(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111781364 B
(45)授权公告日 2023.07.21

(21)申请号 202010861495.2

(22)申请日 2020.08.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111781364 A

(43)申请公布日 2020.10.16

(73)专利权人 北京信诺卫康科技有限公司
地址 100163 北京市大兴区旧桥路1号院1号楼12层1502

(72)发明人 庄光磊 薛新颖 刘三宏 周小进 师凯旋 殷霞 张振峰

(74)专利代理机构 北京中和立达知识产权代理有限公司 11756
专利代理师 杨磊

(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

(56)对比文件
CN 104422768 A,2015.03.18
CN 103582815 A,2014.02.12
CN 103954761 A,2014.07.30
CN 107765013 A,2018.03.06
CN 111521807 A,2020.08.11
US 2020182878 A1,2020.06.11
WO 2014058394 A1,2014.04.17
WO 2016024915 A1,2016.02.18
R Wang.Development of a five-gene signature as a novel prognostic marker in ovarian cancer.Neoplasma.2019,66(3),全文.

审查员 陈亚文

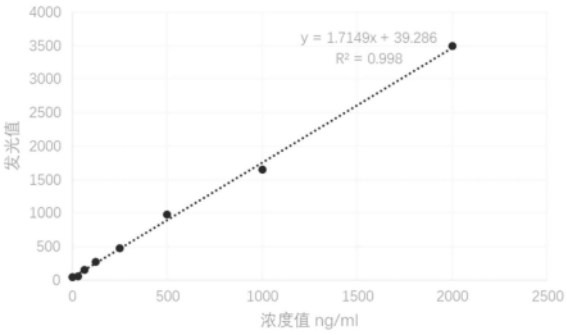
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

Wnt7a和HE4联合用作早期卵巢癌生物标志物以及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及Wnt7a和HE4联合用作早期卵巢癌生物标志物以及试剂盒，属于免疫检测技术领域。本发明公开了检测来自对象的样品中Wnt7a和HE4水平的试剂在制备用于预测、评价或诊断所述对象的早期卵巢癌的试剂盒中的用途。本发明还提供了用于预测、评价或诊断对象的早期卵巢癌的试剂盒，其能够有效用于卵巢癌的早期筛查，通过本发明提供的试剂盒，显著提高了对象中卵巢癌的预测、评价和诊断的灵敏度和特异性，极大地降低了早期卵巢癌检测中的假阳性率。



CN 111781364 B

1.检测来自对象的样品中Wnt7a和HE4水平的试剂在制备用于预测、评价或诊断所述对象的卵巢癌的试剂盒中的用途，其中，所述卵巢癌选自I期卵巢癌、II期卵巢癌或I期和II期卵巢癌二者，所述样品是来自所述对象的血液、血清、血浆；所述检测Wnt7a和HE4水平的试剂分别是针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体；所述针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体分别是针对Wnt7a的单克隆抗体和针对HE4的单克隆抗体；所述抗体的最佳工作浓度均为0.5 μg/mL。

2.根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述试剂盒是化学发光试剂盒，所述化学发光试剂盒包括捕获抗体、检测抗体以及化学发光底物。

3.根据权利要求2所述的用途，其特征在于，所述捕获抗体选自与磁微粒连接的Wnt7a单克隆抗体、与磁微粒连接的HE4单克隆抗体，及其组合；

所述检测抗体选自具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，及其组合；和/或，

所述化学发光底物是AMPPD。

4.用于预测、评价或诊断对象的卵巢癌的试剂盒，其包含检测样品中Wnt7a和HE4水平的试剂，

其中，所述卵巢癌选自I期卵巢癌、II期卵巢癌或I期和II期卵巢癌二者，所述样品是来自所述对象的血液、血清、血浆。

5.根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述检测Wnt7a和HE4水平的试剂分别是针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体。

6.根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于，所述针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体分别是针对Wnt7a的单克隆抗体和针对HE4的单克隆抗体。

7.根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒是化学发光试剂盒，所述化学发光试剂盒包括捕获抗体、检测抗体以及化学发光底物，其中：

所述捕获抗体选自与磁微粒连接的Wnt7a单克隆抗体、与磁微粒连接的HE4单克隆抗体，及其组合；

所述检测抗体选自具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，及其组合；和/或，

所述化学发光底物是AMPPD。

8. 根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括2个试剂亚组，

其中，亚组I包含：包被有针对Wnt7a的单克隆抗体的磁微粒、具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体，和化学发光底物AMPPD；并且

其中亚组Ⅱ包含：包被有针对HE4的单克隆抗体的磁微粒、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，和化学发光底物AMPPD。

Wnt7a和HE4联合用作早期卵巢癌生物标志物以及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明大体上涉及免疫检测技术领域，具体涉及将Wnt7a和HE4组合用作早期卵巢癌生物标志物，以及由其制得的试剂盒。

背景技术

[0002] 卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一，对女性生命造成严重威胁。由于卵巢深居盆腔，体积小，发病时缺乏典型症状，因而，卵巢癌的早期诊断较为困难，已成为技术难题。临床发现时，常常已经发展至中晚期。而发展至中晚期，尤其在发生转移之后，即便通过卵巢上皮癌手术进行治疗，其复发率和5年生存率均较低。因此，卵巢癌的早期诊断对于降低转移、提高5年生存率具有重要意义。目前在临床上，卵巢癌的诊断主要依据阴道超声检查(TVU)和血液中卵巢癌标志物的检测。对于卵巢癌标志物，尽管中华医学会妇科肿瘤学分会推荐HE4与CA125的联合应用(专利文献1和2)，然而，单一HE4对I期卵巢癌辅助诊断的灵敏度比CA125更高，但也仅为45.9％；而HE4和CA125联合检测的灵敏度在I期卵巢癌中并未得到提升(参见Moore RG,Brown AK,MillerMC等,The use ofmultiple novel tumorbiomarkers forthe detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass.Gynecol Oncol,2008,108:402-408)。

[0003] 因此，仍然缺乏准确可靠的肿瘤标志物用于卵巢癌早期的诊断，急需开发一些新的具有诊断价值的卵巢癌血清标志物。理想的标志物需要在卵巢癌恶变的早期阶段即能敏感和特异性地从外周血中检出。

[0004] 市售试剂盒大多采用ELISA法，其原理是：将CA125抗体包被于96孔微孔板中，制成固相载体，向微孔中分别加入标准品或标本，其中的CA125与连接于固相载体上的抗体结合，然后加入生物素化的CA125抗体，将未结合的生物素化抗体洗净后，加入HRP标记的亲和素，再次彻底洗涤后加入TMB底物显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的CA125呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(O.D.值)，计算样品浓度。然而，该方法受到较大的操作者主观影响。需要提供一种减少人为误差的检测试剂盒。

[0005] 生物标志物“Wnt7a”是由19个分泌糖蛋白组成的Wnt家族的一种39kDa的分泌型糖蛋白。Wnt7a在uniprot.org中登录号为UniProtKB-O00755(WNT7A_HUMAN)。Wnt7a蛋白在人中由WNT7A基因编码，长度为349个氨基酸。该蛋白通常在肺、睾丸、淋巴结和脑中表达，通过Wnt/β-catenin信号通路参与调控细胞的生命活动。已知Wnt7a在不同类型的恶性肿瘤中表现出不同的表达模式。然而，从未公开过将HE4和Wnt7a联合用于早期卵巢癌诊断的生物标志物。

[0006] 【参考文献】

[0007] [专利文献1]:CN108008132A;

[0008] [专利文献2]:CN103954761A。

发明内容

[0009] 本发明一般性地涉及早期卵巢癌生物标志物，并且特别地涉及通过测量生物标志物组合Wnt7a和HE4的水平来预测、评价和诊断早期卵巢癌的方法和应用，并且还提供用于预测、评价和诊断早期卵巢癌的试剂盒。本发明提供的方法和试剂盒特别地用于上皮性卵巢癌，并且更特别地用于早期卵巢癌(即I期或II期卵巢癌)，从而提供了一种便于操作、灵敏度高、特异性高、能够有效地用于卵巢癌的早期筛查的方法和试剂盒。为了实现本发明的上述目的，本发明采用如下技术方案：

[0010] 在一个方面中，本发明提供了检测来自对象的样品中Wnt7a和HE4水平的试剂在制备用于预测、评价或诊断所述对象的早期卵巢癌的试剂盒中的用途。在一些实施方案中，所述卵巢癌选自I期卵巢癌、II期卵巢癌或I期和II期卵巢癌二者。

[0011] 在一些实施方案中，所述检测Wnt7a和HE4水平的试剂分别是针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体。优选地，所述针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体分别是针对Wnt7a的单克隆抗体和针对HE4的单克隆抗体。

[0012] 在一些实施方案中，所述样品是来自所述对象的生物流体样品。优选地，所述样品是来自所述对象的血液、血清、血浆、淋巴、脑脊液、腹水、尿和组织活检物。更优选地，所述样品是来自所述对象的血液、血清和血浆。

[0013] 在一些实施方案中，所述试剂盒是化学发光试剂盒。优选地，所述化学发光试剂盒包括捕获抗体、检测抗体以及化学发光底物。

[0014] 在一些实施方案中，所述捕获抗体选自与磁微粒连接的Wnt7a单克隆抗体、与磁微粒连接的HE4单克隆抗体，及其组合。可选地，所述检测抗体选自具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，及其组合。可选地，所述化学发光底物是AMPPD(CAS No:122341-56-4)。

[0015] 在另一个方面中，本发明提供了一种用于预测、评价或诊断对象的卵巢癌的试剂盒，其包含检测样品中Wnt7a和HE4水平的试剂。

[0016] 优选地，所述卵巢癌选自I期卵巢癌、II期卵巢癌或I期和II期卵巢癌二者。

[0017] 在一些实施方案中，所述检测Wnt7a和HE4水平的试剂分别是针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体。优选地，所述针对Wnt7a的抗体和针对HE4的抗体分别是针对Wnt7a的单克隆抗体和针对HE4的单克隆抗体。

[0018] 在一些实施方案中，所述样品是来自所述对象的生物流体样品。优选地，所述样品是来自所述对象的血液、血清、血浆、淋巴、脑脊液、腹水、尿和组织活检物。更优选地，所述样品是来自所述对象的血液、血清和血浆。

[0019] 在一些实施方案中，所述试剂盒是化学发光试剂盒。在一些实施方案中，所述试剂盒是诊断试剂盒。优选地，所述化学发光试剂盒包括捕获抗体、检测抗体以及化学发光底物。

[0020] 在一些实施方案中，所述捕获抗体选自与磁微粒连接的Wnt7a单克隆抗体、与磁微粒连接的HE4单克隆抗体，及其组合。可选地，所述检测抗体选自具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，及其组合。可选地，所述化学发光底物是AMPPD。

[0021] 在一些实施方案中，所述试剂盒包括2个试剂亚组，其中，亚组1包含：包被有针对

Wnt7a的单克隆抗体的磁微粒、具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体，和化学发光底物AMPPD;并且

[0022] 其中亚组2包含：包被有针对HE4的单克隆抗体的磁微粒、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，和化学发光底物AMPPD。

[0023] 在本申请的另一方面中，还提供了预测、评价或诊断对象中卵巢癌的存在及其发展阶段的方法，包括对来自所述对象的样品中Wnt7a和HE4水平进行检测。在一些实施方案中，可以通过如以上方面中所提供的试剂盒来检测对象的样品中Wnt7a和HE4的水平。可选地，可将所检测到的对象的样品中Wnt7a和HE4的水平与由未患病群体中所获得的Wnt7a和HE4水平值(即，标准值)进行比较，以确定所述对象中卵巢癌是否存在及其发展阶段。

[0024] 有益效果

[0025] 本发明联合使用Wnt7a和HE4作为卵巢癌筛选和诊断的新标志物。本发明人已经证实，在卵巢癌患者组与健康对照组之间，血清中Wnt7a和HE4水平均具有显著性差异(P<0.01)，并且在卵巢癌患者组的中，血清Wnt7a和HE4水平之间存在相关性(r＝0.794)。通过将Wnt7a和HE4检测试剂联合用作诊断卵巢癌的标志物，与单独检测其中一种标志物相比，本发明提供的卵巢癌诊断方法和试剂盒的灵敏度和特异性均得到显著提高(灵敏度为84.8%&特异性为91.8%)，极大地降低了假阳性率，提供了一种以低误诊率、降低的人为误差和提高的准确性进行早期卵巢癌筛查的方法和相应的化学发光检测试剂盒。

附图说明

[0026] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚，本发明提供如下附图：

[0027] 图1示出了化学发光法检测Wnt7a蛋白的标准曲线。

[0028] 图2示出了化学发光法检测HE4蛋白的标准曲线。

具体实施方式

[0029] 下面将结合附图，对本发明的优选实施例进行详细的描述。本发明涉及的一些术语解释如下。

[0030] 生物标志物“HE4”，即人附睾分泌蛋白(Human epididymis secretoryprotein E4，HE4)属于乳清酸性4-二硫化中心(WFDC)蛋白家族，具有疑似胰蛋白酶抑制剂的特性。HE4是1991年由Kirchhoff等发现于附睾上皮组织的一种分泌型糖蛋白，是精子成熟过程中的蛋白酶抑制剂，在正常女性中也有表达。目前采用HE4或其与CA125的组合进行卵巢癌的早期诊断。在本文中，生物标志物“HE4”意指与NCBI登录号CAA44869具有至少85％序列同一性的多肽生物标志物或其片段。

[0031] 生物标志物“Wnt7a”是由19个分泌糖蛋白组成的Wnt家族的一种39kDa的分泌型糖蛋白。Wnt7a在uniprot.org中登录号为UniProtKB-000755(WNT7A_HUMAN)。Wnt7a蛋白在人中由WNT7A基因编码，长度为349个氨基酸。该蛋白通常在肺、睾丸、淋巴结和脑中表达，通过Wnt/β-catenin信号通路参与调控细胞的生命活动。Wnt信号通路对多种正常组织和癌组织的细胞增殖和分化起着重要的调控作用，已经发现Wnt信号通路在胚胎发育中起重要作用，包括肢体发育、骨骼发育和泌尿生殖道发育期间的背侧和腹侧模式，是中枢神经系统(CNS)血管生成和血脑屏障调节所必需的。在本文中，“Wnt7a”意指与NCBI登录号BAA82509具有至

少85％序列同一性的多肽生物标志物或其片段。具体地，根据登录号BAA82509的Wnt7a全长氨基酸序列如下所示：MNRKARRCLGHLFLSLGMVYLRIGGFSSVVALGASIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAIIVIGEGSQMGLDECQFQFRNGRWNCSALGERTVFGKELKVGSREAAFTYAIIAAGVAHAITAACTQGNLSDCGCDKEKQGQYHRDEGWKWGGCSADIRYGIGFAKVFVDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKLECKCHGVSGSCTTKTCWTTLPQFRELGYVLKDKYNEAVHVEPVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPMDTDLVYIEKSPNYCEEDPVTGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCKFHWCCYVKCNTCSERTEMYTCK。

[0032] 在本文中，预测、评价或诊断的卵巢癌类型是浆液性肿瘤、子宫内膜样肿瘤、粘液性肿瘤和透明细胞肿瘤。并且，预测、评价或诊断卵巢癌包括预测疾病的具体分期，例如I期(IA、IB或IC)、II期、III期和IV期肿瘤。另外地，“卵巢癌的早期阶段”或“早期卵巢癌”意指处于I期或II期的卵巢癌。“诊断”意指鉴定病症(即，卵巢癌)的存在或性质。诊断方法在其灵敏度和特异性上有不同。诊断测定的“灵敏度”是群体中，测试为阳性的患病个体占总患病个体的百分比。诊断测定的“特异性”是1减去假阳性率，其中“假阳性”率是指测试为阳性但实际上未患病的个体的比例。

[0033] “化学发光试剂盒”意指利用化学发光酶免疫分析(Chemiluminescent enzyme immunoassay，cLEIA)对生物标志物的水平进行测定的试剂盒。具体地，在化学发光酶免疫分析中，以酶标记生物活性物质进行免疫反应，免疫反应复合物上的酶再作用于发光底物，在信号试剂作用下发光，然后用发光信号测定仪进行发光测定，从而对来自对象的样品中的生物标志物水平进行定量分析。

[0034] 在本申请的一些实施方案中，本申请的试剂盒包括捕获抗体、检测抗体以及化学发光底物。具体地，捕获抗体的制备可通过在适当的反应条件下，在偶联液的存在下，将针对目标生物标志物的单克隆抗体与磁微粒进行连接而获得。有利地，可通过在偶联液的存在下，用适当浓度的鼠抗人Wnt7a单克隆抗体，于37℃下包被羧基磁微粒2小时，或者于4℃下包被磁微粒过夜，来制备鼠抗人Wnt7a单克隆抗体包被的磁微粒，从而得到捕获抗体。

[0035] 进一步地，检测抗体可以是具有碱性磷酸酶标记的Wnt7a单克隆抗体、具有碱性磷酸酶标记的HE4单克隆抗体，及其组合。可选地，所述化学发光底物是AMPPD。

[0036] 需要注意的是，尽管可以通过本领域已知的其他方法来检测样品中生物标志物的水平，例如但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)，免疫荧光层析，电化学发光等，然而，本发明人出乎意料地发现，当将化学发光法与本申请的生物标志物HE4和Wnt7a相组合时，能够至少实现以下优势：

[0037] 1.以高灵敏度(例如，10-22mol/L)检出早期卵巢癌患者。这远远高于其他免疫分析方法(如放射免疫分析和酶联免疫分析)的检测限。

[0038] 2.具有宽的线性动力范围。在本申请的方法和试剂盒中，发光强度在4-6个量级之间与测定物质浓度间呈线性关系。这一范围远远大于酶免分析中吸光度(OD值)的线性范围(2.0)。

[0039] 3.结果稳定，误差小，样品直接发光，不需要任何光源照射，消除了诸多可能因素(光源稳定性、光散射、光波选择器等)给分析带来的影响，使分析灵敏稳定更加可靠。

[0040] 因此，化学发光法与本申请的生物标志物HE4和Wnt7a的组合具有上述优势。

[0041] 实施例

[0042] 实施例所用产品购置信息如下，但并不局限于同一制造商。

[0043] 鼠抗人Wnt7a单克隆抗体(包被抗体):货号MAB3008,以商品名人Wnt-7a抗体购自R&D。

[0044] 鼠抗人Wnt7a单克隆抗体(检测抗体):货号sc-365665,以商品名Wnt-7a抗体购自SANTACRUZ。

[0045] Wnt7a蛋白标准品:货号3008-WN,以商品名重组人Wnt-7a蛋白购自R&D。

[0046] 鼠抗人HE4单克隆抗体(包被抗体),货号HE4-McAb1#,以商品名HE4购自菲鹏生物。

[0047] 鼠抗人HE4单克隆抗体(检测抗体),货号HE4-McAb2#,以商品名HE4购自菲鹏生物。

[0048] HE4蛋白标准品:货号HE4-Ag,以商品名HE4购自菲鹏生物。

[0049] 磁微粒:货号:MagCOOH,以商品名羧基磁珠购自苏州知益微球科技有限公司。

[0050] 碱性磷酸酶:货号:SP011401,以商品名碱性磷酸酶购自国药试剂。

[0051] AMPPD:CAS号122341-56-4,即4-甲氧基-4-(3-磷酸酰苯基)螺[1,2-二氧环乙烷-3,2'-金刚烷],为碱性磷酸酶底物,以商品名化学发光底物购自北京科跃中楷。

[0052] Tween-20:以商品名吐温-20购自生工生物。

[0053] 实施例1.建立Wnt7a检测体系及其优化

[0054] 检测体系构建:用浓度为5μg/mL的上述鼠抗人Wnt7a单克隆抗体,于37℃下包被磁珠2小时,或者于4℃下包被磁珠过夜,从而制备鼠抗人Wnt7a单克隆抗体包被的磁珠,即捕获抗体;再将浓度为2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0ng/ml的Wnt7a蛋白标准品和血清样品分别加入不同封闭板中,于37℃下反应30分钟;然后加入浓度为0.5μg/mL的碱性磷酸酶标记的鼠抗人Wnt7a单克隆抗体(即,检测抗体),在37℃下反应30分钟,清洗磁珠,去上清;最后加入发光底物AMPPD,测量发光值。根据由不同浓度标准品值得到的反应体系的发光值,构建Wnt7a蛋白标准曲线,结果如图1所示。由图1可见,Wnt7a检测体系的线性范围为15ng/mL-2000ng/mL,在线性范围内标准品线性相关系数r≥0.990,回收率在90%～110%范围内。

[0055] 检测体系确定:通过棋盘方阵法来对不同浓度的抗体进行检测,通过检测,发现上述Wnt7a捕获抗体的最佳工作浓度为5μg/mL,Wnt7a检测抗体最佳工作浓度为0.5μg/mL。

[0056] 实施例2.Wnt7a化学发光检测试剂盒

[0057] 根据实施例1中建立Wnt7a血清检测体系构建Wnt7a化学发光检测试剂盒,具体组分如表1所示:

[0058] 表1.Wnt7a化学发光检测试剂盒组分

[0059]

序号	组分	备注
1	磁珠	包被有 Wnt7a 的单克隆抗体(浓度为 2.5 μg/mL)
2	酶标抗体	含浓度为 0.25 μg/mL 的 AP 标记的鼠抗人 Wnt7a 单克隆抗体
3	校准品	浓度为 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、0 ng/ml 的 Wnt7a 蛋白
4	稀释液	含质量分数为 1%的 BSA、1×PBS（PH7.2）、0.05%的 Tween-20
5	洗涤浓缩液	25×PBST（体积分数为 1‰的 Tween-20）
6	AMPPD 底物溶液	浓度为 0.1 mg/mL 的 AMPPD
7	质控品	浓度为 250 ng/mL 的 Wnt7a 蛋白

[0060] 评价Wnt7a化学发光检测试剂盒:使用Wnt7a化学发光检测试剂盒检测Wnt7a阳性质控品,分别在Wnt7a蛋白浓度为125ng/mL和1000ng/mL两个水平重复检测10次,结果显示变异系数CV≤10%;用3个批号试剂盒检测同一样本,则3个批号试剂盒的批间变异系数CV≤12%。

[0061] 实施例3.建立HE4血清检测反应体系及其优化

[0062] 用浓度为5μg/mL的鼠抗人HE4单克隆抗体包被磁珠,37℃条件下2小时或者4℃条件下包被过夜;再将浓度为0pmol/L、20pmol/L、40pmol/L、80pmol/L、160pmol/L、320pmol/L、640pmol/L的HE4蛋白标准品和血清样品分别加入封闭板中,于37℃反应30分钟;然后用浓度为0.5μg/mL碱性磷酸酶标记的鼠抗人HE4单克隆抗体,在37℃条件下反应30分钟,清洗磁珠去上清;最后加入发光底物AMPPD,测量发光值。根据由不同浓度标准品值得到的反应体系的发光值,构建HE4的标准曲线,结果如图2所示。由图2可知,HE4化学发光检测试剂盒线性范围为20pmol/L-640pmol/L,在线性范围内标准品线性相关系数r≥0.990,回收率在90%～110%范围内。

[0063] 检测体系确定:与实施例2中的棋盘方阵法类似,通过对不同浓度的抗体进行检测,发现自制HE4捕获抗体的最佳工作浓度为5μg/mL,HE4检测抗体最佳工作浓度为0.5μg/mL。

[0064] 通过以上研究确定了检测体系的主要组分,然后建立了HE4血清检测体系。

[0065] 实施例4.HE4化学发光检测试剂盒

[0066] 根据实施例3中建立HE4血清检测体系构建HE4化学发光检测试剂盒,具体组分如下表2所示:

[0067] 表2.HE4化学发光检测试剂盒组分

[0068]

序号	组分	备注
1	磁微粒	包被有 HE4 的单克隆抗体（浓度为μg/mL）
2	酶标抗体	含浓度为 0.25 μg/mL 的 AP 标记的鼠抗人 HE4 单克隆抗体

[0069]

3	校准品	浓度为 0 pmol/L、20 pmol/L、40 pmol/L、80 pmol/L、160 pmol/L、320 pmol/L、640 pmol/L 的 HE4 蛋白
4	稀释液	含质量分数为 1%的 BSA、1×PBS（PH 7.2）、0.05%的 Tween-20
5	洗涤浓缩液	25×PBST（体积分数为 1‰的 Tween-20）
6	AMPPD 底物溶液	浓度为 0.1 mg/mL 的 AMPPD
7	质控品	浓度为 80 pmol/L 的 HE4 蛋白

[0070] 评价HE4化学发光检测试剂盒：使用HE4化学发光检测试剂盒检测HE4重复性参考品，分别在HE4蛋白浓度为40pmol/L和80pmol/L两个水平重复检测10次，结果显示变异系数CV≤10％；用3个批号试剂盒检测同一样本，则3个批号试剂盒的批间变异系数CV≤15％。

[0071] 实施例5.人卵巢癌标志物Wnt7a-HE4联合检测试剂盒

[0072] 将实施例2中构建的Wnt7a化学发光检测试剂盒与实施例4中构建的HE4化学发光检测试剂盒组合构成Wnt7a-HE4联合检测试剂盒。

[0073] 实施例6.Wnt7a-HE4联合检测试剂盒诊断和预示早期卵巢癌

[0074] 收集100例临床样本，其中正常人群样本22例，早期卵巢癌病人样本78例，每例血清1mL。在78例卵巢癌患者中，24例为I期卵巢癌患者，54例为II期卵巢癌患者。分别检测卵巢癌患者和健康正常人血清中Wnt7a和HE4标志物的浓度，并根据检测结果利用SPASS统计软件对所得数据进行分析，如不同组间差异有统计学意义，则进行独立样本t检验，结果以x±s表示；对各组的Wnt7a与HE4进行相关性分析，以P<0.05为差异有统计学意义。最后，根据数据统计单独或联合检测Wnt7a和HE4标志物的特异性和灵敏度，结果如表3所示。

[0075] 如下表3可见，卵巢癌组血清HE4(514.56±184.12)pmol/L；Wnt7a(979±484.6)ng/mL，两者均高于健康对照组HE4(62.51±46.38)pmol/L；Wnt7a(566±200.49)ng/mL，进行统计学处理，差异有统计学意义(p<0.01)。

[0076] 表3.卵巢癌组和健康对照组血清HE4和Wnt7a检测结果(X±S)

[0077]

组别	n	血清 HE4（pmol/L）	Wnt7a（ng/mL ）
健康对照组	22	62.51±46.38	566±200.49

[0078]

卵巢癌	78	514.56±184.12	979±484.6

[0079] 注：卵巢癌组与健康对照组相比较，P＜0.05；血清HE4在卵巢癌组与健康对照组之

间的比较,P＜0.05,血清Wnt7a水平在卵巢癌组与健康对照组之间的比较,P＜0.05。

[0080] 同时,在卵巢癌组HE4和Wnt7a水平之间存在相关性(r＝0.794),而健康对照组HE4和Wnt7a水平之间无显著相关性(r＝0.072),结果见表4。

[0081] 表4.卵巢癌组和健康对照组的HE4和Wnt7a之间相关性比较

[0082]

组别	n	血清HE4(pmol/L)	Wnt7a(ng/mL)	相关系数r
健康对照组	22	62.51±46.38	566±200.49	0.072
卵巢癌	78	514.56±184.12	979±484.6	0.794

[0083] 注:在卵巢癌组HE4和Wnt7a水平之间存在显著相关性(r＝0.794),而健康对照组HE4和Wnt7a水平之间无显著相关性(r＝0.072)。

[0084] 进一步地,通过对卵巢癌诊断案例的灵敏度和特异性分析可知:单独检测Wnt7a标志物的灵敏度为72.7%,特异性为85.6%;单独检测HE4标志物的灵敏度为77.1%,特异性为80%。将Wnt7a和HE4两种标志物联合检测时灵敏度为84.8%,特异性为91.8%(参见下表5)。由此可知,使用Wnt7a和HE4两种标志物联合检测显著优于单一卵巢癌标志物检测。

[0085] 表5.Wnt7a-HE4联合检测试剂盒诊断卵巢癌结果

[0086]

标志物	灵敏度	特异性
Wnt7a	72.7%	85.6%
HE4	77.1%	80%
Wnt7a+HE4	84.8%	91.8%

[0087] 注:使用Wnt7a和HE4两种标志物联合检测,从灵敏度和特异性来看,显著优于单一卵巢癌标志物检测。

[0088] 综上所述,Wnt7a和HE4可以作为诊断和预示早期卵巢癌的标志物,能够用于卵巢癌的早期诊断,提高早期预测的准确性。

[0089] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

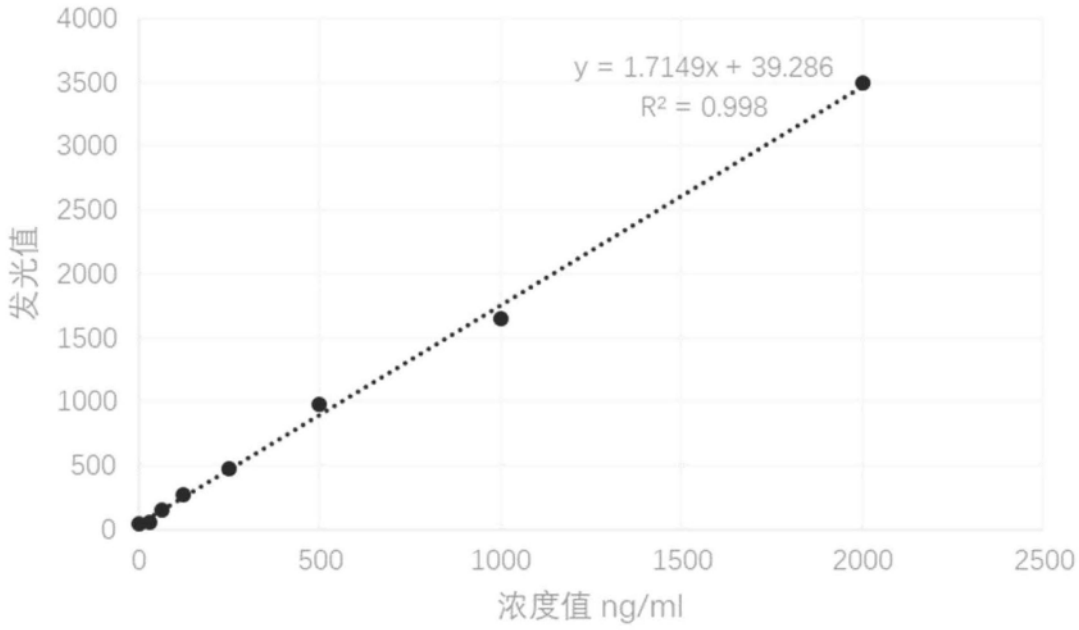

y = 1.7149x + 39.286
R² = 0.998
发光值
浓度值 ng/ml
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000

图1

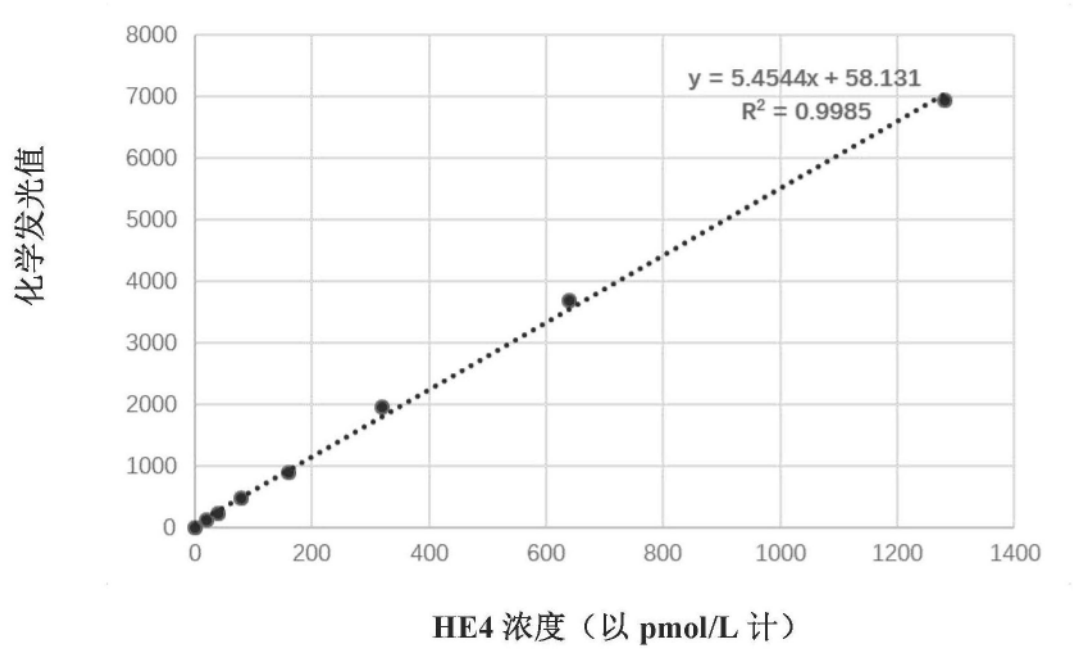

y = 5.4544x + 58.131
R² = 0.9985
化学发光值
HE4 浓度（以 pmol/L 计）
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
200
400
600
800
1000
1200
1400

图2