



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108037297 A

(43)申请公布日 2018.05.15

(21)申请号 201711389669.4

(22)申请日 2017.12.22

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司  
地址 030000 山西省太原市尖草坪区太原  
不锈钢产业园区钢园北路10号

(72)发明人 冯丽昕 许殊荣 张轩 马运乐  
杜爱铭 徐兵

(51)Int.Cl.  
G01N 33/68(2006.01)  
G01N 33/535(2006.01)

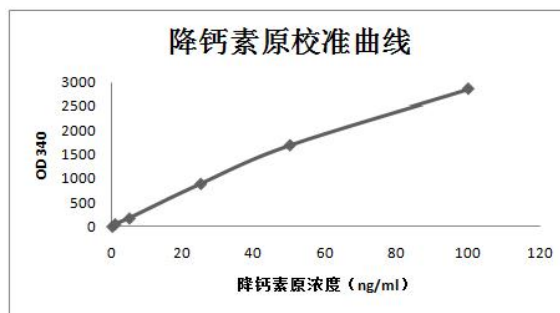
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂；上述酶标降钙素原由降钙素原和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的降钙素原免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中降钙素原含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快捷、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。



1. 一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂。

2. 根据权利要求1所述的降钙素原的免疫检测试剂,其特征在于:所述酶标降钙素原由降钙素原和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

3. 根据权利要求1所述的降钙素原免疫检测试剂,其特征在于:所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

4. 一种降钙素原免疫检测试剂及其制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物的制备:制备葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液,降钙素原的活化,将GDH与降钙素原偶联,纯化偶联的酶标抗原;

(2) 降钙素原均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由降钙素原抗体和均相酶底物混合而成;

试剂2的制备:由葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

5. 根据权利要求5所述的一种降钙素原免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤(1)具体过程为:

1) 葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液的制备:

a. 称取5-20 mg 规格为100-300 KU的GDH,室温溶解于6-10 mL PBS溶液中,pH为7.0-10.0;

2) 降钙素原的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解:10-30 mg 降钙素原、10-40 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、2-10 mg N-羟基琥珀酰亚胺,溶解于2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)溶液中,于室温下搅拌溶解,反应15-60分钟;

3) GDH 与降钙素原的偶联

a. 将上述活化的降钙素原溶液逐滴加入到上述搅拌中的GDH溶液中;

b. 2-8°C 搅拌过夜;

4) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物,于2-8°C下储存。

6. 根据权利要求5所述的一种降钙素原免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤(2)的具体过程如下:

试剂1的制备:将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2L磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将降钙素原抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物加到磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

7. 利用权利要求1至4任意一项所述的降钙素原免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与降钙素原抗体接触;

2) 根据待测样本中降钙素原与降钙素原抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中降

钙素原的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

## 一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体是一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法。

### 背景技术

[0002] 降钙素原(procalcitonin,PCT)是降钙素的前肽,一种无激素活性的糖蛋白,由116个氨基酸组成,分子量为13KD,半衰期为25-30小时,在体内稳定性很好,不受体内激素水平的影响。正常健康人体内PCT水平很低( $<0.05$  ng/mL)。在细菌感染(特别是脓毒血症、革兰阴性杆菌)引起的全身炎症反应时血清PCT水平常显著增高,其增高程度与感染严重程度和死亡率呈正相关。在全身细菌感染患者血清PCT浓度升高比C反应蛋白(CRP)及其它炎症因子出现早,在感染2 h出现升高,6 h急剧上升,8~24 h维持高水平,且对全身与局部细菌性感染的鉴别具有特殊价值。目前认为PCT可能是一种内源性非类固醇类抗炎物质,多在细菌感染时诱导产生,在调控细胞因子网络中发挥着重要作用,是用于检测严重细菌感染的一个重要诊断标志,也是一种敏感的判定炎症类别和活动情况的指标。

[0003] 目前检测降钙素原的常用方法有:凝胶层析及高效液相色谱分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫发光法和胶体金层析法。其中,凝胶层析及高效液相色谱分析费时且不易自动化;ELISA法定量准确性差、操作时间长、自动化程度低,多用于定性检测;RIA法所需时间较长,检测结果不稳定,重复性比ELISA差,且存在放射性污染危险。免疫发光法特异性强,敏感性高,但需要昂贵的仪器设备和经验丰富的操作人员,一般多在特定医疗机构使用。胶体金层析法虽稳定性较好,但灵敏度较低,一般只能定性,不能定量。

[0004] 本发明采用的方法为均相酶免疫检测法,其优点为:操作简便、快速、灵敏度高、准确性好、适合于自动化,应用广泛,并且用全自动生化分析仪对小分子物质和大分子物质都能高通量快速测定。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中降钙素原检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,本发明提供了一种快速、灵敏度高、准确检测出待测样本中降钙素原含量的降钙素原均相酶免疫检测试剂及其制备方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂;上述酶标降钙素原由降钙素原和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0007] 作为本发明进一步的方案,所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

[0008] 作为本发明进一步的方案,所述的一种降钙素原免疫检测试剂及其制备方法,其

特征在于,包括如下步骤:

(1) 葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物的制备:制备葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液,降钙素原的活化,将GDH与降钙素原偶联,纯化偶联的酶标抗原;

(2) 降钙素原均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由降钙素原抗体和均相酶底物混合而成;

试剂2的制备:由葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

[0009] 作为本发明进一步的方案,所述的一种降钙素原免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤(1)具体过程为:

1) 葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液的制备:

a. 称取5-20 mg 规格为100-300 KU的GDH,室温溶解于6-10 mL PBS溶液中,pH为7.0-10.0;

2) 降钙素原的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解:10-30 mg 降钙素原、10-40 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、2-10 mg N-羟基琥珀酰亚胺,溶解于2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)溶液中,于室温下搅拌溶解,反应15-60分钟;

3) GDH 与降钙素原的偶联

a. 将上述活化的降钙素原溶液逐滴加入到上述搅拌中的GDH溶液中;

b. 2-8℃搅拌过夜;

4) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物,于2-8℃下储存。

[0010] 作为本发明进一步的方案,所述的一种降钙素原免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤(2)的具体过程如下:

试剂1的制备:将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2 L磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将降钙素原抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物加到磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0011] 作为本发明进一步的方案,所述的降钙素原免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与降钙素原抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标降钙素原与降钙素原抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中降钙素原的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0012] 本发明的原理是抗原与酶结合成酶标抗原,保留抗原和酶的生物活性,当酶标抗原与抗体结合后,抗原分子上的酶蛋白与抗体密切接触,使酶的活性中心受到影响,酶的活性受到抑制。测定时样本中的抗原、酶标抗原与抗体竞争性结合,样本中的抗原含量越高,加底物后其OD值越高。

[0013] 本发明的优点在于:本发明的降钙素原免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中降钙素原含量。与市场上现有的检测试剂相比,本发明检测试剂具有方便快捷、

灵敏度高、特异性强、定量准确等优点,有利于临床的推广使用。

### 附图说明

[0014] 图1 是降钙素原均相酶免疫反应校准曲线图。

[0015] 图2 是降钙素原均相酶免疫线性范围图。

[0016] 图3 是降钙素原均相酶免疫与诺尔曼的免疫荧光法检测结果的相关性分析图。

### 具体实施方式

[0017] 本发明提供了一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法,为使本发明目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进行详细说明。

[0018] 本发明提供了一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂;上述酶标降钙素原由降钙素原和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0019] 本发明中所指的“降钙素原”不仅仅指完整的降钙素原分子,也包括保留完整抗原特异性结合能力的降钙素原片断或者衍生物。

[0020] 一种降钙素原均相酶免疫检测试剂,包括:酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0021] 上述的降钙素原免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1) 将待测样本与降钙素原抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标降钙素原与降钙素原抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中降钙素原的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0022] 下面通过具体的实施例对本发明进行详细说明。

[0023] 实施例一:葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的制备

1) 葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液的制备:

a. 称取10 mg 规格为100 KU的GDH,室温溶解于8 mL 50mM PBS的溶液中,pH=7.4;

2) 降钙素原的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解:25 mg 降钙素原、20mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、5mg N-羟基琥珀酰亚胺,溶解于2 mL 2-(N-吗啡啉)乙磺酸中,于室温下搅拌溶解,反应30分钟;

3) GDH 与降钙素原的偶联

a. 将上述活化的降钙素原溶液逐滴加入到上述溶解的GDH溶液中;

b 2-8℃搅拌过夜;

4) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物,于2-8℃下储存。

[0024] 实施例二:降钙素原均相酶免疫检测试剂的制备

降钙素原均相酶免疫检测试剂,包括:酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0025] 降钙素原均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是分开放置的,因此降钙素原均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂,具体如下:

1. 试剂1 的制备:将3.588g (10mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、1.802g (10mM) 葡萄糖用1L 50 mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将降钙素原抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100 ~1:10000,在本实施例中具体的比例为1:600。

[0026] 2. 试剂2 的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物加到50mM、pH8.0 的磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000,在本实施例中具体的比例为1:1500。

[0027] 上述降钙素原均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

- 1) 将待测样本与降钙素原抗体接触;
- 2) 根据待测样本中酶标降钙素原与降钙素原抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中降钙素原的含量;

具体的,检测时将待测样本加到试剂1中,待测样本中的降钙素原与试剂1中的降钙素原抗体发生特异性结合,生成抗降钙素原抗体-降钙素原复合物;再加入试剂2,此时试剂2中的葡萄糖脱氢酶-降钙素原偶联物与试剂1中的酶的底物混合、接触,发生酶促反应,构成检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中降钙素原与上述降钙素原抗体的结合情况判断待测样本中降钙素原的含量。

[0028] 由于葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与待测样本中的降钙素原竞争性结合降钙素原抗体,所以,待测样本中降钙素原的量越多,均相酶溶液中游离的葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的量越多,酶促反应越快,导致OD<sub>340</sub> 上升。

[0029] 上述待测样本为生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等,作为一种优选的方案,上述待测样本为血清或血浆。

[0030] 实施例三:降钙素原均相酶免疫检测试剂反应校准曲线。

[0031] 1) PCT校准品配制:将市售人降钙素原重组蛋白溶于类似人血清基质的溶液(NaCl 0.9%,BSA0.2%,NaN<sub>3</sub>0.1%,Tris-HCl pH 7.4)中,制成不同浓度的校准品。以上海元升公司降钙素原校准品为原始标准,采用其降钙素原试剂盒对不同浓度的校准品分别检测10次,求出均值,得到降钙素原校准品的浓度:0.2,1,5,25,50,100 ng/mL。

[0032] 2) 生化分析仪检测:以日立7170操作为例:测定波长为340 nm,分别取不同浓度的校准品溶液(15 $\mu$ L),加入降钙素原R<sub>1</sub>试剂(200 $\mu$ L),混匀,再加入降钙素原R<sub>2</sub>试剂(50 $\mu$ L),混匀后,测定不同时间点的OD<sub>340</sub> 吸光值,算出不同校准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂1 和试剂2的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,每管重复测定3次,以各校准管3次测得的吸光度差值  $\Delta A$ 的平均值为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制“浓度-吸光度差值”校准曲线(见图1)。

[0033] 取待测血清或血浆样本,同法测定样本的吸光度差值,代入校准曲线,即可计算出待测样本中降钙素原PCT的含量。如果血清或血浆中降钙素原的浓度超出校准曲线范围,需对样本进行稀释后再检测以保证检测结果的准确性。

[0034] 本检测试剂不仅适用于日立7170,还适用于其它品牌和型号的半自动、全自动生化分析仪,具体参数可根据仪器进行调整。

[0035] 实施例四:线性范围确定

用接近线性范围上限的降钙素原高浓度样本(90.60 ng/mL),用生理盐水将其按1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 稀释,共配制成6个稀释浓度( $x_i$ )的溶液,用所述生化分析仪检测方法测定各稀释样本浓度。每个稀释浓度测试3次,分别求出每个稀释浓度检测结果的均值( $y_i$ )。以稀释浓度( $x_i$ )为自变量,以测定均值( $y_i$ )为因变量求出线性回归方程,根据公式(1)计算线性回归的相关系数 $r$ ,结果显示回归方程为 $y=0.9904x-0.0368$ ,相关系数 $r=0.9998$ ,表明本发明试剂在0.2 ng/mL-90.6 ng/mL 线性范围内相关性较好(见图2)。

[0036] 实施例五:相关性分析

对包括65例阳性标本和21例阴性标本在内的86例临床标本分别使用诺尔曼的免疫荧光法和本发明的均相酶免疫法分别对样本重复测定2次,分别计算平均值,对86例样本检测结果进行线性回归分析,计算两种试剂检测结果的相关系数。

[0037] 结果显示,两种试剂盒检测结果的相关系数 $r=0.9989$ ,线性回归方程为

$y=0.9905x+0.0156$ (见图3),表明本发明降钙素原均相酶免疫法检测试剂和市售诺尔曼的免疫荧光法检测试剂具有很好的一致性。

[0038] 由于本发明的检测过程是由仪器全自动化完成,所以对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用。

[0039] 需要说明的是,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明的专利保护范围内。

[0040] 此外,以上所述的仅是本发明的优选实施方案,对于本技术领域的技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做若干的改进和调整,这些改进的调整也应视为本发明的保护范围。

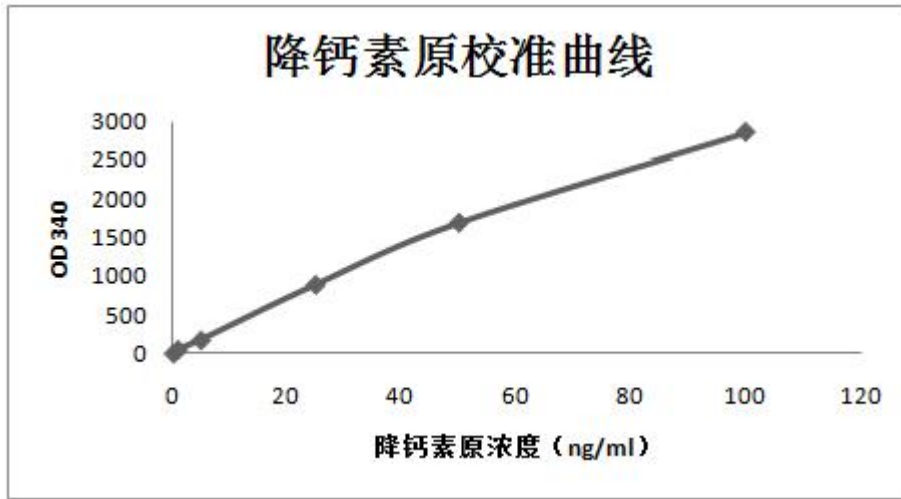


图1

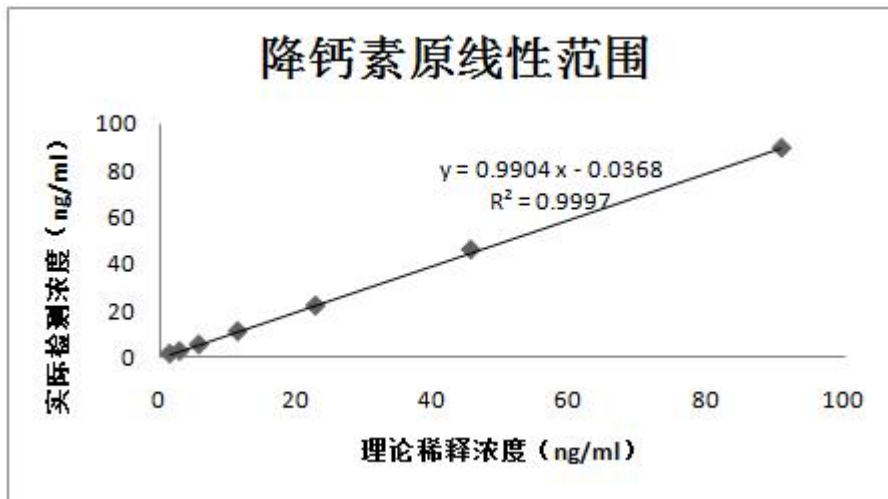


图2

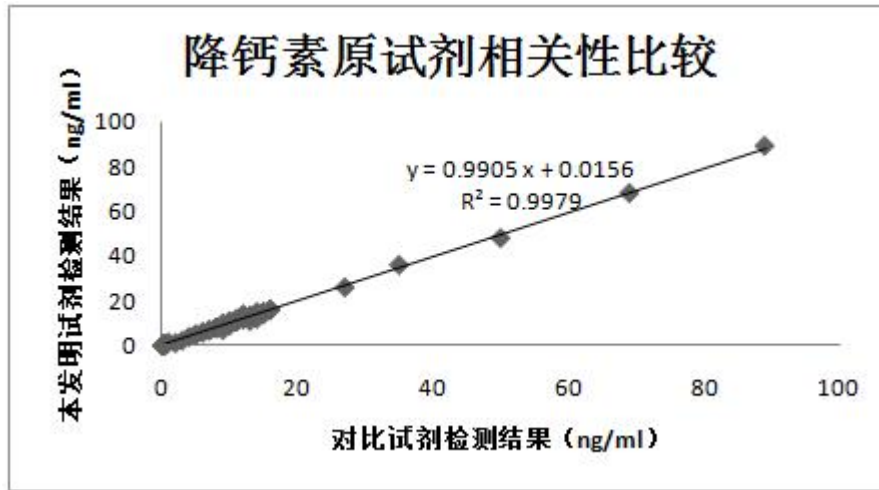


图3

专利名称(译)	一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108037297A</a>	公开(公告)日	2018-05-15
申请号	CN2017111389669.4	申请日	2017-12-22
[标]发明人	冯丽昕 许殊荣 张轩 马运乐 杜爱铭 徐兵		
发明人	冯丽昕 许殊荣 张轩 马运乐 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种降钙素原免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标降钙素原、用于检测降钙素原抗体-酶标降钙素原复合物的指示试剂；上述酶标降钙素原由降钙素原和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的降钙素原免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中降钙素原含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快捷、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。

