



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161230 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201810141464.2

(22)申请日 2018.02.11

(71)申请人 博阳生物科技(上海)有限公司

地址 201210 上海市浦东新区自由贸易试
验区蔡伦路88号五楼东面

(72)发明人 孙小禁 杨阳 洪琳 赵卫国
刘宇卉 李临

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限
公司 11372

代理人 吴大建 方莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书3页 说明书20页 附图1页

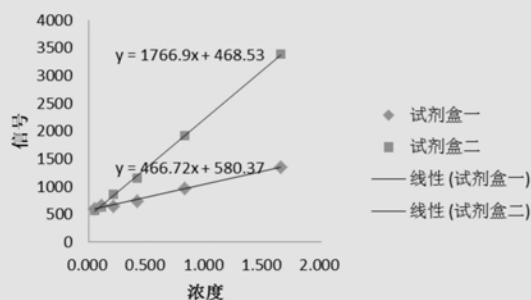
(54)发明名称

快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备
方法、检测方法和装置

(57)摘要

本发明涉及免疫分析技术领域的一种快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备方法、检测方法和装置。由本发明所述方法制备的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒能够快速检测待测样本中的降钙素原,检测时间可缩短至10min以内,且检测灵敏度能达到20pg/mL、变异系数在10%以内。另外,采用本发明所述试剂盒进行检测时,可以减少试剂的用量、节省原料,且能准确、快速确定受治疗者的待测样本中降钙素原的含量,具有广阔的应用前景。

信号与浓度的关系



1. 一种制备快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的方法,其包括:

制备组分a,所述组分a为与第一抗体或其结合片段结合的能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体;所述第一抗体或其结合片段能够与降钙素原的第一表位特异性结合;

制备组分b,所述组分b为与生物素结合的第二抗体或其结合片段;所述第二抗体或其结合片段能够与降钙素原的第二表位特异性结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

制备组分c,所述组分c为与链霉亲和素结合的能够在激发状态产生单线态氧的供体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的第一抗体和第二抗体分别独立地选自单克隆抗体、多克隆抗体、抗体结合片段、人工抗体或修饰的抗体;优选选自多克隆抗体和/或单克隆抗体;进一步优选为单克隆抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒;

所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒。

4. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其特征在于,所述第一抗体或其结合片段与受体间接结合;优选地,所述第一抗体或其结合片段与受体通过异硫氰酸荧光素-异硫氰酸荧光素抗体系统间接结合。

5. 根据权利要求1-4中任意一项所述的方法,其特征在于,所述受体为醛基和/或羧基改性的受体;优选地,所述受体为羧基改性的受体。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:

制备第一组合物,所述第一组合物包括所述组分a和第一缓冲液;

制备第二组合物,所述第二组合物包括所述组分b和第二缓冲液;

制备第三组合物,所述第三组合物包括所述组分c和第三缓冲液。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述第一组合物中组分a的浓度为50~300 $\mu\text{g/mL}$;优选为80~250 $\mu\text{g/mL}$;更优选为100~200 $\mu\text{g/mL}$;和/或,

所述第二组合物中组分b的浓度为1~15 $\mu\text{g/mL}$;优选为2~10 $\mu\text{g/mL}$;更优选为4~8 $\mu\text{g/mL}$;和/或

所述第三组合物中组分c的浓度为20~200 $\mu\text{g/mL}$;优选为30~150 $\mu\text{g/mL}$;更优选为50~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒,且所述第一组合物的制备方法包括:

步骤S1,第一抗体或其结合片段利用第一透析缓冲液进行透析,获得透析后的第一抗体或其结合片段;

步骤S2,用交联缓冲液对受体进行清洗后,再用交联缓冲液对清洗后的受体重悬,获得受体液;

步骤S3,在受体液中加入透析后的第一抗体或其结合片段混匀,进行结合,获得与第一抗体或其结合片段结合的受体;

步骤S4,用清洗缓冲液对与第一抗体或其结合片段结合的受体进行清洗后,加入第一

缓冲溶液获得第一组合物。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其特征在于, 所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为(0.1~0.9):10; 优选地, 所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为(0.2~0.8):10; 更优选为(0.3~0.7):10。

10. 根据权利要求8或9所述的方法, 其特征在于, 所述第一透析缓冲液和交联缓冲液均为pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液; 所述清洗缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBST缓冲液。

11. 根据权利要求6-10中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述第二组合物的制备方法包括:

步骤T1, 第二抗体或其结合片段利用标记缓冲液进行透析, 获得透析后的第二抗体或其结合片段;

步骤T2, 在透析后的第二抗体或其结合片段中加入标记缓冲液混匀, 然后加入生物素溶液混匀, 旋转过夜, 获得与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段;

步骤T3, 与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段利用第二透析缓冲液进行透析, 透析结束后加入第二缓冲液, 获得第二组合物。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其特征在于, 所述标记缓冲液为pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的NaHCO₃溶液; 所述第二透析缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBS缓冲液。

13. 根据权利要求11或12所述的方法, 其特征在于, 所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(10~100); 优选地, 所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(20~90); 更优选为1:(30~80)。

14. 根据权利要求1-13中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液均为pH值为7.0~8.0的0.08~0.12M的Tris-HCl溶液。

15. 根据权利要求1-14中任意一项所述的方法, 其特征在于, 所述第三组合物中还包含表面活性剂; 优选地, 所述表面活性剂为非离子表面活性剂; 进一步优选地, 所述表面活性剂为直链型非离子表面活性剂。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其特征在于, 所述表面活性剂的浓度为0.01-0.04wt%; 优选为0.02-0.04wt%。

17. 一种由权利要求1-16中任意一项所述的方法制备得到的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒。

18. 一种采用如权利要求17所述的试剂盒快速检测降钙素原的均相免疫方法, 所述方法为光激化学发光检测。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤R1, 将V1体积待测样本与V2体积第一组合物和V3体积第二组合物混合后进行第一反应, 以得到第一混合物; 控制所述第一反应的温度为K1以及反应的时长为T1;

步骤R2, 将第一混合物与第三组合物混合后进行第二反应, 以得到第二混合物; 控制所述第二反应的温度为K2, 反应的时长为T2;

步骤R3, 使能量或者活性化合物激发第二混合物中的供体产生单线态氧, 所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号; 通过检测化学发光信号的存在

和/或强度,从而判断测待测样品中是否存在降钙素原和/或确定降钙素原的含量;

其中, $T1 \leq 15\text{min}$, $T2 \leq 5\text{min}$, 且 $T1+T2 \leq 15\text{min}$ 。

20. 根据权利要求19所述的方法,其特征在于,步骤R1中,先将待测样本与所述第一组合物混合后再加入第二组合物。

21. 根据权利要求19或20中所述的方法,其特征在于,所述K1和K2分别独立地选自35~45℃;优选选自37~42℃。

22. 根据权利要求19-21中任意一项所述的方法,其特征在于,所述 $T1 \leq 12\text{min}$;优选地,所述 $T1 \leq 10\text{min}$;进一步优选地, $6\text{min} \leq T1 \leq 10\text{min}$ 。

23. 根据权利要求19-22中任意一项所述的方法,其特征在于,所述 $T2 \geq 2\text{min}$ 。

24. 根据权利要求19-23中任意一项所述的方法,其特征在于,所述 $T1+T2 \leq 13\text{min}$;优选地,所述 $T1+T2 \leq 12.5\text{min}$;进一步优选地,所述 $T1+T2 \leq 10\text{min}$ 。

25. 根据权利要求19-24中任意一项所述的方法,其特征在于,所述T1为8min, T2为2min。

26. 根据权利要求19-25中任意一项所述的方法,其特征在于, $5\mu\text{L} \leq V1 \leq 100\mu\text{L}$;优选地, $10\mu\text{L} \leq V1 \leq 80\mu\text{L}$;更优选地, $20\mu\text{L} \leq V1 \leq 60\mu\text{L}$ 。

27. 根据权利要求19-26中任意一项所述的方法,其特征在于, $5\mu\text{L} \leq V2 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V2 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V2 \leq 25\mu\text{L}$ 。

28. 根据权利要求19-27中任意一项所述的方法,其特征在于, $5\mu\text{L} \leq V3 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V3 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V3 \leq 25\mu\text{L}$ 。

29. 根据权利要求19-28中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤R3中,使用600-700nm波长的激发光照射第二混合物,激发供体产生单线态氧,受体与接触到的单线态氧反应生成520-620nm的发射光,通过检测发射光信号的存在和/强度,从而判断测待测样品中是否存在降钙素原和/或确定降钙素原的含量。

30. 根据权利要求18-29中任意一项所述的方法,其特征在于,所述方法的灵敏度为20pg/mL。

31. 一种快速检测降钙素原的均相免疫检测装置,其采用如权利要求17所述的试剂盒或如权利要求18-30中任意一项所述的方法检测待测样本中的降钙素原。

32. 根据权利要求31所述的装置,其特征在于,所述装置包括:加样模块、试剂模块、温育模块、检测模块以及电路控制模块;所述加样模块、试剂模块、温育模块和检测模块均与所述电路控制模块电连接。

33. 根据权利要求32所述的装置,其特征在于,所述试剂模块包括用于加入第一组合物的第一组件以及用于加入第二组合物的第二组件。

34. 一种如权利要求17所述的试剂盒、如权利要求18-30中任意一项所述的方法或如权利要求31-33中任意一项所述的装置在POCT检测技术中的应用。

35. 一种如权利要求1-16中任意一项所述的方法在制备用于检测疑似患有细菌性脓毒症、急性重症胰腺炎及相关并发症和呼吸道相关炎症及感染的受治疗者的待测样本中的降钙素原,由此确定所述待测样本中降钙素原的水平的应用;优选地,所述待测样本为血清或血浆。

快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备方法、检测方法和装置

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备方法、检测方法和装置。

背景技术

[0002] 降钙素原即procalcitonin (PCT),于1990年发现。现已证明其在血清中的浓度增高与感染的发生有密切的关系。在正常的个体内,其血清浓度极低,仅为10-50pg/ml,一般方法检测不到。在全身性细菌、真菌和寄生虫感染,系统炎症反应综合症、败血症、急慢性肺炎、急性胰腺炎、活动性肝炎、创伤等情况发生时,血清PCT水平异常增高,其浓度可大至正常水平的几倍至上万倍。在病毒感染、自身免疫性疾病、器官移植排异反应等情况发生时,其血清浓度不增高或者轻微增高。

[0003] 对于降钙素原的检测法,不论放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA),还是化学发光免疫分析,由于标记抗体为过量,检测前均需要去除未参加反应的标记抗体。现有非均相免疫分析法都需要繁琐的洗涤步骤;同时,需要克服放射免疫分析环境污染,货架期短的缺陷,克服酶免疫分析重复性差。

[0004] 均相免疫分析技术中无需分离洗涤步骤,然而基于均相免疫的生物检测中,通过缩短检测时间,来进一步提高检测效率时,由于反应未达平衡,会严重影响检测的各项性能,例如:检测灵敏度会显著下降。另外,单线态氧离子寿命太短限制了光激化学发光技术应用效率,目前尚无显著增加其寿命的报道,而增加其寿命就可以提高同等条件下的检测信号,可以增加检测灵敏度,降低检测限。

[0005] 因此,亟待建立一种快速、准确、灵敏的检测降钙素原的均相免疫方法。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足,提供了一种制备快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的方法,由该方法获得的试剂盒能够快速检测待测样本中的降钙素原,检测时间可缩短至10min以内,但同时检测灵敏度却能达到20pg/mL。

[0007] 为此,本发明第一方面提供了一种制备快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的方法,其包括:

[0008] 制备组分a,所述组分a为与第一抗体或其结合片段结合的能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体;所述第一抗体或其结合片段能够与降钙素原的第一表位特异性结合;

[0009] 制备组分b,所述组分b为与生物素结合的第二抗体或其结合片段;所述第二抗体或其结合片段能够与降钙素原的第二表位特异性结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

[0010] 制备组分c,所述组分c为与链霉亲和素结合的能够在激发状态产生单线态氧的供

体。

[0011] 在本发明的一些实施方式中,所述的第一抗体和第二抗体分别独立地选自单克隆抗体、多克隆抗体、抗体结合片段、人工抗体或修饰的抗体;优选选自多克隆抗体和/或单克隆抗体;进一步优选为单克隆抗体。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0013] 在本发明的另一些实施方式中,所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒。

[0014] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与受体间接结合;优选地,所述第一抗体或其结合片段与受体通过硫氰酸荧光素-异硫氰酸荧光素抗体系统(FITC-FITC抗体系统)间接结合。

[0015] 在本发明的另一些实施方式中,所述受体为醛基和/或羧基改性的受体;优选地,所述受体为羧基改性的受体。

[0016] 根据本发明,所述方法还包括:

[0017] 制备第一组合物,所述第一组合物包括所述组分a和第一缓冲液;

[0018] 制备第二组合物,所述第二组合物包括所述组分b和第二缓冲液;

[0019] 制备第三组合物,所述第三组合物包括所述组分c和第三缓冲液。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述第一组合物中组分a的浓度为50~300 $\mu\text{g/mL}$;优选为80~250 $\mu\text{g/mL}$;更优选为100~200 $\mu\text{g/mL}$;和/或,

[0021] 所述第二组合物中组分b的浓度为1~15 $\mu\text{g/mL}$;优选为2~10 $\mu\text{g/mL}$;更优选为4~8 $\mu\text{g/mL}$;和/或

[0022] 所述第三组合物中组分c的浓度为20~200 $\mu\text{g/mL}$;优选为30~150 $\mu\text{g/mL}$;更优选为50~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒,且所述第一组合物的制备方法包括:

[0024] 步骤S1,第一抗体或其结合片段利用第一透析缓冲液进行透析,获得透析后的第一抗体或其结合片段;

[0025] 步骤S2,用交联缓冲液对受体进行清洗后,再用交联缓冲液对清洗后的受体重悬,获得受体液;

[0026] 步骤S3,在受体液中加入透析后的第一抗体或其结合片段混匀,进行结合,获得与第一抗体或其结合片段结合的受体;

[0027] 步骤S4,用清洗缓冲液对与第一抗体或其结合片段结合的受体进行清洗后,加入第一缓冲溶液获得第一组合物。

[0028] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为(0.1~0.9):10;优选地,所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为(0.2~0.8):10;更优选为(0.3~0.7):10。

[0029] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一透析缓冲液和交联缓冲液均为pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液;所述清洗缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M

的PBST缓冲液。

[0030] 根据本发明,所述第二组合物的制备方法包括:

[0031] 步骤T1,第二抗体或其结合片段利用标记缓冲液进行透析,获得透析后的第二抗体或其结合片段;

[0032] 步骤T2,在透析后的第二抗体或其结合片段中加入标记缓冲液混匀,然后加入生物素溶液混匀,旋转过夜,获得与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段;

[0033] 步骤T3,与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段利用第二透析缓冲液进行透析,透析结束后加入第二缓冲液,获得第二组合物。

[0034] 在本发明的一些实施方式中,所述标记缓冲液为pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的NaHCO₃溶液;所述第二透析缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBS缓冲液。

[0035] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(10~100);优选地,所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(20~90);更优选为1:(30~80)。

[0036] 根据本发明,所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液均为pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的Tris-HCl溶液。

[0037] 在本发明的一些实施方式中,所述第三组合物中还包含表面活性剂;优选地,所述表面活性剂为非离子表面活性剂;进一步优选地,所述表面活性剂为直链型非离子表面活性剂。

[0038] 在本发明的另一些实施方式中,所述表面活性剂的浓度为0.01-0.04wt%;优选为0.02-0.04wt%。

[0039] 本发明第二方面提供了一种如本发明第一方面所述的方法制备得到的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒。

[0040] 本发明第三方面提供了一种采用如本发明第二方面所述的试剂盒快速检测降钙素原的均相免疫方法,所述方法为光激化学发光检测。

[0041] 根据本发明,所述方法包括以下步骤:

[0042] 步骤R1,将V1体积待测样本与V2体积第一组合物和V3体积第二组合物混合后进行第一反应,以得到第一混合物;控制所述第一反应的温度为K1以及反应的时长为T1;

[0043] 步骤R2,将第一混合物与第三组合物混合后进行第二反应,以得到第二混合物;控制所述第二反应的温度为K2,反应的时长为T2;

[0044] 步骤R3,使能量或者活性化合物激发第二混合物中的供体产生单线态氧,所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;通过检测化学发光信号的存在和/或强度,从而判断待测样品中是否存在降钙素原和/或确定降钙素原的含量;

[0045] 其中, $T1 \leq 15\text{min}$, $T2 \leq 5\text{min}$, 且 $T1+T2 \leq 15\text{min}$ 。

[0046] 在本发明的一些实施方式中,步骤R1中,先将待测样本与所述第一组合物混合后再加入第二组合物。

[0047] 在本发明的另一些实施方式中,所述K1和K2分别独立地选自35~45℃;优选选自37~42℃。

[0048] 在本发明的一些实施方式中,所述 $T1 \leq 12\text{min}$;优选地,所述 $T1 \leq 10\text{min}$;进一步优选地, $6\text{min} \leq T1 \leq 10\text{min}$ 。

[0049] 在本发明的另一些实施方式中,所述 $T_2 \geq 2\text{min}$ 。

[0050] 在本发明的一些实施方式中,所述 $T_1 + T_2 \leq 13\text{min}$;优选地,所述 $T_1 + T_2 \leq 12.5\text{min}$;进一步优选地,所述 $T_1 + T_2 \leq 10\text{min}$ 。

[0051] 在本发明的另一些实施方式中,所述 T_1 为 8min , T_2 为 2min 。

[0052] 在本发明的一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V_1 \leq 100\mu\text{L}$;优选地, $10\mu\text{L} \leq V_1 \leq 80\mu\text{L}$;更优选地, $20\mu\text{L} \leq V_1 \leq 60\mu\text{L}$ 。

[0053] 在本发明的另一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V_2 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V_2 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V_2 \leq 25\mu\text{L}$ 。

[0054] 在本发明的一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V_3 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V_3 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V_3 \leq 25\mu\text{L}$ 。

[0055] 在本发明的另一些实施方式中,步骤R3中,使用 $600\text{--}700\text{nm}$ 波长的激发光照射第二混合物,激发供体产生单线态氧,受体与接触到的单线态氧反应生成 $520\text{--}620\text{nm}$ 的发射光,通过检测发射光信号的存在和/强度,从而判断测待测样品中是否存在降钙素原和/或确定降钙素原的含量。

[0056] 根据本发明,所述方法的灵敏度为 20pg/mL 。

[0057] 本发明第四方面提供了一种快速检测降钙素原的均相免疫检测装置,其采用如本发明第二方面所述的试剂盒或如本发明第三方面所述的方法检测待测样本中的降钙素原。

[0058] 根据本发明,所述装置包括:加样模块、试剂模块、温育模块、检测模块以及电路控制模块;所述加样模块、试剂模块、温育模块和检测模块均与所述电路控制模块电连接。

[0059] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂模块包括用于加入第一组合物的第一组件以及用于加入第二组合物的第二组件。

[0060] 本发明第五方面提供了一种如本发明第二方面所述的试剂盒、如本发明第三方面所述的方法或如本发明第四方面所述的装置在POCT检测技术中的应用。

[0061] 本发明第六方面提供了一种如本发明第一方面所述方法在制备用于检测疑似患有细菌性脓毒症、急性重症胰腺炎及相关并发症和呼吸道相关炎症及感染的受治疗者的待测样本中的降钙素原,由此确定所述待测样本中降钙素原的水平的应用;优选地,所述待测样本为血清或血浆。

[0062] 本发明的有益效果为:由本发明所述方法制备的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒能够快速检测待测样本中的降钙素原,检测时间可缩短至 10min 以内,且检测灵敏度能达到 20pg/mL 、变异系数在 10% 以内。另外,采用本发明所述试剂盒进行检测时,可以减少试剂的用量、节省原料,且能准确、快速确定受治疗者的待测样本中降钙素原的含量,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0063] 下面将结合附图详细说明本发明。

[0064] 图1为实施例9中试剂盒1和试剂盒2的检测的信号与浓度的关系图。

具体实施方式

[0065] 为使本发明更容易理解,下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前,应当理

解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式,而并不表示限制性的。

[0066] 在提供了数值范围的情况下,应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中,并且也涵盖在本发明内,服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下,排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0067] 除非另有定义,本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0068] I. 术语

[0069] 本发明所述用语“均相”所对应的英文定义为“homogeneous”,其是指无须对特异性结合配对成员之间相互结合形成的复合物和剩余的游离特异性结合配对成员中的一员或另一员进行分离即可进行检测,例如,其可指无须对结合的抗原抗体复合物和剩余的游离抗原或抗体进行分离即可进行检测。

[0070] 本发明所述用语“待测样本”是指可能含有被分析物的一种混合物,被分析物包括但不限于蛋白质、激素、抗体或抗原。可以被用在本发明公开的方法中的典型待测样本包括体液,如血清、血浆等。待测样本可以在使用前根据需要利用稀释液或缓冲溶液对可能含有被分析物的样本进行稀释后的溶液。例如,为了避免HOOK效应,可以在上机检测前使用样本稀释液将被分析物进行稀释后再在检测仪器上进行检测,此时可能含有被分析物的稀释后的溶液均统称为待测样本。

[0071] 本发明所述用语“抗体”以最广含义使用,包括任何同种型的抗体,保留对抗原的特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv、和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、双特异性抗体、和包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。在任何需要的情况下,抗体可以进一步与其它部分,诸如特异性结合配对成员,例如生物素或链霉亲和素(生物素-链霉亲和素特异性结合配对成员中的一员)等缀合。

[0072] 本发明所述用语“单克隆抗体”是指由单克隆的B淋巴细胞分泌的免疫球蛋白,其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。

[0073] 本发明所述用语“多克隆抗体”是指由一个以上的B淋巴细胞克隆产生的免疫球蛋白集合,其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。

[0074] 本发明所述用语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键等相互作用,包括但不限于如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。

[0075] 本发明所述用语“特异性结合”,是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应,从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0076] 本发明所述用语“生物素”广泛存在于动植物组织中,其分子上有两个环状结构,分别为咪唑酮环和噻吩环,其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下,与已知的几乎所有生物大分子偶联,包括蛋白质、核酸、多糖和脂类等;而“链霉亲和素”是由链霉菌分泌的一种蛋白质,分子量为65kD。“链霉亲和素”分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同

时偶联多个生物素分子,从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。在任何需要的情况下,本发明中所用任何试剂,包括抗原、抗体、受体或供体,可以根据实际需要缀合生物素-链霉亲和素特异性结合配对成员中的任一员。

[0077] 本发明所述用语“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。在本发明一些具体实施例中,所述供体是光敏剂,所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对成员的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。在本发明另一些具体实施例中,所述供体是化学活化的其他敏化剂,其非限定性的例子是某些化合物,它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括:1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等,加热这些化合物或者这些化合物直接吸收光会释放单线态氧。

[0078] 本发明所述用语“受体”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的物质。供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧,该高能态的单线态氧被近距离的受体俘获,从而传递能量以激活所述受体。在本发明的一些具体实施例中,所述受体是这样的物质,其经历与单线态氧的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体,所述亚稳态中间体可以分解,同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于:烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙烯醚、双环氧乙烯、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。在本发明的另一些具体实施例中,所述受体是能够与单线态氧反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯烃类;可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷;可以与单线态氧反应以形成二酮类的乙炔类;可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类,诸如鲁米诺;和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716(该专利文献在此全文引为参考)。在本发明另一些具体实施例中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其是非粒子化的并且在含水介质中可溶,这种受体的情况可参见专利PCT/US2010/025433(该专利文献在此全文引为参考)。

[0079] 在本发明中,所述供体可以通过功能基团被包被在基体上形成填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧,此时供体也可以称为感光微球或感光微粒,包含这种感光微球或感光微粒的溶液可以称为感光液或通用液;和/或,所述受体可以通过功能基团被包被在基体上形成填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒,此时可以称为发光微球或发光微粒。在本申请中,系统基于包被在基体表面的发光物质经光激发和能量传递诱导发光信号,能量传递依赖于抗原-抗体结合导致感光微球和发光微球相互靠近而实现。因此无需分离过程。纳米微球的直径更小,其悬浮性能更强,同时采用了三级放大发光系统,因而具有更高的分析灵敏度;整个检测过程无需清洗,即无需分离结合标记和结合标记物,因此反应时间更短;示踪物质(感光剂和发光剂)标记在基体上,而不是标记

在生物分子上,对生物分子的活性没有影响,同时,因基体存在较大的比表面积,故其表面上能够包被更多的示踪物质及生物分子,致其在试剂的有效浓度和灵敏度及检测背景等方面的表现会更优。

[0080] 本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒,其可以是任何尺寸的,优选纳米级的尺寸,其可以有机的或是无机的,其可以是可膨胀或不可膨胀的,其可以是多孔的或非多孔的,其具有任何密度,但优选具有和水接近的密度,优选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是固体(如聚合物、金属、玻璃、有机和无机物诸如矿物、盐和硅藻)、小油滴(如碳氢化合物、碳氟化合物、硅质流体)、囊泡(如合成的诸如磷脂、或天然的诸如细胞、及细胞器官)。基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。基体通常具有多功能性,或者能够通过特异或非特异的共价或非共价相互作用而结合到供体或受体上。有许多官能团是可用的或者将其合并进来。典型的官能团包括羧酸、乙醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。适用于本发明的基体的一个非限制性的例子是羧基改性的乳胶颗粒。这种基体的详细情况可参见美国专利US5709994与US5780646(这两篇专利文献在此全文引为参考)。

[0081] 本发明所述用语“表位”是指能够特异性结合免疫球蛋白或者T细胞受体的任何蛋白决定簇。在本发明的一些具体实施例中,表位是抗原表面能够被抗体特异性集合的区域。表位决定簇通常可以包括分子的化学活性表面基团,例如但不限于:氨基酸、糖侧链、磷酸基和/或磺酰基。在本发明的其他一些具体实施例中,表位可以具体特定三位结构特征以及特定电荷特征。

[0082] II. 实施例

[0083] 如前所述,基于均相免疫的生物检测中,通过缩短检测时间,来进一步提高检测效率时,由于反应未达平衡,会严重影响检测的各项性能。本申请的发明人通过研究发现,通过增加试剂浓度、减少试剂及样本的加样量、提高反应温度以及将第一抗体或其结合片段与受体通过FITC-FITC抗体系统间接结合等措施均能在缩短反应时间的同时,提高检测的灵敏度和准确性。

[0084] 为此,本发明第一方面涉及一种制备快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的方法,其包括:

[0085] 制备组分a,所述组分a为与第一抗体或其结合片段结合的能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体;所述第一抗体或其结合片段能够与降钙素原的第一表位特异性结合;

[0086] 制备组分b,所述组分b为与生物素结合的第二抗体或其结合片段;所述第二抗体或其结合片段能够与降钙素原的第二表位特异性结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

[0087] 制备组分c,所述组分c为与链霉亲和素结合的能够在激发状态产生单线态氧的供体。

[0088] 在本发明的一些实施方式中,所述的第一抗体和第二抗体分别独立地选自单克隆抗体、多克隆抗体、抗体结合片段、人工抗体或修饰的抗体;优选选自多克隆抗体和/或单克

隆抗体;进一步优选为单克隆抗体。

[0089] 在本发明的一些实施方式中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0090] 在本发明的另一些实施方式中,所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒。

[0091] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与受体间接结合;优选地,所述第一抗体或其结合片段与受体通过硫氰酸荧光素-异硫氰酸荧光素抗体系统(FITC-FITC抗体系统)间接结合。即将FITC抗体与受体结合,将FITC与第一抗体或其结合片段结合;然后通过FITC抗体与FITC的特异性结合作用,使第一抗体或其结合片段与受体间接结合。

[0092] 在本发明的另一些实施方式中,所述受体为醛基和/或羧基改性的受体;优选地,所述受体为羧基改性的受体。

[0093] 根据本发明,所述方法还包括:

[0094] 制备第一组合物,所述第一组合物包括所述组分a和第一缓冲液;

[0095] 制备第二组合物,所述第二组合物包括所述组分b和第二缓冲液;

[0096] 制备第三组合物,所述第三组合物包括所述组分c和第三缓冲液。

[0097] 在本发明的一些实施方式中,所述第一组合物中组分a的浓度为50~300 $\mu\text{g/mL}$;优选为80~250 $\mu\text{g/mL}$;更优选为100~200 $\mu\text{g/mL}$;和/或,

[0098] 所述第二组合物中组分b的浓度为1~15 $\mu\text{g/mL}$;优选为2~10 $\mu\text{g/mL}$;更优选为4~8 $\mu\text{g/mL}$;和/或

[0099] 所述第三组合物中组分c的浓度为20~200 $\mu\text{g/mL}$;优选为30~150 $\mu\text{g/mL}$;更优选为50~100 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0100] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述第一组合物中a的浓度可以选自120 $\mu\text{g/mL}$ 、140 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 或80 $\mu\text{g/mL}$;所述第二组合物中组分b的浓度可以选自5 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 或7 $\mu\text{g/mL}$;所述第三组合物中组分c的浓度可以选自60 $\mu\text{g/mL}$ 、70 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 或90 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0101] 在本发明的一些实施方式中,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒,且所述第一组合物的制备方法包括:

[0102] 步骤S1,第一抗体或其结合片段利用第一透析缓冲液进行透析,获得透析后的第一抗体或其结合片段;

[0103] 步骤S2,用交联缓冲液对受体进行清洗后,再用交联缓冲液对清洗后的受体重悬,获得受体液;

[0104] 步骤S3,在受体液中加入透析后的第一抗体或其结合片段混匀,进行结合,获得与第一抗体或其结合片段结合的受体;

[0105] 步骤S4,用清洗缓冲液对与第一抗体或其结合片段结合的受体进行清洗后,加入第一缓冲溶液获得第一组合物。

[0106] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为1:(15~25);优选地,所述第一抗体或其结合片段与受体的质量比为1:(18~22)。

[0107] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一透析缓冲液和交联缓冲液均为pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液;所述清洗缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBST缓冲液。

[0108] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第一组合物的制备方法具体包括:

[0109] (1) 预处理

[0110] 将第一抗体或其结合片段置于透析袋内(截留分子量为14KD)中,用80~120倍体积的pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液(第一透析缓冲液),于磁力搅拌器上,2~8℃进行透析;至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时,获得透析后的第一抗体或其结合片段。

[0111] (2) 第一抗体或其结合片段与受体结合

[0112] 在受体中加入pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液(交联缓冲液),离心后弃上清,然后再次加入pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液(交联缓冲液),进行超声清洗后离心去上清;最后利用pH值为9.5~10.0的0.03~0.08M的CB缓冲液(交联缓冲液)重悬,获得受体溶液。

[0113] 在受体液中加入透析后的第一抗体或其结合片段,混匀后置于35~40℃的垂直旋转混合器上25~40rpm混匀过夜,获得混合液;然后将混合液于2~8℃冷却5~15min,立即加入NaBH₄溶液并混匀,室温,垂直旋转混合器上25~40rpm反应1.5~2.5小时;最后加入Gly溶液混匀,垂直旋转混合器上25~40rpm反应0.5~1.5小时,获得与第一抗体或其结合片段结合的受体。

[0114] (3) 清洗与配制

[0115] 用pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBST缓冲液(清洗缓冲液)对与第一抗体或其结合片段结合的受体进行超声清洗,加入第一缓冲液获得第一组组合物。

[0116] 根据本发明,所述第二组合物的制备方法包括:

[0117] 步骤T1,第二抗体或其结合片段利用标记缓冲液进行透析,获得透析后的第二抗体或其结合片段;

[0118] 步骤T2,在透析后的第二抗体或其结合片段中加入标记缓冲液混匀,然后加入生物素物溶液混匀,旋转过夜,获得与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段;

[0119] 步骤T3,与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段利用第二透析缓冲液进行透析,透析结束后加入第二缓冲液,获得第二组合物。

[0120] 在本发明的一些实施方式中,所述标记缓冲液为pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的NaHCO₃溶液;所述第二透析缓冲液为pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBS缓冲液。

[0121] 在本发明的另一些实施方式中,所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(10~100);优选地,所述第一标记物与第二抗体或其结合片段的质量比为1:(20~90);更优选为1:(30~80)。

[0122] 根据本发明,所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液均为pH值为7.0~8.0的0.08~0.12M的Tris-HCl溶液。优选地,所述第一缓冲溶液和第二缓冲溶液均为pH值为7.3~7.5的0.08~0.12M的Tris-HCl溶液。

[0123] 在本发明的一些具体实施方式中,所述第二组合物的制备方法具体包括:

[0124] (1) 预处理

[0125] 将第二抗体或其结合片段置于透析袋内(截留分子量为3KD)中,用80~120倍体积的pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的NaHCO₃溶液(标记缓冲液),于磁力搅拌器上,2~8℃进行透析;至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时,获得透析后的第一抗体或其结合片段。

[0126] (2) 第一标记物与第二抗体或其结合片段的结合

[0127] 在透析后的第二抗体或其结合片段中加入pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的NaHCO₃溶液(标记缓冲液)混匀,然后加入生物素溶液迅速混匀,于2~8℃垂直旋转混合器上25~40rpm反应过夜,获得与第一标记物结合的第二抗体或其结合片段。

[0128] (3) 透析与配制

[0129] 将与生物素结合的第二抗体或其结合片段置于透析袋(截留分子量为3KD)中,用80~120倍体积的pH值为7.0~7.5的0.08~0.12M的PBS缓冲液(第二透析缓冲液),于磁力搅拌器上,2~8℃进行透析,至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时;透析结束后加入第二缓冲液,获得第二组合物。

[0130] 在本发明的一些实施方式中,所述第三组合物中还包含表面活性剂;优选地,所述表面活性剂为非离子表面活性剂;进一步优选地,所述表面活性剂为直链型非离子表面活性剂。在本发明的一些具体实施例中,所述的表面活性剂为Genapol®X-080。

[0131] 在本发明的另一些实施方式中,所述表面活性剂的浓度为0.01-0.04wt%;优选为0.02-0.04wt%。

[0132] 本发明第二方面涉及一种如本发明第一方面所述的方法制备得到的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒。

[0133] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒具有试验所需的若干试剂位;

[0134] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒为一次性封膜试剂盒。

[0135] 在本发明的一些实施方式中,所述一次性封膜试剂盒包括盒体和设于盒体上的封膜;所述盒体至少包括样本位、稀释位、试剂位、密光检测位;所述试剂位设有若干个。

[0136] 本发明中,采用所述试剂盒进行光激化学发光时,检测仪器包括具有进行液体转移的移液机构,以及对所述试剂盒内反应体系发光信息收集的检测机构。

[0137] 在本发明的一些实施方式中,所述移液机构包括移液组件,所述移液组件在滑轨运动模块的控制下水平向直线运动,在丝杆运动模块的控制下垂直向直线运动;所述移液组件包括活塞机构和与所述活塞机构下端弹性连接的柱塞头,所述柱塞头可与所述移液头连接。

[0138] 在本发明的一些实施方式中,所述活塞机构包括活塞、设于活塞外部的导向件和驱动活塞运动的电机,通过活塞运动实现所述移液头对液体的吸排和转移。

[0139] 在本发明的一些实施方式中,所述检测机构还包括检测器和控制检测器运动的检测器控制模块;所述检测器具有光传感器。

[0140] 在本发明的一些实施方式中,所述光传感器的前端加设镜头。

[0141] 在本发明的一些实施方式中,所述检测仪器进一步包括承载所述试剂盒的试剂盒平台。

[0142] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒平台具有绕中心轴转动的试剂盒平台,沿所述试剂盒平台周向设有若干试剂盒,所述试剂盒底部设有试剂盒托架,相邻的所述试

剂盒托架间,且靠近试剂盒平台的外缘位置设有移液头放置位,移液头设于其内;所述试剂盒平台由试剂盒平台运动模块控制所述试剂盒平台转动。

[0143] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂盒平台上还设有温控模块。

[0144] 本发明第三方面涉及一种采用如本发明第二方面所述的试剂盒快速检测降钙素原的均相免疫方法,所述方法为光激化学发光检测。

[0145] 根据本发明,所述方法包括以下步骤:

[0146] 步骤R1,将V1体积待测样本与V2体积第一组合物和V3体积第二组合物混合后进行第一反应,以得到第一混合物;控制所述第一反应的温度为K1以及反应的时长为T1;

[0147] 步骤R2,将第一混合物与第三组合物混合后进行第二反应,以得到第二混合物;控制所述第二反应的温度为K2,反应的时长为T2;

[0148] 步骤R3,使能量或者活性化合物激发第二混合物中的供体产生单线态氧,所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;通过检测化学发光信号的存在和/或强度,从而判断测待测样品中是否存在降钙素原和/或确定降钙素原的含量;

[0149] 其中, $T1 \leq 15\text{min}$, $T2 \leq 5\text{min}$, 且 $T1+T2 \leq 15\text{min}$ 。

[0150] 在本发明的一些实施方式中,步骤R1中,先将待测样本与所述第一组合物混合后再加入第二组合物。

[0151] 在本发明的另一些实施方式中,所述K1和K2分别独立地选自35~45℃;优选选自37~42℃。

[0152] 在本发明的一些实施方式中,所述 $T1 \leq 12\text{min}$;优选地,所述 $T1 \leq 10\text{min}$;进一步优选地, $6\text{min} \leq T1 \leq 10\text{min}$ 。

[0153] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述T1可以选自7min、8min或9min。

[0154] 在本发明的一些实施方式中,所述 $T2 \geq 2\text{min}$ 。

[0155] 在本发明的一些实施方式中,所述 $T1+T2 \leq 13\text{min}$;优选地,所述 $T1+T2 \leq 12.5\text{min}$;进一步优选地,所述 $T1+T2 \leq 10\text{min}$ 。

[0156] 在本发明的另一些实施方式中,所述T1为8min,T2为2min。

[0157] 在本发明的一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V1 \leq 100\mu\text{L}$;优选地, $10\mu\text{L} \leq V1 \leq 80\mu\text{L}$;更优选地, $20\mu\text{L} \leq V1 \leq 60\mu\text{L}$ 。

[0158] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述V1可以选自30μL、40μL或50μL。

[0159] 在本发明的一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V2 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V2 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V2 \leq 25\mu\text{L}$ 。

[0160] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述V2可以选自12μL、14μL、16μL、18μL、20μL或22μL。

[0161] 在本发明的一些实施方式中, $5\mu\text{L} \leq V3 \leq 50\mu\text{L}$;优选地, $8\mu\text{L} \leq V3 \leq 40\mu\text{L}$;更优选地, $10\mu\text{L} \leq V3 \leq 25\mu\text{L}$ 。

[0162] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述V3可以选自12μL、14μL、16μL、18μL、20μL或22μL。

[0163] 在本发明的另一些实施方式中,步骤R3中,使用600-700nm波长的激发光照射第二混合物,激发供体产生单线态氧,受体与接触到的单线态氧反应生成520-620nm的发射光,通过检测发射光信号的存在和/或强度,从而判断测待测样品中是否存在降钙素原和/或确定

降钙素原的含量。

[0164] 根据本发明,所述方法的灵敏度为20pg/mL。

[0165] 在此,需要特别说明的是,本发明所述的方法均为非疾病诊断目的的方法。

[0166] 本发明第四方面涉及一种快速检测降钙素原的均相免疫检测装置,其采用如本发明第二方面所述的试剂盒或如本发明第三方面所述的方法检测待测样本中的降钙素原。

[0167] 根据本发明,所述装置包括:加样模块、试剂模块、温育模块、检测模块以及电路控制模块;所述加样模块、试剂模块、温育模块和检测模块均与所述电路控制模块电连接。

[0168] 在本发明的一些实施方式中,所述试剂模块包括用于加入第一组合物的第一组件以及用于加入第二组合物的第二组件。

[0169] 一种快速检测降钙素原的均相免疫检测装置的控制方法,其包括:

[0170] 步骤M1,控制所述加样模块取V1体积的待测样本用于检测;其中 $5\mu\text{L} \leq V1 \leq 100\mu\text{L}$,优选 $10\mu\text{L} \leq V1 \leq 80\mu\text{L}$,更优选 $20\mu\text{L} \leq V1 \leq 60\mu\text{L}$;

[0171] 步骤M2,控制所述试剂模块取V2体积的第一组合物以及V3体积的第二组合物与待测样本进行混合后得到第一混合物;其中 $5\mu\text{L} \leq V2 \leq 50\mu\text{L}$,优选 $10\mu\text{L} \leq V2 \leq 40\mu\text{L}$,更优选 $15\mu\text{L} \leq V2 \leq 25\mu\text{L}$; $5\mu\text{L} \leq V3 \leq 50\mu\text{L}$,优选 $10\mu\text{L} \leq V3 \leq 40\mu\text{L}$,更优选 $15\mu\text{L} \leq V3 \leq 25\mu\text{L}$;

[0172] 步骤M3,控制所述温育模块对第一混合物进行温育,第一混合物在K1温度下反应T1时间后得到第二混合物;其中所述 $T1 \leq 12\text{min}$;优选地,所述 $T1 \leq 10\text{min}$;进一步优选地,所述 $6\text{min} \leq T1 \leq 9\text{min}$ 。

[0173] 本发明第五方面涉及一种如本发明第二方面所述的试剂盒、如本发明第三方面所述的方法或如本发明第四方面所述的装置在POCT检测技术中的应用。

[0174] 本发明第六方面涉及一种如本发明第一方面所述方法在制备用于检测疑似患有细菌性脓毒症、急性重症胰腺炎及相关并发症和呼吸道相关炎症及感染的受治疗者的待测样本中的降钙素原,由此确定所述待测样本中降钙素原的水平的试剂盒中的应用;优选地,所述待测样本为血清或血浆。

[0175] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0176] 下述实施例中,实验过程中采用的主要仪器如表1所示,采用的试剂和原料(包括生物原料、稀释液、样本信息等)如表2所示。

[0177] 表1:实验中采用的仪器

[0178]

序号	名称	设备编号	厂家
1	LiCA HT	BYG-222	博阳
2	振荡器(涡旋)	BYD-045-04	VDRTEX

[0179] 表2:实验中采用的试剂和原料

[0180]

序号	名称/标号	批号	备注
1	PCT Ab1	L170401	上海领潮(浓度2.9mg/ml)
2	PCT Ab2	L170401	上海领潮(浓度5.2mg/ml)

3	通用液	A1705	
[0181] 实施例1:快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的制备			
[0182] 1.受体与供体的制备			
[0183] 用作本发明的受体和供体的制备方法、组成结构及其组分含量可以参见中国专利CN100429197C(该专利文献在此全文引为参考)中的实施例1。			
[0184] 2.第一组合物(R1)的制备			
[0185] (1) 预处理			
[0186] 取0.2mg待处理的PCT Ab1装入透析袋(截留分子量为14KD)中,将透析袋放入烧杯,在烧杯中加入100倍体积pH9.6的0.05M CB缓冲液,放在磁力搅拌器上,2~8℃进行透析,至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时,获得透析后的PCT Ab1,并将其吸出转移至干净离心管中,取样测定蛋白浓度。			
[0187] (2) PCT Ab1与受体结合过程			
[0188] 取2mg受体加入离心管,加入pH9.6的0.05M CB缓冲液,7500rpm离心15min,弃上清,向离心管中加入400ul pH9.6的0.05M CB缓冲液,进行超声清洗后,再次离心。			
[0189] 加入200ul pH9.6的0.05M CB缓冲液将受体重悬,使受体浓度为10mg/ml,再加入0.1mg透析后的PCT Ab1,混匀后将离心管置于37℃,垂直旋转混合器上25~40rpm混匀过夜。			
[0190] 将离心管放入2~8℃下冷却10min,取4ul的8mg/ml NaBH ₄ 溶液,立即加入离心管内并混匀,室温,垂直旋转混合器上25~40rpm反应2小时。			
[0191] 在离心管中加入32ul的75mg/ml Gly溶液混匀,垂直旋转混合器上25~40rpm反应1小时。			
[0192] (3) 清洗与配制			
[0193] 离心管称重配平后,7500rpm离心5min,弃上清,加入pH7.4的0.1M PBST缓冲液,进行超声清洗,重复两次,再用受体保存缓冲液清洗一次。加入pH值为7.5~8.5的0.08~0.12M的Tris-HCl溶液,混匀后完成第一组合物的制备,备用。其中第一组合物中组分a的浓度为200μg/mL。			
[0194] 3.第二组合物(R2)的制备			
[0195] (1) 预处理			
[0196] 取0.2mg待处理PCT Ab2装入透析袋(截留分子量为3KD)中,将透析袋放入烧杯,在烧杯中加入100倍体积pH8.0的0.1M NaHCO ₃ 缓冲液,放在磁力搅拌器上,2~8℃进行透析,至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时,获得透析后的PCT Ab2,并将其转移至干净离心管中,取样测定蛋白浓度。			
[0197] (2) 生物素与第二降钙素原抗体的结合			
[0198] 取200ul pH8.0的0.1M NaHCO ₃ 缓冲液加入离心管,加入0.1mg透析后的PCT Ab2,混匀。再加入配制好的5mg/ml生物素溶液8ul,迅速混匀,2~8℃垂直旋转混合器上25~40rpm反应过夜,获得与生物素结合的PCT Ab2。			
[0199] (3) 透析与配制			
[0200] 将与生物素结合的PCT Ab2溶液装入透析袋(截留分子量为3KD)中,将透析袋放入烧杯,在烧杯中加入100倍体积pH7.4的0.1M PBS缓冲液,放在磁力搅拌器上,2~8℃进行透			

析,至少更换透析液1次,每次至少透析4~5小时;透析结束后加入第二缓冲液,完成第二组合物的制备,备用。其中,第二组合合物中组分b的浓度为8 μ g/mL。

[0201] 4.第三组合物(R3)的制备

[0202] a、感光微球(供体)混悬液处理:吸取一定量的感光微球于高速冷冻离心机中离心,弃去上清,加入一定量MES缓冲液,超声细胞破碎仪上超声至微粒重新悬浮,加入MES缓冲液调节感光微球浓度至100mg/ml。

[0203] b、链霉亲和素溶液配制:称量一定量链霉亲和素,加MES缓冲液溶解至8mg/ml。

[0204] c、混合:将处理好的感光微球(供体)混悬液、8mg/ml的链霉亲和素溶液以及MES缓冲液,以2:5:1的体积比进行混合,迅速混匀,得到反应液。

[0205] d、反应:MES缓冲液配制25mg/ml的NaBH₃CN溶液,按照与反应液1:25的体积比加入,迅速混匀,37℃旋转反应48小时。

[0206] e、封闭:MES缓冲液配制75mg/ml的Gly溶液以及25mg/ml的NaBH₃CN溶液,按照与反应液2:1:10的体积比加入上述溶液中,混匀,37℃旋转反应2小时。再加入200mg/ml的BSA溶液(MES缓冲液),其与反应液体积比为5:8,迅速混匀,37℃旋转反应16小时。

[0207] f、清洗:向反应好的溶液中加入MES缓冲液,高速冷冻离心机离心,弃上清,加入新鲜MES缓冲液超声法重新悬浮,再次离心,如此清洗3次,最后用感光试剂缓冲液进行悬浮,获得第三组合物。其中,第三组合物中组分c的浓度为100 μ g/mL,作为通用液使用。

[0208] 5.将第一组合物、第二组合物和第三组合物进行分配、组装,获得快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒。

[0209] 实施2:快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的制备

[0210] 第一组合物(R1)的制备

[0211] 按照专利PCT/US2010/025433实施例中的记载将PCT Ab1与受体连接,形成与PCT Ab1结合的受体。其中,所述受体的结构为可溶的,其为非粒子形式,且第一组合物(R1)中与PCT Ab1结合的受体(组分a)的浓度为200 μ g/mL。

[0212] 其余组分的制备同实施例1。

[0213] 实施例3:快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒的灵敏度检测

[0214] 实验步骤:

[0215] 1.挑选浓度适中的样本,平衡至室温,混匀,然后用阴性样本进行梯度稀释,稀释到检测下限以下;

[0216] 2.在8 $\times$ 12的白板中分别加入混匀的样本、实施例1配制的R1和R2(按照实验设计顺序加入);

[0217] 3.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中反应,采用的反应模式如下;

[0218] (1)将40 μ l样本、15 μ l R1和15 μ l R2混匀;

[0219] (2)37℃温育8min;

[0220] (3)加入160 μ l通用液(R3);

[0221] (4)37℃温育2min;

[0222] (5)激发读数,结果如表3所示。

[0223] 表3:试剂盒灵敏度验证结果

[0224]

样本 1 (1.57ng/ml)		样本 2 (1.97ng/ml)		样本 3 (2.86ng/ml)		样本 4 (4.35ng/ml)		样本 5 (8.8ng/ml)	
1.57	134917	1.97	134978	2.86	179579	4.35	307108	8.80	614237
0.79	54614	0.99	66508	1.43	84093	2.18	137354	4.40	295373
0.39	24524	0.49	31321	0.72	35952	1.09	61970	2.20	115643
0.20	11977	0.25	15825	0.36	17766	0.54	28857	1.10	59037
0.10	6319	0.12	8388	0.18	9316	0.27	14824	0.55	28449
0.05	3902	0.06	4747	0.09	5291	0.14	7579	0.28	14883
0.025	2543	0.031	3072	0.045	3253	0.068	4225	0.138	8190
0.012	2022	0.015	2226	0.022	2324	0.034	2973	0.069	4390
S2/S1	1.26	S2/S1	1.38	0.011	1853	0.017	2218	0.034	2966
				S2/S1	1.25	S2/S1	1.34	0.017	2249
								S2/S1	1.32

[0225] 从表3可知,5个样本的稀释终点均在0.02ng/ml,计算倒数两点的信噪比,发现比值均在1.2倍以上,因此灵敏度判断可以达到0.02ng/ml。

[0226] 实施例4:不同温育时间对降钙素原检测的影响

[0227] 实验步骤:

[0228] 1.重新挑选浓度分布均匀的8例样本,平衡至室温,混匀;

[0229] 2.将实施例1制备的R1、R2的浓度分别稀释至100 μ g/mL和1 μ g/mL,混匀,做好标记;

[0230] 3.在8 $\times$ 12的白板中按设计表分别加入混匀的样本、配制的R1、R2,混匀;

[0231] 4.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中,采用两种反应模式进行反应:

[0232] 第一种反应模式为:

[0233] (1)将25 μ l样本、25 μ l R1和25 μ l R2混匀;

[0234] (2)37 $^{\circ}$ C温育时间如表4所示;

[0235] (3)加入175 μ l的通用液(R3);

[0236] (4)37 $^{\circ}$ C温育5min;

[0237] (5)激发读数,结果如表4所示。

[0238] 第二种反应模式为:

[0239] (1)将25 μ l样本、25 μ l R1和25 μ l R2混匀;

[0240] (2)37 $^{\circ}$ C温育10min;

[0241] (3)加入175 μ l的通用液(R3);

[0242] (4)37 $^{\circ}$ C温育时间见表5;

[0243] (5)激发读数,结果如表5所示。

[0244] 表4:不同的第一步温育时间对降钙素原检测的结果

[0245]

	样本浓度 (ng/ml)	1 (15min)	2 (12min)	偏差	3 (9min)	偏差	4 (6min)	偏差	5 (3min)	偏差
1	0.03	408	420	2.94%	460	12.75%	594	45.59%	610	49.51%
2	0.088	766	724	-5.48%	746	-2.61%	732	-4.44%	756	-1.31%
3	0.19	37632	35162	-6.56%	33506	-10.96%	31202	-17.09%	25810	-31.41%
4	0.495	3220	3232	0.37%	3466	7.64%	3680	14.29%	3572	10.93%
5	0.999	19970	19364	-3.03%	18170	-9.01%	16876	-15.49%	12830	-35.75%
6	1.41	37646	34832	-7.47%	30592	-18.74%	25014	-33.55%	17600	-53.25%
7	3.66	152456	135510	-11.12%	116100	-23.85%	91928	-39.70%	60492	-60.32%
8	14.28	142764	143734	0.68%	154492	8.21%	141638	-0.79%	127640	-10.59%

[0246] 表5:不同的第二步温育时间对降钙素原检测的结果

[0247]

	样本浓度 (ng/ml)	5 (10min)	1 (2min)	偏差	2 (4min)	偏差	3 (6min)	偏差	4 (8min)	偏差
1	0.03	474	478	0.84%	508	7.17%	516	8.86%	546	15.19%
2	0.088	694	736	6.05%	788	13.54%	720	3.75%	720	3.75%
3	0.19	47310	30446	-35.65%	37732	-20.25%	40846	-13.66%	44192	-6.59%
4	0.495	3646	3588	-1.59%	3666	0.55%	3030	-16.90%	3630	-0.44%
5	0.999	18898	19182	1.50%	19096	1.05%	19570	3.56%	17942	-5.06%
6	1.41	34578	28550	-17.43%	33948	-1.82%	34370	-0.60%	33096	-4.29%
7	3.66	130212	118966	-8.64%	127714	-1.92%	135788	4.28%	131838	1.25%
8	14.28	189754	154216	-18.73%	173372	-8.63%	158748	-16.34%	184916	-2.55%

[0248] 从表4可知,第一步温育时间在6min时比在3min的信号有大幅提升,因此第一步温育时间应超过6min。

[0249] 从表5可知,第二步温育时间对信号的影响不大,因此大幅缩短第二步温育时间并不会很大幅度的影响反应结果,但仍要保证第二步温育时间在2min以上。

[0250] 实施例5:样本及试剂的不同加样量和浓度对降钙素原检测的影响

[0251] 实验步骤:

[0252] 1.挑选浓度分布均匀的样本,平衡至室温,混匀;

[0253] 2.配制的R1和R2见表6,配制时采用的稀释液中均添加MAK 33;

[0254] 3.在8×12的白板中分别加入混匀的样本、配制的R1和R2(按照实验设计顺序加入);

[0255] 4.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中反应,采用的反应模式如下;

[0256] (1)见表6;

[0257] (2)37℃温育8min;

[0258] (3)加入通用液(R3);

[0259] (4)37℃温育2min;

[0260] (5)激发读数,结果如表7所示。

[0261] 表6:样本及试剂的不同加样量和浓度

[0262]

样本体积 (ul)	R1			R2			R3			夹心体积	总体积
	浓度 (ug/ml)	体积 (ul)	终浓度	浓度 (ug/ml)	体积 (ul)	终浓度	浓度 (ug/ml)	体积 (ul)	终浓度		
100	85	25	14.17	6.5	25	1.08	80	100	32	150	250
60	140	15	23.33	10.8	15	1.80	80	160	51	90	250
60	140	15	23.33	8	15	1.33	80	160	51	90	250
60	140	15	23.33	6	15	1.00	80	160	51	90	250
60	140	15	23.33	4	15	0.67	80	160	51	90	250

[0263] 表7:样本及试剂的不同加样量和浓度对降钙素原检测的结果

[0264]

	1	2	3	4	5
马血清	482	652	710	661	698
	433	688	685	735	709
0.052	2006	3361	3296	3289	3236
0.171	2141	4486	4409	4671	4116
0.737	20881	35300	34818	36576	33556
1.75	97763	138839	132376	146768	133874
15.57	576295	782811	810708	841319	790957
信噪比					
	1	2	3	4	5
马血清	/	/	/	/	/
0.052	4.38	5.02	4.73	4.71	4.60
0.171	4.68	6.70	6.32	6.69	5.85
0.737	45.64	52.69	49.92	52.40	47.70
1.75	213.7	207.2	189.8	210.3	190.3
15.57	1260	1168	1162	1205	1124

[0265] 从表7可知,在相同加样量的条件下,改变R2的浓度,本底和发光值变化不大,因此降低R2浓度对实验结果影响不大。

[0266] 降低样本量会增加发光值,但由于高端发光值增长没有本底增长的幅度大,因此降低样本量会降低灵敏度;但由于增加样本量又会使得H00K效应的提前,因此需要在保证灵敏度的前提下尽量降低样本加样量。

[0267] 实施例6:PCT Ab1与受体通过FITC-FITC抗体系统间接结合对降钙素原检测的影响。

[0268] 采用的试剂盒分别为:

[0269] 试剂盒1:实施例1制备的试剂盒

[0270] 试剂盒2:除了R1为PCT Ab1通过FITC-FITC抗体系统与受体结合外,其余与试剂盒1相同。

[0271] 实验步骤:

[0272] 1.将抗原进行梯度稀释,混匀待用;

[0273] 2.在白板中分别加入混匀的样本、R1和R2;

[0274] 3.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中反应,采用的反应模式如下;

[0275] (1)将25ul样本、25ul R1和25ul R2混匀;

[0276] (2) 37℃温育15min;

[0277] (3) 加入175ul通用液(R3);

[0278] (4) 37℃温育10min;

[0279] (5) 激发读数,检测结果如表8所示,信号与浓度的关系如图1所示。

[0280] 表8:检测结果

[0281]

PCT样本ng/mL	试剂盒1	试剂盒2
------------	------	------

52.72	46839	125865
26.36	21094	59493
13.18	9210	27526
6.590	4589	13396
3.295	2301	6567
1.647	1351	3385
0.824	978	1926
0.412	743	1156
0.206	647	866
0.103	673	628
0.051	604	581

[0282] 从表8和图1可知,采用试剂盒2能显著提高信号值,进而提高检测的灵敏度。说明PCT Ab1与受体通过FITC-FITC抗体系统间接结合后,减少了PCT Ab1与抗原结合的位阻,提高了检测的灵敏度。

[0283] 实施例7:不同基团改性的受体对降钙素原检测的影响。

[0284] 采用的试剂盒为:

[0285] 试剂盒1:采用醛基改性的受体,按照实施例1所述方法制备的试剂盒。

[0286] 试剂盒2:采用羧基改性的受体,按照实施例1所述方法制备的试剂盒。

[0287] 实验步骤:

[0288] 1.将样本,平衡至室温,混匀;

[0289] 2.在白板中分别加入混匀的样本、R1和R2;

[0290] 3.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中反应,采用的反应模式如下;

[0291] (1)将25ul样本、25ul R1和25ul R2混匀;

[0292] (2) 37℃温育15min;

[0293] (3) 加入175ul通用液(R3);

[0294] (4) 37℃温育10min;

[0295] (5) 激发读数,检测结果如表9所示。

[0296] 表9:检测结果

[0297]

PCT浓度	醛基试剂盒	羧基试剂盒
0	1543	651
21	15560	23222
65.3	105540	171949
98.1	165587	260960

[0298] 从表9可知,采用羧基改性的受体制备的试剂盒进行检测时的信噪比较采用醛基改性的受体制备的试剂盒进行检测时的信噪比提高了26%,因此采用羧基改性的受体进行试剂盒的制备,能够提高检测的灵敏度。

[0299] 实施例8:R3中加入表面活性剂对降钙素原检测的影响

[0300] 实验步骤:

- [0301] 1.在R3中加入不同浓度的表面活性剂；
 [0302] 2.将待测样本25ul、R1 25ul、R2 25ul混匀；
 [0303] 3.37℃温育15min；
 [0304] 4.加入175ul通用液 (R3) ；
 [0305] 5.37℃温育10min；
 [0306] 6.激发读数，结果如表10所示。
 [0307] 表10:R3中加入不同浓度的表面活性剂对降钙素原检测的影响

样本	Genapol® X-080			
	0.00%	0.04%	0.02%	0.01%
1	105897	141394	145902	128725
2	34363	53332	48204	45261
3	10235	14773	13894	12705
4	2115	3488	3515	2842
5	803	1234	1202	1160
6	388	514	583	402

[0309] 从表10可知，R3中加入不同浓度的 Genapol®X-080后，信号均有明显提升，尤其是 Genapol®X-080的浓度在0.02-0.04wt %之间时，信号的提升最为明显。因此，R3中加入表面活性剂后能够提升检测的区分度，进而提升检测的灵敏度。

[0310] 对比例:仅改变试剂浓度对降钙素原检测的影响

[0311] 实验步骤:

[0312] 1.将待测的高值样本进行梯度稀释样本，然后将稀释样本和高值样本平衡至室温，并混匀；

[0313] 2.配制的R1和R2的浓度见表11，配制时采用的稀释液中均添加MAK 33；

[0314] 3.在8×12的白板中分别加入混匀的待测样本、配制的R1和R2 (按照实验设计顺序加入) ；

[0315] 4.将加好样的白板放入LiCA HT仪器中反应，采用的反应模式如下；

[0316] (1) 将25ul待测样本、25ul R1和25ul R2混匀；

[0317] (2) 37℃温育15min；

[0318] (3) 加入175ul通用液 (R3) ；

[0319] (4) 37℃温育10min；

[0320] (5) 激发读数，结果如表12所示。

[0321] 表11:配制的R1和R2的浓度

R1	0.05mg/ml			0.1mg/ml			0.2mg/ml		
R2 (ug/ml)	4	6	8	4	6	8	4	6	8
R3 (ug/ml)	40	80	160	40	80	160	40	80	160

[0323] 表12:检测结果

[0324]

	实验组									对照组
R1 (ug/ml)	50			100			200			50
R3 (ug/ml)	40	80	160	40	80	160	40	80	160	A1705
R2 (ug/ml)	4	6	8	4	6	8	4	6	8	2
1	2681782	2010172	935106	4436688	3478712	1617120	7365416	6075274	3223786	2531340
2	2109562	1680620	815342	3413130	2814518	1332190	5408098	4668226	2422542	1845420
3	1214324	1044586	547662	1963222	1794250	925158	3022980	2773982	1436842	988922
4	506038	512700	273216	806176	776156	415766	1276704	1187358	668038	381776
6	46802	51666	29564	78622	78888	47228	121032	121276	68920	33452
8	4898	5418	3262	7858	8272	5216	12936	13380	8124	2918
9	2286	2344	1378	3432	3952	2248	5708	5628	3556	1086
10	1070	1286	866	1726	1968	1444	3342	3266	2192	512
	信噪比									
R1 (ug/ml)	50			100			200			50
R3 (ug/ml)	40	80	160	40	80	160	40	80	160	A1705
R2 (ug/ml)	4	6	8	4	6	8	4	6	8	2
1	2506	1563	1080	2571	1768	1120	2204	1860	1471	4944
2	1972	1307	942	1977	1430	923	1618	1429	1105	3604
3	1135	812	632	1137	912	641	905	849	655	1931
4	472.9	398.7	315.5	467.1	394.4	287.9	382.0	363.6	304.8	745.7
6	43.74	40.18	34.14	45.55	40.09	32.71	36.22	37.13	31.44	65.34
8	4.58	4.21	3.77	4.55	4.20	3.61	3.87	4.10	3.71	5.70
9	2.14	1.82	1.59	1.99	2.01	1.56	1.71	1.72	1.62	2.12

[0325] 从表12可知,改变试剂浓度后的所有实验组的信噪比均比对照组明显降低,说明仅改变试剂浓度并不能提高检测的灵敏度。具体地,在相同的R1浓度下,提高相应R2和R3的浓度,信噪比下降,进而使检测灵敏度下降;同时在相同的R2和R3的浓度下,增加R1浓度,也不能提高信噪比,甚至当R1浓度浓度达到200ug/ml时信噪比下降。

[0326] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

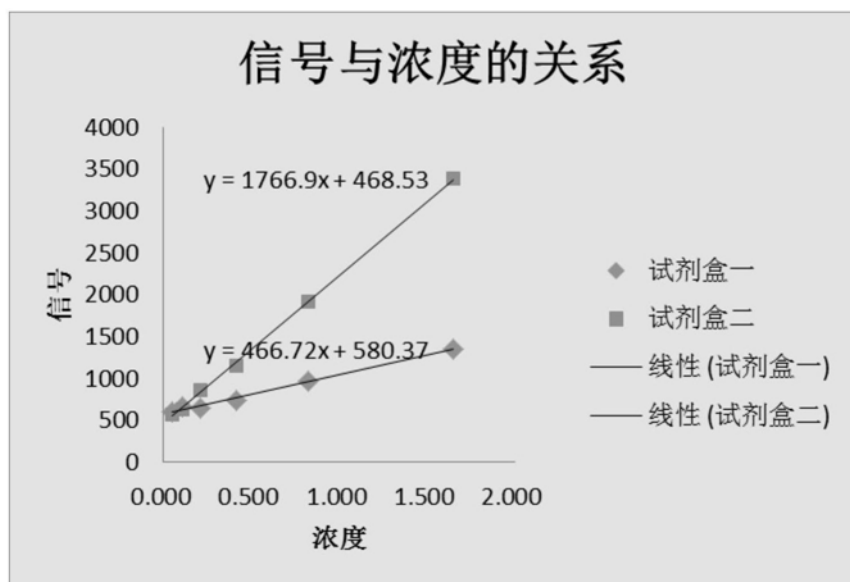


图1

专利名称(译)	快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备方法、检测方法和装置		
公开(公告)号	CN110161230A	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201810141464.2	申请日	2018-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博阳生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	孙小禁 杨阳 洪琳 赵卫国 刘宇卉 李临		
发明人	孙小禁 杨阳 洪琳 赵卫国 刘宇卉 李临		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/536		
代理人(译)	方莉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫分析技术领域的一种快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒、制备方法、检测方法和装置。由本发明所述方法制备的快速检测降钙素原的均相免疫试剂盒能够快速检测待测样本中的降钙素原，检测时间可缩短至10min以内，且检测灵敏度能达到20pg/mL、变异系数在10%以内。另外，采用本发明所述试剂盒进行检测时，可以减少试剂的用量、节省原料，且能准确、快速确定受治疗者的待测样本中降钙素原的含量，具有广阔的应用前景。

