



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725146 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201910017684.9

(22)申请日 2019.01.09

(71)申请人 余波澜

地址 510000 广东省广州市荔湾区多宝路
63号

(72)发明人 余波澜 陈敦金

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务
所(普通合伙) 11427

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

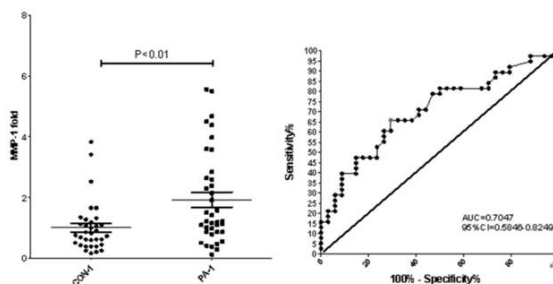
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及MMP-1辅助检测技术领域,尤指采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过检测外周血标志物MMP-1比对结果的一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法,所述用途为采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过MMP-1检测试剂盒对待测样本进行检测,统计正常样本的检测浓度并取平均值;获取待测样本的MMP-1检测值/平均值的比值,将比值与数值1.0作比较以测定检测结果;本发明通过采用外周血标志物检测的方法,对于疑似胎盘植入的孕产妇进行产前无创检测,在分娩前对疾病关联生物标志物的浓度进行检测,从而对于胎盘植入进行快速、低成本、高通量的产前辅助测试。



1. 一种利用血清MMP-1辅助检测的用途,其特征在于,所述用途为采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过MMP-1检测试剂盒对待测样本进行检测,统计正常样本的检测浓度并取平均值;获取待测样本的MMP-1检测值/平均值的比值,将比值与数值1.0作比较以测定检测结果。

2. 一种利用血清MMP-1辅助检测的检测方法,其特征在于,所述方法主要包括以下步骤:

- 1) 收集待检测的非抗凝外周血血清样本;
- 2) 收集正常的非抗凝外周血血清样本;
- 3) 对上述样本进行去除血小板和其他沉淀物处理;
- 4) 按照1:4稀释上述样本,采用MMP-1检测试剂盒在同一块板上检测所有样本的MMP-1浓度;
- 5) 准备10X的洗涤缓冲液按照缓冲液:超纯水=1:9的比例进行稀释并待用;
- 6) Beads的配制:将Beads涡旋30s,每管50X Beads各取出100 μ L,加入1X洗涤缓冲液混合至最终体积为5mL;
- 7) 检测抗体的配制:每管50X检测抗体各取出60 μ L,加入检测抗体稀释剂至最终体积3mL并混匀;
- 8) 加入通用测定缓冲液以溶解标准品;
- 9) 标准品的稀释;
- 10) 采用96孔板准备微球;
- 11) 洗板后加入检测抗体;
- 12) 洗板后加入SA-PE;
- 13) 洗板后上机检测以读取数据。

3. 根据权利要求2所述的一种利用血清MMP-1辅助检测的检测方法,其特征在于,所述步骤1)、2)收集的样本的储存方式为:收集后在室温下凝固30-45分钟,4℃1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱。

4. 根据权利要求2所述的一种利用血清MMP-1辅助检测的检测方法,其特征在于,所述步骤3)中:待样本采集完毕后,4度冻融50微升血清,1000g重复离心10分钟,以完全去除血小板和其他沉淀物。

一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及MMP-1辅助检测技术领域,尤指采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过检测外周血标志物MMP-1比对结果的一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法。

背景技术

[0002] 胎盘植入是指胎盘的绒毛侵入部分子宫肌层,胎盘绒毛错综分散植入子宫肌壁内的一种疾病,是产科少见但是危重的一种并发症,可以导致患者大出血、休克、子宫穿孔和感染,甚至死亡。胎盘植入近年来报道在孕产妇中的发生率为4/1000,其中前置胎盘合并胎盘植入发生率高、临床出血量大、死亡率高,称之为凶险性胎盘植入。

[0003] 目前临床上仍然缺乏简便有效的分娩前胎盘植入早期筛查或辅助测试技术,由此引起的处理延迟是导致其严重不良妊娠结局的关键之一。由于胎盘植入在产前缺乏典型的临床表现、体征及实验室指标,产前测试很困难,最终需要分娩后的病理测试来证明进行确诊。

[0004] 影像学测试是目前临床医师在分娩前测试胎盘植入的重要手段之一,主要有超声和MRI;但是,影像学测试成本昂贵,对操作人员的技术水平要求较高,而且具有一定局限性;超声不能明确胎盘组织植入的深度,而且对于植入部位较低和子宫后壁的胎盘植入病例假阴性较高;同时造影剂不能在孕妇身上使用,限制了临床MRI的应用;因此,临床上采用孕晚期孕妇胎盘植入高危因素结合B超、磁共振成像或者计算机X射线断层扫描(CT)正式宫腔内残留胎盘组织,发现子宫肌层分界不清,有侵入性影像学改变时,可以在产后进行胎盘植入测试。

[0005] 无创血清学测试方法正在进一步的研发中。有报道发现血清AFP与胎盘植入有明显相关性,但是其特异性不高,尚未开发成临床可以应用的检测试剂盒。在孕早期分析孕产妇血浆中的胎盘游离mRNA可以预测胎盘植入,但是对于技术手段要求很高,目前尚无临床应用;此外,有研究报道血浆中胎儿游离DNA在胎盘植入孕产妇外周血中升高,但是临床意义并不明确;因此,目前并没有可供临床应用的、采用母体血液中生物标记物进行胎盘植入辅助测试的检测方法。

[0006] 目前,胎盘植入临床上缺乏产前辅助测试的有效手段,临床上确诊的金标准为分娩后进行胎盘组织的病理学分析,可以采用的影像学辅助测试的经济成本和技术要求较高,对于降低医疗费用和基层医院推广不利。

发明内容

[0007] 本发明旨在公开MMP-1辅助检测技术领域,尤指采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过检测外周血标志物MMP-1比对结果的一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法;采用本检测方法可测定孕产妇的胎盘植入,在分娩前检测疾病关联生物标志物的浓度,从而对于胎盘植入进行快速、低成本、高通量的产前辅助测试。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种利用血清MMP-1辅助检测的用途,其特征在于,所述用途为采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过MMP-1检测试剂盒对待测样本进行检测,统计正常样本的检测浓度并取平均值;获取待测样本的MMP-1检测值/平均值的比值,将比值与数值1.0作比较以测定检测结果。

[0010] 一种利用血清MMP-1辅助检测的检测方法,其特征在于,所述方法主要包括以下步骤:

[0011] 1) 收集待检测的非抗凝外周血血清样本;

[0012] 2) 收集正常的非抗凝外周血血清样本;

[0013] 3) 对上述样本进行去除血小板和其他沉淀物处理;

[0014] 4) 按照1:4稀释上述样本,采用MMP-1检测试剂盒在同一块板上检测所有样本的MMP-1浓度;

[0015] 5) 准备10X的洗涤缓冲液按照缓冲液:超纯水=1:9的比例进行稀释并待用;

[0016] 6) Beads的配制:将Beads涡旋30s,每管50X Beads各取出100 μ L,加入1X洗涤缓冲液混合至最终体积为5mL;

[0017] 7) 检测抗体的配制:每管50X检测抗体各取出60 μ L,加入检测抗体稀释剂至最终体积3mL并混匀;

[0018] 8) 加入通用测定缓冲液以溶解标准品;

[0019] 9) 标准品的稀释;

[0020] 10) 采用96孔板准备微球;

[0021] 11) 洗板后加入检测抗体;

[0022] 12) 洗板后加入SA-PE;

[0023] 13) 洗板后上机检测以读取数据。

[0024] 优选地,所述步骤1)、2)收集的样本的储存方式为:收集后在室温下凝固30-45分钟,4 $^{\circ}$ C 1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱。

[0025] 优选地,所述步骤3)中:待样本采集完毕后,4度冻融50微升血清,1000g重复离心10分钟,以完全去除血小板和其他沉淀物。

[0026] 本发明的有益效果体现在:本发明通过采用外周血标志物检测的方法,对于疑似胎盘植入的孕产妇进行产前无创检测,在分娩前对疾病关联生物标志物的浓度进行检测,从而对于胎盘植入进行快速、低成本、高通量的产前辅助测试。

[0027] 本发明可降低产前筛查胎盘植入的经济成本和技术难度,本发明的方法采用了简单的外周血血清的生化检测技术,设备便利,操作简单,成本较低,合适所有类型的诊疗机构进行产前辅助测试,同时,本发明的方法加快胎盘植入的产前辅助测试的时效性,从采样到获得检测结果耗时为4至24小时,1次实验同时可以进行40例样本的检测,1个工作日内可以进行多次实验,因此是一种高通量和快速的检测方法,适合于人群的产前大规模筛查。

附图说明

[0028] 图1为第一批产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度对照图。

[0029] 图2为第二批产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度对照图。

[0030] 图3为在所有产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度对照图。

具体实施方式

[0031] 在现有的采用外周血标志物检测方法的基础上,本发明提供了一种利用血清MMP-1辅助检测的用途,所述用途为采用酶联免疫吸附检测试剂技术,通过MMP-1检测试剂盒对待测样本进行检测,统计正常样本的检测浓度并取平均值;获取待测样本的MMP-1检测值/平均值的比值,将比值与数值1.0作比较以测定检测结果;

[0032] 本发明还提供了一种利用血清MMP-1辅助检测的检测方法,所述方法主要包括以下步骤:

[0033] 1) 收集待检测的非抗凝外周血血清样本;收集后在室温下凝固30-45分钟,4℃1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱;

[0034] 2) 收集正常的非抗凝外周血血清样本;收集后在室温下凝固30-45分钟,4℃1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱;

[0035] 3) 对上述样本进行去除血小板和其他沉淀物处理;具体为待样本采集完毕后,4度冻融50微升血清,1000g重复离心10分钟,以完全去除血小板和其他沉淀物;

[0036] 4) 按照1:4稀释上述样本,采用MMP-1检测试剂盒在同一块板上检测所有样本的MMP-1浓度;

[0037] 5) 准备10X的洗涤缓冲液按照缓冲液:超纯水=1:9的比例进行稀释并待用;

[0038] 6) Beads的配制:将Beads涡旋30s,每管50X Beads各取出100μL,加入1X洗涤缓冲液混合至最终体积为5mL;

[0039] 7) 检测抗体的配制:每管50X检测抗体各取出60μl,加入检测抗体稀释剂至最终体积3mL并混匀;

[0040] 8) 加入通用测定缓冲液以溶解标准品;

[0041] 9) 标准品的稀释;

[0042] 10) 采用96孔板准备微球;

[0043] 11) 洗板后加入检测抗体;

[0044] 12) 洗板后加入SA-PE;

[0045] 13) 洗板后上机检测以读取数据。

[0046] 进一步地,准备主要材料/设备:试剂盒货号:Bio-Plex Assay 171AL001M;仪器型号:Bio-Plex 200;涡旋混合仪;适用1.5-2ml离心管的冷冻离心机;微孔板振荡器(能达到500rpm的转速);磁性分离板(Hand-Held Magnetic Plate Washer);2μl-1000μl单道移液器;20μl-300μl多道移液器;多道移液器储液槽;去离子水、烧杯、试管、吸水纸等;具体包括如下步骤:

[0047] (1) 分娩前抽取疑似病例的非抗凝外周血血清,在室温下凝固30-45分钟,4℃1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱;

[0048] (2) 采集30-50例正常分娩孕产妇的非抗凝外周血血清,在室温下凝固30-45分钟,4℃1000g离心15分钟,吸取上清并转移到低温冻存管中,冻存于-80度超低温冰箱;

[0049] (3) 待样本采集完毕后,4度冻融50微升血清,1000g重复离心10分钟,以完全去除血小板和其他沉淀物;

[0050] (4) 实验检测时1:4稀释样本,采用MMP-1检测试剂盒,本实施例优选Bio-Plex的MMP-1检测试剂盒,在同一块板上检测所有样本的MMP-1浓度;

[0051] (5) 将10X的wash buffer按照buffer:超纯水=1:9的比例进行稀释,待用;

[0052] (6) Beads的配制:将Beads涡旋30s,每管50X Beads各取出100 μ L,加入1X wash buffer至最终体积5mL,混匀;对照表如下:

[0053]	# of different Simplex Bead vials to be mixed	Total Volume of mixed Bead Solution	Volume of Wash Buffer (1X) to add
	1	100 μ L	4900 μ L
	2	200 μ L	4800 μ L
	3	300 μ L	4700 μ L
	4	400 μ L	4600 μ L
	5	500 μ L	4500 μ L
	6	600 μ L	4400 μ L

[0054] (7) Detection Antibody的配制:每管50X Detection Antibody各取出60 μ L,加入detection antibody diluent至最终体积3mL,混匀;对照表如下:

[0055]	# of Vials of Detection Antibody	Total Volume of Detection Antibody	Volume of Diluent to add
	1	60 μ L	2940 μ L
	2	120 μ L	2880 μ L
	3	180 μ L	2820 μ L
	4	240 μ L	2760 μ L
	5	300 μ L	2700 μ L
	6	360 μ L	2640 μ L

[0056] (8) 标准品的溶解,具体操作为:

[0057] (8-1) 将标准品取出,2000x g离心10s;

[0058] (8-2) 向标准品管中各自加入50 μ L的Universal Assay Buffer;

[0059] (8-3) 轻轻混匀30s;

[0060] (8-4) 置于冰上5-10min;

[0061] (8-5) 将标准品混合到一管里,加入Universal Assay Buffer,最终获得250 μ L混合标准品;对照表如下:

[0062]	# of Standard Sets	Reconstitution Volume per vial	Pooled Volume	Buffer to add	Total Volume
	1	50 μ L	50 μ L	200 μ L	250 μ L
	2	50 μ L	100 μ L	150 μ L	250 μ L
	3	50 μ L	150 μ L	100 μ L	250 μ L
	4	50 μ L	200 μ L	50 μ L	250 μ L
	5	50 μ L	250 μ L	0 μ L	250 μ L

[0063] (9) 标准品的稀释:取出试剂盒中提供的PCR八联管用于稀释标准品;向第一管中加入200 μ L的混合标准品做为标准品1;向管2-8中分别加入150 μ L的1X Universal Assay Buffer;从管1中取50 μ L混合标准品加入管2中,上下吹打10次混匀,尽量避免气泡的产生;更换新的枪头,从管2中吸取50 μ L的稀释标准品转移到管3中,上下吹打10次混匀;依次转移,完成混合标准品的梯度稀释,置于冰上备用;

[0064] (10) 准备微球:

[0065] (10-1) 涡旋微球30s;

- [0066] (10-2) 向96孔板中的每孔中加入50μL预混微球。
- [0067] (10-3) 将96孔板放入磁性分离板中,确保孔板被牢牢卡住;待板静止2min,让微球沉底;然后将磁板快速倒置,倒出孔板中的液体;此过程中不可将96孔板从磁性分离板中取出;
- [0068] (10-4) 向每孔中加入150μL 1X的Wash Buffer,静置30s,然后将磁板倒置,倒出孔板中的液体;
- [0069] (10-5) 在倒置的状态下,用纸巾吸附孔板表面的残留液体;
- [0070] (11) 洗板:
- [0071] (11-1) 将96孔板置于磁性分离板中,静置2min;
- [0072] (11-2) 轻轻去除封膜,避免液体飞溅;
- [0073] (11-3) 将孔板中的液体倒置去掉;
- [0074] (11-4) 向每孔中加入150μL 1X Wash Buffer,静置30s,将孔板中的液体倒置去掉。重复步骤,共洗3次;
- [0075] (11-5) 最后一次清洗结束时,用纸巾吸附残留液体;
- [0076] (12) 加入检测抗体:
- [0077] (12-1) 向每孔中加入25μL 1X检测抗体混合液;
- [0078] (12-2) 使用新的封膜密封孔板;
- [0079] (12-3) 将96孔板从磁性分离板中取出,至于孔板振荡器中500rpm室温震荡30min;
- [0080] (13) 洗板:
- [0081] (13-1) 将96孔板置于磁性分离板中,静置2min;
- [0082] (13-2) 轻轻去除封膜,避免液体飞溅;
- [0083] (13-3) 将孔板中的液体倒置去掉;
- [0084] (13-4) 向每孔中加入150μL 1X Wash Buffer,静置30s,将孔板中的液体倒置去掉,共洗3次;
- [0085] (13-5) 最后一次清洗结束时,用纸巾吸附残留液体;
- [0086] (14) 加入SA-PE:
- [0087] (14-1) 向每孔中加入50μL SA-PE;
- [0088] (14-2) 使用新的密封膜密封孔板;
- [0089] (14-3) 将96孔板从磁性分离板中取出,至于孔板振荡器中500rpm室温震荡30min;
- [0090] (15) 洗板:
- [0091] (15-1) 将96孔板置于磁性分离板中,静置2min;
- [0092] (15-2) 轻轻去除封膜,避免液体飞溅;
- [0093] (15-3) 将孔板中的液体倒置去掉;
- [0094] (15-4) 向每孔中加入150μL 1X Wash Buffer,静置30s,将孔板中的液体倒置去掉,共洗3次;
- [0095] (15-5) 最后一次清洗结束时,用纸巾吸附残留液体;
- [0096] (16) 上机检测:
- [0097] (16-1) 向每孔中加入120μL Reading Buffer;
- [0098] (16-2) 使用新的密封膜密封孔板;

[0099] (16-3) 将96孔板从磁性分离板中取出,至于孔板振荡器中500rpm室温震荡5min;

[0100] (16-4) 轻轻去除密封膜,放入Bio-Plex 200仪器中读数。

[0101] 实施例1:

[0102] 采用非线性回归的方式拟合标准曲线,计算出浓度值,结果内容包括标准曲线、每个孔的荧光强度中位值和根据标准曲线计算出来的浓度;

[0103] 以正常分娩孕产妇的MMP-1检测浓度的平均值为参考值,分别计算出疑似病例样本的MMP-1检测值/参考值的比值,进行分娩前的辅助测试;

[0104] 如图1:左:在第一批产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度,CON-1:正常分娩的对照人群;PA-1:病理确诊患有胎盘植入的孕产妇;右:ROC曲线和AUC值,显示以1.0的cut-off值具有中等强度的区分性能;

[0105] 如图2:左:在第二批产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度,CON-2:正常分娩的对照人群;PA-2:病理确诊患有胎盘植入的孕产妇;右:ROC曲线和AUC值,显示以1.0的cut-off值具有中等强度的区分性能。

[0106] 如图3:左:在所有产前辅助测试人群中检测获得的MMP-1相对浓度;CON:正常分娩的对照人群;PA:病理确诊患有胎盘植入的孕产妇;右:ROC曲线和AUC值,显示以1.0的cut-off值具有中等强度的区分性能。

[0107] 实施例2:

[0108] 表1:以1.0为阈值的MMP-1产前测试胎盘植入的检测结果

[0109]

	确诊患病人数+	确诊非病例人数-	总计
检测阳性+	44	29	73
检测阴性-	34	44	78
总计	78	73	151

[0110] 表2:以1.0为阈值的MMP-1产前测试胎盘植入的敏感性和特异性

[0111]

P 值	敏 感 性	特 异 性	阳 性 预 测 值	阴 性 预 测 值	阳 性 似 然 比	阴 性 似 然 比	OR 值
0.0003	0.56	0.60	0.60	0.56	1.42	0.72	1.96

[0112] 实施例3:

[0113] 检测2017年1月-2017年12月的38例正常分娩孕产妇的外周血清的MMP-1浓度,获得平均值为2250.44,以此平均值为参考正常值,计算2017年1月-2017年12月的12例疑似病例的检测值/参考值比值,获得结果如下:

[0114]

孕 产 妇 住院号	血清 ID	MMP-1 检测 浓度	MMP-1 的 检 测 值 / 参 考 值	分娩前辅 助诊断是 否判断为 胎盘植入	分娩后 病 理 确 证结果
256380	3834	12519.97	5.563325	是	是

[0115]

16380	266633	2854.44	1.268388	是	否
270898	23549	5354.13	2.37914	是	是
269691	22856	4271.33	1.897992	是	是
248437	8446	8068.56	3.585314	是	是
274237	25595	2461.64	1.093845	是	是
259758	8458	8942.04	3.97345	是	是
280059	38349	8044.03	3.574414	是	是
262934	19622	2594.49	1.152877	是	是
268448	21018	2461.64	1.093845	是	是
268301	19712	3537.45	1.571887	是	是
6759	255989	1759.98	0.782058	否	是

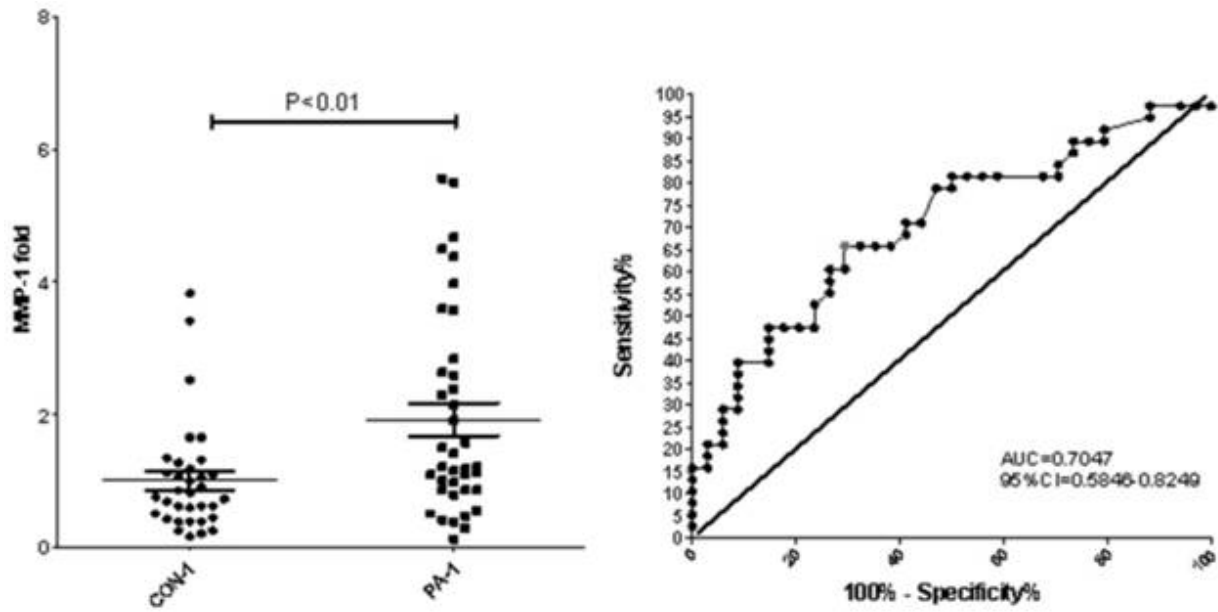


图1

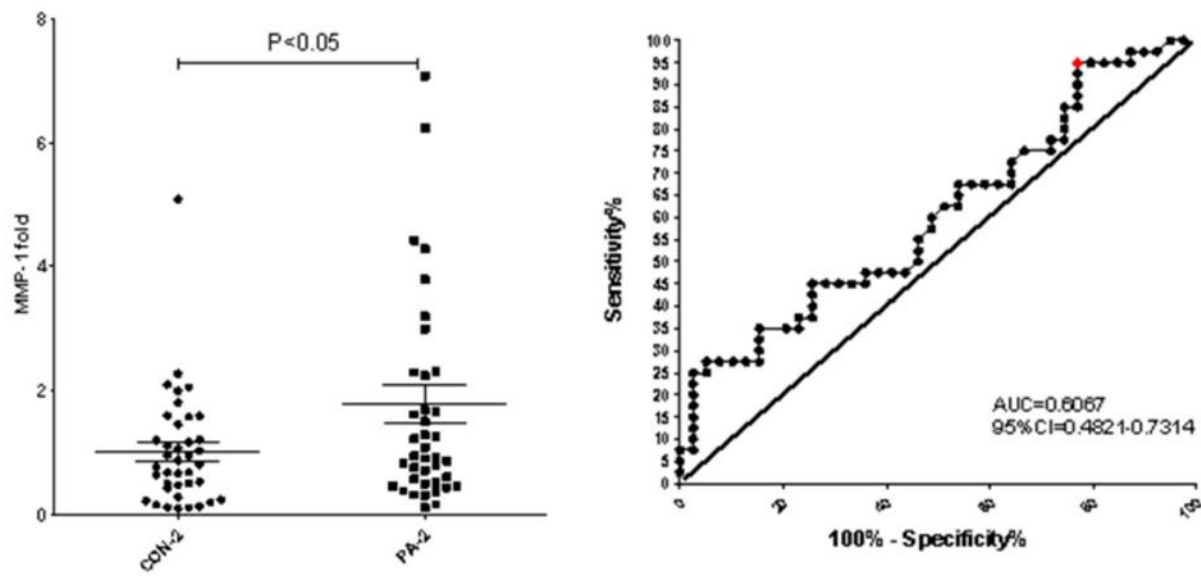


图2

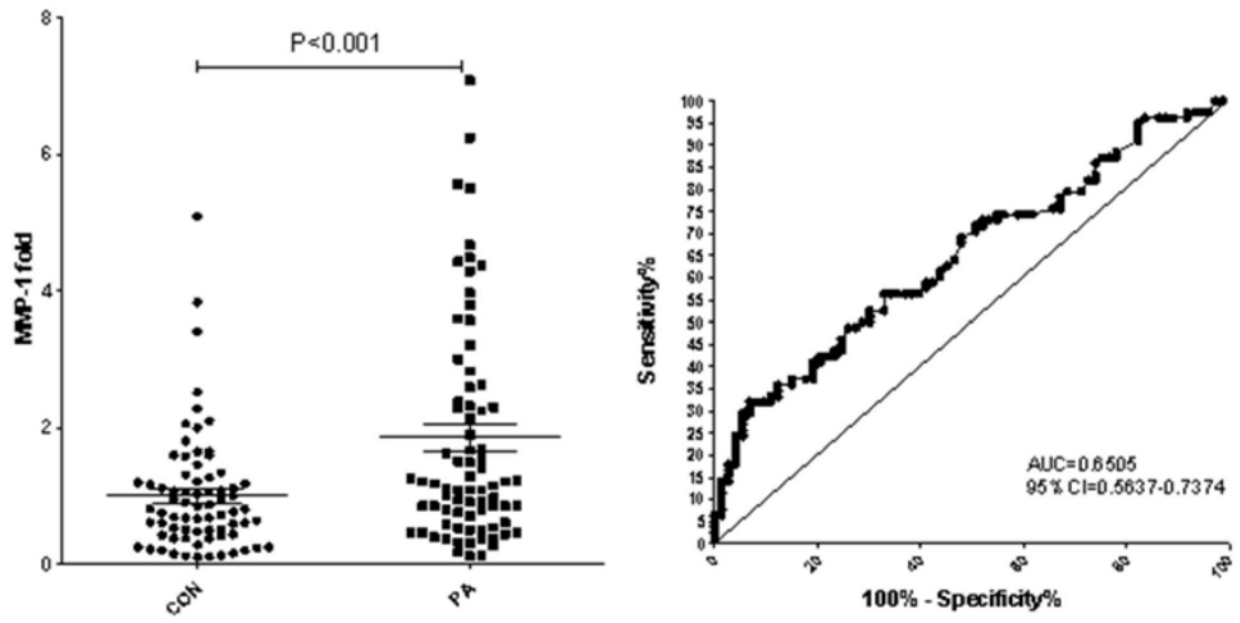


图3

专利名称(译)	一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法		
公开(公告)号	CN109725146A	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201910017684.9	申请日	2019-01-09
[标]发明人	陈敦金		
发明人	余波澜 陈敦金		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	陈娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及MMP-1辅助检测技术领域，尤指采用酶联免疫吸附检测试剂技术，通过检测外周血标志物MMP-1比对结果的一种利用血清MMP-1辅助检测的用途及其检测方法，所述用途为采用酶联免疫吸附检测试剂技术，通过MMP-1检测试剂盒对待测样本进行检测，统计正常样本的检测浓度并取平均值；获取待测样本的MMP-1检测值/平均值的比值，将比值与数值1.0作比较以测定检测结果；本发明通过采用外周血标志物检测的方法，对于疑似胎盘植入的孕产妇进行产前无创检测，在分娩前对疾病关联生物标志物的浓度进行检测，从而对于胎盘植入进行快速、低成本、高通量的产前辅助测试。

