



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109596839 A

(43)申请公布日 2019. 04. 09

(21)申请号 201811594789.2

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 广州万孚生物技术股份有限公司

地址 510663 广东省广州市萝岗区科学城
荔枝山路8号

(72)发明人 王羽 康业 崔跃 吴培钊

何小维 王继华

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 郑彤 万志香

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表1页 附图7页

(54)发明名称

人和肽素快速定量检测方法与试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种基于MPs的全自动化学发光法检测CPP的方法,通过将普通免疫与免疫调节分子相结合,在常规普通免疫的同时辅助递送细胞因子Flt3l、mGM-CSF和CCL20,得到具有高亲和力的抗体,并通过与磁分离相结合,磁珠具有较大的表面积与面积比,可以有效富集低浓度的CPP,从而实现了人血清中CPP快速、灵敏地测定。CPP的测定时间、灵敏度和特异性得到显著改善。

1. 一种人和肽素快速定量检测的试剂盒,其特征在于,包含有:人和肽素单克隆抗体,所述抗人和肽素单克隆抗体由以下方法制备得到:

以人和肽素抗原免疫小鼠;向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒;收集经质粒递送免疫的小鼠的脾细胞或淋巴结细胞,并将所述脾细胞或淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞,培养,分泌得抗人和肽素单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述人和肽素抗原为含有氨基酸序列 SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽;和/或

所述人和肽素抗原为偶联有大分子蛋白的人和肽素抗原,所述大分子蛋白为KLH、OVA、BSA中的至少一种;和/或

所述细胞因子包括mFlt3l、mGM-CSF和mCCL20。

3. 根据权利要求1任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联,作为捕获抗体。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含有检测抗体,所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述检测抗体为:碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的人和肽素单克隆抗体中的任一种。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的试剂盒,其特征在于,包含有:捕获抗体、检测抗体、人和肽素标准品和发光底物;

所述捕获抗体为:磁微粒包被的高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体;

所述检测抗体为:酶标人和肽素单克隆抗体;所述发光底物经酶标人和肽素单克隆抗体上的酶催化后发光;

所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,使用时所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200);和/或

所述酶标人和肽素单克隆抗体为碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体,所述发光底物为AMPPD。

8. 一种人和肽素快速定量检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

将捕获抗体分别加入待测样品中,孵育;

加入检测抗体,形成夹心免疫复合物、检测;

检测梯度浓度的人和肽素标准品制备标准曲线;

根据标准曲线计算待测样品的浓度,即得;

所述捕获抗体为权利要求1所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联得到;所述检测抗体为酶标记的人和肽素抗体,与所述捕获抗体识别的人和肽素的表位不同。

9. 根据权利要求7所述的人和肽素快速定量检测的方法,其特征在于,所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200);和/或

所述孵育的时长为30~50min,pH值为8~9。

10. 根据权利要求8或9所述的人和肽素快速定量检测的方法,其特征在于,所述检测为化学发光法,包括:

将所述夹心免疫复合物磁分离,洗涤去除多余的检测抗体,加入发光底物AMPPD,混匀,

温育,测量发光值。

人和肽素快速定量检测方法与试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,特别涉及一种人和肽素快速定量检测方法与试剂盒。

背景技术

[0002] 为了应对各种疾病可以更加快速的诊断、更准确的预后评估和治疗决策的需求,催生了对新生物标志物的研究。精氨酸加压素 (AVP) 是下丘脑-垂体-肾上腺轴的主要激素之一。AVP系统可敏感感受身体暴露于内源性压力的刺激,其水平可灵敏反应机体在疾病状态下的受迫程度。然而,因为AVP不稳定,并且主要附着于血小板表面,分泌后又被机体迅速清除,因此,关于AVP检测方法学的可靠性存在质疑。和肽素 (copeptin, CPP) 是一种与精氨酸加压素 (AVP) 同源的包含39个氨基酸残基的多肽,是精氨酸加压素原 (pro-VAP) 的C端部分肽段。AVP系统激活后,刺激CPP以等摩尔量的AVP从脑后垂体分泌到循环中。因此, CPP直接反映AVP浓度,可用作AVP分泌的替代生物标志物。一项研究表明, CPP比循环皮质醇更能灵敏地反映机体压力水平。这种新的生物标志物将能够帮助在临床实践中做出早期决策,表现出与各种急性疾病状态的相关程度,如脑血管事件、心肌梗死、肺炎、肾脏疾病和高血压、渗透性改变、肥胖、甚至躁郁症、重度抑郁症、以及儿童期虐待等。在胸痛患者的分类中,除了肌钙蛋白之外,辅助CPP的测定,很好地改善了诊断性能。尤其是在胸痛发作后的早期,肌钙蛋白和CPP的联合测定提供了显着的阴性预测值,几乎与胸痛发作时间无关,因此有助于早期安全地排除心肌梗塞。在急性心肌梗死 (AMI) 的情况下, CPP迅速从垂体释放,并在几小时内开始恢复到正常水平,而肌钙蛋白T浓度仍然正常。在基于5,000个人的CPP诊断截止值的研究中,99%百分位数和18.9pmol/L作为通用定义的生物标志物的cut-off值,并且第97.5百分位数为13pmol/L,第95百分位数仅为9.8pmol/L。显然,监测CPP的及时性和敏感性非常重要。只有在确保检测灵敏度的同时尽可能缩短检测时间,才能使CPP的临床价值最大化。然而,到目前为止,仅有四种技术被用于确定CPP浓度,微管化学发光,放射免疫分析 (RIA), 酶联免疫分析 (ELISA) 和电化学分析。虽然它们的灵敏度可以满足要求,但是检测时间太长,因此它仅用于科学研究,不用于临床。截至目前为止, CPP的即时检验 (POCT) 仍尚未报道,因此它在很大程度上限制了CPP的临床价值。

发明内容

[0003] 基于此,本发明的目的在于提供一种可以用于临床分析的快速检测的人和肽素快速定量检测的试剂盒,且试剂盒的检测灵敏度和准确度高。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0005] 一种人和肽素快速定量检测的试剂盒,包含有:人和肽素单克隆抗体,所述抗人和肽素单克隆抗体由以下方法制备得到:

[0006] 以人和肽素抗原免疫小鼠;向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒;收集经质粒递送的小鼠的脾细胞或淋巴结细胞,并将所述脾细胞或淋巴结细胞与小鼠瘤细胞融合得到杂交瘤细胞,培养,分泌得抗人和肽素单克隆抗体。

[0007] 在其中一些实施例中,所述人和肽素抗原为含有氨基酸序列SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽;和/或

[0008] 所述人和肽素抗原为偶联有大分子蛋白的人和肽素抗原,优选地,所述大分子蛋白为KLH、OVA、BSA中的至少一种;和/或

[0009] 所述细胞因子包括mFlt3l、mGM-CSF和mCCL20。

[0010] 在其中一些实施例中,所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联,作为捕获抗体。

[0011] 在其中一些实施例中,所述试剂盒还包含有检测抗体,所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。

[0012] 在其中一些实施例中,碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的人和肽素单克隆抗体中的任一种。

[0013] 在其中一些实施例中,所述试剂盒中包含有:捕获抗体、检测抗体、人和肽素标准品和发光底物;

[0014] 所述捕获抗体为:磁微粒包被的高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体;

[0015] 所述检测抗体为:酶标人和肽素单克隆抗体;所述发光底物经酶标人和肽素单克隆抗体上的酶催化后发光;

[0016] 所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。

[0017] 在其中一些实施例中,所述试剂盒使用时所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200)。优选地,该试剂盒中所述酶标人和肽素单克隆抗体为碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体,所述发光底物为AMPPD。

[0018] 本发明还提供了一种人和肽素快速定量检测的方法,具体技术方案如下:

[0019] 一种人和肽素快速定量检测的方法,包括以下步骤:

[0020] 将捕获抗体分别加入待测样品中,孵育;

[0021] 加入检测抗体,形成夹心免疫复合物、检测;

[0022] 检测梯度浓度的人和肽素标准品制备标准曲线;

[0023] 根据标准曲线计算待测样品的浓度,即得;

[0024] 所述捕获抗体为权利要求1所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联得到;所述检测抗体为酶标记的人和肽素抗体,与所述捕获抗体识别的人和肽素的表位不同。

[0025] 在其中一些实施例中,所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200);优选地,所述孵育的时长为30~50min,pH值为8~9。

[0026] 在其中一些实施例中,所述检测为化学发光法,包括:将所述夹心免疫复合物磁分离,洗涤去除多余的检测抗体,加入发光底物AMPPD,混匀,温育,测量发光值。

[0027] 基于上述技术方案,本发明具有以下有益效果:

[0028] 本发的发明人无意中发现,相对于普通免疫,将普通免疫与DNA免疫相结合对于免疫反应具有显著的调节作用,同时本发明在常规普通免疫的基础上,结合辅助递送表达细胞因子的质粒,从而增加免疫动物的免疫反应,提高机体内抗原分子的有效递呈,促进抗体有效成熟,进而得到具有高亲和力的抗体,所得到的抗体亲和力较常规方法制备得到的抗体高10~100倍;将上述抗体制备得到人和肽素快速定量检测的试剂盒,应用到和肽素免

疫检测中,实现了在保证检测灵敏度的基础上大大缩短了检测时间,从而可有效实现和肽素的POCT应用,增加和肽素的临床应用价值,为重症监护和预后治疗提供更有效的参考指标。

附图说明

- [0029] 图1为高亲和力抗人和肽素单克隆抗体的制备技术路线;
- [0030] 图2为8株稳定的杂交瘤阳性细胞对应制备得到的单克隆抗体凝胶电泳图;
- [0031] 图3为实施例1制备得到的高亲和力抗体的效价测定结果图;
- [0032] 图4~7为实施例1制备得到的高亲和力抗体的亚型鉴定结果;
- [0033] 图8为实施例1制备得到的高亲和力抗体与普通抗体亲和力测定的结果;
- [0034] 图9为高亲和力抗体与普通抗体用于细胞免疫组化试验的结果;
- [0035] 图10为AP-mAbs和mAb-MPs使用浓度优化试验结果;
- [0036] 图11为基质pH和孵育时间的优化试验结果;
- [0037] 图12为利用高亲和力抗体基于MPs的全自动化学发光法检测CPP的化学发光标准曲线图;
- [0038] 图13为应用稀释回收率评估方法准确性测试结果;
- [0039] 图14为本发明的检测方法与市售的ELISA试剂盒检测进行比较的结果。

具体实施方式

[0040] 为了便于理解本发明,下面将参照实施例对本发明进行更全面的描述,以下给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。应理解,下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用试剂,均为市售产品。

[0041] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0042] 本发明提供了一种人和肽素快速定量检测的试剂盒,其特征在于,包含有:人和肽素单克隆抗体,所述抗人和肽素单克隆抗体由以下方法制备得到:

[0043] 以人和肽素抗原免疫小鼠;向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒;收集经质粒递送的小鼠的脾细胞或淋巴结细胞,并将所述脾细胞或淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞,培养,分泌得抗人和肽素单克隆抗体。

[0044] 可选地,所述人和肽素抗原为含有氨基酸序列SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的多肽。优选地,人和肽素抗原为偶联有大分子蛋白的人和肽素抗原,所述大分子蛋白优选为KLH、OVA、BSA中的至少一种。

[0045] 在其中一些实施方式中,所述细胞因子包括mF1t3l、mGM-CSF和mCCL20。优选地,表达细胞因子的质粒为pCAGGS。

[0046] 优选地,所述向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒为:构建可在真核哺乳细

胞表达细胞因子的质粒,通过小鼠尾静脉注射表达细胞因子的质粒。具体地,设计并构建得到可在真核哺乳细胞表达mFlt3l、mGM-CSF和mCCL20的质粒,包括pCAGGS-mFlt3l、pCAGGS-mGM-CSF和pCAGGS-mCCL20,三种质粒在通过尾静脉注射到小鼠体内后,能够表达细胞因子mFlt3l、mGM-CSF和mCCL20,起到免疫调节作用。优选地,向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒的为:pCAGGS-mFlt3l、pCAGGS-mGM-CSF和pCAGGS-mCCL20每只小鼠各9~11 μ g,更优选地,pCAGGS-mFlt3l、pCAGGS-mGM-CSF和pCAGGS-mCCL20的质量比为(0.5~1.5):(0.5~1.5):1。在其他一些实施方式中,向免疫以后的小鼠递送表达细胞因子的质粒,还可以通过基因枪、电穿孔、皮下注射、皮内注射、腹腔注射等方式实现,且最佳递送时间、剂量与递送方式相关。

[0047] 具体地,免疫小鼠为多次免疫,每次免疫后的第6~8天进行一次细胞因子递送,每次免疫间隔时间为13~15天。其中一些实施方式中,免疫时,将抗原与福氏完全佐剂等体积混合,充分乳化后,初次免疫按照每只90~110 μ g的量进行小鼠背部皮下多位点注射,免疫后第6~8天进行可在真核哺乳细胞表达mFlt3l、mGM-CSF和mCCL20的质粒的尾静脉注射(pCAGGS-mCCL20、pCAGGS-mFlt3l、pCAGGS-mGM-CSF:各9~11 μ g/只);再一周后进行第二次免疫,抗原用量为45~55 μ g,用不完全佐剂替代完全佐剂。此后,每次皮下免疫后一周进行一次细胞因子递送。优选地,免疫及细胞因子递送的过程一共进行三次。可选地,第二次免疫、第三次免疫后可对小鼠血清进行抗体效价测定。优选地,在去小鼠肝脏或淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤细胞前3天时,可以进行腹腔加强免疫。

[0048] 在其他一些实施方式中,向免疫后的小鼠递送表达细胞因子的质粒,还可以采用直接尾静脉注射重组的鼠酪氨酸激酶受体3配体(Mouse fms-like tyrosine kinase 3ligand,Flt3l)、鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,mGM-CSF)和鼠CC亚型趋化因子20(Mouse CC subtype chemokine ligand 20,mCCL20)。

[0049] 在上述免疫策略对小鼠进行免疫的基础上,取免疫小鼠脾脏和/或淋巴结,与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合,得杂交瘤细胞。具体地,融合后的细胞在含有HAT的选择培养基中培养,7~10d后检测细胞培养物上清抗体滴度,筛选阳性杂交瘤细胞。进一步地,采用有限稀释法经3~4次亚克隆,直至单个细胞形成的克隆培养物上清液抗体阳性,测定上清效价,获得稳定分泌抗体的单克隆细胞株。该稳定分泌抗体的单克隆细胞株具有能够稳定分泌抗人和肽素单克隆抗体,且该抗体具有较高的亲和力,用于检测人和肽素时具有很好的抗原富集能力,可有效提高检测灵敏度。

[0050] 进一步地,将上述稳定分泌抗体的单克隆细胞株杂交瘤细胞扩大培养,体内诱生法制备腹水。优选地,将制备得到的腹水离心、取上清、纯化,即得纯化的抗人和肽素的单克隆抗体。具体地,所述体内诱生法制备腹水为:以每只 4.5×10^5 个~ 5.5×10^5 个细胞腹腔注射小鼠,7~10d后收集腹水;所述离心为:9000r/min~11000r/min离心8~12min。进一步地,纯化单克隆抗体为利用0.01mol/L的PBS(pH 7.4)连续双倍稀释小鼠腹水上清,用葡萄球菌蛋白A亲和层析法(按试剂说明书操作)纯化单克隆抗体。得到纯化的单克隆抗体后,还可选用紫外-可见分光光度仪法测定纯化后蛋白质浓度,便于后续的储存及应用。

[0051] 优选的,在人和肽素快速定量检测的试剂盒中,所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联,作为捕获抗体。优选地,高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体通过N末

端氨基与磁微粒 (MPs) 共价偶联。

[0052] 具体地,高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联步骤包括:首先,用结合缓冲液洗涤MPs,在洗涤过程中,将MPs置于磁力浓缩器上并除去上清液;然后,将MPs重悬于结合缓冲液中,振荡孵育过夜,加入将高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体溶液;孵育后,置于磁力浓缩器中分离去除上清;封闭MPs上的残留结合位点,洗涤,即得高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体包被的免疫磁珠 (mAb-MPs)。优选地,所述封闭为:用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭,更优选地,BSA浓度为2%~3%,孵育2~3h。磁性颗粒 (MPs) 由于其固定抗体的比表面积更大,具有捕获效率提高、培养时间缩短、易分离等特点,是用于高灵敏度检测各种生物标记物的合适工具,有利于进一步实现人和肽素的快速检测。而且,MPs的有效富集在极低浓度下增加了人和肽素的捕获量,为其高灵敏度、准确性和特异性提供了保障。

[0053] 进一步地,所述试剂盒还包含有检测抗体,所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。优选地,所述检测抗体为:碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的人和肽素单克隆抗体的任一种。更优选地,所述检测抗体碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体。

[0054] 优选地,本发明所述试剂盒包含有:捕获抗体、检测抗体、人和肽素标准品和发光底物;所述捕获抗体为:磁微粒包被的高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体;所述检测抗体为:酶标人和肽素单克隆抗体;所述发光底物经酶标人和肽素单克隆抗体上的酶催化后发光;所述检测抗体与所述捕获抗体识别人和肽素的不同表位。使用该试剂盒时,采用化学发光法检测人和肽素,并通过标准曲线法计算得人和肽素浓度。优选地,使用时所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200)。优选地,所述酶标人和肽素单克隆抗体为碱性磷酸酶标记的人和肽素单克隆抗体,所述发光底物为AMPPD。

[0055] 本发明在上述试剂盒的基础上,提供了一种人和肽素快速定量检测的方法,包括以下步骤:将捕获抗体分别加入待测样品中,孵育;加入检测抗体,形成夹心免疫复合物、检测;检测梯度浓度的人和肽素标准品制备标准曲线;根据标准曲线计算待测样品的浓度,即得。其中,所述捕获抗体为权利要求1所述高亲和力的抗人和肽素单克隆抗体与磁微粒偶联得到;所述检测抗体为酶标记的人和肽素抗体,与所述捕获抗体识别的人和肽素的表位不同。

[0056] 优选地,所述捕获抗体的稀释比例为1:(50~100),所述检测抗体的稀释比例为1:(50~200)。优选地,所述孵育的时长为30~50min,pH值为8~9。

[0057] 进一步优选地,制备标准曲线时具体参数包括:选择1:100稀释比例的检测抗体和1:50的稀释比例的捕获抗体,孵育时间为30~40min的条件,测量一系列浓度的标准CPP溶液(S0~S9,0~1250pmol/L),构建CPP标准品的校准曲线。其中,所述标准曲线的检测范围为1.2~1250pmol/L,检测限 (LOD) 为6.25pmol/L,相关系数为0.9993。

[0058] 在其中一些实施方式中,所述检测为化学发光法,包括:将所述夹心免疫复合物磁分离,洗涤去除多余的检测抗体,加入发光底物AMPPD,混匀,温育,测量相对光单位值。化学发光免疫分析进一步保证了检测方法的高灵敏度、宽检测范围、方法学可靠性和相对稳定性,便于广泛应用于常规临床分析。

[0059] 本发明应用磁珠作为固相载体,包被可识别CPP羧基端位点的高亲和力抗体,碱性磷酸酶标记识别CPP另一位点的单克隆抗体。应用夹心反应模式在全自动化学发光仪上进

行检测血清和肽素浓度。优化后建立的全自动化学发光方法在人血清样品测试中表现出良好的特异性,稳定性和再现性,并且大大缩短了检测时间(30min)。与普通商业ELISA试剂盒相比,该CLIA的结果没有显示显著差异,意味着本发明所构建的方法具有很好的实用价值。

[0060] 实施例1高亲和力抗人和肽素单克隆抗体的制备方法

[0061] 1.1多肽合成

[0062] 合成和肽素抗原多肽(cppF,N-cpp,C-cpp)并偶联KLH制备完全抗原,得KLH-cppF, KLH-N-cpp, KLH-C-cpp。其中的氨基酸序列为:

[0063] cppF:ATQLDGPAGALLLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY (SEQ ID NO:1),

[0064] N-cpp:CATQLDGPAGALLLRLV (SEQ ID NO:2),

[0065] C-cpp:CLAGAPEPFEPAPDAY (SEQ ID NO:3)

[0066] 即偶联KLH得到的完全抗原为:

[0067] KLH-cppF (KLH-C-ATQLDGPAGALLLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY);

[0068] KLH-N-cpp (KLH-C-ATQLDGPAGALLLRLV);

[0069] KLH-C-cpp (KLH-C-LAGAPEPFEPAPDAY);

[0070] 多肽合成及耦联采用常规方法,委托吉尔生化上海有限公司完成。高效液相色谱(HPLC)法测定纯度,均>95%。

[0071] 1.2质粒构建

[0072] 使用pCAGGS载体,分别构建可在真核哺乳细胞表达人和肽素及免疫调节分子的质粒。免疫调节分子分别为:鼠酪氨酸激酶受体3配体(mouse Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, mFlt3l)、鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, mGM-CSF)、鼠CC亚型趋化因子20(mouse CC subtype chemokine ligand 20, mCCL20)。可在真核哺乳细胞表达Flt3l、mGM-CSF和CCL20的质粒分别为:①pCAGGS-mFlt3L;②pCAGGS-mGM-CSF;③pCAGGS-CCL20。质粒委托普健生物(武汉)生物科技有限公司制备。

[0073] 1.3实验动物及细胞系

[0074] 8~12周龄雌性BALB/c小鼠购自南京医科大学实验动物中心。SP2/0细胞系为广州万孚生物技术股份公司冻存,人宫颈癌细胞系购自中国典型培养物保藏中心。

[0075] 1.4试剂

[0076] 福氏完全佐、福氏不完全佐剂、选择系统HAT(H-次黄嘌呤、A-氨基嘌呤、T-胸腺嘧啶)、人源和肽素、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG、四甲基联苯胺(TMB)和IgG亚类鉴定Isotype specific试剂盒(Sigma公司);葡萄球菌蛋白A(Amersham公司);免疫组化用SABC-AP免疫组化试剂盒(南京建成生物工程研究所);阳性对照人和肽素单克隆抗体4081/4082/4084/4086(Medix公司)。

[0077] 1.5实验方法

[0078] 1.5.1免疫策略

[0079] 本实施例中将抗原KLH-cppF与福氏完全佐剂等体积混合(在其他实施例中,抗原还可以选用KLH-C-cpp或其它包含KLH-C-cpp序列的人和肽素C末端的序列),充分乳化后,按照每只100μg的量进行小鼠背部皮下多位点注射,为初次免疫;一周后进行细胞因子递送:通过尾静脉注射表达细胞因子的质粒(pCAGGS-mCCL20、pCAGGS-mFlt3L、pCAGGS-mGM-

CSF:各10 μ g/只);再一周后进行第二次免疫,抗原用量为50 μ g,用不完全佐剂替代完全佐剂。此后,每次皮下免疫后一周进行一次细胞因子递送。一共进行3次。二免、三免后进行效价测定。融合前3天进行腹腔加强免疫。对照组不进行细胞因子递送,其他条件均一致。

[0080] 1.5.2细胞融合、筛选和克隆细胞株

[0081] 无菌取免疫小鼠脾脏、淋巴结,使用细胞融合仪与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合进行融合。融合后的细胞在含有HAT的选择培养基中培养,7~10d后用间接ELISA法检测细胞培养物上清抗体滴度,筛选阳性杂交瘤细胞。采用有限稀释法经3~4次亚克隆,直至单个细胞形成的克隆培养物上清液抗体阳性,用间接ELISA法测定上清效价,获得稳定分泌抗体的单克隆细胞株。扩大培养,分装后置液氮冻存。

[0082] 1.5.3融合阳性率及稳定株数计算

[0083] 阳性率=阳性孔数/选择培养后杂交瘤孔数 $\times 100\%$

[0084] 其中,稳定株数为一次融合中最终亚克隆培养得到的细胞株数。

[0085] 1.5.4抗人和肽素单克隆抗体制备

[0086] 将获得的杂交瘤细胞株扩大培养,体内诱生法制备腹水,即以每只 5×10^5 个细胞腹腔注射小鼠,7~10d后收集腹水,12000r/min离心10min,留上清。利用0.01mol/L的PBS (pH 7.4)连续双倍稀释小鼠腹水上清,用葡萄球菌蛋白A亲和层析法(按试剂说明书操作)纯化单克隆抗体,Nanodrop2000紫外-可见分光光度仪法测定纯化后蛋白质浓度,分装,-70 $^{\circ}$ C保存。上述制备方法及后续表征的技术方案如图1所示。

[0087] 实施例2免疫效果及抗体效价测定

[0088] 细胞因子组:实施例1所述的免疫策略:即在每次皮下免疫后一周进行一次细胞因子尾静脉注射。

[0089] 对照组1:与实施例1相比,每次免疫后均不进行细胞因子尾静脉注射,其余步骤方法与实施例1相同。

[0090] 对照组2:与实施例1相比,皮下对位点注射的初次免疫后,一周后通过尾静脉注射表达细胞因子的质粒:pCAGGS-mF1t3L和pCAGGS-mGM-CSF,即与实验组相比,不注射pCAGGS-mCCL20。

[0091] 上述两组的免疫效果对比结果如表1所示。

[0092] 表1免疫效果对比

[0093]

免疫方式	小鼠编号	二免效价	三免效价	杂交瘤阳性率	稳定株数
对照组 1	1	$<10^{-3}$	1: 10^{-4}	-	-
	2	1: 10^{-4}	1: 10^{-5}	9/146 (0.062)	0
	3	$<10^{-3}$	$<10^{-3}$	-	-

[0094]

	4	1: 10 ⁻⁴	1: 10 ⁻⁶	12/136 (0.089)	1
	5	<10 ⁻³	<10 ⁻³	-	-
对照组 2	1	<10 ⁻³	1: 10 ⁻⁵	-	
	2	1: 10 ⁻⁴	1: 10 ⁻⁵	-	
	3	<10 ⁻³	<10 ⁻³	-	
	4	1: 10 ⁻⁴	1: 10 ⁻⁶	11/121 (0.09)	0
	5	1: 10 ⁻⁴	<10 ⁻³	-	
细胞因子组	1	1: 10 ⁻⁴	1: 10 ⁻⁶	-	-
	2	1: 10 ⁻⁵	1: 10 ⁻⁶	104/337 (0.309)	8
	3	<10 ⁻³	1: 10 ⁻⁴	-	-
	4	<10 ⁻³	1: 10 ⁻⁵	-	-
	5	<10 ⁻³	<10 ⁻³	-	-

[0095] 由表1可知,细胞因子组即实施例1所述的方法进行免疫,免疫效果明显较好。其中,细胞因子组中,制备得到了8株稳定的杂交瘤阳性细胞,将其分别扩大培养后,体内诱生法制备腹水,即以每只 5×10^5 个细胞腹腔注射小鼠,7~10d后收集腹水,12000r/min离心10min,留上清。利用葡萄球菌蛋白A亲和层析法(按试剂说明书操作)纯化单克隆抗体,Nanodrop2000紫外-可见分光光度仪法测定纯化后蛋白质浓度。凝胶电泳法测定抗体纯化纯度。结果如图2所示。其中,Lane1为Marker,Lane2~Lane9(9#~16#)分别为细胞因子组所得8株稳定的杂交瘤阳性细胞对应制备得到的单克隆抗体。可见,实施例1所述的方法制备得到的抗体的纯度均在90%以上。而对照组1阳性杂交率很低,仅得到1株稳定的细胞株,而对照组2没有筛选到稳定表达的细胞株。

[0096] 纯化后的抗体10倍梯度稀释后(1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000)加入包被人和肽素的ELISA反应板微孔中,37℃水浴30min后,加入二抗(1:20000稀释),37℃水浴30min后,TMB显色液显色,加入50μL 2mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪(Thermo fisher公司)测定450nm处吸光度值。结果如图3所示。其中,OD₄₅₀≥0.3视为阳性。可见,9#~16#抗体按1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000稀释后,OD₄₅₀均大于0.3,2#抗体(对照组1所得)、9#~16#(细胞因子组所得)抗体的效价均高达10⁻⁶,与阳性对照人和肽素单克隆抗体Medix4084和Medix4086的效价相当。

[0097] 实施例3单克隆抗体亚类鉴定

[0098] 将纯化后的抗体10倍梯度稀释后(1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000)加入包被人和肽素的ELISA反应板微孔中,37℃水浴30min后,分别加入IgG亚类鉴定Isotype specific试剂盒(Sigma公司)中的亚类鉴定二抗(包括IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM),

以1:1000稀释后,37℃水浴30min后,TMB显色液显色,加入50μL 2mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪(Thermo fisher公司)测定450nm处吸光度值,并根据结果判断抗体亚类。结果如图4~7所示,图4为9#抗体的亚型鉴定结果、图5为13#抗体的亚型鉴定结果、图6为14#抗体的亚型鉴定结果、图7为15#抗体的亚型鉴定结果。综合图4~7,可判断本发明制备得到的抗人和肽素单克隆抗体的亚型为IgG1型。

[0099] 实施例4抗体亲和力测定

[0100] 使用生物膜干涉技术进行测定。亲和素传感器固化抗原分子,抗体梯度稀释,通过结合和解离速率表征抗体亲和力大小。结果如图8所示。其中图8A为阳性对照单克隆抗体MEDIX 4084的亲和力测定结果,得到亲和力1.693nM,图8B为本发明实施例1制备得到的高亲和力抗人和肽素抗体9#的亲和力测定结果,其亲和力为0.14nM,图8C为对照组1中的普通抗体(2#)(免疫方法中不进行细胞因子递送,其余步骤方法与实施例1相同)的亲和力测定结果,其亲和力为19.3nM。可见,本发明实施例1制备得到的抗人和肽素抗体亲和力较市面上常用的对照抗体MEDIX 4084亲和力提高了10倍以上,相对于未进行细胞因子递送的免疫小鼠制备得到的普通抗体亲和力有更加明显的提高。

[0101] 实施例5细胞免疫组化试验

[0102] 采用人宫颈癌细胞(HeLa),及高亲和力抗体(实施例1制备得到)、普通抗体(免疫方法中不进行细胞因子递送,其余步骤方法与实施例1相同)进行免疫组化试验,结果如图9所示。其中,图9A为高亲和抗体(9#)的结果、9B为阴性对照、9C为对照组1制备得到的普通抗体(2#)免疫组化结果、9D为对照抗体(MEDIX 4084)的免疫组化结果。可见,本发明制备得到的抗体可与天然和肽素结合。高亲和抗体由于其突出的亲和力,背景显色较普通抗体明显降低。

[0103] 实施例6基于MPs的全自动化学发光法检测CPP

[0104] 1、识别CPP不同位点的抗体

[0105] 采用和肽素抗原多肽(cppF,N-cpp,C-cpp)并偶联KLH制备得到KLH-cppF,KLH-N-cpp,KLH-C-cpp作为完全抗原,免疫小鼠,可制备得到识别CPP不同位点的抗体,包括:识别N-cpp位点的抗体和识别C-cpp位点的抗体,其中N-cpp位点序列CATQLDGPAGALLRLV(SEQ ID NO:2),代表pre-proAVP的位置132-147加上N-末端半胱氨酸残基,C-cpp位点序列CLAGAPEPFEPAPDAY(SEQ ID NO:3),代表pre-proAVP的位置149-164加上N-末端半胱氨酸残基。

[0106] cppF序列ATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY(SEQ ID NO:1)则代表pre-proAVP的132-164位。

[0107] 2、CPP包被免疫磁珠的制备

[0108] 将识别C-cpp位点的高亲和力CPP单克隆抗体通过N末端氨基与磁微粒(MPs)共价偶联,作为捕获抗体。具体步骤如下:

[0109] 首先,将20mg/mL的MPs置于2.0mL Ep管中。用结合缓冲液洗涤MPs五次。在洗涤过程中,将管置于磁力浓缩器上并除去上清液。然后,将MPs重悬于2mL结合缓冲液中。在37℃下振荡培养过夜,将抗体溶液加入到上述悬浮液中以CPP抗体和MPs。孵育后,将Ep管置于磁力浓缩器中以将它们与上清液分离。用3%牛血清白蛋白(BSA)封闭MPs上的残留结合位点,在37℃温育并轻微摇动2小时。洗涤5次后,将包被的免疫磁珠(mAb-MPs)分散在2mL缓冲液

中并在4℃下保存,备用。

[0110] 3、戊二醛偶联法AP(碱性磷酸酶)标记CPP抗体的制备

[0111] 碱性磷酸酶(AP)标记识别N-cpp位点的抗体,制备得到酶标CPP抗体(AP-mAbs),作为检测抗体。具体步骤如下:

[0112] 首先,将AP和抗CPP抗体悬浮在超纯水中并分别稀释至4和8mg/mL。将250μL等份的4mg/mL AP溶液转移至1.5mL Ep管中并与250μL 8mg/mL抗CPP抗体溶液混合。其次,向溶液中加入0.5mL含1%戊二醛的0.1mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4)。将所得混合物在37℃下在黑暗中轻微振荡温育4小时。第三步,向混合物中加入0.1mL 1mol/L单乙醇胺溶液,随后在室温下振荡温育2小时。将混合物在4℃下用PBS溶液透析过夜。透析后,将酶标CPP抗体转移至Ep管中,并与等体积的甘油和1%BSA混合。最后,将酶标CPP抗体(AP-mAbs)储存在-20℃,备用。

[0113] 3、AP-mAbs和mAb-MPs使用浓度优化

[0114] 应用磁珠包被抗体(mAb-MPs)和酶标抗体(AP-mAbs)夹心反应模式在全自动化学发光仪上进行CPP检测。

[0115] 将50μL不同浓度的mAb-MP(1:20、1:50、1:100、1:200、1:500)和CPP样品或者标准品(30μL)分别移液到与仪器匹配的管中,并在37℃轻轻摇动孵育20分钟(捕获时间)。然后管子通过清洗站用洗涤液(含有0.05%Twe的0.01mol/L PBS)洗涤3次,去除非特异性的结合。然后分别加入不同浓度的AP-mAbs(1:50、1:100、1:200、1:500),37℃轻轻摇动孵育10分钟。此时,夹心免疫复合物MPs-CPP-AP形成。将形成的夹心免疫复合物磁分离,并通过洗涤除去过量的AP-mAbs。随后,将含有发光底物AMPPD(200μL)的溶液加入夹心复合物。将所得混合物在免疫测定仪器中温育,并测量相对光单位(RLU)的值,结果如图10所示。可见,当AP-mAbs的稀释比从1:500增加到1:50时,RLU_{S3}/RLU_{S0}增加(P<0.05)。AP-mAbs的稀释比为1:50和1:100时,RLU_{S3}/RLU_{S0}的差异不显著。对于mAb-MPs,稀释比为1:50时RLU_{S3}/RLU_{S0}出现峰值,当mAb-MPs量从1:50减少到1:500时,RLU_{S3}/RLU_{S0}下降,表明并未捕获所有的CPP。当加入1:50的mAb-MPs时,抗原与mAb-MPs充分结合,出现最高的RLU_{S3}/RLU_{S0}比率。当添加超过1:50的mAb-MPs时(1:20),过量的mAb-MPs导致灵敏度降低,因为mAb-MPs的颗粒太靠近,吸收发射的光,从而阻挡发光。因此,考虑到灵敏度和测定成本,分别选择1:100和1:50的稀释比例用于AP-mAbs和mAb-MPs。

[0116] 4、基质缓冲液pH和孵育时间优化

[0117] pH值和温育时间也是两个重要参数,因为溶液的酸度极大地影响包被抗体的活性,并且太长的温育时间可能会导致抗原-抗体复合物的解离。

[0118] 通过检测CPP标准样品(S9,1250pmol/L)的最大RLU值来评估这两个参数。将AP-mAbs溶液(1:100,50μL),mAb-MPs溶液(1:50,50μL)和CPP标准样品(S9,30μL)在37℃下孵育0~60分钟。每隔5分钟洗涤免疫复合物MPs-CPP-AP,然后加入具有不同pH(200μL)的化学发光底物以测量RLU。通过添加1mol/L的NaOH溶液制备不同pH的底物缓冲液。图11显示了pH和温育时间对光发射的动力学的影响。随着孵育时间的延长RLU强度逐渐增加,直至达到稳定状态。当pH为7.0时,RLU值从0~20min增加,并在随后形成不稳定的平台,且该pH下的最大RLU低于其他值。RLU显然在pH约9.0时达到最大值,故pH值选择为9.0。对于孵育时间,最大RLU随孵育时间从0到30分钟增加。然而,在30~50min之间没有变化,表明抗原-抗体复合物

形成已达到平衡。因此,30min为最合适的孵育时间。

[0119] 实施例8基于MPs的全自动化学发光法检测CPP

[0120] 1、标准曲线的建立

[0121] 选择1:100和1:50的稀释比例用于AP-mAbs和mAb-MPs,孵育时间为30min的条件,测量一系列浓度的标准CPP溶液(S0~S9,0~1250pmol/L)。构建CPP标准品的校准曲线,如图12所示。通过将10个S0孔的平均值加两倍标准偏差确定最低检测限(LOD)。标准曲线的检测范围为1.2~1250pmol/L,检测限(LOD)为6.25pmol/L,相关系数为0.9993。

[0122] 2、基于MPs的全自动化学发光法检测CPP与现有常用方法比较

[0123] 本发明所述的检测方法可满足临床诊断需求(低于18.9pmol/L)。将此方法与之前关于CPP检测的报告进行比较,以评估本发明所述方法的优势。如表2所示。

[0124] 表2不同CPP检测方法的比较

[0125]

Method	LOD	Detection range	Assay Time	Reference
Tubes CLIA	2.25pmol/L	2.25-1215pmol/L	>2h	[1]
RIA	—	0-2500pmol/L	>24h	[2]
ELISA	19.5pmol/L	19.5-1250pmol/L	>5h	[3]
Electrochemical assay	37pmol/L	25-125pmol/L	5min	[4]
Fully automated CLIA	6.25pmol/L	1.2-1250pmol/L	30min	本发明

[0126] Reference:

[0127] [1]N.G.Morgenthaler,J.Struck,C.Alonso,A.Bergmann,Assay for the Measurement of Copeptin,a Stable Peptide Derived from the Precursor of Vasopressin,Clinical Chemistry,52(2006)112.

[0128] [2]Y.Xiao,Z.G.Zhang,S.B.Chai,etermination of Plasma Copeptin Levels in Some Cardiacand Pulmonary Disorders,Journal of Radioimmunology,21(2008)97-100.

[0129] [3]X.D.Zhu,J.S.Chen,F.Zhou,Q.C.Liu,G.Chen,J.M.Zhang,Detection of copeptin in peripheral blood of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage,Critical Care,15,6(2011-11-29),15(2011)1-13.

[0130] [4]Y.Yang,Development of an Ultrasensitive Electrochemical Method for Copeptin Content Determination,International Journal of Electrochemical Science,(2017)6694-6704.

[0131] 可见,本发明的检测时间仅需30min远远低于先前报道的方法,包括TubesCLIA(>2h),RIA(>24h)和ELISA(>5h)。缩短检测时间也是实现和肽素POCT的必要前提。另外,尽管电化学测定方法^[4]的测定时间仅为5分钟,但其LOD为37pmol/L,无法满足临床应用要求,而本发明所述方法中的LOD为6.25pmol/L。总而言之,这些结果表明,基于磁珠富集构建的全自动化学发光和肽素分析方法具有明显优势,可有效实现和肽素的POCT应用,增加和肽素的临床应用价值,从而为重症监护和预后治疗提供更有效的参考指标。

[0132] 实施例9检测方法的准确性、精密性和稳定性评估

[0133] 本实施例采用稀释回收率评估本发明所述的基于MPs的全自动化学发光法检测

CPP的方法准确性。具体实验步骤如下:

[0134] 五个血清样品在梯度稀释(至多1:32)后进行测试,结果如图13所示。将测量值乘以稀释因子并与原始未稀释浓度比较。在稀释过程中,5个样品中均未显示>15%的偏差。为了确认该方法的精确度,使用三种不同浓度的CPP标准品进行测定批内和批间差,其中6次重复用于7天内进行测定。如表3所示,两者CV均低于15%。

[0135] 本实施例还研究了全自动化学发光法的稳定性。在4℃下储存AP-mAbs,在-20℃下储存CPP标准品和AP-mAbs 20天后,RLU_{S3}/RUL_{S0}的值无显著变化。结果显示了此全自动化学发光的优异性能。

[0136] 表3批间、批内差分析

[0137]

Times	Added concentration .of CPP(pmol/L)								
	10.0 (n=6)			50.0 (n=6)			100.0(n=6)		
	Average	SD	CV(%)	Average	SD	CV(%)	Average	SD	CV(%)
1	9.86	0.36	3.70	50.14	0.71	1.42	100.55	3.01	2.99
2	9.92	0.28	2.85	49.94	1.39	2.80	99.51	3.24	3.26
3	9.94	0.39	4.01	49.69	1.66	3.34	99.50	2.07	2.08
4	10.25	0.65	6.29	49.93	2.07	4.14	100.43	2.95	2.94
5	10.38	1.28	12.30	51.08	2.83	5.53	99.61	2.98	2.99
6	10.03	0.59	5.92	47.51	2.62	5.52	96.46	2.39	2.49

[0138] Note.Intraassay and interassay tests were performed using three different concentrations of CPP standards.CV,coefficient of variation;SD, standard deviation.

[0139] 实施例10检测方法的方法学比较

[0140] 为了进一步评估该分析方法的有效性,分析了37个血清样本并与市售的ELISA试剂盒进行比较。如图14所示,两种方法之间有很好的 consistency。数据的线性回归方程如下: $Y=0.58782X+0.94386$ ($R=0.9813$)。数据显示,新开发的测定法可作为血清样品中CPP的测定。

[0141] 在本发明中,通过与磁分离相结合,实现了人血清中CPP快速,灵敏地测定。CPP的测定时间,灵敏度和特异性得到显著改善。磁珠具有较大的表面积与面积比,可以有效富集低浓度的CPP。该方法用于CPP测定的检测范围为1.2~1250pmol/L,检测限为6.25pmol/L,远低于检测CPP(<18.9pmol/L)的标准要求。此外,自动化学发光免疫测定仪器的应用大大缩短了测定时间(在30分钟内),而在其他方法中均需要超过180分钟。该方法用于临床血清标本中CPP的检测,与市售CPP检测ELISA试剂盒检测结果具有较高的相关性。因此,我们的方法可以为临床样品中CPP的快速和准确检测提供有利工具。

[0142] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对以上实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0143] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员

来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 广州万孚生物技术股份有限公司

<120> 人和肽素快速定量检测方法 with 试剂盒

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu Arg Leu Val

1 5 10 15

Gln Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln Pro Asp Ala

20 25 30

Tyr

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

Cys Ala Thr Gln Leu Asp Gly Pro Ala Gly Ala Leu Leu Leu Arg Leu

1 5 10 15

Val

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

Cys Leu Ala Gly Ala Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Gln Pro Asp Ala

1 5 10 15

Tyr

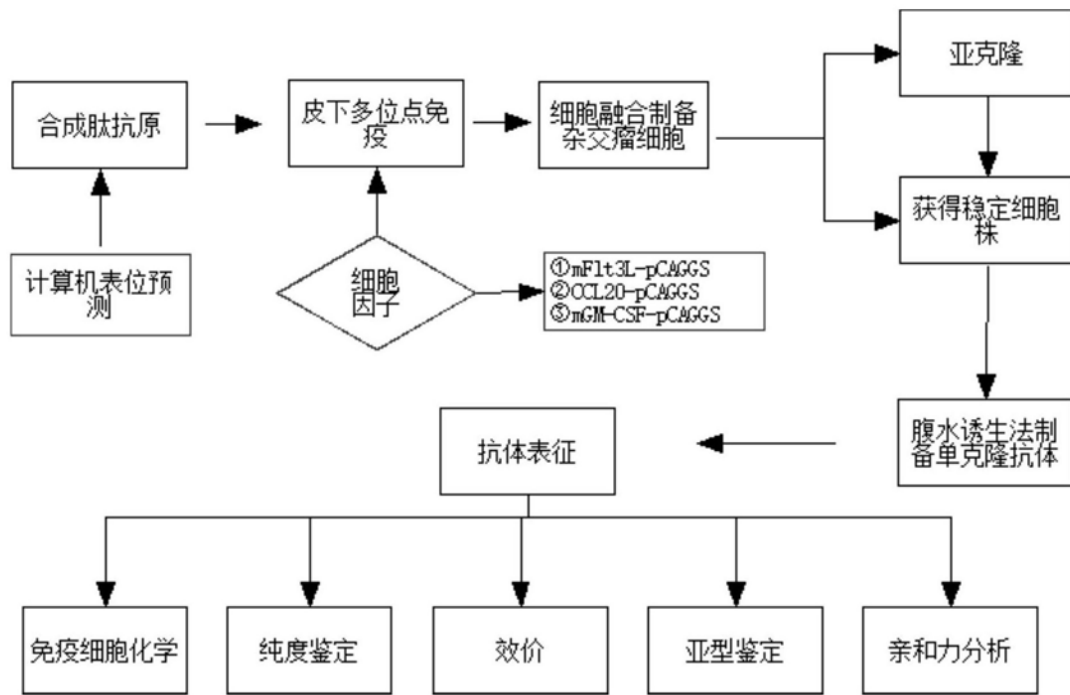


图1

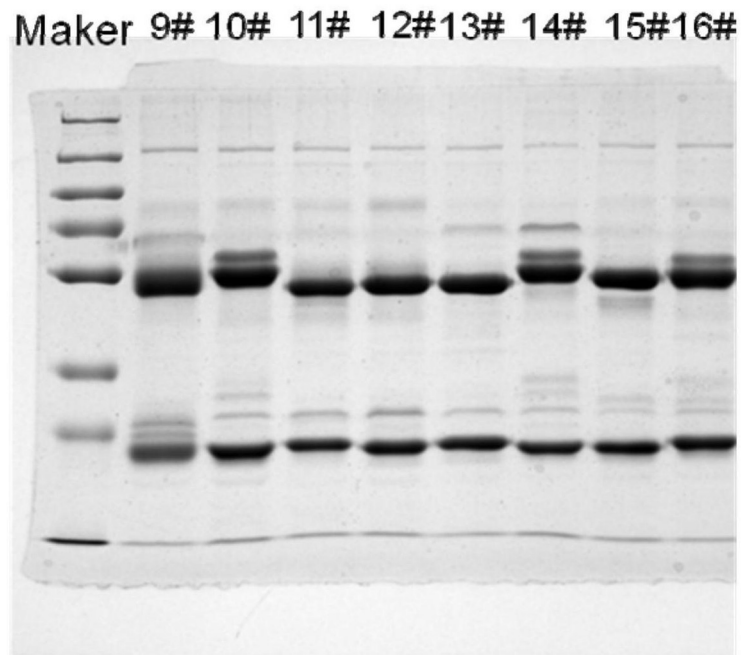


图2

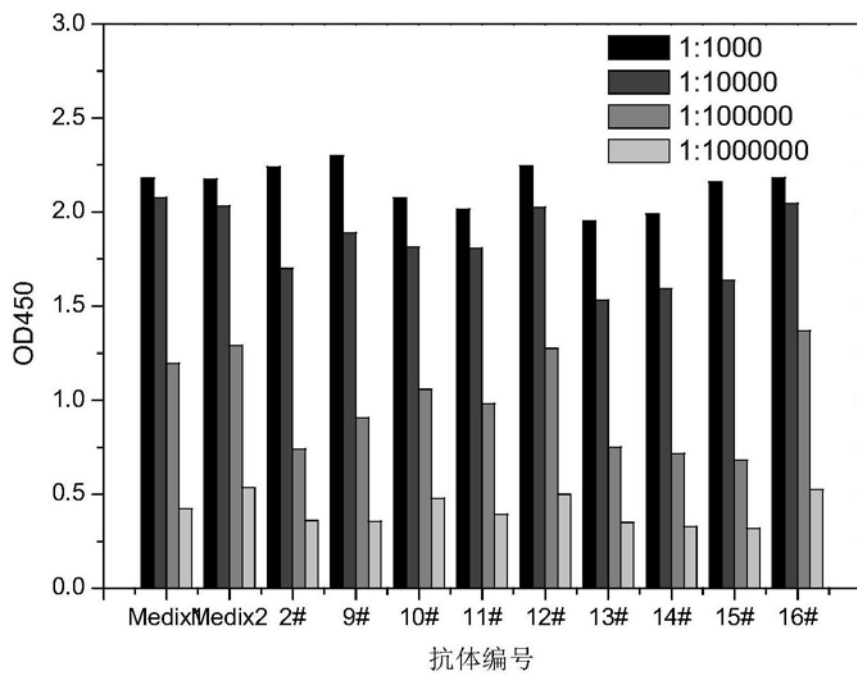


图3

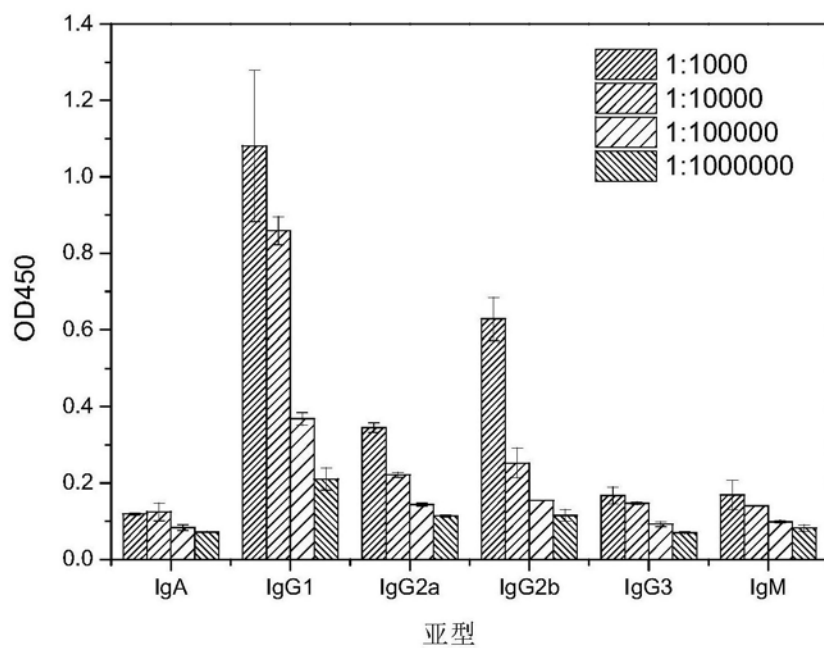


图4

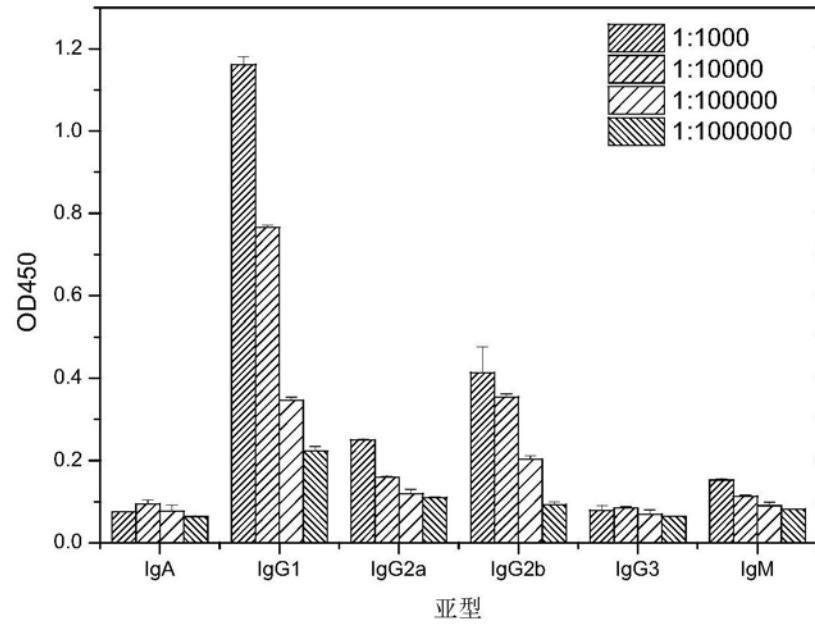


图5

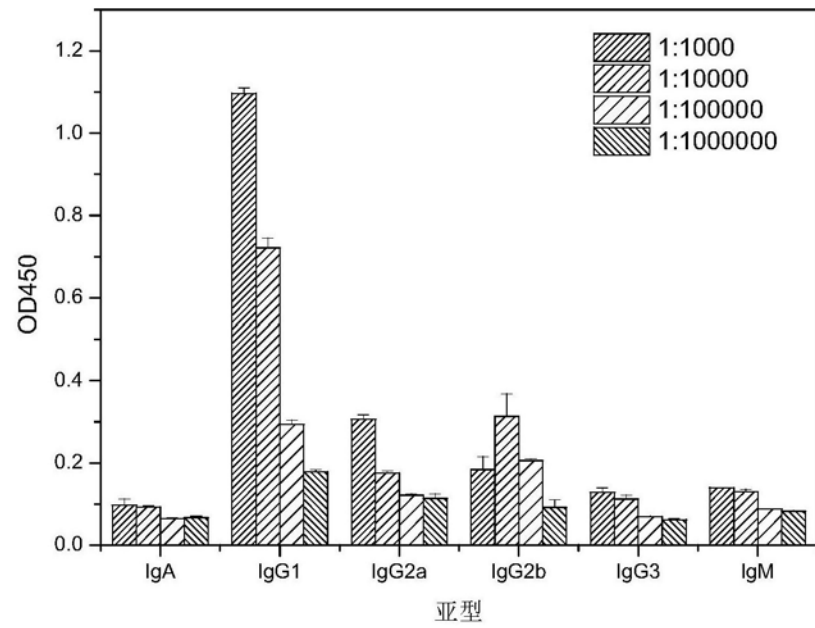


图6

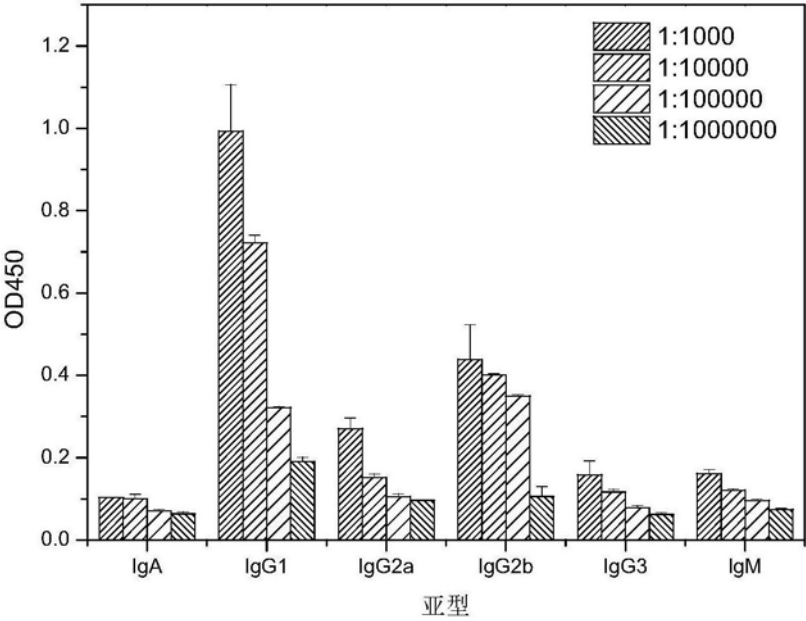


图7

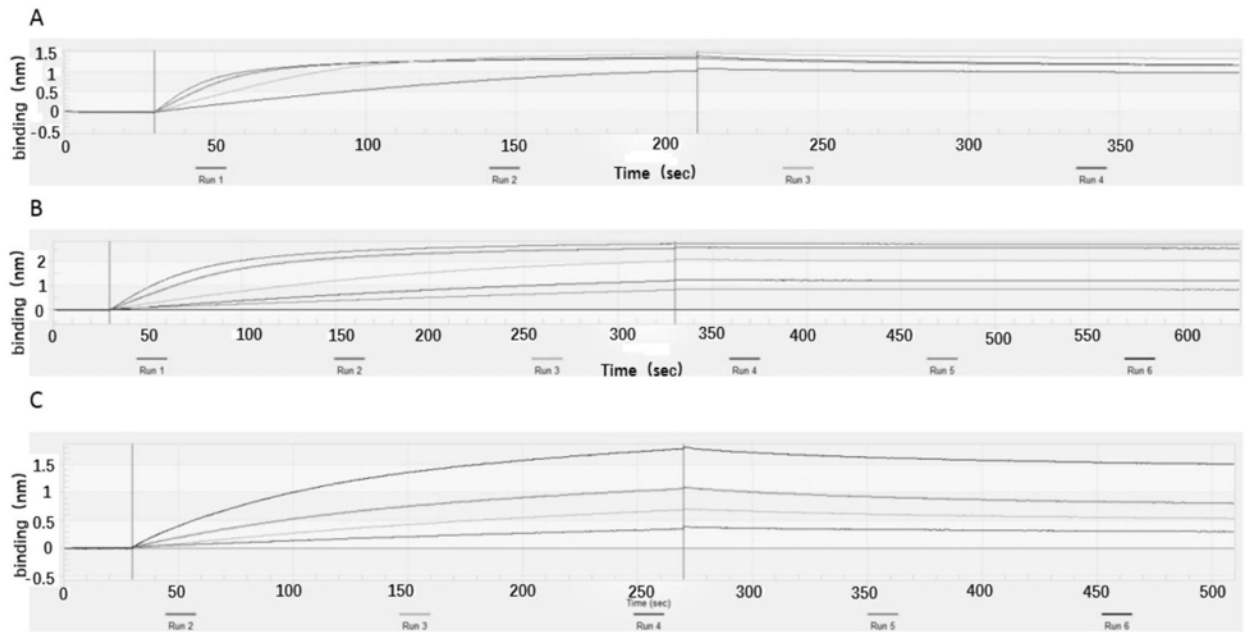


图8

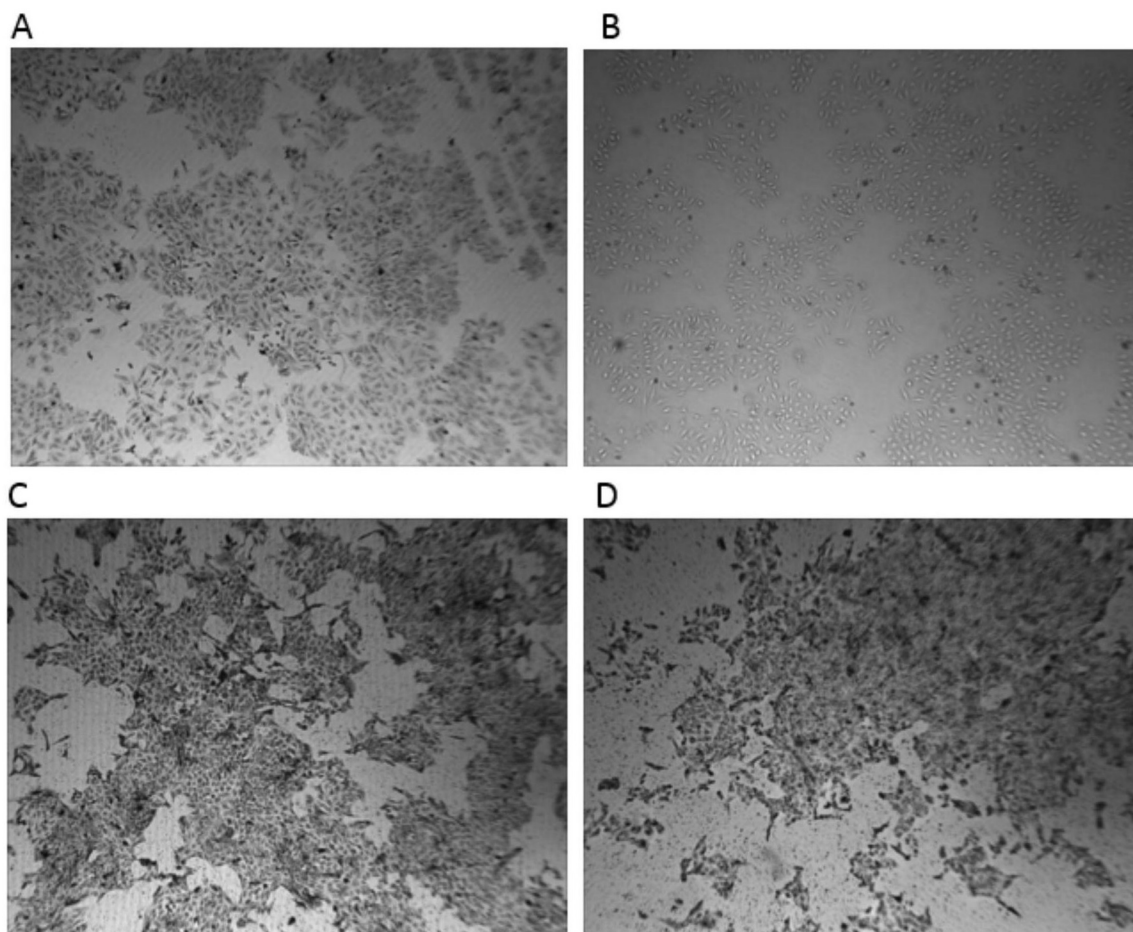


图9

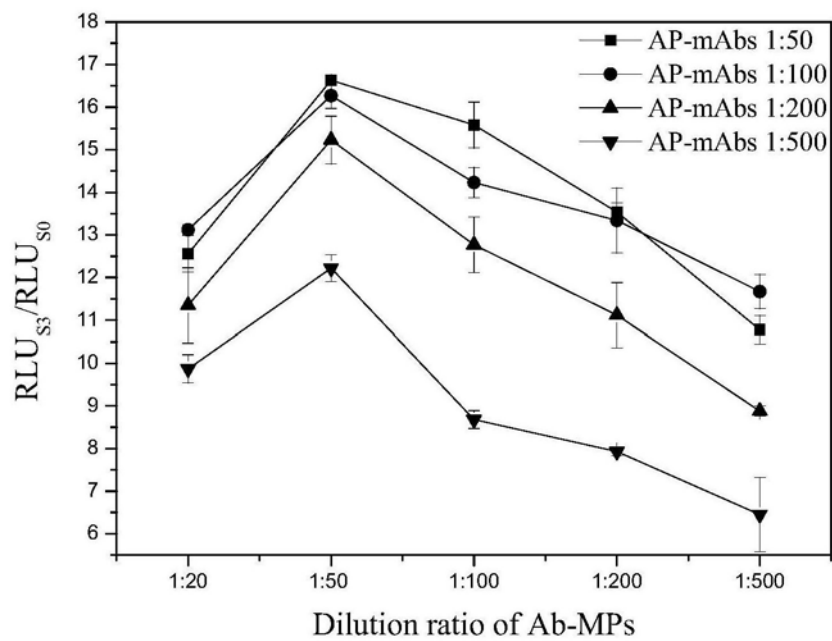


图10

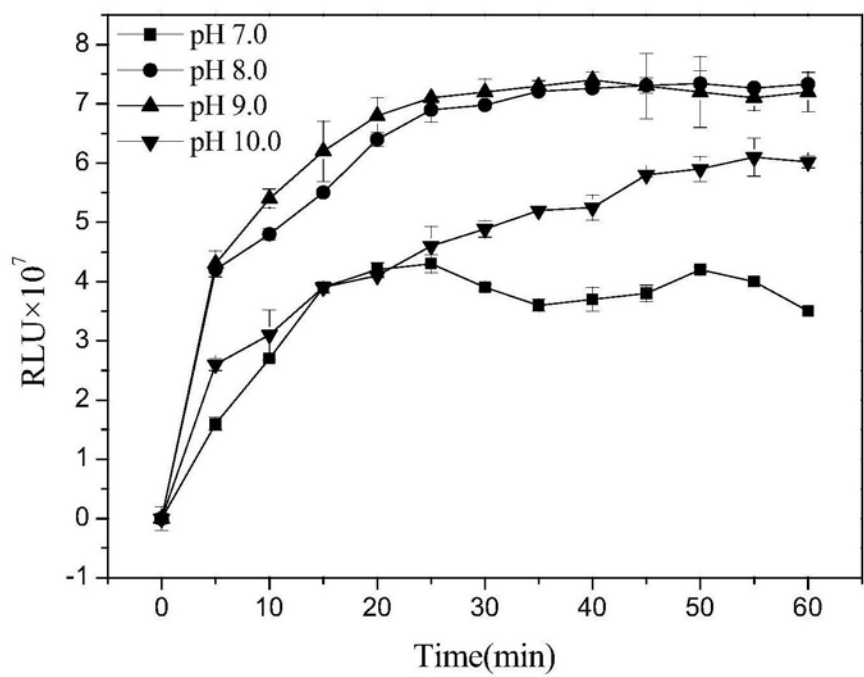


图11

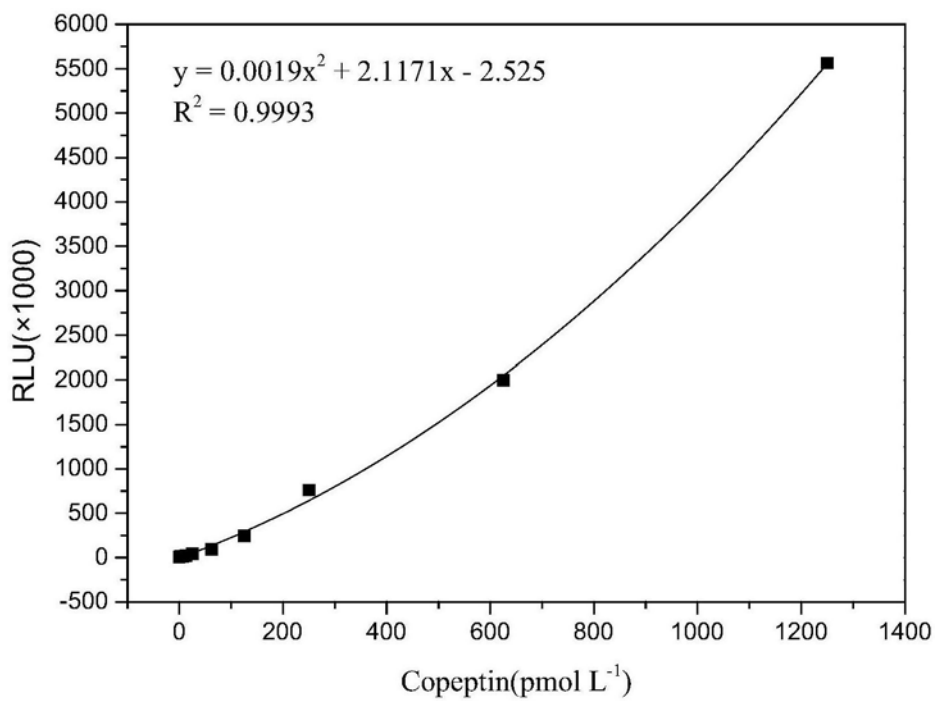


图12

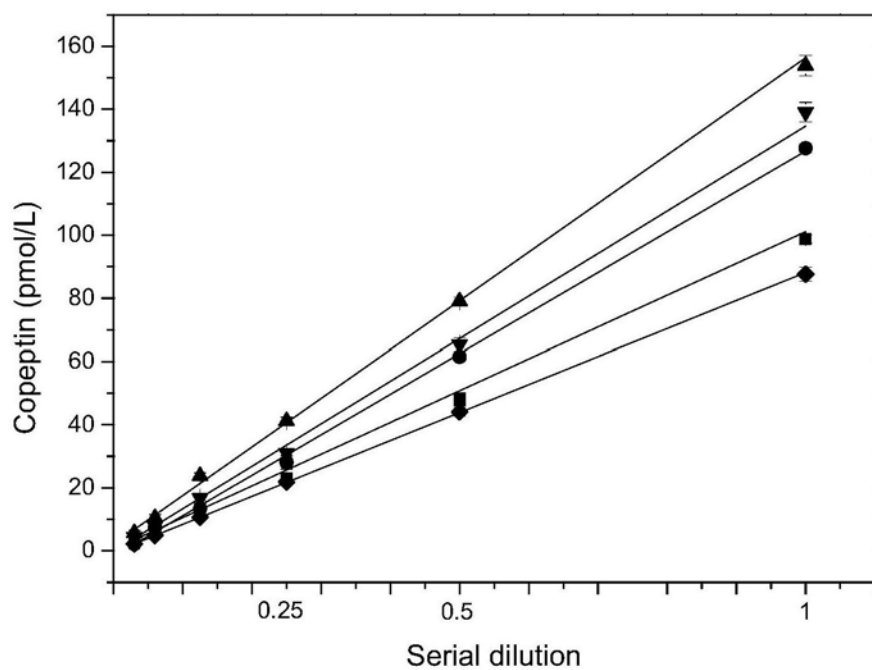


图13

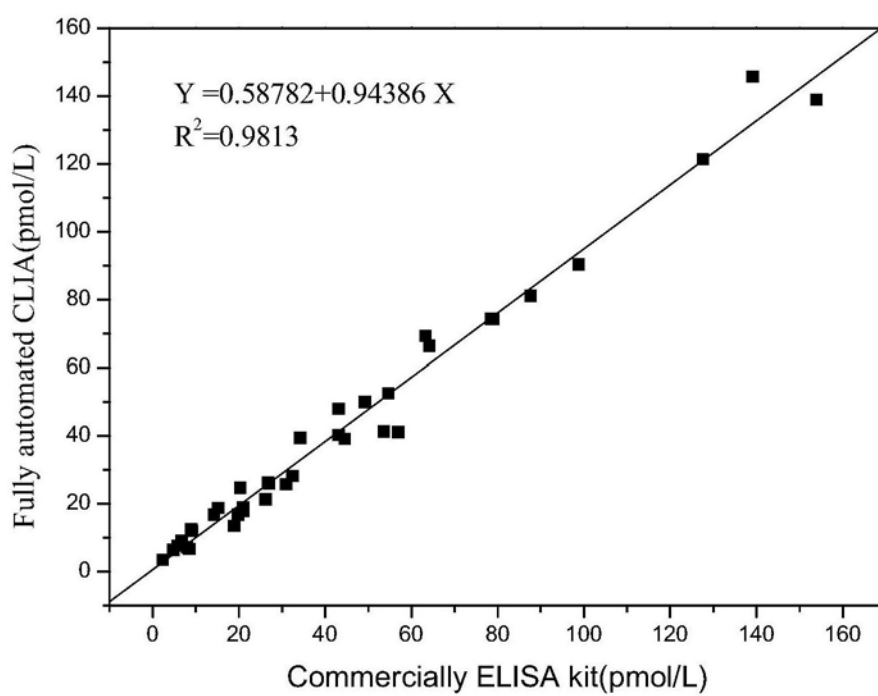


图14

专利名称(译)	人和肽素快速定量检测方法与试剂盒		
公开(公告)号	CN109596839A	公开(公告)日	2019-04-09
申请号	CN201811594789.2	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
[标]发明人	王羽 崔跃 吴培钿 何小维 王继华		
发明人	王羽 康业 崔跃 吴培钿 何小维 王继华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	郑彤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于MPs的全自动化学发光法检测CPP的方法，通过将普通免疫与免疫调节分子相结合，在常规普通免疫的同时辅助递送细胞因子Flt3l、mGM-CSF和CCL20，得到具有高亲和力的抗体，并通过与磁分离相结合，磁珠具有较大的表面积与面积比，可以有效富集低浓度的CPP，从而实现了人血清中CPP快速、灵敏地测定。CPP的测定时间、灵敏度和特异性得到显著改善。

免疫方式	小鼠编号	二免效价	三免效价	杂交瘤阳性率	稳定株数
对照组1	1	$<10^{-3}$	$1:10^4$	.	.
	2	$1:10^4$	$1:10^5$	9/146 (0.062)	0
	3	$<10^{-3}$	$<10^{-3}$	.	.