



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111004328 A

(43)申请公布日 2020.04.14

(21)申请号 201911269089.0

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2019.12.11

G01N 21/76(2006.01)

(71)申请人 深圳市国创纳米抗体技术有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街  
道科苑南路留学生创业大厦一期1310  
室

(72)发明人 林景涛 宋海鹏 于建立 张霞

王欢 陈晓恒

(74)专利代理机构 北京市众天律师事务所

11478

代理人 李新军

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图3页

(54)发明名称

一种用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳  
米抗体组合

(57)摘要

本发明公开了一组用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合,所述组合包括作为捕获抗体的抗癌胚抗原二价纳米抗体和作为检测抗体的抗癌胚抗原单价纳米抗体,本发明还公开了所述纳米抗体组合在制备癌胚抗原检测试剂盒中的应用。本发明提供的抗癌胚抗原二价纳米抗体与抗癌胚抗原单价纳米抗体的纳米抗体组合具有很好的匹配度,在对CEA抗原的检测中显示出优异的P/N值,最低检测限,准确度,可满足临床样本中CEA的检测。

1. 一组用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合,所述组合包括作为捕获抗体的抗癌胚抗原二价纳米抗体和作为检测抗体的抗癌胚抗原单价纳米抗体,所述二价纳米抗体的可变区序列如SEQ ID NO.1所示,所述单价纳米抗体的可变区序列如SEQ ID NO.2所示。
2. 根据权利要求1所述的纳米抗体组合,其特征在于,所述二价纳米抗体由一个抗体较链区的两末端分别与所述二价纳米抗体的可变区连接。
3. 根据权利要求2所述的纳米抗体组合,其特征在于,所述二价纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
4. 根据权利要求1所述的纳米抗体组合,其特征在于,所述单价纳米抗体与一化学显色基团相连接。
5. 根据权利要求4所述的纳米抗体组合,其特征在于,所述化学显色基团为人碱性磷酸酶。
6. 根据权利要求5所述的纳米抗体组合,其特征在于,所述单价纳米抗体与人碱性磷酸酶的连接方式为融合表达连接。
7. 权利要求1-6任一所述的纳米抗体组合在制备癌胚抗原检测试剂盒中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述检测试剂盒为磁珠化学发光法免疫检测试剂盒。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述二价纳米抗体是生物素化的二价纳米抗体,所述试剂盒还包括链霉亲和素化磁珠。

## 一种用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种纳米抗体组合,属于免疫学领域。

### 背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEA,又称为CEACAM-5或CD66e)是一种具有约180kDa分子量的糖蛋白。CEA是免疫球蛋白超家族的一名成员,并且含有经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚与细胞膜连接的7个域。7个域包括单一N端Ig可变域和与Ig恒定域同源的6个域(A1-B1-A2-B2-A3-B3)。CEA最初分类为仅在胎儿组织中表达的蛋白质,现在已经在几种正常成年组织中鉴定出。CEA的过量表达在许多类型的癌症中观察到,包括结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞癌、乳腺癌和甲状腺癌。因此,CEA已经被鉴定为肿瘤相关抗原。CEA容易自细胞表面切割,并直接或经由淋巴系统自肿瘤脱落入血流中。由于此特性,已经使用血清CEA的水平作为临床标志物以诊断癌症并筛选癌症。而且,CEA也已被用作肿瘤标记,测量癌症患者血液中升高的CEA的免疫学测定法已在临床上用于癌症的预后和控制。

[0003] 更重要的是,CEA已成为用于靶向治疗的潜在有用的肿瘤相关抗原。已经报道的使用CEA靶向免疫治疗癌症主要有2种主要方法。一种方法使用抗CEA抗体引发免疫细胞的溶解活性,特别是通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC),以消除表达CEA的肿瘤细胞。另一种方法是通过抗CEA抗体或抗体片段与例如药物、毒素、放射性核苷酸、免疫调节剂或细胞因子等效应分子缀合,特异性靶向表达CEA的肿瘤细胞,从而发挥效应分子的治疗作用。

[0004] 目前已经针对CEA生成多种单克隆抗体。Chester等已经自噬菌体展示文库分离出单链抗CEA抗体以在放射性免疫检测和放射性免疫疗法中使用(美国专利No.5,876,691),随后将抗体人源化(美国专利No.7,232,888)。放射性标记的抗CEA抗体已经在结肠直肠癌患者的临床试验中使用。

[0005] 1993年,Hamers-Casterman等研究发现,在骆驼科动物(骆驼、单峰骆驼和美洲驼)的体内发现了一类仅有重链二聚体抗体H<sub>2</sub>,其主要是IgG2和IgG3类型。此类抗体由于缺乏轻链,于是将这种抗体称为仅有重链的抗体(heavychain-only-like Antibody,HCAbs)。此类抗体的抗原结合部位由一个结构域组成,称为VHH区,因此该类抗体也被称为单结构域抗体或者单域抗体(sdAb)。由于该类抗体为去除恒定区后的可变区序列,分子量只有15kD,大约10纳米的直径,因此也被称为纳米抗体(Nbs)。另外,在鲨鱼中也观察到这类单结构域抗体,称为VNAR。这种仅有重链的抗体原来只是作为一种人类B细胞增生性疾病(重链病)的病理形式被人们所认识,这种仅有重链的抗体可能是由于基因组水平的突变和缺失而导致重链CH1结构域不能表达,使得表达出的重链缺乏CH1,从而缺乏与轻链的结合能力,从而形成一种重链二聚体。

[0006] 相对于常规的四链抗体的scFv而言,纳米抗体在亲和力方面与其对应的scFv相当,但在可溶性、稳定性、对聚集的抗性、可重折叠性、表达产率以及DNA操作、文库构建和3-D结构测定的容易性方面超越scFv。

[0007] 纳米抗体有来源于成年骆驼体内HCAbs的最小的功能性抗原结合片段,具有高度稳定性和与抗原结合的高亲合力,能与蛋白裂隙和酶活性位点的相互作用,使之作用类似于抑制剂。因此,纳米抗体可以为从肽模拟药物设计小分子酶抑制物提供新的思路。由于仅有重链,纳米抗体的制造较单克隆抗体容易。纳米抗体的独特性质,如处于极端温度和pH环境中的稳定性,可以低成本制造大产量。因此,纳米抗体在疾病的治疗和诊断中具有很大的价值,在肿瘤的抗体靶向诊断和治疗中也具有很大的发展前景。

[0008] 鉴于CEA更多地过量表达于一些诸如结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌等实体肿瘤中,因此研发抗CEA的纳米抗体,充分发挥纳米抗体超强的抗原识别能力,特别是识别一些隐匿于裂隙或空腔里的抗原决定簇成为抗体技术领域的一种新的需求。但是鉴于纳米抗体分子量过低而存在的一些诸如亲和力低、易于集聚、血清半衰期短等结构缺陷却阻碍着纳米抗体的进一步应用。

[0009] 目前已有抗CEA纳米抗体的研发报道和相关专利申请,中国发明专利CN106749667A公开了三株抗CEA的纳米抗体,其都具有非常强的抗原亲和力,其中VHH-CEA1的抗原亲和力达到 $2.40E-9$ 。另一个中国发明专利申请CN107880130A公开了一株抗CEA的纳米抗体2D5,其抗原亲和力更是达到 $2.67E-11$ 。优异的抗原亲和力保证了所述纳米抗体在目的抗原的鉴别诊断上的应用前景,但是在具体应用上,即使拥有高抗原亲和力的纳米抗体,在抗原检测的实际操作中仍然存在很大的技术问题。例如,在免疫夹心检测法中的第一抗体和第二抗体之间的抗原结合位点的重叠度问题,以及纳米抗体自身分子量过小所带来的一系列问题依然是获得高效检测试剂盒的技术难题所在。本发明的目的就是提供一种既能够充分发挥纳米抗体的优越性能,又能克服其固有缺陷的抗CEA的纳米抗体组合,以充分发挥其在CEA抗原检测中的高效性能。

#### 发明内容:

[0010] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一组用于双抗体夹心法检测癌胚抗原(CEA)的纳米抗体组合,所述组合包括作为捕获抗体的抗癌胚抗原二价纳米抗体和作为检测抗体的抗癌胚抗原单价纳米抗体,所述二价纳米抗体的可变区序列如SEQ ID NO.1所示,所述单价纳米抗体的可变区序列如SEQ ID NO.2所示。

[0011] 在一个优选的实施方案中,所述二价纳米抗体由一个抗体铰链区的两末端分别与所述二价纳米抗体的可变区连接。

[0012] 在一个更为优选的实施方案中,所述二价纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0013] 在另一个优选的实施方案中,所述单价纳米抗体与一化学显色基团相连接。

[0014] 更为优选地,所述化学显色基团为人碱性磷酸酶。

[0015] 尤为优选地,所述单价纳米抗体与人碱性磷酸酶的连接方式为融合表达连接。

[0016] 其次,本发明还提供了上述的纳米抗体组合在制备癌胚抗原检测试剂盒中的应用。

[0017] 在一个优选的实施方案中,所述检测试剂盒为磁珠化学发光法免疫检测试剂盒。

[0018] 更为优选地,所述二价纳米抗体是生物素化的二价纳米抗体,所述试剂盒还包括链霉亲和素化磁珠。

[0019] 本发明提供的用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合在CEA抗原检测中显示出高效的性能,其中作为捕获抗体的抗癌胚抗原二价纳米抗体具有单价纳米抗体双倍的抗原结合位点,相比单价纳米抗体对CEA抗原具有更高识别和结合能力。经过检测反应体系的优化调试后,其反应性,最低检测限,准确度均有大幅提升。本发明提供的抗癌胚抗原二价纳米抗体与抗癌胚抗原单价纳米抗体的纳米抗体组合具有很好的匹配度,在对CEA抗原的检测中显示出优异的P/N值,最低检测限,准确度,可满足临床样本中CEA的检测。

#### 附图说明

- [0020] 图1. 第一轮PCR扩增电泳鉴定图;  
[0021] 图2. 第二轮PCR扩增电泳鉴定图;  
[0022] 图3. 二价纳米抗体纯化SDS-PAGE图;  
[0023] 图4. 二价纳米抗体亲和力测试曲线图;  
[0024] 图5. 生物素化二价纳米抗体亲和力测试曲线图。

#### 具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明权利要求所限定的保护范围构成任何限制。

[0026] 实施例1抗CEA单价纳米抗体的制备

[0027] 参考中国发明专利申请CN106749667A。所述单价纳米抗体的可变区序列如SEQ ID NO.1所示。

[0028] 实施例2. 抗CEA二价纳米抗体的制备

[0029] 2.1VHH1-LHC-VHH1-pMES4载体构建:

[0030] 由于抗体铰链区(LHC)较长,设计两个下游引物,进行两轮PCR,操作如下:

[0031] 2.1.1以单价纳米抗体DNA作为模版进行第一轮PCR,引物序列如下:

[0032] 11F1:AACTGCAGGAGAGCGGTGGCGGTC

[0033] 11R1:CAAGTGACCGTTAGCAGCGAACCGAAAACCCCGAAACC

[0034] GCAGCCGAGCCTCAACCGCAACCGCAGCCG

[0035] PCR反应条件及程序为:95℃5分钟;95℃30秒,55℃30秒,72℃30秒,30个循环;72℃7分钟。使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收300bp左右的条带(图1:M为Trans 2K DNA Marker;1为阴性对照,2-10为第一轮PCR产物)。

[0036] 2.1.2以第一轮PCR回收产物为模板进行第二轮PCR,引物序列如下:

[0037] 11F1:AACTGCAGGAGAGCGGTGGCGGTC

[0038] 11R2:CAACCGCAACCGCAGCCGAATCCGACCACCGAAAGCA

[0039] AAGCAAATGTCCGACCACCATCACCATCACTAGTC

[0040] PCR反应条件及程序为:95℃5分钟;95℃30秒,55℃30秒,72℃30秒,15个循环;72℃7分钟。使用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物(图2:M为Trans 5K DNAMarker;1-3为第二轮PCR产物,4为阴性对照)。

[0041] 2.1.3载体构建:将pMES4(购自Biovector)与第二次PCR产物分别进行Pst I和Spe

I双酶切,取1.5 $\mu$ g酶切后载体和450ng酶切后的第二次PCR产物,加1.5 $\mu$ L T4 DNA连接酶,补充缓冲液和水至10 $\mu$ L总体积,16 $^{\circ}$ C过夜连接。

[0042] 2.2二价纳米抗体的诱导表达;

[0043] 2.2.1VHH1-LHC-VHH1连接产物转化大肠杆菌Shuffle:将连接产物10 $\mu$ l转化于100 $\mu$ l Shuffle感受态细胞中,轻轻混匀,在冰上放置30分钟,42 $^{\circ}$ C水浴热击90秒,冰浴冷却3分钟。向离心管加入600 $\mu$ l LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养60分钟。取上清100 $\mu$ l,用三角涂布器涂布在LB-A平板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。

[0044] 2.2.2二价纳米抗体的诱导表达和提取:挑取上述10个单克隆菌落于LB-A培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,送测序,正确序列参考SEQ. NO.3或4。选择测序正确的菌株进行诱导表达。取该菌液按照1:100比例加入100ml新鲜LB-A培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养3小时至菌液OD<sub>600</sub>=0.8左右,加入终浓度为1mM IPTG,30 $^{\circ}$ C诱导过夜。第三日,8000rpm,离心10分钟收集菌体,加入1.5mL的预冷TES缓冲液重悬沉淀。冰浴2分钟后,轻柔振荡30秒,重复此循环6次。加3.0ml TES/4(将TES用水稀释4倍),轻柔振荡30秒后,冰浴静置2分钟,同样重复振荡和静置步骤共6次。9000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10分钟,收集约4.5mL的上清(周质提取物),将上清进行蛋白电泳分析。

[0045] 2.2.3二价纳米抗体的纯化和鉴定:将IMAC Sepharose(GE公司)重悬后,取2ml加入到重力柱内,静置30分钟,使sepharose自然沉降于重力柱底部,流出保存缓冲液。加入2倍柱体积的硫酸镍溶液(0.1M),按照约8秒/滴的流速流出硫酸镍溶液;加入10倍柱体积的平衡缓冲液平衡并洗涤sepharose,流速维持不变;将样品使用平衡缓冲液2倍稀释后,加入重力柱中,调节流速为6秒/滴,收集穿透液;加入10倍柱体积洗涤缓冲液洗涤sepharose,维持流速不变,收集洗涤液;加入3倍柱体积的洗脱缓冲液,流速维持在6秒/滴,收集含有目的蛋白的洗脱液;最后依次加入10倍柱体积的平衡缓冲液、10倍柱体积的纯水和10倍柱体积的20%乙醇洗涤sepharose,并最终保留4ml的20%乙醇来保存柱子。上述收集的样品分别进行SDS-PAGE检测(图3:M为彩虹180广谱蛋白;1为大肠杆菌诱导表达纯化后的纳米抗体即VHH1-LHC-VHH1)。所述二价纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,其核苷酸编码序列如SEQ ID NO.4所示。

[0046] 实施例3.抗CEA纳米抗体的亲和力测试

[0047] 3.1芯片抗原偶联:将CEA抗原用不同pH的醋酸钠缓冲液(pH 5.5,pH 5.0,pH 4.5,pH 4.0)配制成20 $\mu$ g/mL的工作液,同时准备50mM的NaOH再生溶液,利用Biacore T100蛋白质相互作用分析系统仪器中的模板方法对不同pH条件的抗原与芯片(GE公司)表面之间的静电结合进行分析,以信号增加的量达到5倍RL为标准,选择合适的最偏中性的pH体系并根据需要调整抗原浓度作为偶联时的条件。按照仪器中自带的模板方法对芯片进行偶联:其中1通道选择空白偶联模式,2通道选择Target偶联模式,目标设置为设计好的理论偶联量。偶联过程大概耗时60分钟。

[0048] 3.2分析物浓度设置条件探索及再生条件优化:采取手动进样模式,选择1,2通道2-1模式进样,流速设置为30 $\mu$ L/分钟。进样条件均为120秒,30 $\mu$ L/分钟。再生条件均为30秒,30 $\mu$ L/分钟。首先持续空走运行缓冲液直至所有基线均稳定。准备浓度跨度较大的纳米抗体溶液,以运行缓冲液配置,建议设置200 $\mu$ g/mL,150 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ g/mL,20 $\mu$ g/mL,10 $\mu$ g/mL,2 $\mu$ g/mL。准备再生溶液,选择谷氨酸盐酸体系四个pH梯度的再生溶液:1.5,2.0,2.5,

3.0。手动进样200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分析物样品,观察2通道,从最偏中性pH的再生缓冲液进行再生,直至2通道再生后的响应线回到与基线同一高度。再手动进样一次200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量,用上一步中最后使响应线回到基线的再生溶液进行再生后,再次收手动进样200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量与刚才的结合量数值对比,若偏差小于5%,即认为此pH的再生溶液为最佳的再生溶液,若再次进样的结合量偏低,则继续以更低pH的再生缓冲液进行实验。以选择的最佳再生溶液,作为每次进样后的芯片表面再生试剂。分别进样上面设置的分析物浓度样品,并对每个浓度的结合量进行分析,最终确定亲和力测试所需的浓度梯度。

[0049] 3.3亲和力测试:按优化好的样品浓度梯度,再生溶液,使用仪器自带的模板方法(其中设置进样条件为60秒,30 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ ;解离时间:600秒;再生条件:30秒,30 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ )对纳米抗体及抗原之间的亲和力进行测试。随时观察2-1通道的信号情况。亲和力测试过程大概耗时200分钟。在具体实验中,将芯片上的纳米体俘获到适当的信号值,然后用系统运行缓冲液HBS-EP(10mM HEPES,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%P20)以30 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速注射到芯片上,获得纳米抗体与抗原相互作用的动态过程。分别使用该方法测试了单价/二价纳米抗体与抗原结合和解离的能力。

[0050] 3.4结果分析:选择合适的几个浓度梯度的结合解离曲线采用1:1binding的模式对所有曲线进行拟合,最终得到亲和力数值及结合常数和解离常数等重要参数(见图4)。筛选的单价/二价纳米抗体亲和力均达到 $10^{-9}$ 以上。

[0051] 表1:单价/二价纳米抗体亲和力数据

样品编号	亲和力
VHH-CEA1	2.40E-09
VHH1-LHC-VHH1	3.08E-10

[0053] 实施例4.生物素化抗CEA纳米抗体的制备

[0054] 使用购自Thermo的生物素化偶联试剂盒,参考说明书进行单价/二价纳米抗体与生物素的偶联,步骤如下:

[0055] 先用超纯水将生物素稀释至10mM,同时确保抗体保存在PBS或者PH7.2-8.0的缓冲溶液中;按照说明书提供的计算公式,如下,

$$[0056] \quad \text{mL protein} \times \frac{\text{mg protein}}{\text{mL protein}} \times \frac{\text{mmol protein}}{\text{mg protein}} \times \frac{20 \text{ mmol Biotin}}{\text{mmol protein}} = \text{mmol Biotin}$$

$$[0057] \quad \text{mmol Biotin} \times \frac{1,000,000 \text{ uL}}{L} \times \frac{L}{10 \text{ mmol}} = \text{uL Biotin}$$

[0058] 将纳米抗体与生物素按照计算的比例混合,置于室温偶联30min以上;纯化步骤,先用镍柱纯化,得到30ml洗脱液,再通过分子筛进一步纯化。按照实施例3的方法对生物素化单价/二价纳米抗体进行亲和力测试(结果见图5),数值见表2:

[0059] 表2.生物素化单价/二价纳米抗体亲和力数据

名称	亲和力数值
Bio-VHH-CEA1	3.12E-09
Bio-VHH1-LHC-VHH1	1.05E-08

[0061] 实施例5.2D5-HAP的制备

[0062] 参考中国发明专利申请CN107880130A的说明书公开内容,所述纳米抗体2D5的可变区序列如SEQ ID NO.2所示。该专利申请公开了通过柔性多肽将纳米抗体与人碱性磷酸酶相融合成为带有化学发光区序列的纳米抗体2D5-HAP。在所述核苷酸编码序列的两个末端添加有HindIII和EcoRI两个酶切位点,以该两个酶切位点连接到载体pcDNA3.1(+)上。无内毒素大提质粒后利用状态处于对数生长的293细胞进行转染。获得转染的细胞培养至36h后将细胞培养液倒入50ml离心管中,12000g离心5min,收集上清,用0.22um滤膜过滤,利用阴离子交换层析对培养上清进行纯化。利用实施例3相同的方法对带有化学发光区的纳米抗体进行亲和力测试,经测试,2D5-HAP亲和力数值为2.67E-11。

[0063] 实施例6. 抗CEA纳米抗体在检测试剂盒中的应用

[0064] 选取生物素化纳米抗体(二价/单价)为捕获抗体,2D5-HAP为检测抗体,进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的CEA抗原,本方法使用的是磁珠化学发光法,具体过程如下:

[0065] 取生物素化纳米抗体(1ug/ml) 80ul/孔,CEA质控品(罗氏化学发光CEA诊断试剂盒质控品10ng/ml) 或者阴性血清30ul/孔,2D5-HAP(3ug/ml) 80ul/孔,三者混匀,置于96孔微孔板中,37°温育15min;洗涤,加入洗涤液,300ul/孔,混匀,置于磁力架上静止3min,吸弃上清,重复以上洗涤步骤4次;加入链霉亲和素化磁珠(购自JSR)(0.3mg/ml) 80ul/孔,混匀,37°温育15min;重复上述洗涤5次;加入AP化学发光显色液(BM Chemiluminescence ELISA Substrate) 100μL/孔,在摇床上摇动3~5s,选择酶标仪程序Luminescence,测定各孔读值。

[0066] 6.1P/N的检测:阳性质控品(10ng/ml)的检测值与阴性血清测值的比值。

[0067] 6.2最低检测限的检测:用零浓度校准品或样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,计算20次测量结果的数值,计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,即为最低检测限。

[0068] 6.3准确度(回收率)的检测:将浓度约为50ng/ml(允许偏差±10%)的癌胚抗原(CEA)液(A)加入到浓度范围在2ng/ml~5ng/ml的血清B中,所加入CEA与血清B之间的体积比例为1:9,根据公式(1)计算结果;

[0069] 
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_S} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

[0070] 式中:R---回收率;

[0071] V---加入A液体积;

[0072] V0---血清样品B的体积;

[0073] C---血清样品加入A液后的检测浓度;

[0074] C0---血清样品B的检测浓度;

[0075] CS---A液的浓度

[0076] 6.4参考中国发明专利CN106749667A,将CEA1,CEA2,CEA3进行了抗原抗体表位叠加试验,数据见表3:

[0077] 表3抗原抗体表位叠加试验

	1st 抗体*2 (叠加对照)	2nd 抗体	1st+2nd	叠加率 (AI)	
[0078]	VHH-CEA1+VHH-CEA2	0.325	0.617	0.687	62.88%
	VHH-CEA2+VHH-CEA3	0.285	0.617	0.672	65.77%
	VHH-CEA1+VHH-CEA3	0.215	0.617	0.667	75.26%

[0079] 结果分析,两株抗体叠加率AI, AI>50%说明被测2株抗体抗原位点不同, AI<50%说明被测两株抗体抗原表位相同, AI值越大, 位点重叠可能性越低。以上数据说明, VHH-CEA1+VHH-CEA3为最佳组合。

[0080] 6.5参考中国发明专利CN107880130A, VHH-CEA1作为捕获抗体, VHH-CEA3-HAP和2D5-HAP作为检测抗体进行配对检测, 结果表明, VHH-CEA1+2D5-HAP取得优异的检测效果, VHH-CEA1和2D5作为最佳组合。

[0081] 6.6本专利针对VHH-CEA1和2D5这对最佳组合进行二价纳米抗体构建并生物素化, 进行配对检测, 数据见表4。

[0082] 表4单价/二价纳米抗体配对检测结果

	捕获抗体	检测抗体	P/N 值	最低检测限 (ng/mL)	准确度 (回收率%)
[0083]	Bio-VHH1-LHC-VHH1	2D5-HAP	28	0.10	102
	Bio-VHH-CEA1	2D5-HAP	13	0.24	93

[0084] 结果表明, 二价纳米抗体Bio-VHH1-LHC-VHH1与2D5-HAP反应的P/N值, 最低检测限, 准确度均优于单价纳米抗体, 以及其它类型的纳米抗体组合。

## 序列表

<110> 深圳市国创纳米抗体技术有限公司  
 <120> 一种用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Lama pacos  
 <400> 1

```

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1           5           10           15
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
           20           25           30
Gly Arg Trp Asp Arg Leu Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
           35           40           45
Thr Ile Thr Ser Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
           50           55           60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
65           70           75           80
Gln Met Thr Lys Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
           85           90           95
Ala His Asn Gly Arg Gly Tyr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
           100          105          110
Ser Ser His His His His His His
           115          120
  
```

<210> 2  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> Lama pacos  
 <400> 2

```

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser
1           5           10           15
Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser His Pro
           20           25           30
Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
           35           40           45
Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
  
```



	180		185		190
Ala Tyr Asn Thr Ser Gly Gly Thr Ser Thr Ile Thr Ala Val Leu Glu					
	195		200		205
Arg Glu Lys Gly Pro Ala Leu Arg Asp Trp Arg Gly Thr Tyr Ser Ser					
	210		215		220
Phe Thr Phe Gly Ser Ala Ala Cys Ser Leu Arg Leu Ser Gly Gly Pro					
225		230		235	240
Gln Val Leu Gly Gly Gly Ser Glu Gln Leu					
	245		250		

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 750

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lama pacos

&lt;400&gt; 4

ctgcaggaga gcggtggcgg tctggttcaa ccgggcggta gcctgcgtct gagctgcgcg	60
gcgagcgggt tcaccttag cagctatacc ggtcgttggg accgtctggc gccgggtaaa	120
gagcgtgaac tgggtggcgac catcaccagc accggcggta gcaccaacta cgcggacagc	180
gttaaagggtc gtttcacat cagccgtgat aacgcgaaga acaccattta tctgcaaatg	240
accaagctga aaccggacga taccgcggtg tactattgcg ttgcgcacaa cggccgtggt	300
tattttggcc aggttaccca agtgaccgtt agcagcgaac cgaaaacccc gaaaccgcag	360
ccgcagcctc aaccgaacc gcagccgaat ccgaccaccg aaagcaaatg tccgcgacga	420
ttgccagtga acccatggga ccggttttat tgggtgccgc aacacgcgtt gcgttatcat	480
gtggcgccat agcaggccaa agtcgaacca gtaaactgct atttaccaca agaagcgcga	540
tagtgccgac taccactttg ctggaaattg cgacagggcg atcaaccacg atggcggcca	600
cgaccactac cagcgggtgt caagtgcgag aaatgggccc cggctctgcca gggttgctgg	660
ccatatcgac gatttccact ttggcgagcg gcgcgtcgag tctgcgtccg atggcgggcc	720
aacttgggtct ggcggtggcg agaggacgtc	750

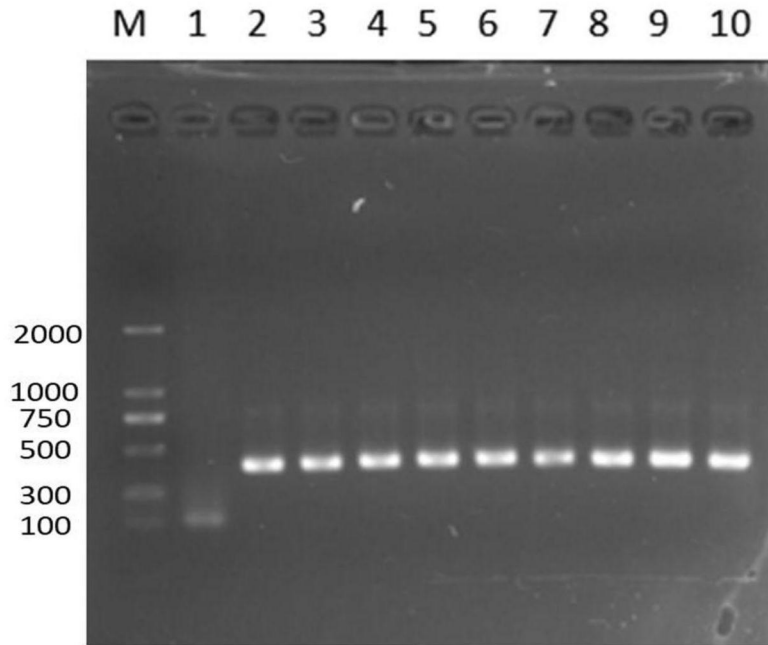


图1

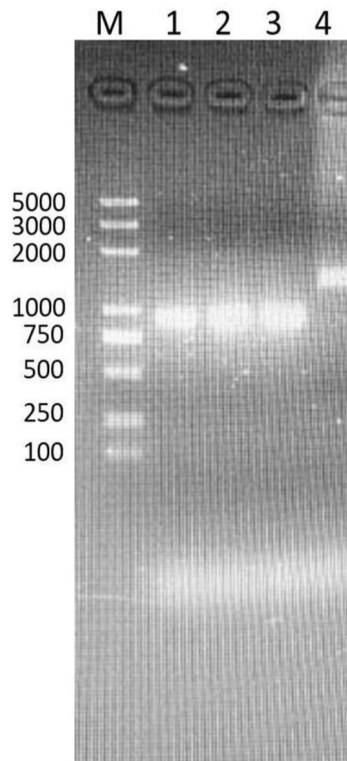


图2

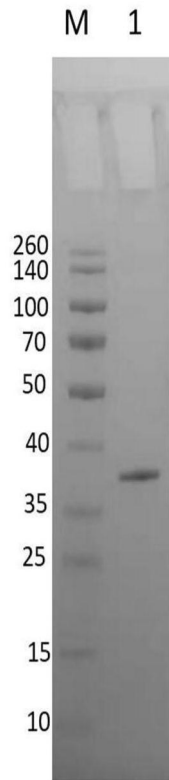
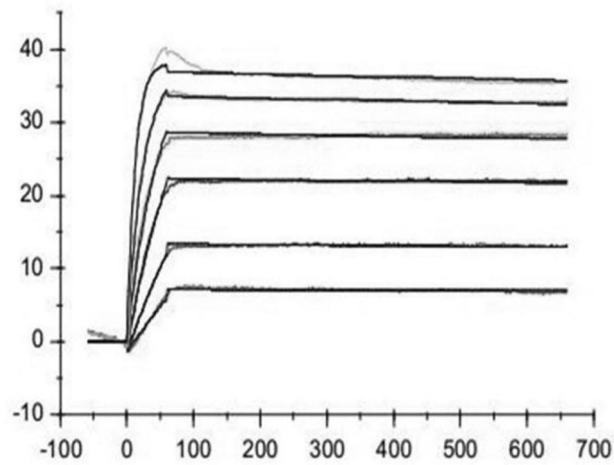


图3

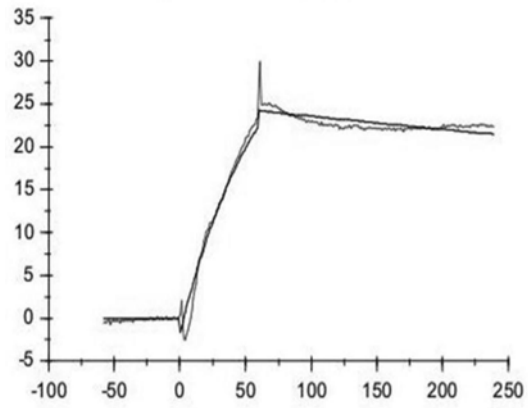
Item: VHH1-LHC-VHH1  
Ligand: Natural-CEA      Sample: VHH1-LHC-VHH1  
Curve: Fc=4-1      Temperature: 25 °C



Fit: 1:1 Binding  
ka (1/ Ms): 1.732E+5  
kd (1/ s): 5.335E-5

图4

Item: Bio-VHH1-LHC-VHH1  
Ligand: Natural-CEA      Sample: Bio-VHH1-LHC-VHH1  
Curve: Fc=4-1      Temperature: 25 °C



Fit: 1:1 Binding  
ka (1/Ms): 6.535E+4  
kd (1/s): 6.839E-4

图5

专利名称(译)	一种用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合		
公开(公告)号	<a href="#">CN111004328A</a>	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201911269089.0	申请日	2019-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市国创纳米抗体技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市国创纳米抗体技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市国创纳米抗体技术有限公司		
[标]发明人	林景涛 宋海鹏 于建立 张霞 王欢 陈晓恒		
发明人	林景涛 宋海鹏 于建立 张霞 王欢 陈晓恒		
IPC分类号	C07K16/30 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/574 G01N21/76		
CPC分类号	C07K16/3007 C07K2317/35 C07K2317/569 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/57473		
代理人(译)	李新军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一组用于双抗体夹心法检测癌胚抗原的纳米抗体组合，所述组合包括作为捕获抗体的抗癌胚抗原二价纳米抗体和作为检测抗体的抗癌胚抗原单价纳米抗体，本发明还公开了所述纳米抗体组合在制备癌胚抗原检测试剂盒中的应用。本发明提供的抗癌胚抗原二价纳米抗体与抗癌胚抗原单价纳米抗体的纳米抗体组合具有很好的匹配度，在对CEA抗原的检测中显示出优异的P/N值，最低检测限，准确度，可满足临床样本中CEA的检测。

