



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212192 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811157108.6

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2018.09.30

(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 周金龙 刘雅奇
万鹏 马雷 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7页

(54)发明名称

用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒，包括GP73校准品，包被GP73第一抗体的磁微粒混悬液，样品稀释液，辣根过氧化物酶标记的GP73第二抗体的酶结合物。本发明采用夹心法原理进行检测，用GP73抗体包被磁微粒，辣根过氧化物酶标记GP73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GP73的含量成正比。本发明试剂盒引入的样稀组分对样本进行稀释，在最大可稀释倍数范围内稀释结果可信。本发明试剂盒基于磁微粒化学发光法平台制备而成，配套安图生物的全自动免疫测定仪可实现血清、血浆中GP73的快速、自动化检测，分析灵敏度低，线性范围宽，更便于临床应用。

1. 一种用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:包括GP73校准品,包被GP73第一抗体的磁微粒混悬液,样品稀释液,辣根过氧化物酶标记GP73第二抗体的酶结合物。

2. 根据权利要求1所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,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。

3. 根据权利要求1所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述GP73校准品是由GP73抗原配制的浓度在0~1000 ng/mL之间的6个不同浓度点的校准品溶液。

4. 根据权利要求1所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述磁微粒混悬液中的磁微粒是由GP73抗体按照0.2~0.8 ug/T包被而成。

5. 根据权利要求1所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述GP73酶结合物是由辣根过氧化物酶标记的GP73抗体与酶结合物稀释液按照0.1%~0.5%的比例稀释制成。

6. 根据权利要求5所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述酶结合物稀释液为pH7~8的PBS缓冲液;所述PBS缓冲液中包括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所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液为PH7~8的PBS缓冲液;所述PBS缓冲液中包括防腐剂、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、Tween 20、Tween 60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所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,其特征在于:所述样品稀释液中含有0.01%~0.05%的阻断剂。

用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,尤其是涉及一种基于磁微粒化学发光法制备的用于原发性肝癌早期诊断的GP73(高尔基体蛋白73)检测试剂盒。

背景技术

[0002] 肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)(以下简称肝癌)是世界范围最常见的恶性肿瘤之一。据最新数据统计,全世界每年新发肝癌患者约七十万,居恶性肿瘤的第五位,并且其恶性程度高,预后差,死亡率为世界肿瘤死亡第二位。我国是全球肝癌发病率最高的国家,每年发病患者数占全球约 55 %。肝癌患者早期无明显症状,一旦出现症状就诊,往往已属于中晚期,失去了有效的治疗时机,发病后一般只能生存 6 个月,被誉为“癌中之王”。因此其早期诊断就显得尤为重要。

[0003] AFP是目前HCC筛检中最为常用的一种指标,也被视为HCC血清学诊断的金标准。当前,国际上各临床单位仍建议在肝炎肝硬化等高危人群中每6个月随访一次B超和AFP,以期能及早发现小肝癌,但是AFP用于肝癌早期诊断在肝癌患者中AFP诊断HCC的敏感性和特异性分别为41%~65%和80%~94%,有一定的局限性。

[0004] 高尔基体蛋白73(GP73)是在研究成人巨细胞性肝炎病原学首次发现的存在于高尔基体的一种 II 型跨膜糖蛋白,相对分子质量为 73 KDa。GP73 在人体多种组织中均表达,但表达强度不一,最高可相差20倍。在胃、肠、前列腺中表达较强,在肾、脾、肺、子宫及睾丸中表达较弱,在心脏中表达最弱。在正常肝脏组织,GP73 主要表达于汇管区的胆管上皮细胞,在肝细胞则无表达或表达很少。但在肝脏疾病中,其在肝细胞及血清中的含量上调,在肝炎中上调水平低,在肝癌中上调水平高。

[0005] 近年来大量研究证明, GP73 对于肝癌的早期诊断具有较高的敏感性与特异性,其敏感性为74.6%,特异性为 97.4%,在诊断早期HCC时,与AFP的敏感度(25%)相比,GP73水平的敏感度明显更高(62%)。此外, GP73 在HCC患者术后或治疗后有下降趋势,而在肝癌复发时 GP73 重新升高。术后血清GP73水平依旧维持在较高水平者,5 年复发率明显升高。与 AFP无直接相关性,联检可提高肝癌的检出率。

[0006] 文献报道的GP73检测试剂盒的检测方法,主要有酶联免疫法、胶体金法、板式化学发光法,均是手工操作,不仅操作繁琐,效率低,而且不同人操作差别,易引入较大的实验误差。目前有注册文号的GP73试剂盒只有热景公司1家,该试剂盒为酶联免疫法,检测范围50-500ng/mL,分析灵敏度25ng/mL,分析灵敏度偏低,有待提升。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,该试剂盒基于磁微粒化学发光法平台制备而成,配套安图生物的全自动免疫测定仪(AutoLumo A2000系列)可实现GP73的快速、自动化检测。此外,本试剂盒的分析灵敏度低(<1ng/mL),线性范围宽(1-1000ng/mL),更便于临床应用。

[0008] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒,包括GP73校准品,包被GP73第一抗体的磁微粒混悬液,样品稀释液,辣根过氧化物酶标记的GP73第二抗体的酶结合物。

[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GP73的不同位点。

[0010] 所述GP73校准品是由GP73抗原配制而成的浓度在0~1000 ng/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磁微粒是由GP73抗体按照0.2~0.8 ug/T包被而成。

[0012] 所述GP73酶结合物是由辣根过氧化物酶标记的GP73抗体与酶结合物稀释液按照0.1%~0.5%的比例稀释制成。所述酶结合物稀释液为pH7~8的PBS缓冲液;所述PBS缓冲液中包括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。

[0013] 所述样品稀释液为PH7~8的PBS缓冲液;所述PBS缓冲液中包括防腐剂、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、Tween 20、Tween 60或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上。

[0014] 所述样品稀释液中含有0.01%~0.05%的阻断剂。

[0015] 本发明试剂盒的制备方法为:

1、制备校准品:将GP73抗原分别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 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL的校准品溶液,分别记为S0、S1、S2、S3、S4、S5。

[0016] 2、制备磁微粒混悬液:选择合适的磁微粒原液,分别将GP73抗体按照0.3ug/T的浓度用羧基两步法包被到磁微粒表面,制成GP73混悬液备用。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 经测试,本发明试剂盒的线性范围在1~1000ng/mL,最大可稀释倍数为5倍,可报告范围为1~5000ng/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。

[0020] 本发明采用夹心法原理进行检测。用GP73抗体包被磁微粒,辣根过氧化物酶标记GP73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GP73的含量成正比。本发明试剂盒引入的样稀组分对样本进行稀释,在最大可稀释倍数范围内稀释结果可信。

具体实施方式

[0021] 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。如无特殊说明,本发明采用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。

[0022] 实施例1 制备用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒

1、配制封保液

封保液是由0.01 M的PH7~8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),1~5‰(w/v)的蔗糖和5~15%(w/v)的甘油。

[0023] 2、配制酶结合物稀释液

酶结合物是由0.05M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)及0.1~0.5‰的惰性胭脂红色素。

[0024] 3、配制样品稀释液

样品稀释液是由0.01M的pH 7~8 的PBS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),1~3‰(w/v)表面活性剂(可采用Triton X-100、Tween 20、Tween 60或辛基酚聚氧乙烯醚中的一种或两种以上混合物)及0.1~0.5‰的惰性果绿色素。

[0025] 4、制备校准品稀释液

校准品稀释液是由0.05M的PH7~8的PBS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),含有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),0.1~0.5‰的惰性日落黄或柠檬黄色素。

[0026] 5、制备磁微粒混悬液

- a、取30ul混匀后的磁微粒原液用300ul的PBS缓冲液洗涤5次;
- b、用20mg/mL的EDC和20mg/mL的NHS对磁微粒活化1小时;
- c、用PH 4~5 MES缓冲液将活化后的磁微粒洗涤2次;
- d、按照0.2~0.8 ug/测试的量加入抗体,包被2小时;
- e、用1mol/L的乙醇胺终止反应30min;
- f、用封闭液封闭4次;
- g、加入3mL封闭液保存。

[0027] 6、配制酶结合物溶液

将GP73酶标抗体按照体积比 1:1000~1:2000的比例稀释到酶结合物缓冲液中,混匀后分装备用

7、配制校准品和质控品

用校准品稀释液将GP73纯品稀释为浓度为0 pg/mL、20 pg/mL、40 pg/mL、100 pg/mL、

500 pg/mL、1000 pg/mL, 分别记为校准品S 0、S 1、S 2、S 3、S 4、S 5; 稀释为80 pg/mL、400 pg/mL, 记为质控品Q 1、Q 2。

[0028] 实施例2 本发明试剂盒等性能评价

1、精密性考核

取两批试剂进行精密性实验, 用临床高/中/低值样本各一例, 各测20次计算测定浓度的变异, 测定结果如表1所示。

[0029] 表1 精密性数据

样本浓度	第1批			第2批		
	(高值)	(中值)	(低值)	(高值)	(中值)	(低值)
1.	808.	304.	84.	834.	314.	88.
2.	885.	315.	82.	852.	321.	87.
3.	820.	298.	83.	766.	321.	86.
4.	816.	317.	88.	840.	312.	83.
5.	808.	302.	84.	864.	319.	88.
6.	821.	309.	82.	854.	304.	85.
7.	831.	298.	86.	827.	320.	79.
8.	828.	306.	81.	811.	301.	88.
9.	832.	302.	88.	805.	336.	85.
10.	820.	296.	90.	828.	299.	87.
11.	752.	286.	91.	877.	318.	85.
12.	769.	300.	83.	793.	308.	88.
13.	805.	309.	83.	844.	339.	90.
14.	744.	327.	88.	848.	315.	92.
15.	811.	327.	87.	882.	308.	83.
16.	814.	286.	87.	799.	306.	88.
17.	770.	299.	87.	853.	321.	82.
18.	864.	292.	80.	793.	314.	88.
19.	806.	302.	82.	872.	290.	86.
20.	776.	294.	82.	824.	314.	89.
平均值	810.	303.	85.	835.	314.	86.
SD.	34.37.	11.64.	3.24.	32.34.	11.77.	3.37.
变异系数 CV%.	4.25%.	3.84%.	3.81%.	3.87%.	3.74%.	3.90%.

从表1数据中可以看出, 其变异系数均小于5%, 证明本发明试剂盒的精密性较好。

2、准确度考核

将浓度约为800 ng/mL(允许偏差±20%)的GP73样本(A)加入到正常血清样品B中, 所加入的样品A与样品B之间的体积比例为1:9, 根据公式(1)计算回收率, 应满足85%-115%的要求。结果如表2所示;

$$R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_S} \times 100\% \quad \dots \dots \dots (1)$$

式中：R—回收率；
V—样品A液的体积；
V0—样品B液的体积；
C—样品B液加入A液后的检测浓度；
C0—样品B液的检测浓度；
Cs—样品A液的检测浓度。

[0031] 表2 准确度--回收率

			第1批 ^{a)}					第2批 ^{b)}				
			1.9混 合后 ^{c)}	均值 ^{d)}	回收 率 ^{e)}	高值 ^{f)}	均值 ^{g)}	1.9混 合后 ^{c)}	均值 ^{d)}	回收 率 ^{e)}	高值 ^{f)}	均值 ^{g)}
样本 1 ^{a)}	HS1 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	102.1 ^{a)}	100.37 ^{a)}	1.02 ^{a)}	918.6 ^{a)}	946.00 ^{a)}	101.4 ^{a)}	103.30 ^{a)}	1.02 ^{a)}	978.9 ^{a)}	982.53 ^{a)}
	HS1 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	97.2 ^{a)}			963.7 ^{a)}		102.3 ^{a)}			973.4 ^{a)}	
	HS1 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	101.9 ^{a)}			955.7 ^{a)}		106.1 ^{a)}			995.3 ^{a)}	
样本 2 ^{a)}	HS2 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	84.8 ^{a)}	84.15 ^{a)}	1.04 ^{a)}	750.4 ^{a)}	771.63 ^{a)}	88.8 ^{a)}	85.79 ^{a)}	1.06 ^{a)}	828.4 ^{a)}	783.29 ^{a)}
	HS2 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	82.9 ^{a)}			785.9 ^{a)}		86.8 ^{a)}			790.5 ^{a)}	
	HS2 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	84.7 ^{a)}			778.5 ^{a)}		81.7 ^{a)}			730.9 ^{a)}	
样本 3 ^{a)}	HS3 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	93.6 ^{a)}	93.04 ^{a)}	0.99 ^{a)}	917.4 ^{a)}	902.55 ^{a)}	92.7 ^{a)}	93.49 ^{a)}	0.99 ^{a)}	936.1 ^{a)}	916.80 ^{a)}
	HS3 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	90.9 ^{a)}			908.2 ^{a)}		92.0 ^{a)}			930.4 ^{a)}	
	HS3 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	94.6 ^{a)}			882.1 ^{a)}		95.8 ^{a)}			884.0 ^{a)}	
样本 4 ^{a)}	HS4 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	95.5 ^{a)}	97.10 ^{a)}	1.01 ^{a)}	921.3 ^{a)}	924.65 ^{a)}	102.3 ^{a)}	100.13 ^{a)}	1.03 ^{a)}	909.4 ^{a)}	939.90 ^{a)}
	HS4 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	98.0 ^{a)}			911.5 ^{a)}		102.6 ^{a)}			981.4 ^{a)}	
	HS4 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	97.9 ^{a)}			941.1 ^{a)}		95.5 ^{a)}			928.9 ^{a)}	
样本 5 ^{a)}	HS5 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	106.1 ^{a)}	98.96 ^{a)}	0.95 ^{a)}	998.8 ^{a)}	994.21 ^{a)}	103.7 ^{a)}	102.88 ^{a)}	1.03 ^{a)}	998.8 ^{a)}	971.99 ^{a)}
	HS5 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	92.4 ^{a)}			984.8 ^{a)}		102.7 ^{a)}			947.8 ^{a)}	
	HS5 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	98.4 ^{a)}			995.5 ^{a)}		102.3 ^{a)}			958.6 ^{a)}	
样本 6 ^{a)}	HS6 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	94.2 ^{a)}	93.57 ^{a)}	1 ^{a)}	927.8 ^{a)}	897.80 ^{a)}	95.9 ^{a)}	95.09 ^{a)}	1.04 ^{a)}	839.7 ^{a)}	884.90 ^{a)}
	HS6 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	91.1 ^{a)}			863.5 ^{a)}		95.1 ^{a)}			907.7 ^{a)}	
	HS6 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	95.4 ^{a)}			902.1 ^{a)}		94.3 ^{a)}			907.3 ^{a)}	
样本 7 ^{a)}	HS7 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	88.4 ^{a)}	88.15 ^{a)}	0.99 ^{a)}	838.9 ^{a)}	853.88 ^{a)}	91.9 ^{a)}	91.09 ^{a)}	1.04 ^{a)}	834.4 ^{a)}	843.70 ^{a)}
	HS7 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	87.3 ^{a)}			839.7 ^{a)}		90.8 ^{a)}			844.8 ^{a)}	
	HS7 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	88.7 ^{a)}			883.0 ^{a)}		90.6 ^{a)}			851.9 ^{a)}	
样本 8 ^{a)}	HS8 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	92.4 ^{a)}	93.70 ^{a)}	0.99 ^{a)}	917.2 ^{a)}	909.23 ^{a)}	91.6 ^{a)}	93.05 ^{a)}	0.99 ^{a)}	958.4 ^{a)}	912.68 ^{a)}
	HS8 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	94.8 ^{a)}			911.6 ^{a)}		94.4 ^{a)}			872.3 ^{a)}	
	HS8 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	93.9 ^{a)}			898.9 ^{a)}		93.1 ^{a)}			907.3 ^{a)}	
样本 9 ^{a)}	HS9 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	96.2 ^{a)}	95.47 ^{a)}	0.99 ^{a)}	900.4 ^{a)}	925.92 ^{a)}	97.6 ^{a)}	96.40 ^{a)}	0.98 ^{a)}	930.0 ^{a)}	951.41 ^{a)}
	HS9 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	95.6 ^{a)}			931.2 ^{a)}		97.3 ^{a)}			979.2 ^{a)}	
	HS9 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	94.6 ^{a)}			946.2 ^{a)}		94.3 ^{a)}			945.0 ^{a)}	
样本 10 ^{a)}	HS1 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	93.5 ^{a)}	92.94 ^{a)}	0.98 ^{a)}	923.6 ^{a)}	902.77 ^{a)}	97.6 ^{a)}	96.13 ^{a)}	1.04 ^{a)}	887.0 ^{a)}	895.79 ^{a)}
	HS1 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	91.4 ^{a)}				949.9 ^{a)}				900.1 ^{a)}	
	HS1 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	94.0 ^{a)}					93.6 ^{a)}			900.3 ^{a)}	
低值 样本 ^{a)}	复孔 1 ^{a)}	5.6 ^{a)}	4.82 ^{a)}	0.98 ^{a)}	复孔 2 ^{a)}	5.3 ^{a)}	5.02 ^{a)}	5.5 ^{a)}	5.02 ^{a)}	复孔 3 ^{a)}	5.1 ^{a)}	5.02 ^{a)}
	复孔 4 ^{a)}	5.0 ^{a)}			复孔 5 ^{a)}	4.0 ^{a)}		4.5 ^{a)}		复孔 6 ^{a)}	4.1 ^{a)}	
	复孔 1 ^{a)}	5.6 ^{a)}			复孔 2 ^{a)}	5.3 ^{a)}		5.5 ^{a)}		复孔 3 ^{a)}	5.1 ^{a)}	
	复孔 4 ^{a)}	5.0 ^{a)}			复孔 5 ^{a)}	4.0 ^{a)}		4.5 ^{a)}		复孔 6 ^{a)}	4.1 ^{a)}	
	复孔 1 ^{a)}	5.6 ^{a)}			复孔 2 ^{a)}	5.3 ^{a)}		5.5 ^{a)}		复孔 3 ^{a)}	5.1 ^{a)}	
	复孔 4 ^{a)}	5.0 ^{a)}			复孔 5 ^{a)}	4.0 ^{a)}		4.5 ^{a)}		复孔 6 ^{a)}	4.1 ^{a)}	

由表2数据可以看出，其回收率均在85%~115%之间，满足要求。

[0032] 3、灵敏度检测

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;LoD,准备5份浓度范围为1-5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;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%,最接近20%的浓度为功能灵敏度;从下表3可以看出第一批能够准确检测出的浓度是0.436ng/mL,第二批能够准确检出的浓度是0.500ng/mL。所以,设定本项目的FS为1ng/mL。

[0033] 表3 灵敏度数据

灵敏度 ^o	批次 ^o	
	第1批(ng/mL) ^o	第2批(ng/mL) ^o
LOB ^o	0.049 ^o	0.036 ^o
LOD ^o	0.306 ^o	0.312 ^o
FS ^o	0.436 ^o	0.500 ^o

4、线性与可报告范围

取9例高值样本H(>1000 ng/mL),1例低值样本L(<1 ng/mL),分别按照如下比例混合成10个浓度样本(10H、8H+2L、6H+4L、6H+4L、2H+8L、1H+9L、0.5H+9.5L、0.25H+9.75L、0.125H+9.875L、10L),每个浓度样本检测4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R²,要求a=1±0.1,R²>0.99。结果如下表4所示,可以看出本发明试剂盒线性范围可达1-1000 ng/mL。

[0034] 取5例高值样本H(>700 ng/mL),使用样品稀释液分别按照如下比例进行稀释成5个浓度样本(1:2、1:4、1:8、1:16、1:32),每个浓度样本检测3次,计算均值。将实测值乘以稀释倍数与原倍比较,同时满足三批试剂偏差<10%的最大倍数设定为最大可稀释倍数。结果如表5所示,可以看出本发明试剂盒最大可稀释倍数为5倍,可报告范围为1-5000 ng/mL。

[0035] 表4 线性范围考核

	第1批 ^o	第2批 ^o	第3批 ^o
样本1 ^o	0.25-1073.65ng/mL ^o y=0.9563x+2.2296; R2=0.9924	0.25-1123.30ng/mL ^o y=0.9858x+1.3011; R2=0.9953 ^o	0.25-1218.28ng/mL ^o y=1.0864x-2.3669; R2=0.9994 ^o
样本2 ^o	0.25-1156.75ng/mL ^o y=1.0262x-1.1034; R2=0.9985	0.25-1113.03ng/mL ^o y=1.0213x+0.2991; R2=0.9989 ^o	0.25-1127.74ng/mL ^o y=1.043x-1.1484; R2=0.9996 ^o
样本3 ^o	0.25-1101.2ng/mL ^o y=0.973x+0.4; R2=0.9994 ^o	0.25-1065.01ng/mL ^o y=0.9373x+2.4426; R2=0.9967 ^o	0.25-1077.39ng/mL ^o y=1.0148x-0.0948; R2=0.9948 ^o
样本4 ^o	0.25-1135.72ng/mL ^o y=1.0051x-0.3212; R2=0.9992	0.25-1166.75ng/mL ^o y=0.9375x+2.6478; R2=0.9982 ^o	0.25-1163.32ng/mL ^o y=1.0302x-0.0243; R2=0.9991 ^o
样本5 ^o	0.25-1268.78ng/mL ^o y=0.9368x+0.8123; R2=0.9986	0.25-1148.79ng/mL ^o y=0.9228x+2.155; R2=0.9997	0.25-1182.48ng/mL ^o y=1.0586x-1.8173; R2=0.999 ^o
样本6 ^o	0.25-1198.92ng/mL ^o y=1.0103x-0.6743; R2=0.9998	0.25-1164.35ng/mL ^o y=0.9899x+0.0781; R2=0.9985 ^o	0.25-1153.05ng/mL ^o y=0.9837x+0.3982; R2=0.9954 ^o
样本7 ^o	0.25-1203.48ng/mL ^o y=1.0347x-2.7969; R2=0.9951	0.25-1219.59ng/mL ^o y=0.9885x+0.2755; R2=0.9983 ^o	0.25-1150.40ng/mL ^o y=0.966x+1.3085; R2=0.9999 ^o
样本8 ^o	0.25-1083.46ng/mL ^o y=0.9389x+0.8018; R2=0.9992	0.25-1080.14ng/mL ^o y=0.987x-0.3281; R2=0.9993	0.25-1126.72ng/mL ^o y=1.0348x-2.1007; R2=0.9969 ^o
样本9 ^o	0.25-1115.12ng/mL ^o y=1.0429x-2.4257; R2=0.9958	0.25-1016.43ng/mL ^o y=1.0546x-1.9795; R2=0.9988 ^o	0.25-1016.52ng/mL ^o y=1.0094x-1.5437; R2=0.9963 ^o

表5 最大稀释倍数数据

项目名称		AutoLumex Al7000Plus											
样本编号	稀释比例	第1批			第2批			第3批			第4批		
		实测值	理论值	偏差	稀释比例	实测值	理论值	偏差	稀释比例	实测值	理论值	偏差	
样本1	原液	933.85	926.71	✓	1:2 ^c	905.76	904.71	✓	1:2 ^c	971.08	974.94	✓	
	原液	935.42	✓	✓	原液	900.16	✓	✓	原液	949.62	✓	✓	
	原液	934.88	✓	✓		903.20	✓	✓		964.12	✓	✓	
	440.63	463.36	1.05		468.04	453.34	0.97		450.45	487.47	1.08		
	1:2 ^c	445.94	463.36	1.04	1:2 ^c	466.24	452.36	0.97	1:2 ^c	449.93	487.47	1.08	
	447.11	463.36	1.04		464.00	452.36	0.97		451.22	487.47	1.08		
	239.07	231.68	0.97		246.74	226.18	0.92		229.22	243.74	1.06		
	1:4 ^c	239.85	231.68	0.97	1:4 ^c	245.41	226.18	0.92	1:4 ^c	233.49	243.74	1.04	
	237.12	231.68	0.98		247.65	226.18	0.91		235.23	243.74	1.04		
	117.42	115.84	0.95		128.47	113.09	0.88		125.41	121.87	0.97		
样本2	1:3 ^c	121.61	115.84	0.95	1:3 ^c	126.60	113.09	0.89	1:3 ^c	121.32	121.87	1.00	
	123.99	115.84	0.93		126.71	113.09	0.89		121.45	121.87	1.00		
	58.69	57.92	0.99		63.10	56.54	0.90		62.78	60.93	0.97		
	1:16 ^c	59.73	57.92	0.97	1:16 ^c	62.56	54.54	0.90	1:16 ^c	61.16	60.93	1.00	
	61.32	57.92	0.95		61.62	54.54	0.92		61.87	60.93	0.98		
	27.04	28.96	1.07		26.99	26.27	1.05		28.80	30.47	1.06		
	1:32 ^c	26.77	28.96	1.08	1:32 ^c	26.99	26.27	1.05	1:32 ^c	28.97	30.47	1.05	
	28.49	28.96	1.02		26.04	26.27	1.09		29.34	30.47	1.04		
	826.67	830.88	✓		900.91	900.90	✓		894.56	911.18	✓		
	822.58	✓	✓	原液	904.23	✓	✓	原液	920.05	✓	✓		
样本3	843.39	✓	✓		897.56	✓	✓		918.94	✓	✓		
	408.30	415.44	1.02		462.00	450.45	0.97		450.93	453.59	1.01		
	1:2 ^c	418.48	415.44	0.99	1:2 ^c	460.04	450.45	0.98	1:2 ^c	461.49	455.59	0.99	
	395.18	415.44	1.05		458.10	450.45	0.98		458.90	455.59	0.99		
	209.07	207.72	1.01		242.91	225.22	0.93		234.92	227.89	0.97		
	204.54	207.72	1.02	1:4 ^c	242.94	225.22	0.93	1:4 ^c	240.54	227.89	0.95		
	204.87	207.72	1.01		237.76	225.22	0.95		236.34	227.89	0.96		
	115.80	103.86	0.99		129.25	112.41	0.87		122.96	113.90	0.93		
	1:8 ^c	118.30	103.86	0.88	1:8 ^c	128.01	112.41	0.88	1:8 ^c	126.37	113.90	0.90	
	120.26	103.86	0.86		125.32	112.41	0.90		123.24	113.90	0.92		
样本4	60.71	51.93	0.88		63.35	56.38	0.86		61.49	56.95	0.93		
	1:16 ^c	63.84	51.93	0.84	1:16 ^c	63.55	56.38	0.89	1:16 ^c	62.92	56.95	0.91	
	67.03	51.93	0.77		62.64	56.31	0.90		62.18	56.95	0.92		
	30.08	25.96	0.88		26.69	26.15	1.05		28.56	28.47	1.05		
	1:32 ^c	31.08	25.96	0.84	1:32 ^c	27.82	26.15	1.01	1:32 ^c	31.19	28.47	0.91	
	32.02	25.96	0.81		27.71	28.15	1.02		28.96	28.47	0.98		
	821.43	831.32	✓	原液	933.64	921.23	✓	原液	862.11	861.72	✓		
	833.71	✓	✓		915.24	✓	✓		866.32	✓	✓		
	838.82	✓	✓		914.79	✓	✓		858.73	✓	✓		
	418.88	415.66	0.99		456.79	460.81	1.01		439.22	430.86	0.98		
样本5	416.29	415.66	1.00	1:2 ^c	450.79	460.81	1.02	1:2 ^c	438.99	430.86	0.98		
	416.49	415.66	1.00		437.21	460.81	1.01		433.07	430.86	0.99		
	223.80	207.83	0.93	1:4 ^c	245.58	230.31	0.94	1:4 ^c	234.87	215.43	0.92		
	224.99	207.83	0.92	1:4 ^c	238.26	230.31	0.97	1:4 ^c	234.42	215.43	0.92		
	225.67	207.83	0.92		242.48	230.31	0.95		236.21	215.43	0.91		
	119.98	103.91	0.87		126.28	115.15	0.91		114.51	107.72	0.94		
	120.04	103.91	0.84	1:8 ^c	124.62	115.15	0.92	1:8 ^c	117.29	107.72	0.92		
	124.03	103.91	0.84		129.02	115.15	0.89		116.39	107.72	0.93		
	64.36	51.98	0.81		58.58	57.58	0.98		64.31	58.86	0.84		
	65.17	51.98	0.80	1:16 ^c	60.59	57.58	0.95	1:16 ^c	66.46	58.86	0.78		
样本6	66.30	51.98	0.78		59.63	57.58	0.97		64.09	58.86	0.84		
	33.05	25.98	0.79		25.87	28.79	1.11		26.04	26.93	1.03		
	33.07	25.98	0.79	1:32 ^c	26.09	28.79	1.10	1:32 ^c	26.52	26.93	1.02		
	33.93	25.98	0.77		26.27	28.79	1.10		27.19	26.93	0.89		
	899.66	891.21	✓		878.74	894.84	✓		904.59	906.38	✓		
	881.15	✓	✓	原液	910.52	✓	✓	原液	904.83	✓	✓		
	898.82	✓	✓		894.63	✓	✓		909.70	✓	✓		
	448.99	445.43	0.99		470.86	447.32	0.95		450.31	453.19	1.01		
	1:2 ^c	443.36	445.43	1.01	1:2 ^c	461.86	447.32	0.97	1:2 ^c	439.59	453.19	0.99	
样本7	421.74	445.43	1.06		464.91	447.32	0.98		460.89	453.19	0.98		
	238.03	222.80	0.94		242.74	223.66	0.92		232.28	226.59	0.98		
	1:4 ^c	241.04	222.80	0.92	1:4 ^c	242.12	223.66	0.92	1:4 ^c	231.49	226.59	0.98	
	239.02	222.80	0.93		242.42	223.66	0.92		230.61	226.59	0.98		
	119.31	111.40	0.93		125.69	111.83	0.89		114.50	113.30	0.99		
	1:8 ^c	126.47	111.40	0.88	1:8 ^c	126.04	111.83	0.89	1:8 ^c	115.03	113.30	0.98	
	128.30	111.40	0.87		130.93	111.83	0.85		114.59	113.30	0.99		
	66.25	55.70	0.84		62.29	55.91	0.90		56.48	56.65	1.00		
	66.65	55.70	0.84	1:16 ^c	62.02	55.91	0.90	1:16 ^c	56.93	56.65	1.00		
	32.10	27.85	0.87		61.63	55.91	0.91		56.88	56.65	1.00		
样本8	32.72	27.85	0.85	1:32 ^c	27.35	27.96	1.01	1:32 ^c	26.11	28.32	1.08		
	33.82	27.85	0.82		27.37	27.96	1.01		27.29	28.32	1.04		
	842.24	856.50	✓		883.85	886.01	✓		808.93	794.72	✓		
	863.29	✓	✓	原液	896.32	✓	✓	原液	791.68	✓	✓		
	863.98	✓	✓		878.06	✓	✓		819.56	✓	✓		
	405.34	428.25	1.06		449.95	443.04	0.98		401.68	398.56	0.99		
	1:2 ^c	393.72	428.25	1.09	1:2 ^c	428.72	443.04	1.03	1:2 ^c	388.14	398.56	1.02	
	418.47	428.25	1.02		443.64	443.04	1.00		400.63	398.36	0.99		
	217.32	214.33	0.99		234.55	221.52	0.94		212.44	199.18	0.94		
	1:4 ^c	223.27	214.33	0.99	1:4 ^c	232.89	221.52	0.95	1:4 ^c	211.14	199.18	0.94	
样本9	226.37	214.33	0.95		238.60	221.52	0.93		217.02	199.18	0.92		
	117.57	107.06	0.91		118.52	110.76	0.93		117.94	99.59	0.84		
	1:8 ^c	118.33	107.06	0.96	1:8 ^c	117.25	110.76	0.94	1:8				

专利名称(译)	用于原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒						
公开(公告)号	CN109212192A		公开(公告)日	2019-01-15			
申请号	CN201811157108.6		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 周金龙 刘雅奇 万鹏 马雷 郑业煥 渠海 付光宇 吴学炜						
发明人	渠文涛 史小芹 周金龙 刘雅奇 万鹏 马雷 郑业煥 渠海 付光宇 吴学炜						
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76 G01N33/574						
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原发性肝癌早期诊断的GP73检测试剂盒，包括GP73校准品，包被GP73第一抗体的磁微粒混悬液，样品稀释液，辣根过氧化物酶标记的GP73第二抗体的酶结合物。本发明采用夹心法原理进行检测，用GP73抗体包被磁微粒，辣根过氧化物酶标记GP73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GP73的含量成正比。本发明试剂盒引入的样稀组分对样本进行稀释，在最大可稀释倍数范围内稀释结果可信。本发明试剂盒基于磁微粒化学发光法平台制备而成，配套安图生物的全自动免疫测定仪可实现血清、血浆中GP73的快速、自动化检测，分析灵敏度低，线性范围宽，更便于临床应用。

样本浓度	第1批			第2批		
	(高值)	(中值)	(低值)	(高值)	(中值)	(低值)
808.	304.	84.	834.	314.	88.	
1.	835.	313.	82.	852.	321.	87.
2.	820.	298.	83.	766.	321.	86.
3.	816.	317.	88.	840.	312.	83.
4.	808.	302.	84.	864.	319.	88.
5.	821.	309.	82.	854.	304.	85.
6.	831.	298.	86.	827.	320.	79.
7.	828.	306.	81.	811.	301.	88.
8.	832.	302.	88.	803.	336.	83.
9.	820.	296.	90.	828.	299.	87.
10.	752.	286.	91.	877.	318.	85.
11.	769.	300.	83.	793.	308.	88.
12.	805.	309.	83.	844.	339.	90.
13.	744.	327.	88.	848.	315.	92.
14.	811.	327.	87.	882.	308.	83.
15.	814.	286.	87.	799.	306.	88.
16.	770.	299.	97.	853.	321.	82.
17.	864.	292.	80.	793.	314.	88.
18.	806.	302.	82.	872.	290.	86.
19.	776.	294.	82.	824.	314.	89.
20.	818.	294.	87.	870.	324.	93.
平均值	810.	303.	85.	835.	314.	86.
SD.	34.37.	11.64.	3.24.	32.34.	11.77.	3.37.
变异系数	4.23%.	3.84%.	3.81%.	3.87%.	3.74%.	3.90%.
CV%.						