



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104237525 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201310253612. 7

(22) 申请日 2013. 06. 24

(71) 申请人 北京美康生物技术研究中心有限责
任公司

地址 100070 北京市丰台区南四环西路 188
号总部基地 15 区 5 号楼 8 层

(72) 发明人 金鑫 曾滨

(74) 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理
有限责任公司 11139

代理人 孙皓晨 费碧华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/82 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊
试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于测定降钙素原的胶乳
增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用,属于
疾病的诊断和检测技术领域。本发明一种用于测
定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒,包括稀
释液、胶乳制剂、空白液、校准品和质控品;其中
所述的胶乳制剂中含有分别偶联了 PCT 单克隆抗
体以及 PCT 多克隆抗体的不同粒径大小的羧基化
的聚苯乙烯胶乳。使用本发明的方法分别对 PCT
单克隆抗体和 PCT 多克隆抗体进行标记后,得到
的大粒径胶乳可以提高检测灵敏度,小粒径胶乳
可以拓宽线性范围,因此,本发明的复合胶乳制剂
既可以提高检测灵敏度,又可拓宽检测线性范围,
对降钙素原的检测来说具有检测快速、敏感度高、
特异性强和准确性好等优点。

1. 一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在於所述的试剂盒包括稀释液、胶乳制剂、空白液、校准品和质控品;其中所述的胶乳制剂中含有分别偶联了 PCT 单克隆抗体以及 PCT 多克隆抗体的不同粒径大小的羧基化的聚苯乙烯胶乳。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於,偶联了 PCT 单克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的粒径为 76nm,偶联了 PCT 多克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的粒径为 187nm。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述的稀释液为含有 2M NaCl,2% (w/w) PEG20000,0.5% (w/w) BSA,0.1% (w/w) proclin-300 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液,pH=8.4。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述的胶乳制剂是按照以下方法制备得到的:

(1) 羧基化的聚苯乙烯胶乳活化

10mg/ml 的羧基化的聚苯乙烯胶乳 1ml 中加入 50mM, PH6.1MES 溶解的 1mg EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和 10mgNHS (N-羟基琥珀酰亚胺)混匀活化 60 分钟,离心 8000rpm 弃去上清,沉淀用 PH7.4 的 50mM PBS 重悬;按照上述方法分别制备得到了粒径为 76nm 和 187nm 活化后的羧基化的聚苯乙烯胶乳;

(2) 偶联了 PCT 单克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

将 1mg PCT 单克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 76nm 胶乳溶液中,室温混匀 2-4 小时,2-8℃ 8000rpm 离心 15min,收集上清液备用,加入含有 5mg BSA 的 50mM PBS,室温混匀 1-2 小时;2-8℃ 8000rpm 离心 15min,弃掉上清液,沉淀中加入 5ml50mM 的甘氨酸,充分混匀 30min;2-8℃ 8000rpm 离心 15min,弃掉上清液,沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

(3) 偶联了 PCT 多克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

将 0.5mg PCT 多克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 187nm 的胶乳溶液中,室温混匀 2-4 小时,2-8℃ 8000rpm 离心 15min,收集上清液备用,加入含有 2.5mgBSA 的 50mM PBS,室温混匀 1-2 小时;2-8℃ 8000rpm 离心 15min,弃掉上清液,沉淀中加入 5ml50mM 的甘氨酸,充分混匀 30min;2-8℃ 8000rpm 离心 15min,弃掉上清液,沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

(4) 将两种胶乳溶液进行混合。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在於步骤(4)中,是将两种粒径的胶乳试剂进行体积比 1:1 混合,充分混匀后备用。

6. 如权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在於步骤(2)或步骤(3)中所述的缓冲液为含有 1% (w/w) BSA,0.05% (v/v) 吐温,0.1% (w/w) 海藻糖、0.1g/L 羧甲基纤维素钠,0.1% (w/w) NaN₃ 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液,pH=7.4。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述的空白液为 0.05M PBS 磷酸缓冲液。

8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述的校准品包括降钙素原浓度分别为 0、0.1、0.5、2.5、10、30 μg/L 的校准品。

9. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述的质控品中降钙素原的浓度为 0.21-0.29 μg/L。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的试剂盒在制备检测降钙素原试剂中的应用。

一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用,特别涉及一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用,本发明属于疾病的诊断或检测技术领域。

背景技术

[0002] 降钙素原(PCT)是无激素活性的降钙素前肽物质,由 116 个氨基酸组成,分子量为 13KD 的糖蛋白。PCT 的半衰期为 25-30 小时,在体外稳定性很好。

[0003] PCT 来自定位于第 11 号染色体上(11P15,4)的单拷贝基因(与降钙素基因相关肽为同一基因)。该基因由 2800 个碱基对组成,含 6 个外显子和 5 个内含子,基因全长约 7.6Kb。转录后经特定剪接产生 PCTmRNA,再翻译成降钙素原前体(Pre-PCT),在高尔基复合体及分泌囊中,经一系列水解酶作用最终形成 PCT 氨基酸多肽(aminoPCT),降钙素(CT)及羧基端 21 个氨基多肽(CT:CCP-1)。

[0004] 正常条件下人血清 PCT 含量极低,约 2.5pg/ml(运用高效液相色谱分析),而成熟 CT 含量约 6.3pg/ml。髓质甲状腺肿瘤或其他神经内分泌肿瘤患者血清 PCT 及其组分均增高,组分相对含量也发生变化。在一些非甲状腺损伤如慢性肾衰、吸入性烧伤、急性细菌感染、中风、败血症等患者血清 PCT 及其组分也均增高,有些甚至成倍的上升,而 CT 略微升高,说明除甲状腺髓质细胞分泌贮存 PCT 外,仍有其他细胞具有这些功能。

[0005] PCT 选择性地对系统性细菌感染、真菌感染及寄生虫感染有反应,而对无菌性炎症和病毒感染无反应或仅有轻度反应。许多学者研究发现,全身性细菌、真菌和寄生虫感染时,PCT 水平异常增高,增高的程度与感染的严重程度及预后相关,在全身性细菌感和脓毒症辅助鉴别诊断、预后判断、疗效观察等方面有很高的临床价值。PCT 水平的监测,对于严重威胁生命的感染性疾病过程和跟踪治疗方案是很有用的,PCT 浓度的升高标志着炎症反应正在进行中,使用足够的抗生素、炎症灶清除术治疗等,PCT 值下降,证明治疗方案正确,预后良好,反之改变治疗方案。

[0006] PCT 为所有不知病因的炎症性疾病的鉴别诊断提供帮助与支持,如细菌性与毒素性的急性成人呼吸窘迫综合征(ARDS)的鉴别;胆源性与毒素性胰腺炎的鉴别;细菌性与病毒性脑膜炎的鉴别;微生物诱导的发热与非细菌性发热的鉴别,特别是发热待查(FOU)的诊断,病毒感染或自身免疫失调与免疫抑制条件下的急性细菌感染的鉴别,发热的病因的鉴别,如在肿瘤患者中被肿瘤溶解物或化疗诱导与细菌、真菌或其他感染病因区别,早期诊断新生儿和婴儿全身性细菌感染与败血症引起的急性发热;术后常规,包括术后感染预警及用药监测,术后切除感染灶(如腹膜炎、软组织感染)后的治疗指导,监测腹膜炎、吻合口漏和无典型腹部症状的疾病过程;器官移植后的监测,移植前排除急性细菌或其他感染,鉴别急性器官排斥、急性病毒、细菌与真菌感染;长期在 ICU 的患者及长期机械通气患者的监测,监测疾病过程及指导治疗;监测高危患者,早期获得有关并发症和内环境衰退的信息。

[0007] 许多临床研究证明,PCT 在不同医学领域对诊断和指导治疗有很高的价值,与目前所应用的诊断指标相比,PCT 在鉴别诊断和控制感染及严重炎症方面提供了额外的信息。随着临床实践性研究的不断深入,临床数据的不断积累,PCT 作为一个全身性细菌感染和脓毒症辅助和鉴别诊断的常规指标将成为共识,并将得到广泛的应用。

[0008] 目前,检测 PCT 较特异与敏感的分析方法有:双抗夹心免疫化学发光法(双抗夹心法)和放射免疫分析法(RIA)。

[0009] 双抗夹心法运用双单克隆抗体,其一作为捕获抗体直接结合 PCT96-106 氨基酸残基即未成熟 CT:CCP-1 部分,另一作为示踪抗体直接结合 PCT70-76 氨基酸残基,即未成熟 CT 分子,人工合成的 PCT 作为标准。该方法比较特异无交叉反应,其检测最低为 $10\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$,标准曲线线性范围为 $10-60\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。批内、批间变异系数分别为 7% 和 8%。该法已有商品试剂,所需时间较短,易自动化,但该法不能检测到正常人血清中 PCT。

[0010] RIA 使用一种对人工合成的 aminoPCT 特异的多克隆抗体 RIB7。RIB7 直接作用 PCT 的 aminoPCT 部分,故 RIA 既能检测游离的 PCT,又能检测结合型的 PCT,也可检测降钙素基因相关前体(Pro-CGRP),此法可信的敏感度为 $4\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。线性范围 $10-77\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$,50% 的结合游离比为 $140\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$,该法能检测正常人血清 PCT,故较双抗夹心法敏感,另一优点是 RIA 与患者病程呈现正相关($r=0.47, p=0.071$)。但是 RIA 的缺点是所需时间较长。

发明内容

[0011] 针对现有技术中的问题,本发明提出了一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用,本发明所建立的用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒采用免疫比浊法,以乳胶增强免疫比浊法为测定原理可实现对降钙素原快速且准确的检测。

[0012] 为了达到上述目的,本发明所采用的技术手段为:

[0013] 本发明公开了一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒,其特征在于所述的试剂盒包括稀释液、胶乳制剂、空白液、校准品和质控品;其中所述的胶乳制剂中含有分别偶联了 PCT 单克隆抗体以及 PCT 多克隆抗体的不同粒径大小的羧基化的聚苯乙烯胶乳。

[0014] 在本发明中,优选的,偶联了 PCT 单克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的粒径为 76nm,偶联了 PCT 多克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的粒径的 187nm。

[0015] 在本发明中,优选的,所述的稀释液为含有 2M NaCl,2% (w/w)PEG20000,0.5% (w/w) BSA,0.1% (w/w) proclin-300 的 0.05M Tris-HCL 缓冲液, pH=8.4。

[0016] 在本发明中,优选的,所述的胶乳制剂是按照以下方法制备得到的:

[0017] (1) 羧基化的聚苯乙烯胶乳活化

[0018] 10mg/ml 的羧基化的聚苯乙烯胶乳 1ml 中加入 50mM, PH6.1MES 溶解的 1mg EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和 10mgNHS (N-羟基琥珀酰亚胺)混匀活化 60 分钟,离心 8000rpm 弃去上清,沉淀用 PH7.4 的 50mM PBS 重悬;按照上述方法分别制备得到了粒径为 76nm 和 187nm 活化后的羧基化的聚苯乙烯胶乳;

[0019] (2) 偶联了 PCT 单克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

[0020] 将 1mg PCT 单克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 76nm 胶乳溶液中,室温

混匀 2-4 小时, 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 收集上清液备用, 加入含有 5mg BSA 的 50mM PBS, 室温混匀 1-2 小时; 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀中加入 5ml 50mM 的甘氨酸, 充分混匀 30min; 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

[0021] (3) 偶联了 PCT 多克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

[0022] 将 0.5mg PCT 多克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 187nm 的胶乳溶液中, 室温混匀 2-4 小时, 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 收集上清液备用, 加入含有 2.5mg BSA 的 50mM PBS, 室温混匀 1-2 小时; 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀中加入 5ml 50mM 的甘氨酸, 充分混匀 30min; 2-8°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

[0023] (4) 将两种胶乳溶液进行混合。

[0024] 在本发明中, 优选的, 步骤(4)中, 是将两种粒径的胶乳试剂进行体积比 1:1 混合, 充分混匀后备用。

[0025] 在本发明中, 优选的, 所述的缓冲液为含有 1% (w/w) BSA, 0.05% (v/v) 吐温, 0.1% (w/w) 海藻糖、0.1g/L 羧甲基纤维素钠, 0.1% (w/w) NaN₃ 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液, pH=7.4。

[0026] 本发明在胶乳试剂中加入羧甲基纤维素钠, 增加了胶乳分散性, 加入海藻糖, 增加胶乳的蛋白稳定性。

[0027] 在本发明中, 优选的, 所述的空白液为 0.05M PBS 磷酸缓冲液。

[0028] 在本发明中, 优选的, 所述的校准品包括降钙素原浓度分别为 0、0.1、0.5、2.5、10、30 μ g/L 的校准品。

[0029] 在本发明中, 优选的, 所述的质控品中降钙素原的浓度为 0.21-0.29 μ g/L。

[0030] 更进一步的, 本发明提出了所述的试剂盒在制备检测降钙素原试剂中的应用。

[0031] 本发明试剂盒的使用方法:

[0032] 采用免疫比浊法, 以乳胶增强免疫比浊法为测定原理。样品中的 PCT 与标记了 PCT 抗体的乳胶颗粒发生特异性的抗原抗体反应, 形成免疫复合物, 从而引起吸光度的变化。此吸光度的变化与样品中的 PCT 浓度呈正比。用已知浓度的 PCT 校准品制作工作曲线, 从该曲线上即可计算出样品中的 PCT 含量。

附图说明

[0033] 图 1 为使用本发明的校准品制备得到的标准曲线。

具体实施方式

[0034] 下面通过实验并结合实施例对本发明做进一步说明, 应该理解的是, 这些实施例仅用于例证的目的, 决不限本发明的保护范围。本领域普通技术人员理解, 在本发明权利要求所限定的精神和范围内可对其进行许多改变, 修改, 甚至等效变更, 但都将落入本发明的保护范围内。

[0035] 本发明实施例所涉及主要材料及试剂的购买来源:

[0036] PCT 抗原、抗体均购自杭州启泰生物;

[0037] EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、

proclin-300 购自 SIMGA ;

[0038] 聚苯乙烯胶乳购自美国 Bangs ;

[0039] 其他的无机盐试剂及 PEG20000, 羧甲基纤维素钠等均购自国药试剂。

[0040] 实施例 1 本发明的一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备

[0041] 1、试剂配置

[0042] 1.1、稀释液 R1 配制

[0043] 配方 :0.05M Tris-HCl 缓冲液, 含有 2M NaCl, 2% (w/w)PEG20000, 5% (w/w)BSA, 0.1% (w/w) proclin-300, pH=8.4

[0044] 1.2、胶乳试剂 R2 的配制

[0045] (1) 羧基化的聚苯乙烯胶乳活化

[0046] 10mg/ml 的羧基化的聚苯乙烯胶乳 1ml 中加入 50mM, PH6.1MES 溶解的 1mg EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 10mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 混匀活化 60 分钟, 离心 8000rpm 弃去上清, 并用 50mM PBS 重悬; 按照上述方法分别制备得到了粒径为 76nm 和 187nm 活化后的羧基化的聚苯乙烯胶乳;

[0047] (2) 偶联了 PCT 单克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

[0048] 将 1mg PCT 单克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 76nm 胶乳溶液中, 室温混匀 4 小时, 4°C 8000rpm 离心 15min, 收集上清液备用, 加入含有 5mg BSA 的 50mM PBS, 室温混匀 2 小时; 4°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀中加入 5ml 50mM 的甘氨酸, 充分混匀 30min; 4°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

[0049] (3) 偶联了 PCT 多克隆抗体的羧基化的聚苯乙烯胶乳的制备

[0050] 将 0.5mg PCT 多克隆抗体加入 2ml 浓度为 10mg/ml 的粒径为 187nm 的胶乳溶液中, 室温混匀 4 小时, 4°C 8000rpm 离心 15min, 收集上清液备用, 加入含有 2.5mgBSA 的 50mM PBS, 室温混匀 2 小时; 4°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀中加入 5ml 50mM 的甘氨酸, 充分混匀 30min; 4°C 8000rpm 离心 15min, 弃掉上清液, 沉淀使用 5ml Tris-HCl 缓冲液复融胶乳;

[0051] 所述的缓冲液为含有 1% (w/w)BSA, 0.05% (v/v)吐温, 0.1% (w/w)海藻糖、0.1g/L 羧甲基纤维素钠, 0.1% (w/w) NaN₃ 的 0.05M Tris-HCL 缓冲液, pH=7.4。

[0052] (4) 将两种粒径的胶乳试剂进行体积比 1 : 1 混合, 充分混匀后备用。

[0053] 1.3、标准品稀释液的配制

[0054] 0.05M PBS 缓冲液

[0055] 1.4、标准品的配制

[0056] 以进口的罗氏公司降钙素原标准品为基准, 使用混合后的胶乳试剂连续测试 20 次后取平均值, 然后使用标准品稀释液稀释人降钙素原重组蛋白(购自杭州启泰生物) 与罗氏公司标准品一致。

[0057] 1.5、校准品及质控品配制

[0058] 取大小合适的容器 7 个, 使用标准稀释液稀释含有人降钙素原重组蛋白的标准品配制浓度点依次为 0、0.1、0.5、2.5、10、30 μ g/L 的校准品各点, 以及人降钙素原重组蛋白浓度为 0.21-0.29 μ g/L 的质控品, 各浓度点要使依次加入的原料浓溶液混匀。

[0059] 质控品的目的: 在校准完成以后, 首先测试质控品, 其浓度应在标示的范围之内,

如超出则认为试剂盒定标不成功或者试剂盒失效。

[0060] 2、确定稀释倍数

[0061] 取抗体标记剩余上清液体分别用 OD260 和 OD280 测量其吸光度值,利用测量结果并根据一下公式计算剩余上清液中抗体的浓度和标记效率;最后根据标记抗体量确定稀释倍数。

[0062] 抗体浓度 = $1.45 * A_{280} - 0.74 * A_{260}$

[0063] 标记抗体量 = 标记总蛋白量 - 上清中蛋白量

[0064] 标记效率 = $(\text{标记总蛋白量} - \text{上清中蛋白量}) / \text{标记总蛋白量} * 100\%$

[0065] 通过测量计算出单克隆抗体标记量为 0.886mg,故标记效率为 88.6%;

[0066] 通过测量计算出多克隆抗体标记量为 0.459mg,故标记效率为 91.8%。

[0067] 3、胶乳颗粒稀释

[0068] 按照抗体过量原则,根据已定所需标记抗体浓度用缓冲液对标记的抗体进行稀释。对浓缩胶乳颗粒进行 1:8、1:9、1:10 三个比例进行稀释,分别测量配置完成的校准品,以线性最好且线性范围最大的稀释比例为最佳,通过检测选择的为 1:10 的比例进行稀释。

[0069] 4、分装

[0070] 将检测合格的胶乳微粒工作液进行分装,贴上标签后,置于 2~8℃ 保存。经检验合格后,将配制好的校准品和质控品分装到 1ml 塑料瓶中,1.0ml/瓶。本发明试剂盒的主要组成成份如表 1 所示:

[0071] 表 1 本发明试剂盒的主要组成成份

[0072]

组成	装量	主要成分
稀释液 R1	25mL/瓶	TRIS 缓冲液
胶乳试剂 R2	5mL/瓶	抗人 PCT 抗体的乳胶溶液
空白液	1mL/瓶	0.05M PBS 缓冲液
校准品	1mL/瓶 *6	降钙素原(PCT)抗原原料
质控品	1mL/瓶	降钙素原(PCT)抗原原料
说明书	1份	

[0073] 储存条件及有效期:试剂盒应在 2-8℃ 下干燥保存,贮存时避免重压并应防潮、避光、避热;有效期:12 个月。

[0074] 5、对本发明试剂盒的检测灵敏度和线性范围的测定

[0075] 分别使用本发明的复合胶乳试剂和单一粒径的胶乳试剂对 20 个样本中的降钙素原浓度进行了测定,其结果如下 2 所示:

[0076] 表 2

[0077]

样本编号	不同粒径胶乳测试样本数据 (ug/L)		
	76nm	187nm	76nm+187nm
低值样本 1	0.01	0.007	0.008
低值样本 2	0.046	0.03	0.033
低值样本 3	0.024	0.02	0.02
低值样本 4	0.04	0.03	0.034
低值样本 5	0.065	0.04	0.046
低值样本 6	0.03	0.01	0.012
低值样本 7	0.056	0.029	0.033
低值样本 8	0.044	0.028	0.031
低值样本 9	0.051	0.03	0.035
低值样本 10	0.032	0.015	0.018
高值样本 11	2.878	2.337	2.866
高值样本 12	9.56	8.50	9.387
高值样本 13	5.77	4.78	5.49
高值样本 14	8.39	7.66	8.14
高值样本 15	1.90	1.08	1.16
高值样本 16	9.03	7.86	8.46
高值样本 17	7.14	6.33	6.95
高值样本 18	1.88	1.43	1.69
高值样本 19	4.72	4.11	4.214
高值样本 20	8.65	8.08	8.525

[0078] 从表 2 数据可以看出,本发明的复合胶乳制剂既可以提高检测灵敏度,又可拓宽检测线性范围,可实现对降钙素原快速准确的检测。

[0079] 实施例 2 本发明所述的试剂盒在制备检测降钙素原试剂中的应用

[0080] 1、本发明试剂盒的使用方法：

[0081] 采用免疫比浊法,以乳胶增强免疫比浊法为测定原理。样品中的 PCT 与标记了 PCT 抗体的乳胶颗粒发生特异性的抗原抗体反应,形成免疫复合物,从而引起吸光度的变化,此吸光度的变化与样品中的 PCT 浓度呈正比。用已知浓度的 PCT 标准品制作工作曲线,从该曲线上即可计算出样品中的 PCT 含量,本发明的校准品制备得到的标准曲线如图 1 所示,在校准完成以后,首先测试质控品,其浓度在标示的范围(0.21-0.29 μ g/L)之内,试剂盒有效。

[0082] 2、适用仪器:东芝(TBA-40FR)、迪瑞(CS-T300)、劳拉(FAITH-1000)、奥林巴斯(AU-1000)、迈瑞(BS-200)、上海合意 CB178 血液分析仪等生化分析仪。

[0083] 3、样本要求:病人标本无需特殊处理,采用常规医用技术收集全血标本,离心分离后吸取血清用于检测。待测血清如在 24 小时之内使用,可于 2~8℃ 保存,若需长期存放应保存在 -20℃ 以下,并避免反复冻融。请不要使用严重溶血、脂血或黄疸标本。

[0084] 4、检验方法：

[0085] 4.1. 试剂配置:试剂开瓶即用,缓冲液及乳液试剂在测定前要充分混匀；

[0086] 4.2. 试验条件：

[0087] 血清标本:5ul

[0088] 稀释液 R1:160ul;胶乳试剂 R2:40ul;主波长:570nm;副波长:800nm;反应温度:37℃

[0089] 方法:先加入 R1 试剂 160 μ l,再加入血清样本 5 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟后加入 R2 试剂 40 μ l 读取 OD,反应 5 分钟后在主波长 570nm,副波长 800nm 下读取数据。

[0090] 4.3. 结果计算:以人降钙素原重组蛋白浓度分别为 0、0.1、0.5、2.5、10、30 μ g/L 的校准品做标准曲线,样品中的抗原浓度通过标准曲线读出。

[0091] 5、对典型病例进行诊断

[0092] 根据临床试验结果,结合文献研究,本发明试剂盒采用以下的诊断指标,本评价以 1-10X 作为评价细菌感染/脓毒症程度:

[0093] PCT 浓度 <0.05 μ g/L,为非重症患者,不建议使用抗生素,严重程度为 1X;

[0094] 0.05 μ g/L<PCT 浓度 <0.5 μ g/L,可能为局部细菌感染,发展成为全身感染(脓毒症)的风险很低,严重程度为 2-4X;

[0095] 0.5 μ g/L<PCT<2 μ g/L,很可能为全身感染(脓毒症),发展成为严重脓毒症的风险中等,严重程度为 5-6X;

[0096] 2 μ g/L<PCT<10 μ g/L 几乎可以确认为全身感染(脓毒症)发展成为重度全身感染的风险很高,严重程度为 8-9X;

[0097] PCT>10 μ g/L 重要的全身炎症应答几乎无一例外的是严重脓毒症或脓毒性休克,严重程度为 10X;

[0098] 根据上述诊断指标对以下典型病例进行了判定,其结果如表 3-表 6 所示:

[0099] 表 3 病例 1

[0100]

降钙素原 (PCT)	0.03 μ g/L
病人年龄	56 岁
<p>诊断意见: 正常</p> <p>1)无明显细菌/病毒感染</p> <p>2)不建议使用抗生素</p> <p>3)脓毒症危险指数 1X</p> <p>进一步观察及治疗的建议: 不建议进一步检查。</p> <p>其他检查结果: CRP: 0.9mg/L</p> <p>通过 CRP 和 PCT 结果证明患者无感染。</p>	

[0101] 表 4 病例 2

[0102]

降钙素原 (PCT)	0.23 ug/L
病人年龄	45 岁
<p>诊断意见:</p> <p>1)局部细菌/病毒感染</p> <p>2)不鼓励使用抗生素</p> <p>3)脓毒症危险指数 3X</p> <p>进一步观察及治疗的建议: 建议进一步检查。</p> <p>进一步检查结果: CRP: 5.8mg/L</p> <p>通过 CRP 和 PCT 结果证明患者确有感染。</p>	

[0103] 表 5 病例 3

[0104]

降钙素原 (PCT)	0.76ug/L
病人年龄	36 岁
<p>诊断意见:</p> <p>1)明显细菌/病毒感染</p> <p>2)建议使用抗生素</p> <p>3)脓毒症危险指数 6X</p> <p>进一步观察及治疗的建议: 建议进一步检查。</p> <p>进一步检查结果: CRP: 8.4mg/L</p> <p>通过 CRP 和 PCT 结果证明患者确有感染。</p>	

[0105] 表 6 病例 4

[0106]

降钙素原 (PCT)	1.15 ug/L
病人年龄	75 岁
<p>诊断意见:</p> <ol style="list-style-type: none">1)确认细菌/病毒感染2)强烈建议使用抗生素3)脓毒症危险指数 9X <p>进一步观察及治疗的建议: 建议 ICU。</p> <p>进一步检查结果: CRP: 19.8mg/L</p> <p>通过 CRP 和 PCT 结果证明患者确有感染。</p>	

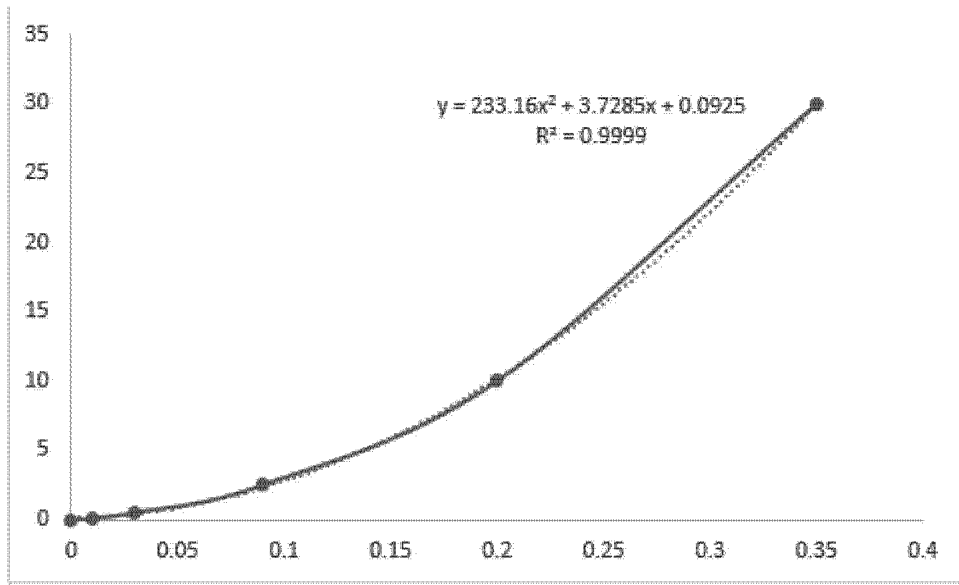


图 1

专利名称(译)	一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104237525A	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201310253612.7	申请日	2013-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京美康生物技术研究中心有限责任公司		
[标]发明人	金鑫 曾滨		
发明人	金鑫 曾滨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/82		
CPC分类号	G01N33/6812		
代理人(译)	孙皓晨		
其他公开文献	CN104237525B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒及其制备方法和应用,属于疾病的诊断和检测技术领域。本发明一种用于测定降钙素原的胶乳增强免疫比浊试剂盒,包括稀释液、胶乳制剂、空白液、校准品和质控品;其中所述的胶乳制剂中含有分别偶联了PCT单克隆抗体以及PCT多克隆抗体的不同粒径大小的羧基化的聚苯乙烯胶乳。使用本发明的方法分别对PCT单克隆抗体和PCT多克隆抗体进行标记后,得到的大粒径胶乳可以提高检测灵敏度,小粒径胶乳可以拓宽线性范围,因此,本发明的复合胶乳制剂既可以提高检测灵敏度,又可拓宽检测线性范围,对降钙素原的检测来说具有检测快速、敏感度高、特异性强和准确性好等优点。

PCT 单克隆抗体和 PCT 多克隆抗体			
粒径 (nm)	灵敏度 (pg/ml)	线性范围 (pg/ml)	特异性 (%)
1000	0.01	100	99.9
500	0.05	10	99.8
200	0.1	1	99.7
100	0.5	0.1	99.6
50	1.0	0.01	99.5
20	5.0	0.001	99.4
10	10.0	0.0001	99.3
5	50.0	0.00001	99.2
2	100.0	0.000001	99.1
1	500.0	0.0000001	99.0
0.5	1000.0	0.00000001	98.9
0.2	5000.0	0.000000001	98.8
0.1	10000.0	0.0000000001	98.7