



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102305858 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201110210250. 4

CN 101937000 A, 2011. 01. 05,

(22) 申请日 2011. 07. 26

CN 101029897 A, 2007. 09. 05,

US 2011/0086831 A1, 2011. 04. 14,

(73) 专利权人 深圳市国赛生物技术有限公司

审查员 舒霏霏

地址 518067 广东省深圳市南山区蛇口工业
七路科技大厦辅楼 3 楼

(72) 发明人 陆春 郑筱雯 陈明锋

(74) 专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有
限公司 44223

代理人 江耀纯

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101639478 A, 2010. 02. 03,

CN 1892226 A, 2007. 01. 10,

CA 2328803 A1, 2001. 06. 22,

CN 101377490 A, 2009. 03. 04,

CN 101614742 A, 2009. 12. 30,

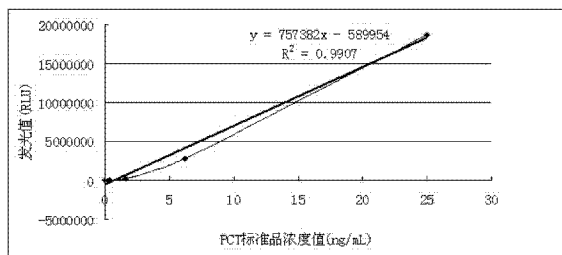
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测降钙素原的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种检测降钙素原的试剂盒,包括磁微粒分离试剂、PCT 检测抗体、酶结合物、以及发光底物;所述磁微粒分离试剂中磁微粒偶联的蛋白分子为羊抗鼠免疫球蛋白G;所述PCT 检测抗体为鼠抗 PCT 单克隆抗体;所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记羊抗 PCT 多克隆抗体。本发明具有检测灵敏度高、成本低的有益效果。



1. 一种检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:包括磁微粒分离试剂、PCT 检测抗体、酶结合物、以及发光底物;

所述磁微粒分离试剂中磁微粒偶联的蛋白分子为羊抗鼠免疫球蛋白 G;所述 PCT 检测抗体为鼠抗 PCT 单克隆抗体;所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记羊抗 PCT 多克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:所述发光底物为鲁米诺增强发光底物或异鲁米诺增强发光底物。

3. 根据权利要求 2 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:所述鲁米诺增强发光底物和所述异鲁米诺增强发光底物均包括 A 液和 B 液,所述鲁米诺增强发光底物的 A 液包括鲁米诺和增强剂,所述异鲁米诺增强发光底物的 A 液包括异鲁米诺和增强剂,所述鲁米诺增强发光底物和所述异鲁米诺增强发光底物的 B 液均包括氧化剂。

4. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:所述磁微粒分离试剂中磁微粒的大小为 $200\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$,磁微粒表面的活性基团为 COOH 或 NH_2 。

5. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:还包括 PCT 标准品。

6. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:还包括用于稀释所述酶结合物的酶稀释液,或者所述酶结合物溶解在酶稀释液中形成酶结合物工作液。

7. 根据权利要求 6 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:所述酶稀释液包括: 0.1mol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液、体积分数为 $0.2\% \sim 2.5\%$ 的 casein、体积分数为 $1\% \sim 10\%$ 的山羊血清、体积分数为 0.1% 的 Proclin300。

8. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:还包括用于制备磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体混合液的稀释液,或者所述磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体溶解在稀释液中形成磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体混合液。

9. 根据权利要求 1 所述的检测降钙素原的试剂盒,其特征在于:还包括洗涤缓冲液。

一种检测降钙素原的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及降钙素原的检测技术,特别是涉及一种检测降钙素原的试剂盒。

背景技术

[0002] 近些年来,对全身性感染的病理、生理过程有了更多了解,支持强化治疗也获得显著改善,但在非心脏重症监护病房中患者的首位死因仍然是全身性感染及其并发症。美国每年大约有 500000 例全身性感染患者,约 40% 最终死亡。因此,需要一种标记物能更有效地反映感染导致的炎症损伤程度。降钙素原 (procalcitonin, PCT) 是具有高灵敏度、特异性的新指标,它在细菌或真菌感染合并严重全身系统反应或器官低灌注时显著升高,而在病毒或局灶感染时水平正常或轻度升高。这个特性使得 PCT 用来鉴别系统感染和非感染性炎症或局灶感染。

[0003] 降钙素原 (Procalcitonin, PCT) 是人降钙素的前体物。降钙素原来自定位于第 11 号染色体上 (11p15.4) 的单拷贝基因,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 M_r 约 7600。转录后在甲状腺滤泡旁细胞粗面内质网内翻译成降钙素原前体 proprocalcitonin, 由 116 个氨基酸残基组成,包括 N 端 84 个氨基酸、活性降钙素 (CT, 32 肽) 和降钙蛋白 (katalcalcin, 21 肽) 三部分, PCT 的相对分子量为 13KD。在正常情况下,具有激素活性的降钙素是在甲状腺滤泡旁细胞产生与分泌,并由细胞内特殊蛋白酶分解 PCT 成降钙素。

[0004] 正常健康人体内 PCT 水平很低 ($<0.05\text{ng/mL}$)。血清 PCT 浓度 $\leq 0.5\text{ng/mL}$ 出现重症败血症和 / 或败血症休克的风险较低;血清 PCT 浓度 $\geq 2\text{ng/mL}$ 出现重症败血症和 / 或败血症休克的风险较高。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) 及其它炎性因子出现早,在感染 2h 出现升高,6h 急剧上升,8 ~ 24h 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。PCT 在血中半衰期为 22 ~ 29h,检测不受临床用药影响;是疗效观察和预后观察的重要指标。非细菌感染时血清 PCT 浓度不升高,因而可以鉴别二者。在脓毒血症的辅助和鉴别诊断方面,与其它炎症指标相比,PCT 被认为是目前最敏感和最特异的脓毒血症诊断指标。随着细菌耐药性、重症感染患者的增加,在快速诊断显得愈发重要。近年来发现,在全身严重细菌感染、败血症及多种器官功能失调综合征的辅助诊断方面,降钙素原 (PCT) 是一个具有高灵敏度、高特异性的新指标,不仅能早期鉴别细菌与非细菌感染,更是败血症的预警和诊断指标,且 PCT 与细菌感染的程度成正相关,因此越来越受到临床重视。

[0005] 目前,PCT 在临床中的应用主要有以下方面。

[0006] 1) 自身免疫性疾病与其他标记物如血沉、C 反应蛋白不同,炎症性疾病 (如红斑狼疮、结缔组织病、反应性关节炎和炎症性肠病) 活动期间 PCT 值无显著性变化。Tamaki 等检测 99 例系统性自身免疫病患者,细菌感染组的 PCT 水平显著高于免疫病活动组 (两组的 PCT 值分别为: 4.539 ± 9.677 和 0.116 ± 0.127 , $P < 0.001$), PCT 诊断细菌感染的准确性是

0.797, 敏感性 53.3%, 特异性 97.1%。PCT 不受自身免疫病活动影响, 仅在全身感染时显著升高, 因此 PCT 可用来鉴别自身免疫病活动与是否同时合并感染, 且它不受使用激素剂量和其他免疫抑制因素的影响。

[0007] 2) 器官移植的监测

[0008] Hammer 等对 78 例心脏或肺脏移植患者研究显示, 急性排异期 C 反应蛋白和白细胞计数升高, 而 PCT 无变化。合并全身细菌或真菌感染时 $PCT > 1ng/mL$, 因此 PCT 可用来鉴别急性排异反应与感染。病毒或局灶感染时 PCT 正常或轻微升高, $PCT < 1ng/mL$ 。肝脏移植后的急性排异反应并未影响术后的 PCT 值。肾脏移植后存在排异反应的患者与对照组间 PCT 值差异亦无显著性。PCT 浓度不受免疫抑制剂如硫唑嘌呤、环孢菌素和他克罗姆的影响, 口服激素以及急性排异期大剂量激素冲击治疗对 PCT 水平无影响。但使用鼠单克隆 CD3 单抗抗肾移植排异反应时 PCT 浓度升高, 类似细胞因子释放。CD3 单克隆抗体引起大量肿瘤坏死因子 α 释放, 肿瘤坏死因子 α 促进 PCT mRNA 表达。CD3 单克隆抗体治疗后 PCT 升高不提示合并感染。PCT 为器官移植术后鉴别急性排异反应与细菌、真菌及病毒感染提供了方法。

[0009] 3) 脓毒症

[0010] 脓毒症时一般 PCT 升高且 $> 2ng/mL$ 。Bernard 等研究显示粒细胞减少症者 $PCT > 0.5ng/mL$ 提示合并细菌感染, 全身真菌感染包括念珠菌和曲霉菌也引起 PCT 显著增加。通常 $PCT > 5ng/mL$ 提示重症感染, 包括免疫抑制患者如艾滋病人群, 高浓度的 PCT、特别是抗生素治疗后无下降者常提示预后不良。Schroder 等观察术后重症感染患者显示, C 反应蛋白在所有病例治疗后都保持高水平, 但 PCT 浓度在存活者中迅速下降、在死亡病例中处于高水平。PCT 可用来判断脓毒症和菌血症者抗生素治疗的有效性和临床情况是否改善。

[0011] 4) 急性胰腺炎

[0012] 由于胰腺炎并发感染坏死时需要外科手术治疗, 临床医师需要早期、准确判断病情。PCT 可以作为急性胰腺炎发生感染并发症的指标, 作出早期诊断, 并可以作为观察疗效的指标, 其升高程度反映全身炎症感染继发器官衰竭的严重性。急性水肿型胰腺炎和无菌性坏死胰腺炎 PCT 无显著变化, 胰腺感染坏死患者中 PCT 含量明显增加。PCT $\geq 1.8ng/mL$ 可预测感染坏死, 敏感性和特异性分别是 80% 和 93%。Rau 等对 61 例急性胰腺炎研究显示, 感染坏死性胰腺炎患者中 12 例死亡者术前 PCT 峰浓度高于 7 例存活者, 存活者 PCT 浓度在术后 1 ~ 3d 恢复至正常范围, 而死亡组 PCT 浓度持续升高, $PCT \geq 5.7ng/mL$ 预测死亡时敏感性和特异性分别是 93% 和 91%。PCT 是第 1 个与急性重症胰腺炎感染坏死在形态学和严重程度方面同时具有相关性的生化指标, 手术切除坏死组织 PCT 迅速下降提示外科治疗有效。

[0013] 目前市场常见的 PCT 检测方法有双抗体夹心法, 一株针对 PCT 的抗体包被反应管或板孔, 另一株抗体标记发光物质(如吖啶酯等), 与样本中的 PCT 形成夹心复合物, 发光物质在一定 PH 值下发光, 被检测器检测到发光信号。专利 CN101029897A 公开了一种检测降钙素原的试剂盒和方法, 该方法以两株针对 PCT 的单克隆抗体为基础, 一株抗体直接标记发光物质异鲁米诺, 另一株抗体标记 FITC (荧光素), 磁微粒偶联羊抗 FITC 抗体, 经过免疫反应, 形成磁微粒 - 羊抗 FITC 抗体 - FITC 抗体 - PCT - 发光标记抗体复合物, 在碱性环境下, 发光标记物发出光子, 被检测器检测到发光信号。

[0014] 现有检测方法或试剂盒存在以下缺点：

[0015] 1. 普通的板式或管式包被试剂,受限于包被面积的限制,无法包被更多抗体参与免疫反应,且反应过程是由液态向固态的扩散过程,免疫反应过程非常缓慢。该固定方式很难达到更高的分析灵敏度,并且无法实现快速检测。

[0016] 2. 现有方法基本都采用发光物质直接标记抗体(发光物质如吖啶酯,异鲁米诺类),直接标记容易造成发光物质的发光效率降低,且发光标记物稳定性差的问题。

[0017] 3. 现有的吖啶酯和异鲁米诺直接标记物都属于瞬间发光型,发光时间极短,需要复杂的原位检测机构,且较难保证结果的重复性,成本上也不具有优势。

[0018] 4. 专利 CN101029897A 所述方法还具有标记物过多,反应过程较复杂的缺点。

[0019] 5. 用针对 PCT 的单克隆抗体直接偶联磁微粒,另一株抗体标记酶或发光物质,从而形成双抗体夹心的复合结构。偶联方法是利用化学交联试剂将蛋白的 NH_2 (或 COOH) 基团与磁微粒表面的 COOH (或 NH_2) 基团共价结合,形成稳固结合物。但是不管是 COOH 偶联还是 NH_2 偶联,抗体与磁微粒的结合都是随机的,将可能存在抗体的 Fc 端偶联在磁微粒表面或者 Fab 端偶联在磁微粒表面两种形式,只有抗体的 Fc 端结合磁微粒,才能使 Fab 端的抗原结合位点参与下一步的免疫反应(Fab 端结合磁微粒,将阻碍其参与下一步的免疫反应,即这种方式偶联的抗体分子类似于无效抗体),理论上有近 50% 的抗体分子是属于无效抗体的,这样造成了昂贵的 PCT 单克隆抗体的浪费。并且从增加试剂分析灵敏度的角度考虑,通常采用更高浓度 PCT 单抗用于偶联磁微粒,增加磁微粒上包被抗体的密度,这也进一步增加了 PCT 单抗的浪费,明显增加了试剂成本。

发明内容

[0020] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种检测降钙素原的试剂盒以提高检测质量、降低检测成本。

[0021] 本发明的技术问题通过以下技术方案解决：

[0022] 一种检测降钙素原的试剂盒,包括磁微粒分离试剂、PCT 检测抗体、酶结合物、以及发光底物;所述磁微粒分离试剂中磁微粒偶联的蛋白分子为羊抗鼠免疫球蛋白 G (以下简称:羊抗鼠 IgG);所述 PCT 检测抗体为鼠抗 PCT 单克隆抗体;所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记羊抗 PCT 多克隆抗体。

[0023] 优选地,所述发光底物为鲁米诺增强发光底物或异鲁米诺增强发光底物。所述鲁米诺增强发光底物和所述异鲁米诺增强发光底物均包括 A 液和 B 液,所述鲁米诺增强发光底物的 A 液包括鲁米诺和增强剂,所述异鲁米诺增强发光底物的 A 液包括异鲁米诺和增强剂,所述鲁米诺增强发光底物和所述异鲁米诺增强发光底物的 B 液均为氧化剂。

[0024] 优选地,所述磁微粒分离试剂中磁微粒的大小为 $200\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$,磁微粒表面的活性基团为 COOH 或 NH_2 ,更优选择 COOH 。

[0025] 优选地,该试剂盒还包括 PCT 标准品。

[0026] 优选地,该试剂盒还包括用于稀释所述酶结合物的酶稀释液,或者所述酶结合物溶解在酶稀释液中形成酶结合物工作液,其中后者更加便于试剂盒的保存及使用。优选的酶稀释液的成分包括:0.1mol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液、体积分数为 0.2%~2.5% 的 casein、体积分数为 1%~10% 的山羊血清、体积分数为 0.1% 的 Proclin300。但本发明不局限于上

述成分的酶稀释液,本领域技术人员也可采用其他类似稀释液来实现本发明。

[0027] 优选地,该试剂盒还包括用于制备磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体混合液的稀释液,或者所述磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体溶解在稀释液中形成磁微粒分离试剂和 PCT 检测抗体混合液。

[0028] 本发明与现有技术相比的有益效果:本发明采用一种相对便宜的二抗(羊抗鼠免疫球蛋白 G)(成本仅为 PCT 单抗 1/5 ~ 1/15)偶联磁微粒, PCT 单克隆抗体结合二抗这种间接包被模式。这种模式明显的降低了 PCT 单抗的用量(用量减少为 PCT 单抗直接包被磁微粒的 1/10 ~ 1/20),明显的降低了成本。通过增加偶联磁微粒的羊抗鼠 IgG 的浓度,能够明显的提高检测灵敏度,而成本仅稍有增加。另外,与 PCT 单抗直接偶联磁微粒相比,由于采用间接包被的模式,增加了一级抗体反应,相当于延长了抗原抗体的反应臂,在一定程度上避免了抗体分子间空间位阻的影响,有利于被检测物与抗体分子的结合,也明显的改善了试剂的特异性。

附图说明

[0029] 图 1 为本发明具体实施例的试剂盒检测 PCT 浓度时的标准曲线及曲线方程示例图;

[0030] 图 2 为本发明具体实施例的试剂盒检测 PCT 浓度的结果与 Biomérieux PCT 试剂检测结果的相关性比较图。

具体实施方式

[0031] 下面对照附图并结合优选具体实施方式对本发明进行详细的阐述。

[0032] 一、试剂盒的制备

[0033] 1. 磁微粒分离试剂的制备

[0034] 本发明的磁微粒分离试剂为磁微粒偶联羊抗鼠 IgG,其制备方法如下:

[0035] 取 COOH 活性基团的磁微粒 5mg,置于磁分离器上 4min,弃去上清液;加入 0.1mol/mL PBS 缓冲液 3mL,吹打均匀,置于磁分离器上分离 4min,弃去上清液,重复洗涤 2 次。清洗完毕后,加入 10mg/mL 碳二亚胺溶液(EDC 溶液)(pH7.0)1500 μ L 活化磁微粒,吹打均匀后,置于振荡器上,反应 30min ~ 1h。然后加入羊抗鼠 IgG 进行偶联:向活化后的磁性微粒中加入 1mg/mL 羊抗鼠 IgG 溶液 600 μ L,置于振荡器上反应 3 ~ 6h;偶联完成后,加入 1mol/L 甘氨酸 3mL 封闭磁微粒表面的活性基团,混匀后,置于振荡器上反应 30min;加入 0.1mol/mL 磷酸盐吐温缓冲液(PBST)3mL,混合均匀,置于磁分离器上分离,弃去上清液,重复洗涤 2 次;最后加入含 0.1mol/mL 的 PBS、0.5%(体积分数)牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, 缩写词为 BSA)的保存液复溶磁微粒,使磁微粒的浓度为 1mg/mL,置于 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0036] 本发明也可采用 NH₂ 活性基团的磁微粒或其他活性基团,但优选采用 COOH 活性基团的磁微粒,磁微粒的大小优选 200nm ~ 10 μ m,在交联剂的作用下与羊抗鼠 IgG 一端的 NH₂ 基团形成酰胺键而共价结合,羊抗鼠 IgG 的另一端用于与 PCT 检测抗体结合。

[0037] 2. 酶结合物(辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗 PCT 多克隆抗体)的制备

[0038] 取 HRP5mg 溶于蒸馏水 0.5mL 中,加入 60mmol/L NaIO₄0.5mL,放置 4 $^{\circ}$ C,混合均匀,氧化 30min,然后加入 0.16mol/L 乙二醇 0.5mL,再置 4 $^{\circ}$ C 终止 30min。加入羊抗 PCT 多克

隆抗 5mg,用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液透析,4℃过夜,加 KBH_4 (5mg/mL) 0.3mL,置 4 度终止 3h。加等容积饱和硫酸铵,4 度沉淀 30min 后用 4000r/min 离心 15min。沉淀物用 PH7.4、0.02mol/L 的 PBS0.5mL 溶解,用 PBS 透析除铵。完成后负 20℃保存

[0039] 3. 磁微粒偶联抗体 (指步骤 1 制备得到的磁微粒偶联羊抗鼠 IgG) 和 PCT 检测抗体混合液的制备

[0040] (1) 磁微粒偶联抗体和 PCT 检测抗体稀释液的配置

[0041] 稀释液成分及含量如下:20mmol/L 的 PB 缓冲液 (PH7.4),体积分数的 1.5%BSA,体积分数 0.5% 的 Triton X-100,体积分数为 0.1% 的 Proclin300。

[0042] (2) 磁微粒偶联抗体和 PCT 检测抗体混合液的制备

[0043] 取制备好的磁微粒偶联抗体和 PCT 检测抗体按照棋盘滴定法,选定使用浓度,用所述稀释液对其进行稀释,最终确定的混合溶液中,磁微粒偶联抗体的使用浓度为 0.5mg/mL, PCT 检测抗体的使用浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0044] 4. 酶结合物工作液的制备

[0045] 酶稀释液的组成为:0.1mol/L 的 Tris-HCl 的缓冲液 (PH7.4),0.2 ~ 2.5%casein (中文名称为:酪蛋白),1 ~ 10% 山羊血清,0.1%Proclin300。通过棋盘滴定法,最终确定酶结合物的工作液稀释比例为 1:2000-5000,优选 1:2500。

[0046] 5. PCT 标准品的制备

[0047] 用马血清将 PCT 重组蛋白 (蛋白纯度 >95%) 稀释成标准品,稀释浓度为 0ng/mL,0.2ng/mL,0.4ng/mL,0.8ng/mL,6.25ng/mL,25ng/mL,用于制作标准曲线。

[0048] 6. 洗涤缓冲液的配置

[0049] 配置 2L 体积的洗涤液:用 102g 磷酸氢二钠 $\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、19.5g 磷酸二氢钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、310g 氯化钠,20mL Tween-20 用双蒸水定容至 2L 体积,加入 0.1% 防腐剂。临用前稀释 20 倍使用。

[0050] 7. 发光底物

[0051] 采用鲁米诺增强发光底物或异鲁米诺增强发光底物。鲁米诺增强发光底物和异鲁米诺增强发光底物均包括 A 液和 B 液,鲁米诺增强发光底物的 A 液包括鲁米诺和增强剂,异鲁米诺增强发光底物的 A 液包括异鲁米诺和增强剂,鲁米诺增强发光底物和异鲁米诺增强发光底物的 B 液均为氧化剂。临用前,将 A 液、B 液对半混合使用。

[0052] 二. 本发明试剂盒的使用方法

[0053] 1. 标本处理

[0054] 按照医学处理过程收集病人标本,低速离心全血标本,取上层血清进行检测。

[0055] 2. 检测方法

[0056] 1) 使用前,将酶结合物工作液,磁微粒偶联抗体和 PCT 检测抗体混合液, PCT 标准品和发光底物放到室温平衡至少半个小时。

[0057] 2) 可采用一步法检测或二步法检测,检测方法分别如下:

[0058] 二步法检测:

[0059] 准备好需要数量的反应管,在其中一个反应管中加入 50 μL 的血清样品、其他反应管中加入不同浓度的 PCT 标准品溶液,再分别在各反应管中加入 50 μL 的酶结合物工作液,振荡混合均匀,放置 37 度水浴中反应 20 分钟,然后加入 50 μL 的磁微粒偶联抗体和 PCT

检测抗体混合液,37 度水浴反应 10 分钟,磁性分离,弃去上层反应液体;于反应管中加入洗涤液 400 μ L,充分混合均匀,置于磁性分离器中,分离 3min,弃去洗涤液上清,洗涤液应充分去除干净,重复洗涤 5 次。然后加入 A 液、B 液混合后的反应底物 100 μ L,充分混合均匀,放入到化学发光检测仪,10 分钟后检测各管的发光强度值(RLU)。以 PCT 标准品的不同浓度值为横坐标,相应的浓度的 RLU 为纵坐标,按照线性拟合建立标准曲线,得出曲线方程;将待测血清的 RLU 值带入曲线方程,可计算出待测血清中 PCT 的浓度值。

[0060] 一步法检测:

[0061] 准备好需要数量的反应管,一个反应管中加入 50 μ L 的血清样品、其他反应管中加入不同浓度的 PCT 标准品溶液,再分别加入 100 μ L 的酶工作液,然后加入 60 μ L 的磁微粒偶联抗体和 PCT 检测抗体混合液,混合均匀,于 37 度水浴反应 40 分钟,磁性分离,弃去上层反应液体;于反应管中加入洗涤液 400 μ L,充分混合均匀,置于磁性分离器中,分离 3min,弃去洗涤液上清,洗涤液应充分去除干净,重复洗涤 5 次。然后加入 A 液、B 液混合后的反应底物 100 μ L,充分混合均匀,放入到化学发光检测仪,10 分钟后检测各管的发光强度值(RLU)。以 PCT 标准品的不同浓度值为横坐标,相应的浓度的 RLU 为纵坐标,按照线性拟合建立标准曲线,得出曲线方程;将待测血清的 RLU 值带入曲线方程,可计算出待测血清中 PCT 的浓度值。

[0062] 三. 本发明的方法学评价

[0063] 1. 准确性

[0064] 准确性测量是指用已知量 PCT 蛋白的标准品加入到正常人血清标本中,测量加入后浓度值与加入的理论值进行比较,计算 PCT 的回收率。检测结果如下:

[0065]

样本编号	加入 PCT 浓度 (ng/mL)	测量 PCT 的浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
1	4.0	3.86	96.5
2	40	40.53	101.33
3	120	118.7	98.9

[0066] 1. 精密性

[0067] 选取 3 份不同浓度的标本,分别按照本发明所述的方法重复测量 20 次。根据 20 次的测量结果,计算平均偏差 C.V. % 值。

[0068]

批内	批间
----	----

[0069]

平均值 (ng/mL)	CV值 (%)	次数	平均值 (ng/mL)	CV值 (%)	次数
1.52	5.98	20	2.54	6.23	20
9.20	4.4	20	12.56	7.41	20
29.7	3.96	20	40.53	8.5	20

[0070] 3. 分析灵敏度

[0071] 分析灵敏度的定义为：是指在统计学意义上能与零剂量区别的量。重复 20 次测量零剂量点，计算其平均值(X)和标准差(SD)，以 $X+2SD$ 的计算的浓度值即为该试剂盒的分析灵敏度。该试剂盒的分析灵敏度为 0.15ng/mL。

[0072] 4. 特异性

[0073] 与降钙素(CT)和其他容易产生交叉反应的物质的反应值均在允许的范围内。

[0074] 5. 相关性

[0075] 与 Biomérieux PCT 化学发光试剂盒的相关性为：

[0076] $Y=0.9035X+0.2164$

[0077] $R=0.9846$

[0078] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干等同替代或明显变型，而且性能或用途相同，都应当视为属于本发明的保护范围。

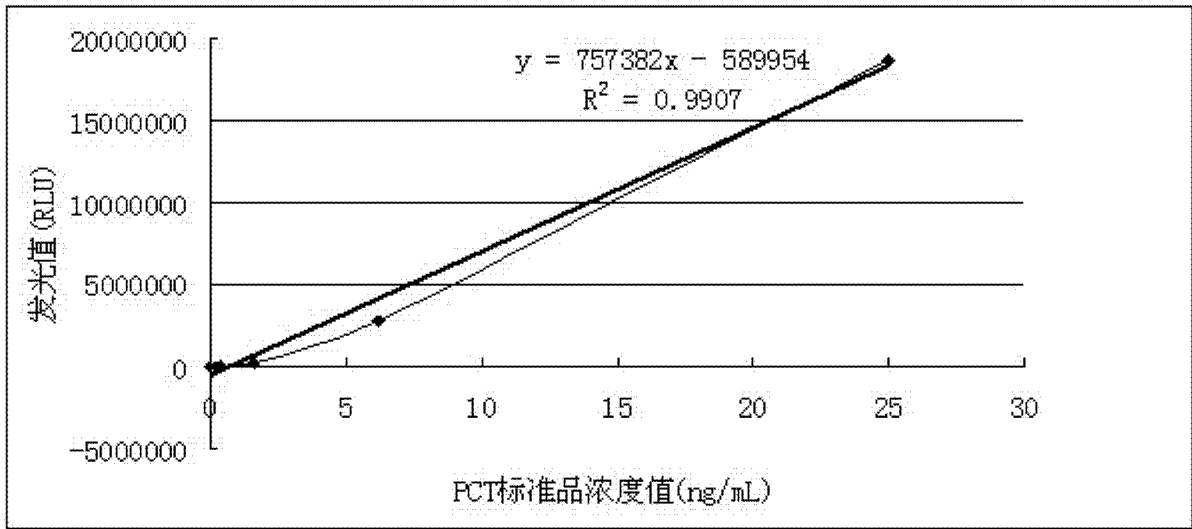


图 1

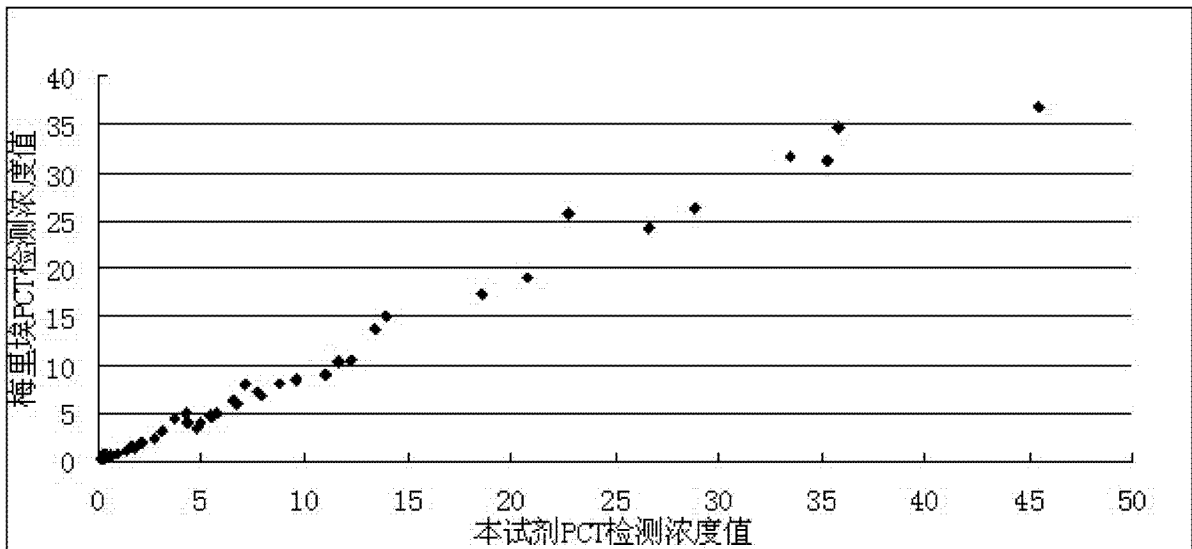


图 2

专利名称(译)	一种检测降钙素原的试剂盒		
公开(公告)号	CN102305858B	公开(公告)日	2013-08-21
申请号	CN201110210250.4	申请日	2011-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市国赛生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市国赛生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市国赛生物技术有限公司		
[标]发明人	陆春 郑筱雯 陈明锋		
发明人	陆春 郑筱雯 陈明锋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/535 G01N21/76		
其他公开文献	CN102305858A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测降钙素原的试剂盒，包括磁微粒分离试剂、PCT检测抗体、酶结合物、以及发光底物；所述磁微粒分离试剂中磁微粒偶联的蛋白分子为羊抗鼠免疫球蛋白G；所述PCT检测抗体为鼠抗PCT单克隆抗体；所述酶结合物为辣根过氧化物酶标记羊抗PCT多克隆抗体。本发明具有检测灵敏度高、成本低的有益效果。

