



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102435733 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 02

(21) 申请号 201110231053. 0

G01N 33/535 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 08. 12

(71) 申请人 徐斌

地址 213003 江苏省常州市局前街 185 号常州第一人民医院

申请人 蒋敬庭

吴昌平

陆明洋

(72) 发明人 徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋

(74) 专利代理机构 北京市惠诚律师事务所

11353

代理人 王美华

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

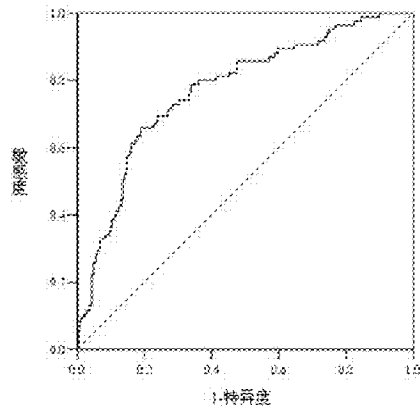
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种 AFP-IgM 检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测患者体内 AFP-IgM 含量的试剂盒,包括下列试剂:作为标准品的人免疫球蛋白 IgM、作为标准品包被抗体的抗 IgM 抗体、作为检测样品包被抗体的抗 AFP 抗体、作为酶标记检测抗体的抗 IgM 辣根过氧化物酶标记物、作为显色剂的四甲基联苯胺溶液、作为终止液的 2M H₂SO₄ 溶液、包被缓冲液、洗涤缓冲液、稀释缓冲液。本发明还涉及使用该试剂盒检测人体内 AFP-IgM 含量的方法。本发明的 AFP-IgM 试剂盒对肝癌的诊断较 AFP 试剂盒具有更高的敏感度,更适合人群中肝癌的筛检实验,同时联合 AFP-IgM 试剂盒、AFP 试剂盒对肝癌进行诊断将会提高对肝癌诊断准确度,两者具有很好的互补性。



1. 一种检测患者体内 AFP-IgM 含量的试剂盒,包括下列试剂:作为标准品的人免疫球蛋白 IgM、作为标准品包被抗体的抗 IgM 抗体、作为检测样品包被抗体的抗 AFP 抗体、作为酶标记检测抗体的抗 IgM 辣根过氧化物酶标记物、作为显色剂的四甲基联苯胺溶液、作为终止液的 2M H₂SO₄ 溶液、包被缓冲液、洗涤缓冲液、稀释缓冲液。

2. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于标准品包被抗体 IgM 抗体为羊抗人 IgM 多克隆抗体,0.2 μg/ml,0.3ml。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于检测样品包被抗体抗 AFP 抗体为鼠抗人 AFP 单克隆抗体,0.2 μg/ml,0.3ml。

4. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于抗 IgM 辣根过氧化物酶标记物为兔抗人辣根过氧化物酶标记物,0.5mg/L,0.1ml。

5. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于包被缓冲液为 PH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液。

6. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于洗涤缓冲液为 PH7.4 0.15M 磷酸盐缓冲溶液。

7. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于稀释缓冲液为牛血清白蛋白与洗涤缓冲液配成质量分数 0.1% 使用或以羊血清、兔血清与洗涤缓冲液配成质量分数 5 ~ 10% 使用。

8. 权利要求 1 所述的试剂盒,特征在于四甲基联苯胺溶液由 2mg/ml 四甲基联苯胺无水乙醇溶液 0.5ml、PH5.0 底物缓冲液 10ml、0.75% H₂O₂ 32 μl 制得,其中 PH5.0 底物缓冲液由 0.2M Na₂HPO₄ 25.7ml、0.1M 柠檬酸 24.3ml,加蒸馏水 50ml 制得。

9. 权利要求 1-8 任一项试剂盒检测患者体内体内 AFP-IgM 含量的方法,包括下列步骤:

第一步:包被

(1) 标准品孔用 IgM 抗体包被于酶标板孔内;

(2) 检测孔用 AFP 抗体包被于酶标板孔内;

第二步:洗涤酶标板孔,移去包被液;

第三步:通过倍比稀释建立标准品浓度梯度,标准品孔分别加入各个浓度的人免疫球蛋白 IgM 标准品;样品孔加入稀释的血清或血浆被检标本;并建立阴性、阳性对照,阴性对照为稀释缓冲液,阳性对照为阳性血清;37℃作用 2 小时,IgM 标准品与包被的 IgM 抗体结合,被检标本中 AFP 及 AFP-IgM 与包被的 AFP 抗体结合;

第四步:洗涤酶标板孔,将未结合的多余样品去除;

第五步:每个凹孔加入兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物溶液,与复合物的 IgM 端结合;

第六步:洗涤酶标板孔,去除多余的抗 IgM-HRP;

第七步:加入底物四甲基联苯胺溶液于每个凹孔,显色。

第八步:每个凹孔加终止剂 H₂SO₄;

第九步:观察记录结果,在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值。

第十步:计算检测样品中 AFP-IgM 浓度,通过倍比稀释建立标准品浓度拟合曲线: $y = ax+b$,x 为标准品 OD 值,y 为标准品浓度,获得 a、b 值;测得待测样品 OD 值为 x₁,则可计算待测样品浓度 $y_1 = ax_1+b$ 。

10. 权利要求 9 所述的 AFP-IgM 含量的检测方法,其特征是包括下列步骤:

第一步:包被

(1) 标准品孔包被 :用包被缓冲液稀释羊抗人 IgM 多克隆抗体至 $0.2 \mu\text{g/ml}$, 96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml , 4°C 过夜, 或 37°C 水浴 3 小时, 贮存冰箱 ;

(2) 检测孔包被 :用包被缓冲液稀释鼠抗人 AFP 单克隆抗体至 $0.2 \mu\text{g/ml}$, 96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml , 4°C 过夜, 或 37°C 水浴 3 小时, 贮存冰箱 ;

第二步 :每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 分钟, 移去包被液 ;

第三步 :通过倍比稀释建立标准品浓度梯度, 为 $0 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \mu\text{g/L}$ 、 $4 \mu\text{g/L}$ 、 $8 \mu\text{g/L}$ 、 $16 \mu\text{g/L}$ 、 $32 \mu\text{g/L}$, 标准品孔包括 6 孔, 分别加入 0.1ml 各浓度的人免疫球蛋白 IgM 标准品, 于第五、第六孔各加浓度为 $32 \mu\text{g/L}$ 的标准品 0.1ml ;样品孔加入 0.1ml 5 倍稀释血清或血浆被检标本 ;并建立阴性、阳性对照, 阴性对照为稀释缓冲液, 阳性对照为阳性血清 ; 37°C 作用 2 小时 ;

第四步 :每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 分钟, 将未结合的多余样品去除 ;

第五步 :加入酶标抗体, 每凹孔加入 0.1ml 用稀释缓冲液稀释的兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物溶液, 浓度为 0.5mg/L , 37°C 作用 1 小时 ;

第六步 :每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 5 分钟, 去除多余的抗 IgM-HRP ;

第七步 :加入 0.1ml 底物四甲基联苯胺溶液于每个凹孔, 室温作用 30 分钟 ;

第八步 :加终止剂, 每凹孔加 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 0.05ml ;

第九步 :观察记录结果, 在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值 ;

第十步 :计算检测样品中 AFP-IgM 浓度, 通过倍比稀释建立标准品浓度拟合曲线 : $y = ax+b$, x 为标准品 OD 值, y 为标准品浓度, 获得 a 、 b 值 ;测得待测样品 OD 值为 x_1 , 则可计算待测样品浓度 $y_1 = ax_1+b$ 。

一种 AFP-IgM 检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 AFP-IgM 检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤之一, 每年在世界范围内约有 100 万新发的病例。其主要诱因为乙型 (中国与东南亚地区) 和丙型 (欧洲) 肝炎病毒, 早期缺乏典型的临床表现、恶性程度高, 难以早期诊断, 且预后较差。

[0003] 甲胎蛋白 (AFP) 在肝癌病人体内以两种形式存在: 即游离 AFP (fAFP) 和循环 IgM 复合型 AFP (AFP-IgM IC)。游离 AFP 又根据对植物凝集素 (lectin) 亲和力的不同分为: AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3 三个亚型, 其中 AFP-L3 可作为衡量肝癌细胞恶性程度的一个标志物。AFP 作为诊断 HCC 的首选肿瘤标志物, 在肝癌的诊断方面占据着主要的地位, 自应用于临床以来使 HCC 诊断的准确性得到较大的提高, 文献报道其敏感性为 41%~65%, 但也易受如慢性肝炎、肝硬化与妊娠等其他因素影响。对于早期 HCC 的诊断, AFP 假阴性率可达 40% 以上, 进展期 AFP 的假阴性率为 15%~20%, 如何提高肝癌临床检出率是提高其生存率的关键因素。

[0004] AFP-IgM 复合物是近年发现的新型肝癌标志物, AFP-IgM 与 AFP 之间存在很好的互补性。游离 AFP 和循环 IgM 复合型 AFP 不会发生交迭, AFP-IgM 是一种补充血清标志物, 两类标志物的联合检测有助于肝癌的诊断。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提高肝癌检出率。为此本发明提供了一种 AFP-IgM 检测试剂盒及检测方法, 使用该试剂盒同时联合现有 AFP 检测技术能提高肝癌诊断准确度。

[0006] 本发明提供了一种检测患者体内 AFP-IgM 含量的试剂盒, 包括下列试剂: 作为标准品的人免疫球蛋白 IgM、作为标准品包被抗体的抗 IgM 抗体、作为检测样品包被抗体的抗 AFP 抗体、作为酶标记检测抗体的抗 IgM 辣根过氧化物酶标记物 (IgM-HRP)、作为显色剂的四甲基联苯胺溶液 (TMB)、作为终止液的 2M H₂SO₄ 溶液、包被缓冲液、洗涤缓冲液、稀释缓冲液。

[0007] 作为优选, 标准品包被抗体 IgM 抗体为羊抗人 IgM 多克隆抗体, 0.2 μg/ml, 0.3ml。

[0008] 作为优选, 检测样品包被抗体抗 AFP 抗体为鼠抗人 AFP 单克隆抗体, 0.2 μg/ml, 0.3ml。

[0009] 作为优选, 抗 IgM 辣根过氧化物酶标记物为兔抗人辣根过氧化物酶标记物, 0.5mg/L, 0.1ml。

[0010] 作为优选, 包被缓冲液为 PH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液。该缓冲液可由 Na₂CO₃ 1.59 克 NaHCO₃ 2.93 克, 加蒸馏水至 1000ml, 调 PH 至 9.6 制得。

[0011] 作为优选, 洗涤缓冲液为 PH7.40.15M 磷酸盐缓冲溶液。该溶液可由 KH₂PO₄ 0.2 克、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 克、NaCl 8.0 克、KCl 0.2 克、0.05% Tween-20 0.5ml、加蒸馏水至

1000ml,调 PH 至 7.4 制得。

[0012] 作为优选,稀释缓冲液为牛血清白蛋白 (BSA) 与洗涤缓冲溶液配成质量分数 0.1% (g/ml) 使用或以羊血清、兔血清血清与洗涤缓冲溶液配成质量分数 5~10% (g/ml) 使用。

[0013] 作为优选,四甲基联苯胺溶液可由 2mg/ml 四甲基联苯胺无水乙醇溶液 0.5ml、PH5.0 底物缓冲液 10ml、0.75% H_2O_2 32 μ l 制得,其中 PH5.0 底物缓冲液可由 0.2M Na_2HPO_4 25.7ml、0.1M 柠檬酸 24.3ml,加蒸馏水 50ml 制得。

[0014] 本发明提供了一种使用上述试剂盒检测患者体内体内 AFP-IgM 含量的方法,具体方法是:

[0015] 第一步:包被

[0016] (2) 标准品孔用 IgM 抗体包被于酶标板孔内;

[0017] (2) 检测孔用 AFP 抗体包被于酶标板孔内;

[0018] 第二步:洗涤酶标板孔,移去包被液;

[0019] 第三步:通过倍比稀释建立标准品浓度梯度,标准品孔分别加入各个浓度的人免疫球蛋白 IgM 标准品;样品孔加入稀释的血清或血浆被检标本;并建立阴性、阳性对照,阴性对照为稀释缓冲液,阳性对照为阳性血清;37 $^{\circ}$ C 作用 2 小时,IgM 标准品与包被的 IgM 抗体结合,被检标本中 AFP 及 AFP-IgM 与包被的 AFP 抗体结合;

[0020] 第四步:洗涤酶标板孔,将未结合的多余样品去除;

[0021] 第五步:每个凹孔加入兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物溶液,与复合物的 IgM 端结合;

[0022] 第六步:洗涤酶标板孔,去除多余的抗 IgM-HRP;

[0023] 第七步:加入底物四甲基联苯胺溶液于每个凹孔,显色;

[0024] 第八步:每个凹孔加终止剂 H_2SO_4 ;

[0025] 第九步:观察记录结果,在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值;

[0026] 第十步:计算检测样品中 AFP-IgM 浓度,通过倍比稀释建立标准品浓度拟合曲线: $y = ax+b$,x 为标准品 OD 值,y 为标准品浓度,获得 a、b 值;测得待测样品 OD 值为 x_1 ,则可计算待测样品浓度 $y_1 = ax_1+b$ 。

[0027] 作为优选,AFP-IgM 含量的检测方法是:

[0028] 第一步:包被

[0029] (1) 标准品孔包被:用包被缓冲液稀释羊抗人 IgM 多克隆抗体至 0.2 μ g/ml,96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml,4 $^{\circ}$ C 过夜,或 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时,贮存冰箱;

[0030] (2) 检测孔包被:用包被缓冲液稀释鼠抗人 AFP 单克隆抗体至 0.2 μ g/ml,96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml,4 $^{\circ}$ C 过夜,或 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时,贮存冰箱;

[0031] 第二步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,移去包被液;

[0032] 第三步:通过倍比稀释建立标准品浓度梯度,为 0 μ g/L、2 μ g/L、4 μ g/L、8 μ g/L、16 μ g/L、32 μ g/L,标准品孔包括 6 孔,分别加入 0.1ml 各浓度的人免疫球蛋白 IgM 标准品,于第五、第六孔各加浓度为 32 μ g/L 的标准品 0.1ml;样品孔加入 0.1ml 5 倍稀释血清或血浆被检标本;并建立阴性、阳性对照,阴性对照为稀释缓冲液,阳性对照为阳性血清;37 $^{\circ}$ C 作用 2 小时;

[0033] 血清或血浆被检标本 5 倍稀释一方面,降低了标本中其它因子的浓度,避免其对实验的干扰,增加试剂的特异性;另一方面,可使试剂与标本中的抗体/抗原达到最佳反应浓度,提高试剂的灵敏度,根据 AFP-IgM 在血清中的含量确定大概的稀释度。

[0034] 第四步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,将未结合的多余样品去除;

[0035] 第五步:加入酶标抗体,每凹孔加入 0.1ml 用稀释缓冲液稀释的兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物溶液,浓度为 0.5mg/L,37℃作用 1 小时;

[0036] 第六步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,去除多余的抗 IgM-HRP;

[0037] 第七步:加入 0.1ml 底物四甲基联苯胺溶液于每个凹孔,室温作用 30 分钟;

[0038] 第八步:加终止剂,每凹孔加 2M H_2SO_4 0.05ml;

[0039] 第九步:观察记录结果,在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值;

[0040] 第十步:计算检测样品中 AFP-IgM 浓度,通过倍比稀释建立标准品浓度拟合曲线: $y = ax + b$, x 为标准品 OD 值, y 为标准品浓度,获得 a、b 值;测得待测样品 OD 值为 x_1 ,则可计算待测样品浓度 $y_1 = ax_1 + b$ 。

[0041] 当血清中 AFP-IgM 含量大于等于 25ug/L,可诊断为肝癌。通过 ROC 曲线对 AFP-IgM 诊断肝癌的敏感度、特异度及准确度进行分析;不同参考值对应不同的敏感度、特异度以及准确度;根据不同的诊断目的并结合诊断效率确定参考值;确定 25ug/L 作为参考值是考虑了用该参考值诊断效率接近最高,并且敏感度较高,能与 AFP 形成互补。

[0042] 本发明的技术效果为,本发明的 AFP-IgM 试剂盒对肝癌的诊断较 AFP 试剂盒具有更高的敏感度,AFP-IgM 更适合人群中肝癌的筛检实验,同时联合 AFP-IgM 试剂盒、AFP 试剂盒对肝癌进行诊断将会提高对肝癌诊断准确度,两者具有很好的互补性。

附图说明

[0043] 图 1:酶标抗体浓度曲线

[0044] 图 2:AFP-IgM 诊断肝癌 ROC 曲线

具体实施方式

[0045] 实施例 1 试剂盒的使用方法

[0046] 第一步:包被

[0047] (1) 标准品孔包被:用包被缓冲液稀释羊抗人 IgM 多克隆抗体至 0.2 μ g/ml,96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml,4℃过夜,或 37℃水浴 3 小时,贮存冰箱;

[0048] (2) 检测孔包被:用包被缓冲液稀释鼠抗人 AFP 单克隆抗体至 0.2 μ g/ml,96 孔酶标板的凹孔加 0.3ml,4℃过夜,或 37℃水浴 3 小时,贮存冰箱;

[0049] 第二步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,移去包被液;

[0050] 第三步:通过倍比稀释建立标准品浓度梯度,为 0 μ g/L、2 μ g/L、4 μ g/L、8 μ g/L、16 μ g/L、32 μ g/L,标准品孔包括 6 孔,分别加入 0.1ml 各浓度的人免疫球蛋白 IgM 标准品,于第五、第六孔各加浓度为 32 μ g/L 的标准品 0.1ml;样品孔加入 0.1ml 5 倍稀释血清或血浆被检标本;并建立阴性、阳性对照,阴性对照为稀释缓冲液,阳性对照为阳性血清;37℃作用 2 小时;

[0051] 第四步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,将未结合的多余样品去除;

[0052] 第五步:加入酶标抗体,每凹孔加入 0.1ml 用稀释缓冲液稀释的兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物溶液,浓度为 0.5mg/L,37℃作用 1 小时;

[0053] 第六步:每凹孔用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 5 分钟,去除多余的抗 IgM-HRP;

[0054] 第七步:加入 0.1ml 底物四甲基联苯胺溶液于每个凹孔,室温作用 30 分钟;

[0055] 第八步:加终止剂,每凹孔加 2M H₂SO₄ 0.05ml;

[0056] 第九步:观察记录结果,在 450nm 波长下用酶标仪测定 OD 值;

[0057] 第十步:计算检测样品中 AFP-IgM 浓度,通过倍比稀释建立标准品浓度拟合曲线: $y = ax+b$, x 为标准品 OD 值, y 为标准品浓度,获得 a、b 值;测得待测样品 OD 值为 x₁,则可计算待测样品浓度 $y_1 = ax_1+b$ 。

[0058] 包被缓冲液为 PH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液。该缓冲液可由 Na₂CO₃ 1.59 克 NaHCO₃ 2.93 克,加蒸馏水至 1000ml,调 PH 至 9.6 制得。

[0059] 洗涤缓冲液为 PH7.40.15M PBS 溶液。该溶液可由 KH₂PO₄0.2 克、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 克、NaCl 8.0 克、KCl 0.2 克、0.05% Tween-200.5ml、加蒸馏水至 1000ml,调 PH 至 7.4 制得。

[0060] 稀释缓冲液为牛血清白蛋白 (BSA) 与洗涤缓冲溶液配成质量分数 0.1% (g/ml) 使用或以羊血清、兔血清等血清与洗涤缓冲溶液配成质量分数 5~10% (g/ml) 使用。

[0061] 四甲基联苯胺溶液可由 2mg/ml 四甲基联苯胺无水乙醇溶液 0.5ml、PH5.0 底物缓冲液 10ml、0.75% H₂O₂ 32 μl 制得,其中 PH5.0 底物缓冲液可由 0.2M Na₂HPO₄25.7ml、0.1M 柠檬酸 24.3ml,加蒸馏水 50ml 制得。

[0062] 使用的人免疫球蛋白 IgM 购自北京赛驰生物科技有限公司,产品编号 009016,羊抗人 IgM 多克隆抗体购自北京赛驰生物科技有限公司,产品编号 020003,鼠抗人 AFP 单克隆抗体购自上海博耀生物科技有限公司,兔抗人 IgM 辣根过氧化物酶标记物购自北京赛驰生物科技有限公司,产品编号 030018。

[0063] 实施例 2 包被抗体浓度的确定

[0064] 用不同的抗体浓度 0.01、0.1、1.0、10 μg/ml 等进行包被后,分别按照实施例第 1-9 步操作,记录阳性标本的 OD 值,见表 1、表 2。

[0065] 表 1 不同浓度标准品孔包被抗体对应的 OD 值

	羊抗人 IgM 多克隆抗体浓度(μg/ml)	测定 OD 值
[0066]	0.01	0.064
	0.1	0.189
	1	0.185
	10	0.204

[0067] 表 2 不同浓度样品孔包被抗体对应的 OD 值

	鼠抗人 AFP 单克隆抗体(μg/ml)	测定 OD 值
[0068]	0.01	0.087
	0.1	0.245
	1	0.251
	10	0.239

[0069] 选择 OD 值较大而抗体用量较少的浓度作为包被抗体浓度,表 1、表 2 结果表明标准品孔和样品孔合适的包被抗体浓度均为 0.1 μg/ml,为保证抗体的足量,取 0.2 μg/ml 为包被抗体浓度。

[0070] 实施例 3 酶标抗体浓度的确定

[0071] 将 IgM 标准品用 0.05M PH9.6 包被缓冲液稀释为 $10 \mu\text{g/ml}$, 于聚苯乙烯 96 孔板内加 0.1ml, 4°C 过夜, 次日以洗涤缓冲液洗涤 3 次。原始酶标抗体浓度为 0.1mg/ml , 用 1% BSA-PBS 液依次稀释成 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 分别加入反应孔中, 每个稀释度二孔, 每孔 0.1ml, 37°C 孵育 1 小时后洗涤。然后加底物液 TMB, 每孔 0.1ml, 37°C 10 ~ 30 分钟。以 $2\text{MH}_2\text{SO}_4$ 0.05ml 终止反应。读取各孔 OD 值 (表 3), 并以 OD 为纵座标, 结合物浓度为横座标, 绘制滴定曲线 (见图 1)。由曲线上查得 OD 值为 1.0 左右, 且曲线斜率最大时的酶标抗体稀释度, 即为该标记物的工作浓度, 本实验结果酶标抗体浓度取 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 。

[0072] 表 3

[0073]

稀释倍数	酶标抗体浓度($\mu\text{g/ml}$)	测定 OD 值
1 : 50	2	1.358
1 : 100	1	1.126
1 : 200	0.5	0.876
1 : 400	0.25	0.416
1 : 800	0.125	0.259

[0074] 实施例 4 参考值的确定

[0075] 通过 ROC 曲线 (图 2) 对 AFP-IgM 诊断肝癌的敏感度、特异度及准确度进行分析; 不同 cutoff 值对应不同的敏感度、特异度 (表 4); 根据不同的诊断目的并结合诊断效率确定参考值; 确定 $25\mu\text{g/L}$ 作为参考值是考虑了用该参考值诊断效率接近最高, 并且敏感度较高, 能与 AFP 形成互补。表 4 中约登指数 = 敏感度 + 特异度 - 1, $25\mu\text{g/L}$ 对应的 cutoff 值约登指数最大。

[0076] 表 4

	cutoff 值	敏感度	特异度	约登指数
	0.068	1.000	0.008	0.008
	0.387	1.000	0.028	0.028
	1.012	1.000	0.064	0.064
	2.113	0.988	0.112	0.100
	3.191	0.965	0.176	0.141
	4.293	0.953	0.232	0.185
	5.500	0.929	0.256	0.185
	7.113	0.906	0.288	0.194
	8.302	0.906	0.344	0.250
[0077]	9.646	0.882	0.404	0.286
	11.225	0.859	0.504	0.363
	13.053	0.812	0.564	0.376
	15.078	0.800	0.640	0.440
	17.814	0.729	0.696	0.425
	20.072	0.694	0.756	0.450
	21.064	0.671	0.764	0.435
	21.553	0.671	0.768	0.439
	22.236	0.671	0.772	0.443
	23.248	0.659	0.776	0.435
	24.143	0.659	0.792	0.451
	24.441	0.659	0.796	0.455
	24.730	0.659	0.804	0.463
	25.013	0.659	0.812	0.471
	25.338	0.647	0.812	0.459
	25.775	0.635	0.820	0.455
	26.118	0.624	0.824	0.448
	26.659	0.612	0.828	0.440
	27.611	0.612	0.840	0.452
	28.838	0.553	0.852	0.405
	32.127	0.518	0.860	0.378
	35.138	0.447	0.864	0.311
[0078]	36.055	0.447	0.868	0.315
	40.423	0.400	0.888	0.288
	45.610	0.353	0.900	0.253
	61.986	0.318	0.932	0.250
	86.369	0.212	0.956	0.168
	129.917	0.118	0.972	0.090
	192.574	0.059	0.992	0.051
	224.045	0.047	0.996	0.043
	321.060	0.012	0.996	0.008
	418.900	0.000	1.000	0.000

[0079] 实施例 5 AFP-IgM、AFP 试剂盒检测试验

[0080] AFP-IgM、AFP 分别检测肝癌,AFP-IgM 按照实施例 1 的方法,AFP 采用化学发光法进行检测(北京源德生物医学工程有限公司是 AFP 单克隆抗体的提供厂家),仪器为 Access® I analyzer(Beckman Coulter, CA, USA)。两种试剂盒对肝细胞癌的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、诊断效率结果见表 5。

[0081] 表 5

[0082]

试剂盒	指标	分组	敏感度 %	特异度 %	阳性预测 值 %	阴性预测 值 %	诊断效 率 %
AFP-IgM 试剂盒	AFP-IgM cutoff=25 μ g/L	HCC vs 正常	66	98	97	80	84
		HCC vs 肝硬化	66	65	77	53	66
		HCC vs 慢性肝炎	66	68	67	67	67
AFP 试剂盒	AFP cutoff =20 ng/mL	HCC vs 正常	44	100	100	64	72
		HCC vs 肝硬化	44	82	71	59	63
		HCC vs 慢性肝炎	44	98	96	64	71

[0083] 试验结果表明本发明的 AFP-IgM 试剂盒对肝癌的诊断较 AFP 试剂盒具有更高的敏感度,对于早期肝癌及小肝癌(直径 < 3cm) 诊断效率更高;而 AFP 对肝炎、肝硬化具有更高的特异度,对一些假阳性的标本具有更好的鉴别力;因此 AFP-IgM 更适合人群中肝癌的筛检实验,同时联合 AFP-IgM 试剂盒、AFP 试剂盒对肝癌进行诊断将会提高对肝癌诊断准确度,两者具有很好的互补性。

[0084] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

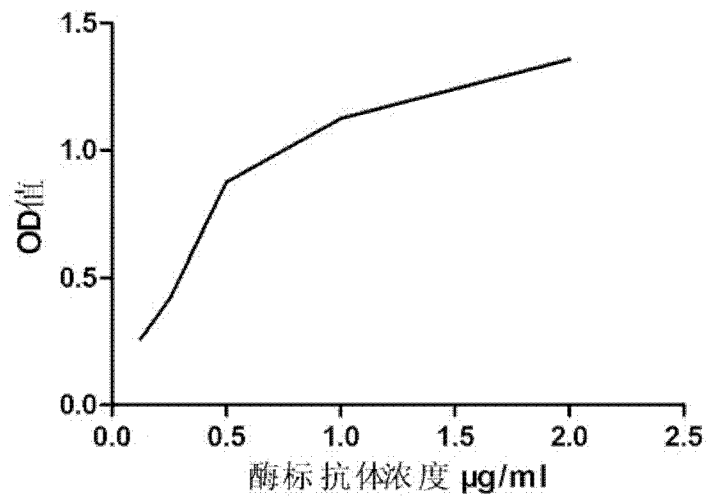


图 1

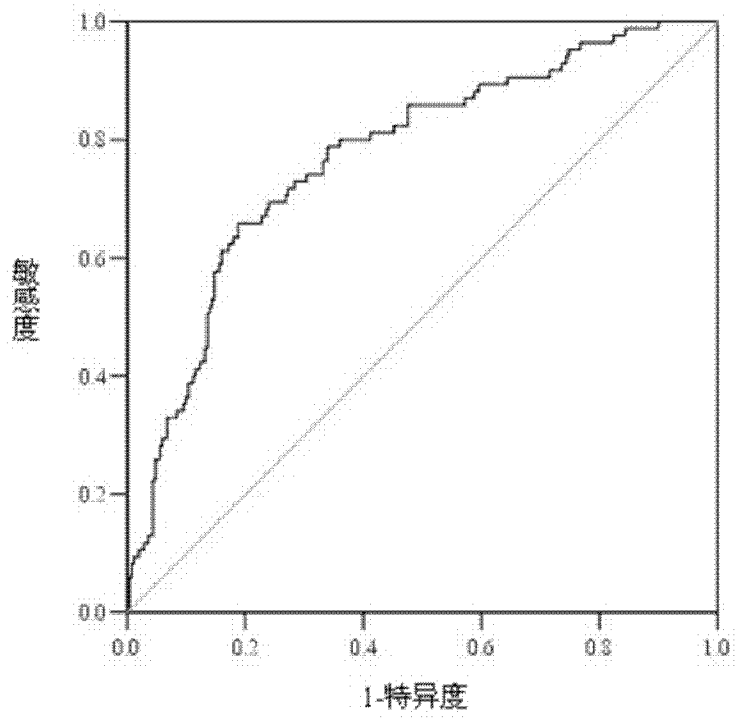


图 2

专利名称(译)	一种AFP-IgM检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN102435733A	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201110231053.0	申请日	2011-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋		
申请(专利权)人(译)	徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋		
当前申请(专利权)人(译)	徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋		
[标]发明人	徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋		
发明人	徐斌 蒋敬庭 吴昌平 陆明洋		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	王美华		
其他公开文献	CN102435733B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测患者体内AFP-IgM含量的试剂盒，包括下列试剂：作为标准品的人免疫球蛋白IgM、作为标准品包被抗体的抗IgM抗体、作为检测样品包被抗体的抗AFP抗体、作为酶标记检测抗体的抗IgM辣根过氧化物酶标记物、作为显色剂的四甲基联苯胺溶液、作为终止液的2M H₂SO₄溶液、包被缓冲液、洗涤缓冲液、稀释缓冲液。本发明还涉及使用该试剂盒检测人体内AFP-IgM含量的方法。本发明的AFP-IgM试剂盒对肝癌的诊断较AFP试剂盒具有更高的敏感度，更适合人群中肝癌的筛检实验，同时联合AFP-IgM试剂盒、AFP试剂盒对肝癌进行诊断将会提高对肝癌诊断准确度，两者具有很好的互补性。

