



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101738481 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200910193662.4

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2009.11.05

(71) 申请人 广州医学院第二附属医院

地址 510260 广东省广州市海珠区昌岗东路
250 号

申请人 中山大学

(72) 发明人 刘世明 吴文言

(74) 专利代理机构 广州广信知识产权代理有限公司 44261

代理人 张文雄

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

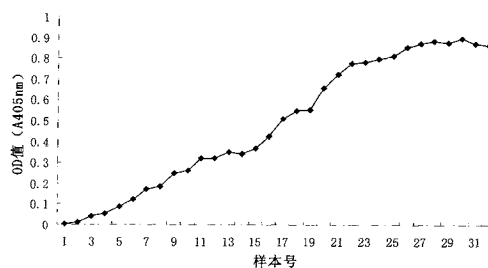
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂及制备方法和临床应用

(57) 摘要

本发明公开用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂及制备方法和临床应用,其特征在于:1) 包括抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽,其 DNA 序列如序列表 SEQ ID No:1 所示;2) 所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽与载体蛋白 KLH 连接,并将所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽固定在硝酸纤维素膜上。本发明采用噬菌体展示 New England Biolabs 公司的噬菌体随机 12 肽库比杂交瘤技术,缩短了制备单抗从取脾细胞到稳定的克隆株过程的时间;淘洗出来的特异性 12 肽,分子量小、结构简单,制成试剂盒后提高检测的特异性和敏感性;直接用于噬菌体随机多肽库进行实验,具有降低成本、节约时间、提高工作效率的效果。



1. 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂,其特征在于:
 - 1) 包括抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽,其 DNA 序列如序列表 SEQ ID No :1 所示;
 - 2) 所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽与载体蛋白 KLH 连接,并将所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽固定在硝酸纤维素膜上。
2. 如权利要求 1 所述的用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂,其特征在于:所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽是指抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽。
3. 如权利要求 1 所述的用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂,其特征在于:所述用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的主要组份还包括胶体金颗粒、抗人 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体。
4. 用于抗人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法,其特征在于包括以下步骤:
 - 1) 从噬菌体随机 12 肽库淘洗出与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆;
 - 2) 通过 DNA 测序对每个与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆进行定性,推断出最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽;
 - 3) 利用免疫化学发光法检测血浆标本的 B 型钠尿肽 BNP 浓度,记录结果;
 - 4) 利用步骤 2) 推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽代替 BNP 的两种多克隆抗体夹心 ELISA 法中的其中一种 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体,建立一种新的检测 B 型钠尿肽 BNP 的夹心 ELISA 方法,利用此方法检测步骤 3) 中所用的血浆标本的 B 型钠尿肽 BNP 浓度,记录结果;
 - 5) 将步骤 3) 和步骤 4) 的两种检测结果进行线性相关性分析,若具有正相关,则确定此推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽具有检测 B 型钠尿肽 BNP 的有效性。
5. 如权利要求 4 所述用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法,其特征在于:所述噬菌体随机 12 肽库是 New England Biolabs 公司的噬菌体随机 12 肽库。
6. 如权利要求 4 所述用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法,其特征在于:所述淘洗方法是应用噬菌体展示 12 肽库,经过 3~4 轮淘洗,将洗脱液进行蓝白斑筛选,挑选出蓝斑进行噬菌体阳性克隆鉴定,获得与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆。
7. 如权利要求 4 所述用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法,其特征在于:步骤 4) 中所述的 12 肽是利用化学合成的方法获得的与步骤 2) 推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽具有相同基因的 12 肽。
8. 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的临床应用,其特征在于:将抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽与 KLH 的连接蛋白、胶体金颗粒、抗人 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体一起置入包装盒体中,利用免疫层析法原理作为检测方法,构成临床用诊断试剂盒。

用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂及制备方法和临床应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂及制备方法和临床应用。属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] BNP 是 B 型钠尿肽 (B type natriuretic peptide) 的简称。现有技术中,测定血浆 BNP 的方法主要有放射免疫法、免疫放射测量法、电化学发光法、免疫荧光法。目前国内外常用的实验室检测方法是电化学发光法,虽然该方法结果精确,但不能快速提供检查结果。虽然目前有人使用“床旁即时检测 BNP”的方法,但价格昂贵,普通患者无法承受,不能广泛应用。为了解决现有电化学方法测定血浆 BNP 存在不能快速提供检查结果以及“床旁即时检测 BNP”法存在价格昂贵等问题,需要研制出一种用于 BNP 快速诊断试剂。

[0003] 目前,关于 BNP 快速诊断试剂的研制处于起步阶段。BNP 快速诊断试剂盒多采用 BNP 的两种多克隆抗体夹心 ELISA(酶联免疫吸附测定, Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法检测 BNP 浓度,其试剂盒的主要成分为:两种抗 BNP 的多克隆抗体、ELISA 反应板、显色酶和显色剂等。其中获得抗 BNP 的抗体或者多肽、并采用合适的方法将其应用于检测是制备 BNP 快速诊断试剂盒的关键技术。现有技术中所使用的 BNP 抗体多采用杂交瘤的方法获得,或通过自行构建噬菌体抗体库,筛选出抗 BNP 的单链可变区抗体片段(scFv)。但是这两种方法均有很多缺点。采用杂交瘤的方法获得的杂交瘤细胞不稳定、难保存,不适应于大规模工业化生产,而且制备单抗从取脾细胞到稳定的克隆株至少需要数月,耗时长。而利用自行构建的噬菌体抗体库进行筛选的方法,不仅自行构建抗体库会花费大量时间,而且自行构建的噬菌体抗体库的库容小,一般只能达到 10⁸ pfu/ml。

发明内容

[0004] 本发明的第一个目的,是为了提供一种用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂。

[0005] 本发明的第二个目的,是为了提供一种用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法。

[0006] 本发明的第三个目的,是为了提供一种用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的临床应用。

[0007] 本发明的第一个目的可以通过采取如下技术方案达到:

[0008] 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂,其特点是:

[0009] 1) 包括抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽,其 DNA 序列如序列表 SEQ ID No:1 所示;

[0010] 2) 所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽与载体蛋白 KLH 连接,并将所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽固定在硝酸纤维素膜上。

[0011] 本发明的第一个目的还可以通过采取如下技术方案达到:

[0012] 本发明的一种实施方案是:所述抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽是指抗人 B 型钠

尿肽 BNP 特异性 12 肽。

[0013] 本发明的一种实施方案是：采用戊二醛法，将抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽与载体蛋白 KLH 连接。

[0014] 本发明的一种实施方案是：所述用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的主要组份还包括胶体金颗粒、抗人 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体。

[0015] 本发明的第二个目的可以通过采取如下技术方案实现：

[0016] 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法，其特征是包括以下几个步骤：

[0017] 1) 从噬菌体随机 12 肽库淘洗出获得与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆；

[0018] 2) 通过 DNA 测序对每个与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆进行定性，推断出最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽；

[0019] 3) 利用免疫化学发光法检测血浆标本的 B 型钠尿肽 BNP 浓度，记录结果；

[0020] 4) 利用步骤 2) 推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽代替 B 型钠尿肽 BNP 的两种多克隆抗体夹心 ELISA 法中的其中一种 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体，建立一种新的检测 B 型钠尿肽 BNP 的夹心 ELISA 方法，利用此方法检测步骤 3) 中所用的血浆标本的 B 型钠尿肽 BNP 浓度，记录结果。

[0021] 5) 将步骤 3) 与步骤 4) 的两种检测结果进行线性相关性分析，若具有正相关，则确定步骤 2) 推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆 12 肽具有检测 B 型钠尿肽 BNP 的有效性。

[0022] 本发明的第二个目的还可以通过以下技术方案实现：

[0023] 本发明的一种实施方案是：所述噬菌体随机 12 肽库是 New England Biolabs 公司的噬菌体随机 12 肽库。

[0024] 本发明的一种实施方案是：所述淘洗方法是应用噬菌体展示 12 肽库，经过 3～4 轮淘洗，将洗脱液进行蓝白斑筛选，挑选出蓝斑进行噬菌体阳性克隆鉴定，获得与 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆。

[0025] 本发明的一种实施方案是：用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的制备方法的步骤 4) 所述的 12 肽可以是利用化学合成的方法获得的与步骤 2) 推断出的最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆具有相同基因的 12 肽。

[0026] 本发明的第三个目的可以通过采取如下技术方案实现：

[0027] 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂的临床应用，其特征是：将抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽与 KLH 的连接蛋白与胶体金颗粒、抗人 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体一起置入包装盒体中，利用免疫层析法原理作为检测方法，构成临床用诊断试剂盒。

[0028] 噬菌体展示是一项选择技术，它将外源多肽或蛋白与噬菌体的一种衣壳蛋白融合表达，融合蛋白将展示在病毒颗粒的表面，而编码这个融合子的 DNA 则位于该病毒子内。噬菌体展示技术使大量随机多肽与其 DNA 编码序列之间建立了直接联系，使得各种靶分子的多肽配体通过一种被称为淘选的体外选择程序得以快速鉴定。经 3-4 轮淘选后，通过 DNA 测序对每个可结合克隆进行定性。直接采用噬菌体随机多肽库，通过淘洗的方法获得抗 B 型钠尿肽 BNP 特异性多肽是一种新方法，具有耗时短，抗体工程菌比杂交瘤细胞稳定、易保

存,适应于大规模工业化生产,同时,可以利用库容量大(可达 $1.5 \sim 2.0 \times 10^{13}$ pfu/ml)的商品化噬菌体随机多肽库,省却了构建抗体库的时间,可直接进行淘洗。

[0029] 免疫胶体金标记技术是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,应用于抗原抗体反应的一种常用的标记技术,在医学检验中的应用主要是免疫层析法(immunochromatography)和快速免疫金渗滤法(Dot-immuogold filtration assay DIGFA),已成功用于检测HBsAg、HCG和抗双链DNA抗体等,具有简单、快速、准确和无污染等优点。免疫层析法原理是将特异的抗体或多肽先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,若用免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。

[0030] 本发明具有的有益效果如下:

[0031] 1、本发明解决了B型钠尿肽BNP的抗体或者多肽获得难的问题,本发明采用噬菌体展示New England Biolabs公司的噬菌体随机12肽库比杂交瘤技术简单快速,大大缩短了制备单抗从取脾细胞到稳定的克隆株过程的时间。

[0032] 2、本发明通过噬菌体随机多肽库淘洗出来的是针对人B型钠尿肽BNP的抗原决定簇的特异性12肽,不仅分子量小,结构简单,而且制成试剂盒后能够提高检测的特异性和敏感性;同时直接用商品化的噬菌体随机多肽库进行实验,降低了成本、节约了时间、提高了工作效率。克服了既往的试剂盒多采用B型钠尿肽BNP的两种多克隆抗体夹心的方法检测B型钠尿肽BNP,存在特异性和敏感性不高的缺点。

附图说明

[0033] 图1是噬菌体克隆与B型钠尿肽BNP的结合力示意图。

[0034] 图2是显示1-32号血浆标本使用免疫化学发光法检测B型钠尿肽BNP的结果图。

[0035] 图3是化学合成的12肽代替B型钠尿肽BNP的两种多克隆抗体中的任一种建立的新的夹心ELISA法检测1-32号血浆标本B型钠尿肽BNP含量的结果(OD值)。

[0036] 图4是打点印迹法鉴定12肽-KLH偶联物与B型钠尿肽BNP的结合力(1为随机对照12肽-KLH偶联物;2为KLH;3为12肽-KLH偶联物)。

具体实施方式

[0037] 具体实施例1

[0038] 本实施例制成一种用于人B型钠尿肽BNP快速检测的试剂,其特点是:

[0039] 1) 包括抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽,其DNA序列如序列表SEQ ID No:1所示;

[0040] 2) 所述抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽与载体蛋白KLH连接,并将所述抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽固定在硝酸纤维素膜上。

[0041] 本实施例中,抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽是指抗人B型钠尿肽BNP特异性12肽。所述用于人B型钠尿肽BNP快速检测的试剂的主要组份还包括胶体金颗粒、抗人B型钠尿肽BNP多克隆抗体。

[0042] 本实施例的制备方法如下:

[0043] 试剂与材料:噬菌体随机12肽库和ER2738肠杆菌菌株购于New England Biolabs

公司 ;B 型钠尿肽 BNP 抗原液,购于 sigma 公司。Tween-20 清洗液 (吐温 20)、PEG (聚乙二醇)、IPTG (异丙基硫代半乳糖苷)、Glycine-HCl (非特异性缓冲液)、Tris-HCl 缓冲液、HRP (辣根过氧化物酶)、TME 显色液和 Xgal (β -半乳糖苷酶的显色底物) 直接购买 ;LB 培养基、TBS 缓冲液和 PBS 缓冲液自行配制 ;PBST 和 TBST 分别为加了 Tween-20 的缓冲液。

[0044] 一、从噬菌体展示噬菌体随机 12 肽库,淘洗出与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆,具体步骤如下 :

[0045] 1、准备 100 μ g/ml 的靶分子溶液 ;用所述溶液 150 μ l 包被一个反应孔 ;在增湿容器中 4℃ 轻微震荡,孵育过夜 ;

[0046] 2、第二天,挑 ER2738 单克隆 (噬菌体滴度测定时铺的板) 于 20ml 细菌培养基 LB 液体中,37℃ 剧烈震荡培养 ;

[0047] 3、倒掉孔中的包被液,板倒置在干净的纸巾上用力拍甩以除去残余溶液。反应孔加满封阻液,4℃ 作用 1hr ;

[0048] 4、按照步骤 3 中所述方法去封阻液,再用 TBST (TBS+0.1% [v/v] Tween-20) 缓冲液快速洗板 6 次 ;

[0049] 5、用 1ml (微孔板则用 100 μ l) 的 TBST 缓冲液稀释 2×10^{11} 的噬菌体 (即 10 μ l 的原始文库),然后加到已包被好的板上,室温温和摇动 10-60min ;倾倒除去未结合噬菌体,倒置板在干净的纸巾上拍甩除去残余溶液 ;

[0050] 6、按步骤 4 中所述方法用 TBST 缓冲液洗板 10 次 ;

[0051] 7、用非特异性缓冲液 0.2M Glycine-HCl (pH 2.2),1mg/ml BSA 来分离已结合分子 :温和摇动 > 10min,洗脱液吸入另一干净微量离心管中,然后再用 150 μ l (微量孔则用 15 μ l) 1M Tris-HCl (pH 9.1) 中和上述洗脱液 ;

[0052] 8、按常规 M13 方法中的程序测定少量 (1 μ l) 洗脱物的滴度 ;

[0053] 9、剩余洗脱物应当被扩增 :将洗脱物加入到 20ml ER2738 培养物中 (菌体应当处于对数前期),37℃ 剧烈摇动培养 4.5hr ;

[0054] 10、将培养物转入一离心管中,然后,4℃ 10,000rpm 离心 10min ;上清液转入另一离心管中,再离心 ;将上清的上部 80% 转入一新鲜管中,加入 1/6 体积的 PEG/NaCl ;让噬菌体 4℃ 沉淀过夜 ;

[0055] 11、第二天,4℃ 10,000rpm 离心 PEG 沉淀 15min。倒掉上清液,再短暂离心,吸去残留上清液 ;沉淀物重悬于 1ml TBS 中,悬液转入微量离心管中,4℃ 离心 5min 使残余细胞沉淀 ;上清液转入另一新鲜微量离心管,用 1/6 体积的 PEG/NaCl 再沉淀 ;冰上孵育 15-60min ;4℃ 离心 10min,弃上清 ;沉淀物重悬于 200 μ l TBS,0.02% NaN₃ 中,离心 1min,沉淀任何残余的不溶物,上清液转入新鲜管中。此即为扩增后的洗脱物 ;

[0056] 12、根据上述常规 M13 方法用 LB/IPTG/Xgal 平板滴定扩增后的洗脱物,4℃ 贮存 ;

[0057] 13、再包被一个板或孔准备第二轮淘选时用,如步骤 1 ;

[0058] 14、计数板上蓝斑数确定滴度。用这个值来计算相应于 2×10^{11} pfu 的加入量。如果滴度太低,接下来的几轮淘选可用低至 10^9 pfu 的噬菌体加入量进行试验 ;

[0059] 15、进行第二轮淘选 :用第一轮淘选扩增的洗脱物中 2×10^{11} pfu 的噬菌体量重复步骤 2 ~ 11,在清洗步骤中将 Tween 的浓度增至 0.5% (v/v) ;在 LB/IPTG/Xgal 平板上测定第二轮淘选所得洗脱物扩增后的滴度 ;

[0060] 16、再包被一个板或孔准备第三轮淘选时用,如步骤 1;

[0061] 17、进行第三轮淘选:用第二轮淘选扩增的洗脱物中 2×10^{11} pfu 的噬菌体量重复步骤 2 ~ 11,在清洗步骤中将 Tween 的浓度增至 0.5% (v/v);在 LB/IPTG/Xgal 平板上测定第三轮淘选所得洗脱物扩增后的滴度;

[0062] 18、再包被一个板或孔准备第四轮淘选时用,如步骤 1;

[0063] 19、进行第四轮淘选:用第三轮淘选扩增的洗脱物中 2×10^{11} pfu 的噬菌体量重复步骤 2 ~ 11,清洗步骤中同样用 0.5% (v/v) 的 Tween 在 LB/IPTG/Xgal 平板上测定第四轮淘选所得洗脱物未扩增时的滴度。第四轮洗脱液即是经过富集的噬菌体克隆,不必再扩增,将第四轮洗脱液进行蓝白斑筛选,挑选 16 个蓝斑进行噬菌体阳性克隆鉴定,获得 10 个阳性克隆,提取其 DNA。

[0064] 其中所述噬菌体阳性克隆鉴定的步骤具体如下:

[0065] 以 B 型钠尿肽 BNP 包被 96 孔酶联板 ($100 \mu\text{g/ml}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$) 中的 17 个孔,同时包被一阳性对照孔,置于 4°C 孵育过夜后;倒弃包被液后,每孔加满封闭液 (2% 脱脂奶粉,用 PBS 溶解稀释),室温孵育 2h。倒去封闭液, PBST [TBS+0.05% (v/v) Tween-20] 洗 3 次, 16 个实验孔中每孔加入上步纯化的噬菌体 $200 \mu\text{L}$ (约含 2×10^{11} 的噬菌体,用封闭液等量稀释并先孵育 30min),另 1 孔加入 M13K07 作为阴性对照,阳性对照孔则加入阳性对照液,室温孵育 1h;PBST 洗 6 次后,每孔加入 HRP 标记的抗 M13 噬菌体抗体 (1 : 5000) $200 \mu\text{L}$,室温孵育 1h;TBST 洗 6 次,每孔加 $100 \mu\text{g}$ TMB 显色,用 2M H_2SO_4 终止反应;酶标仪在 410nm 波长下测定吸光度 (OD) 值,以 OD 值高于 0.2,且高于阴性对照 (阴性对照值低于 0.1) 2 倍以上者为阳性克隆,如图 1 所示。

[0066] 其中所述提取 10 个阳性克隆 DNA 的步骤具体如下:

[0067] 取扩增后的噬菌体上清 $500 \mu\text{L}$,加入 $200 \mu\text{L}$ PEG/NaCl,室温反应 10min,离心弃上清,沉淀物重悬于 $100 \mu\text{L}$ 碘化物缓冲液中,加入 $250 \mu\text{L}$ 乙醇,室温温育 10,沉淀 DNA,离心弃上清,用 70% 乙醇洗沉淀,短暂真空干燥,沉淀重悬于 $30 \mu\text{L}$ 灭菌双蒸水中。

[0068] 二、通过 DNA 测序对每个与 B 型钠尿肽 BNP 特异性结合的阳性噬菌体克隆进行定性,推断出最有特异性结合的阳性噬菌体克隆。

[0069] 将提取出的 10 个阳性克隆的 DNA 送广州英骏生物公司进行 DNA 测序,结果显示 10 个阳性克隆中有 5 个阳性克隆的序列相同,推断具有相同序列的阳性克隆即为与 B 型钠尿肽 BNP 最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆,其序列如序列表 SEQ ID No:1 所示。

[0070] 三、证实上述推断出的与 B 型钠尿肽 BNP 最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆具有检测 B 型钠尿肽 BNP 的有效性。

[0071] 1、免疫化学发光法是目前广泛应用于临床定量检测血浆 B 型钠尿肽 BNP 水平的方法,所以选取 1-32 号患者的血浆标本,利用免疫化学发光法检测 B 型钠尿肽 BNP 浓度,记录结果,见图 2;

[0072] 2、推断出的与 B 型钠尿肽 BNP 最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆可以通过生物体原核或真核表达,进而通过纯化获得成品。但由于此推断出的与 B 型钠尿肽 BNP 最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆序列短,只有 12 个氨基酸,生物体表达较困难,采用化学合成的方法获得与推断出的与 B 型钠尿肽 BNP 最有特异性结合能力的阳性噬菌体克隆具有相同基因的 12 肽,送与上海生物工程技术服务有限公司进行此 12 肽的合成;

[0073] 3、把化学合成的抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽包被 32 个酶联板实验孔（每孔 100 μ L），同时用 B 型钠尿肽 BNP 抗原液（100 μ g/ml，每孔 200 μ L）包被一个阳性对照孔，用 1 $\times$ PBS 包被一个阴性对照孔。置于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后；倒弃包被液后，每孔加满封闭液（2% 脱脂奶粉，用 PBS 溶解稀释），室温孵育 2h。倒去封闭液，PBST[PBS+0.05%（v/v）Tween-20] 洗 3 次，挑选免疫化学发光法结果中 B 型钠尿肽 BNP 浓度依次升高的 32 位患者的血浆标本，分别取 200 μ L 加入至 32 个实验孔中，室温孵育 1h，PBST 洗 6 次；各实验孔与阴性、阳性对照孔各加入一抗溶液 200 μ L（抗 BNP 多克隆抗体，1 : 30 稀释，用封闭液等量稀释并先孵育 30min），室温孵育 1h，PBST 洗 6 次；每孔加入二抗溶液 200 μ L（HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体，1 : 5000 稀释，用封闭液等量稀释并先孵育 30min），室温孵育 1h；PBST 洗 6 次后，每孔加 100 μ L TMB 显色，用 2M H₂SO₄ 终止反应；酶标仪在波长 405nm 处测吸光度（OD）值。化学合成的 12 肽代替现有技术 B 型钠尿肽 BNP 的两种多克隆抗体夹心 ELISA 法中的其中一种 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体，建立的此检测 B 型钠尿肽 BNP 的夹心 ELISA 方法检测 B 型钠尿肽 BNP 浓度，记录结果，见图 3。

[0074] 4、用所得 OD 值与免疫化学发光法测定获得的 B 型钠尿肽 BNP 浓度值进行线性相关性分析。由图 2、图 3 可以看出两种方法的检测结果呈正相关（ $r = 0.813$ ， $P < 0.001$ ），证明本发明淘选出的 12 肽与 B 型钠尿肽 BNP 有特异性结合能力。

[0075] 四、应用本发明淘洗出的 12 肽研制成一种用于抗人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂。

[0076] 由于 12 肽是小分子物质，必须将其与分子量大的载体蛋白连接，才能较好地将多肽固定在硝酸纤维素膜上。KLH 是常用的载体蛋白，其与目的多肽的连接不影响 12 肽的结构特异性；连接反应效率高、产物均一、易于纯化；本发明采用戊二醛法成功地将 12 肽与 KLH 连接，打点印迹（Dot blot）表明偶联物能与 B 型钠尿肽 BNP 结合，见图 4。而且，通过分光光度法，测得偶联物中 12 肽与 KLH 具有较高的结合比。

[0077] 所述戊二醛法交联化学合成 12 肽与 KLH 的主要步骤是：将 8mg KLH 溶于 2ml 的硼酸盐缓冲液中，温和震荡，加入 12 肽 10mg，边振荡边缓慢加入新鲜配制的 3mol/L 的戊二醛溶液（1ml），室温作用 2h，将反应物在 $\text{Ph} = 8.5$ 的硼酸盐缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜，交联形成 12 肽-KLH 偶联物。

[0078] 所述打点印迹法鉴定偶联物的主要步骤是：取 12 肽-KLH 偶联物 6 μ l，缓慢点在 NC 膜上，待干透后，以封闭液（0.1M NaHCO₃，5mg/ml BSA，0.02% NaN₃，pH8.6）封闭 2h，PBST 洗涤 5 次，加入 100 μ g/ml BNP，室温孵育 2h；同法洗涤后，加入抗 B 型钠尿肽 BNP 一抗（1 : 30 稀释），室温孵育 2h；同法洗涤后，加入 HRP 标记羊抗兔二抗（1 : 5000 稀释），室温孵育 1h，洗涤后显色，以不加戊二醛的反应体系产生的蛋白及随机 12 肽-KLH 偶联物为对照。

[0079] 所述分光光度法计算偶联物的结合比的主要步骤是：取 KLH 溶液、12 肽溶液、偶联物溶液，分别利用分光光度仪在波长 300nm 下测吸光度 A 值，根据朗伯-比尔定律计算 3 种溶液的 300nm 处摩尔吸光系数 ϵ 。由光的加合性原理计算结合物中 12 肽与 KLH 的结合比。

[0080] 具体实施例 2

[0081] 本发明利用免疫层析法原理作为 B 型钠尿肽 BNP 快速诊断试剂盒的检测方法，将抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽与 KLH 连接蛋白，胶体金颗粒、抗人 B 型钠尿肽 BNP 多克隆抗体一起置入包装盒体中，构成临床用诊断试剂盒。

- [0082] 序列表
- [0083] <110> 广州医学院第二附属医院、中山大学
- [0084] <120> 用于人 B 型钠尿肽 BNP 快速检测的试剂及制备方法和临床应用
- [0085] <160>1
- [0086] <210>1
- [0087] <211>36
- [0088] <212>DNA
- [0089] <213> 人工序列
- [0090] <220>
- [0091] <223> 抗人 B 型钠尿肽 BNP 特异性 12 肽, 该 12 肽与 B 型钠尿肽 BNP 有特异性
- [0092] 结合能力, 用于研制 BNP 快速诊断试剂盒。
- [0093] <400>1
- [0094] tct cat tgg tgg tgg tgg gat gcg agg ggt tat gat 36
- [0095] Ser His Trp Trp Trp Trp Asp Ala Arg Gly Tyr Asp
- [0096] 1 5 10 12

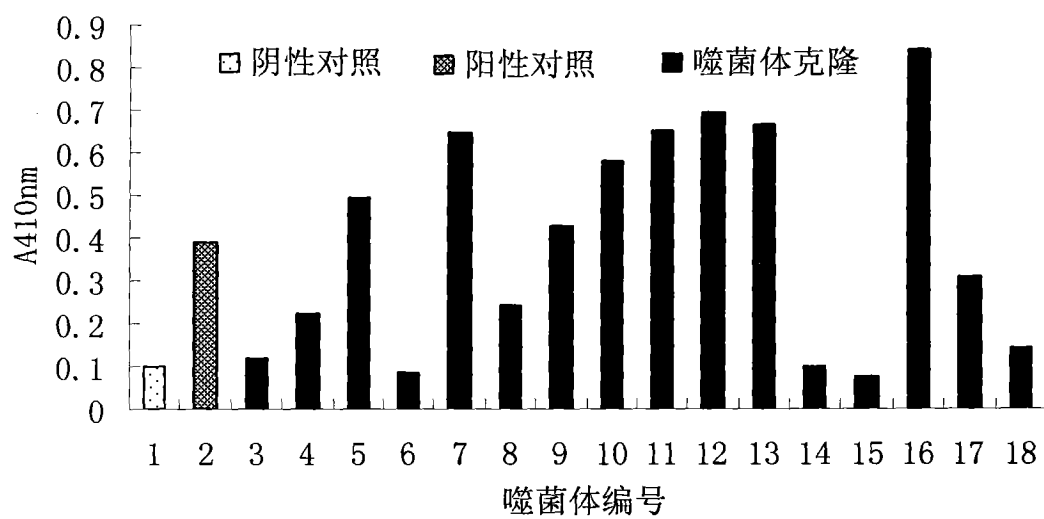


图 1

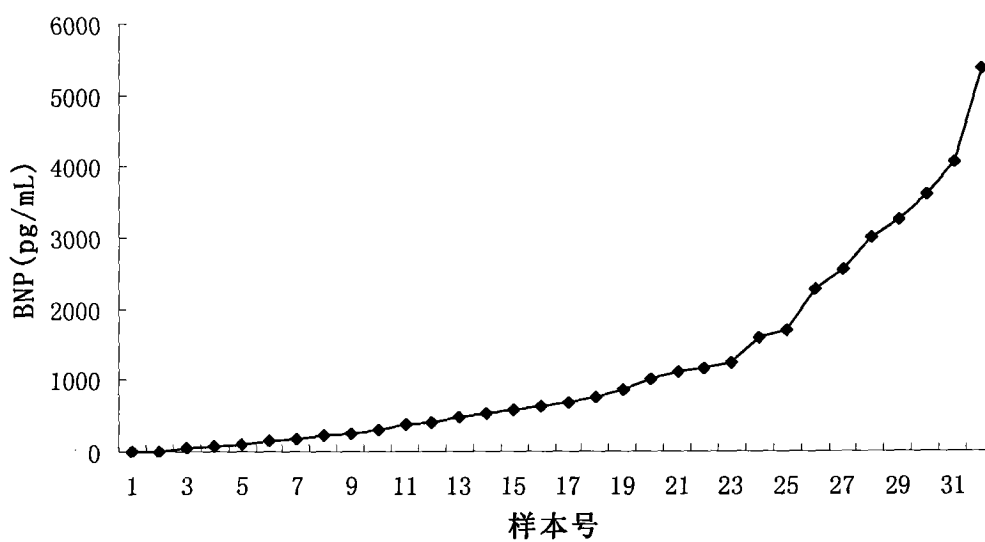


图 2

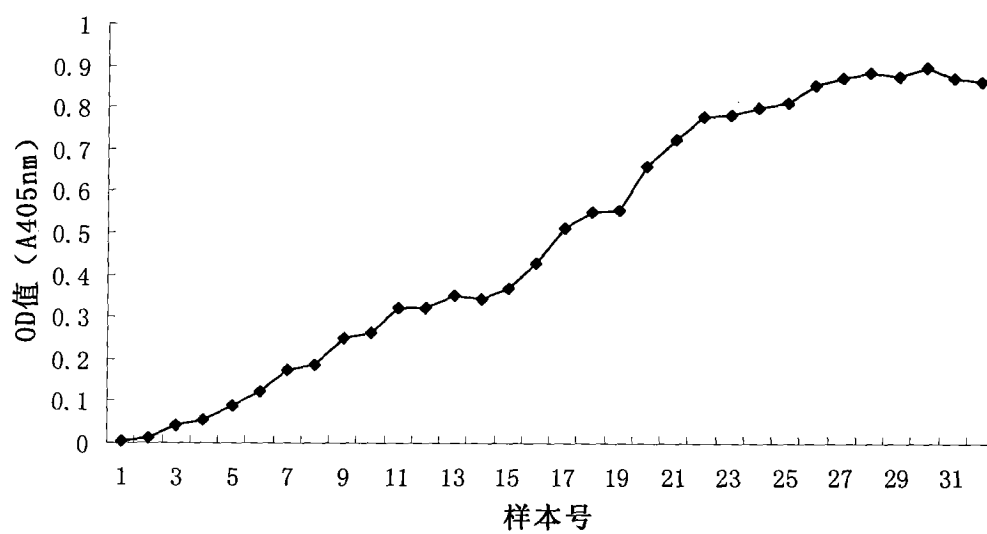


图 3

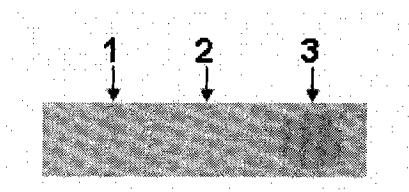


图 4

专利名称(译)	用于人B型钠尿肽BNP快速检测的试剂及制备方法和临床应用		
公开(公告)号	CN101738481A	公开(公告)日	2010-06-16
申请号	CN200910193662.4	申请日	2009-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	广州医学院第二附属医院 中山大学		
申请(专利权)人(译)	广州医学院第二附属医院 中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	广州医学院第二附属医院 中山大学		
[标]发明人	刘世明 吴文言		
发明人	刘世明 吴文言		
IPC分类号	G01N33/68 G01N1/28 G01N21/76 G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	张文雄		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开用于人B型钠尿肽BNP快速检测的试剂及制备方法和临床应用，其特征在于：1)包括抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽，其DNA序列如序列表SEQ IDN^o：1所示；2)所述抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽与载体蛋白KLH连接，并将所述抗人B型钠尿肽BNP特异性多肽固定在硝酸纤维素膜上。本发明采用噬菌体展示New England Biolabs公司的噬菌体随机12肽库比杂交瘤技术，缩短了制备单抗从取脾细胞到稳定的克隆株过程的时间；淘洗出来的特异性12肽，分子量小、结构简单，制成试剂盒后提高检测的特异性和敏感性；直接用于噬菌体随机多肽库进行实验，具有降低成本、节约时间、提高工作效率的效果。

