



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107478848 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(21)申请号 201710729898.X

(22)申请日 2017.08.23

(71)申请人 广州瑞博奥生物科技有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城瑞和路79号

(72)发明人 周腊梅 黄若磐 胡守旺 宋旭东

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 张春水 唐京桥

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书17页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

定量检测人NT-proBNP的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于多肽化学与免疫学领域,尤其涉及NT-proBNP抗原表位肽、用该抗原表位肽制备的NT-proBNP特异性抗体、所述抗体在制备检测NT-proBNP的用途和定量检测NT-proBNP的试剂盒。本发明的公开的所述NT-proBNP抗原表位肽的氨基酸序列具有:(I)SEQ ID NO.1所示;或(II)与(I)所述序列至少有90%同源性的序列。本发明提供的定量检测人NT-proBNP的试剂盒能有效解决现有的检测NT-proBNP方法的灵敏度差、检测操作繁琐的缺陷。

1. 一种NT-proBNP抗原表位肽,其特征在于,所述NT-proBNP抗原表位肽的氨基酸序列具有:

(I) SEQ ID NO.1所示;或

(II) 与(I)所述序列至少有90%同源性的序列。

2. 根据权利要求1所述的NT-proBNP抗原表位肽,其特征在于,具有与(I)或(II)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或两个氨基酸序列获得的氨基酸序列,且与(I)或(II)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列。

3. 权利要求1或2所述NT-proBNP抗原表位肽在制备检测NT-proBNP产品中的应用。

4. 一种NT-proBNP抗体,其特征在于,NT-proBNP抗体为权利要求1或2权利要求1或2所述NT-proBNP抗原表位肽制备而成的单克隆或多克隆抗体。

5. 一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,包含权利要求4所述NT-proBNP抗体。

6. 根据权利要求5所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,还包括标记有所述NT-proBNP抗体的荧光微球。

7. 根据权利要求6所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,所述荧光微球为稀土离子微球。

8. 根据权利要求7所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,还包括抗NT-proBNP抗体。

9. 根据权利要求8所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,还包括NT-proBNP抗体的第二抗体。

10. 根据权利要求9所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,其特征在于,还包括底板以及附着于底板上依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸;

所述结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体;

所述包被膜上设有检测区和对照区,所述检测区设于靠近结合垫层一侧,所述对照区设于靠近吸水纸一侧,所述检测区与所述对照区相互间隔设置;

所述检测区固定抗NT-proBNP抗体;所述对照区固定有NT-proBNP抗体的第二抗体。

定量检测人NT-proBNP的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于多肽化学与免疫学领域,尤其涉及定量检测人NT-proBNP的试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 心肌细胞首先合成108个氨基酸的BNP原,称之为proBNP (BNP前体)。在受到心肌细胞的刺激后(例如,心肌细胞拉伸),proBNP在蛋白酶作用下列解为NT-proBNP (氨基末端-proBNP或N端-proBNP) 和生物活性激素BNP。NT-proBNP是BNP激素原分裂后没有活性的N-末端片段,与BNP相比,半衰期更长,更稳定,其浓度可反映短暂时间内新合成的而不是贮存的BNP释放,因此更能反映BNP通路的激活。血浆NT-proBNP水平随心衰程度加重而升高。NT-proBNP水平与心衰相关关系为:50岁以下的成人血浆NT-proBNP浓度450pg/ml,诊断急性心衰的敏感性和特异性分别为93%和95%;50岁以上的人血浆浓度900pg/ml,诊断心衰的敏感性和特异性分别为91%和80%。NT-proBNP<300pg/ml为正常,可排除心衰,其阴性预测值为99%。心衰治疗后NT-proBNP<200pg/ml提示预后良好。肾功能不全,肾小球滤过率<60ml/min时NT-proBNP 1200pg/ml诊断心衰的敏感性和特异性分别为85%和88%。NT-proBNP值正常可以排除心衰(阴性预测值接近100%)。此外,NT-proBNP有助于区分心源性和非心源性呼吸困难。NT-proBNP值的高低与伴有呼吸困难心衰的症状严重程度相关。在急性心衰的诊断中,NT-proBNP明显优于临床判断,而二者联合的方法又优于单一诊断方法。

[0003] NT-proBNP的测定主要采用双抗体夹心的免疫学方法,检测方法则包括:金标法,该法具有快速简便、易观察的特点,但是灵敏度不高;透射免疫浊度法,该测定方法简便、快速,可自动化,适合于批量检测,但是免疫透射比浊的方法学及临床应用尚需做进一步的验证。综上所述,现有的检测NT-proBNP方法均有灵敏度差、检测操作繁琐的缺陷。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供的NT-proBNP抗原表位肽、抗体及NT-proBNP定量检测试剂盒,能有效解决现有的检测NT-proBNP方法的灵敏度差、检测操作繁琐的技术缺陷。

[0005] 本发明提供了一种NT-proBNP抗原表位肽,所述NT-proBNP抗原表位肽的氨基酸序列具有:

[0006] (I) SEQ ID NO.1所示;或

[0007] (II) 与(I)所述序列至少有90%同源性的序列。

[0008] 作为优选,具有与(I)或(II)所示的氨基酸序列经取代、缺失或添加一个或多个氨基酸序列获得的氨基酸序列,且与(I)或(II)所示的氨基酸序列功能相同或相似的氨基酸序列。

[0009] 作为优选,所述多个为2个。

[0010] 其中,本领域公知的是在同一个属中NT-proBNP蛋白的编码序列可能存在微小的差别,但这种差异通常并不会导致该NT-proBNP蛋白丧失或改变功能,同理,NT-proBNP抗原

表位肽是针对NT-proBNP蛋白的序列重组设计的,因此,NT-proBNP抗原表位肽基于同一个属中具有微小的差别,通常并不会影响其抗原表位肽的特异性。

[0011] 本发明提供的NT-proBNP抗原表位肽在制备检测NT-proBNP产品中的应用。

[0012] 作为优选,所述NT-proBNP抗体由所述的NT-proBNP抗原表位肽制备而成的单克隆或多克隆抗体。

[0013] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽制备而成的单克隆或多克隆抗体可用于临床检验的免疫实验方法,主要方法包括:ELISA法、化学发光法、荧光层析法、胶体金免疫测定法等。

[0014] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽是根据NT-proBNP抗原的结构重组设计的,所述NT-proBNP抗原表位肽选取NT-proBNP抗原序列中亲水性强的序列组合在一起形成较强的抗原表位。由所述NT-proBNP抗原表位肽制备得到的NT-proBNP抗体能特异性的与NT-proBNP抗原结合,实验数据表明,所述NT-proBNP抗体的特异性强。

[0015] 本发明还提供了一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,所述定量检测人NT-proBNP的试剂盒采用的时间分辨荧光分析法(TRFIA)的原理设计。

[0016] 本发明测定NT-proBNP水平,TRFIA是在荧光分析(FIA)的基础上发展起来的,它是一种特殊的荧光分析。荧光分析利用了荧光的波长与其激发波长的巨大差异克服了普通紫外-可见分光分析法中杂色光的影响,同时,荧光分析与普通分光不同,光电接受器与激发光不在同一直线上,激发光不能直接到达光电接受器,从而大幅度地提高了光学分析的灵敏度。

[0017] 与经典的时间分辨荧光免疫分析方法不同,时间分辨荧光免疫层析技术采用荧光纳米微球作为标记物,当将含有待测抗原(抗体)的样品滴在加样区,待测样品中的抗原(抗体)与结合垫中的荧光纳米微球标记的抗体(抗原)结合并通过毛细作用向前层析,当达到检测区后,与检测线上固定的抗体(抗原)结合,形成微粒-抗体-抗原-抗体夹心复合物并被固定在检测线上,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,与固定在对照线二抗结合。反应结束后,用紫外光源(365nm)对检测区扫描检测,检测线和对照线上荧光纳米微球发出高强度的荧光(615nm),且衰变时间也较长。利用延缓测量时间,待样品基质中自然发生的短寿命荧光(1-10ns)全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,这样就可以完全排除特异本底荧光的干扰。通过检测线和对照线荧光强度的强弱及其比值,即可分析出样品中待测物的浓度。

[0018] 时间分辨荧光免疫层析具有以下优势:

[0019] 1、灵敏度高,比金标、普通荧光灵敏度高2-3个数量级;

[0020] 2、可定量检测,根据内置的标准曲线,可给出待测物的具体浓度;

[0021] 3、标记物稳定,抗干扰强,检测结果重复性好;

[0022] 4、操作简便,检测时间短,可用于现场筛查;

[0023] 5、成本相对便宜,性价比高。

[0024] 本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,包括所述的NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体作为检测抗体。

[0025] 作为优选,所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,所述NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体标记在荧光微球上。

- [0026] 在一种实施例中,所述NT-proBNP抗体为鼠源性抗体。
- [0027] 作为优选,所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,还包括抗NT-proBNP抗体;所述抗NT-proBNP抗体能捕获所述NT-proBNP抗体。
- [0028] 作为优选,所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,还包括NT-proBNP抗体的第二抗体。
- [0029] 在一种实施例中,所述NT-proBNP抗体的第二抗体为羊抗鼠IgG抗体或兔抗鼠IgG抗体。
- [0030] 在一种实施例中,所述NT-proBNP抗体的第二抗体为羊抗鼠IgG。
- [0031] 作为优选,所述的定量检测人NT-proBNP的试剂盒,还包括底板以及附着于底板上依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸;
- [0032] 所述结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体。
- [0033] 其中,依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸制备成时间分辨免疫层析试纸条;所述结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体。
- [0034] 所述包被膜上设有检测区和对照区,所述检测区设于靠近结合垫层一侧,所述对照区设于靠近吸水纸一侧,所述检测区与所述对照区相互间隔设置。
- [0035] 所述检测区固定抗NT-proBNP抗体;所述抗NT-proBNP抗体能捕获所述NT-proBNP抗体,所述对照区固定有NT-proBNP抗体的第二抗体。
- [0036] 在一种实施例中,所述对照区固定的NT-proBNP抗体的第二抗体为羊抗鼠IgG抗体或兔抗鼠IgG抗体。
- [0037] 在一种实施例中,所述对照区固定的抗体为有羊抗鼠IgG抗体。
- [0038] 其中,未结合NT-proBNP抗体的荧光微球与所述NT-proBNP抗体的第二抗体结合。
- [0039] 作为优选,所述包被膜为化学交联聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈(聚合物)的硝酸纤维素膜。
- [0040] 作为优选,所述的结合垫为聚酯膜。
- [0041] 其中,所述聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈聚合物在小于450nm波长具有10%以下的透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率,这种材料可以允许绝大多数的可见光透过,光检测器能够捕捉多层多孔膜表面和内部的荧光信号,使检测结果更准确。
- [0042] 其中,所述的聚酯膜,其能够载有足量的荧光微球,且遇样品后又能迅速释放微球。
- [0043] 其中,所述的荧光微球为用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素;所述荧光微球的直径为290nm。
- [0044] 更为优选的,所述荧光微球为稀土离子微球。
- [0045] 在一种实施例中,所述稀土离子微球具有Eu³⁺镧系元素。
- [0046] 优选的,定量检测人NT-proBNP的试剂盒还包括卡壳;所述时间分辨免疫层析试纸条安装于所述卡壳内。
- [0047] 其中,所述卡壳为塑料卡壳。
- [0048] 本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,血液样本浸入到样品垫层上,当样品垫上的样本达到饱和状态后,通过毛细管作用将样本输送到结合垫层,样品液向吸水纸一段泳动,当样品液中含有NT-proBNP时,NT-proBNP与荧光微球上NT-proBNP抗原表位

肽制备的NT-proBNP抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达包被膜的检测区,检测区的抗NT-proBNP抗体能捕获抗体能捕获结合垫层中的抗原-抗体复合物,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测区上;未结合NT-proBNP抗体的荧光微球继续前行,到达对照区时,羊抗鼠IgG抗体与荧光微球上的鼠源性抗体(即NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体)结合,在对照区处出现荧光微球的聚集。整个反应在10分钟内完成,并进行上机读卡。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区和对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量,根据预置标准曲线将相应的荧光信号值算出定量结果。实验表明,本发明所述定量检测NT-proBNP的试剂盒灵敏度高、检测方法简单。

[0049] 综上所述,本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒具有以下有益效果:

[0050] 1、通过对试纸条的改进,将时间分辨荧光免疫层析技术引入NT-proBNP的定量检测中,结合时间分辨荧光检测仪,实现了NT-proBNP的单人份定量检测,且灵敏度高,比金标、普通荧光灵敏度高2-3个数量级,批内、批间CV小于15%;标记物稳定,抗干扰强,检测结果重复性好;为临床使用提供了极大便利;

[0051] 2、本发明的试纸条,采用特殊的透光材料,既可以达到化学发光法的定量分析,又能达到金标法的快速检测,且保证了试验结果的准确可靠;

[0052] 3、本发明的试纸条操作简便,检测时间短,可用于现场筛查,适合大规模生产,对于NT-proBNP的定量检测有着积极的意义;

[0053] 4、本发明的试纸条成本相对便宜,性价比高。

附图说明

[0054] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0055] 图1示抗NT-proBNP-1作为检测抗体的相关性验证结果;

[0056] 图2示定量检测人NT-proBNP的试剂盒中的标准曲线图;

[0057] 图3示定量检测人NT-proBNP的试剂盒中测量稀释线性曲线图;

[0058] 图4示定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行临床样本相关性的性能分析图。

具体实施方式

[0059] 本发明提供了定量检测人NT-proBNP的试剂盒,能有效解决现有的检测NT-proBNP方法的灵敏度差、检测操作繁琐的缺陷。

[0060] 下面将对本发明实施例中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前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0061] 其中,以下实施例涉及的试剂均为市售。

[0062] 实施例1

[0063] NT-proBNP天然蛋白的制备,制备方法如下:

[0064] 1、根据Genbank中提供的人NT-proBNP的DNA序列设计引物由引物的5'端分别引入NdeI+XhoI酶切位点,通过PCR扩增得到NT-proBNP的目的基因,将载体pET-28a及经过琼脂糖凝胶纯化的NT-proBNP基因片段,用NdeI+XhoI进行双酶切处理,用T₄DNA连接酶将纯化后酶切产物连接,得到重组质粒pET-28a-NT-proBNP,并连接产物转化进入大肠杆菌DH5 α ,在含有氨苄青霉素的LB平板上挑选克隆,小量制备质粒,通过双酶切/PCR鉴定筛选出阳性克隆,测序结果表明重组的NT-proBNP片段与设计的序列完全一致。

[0065] 2、NT-proBNP质粒经测序验证后,转化进入大肠杆菌(BL21),在含有氨苄青霉素的LB培养基中培养,可在LB平板上挑选阳性克隆并进行质粒酶切鉴定,小量制备质粒,用双酶切PCR鉴定筛选出阳性克隆,最终获得含有NT-proBNP的重组质粒工程菌。

[0066] 3、在表达时,将NT-proBNP的重组质粒工程菌于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中培养,A₆₀₀达到0.5-0.6之间,然后加入终浓度为0.5mM的Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)于37 $^{\circ}$ C诱导4h,诱导完成后的菌液4,000rpm离心10min,收集菌体,并用PBS洗涤沉淀;PBS重悬沉淀后置于冰浴中,超声破菌后12000rpm离心20min,上清和沉淀分别进行SDS-PAGE电泳。结果表明:表达的NT-proBNP重组蛋白为胞浆不可溶性表达,将该重组蛋白命名为BL21 (DE3)-NT-proBNP。

[0067] 4、将大量表达得到的菌体,经超声破碎后离心,再进行包涵体洗涤,洗涤完成后用GE Healthcare公司的His Trap FF纯化柱将蛋白进行纯化。最终获得的蛋白用SDS-PAGE电泳进行分析,用BCA蛋白定量试剂盒测得其浓度为0.2mg/ml。

[0068] 实施例2

[0069] NT-proBNP肽段的制备,方法如下:

[0070] 通过上海吉尔生化生物公司合成以下4组肽段;氨基酸改变的目的是为了将疏水氨基酸变为亲水氨基酸,增加此蛋白的亲水性,同时在后续实验中检测样本的目标蛋白来筛选出最适合的抗体。

[0071] 本发明的抗原表位肽为肽段1,编号为SEQ ID NO.1:GESDPLGSPGSASDLETSGL。

[0072] 肽段2,编号为SEQ ID NO.2:LQVKQTSLEPLQESPRPTG。

[0073] 肽段3,编号为SEQ ID NO.3:ESPRPTGVWKSDEVATEGIRG。

[0074] 肽段4,编号为SEQ ID NO.4:RAPESPKMVQSGCFGRKMDRI。

[0075] 实施例3

[0076] 制备NT-proBNP天然蛋白的特异性抗体,NT-proBNP天然蛋白特异性抗体作为捕获抗体,和制备NT-proBNP肽段的特异性抗体,NT-proBNP肽段特异性抗体作为检测抗体,将捕获抗体和检测抗体进行纯化,方法如下:

[0077] 采用NT-proBNP天然蛋白以及4组肽段免疫8周龄、体重18g左右且健康的雌性BALB/c小鼠各2只,适应性饲养1周后,采集阴性血作为对照用;采用中程免疫方案(0.3ml/只,2周/次),首次免疫时(50 μ g/只)按免疫原与等体积的弗氏完全佐剂搅拌乳化,背部皮下多点注射,此后按免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂搅拌乳化进行常规免疫;3次免疫时,一般50 μ g抗原和TiterMax等量混合乳化后背部多点注射,7天后测效价。小鼠效价明显达到一定要求后加强免疫,加强免疫不加佐剂,加强免疫剂量为50 μ g,加强免疫后3天,摘眼球采血,分离血清保存。同时取脾脏进行融合。细胞融合时,将脾细胞与骨髓瘤细胞按4:1左右进行混合,并在聚乙二醇(PEG,分子量为1450)的促融作用下进行融合,融合细胞再HAT选择性

培养液中进行培养,10天后通过间接ELISA方法筛选出能与NT-proBNP天然蛋白反应的阳性杂交瘤细胞,并将初筛得到的阳性杂交瘤细胞扩大培养,用有限稀释法将获得的阳性杂交瘤细胞连续亚克隆至少两次以上,每次亚克隆用HT选择性培养基进行培养,亚克隆8-10天后进行ELISA筛选,直至单克隆细胞阳性率为100%为止,获得能稳定分泌针对NT-proBNP天然蛋白与肽段的特异性抗体的单克隆细胞株。

[0078] 选择8-12周龄雌性健康BALB/c小鼠,腹腔注射降植烷,0.5ml/只;7-10天后,给每只小鼠腹腔注射 1×10^6 个单克隆杂交瘤细胞,注意吹下细胞或稀释细胞需用PBS或无血清培养基;将腹水10,000r/min离心15min,除去细胞成分和其他的沉淀物、脂肪以及油层等,收集中间层,测定抗体效价,分装,置-70℃冻存备用。饱和硫酸铵沉淀:吸取5ml处理好的腹水移入小烧杯中,在搅拌下,逐滴加入过0.22 μ m滤膜的PBS 5.0ml;混合均匀后,再逐滴加入10ml饱和硫酸铵溶液(pH7.4),继续缓慢搅拌30min;静置2h后10,000r/min离心15分钟,弃去上清,沉淀物过0.22 μ m滤膜的PBS重悬,然后再将该重悬液过0.22 μ m滤膜;根据抗体不同亚型,选定不同的GE Healthcare公司的纯化柱,收集抗体峰;用PBS缓冲液将抗体进行透析,用BCA蛋白定量试剂盒测定抗体浓度,并将抗体分装保存。其中肽段1、肽段2、肽段3和肽段4制备得到的抗体编号为抗NT-proBNP-1抗体、抗NT-proBNP-2抗体、抗NT-proBNP-3抗体、抗NT-proBNP-4抗体,实施例1制备的NT-proBNP天然蛋白制备得到的为捕获抗体。

[0079] 将抗NT-proBNP天然蛋白制备的抗体作为捕获抗体,抗NT-proBNP-1抗体、抗NT-proBNP-2抗体、抗NT-proBNP-3抗体、抗NT-proBNP-4抗体作为检测抗体,进行血清学验证特异性抗体对的配对实验,验证肽段的相关性。

[0080] 结果表明如表1所示,抗NT-proBNP天然蛋白抗体作为捕获抗体可获得针对天然NT-proBNP蛋白效价最高的抗体对,其中,肽段2、肽段3和肽段4制备得到的抗体编号为抗NT-proBNP-2抗体、抗NT-proBNP-3抗体和抗NT-proBNP-4抗体的效价高。

[0081] 表1特异性抗体对配对实验

[0082]

检测抗体	抗 NT-proBNP-1 抗体	抗 NT-proBNP-2 抗体	抗 NT-proBNP-3 抗体	抗 NT-proBNP-4 抗体
对应肽段	肽段 1	肽段 2	肽段 3	肽段 4
100ng	0.816	1.615	1.415	2.24
50ng	0.583	1.105	0.895	1.501
25ng	0.461	0.713	0.615	1.05
12.5ng	0.335	0.524	0.462	0.755
6.25ng	0.292	0.402	0.342	0.487
3.125ng	0.251	0.267	0.258	0.306
1.5625ng	0.192	0.2	0.251	0.23

[0083]

NC	0.188	0.199	0.189	0.168
----	-------	-------	-------	-------

[0084] 实施例4

[0085] 采用抗NT-proBNP天然蛋白抗体作为捕获抗体,抗NT-proBNP-1抗体、抗NT-proBNP-2抗体、抗NT-proBNP-3抗体、抗NT-proBNP-4抗体作为检测抗体进行血清学验证特异性抗体对,分别测定了20例样本,结果证明,抗NT-proBNP-2抗体,抗NT-proBNP-3抗体,抗NT-proBNP-4抗体对血清中的NT-proBNP蛋白识别比较弱,而且进行了相关性分析,相关性均较低;如图1所示抗NT-proBNP-1抗体,经过交叉配对后,相关性很好, R^2 为0.969,是一对对血清识别较好的抗体对:抗NT-proBNP抗体与抗NT-proBNP-1抗体,因此,肽段1为特异性较高的NT-proBNP抗原表位肽,用肽段1制备NT-proBNP抗体,再制备一种定量检测NT-proBNP的试剂盒。

[0086] 实施例5

[0087] 本发明提供了一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,试剂盒包括底板以及附着于底板上依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸;

[0088] 底板以及附着于底板上样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸;样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸依次排列在底板上;

[0089] 结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体(肽段1相对应的抗NT-proBNP-1抗体)。

[0090] 其中,依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸制备成时间分辨免疫层析试纸条;结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体。

[0091] 进一步的,包被膜上设有检测区和对照区,检测区设于靠近结合垫层一侧,对照区设于靠近吸水纸一侧,检测区与所述对照区相互间隔设置。

[0092] 进一步的,包被膜上设有检测区和对照区,检测区设于靠近结合垫层一侧,对照区设于靠近吸水纸一侧,检测区与所述对照区相互间隔设置。

[0093] 进一步的,检测区固定有抗NT-proBNP抗体,抗NT-proBNP抗体能捕获所述NT-proBNP抗体;对照区固定有NT-proBNP抗体的第二抗体(NT-proBNP抗体的第二抗体为羊抗鼠IgG抗体或兔抗鼠IgG抗体)。

[0094] 进一步的,包被膜为化学交联聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈(聚合物)的硝酸纤维素膜。

[0095] 进一步的,结合垫为聚酯膜。

[0096] 进一步的,检测区的荧光值信号为C值,对照区的荧光值信号为T值。

[0097] 进一步的,本实施例对照区固定的抗体为有羊抗鼠IgG抗体。

[0098] 进一步的,荧光微球为稀土离子微球。

[0099] 进一步的,稀土离子微球具有 Eu^{3+} 镧系元素。

[0100] 其中,聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈聚合物在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有95%以上的透光率,材料可以允许绝大多数的可见光透过,光检测器能够捕捉多层多孔膜表面和内部的荧光信号,使检测结果更准确。

[0101] 其中,聚酯膜,其能够载有足量的荧光微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0102] 其中,荧光微球为用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素;荧光微球的直径为290nm。本实施例对微球表面的活性基团和所述荧光微球的直径不做限定。

[0103] 进一步的,定量检测人NT-proBNP的试剂盒还包括卡壳;时间分辨免疫层析试纸条安装于卡壳内。

[0104] 其中,卡壳为塑料卡壳。

[0105] 本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒,血液样本浸入到样品垫层上,当样品垫上的样本达到饱和状态后,通过毛细管作用将样本输送到结合垫层,样品液向吸水纸一端泳动,当样品液中含有NT-proBNP时,NT-proBNP与荧光微球上NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达包被膜的检测区,检测区的抗NT-proBNP抗体能捕获结合垫层中的NT-proBNP抗体(抗原-抗体复合物),形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测区上;未结合NT-proBNP抗体的稀土离子微球(Eu^{3+} 镧系元素)继续前行,到达对照区时,对照区固定有NT-proBNP抗体的第二抗体(羊抗鼠IgG抗体),NT-proBNP抗体的第二抗体与稀土离子微球上的鼠源性单抗(即NT-proBNP抗体)结合,在对照区处出现稀土离子微球的聚集。整个反应在10分钟内完成,并进行上机读卡。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区和对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量,根据预置标准曲线将相应的荧光信号值算出定量结果。

[0106] 实施例6

[0107] 实施例5的定量检测人NT-proBNP的试剂盒制备方法包括以下步骤:

[0108] (1) 分别在包被膜的检测区和对照区分别固定能捕获NT-proBNP抗体的抗NT-proBNP抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成检测区和对照区;

[0109] (2) 制备荧光微球标记的本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽(肽段1)制备的NT-proBNP抗体(肽段1相对应的抗NT-proBNP-1抗体)垫层,并喷涂在结合垫上;

[0110] (3) 在底板上依次粘贴上样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小,装入塑料卡壳。

[0111] (4) 试纸条的组装需在操作过程必须在湿度小于35%,温度为20°C-25°C的房间内进行。

[0112] 其中,依次排列的样品垫层、结合垫层、包被膜和吸水纸制备成时间分辨免疫层析试纸条;结合垫层上包被有荧光微球标记的NT-proBNP抗体。

[0113] 其中,包被膜的制备方法是:使用含有1%蔗糖的0.01mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液,分别将NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体和抗NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体的第二抗体(羊抗鼠IgG抗体或兔抗鼠IgG抗体)稀释到1mg/ml的浓度,使用定量喷膜仪以1 μ l/cm的量将二者以0.5cmm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,35°C烘干1h,加入干燥剂封存备用。

[0114] 其中,荧光标记的NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体的制备方法包括以下步骤:

[0115] (1) 将NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体用0.02-0.05mol/L的PH为7.2

的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1mg/ml;

[0116] (2) 使用0.01-0.05mol/L的PH为7.2的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmol/L,室温反应15分钟,充分洗涤微球,用0.01-0.05mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体,使NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体与微球的质量比为1:5,室温反应2小时,加入含有1%BSA的0.01mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有0.05%BSA,0.05%Tween-20,0.01mol/L的PH为7.2的磷酸盐缓冲液保存液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以4ul/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在30℃烘干2小时,加入干燥剂封存备用。

[0117] 实施例7

[0118] 定量检测人NT-proBNP的试剂盒中的标准曲线绘制步骤:

[0119] 在制备好的NT-proBNP的时间分辨免疫层析试纸条的样品垫层上加入不同浓度的NT-proBNP标准品(取9个不同的浓度,分别为20000pg/ml、10000pg/ml、5000pg/ml、2500pg/ml、1000pg/ml、500pg/ml、100pg/ml、50pg/ml、0每个浓度做5个平行样)。膜层析反应15分钟后,仪器读取检测区和对照区的荧光信号,其中,检测区的荧光值信号为C值,对照区的荧光值信号为T值。如表2所示,以检测的样品荧光值信号T/C值为纵坐标,NT-proBNP标准品浓度为横坐标,取双对数建立方程并拟合成标准曲线。拟合的标准曲线如图2所示。

[0120] 由图2的标准曲线可以看出,该标准曲线的 R^2 为0.996,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含NT-proBNP浓度进行定量分析。

[0121] 表2定量检测人NT-proBNP的试剂盒中的标准曲线表

[0122]

校准抗原浓度 (pg/ml)	20000	10000	5000	2500	1000	500	100	50	0	
	7.792712973	5.501774	3.316354	2.021486	0.84159	0.402785	0.117324	0.062419077	0.028439	
T/C值	7.621406476	5.280815	3.291421	1.876933	0.797856	0.480724	0.111	0.060792486	0.011375	
	7.103220206	4.610467	2.988608	1.918945	0.777763	0.383459	0.120794	0.06	0.027925	
	7.107269545	5.120193	3.059366	1.94946	0.727487	0.44	0.107238	0.062866131	0.012288	
	8.056487863	4.695107	3.549329	1.819105	0.676016	0.492096	0.101731	0.0530254	0.021672	
AVERAGE	7.536	5.042	3.241	1.917	0.764	0.44	0.112	0.06	0.02	
STDEV	0.423	0.381	0.224	0.076	0.064	0.047	0.008	0.004	0.008	
CV	5.61%	7.56%	6.90%	3.97%	8.39%	10.76%	6.85%	6.64%		CV 平均值 7.09%
T/C平均值	7.536	5.042	3.241	1.917	0.764	0.44	0.112	0.06	0.02	
标定抗原浓度 (pg/ml)	20000	10000	5000	2500	1000	500	100	50	0	
校准抗原浓度取对数	0.877	0.703	0.511	0.283	-0.117	-0.357	-0.952	-1.223		
样品荧光值 信号T/C平均值 取对数	4.301	4	3.699	3.398	3	2.699	2	1.699		

[0123] 实施例8

[0124] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽 (肽段1) 制备的NT-proBNP抗体 (肽段1相对应

的抗NT-proBNP-1抗体)制备的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行准确度性能分析,方法如下:

[0125] 1、测量试剂盒的准确度(相对偏差)

[0126] 用经标定的NT-proBNP浓度为10000pg/ml、500pg/ml、100pg/ml的样本采用本试剂盒测定样品荧光值信号T/C值,重复3次,平均值结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差B,结果应符合 $B \leq 10\%$ 公式(1)。

[0127] $B = (M - T) / T \times 100\%$ 式中:

[0128] B——相对偏差;

[0129] M——测量浓度的均值;

[0130] T——标定浓度。

[0131] 其中,检测区的荧光值信号为C值,对照区的荧光值信号为T值。

[0132] 本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒经检测,相对偏差结果如表3所示,表3说明标定的NT-proBNP浓度为10000pg/ml、500pg/ml、100pg/ml的样本的偏差准确率低于10%,说明本发明的定量检测NT-proBNP的试剂盒准确率高。

[0133] 表3定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行准确度性能分析表

标定抗原浓度 (pg/ml)	10000	500	100
T/C 值	4.787425	0.452079	0.09532
	4.793423	0.39211	0.098925
	5.080579	0.357749	0.10707
测量抗原浓度 (pg/ml)	9151.811	531.1111	81.22546
	9165.644	447.3305	84.94473
	9832.027	400.4803	93.45228
平均值	9383.161	459.6406	86.54082
偏差	-6%	-8%	-13%

[0134] 实施例9

[0136] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽(肽段1)制备的NT-proBNP抗体(肽段1相对应的抗NT-proBNP-1抗体)制备的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行稀释线性性能分析,方法如下:

[0137] 将NT-proBNP样本按比例稀释成10000pg/ml、5000pg/ml、2500pg/ml、1250pg/ml与625pg/ml。按试剂盒说明书进行操作,对每一个浓度的样本均重复3次,计算其荧光值信号T/C值,其中,检测区的荧光值信号为C值,对照区的荧光值信号为T值。如表4和图3所示,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 R^2 。

[0138] 本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒经检测,测量稀释线性数据如表4所示,图3中说明线性相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 的要求,说明稀释线性分析性能满足要求。

[0139] 表4定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行稀释线性性能分析表

[0140]

标定抗原浓度 (pg/ml)	10000	5000	2500	1250	625
T/C值	4.396268	2.756925	1.389014	0.744809	0.489297
	4.496847	2.868175	1.515822	0.842937	0.404229
	4.365754	2.876444	1.575527	0.913085	0.414517
测量抗原浓度 (pg/ml)	8257.573	4703.105	2057.059	969.9471	584.2934
	8486	4932.984	2285.682	1126.125	464.0611
	8188.484	4950.144	2394.721	1240.123	478.3449
平均值	8310.685	4862.078	2245.821	1112.065	508.8998

[0141] 实施例10

[0142] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽(肽段1)制备的NT-proBNP抗体(肽段1相对应的抗NT-proBNP-1抗体)制备的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒的进行最低检测限性能分析,方法如下:

[0143] 使用空白对照品(检测样品的缓冲液)重复测定20次求平均值M,并求得标准差SD, M+2SD数值应不高于50pg/ml。

[0144] 其中,检测区的荧光值信号为C值,对照区的荧光值信号为T值。

[0145] 从表5可知,最低检测限=M+2SD=20个浓度平均值+2倍20个浓度的SD,最低检测限为34.803 (pg/ml),说明了定量检测人NT-proBNP的试剂盒的最低检测限性能符合要求。

[0146] 表5定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行最低检测限性能分析表(20个样本的检测浓度)

[0147]

次数	20次对照品的荧光值信号 T/C 值	测量浓度 (pg/ml)
1	0.037809648	26.623
2	0.010984848	5.994
3	0.010202442	5.483
4	0.013986728	8.022
5	0.038874974	27.531
6	0.028972926	19.311
7	0.010907585	5.943
8	0.035992218	25.087
9	0.030157293	20.267
10	0.009234775	4.862
11	0.027481051	18.118
12	0.032194617	21.930
13	0.052865475	39.890
14	0.018677579	11.371
15	0.02621598	17.117
16	0.012781864	7.196
17	0.016144428	9.538
18	0.029469292	19.711
19	0.0144	8.309
20	0.009563344	5.071
平均值		15.369
标准偏差		9.717

[0148]

最低检测限=20个浓度平均值+2倍20个浓度的SD	最低检测限=34.803(pg/ml)	
---------------------------	---------------------	--

[0149] 实施例11

[0150] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体制备的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行重复性性能分析,方法如下:

[0151] 经标定的NT-proBNP浓度为10000pg/ml、500pg/ml的样本分别进行重复检测10次，计算10次测量结果的平均值M和标准差SD，根据公式(2)得出其变异系数CV，结果不大于15%。

[0152] $CV = SD/M \times 100\%$ 公式(2)

[0153] 式中：

[0154] CV——变异系数；

[0155] SD——10次测量结果的标准差；

[0156] M——10次测量结果的平均值。

[0157] 其中，检测区的荧光值信号为C值，对照区的荧光值信号为T值。

[0158] 重复性测量结果如表6所示，标定的NT-proBNP浓度为10000pg/ml、500pg/ml的两个样本的变异系数CV分别为10.63%和11.57%，符合变异系数CV小于15%的标准。

[0159] 表6定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行重复性性能分析表

[0160]

标定抗原浓度 (pg/ml)	10000	500
荧光值信号 T/C 值	4.766546982	0.349333
	4.817044488	0.3291348
	4.843759982	0.376048
	4.391284442	0.285059
	4.544641062	0.351207
	4.268503711	0.274327
	4.360266864	0.376711

[0161]

	5.41459247	0.296335
	5.901590804	0.332614
	4.618144349	0.315711
AVERAGE	4.793	0.329
STDEV	0.509	0.038
CV	10.63%	11.57%

[0162] 实施例12

[0163] 本发明公开的NT-proBNP抗原表位肽制备的NT-proBNP抗体制备的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒进行临床样本相关性的性能分析，方法如下：

[0164] 采用本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒与化学发光试剂方法(对比例)分别对50例临床样本进行测试，测试结果如表7所示，得到的结果计算这两种方法的相关性。

[0165] 临床样本相关性检测结果如图4(表7的左边栏的数据为横坐标,右边栏数据为纵坐标进行相关性作图)所示,采用两种方法检测临床样品NT-proBNP的结果其相关性 $R^2 > 95\%$,说明本发明提供的一种定量检测人NT-proBNP的试剂盒的检测结果准确度高。

[0166] 表7与其它试剂盒对比的相关性数据

[0167]

本发明定量检测人 NT-proBNP 的试剂盒检测 50 例临床样本的浓度 (pg/ml)	对比试剂盒检测 50 例临床样本的浓度(pg/ml)
51	150
20000	25000
60	200
63	68
43	48
72	203
80	150
90	200

[0168]

142	200
111	156
120	135
508	600
1500	1106
2600	2100
3000	3600
4000	4058
5600	6000
6000	6108
7500	7200
8000	9104
9000	9300
130	120
11000	15000
15000	18000
17200	20025
19000	20000
16500	18003
120	82
130	136
150	73
68	52
230	300
300	600
600	500
55	25
77	51
1100	1100

	950	770
	46	32
	30	31
	89	200
	300	401
	420	200
[0169]	450	500
	680	300
	38	20
	35	13
	37	5
	48	20
	900	1500

[0170] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

Arg Lys Met Asp Arg Ile

20

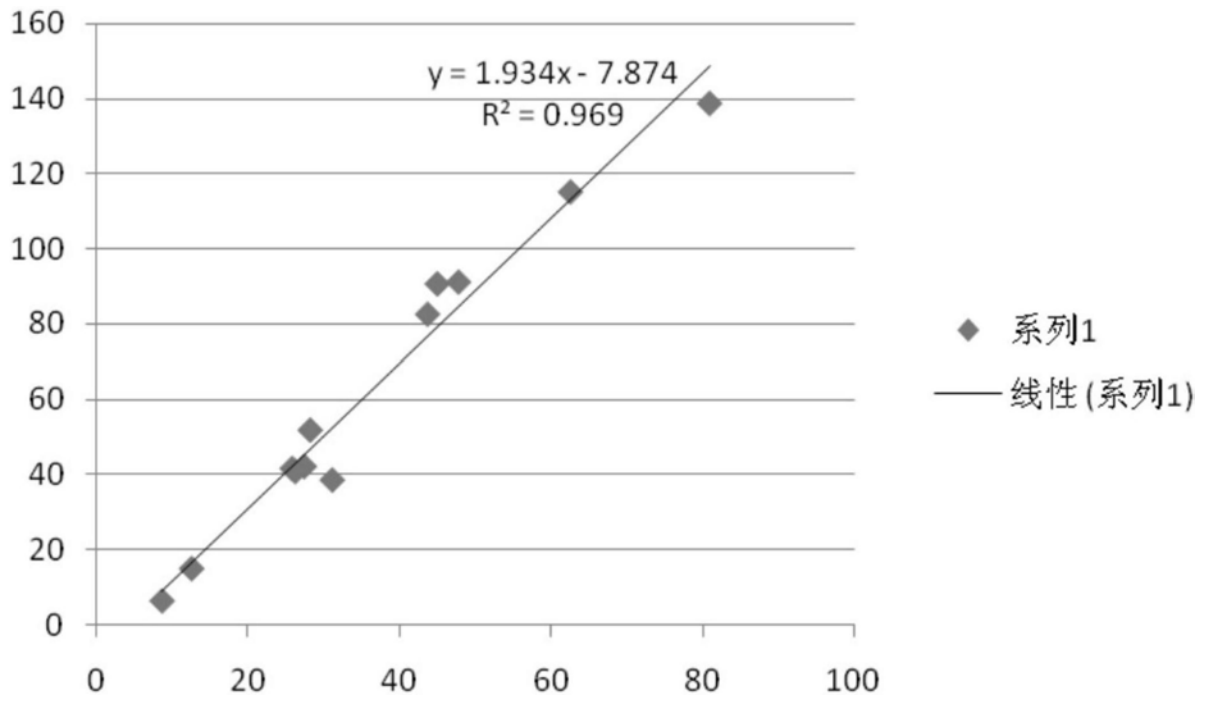


图1

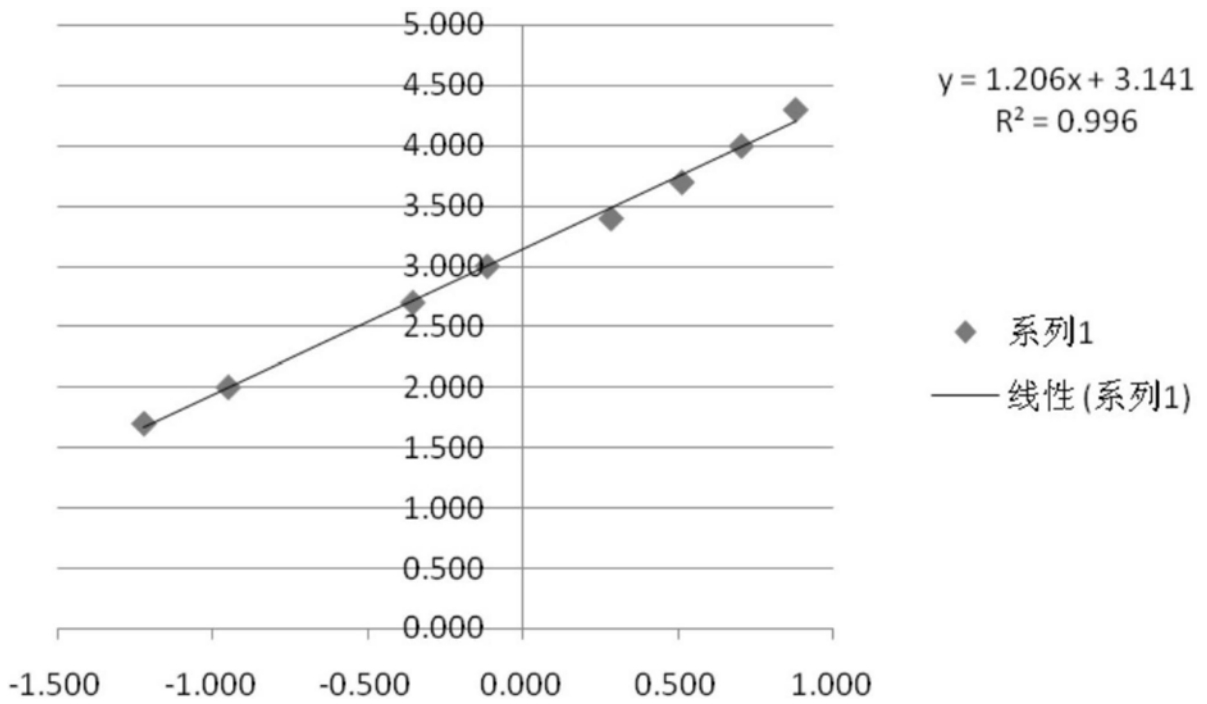


图2

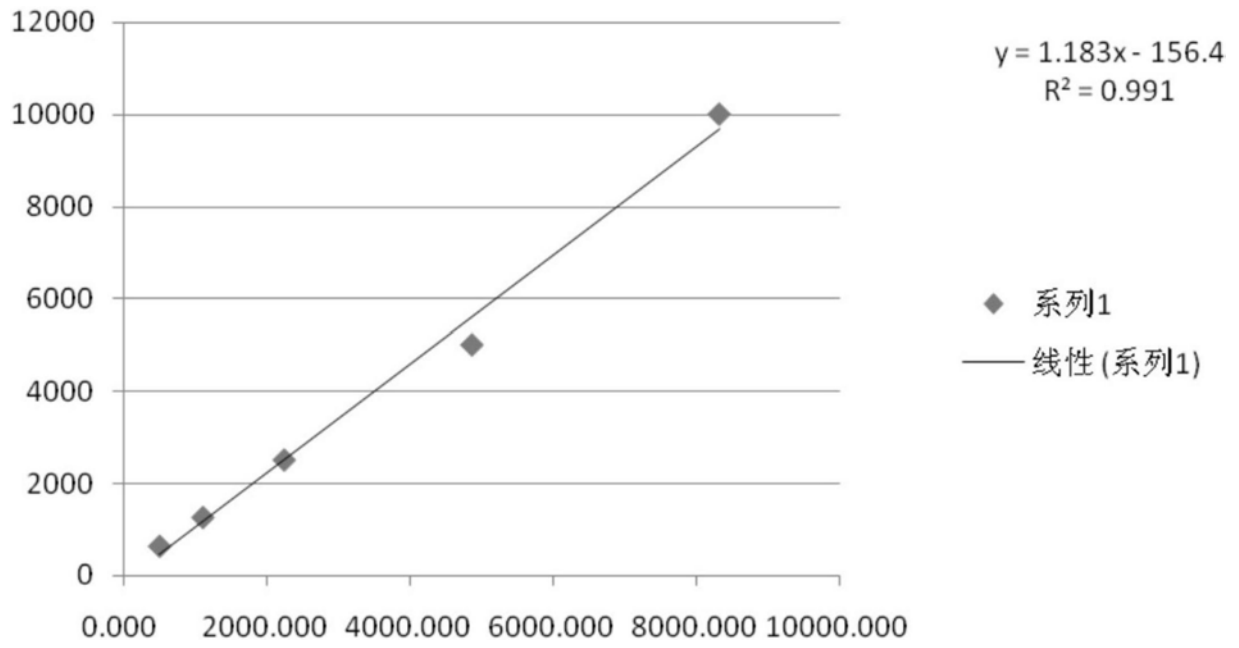


图3

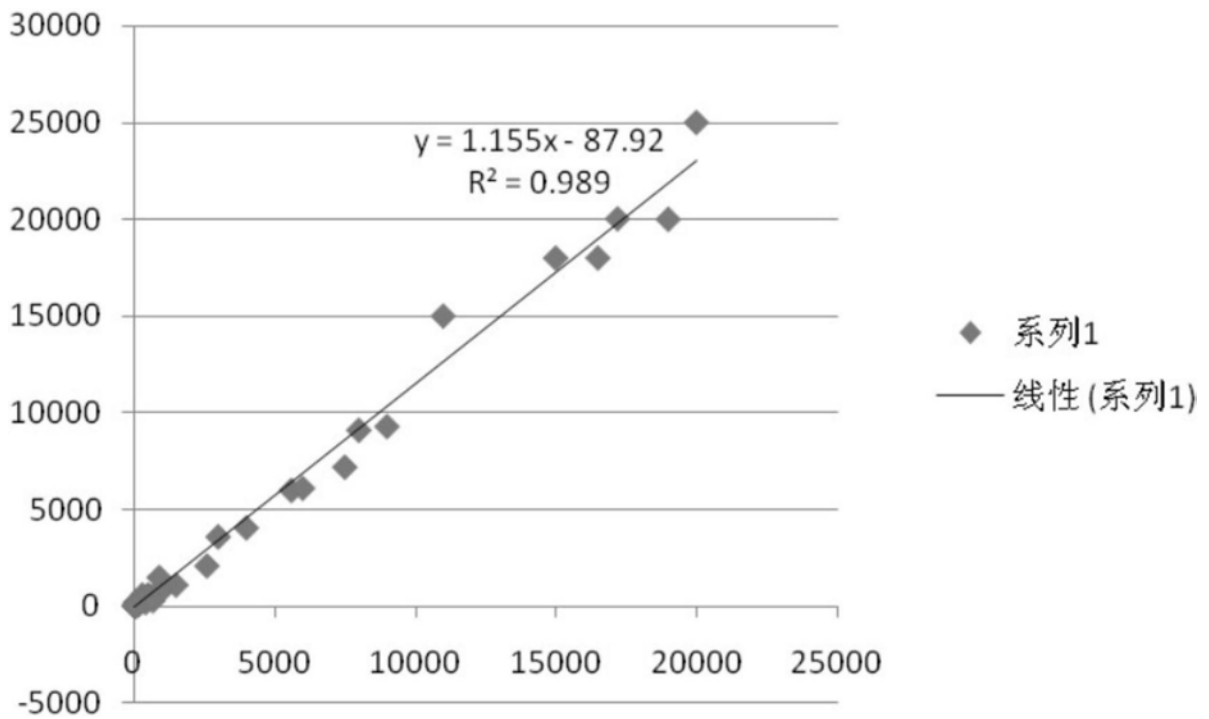


图4

专利名称(译)	定量检测人NT-proBNP的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107478848A	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN201710729898.X	申请日	2017-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
[标]发明人	周腊梅 黄若馨 胡守旺 宋旭东		
发明人	周腊梅 黄若馨 胡守旺 宋旭东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/68		
代理人(译)	张春水		
其他公开文献	CN107478848B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于多肽化学与免疫学领域，尤其涉及NT-proBNP抗原表位肽、用该抗原表位肽制备的NT-proBNP特异性抗体、所述抗体在制备检测NT-proBNP的用途和定量检测NT-proBNP的试剂盒。本发明的公开的所述NT-proBNP抗原表位肽的氨基酸序列具有：(I)SEQ ID NO.1所示；或(II)与(I)所述序列至少有90%同源性的序列。本发明提供的定量检测人NT-proBNP的试剂盒能有效解决现有的检测NT-proBNP方法的灵敏度差、检测操作繁琐的缺陷。

检测抗体	抗 NT-proBNP-1 抗体	抗 NT-proBNP-2 抗体	抗 NT-proBNP-3 抗体	抗 NT-proBNP-4 抗体
对应肽段	肽段 1	肽段 2	肽段 3	肽段 4
100ng	0.816	1.615	1.415	2.24
50ng	0.583	1.105	0.895	1.501
25ng	0.461	0.713	0.615	1.05
12.5ng	0.335	0.524	0.462	0.755
6.25ng	0.292	0.402	0.342	0.487
3.125ng	0.251	0.267	0.258	0.306
1.5625ng	0.192	0.2	0.251	0.23