



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101930007 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201010241049. 8

(22) 申请日 2010. 07. 30

(73) 专利权人 北京热景生物技术有限公司  
地址 102600 北京市大兴区大兴科苑路 27  
号意安大厦 3 层

(72) 发明人 林长青 李华柏

(74) 专利代理机构 北京一格知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11316  
代理人 滑春生

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

审查员 李倩

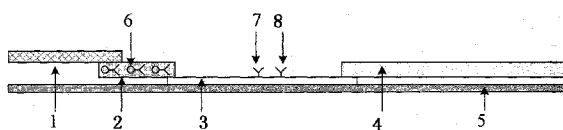
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种孕妇早产检测的上转发光快速定量试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及了一种免疫层析试纸条的测试使用及应用这种测试方法的胎儿纤维连接蛋白 fFN 快速定量试剂。该层析试剂采用上转发光材料即 UCP 作为生物标记物。本发明涉及了这种上转发光法试剂的测试使用方法,应用次测试方法可快速、简便、定量而且的测定被检测物的含量,为孕妇早产的预防、诊断、治疗提供支持。



1. 一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于:其上转发光 UCP 颗粒标记了胎儿纤维连接蛋白 fFN 抗体。
2. 如权利要求 1 所述的基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于:分析膜为硝酸纤维素膜,分析膜上包被有胎儿纤维连接蛋白 fFN 抗体。
3. 如权利要求 1 所述的基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于:所述试纸条包括一外壳,所述外壳上包括加样孔、结果判读窗口和终点指示窗口,通过所述加样孔,将生物样品添加到样品垫上;结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带;终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带。
4. 如权利要求 1 所述的基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于:检测样品为宫颈分泌物。
5. 如权利要求 1 所述的基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于:检测胎儿纤维连接蛋白 fFN 的临界值为 50ng/ml。

## 一种孕妇早产检测的上转发光快速定量试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及了一种上转发光法的免疫层析检测试剂盒的制备方法,涉及了应用此方法进行测试的胎儿纤维连接蛋白 fFN 免疫层析定量检测试剂盒的制备,属医疗产品技术领域,用于对孕妇早产的发生进行免疫诊断。

### 背景技术

[0002] 自然界中存在着一些有机或无机物质,它们可以受电磁辐射激发,发射荧光或磷光。在其发光的过程中都遵守 Stokes 规则,即发射光的波长长于激发光的波长。而在 20 世纪 70 年代,有些科学家却发现了一类可以反 Stokes 规则产生磷光的特殊材料,这种材料在红外光区(波长  $> 780\text{nm}$ ) 被激发,却可以发射波长远短于激发光的可见光(波长  $475\text{nm}-670\text{nm}$ ),即能量上转,这种现象被称为上转发光。

[0003] 由某些稀土金属元素掺杂于晶体的晶格中构成的材料具有上转发光现象,在这种材料中有三种主要的成分:主基质(host matrix)、吸收子(absorber)和发射子(emitter)。作为主基质的晶体材料有:氧硫化物(如  $\text{Y}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Gd}_2\text{O}_3$ 、 $\text{La}_2\text{O}_3$  等)、氟化物(如  $\text{YF}_3$ 、 $\text{GdF}_3$ 、 $\text{LaF}_3$  等)、镓酸盐(如  $\text{YGaO}_3$ 、 $\text{Y}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$  等)以及硅酸盐(如  $\text{YSi}_2\text{O}_5$ 、 $\text{YSi}_3\text{O}_7$  等)等;常用作吸收子的稀土金属离子有:镱离子( $\text{Yb}^{3+}$ )、铒离子( $\text{Er}^{3+}$ )、钐离子( $\text{Sm}^{3+}$ )等;常用作发射子的稀土金属离子有:铒离子( $\text{Er}^{3+}$ )、钬离子( $\text{Ho}^{3+}$ )、铥离子( $\text{Tm}^{3+}$ )、铽离子( $\text{Tb}^{3+}$ )等。吸收子和发射子这一离子对在主基质晶格内适宜的空间取向和距离,是产生上转发光的基础。上转发光的产生是一个涉及多个光子(至少两个)的光学过程。在这个过程中,上转发光材料内的吸收子(如  $\text{Yb}^{3+}$ )至少要吸收两个低能量光子(红外光区,如  $970\text{nm}$ ),而后经过一系列内部能量转换,以非辐射的形式( $A_1 \rightarrow A_2$ ,  $A_2 \rightarrow A_3$ )将这两个光子的能量连续传递给发射子(如  $\text{Er}^{3+}$ ),以使其处于激发态( $A_3$ )。后者接着发生一个返回基态能级的跃迁,释放一个高能光子(可见光区,如  $525\text{nm}$  或  $540\text{nm}$ )完成能量上转。

[0004] 两个光子激发 UCP 产生上转发光的过程(见图)

[0005] 不同的吸收子、发射子、主基质结合可使上转发光颗粒(up-converting particle UCP)具有不同的光学性质。如:(1)主基质相同的情况下,一系列 UCP 采用相同的吸收子,不同的发射子,则它可由相同波长的红外光激发,产生不同波长的发射光(如:  $980\text{nm}$  红外光激发吸收子  $-\text{Yb}^{3+}$ - 发射子  $-\text{Er}^{3+}$ 、吸收子  $-\text{Yb}^{3+}$ - 发射子  $-\text{Tm}^{3+}$ ,分别发射  $550\text{nm}$  绿色可见光、 $475\text{nm}$  蓝色可见光);采用不同的吸收子,相同的发射子,则虽经由不同的激发光,但却可产生相同的发射光。(2)主基质不同的情况下,UCP 光谱特征也将改变(如:吸收子  $-\text{Yb}^{3+}$ - 发射子  $-\text{Er}^{3+}$ ,在主基质  $\text{YF}_3$ 、 $\text{GdF}_3$  中,分别发射红色和绿色的可见光)。组成的多样性决定了 UCP 光谱(激发光谱、发射光谱)的多样性,这成为其使用中灵活性的基础。

[0006] 上转发光颗粒 UCP 所具有的这种独特光学特性,使其作为新型标记物在生物检测领域将发挥巨大的潜能:

[0007] (1)高度的灵敏性:独有的上转发光现象确保了 UCP 在检测的过程中绝不存在来自于外界的背景干扰;

[0008] (2) 高度的稳定性 :UCP 的发光现象是产生于结构内部的纯粹物理过程,因而完全避免了来自检测样品腐蚀以及自身衰变导致的发光淬灭;

[0009] (3) 高度的简易性 :利用 UCP 可对全血、尿液、唾液、组织分泌物等进行直接检测,而无须样品预处理;

[0010] (4) 高度的灵活性 :UCP 具有的可自由组合的多样化特征光谱(吸收光谱和发射光谱),使其适用于多重分析;

[0011] (5) 高度的安全性 :无机惰性、红外光激发、可见光发射使得基于 UCP 的检测对于检测者、被检测品、环境均无任何危害。

[0012] 正是上述特点使得 UCP 作为生物标记物有着极为广泛的应用前景,在医学诊断领域特别是床旁快速检测(Point Of Care Testing, POCT) 领域使用。因而在以抗原抗体为代表的 UCP 标记技术平台的基础上,结合免疫层析快速检测技术,再利用微型化的光电子材料可以开发一种灵敏、快速、定量准确、操控简易的免疫诊断分析仪

[0013] 床旁快速检测(Point Of Care Testing, POCT) 是检测技术发展的大势所趋。POCT 的显著特点是快速(15 分钟内要求获得数据)、便携、操作简易得到医学诊断结果。在大型医疗中心或实验室使用外,还能够走出医院,走进社区,面向基层。

[0014] 胎儿纤维连接蛋白(fetal Fibroneetin, fFN) 是一种糖蛋白,分子量约 500KD,有 20 种不同的分子形式。fFN 产生于绒毛膜滋养细胞,主要分布在羊水、胎盘组织及绒毛蜕膜交界面,在胎盘与子宫蜕膜的相互粘附和保护方面起着重要作用。大量文献报道,在孕早期,随着孕囊种植和附着于子宫内膜, fFN 可出现于宫颈分泌物中,但孕 20 周以后,绒毛膜与蜕膜的融合阻止了 fFN 的释放,所以正常的孕妇在 22-35 孕周期间 fFN 的含量极低。只有当绒毛膜与蜕膜分离、绒毛膜与蜕膜界面的细胞外基质遭到机械损伤或蛋白水解酶的降解时, fFN 才可见于宫颈阴道分泌物中。因此,正常妊娠中、晚期羊水和宫颈阴道分泌物中仅含少量的 fFN ;当早产有宫缩时,绒毛膜 - 蜕膜界面断裂, fFN 渗入羊水和宫颈中,宫颈阴道分泌物中会出现过量的 fFN。宫颈、阴道内分泌物 fFN 阳性提示胎盘与子宫蜕膜的黏附受到破坏,预示子宫下段蜕膜与胎膜分离, fFN 经宫颈漏入阴道内,并被认为是非足月妊娠临产发动的一项高危指标。因此,在孕 22-35 周之间,宫颈阴道分泌物中 fFN 的水平与是否发生早产有很好的相关性, fFN 检测可作为预测早产的一个重要客观指标。

[0015] 胎儿纤维连接蛋白(fFN) 检测是美国 FDA 批准,用于有早产症状的孕妇和有高危因素孕妇的早产风险性评估,用于 22-30 孕周无症状孕妇的常规筛查和 24-35 孕周有早产症状孕妇检查。fFN 检测是美国妇产科医师协会(ACOG) 推荐的常规用于早产诊断的项目。

[0016] 与传统方法相比,在孕 32 周以前,胎儿纤维连接蛋白(ffn) 检测是可靠的,能够独立预测早产指标。对于孕 22-35 周的孕妇, ffn 检测可以帮助决定孕妇是否需要进行治疗、卧床休息,是否可以继续工作。在一个对 2929 名无症状孕妇研究中, ffn 检测基本上可以预测三分之二的、发生在孕 28 周前的自发性早产。对于存在早产症状且 ffn 检测结果是阴性的孕妇,在接下来的 7 天内,99.5% 的孕妇不会发生早产。

[0017] 我国大约 1 秒钟就会有一个早产儿出生;早产是新生儿死亡及致残的首要原因,早产儿会表现为听力丧失、智力发育迟缓、脑瘫、生长缓慢和其它一些健康问题。如何预测和早期诊断早产,从而积极处理,减少早产及相应并发症的发生,是产前保健的重要任务之一。

[0018] 以临界值 50ng/ml 为判断标准,运用 fFN 管理存在早产分娩风险的患者,减少的早产住院的人数 (50%以上)。

[0019] 现有胎儿纤维连接蛋白 fFN 试剂为胶体金方法制备,胶体金形成红色颗粒,靠肉眼判断临界值而判定疾病情况,由于肉眼判断带来很大主观性,导致临床测试容易导致医患纠纷。

[0020] 因此,应用上转发光免疫分析技术开发胎儿纤维连接蛋白 fFN 快速检测试剂应用于临床 POCT 领域具有重要临床应用价值。

## 发明内容

[0021] 为了克服上述现有技术中的不足,本发明提供一种基于上转发光法的测定胎儿纤维连接蛋白 fFN 的免疫层析定量试纸条,具有准确、快速的特点。

[0022] 本发明的试纸条是检测原理是通过一系列表面修饰与活化,上转换发光材料 UCP (Up-Convertng Phosphor,UCP) 颗粒可与生物活性分子相结合,利用 UPT 生物传感器,对在层析过程中通过特异免疫反应结合于特定区域 (检测带与质控带) 的 UCP 颗粒进行扫描分析,从而利用由 UPT 快速定量检验系统实现精确定量或定性。

[0023] 具体地,本发明提供了一种基于上转换发光技术的免疫层析试纸条,其特征在于含有结合了胎儿纤维连接蛋白 fFN 抗体的上转换发光材料 (UCP) 颗粒。

[0024] 在一个优选的实施方案中,所述免疫层析试纸条的分析膜为硝酸纤维素膜。

[0025] 在另一个优选的实施方案中,所述试纸条包括一外壳,所述外壳上包括加样孔、结果判读窗口和终点指示窗口。

[0026] 在另一个优选的实施方案中,通过所述加样孔,将生物样品添加到样品垫上;结果判读窗口对应于分析膜上的检测带和质控带;终点指示窗口对应于吸水垫上的终点指示带。

[0027] 本发明还提供了一种制备上述免疫层析试纸条的方法,其特征在上转发光颗粒表面结合了胎儿纤维连接蛋白 fFN 抗体。

[0028] 本发明还提供了一种基于上转换发光技术的免疫层析快速试剂盒,包括本发明的上述免疫层析试纸条。

[0029] 本发明克服了以往胶体金方法制备的胎儿纤维连接蛋白试纸条,依靠肉眼判断而导致主观性强的缺点,可对样本检测进行准确定量。使得胎儿纤维连接蛋白 fFN 上转发光法免疫层析试纸条可以应用于临床。

## 附图说明

[0030] 图 1 为两个光子激发 UCP 产生上转发光的过程。

[0031] 图 2 为附图为本发明胎儿纤维连接蛋白上转发光免疫定量检测免疫层析试纸条免疫层析试纸条的剖面结构示意图。其中 1 为样品垫、2 为结合垫、3 为分析膜、4 为吸水垫、5 为粘性低衬、6 为胎儿纤维连接蛋白抗体-UCP 结合物、7 为检测带 T 线、8 为质控带 C 线。

## 具体实施方式

[0032] 下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是,本发明的实施例是用于说明本

发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的具体改进都属于本发明要求保护的范畴。

[0033] 实施例 1 :胎儿纤维连接蛋白 fFN 上转发光试剂盒生产的工艺如下 :

[0034] (1) 包被 :将 fFN 单抗 ( 购买自美国西格玛公司, SIGMA) 稀释到 2mg/ml, 作为 T 线包被液, 将羊抗鼠 IgG ( 购买自北京索莱宝生物科技有限公司) 稀释到 2mg/ml, 作为 C 线包被液。通过喷膜机, 将 T 线包被液和 C 线包被液包被到硝酸纤维素膜上。晾干, 即获得单克隆抗体包被膜条。

[0035] (2) UCP 标记单抗 :本试剂盒中的 UCP 标记单克隆抗体是用以下步骤获得, 步骤如下 :

[0036] a) 称取 10mg UCP 颗粒置于锥形瓶中 ;

[0037] b) 加入 10ml pH = 7.2 0.20M PB ;

[0038] c) UCP 颗粒悬浊液中加入 0.5mg 胎儿纤维连接蛋白 fFN 抗体, 再加入无水戊二醛至终浓度 0.1%, 搅拌过夜 ;

[0039] d) 12000rpm, 4°C, 离心 15min, 弃上清 ;

[0040] e) UCP 沉淀物中加入 10ml pH = 7.20.20M PB, 吹打混匀 ;

[0041] f) 12000rpm, 4°C, 离心 15min, 弃上清 ; ;

[0042] g) UCP 沉淀物收集待用 ;

[0043] (3) 冻干结合垫的制备 :

[0044] a) 将 50ml UCP 标记物悬浊液, 12000rpm, 4°C, 离心 30min, 弃上清 ;

[0045] b) 加入 45ml 的冻干液 (pH = 7.20.20M PB, 含 2% BSA, 3% 蔗糖) ;

[0046] d) 将 UCP 标记物悬浊液按 5cm<sup>2</sup>/ml 加于玻璃纤维上 ;

[0047] e) 真空冻干 11h ;

[0048] (4) 裁剪结合垫 ;将冻干的结合垫裁剪成 1cm 宽的长条。

[0049] (5) 组装试纸条 ;依次将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴到底板上, 切成 4.0mm 宽的纸条。

[0050] (6) 装塑料卡 ;将 4.0mm 宽的试纸条装到塑料卡底壳中, 盖上塑料卡上壳, 压紧。

[0051] (7) 样本稀释液配制 ;样本稀释液成分为 pH = 7.2 的 0.20M PB, 1% Tween20。

[0052] 实施例 2. 胎儿纤维连接蛋白 fFN 上转发光定量试剂盒的组成成份 :

[0053] 1、Ffn-UPT 快速检测试纸条 (40 人份)

[0054] 2、样本稀释液 (1 瓶, 45ml)

[0055] 3、样品管 (40 个)

[0056] 4、使用说明书 (1 份)

[0057] 实施例 3 :胎儿纤维连接蛋白 fFN-UPT 免疫层析试纸条的原理

[0058] 该试纸条的原理 :fFN-UPT 快速检测试纸条采用双抗体夹心免疫层析方法定量检测样品中胎儿纤维连接蛋白 fFN。分析膜上测试区 (T) 预包被抗 fFN 单抗, 质控区 (C) 预包被羊抗鼠 IgG, 结合垫上有 UCP 颗粒标记的另一株抗 fFN 单抗。反应时样品中 fFN 蛋白与两株抗体反应结合, 在 T 区形成抗 fFN 蛋白抗体 -fFN 蛋白抗原 -UCP 标记的抗 fFN 蛋白抗体复合物, UCP 颗粒在红外光激发下发射可见光, 发射光的强度与样品中 fFN 蛋白的浓度成正比。无论样品中是否存在 fFN 蛋白, 在 C 区都会形成羊抗鼠 -UCP 标记的抗 fFN 蛋白抗体复

合物。

[0059] 实施例 4 :本发明的 fFN-UPT 试剂盒的质量检测

[0060] 采用本发明提供的检测 fFN-UPT 的上转发光法检测试剂盒进行胎儿纤维连接蛋白 fFN 含量检测的步骤为 :

[0061] a. 在测试前先完整阅读使用说明书,

[0062] b. 将待测样本从储存环境中取出,编号并且平衡至室温 (20℃ -30℃)。

[0063] c. 已经擦拭了宫颈分泌物的擦拭子插入试管中,滴入稀释液 0.5ml,混匀。

[0064] d. 将试纸条置于干净平整的平面上,取 40 μ l 样本加至 UPT 免疫层析试纸的加样孔,再加入 100 μ l 稀释液,同时开始计时。

[0065] d. 放置 15min 后,利用 UPT 生物传感器对试纸条进行扫描分析。

[0066] e. UPT 生物传感器显示测量结果, Y 值为胎儿纤维连接蛋白 fFN 的浓度,系统默认单位为 ng/ml。

[0067] 检测指标 :

[0068] 1) 准确性 :采用试剂盒校准品与相应浓度的校准品 (来源于美国西格玛公司) 同时进行分析测定,用双对数 (或其它适当的) 数学模型拟合,要求两条剂量 - 反应曲线不显著偏离平行 (t 检验),以进口标准品为对照,试剂盒校准品的测定浓度与理论浓度的比值即为试剂盒校准品的效价。测定结果应符合以下规定,即试剂盒校准品的效价应在 0.900 ~ 1.100 范围内。

[0069] 2) 精密度 :随机抽取 20 人份试纸条,用同一份 fFN 阳性标准品 (80ng/ml) 按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果,求出均值、标准偏差 (SD) 和变异系数 CV。批内变异系数 (CV) 应不高于 15%。

[0070] 具体检测方法如下 :

[0071] a. 将试纸条、稀释液及待测样本平衡至室温 (20 ~ 25℃)。

[0072] b. 拆开试纸条的铝箔袋包装,将试纸条放置在平整的表面上。

[0073] c. 在试纸条外壳上写上待测样本的编号。

[0074] d. 取 40 μ l 样本,加入加样孔中。

[0075] e. 取 100 μ l 稀释液,加入加样孔中。

[0076] f. 室温放置 15 分钟。

[0077] g. 在上转发光免疫分析仪中输入该批试纸条的参数,进行测量。

[0078] h. 数据处理 :与 fFN 定量测定试剂盒配套的上转发光免疫分析仪具有计算浓度功能。测量完成后仪器自动将 T/C 值 (TEST 线 /CONTROL 线的浓度比值) 经过计算得到的浓度值显示在屏幕上。

[0079] 3) 检测灵敏度 :根据 fFN 标准品稀释测定结果,本试剂盒的检测灵敏度为 5-1000ng/ml。

[0080] 测定 20 个 0ng/ml 点,计算平均值和标准差,以 (平均值 +2 倍标准差) 在标准曲线上对应的浓度为灵敏度。

[0081] 表 3 灵敏度检测数据

[0082]

<b>0 ng/ml</b>	<b>0.177</b>	<b>0.167</b>	<b>0.243</b>	<b>0.177</b>	<b>0.262</b>	<b>0.180</b>	<b>0.170</b>	<b>0.248</b>	<b>0.214</b>	<b>0.211</b>
	<b>0.231</b>	<b>0.221</b>	<b>0.268</b>	<b>0.165</b>	<b>0.207</b>	<b>0.270</b>	<b>0.214</b>	<b>0.265</b>	<b>0.161</b>	<b>0.274</b>
<b>平均值</b>	<b>0.216</b>		<b>标准差</b>		<b>0.040</b>	<b>平均值 + 2 倍标准差</b>			<b>0.296</b>	

[0083] 表 4 灵敏度检测结果

[0084]

<b>fFN 标准品</b>					<b>灵敏度</b>
<b>5ng/ml</b>	<b>20ng/ml</b>	<b>100ng/ml</b>	<b>400ng/ml</b>	<b>1000ng/ml</b>	
<b>0.357</b>	<b>0.526</b>	<b>1.083</b>	<b>2.442</b>	<b>4.267</b>	<b>3.23ng/ml</b>

[0085] 实施例 5: 本发明 fFN-UPT 试剂盒和 fFN 胶体金试剂盒的性能对比:

[0086] 取本发明 fFN-UPT 试剂盒和美国 Hologic 公司的 fFN 胶体金试剂盒进行了对比检测实验。

[0087] 表 5 在不同标本中检出率比较

[0088]

	<b>胶体金 fFN</b>	<b>fFN-UPT</b>
<b>临界值</b>	<b>50ng</b>	<b>50ng</b>
<b>30 份阳性标本</b>	<b>30/30, 定性测定</b>	<b>定量测试, 30 份含量大于 50ng</b>
<b>50 份阴性标本</b>	<b>50/50, 定性测定</b>	<b>定量测试, 50 份含量小于 50ng</b>

[0089] 结果表明, 这 2 种方法灵敏度关系没有差异, 即本发明的 fFN-UPT 试剂盒与美国 Hologic 公司的 fFN 胶体金试剂盒的性能一致, 没有差异。

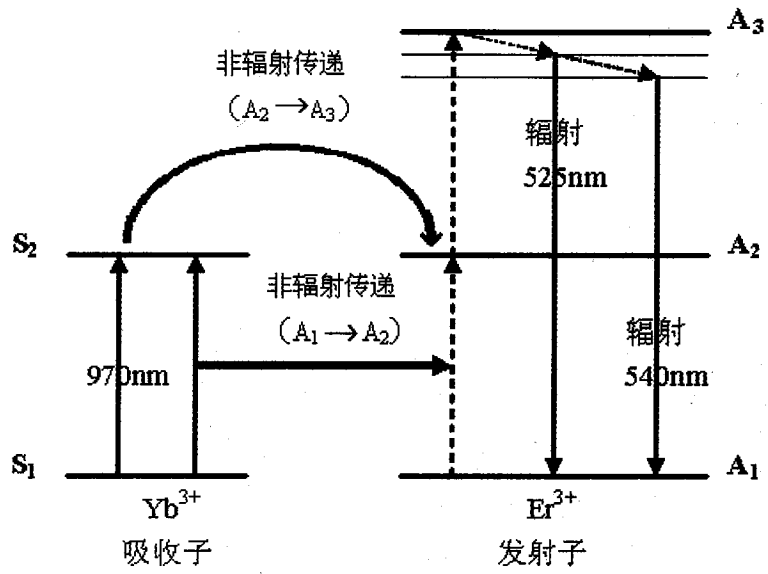


图 1

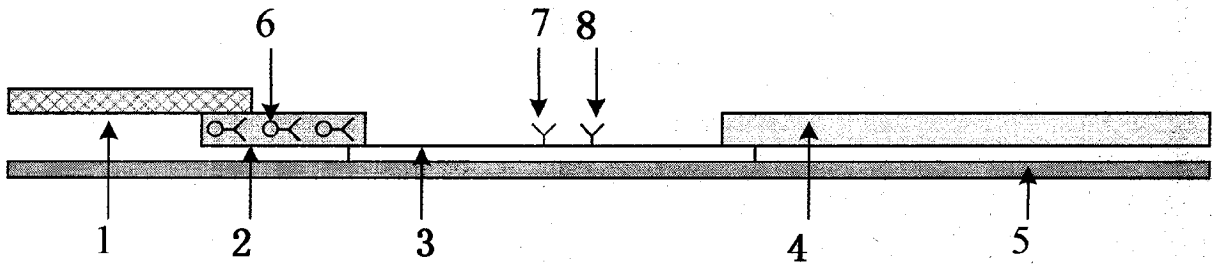


图 2

专利名称(译)	一种孕妇早产检测的上转发光快速定量试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101930007B</a>	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN201010241049.8	申请日	2010-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
[标]发明人	林长青 李华柏		
发明人	林长青 李华柏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN101930007A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及了一种免疫层析试纸条的测试使用及应用这种测试方法的胎儿纤维连接蛋白fFN快速定量试剂。该层析试剂采用上转发光材料即UCP作为生物标记物。本发明涉及了这种上转发光法试剂的测试使用方法，应用次测试方法可快速、简便、定量而且的测定被检测物的含量，为孕妇早产的预防、诊断、治疗提供支持。

