



(21) 申请号 202110867218.7

(22) 申请日 2021.07.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113480658 A

(43) 申请公布日 2021.10.08

(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 16/38 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

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3页

(54) 发明名称

一种抗HE4的纳米抗体1D9及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抗HE4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 $1.193E-11$,而且能够在HE4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HE4的纳米抗体组合以及该抗体组合在制备HE4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HE4二价纳米抗体和作为检测抗体的抗HE4单价纳米抗体。

1. 抗HE4的纳米抗体在HE4免疫法检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述免疫法为双抗体夹心法,其中第一抗体为氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示的二价纳米抗体,第二抗体的可变区序列由SEQ ID NO.6所示。

一种抗HE4的纳米抗体1D9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] 卵巢上皮癌(Endometrioid Ovarian Cancer, EOC)是常见的女性生殖器官恶性肿瘤,在女性恶性肿瘤中其发病率位居第三,然而因其发现时大多处于晚期、预后差且复发率高,其死亡率却位居首位。人附睾蛋白(HE4)是一种新的卵巢癌特异性肿瘤标志物,属于乳清酸性蛋白家族(WAP),是由WFDC2基因编码的一种分泌型小分子糖蛋白。分子量为13kDa左右,其成熟后以25kDa糖基化形式存在,主要在卵巢上皮癌、子宫内膜癌中过量表达,并且其血清水平预测卵巢癌的灵敏度明显高于CA125,尤其是在早期,检测临界值可达150pmol/L。卢仁泉等(HE4在卵巢癌诊治中的临床应用评价,中国癌症杂志,2010年20卷9期)在早年间对EOC患者的研究中就发现HE4对EOC诊断的灵敏度为72.4%,特异度为90.1%,准确性83.6%,阳性和阴性符合率分别为80.8%和85.0%,可见HE4完全可满足EOC辅助诊断的要求。朱振宁等(HE4联合CA125在卵巢癌早期诊断中的应用价值,现代肿瘤医学,2014年22卷3期)比较研究了HE4和CA125用于卵巢癌早期诊断的差异,结果显示,在早期卵巢癌组中,HE4水平显著高于健康对照组及良性肿瘤组,具有统计学意义($P < 0.05$),CA125水平在早期卵巢癌组和良性肿瘤组中无显著差异。此前Moore等(Moore RG等, Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders, American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2012年206卷4期)也曾报道HE4是鉴别卵巢癌和良性肿瘤的最好指标。此外,朱振宁等(HE4联合CA125在卵巢癌早期诊断中的应用价值,现代肿瘤医学,2014年22卷3期)的研究中HE4的敏感性和特异性分别为85%和96%,而CA125相应仅为65%和76%,可见HE4指标的优越性。HE4不仅在卵巢癌的早期诊断具有巨大潜力,其在预后评价和疗效监测方面也有重要价值。2008年FDA批准将HE4用于EOC患者的疗效评估和复发监测。大量研究也证实了HE4在这方面的性能优势。有研究者将血清HE4水平成功用于卵巢癌病人的疗效预测,通过与CA72-4和CA125结合,可用于卵巢癌随访的复发监测。结合MDCT,HE4还可用于跟踪进展期卵巢癌患者的淋巴结转移状态。

[0003] 对癌症生物标志物的敏感检测在过去几十年里引起了巨大的研究兴趣,因为它在癌症的早期诊断和治疗预后中起着重要的作用。免疫分析由于特异性和稳定性的优势,广泛应用于癌症生物标志物的敏感检测,尤其,基于抗原抗体相互作用的免疫分析方法是检测肿瘤标志物的可靠工具,并用于基础研究和临床检测。在许多研究团体的研究共同努力下,目前已开发出了多种类型的免疫分析方法:包括电泳免疫分析法、酶联免疫吸附分析法、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法、比色法免疫分析法、质谱免疫分析法、表面拉曼增强光谱免疫分析。化学发光免疫分析法的灵敏度和精确度比酶联免疫吸附法、荧光法高几个数量级,且具有方法稳定快速、检测范围宽、操作简单自动化程度高等优点,可用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等相关物质的检测分析。

[0004] 基于HE4在临床诊断方面所表现出的突出特性,研发出针对HE4的特异性结合抗体

显得尤为重要。

[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(H₂)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, HCAbs),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15kDa,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。

[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。

[0008] 鉴于HE4分子量较小,常规抗体与之结合难以充分识别一些隐匿于裂隙或空腔里的抗原决定簇,如果抗体识别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。因此研发抗HE4的纳米抗体,充分发挥纳米抗体超强的抗原识别能力成为抗体技术领域的一种新的需求。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HE4的纳米抗体,即所述抗体既具有高度特异的抗原识别能力,具有高度的亲和力,并且具有独特的抗原决定簇识别位点,能够在HE4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

[0009] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一种抗HE4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。

[0010] 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例为纳米抗体1D9。

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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)。

[0014] 最后,本发明还提供了上述纳米抗体在HE4免疫法检测试剂盒中的应用。

[0015] 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。

[0016] 更为优选地,所述第一抗体为二价纳米抗体。

[0017] 尤为优选地,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。

[0018] 其次,本发明还提供了上述的纳米抗体组合在制备HE4抗原检测试剂盒中的应用。

[0019] 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。

[0020] 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磁珠。

[0021] 本发明提供的用于双抗体夹心法检测HE4的纳米抗体组合在HE4抗原检测中显示出高效的性能,其中作为捕获抗体的抗HE4二价纳米抗体1D9-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HE4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HE4二价纳米抗体1D9-LHC与抗HE4单价纳米抗体1G8-HAP的抗体组合具有很好的匹配度,在对HE4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HE4的检测。

附图说明

[0022] 图1. 纳米抗体1D9纯化SDS-PAGE图;

[0023] 图2. 二价纳米抗体1D9-LHC纯化SDS-PAGE图;

[0024] 图3. 1D9和1D9-LHC亲和力测试曲线图;

[0025] 图4. 生物素化1D9和1D9-LHC亲和力测试曲线图。

具体实施方式

[0026] 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,并不对本发明的保护范围构成任何限制。

[0027] 实施例1. 抗HE4单价纳米抗体的制备

[0028] 制备方法参照中国发明专利申请CN112979815A中的实施例1-2。所得单价纳米抗体1D9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51-58位氨基酸序列为CDR2,第59-96位氨基酸序列为FR3,第97-113位氨基酸序列为CDR3,第114-124位氨基酸序列为FR4。将表达纯化后的纳米抗体1D9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1D9)。

[0029] 实施例2. 抗HE4二价纳米抗体的制备

[0030] 2.1 1D9-LHC-pMES4载体构建

[0031] 在纳米抗体1D9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。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:

[0032] F1:AACTGCAGGAGTCTGGAGGAGG

[0033] R1:CGGCTGCGGTTGCGGTTGAGGCTGCGGCTGCGGTTTCGGGGTTTTCGGTTCTGAGGAGACGGTGA
CCTG

[0034] 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。以第一轮PCR回收产物为模板进行第二轮PCR,引物序列如下:

[0035] F1:AACTGCAGGAGTCTGGAGGAGG

[0036] R2:GGACTAGTGATGGTGATGGTGGTGCAGACATTTGCTTTTCGGTGGTTCGGATTCGGCTGCGGTTGCG
GTTG

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 2.2 1D9-LHC的诱导表达

[0040] 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个单克隆菌落于LB-A培养基中,37℃振荡培养过夜,送测序,正确核酸序列参考SEQ ID NO.10。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OD₆₀₀=0.8左右,加入终浓度为1mM IPTG,30℃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℃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。

[0041] 2.3 1D9-LHC的纯化和鉴定

[0042] 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2:M为彩虹180广谱蛋白;1-2为大肠杆菌诱导表达纯化后的纳米抗体即1D9-LHC)。所述二价纳米抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示。

[0043] 实施例3. 纳米抗体与抗原的亲合活性测定

[0044] 3.1芯片抗原偶联

[0045] 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 μ 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。

[0046] 3.2分析物浓度设置条件探索及再生条件优化

[0047] 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 μ l/分钟。进样条件均为120秒,30 μ l/分钟。再生条件均为30秒,30 μ 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 μ g/ml,150 μ g/ml,100 μ g/ml,50 μ g/ml,20 μ g/ml,10 μ g/ml,2 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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,则继续以更低的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。

[0048] 3.3亲和力测试

[0049] 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 μ l/分钟;解离时间:600秒;再生条件:30秒,30 μ 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 μ 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1D9、1D9-LHC与抗原结合解离的能力。

[0050] 3.4结果分析

[0051] 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3)。筛选的单价/二价纳米抗体亲和力均达到 10^{-11} 以上。

[0052] 表1:单价/二价纳米抗体亲和力数据

[0053]

样品编号	结合常数	解离常数	亲和力
1D9	2.276E+6	2.714E-5	1.193E-11
1D9-LHC	2.943E+6	2.032E-5	6.904E-12

[0054] 实施例4.抗HE4纳米抗体的ELISA叠加数据分析

[0055] 将纳米抗体1D9与中国发明专利申请CN112979814A中公开的纳米抗体3C8和中国发明专利申请CN112979815A中公开的纳米抗体1G8以及中国发明专利申请CN113045663A中公开的纳米抗体1A8进行ELISA抗原表位分析,分析方法参照中国发明专利申请CN112979815A中的实施例4,结果见表2。1D9与其他三株纳米抗体分别针对HE4抗原不同的抗原表位,这预示着在HE4的检测应用上,1D9与其他三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。

[0056] 表2:抗原抗体表位叠加实验结果

[0057]

	1st抗体	2nd抗体	1st抗体+2nd抗体	叠加率
1D9+3C8	0.286	0.635	0.944	102.44%
1D9+1G8	0.286	0.481	0.735	95.65%
1D9+1A8	0.286	0.573	0.972	111.63%

[0058] 实施例5.利用Biacore分析纳米抗体1D9结合位点

[0059] 将纳米抗体1D9与中国发明专利申请CN112979814A中公开的纳米抗体3C8和中国发明专利申请CN112979815A中公开的纳米抗体1G8以及中国发明专利申请CN113045663A中公开的纳米抗体1A8进行Biacore抗原表位分析,分析方法参照中国发明专利申请CN112979815A中的实施例5,结果见表3。1D9纳米抗体与其他三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,验证了抗HE4纳米抗体1D9在HE4检测领域的应用前景。

[0060] 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)	抗体 B	
[0061]	1G8	1D9	7.5	217.5	231.2	5.93%
	1A8	1D9	11.8	204.9	226.4	9.50%
	3C8	1D9	12.7	189.3	205.7	7.97%

[0062] 实施例6.生物素化抗HE4纳米抗体的制备

[0063] 将纳米抗体1D9与1D9-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的方法对生物素化单价/二价纳米抗体进行亲和力测试,数值见表4和图4。

[0064] 表4.生物素化单价/二价纳米抗体亲和力数据

[0065]

名称	亲和力数值
Bio-1D9	1.080E-11
Bio-1D9-LHC	8.251E-12

[0066] 实施例7.抗HE4纳米抗体在检测试剂盒中的应用

[0067] 参照中国发明专利申请CN112979815A的说明书公开内容,所述纳米抗体1G8的可变区序列如SEQ ID NO.6所示。该专利申请中的实施例5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的纳米抗体1G8-HAP,其氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示,经测试,1G8-HAP亲和力数值为2.945E-9。选取生物素化纳米抗体1D9(二价/单价)为捕获抗体,1G8-HAP为检测抗体,进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的HE4抗原,本方法使用的是磁珠化学发光法,具体过程如下:

[0068] 取生物素化纳米抗体(1μg/ml) 80μl/孔,HE4质控品(罗氏化学发光HE4诊断试剂盒质控品10ng/ml) 或者阴性血清30μl/孔,1G8-HAP(3μg/ml) 80μl/孔,三者混匀,置于96孔微孔板中,37℃温育15分钟;加入洗涤液,300μl/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)(0.3mg/ml) 80μl/孔,混匀,37℃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) 100μL/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。

[0069] 7.1P/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;

[0070] 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。

[0071] 7.3准确度(回收率)的检测:将浓度约为50ng/ml(允许偏差±10%)的抗原(HE4)液(A)加入到浓度范围在2ng/ml~5ng/ml的血清B中,所加入HE4与血清B之间的体积比例为1:9,根据公式(1)计算结果。

[0072]
$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

[0073] 式中:R---回收率;

[0074] V---加入A液体积;

[0075] V0---血清样品B的体积;

[0076] C---血清样品加入A液后的检测浓度;

[0077] C0---血清样品B的检测浓度;

[0078] CS---A液的浓度

[0079] 7.4参考中国发明专利CN112979814A,3C8作为捕获抗体,1G8-HAP或者1A8-HAP作为检测抗体进行配对检测血清中的HE4抗原,R²均大于0.99,取得了优异的检测效果。将以上两组抗体对利用上述方法同时进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的HE4抗原,结果见表5。

[0080] 表5. 3C8+1G8-HAP和3C8+1A8-HAP配对数据对比

[0081]

捕获抗体	检测抗体	线性指数(R ²)	灵敏度(ng/ml)	漏检数
3C8	1A8-HAP	0.9929	0.2	0
3C8	1G8-HAP	0.9948	0.15	0

[0082] 7.5本专利针对1D9和1G8-HAP这对抗体组合进行二价纳米抗体构建并生物素化,进行配对检测,并与3C8和1G8-HAP这对抗体组合进行对比。结果见表6。

[0083] 表6. 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%)
[0084]	Bio-3C8-LHC	1G8-HAP	19	0.11	96
	Bio-3C8	1G8-HAP	15	0.16	95
	Bio-1D9-LHC	1G8-HAP	22	0.08	98
[0085]	Bio-1D9	1G8-HAP	14	0.17	93

[0086] 结果表明,二价纳米抗体Bio-1D9-LHC与1G8-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HE4的纳米抗体1D9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 Pro Arg Phe Ser Ser Tyr Gly			
[0012]	1	5		
[0013]	<210>	2		
[0014]	<211>	8		
[0015]	<212>	PRT		
[0016]	<213>	Lama pacos		
[0017]	<400>	2		
[0018]	Ile Ser Met Ser Gly Thr Met Thr			
[0019]	1	5		
[0020]	<210>	3		
[0021]	<211>	17		
[0022]	<212>	PRT		
[0023]	<213>	Lama pacos		
[0024]	<400>	3		
[0025]	Ala Ala Gly Gly Arg Arg Gly Trp Gly Arg Ala Leu Phe Ala Tyr Asp			
[0026]	1	5		10 15
[0027]	Tyr			
[0028]	<210>	4		
[0029]	<211>	124		
[0030]	<212>	PRT		
[0031]	<213>	Lama pacos		
[0032]	<400>	4		
[0033]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0034]	1	5		10 15
[0035]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Arg Phe Ser Ser Tyr			
[0036]	20		25 30	
[0037]	Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val			
[0038]	35		40 45	

[0039]	Ala Ala Ile Ser Met Ser Gly Thr Met Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Val			
[0040]	50	60		
[0041]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr			
[0042]	65	75	80	
[0043]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Cys Cys			
[0044]	85	90	95	
[0045]	Ala Ala Gly Gly Arg Arg Gly Trp Gly Arg Ala Leu Phe Ala Tyr Asp			
[0046]	100	105	110	
[0047]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
[0048]	115	120		
[0049]	<210>	5		
[0050]	<211>	372		
[0051]	<212>	DNA		
[0052]	<213>	Lama pacos		
[0053]	<400>	5		
[0054]	caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttggtgcagc ctgggggggc tctgagactc	60		
[0055]	tcctgtgcag cctctggacc gcgcttcagt agttatggca tgggctgggt ccgccaggct	120		
[0056]	ccaggaaagg agcgtgagtt tgtagcagct attagcatga gtggtactat gacagactat	180		
[0057]	acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat	240		
[0058]	ctgcaaatga acagcctgaa acctgacgac acggccgttt attgctgtgc agccgggggt	300		
[0059]	cgccgggggt ggggtcgagc gctatttgcg tatgactact ggggccaggg gaccaggctc	360		
[0060]	accgtctcct ca	372		
[0061]	<210>	6		
[0062]	<211>	124		
[0063]	<212>	PRT		
[0064]	<213>	Lama pacos		
[0065]	<400>	6		
[0066]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Thr Gly Gly			
[0067]	1	5	10	15
[0068]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Leu Asp Arg Tyr			
[0069]	20	25	30	
[0070]	Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val			
[0071]	35	40	45	
[0072]	Ala Ala Ile Ser Met Ser Gly Thr Met Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Val			
[0073]	50	55	60	
[0074]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr			
[0075]	65	70	75	80
[0076]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Cys Cys			
[0077]	85	90	95	

[0078]	Ala Ala Gly Gly Arg Arg Gly Trp Gly Arg Ala Leu Phe Ala Tyr Asp
[0079]	100 105 110
[0080]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0081]	115 120
[0082]	<210> 7
[0083]	<211> 150
[0084]	<212> PRT
[0085]	<213> Homo sapiens
[0086]	<400> 7
[0087]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0088]	1 5 10 15
[0089]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Arg Phe Ser Ser Tyr
[0090]	20 25 30
[0091]	Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
[0092]	35 40 45
[0093]	Ala Ala Ile Ser Met Ser Gly Thr Met Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Val
[0094]	50 55 60
[0095]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
[0096]	65 70 75 80
[0097]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Cys Cys
[0098]	85 90 95
[0099]	Ala Ala Gly Gly Arg Arg Gly Trp Gly Arg Ala Leu Phe Ala Tyr Asp
[0100]	100 105 110
[0101]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr
[0102]	115 120 125
[0103]	Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Asn Pro Thr
[0104]	130 135 140
[0105]	Thr Glu Ser Lys Cys Pro
[0106]	145 150
[0107]	<210> 8
[0108]	<211> 26
[0109]	<212> PRT
[0110]	<213> Homo sapiens
[0111]	<400> 8
[0112]	Glu Pro Lys Thr Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Pro Asn Pro Thr Thr Glu Ser Lys Cys Pro
[0115]	20 25
[0116]	<210> 9

[0117]	<211>	78	
[0118]	<212>	DNA	
[0119]	<213>	Homo sapiens	
[0120]	<400>	9	
[0121]		gaaccgaaaa ccccgaaacc gcagccgcag cctcaaccgc aaccgcagcc gaatccgacc	60
[0122]		accgaaagca aatgtccg	78
[0123]	<210>	10	
[0124]	<211>	450	
[0125]	<212>	DNA	
[0126]	<213>	Homo sapiens	
[0127]	<400>	10	
[0128]		caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc ttgggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc	60
[0129]		tcctgtgcag cctctggacc gcgcttcagt agttatggca tgggctgggt ccgccagget	120
[0130]		ccaggaaagg agcgtgagtt tgtagcagct attagcatga gtggtactat gacagactat	180
[0131]		acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgggtgtat	240
[0132]		ctgcaaatga acagcctgaa acctgacgac acggccgttt attgctgtgc agccgggggt	300
[0133]		cgccgggggtt ggggtcgagc gctatctgagc tatgactact ggggcccaggg gaccaggtc	360
[0134]		accgtctcct cagaaccgaa aaccccgaaa ccgcagccgc agcctcaacc gcaaccgcag	420
[0135]		ccgaatccga ccaccgaaag caaatgtccg	450
[0136]	<210>	11	
[0137]	<211>	623	
[0138]	<212>	PRT	
[0139]	<213>	Homo sapiens	
[0140]	<400>	11	
[0141]		Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Thr Gly Gly	
[0142]		1 5 10 15	
[0143]		Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Leu Asp Arg Tyr	
[0144]		20 25 30	
[0145]		Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val	
[0146]		35 40 45	
[0147]		Ala Ala Ile Ser Met Ser Gly Thr Met Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Val	
[0148]		50 55 60	
[0149]		Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr	
[0150]		65 70 75 80	
[0151]		Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Cys Cys	
[0152]		85 90 95	
[0153]		Ala Ala Gly Gly Arg Arg Gly Trp Gly Arg Ala Leu Phe Ala Tyr Asp	
[0154]		100 105 110	
[0155]		Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly	

[0156]	115	120	125
[0157]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Ile Pro Val Glu		
[0158]	130	135	140
[0159]	Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly		
[0160]	145	150	155
[0161]	Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile		
[0162]	165	170	175
[0163]	Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg		
[0164]	180	185	190
[0165]	Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu		
[0166]	195	200	205
[0167]	Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val		
[0168]	210	215	220
[0169]	Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys		
[0170]	225	230	235
[0171]	Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg		
[0172]	245	250	255
[0173]	Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met		
[0174]	260	265	270
[0175]	Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr		
[0176]	275	280	285
[0177]	Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn		
[0178]	290	295	300
[0179]	Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu		
[0180]	305	310	315
[0181]	Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp		
[0182]	325	330	335
[0183]	Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro		
[0184]	340	345	350
[0185]	Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp		
[0186]	355	360	365
[0187]	Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg		
[0188]	370	375	380
[0189]	Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser		
[0190]	385	390	395
[0191]	Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu		
[0192]	405	410	415
[0193]	Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu		
[0194]	420	425	430

[0195]	Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe
[0196]	435 440 445
[0197]	Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr
[0198]	450 455 460
[0199]	Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala
[0200]	465 470 475 480
[0201]	Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp
[0202]	485 490 495
[0203]	His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser
[0204]	500 505 510
[0205]	Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr
[0206]	515 520 525
[0207]	Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala
[0208]	530 535 540
[0209]	Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln
[0210]	545 550 555 560
[0211]	Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val
[0212]	565 570 575
[0213]	Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln
[0214]	580 585 590
[0215]	Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu
[0216]	595 600 605
[0217]	Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp
[0218]	610 615 620

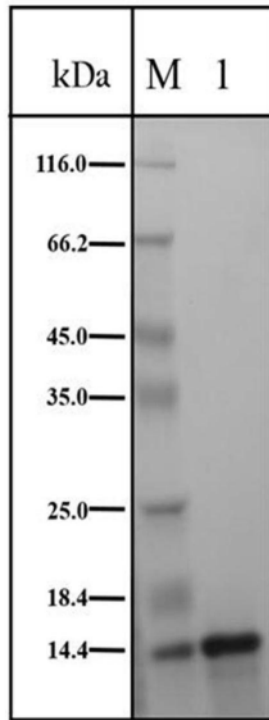


图1

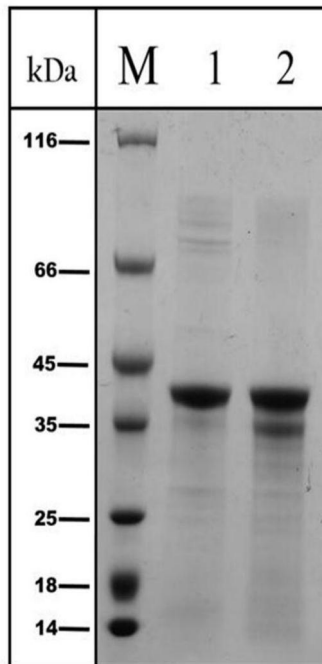


图2

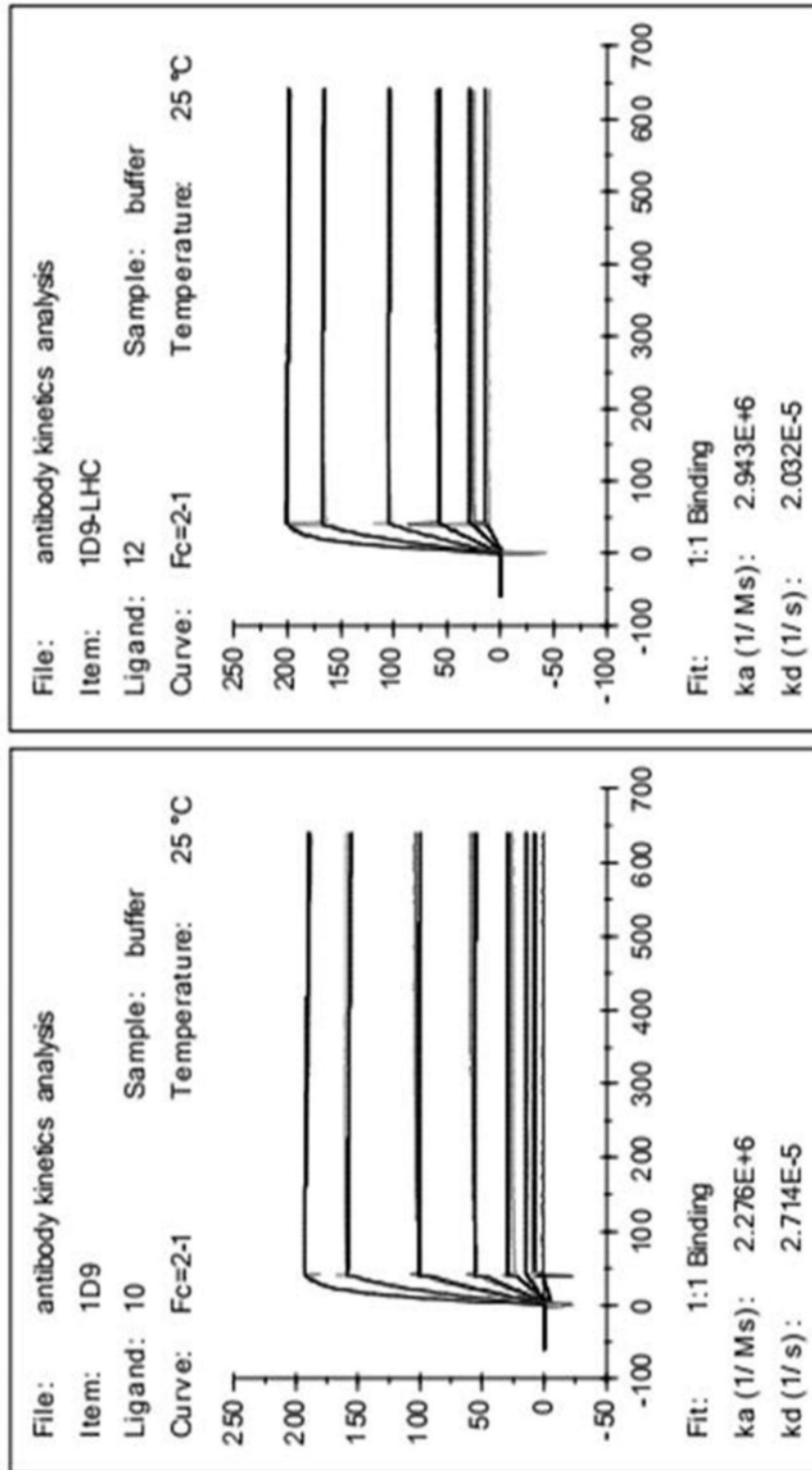


图3

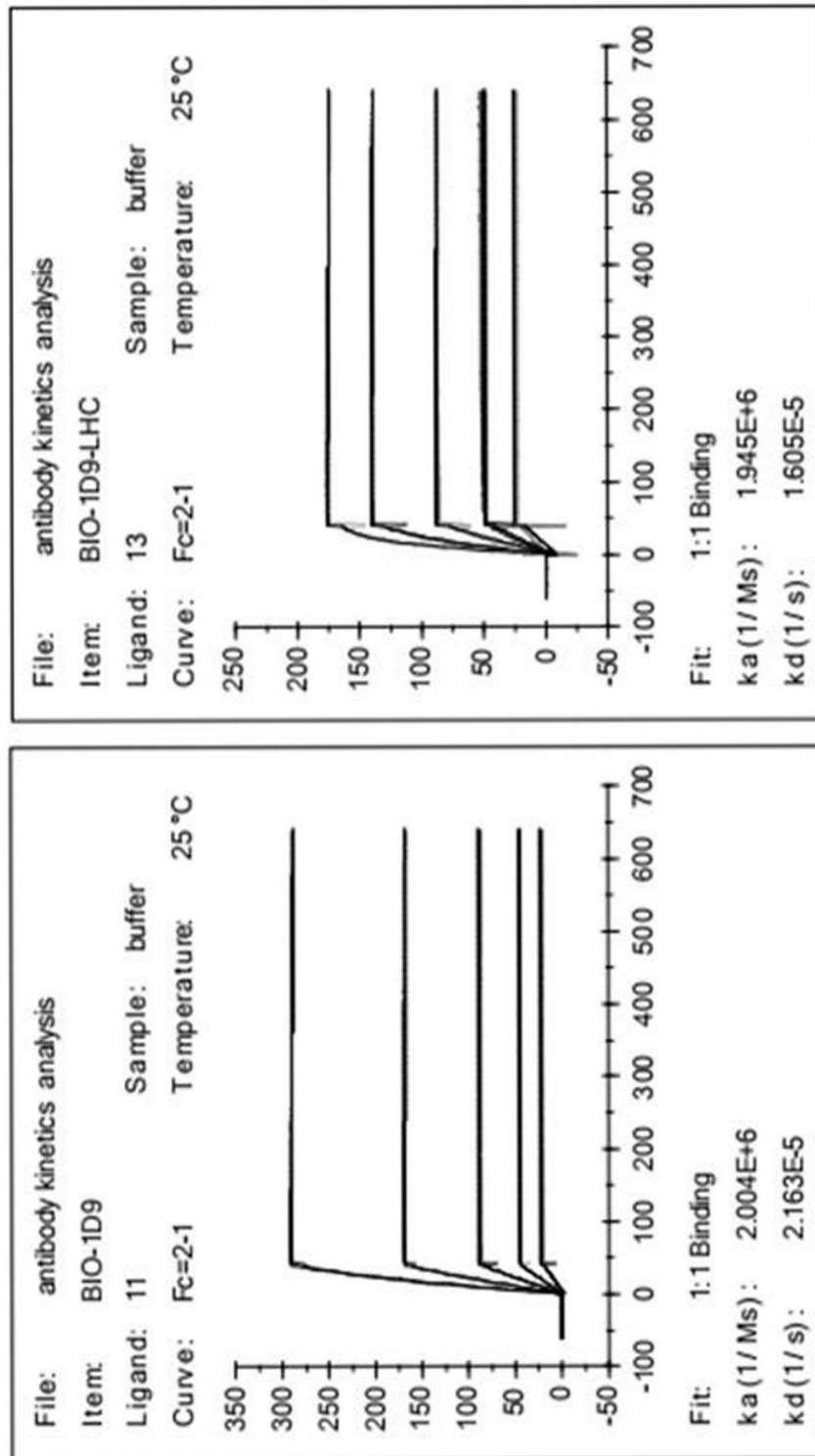


图4