



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107490679 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201610401787.1

(22)申请日 2016.06.09

(71)申请人 常州博闻迪医药科技有限公司

地址 213025 江苏省常州市戚墅堰区东方
东路167号

(72)发明人 李亚星 刘凤鸣 刘冰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法

(57)摘要

本发明涉及免疫检测分析的技术领域,尤其是一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法,包含有唾液收集器、唾液、抗降钙素原抗体、酶标试剂和检测器。唾液收集器包括收集管、收集棒、收集刮片的一种或组合;抗降钙素原抗体为抗降钙素原单克隆抗体和抗降钙素原多克隆抗体的一种或组合;酶标试剂为含有所述酶标物质的液相和/或固相材料;检测器为酶联免疫检测器。以人体唾液为检测样本,可有效监测唾液中降钙素原,特异性强,重复性好,灵敏度高,操作简单,不需特殊仪器设备,不需专业培训,结果清晰易辨,易于推广,适合于现场检测。

1. 一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 包含有唾液收集器、唾液、抗降钙素原抗体、酶标试剂和检测器, 具有如下特征:

1) 所述唾液收集器包括收集管、收集棒、收集刮片的一种或组合;

2) 所述抗降钙素原抗体为抗降钙素原单克隆抗体和抗降钙素原多克隆抗体的一种或组合;

3) 所述酶标试剂为含有所述酶标物质的液相和/或固相材料;

4) 所述检测器为酶联免疫检测器。

2. 根据权利要求1所述的一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 其特征在于所述方法包括如下步骤:

步骤一, 制备降钙素原酶联免疫唾液标准品:

用pH=7.4, 20mmol/L的PBS缓冲液与胎牛血清按体积比3:1比例混合配制成基础缓冲液, 用基础缓冲液将降钙素原抗原稀释成浓度为10ng/mL、5ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0ng/ml标准品;

步骤二, 制备包被有降钙素原抗体的载体:

所述包被载体为微孔板, 包被载体通过以下方法制备: 降钙素原抗体用包被缓冲液稀释, 取待包被载体, 将经过稀释的降钙素原抗体负载于载体上, 包被结束后, 吸去包被缓冲液, 再加入封闭缓冲液, 置于37°C封闭2小时或4°C封闭过夜; 弃去封闭液, 室温18-25°C干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装, 得到降钙素原抗体包被载体, 所述包被缓冲液为pH为7.2~7.4、10mmol/L磷酸盐溶液, 降钙素原抗体的稀释浓度为1ug/mL; 稀释的降钙素原抗体在载体上的包被量可为每孔100u1; 包被的条件可置于37°C包被2小时或4°C包被过夜; 封闭缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L PBST溶液, 内含1%BSA及1~10%蔗糖; 封闭缓冲液的加入量可为每孔300u1; 封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%;

步骤三, 制备降钙素原抗体酶标记物:

酶标记抗体的制备方法为: 采用戊二醛交联法将降钙素原抗体与碱性磷酸酶偶联, 用pH为7.2、10mmol/L PBS缓冲液充分透析, 在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油, -20°C以下保存; 标记好的降钙素原抗体酶结合物可用20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度, 置于4°C保存至有效期, 胎牛血清稀释液为pH为7.4、20mmol/L PBST溶液, 内含20%胎牛血清、1~10%蔗糖、0.01%食品红;

步骤四, 制备分析缓冲液, 分析缓冲液为pH7.4、10mmol/L PBST缓冲液, 内含1%BSA、1%防腐剂;

步骤五, 制备浓缩洗涤液, 浓缩洗涤液为pH7.2-7.4、20mmol/L PBS缓冲液, 内含1%吐温。

3. 如权利要求2所述的唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 其特征在于, 所述包被载体为微孔板。

4. 如权利要求2所述的唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 其特征在于, 所述酶标物质为碱性磷酸酶。

5. 如权利要求2所述的唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 其特征在于, 所述显色液为四甲基苯胺。

6. 如权利要求2所述的唾液降钙素原酶联免疫检测方法, 其特征在于, 所述分析缓冲液

为含有1%牛血清白蛋白和0.05%吐温的10mM磷酸盐缓冲溶液,pH为7.2~7.4。

7.如权利要求2所述的唾液降钙素原酶联免疫检测方法,其特征在于,所述浓缩洗涤液为含有1%吐温的20mM磷酸盐缓冲溶液,pH为7.2~7.4。

一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,尤其涉及一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法。

背景技术

[0002] 降钙素原(PCT)是一种含116个氨基酸的无激素活性糖蛋白,分子量为13KD。其半衰期为25-30h。在生理情况下由甲状腺-C细胞产生,含量极少,在健康人群的血清或脑脊液中几乎不能被检出。据文献介绍,在细菌、真菌、寄生虫等感染性疾病并有全身和中枢神经系统炎症反应时,病菌的内毒素可促使甲状腺-C细胞、肝脏巨噬细胞和单核细胞、肺和肠道组织的淋巴细胞以及神经内分泌细胞等甲状腺以外的组织大量产生PCT,而导致其血清和脑脊液中的含量升高或持续性升高,且与感染的程度、进展或消退呈正相关。在病毒感染、慢性非生物性炎症、癌性发热、药热、自身免疫性疾病以及手术创伤患者的PCT水平却不增高或仅有轻度短暂性增高。其敏感度和特异性远高于传统的C-反应蛋白和外周血白细胞计数的检测,因而具有重要的临床诊断和鉴别诊断价值。

[0003] 目前检测PCT常用的实验室方法有放射免疫学分析法(RIA)、化学发光免疫分析法(CLIA)、胶体金比色法(GICA)和酶联免疫法(ELISA),众多血液样本PCT检测技术与产品已广泛应用于临床,这些产品取得了比较满意的准确率。但采用唾液进行PCT快速检测的产品还鲜有面市。

[0004] 其实,唾液与广泛应用于临床检测的血液(包括全血、血清与血浆)均是人体体液的一部分,都属于细胞外液,其大多数成分类似,尤其是临床检测中具有重大意义目标物质的出现时机具有一致性,只是含量存在一定差异。因而唾液被认为是人体健康状态的一面镜子,能反映出机体的各种内环境状态,例如癌症、感染、系统性疾病等。Challacombe的研究结果证实唾液中IgG可及时反映体内IgG的存在;Parry通过RIA及ELISA对唾液的特异性抗体水平进行研究表明:唾液中抗体含量虽远低于血清,IgA、IgG与IgM分别大约为血清含量的1/10、1/800、1/400,但已足够用于某些免疫学诊断。另外在临床中,于唾液中寻找诊断标志物是最理想的方法,因为收集唾液存在简单、方便、无创、经济、不会引起患者不安、操作者易于掌握等优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种简便、快捷、准确的唾液降钙素原酶联免疫检测方法,旨在解决酶联免疫分析技术在人唾液降钙素原免疫分析产品的应用方面仍是空白的问题。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法,包含有唾液收集器、唾液、抗降钙素原抗体、酶标试剂和检测器。所述唾液收集器包括收集管、收集棒、收集刮片的一种或组合;所述抗降钙素原抗体为抗降钙素原单克隆抗体和抗降钙素原多克隆抗体的一种或组合;所述酶标试剂为含有所述酶标物质的液相和/或固相材料;所述检测器为酶联免疫检测器。

[0007] 进一步的,所述的检测方法包括如下步骤:

步骤一,制备降钙素原标准品:

用pH7.4、20mmol/L PBS缓冲液与胎牛血清按体积比3:1比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将降钙素原重组抗原稀释成浓度为10ng/mL、5ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0ng/ml标准品;

步骤二,制备包被有降钙素原抗体的载体:

载体为微孔板,包被载体通过以下方法制备:降钙素原抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的降钙素原抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于37℃封闭2小时或4℃封闭过夜;弃去封闭液,室温18~25℃干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装,得到降钙素原抗体包被载体,所述包被缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L磷酸盐溶液,降钙素原抗体的稀释浓度为1ug/mL;稀释的降钙素原抗体在载体上的包被量可为每孔100ul;包被的条件可置于37℃包被2小时或4℃包被过夜;封闭缓冲液为pH7.2~7.4、10mmol/L PBST溶液,内含1%BSA及1~10%蔗糖;封闭缓冲液的加入量可为每孔300ul;封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%;

步骤三,制备降钙素原抗体酶标记物:

酶标记抗体的制备方法为:采用戊二醛交联法将降钙素原抗体与碱性磷酸酶偶联,用pH7.2、10mmol/L PBS缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油,-20℃以下保存;标记好的降钙素原抗体酶结合物可用20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,置于4℃保存至有效期,胎牛血清稀释液为pH7.4、20mmol/L PBST溶液,内含20%胎牛血清、1~10%蔗糖、0.01%食品红;

步骤四,制备分析缓冲液,分析缓冲液为pH7.4、10mmol/L PBST缓冲液,内含1%BSA;

步骤五,制备浓缩洗涤液,浓缩洗涤液为pH7.2~7.4、20mmol/L PBS缓冲液,内含1%吐温;

步骤六,组装唾液降钙素原酶联免疫检测试剂盒,将标准品、包被载体、酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液组装成降钙素原酶联免疫检测试剂盒。

[0008] 本发明提供的唾液降钙素原酶联免疫检测方法,采用双抗体夹心反应模式,可以对人唾液样本中的降钙素原分子进行专一的定量检测。具有灵敏度高、检测范围宽、稳定性好、操作简便快速无污染等优点。本发明与其他开放式全自动酶联免疫检测平台相结合,可以有效缩短检测时间,降低检测成本和人力花费。项目开发的产品市场前景广阔,经济和社会效益显著;与免疫比浊等方法相比较,本发明简化了操作步骤,缩短了检测时间、大大提高了测定的灵敏度和准确性。

[0009] 本发明使用的降钙素原抗体具有高度特异性,得到的唾液降钙素原酶联免疫检测试剂盒可以取代其他试剂盒来进行降钙素原的定量检测。与国外试剂盒相比,本发明试剂盒不仅价格低廉,而且操作简便,灵敏度高,便于在临床上大规模推广使用。

附图说明

[0010] 图1是降钙素原线性检测标准工作曲线图。

具体实施方式

[0011] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0012] 实施例1:唾液降钙素原酶联免疫检测试剂盒的制备

本发明实施例的唾液降钙素原酶联免疫检测试剂盒包括标准品、包被载体、碱性磷酸酶酶标记物、显色液、分析缓冲液及浓缩洗涤液;

其中:

1. 标准品用下述方法制成:用pH7.4、20mmol/L PBS缓冲液与胎牛血清按体积比3:1比例混合配制成基础缓冲液,用基础缓冲液将降钙素原抗原稀释成浓度为10ng/mL、5ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0ng/ml标准品;

2. 包被微孔板的制备步骤为:降钙素原抗体用包被缓冲液稀释,取待包被载体,将经过稀释的降钙素原抗体负载于载体上,包被结束后,吸去包被缓冲液,再加入封闭缓冲液,置于37℃封闭2小时或4℃封闭过夜;弃去封闭液,室温(18~25℃)干燥3~4小时后加入干燥剂密封包装,得到降钙素原抗体包被载体,所述包被缓冲液为pH7.2、10mmol/L磷酸盐溶液,所述降钙素原抗体的稀释浓度为1ug/mL;所述稀释的降钙素原抗体在载体上的包被量可为每孔100ul;所述包被的条件可置于37℃包被2小时或4℃包被过夜;所述封闭缓冲液为pH7.4、10mmol/L PBST溶液,内含1%BSA及1~10%蔗糖;所述封闭缓冲液的加入量可为每孔300ul;所述封闭后包被载体的干燥环境相对湿度小于30%;

3. 碱性磷酸酶标记抗体的制备方法为:采用戊二醛交联法将降钙素原抗体与碱性磷酸酶偶联,用pH7.2、10mmol/L PBS缓冲液充分透析,在透析后的结合物溶液中加入等体积的甘油,-20℃以下保存;标记好的降钙素原抗体酶结合物可用20%胎牛血清稀释液稀释至工作浓度,可置于4℃保存至有效期,所述胎牛血清稀释液为pH7.4、20mmol/L PBST溶液,内含20%胎牛血清、1%蔗糖、0.01%食品红;

4. 分析缓冲液的制备配方为:pH7.4、10mmol/L PBST缓冲液,内含1%BSA;

5. 浓缩洗涤液的制备配方为:pH7.4、20mmol/L PBS缓冲液,内含1%吐温;

6. 半成品及成品组成:上述步骤所得产品分装即为半成品,组装后即降钙素原酶联免疫检测试剂盒。

[0013] 实施例2:唾液降钙素原酶联免疫检测试剂盒的检测方式,包括以下步骤:

将唾液样本、分析缓冲液加到固相有降钙素原抗体的微孔板中,反应30min后,样本中的降钙素原与固相抗体特异性结合,洗去游离成分,加入酶标记物避光反应30min,被酶标记的降钙素原抗体与抗原、固相抗体形成“夹心”复合物,洗去游离成分,加入显色液,避光反应5min后测定各孔吸光值,其与其中的降钙素原抗原浓度正相关,样本浓度依据样本的OD值可进行定量计算;

实施例3:唾液降钙素原荧光免疫检测试剂盒的性能评估试验

1、标准曲线的制作

将降钙素原标准品用正常人唾液配制成如下浓度的样品:0.5、1、2、5、10ng/mL,再分别测定其降钙素原浓度,以配成值为X,酶联免疫检测信号值为Y绘制标准曲线,经统计拟合标准曲线的表达式列出回归方程为: $Y=0.05244X+0.07978$,相关系数为 $R^2=0.99$ (见附图1)。降钙素原测定范围为0.5~10ng/ml;

2、准确性试验

取同一患者唾液标本,用同一批次的试剂盒重复检测3次,计算出相对偏差B值为10.9%,符合产品设计要求;

3、重复性试验

取同一患者唾液标本,用同一批次的试剂盒同时检测20次,计算出变异系数CV值为3.15%,符合产品设计要求。

[0014] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

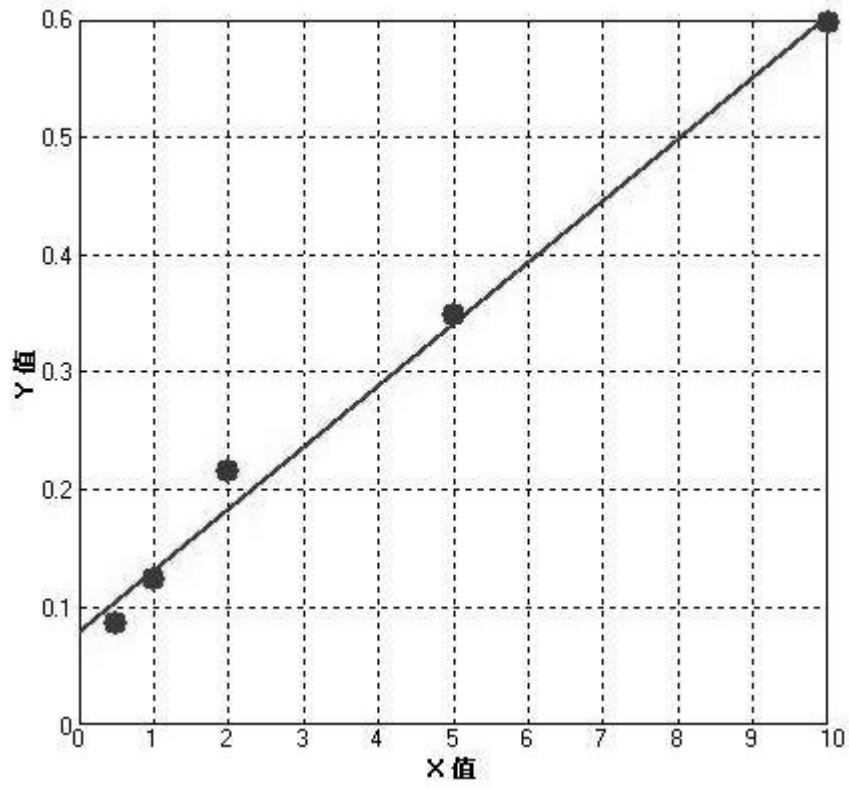


图 1

专利名称(译)	一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN107490679A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN201610401787.1	申请日	2016-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
[标]发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测分析的技术领域，尤其是一种唾液降钙素原酶联免疫检测方法，包含有唾液收集器、唾液、抗降钙素原抗体、酶标试剂和检测器。唾液收集器包括收集管、收集棒、收集刮片的一种或组合；抗降钙素原抗体为抗降钙素原单克隆抗体和抗降钙素原多克隆抗体的一种或组合；酶标试剂为含有所述酶标物质的液相和/或固相材料；检测器为酶联免疫检测器。以人体唾液为检测样本，可有效监测唾液中降钙素原，特异性强，重复性好，灵敏度高，操作简单，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，易于推广，适合于现场检测。

