



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110850085 A

(43)申请公布日 2020.02.28

(21)申请号 201911075093.3

(22)申请日 2019.11.06

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 王凯 孟令敏 韩美玉 张丹丹
高威 孙成艳 何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 于晓庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

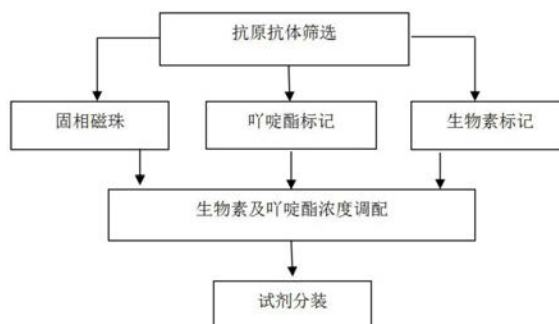
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,属于体外检测领域,该试剂盒包括:链霉亲和素磁颗粒、化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、化学发光激发液、异常凝血酶原校准品。链霉亲和素磁颗粒中磁颗粒浓度0.01~1%,粒径0.05~3 μ m。异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~20。异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~50。化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。偶联标记物为生物素。本发明灵敏度高,特异性强,准确性高,检测时间短,操作方便。



1. 异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 包括: 链霉亲和素磁颗粒、化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述链霉亲和素磁颗粒中, 磁颗粒的浓度为0.01~1%, 磁颗粒的粒径为0.05~3 μ m。

3. 根据权利要求1所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中, 异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~20; 所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钐。

4. 根据权利要求1所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 所述偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中, 异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~50; 所述偶联标记物为生物素。

5. 根据权利要求1所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 还包括化学发光激发液, 所述化学发光激发液包括A液和B液, 所述A液为硝酸和过氧化氢溶液, B液为氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求1所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒, 其特征在于, 还包括异常凝血酶原校准品, 所述异常凝血酶原校准品的浓度分别为0.00mAU/mL、40.00mAU/mL、100.00mAU/mL、300.00mAU/mL、5000.00mAU/mL和30000.00mAU/mL。

7. 如权利要求1至6中任意一项所述的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤一、制备链霉亲和素磁颗粒

取浓度50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL, 加入5~10mLTBST溶液混匀后, 置于磁分离器上分离磁颗粒, 直至上清无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒; 重复清洗3次后, 加入缓冲液A配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂, 即得链霉亲和素磁颗粒, 2~8℃保存备用;

步骤二、制备化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

将化学发光标记物溶解于DMF溶液中, 按照异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:1~20的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记, 加入标记缓冲液, 避光反应2~6h;

步骤三、制备偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

将偶联标记物溶解于DMF溶液中, 按照异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物摩尔比为1:1~50的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记, 加入标记缓冲液, 避光反应2~6h。

8. 根据权利要求7所述的制备方法, 其特征在于, 步骤一中, 所述缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成, pH为7.4。

9. 根据权利要求7所述的制备方法, 其特征在于, 步骤二和步骤三中, 标记缓冲液为PB缓冲液, pH为7.4, 浓度为20mmol/L。

10. 根据权利要求7所述的制备方法, 其特征在于, 所述化学发光标记物和偶联标记物的浓度均为2mg/mL。

异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外检测技术领域,具体涉及一种异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] PIVKA-II是一种维生素K缺乏诱导蛋白,又被称为异常凝血酶原,最初于1984年由Liebman从肝细胞癌患者的血清中发现,是肝细胞癌的产物,凝血酶原在维生素K充足情况下由肝脏合成,其主要有四个功能域:1个 γ -羧基谷氨酸区(Gla区),2个环状(Kringlek区)和1个催化区。正常凝血酶原是在肝细胞微粒体内主要依赖维生素K的 γ -谷氨酰羧化酶及辅酶VitaminK-epoxide-reductase和VitaminK-reductase参与下,将结构Gla区中的第6,7,14,16,19,20,25,26,29和32位的10个Glu残基羧化为Gla,使之成为有活性的凝血酶原,上述任何位点的一个或多个Glu残基羧化不全,都将可能形成PIVKA-II,从而失去与钙离子和磷脂的结合能力,丧失凝血活性。

[0003] 肝癌(HCC)因缺少早期的诊断指标,有50%的患者出现临床症状时的检验结果都处于临床晚期,5年存活率低于10%。乙肝病毒感染是肝癌发病的主要原因,HCC早期诊断的血清标志物一直是研究关注的热点,甲胎蛋白AFP是HCC检测最常用的标志物,其检测敏感性仅为60%~70%,但约18%的肝癌AFP不升高,早期肝癌AFP的假阴性率高达40%,可能因为某些类型的肝癌早期并不表达AFP,或者AFP含量与肿瘤体积大小有关。此外,在筛选有慢性病毒性肝炎背景下的HCC时,AFP的特异性和敏感性相对较低,其假阴性和假阳性均影响HCC的正确诊断,而且AFP在一些良性肝病、部分生殖系统和胃肠道的恶性肿瘤患者的血清中也会升高,从而影响临床诊断结果。临床研究表明,PIVKA-II与多种HCC恶性增值途径相关,其可能在HCC的发展、浸润与转移等方面促进肝细胞的恶性增值,AFP与PIVKA-II联合诊断,可以将HCC诊断的敏感度和特异性提高8~20%。目前测定异常凝血酶原的方法有放射免疫分析法(RIA)、酶免疫分析法(EIA)、化学发光免疫法法(CLEIA)等。然而,EIA法尤其局限性,特异性差、灵敏度低、准确性不高等。放射性免疫方法虽然被认为是准确可靠的方法,但是放射性同位素的辐射影响,废物处理需要专门的实验室,成本高和半衰期短的弊端,已经使该方法逐渐遭到淘汰。

发明内容

[0004] 目前市面上检测异常凝血酶原常用的方法是酶免疫分析法和放射免疫分析法,由于两种方法存在固有缺点即灵敏度低、特异性差、线性范围窄以及抗干扰能力差导致测量结果不准确,而放射性免疫对实验室的要求也造成了实验成本高的问题,为了解决上述问题,本发明提供一种异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,其采用链霉亲和素磁珠-生物素标记抗体-吖啶酯标记抗体体系进行PIVKA-II的检测,具有较高的灵敏度和特异性,准确性更高,检测时间更短,操作更方便。

[0005] 本发明为解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0006] 本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒,包括:链霉亲和素磁颗粒、化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体。

[0007] 作为优选的实施方式,所述链霉亲和素磁颗粒中,磁颗粒的浓度为0.01~1%,磁颗粒的粒径为0.05~3 μ m。

[0008] 作为优选的实施方式,所述化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中,异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~20。

[0009] 作为优选的实施方式,所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。

[0010] 作为优选的实施方式,所述偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中,异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~50。

[0011] 作为优选的实施方式,所述偶联标记物为生物素。

[0012] 作为优选的实施方式,还包括化学发光激发液,所述化学发光激发液包括A液和B液,所述A液为硝酸和过氧化氢溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0013] 作为优选的实施方式,还包括异常凝血酶原校准品,所述异常凝血酶原校准品的浓度分别为0.00mAU/mL、40.00mAU/mL、100.00mAU/mL、300.00mAU/mL、5000.00mAU/mL和30000.00mAU/mL。

[0014] 本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0015] 步骤一、制备链霉亲和素磁颗粒

[0016] 取浓度50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL,加入5~10mLTBST溶液混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用;

[0017] 步骤二、制备化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

[0018] 将化学发光标记物溶解于DMF溶液中,按照异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物摩尔比为1:1~20的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记,加入标记缓冲液,避光反应2~6h;

[0019] 步骤三、制备偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

[0020] 将偶联标记物溶解于DMF溶液中,按照异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物摩尔比为1:1~50的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记,加入标记缓冲液,避光反应2~6h。

[0021] 作为优选的实施方式,步骤一中,所述缓冲液A由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05%Proclin300组成,pH为7.4。

[0022] 作为优选的实施方式,步骤二和步骤三中,标记缓冲液为PB缓冲液,pH为7.4,浓度为20mmol/L。

[0023] 作为优选的实施方式,所述化学发光标记物和偶联标记物的浓度均为2mg/mL。

[0024] 本发明的有益效果是:本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒相比传统的检测方法,抗原、抗体的结合是在相似的液体条件下进行,反应过程更简洁、反应迅速灵敏、线性范围更宽以及特异性更好;另一方面,PIVKA-II化学发光免疫测试试剂盒与化学发光

免疫检测仪器组成封闭系统,试剂、样本的添加及检测任务均由仪器自动完成,降低了人为操作的误差,提高了整个系统的灵敏度与准确度。与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0025] 1、选择吖啶酯为化学发光免疫分析系统的标记材料,该材料有激发态回到基态时产生的能量跃迁为直接化学发光,不需要酶的参与,节约时间及成本。

[0026] 2、采用链霉亲和素磁珠与生物素标记的类似物可以牢牢的结合在一起,减少非特异性吸附,提高测试样本的准确度,抗干扰能力强。

[0027] 3、异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒为全自动的测量样本,并直接给出数值,减少人为操作误差,并且实现无人值守。

[0028] 4、吖啶酯的化学发光免疫分析系统线性范围宽。

[0029] 5、试剂与仪器组成封闭系统,系统误差小。

[0030] 6、化学发光免疫检测试剂盒在准确度方面可以替代市面传统试剂盒,为客户提供更加准确的测量数据及低廉的测试成本。

附图说明

[0031] 图1为本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法的流程设图。

[0032] 图2为本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒PIVKA-II标准曲线图。

具体实施方式

[0033] 本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒,主要包括:链霉亲和素磁颗粒、化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、化学发光激发液、异常凝血酶原校准品。

[0034] 链霉亲和素磁颗粒中,磁颗粒的浓度优选为0.01~1%,更优选为0.072%,磁颗粒的粒径优选为0.05~3 μ m,更优选为3 μ m。

[0035] 化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中,异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比优选为1:1~20,更优选为1:3。

[0036] 化学发光标记物优选为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌;化学发光标记物更优选为吖啶酯。

[0037] 偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体中,异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比优选为1:1~50,更优选为1:5。

[0038] 偶联标记物优选为生物素。

[0039] 优选的,化学发光激发液包括A液和B液,A液为硝酸和过氧化氢溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0040] 优选的,异常凝血酶原校准品的浓度分别为0.00mAU/mL、40.00mAU/mL、100.00mAU/mL、300.00mAU/mL、5000.00mAU/mL和30000.00mAU/mL。

[0041] 如图1所示,本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:抗原抗体的筛选、固定磁珠、吖啶酯标记、生物素标记、生物素及吖啶酯浓度调配、最后进行试剂分装。具体包括以下步骤:

[0042] 步骤一、制备链霉亲和素磁颗粒

[0043] 取浓度50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5~1mL,加入5~10mLTBST溶液

混匀后,置于磁分离器上分离磁颗粒,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,加入缓冲液A(缓冲液A优选由浓度为50mM的MES溶液、0.05%吐温-20和0.05% Proclin300组成,pH为7.4)配制成磁颗粒浓度为0.01~1%的固相试剂,即得链霉亲和素磁颗粒,2~8℃保存备用。

[0044] 步骤二、制备化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

[0045] 将化学发光标记物溶解于DMF溶液中,按照异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物(2mg/mL)摩尔比为1:1~20的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记,加入标记缓冲液(PB缓冲液,pH为7.4,浓度为20mmol/L),标记时间为2~6h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为1~5mL/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量。

[0046] 步骤三、制备偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体

[0047] 将偶联标记物溶解于DMF溶液中,按照异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物(2mg/mL)摩尔比为1:1~50的比例加入异常凝血酶原单克隆抗体进行标记,加入标记缓冲液(PB缓冲液,pH为7.4,浓度为20mmol/L),标记时间为2~6h,反应过程需要避光。标记反应结束后,使用AKTA纯化仪(G25凝胶柱)纯化,流速为1~5mL/min,收集管中纯化后的原液使用紫外分光光度计进行抗体定量。

[0048] 本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒用于检测异常凝血酶原时,利用全自动化学发光免疫分析仪(CM180)对异常凝血酶原校准品进行检测,绘制标准曲线,内置于电脑软件;然后根据需求按照上述的检测方法测试临床样品,根据样本的相对光单位(RLU)计算异常凝血酶原的浓度;最后对本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒进行性能(灵敏度、线性、抗干扰/特异性)的评价。

[0049] 本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成对异常凝血酶原的检测。本发明的异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒与仪器配套使用,缩短了临床检测所需的时间,检测精度较高,具有操作简便快捷,灵敏度高、线性范围宽、特异性好等优点。

[0050] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0051] 实施例1异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0052] (1)链霉亲和素磁颗粒制备工艺:取浓度100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.72mL(72mg),加入10mL的TBST溶液充分混匀10min后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后,在含有50mM MES、0.05%吐温、0.05% Proclin300, pH7.4的缓冲液A中配成磁颗粒浓度为0.072%的固相试剂,2~8℃保存备用。

[0053] (2)化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体制备工艺:将500ug异常凝血酶原单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置,离心机室温离心20s后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5μL浓度2mg/mL吖啶酯的DMF溶液,用离心机室温条件下离心0.5min;将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4h;加入1mL20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封

闭时间为1h。将封闭好的抗体上AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,流速为3mL/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存;使用时将纯化后的异常凝血酶原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.2μg/mL,2~8℃保存。

[0054] (3) 偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体制备工艺:将500ug异常凝血酶原单克隆抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置,离心机室温离心20s后加入磷酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mL浓度2mg/mL生物素的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s;2~8℃混匀4h;加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上AKTA纯化仪(葡聚糖凝胶G250柱)纯化,流速为3mL/min,用PB缓冲液洗脱,分部收集;将收集好的抗体溶液放置于2~8℃保存;使用时将纯化后的异常凝血酶原抗体浓溶液用100mM Bis-tris丙烷、0.05%吐温、0.05%Proclin300,pH6.0的缓冲液稀释至终浓度为0.7μg/mL,2~8℃保存。

[0055] 实施例2异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒检测方法

[0056] 以全自动化学发光免疫分析仪(CM180)为检测仪器,方法学采用夹心法,即仪器依次加入25μL的样本,50μL吖啶酯标记的异常凝血酶原单克隆抗体,50μL生物素标记的异常凝血酶原类似物及40μL链霉亲和素磁颗粒;反应20min后,进行磁分离;仪器将反应复合物送入暗室,依次加入化学发光激发液A液(HNO₃溶液和H₂O₂溶液)和B液(NaOH溶液)进行发光反应,最后记录相对光单位(RLU)。

[0057] 实施例3异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0058] (1) 线性的评价:将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为5种浓度,对每一浓度的样本均重复检测3次,计算平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,计算线性相关系数r,得到线性相关系数r=1.0000,线性范围为3.00~30000.00mAU/mL,结果详见表1。

[0059] 表1线性的评价结果

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----------|---------|---------|--------|-------|------|------|---------|
| [0060] | 线性样本理论浓度值(mAU/mL) | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | 相关系数(r) |
| | | 30000.00 | 6000.00 | 1200.00 | 240.00 | 48.00 | 9.60 | 1.92 | |
| | 测定值(mAU/mL) | 29100.52 | 5980.58 | 1182.21 | 242.40 | 48.48 | 9.60 | 2.02 | 1.0000 |
| | | 31809.36 | 6203.85 | 1150.63 | 230.40 | 47.04 | 9.30 | 1.87 | |
| [0061] | 测定均值(mAU/mL) | 30454.94 | 6092.22 | 1166.42 | 236.40 | 47.76 | 9.45 | 1.95 | |

[0062] (2) 最低检测限的评价:对零值校准品进行20次测定相对光单位(RLU),取其平均值减去两倍的标准差,带入标准曲线(标准曲线如图2所示)所得即为灵敏度;计算异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒的最低检测限<1.00mAU/mL,结果详见表2。

[0063] 表2最低检测限的评价结果

[0064]

| 测试次数 | 相对光单位 (RLU) | 测试次数 | 相对光单位 (RLU) |
|-------------------|-------------|------|-------------|
| 1 | 322 | 11 | 262 |
| 2 | 291 | 12 | 310 |
| 3 | 275 | 13 | 294 |
| 4 | 239 | 14 | 265 |
| 5 | 291 | 15 | 279 |
| 6 | 301 | 16 | 235 |
| 7 | 285 | 17 | 319 |
| 8 | 235 | 18 | 246 |
| 9 | 322 | 19 | 301 |
| 10 | 272 | 20 | 251 |
| 平均值 | | 280 | |
| 标准差 | | 29 | |
| 最低检测限的评价 (mAU/mL) | | 0.79 | |

[0065] (3) 准确度的评价: 将浓度约为2000.00mAU/mL (允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$) 的异常凝血酶原样品 (A) 加入到相应基质的样品 (B) 中, 所加入 (A) / (B) 的体积比为1:9, 计算回收率为103.44%, 结果详见表3。

[0066] 表3准确度的评价结果

[0067]

| A 液样本浓度 Cs (mAU/mL) | B 液样本浓度 C0 (mAU/mL) | A+B 液混合浓度 C (mAU/mL) | 回收率 (R) |
|------------------------|------------------------|-------------------------|---------|
| 20000.00 | 2.01 | 2075.41 | 103.44% |
| 20000.00 | 1.97 | 2044.07 | |
| 20000.00 | 1.92 | 2092.14 | |
| V (mL) | V0 (mL) | V0+V (mL) | |
| 0.300 | 2.700 | 3.000 | |

[0068] (4) 重复性的评价: 分别用浓度为 100 ± 20 mAU/mL和 25000 ± 1000 mAU/mL的样本各重复检测10次, 计算两个样本重复性变异系数 (CV) 分别为1.44%和2.05%, 结果详见表4。

[0069] 表4重复性的评价结果

[0070]

| 测定次数 | 重复性样本 1 | 重复性样本 2 |
|------|---------|----------|
| Rep1 | 107.31 | 24520.83 |

[0071]

| | | |
|------------|--------|----------|
| Rep2 | 110.77 | 24696.24 |
| Rep3 | 107.62 | 24751.09 |
| Rep4 | 107.02 | 24615.56 |
| Rep5 | 105.26 | 24534.76 |
| Rep6 | 106.58 | 24507.35 |
| Rep7 | 109.25 | 24585.96 |
| Rep8 | 108.64 | 23024.86 |
| Rep9 | 107.30 | 24605.87 |
| Rep10 | 108.81 | 24428.41 |
| M (mAU/mL) | 107.86 | 24427.09 |
| SD | 1.55 | 501.47 |
| CV | 1.44% | 2.05% |

[0072] (5) 抗干扰特异性的评价: 对于1000ng/mL的丝裂霉素C、阿霉素和氟尿嘧啶测试结果小于0.5ng/mL; 20mg/dL胆红素、500mg/dL血红蛋白、3000mg/dL甘油三酯、12g/dL总蛋白、RF的样本, 不会显著影响异常凝血酶原的测定。

[0073] (6) 稳定性: 试剂在2~8℃和37℃条件下的烘箱放置7天、14天, 测试各项性能指标

合格,结果详见表5。

[0074] 表5稳定性评价结果

[0075]

| 测试样本说明 | 理论浓度 (mAU/mL) | PIVKA-II 高温稳定性数据 | | | | | | | | |
|---------------|------------------|------------------|--------|---------------|--------|----------------------|----------|--------|---------------------|----------------------------|
| | | 零时间 2℃~8℃ | | 14 天 2℃8℃ | | | 14 天 37℃ | | | |
| | | 平均相对光单位 (RLU) | CV (%) | 平均相对光单位 (RLU) | CV (%) | 与零时间比相对光单位 (RLU) 衰减率 | 平均光子数 | CV (%) | 与零时间相对光单位 (RLU) 衰减率 | 与 2℃~8℃14 天相对光单位 (RLU) 衰减率 |
| 生理盐水 | 0 | 256 | 5.34% | 243 | 5.17% | -5.08% | 259 | 4.77% | 1.17% | 6.58% |
| PIVKA-II 校准-1 | 0.00 | 311 | 2.27% | 295 | 3.21% | -5.14% | 289 | 1.62% | -7.07% | -2.03% |
| PIVKA-II 校准-2 | 40.00 | 1642 | 1.46% | 1582 | 6.36% | -3.65% | 1625 | 3.28% | -1.04% | 2.72% |
| PIVKA-II 校准-3 | 100.00 | 3717 | 0.38% | 3865 | 2.60% | 3.98% | 3642 | 1.28% | -2.02% | -5.77% |
| PIVKA-II 校准-4 | 300.00 | 10815 | 2.34% | 11139 | 0.65% | 3.00% | 10590 | 1.57% | -2.08% | -4.93% |
| PIVKA-II 校准-5 | 5000.00 | 187912 | 1.09% | 186032 | 1.93% | -1.00% | 182586 | 0.20% | -2.83% | -1.85% |
| PIVKA-II 校准-6 | 30000.00 | 1164962 | 0.85% | 1130013 | 0.26% | -3.00% | 1152613 | 1.60% | -1.06% | 2.00% |
| 平均衰减率 | | 校准平均衰减 | | -1.56% | | 校准平均衰减 | | -2.13% | | -0.47% |
| PIVKA-II 临床-1 | 12.56 | 716 | 3.65% | 709 | 1.89% | -0.98% | 730 | 3.52% | 1.96% | 2.96% |
| PIVKA-II 临床-2 | 89.36 | 3344 | 1.25% | 3411 | 2.36% | 2.00% | 3210 | 3.88% | -4.01% | -5.89% |
| PIVKA-II 临床-3 | 569.36 | 20594 | 2.87% | 20388 | 4.35% | -1.00% | 20182 | 2.14% | -2.00% | -1.01% |
| PIVKA-II 临床-4 | 7954.25 | 302508 | 1.44% | 287383 | 2.61% | -5.00% | 293433 | 3.95% | -3.00% | 2.11% |
| PIVKA-II | 25698.68 | 995054 | 1.36% | 1014955 | 1.27% | 2.00% | 985103 | 1.23% | -1.00% | -2.94% |

[0076]

| | | | | | | | | | | |
|-------|--|--------|--|--------|--|--------|--|--------|--|--------|
| 临床-5 | | | | | | | | | | |
| 平均衰减率 | | 临床平均衰减 | | -0.59% | | 临床平均衰减 | | -1.61% | | -0.96% |

[0077] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

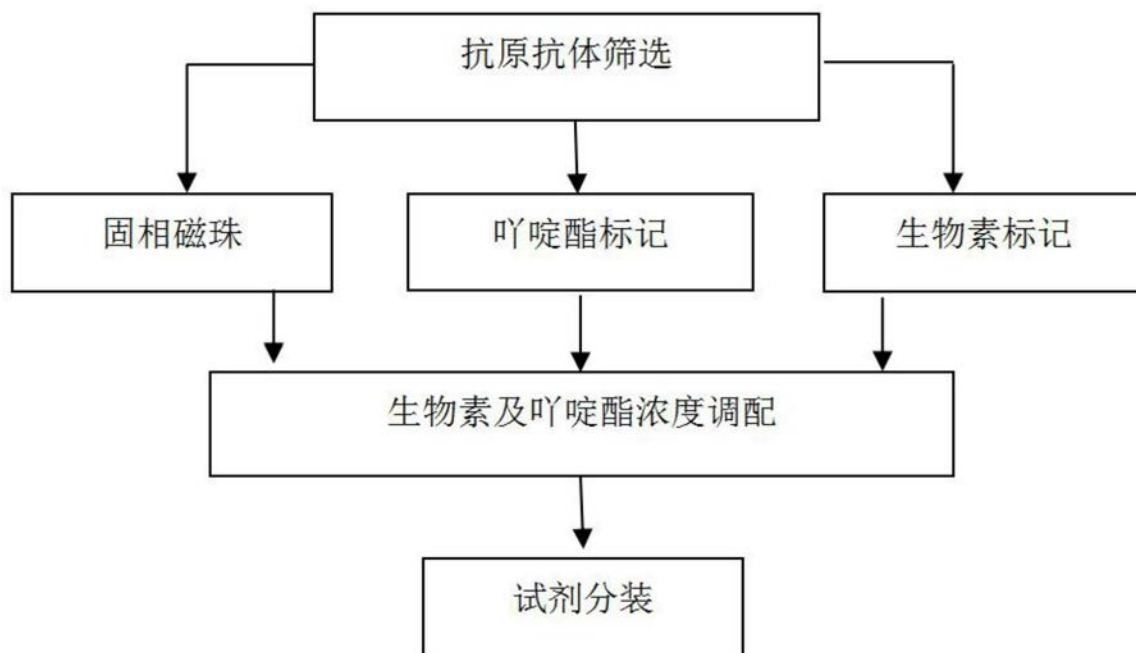


图1

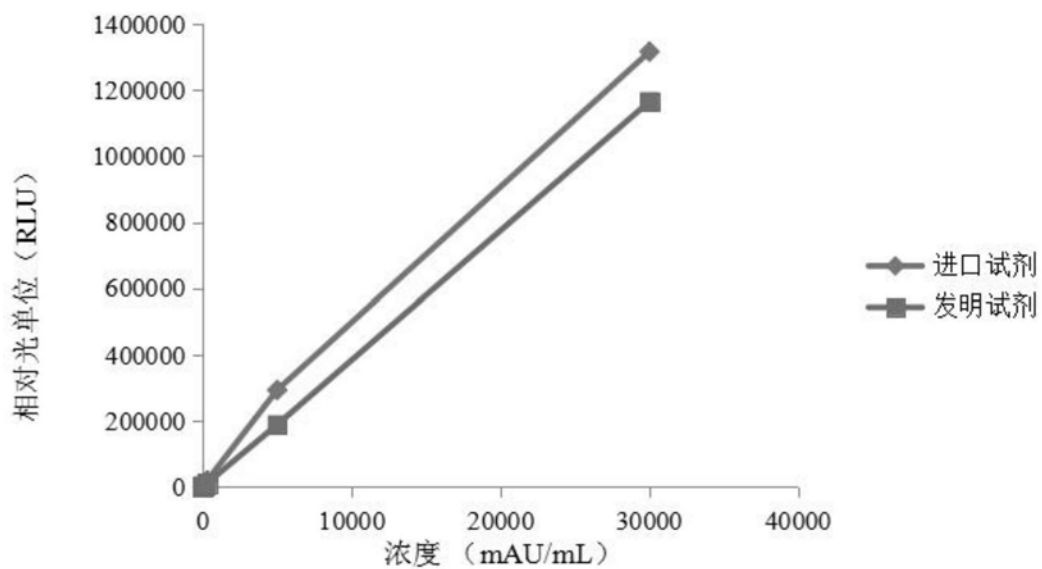


图2

| | | | |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN110850085A | 公开(公告)日 | 2020-02-28 |
| 申请号 | CN201911075093.3 | 申请日 | 2019-11-06 |
| [标]发明人 | 王凯 孟令敏 韩美玉 张丹丹 高威 孙成艳 何浩会 | | |
| 发明人 | 王凯 孟令敏 韩美玉 张丹丹 高威 孙成艳 何浩会 | | |
| IPC分类号 | G01N33/573 G01N33/543 G01N33/532 | | |
| CPC分类号 | G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/573 G01N2333/96433 | | |
| 代理人(译) | 于晓庆 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

异常凝血酶原化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，属于体外检测领域，该试剂盒包括：链霉亲和素磁颗粒、化学发光标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、偶联标记物标记的异常凝血酶原单克隆抗体、化学发光激发液、异常凝血酶原校准品。链霉亲和素磁颗粒中磁颗粒浓度0.01~1%，粒径0.05~3 μ m。异常凝血酶原单克隆抗体与化学发光标记物的摩尔比为1:1~20。异常凝血酶原单克隆抗体与偶联标记物的摩尔比为1:1~50。化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钼。偶联标记物为生物素。本发明灵敏度高，特异性强，准确性高，检测时间短，操作方便。

