



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105759051 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201610104825.7

(22)申请日 2016.02.25

(71)申请人 广州科方生物技术有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城开源大道11号C4栋六层

(72)发明人 梁敏瑶

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 李健富

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒及其制备方法

(57)摘要

一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,包括GPC3标准品、吖啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液、偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。本发明还提供了该试剂盒的制作方法。本发明以吖啶酯为发光标记物的GPC3纳米磁微球化学发光免疫分析测定试剂盒,不仅具有灵敏度高、线性范围宽、特异性好、标记物稳定、成本低等特点,而且其检测程序亦简便、快速,只需微量样本即可检测。

1. 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,包括如下:

- (1) GPC3标准品;
- (2) 吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液;
- (3) 偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。

2. 根据权利要求1所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,其特征在于:所述GPC3标准品为溶液状态,浓度分别为:0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL。

3. 根据权利要求1所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括发光液,所述发光液为H₂O₂溶液。

4. 根据权利要求1所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,其特征在于:所述偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体纳米磁微球溶液中的纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

5. 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成阶梯浓度的GPC3溶液,所述标准品缓冲液包括质量比为1~5% BSA、0.5~1.0% NaCl、0.05~0.1% TritonX-100或Tween20、0.05~0.1% ProClin 300和余量的磷酸缓冲液;所述磷酸缓冲液浓度为0.1~0.2mol/L;

(2) 吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

a、取GPC3抗体溶于,pH为6.8~7.3浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为2~8mg/L;

b、向步骤a处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.1~0.5mg/L,避光静置8~16小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

(3) 偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

A、取GPC3抗体溶于,pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为2~8mg/L;

B、取1重量份纳米磁微球,加入1~4重量份的偶联剂一和2~5重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转20~40分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1~2% NHS和余量的pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES;所述偶联剂二包括质量比为1~2% EDC和余量的pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES;所述连接缓冲液为pH为4.5~5.5的0.2mol/L MES溶液;

C、将A步骤处理后的GPC3抗体溶液和B步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:25~100混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转10~14小时,再用1~5倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1%~3% BSA、0.1%~0.5% NaCl、0.1%~0.5% TritonX-100或Tween20、0.05%~0.1% ProClin 300,和余量的40~50mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液的pH为6.8~7.4。

6. 根据权利要求5所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、

5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL系列浓度;所述标准品缓冲液包括质量比为3% BSA、0.6% NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05% ProClin 300、余量的0.2mol/L磷酸缓冲液,所述标准品缓冲液的pH为7.0;

(2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

①、取GPC3抗体溶于,pH为7.0浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为5mg/L;

②、向步骤①处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.25mg/L,避光静置10小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

(3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

i、取GPC3抗体溶于,pH为5.0浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为5mg/L;

ii、取1重量份纳米磁微球,加入2重量份的偶联剂一和3重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转30分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1% NHS和余量的浓度为0.2mol/L的pH为5.0的MES;所述偶联剂二包括质量比为1%的EDC和余量的pH为5.0的0.2mol/L的MES溶液;所述连接缓冲液为pH为5.0的0.2mol/L MES溶液;

iii、将i步骤处理后的GPC3抗体溶液和ii步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:40混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转12小时,再用3倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1% BSA、0.5% NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05% ProClin 300以及余量的30mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液pH为7.0。

一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,尤其涉及一种GPC3检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3, GPC3)是一种硫酸肝素类蛋白多糖,由蛋白质、脂质和糖三者共价连接的复杂糖复合物。GPC3在胚胎及胎儿期组织器官的形成和发育阶段扮演着重要角色,主要起负性调控作用,防止组织器官生长过大并在整体上调节身体大小;肝实质细胞在整个胎儿期均有明显表达,在成人肝脏不表达,而肝癌发生早期即可被再激活而高表达,在良性肝病(肝炎,脂肪肝)、肝硬化和肝胆管癌中GPC3不表达或呈低表达,因此血清中可溶性GPC3可作为原发性肝癌的特异性标志物,在肝癌的鉴别诊断中发挥作用。

[0003] 目前所用检测GPC3的化学发光分析法主要是酶催化化学发光分析法,其是以酶标记待检物特异性结合物,形成待检物和酶的复合物,然后以酶再作用于发光底物,在信号试剂作用下发光,用发光信号测定仪进行发光测定。由于酶催化化学发光分析法受到酶和发光底物的限制导致其背景发光增强、测量成本高等,从而限制了这一方法的灵敏度和它的应用。因此需要一种能够快速、准确、成本低的检测GPC3的试剂盒来满足检测的需求。

发明内容

[0004] 为了有效的解决上述提出的技术问题,本发明提供了一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒及其制备方法。

[0005] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒

[0006] (1)GPC3标准品,所述GPC3为磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3;

[0007] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液;

[0008] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。

[0009] 优选地,所述GPC3标准品为溶液状态,浓度分别为:0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL。

[0010] 优选地,所述试剂盒还包括发光液,所述发光液为H₂O₂溶液。

[0011] 优选地,所述偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体纳米磁微球溶液中的纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0012] 本发明还包括一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0013] (1)GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成阶梯浓度的GPC3溶液,所述标准品缓冲液包括质量比为1~5%BSA、0.5~1.0%NaCl、0.05~0.1%TritonX-100或Tween20、0.05~0.1%ProClin 300和余量的磷酸缓冲液;所述磷酸缓冲液浓度为0.1~0.2mol/L;

[0014] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

[0015] a、取GPC3抗体溶于,pH为6.8~7.3浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为2~8mg/L;

[0016] b、向步骤a处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.1~0.5mg/L,避光静置8~16小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

[0017] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

[0018] A、取GPC3抗体溶于,pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为2~8mg/L;所述MES为2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物;

[0019] B、取1重量份纳米磁微球,加入1~4重量份的偶联剂一和2~5重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转20~40分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1~2% NHS和余量的pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES;所述偶联剂二包括质量比为1~2% EDC和余量的pH为4.5~5.5浓度为0.2mol/L的MES;所述连接缓冲液为pH为4.5~5.5的0.2mol/L MES溶液;所述NHS为N-羟基丁二酰亚胺,所述EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;

[0020] C、将A步骤处理后的GPC3抗体溶液和B步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:25~100混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转10~14小时,再用1~5倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1%~3% BSA、0.1%~0.5% NaCl、0.1%~0.5% TritonX-100或Tween20、0.05%~0.1% Proclin-300,和余量的40~50mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液的pH为6.8~7.4。

[0021] 优选地,所述制备方法,包括如下步骤:

[0022] (1)GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL系列浓度;所述标准品缓冲液包括质量比为3% BSA、0.6% NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05% Proclin-300、余量的0.2mol/L磷酸缓冲液,所述标准品缓冲液的pH为7.0;

[0023] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

[0024] ①、取GPC3抗体溶于,pH为7.0浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为5mg/L;

[0025] ②、向步骤①处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.25mg/L,避光静置10小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

[0026] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

[0027] i、取GPC3抗体溶于,PH为5.0浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为5mg/L;

[0028] ii、取1重量份纳米磁微球,加入2重量份的偶联剂一和3重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转30分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1% NHS和余量的浓度为0.2mol/L的pH为5.0的MES;所述偶联剂二包括质量比为1%的EDC和余量的pH为5.0的0.2mol/L的MES溶液;所述连接缓冲液为pH为5.0的0.2mol/L MES溶液;

[0029] iii、将i步骤处理后的GPC3抗体溶液和ii步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:40混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转12小时,再用3倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3

抗体的纳米磁微球溶液；所述包被缓冲液包括质量比为1%BSA、0.5%NaCl、0.1%TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300以及余量的30mmol/L Tris-HCl，所述包被缓冲液pH为7.0。

[0030] 相比现有技术，本发明的有益效果在于克服了现有对磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3检测方法的成本高、背景干扰大并需要额外增强信号的底物等问题，并且解决了现有技术血清学检测GPC3需要标本量大反应不彻底的不足。本发明以吡啶酯为发光标记物的GPC3纳米磁微球化学发光免疫分析测定试剂盒，不仅具有灵敏度高、线性范围宽、特异性好、标记物稳定、成本低等特点，而且其检测程序亦简便、快速，只需微量样本即可检测。

具体实施方式

[0031] 下面，结合具体实施方式，对本发明做进一步描述：

[0032] 实施例一

[0033] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒，包括如下：

[0034] (1)GPC3标准品；

[0035] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液；

[0036] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液；

[0037] 该试剂盒由如下步骤制得：

[0038] (1)GPC3标准品的制备：用标准品缓冲液将GPC3配制成阶梯浓度的GPC3溶液，所述标准品缓冲液包括质量比为1%BSA、0.5%NaCl、0.05% TritonX-100或Tween20、0.05% ProClin 300和余量的磷酸缓冲液；所述磷酸缓冲液浓度为0.1mol/L。

[0039] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备：

[0040] a、取GPC3抗体溶于，pH为6.8浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中，至终浓度为2mg/L。

[0041] b、向步骤a处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.1mg/L，避光静置8小时，收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液。

[0042] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备：

[0043] A、取GPC3抗体溶于，pH为4.5浓度为0.2mol/L的MES溶液中，至终浓度为2mg/L。

[0044] B、取1重量份纳米磁微球，加入1重量份的偶联剂一和2重量份偶联剂二，置于磁微球混合器旋转20分钟，除去上清；再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球，除去上清；所述偶联剂一包括质量比为1%NHS和余量的pH为4.5浓度为0.2mol/L的MES；所述偶联剂二包括质量比为1%EDC和余量的pH为4.5浓度为0.2mol/L的MES；所述连接缓冲液为pH为4.5的0.2mol/L MES溶液；所述纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0045] C、将A步骤处理后的GPC3抗体溶液和B步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:25混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液，放置磁微球混合器旋转10小时，再用1倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液；获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液；所述包被缓冲液包括质量比为1%BSA、0.1%NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300，和余量的40mmol/L Tris-HCl，所述包被缓冲液的pH为6.8。

[0046] 实施例二

[0047] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒，包括如下：

[0048] (1)GPC3标准品；

[0049] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液；

[0050] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液；

[0051] 该试剂盒由如下步骤制得：

[0052] (1)GPC3标准品的制备：用标准品缓冲液将GPC3配制成阶梯浓度的GPC3溶液，所述标准品缓冲液包括质量比为5%BSA、1.0%NaCl、0.1%TritonX-100或Tween20、0.1%Proclin-300和余量的磷酸缓冲液；所述磷酸缓冲液浓度为0.2mol/L。

[0053] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备：

[0054] a、取GPC3抗体溶于，pH为7.3浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中，至终浓度为8mg/L。

[0055] b、向步骤a处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.5mg/L，避光静置16小时，收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液。

[0056] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备：

[0057] A、取GPC3抗体溶于，pH为5.5浓度为0.2mol/L的MES溶液中，至终浓度为8mg/L。

[0058] B、取1重量份纳米磁微球，加入4重量份的偶联剂一和5重量份偶联剂二，置于磁微球混合器旋转40分钟，除去上清；再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球，除去上清；所述偶联剂一包括质量比为2%NHS和余量的pH为5.5浓度为0.2mol/L的MES；所述偶联剂二包括质量比为2%EDC和余量的pH为5.5浓度为0.2mol/L的MES；所述连接缓冲液为pH为5.5的0.2mol/L MES溶液；所述纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0059] C、将A步骤处理后的GPC3抗体溶液和B步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:100混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液，放置磁微球混合器旋转14小时，再用5倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液；获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液；所述包被缓冲液包括质量比为3%BSA、0.5%NaCl、0.5%TritonX-100或Tween20、0.1%Proclin-300，和余量的50mmol/L Tris-HCl，所述包被缓冲液的pH为7.4。

[0060] 实施例三

[0061] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒，包括如下：

[0062] (1)GPC3标准品；

[0063] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液；

[0064] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液；

[0065] (4)发光液。

[0066] 该试剂盒由如下步骤制得：

[0067] (1)GPC3标准品的制备：用标准品缓冲液将GPC3配制成0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL系列浓度；所述标准品缓冲液包括质量比为3%BSA、0.6%NaCl、0.1%TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300、余量的0.2mol/L磷酸缓冲液，所述标准品缓冲液的pH为7.0。

[0068] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备：

[0069] ①、取GPC3抗体溶于，PH为7.0浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中，至终浓度为5mg/L。

[0070] ②、向步骤①处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.25mg/L,避光静置10小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液。

[0071] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

[0072] i、取GPC3抗体溶于,pH为5.0浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为5mg/L。

[0073] ii、取1重量份纳米磁微球,加入2重量份的偶联剂一和3重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转30分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1%NHS和余量的浓度为0.2mol/L的pH为5.0的MES;所述偶联剂二包括质量比为1%的EDC和余量的pH为5.0的0.2mol/L的MES溶液;所述连接缓冲液为PH为5.0的0.2mol/L MES溶液;所述纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0074] iii、将i步骤处理后的GPC3抗体溶液和ii步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:40混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转12小时,再用3倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1%BSA、0.5%NaCl、0.1%TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300以及余量的30mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液pH为7.0。

[0075] 实施例四

[0076] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,包括如下:

[0077] (1)GPC3标准品;

[0078] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液;

[0079] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。

[0080] 该试剂盒制作方法如下:

[0081] (1)GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL 系列浓度;所述标准品缓冲液包括质量比为3%BSA、0.6%NaCl、0.1%TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300、余量的0.2mol/L磷酸缓冲液,所述标准品缓冲液的pH为7.0。

[0082] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

[0083] ①、取GPC3抗体溶于,pH为7.0浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为3mg/L。

[0084] ②、向步骤①处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.35mg/L,避光静置10小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

[0085] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

[0086] i、取GPC3抗体溶于,pH为5.0浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为3mg/L。

[0087] ii、取1重量份纳米磁微球,加入2重量份的偶联剂一和3重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转30分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1%NHS和余量的浓度为0.2mol/L的pH为5.0的MES;所述偶联剂二包括质量比为1%的EDC和余量的pH为5.0的0.2mol/L的MES溶液;所述连接缓冲液为pH为5.0的0.2mol/L MES溶液;所述纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0088] iii、将i步骤处理后的GPC3抗体溶液和ii步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:60混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转12小时,再用3倍GPC3抗体纳

米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1%BSA、0.5%NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300以及余量的30mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液pH为7.0。

[0089] 实施例五

[0090] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,包括如下:

[0091] (1)GPC3标准品;

[0092] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液;

[0093] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。

[0094] 该试剂盒制作方法如下:

[0095] (1)GPC3标准品的制备:用标准品缓冲液将GPC3配制成0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL系列浓度;所述标准品缓冲液包括质量比为3%BSA、0.6%NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300、余量的0.2mol/L磷酸缓冲液,所述标准品缓冲液的pH为7.0。

[0096] (2)吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液的制备:

[0097] ①、取GPC3抗体溶于,pH为7.0浓度为0.2mol/L的磷酸缓冲液中,至终浓度为7mg/L。

[0098] ②、向步骤①处理后的GPC3抗体溶液加入吡啶酯至吡啶酯终浓度为0.45mg/L,避光静置10小时,收集标记有吡啶酯的GPC3抗体溶液;

[0099] (3)偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液的制备:

[0100] i、取GPC3抗体溶于,pH为5.0浓度为0.2mol/L的MES溶液中,至终浓度为7mg/L。

[0101] ii、取1重量份纳米磁微球,加入2重量份的偶联剂一和3重量份偶联剂二,置于磁微球混合器旋转30分钟,除去上清;再加入连接缓冲液洗涤纳米磁微球,除去上清;所述偶联剂一包括质量比为1%NHS和余量的浓度为0.2mol/L的pH为5.0的MES;所述偶联剂二包括质量比为1%的EDC和余量的pH为5.0的0.2mol/L的MES溶液;所述连接缓冲液为pH为5.0的0.2mol/L MES溶液;所述纳米磁微球为直径为3 μ m、表面带羧基的超顺磁性的纳米磁微球。

[0102] iii、将i步骤处理后的GPC3抗体溶液和ii步骤处理后的纳米磁微球按质量比1:80混匀形成GPC3抗体纳米磁微球混合液,放置磁微球混合器旋转12小时,再用3倍GPC3抗体纳米磁微球混合液的体积的包被缓冲液置换连接缓冲液;获得偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液;所述包被缓冲液包括质量比为1%BSA、0.5%NaCl、0.1% TritonX-100或Tween20、0.05%Proclin-300以及余量的30mmol/L Tris-HCl,所述包被缓冲液pH为7.0。

[0103] 实施例六

[0104] (1)皮尔逊相关系数r的测定:

[0105] 用实施例一至实施例五所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,对浓度为0ng/mL、0.5ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL、20.0ng/mL、100.0ng/mL的GPC3标准品进行定量测定,重复5次,根据发光强度和标准品浓度做出标准曲线,并求得皮尔逊相关系数r,结果如表一所示;具体测试方法如下:

[0106] 将偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液和GPC3标准品各50 μ l加

入到反应试管中,37℃振动孵育20min,然后将反应试管放在磁分离架上30s,小心移去上清,加入500ul清洗液(pH 7.2,含0.15%Triton X-100的PBS清洗缓冲液)反复吹打使其混匀,重复以上步骤3次后去上清;接着加入100ul吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液混匀,37℃振动孵育20min,然后用清洗液反复清洗5次后去上清,接着在检测仪上加预激发液与激发液后检测并记录信号值。

[0107] (2)分析灵敏度测定:

[0108] 分别用实施例一至实施例五所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒,对20次浓度为0ng/mL的GPC3标准品进行测定,计算其均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,M-2SD其在标准曲线上所对应的浓度即为分析灵敏度。结果如表一所示。

[0109] 表一、皮尔逊相关系数r及分析灵敏度

实验 序数	检测结果	
	分析灵敏度 (ng/ml)	皮尔逊相 关系数r
[0110] 实施例一	0.012	0.9701
实施例二	0.015	0.9716
实施例三	0.002	0.9983
[0111] 实施例四	0.008	0.9853
实施例五	0.009	0.9872

[0112] 对本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

专利名称(译)	一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN105759051A	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	CN201610104825.7	申请日	2016-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术有限公司		
[标]发明人	梁敏瑶		
发明人	梁敏瑶		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N2333/4722		
其他公开文献	CN105759051B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的定量分析试剂盒，包括GPC3标准品、吡啶酯标记的磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体溶液、偶联有磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体的纳米磁微球溶液。本发明还提供了该试剂盒的制作方法。本发明以吡啶酯为发光标记物的GPC3纳米磁微球化学发光免疫分析测定试剂盒，不仅具有灵敏度高、线性范围宽、特异性好、标记物稳定、成本低等特点，而且其检测程序亦简便、快速，只需微量样本即可检测。

实验 序数	检测结果	
	分析灵敏度 (ng/ml)	皮尔逊相 关系数r
实施例一	0.012	0.9701