



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106526165 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201610980010.5

(22)申请日 2016.11.08

(71)申请人 北京久峰润达生物技术有限公司

地址 100037 北京市海淀区甘家口街道建设部大院南配楼524号

(72)发明人 张念林

(74)专利代理机构 北京中企鸿阳知识产权代理

事务所(普通合伙) 11487

代理人 郭鸿雁

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法,涉及一种借助于生物特有的结合方法来测定或分析材料的试剂盒及其测定方法,特别是涉及一种免疫检测试剂盒及其检测方法。其目的是为了提供一种更加有效、灵敏,特异性更强的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒。本发明的试剂盒包括:磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂、酶反应物、标准品和底物溶液。本发明的制备方法,本发明的检测方法包括:待测样品和标准品分别与磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂充分结合;然后与酶反应物混合,温育;将磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂分离;清洗后加入底物溶液;测定吸光度。本发明的检测方法准确性好、精密度高、灵敏度高,操作简单省时,检测范围宽。

1. 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括:磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂、酶反应物、标准品和底物溶液;

其中,所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂为标记有抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖单克隆抗体的磁性微球;

所述酶反应物为含有碱性磷酸酶标记的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖单克隆抗体;

所述标准品为含有磷脂酰肌醇蛋白聚糖抗原的BSA蛋白溶液;

所述底物溶液为酶促化学发光底物溶液。

2. 根据权利要求1所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括清洗液,所述清洗液为含TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒,其特征在于:所述清洗液中TWEEN-20的工作浓度为0.25g/L,Proclin-300的工作浓度为0.05mL/1000mL,且清洗液的pH值为7.35—7.45。

4. 一种利用权利要求1中所述试剂盒定量检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖的方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

a. 将待测样品和所述标准品分别与所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂混合并使其充分结合,得到第一混合物;

b. 将第一混合物与所述酶反应物混合,温育后得到第二混合物;

c. 将第二混合物置于磁场中,使所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂在磁场中沉降,去除上清并用清洗液洗涤;

d. 向洗涤后的磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂中加入所述底物溶液;

e. 测定发光反应后的吸光度。

5. 根据权利要求4所述的定量检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖的方法,其特征在于:所述清洗液为含TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

6. 根据权利要求5所述的定量检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖的方法,其特征在于:所述清洗液中TWEEN-20的工作浓度为0.25g/L,Proclin-300的工作浓度为0.05mL/1000mL,且清洗液的pH值为7.35—7.45。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种借助于生物特有的结合方法来测定或分析材料的试剂盒及其测定方法,特别是涉及一种免疫检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)是一种细胞膜表面的硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparan sulfate proteoglycan, HSPG), GPC3在肝癌组织中高表达,而在正常肝组织不表达。肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,大多数患者被发现时已是中晚期。HCC在我国发病率高,死亡率亦高,严重危害广大人民身体健康,因此值得高度重视和深入研究。磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3, GPC3)是一种新的肝细胞癌的癌胚抗原, GPC3基因位于人染色体x26.1,长900kb,5'端朝向端粒区,3'端朝向中心粒区,由8个外显子组成,其5'端上游153kb和3'下游200kb以内的区域均未发现其它基因,5'端上游21d)为最小启动子序列,启动子区有许多转录因子结合位点,包括6个SP1结构、7个AP2结构和2个CAAT盒。但无TATA盒,产生单一2.3kb的转录子,包括197nt的5'非翻译区,1740bp的开放阅读框,编码580个氨基酸的蛋白质,分子量为66kD。GPC3基因编码的蛋白属于硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparansulfate proteoglycans, HSPGs),通过糖基磷脂酰肌醇锚蛋白(glycosyl-phosphatidylinositol anchor, GPI)锚定在细胞表面,可结合肝素结合型蛋白如生长因子,为细胞外基质成分,调控着细胞生长、繁殖、分化、黏附和迁移等行为,还可能涉及到抑制或调节大部分中胚层组织和器官的生长。目前在哺乳动物中已发现glypican家族6个成员:glypican 1~6。其共同点有:①蛋白质分子量相近;②富含半胱氨酸,都位于13个保守位点;③无跨膜区,但在C末端,N末端都有一个引导肽样结构,C末端还有一个糖基化结构。现在已证实glypican基因是过度生长和畸变综合征(simpson-golabi-behmel syndrome, SGBS)的致病基因。SGBS综合征主要表现为产前,产后胎儿过度生长伴有多脏器和骨骼发育异常,男性发病者身高可达195cm,多有粗糙面容,上腭裂特征性表现,其他表现有先天性房(室)间隔缺损、肾肿大和异常、隐睾、尿道下裂、疝、脊柱和肋骨异常、并指(趾)及6指畸形等。

[0003] 1997年Hsu等应用DDRT-PCR技术在肝癌组织中克隆了一全长GPC3的cDNA。Northern blot杂交发现191例HCC中,143例(74.8%)可检测到GPC3mRNA表达,而在正常肝和肝炎组织中只有3.2%检测到GPC3mRNA。大量的研究证实GPC3蛋白在肝癌组织中高表达,而在非癌组织中没有表达或表达量极低,说明GPC3和肝癌有特定的关系,同时有研究表明GPC3在肺癌、乳腺癌、间皮瘤、肾癌和卵巢癌组织中表达缺失,GPC3具有抑制这些肿瘤的生长,更加说明GPC3在肝癌表达的特异性和在肝癌作用机制的特异性。鉴于GPC3在HCC、黑色素瘤和卵巢透明细胞癌中高表达,GPC3已经被确认为新兴的肿瘤免疫诊断的靶点。对于肿瘤诊断来说,虽然单单该靶点的测得并不足以完成肿瘤的诊断,但是对于以临床症状为主要诊断指标的诊断仍然有很大的辅助作用。

[0004] 从GPC3的检测角度上来说,目前临床上用于测定GPC3的方法比较有限。目前有在

使用的酶联免疫法(ELISA)检测GPC3,但是此种方法是一种显色的固相反应法,它的方法学限制了检测的灵敏度和特异性。而且ELISA方法线性范围窄、也不易实现全自动化,GPC3作为一种特异性的肿瘤免疫诊断指标,GPC3的检测灵敏度、准确性和特异性的提高,有助于更好的对肿瘤进行判断和治疗,本发明采用磁微粒化学发光法检测GPC3,进一步的提高了GPC3诊断试剂盒的各项参数标准。

发明内容

[0005] 本发明为了更加有效、灵敏、特异地检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖,而提供了一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒,所述试剂盒包括:磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂、酶反应物、标准品和底物溶液。

[0006] 本发明涉及一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒,所述试剂盒包括:磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂、酶反应物、标准品和底物溶液;

[0007] 其中,所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂为标记有抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖单克隆抗体的磁性微球;

[0008] 所述酶反应物为含有碱性磷酸酶标记的抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖单克隆抗体;

[0009] 所述标准品为含有磷脂酰肌醇蛋白聚糖抗原的BSA蛋白溶液;

[0010] 所述底物溶液为酶促化学发光底物溶液。

[0011] 优选地,所述试剂盒还包括清洗液,所述清洗液为含TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

[0012] 优选地,所述清洗液中TWEEN-20的工作浓度为0.25g/L,Proclin-300的工作浓度为0.05mL/1000mL,且清洗液的pH值为7.35—7.45。

[0013] 本发明还涉及一种定量检测磷脂酰肌醇蛋白聚糖的方法,所述方法包括以下步骤:

[0014] a.将待测样品和所述标准品分别与所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂混合并使其充分结合,得到第一混合物;

[0015] b.将第一混合物与所述酶反应物混合,温育后得到第二混合物;

[0016] c.将第二混合物置于磁场中,使所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂在磁场中沉降,去除上清并用清洗液洗涤;

[0017] d.向洗涤后的磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂中加入所述底物溶液;

[0018] e.测定发光反应后的吸光度(将待测样品的吸光度与标准品比较,得到待测样品的定量数据)。

[0019] 优选地,所述清洗液为含TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

[0020] 优选地,所述清洗液中TWEEN-20的工作浓度为0.25g/L,Proclin-300的工作浓度为0.05mL/1000mL,且清洗液的pH值为7.35—7.45。

[0021] 本发明采用的磁微粒化学发光免疫检测技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,是的某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。由于磁性微粒的直接仅有1微米左右,相对比较面积

大,球形的表面可以吸附或者偶联更多的免疫活性物质,一致在一定环境的缓冲液中反应,能够有更多的机会接触更多的目标物质,最终能够更快和更多的结合特异性物质,使得最终的反应时间缩短,试剂盒结合量大,试剂盒的检测范围扩大。

[0022] 磁分离化学发光免疫分析法综合采用了目前国际上的两大主流免疫分析尖端技术—悬浮磁微粒载体技术、化学发光检测技术,使系统能够充分满足临床对检测结果的要求

[0023] 本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法与现有技术不同之处在于:

[0024] 1.采用本发明试剂盒对磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量进行检测的方法,其检测范围宽:表面巨大的磁微粒免疫反应载体、灵敏稳定的碱性磷酸酶底物化学发光体系保证了线性范围达到0.50-64ng/ml。

[0025] 2.采用本发明试剂盒对磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量进行检测的方法,其灵敏度高:悬浮磁微粒表面积大,可有效捕获样品中的痕量待测物,提高检测的灵敏度达到0.05ng/ml。

[0026] 3.采用本发明试剂盒对磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量进行检测的方法,其快速准确:悬浮磁微粒作为反应载体,可发挥液相免疫反应的优点,保证免疫反应和发光反应迅速达到平衡,无需耗时等待。

[0027] 4.本发明试剂盒采用了磁性微粒分离的技术和化学发光技术,让整个反应近似液相反应,这种方法用于检测GPC3,使得试剂盒检测的准确性、灵敏度、特异性得到了极大的提高,另外相对传统的ELISA方法检测GPC3,缩短了近40分钟,而且操作简单。

[0028] 5.本发明公开了一种新的专用稳定增强剂 Na_2SO_3 以及清洗液,使得反应过程更加稳定可靠,实验数据灵敏有效,在提高产品性能的同时,并且大大降低了产品成本

[0029] 6.本发明的试剂盒中的磁分离试剂,酶反应物,稳定增强剂,标准品、质控品,清洗液浓缩液、稀释液以及底物溶液均是该反应体系下的最优配方,使该试剂盒的使用效期可达1年以上,为产品的使用效期及检测性能提供了有力保障。

具体实施方式

[0030] 通过以下实施例和验证试验对本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法作进一步的说明。

[0031] 本发明所述的检测方法是对于一种肿瘤靶标——磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC3)的定量检测,其对于肿瘤的诊断可以有辅助作用,但是单单这一个指标并不足以确诊。肿瘤的诊断在临床上仍然以临床症状为主要指征,这些靶标的存在仅仅是一种辅助的验证,因此,本发明所述的检测方法不属于疾病的诊断方法。

[0032] 本发明提供了一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC3)的定量测定试剂盒,其包含的试剂有GPC3磁分离试剂,酶反应物,标准品,浓缩洗涤液以及底物溶液。

[0033] 磁分离试剂为含有标记有抗GPC3单克隆抗体的磁性微球。

[0034] 酶反应物为碱性磷酸酶标记的抗GPC3单克隆抗体。

[0035] 标准品为含有一定量的GPC3抗原的BSA蛋白溶液。

[0036] 清洗液浓缩液为含有TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液。

[0037] 所述的底物溶液为酶促化学发光底物溶液。

[0038] 本发明磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (GPC3) 的定量测定试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0039] 第一步:磁分离试剂的制备过程

[0040] 一、磁珠缓冲液配制操作步骤,配制1L:

[0041] 1、称取TRIS 6.06g、NaCl 9.0g、1.0g TWEEN-20于1L容器中;

[0042] 2、用移液器将Proclin-300量取0.5ml于上述1L容器中,然后在上述1L容器中加入800ml纯化水,充分搅拌;

[0043] 3、调节PH计测量其PH值,调PH,控制PH在8.0 (正负0.5);

[0044] 4、称取BSA 2g倒入上述1L容器中;

[0045] 5、最后定容至1000ml,用0.2um滤器过滤;过滤完后贴好标签于2-8℃冷库贮存。

[0046] 二、磁分离试剂的制备过程

[0047] 1、将2.0mg 辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于100ul DMSO中,取4mg抗GPC3单克隆抗体溶于PH 9.5的0.15mol/L PB缓冲液中至总体积为2ml;

[0048] 2、确定辛二酸二琥珀酰亚胺酯的投入量,用移液枪吸取辛二酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤1的抗体溶液中,置室温90min;

[0049] 3、将步骤2抗体溶液加入到Centricon-10浓缩管中然后放入到高速冷冻离心机中浓缩40min至体积为1ml;

[0050] 4、取1ml磁珠,加入10ml反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附2分钟后吸取上清;

[0051] 5、每次加入1.5ml PH9.5 0.15mol/L PB,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;将步骤4获得的抗体溶液加入到上述磁珠中,混匀后室温反应4小时;

[0052] 6、加入0.6ml 1mol/L的TRIS溶液37℃20分钟;

[0053] 7、每次加入1.5ml PH 7.2 0.15mol/LPB清洗已经标记的磁珠,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;

[0054] 8、用100ml磁珠保存液将磁珠转入125ml玻璃瓶,即为0.05%的GPC3磁分离试剂;磁珠保存液配方为0.5%BSA,0.05%吐温-20,0.02%NaN₃,4℃保存。

[0055] 9、将步骤9获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照1:1的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂。

[0056] 第二步:酶反应物制备过程

[0057] 一、酶反应物稀释液配制操作步骤,配制1L:

[0058] 1、取Tris 6.06g、NaCl 9.0g、ZnCl₂ 0.05g、Proclin-300 0.5ml和MgCl₂ 0.05g于烧瓶中,然后在烧瓶中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0059] 2、调PH,控制PH在7.35-7.45范围内;

[0060] 3、称取BSA2g倒入上述烧杯中;

[0061] 4、最后定容至1000ml,用0.2um滤器过滤即得。

[0062] 二、碱性磷酸酶ALP与抗GPC3单克隆抗体的偶联

[0063] 1、取10mgALP加入1ml生理盐水中,充分溶解;

[0064] 2、向步骤1中加入0.1ml的0.2M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟,然后装入透

析袋中,用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,收集保留液;

[0065] 3、向步骤3获得保留液中加入0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使PH升高到9.0,然后立即加入2.5mg抗GPC3单克隆抗体,室温避光轻轻搅拌2小时,再加入0.1ml的4mg/ml NaBH₄溶液,混匀,置4℃下2小时;

[0066] 4、将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4℃过夜,收集保留液;

[0067] 5、向步骤4获得保留液中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时,然后3000rpm离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于20ml的0.15M PH7.4的PBS中;

[0068] 6、将步骤5获得的溶液装入透析袋中,用0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析5个小时去除铵离子,收集保留液后10,000rpm离心30分钟去除沉淀,收集上清液,按照体积比为1:100的比例添加1M MgCl₂溶液,即得碱性磷酸酶(ALP)与GPC3单克隆抗体的偶联物,最后将收集到的碱性磷酸酶(ALP)与GPC3单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:1000的体积比混合均匀,即得酶反应物。

[0069] 第三步:

[0070] 校准品的配制:

[0071] 使用校准品稀释液将GPC3的抗原按照一定浓度和方法稀释成:0、0.5、2、8、32、64ng/mL。

[0072] 第四步:

[0073] 清洗浓缩液配制步骤,配制1L:

[0074] 1、称取TRIS 12.12g和NaCl 180g于1L容器中;

[0075] 2、称取5g Tween-20于100ml容器中加20ml水使其完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0076] 3、用移液器将Proclin-300量取1ml于盛有10ml纯化水的烧杯中完全溶解后,倒入上述1L容器中;

[0077] 4、用量筒量取800ml纯化水于上述1L容器中,充分搅拌,直至完全溶解;

[0078] 5、调PH,控制其范围在7.35—7.45之间;

[0079] 6、最后定容1000ml,完全溶解后用0.2um滤器过滤即得。

[0080] 第五步:

[0081] 底物溶液配制步骤,配制1L:

[0082] 1、称取TRIS 3.02g、NaCl 4.5g、Na₂SO₃ 0.002g和Proclin-300 0.5ml于1L烧杯中;

[0083] 2、用量筒量取600ml纯化水于1L烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,调PH,控制其范围在7.95—8.05之间;

[0084] 3、加入250ml Lumi-Phos 480后,用0.2um滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得。

[0085] 本发明工作原理:本发明为采用双抗体夹心法用于检测GPC3抗原,采用了磁性微粒分离技术实现了目标物质与其他物质的分离,采用了化学发光的光信号用于最终的信号检测。在试剂盒检测时:在标本、校准品和质控品中加入定量的酶标GPC3单抗、在含有结合着GPC3单克隆抗体的磁性微粒中,加入检测标本(血清标本、标准品或者质控品),然后再加

入标记有ALP的酶标GPC3抗体,37℃孵育后,磁性微粒上结合的GPC3单克隆抗体与酶标单克隆抗体分别与GPC3抗原的不同表位结合,形成“三明治”结构的双抗体夹心法的复合物。然后采用外加磁场,让复合物沉淀吸附在试管壁,倒掉上清液,并采用洗涤液洗涤,然后加入化学发光底物液。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,即可使用发光仪检测反应的发光强度,根据标准曲线即可算出样品中的GPC3含量。在检测范围内,发光强度与样本中的GPC3浓度成正比。

[0086] 实施例1

[0087] 本实施例的含有标记有抗GPC3单克隆抗体的磁性微球按以下步骤制备:

[0088] 一、磁珠缓冲液的配置:配方见表1,以配制1L为例:

[0089] 1、称取TRIS 6.06g、NaCl 9.0g、1.0g TWEEN-20于1L容器中;

[0090] 2、用移液器将Proclin-300量取0.5ml于上述1L容器中,然后在上述1L容器中加入800ml纯化水,充分搅拌;

[0091] 3、调节PH计测量其PH值,调PH,控制PH在8.0+0.05;

[0092] 4、称取BSA2g倒入上述1L容器中;

[0093] 5、最后定容至1000ml,用0.2um滤器过滤;过滤完后贴好标签于2-8℃冷库贮存。

[0094] 磁珠缓冲液有效期为12个月;

[0095] 表1磁珠缓冲液的原料及配比

[0096]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	6.06g	分析纯
NaCl	9.0g	分析纯
TWEEN-20	1.0g	分析纯

[0097]

Proclin-300	0.5ml	/
加水至	加至 800ml，溶解混匀	
PH	8.0+0.05	
加水至	加至 1000ml	
BSA	2.0g	
验证 PH	8.0+0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0098] 二、磁分离试剂的制备过程

[0099] 1、将2.0mg辛二酸二琥珀酰亚胺酯溶于100ul DMSO中,取4mg抗GPC3(来源于科博信(北京)生物技术有限公司,浓度为3.24mg/ml)单克隆抗体溶于PH 9.5的0.15mol/L PB缓冲液中至总体积为2ml;

[0100] 2、确定辛酸二琥珀酰亚胺酯的投入量,用移液枪吸取辛酸二琥珀酰亚胺酯加入到步骤1的抗体溶液中,置室温90min;

[0101] 3、将步骤2抗体溶液加入到Centricon-10浓缩管中然后放入到thermo高速冷冻离心机中浓缩40min至体积为1ml;

[0102] 4、取1ml磁珠(MERCK),浓度为1mg/ml,直径1微米左右,加入10ml反应杯中,放入专用试管架,经磁铁吸附2分钟后吸取上清;

[0103] 5、每次加入1.5ml PH9.5 0.15mol/L PB,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;将步骤4获得的抗体溶液加入到上述磁珠中,混匀后室温反应4小时;

[0104] 6、加入0.6ml 1mol/L的TRIS溶液37℃20分钟;

[0105] 7、每次加入1.5ml PH 7.2 0.15mol/L PB清洗已经标记的磁珠,混匀30秒,上架,去上清,重复操作3次;

[0106] 8、用100ml磁珠保存液将磁珠转入125ml玻璃瓶,即为0.05%的GPC3磁分离试剂;磁珠保存液配方为0.5%BSA,0.05%吐温-20,0.02%NaN₃,4℃保存。

[0107] 9、将步骤8获得的磁分离试剂用磁珠缓冲液按照1:1的比例混匀,即得本发明试剂盒中磁分离试剂。

[0108] 10、贴好标签于2-8℃冷库贮存,磁分离试剂有效期为12个月。

[0109] 实施例2

[0110] 本实施例的碱性磷酸酶标记的抗GPC3单克隆抗体按以下步骤制备:

[0111] 一、酶反应物(碱性磷酸酶标记的抗GPC3单克隆抗体)稀释液配制:配方见表2,以配制1L为例:

[0112] 1、取Tris 6.06g、NaCl 9.0g、ZnCl₂ 0.05g、Proclin-300 0.5ml和MgCl₂ 0.05g于烧瓶中,然后在烧瓶中加入800ml纯化水,充分搅拌,使试剂完全溶解;

[0113] 2、调PH,控制PH在7.35-7.45范围内;

[0114] 3、称取BSA 2g倒入上述烧杯中;

[0115] 4、最后定容至1000ml,用0.2um滤器过滤即得,贴好标签于2-8℃冷库贮存,有效期为12个月。

[0116] 表2酶反应物稀释液的原料及配比

[0117]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	6.06g	分析纯
NaCl	9.0g	分析纯
Proclin-300	0.5ml	/
MgCl ₂	0.05g	分析纯
ZnCl ₂	0.05g	分析纯
纯化水	加至 800ml, 溶解混匀	
HCL 或者 NaOH	调节 PH 到 7.4+0.05	
BSA	2.0g	/
纯化水	加至 1000ml, 充分混匀	
验证 PH	7.4+0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0118] 二、碱性磷酸酶 (ALP) 与抗GPC3单克隆抗体的偶联

[0119] 1、取10mgALP加入1ml生理盐水中,充分溶解;

[0120] 2、向步骤1中加入0.1ml的0.2M NaIO₄溶液,室温下避光搅拌20分钟,然后装入透析袋中,用1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜,收集保留液;[0121] 3、向步骤3获得保留液中加入0.2M PH9.5碳酸盐缓冲液,使PH升高到9.0,然后立即加入2.5mg抗GPC3单克隆抗体(购自科博信(北京)生物技术有限公司,浓度3.85mg/ml),室温避光轻轻搅拌2小时,再加入0.1ml的4mg/ml NaBH₄溶液,混匀,置4℃下2小时;

[0122] 4、将上述液装入透析袋中,对0.15M PH7.4PBS透析,4℃过夜,收集保留液;

[0123] 5、向步骤4获得保留液中逐滴加入等体积饱和硫酸铵,置4℃1小时,然后3000rpm离心半小时,弃上清,沉淀物用半饱和硫酸铵洗二次,最后沉淀物溶于20ml的0.15M PH7.4的PBS中;

[0124] 6、将步骤5获得的溶液装入透析袋中,用0.15M PH7.4的PB缓冲盐水透析5个小时去除铵离子,收集保留液后10,000rpm离心30分钟去除沉淀,收集上清液,按照体积比为1:100的比例添加1M MgCl₂溶液,即得碱性磷酸酶 (ALP) 与GPC3单克隆抗体的偶联物,最后将收集到的碱性磷酸酶 (ALP) 与GPC3单克隆抗体的偶联物用上述酶反应物稀释液以1:1000的体积比混合均匀,即得酶反应物(碱性磷酸酶标记的抗GPC3单克隆抗体)。

[0125] 实施例3

[0126] 本实施例的校准品按以下步骤制备:

[0127] 一、校准品稀释液的配制:以配制1L为例:

[0128] 1、称取NaCl9.0g和BSA 40g于1L的容器中;

[0129] 2、用移液器将Proclin-300量取0.5ml加10ml纯化水溶解,倒入上述1L的容器中;

[0130] 3、最后定容1000ml，完全溶解后，用0.2um滤器过滤，贴好标签于2-8℃冷库贮存，有效期为12个月。

[0131] 表3稀释液的原料及配比

[0132]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
NaCl	9g	分析纯
Proclin-300	1ml	/
BSA	40g	/
0.2um 滤器过滤		

[0133] 二、校准品最高点：最高浓度点为X，目标点浓度为A,B,C,D,E,F，配制V体积的溶液时，需加入原料的体积如表4所示。

[0134] 表4加入原料的体积

[0135]

浓度	加入标准品稀释液体积	加入X体积
A	$V-A*V/X$	$A*V/X$
B	$V-B*V/X$	$B*V/X$
C	$V-C*V/X$	$C*V/X$
D	$V-D*V/X$	$D*V/X$
E	$V-E*V/X$	$E*V/X$
F	$V-F*V/X$	$F*V/X$

[0136] 三、磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (GPC3) 定量测定试剂盒GPC3校准品原料 (Fitzgerald公司, 浓度为1.0mg/ml) 用校准品稀释液按照上述方法配制成浓度点为0、0.5、2、8、32、64ng/mL。配置好充分混匀后，分装，贴好标签于2-8℃冷库贮存，有效期为12个月。

[0137] 实施例4

[0138] 本实施例的清洗液浓缩液(含有TWEEN-20和Proclin-300的缓冲液)按以下步骤制备：

[0139] 配方见(表5)以配制1L为例：

[0140] (注：浓缩洗涤液使用时需要20倍稀释后使用。)

[0141] 1、称取TRIS 12.12g和NaCl 360g于1L容器中；

[0142] 2、称取5g Tween-20后，倒入上述1L容器中；

[0143] 3、用移液器将Proclin-300量取1ml，倒入上述1L容器中；

[0144] 4、用量筒量取800ml纯化水于上述1L容器中，充分搅拌，直至完全溶解；

[0145] 5、用HCL或NaOH调pH值，控制其范围在7.35—7.45之间；

[0146] 6、最后定容1000ml，完全溶解后用0.2um滤器过滤，分装后贴标签于2-8℃贮存，有效期为12个月。

[0147] 表5清洗浓缩液的原料及配比

[0148]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	12.12g	分析纯
NaCl	360g	分析纯
Tween-20	5g	分析纯
Proclin-300	1ml	/
纯化水	加至 800ml，混匀溶解	
pH	7.4+0.05	
纯化水	加至 1000ml，混匀溶解	
验证 pH	7.4+0.05	
0.2um 滤器过滤		

[0149] 实施例5

[0150] 本实施例的底物溶液按以下步骤配制:

[0151] 配方见(表6),以配制1L为例:

[0152] 1、称取TRIS 3.02g、NaCl 4.5g、Na₂S₂O₃ 0.002g和Proclin-300 0.5ml于1L烧杯中;

[0153] 2、用量筒量取600ml纯化水于1L烧杯中,充分搅拌,直至完全溶解,用HCl或NaOH调PH,控制其范围在7.95—8.05之间;

[0154] 3、加入250ml Lumi-Phos 480后,用0.2um滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后分装。贴好标签于2-8℃冷库贮存,有效期为12个月。

[0155] 表6化学发光底物的原料及配比

[0156]

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	3.02g	分析纯
NaCL	4.5g	分析纯
Na2SO3	0.002g	分析纯
Proclin-300	0.5ml	/
纯化水	加至 600ml，混匀溶解	
PH	8.0+0.05	
Lumi-Phos 480	250ml，混匀	
验证 PH	8.0+0.05	
0.2um 滤器过滤		
纯化水	加至 1000ml，充分混匀	

[0157] 实施例6

[0158] 本实施例的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (GPC3) 的定量测定方法, 其采用实施例1-5中制得的试剂进行检测, 并按以下步骤进行:

[0159] 1、取与反应测试数相等的洁净试管, 放于特质试管架上;

[0160] 2、在对应试管的底部加入20 μ l GPC3的待测标本或者标准品;

[0161] 3、在每个试管内加入50 μ l酶反应物;

[0162] 4、在每个试管中加入30 μ l磁分离试剂;

[0163] 5、采用多管混匀器振荡混匀试管架20-30s, 然后置于37℃水浴锅中水浴放置30分钟;

[0164] 6、从水浴锅中取出试管架, 放于磁分离器上, 确保每支试管都与分离器表面接触, 沉淀2-3分钟。缓慢的倒转分离器倒出上清液, 把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上, 用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0165] 7、将浓缩洗涤液用纯化水稀释20倍后, 加入400 μ l稀释后的清洗液至每一试管中, 置多管混匀器上轻轻振荡混匀20-30s。然后重复6、7的操作两遍;

[0166] 8、在清洗完, 并在滤纸上充分倒出了清洗液的试管内加入200 μ l底物溶液中, 手工试管架约3-5秒后, 迅速使用准备好的发光检测仪进行检测;

[0167] 9、通过发光检测仪, 获取各测试的光子技术, 根据校准品检测的化学发光值和已知的浓度值绘制标准曲线, 将待测样品的发光值代入标准曲线中, 求得其对应的浓度值, 即得检查样本中GPC3的含量。

[0168] 验证试验:

[0169] 临床应用测试:

[0170] 1、检测数据

[0171] 我们通过不同地域的多家医院, 并尽量收集到不同地区、不同个体的血清标本共

计1050例,其中体检正常人的标本600例,肿瘤患者标本420例(其中肝癌患者标本342例,其他癌症患者标本78例),溶血、脂血、胆固醇高者等干扰性标本30例。我们采用本发明的试剂盒对以上1050份血清标本进行检测,同时我们也采用某国外公司生产的磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC3)ELISA检测试剂盒同时进行对比,我公司在检测600例正常人标本时,阴性率达到了99.7%,而对比试剂盒阴性率97.7%;我们在检测420例癌症标本时,阳性率达到了82.4%,对比试剂盒阳性率是73.3%,我们对干扰性标本进行检测时,出现了2份阳性,而对比试剂盒出现了8份阳性。通过临床实验数据表明,我们采用本发明的磁微粒化学发光技术对磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC3)的检测,能够大大提高试剂盒对GPC3检出的灵敏度和特异性。本发明采用的方法和试剂盒在临床的应用检测中可以为肿瘤疾病的诊断和治疗发挥更大的作用。

[0172] 2、本发明试剂盒性能指标

[0173] 分析灵敏度:0.05ng/ml

[0174] 精密性:批内变异CV% $\leq$ 10.0%;批间变异CV% $\leq$ 15.0%

[0175] 线性系数: $r\geq 0.9900$

[0176] 线性范围:0.50-64ng/ml

[0177] 特异性:测定1000 μ g/L的AFP,干扰度 $<0.5\%$ 。

[0178] 虽然以上描述了本发明的具体实施方式,但是本领域的技术人员应当理解,这些仅是举例说明,本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下,可以对这些实施方式作出多种变更或修改,但这些变更和修改均落入本发明的保护范围。

专利名称(译)	磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN106526165A	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610980010.5	申请日	2016-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京久峰润达生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京久峰润达生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京久峰润达生物技术有限公司		
发明人	张念林		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	郭鸿雁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒及其检测方法，涉及一种借助于生物特有的结合方法来测定或分析材料的试剂盒及其测定方法，特别是涉及一种免疫检测试剂盒及其检测方法。其目的是为了提供一种更加有效、灵敏，特异性更强的磷脂酰肌醇蛋白聚糖定量测定试剂盒。本发明的试剂盒包括：磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂、酶反应物、标准品和底物溶液。本发明的制备方法，本发明的检测方法包括：待测样品和标准品分别与磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂充分结合；然后与酶反应物混合，温育；将磷脂酰肌醇蛋白聚糖磁分离试剂分离；清洗后加入底物溶液；测定吸光度。本发明的检测方法准确性好、精密度高、灵敏度高，操作简单省时，检测范围宽。

试剂	1000ml 用量	试剂级别
TRIS	6.06g	分析纯
NaCl	9.0g	分析纯
TWEEN-20	1.0g	分析纯