



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101819206 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200910213630. 6

(22) 申请日 2009. 12. 08

(73) 专利权人 广州市丰华生物工程有限公司
地址 510730 广东省广州市广州经济技术开发区志诚大道银谊路 6 号

(72) 发明人 吴道贫 汪勤 季涛 李贵情
谭玉华 何海荣 冯健明 沈健
郑元升 刘胜利

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202
代理人 郝传鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

徐伟文等. 时间分辨荧光免疫法定量检测 AFP 试剂盒临床应用研究. 《标记免疫分析与临床》. 2006, 第 13 卷 (第 1 期), 43-45.

陈键等. 甲胎蛋白干血滤纸免疫放射分析试剂盒的研制. 《同位素》. 1998, 第 11 卷 (第 3 期), 134-138.

宋蓉等. 时间分辨荧光免疫分析法检测甲胎蛋白的临床应用. 《实用医技杂志》. 2005, 第 12 卷 (第 1 期), 175-176.

杭建峰等. 人甲胎蛋白时间分辨免疫荧光分析试剂盒的研制. 《第一军医大学学报》. 2005, 第 25 卷 (第 3 期), 313-317.

杭建峰等. 人甲胎蛋白时间分辨免疫荧光分析试剂盒的研制. 《第一军医大学学报》. 2005, 第 25 卷 (第 3 期), 313-317.

盛世乐等. AFP 时间分辨荧光免疫分析试剂盒的研制及其临床应用. 《放射免疫学杂志》. 2006, 第 19 卷 (第 4 期), 329-332.

贺广彩等. 人甲胎蛋白时间分辨免疫荧光分析法的建立. 《免疫学杂志》. 1994, 第 10 卷 (第 2 期), 130-132.

审查员 温婧

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

产前筛查 AFP 测定试剂盒 (时间分辨荧光免疫法) 及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种适用于孕中期产前筛查的甲胎蛋白测定试剂盒 (时间分辨荧光免疫法) 及其制备方法。该试剂盒主要成分包括: 1) 实验缓冲液; 2) 浓缩洗液; 3) 增强液; 4) 反应板; 5) 滤纸干血片标准品、质控品; 以及 6) 销标记物。根据本发明制备该试剂盒的方法包括以下步骤: 1) 制备实验缓冲液、浓缩洗液、增强液; 2) 包被反应板; 3) 制备标准品、质控品; 4) 制备销标记物; 5) 分装; 6) 贴标签; 以及 7) 组装为成品。本发明具有检测结果准确性、灵敏度高, 稳定性好, 检测方法经济、简便、安全、无创伤性、自动化程度高等特点。滤纸干纸片技术应用于产前筛查工作, 有利于血样采集、贮存、运输, 保障实验可靠性。

1. 一种产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒,对孕中期的孕妇血清中的甲胎蛋白进行定量测定,其特征包括以下组分:

实验缓冲液:在含 0.01g/L 的乙二胺四乙酸二钠的 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 溶液中加入 100ml/L 的小牛血清制备而成;

浓缩洗液:在含 0.385mol/L NaCl, 0.124mol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 4.0ml/L 的 Tween-20 制备而成;

增强液:在含有 1ml/L TritonX-100、0.1mol/L 邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入 4.0mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、20mg/L 的三正辛基氧化磷制备而成;

AFP 单克隆抗体包被的微孔反应板:将纯化得到的 AFP 单克隆抗体用包被抗体稀释液稀释成浓度为 1~10 μ g/mL 的包被液;在 96 孔的微孔空白板中加入包被液 100~200 μ L/孔, 2~8°C 条件下孵育过夜;孵育好的包被板按 250 μ L/孔加入封闭液, 37 \pm 2°C 条件下孵育 2~3h;甩干,过夜晾干;用铝箔袋真空密封;置 2~8°C 条件下保存;所述包被抗体稀释液为含 5ppm Proclin300[®], 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,所述封闭液为含 5.0g/L 海藻糖、0.5%BSA, 0.02mol/L、pH9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;

AFP 标准品:按 50%~55%的血细胞比容由人血红细胞和阴性血清混合基质将 AFP 纯品制备成 6 个适当浓度的标准品,以 50 μ L 体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 位置上,经室温自然干燥后得到的干滤纸片标准品,用铝箔袋真空密封;

AFP 质控品:按 50%~55%的血细胞比容由人血红细胞和阴性血清混合基质将 AFP 纯品制备成低、中、高三个适当浓度的质控品,以 50 μ L 体积分别滴加在滤纸的 Q1、Q2、Q3 位置上,经室温自然干燥后得到的干滤纸片质控品,用铝箔袋真空密封;

$\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠}$ 标记的 AFP 单克隆抗体标记物:将纯化得到的 1mg AFP 单克隆标记抗体;加入 1mg 的 $\text{Eu}^{3+}\text{-N}_2\text{-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠}$ 中混匀,室温反应过夜;反应液经 1 \times 40cm Sephadex G-50 柱用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,分离 Eu^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Eu^{3+} ,采用全自动部分收集器 2mL/管进行液体收集;于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数,收集第一峰中荧光计数大于 1000000 的洗脱液,加等体积甘油,混匀后 -20°C 保存。

2 如权利要求 1 所述的甲胎蛋白测定试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 制备实验缓冲液、浓缩液、增强液:

制备实验缓冲液:在含 0.01g/L 的乙二胺四乙酸二钠的 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 溶液中加入 100ml/L 的小牛血清;

制备浓缩洗液:在含 0.385mol/L NaCl, 0.124mol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 4.0ml/L 的 Tween-20;

制备增强液:在含有 1ml/L TritonX-100、0.1mol/L 邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入 4.0mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、20mg/L 的三正辛基氧化磷;

2) 以 AFP 单克隆抗体包被微孔反应板:将纯化得到的 AFP 单克隆抗体用包被抗体稀释液稀释成浓度为 1~10 μ g/mL 的包被液;在 96 孔的微孔空白板中加入包被液 100~200 μ L/孔, 2~8°C 条件下孵育过夜;孵育好的包被板按 250 μ L/孔加入封闭液, 37 \pm 2°C 条件下孵育 2~3h;甩干,过夜晾干;用铝箔袋真空密封;置 2~8°C 条件下保存;所述包被

抗体稀释液为含 5ppm **Proclin300**[®], 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液, 所述封闭液为含 5.0g/L 海藻糖、0.5%BSA, 0.02mol/L、pH9.6 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液;

3) 以 AFP 纯品制备标准品、质控品: 按 50%~55% 的血细胞比容由人血红细胞和阴性血清混合基质将 AFP 纯品制备成 6 个适当浓度的标准品和低、中、高三个适当浓度的质控品, 以 50 μ L 体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 位置和 Q1、Q2、Q3 位置上, 经室温自然干燥后得到的干滤纸片标准品和质控品, 用铝箔袋真空密封;

4) 以 Eu^{3+} -N₂-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记 AFP 单克隆抗体: 将纯化得到的 1mgAFP 单克隆标记抗体; 加入 1mg 的 Eu^{3+} -N₂-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀, 室温反应过夜; 反应液经 1×40cm Sephadex G-50 柱用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 分离 Eu^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Eu^{3+} , 采用全自动部分收集器 2mL/管进行液体收集; 于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数, 收集第一峰中荧光计数大于 1000000 的洗脱液, 加等体积甘油, 混匀后 -20℃ 保存;

5) 分装上述实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品、质控品和标记物;

6) 贴标签; 以及

7) 组装为成品。

产前筛查 AFP 测定试剂盒（时间分辨荧光免疫法）及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于孕中期产前筛查的试剂盒，特别涉及一种孕中期产前筛查的甲胎蛋白测定试剂盒（时间分辨荧光免疫分析法）及其制备方法，结合了单克隆抗体制备技术、固相抗体包被技术、镧系元素离子标记技术、滤纸干血片制备技术和时间分辨免疫荧光技术。

背景技术

[0002] 产前筛查 (Prenatal Screening) 是指通过经济、简便和较少创伤的检测方法，从孕妇群体中筛选出怀有某些先天缺陷胎儿的高危孕妇并进行诊断，从而最大限度地减少缺陷儿的出生。产前筛查可在妊娠中期（14 ~ 21 周）进行，其筛查最主要的两种疾病是唐氏综合征 (Down's Syndrome, DS) 和胎儿神经管缺陷 (Neural Tube Defects, NTDs)。产前筛查系统由体外诊断试剂、检测仪器和筛查分析软件组成。甲胎蛋白 (AFP) 是胎儿血清中最常见的蛋白质，也是目前常用于产前筛查的血清学标志物之一。

[0003] 唐氏综合征又称为先天愚型或 21 三体综合征，是胎儿先天缺陷中最常见的一种，主要临床表现：严重智力低下、愚型面容，约 50% 伴有先天性心脏病、小头畸形等发育异常。其出生率约占活产新生儿的 1/700 ~ 1/800，我国每年大约有 26600 个先天愚型痴呆儿出生，平均每 20 分钟就出生一例。目前对 DS 尚未有治疗方法。因此通过产前筛查找出高危孕妇，对其进行产前诊断是减少患儿出生的重要手段。当孕妇胎儿患 DS 时，由于胎儿生长发育迟缓，组织器官发育不全，肝脏、胎盘的功能不良，合成 AFP 能力降低。

[0004] 胎儿神经管缺陷也是出生缺陷最常见疾病类型之一。1977 年首次报道血清中 AFP 水平升高和开放性神经管缺陷畸形有关。AFP 是一个很有效的神经管缺陷筛查指标，是其它标志物所无法比拟的。通过检测孕妇血清中 AFP 浓度，进行神经管缺陷的产前筛查，可以检出 80 ~ 90% 的开放性神经管缺陷。

[0005] 目前临床上主要采用羊水穿刺或绒毛膜取样等方法来进行产前诊断，存在诸多不足。不仅是创伤性的，而且有 1% ~ 2% 的流产率。因此，对孕妇血清标志物的筛查是今后产前筛查的主要手段。

[0006] TrFIA 又称解离-增强镧系荧光免疫分析 (dissociation-enhancement lanthanidefluoroimmunoassay, DELFIA)，是用三价稀土离子及其螯合物作为示踪物，代替荧光物质、同位素、酶和化学发光物质，标记抗原、抗体、激素、核酸探针等物质；当反应体系发生后，用时间分辨荧光免疫分析仪，测定反应物中的荧光强度，定量分析待测物质的含量。其灵敏度高，可达 10^{-17} mol/孔，技术上具有独特优势，应用范围广泛。铕 (Eu) 标记时间分辨荧光免疫技术是一种非放射标记超微量免疫检测技术，利用光谱分辨、时间分辨、解离-增强原理，具有荧光寿命极长、Stokes 位移大、荧光特异性强、Eu³⁺ 离子的发光范围宽的特点。TrFIA 具有敏感性高、特异性强、重复性好、定量范围宽、检测速度快、标记物稳定、试剂盒保存期长等突出优点，成为继放射免疫分析之后的新的里程碑。目前国外的 TrFIA

系统试剂盒已成商品化,主要用于激素类、癌抗原、蛋白质和多肽等项目的检查。我国从 20 世纪 80 年代中期开始这方面的研究,目前国内也有部分试剂盒问世,但用于临床检测的项目并不多,许多项目亟待研究开发,并形成产业化。

[0007] 我国幅员广阔,各地区发展不平衡,经济技术滞后和对于产前筛查的认识不足,缺少进行产前筛查的设备、仪器、试剂和专业技术人员等原因,部分地区仍无法开展 DS、神经管缺陷等先天性疾病的产前筛查。现在滤纸干血片已经常规应用于新生儿疾病筛查,通过检测滤纸干血片中促甲状腺激素刺激激素 (TSH) 及苯丙氨酸的浓度进行新生儿甲状腺功能低下症和苯丙酮尿症的筛查。滤纸干血片技术在一定程度上解决了大面积开展筛查工作中采血问题、血样的递送保存问题,大大减少了产前筛查的人力、物力资源,保障了实验的可靠性,有利于产前筛查在全国普及和深入开展。

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题即是克服上述现有技术的缺陷,提供一种检测结果准确性、灵敏度和稳定性更高的,检测方法更经济、简便、安全,且无创伤性的,用于孕中期产前筛查的甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)及其制备方法,该试剂盒适于产业化推广应用。

[0009] 本发明要解决的另一个问题是为了使产前筛查在全国深入开展和普及,我们采用了滤纸干血片技术,建立滤纸干血片中 AFP 的检测方法,并应用于产前筛查的研究中。为我国开展大面积产前筛查工作在一定程度上解决了样本采集、贮存与运输问题,大大减少了产前筛查的人力物力资源,实验的可靠性也得到了保障。为产前筛查的普及奠定了良好的滤纸干血片技术基础,对我国的产前筛查产前事业有着重要的意义。

[0010] 本发明的目的是提供一种结合了单克隆抗体制备技术、固相抗体包被技术、镧系元素离子标记技术、滤纸干血片制备技术和时间分辨免疫荧光技术,用于孕中期产前筛查的甲胎蛋白测定试剂盒。

[0011] 本发明的试剂盒包括包括以下组分:1) 实验缓冲液;2) 浓缩洗液;3) 增强液;4) AFP 单克隆抗体包被的微孔反应板;5) AFP 标准品、质控品;以及 6) Eu^{3+} - N_2 -[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记的 AFP 单克隆抗体标记物。

[0012] 本发明提供的一种适用于孕早期和孕中期产前筛查的时间分辨荧光免疫试法试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0013] 1) 制备实验缓冲液、浓缩液、增强液;

[0014] 2) 以 AFP 单克隆抗体包被微孔反应板;

[0015] 3) 以 AFP 纯品配制标准品、质控品;

[0016] 4) 以 Eu^{3+} - N_2 -[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记 AFP 单克隆抗体;

[0017] 5) 分装上述实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品和标记物;

[0018] 6) 贴标签;

[0019] 7) 组装为成品。

[0020] 根据本发明的试剂盒,其中,所述以 AFP 纯品配制标准品、质控品采用以下步骤:

[0021] 制作的基质为人血红细胞和阴性血清;基质包括,但不限于人血红细胞和阴性血清。其中基质的血细胞比容为 45%~90%;其中血细胞比容以 50%~55%为佳。标准品

为 A、B、C、D、E、F 6 个标准点。质控品为 Q_1 、 Q_2 、 Q_3 (低、中、高) 3 个浓度。外包装为铝箔袋。标准品和质控品制作是以甲胎蛋白国家标准品为参照, 由人血红细胞和阴性血清的混合基质将 AFP 纯品制备成 6 个适当浓度的标准品和低、中、高 3 个适当浓度的质控品, 以适当体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 位置和 Q_1 、 Q_2 、 Q_3 位置上, 经室温自然干燥后得到的干血滤纸片标准品、质控品, 用铝箔袋真空密封。

[0022] 根据本发明提供的试剂盒, 采用时间分辨荧光免疫法, 实验方法简单快速, 可自动化操作, 检测系统为开放式操作系统, 本发明的试剂盒操作方法包括以下步骤:

[0023] 1) 试剂准备将试剂所需数量的微孔反应板条平衡至室温; 将 40ml 上述浓缩洗涤液和 960ml 纯化水混合成工作洗涤液; 使用前, 将钨标记物用实验缓冲液按体积比 1 : 50 稀释成标记物工作液;

[0024] 2) 将标准品、质控品或样本用直径约 3.0mm 打孔器打入固相抗体包被反应板中, 向每孔中加入 100 ~ 200 μ l 上述的 AFP 的标记物工作液; 反应板在室温下, 缓慢振荡孵育 1.0 ~ 4.0h; 甩出纸片, 用上述的工作洗涤液洗板 6 次, 拍干; 向每孔中加入 100 ~ 200 μ l 增强液; 缓慢振荡 5min, 于时间分辨荧光免疫分析仪内进行荧光计数; 按测定参数进行结果拟合分析, 得到定量结果; 将结果转入唐氏综合征和神经管缺陷风险评估软件, 得到孕妇胎儿的出生缺陷的发生机率。

[0025] 根据本发明试剂盒, 风险分析软件采用国内人群数据库, 更适合中国人群; 本发明的系统化、人性化的中文数据拟合分析及配套仪器, 更具有可靠性和严谨性。

[0026] 根据本发明试剂盒, 适用于孕中期产前筛查, 检测孕妇血清中的 AFP 含量。AFP 检测试剂盒灵敏度: 不高于 1.0U/ml; 特异性: 检测 500ng/ml CEA 和 100mg/L 白蛋白, hAFP 表观值不高于 1.0U/ml; 线性相关系数: 试剂盒的测量范围内, 剂量 - 反应曲线线性相关系数应不低于 0.9900; 测量准确度: 以 hAFP 国家标准品为对照, 试剂盒校准品的实测效价与标示效价比平均值应在 0.900 ~ 1.100 范围内; 测量精密性: 分析内不超过 15.0%; 分析间不超过 20.0%; 质控品测定值: 三个不同浓度质控, 测值在允许范围内; HOOK 效应: 试剂盒的 HOOK 效应高于 10000U/ml; 稳定性: 37°C 3 天烘烤后, 检测结果符合以上技术性能指标。

[0027] AFP 检测分析仪已实现高度自动化, 这样提高了检测速度, 提高了检测结果的准确性。

[0028] 本发明的检测方法可同时用于唐氏综合症、开放性神经管缺陷、18 三体、13 三体等出生缺陷儿的筛查。

[0029] 附图说明

[0030] 图 1 为实施例 1 所制备的试剂盒的剂量 - 反应曲线图。剂量反应曲线采用双对数轴变换方式 (LOG-LOG_B), 三样条平滑拟合 (SPLINE) 曲线拟合数学模型, X 轴为标准品的标示浓度 (ng/ml), Y 轴为标准品对应的检测反应荧光值 (其数值是实际检测荧光值的 1/1000)。

[0031] 图 2 为实施例 4 本发明试剂盒与市场上的时间分辨荧光免疫法试剂盒检测样本的比较图。Y 轴为本发明试剂盒检测孕妇血清样本的甲胎蛋白浓度 (U/ml), X 轴为比对试剂盒检测孕妇血清样本的甲胎蛋白浓度 (U/ml), 本发明试剂盒检测孕妇血清样本的甲胎蛋白浓度与比对试剂盒检测孕妇血清样本的甲胎蛋白浓度的线性回归方程为 $y = 1.0835x - 0.8709$, $r = 0.9993$ 。

[0032] 具体实施方式

[0033] 下面用实施实例来进一步说明本发明,但本发明并不受其限制。

[0034] 其中,下列实施例中的 AFP 纯品、单克隆抗体购于 Sigma 公司;Sephadex G-50、PD-10 为 Pharmacia 公司产品;AFP、CEA、白蛋白国家标准品购自中国药品生物制品检定所; β -萘甲酰三氟丙酮、三正辛基氧化磷、TritonX-100 购于 Sigma 公司;其他试剂为国产分析纯;时间分辨荧光免疫分析仪 (TALENT-II)、恒温振荡仪、全自动酶标洗板机均为广州市丰华生物有限公司产品;唐氏综合征和神经管缺陷风险评估软件为珠海艾博罗公司产品。

[0035] 实施例 1 制备本发明的产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)

[0036] 孕中期产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)成分包括:增强液:用 1~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L 的三正辛基氧化磷和缓冲液制成;实验缓冲液:用 10.0ml/L~100.0ml/L 的小牛血清和缓冲液制成;浓缩洗液:用 1.0ml/L~10.0ml/L 的 Tween-20 和缓冲液制成。单克隆抗体包被板:甲胎蛋白单克隆抗体包被板用含有 1~10ppm 防腐剂的缓冲液将甲胎蛋白单克隆抗体稀释成 1~10 μ g/ml 的包被液,包被微孔空白板,并用含有 1.0g/L~10.0g/L 的保护剂的封闭液封闭后干燥制成。

[0037] 标准品、质控品:甲胎蛋白标准品、质控品按 50%~55%的血细胞比容由人红细胞和阴性血清混合基质将 AFP 纯品制备成六个适当浓度的标准品和低、中、高三个适当浓度的质控品,以 50 μ l 体积分别滴加在滤纸上,经室温自然干燥后得到。标记物:甲胎蛋白标记物用甲胎蛋白单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按 1:1~1:6(m/m) 标记制得母液,母液再用标记物稀释液按 1:10~1:25 倍稀释而成。

[0038] 本发明的产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的主要工艺制备如下:

[0039] 1) 通用试剂的制备:实验缓冲液为在含 0.01g/L 的乙二胺四乙酸二钠的 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 溶液中加入 10.0ml/L~200.0ml/L 的小牛血清;浓缩洗液为在含 0.385mol/L NaCl, 0.124mol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 1.0ml/L~10.0ml/L 的 Tween-20;增强液为在含有 1ml/L TritonX-100、0.1mol/L 邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入 1~5mg/L β -萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L 的三正辛基氧化磷。其中实验缓冲液的小牛血清为 100.0ml/L;浓缩洗液中的 Tween-20 为 4.0ml/L。增强液中的 β -萘甲酰三氟丙酮 4.0mg/L、三正辛基氧化磷 20mg/L、TritonX-100 为 1ml/L;

[0040] 2) 单克隆抗体的制备:用单克隆抗体技术,建立 AFP 单克隆抗体细胞库,然后再经过接种小鼠腹腔制备腹水,再将腹水纯化后获得特异性为 100%、纯度大于 95%的 AFP 配对单克隆抗体;

[0041] 3) 包被板的制备:将纯化得到的 AFP 单克隆抗体用缓冲液稀释成浓度为 1~10 μ g/ml 的包被液;在 96 孔的微孔空白板中加入包被液 100~200 μ l/孔,2~8 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜;孵育好的包被板按 250 μ l/孔加入封闭液,37 \pm 2 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2~3h;甩干,过夜晾干;用铝箔袋真空密封;置 2~8 $^{\circ}$ C 条件下保存。

[0042] 其中 AFP 单克隆抗体采用棋盘滴定法确定包被浓度,用缓冲液稀释成浓度为 10 μ g/ml 的包被液包被效果为最佳。包被抗体稀释液为含 5ppm Proclin300[®], 0.05mol/L、pH9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液;封闭液为含 5.0g/L 海藻糖、0.5% BSA, 0.05mol/L、pH9.6 的碳

酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液,单克隆抗体包被板的热稳定性良好;

[0043] 4) 标准品、质控品的制备:以 AFP 国家标准品为参照,按 50%~55%的血细胞比容由人血红细胞和阴性血清混合基质将 AFP 纯品制备成 6 个适当浓度的标准品和低、中、高三个适当浓度的质控品,以 50 μ l 体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 位置和 Q_1 、 Q_2 、 Q_3 位置上,经室温自然干燥后得到的干滤纸片标准品和质控品,用铝箔袋真空密封。

[0044] 5) 铈标记物的制备:将纯化得到的 1mg AFP 单克隆标记抗体;加入 1mg 的 Eu^{3+} - N_2 -[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠中混匀,室温反应过夜;反应液经 Sephadex G-50 柱 (1 \times 40cm) 用 50mmol/L、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,分离 Eu^{3+} -单克隆抗体结合物与游离 Eu^{3+} ,采用全自动部分收集器 2ml/管进行液体收集;于时间分辨荧光免疫分析仪上进行荧光计数,收集第一峰中荧光计数大于 1000000 的洗脱液,加等体积甘油,混匀后 -20 $^{\circ}$ C 保存;采用棋盘滴定法确定铈标记工作液浓度,用实验缓冲液再按 1:50 稀释检测效果最佳;

[0045] 6) 实验缓冲液、浓缩洗液、增强液、标准品和铈标记物分装;

[0046] 7) 贴标签;以及

[0047] 8) 成品组装。

[0048] 上述步骤所得产品分装即为半成品。抽出 3 份经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)。组装成试剂盒后还需抽检合格后才能出厂。

[0049] 实施例 2 本发明的试剂盒的使用方法

[0050] 以上实施例 1 制备的产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的具体操作如下:

[0051] 将试剂所需数量的微孔反应板条平衡至室温;将 40ml 上述浓缩洗液和 960ml 纯化水混合成工作洗涤液;使用前,将铈标记物用实验缓冲液按体积比 1:50 稀释成标记物工作液。

[0052] 将标准品、质控品或样本用直径 3.0mm 打孔器打入固相抗体包被板中,向每孔中加入 100~200 μ l 上述的 AFP 的标记物工作液;反应板在室温下,缓慢振荡孵育 90~240min;甩出纸片。用上述的工作洗涤液洗板 6 次,拍干;向每孔中加入 100~200 μ l 增强液;缓慢振荡 5 分钟,于时间分辨荧光免疫分析仪内进行荧光计数;按测定参数进行结果拟合分析,得到定量结果;将结果转入唐氏综合征和神经管缺陷风险评估软件,得到孕妇胎儿的出生缺陷的发生机率。

[0053] 实施例 3 本发明的试剂盒的分析性能评价指标

[0054] 以上实施例 1 制备的产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫分析法)的性能评价指标如下:

[0055] 1. 剂量反应曲线和线性范围

[0056] 采用 LOG-LOGB 轴变换模式与 SPLINE 拟合算法,标准品含量对数值为横坐标,相应反应孔荧光值对数值为纵坐标,绘制标准曲线。

[0057] AFP 试剂盒的测量范围内,剂量-反应曲线线性相关系数应不低于 0.9900。

[0058] 2. 灵敏度

[0059] 以零标准检测 20 次,计算其浓度均值 (\bar{x}) 和标准偏差 (s),以 $\bar{x} \pm 2s$ 为检测低限,

则 AFP 检测试剂盒灵敏度 :不高于 1.0U/ml。

[0060] 3. 方法特异性

[0061] AFP 试剂盒检测 500ng/mlCEA,hAFP 表观值不高于 1.0U/ml ;检测 100mg/L 白蛋白, hAFP 表观值不高于 1.0U/ml。

[0062] 4. 准确性

[0063] 以国家标准品为对照, AFP 试剂盒标准品的实测效价与标示效价比平均值应在 0.900 ~ 1.100 范围内。

[0064] 5. 精密性

[0065] AFP 试剂盒的测量精密性,批内不超过 15.0% ;批间不超过 20.0%。

[0066] 6. 室内质控

[0067] 三个不同浓度质控, AFP 试剂盒测值均在允许范围内。

[0068] 7. HOOK 效应

[0069] 试剂盒的 HOOK 效应高于 10000U/ml。

[0070] 8. 热稳定性 (加速破坏试验)

[0071] AFP 试剂盒在 37℃ 3 天烘烤后,检测结果符合以上性能指标。

[0072] 以上性能指标表明“产前筛查甲胎蛋白测定试剂盒 (时间分辨荧光免疫分析法)”的线性范围宽、灵敏度高、特异性强、准确性好、精密性好和热稳定性好,完全符合要求。

[0073] 实施例 4 使用本发明的试剂盒与市场上的时间分辨荧光免疫法试剂盒对孕妇血清检测值的比较

[0074] 使用本发明的滤纸干血片法试剂盒与市场上的血清学法时间分辨荧光免疫法试剂盒对比检测 24 例孕母血清样本,两种试剂盒线性回归方程为 $Y_{(滤纸干血片法)} = 1.0835X_{(血清学法)} - 0.8709$, $r = 0.9993$ 。将给定值带入回归方程计算预期偏差如表 1 :

[0075] 表 1 本发明的试剂盒检测孕妇血清样本结果的预期偏差

[0076]

给定值 (U/ml)	预期值 (U/ml)	偏差 (U/ml)	相对偏倚 (%)
16.51	17.02	0.51	3.08
23.81	24.93	1.12	4.69
29.98	31.61	1.63	5.44
32.96	34.84	1.88	5.71
36.86	39.07	2.21	5.99
43.01	45.73	2.72	6.33
49.61	52.88	3.27	6.59
59.66	63.77	4.11	6.89
71.11	76.18	5.07	7.13
510	551.71	41.71	8.18

[0077] 以上结果表明,本发明的滤纸干血片法试剂盒与市场上的血清法时间分辨荧光免疫法试剂盒检测孕妇血清标本结果具有高度的相关性,预期偏差小。

[0078] AFP 最先用于 NTDs 筛查,检出率为 85%,一般以 MSAFP $> 2.5\text{MoM}$ 为标准,为目前其他标志物无法取代的 NTDs 筛查标志物。而 AFP 单独用于 DS 筛查的阳性检出率约为 25% 左右,一般以 MSAFP $< 0.4\text{MoM}$ 为标准,也有以 MSAFP $< 0.7\text{MoM}$ 为标准。

[0079] 产前筛查日益受到临床重视,本发明产前筛查试剂盒的研制成功,为孕妇血清/全血中 AFP 定量分析提供了可靠的保障,必将对推动国内产前筛查的开展产生深远的影响。

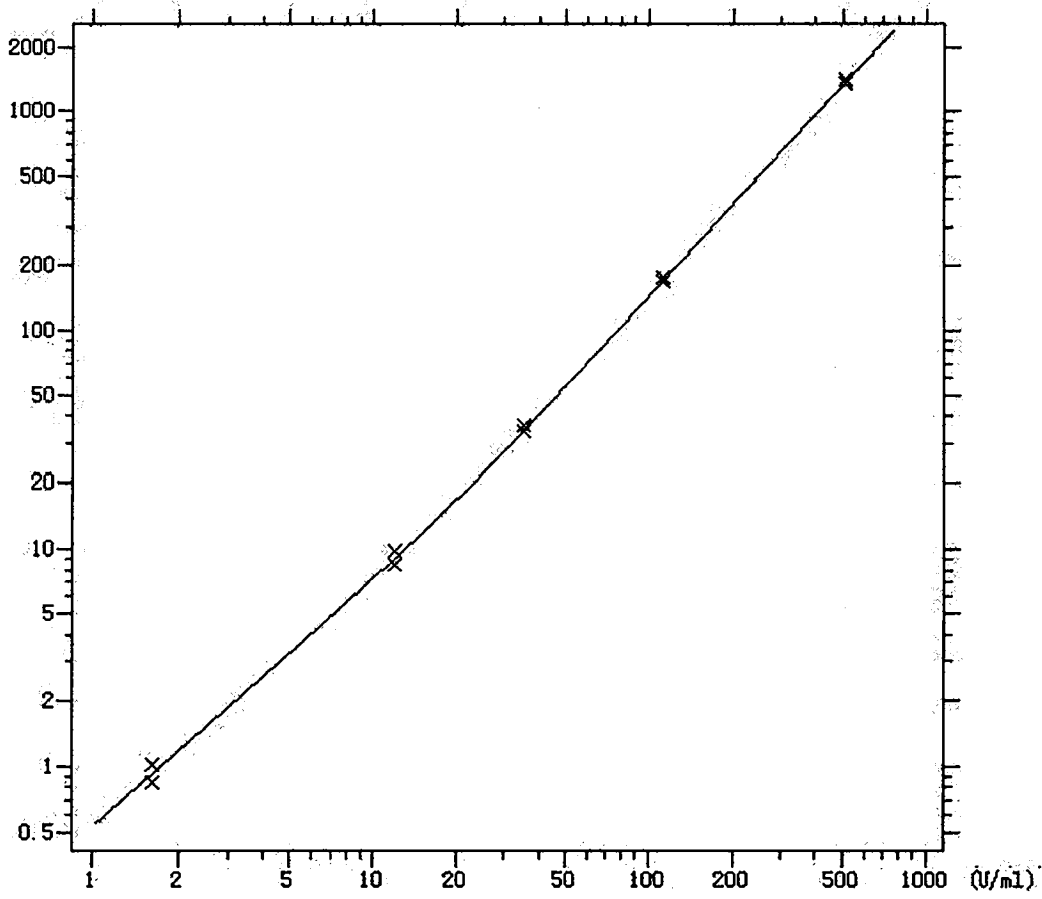


图 1

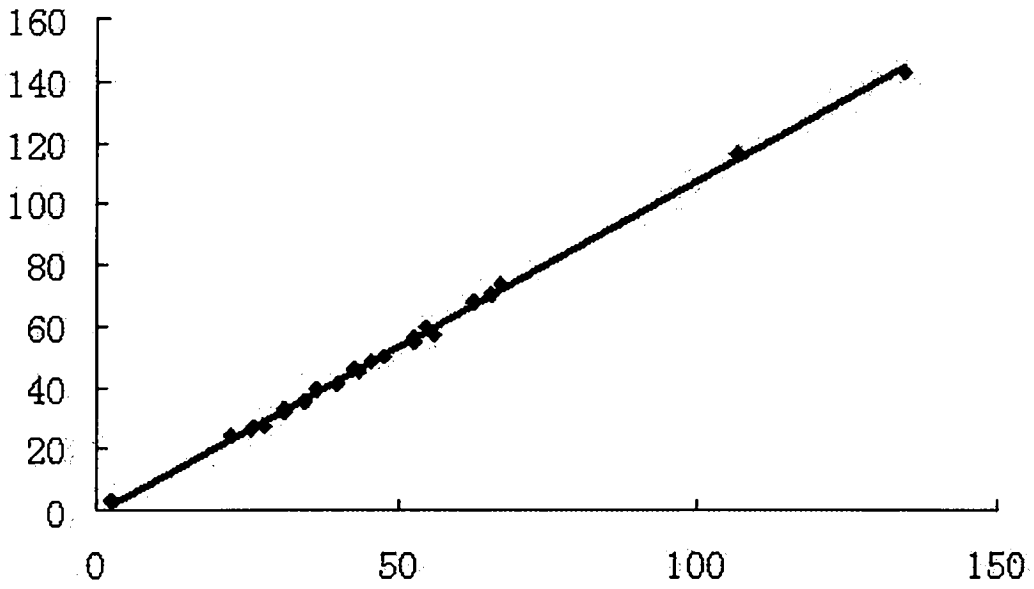


图 2

专利名称(译)	产前筛查AFP测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)及其制备方法		
公开(公告)号	CN101819206B	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN200910213630.6	申请日	2009-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	吴道贫 汪勤 季涛 李贵情 谭玉华 何海荣 冯健明 沈健 郑元升 刘胜利		
发明人	吴道贫 汪勤 季涛 李贵情 谭玉华 何海荣 冯健明 沈健 郑元升 刘胜利		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532		
审查员(译)	温婧		
其他公开文献	CN101819206A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于孕中期产前筛查的甲胎蛋白测定试剂盒(时间分辨荧光免疫法)及其制备方法。该试剂盒主要成分包括：1)实验缓冲液；2)浓缩洗液；3)增强液；4)反应板；5)滤纸干血片标准品、质控品；以及6)钡标记物。根据本发明制备该试剂盒的方法包括以下步骤：1)制备实验缓冲液、浓缩洗液、增强液；2)包被反应板；3)制备标准品、质控品；4)制备钡标记物；5)分装；6)贴标签；以及7)组装为成品。本发明具有检测结果准确性、灵敏度高，稳定性好，检测方法经济、简便、安全、无创伤性、自动化程度高等特点。滤纸干纸片技术应用于产前筛查工作，有利于血样采集、贮存、运输，保障实验可靠性。

给定值 (U/ml)	预期值 (U/ml)	偏差 (U/ml)	相对偏差 (%)
16.51	17.02	0.51	3.08
23.81	24.93	1.12	4.69
29.98	31.61	1.63	5.44
32.96	34.84	1.88	5.71
36.86	39.07	2.21	5.99
43.01	45.73	2.72	6.33