



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105842440 B

(45)授权公告日 2017.08.04

(21)申请号 201610225639.9

(22)申请日 2016.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105842440 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(73)专利权人 江苏晶红生物医药科技股份有限公司

地址 213125 江苏省常州市新北区云河路
518号常州千红生化制药众红生物

(72)发明人 马永 时振华 丁娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件

CN 204228720 U,2015.03.25,

CN 104122397 A,2014.10.29,

CN 203858251 U,2014.10.01,

CN 102680702 A,2012.09.19,

US 2015072022 A1,2015.03.12,

WO 2004011947 A1,2004.02.05,

CN 105092861 A,2015.11.25,

CN 105158482 A,2015.12.16,

CN 104630151 A,2015.05.20,

审查员 舒霏霏

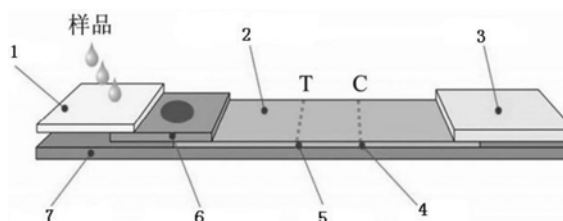
权利要求书1页 说明书10页
序列表7页 附图5页

(54)发明名称

人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡

(57)摘要

本发明涉及抗人C-反应蛋白抗体及其应用。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(P24及P03);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人临床样本检测的人C-反应蛋白的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。



1. 人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,包括样品垫、荧光结合垫、反应膜和吸水垫;所述荧光结合垫喷涂有荧光微球标记的抗体P03,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有抗体P24,质控带位置包被抗His标签抗体或Protein L;

所述抗体P24是抗人C-反应蛋白抗体,包括:

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和如序列SEQ ID NO:3所示的HCDR3;

以及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和如序列SEQ ID NO:6所示的LCDR3;

所述抗体P03是抗人C-反应蛋白抗体,包括:

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和如序列SEQ ID NO:11所示的HCDR3;

以及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和如序列SEQ ID NO:14所示的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于抗体P24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所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于所述P24抗体为单链抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示。

4. 根据权利要求1所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于抗体P03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。

5. 根据权利要求1所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于所述P03抗体为单链抗体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于封闭液为含10%BSA的0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液。

7. 根据权利要求1-5任一项所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于荧光抗体稀释液为含1%BSA、10%海藻糖和0.025%吐温-20的0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液。

8. 根据权利要求1-5任一项所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于包被抗体稀释液为含3%甲醇和0.025%吐温-20的0.05mol/L pH7.2的PBS。

9. 根据权利要求1-5任一项所述的人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡,其特征在于样本稀释液为含0.5%BSA、0.025%吐温-20、0.05%安替比林和0.05%proclin300的0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液。

人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体的涉及两种抗人C-反应蛋白(CRP)抗体及其制备方法以及上述抗体在人C-反应蛋白检测中的应用。

背景技术

[0002] C-反应蛋白(C reactive protein,CRP)是蛋白质家族中的一员,是一种急性期反应蛋白,在组织损伤和细菌感染时血浆浓度急剧升高,是机体重要的防御分子,主要由肝脏产生并分泌。CRP由五个完全相同的球形单体以非共价键结合组成稳定的盘状结构,属于正五聚体家族。CRP在结构上为对称的五面体,其单体由206个氨基酸组成,分子量约为23KDa,CRP的总分子量约为118KDa。CRP参与体内的各种炎症及免疫反应,是冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)的重要标志物。大量研究表明:高水平的CRP是周围性血管病、心肌梗死、脑血管病及血管性死亡的独立风险预测因子。

[0003] 在正常人血清中CRP含量极少,浓度为0.062-8.2mg/L,半衰期约为15小时。当发生细菌感染2小时后即开始升高,平均8小时增加1倍,48小时达高峰,其在病毒感染时则不会升高。CRP持续升高则提示机体存在慢性炎症或自身免疫性疾病。CRP变化不受病人的个体差异、机体状态及治疗药物的影响。另外,CRP在其他领域亦发挥着重要的作用:①在由慢性炎症引发心血管疾病的独立危险因素中CRP的作用已被证实,及时监测CRP的水平变化对心血管疾病的干预及预后起重要作用。有些学者甚至认为CRP可作为心血管危险评估的金标准,且CRP水平越高,发生心脑血管的危险性就越大;②CRP可用来评价急性胰腺炎的严重程度,当发生广泛坏死性胰腺炎时血清中CRP的水平可高达250mg/L;③如将CRP与甲胎蛋白联合应用,可用来鉴别肝脏恶性肿瘤与良性疾病,为临床治疗方案制定提供指导;另外,CRP测定对肿瘤的治疗和预后亦有积极的意义,恶性肿瘤患者CRP水平大都升高,手术切除肿瘤后CRP水平则会下降,且进行放疗、化疗和皮质激素治疗对血清CRP的影响非常小,所以测定血清CRP的水平变化有助于临床估测各个器官系统中恶性肿瘤的进展过程。④评估患者预后:CRP水平越高,提示疾病控制不佳,预后不良。

[0004] 鉴于CRP在众多领域中的重要作用,制备CRP抗体并用于制备CRP定量检测试剂盒具有重要的临床应用价值。CRP通常是通过抗体浊度法或免疫比浊法测定的,而他们的检测能力在3-5mg/L以上,这个水平仅仅适用于对感染的预测,而对于冠脉及脑血管的危险预测是远远不够的。除上述技术以外,使用胶体金和荧光定量检测技术的CRP试纸卡,可满足快速检测及床旁检测的需求。其中荧光定量检测具备较高的检测性能,因此适用于检测精密度要求较高的检验中心或大型医院临床科室的应用需求。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供能有效的、特异性结合人C-反应蛋白的抗体。更具体地说:

[0006] 本发明的第一目的在于提供两种抗人C-反应蛋白抗体。

[0007] 第一种抗人C-反应蛋白抗体(记为P24),

[0008] 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;

[0009] 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。

[0010] 优选的是本发明中的抗体P24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。

[0011] 第二种抗人C-反应蛋白抗体(记为P03),

[0012] 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;

[0013] 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。

[0014] 优选的是本发明中的抗体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。

[0015] 本发明第二个目的是提供两种单链抗体,所述单链抗体P24的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;所述单链抗体P03的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。

[0016] 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P24的核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示,和编码单链抗体P03的核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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:

[0020] 1) 在合适的条件下培养上述重组宿主菌表达抗体;

[0021] 2) 然后从宿主菌中纯化、收集抗体。

[0022] 本发明的第七个目的在于提供上述抗人C-反应蛋白抗体在检测人C-反应蛋白含量中的应用。

[0023] 本发明的第八个目的在于提供一组可进行配对并检测人C-反应蛋白的抗体对组合;该抗体对组合的检测灵敏度高,特异性好。

[0024] 本发明的第九个目的在于提供一种利用所述抗人C-反应蛋白抗体检测人C-反应蛋白的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡,包括样品垫、荧光结合垫、反应膜和吸水垫;所述荧光结合垫喷涂有荧光微球标记的抗体P03,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有抗体P24,质控带位置包被抗His标签抗体或Protein L。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。

[0025] 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(P24及P03);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均可满足人临床样本检测的人C-反应蛋白的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

附图说明

[0026] 图1. 抗体重链及轻链可变区基因电泳图。Lane 1和Lane4为200bp DNA Ladder；Lane 2为抗体P24重链可变区DNA；Lane 3为抗体P24轻链可变区DNA；Lane5为抗体P03重链可变区DNA；Lane 6为抗体P03轻链可变区DNA。

[0027] 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。

[0028] 图3. 单链抗体PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图。

[0029] 其中，图3-a. 为单链抗体P24基因PCR产物；图3-b为单链抗体P03基因PCR产物。

[0030] 图4. 重组单链抗体毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液鉴定图。

[0031] 其中，图4-a为重组单链抗体P24重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液SDS-PAGE电泳鉴定图；图4-b为重组单链抗体P03重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液SDS-PAGE电泳鉴定图。

[0032] 图5. SDS-PAGE电泳鉴定单链抗体纯化效果图。

[0033] 其中，图5-a为SDS-PAGE电泳鉴定单链抗体P24纯化效果图；图5-b为SDS-PAGE电泳鉴定单链抗体P03纯化效果图

[0034] 图6. 为本发明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为吸水垫、4为质控线(C线)、5为检测线(T线)、6为荧光结合垫、7为PVC片材。

[0035] 图7. 本发明时间分辨免疫荧光层析定量检测卡检测范围拟合曲线。其中横坐标为蛋白浓度(ng/mL)；纵坐标为检测值； r^2 为0.998。

[0036] 图8. 本发明时间分辨免疫荧光层析定量检测卡线性范围拟合曲线。其中横坐标为理论浓度(ng/mL)；纵坐标为检测值； r^2 为0.996。

[0037] 图9. 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

[0038] 定义

[0039] “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。

[0040] “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。

[0041] 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。

[0042] 实施例1. 抗人C-反应蛋白杂交瘤细胞株的制备

[0043] 1. 动物免疫

[0044] 以提取于人血浆的C-反应蛋白(购买于HyTest公司)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,进行小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合实验。

[0045] 2. 细胞融合

[0046] (1). 脾脏细胞的制备

[0047] 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。

[0048] (2). 饲养细胞的制备

[0049] 取8~10周龄的雌性BALB/c小鼠一只,摘眼球获取阴性血清,经断颈椎处死后置于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;

[0050] 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。

[0051] (3). 细胞融合

[0052] 选择处于对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞株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。

[0053] 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。

[0054] 3. 抗人C-反应蛋白特异性杂交瘤株筛选

[0055] (1). 检测板的准备:用CB包被液稀释CRP(购买于HyTest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%牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA,购买于盐城赛宝生物科技有限公司)的PBST缓冲液封闭(200 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C封闭2小时;拍干,备用。

[0056] (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M24及M03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。

[0057] 实施例2. 杂交瘤细胞株抗体可变区序列的测定

[0058] 对上述杂交瘤细胞株M24及M03抗体可变区序列进行测定。

[0059] 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M24及M03进行总RNA提取并立即进行反转录;

[0060] 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℃备用;

[0061] 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;

[0062] 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,交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

[0063] 测序得到杂交瘤细胞株M24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和如序列SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0064] 测序得到杂交瘤细胞株M03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和如序列SEQ ID NO:14所示的LCDR3。

[0065] 实施例3. 单链抗体的重组表达及纯化

[0066] 根据实施例2中测序结果,分别将杂交瘤细胞株M24及M03抗体重链及轻链可变区之间加入连接肽(GGGGS)₃,引入六个组氨酸标签SEQ ID NO:17,并将其全基因融合组氨酸标签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P24及抗体P03,其结构组成如附图2所示。上述单链抗体的重组表达具体如下:

[0067] a) 融合蛋白基因的表达质粒构建

[0068] 密码子优化后的抗体P24的核苷酸序列如SEQ ID NO:18所示、氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示;密码子优化后的抗体P03的核苷酸序列如SEQ ID NO:20所示、氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示。分别将优化后的抗体P24及P03全基因合成的片段上游引入pPICZ α A载体中XhoI酶切位点,下游引入XbaI酶切位点,构建到pUC57质粒中,得到一种长期保存质粒,质粒记为pUC57-P24及pUC57-P03(由南京金斯瑞科技有限公司提供)。进行PCR扩增,其中上游引物P1为:5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3';下游引物P2为:5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'。常规PCR程序后,琼脂糖凝胶电泳分析(附图3-a,图3-b),显示两种产物大小与预期大小(800bp、780bp)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 A(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,即得到单链抗体P24及P03的表达质粒,分别记为pPICZ α -P24及pPICZ α -P03。

[0069] b) 单链抗体基因在毕赤酵母宿主工程菌株的构建、筛选及表达

[0070] YPDS固体培养基配制:参照Invitrogen公司EasySelect Pichia Expression Kit说明书;毕赤酵母感受态细胞制备:参照EasySelect Pichia Expression Kit说明书;BMGY培养基配制:参照Invitrogen公司Multi-Copy Pichia Expression Kit说明书;BMMY培养基配制:参照Invitrogen公司Multi-Copy Pichia Expression Kit说明书。

[0071] 将pPICZ α -P24及pPICZ α -P03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。

[0072] 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凝胶电泳鉴定,观察目标蛋白表达情况(附图4-a,图4-b)。

[0073] 将上述获得的P24及P03重组基因工程菌株分别接种于500mL 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。

[0074] c) 单链抗体纯化

[0075] 采用组氨酸标签亲和柱纯化抗体P24及P03单链抗体,预装柱子选择为HisTrap HP,具体步骤如下:

[0076] 步骤一、发酵液的除杂预处理:将上述表达得到抗体P24及P03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。

[0077] 步骤二、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P24及P03融合蛋白发酵液进行亲和纯化,柱子为HisTrap HP(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-a和图5-b可知,两种纯化后的蛋白纯度均达到95%以上,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。

[0078] 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。

[0079] 实施例4. 抗体的性能评价

[0080] 1、抗体P24及P03的Western blot鉴定

[0081] a. 聚丙烯酰胺凝胶电泳:分别配置12%非变性聚丙烯酰胺凝胶和SDS-聚丙烯酰胺凝胶;分别上样标准蛋白质及天然CRP蛋白(购买于HyTest公司),恒压下电泳1小时;

[0082] b. 转膜: 恒流 (35mA/膜) 条件下转膜1小时, 将聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白质分别转移至硝酸纤维素膜上。考马斯亮蓝G250对完成转膜的聚丙烯酰胺凝胶进行染色, 观察蛋白的残留情况;

[0083] 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;

[0084] 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P24 (P24-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P03 (P03-HRP, 1mg/mL, 本公司采用经典过碘酸钠法标记, 下同), 分别加入上述硝酸纤维素膜中, 室温反应1小时; TBST洗涤5次, 每次10分钟;

[0085] 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。

[0086] 实验结果表明, 本发明两种抗体均可与变性及非变性血液提取的天然CRP反应, 证明了本发明两种抗体与天然CRP的结合力。

[0087] 2、单链抗体P24及P03在时间分辨荧光检测平台的评价

[0088] 用0.05mol/L pH7.2的PBS将P24抗体稀释至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P03抗体稀释10倍, 喷涂于结合垫上; 按附图6所示贴膜、切条、装卡 (具体制备参见实施例5)。将检测卡分别检测浓度含量为400、200ng/ml的天然CRP蛋白 (购买于HyTest公司) 和0.05mol/L pH7.2的PBS, 检测结果如下:

包被抗体		P24
标记抗体		P03
[0089] 标准品浓度 (ng/ml)	400	1.634
	200	1.144
	0	0.018

[0090] 由上述结果可知, P24、P03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, 能够检测一定浓度的天然CRP蛋白。

[0091] 实施例5.C-反应蛋白的时间分辨荧光免疫检测卡的制备

[0092] 本检测方法采用双抗体夹心免疫层析法的原理。

[0093] 1、溶液配制

[0094] 0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液制备: 取0.1mol/L的H₃BO₃ 70ml, 用0.025mol/L的Na₂B₄O₇ · 10H₂O调节pH至8.0, 并定容至100ml, 置于4℃备用, 有效期3个月。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 荧光抗体稀释液制备: 含1%BSA, 10%海藻糖, 0.025%吐温-20, 0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液, 用0.22U膜过滤, 置于4℃备用, 有效期7天。

[0098] 包被抗体稀释液制备:含3%甲醇,0.025%吐温-20,0.05mol/L pH7.2的PBS,用0.22U膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0099] 样本稀释液:含0.5%BSA,0.025%吐温-20,0.05%安替比林,0.05%proclin300,0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,2-28℃保存有效期1年。

[0100] 2、C-反应蛋白荧光检测卡制备

[0101] 1) 时间分辨荧光微球标记

[0102] P03抗体标记方法如下(以500u1反应体系为例):加400u1硼酸缓冲溶液于2ml离心管中,加入100u1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10u1EDC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)。

[0103] 活化后的微球中加入浓度1mg/ml的P03抗体75u1,250r/min25℃恒温震荡反应2h;加入58u1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。

[0104] 2) 荧光结合垫的喷涂

[0105] P03抗体荧光结合垫6喷点方法如下:用荧光抗体稀释液将上述制备的P03荧光抗体稀释10倍,喷涂于整条结合垫(长300mm,宽12mm的玻璃纤维)上。

[0106] 3) 硝酸纤维素膜的包被

[0107] 硝酸纤维素膜包被方法如下:取0.5ml浓度4mg/ml的P24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。

[0108] 4) 贴膜、切条、装卡

[0109] 样品垫1、荧光结合垫6、包被有P24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6所示),并根据卡壳大小进行切割,装入卡壳,完成检测卡制备。

[0110] 5) 试剂盒组装

[0111] 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。

[0112] 3、C-反应蛋白荧光检测卡的使用方法

[0113] 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10μL血清/血浆样本,加入到离心管中,振荡充分混匀。

[0114] 2) 加样及判读:用移液枪吸取50μL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。

[0115] 4、C-反应蛋白荧光检测卡检测效果评估

[0116] 1) 精密性:将P24(包被)-P03(标记)检测卡按检测卡使用方法检测1、10、50mg/l的CRP参考品(购于hytest)各25次重复测定,剔除离群值后计算检测卡精密度。实验结果显示三个浓度检测结果变异系数CV<15%。

[0117]

浓度点 (mg/l)	1	10	50
------------	---	----	----

CV	12%	8%	4%
----	-----	----	----

[0118] 2) 检测范围:将P24(包被)-P03(标记)检测卡检测不同浓度的CRP天然蛋白(购于hytest)0.5、1、2、4、8、16、32、64、128mg/l,拟合曲线及检测范围为0.5-120mg/L(如附图7)。

[0119] 3) 线性范围:将高值样本与样本稀释液按照一定比例配制成5个系列浓度样本(0.5、1、10、50、100mg/ml),用P24(包被)-P03(标记)检测卡检测,每个样本检测3次,将结果与理论浓度进行回归统计,判断在该浓度范围内是否成线性。线性范围为0.5-100mg/L(如附图8)。灵敏度是0.5mg/L

[0120] 4) 准确度—回收率:将P24(包被)-P03(标记)的检测卡检测添加量分别为1、10、50mg/l的天然CRP蛋白,检测结果如下表。

[0121]

浓度点(mg/l)	1	10	50
回收率	115%	93%	102%

[0122] 5、准确度—方法学比对:

[0123] 上述结果显示P24(包被)-P03(标记)的CRP检测卡性能较优,选择同类产品目前市场上获得良好信誉的广州万孚生物技术股份有限公司全程C-反应蛋白(hsCRP+常规CRP)定量检测试剂盒(免疫层析法)作对照产品比对验证。选择20份临床病人标本,按1到20的顺序编号,用对照产品和待评价的P24(包被)-P03(标记)的CRP荧光检测卡同时进行实验,按照1,2,3,.....18,19,20,20,19,18,.....3,2,1的样本顺序进行测定。对照和待评价产品的检测结果相关系数 $R^2=0.98$,说明两种方法检测结果有较好的相关性(如附图9)。

[0124] 6、配方筛选:

[0125] 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:

参数	制备例 2	制备例 3	制备例 4
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)
[0126] 荧光抗体稀释液	10%海藻糖+0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	1%BSA+10%海藻糖+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)

[0127]

包被抗体稀 释液	3%甲醇+0.025%吐温 20+50mM PBS 缓 冲液 (pH7.2)	3%甲醇+0.025%吐温 20+50mM PBS 缓 冲液 (pH7.2)	3%甲醇+50mM PBS 缓 冲液 (pH7.2)
样本稀释液	0.05%安替比林 +0.025%吐温 20+0.05%proclin30 0+50mM 硼酸缓 冲液 (pH8.0)	0.05%安替比林 +0.025%吐温 20+0.05%proclin30 0+50mM PBS 缓冲 液 (pH7.2)	0.5%BSA+0.05%安替 比林+0.05% proclin300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
精密性	10-22%	16-28%	7-25%
灵敏度	0.88mg/L	0.5 mg/L	0.75 mg/L
反应时间 (加样至判 读的时间)	10min	10min	20min

SEQUENCE LISTING

<110> 江苏众红生物工程创药研究院有限公司
 <120> 人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡
 <130> 人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 2

Val Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ala
 1 5

[0001]

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 3

Ala Arg Trp Ser Ser Trp Asp Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 4

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 5

Lys Val Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

Asp Ile His His Glu Leu Arg Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp

20 25 30

Met Gln Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Ala Val Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ala Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

50 55 60

[0002]

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Trp Ser Ser Trp Asp Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 14
 Gln Thr Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 15
 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Val Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Trp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Arg Gly Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala

[0004]

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly His Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Thr Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr
 85 90 95

Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Tag

<400> 17

His His His His His His
 1 5

<210> 18

<211> 774

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 18

[0005]

gatattcacc atgaattgag agctgagttg getagaccag gtgcttctgt taaattgtct 60
 tgtaaggctt ctggttacac ttttactaga tattggatgc aatggttgaa acaaagacca 120
 ggtaaggtt tggagtggat tgggtctgtt taccctggag atggagatgc tagatatact 180
 caaaagttca aaggtaaagc tactttgact getgataagt cttcttctac tgcttacatg 240
 caattgtctt ctttggcttc tgaagattct gctgtttact attgtgctag atggctctct 300
 tgggatgagg gttactattt tgattattgg ggtcaaggta ctactttgac tgtttcttct 360
 ggtgggtggtg gatccggagg tgggtggtct ggtgggtggtg gttctgatgt tgttatgacc 420
 caaactccat tgtctttgcc tgtttcttg ggagatcaag cttctatttc ttgtagatct 480
 tetcaatctt tggttcattc taacggtaat acttacttgc actggtattt gcaaaaacca 540
 ggicaatctc ctaaattgtt gatctacaag gtttctaaca gattttctgg tgttctctgat 600
 agattctctg gttctggitc tggactgat ttcactttga agatttccag aatggaagct 660
 gaggatttgg gtgtttactt ctgttctcaa tetactcatg ttccacctac tttcgggtgt 720
 ggtactaaat tggaaattaa gagacatcac catcaccatc actaatagtc taga 774

<210> 19

<211> 254

<212> PRT

<213> mouse

<400> 19

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

Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Trp Ser Ser Trp Asp Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu
 130 135 140
 Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr
 165 170 175
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser
 180 185 190
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 210 215 220
 Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg His His His His His His
 245 250

[0006]

<210> 20
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> mouse
 <400> 20
 gaagttatgt tggttgaatc tgggtggtggt ttggttaagc caggtgggttc ttgaaattg 60
 tcttgtgttg tttctgggtt tactttctct tcttacgcta tgtcttgggt tagattgacc 120
 ccagagagaa gattggaatg ggttgctact atttctctcg gtgtttctaa cacttactat 180
 cctgattctg ttaagtggag attcactatt tccagagata acgctaaaaa tatcttgtac 240
 ttgcaaatga actctttgag atctgatgat actgctatgt actattgtgt tagaagaggt 300
 tgggattatt ggggtcaagg tacttctggt actgttctcg ctggtggtgg tggttccgga 360
 ggtggtggtt ctggtggtgg tggttctgat attgttatga cccaatctcc atcttctttg 420
 actgttactg ctggtgaaaa ggttactatg aactgtaaact cttctcaate ttgtttgaac 480
 tctggtcacc aaaagaacta cttgacttgg ttccaacaaa agactggtca accacctaaa 540
 ttgtgatct actgggcttc tactagagaa tctggtgttc cagatagatt cactggttct 600
 ggttctggta ctgatttcac tttgactatt tctaacgttc aagctgagga tttggtctgt 660
 tactactgic aaactgattt ctcttaccct ttgactttcg gtgctgtgtac taagttggaa 720
 attaaaagac atcacatca ccactactaa tagtctaga 759
 <210> 21
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 21
 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Leu Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Val Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Trp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Arg Gly Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 [0007] 115 120 125
 Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala
 130 135 140
 Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly His Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Thr Gly
 165 170 175
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Thr Asp Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg His His His His His
 245

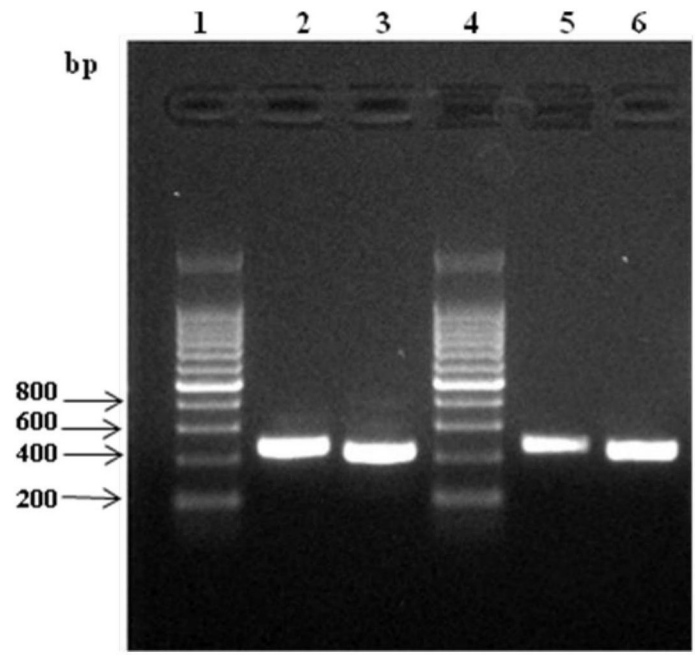


图1



图2

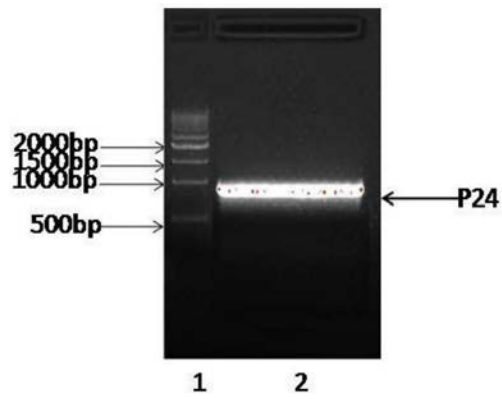


图3-a

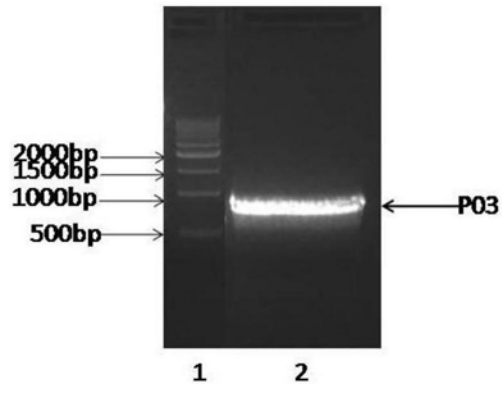


图3-b

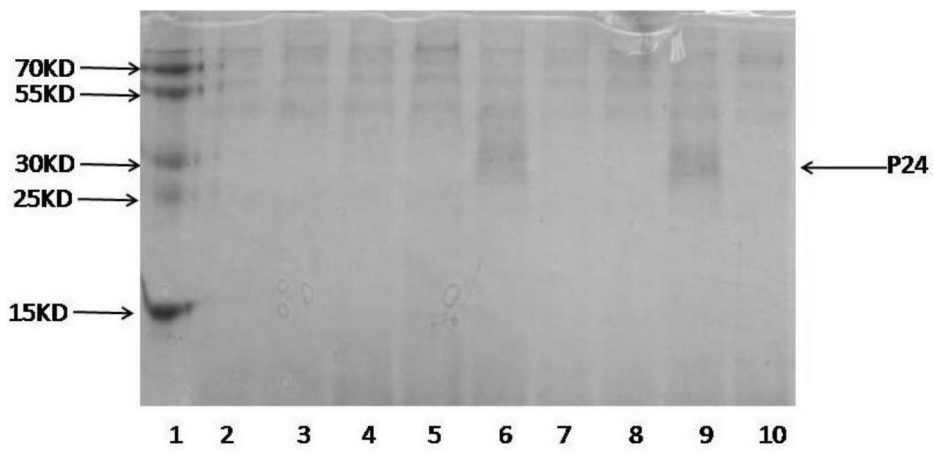


图4-a

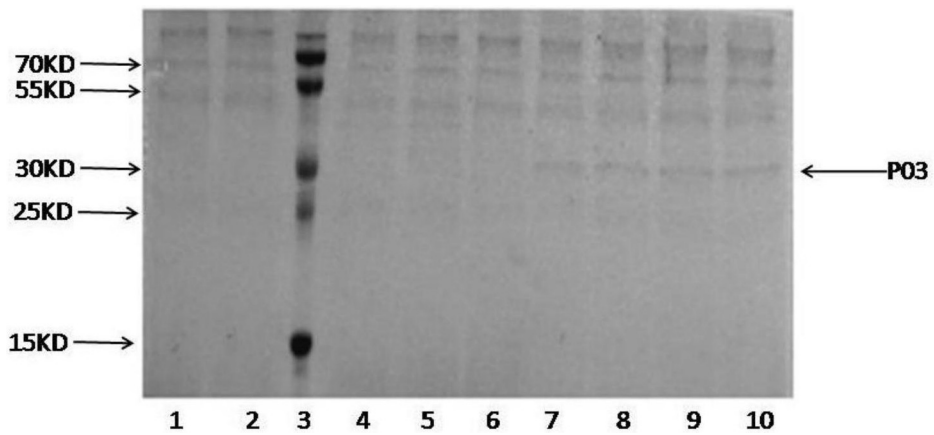


图4-b

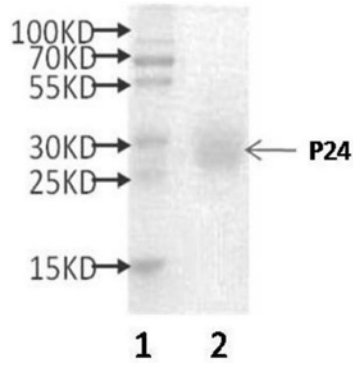


图5-a

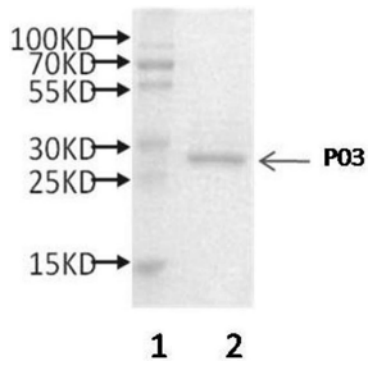


图5-b

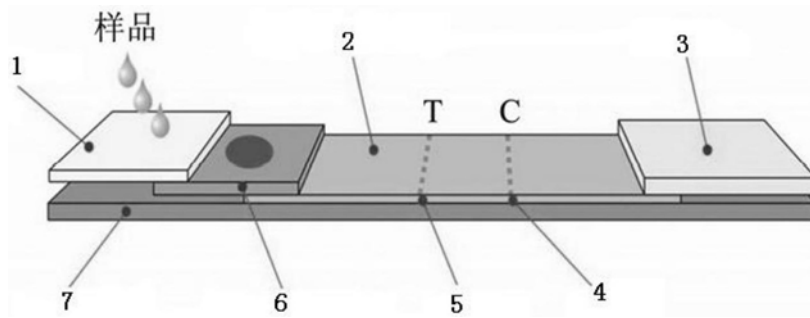


图6

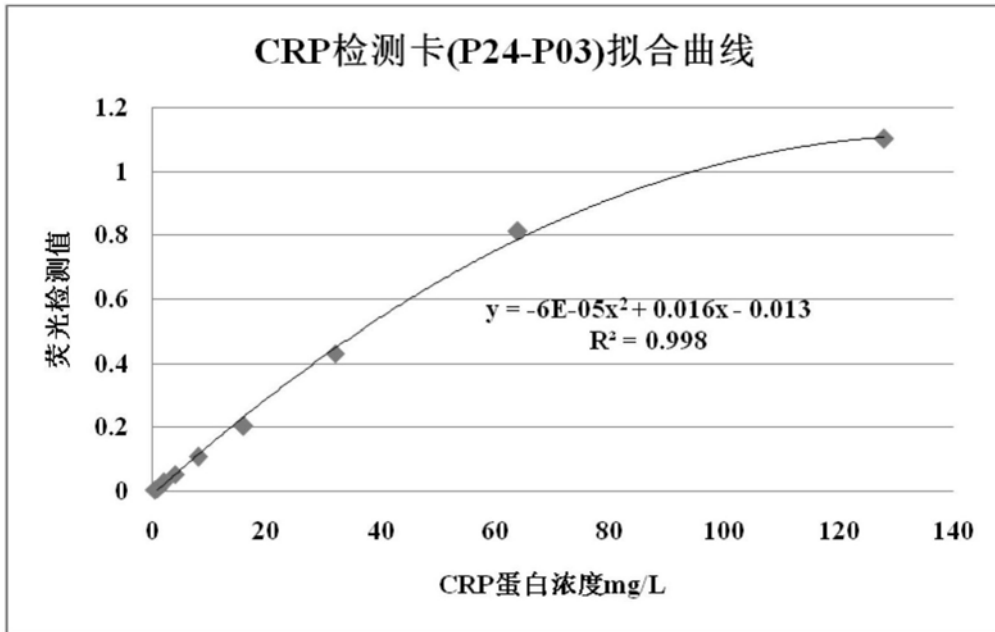


图7

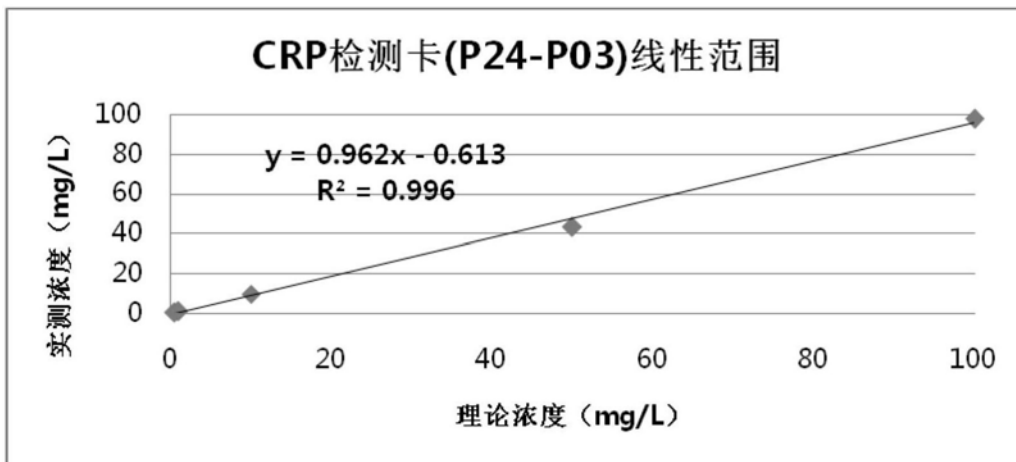


图8

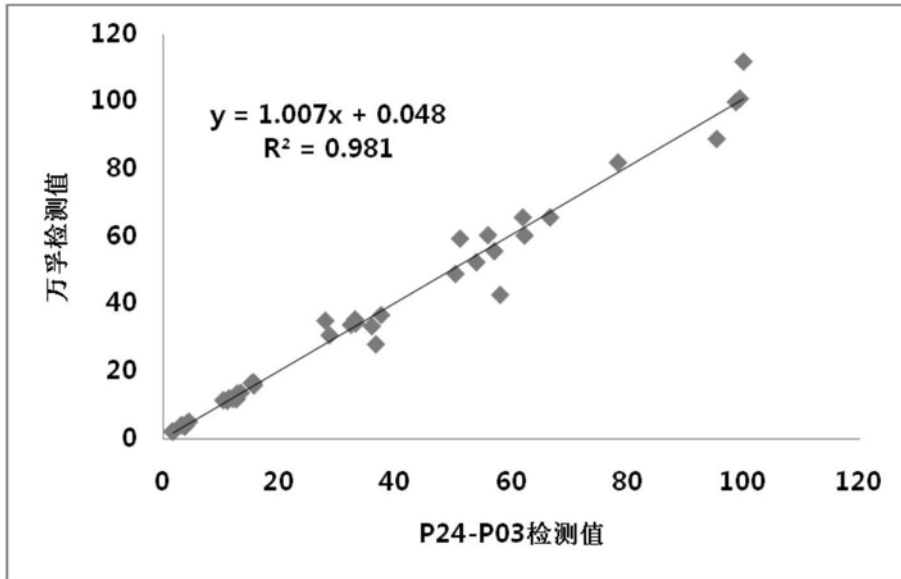


图9

专利名称(译)	人C-反应蛋白荧光定量检测试纸卡		
公开(公告)号	CN105842440B	公开(公告)日	2017-08-04
申请号	CN201610225639.9	申请日	2016-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	江苏晶红生物医药科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏晶红生物医药科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏晶红生物医药科技股份有限公司		
[标]发明人	马永 时振华 丁娜		
发明人	马永 时振华 丁娜		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
其他公开文献	CN105842440A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗人C-反应蛋白抗体及其应用。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(P24及P03)；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人临床样本检测的人C-反应蛋白的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

