



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459115 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410735789.5

(22) 申请日 2014. 12. 05

(71) 申请人 重庆乾德生物技术有限公司

地址 400039 重庆市九龙坡区科园四街
70-1、70-2 号 J 座六楼

(72) 发明人 陈亨宇

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧 许亦琳

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种 GP73、PIVKA-II 联合检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种定量检测高尔基体糖蛋白-73 GP73、维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒及其制备方法和用途。本发明所述检测试剂盒,包括互相独立的高尔基体糖蛋白-73 GP73 检测试纸卡和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡,所述检测试纸卡均各自包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。本发明所提供的试剂盒首次将 GP73 和 PIVKA-II 通过荧光微球免疫层析技术进行检测,兼具灵敏性和特异性,具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点。

1. 一种定量检测高尔基体糖蛋白 -73 GP73、维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒，包括互相独立的高尔基体糖蛋白 -73 GP73 检测试纸卡和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡，所述检测试纸卡均各自包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述所述高尔基体糖蛋白 -73 GP73 检测试纸卡的金标垫上包含高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体，所述维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的金标垫上包含维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体，所述各硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，所述金标垫上的高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体采用荧光微球标记。

2. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述各硝酸纤维素膜上，检测线位于离加样端较近一侧，质控线位于离加样端较远一侧。

3. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述高尔基体糖蛋白 -73 GP73 检测试纸卡的检测线上包被有高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体；所述维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的检测线上包被有维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体。

4. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，各质控线上包被羊抗鼠抗体。

5. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述各样品垫采用缓冲液处理，所述缓冲液选自 PBS 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液和柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液中的一种或多种的组合，缓冲液的浓度为 20~200mM。

6. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述各金标垫采用缓冲液处理，所述缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合，缓冲液的浓度为 5~50mM。

7. 根据权利要求 6 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述缓冲液中还包括反应增强剂，所述反应增强剂选自 PEG4000、PEG6000、PEG8000 和 PEG20000 中的任意一种，所述反应增强剂的浓度为 10~50g/L。

8. 如权利要求 1 所述的检测试剂盒，其特征在于，还包括卡壳，所述卡壳包括背卡和上盖，所述背卡设有两个平行的试纸卡卡槽，所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内，所述上盖设有两个测试窗和两个加样孔，所述两个测试窗的位置分别与两个试纸卡的检测线和质控线的位置相配合，所述两个加样孔的位置与两个试纸卡的样品垫的位置相配合。

9. 如权利要求 8 所述的检测试剂盒，其特征在于，所述两个加样孔之间还设有连接两个加样孔的横槽。

10. 根据权利要求 1~9 任一权利要求所述的检测试剂盒的制备方法，具体包括如下步骤：

1) 用荧光微球标记的高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体溶液分别喷涂各自对应的金标垫，制得分别包含高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体的金标垫；

2) 在高尔基体糖蛋白 -73 GP73 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂高尔基体糖蛋白 -73 GP73 抗体及羊抗鼠抗体；在维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂维生素 K 缺乏

或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体及羊抗鼠抗体；

3) 将两套样品垫、步骤 1) 制备的两套金标垫、步骤 2) 制备的两套硝酸纤维素膜、两套吸水垫依次粘贴在底板上，切裁制得检测试纸卡；最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

一种 GP73、PIVKA-II 联合检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种 GP73、PIVKA-II 联合检测试剂盒及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 高尔基体糖蛋白 -73(Golgi Protein 73, GP73) 又称 II型高尔基体膜蛋白 (Golgi phosphoprotein2, GOLPH 2), 其在慢性肝炎、肝硬化等病人血清中浓度升高, 而在肝细胞肝癌病人血清中升高更加明显, 和正常人或良性肝病病人之间呈显著差异。有研究表明, 血清 GP73 用于肝癌的诊断, 优于血清 AFP 检测。据文献报道, GP73 检测肝癌的灵敏度为 69%, 特异性为 75%。对于早期肝癌的诊断, GP73 的敏感性为 62%, 而 AFP 敏感性仅为 25%。AFP 水平低于 20 μg/L 的肝癌患者中, 有 57% 的人群 GP73 水平显著升高。这表明, GP73 的应用能够大大提高对 AFP 阴性的肝癌患者的检出率。

[0003] 维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导的蛋白质 (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist-II, PIVKA-II), 又叫脱 -γ - 羧基凝血酶原 (Des-gamma-carboxy prothrombin, DCP) 或异常凝血酶原, 1984 年首次被认定为原发性肝癌的标志物。肝细胞肝癌患者血清中 PIVKA-II 浓度水平远高于肝硬化和转移性肝癌患者, 而且其血清浓度变化和患者肝细胞癌的动态变化 (手术、治疗和复发等) 相关。后来的研究证实, PIVKA-II 和 AFP 检测可以互为补充, 二者的联合检测可以将肝细胞肝癌的诊断率提高到 84%, 仅大约 16% 的肝细胞肝癌患者两者都呈阴性结果。目前 PIVKA-II 检测已被列入《日本肝癌学会肝癌诊疗规范 2009 年版》中, 用于肝细胞癌高危人群的筛查及原发性肝癌的辅助诊断; 我国卫生部发布的《原发性肝癌诊疗规范 (2011 年版)》中用于肝细胞癌辅助诊断的标志物也包括 PIVKA-II。

[0004] 综上, GP73 和 PIVKA-II 是新型肝癌标志物的典型代表。相对而言, GP73 的敏感性更高, 而 PIVKA-II 的特异性更好, 两种指标单独应用时都存在一定程度的假阴性和假阳性, 如果通过恰当的方式和手段, 同时联合检测两项指标, 互为补充, 将有助于进一步降低肝细胞肝癌临床诊断的假阴性和假阳性, 提高这些标志物对肝细胞肝癌的诊断性能, 更好地为临床和患者服务。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点, 本发明的目的在于提供一种定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73、维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒及其制备方法和用途, 用于解决现有技术中的问题。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的, 本发明提供一种定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73、维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒, 包括互相独立的高尔基体糖蛋白 -73GP73 检测试纸卡和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡, 所述检测试纸卡均各自包括底板、及位于底板表面的从加样端开

始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述高尔基体糖蛋白 -73GP73 检测试纸卡的金标垫上包含高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体，所述维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的金标垫上包含维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体，所述各硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线，所述金标垫上的高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体采用荧光微球标记。

[0007] 优选的，各个金标垫上的抗体采用 180nm 荧光微球标记， $EX(nm) = 650/Em(nm) = 670$ ，具有信号受背景干扰小，检测灵敏度高，结果重复性好的优点。

[0008] 优选的，所述底板为 PVC 底板。

[0009] 优选的，所述各硝酸纤维素膜上，检测线位于离加样端较近一侧，质控线位于离加样端较远一侧。

[0010] 优选的，所述高尔基体糖蛋白 -73GP73 检测试纸卡的检测线上包被有高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体；所述维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的检测线上包被有维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体。

[0011] 每个检测卡中金标垫上的抗体与检测线上的抗体可以是相同的抗体，也可以是不同的抗体。

[0012] 优选的，各质控线上包被羊抗鼠抗体。

[0013] 优选的，所述各样品垫采用缓冲液处理，所述缓冲液选自 PBS 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液和柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液中的一种或多种的组合，缓冲液的浓度为 20-200mM。

[0014] 优选的，本发明所述的各金标垫还经过预处理，预处理时所使用的预处理缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合，缓冲液的浓度为 5-50mM。

[0015] 优选的，所述缓冲液还包括反应增强剂，所述反应增强剂选自 PEG4000、PEG6000、PEG8000 和 PEG20000 中的任意一种，所述反应增强剂的浓度为 10 ~ 50g/L。

[0016] 优选的，所述缓冲溶液还包括表面活性剂，所述表面活性剂选自 S-19TWEEN 20、S-20 TWEEN 80、S-13TRITON X-45、S-14TRITON X-100、S-15TRITON X305 中的任意一种或多种的组合，所述表面活性剂的浓度为 10 ~ 50g/L。

[0017] 优选的，为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果，本发明所述的各金标垫在预处理时所使用的预处理缓冲液包括下列组分：水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸，且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 — 7.5g/L，缓冲液的 pH 值为 7.2 — 7.6。

[0018] 优选的，各组分在缓冲液中的浓度为：

[0019]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0020] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0021] 所述预处理的具体步骤为：将各金标垫在预处理液中浸泡 1.5 ~ 2h，取出放于 36 ~ 38℃ 烘干。

[0022] 所述预处理缓冲液可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0023] 优选的，所述试剂盒还包括卡壳，所述卡壳包括背卡和上盖，所述背卡设有两个平行的试纸卡卡槽，所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内，所述上盖设有两个测试窗和两个加样孔，所述两个测试窗的位置分别与两个试纸卡的检测线和质控线的位置相配合，所述两个加样孔的位置与两个试纸卡的样品垫的位置相配合。

[0024] 更优选的，所述卡壳为塑料卡壳。

[0025] 更优选的，所述两个加样孔之间还设有连接两个加样孔的横槽。

[0026] 优选的，所述检测试剂盒用于定量检测血清或血浆中高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的含量。

[0027] 本发明所提供的定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73、维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒，可配套免疫定量分析仪器使用。免疫分析仪器通过采集检测线 (T) 和质控线 (C) 条带荧光信号，计算 T/C 信号值。使用前先将不同标准品滴加到试纸卡上，分析处理建立定标曲线 (T/C 信号值与标准品真实值的关系)，再将检测样品时获得的 T/C 值与标准曲线比较，即可获得检测样品中的高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 含量。

[0028] 本发明第二方面提供所述定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

[0029] 1) 用荧光微球标记的高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体溶液分别喷涂各自对应的金标垫，制得分别包含高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体的金标垫；

[0030] 2) 在高尔基体糖蛋白 -73GP73 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体及羊抗鼠抗体；在维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体及羊抗鼠抗体；

[0031] 3) 将两套样品垫、步骤 1) 制备的两套金标垫、步骤 2) 制备的两套硝酸纤维素膜、两套吸水垫依次粘贴在底板上，裁制得检测试纸卡；最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0032] 优选的，本发明所述的各金标垫还经过预处理，预处理时所使用的预处理缓冲液

选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为 5-50mM。

[0033] 优选的,为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明所述的各金标垫在预处理时所使用的预处理缓冲液包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 — 7.5g/L,缓冲液的 pH 值为 7.2 — 7.6。

[0034] 优选的,各组分在缓冲液中的浓度为:

[0035]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0036] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0037] 所述预处理的具体步骤为:将金标垫在预处理液中浸泡 1.5 ~ 2h,取出放于 36 ~ 38℃ 烘干。

[0038] 所述预处理缓冲液可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0039] 本发明第三方面提供所述定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒在高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测领域的用途。

[0040] 本发明的有益效果为:

[0041] 本发明所提供的定量检测高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的检测试剂盒首次将高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 通过荧光微球免疫层析技术进行检测,兼具高灵敏性和高特异性,能够快速检测高尔基体糖蛋白 -73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的含量。此外,所述检测试剂盒具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点,受血清(或血浆)严重血脂、溶血干扰小,当血清(或血浆)血红蛋白≤ 500mg/L、甘油三酯≤ 30mg/dL 时,对准确度的影响变差< 10%。

具体实施方式

[0042] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0043] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0044] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0045] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001 ;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley& Sons, New York, 1987 and periodic updates ;the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego ;Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998 ;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin (P. M. Wasserman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999 ;和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, Chromatin Protocols (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999 等。

[0046] 实施例 1

[0047] 本发明试纸卡的制备 :

[0048] 1) 使用预处理缓冲液对金标垫进行预处理,预处理缓冲液为:水苏糖 2g/L,明矾 0.5g/L,果糖二磷酸钠 1.5g/L,六偏磷酸钠 0.3g/L,甘氨酸 1.88g/L 的水溶液, pH = 7.4, 预处理的具体步骤为:将金标垫在预处理液中浸泡 2h, 取出放于 37℃ 烘干;然后用荧光微球标记的高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体溶液分别喷涂各自对应的经预处理的金标垫, 制得分别包含高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体的金标垫;溶液中荧光微球与抗体的质量比为 5:1, 溶液的浓度为 10mg/ml, 喷涂量为 4ul/cm;

[0049] 2) 在高尔基体糖蛋白 -73GP73 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂高尔基体糖蛋白 -73GP73 抗体及羊抗鼠抗体;在维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂维生素 K 缺乏或拮抗剂 -II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体及羊抗鼠抗体;制得两种包被后的硝酸纤维素膜, 喷涂溶液的浓度为 1mg/ml, 喷涂量为 1ul/cm;

[0050] 3) 将两套样品垫、步骤 1) 制备的两套金标垫、步骤 2) 制备的两套硝酸纤维素膜、两套吸水垫依次粘贴在底板上, 切裁制得检测试纸卡;最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0051] 标准曲线 :

[0052] 分别将浓度为 0、2、5、20、60、100、200、400、600、800、1000ng/ml 的高尔基体糖蛋白 -73GP73 缓冲溶液滴加于样品垫上, 每个浓度设 5 个重复(检测结果取 5 个重复的平均值), 膜层析 10 分钟以后, 使用免疫分析仪器通过采集检测线 (T) 和质控线 (C) 条带荧光信号, 分析仪对荧光信号的检测范围是 AD 值 0~10000, 计算 T/C 信号值, 建立定标曲线, 其中 Y

轴为 T/C 信号值, X 轴为标准品真实值。

[0053] 分别将浓度为 0、1.0、1.5、2.0、5.0、20、100、200、500、800、1000ng/ml 的维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 缓冲溶液滴加于样品垫上, 每个浓度设 5 个重复(检测结果取 5 个重复的平均值), 膜层析 10 分钟以后, 使用免疫分析仪器通过采集检测线(T) 和质控线(C) 条带荧光信号, 分析仪对荧光信号的检测范围是 AD 值 0~10000, 计算 T/C 信号值, 建立定标曲线, 其中 Y 轴为 T/C 信号值, X 轴为标准品真实值。

[0054] 高尔基体糖蛋白-73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗干扰性和特异性的检测:

[0055] 将检测样品滴加于样品垫上, 每个样品设 5 个重复(检测结果取 5 个重复的平均值), 膜层析 10 分钟以后, 将检测样品时获得的 T/C 值与标准曲线比较, 获得检测样品中的高尔基体糖蛋白-73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 含量的检测数据, 再将检测获得的高尔基体糖蛋白-73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 含量数据与真实高尔基体糖蛋白-73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 含量数据进行对比, 获得准确度影响偏差值。

[0056] 样品 1:1ng/ml 高尔基体糖蛋白-73GP73、1.5ng/ml 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II、50mg/L 血红蛋白、50mg/dL 甘油三酯;

[0057] 样品 2:3ng/ml 高尔基体糖蛋白-73GP73、3ng/ml 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II、500mg/L 血红蛋白、10mg/dL 甘油三酯;

[0058] 样品 3:6ng/ml 高尔基体糖蛋白-73GP73、6ng/ml 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II、100mg/L 血红蛋白、20mg/dL 甘油三酯;

[0059] 样品 4:150ng/ml 高尔基体糖蛋白-73GP73、12ng/ml 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II、150mg/L 血红蛋白、30mg/dL 甘油三酯;

[0060] 样品 5:500ng/ml 高尔基体糖蛋白-73GP73、18ng/ml 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II、200mg/L 血红蛋白、40mg/dL 甘油三酯;

[0061] 空白对照:50mg/L 血红蛋白、50mg/dL 甘油三酯;

[0062] 样品 1~5 所获得的检测的高尔基体糖蛋白-73GP73 含量数据分别为 1.01ng/ml、2.99ng/ml、6.02ng/ml、149.99ng/ml、500.03ng/ml; 维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 含量数据分别为 1.49ng/ml、3.01ng/ml、5.99ng/ml、11.95ng/ml、18.02ng/ml; 准确度的影响变差 < 10%, 空白对照中检测时未发现明显荧光信号变化。

[0063] 实施例 2

[0064] 对比例试纸卡的制备:采用 25mM 甘氨酸缓冲液预处理金标垫, 其他试剂及实验方法均同实施例 1。

[0065] 1) 采用 25mM 甘氨酸缓冲液预处理金标垫, 然后用荧光微球标记的高尔基体糖蛋白-73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体溶液分别喷涂各自对应的经预处理的金标垫, 制得分别包含高尔基体糖蛋白-73GP73 抗体和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体的金标垫; 溶液中荧光微球与抗体的质量比为 5:1, 溶液的浓度为 10mg/ml, 喷涂量为 4ul/cm;

[0066] 2) 在高尔基体糖蛋白-73GP73 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂高尔基体糖蛋白-73GP73 抗体及羊抗鼠抗体; 在维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导

产生的蛋白 PIVKA-II 检测试纸卡的硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 抗体及羊抗鼠抗体；制得两种包被后的硝酸纤维素膜，喷涂溶液的浓度为 1mg/ml，喷涂量为 1ul/cm；

[0067] 3) 将两套样品垫、步骤 1) 制备的两套金标垫、步骤 2) 制备的两套硝酸纤维素膜、两套吸水垫依次粘贴在底板上，裁制得检测试纸卡；最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0068] 高尔基体糖蛋白-73GP73 和维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 的灵敏性和检测限对比实验：

[0069] 用荧光仪器进行判断，分析仪的对荧光信号的检测范围是 AD 值 0-10000，根据仪器的性能，CUTOFF 值为 50，在特定浓度下，90% 以上检测例 AD 值 ≥ 50 ，即认为试剂盒能够用于该浓度下的检测。

[0070] 采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本，空白样本应不含被测物。取 1 ~ 20pg/ml 梯度浓度的高尔基体糖蛋白-73GP73 已知样品进行灵敏性检测，每间隔 0.5pg/ml 设置一个梯度，每个梯度设置 40 个样本，记录检测结果。结果显示实施例 1 所制备的试剂盒的最低检测限为 2.5pg/ml；而实施例 2 制备的试剂盒的最低检测限高于 20pg/ml。

[0071] 采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本，空白样本应不含被测物。取 0.1 ~ 60ug/L 梯度浓度的维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导产生的蛋白 PIVKA-II 已知样品进行灵敏性检测，每间隔 0.2ng/ml 设置一个梯度，每个梯度设置 300 个样本，记录检测结果。结果显示实施例 1 所制备的试剂盒的最低检测限为 0.2ng/ml；而实施例 2 制备的试剂盒的最低检测限高于 60ug/L。

[0072] 综上所述，本发明所提供的检测试剂盒具有良好的抗干扰性和特异性，且具有很好的灵敏性，阴性本底更低，有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0073] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效，而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下，对上述实施例进行修饰或改变。因此，举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变，仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种GP73、PIVKA-II联合检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104459115A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410735789.5	申请日	2014-12-05
申请(专利权)人(译)	重庆干德生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆干德生物技术有限公司		
[标]发明人	陈亨宇		
发明人	陈亨宇		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/68		
代理人(译)	郭婧婧		
其他公开文献	CN104459115B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物检测领域，特别是涉及一种定量检测高尔基体糖蛋白-73 GP73、维生素K缺乏或拮抗剂-II诱导产生的蛋白PIVKA-II的检测试剂盒及其制备方法和用途。本发明所述检测试剂盒，包括互相独立的高尔基体糖蛋白-73 GP73检测试纸卡和维生素K缺乏或拮抗剂-II诱导产生的蛋白PIVKA-II检测试纸卡，所述检测试纸卡均各自包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫。本发明所提供的试剂盒首次将GP73和PIVKA-II通过荧光微球免疫层析技术进行检测，兼具灵敏性和特异性，具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点。

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;