



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104316692 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410577365. 0

(22) 申请日 2014. 10. 24

(71) 申请人 广州市丰华生物工程有限公司
地址 510730 广东省广州市开发区银谊街 6 号

(72) 发明人 冯健明

(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 付静

(51) Int. Cl.
G01N 33/66 (2006. 01)
G01N 33/531 (2006. 01)

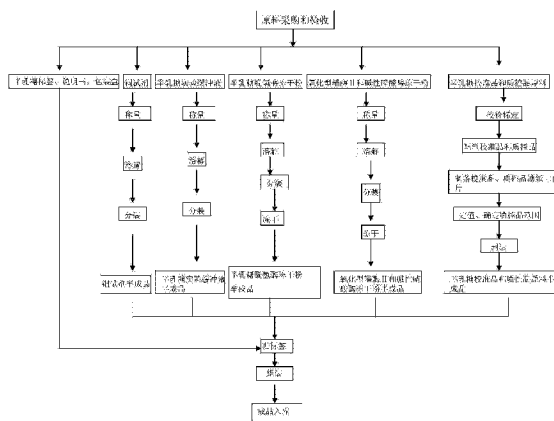
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

一种新生儿总半乳糖检测试剂盒、其使用方法及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种新生儿总半乳糖检测试剂盒,包括实验缓冲液,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉、半乳糖脱氢酶冻干粉、半乳糖滤纸干血片校准品、质控品、铜试剂和白色反应板。本发明还公开了新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法和制备方法。本发明的新生儿总半乳糖检测试剂盒经济、省时、省工,可用于新生儿半乳糖血症筛查,为新生儿筛查的普及奠定良好的技术基础。



1. 一种新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:包括实验缓冲液,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉、半乳糖脱氢酶冻干粉,半乳糖滤纸干血片校准品、质控品,铜试剂和白色反应板。

2. 如权利要求 1 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液,其中,Tris-HCl 的摩尔浓度为 5 ~ 100mmol/L,KCl 的摩尔浓度为 10 ~ 100mmol/L。

3. 如权利要求 1 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉的制备方法为:a) 制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液,其包括浓度为 0.5 ~ 5000U/mL 的碱性磷酸酶,浓度为 10 ~ 1000mg/mL 的氧化型辅酶 II,摩尔浓度为 10 ~ 20mmol/L 的 Tris-HCl,摩尔浓度为 40 ~ 60mmol/L 的 KCl,摩尔浓度为 0.5 ~ 1.5mmol/L 的 MgCl₂,质量百分比浓度为 1 ~ 3% 的海藻糖,质量百分比浓度为 2 ~ 4% 的甘露醇;b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥,即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉。

4. 如权利要求 3 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述步骤 a) 为:制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液,其包括浓度为 1000U/mL 的碱性磷酸酶,浓度为 46mg/mL 的氧化型辅酶 II,摩尔浓度为 10mmol/L 的 Tris-HCl,摩尔浓度为 50mmol/L 的 KCl,摩尔浓度为 1mmol/L 的 MgCl₂,质量百分比浓度为 2% 的海藻糖,质量百分比浓度为 3% 的甘露醇。

5. 如权利要求 1 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为:1) 制备半乳糖脱氢酶溶液,其包括浓度为 0.05 ~ 200U/mL 的半乳糖脱氢酶,质量百分比浓度为 0.5 ~ 1.5% 的 BSA,摩尔浓度为 0.6 ~ 1.0mmol/L 的 EDTA,摩尔浓度为 1.3 ~ 5.0mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄;2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥,即得所述半乳糖脱氢酶冻干粉。

6. 如权利要求 5 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述步骤 1) 为:制备半乳糖脱氢酶溶液,其包括浓度为 20U/mL 的半乳糖脱氢酶,质量百分比浓度为 1% 的 BSA,摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA,摩尔浓度为 3.2mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄。

7. 如权利要求 1 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为:使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血,调整血细胞比容至 50% ~ 55%,分别向其中加入不同量的 D- 半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品,将配置好的校准品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点,将配置好的质控品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上,经室温自然干燥后得到半乳糖干滤纸片校准品和质控品,用铝箔袋真空密封。

8. 如权利要求 1 所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒,其特征在于:所述铜试剂中包括摩尔浓度为 0.5 ~ 8.0mmol/L 的硫酸铜,摩尔浓度为 10 ~ 250mmol/L 的碳酸钠,摩尔浓度为 0.5 ~ 10mmol/L 的酒石酸钾钠。

9. 如权利要求 1 ~ 8 中任一项权利要求所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 准备所需试剂:取出试剂盒,将其中的铜试剂仍于 2 ~ 8℃ 下保存,即用即取,试剂盒中其他试剂平衡至室温;配制质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液;配制反应工作液:将

碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉加入到实验缓冲液中,再加入半乳糖脱氢酶,混匀备用,其中,半乳糖脱氢酶的最终浓度为 0.0015 ~ 6U/mL,碱性磷酸酶的最终浓度为 0.001 ~ 10U/mL,氧化型辅酶 II 的最终浓度为 0.13 ~ 13mg/mL;

2) 将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和采集的滤纸干血片样本用直径 3.0mm 自动打孔仪打入塑料排钉上;

3) 向洁净的普通反应板的微孔中分别加入 100 ~ 150 μ L 的质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液,将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本浸入乙醇溶液中约 1min,然后将挂有半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本的塑料排钉烘干;

4) 向白色反应板每孔中分别加入 200 ~ 300 μ L 反应工作液,将烘干后的半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本放入白色反应板的微孔中,37 $^{\circ}$ C 缓慢震荡 0.5 ~ 1 小时;

5) 取出铜试剂,向白色反应管的每孔中分别加入 100 ~ 200 μ L 铜试剂,混合均匀,得到最终反应物;

6) 样本中总半乳糖浓度的测定:

(1) 将半乳糖滤纸干血片校准品的不同浓度的校准位点的最终反应物分别放入荧光分析仪中,检测各个校准位点的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 的蓝色荧光的荧光强度,并根据已知的半乳糖滤纸干血片校准品各个位点的 D-半乳糖的浓度,绘制标准曲线;

(2) 用荧光分析仪测定滤纸干血片样本的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 蓝色荧光的荧光强度,并根据标准曲线,得出滤纸干血片样本中的总半乳糖浓度。

10. 如权利要求 1 ~ 8 中任一权利要求所述的新生儿总半乳糖检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 配制实验缓冲液、铜试剂、碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液、半乳糖脱氢酶溶液;

2) 以不同浓度的 D-半乳糖纯品加入基质中混合,然后滴加在滤纸上制备半乳糖滤纸干血片校准品、质控品;

3) 分装所述实验缓冲液、铜试剂、半乳糖滤纸干血片校准品、质控品;分装所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液并冻成干粉;分装所述半乳糖脱氢酶溶液并冻成干粉;

4) 贴标签;

5) 组装为成品。

一种新生儿总半乳糖检测试剂盒、其使用方法及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新生儿半乳糖血症的筛查领域,尤其涉及一种利用总半乳糖与氧化型辅酶 II 反应生成荧光物质还原型辅酶 II 的原理,快速检测新生儿总半乳糖的试剂盒、其使用方法及制备方法。

背景技术

[0002] 半乳糖血症是由于半乳糖代谢过程中酶缺陷导致半乳糖利用障碍、有害代谢产物积累,属于常染色体隐性遗传疾病。在临床上较为少见,不同的地区发病率存在一定的差异。沙特阿拉伯东部地区的发病率为 12/10 万,爱尔兰永久居民的发病率为 1/3 万,美国的发病率约为 1/5.9 万。据报道我国香港地区的发病率为 0.25/10 万。

[0003] 在肝脏中,半乳糖在半乳糖激酶 (galactokinase, GALK)、半乳糖 -1- 磷酸尿苷酰转移酶 (galactose-1-phosphate uridyl-transferase, GALT) 和半乳糖尿苷二磷酸 -4- 表异构酶 (uridine-diphosphate galactose-4' epimerase, UDPGa-4-E) 的作用下,通过 Leloir 途径,转变为葡萄糖和能量被组织利用。该代谢过程中任何一种酶的缺陷都将导致半乳糖的异常堆积,堆积的半乳糖分别在醛糖还原酶和脱氢酶的作用下生成半乳糖醇和半乳糖酸。半乳糖及其异常代谢产物的沉积导致半乳糖血症的发生。

[0004] (1) 经典的半乳糖血症 (I 型) 即半乳糖 -1- 磷酸尿苷酰转移酶 (galactose-1-phosphate uridyl-transferase, GALT) 缺陷,占 95%。该类型患儿常在围生期即发病,表现为进食奶类后出现呕吐、拒食、体重不增、腹泻、嗜睡和肌张力减低等症状,随后出现黄疸及肝脏肿大,如未得到及时诊治,患儿可出现腹水、肝功能衰竭、出血等终末期症状,多于新生儿期夭折。

[0005] (2) II 型半乳糖激酶 (GALK) 缺陷,较罕见。病情比 I 型半乳糖血症轻,白内障常见,智力发育正常或迟缓,血中半乳糖浓度增高,尿中出现半乳糖或半乳糖醇,但无氨基酸和蛋白。

[0006] (3) III 型半乳糖尿苷二磷酸 -4- 表异构酶 (UDPGa1-4-E) 缺陷,罕见。临床表现不一,可无症状或类似于 I 型半乳糖血症。

[0007] 因半乳糖血症的临床表现无特异性,故其诊断多依赖于实验室检查。目前常用的诊断方法主要为酶学检测、血和尿中半乳糖及其代谢产物的检测和基因诊断。

[0008] (1) 酶学检测:主要是针对 GALT 缺陷的检测。检验原理主要依赖于 Beutler 试验中检测红细胞中 GALT 酶活性的方法。此方法在全血或者血滤纸片中加入混有尿苷 - 二磷酸葡萄糖、1- 磷酸半乳糖 (Ga-1-P)、三磷酸吡啶核苷酸 (TPN) 的混合物,孵育一段时间,如果 GALT 活性正常,则 Ga1-1-P 和尿苷二磷酸葡萄糖可以在 GALT 的作用下生成 α -1- 磷酸葡萄糖。 α -1- 磷酸葡萄糖在变位酶的作用下生成 β -1- 磷酸葡萄糖,进而在葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 (G6PD) 存在的情况下可以还原 TPN 生成还原型的 TPN,后者被波长为 465 μ m 的紫外灯激发可以产生荧光。该测定方法具有季节差异性,容易受到酶活性抑制因素的影响,且反应依赖 G6PD 的存在,易造成假阳性结果。同时,半乳糖代谢主要在肝内进行,而目前酶学检测都是

检测红细胞内对 GALT 的活性,并不能完全反映肝内半乳糖的代谢水平。

[0009] (2) 血和尿中半乳糖及其代谢产物的检测:由于半乳糖代谢途径的阻断及旁路代谢的不完全,人体内可以出现半乳糖、1-磷酸半乳糖、半乳糖醇、半乳糖酸等代谢产物堆积。由于 1-磷酸半乳糖是半乳糖血症的主要致病物质,因此常通过检测半乳糖、1-磷酸半乳糖的浓度来诊断半乳糖血症。代谢物的检测依赖于半乳糖的摄入,容易产生假阴性。此外,在保证假阴性率的前提下,通过代谢物检测无法判断属于哪一种酶缺陷。

[0010] (3) 基因诊断:目前已经发现了近 20 种 GALK 基因突变,160 余种 GALT 基因突变,近 10 种 UDPGal-4-E 基因突变,通过对致病突变的检测可以诊断半乳糖血症。基因突变因人种而异,具有地域性,而我国人群中尚未有半乳糖血症常见突变的报道。同时由于基因诊断耗时相对较长,因此主要用于辅助诊断。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于解决现有的新生儿半乳糖血症筛查准确性差,检测速度慢,工作强度高的问题。

[0012] 因此,本发明提供了一种新生儿总半乳糖检测试剂盒,包括实验缓冲液,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉、半乳糖脱氢酶冻干粉,半乳糖滤纸干血片校准品、质控品,铜试剂和白色反应板。

[0013] 在上述技术方案中,由于人体中的半乳糖主要是 D-半乳糖,这里总半乳糖是指 D-半乳糖和 D-半乳糖-1-磷酸。无论是三种酶(GALT、GALK、UDPGal-4-E)中的哪一种的缺陷引起的半乳糖血症,患者体内的 D-半乳糖或者 D-半乳糖-1-磷酸的量会升高,换句话说,其体内总的半乳糖量是升高的,因此通过测量总半乳糖的量,可以筛查新生儿半乳糖血症。

[0014] 在上述技术方案中,利用试剂盒检测新生儿总半乳糖的原理为:首先,在试剂盒中的碱性磷酸酶的作用下,D-半乳糖-1-磷酸转化成 D-半乳糖,D-半乳糖和氧化型辅酶 II (NADP+) 在半乳糖脱氢酶的作用下转化成 D-半乳糖酸内酯和还原型辅酶 II (NADPH),还原型辅酶 II (NADPH) 在 355nm 的激发光的作用下会发射出波长为 460nm 的蓝色荧光,还原型辅酶 II 的荧光强度与总半乳糖含量成正比,通过检测蓝色荧光的强度,结合标准曲线,即可得出总半乳糖的含量。其中,半乳糖脱氢酶又名半乳糖 1-脱氢酶。本发明的试剂盒测定新生儿滤纸干血片中总半乳糖的原理简单概括如下:

[0015]



[0016]



[0017] 在上述技术方案中,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉可以是两者的混合冻干粉,也可以是独立冻干粉,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉使用起来更为方便。

[0018] 在上述技术方案中,试剂盒中的半乳糖滤纸干血片校准品、质控品是由 D-半乳糖溶解在校准品和质控品基质中,并滴加在滤纸上制得。半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的基质优选脱纤维绵羊全血,其中基质的血细胞比容为 45%~90%,以 50%~55%为佳。半乳糖滤纸干血片校准品上设有 3~10 个校准位点,每个校准位点的 D-半乳糖浓度不同,且

各浓度呈梯度分布,优选为 6 个校准位点。半乳糖滤纸干血片质控品上设有 1 ~ 5 个质控位点,每个质控位点的 D- 半乳糖浓度不同,优选为 2 个质控位点。半乳糖滤纸干血片校准品用来绘制标准曲线,以便用来计算待测样品中的总半乳糖浓度。半乳糖滤纸干血片质控品用来校准结果测定的准确性。校准品和质控品所使用的干血滤纸片具有用量少、保存简单、便于运输等优点。

[0019] 在上述技术方案中,铜试剂的作用是作为荧光检测时的荧光稳定剂,铜试剂中起到荧光稳定效果的主要物质是重金属 Cu^{2+} ,由于 Cu^{2+} 比较容易得到,成本低廉,故在此选择铜试剂作为荧光稳定剂。在此,铜试剂优选为含有硫酸铜、碳酸钠和酒石酸钾钠的铜试剂。

[0020] 在上述技术方案中,实验缓冲液主要用于溶解碱性磷酸酶、氧化型辅酶 II、半乳糖脱氢酶,保持溶液的 pH 稳定,以维持酶活性的稳定,在此不对缓冲液的种类不作限定。为了保持试剂盒中各试剂的稳定性,试剂盒应于 2 ~ 8℃ 下保存。

[0021] 作为对上述方案的进一步改进,所述实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液,其中,Tris-HCl 的摩尔浓度为 5 ~ 100mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 10 ~ 100mmol/L。Tris-HCl 缓冲液对生物化学过程干扰很小,且不与重金属离子发生沉淀,其中加入的 KCl 能够保持酶活性。

[0022] 作为对上述方案的进一步改进,所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉的制备方法为:a) 制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液,其包括浓度为 0.5 ~ 5000U/mL 的碱性磷酸酶,浓度为 10 ~ 1000mg/mL 的氧化型辅酶 II,摩尔浓度为 10 ~ 20mmol/L 的 Tris-HCl,摩尔浓度为 40 ~ 60mmol/L 的 KCl,摩尔浓度为 0.5 ~ 1.5mmol/L 的 MgCl_2 ,质量百分比浓度为 1 ~ 3% 的海藻糖,质量百分比浓度为 2 ~ 4% 的甘露醇;b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥,即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉。

[0023] 在上述技术方案中,所述步骤 a) 中,碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液的制备是将碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 溶解在 Tris-HCl 缓冲液中,在此,Tris-HCl 缓冲液中加入了 KCl、 MgCl_2 、海藻糖和甘露醇,其中, KCl、 MgCl_2 的作用是在冻干过程中保持酶的活性,海藻糖和甘露醇的作用不仅是在冻干过程中起到保护剂的作用,它们还构成了混合冻干粉的骨架,保证了混合冻干粉的结构牢固性和稳定性。

[0024] 作为对上述方案的更进一步改进,所述步骤 a) 为:制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液,其包括浓度为 1000U/mL 的碱性磷酸酶,浓度为 46mg/mL 的氧化型辅酶 II,摩尔浓度为 10mmol/L 的 Tris-HCl,摩尔浓度为 50mmol/L 的 KCl,摩尔浓度为 1mmol/L 的 MgCl_2 ,质量百分比浓度为 2% 的海藻糖,质量百分比浓度为 3% 的甘露醇。U/mL 是指液态酶制剂的酶浓度,它是用单位体积酶制剂所含的酶活性单位来表示的。

[0025] 在上述技术方案中,所述碱性磷酸酶的浓度优选为 1000U/mL,氧化型辅酶 II 的浓度优选为 46mg/mL,以上浓度的碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 在冻干制备过程中,更容易保证其活性的稳定,同时此浓度的碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 可以保证在分装的过程中,分装体积适量,便于操作。

[0026] 作为对上述方案的进一步改进,所述半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为:1) 制备半乳糖脱氢酶溶液,其包括浓度为 0.05 ~ 200U/mL 的半乳糖脱氢酶,质量百分比浓度为 0.5 ~ 1.5% 的 BSA,摩尔浓度为 0.6 ~ 1.0mmol/L 的 EDTA,摩尔浓度为 1.3 ~ 5.0mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥,即得所述半乳糖脱氢酶

冻干粉。为了保证半乳糖脱氢酶的活性,延长其保质期,在此将半乳糖脱氢酶以冻干粉的形式保存,BSA、EDTA 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的作用是保持半乳糖脱氢酶活性的稳定。

[0027] 作为对上述方案的更进一步改进,所述步骤 1) 为:制备半乳糖脱氢酶溶液,其包括浓度为 20U/mL 的半乳糖脱氢酶,质量百分比浓度为 1% 的 BSA,摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA,摩尔浓度为 3.2mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

[0028] 作为对上述方案的进一步改进,所述半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为:使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血调整血细胞比容至 50%~55%,向其中加入不同量的 D-半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品,将配置好的校准品以 50 μL /滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点,将配置好的质控品以 50 μL /滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上,经室温自然干燥后得到干滤纸片校准品和质控品,用铝箔袋真空密封,各个位点的校准品浓度可如下表所示:

[0029]

位点种类	位点	D-半乳糖 (mg/dL)
校准位点	A	0
	B	3
	C	10
	D	15

[0030]

	E	30
	F	60
质控位点	C1	6
	C2	20

[0031] 作为对上述方案的进一步改进,所述铜试剂中包括摩尔浓度为 0.5~8.0mmol/L 的硫酸铜,摩尔浓度为 10~250mmol/L 的碳酸钠,摩尔浓度为 0.5~10mmol/L 的酒石酸钾钠。

[0032] 本发明还提供了一种新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0033] 1) 准备所需试剂:取出试剂盒,将其中的铜试剂仍于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,即用即取,试剂盒中其他试剂平衡至室温;配制质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液;配制反应工作液:将碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的冻干粉加入到实验缓冲液中,再加入半乳糖脱氢酶,混匀备用,其中,半乳糖脱氢酶的最终浓度为 0.0015~6U/mL,碱性磷酸酶的最终浓度为 0.001~10U/mL,氧化型辅酶 II 的最终浓度为 0.13~13mg/mL;

[0034] 2) 将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和采集的滤纸干血片样本用直径 3.0mm 自动打孔仪打入塑料排钉上;

[0035] 3) 向洁净的普通反应板的微孔中分别加入 100~150 μL 的质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液,将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本浸入乙醇溶液中

约 1min,然后将挂有半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本的塑料排钉烘干;

[0036] 4) 向白色反应板每孔中分别加入 200 ~ 300 μ L 反应工作液,将烘干后的半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本放入白色反应板的微孔中,37 $^{\circ}$ C 缓慢震荡 0.5 ~ 1 小时;

[0037] 5) 取出铜试剂,向白色反应管的每孔中分别加入 100 ~ 200 μ L 铜试剂,混合均匀,得到最终反应物;

[0038] 6) 样本中总半乳糖浓度的测定:

[0039] (1) 将半乳糖滤纸干血片校准品的不同浓度的校准位点的最终反应物分别放入荧光分析仪中,检测各个校准位点的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 的蓝色荧光的荧光强度,并根据已知的半乳糖滤纸干血片校准品各个位点的 D-半乳糖的浓度,绘制标准曲线;

[0040] (2) 用荧光分析仪测定滤纸干血片样本的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 蓝色荧光的荧光强度,并根据标准曲线,得出滤纸干血片样本中的总半乳糖浓度。

[0041] 在上述技术方案中,优选地,所述步骤 1) 中,配制好的反应工作液中,半乳糖脱氢酶的最终浓度为 0.03 ~ 0.07U/mL,碱性磷酸酶的最终浓度为 1.7 ~ 2.3U/mL,氧化型辅酶 II 的最终浓度为 0.5 ~ 0.7mg/mL。所述步骤 3) 的目的是固定血斑蛋白和红细胞,以便于更为精准的测量总半乳糖的浓度。将塑料排钉烘干时,可于在 37 $^{\circ}$ C 下烘干 20min,也可于 60 $^{\circ}$ C,烘干 10min,室温静置,冷却至 37 $^{\circ}$ C 左右。本发明的使用方法操作简单、方便,可实现新生儿半乳糖样本的大批量检测,且检测准确率高。

[0042] 本发明还提供了所述新生儿总半乳糖检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0043] 1) 配制实验缓冲液、铜试剂、碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液、半乳糖脱氢酶溶液;

[0044] 2) 以不同浓度的 D-半乳糖纯品加入基质中混合,然后滴加在滤纸上制备半乳糖滤纸干血片校准品、质控品;

[0045] 3) 分装所述实验缓冲液、铜试剂、半乳糖滤纸干血片校准品、质控品;分装所述半乳糖脱氢酶溶液并冻成干粉,分装所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液并冻成干粉;

[0046] 4) 贴标签;

[0047] 5) 组装为成品。

[0048] 相对于现有技术,本发明的有益效果为:

[0049] 本发明的试剂盒通过测量新生儿总半乳糖含量,即可判断新生儿是否患有半乳糖血症,可提高临床检验速度和检验数量,大幅度降低人为误差,减轻临床工作强度;且待检标本用量少,填补了国内该类试剂的空白,降低了成本。同时,本发明适用于全自动设备,整个实验用时不超过 1 小时,减少了工作强度,操作简单、省时。本发明的试剂盒使用时,可利用滤纸干血片取新生儿足跟血,通过酶促反应定量分析总半乳糖含量,从而在筛查半乳糖血症时,不必采集大量血液,就能进行初步筛查,更适合应用在新生儿筛查中。本发明的试剂盒具有灵敏度高、特异性强、准确性好、精密性好和热稳定性好等优点,本发明的试剂盒的检测灵敏度不高于 0.75mg/dL;在特异性方面,检测葡萄糖 1200mg/dL,甘露糖 10mg/dL,

果糖 25mg/dL, 维生素 C 3mg/dL, 胆红素 40mg/dL, 血红蛋白 25g/dL 对总半乳糖的检测无显著影响; 在精密度方面, 本发明的试剂盒的批内精密度不超过 10%, 批间精密度不超过 15%; 在稳定性方面, 本发明的试剂盒于 37°C 烘烤 3 天后, 检测结果仍满足技术性能指标要求。本发明的试剂盒的使用方法中, 采用荧光分析技术, 实验方法简单快速, 可自动化操作, 可实现大批量样本检测。

附图说明

- [0050] 图 1 为本发明试剂盒总半乳糖浓度检测剂量 - 反应标准曲线;
- [0051] 图 2 为新生儿总半乳糖检测试剂盒制备方法流程图;
- [0052] 图 3 为热稳定性测试中的荧光值走势图;
- [0053] 图 4 为 Ani Labsystems 公司对照试剂与本发明的试剂盒试剂检测结果比较的线性相关图;
- [0054] 图 5 为 PerkinElmer 公司对照试剂与本发明的试剂盒试剂检测结果比较的线性相关图。

具体实施方式

[0055] 以下结合实施例对本发明进行更为详细的描述, 但是以下描述仅用于对本发明进行解释性说明, 并不对本发明的保护范围进行任何的限制, 凡依据本发明内容所作的等同变换, 均同理包含在本发明的范围内。

[0056] 实施例中的所使用的 D- 半乳糖纯品购于 Sigma 公司; 96 孔微孔空白白色反应板 (8×12 孔) 为 NUNC 产品; 氧化型辅酶 II 为 Roche 进口分装品, 碱性磷酸酶、半乳糖脱氢酶及其他化学试剂为国产分析纯; 荧光分析仪, 恒温振荡器均为广州市丰华生物有限公司。其中, 荧光分析仪 (型号: Auto TRFIA-2、Auto TRFIA-4、Auto TRFIA-8) 可通过建立新生儿半乳糖血症筛查试剂盒检测程序, 实现固定干燥、孵育反应、检测判读等步骤的自动化操作。

[0057] 实施例 1

[0058] 新生儿总半乳糖检测试剂盒

[0059] 新生儿总半乳糖检测试剂盒包含以下成分: 1) 实验缓冲液; 2) 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉; 3) 半乳糖脱氢酶冻干粉; 4) 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品; 5) 铜试剂; 6) 96 孔微孔空白白色反应板。

[0060] 其中, 实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液, 其中, Tris-HCl 的摩尔浓度为 10mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 50mmol/L, pH 为 8.0。

[0061] 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉的制备方法为: a) 制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液, 其包括浓度为 1000U/mL 的碱性磷酸酶, 浓度为 46mg/mL 的氧化型辅酶 II, 摩尔浓度为 10mmol/L 的 Tris-HCl, 摩尔浓度为 50mmol/L 的 KCl, 摩尔浓度为 1mmol/L 的 MgCl₂, 质量百分比浓度为 2% 的海藻糖, 质量百分比浓度为 3% 的甘露醇; b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥, 即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉。

[0062] 铜试剂中包括摩尔浓度为 1.02mmol/L 的硫酸铜, 摩尔浓度为 41.7mmol/L 的碳酸钠, 摩尔浓度为 1.78mmol/L 的酒石酸钾钠。

[0063] 半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为：1) 制备半乳糖脱氢酶溶液，其包括浓度为 20U/mL 的半乳糖脱氢酶，质量百分比浓度为 1% 的 BSA，摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA，摩尔浓度为 3.2mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥，即得所述半乳糖脱氢酶冻干粉。

[0064] 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为：使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血，调整血细胞比容至 50%~55%，向其中加入不同量的 D-半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品，将配置好的校准品以 50 μL /滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点，将配置好的质控品以 50 μL /滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上，经室温自然干燥后得到干滤纸片校准品和质控品，用铝箔袋真空密封，各个位点的校准品浓度如下：

[0065]

位点种类	位点	D-半乳糖 (mg/dL)
校准位点	A	0
	B	3
	C	10
	D	15
	E	30

[0066]

	F	60
质控位点	C1	6
	C2	20

[0067] 新生儿总半乳糖检测试剂盒的制备方法

[0068] 新生儿总半乳糖检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0069] 1) 根据试剂盒中各组分的配比要求，配制实验缓冲液、铜试剂、碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液、半乳糖脱氢酶溶液；

[0070] 2) 根据各个校准位点和质控位点对 D-半乳糖浓度的要求，将不同浓度的 D-半乳糖纯品加入基质中混合，制成不同浓度的校准品和质控品，然后将校准品和质控品分别滴加在相应的校准位点和质控位点上；

[0071] 3) 分装制得的实验缓冲液、铜试剂、半乳糖滤纸干血片校准品、质控品；按照 400 μL /瓶分装制得的碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 混合溶液并冻成干粉；按照 60 μL /瓶分装制得的半乳糖脱氢酶溶液并冻成干粉；

[0072] 4) 贴标签；

[0073] 5) 组装为成品。

[0074] 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新生儿半乳糖血症筛查试剂盒（荧光法）。组装完成后还需抽检合

格后才能出厂。

[0075] 新生儿总半乳糖检测试剂盒的制备方法的流程图如图 2 所示。

[0076] 新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法

[0077] 新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0078] 1) 准备所需试剂:取出试剂盒,将其中的铜试剂仍于 2~8℃ 下保存,即用即取,试剂盒中其他试剂平衡至室温;将恒温设备打开,温度设定为 37℃;配制质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液;配制反应工作液:将碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉加入到实验缓冲液中,再加入半乳糖脱氢酶,定容至 24ml,混匀备用,其中,半乳糖脱氢酶的最终浓度为 0.05U/mL,碱性磷酸酶的最终浓度为 2U/mL,氧化型辅酶 II 的最终浓度为 0.6mg/mL;

[0079] 2) 将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和采集的滤纸干血片样本用直径 3.0mm 自动打孔仪打入塑料排钉上;

[0080] 3) 向洁净的普通反应板的微孔中分别加入 100 μL 的质量百分比浓度为 80% 的乙醇溶液,将半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本浸入乙醇溶液中约 1min,然后将挂有半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本的塑料排钉在 37℃ 下烘干 20min;

[0081] 4) 向白色反应板每孔中分别加入 200 μL 反应工作液,将烘干后的半乳糖滤纸干血片校准品、质控品和滤纸干血片样本放入白色反应板的微孔中,37℃ 缓慢震荡 0.5 小时;

[0082] 5) 取出铜试剂,向白色反应管的每孔中分别加入 100 μL 铜试剂,混合均匀,得到最终反应物;

[0083] 6) 样本中总半乳糖浓度的测定:

[0084] (1) 将半乳糖滤纸干血片校准品的 6 个不同浓度的校准位点的最终反应物分别放入荧光分析仪中,检测各个校准位点的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 的蓝色荧光的荧光强度,并根据已知的半乳糖滤纸干血片校准品各个位点的 D-半乳糖的浓度,绘制标准曲线(如图 1 所示);

[0085] (2) 用荧光分析仪测定滤纸干血片样本的最终反应物在波长为 355nm 的激发光的作用下,发射出的波长为 460nm 蓝色荧光的荧光强度,并根据标准曲线,得出滤纸干血片样本中的总半乳糖浓度。

[0086] 步骤 2) 中的滤纸干血片样本的采集方法如下:对被采血新生儿足跟进行按摩或热敷,并用 75% 酒精消毒皮肤后,使用一次性采血针刺足跟内或外侧,深度小于 3 毫米,用干棉球拭去第一滴血,取第二滴血;将滤纸片接触血滴,切勿触及足跟皮肤,使血自然渗透至滤纸背面,至少采集三个血斑;样本采集后,滤纸应平放室内自然晾干,2~8℃ 保存。

[0087] 实施例 2

[0088] 新生儿总半乳糖检测试剂盒

[0089] 新生儿总半乳糖检测试剂盒包含以下成分:1) 实验缓冲液;2) 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉;3) 半乳糖脱氢酶冻干粉;4) 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品;5) 铜试剂;6) 96 孔微孔空白白色反应板。

[0090] 其中,实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液,其中,Tris-HCl 的摩尔浓度为 10mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 10mmol/L。

[0091] 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉的制备方法为:a) 制备碱性磷酸酶

和氧化型辅酶 II 的混合液,其中,碱性磷酸酶的浓度为 25U/mL,氧化型辅酶 II 的浓度为 1000mg/mL,Tris-HCl 的摩尔浓度为 10mmol/L,KCl 的摩尔浓度为 40mmol/L,MgCl₂0.5mmol/L,海藻糖的质量百分比浓度为 1%,甘露醇的质量百分比浓度为 2% ;b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥,即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉。

[0092] 铜试剂为含有硫酸铜的碳酸钠溶液,其中,硫酸铜的摩尔浓度为 0.5mmol/L,碳酸钠的摩尔浓度为 10mmol/L,酒石酸钾钠的摩尔浓度为 0.5mmol/L。

[0093] 半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为 :1) 制备半乳糖脱氢酶溶液,其包括浓度为 50U/mL 的半乳糖脱氢酶,质量百分比浓度为 1% 的 BSA,摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA,摩尔浓度为 2.2mol/L 的 (NH₄)₂SO₄ ;2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥,即得所述半乳糖脱氢酶冻干粉。

[0094] 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为 :使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血,调整血细胞比容至 50%,向其中加入不同量的 D- 半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品,将配置好的校准品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点,将配置好的质控品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上,经室温自然干燥后得到干滤纸片校准品和质控品,用铝箔袋真空密封,各个位点的校准品浓度如下 :

[0095]

位点种类	位点	D-半乳糖 (mg/dL)
校准位点	A	0
	B	3
	C	10
	D	15
	E	30
	F	60
质控位点	C1	6
	C2	20

[0096] 实施例 3

[0097] 新生儿总半乳糖检测试剂盒

[0098] 新生儿总半乳糖检测试剂盒包含以下成分 :1) 实验缓冲液 ;2) 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉 ;3) 半乳糖脱氢酶冻干粉 ;4) 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品 ;5) 铜试剂 ;6) 96 孔微孔空白白色反应板。

[0099] 其中,实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液,其中,Tris-HCl 的摩尔浓度为 100mmol/L,KCl 的摩尔浓度为 100mmol/L。

[0100] 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉的制备方法为 :a) 制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液,其中,碱性磷酸酶的浓度为 5000U/mL,氧化型辅酶 II 的浓度为

10mg/mL, Tris-HCl 的摩尔浓度为 20mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 50mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L, 海藻糖的质量百分比浓度为 2%, 甘露醇的质量百分比浓度为 3%; b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥, 即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉。

[0101] 铜试剂为含有硫酸铜的碳酸钠溶液, 其中, 硫酸铜的摩尔浓度为 3.9mmol/L, 碳酸钠的摩尔浓度为 120mmol/L, 酒石酸钾钠的摩尔浓度为 5mmol/L。

[0102] 半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为: 1) 制备半乳糖脱氢酶溶液, 其包括浓度为 200U/mL 的半乳糖脱氢酶, 质量百分比浓度为 1% 的 BSA, 摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA, 摩尔浓度为 2.2mol/L 的 (NH₄)₂SO₄; 2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥, 即得所述半乳糖脱氢酶冻干粉。

[0103] 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为: 使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血, 调整血细胞比容至 50%, 向其中加入不同量的 D-半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品, 将配置好的校准品以 50 μL/滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点, 将配置好的质控品以 50 μL/滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上, 经室温自然干燥后得到干滤纸片校准品和质控品, 用铝箔袋真空密封, 各个位点的校准品浓度如下:

[0104]

位点种类	位点	D-半乳糖 (mg/dL)
校准位点	A	0
	B	3
	C	10
	D	15
	E	30
	F	60
质控位点	C1	6

[0105]

	C2	20
--	----	----

[0106] 实施例 4

[0107] 新生儿总半乳糖检测试剂盒

[0108] 新生儿总半乳糖检测试剂盒包含以下成分: 1) 实验缓冲液; 2) 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉; 3) 半乳糖脱氢酶冻干粉; 4) 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品; 5) 铜试剂; 6) 96 孔微孔空白白色反应板。

[0109] 其中, 实验缓冲液为含有 KCl 的 Tris-HCl 缓冲液, 其中, Tris-HCl 的摩尔浓度为 15mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 20mmol/L。

[0110] 碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉的制备方法为: a) 制备碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合液, 其中, 碱性磷酸酶的浓度为 100U/mL, 氧化型辅酶 II 的浓度为

100mg/mL, Tris-HCl 的摩尔浓度为 15mmol/L, KCl 的摩尔浓度为 20mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L, 海藻糖的质量百分比浓度为 2%, 甘露醇的质量百分比浓度为 3% ;b) 将步骤 a) 中的混合液进行真空冷冻干燥, 即得所述碱性磷酸酶和氧化型辅酶 II 的混合冻干粉。

[0111] 铜试剂为含有硫酸铜的碳酸钠溶液, 其中, 硫酸铜的摩尔浓度为 8.0mmol/L, 碳酸钠的摩尔浓度为 250mmol/L, 酒石酸钾钠的摩尔浓度为 10mmol/L。

[0112] 半乳糖脱氢酶冻干粉的制备方法为 :1) 制备半乳糖脱氢酶溶液, 其包括浓度为 0.05U/mL 的半乳糖脱氢酶, 质量百分比浓度为 1% 的 BSA, 摩尔浓度为 0.8mmol/L 的 EDTA, 摩尔浓度为 2.2mol/L 的 (NH₄)₂SO₄; 2) 将步骤 1) 中的半乳糖脱氢酶溶液进行真空冷冻干燥, 即得所述半乳糖脱氢酶冻干粉。

[0113] 半乳糖滤纸干血片校准品、质控品的制备方法为 :使用无菌生理盐水洗涤脱纤维绵羊全血, 调整血细胞比容至 55%, 向其中加入不同量的 D-半乳糖原料以配制不同浓度的校准品和质控品, 将配置好的校准品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 A、B、C、D、E、F 六个校准位点, 将配置好的质控品以 50 μ L/ 滴的体积分别滴加在滤纸的 C1、C2 两个质控位点上, 经室温自然干燥后得到干滤纸片校准品和质控品, 用铝箔袋真空密封, 各个位点的校准品浓度如下 :

[0114]

位点种类	位点	D-半乳糖 (mg/dL)
校准位点	A	0
	B	3

[0115]

	C	10
	D	15
	E	30
	F	60
质控位点	C1	6
	C2	20

[0116] 实施例 5

[0117] 试剂盒的分析性能评价

[0118] 以上实施例 1 制备的新生儿总半乳糖检测试剂盒为例, 进行如下性能指标评价 :

[0119] 剂量反应曲线和线性范围

[0120] 将半乳糖滤纸干血片校准品浓度值与相应反应孔测定的荧光值用 LIN-MEAS 数学模型进行拟合, 绘制标准曲线。在试剂盒的测量范围内, 剂量 - 反应标准曲线线性相关系数应不低于 0.9900, 在本实施例中, 剂量 - 反应标准曲线线性相关系数达到 0.999, 如图 1 所示。

[0121] 分析灵敏度

[0122] 将试剂盒校准品 A 点重复检测 20 次,计算其荧光值均值 (\bar{X}) 和标准偏差 (SD),求得 $\bar{X}+2SD$ 相对应的浓度值,结果不高于 0.75mg/dL,结果如下表所示。

[0123]

测定值										$\bar{X}+2SD$	灵敏度
556	576	575	579	581	579	584	567	569	556	602	0.1
590	593	573	589	545	553	594	564	571	590		

[0124] 特异性

[0125] 检测葡萄糖 1200mg/dL,甘露糖 10mg/dL,果糖 25mg/dL,维生素 C 3mg/dL,胆红素 40mg/dL,谷胱甘肽 60mg/dL,血红蛋白 25g/dL 对半乳糖的检测无显著影响;

[0126] 准确性

[0127] 以 Ani Labsystems 公司新生儿半乳糖试剂盒中的校准品和广州市丰华生物工程有限公司校准品为对照,试剂盒半乳糖滤纸干血片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,在此实施例中,试剂盒半乳糖滤纸干血片校准品的实测效价与标示效价比平均值为 0.97。

[0128] 精密性

[0129] 一次实验中分别测定在标准曲线范围内高、低 2 种不同浓度的质控品,各测定 10 个平行孔,计算测定结果的平均值 (\bar{X}) 与标准差 (SD),批内不精密度 ($CV\%$) = $SD \times 100\% / \bar{X}$,结果应符合批内不精密度 ($CV\%$) 应不超过 15.0%。测定结果如下表所示。

[0130]

质控点	测量值										均值 (mg/dL)	标准 差	批内不精 密度
C1(6.0: 4.2~7.8mg/dL)	6.2	5.3	6.2	5.6	6.3	5.6	6.4	5.6	6.5	5.5	5.92	0.44	7.42%
C2(20.0: 14~26 mg/dL)	20.	20.	20.	19.	20.	20.	20.	20.	20.	20.	20.35	0.34	1.66%

[0131] 用三批试剂盒分别测定低值质控品,每批试剂盒各测 10 孔,计算 30 次测定结果的平均值 (\bar{X}) 与标准差 (SD),批间不精密度 ($CV\%$) = $SD \times 100\% / \bar{X}$,结果应符合批间不精密度 ($CV\%$) 应不超过 20.0%。测量结果及分析如下表所示。

[0132]

批次	测量值										均值 (mg/dL)	标准 差	批间不精 密度
第一批	6.2	5.3	6.2	5.6	6.3	5.6	6.4	5.6	6.5	5.5	6.05	0.52	9%
第二批	6.5	5.5	6.1	5.8	6.7	5.6	6.2	5.7	6.9	5.5			
第三批	6.8	5.6	6.5	5.7	6.6	5.8	6.5	5.6	7.2	5.5			

[0133] 综上可知,试剂盒的测量精密性,批内不超过 15.0%;批间不超过 20.0%。

[0134] 质控

[0135] 10 孔平行测定 2 种不同浓度的质控品,计算测定结果的平均值 (\bar{X}),结果应在允许范围内。数值及分析如下表所示,两个不同浓度质控,测值均在允许范围内。

[0136]

检测目标	平均值(U/L)	允许范围(U/L)	是否在允许范围
C1	5.92	4.2~7.8mg/dL	是
C2	20.35	14~26 mg/dL	是

[0137] 热稳定性 (加速破坏试验)

[0138] 试剂盒在 37℃,3 天烘烤后,检测结果符合以上性能指标,说明试剂盒具有良好的热稳定性。热稳定性测试中的荧光值走势图如图 3 所示。

[0139] 以上性能指标表明“新生儿总半乳糖检测试剂盒(荧光法)”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。

[0140] 实施例 6

[0141] 与其他试剂盒的比较

[0142] 使用本发明的试剂盒与市场上 Ani LabSystems 公司和 PerkinElmer 公司的新生儿总半乳糖检测试剂盒(荧光法)检测新生儿滤纸干血片样品值的比较

[0143] 本发明的试剂盒与市场上 Ani LabSystems 公司的新生儿总半乳糖检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)检测新生儿滤纸干血片样品值的比较,相关系数为 $|r|$ 应不低于 0.9800,如图 4 所示。

[0144] 本发明的试剂盒与市场上 PerkinElmer 公司的新生儿总半乳糖检测试剂盒(时间分辨荧光免疫法)检测新生儿滤纸干血片样品值的比较,相关系数为 $|r|$ 应不低于 0.9800,如图 5 所示。

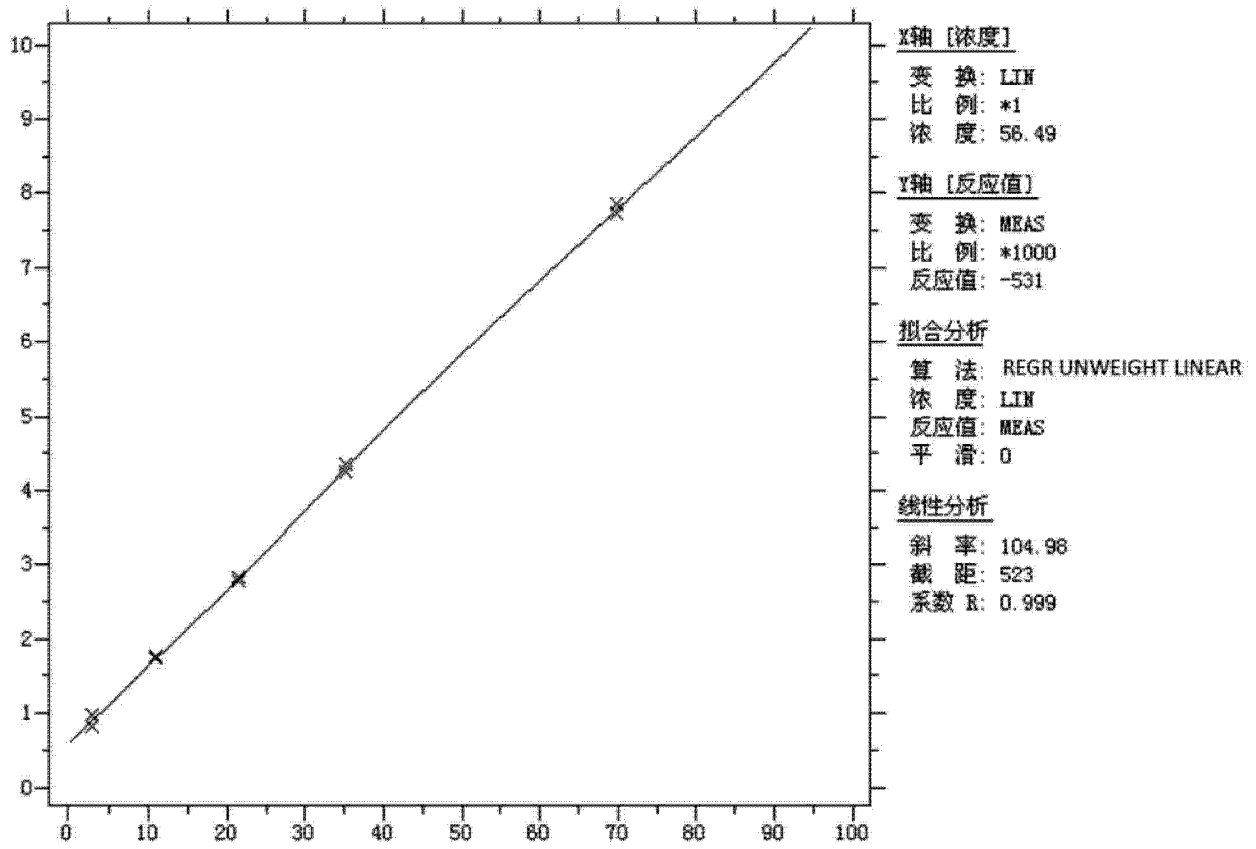


图 1

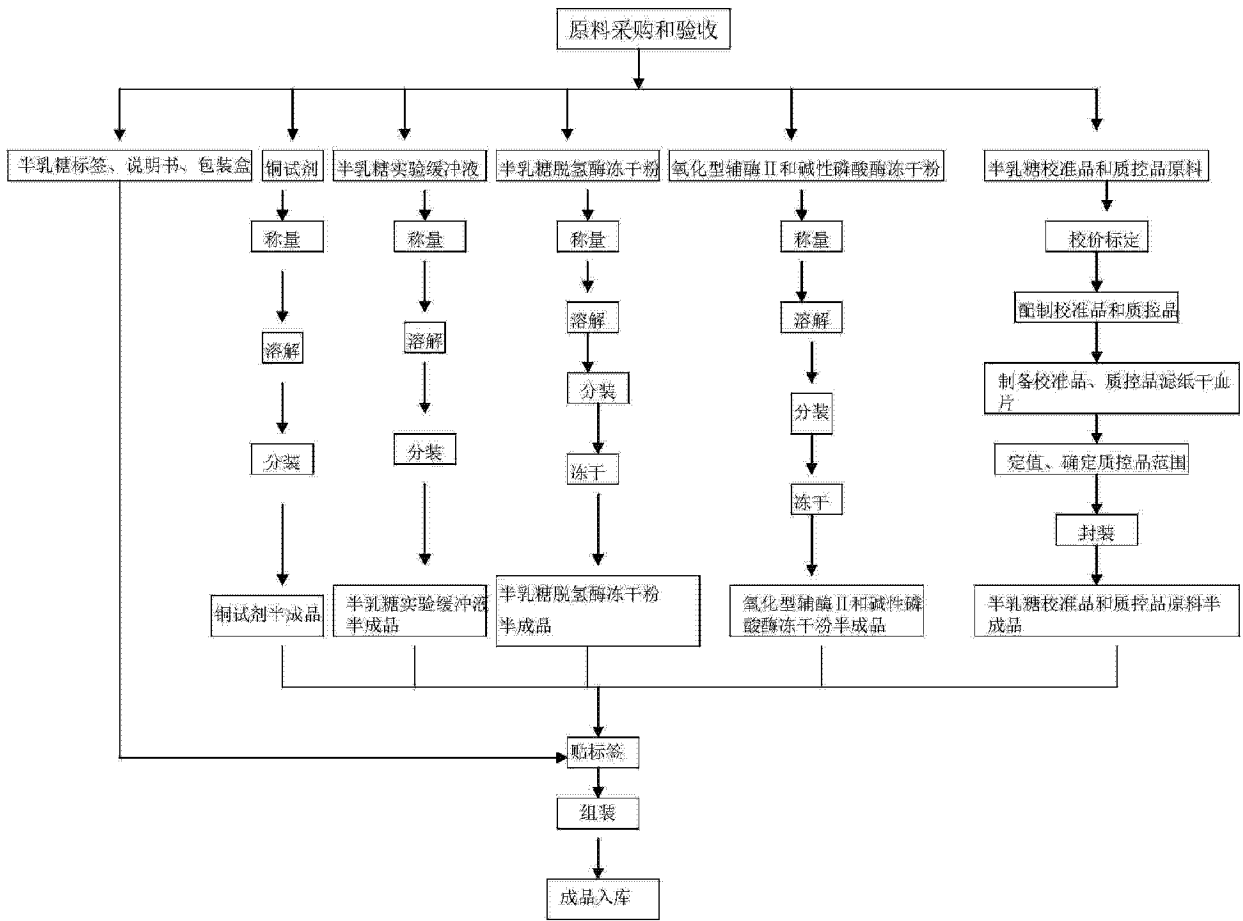


图 2

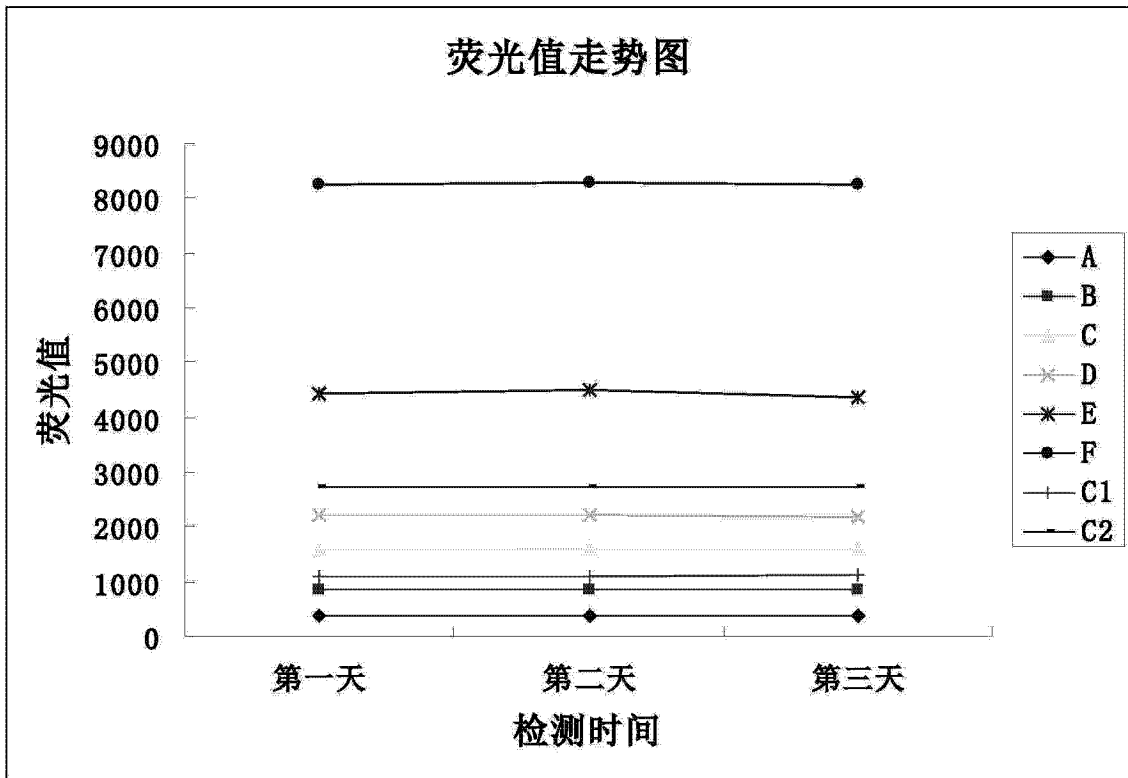


图 3

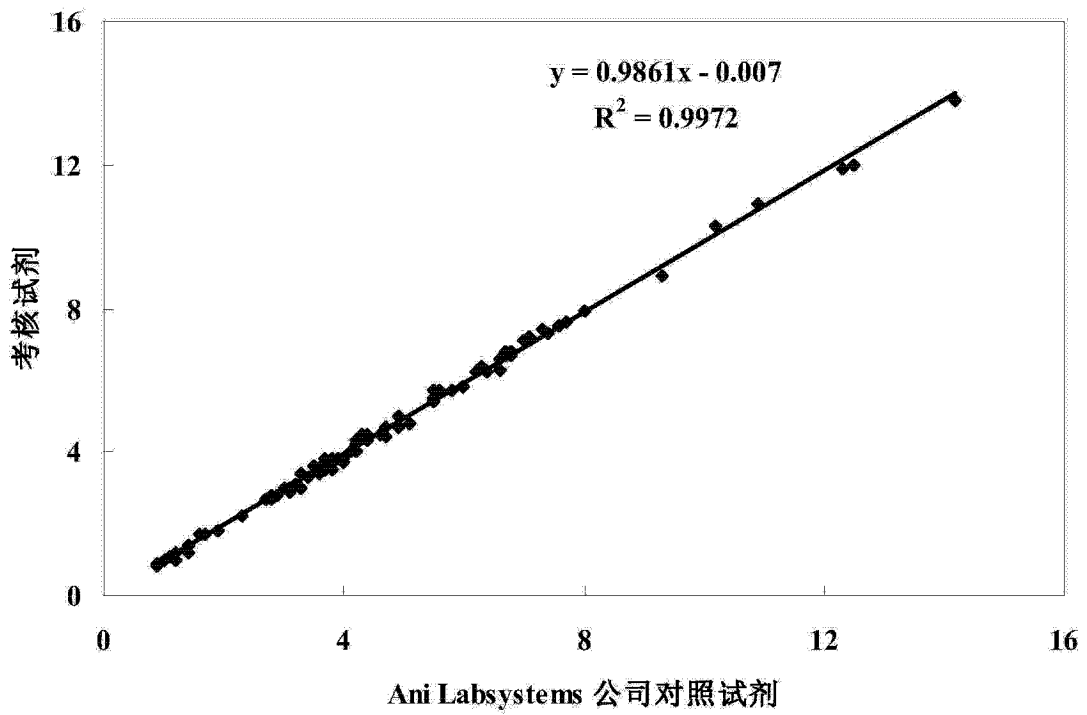


图 4

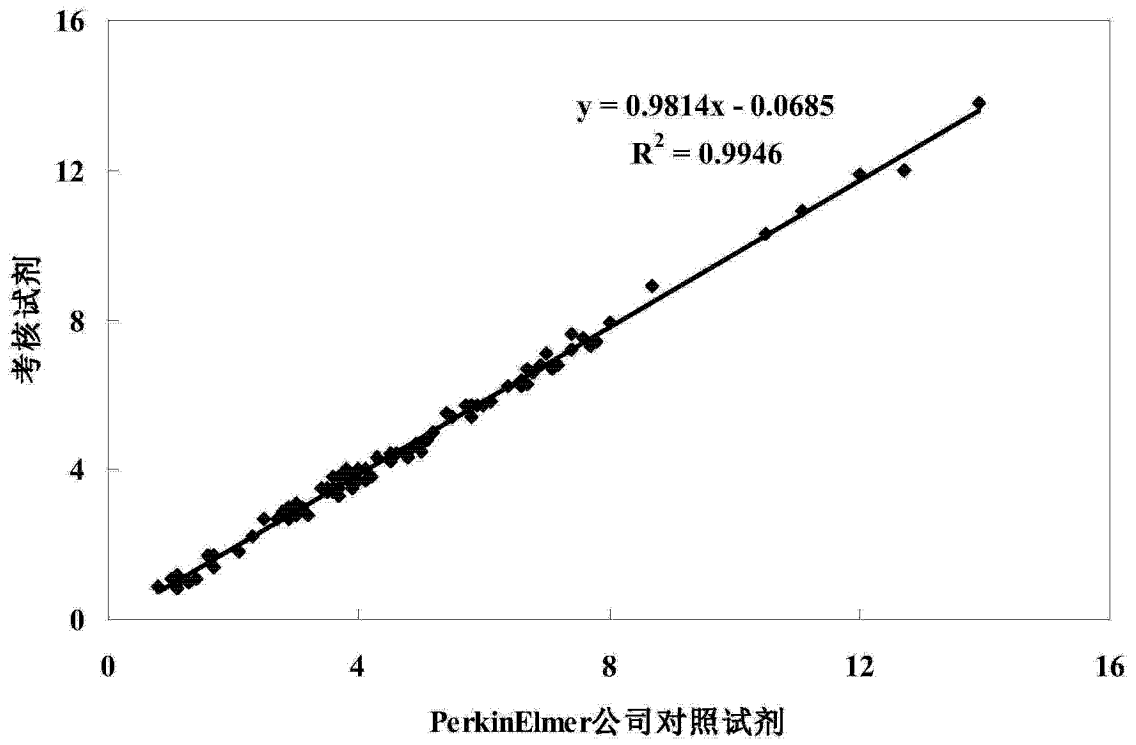


图 5

专利名称(译)	一种新生儿总半乳糖检测试剂盒、其使用方法及制备方法		
公开(公告)号	CN104316692A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410577365.0	申请日	2014-10-24
[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	冯健明		
发明人	冯健明		
IPC分类号	G01N33/66 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/66		
代理人(译)	付静		
其他公开文献	CN104316692B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新生儿总半乳糖检测试剂盒，包括实验缓冲液，碱性磷酸酶和氧化型辅酶II的混合冻干粉、半乳糖脱氢酶冻干粉、半乳糖滤纸干血片校准品、质控品、铜试剂和白色反应板。本发明还公开了新生儿总半乳糖检测试剂盒的使用方法和制备方法。本发明的新生儿总半乳糖检测试剂盒经济、省时、省工，可用于新生儿半乳糖血症筛查，为新生儿筛查的普及奠定良好的技术基础。

