



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110895279 A

(43)申请公布日 2020.03.20

(21)申请号 201911182031.2

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.11.27

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(83)生物保藏信息

G01N 33/577(2006.01)

CCTCC NO:C2019289 2019.11.01

G01N 21/76(2006.01)

CCTCC NO:C2019288 2019.11.01

C07K 16/38(2006.01)

(71)申请人 普健生物(武汉)科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号光谷生物城武汉
生物技术研究院B8栋

(72)发明人 雷坤 代腾飞 秦伏波 方绪凤

鲁亮 万定一 张永霞

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 徐瑛

权利要求书2页 说明书10页

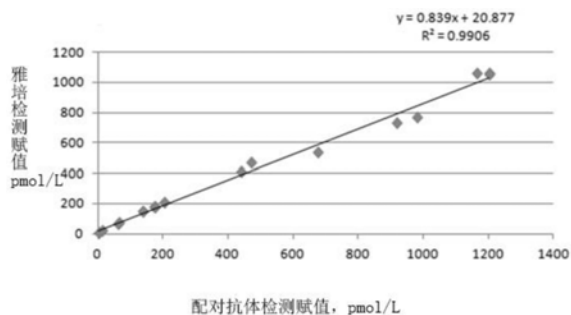
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂
盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒,试剂盒中包含人附睾分泌蛋白4、吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体。吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体分别由各自对应的杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8和9-C3-D12-B1分泌获得。这两种杂交瘤细胞株是利用人工合成的HE4基因,经重组质粒、蛋白质表达、动物免疫和筛选,最终亚克隆获得。本发明公开的双抗体夹心复合物的检测灵敏度和精密度好,线性范围宽,对抗原的反应特异性好,不会产生交叉反应。



1. 一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒,其特征在于,包括吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体;

所述吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体是将单克隆抗体69-G10-B8-G8通过吖啶酯标记后制得,所述单克隆抗体69-G10-B8-G8是由杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8分泌获得;

所述生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体是先将单克隆抗体9-C3-D12-B1利用生物素标记,然后再与包埋有亲和素的磁珠结合后制得,所述单克隆抗体9-C3-D12-B1是由杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1分泌获得;

所述杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1保藏在中国典型培养物保藏中心CCTCC,其保藏编号为CCTCC NO:C2019288;所述杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8保藏在中国典型培养物保藏中心CCTCC,其保藏编号为CCTCC NO:C2019289。

2. 根据权利要求1所述的化学发光试剂盒,其特征在于,所述杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8和杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1的筛选配对获得的具体方法如下:

S1、人工合成人附睾分泌蛋白4基因,将人附睾分泌蛋白4基因重组到表达载体质粒pATX1中,得到HE4-pATX1表达载体;克隆位点为EcoRI/XhoI,人附睾分泌蛋白4基因的基因序列如SEQ NO.1所示;

S2、将HE4-pATX1表达载体转染到293F细胞系中培养,收集上清液进行镍柱纯化得到人附睾分泌蛋白4;

S3、用人附睾分泌蛋白4免疫若干小鼠,共免疫至少4次,取血清效价检测合格的小鼠进行细胞融合,再进行间接Elisa筛选,得到若干株杂交瘤细胞株;

S4、将步骤S3所得的若干杂交瘤细胞株分泌的抗体分别进行吖啶酯标记和生物素标记,得到吖啶酯标记的检测抗体和生物素标记的捕获抗体,并制备人附睾蛋白4的标准品、质控品;

S5、选择步骤S4所得任一种吖啶酯标记的检测抗体、任一种生物素标记的捕获抗体进行配对,再与含有人附睾蛋白4的溶液同时加至孵育槽中孵育,再通过清洗、磁性分离,得到若干组双抗体夹心复合物;加入化学发光底物液测定各组的发光强度,筛选出最佳配对的吖啶酯标记的检测抗体和生物素标记的检测抗体,即获得对应的最佳配对的杂交瘤细胞株。

3. 根据权利要求2所述的化学发光试剂盒,其特征在于,步骤S4中,杂交瘤细胞株分泌的抗体进行吖啶酯标记的具体方法为:

S411、取吖啶酯使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度3mg/ml,得吖啶酯溶液;

S412、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调至pH=9.0,终浓度2-5mg/ml,得抗体溶液I;

S413、按每mg抗体加14ul吖啶酯溶液的比例,将吖啶酯溶液和抗体溶液I于25℃避光搅拌2小时;

S414、加入赖氨酸终止反应,25℃避光搅拌0.5小时,收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液3-4次,得吖啶酯标记的检测抗体;

杂交瘤细胞株分泌的抗体进行生物素标记的具体方法为:

S421、生物素使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度20mg/ml,得生物素溶液;

S422、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调至pH

=8.5,终浓度1-10mg/ml,得抗体溶液Ⅱ;

S423、按每mg抗体加5ul生物素溶液的比例,将生物素溶液和抗体溶液Ⅱ于室温避光搅拌2小时;

S424、收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液3-4次;

S425、步骤S424所得溶液中加入包埋有亲和素的磁珠溶液,25℃避光搅拌2小时,得生物素标记的检测抗体。

4.根据权利要求2所述的化学发光试剂盒,其特征在于,步骤S5中,吖啶酯标记的检测抗体、生物素标记的捕获抗体配对的方式为交叉法配对。

5.根据权利要求2所述的化学发光试剂盒,其特征在于,步骤S5中,清洗和磁性分离的方式为:对孵育后的产物溶液施加外加磁场,然后吸去上清液,用pH值7.4的含0.05%吐温-20的0.01M磷酸盐缓冲液清洗缓冲液清洗3次,继续吸去上清液,去除外加磁场后即得到双抗体夹心复合物。

6.根据权利要求2所述的化学发光试剂盒,其特征在于,步骤S2中培养的时间为6天。

一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于人附睾分泌蛋白的检测技术领域,特别是一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒。

背景技术

[0002] 人附睾分泌蛋白4 (HE4) 是一个新的高特异性卵巢癌标志物,HE4 (又名WFDC2),主要由WAP类型的4个二硫键核心 (WFDC) 组成,与细胞外蛋白酶抑制剂有很高的同源性。转录介质WFDC的蛋白质家族是白细胞中的蛋白酶抑制剂,HE4也假定在自然免疫中有作用。该基因编码的蛋白质基因位于染色体20q12~13.1,全长为12kb左右,由5个外显子和4个内含子组成,该基因存在多种剪切方式,编码分泌小分子蛋白。卵巢癌发病率位居三大妇科恶性肿瘤的第三位,由于其早期症状不明显而不容易被发现,随着患癌时间的增长,患者的5年生存率由70-90%降到20%,因此早期确诊对卵巢癌的治愈率至关重要。HE4首先在附睾远端上皮中发现,生理情况下在呼吸道、生殖系统和卵巢组织中有非常低水平的表达,但在卵巢癌组织和患者血清中均高度表达,88%的卵巢癌患者都会出现 HE4升高的现象。HE4是卵巢癌检测敏感性较高的肿瘤标志物,特别是早期无症状的I期卵巢癌。HE4是一种分泌蛋白,释放到体液中,卵巢中的表达仅限于肿瘤,特异性较高,而且在卵巢癌的早期晚期高度上调表达,疾病早期灵敏度较高。

[0003] HE4与CA125联合检测,可提高诊断准确性。HE4升高,CA125正常提示卵巢癌或其他类型的肿瘤,如子宫内膜癌。与CA125相比,HE4的敏感度更高、特异性更强,尤其在疾病初期无症状表现的阶段。疾病早期HE4诊断的敏感度是82.7%,CA125仅有45.9%; HE4的特异性高达99%,而CA125仅为20%。HE4与CA125联合应用,敏感性可增加到 92%,能将假阴性结果减少30%,可避免单一应用的阴性结果造成疾病复发监测的漏诊,大大增加卵巢癌诊断的准确性。

[0004] 化学发光标记免疫分析又称化学发光免疫分析 (CLIA),是用化学发光剂直接标记抗原或抗体的免疫分析方法。常用于标记的化学发光物质为吖啶酯类化合物 (AE),其通过起动发光试剂 ($\text{NaOH}-2\text{H}_2\text{O}_2$) 作用而发光,强烈的直接发光在一秒钟内完成,为快速的闪烁发光。吖啶酯作为标记物用于免疫分析,其化学反应简单、快速、无须催化剂。

[0005] 现有技术中,例如专利CN201510240537.X提供了一种基于金磁微粒的吖啶酯化学发光免疫学检测HE4的方法,采用先在金磁微粒表面偶联HE4包被抗体,然后封闭金磁微粒表面未与HE4包被抗体结合的空位点,再标记抗体,与待测物结合、清洗,最后进行化学发光检测的方法,然而该专利技术所选用的HE4包被抗体和吖啶酯HE4标记抗体是现有的生物公司生产合成的抗体,未对HE4包被抗体和吖啶酯HE4标记抗体的种类进行研究,也未对两者如何配对使用进行研究,导致该方法的检测灵敏度并不能达到最佳。

发明内容

[0006] 针对以上现有技术的不足,本发明提供了一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光

试剂盒,具体通过以下技术实现。

[0007] 一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒,包括吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体;所述吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体是将单克隆抗体69-G10-B8-G8通过吖啶酯标记后制得,所述单克隆抗体69-G10-B8-G8是由杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8分泌获得;

[0008] 所述生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体是先将单克隆抗体9-C3-D12-B1利用生物素标记,然后再与包埋有亲和素的磁珠结合后制得,所述单克隆抗体9-C3-D12-B1是由杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1分泌获得;

[0009] 所述杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1已于2019年11月01日保藏在中国典型培养物保藏中心CCTCC(培养物名称:杂交瘤细胞株9-C3-D2-B1,保藏编号为CCTCC NO:C2019288),保藏地址为中国武汉;所述杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8已于2019年11月01日保藏在中国典型培养物保藏中心 CCTCC(培养物名称:杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8,保藏编号为CCTCC NO:C2019289),保藏地址为中国武汉。

[0010] 除上述试剂以外,上述化学发光试剂盒还包括市面上常用的人附睾分泌蛋白4标准品、人附睾分泌蛋白4质控品、磷酸盐(PBS)缓冲液、吖啶酯标记碳酸盐(CBS)缓冲液、生物素标记碳酸盐(CBS)缓冲液、稀释生物素标记的抗体试剂缓冲液R1、稀释吖啶酯标记的抗体试剂缓冲液R2、磁珠及磁珠稀释液、标准品和质控品稀释液;

[0011] 上述试剂盒中,通过将吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体与人附睾分泌蛋白4放入孵育槽中孵育,使吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体和生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体分别与HE4结合得到双抗体夹心复合物。所用的杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1和69-G10-B8-G8是从筛选出的若干种不同的杂交瘤细胞株中进一步筛选出的。经过验证可知,只有将杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8分泌的单克隆抗体 69-G10-B8-G8与吖啶酯标记,将杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1分泌的单克隆抗体 9-C3-D12-B1与生物素标记,再与磁珠结合,形成的双抗体夹心复合物才能具有最好的灵敏度、精密度。而如果反过来将单克隆抗体9-C3-D12-B1与吖啶酯标记,单克隆抗体69-G10-B8-G8与生物素结合,或者采用筛选出的其他杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体标记,所获得双抗体夹心复合物均不能获得最佳的灵敏度、精密度均。

[0012] 人附睾分泌蛋白4标准品、人附睾分泌蛋白4质控品、磷酸盐(PBS)缓冲液、吖啶酯标记碳酸盐(CBS)缓冲液、生物素标记碳酸盐(CBS)缓冲液、稀释生物素标记的抗体试剂缓冲液R1、稀释吖啶酯标记的抗体试剂缓冲液R2、磁珠稀释液、标准品(质控品) 稀释液等属于市面上销售的,或常用的试剂,其配置方法也属于常见的配置方法。

[0013] 优选地,所述杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8和杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1是利用人工合成的人附睾分泌蛋白4基因制备重组质粒,进行蛋白质表达纯化,再通过动物免疫、细胞融合、间接Elisa筛选、亚克隆获得若干杂交瘤细胞株,最后从若干杂交瘤细胞株中进一步筛选配对获得。具体方法如下:

[0014] S1、人工合成人附睾分泌蛋白4基因,将人附睾分泌蛋白4基因重组到表达载体质粒 pATX1中,得到HE4-pATX1表达载体;克隆位点为EcoRI/XhoI,人附睾分泌蛋白4基因基因序列如SEQ NO.1所示;

[0015] S2、将HE4-pATX1表达载体转染到293F细胞系中培养,收集上清液进行镍柱纯化得

到人附睾分泌蛋白4;纯化后的HE4还需要进行SDS-PAGE电泳(聚丙烯酰胺凝胶电泳)以验证其纯度。

[0016] S3、用人附睾分泌蛋白4免疫若干小鼠,共免疫至少4次,取血清效价检测合格的小鼠进行细胞融合,再进行间接Elisa筛选,得到若干株杂交瘤细胞株;

[0017] 一般情况下,选择10只小鼠,共免疫四次即可达到目的。对免疫后的小鼠采用常规的方法进行血清效价检测,当血清效价达到1:64000以上即为血清效价合格的小鼠,进行细胞融合,再经过间接Elisa筛选。

[0018] 细胞融合的方法为:

[0019] (1)将已进行免疫的Balb/c小鼠固定,摘除眼球取血,然后颈椎脱臼处死小鼠,置于75%的酒精中消毒至少30秒;

[0020] (2)取小鼠全血于室温下静置1小时,然后4℃过夜保存;次日将小鼠全血3000rpm离心15min,小心吸取上层血清做为杂交瘤筛选阳性对照,-20℃下分装保存;

[0021] (3)取出小鼠脾脏,分别取3个直径10cm的培养皿,加入10ml 1640基本培养基;在第一个培养皿中漂洗脾脏一次;在第二个培养皿中用镊子去除脾脏表面残留结缔组织(注意不要撕破脾脏被膜);在第三个培养皿中,用两个载玻片磨砂面轻轻碾磨,碾破脾脏被膜后,即可得到脾细胞;

[0022] (4)用10ml移液管吸取碾磨充分的脾细胞悬液经细胞筛过滤,转移到50ml的无菌离心管中;再次吸取10ml 1640基本培养基反复冲洗培养皿2-3次后经细胞筛过滤,转移到上述无菌离心管中,经1500rpm离心6min;

[0023] (5)弃去上清,用10ml 1640基本培养基反复吹打10-15次,充分悬浮脾细胞沉淀,再添加30ml 1640基本培养基反复吹打5次,混匀,经1500rpm离心6min;

[0024] (6)重复步骤(5)一次;弃去上清,用5ml 1640基本培养基反复吹打10-15次,重悬脾细胞沉淀;取出约0.2ml细胞悬液,经20-40倍稀释后进行脾细胞计数,融合之前室温放置;

[0025] (7)在小鼠脾细胞离心期间,将sp2/0细胞收集在50ml无菌离心管中,经1000rpm离心5min;

[0026] (8)弃去上清,用10ml 1640基本培养基反复吹打10-15次,悬浮骨髓瘤细胞沉淀,再添加30ml 1640基本培养基反复吹打5次,混匀,经1000rpm离心5min;

[0027] (9)重复步骤(8)一次,

[0028] (10)弃去上清,用5ml 1640基本培养基反复吹打10-15次重悬骨髓瘤细胞沉淀;取出约0.2ml细胞悬液,经10-20倍稀释后进行细胞计数,融合前室温放置;

[0029] (11)融合开始前,打开恒温水浴锅,将温度调到37℃;将PEG和1640基本培养基放在水浴锅中预热;

[0030] (12)根据细胞计数结果,将所需的脾细胞和骨髓瘤细胞分别混匀后按5:1比例在50ml离心管中混合;

[0031] (13)1000rpm离心5min,弃去上清,轻弹离心管壁,松动细胞沉淀。

[0032] (14)将离心管置于37℃水浴中,向细胞沉淀内匀速加入已预热的PEG(1min内加入1ml),加入PEG过程中,一边转动离心管一边用枪头的尖端温柔地搅拌,静止90s;匀速加入已预热的1640基本培养基(第一次):1min内加入1ml,边加边温柔地搅拌;匀速加入已预热

的1640基本培养基(第二次):1min内加入2ml,边加边温柔地搅拌;匀速加入已预热的1640基本培养基(第三次):3min内加入9ml,边加边温柔地搅拌;匀速加入已预热的1640基本培养基(第四次),边加边温柔地搅拌直至40ml,将离心管置于37℃水浴中静置3min。

[0033] (15)已融合的细胞悬液经800rpm离心5min,去上清,松动细胞沉淀。

[0034] (16)加5ml HAT培养基,温柔地吹打10次悬浮细胞沉淀,根据脾细胞数加入适量的HAT培养基,吹打混匀,接种到96孔细胞培养板。

[0035] 所用的间接Elisa筛选方法为:

[0036] I、包被:取抗原用包被液稀释至2-5 μ g/ml,根据所需的孔计算出所需的包被液的量,每孔加100 μ l,37℃作用1h后4℃过夜;

[0037] II、封闭:次日取出酶标板用PBST加满各孔洗涤3次每次五分钟,每次充分拍干;然后每孔加入200 μ l的封闭液(1%BSA或者5%脱脂乳),37℃作用2h,PBST洗涤3次;

[0038] III、加一抗:按一定比例稀释相应的某杂交瘤细胞株分泌的抗体上清(一抗),每孔加100 μ l稀释液。设置阴性对照和空白对照,阴性对照为对应的小鼠进行免疫之前的血清,空白对照为磷酸盐缓冲液,37℃作用1h,PBST洗涤3次;此步骤是加稀释受检血清,使血清中的特异性抗体与固相抗原结合,形成固相抗原抗体复合物,经洗涤后,固相载体上只留下特异性抗体,其他免疫球蛋白及血清中的杂质由于不能与固相抗原结合,在洗涤过程中被洗去;

[0039] IV、加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG的抗体:将其以1:10000稀释,每孔100 μ l,37℃作用1h,PBST洗涤3次。此步目的是加酶标抗免疫球蛋白(酶标抗体),它与一抗相结合,从而使该抗体间接的标记上酶,清洗后,固相载体上的酶量就代表特异性抗体的量;

[0040] V、加底物:每孔加入100 μ l的底物反应液(现配现用,避光)置37℃,30min,然后取出加入2mol/L的H₂SO₄终止反应;加底物显色,颜色深度代表标本中受检抗体量;

[0041] VI、酶标仪测OD₄₅₀值,以OD₄₅₀值大于3倍阴性对照孔的值为标准,筛选出对应的一抗及对应的单克隆细胞株。

[0042] S4、将步骤S3所得的若干杂交瘤细胞株分泌的抗体分别进行吡啶酯标记和生物素标记,得到吡啶酯标记的检测抗体和生物素标记的捕获抗体,并制备人附睾蛋白4的标准品、质控品;

[0043] S5、选择步骤S4所得任一种吡啶酯标记的检测抗体、任一种生物素标记的捕获抗体进行配对,再与含有人附睾蛋白4的溶液同时加至孵育槽中孵育,再通过清洗、磁性分离,得到若干组双抗体夹心复合物;加入化学发光底物液测定各组的发光强度,筛选出最佳配对的吡啶酯标记的检测抗体和生物素标记的检测抗体,即获得对应的最佳配对的杂交瘤细胞株。

[0044] 生物素标记的捕获抗体,是先将单克隆抗体与生物素结合,然后加入已预先包埋了亲和素的磁珠,搅拌后外加磁场,最终筛选而得到。亲和素是从卵白蛋白中提取的一种由4个相同亚基组成的碱性糖蛋白,可以与生物素结合。当生物素标记的单克隆抗体加入到包埋有亲和素的磁珠后,就将单克隆抗体稳定结合在磁珠上。与一般情况下,假如通过间接Elisa筛选获得了10株杂交瘤细胞株,则需要将这10株杂交瘤细胞株分别用吡啶酯标记和生物素标记,然后一对一地进行配对制备双抗体夹心复合物,即一共有100组双抗体夹心复

合物,然后统一进行化学发光检测。

[0045] 采用上述方法,制备含有人附睾分泌蛋白4基因序列的重组质粒,然后纯化人附睾分泌蛋白4,在进行小鼠免疫,最后进行杂交瘤细胞株的筛选配对,就能够初步筛选出若干杂交瘤细胞株,并能够进一步筛选出上述杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8和杂交瘤细胞株 9-C3-D12-B1,最终发现采用吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1 捕获抗体配对制备的双抗体夹心复合物具有最好的灵敏度和精密度。而若改变了上述制备方法的各条件参数,就会对筛选的杂交瘤细胞株种类有很大影响,无法筛选出杂交瘤细胞株 69-G10-B8-G8和杂交瘤细胞株9-C3-D12-B1,进而导致制备的双抗体夹心复合物不能达到最佳的灵敏度和精密度。

[0046] 进一步优选地,步骤S4中,杂交瘤细胞株分泌的抗体进行吖啶酯标记的具体方法为:

[0047] S411、取吖啶酯使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度3mg/ml,得吖啶酯溶液;

[0048] S412、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调至 pH=9.0,终浓度2-5mg/ml,得抗体溶液I;碳酸盐缓冲液(CBS缓冲液)的pH=9.0,浓度2-5mg/ml;

[0049] S413、按每mg抗体加14ul吖啶酯溶液的比例,将吖啶酯溶液和抗体溶液I于25℃避光搅拌2小时;

[0050] S414、加入赖氨酸终止反应,25℃避光搅拌0.5小时,收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液3-4次,得吖啶酯标记的检测抗体;赖氨酸和吖啶酯的质量比为1:1-5;

[0051] 杂交瘤细胞株分泌的抗体进行生物素标记的具体方法为:

[0052] S421、生物素使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度20mg/ml,得生物素溶液;

[0053] S422、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调至 pH=8.5,终浓度1-10mg/ml,得抗体溶液II;所用的碳酸盐缓冲液与步骤S412的相同。

[0054] S423、按每mg抗体加5ul生物素溶液的比例,将生物素溶液和抗体溶液II于室温避光搅拌2小时;

[0055] S424、收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液3-4次;

[0056] S425、步骤S424所得溶液中加入包埋有亲和素的磁珠,25℃避光搅拌2小时,得生物素标记的检测抗体。

[0057] 优选地,步骤S5中,吖啶酯标记的检测抗体、生物素标记的捕获抗体配对的方式为十字交叉法配对。十字交叉法能够减少实验的检测样本数量,节省时间,不采用十字交叉法而采用一一配对的方法也同样能达到筛选的目的。

[0058] 优选地,步骤S5中,清洗和磁性分离的方式为:对孵育后的产物溶液施加外加磁场,然后吸去上清液,用pH值7.4的含0.05%吐温-20的0.01M磷酸盐缓冲液清洗缓冲液清洗3次,继续吸去上清液,去除外加磁场后即得到双抗体夹心复合物。

[0059] 优选地,步骤S2中培养的时间为6天。

[0060] 采用化学发光检测筛选的具体方法为:取上述制备的双抗体夹心复合物,取0.1M硝酸,0.1%过氧化氢,发光激发液A100μl,立即放入化学发光免疫检测仪内,仪器自动加入0.25M氢氧化钠溶液,2%Triton-100发光激发液B100μl;检测累计时间15s,检测各孔的发

光强度(RLU)。发光强度与待测样本的浓度成正比关系,从而获得采用不同配对的吡啶酯标记的检测抗体、生物素标记的捕获抗体制备双抗体夹心复合物检测标准品浓度,最终筛选出检测结果与标准品浓度最接近的配对组合。

[0061] 与现有技术相比,本发明的有益之处在于:本发明提供了一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒,通过选用最佳配对的吡啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体与HE4结合制备双抗体夹心复合物进行化学发光检测,显著提高了检测的灵敏度和精密度,线性范围宽,对抗原的反应特异性好,不会产生交叉反应。

附图说明

[0062] 图1为实施例1的步骤S1中对重组质粒HE4-pATX1进行电泳验证的电泳图;

[0063] 图2为实施例1的步骤S2中对纯化后的HE4进行SDS-PAGE电泳的电泳图;

[0064] 图3为实施例1制备的试剂盒与雅培试剂盒检测临床样品相关性的结果图。

具体实施方式

[0065] 下面将对本发明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做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0066] 实施例1

[0067] 本实施例的检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒中,所选用的吡啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体,采用如下方法筛选获得:

[0068] S1、人工合成人附睾分泌蛋白4基因,将人附睾分泌蛋白4基因重组到表达载体质粒 pATX1中,得到HE4-pATX1表达载体,通过进行电泳验证,结果如附图1,由附图1可知;克隆位点为EcoRI/XhoI,人附睾分泌蛋白4基因基因序列如SEQ NO.1所示;

[0069] S2、将HE4-pATX1表达载体转染到293F细胞系中培养6d,收集上清液进行镍柱纯化得到人附睾分泌蛋白4;纯化后的HE4进行SDS-PAGE电泳(聚丙烯酰胺凝胶电泳)以验证其纯度达到95%以上,其电泳图如附图2所示。

[0070] S3、用人附睾分泌蛋白4免疫10只小鼠,共免疫至少4次,取第3、4次免疫后的血清效价检测合格的小鼠进行细胞融合,再进行间接Elisa筛选,得到18株杂交瘤细胞株,如下表1所示;

[0071] 表1间接Elisa筛选得到的18株杂交瘤细胞株

2-H9-A6-A1	9-C3-D12-B1	10-G5-A7-B8	27-E1-H1-E5	62-E10-C5-G11	69-G10-B8-G8
80-F4-A1-E12	107-B1-E3-F1	117-B3-C4-G1	124-D5-H4-H1	131-C12-E8-F9	138-F2-H7-E1
140-D7-D3-G6	150-E5-G1-A1	151-A7-D1-F7	152-C12-C9-G1	157-A12-F1-D1	161-F10-D7-E11

[0073] S4、将步骤S3所得的若干杂交瘤细胞株分泌的抗体分别进行吡啶酯标记和生物素标记,得到吡啶酯标记的检测抗体和生物素标记的捕获抗体,并制备人附睾蛋白4的标准品、质控品;

[0074] 其中杂交瘤细胞株分泌的抗体进行吡啶酯标记的具体方法为:

[0075] S411、取吡啶酯使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度3mg/ml,得吡啶酯溶液;

[0076] S412、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调

至 pH=9.0,终浓度5mg/ml,得抗体溶液I;

[0077] S413、按每mg抗体加14ul吡啶酯溶液的比例,将吡啶酯溶液和抗体溶液I于25℃避光搅拌2小时;

[0078] S414、加入赖氨酸终止反应,25℃避光搅拌0.5小时,收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液4次,得吡啶酯标记的检测抗体;

[0079] 杂交瘤细胞株分泌的抗体进行生物素标记的具体方法为:

[0080] S421、生物素使用N,N-二甲基甲酰胺溶解,浓度20mg/ml,得生物素溶液;

[0081] S422、将杂交瘤细胞株分泌的抗体溶解于磷酸盐缓冲液中,并用碳酸盐缓冲液调至 pH=8.5,终浓度10mg/ml,得抗体溶液II;

[0082] S423、按每mg抗体加5ul生物素溶液的比例,将生物素溶液和抗体溶液II于室温避光搅拌2小时;

[0083] S424、收集反应物使用磷酸盐缓冲液透析过夜,中途更换磷酸盐缓冲液4次;

[0084] S425、步骤S424所得溶液中加入包埋有亲和素的磁珠溶液,25℃避光搅拌2小时,得生物素标记的检测抗体。

[0085] 所用的磁珠通过购买获得,货号JSR,Magnosphere-MS160/Streptavidin;

[0086] S5、将步骤S4所得吡啶酯标记的检测抗体、生物素标记的捕获抗体进行夹心配对,配对实验开始前需要将以下试剂稀释成工作浓度。

[0087] 生物素标记的捕获抗体,工作浓度稀释至0.1μg/ml~4μg/ml。所用的抗体稀释缓冲液为R1:配置20mM HEPES溶液,pH7.4,然后分别加入BSA 30g,蔗糖50g,甘氨酸2g,tween-20 5ml,Na₂CO₃ 0.5g,充分溶解后,定容至1L。

[0088] 吡啶酯标记的检测抗体,工作浓度为0.1μg/ml~4μg/ml。所用的抗体稀释缓冲液为R2:配置20mM HEPES溶液,pH5.5,然后分别加入BSA 30g,蔗糖20g,甘氨酸20g,tween-20 5ml,Na₂CO₃ 0.5g,充分溶解后,定容至1L。准备磁珠,磁珠稀释液为:配置50mM PBS溶液pH7.4,加入BSA 2g,Na₂CO₃ 0.5g,Tritonx-100 5ml,充分溶解后,定容至1L。

[0089] 磁珠使用终浓度为1~5mg/ml。所用的磁珠稀释液:配置50mM PBS溶液pH7.4,加入BSA 2g,Na₂CO₃ 0.5g,Tritonx-100 5ml,充分溶解后,定容至1L。

[0090] 人附睾分泌蛋白4标准品和质控品,工作浓度1μg/ml,稀释液为pH=7.4的磷酸盐缓冲液。

[0091] 将上述4种试剂按照全自动化学发光仪器使用说明放入到对应的试剂仓中,进行上机操作。在全自动化学发光仪器中自动完成双抗体夹心复合物的制备以及筛选最佳配对的吡啶酯标记的检测抗体和生物素标记的捕获抗体。

[0092] 将分组配对后得到的18×18共324组双抗体夹心复合物进行筛选。例如,将抗体9-C3-D12-B1进行生物素标记后,与所有18株吡啶酯标记的捕获抗体(包括生物素标记的抗体9-C3-D12-B1)进行双抗夹心配对筛选,得到10对吡啶酯标记的检测抗体和生物素标记的捕获抗体可以双抗体夹心检测人附睾分泌蛋白4标准品;然后将这10对配对抗体分别检测10例阳性血清样本,每例样本重复检测3次,计算3次检测的变异系数。

[0093] 作为其中几组例子,下表2-4是分别将生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体与吡啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体,生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体与吡啶酯标记 152-C12-C9-G1检测抗体,以及生物素标记2-H9-A6-A1捕获抗体与吡啶酯标记 69-G10-B8-G8检测抗

体进行双抗体夹心检测,结果如下表2-4。

[0094] 表2变异系数检测结果1

[0095]	生物素标记	9-C3-D12-B1	变异系数
	吖啶酯标记	69-G10-B8-G8	
		检测化学发光值 (RLU)	
	血清样本 1	3021	4.82
	血清样本 2	3516	7.94
	血清样本 3	5231	1.78
	血清样本 4	3563	1.74
	血清样本 5	3162	3.17
	血清样本 6	3278	1.09
	血清样本 7	3607	6.81
	血清样本 8	5882	0.66
	血清样本 9	3518	1.86
	血清样本 10	3704	2.36

[0097] 表3变异系数检测结果2

[0098]	生物素标记	9-C3-D12-B1	变异系数
	吖啶酯标记	152-C12-C9-G1	
		检测化学发光值 (RLU)	
	血清样本 1	1481	5.01
	血清样本 2	1680	1.46
	血清样本 3	1891	6.15
	血清样本 4	1473	5.95
	血清样本 5	1455	2.6
	血清样本 6	1597	2.81
	血清样本 7	1663	3.34
	血清样本 8	4402	8.81
	血清样本 9	1714	3.37
	血清样本 10	1593	2.96

[0099] 表4变异系数检测结果3

[0100]	生物素标记	2-H9-A6-A1	变异系数
	吖啶酯标记	69-G10-B8-G8	
		检测化学发光值 (RLU)	
	血清样本 1	1512	6.99
	血清样本 2	1560	6.83
	血清样本 3	1719	5.53
	血清样本 4	1399	9.09
	血清样本 5	1287	8.9
[0101]	血清样本 6	1454	5.7
	血清样本 7	1536	2.16
	血清样本 8	4527	6.5
	血清样本 9	1569	2.68
	血清样本 10	1484	5.6

[0102] 通过上述对比发现,吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体和生物素标记9-C3-D12-B1 捕获抗体的检测阳性血清信号值高,变异系数小,为最佳配对;其对应的分别分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株即69-G10-B8-G8和9-C3-D12-B1。

[0103] 将吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体和生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体制成用于检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒,试剂盒中还包括人附睾分泌蛋白4标准品、人附睾分泌蛋白4质控品、磷酸盐 (PBS) 缓冲液、吖啶酯标记碳酸盐 (CBS) 缓冲液、生物素标记碳酸盐 (CBS) 缓冲液、稀释生物素标记的抗体试剂缓冲液R1、稀释吖啶酯标记的抗体试剂缓冲液R2、磁珠稀释液、标准品 (质控品) 稀释液等常用试剂。

[0104] 1、灵敏度的检测

[0105] 参照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 发布的《临床实验室检验程序检测能力评价指南 (第2版)》(EP17A) 的实验方案,计算定量检测人附睾分泌蛋白4含量的化学发光试剂盒的灵敏度,求得的灵敏度 $<1.5\text{pg/mL}$,具有非常高的灵敏度。

[0106] 2、线性的检测

[0107] 选择浓度为0、0.375、0.75、1.5、3.75、7.5、15、37.5、75、150、375、750、1500pmol/L 的HE4标准品,所用的标准品稀释液为:900ml去离子水,加入 Na_2HPO_4 11.45g, NaH_2PO_4 2.28g,蔗糖30g,甘氨酸1g, Tritonx-100 5ml, NaN_3 0.5g,充分溶解后,定容至1L。

[0108] 采用上述化学发光试剂盒对上述不同浓度的标准品做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.999$,该化学发光试剂盒对人附睾分泌蛋白4的检测的线性范围为1.5-1500pmol/mL。

[0109] 3、精密度的检测

[0110] 取浓度为30pmol/mL的低浓度HE4样品和800pmol/mL高浓度HE4样品,每个样品每个浓度各做3次平行测试,用3批试剂盒进行检测,计算上述化学发光试剂盒批内及批间差,结果表明上述化学发光试剂盒批内及批间差均 $<3\%$ 。

[0111] 4、与雅培试剂盒检测临床样品相关性：

[0112] 采用上述化学发光试剂盒与雅培人附睾蛋白4测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)HE4 Reagent Kit试剂盒检测同一批次的临床样品,根据所得结果比较两者的相关性。结果如下表5和附图3。

[0113] 表5实施例1的试剂盒与雅培试剂盒检测临床样品相关性结果

[0114]

血清样本编号	检测RLU值	CV (%)	检测赋值 (pmol/L)	雅培赋值 (pmol/L)
1	3013	2.6	2.67	1.5
2	6145	1.57	14.17	20.75
3	18658	4.13	60.51	65.07
4	19703	0.84	64.41	71.26
5	39365	0.91	138.58	142.9
6	39272	2.26	138.24	147.8
7	48984	2.54	175.43	178.5
8	47957	1.85	171.48	178.7
9	56420	1.32	204.17	209.3
10	115429	2.12	439.57	411.1
11	78859	4.34	470.18	465.3
12	171940	0.77	675.74	534.6
13	228063	1.52	917.46	727
14	243037	3.34	982.63	767.7
15	293293	1.81	1201.59	1053
16	293553	2.59	1202.72	1055.5
17	285052	0.98	1165.75	1058

[0115] 利用本实施例的上述方法筛选得到的最佳配对抗体,对17例人血清样本进行检测,获得了血清中HE4的浓度值,并同时利用雅培的试剂和仪器对该批样本进行了检测,绘制散点图。

[0116] 在比对试验中,人附睾蛋白4浓度1.5~1500pmol/L线性拟合后,回归方程 $Y=0.839X+20.877$, $R^2=0.9906$,参照EP9-A3文件,计算医学决定水平处的偏移,以国家卫计委临床检验中心室间质评1/2Tea (15%) 为可接受标准,计算医学决定性水平处的偏移结果为3.57%,偏移远远小于1/2TEa (15%),比对通过。这说明结合表5和附图3,该试剂盒测定的病人和正常人的血清中HE4的浓度值,具有明显差异性,与雅培检测数据的相关性非常好。

序列表

<110> 普健生物(武汉)科技有限公司

<120> 一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒

<141> 2019-11-27

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 417

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
gaattcgcca ccatgccagc ttgcagactg ggacctctcg ccgccgctct cctcctgagc 60
ctgctcctgt tcggattcac actcgtgtct ggaaccgggg ccgaaaagac cggcgtgtgc 120
cccgagttac aagctgacca gaactgcaca caggaatgcg tgagcgactc tgagtgcgcc 180
gacaacctca agtgttgag cgctggatgc gctacattct gtagcctccc taacgacaaa 240
gaagggtctt gcccacaggt gaacattaac ttccctcagc tcggcctgtg ccgcgaccag 300
tgccaggtgg actctcagtg ccccgagacag atgaagtgt gtagaaacgg atgcggaaag 360
gtgtcttgcg tgacacccaa cttcggatct caccaccacc accaccactg actcgag 417
```

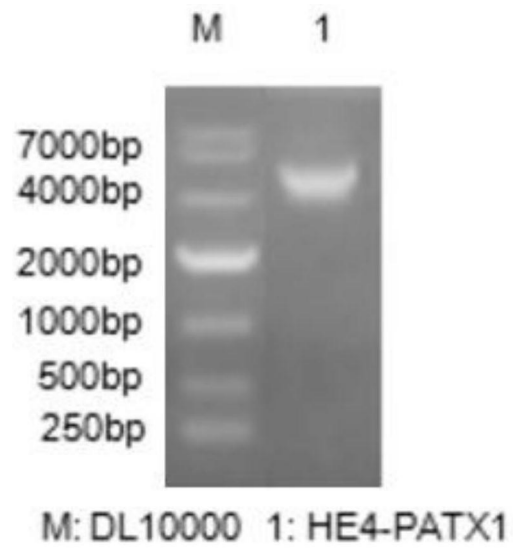


图1

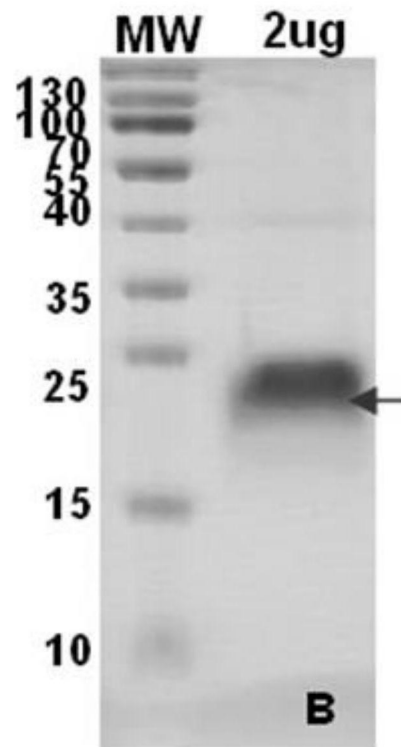


图2

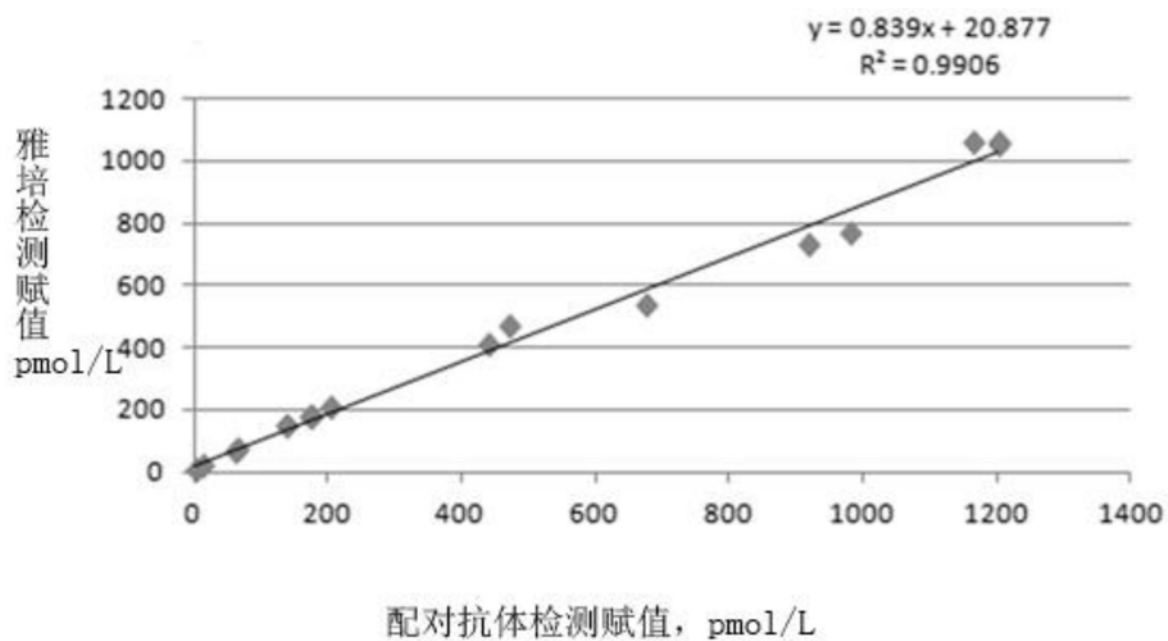


图3

专利名称(译)	一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒		
公开(公告)号	CN110895279A	公开(公告)日	2020-03-20
申请号	CN201911182031.2	申请日	2019-11-27
[标]发明人	雷坤 代腾飞 秦伏波 鲁亮 万定一 张永霞		
发明人	雷坤 代腾飞 秦伏波 方绪凤 鲁亮 万定一 张永霞		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/577 G01N21/76 C07K16/38		
CPC分类号	C07K16/38 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/57449 G01N33/57488 G01N33/577		
代理人(译)	徐瑛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人附睾分泌蛋白4的化学发光试剂盒，试剂盒中包含人附睾分泌蛋白4、吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体。吖啶酯标记69-G10-B8-G8检测抗体、生物素标记9-C3-D12-B1捕获抗体分别由各自对应的杂交瘤细胞株69-G10-B8-G8和9-C3-D12-B1分泌获得。这两种杂交瘤细胞株是利用人工合成的HE4基因，经重组质粒、蛋白质表达、动物免疫和筛选，最终亚克隆获得。本发明公开的双抗体夹心复合物的检测灵敏度和精密度好，线性范围宽，对抗原的反应特异性好，不会产生交叉反应。

