



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212219 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811333181.4

(22)申请日 2018.11.09

(71)申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市朝阳区人民大街5625号

(72)发明人 孙健 杨秀荣 赵佳会 赵丹

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理有限公司 22214

代理人 张伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

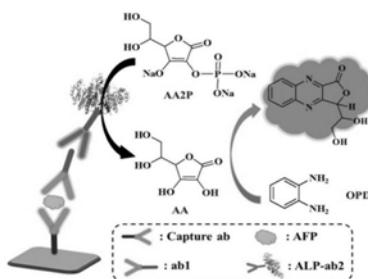
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明属于荧光免疫分析领域,涉及一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法,包括甲胎蛋白、AFP捕获抗体、AFP检测一抗、碱性磷酸酶标记的二抗、L-抗坏血酸磷酸二钠盐、邻苯二胺等。该试剂盒是通过在96孔酶标板上依次吸附捕获抗体、甲胎蛋白和检测一抗形成类似三明治的结构,后续加入的碱性磷酸酶标记的二抗特异性地与检测一抗结合,最后加入底物L-抗坏血酸磷酸二钠盐,在碱性磷酸酶的脱磷酸作用下生成抗坏血酸,酶切产物与邻苯二胺发生原位反应生成具有荧光发射的基团,进而实现对甲胎蛋白的定量检测。该试剂盒的检测结果与基于4-硝基苯磷酸二钠盐的比色ELISA方法相符,可通过荧光激活反应而灵敏检测甲胎蛋白,并最终用于检测肝癌病人血清中甲胎蛋白。



1.一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,包括:

甲胎蛋白,AFP捕获抗体,AFP检测一抗,碱性磷酸酶标记的二抗,包被缓冲液,洗涤液,抗体稀释液,样品稀释液,L-抗坏血酸磷酸二钠盐,邻苯二胺,封闭液,三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,MgCl<sub>2</sub>溶液。

2.根据权利要求1所述的甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,所述的包被缓冲液是pH=8.0~9.6的10~100mM碳酸盐溶液。

3.根据权利要求1所述的甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液是pH=7.4的含有0.05~0.5%Tween-20和10~100mM磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液。

4.根据权利要求1所述的甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,所述的抗体稀释液是pH=7.4的含有0.05~0.2%Tween-20和0.1~2%牛血清蛋白的缓冲溶液;所述的样品稀释液是含有0.1~1%牛血清蛋白的缓冲溶液。

5.根据权利要求1所述的甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,所述的封闭液是用抗体稀释液溶解的牛血清蛋白浓度为0.1~5%的溶液。

6.根据权利要求1所述的甲胎蛋白荧光检测试剂盒,其特征在于,所述的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液是浓度为50~200mM、pH 8.5~9.5的溶液,所述的MgCl<sub>2</sub>溶液的浓度是0.25~2mM。

7.一种甲胎蛋白的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一:将 AFP捕获抗体用包被稀释液稀释后加入酶标板后进行孵育,然后弃去孔内液体并用洗涤液清洗,再向孔内加入封闭液,孵育后弃去孔内液体,再用洗涤液清洗,之后加入不同浓度的用样品稀释液稀释后的甲胎蛋白标准溶液并进行孵育,接着弃去孔内液体后用洗涤液清洗,加入用抗体稀释液稀释后的 AFP检测一抗接着进行孵育后,弃去孔内液体后并用洗涤液清洗,加入用抗体稀释液稀释后的碱性磷酸酶标记的二抗,孵育后弃去孔内液体后并用洗涤液清洗;

步骤二:在孔内加入L-抗坏血酸磷酸二钠盐溶液,MgCl<sub>2</sub>溶液,三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,孵育后依次加入邻苯二胺溶液,孵育后进行荧光光谱测试。

8.根据权利要求7所述的甲胎蛋白的检测方法,其特征在于,其具体包括以下步骤:

步骤一:将 AFP捕获抗体用包被稀释液稀释200倍,取100μL加入酶标板后在4℃孵育过夜或者室温孵育2.5h,弃去孔内液体并用300μL洗涤液洗3次,在孔内加入200μL封闭液,37℃孵育1h后弃去孔内液体,再用300μL洗涤液洗3次,之后加入不同浓度的用样品稀释液稀释后的甲胎蛋白标准溶液并在37℃孵育1h,弃去孔内液体后用300μL洗涤液洗3次,加入100μL用抗体稀释液稀释后的 AFP检测一抗,37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤3次,加入100μL用抗体稀释液稀释后的碱性磷酸酶标记的二抗,37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤3次;

步骤二:在孔内加入25μL 100mM L-抗坏血酸磷酸二钠盐溶液,30μL MgCl<sub>2</sub>溶液,170μL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液,37℃孵育50min后依次加入25μL 10mM邻苯二胺溶液,37℃孵育120min后进行荧光光谱测试。

9.根据权利要求8所述的甲胎蛋白的检测方法,其特征在于,步骤二中的 AFP捕获抗体的浓度为10~50μg/mL, AFP检测一抗的浓度为5~20μg/mL, 碱性磷酸酶标记的二抗的浓度为0.05~1μg/mL。

10. 根据权利要求7-9任意一项所述的甲胎蛋白的检测方法，其特征在于，  
所述的包被缓冲液是pH=8.0~9.6的10~100mM碳酸盐溶液；  
所述的洗涤液是pH=7.4的含有0.05~0.5%Tween-20和10~100mM磷酸根/磷酸氢根/  
磷酸二氢根的混合溶液；  
所述的抗体稀释液是pH=7.4的含有0.05~0.2%Tween-20和0.1~2%牛血清蛋白的缓  
冲溶液；  
所述的样品稀释液是含有0.1~1%牛血清蛋白的缓冲溶液；所述的封闭液是用抗体稀  
释液溶解的牛血清蛋白浓度为0.1~5%的溶液；  
所述的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液是浓度为50~200mM、pH 8.5~9.5的溶液；  
所述的MgCl<sub>2</sub>溶液的浓度是0.25~2mM。

## 一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光免疫分析领域,具体涉及一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法。

### 背景技术

[0002] 酶联免疫吸附分析(ELISA)是将抗原抗体特异性识别作用和酶的生物催化性质相结合,并以酶作为信号输出单元而实现抗原高灵敏检测的技术,是复杂生物基质样品分析中的一个重要的方法。酶广泛地作为免疫分析中的标记物,因为一个酶分子可以在短时间内将大量的酶底物转化成产物,从而发挥信号放大的作用,该信号放大效应为分析物的灵敏检测奠定基础。

[0003] 碱性磷酸酶(ALP)是一种磷酸水解酶,该酶广泛分布于人体组织和体液,以骨、肝、乳腺、小肠、肾中含量较高,其大部分由骨细胞产生,小部分来自肝,经胆汁排入肠道。在碱性环境中,ALP能水解很多磷酸单酯化合物,将底物脱磷酸化。该酶的用途广泛,它可以作为某些疾病的标志物,包括骨病,糖尿病,乳腺癌和前列腺癌和肝炎。ALP由于其较高的催化活性、较好的稳定性、易于和抗体偶联等特点,也经常作为ELISA的信号输出酶。

[0004] 与传统的比色ELISA相比,荧光ELISA由于其灵敏度高和背景干扰低,具有较明显的优势,而得到越来越多的关注。生物标志物可客观测定和评价普通生理、病理或治疗过程中的某种特征性,通过对它的测定可以指示不同的疾病导致的致病过程,生物标志物的监测广泛用于基础和临床研究。检查一种疾病特异性的生物标志物,对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控可能起到帮助作用。甲胎蛋白(AFP)是肝癌患者血清中的一个重要标志物,正常成年人血清中AFP含量通常低于20ng/mL,甚至低于5ng/mL,而肝癌患者血清中AFP含量异常升高,通常大于400ng/mL。因此,AFP的准确定量对肝癌疾病的诊断和监控具有重大意义。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了提供一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法,该检测方法灵敏度高,具有普适性。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案具体如下:

[0007] 一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒,包括:

[0008] 甲胎蛋白(AFP), AFP捕获抗体, AFP检测一抗, 碱性磷酸酶标记的二抗, 包被缓冲液, 洗涤液, 抗体稀释液, 样品稀释液, L-抗坏血酸磷酸二钠盐(AA2P), 邻苯二胺(OPD), 封闭液, 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液, MgCl<sub>2</sub>溶液。

[0009] 在上述技术方案中,所述的包被缓冲液是pH=8.0~9.6的10~100mM碳酸盐溶液。

[0010] 在上述技术方案中,所述的洗涤液是pH=7.4的含有0.05~0.5%Tween-20和10~100mM磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液。

[0011] 在上述技术方案中,所述的抗体稀释液是pH=7.4的含有0.05~0.2%Tween-20和

0.1-2%牛血清蛋白的缓冲溶液；所述的样品稀释液是含有0.1-1%牛血清蛋白的缓冲溶液。

[0012] 在上述技术方案中，所述的封闭液是用抗体稀释液溶解的牛血清蛋白浓度为0.1~5%的溶液。

[0013] 在上述技术方案中，所述的Tris-HCl缓冲液是浓度为50~200mM、pH8.5~9.5的溶液，所述的MgCl<sub>2</sub>溶液的浓度是0.25~2mM。

[0014] 本发明还提供一种甲胎蛋白的检测方法，包括以下步骤：

[0015] 步骤一：将 AFP 捕获抗体用包被稀释液稀释后加入酶标板后进行孵育，然后弃去孔内液体并用洗涤液清洗，再向孔内加入封闭液，孵育后弃去孔内液体，再用洗涤液清洗，之后加入不同浓度的用样品稀释液稀释后的 AFP 标准溶液并进行孵育，接着弃去孔内液体后用洗涤液清洗，加入用抗体稀释液稀释后的 AFP 检测一抗接着进行孵育后，弃去孔内液体后并用洗涤液清洗，加入用抗体稀释液稀释后的碱性磷酸酶标记的二抗，孵育后弃去孔内液体后并用洗涤液清洗；

[0016] 步骤二：在孔内加入 AA2P 溶液，MgCl<sub>2</sub> 溶液，Tris-HCl 缓冲溶液，孵育后依次加入 OPD 溶液，孵育后进行荧光光谱测试。

[0017] 在上述技术方案中，所述甲胎蛋白的检测方法具体包括以下步骤：

[0018] 步骤一：将 AFP 捕获抗体用包被稀释液稀释 200 倍，取 100μL 加入酶标板后在 4℃ 孵育过夜或者室温孵育 2.5h，弃去孔内液体并用 300μL 洗涤液洗 3 次，在孔内加入 200μL 封闭液，37℃ 孵育 1h 后弃去孔内液体，再用 300μL 洗涤液洗 3 次，之后加入不同浓度的用样品稀释液稀释后的 AFP 标准溶液并在 37℃ 孵育 1h，弃去孔内液体后用 300μL 洗涤液洗 3 次，加入 100μL 用抗体稀释液稀释后的 AFP 检测一抗，37℃ 孵育 1h 后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤 3 次，加入 100μL 用抗体稀释液稀释后的碱性磷酸酶标记的二抗，37℃ 孵育 1h 后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤 3 次；

[0019] 步骤二：在孔内加入 25μL 100mM AA2P 溶液，30μL MgCl<sub>2</sub> 溶液，170μL Tris-HCl 缓冲溶液，37℃ 孵育 50min 后依次加入 25μL 10mM OPD 溶液，37℃ 孵育 120min 后进行荧光光谱测试。

[0020] 在上述技术方案中，步骤二中的 AFP 捕获抗体的浓度为 10~50μg/mL，AFP 检测一抗的浓度为 5~20μg/mL，碱性磷酸酶标记的二抗的浓度为 0.05~1μg/mL。

[0021] 在上述技术方案中，

[0022] 所述的包被缓冲液是 pH=8.0~9.6 的 10~100mM 碳酸盐溶液；

[0023] 所述的洗涤液是 pH=7.4 的含有 0.05~0.5% Tween-20 和 10~100mM 磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液；

[0024] 所述的抗体稀释液是 pH=7.4 的含有 0.05~0.2% Tween-20 和 0.1~2% 牛血清蛋白的缓冲溶液；

[0025] 所述的样品稀释液是含有 0.1~1% 牛血清蛋白的缓冲溶液；所述的封闭液是用抗体稀释液溶解的牛血清蛋白浓度为 0.1~5% 的溶液；

[0026] 所述的 Tris-HCl 缓冲液是浓度为 50~200mM、pH 8.5~9.5 的溶液；

[0027] 所述的 MgCl<sub>2</sub> 溶液的浓度是 0.25~2mM。

[0028] 本发明的有益效果是：

[0029] 本发明提供的甲胎蛋白荧光检测试剂盒，该试剂盒是基于碱性磷酸酶引发的原位荧光反应检测肝癌标志物AFP，其原理是基于抗原抗体特异性作用和酶的信号放大效应，通过在酶标板上依次吸附捕获抗体、 AFP 和 AFP 检测一抗来形成类似三明治的结构，后续加入的碱性磷酸酶标记的二抗特异地与 AFP 检测一抗结合，最后加入底物 AA2P，在碱性磷酸酶的脱磷酸作用下，AA2P 被脱磷酸化生成抗坏血酸（AA），与后续加入的 OPD 发生反应生成具有荧光发射的基团，体系的荧光强度与碱性磷酸酶的浓度成正相关，而 AFP 浓度与碱性磷酸酶浓度正相关，进而实现对 AFP 的定量检测。碱性磷酸酶作为连接 AFP 浓度和荧光信号的桥梁，利用碱性磷酸酶引发的荧光反应作为输出信号。将该试剂盒用于正常人和肝癌患者的血清中 AFP 含量的检测，结果表明该试剂盒的检测结果与基于 pNPP 的比色 ELISA 方法相符，该试剂盒可通过荧光激活反应而检测 AFP。同时，该方法具有普适性，只需根据不同的靶标抗原更换相应的捕获抗体和检测一抗，就可将其应用拓展到其他癌症标志物的检测。

[0030] 本发明提供的 AFP 检测方法，该方法是以碱性磷酸酶作为 ELISA 信号输出酶来提供一种荧光的信号输出模式，碱性磷酸酶具有的脱磷酸作用将 AA2P 转变成 AA，然后加入 OPD 溶液，AA 和 OPD 能发生反应产生具有荧光发射的基团，最终通过荧光激活反应来检测肿瘤标志物 AFP。

## 附图说明

[0031] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0032] 图 1 为本发明实施例 1 基于碱性磷酸酶引发的原位荧光反应检测肝癌标志物 AFP 的酶联免疫方法示意图。

[0033] 图 2 为本发明实施例 1-2 中的 ELISA 的荧光强度和 AFP 浓度的曲线关系图。

## 具体实施方式

[0034] 下面结合附图对本发明做以详细说明。

[0035] 本发明提供一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒，包括：

[0036] 甲胎蛋白（AFP）， AFP 捕获抗体， AFP 检测一抗， 碱性磷酸酶标记的二抗， 包被缓冲液， 洗涤液， 抗体稀释液， 样品稀释液， L-抗坏血酸磷酸二钠盐（AA2P）， 邻苯二胺（OPD）， 封闭液， 三羟甲基氨基甲烷-盐酸（Tris-HCl）缓冲液， MgCl<sub>2</sub>溶液。

[0037] 优选所述的包被缓冲液是 pH=8.0~9.6 的 10~100mM 碳酸盐溶液； 所述的洗涤液是 pH=7.4 的含有 0.05~0.5% Tween-20 和 10~100mM 磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液； 所述的抗体稀释液是 pH=7.4 的含有 0.05~0.2% Tween-20 和 0.1~2% 牛血清蛋白的缓冲溶液； 所述的样品稀释液是含有 0.1~1% 牛血清蛋白的缓冲溶液； 所述的封闭液是用抗体稀释液溶解的牛血清蛋白浓度为 0.1~5% 的溶液； 所述的 Tris-HCl 缓冲液是浓度为 50~200mM、 pH 8.5~9.5 的溶液， 所述的 MgCl<sub>2</sub>溶液的浓度是 0.25~2mM。

[0038] 本发明还提供一种甲胎蛋白的检测方法， 具体包括以下步骤：

[0039] 步骤一： 将 AFP 捕获抗体用包被稀释液稀释 200 倍， 取 100μL 加入酶标板后在 4℃ 孵育过夜或者室温孵育 2.5h， 弃去孔内液体并用 300μL 洗涤液洗 3 次，在孔内加入 200μL 封闭液， 37℃ 孵育 1h 后弃去孔内液体， 再用 300μL 洗涤液洗 3 次， 之后加入不同浓度的用样品稀释液稀释后的 AFP 标准溶液并在 37℃ 孵育 1h， 弃去孔内液体后用 300μL 洗涤液洗 3 次， 加入 100μ

L用抗体稀释液稀释后的AFP检测一抗,37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤3次,加入100μL用抗体稀释液稀释后的碱性磷酸酶标记的二抗,37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液洗涤3次;

[0040] 步骤二:在孔内加入25μL 100mM AA2P溶液,30μL MgCl<sub>2</sub>溶液,170μL Tris-HCl缓冲溶液,37℃孵育50min后依次加入25μL 10mM OPD溶液,37℃孵育120min后进行荧光光谱测试。

[0041] 优选步骤二中的 AFP捕获抗体的浓度为10~50μg/mL, AFP检测一抗的浓度为5~20μg/mL, 碱性磷酸酶标记的二抗的浓度为0.05~1μg/mL。

[0042] 上述检测方法中:优选所述的包被缓冲液是pH=8.0~9.6的10~100mM碳酸盐溶液;所述的洗涤液是pH=7.4的含有0.05~0.5%Tween-20和10~100mM磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液;所述的抗体稀释液是pH=7.4的含有0.05~0.2%Tween-20和0.1~2%牛血清蛋白的缓冲溶液;所述的样品稀释液是含有0.1~1%牛血清蛋白的缓冲溶液;所述的封闭液是用抗体稀释液溶解的牛血清蛋白浓度为0.1~5%的溶液;所述的Tris-HCl缓冲液是浓度为50~200mM、pH 8.5~9.5的溶液;所述的MgCl<sub>2</sub>溶液的浓度是0.25~2mM。

[0043] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。需要说明的是,实施例中涉及到的原料均为商购获得。

[0044] 实施例1

[0045] 夹心式ELISA操作步骤:

[0046] 首先,选用鼠单抗作为AFP的捕获抗体,用包被缓冲液稀释至5μg/mL后,取100μL加入酶标板后在4℃静置包被过夜。弃去孔内液体并用300μL洗涤液清洗三次并拍干,在孔内加入200μL 1%牛血清蛋白溶液,37℃封闭1h后弃去孔内液体,再用300μL洗涤液洗涤,之后加入用样品稀释液稀释后的100μL不同浓度AFP标准溶液(0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 and 150ng/mL)并在37℃孵育1h,弃去孔内液体后用300μL洗涤液清洗酶标板。加入100μL用抗体稀释液稀释后的兔多抗(抗AFP, 2μg/mL), 37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液清洗。加入用抗体稀释液稀释后的100μL碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗(333ng/mL), 37℃孵育1h后弃去孔内液体后并用洗涤液清洗。此夹心式ELISA方法的模型示意图如图1所示。

[0047] 本实施例中所用的包被缓冲液是pH=9.0的50mM碳酸盐溶液,洗涤液是pH=7.4的含有0.05%Tween-20和20mM磷酸根/磷酸氢根/磷酸二氢根的混合溶液;所述的抗体稀释液是pH=7.4的含有0.1%Tween-20和0.5%牛血清蛋白的磷酸盐缓冲溶液;所述的样品稀释液是pH=7.4的含有0.1%牛血清蛋白的磷酸盐缓冲溶液。

[0048] 本实施例中所用的包被缓冲液、洗涤液、抗体稀释液、样品稀释液及封闭液还可以替换成前述限定的其他组成的,这里不再一一例举。

[0049] 实施例2

[0050] 碱性磷酸酶引发的原位荧光激活反应

[0051] 在实施例1中得到的酶标板孔内加入25μL 100mM AA2P溶液,30μL 0.25mM MgCl<sub>2</sub>溶液,170μL 50mM Tris-HCl缓冲溶液(pH=9.0),37℃孵育50min后依次加入25μL 10mM OPD溶液,37℃孵育120min后进行荧光光谱测试。

[0052] 图2为本发明实施例1,2中的夹心式ELISA体系的荧光信号随AFP浓度变化的曲线

关系图,其中图2(A)为夹心式ELISA体系的荧光发射光谱随AFP浓度增加的变化曲线图(激发波长为360nm);图2(B)为荧光发射强度随AFP浓度的变化与线性响应关系(横坐标为AFP浓度,纵坐标为425nm处的荧光发射强度)。图2的实验结果说明,随着AFP浓度的升高(0~150ng/mL),体系在425nm处的荧光强度与 AFP 的浓度呈正相关,荧光强度与 AFP 浓度在 0.5~40ng/mL 之间呈现较好的线性关系,拟合的线性方程为  $F = 7.65 + 1.17C_{\text{AFP}}$  (ng/mL),  $R^2 = 0.997$ 。该方法能特异性检出 0.21ng/mL 的 AFP,能够满足测试血清中 AFP 含量的需求。

[0053] 本实施例中所用的  $\text{MgCl}_2$  溶液及 Tris-HCl 缓冲溶液还可以替换成前述限定的其他组成的,这里不再一一例举。

[0054] 实施例3

[0055] 肝癌患者和正常人血清中 AFP 含量检测:

[0056] 肝癌患者和正常人的临床血清样本由吉林大学第二医院提供,血清的荧光夹心式 ELISA 方法与实施例 1,2 中的 AFP 测定方法基本相同,不同之处在于用稀释的临床血清样品代替实施例 1 的 AFP 标准溶液。检测前将患者血清样品稀释 20 倍后加入孔中。同时以 4- 硝基苯磷酸二钠盐(pNPP)作为碱性磷酸酶的底物用于 ELISA 的方法作为对照。

[0057] 如表 1 所示,正常人和肝癌患者的血清中 AFP 含量的检测结果表明,本发明试剂盒的检测结果和传统的 pNPP-ELISA 检测结果相当,表明本发明的试剂盒能用于临床检测,检测结果可靠。

[0058] 表 1. 正常人(A,B) 和肝癌患者(C-F) 血清中的 AFP 检测结果 (mean  $\pm$  SD; n=3) .

[0059]

Samples	The present method		pNPP-based standard ELISA method	
	Detected (ng/mL)	RSD(%)	Detected (ng/mL)	RSD(%)
A	4.8	2.35	5.6	1.98
B	12.4	3.45	13.6	2.57
C	189.3	1.35	210.4	3.68
D	356.8	3.78	380.2	5.02
E	568.6	5.45	582.4	4.87
F	446.8	6.89	448.6	2.89

[0060] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之中。

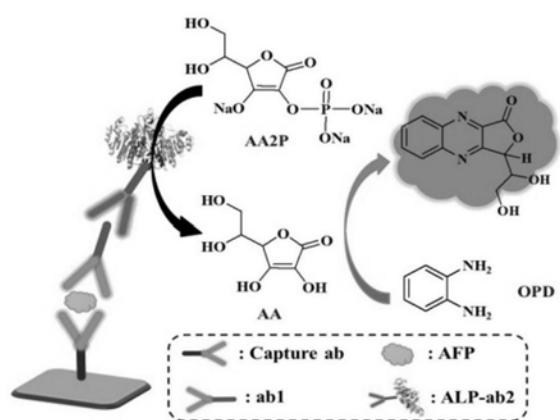


图1

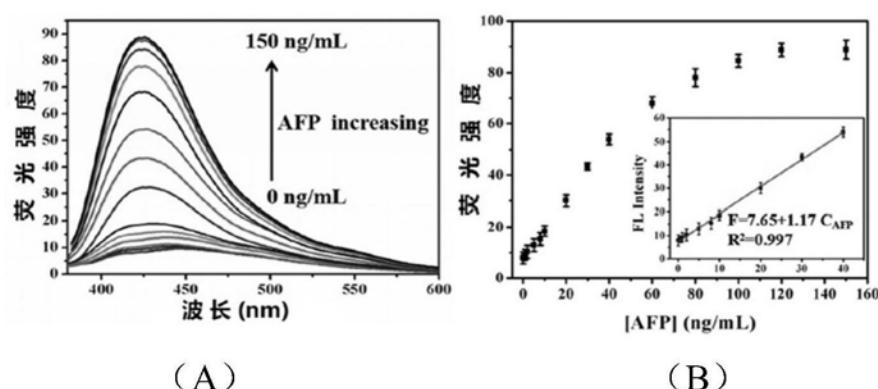


图2

专利名称(译)	一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109212219A</a>	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811333181.4	申请日	2018-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
[标]发明人	孙健 杨秀荣 赵佳会 赵丹		
发明人	孙健 杨秀荣 赵佳会 赵丹		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/535 G01N33/533		
代理人(译)	张伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明属于荧光免疫分析领域，涉及一种甲胎蛋白荧光检测试剂盒及检测方法，包括甲胎蛋白、AFP捕获抗体、AFP检测一抗、碱性磷酸酶标记的二抗、L-抗坏血酸磷酸二钠盐、邻苯二胺等。该试剂盒是通过在96孔酶标板上依次吸附捕获抗体、甲胎蛋白和检测一抗形成类似三明治的结构，后续加入的碱性磷酸酶标记的二抗特异性地与检测一抗结合，最后加入底物L-抗坏血酸磷酸二钠盐，在碱性磷酸酶的脱磷酸作用下生成抗坏血酸，酶切产物与邻苯二胺发生原位反应生成具有荧光发射的基团，进而实现对甲胎蛋白的定量检测。该试剂盒的检测结果与基于4-硝基苯磷酸二钠盐的比色ELISA方法相符，可通过荧光激活反应而灵敏检测甲胎蛋白，并最终用于检测肝癌病人血清中甲胎蛋白。

