



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212193 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811158345.4

G01N 33/573(2006.01)

(22)申请日 2018.09.30

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区
区经开第十五大街199号

(72)发明人 渠文涛 史小芹 马雷 周金龙

刘雅奇 郑业焕 渠海 付光宇
吴学炜

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通
合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

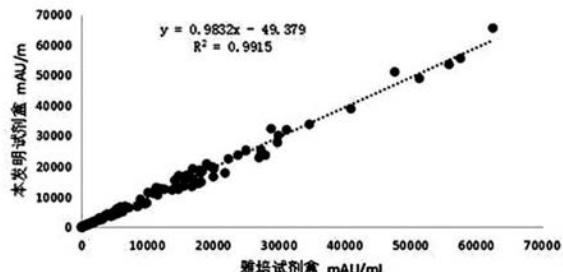
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒，包括磁微粒PIVKA-II校准品、包被PIVKA-II抗体的磁微粒混悬液、磁微粒PIVKA-II酶结合物和样品稀释液。本发明采用夹心法原理进行检测。用PIVKA-II抗体包被磁微粒，辣根过氧化物酶标记PIVKA-II抗体制备酶结合物。通过免疫反应形成抗体—抗原—抗体—酶复合物，该复合物催化发光底物发出光子，发光强度与PIVKA-II的含量成正比。本发明试剂盒操作简单方便，灵敏度高，特异性强，检测范围宽。本发明试剂盒的校准品是液态的，避免了因校准品复溶引入的检测误差，检测结果更准确，更便于临床应用。本发明的试剂盒临幊上可辅助用于肝细胞癌的早期诊断、疾病进程监测及治疗效果评价等。



1. 一种用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:包括磁微粒PIVKA-II校准品、包被PIVKA-II抗体的磁微粒混悬液、磁微粒PIVKA-II酶结合物和样品稀释液。
2. 根据权利要求1所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述包被抗体与酶标抗体均为单克隆抗体或多克隆抗体,分别针对PIVKA-II的不同位点。
3. 根据权利要求1所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述PIVKA-II校准品为由PIVKA-II抗原配制的浓度在0~75000 mAU/mL之间的6个不同浓度点的校准品溶液,均为液态。
4. 根据权利要求1所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述磁微粒混悬液中的PIVKA-II抗体包被浓度是0.2~1.2 ug/T。
5. 根据权利要求1所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述酶结合物是由辣根过氧化物酶标记的PIVKA-II抗体与酶结合物稀释液按照1:1000~1:2000的比例稀释制成。
6. 根据权利要求5所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述酶结合物稀释液为pH 7~8的Tris-NaCl缓冲液;所述Tris-NaCl缓冲液中包含防腐剂和蛋白质类稳定剂,其中防腐剂为Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上,蛋白质类稳定剂为酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上。
7. 根据权利要求1所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液为pH 7~8的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液中包含防腐剂、蛋白质类稳定剂和表面活性剂;其中防腐剂为Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上,蛋白质类稳定剂为酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上,表面活性剂为Triton X-100、Tween20、Tween60或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上。
8. 根据权利要求7所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液中含有0.01%~0.05%的阻断剂。

用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,尤其是涉及一种用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒。

背景技术

[0002] 凝血酶原是由肝脏合成的、含有579个氨基酸残基的单链糖蛋白,分子量72kDa。自N-末端起,有一个G1a区,两个环区,和一个蛋白酶区。凝血酶原前体肽链的N-末端含有10个谷氨酸残基,其在维生素K依赖的 γ -谷氨酰羧化酶的催化下,转化为10个 γ -羧基谷氨酸残基,形成凝血酶原。当维生素K缺乏、维生素K拮抗剂存在、变异膜受体、凝血酶原前体增加、 γ -谷氨酰羧化酶缺陷、肝细胞无法摄取低密度脂蛋白、上皮间叶细胞转化过程中细胞骨架改变等均可能导致凝血酶原前体G1a区中的一个或多个谷氨酸残基不能被羧化为 γ -羧基谷氨酸残基,从而形成异常凝血酶原(简称PIVKA-II或者DCP)。

[0003] PIVKA-II是由Liebeman在1984年首次将其描述为肿瘤标志物。目前,《亚太肝病学会》、《日本肝病学会》均已将PIVKA-II写入指南中,作为肝癌检测的一个重要指标,推荐用于高危人群的筛查、肝癌的辅助诊断、监测治疗效果、作为预后和复发的预测工具。我国最新《中国肝癌规范化诊治指南》和《原发性肝癌诊疗规范》(2017年版)也将PIVKA-II作为一种辅助肝癌诊断的肿瘤标志物。

[0004] PIVKA-II存在于肝脏组织中,由于它和正常凝血酶原含有不同数量的 γ -羧基谷氨酸残基,而存在具有不同数量 γ -羧基谷氨酸残基形式的PIVKA-II。凝血酶原肽链的N-末端含有的10个谷氨酸残基分别在G1a 6、G1a 7、G1a 14、G1a 16、G1a 19、G1a 20、G1a 25、G1a 26、G1a 29、G1a 32位点。据报道,在良性肝病如肝硬化、酒精性肝病或慢性肝炎中含有具有多于5个 γ -羧基谷氨酸残基的PIVKA-II,而在HCC中,则含有少于4个 γ -羧基谷氨酸残基的PIVKA-II,分别在G1a 16、G1a 25、G1a 26、G1a 29位点。

[0005] 目前原发性肝癌的早期诊断指标仍以血清甲胎蛋白(AFP)的测定为主,但是却有约40%的HCC患者血清AFP水平处于正常范围,而在慢性肝炎或肝硬化患者中却有可能出现假性升高的现象。与此同时,PIVKA-II的血清半衰期(40~72小时)比 AFP 的半衰期(5~7天)短很多。因此,PIVKA-II在良、恶性肝病的鉴别诊断以及疾病治疗的监测上较AFP更有优势。

[0006] 专利CN 106468711A公开了一种DCP快速分离检测试剂盒,该试剂盒的加测范围是5~20000ng/ml,线性范围偏窄。富士公司的试剂盒校准品状态为冻干品,不方便使用,且有效期较短(9个月)。同时,作为进口试剂盒,其价格较为昂贵,成本较高。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种灵敏度高、方便使用的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,可用于肝癌的辅助诊断。

[0008] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒,包括磁微粒PIVKA-II校准品、包

被PIVKA-II抗体的磁微粒混悬液、磁微粒PIVKA-II酶结合物和样品稀释液。

[0009] 所述包被抗体与酶标抗体均为单克隆抗体或多克隆抗体,分别针对PIVKA-II的不同位点。

[0010] 所述PIVKA-II校准品为由PIVKA-II抗原配制的浓度在0~75000 mAU/mL之间的6个不同浓度点的校准品溶液。

[0011] 所述磁微粒混悬液中的PIVKA-II抗体的包被浓度是0.2~1.2 μ g/T。

[0012] 所述酶结合物是由辣根过氧化物酶标记的PIVKA-II抗体与酶结合物稀释液按照0.1%~0.5%的比例稀释制成。

[0013] 所述酶结合物稀释液为pH 7~8的Tris-NaCl缓冲液;所述Tris-NaCl缓冲液中包含防腐剂和蛋白质类稳定剂,其中防腐剂为Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上,蛋白质类稳定剂为酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上。

[0014] 所述样品稀释液为pH 7~8的PBS缓冲液,所述PBS缓冲液中包含防腐剂、蛋白质类稳定剂和表面活性剂;其中防腐剂为Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上,蛋白质类稳定剂为酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上,表面活性剂为Triton X-100、Tween20、Tween60或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上。

[0015] 所述样品稀释液中含有0.01%~0.05%的阻断剂。

[0016] 本发明试剂盒的制备方法为:

1、制备校准品:将PIVKA-II抗原按照一定的浓度溶解在校准品稀释液中,配制成浓度分别为0 mAU/mL、30 mAU/mL、80 mAU/mL、1000 mAU/mL、10000 mAU/mL、75000 mAU/mL的校准品溶液,分别记为S0、S1、S2、S3、S4、S5。相同方法配制浓度为100 mAU/mL、10000 mAU/mL,记为质控品Q1、Q2。

[0017] 2、制备磁微粒混悬液:选择合适的磁微粒原液,将PIVKA-II抗体按照0.2~1.2 μ g/T的浓度用羧基两步法包被到磁微粒表面,制成PIVKA-II磁微粒混悬液。

[0018] 3、制备样品稀释液:选择合适的缓冲体系,在缓冲体系内加入蛋白保护剂、防腐剂、表面活性剂;另外在样品稀释液中加入0.01%~0.05%的阻断剂,用于消除反应过程中嗜异性抗体干扰引起的假阳性或假阴性。

[0019] 4、制备酶结合物稀释液:选择合适的缓冲体系,在缓冲体系中加入蛋白保护剂、防腐剂,按照合适的比例配制成酶结合物稀释液,将酶标抗体用酶结合物稀释液按照1:1000~1:2000的比例进行稀释。

[0020] 经测试,本发明制备的试剂盒线性范围在5~75000 mAU/mL。由于抗体是包被在磁微粒上的,减少了包被抗体用量的同时提高了包被效果,增大了相对反应面积,提高了反应效率。

[0021] 本发明采用夹心法原理进行检测。用PIVKA-II抗体包被磁微粒,辣根过氧化物酶标记PIVKA-II抗体制备酶结合物。通过免疫反应形成抗体—抗原—抗体-酶复合物,该复合物催化发光底物发出光子,发光强度与PIVKA-II的含量成正比。

[0022] 本发明试剂盒操作简单方便,灵敏度高,特异性强,检测范围宽。本发明试剂盒的校准品是液态的,避免了因校准品复溶引入的检测误差,检测结果更准确,更便于临床应用。本发明的试剂盒临幊上可辅助用于肝细胞癌的早期诊断、疾病进程监测及治疗效果评价等。

附图说明

- [0023] 图1本发明试剂盒与雅培试剂盒的临床相关性考核。
[0024] 图2本发明试剂盒线性范围考核。

具体实施方式

[0025] 下面通过具体实施例对本发明进行更加详细等说明,以方便本领域技术人员等理解。本申请中所用的全自动磁微粒化学发光仪(AutoLumo A2000系列)由郑州安图生物工程股份有限公司提供。其他的试剂和仪器均为市售产品,采用的方法均为本领域常规的方法。

[0026] 实施例1 制备用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒

1、配制封保液

封保液是由0.01 M的pH 7~8的PBS缓冲液配制而成,其中含有1~3‰(w/v)的防腐剂(可采用Proclin300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上的混合物),1~3‰(w/v)蛋白质类稳定剂(可采用酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上混合物)及0.1~1‰(w/v)的甘油。

[0027] 2、配制酶结合物稀释液

酶结合物是由0.05 M的pH 7~8的Tris-NaCl缓冲液配制而成,其中含有1~3‰(w/v)的防腐剂(可采用Proclin 300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上的混合物); 1~3‰(w/v)蛋白质类稳定剂(可采用酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上混合物)及0.1~0.5‰的胭脂红色素。

[0028] 3、配制样品稀释液

样品稀释液是由0.01 M的pH 7~8的PBS缓冲液配制而成,其中含有1~3‰(w/v)的防腐剂(可采用Proclin 300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上的混合物),1~3‰(w/v)蛋白质类稳定剂(可采用酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上混合物),0.1~0.3‰(w/v)的表面活性剂(可采用Triton X-100、Tween20、Tween60或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上),0.1~0.5‰的果绿色素,2~8℃保存待用。

[0029] 4、配制校准品稀释液

校准品稀释液是由0.05 M的pH 7~8的Tris-NaCl缓冲液配制,其中含有1~3‰(w/v)的防腐剂(可采用Proclin 300、MIT、Bro、IPBC或NaN₃中的一种或两种以上的混合物),1~3‰(w/v)蛋白质类稳定剂(可采用酪蛋白、鱼明胶或牛血清白蛋白中的一种或两种以上混合物)和0.1~0.5‰的日落黄或柠檬黄色素。

[0030] 5、制备磁微粒混悬液

a、取30 μL混匀后的磁微粒原液用300 μL的PBS缓冲液洗涤5次。

[0031] b、用200ul 磁珠偶联剂对磁微粒活化2小时。

[0032] c、用 300ul MES (PH=6) 缓冲液将活化后的磁微粒洗涤2次。

[0033] d、按照0.2~1.2 μg/T的量加入抗体,包被2小时。

[0034] e、用200ul 5 mol/L的乙醇胺终止反应2小时。

[0035] f、用封闭液封闭2次。

[0036] g、加入3 mL封闭液定容,混匀分装后于2~8℃保存待用。

[0037] 6、配制酶结合物溶液

将HRP标记的PIVKA-II酶结合物按照体积比1:1000~1:2000的比例稀释到酶结合物缓冲液中,混匀分装后于2~8℃保存待用。

[0038] 7、配制校准品和质控品

用校准品稀释液将PIVKA-II抗原纯品稀释为浓度0 mAU/mL、30 mAU/mL、80 mAU/mL、1000 mAU/mL、10000 mAU/mL、75000 mAU/mL,分别记为校准品S0、S1、S2、S3、S4、S5。相同方法配制浓度为100 mAU/mL、10000 mAU/mL,记为质控品Q1、Q2。

[0039] 实施例2 本发明试剂盒的灵敏度考核

按照 CLSI标准《EP17-A:临床实验室检测限的评价》的性能确认(建立)的方法,进行LoB、LoD、LoQ的建立。不能严格溯源至SI单位的项目不建立LoQ,而是建立试剂盒的功能灵敏度(FS)。

[0040] 空白限(LoB):准备5份接近0值的临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据,按照EP17-A的计算方法计算LoB。

[0041] 检测限(LoD):准备5份浓度范围为1~4倍LoB的系列临床样本,每个样本重复3次,总共做4天,得到60个数据,按照EP17-A的计算方法计算LoD。

[0042] 功能灵敏度(FS):采用LoD实验中的数据,5个浓度样本每天测3次,总共测4天,每个样本得到12个结果,计算每个样本的均值、SD和CV%,取CV=20%的浓度即为功能灵敏度。灵敏度检测结果见下表1。

[0043] 表1 PIVKA-II试剂盒的灵敏度

灵敏度	批次		
	第1批/(mAU/mL)	第2批/(mAU/mL)	第3批/(mAU/mL)
LoB ^a	0.57 ^a	0.62 ^a	0.55 ^a
LoD ^a	1.25 ^a	1.31 ^a	1.28 ^a
FS ^a	3.27 ^a	2.35 ^a	2.32 ^a

取3批试剂盒中的最大浓度为本试剂盒的灵敏度。从表1可以看出,本试剂盒的LoB、LoD、FS分别是0.62mAU/mL、1.31mAU/mL、3.27mAU/mL。可以看出本试剂盒的灵敏度能够满足临床检测需求。

[0044] 实施例3 本发明试剂盒的精密度考核

取三批试剂进行精密度实验,分别用高/低值质控品进行考核,各测20次计算测定浓度的变异,测定结果如下表2所示,结果表明变异系数均小于6%。

[0045] 表2 试剂盒精密度

序号	第1批		第2批		第3批	
	(高值)	(低值)	(高值)	(低值)	(高值)	(低值)
1	11622	93	12011	101	11211	96
2	12097	105	11691	96	11517	104
3	12102	103	12342	99	11234	106
4	11823	110	12003	108	11793	99
5	11504	94	11746	106	11756	98
6	12005	97	11405	105	11545	103
7	12197	100	10876	112	11654	92
8	11802	107	12007	105	12037	102
9	12008	98	12008	96	12012	97
10	12122	102	12459	97	11239	96
11	12097	109	11153	102	11347	103
12	11302	96	11903	111	11677	108
13	11623	102	12012	104	11425	96
14	11104	93	11973	96	11629	108
15	11675	96	12214	104	11563	105
16	12197	99	11655	107	11972	97
17	12124	93	12176	96	10939	107
18	11277	107	12364	103	11174	104
19	11818	98	11818	105	11996	95
20	11319	99	11999	99	12174	98
平均值	11790.9	100.05	11890.75	102.6	11594.7	100.7
SD	346.38	5.40	394.41	5.00	339.97	4.85
变异系数 CV%	2.94%	5.40%	3.32%	4.87%	2.93%	4.81%

实施例4 本发明试剂盒的临床性能考核

用本发明试剂盒和雅培试剂盒平行检测287例PIVKA-II梯度临床样本,雅培结果大于30000mAU/mL的样本稀释10倍后进行检测。两种试剂盒的临床相关性图如图1所示,临床符合率如表3所示:

表3 临床符合率

		雅培 PIVKA-II 试剂盒		合计
		+	-	
本发明试剂盒	+	186	4	190
	-	4	93	97
合计		190	97	287
阳性符合率	97.85%			
阴性符合率	95.88%			
总符合率	97.21%			

从表3中可以看出:与雅培的阳性符合率97.85%,阴性符合率95.88%,总符合率97.21%;

与雅培试剂盒的相关性见图1所示: $y=0.9832x-49.379$, $R^2=0.9915$, 说明本试剂盒与雅培试剂盒符合率较高。

[0046] 实施例5 本发明试剂盒的线性范围考核

取1例高值样本H($>75000\text{mAU/mL}$), 1例低值样本L($<3\text{ mAU/mL}$), 分别按照如下比例进行混合成7个浓度样本(6H、5H+1L、4H+2L、3H+3L、2H+4L、1H+5L、6L), 每个浓度样本检测3次, 计算均值。将理论值与实测均值使用EXCEL软件进行一次方程 $y=ax+b$ 回归分析, 统计方程因子斜率a和相关性r, 要求 $a=1\pm 0.1$, $r>0.99$ 。结果如图2所示, 可以看出本发明试剂盒线性范围可达5-75000mAU/mL。

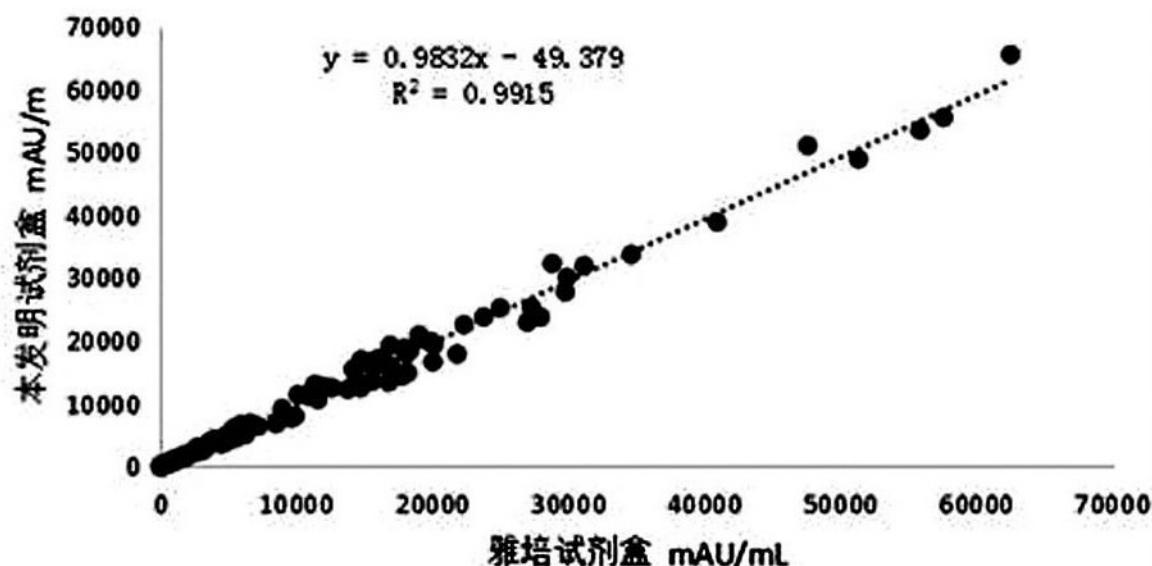


图1

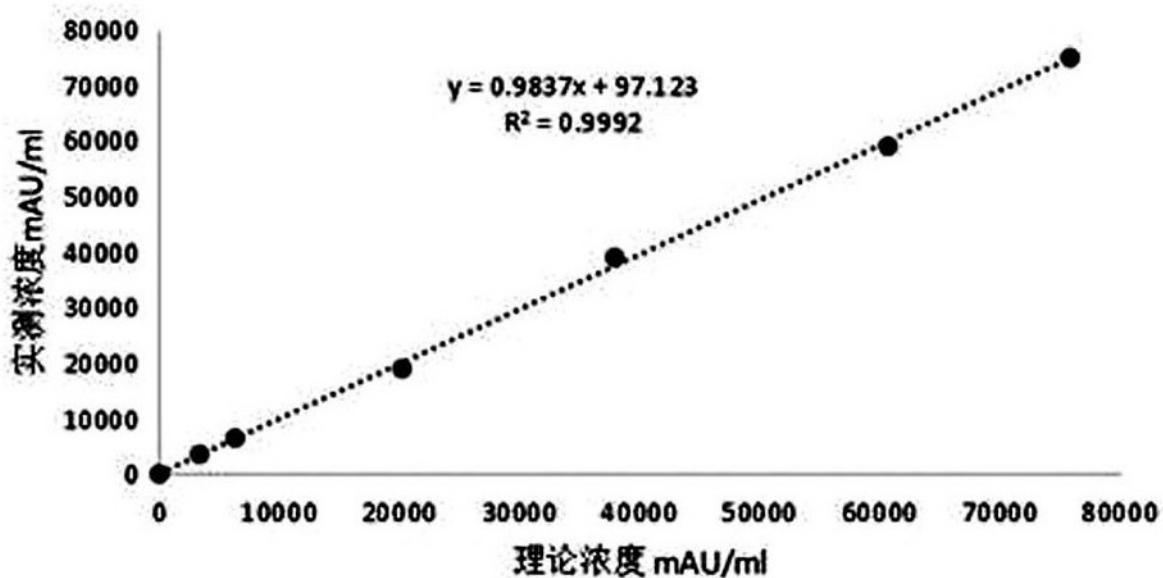


图2

专利名称(译)	用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒		
公开(公告)号	CN109212193A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811158345.4	申请日	2018-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	渠文涛 史小芹 马雷 周金龙 刘雅奇 郑业煥 渠海 付光宇 吴学炜		
发明人	渠文涛 史小芹 马雷 周金龙 刘雅奇 郑业煥 渠海 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76 G01N33/573 G01N33/68		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/573 G01N33/68		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种用于临床检测异常凝血酶原的试剂盒，包括磁微粒PIVKA-II校准品、包被PIVKA-II抗体的磁微粒混悬液、磁微粒PIVKA-II酶结合物和样品稀释液。本发明采用夹心法原理进行检测。用PIVKA-II抗体包被磁微粒，辣根过氧化物酶标记PIVKA-II抗体制备酶结合物。通过免疫反应形成抗体—抗原—抗体-酶复合物，该复合物催化发光底物发出光子，发光强度与PIVKA-II的含量成正比。本发明试剂盒操作简单方便，灵敏度高，特异性强，检测范围宽。本发明试剂盒的校准品是液态的，避免了因校准品复溶引入的检测误差，检测结果更准确，更便于临床应用。本发明的试剂盒临幊上可辅助用于肝细胞癌的早期诊断、疾病进程监测及治疗效果评价等。

