



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107436360 A

(43)申请公布日 2017.12.05

(21)申请号 201710630814.7

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2017.07.28

G01N 33/543(2006.01)

(71)申请人 佛山市烨泰科技有限公司

G01N 33/535(2006.01)

地址 528231 广东省佛山市南海区狮山镇
虹岭三路181号中国科学院南海生物
医药科技产业中心B座三楼303-305室

G01N 21/64(2006.01)

(72)发明人 龙飞 肖静 彭涛 任侃 陈利军
李自强

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利
代理事务所(普通合伙)
44295

代理人 黄为

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

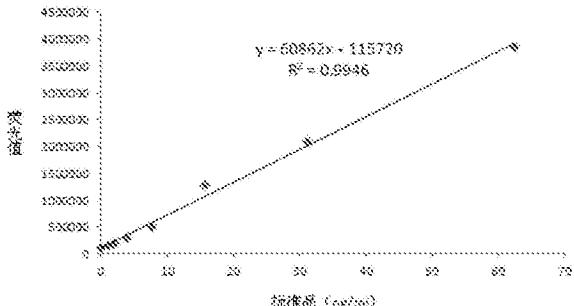
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统及
使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,包括试剂盒、便携式荧光检测仪、磁铁板以及磁珠载体,其中所述的试剂盒中包括样品稀释液、清洗缓冲液、抗体稀释液、封闭缓冲液、显色试剂、终止液、磁珠活化剂、GP73标准品、识别GP73的单克隆抗体-5F10以及辣根过氧化物酶标记的识别GP73的单克隆抗体-5B12。本发明还公开了上述检测系统的使用方法。本发明不需要使用酶标仪,可在缺乏大型设备的相关单位使用。该系统基于免疫磁珠的血清GP73双单抗夹心ELISA检测试剂,结合便携式荧光检测仪即可完成整个检测过程,检测成本低、操作简单高效。



1. 一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,包括试剂盒、便携式荧光检测仪、磁铁板以及磁珠载体,其中所述的试剂盒中包括清洗缓冲液、样品稀释液、磁珠清洗缓冲液、抗体稀释液、封闭缓冲液、显色试剂、终止液、磁珠活化剂、GP73标准品、识别GP73的单克隆抗体-5F10以及辣根过氧化物酶标记的识别GP73的单克隆抗体-5B12。

2. 根据权利要求1所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述磁珠清洗缓冲液为pH6.0的15Mm MES缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的用于高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述样品稀释液和抗体稀释液均为pH为7.4的含1%BSA的PBS溶液。

4. 根据权利要求1所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述磁珠载体为选用羧基修饰的超顺磁性微球。

5. 根据权利要求1所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述封闭缓冲液为pH为7.4的含0.05%NaN₃、1%BSA的PBS溶液,所述清洗缓冲液为含0.05%Tween-20的PBST溶液。

6. 根据权利要求1所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述显色试剂包含10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪、荧光稳定剂、增强剂以及柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液;所述终止液为甘氨酸溶液。

7. 根据权利要求6所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述的增强剂包括但不限于过硼酸钠与碘酸钠。

8. 根据权利要求7所述的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统,其特征是,所述显色试剂中包含50μm 10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪(ADHP),3.8mM过硼酸钠,950μm3-(10-吩嗪基)丙烷-1-碘酸钠,缓冲液为pH6.0的75mM柠檬酸-柠檬酸钠;所述终止液为浓度为1.5M甘氨酸,pH10.3。

9. 权利要求1-8任一项所述的小型ELISA检测系统的使用方法,其特征是,包括以下步骤:

1) 活化磁珠载体:取磁珠载体经磁珠清洗缓冲液进行清洗后,加入磁珠活化剂在室温下避光振荡反应25-35min后采用磁铁板进行磁性分离,得到活化的磁珠载体;

2) 制备人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫磁珠:按45-55ug抗体/mg磁珠的比例加入样品稀释液稀释的人GP73单克隆抗体5F10,37℃下避光震荡反应1.5-2h,采用磁铁板磁性分离清洗后,加入封闭缓冲溶液进行室温震荡反应30min,以封闭未结合抗体的游离醛基,即得人GP73单克隆抗体5F10包被的的免疫活性磁珠;

3) 用样品稀释液稀释步骤2)所得的免疫磁珠,免疫磁珠与样品稀释液之间的质量体积比为1:10-1:1000,然后按100uI/孔加到特异性AFP抗体包被酶标板中;

4) 制备不同浓度梯度的GP73标准品溶液;

5) 对酶标板的各孔中的免疫磁珠进行磁性分离并用清洗缓冲液洗涤,而后将各浓度梯度的GP73P标准品和10倍稀释的待测血清样品按100uI/孔分别加入酶标板相应的孔中,37℃避光震荡孵育0.5-2h;

6) 对经过GP73P标准品和待测血清样品孵育的酶标板的各孔的免疫磁珠磁性分离并用清洗缓冲液洗涤,然后各孔分别加入100uI/孔HRP标记的GP73抗体,37℃避光震荡孵育0.5-2h,从而形成以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物;

7) 对以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物进行磁性分离并采用清洗缓冲液洗涤,然后各孔中按100uL/孔加入显色试剂,37℃避光震荡显色5-15min;

8) 各孔按50uL/孔分别加入终止液;

9) 采用便携式荧光检测仪对各孔荧光值进行单独检测,激发波长为530nm,检测波长为590nm,然后根据各浓度标准品对应的荧光值,进行线性拟合绘制标准曲线,根据标准曲线的线性关系即可计算待测样品中GP73的含量。

10. 根据权利要求9所述的小型ELISA检测系统的使用方法,其特征是,所述步骤4)中的GP73标准品溶液的浓度分别为0ng/mL、3.9ng/mL、7.8ng/mL、15.6ng/mL、31.25ng/mL和62.5ng/mL。

一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及ELISA检测系统,具体涉及了一种高尔基蛋白-73 (GP73) 小型ELISA检测系统。同时,本发明还涉及了该小型ELISA检测系统的使用方法。

背景技术

[0002] 肝癌作为全球最为常见的恶性肿瘤之一,尤其是在我国肝癌发病率约占全球总数的55%,其死亡率居我国恶性肿瘤死亡率第二位。由于肝癌早期症状不明显,且具有发展迅速,早期易转移等特点,在临幊上早期诊断困难,预后效果差。目前,B超和血清学检测甲胎蛋白AFP含量是肝癌筛查的主要手段。然而B超对小肝癌和肝硬化结节的鉴别较难,而AFP近年来相继报道其诊断肝癌的灵敏度和特异性较低等缺点,据保守估计,凭借单一的甲胎蛋白血清学检测早期肝癌的漏诊率约在80%以上。因此,开发高灵敏度、高特异性的具有临幊早期诊断潜力的检测手段,在无症状的人群中发现早期病例,对于提高患者生存率,控制肝癌的病死率具有非常重要的现实意义。

[0003] 因此,目前使用的肝癌特异性血清学标识物无论在灵敏度及特异性方面,都需要通过新标识物的发现及多个标识物的联合使用进行改进。高尔基蛋白-73 (GP73) 是新发现的一个表达在高尔基膜上的二型跨膜蛋白,其在细胞中的正常生理功能尚不清楚。在人正常肝脏组织中很少表达,在病毒性肝病和纤维化肝病患者的肝脏中,GP73的表达量上调。近年相继有报道通过分析不同病人血清GP73的含量,显示GP73在肝癌的早期诊断中,其灵敏度和特异性都要较AFP高,联合应用可提高肝癌早期诊断的准确率。

[0004] 但目前关于GP73的检测主要是利用Western-blot、免疫组化和传统的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的方法,这些方法操作繁琐,且需依赖大型的检测仪器,限制了其在基层、社区医疗单位的运用。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供一种高尔基蛋白-73 (GP73) 小型ELISA检测系统。该系统检测成本低、操作简单高效。

[0006] 本发明的目的之二是提供上述小型ELISA检测系统的使用方法。

[0007] 本发明的第一个目的是通过以下技术方案来实现的:一种高尔基蛋白-73 (GP73) 小型ELISA检测系统,包括试剂盒、便携式荧光检测仪、磁铁板以及磁珠载体,其中所述的试剂盒中包括清洗缓冲液、样品稀释液、磁珠清洗缓冲液、抗体稀释液、封闭缓冲液、显色试剂、终止液、磁珠活化剂、GP73标准品、识别GP73的单克隆抗体-5F10以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的识别GP73的单克隆抗体-5B12。

[0008] 所述磁珠清洗缓冲液为pH6.0的15Mm MES缓冲液,用于磁珠载体的清洗。

[0009] 所述清洗缓冲液为含0.05% Tween-20的PBST溶液,用于除了磁珠清洗以外的ELISA检测过程中涉及的洗涤和清洗中。

[0010] 所述样品稀释液和抗体稀释液分别为pH为7.4的含1% BSA的PBS溶液。

- [0011] 所述磁珠活化剂为pH 6.0的15Mm MES缓冲液和1.25M的EDC溶液。
- [0012] 所述磁珠载体为选用羧基修饰的超顺磁性微球。
- [0013] 所述封闭缓冲液为含0.05%NaN₃、1%BSA的PBS溶液。
- [0014] 所述显色试剂包含10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪(ADHP)、荧光稳定剂、增强剂以及柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。其中所述的增强剂包括但不限于过硼酸钠与碘酸钠。优选地,所述显色试剂中包含50um 10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪(ADHP),3.8mM过硼酸钠,950um 3-(-10-吩噻嗪基)丙烷-1-碘酸钠,缓冲液为pH6.0的75mM柠檬酸-柠檬酸钠。
- [0015] 所述终止液为甘氨酸溶液,最优的浓度为1.5M甘氨酸, pH10.3。
- [0016] 本发明的第二个目的是通过以下技术方案来实现的:上述小型ELISA检测系统的使用方法,包括以下步骤:
- [0017] 1)活化磁珠载体:取磁珠载体经磁珠清洗缓冲液进行清洗后,加入磁珠活化剂在室温下避光振荡反应25-35min后采用磁铁板进行磁性分离,得到活化的磁珠载体;
- [0018] 2)制备人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫磁珠:按45-55ug抗体/mg磁珠的比例加入样品稀释液稀释的人GP73单克隆抗体5F10,37℃下避光震荡反应1.5-2h,采用磁铁板磁性分离清洗后,加入封闭缓冲溶液进行室温震荡反应30min,以封闭未结合抗体的游离醛基,即得人GP73单克隆抗体5F10包被的的免疫活性磁珠;
- [0019] 3)用样品稀释液稀释步骤2)所得的免疫磁珠,免疫磁珠与样品稀释液之间的体积比为1:10-1:1000,然后按100uL/孔加到酶标板中;
- [0020] 4)制备不同浓度梯度的GP73标准品溶液;
- [0021] 5)对酶标板的各孔中的免疫磁珠进行磁性分离并用清洗缓冲液洗涤,而后将各浓度梯度的GP73标准品和经过样品稀释液10倍稀释的待测血清样品按100uL/孔分别加入酶标板相应的孔中,37℃避光震荡孵育0.5-2h;
- [0022] 6)对经过GP73标准品和待测血清样品孵育的酶标板的各孔的免疫磁珠磁性分离并用清洗缓冲液洗涤,然后各孔分别加入100uL/孔HRP标记的GP73抗体,37℃避光震荡孵育0.5-2h,从而形成以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物;
- [0023] 7)对以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物进行磁性分离并采用清洗缓冲液洗涤,然后各孔中按100uL/孔加入显色试剂,37℃避光震荡显色5-15min;
- [0024] 8)各孔按50uL/孔分别加入终止液;
- [0025] 9)采用便携式荧光检测仪对各孔荧光值进行单独检测,激发波长为530nm,检测波长为590nm,然后根据各浓度标准品对应的荧光值,进行线性拟合绘制标准曲线,根据标准曲线的线性关系即可计算待测样品中GP73的含量。
- [0026] 所述步骤4)中的GP73标准品溶液的浓度分别为0ng/mL、3.9ng/mL、7.8ng/mL、15.6ng/mL、31.25ng/mL和62.5ng/mL。
- [0027] 本发明与现有技术相比具有以下有益效果:
- [0028] 本发明提供的用于肝癌早期诊断的高尔基蛋白-73(GP73)的小型ELISA检测系统,不需要使用酶标仪,可在缺乏大型设备的相关机构使用。该系统基于免疫磁珠的血清GP73双单抗夹心ELISA检测试剂,结合便携式荧光检测仪即可完成整个检测过程,检测成本低、操作简单高效。

附图说明

- [0029] 图1是终止液对反应体系荧光值的影响。
- [0030] 图2是本发明提供的高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统的检测结果。
- [0031] 图3是传统ELISA检测结果。

具体实施方式

- [0032] 下面将结合附图,进一步对本发明优选实施例,进行详细说明。
- [0033] **实施例一小型ELISA检测系统**
 - [0034] 基于免疫磁珠的高尔基蛋白-73 (GP73) 小型ELISA检测系统,包括试剂盒、ZL201220212974.2公开的便携式荧光检测仪、酶标板、磁铁板以及磁珠载体,其中试剂盒中包括清洗缓冲液、样品稀释液、磁珠清洗缓冲液、抗体稀释液、封闭缓冲液、显色试剂、终止液、磁珠活化剂、GP73标准品以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的识别GP73的单克隆抗体-5B12。
 - [0035] 磁珠清洗缓冲液为pH6.0的15Mm MES缓冲液。
 - [0036] 清洗缓冲液为含0.05% Tween-20的PBST溶液。
 - [0037] 样品稀释液和抗体稀释液均为pH为7.4的含1% BSA的PBS溶液。
 - [0038] 磁珠活化剂为pH 6.0的15Mm MES缓冲液和1.25M的EDC溶液。
 - [0039] 磁珠载体为选用羧基修饰的超顺磁性微球。
 - [0040] 封闭缓冲液为含0.05% NaN₃、1% BSA的PBS溶液。
 - [0041] 显色试剂包含50μm 10-乙酰基-3,7-二羟基吩嗪 (ADHP) ,3.8mM过硼酸钠,950μm 3-(-10-吩噻嗪基)丙烷-1-磺酸钠,缓冲液为pH6.0的75mM柠檬酸-柠檬酸钠。
 - [0042] 终止液采用浓度为1.5M甘氨酸,pH10.3。
- [0043] **实施例二**
 - [0044] 1) 活化磁珠载体:取羧基修饰的超顺磁性微球作为磁珠载体,经pH 6.0的15Mm MES缓冲液进行清洗后,按1:1的体积比加入1.25M的EDC溶液,在室温下避光振荡反应30min后采用磁铁板对磁珠进行磁性分离,得到活化的磁珠载体。
 - [0045] 2) 制备人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫磁珠:按50μg抗体/mg磁珠的比例加入pH为7.4的含1% BSA的PBS溶液稀释的人GP73单克隆抗体5F10,37℃下避光震荡反应2h,采用磁铁板磁性分离清洗后,加入含0.05% NaN₃、1% BSA的PBS溶液进行室温震荡反应30min,以封闭未结合抗体的游离醛基,得到用含0.1% Tween-20、0.1% BSA的PBST溶液贮存人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫活性磁珠。
 - [0046] 3) 用样品稀释液 (pH为7.4的含1% BSA的PBS溶液) 稀释步骤2) 所得的免疫磁珠,免疫磁珠与样品稀释液之间的质量体积比为1:10-1:1000,然后按100uL/孔加到酶标板中。
 - [0047] 4) 制备不同浓度梯度的GP73标准品溶液,各标准品溶液浓度分别为0ng/mL、3.9ng/mL、7.8ng/mL、15.6ng/mL、31.25ng/mL和62.5ng/mL。
 - [0048] 5) 对酶标板的各孔中的免疫磁珠进行磁性分离并用含0.05% Tween-20的PBST溶液洗涤,而后将各浓度梯度的GP73P标准品和经过pH为7.4的含1% BSA的PBS溶液10倍稀释的待测血清样品按100uL/孔分别加入酶标板相应的孔中,37℃避光震荡孵育1h;

[0049] 6) 对经过GP73P标准品和待测血清样品孵育的酶标板的各孔的免疫磁珠磁性分离并用含0.05%Tween-20的PBST溶液洗涤,然后各孔分别加入100uI/孔HRP标记的GP73抗体,37℃避光震荡孵育1h,从而形成以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物;

[0050] 7) 对以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物进行磁性分离并洗涤,然后各孔中按100uI/孔加入显色试剂,37℃避光震荡显色5-15min;

[0051] 8) 各孔按50uI/孔分别加入pH10.3的1.5M甘氨酸,终止反应。

[0052] 9) 采用便携式荧光检测仪对各孔荧光值进行单独检测,激发波长为530nm,检测波长为590nm,然后根据各浓度标准品对应的荧光值,进行线性拟合绘制标准曲线(见图2),根据标准曲线的线性关系即可计算待测样品中GP73的含量。

[0053] 对比例一 终止液对反应体系荧光值的影响

[0054] 用pH为7.4的含1%BSA的PBS溶液将人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫磁珠以1/300比例稀释,按100uI/孔加至酶标板,磁性分离洗涤后,每孔分别加入100uI/孔pH为7.4的含1%BSA的PBS溶液,37℃避光震荡孵育1h,磁性分离洗涤后,每孔加入100uI/孔HRP标记的GP73抗体,37℃避光震荡孵育1h,进行磁性分离洗涤后,加入100uI/孔显色底物,分别设置不加终止液和添加终止液的体系,终止液采用浓度为1.5M甘氨酸,pH10.3。每间隔5分钟在酶标仪上读取荧光值,分析终止液对反应体系荧光值的影响(图1)。结果表明添加终止液可显著降低背景荧光信号的上升,能在较长时间内保持荧光信号的稳定。

[0055] 对比例二 传统ELISA检测

[0056] 用pH为7.4的含1%BSA的PBS溶液将人GP73单克隆抗体5F10包被的免疫磁珠以1/300比例稀释,按100uI/孔加酶标板,磁性分离,洗涤后,每孔分别按100uI/孔加入pH为7.4的含1%BSA的PBS溶液稀释的GP73标准品梯度稀释液,GP73标准品浓度分别为0ng/mL、3.9ng/mL、7.8ng/mL、15.6ng/mL、31.25ng/mL和62.5ng/mL。37℃避光震荡孵育1h,磁性分离,洗涤后每孔再加入100uI/孔HRP标记的GP73抗体,从而形成以免疫磁珠为液相载体的GP73双抗夹心复合物,37℃避光震荡孵育1h,磁性分离洗涤后,每孔加入100uI/孔显色试剂和50uI/孔的终止液,分别在ZL201220212974.2公开的便携式荧光检测仪和酶标仪上读取荧光值,根据各浓度标准品对应的荧光值,进行线性拟合绘制标准曲线(图2)。结果表明高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统在标准品的检测上与传统ELISA检测方法一致,两者具有类似的相关系数。

[0057] 以上实施例和对比例中所涉及的磁性分离是指采用磁铁板吸附磁珠以达到磁珠与液体的分离。所涉及的洗涤都是指采用清洗缓冲液,即pH为7.4的含0.05%Tween-20的PBS溶液进行洗涤。

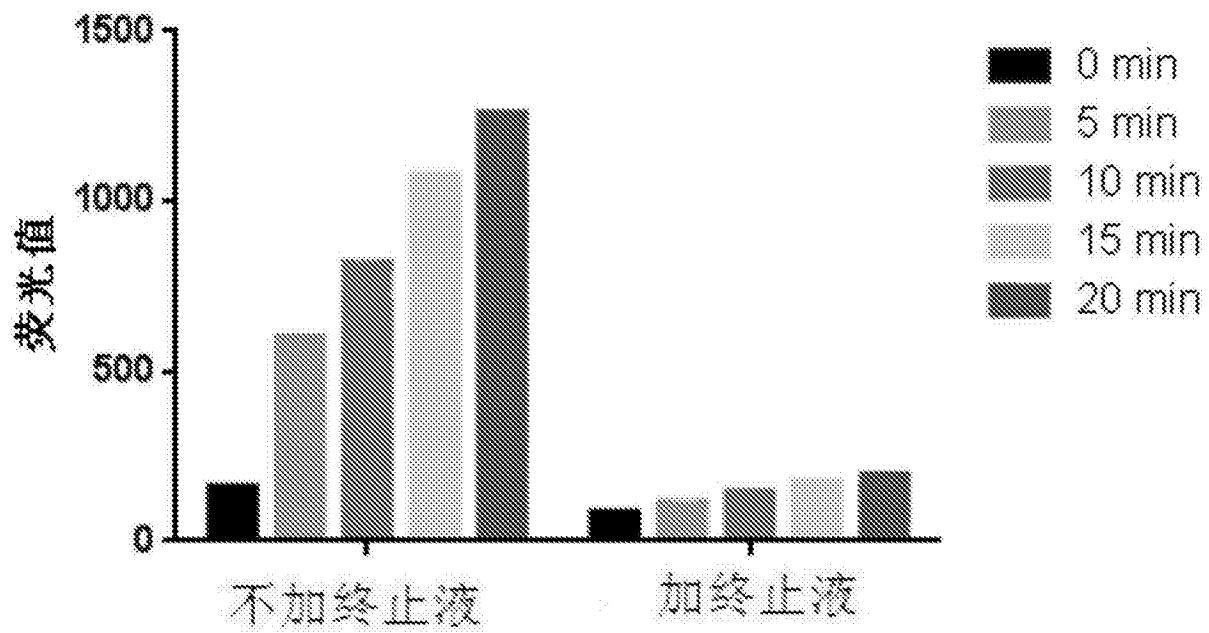


图1

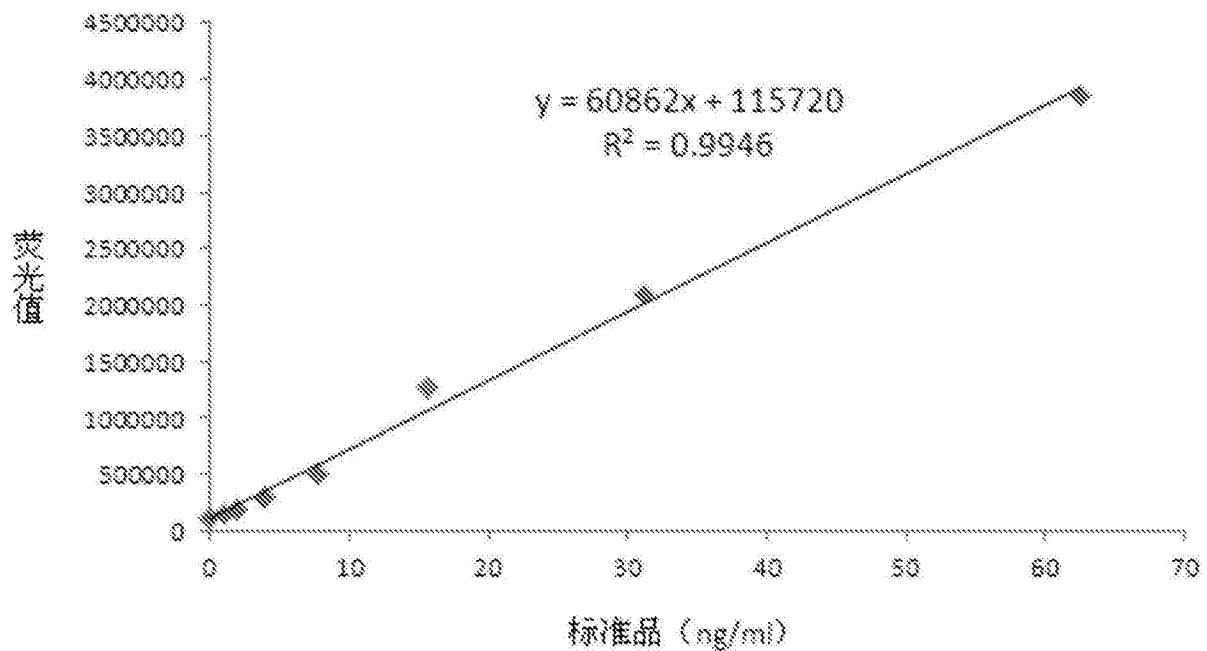


图2

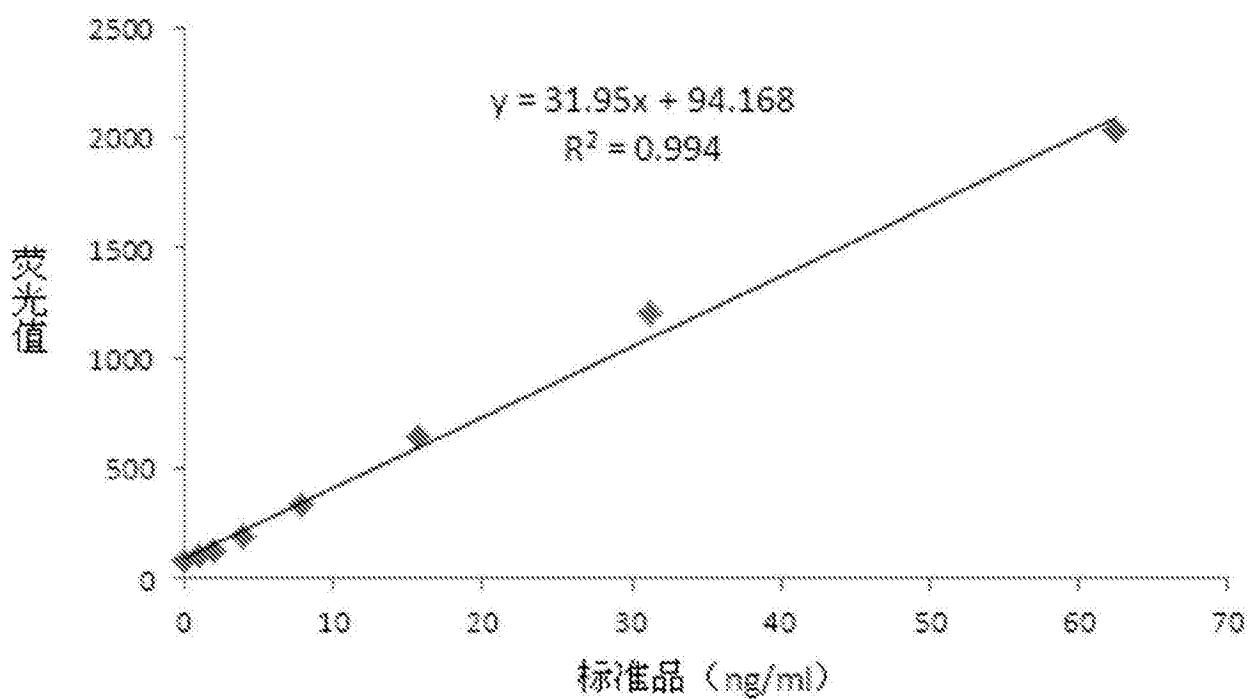


图3

专利名称(译)	一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统及使用方法		
公开(公告)号	CN107436360A	公开(公告)日	2017-12-05
申请号	CN201710630814.7	申请日	2017-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	佛山市烨泰科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	佛山市烨泰科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	佛山市烨泰科技有限公司		
[标]发明人	龙飞 肖静 彭涛 任侃 陈利军 李自强		
发明人	龙飞 肖静 彭涛 任侃 陈利军 李自强		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/68 G01N21/6428 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/57438 G01N33/57484 G01N33/577 G01N2021/6439		
代理人(译)	黄为		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种高尔基蛋白-73小型ELISA检测系统，包括试剂盒、便携式荧光检测仪、磁铁板以及磁珠载体，其中所述的试剂盒中包括样品稀释液、清洗缓冲液、抗体稀释液、封闭缓冲液、显色试剂、终止液、磁珠活化剂、GP73标准品、识别GP73的单克隆抗体-5F10以及辣根过氧化物酶标记的识别GP73的单克隆抗体-5B12。本发明还公开了上述检测系统的使用方法。本发明不需要使用酶标仪，可在缺乏大型设备的相关单位使用。该系统基于免疫磁珠的血清GP73双单抗夹心ELISA检测试剂，结合便携式荧光检测仪即可完成整个检测过程，检测成本低、操作简单高效。

