



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106046157 A

(43)申请公布日 2016. 10. 26

(21)申请号 201610396648.4

(22)申请日 2016.06.07

(71)申请人 江苏晶红生物医药科技股份有限公司

地址 213022 江苏省常州市黄河西路192号

(72)发明人 马永 时振华 丁娜

(51) Int. Cl.

G07K 16/26(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表4页 附图3页

(54)发明名称

人PCT荧光定量检测试纸卡

(57)摘要

本发明涉及人降钙素原荧光定量检测试纸卡。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;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降钙素原的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

1. 人降钙素原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结合抗体, 所述反应膜上有检测带和质控带, 检测带位置包被有包被抗体, 质控带位置包被抗His标签抗体或Protein L;

所述结合抗体是抗人降钙素原抗体, 包括:

重链可变区含有以下的互补决定区: 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和/或如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SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2和/或如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的人降钙素原荧光定量检测试纸卡, 其特征在于所述结合抗体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。

3. 根据权利要求1所述的人降钙素原荧光定量检测试纸卡, 其特征在于所述结合抗体为单链抗体, 其氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的人降钙素原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。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的人降钙素原荧光定量检测试纸卡, 其特征在于荧光抗体稀释液为含3%海藻糖和0.05%吐温-20的0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的人降钙素原荧光定量检测试纸卡, 其特征在于包被抗体稀释液为含1%海藻糖和2%甲醇的0.05mol/L pH7.2的PBS。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的人降钙素原荧光定量检测试纸卡, 其特征在于样本稀释液为含0.05%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PCT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,具体的涉及一种抗人降钙素原(PCT)抗体及其制备方法以及上述抗体在人降钙素原检测中的应用。

背景技术

[0002] 降钙素原(Procalcitonin,PCT)是一种无激素活性的糖蛋白,由降钙蛋白、降钙素、N端残基片段组成的,是降钙素(Calcitonin,CT)的前体,相对分子量13KDa,半衰期25-30小时。生理条件下,PCT主要由甲状腺滤泡旁C细胞产生;病理状态下,PCT可来源于肝、肺等多种器官和组织。

[0003] PCT在临床上具有广泛而又重要的应用价值。健康人血浆PCT含量极低,在正常人血中低于0.5ng/ml。当发生严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时,它在血浆中的水平升高;而发生自身免疫、过敏和局部感染、病毒感染、慢性非特异性炎症、癌症发热、移植物宿主排斥反应等疾病时PCT水平不会升高;这就决定了PCT的高度特异性,因此可用于各种临床情况的鉴别诊断。此外,PCT浓度和炎症严重程度成正相关,并随着炎症的控制和病情的缓解而降低至正常水平,因而PCT又可作为判断病情与预后的可靠指标。PCT可在感染后2个小时后检测到,对临床早期诊断具有重要意义,在感染后12~24小时达到高峰。

[0004] 目前检测PCT常用的实验室方法有放射免疫学分析法(RIA)、化学发光免疫分析法(CLIA)、胶体金比色法(GICA)和酶联免疫法(ELISA)。放射免疫学分析法是利用人工合成的多克隆抗体特异地识别和连接降钙素原。该方法能检测正常人的血清PCT,但检测的是游离PCT、结合型PCT和降钙素基因相关肽前体的混合物,而不能区分上述三种物质;且存在检测耗时长(19~22h),有放射性元素的污染,标记物稳定性差,废弃物难以处理等缺点而使其应用受到限制。化学发光免疫分析法(CLIA)一般需要配套昂贵的全自动电化学发光检测仪,常规实验室无法开展,而且给患者带来不必要的费用,增加患者负担。而利用生物素-亲和素系统检测PCT的电化学发光免疫试剂盒,也需要配套昂贵的全自动电化学发光检测仪,常规实验室无法开展,而且给患者带来不必要的费用,增加患者负担。本发明的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡可满足快速检测及床边检测的需求,且无需专业技术人员。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供能有效的、特异性结合人降钙素原的抗体。更具体地说:

[0006] 本发明的第一目的在于提供一种抗人降钙素原抗体,

[0007] 其重链可变区含有以下的互补决定区:氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和/或如SEQ ID NO:3所示的HCDR3;

[0008] 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SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2和/或如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0009] 优选的是本发明中的抗体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。

[0010] 本发明第二个目的是提供一种单链抗体,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0011] 本发明第三个目的是提供一种编码上述单链抗体的核苷酸序列,编码单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0012] 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。

[0013] 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。

[0014] 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:

[0015] 1)在合适的条件下培养上述重组宿主菌表达抗体;

[0016] 2)然后从宿主菌中纯化、收集抗体。

[0017] 本发明的第七个目的在于提供上述抗人降钙素原抗体在检测人降钙素原含量中的应用。

[0018] 本发明的第八个目的在于提供一种可配对检测人降钙素原的抗体对:外购商品化抗降钙素原抗体(购于Hytest公司名为42的PCT抗体,Cat.#4PC47,本申请命名为H42)和本发明的抗人降钙素原抗体;该抗体对组合的检测灵敏度高,特异性好。

[0019] 本发明的第九个目的在于提供一种利用所述抗人降钙素原抗体检测人降钙素原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本发明的抗人降钙素原抗体,所述反应膜上有检测带和质控带,检测带位置包被有抗体H42,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。

[0020] 本发明制备了多种抗体,并与商业化抗体进行配对筛选,获得灵敏度及特异性均能满足需求的抗体组合(本发明的抗人降钙素原抗体及H42);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降钙素原的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

附图说明

[0021] 图1.抗体重链及轻链可变区基因电泳图。Lane 1为200bp DNA Ladder;Lane 2为本发明的抗人降钙素原抗体重链可变区DNA;Lane 3为本发明的抗人降钙素原抗体轻链可变区DNA。

[0022] 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。

[0023] 图3.单链抗体PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图。

[0024] 图4.单链抗体重组毕赤酵母菌株诱导表达上清培养液SDS-PAGE电泳鉴定图;图中箭头所指即为单链抗体。

[0025] 图5.SDS-PAGE凝胶电泳鉴定纯化单链抗体。

[0026] 图6.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为吸收垫、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。

[0027] 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0.996。

[0028] 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0.998。

[0029] 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

[0030] 定义

[0031] “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。

[0032] “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。

[0033] 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。

[0034] 实施例1. 抗人降钙素原杂交瘤细胞株的制备

[0035] 1. 动物免疫

[0036] 以人重组降钙素原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。

[0037] 2. 细胞融合

[0038] (1). 脾脏细胞的制备

[0039] 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。

[0040] (2). 饲养细胞的制备

[0041] 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;

[0042] 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。

[0043] (3).细胞融合

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 3. 抗人降钙素原特异性杂交瘤株筛选

[0047] (1).检测板的准备:用CB包被液稀释重组PCT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。

[0048] (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。选择具有较高的效价的杂交瘤细胞株,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。

[0049] 实施例2.杂交瘤细胞株抗体可变区序列的测定

[0050] 对上述杂交瘤细胞株抗体可变区序列进行测定。

[0051] 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进行总RNA提取并立即进行反转录;

[0052] 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;

[0053] 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;

[0054] 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。

[0055] 测序得到杂交瘤细胞株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SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2和/或如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SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2和/或如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0056] 实施例3.单链抗体的重组表达及纯化

[0057] 根据实施例2中测序结果,将杂交瘤细胞株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见SEQ ID NO:9,该融合组氨酸标签后单链抗体氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,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,密码子优化后的单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示,进行单链抗体重组表达。其结构组成如附图2所示。上述单链抗体的重组表达步骤具体如下:

[0058] a)单链抗体基因的表达质粒构建

[0059] 将优化后的单链抗体全基因上游引入pPICZαA载体中XhoI酶切位点,下游引入XbaI酶切位点,构建到pUC57载体中,得到一种长期保存质粒,质粒记为pUC57-T01(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'。按照常规PCR程序扩增目的基因,进行琼脂糖凝胶电泳分析(附图3),显示产物大小与预期大小(750bp)一致。将PCR获得基因产物回收纯化后,用XhoI(#R0146S,购自New England BioLabs公司)和XbaI(#R0145V,购自New England BioLabs公司)双酶切,并用T4连接酶将回收产物连接到pPICZαA(V19520,购自Invitrogen)质粒中,转化到DH5α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,即得到单链抗体的表达质粒,记为pPICZα-T01。

[0060] 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

[0061] 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。

[0062] 将pPICZα-T01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。

[0063] 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,观察目标蛋白表达情况(附图4)。

[0064] 将上述获得的本发明抗人降钙素原抗体重组基因工程菌株接种于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。

[0065] c)单链抗体纯化

[0066] 采用组氨酸标签亲和柱纯化抗体融合蛋白,预装柱子选择为HisTrap HP,具体步骤如下:

[0067] 步骤一、发酵液的除细胞预处理:将上述表达得到抗体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pH7.5,0.45μm滤膜过滤。

[0068] 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可知,纯化后的蛋白纯度达到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。

[0069] 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。

[0070] 实施例4.单链抗体的性能评价

[0071] 1.抗体的Western blot鉴定

[0072] a.聚丙烯酰胺凝胶电泳:配置12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶;分别上样标准蛋白质及重组PCT蛋白,恒压下电泳1小时;

[0073] 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;

[0074] 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;

[0075] 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抗体(1mg/ml,本公司采用经典过碘酸钠法标记,下同),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;

[0076] 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。

[0077] 实验结果表明,抗体可与PCT蛋白反应,证明了本发明单链抗体与PCT蛋白的结合力。

[0078] 2.单链抗体在时间分辨荧光检测平台的评价

[0079] 用0.05mM/L pH7.2的PBS将H42抗体(购买于Hytest公司)稀释至1mg/ml,划线于硝酸纤维素膜上;用0.05mM/L pH8.0的硼酸缓冲液将时间分辨荧光微球标记的抗体稀释20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10、1ng/ml的PCT重组蛋白和0.05mM/L pH7.2的PBS,检测结果如下:

包被抗体		H42
标记抗体		单链抗体
[0080] 标准品浓度 (ng/ml)	10	0.542
	1	0.061
	0	0.004

[0081] 由上述结果可知,H42、本发明单链抗体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PCT重组蛋白。

[0082] 实施例5.降钙素原的时间分辨荧光免疫检测卡的制备

[0083] 本检测方法采用双抗体夹心免疫层析法的原理。

[0084] 1、溶液配制

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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0.22μm滤膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0088] 荧光抗体稀释液制备:含3%海藻糖,0.05%吐温-20,0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,用0.22μm膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0089] 包被抗体稀释液制备:含1%海藻糖,2%甲醇,0.05mol/L pH7.2的PBS,用0.22μm膜过滤,置于4℃备用,有效期7天。

[0090] 样本稀释液:含0.05%吐温-20,0.05%安替比林,0.05%procIn300,0.05mol/L pH8.0的硼酸缓冲液,2-28℃保存有效期1年。

[0091] 2、降钙素原荧光检测卡制备

[0092] 1)时间分辨荧光微球标记

[0093] 单链抗体标记方法如下(以500uI反应体系为例):加400uI硼酸缓冲液于2ml离心管中,加入100uI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10uIEDC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)。

[0094] 活化后的微球中加入浓度1mg/ml的单链抗体125uI,250r/min25℃恒温震荡反应2h;加入62uI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。

[0095] 2)荧光结合垫的喷涂

[0096] 单链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单链荧光标记抗体稀释20倍,喷涂于整条结合垫(长300mm,宽12mm的玻璃纤维)上。

[0097] 3)硝酸纤维素膜的包被

[0098] 硝酸纤维素膜包被方法如下:取1ml浓度2mg/ml的H42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(反应膜)2的C线4位置。

[0099] 4)贴膜、切条、装卡

[0100] 样品垫1、荧光结合垫6、包被有H42抗体的硝酸纤维素膜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。

[0101] 5)试剂盒组装

[0102] 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。

[0103] 3、降钙素原荧光检测卡的使用方法

[0104] 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100 μ L血清/血浆样本, 加入到离心管中, 振荡充分混匀。

[0105] 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。

[0106] 4、降钙素原荧光检测卡检测效果评估

[0107] 1) 精密性: 将H42(包被)-本发明单链抗体(标记)检测卡按检测卡使用方法检测0.1、1、20ng/mL的PCT重组蛋白各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%。

[0108]

浓度点(ng/mL)	0.1	1	20
CV	14%	6%	11%

[0109] 2) 检测范围: 将H42(包被)-本发明单链抗体(标记)检测卡检测不同浓度的PCT重组蛋白0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2ng/mL, 拟合曲线及检测范围为0.1-51.2ng/mL(如附图7)。

[0110] 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6个系列浓度样本(0.1、0.5、2、10、20、50ng/mL), 用H42(包被)-本发明单链抗体(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0.1-50ng/mL(如附图8)。灵敏度为0.1ng/mL。

[0111] 4) 准确度—回收率: 将H42(包被)-本发明单链抗体(标记)的检测卡检测添加量分别为0.2、1、10ng/mL的PCT重组蛋白, 检测结果如下表。

[0112]

浓度点(ng/mL)	0.2	1	10
回收率	113%	107%	89%

[0113] 5、准确度—方法学比对:

[0114] 上述结果显示H42(包被)-本发明单链抗体(标记)的PCT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降钙素原定量检测试剂盒(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H42(包被)-本发明单链抗体(标记)的PCT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)。

[0115] 6、配方筛选

[0116] 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:

[0117]

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)
荧光抗体稀释液	3%海藻糖+0.05%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.025%吐温 20+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	3%蔗糖+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
包被抗体稀释液	2%甲醇+1%蔗糖 50mM PBS 缓冲液 (pH7.2)	2%甲醇+0.025%吐温 20+50mM PBS 缓冲液 (pH7.2)	2%甲醇+1%蔗糖 +50mM PBS 缓冲液 (pH7.2)
样本稀释液	0.05%安替比林+0.05%吐温 20+0.05%proclin300+50mM PBS 缓冲液 (pH7.2)	0.05%安替比林+0.05%吐温 20+0.05%proclin300+50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)	0.05%安替比林 +0.05%proclin300 +50mM 硼酸缓冲液 (pH8.0)
精密性	10-18%	8-32%	17-20%
灵敏度	0.25ng/ml	0.13ng/ml	0.25ng/ml
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 PCT 荧光定量检测试纸卡
 <130> 人 PCT 荧光定量检测试纸卡
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 2
 Phe Gly Pro Gly Ser Gly Ile Ala
 1 5

[0001]

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 3
 Ala Arg Glu Arg His Tyr Tyr Gly His Val Ala Trp Phe Pro Tyr
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> mouse
 <400> 4
 Ser Ser Val Ser 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

<400> 6

His Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Phe Gly Pro Gly Ser Gly Ile Ala Gln Tyr Asn Glu Val Phe

50 55 60

[0002]

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Arg His Tyr Tyr Gly His Val Ala Trp Phe Pro Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Gln Val Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Ala Thr Ser Asn 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 Met Glu Ala Glu

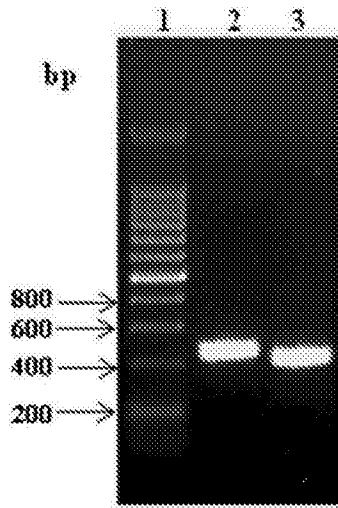


图1



图2

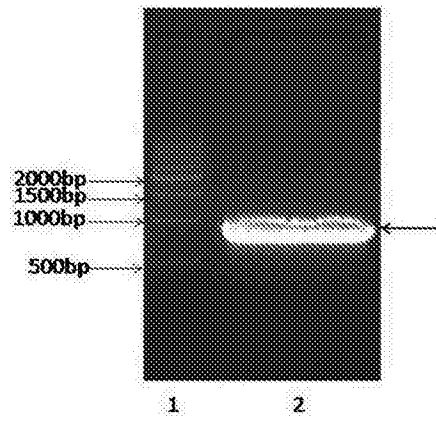


图3

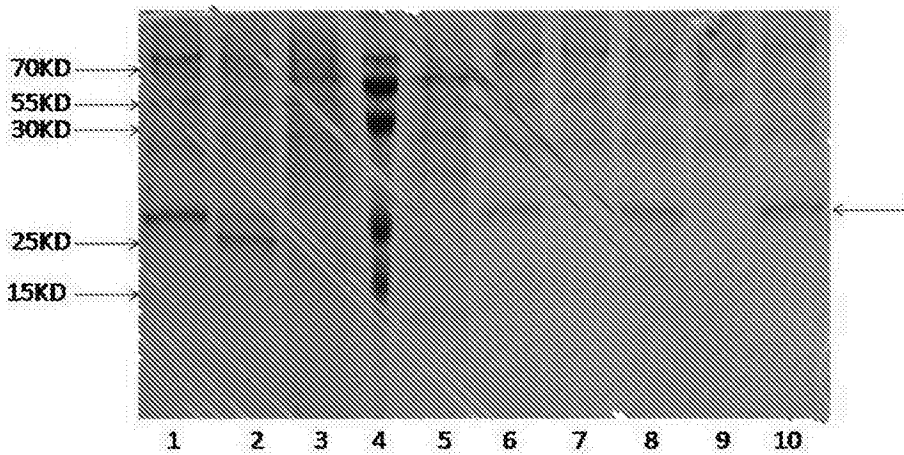


图4

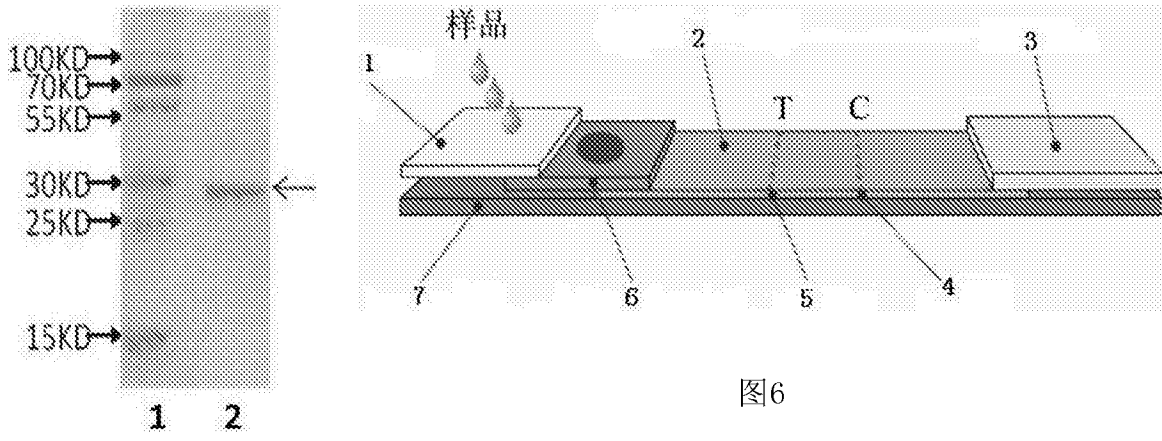


图5

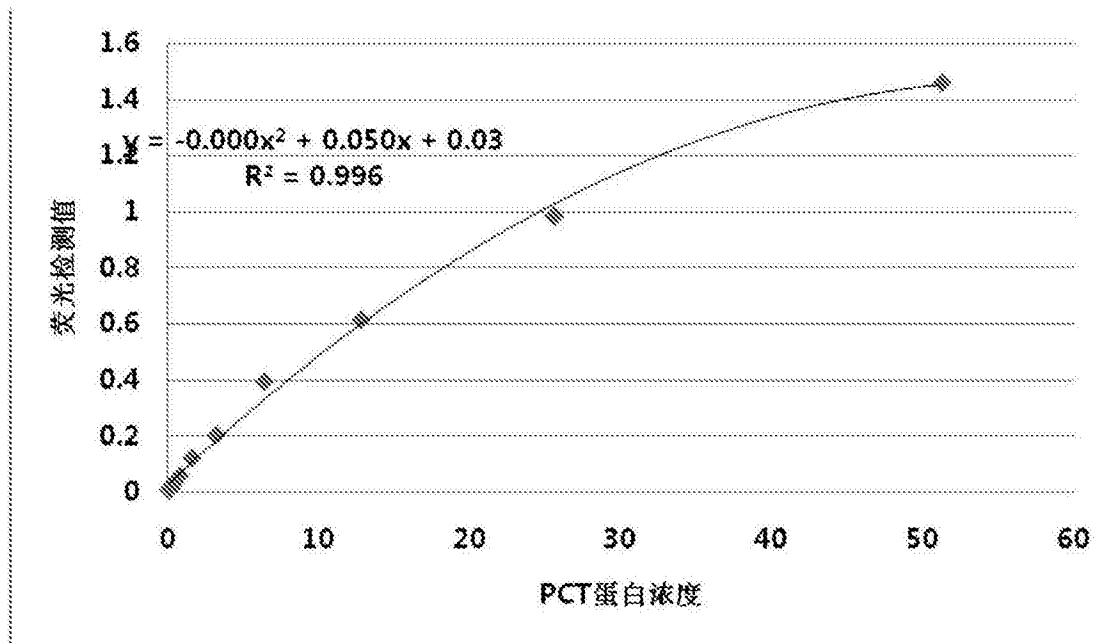


图7

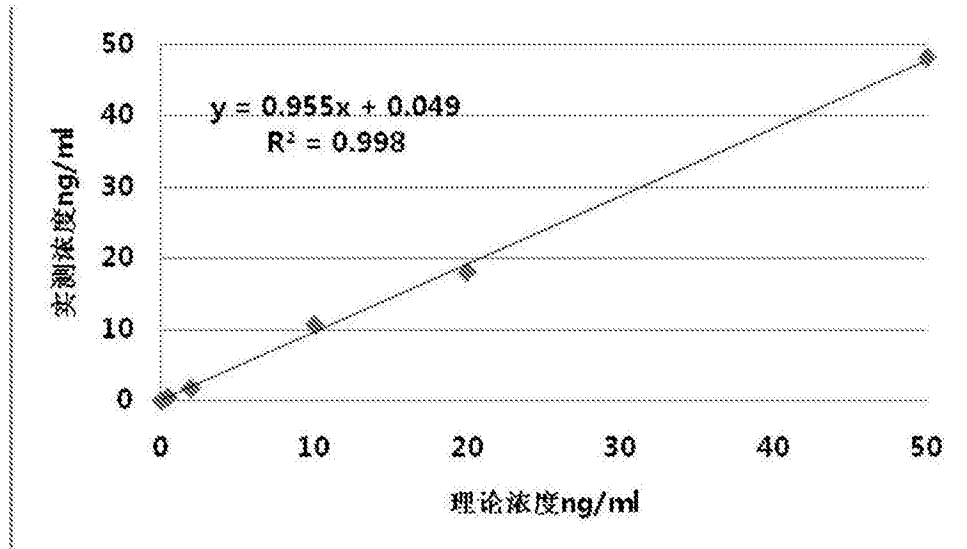


图8

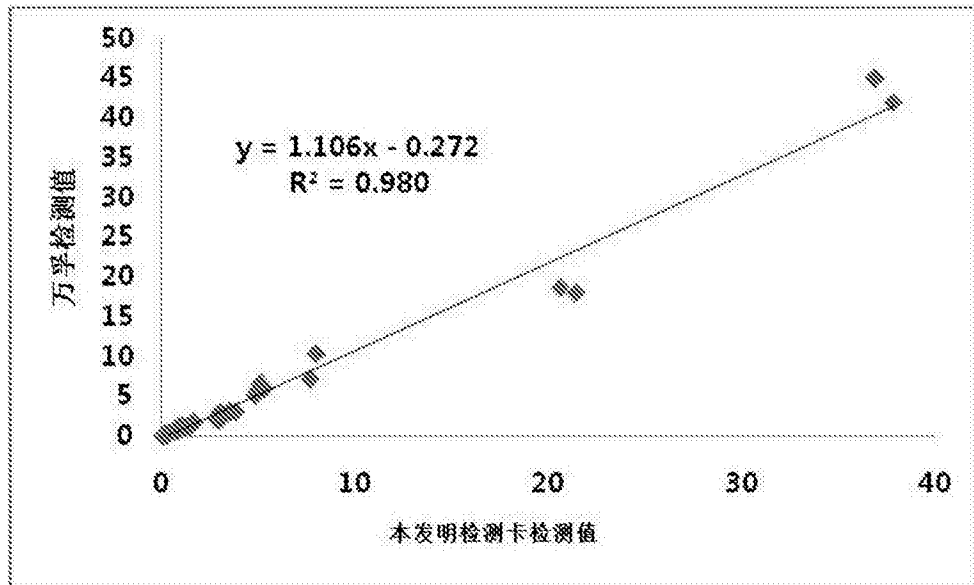


图9

专利名称(译)	人PCT荧光定量检测试纸卡		
公开(公告)号	CN106046157A	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610396648.4	申请日	2016-06-07
[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	C07K16/26 G01N33/68 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/56 C07K2317/565 G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/6803		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及人降钙素原荧光定量检测试纸卡。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；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降钙素原的时间分辨免疫荧光层析定量检测卡。

	包被抗体	H42
	标记抗体	单链抗体
标准品浓度 (ng/ml)	10	0.542
	1	0.061
	0	0.004