



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104520710 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201380042250.5

(22)申请日 2013.08.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104520710 A

(43)申请公布日 2015.04.15

(30)优先权数据  
2012-176761 2012.08.09 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.02.09

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2013/071188 2013.08.06

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/024853 JA 2014.02.13

(73)专利权人 富士瑞必欧株式会社  
地址 日本东京都  
专利权人 爱代尔株式会社

(72)发明人 山口建太郎 青柳克己 寺尾梓

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李志强 石克虎

(51)Int.Cl.  
G01N 33/53(2006.01)  
C07K 14/47(2006.01)

(56)对比文件  
US 6893831 B1,2005.05.17,  
CN 101377505 A,2009.03.04,全文.  
JP 2007192557 A,2007.08.02,全文.  
US 2005113562 A1,2005.05.26,全文.  
WO 0153837 A1,2001.07.26,全文.

审查员 张绚

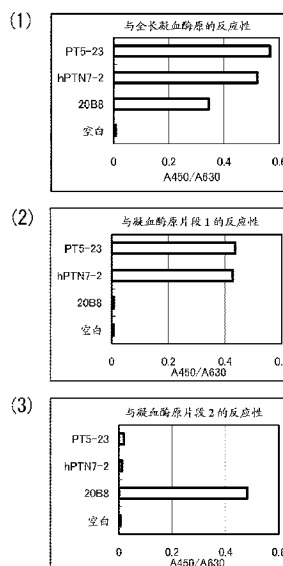
权利要求书1页 说明书11页  
序列表7页 附图1页

(54)发明名称

PIVKA-II测定方法、测定试剂和测定试剂盒

(57)摘要

本发明公开了与以往的方法相比,血清/血浆相关性良好的PIVKA-II的测定方法、以及用于该测定的试剂和试剂盒。本发明的PIVKA-II的测定方法包括:通过使用与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段的混合物,以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段的免疫测定,来测定样品中的PIVKA-II。



1. 下述物质在制备样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂盒中的用途：与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段的混合物，以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段，

其中，所述抗F1抗体、所述抗F2抗体和所述抗PIVKA-II抗体是单克隆抗体。

2. 权利要求1所述的用途，其中，所述抗F1抗体是识别F1区内的表位而与PIVKA-II结合的抗体，所述抗F2抗体是识别F2区内的表位而与PIVKA-II结合的抗体。

3. 权利要求1所述的用途，其中，所述免疫测定是通过使用所述混合物作为标记抗体、使用所述抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段作为固相抗体的夹心法进行。

4. 权利要求2所述的用途，其中，所述免疫测定是通过使用所述混合物作为标记抗体、使用所述抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段作为固相抗体的夹心法进行。

5. 权利要求1所述的用途，其中，所述混合物是以1:0.2-2的比例含有抗F1抗体和抗F2抗体的混合物。

6. 权利要求2所述的用途，其中，所述混合物是以1:0.2-2的比例含有抗F1抗体和抗F2抗体的混合物。

7. 权利要求3所述的用途，其中，所述混合物是以1:0.2-2的比例含有抗F1抗体和抗F2抗体的混合物。

8. 权利要求4所述的用途，其中，所述混合物是以1:0.2-2的比例含有抗F1抗体和抗F2抗体的混合物。

9. 权利要求1-8中任一项所述的用途，其中，所述样品是血清或血浆。

10. 样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂，包含：与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段；与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段的混合物，

其中所述抗F1抗体、所述抗F2抗体和所述抗PIVKA-II抗体是单克隆抗体。

11. 样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂盒，包括：权利要求10所述的免疫测定试剂。

## PIVKA-II测定方法、测定试剂和测定试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及与血清/血浆相关性良好的PIVKA-II测定方法、以及PIVKA-II免疫测定试剂和试剂盒。

### 背景技术

[0002] PIVKA-II(维生素K缺乏诱导的蛋白-II(Protein induced by vitamin K absence-II))是与血液凝固相关的、具有与凝血酶原类似结构的糖蛋白。凝血酶原是622个残基的蛋白质,位于N末端附近的10个谷氨酸(Glu)残基受到 $\gamma$ -羧基化,形成 $\gamma$ -羧基谷氨酸(GIa)残基。已知该凝血酶原在生物体内产生时,由于维生素K的缺乏,肝功能衰竭、维生素K拮抗剂的给予、肝细胞损伤等, $\gamma$ -羧基化不完全,10个残基中的全部或部分形成Glu残基的糖蛋白出现在血液中。该蛋白质是被称作异常凝血酶原的PIVKA-II。近年来,有报道称在肝细胞癌患者血浆中高浓度检出PIVKA-II,作为肝细胞癌的标志被用于诊断的监测物。

[0003] 作为特异性检出样品中PIVKA-II的方法,有人报道了使用特异性识别PIVKA-II的单克隆抗体和抗凝血酶原的多克隆抗体两者,以其中一方作为固定抗体,以另一方作为标记抗体进行测定的免疫测定法(专利文献1)。

[0004] 在测定来自血液的样品中的被检物质时,主要使用血清或血浆。根据被检物质的性质或测定系统等,在由同一受试者得到的血清/血浆样品对中,血清样品和血浆样品中的被检物质的测定值不同,即血清/血浆相关性低,只能测定血清和血浆样品中的一方。这在同时测定两种被检物质时特别成为问题。例如,在同时测定两种被检物质时,一种被检物质只能用血清测定时,如果另一种被检物质也可以用血清测定,则由患者采集的样品可以只是血清样品。但是,如果另一方的被检物质只能用血浆样品测定时,则必须由患者采集血清和血浆两种样品,样品的取得或处理麻烦,并且也增加了患者的负担。因此,人们希望可以建立血清/血浆相关性高的测定系统。

[0005] 在采用ELISA法的PIVKA-II测定中,在以特异性识别PIVKA-II的单克隆抗体作为固相抗体、以抗凝血酶原的多克隆抗体作为二次抗体使用时,已知,与凝血酶显示反应性的抗体包含在二次抗体中,因此,血清样品对测定系统产生不良影响,无法获得稳定的测定值(专利文献2)。专利文献2中报道,为了解决该问题,是使用不与人凝血酶反应、而与人凝血酶原特异性反应的抗体作为二次抗体,由此,即使是血清样品也可以稳定测定PIVKA-II。但是,专利文献2所述的方法中,为了从抗人凝血酶原的多克隆抗体中除去抗凝血酶的抗体,必须使用人凝血酶原亲和柱,在取得与凝血酶原反应的抗体后进行透析,再进一步使用人凝血酶亲和柱,取得不与凝血酶反应的抗体,进行透析,抗体的纯化工序非常麻烦。另外,专利文献2的方法中,虽然血清/血浆相关性得到改善,但人们希望进一步的改善。并且,多克隆抗体因批次不同而出现偏差,因此为了严格确保特异性,与多克隆抗体相比,人们通常希望采用单克隆抗体。专利文献2中虽然记载,在采用ELISA法的PIVKA-II测定法中,使用不与人凝血酶反应、而与人凝血酶原特异性反应的单克隆抗体,但是,对于使用这样的单克隆抗

体时它们对血清/血浆相关性的影响或问题则未有任何记载。

[0006] 专利文献3中记载了,使用特异性识别PIVKA-II的单克隆抗体和抗凝血酶原的单克隆抗体两者,以其中一方作为固定抗体、另一方作为标记抗体进行测定的免疫测定法。还记载了,将PIVKA-II特异性单克隆抗体混合使用。但是专利文献3中仍然完全未记载免疫测定系统中血清/血浆相关性的问题,专利文献3所述的方法对于血清/血浆相关性有何影响是不清楚的。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本特开昭60-60557号公报

[0010] 专利文献2:日本特开平5-249108号公报

[0011] 专利文献3:日本特开平9-43237号公报。

## 发明内容

[0012] 发明所要解决的课题

[0013] 本发明的目的在于提供:与以往的方法相比,血清/血浆相关性良好的PIVKA-II的测定方案。

[0014] 解决问题的方案

[0015] 本发明人对于PIVKA-II的测定进行了深入的研究,结果发现:通过使用将与人凝血酶原片段1特异性结合的抗体、和与人凝血酶原片段2特异性结合的抗体的混合而成的混合抗体作为免疫测定中的抗体,与以往的方法相比,血清/血浆相关性大幅改善,从而完成了本发明。

[0016] 即,本发明提供PIVKA-II的测定方法,该测定方法包括:通过使用与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段的混合物,以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段的免疫测定,来测定样品中的PIVKA-II。本发明还提供样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂,该免疫测定试剂包含:与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段、与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段。本发明进一步提供样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂盒,该试剂盒包括所述本发明的免疫测定试剂。

[0017] 发明效果

[0018] 根据本发明,可提供血清/血浆相关性良好的PIVKA-II的测定方法、以及用于该测定的试剂和试剂盒。本发明的方法与以往的方法相比,血清/血浆相关性进一步得到大幅改善,作为PIVKA-II测定方法,其实用性更高。

## 附图说明

[0019] 图1是表示实施例1中制备的单克隆抗体与全长人凝血酶原(1)、F1区(2)和F2区(3)的反应性的图表。

## 具体实施方式

[0020] 凝血酶原含有凝血酶原片段1(F1)区和凝血酶原片段2(F2)区和凝血酶区。PIVKA-II是因为N末端附近的10个GIu残基中的 $\gamma$ -羧基化不完全而10个残基的全部或部分未形成GIa、仍为GIu的糖蛋白,PIVKA-II也含有凝血酶原片段1(F1)区和凝血酶原片段2(F2)区和凝血酶区。

[0021] SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列是PIVKA-II的氨基酸序列,第44号-第198号氨基酸区是凝血酶原F1区,第199号-第314号氨基酸区是凝血酶原F2区。含有F1区的一部分的第25号-第88号氨基酸区被称作GIa区。凝血酶原中,SEQ ID NO: 1中的10个“Xaa”全部形成 $\gamma$ -羧基谷氨酸(GIa)残基。该凝血酶原序列在GenBank中以登录号NP\_000497登记。SEQ ID NO: 2所示的碱基序列是编码SEQ ID NO: 1的PIVKA-II和NP\_000497的凝血酶原的序列,在GenBank中以登录号NM\_000506登记。SEQ ID NO: 2中的第44号-第1912号的碱基区域是编码区。

[0022] 本发明的测定方法中,使用抗F1抗体和抗F2抗体的混合物、以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体进行夹心免疫测定。通过使用抗F1抗体和抗F2抗体的混合物作为夹心法中抗体的一方,可以合乎需要地改善PIVKA-II测定值中的血清/血浆相关性。

[0023] 抗F1抗体是与凝血酶原F1特异性结合的抗体。即,在PIVKA-II的凝血酶原F1区内具有表位,是识别该表位而与PIVKA-II结合的抗体。例如,只与凝血酶原或PIVKA-II的F1区片段结合、实质上不与F2区片段以及凝血酶区片段的任意一方结合的抗体就是“与在F1区内具有表位的凝血酶原F1特异性结合的抗体”。这里所述的“实质上不结合”是指:不与F2区片段以及凝血酶区片段的任意一方以可检测的水平结合(即,与F2区片段以及凝血酶区片段的结合为背景噪声以下),或者即使是以可检测的水平结合,也仅以本领域技术人员清楚的程度结合,即与它们结合的程度明显少于与F1区片段的结合,并非与F2区片段或凝血酶区片段结合。抗F1抗体可以是可与PIVKA-II的F1区、也与凝血酶原的F1区结合的抗体,可以不具有PIVKA-II分子特异性(即,不与凝血酶原结合而只与PIVKA-II结合的结合性)。

[0024] 抗F2抗体是与凝血酶原F2特异性结合的抗体。即,在PIVKA-II的凝血酶原F2区内具有表位,是识别该表位而与PIVKA-II结合的抗体。例如,只与凝血酶原或PIVKA-II的F2区片段结合、实质上不与F1区片段以及凝血酶区片段的任意一方结合的抗体是“与凝血酶原F2特异性结合的抗体”。这里所述的“实质上不结合”是指:不与F1区片段以及凝血酶区片段的任意一方以可检测的水平结合(即,与F1区片段以及凝血酶区片段的结合为背景噪声以下),或者即使是以可检测的水平结合,也仅以本领域技术人员清楚的程度结合,即与它们结合的程度明显少于与F2区片段的结合,并非与F1区片段或凝血酶区片段结合。F2区的氨基酸序列在PIVKA-II和凝血酶原中均相同,因此抗F2抗体通常是可以与PIVKA-II的F2区、也可以与凝血酶原的F2区结合的抗体。

[0025] 抗PIVKA-II抗体是只与PIVKA-II结合、实质上不与凝血酶原结合的抗体。

[0026] 抗F1抗体、抗F2抗体和抗PIVKA-II抗体各自可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。从免疫测定的再现性等角度考虑,可优选使用单克隆抗体。另外,这些抗体也可以以保持与对应抗原的结合性的抗体片段(抗原结合性片段)的形式使用。

[0027] 多克隆抗体、单克隆抗体和抗原结合性片段的制备方法本身是周知的常规方法,抗F1抗体、抗F2抗体、抗PIVKA-II抗体以及它们的抗原结合性片段可按照常规方法制备。另外,这些抗体也存在市售商品,因此也可以使用市售的抗体。

[0028] 抗F1多克隆抗体例如可如下获得：将F1多肽或其部分片段与适当的佐剂一起免疫动物(人除外)，由从该动物采集的血液获得抗血清，纯化该抗血清中的多克隆抗体。为了使被免疫动物中抗体效价升高，免疫通常需要花费数周进行多次。抗血清中的抗体的纯化例如可通过用硫酸铵沉淀或采用阴离子色谱的分离、亲和柱纯化等进行。抗F2多克隆抗体也可以以F2多肽或其部分片段作为免疫原类似地制备。

[0029] 抗F1单克隆抗体例如可通过周知的杂交瘤法制备。具体来说，可将F1多肽(F1区片段)、凝血酶原、PIVKA-II或它们的部分片段与适当的佐剂一起免疫动物(人除外)，从该动物采集脾细胞或淋巴细胞等的抗体生成细胞，将其与骨髓瘤细胞融合，制备杂交瘤，选择生产与F1多肽结合的抗体的杂交瘤，使其增殖，从培养上清中获得抗F1单克隆抗体。抗F2单克隆抗体也同样，以F2多肽、凝血酶原、PIVKA-II或其部分片段作为免疫原，通过选择生产与F2多肽结合的抗体的杂交瘤来制备。

[0030] 关于抗PIVKA-II抗体，多克隆抗体可使用羧基化不完全的GIa区部分片段作为免疫原来制备，但本发明中，必须对PIVKA-II具有足够的特异性，因此通常使用单克隆抗体。对于PIVKA-II单克隆抗体，可使用PIVKA-II或其部分片段(含有受到羧基化的GIa区的10个残基中的至少一部分的部分片段)作为免疫原制备杂交瘤，然后选择生产与PIVKA-II结合而不与凝血酶原结合的抗体的杂交瘤，回收抗体。抗PIVKA-II抗体的制备方法的具体例子可举出日本特开昭60-60557号公报、日本特开平9-249699号公报所述的方法。

[0031] “抗原性结合性片段”只要可保持原本抗体与对应抗原的结合性(抗原抗体反应性)即可，可以是任何抗体片段。具体例子可举出：Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv等，但并不限于此。众所周知，Fab或F(ab')<sub>2</sub>可通过将单克隆抗体用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶等的蛋白质分解酶处理来获得。scFv(单链可变区片段，单链抗体)的制备方法也是周知的，例如可提取如上所述制备的杂交瘤的mRNA，制备单链cDNA，使用对免疫球蛋白H链和L链为特异性的引物进行PCR，使免疫球蛋白H链基因和L链基因扩增，将它们用接头连接，使其具有适当的限制酶切位点，导入质粒载体中，用该载体转化大肠杆菌，使scFv表达，将其从大肠杆菌中回收，由此获得scFv。

[0032] 作为免疫原使用的多肽或其部分片段可通过化学合成、遗传工程学方法等常规方法制备。或者可从新鲜人血浆等中提取凝血酶原或PIVKA-II并纯化获得(参照Thromb.Diath.Haemorph. 1966;16:469-90等)。

[0033] 化学合成法的具体例子例如可举出：Fmoc法(苄氧羰基法)、tBoc法(叔丁氧羰基法)等。还可以利用各种市售的肽合成仪，通过常规方法合成。化学合成时，可以只根据氨基酸序列合成所需的多肽。

[0034] 通过遗传工程学方法制备多肽的方法也是周知的。具体来说，例如可通过以下所述的方法制备。首先，由来自人的培养细胞等中提取RNA，通过反转录反应由mRNA合成cDNA。以该cDNA为模板，使用根据人凝血酶原的mRNA序列信息设计的引物进行PCR，制备编码凝血酶原全长或所需一部分(F1区或F2区等)的多核苷酸。PCR中使用的引物可以根据SEQ ID NO: 2所示的碱基序列或登记于GenBank等数据库中的人凝血酶原序列信息等适当设计。或者，编码所需多肽的多核苷酸可通过使用市售的核酸合成仪的常规方法制备。编码各氨基酸的密码子是公知的，因此只要特定氨基酸序列，编码该氨基酸序列的多核苷酸的碱基序列也可确定。接着，将制备的多核苷酸掺入适当的载体，通过适当的表达系统使多肽表达，

回收该多肽,由此可获得所需的多肽。所使用的载体或各种表达系统(细菌表达系统、酵母细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、昆虫细胞表达系统、无细胞表达系统等)也是周知的,各种载体或宿主细胞、试剂类、试剂盒均有市售,因此,本领域技术人员可适当选择使用。来自人的培养细胞也有市售/分开出售,容易获得。

[0035] 抗F1抗体与抗F2抗体的混合比例只要是在PIVKA-II测定值中可得到良好的血清/血浆相关性的范围即可,没有特别限定,以抗F1抗体:抗F2抗体=1:0.2-2、优选1:0.3-1.5、更优选1:0.5-1.0的混合比例,尤其可获得良好的血清/血浆相关性。如后述实施例所示,在只使用抗F2抗体时,血浆样品的PIVKA-II测定值比血清样品的测定值高,未能得到良好的血清/血浆相关性。只使用抗F1抗体时,血清样品的PIVKA-II测定值比血浆样品的测定值高,未能得到良好的血清/血浆相关性。而通过将抗F1抗体和抗F2抗体混合使用,可以改善血清/血浆相关性。

[0036] 夹心免疫测定本身是周知的常规方法。作为具体例子,可举出化学发光酶免疫测定法(CLEIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫测定、电化学发光免疫测定法等各种方法,本发明中可以采用任意方法。

[0037] 夹心测定系统中,通常使用2种抗体中的一方作为固定于固相上的固相抗体,使用另一方作为标记抗体。本发明中,使用抗F1抗体/抗F2抗体混合物作为1种抗体,使用抗PIVKA-II抗体作为另1种抗体,但是,可以使用任意一种作为固相抗体。下述实施例中,使用抗PIVKA-II抗体作为固相抗体,使用抗体混合物作为标记抗体,但并不限于此。

[0038] 以使用抗F1抗体/抗F2抗体混合物作为标记抗体的情形为例,具体说明本发明的PIVKA-II测定方法。首先,将PIVKA-II抗体(固相抗体)固定于载体上。使固定的PIVKA-II抗体与样品中所含的PIVKA-II接触,由此使固相抗体与PIVKA-II特异性结合。接着,用适当的缓冲液洗涤除去未结合的样品中成分,例如载体,然后使用标记物标记的抗F1抗体/抗F2抗体混合物(即,标记抗F1抗体和标记抗F2抗体的混合物)与结合于固相抗体上的PIVKA-II结合。反应结束后,为了除去未反应的成分,例如用适当的缓冲液洗涤载体后,用适当的方法检测来自标记物的信号,由此可测定样品中所含的PIVKA-II。

[0039] 固相没有特别限定,可以与在公知的夹心免疫测定系统中使用的固相相同。固相的材质的具体例子可举出:聚苯乙烯、聚乙烯、琼脂糖等,但并不限于这些。固相的物理形状本质上并不重要。所使用的固相优选为抗体与其表面的固定容易且可容易地将测定中形成的免疫复合物与未反应的成分分离的材料。特别优选在常规免疫测定法中使用的塑料板或磁性粒子。从操作、保存和分离的容易性等考虑,最优选使用如上所述材质的磁性粒子。抗体与这些固相的结合可通过本领域周知的常规方法进行。

[0040] 标记物也没有特别限定,可以使用与在公知的免疫测定系统中使用的标记物同样的物质。具体例子可举出:酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质、放射性物质等。酶可以使用碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶、 $\beta$ 半乳糖苷酶等公知的酶,但并不限于这些。为了提供高检测灵敏度的测定系统,优选使用ALP。

[0041] 使用酶作为标记物时,通过使与该酶对应的显色底物、荧光底物或发光底物等底物与该酶反应并测定由此产生的信号,可求出酶活性对测定对象物进行测定。例如,使用ALP作为标记物时,可以使用3-(4-甲氧基螺(1,2-二氧环乙烷-3,2'-三环[3.3.1.1.3,7]癸烷)-4-基)苯基磷酸二钠(例如商品名AMPPD)等的发光底物。

[0042] 使用生物素或半抗原作为标记物时,可以使用结合了酶、荧光物质、化学发光物质、染色物质或放射性物质等的链霉抗生物素或半抗原抗体等测定。

[0043] 信号的检测可根据标记物的种类适当选择。例如信号如果是显色,则可以使用比色计或吸光光度计,如果是荧光则可以使用荧光光度计,如果是发光则可以使用光子计数器,如果是放射线则可以使用放射线测定装置。对于以各种浓度含有PIVKA-II的浓度已知的标准样品,按照本发明的方法测定PIVKA-II,由来自标记的信号量和标准样品中PIVKA-II的浓度的相关关系制图,制成校正曲线,对PIVKA-II浓度未知的样品同样进行测定操作,测定来自标记的信号量,将测定值代入该校正曲线,由此可对样品中PIVKA-II进行定量。

[0044] 本发明的方法所适用的样品是从受试者分离的样品,优选血液样品,特别优选血浆或血清。根据本发明的测定方法,不管是血浆样品还是血清样品,均可稳定地测定PIVKA-II。样品可根据需要适当稀释后使用。

[0045] 本发明还提供样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂,该试剂含有:抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段(抗PIVKA-II抗体等)、抗F1抗体或其抗原结合性片段(抗F1抗体等)、和抗F2抗体或其抗原结合性片段(抗F2抗体等)。该免疫测定试剂中,抗F1抗体等和抗F2抗体等可分别封装入容器,或者预先混合后封装入容器。还可以进一步含有对这些抗体或其抗原结合性片段的稳定等有利的其它成分。这些抗体或其抗原结合性片段可以用标记物标记的形态,或固定在板、粒子等固相上的形态。

[0046] 上述免疫测定试剂可以与其它试剂类等适当组合,作为样品中的PIVKA-II的免疫测定试剂盒提供。免疫测定所必需的其它试剂类是周知的。例如,除上述免疫测定试剂之外,本发明的试剂盒中还可以进一步含有样品稀释液、洗涤液、以及标记抗体中使用的标记物为酶时的该酶的底物液等。

## 实施例

[0047] 以下通过实施例具体说明本发明。当然本发明并不受这些实施例等的限定。

[0048] 实施例1. 标记抗体的制备

[0049] (A)杂交瘤的制备

[0050] 将纯化凝血酶原(按照Shapiro S.等人., The purification of human prothrombin. Thromb. Diath. Haemorph. 1966;16:469-90所述的方法从新鲜人血浆中纯化而得)在含有0.15M NaCl的10mM磷酸缓冲液(pH7.3)中稀释,终浓度为0.2-1.0mg/mL,与等量的弗氏完全佐剂混合,制成油包水型乳液。将该乳液腹腔内给予7周龄的BALB/c系小鼠,之后将氟完全佐剂变更为弗氏不完全佐剂,每2周进行同样的免疫,进行2到3次。进而在约2周后腹腔内给予100 $\mu$ L溶解于生理盐水的0.2-1.0mg/mL纯化凝血酶原(最终追加免疫)。

[0051] 最终追加免疫后第3天,由该免疫动物无菌摘除脾脏,用剪刀剪成碎片,进一步使用筛网将脾脏拆解成单个细胞,用RPMI-1640培养基洗涤3次,计测细胞数。与上述同样地洗涤对数生长期的的小鼠骨髓瘤细胞株P3X63Ag8-U1,然后调节为所计测的脾细胞数的1至1/10的细胞数,加入到50mL容量的离心管中混合。以200 $\times$ g、5分钟进行离心,除去上清,加入1mL聚乙二醇(PEG)1500(メルク制造)进行细胞融合。然后加入15mL RPMI-1640培养基,进行聚乙二醇的稀释。

[0052] 对于融合细胞,通过离心(200 $\times$ g,5分钟)除去PEG,然后使用96孔板在含有10%胎

牛血清、次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT)的RPMI-1640培养基中培养约10天,只使杂交瘤增殖。然后取部分培养上清,通过将纯化凝血酶原用作固相抗原的ELISA法,筛选各个生产凝血酶原抗体的孔,得到多个生产对凝血酶原具有反应性的单克隆抗体的杂交瘤。对于所得杂交瘤,按照常规的极限稀释法进行单克隆。

#### [0053] (B)单克隆抗体的制备

[0054] 将按照(A)所述的方法得到的杂交瘤移植到预先腹腔内给予了0.5mL降植烷的小鼠腹腔内,每只移植约 $1 \times 10^7$ 个,取得在腹水中产生的单克隆抗体。该单克隆抗体的纯化是通过利用结合了A蛋白的琼脂糖柱(バイオラッド制造)分离IgG流分来进行。

[0055] 接着,分别将凝血酶原多肽、F1多肽和F2多肽分别固定在微量滴定板上,分别对于得到的单克隆抗体研究其对各多肽的反应性。即,将全长凝血酶原(Termo)、凝血酶原-片段1(HaematoLogic Technologies Inc.)、凝血酶原-片段2(HaematoLogic Technologies Inc.)分别用0.1M磷酸缓冲液(pH7.0)制备成5 $\mu$ g/mL的溶液。将100 $\mu$ L这些抗原溶液添加到微量板(Nunc,Maxisorp)的各孔中,在4 $^{\circ}$ C下反应12-18小时,然后除去抗原溶液,将300 $\mu$ L含有1%BSA、0.1%叠氮化钠的50mM Tris-HCl缓冲液(pH7.2)添加到各孔中。在室温下静置2小时,然后封闭微量板的未反应部位,用含有0.01%TritonX-100、0.03M NaCl的10mM Tris-HCl (pH7.2) (以下记为洗涤液)洗涤3次,由此得到各种多肽固相板。制备单克隆抗体hPTN7-2、PT5-23和20B8的5 $\mu$ g/mL抗体溶液,将100 $\mu$ L该溶液添加到固定有上述3种多肽(全长凝血酶原、凝血酶原-片段1、凝血酶原-片段2)的微量板的各孔中,在室温下反应1小时,然后除去抗体溶液,用洗涤液洗涤3次。将100 $\mu$ L稀释为一定浓度的碱性磷酸酶标记抗小鼠IgG(ジャクソンイムノリサーチ制造)添加到各孔中,在室温下反应1小时,然后除去标记抗体溶液,用洗涤液洗涤3次,添加100 $\mu$ L含有作为显色底物的10mM 4-硝基苯基磷酸、1mM氯化镁的1M二乙醇胺-盐酸缓冲液(pH10.5),进行显色反应。在遮光下室温静置15分钟,然后添加100 $\mu$ L含有50mM EDTA的0.1M磷酸缓冲液(pH7.0),终止反应,然后用微量板读数仪(バイオラッド)测定450nm/630nm的吸光度。

[0056] 测定结果如图1所示。单克隆抗体hPTN7-2和PT5-23与凝血酶原多肽和F1多肽反应,不与F2多肽反应,因此,可确认是特异性识别F1的抗F1单克隆抗体。而单克隆抗体20B8与凝血酶原多肽和F2多肽反应,不与F1多肽反应,因此,可确认是特异性识别F2的抗F2单克隆抗体。

#### [0057] (C)标记抗体的制备

[0058] 接着,取6mL 3mg/mL的hPTN7-2抗体溶液,添加到用0.1M柠檬酸缓冲液(pH3.5)平衡的G-25柱(ファルマシア制造)中,进行抗体溶液的缓冲液置换。向其中加入约100 $\mu$ L 1mg/mL胃蛋白酶溶液,37 $^{\circ}$ C放置1小时,用Tris缓冲液将pH调至中性附近,然后添加到スーパーデックス200柱(ファルマシア制造)中,进行抗体的凝胶过滤纯化。合并所得流分在吸光度280nm下的单峰,作为hPTN7-2抗体F(ab')<sub>2</sub>片段。在4mL该F(ab')<sub>2</sub>片段溶液中添加200 $\mu$ L 0.2M 2-巯基乙胺(以下记为2-MEA)溶液,37 $^{\circ}$ C放置2小时,进行还原处理。将其添加到G-25柱中,除去2-MEA,作为hPTN7-2抗体Fab'片段。

[0059] 将1.5mL 10mg/mL的高比活性ALP溶液添加到用0.1M磷酸缓冲液(pH7.0)平衡的G-25中,进行ALP溶液的缓冲液置换。向其中添加70 $\mu$ L 10mg/mL N-(4-马来酰亚胺基丁基氧基)-琥珀酰亚胺(以下记为GMBS)的二甲基甲酰胺溶液,30 $^{\circ}$ C放置1小时以进行反应。将该溶

液添加到用0.1M磷酸缓冲液(pH6.3)平衡的G-25柱中,除去过量的GMBS,制备马来酰亚胺化ALP。将4mL之前制备的hPTN7-2抗体Fab'片段溶液、3mL马来酰亚胺化ALP溶液和13mL 0.1M磷酸缓冲液(pH6.3)混合,在室温下放置1小时,由此制备ALP标记抗体。向其中加入1mL 2M 2-MEA溶液,在室温下放置30分钟,将多余的马来酰亚胺基封闭,然后添加到スーパーデックス200柱中,进行纯化。合并吸光度280nm的几个峰中Fab'和ALP为1:1的分子量的峰,作为纯化ALP标记hPTN7-2抗体(ALP标记抗F1抗体)。对于PT5-23抗体和20B8抗体,也同样地制备纯化ALP标记PT5-23抗体(ALP标记F1抗体)和纯化ALP20B8抗体(ALP标记抗F2抗体)。

[0060] 实施例2. 测定数据

[0061] (D)PIVKA-II的测定

[0062] 样品是由同一健康受试者得到的人血清/血浆(肝素钠和EDTA-2钠)样品对。除了使用酶标抗体之外,测定中还使用ルミパルスプレストPIVKA-IIエーザイ(富士レビオ制造)所附的试剂(抗体结合粒子、洗涤液)。

[0063] 首先,在50 $\mu$ L结合有与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II单克隆抗体(小鼠)的抗体结合粒子(抗PIVKA-II单克隆抗体(小鼠)结合磁性粒子)中添加20 $\mu$ L样品,搅拌,然后在37 $^{\circ}$ C下反应8分钟。通过磁力从磁性粒子中分离除去反应残余液,用洗涤液洗涤。在洗涤后的粒子中添加在(C)中制备的ALP标记抗F1抗体(hPTN7-2抗体或PT5-23抗体)(终浓度0.4 $\mu$ g/mL)和ALP标记抗F2抗体(终浓度0.2 $\mu$ g/mL),搅拌后在37 $^{\circ}$ C下反应8分钟。比较例是使用ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体作为酶标抗体。

[0064] 然后,再次通过磁力分离磁性粒子,除去反应残余液,用洗涤液洗涤。向该粒子中添加200 $\mu$ L含有碱性磷酸酶的化学发光底物3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酸氧基)苯基-1,2-二氧环乙烷·2钠盐(AMPPD)的底物液,在37 $^{\circ}$ C下进行4分钟的酶促反应。通过发光测定仪测定反应后的化学发光量。测定仪器使用全自动化学发光免疫测定装置ルミパルスプレストII(富士レビオ制造)。

[0065] 表1示出使用ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体作为酶标抗体测定的9个血清/血浆样品对的结果。表2示出使用ALP标记抗F1抗体(hPTN7-2抗体)和ALP标记抗F2抗体(20B8抗体)的混合物作为酶标抗体测定的9个血清/血浆样品对的结果。结果,如表1所示,在使用ALP标记抗凝血酶原多克隆抗体时,肝素血浆中的血浆/血清比例平均约为79%,可确认血清/血浆相关性低。而将抗F1抗体和抗F2抗体按照重量比2:1混合作为ALP标记抗体时,如表2所示,肝素血浆中的血浆/血清比例约为102%,EDTA血浆中的血浆/血清比例约105%,每种情形的血清/血浆的相关性均得到改善。

[0066] [表1]

[0067]

	样品编号	样品种类	
		血清	肝素血浆
测定值 mAU/mL	1	15.5	12.6
	2	17.4	13.8
	3	15.9	11.5
	4	20.8	16.3
	5	15.9	13.9
	6	19.1	16.1
	7	24.6	17.1
	8	19.6	15.4
	9	15.2	11.9
相对 血清的 比例	1		81%
	2		79%
	3		72%
	4		78%
	5		87%
	6		84%
	7		70%
	8		79%
	9		78%
	平均值		79%

[0068] [表2]

[0069]

	样品编号	样品种类		
		血清	肝素血浆	EDTA 血浆
测定值 mAU/mL	1	15.1	15.5	15.5
	2	16.6	16.9	18.3
	3	13.9	13.6	14.1
	4	19.4	21.3	21.0
	5	15.9	15.6	16.9
	6	20.0	20.1	19.9
	7	21.0	21.3	21.0
	8	18.9	18.4	19.6
	9	14.1	14.9	16.4
相对 血清的 比例	1		103%	103%
	2		102%	110%
	3		98%	101%
	4		110%	108%
	5		98%	106%
	6		101%	100%
	7		101%	100%
	8		97%	104%
	9		106%	116%
	平均值		102%	105%

[0070] 表3中示出使用PT5-23抗体代替hPTN7-2抗体作为抗F1抗体、使用ALP标记抗F1抗体(PT5-23抗体)和ALP标记抗F2抗体(20B8抗体)的2:1混合物作为酶标抗体而测定的10个血清/血浆样品对中的PIVKA-II的结果。使用PT5-23抗体作为ALP标记抗F1抗体时,通过与ALP标记抗F2抗体混合后使用,肝素血浆中血浆/血清比例约为106%,EDTA血浆中的血浆/血清比例约为107%,亦可确认每种情形均得到了良好的血清/血浆相关性。

[0071] [表3]

[0072]

	样品编号	样品种类			
		血清	肝素血浆	EDTA 血浆	
测定值 mAU/mL	13	17.1	17.7	18.5	
	14	19.5	20.7	22.2	
	15	16.3	17.3	16.1	
	16	22.5	24.2	24.7	
	17	18.8	19.8	20.2	
	18	23.7	25.4	24.9	
	19	17.7	18.8	19.2	
	20	25.2	26.0	26.2	
	21	22.9	24.6	24.6	
	22	17.4	17.5	19.2	
	相对 血清的 比例	13		104%	108%
		14		106%	114%
15			106%	99%	
16			108%	110%	
17			105%	107%	
18			107%	105%	
19			106%	108%	
20			103%	104%	
21			107%	107%	
22			101%	110%	
平均值				106%	107%

[0073] (E)混合比的研究

[0074] 对ALP标记抗F1抗体和ALP标记抗F2抗体的混合比例进行了研究。如表4所示,作为标记抗体,单独添加1.5μg/mL抗F2抗体时血浆/血清比例约为118%,单独添加0.5μg/mL抗F2抗体时,血浆/血清比例约为127%,均非常高。单独添加1.5μg/mL抗F1抗体作为标记抗体时,血浆/血清比例约为68%,结果非常低。由此可知,就单独的抗F1抗体或抗F2抗体而言,血清/血浆相关性低。而将抗F1抗体和抗F2抗体混合时,在所研究的比例2:1-1:2的全部情形中,血浆/血清比例均为约98%-约110%,可确认显示良好的血清/血浆相关性。

[0075] [表4]



- <110> FUJIREBIO Inc.  
 EIDIA Co., Ltd.
- <120> PIVKA-II 测定方法、测定试剂和测定试剂盒
- <130> PF489-PCT
- <160> 2
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> 人(Homo sapiens)
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (49)..(49)  
 [0001] <223> Gla 或 Glu
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (50)..(50)  
 <223> Gla 或 Glu
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (57)..(57)  
 <223> Gla 或 Glu
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (59)..(59)  
 <223> Gla 或 Glu
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (62)..(62)  
 <223> Gla 或 Glu



	Cys	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Ala	Phe	Xaa	Ala	Leu	Xaa	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr
	65					70				75						80
	Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Lys	Tyr	Thr	Ala	Cys	Glu	Thr	Ala	Arg	Thr	Pro
					85					90						95
	Arg	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Asn	Cys	Ala	Glu	Gly	Leu
				100					105						110	
	Gly	Thr	Asn	Tyr	Arg	Gly	His	Val	Asn	Ile	Thr	Arg	Ser	Gly	Ile	Glu
			115					120						125		
	Cys	Gln	Leu	Trp	Arg	Ser	Arg	Tyr	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Ile	Asn	Ser
			130				135						140			
[0003]	Thr	Thr	His	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro
	145					150					155					160
	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Val
					165					170						175
	Arg	Arg	Gln	Glu	Cys	Ser	Ile	Pro	Val	Cys	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Thr
				180					185							190
	Val	Ala	Met	Thr	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Pro
			195					200						205		
	Pro	Leu	Glu	Gln	Cys	Val	Pro	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	Tyr	Gln	Gly	Arg
		210					215							220		
	Leu	Ala	Val	Thr	Thr	His	Gly	Leu	Pro	Cys	Leu	Ala	Trp	Ala	Ser	Ala
	225					230					235					240

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln  
 245 250 255

Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val  
 260 265 270

Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu  
 275 280 285

Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp  
 290 295 300

Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr  
 305 310 315 320

[0004] Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys  
 325 330 335

Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu  
 340 345 350

Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser  
 355 360 365

Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys  
 370 375 380

Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp  
 385 390 395 400

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn  
 405 410 415

Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr  
 420 425 430

Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr  
 435 440 445

Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala  
 450 455 460

Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro  
 465 470 475 480

Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly  
 485 490 495

[0005]

Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr  
 500 505 510

Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu  
 515 520 525

Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile  
 530 535 540

Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg  
 545 550 555 560

Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser  
 565 570 575

Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu  
 580 585 590

Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg  
 595 600 605

Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu  
 610 615 620

<210> 2

<211> 2018

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

[0006]

gtcaggacag acaattctc agtgaccag gagctgacac actatggcgc acgtccgagg 60  
 ettgcagctg cctggctgcc tggccctggc tgccttgtgt agccttgtgc acagccagea 120  
 tgtgttccctg gctctcagc aagcacggc gctgctccag cgggtccggc gageccaacac 180  
 cttcttggag gaggcgcga agggcaacct ggagcgagag tgcgtggagg agacgtgcag 240  
 ctacgaggag gccttcgagg ctctggagtc ctccaaggct acggatgtgt tctgggccaa 300  
 gtacacagct tgtgagacag cgaggacgcc tcgagataag cttgctgcat gctctggaagg 360  
 taactgtgct gagggtctgg gtacgaacta ccgagggcat gtgaacatca cccggtcagg 420  
 cattgagtgc cagctatgga ggagtcgcta cccacataag cctgaaatca actccactac 480  
 ccctctggg gccgacctac aggagaatct ctgcccaac cccgacagca gcaccacggg 540  
 accctggtgc tacaactacg accccacctg gaggaggcag gaatgeagca tcctgtcttg 600  
 tggccaggat caagteactg tagcgatgac tcaagctec gaaggetcea gtgtgaatct 660  
 gtcacctcca ttgagcagt gtgtccctga tcgggggcag cagtaccagg ggcgctggc 720  
 ggtgaccaca catggctcc cctgcttggc ctgggccagc gcacaggcca aggccctgag 780  
 caagcaccag gacttcaact cagctgtgca gctggctggag aacttcctgc gcaaccaga 840  
 cggggatgag gaggcgtgt ggtgctatgt ggcgggaag cctggcgact ttgggtactg 900

	cgacctcaac tattgtgagg aggccgtgga ggaggagaca ggagatgggc tggatgagga	960
	ctcagacagg gccatcgaag ggcgtaccgc caccagtgag taccagactt tcttcaatcc	1020
	gaggaccttt ggctcgggag aggcagactg tgggctgcca cctctgttcg agaagaagtc	1080
	gctggaggac aaaaccgaaa gagagctcct ggaatcctac atcgacgggc gcattgtgga	1140
	gggctcggat gcagagatcg geatgtcacc ttggcaggtg atgcttttcc ggaagagtcc	1200
	ccaggagctg ctgtgtgggg ccagcctcat cagtgaccgc tgggtectca ccgccccca	1260
	ctgcctctg taccgccct gggacaagaa cttcaccgag aatgaccttc tggtgccat	1320
	tggcaagcac tccgcacca ggtacgagcg aaacattgaa aagatatcca tgttgaaaa	1380
	gatctacatc caccacaggt acaactggcg ggagaacctg gaccgggaca ttgccctgat	1440
[0007]	gaagctgaag aagcctgttg ccttcagtga ctacattcac cctgtgtgtc tgeccgacag	1500
	ggagacggca gccagcttgc tccaggctgg atacaagggg cgggtgacag getggggcaa	1560
	cctgaaggag acgtggacag ccaacgttgg taaggggcag cccagtgtcc tgcaggtggt	1620
	gaacctgecc attgtggagc ggcoggtctg caaggactcc acccggatcc geatcactga	1680
	caacatgttc tgtgtgtggtt acaagcctga tgaagggaaa cgaggggatg cctgtgaagg	1740
	tgacagtggg ggaccctttg tcatgaagag cccctttaac aaccgtggt atcaaatggg	1800
	catcgtctca tgggtgaag gctgtgaccg ggatgggaaa tatggttct acacacatgt	1860
	gttccgctg aagaagtga tacagaaggt cattgateag tttggagagt agggggccac	1920
	tcatattctg ggtcctgga accaatcccg tgaagaatt atttttgtgt ttctaaaact	1980
	atggttccca ataaaagtga ctctcagcga aaaaaaaaa	2018

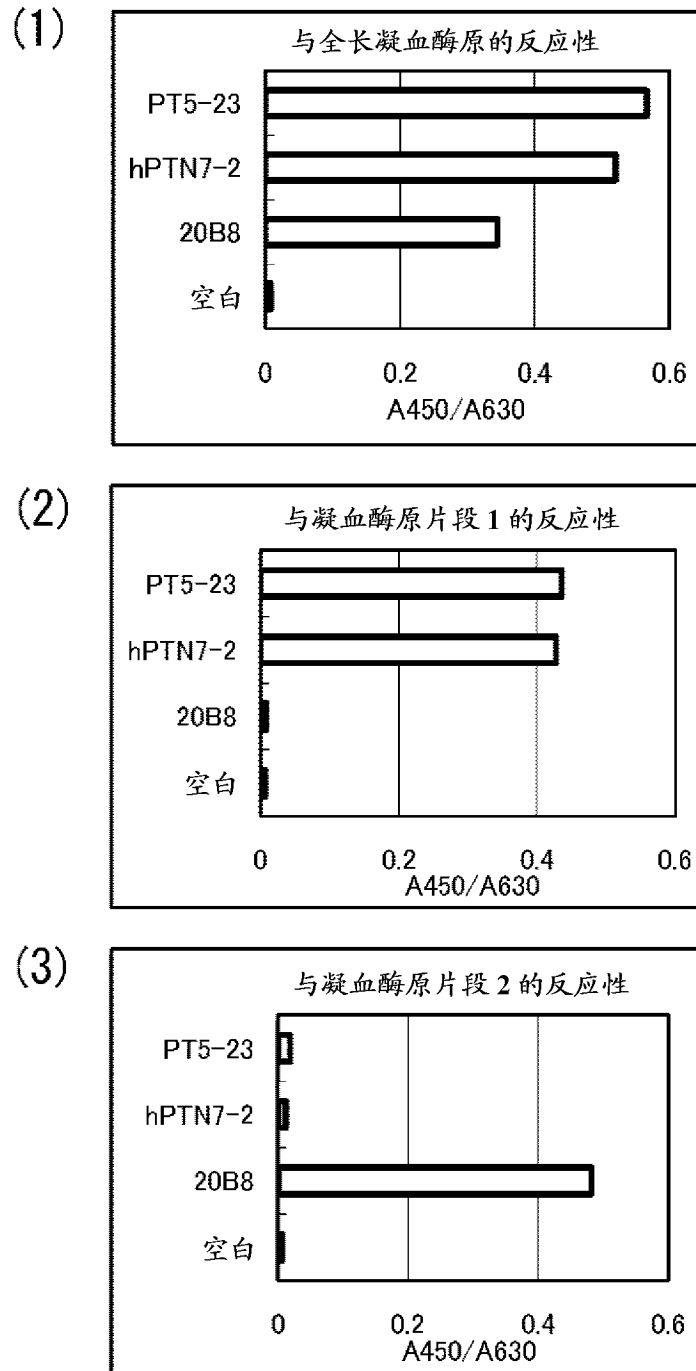


图 1

专利名称(译)	PIVKA-II测定方法、测定试剂和测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN104520710B</a>	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201380042250.5	申请日	2013-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 爱代尔株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 爱代尔株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社 爱代尔株式会社		
[标]发明人	山口建太郎 青柳克己 寺尾梓		
发明人	山口建太郎 青柳克己 寺尾梓		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/86 C07K14/745 G01N33/57438 G01N33/53 G01N33/54306 G01N2333/745		
代理人(译)	李志强		
审查员(译)	张绚		
优先权	2012176761 2012-08-09 JP		
其他公开文献	CN104520710A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了与以往的方法相比，血清/血浆相关性良好的PIVKA-II的测定方法、以及用于该测定的试剂和试剂盒。本发明的PIVKA-II的测定方法包括：通过使用与凝血酶原片段F1特异性结合的抗F1抗体或其抗原结合性片段、和与凝血酶原片段F2特异性结合的抗F2抗体或其抗原结合性片段的混合物，以及与PIVKA-II特异性结合的抗PIVKA-II抗体或其抗原结合性片段的免疫测定，来测定样品中的PIVKA-II。

