(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802371 A
(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810576662.1

(22)申请日 2018.06.06

(71)申请人 广州市康润生物科技有限公司
地址 511442 广东省广州市番禺区南村镇塘坡东村登云大路8号2栋601A

(72)发明人 姜德华 胡洪海

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350
代理人 赵蕊红

(51)Int.Cl.
G01N 33/535(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及在早期子痫前期筛查中的用途

(57)摘要

以PAPP-A2血浆蛋白作为标志物进行早期筛查子痫前期,能够对孕9-12周的样本进行检测。本发明提供的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒,用于早期筛查子痫前期。PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法,待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的抗PAPP-A2抗体结合,再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合,形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物,加入底物后检测发光值,通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。本试剂盒检测结果诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93%、98%,是一种性能优良的检测试剂盒,可进行早期子痫前期筛查。

CN 108802371 A

1.PAPP-A2血浆蛋白作为标志物在早期筛查子痫前期中的用途。

2.根据权利要求1所述的PAPP-A2血浆蛋白作为标志物在早期筛查子痫前期中的用途，其特征在于，早期是指孕9-12周。

3.一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，用于早期筛查子痫前期。

4.根据权利要求3所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，含有：

R1，简称磁珠包被物，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠包被物的0.01M PBS缓冲液；

R2，简称吖啶酯标记物，含吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体的0.01M PBS缓冲液。

5.根据权利要求4所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠包被物的0.01M PBS缓冲液的PH值为7.2，内含0.1％吐温20(v/v)、5％牛血清白蛋白(w/v)、0.5％Proclin300(v/v)。

6.根据权利要求5所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，含吖啶酯标记的PAPP-A2结合物的0.01M PBS缓冲液的PH值为7.2，内含0.1％吐温20(v/v)、5％牛血清白蛋白(w/v)、0.5％Proclin300(v/v)。

7.根据权利要求6所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，其特征在于，还含有：

底物液A：含H_2O_2的水溶液，作为预激发液；

底物液B：含NaOH的水溶液，作为激发液。

8.根据权利要求3-7任意一项所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒用于早期筛查子痫前期的用途。

9.通过权利要求3-7任意一项所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查的方法，其特征在于，PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法，待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的的抗PAPP-A2抗体结合，再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合，形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物，加入底物后检测发光值，通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。

10.根据权利要求8所述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查的方法，其特征在于，诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93％、98％。

PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及在早期子痫前期筛查中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及子痫前期筛查技术领域，特别是涉及一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及用途。

背景技术

[0002] 孕前血压正常的孕妇在妊娠20周以后出现高血压、蛋白尿，称子痫前期，或称为先兆子痫，是妊娠期高血压疾病的五种状况之一，为妊娠期特发疾病，可影响机体各器官系统。据统计，国外孕妇子痫前期的发病率为5％～12％，我国为9.4％。子痫前期可导致产妇及围产儿死亡，全球范围内每年死于子痫前期的孕妇高达5万至7.5万。

[0003] 目前子痫前期的诊断依据是孕妇血压和尿蛋白两项指标：1.妊娠20周后出现收缩压≥140mmHg和(或)舒张压≥90mmHg；2.伴随蛋白尿≥0.3g/24小时或随机尿蛋白≥(+)。但这两项指标敏感性和特异性低，部分女性妊娠期间出现高血压不伴有蛋白尿，或持续的蛋白尿没有高血压但出现相应的临床症状；而且出现高血压和蛋白尿之后，疾病发展迅速。因此这两项指标均无法准确预测哪些孕妇会发生子痫前期、以及发病后如何进展。

[0004] 近年来新出现的生物标记物有多种，包括血浆相关蛋白A(PPAP-A)、胎儿血红蛋白、纤连蛋白(Fn)、胎盘生长因子(PLGF)、可溶性血管内皮生长因子受体1(sFlt1)等，其中PLGF/sFlt1为市场上已应用的产品，联合检测诊断子痫前期的NPV为99.3％，PPV为36.7％。

[0005] 现有技术中的筛查需要通过多个指标判断，不能以单一指标检测，更为严重的是不能进行孕早期诊断。因为现有技术中的标记物涉及内皮功能不良、炎症反应、凝血障碍等与子痫前期相关的病理生理变化，母体血液循环中浓度水平出现变化时已为孕中期。因此，如何早期进行筛查子痫前期，成为本领域的一大技术难题。

[0006] 因此，针对现有技术不足，提供一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及其用途以克服现有技术不足甚为必要。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于避免现有技术的不足之处而提供一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及测试方法，能够实现单一指标进行孕早期子痫前期筛查。

[0008] 本发明的目的通过以下技术措施实现。

[0009] 提供PAPP-A2血浆蛋白作为标志物在早期筛查子痫前期中的用途。优选的，早期是指孕9-12周。

[0010] 本发明同时提供一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，用于早期筛查子痫前期。

[0011] 优选的，上述PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，含有：

[0012] R1，简称磁珠包被物，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠包被物的0.01M PBS缓冲液；

[0013] R2，简称吖啶酯标记物，含吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体的0.01M PBS缓冲液。

[0014] 优选的，上述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠

包被物的0.01M PBS缓冲液的PH值为7.2，内含0.1％吐温20(v/v)、5％牛血清白蛋白(w/v)、0.5％Proclin300(v/v)。

[0015] 优选的，上述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，含吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体的0.01M PBS缓冲液的PH值为7.2，内含0.1％吐温20(v/v)、5％牛血清白蛋白(w/v)、0.5％Proclin300(v/v)。

[0016] 优选的，上述的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，还含有：

[0017] 底物液A：含H_2O_2的水溶液，作为预激发液；

[0018] 底物液B：含NaOH的水溶液，作为激发液。

[0019] 本发明提供根据上述PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒用于早期筛查子痫前期的用途。

[0020] 优选的，通过上述PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查的方法，PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法，待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的的抗PAPP-A2抗体结合，再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合，形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物，加入底物后检测发光值，通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。

[0021] 优选的，上述进行早期子痫前期筛查的方法，诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93％、98％。

[0022] 本发明以PAPP-A2血浆蛋白作为标志物进行早期筛查子痫前期，能够对孕9-12周的样本进行检测。本发明提供的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，用于早期筛查子痫前期。PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法，待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的的抗PAPP-A2抗体结合，再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合，形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物，加入底物后检测发光值，通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。本试剂盒检测结果诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93％、98％，是一种性能优良的检测试剂盒，可进行早期子痫前期筛查。

具体实施方式

[0023] 结合以下实施例对本发明作进一步说明。

[0024] 实施例1。

[0025] 提供PAPP-A2血浆蛋白作为标志物在早期筛查子痫前期中的用途。早期可实现孕9-12周的时间。

[0026] PAPP-A2水平升高是子痫前期状态时滋养层细胞对缺氧的一种反应，其水平越高，胎盘功能降低和缺氧的程度越严重。研究表明在孕12周时就能检测到子痫前期患者的PAPP-A2水平显著升高，且早发型子痫比晚发型子痫患者的水平更高，而早发型子痫容易出现严重的临床症状，预后较差。越早期预测子痫前期的发生，就能更早地进行干预，从而得到良性的妊娠结局。

[0027] 实施例2。

[0028] 一种PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，用于早期筛查子痫前期，含有：

[0029] R1，简称磁珠包被物，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠包被物的0.01M PBS缓冲液；PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，含包被抗PAPP-A2抗体的磁珠包被物的0.01M PBS缓冲

液的PH值为7.2,内含0.1%吐温20(v/v)、5%牛血清白蛋白(w/v)、0.5%Proclin300(v/v);

[0030] R2,简称吖啶酯标记物,含吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体的0.01M PBS缓冲液。含吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体的0.01M PBS缓冲液的PH值为7.2,内含0.1%吐温20(v/v)、5%牛血清白蛋白(w/v)、0.5%Proclin300(v/v);

[0031] 底物液A:含H_2O_2的水溶液,作为预激发液;

[0032] 底物液B:含NaOH的水溶液,作为激发液。

[0033] 通过该PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查的方法,PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法,待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的的抗PAPP-A2抗体结合,再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合,形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物,加入底物后检测发光值,通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。

[0034] 通过该PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查的方法,诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93%、98%。

[0035] 实施例3。

[0036] 通过实施例2的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒进行早期子痫前期筛查,具体操作过程如下:

[0037] 1.试剂盒在第一次使用时,在装机前,需要将磁珠包被物(R1)轻轻颠倒翻转约30次,使磁珠微粒分散均匀。首次装载磁珠包被物(R1)后不需要继续混匀。

[0038] 2.将磁珠包被物(R1)及吖啶酯标记物(R2)安装到试剂架上。在仪器操作介面选取试剂位,扫描试剂架上的二维码,将试剂架放入试剂仓中。

[0039] 3.按PPAP-A2校准品说明书和PPAP-A2质控品说明书准备PPAP-A2校准品和PPAP-A2质控品。

[0040] 4.按样本稀释液说明书准备样本稀释液。

[0041] 5.按浓缩洗涤液说明书准备洗涤液。

[0042] 6.按底物液说明书准备底物液A和底物液B。

[0043] 7.校准

[0044] 点击曲线,选取PPAP-A2项目,扫描试剂盒中附带的二维码信息,将自动生成曲线。将PPAP-A2校准品放入样本架上,推入样本架,在操作介面上编辑样本信息,选取PPAP-A2项目,每个校准品做2个复孔,样本类型设置为“CA”,确定后点击“运行”。

[0045] 8.检测

[0046] 样本使用前平衡至室温,并充分混匀。

[0047] 将PPAP-A2质控品及样本放入样本架上(样本量应大于300μL),推入样本架,在操作界面上编辑样本信息,选取PPAP-A2项目,确定后点击“运行”。系统将执行如下操作(校准操作相同):

[0048] 总孵育时间15分钟。

[0049] ●将待测物(校准品、质控品、样本)传送至吸液点。

[0050] ●将反应杯载入运行通道。

[0051] ●分别吸取30μL待测物到反应杯。

[0052] ●运送反应杯到试剂仓位,加入50μL试剂R1。

[0053] ●震荡混合后,将反应杯运送至孵育仓,37℃孵育10分钟。

[0054] ●将反应杯运送至洗涤通道,进行磁分离,用洗液清洗反应混合物,再重复磁分离-清洗4次。

[0055] ●再次运送反应杯到试剂仓位,加入50μL试剂R2。

[0056] ●震荡混合后,将反应杯运送至孵育仓,37℃孵育5分钟。

[0057] ●将反应杯运送至洗涤通道,进行磁分离,用洗液清洗反应混合物,再重复磁分离-清洗4次。

[0058] ●将反应杯运送至底物通道,加入100μL底物液A,震荡混合。

[0059] ●将反应杯运送至检测通道,抓取反应杯至检测仓,加入100μL底物液B,并立即检测发光信号,计算PPAP-A2浓度。

[0060] ●抓取反应杯到废料仓。

[0061] 9.结果判定

[0062] 本项目试剂使用四参数Logistic曲线拟合数据约简法(4PLC,Y加权)生成一条标准曲线。

[0063] 实施例4。

[0064] 以检测5例正常孕妇血清、5例子痫前期孕妇血清为例,说明本发明的试剂盒操作过程及筛查效果。

[0065] 1.在装机前,需要将磁珠包被物(R1)轻轻颠倒翻转约30次,使磁珠微粒分散均匀。首次装载磁珠包被物(R1)后不需要继续混匀。

[0066] 2.将磁珠包被物(R1)及吖啶酯标记物(R2)安装到试剂架上。在仪器操作介面选取试剂位,扫描试剂架上的二维码,将试剂架放入试剂仓中。

[0067] 3.按PPAP-A2校准品说明书和PPAP-A2质控品说明书准备PPAP-A2校准品和PPAP-A2质控品。

[0068] 4.按样本稀释液说明书准备样本稀释液。

[0069] 5.按浓缩洗涤液说明书准备洗涤液。

[0070] 6.按底物液说明书准备底物液A和底物液B。

[0071] 7.校准

[0072] 点击曲线,选取PPAP-A2项目,扫描试剂盒中附带的二维码信息,将自动生成曲线。将PPAP-A2校准品放入样本架上,推入样本架,在操作介面上编辑样本信息,选取PPAP-A2项目,每个校准品做2个复孔,样本类型设置为“CA”,确定后点击“运行”。

[0073] 8.检测

[0074] 样本使用前平衡至室温,并充分混匀。

[0075] 将PPAP-A2质控品及样本放入样本架上,推入样本架,在操作界面上编辑样本信息,选取PPAP-A2项目,确定后点击“运行”。系统将执行如下操作:

[0076] 总孵育时间15分钟。

[0077] ●将待测20份样本(校准品、质控品、样本)传送至吸液点。

[0078] ●将反应杯载入运行通道。

[0079] ●分别吸取30μL待测物到反应杯。

[0080] ●运送反应杯到试剂仓位,加入50μL试剂R1。

[0081] ●震荡混合后，将反应杯运送至孵育仓，37℃孵育10分钟。

[0082] ●将反应杯运送至洗涤通道，进行磁分离，用洗液清洗反应混合物，再重复磁分离-清洗4次。

[0083] ●再次运送反应杯到试剂仓位，加入50μL试剂R2。

[0084] ●震荡混合后，将反应杯运送至孵育仓，37℃孵育5分钟。

[0085] ●将反应杯运送至洗涤通道，进行磁分离，用洗液清洗反应混合物，再重复磁分离-清洗4次。

[0086] ●将反应杯运送至底物通道，加入100μL底物液A，震荡混合。

[0087] ●将反应杯运送至检测通道，抓取反应杯至检测仓，加入100μL底物液B，并立即检测发光信号，计算PPAP-A2浓度。

[0088] ●抓取反应杯到废料仓。

[0089] 10.结果判定

[0090] 使用四参数Logistic曲线拟合数据约简法(4PLC，Y加权)生成一条标准曲线，检测结果如表1所示。

[0091] 表1

[0092]

标本编号	孕周	诊断结果	检测结果 (ng/mL)
1	10W+3d	正常	19.057
2	9W+2d	正常	11.132
3	11W	正常	19.225
4	10W	正常	16.896
5	10W+5d	正常	18.757
6	10W+2d	子痫前期	38.276
7	9W+4d	子痫前期	28.536
8	9W+3d	子痫前期	28.393
9	10W+1d	子痫前期	32.478
10	10W	子痫前期	37.069

[0093] 本发明以PAPP-A2血浆蛋白作为标志物进行早期筛查子痫前期，能够对孕9-12周的样本进行检测。本发明提供的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，用于早期筛查子痫前期。PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法，待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的的抗PAPP-A2抗体结合，再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合，形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物，加入底物后检测发光值，通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。本试剂盒检测结果诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93%、98%，是一种性能优良的检测试剂盒，可进行早期子痫前期筛查。

[0094] 最后应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

专利名称(译)	PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒及在早期子痫前期筛查中的用途		
公开(公告)号	CN108802371A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810576662.1	申请日	2018-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
[标]发明人	姜德华 胡洪海		
发明人	姜德华 胡洪海		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

以PAPP-A2血浆蛋白作为标志物进行早期筛查子痫前期，能够对孕9-12周的样本进行检测。本发明提供的PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒，用于早期筛查子痫前期。PAPP-A2化学发光定量检测试剂盒采用两步双抗体夹心免疫检测方法，待测血清中的PPAP-A2与磁珠上包被的抗PAPP-A2抗体结合，再与吖啶酯标记的抗PAPP-A2抗体结合，形成磁珠包被物-PAPP-A2-吖啶酯标记物夹心型免疫复合物，加入底物后检测发光值，通过标准曲线计算得出样本中PAPP-A2的浓度。本试剂盒检测结果诊断子痫前期的敏感性和特异性分别达到93%、98%，是一种性能优良的检测试剂盒，可进行早期子痫前期筛查。

标本编号	孕周	诊断结果	检测结果(ng/mL)
1	10W+3d	正常	19.057
2	9W+2d	正常	11.132
3	11W	正常	19.225
4	10W	正常	16.896
5	10W+5d	正常	18.757
6	10W+2d	子痫前期	38.276
7	9W+4d	子痫前期	28.536
8	9W+3d	子痫前期	28.393
9	10W+1d	子痫前期	32.478
10	10W	子痫前期	37.069