



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687288 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910349875.5

(22)申请日 2019.04.28

(71)申请人 中山大学肿瘤防治中心

地址 510060 广东省广州市越秀区东风东路  
路651号

申请人 广州市微米生物科技有限公司

(72)发明人 刘万里 吴棉涛 汪艳涛 潘秀华

(74)专利代理机构 北京汇捷知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11531

代理人 李宏伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

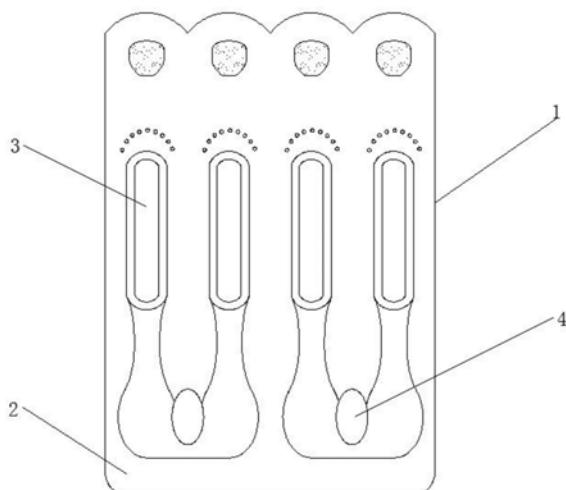
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备  
方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测肝病的多联检  
试剂盒及制备方法,采用荧光免疫层析法,将检  
测肝病的四个标志物:分别为血管生成素样蛋白  
2(angpt12)、甲胎蛋白(AFP)、血清骨桥蛋白  
(OPN)及人类软骨糖蛋白(YKL-40)制备成四种荧  
光检测卡,四种检测卡平行排列连接在一起,组成  
试剂盒本体,其中每相邻的两个检测卡有一个加  
样孔,且每个检测卡上均设置有读卡窗。本发明可同  
时检测肝病的4种不同标志物,可以对肝硬  
化、肝癌及肝癌预后全面监测,使肝病的早期  
检测更加快速准确;操作简单、检测时间短,只需  
要加样2次,即可得到4种检测结果,加样完成后,  
10min即可出结果,更适合基层应用。



1. 一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，采用荧光免疫层析法，将检测肝病的四个标志物：分别为血管生成素样蛋白2 (angpt12)、甲胎蛋白 (AFP)、血清骨桥蛋白 (OPN) 及人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 制备成四种荧光检测卡，四种检测卡平行排列连接在一起，组成试剂盒本体，其中每相邻的两个检测卡有一个加样孔，且每个检测卡上均设置有读卡窗。

2. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，所述荧光免疫层析法中采用的荧光标记物为铕、钐、镝的镧系螯合物中的一种。

3. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，所述血管生成素样蛋白2 (angpt12) 检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

4. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，所述甲胎蛋白 (AFP) 检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

5. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，所述血清骨桥蛋白 (OPN) 检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T1线及一条检测线T2线，其中T1线代表血清骨桥蛋白 (OPN) b亚型、T2线代表血清骨桥蛋白 (OPN) c亚型。

6. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，所述人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

7. 根据权利要求1所述的一种快速检测肝病的多联检试剂盒，其特征在于，每个所述的检测卡内均有检测试纸，试纸包括底板，底板上依次衔接有样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫。

8. 一种如权利要求1-7中任一项所述的快速检测肝病的多联检试剂盒的制备方法，其特征在于，该方法依次包括下述步骤：

S1: 样品垫的制备

将样品垫裁成20mm×300mm的大小，浸泡在样品垫缓冲液中，1小时之后取出，于室温干燥16-18小时；

S2: 荧光微球标记垫的制备

1) 血管生成素样蛋白2 (angpt12) 荧光微球标记垫的制备

① 微球预处理：取粒径300nm的含铕的荧光微球10uL加入到0.1M的pH5.5的1mL的MES缓冲液中，混匀；

② 微球的活化：取浓度为20mg/mL的EDC50uL，加入上述溶液中，混匀，在旋转培养器上混匀反应20min；

③ 微球淬灭：加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC；

④ 偶联抗体：加入血管生成素样蛋白2 (angpt12) 单克隆抗体35ug至上述溶液中，在旋转培养器上混匀反应1h；

⑤ 微球封闭：加入3%的液体明胶200uL封闭，在旋转培养器上混匀反应30min；

⑥ 微球纯化：用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来；

⑦ 保存：向脱盐柱中加入体积为300uL的保存液，移至EP管中，超声打散2-4次；

⑧ 将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上，喷量为1-5uL/cm，放入37℃烘箱，干燥6-8小时，得到血管生成素样蛋白2 (angpt12) 荧光微球标记垫；

2) 按上述方法将血管生成素样蛋白2 (angpt12) 抗体换成甲胎蛋白 (AFP) 抗体、人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 抗体分别制成甲胎蛋白 (AFP) 荧光微球标记垫和人类软骨糖蛋白 (YKL-

40) 荧光微球标记垫；

3) 血清骨桥蛋白 (OPN) 荧光微球标记垫的制备

①微球预处理：取粒径300nm的含铕的荧光微球10ul加入到0.1M的pH5.5的1ml的MES缓冲液中，混匀；

②微球的活化：取浓度为20mg/ml的EDC50ul，加入上述溶液中，混匀；在旋转培养器上混匀反应20min；

③微球淬灭：加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC；

④偶联抗体：加入血清骨桥蛋白 (OPN) b亚型和血清骨桥蛋白 (OPN) c亚型抗体各30ug至上述溶液中，在旋转培养器上混匀反应1h；

⑤微球封闭：加入3%的液体明胶200ul封闭，在旋转培养器上混匀反应30min；

⑥微球纯化：用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来；

⑦保存：向脱盐柱中加入体积为300ul的保存液，移至EP管中，超声打散2-4次；

⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上，喷量为1-5 $\mu$ L/cm，放入37℃烘箱，干燥6-8小时，得到血清骨桥蛋白 (OPN) 荧光微球标记垫；

S3: 包被膜的制备

1) 血管生成素样蛋白2 (angpt12) 包被膜的制备

检测线 (T线)：在硝酸纤维膜上划线，在膜的一端用记号笔做好C线和T线的标记，C线和T线的距离为0.5cm，T线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1cm，用2%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血管生成素样蛋白2 (angpt12) 单克隆抗体稀释到1.0mg/ml进行包被；划线浓度为1.5 $\mu$ L/cm，速度100mm/s；

质控线 (C线)：用3%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被，划线浓度为1.5 $\mu$ L/cm，速度100mm/s；

将包被上C线和T线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱，干燥6-8小时，得到血管生成素样蛋白2 (angpt12) 包被膜；

2) 甲胎蛋白 (AFP) 、人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 包被膜的制备与血管生成素样蛋白2 (angpt12) 包被膜的制备方法相同；

3) 血清骨桥蛋白 (OPN) 包被膜的制备

检测线 (T1和T2线)：在硝酸纤维膜上划线，在膜的一端用记号笔做好C线、T1线及T2线的标记，C线和T1线的距离为0.4cm，T1线和T2线的距离为0.4cm，T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.9cm，用2%甲醇，1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白 (OPN) b亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被，为T1线；用2%甲醇，1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白 (OPN) c亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被，为T2线；划线浓度均为1.5 $\mu$ L/cm，速度均为100mm/s；

质控线 (C线)：用3%甲醇，1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被，划线浓度为1.5 $\mu$ L/cm，速度100mm/s；

将包被上C线、T1线及T2线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱，干燥6-8小时，得到血清骨桥蛋白 (OPN) 包被膜；

S4: 制备试纸

将样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫依次搭接组装，其中，吸水垫和荧光微球

标记垫分别叠压在包被膜的两端，并在包被膜的表面形成检测区；样品垫交叠压在荧光微球标记垫上，组装后裁切成4mm宽度得到检测试纸，根据不同荧光微球标记垫和包被膜制成四条试纸条；

S5:制备检测盒

将步骤S4中所得到的四条试纸条依次安装在检测卡底盖上，再盖上盒盖，盒盖中读卡窗的位置与包被膜检测区相对应，加样孔的位置位于样品垫的中部，相邻两个样品垫共用一个加样孔，从而制成多联检检测盒。

9.根据权利要求8所述的快速检测肝病的多联检试剂盒的制备方法，其特征在于，所述样品垫中缓冲液配方如下：2%BSA、1%PEG4000、0.5%Tween溶解于0.01M的PBS (pH7.4) 缓冲液中。

10.根据权利要求8所述的快速检测肝病的多联检试剂盒的制备方法，其特征在于，所述的保存液为0.05M的pH8.5的甘氨酸-NaOH缓冲液，含1%酪蛋白钠、5%海藻糖、1%PVP、0.5%EDTA。

## 一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及疾病检测技术领域,具体是一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备方法。

### 背景技术

[0002] 目前全球肝病病毒感染者约有20多亿,肝病病毒携带者有3.5亿,其中我国肝病病毒携带者有1.3亿人,慢性乙肝患者3000万人,如此一来,也就意味着几乎每10个中国人中,就有1个是肝病病毒携带者。中国每年新发肝病病例50万人,而每年死于肝病相关疾病的约有28万人,死于因各类肝病引发的肝硬化、肝癌的患者约有35万人。由此看出,肝病已经成为一种严重危害我们身心健康的疾病之一。肝病的后期极易发展成肝癌,目前治疗肝癌最有效的方法是手术切除及肝移植,但大多数患者就诊时已到中晚期,手术切除率仅为10%-30%,因此肝癌早期诊断至关重要,是临床诊疗和预后的关键。

[0003] 目前肝癌的诊断主要依靠血清学检查和影像学诊断。血清学检测主要检查血清中的肿瘤标志物,目前主要检测的标志物是甲胎蛋白(AFP),但是甲胎蛋白(AFP)在小肝癌中的敏感度仅为40%左右,即单独使用一种肿瘤标志物无法准确诊断出肿瘤的发生和发展,多种标志物联合检测才能提高检出的准确率,避免漏诊和假阳性。选择更有诊断价值的标志物组合,提高现有标志物检测的灵敏度和特异性,对肝癌早期诊断极为重要。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种快速检测肝病的多联检试剂盒,采用荧光免疫层析法,将检测肝病的四个标志物:分别为血管生成素样蛋白2(angpt12)、甲胎蛋白(AFP)、血清骨桥蛋白(OPN)及人类软骨糖蛋白(YKL-40)制备成四种荧光检测卡,四种检测卡平行排列连接在一起,组成试剂盒本体,其中每相邻的两个检测卡有一个加样孔,且每个检测卡上均设置有读卡窗。

[0007] 作为本发明进一步的方案:所述荧光免疫层析法中采用的荧光标记物为铕、钐、镝的镧系螯合物中的一种。

[0008] 作为本发明再进一步的方案:所述血管生成素样蛋白2(angpt12)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

[0009] 作为本发明再进一步的方案:所述甲胎蛋白(AFP)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

[0010] 作为本发明再进一步的方案:所述血清骨桥蛋白(OPN)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T1线及一条检测线T2线,其中T1线代表血清骨桥蛋白(OPN)b亚型、T2线代表血清骨桥蛋白(OPN)c亚型。

[0011] 作为本发明再进一步的方案:所述人类软骨糖蛋白(YKL-40)检测卡包含一条质控

线C线及一条检测线T线。

[0012] 作为本发明再进一步的方案:每个所述的检测卡内均有检测试纸,试纸包括底板,底板上依次衔接有样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫。

[0013] 本发明的另一技术方案是提供肝病的多联检试剂盒的制备方法,该方法依次包括下述步骤:

[0014] S1:样品垫的制备

[0015] 将样品垫裁成20mm×300mm的大小,浸泡在样品垫缓冲液中,1小时之后取出,于室温干燥16-18小时;

[0016] S2:荧光微球标记垫的制备

[0017] 1) 血管生成素样蛋白2(angpt12) 荧光微球标记垫的制备

[0018] ①微球预处理:取粒径300nm的含铕的荧光微球10ul加入到0.1M的pH5.5的1ml的MES缓冲液中,混匀;

[0019] ②微球的活化:取浓度为20mg/ml的EDC50ul,加入上述溶液中,混匀,在旋转培养器上混匀反应20min;

[0020] ③微球淬灭:加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC;

[0021] ④偶联抗体:加入血管生成素样蛋白2(angpt12) 单克隆抗体35ug至上述溶液中,在旋转培养器上混匀反应1h;

[0022] ⑤微球封闭:加入3%的液体明胶200ul封闭,在旋转培养器上混匀反应30min;

[0023] ⑥微球纯化:用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来;

[0024] ⑦保存:向脱盐柱中加入体积为300ul的保存液,移至EP管中,超声打散2-4次;

[0025] ⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为1-5μL/cm,放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血管生成素样蛋白2(angpt12) 荧光微球标记垫;

[0026] 2) 按上述方法将血管生成素样蛋白2(angpt12) 抗体换成甲胎蛋白(AFP) 抗体、人类软骨糖蛋白(YKL-40) 抗体分别制成甲胎蛋白(AFP) 荧光微球标记垫和人类软骨糖蛋白(YKL-40) 荧光微球标记垫;

[0027] 3) 血清骨桥蛋白(OPN) 荧光微球标记垫的制备

[0028] ①微球预处理:取粒径300nm的含铕的荧光微球10ul加入到0.1M的pH5.5的1ml的MES缓冲液中,混匀;

[0029] ②微球的活化:取浓度为20mg/ml的EDC50ul,加入上述溶液中,混匀;在旋转培养器上混匀反应20min;

[0030] ③微球淬灭:加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC;

[0031] ④偶联抗体:加入血清骨桥蛋白(OPN)b亚型和血清骨桥蛋白(OPN)c亚型抗体各30ug至上述溶液中,在旋转培养器上混匀反应1h;

[0032] ⑤微球封闭:加入3%的液体明胶200ul封闭,在旋转培养器上混匀反应30min;

[0033] ⑥微球纯化:用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来;

[0034] ⑦保存:向脱盐柱中加入体积为300ul的保存液,移至EP管中,超声打散2-4次;

[0035] ⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上,喷量为1-5μL/cm,放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血清骨桥蛋白(OPN) 荧光微球标记垫;

[0036] S3:包被膜的制备

[0037] 1) 血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜的制备

[0038] 检测线(T线):在硝酸纤维膜上划线,在膜的一端用记号笔做好C线和T线的标记,C线和T线的距离为0.5cm,T线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1cm,用2%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血管生成素样蛋白2(angpt12)单克隆抗体稀释到1.0mg/ml进行包被;划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0039] 质控线(C线):用3%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被,划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0040] 将包被上C线和T线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜;

[0041] 2) 甲胎蛋白(AFP)、人类软骨糖蛋白(YKL-40)包被膜的制备与血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜的制备方法相同;

[0042] 3) 血清骨桥蛋白(OPN)包被膜的制备

[0043] 检测线(T1和T2线):在硝酸纤维膜上划线,在膜的一端用记号笔做好C线、T1线及T2线的标记,C线和T1线的距离为0.4cm,T1线和T2线的距离为0.4cm,T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.9cm,用2%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白(OPN)b亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被,为T1线;用2%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白(OPN)c亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被,为T2线;划线浓度均为1.5μL/cm,速度均为100mm/s;

[0044] 质控线(C线):用3%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被,划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0045] 将包被上C线、T1线及T2线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血清骨桥蛋白(OPN)包被膜;

[0046] S4:制备试纸

[0047] 将样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫依次搭接组装,其中,吸水垫和荧光微球标记垫分别叠压在包被膜的两端,并在包被膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在荧光微球标记垫上,组装后裁切成4mm宽度得到检测试纸,根据不同荧光微球标记垫和包被膜制成四条试纸条;

[0048] S5:制备检测盒

[0049] 将步骤S4中所得到的四条试纸条依次安装在检测卡底盖上,再盖上盒盖,盒盖中读卡窗的位置与包被膜检测区相对应,加样孔的位置位于样品垫的中部,相邻两个样品垫共用一个加样孔,从而制成多联检检测盒。

[0050] 作为本发明进一步的方案:所述样品垫中缓冲液配方如下:2%BSA、1%PEG4000、0.5%Tween溶解于0.01M的PBS(pH7.4)缓冲液中。

[0051] 作为本发明再进一步的方案:所述的保存液为0.05M的pH8.5的甘氨酸-NaOH缓冲液,含1%酪蛋白钠、5%海藻糖、1%PVP、0.5%EDTA。

[0052] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0053] 1.本发明可同时检测肝病的4种不同标志物,可以对肝硬化、肝癌及肝癌预后全面监测,使肝病的早期检测更加快速准确,目前市面上尚无此种检测肝病的多联检试剂。

[0054] 2.本发明操作简单、检测时间短,只需要加样2次,即可得到4种检测结果,加样完

成后,10min即可出结果,更适合基层应用。

[0055] 3.本发明采用时间分辨荧光微球标记技术,检测卡灵敏度高、线性范围宽、结果准确,更好的满足临床应用,且设置有能够同时检测b亚型及c亚型的OPN检测试纸条。

## 附图说明

[0056] 图1为一种快速检测肝病的多联检试剂盒的结构示意图。

[0057] 图中:1-试剂盒本体、2-检测卡、3-读卡窗、4-加样孔。

## 具体实施方式

[0058] 下面将结合本发明实施例中的附图,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。

[0059] 本发明中所涉及到的名词具体如下:

[0060] 血管生成素样蛋白2(angipt12):血管生成素样蛋白2(angipt12)是血管生成素样白家族成员之一,能通过增加金属蛋白酶的表达及活性从而调节细胞外基质的沉积及降解。通过检测血管生成素样蛋白2(angipt12)的含量,可预测肝病人群的纤维化程度。

[0061] 甲胎蛋白(AFP):甲胎蛋白(AFP)是诊断原发性肝癌的一个特异性临床指标。正常人血清中AFP的含量尚不到20 $\mu$ g/L,在大约70%的原发性肝癌患者中AFP都会升高,而且在症状出现前的6-12月就会出现升高,但是仍约有30%的肝癌患者甲胎蛋白(AFP)正常。

[0062] 血清骨桥蛋白(OPN):血清骨桥蛋白(OPN)广泛分布于多种组织和细胞中,正常人血清骨桥蛋白(OPN)表达甚微,但在高侵袭性肿瘤中OPN则高表达,OPN作为一种肝癌肿瘤标志物,在肝癌发展、诊断起着重要的作用,可以弥补AFP在肝癌诊断中的不足。

[0063] 人类软骨糖蛋白(YKL-40):是哺乳动物壳多糖酶家族中的一员,研究显示,YKL-40和肝癌患者预后有一定相关性,YKL-40阳性表达患者术后的生存率较阴性患者明显降低。

[0064] 请参阅图1,本发明实施例中,一种快速检测肝病的多联检试剂盒,采用荧光免疫层析法,将检测肝病的四个标志物:分别为血管生成素样蛋白2(angipt12)、甲胎蛋白(AFP)、血清骨桥蛋白(OPN)及人类软骨糖蛋白(YKL-40)制备成四种荧光检测卡2,四种检测卡2平行排列连接在一起,组成试剂盒本体1,其中每相邻的两个检测卡2有一个加样孔4,且每个检测卡2上均设置有读卡窗3,操作时,只需要加两次样,10min内即可获得四种检测结果。

[0065] 所述荧光免疫层析法中采用的荧光标记物为铕、钐、镝的镧系螯合物中的一种。

[0066] 所述血管生成素样蛋白2(angipt12)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

[0067] 所述甲胎蛋白(AFP)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

[0068] 所述血清骨桥蛋白(OPN)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T1线及一条检测线T2线,其中T1线代表血清骨桥蛋白(OPN)b亚型、T2线代表血清骨桥蛋白(OPN)c亚型。

[0069] 所述人类软骨糖蛋白(YKL-40)检测卡包含一条质控线C线及一条检测线T线。

[0070] 每个所述的检测卡2内均有检测试纸,试纸包括底板,底板上依次衔接有样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫。

[0071] 本发明的最后一技术方案是提供肝病的多联检试剂盒的制备方法,该方法依次包括

下述步骤：

[0072] S1: 样品垫的制备

[0073] 1) 将样品垫裁成20mm×300mm的大小, 浸泡在样品垫缓冲液中, 1小时之后取出, 于室温干燥16-18小时;

[0074] 2) 样品垫中缓冲液配方如下: 2% BSA、1% PEG4000、0.5% Tween溶解于0.01M的PBS (pH7.4) 缓冲液中;

[0075] S2: 荧光微球标记垫的制备

[0076] 1) 血管生成素样蛋白2 (angpt12) 荧光微球标记垫的制备

[0077] ①微球预处理: 取粒径300nm的含铕的荧光微球10ul加入到0.1M的pH5.5的1ml的MES缓冲液中, 混匀;

[0078] ②微球的活化: 取浓度为20mg/ml的EDC50ul, 加入上述溶液中, 混匀, 在旋转培养器上混匀反应20min;

[0079] ③微球淬灭: 加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC;

[0080] ④偶联抗体: 加入血管生成素样蛋白2 (angpt12) 单克隆抗体35ug至上述溶液中, 在旋转培养器上混匀反应1h;

[0081] ⑤微球封闭: 加入3%的液体明胶200ul封闭, 在旋转培养器上混匀反应30min;

[0082] ⑥微球纯化: 用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来;

[0083] ⑦保存: 向脱盐柱中加入体积为300ul的保存液, 移至EP管中, 超声打散2-4次; 所述的保存液为0.05M的pH8.5的甘氨酸-NaOH缓冲液, 含1% 酪蛋白钠、5% 海藻糖、1% PVP、0.5% EDTA;

[0084] ⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上, 喷量为1-5μL/cm, 放入37°C烘箱, 干燥6-8小时, 得到血管生成素样蛋白2 (angpt12) 荧光微球标记垫;

[0085] 2) 按上述方法将血管生成素样蛋白2 (angpt12) 抗体换成甲胎蛋白 (AFP) 抗体、人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 抗体分别制成甲胎蛋白 (AFP) 荧光微球标记垫和人类软骨糖蛋白 (YKL-40) 荧光微球标记垫;

[0086] 3) 血清骨桥蛋白 (OPN) 荧光微球标记垫的制备

[0087] ①微球预处理: 取粒径300nm的含铕的荧光微球10ul加入到0.1M的pH5.5的1ml的MES缓冲液中, 混匀;

[0088] ②微球的活化: 取浓度为20mg/ml的EDC50ul, 加入上述溶液中, 混匀; 在旋转培养器上混匀反应20min;

[0089] ③微球淬灭: 加入终浓度为0.02M的2-巯基乙醇淬灭多余的EDC;

[0090] ④偶联抗体: 加入血清骨桥蛋白 (OPN) b亚型和血清骨桥蛋白 (OPN) c亚型抗体各30ug至上述溶液中, 在旋转培养器上混匀反应1h;

[0091] ⑤微球封闭: 加入3%的液体明胶200ul封闭, 在旋转培养器上混匀反应30min;

[0092] ⑥微球纯化: 用脱盐柱将蛋白微球复合物从溶液中分离出来;

[0093] ⑦保存: 向脱盐柱中加入体积为300ul的保存液, 移至EP管中, 超声打散2-4次; 所述的保存液为0.05M的pH8.5的甘氨酸-NaOH缓冲液, 含1% 酪蛋白钠、5% 海藻糖、1% PVP、0.5% EDTA;

[0094] ⑧将上述所得的溶液用喷金划膜仪喷至玻璃纤维素膜上, 喷量为1-5μL/cm, 放入

37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血清骨桥蛋白(OPN)荧光微球标记垫;

[0095] S3:包被膜的制备

[0096] 1) 血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜的制备

[0097] 检测线(T线):在硝酸纤维膜上划线,在膜的一端用记号笔做好C线和T线的标记,C线和T线的距离为0.5cm,T线与硝酸纤维素膜下缘的距离为1cm,用2%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血管生成素样蛋白2(angpt12)单克隆抗体稀释到1.0mg/ml进行包被;划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0098] 质控线(C线):用3%甲醇、1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被,划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0099] 将包被上C线和T线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜;

[0100] 2) 甲胎蛋白(AFP)、人类软骨糖蛋白(YKL-40)包被膜的制备与血管生成素样蛋白2(angpt12)包被膜的制备方法相同;

[0101] 3) 血清骨桥蛋白(OPN)包被膜的制备

[0102] 检测线(T1和T2线):在硝酸纤维膜上划线,在膜的一端用记号笔做好C线、T1线及T2线的标记,C线和T1线的距离为0.4cm,T1线和T2线的距离为0.4cm,T2线与硝酸纤维素膜下缘的距离为0.9cm,用2%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白(OPN)b亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被,为T1线;用2%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将血清骨桥蛋白(OPN)c亚型抗体稀释到1.0mg/ml进行包被,为T2线;划线浓度均为1.5μL/cm,速度均为100mm/s;

[0103] 质控线(C线):用3%甲醇,1%蔗糖0.01M的pH7.4的PBS将羊抗鼠IgG多克隆抗体稀释到0.8mg/ml进行包被,划线浓度为1.5μL/cm,速度100mm/s;

[0104] 将包被上C线、T1线及T2线的硝酸纤维膜放入37℃烘箱,干燥6-8小时,得到血清骨桥蛋白(OPN)包被膜;

[0105] S4:制备试纸

[0106] 将样品垫、荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫依次搭接组装,其中,吸水垫和荧光微球标记垫分别叠压在包被膜的两端,并在包被膜的表面形成检测区;样品垫交叠压在荧光微球标记垫上,组装后裁切成4mm宽度得到检测试纸,根据不同荧光微球标记垫和包被膜制成四条试纸条;

[0107] S5:制备检测盒

[0108] 将步骤S4中所得到的四条试纸条依次安装在检测卡底盖上,再盖上盒盖,盒盖中读卡窗3的位置与包被膜检测区相对应,加样孔4的位置位于样品垫的中部,相邻两个样品垫共用一个加样孔4,从而制成多联检检测盒。

[0109] 本发明的具体使用方法如下:

[0110] 1) 本发明在使用时,先打开仪器,插入与试剂批号相同的芯片,读ID卡,然后精确吸取10μl样本,加入到稀释液中,混合均匀,备用;

[0111] 2) 打开检测盒内包装,取出检测盒,将检测盒水平放置;

[0112] 3) 吸取稀释后的样本75μl,加入到检测盒的加样孔中,然后开始计时;

[0113] 4) 通过仪器选择样本类型“血浆/血清”或“全血”;

- [0114] 5) 待室温反应10min后,点击仪器上的“测试”按键,仪器将开始检测,并显示结果;
- [0115] 6) 点击“打印”,可打印检测结果报告。
- [0116] 本发明提供的快速检测肝病的多联检试剂盒具有如下优点:
- [0117] 本发明可同时检测肝病的4种不同标志物,可以对肝硬化、肝癌及肝癌预后全面监测,使肝病的早期检测更加快速准确,目前市面上尚无此种检测肝病的多联检试剂。
- [0118] 本发明操作简单、检测时间短,只需要加样2次,即可得到4种检测结果,加样完成后,10min即可出结果,更适合基层应用。
- [0119] 本发明采用时间分辨荧光微球标记技术,检测卡灵敏度高、线性范围宽、结果准确,更好的满足临床应用,且设置有能够同时检测b亚型及c亚型的OPN检测试纸条。
- [0120] 本发明对1000例肝病患者进行检测,结果显示:angpt12单指标检测的敏感度为80.37%、特异性为82.66%,AFP单指标检测的敏感度为80.53%、特异性为81.29%,OPN单指标检测的敏感度为81.36%、特异性为83.64%,YKL-4单指标检测的敏感度为82.72%、特异性为83.51%;
- [0121] angpt12与AFP双指标检测的敏感度为84.45%、特异性为84.87%,angpt12与OPN双指标检测的敏感度为84.01%、特异性为85.72%,angpt12与YKL-40双指标检测的敏感度为85.23%、特异性为84.33%,AFP与OPN双指标检测的敏感度为85.76%、特异性为86.12%,AFP与YKL-40双指标检测的敏感度为84.97%、特异性为86.23%,OPN与YKL-40双指标检测的敏感度为85.65%、特异性为86.83%;
- [0122] angpt12、AFP与OPN三指标检测的敏感度为90.16%、特异性为91.48%,angpt12、AFP与YKL-40三指标检测的敏感度为89.67%、特异性为90.10%,angpt12、OPN与YKL-40三指标检测的敏感度为91.23%、特异性为92.88%,AFP、OPN与YKL-40三指标检测的敏感度为89.55%、特异性为90.36%;
- [0123] angpt12、AFP、OPN、YKL-40四指标检测的敏感度为95.15%、特异性为96.37%。
- [0124] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

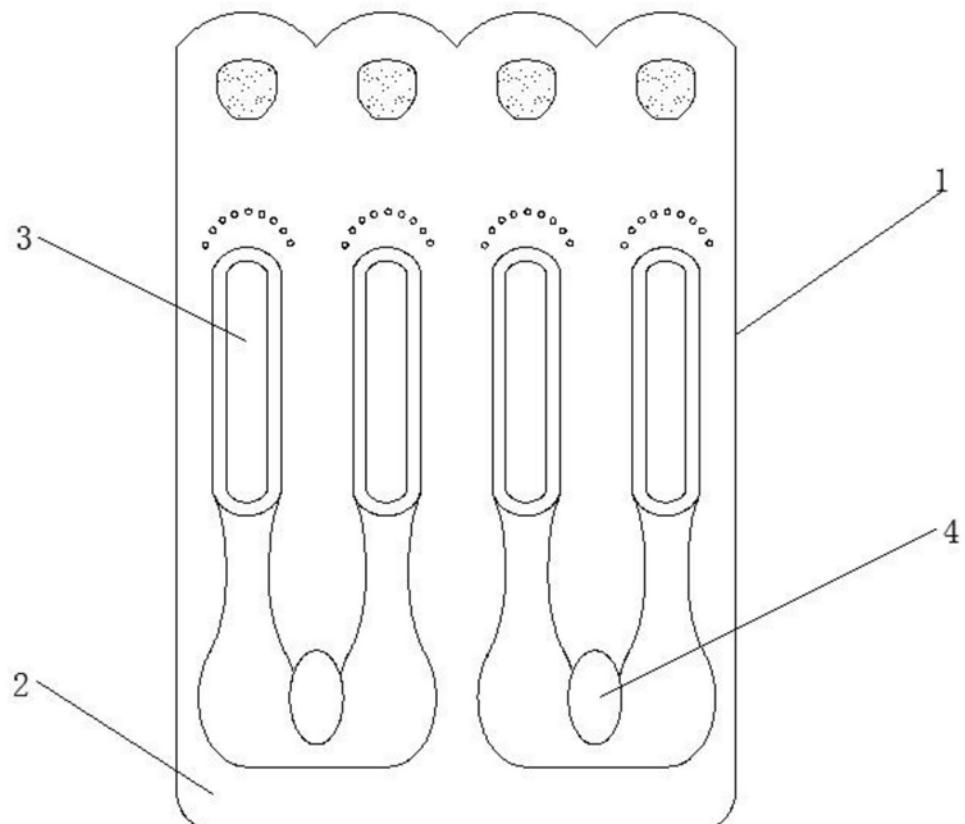


图1

专利名称(译)	一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110687288A</a>	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910349875.5	申请日	2019-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心 广州市微米生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心 广州市微米生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学肿瘤防治中心 广州市微米生物科技有限公司		
[标]发明人	刘万里 汪艳涛 潘秀华		
发明人	刘万里 吴棉涛 汪艳涛 潘秀华		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/574 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54306 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/57438		
代理人(译)	李宏伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了一种快速检测肝病的多联检试剂盒及制备方法，采用荧光免疫层析法，将检测肝病的四个标志物：分别为血管生成素样蛋白2(angptl2)、甲胎蛋白(AFP)、血清骨桥蛋白(OPN)及人类软骨糖蛋白(YKL-40)制备成四种荧光检测卡，四种检测卡平行排列连接在一起，组成试剂盒本体，其中每相邻的两个检测卡有一个加样孔，且每个检测卡上均设置有读卡窗。本发明可同时检测肝病的4种不同标志物，可以对肝硬化、肝癌及肝癌预后全面监测，使肝病的早期检测更加快速准确；操作简单、检测时间短，只需要加样2次，即可得到4种检测结果，加样完成后，10min即可出结果，更适合基层应用。

