物质中抗原的含量。

[0007] 该双识别抗体片段由两个来自不同的单抗的 Fab' (Fab'-a 和 Fab'-b) 组成。所述的 Fab'-a 片段来源于一株待测抗原的单克隆抗体,是经胃蛋白酶消化及还原试剂打开铰链区二硫键得到的 Fab' 片段。

[0008] 所述的 Fab'-b 来源于一种无关蛋白的单克隆抗体,是经胃蛋白酶消化及还原试剂打开铰链区二硫键得到的 Fab' 片段。

[0009] 所述的待测抗原是降钙素原、心肌肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 T 或 N-端脑钠肽前体等生物标志物。

[0010] 所述的无关蛋白为牛血清白蛋白、卵清白蛋白等天然或重组蛋白,是指分子量在 10KDa 到 300KDa 之间的,与待测抗原无相互作用的,能标记示踪物的蛋白。

[0011] 所述示踪物为吖啶酯、ABEI、luminol、HRP、AP、Cy3、Cy5、647、FITC 等物质中的一种或几种。

[0012] 根据本发明所述的双识别抗体制备方法,所得的双识别抗体可应用于化学发光免疫法检测、荧光免疫层析法检测、酶联免疫法检测等领域,可用于定量检测人体尿液、脑积液、血液等体液或以其他形式存在的待检抗原,能够大幅度提高原有方法学的检测灵敏度。

[0013] 所述的双识别抗体的制备方法,以制备抗降钙素原-抗 BSA 双识别抗体为例,如图 1 所示,包括如下步骤:

[0014] 1. 取 NHS-sepharose4FF(购自 GE 公司)10mL,用 200mL1mM HCl 溶液洗涤,除去异丙醇,平均分成两份;将 40mg pH7.4PBS 平衡的 PCT 抗原(购自 Fitzgerald 公司)及 BSA(购自 Sigma 公司)分别与预先洗好的 5mLNHS 活化树脂混匀,室温孵育 2h。

[0015] 2. 0.1M Tris-HCl(pH8.0) 缓冲液封闭 1h。用 5 倍柱体 0.1M HAc-NaAc(0.5M NaCl, pH4.0) 和 0.1M Tris-HCl(0.5M NaCl, pH8.0) 缓冲液交替洗,重复 5 次,即为做好的 PCT 抗原抗体亲和柱和 BSA 抗原抗体亲和柱。

[0016] 3. 将一株抗降钙素原(PCT)的单抗 1 与另一株抗 BSA 的单抗 2,在 0.1M HAc-NaAc(pH4.5) 透析 3h,按照抗体与胃蛋白酶 50:1 比例,加入新配制的 2mg/mL 胃蛋白酶溶液,37°C 震荡反应 1h。

[0017] 4. 反应结束后,加入 1MTris-HCl(pH8.5) 进行终止反应。将单抗 1、单抗 2 反应液分别上样预先平衡好的 PCT 抗原抗体亲和柱和 BSA 抗原抗体亲和柱(平衡缓冲液均为 0.1M Tris-HCl, pH8.5, 2M NaCl)。用 50 倍体积 Tris-HCl 缓冲液进行流洗,至洗出的蛋白含量不再减少为止。

[0018] 5. 用洗脱缓冲液(Gly 缓冲液, pH2.0) 分别对两亲和柱进行洗脱,准备两支装有中和缓冲液(1M Tris-HCl, pH8.0) 的离心管分别收集蛋白含量高的部分,即为单抗 1 和单抗

2 的 F(ab')<sub>2</sub> 片段 (图 1 所示的 3 和 4), 其中中和缓冲液以收集蛋白体积 1/10 加入。将收集抗体片段于 20mM PBS (pH7.4) 透析 4 次, 每次 4-6h。

[0019] 6. 将透析后的 3 和 4 分别加入还原剂 β-巯基乙醇 (终浓度为 5mM), 37℃ 孵育 30min。取少量的还原反应液, 经非还原 SDS-PAGE 鉴定还原效果。3 和 4 还原后的片段即为 5 和 6。

[0020] 7. 将 5 和 6 片段等摩尔量混合, 在含 0.1mM 氧化型谷胱甘肽的 20mMPBS 缓冲液中 4℃ 透析过夜, 使片段 5 和 6 随机组合。

[0021] 8. 将透析后的 5 和 6 组合液上样于预先用 20mM PBS (pH7.4, 2MNaCl) 平衡的 PCT 抗原抗体亲和柱, 用 20mM PBS 洗亲和柱, 直至洗出的蛋白含量不再减少为止。

[0022] 9. 同步骤 5, 用洗脱缓冲液洗脱并收集抗体。用 PBS 透析抗体共三次, 每次间隔至少 4h。

[0023] 10. 按照步骤 8、9 所述纯化方法, 将透析后的溶液再次上样包被 BSA 的抗原抗体亲和柱。洗脱收集, 并用 PBS 透析。

[0024] 11. 透析后, 抗体片段于 4℃, 12000rpm 离心 10min, 取上清, 即得到本发明所述的双识别抗体 7。分别留样测效价和电泳, 然后将双识别抗体分装并冻存于 -20℃, 备用。

#### 附图说明

[0025] 图 1 为双识别抗体片段的结构示意图

[0026] 图 2 为双识别抗体在检测过程中的交联示意图 (a 为化学发光法 ;b 为亲和层析法 ;c 为 ELISA 法)

[0027] 图 3 为化学发光法测定 PCT 灵敏度

[0028] 图 4 为免疫层析法测定 PCT 灵敏度

[0029] 图 5 为 ELISA 法检测 PCT 的灵敏度

#### 具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步的描述, 这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。

[0031] 实施例 1

[0032] 化学发光免疫分析法检测 PCT

[0033] 应用于化学发光检测 PCT 试剂盒, 包括致敏磁性微粒 1, 即共价偶联了抗 PCT 单抗 5 的磁性微粒悬浮液 ; 双识别抗体片段 6, 即可同时识别 PCT 和 BSA 的抗体, 制备方法如发明内容所述 ; 标记吖啶酯 (4) 的 BSA (3) 溶液 ; 激发物 I 和激发物 II。将抗原 2 加入含有磁性微粒 1 和双识别抗体 6 及标记发光物的无关蛋白 3 的溶液中时, 通过抗体 - 抗原 - 抗体 - 抗原的相互作用, 形成磁性微粒 - 抗体 - 待测抗原 - 双识别抗体 - 标记蛋白复合物, 使用磁性分离技术捕获所述的复合物, 加入配置好的激发物 I 和激发物 II, 利用化学发光检测仪检测发光强度, 即可计算出待测抗原浓度。所述的复合物的交联方式结构示意图如图 2(a) 所示。

[0034] 其中标记发光物的无关蛋白 3 是标记了吖啶酯 (AE) 的 BSA, 吖啶酯购于上海迈拓崑崙化工新材料科技有限公司。取 1.0mg/mL BSA 溶液 50 μ L, 加入 5mg/mL 浓度的 AE 1 μ L,

49  $\mu$  L 50mM pH9.5 的碳酸盐缓冲液, 37°C 标记 1h, 后对 20mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液 4°C 透析 5 次, 加入抗体储存液及甘油, -20°C 保存。其中抗体储存液为 0.1M pH7.4 PBS、2% 酪蛋白、1% Tween-20 及 2%  $\text{NaN}_3$ 。

[0035] 抗体 5 为抗 PCT 单克隆抗体, 购于 Fitzgerald 公司, 编号 10-7942。与构建双识别抗体的抗 PCT 单抗是配对的, 即针对人 PCT 氨基酸序列的不同抗原决定簇。

[0036] 使用碳化二亚胺 (EDAC) 法共价偶联酶标抗体以制备致敏磁性微球 1 悬浮液: 磁性微球 (羧基化磁性微球, 1.0  $\mu$  m, 购于 Bangslab 公司) 20mM MES 水溶液 (pH5.6) 清洗磁性微球两次, 重悬磁性微球在此缓冲液中, 添加 EDAC 和 Sulfo-NHS 使微球: EDAC: Sulfo-NHS 的质量比为 1:1:0.6, 24°C 活化 1 小时, 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 清洗三遍微球后, 添加微球等质量 1/20 的抗 PCT 单抗 5。24°C 反应 12 小时后添加 1/20 体积甘氨酸封闭液 (1mol/L 甘氨酸水溶液) 24°C 封闭 1 小时。100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗微球三次, 溶于 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.1% 酪蛋白) 中, 使磁性微球的浓度为 0.25% (W/V, g/100ml)。

[0037] 激发物 1 溶液配制:  $\text{HNO}_3$  使用纯水稀释到浓度为 0.1M, 并加入 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 混匀。

[0038] 激发物 2 溶液的配制: 配制 0.25M 的 NaOH 水溶液, 并加入 1% TritonX-100, 混匀。

[0039] 化学发光法灵敏度的考察: 将 PCT 校准品 (购于 Fitzgerald 公司, 30-1379), 依次稀释到 0pg/mL、2pg/mL、5pg/mL、10pg/mL、30pg/mL、100pg/mL、1000pg/mL、10000pg/mL, 稀释缓冲液为抗体稀释液。取 20  $\mu$  L 致敏磁性微球 1, 加入校准品稀释液 50  $\mu$  L。37°C 反应 10min, 磁性分离, 清洗 1 次。加入 100  $\mu$  L AE 标记的 BSA 及 100  $\mu$  L 抗 PCT- 抗 BSA 抗体 6, 37°C 反应 10min, 磁性分离, 清洗三次, 在全自动发光仪 (新产业 Maglumi) 上测定发光值。

[0040] 为对比该方法的优越性, 同时使用常规抗体直接标记吡啶酯, 标记过程如上所述。反应时使用直接标记的常规抗体替代双识别抗体 6 及标记吡啶酯的 BSA, 按上述的实验方案测定 PCT 校准品稀释液。

[0041] 实施例 2

[0042] 免疫层析法检测 PCT

[0043] 应用于免疫层析法检测 PCT 试剂盒, 包括致敏胶乳颗粒 1, 即共价偶联了双识别抗体 6 的胶乳悬浮液; 双识别抗体片段 6, 即可同时识别 PCT 和 BSA 的抗体, 制备方法如发明内容所述; 标记荧光素 Cy5-NHS 酯 (4) 的 BSA 蛋白 (3) 溶液; 醋酸纤维膜, 划有抗 PCT 单克隆抗体及抗双识别抗体 Fab 段的单抗。将抗原 2 与致敏胶乳微粒 1 及标记荧光素的无关蛋白 3 溶液混合时, 通过抗体-抗原-抗体-抗原的相互作用, 形成胶乳微粒-双识别抗体-待测抗原/标记蛋白复合物, 并通过标记在纤维素膜上的另一株抗 PCT 单抗与抗原作用, 捕获复合物。在荧光分析仪中检测荧光强度, 即可得到待测抗原浓度。所述的复合物交联方式如图 2(b) 所示。

[0044] 其中标记荧光素的无关蛋白 3 是标记了 Cy5 的 BSA。Cy5 购于上海迈拓崑化工新材料科技有限公司。使用 25mM pH9.0 的 CB 缓冲液将 BSA 稀释到 20mg/mL, 溶液放置冰浴内。取抗体 1/100 的 Cy5-NHS 酯溶于所用 CB 量 1/10 的 0.5M pH9.5 的 CB 中。在缓慢搅拌中, 将 Cy5-NHS 酯滴加入 BSA 溶液中, 5-10min 内完成。将容器加塞封闭后, 连同搅拌装置置于 4°C, 继续搅拌, 是 Cy5-NHS 酯与 BSA 结合 12-18h。3000rpm 离心 20min 后取上清, 置于透析袋中, 流水透析 5min 后, 用 10mM pH7.2 的 PBS 4°C 透析, 得到 Cy5-NHS 酯标记的 BSA。

[0045] 使用碳化二亚胺 (EDAC) 法共价偶联酶标抗体以制备致敏胶乳微粒 1 悬浮液 : 胶乳微粒 (26nm, 购于 Bangslab 公司) 20mM MES 水溶液 (pH5.6) 清洗胶乳微粒两次, 重悬胶乳在此缓冲液中, 添加 EDAC 和 Sulfo-NHS 使胶乳 :EDAC :Sulfo-NHS 的质量比为 1 : 1 : 0.6, 24°C 活化 1 小时, 20mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.5) 清洗三遍微球后, 添加胶乳等质量的双识别抗体 6。24°C 反应 12 小时后添加 1/20 体积甘氨酸封闭液 (1mol/L 甘氨酸水溶液) 24°C 封闭 1 小时。100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20) 清洗胶乳三次, 溶于 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.1% 酪蛋白) 中, 使胶乳微粒的浓度为 0.25% (W/v, g/100ml)。

[0046] 抗体 5 为抗 PCT 单克隆抗体, 购于 Fitzgerald 公司, 编号 10-7942。与构建双识别抗体的抗 PCT 单抗是配对的, 即针对人 PCT 氨基酸序列的不同抗原决定簇。

[0047] 醋酸纤维膜的制备 : 将抗 PCT 单克隆抗体 5 以 1.0mg/mL 的浓度, 蠕动泵授液量 0.2mL/min, 划线速度 50m/20min, 在干燥箱内 20°C 鼓风干燥 12h, 完成检测线的制备。将一株抗双识别抗体 6Fab 段的单抗以 4mg/mL 的浓度, 蠕动泵授液量 0.2mL/min, 划线速度 50m/20min, 该线与检测线平行, 在干燥箱内 20°C 鼓风干燥 12h, 完成质控线的制备。

[0048] 亲和层析法测定 PCT 灵敏度的考察 : 将 PCT 校准品用校准品稀释液稀释, 浓度依次为 10pg/mL、200pg/mL、50pg/mL、100pg/mL、300pg/mL、1ng/mL、3ng/mL、10ng/mL、30ng/mL。取 30  $\mu$ L 不同浓度的 PCT 校准品, 加入 50  $\mu$ L 的荧光微球, 室温下充分混合 1min, 取 75  $\mu$ L 的混合样本加入测试卡加样孔中, 室温放置 15min。将测试卡插入免疫荧光检测仪中, 进行荧光检测。

[0049] 为对比该方法的优越性, 同时使用常规抗体直接标记 Cy5, 标记过程如上所述。反应时使用直接标记的常规抗体替代双识别抗体 6 及标记 Cy5 的 BSA, 按上述的实验方案测定 PCT 校准品稀释液。

[0050] 实施例 3

[0051] ELISA 法测定降钙素原 (PCT)

[0052] 应用于酶联免疫检测 PCT 试剂盒, 包括抗 PCT 的单抗 5 溶液及包被液, 用于包被酶标板 ; 双识别抗体片段 6, 即可同时识别 PCT 和 BSA 的抗体, 制备方法如发明内容所述 ; 标记辣根过氧化物酶 HRP 的 BSA (3) 溶液 ; 清洗液和封闭液 ; 显色液 A、B 及终止液。将抗原 2 加入包被抗 PCT 单抗 5 的酶标板中, 并加入双识别抗体 6 及标记辣根过氧化物酶的无关蛋白 3 的溶液中时, 通过抗体 - 抗原 - 抗体 - 抗原的相互作用, 形成固相 - 抗体 - 待测抗原 - 双识别抗体 - 标记蛋白复合物, 加入配置好的显色液 A 及显色液 B, 利用酶标仪检测 OD 值, 即可计算出待测抗原浓度。所述的复合物的交联方式结构示意图如图 2(c) 所示。

[0053] 其中, 标记 HRP 的 BSA 溶液配制方法 : 取 1mL 5mg/mL 的 HRP 溶液, 加入 0.2mL 新配的 0.1M NaIO<sub>4</sub> 溶液, 室温下搅拌 20min。将上述溶液对 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析, 4°C 过夜。加入 20  $\mu$ L 0.2M pH9.5 的碳酸盐缓冲液, 使醛化的 HRP pH 上升到 9.0-9.5。后立即加入 10mg BSA 在 1mL 0.01M 碳酸盐缓冲液中, 室温避光轻轻搅拌 2h。加入 0.1mL 新配的 4mg/mL NaBH<sub>4</sub> 溶液, 混匀, 4°C 放置 2h。然后对 0.15M pH7.4 的 PBS 透析, 即得到 HRP 标记的 BSA 溶液。

[0054] 显色液 A 配制 : 配制 4.2g/L 的柠檬酸溶液, 调节 pH 到 2.6。高温灭菌后加入 TMB 至终浓度为 0.476g/L, 避光保存。

[0055] 清洗液和封闭液配制:纯水中加入  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  6.5g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  29g/L,  $\text{NaCl}$  9g/L, 再加入 1% Tween-20, 即得到清洗液。在清洗液中加入 1% 的酪蛋白及 1% P300, 即得到酪蛋白封闭液。将封闭液用清洗液稀释至酪蛋白浓度 0.1%, 即为反应过程中实用的稀释液。

[0056] 显色液 B 配制:配制 8.4g/L 的柠檬酸溶液, 调节 pH 到 5.2。加入  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  至终浓度 30.38g/L, 高温灭菌后, 按 1:1000 添加 30% 的双氧水。

[0057] 终止液配制:2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液。

[0058] ELISA 法测定 PCT 灵敏度考察:将 PCT 校准品依次稀释到 0pg/mL、10pg/mL、20pg/mL、50pg/mL、200pg/mL、500pg/mL、1000pg/mL, 稀释缓冲液为 0.1% 酪蛋白。以 100  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g/mL}$  的 PCT 单抗 5 的碳酸盐溶液包被 96 孔板, 37°C 包被 1h, 使用 1% 的酪蛋白 200  $\mu\text{L}$  37°C 封闭 30min, 清洗并排干后加入 PCT 校准品稀释液 100  $\mu\text{L}$ , 37°C 孵育 1h。清洗 3 次排干, 加入抗 PCT- 抗 BSA 双识别抗体, 37°C 反应 1h, 清洗后拍干, 加入 1:5000 倍稀释的 HRP 标记的 BSA, 37°C 反应 30min, 清洗并排干后加入显色液 A 和显色液 B 各 50  $\mu\text{L}$ , 37°C 反应 10min, 加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 在酶标仪上测定 450nm 处的吸光值。

[0059] 为对比该方法的优越性, 同时使用常规抗体直接标记 HRP, 标记过程如上所述。反应时使用直接标记的常规抗体替代双识别抗体 6 及标记 HRP 的 BSA, 按上述的实验方案测定 PCT 校准品稀释液。

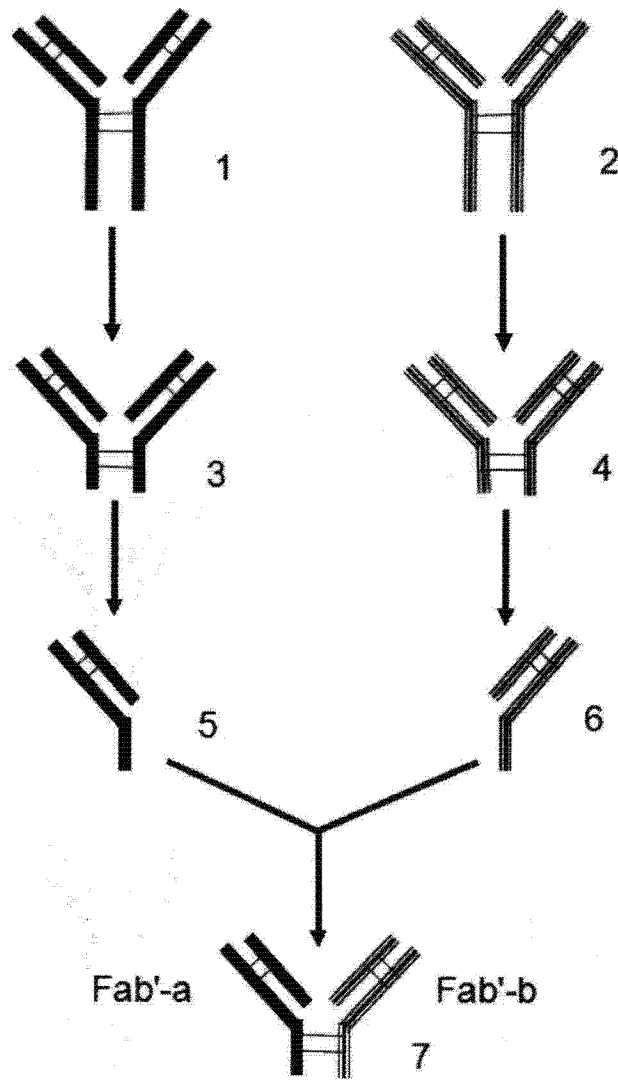


图 1

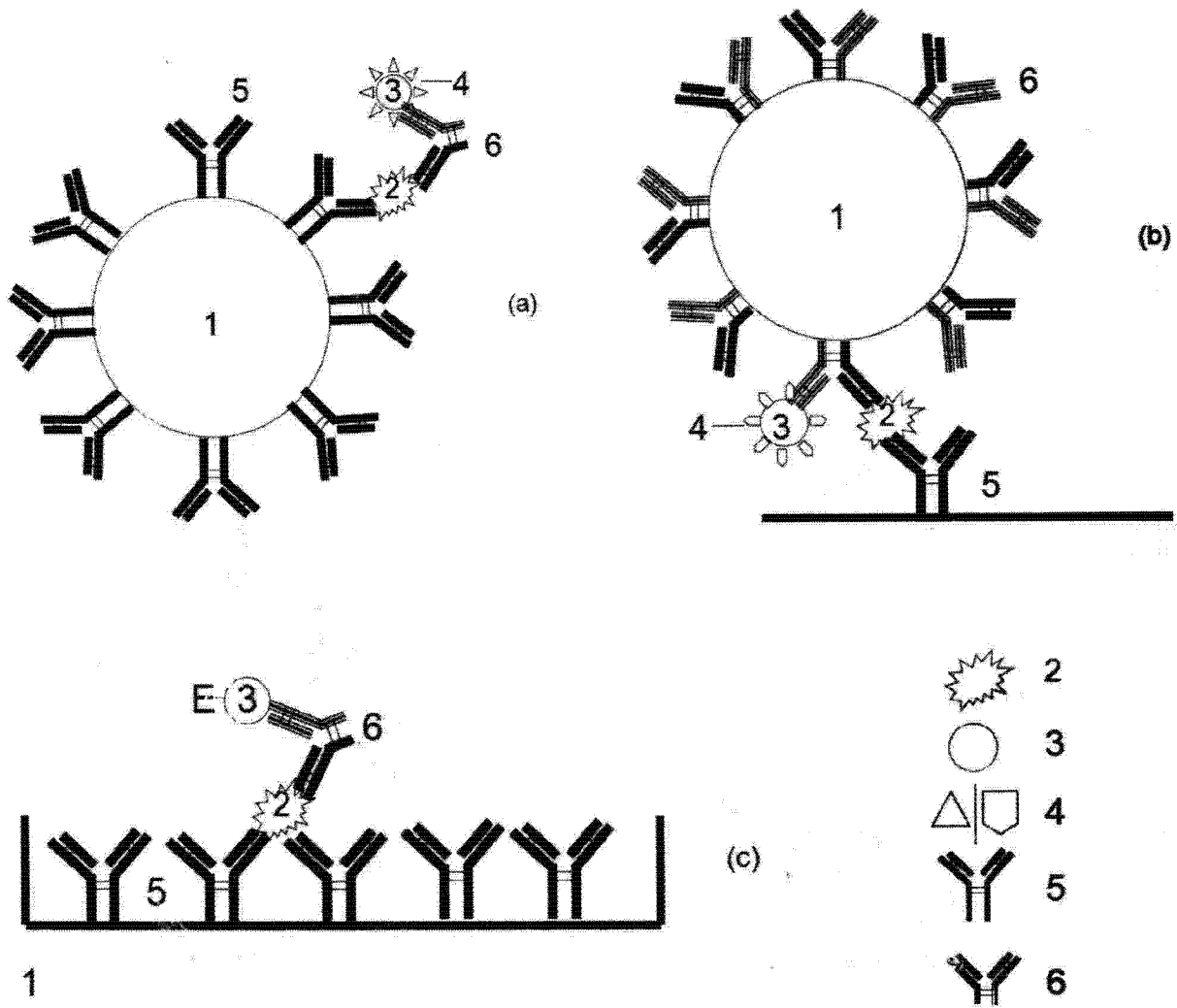


图 2

### 化学发光法测定PCT

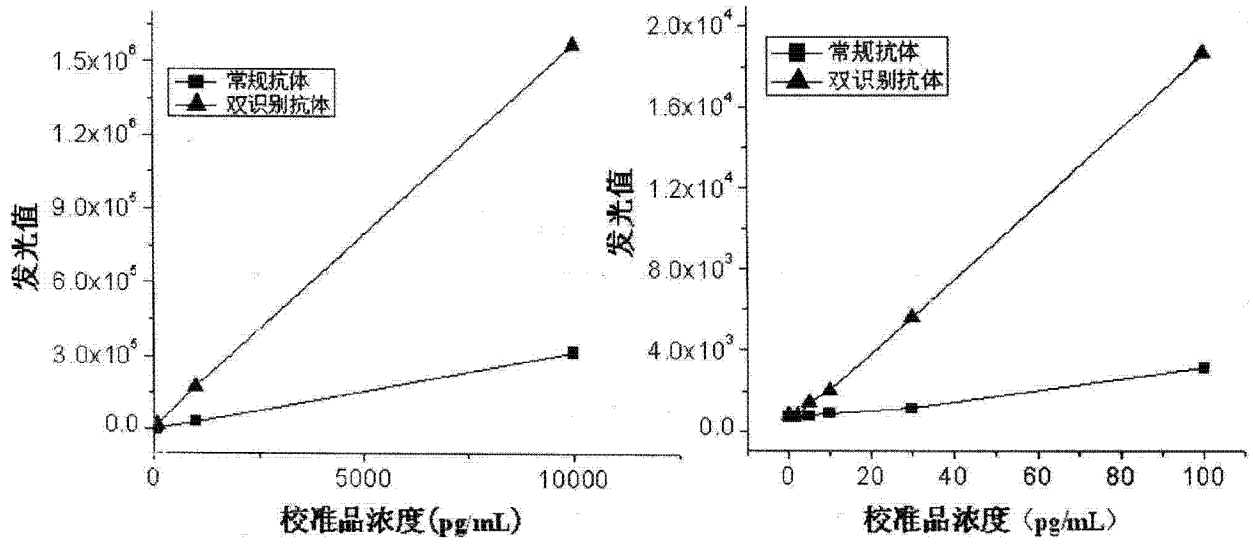


图 3

### 免疫层析法测定PCT

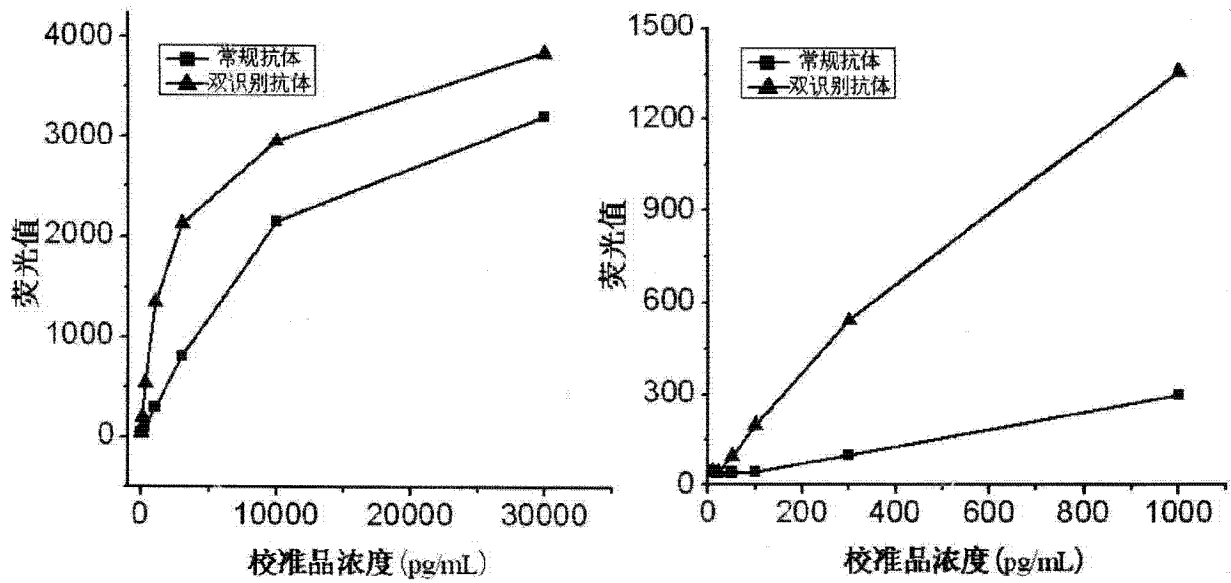


图 4

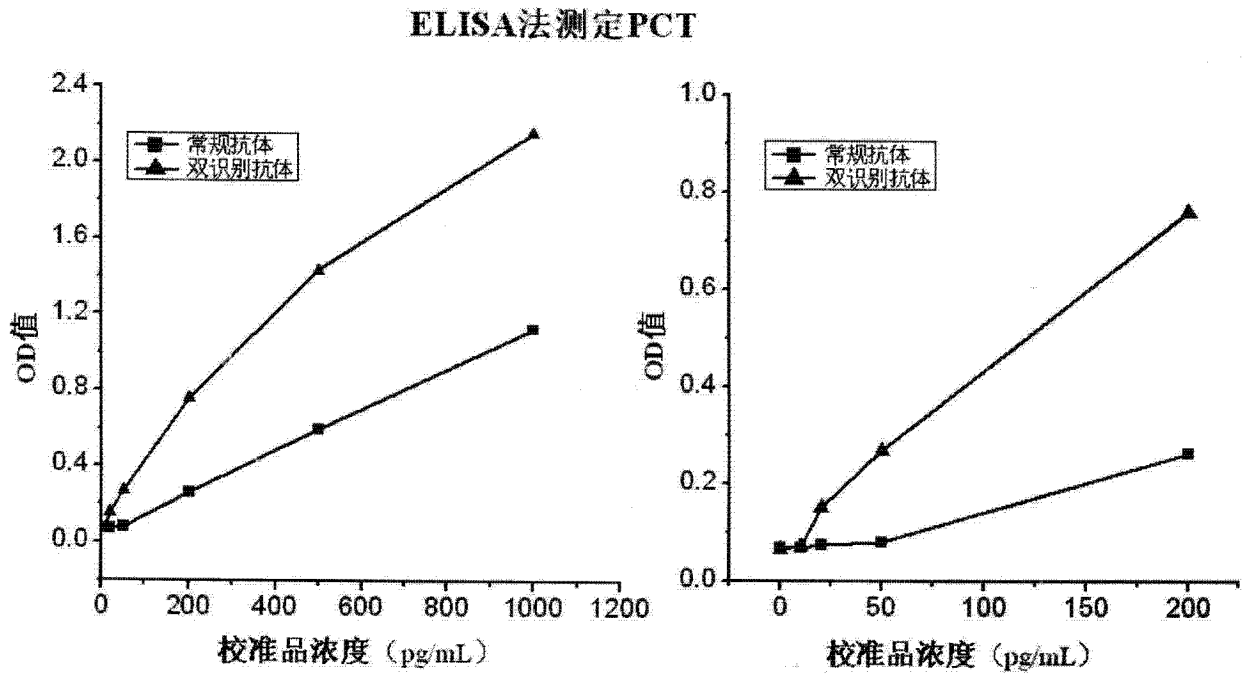


图 5

专利名称(译)	一种双识别抗体片段的制备方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104109197A</a>	公开(公告)日	2014-10-22
申请号	CN201310571300.0	申请日	2013-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	叶森		
申请(专利权)人(译)	叶森		
当前申请(专利权)人(译)	叶森		
[标]发明人	叶森		
发明人	叶森		
IPC分类号	C07K14/46 G01N33/532		
CPC分类号	C07K16/468 C07K2317/55		
其他公开文献	CN104109197B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及医药卫生领域，提供了一种双识别抗体片段的制备方法。本发明得到的抗体由两个不同单抗的Fab'片段组成，一端可识别待测抗原，另一端识别运载示踪物的无关蛋白。通过结合高比例示踪物的无关蛋白，放大检测信号，提高检测灵敏度。通过本发明提供的方法制备的抗体，可应用于化学发光、荧光、酶联免疫分析领域。

