



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110794135 A

(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201911051705.5

(22)申请日 2019.10.31

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司

地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工
业园繁华大道工投·立恒工业广场
B12C

(72)发明人 芮双印 符修乐

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限
公司 34148

代理人 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

权利要求书7页 说明书17页
序列表2页 附图2页

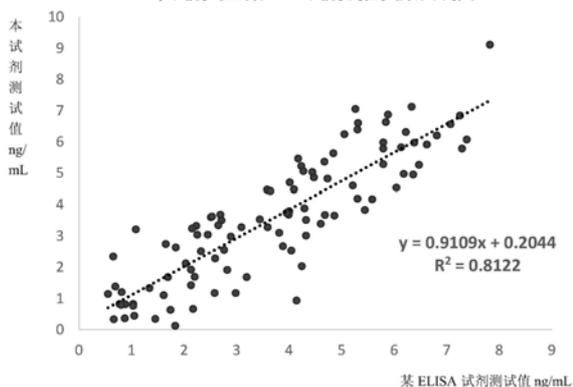
(54)发明名称

GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备
使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括R1和R2,R1:PBS、PEG6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA;R2:PBS、PEG6000、BSA、NaCl、偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球、TX-100、NaN₃、EDTA。本发明还公开了一种上述GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备与使用方法。本发明的优点在于:本发明可在全自动生化分析仪上使用,成本低廉,且自动化高、节省检测时间;并且,在高稳定性和高精密度情况下,相比他类产品,本发明具有更高的灵敏度和特异性,大大提升了GPBB检测的应用价值。

本试剂对比某ELISA试剂线性关系曲线图



1. 一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的R1和R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

R1:

PBS	50~150 mM/L
PEG6000	5~30 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	8~16 g/L
NaN ₃	0.3~1.0 g/L
EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水;

R2:

PBS	50~150 mM/L
PEG6000	5~30 g/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	8~16 g/L
偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	5~20%
TX-100	0.5~3.0%
NaN ₃	0.3~1.0 g/L
EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括的成分及相应含量为:

R1:

PBS	100 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	15 g/L
NaCl	9 g/L
NaN ₃	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水;

R2:

PBS	100 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	15 g/L
NaCl	9 g/L
偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	12%
TX-100	1.5%
NaN ₃	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,还包括GPBB校准品,包括的成分及相应含量为:

PBS	50~150 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	5~15 g/L
NaCl	4~16 g/L
rGPBB	1~100 mg/L
NaN ₃	0.3~1.0 g/L
EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水。

4. 根据权利要求3所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述GPBB校准品包括的成分及相应含量具体为:

PBS	100 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	10 g/L
NaCl	9 g/L
rGPBB	10 mg/L
NaN ₃	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

5. 根据权利要求3所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述GPBB校准品中rGPBB具体为重组人GPBB蛋白,获取方法具体如下:

①人GPBB基因的获取：

参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

②表达载体构建：

使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度99.99%,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为GS15/rGPBB工程菌;

③重组人GPBB的表达和纯化：

取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养,培养条件为28℃、250r/min,培养至OD600为2~6时,离心收集菌体;用BMMY培养基重悬菌体,至OD600为1,继续摇床发酵,并且,每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%;培养48h终止,于12000rpm/min转速下离心5min,取上清,即得目的蛋白rGPBB粗制品;

将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶,并于23℃水浴下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理,过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;将获得的rGPBB过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rGPBB峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄,0.15M NaCl,pH7.0;

使用GPBB抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带,即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白;此时,加入终浓度20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

6. 根据权利要求1-5任一所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人GPBB多克隆抗体偶联到聚苯乙烯胶乳微球上。

7. 根据权利要求6所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述山羊抗人GPBB多克隆抗体的制备方法为:

(1) 重组人GPBB蛋白的制备

①人GPBB基因的获取：

参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

②表达载体构建：

使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度

99.99%，鉴定为阳性，表示表达载体构建成功，记为GS15/rGPBB工程菌；

③重组人GPBB的表达和纯化：

取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养，培养条件为28℃、250r/min，培养至OD600为2~6时，离心收集菌体；用BMMY培养基重悬菌体，至OD600为1，继续摇床发酵，并且，每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%；培养48h终止，于12000rpm/min转速下离心5min，取上清，即得目的蛋白rGPBB粗制品；

将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶，并于23℃水浴下酶切过夜；酶切后，将粗制蛋白过滤处理，过GST亲和层析柱，并用第一Elution buffer梯度洗脱，收集rGPBB峰；过脱盐柱，用脱盐柱缓冲液置换，再分别用Loading buffer平衡好柱体，上样后用第二Elution buffer梯度洗脱，收集rGPBB峰；将获得的rGPBB过分子筛层析柱，用第三Elution buffer收集rGPBB峰；其中，所述第一Elution buffer的配方为：50mM Tris-Cl, 40mM还原性谷胱甘肽，pH 7.0；所述脱盐柱缓冲液的配方为：50mM Tris-Cl, pH 9.0；所述Loading buffer的配方为：50mM Tris-Cl, pH7.0；所述第二Elution buffer的配方为：50mM Tris-Cl, 1M NaCl, pH7.0；所述第三Elution buffer的配方为：50mM Na₂HPO₄, 0.15M NaCl, pH7.0；

使用GPBB抗体为第一抗体，使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB，当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带，即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白；此时，加入终浓度20%甘油无菌分装，于-80℃保存备用；

(2) 山羊抗人GPBB多克隆抗体的获得

①山羊的免疫：

选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊；取1mL 5mg/mL rGPBB，使用弗氏完全佐剂乳化，每只山羊于四蹄注射共2mL乳化rGPBB，进行第一次免疫；7日后，使用弗氏完全佐剂乳化的rGPBB进行第二次免疫，免疫方案如前；21日后，使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第三次免疫，免疫方案如前；42日后，使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第四次免疫，免疫方案如前；49日后，进行第五次免疫，采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rGPBB；55日，取耳缘静脉血，并使用琼脂双扩散法测抗体效价，测得效价1:32及以上，终止免疫；采用颈部静脉无菌放血法获得全血；

②多克隆抗体的纯化：

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h，再取上清获得粗制血清；将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min，再加入等体积的PBS混匀得混合液，并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵，4℃静置5h；于4℃、4200r/min条件下离心30min，上清弃去，将沉淀用200mL的PBS溶解，加入总体积量33%的饱和硫酸铵，4℃下静置3h后，再于4℃、4200r/min条件下离心30min；此时，上清弃去，并将沉淀用200mL的PBS溶解，加入总体积量33%的饱和硫酸铵，4℃下静置3h后，4℃、4200r/min离心30min；离心后的沉淀用200mL PBS溶解，并进一步装入10kD透析袋；最后，将其置于4℃环境下，采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐，即得山羊抗人GPBB多克隆抗体；

③多克隆抗体的验证：

使用上述制备的rGPBB为抗原，上述制备的山羊抗人GPBB多克隆抗体为第一抗体，使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB，在110kD处有阳性条带产生；因rGPBB已经商品化抗体验证，且无其他标签蛋白，使用多克隆抗体验证rGPBB同样出现阳性条带，表明山羊抗

人多克隆抗体制备成功。

8. 一种如权利要求1-7任一所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 重组人GPBB蛋白的制备

①人GPBB基因的获取:

参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

②表达载体构建:

使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度99.99%,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为GS15/rGPBB工程菌;

③重组人GPBB的表达和纯化:

取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养,培养条件为28℃、250r/min,培养至OD600为2~6时,离心收集菌体;用BMMY培养基重悬菌体,至OD600为1,继续摇床发酵,并且,每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%;培养48h终止,于12000rpm/min转速下离心5min,取上清,即得目的蛋白rGPBB粗制品;

将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶,并于23℃水浴下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理,过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;将获得的rGPBB过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rGPBB峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄,0.15M NaCl,pH7.0;

使用GPBB抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带,即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白;此时,加入终浓度20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

(2) 山羊抗人GPBB多克隆抗体的获得

①山羊的免疫:

选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊;取1mL 5mg/mL rGPBB,使用弗氏完全佐剂乳化,每只山羊于四蹄注射共2mL乳化rGPBB,进行第一次免疫;7日后,使用弗氏完全佐剂乳化的抗原进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rGPBB;55日,取耳缘静脉血,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人GPBB多克隆抗体;

③多克隆抗体的验证:

使用上述制备的rGPBB为抗原,上述制备的山羊抗人GPBB多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,110kD处有阳性条带产生;因rGPBB已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rGPBB同样出现阳性条带,表明山羊抗人多克隆抗体制备成功;

(3) 偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的制备

使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人GPBB多克隆抗体偶联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球;

(4) 糖原磷酸化酶同工酶BB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

①配制R1:

按照R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R1;

②配制R2:

按照R2的组分含量,将步骤(3)制得的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R2;

③配制GPBB校准品:

GPBB校准品包括的成分及相应含量如下:

PBS	50~150 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	5~15 g/L
NaCl	4~16 g/L
rGPBB	1~100 mg/L
NaN ₃	0.3~1.0 g/L
EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水;

按照试剂上述GPBB校准品的组分含量,将步骤(1)制得的rGPBB以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得GPBB校准品。

9. 一种如权利要求1-7任一所述的GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

- (1) 吸取20 μ L样本,加入240 μ LR1,37 $^{\circ}$ C孵育5min;
- (2) 再加入60 μ LR2进行混合,并使其充分反应;
- (3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;
- (4) 定标方法为6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、2、4、8、16、32ng/mL;依据定标值,根据 ΔA 测算样本中GPBB含量。

GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术及免疫学测定分析领域,具体涉及一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

背景技术

[0002] 糖原磷酸化酶(Glycogen phosphorylase,GP)是糖原分解代谢的关键酶。GP单体分子量约为94KD,常以同源二聚体形式存在。在人类组织中至少有三种类型的GP同工酶,根据其组织来源分别被命名为GPBB(脑型)、GPMM(肌型)和GPLL(肝型)。GPBB为胎儿时期的主要同工酶,成年后则主要在脑和心脏表达,两器官间表达量相近。GPBB作为糖原分解的关键酶,是心肌细胞中肌浆网结构(SR)中糖原分解复合物的特定成分,而这种复合物的结合和分解取决于心肌的氧及血液供给状态。正常条件下,糖原磷酸化酶复合物与SR牢固结合,不易分解。但当心肌细胞缺血、缺氧时,这种糖原分解的关键酶GPBB即可加速其分解过程。糖原降解过程可被磷酸化活性的GP(GPa)和非磷酸化活性的GP(GPb)以及AMP依赖形式所共同催化。缺血发生后,有利于结合型GPb向GPa转化,从而加速糖原分解过程,是使GP成为可溶性二聚体的先决条件。当心肌缺血缺氧时细胞膜通透性改变,GPBB可弥散入血,使血液中GPBB浓度增高。因而GPBB对缺血性心肌损伤具有高度敏感性,分析GPBB既可以对突发胸痛的患者在4小时内作出有无急性心肌梗塞(AMI)的鉴别诊断,也可对缺血性冠状动脉综合征进行鉴别诊断,在不稳定性胸痛伴有静息时ST-T波改变患者,血清GPBB是至今检测到唯一升高至病理浓度的检验指标。其对缺血性心肌损伤的诊断价值,特别是对AMI的早期诊断明显优于其它生化指标(CK,CK-MB,TnT等)。

[0003] 现有的GPBB的检测方法有近红外荧光法、胶体金法和ELISA法。其中,胶体金法的特异性和灵敏度均不高,不适用于临床使用;近红外荧光法需要光谱仪等特殊仪器,耗时较长,无法在医院推广使用;ELISA法耗时较长,不适用于急诊室和现场对AMI的快速诊查的需要。

[0004] 胶乳增强免疫比浊法是一种动态测定抗原抗体结合的检测方法:在特定的稀释系统中,抗原抗体发生结合,并且在结合比例合适时,会形成微粒从液相析出;在抗原和抗体结合的前后,会发生浊度的变化;通过全自动生化分析仪检测这种浊度变化,并利用标准品绘制线性曲线,可得出相应样品中待测物质的含量。该方法不需要特殊的仪器,操作上简单便捷。此外,胶乳增强免疫比浊法能够利用胶乳载体增强反应的吸光度,使检测的敏感性大大提高,通过全自动生化分析仪进行检测实现了检测的自动化,更加方便、快捷、节省时间,能够满足临床大样本检测的需求。

发明内容

[0005] 本发明的主要目的是提出一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法,旨在解决现有GPBB检测方法存在的特异性和灵敏度低、检测成本高以及耗时长的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明提出一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独

立的R1和R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

- [0007] R1:
- | | |
|---------|-------------|
| PBS | 50~150 mM/L |
| PEG6000 | 5~30 g/L |
| BSA | 5~20 g/L |
- [0008] NaCl 8~16 g/L
- NaN₃ 0.3~1.0 g/L
- EDTA 0.1~0.5 g/L
- 其溶剂为纯化水;
- [0009] R2:
- | | |
|---------|-------------|
| PBS | 50~150 mM/L |
| PEG6000 | 5~30 g/L |
| BSA | 5~20 g/L |
| NaCl | 8~16 g/L |
- [0010] 偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球 5~20%
- TX-100 0.5~3.0%
- NaN₃ 0.3~1.0 g/L
- EDTA 0.1~0.5 g/L
- 其溶剂为纯化水。
- [0011] 作为本发明的优选方式之一,包括的成分及相应含量为:
- [0012] R1:
- | | |
|---------|----------|
| PBS | 100 mM/L |
| PEG6000 | 20 g/L |
- [0013] BSA 15 g/L
- NaCl 9 g/L
- NaN₃ 0.65 g/L
- [0014] EDTA 0.3 g/L
- [0015] 其溶剂为纯化水;
- [0016] R2:

	PBS	100 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	15 g/L
	NaCl	9 g/L
[0017]	偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	12%
	TX-100	1.5%
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

[0018] 作为本发明的优选方式之一,还包括GPBB校准品,包括的成分及相应含量为:

	PBS	50~150 mM/L
	PEG6000	10~30 g/L
	BSA	5~15 g/L
	NaCl	4~16 g/L
[0019]	rGPBB	1~100 mg/L
	NaN ₃	0.3~1.0 g/L
	EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0020] 作为本发明的优选方式之一,所述GPBB校准品包括的成分及相应含量具体为:

	PBS	100 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	10 g/L
	NaCl	9 g/L
[0021]	rGPBB	10 mg/L
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

[0022] 作为本发明的优选方式之一,所述GPBB校准品中rGPBB具体为重组人GPBB蛋白,获取方法具体如下:

[0023] ①人GPBB基因的获取:

[0024] 参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所

示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0025] ②表达载体构建:

[0026] 使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转导入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度99.99%,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为GS15/rGPBB工程菌;

[0027] ③重组人GPBB的表达和纯化:

[0028] 取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养,培养条件为28℃、250r/min,培养至OD600为2~6时,离心收集菌体;用BMMY培养基重悬菌体,至OD600为1,继续摇床发酵,并且,每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%;培养48h终止,于12000rpm/min转速下离心5min,取上清,即得目的蛋白rGPBB粗制品;

[0029] 将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶,并于23℃水浴下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理,过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;将获得的rGPBB过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rGPBB峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄,0.15M NaCl,pH7.0;

[0030] 使用GPBB抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带,即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白;此时,加入终浓度20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

[0031] 作为本发明的优选方式之一,所述偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人GPBB多克隆抗体偶联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0032] 作为本发明的优选方式之一,所述山羊抗人GPBB多克隆抗体的制备方法为:

[0033] (1) 重组人GPBB蛋白的制备

[0034] ①人GPBB基因的获取:

[0035] 参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0036] ②表达载体构建:

[0037] 使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转导入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度99.99%,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为GS15/rGPBB工程菌;

[0038] ③重组人GPBB的表达和纯化:

[0039] 取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养,培养条件为28℃、250r/min,培养至OD600为2~6时,离心收集菌体;用BMMY培养基重悬菌体,至OD600为1,继续摇床发酵,并

且,每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%;培养48h终止,于12000rpm/min转速下离心5min,取上清,即得目的蛋白rGPBB粗制品;

[0040] 将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶,并于23℃水浴下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理,过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;将获得的rGPBB过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rGPBB峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄,0.15M NaCl,pH7.0;

[0041] 使用GPBB抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带,即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白;此时,加入终浓度20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

[0042] (2) 山羊抗人GPBB多克隆抗体的获得

[0043] ①山羊的免疫:

[0044] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊;取1mL 5mg/mL rGPBB,使用弗氏完全佐剂乳化,每只山羊于四蹄注射共2mL乳化rGPBB,进行第一次免疫;7日后,使用弗氏完全佐剂乳化的rGPBB进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rGPBB;55日,取耳缘静脉血,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0045] ②多克隆抗体的纯化:

[0046] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人GPBB多克隆抗体;

[0047] ③多克隆抗体的验证:

[0048] 使用上述制备的rGPBB为抗原,上述制备的山羊抗人GPBB多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在110kD处有阳性条带产生;因rGPBB已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rGPBB同样出现阳性条带,表明山羊抗人多克隆抗体制备成功。

[0049] 一种上述GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0050] (1) 重组人GPBB蛋白的制备

[0051] ①人GPBB基因的获取:

[0052] 参考GENBANK登录号NM_002862.4,上游添加酶切位点SnaB I,并添加柔性linker以保护目的片段的空间结构,下游添加酶切位点Not I和保护碱基,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0053] ②表达载体构建:

[0054] 使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并电转导入毕赤酵母感受态细胞中,涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上,28℃恒温培养36h,挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因,符合度99.99%,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为GS15/rGPBB工程菌;

[0055] ③重组人GPBB的表达和纯化:

[0056] 取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养,培养条件为28℃、250r/min,培养至OD₆₀₀为2~6时,离心收集菌体;用BMMY培养基重悬菌体,至OD₆₀₀为1,继续摇床发酵,并且,每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%;培养48h终止,于12000rpm/min转速下离心5min,取上清,即得目的蛋白rGPBB粗制品;

[0057] 将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶,并于23℃水浴下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理,过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rGPBB峰;将获得的rGPBB过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rGPBB峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na₂HPO₄,0.15M NaCl,pH7.0;

[0058] 使用GPBB抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带,即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白;此时,加入终浓度20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

[0059] (2) 山羊抗人GPBB多克隆抗体的获得

[0060] ①山羊的免疫:

[0061] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊;取1mL 5mg/mL rGPBB,使用弗氏完全佐剂乳化,每只山羊于四蹄注射共2mL乳化rGPBB,进行第一次免疫;7日后,使用弗氏完全佐剂乳化的rGPBB进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后,使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后,进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rGPBB;55日,取耳缘静脉血,并使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0062] ②多克隆抗体的纯化:

[0063] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积

量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人GPBB多克隆抗体;

[0064] ③多克隆抗体的验证:

[0065] 使用上述制备的rGPBB为抗原,上述制备的山羊抗人GPBB多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在110kD处有阳性条带产生;因rGPBB已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rGPBB同样出现阳性条带,表明山羊抗人多克隆抗体制备成功;

[0066] (3) 偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0067] 使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人GPBB多克隆抗体偶联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球;

[0068] (4) 糖原磷酸化酶同工酶BB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

[0069] ①配制R1:

[0070] 按照R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R1;

[0071] ②配制R2:

[0072] 按照R2的组分含量,将步骤(3)制得的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R2;

[0073] ③配制GPBB校准品:

[0074] GPBB校准品包括的成分及相应含量如下:

	PBS	50~150 mM/L
	PEG6000	10~30 g/L
	BSA	5~15 g/L
	NaCl	4~16 g/L
[0075]	rGPBB	1~100 mg/L
	NaN ₃	0.3~1.0 g/L
	EDTA	0.1~0.5 g/L

其溶剂为纯化水;

[0076] 按照试剂上述GPBB校准品的组分含量,将步骤(1)制得的rGPBB以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得GPBB校准品。

[0077] 一种上述GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,包括如下具体步骤:

[0078] (1) 吸取20μL样本,加入240μLR1,37℃孵育5min;

[0079] (2) 再加入60μLR2进行混合,并使其充分反应;

[0080] (3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算ΔA;

[0081] (4) 定标方法为6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、2、4、8、16、32ng/mL;依据定标值,根据ΔA测算样本中GPBB含量。

[0082] 本发明试剂盒由R1和R2构成,所述R1由缓冲液(PBS)、表面活性剂(PEG6000)、稳定

剂 (BSA、NaCl、EDTA) 及防腐剂 (NaN₃) 构成, 所述R2由缓冲液 (PBS)、表面活性剂 (PEG6000、TX-100)、稳定剂 (BSA、NaCl、EDTA)、防腐剂 (NaN₃) 及偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球构成。

[0083] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0084] (1) 相比ELISA法, 本发明试剂利用胶乳增强免疫透射比浊法测定糖原磷酸化酶同工酶BB, 检测信号倍数放大提高了检测灵敏度; 并且, 可用于全自动生化分析仪, 相对于全自动ELISA仪器更加省时, 且一次检测样本量较ELISA方法更加灵活;

[0085] (2) 相比近红外荧光法, 本发明试剂用于全自动生化分析仪, 不需要额外的仪器设备, 成本低廉且自动化高节省检测时间, 操作简单便捷;

[0086] (3) 相比胶体金法, 本发明试剂可做到定量检测, 较定性检测更具有临床检测价值, 具有更高的特异性和灵敏度, 提升了糖原磷酸化酶同工酶BB检测的临床应用价值。

附图说明

[0087] 图1是实施例4中rGPBB蛋白的Western Blot鉴定结果图 (图中, 泳道M: 蛋白Marker 26616; 泳道1: abcam公司GPBB抗体 (ab251810) 对照; 泳道2: 重组人GPBB纯化后样本);

[0088] 图2是实施例4中山羊抗人GPBB多克隆抗体的Western Blot鉴定结果图 (图中, 泳道M: 蛋白Marker 26616; 泳道1: 多克隆抗体纯化后样本);

[0089] 图3是实施例6中本发明试剂盒与商品化GPBB检测试剂盒线性关系曲线图;

[0090] 图4是实施例6中本发明试剂盒线性范围线性回归图。

具体实施方式

[0091] 下面对本发明的实施例作详细说明, 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和具体的操作过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0092] 实施例1

[0093] 本实施例的一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒, 包括彼此独立的R1和R2双液体组分, 包括的成分及相应含量为:

[0094] R1:

PBS 100 mM/L

PEG6000 20 g/L

BSA 15 g/L

[0095] NaCl 9 g/L

NaN₃ 0.65 g/L

EDTA 0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

[0096] R2:

	PBS	100 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	15 g/L
	NaCl	9 g/L
[0097]	偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	12%
	TX-100	1.5%
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

[0098] 此外,还包括GPBB校准品,包括的成分及相应含量为:

	PBS	100 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	10 g/L
	NaCl	9 g/L
[0099]	rGPBB	10 mg/L
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

[0100] 进一步地,GPBB校准品中rGPBB具体为重组人GPBB蛋白(制备方法见实施例4)。

[0101] 进一步地,R2中偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人GPBB多克隆抗体(制备方法见实施例4)偶联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0102] 实施例2

[0103] 本实施例的一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的R1和R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0104] R1:

	PBS	50 mM/L
	PEG6000	5 g/L
	BSA	5 g/L
[0105]	NaCl	8 g/L
	NaN ₃	0.3 g/L
	EDTA	0.1 g/L
	其溶剂为纯化水；	
[0106]	R2:	
	PBS	50 mM/L
	PEG6000	5 g/L
	BSA	5 g/L
	NaCl	8 g/L
[0107]	偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	5%
	TX-100	0.5%
	NaN ₃	0.3 g/L
	EDTA	0.1 g/L
	其溶剂为纯化水。	
[0108]	此外,还包括GPBB校准品,包括的成分及相应含量为:	
	PBS	50 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	5 g/L
	NaCl	4 g/L
[0109]	rGPBB	1 mg/L
	NaN ₃	0.3 g/L
	EDTA	0.1 g/L
	其溶剂为纯化水。	

[0110] 进一步地,GPBB校准品中rGPBB具体为重组人GPBB蛋白(制备方法见实施例4)。

[0111] 进一步地,R2中偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人GPBB多克隆抗体(制备方法见实施例4)偶联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0112] 实施例3

[0113] 本实施例的一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的R1和R2双液体

组分,包括的成分及相应含量为:

[0114]	R1:	
	PBS	150 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	20 g/L
[0115]	NaCl	16 g/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	0.5 g/L

其溶剂为纯化水;

[0116]	R2:	
	PBS	150 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	20 g/L
	NaCl	16 g/L
[0117]	偶联山羊抗人 GPBB 多克隆抗体的胶乳微球	20%
	TX-100	3.0%
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	0.5 g/L

其溶剂为纯化水。

[0118] 此外,还包括GPBB校准品,包括的成分及相应含量为:

	PBS	150 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	15 g/L
[0119]	NaCl	16 g/L
	rGPBB	100 mg/L
	NaN ₃	1.0 g/L
	EDTA	0.5 g/L

[0120] 其溶剂为纯化水。

[0121] 进一步地,GPBB校准品中rGPBB具体为重组人GPBB蛋白(制备方法见实施例4)。

[0122] 进一步地,R2中偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人GPBB多克隆抗体(制备方法见实施例4)偶联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0123] 实施例4

[0124] 本实施例的一种上述实施例1-3中GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

[0125] (1) 重组人GPBB蛋白的制备

[0126] ①人GPBB基因的获取：

[0127] 参考GENBANK登录号NM_002862.4，上游添加酶切位点SnaB I，并添加柔性linker以保护目的片段的结构，下游添加酶切位点Not I和保护碱基，获得如SEQ ID NO.1所示基因序列；得到基因序列后，送华大基因公司合成，测序合格，获得目标基因序列；

[0128] ②表达载体构建：

[0129] 使用SnaB I和Not I两种内切酶对合成的基因及pPIC9K质粒进行双酶切，将双酶切产物使用连接酶连接，并电转入毕赤酵母感受态细胞中，涂布于含100mg/L Zeocin的YPD平板上，28℃恒温培养36h，挑取抗性平板上生长的菌落送往基因测序鉴定目的基因，符合度99.99%，鉴定为阳性，表示表达载体构建成功，记为GS15/rGPBB工程菌；

[0130] ③重组人GPBB的表达和纯化：

[0131] 取经测序GPBB阳性菌于BMGY培养基中摇床培养，培养条件为28℃、250r/min，培养至OD600为2~6时，离心收集菌体；用BMMY培养基重悬菌体，至OD600为1，继续摇床发酵，并且，每24h向培养基中添加无水甲醇至终浓度为1%；培养48h终止，于12000rpm/min转速下离心5min，取上清，即得目的蛋白rGPBB粗制品；

[0132] 将上述目的蛋白rGPBB粗制品加入肠激酶，并于23℃水浴下酶切过夜；酶切后，将粗制蛋白过滤处理，过GST亲和层析柱，并用第一Elution buffer梯度洗脱，收集rGPBB峰；过脱盐柱，用脱盐柱缓冲液置换，再分别用Loading buffer平衡好柱体，上样后用第二Elution buffer梯度洗脱，收集rGPBB峰；将获得的rGPBB过分子筛层析柱，用第三Elution buffer收集rGPBB峰；其中，所述第一Elution buffer的配方为：50mM Tris-Cl，40mM还原性谷胱甘肽，pH 7.0；所述脱盐柱缓冲液的配方为：50mM Tris-Cl，pH 9.0；所述Loading buffer的配方为：50mM Tris-Cl，pH7.0；所述第二Elution buffer的配方为：50mM Tris-Cl，1M NaCl，pH7.0；所述第三Elution buffer的配方为：50mM Na₂HPO₄，0.15M NaCl，pH7.0；

[0133] 使用abcam公司GPBB抗体(ab251810)为第一抗体，使用abcam公司山羊抗兔IgG(HRP标记)为第二抗体做WB，当收集的上述rGPBB蛋白样本在110kD处有阳性条带(见图1)，即表明纯化后所得rGPBB为目标所需的重组人GPBB蛋白；此时，加入终浓度20%甘油无菌分装，于-80℃保存备用。

[0134] (2) 山羊抗人GPBB多克隆抗体的获得

[0135] ①山羊的免疫：

[0136] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊；取1mL 5mg/mL rGPBB，使用弗氏完全佐剂乳化，每只山羊于四蹄注射共2mL乳化rGPBB，进行第一次免疫；7日后，使用弗氏完全佐剂乳化的rGPBB进行第二次免疫，免疫方案如前；21日后，使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第三次免疫，免疫方案如前；42日后，使用弗氏不完全佐剂乳化的rGPBB进行第四次免疫，免疫方案如前；49日后，进行第五次免疫，采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rGPBB；55日，取耳缘静脉血，并使用琼脂双扩散法测抗体效价，测得效价1:32及以上，终止免疫；采用颈部静脉无菌放血法获得全血；

[0137] ②多克隆抗体的纯化:

[0138] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,上清弃去,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀用200mL PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人GPBB多克隆抗体;

[0139] ③多克隆抗体的验证:

[0140] 使用上述制备的rGPBB为抗原,上述制备的山羊抗人GPBB多克隆抗体为第一抗体,使用abcam公司驴抗山羊IgG (HRP标记,ab6885)为第二抗体做WB,抗原在110kD处有阳性条带产生(见图2);因rGPBB已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rGPBB同样出现阳性条带,表明山羊抗人多克隆抗体制备成功;

[0141] (3) 偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0142] 使用直径为30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人GPBB多克隆抗体偶联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球;

[0143] (4) 糖原磷酸化酶同工酶BB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

[0144] ①配制R1:

[0145] 按照R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R1;

[0146] ②配制R2:

[0147] 按照R2的组分含量,将步骤(3)制得的偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得R2;

[0148] ③配制GPBB校准品:

[0149] 按照试剂上述GPBB校准品的组分含量,将步骤(1)制得的rGPBB以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得GPBB校准品。

[0150] 实施例5

[0151] 本实施例的一种上述实施例1-3中GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的测定方法:

[0152] 分析方法:两点终点法;

[0153] 反应方向:上升反应;

[0154] 校准方式:Logit-Log (5P);

[0155] 测定波长:600nm;

[0156] 测定温度:37℃;

[0157] 样本:R1:R2=20:240:60(μL);

[0158] 测试步骤:吸取20μL样本,加入240μLR1,37℃孵育5min,加入60μLR2,1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算ΔA。

[0159] 定标方法:6点定标,采用贝克曼AU680全自动生化分析仪(或其他品牌型号),进行检测,设置校准品浓度分别为:0、2、4、8、16、32ng/mL。

[0160] 依据定标值根据 ΔA 测算样本中 GPBB 含量。

[0161] 实施例6

[0162] 本实施例用以评价上述实施例中 GPBB 胶乳增强比浊法检测试剂盒：

[0163] (1) 线性相关性验证

[0164] 利用实施例1配方配制试剂，与国家食品药品监督管理局认可的某上市公司的 GPBB ELISA 检测试剂盒进行对照检测，检测100份临床血清样本，检测结果如下表1，获得了本发明试剂盒与上市某公司在售 GPBB ELISA 检测试剂的相关性曲线（见图3），通过检测结果显示，两试剂盒的线性相关曲线为 $y = 0.9109x + 0.2044$ ，相关系数 $R^2 = 0.8122$ ，说明两者有较大的相关性。

[0165] 表1本发明试剂盒与某上市公司在售 GPBB 检测试剂盒线性相关性对比值

[0166]

序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值
1	0.87	0.37	35	6.81	6.21	69	4.17	5.47
2	6.33	7.13	36	0.65	2.35	70	5.84	6.64
3	4.73	4.83	37	4.01	4.71	71	4.47	4.87
4	1.69	1.69	38	2.13	1.93	72	5.3	6.4
5	1.05	0.45	39	6.38	5.98	73	1.74	0.64
6	0.81	1.21	40	7.25	6.85	74	4.44	5.04
7	2.69	3.69	41	1.03	0.77	75	2.17	0.67
8	2.23	3.33	42	4.86	3.66	76	6.47	5.27
9	4.14	0.94	43	2.98	1.18	77	2.58	1.18
10	1.61	1.11	44	5.26	7.06	78	3.64	4.44
11	0.88	0.82	45	7.29	5.79	79	2.2	1.7
12	2.82	1.92	46	0.8	0.8	80	2.53	3.63
13	4.29	3.89	47	2.71	3.51	81	3.81	3.11
14	1.65	2.75	48	2.51	3.61	82	6.04	4.54
15	5.3	4.2	49	2.59	2.29	83	5.79	5.29
16	0.66	0.34	50	7.38	6.08	84	3.99	3.69
17	6.36	4.96	51	0.55	1.15	85	6.13	5.83
18	3.58	4.48	52	5.21	4.61	86	4.09	4.49
19	4.68	3.68	53	3.09	3.29	87	2.32	2.52
20	4.23	5.23	54	6.22	6.32	88	2.45	3.05
21	0.69	1.39	55	6.62	5.92	89	3.95	3.75
22	4.32	3.52	56	5.31	6.61	90	5.88	6.88
23	1.45	0.35	57	5.05	6.25	91	4.32	3.02
24	2.13	1.43	58	1.84	2.64	92	2.76	2.56
25	5.79	5.79	59	5.44	3.84	93	3.59	3.29
26	1.03	0.83	60	7.07	6.57	94	3.88	2.68
27	4.27	5.07	61	4.67	5.37	95	1.08	3.22
28	2.03	2.13	62	3.19	1.69	96	1.83	0.13

[0167]

29	5.58	4.18	63	2.25	3.05	97	3.44	3.54
30	7.82	9.12	64	5.79	5.99	98	2.65	3.35
31	0.77	0.83	65	4.24	2.04	99	6.18	4.98
32	4.04	2.54	66	4	3.8	100	2.89	2.99
33	4.6	3.4	67	2.15	3.25			
34	4.84	5.64	68	1.34	1.34			

[0168] (2) 线性范围验证

[0169] 使用重组GPBB纯化品和生理盐水配制成浓度100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL和0ng/mL(生理盐水对照)的测试品,使用本发明试剂盒测定各测试品浓度,以稀释浓度为自变量,以测定结果为因变量求出线性回归方程,计算测定结果的相对偏差,计算结果如表2所示。结果显示,测定结果与稀释浓度之间的线性回归方程为 $y=0.9971x+0.1254$,见图4。相关系数 $R^2=0.9998$,说明线性关系良好,线性范围可达100ng/mL。

[0170] 表2本发明试剂线性范围验证

[0171]

序号	稀释浓度	测试值 1	测试值 2	测试值 3	平均数	绝对偏差	相对偏差
1	100	98.22	102.12	97.94	99.43		-0.57%
2	50	51.18	52.47	48.77	50.81		1.61%
3	25	25.23	24.89	25.7	25.27		1.09%
4	12.5	11.31	12.54	12.72	12.19	-0.31	
5	6.25	5.99	6.43	6.31	6.24	-0.01	
6	0	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	

[0172] (3) 准确度验证

[0173] 取具有溯源性高值血清质控和低值血清质控各一份,使用所述试剂盒检测6次,取均值,与质控靶值进行比对。结果表明检测值较靶值相对偏差较小,准确度较高,见表3。

[0174] 表3所述试剂盒准确度验证结果

[0175]

测定值 1	测定值 2	测定值 3	测定值 4	测定值 5	测定值 6	测定均值	血清靶值	相对偏差
5.51	5.58	6.10	5.93	5.60	6.14	5.81	6.00	-3.17%

[0176]

1.07	1.04	1.30	1.18	0.88	0.88	1.06	1.00	5.83%
------	------	------	------	------	------	------	------	-------

[0177] (4) 精密度验证

[0178] 取经在售试剂盒检测的临床血清样本高值和低值各一份,使用所述试剂盒对同一份血清样本连续检测10次,计算所述试剂盒的变异系数。精密度检测数据如下表4,检测结果表明所述试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小分别为3.36%和4.70%,精密度较好。

[0179] 表4所述试剂盒精密度验证结果

[0180]	检测值1	检测值2	检测值3	检测值4	检测值5
	6.29	5.94	5.91	5.98	5.95
	0.96	0.93	1.00	1.09	1.02
	检测值6	检测值7	检测值8	检测值9	检测值10
	5.64	5.61	6.06	5.90	5.78
	1.02	0.99	1.04	1.02	1.07
	检测均值	标准差	变异系数		
	5.906	0.1983	3.36%		
	1.014	0.0476	4.70%		

[0181] (5) 灵敏度及特异度验证

[0182] 选取确诊AMI疾病50份阳性血清(异常血清)和健康就诊者50份阴性血清,选择市售ELISA法GPBB检测试剂盒与所述试剂盒同步检测此100份血清样本,按各试剂盒判定标准设高于参考标准为阳性,低于参考标准为阴性,计算各试剂盒的灵敏度和特异度,结果见表5。结果表明,所述试剂盒较市售ELISA试剂盒有较高的灵敏度和特异度。本发明的突出优点是较ELISA检测试剂盒有较高的灵敏度和特异度,从而大大地提高临床检测的准确性,且试剂成本较低能使用全自动生化仪进行检测,能极大满足临床检测的需求。

[0183] 表5所述试剂盒灵敏度及特异度与市售检测试剂比较

试剂盒	检测项	金标准(临床诊断)		灵敏度	特异度
		真阳性	真阴性		
[0184] 本发明所述试剂	检测阳性	49	2	98%	96%
	检测阴性	1	48		
[0185] 某 ELISA 试剂盒	检测阳性	41	8	82%	84%
	检测阴性	9	42		

[0186] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 安徽大千生物工程有限公司

<120> GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

<130> 2019

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2591

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```
tacgtaggtg gtggtggttc cggtaggtggt ggttccggtg gtggtggttc catggcgaag 60
ccgctgacgg acagcgagaa gcggaagcag atcagcgtgc gcggcctggc ggggctaggc 120
gacgtggccg aggtgcggaa gagcttcaac cggcacttgc acttcacgct ggtcaaggac 180
cgcaatgtgg ccacgccccg cgactacttc ttcgcgctgg cgcacacggt gcgcgaccac 240
ctcgtgggcc gctggatccg cacgcagcag cactactacg agcgcgacc caagcgcatt 300
tattatcttt ccctggaatt ctacatgggt cgcacgctgc agaacacgat ggtgaacctg 360
ggccttcaga atgcctgcga tgaagccatc tatcagttgg ggttagactt ggaggaactc 420
gaggagatag aagaagatgc tggccttggg aatggaggcc tggggaggct ggcagcgtgt 480
ttccttgact caatggctac cttgggcctg gcagcatacg gctatggaat ccgctatgaa 540
tttgggattt ttaaccagaa gattgtcaat ggctggcagg tagaggaggc cgatgactgg 600
ctgcgctacg gcaaccctg ggagaaagcg cggcctgagt atatgcttcc cgtgcacttc 660
tacggacgcg tggagcacac cccgacggc gtgaagtggc tggacacaca ggtggtgctg 720
gccatgccct acgacacccc agtccccggc tacaagaaca acaccgtcaa caccatgcgg 780
ctgtggtccg ccaaggctcc caacgacttc aagctgcagg acttcaactg gggagactac 840
atcgaggcgg tcctggaccg gaacttggct gagaacatct ccagggtcct gtatccaaat 900
gataacttct ttgaggggaa ggagctgcgg ctgaagcagg agtacttctg gttggccgcc 960
acgctccagg acatcatccg ccgcttcaag tcgtccaagt tcggctgccg ggaccctgtg 1020
agaacctgtt tcgagacggt cccagacaag gtggccatcc agctgaacga caccacccc 1080
gccctctcca tccctgagct catgcggatc ctggtggacg tggagaaggt ggactgggac 1140
aaggcctggg aatcacgaa gaagacctgt gcataacca accacactgt gctgcctgag 1200
gccttggagc gctggccccg gtccatgttt gagaagctgc tgccgcggca cctggagata 1260
atctatgcca tcaaccagcg gcacctggac cacgtggccg cgctgtttcc cggcgatgtg 1320
gaccgcctgc gcaggatgtc tgtgatcgag gagggggact gcaagcggat caacatggcc 1380
cacctgtgtg tgattgggtc ccatgctgtc aatggtgtgg cgaggatcca ctcgagatc 1440
gtgaaacagt cggctcttaa ggatttttat gaactggagc cagagaagtt ccagaataag 1500
accaatggca tcacccccg ccggtggctg ctgctgtgca acccgggct ggccgatacc 1560
atcgtggaga aaattgggga ggagttcctg actgacctga gccagctgaa gaagctgctg 1620
```

ccgctgggtca gtagcagaggt gttcatcagg gacgtggcca aggtcaaaca ggagaacaag 1680
ctcaagttct cggccttcct ggagaaggag tacaaggatga agatcaaccc ctctccatg 1740
ttcgatgtgc atgtgaagag gatccacgag tacaagcggc agctgctcaa ctgcctgcac 1800
gtcgtcacc cgtacaatcg aatcaagaga gaccggcca aggcttttgt gccaggact 1860
gttatgattg ggggcaaggc agcggccggt taccacatgg ccaagctgat catcaagttg 1920
gtcacctcca tcggcgacgt cgtcaatcat gaccagttg tgggtgacag gttgaaagt 1980
atcttcctgg agaactaccg tgtgtccttg gctgagaaag tgatcccggc cgctgatctg 2040
tcgcagcaga tctccactgc aggcaccgag gcctcaggca caggcaacat gaagttcatg 2100
ctcaacgggg ccctcaccat cggcaccatg gacggcgcca acgtggagat ggccgaggag 2160
gccggggccg agaacctctt catcttcggc ctgcgggtgg aggatgtcga ggccttgac 2220
cggaaagggt acaatgccag ggagtactac gaccacctgc ccgagctgaa gcaggccgtg 2280
gaccagatca gcagtggctt tttttctcc aaggagccag actgcttcaa ggacatcgtg 2340
aacatgctga tgcaccatga caggttcaag gtgtttgcag actatgaagc ctacatgcag 2400
tgccaggcac aggtggacca gctgtaccgg aacccaagg agtggaccaa gaaggtcatc 2460
aggaacatcg cctgctcggg caagttctc agtgaccgga ccatcacgga gtatgcacgg 2520
gagatctggg gtgtggagcc ctccgacctg cagatcccgc ccccaacat ccccgggac 2580
tagccggccg c 2591

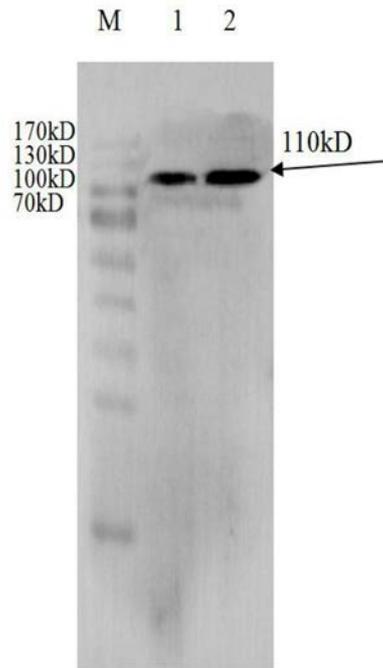


图1

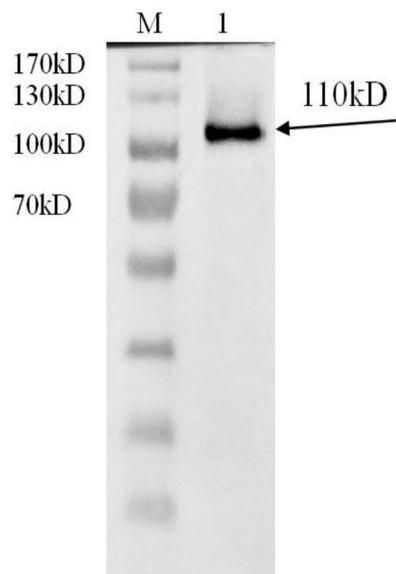


图2

本试剂对比某ELISA试剂线性关系曲线图

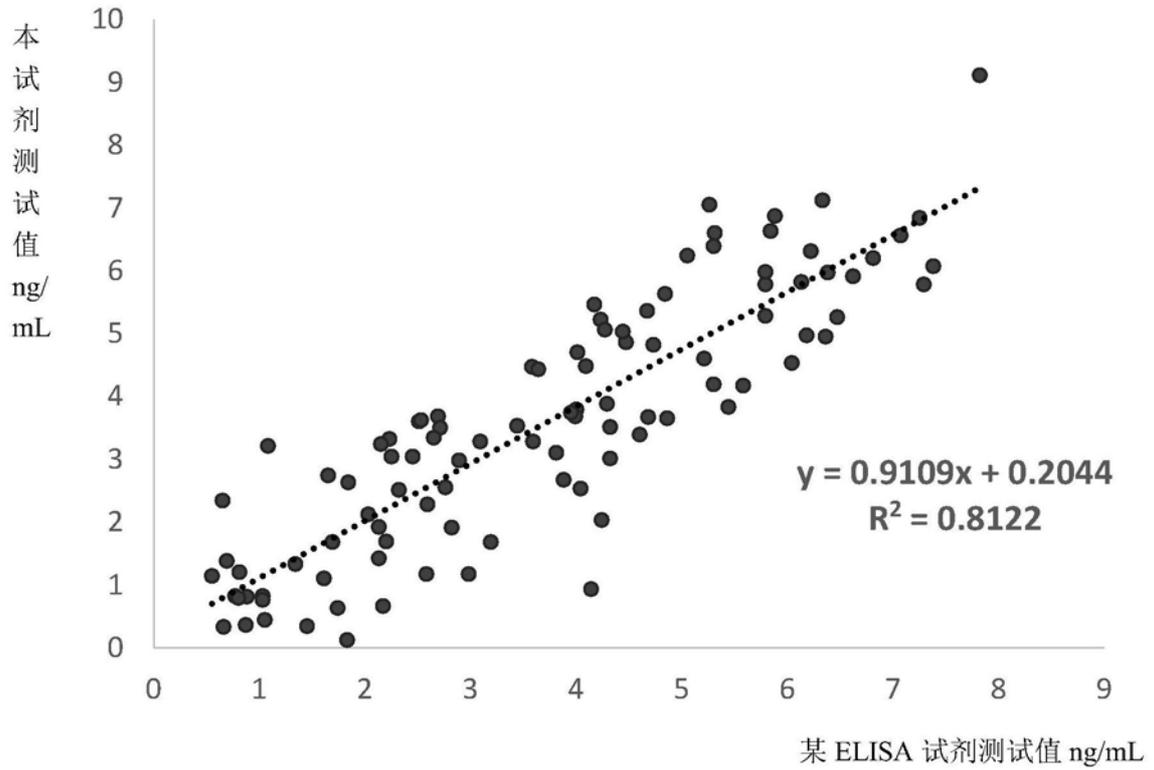


图3

本发明试剂线性范围曲线图

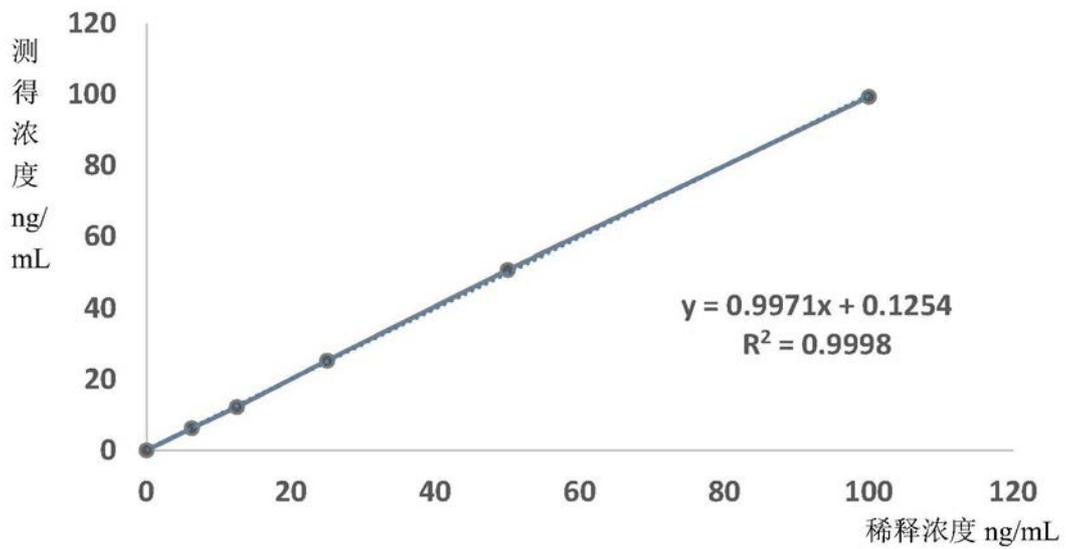


图4

专利名称(译)	GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	CN110794135A	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	CN2019111051705.5	申请日	2019-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	芮双印 符修乐		
发明人	芮双印 符修乐		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/82		
CPC分类号	G01N21/82 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/573 G01N2333/91102		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒，包括R1和R2，R1：PBS、PEG6000、BSA、NaCl、NaN₃、EDTA；R2：PBS、PEG6000、BSA、NaCl、偶联山羊抗人GPBB多克隆抗体的胶乳微球、TX-100、NaN₃、EDTA。本发明还公开了一种上述GPBB胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备与使用方法。本发明的优点在于：本发明可在全自动生化分析仪上使用，成本低廉，且自动化高、节省检测时间；并且，在高稳定性和高精密度情况下，相比他类产品，本发明具有更高的灵敏度和特异性，大大提升了GPBB检测的应用价值。

本试剂对比某ELISA试剂线性关系曲线图

