



(10) 授权公告号 CN 113416250 B

(45) 授权公告日 2022.07.15

(21) 申请号 202110640612.7

(22) 申请日 2021.06.08

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113416250 A

(43) 申请公布日 2021.09.21

(73) 专利权人 深圳市国创纳米抗体技术有限公司

地址 518110 广东省深圳市龙华区观澜街  
道新澜社区观光路1301号银星科技大  
厦C803

(72) 发明人 宋海鹏 刘原源 于建立 蒋立仲  
王准 曹慧 古一 李飞 张霞

(74) 专利代理机构 北京市众天律师事务所  
11478

专利代理师 李新军

(51) Int. Cl.

*C07K 16/18* (2006.01)

*C12N 15/13* (2006.01)

*C12N 15/70* (2006.01)

*C12N 1/21* (2006.01)

*G01N 33/74* (2006.01)

*C12R 1/19* (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108383907 A, 2018.08.10

CN 108445230 A, 2018.08.24

CN 110903390 A, 2020.03.24

CN 110885374 A, 2020.03.17

审查员 邹吉承

权利要求书1页 说明书8页  
序列表6页 附图4页

(54) 发明名称

一种抗PCT的纳米抗体2G11及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗PCT的纳米抗体,所述纳米抗体具有独特的3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,该抗体亲和力可达到 $1.623E-09$ ,而且能够在PCT血清检测特别是双抗体夹心法中获得优异的检测效果。本发明还提供了一组用于双抗体夹心法检测PCT的纳米抗体组合以及该抗体组合在制备PCT抗原检测试剂盒中的应用,所述组合包括作为捕获抗体的抗PCT二价纳米抗体和作为检测抗体的抗PCT单价纳米抗体。

1. 一种抗PCT的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所述氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所述氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所述氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所述氨基酸序列组成。

3. 一种编码权利要求2所述纳米抗体序列的核酸,其特征在于,所述编码序列由SEQ ID NO.5所示。

4. 一种含有权利要求3所述的核酸的表达载体,其特征在于,所述表达载体为pMES4。

5. 一种含有权利要求4所述表达载体的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为大肠杆菌BL21 (DE3)。

6. 权利要求1-2任一所述的纳米抗体在PCT免疫法检测试剂盒中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述免疫法为双抗体夹心法,其中第一抗体为权利要求1-2任一所述的纳米抗体,第二抗体为可变区序列由SEQ ID NO.6所示的纳米抗体。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述第一抗体为生物素化的抗体,所述第二抗体连接有HAP。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述第一抗体为二价纳米抗体,所述二价纳米抗体由单价纳米抗体的可变区羧基端与抗体铰链区的氨基端相连接。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述二价纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

## 一种抗PCT的纳米抗体2G11及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种纳米抗体,属于免疫学领域。

### 背景技术

[0002] PCT (Procalcitonin) 是一种无激素活性的降钙素前肽物质,由降钙蛋白、降钙素、N端残基片段组成,相对分子量为13kDa。降钙素仅在甲状腺C细胞受到激素性刺激时才产生,而PCT可由很多器官的不同类型细胞在受到促炎症反应刺激特别是受到细菌引起的刺激后分泌。

[0003] PCT可作为一种能特异性区分细菌感染和其他原因导致的炎症反应的重要标志物,当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时,其在血浆中的水平升高。临床资料显示,PCT浓度大于0.1ng/ml时说明存在临床相关的细菌感染,需要采用抗生素进行治疗;当PCT浓度大于0.5ng/ml时,要考虑患者可能发展成重症败血症或败血症性休克的危险。PCT反映了全身炎症反应的活跃程度。而影响PCT水平的因素包括被感染器官的大小和类型、细菌的种类、炎症的程度和免疫反应的状况。检测病例中PCT浓度的变化,有利于判断机体细菌感染情况,评判机体健康状况,对临床和基础性研究均具有重要意义。

[0004] 自上世纪80年代以后,免疫学检测技术随着单克隆抗体、人工合成多肽、基因工程表达抗原及各种标记技术的成熟而迅速发展,免疫比浊法、速率散射比浊法、胶乳增强透射比浊法与化学发光分析技术逐渐取代传统的免疫沉淀、免疫凝集物,使检测更为快捷。目前,检测PCT的方法有很多,不仅可以定性,亦可以定量。常用的方法有如下几种:

[0005] 1、放射免疫学分析法:该方法利用人工合成的多克隆抗体特异性地识别和连接合成氨基酸降钙素原。该方法能检测正常人的血清PCT,敏感度可达4pm/ml,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,而不能区别上述三种物质。且该方法检测耗时19-22小时,并有放射性元素污染的风险。

[0006] 2、胶体金比色法:该方法利用的是胶体金标记的抗PCT的单克隆抗体和用做包被的抗PCT多克隆抗体。当血清或者血浆加入标本孔,金标单克隆抗体与标本中的PCT结合,形成金标记的抗原抗体复合物。该复合物在反应膜上移动,与固定在膜上的抗PCT抗体结合形成更大的复合物。当PCT浓度超过0.5ng/ml,该复合物显示红色,红色的深浅与PCT的浓度成正比,与标准比色板比较即可得出PCT的浓度范围。然而此方法在颜色对比过程中容易产生较大的误差。

[0007] 3、透射免疫浊度法:该方法的原理为样品中的PCT与试剂中的PCT单克隆抗体发生抗原抗体反应,使反应液浊度增加,并在一定范围内反应液浊度与所加抗原的量呈线性关系,使用生化分析仪或其他光学检测仪器在600nm波长处测定反应液吸光度值。所测吸光度值与所检测PCT浓度成正比。该方法虽然简便、快速,但免疫透射比浊的方法学及临床应用尚需进一步的验证。

[0008] 4、双抗体夹心免疫化学发光法:该方法运用双单克隆抗体,其中一个抗体为降钙素抗体,另一个为抗钙素抗体,分别结合到PCT分子的降钙素和抗钙素部位,可排除交叉反

应。其中一个抗体是光标记的,另一个未标记的抗体固定在反应容器的内壁,反应过程中两个抗体与PCT分子结合而形成三明治复合体,发光部位位于反应容器的表面。该方法操作简便、特异性强、敏感度高,测定的底限值可达0.1ng/ml,且耗时2h。

[0009] 基于PCT在临床诊断方面所表现出的突出特性,研发出针对PCT的特异性结合抗体,在保证灵敏度的同时增加检测范围成为现有技术的迫切需求。

[0010] 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( $H_2$ )的抗体,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(Heavy chain only like Antibody, HCAs),而它们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,因此形成一种重链二聚体。

[0011] 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。

[0012] 纳米抗体有来源于成年骆驼体内HCAs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及发展前景。

[0013] 鉴于PCT更多地过量表达于一些细菌、真菌、寄生虫严重感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭等疾病中,因此研发抗PCT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。而在PCT的免疫检测具体应用中,如果抗PCT抗体识别PCT的抗原决定簇过于单一或者位点过于接近或者重叠,都会导致特异性的抗原抗体结合反应受到影响,从而严重影响检测效率。目前,已有抗PCT纳米抗体的相关专利申请,如中国发明专利CN110885374A公开了一株抗PCT纳米抗体,其亲和力达 $3.773E-9$ ;中国发明专利CN110903390A公开了一株抗PCT纳米抗体,其亲和力达 $7.429E-9$ 。优异的亲和力保证了所述纳米抗体在抗原检测上的应用前景,但是在具体应用上,即使拥有高亲和力的纳米抗体,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PCT的纳米抗体,即,所述抗体既具有高度特异的抗原识别能力,并且具有独特的抗原决定簇识别位点,能够在PCT抗原的免疫

检测特别是双抗体夹心法中获得优异的检测效率。

### 发明内容

[0014] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一种抗PCT的纳米抗体,所述纳米抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所述氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所述氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所述氨基酸序列组成。

[0015] 在一个优选的技术方案中,所述纳米抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所述氨基酸序列组成。在本发明中具有该可变区序列的纳米抗体的一个优选实施方案为纳米抗体2G11。

[0016] 其次,本发明还提供了一种编码上述纳米抗体的核酸,所述编码序列由SEQ ID NO.5所示。

[0017] 第三,本发明提供了一种含有上述核酸的表达载体,所述表达载体为pMES4。

[0018] 第四,本发明提供了一种含有上述表达载体的宿主细胞,所述宿主细胞为大肠杆菌BL21 (DE3)。

[0019] 最后,本发明还提供了上述纳米抗体在PCT免疫法检测试剂盒中的应用。

[0020] 在一个优选的实施方案中,所述免疫法为双抗体夹心法,其中第一抗体为上述的纳米抗体;第二抗体为可变区序列由SEQ ID NO.6所示的纳米抗体。

[0021] 更为优选地,所述第一抗体为生物素化的抗体,所述第二抗体连接有HAP。

[0022] 尤为优选地,第一抗体为二价纳米抗体,所述二价纳米抗体由单价纳米抗体的可变区羧基端与抗体铰链区的氨基端相连接,氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0023] 其次,本发明还提供了上述的纳米抗体组合在制备PCT抗原检测试剂盒中的应用。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 本发明提供的用于双抗体夹心法检测PCT的纳米抗体组合在PCT抗原检测中显示出高效的性能,其中作为捕获抗体的抗PCT二价纳米抗体2G11-LHC由于添加了抗体铰链区,可在周质空间自发形成二硫键形成二价抗体,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PCT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、最低检测限和准确度均有大幅度提升。本发明提供的抗PCT二价纳米抗体2G11-LHC与抗PCT单价纳米抗体1B10-HAP的抗体组合具有很好的匹配度,在对PCT抗原的检测中显示出优异的P/N值、最低检测限和准确度,可满足临床样本中的PCT的检测。

### 附图说明

[0027] 图1. 纳米抗体2G11纯化SDS-PAGE图;

[0028] 图2. 第一轮PCR扩增电泳鉴定图;

[0029] 图3. 第二轮PCR扩增电泳鉴定图;

[0030] 图4. 二价纳米抗体2G11-LHC纯化SDS-PAGE图;

[0031] 图5. 2G11和2G11-LHC亲和力测试曲线图;

[0032] 图6.生物素化纳米抗体亲和力测试曲线图。

### 具体实施方式

[0033] 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限定的保护范围构成任何限制。

[0034] 实施例1.抗PCT单价纳米抗体的制备

[0035] 制备方法参照中国发明专利申请CN110903390A中的实施例1-2。所得单价纳米抗体2G11的重链核苷酸序列为SEQ ID NO.5所示,可变区氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,其中第1-25位氨基酸序列为FR1,第26-33位氨基酸序列为CDR1,第34-50位氨基酸序列为FR2,第51-57位氨基酸序列为CDR2,第58-95位氨基酸序列为FR3,第96-103位氨基酸序列为CDR3,第104-114位氨基酸序列为FR4。将表达纯化后的纳米抗体2G11进行SDS-PAGE检测(图1:M为彩虹光谱蛋白Marker;1为大肠杆菌诱导表达纯化后的纳米抗体2G11)。

[0036] 实施例2.抗PCT二价纳米抗体的制备

[0037] 2.1 2G11-LHC-pMES4载体构建

[0038] 在纳米抗体2G11的可变区羧基端添加抗体铰链区。铰链区氨基酸序列为SEQ ID NO.8所示,核酸序列为SEQ ID NO.9所示。构建后的2G11-LHC的氨基酸序列为SEQ ID NO.7所示,核酸序列为SEQ ID NO.10所示。由于铰链区较长,设计两个下游引物,进行两轮PCR,操作如下:以单价纳米抗体DNA作为模版进行第一轮PCR,引物序列如下:

[0039] F1:AACTGCAGGAGTCTGGAGGAGG

[0040] R1:CGGCTGCGGTTGCGGTTGAGGCTGCGGCTGCGGTTTCGGGGTTTTTCGGTTCTGAGGAGACGGTGACCTG

[0041] 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2:M为Trans 2K DNA Marker;1为阴性对照;2为第一轮PCR产物)。以第一轮PCR回收产物为模板进行第二轮PCR,引物序列如下:

[0042] F1:AACTGCAGGAGTCTGGAGGAGG

[0043] R2:GGACTAGTGATGGTGATGGTGGTGCGGACATTTGCTTTTCGGTGGTCGGATTCGGCTGCGGTTGCGGTTG

[0044] 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3:M为Trans 2K DNA Marker;1为第二轮PCR产物)。

[0045] 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 μg酶切后载体和450ng酶切后的第二次PCR产物,加1.5 μl T4 DNA连接酶,补充缓冲液和水至10 μl总体积,16℃过夜连接。

[0046] 2.2 2G11-LHC的诱导表达

[0047] 将连接产物10 μl转化于100 μl Shuffle感受态细胞中,轻轻混匀,在冰上放置30分钟,42℃水浴热激90秒,冰浴冷却3分钟。向离心管加入600 μl LB培养基,37℃振荡培养60分钟。取上清100 μl,用三角涂布器涂布在LB-A平板上,37℃倒置培养过夜。挑取上述10个单克

菌落于LB-A培养基中,37℃振荡培养过夜,测序。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℃振荡培养3小时至菌液 $OD_{600}=0.8$ 左右,加入终浓度为1mM IPTG,30℃诱导过夜。第三日,8000g,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。9000g,4℃离心10分钟,收集约4.5ml的上清(周质提取物)。

#### [0048] 2.3 2G11-LHC的纯化和鉴定

[0049] 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4: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2G11-LHC)。

#### [0050] 实施例3. 纳米抗体与抗原的亲合活性测定

##### [0051] 3.1 芯片抗原偶联

[0052] 将抗原用不同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。

##### [0053] 3.2 分析物浓度设置条件探索及再生条件优化

[0054] 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 $\mu$ g/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 $\mu$ g/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 $\mu$ g/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。

## [0055] 3.3亲和力和测试

[0056] 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 $\mu$ l/分钟;解离时间:600秒;再生条件:30秒,30 $\mu$ l/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,将芯片上的纳米抗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 $\mu$ L/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纳米抗体2G11、2G11-LHC与抗原结合解离的能力。

## [0057] 3.4结果分析

[0058] 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(见表1和图5)。筛选的2G11和2G11-LHC亲和力均达到 $10^{-9}$ 以上。

[0059] 表1:2G11和2G11-LHC亲和力数据

样品编号	结合常数	解离常数	亲和力
2G11	1.211E+5	1.966E-4	1.623E-09
2G11-LHC	6.386E+5	2.934E-4	4.595E-10

## [0061] 实施例4.抗PCT纳米抗体2G11的ELISA叠加数据分析

[0062] 将纳米抗体2G11与中国发明专利申请CN110903390A中公开的纳米抗体1B10、2H4、BF5和中国发明专利申请CN110885374A中公开的纳米抗体6H6进行ELISA抗原表位分析,分析方法参照中国发明专利申请CN110903390A中的实施例4,结果见表2。2G11与其他四株纳米抗体分别针对PCT抗原不同的抗原表位,这预示着在PCT的检测应用上,2G11与其他四株纳米抗体组成检测抗体对的几率大大增加,从而可以增大检测效率。

[0063] 表2:抗原抗体表位叠加实验结果

	1st 抗体	2nd 抗体	1st 抗体+2nd 抗体	叠加率	
[0064] 2G11+2H4	0.347	0.536	0.711	107.98%	
	2G11+BF5	0.347	0.525	0.845	96.80%
[0065] 2G11+1B10	0.347	0.474	0.983	116.48%	
	2G11+6H6	0.347	0.637	0.754	69.50%

## [0066] 实施例5.利用Biacore分析纳米抗体2G11结合位点

[0067] 将纳米抗体2G11与中国发明专利申请CN110903390A中公开的纳米抗体1B10、2H4、BF5和中国发明专利申请CN110885374A中公开的纳米抗体6H6进行Biacore抗原表位分析,分析方法参照中国发明专利申请CN110903390A中的实施例5,结果见表3。2G11纳米抗体与其他四株纳米抗体均识别不同抗原位点,该结果与ELISA叠加实验推测的结果一致。更加验证了抗PCT纳米抗体2G11在PCT检测领域的应用前景。

[0068] 表3:Biacore检测纳米抗体叠加实验RU值变化表

样品名称	相对 RU 值增加量				位阻率
	抗体 A	抗体 B	抗体 (A*2)	抗体 (A+B)	
[0069] BF5	2G11	23.5	157.4	172.5	8.75%
2H4	2G11	17.8	174.1	193.2	9.89%
6H6	2G11	21.9	168.8	183.9	8.21%
1B10	2G11	18.3	196.2	202.7	3.21%

[0070] 实施例6.生物素化抗PCT纳米抗体的制备

[0071] 将纳米抗体2G11与2G11-LHC进行生物素化,具体操作参照中国发明专利申请CN111004328A中的实施例4.将生物素化后的抗体先用镍柱纯化,各得到30ml洗脱液,再通过分子筛进一步纯化.按照实施例3的方法对生物素化后的纳米抗体进行亲和力测试,结果见表4和图6.生物素化后单价纳米抗体2G11的亲和力为 $2.457E-9$ ,二价纳米抗体2G11-LHC的亲和力为 $3.312E-10$ .

[0072] 表4.生物素化纳米抗体亲和力数据

名称	结合常数	解离常数	亲和力数值
Bio-2G11	$1.078E+5$	$2.649E-4$	$2.457E-09$
Bio-2G11-LHC	$3.792E+5$	$1.256E-4$	$3.312E-10$

[0074] 实施例7.抗PCT纳米抗体在检测试剂盒中的应用

[0075] 参照中国发明专利申请CN110903390A的说明书公开内容,所述纳米抗体1B10的可变区序列如SEQ ID NO.6所示.该专利申请中的实施例6通过柔性多肽与纳米抗体相融合成为带有化学发光区序列HAP(人源碱性磷酸酶)的纳米抗体1B10-HAP,其氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示,经测试,1B10-HAP亲和力数值为 $3.785E-9$ .选取生物素化纳米抗体2G11(二价/单价)为捕获抗体,1B10-HAP为检测抗体,进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的PCT抗原,本方法使用的是磁珠化学发光法,具体过程如下:

[0076] 取生物素化纳米抗体( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $80\mu\text{l}/\text{孔}$ ,PCT质控品(罗氏化学发光PCT诊断试剂盒质控品 $10\text{ng}/\text{ml}$ )或者阴性血清 $30\mu\text{l}/\text{孔}$ ,1B10-HAP( $3\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $80\mu\text{l}/\text{孔}$ ,三者混匀,置于96孔微孔板中, $37^\circ\text{C}$ 温育15分钟;加入洗涤液, $300\mu\text{l}/\text{孔}$ ,混匀,置于磁力架上静止3分钟,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) ( $0.3\text{mg}/\text{ml}$ )  $80\mu\text{l}/\text{孔}$ ,混匀, $37^\circ\text{C}$ 温育15分钟;重复上述洗涤5次;加入AP化学发光显色液(BM Chemiluminescence ELISA Substrate)  $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ,在摇床上摇动3~5秒,选择酶标仪程序Luminescence,测定各孔读值.数据见表5.

[0077] 7.1 P/N的检测:阳性质控品( $10\text{ng}/\text{ml}$ )的检测值与阴性血清测值的比值;

[0078] 7.2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.

[0079] 7.3准确度(回收率)的检测:将浓度约为 $50\text{ng}/\text{ml}$ (允许偏差 $\pm 10\%$ )的降钙素原(PCT)液(A)加入到浓度范围在 $2\text{ng}/\text{ml} \sim 5\text{ng}/\text{ml}$ 的血清B中,所加入PCT与血清B之间的体积

比例为1:9,根据公式(1)计算结果。

[0080] 
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

- [0081] 式中:R---回收率;
- [0082] V---加入A液体积;
- [0083] V0---血清样品B的体积;
- [0084] C---血清样品加入A液后的检测浓度;
- [0085] C0---血清样品B的检测浓度;
- [0086] CS---A液的浓度

[0087] 7.4参考中国发明专利CN110903390A,BF5或2H4作为捕获抗体,1B10-HAP作为检测抗体进行配对检测,结果表明,2H4+1B10-HAP取得优异的检测效果,2H4和1B10作为最佳组合。参考中国发明专利CN110885374A,BF5或2H4作为捕获抗体,6H6-HAP作为检测抗体进行配对检测,结果表明,BF5+6H6-HAP取得优异的检测效果,BF5和6H6作为最佳组合。按照中国发明专利CN110903390A中的实施例6中的方法对2G11和1B10-HAP进行配对,结果数据见表5。结合中国发明专利CN110903390A和CN110885374A的配对结果,在漏检数均为0的情况下,选择线性指数和灵敏度最好的两个抗体组合,即2H4+1B10-HAP和2G11+1B10-HAP。

[0088] 表5. 2G11与1B10-HAP配对数据

[0089]

捕获抗体	检测抗体	线性指数 (R <sup>2</sup> )	灵敏度 (ng/ml)	漏检数
2G11	1B10-HAP	0.9965	0.02	0

[0090] 7.5本专利针对2G11和1B10-HAP这对抗体组合进行二价纳米抗体构建并生物素化,进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的PCT抗原,并与2H4和1B10-HAP这对抗体组合进行对比。结果见表6。

[0091] 表6. 单价/二价纳米抗体配对检测结果

[0092]

捕获抗体	检测抗体	P/N 值	最低检测限 (ng/ml)	准确度 (回收率%)
Bio-2H4-LHC	1B10-HAP	21	0.08	89
Bio-2H4	1B10-HAP	12	0.1	83
Bio-2G11-LHC	1B10-HAP	36	0.02	108
Bio-2G11	1B10-HAP	15	0.1	91

[0093] 结果表明,二价纳米抗体Bio-2G11-LHC与1B10-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他类型的纳米抗体组合。

[0001]		序列表
[0002]	<110>	深圳市国创纳米抗体技术有限公司
[0003]	<120>	一种抗PCT的纳米抗体2G11及其应用
[0004]	<160>	11
[0005]	<170>	PatentIn version 3.3
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	8
[0008]	<212>	PRT
[0009]	<213>	Lama pacos
[0010]	<400>	1
[0011]		Gly Ser Ile Phe Asn Ile Val Ala
[0012]	1	5
[0013]	<210>	2
[0014]	<211>	7
[0015]	<212>	PRT
[0016]	<213>	Lama pacos
[0017]	<400>	2
[0018]		Val Thr Ser Gly Gly Gly Ala
[0019]	1	5
[0020]	<210>	3
[0021]	<211>	8
[0022]	<212>	PRT
[0023]	<213>	Lama pacos
[0024]	<400>	3
[0025]		Asn Phe Leu Pro Asn Arg His Gly
[0026]	1	5
[0027]	<210>	4
[0028]	<211>	114
[0029]	<212>	PRT
[0030]	<213>	Lama pacos
[0031]	<400>	4
[0032]		Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0033]	1	5 10 15
[0034]		Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Ser Ile Phe Asn Ile Val
[0035]		20 25 30
[0036]		Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Val Val
[0037]		35 40 45
[0038]		Ala Val Val Thr Ser Gly Gly Gly Ala Ser Tyr Ala Glu Ser Val Lys

[0039]	50	55	60	
[0040]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu			
[0041]	65	70	75	80
[0042]	Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn			
[0043]		85	90	95
[0044]	Phe Leu Pro Asn Arg His Gly Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val			
[0045]		100	105	110
[0046]	Ser Ser			
[0047]	<210>	5		
[0048]	<211>	342		
[0049]	<212>	DNA		
[0050]	<213>	Lama pacos		
[0051]	<400>	5		
[0052]	caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc			60
[0053]	tcctgtacag cctctggaag catcttcaac atcgttgcca tgggctggta ccgccagget			120
[0054]	ccaggaagc agcgcgaggt ggtcgcagtt gttactagtg gtggtggggc aagctatgca			180
[0055]	gagtccgtga agggccgatt caccatttcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg			240
[0056]	caaatgaaca gcttgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaattt cttaccgaac			300
[0057]	cgacacgggt ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct ca			342
[0058]	<210>	6		
[0059]	<211>	115		
[0060]	<212>	PRT		
[0061]	<213>	Lama pacos		
[0062]	<400>	6		
[0063]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0064]	1	5	10	15
[0065]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Trp Tyr			
[0066]		20	25	30
[0067]	Pro Met Ile Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val			
[0068]		35	40	45
[0069]	Ala Arg Ile Ser Ser Ile Gly Gly Arg Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val			
[0070]	50	55	60	
[0071]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val Tyr			
[0072]	65	70	75	80
[0073]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0074]		85	90	95
[0075]	Asn Ile Ile Pro Glu Ser Gln Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr			
[0076]		100	105	110
[0077]	Val Ser Ser			



[0117]	accgaaagca aatgtccg	78
[0118]	<210> 10	
[0119]	<211> 420	
[0120]	<212> DNA	
[0121]	<213> Homo sapiens	
[0122]	<400> 10	
[0123]	caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc	60
[0124]	tcctgtacag cctctggaag catcttcaac atcgtttgcca tgggctggta ccgccaggct	120
[0125]	ccagggaagc agcgcgaggt ggtcgcagtt gttactagtg gtgggtggggc aagctatgca	180
[0126]	gagtccgtga agggccgatt caccatttcc agagacaacg ccaagaacac ggtgtatctg	240
[0127]	caaatgaaca gcttgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaattt cttaccgaac	300
[0128]	cgacacgggt ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct cagaaccgaa aacccccgaaa	360
[0129]	ccgcagccgc agcctcaacc gcaaccgcag ccgaatccga ccaccgaaag caaatgtccg	420
[0130]	<210> 11	
[0131]	<211> 615	
[0132]	<212> PRT	
[0133]	<213> Homo sapiens	
[0134]	<400> 11	
[0135]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0136]	1 5 10 15	
[0137]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Trp Tyr	
[0138]	20 25 30	
[0139]	Pro Met Ile Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Asn Glu Arg Glu Phe Val	
[0140]	35 40 45	
[0141]	Ala Arg Ile Ser Ser Ile Gly Gly Arg Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val	
[0142]	50 55 60	
[0143]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Val Tyr	
[0144]	65 70 75 80	
[0145]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0146]	85 90 95	
[0147]	Asn Ile Ile Pro Glu Ser Gln Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr	
[0148]	100 105 110	
[0149]	Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
[0150]	115 120 125	
[0151]	Gly Gly Ser Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn	
[0152]	130 135 140	
[0153]	Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala	
[0154]	145 150 155 160	
[0155]	Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly	



[0195]	Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly
[0196]	485 490 495
[0197]	Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys
[0198]	500 505 510
[0199]	Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro
[0200]	515 520 525
[0201]	Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu
[0202]	530 535 540
[0203]	Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu
[0204]	545 550 555 560
[0205]	Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln
[0206]	565 570 575
[0207]	Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val
[0208]	580 585 590
[0209]	Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala
[0210]	595 600 605
[0211]	Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp
[0212]	610 615

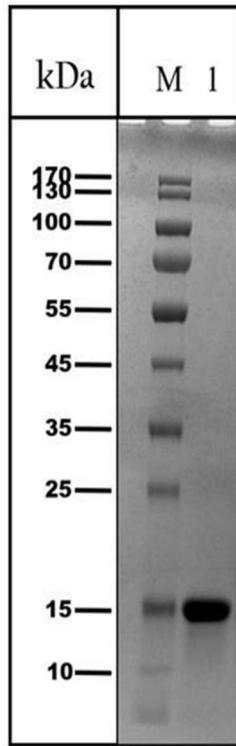


图1

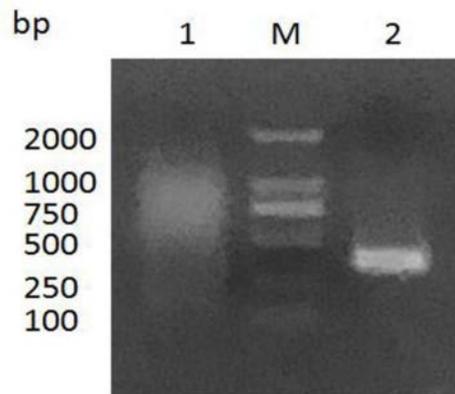


图2

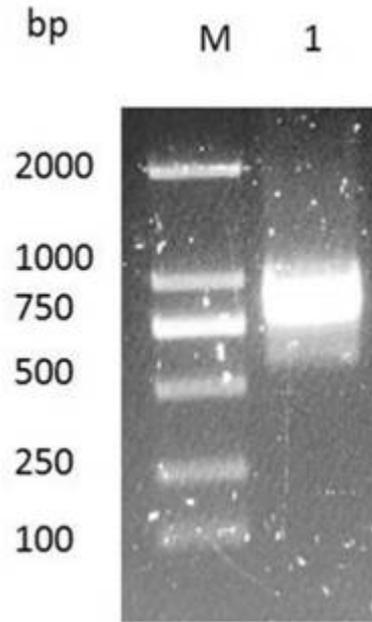


图3

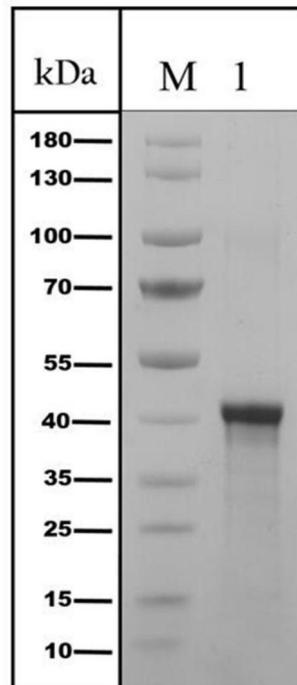


图4

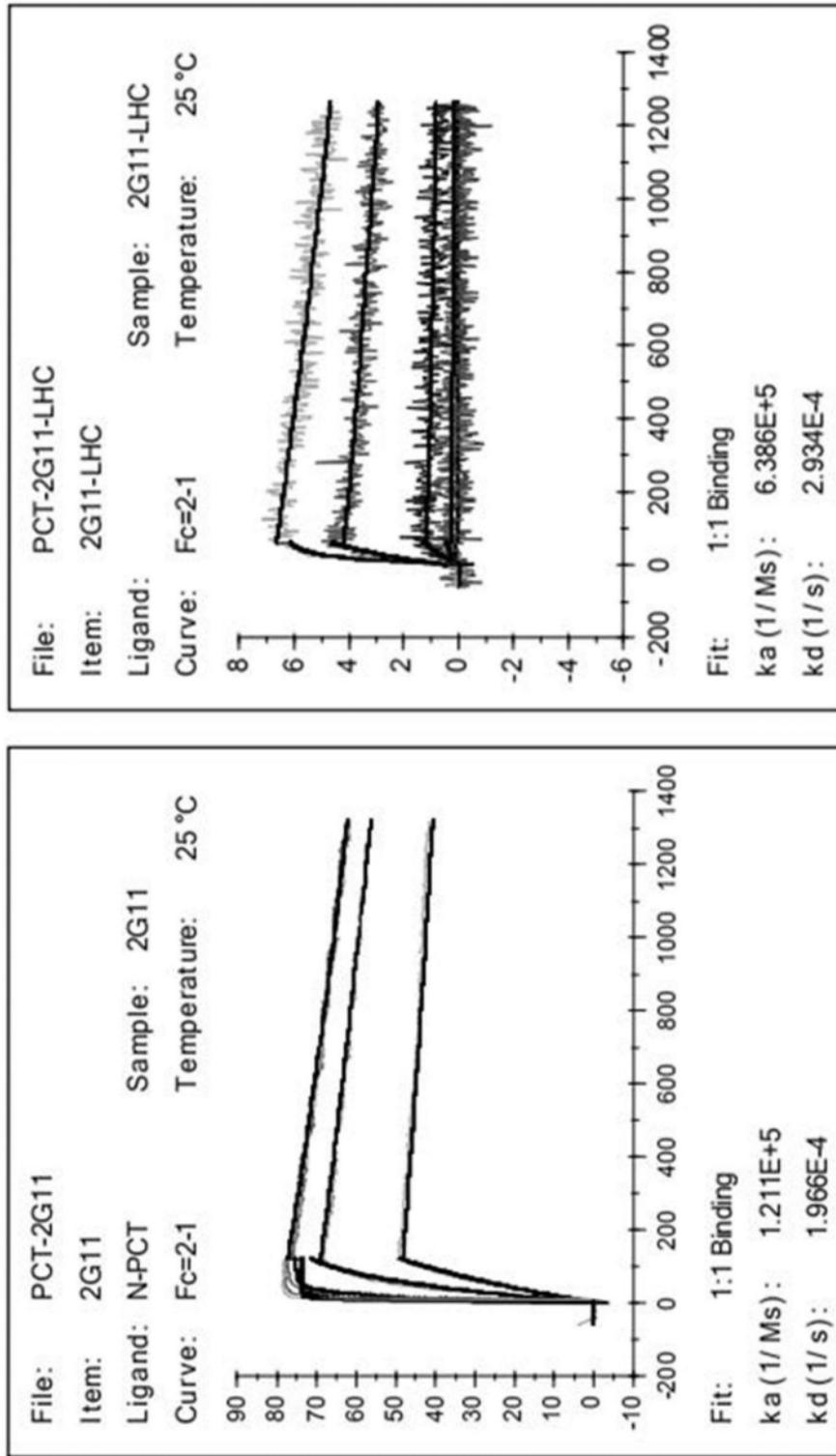


图5

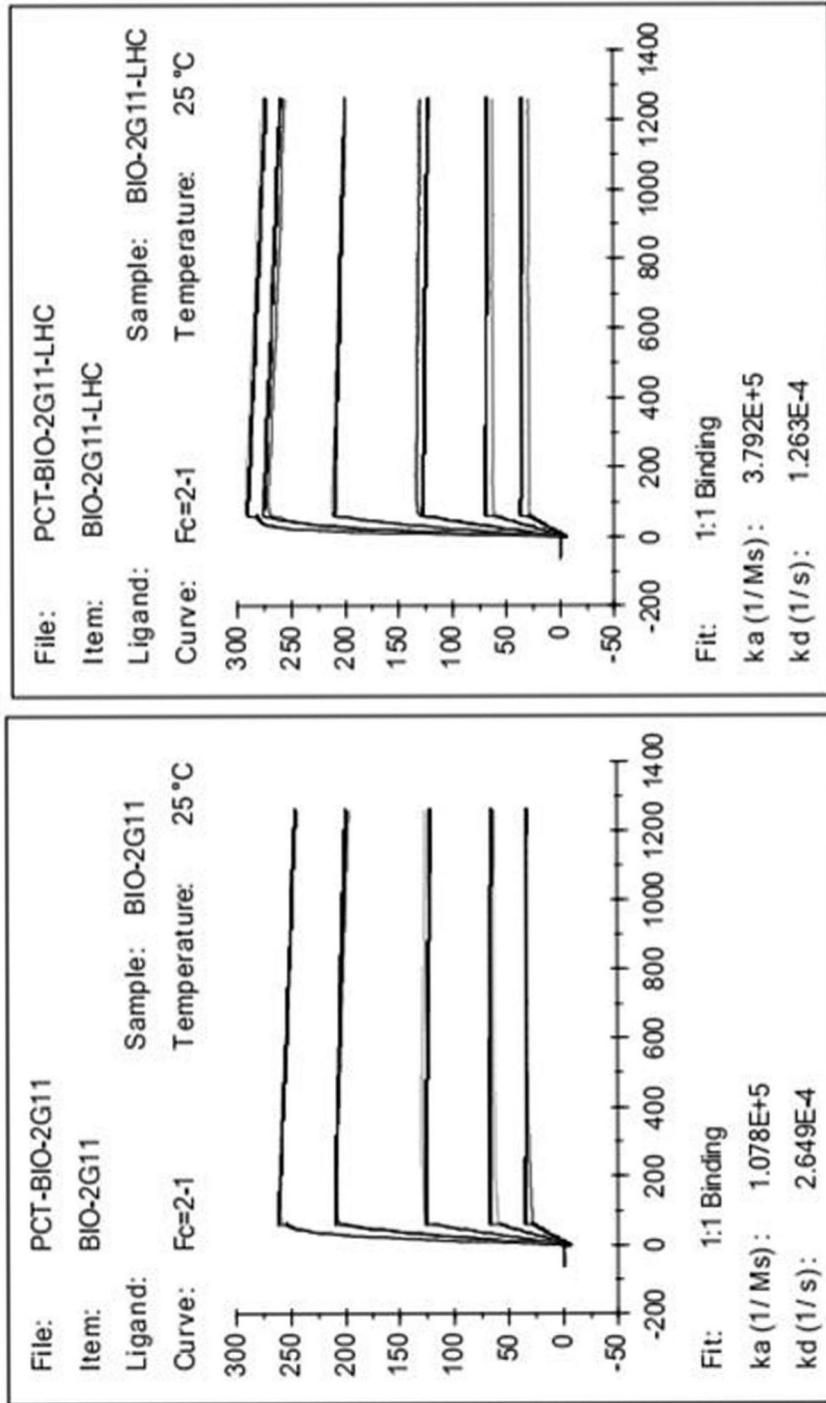


图6