



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103018456 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201210498784. 6

(22) 申请日 2012. 11. 29

(73) 专利权人 深圳市伯劳特生物制品有限公司
地址 518054 广东省深圳市南山区月亮湾大道 2076 号中国高科大厦六楼 A2

(72) 发明人 马伟民 张永顶 马新民

(74) 专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事务
所(普通合伙) 44285
代理人 唐华明

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 201886025 U, 2011. 06. 29,

CN 1811449 A, 2006. 08. 02,

CN 101617230 A, 2009. 12. 30,

鲁敏翔等. 胶体金法检测降钙素原诊断儿科感染性疾病的临床性能评价. 《武汉大学学报(医学版)》. 2012, 第 33 卷(第 6 期),

高红军等. 两种降钙素原检测方法的比较研究. 《医学检验》. 2011, 第 8 卷(第 32 期),

审查员 胡晓佳

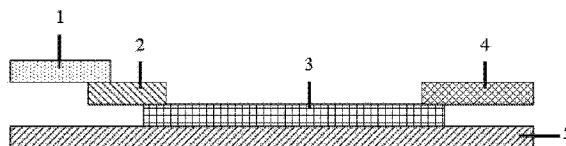
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

降钙素原检测试纸条及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种降钙素原检测试纸条及其制备方法。本发明所述降钙素原检测试纸包括依次设置的加样区、结合物释放区、反应区和吸水区;所述结合物释放区为包被量子点标记的降钙素原单克隆抗体的结合物释放垫;所述反应区为分为测试区和控制区,所述反应区为测试区包被降钙素原,控制区包被抗鼠 IgG 抗体的固体支持物。本发明所述降钙素原检测试纸以新型荧光染料量子点替代传统的胶体金,能够准确、定量、快速、灵敏的检测人血清中的降钙素原,并且所需仪器不同于以往检验科的大型昂贵仪器,只需一台小型的荧光定量分析仪即可,实现了实时检测。



1. 一种降钙素原检测试纸条,其特征在于,包括依次设置的加样区、结合物释放区、反应区和吸水区;所述结合物释放区为包被量子点标记的降钙素原单克隆抗体的结合物释放垫,所述量子点粒径为 5nm,激发波长为 365nm,发射波长为 605nm;所述反应区为分为测试区和控制区,所述反应区为测试区包被降钙素原,控制区包被抗鼠 IgG 抗体的固体支持物;所述量子点标记的降钙素原单克隆抗体的制备方法为向 1mL pH7.4、50mM 的磷酸盐缓冲液中加入 2 μ mol 量子点和 1mg 抗人降钙素原单克隆抗体,室温下温和振荡 2 小时,然后 12000r/min 离心 30min,取沉淀即得。

2. 根据权利要求 1 所述的降钙素原检测试纸条,其特征在于,还包括背衬,所述加样区、结合物释放区、反应区和吸水区依次相互搭接的粘贴在背衬上。

3. 根据权利要求 1 所述的降钙素原检测试纸条,其特征在于,所述结合物释放垫为玻璃纤维素膜。

4. 根据权利要求 1 所述的降钙素原检测试纸条,其特征在于,所述固体支持物为硝酸纤维素膜。

5. 权利要求 1-4 任意一项所述降钙素原检测试纸条的制备方法,其特征在于,包括:

步骤 1:将量子点标记的降钙素原单克隆抗体喷涂在结合物释放垫上获得结合物释放区;所述量子点粒径为 5nm,激发波长为 365nm,发射波长为 605nm;所述量子点标记的降钙素原单克隆抗体的制备方法为向 1mL pH7.4、50mM 的磷酸盐缓冲液中加入 2 μ mol 量子点和 1mg 抗人降钙素原单克隆抗体,室温下温和振荡 2 小时,然后 12000r/min 离心 30min,取沉淀即得;

步骤 2:将降钙素原和抗鼠 IgG 抗体喷涂在反应区的固体支持物上,分别形成测试区、控制区获得反应区;

步骤 3:将加样区、结合物释放区、反应区和吸水区依次相互搭接的粘贴在背衬上即得。

降钙素原检测试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及降钙素原检测试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 是降钙素的前体,主要在甲状腺滤泡旁细胞内合成,是由 116 个氨基酸组成的糖蛋白,分子量大约 13KD。它可以在酶的作用下逐步裂解成 57 个氨基酸的氨基 PCT,32 个氨基酸的 CT 和 21 个氨基酸的降钙蛋白。降钙素原是 11 号染色体上降钙素 I 基因 (CAI C-I) 的表达产物,在不存在感染的情况下,甲状腺外 CALC-I 表达被抑制,而主要局限于甲状腺和肺的神经内分泌细胞有一定程度的表达,在细菌感染时可诱导全身各种组织多种类型细胞 CALC-I 表达和 PCT 连续性释放。降钙素原的生成非常快,内毒素刺激反应 2h~6h 之内即升高 (正常人血浆中的 PCT 浓度 $<0.15 \mu\text{g/L}$), PCT 值的下降取决于其在血浆中的衰减和新生成的 PCT 间的平衡, PCT 的半衰期大约为 20h~24h,在败血症休克患者中,血浆 PCT 不断产生,并保持高值,已经报告在败血症休克恢复的患者中, PCT 血浆浓度平均 2.4 天降到初始浓度的 50%,而在最终死亡的患者中 PCT 升高的水平持续达 27 天。

[0003] 近年大量研究结果显示,PCT 这个指标能够诊断性地区分细菌感染与病毒感染。这为微生物检测的选择提供了依据,在降低资源浪费的同时可快速明确病原学诊断,为抢救病人提供了宝贵的时间,提高了治疗效果。

[0004] 目前检测 PCT 的方法有很多种,除过去使用费时不易自动化的凝胶层分析法和高效液相色谱分析法外,现今检测 PCT 较特异、敏感的方法有:酶联免疫吸附法,放射免疫法、免疫荧光法和胶体金免疫层析法。

[0005] 酶联免疫吸附法是利用两种鼠单克隆抗体双抗体夹心法原理检测血清中 PCT,方法较特异,无交叉反应。但是酶联免疫吸附法检测敏感性低,最低限为仅 $10 \mu\text{g/L}$,正常人血清中 PCT 浓度不能检出。

[0006] 放射免疫法使用由人体合成的 57 个氨基酸部分制成 R2B7 特异多克隆抗体, R2B7 直接作用 PCT 的 57 个氨基酸部分,既能检测游离型 PCT,又能检测结合型 PCT,检测灵敏度高,最低限为 4pg/L 。但放射免疫法检测所需时间较长,通常需要数小时,且放射性元素的污染限制了此方法的应用。

[0007] 免疫荧光法是一种定量的免疫荧光检测方法,两种鼠单克隆抗体与 PCT 抗原的两个不同的结合位点结合,一种抗体经荧光标记 (示踪剂),另一种固定在试管壁,抗体与血清中的 PCT 分子反应形成“夹心复合物”,荧光标记抗体被缚在试管壁上,通过发光试剂记数荧光标志物的含量,荧光信号的强度与标本 PCT 浓度成正比,同时测定标准品,根据已知抗原浓度的 PCT 制成标准曲线后,以定量得到标本的 PCT 浓度,此方法敏感性与放射免疫法相似。但是免疫荧光法需要配备昂贵的免疫荧光检测仪。

[0008] 胶体金免疫层析法主要是应用一个单克隆鼠抗降钙素原抗体结合在胶体金上 (示踪物) 和一个多克隆羊抗 - 降钙素原抗体 (固相),病人标本加到反应孔后,示踪物

结合样品中的 PCT 并形成明显的抗原抗体复合物,该复合物经虹吸作用通过观察区,在这里标记的抗原抗体复合物结合到同定的抗降钙素原抗体上形成夹心复合物。当 PCT 浓度 $\geq 0.5 \mu\text{g/L}$ 时,夹心复合物呈红色带,颜色深浅与样品中的 PCT 浓度成正比例,未结合的示踪物扩散到对照区,结合并产生了红色的对照带。胶体金免疫层析法快速简单,但是仅能半定量检测。

发明内容

[0009] 有鉴于此,本发明提供一种快速、准确、可定量的检测人血清中的降钙素原的原检测试纸条及其制备方法。

[0010] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0011] 一种降钙素原检测试纸条,包括依次设置的加样区、结合物释放区、反应区和吸水区;所述结合物释放区为包被量子点标记的降钙素原单克隆抗体的结合物释放垫;所述反应区为分为测试区(T区)和控制区(C区),所述反应区为测试区包被降钙素原,控制区包被抗鼠 IgG 抗体的固体支持物。

[0012] 本发明所述降钙素原检测试纸条将包被有量子点标记的降钙素原单克隆抗体结合物释放区与包被有降钙素原的测试区(T区)连接在一起,利用量子点免疫层析法竞争性结合单抗原原理,即被检者血清的降钙素原与包被在支持物上的降钙素原竞争性结合降钙素原单克隆抗体的原理,通过检测被激发的量子点的荧光强度,定量检测人血清中的降钙素原。

[0013] 当血清中不存在降钙素原时,量子点标记的降钙素原单克隆抗体由于毛细管作用沿着结合物释放垫移动至测试区,与该测试区包被在固体支持物上的降钙素原结合,经激发后产生强的荧光信号;当血清中存在高浓度降钙素原时,量子点标记的降钙素原单克隆抗体首先与血清中的降钙素原结合,仅有少量的量子点标记的降钙素原单克隆抗体会受毛细管作用沿着结合物释放垫移动至测试区,与测试区的降钙素原结合,经激发后只能产生弱的荧光信号。根据荧光强度的大小,可定量判断人血清中的降钙素原浓度。

[0014] 而控制区(C区)包被抗鼠 IgG 抗体,量子点标记的降钙素原单克隆抗体(鼠 IgG)与包被的抗鼠 IgG 抗体结合产生荧光信号,可判断试纸条及检测结果是否有效。如果控制区不产生荧光信号,则说明试纸条失效。

[0015] 进一步的,本发明所述降钙素原检测试纸条还包括背衬,所述加样区、结合物释放区、反应区和吸水区依次相互搭接的粘贴在背衬上。

[0016] 由于降钙素原的浓度最终由被激发的信号扩增物量子点的荧光强度来决定,因此降钙素原单克隆抗体扮演了连接量子点和降钙素原这两种物质的重要角色,既能与量子点结合,又能与降钙素原结合,其中降钙素原单克隆抗体与降钙素原结合是一个自发的过程,而降钙素原单克隆抗体与量子点的结合需要人为的促进。生产的一个重要步骤就是量子点标记降钙素原单克隆抗体。标记了量子点的降钙素原单克隆抗体必须性能稳定,溶于缓冲液后无沉淀、无游离的量子点。

[0017] 其中,作为优选,本发明所述量子点标记的降钙素原单克隆抗体的制备方法为向 1mL pH7.4、50mM 的磷酸盐缓冲液中加入 $2 \mu\text{mol}$ 量子点和 1mg 抗人降钙素原单克隆抗体,室温下温和振荡 2 小时,然后 12000r/min 离心 30min,取沉淀即得。

[0018] 其中,所述抗人降钙素原单克隆抗体、降钙素原和抗鼠 IgG 抗体是本领域技术人员公知的,可以通过商业途径获得或通过现有技术中公开的方法制备得到。

[0019] 作为信号扩增物的量子点是试纸条定量检测中的重点。量子点的大小、均一度、稳定性都会影响产品的最后读数。作为优选,本发明所述降钙素原检测试纸条中,所述量子点粒径为 5nm,激发波长为 365nm,发射波长为 605nm。

[0020] 作为优选,所述结合物释放垫为玻璃纤维素膜。

[0021] 在本发明中,反应区的固体支持物承载了产品的毛细管运动,选择合适的固体支持物有助于提高产品的灵敏度。作为优选,本发明所述降钙素原检测试纸条中,所述固体支持物为硝酸纤维素膜。

[0022] 本发明所述加样区和吸水区为具有吸收功能的材料,优选为吸水纸。

[0023] 本发明所述背衬支持加样区、结合物释放区、反应区和吸水区粘结固定。所述背衬优选为 PVC 板。

[0024] 本发明还提供了所述降钙素原检测试纸条的制备方法,包括

[0025] 步骤 1 :将量子点标记的降钙素原单克隆抗体喷涂在结合物释放垫上获得结合物释放区 ;

[0026] 步骤 2 :将降钙素原和抗鼠 IgG 抗体喷涂在反应区的固体支持物上,分别形成测试区、控制区获得反应区 ;

[0027] 步骤 3 :将加样区、结合物释放区、反应区和吸水区依次相互搭接的粘贴在背衬上即得。

[0028] 在一些实施例中,所述将量子点标记的降钙素原单克隆抗体喷涂在结合物释放垫上获得结合物释放区的具体步骤为将 0.1mg/mL 量子点标记的降钙素原单克隆抗体按每平方米 65 μ L 的量均匀喷涂于玻璃纤维素膜上,冷冻干燥即得。

[0029] 在一些实施例中,所述将降钙素原喷涂在反应区的固体支持物上形成测试区的具体步骤为将 0.1mg/mL 降钙素原 10 μ L 喷涂在反应区的硝基纤维素膜上,置冷冻干燥即得。

[0030] 在一些实施例中,所述将抗鼠 IgG 抗体喷涂在反应区的固体支持物上形成控制区的具体步骤为将 0.1mg/mL 抗鼠 IgG 抗体 10 μ L 喷涂在反应区的硝基纤维素膜上,置冷冻干燥即得。

[0031] 本发明还提供了基于本发明提供的降钙素原检测试纸条的非用于疾病诊断和治疗目的的检测方法,包括如下步骤 :

[0032] 取一定浓度梯度的降钙素原标准品各 100 μ L,将本发明所述试纸条加样区置入标准品中待渗入,室温放置 10min。将检测试纸条插入专用荧光定量检测仪读取试纸条降钙素原含量,根据降钙素原的浓度及相应的荧光强度,绘制标准曲线 ;

[0033] 取待检样品 100 μ L,将本发明所述试纸条加样区置入待检样品中待渗入,室温放置 10min。将检测试纸条插入专用荧光定量检测仪读取试纸条待检样品的荧光强度,根据标准曲线,获得待检样品中降钙素原含量。

[0034] 本发明所述降钙素原检测试纸包括依次设置的加样区、结合物释放区、反应区和吸水区 ;所述结合物释放区为包被量子点标记的降钙素原单克隆抗体的结合物释放垫 ;所述反应区为分为测试区和控制区,所述反应区为测试区包被降钙素原,控制区包被抗鼠 IgG 抗体的固体支持物。本发明所述降钙素原检测试纸条以新型荧光染料量子点替代传统的胶

体金,利用量子点免疫层析法竞争性结合单抗原检测人血清中的降钙素原。与传统的胶体金法相比,本发明所述试纸条不仅灵敏度提高数十倍,而且还可以定量检测,为临床诊断和治疗提供更加准确的依据。本试纸条所需仪器不同于以往检验科的大型昂贵仪器,只需一台小型的荧光定量分析仪即可,实现了实时检测,为各级医院和疾控中心对降钙素原定量诊断和流行病学调查提供了方便、快速的检测手段。

附图说明

[0035] 图 1 示本发明所述降钙素原检测试纸条的侧面示意图,其中 1:加样区,2:结合物释放区,3:反应区,4:吸水区,5:背衬;

[0036] 图 2 示本发明所述降钙素原检测试纸条的正面示意图,1:加样区,2:结合物释放区,4:吸水区,T:测试区,C:控制区。

具体实施方式

[0037] 本发明公开了一种降钙素原检测试纸条及其制备方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用程序进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0038] 本发明提供的一种降钙素原检测试纸条及其制备方法中所用生物材料及试剂均可由市场购得。

[0039] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0040] 实施例 1:结合物释放区的制备

[0041] 向 1mL pH7.4、50mM 的磷酸盐缓冲液中加入 $2\mu\text{mol}$ 粒径为 5nm,激发波长为 365nm,发射波长为 605nm 量子点和 1mg 抗人降钙素原单克隆抗体(购于深圳市伯劳特生物制品有限公司),室温下温和振荡 2 小时,然后 12000r/min 离心 30min,取沉淀即得量子点标记的降钙素原单克隆抗体。

[0042] 将量子点标记的降钙素原单克隆抗体经稳定剂处理后,按每平方厘米 $65\mu\text{L}$ 的量均匀喷涂于玻璃纤维素膜上,冷冻干燥即得结合物释放区。

[0043] 实施例 2:反应区的制备

[0044] 将 1mg/mL 降钙素原 $10\mu\text{L}$ 喷涂在反应区的硝基纤维素膜上,置冷冻干燥即得测试区。

[0045] 将 1mg/mL 抗鼠 IgG 抗体(购于深圳市伯劳特生物制品有限公司) $10\mu\text{L}$ 喷涂在反应区的硝基纤维素膜上,置冷冻干燥即得控制区。

[0046] 实施例 3:试纸条的制备

[0047] 将加样区、实施例 1 制得的结合物释放区、实施例 2 制得的反应区和吸水区依次相互搭接的粘贴在背衬上即得。

[0048] 实施例 4:基于本发明提供的试纸条的检测方法与免疫荧光法 PCT 定量法的比较

[0049] 1、对试剂:免疫荧光法 PCT 定量检测试剂盒购自深圳新产业生物医学工程有限公司;

[0050] 2、临床标本：136例发热病人标本来源于北京大学深圳医院传染科患者。静脉取血3毫升分离血清-80℃保存，待检。

[0051] 3、实验方法：

[0052] 免疫荧光法定量PCT检测：严格按照厂家试剂盒标准操作规程进行试验。标准品、质控品、标本各加20μL，然后加发光物标记抗体20μL，加荧光素标记抗体20μL，混匀，37℃水浴15min；加磁分离试剂40μL，混匀，37℃水浴5min，上磁分离器分离4min，倒去上清；加应用洗涤液400μL，混匀，上磁分离器分离4min，倒去上清；重复一次洗涤过程；直接按要求上机测试。PCT浓度与相对光强度(RLM)成一定的比例关系，仪器自动拟合计算PCT浓度。

[0053] 本发明(量子点免疫层析法)：

[0054] 取浓度为0.2μg/L、0.4μg/L、0.8μg/L、1.6μg/L和3.2μg/L的降钙素原标准品各100μL，加入本发明实施例1制备的试纸条的加样区待渗入，室温放置10min。将试纸条插入专用荧光定量检测仪读取降钙素原含量，根据降钙素原的浓度及相应的荧光强度，绘制标准曲线；

[0055] 取待检样品100μL，加入取本发明实施例1制备的试纸条的加样区待渗入，室温放置10min。将试纸条插入专用荧光定量检测仪读取待检样品的荧光强度，根据标准曲线，获得待检样品中降钙素原含量。

[0056] 结果数据：比较了两种不同方法的检测PCT结果，若以血清降钙素原 $\geq 0.5\mu\text{g/L}$ 为阳性阈值，检测136例发热患者，免疫荧光法有89例阳性，量子点免疫层析法有86例阳性。卡方检验结果见表1。

[0057] 表1 量子点免疫层析法和免疫荧光法检测136例发热患者PCT结果比较

[0058]

| 组别 | 免疫荧光法(+) | 免疫荧光法(-) | 合计 |
|-------------|----------|----------|-----|
| 量子点免疫层析法(+) | 85 | 1 | 86 |
| 量子点免疫层析法(-) | 4 | 46 | 50 |
| 合计 | 89 | 47 | 136 |

[0059] 由表1结果可见，以免疫荧光法为标准，量子点免疫层析法检测血清降钙素原的敏感度95.5%，特异度97.8%，阳性预测值98.8%，阴性预测值92.0%，准确度96.3%。

[0060] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

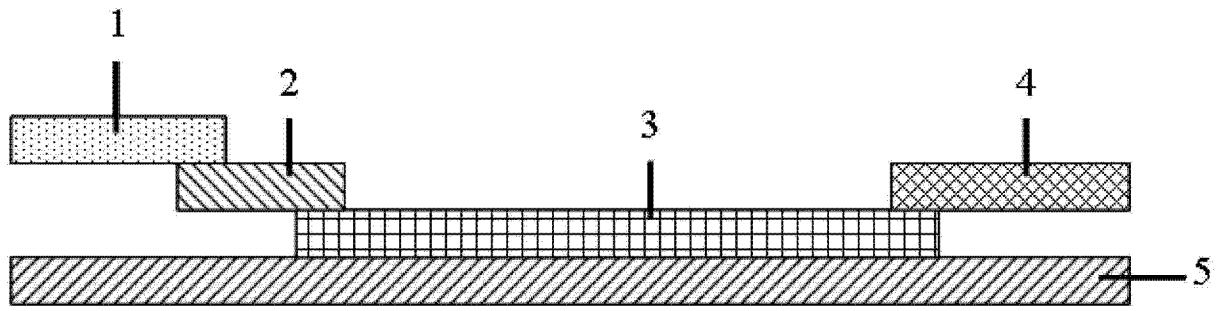


图 1

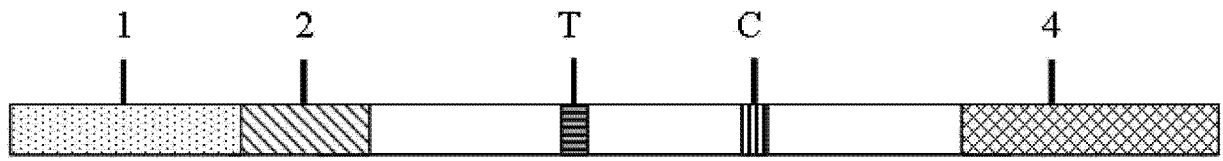


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 降钙素原检测试纸条及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103018456B | 公开(公告)日 | 2014-10-01 |
| 申请号 | CN201210498784.6 | 申请日 | 2012-11-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳市伯劳特生物制品有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 深圳市伯劳特生物制品有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 深圳市伯劳特生物制品有限公司 | | |
| [标]发明人 | 马伟民 张永顶 马新民 | | |
| 发明人 | 马伟民 张永顶 马新民 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/533 | | |
| 代理人(译) | 唐华明 | | |
| 审查员(译) | 胡晓佳 | | |
| 其他公开文献 | CN103018456A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，公开了一种降钙素原检测试纸条及其制备方法。本发明所述降钙素原检测试纸包括依次设置的加样区、结合物释放区、反应区和吸水区；所述结合物释放区为包被量子点标记的降钙素原单克隆抗体的结合物释放垫；所述反应区为分为测试区和控制区，所述反应区为测试区包被降钙素原，控制区包被抗鼠IgG抗体的固体支持物。本发明所述降钙素原检测试纸以新型荧光染料量子点替代传统的胶体金，能够准确、定量、快速、灵敏的检测人血清中的降钙素原，并且所需仪器不同于以往检验科的大型昂贵仪器，只需一台小型的荧光定量分析仪即可，实现了实时检测。

