



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370841 A  
(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610789114.8

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 镇江华测金太医学检验所有限公司  
地址 212016 江苏省镇江市京口区宗泽路  
60号恺源大厦10楼

(72)发明人 陆上苏 吴伟 徐恒

(51)Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

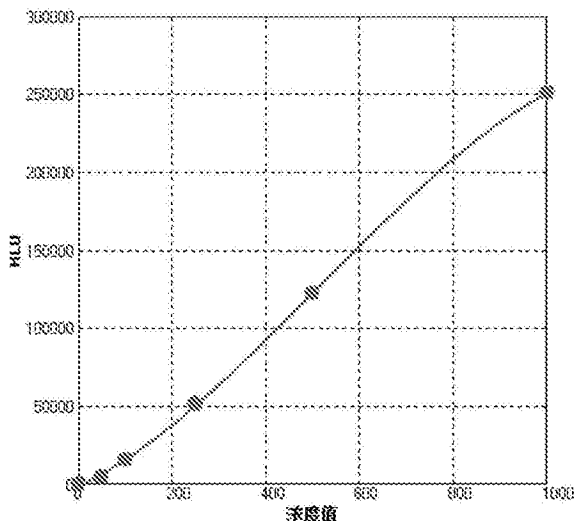
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,各孔包被有抗GP73抗体,抗体包被浓度为 5.0 μg/mL,所述试剂包括:GP73系列标准品溶液,GP73系列质控品溶液,样本稀释液,酶标GP73抗体,链酶亲和素-HRP,化学发光液A液,化学发光液B液,浓缩洗涤液。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。可用作检测肝癌的辅助诊断。



1. 一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,各孔包被有抗GP73抗体,抗体包被浓度为 $5.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ,所述试剂包括:GP73系列标准品溶液,GP73系列质控品溶液,样本稀释液,酶标GP73抗体,链酶亲和素-HRP,化学发光液A液,化学发光液B液,浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述盒体检测样本为人血清样本。

3. 根据权利要求2所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述GP73系列标准品溶液浓度分别为: $0$ 、 $50\text{ng}/\text{mL}$ 、 $100\text{ng}/\text{mL}$ 、 $250\text{ng}/\text{mL}$ 、 $500\text{ng}/\text{mL}$ 、 $1000\text{ng}/\text{mL}$ 。

4. 根据权利要求3所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述GP73系列质控品溶液浓度分别为: $500\pm 100\text{ng}/\text{mL}$ 、 $200\pm 40\text{ng}/\text{mL}$ 。

5. 根据权利要求4所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述样本稀释液为 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=7.4$ ,磷酸盐缓冲液是每升含有 $16\text{g NaCl}$ , $0.4\text{g KCl}$ , $0.4\text{g KH}_2\text{PO}_4$ , $5.8\text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 的水溶液。

6. 根据权利要求5所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述酶标GP73抗体是由GP73抗体与生物素偶合制成的偶联物作为检测抗体。

7. 根据权利要求6所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液是含有体积分数 $0.05\%$ 吐温-20的 $\text{pH}=7.4$ , $0.1\text{mol}/\text{L}$ 磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求7所述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为 $0.01\text{M}$ 、对甲苯酚含量为 $0.001\text{M}$   $\text{pH}=8.8$ 的三羟甲基氨基甲烷溶液;B液为每 $100\text{mL}$ 溶液含柠檬酸 $2.1\text{g}$ ,无水 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $2.82\text{g}$ , $0.75\%$ 的过氧化氢脲 $0.64\text{mL}$ 的水溶液,所述百分比为质量百分比。

## 一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种高尔基体蛋白73 (GP73) 的化学发光酶联免疫 (CLEIA) 检测试剂盒,用于检测肝癌病人血清中的GP73蛋白的浓度。可用作检测脑梗死等脑损伤疾病的辅助诊断。属于免疫学检测领域。

### 背景技术

[0002] 无论是在发达国家还是在欠发达国家,癌症是导致死亡的主要原因之一,随着全球范围内的人口增长和老龄化,以及日益增加的患病因素(包括吸烟,体重超重,缺乏体力活动,城市化和经济发展相关的生育模式的变化),癌症的发生率和死亡人数一直在增加,癌症的治疗和预防研究刻不容缓。在我国,因肺和支气管、胃、肝、食道、结肠发生的癌症导致死亡的人数占所有癌症死亡总数的约四分之三。2015年相关数据分析显示,有新发浸润性癌病例数429.2万,相当于平均每天新发12000例癌症,有281.4万癌症死亡病例,相当于平均每天7500人死于癌症。

[0003] GP73是Kladney等在研究成人巨细胞性肝炎(giant cell hepatitis,GCH)病原学时首次被发现的一种相对分子质量为 $7.3 \times 10^4$ Da的跨膜糖蛋白,又称为II型高尔基体膜蛋白(Golginphosphoprotein2,Golph2)和高尔基体膜蛋白I(GolginmembraneproteinI,GolmI)。编码GP73蛋白的基因位于第9号染色体,全长共3080个核苷酸,编码区位于199-1404nt,共编码402个氨基酸。GenBank目前已经公布了人类GP73序列共9条,其长度和核苷酸序列都有不同。血浆中的可溶性GP73来源于高尔基体。肝病患者血清中蛋白表达水平与健康者明显不同,GP73的异常表达与肝细胞癌密切相关。

[0004] 化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有技术中的问题,本发明提供了一种具有高灵敏度、简便快速、准确度高的高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒

[0006] 为了解决上述问题,本发明所采取的技术方案是:

[0007] 一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂,所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板,各孔包被有抗GP73抗体,抗体包被浓度为 $5.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,所述试剂包括:GP73系列标准品溶液,GP73系列质控品溶液,样本稀释液,酶标GP73抗体,链酶亲和素-HRP,化学发光液A液,化学发光液B液,浓缩洗涤液。

[0008] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述盒体检测样本为人血清样本。

[0009] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述GP73系列标准品溶液浓度分别为:0、50、100、250、500、1000ng/mL。

[0010] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述GP73系列质控品溶液浓度分别为:500±100、200±40ng/mL

[0011] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述样本稀释液为0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4,磷酸盐缓冲液是每升含有16g NaCl,0.4g KCl,0.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,5.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的水溶液。

[0012] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所设酶标GP73抗体是由GP73抗体与生物素偶合制成的偶联物作为检测抗体。

[0013] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩洗涤液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4,0.1mol/L磷酸盐缓冲液。

[0014] 前述的一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M pH=8.8的三羟甲基氨基甲烷溶液;B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g,无水Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.82g,0.75%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液,所述百分比为质量百分比。

[0015] 本发明所达到的有益效果:本发明试剂盒利用抗原与抗体的特异性免疫反应的基本原理来实现的。化学发光免疫分析法是化学发光法和免疫分析法结合的产物,因此同时具有化学发光法的高灵敏性和免疫分析法的高特异性。在整个反应过程中,样品中GP73含量越高,反应体系中发光强度越强;反之,样品中GP73含量越少,发光强度越弱。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点,与传统的ELISA法比较,操作时间大幅度减少。可用作检测肝癌的辅助诊断。

## 附图说明

[0016] 图1是本发明化学发光试剂盒标准曲线。

## 具体实施方式

[0017] 下面结合附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0018] 本发明第一方面提供了一种高尔基体蛋白73(GP73)的化学发光酶联免疫(CLEIA)检测试剂盒,包括盒体,设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂:

[0019] 1.包被有抗GP73抗体的白色不透明96孔可拆卸或不可拆卸的聚苯乙烯化学发光板,抗体包被浓度为5.0μg/mL。

[0020] 2.GP73系列标准品溶液。浓度分别为:0、50、100、250、500、1000ng/mL。

[0021] 3.GP73系列质控品溶液浓度分别为:500±100、200±40ng/mL。

[0022] 4.样本稀释液。为0.05mol/L磷酸盐缓冲液,pH=7.4。

[0023] 5.酶标GP73抗体。由GP73抗体与生物素偶联制备得到。

[0024] 6.链亲和素-HRP。

[0025] 7.发光底物液。发光底物液分为A、B液。A液为化学发光底物-鲁米诺和发光增强剂-对甲苯酚溶液,B液为过氧化氢脲溶液。

[0026] 8.浓缩洗涤液。浓缩洗涤液具体为含有吐温-20(Tween-20)缓冲液的20倍浓缩磷酸盐缓冲液,使用前用双蒸水稀释至工作浓度后使用,用于实验过程中洗涤化学发光板。

- [0027] 本发明第二方面该试剂盒适用于肝癌的辅助诊断。
- [0028] 本发明第三方面该试剂盒检测样本为人血清样本。
- [0029] 本发明第四方面相关溶液的配制：
- [0030] 本发明试剂盒中涉及的GP73标准品溶液、样本稀释液、化学发光溶液及洗涤溶液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大；其中各溶液的主要成分及其配制方法是：
- [0031] 1. GP73标准品溶液：以常规方法将GP73纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为0、50、100、200、500、1000ng/mL的1CAM-1标准溶液。
- [0032] 2. GP73系列质控品溶液：以常规方法将GP73纯品用标准品稀释液配制成浓度分别为：500±100、200±40ng/mL
- [0033] 3. 酶标GP73抗体溶液：用GP73抗体与生物素偶联制备，将所得GP73抗原用酶标GP73稀释液稀释成1:4000的工作浓度。
- [0034] 4. 标准品稀释液：为含有BSA，蔗糖的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，是每升含有20g BSA，50g蔗糖，16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，5.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的水溶液。
- [0035] 5. 酶标抗原稀释液：为含有BSA的0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，是每升含有20g BSA，16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，5.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的水溶液。
- [0036] 6. 样本稀释液：为0.05mol/L磷酸盐缓冲液，pH=7.4，是每升含有16g NaCl，0.4g KCl，0.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，5.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>的水溶液。
- [0037] 7. 化学发光溶液：A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M，pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液，B液为每100mL溶液含柠檬酸2.1g，无水Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.82g，0.75%的过氧化氢脲0.64mL的水溶液。
- [0038] 8. 浓缩洗涤液：按体积分数0.05%将吐温-20添加至pH=7.4，0.1mol/L磷酸盐缓冲液中。
- [0039] 9. 包被溶液：1.59g碳酸钠和2.53g碳酸氢钠溶于1L水中，调节pH=9.5。
- [0040] 10. 封闭溶液：10g BSA溶于1L洗涤溶液中，再加入重量比为5%的NaN<sub>3</sub>
- [0041] 本发明第五方面化学发光板的包被：
- [0042] 本发明中包被化学发光板采用将抗GP73抗体置于设定的包被溶液中，以设定的浓度，在37℃恒温箱中反应包被。
- [0043] 本发明采用的是pH=9.5的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液。本发明中微孔板中所包被的抗GP73抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上，可以经受多次洗板，采用的抗体包被浓度为5.0μg/mL。包被好的微孔板可以用封闭溶液封闭，封闭液中惰性蛋白优选BSA，需加入NaN<sub>3</sub>防止变质
- [0044] 本发明第六方面该试剂盒的实验操作方法：
- [0045] 1. 化学发光板使用前每孔加200μl清洗液，等待30秒后甩尽清洗液，重复2次。
- [0046] 2. 将校准品、质控品或样本各20μl分别加入化学发光板微孔中，再加入样本稀释液80μl，震荡混匀后，用封板膜封板，37℃水浴20分钟。
- [0047] 3. 甩去化学发光板孔内液体，每孔加200μl清洗液，等待30秒后甩尽清洗液，重复此操作5次。
- [0048] 4. 加入生物素标记抗体，每孔100μl，用封板膜封板，37℃水浴30分钟。

- [0049] 5. 甩去孔内液体,每孔加200 $\mu$ l清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,重复此操作5次。  
 [0050] 6. 每孔加入100 $\mu$ l的链酶亲和素-HRP,用封板膜封板,37 $^{\circ}$ C水浴30分钟。  
 [0051] 7. 甩去孔内液体,每孔加200 $\mu$ l清洗液,等待30秒后甩尽清洗液,重复此操作5次。  
 [0052] 8. 每孔分别加入50 $\mu$ l发光液A液和50 $\mu$ l发光液B液,立刻置于化学发光仪器中读数。

[0053] 本发明理化实验数据

[0054] 1. 最低检测线

[0055] 用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的发光值(RLU值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD所对应的RLU值,根据试剂盒所用校准品的定标曲线方程,将M+2SD所对应的RLU值带入标准曲线中,求出对应的浓度值,即为检测限。

检验编号	RLU 值	发光值均值 (M)	标准差 SD	M+2SD	最低检测限 (ng/mL)
1	269	221	10.71	241.02	9.9
2	278				
3	258				
4	270				
5	273				
6	255				
7	255				
8	248				
9	285				
10	243				
11	252				
12	291				
13	255				
14	261				
15	275				
16	278				
17	285				
18	270				
19	260				
20	252				

[0057] 2. 准确度

[0058] 取准确度参考品作为样本进行检测。重复测量3次后,其平均结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差。

[0059]  $B = (M - T) / T \times 100\%$  ..... 公式(1)

[0060] 式中:

[0061] B—相对偏差;

[0062] M—测量浓度3次结果的平均值;

[0063] T—准确度参考品的浓度。

准确度参考品 浓度 (T) (ng/ml)	样本RLU值	样本测量浓度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	相对偏差 (B)
500	130273	525.06	521.83	4.37%
	126617	512.98		
	130993	527.44		

[0065] 3. 重复性

[0066] 用两个浓度水平的样本各重复检测10次,计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出变异系数CV。

[0067]  $CV = SD / M \times 100\%$  ..... 公式(2)

[0068] 式中:

[0069] CV—变异系数;

[0070] SD—10次测量结果的标准差;

[0071] M—10次测量结果的平均值。

样本浓度 (ng/ml)	检验 编号	RLU 值	测量浓度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	标准 差	变异 系数
500	1	129706	523.19	509.47	17.87	3.49%
	2	117779	483.77			
	3	120299	492.11			
	4	127773	516.80			
	5	126626	513.01			
	6	120029	491.21			

[0073]	7	132525	532.50			
	8	127760	516.76			
	9	120897	494.08			
	10	132158	531.29			

样本浓度 (ng/ml)	检验 编号	RLU 值	测量浓度 (ng/ml)	均值 (M) (ng/ml)	标准 差	变异 系数
[0074]  200	1	57447	275.43	288.04	18.83	6.54%
	2	62762	295.05			
	3	66330	308.01			
	4	65385	304.59			
	5	59582	283.36			
	6	61839	291.67			
	7	65347	304.45			
	8	64069	299.81			
	9	50567	249.40			
	10	55638	268.66			

[0075] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

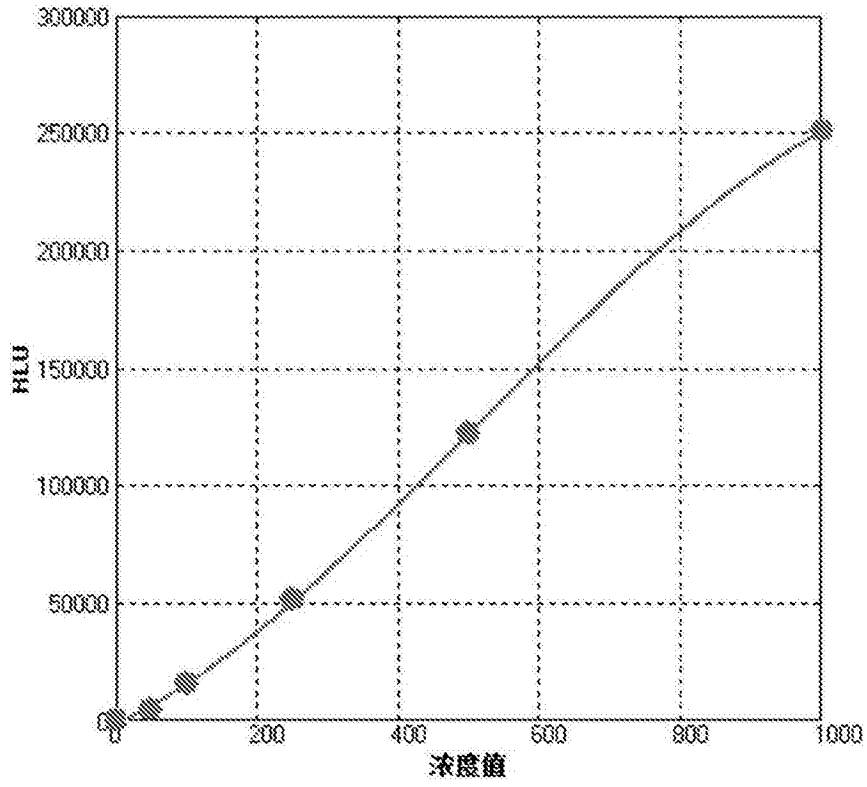


图1

专利名称(译)	一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106370841A</a>	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610789114.8	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	镇江华测金太医学检验所有限公司		
[标]发明人	陆上苏 吴伟 徐恒		
发明人	陆上苏 吴伟 徐恒		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/574 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/76 G01N33/57438		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种高尔基体蛋白73的化学发光酶联免疫检测试剂盒，其特征在于：包括盒体，设在盒体内的化学发光板和设在盒体内的试剂，所述化学发光板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光板，各孔包被有抗GP73抗体，抗体包被浓度为 5.0 μg/mL，所述试剂包括：GP73系列标准品溶液，GP73系列质控品溶液，样本稀释液，酶标GP73抗体，链酶亲和素-HRP，化学发光液A液，化学发光液B液，浓缩洗涤液。本发明的化学发光酶联免疫检测试剂盒具有高灵敏度、简便快速、准确度高的特点，与传统的ELISA法比较，操作时间大幅度减少。可用作检测肝癌的辅助诊断。

