



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105445451 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201610016466.X

(22)申请日 2016.01.08

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105445451 A

(43)申请公布日 2016.03.30

(73)专利权人 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 陈建起 鲍冬芹 谭玉华

(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 宋静娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 104155449 A,2014.11.19,

CN 1885039 A,2006.12.27,

CN 101819206 A,2010.09.01,

CN 102520196 A,2012.06.27,

JP 2-1811654 A,1990.07.16,

CN 103869073 A,2014.06.18,

US 4478934 ,1984.10.23,

审查员 刘迎鸣

权利要求书1页 说明书18页

(54)发明名称

适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法

(57)摘要

本发明公开了一种适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,包括:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入缓冲液,然后加入标记物工作液,所述标记物工作液的浓度允许在所述缓冲液与标记物工作液的体积均不大于50 $\mu$ L时与所述样本中的待测物质充分结合。本发明的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法免除了中间容器混合缓冲液与标记物的步骤,操作简单、方便,减小了引入污染的可能性,有效降低了各实验室之间关于同一检验和/或实验因不同操作者甚至同一操作者不同批次操作造成的上述误差,提高实验结果的精确度、可信性,由于标记物工作液中的标记物浓度增加,可显著缩短反应时间。

1. 一种非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在于:包括:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入缓冲液,然后加入标记物工作液,所述标记物工作液的浓度允许在所述缓冲液与标记物工作液的体积均不大于50 $\mu$ L时与所述样本中的待测物质充分结合。

2. 如权利要求1所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:所述样本中的待测物质为甲胎蛋白、新生儿促甲状腺激素、风疹病毒IgM、弓形虫IgM、巨细胞病毒IgM和单纯疱疹病毒IgM中的至少一种。

3. 如权利要求1所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:当所述样本中的待测物质为甲胎蛋白时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入20~30 $\mu$ L缓冲液,然后加入3~7 $\mu$ L标记物工作液;其中,所述标记物工作液通过将甲胎蛋白单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按5:1~5的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释200~300倍而成。

4. 如权利要求3所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mI/L~200.0mI/L的小牛血清、牛 $\gamma$ -球蛋白和鼠IgG中的至少一种。

5. 如权利要求1所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:当所述样本中的待测物质为新生儿促甲状腺激素时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入40~50 $\mu$ L缓冲液,然后加入40~50 $\mu$ L标记物工作液;其中,所述标记物工作液通过将新生儿促甲状腺激素单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按10:5~10的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释300~400倍而成。

6. 如权利要求5所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mI/L~200.0mI/L的小牛血清、Tween40和鼠IgG中的至少一种。

7. 如权利要求1所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:当所述样本中的待测物质为风疹病毒IgM时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,再立即向每孔中加入20~30 $\mu$ L生物素化抗原,孵育5~10min,再向每孔中加入20~30 $\mu$ L缓冲液,然后加入20~30 $\mu$ L标记物工作液;其中,所述标记物工作液通过将链霉亲和素与镧系元素离子螯合物按1:1~5的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释400~800倍而成。

8. 如权利要求7所述的非疾病诊断或治疗为目的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,其特征在於:所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mI/L~200.0mI/L的小牛血清和鼠IgG中的至少一种。

## 适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于时间分辨荧光免疫分析技术领域,尤其涉及适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法。

### 背景技术

[0002] 时间分辨荧光免疫分析法测定样本中物质的含量时,其步骤通常包括:

[0003] 1) 加样:在容器中将标记物与缓冲液混合均匀,配制标记物工作液;然后将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入配制好的标记物工作液;

[0004] 2) 反应板在室温下,缓慢振荡孵育;

[0005] 3) 用上述的工作洗涤液洗板,拍干;

[0006] 4) 向每孔中加入增强液;将抗体固相载体于室温下缓慢振荡后检测。

[0007] 其中,第一步的加样方法至关重要,影响着测定结果的准确性和稳定性。对于目前的加样方法来说,为了使标记物充分与样本的待测物质结合,尽可能提高样本的分析准确性,通常将标记物通过缓冲液稀释至较低浓度,然后向固相载体包被反应板加入多于100 $\mu$ L体积的标记物工作液。

[0008] 这种的操作方法由于多种试剂均需要由操作者在每次检测前配制,必须增加因加样引起的误差和由于操作者不同操作或操作批次不同所造成的误差。另一方面,由于参与反应的各种试剂及缓冲液之间常常会发生某种化学反应,或者是某些试剂与缓冲液配制到说明书要求的工作浓度后,影响测定结果的稳定性,因此不能在操作前将待加样试剂和缓冲试剂混合保存。同时,由于引入了一个中间容器,这样的加样方法不但操作繁琐,更使操作时间延长,而且增加了引入污染的可能性,往往导致反应产生假阳性或假阴性结果,造成实验失败。

### 发明内容

[0009] 为了解决现有技术中存在的上述问题,降低各实验室之间关于同一检验和/或实验因不同操作者甚至同一操作者不同批次操作造成的上述误差,提高实验结果的精确度、可信性以及实验的反应时间,本发明提供了一种适用于时间分辨荧光免疫分析的加样方法。

[0010] 本发明采用的技术方案为:一种适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法,包括:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入缓冲液,然后加入标记物工作液,所述标记物工作液的浓度允许在所述缓冲液与标记物工作液的体积均不大于50 $\mu$ L时与固相载体充分结合。

[0011] 优选地,所述样本中的待测物质为甲胎蛋白、新生儿促甲状腺激素、风疹病毒IgM、弓形虫IgM、巨细胞病毒IgM和单纯疱疹病毒IgM中的至少一种。

[0012] 优选地,当所述样本中的待测物质为甲胎蛋白时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入20~30 $\mu$ L缓冲液,然后加入3~7 $\mu$ L标记物工作液;其

中,所述标记物工作液通过将甲胎蛋白单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按5:1~5的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释200~300倍而成。

[0013] 更优选地,所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mL/L~200.0mL/L的小牛血清、牛 $\gamma$ -球蛋白和鼠IgG中的至少一种。

[0014] 优选地,当所述样本中的待测物质为新生儿促甲状腺激素时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入40~50 $\mu$ L缓冲液,然后加入40~50 $\mu$ L标记物工作液;其中,所述标记物工作液通过将促甲状腺激素单克隆抗体与镧系元素离子螯合物按10:5~10的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释300~400倍而成。

[0015] 更优选地,所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mL/L~200.0mL/L的小牛血清、Tween40和鼠IgG中的至少一种。

[0016] 优选地,当所述样本中的待测物质为新生儿风疹病毒IgM时,所述加样方法为:将样本加入固相载体包被反应板中,再立即向每孔中加入20~30 $\mu$ L生物素化抗原,孵育5~10min,再向每孔中加入20~30 $\mu$ L缓冲液,然后加入20~30 $\mu$ L标记物工作液;其中,所述标记物工作液通过将链霉亲和素与镧系元素离子螯合物按1:1~5的质量比混合制得母液,再将母液用缓冲液稀释500~1000倍而成。

[0017] 更优选地,所述缓冲液的制备方法为:在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mL/L~200.0mL/L的小牛血清和鼠IgG中的至少一种。

[0018] 目前,人们普遍认为若标记物不经过缓冲液在中间容器中稀释,直接加入标记物,再加入缓冲液这样的做法在较小的体积用量下,是无法保证标记物与缓冲液充分混合的,从而无法实现短时间内准确检测待测物质的目的。若使用现有的方法通过提高标记物的浓度来提高反应速度,则无法保证校准品背景的荧光值小于等于2000,从而根据此方法制得的试剂盒无法满足质量要求。本发明通过巧妙的选择标记物工作液的浓度及使用体积等参数,不仅可以实现在较小的体积用量下,通过“向孔中加入缓冲液,再加入标记物工作液”这样的操作实现短时间内准确检测待测物质的目的,同时根据此方法制得的试剂盒还可以在满足质量要求的条件下,节省标记物的用量(不是体积,而是体积和浓度换算后的质量)。

[0019] 相对于现有技术,本发明的有益效果为:

[0020] 本发明的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法免除了中间容器混合缓冲液与标记物的步骤,操作简单、方便,减小了引入污染的可能性,有效降低了各实验室之间关于同一检验和/或实验因不同操作者甚至同一操作者不同批次操作造成的上述误差,提高实验结果的精确度、可信性,由于标记物工作液中的标记物浓度增加,可显著缩短反应时间。

[0021] 根据本发明的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法可制备快速型的试剂盒,而且试剂盒中标记物的用量相对于现有的试剂盒更少。本发明的方法尤其适用于全自动仪器上使用。

## 具体实施方式

[0022] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明

作进一步说明。

[0023] 实施例1

[0024] 本发明适用于时间分辨荧光免疫分析的加样方法在测定甲胎蛋白中的应用

[0025] 1) 产前筛查甲胎蛋白 (AFP) 快速测定试剂盒

[0026] 甲胎蛋白快速测定试剂盒里的主要组分: (1) 固相载体; (2) 镧系元素标记物工作液, 4mI/瓶 (直接加入微孔板); (3) 缓冲液, 4mI/瓶 (直接加入微孔板); (4) 校准品, 1.5mI/瓶; (5) 浓缩洗液以及 (6) 增强液;

[0027] 固相载体的制备方法: 将AFP单克隆抗体用包被缓冲液 (可以使用50mmoI/L, pH9.6的碳酸缓冲液、20mmoI/L, pH4.5的磷酸盐缓冲液、50mmoI/L, pH7.8的Tris-HCl缓冲液或50mmoI/L, pH4.5的柠檬酸盐缓冲液) 稀释至最适浓度, 在固相上进行包被, 将固相洗涤1次, 然后再用封闭液进行封闭, 将固相甩干, 晾干, 真空包装, 2~8℃保存备用;

[0028] 所述镧系元素标记物为Eu<sup>3+</sup>-N2-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记AFP单克隆抗体, 所述镧系元素标记物工作液的制备方法如下:

[0029] 按照Eu<sup>3+</sup>标记试剂盒说明书操作。将1.0mg的AFP单克隆抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中, 10000r/min离心5~6min, 再用标记缓冲液重复洗涤6次, 将处理得到的200μLAFP单克隆抗体加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的Eu<sup>3+</sup>标记试剂充分混匀, 2~8℃振荡孵育72h。反应液经分别用50mmoI/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sepharose CL-6B柱 (1cm×40cm) 层析, 分别A280监测收集第一峰中的洗脱液; 将洗脱液用缓冲液稀释240倍即得所述镧系元素标记物工作液;

[0030] 缓冲液为在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmoI/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mI/L~200.0mI/L的小牛血清、牛γ-球蛋白或鼠IgG;

[0031] 校准品的制备方法为: 以WH01#International Standard (72/225), 将甲胎蛋白用含有10g/L BSA的50mmoI/L, pH7.8的Tris-HCl缓冲液分别稀释成0, 1.0, 10.0, 30.0, 100.0, 500.0u/mI。

[0032] 浓缩洗液为在含0.385moI/L NaCl, 0.124moI/L、pH7.8的Tris-HCl缓冲液中加入1.0mI/L~10.0mI/L的Tween-20;

[0033] 增强液为在含有1mI/L TritonX-100、0.1moI/L邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入1~5mg/Lβ-萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L的三正辛基氧化磷。

[0034] 2) 使用甲胎蛋白快速测定试剂盒测定甲胎蛋白

[0035] 以本实施例中制备的产前筛查甲胎蛋白快速测定试剂盒采用时间分辨荧光免疫分析法测定甲胎蛋白的具体操作如下:

[0036] (1) 试剂准备

[0037] ①抗体固相载体: 将试剂及所需数量的抗体固相载体平衡至室温 (20~25℃)。余下的抗体固相载体及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0038] ②校准品复溶: 轻轻旋开橡皮塞, 向每瓶中精确加入1.5mI的蒸馏水, 充分溶解, 轻轻混匀。复溶后, 静置约30分钟后使用。

[0039] ③工作洗涤液: 将40mI浓缩洗液和960mI纯化水在干净的容器中混合, 作为工作洗涤液备用。

[0040] (2) 试验操作

[0041] ①加样:将校准品、质控品或样本10uI加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入25μL缓冲液,再向每孔中加入5μL AFP的镧系元素标记物工作液;

[0042] ②反应板在室温下,缓慢振荡孵育20min;

[0043] ③用上述的工作洗涤液洗板6次,拍干;

[0044] ④向每孔中加入100~200μL增强液;抗原和抗体固相载体于室温下缓慢振荡5min后检测,在30min内完成检测并进行分析。

[0045] 比较例1

[0046] 现有加样方法在测定甲胎蛋白中的应用

[0047] 1) 产前筛查甲胎蛋白普通测定试剂盒

[0048] 甲胎蛋白普通试剂盒里的主要组分:(1)固相载体;(2)镧系元素标记物,1.5mI/瓶;(3)缓冲液,30mI/瓶;(4)校准品,1.5mI/瓶;(5)浓缩洗液以及(6)增强液;

[0049] 其中固相载体、缓冲液、校准品、浓缩洗液和增强液的制备方法同实施例1;

[0050] 所述镧系元素标记物为Eu<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记AFP单克隆抗体,其制备方法如下:

[0051] 按照Eu<sup>3+</sup>标记试剂盒说明书操作。将1.0mg的AFP单克隆抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,10000r/min离心5~6min,再用标记缓冲液重复洗涤6次,将处理得到的200μLAFP单克隆抗体加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的Eu<sup>3+</sup>标记试剂充分混匀,2~8℃振荡孵育72h。反应液经分别用50mmol/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sepharose CL-6B柱(1cm×40cm)层析,分别A280监测收集第一峰中的洗脱液;将洗脱液用缓冲液稀释30倍即得所述镧系元素标记物工作液;

[0052] 2) 使用甲胎蛋白普通测定试剂盒测定甲胎蛋白

[0053] (1) 试剂准备

[0054] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0055] ②校准品复溶:轻轻旋开橡皮塞,向每瓶中精确加入1.5mI的蒸馏水,充分溶解,轻轻混匀。复溶后,静置约30分钟后使用。

[0056] ③洗涤液:将40mI浓缩洗液和960mI蒸馏水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。蒸馏水敬请用户自备。

[0057] ④标记物工作液:使用前配制,将hAFP标记物与实验缓冲液按体积比1:50加进洁净的一次性容器中并混匀,当次试验用完。

[0058] (2) 检验操作

[0059] ①加样:将校准品、质控品或样本25uI加入固相载体包被反应板中,向每孔中加入100μL配制好的标记物工作液;

[0060] ②反应板在室温下,缓慢振荡孵育90min。

[0061] ③用上述的工作洗涤液洗板6次,拍干;

[0062] ④向每孔中加入100μL增强液;抗原和抗体固相载体于室温下缓慢振荡5min后检测,在30min内完成检测并进行分析。

[0063] 实施例1和比较例1中的两种试剂盒的性能评价

[0064] 1) 测量精密度:分别选取低、中、高3个不同浓度的样品,用甲胎蛋白快速测定试剂

盒根据实施例1中测定甲胎蛋白的方法以及甲胎蛋白普通测定试剂盒根据实施例2中测定甲胎蛋白的方法对每一个浓度样品重复检测20次,结果见表1。

[0065] 表1

[0066]

测定次数	样品浓度(单位: U/mL)					
	低浓度		中浓度		高浓度	
	普通	快速	普通	快速	普通	快速
1	19.87	19.82	60.21	60.12	150.68	150.21
2	20.24	20.10	60.21	60.03	150.29	150.03
3	20.16	20.12	60.24	60.05	150.69	150.21
4	19.98	19.94	60.24	59.97	150.27	150.23
5	20.26	20.12	60.25	59.97	150.35	150.21
6	20.13	20.03	60.18	60.00	150.14	150.20
7	20.09	19.98	60.61	60.51	150.28	150.11
8	20.24	20.12	60.24	60.24	150.29	150.14
9	20.19	20.15	60.55	60.57	150.36	150.12
10	20.04	19.96	60.21	59.98	150.29	150.08
11	20.13	20.11	60.24	59.96	150.84	150.09
12	20.19	20.14	60.24	59.99	150.94	150.12
13	20.06	19.95	60.18	60.07	150.28	150.07
14	20.11	20.00	61.29	60.08	150.47	150.21
15	20.16	20.06	60.27	60.02	150.29	150.09
16	20.08	20.00	60.19	59.99	150.74	150.11
17	20.15	20.04	60.11	60.05	150.29	150.05
18	20.08	20.03	60.21	60.25	150.92	150.07
19	20.12	19.99	61.24	60.11	150.64	150.21

[0067]

20	20.19	19.98	60.19	60.2	150.38	150.21
平均值	20.12	20.03	60.355	60.11	150.47	150.14
标准偏差	0.09	0.08	0.33	0.17	0.25	0.07
变异系数	0.46%	0.42%	0.55%	0.29%	0.17%	0.04%

[0068] 2) 测量准确度:

[0069] 分别用甲胎蛋白快速测定试剂盒根据实施例1中测定甲胎蛋白的方法以及甲胎蛋白普通测定试剂盒根据实施例2中测定甲胎蛋白的方法测定浓度为100U/mL(允许偏差为±10%)的AFP国际标准品(WH01#International Standand(72/225),测定结果的相对偏差应在±10%范围内。结果见表2。

[0070] 表2

[0071]

测定次数	标准品浓度 (单位: U/ml)	
	普通	快速
1	101.21	100.07
2	101.26	100.11
3	101.51	100.09
4	101.62	100.13
5	101.21	100.11
6	101.24	100.09
7	101.63	100.21
8	101.56	100.09
9	101.42	100.16
10	101.24	100.08
平均值	101.39	100.11
标准偏差	0.18	0.04
变异系数	0.17%	0.04%

[0072] 3) 最低检测限:

[0073] 分别用甲胎蛋白快速测定试剂盒根据实施例1中测定甲胎蛋白的方法以及甲胎蛋白普通测定试剂盒根据实施例2中测定甲胎蛋白的方法把样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,计算20次测量结果的相对发光值,计算其平均值和标准差以及平均值加上两倍的标准差的发光值,将平均值加上两倍的标准差的发光值代入试剂盒所用校准品的定标曲线方程计算出对应的浓度值,即为最低检测限,最低检出限不高于1.0U/mI。结果见表3。

[0074] 表3

[0075]

测定次数	发光值	
	普通	快速
1	1098	1456
2	1012	1429

[0076]

3	1021	1492
4	1121	1485
5	998	1463
6	1095	1427
7	985	1528
8	1002	1495
9	1102	1462
10	1136	1437
11	1099	1489
12	1098	1484
13	1023	1468
14	1002	1459
15	1125	1486
16	1145	1495
17	1096	1435
18	1021	1487
19	1123	1491
20	1045	1485
平均值 (X)	1067.35	1473
标准偏差(SD)	54.13	26.39
X+2*SD	1175.61	1525.42
拟合浓度	0.05	0.05

[0077] 4) 特异性:

[0078] 对实施例1中的快速测定试剂盒,用CEA 500ng/mL进行检测,测得表观hAFP浓度不高于1.0U/mL。

[0079] 用白蛋白(ALB) 100mg/L进行检测,测得表观hAFP浓度不高于1.0U/mL。

[0080] 5) 线性相关系数:

[0081] 实施例1中的快速测定试剂盒的线性范围(1.0U/mL~500U/mL)内的线性应符合如下要求:

[0082] a) 线性相关系数 $r \geq 0.990$ ;[0083] b) 检测浓度 $< 50U/mL$ 的AFP时,线性的绝对偏差应在 $\pm 8U/mL$ 范围内;检测浓度 $\geq 50U/mL$ 的AFP时,线性相对偏差不超过 $\pm 15\%$ 。

[0084] 6) Hook效应:

[0085] 实施例1中的快速测定试剂盒,检测浓度为5000U/mL的hAFP时,其荧光值仍高于最高点校准品的荧光值。

[0086] 7) 稳定性:取有效期内的实施例1中的快速测定试剂盒,37℃放置6天后检测以上性能指标无明显改变。

[0087] 8) 实施例1和比较例1中的两种试剂盒在检测伯乐质控实验结果如表4。

[0088] 表4

[0089]

靶值 (单位: u/ml)	伯乐 质控	现有对照 (单位: u/ml)	快速法 (单位: u/ml)
9.3	Q1	8.28	8.87
		7.89	8.62
28	Q2	27.60	26.8
		27.80	27.10
65	Q3	59.70	62.10
		60.20	62.20

[0090] 9) 免疫反应时间比较

[0091] 用甲胎蛋白快速测定试剂盒根据实施例1中测定甲胎蛋白的方法以及甲胎蛋白普通测定试剂盒根据实施例2中测定甲胎蛋白的方法测定样本中的甲胎蛋白免疫反应时间的对比结果如表5所示。

[0092] 表5

[0093]

现有对照所需时间	快速法所需时间
100min	25min

[0094] 10) 试剂盒成本比较

[0095] 对于一块96孔板来说,现有的试剂盒提供的标记物的量为1.5mL,这1.5mL的标记物是标记物母液经30倍稀释后而得到的,当其用于全自动化仪器测定时,标记物需要预先稀释50倍,为了满足仪器吸液量的要求,通常吸液完成后,孔内需要留至少有700 $\mu$ L的量,因此1.5mL的标记物实际上被用于测定的只有500 $\mu$ L,余下的1.0mL的标记物为满足仪器的吸液量要求而留置在孔内被弃掉。

[0096] 而使用本发明的方法可提供快速测定试剂盒,对于一块96孔板(为了便于说明,暂且以100孔来算)来说,快速测定试剂盒提供的标记物的量为4.0mL,这4.0mL的标记物是标记物母液经240倍稀释后而得到的,当其用于全自动化仪器测定时,无需进行稀释,可直接加样,4.0mL的标记物实际上被用于测定的只有2.5mL,余下的1.5mL的标记物为满足仪器的吸液量要求而留置在孔内被弃掉。由于4.0mL中的标记物母液的用量少于1.5mL标记物母液的用量,采用快速测定试剂盒可节省标记物的用量,通常标记物的制备成本昂贵,从而可大幅节省试剂盒的成本。

[0097] 在时间分辨荧光免疫方法学中,我们对本底(背景)有严格要求,一般要求本底(背景,我们在试剂盒中是用校准品A点来体现的)是 $\leq 2000$ 荧光值,校准品B点荧光值/A点荧光值至少要 $\geq 2.1$ 倍,校准品F点荧光值 $\geq 2000000$ ,且校准品A、B、C、D、E、F是按照一定浓度梯度比例配制下来的,那么在检测荧光值时,校准品A、B、C、D、E、F荧光值也得要有梯度(线性)比例关系。普通试剂盒的母液之所以稀释30倍,对于目前的加样方法来说,是为了满足标准品A点(背景)的荧光值小于2000,F点的荧光值大于2000000的要求;若母液稀释后的浓度过高,对于目前的加样方法来说,则A点(背景)的荧光值会大于2000,无法满足本底要求;若母

液稀释后的浓度过低,则无法满足F点的荧光值大于2000000的要求。

[0098] 快速测定试剂盒的母液稀释200~300倍(优选240倍)后,对于本发明的加样方法来说,仍然可以满足标准品A点(背景)的荧光值小于2000,F点的荧光值大于2000000的要求,同时可实现大幅节省试剂盒成本的目的。

[0099] 实施例2

[0100] 本发明适用于时间分辨荧光免疫分析的加样方法在测定新生儿促甲状腺激素中的应用

[0101] 1) 新生儿促甲状腺激素(TSH)快速测定试剂盒

[0102] 新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒里的主要组分(以96人份/盒,全自动来比较): (1) 固相载体; (2) 镧系元素标记物工作液, 4mI/瓶, 2瓶(直接加入微孔板); (3) 缓冲液, 4mI/瓶, 2瓶(直接加入微孔板); (4) 滤纸干血片校准品, 1套; (5) 浓缩洗液以及(6) 增强液;

[0103] 固相载体的制备方法: 将促甲状腺激素抗体包被用包被缓冲液(可以使用50mmol/L, pH9.6的碳酸缓冲液、20mmol/L, pH4.5的磷酸盐缓冲液、50mmol/L, pH7.8的Tris-HCl缓冲液或50mmol/L, pH4.5的柠檬酸盐缓冲液等)稀释至最适浓度,在固相上进行包被,将固相洗涤1次,然后再用封闭液进行封闭,将固相甩干,晾干,真空包装,2~8℃保存备用。

[0104] 所述镧系元素标记物为Eu<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记TSH单克隆抗体,所述镧系元素标记物工作液的制备方法如下:

[0105] 将1.0mg的TSH单克隆抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,10000r/min离心(5~6)min,再用标记缓冲液重复洗涤6次,将处理得到的200μLTSH单克隆抗体加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的Eu<sup>3+</sup>标记试剂充分混匀,28℃振荡孵育48h。反应液经分别用50mmol/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sepharose CL-6B柱(1cm×40cm)层析,分别A280监测收集第一峰中的洗脱液。将洗脱液用缓冲液稀释320倍即得所述镧系元素标记物工作液;

[0106] 缓冲液为在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0mI/L~200.0mI/L的小牛血清、Tween40或鼠IgG;

[0107] 校准品的制备方法为:以TSH国家标准品为标准,将TSH抗原用含量约50%的人血球及TSH抗原的人血清在S&S903#滤纸上制备分别稀释成1、10、25、50、100、260μIU/mI浓度点。

[0108] 浓缩洗液为在含0.385mol/L NaCl,0.124mol/L、pH7.8的Tris-HCl缓冲液中加入1.0mI/L~10.0mI/L的Tween-20;

[0109] 增强液为在含有1mI/L TritonX-100、0.1mol/L邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入1~5mg/Lβ-萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L的三正辛基氧化磷。

[0110] 2) 使用新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒测定新生儿促甲状腺激素

[0111] 以本实施例中制备的新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒采用时间分辨荧光免疫分析法测定新生儿促甲状腺激素的具体操作如下:

[0112] (1) 试剂准备

[0113] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0114] ②洗涤液:将40mI浓缩洗液和960mI蒸馏水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液

备用。

[0115] (2) 试验操作

[0116] ①加入校准品、质控品、待测样本：用打孔器从Neo hTSH血片校准品的滤纸圆斑上打下直径为3mm (1/8inch) 校准品、质控品以及样本(打下纸片须被血液浸透)，并依次放置于微孔反应板中，每孔一片。控制打孔的一致性，使纸片尽量一致。

[0117] ②加入分析缓冲液：向每孔中加入50 $\mu$ I分析缓冲液。

[0118] ③加入钷标记物工作液：向每孔中加入50 $\mu$ I钷标记物工作液，并加贴封片。

[0119] ④孵育：微孔反应板条在室温下，用振荡器快速振荡30分钟。

[0120] ⑤洗板：孵育结束后，吸取滤纸片，用洗板机洗涤6次，拍干。

[0121] ⑥加入增强液：洗涤完成后，向每孔中加入增强液150 $\mu$ I。

[0122] ⑦检测：微孔反应板条于室温下缓慢振荡10分钟后上机检测，在30分钟内完成检测。

[0123] 还可采用支架法进行操作，具体如下：

[0124] ①校准品、质控品、待测样本的打孔：用自动打孔机从Neo hTSH血片校准品的滤纸圆斑上打下直径为3mm (1/8inch) 的校准品、质控品以及样本(打下纸片须被血液浸透)，依次固定在支架上。

[0125] ②加入分析缓冲液：向每孔中加入50 $\mu$ I分析缓冲液。

[0126] ③加入钷标记物工作液：向每孔中加入50 $\mu$ I钷标记物工作液，依次将打好校准品、质控品以及样本的支架放入板孔中，用自封袋装好放在振荡器上。

[0127] ④孵育：室温下缓慢振荡30分钟。

[0128] ⑤洗板：孵育结束后，扔掉支架，用洗板机洗涤6次，拍干。

[0129] ⑥加入增强液：洗涤完成后，向每孔中加入增强液150 $\mu$ I。

[0130] ⑦检测：微孔反应板条于室温下缓慢振荡10分钟后上机检测，在30分钟内完成检测。

[0131] 比较例2

[0132] 现有加样方法在测定新生儿促甲状腺激素中的应用

[0133] 1) 新生儿促甲状腺激素普通测定试剂盒

[0134] 新生儿促甲状腺激素普通试剂盒里的主要组分(以96人份/盒，全自动来比较)：(1) 固相载体；(2) 镧系元素标记物，1.5mI/瓶；(3) 缓冲液，30mI/瓶；(4) 滤纸干血片校准品，1套；(5) 浓缩洗液以及(6) 增强液；

[0135] 其中固相载体、缓冲液、校准品、浓缩洗液和增强液的制备方法同实施例1；

[0136] 所述镧系元素标记物为Eu<sup>3+</sup>-N2-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记TSH单克隆抗体，其制备方法如下：

[0137] 将1.0mg的TSH单克隆抗体加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中，10000r/min离心(5~6)min，再用标记缓冲液重复洗涤6次，将处理得到的200 $\mu$ LTSH单克隆抗体加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的Eu<sup>3+</sup>标记试剂充分混匀，28 $^{\circ}$ C振荡孵育48h。反应液经分别用50mmol/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sephacryl CL-6B柱(1cm $\times$ 40cm)层析，分别A280监测收集第一峰中的洗脱液。将洗脱液用缓冲液稀释20倍即得所述镧系元素标记物工作液；

[0138] 2) 使用新生儿促甲状腺激素普通测定试剂盒测定新生儿促甲状腺激素

[0139] (1) 试剂准备

[0140] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0141] ②铊标记物工作液:使用前按需要量配制,将Neo hTSH标记物与实验缓冲液按体积比1:100加进洁净的一次性容器中并混匀,当次试验用完,没用完的应舍弃。

[0142] ③洗涤液:将40mI浓缩洗液和960mI蒸馏水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。蒸馏水敬请用户自备。

[0143] (2) 检验操作

[0144] ①加入校准品、质控品、待测样本:用打孔器从Neo hTSH血片校准品的滤纸圆斑上打下直径为3mm(1/8inch)校准品、质控品以及样本(打下纸片须被血液浸透),并依次放置于微孔反应板中,每孔一片。控制打孔的一致性,使纸片尽量一致。

[0145] ②加入铊标记物工作液:向每孔中加入150μI已配好的铊标记物工作液,并加贴封片。

[0146] ③孵育:微孔反应板条在室温下,先用振荡器快速振荡15分钟,在2~8℃静置过夜,第二天再于室温下缓慢振荡孵育60分钟(此为过夜孵育法);或者用振荡器快速振荡15分钟,然后再室温下缓慢振荡4小时(此为快速孵育法)。

[0147] 注:快速振荡15分钟是为了将hTSH从纸片中完全提取出来。

[0148] ④洗板:孵育结束后,吸取滤纸片,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0149] ⑤加入增强液:洗涤完成后,向每孔中加入增强液150μI。

[0150] ⑥检测:微孔反应板条于室温下缓慢振荡10分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。

[0151] 还可采用支架法进行操作,具体如下:

[0152] ①校准品、质控品、待测样本的打孔:用自动打孔机从Neo hTSH血片校准品的滤纸圆斑上打下直径为3mm(1/8inch)的校准品、质控品以及样本(打下纸片须被血液浸透),依次固定在支架上。

[0153] ②加入铊标记物工作液:向每孔中加入150μI已配好的铊标记物工作液,依次将打好校准品、质控品以及样本的支架放入板孔中,用自封袋装好放在振荡器上。

[0154] ③孵育:室温下缓慢振荡2小时。

[0155] ④洗板:孵育结束后,扔掉支架,用洗板机洗涤6次,拍干。

[0156] ⑤加入增强液:洗涤完成后,向每孔中加入增强液150μI。

[0157] ⑥检测:微孔反应板条于室温下缓慢振荡10分钟后上机检测,在30分钟内完成检测。

[0158] 实施例2和比较例2中的两种试剂盒的性能评价

[0159] 1) 测量精密度:分别选取低、中、高3个不同浓度的样品,用新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒根据实施例2中测定促甲状腺激素的方法以及促甲状腺激素普通测定试剂盒根据实施例2中测定促甲状腺激素的方法对每一个浓度样品重复检测20次,结果见表6。

[0160] 表6

[0161]

测定次数	样品浓度(单位: uU/mL)					
	低浓度		中浓度		高浓度	
	普通	快速	普通	快速	普通	快速
1	0.70	0.80	14.30	14.69	49.70	50.29
2	0.80	0.80	14.60	15.01	50.21	51.27
3	0.90	0.90	14.50	14.29	52.15	52.36
4	0.70	1.00	15.20	15.24	52.18	54.29
5	0.90	0.90	14.90	15.24	52.63	53.28
6	0.80	0.90	14.23	16.24	52.49	53.26
7	0.80	1.00	14.21	15.24	60.58	52.36
8	0.70	0.70	14.29	15.36	52.36	52.36
9	0.90	0.70	15.63	15.14	51.29	52.14
10	1.00	0.80	15.69	15.36	50.86	52.49
11	0.90	0.80	16.71	15.86	53.24	52.28
12	0.80	0.90	14.59	15.04	52.19	52.38
13	0.90	0.90	14.29	15.34	52.49	52.48
14	1.00	0.90	14.59	15.24	53.48	52.39
15	0.90	0.90	14.85	15.14	52.78	52.14
16	0.90	0.80	15.24	15.04	49.68	52.25
17	0.80	0.90	16.48	14.94	59.25	52.23
18	0.90	0.90	15.29	14.84	57.35	52.20
19	1.00	0.90	17.01	14.74	58.77	52.17
20	1.00	0.90	16.54	14.64	60.19	52.15
平均值	0.87	0.87	15.16	15.13	53.69	52.34
标准偏差	0.10	0.08	0.91	0.42	3.49	0.76
变异系数	11.42%	9.40%	5.97%	2.80%	6.50%	1.46%

[0162] 2) 测量准确度:

[0163] 分别用新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒根据实施例2中测定新生儿促甲状腺激素的方法以及新生儿促甲状腺激素普通测定试剂盒根据实施例2中测定新生儿促甲状腺激素的方法测定浓度为300uU/mL“Thyroid-Stimulating Hormone, Human, for Immunoassay, Third International Standard, NIBSC Code 81/565”(允许偏差为±10%)的标准品,测定结果的相对偏差应在±10%范围内。结果见表7。

[0164] 表7

[0165]

测定次数	标准品浓度 (单位: uI/mL)	
	普通	快速
1	298.26	299.81
2	296.36	298.47
3	297.86	298.34
4	299.84	299.74
5	299.54	299.43
6	299.68	296.84
7	291.53	295.82
8	297.84	298.74
9	294.35	298.28
10	299.68	298.57
平均值	297.49	298.40
标准偏差	2.72	1.25
变异系数	0.92%	0.42%

[0166] 3) 最低检测限:

[0167] 分别用新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒根据实施例2中测定新生儿促甲状腺激素的方法以及新生儿促甲状腺激素普通测定试剂盒根据实施例2中测定新生儿促甲状腺激素的方法把校准品A点作为样本进行检测,重复测定20次,计算20次测量结果的相对发光值,计算其平均值和标准差以及平均值加上两倍的标准差的发光值,将平均值加上两倍的标准差的发光值代入试剂盒所用校准品的定标曲线方程计算出对应的浓度值,即为最低检测限,最低检出限不高于5 $\mu$ IU/mL。结果见表8。

[0168] 表8

[0169]

测定次数	发光值	
	普通	快速
1	1532	1625
2	1526	1635
3	1548	1759
4	1536	1842
5	1726	1865
6	1820	1765
7	1723	1763
8	1564	1758
9	1475	1689
10	1547	1675
11	1485	1687
12	1236	1685
13	1524	1674

[0170]

14	1532	1684
15	1235	1598
16	1256	1758
17	1248	1768
18	1356	1358
19	1357	1658
20	1568	1478
平均值 (X)	1489.70	1686.20
标准偏差(SD)	166.05	116.29
X+2*SD	1821.81	1918.78
拟合浓度	1.00	1.10

[0171] 2特异性:

[0172] 用黄体生成素 (hLH) 250U/L进行检测,测得表观Neo-TSH浓度不高于5 $\mu$ IU/mL。[0173] 用促卵泡激素 (hFSH) 250U/L进行检测,测得表观Neo-TSH浓度不高于5 $\mu$ IU/mL。[0174] 用绒毛膜促性腺激素 (hCG) 10000U/L进行检测,测得表观Neo-TSH浓度不高于5 $\mu$ IU/mL。

[0175] 3线性相关系数:

[0176] 试剂(盒)的线性范围(1 $\mu$ IU/mL~260 $\mu$ IU/mL)内的线性应符合如下要求:[0177] a) 线性相关系数 $r \geq 0.990$ ;[0178] b) 检测浓度 $< 50 \mu$ IU/mL的TSH纸片时,线性的绝对偏差应在 $\pm 8 \mu$ IU/mL范围内;检测浓度 $\geq 50 \mu$ IU/mL的TSH纸片时,线性相对偏差不超过 $\pm 15\%$ 。

[0179] 4测量精密度:

[0180] 校准品均一性:试剂盒校准品(A点除外)B点、C点的不精密度(CV%)应不超过25.0%;D点、E点、F点的不精密度(CV%)应不超过15.0%。

[0181] 质控品均一性:试剂盒质控品的不精密度(CV%)应不超过15.0%;

[0182] 试剂盒的批内不精密度(CV%)应不超过15.0%;

[0183] 试剂盒的批间不精密度(CV%)应不超过20.0%。

[0184] 6HOOK效应:

[0185] 检测浓度为1000 $\mu$ IU/mL的TSH时,其荧光值仍高于260 $\mu$ IU/mL标准品的荧光值。

[0186] 7免疫反应时间比较

[0187] 用新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒根据实施例1中测定新生儿促甲状腺激素的方法以及新生儿促甲状腺激素快速测定试剂盒根据实施例2中测定新生儿促甲状腺激素的方法测定样本中的新生儿促甲状腺激素免疫反应时间对比结果如表9所示。

[0188] 表9

[0189]

现有对照所需时间	快速法所需时间
过夜或120min	30min

[0190] 实施例3

[0191] 本发明适用于时间分辨荧光免疫分析的加样方法在测定风疹病毒IgM中的应用

[0192] 1) 风疹病毒IgM快速测定试剂盒

[0193] 风疹病毒IgM快速测定试剂盒里的主要组分:1) 抗体固相载体;2) 校准品;3) 镧系

元素标记物,4.0ml/瓶;4) 实验缓冲液,4.0ml/瓶;5) 风疹病毒1gM生物素化抗原,4ml/瓶6) 浓缩洗液以及7) 增强液。

[0194] 固相载体的制备方法:将抗u链用包被缓冲液(可以使用50mmol/L,pH9.6的碳酸缓冲液、20mmol/L,pH4.5的磷酸盐缓冲液、50mmol/L,pH7.8的Tris-HCl缓冲液或50mmol/L,pH4.5的柠檬酸盐缓冲液等)稀释至最适浓度,在固相上进行包被,将固相洗涤1次,然后再用封闭液进行封闭,将固相甩干,晾干,真空包装,2~8℃保存备用。

[0195] 所述镧系元素标记物为Eu<sup>3+</sup>-N<sub>2</sub>-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记链霉亲和素,所述镧系元素标记物工作液的制备方法如下:

[0196] 将1.0mg的链霉亲和素加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,10000r/min离心(5~6)min,再用标记缓冲液重复洗涤6次,将处理得到的200μL链霉亲和素加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的Eu<sup>3+</sup>标记试剂充分混匀,2~8℃振荡孵育72h。反应液经分别用50mmol/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sephacryl CL-6B柱(1cm×40cm)层析,分别A280监测收集第一峰中的洗脱液。将洗脱液用缓冲液稀释400倍即得所述镧系元素标记物工作液;

[0197] 风疹病毒1gM生物素化抗原采用以下步骤:

[0198] 以能满足风疹病毒1gM国家参考品检标准要求,将风疹病毒1gM生物素抗原用含有10g/L BSA的50mmol/L,pH7.8的Tris-HCl缓冲液稀释合适的工作浓度。

[0199] 缓冲液为在含0.01g/L的乙二胺四乙酸二钠的50mmol/L、pH7.8的Tris-HCl溶液中加入10.0ml/L~200.0ml/L的小牛血清、牛γ-球蛋白或鼠IgG;

[0200] 校准品的制备方法为:以风疹病毒1gM国家参考品,将风疹病毒1gM用含有10g/L BSA的50mmol/L,pH7.8的Tris-HCl缓冲液分别稀释成0,2.0,4.0,8.0,16.0,32.0RU/ml。

[0201] 浓缩洗液为在含0.385mol/L NaCl,0.124mol/L、pH7.8的Tris-HCl缓冲液中加入1.0ml/L~10.0ml/L的Tween-20;

[0202] 增强液为在含有1ml/L TritonX-100、0.1mol/L邻苯二甲酸氢钾-冰醋酸溶液中加入1~5mg/Lβ-萘甲酰三氟丙酮、15~30mg/L的三正辛基氧化磷。

[0203] 2) 使用风疹病毒1gM快速测定试剂盒测定风疹病毒1gM

[0204] 以本实施例中制备的风疹病毒1gM快速测定试剂盒采用时间分辨荧光免疫分析法测定风疹病毒1gM的具体操作如下:

[0205] (1) 试剂准备

[0206] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0207] ②洗涤工作液:将浓缩洗液用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。纯化水敬请用户自备。

[0208] ③校准品、对照品的复溶:第一次使用前30min,在校准品、对照品中各加入1.5ml纯化水复溶并充分混匀,如需反复使用请放置至少-20℃条件下保存,请避免反复冻融。

[0209] ④样本稀释:将血样本和样本稀释液按体积比1:100稀释待检样本,如1ml样本稀释液中加入10μL待检样本。试剂盒校准品和对照品均不需稀释,请直接使用。

[0210] (2) 试验操作

[0211] 1) 吸取50μl的RV 1gM校准品、对照品、已稀释好的待测样本依次加入微孔反应板

的微孔中。一般情况校准品、对照品至少做2孔的复孔。建议待测样本作复孔检测。

[0212] 2) 向每孔中加入RV 1gM生物素标记抗原25u1,用振荡器缓慢振荡孵育5min。

[0213] 3) 第一步孵育结束后,立即加入25u1分析缓冲液和25u1铕标记物工作液

[0214] 4) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育30min。

[0215] 5) 第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤6,拍干。

[0216] 6) 向每孔中加入增强液100μl。

[0217] 7) 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30min内完成检测。

[0218] 比较例2

[0219] 现有加样方法在测定风疹病毒1gM中的应用

[0220] 1) 风疹病毒1gM普通测定试剂盒

[0221] 风疹病毒1gM普通试剂盒里的主要组分:1) 抗体固相载体;2) 校准品;3) 镧系元素标记物,1.5ml/瓶;4) 实验缓冲液,30ml/瓶;5) 风疹病毒1gM生物素化抗原,1.5ml/瓶6) 浓缩洗液以及7) 增强液。

[0222] 其中固相载体、缓冲液、校准品、浓缩洗液和增强液的制备方法同实施例1;

[0223] 所述镧系元素标记物为 $\text{Eu}^{3+}$ -N2-[P-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸钠标记链霉亲和素,其制备方法如下:

[0224] 将1.0mg的链霉亲和素加入Millipore公司的带有滤膜的离心管中,10000r/min离心(5~6)min,再用标记缓冲液重复洗涤6次,将处理得到的200μL链霉亲和素加入到1.0mg的预先用标记缓冲液溶解的 $\text{Eu}^{3+}$ 标记试剂充分混匀,2~8℃振荡孵育72h。反应液经分别用50mmol/L pH7.80Tris-HCl缓冲液平衡的Sephacryl CL-6B柱(1cm×40cm)层析,分别A280监测收集第一峰中的洗脱液。将洗脱液用缓冲液稀释20倍即得所述镧系元素标记物工作液;

[0225] 2) 使用风疹病毒1gM普通测定试剂盒测定风疹病毒1gM

[0226] (1) 试剂准备

[0227] ①微孔反应板:将试剂及所需数量的微孔反应板条平衡至室温(20~25℃)。余下的微孔板条及时置入自封袋密闭并于2~8℃保存。

[0228] ②洗涤工作液:将浓缩洗液用纯化水在干净的容器中按体积比1:25倍稀释,混匀,作为工作洗涤液备用。纯化水敬请用户自备。

[0229] ③生物素标记抗原和铕标记物工作液:生物素标记抗原第一次使用前30min加入1.5ml纯化水充分溶解,在试验使用前按所需量将生物素标记抗原、铕标记物与实验缓冲液按体积比1:50加进洁净的一次性容器中并混匀,当次试验用完。

[0230] ④校准品、对照品的复溶:第一次使用前30min,在校准品、对照品中各加入1.5ml纯化水复溶并充分混匀,如需反复使用请放置至少-20℃条件下保存,请避免反复冻融。

[0231] ⑤样本稀释:将血样本和样本稀释液按体积比1:100稀释待检样本,如1ml样本稀释液中加入10μL待检样本。试剂盒校准品和对照品均不需稀释,请直接使用。

[0232] (3) 检验操作

[0233] 1) 吸取100μl的RV 1gM校准品、对照品、已稀释好的待测样本依次加入微孔反应板的微孔中。一般情况校准品、对照品至少做2孔的复孔。建议待测样本作复孔检测。

[0234] 2) 将加好样本的微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育45min。

- [0235] 3) 第一步孵育结束后,用洗板机洗涤5次,拍干。
- [0236] 4) 向每孔中加入已配好的生物素标记抗原和钨标记物工作液100 $\mu$ l,加贴封片。
- [0237] 5) 微孔反应板条在室温下,用振荡器缓慢振荡孵育45min。
- [0238] 6) 第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤5次,拍干。
- [0239] 7) 向每孔中加入增强液100 $\mu$ l。
- [0240] 8) 微孔反应板条于室温下缓慢振荡5分钟后上机检测,在30min内完成检测。
- [0241] 实施例2和比较例2中的两种试剂盒的性能评价
- [0242] 1) 测量精密度:分别选取低、中、高3个不同浓度的样品,用风疹病毒1gM快速测定试剂盒根据实施例2中测定风疹病毒1gM的方法以及风疹病毒1gM普通测定试剂盒根据实施例2中测定风疹病毒1gM的方法对每一个浓度样品重复检测20次,结果见表10。
- [0243] 表10
- [0244]

测定次数	样品 S/CO 比值					
	低浓度		中浓度		高浓度	
	普通	快速	普通	快速	普通	快速
1	0.50	0.49	0.98	1.00	2.12	2.10
2	0.51	0.49	0.99	1.01	2.15	2.13
3	0.53	0.50	1.00	0.99	2.15	2.16
4	0.52	0.51	1.01	0.98	2.16	2.15
5	0.49	0.52	1.02	1.02	2.30	2.19
6	0.53	0.49	1.02	1.03	2.15	2.15
7	0.52	0.48	1.03	0.99	2.24	2.13
8	0.51	0.52	0.99	0.98	2.24	2.19
9	0.49	0.53	0.98	1.02	2.19	2.21
10	0.53	0.51	0.96	0.99	2.18	2.15
11	0.52	0.49	1.02	1.03	2.09	2.29
12	0.53	0.45	1.05	1.02	2.21	2.15
13	0.52	0.49	0.99	0.99	2.19	2.30
14	0.51	0.49	0.98	0.98	2.31	2.15
15	0.51	0.52	1.02	0.99	2.22	2.15
16	0.49	0.48	1.03	0.99	2.19	2.36
17	0.55	0.46	1.02	0.98	2.12	2.14
18	0.54	0.51	0.99	1.01	2.09	2.18
19	0.54	0.52	1.03	1.02	2.12	2.20
20	0.59	0.51	1.02	1.01	2.15	2.19
平均值	0.52	0.50	1.01	1.00	2.18	2.18
标准偏差	0.02	0.02	0.02	0.02	0.06	0.06
变异系数	4.50%	4.20%	2.29%	1.75%	2.83%	2.95%

- [0245] 2) 最低检测限:

[0246] 分别用风疹病毒1gM快速测定试剂盒根据实施例2中测定风疹病毒1gM的方法以及风疹病毒1gM普通测定试剂盒根据实施例2中测定风疹病毒1gM的方法把样本稀释液作为样本进行检测,重复测定20次,计算20次测量结果的相对发光值,计算其平均值和标准差以及平均值加上两倍的标准差的发光值,将平均值加上两倍的标准差的发光值代入试剂盒所用校准品的定标曲线方程计算出对应的浓度值,即为最低检测限,最低检出限不高于1.0U/ml。结果见表11。

[0247] 表11

[0248]

测定次数	发光值	
	普通	快速
1	989	1125
2	998	1145
3	968	1325
4	1022	1254
5	1122	1524
6	1023	1325
7	999	1025
8	1011	1320
9	1032	1420
10	1120	1520
11	1125	1302
12	1024	1402
13	1036	1520
14	1035	1423
15	1054	1520
16	1123	1325
17	995	1263
18	1041	1234
19	1130	1206
20	1140	1258
平均值 (X)	1049.35	1321.80
标准偏差(SD)	52.81	143.86
X+2*SD	1154.98	1609.52
拟合浓度	0.05	0.05

[0249] 4) 阴性参考品符合率:用国家参考品或企业参考品检定,10份阴性参考品检测符合率为10/10;

[0250] 5) 阳性参考品符合率:用国家参考品或企业参考品检定,5份阳性参考品检测符合率为5/5;

[0251] 6) 稳定性试验:有效期内的试剂盒37℃放置6天后检定以上指标,其性能无明显改变。

[0252] 2免疫反应时间比较

[0253] 用风疹病毒1gM快速测定试剂盒根据实施例1中测定风疹病毒1gM的方法以及风疹病毒1gM普通测定试剂盒根据实施例2中测定风疹病毒1gM的方法测定样本中的风疹病毒1gM免疫反应时间的对比结果如表12所示。

[0254] 表12

[0255]

现有对照所需时间	快速法所需时间
90min	35min

[0256] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

专利名称(译)	适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105445451B</a>	公开(公告)日	2017-04-12
申请号	CN201610016466.X	申请日	2016-01-08
[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	陈建起 鲍冬芹 谭玉华		
发明人	陈建起 鲍冬芹 谭玉华		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
其他公开文献	CN105445451A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法，包括：将样本加入固相载体包被反应板中，向每孔中加入缓冲液，然后加入标记物工作液，所述标记物工作液的浓度允许在所述缓冲液与标记物工作液的体积均不大于50 $\mu$ L时与所述样本中的待测物质充分结合。本发明的适用于时间分辨荧光免疫法的加样方法免除了中间容器混合缓冲液与标记物的步骤，操作简单、方便，减小了引入污染的可能性，有效降低了各实验室之间关于同一检验和/或实验因不同操作者甚至同一操作者不同批次操作造成的上述误差，提高实验结果的精确度、可信性，由于标记物工作液中的标记物浓度增加，可显著缩短反应时间。

测定次数	样品浓度(单位: U/ml)					
	低浓度		中浓度		高浓度	
	普通	快速	普通	快速	普通	快速
1	19.87	19.82	60.21	60.12	150.68	150.21
2	20.24	20.10	60.21	60.03	150.29	150.03
3	20.16	20.12	60.24	60.05	150.69	150.21
4	19.98	19.94	60.24	59.97	150.27	150.23
5	20.26	20.12	60.25	59.97	150.35	150.21
6	20.13	20.03	60.18	60.00	150.14	150.20
7	20.09	19.98	60.61	60.51	150.28	150.11
8	20.24	20.12	60.24	60.24	150.29	150.14
9	20.19	20.15	60.55	60.57	150.36	150.12
10	20.04	19.96	60.21	59.98	150.29	150.08
11	20.13	20.11	60.24	59.96	150.84	150.09
12	20.19	20.14	60.24	59.99	150.94	150.12
13	20.06	19.95	60.18	60.07	150.28	150.07
14	20.11	20.00	61.29	60.08	150.47	150.21
15	20.16	20.06	60.27	60.02	150.29	150.09
16	20.08	20.00	60.19	59.99	150.74	150.11
17	20.15	20.04	60.11	60.05	150.29	150.05
18	20.08	20.03	60.21	60.25	150.92	150.07
19	20.12	19.99	61.24	60.11	150.64	150.21