

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/573

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03136490.X

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1553191A

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03136490.X

[71] 申请人 北京新科基业生物科技有限责任公司

地址 100081 北京市海淀区大慧寺 5 号

[72] 发明人 马 旭 吴尔若

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 用妊娠相关蛋白 - A 检测孕早期唐氏综合症的试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种妊娠相关蛋白 - A 检测孕早期唐氏综合症的试剂盒，它由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成，本发明还涉及这种试剂盒的制作方法及其检测方法。本发明试剂盒可用于唐氏综合症诊断，尤其可用于孕早期(9 - 13 周)发生唐氏综合症的危险性评估。本试剂盒采用定量双抗体夹心酶联免疫反应法，灵敏度高，特异性好，组配合理，操作简便，适宜大规模产前筛查使用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于诊断孕早期唐氏综合征的妊娠相关蛋白-A 酶联免疫检测试剂盒, 其由妊娠相关蛋白-A 标准品, 多克隆抗体包被板, 辣根过氧化物酶标记的妊娠相关蛋白-A 单克隆抗体, 质控品和辅助试剂组成。
5
2. 根据权利要求 1 的试剂盒, 其中所述妊娠相关蛋白-A 标准品是用足月产妇产血清经凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析分离纯化而获得的妊娠相关蛋白-A 纯品制备的。
3. 根据权利要求 2 的试剂盒, 其中所述多克隆抗体包被板是用妊娠相关蛋白-A 纯品免疫动物而获得的妊娠相关蛋白-A 多克隆抗体包被酶标板而制作的。
10
4. 根据权利要求 3 的试剂盒, 其中所述妊娠相关蛋白-A 多克隆抗体是由妊娠相关蛋白-A 纯品免疫兔子而获得的血清制备的。
5. 根据权利要求 4 的试剂盒, 其中所述多克隆抗体包被板的制作是将妊娠相关蛋白-A 多克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释后滴入酶标板各孔内, 经吸附、洗板、
15 封闭、吹干等步骤处理后而制作的。
6. 根据权利要求 5 的试剂盒, 其中所述辣根过氧化物酶标的妊娠相关蛋白-A 单克隆抗体是用妊娠相关蛋白-A 纯品免疫小鼠后制备的单克隆抗体, 经辣根过氧化物酶标记而制备的。
7. 根据权利要求 1-6 之一的试剂盒, 其中所述质控品是用足月正常产妇产血清经
20 混合、稀释调配而制备的。
8. 根据权利要求 7 的试剂盒, 其中所述辅助试剂包括: 酶联反应的底物溶液、显色液、反应终止液及清洗缓冲液。
9. 根据权利要求 1-8 之一的试剂盒用于检测和/或诊断孕早期唐氏综合征的用途。
25

用妊娠相关蛋白-A检测孕早期唐氏综合征的试剂盒

- 5 本发明属于医学和生物学检测领域，具体而言，本发明涉及一种用妊娠相关蛋白-A（即 Pregnancy-Associated Plasma Protein-A 简称 PAPP-A）检测孕早期唐氏综合征的试剂盒，这种试剂盒可以用于唐氏综合征诊断，尤其可用于孕早期（9-13周）发生唐氏综合征的危险性评估，本发明还涉及该试剂盒的制作方法和测定方法。
- 10 唐氏综合征（Down's Syndrome）又称先天愚型，是人类最常见的染色体疾病（21三体），发病率为活产新生儿的 1/600~1/800。唐氏综合征的临床特征为严重先天性智力低下，具有独特的面容（如宽眼距、低鼻梁）、及肢体短小等；并常伴有先天性心脏病、消化道畸形等症状。唐氏综合征缺乏有效的治疗手段。为了降低唐氏综合征的发病率和提高我国人口素质，目前只有加强产前诊断，尽早终止妊娠
- 15 和防止患儿出生。进行绒毛活检或羊膜腔穿刺是一种目前采用的产前诊断方法，虽然准确度很高，但这是一种侵入性检查，有引起流产的危险（约有 1%~2% 的流产率）；而且实验方法繁琐、持续时间长，不适宜大规模普查。八十年代末人们开始用甲胎蛋白（AFP）和人绒毛膜促性腺激素（hCG）等生物化学指标来筛查唐氏综合征。生化指标具有快速简便的优点，但是当唐氏综合征的发生时，血清中 AFP
- 20 和 hCG 浓度的改变一般在孕中期才比较明显，因此它们不适宜作为孕早期的唐氏综合征的筛查指标。本发明的目的正是为了克服上述已有检测指标的缺点和不足，本发明根据妊娠相关蛋白-A（即 PAPP-A）在唐氏综合征刚发生时即呈现血清浓度明显降低的特点，将 PAPP-A 作为一种孕早期唐氏综合征的筛查指标，同时建立了 PAPP-A 的酶免定量检测试剂盒和测定方法，从而可以提高唐氏综合征的产前筛查
- 25 率，有效地降低唐氏胎儿的出生率。

因此，本发明的目的是提供了一种用妊娠相关蛋白-A（PAPP-A）检测孕早期唐氏综合征的试剂盒。

本发明的上述目的是通过下列技术方案实施的：

- 一种妊娠相关蛋白-A（PAPP-A）的定量酶联免疫检测孕早期唐氏综合征的试剂
- 30 盒，其特征在于它由 PAPP-A 标准品、多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶（HRP）标记的 PAPP-A 单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。

本发明试剂盒的制作方法包括标准品的制备、多克隆抗体包被板的制作、酶标

单克隆抗体的制备、质控品的制备以及辅助试剂的配制。

PAPP-A 标准品可外购（比如，DSL 公司），也可自行制备。本发明试剂盒中的标准品是从足月产妇血清中提取制备的。一种制备步骤包括：收集足月产妇静脉血，及时分离血清，低温贮存备用；累积的足月产妇血清经 S-300 凝胶过滤层析、DEAE 离子交换层析、Heparin 亲和层析三步层析进行 PAPP-A 的分离纯化，三步层析的顺序可以变换，本发明试剂盒使用的一种顺序依次为凝胶过滤层析、离子交换层析和亲和层析；将获得的 PAPP-A 纯品按试剂盒的标准曲线最高点浓度（160 ng/ml）进行稀释，然后进行分装、冷冻干燥，即获得 PAPP-A 标准品。

本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板可用 PAPP-A 蛋白水解酶纯品对兔或鼠免疫而获得的多克隆抗体包被酶标板而制作。本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板是用经三次层析分离纯化得到的 PAPP-A 纯品对兔子免疫而获得的兔抗人多克隆抗体包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是 96 孔平板或 12 x 8、6 x 8 可拆条板。本发明试剂盒采用一种进口酶标板（Costar 公司产品）。一种多克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下：

15 a) 制备多克隆抗体：

(1) 免疫兔子：选用三月龄大耳白雄兔 3 只，用 PAPP-A 纯品按常规进行免疫。基础免疫抗原用量为每只兔子 500 μ g PAPP-A，加强免疫抗原用量 250 μ g/只，共两次。一个月后开始从耳缘静脉取血，每周一次，分离血清贮存于 4 $^{\circ}$ C。(2) 血清筛选：用 PAPP-A 纯品按 2 μ g/孔包被酶标板，及时跟踪监测每只免疫雄兔血清中的 PAPP-A 抗体滴度上升状况。将筛选出的雄兔进行颈动脉放血，分离血清，加 0.01% 硫柳汞于 4 $^{\circ}$ C 保存。(3) 抗血清纯化：高滴度的抗血清经饱和硫酸铵沉淀等步骤纯化后即获得 PAPP-A 多克隆抗体。

20 b) 包被：将上述多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释后加入酶标板各孔，每孔 100 μ l，吸附过夜，用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得多克隆抗体包被酶标板。

本发明试剂盒中的酶标单克隆抗体是用 PAPP-A 纯品免疫小鼠、获取脾细胞、经过与骨髓瘤细胞融合等步骤获得单克隆抗体，再将单克隆抗体用辣根过氧化物酶（HRP）标记而制备的。一种酶标单克隆抗体的制备步骤如下：

30 a) 免疫小鼠获取脾细胞：用 PAPP-A 纯品作为抗原免疫 Balb/c 小鼠，免疫程序结束后获取脾细胞，在二氧化碳孵育箱中按常规方法进行培养；

b) 细胞融合及阳性细胞筛选：将上述脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，在甲基纤维素半固体培养基中进行选择性培养；筛选阳性融合细胞后进行克隆化培养，

可获得强阳性单克隆杂交瘤细胞株;

c) 获取腹水和腹水纯化: 将上述杂交瘤细胞注入小鼠腹腔, 获得小鼠腹水; 使用重组 Protein G 亲和层析预装柱纯化小鼠腹水即可获得 PAPP-A 单克隆抗体。

5 d) HRP 酶标采用改良过碘酸钠氧化法: 适量 HRP 酶溶于 0.5ml 乙酸缓冲液 (pH5.6), 加入新鲜配置的适量 NaIO_4 (0.06M) 溶液, 反应充分后加入 0.5ml 乙二醇 (2.5%); 将 5mg 纯化好的 PAPP-A 单克隆抗体溶液加入, 经透析、硼氢化钠反应、饱和硫酸铵沉淀等步骤后, 即获得 HRP 酶标 PAPP-A 单克隆抗体。

e) 纯化: 用重组 Protein G 亲和层析预装柱去除游离的 HRP 酶, 获得克分子比接近 0.4 的 HRP 酶标 PAPP-A 单克隆抗体。

10 本发明试剂盒中的质控品是用正常妇女血清稀释混合足月产妇产血清、并按照本试剂盒的标准曲线范围要求而调配制备的。本发明试剂盒采用的一种质控品制备方法包括如下步骤:

a) 收集足月产妇产血清 (经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者), 经离心后收集血清于 -20°C 保存;

15 b) 将积累的各个血清混合, 用 ELISA 方法测定 PAPP-A 含量, 并按标准曲线要求, 用正常妇女血清将两份混合产妇产血清的浓度分别调至 $20 \pm 5\text{ng/ml}$ 、 $85 \pm 15\text{ng/ml}$ 范围;

c) 将步骤 b) 所获得的两份血清按每个试剂盒的需要量分装, 冷冻干燥, 即制备成低、高值质控品。

20 本发明试剂盒中的辅助试剂包括酶联反应的底物溶液, 显色液, 反应终止液和清洗缓冲液。一种配制辅助试剂的方法如下:

a) 底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液;

b) 显色液: 四甲基联苯胺 (TMB) 甲醇溶液, 浓度为 0.1 mg/ml;

c) 反应终止液: 2M 硫酸

25 d) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20X): PBS (pH7.4) 配制的 0.05% 吐温 20 溶液。

本发明试剂盒的测定方法, 其特征在于它依次按下述步骤进行:

a) 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 $100\mu\text{l}$ 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品, 或待测血清样品, 37°C 水浴保温 60 分钟; 然后用清洗缓冲液重复洗板 4 次。

30 b) 酶联反应: 将 HRP 酶标单克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 $100\mu\text{l}$, 37°C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次。

- c) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、显色液各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
- d) 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 值并记录。
- e) 结果计算:
- 5 A. 制作标准曲线: 以标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 OD 值为纵坐标, 作出标准曲线; 计算标准曲线回归系数 R^2 , 当 $R^2 > 0.98$ 时本次测定有效;
- B. 评判质控品浓度: 根据质控品的 OD 值, 从标准曲线上读取相应的浓度值; 当低值质控品、高值质控品的浓度均在给定范围内时, 本次测定判为有效;
- C. 计算待测血清样品浓度: 当标准曲线和质控品均被判定有效时, 根据待测样
- 10 本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的浓度。

与已有的唐氏综合征检测指标和技术相比较, 本发明试剂盒具有以下优点:

- a) . 与已有的生化指标甲胎蛋白 (AFP) 和 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 相比较, PAPP-A 可作为孕早期筛查唐氏综合征的生化指标, 克服了 AFP 和 hCG 只在孕
- 15 中期才有效、不适宜对孕早期筛查唐氏综合征的缺点;
- b) . 与已有的绒毛活检或羊膜腔穿刺方法相比较, 本发明试剂盒采用了双抗体夹心定量酶免检测法, 操作简便, 快速有效, 克服了绒毛活检或羊膜腔穿刺检查需要进行细胞培养和核型分析而耗费较多时间和人力的缺点; 而且本发明属于无创伤检测, 克服了绒毛活检或羊膜腔穿刺的侵入性检查可能引起流产的危
- 20 险, 对孕妇更加安全, 增加了可接受性, 适宜在人群中进行大规模产前筛查, 可更有效地达到降低唐氏综合征发病率的目的。

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简单改进都属于本发明要求保护的范

25 围。除非另有说明, 本发明中的百分数是重量百分数。

实施例一: PAPP-A 定量酶免检测试剂盒制作方法的应用实例

- PAPP-A 定量酶免检测试剂盒 (48 人份), 其组成包括:
- PAPP-A 冻干标准品 1 瓶;
- 30 PAPP-A 多克隆抗体包被板 (48 孔) 1 块;
- 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 PAPP-A 单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;
- 冻干低值质控品 1 瓶;

- 冻干高值质控品 1 瓶;
- 底物溶液 1 瓶, 3ml/瓶;
- 显色液 (TMB) 1 瓶, 3ml/瓶;
- 反应终止液 1 瓶, 3ml/瓶;
- 5 清洗缓冲液 (20X 浓缩) 1 瓶, 15ml/瓶。

具体制作方法如下:

1. 制备 PAPP-A 标准品:

- 1) 收集血清: 从产房获得健康足月产妇静脉血, 3000rpm 离心 15 分钟, 分离血清于-70℃保存备用。
- 10 2) PAPP-A 的分离纯化: 使用 AKTA 蛋白纯化仪 (Pharmacia 公司产品, 型号 Purifier100) 从上述血清中分离纯化 PAPP-A。选用的操作步骤依次为: a) S-300 凝胶过层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl, (PH7.2), 流速 2 ml/min; b) DEAE 离子交换层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl (PH7.2), 1M NaCl, 流速 3ml/min; c) Heparin 亲和层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl (PH7.2), 1M NaCl, 流速 1.5 ml/min。层析过程中用 UNICRN V400 软件控制 NaCl 的浓度梯度及蛋白峰的紫外吸收监测。每
- 15 一步层析所获蛋白峰的活性检测采用 ELISA 法。最后将活性蛋白洗脱峰合并, 装透析袋, 透析除盐后浓缩, 贮存于-70℃。
- 3) PP-A 纯品按试剂盒说明书中标准曲线第一点所需要浓度分装 (160 ng/ml)、冷冻干燥、贮存于 4℃。

20

2. 制作 PAPP-A 多克隆抗体包被板:

1) PAPP-A 多克隆抗体制备:

- (1) 免疫兔子: 选用三月龄大耳白雄兔 3 只, 用 PAPP-A 纯品按常规进行免疫。每只雄兔用含 500μg PAPP-A 纯品的生理盐水与等量弗氏完全佐剂制成 2 ml 乳剂,
- 25 在背部皮内多点注射; 同时在后肢根部注射 0.5ml 灭活百日咳菌苗。3 个月后用 1ml 同样的抗原乳剂在四肢根部皮下做加强注射。一个月后开始从耳缘静脉取血, 每周一次, 分离血清贮存于 4℃。

- (2) 血清筛选: 用 PAPP-A 纯品按 2μg/孔包被酶标板, 及时跟踪监测每只免疫雄兔血清中的 PAPP-A 抗体滴度上升状况, 从中筛选出 2# 雄兔的抗血清滴度高于 1.5×10^6 ;
- 30 待连续三次采血检查结果均呈现抗血清滴度后, 对 2# 雄兔进行颈动脉放血, 获兔血 110 ml; 将所有兔血于 2000 rpm/min 离心 10 分钟, 合并血清, 加 0.01% 硫柳汞于 4℃保存。

(3) 抗血清纯化: 高滴度的抗血清经饱和硫酸铵沉淀、DEAE-纤维素柱层析纯化后即获得 PAPP-A 多克隆抗体; 加入等量中性甘油后, 分装小瓶于 -20°C 保存。

2) 包被:

酶标板采用 Costar 公司生产的 6 X 8 可拆条板。将步骤 1) 所获多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释为 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 后加入酶标板各孔, 每孔 100ul, 吸附过夜, 用清洗缓冲液洗板, 再用该缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得多克隆抗体包被酶标板。按 48 孔/块用锡箔纸包装、真空封闭。

3. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 PAPP-A 单克隆抗体

1) 获取免疫小鼠脾细胞: 用 PAPP-A 纯品作为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 免疫程序结束后获取脾细胞, 在 CO_2 孵育箱中按常规方法进行细胞培养;

2) 细胞融合、筛选: 将步骤 1) 所得脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 在 IMDM 甲基纤维素半固体培养基中进行选择性培养、阳性融合细胞筛选, 再进行克隆化培养, 即获得强阳性单克隆杂交瘤细胞株;

3) 小鼠腹水获取、纯化: 将步骤 2) 获得的杂交瘤细胞注入小鼠腹腔进行扩大培养, 5 只小鼠在注入杂交瘤细胞前一周先注射 0.5ml 石蜡油, 每只小鼠注射的杂交瘤细胞数为 $0.5\sim 1.0 \times 10^6$ 个, 约 10 天后可收获小鼠腹水, 每次 3~5ml, 每只小鼠可收集 2~3 次。用重组 Protein G 亲和层析预装柱从小鼠腹水中纯化 PAPP-A 单克隆抗体, 缓冲液为 0.02M 磷酸缓冲液, pH7.0; 洗脱液为 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 2.7。

4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 酶标采用改良过碘酸钠氧化法: 用于标记的 HRP 酶的 RZ 值不低于 3.0; 5mg HRP 酶溶于 0.5ml 乙酸缓冲液 (pH5.6), 加入新鲜配置的 0.5ml NaIO_4 (0.06M) 溶液, 反应充分后加入 0.5ml 乙二醇 (2.5%); 将 5mg 纯化好的 PAPP-A 单抗溶液加入, 经透析、硼氢化钠反应、饱和硫酸铵沉淀等步骤后, 即获得 HRP 酶标 PAPP-A 单克隆抗体。

5) 纯化: 用重组 Protein G 亲和层析预装柱去除游离的 HRP 酶, 获得克分子比接近 0.4 的 HRP 酶标 PAPP-A 单克隆抗体。

6) 组装: 用含 10% 胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 5) 获得的酶标单克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4°C 。

4. 制备质控品:

收集足月产妇产妇静脉血(经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者), 3000rpm

离心 15 分钟后收集血清于-20℃保存。将积累的各个血清混合，用 ELISA 方法测定 PAPP-A 浓度，并用非孕妇女血清将两份混合血清的浓度调至 20 ± 5 ng/ml、 85 ± 15 ng/ml 范围，制备成低、高质控品。按每个试剂盒的需要量分装，冷冻干燥后贮存于 4℃。每个试剂盒中含低浓度质控品和高浓度质控品各一瓶。

5. 配制辅助试剂:

1) 底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液, 按 3ml/瓶分装。

2) 配制显色液: TMB (0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 3ml/瓶分装。

3) 配制反应终止液: 2M H₂SO₄, 按 3ml/瓶分装。

4) 配制清洗缓冲液 (20 倍浓缩液): PBS (pH7.4) 配制的 1% 吐温 20 溶液, 按 15ml/瓶分装。

应用本发明技术制备 PAPP-A 定量酶免检测试剂盒的质量检测:

1) 准确性: 取三份待测样品混合后分为三份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 0、30、100 ng 的 PAPP-A 纯品, 制成回收试验血清标本#1、#2、#3。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按回收率计算公式计算回收率。标本#2、#3 的回收率分别为 96.5%和 97.5%, 平均回收率为 97.0%, 即试剂盒的比例偏差为 3.0%, 准确性为 97.0%。

2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份待测样本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、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV ≤ 15%

3) 线性范围: 用 PAPP-A 纯品稀释成一系列不同浓度的纯品溶液: 320ng、160ng、80ng、40ng、20ng、10ng、5ng、2.5ng、1.25ng/ml。按照说明书操作步骤进行测定。以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制曲线。线性范围内最高检测上限值为 160 ng/ml, 最低检测下限值为 5 ng/ml。试剂盒的线性范围为 5~160 ng/ml。

4) 检测灵敏度: 根据上述线性范围测定结果, 本试剂盒的检测灵敏度为 5.0 ng/ml。

5) 特异性: 取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 50ng 剂量的人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、人胎盘泌乳素 (hPL)、妊娠特异性糖蛋白 1 (SP1) 后制成干扰试验血清标本#1、#2、#3, 未加任何干扰物的#4 混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本#1、#2、#3 的干扰误差均小于 1.5%。

实施例二：PAPP-A 定量酶免检测试剂盒的使用实例

1. 清洗缓冲液配制：将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水 20 倍稀释。
2. 将试剂盒提供的标准品第一点冻干粉（浓度 160 ng/ml）用 500 μ l 清洗缓冲液溶解，然后进行倍比稀释 5 次。试剂盒中的标准曲线由 6 个不同浓度的 PAPP-A 标准品组成，标准曲线各点浓度分别为 160 ng/ml、80 ng/ml、40 ng/ml、20 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml。
3. 质控品的稀释：将试剂盒提供的低、高质控品冻干粉分别用 110 μ l 清洗缓冲液溶解。
4. 抗原-抗体反应：在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品，或待测血清样品，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。然后用清洗缓冲液重复洗板 4 次，每次 3min。
5. 酶联反应：将 HRP 酶标单克隆抗体溶液加入各孔，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次，每次 3min。
6. 显色反应：每孔依次加入底物溶液、TMB 显色液各 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟，每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
7. 比色：以空白对照孔的吸光值调零，用酶标仪在 450nm 测定 OD 平均值；记录各孔吸光值；计算双孔标准品 OD 值的平均值。
8. 结果计算：
 - 1) 标准曲线的绘制：以标准品浓度为横坐标，标准品测定的平均 OD 值为纵坐标，绘制本次测定的标准曲线；计算标准曲线回归系数 R^2 ，当 $R^2 > 0.98$ 时本次实验有效。
 - 2) 质控品浓度的评判：根据质控品的 OD 值，从标准曲线上读取相应的质控品浓度值。当低值质控品浓度在 20 ± 5 ng/ml、高值质控品浓度在 85 ± 15 ng/ml 范围内时，本次测定判为有效；
 - 3) 计算待测血清样品浓度：当标准曲线和质控品均被判定有效时，根据待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品中的 PAPP-A 浓度。

专利名称(译)	用妊娠相关蛋白 - A检测孕早期唐氏综合征的试剂盒		
公开(公告)号	CN1553191A	公开(公告)日	2004-12-08
申请号	CN03136490.X	申请日	2003-06-05
[标]发明人	马旭 吴尔若		
发明人	马旭 吴尔若		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/573 G01N33/577		
其他公开文献	CN1266476C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种妊娠相关蛋白 - A检测孕早期唐氏综合征的试剂盒，它由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成，本发明还涉及这种试剂盒的制作方法及其检测方法。本发明试剂盒可用于唐氏综合征诊断，尤其可用于孕早期(9 - 13周)发生唐氏综合征的危险性评估。本试剂盒采用定量双抗体夹心酶联免疫反应法，灵敏度高，特异性好，组配合理，操作简便，适宜大规模产前筛查使用。