



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107688096 A

(43)申请公布日 2018.02.13

(21)申请号 201710715062.4

(22)申请日 2017.08.19

(71)申请人 杭州飞悦生物技术有限公司
地址 311121 浙江省杭州市余杭区文一西路1500号健康谷4号楼12楼

(72)发明人 章建东 韩峰 罗君燕 伍德丰
叶涛 张墨楠

(74)专利代理机构 杭州天欣专利事务所(普通合伙) 33209
代理人 张狄峰

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

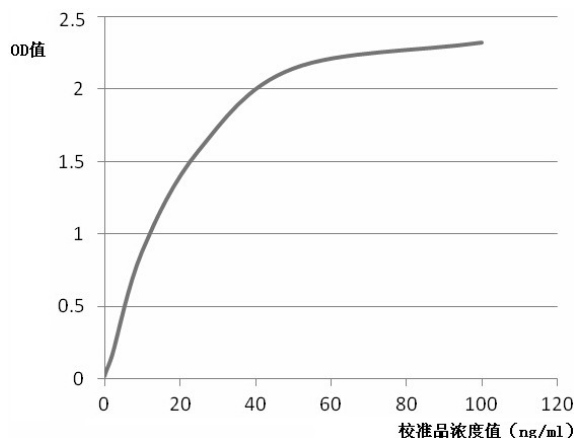
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法
及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种降钙素原的检测技术,尤其是涉及一种检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法及检测方法。目前市场上常见的降钙素原检测试剂盒的包被、标记程序复杂,成本高。本发明检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的特点在于:包括包被酶标板、酶结合物、校准品、底物、洗液和终止液,酶标板为聚苯乙烯包被的PCT抗体,酶结合物为HRP标记的PCT抗体,校准品为PCT抗原,底物为TMB的显色剂,洗液为PB的缓冲液,终止液为0.5mol/L的硫酸。本发明的操作简便,灵敏度高,得到检测结果的速度快。



1. 一种检测降钙素原的酶联免疫试剂盒,其特征在于:包括包被酶标板、酶结合物、校准品、底物、洗液和终止液,包被酶标板为聚苯乙烯包被的PCT抗体,酶结合物为HRP标记的PCT抗体,校准品为PCT抗原,底物为TMB的显色剂,洗液为PB的缓冲液,终止液为0.5mol/L的硫酸。

2. 一种制备如权利要求1所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的方法,其特征在于:所述制备方法的步骤如下:

A、板子制作:

1) 用碳酸盐包被缓冲液将PCT抗体稀释至工作浓度,包被96孔酶标板,每孔100 μ l,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时;

2) 弃去孔中液体,每孔加入300~350 μ l的洗液,静置3分钟,弃去洗液,甩干,洗涤3遍;

3) 加入终止液,每孔200 μ l,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时;

4) 弃去孔中液体,甩干,37 $^{\circ}$ C烘箱过夜;密封;2~8 $^{\circ}$ C保存;

B、酶结合物标记:

1) 取5mg HRP溶于0.5 ml 浓度为0.2mol/L、pH值为5.6的醋酸盐缓冲液中;加入0.25 ml新鲜配制的浓度为0.1mol/L的NaIO₄;混匀;4 $^{\circ}$ C保温30min;

2) 加入0.5ml体积百分浓度为2.5%的己二醇,混匀;室温置30min;

3) 加入5~10mg待标记的抗体,用浓度为1.0mol/L、pH值为9.5的CBS调节pH值至9.0,混匀;透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

4) 加入0.1ml或0.5mg NaHB₄,混匀;4 $^{\circ}$ C放置2小时后,对浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜;加入中性甘油后分装;

C、酶结合物配制:

用酶稀释液把标记好的酶稀释到1 μ g/ml;所述酶稀释液如下:1000ml酶稀释液中含有8g的NaCl、0.2g的KCl、3.63g的Na₂HPO₄·12H₂O、以及0.24g的KH₂PO₄;

D、校准品配制:

用校准品稀释液把抗原稀释到100ng/ml,50ng/ml,25ng/ml,10ng/ml,2ng/ml,0.5ng/ml。

3. 根据权利要求2所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:所述板子制作步骤的工序1)中,PCT抗体的工作浓度为1~3 μ g/ml。

4. 根据权利要求3所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:所述板子制作步骤的工序1)中,PCT抗体的工作浓度为2 μ g/ml。

5. 根据权利要求2所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:所述板子制作步骤的工序1)中,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜的时间为16~24小时;所述板子制作步骤的工序3)中,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜的时间为16~24小时;所述板子制作步骤的工序4)中,37 $^{\circ}$ C烘箱过夜的时间为16~24小时。

6. 根据权利要求2所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的制备方法,其特征在于:所述酶结合物标记步骤的工序3)中,过夜的时间为16~24小时;所述酶结合物标记步骤的工序4)中,过夜的时间为16~24小时。

7. 一种如权利要求1~6任一权利要求所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于:所述检测方法的步骤如下:

- 1) 取出试剂盒和血清样品, 室温平衡15~30分钟; 浓缩洗涤液用蒸馏水1:19稀释, 待用;
- 2) 取出包被板, 每孔加入50 μ l标准品、质控血清和血清样品;
- 3) 每孔分别加入酶结合物50 μ l;
- 4) 微量振荡器振荡30秒使其混合均匀, 封膜覆盖, 置37 $^{\circ}$ C温育0.5小时;
- 5) 甩干孔内混合物, 用洗涤液注满各孔, 静置18~22秒, 甩干孔内液体, 重复5次, 最后拍干;
- 6) 每孔加入底物2滴或100 μ l;
- 7) 微量振荡器振荡30秒, 37 $^{\circ}$ C避光反应10分钟以内, 用酶标仪测定各孔的OD值。
8. 根据权利要求7所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的检测方法, 其特征在于: 所述步骤2)中的标准品为S0~S6。

检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种降钙素原的检测技术,尤其是涉及一种检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 目前市场上常见的降钙素原检测试剂盒的包被、标记程序复杂,成本高。虽然现在也有检测相对方便的技术,如公开日为2016年11月09日,公开号为CN106093416A的中国专利中,公开了一种一步法检测降钙素原的试剂盒及其制备方法,但是该试剂盒需要在90分钟内才能够得到检测结果,出结果的速度较慢。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的上述不足,而提供一种操作简便,灵敏度高,得到检测结果的速度快的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒。

[0004] 本发明解决上述问题所采用的技术方案是:该检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的特点在于:包括包被酶标板、酶结合物、校准品、底物、洗液和终止液,包被酶标板为聚苯乙烯包被的PCT抗体,酶结合物为HRP标记的PCT抗体,校准品为PCT抗原,底物为TMB的显色剂,洗液为PB的缓冲液,终止液为0.5mol/L的硫酸。

[0005] 一种制备所述的检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的方法,其特点在于:所述制备方法的步骤如下:

A、板子制作:

1)用碳酸盐包被缓冲液将PCT抗体稀释至工作浓度,包被96孔酶标板,每孔100 μ l,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时;

2)弃去孔中液体,每孔加入300~350 μ l的洗液,静置3分钟,弃去洗液,甩干,洗涤3遍;

3)加入终止液,每孔200 μ l,2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时;

4)弃去孔中液体,甩干,37 $^{\circ}$ C烘箱过夜;密封;2~8 $^{\circ}$ C保存;

B、酶结合物标记:

1)取5mg HRP溶于0.5 ml 浓度为0.2mol/L、pH值为5.6的醋酸盐缓冲液中;加入0.25 ml新鲜配制的浓度为0.1mol/L的NaIO₄;混匀;此时溶液的颜色应由黄棕色变为墨绿色4 $^{\circ}$ C保温30min;

2)加入0.5ml体积百分浓度为2.5%的已二醇,混匀;室温置30min;此时溶液应恢复为黄色;

3)加入5~10mg待标记的抗体,用浓度为1.0mol/L、pH值为9.5的CBS调节pH值至9.0,混匀;透析,4 $^{\circ}$ C过夜;

4)加入0.1ml或0.5mg NaHB₄,混匀;4 $^{\circ}$ C放置2小时后,对浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS透析,4 $^{\circ}$ C过夜;加入中性甘油后分装;

C、酶结合物配制:

用酶稀释液把标记好的酶稀释到1ug/ml;所述酶稀释液如下:1000mL酶稀释液中含有8g的NaCl、0.2g的KCl、3.63g的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、以及0.24g的 KH_2PO_4 ;

D、校准品配制:

用校准品稀释液把抗原稀释到100ng/ml,50ng/ml,25ng/ml,10ng/ml,2ng/ml,0.5ng/ml。

[0006] 作为优选,本发明所述板子制作步骤的工序1)中,PCT抗体的工作浓度为1~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0007] 作为优选,本发明所述板子制作步骤的工序1)中,PCT抗体的工作浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0008] 作为优选,本发明所述板子制作步骤的工序1)中,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜的时间为16~24小时;所述板子制作步骤的工序3)中,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜的时间为16~24小时;所述板子制作步骤的工序4)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜的时间为16~24小时。

[0009] 作为优选,本发明所述酶结合物标记步骤的工序3)中,过夜的时间为16~24小时;所述酶结合物标记步骤的工序4)中,过夜的时间为16~24小时。

[0010] 一种检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特点在于:所述检测方法的步骤如下:

1)取出试剂盒和血清样品,室温平衡15~30分钟;浓缩洗涤液用蒸馏水1:19稀释,待用;

2)取出包被板,每孔加入50 μl 标准品、质控血清和血清样品;

3)每孔分别加入酶结合物50 μl ,注意加样枪头不要碰到包被板壁或孔内的液体;

4)微量振荡器振荡30秒使其混合均匀,用不干胶封膜覆盖,置37 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5小时;

5)甩干孔内混合物,用洗涤液注满各孔,静置20秒左右,如静置18~22秒,甩干孔内液体,重复5次,最后在吸水纸上拍干;

6)每孔加入底物2滴或100 μl ;

7)微量振荡器振荡30秒,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应10分钟以内,用酶标仪测定各孔的OD值。

[0011] 作为优选,本发明所述步骤2)中的标准品为S0~S6。

[0012] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:本发明的试剂盒具有操作简便,仅需一步温育反应即可,还具有灵敏度高、特异性强、重复性好、定量准确、范围广、能在40分钟内得到检测结果,且成本低等优点。

附图说明

[0013] 图1是本发明实施例的PCT的标准曲线图。

具体实施方式

[0014] 下面结合附图并通过实施例对本发明作进一步的详细说明,以下实施例是对本发明的解释而本发明并不局限于以下实施例。

[0015] 实施例。

[0016] 本实施例中检测降钙素原的酶联免疫试剂盒包括包被酶标板、酶结合物、校准品、底物、洗液和终止液,包被酶标板为聚苯乙烯包被的PCT抗体,酶结合物为HRP标记的PCT抗体,校准品为PCT抗原,底物为TMB的显色剂,洗液为PB的缓冲液,终止液为0.5mol/L的硫酸。

[0017] 本实施例中检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的制备方法的步骤如下：

A、板子制作：

1) 用碳酸盐包被缓冲液将PCT抗体稀释至工作浓度，包被96孔酶标板，每孔100 μ l，2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时；

2) 弃去孔中液体，每孔加入300~350 μ l的洗液，静置3分钟，弃去洗液，甩干，洗涤3遍；

3) 加入终止液，每孔200 μ l，2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜或37 $^{\circ}$ C烘箱2小时；

4) 弃去孔中液体，甩干，37 $^{\circ}$ C烘箱过夜；密封；2~8 $^{\circ}$ C保存；

B、酶结合物标记：

1) 取5mg HRP溶于0.5 ml 浓度为0.2mol/L、pH值为5.6的醋酸盐缓冲液中；加入0.25 ml新鲜配制的浓度为0.1mol/L的NaIO₄；混匀；此时溶液的颜色应由黄棕色变为墨绿色；4 $^{\circ}$ C保温30min；

2) 加入0.5ml体积百分浓度为2.5%的己二醇，混匀；室温置30min；此时溶液应恢复为黄色；

3) 加入5~10mg待标记的抗体，用浓度为1.0mol/L、pH值为9.5的CBS调节pH值至9.0，混匀；透析，4 $^{\circ}$ C过夜；

4) 加入0.1ml或0.5mg NaHB₄，混匀；4 $^{\circ}$ C放置2小时后，对浓度为0.01mol/L、pH值为7.4的PBS透析，4 $^{\circ}$ C过夜；加入中性甘油后分装；

C、酶结合物配制：

用酶稀释液把标记好的酶稀释到1 μ g/ml；

D、校准品配制：

用校准品稀释液把抗原稀释到100ng/ml，50ng/ml，25ng/ml，10ng/ml，2ng/ml，0.5ng/ml。

[0018] 在板子制作步骤的工序1)中，PCT抗体工作浓度可以为1~3 μ g/ml，优选为2 μ g/ml。

[0019] 在板子制作步骤的工序1)中，2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜的时间为16~24小时；所述板子制作步骤的工序3)中，2~8 $^{\circ}$ C孵育过夜的时间为16~24小时；板子制作步骤的工序4)中，37 $^{\circ}$ C烘箱过夜的时间为16~24小时。

[0020] 在酶结合物标记步骤的工序3)中，过夜的时间为16~24小时；酶结合物标记步骤的工序4)中，过夜的时间为16~24小时。

[0021] 本实施例中的洗液如下：1000mL洗液中含有90g的NaCl、29g的Na₂HPO₄·12H₂O、2.97g的NaH₂PO₄·2H₂O、以及10ml的吐温20。

[0022] 本实施例中的酶稀释液如下：1000mL酶稀释液中含有8g的NaCl、0.2g的KCl、3.63g的Na₂HPO₄·12H₂O、以及0.24g的KH₂PO₄。

[0023] 本实施例中检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的检测方法的步骤如下：

1) 取出试剂盒和血清样品，室温平衡15~30分钟；浓缩洗涤液用蒸馏水1:19稀释，待用；

2) 取出包被板，每孔加入50 μ l标准品、质控血清和血清样品；标准品为S0~S6。

[0024] 3) 每孔分别加入酶结合物50 μ l，注意加样枪头不要碰到包被板壁或孔内的液体；

4) 微量振荡器振荡30秒使其混合均匀，用不干胶封膜覆盖，置37 $^{\circ}$ C温育0.5小时；

5) 甩干孔内混合物,用洗涤液注满各孔,静置20秒左右,甩干孔内液体,重复5次,最后在吸水纸上拍干;

6) 每孔加入底物2滴或100 μ l;

7) 微量振荡器振荡30秒,37 $^{\circ}$ C避光反应10分钟以内,用酶标仪测定各孔的OD值。

[0025] 如附图1所示,图1中X轴表示校准品浓度值,单位是ng/ml,Y轴表示OD值,曲线表示PCT的标准曲线,未知标本测得OD值可以通过标准曲线算出浓度值。

[0026] 本实施例可以采用ELISA双抗体酶联免疫夹心法定量检测人血清、血浆及相关液体样本中降钙素原(PCT)含量。检测出来的结果适用于严重感染或脓毒血症的早期诊断;全身性感染与非细菌性炎症反应(如自身免疫性疾病)的鉴别诊断;全身性细菌性感染与病毒感染的鉴别诊断;全身性细菌/真菌感染与器官移植排斥和移植后病毒感染的鉴别诊断;作为高危患者(如ICU、器官移植术后或接受免疫抑制治疗的患者)感染性疾病的监测指标。人降钙素原(PCT)是人降钙素的前体物,无激素活性,其在健康人血清中水平极低,但在全身性细菌感染患者血清中含量迅速升高,感染后两个小时即可检测到,且持续时间长,其在血清中的水平与感染性疾病的严重程度呈正相关,经有效抗生素治疗后,PCT水平可迅速下降,而病毒感染、肿瘤、自身免疫性疾病、外伤(多创伤或手术创伤)、临床用药、慢性炎症以及局部感染者,PCT水平维持在正常范围内或者有轻度升高。因此,PCT是细菌感染所致重症全身性炎症反应的良好指标,在全身性细菌感染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。

[0027] 在局限性感染、病毒感染、自身免疫性疾病、手术创伤和慢性炎症时,其血浆浓度正常或轻度升高;严重细菌感染或霉菌、寄生虫感染(如腹膜炎、软组织感染、蜂窝组织炎、吻合口漏、肺炎、ARDS)时大量上升,特别是脓毒性休克时PCT浓度成倍升高。因此,利用它能有效地评估感染和炎症的严重程度及进展情况,还能监测药物疗效,指导外科围手术期的处理以及抗生素正确应用。

[0028] 作为高危患者(如ICU、器官移植术后或接受免疫抑制治疗的患者)感染性疾病的监测指标;早期预测脓毒性休克、多器官功能不全综合征(MODS)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)及多器官功能障碍(MOF)的发生及判断疾病预后等。

[0029] 虽然本发明已以实施例公开如上,但其并非用以限定本发明的保护范围,任何熟悉该项技术的技术人员,在不脱离本发明的构思和范围内所作的更动与润饰,均应属于本发明的保护范围。

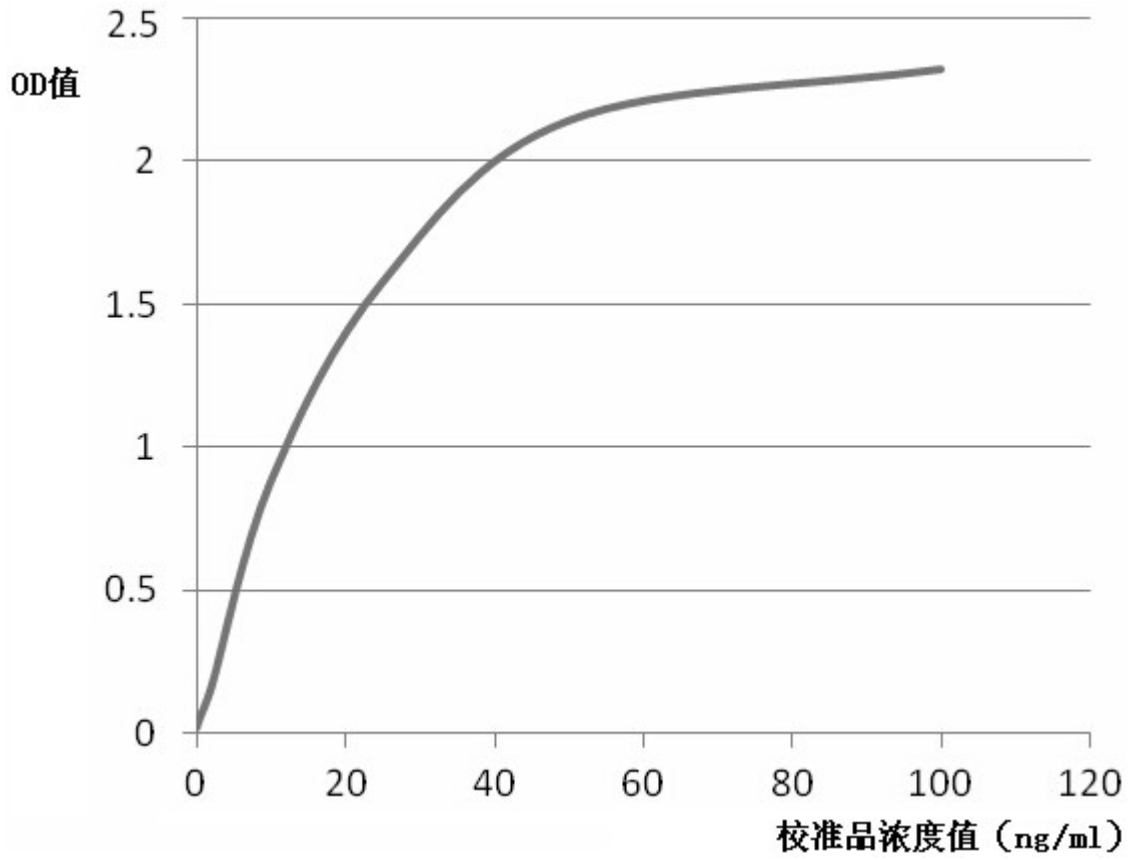


图1

专利名称(译)	检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN107688096A	公开(公告)日	2018-02-13
申请号	CN2017110715062.4	申请日	2017-08-19
[标]发明人	章建东 韩峰 罗君燕 伍德丰 叶涛 张墨楠		
发明人	章建东 韩峰 罗君燕 伍德丰 叶涛 张墨楠		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6803		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种降钙素原的检测技术，尤其是涉及一种检测降钙素原的酶联免疫试剂盒及制备方法及检测方法。目前市场上常见的降钙素原检测试剂盒的包被、标记程序复杂，成本高。本发明检测降钙素原的酶联免疫试剂盒的特点在于：包括包被酶标板、酶结合物、校准品、底物、洗液和终止液，酶标板为聚苯乙烯包被的PCT抗体，酶结合物为HRP标记的PCT抗体，校准品为PCT抗原，底物为TMB的显色剂，洗液为PB的缓冲液，终止液为0.5mol/L的硫酸。本发明的操作简便，灵敏度高，得到检测结果的速度快。

