

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810022619.7

[43] 公开日 2008 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 101324574A

[22] 申请日 2008.7.16

[21] 申请号 200810022619.7

[71] 申请人 江苏省原子医学研究所

地址 214063 江苏省无锡市钱荣路 20 号

[72] 发明人 黄 飏 王 柯 马智鸿 周 彬
张 艺 朱 岚 张 珏

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

时间分辨荧光免疫分析中检测洗涤残留干扰
的一种方法

[57] 摘要

时间分辨荧光免疫分析中检测洗涤残留干扰的一种方法，属于时间分辨荧光免疫分析技术领域。本发明方法采用如下工作步骤：1. 在镧离子标记的 TRFIA 试剂中的标记物中添加一定量的钐离子；2. 在微孔板上进行的 TRFIA 分析过程中通过洗涤去除未结合的镧标记物，同时也清洗钐离子；3. 洗涤结束后加增强液，5 分钟后检测，用可进行双波长测量的时间分辨荧光仪 (DELFI A1235、DELFI A1420 等型号仪器) 分别测定每一孔的镧离子和钐离子的荧光强度 cps，计算钐离子的残留量，如果大于设定的残留比例，则判定有洗涤残留的干扰。本方法可有效的发现 TRFIA 中由于洗涤残留造成的干扰，避免一些由于操作失误造成的假阳性或假阴性。

1、一种在常用的镉离子标记的时间分辨荧光免疫分析法 TRFIA 中检测洗涤残留的方法，其特征在于，它采用如下工作步骤：

(1) 在镉离子标记的 TRFIA 试剂中的标记物中添加 2-6 万 cps/ μ L 的钐离子，添加无生物活性的钐离子仅用于示踪洗涤残留的量；当用反应缓冲液稀释镉离子标记物时，同时稀释钐离子，钐离子的最终荧光强度计数控制在 100000-200000 cps /孔；

(2) 在微孔板上进行的 TRFIA 分析过程中当含有钐离子的镉标试剂与微孔板上的物质反应完毕之后，用洗液洗板 6 次，通过洗涤去除未结合的镉标记物，同时也洗涤去除钐离子；

(3) 洗涤结束后加增强液，5 分钟后检测，用进行双波长测量的时间分辨荧光仪分别测定每一孔的镉离子和钐离子的荧光强度 cps，计算钐离子的残留量，判断残留中镉离子是否超标；计算钐离子的残留比例：实测值/理论值 $\times$ 100%，如果大于 0.1%，则判定有洗涤残留的干扰。

时间分辨荧光免疫分析中检测洗涤残留干扰的一种方法

技术领域

本发明涉及到一种对时间分辨荧光免疫分析中洗涤残留干扰进行检测的方法，具体内容是采用在铈标试剂中添加钐离子为对照物判断是否有洗涤残留干扰的方法，属于时间分辨荧光免疫分析技术领域。

背景技术

时间分辨荧光免疫分析（TRFIA）是医学领域超微量检测中一项新兴的检测技术，是利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一类微量物质检测技术。TRFIA 法的原理为用三价稀土离子（最常用的是铈离子）标记蛋白质、多肽、抗体、激素等，当体系反应发生后，用时间分辨荧光仪，测定最后产物的荧光强度。根据荧光强度或相对荧光强度比值，来判断反应体系被分析物的浓度，达到定量分析之目的。在 DELFIA 的免疫分析中，增强液具有非常重要的作用，结合于免疫复合物上的稀土离子荧光信号非常微弱，增强液可使免疫复合物上的稀土离子解离下来，荧光信号可放大 100 万倍以上，起到放大荧光效果的作用。

在 TRFIA 免疫分析中，由于增强液的强烈增强效果，一方面提高了检测的灵敏度，同时也容易放大误差，所以在洗涤时，有可能会残留未结合的稀土离子，如果大于 0.1%，就会明显造成结果出现假阳性或假阴性。由于铈离子和钐离子在溶液中是同时均匀分布的，铈离子的残留比例与钐离子相同，由于铈离子和钐离子的发射光的波长不同，铈离子最大激发波长 340nm，最大发射波长 613nm，钐离子的最大激发波长 340nm，最大发射波长 600nm，因此钐离子对铈离子没有干扰，用时间分辨荧光仪（DELFI A1235、DELFI A1420 等）进行铈离子和钐离子的双波长检测，所以钐离子可作为在铈标记的 TRFIA 试剂反应中洗涤残留的示踪剂。

发明内容

本发明的目的，旨在找到一种灵敏度高，操作简便，对分析过程不造成影响的方法，对铈标记的 TRFIA 中的洗涤残留干扰进行检测，从而避免一些由于操作误差造成的分析结果的假阳性或假阴性。

为达到上述目的，本发明的技术方案：一种在常用的铈离子标记的时间分辨荧光免疫分析法 TRFIA 中检测洗涤残留的方法，它采用如下工作步骤：

（1）在铈离子标记的 TRFIA 试剂中的标记物中添加 2-6 万 cps/ μ L 的钐离子，添加无生物活性的钐离子仅用于示踪洗涤残留的量；当用反应缓冲液稀释

铈离子标记物时，同时稀释钐离子，钐离子的最终荧光强度计数控制在100000-200000 cps/孔；

(2)在微孔板上进行的 TRFIA 分析过程中当含有钐离子的铈标试剂与微孔板上的物质反应完毕之后，用洗液洗板 6 次，通过洗涤去除未结合的铈标记物，同时也洗涤去除钐离子；

(3) 洗涤结束后加增强液，5 分钟后检测，用进行双波长测量的时间分辨荧光仪分别测定每一孔的铈离子和钐离子的荧光强度 cps，计算钐离子的残留量，判断残留中铈离子是否超标；计算钐离子的残留比例：实测值/理论值×100%，如果大于 0.1%，则判定有洗涤残留的干扰，该孔结果不可信。

本发明的有益效果：本发明方法是一种灵敏度高，操作简便，对分析过程不造成影响的方法，对铈标记的 TRFIA 中的洗涤残留干扰进行检测，从而避免一些由于操作误差造成的分析结果的假阳性或假阴性。

具体实施方式

实施例 1：肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)测定时的洗涤残留干扰的检测，该方法包括如下工作步骤：

1、钐离子的添加：在铈标 CEA 单抗的溶液中，加入一定量的钐离子，使钐离子浓度达到 5 万 cps/ μ L。

2、铈标抗体的反应：取 CEA 单抗包被板 12 孔，每孔加入 25 μ L 的标准或样品，再加入 200 μ L 缓冲液（含 8mmol/L NaCl、0.1% BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1ml/L Tween-80 和 0.1% NaN₃ 的 50mmol/L Tris-HCl pH7.8），25℃振荡孵育 3 小时，洗涤 2 次（洗涤液为 14.5mmol/L NaCl、0.2mL/L Tween-80 和 0.2% NaN₃ 的 50mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液，下同），再加入用缓冲液 1：100 稀释的含有钐离子的铈标 CEA 单抗溶液 200 μ L，25℃振荡孵育 1 小时，洗涤 6 次，去除孔内多余的液体。每孔加入增强液（1 升 pH 3.2 邻苯二甲酸氢钾缓冲液含：15 μ mol β -萘甲酰三氟丙酮（ β -NTA），50 μ mol 三正辛基氧化膦(TOPO)和 1mL 曲拉通 X-100）200 μ L，25℃振荡孵育 5 分钟后进行荧光检测：用 DELFIA1235 时间分辨荧光仪测定每一孔的铈离子和钐离子的荧光强度 cps，铈离子的荧光强度 cps 用于 CEA 含量的检测，钐离子的荧光强度 cps 用于计算钐离子的残留比例：实测值/理论值×100%（表 1），如果大于 0.1%，则判定有洗涤残留的干扰，该孔结果不可信。

表 1: CEA 测定时钐离子的残留判定

钐离子实测值 cps	50	82	74	32	61	81	47	203	92	125	65	72
钐离子理论值 cps	100000/孔											
钐离子残留比例%	0.05	0.08	0.07	0.03	0.06	0.08	0.05	0.20	0.09	0.13	0.07	0.07
是否有洗涤残留的干扰	无	无	无	无	无	无	无	有	无	有	无	无

实施例 2：甲胎蛋白(AFP)测定时的洗涤残留干扰的检测，该方法包括如下工作步骤：

1、钐离子的添加：在钐标 AFP 单抗的溶液中，加入一定量的钐离子，使钐离子浓度达到 3.75 万 cps/ μ L。

2、钐标抗体的反应：取 AFP 单抗包被板 12 孔，每孔加入 25 μ L 的标准或样品，再加入用缓冲液（缓冲液组成同实施例 1）1：75 稀释的含有钐离子的钐标 AFP 单抗溶液 200 μ L，25℃振荡孵育 1 小时，洗涤 6 次，去除孔内多余的液体。每孔加入增强液（增强液组成同实施例 1）200 μ L，25℃振荡孵育 5 分钟后进行荧光检测：用 DELFIA1420 时间分辨荧光仪测定每一孔的钐离子和钐离子的荧光强度 cps，钐离子的荧光强度 cps 用于 CEA 含量的检测，钐离子的荧光强度 cps 用于计算钐离子的残留比例：实测值/理论值 $\times$ 100%(表 2)，如果大于 0.1%，则判定有洗涤残留的干扰，该孔结果不可信。

表 2: AFP 测定时钐离子的残留判定

钐离子实测值 cps	802	72	64	52	51	61	47	53	92	63	55	172
钐离子理论值 cps	100000/孔											
钐离子残留比例%	0.8	0.08	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.09	0.06	0.06	0.17
是否有洗涤残留的干扰	有	无	无	无	无	无	无	无	无	无	无	有

专利名称(译)	时间分辨荧光免疫分析中检测洗涤残留干扰的一种方法		
公开(公告)号	CN101324574A	公开(公告)日	2008-12-17
申请号	CN200810022619.7	申请日	2008-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
申请(专利权)人(译)	江苏省原子医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	无锡市江原实业技贸总公司		
[标]发明人	黄飏 王柯 马智鸿 周彬 张艺 朱岚 张珏		
发明人	黄飏 王柯 马智鸿 周彬 张艺 朱岚 张珏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
其他公开文献	CN101324574B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

时间分辨荧光免疫分析中检测洗涤残留干扰的一种方法，属于时间分辨荧光免疫分析技术领域。本发明方法采用如下工作步骤：1.在镧离子标记的TRFIA试剂中的标记物中添加一定量的钐离子；2.在微孔板上进行的TRFIA分析过程中通过洗涤去除未结合的镧标记物，同时也清洗钐离子；3.洗涤结束后加增强液，5分钟后检测，用可进行双波长测量的时间分辨荧光仪(DELFI1235、DELFI1420等型号仪器)分别测定每一孔的镧离子和钐离子的荧光强度cps，计算钐离子的残留量，如果大于设定的残留比例，则判定有洗涤残留的干扰。本方法可有效的发现TRFIA中由于洗涤残留造成的干扰，避免一些由于操作失误造成的假阳性或假阴性。

钐离子实测值 cps	50	82	74	32	61	81	47	203	92	125	65	72
钐离子理论值 cps	100000/孔											
钐离子残留比例%	0.05	0.08	0.07	0.03	0.06	0.08	0.05	0.20	0.09	0.13	0.07	0.07
是否有洗涤残留的干扰	无	无	无	无	无	无	无	有	无	有	无	无