



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212221 A

(43)申请公布日 2019.01.15

---

(21)申请号 201710519154.5

(22)申请日 2017.06.30

(71)申请人 江苏金武生物技术有限公司

地址 211106 江苏省南京市江宁区将军  
大道6号9栋107

(72)发明人 汪志友 郑荣 温天文 王雪根  
叶青 刘宝瑞 钱晓萍

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光  
(TRFIA)试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光(TRFIA)试剂盒，包括盒体和盒体上方的盒盖，所述盒体内设有放置包被抗肿瘤特异性生长因子(Tumor Specific Growth Factor, TSGF)单克隆抗体的酶标板的隔层和包被抗晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)单克隆抗体的酶标板的隔层；所述盒体内设有放置试剂瓶的容器孔，所述容器孔内放置有：装有分析液的试剂瓶；装有清洗液的试剂瓶；装有增强液的试剂瓶；装有TSGF、RAGE校准品的试剂瓶；装有标记的抗TSGF单克隆抗体和抗RAGE单克隆抗体的试剂瓶。本发明试剂盒的灵敏度高、准确性好、检测范围广、稳定性好、操作简单省时，且无辐射污染。

1. 一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述的试剂盒, 包括盒体和盒体上方的盒盖, 所述盒体内设有放置包被抗肿瘤特异性生长因子 (Tumor Specific Growth Factor, TSGF) 单克隆抗体的酶标板的隔层和包被抗晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 单克隆抗体的酶标板的隔层; 所述盒体内设有放置试剂瓶的容器孔, 所述容器孔内放置有: 装有分析液的试剂瓶; 装有清洗液的试剂瓶; 装有增强液的试剂瓶; 装有TSGF、RAGE校准品的试剂瓶; 装有标记的抗TSGF单克隆抗体和抗RAGE单克隆抗体的试剂瓶。

2. 按权利要求1所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述的肿瘤标志物组合物, 是指肿瘤特异性生长因子 (Tumor Specific Growth Factor, TSGF) 和晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE)。

3. 按权利要求1所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述的盒体内设有放置包被抗TSGF单克隆抗体的酶标板的隔层和包被抗RAGE单克隆抗体的酶标板的隔层。

4. 按权利要求1、3所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述镧系元素标记的TSGF单克隆抗体标记物中抗体是TSGF单克隆抗体, 所述标记示踪物是镧系元素金属离子及其螯合物中的一种, 包括铕Eu、铽Tb、钐Sm和镝Dy。

5. 按权利要求1、3所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述镧系元素标记的RAGE单克隆抗体标记物中抗体是RAGE单克隆抗体, 所述标记示踪物是镧系元素金属离子及其螯合物中的一种, 包括铕Eu、铽Tb、钐Sm和镝Dy。

6. 按权利要求1、4所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中镧系元素离子与TSGF单克隆抗体的摩尔比例 是5-12:1。

7. 按权利要求1、5所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于: 所述镧系元素标记的鼠单克隆抗体标记物中镧系元素离子与RAGE单克隆抗体的摩尔比例 是5-12:1。

8. 按权利要求1-7所述的一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤1. 待检样品的制备: 将TRFIA、RAGE抗体包被到固体载体上后, 收集其废弃液, 测量废弃液的体积并用分析液稀释作为待检样品; 步骤2. 将TRFIA、RAGE单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到RAGE多克隆抗体包被的酶标板上, 每个校准品和待检样品重复三孔, 再加入分析液, 震荡孵育; 步骤3. 将清洗液用去离子水进行稀释, 然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干; 步骤4. 将纯化好的镧系元素离子标记的TRFIA、RAGE单克隆抗体, 用分析液稀释, 加入酶标板中, 震荡孵育; 步骤5. 用稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干; 步骤6. 每孔加入增强液, 在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号; 步骤7. 根据荧光数值二者的比值建立标准曲线, 将待检样品的荧光信号代入到标准曲线中, 求得待检样品中TRFIA、RAGE抗体的检测浓度, 再按照公式“ $100\% - \frac{\text{废弃液体积} * \text{稀释倍数}}{\text{TRFIA、RAGE抗体投入量}} * 100\%$ ”计算TRFIA、RAGE抗体的包被率。

## 一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外免疫诊断试剂领域,尤其涉及一种检测诊断肿瘤标志物TSGF与RAGE组合物的时间分辨免疫荧光试剂盒,实现对肿瘤确诊、高效诊断。

### 背景技术

[0002] 肿瘤特异性生长因子(Tumor Specific Growth Factor, TSGF)是恶性肿瘤及其周边毛细血管大量扩增的结果,并随着肿瘤的形成和增长逐渐释放到外周血液。恶性肿瘤病人血清中存在TSGF,对恶性肿瘤血管增生起重要作用,在肿瘤形成早期即明显升高。血清TSGF是一种新的、敏感性和特异性较高的广谱肿瘤标志物,检测方法简便快捷,结果稳定。对恶性肿瘤的初筛、早期辅助诊断、疗效评价和预示肿瘤复发具有重要临床意义和应用价值。通过化学显色和分析技术,可以检测当细胞发生恶性转化时含量升高的TSGF。因此,这个指标可以用来做体检指标,是一种适合群体肿瘤普查的过筛试验。

[0003] 如何避免假阳性:据文献报道,临床使用中发现:急性炎症、部分自身免疫性疾病如红斑狼疮、类风湿病、病毒性肝炎等患者其TSGF值会有一过性升高,应间隔3周~5周进行2次~3次跟踪复检,以排除一过性升高造成的假阳性。

[0004] 这种测定方法还具有无需特殊设备,有成熟的试剂盒、无创伤性、操作简便、快速(1h即可出结果),而且持续阳性者或进行性阳性增高者,特异性高。TSGF作为一种早期的恶性肿瘤标志物,其操作等特点,适宜各级医院测定。

[0005] 晚期糖基化终产物(the Receptor of Advanced Glycation End-products, RAGE)是一种新的模式识别受体,广泛参与众多疾病的病理过程,如阿尔兹海默症、肺炎、肿瘤和糖尿病等。晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)是晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)最具特征的受体之一,通过与AGEs的结合,可促进炎症反应并参与多种病理过程。可溶性RAGE(soluble forms of RAGE, sRAGE)是RAGE的可溶性形式,可阻止RAGE与其相关的促炎配体(AGEs, 高流变簇盒蛋白1, S100蛋白)结合。目前越来越多的研究发现sRAGE可作为生物标志物或者内源性蛋白因子阻止RAGE介导的疾病发生,表明sRAGE在众多疾病的发生发展中有着举足轻重的作用。

[0006] 在肿瘤生病、病变过程中,都较典型涉及肿瘤特异性生长因子(Tumor Specific Growth Factor, TSGF)、晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)变化。因此,可以作为联合检测的很好指征。本发明将肿瘤特异性生长因子(Tumor Specific Growth Factor, TSGF)、晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)作为肿瘤标志物的组合物,采用时间分辨免疫荧光(TRFIA)法检测二者在血清中的含量比值,研制成试剂盒,其灵敏度高、准确性好、检测范围广、稳定性好、操作简单省时,且无辐射污染。

[0007] 时间分辨荧光免疫分析方法(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是1982年发展起来的一种新型的非放射性标记技术。TRFIA利用镧系元素金属的三价离子及其螯

合物作为荧光标记,常用的镧系元素为铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)和镝(Dy),最常用的是铕、铽,镧系元素标记物比较稳定,可以保存1-2年,克服了同位素、酶标等不稳定的缺点。TRFIA现已成为免疫检测中一项非常有应用前景的分析手段,具有操作简便、灵敏度高、示踪物稳定、不受样品自然荧光干扰、多标记、无放射性污染等优点。在抗体检测方面,时间分辨荧光免疫分析方法的检测目标物通常是针对某一抗原包括小分子抗原的抗体,一般不会采用该方法来检测多个肿瘤标志物含量比值来临床诊断。目前,对于采用时间分辨荧光免疫分析方法定量同时检测肿瘤标志物TSGF、RAGE组合物尚未见报道。

## 发明内容

[0008] 本发明公开一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光(TRFIA)试剂盒,包括盒体和盒体上方的盒盖,所述盒体内设有放置包被抗TSGF单克隆抗体的酶标板的隔层和包被抗RAGE单克隆抗体的酶标板的隔层;所述盒体内设有放置试剂瓶的容器孔,所述容器孔内放置有:装有分析液的试剂瓶;装有清洗液的试剂瓶;装有增强液的试剂瓶;装有TSGF、RAGE校准品的试剂瓶;装有标记的抗TSGF单克隆抗体和抗RAGE单克隆抗体的试剂瓶。本发明试剂盒的灵敏度高、准确性好、检测范围广、稳定性好、操作简单省时,且无辐射污染。

[0009] 本发明提供一种检测TSGF、RAGE肿瘤标志物组合物的时间分辨免疫荧光试剂盒,一方面解决免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的TSGF、RAGE浓度,从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率,以评估包被效果,该试剂盒能够定量检测TSGF、RAGE,具有检测灵敏度高,操作简单,操作流程短,储存时间长等优点;另一方面,采用时间分辨免疫荧光(TRFIA)分析法检测恶性肿瘤特异性生长因子(TSGF)及可溶性晚期糖基化终产物受体(sRAGE)血清含量,通过二者含量数值的比值法研制成时间分辨免疫荧光(TRFIA)分析法检测试剂盒,进行恶性肿瘤的初筛、早期辅助诊断、疗效评价和预示肿瘤复发的临床病理评判。

[0010] 本发明的原理是采用时间分辨免疫荧光(TRFIA)分析法,具体包括如下步骤:将TSGF、RAGE抗体包被到酶标板上,形成包被TSGF、RAGE抗体的酶标板,待测样品中的TSGF、RAGE抗体先与包被在酶标板上的TSGF、RAGE克隆抗体反应(震荡、洗板),形成TSGF单克隆抗体/RAGE单克隆抗体免疫复合物,然后加入镧系元素标记的TSGF、RAGE单克隆抗体反应(震荡、洗板)形成TSGF单克隆抗体/RAGE多克隆抗体/镧系元素免疫复合物,加入增强液震荡反应,在荧光检测设备如AutoDELFIA1235上读荧光信号,从而确定标准品中TSGF、RAGE抗体的浓度。当镧系元素离子在荧光增强液中从TSGF、RAGE单克隆抗体上解离后发出强荧光,荧光强度与样品中的TSGF、RAGE抗体浓度成反比,对照标准曲线即可确定样品中TSGF、RAGE抗体的浓度,再按照公式“ $100\% - \text{TSGF, RAGE抗体浓度} * \text{待检样品种体积} / \text{TSGF, RAGE抗体投入量} * 100\%$ ”计算TSGF、RAGE抗体的包被率。

[0011] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是一种检测TSGF、RAGE肿瘤标志物组合物的时间分辨免疫荧光试剂盒,包括以下组分:

包被TSGF、RAGE多克隆抗体的酶标板;

镧系元素离子标记的鼠单克隆抗体标记物;

TSGF、RAGE单克隆抗体校准品(浓度已知,用于建立标准曲线);

清洗液(市售商品);

分析液(市售商品)；

增强液(市售商品)。

[0012] 作为本发明优选的技术方案,所述TSGF、RAGE多克隆抗体的包被浓度为1-100 $\mu$ g/ml。

[0013] 作为本发明优选的技术方案,所述镧系元素标记的TSGF、RAGE单克隆抗体标记物中抗体是TSGF、RAGE单克隆抗体,所述标记示踪物是镧系元素金属离子及其螯合物中的一种,包括铕Eu、铽Tb、钐Sm和镝Dy

作为本发明优选的技术方案,所述镧系元素标记的TSGF、RAGE单克隆抗体标记物中镧系元素离子与TSGF、RAGE单克隆抗体的摩尔比例是5-12:1。

[0014] 此外,本发明还提供了一种制备上述试剂盒的方法,包括以下步骤:

步骤1. TSGF、RAGE多克隆抗体包被酶标板的制备:将TSGF、RAGE多克隆抗体在包被液中透析,用包被液将TSGF、RAGE多克隆抗体稀释到1-100 $\mu$ g/ml,然后包被到96孔酶标板中,再用封闭保护液封闭,最后甩干封闭保护液干燥密封备用;

步骤2. 镧系元素标记的TSGF、RAGE单克隆抗体标记物的制备:

将TSGF、RAGE单克隆抗体用标记液进行透析,取透析好的TSGF、RAGE单克隆抗体加入到镧系元素离子中进行标记,然后纯化,收集标记物;

步骤3. TSGF、RAGE单克隆抗体校准品的制备:用TSGF、RAGE单克隆抗体和PBS配制浓度为0.1、0.5、1.0、2.0、5.0和10ng/ml的TSGF、RAGE单克隆抗体校准品;

所述清洗液、分析液和增强液为市售商品。

[0015] 作为本发明优选的技术方案,步骤2中,所述取透析好的TSGF、RAGE单克隆抗体加入到镧系元素离子中进行标记,所述镧系元素离子与TSGF、RAGE单克隆抗体的摩尔比例是5-12:1。

[0016] 作为本发明优选的技术方案,步骤1中,所述的包被液采用如下方法制得:在900ml去离子水中依次加入35.08g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O、15.91g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O和9.00g NaCl,待完全溶解后用1N HCl或1N NaOH调整PH值至6.8±0.1。

[0017] 作为本发明优选的技术方案,步骤1中,所述的封闭保护液采用如下方法制得:将8.77g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O和3.98g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O加入到600ml去离子水中,再依次加入1g BSA,60g Trehalose和1g Diazolidinyl Urea,待完全溶解后调整pH值至6.8±0.1,定容到1L。

[0018] 作为本发明优选的技术方案,步骤2中,所述的标记液采用如下方法制得:在900ml去离子水中依次加入2.12g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和6.72g NaHCO<sub>3</sub>,待完全溶解后用1N HCl或1N NaOH调整pH值至9.2±0.2。

[0019] 此外,本发明还提供了试剂盒在定量检测TSGF、RAGE抗体中的应用,包括如下步骤:

步骤1.待检样品的制备:将TSGF、RAGE抗体包被到酶标板、芯片、胶体金颗粒、乳胶微球颗粒和磁性微球颗粒等固体载体上后,收集其废弃液,测量废弃液的体积并用分析液稀释作为待检样品;

步骤2.将TSGF、RAGE单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到TSGF、RAGE多克隆抗体包被的酶标板上,每个校准品和待检样品重复三孔,再加入分析液,震荡孵育;

步骤3. 将清洗液用去离子水进行稀释, 然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

步骤4. 将纯化好的镧系元素离子标记的TSGF、RAGE单克隆抗体, 用分析液稀释, 加入酶标板中, 震荡孵育;

步骤5. 用稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干;

步骤6. 每孔加入增强液, 在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号;

步骤7. 根据荧光数值建立标准曲线, 将待检样品的荧光信号代入到标准曲线中, 求得待检样品中TSGF、RAGE抗体的检测浓度, 再按照公式“ $100\% = \frac{\text{待检样品浓度} * \text{废弃液体积} * \text{稀释倍数}}{\text{TSGF、RAGE抗体投入量}} * 100\%$ ”计算TSGF、RAGE抗体的包被率;

与现有技术相比, 本发明具有以下有益效果:

本发明利用时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 分析法检测恶性肿瘤特异性生长因子 (TSGF) 及可溶性晚期糖基化终产物受体 (sRAGE) 血清含量, 通过二者含量数值的比值法研制成时间分辨免疫荧光 (TRFIA) 分析法检测试剂盒, 进行恶性肿瘤的初筛、早期辅助诊断、疗效评价和预示肿瘤复发的临床病理评判。

[0020] 本发明解决免疫诊断技术中定量检测未有效包被到固体载体上的TSGF、RAGE浓度, 从而计算有效包被到固体载体上的抗体包被率, 以评估包被效果, 该试剂盒能够定量检测TSGF、RAGE, 具有检测灵敏度高, 操作简单, 操作流程短, 储存时间长等优点。同时, 该试剂盒同时检测肿瘤标志物TSGF 和RAGE, 一方面减少了检测时间, 另一方面, 通过二者含量比值建立标准曲线, 消除或大大减少了检测误差和假阳性的机率, 使检测更加精准、重复性更高。

## 具体实施方式

[0021] 下面实施例对本发明作进一步详细的说明, 但不限于所列举的实施例。

[0022] 实施例1试剂盒的制备

1. 包被液的制备

包被液: 200mMPBS, 0.9% NaCl, pH 6.8 ± 0.1;

制备方法: 在900ml去离子水中依次加入35.08g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O、15.91g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O和9.00g NaCl, 待完全溶解后用1N HCl或1N NaOH调整pH值至6.8 ± 0.1。

[0023] 2. 标记液的制备

标记液: 100mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2 ± 0.2;

制备方法: 在900ml去离子水中依次加入2.12g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和6.72g NaHCO<sub>3</sub>, 待完全溶解后用1N HCl或1N NaOH调整pH值至9.2 ± 0.2。

[0024] 3. 封闭保护液的制备

封闭保护液: 50mM PBS, 0.1% BSA, 6% Trehalose和0.1% Diazolidinyl Urea, pH 6.8 ± 0.1;

制备方法: 将8.77g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O和3.98g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O加入到600ml去离子水中, 再依次加入1g BSA(牛血清白蛋白), 60g Trehalose(海藻糖) 和1g Diazolidinyl Urea(双咪唑烷基脲), 待完全溶解后调整pH值至6.8 ± 0.1, 定容到1L。

## [0025] 4.RAGE多克隆抗体包被酶标板的制备

4.1从冰箱中取出RAGE多克隆抗体,用200mmol/L,pH=6.8±0.1的包被液进行透析,将透析好的RAGE多克隆抗体在紫外分光光度计下测定浓度,然后用此包被液将抗体稀释到8 $\mu$ g/ml备用。

[0026] 4.2取出96孔酶标板,恢复至室温,每孔加入150 $\mu$ l,8 $\mu$ g/ml RAGE多克隆抗体,将96孔酶标板置于2-8℃包被过夜。

[0027] 4.3取出96孔酶标板,将液体甩干,用25倍稀释的清洗液清洗3次,甩干,仔细检查孔中不能存有液体。每孔加入200 $\mu$ l,50mmol/L,pH=6.8±0.1的封闭保护液,于室温封闭过夜。

[0028] 4.4取出96孔酶标板,将封闭保护液甩干,放入自封袋中并同时放入适量的干燥剂,2-8℃冰箱干燥备用。

## [0029] 5.三价铕离子(Eu3+)标记的TSGF单克隆抗体的制备

5.1将TSGF单克隆抗体,用100mmol/L,pH=9.2±0.2的标记液进行透析。

[0030] 5.2按照三价铕离子(Eu3+)与抗体5-12:1的结合比例,将TSGF单克隆抗体加入到三价铕离子(Eu3+)中,缓慢摇匀,置于2-8℃冰箱中过夜,待用。

## [0031] 5.3 50mmol/L,pH=7.8±0.1洗脱液的配制

将6.057g Tris,9g NaCl和345ml 0.1N HCl加入600ml去离子水中,用1N HCl和1N NaOH调整pH值至7.8±0.1,定容到1L。

[0032] 5.4取PD-10 (SephadexG-50M填料) 纯化柱,用50mmol/L pH=7.8±0.1的洗脱液洗脱平衡至少2小时。

[0033] 5.5将步骤5.2中制备的标记物全部转入柱子的顶端,重力自然洗脱,以0.25ml/管为单位进行收集。收集好后,每管取10 $\mu$ L依次加入到96孔酶标板中,用AutoDELFIA1235(全自动时间分辨荧光免疫分析仪)进行荧光读数,将所得数据利用Excel(或其它软件)进行描绘曲线。

[0034] 5.6按照洗脱曲线,收集两个箭头中间的部分用于检测,把两个箭头中间的部分合并后,加入总体积0.1%的BSA,-80±10℃冷冻保存备用。

## [0035] 6.TSGF单克隆抗体校准品

用TSGF单克隆抗体和100mM,pH7.2±0.2PBS先后配制浓度为0.1、0.5、1.0、2.0、5.0和10ng/ml TSGF单克隆抗体校准品。

## [0036] 7.清洗液、分析液和增强液为市售商品。

[0037] 分析液(assay buffer):购自PerkinElmer,组分:<0.1%NaN<sub>3</sub>,BSA, bovine gamma globulins,Tween40,DTPA,inertreddye.(pH=7.8)。

[0038] 清洗液(wash concentrate):购自PerkinElmer,,组分:Tween20,Germall II。

[0039] 增强液(enhancement solution):购自PerkinElmer,组分:Triton X-100,乙酸和螯合剂。

## [0040] 实施例2试剂盒的实验室性能

对实施例1的试剂盒进行实验室性能分析,其结果如下:

1.最低检测量为0.1ng/ml

2.剂量-反应曲线的线性,当样品中TSGF单克隆抗体浓度在0.1-10ng/ml 范围内,

TSGF、RAGE抗体比值浓度-反应曲线相差系数(r)为0.966。

[0041] 实施例3试剂盒的应用

1. 待检样品的制备

将150 $\mu$ l, 10 $\mu$ g/ml TSGF、RAGE单克隆抗体包被到酶标板上, 包被结束后收集其废弃液, 测量废弃液的体积并用分析液稀释1000倍作为待检样品, 体积为150 $\mu$ l。

[0042] 2. 将浓度为0.1、0.5、1.0、2.0、5.0和10ng/ml的TSGF、RAGE单克隆抗体校准品和待检样品依次加入到RAGE多克隆抗体包被的酶标板上, 每个校准品和待检样品重复三孔, 每孔加样50 $\mu$ l, 再加入150 $\mu$ l分析液, 震荡孵育30分钟。

[0043] 3. 将清洗液用去离子水进行25倍稀释, 然后用已稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干。

[0044] 4. 将纯化好的镧系元素离子标记的TSGF单克隆抗体, 用分析液1:100稀释, 200 $\mu$ l/孔加入酶标板中, 震荡孵育30分钟。

[0045] 5. 用25倍稀释的清洗液清洗酶标板多次并甩干。

[0046] 6. 每孔加入300 $\mu$ l增强液, 在时间分辨荧光检测仪上按所编程序检测荧光信号。

[0047] 7. 使用EXCEL或其他软件, 根据荧光数值建立标准曲线, 将待检样品的荧光信号代入到标准曲线 $Y = -3698 \ln(X) + 12683$ 中, 可求得待检样品中TSGF、RAGE抗体的浓度分别为1.026 ng/ml、1.69ng/ml, 再按照公式“100%-RAGE抗体浓度\*待检样品体积/RAGE抗体投入量\*100%”计算 RAGE抗体的包被率分别为81.9%、80.6%。

专利名称(译)	一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光(TRFIA)试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109212221A</a>	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201710519154.5	申请日	2017-06-30
[标]发明人	汪志友 郑荣 温天文 王雪根 叶青 刘宝瑞 钱晓萍		
发明人	汪志友 郑荣 温天文 王雪根 叶青 刘宝瑞 钱晓萍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明公开一种肿瘤标志物组合物时间分辨免疫荧光(TRFIA)试剂盒，包括盒体和盒体上方的盒盖，所述盒体内设有放置包被抗肿瘤特异性生长因子(Tumor Specific Growth Factor,TSGF)单克隆抗体的酶标板的隔层和包被抗晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products,RAGE)单克隆抗体的酶标板的隔层；所述盒体内设有放置试剂瓶的容器孔，所述容器孔内放置有：装有分析液的试剂瓶；装有清洗液的试剂瓶；装有增强液的试剂瓶；装有TSGF、RAGE校准品的试剂瓶；装有标记的抗TSGF单克隆抗体和抗RAGE单克隆抗体的试剂瓶。本发明试剂盒的灵敏度高、准确性好、检测范围广、稳定性好、操作简单省时，且无辐射污染。