

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2011 年 8 月 18 日 (18.08.2011)



(10) 国际公布号
WO 2011/097933 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 30/02 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/080483
- (22) 国际申请日: 2010 年 12 月 30 日 (30.12.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010108382.1 2010 年 2 月 10 日 (10.02.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院 (INTERNATIONAL COOPERATION LABORATORY ON SIGNAL TRANSDUCTION, EASTERN HEPATOBIILIARY SURGERY INSTITUTE, THE SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市长海路 225 号, Shanghai 200438 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王文昭 (WANG, Wen-zhao) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。谈治雄 (TAN, Yexiong) [CN/CN]; 中国上海市长海路 225 号, Shanghai 200438 (CN)。尹佩源 (YIN, Peiyuan) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。洪毅 (HONG, Yi) [CN/CN]; 中国上海市长海路 225 号, Shanghai 200438 (CN)。路鑫 (LU, Xin) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。汤靓 (TANG, Liang) [CN/CN]; 中国上海市长海路 225 号, Shanghai 200438 (CN)。王红阳 (WANG, Hongyang) [CN/CN]; 中国上海市长海路 225 号, Shanghai 200438 (CN)。许国旺 (XU, Guowang) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

[续页]

(54) Title: KIT FOR DETECTING GLYCOCHENODEOXYCHOLATE-3-SULFATE AND GLYCOCHENODEOXYCHOLATE IN BLOOD

(54) 发明名称: 检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸的试剂盒

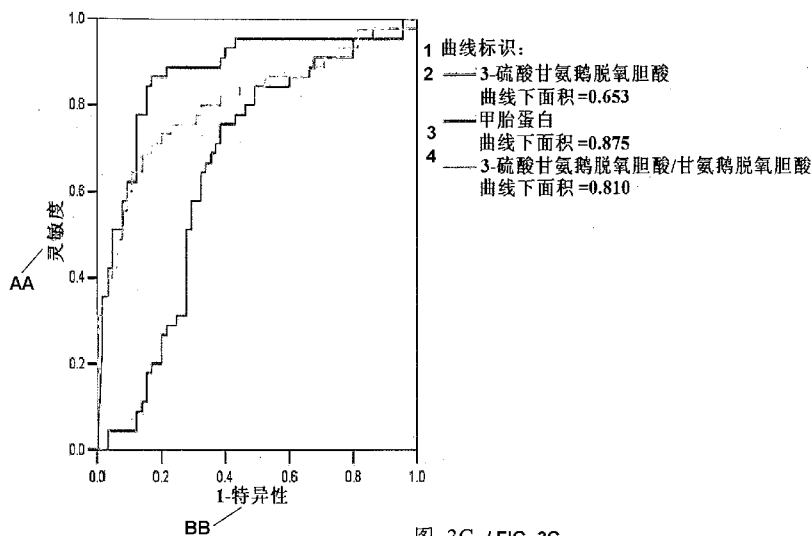


图 3C / FIG. 3C

1: SOURCE OF THE CURVE
2: GDCS
AUC=0.653
3: AFP
AUC=0.875
4: GDCS/GCDCA
AUC=0.810
AA SENSITIVITY
BB 1-SPECIFICITY

(57) Abstract: A kit for detecting glycochenodeoxycholate-3-sulfate and glycochenodeoxycholate in blood is provided. The kit consists of isotope standard of leucine enkephalin (Lep) or bile acid as the inner standard, ammonium acetate or ammonium formate or ammonium bicarbonate as the buffer solution with pH 4.0-8.0, and acetonitrile or methanol as the eluent.

[续页]



(74) 代理人: 沈阳科苑专利商标代理有限公司 (SHENYANG PATENT & TRADEMARK AGENCY ACADEMIA SINICA); 中国辽宁省沈阳市和平区三好街 24 号, Liaoning 110004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

本发明公开了一种检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸的试剂盒, 该试剂盒由内标异亮氨酸鸟菲肽, 缓冲液醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵和乙腈组成。使用该试剂盒检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸的方法具有检测成本低, 重复性好, 稳定性高, 快速高效的特点; 测定一个实际样本只需 19 分钟, 适于临床应用。

检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸的试剂盒

技术领域

本发明涉及分析化学和医学领域，是一种基于检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸（GCDCS 和 GCDCA）的试剂盒对人血液进行超高效液相色谱质谱联用高温高速分析，以快速定量测定血中 GCDCS 和 GCDCA 的技术。

背景技术

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。肝癌或者起始于肝脏本身，或者来源于身体其他癌症细胞的转移作用。原发性肝癌是指肝细胞或肝内胆管细胞发生的恶性肿瘤，起始于肝脏的原发性肝癌的发病率一直是肝脏恶性肿瘤之首。在恶性肿瘤死亡率中仅次于胃癌和食道癌而居第三位，在部份地区的农村中则占第二位，仅次于胃癌。我国每年死于肝癌约 11 万人，占全世界肝癌死亡人数的 45%。近年来，我国原发性肝癌的发病率、死亡率有上升趋势，而农村明显高于城市。

在我国，肝癌主要和乙型、丙型肝炎病毒感染以及肝硬化等疾病相关。肝癌的早期症状经常不明显，多数病人无症状，体检亦缺乏肿瘤本身的体征，此期称之为亚临床阶段。肝癌一旦出现症状，表示患者大多已进入中晚期。目前，中晚期肝癌缺乏有效治疗手段。因此，肝癌的早期诊断非常重要，如积极综合治疗，可使肝癌的五年生存率有显著性提高。一般影像学检查和体格检查作用有限，往往到了中、晚期才能够发现和确诊，缺少预警价值。随着分子生物学的不断发展，多种新型标志物不断发现，提高了肝癌在亚临床阶段的早期诊断率，使治疗效果得到改善。目前最常用的肝癌血清标志物为甲胎蛋白（AFP）。然而甲胎蛋白（AFP）血清水平在诊断肝癌时存在敏感性和特异性较低的缺点，单独用于确诊时的检出率一般只有 50%-75%左右。因此，为了提高临床诊断的灵敏度和特异性，开发新的检测方法势在必行。

胆汁酸是由肝实质细胞在线粒体中以胆固醇为原料直接合成的，经输胆管运输后在胆囊中浓缩，是存在于胆汁中的一大类胆烷酸的总称。作为胆固醇代谢的主要产物，胆汁酸具有类似的固醇核心结构和不同结合体的支链结构。人体内主要含有 5 种游离型胆汁酸以及 10 种其与甘氨酸、牛磺酸结合的结合型胆汁酸；同时，人体内也含有少量的 3 羟基位结合的单硫酸化胆汁酸。胆汁酸一直被认为仅具有促进脂类的消化和吸收、维持胆汁酸分泌的动态平衡、抑制胆固醇在胆汁中析出沉淀而形成胆结石以及在病毒性肝炎和胆道堵塞等疾病中辅助诊断等生理功能。近年来，胆汁酸越来越引起人们的重视，其被认为是一种多功能的重要信号分子，在能量动态平衡（文献 1：Watanabe, M.; Houten, S. M.; Matak, C.; Christoffolete, M. A.; Kim, B. W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J. W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A. C.; Auwerx, J. Nature 2006, 439, 484-489. 文献 2：Baxter, J. D.; Webb, P. Nature 2006, 439,

402-403.)、磷脂代谢(文献 3: Martin, F. P. J.; Dumas, M. E.; Wang, Y. L.; Legido-Quigley, C.; Yap, I. K. S.; Tang, H. R.; Zirah, S.; Murphy, G. M.; Cloarec, O.; Lindon, J. C.; Sprenger, N.; Fay, L. B.; Kochhar, S.; van Bladeren, P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Molecular Systems Biology* 2007, 3, 16.文献 4: Bilz, S.; Samuel, V.; Morino, K.; Savage, D.; Choi, C. S.; Shulman, G. I. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006, 290, E716-E722.)、糖代谢(文献 5: Nguyen, A.; Bouscarel, B. *Cellular Signalling* 2008, 20, 2180-2197.文献 6: Brinton, E. A. *Diabetes Obesity & Metabolism* 2008, 10, 1004-1011.)以及细胞增殖或凋亡(文献 7: Metalli, V. D.; Mancino, M. G.; Mancino, A.; Torrice, A.; Gatto, M.; Attili, A. F.; Alpini, G.; Alvaro, D. *Digestive and Liver Disease* 2007, 39, 654-662.文献 8: Ramalho, R. M.; Viana, R. J. S.; Low, W. C.; Steer, C. J.; Rodrigues, C. M. P. *Trends in Molecular Medicine* 2008, 14, 54-62.)等整合调节中起重要作用。近年来,随着人们对肿瘤学认知的不断加深,恶性肿瘤被更多的认为是一种系统性的慢性疾病。以原发性肝癌为例,其多由肝炎肝硬化等慢性疾病发展而成。当人体遭受肝胆疾病尤其是恶性肿瘤侵袭时,肝脏的基本单位——肝实质细胞的代谢将受到癌症刺激而使胆汁酸的代谢发生变化。虽然血清总胆汁酸(TBA)含量已被广泛应用于病毒性肝炎和肝硬化等慢性疾病的辅助诊断当中,但其在肝癌诊断中的作用极为微小。并且因为血清总胆汁酸含量是基于 3 羟基固醇酶法测定的,其并不能反映当人体遭受原发性肝癌时,体内各个胆汁酸的变化情况。有鉴于此,测定血中各胆汁酸的含量变化情况有利于我们了解肝细胞的代谢变化,以便找出有效的潜在标志物以开发和建立检测肝癌的新方法。

目前检测胆汁酸的常用方法有:酶法、核磁共振、气相色谱和液相色谱以及与其联用的紫外吸收、荧光散射、质谱等。临床酶法可快速检测总胆汁酸,却不能准确定量各个单独胆汁酸的含量(文献 9 Mashige, F.; Tanaka, N.; Maki, A.; Kamei, S.; Yamanaka, M. *Clinical Chemistry* 1981, 27, 1352-1356.);核磁共振技术虽然具有快速和无偏向性的特点,但与其它技术相比灵敏度太低且花费较大;气相色谱及其质谱联用技术预处理过程冗繁,且结合型胆汁酸易分解为游离型胆汁酸(文献 10: Keller, S.; Jahreis, G. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 813, 199-207.文献 11: Roda, A.; Piazza, F.; Baraldini, M. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1998, 717, 263-278.文献 12: Makino, I.; Shinozak.K; Nakagawa, S.; Mashimo, K. *Journal of Lipid Research* 1974, 15, 132-138.);常规液相色谱技术存在检测灵敏度低或衍生化过程复杂等缺点(文献 11: Roda, A.; Piazza, F.; Baraldini, M. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1998, 717, 263-278.文献 13: Sakakura, H.; Kimura, N.; Takeda, H.; Komatsu, H.; Ishizaki, K.; Nagata, S. *Journal of Chromatography B* 1998, 718, 33-40.)。随着液相色谱质谱联用技术的发展,高灵敏度

和高分离度的特性不断得到提升,在复杂体液分析测试胆汁酸中获得广泛应用(文献 14: Alnouti, Y.; Csanaky, I. L.; Klaassen, C. D. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2008, 873, 209-217.文献 15 Bobeldijk, I.; Hekman, M.; de Vries-van der Weij, J.; Coulier, L.; Ramaker, R.; Kleemann, R.; Kooistra, T.; Rubingh, C.; Freidig, A.; Verheij, E. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2008, 871, 306-313.: 文献 16: Tagliacozzi, D.; Mozzi, A. F.; Casetta, B.; Bertucci, P.; Bernardini, S.; Di Ilio, C.; Urbani, A.; Federici, G. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2003, 41, 1633-1641.文献 17: Ye, L.; Liu, S. Y.; Wang, M.; Shao, Y.; Ding, M. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2007, 860, 10-17.文献 18: Ando, M.; Kaneko, T.; Watanabe, R.; Kikuchi, S.; Goto, T.; Iida, T.; Hishinuma, T.; Mano, N.; Goto, J. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006, 40, 1179-1186.文献 19: Burkard, I.; von Eckardstein, A.; Rentsch, K. M. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2005, 826, 147-159.); 尤其是超高效液相色谱技术由于具有更高的分离度、分辨率以及更短的分析时间等特点而备受人们青睐 3。但这些技术只能检测到人体内常规的 15 种胆汁酸,并不能检测到任何单硫酸化胆汁酸。而用于检测单硫酸化胆汁酸的方法较少,其预处理过程冗繁,采用多步 SPE 柱分离得到硫化胆汁酸,且具有离子抑制效应大,分离度低,只能用于检测单硫酸化胆汁酸等缺点(见参考文献: Ikegawa S, Yanagihara T, Murao N, etc. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY. 1997, 32, 401-407.)。目前,还没有一种快速高效的方法既能够检测到人体内的常规胆汁酸又能检测到硫酸化胆汁酸,并且还没有人将各个胆汁酸的变化情况与原发性肝癌联系起来。(文献 20: Administration, F. a. D. 2001.)

本发明提供了一种用于快速检测血中 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸和甘氨酸鹅脱氧胆酸的试剂盒,该试剂盒无需复杂的 SPE 预处理过程,不但检测血中 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸/时通量高,并且具有检测成本低、重复性好以及稳定性高的特点。

发明内容

本发明的目的是开发一种检测血中 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸和甘氨酸鹅脱氧胆酸的试剂盒。使用该试剂盒检测血中 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸和甘氨酸鹅脱氧胆酸的方法具有检测成本低,重复性好,稳定性高,快速高效的特点;测定一个实际样本只需 19 分钟,适于临床应用。

为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

该试剂盒由三部分构成:(1)内标—异亮氨酸鸟菲肽或胆汁酸同位素标准品;(2)缓冲液—pH 4.0~8.0 的醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵;(3)洗脱液—乙腈或甲醇。

本试剂盒选用异亮氨酸鸟菲肽作为内标,可降低分析成本并加强检测准确性;采用 pH=5.0 的缓冲液醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵、洗脱液乙腈体系可以得到较好的分离效果并达到快速分离分析 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸和甘氨酸鹅脱氧胆酸的目的。本发明还开发了基于检测试剂盒的使用条件,并在正常对照、肝炎、肝硬化和肝癌样本中进行了应用。

具体步骤如下,

1) 选取试剂盒最佳组成: 内标选择为异亮氨酸鸟菲肽(也可使用各种胆汁酸同位素作为内标(文献 14, 15, 18), 但因其价格昂贵而较少用于实际应用中), 可以有效降低分析成本并加强检测准确性; 缓冲液选择 pH=5.0 的醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵; 洗脱液选择乙腈体系(也可选择 pH 4.0~8.0 的醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵和乙腈(甲醇)体系, 但这些体系的分析速度较慢且各胆汁酸分离度也较差)。

2) 试剂盒使用条件: 色谱仪器为 Waters 超高效液相色谱, 色谱柱为 C8 柱, 柱温 60 摄氏度, 流速 0.5 ml/min(也可选用 C18 色谱柱, 柱温 25~60 摄氏度, 流速 0.2~1.0ml/min 的条件来分析胆汁酸, 但因这些方法分离速度较慢且各胆汁酸分离度较差而未采用(文献 14-19)), 质谱仪器为单四极杆质谱。

3) 在相同条件下取早晨空腹正常人和确诊的肝炎、肝硬化和肝癌患者的离体血清, 采集后于 4℃ 静置半小时、9000g 条件下离心 15 分钟取上清(血清)后立即储存于 -80℃ 的冰箱中备用。

4) 血清样品预处理: 样品待测时室温解冻, 取 150 μl 血清, 加入 600 μl 乙腈、30 μl 异亮氨酸鸟菲肽的浓度为 3.3 μg/ml 乙腈水溶液(乙腈水体积比为 1: 1), 振荡 30 秒, 4℃ 9000g 条件下离心 15 分钟后取 650 μl 上清液冻干, 采用体积比为 1: 3 的乙腈水混合溶液 100 μl 复溶后 4℃ 9000g 条件下离心 15 分钟取上清后直接上样分析, 通过总离子流图计算内标峰、3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸以及甘氨酸鹅脱氧胆酸的峰面积, 以确定 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸以及甘氨酸鹅脱氧胆酸的含量。

5) 对 4 组血清样本按随机顺序依次进行超高效液相色谱质谱高温高速分析, 并对血液胆汁酸的分析方法进行了标征, 要求 14 种胆汁酸标准品的线性方程、单针进样重复性、回收率以及日间和日内精密度均符合美国食品与药物管理局(FDA)检验标准(文献 13)。

6) 在血清样本测试中, GCDCS 在肝癌组中相对正常组有显著性升高。GCDCS 判断肝癌的灵敏度为 75.56%, 特异性为 88.89%; 而采用 AFP 判断肝癌的灵敏度为 62.2%, 特异性为 100%。而在 45 例肝癌样本中有 17 例 AFP 值小于 20ug/L(假阴性)的样本, 我们通过 GCDCS 判断, 发现其中 14 例样本大于 0.21(阳性结果), 可以判断其为肝癌。这说明 GCDCS 与 AFP 具有较好的互补性, 可用于辅助 AFP 进行原发性肝癌普筛。

为了进一步考察 GCDCS 在临床中的应用潜力以及其在肝癌发生中的机制, 肝炎

和肝硬化组血中的 GCDCS、其上游代谢物 GCDCA 及其相关参数 GCDCS/GCDCA 与正常对照和肝癌组进行了比较,发现 GCDCS 在在肝炎和肝硬化中的含量更高。GCDCA 在正常对照组、肝炎、肝硬化和肝癌组的含量变化,发现其变化趋势近似于 GCDCS。但其在肝癌组中的含量相对于正常组有升高但无显著性。而 GCDCS/GCDCA 在肝癌组中相对于三组非肝癌组都是显著性升高的。通过 ROC 曲线分析,只有 GCDCS/GCDCA 与 AFP 没有显著性,说明 GCDCS/GCDCA 更具有应用潜力。采用 GCDCS/GCDCA 判断肝癌的灵敏度为 68.89%,特异性为 86.15%;而采用 AFP 判断肝癌的灵敏度为 62.2%,特异性为 89.2%。而在 45 例肝癌样本中有 17 例 AFP 值小于 20ug/L (假阴性)的样本,我们通过 GCDCS/GCDCA 判断,发现其中 10 例样本大于 0.097 (阳性结果),可以判断其为肝癌。这说明 GCDCS/GCDCA 与 AFP 具有较好的互补性,可用于辅助 AFP 进行原发性肝癌的诊断。

本发明方法具有的效果是:组成试剂盒的内标异亮氨酸鸟菲肽可以有效降低分析成本并加强检测准确性;缓冲液选择 pH=5.0 的醋酸铵和乙腈体系,可以得到最好的分离效果,不但能检测到血中的 15 种常规胆汁酸,并且可以检测到 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸等几种硫酸化胆汁酸。基于试剂盒开发的方法具有以下特点:样本的采集、储存采用了标准化操作程序,避免引入人为误差;预处理过程简单,分析过程采用高温高速的方法,此方法不仅提高了对被分析物的分离分辨能力,而且大大缩短了分析时间,既能分离常规胆汁酸,又能够同时分离几种硫酸化胆汁酸。在血清样本测试中, GCDCS/GCDCA 可辅助 AFP 进行原发性肝癌的诊断。采用这种方法建立的诊断肝癌的方法,具有安全可靠、通量高、灵敏度和特异性高的特点,适于肝癌的早期筛查和辅助诊断。

附图说明

图 1 人血清胆汁酸 TIC 图: 1, 亮氨酸脑菲肽 (内标); 2, 3-硫酸甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCS); 3, 3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸 (GCDCS); 4, 3-硫酸甘氨酸脱氧胆酸 (GDCS); 5, 甘氨酸熊脱氧胆酸 (GUDCA); 6, 牛磺鹅脱氧胆酸 (TUDCA); 7, 甘氨酸胆酸 (GCA); 8, 牛磺胆酸 (TCA); 9, 甘氨酸鹅脱氧胆酸 (GCDCA); 10, 牛磺鹅脱氧胆酸 (TCDCA); 11, 甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA); 12, 牛磺脱氧胆酸 (TDCA); 13, 胆酸 (CA); 14, 熊脱氧胆酸 (UDCA); 15, 甘氨酸石胆酸 (GLCA); 16, 牛磺石胆酸 (TLCA); 17, 鹅脱氧胆酸 (CDCA); 18, 脱氧胆酸 (DCA); 19, 石胆酸 (LCA)。

图 2 (A) 血清 GCDCS 在正常对照组、肝癌肝炎、和肝硬化组血清样本中的含量变化 (均值±标准误表示)。(B) 正常对照组和肝癌组血清样本中 GCDCS 和 AFP 的 ROC 曲线图: AUC 值分别为 GCDCS=0.866, AFP=0.935。(C) 血清 GCDCA 在正常对照组、肝癌肝炎、和肝硬化组血清样本中的含量变化。

图 3 (A), (B) 血清 GCDCS/GCDCA 和 AFP 在正常对照、肝炎、肝硬化和肝癌组中的含量变化。(C) 正常对照、肝炎、肝硬化和肝癌组血清样本中 GCDCS、AFP

以及 GCDSCS/GCDCA 的 ROC 曲线图: AUC 值分别为 GCDSCS=0.653, AFP=0.875 以及 GCDSCS/GCDCA=0.810。

具体实施方式

5 实施例 1

1. 血清样品收集

采集前, 纳入志愿者签署知情同意书。

正常对照、肝炎、肝硬化和原发性肝癌组纳入标准: 参考《黄家驷外科学 (第 7 版)》人民卫生出版社 2008 北京

10 在相同条件下收集 36 例正常人、确诊的 14 例肝炎、15 例肝硬化和 45 例肝癌患者的血清, 采集后于 4℃ 静置半小时、9000g 条件下离心 15 分钟取上清后立即储存于 -80℃ 的冰箱中备用。

2. 分析方法、

2. 1 血清样本预处理

15 样品待测时室温解冻, 取 150 μ l 血清, 加入 600 μ l 乙腈、30 μ l 异亮氨酸鸟菲肽的浓度为 3.3 μ g/ml 乙腈水溶液 (乙腈水体积比为 1: 1), 振荡 30 秒, 4℃ 9000g 条件下离心 15 分钟后取 650 μ l 上清液冻干, 采用体积比为 1: 3 的乙腈水混合溶液 100 μ l 复溶后 4℃ 9000g 条件下离心 15 分钟取上清后直接上样分析, 通过总离子流图计算内标峰、3-硫酸甘氨酸鹅脱氧胆酸以及甘氨酸鹅脱氧胆酸的峰面积, 以确定 3-硫酸
20 甘氨酸鹅脱氧胆酸以及甘氨酸鹅脱氧胆酸的含量。

2. 2 超高效液相色谱质谱高温高速分析

(1)液相条件为: 色谱仪器为 Waters 超高效液相色谱, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLCTM BEH C8 柱, 流动相 A 为 pH=5.0 的 50mM 醋酸氨溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱条件为: 0~0.5 min 为 75% A 相, 0.5~3.5 min 线性变化至 70% A 相, 3.5~9 min
25 降至 45%, 9~11 min 降至 25%, 11~13.5 min 降至 15%, 13.5~15 min 降至 10%, 并保持 2 min, 17~17.5 min 升至 75% A 相并保持 1.5 min; 流速 0.5 mL/min, 柱温 60 °C, 进样量 20 μ L, 柱后流出液不经分流直接进入质谱检测。

(2) 质谱条件为: 质谱仪器为 Waters 单四极杆质谱, 采用电喷雾离子源负离子模式检测; 脱溶剂气和锥孔气流量分为 700 L/h 和 50 L/h, 脱溶剂气和锥孔气均为高
30 纯氮气; 脱溶剂气温度为 300 °C, 离子源温度为 120 °C; 毛细管电压和锥孔电压分别为 2800 V 和 45 V; 采用选择性离子监测模式检测: 0~2.6 min 检测离子 528.3 和 554.3, 2.65~3.7 min 检测离子 448.3、464.3、498.3 和 514.3, 3.75~6 min 检测离子 391.3、407.3、448.3 和 498.3, 6.05~19 min 检测离子 375.3、391.3、432.3 和 482.3; 每 0.1 秒采集一次数据 (图 1)。

35 3. 血清测试结果与辅助诊断潜力分析

在血清样本测试中，GCDCS 在正常对照和肝癌组中的含量如图 2A 所示。GCDCS 在肝癌组中有显著性升高，对 GCDCS 和 AFP 分别作 ROC 曲线，得到 ROC 曲线 AUC 值分别为 GCDCS=0.866 和 AFP=0.935（图 2B）。通过比较我们发现，采用 GCDCS 来诊断肝癌时不但具有较高的灵敏度和特异性，并且其与 AFP 进行联合诊断更有助于提高检测肝癌的能力。例如，在 45 例肝癌样本中有 17 例 AFP 值小于 20ug/L（假阴性）的样本，我们通过 GCDCS 判断，发现其中 14 例样本大于 0.21（阳性结果），可以判断其为肝癌。说明 GCDCS 与 AFP 具有较好的互补性。表 1 显示了 AFP、GCDCS 以及“AFP+GCDCS”的灵敏性、特异性。

为了进一步考察 GCDCS 在临床中的应用潜力以及其在肝癌发生中的机制，肝炎和肝硬化组血中的 GCDCS、其上游代谢物 GCDCA 及其相关参数 GCDCS/GCDCA 与正常对照和肝癌组进行了比较，发现 GCDCS 在在肝炎和肝硬化中的含量更高（图 2A）。GCDCA 在正常对照组、肝炎、肝硬化和肝癌组的含量变化，发现其变化趋势近似于 GCDCS（图 2C）。虽然其在肝炎和肝硬化组中显著性升高，但其在肝癌组中的含量相对于正常组有升高但无显著性。而 GCDCS/GCDCA 在肝癌组中相对于三组非肝癌组都是显著性升高的（图 3A）。我们对肝癌组和三组非肝癌组中 GCDCS、AFP 以及 GCDCS/GCDCA 分别作 ROC 曲线，得到 ROC 曲线 AUC 值分别为 GCDCS=0.653，AFP=0.875 以及 GCDCS/GCDCA=0.810（图 3B）。通过比较我们发现，采用 GCDCS/GCDCA 来诊断肝癌时不但具有较高的灵敏度和特异性，并且只有 GCDCS/GCDCA 与 AFP 没有显著性，说明 GCDCS/GCDCA 更具有应用潜力，其与 AFP 进行联合诊断更有助于提高检测肝癌的能力。例如，采用 AFP 法检测肝癌时，45 例肝癌患者中有 17 例呈阴性反应（AFP<20 ng/L），而采用 GCDCS/GCDCA 法来对这 17 例病人进行诊断时，发现其中 10 例呈阳性反应（GCDCS/GCDCA>0.097）。这说明 GCDCS/GCDCA 与 AFP 具有较好的互补性，表 2 显示了 GCDCS、AFP、GCDCS/GCDCA 以及“AFP+GCDCS/GCDCA”的灵敏度和特异性。

表 1 AFP 与 GCDCS 在正常对照组和肝癌组中的灵敏度和特异性

标志物	Sensitivity (%)	Specificity (%)
GCDCS	75.56	88.89
AFP	62.22	100.00
“AFP+GCDCS”	93.33	100.00

表 2 GCDCS、AFP、GCDCS/GCDCA 以及“AFP+GCDCS/GCDCA”在非肝癌组和肝癌组中的灵敏度和特异性

标志物	Sensitivity (%)	Specificity (%)
GCDCS	75.56	61.54
AFP	62.22	89.23
GCDCS/GCDCA	68.89	86.15
“AFP+GCDCS/GCDCA”	84.44	96.92

权 利 要 求 书

- 1、检测血中 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和甘氨鹅脱氧胆酸的试剂盒，其特征在于该试剂盒由三部分构成：（1）内标—异亮氨酸鸟菲肽或胆汁酸同位素标准品；（2）缓冲液—pH 4.0~8.0 的醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵；（3）洗脱液—乙腈或甲醇。
- 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：选取的试剂盒内标为异亮氨酸鸟菲肽，可以有效降低分析成本并加强检测准确性。
- 3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：选取的试剂盒缓冲液为 pH=5.0 的醋酸铵、甲酸铵或碳酸氢铵、洗脱液为乙腈，可以得到较好的分离效果并达到快速分离分析 3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸和常规胆汁酸的目的。

说明书附图

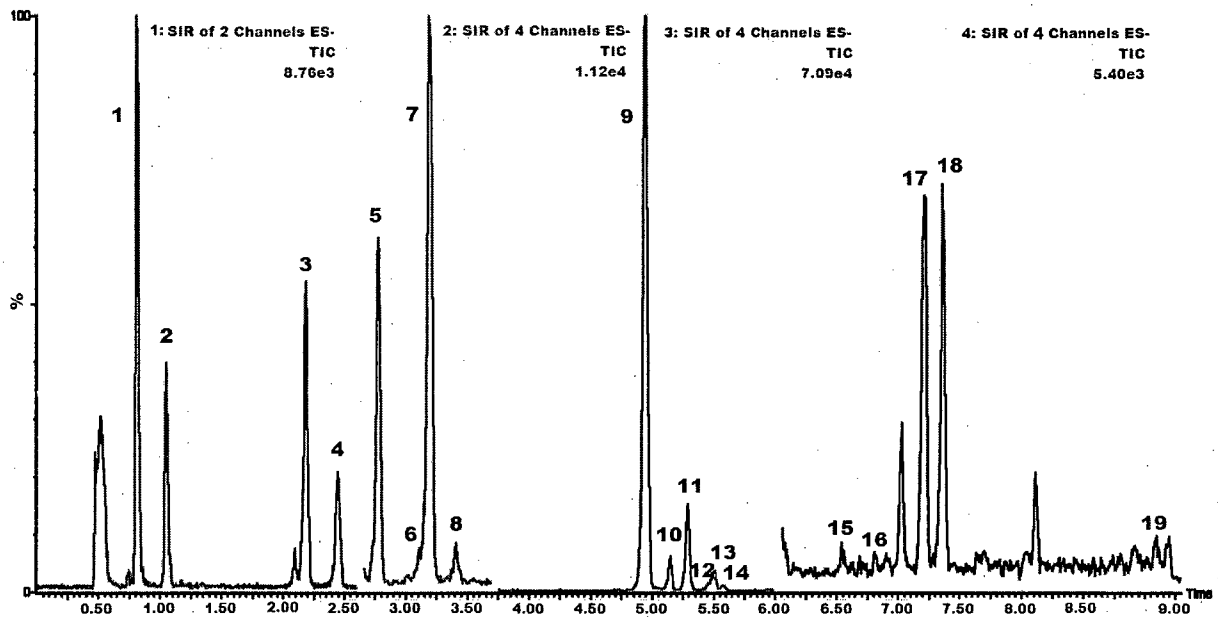


图 1

3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸

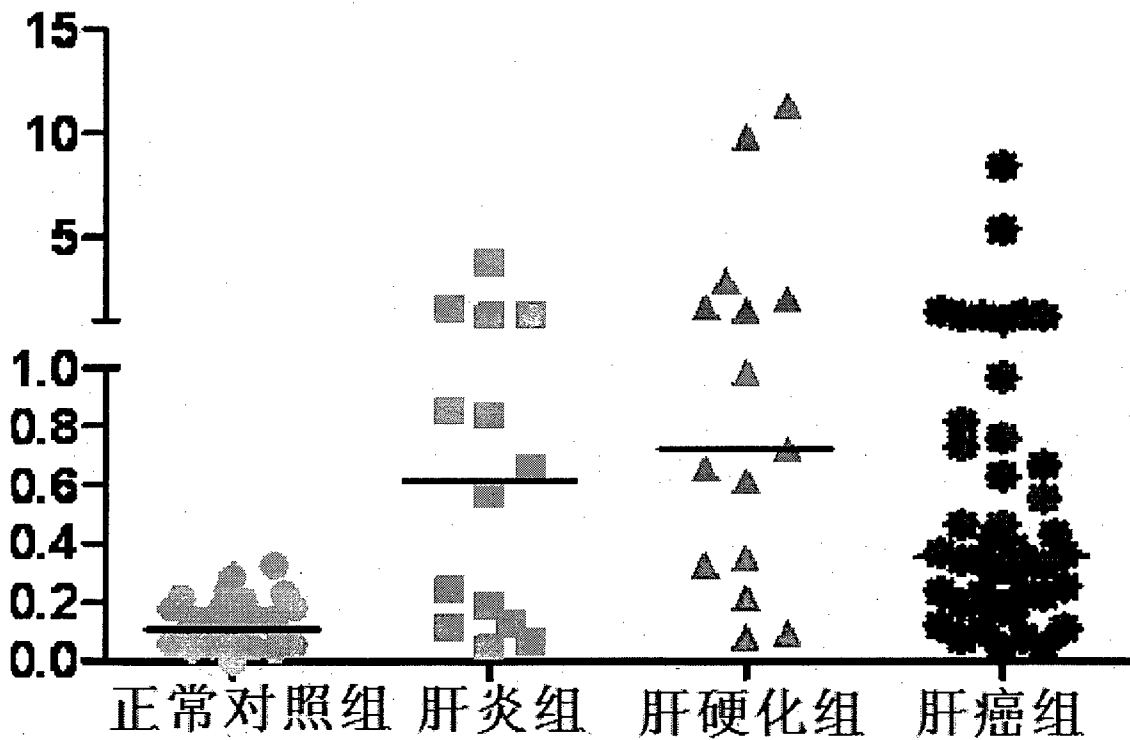


图 2A

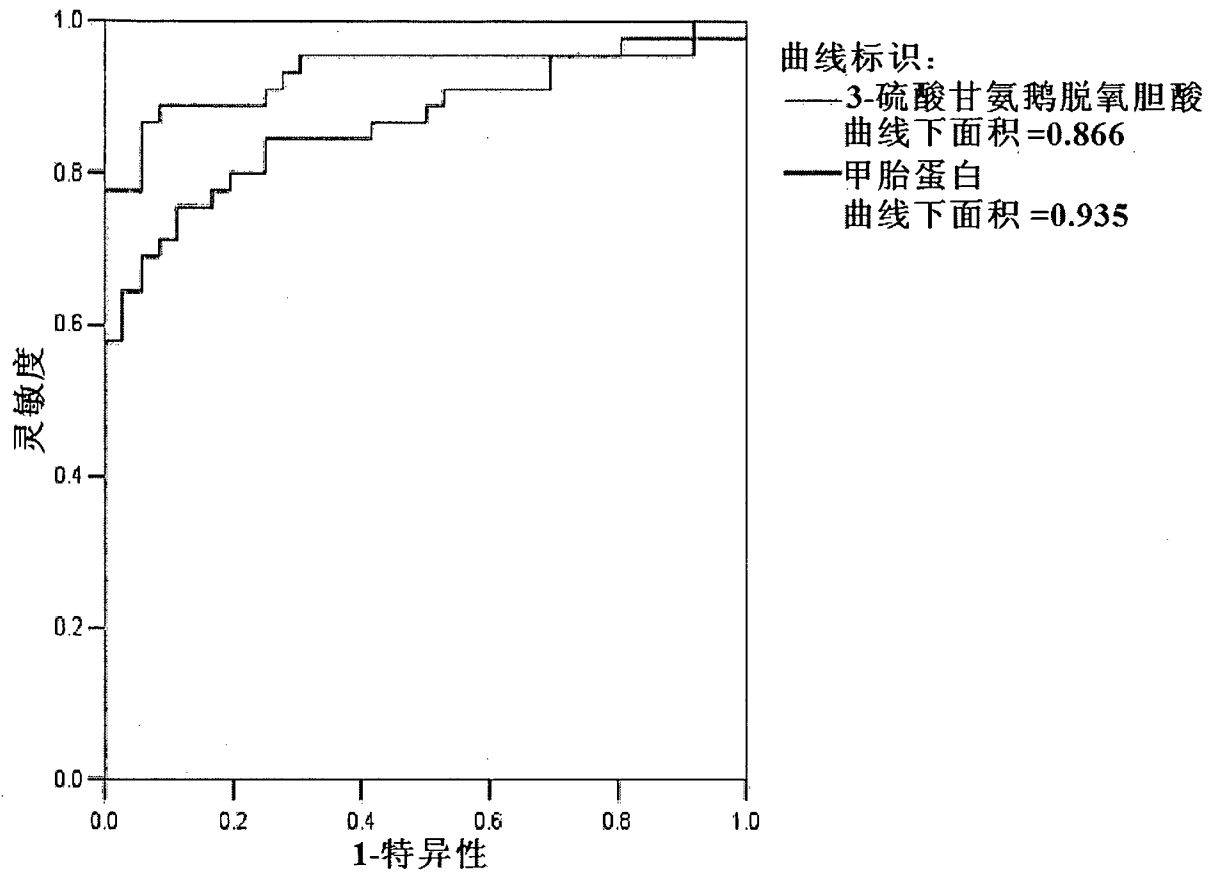


图 2B

甘氨酸鹅脱氧胆酸

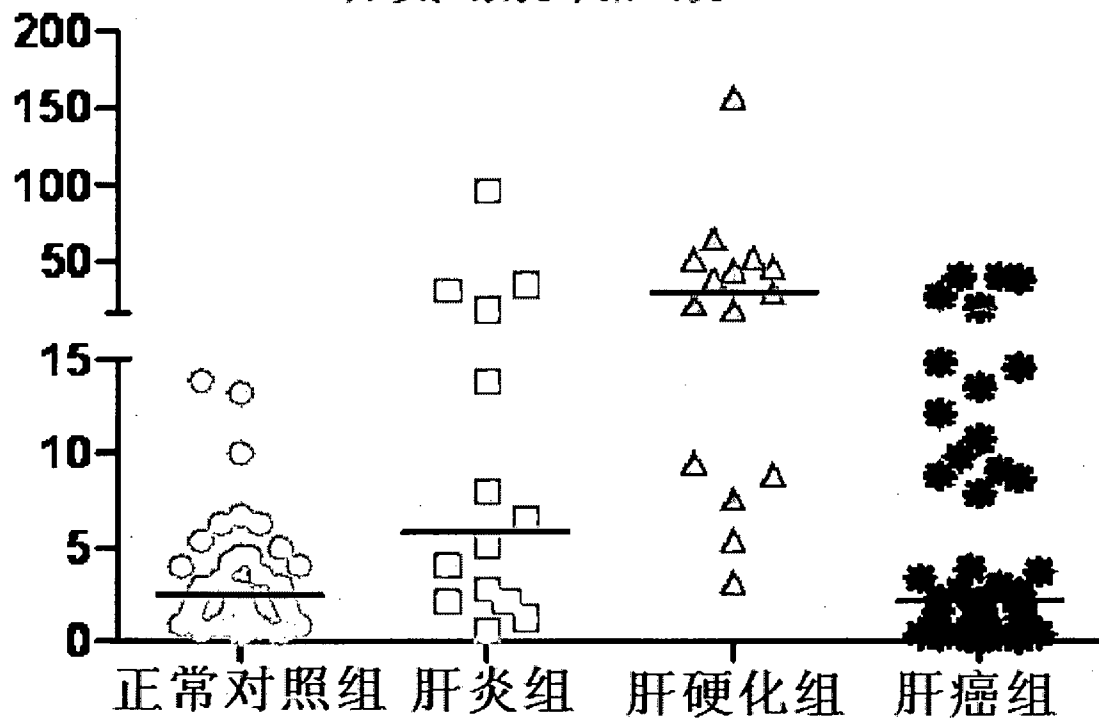


图 2C

3-硫酸甘氨鹅脱氧胆酸/甘氨鹅脱氧胆酸

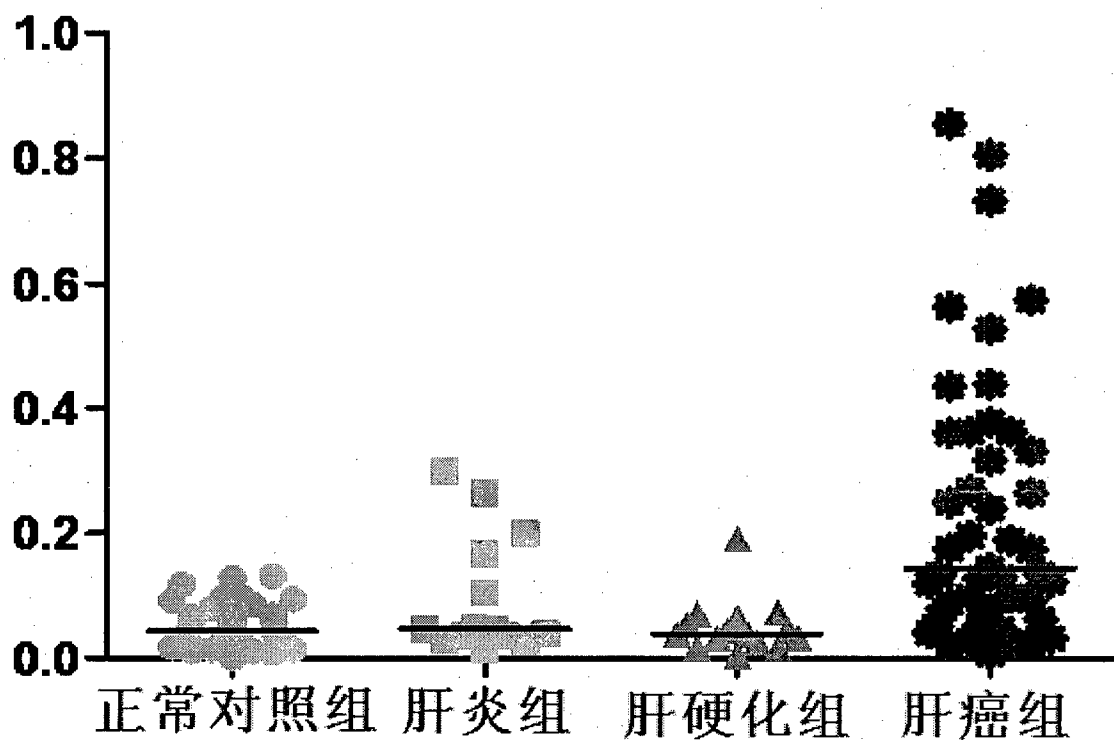


图 3A

甲胎蛋白

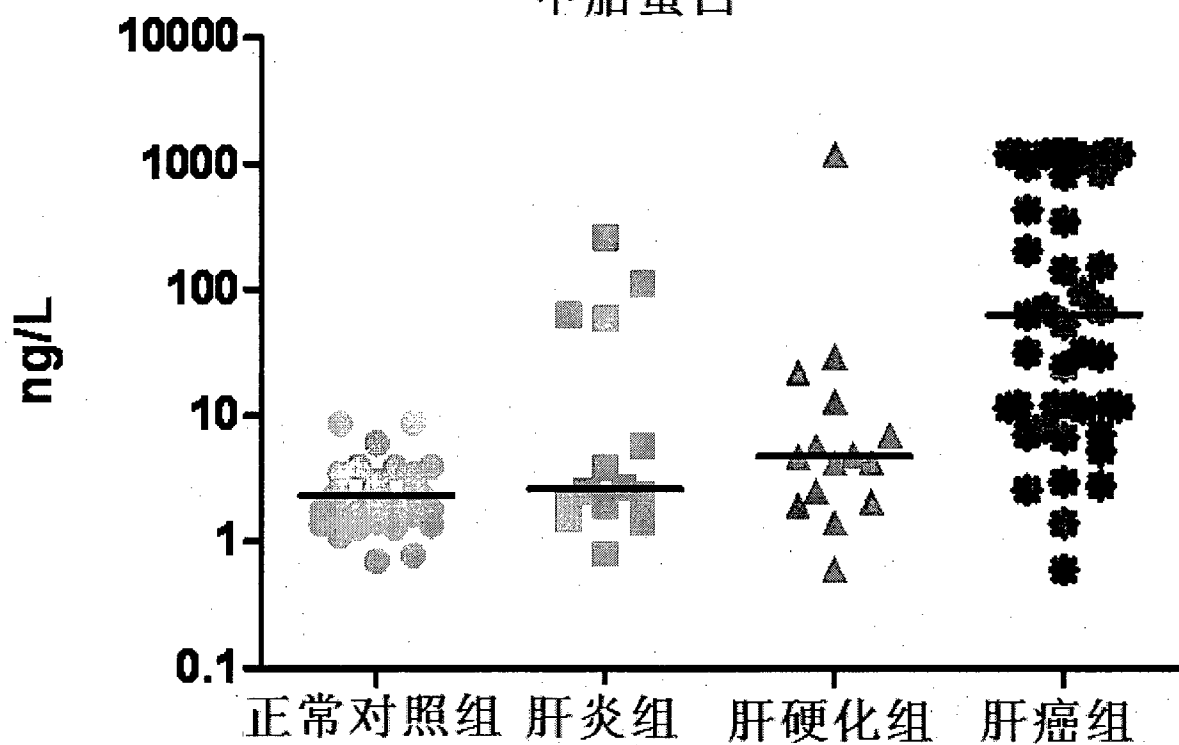


图 3B

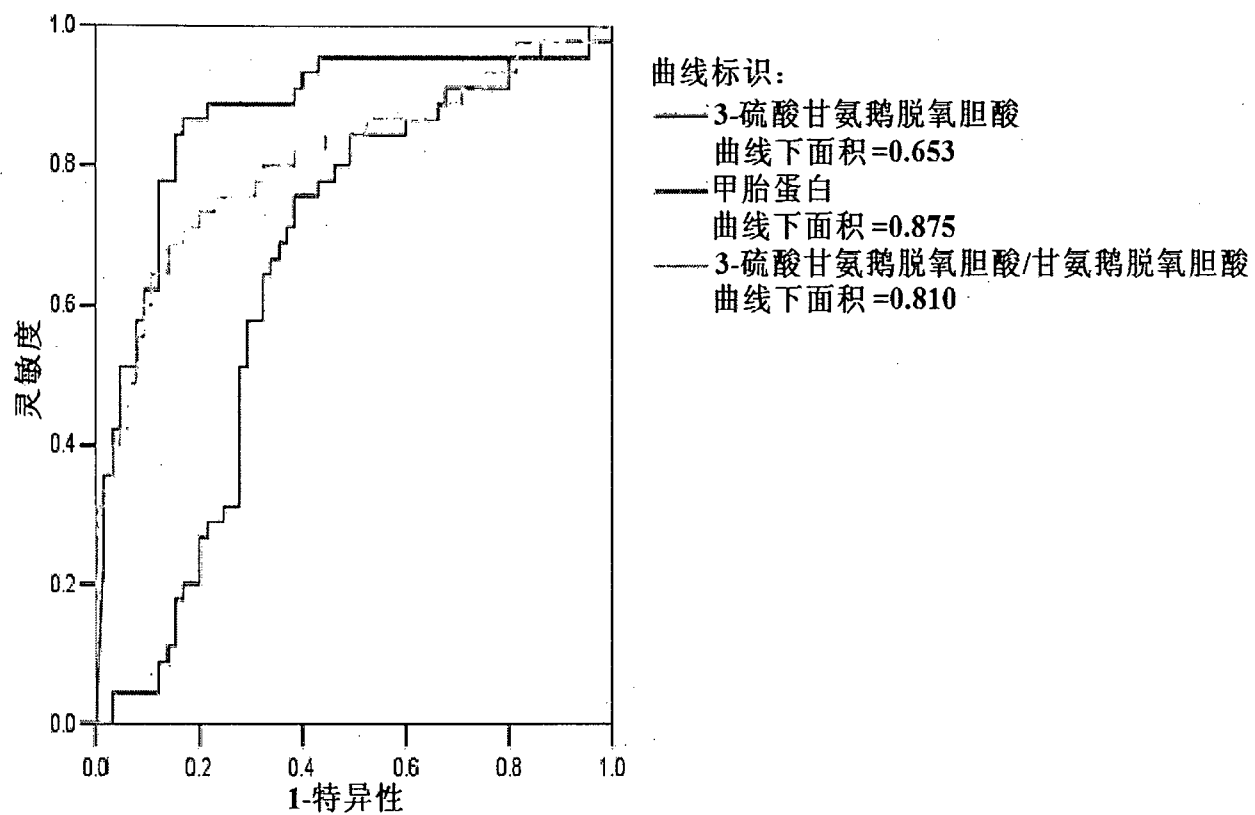


图 3C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/080483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N30/, G01N33/

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, Duxiu scholar
bile w acid?, deoxycholate, chenodeoxycholate, GCDC, standard, Ile, leucine, Leu, ammonium w acetate,
ammonium w formate, ammonium w bicarbonate, buffer, eluent, acetonitrile, methanol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1608138 A (DE SIMONE, Claudio) 20 Apr. 2005 (20.04.2005) the whole document	1-3
A	WO 9011526 A1 (EVANS, CHRISTOPHER THOMAS) 04 Oct. 1990 (04.10.1990) the whole document	1-3
A	SWOBODNIK, W. Analysis of Conjugated Bile Acids in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography Using Post-Column Enzyme Reaction and Off-Line Fluorimetric Determination. Journal of Chromatography . 1987, No.423, pages 75-84	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 Feb. 2011 (27.02.2011)	Date of mailing of the international search report 07 Apr. 2011 (07.04.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer LIU, Ruihua Telephone No. (86-10)82245429

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/080483

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1608138 A	20.04.2005	WO 03056031 A2	10.07.2003
		AU 2002367123 A1	15.07.2003
		EP 1456405	15.09.2004
		KR 20040068209 A	30.07.2004
		BR 0215045 A	03.11.2004
		NO 20042992 A	20.09.2004
		HU 0402542 A2	29.03.2005
		JP 200551260 T	12.05.2005
		US 2005118152 A1	02.06.2005
		MAXA 04005919 A	01.12.2004
		NZ 533806 A	26.05.2006
		ZA 200405762 A	28.06.2006
		US 7211410 B2	01.05.2007
		RU 7323317 C2	27.01.2008
		AU 2002367123 B2	10.01.2008
		EP 1456405 B1	17.09.2007
		DE 60228993 E	30.10.2008
		MX 258330 B	01.07.2008
		IN 207390 B	08.06.2007
		IL 162513 A	24.12.2009
		CA 2469796 C	14.09.2010
WO 9011526 A1	04.10.1990	AU 3358489 A	22.10.1990

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/080483

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/02 (2006.01) i

G01N33/49 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N30/, G01N33/

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, 读秀学术搜索

胆酸, 脱氧胆酸, 甘氨鹅脱氧胆酸, 内标, 亮氨酸, 异亮氨酸, 醋酸铵, 甲酸铵, 碳酸氢铵, 缓冲液, 洗脱液, 乙腈, 甲醇, bile w acid?, deoxycholate, chenodeoxycholate, GCDC, standard, Ile, leucine, Leu, ammounium w acetate, ammounium w formate, ammounium w bicarbonate, buffer, eluent, acetonitrile, methanol

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1608138 A (C 德西蒙) 20. 4 月 2005 (20.04.2005) 全文	1-3
A	WO 9011526 A1 (EVANS, CHRISTOPHER THOMAS) 04. 10 月 1990 (04.10.1990) 全文	1-3
A	SWOBODNIK, W. Analysis of Conjugated Bile Acids in Human Serum by High- Performance Liquid Chromatography Using Post-Column Enzyme Reaction and Off-Line Fluorimetric Determination. Journal of Chromatography . 1987 年, 第 423 期, 第 75-84 页	1-3



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

27.2 月 2011 (27.02.2011)

国际检索报告邮寄日期

07.4 月 2011 (07.04.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

刘瑞华

电话号码: (86-10) 82245429

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/080483

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1608138 A	20.04.2005	WO 03056031 A2	10.07.2003
		AU 2002367123 A1	15.07.2003
		EP 1456405	15.09.2004
		KR 20040068209 A	30.07.2004
		BR 0215045 A	03.11.2004
		NO 20042992 A	20.09.2004
		HU 0402542 A2	29.03.2005
		JP 200551260 T	12.05.2005
		US 2005118152 A1	02.06.2005
		MAXA 04005919 A	01.12.2004
		NZ 533806 A	26.05.2006
		ZA 200405762 A	28.06.2006
		US 7211410 B2	01.05.2007
		RU 7323317 C2	27.01.2008
		AU 2002367123 B2	10.01.2008
		EP 1456405 B1	17.09.2007
		DE 60228993 E	30.10.2008
		MX 258330 B	01.07.2008
		IN 207390 B	08.06.2007
		IL 162513 A	24.12.2009
WO 9011526 A1	04.10.1990	CA 2469796 C	14.09.2010
		AU 3358489 A	22.10.1990

主题的分类

G01N30/02 (2006.01) i

G01N33/49 (2006.01) i