



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101825639 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 201010163449.1

(22) 申请日 2010.05.06

(71) 申请人 北京中诚晶创医药科技有限公司  
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街5号683号楼理工科技大厦2020室

(72) 发明人 边旭明 蒋宇林

(74) 专利代理机构 北京市盈科律师事务所  
11344

代理人 刘立国

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/76 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

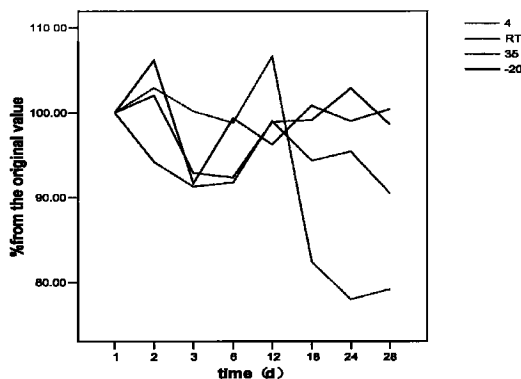
(54) 发明名称

胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法,其中试剂盒包括由全血干血片滤纸,标准品血片及质控品血片,复溶洗脱缓冲液,血清学检测试剂组成。本发明通过静脉取血或末梢血取血制成干血片,实现标本的简易远程寄送,再通过一系列复溶技术实现在现有技术平台上各筛查指标(甲胎蛋白、游离βHCG)的准确检测。本发明所述的技术的应用完全改变了现有取血技术存在的标本保存、运送需冷链管理、易碎、成本较高等的巨大缺陷,有利于大规模推广产前筛查的覆盖面和技术可及性,克服了现有技术存在的缺陷。

AFP血片在不同温度下的稳定性



1. 胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述试剂盒包括:  
全血干血片滤纸;  
标准品血片及质控品血片;  
复溶洗脱缓冲液;  
血清学检测试剂。

2. 如权利要求 1 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述的血清学检测试剂为:

- 1) 抗 AFP-Eu 示踪剂,该示踪剂为钬标记的 AFP IgG;
- 2) 抗 free  $\beta$  HCG-Sm 示踪剂,该示踪剂为钐标记的 free  $\beta$  HCG IgG;

上述标记的 IgG 将通过抗原抗体反应与待测标本中的 AFP 与 free  $\beta$  HCG 结合,并在标记有固相 AFP/free  $\beta$  HCG 抗体表面形成免疫复合物,每个样本的 Eu 和 Sm 荧光强度分别与样品中的 AFP 和游离  $\beta$  HCG 含量成正比例关系。

3. 如权利要求 1 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述的血清学检测试剂为抗 AFP 和 hAFP/Free- $\beta$ -HCG 示踪剂及检测洗脱缓冲液。

4. 如权利要求 1~3 任一项所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述的复溶洗脱缓冲液为 pH 为 7.2~7.6 的 0.01~0.03M 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液体系。

5. 如权利要求 4 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:还包括增强液,所述的增强液为含有 TritonX-100,乙酸和螯合剂的复合溶液。

6. 如权利要求 5 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述的增强液为  $\beta$  萘甲酰三氟丙酮 1.995mg;三辛基氧化膦 9.840mg,Triton X-1000.5mL,邻苯二甲酸氢钾 0.695g,冰醋酸 2.95mL,溶于 500mL 水,调 pH 至 3.2,4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存。

7. 一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法,包括:

- AFP 或 / 和 HCG 标准品血片及质控品血片的制备;
- 打孔及洗脱;
- 血清学检测;
- 结果计算。

8. 如权利要求 7 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法,其特征为:所述的 AFP 或 / 和 HCG 标准品血片及质控品血片的制备包括

- 1) 采集男性健康志愿者静脉血 40~50ml,所述静脉血的血清 AFP  $\leq 2\mu\text{g/l}$ ;
- 2) 4 $^{\circ}\text{C}$  1000rpm/min 离心 15 分钟,弃上清液,加入等量 PBS 溶液,充分混匀,重复离心洗涤步骤三次;

3) 取制备完成的浓缩洗涤红细胞与试剂标准品溶液等量混合。检测混合液红细胞压积 45%左右,将此混合液滴至滤纸片上,自然晾干,获得标准血片浓度分别为 0,0.5,5,50,250,500U/ml;

- 4) 将制备好的标准干血片 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存;
- 5) 质控干血片的制备同标准血片,取浓缩洗涤红细胞与质控品等量混合制备而成。

9. 如权利要求 7 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法,其特征为:所述的打孔及洗脱包括用专用打孔钳在血片相同部位打下直径 6mm 标准品、质控品和样本血片放入相应的微孔中,加入 100ul 专用洗脱缓冲液,室温下慢速震荡 1h 洗脱。

10. 如权利要求 7 所述的胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法,其特征为:所述的血清学检测包括

1)Free  $\beta$  HCG 的检测

- 1.1 将抗 Free  $\beta$  HCG 示踪剂贮存液按比例稀释;
- 1.2 在 96 微孔板中分别加入 200u1 示踪剂稀释液及 25u1 标准品或待测品;
- 1.3 25 ~ 30°C 慢速震荡 2.5 小时;
- 1.4 洗板 4 ~ 6 次;
- 1.5 在多孔板中加入 200u1 增强液,慢速震荡 5 分钟;
- 1.6 Wallac DELFIA 系统根据标准品运行标准曲线,计算待测品浓度;

2)AFP 的检测

- 2.1 在 96 微孔板中分别加入 200u1 专用洗脱液及 25u1 标准品或待测品,慢速震荡 1h;
- 2.2 洗板 2 次;
- 2.3 在微孔中加入 200u1 抗 AFP 示踪剂稀释液;
- 2.4 室温下静置 1h;
- 2.5 洗板 6 次;
- 2.6 在 96 孔板中加入 200u1 增强液,慢速震荡 5 分钟;
- 2.7 Wallac DELFIA 系统根据标准品运行标准曲线,计算待测品浓度。

## 胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于染色体异常诊断试剂盒技术领域,尤其是涉及一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 染色体异常是人类常见的重大出生缺陷,多伴有多发畸形或严重的智力障碍。唐氏综合征,即 21-三体综合征(Down's syndrome,DS) 是其中最多见的染色体病(发生率为 1/800-1000 活产或 1/150 妊娠)。唐氏综合征患者平均寿命只有 16.2 岁,临床表现以中到重度智能及体格发育障碍为主,50%有先天性心脏畸形,如房、室间隔缺损,动脉导管未闭、法洛四联症等;消化道畸形、脐疝、裂唇、裂腭及多指(趾)、并指(趾)等畸形亦较常见;该症患者白血病的发生率较正常儿高 20 倍左右,10%伴有癫痫且易早发 Alzheimer's 病。目前无特效治疗方法,主要是加强护理,针对性地进行智力和劳动技能训练,使其能够自食其力地生活。因此应用产前筛查和诊断的方法以降低该类患儿的出生率是当前围产优生和产前诊断的重要任务。

[0003] 目前常规产前筛查技术均采用静脉取血的采血方法。即采用真空采血管抽取病人静脉血 5ml,离心得到血清后,采用冷链的方式(5℃)进行运送,在实验室进行甲胎蛋白和游离 HCG 的检测。检测技术平台一般为时间分辨免疫荧光技术和化学发光技术。

[0004] 由于静脉取血的筛查方法具有筛查成本偏高,检测技术依赖性大、标本不便于远距离寄送等固有的局限性,我国的产前筛查覆盖率仍不足 30%,尤其在我国中西部地区及偏远农村,受到当地经济条件及运输条件的限制,唐氏综合症筛查难以得到广泛的开展。并且由于血样无法转运,只能当地检测,造成我国目前产前筛查中心分布分散,设备重复,血样检测和质量控制及机构管理的成本很大。

[0005] 发明目的

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种干血片法诊断孕期胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,通过静脉取血或末梢血取血制成干血片,实现标本的简易远程寄送,再通过一系列复溶技术实现在现有技术平台上各筛查指标(甲胎蛋白、游离  $\beta$  HCG)的准确检测。本发明所述的技术的应用完全改变了现有取血技术存在的标本保存、运送需冷链管理、易碎、成本较高的巨大缺陷,有利于大规模推广产前筛查的覆盖面和技术可及性,克服了现有技术存在的缺陷。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 胎儿常见染色体异常诊断试剂盒,其特征是:所述试剂盒包括:

[0009] 全血干血片滤纸;

[0010] 标准品血片及质控品血片;

[0011] 复溶洗脱缓冲液;

[0012] 血清学检测试剂。

[0013] 优选的是:所述的血清学检测试剂为:

- [0014] 1) 抗 AFP-Eu 示踪剂, 该示踪剂为钬标记的 AFP IgG ;
- [0015] 2) 抗 free  $\beta$  HCG-Sm 示踪剂, 该示踪剂为钐标记的 free  $\beta$  HCG IgG ;
- [0016] 上述标记的 IgG 将通过抗原抗体反应与待测标本中的 AFP 与 free  $\beta$  HCG 结合, 并在标记有固相 AFP/free  $\beta$  HCG 抗体表面形成免疫复合物, 每个样本的 Eu 和 Sm 荧光强度分别与样品中的 AFP 和游离  $\beta$  HCG 含量成正比例关系。
- [0017] 更优的是 : 所述的血清学检测试剂为抗 AFP 和 hAFP/Free- $\beta$ -HCG 示踪剂及检测洗脱缓冲液。
- [0018] 更优的是 : 所述的复溶或者检测洗脱缓冲液为 pH 为 7.2 ~ 7.6 的 0.01 ~ 0.03M 的 Na<sub>2</sub>HP04-KH<sub>2</sub>P04 缓冲液体系。称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na<sub>2</sub>HP04 和 0.24g KH<sub>2</sub>P04, 溶于 800ml 蒸馏水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 最后加蒸馏水定容至 1L 即可。在 151bf/in<sup>2</sup>(1034×105Pa) 高压下蒸气灭菌 (至少 20 分钟), 保存于室温或 4℃ 环境。
- [0019] 更优的是 : 还包括增强液, 所述的增强液含有 TritonX-100, 乙酸和螯合剂的复合溶液。
- [0020] 更优的是 : 增强液为  $\beta$  萘甲酰三氟丙酮 1.995mg ; 三辛基氧化膦 9.840mg, Triton X-100 0.5mL, 邻苯二甲酸氢钾 0.695g, 冰醋酸 2.95mL, 溶于 500mL 水, 调 pH 至 3.2, 4℃ 避光保存。
- [0021] 增强液将 Eu 和 Sm 从标记抗体分离至溶液中, 从而与增强液中的成分生成高荧光强度螯合物, 将提高待测物质的检出低限浓度。
- [0022] 本发明的目的之二在于提供一种干血片法诊断孕期胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法, 采用如下技术方案 :
- [0023] 一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法, 包括 :
- [0024] 标准品血片及质控品血片的制备 ;
- [0025] 打孔及洗脱 ;
- [0026] 血清学检测 ;
- [0027] 结果计算。
- [0028] 所述的 AFP 或 / 和 HCG 标准品血片及质控品血片的制备包括
- [0029] 1) 采集男性健康志愿者静脉血 40 ~ 50ml, 所述静脉血的血清 AFP  $\leq$  2ug/l ;
- [0030] 2) 4℃ 1000rpm/min 离心 15 分钟, 弃上清液, 加入等量 PBS 溶液, 充分混匀, 重复离心洗涤步骤三次 ;
- [0031] 3) 取制备完成的浓缩洗涤红细胞与试剂标准品溶液等量混合。检测混合液红细胞压积 45% 左右, 将此混合液滴至滤纸片上, 自然晾干, 获得标准血片浓度分别为 0, 0.5, 5, 50, 250, 500U/ml ;
- [0032] 4) 将制备好的标准干血片 4℃ 冰箱保存 ;
- [0033] 5) 质控干血片的制备同标准血片, 取浓缩洗涤红细胞与质控品等量混合制备而成。
- [0034] 所述的打孔及洗脱包括用专用打孔钳在血片相同部位打下直径 6mm 标准品、质控品和样本血片放入相应的微孔中, 加入 100ul 专用洗脱缓冲液, 室温下钟), 保存于室温或 4℃ 环境。
- [0035] 更优的是 : 还包括增强液, 所述的增强液含有 TritonX-100, 乙酸和螯合剂的复合

溶液。

[0036] 更优的是：增强液为  $\beta$  萘甲酰三氟丙酮 1.995mg；三辛基氧化膦 9.840mg, Triton X-100 0.5mL, 邻苯二甲酸氢钾 0.695g, 冰醋酸 2.95mL, 溶于 500mL 水, 调 pH 至 3.2, 4℃ 避光保存。

[0037] 增强液将 Eu 和 Sm 从标记抗体分离至溶液中, 从而与增强液中的成分生成高荧光强度螯合物, 将提高待测物质的检出低限浓度。

[0038] 本发明的目的之二在于提供一种干血片法诊断孕期胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法, 采用如下技术方案：

[0039] 一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒的制备方法, 包括：

[0040] 标准品血片及质控品血片的制备；

[0041] 打孔及洗脱；

[0042] 血清学检测；

[0043] 结果计算。

[0044] 所述的 AFP 或 / 和 HCG 标准品血片及质控品血片的制备包括

[0045] 1) 采集男性健康志愿者静脉血 40 ~ 50ml, 所述静脉血的血清 AFP  $\leq$  2ug/l；

[0046] 2) 4℃ 1000rpm/min 离心 15 分钟, 弃上清液, 加入等量 PBS 溶液, 充分混匀, 重复离心洗涤步骤三次；

[0047] 3) 取制备完成的浓缩洗涤红细胞与试剂标准品溶液等量混合。检测混合液红细胞压积 45% 左右, 将此混合液滴至滤纸片上, 自然晾干, 获得标准血片浓度分别为 0, 0.5, 5, 50, 250, 500U/ml；

[0048] 4) 将制备好的标准干血片 4℃ 冰箱保存；

[0049] 5) 质控干血片的制备同标准血片, 取浓缩洗涤红细胞与质控品等量混合制备而成。

[0050] 所述的打孔及洗脱包括用专用打孔钳在血片相同部位打下直径 6mm 标准品、质控品和样本血片放入相应的微孔中, 加入 100u1 专用洗脱缓冲液, 室温下需要血清样本转运时所需的冷冻设备。且血片法适用的检测技术多费用较低, 适于国民公共卫生预算有限的国家及地区应用。

[0051] 3. 稳定性 本技术条件下 AFP 血片在 37℃ 下至少可保存 1 个月。国外相关研究认为 AFP 血片在 4℃ 下可保存至少 6 个月

[0052] 本技术体系的创新点为在国际上首次提出完整的血片法产前筛查的思路, 并发展出完整的技术体系及流程标准。包括适宜干血片的制备, 干血片保存及转运的技术要求, 复溶技术体系 (复溶液及复溶条件), 后续检测技术, 以及获得多种指标的检测结果后将其结合孕妇的孕周、年龄等因素综合计算胎儿患唐氏综合征、18 三体综合征等重大染色体异常的风险, 以指导后续的产前诊断。

[0053] 本技术是在传统的静脉取血进行胎儿染色体异常产前筛查基础上加以完善和革新, 通过对于孕妇甲胎蛋白 (AFP) 和游离人绒毛膜促性腺激素 (free  $\beta$  hCG) 的检测, 改变其取血途径, 并结合后续的一整套针对干血片技术建立起的产前筛查检测及风险计算系统, 来完成产前筛查的过程, 并达到传统静脉取血产前筛查技术的性能水平, 同时使产前筛查标本的转运、保存、处理过程便捷, 成本低廉, 为全国形成集中检测及大规模检测的局面

奠定技术基础。血片技术具有血样采集方法简单、成本低廉、减少溶血和样本降解、不需要离心、增强标本在高温情况下的稳定性、提高了对生物有害物的管理、减少了运输和贮存费用等优势。通过采取指尖末梢血于特定干血片滤纸上自然风干,在检测前通过洗脱液将血片复溶,再进行检测。经前期研究发现应用血片法 AFP 的洗脱率可以达到 90.1%。且血片法稳定性较好,研究显示 AFP 及 free  $\beta$  hCG 血片即使在 37°C 存放 9 天以上仍保持稳定性。目前在北京协和医院完成的的大规模实验证明干血片法相对于染色体异常血清学产前筛查是一种经济有效的方法,适用于大规模的人群筛查。

#### 附图说明

[0054] 图 1 为 AFP 血片在不同温度下的稳定性实验结果示意图;

[0055] 图 2 为 Free- $\beta$  HCG 血片在不同温度下的稳定性实验结果示意图;

[0056] 图 3 为血片在不同条件下的洗脱结果示意图。

[0057] 图 4 为 AFP 标准曲线示意图(抗 AFP-Eu 荧光强度)。纵轴是荧光强度,横轴均为浓度,其中呈反比例(或大致平行的,用圆点表示)的是检测变异系数(CV),即说明浓度越高,检测精密度越高(CV 值越低)。

[0058] 图 5 为  $\beta$  HCG 的工作曲线示意图(抗  $\beta$  HCG-Sm 荧光强度)。纵轴是荧光强度,横轴均为浓度,其中呈反比例(或大致平行的,用圆点表示)的是检测变异系数(CV),即说明浓度越高,检测精密度越高(CV 值越低)。

#### 具体实施方式

[0059] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

[0060] 实施例 1 试剂盒的制备

[0061] 标准及质控干血片的制备(以 AFP 血片为例)

[0062] 1.1 肝素抗凝,采集男性健康志愿者静脉血(血清 AFP  $\leq$  2ug/l)50ml。

[0063] 1.24°C 1000rpm/min 离心 15 分钟,弃上清液,加入等量 PBS 溶液,充分混匀,重复离心洗涤步骤三次。

[0064] 1.3 取制备完成的浓缩洗涤红细胞与试剂标准品溶液等量混合。检测混合液红细胞压积 45%左右,将此混合液滴至滤纸片上,自然晾干,获得标准血片浓度分别为 0,0.5,5,50,250,500U/ml。

[0065] 1.4 将制备好的标准干血片 4°C 冰箱保存。

[0066] 1.5 质控干血片的制备同标准血片,取浓缩洗涤红细胞与质控品等量混合制备而成。

[0067] 实施例 2 标本采集

[0068] 采集对象

[0069] 本研究收集 2008 年 11 月至 2009 年 4 月期间,于本院产前筛查中心接受唐氏综合征产前筛查的孕妇共计约 500 例,每个孕周约 100 例左右。

[0070] 入组条件:(1)单胎中孕期妊娠 15<sup>+0</sup>周-20<sup>+6</sup>周孕妇;(2)孕周核对准确;(3)孕妇知情同意,并签署知情同意书。

[0071] 排除条件:(1)多胎妊娠;(2)孕周计算不准确者。

**[0072] 采集方法**

**[0073]** 血清学标本采集:抽取静脉血 4-5ml,置室温 60 分钟待血液完全凝集后,2000rpm 离心 10 分钟并分离血清,避免溶血,将血清用一次性吸管装入血清保存管中,保存管盖需拧紧,防止血清漏出。在血清保存管上注明标本编号,申请单上均须注明孕妇的姓名和标本编号。同一标本血清管使用同一编码,各血清标本统一编码。新鲜血清 1 周内于北京协和医院产前筛查中心或海淀妇产医院检验科完成 TRAFIA 法检测 AFP、游离  $\beta$  HCG 及 uE3,剩余血清 -20℃ 温度下保存,备 Total HCG 检测,避免反复冻融。

**[0074]** 末梢血标本采集:同时应用一次性采血针采集入组孕妇手指末梢血,使血滴自然渗透至 S&S903 滤纸,采集 3 个血斑。将采集的血片置于清洁空气中,避免阳光直射,自然晾干呈深褐色,并登记孕妇临床资料;检查合格的滤纸干血片,置于塑料袋内,保存在 4℃ 冰箱中。

**[0075]** 末梢血标本采集注意事项:(1) 本研究所有入组孕妇末梢血标本均为研究生本人采集,减少不同采血人员造成的偏移;(2) 采血前清洗双手并佩戴手套;

**[0076]** (3) 自孕妇左手无名指侧采血,深度小于 3 毫米,用干棉球拭去第一滴血,取第二滴血;(4) 将滤纸片接触血滴,切勿触及指尖皮肤;(5) 取血完毕,血片应在室温中水平放置清洁干燥处自然晾干(2~4 小时),然后装入密封塑料袋内,放置 4℃ 冰箱中保存。血片应避免潮湿、日照,不可烘烤。放置时应头尾交叉,避免血标本互相污染。(6) 滴在滤纸圆圈内的血液,必须从正面吸入并渗透到滤纸背面。正反面的血斑直径要求一致。避免正反两面滴血及采集有大量组织液的血液或凝固的血液。避免血斑血量不足,渗透不够,而出现梅花状、夹心状和直径 < 8mm 血斑。(7) 未采血的滤片应放置在干燥处保存,滤纸表面必须保持清洁,不能与手、奶、消毒液、清洁剂、水等物质接触防止污染。

**[0077]** 合格血斑标准:①每个血斑直径要达到 10mm;②同时取 3 个血斑;③血液必须完全渗透到滤纸背面;④无重叠;⑤无污染;⑥易洗脱。

**[0078]** 于筛查同时收集符合要求的孕妇对象信息,包括姓名,病案号(或标本编号),出生日期,联系电话;月经史,末次月经,筛查抽血日期,筛查当日体重,筛查孕周,孕周核对方式(LMP 或 B 超);既往 1 型糖尿病史,烟酒史,既往不良孕产史;孕期病史,妊娠结局。

**[0079] 实施例 3 打孔及洗脱**

**[0080]** AFP、free- $\beta$ -HCG 血片检测:用专用打孔钳尽量在血片相同部位打下直径 6mm 标准品、质控品和样本血片放入相应的微孔中,加入 100u1 专用洗脱缓冲液,室温(20-25 摄氏度)下慢速震荡 1h 洗脱。

**[0081] 实施例 4 基于时间分辨免疫荧光技术的血清学检测****[0082] 1) Free  $\beta$  HCG 的检测**

**[0083]** 1.1 将抗 Free  $\beta$  HCG 示踪剂贮存液按比例稀释。

**[0084]** 1.2 在 96 微孔板中分别加入 200u1 示踪剂稀释液及 25u1 标准品或待测品。

**[0085]** 1.3 室温慢速震荡 2.5 小时(最大温度 30℃)

**[0086]** 1.4 洗板 6 次。

**[0087]** 1.5 在 96 孔板中加入 200u1 增强液,慢速震荡 5 分钟。

**[0088]** 1.6 Wallac DELFIA 系统根据标准品运行标准曲线,计算待测品浓度。

**[0089] 2) AFP 的检测**

[0090] 2.1 在 96 微孔板中分别加入 200u1 专用洗脱液及 25u1 标准品或待测品,慢速震荡 1h。

[0091] 2.2 洗板 2 次。

[0092] 2.3 在微孔中加入 200u1 抗 AFP 示踪剂稀释液。

[0093] 2.4 室温下静置 1h(Total HCG 检测时需慢速震荡 0.5 小时)。

[0094] 2.5 洗板 6 次。

[0095] 2.6 在 96 孔板中加入 200u1 增强液,慢速震荡 5 分钟。

[0096] 2.7Wallac DELFIA 系统根据标准品运行标准曲线,计算待测品浓度。

[0097] 实施例 5 结果计算

[0098] 根据标准血片洗脱液的平均荧光值,建立标准曲线,使用标准品的荧光值与其相对应的浓度绘制标准曲线。荧光值为纵轴(Y轴),浓度为横轴(X轴);根据待测血片洗脱液荧光值与标准血片洗脱液荧光值的对应关系,计算待测血片浓度值。

[0099] 血片法的评价

[0100] 5.1 洗脱

[0101] 分别在洗脱 1h、2h、4h、8h、16h 及过夜情况下检测洗脱液的浓度,以寻找最佳洗脱条件 (n = 8)。

[0102] 5.2 打孔

[0103] 分别在血片中心、边缘及中心 1/2 处、边缘处打孔,在同一块微孔板上测定其浓度,观察不同部位所取血片对洗脱液浓度值测定的影响,重复实验 10 次,以统计学 t 检验处理数据,比较各取血部位有无显著性差异。

[0104] 5.3 血片法精密性评价

[0105] 取低、中、高三个浓度血片通过 8 次试验,每次试验采用 10 复孔,采用方差分析方法计算组内及组间变异系数(CV)、平均值及标准差等,并利用以下公式将血片法方差与厂家给出的血清学测量方差进行检验。

$$[0106] \quad x^2 = (n-1) s_1^2 / s_2^2$$

[0107] 其中,  $s_1^2$  为血片法测量值的方差,  $s_2^2$  为血清学测量值的方差。

[0108] 5.4 重吸收率计算

[0109] 分别向低、中、高三个浓度 AFP(或 HCG) 样本中加入等量已知浓度的 AFP(或 HCG) 后,制备成干血片。通过实际测得血片浓度与期待浓度值计算血片重吸收率。

[0110] 5.5 灵敏度检测

[0111] 取男性志愿者静脉血制备为干血片,测量其洗脱液浓度。灵敏度为测定平均值以上 3 个标准差(平均值 +3SD) (n = 20)。

[0112] 5.6 与血清学方法相关性

[0113] 分别测量 106 例患者 AFP、Free  $\beta$  HCG、HCG 及 uE3 血清及血片浓度,作散点图,且测血清法与血片法测量的线性关系;并运用以下公式计算相关系数:

[0114]

作散点图

$$\text{数: } b = \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{y}_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2}$$

[0115]  $\bar{x} = \frac{\sum \sum x_{ij}}{2N}$  等计算得到回归方程。

[0116]

$$\bar{y} = \frac{\sum \sum y_{ij}}{2N}$$

[0117]  $a = \bar{y} - b\bar{x}$

[0118] 得到线性方程： $\hat{Y} = bX + a$

[0119] 5.7 质量控制

[0120] 5.7.1 温度稳定性

[0121] 干血片分别在 -20℃、4℃、室温（约 25℃）及 35℃ 下保存 4 周，检测血片在各温度下的稳定性（n = 10）。

[0122] 5.7.2 打孔位置不同对血片测量值的影响

[0123] 分别在血片中心、中心与边缘 1/2 交界处及边缘处打孔（n = 10）并测量，以验证位置对血片测量值的影响。

[0124] 5.7.3 末梢血片与静脉血片

[0125] 对 40 例孕妇同时收集静脉血片（静脉采血同时直接由采血器滴到滤纸片上）及末梢血片，分别检测两种血片，并对测量结果行一致性分析。

[0126] 实验结果

[0127] 一、AFP+Free β HCG 二联血片法初步评价

[0128] 1 二联血片法检测精密度评价

[0129] 1.1 统计结果如表 1-2 所示。

[0130] 表 1 血片法检测 AFP 的精密度评价

[0131]

	复孔数	重复 检测次数	均数 (U/ml)	组 内差异 (% CV)	组间 差异 (% CV)	总差异 (% CV)
样本 1	10	8	4.57 ± 0.4 1	6.35	22.6	8.97
样本 2	10	8	13.54 ± 1. 13	7.71	13.51	8.36
样本 3	10	8	32.46 ± 2. 62	6.52	18.09	8.08

[0132]

[0133] 表 2 血片法检测 Free-β HCG 的精密度评价

[0134]

	复孔数	重复检测次数	均数 (ng/ml)	组内 差异 (% CV)	组间 差异 (% CV)	总差异 (% C V)
样本 1	10	8	14.05±0.94	6.40	9.44	6.71
样本 2	10	8	43.15±3.55	7.25	15.12	8.23
样本 3	10	8	91.47±9.65	9.99	15.23	10.55

[0135] 1.2 将测得 AFP Free-β HCG 组内及组间差异与目前公认的血清学检测金标准时间分辨技术检测数据进行方差检验 (x<sup>2</sup> 检验), 结果如表 3-4 所示:

[0136] 表 3 血片法与血清法检测组内差异的比较

[0137]

		方差	自由度	x <sup>2</sup>	P
AFP	样本 1	0.084	9	394.07	<0.05
	样本 2	1.09	9	13.48	>0.05
	样本 3	4.48	9	1.30	>0.05
Freeβ HCG	样本 1	0.81	9	456.35	<0.05
	样本 2	9.79	9	226.29	<0.05

[0138]

	样本 3	83.63	9	26.41	< 0.05
--	------	-------	---	-------	--------

[0139] 表 4 血片法与血清法检测组间差异的比较

[0140]

		方差	自由度	$\chi^2$	P
AFP	样本 1	1.07	7	432.6	<0.05
	样本 2	3.35	7	61.76	<0.05
	样本 3	35.0	7	7.88	>0.05
Free $\beta$ HCG	样本 1	1.76	7	496.97	<0.05
	样本 2	42.57	7	447.53	<0.05
	样本 3	194.18	7	70.34	<0.05

[0141] 2 二联血片法检测准确性评价

[0142] 血片法二联检测重吸收率统计结果如表 5-6 所示。

[0143] 表 5 血片法检测 AFP 重吸收率

[0144]

	复 孔数	AFP 期待值	AFP 实际值 (mean $\pm$ S. D.)	重吸收率 % (mean $\pm$ S. D.)	重吸收率范 围 %
样本 1	8	26.8	25.1 $\pm$ 1.6	93.66 $\pm$ 5.98	85.82-100.37
样本 2	8	30.75	30.9 $\pm$ 0.98	100.49 $\pm$ 3.2	96.59-104.39
样本 3	8	38.8	36.23 $\pm$ 2.25	93.37 $\pm$ 5.8	88.66-101.55

[0145] 表 6 血片法检测 Free- $\beta$  HCG 重吸收率

[0146]

	复 孔数	Free- $\beta$ HCG : 期待值	Free- $\beta$ HCG : 实际值	重吸收率 % (mean $\pm$ S. D.)	重吸收率范 围 %
样	8	30.25	28.28 $\pm$ 1.42	93.47 $\pm$ 4.68	87.6-98.51
样	8	38.5	42.68 $\pm$ 0.95	110.85 $\pm$ 2.47	108.05-113.51
样	8	55.5	58.1 $\pm$ 2.49	104.68 $\pm$ 4.48	100.36-110.81

[0147] 3AFP 及 Free- $\beta$  HCG 温度稳定性研究

[0148] 3. 1AFP 温度稳定性

[0149] AFP 分别在 4℃、室温（约 25℃）、35℃及 -20℃下温度稳定性如图 1 所示。

[0150] 由图可知，AFP 血片 4℃、室温（约 25℃）及 -20℃下均可保存 28 天，差异无统计学意义。而在 35℃下保存结果经 SNK 多重比较，如下表所示。

[0151] 表 7AFP35℃温度稳定性

[0152]

	a=0.05	
	1	2
第 1 天	10.91	
第 2 天	12.23	
第 3 天	10.93	
第 6 天	9.78	
第 12 天	11.63	
第 18 天		8.99
第 24 天		8.50
Sig	0.79	0.3

[0153] 如上表示，第 12 天与第 18 天测量均数差异有统计学意义 ( $p = 0.018, a = 0.05$ )，因此，我们认为 AFP 血片 35℃下最长可以保存 12 天。

[0154] 3. 2Free- $\beta$  HCG 温度稳定性

[0155] Free- $\beta$  HCG 分别在 4℃、室温（约 25℃）、35℃及 -20℃下温度稳定性如图 2 所示。

[0156] 由图 2 可知，Free- $\beta$  HCG 血片 4℃及 -20℃下均可保存 28 天，差异无统计学意义。而在室温（约 25℃）及 35℃下保存结果经 SNK 多重比较，如表 17-18 所示。

[0157] 表 8Free- $\beta$  HCG 室温温度稳定性

[0158]

	a=0.05			
	1	2	2	4
第 1 天	13.70			
第 2 天	14.23	16.23		

[0159]

第 3 天	14.25	14.25		
第 6 天	15.35	15.35		
第 12 天		16.23	16.23	
第 18 天			17.75	17.75
第 24 天				18.28
Sig	.18	.07	.07	.51

[0160] 如表 8 所示, Free- $\beta$  HCG 血片室温下可保存 6 天, 测量值差异无显著意义。保存期后测量值较前逐渐升高, 可以考虑为 HCG 降解为 Free- $\beta$  亚基形式所致。

[0161] 表 9 Free- $\beta$  HCG 在 35°C 温度稳定性

[0162]

	a=0.05		
	1	2	3
第 1 天	14.23		
第 2 天	15.90	15.90	
第 3 天	16.23	16.23	
第 6 天		17.23	
第 12 天		17.80	19.97
第 18 天			20.33
第 24 天			
Sig	.07	.15	.51

[0163] 如表 9 所示, Free- $\beta$  HCG 血片 35°C 下可保存 3 天, 测量值差异无显著意义。保存期后测量值较前逐渐升高。

[0164] 4. 灵敏度测定

[0165] 灵敏度为测定平均值以上三个标准差 (平均值 +3SD) ( $n = 0$ )。AFP 及 Free  $\beta$  HCG 血片法测量的灵敏度如表 19 所示。

[0166] 表 10 血片法二联测定的灵敏度

[0167]

	平均值	标准差	灵敏度
AFP	0.70 (U/ml)	0.27	1.51 (U/ml)
Free $\beta$ HCG	0.29 (ng/ml)	0.12	0.65 (ng/ml)

[0168]

[0169] 5. 血片法质量控制

[0170] 5.1 末梢血片与静脉血片对比分析

[0171] 临床工作中,静脉血片往往更易得到。末梢血片与静脉血片是否有区别?对40例孕妇同时收集静脉血片(静脉采血同时直接由采血器滴到滤纸片上)及末梢血片,统计结果如表11-12所示。

[0172] 表11 末梢及静脉血片 AFP 测量对比研究

[0173]

	例数	AFP 均数	相关系数	T 值	P 值 ( $\alpha < 0.05$ )
末梢血片组	40	17.37	0.877	1.184	0.245
静脉血片组	40	17.89			

[0174] 表12 末梢及静脉血片 Free  $\beta$  HCG 测量对比研究

[0175]

	例数	Free $\beta$ HCG 均数	相关系数	T 值	P 值 ( $\alpha < 0.05$ )
末梢血片组	40	19.42	0.901	1.498	0.144
静脉血片组	40	17.88			

[0176] 由上可知,末梢血片与静脉血片二联法测量差异无统计学意义。

[0177] 6.2 血片洗脱时间摸索

[0178] 干血片洗脱条件各文献报道不一,为此,本研究就干血片的各种洗脱条件进行试

验。分别将干血片在洗脱液中慢速震荡洗脱 1、2、4、8、16 小时,或 4℃ 过夜 (n = 8),实验结果如图 3 所示。

[0179] 如上图所示,室温下慢速震荡 1 小时与 4℃ 过夜洗脱效果近似。

[0180] 6.3 打孔位置对血片测量值的影响

[0181] 分别在血片中心、中心与边缘 1/2 交界处及边缘处打孔 (n = 10),测量统计结果如表 13-14 所示。

[0182] 表 13 打孔位置对 AFP 测量值的影响

	AFP值, $\alpha=0.05$	
	1	2
中心处	22.77	
交界处	23.87	
边缘处		31.78
Sig	0.29	1

[0184] 由表 13 可知,血片中心及中心-边缘交界处 AFP 测量值无显著差异,而边缘处 AFP 测量值高于前两者,差异有统计学意义。

[0185] 表 14 打孔位置对 Free  $\beta$  HCG 测量值的影响

	Free $\beta$ HCG值, $\alpha=0.05$		
	1	2	3
中心处	24.48		
交界处		27.67	
边缘处			31.33
Sig	1	1	1

[0187] 由表 14 可知,血片中心、中心-边缘交界处及边缘处 Free  $\beta$  HCG 测量值均有显著差异,其中边缘处 Free  $\beta$  HCG 测量值最高,血片中心处最低。

[0188] 通过血清学检测试剂:

[0189] 1) 抗 AFP-Eu 示踪剂,该示踪剂为钼标记的 AFP IgG;

[0190] 2) 抗 free  $\beta$  HCG-Sm 示踪剂, 该示踪剂为钐标记的 free  $\beta$  HCG IgG;

[0191] 上述标记的 IgG 将通过抗原抗体反应与待测标本中的 AFP 与 free  $\beta$  HCG 结合, 并在标记有固相 AFP/free  $\beta$  HCG 抗体表面形成免疫复合物, 每个样本的 Eu 和 Sm 荧光强度分别与样品中的 AFP 和游离  $\beta$  HCG 含量成正比例关系。检测结果如图 4 及图 5 所示, 纵轴是荧光强度, 横轴均为浓度, 其中呈反比例 (或大致平行的, 用圆点表示) 的是检测变异系数 (CV), 即说明浓度越高, 检测精密度越高 (CV 值越低)。

[0192] 结论

[0193] 1. 血片法 AFP 的组内差异在 6.35-7.71%、组间差异在 13.51-22.6%, 总差异 8.08-8.97%, Free  $\beta$  HCG 组内差异 6.40-9.99%, 组件差异 9.44-15.23%, 总差异在 6.71-10.55%。检测均与血清学方法有很好的相关性。

[0194] 2. 血片法 AFP 及 Free  $\beta$  HCG 的重吸收率均在 93% 以上。

[0195] 3. 4 摄氏度下保存标本, AFP 及 Free  $\beta$  HCG 血片均可保存 28 天, 室温 (25 摄氏度)

[0196] 下保存标本, AFP 可保存 28 天, Free  $\beta$  HCG 血片可保存 6 天, 在 35 $^{\circ}$ C 保存 AFP 血片保存达 12 天, Free  $\beta$  HCG 血片可保存 3 天

[0197] 4. 血片法 AFP+Free  $\beta$  HCG TRAFIA 检测的灵敏度分别为 1.51u/ml、0.65ng/ml。

AFP血片在不同温度下的稳定性

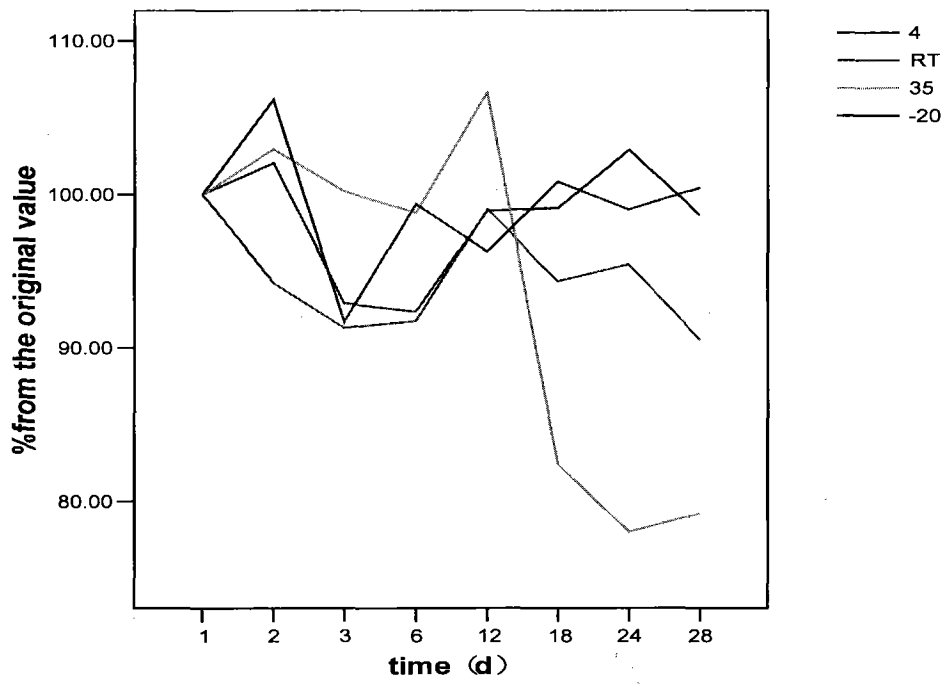


图 1

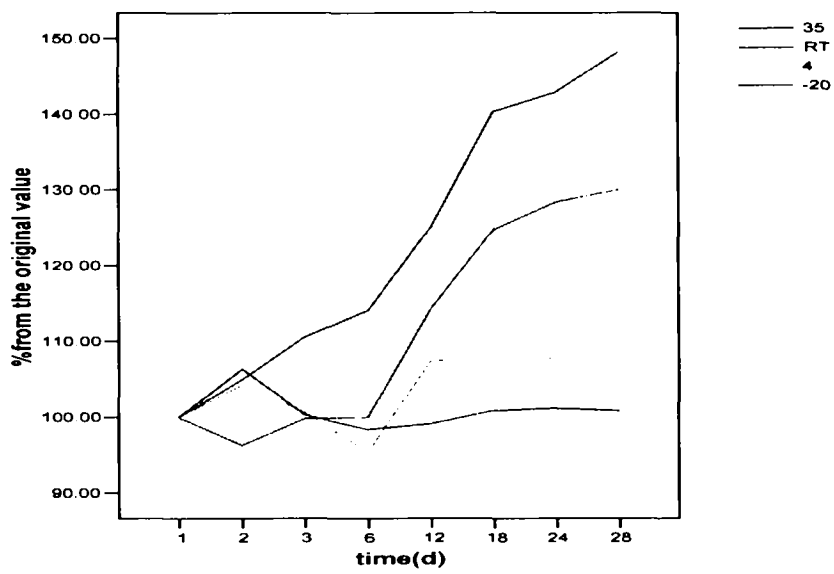


图 2

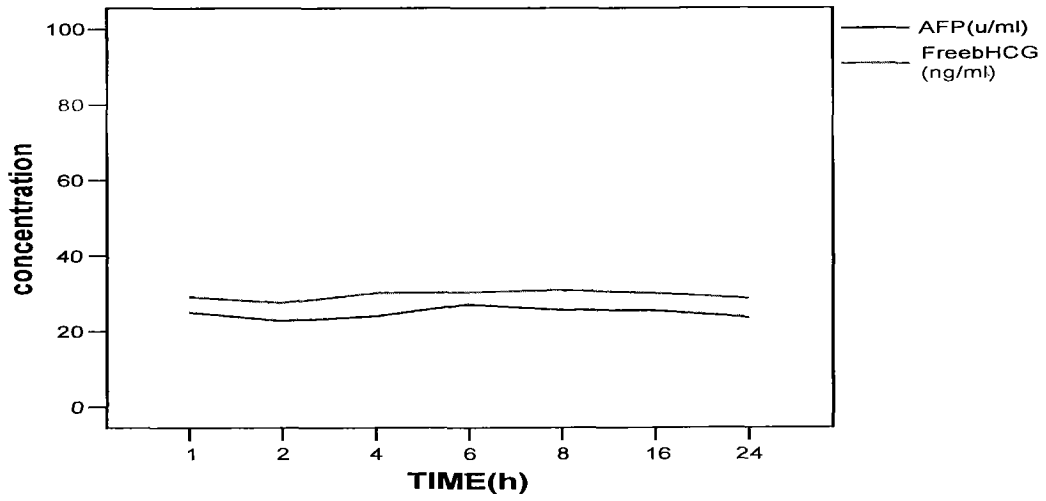


图 3

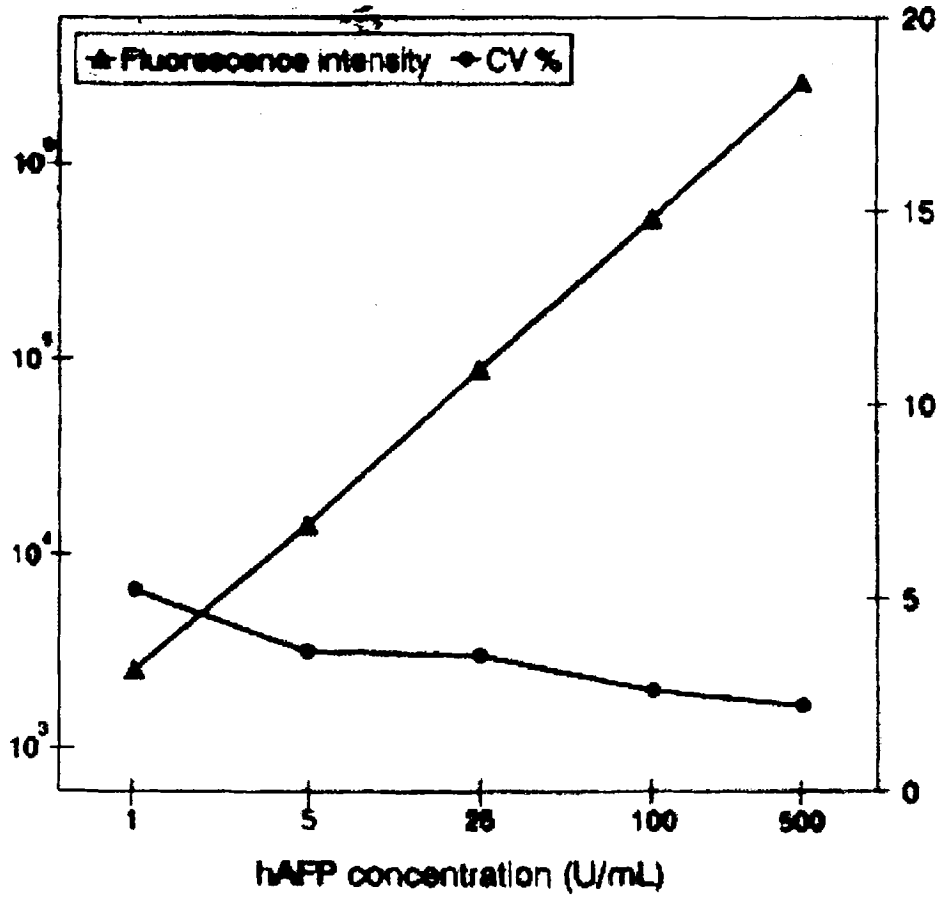


图 4

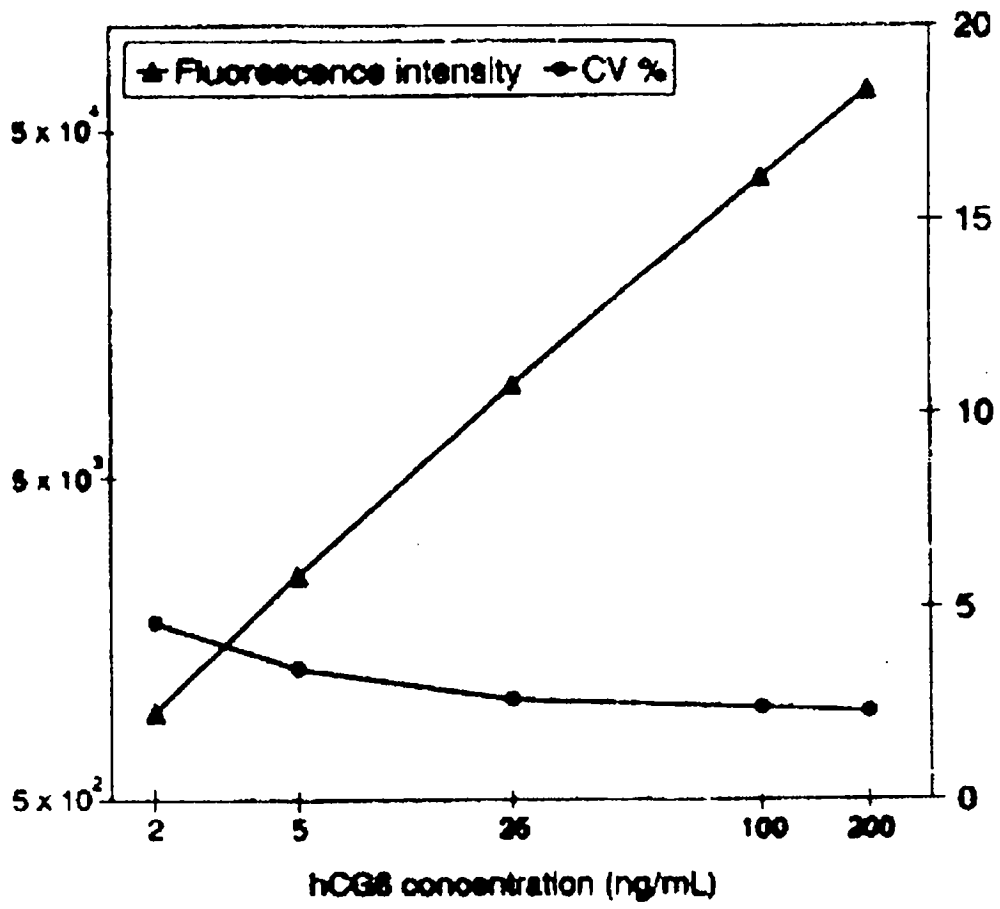


图 5

专利名称(译)	胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101825639A</a>	公开(公告)日	2010-09-08
申请号	CN201010163449.1	申请日	2010-05-06
[标]发明人	边旭明 蒋宇林		
发明人	边旭明 蒋宇林		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/76 G01N33/533 G01N33/96		
代理人(译)	刘立国		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种胎儿常见染色体异常诊断试剂盒及其制备方法，其中试剂盒包括由全血干血片滤纸，标准品血片及质控品血片，复溶洗脱缓冲液，血清学检测试剂组成。本发明通过静脉取血或未梢血取血制成干血片，实现标本的简易远程寄送，再通过一系列复溶技术实现在现有技术平台上各筛查指标(甲胎蛋白、游离βHCG)的准确检测。本发明所述的技术的应用完全改变了现有取血技术存在的标本保存、运送需冷链管理、易碎、成本较高等的巨大缺陷，有利于大规模推广产前筛查的覆盖面和技术可及性，克服了现有技术存在的缺陷。

