



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110865192 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911145541.2

(22)申请日 2019.11.21

(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 高耀辉

(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 李静

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书6页 说明书19页 附图2页

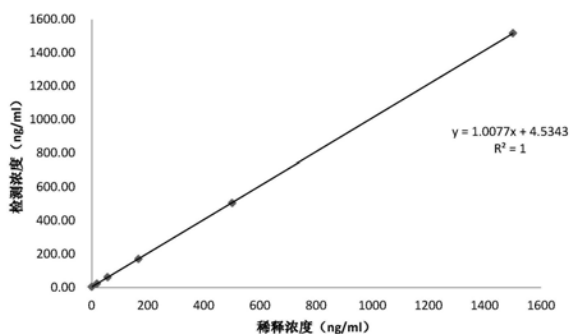
(54)发明名称

一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒及其制备使用方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;试剂R1包括PBS缓冲液、PEG6000、BSA、NaCl、吐温20、NaN₃、EDTA;试剂R2包括PBS缓冲液、BSA、NaCl、交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球、交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球、NaN₃、EDTA。本发明还提供了一种上述基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的制备使用方法。本发明可在全自动生化分析仪上使用,操作简单、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。

本试剂盒线性范围线性回归图



1. 一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

PBS 缓冲液	25~100 mM/L
PEG6000	20~50 g/L
BSA	2~3 g/L
NaCl	3~5 g/L
吐温 20	0.5~1m L /L
NaN ₃	0.6~0.8 g/L
EDTA	0.5~1 g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

PBS 缓冲液	25~100 mM/L
BSA	2~3 g/L
NaCl	3~5 g/L
交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	1%~4%
交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	2%~6%
NaN ₃	0.6~0.8 g/L
EDTA	0.5~1 g/L

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,包括的成分及相应含量具体为:

试剂R1:

PBS 缓冲液	50 mM/L
PEG6000	30 g/L
BSA	2.2 g/L
NaCl	4.85g/L
吐温 20	0.6 mL /L
NaN ₃	0.65 g/L
EDTA	0.74 g/L

其溶剂为纯化水；

试剂R2：

PBS 缓冲液	50 mM/L
BSA	2.2 g/L
NaCl	4.85 g/L
交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	2.5%
交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	4%
NaN ₃	0.65 g/L
EDTA	0.74 g/L

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒，其特征在于，还包括GP73校准品，包括的成分及相应含量为：

PBS 缓冲液	25~100 mM/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	0.4~0.8 g/L
rGP73	1~10 mg/L
NaN ₃	0.6~0.8 g/L
甘油	5~10 mL /L

其溶剂为纯化水。

4. 根据权利要求3所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,所述GP73校准品包括的成分及相应含量具体为:

PBS 缓冲液	50 mM/L
BSA	10 g/L
NaCl	0.62 g/L
rGP73	5 mg/L
NaN ₃	0.65 g/L
甘油	6.4 mL /L

其溶剂为纯化水。

5. 根据权利要求3所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,所述GP73校准品中rGP73为重组人GP73蛋白。

6. 根据权利要求1所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,所述交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球中的抗人rGP73单克隆抗体1以及交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球中的抗人rGP73单克隆抗体2为两种分别具有rGP73抗原表位识别功能的抗人rGP73单克隆抗体。

7. 根据权利要求1-6任一所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,所述交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球的获取方法为:使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上;

所述交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的获取方法为:使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

8. 根据权利要求7所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,其特征在于,所述抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2的具体制备方法为:

①小鼠的免疫:

取2mL1mg/mL的rGP73抗原与等量弗氏佐剂充分乳化形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠腹腔注射0.3mL乳化抗原,进行第一次免疫;14日后,使用乳化抗原加强免疫一次;28日,再次加强免疫一次;42日,使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫;45日,摘除眼球取血,同时,取脾脏;

②融合细胞的制备:

复苏SP2/0细胞并用8-Ag选择性培养基进行筛选;将脾脏制备成单个悬浮细胞,并利用PBS清洗两遍重悬,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,并补加不完全培养液至30mL;充分混匀后,1500r/min条件下离心15min;

吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在100mL的HAT培养基中;接着,将细胞接种到5个96孔平底细胞板,每孔0.2mL;接种完成后,将其置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培

养;当融合细生长至板孔一半时,扩增单克隆细胞至24孔板中继续培养,并更换成20%胎牛血清的完全培养基培养,收集融合细胞培养上清液;

③间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

用10 μ g/mL rGP73抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔100 μ L,再用含5%小牛血清的封闭液于37 $^{\circ}$ C温度下封闭60min;接着,用含0.05%Tween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;

取100 μ L步骤②制得的融合细胞培养上清液加入到上述包被板中,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入稀释倍数为1:5000的羊抗鼠HRP-IgG,每孔100 μ L,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育90min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入OPD底物液,100 μ L/孔,置室温15min观察;当孔内出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50 μ L终止反应,并测定各孔OD值;选取OD值最大的两株融合细胞,用有限稀释法克隆化并扩大培养;

分别取融合细胞培养上清作为一抗,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG作为二抗,使用已验证的rGP73作为抗原,使用现有抗人GP73单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该两株融合杂交瘤细胞为抗人GP73阳性;

④单克隆抗体的纯化:

收集两株融合细胞培养上清液,分别向上清液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3h以上;4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用200mL的PBS溶解;加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,再于4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min继续离心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 $^{\circ}$ C环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析12h除盐,即得抗人rGP73单克隆抗体,分别标识为抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2;

⑤重组抗人rGP73单克隆抗体验证:

使用rGP73蛋白为抗原,上述制备的单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的兔抗鼠IgG为第二抗体做WB,抗原在73kD处有阳性条带产生;使用两种克隆抗体验证rGP73出现阳性条带,即表明两株单克隆抗体制备成功。

9.一种如权利要求1-8任一所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2的制备:

①小鼠的免疫:

取2mL1mg/mL的rGP73抗原与等量弗氏佐剂充分乳化形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠腹腔注射0.3mL乳化抗原,进行第一次免疫;14日后,使用乳化抗原加强免疫一次;28日,再次加强免疫一次;42日,使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫;45日,摘除眼球取血,同时,取脾脏;

②融合细胞的制备:

复苏SP2/0细胞并用8-Ag选择性培养基进行筛选;将脾脏制备成单个悬浮细胞,并利用PBS清洗两遍重悬,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,并补加不完全培养液至30mL;充分混匀后,1500r/min条件下离心15min;

吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在100mL的HAT培养基中;接着,将细胞接种到5个96孔平底细胞板,每孔0.2mL;接种完成后,将其置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培养;当融合细生长至板孔一半时,扩增单克隆细胞至24孔板中继续培养,并更换成20%胎牛

血清的完全培养基培养,收集融合细胞培养上清液;

③间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

用10 μ g/mL rGP73抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔100 μ L,再用含5%小牛血清的封闭液于37 $^{\circ}$ C温度下封闭60min;接着,用含0.05%Tween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;

取100 μ L步骤②制得的融合细胞培养上清液加入到上述包被板中,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入稀释倍数为1:5000的羊抗鼠HRP-IgG,每孔100 μ L,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育90min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入OPD底物液,100 μ L/孔,置室温15min观察;当孔内出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50 μ L终止反应,并测定各孔OD值;选取OD值最大的两株融合细胞,用有限稀释法克隆化并扩大培养;

分别取融合细胞培养上清作为一抗,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG作为二抗,使用已验证的rGP73作为抗原,使用现有抗人GP73单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该两株融合杂交瘤细胞为抗人GP73阳性;

④单克隆抗体的纯化:

收集两株融合细胞培养上清液,分别向上清液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3h以上;4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用200mL的PBS溶解;加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,再于4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min继续离心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 $^{\circ}$ C环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析12h除盐,即得抗人rGP73单克隆抗体,分别标识为抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2;

⑤重组抗人rGP73单克隆抗体验证:

使用rGP73蛋白为抗原,上述制备的单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的兔抗鼠IgG为第二抗体做WB,抗原在73kD处有阳性条带产生;使用两种克隆抗体验证rGP73出现阳性条带,即表明两株单克隆抗体制备成功;

(2) 交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球和交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的制备:

使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球;

使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球;

(3) GP73胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

①配制试剂R1:

按照试剂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,制得试剂R1;

②配制试剂R2:

按照试剂R2的组分含量,将步骤(2)制得的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球、交联抗人rGP73单克隆抗体2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,制得试剂R2;

③配制GP73校准品:

GP73校准品包括的成分及相应含量如下：

PBS 缓冲液	25~100 mM/L
BSA	5~20 g/L
NaCl	0.4~0.8 g/L
rGP73	1~10 mg/L
NaN ₃	0.6~0.8 g/L
甘油	5~10 mL /L

其溶剂为纯化水；

按照上述GP73校准品的组分含量，将rGP73以及余下的其他组分于同一容器中混合，混合均匀后，制得GP73校准品。

10. 一种如权利要求1-8任一所述的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的使用方法，其特征在于，包括如下具体步骤：

- (1) 吸取10 μ L样本，加入180 μ L试剂R1，37 $^{\circ}$ C孵育5min；
- (2) 加入60 μ L试剂R2，置37 $^{\circ}$ C孵育；
- (3) 孵育1min后读取吸光值A1，孵育3min后读取吸光值A2，计算 ΔA ；

其中，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、18.7、55.7、166.7、500和1500ng/mL；依据定标值，根据 ΔA 测算样本中GP73含量。

一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的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及免疫学测定分析领域,尤其涉及一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒及其制备使用方法。

背景技术

[0002] 高尔基体糖蛋白-73又称Ⅱ型高尔基体跨膜蛋白,因其在SDS-PAGE中显示相对分子质量为 7.3×10^4 ,所以称为GP73。现代研究表明,GP73在肝癌、胆管癌、前列腺癌、精原细胞瘤、肺腺癌等多种肿瘤组织中呈现高表达状态,恒定表达于正常肝脏的胆管上皮细胞,肝实质细胞很少或不表达。近期研究表明,GP73在多种疾病中表达异常,但GP73与肝脏疾病,尤其同肝癌关系密切,有望成为肝癌早期诊断的血清学标志物,且敏感性优于AFP。血清GP73水平可以作为肝病预后评估的指标,也可以诊断显著肝损伤和肝硬化;GP73是ALT诊断肝损伤的补充指标。

[0003] 检测GP73的方法主要基于抗原抗体反应。目前,实验室检测GP73多采用酶联免疫吸附测定(ELISA)的方法。然而,采用酶联免疫吸附测定方法进行GP73检测,虽然可以准确地检测样品中的GP73浓度,但其操作相对复杂,且耗时长,不能满足门诊或者急诊的快速检测的需求。

[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。

[0005] 据此,目前急需一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒及其制备使用方法。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种操作简单、耗时短、特异性强、灵敏度高,且可用于全自动生化分析仪的基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒及其制备使用方法。

[0007] 本发明采用以下技术方案解决上述技术问题:

[0008] 一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0009] 试剂R1:

	PBS 缓冲液	25~100 mM/L
	PEG6000	20~50 g/L
	BSA	2~3 g/L
[0010]	NaCl	3~5 g/L
	吐温 20	0.5~1m L /L
	NaN ₃	0.6~0.8 g/L
	EDTA	0.5~1 g/L
[0011]	其溶剂为纯化水；	
[0012]	试剂R2：	
	PBS 缓冲液	25~100 mM/L
	BSA	2~3 g/L
	NaCl	3~5 g/L
[0013]	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	1%~4%
	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	2%~6%
	NaN ₃	0.6~0.8 g/L
	EDTA	0.5~1 g/L
[0014]	其溶剂为纯化水。	
[0015]	作为本发明的优选方式之一，包括的成分及相应含量具体为：	
[0016]	试剂R1：	

	PBS 缓冲液	50 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	2.2 g/L
[0017]	NaCl	4.85g/L
	吐温 20	0.6 mL /L
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.74 g/L
[0018]	其溶剂为纯化水；	
[0019]	试剂R2：	
	PBS 缓冲液	50 mM/L
[0020]	BSA	2.2 g/L
	NaCl	4.85 g/L
	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	2.5%
	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	4%
[0021]	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.74 g/L
[0022]	其溶剂为纯化水。	
[0023]	作为本发明的优选方式之一，还包括GP73校准品，包括的成分及相应含量为：	
	PBS 缓冲液	25~100 mM/L
	BSA	5~20 g/L
	NaCl	0.4~0.8 g/L
[0024]	rGP73	1~10 mg/L
	NaN ₃	0.6~0.8 g/L
	甘油	5~10 mL /L
[0025]	其溶剂为纯化水。	

[0026] 作为本发明的优选方式之一,所述GP73校准品包括的成分及相应含量具体为:

PBS 缓冲液 50 mM/L

BSA 10 g/L

NaCl 0.62 g/L

[0027]

rGP73 5 mg/L

NaN₃ 0.65 g/L

甘油 6.4 mL /L

[0028] 其溶剂为纯化水。

[0029] 作为本发明的优选方式之一,所述GP73校准品中rGP73为重组人GP73蛋白,通过购买获得。

[0030] 作为本发明的优选方式之一,所述交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球中的抗人rGP73单克隆抗体1以及交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球中的抗人rGP73单克隆抗体2为两种分别具有rGP73抗原表位识别功能的抗人rGP73单克隆抗体。

[0031] 作为本发明的优选方式之一,所述交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球的获取方法为:使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上;

[0032] 所述交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的获取方法为:使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0033] 作为本发明的优选方式之一,所述抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2的具体制备方法为:

[0034] ①小鼠的免疫:

[0035] 取2mL1mg/mL的rGP73抗原与等量弗氏佐剂充分乳化形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠腹腔注射0.3mL乳化抗原,进行第一次免疫;14日后,使用乳化抗原加强免疫一次;28日,再次加强免疫一次;42日,使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫;45日,摘除眼球取血,同时,取脾脏;

[0036] ②融合细胞的制备:

[0037] 复苏SP2/0细胞并用8-Ag选择性培养基进行筛选;将脾脏制备成单个悬浮细胞,并利用PBS清洗两遍重悬,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,并补加不完全培养液至30mL;充分混匀后,1500r/min条件下离心15min;

[0038] 吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在100mL的HAT培养基中;接着,将细胞接种到5个96孔平底细胞板,每孔0.2mL;接种完成后,将其置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培养;当融合细胞生长至板孔一半时,扩增单克隆细胞至24孔板中继续培养,并更换成20%胎牛血清的完全培养基培养,收集融合细胞培养上清液;

[0039] ③间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

[0040] 用10 μ g/mL rGP73抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔100 μ L,再用含5%小牛血清的封闭液于37 $^{\circ}$ C温度下封闭60min;接着,用含0.05%Tween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;

[0041] 取100 μ L步骤②制得的融合细胞培养上清液加入到上述包被板中,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入稀释倍数为1:5000的羊抗鼠HRP-IgG,每孔100 μ L,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育90min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入OPD底物液,100 μ L/孔,置室温15min观察;当孔内出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50 μ L终止反应,并测定各孔OD值;选取OD值最大的两株融合细胞,用有限稀释法克隆化并扩大培养;

[0042] 分别取融合细胞培养上清作为一抗,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG作为二抗,使用已验证的rGP73作为抗原,使用现有抗人GP73单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该两株融合杂交瘤细胞为抗人GP73阳性;

[0043] ④单克隆抗体的纯化:

[0044] 收集两株融合细胞培养上清液,分别向上清液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3h以上;4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用200mL的PBS溶解;加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,再于4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min继续离心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 $^{\circ}$ C环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析12h除盐,即得抗人rGP73单克隆抗体,分别标识为抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2;

[0045] ⑤重组抗人rGP73单克隆抗体验证:

[0046] 使用rGP73蛋白为抗原,上述制备的单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的兔抗鼠IgG为第二抗体做WB,抗原在73kD处有阳性条带产生;使用两种克隆抗体验证rGP73出现阳性条带,即表明两株单克隆抗体制备成功。

[0047] 一种上述基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0048] (1)抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2的制备:

[0049] ①小鼠的免疫:

[0050] 取2mL1mg/mL的rGP73抗原与等量弗氏佐剂充分乳化形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠腹腔注射0.3mL乳化抗原,进行第一次免疫;14日后,使用乳化抗原加强免疫一次;28日,再次加强免疫一次;42日,使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫;45日,摘除眼球取血,同时,取脾脏;

[0051] ②融合细胞的制备:

[0052] 复苏SP2/0细胞并用8-Ag选择性培养基进行筛选;将脾脏制备成单个悬浮细胞,并利用PBS清洗两遍重悬,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,并补加不完全培养液至30mL;充分混匀后,1500r/min条件下离心15min;

[0053] 吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在100mL的HAT培养基中;接着,将细胞接种到5个96孔平底细胞板,每孔0.2mL;接种完成后,将其置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培养;当融合细胞生长至板孔一半时,扩增单克隆细胞至24孔板中继续培养,并更换成20%胎牛血清的完全培养基培养,收集融合细胞培养上清液;

[0054] ③间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

[0055] 用10 μ g/mL rGP73抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔100 μ L,再用含5%小牛血清的封闭液于37 $^{\circ}$ C温度下封闭60min;接着,用含0.05%Toween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;

[0056] 取100 μ L步骤②制得的融合细胞培养上清液加入到上述包被板中,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入稀释倍数为1:5000的羊抗鼠HRP-IgG,每孔100 μ L,置湿盒37 $^{\circ}$ C孵育90min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入OPD底物液,100 μ L/孔,置室温15min观察;当孔内出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50 μ L终止反应,并测定各孔OD值;选取OD值最大的两株融合细胞,用有限稀释法克隆化并扩大培养;

[0057] 分别取融合细胞培养上清作为一抗,使用HRP标记的山羊抗鼠IgG作为二抗,使用已验证的rGP73作为抗原,使用现有抗人GP73单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该两株融合杂交瘤细胞为抗人GP73阳性;

[0058] ④单克隆抗体的纯化:

[0059] 收集两株融合细胞培养上清液,分别向上清液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C静置3h以上;4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用200mL的PBS溶解;加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C下静置3h后,再于4 $^{\circ}$ C条件下4200r/min继续离心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 $^{\circ}$ C环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析12h除盐,即得抗人rGP73单克隆抗体,分别标识为抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2;

[0060] ⑤重组抗人rGP73单克隆抗体验证:

[0061] 使用rGP73蛋白为抗原,上述制备的单克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的兔抗鼠IgG为第二抗体做WB,抗原在73kD处有阳性条带产生;使用两种克隆抗体验证rGP73出现阳性条带,即表明两株单克隆抗体制备成功;

[0062] (2) 交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球和交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的制备:

[0063] 使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球;

[0064] 使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球;

[0065] (3) GP73胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

[0066] ①配制试剂R1:

[0067] 按照试剂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,制得试剂R1;

[0068] ②配制试剂R2:

[0069] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(2)制得的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球、交联抗人rGP73单克隆抗体2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,制得试剂R2;

[0070] ③配制GP73校准品:

[0071] GP73校准品包括的成分及相应含量如下：

	PBS 缓冲液	25~100 mM/L
	BSA	5~20 g/L
	NaCl	0.4~0.8 g/L
[0072]	rGP73	1~10 mg/L
	NaN ₃	0.6~0.8 g/L
	甘油	5~10 mL /L

[0073] 其溶剂为纯化水；

[0074] 按照上述GP73校准品的组分含量，将rGP73以及余下的其他组分于同一容器中混合，混合均匀后，制得GP73校准品。

[0075] 一种上述基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的使用方法，包括如下具体步骤：

[0076] (1) 吸取10μL样本，加入180μL试剂R1，37℃孵育5min；

[0077] (2) 加入60μL试剂R2，置37℃孵育；

[0078] (3) 孵育1min后读取吸光值A1，孵育3min后读取吸光值A2，计算ΔA；

[0079] 其中，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、18.7、55.7、166.7、500和1500ng/mL；依据定标值，根据ΔA测算样本中GP73含量。

[0080] 本发明试剂盒是一种基于多种单克隆抗体为共同交联底物的GP73胶乳增强比浊检测试剂盒，由试剂R1和试剂R2构成；所述试剂R1含有缓冲液（PBS缓冲液）、表面活性剂（PEG6000、吐温-20）、稳定剂（BSA、NaCl、EDTA）及防腐剂（NaN₃）；所述试剂R2含有缓冲液（PBS缓冲液）、稳定剂（BSA、NaCl、EDTA）、防腐剂（NaN₃）及聚苯乙烯胶乳微球（交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球和交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球）。

[0081] 本发明相比现有技术的优点在于：

[0082] (1) 相比其他方法，本发明试剂盒利用胶乳增强免疫透射比浊法测定GP73，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，不仅成本低廉，并且操作简单、自动化程度高、检测时间快，便于临床应用；

[0083] (2) 与同类胶乳增强免疫透射比浊法测定GP73的试剂盒相比，本发明试剂盒采用两株抗人GP73的单克隆抗体联用的方式，能够分别识别两个抗原表位，较单一使用单克隆抗体试剂盒有更高的灵敏度，较多克隆抗体试剂盒有更好的特异性；

[0084] (3) 本发明在标记抗体过程中采用特殊的标记方法将抗体与大小均一的胶乳微球偶联，提高了胶乳抗体颗粒的稳定性，同时保障抗体的活性不改变，从而提升检测试剂盒的稳定性和灵敏度。

附图说明

[0085] 图1是实施例4中抗人rGP73单克隆抗体Western Blot鉴定结果（图中，泳道M：蛋白

Marker26616;泳道1:阴性细胞培养液对照;泳道2:抗人rGP73单克隆抗体1纯化后样本;泳道3:抗人rGP73单克隆抗体2纯化后样本;泳道4:abcam公司GP73单抗对照);

[0086] 图2是实施例6中本发明试剂盒与商品化GP73检测试剂盒线性关系曲线图;

[0087] 图3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

[0088] 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。

[0089] 实施例1

[0090] 本实施例的一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0091] 试剂R1:

PBS 缓冲液	25 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	2 g/L
[0092] NaCl	3 g/L
吐温 20	0.5m L /L
NaN ₃	0.6 g/L
EDTA	0.5 g/L

[0093] 其溶剂为纯化水。

[0094] 试剂R2:

PBS 缓冲液	25 mM/L
BSA	2 g/L
NaCl	3 g/L
[0095] 交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	1%
交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	2%
NaN ₃	0.6 g/L
EDTA	0.5 g/L

[0096] 其溶剂为纯化水。

[0097] 此外,还包括GP73校准品,包括的成分及相应含量为:

PBS 缓冲液	25 mM/L
BSA	5 g/L
NaCl	0.4 g/L
[0098] rGP73	1 mg/L
NaN ₃	0.6 g/L
甘油	5 mL /L

[0099] 其溶剂为纯化水。

[0100] 进一步地,GP73校准品中的rGP73为重组人GP73蛋白(通过购买渠道获得)。

[0101] 进一步地,试剂R2中的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球的获取方法为:使用直径80nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上。交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的获取方法为:使用直径80nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0102] 进一步地,所述抗人rGP73单克隆抗体1与抗人rGP73单克隆抗体2具体为两种分别具有rGP73抗原表位识别功能的抗人rGP73单克隆抗体,二者的制备方法详见实施例4。

[0103] 实施例2

[0104] 本实施例的一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0105] 试剂R1:

PBS 缓冲液	100 mM/L
[0106] PEG6000	50 g/L
BSA	3 g/L
NaCl	5 g/L
[0107] 吐温 20	1m L /L
NaN ₃	0.8 g/L
EDTA	1 g/L

[0108] 其溶剂为纯化水。

[0109] 试剂R2:

	PBS 缓冲液	100 mM/L
	BSA	3 g/L
	NaCl	5 g/L
[0110]	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	4%
	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	6%
	NaN ₃	0.8 g/L
	EDTA	1 g/L
[0111]	其溶剂为纯化水。	
[0112]	此外,还包括GP73校准品,包括的成分及相应含量为:	
	PBS 缓冲液	100 mM/L
	BSA	20 g/L
	NaCl	0.8 g/L
[0113]	rGP73	10 mg/L
	NaN ₃	0.8 g/L
	甘油	10 mL /L
[0114]	其溶剂为纯化水。	
[0115]	进一步地,GP73校准品中的rGP73为重组人GP73蛋白(通过购买渠道获得)。	
[0116]	进一步地,试剂R2中的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球的获取方法为:使用直径120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上。交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的获取方法为:使用直径120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上。	
[0117]	进一步地,所述抗人rGP73单克隆抗体1与抗人rGP73单克隆抗体2具体为两种分别具有rGP73抗原表位识别功能的抗人rGP73单克隆抗体,二者的制备方法详见实施例4。	
[0118]	实施例3	
[0119]	本实施例的一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:	
[0120]	试剂R1:	

	PBS 缓冲液	50 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	2.2 g/L
[0121]	NaCl	4.85g/L
	吐温 20	0.6 mL /L
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.74 g/L
[0122]	其溶剂为纯化水。	
[0123]	试剂R2:	
	PBS 缓冲液	50 mM/L
	BSA	2.2 g/L
	NaCl	4.85 g/L
[0124]	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 1 的胶乳微球	2.5%
	交联抗人 rGP73 单克隆抗体 2 的胶乳微球	4%
	NaN ₃	0.65 g/L
	EDTA	0.74 g/L
[0125]	其溶剂为纯化水。	
[0126]	此外,还包括GP73校准品,包括的成分及相应含量为:	
	PBS 缓冲液	50 mM/L
	BSA	10 g/L
	NaCl	0.62 g/L
[0127]	rGP73	5 mg/L
	NaN ₃	0.65 g/L
	甘油	6.4 mL /L
[0128]	其溶剂为纯化水。	

[0129] 进一步地,GP73校准品中的rGP73为重组人GP73蛋白(通过购买渠道获得)。

[0130] 进一步地,试剂R2中的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球的获取方法为:使用直径100nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上。交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的获取方法为:使用直径100nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0131] 进一步地,所述抗人rGP73单克隆抗体1与抗人rGP73单克隆抗体2具体为两种分别具有rGP73抗原表位识别功能的抗人rGP73单克隆抗体,二者的制备方法详见实施例4。

[0132] 实施例4

[0133] 本实施例的一种上述实施例1-3中基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0134] (1) 抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2的制备:

[0135] ①小鼠的免疫:

[0136] 取2mL1mg/mL的rGP73抗原与等量弗氏佐剂充分乳化形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠腹腔注射0.3mL乳化抗原,进行第一次免疫;14日后,使用乳化抗原加强免疫一次;28日,再次加强免疫一次;42日,使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫;45日,摘除眼球取血,同时,取脾脏;

[0137] ②融合细胞的制备:

[0138] 复苏SP2/0细胞并用8-Ag选择性培养基进行筛选;将脾脏制备成单个悬浮细胞,并利用PBS清洗两遍重悬,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 1×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,并补加不完全培养液至30mL;充分混匀后,1500r/min条件下离心15min;

[0139] 吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在100mL的HAT培养基中;接着,将细胞接种到5个96孔平底细胞板,每孔0.2mL;接种完成后,将其置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下进行培养;当融合细胞生长至板孔一半时,扩增单克隆细胞至24孔板中继续培养,并更换成20%胎牛血清的完全培养基培养,收集融合细胞培养上清液;

[0140] ③间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

[0141] 用10μg/mL rGP73抗原包被聚苯乙烯微孔板,每孔100μL,再用含5%小牛血清的封闭液于37℃温度下封闭60min;接着,用含0.05%Tween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;

[0142] 取100μL步骤②制得的融合细胞培养上清液加入到上述包被板中,置湿盒37℃孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次;加入羊抗鼠HRP-IgG(1:5000倍稀释),每孔100μL,置湿盒37℃孵育90min;用PBST液洗涤3次,5min/次(每次实验均设阴性、阳性、空白对照各3孔);加入OPD底物液,100μL/孔,置室温15min观察;当阳性对照孔内出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50μL终止反应,并测定各孔OD值;选取OD值最大的两株融合细胞,用有限稀释法克隆化并扩大培养;

[0143] 分别取融合细胞培养上清作为一抗,使用abcam山羊抗鼠IgG(HRP标记)作为二抗,使用已验证的rGP73作为抗原,使用abcam抗人GP73单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该两株融合杂交瘤细胞为抗人GP73阳性;

[0144] ④单克隆抗体的纯化:

[0145] 收集两株融合细胞培养上清液,分别向上清液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;4℃条件下4200r/min离心30min,弃去上清液,将沉淀用200mL的PBS (pH 7.4) 溶解;加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃条件下4200r/min继续离心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 (pH 7.4) 透析12h除盐,即得抗人rGP73单克隆抗体,分别标识为抗人rGP73单克隆抗体1和抗人rGP73单克隆抗体2;

[0146] ⑤重组抗人rGP73单克隆抗体验证:

[0147] 使用购置的rGP73蛋白为抗原,上述制备的单克隆抗体为第一抗体,使用abcam公司兔抗鼠IgG (HRP标记) 为第二抗体做WB,抗原在73kD处有阳性条带产生。见图1,使用两种克隆抗体验证rGP73出现阳性条带,即表明两株单克隆抗体制备成功(图1中,泳道2和3出现的阳性片段,泳道4也出现阳性片段,说明制备的两株单克隆抗体均与GP73抗原结合,且泳道1未出现阳性条带,说明单克隆抗体与抗原结合是特异性结合);

[0148] (2) 交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球和交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球的制备:

[0149] 使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体1交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球;

[0150] 使用直径80~120nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用化学交联法将步骤(1)得到的抗人rGP73单克隆抗体2交联到聚苯乙烯胶乳微球上,得交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球;

[0151] (3) GP73胶乳增强免疫比浊法试剂盒的制备

[0152] ①配制试剂R1:

[0153] 按照试剂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,制得试剂R1;

[0154] ②配制试剂R2:

[0155] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(2)制得的交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球、交联抗人rGP73单克隆抗体2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,制得试剂R2;

[0156] ③配制GP73校准品:

[0157] 按照GP73校准品的组分含量,将rGP73以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得GP73校准品。

[0158] 实施例5

[0159] 本实施例的一种上述实施例1-3中基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的测定方法:

[0160] 分析方法:两点终点法;

[0161] 反应方向:上升反应;

[0162] 校准方式:Logit-Log (4P);

[0163] 测定波长:600nm;

[0164] 测定温度:37℃;

[0165] 样本:试剂R1:试剂R2=10:180:60 (μL)

[0166] 测试步骤:吸取10μL样本,加入180μL试剂R1,37℃孵育5min;加入60μL试剂R2,1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA 。

[0167] 定标方法:6点定标,采用日立7180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、18.7、55.7、166.7、500和1500ng/mL。依据定标值根据 ΔA 测算样本中GP73含量。

[0168] 实施例6

[0169] 本实施例用以评价上述实施例中基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒:

[0170] (1) 线性相关性验证

[0171] 利用实施例3配方配制试剂,并与国家食品药品监督管理总局认可的现有GP73检测试剂盒进行对照检测,检测100份临床血清样本,检测结果见表1,获得了本发明试剂盒与现有其他在售GP73检测试剂的相关性曲线,见图2。通过检测结果显示,两试剂盒的线性相关曲线为 $y=1.0011+0.0857X$,相关系数 $R^2=0.9996$,说明两者较大的相关性。

[0172] 表1本发明试剂盒与在售GP73检测试剂盒线性相关性对比值

[0173]

序 号	测试值 (ng/mL)	对照值 (ng/mL)	序 号	测试值 (ng/mL)	对照值 (ng/mL)	序 号	测试值 (ng/mL)	对照值 (ng/mL)
1	88.25	88.72	35	20.36	20.01	69	64.16	64.58
2	49.51	48.81	36	72.54	73.15	70	73.68	74.59
3	99.83	99.17	37	40.86	40.93	71	88.87	89.86
4	68.16	68.02	38	31.47	32.17	72	104.77	104.27
5	38.12	37.54	39	54.23	54.53	73	67.02	67.31
6	31.79	32.16	40	46.3	45.11	74	79.73	78.84
7	10.98	10.32	41	54.11	52.48	75	94.96	95.56
8	89.53	90.29	42	69.25	69.71	76	58.48	58.35
9	92.22	92.63	43	109.08	108.38	77	50.71	49.84
10	46.29	46.42	44	99.02	98.22	78	64.42	65.27
11	39.58	38.74	45	53.96	54.95	79	74.82	74.75
12	11.32	11.8	46	23.04	22.39	80	109.49	108.86
13	30.68	29.91	47	103.54	103.48	81	99.99	100.53
14	32.78	33.42	48	13.01	12.41	82	15.29	14.97
15	101.04	100.62	49	72.8	72.22	83	40.81	40.56
16	44.45	44.4	50	34.64	35.34	84	109.08	108.2
17	30.5	29.6	51	16.3	17.04	85	106.75	107.06
18	95.52	95.06	52	77.44	77.84	86	79.33	80.32

[0174]

19	95.78	96.46	53	72.01	72.12	87	10.36	9.53
20	15.09	14.89	54	69.11	68.87	88	27.69	27.52
21	109.97	110.46	55	39.59	40.56	89	13.71	13.45
22	41.04	39.82	56	81.54	81.87	90	101.75	101.09
23	54.62	54.81	57	72.36	71.77	91	77.41	77.1
24	40.88	41.01	58	54.85	54.54	92	46.41	46.6
25	45.43	46.12	59	30.5	31.49	93	25.02	26.95
26	28.67	29.32	60	66.42	67.21	94	19.31	18.4
27	105.21	105.1	61	70	69.21	95	57.51	58.27
28	71.17	71.09	62	16.8	15.89	96	72.17	71.27
29	62.35	62.35	63	90.51	90.55	97	27.64	26.74
30	105.03	105.03	64	42.47	42.1	98	55.34	54.82
31	83.73	83.73	65	54.8	54.43	99	43.26	44.05
32	85.64	85.64	66	25.85	25.24	100	41.82	41.37
33	21.76	21.76	67	76.12	75.53			
34	104.31	103.2	68	75.2	75.16			

[0175] (2) 线性范围验证

[0176] 使用rGP73和生理盐水配制成浓度1500ng/mL、500ng/mL、166.7ng/mL、56.7ng/mL、18.7ng/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,见表2。结果显示,测定结果与稀释浓度之间的线性回归方程为 $y=1.011+3.2175X$,见图3,相关系数 $R^2=1.000$,说明线性关系良好,线性范围可达1500ng/mL。

[0177] 表2本发明试剂盒线性范围验证

序号	稀释浓度 (ng/mL)	测试值 1 (ng/mL)	测试值 2 (ng/mL)	测试值 3 (ng/mL)	平均数 (ng/mL)	绝对 偏差	相对 偏差
1	1500	1540.67	1525.05	1518.99	1528.24	-	1.88%
2	500	504.40	504.63	505.98	505.00	-	1.00%
[0178] 3	166.7	171.40	173.05	174.57	173.00	6.30	-
4	56.7	59.67	58.78	57.16	58.54	1.84	-
5	18.7	19.61	27.04	27.29	24.65	5.95	-
6	0	5.30	4.74	5.18	5.07	5.07	-

[0179] (3) 准确度验证

[0180] 取具有溯源性高值血清质控和低值血清质控各一份,使用本发明试剂盒检测10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。

[0181] 表3本发明试剂盒准确度验证结果

测定 值 1 (ng/ mL)	测定 值 2 (ng /mL)	测定 值 3 (ng /mL)	测定 值 4 (ng /mL)	测定 值 5 (ng /mL)	测定 值 6 (ng /mL)	测定 值 7 (ng/ mL)	测定 值 8 (ng/ mL)	测定 值 9 (ng/ mL)	测定 值 10 (ng/ mL)	测定 均值 (ng/ mL)	血 清 靶 值	相 对 偏 差
164.9 6	161. 80	150. 90	164. 98	156. 20	153. 36	159.1 4	164.4 4	150.6 8	164.4 0	158.5 0	160. 00	-0.9 4%
46.03	46.8 1	45.8 2	46.8 7	45.3 8	46.6 0	46.54	45.67	45.86	45.94	46.18	45.0 0	2.6 1%

[0184] (4) 精密度验证

[0185] 取经在售试剂盒检测的临床血清样本高值和低值各一份,使用本发明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,检测结果表明本发明试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小分别为0.34%和1.73%,精密度较好。

[0186] 表4本发明试剂盒精密度验证结果

[0187]

检测值 1 (ng/mL)	检测值 2 (ng/mL)	检测值 3 (ng/mL)	检测值 4 (ng/mL)	检测值 5 (ng/mL)
147.74	145.91	147.72	148.48	147.74
12.13	12.011	12.78	12.29	12.60
检测值 6 (ng/mL)	检测值 7 (ng/mL)	检测值 8 (ng/mL)	检测值 9 (ng/mL)	检测值 10 (ng/mL)
67.23	67.15	66.9	67.09	67.03
0.76	0.75	0.77	0.74	0.74
检测均值 (ng/mL)	标准差	变异系数		
147.61	1.53	1.04%		
12.37	0.25	1.99%		

[0188] (5) 灵敏度及特异度验证

[0189] 采用进口间接ELISA法GP73检测试剂盒检测筛选50份阳性血清、50份阴性血清,选择市售采用抗GP73多克隆抗体制备的胶乳增强免疫比浊法试剂盒、市售采用抗单克隆抗体制备的胶乳增强免疫比浊法试剂盒与本发明试剂盒同步检测此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,以进口间接ELISA法检测试剂盒为金标准计算各试剂盒的灵敏度和特异度,结果见表5。结果表明,本发明试剂盒较市售两款试剂盒有较高的灵敏度及特异度。本发明的突出优点是:较单克隆抗体制备试剂盒有更高的灵敏度,且较多克隆抗体制备的试剂盒有更高的特异度,从而大大地提高临床检测的准确性满足临床检测的需求。

[0190] 表5本发明试剂盒灵敏度及特异度与市售试剂盒比较

[0191]

试剂盒	检测项	金标准		灵敏度	特异度
		真阳性	真阴性		
本发明所述试剂盒	检测阳性	48 份	1 份	96%	98%
	检测阴性	2 份	49 份		
单克隆抗体制备试剂盒	检测阳性	43 份	4 份	86%	92%
	检测阴性	7 份	46 份		
多克隆抗体制备试剂盒	检测阳性	45 份	8 份	90%	84%
	检测阴性	5 份	42 份		

[0192] 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。

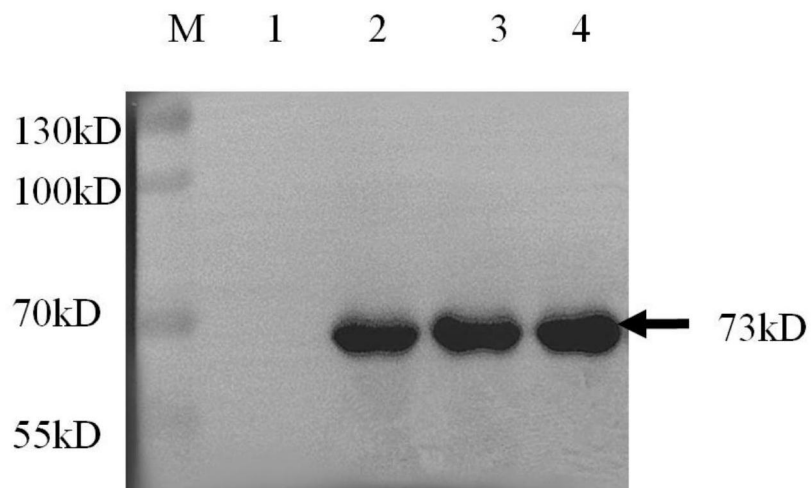


图1

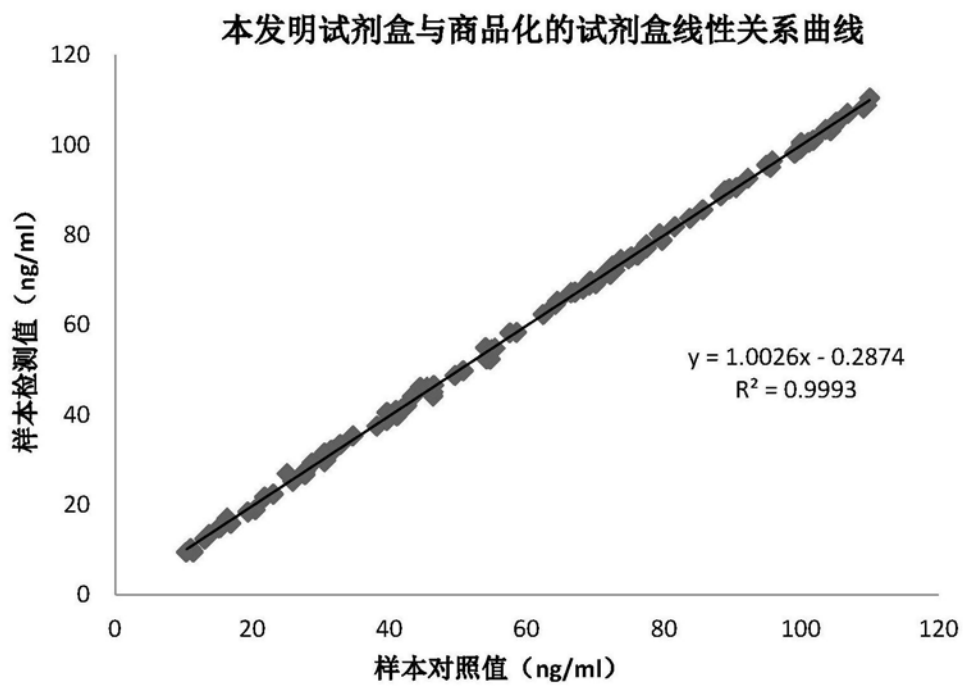


图2

本试剂盒线性范围线性回归图

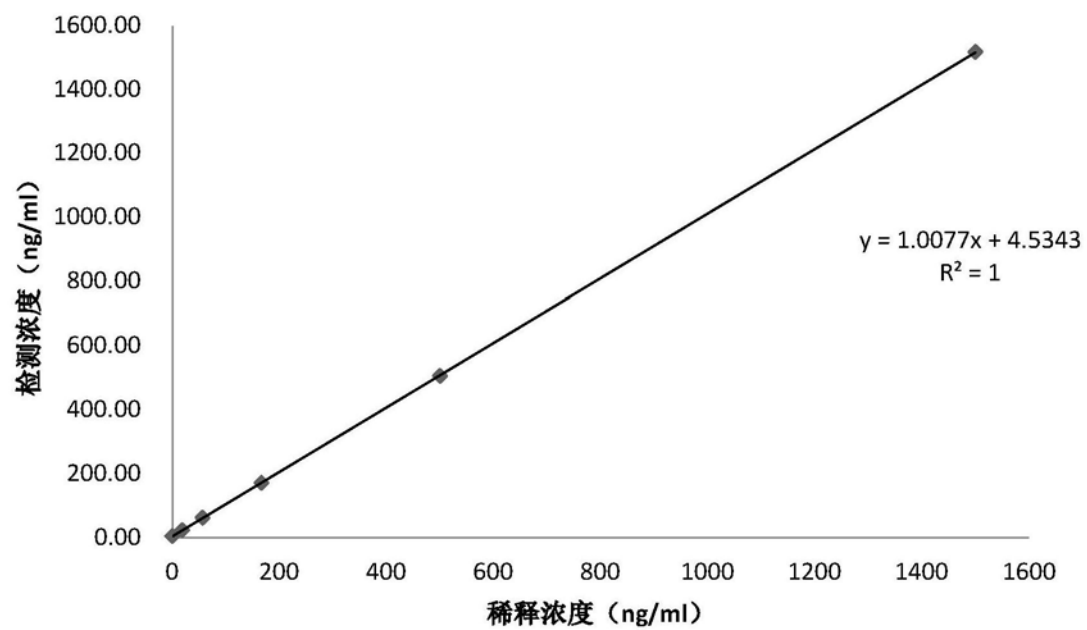


图3

专利名称(译)	一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	CN110865192A	公开(公告)日	2020-03-06
申请号	CN201911145541.2	申请日	2019-11-21
[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 高耀辉		
发明人	芮双印 高耀辉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/577 G01N33/68 G01N2333/47		
代理人(译)	李静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒，包括试剂R1和试剂R2；试剂R1包括PBS缓冲液、PEG6000、BSA、NaCl、吐温20、NaN₃、EDTA；试剂R2包括PBS缓冲液、BSA、NaCl、交联抗人rGP73单克隆抗体1的胶乳微球、交联抗人rGP73单克隆抗体2的胶乳微球、NaN₃、EDTA。本发明还提供了一种上述基于胶乳增强免疫比浊法测定GP73的试剂盒的制备使用方法。本发明可在全自动生化分析仪上使用，操作简单、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。

本试剂盒线性范围线性回归图

