



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109425740 A

(43)申请公布日 2019.03.05

(21)申请号 201710768857.1

(22)申请日 2017.08.31

(71)申请人 江苏麦得科生物科技有限公司

地址 223600 江苏省宿迁市沭阳县学院路
高创园

(72)发明人 张波 郝日沫 张学记 王鹏

雷达 刘向阳

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

异常凝血酶原(PIVKA-II)磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明属于免疫分析医学检测技术领域,具体地提供了一种血清或血浆中的异常凝血酶原(PIVKA-II)的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法,试剂盒主要包括:(1)PIVKA-II标准品;(2)抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体包被的磁微粒;(3)碱性磷酸酶标记的PIVKA-II样品与异硫氰酸荧光素标记的PIVKA-II;(4)碱性磷酸酶标记的化学发光底物;(5)分装上述标准品、磁微粒溶液、混合液、样品稀释液、洗液、化学发光底物和反应管。该方法酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物,提供了一种接近均相的反应体系,兼具简单、灵敏度、特异性好、线性范围宽、重复性好等优势。

1. 异常凝血酶原磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法,其特征在于是酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术等结合,并生成了检测试剂盒;

其特征在于所述试剂盒包括:(1)PIVKA-II标准品;(2)抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体包被的磁微粒;(3)碱性磷酸酶标记的PIVKA-II样品、异硫氰酸荧光素标记的PIVKA-II;(4)碱性磷酸酶标记的化学发光底物;(5)分装上述标准品、磁微粒溶液、混合液、样品稀释液、洗液、化学发光底物和反应管。

2. 根据权利要求1所述,其特征在于:所述的碱性磷酸酶标记的化学发光底物,化学发光底物为APS-5。

3. 根据权利要求1所述,其特征在于:碱性磷酸酶标记的PIVKA-II样品的浓度为1-3mg/mL、异硫氰酸荧光素标记的PIVKA-II的样品浓度为2-8 mg/mL。

4. 根据权利要求1所述,其特征在于:所述的反应管的材料是聚乙烯、聚丙烯、透明聚苯乙烯或玻璃。

5. 根据权利要求1所述,其特征在于,在所述制备抗FITC单克隆抗体包被的磁微粒步骤(2)中:所述的抗体包被磁微粒直径在0.01-2 μ m之间,四氧化三铁为内核,具有超顺磁性,表面为包裹带有氨基(NH₂)或者羧基(COOH)活性基团的聚合物,其使用浓度为:1-8 mg/mL;

以封闭液封闭包被的磁微粒,所述的封闭液为含有0.2%~1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、pH值为7.2的0.02mol/L磷酸缓冲液。

6. 根据权利要求1所述,其特征在于,检测分析步骤如下:

(1)加样与免疫反应:在平底试管中加入15-50 μ L的标准品、质控品、待测样本,加入45 μ L酶标抗体,加入包被的45 μ L磁珠抗体,加入300 μ L稳定剂,震荡30s,混匀后,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;

(2)洗涤:将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入300 μ L清洗液,震荡30秒,将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;重复5次;

(3)加入发光底物溶液:每管中加入200 μ L发光底物;

(4)读取发光值:用化学发光测定仪测定每管的发光值。

异常凝血酶原(PIVKA-II)磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测医学分析技术领域,具体涉及到临床上诊断异常凝血酶原的含量,提供了一种人异常凝血酶原的磁分离化学发光免疫检测方法,适用于人血清、血浆中的异常凝血酶原的定量检测。

背景技术

[0002] 肿瘤标志物(Tumor marker, TM),是反映肿瘤发生、发展,监测肿瘤对治疗反应的一类物质,可通过免疫学、化学和分子生物学等方法进行定量检测。肿瘤标志物的血清水平一般与肿瘤的发生、发展、消退和复发具有良好的相关性,因此可利用血清水平测定结果,从而获得关于肿瘤辅助诊断、疗效观察、预后评判及复发预报等方面的信息。

[0003] 当今,肝细胞肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是全球第六大最常见的危害人体健康的消化道恶性肿瘤,占原发性肝癌的90%,临床上约有2/3的肝癌患者初诊时已属中晚期,已失去了手术治疗的最佳机会。因此,高灵敏的检测是及时有效诊断疾病早期预警的关键。目前,临床上最常用甲胎蛋白(Alphafetoprotein, AFP)筛查诊断HCC,然而对于AFP低浓度或者阴性的患者的筛选,其结果并不理想。

[0004] 最新研究表明异常凝血酶原(Protein induced by vitamin K absence-II, PIVKA-II)为一种新型的肝细胞肿瘤标志物,具有较高的诊断特异性,其主要是指维生素K缺乏拮抗剂II诱导的蛋白所引发的肝细胞难以有效合成凝血因子的现象,可作为肝癌诊断的指标,已成为肿瘤基础和临床研究的热点之一。

[0005] 免疫学测定是以抗体-抗原的特异性识别、抗体标记技术和示踪技术为基础的定量技术,在肿瘤标志物的体液检测中具有广泛应用。化学发光免疫分析法结合了免疫反应的高特异性和化学发光反应的高灵敏小,仪器简单,成本低廉,可达到 10^{-18} mol检测水平,且在检测范围较广,在临床检测分析中受到了越来越多的关注。

发明内容

[0006] 本发明需要解决的技术问题在于提供一种特异性强、灵敏度高、操作简单、检测快速、准确的检测异常凝血酶原含量的分析测定试剂盒,同时也提供了一种异常凝血酶原检测试剂盒的制备方法,该试剂盒可适于产业化生产,具有广阔的市场应用前景。

[0007] 本发明的试剂盒,其特征在于所述的试剂盒包括:(1)PIVKA-II标准品;(2)抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体包被的磁微粒;(3)碱性磷酸酶标记的PIVKA-II样品、异硫氰酸荧光素标记的PIVKA-II;(4)碱性磷酸酶标记的化学发光底物;(5)分装上述标准品、磁微粒溶液、混合液、样品稀释液、洗液、化学发光底物和反应管。

[0008] 本发明的技术解决方案,检测分析步骤如下:

(1)加样与免疫反应:在平底试管中加入15-50 μ L的标准品、质控品、待测样本,加入45 μ L酶标抗体,加入包被的45 μ L磁珠抗体,加入300 μ L稳定剂,震荡30s,混匀后,37 $^{\circ}$ C温育30分

钟；

(2) 洗涤:将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入300 μ L清洗液,震荡30秒,将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;重复5次;

(3) 加入发光底物溶液:每管中加入200 μ L发光底物;

(4) 读取发光值:用化学发光测定仪测定每管的发光值。

[0009] 本发明的有益效果在于:

本发明将具有高灵敏度的化学发光检测技术与高特异性的免疫反应相结合,操作简单,用时短,无需长时间显色及终止,且灵敏度高,特异性好,能快速、简便、灵敏地适用于人血清、血浆中的异常凝血酶原的定量检测。

[0010] (1) 采用微小的磁微粒作为固相,可增加包被表面积,增加了抗体的有效包被量,不仅节省了抗体,而且有助于建立宽范围的免疫检测方法,尤其适合于高浓度临床样本的测定,避免弯钩效应的发生。

[0011] (2) 在液相的反应中,使用发光增强剂,将水分子从发光底物的发光位点排开,同时还可缩短发光的达峰时间。

[0012] (3) 本发明是在酶免疫分析的基础上应用酶催化发光底物,可以检测发光底物产生的光信号代替酶免分析中的显色底物,因而其灵敏度大大提高,并且操作简便实用性广,即可应用于开放式的半自动化学发光测量仪,也可用于全自动的测量系统,可实现大批量、快检测,使用成本低,更易推广应用。

附图说明

[0013] 图1 为本发明的PIVKA-II 化学发光免疫检测标准曲线,其中,横坐标为PIVKA-II 的浓度,纵坐标为相对发光强度(RLU)。

具体实施方式

[0014] 实施实例1 抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体包被的磁微粒

将粒径0.1-5 μ m的磁微粒用戊二醛进行活化,室温搅拌,混匀2小时后,加磁场,静置20-25min,倒出上清,用pH值为7.4的0.01mol/L磷酸盐缓冲液清洗三次,并用该溶液进行悬浮,浓度为50-100mg/mL;每毫升悬浮液中加入抗FITC单克隆抗体60-100 μ g,在4 $^{\circ}$ C下搅拌过夜后,加磁场,静置10-15min,倒出上清液,用含有0.2%-1.0%牛血清白蛋白、0.5%~1.0%酪蛋白、0.02mol/L的磷酸缓冲液(pH为7.2)于室温封闭3-4小时;最后用pH值为7.4、含吐温-20和叠氮化钠防腐剂的磷酸盐洗涤缓冲液清洗3-5次,并用该溶液配制成5~10mg/mL的工作液。磁微粒溶液在4 $^{\circ}$ C保存,不应冻存,用时轻轻摇匀。

[0015] 实施实例2 洗涤缓冲液

洗涤缓冲液是含有0.2-0.5%吐温-20、0.5mL/L Proclin 300防腐剂的磷酸盐缓冲液,pH值为7.4。使用时用蒸馏水稀释10倍。

[0016] 实施实例3 本试剂盒的使用方法

一、样品前处理

取人的空腹晨血清样品,3000rpm离心5min,取上层血清进行分析。

[0017] 二、检测方法

异常凝血酶原 (PIVKA-II) 磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒。

[0018] 使用本试剂盒进行实验前,需先取出磁微粒溶液、FITC标记 PIVKA-II 抗体、标准品、质控品、化学发光底物等实验试剂在室温条件下放置15~30分钟,平衡至室温;其次,将水浴锅或恒温温箱调制37℃,以方便使用;之后,准备合适的微量加样器及对应的吸头,同时检查化学发光仪是否正常工作。

[0019] 检测分析步骤如下:

(1) 加样与免疫反应:在平底试管中加入15-50μL的标准品、质控品、待测样本,加入45μL酶标抗体,加入包被的45μL磁珠抗体,加入300μL稳定剂,震荡30s,混匀后,37℃温育30分钟。

(2) 洗涤:将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;每管中加入300μL清洗液,震荡30秒,将平底试管在磁架上静置2分钟,然后倒出上清液,将试管及磁架一同倒置在吸水纸上拍干;重复5次;

(3) 加入发光底物溶液:每管中加入200μL发光底物;

(4) 读取发光值:用化学发光测定仪测定每管的发光值。

[0020] 本发明试剂盒性能指标

分析灵敏度:1.53 mAU//mL

精密度:批内变异CV%≤10%,批间变异系数CV%≤15;

线性系数: $r \geq 0.9900$;

线性范围:8.5 mAU/mL-63000 mAU/mL;

特异性:测定高浓度的交叉反应物质,结果如下:

潜在交叉反应物	最大检测浓度
人抗鼠抗体	109.5 ng/mL
胆红素C	19.9 mg/dL
胆红素F	18.8 mg/dL
类风湿因子	950 IU/mL
血红蛋白	513 mg/dL

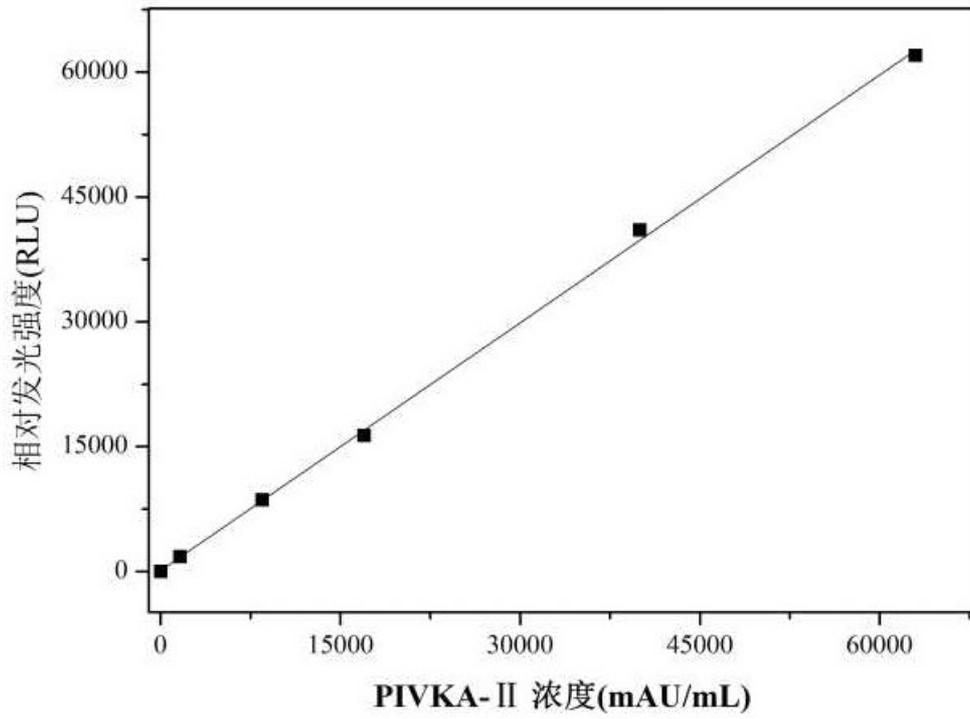


图1

专利名称(译)	异常凝血酶原(PIVKA-II)磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN109425740A	公开(公告)日	2019-03-05
申请号	CN2017110768857.1	申请日	2017-08-31
[标]发明人	张波 郝日沫 张学记 王鹏 雷达 刘向阳		
发明人	张波 郝日沫 张学记 王鹏 雷达 刘向阳		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析医学检测技术领域，具体地提供了一种血清或血浆中的异常凝血酶原(PIVKA-II)的磁微粒化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法，试剂盒主要包括：(1) PIVKA-II标准品；(2) 抗异硫氰酸荧光素(FITC)单克隆抗体包被的磁微粒；(3) 碱性磷酸酶标记的PIVKA-II样品与异硫氰酸荧光素标记的PIVKA-II；(4) 碱性磷酸酶标记的化学发光底物；(5) 分装上述标准品、磁微粒溶液、混合液、样品稀释液、洗液、化学发光底物和反应管。该方法酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物，提供了一种接近均相的反应体系，兼具简单、灵敏度、特异性好、线性范围宽、重复性好等优势。

