

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 9 月 21 日 (21.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/157194 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/075758
- (22) 国际申请日: 2017 年 3 月 6 日 (06.03.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610143751.8 2016 年 3 月 14 日 (14.03.2016) CN
- (71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国山东省济南历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。
- (72) 发明人: 李福川 (LI, Fuchuan); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。 韩乃寒 (HAN, Naihan); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。 王文爽 (WANG, Wenshuang); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。 蔡晓娟 (CAI, Xiaojuan); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。
- (74) 代理人: 济南金迪知识产权代理有限公司 (JINAN JINDI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国山东省济南历城区山大南路 27 号, Shandong 250199 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于发明人身份(细则 4.17(i))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: KIT FOR PROTEOGLYCANS HIGH SENSITIVITY DETECTION AND MANUFACTURING METHOD FOR SAME

(54) 发明名称: 一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒及其制备方法

(57) Abstract: A kit for proteoglycans high sensitivity detection and a manufacturing method for same. The kit comprises carboxyl grapheme coupled to a monoclonal antibody and/or carboxyl grapheme coupled to a polyclonal antibody, fluorescent protein with high and positive charges, and buffer solution. The kit for proteoglycans high sensitivity detection can make a rapid detection on and analysis of objective proteoglycan in a homogeneous system and has a high sensitivity, without going through complex steps as absorbing and coating elisa plate by antibody, and washing after antigen antibody combination and etc.

(57) 摘要: 一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒及其制备方法。试剂盒包括: 偶联单克隆抗体的羧基石墨烯和/或偶联多克隆抗体的羧基石墨烯; 带高正电荷的荧光蛋白; 缓冲液。所述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒, 无需抗体吸附包被酶标板, 且无抗原抗体结合后的洗涤等繁琐步骤, 可以实现均相体系中目的蛋白聚糖的快速检测分析, 灵敏度高。



WO 2017/157194 A1

一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒及其制备方法，属于生物分析和医学检测技术领域。

背景技术

蛋白聚糖(proteoglycan, PG)是一类复杂的生物大分子，在核心蛋白上共价偶联着一条或多条糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)链。GAG是由重复的二糖单位组成的直链多糖，主要分为四类：透明质酸(HA)、硫酸软骨素(CS)/硫酸皮肤素(DS)、硫酸角质素(KS)及肝素(Hep)/硫酸乙酰肝素(HS)。其中透明质酸不与核心蛋白结合组成蛋白聚糖。蛋白聚糖除含糖胺聚糖链外，还偶联一些N-或O-链接的寡糖链。

PG在细胞外基质中广泛分布，也存在于细胞表面以及细胞内的分泌颗粒中。在机体中PG参与了众多生理学过程，如作为组织结构的构成原件存在，调控细胞的增殖、粘附、迁移和变异等过程，还参与生长因子、细胞因子的结合，细胞的信号转导，神经元的生长和形态发生等过程。在癌变微环境中，PG的表达显著改变，因此一部分蛋白聚糖被用作检测某些疾病的特异性标志分子，如蛋白聚糖Glypican的家族成员之一Glypican-3(GPC3)，目前被普遍认为是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的特异性标志分子。

GPC3由单链核心蛋白、硫酸乙酰肝素(Heparin Sulfate, HS)链和糖基化磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)组成，通过GPI锚定于细胞膜上。GPC3在75%的HCC中显著表达，但在肝脏正常组织和良性病变中并不表达，因此是比甲胎球蛋白更为特异和灵敏的新型HCC标志分子。

由于蛋白聚糖核心蛋白分子量的大小及其结构不同，且共价偶联的GAG链的数量、种类、长度、硫酸化程度及偶联部位不同，使得蛋白聚糖组成复杂，结构多样，因而给其检测带来了诸多困难。在GPC3的检测中，目前最常用的检测方法为夹心ELISA法，但其检测灵敏度偏低，只能检测到50%左右HCC病人血清中有明显GPC3存在；且由于第一抗体在酶标板上的吸附包被及第二抗体与抗原的结合需要孵育过夜，完成一次实验需要三天时间，耗时较长，这极大的限制了此方法的应用，给GPC3的检测带来了困难。

发明内容

本发明针对现有技术的不足，提供一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒及其制备方法。该试剂盒可运用耦联抗体的石墨烯与GPC3核心蛋白的结合，对结合在GPC3 HS侧链上的ScGFP的荧光淬灭作用达到对血清/血浆中HCC的标志物GPC3的高灵敏度快速检测。

一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒，包括：

偶联单克隆抗体的羧基石墨烯和/或偶联多克隆抗体的羧基石墨烯；偶联单克隆抗体的羧基石墨烯包括：偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 1 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 2 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联多克隆抗体的羧基石墨烯包括：偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯，所述多克隆抗体 3 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯，所述多克隆抗体 4 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；

带高正电荷的荧光蛋白；

缓冲液：含有浓度 5~50 mM Tris-HCl 和浓度 50~200 mM NaCl 的溶液。

根据本发明优选的，所述蛋白聚糖为 GPC3、GPC1、GPC2、GPC4、GPC5、GPC6、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、Versican、Aggrecan、Brevican、Decorin、Lumican、Perlecan、Agrin、CD44 或 NG2；进一步优选的，所述的蛋白聚糖为 GPC3 或蛋白聚糖 Syndecan-2；最优的，所述蛋白聚糖为 GPC3 时，羧基端氨基酸序列长度为 50~90 个氨基酸，氨基端氨基酸序列长度为 490~530 个氨基酸。

根据本发明优选的，所述偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据本发明优选的，所述偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据本发明优选的，所述偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据本发明优选的，所述偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 。

根据本发明优选的，所述带高正电荷的荧光蛋白的浓度为 0.001~0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；进一步优选的，所述的带高正电荷荧光蛋白为高正电荷绿色荧光蛋白（ScGFP）。

根据本发明优选的，还包括装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

上述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法，步骤如下：

（1）将单克隆抗体 1 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯；

将单克隆抗体 2 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯；

将多克隆抗体 3 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯；

和/或，

将多克隆抗体 4 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯；

（2）制备带高正电荷荧光蛋白，配制带高正电荷荧光蛋白溶液；

（3）配制含有浓度 5~50 mM Tris-HCl 和浓度 50~200 mM NaCl 的溶液，制得缓冲液；

(4) 分别将步骤(1)制得的偶联单克隆抗体1的羧基石墨烯、步骤(1)制得的偶联单克隆抗体2的羧基石墨烯、步骤(2)制得的带高正电荷荧光蛋白溶液和步骤(3)制得的缓冲液经装配后,制得用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒。

根据本发明优选的,所述步骤(1)中,表面活性剂为乙二胺四乙酸(EDTA)或十二烷基磺酸钠(SDS),每毫升反应体系加入表面活性剂1~5 μL ;封闭剂为牛血清白蛋白(BSA),反应体系中加入封闭剂至质量浓度为0.5%~2%。

根据本发明优选的,所述步骤(1)中,所述羧基石墨烯的反应质量浓度为0.8~1.2 mg/mL,羧基石墨烯与单克隆抗体1的反应质量浓度比为10:1,羧基石墨烯与单克隆抗体2的反应质量浓度比为10:1,羧基石墨烯与多克隆抗体3的反应质量浓度比为10:1,羧基石墨烯与多克隆抗体4的反应质量浓度比为10:1。

根据本发明优选的,所述步骤(1)中,单克隆抗体1的制备方法如下:

(i) 蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体(购自 INVITROGEN),转染 HEK293 细胞(购自上海细胞所),从细胞培养上清中纯化, PBS 稀释至 1.0~2.0 mg/mL,制得抗原;

(ii) 将步骤(i)制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次,抗原免疫量为 50~100 μg /次,然后用 PEG 法将效价 ≥ 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合,并筛选出阳性克隆;

(iii) 向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂(购自 SIGMA 公司),待小鼠腹腔中产生足量腹水后,于小鼠腹腔中接种步骤(ii)制得的阳性克隆,两周后抽取腹水,离心取上清,纯化后,制得单克隆抗体1。

根据本发明进一步优选的,所述步骤(i)的纯化,为用 NI-NTA 亲和层析柱进行纯化。

根据本发明进一步优选的,所述步骤(iii)的纯化,步骤如下:

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍,上蛋白 A/G 亲和层析柱(GE),分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂,最后用 100 mM 三乙胺洗脱回收抗体,收集前三柱体积的洗脱液,并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和,最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐,并将抗体置换到 PBS 中,即得。

根据本发明优选的,所述步骤(1)中,单克隆抗体2的制备方法如下:

(a) 蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体,转染 HEK293 细胞,从细胞培养上清中纯化, PBS 稀释至 1.0~2.0 mg/mL,制得抗原;

(b) 将步骤(a)制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次,抗原免疫量为 50~100 μg /次,然后用 PEG 法将效价 ≥ 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合,并筛选出阳性克隆;

(c) 向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂,待小鼠腹腔中产生足量腹水后,于小鼠腹腔中接种步骤(b)制得的阳性克隆,两周后抽取腹水,离心取上清,纯化后,制得单克隆抗体2。

根据本发明进一步优选的,所述步骤(a)的纯化,为用 NI-NTA 亲和层析柱进行纯化。

根据本发明进一步优选的,所述步骤(c)的纯化,步骤如下:

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱 (GE)，分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 中，即得。

根据本发明优选的，所述步骤 (1) 中，多克隆抗体 3 的制备方法如下：

a、蛋白聚糖的核心蛋白羧基端氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 1.0~2.0 mg/mL，制得抗原；

b、将步骤 a 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 200~400 μg /次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 3；

所述步骤 b 的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱 (GE)，分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 缓冲液中，即得。

根据本发明优选的，所述步骤 (1) 中，多克隆抗体 4 的制备方法如下：

a、蛋白聚糖的核心蛋白氨基端氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 1.0~2.0mg/mL，制得抗原；

b、将步骤 a 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 200~400 μg /次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 4；

所述步骤 b 的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱 (GE)，分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 缓冲液中，即得。

根据本发明优选的，所述步骤 (2) 中，带高正电荷荧光蛋白为高正电荷绿色荧光蛋白 (ScGFP)。带高正电荷荧光蛋白的制备为本领域的常规技术，如可参考文献 Lawrence, M. S.; Phillips, K. J.; Liu, D. R. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 10110-10112. 中记载的构建表达方法。

上述工艺步骤如无特别说明，均可采用本领域的常规操作。

有益效果

1、本发明所述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒，无需抗体吸附包被酶标板，且无抗原抗体结合后的洗涤等繁琐步骤，可以实现均相体系中目的蛋白聚糖的快速检测分析，灵敏度高；

2、本发明所述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒，在均相体系中通过偶联在羧基石墨烯上的抗体，特异性的结合目的蛋白聚糖的核心蛋白，同时目的蛋白聚糖上的糖侧链又可

与带高正电荷的绿色荧光蛋白（ScGFP）通过电荷作用相互连接，待最后加入偶联另一种抗体的羧基石墨烯后，形成一种夹心结构，可对处于夹层中间目的蛋白聚糖侧链上的 ScGFP 进行更好的荧光淬灭作用，进一步提高检测的灵敏度，从而解决 ELISA 法检测灵敏度低，反应时间过长等缺点，可解决在无昂贵设备条件下病人血清中目的蛋白聚糖的快速灵敏检测问题；

3、本发明所述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法简单，易操作，成本低廉，便于大规模推广应用。

附图说明

图 1：ScGFP、偶联单克隆抗体（ α GCN、 α GCC）的羧基石墨烯和 GPC3 加入顺序对荧光强度的影响柱状图；

A：偶联 α GCN 的羧基石墨烯和 GPC3、ScGFP 混合后加入偶联 α GCC 的羧基石墨烯；
B：两种分别偶联 α GCN 和 α GCC 的羧基石墨烯与 GPC3 混合后加入 ScGFP； C：两种分别偶联 α GCN 和 α GCC 的羧基石墨烯与 ScGFP 混合后加入 GPC3； D：偶联 α GCC 的羧基石墨烯和 GPC3、ScGFP 混合后加入偶联 α GCN 的羧基石墨烯。

图 2：缓冲液中 GPC3 的检测结果柱状图；

图 3：FBS 中 GPC3 的检测结果柱状图；

图 4：GPC3 与 GPC3 Δ GAG 的检测结果比较柱状图；

图 5：临床血清中 GPC3 的检测结果。

图 6：缓冲液中 Syndecan-2 的检测结果柱状图；

图 7：偶联抗体 1 的羧基石墨烯的制备过程示意图；

图 8：偶联抗体 2 的羧基石墨烯的制备过程示意图；

图 9：蛋白聚糖 GPC3 检测过程的过程示意图；

图 10：实施例 9 采用蛋白聚糖 GPC3 高灵敏度检测的试剂盒检测 GPC3 的检测结果柱状图；

图 11：实施例 11 采用蛋白聚糖 GPC3 高灵敏度检测的试剂盒检测 GPC3 的检测结果柱状图；

具体实施方式

以下实施例的阐述，是为了全面公开本发明如何实施的一些常用技术，而不是为了限制本发明的应用范围。发明人已经尽最大努力确保实施例中各参数的准确性（例如质量，温度等），但是一些实验误差和偏差也应该予以考虑。

实施例 1、

一种用于蛋白聚糖 GPC3 高灵敏度检测的试剂盒，包括：

偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 1 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端 70 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体；所述偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯的浓度为 10 μ g/mL；

偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 2 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端 510 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体；所述偶联单克隆抗体 2 羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ；

带高正电荷的绿色荧光蛋白（ScGFP）；带高正电荷的绿色荧光蛋白的浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；

缓冲液：含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液；

以及，装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

上述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法，步骤如下：

（1）将单克隆抗体 1 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯（制备过程示意图如图 7 所示）；

将单克隆抗体 2 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯（制备过程示意图如图 8 所示）；

（2）制备带高正电荷荧光蛋白，配制带高正电荷荧光蛋白溶液；

（3）配制含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液，制得缓冲液；

（4）分别将步骤（1）制得的偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯、步骤（1）制得的偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯、步骤（2）制得的带高正电荷荧光蛋白溶液和步骤（3）制得的缓冲液经装配后，制得用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒。

所述步骤（1）中，表面活性剂为乙二胺四乙酸（EDTA），每毫升反应体系加入表面活性剂 5 μL ；封闭剂为牛血清白蛋白（BSA），反应体系中加入封闭剂至质量浓度为 1.5%。

所述步骤（1）中，所述羧基石墨烯的反应质量浓度为 1.0 mg/mL ，羧基石墨烯与单克隆抗体 1 的反应质量浓度比为 10: 1，羧基石墨烯与单克隆抗体 2 的反应质量浓度比为 10: 1。

所述步骤（1）中，单克隆抗体 1 的制备方法如下：

（i）用 GPC3 全长蛋白基因核心蛋白的羧基端 70 个氨基酸序列片段（ αGCC ，SEQ ID NO.1）的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，用 NI-NTA 亲和层析柱从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 2.0 mg/mL ，制得抗原；

（ii）将步骤（i）制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次，抗原免疫量为 80 μg /次，然后用 PEG 法将效价达到 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合，并筛选出阳性克隆；

（iii）向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂，待小鼠腹腔中产生足量腹水后，于小鼠腹腔中接种步骤（ii）制得的阳性克隆，两周后抽取腹水，离心取上清，纯化后，制得单克隆抗体 1。

所述步骤（iii）的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱（GE），分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 中，即得。

所述步骤（1）中，单克隆抗体 2 的制备方法如下：

（a）用 GPC3 全长蛋白基因除羧基端的 70 个氨基酸序列外的其他氨基酸序列片段（ αGCN ，SEQ ID NO.2）的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，用 NI-NTA 亲和层析柱从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 2.0mg/mL，制得抗原；

（b）将步骤（a）制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次，抗原免疫量为 80 μg /次，然后用 PEG 法将效价达到 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合，并筛选出阳性克隆；

（c）向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂，待小鼠腹腔中产生足量腹水后，于小鼠腹腔中接种步骤（b）制得的阳性克隆，两周后抽取腹水，离心取上清，纯化后，制得单克隆抗体 2。

所述步骤（c）的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱（GE），分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 中，即得。

所述步骤（2）中，带高正电荷荧光蛋白的制备为本领域的常规技术，如可参考文献 Lawrence, M. S.; Phillips, K. J.; Liu, D. R. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 10110-10112. 中记载的构建表达方法。

实施例 2、反应条件的优化

试剂添加顺序对 GPC3 检测的影响

在微孔板 40 μL 反应体系中依照不同顺序加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg 、偶联 αGCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg 、ScGFP 0.01~0.5 μg 、GPC3 0.001~0.005 ng，混匀、室温避光放置 15min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。

其中：A 组为偶联 αGCN 的羧基石墨烯和 GPC3、ScGFP 混合后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯；B 组为两种分别偶联 αGCN 和 αGCC 的羧基石墨烯与 GPC3 混合后加入 ScGFP；C 组为两种分别偶联 αGCN 和 αGCC 的羧基石墨烯与 ScGFP 混合后加入 GPC3；D 组为偶联 αGCC 的羧基石墨烯和 GPC3、ScGFP 混合后加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯。

结果显示，先加入偶联一种抗体的羧基石墨烯和 GPC3，随后加入 ScGFP，最后加入偶联另一种抗体的石墨烯的顺序对荧光的淬灭作用最强，因此选用此顺序进行后续实验（如图 1）。

加入试剂孵育时间对 GPC3 检测的影响

在微孔板 40 μL 反应体系中加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg 、GPC3 0.001~0.005 ng, 混匀、室温放置不同的时间; 然后统一加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置 5 min; 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , 混匀、室温避光放置 10 min, 孵育结束后, 测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。

结果显示, 加入前两者后放置 5 min 即可基本达到最佳荧光淬灭效果。

在微孔板 40 μL PBS (pH7.4) 溶液中加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , GPC3 0.001~0.005 ng 后混匀、室温放置 5min; 随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置不同时间, 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , 混匀、室温避光放置 10 min, 孵育结束后, 测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。

结果显示, 加入混合物后放置 15 min 后基本达到荧光淬灭平衡状态。

在微孔板 40 μL PBS (pH7.4) 溶液中加入 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg 、GPC3 0.001~0.005 ng, 混匀、室温反应 5 min; 随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置 15 min; 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , 混匀、室温避光放置不同的时间, 孵育结束后, 测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。

结果显示, 加入羧基石墨烯后 10 min 即可基本达到荧光淬灭平衡。

因此最后选择加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯和 GPC3 后放置 5~10 min, 随后加入 ScGFP, 室温避光放置 10~30 min, 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯避光放置 5~20 min 作为反应时间。

不同 pH 的不同缓冲溶液对 GPC3 检测的影响

在不同 pH 值的 10 mM HAc-NaAc、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 、Tris-HCl 缓冲液中加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , GPC3 0.001~0.005 ng, 混匀、室温放置 5 min; 随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置 15 min; 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , 混匀、室温避光放置 10 min, 孵育结束后, 测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。

结果显示在 Tris-HCl (pH 7~10.0) 缓冲液中, 对 ScGFP 的荧光淬灭能力最强。

不同 NaCl 浓度对 GPC3 检测的影响

在含不同浓度 NaCl 的 10 mM Tris-HCl 缓冲液中加入偶联 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , GPC3 0.001~0.005 ng, 混匀、室温放置 5 min; 随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置 15 min; 最后加入偶联 αGCC 的羧基石墨烯, 混匀、室温避光放置 10 min, 孵育结束后, 测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。

结果显示随着 NaCl 浓度的增加, 对 ScGFP 的荧光淬灭能力呈现先增强后减弱的情况, 据此选择 NaCl 浓度为 50~200 mM 作为反应体系中加入盐的浓度。

羧基石墨烯偶联抗体量对 GPC3 检测的影响

制备偶联不同含量抗体的羧基石墨烯, 在 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 溶液中加入偶联不同含量 αGCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , GPC3 0.001~0.005 ng, 混匀、室温放置 5 min; 随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg , 混匀、室温避光放置 15 min; 最后加入相对应的偶联不同含

量 α GCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。

结果显示，偶联 0.05~0.2 mg/mL 抗体的羧基石墨烯具有最好的淬灭效果。

实施例 3、GPC3 在缓冲液中的检测

在微孔板 40 μL 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl 溶液中，加入偶联 α GCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，GPC3 0~0.04 ng，混匀、室温放置 5 min；随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ，混匀，室温避光放置 15 min；最后加入偶联 α GCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。蛋白聚糖 GPC3 检测过程的过程示意图如图 9 所示。

结果显示，随着 GPC3 浓度的升高，其介导的荧光淬灭强度也逐渐增高，检测灵敏度可以达到 10 pg/mL 以下（如图 2），远高于夹心 ELISA 法。

实施例 4、GPC3 在血清中的检测

将 GPC3 溶于胎牛血清（FBS）作为贮备液。然后用质量浓度为 20% 的 FBS 稀释 GPC3 贮藏液成不同浓度，待检。在 40 μL 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl 溶液中，加入偶联 α GCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，GPC3 0~0.04 ng，混匀、室温放置 5 min；随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ，混匀、室温避光放置 15 min；最后加入偶联 α GCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。

结果显示，血清中 GPC3 含量与荧光淬灭强度呈显著的剂量依赖性，灵敏度与在缓冲液中相似，达到皮克级（如图 3）。

实施例 5、GPC3 和 GPC3 Δ GAG 检测的比较

在 40 μL 10 mM Tris-HCl (pH 10.0)，100 mM NaCl 溶液中加入偶联 α GCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，并分别加入不同浓度的 GPC3 和其非糖基化突变 GPC3 Δ GAG，混匀、室温放置 5min；随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ，混匀、室温避光放置 15 min；最后加入偶联 α GCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。

结果显示，GPC3 的非糖基化突变 GPC3 Δ GAG 几乎不能介导羧基石墨烯对 ScGFP 的荧光淬灭（如图 4），表明 GPC3 的糖胺聚糖侧链 HS 对于 ScGFP 的结合至关重要，同时也表明上述由偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯和偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯装配的试剂盒对 GPC3 检测的专一性。

实施例 6、临床血清中 GPC3 的检测和比较分析

在 32 μL 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 溶液中加入偶联 α GCN 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，8 μL 五倍稀释的血清（正常人、良性肝病病人或 HCC 病人），混匀，室温放置 5 min；随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ，混匀、室温避光放置 15 min；最后加入加入偶联 α GCC 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度（Ex: 470nm, Em: 509nm）。

结果显示,正常人和良性肝病病人血清样本的荧光强度分布范围基本相似,无显著差异。但 HCC 病人血清的荧光强度显著下降,意味着 GPC3 的存在介导了石墨烯对 ScGFP 的荧光淬灭,与正常组和良性肝病组相比存在极为显著的差异。其中有近 14 例 HCC 病人的血清的荧光强度显著低于正常和良性肝病组,占 HCC 病人总数的 60% (如图 5),高于以前报道的 45~50%。本发明所建立的 GPC3 均相检测技术,灵敏度远高于常用的 ELISA 法,这可能是其检出率较高的原因。

实施例 7、Syndecan-2 在缓冲液中的检测

一种用于蛋白聚糖 Syndecan-2 高灵敏度检测的试剂盒,包括:

偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 1 的羧基石墨烯,所述 Syndecan-2 单克隆抗体 1 为 Human Syndecan-2 MAb (Clone 305507), Rat IgG2A (购自 R&D Systems 公司);所述偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 1 的羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 2 的羧基石墨烯,所述 Syndecan-2 单克隆抗体 2 为 Human Syndecan-2 MAb (Clone 305515), Rat IgG2B (购自 R&D Systems 公司);所述偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 2 的羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

带高正电荷的绿色荧光蛋白 (ScGFP);带高正电荷的绿色荧光蛋白的浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;

缓冲液:含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液;

以及,装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

上述用于蛋白聚糖 Syndecan-2 高灵敏度检测的试剂盒的制备方法同实施例 1。

在微孔板 40 μL 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl 溶液中,加入偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 1 (Human Syndecan-2 MAb (Clone 305507), Rat IgG2A) 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , Syndecan-2 0~0.05 ng,混匀、室温放置 5 min;随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ,混匀,室温避光放置 15 min;最后加入偶联抗 Syndecan-2 单克隆抗体 2 (Human Syndecan-2 MAb (Clone 305515), Rat IgG2B) 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ,混匀、室温避光放置 10min,孵育结束后,测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)。结果显示,随着 Syndecan-2 浓度的升高,其辅助荧光淬灭强度也逐渐增高 (如图 6)。

实施例 8、

一种用于蛋白聚糖 GPC3 高灵敏度检测的试剂盒,包括:

偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯,所述多克隆抗体 3 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端 290 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯,所述多克隆抗体 4 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端 290 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联多克隆抗体 4 羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

带高正电荷的绿色荧光蛋白 (ScGFP);带高正电荷的绿色荧光蛋白的浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;

缓冲液：含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液；

以及，装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

上述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法，步骤如下：

(1) 将多克隆抗体 3 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯；

将多克隆抗体 4 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯；

(2) 制备带高正电荷荧光蛋白，配制带高正电荷荧光蛋白溶液；

(3) 配制含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液，制得缓冲液；

(4) 分别将步骤 (1) 制得的偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯、步骤 (1) 制得的偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯、步骤 (2) 制得的带高正电荷荧光蛋白溶液和步骤 (3) 制得的缓冲液经装配后，制得用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒。

所述步骤 (1) 中，表面活性剂为乙二胺四乙酸 (EDTA)，每毫升反应体系加入表面活性剂 5 μ L；封闭剂为牛血清白蛋白 (BSA)，反应体系中加入封闭剂至质量浓度为 1.5%。

所述步骤 (1) 中，所述羧基石墨烯的反应质量浓度为 1.0 mg/mL，羧基石墨烯与多克隆抗体 3 的反应质量浓度比为 10: 1，羧基石墨烯与多克隆抗体 4 的反应质量浓度比为 10: 1。

所述步骤 (1) 中，多克隆抗体 3 的制备方法如下：

(i) 用 GPC3 全长蛋白基因核心蛋白的羧基端 290 个氨基酸序列片段 (SEQ ID NO.3) 的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，用 NI-NTA 亲和层析柱从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 2.0 mg/mL，制得抗原；

(ii) 将步骤 (i) 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 300 μ g/次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 3；

所述步骤 (ii) 的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱 (GE)，分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 缓冲液中，即得。

所述步骤 (1) 中，多克隆抗体 4 的制备方法如下：

(a) 用 GPC3 全长蛋白基因核心蛋白的氨基端 290 个氨基酸序列片段 (SEQ ID NO.4) 的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，用 NI-NTA 亲和层析柱从细胞培养上清中纯化，PBS 稀释至 2.0 mg/mL，制得抗原；

(b) 将步骤 (a) 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 300 μ g/次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 4；

所述步骤(b)的纯化,步骤如下:

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍,上蛋白 A/G 亲和层析柱(GE),分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂,最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体,收集前三柱体积的洗脱液,并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和,最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐,并将抗体置换到 PBS 缓冲液中,即得。

所述步骤(2)中,带高正电荷荧光蛋白的制备为本领域的常规技术,如可参考文献 Lawrence, M. S.; Phillips, K. J.; Liu, D. R. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 10110-10112. 中记载的构建表达方法。

实施例 9、多克隆抗体用于 GPC3 的检测

在微孔板 40 μL 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl 溶液中,加入实施例 8 制得的偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg , GPC3 0~0.04 ng,混匀、室温放置 5 min;随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μg ,混匀,室温避光放置 15 min;最后再加入实施例 8 制得的偶联 GPC3 多克隆抗体 4 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μg ,混匀、室温避光放置 10min,孵育结束后,测定荧光强度(Ex: 470nm, Em: 509nm),结果如图 10 所示;

结果显示,同单克隆抗体一样,多克隆抗体也可用于 GPC3 的检测,且随着 GPC3 浓度的升高,其介导的荧光淬灭强度也逐渐增高。

实施例 10、

一种用于蛋白聚糖 GPC3 高灵敏度检测的试剂盒,包括:

偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯,所述单克隆抗体 1 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端 70 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯,所述多克隆抗体 4 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联多克隆抗体 4 羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

或

偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯,所述单克隆抗体 2 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端 510 个氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯,所述多克隆抗体 3 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列片段做为抗原免疫后制得的抗体;所述偶联多克隆抗体 3 羧基石墨烯的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$;

带高正电荷的绿色荧光蛋白(ScGFP);带高正电荷的绿色荧光蛋白的浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;

缓冲液:含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液;

以及,装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

上述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法，步骤如下：

(1) 将单克隆抗体加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联单克隆抗体的羧基石墨烯；

将多克隆抗体加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂 EDTA，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 3 min，制得偶联多克隆抗体的羧基石墨烯；

(2) 制备带高正电荷荧光蛋白，配制带高正电荷荧光蛋白溶液；

(3) 配制含有浓度 10 mM Tris-HCl 和浓度 100 mM NaCl 的溶液，制得缓冲液；

(4) 分别将步骤 (1) 制得的偶联单克隆抗体的羧基石墨烯、步骤 (1) 制得的偶联多克隆抗体的羧基石墨烯、步骤 (2) 制得的带高正电荷荧光蛋白溶液和步骤 (3) 制得的缓冲液经装配后，制得用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒。

所述步骤 (1) 中，表面活性剂为乙二胺四乙酸 (EDTA)，每毫升反应体系加入表面活性剂 5 μ L；封闭剂为牛血清白蛋白 (BSA)，反应体系中加入封闭剂至质量浓度为 1.5%。

所述步骤 (1) 中，所述羧基石墨烯的反应质量浓度为 1.0 mg/mL，羧基石墨烯与单克隆抗体的反应质量浓度比为 10: 1，羧基石墨烯与多克隆抗体的反应质量浓度比为 10: 1。

实施例 11、单、多克隆抗体混合用于 GPC3 的检测

在微孔板 40 μ L 10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl 溶液中，加入制得的偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μ g，GPC3 0~0.04 ng，混匀、室温放置 5 min；随后加入 ScGFP 0.01~0.5 μ g，混匀，室温避光放置 15 min；最后再加入偶联 GPC3 多克隆抗体 4 的羧基石墨烯 0.05~0.2 μ g，混匀、室温避光放置 10min，孵育结束后，测定荧光强度 (Ex: 470nm, Em: 509nm)，结果如图 11 所示；

结果显示，同单克隆抗体一样，单、多克隆抗体混合也可用于 GPC3 的检测，随着 GPC3 浓度的升高，其介导的荧光淬灭强度也逐渐增高。

说明书中涉及的参考文献：

1. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2003, 362:1907-17.
2. Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. J. Clin. Invest. 2001, 108:497-501.
3. Z-W Zhu, H Friess, L Wang, M Abou-Shady, A Zimmermann, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. Gut 2001, 48:558-564.
4. Chunyang Lei, Yan Huang, Zhou Nie, et al. A Supercharged Fluorescent Protein as a Versatile Probe for Homogenous DNA Detection and Methylation Analysis. Angewandte Chemie 2014, 53:8358-8362.
5. Michael S, Lawrence, Kevin J. Phillips, et al. Supercharging proteins can impart unusual

- resilience. *J. Am. Chem. Soc.* 2007,129:10110–10112.
6. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003, 125: 81–90.
 7. Achilleas D. Theocharis, Spyridon S. Skandalis, George N. Tzanakakis, et al. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2010,277:3904-3923.
 8. Mariana I Capurro, Ping Xu, Wen Shi, et al. Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling During Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding. *Dev. Cell.* 2008, 14(5):700-11.

权利要求书

1、一种用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒，包括：

偶联单克隆抗体的羧基石墨烯和/或偶联多克隆抗体的羧基石墨烯；偶联单克隆抗体的羧基石墨烯包括：偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 1 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯，所述单克隆抗体 2 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联多克隆抗体的羧基石墨烯包括：偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯，所述多克隆抗体 3 为蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯，所述多克隆抗体 4 为蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端氨基酸序列做为抗原免疫后制得的抗体；

带高正电荷的荧光蛋白；

缓冲液：含有浓度 5~50 mM Tris-HCl 和浓度 50~200 mM NaCl 的溶液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述蛋白聚糖为 GPC3、GPC1、GPC2、GPC4、GPC5、GPC6、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、Versican、Aggrecan、Brevican、Decorin、Lumican、Perlecan、Agrin、CD44 或 NG2；进一步优选的，所述的蛋白聚糖为 GPC3 或蛋白聚糖 Syndecan-2；最优的，所述蛋白聚糖为 GPC3 时，羧基端氨基酸序列长度为 50~90 个氨基酸，氨基端氨基酸序列长度为 490~530 个氨基酸。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ ；

优选的，所述偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ ；

优选的，所述偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ ；

优选的，所述偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯的浓度为 5~20 $\mu\text{g/mL}$ ；

优选的，所述带高正电荷的荧光蛋白的浓度为 0.001~0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ；进一步优选的，所述的带高正电荷荧光蛋白为高正电荷绿色荧光蛋白（ScGFP）；

优选的，还包括装配试剂盒必须的微孔板、锡箔纸。

4、权利要求 1 所述用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒的制备方法，其特征在于，步骤如下：

（1）将单克隆抗体 1 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯；

将单克隆抗体 2 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯；

将多克隆抗体 3 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联多克隆抗体 3 的羧基石墨烯；

和/或，

将多克隆抗体 4 加入到羧基石墨烯溶液中，混匀，静置 1 min，然后加入表面活性剂，再加入封闭剂，混合均匀，静置封闭 1~3 min，制得偶联多克隆抗体 4 的羧基石墨烯；

（2）制备带高正电荷荧光蛋白，配制带高正电荷荧光蛋白溶液；

(3) 配制含有浓度 5~50 mM Tris-HCl 和浓度 50~200 mM NaCl 的溶液, 制得缓冲液;

(4) 分别将步骤 (1) 制得的偶联单克隆抗体 1 的羧基石墨烯、步骤 (1) 制得的偶联单克隆抗体 2 的羧基石墨烯、步骤 (2) 制得的带高正电荷荧光蛋白溶液和步骤 (3) 制得的缓冲液经装配后, 制得用于蛋白聚糖高灵敏度检测的试剂盒。

5、如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中, 表面活性剂为乙二胺四乙酸 (EDTA) 或十二烷基磺酸钠 (SDS), 每毫升反应体系加入表面活性剂 1~5 μL ; 封闭剂为牛血清白蛋白 (BSA), 反应体系中加入封闭剂至质量浓度为 0.5%~2%。

6、如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中, 所述羧基石墨烯的反应质量浓度为 0.8~1.2 mg/mL, 羧基石墨烯与单克隆抗体 1 的反应质量浓度比为 10: 1, 羧基石墨烯与单克隆抗体 2 的反应质量浓度比为 10: 1, 羧基石墨烯与多克隆抗体 3 的反应质量浓度比为 10:1, 羧基石墨烯与多克隆抗体 4 的反应质量浓度比为 10:1。

7、如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中, 单克隆抗体 1 的制备方法如下:

(i) 蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端 50~90 个氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体, 转染 HEK293 细胞, 从细胞培养上清中纯化, PBS 稀释至 1.5~2.5mg/mL, 制得抗原;

(ii) 将步骤 (i) 制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次, 抗原免疫量为 50~100 mg /次, 然后用 PEG 法将效价 ≥ 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合, 并筛选出阳性克隆;

(iii) 向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂, 待小鼠腹腔中产生足量腹水后, 于小鼠腹腔中接种步骤 (ii) 制得的阳性克隆, 两周后抽取腹水, 离心取上清, 纯化后, 制得单克隆抗体 1。

8、如权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (i) 的纯化, 为用 NI-NTA 亲和层析柱进行纯化;

优选的, 所述步骤 (iii) 的纯化, 步骤如下:

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍, 上蛋白 A/G 亲和层析柱 (GE), 分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂, 最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体, 收集前三柱体积的洗脱液, 并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和, 最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐, 并将抗体置换到 PBS 缓冲液中, 即得。

9、如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤 (1) 中, 单克隆抗体 2 的制备方法如下:

(a) 蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端 490~530 个氨基酸序列的表达基因插入 PTRACER 真核表达载体, 转染 HEK293 细胞, 从细胞培养上清中纯化, PBS 缓冲液稀释至 1.5~2.5mg/mL, 制得抗原;

(b) 将步骤 (a) 制得的抗原免疫 BALB/C 小鼠 3 次, 抗原免疫量为 50~100 mg /次, 然后用 PEG 法将效价 ≥ 2000 的小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞进行融合, 并筛选出阳性克隆;

(c) 向 BALB/C 小鼠腹腔中注射弗氏不完全佐剂, 待小鼠腹腔中产生足量腹水后, 于小鼠腹腔中接种步骤 (b) 制得的阳性克隆, 两周后抽取腹水, 离心取上清, 纯化后, 制得单克隆抗体 2;

所述步骤 (a) 的纯化, 为用 NI-NTA 亲和层析柱进行纯化;

进一步优选的，所述步骤（c）的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱（GE），分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 中，即得。

10、如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于，所述步骤（1）中，多克隆抗体 3 的制备方法如下：

a、蛋白聚糖的核心蛋白的羧基端 290 个氨基酸序列表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，从细胞培养上清中纯化，PBS 缓冲液稀释至 1.0~2.0 mg/mL，制得抗原；

b、将步骤 a 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 200~400 μg /次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 3；

所述步骤 b 的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱（GE），分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 缓冲液中，即得。

优选的，所述步骤（1）中，多克隆抗体 4 的制备方法如下：

a、蛋白聚糖的核心蛋白的氨基端 290 个氨基酸序列表达基因插入 PTRACER 真核表达载体，转染 HEK293 细胞，从细胞培养上清中纯化，PBS 缓冲液稀释至 1.0~2.0 mg/mL，制得抗原；

b、将步骤 a 制得的抗原免疫雌性新西兰大白兔 3 次，抗原免疫量为 200~400 μg /次，然后取血，离心取上清，纯化后，制得多克隆抗体 4；

所述步骤 b 的纯化，步骤如下：

将上清用 PBS 缓冲液稀释 2.5 倍，上蛋白 A/G 亲和层析柱（GE），分别用含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 8.0 的缓冲液和含 0.5M NaCl 的 TRIS-HCl pH 9.0 的缓冲液充分洗脱除杂，最后用 100mM 三乙胺洗脱回收抗体，收集前三柱体积的洗脱液，并立即用 1M 的 NaH_2PO_4 中和，最后用截流分子量为 10KD 的超滤管脱盐，并将抗体置换到 PBS 缓冲液中，即得。

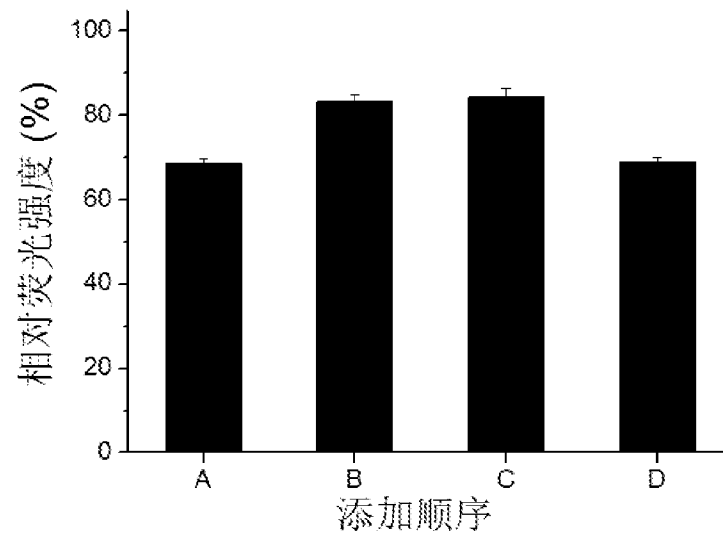


图 1

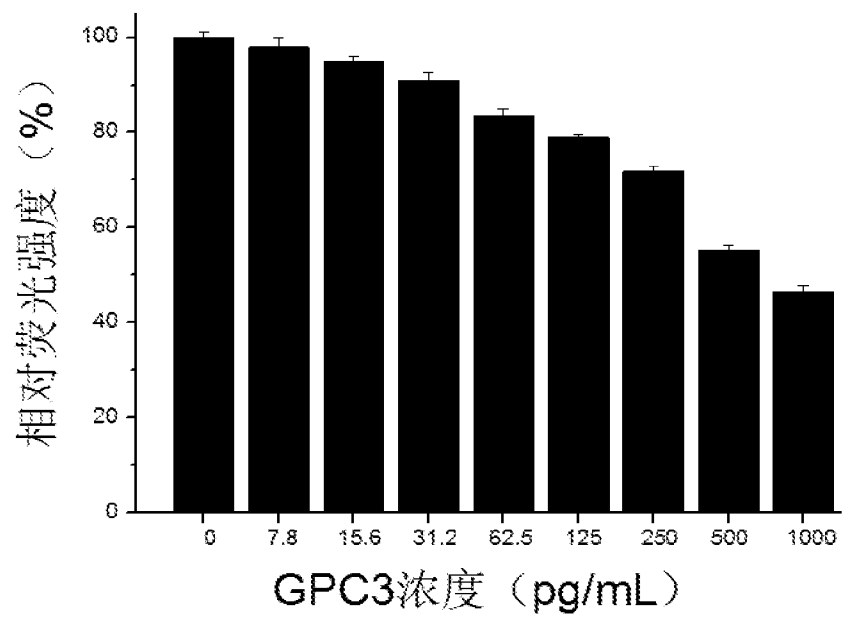


图 2

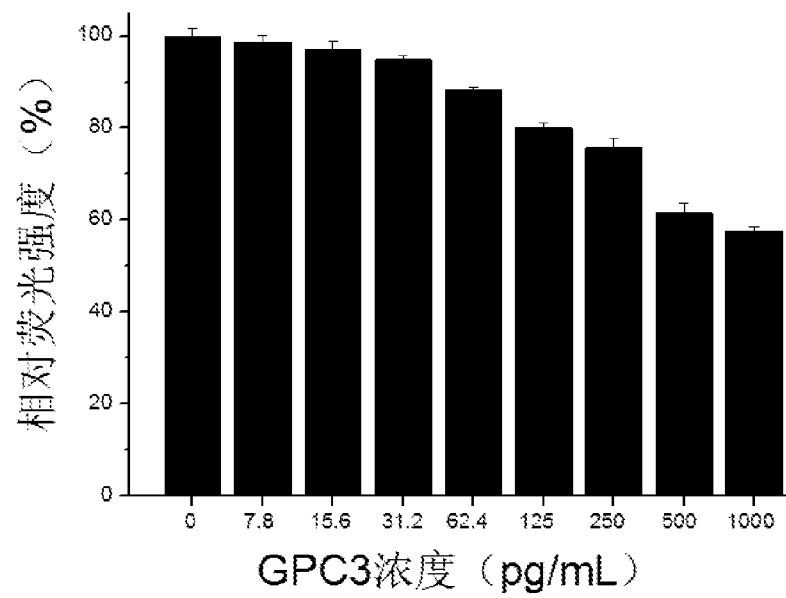


图 3

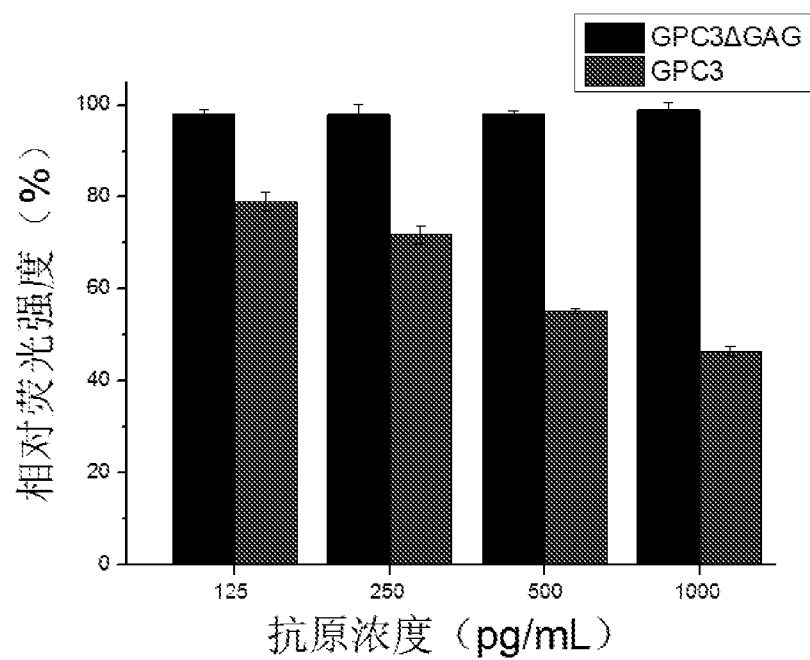


图 4

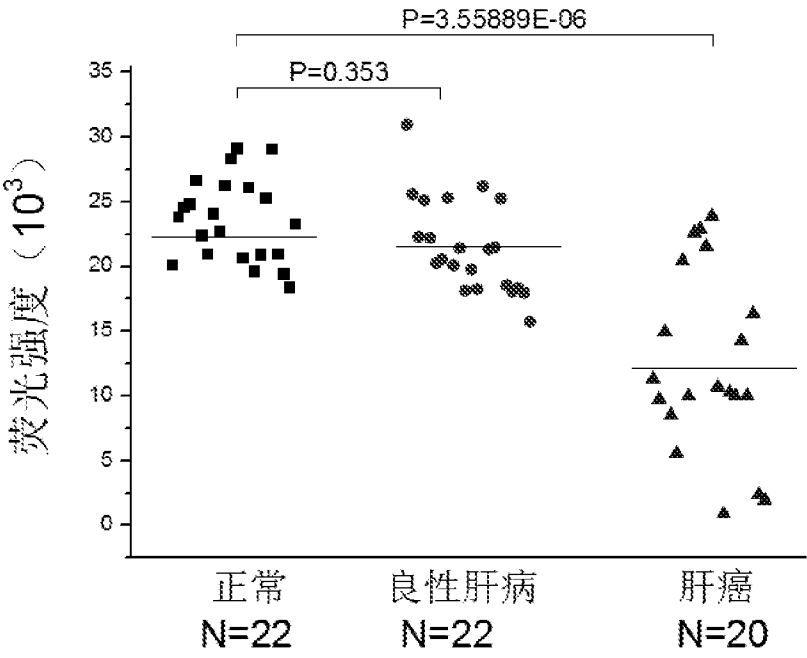


图 5

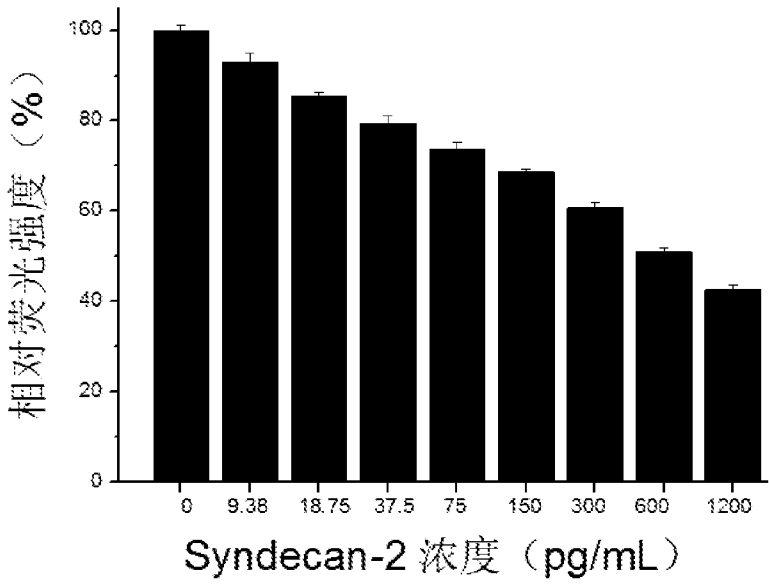


图 6

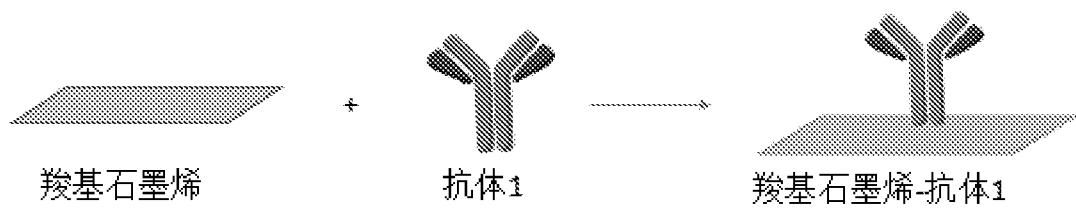


图 7



图 8

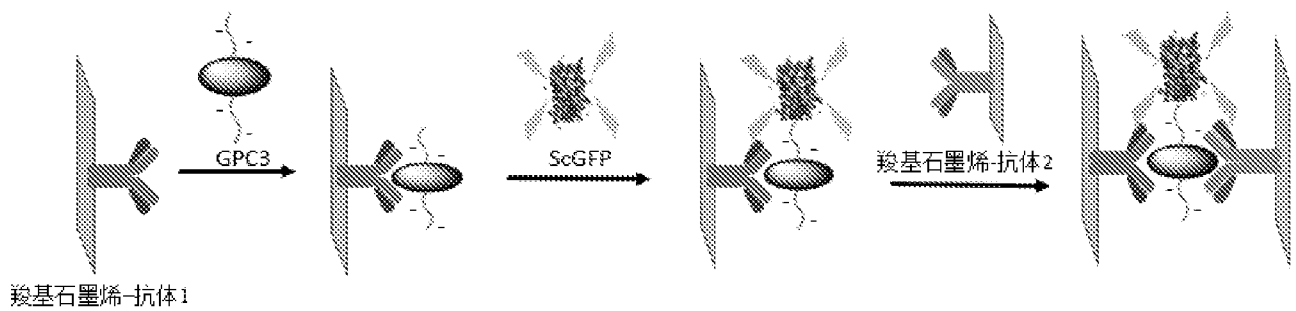


图 9

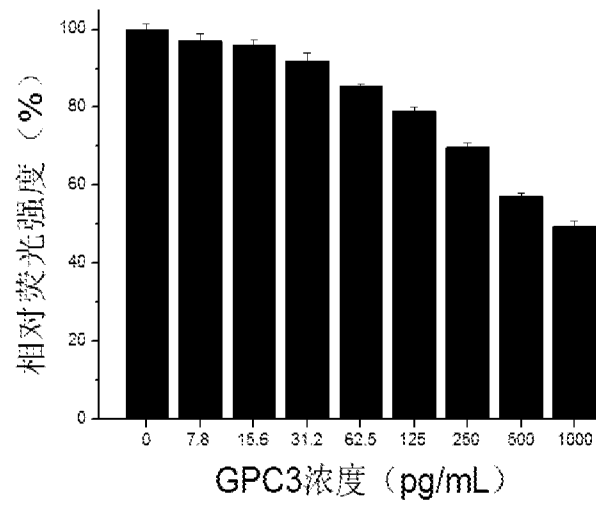


图 10

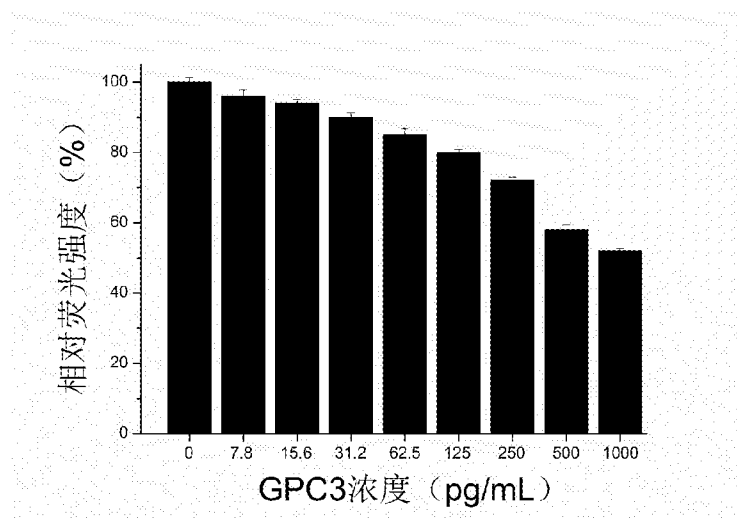


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/075758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI; VEN; CNPAT; CNKI; PubMed; ISI: applicant/inventor, monoclonal antibody, fluorescent protein, amino terminal, carboxyl terminal, proteoglycan, PG, GPC, Glypican, Syndecan, Versican, Aggrecan, Brevican, Decorin, Lumican, Perlecan, Agrin, CD44, NG2, GAG, glycosaminoglycan, graphene, GNS, antibody, mab, Fluorescent, supercharge, ScGFP, core protein, quench

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 104678092 A (SHANDONG UNIVERSITY), 03 June 2015 (03.06.2015), description, paragraphs 0008-0020 and 0045	1-10
Y	CN 101186650 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 28 May 2008 (28.05.2008), description, page 3, line 8, page 5, lines 13 and 23, page 6, line 3 and page 33, lines 4-6, and figures 7-8	1-10
Y	WANG, Wenshuang et al., "Supercharged Fluorescent Protein as a Versatile Probe for the Detection of Glycosaminoglycans in Vitro and in Vivo", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol.87, 19 August 2015 (19.08.2015), pages 9302-9307	1-10
PX	CN 105606827 A (SHANDONG UNIVERSITY), 25 May 2016 (25.05.2016), claims 1-10	1-10
A	LEI, Jiuqian et al., "A simple and Sensitive Immunoassay for the Determination of Human Chorionic Gonadotropin by Graphene-based Chemiluminescence Resonance Energy Transfer", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, vol.54, 31 October 2013 (31.10.2013), pages 72-77	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 May 2017 (19.05.2017)	Date of mailing of the international search report 02 June 2017 (02.06.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Hao Telephone No.: (86-10) 52871050

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/075758

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, J.S. et al., "Graphene-Based Chemiluminescence Resonance Energy Transfer for Homogeneous Immunoassay", ACSNANO, vol.6, no.4, 14 March 2012 (14.03.2012), pages 2978-2983	1-10
A	LIU, Meng et al., "Distance-independent Quenching of Quantum Dots by Nanoscale-graphene in Self-assembled Sandwich Immunoassay", CHEM. COMMUN, vol.46, 21 September 2010 (21.09.2010), pages 7909-7911	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/075758

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/075758

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104678092 A	03 June 2015	WO 2016119536 A1	04 August 2016
CN 101186650 A	28 May 2008	CY 1112299 T1	09 December 2015
		AU 2008246259 B2	20 September 2012
		US 2009060907 A1	05 March 2009
		WO 2004022739 A1	18 March 2004
		JP 4221370 B2	12 February 2009
		CA 2497744 A1	18 March 2004
		AU 2008246258 B2	16 February 2012
		EP 1795592 A2	13 June 2007
		EP 1541680 A1	15 June 2005
		CA 2497744 C	12 March 2013
		KR 20050057201 A	16 June 2005
		AU 2002338020 A1	29 March 2004
		AU 2003261941 B2	21 August 2008
		EP 1795592 A3	03 October 2007
		SI 1541680 T1	29 February 2012
		EP 1541680 B9	11 April 2012
		AT 532862 T	15 November 2011
		EP 1541680 A4	04 October 2006
		CN 1678740 A	05 October 2005
		ES 2373652 T3	07 February 2012
		KR 101046578 B1	06 July 2011
		AU 2008246259 C1	24 October 2013
		JP 2009108047 A	21 May 2009
		AU 2003261941 A1	29 March 2004
		US 2010183595 A1	22 July 2010
		KR 20100122530 A	22 November 2010
		CA 2801911 A1	18 March 2004
		PT 1541680 E	09 February 2012
		AU 2008246259 A1	11 December 2008
		US 2006167232 A1	27 July 2006
		EP 1541680 B1	09 November 2011
		DK 1541680 T3	12 March 2012
		AU 2008246258 A1	11 December 2008
		CN 101186650 B	26 September 2012
		AU 2008203369 A1	21 August 2008
		KR 101118964 B1	27 February 2012
		US 2006188510 A1	24 August 2006
		WO 2004022597 A1	18 March 2004
		ES 2373652 T9	04 July 2012
CN 105606827 A	25 May 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075758

A. 主题的分类

G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N33/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI; VEN; CNPAT; CNKI; PubMed; ISI; 申请人/发明人, 蛋白聚糖, 糖胺聚糖, 石墨烯, 抗体, 单抗, 荧光蛋白, 高正电荷, 核心蛋白, 淬灭, 氨基端, 羧基端, proteoglycan, PG, GPC, Glypican, Syndecan, Versican, Aggrecan, Brevican, Decorin, Lumican, Perlecan, Agrin, CD44, NG2, GAG, glycosaminoglycan, graphene, GNS, antibody, mab, Fluorescent, supercharg, ScGFP, core protein, quench

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 104678092 A (山东大学) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03) 说明书第0008-0020、0045段	1-10
Y	CN 101186650 A (中外制药株式会社) 2008年 5月 28日 (2008 - 05 - 28) 说明书第3页第8行, 第5页第13、23行, 第6页第3行, 第33页第4-6行, 图7-8	1-10
Y	WANG, Wenshuang等. "Supercharged Fluorescent Protein as a Versatile Probe for the Detection of Glycosaminoglycans in Vitro and in Vivo." Analytical Chemistry., 第87卷, 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19), 第9302-9307页	1-10
PX	CN 105606827 A (山东大学) 2016年 5月 25日 (2016 - 05 - 25) 权利要求1-10	1-10
A	LEI, Jiuqian等. "A simple and sensitive immunoassay for the determination of human chorionic gonadotropin by graphene-based chemiluminescence resonance energy transfer." Biosensors and Bioelectronics., 第54卷, 2013年 10月 31日 (2013 - 10 - 31), 第72-77页	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 5月 19日

国际检索报告邮寄日期

2017年 6月 2日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

潘浩

电话号码 (86-10)52871050

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	LEE, Joon Seok等. "Graphene-Based Chemiluminescence Resonance Energy Transfer for Homogeneous Immunoassay." ACS NANO., 第6卷, 第4期, 2012年 3月 14日 (2012 - 03 - 14), 第2978-2983页	1-10
A	LIU, Meng等. "Distance-independent quenching of quantum dots by nanoscale-graphene in self-assembled sandwich immunoassay." Chem. Commun., 第46卷, 2010年 9月 21日 (2010 - 09 - 21), 第7909-7911页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. (提交时间)

☒ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/075758

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104678092	A	2015年 6月 3日	WO	2016119536	A1	2016年 8月 4日
CN	101186650	A	2008年 5月 28日	CY	1112299	T1	2015年 12月 9日
				AU	2008246259	B2	2012年 9月 20日
				US	2009060907	A1	2009年 3月 5日
				WO	2004022739	A1	2004年 3月 18日
				JP	4221370	B2	2009年 2月 12日
				CA	2497744	A1	2004年 3月 18日
				AU	2008246258	B2	2012年 2月 16日
				EP	1795592	A2	2007年 6月 13日
				EP	1541680	A1	2005年 6月 15日
				CA	2497744	C	2013年 3月 12日
				KR	20050057201	A	2005年 6月 16日
				AU	2002338020	A1	2004年 3月 29日
				AU	2003261941	B2	2008年 8月 21日
				EP	1795592	A3	2007年 10月 3日
				SI	1541680	T1	2012年 2月 29日
				EP	1541680	B9	2012年 4月 11日
				AT	532862	T	2011年 11月 15日
				EP	1541680	A4	2006年 10月 4日
				CN	1678740	A	2005年 10月 5日
				ES	2373652	T3	2012年 2月 7日
				KR	101046578	B1	2011年 7月 6日
				AU	2008246259	C1	2013年 10月 24日
				JP	2009108047	A	2009年 5月 21日
				AU	2003261941	A1	2004年 3月 29日
				US	2010183595	A1	2010年 7月 22日
				KR	20100122530	A	2010年 11月 22日
				CA	2801911	A1	2004年 3月 18日
				PT	1541680	E	2012年 2月 9日
				AU	2008246259	A1	2008年 12月 11日
				US	2006167232	A1	2006年 7月 27日
				EP	1541680	B1	2011年 11月 9日
				DK	1541680	T3	2012年 3月 12日
				AU	2008246258	A1	2008年 12月 11日
				CN	101186650	B	2012年 9月 26日
				AU	2008203369	A1	2008年 8月 21日
				KR	101118964	B1	2012年 2月 27日
				US	2006188510	A1	2006年 8月 24日
				WO	2004022597	A1	2004年 3月 18日
				ES	2373652	T9	2012年 7月 4日
CN	105606827	A	2016年 5月 25日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)