



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104792997 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201410029667. 4

(22) 申请日 2014. 01. 22

(71) 申请人 天津汇滨生物科技有限公司

地址 300457 天津市滨海新区开发区洞庭路
220 号天津国际生物医药联合研究院
实验楼十四层 N1406

(72) 发明人 周泽奇

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

代理人 方挺 孟潭

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

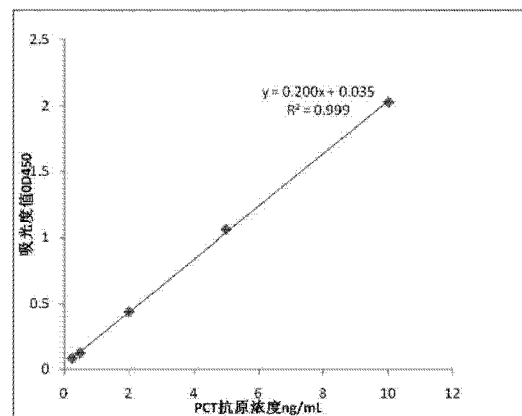
权利要求书3页 说明书24页 附图2页

(54) 发明名称

一种人降钙素原免疫检测试剂盒及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种人降钙素原免疫检测试剂盒,试剂盒内包括 PCT 单克隆多抗包被的酶标板;至少两个 PCT 标准品试剂瓶,每个 PCT 标准品试剂瓶中装有不同浓度的 PCT 标准品;酶标试剂瓶,其中装有酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗。本发明的检测试剂盒具有较好的敏感性和特异性,结果与参比试剂符合率高,能提供更准确可靠的检验结果,所述试剂盒操作简便易行,检测快速灵敏,所用酶标仪简单、普及,价格低廉,该检测试剂盒为人降钙素原检测提供了一种有效工具。



1. 一种人降钙素原免疫检测试剂盒,其特征在於试剂盒内包括 PCT 单克隆多抗包被的酶标板;至少两个 PCT 标准品试剂瓶,每个 PCT 标准品试剂瓶中装有不同浓度的 PCT 标准品;酶标试剂瓶,其中装有酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗。

2. 根据权利要求 1 所述的人降钙素原免疫检测试剂盒,其特征在於:试剂盒内还包括洗液试剂瓶,其中装有用於洗涤酶标版的洗液;样本稀释液试剂瓶,其中装有稀释样本用的稀释液;底液试剂瓶,其中装有受酶催化显色的底物溶液;终止液试剂瓶,其中装有终止显色反应的终止液。其中,所述样本稀释液、底物溶液和终止液分别如下:

样本稀释液:人工血清;

底物溶液:TMB 溶液或 PNPP 溶液;

终止液:2mol/L 硫酸溶液或 3mol/L 氢氧化钠溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於所述 PCT 标准品试剂瓶为 5 个,所述 PCT 标准品浓度范围为 0.05ng-100ng/mL,在此范围内的任意五个不同浓度。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於:酶标试剂瓶中为 HRP 标记或 AP 标记的抗 PCT 的单克隆多抗的酶标抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在於试剂盒内还包括阳性质控试剂瓶和 / 或阴性质控试剂瓶。

6. 权利要求 1、2、3 或 4 任一所述人降钙素原检测试剂盒的制备方法,其特征在於:具体步骤如下:

(1) 制备 PCT 单克隆多抗包被的酶标板

(a) PCT 单克隆多抗包被液的配制:採用以下任一缓冲溶液将 GM 稀释至 25ng/100 μ L ~ 2 μ g/100 μ L: 0.01mol/L ~ 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS),其 pH7.0 ~ pH8.0; 0.05 ~ 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS),其 pH9.0 ~ pH9.6; 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液,其 pH10.0 ~ pH10.6;

(b) 封闭液的配制:将 3% ~ 5% 的脱脂奶粉或者 1% ~ 4% BSA 加入下述缓冲溶液中,配制成封闭液:缓冲溶液,0.01mol/L ~ 0.2mol/L PBS,其 pH7.0 ~ pH8.0;

(c) 包被酶标板:

①将配制的 PCT 单克隆多抗包被液加入酶标板孔中,每孔分别加入 60 μ L ~ 200 μ L 包被液;

②酶标板置于 2-8 $^{\circ}$ C 环境下包被 8 ~ 16h;

③将配制的封闭液加入酶标板孔中,每孔分别加入 60 μ L ~ 200 μ L 封闭液,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱,30 ~ 90 分钟;

④从温箱取出酶标板后弃去封闭液,37 $^{\circ}$ C 恒温 30 ~ 90 分钟,即得;

(2) 标准品的制备

标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成;

(3) 酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将 HRP 或 AP 标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 2000 ~ 1 : 20000 的比例稀释而成。

(4) 浓缩洗液 (20 \times 0.01mol/L PBS) 的配制:按重量份数称取氯化钠 96.0 份,氯化钾 2.40 份,十二水合磷酸氢二钠 42.96 份,磷酸二氢钾 2.88 份,吐温-200.05 份,超纯水 1000

份,混合均匀;

(5) 样本稀释液为:人工血清;

(6) 底物溶液为:TMB 溶液或 PNPP 溶液;

(7) 终止液的配制:配制 2mol/L 硫酸溶液或 3mol/L 氢氧化钠溶液。

7. 根据权利要求 6 所述的人降钙素原检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述抗 PCT 单克隆多抗用 PCT 抗原多肽或片段做为免疫原,经免疫动物、分离和纯化抗血清得到。

8. 根据权利要求 7 所述的人降钙素原检测试剂盒的制备方法,其特征在于所述免疫方法为皮下注射、脾内注射、静脉注射或腹腔注射,免疫剂量为 0.1mg-10mg,免疫的动物选自大鼠、小鼠、豚鼠、兔、鸡、羊、马、猪或驴。

9. 根据权利要求 8 所述的人降钙素原检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

(a) 用 PCT 抗原作为免疫原免疫动物;

(b) 将 (a) 步骤得到的血清进行分离纯化,得到多克隆抗体。

(c) 取动物脾脏,进行细胞融合,杂交瘤细胞的克隆化和建株扩大培养,得到单克隆抗体。

10. 根据权利要求 9 所述的人降钙素原检测试剂盒的制备方法,其特征在于抗体纯化方法为饱和硫酸铵盐析沉淀法和亲和层析法。

11. 根据权利要求 7 所述的人降钙素原检测试剂盒的制备方法,其特征在于 PCT 抗原多肽或片段的制备,包括下述步骤:

(1) 取 1 份 PCT 全长抗原;

(2) 配置 2 份酶解液:Prohormone Convertase、Carboxypeptidase、Aminopeptidase、Peptidyl Glycine Amidating Mono-oxygenase 各 30IU/g,溶解在 2 份 20mM Tris,500mM NaCl, pH7.4 或者 PBS 缓冲液中, pH7.4。

(3) 加入酶解液,37°C 水浴酶解 2h ~ 4h;

(4) 将分别针对 N 端、降钙素以及下钙素抗原的三种单克隆抗体单独偶联到层析柱上,将酶解液依次过滤进行亲和纯化,从而获得 N 端、降钙素以及下钙素三种抗原,具体步骤如下:

a 将上述抗体分别结合到蛋白 A 或蛋白 G 微珠上。每份湿的微珠结合 2 份单克隆抗体。将抗体和蛋白 A 或蛋白 G 微珠混合制成匀浆,在总量为 10 份的溶液中加入大约 1 份微珠,室温孵育 1h,混匀。

b 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠, pH9.0 洗涤微珠 2 次,每次以 3000g 离心 2min 或 10,000g 离心 30s。

c 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠, pH9.0 重悬微珠,留样。加入足量的二甲基庚二酸酯(固体)至微珠匀浆中,使终浓度为 20mmol/L。

d 室温孵育 30min,并混匀,留样。

e 用 0.2mol/L 乙醇胺, pH8.0 洗涤微珠 1 次以终止反应。然后重悬于 0.2mol/L 乙醇胺,室温孵育 2h,混匀。

f 将抗体包被的微珠转入层析柱中,用 PBS 缓冲液, pH7.4 冲洗容器。

g 用 20 倍柱床体积与制备抗原相同的缓冲液洗柱。

h 将抗原液加到柱上,按每毫升柱体积大约 1mL/h 的速度使抗原溶液流过层析柱。

i 用 20 倍柱床体积的结合缓冲液洗柱。

k 采用分段洗脱法,连续以 0.5 倍柱床体积的洗脱缓冲液通过层析柱,分管收集每一组分份。

l 检测每管的抗原含量,将浓度高的各管合并。

12. 根据权利要求 11 所述的降钙素原试剂盒的制备方法:抗原片段获得衍生物,其特征在于:该衍生物偶联有 KLH,也可以是载体蛋白 BSA 或者乳胶微球,或者 GST。

13. 根据权利要求 12 所述的降钙素原试剂盒的制备方法,所制备的单克隆抗体或者多克隆抗体分别是针对 PCT 抗原的 N 端、降钙素以及下钙素的表位具有单一特异性的抗体。

14. 权利要求 1-3 任一所述的人降钙素原免疫检测试剂盒在检测 PCT 浓度方面的应用。

15. 根据权利要求 14 所述的应用,采用夹心 ELISA 方法,包括 PCT 单克隆多抗包被的酶标板,酶标记的抗 PCT 单克隆多抗,多个 PCT 标准品,浓缩洗液,样本稀释液、底物溶液和终止液,具体步骤如下:

a) 将 PCT 标准品、待测样品加入到 PCT 单克隆多抗包被的酶标板的孔中,同时加入酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗,孵育 5-60min;

b) 孵育后,甩去反应液,使用洗液洗板;

c) 洗涤结束后在孔中加入底物溶液孵育 15min,然后加入终止液混匀后,在 OD450nm 处读数;

d) 根据 PCT 标准品和待测样品的吸光度测定值,绘制标准曲线和方程,计算出待测样品中 PCT 的浓度。

一种人降钙素原免疫检测试剂盒及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及人降钙素原的检测方法,尤其涉及 vde 免疫检测试剂盒,属于生物领域。

背景技术

[0002] 降钙素原 (procalcitonin, PCT) 是无激素活性的降钙素前肽物质,分子质量为 13kD 的糖蛋白,由 116 个氨基酸组成,包括 N- 残端、降钙素、下钙素三个部分,其中 1 ~ 57 为 N- 残端,60 ~ 92 为降钙素,96 ~ 116 为下钙素。1996 年以来,PCT 作为一种新型的诊断细菌感染以及其继发的合并症的鉴别诊断工具,在诊断败血症、败血症休克以及严重系统炎症反应等此类疾病诊断以及过程的追踪观察方面,PCT 诊断具有明显优势,且特异性高。2001 年国际脓毒症会议的脓毒症诊断标准已把 PCT 作为诊断指标之一。近年来 PCT 被认为是系统性炎症反应综合征、脓毒症、急性呼吸窘迫综合征等疾病的预警指标,反映了全身性细菌感染的存在和严重程度。

[0003] 在人体血液循环中,不仅存在全长的 PCT 多肽 (约 13kD),而且源自于 PCT 多肽的片段也广泛存在其中,具体来说,相关文献也讨论过降钙素部分上下游分别发生的蛋白水解切割 (Muller 等,Crit Care Med2000 ;977-83 ;Whang 等,J Clin Endocrinol Metab1998 ;83 :3296-301)。然而,关于此的实验证据很少,使用针对 PCT 的降钙素部分的抗体通过亲和层析从脓症患者分离到循环中的 PCT,并且已经得出结论,即 PCT3-116 是主要的循环 PCT 物质 (Weglohner 等,Peptides2001 ;22 :2099-103.)。目前可以确定的是,甲状腺的 C 细胞首先合成前 PCT,前降钙素原主要由 N 端 84 个氨基酸 (含由 25 个氨基酸的前导肽)、活性降钙素 (32 肽) 和 Katalcalcic (21 肽) 三部分组成,后两部分被 4 肽 (-Gys-Lys-Lys-Arg-) 隔开。前降钙素原进入内质网,经糖基化和酶切除导肽,转变为 PCT,PCT 又经不同蛋白酶分别作用,先切除 N 端肽形成 57 肽,57 肽进一步降解即生成成熟降钙素和 Katalcalcic,成熟降钙素的 C 末端尚需酰胺化才能最后形成活性降钙素,降钙素为活性 32 肽。

[0004] 实验证明,PCT 浓度升高的主要原因是细菌内毒素引发的全身效应。PCT 在检测时表现出的高度特异性的原因是:1、在正常个体中,PCT 经过一系列的体内酶催化作用最后水解形成 CT,故其血清中的 PCT 浓度很低,仅为 10 ~ 50pg/ml。2、在系统炎症反应综合征 (SIRS)、败血症、急性 / 慢性肺炎、急性胰腺炎、活动性肝炎和创伤等患者的血清中的 PCT 浓度会显著升高,其浓度可达到正常水平的几倍甚至上万倍。研究表明,在 LPS 血类败血症相关因子作用下,靶细胞 (PBMC) 等应急分泌 PCT,这时 PCT 的分泌速率超过转化速率 (由 PCT 分解成 CT),或者该转换过程缺少相关的水解酶,从而导致血清中 PCT 浓度成倍升高。3、在病毒感染、慢性非特异性炎症等患者的血清中 PCT 浓度持平或稍有增加。因此,PCT 可作为判断病情与预后以及疗效观察的可靠指标,它不仅与疾病的严重程度成正相关,而且随着病情的变化而变化。

[0005] 目前国际上开展的 PCT 浓度检测方法很多,主要有以下几类:

[0006] (1) 凝胶法,此方法费事且不易形成自动化检测;

- [0007] (2) 酶联免疫吸附法,传统的 ELISA 法检测操作复杂、反应时间较长、灵敏度低;
- [0008] (3) 放射免疫测定,此方法反应时间长、检测结果不稳定,重复性差,且存在放射性污染问题;
- [0009] (4) 免疫发光法,该方法特异性强、灵敏度高,但需要昂贵的实验仪器;
- [0010] (5) 胶体金层析法,此方法灵敏度低,只能定性无法实验定量检测;
- [0011] 在 PCT 的临床检测中,目前国际市场上免疫检测产品包括法国梅里埃 VIDAS,美国 RB 公司,美国 RD 公司等均有推出,VIDAS 采用荧光法检测,需要特定的仪器,才能够实现准确定量;ELISA 产品采用双抗夹心法,先将 PCT 的特异抗体包被在酶标板上,再加入待检样本 37℃ 孵育,再加入辣根过氧化物酶(即 HRP) 标记的单克隆抗体 37℃ 孵育,待检样本中的抗原会与特异单克隆抗体结合并形成夹心结构,再加入四甲基联苯胺显色,颜色的深浅和待检抗原的浓度呈正相关,从而实现 PCT 的检测。此类产品在检测时采用两步法,检测速度慢导致检测耗时过长,检测的准确度也存在不足之处;并且此类方法通常采用 PCT 单抗或多抗,检测敏感性不足,在较低浓度下往往无法建立线性良好的标准曲线,导致其无法检测较低浓度的 PCT 待测样品。

发明内容

- [0012] 在本发明的全文中,下述简写分别代表的术语是:
- [0013] PCT- 人降钙素原;
- [0014] PBS- 磷酸盐缓冲溶液;
- [0015] CBS- 碳酸盐缓冲溶液;
- [0016] Tris- 三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液;
- [0017] BSA- 牛血清白蛋白;
- [0018] TMB- 四甲基联苯胺;
- [0019] HRP- 辣根过氧化物酶;
- [0020] AP- 碱性磷酸酶;
- [0021] PNPP- 对硝基苯磷酸二钠;
- [0022] OD- 在给定波长下的吸光度。
- [0023] 对于 PBS、CBS、Tris、TMB 等的组成、浓度、pH 等,均可采用免疫生物学上的常见类型。
- [0024] 针对现有技术的缺陷,本发明提供了一种人降钙素原免疫检测试剂盒,能够快速、准确检测待测样品中 PCT 的浓度,检测效率高,在 20min 内即可完成检测操作;检测灵敏度高,在 0.01ng/ml ~ 20ng/ml 范围内均呈现良好的线性;检测成本低,只需使用酶标仪等即可完成检测。
- [0025] 为实现上述目的,本发明是通过下述技术方案实现的:
- [0026] 一种人降钙素原免疫检测试剂盒,试剂盒内包括 PCT 单克隆多抗包被的酶标板;至少两个 PCT 标准品试剂瓶,每个 PCT 标准品试剂瓶中装有不同浓度的 PCT 标准品;酶标试剂瓶,其中装有酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗。
- [0027] 对于本发明而言,上述的单克隆多抗体,可以是针对某一个肽段表位的多个单克隆抗体混合得到,也可以是相应的单克隆抗体与多克隆抗体混合,同样的,也可以是一个或

多个多克隆抗体的混合物。

[0028] 上述单克隆抗体制备方法为本领域技术人员所熟知, GENBANK 中获得人降钙素原蛋白的基因序列, 相应的可以得到其 N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及下钙素 (Katacalcin, KAT) 抗原的多肽序列:

[0029] N 端 (N-proCT):

[0030] Ala-Pro-Phe-Arg-Ser-Ala-Leu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ala-Asp-Pro-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Asp-Glu-Ala-Arg-Leu-Leu-Leu-Ala-Ala-Leu-Val-Gln-Asp-Tyr-Val-Gln-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Leu-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg-Glu-Gly-Ser-Ser-Leu-Asp-Ser-Pro-Arg-Ser

[0031] 降钙素 (Calcitonin, CT):

[0032] Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro

[0033] 下钙素 (Katacalcin, KAT):

[0034] Asp-Met-Ser-Ser-Asp-Leu-Glu-Arg-Asp-His-Arg-Pro-His-Val-Ser-Met-Pro-Gln-Asn-Ala-Asn

[0035] 本发明所述的不同区域的 PCT 抗原的制备方法, 具体步骤如下:

[0036] (1) 取 1 份 PCT 全长抗原;

[0037] (2) 配置 2 份酶解液: 激素原转化酶 (Prohormone Convertase, PC)、羧肽酶 (Carboxypeptidase, CP)、氨肽酶 (Aminopeptidase, AP)、肽酰甘氨酸羟单氧化酶 (Peptidyl Glycine Amidating Mono-oxygenase, PAM) 各 30IU/g, 溶解在 2 份 20mM Tris(三羟甲基氨基甲烷), 500mM NaCl, pH7.4 或者 PBS(磷酸盐) 缓冲液, pH7.4。

[0038] (3) 加入酶解液, 37°C 水浴酶解 2h ~ 4h;

[0039] (4) 将分别针对 N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及下钙素 (Katacalcin, KAT) 抗原的三种单克隆抗体单独偶联到层析柱上, 将酶解液依次过滤进行亲和纯化, 从而获得 N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及下钙素 (Katacalcin, KAT) 三种抗原, 具体步骤如下:

[0040] a 将上述抗体分别结合到蛋白 A 或蛋白 G 微珠上。每份湿的微珠结合 2 份单克隆抗体。将抗体和蛋白 A 或蛋白 G 微珠混合制成匀浆, 在总量为 10 份的溶液中加入大约 1 份微珠, 室温孵育 1h, 混匀。

[0041] b 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠 (pH9.0) 洗涤微珠 2 次, 每次以 3000g 离心 2min 或 10,000g 离心 30s。

[0042] c 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠 (pH9.0) 重悬微珠, 留样。加入足量的二甲基庚二酸酯 (固体) 至微珠匀浆中, 使终浓度为 20mmol/L。

[0043] d 室温孵育 30min, 并混匀, 留样。

[0044] e 用 0.2mol/L 乙醇胺 (pH8.0) 洗涤微珠 1 次以终止反应。然后重悬于 0.2mol/L 乙醇胺, 室温孵育 2h, 混匀。

[0045] f 将抗体包被的微珠转入层析柱中, 用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗容器。

[0046] g 用 20 倍柱床体积与制备抗原相同的缓冲液洗柱。

[0047] h 将抗原液加到柱上, 按每毫升柱体积大约 1mL/h 的速度使抗原溶液流过层析柱。

[0048] i 用 20 倍柱床体积的结合缓冲液 (PBS) 洗柱。

[0049] k 采用分段洗脱法,连续以 0.5 倍柱床体积的洗脱缓冲液通过层析柱,分管收集每一组份。

[0050] l 检测每管的抗原含量,将浓度高的各管合并。

[0051] 将多肽偶联到 BSA、OVA、KLH、乳胶微球等较大的蛋白载体上从而产生显著地免疫反应。KLH 由于在 ELISA 或 Western blotting 检测中没有抑制作用不影响检测结果。合成抗原多肽时,在其 N 端或 C 端添加一个半胱氨酸残基有利于多肽与载体蛋白的偶联。

[0052] 在 KLH 分子表面有大量的活性基团,最常用于偶联的是伯胺基团。小的多肽通常也带有不同基团可以用于偶联,常用的有伯胺基团,羧基和巯基。多肽与 KLH 的偶联就是利用这些基团,再通过交联剂 (crosslinker),将多肽上的巯基 / 羧基 / 伯胺与 KLH 上的伯胺相连,从而形成共价偶联,制备成完全抗原,用于免疫动物获得抗体。所以偶联的伯胺应该是来自于赖氨酸侧链和 N 端,而偶联的羧基则来自于天冬氨酸,谷氨酸和 C 端,巯基则来自于半胱氨酸。

[0053] 近年来,亲和乳胶微球已被广泛用作免疫载体。聚合物微球提供了一个应用于诊断和生物分离的平台。它们可以被涂覆有识别分子,如抗体,抗原,肽,或核酸探针,并且可以加载疏水性染料和其他化合物。未改性的聚合物微球也被广泛使用于标准仪器的安装和校准。微球直径范围从 20nm 到 200 μ m,具有良好的尺寸均匀性。普通聚苯乙烯微球蛋白吸附效果很理想,并且已经被一系列的诊断测试和分析所证实。表面改性的微球可与羧基和伯胺基团进行共价配对。直径在 22nm-99nm 之间的微球,可作为优良的免疫原偶联物。

[0054] 所得到的 PCT 各段抗原多肽通过交联剂 (crosslinker),将多肽上的巯基 / 羧基 / 伯胺与 KLH 上的伯胺相连,从而形成共价偶联,制备成完全抗原,用于免疫动物获得抗体。偶联的伯胺是来自于赖氨酸侧链和 N 端,而偶联的羧基则来自于天冬氨酸,谷氨酸和 C 端,巯基则来自于半胱氨酸。

[0055] 本发明中所述的单克隆抗体,优选为兔单克隆抗体,具有如下优势:

[0056] 动物经过初次和加强免疫后,原始的 B 细胞被诱导分化为不同的细胞,包括分泌抗体的浆细胞和记忆细胞。T 细胞表位的 MHC I 和 MHC II 而非典型的 MHC 分子参与多肽呈递。CD1 家族分子呈递非多肽抗原,如脂质和糖类。CD1 家族可以分为三类:第 I 类包括 CD1a, CD1b 和 CD1c,第 II 类是 CD1d,第 III 类 CD1e,兔子可以表达这三类,老鼠只能表达第 II 类。第 I 类分子主要根据脂质抗原的变化来表达不同的 T 细胞进行免疫反应,相比较而言,第 II 类则根据脂质抗原而产生自然杀伤性 T 细胞,兔和鼠针对脂质或糖脂类抗原的决定簇的不同,因此针对多糖类分子免疫兔产生抗体优于鼠产生的抗体。

[0057] 在兔体内抗体产生的初期和第二期具有几个特征:与人和鼠不同,兔 B 细胞不断的在肠相关的淋巴组织产生,由富含 B 细胞的淋巴组织和血液中的游离的 B 细胞产生抗体,通过进行非特异性免疫原的抗体扩增而形成大的抗体库;相对鼠和人,兔的免疫更加简单,兔的 IgG 没有亚基,而且很少会产生 IgM。兔抗体仅有 C γ 基因,而且轻链的大部分 (90-95%) 来自同型的 C κ 1, IgG 的全部轻链仅 5% -10% 来自同型的 λ ,兔 IgG 的这些特点使得基因克隆比鼠和人的更容易。

[0058] 本发明所述的不同区域的 PCT 抗原的多克隆抗体的制备方法,步骤如下:

[0059] 1. 用制备好的各个区域的 PCT 抗原免疫动物。

- [0060] 2. 测定免疫后动物的血清效价,从免疫后的动物体内取血。
- [0061] 3. 用饱和硫酸铵盐析法和亲和层析法对血清进行纯化,得到纯化的多克隆抗体。
- [0062] 上述步骤 2 中免疫的方法是多种多样的,如:脾内注射法,腹腔注射法等。免疫剂量可视具体动物种类而定。用于制备 PCT 多克隆抗体的动物可以是鼠、兔、鸡、羊、马、猪、驴等可用于免疫的动物。
- [0063] 上述步骤 3 中免疫后的动物可处死后采血,也可以不处死,饲养过程中每次采一定量的血。
- [0064] 上述步骤 4 中用于抗体纯化的方法可以是饱和硫酸铵盐析沉淀法和亲和层析法等。
- [0065] 亲和层析法步骤如下:
- [0066] (A) 取 2 份抗血清样本,加等体积的生理盐水,再加入 4 份饱和硫酸铵溶液,于 4℃ 沉淀过夜;
- [0067] (B) 10000g 低温离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 2 份 PBS 溶解,缓慢滴加 1 份饱和硫酸铵溶液,在 4℃ 静置 1 小时;
- [0068] (C) 10000g 低温离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 1 份 PBS 溶解,用 PBS 溶液 4℃ 透析过夜;
- [0069] (D) 用亲和层析的方法进一步纯化:
- [0070] I 用 5-10 倍柱床体积的洗脱缓冲液洗柱;
- [0071] II 用 5-10 倍柱床体积的偶联缓冲液洗柱;
- [0072] III 将用饱和硫酸铵盐析法初步纯化过的样品上样;
- [0073] IV 用 5-10 倍柱床体积的偶联缓冲液洗柱;
- [0074] V 用 2-5 倍柱床体积的洗脱缓冲液洗脱,得到抗 PCT 抗原的多克隆抗体。
- [0075] 用上述方法制备得到的多克隆抗体及其他种属来源的多克隆抗体是需要本发明保护的。
- [0076] 本发明提供了抗 PCT 抗原的多克隆抗体和单克隆抗体,及抗 PCT 抗原的多克隆抗体和单克隆抗体的制备方法。实验证明,用本发明所属方法制得的多克隆抗体具有效价高,特异性好的特点,有很强的应用前景。
- [0077] 通过上述试剂盒,可利用多个 PCT 标准品建立标准曲线,即可得到待测样品的 PCT 浓度。
- [0078] 为了保证检测过程的顺利进行,本领域技术人员可以理解上述检测试剂盒还需要使用必要的缓冲液、终止液等,因此试剂盒内还包括洗液试剂瓶,其中装有用于洗涤酶标版的洗液;底液试剂瓶,其中装有受酶催化显色的底物溶液;终止液试剂瓶,其中装有终止显色反应的终止液。
- [0079] 对于上述应作广泛理解,即可以将这些缓冲液等成分的试剂瓶装在一个单独的盒子中与本发明的试剂盒组成配套试剂盒使用,以便避免材料浪费;也可以是这些试剂瓶均装在本发明的试剂盒中,以便于快速操作,分类方便。这两种试剂盒形式均涵盖于本发明的保护范围。
- [0080] 尽管只要使用两个标准品即可建立标准曲线,为了提高检测的准确度,所述 PCT 标准品试剂瓶为 5 个,所述 PCT 标准品浓度范围为 0.05ng-100ng/mL,在此范围内的任意五

个不同浓度。可以理解,更多的不同浓度的标准品可以进一步提高检测准确度,其它任意数目均涵盖于本发明。

[0081] 在本发明中,优选的,用于标记抗 PCT 的单克隆多抗的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0082] 其中,所述的浓缩洗液,样本稀释液、底物溶液和终止液的组分及配比如下:

[0083] 浓缩洗液:按重量份数计,氯化钠 96.0 份,氯化钾 2.40 份,十二水合磷酸氢二钠 42.96 份,磷酸二氢钾 2.88 份,吐温-20 0.05 份,超纯水 1000 份;

[0084] 样本稀释液:人工血清;

[0085] 底物溶液:TMB 溶液或 PNPP 溶液;

[0086] 终止液:2mol/L 硫酸溶液或 3mol/L 氢氧化钠溶液。

[0087] 为了保证检测结果的可靠性,防止污染等导致的失真,试剂盒内还包括阳性质控试剂瓶和/或阴性质控试剂瓶。

[0088] 在此基础上,本发明相应的提供了所述试剂盒的制备方法,包括下述步骤:

[0089] (1) 制备 PCT 单克隆多抗包被的酶标板

[0090] (a) PCT 单克隆多抗包被液的配制:采用以下任一缓冲溶液将 GM 稀释至 25ng/100 μ L ~ 2 μ g/100 μ L: 0.01mol/L ~ 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS), 其 pH7.0 ~ pH8.0; 0.05 ~ 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (CBS), 其 pH9.0 ~ pH9.6; 0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液, 其 pH10.0 ~ pH10.6;

[0091] (b) 封闭液的配制:将 3% ~ 5% 的脱脂奶粉或者 1% ~ 4% BSA 加入下述缓冲溶液中,配制成封闭液:缓冲溶液,0.01mol/L ~ 0.2mol/L PBS, 其 pH7.0 ~ pH8.0;

[0092] (c) 包被酶标板:

[0093] ①将配制的 PCT 单克隆多抗包被液加入酶标板孔中,每孔分别加入 60 μ L ~ 200 μ L 包被液;

[0094] ②酶标板置于 2-8 $^{\circ}$ C 环境下包被 8 ~ 16h;

[0095] ③将配制的封闭液加入酶标板孔中,每孔分别加入 60 μ L ~ 200 μ L 封闭液,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱,30 ~ 90 分钟;

[0096] ④从温箱取出酶标板后弃去封闭液,37 $^{\circ}$ C 恒温 30 ~ 90 分钟,即得;

[0097] (2) 标准品的制备

[0098] 标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成;

[0099] (3) 酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

[0100] 酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将 HRP 或 AP 标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 2000 ~ 1 : 20000 的比例稀释而成。

[0101] 本发明的试剂盒对于检测 PCT 的浓度具有非常好的效果,不仅快速准确,而且灵敏性高,因此本发明还公开了所述试剂盒在检测人降钙素原浓度中的应用,具体操作步骤如下所示:

[0102] 1) 将 PCT 标准品、待测样品加入到 PCT 单克隆多抗包被的酶标板的孔中,同时加入酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗,孵育 5-60min; 2) 甩掉反应液,采用洗液洗涤酶标板的孔; 2) 洗涤结束后在孔中加入底物溶液孵育 15min, 然后加入终止液混匀后,在 OD450nm 处读数; 3) 根据 PCT 标准品和待测样品的吸光度测定值,绘制标准曲线和方程,计算出待测样品

中 PCT 的浓度。

[0103] 本发明的试剂盒,通过将针对特异片段 PCT 的单克隆多抗包被在固相载体上,制成固相抗体,然后将待检样本与酶标的抗 PCT 的单克隆多抗分别加入所得固相上,恒温反应并经过彻底洗涤后使待检抗原与单克隆多抗结合形成免疫复合物;由于酶的反应底物 TMB 显色,颜色的深浅和待检样本中 PCT 浓度呈正相关,因此用酶标仪在一定波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线实现对抗原的定量检测分析,快速准确的检测 PCT 抗原,有利于相关疾病的早期诊断;同时,本发明的试剂盒敏感性和特异性好,能提供更准确可靠的检验结果;具体到检测操作,本发明的试剂盒采用一步式操作,实验操作简便易行,检测快速敏感,不需要精密的仪器设备,是一种面向不同级别医院及临床检验机构进行 PCT 检测的有效方法。

附图说明

[0104] 图 1 为本发明试剂盒实际应用生成的标准曲线图;

[0105] 图 2 为对应于检测结果的 ROC 曲线图。

[0106] 图 3 显示了兔 IgG 型多克隆抗体的 SDS-PAGE 检测的结果,其中,pAb 泳道为多抗,M 泳道为蛋白 Marker。

[0107] 图 4 显示了兔 IgG 型多克隆抗体的效价测定的结果。

具体实施方式

[0108] 在下述实施例中,本发明提供了所述试剂盒的优选实现方式,通常本发明的 PCT 诊断试剂盒在盒体内放置海绵托架和单克隆多抗包被的酶标板 R1,在海绵托架上防治符合要求的试剂瓶,例如 R2a 试剂瓶(PCT 标准品 a)、R2b 试剂瓶(PCT 标准品 b)、R2c 试剂瓶(PCT 标准品 c)、R2d 试剂瓶(PCT 标准品 d)、R2e 试剂瓶(PCT 标准品 e)、R3 试剂瓶(辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗)、R4 试剂瓶(浓缩洗液)、R5 试剂瓶(TMB 溶液)、R6 试剂瓶(终止液)、R7 试剂瓶(阳性质控)、R8 试剂瓶(阴性质控)、封板膜和海绵托架组成。

[0109] 其中,所用的洗液为了尽可能减少体积占用,采用浓缩洗液,所用的浓缩洗液、底物溶液和终止液的组分及配比如下:

[0110] 浓缩洗液:氯化钠 96.0 份,氯化钾 2.40 份,十二水合磷酸氢二钠 42.96 份,磷酸二氢钾 2.88 份,吐温-200.05 份,超纯水 1000 份;

[0111] 底物溶液:TMB 或 PNPP;

[0112] 终止液:2mol/L 硫酸溶液或 3mol/L 氢氧化钠溶液。

[0113] 上述所公开的组成以及浓度均为免疫学领域最常用的,根据需要,可以对其进行合理调整。

[0114] 实施例 1:PCT 抗原的制备

[0115] (1) 取 1mg PCT 全长抗原;

[0116] (2) 配置 2ml 酶解液:激素原转化酶(Prohormone Convertase, PC)、羧肽酶(Carboxypeptidase, CP)、氨肽酶(Aminopeptidase, AP)、肽酰甘氨酸羟单氧化酶(Peptideyl Glycine Amidating Mono-oxygenase, PAM)各 30IU/g 溶解于 20mM Tris, 500mM

NaCl, pH7.4 缓冲液中。

[0117] (3) 加入酶解液, 37°C 水浴酶解 2h ;

[0118] (4) 将分别针对 N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及下钙素 (Katacalcin, KAT) 抗原的三种单克隆抗体单独偶联到层析柱上, 将酶解液依次过滤进行亲和纯化, 从而获得 N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及抗降钙素原 (Katacalcin, KAT) 三种抗原, 具体步骤如下 :

[0119] a 将上述抗体分别结合到蛋白 A 微珠上。2mg 的单克隆抗体结合 1mL 湿的微珠。将抗体和蛋白 A 微珠混合制成稀薄的匀浆, 在总量为 10mL 的溶液中加入 1mL 微珠, 室温孵育 1h, 混匀。

[0120] b 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠 (pH9.0) 洗涤微珠 2 次, 每次以 3000g 离心 2min。

[0121] c 用 10 倍体积的 0.2mol/L 硼酸钠 (pH9.0) 重悬微珠, 留样。加入二甲基庚二酸酯 (固体) 至微珠匀浆中, 使终浓度为 20mmol/L。

[0122] d 室温孵育 30min, 并混匀, 留样。

[0123] e 用 0.2mol/L 乙醇胺 (pH8.0) 洗涤微珠 1 次以终止反应。然后重悬于 0.2mol/L 乙醇胺, 室温孵育 2h, 混匀。

[0124] f 将抗体包被的微珠转入层析柱中, 用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 冲洗容器。

[0125] g 用 20 倍柱床体积的 20mM Tris, 500mM NaCl, pH7.4 缓冲液洗柱。

[0126] h 将抗原液加到柱上, 按每毫升柱体积大约 1ml/h 的速度使抗原溶液流过层析柱。

[0127] i 用 20 倍柱床体积的结合缓冲液 (PBS, pH7.4) 洗柱。

[0128] k 采用分段洗脱法, 连续以 0.5 倍柱床体积的洗脱缓冲液 (0.1M 甘氨酸-HCl, pH2.8) 通过层析柱, 分管收集每一组分, 洗脱产物用 1.0M Tris-HCl, pH9.0 中和。

[0129] l 用蛋白定量检测每管的抗原含量, 将浓度高的各管合并。

[0130] 实施例 2, PCT 表位肽段的检测

[0131] Western blot 对 PCT 抗原多肽进行免疫反应特异性鉴定 : 取最后纯化的降钙素原多肽进行 15% SDS-PAGE 鉴定, 用 Abcam 公司生产的抗 PCT 单克隆抗体对其进行 western blot 分析, 选用 Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate 系统显色, 结果显示抗 PCT 单抗结合 PCT 蛋白处可见清晰条带。

[0132] 实施例 3, PCT 表位肽段抗原的制备

[0133] 由实施例 1 得到的相关抗原, 与相关大分子物质偶联以提高其免疫原性 : 所述的 PCT N 端 (N-proCT)、降钙素 (Calcitonin, CT) 以及下钙素 (Katacalcin, KAT) 分别与乳胶微球, KLH, BSA, GST 等进行偶联, 部分偶联需加入交联剂, 以促进其交联率的提高, 获得的抗原多肽片段可用于免疫动物。

[0134] 实施例 4, PCT 单克隆抗体的制备

[0135] 一、动物免疫

[0136] 选取 3 公斤左右健康新西兰大白兔 2 只, 免疫前先从耳缘静脉抽取静脉血, 析出的血清作为阴性对照。剪去兔背部部分毛发, 并用酒精擦拭消毒, 防止感染。第一次免疫时使用弗氏完全佐剂, 将 1ml 抗原 (0.4mg/ml) 与等体积佐剂充分乳化后, 背部皮下多点注射。3 周后进行第二次免疫, 抗原量减半, 并和弗氏不完全佐剂乳化后免疫兔子, 方法同第一次。此后每二周免疫一次, 并在第 3 次免疫后 12 天和第五次免疫后 12 天耳缘静脉取血获得抗

血清,用间接 ELISA 法进行抗血清效价测试。获得抗体滴度结果后可以进行最后一次加强免疫。方法是耳缘静脉注射 1ml (0.4mg/ml) 抗原,不使用佐剂。免疫后四天,处死动物,收集多抗血清,暴露腹部皮肤,酒精擦洗,相对无菌条件下取出脾脏。

[0137] 二、细胞融合

[0138] 1 骨髓瘤细胞的准备

[0139] 选择生长状态良好的 SP2/0 细胞,覆盖瓶底 80%时弃上清,以不完全培养基洗涤一次后,用 10mL 不完全培养基将细胞轻轻吹下。

[0140] 2 脾淋巴细胞的准备

[0141] 颈动脉放血处死兔子,暴露腹部皮肤,酒精擦洗,相对无菌条件下取出脾脏。在超净台中去除脾脏周围残余脂肪和结缔组织。用不含血清,含 $2\times$ 双抗 (200 单位青 / 链霉素 /ml) 的不完全培养液漂洗脾脏。将脾脏组织剪碎后过不锈钢筛网。冲洗筛网,收集细胞悬液,离心去上清。红细胞裂解液处理以去除红细胞。加不完全培养液中中止。离心去上清。再洗一次细胞,重悬细胞后台盼蓝染色测活计数。记录细胞总数 (染色细胞 + 未染色细胞)、活细胞数 (未染色细胞),计算细胞存活率 (活细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$)。

[0142] 将细胞悬液离心去上清,将细胞用冻存液悬浮后,分装至冻存管中,放入装有异丙醇的程序降温盒内, -80°C 低温冰箱过夜,第二日转入液氮罐中冻存。

[0143] 3 融合

[0144] 将上述制备的骨髓瘤细胞与脾细胞混合于一支 50mL 的带盖的融合管中,1000rpm 离心 10min,弃上清。将融合管置于手掌中,轻轻摩擦底部,使两种细胞充分混匀;在 37°C 水浴中 45s 内缓慢加入 1mL 预热的 PEG-1500 到融合管中,边加边轻轻摇匀;随即在 90s 内先后快滴加 30mL 37°C 预热的不完全 DMEM 培养基,使 PEG 稀释而失去作用, 37°C 静置 10min, 1000rpm 离心 10min;弃上清,用 60mL HAT 培养基轻轻悬浮沉淀细胞,再加入适量的腹腔巨噬细胞;分装于 96 孔细胞培养板,然后将培养板置 37°C 6% CO_2 培养箱内培养;5d 后用新鲜的 HAT 培养基换出一半培养基;10d 后用预热的 HT 换出 HAT;观察杂交瘤细胞的生长情况,待其细胞培养上清变黄或克隆分布至孔底面积的 1/10 以上时,吸取适量细胞上清进行 ELISA 检测,两次检测结果为阳性设为阳性克隆孔。

[0145] 三、杂交瘤细胞的克隆化及建株

[0146] 采用有限稀释法对连续两次检测为阳性的细胞株进行克隆化。阳性细胞计数,取 100 个细胞放入 5mL 含饲养细胞的培养液中,即 20 个细胞 /mL, $100\mu\text{L}$ / 孔滴加于 96 孔细胞培养板,即每孔 1 个细胞;再将余下的细胞悬液倍比稀释,细胞数为 10 个 /mL, $100\mu\text{L}$ / 孔滴加于 96 孔细胞培养板,即每孔 0.5 个细胞。第 8 ~ 9d 时,肉眼可见细胞克隆,对出现单个细胞克隆的孔再按筛选阳性杂交瘤细胞的间接 ELISA 方法进行筛选。连续进行三次以上亚克隆,判为阳性的细胞株扩大培养,建株冻存。

[0147] 实施例 5, PCT 多克隆抗体的制备

[0148] 一、多克隆抗体的制备

[0149] 1. 免疫动物

[0150] 将上述实施例 1 亲和层析得到的 N 端 (N-proCT) 抗原与弗氏完全佐剂等体积混合至合适体积。充分乳化后对新西兰大耳兔进行皮下多点注射,每只兔免疫剂量控制在 0.01-1mg。免疫前 3 天取耳血,分离血清做阴性对照。初次免疫后每 2 周免疫 1 次,方法与

第 1 次相同。

[0151] 2. 多克隆抗体的获得

[0152] 1) 效价测定:免疫过程中,免疫后每隔几天采血测效价 1 次,免疫次数不少于 3 次。

[0153] 2) 分离抗血清:血清效价达到最高时,用颈动脉放血的方法大量采血。待血液凝固,血清分离出后,高速离心,取上清,-20℃保存。

[0154] 3) 用饱和硫酸铵盐析法进行初步纯化

[0155] (1) 取 2ml 抗血清样本,加等体积的生理盐水,再加入 4ml 饱和硫酸铵溶液,4℃沉淀过夜。

[0156] (2) 10000g 低温离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 2ml PBS 溶解,缓慢滴加 1ml 饱和硫酸铵溶液,4℃静置 1 小时。

[0157] (3) 10000g 低温离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 1ml PBS 溶解,用 PBS 溶液 4℃透析过夜。

[0158] 4) 用亲和层析的方法进一步纯化

[0159] I 用 5-10 倍柱床体积的洗脱缓冲液洗柱;

[0160] II 用 5-10 倍柱床体积的偶联缓冲液洗柱;

[0161] III 将用饱和硫酸铵盐析法初步纯化过的样品上样;

[0162] IV 用 5-10 倍柱床体积的偶联缓冲液洗柱;

[0163] V 用 2-5 倍柱床体积的洗脱缓冲液洗脱,得到抗 N 端 (N-proCT) 抗原的多克隆抗体。

[0164] 实施例 6, PCT 多克隆抗体的制备

[0165] 采用上述实施例 2 亲和层析得到的降钙素 (Calcitonin, CT) 制备抗降钙素 (Calcitonin, CT) 抗原的多克隆抗体。

[0166] 具体步骤与实施例 5 相同。

[0167] 实施例 7, PCT 多克隆抗体的制备

[0168] 采用上述实施例 3 亲和层析得到的下钙素 (Katacalcin, KAT) 抗原制备抗降钙素原 (Katacalcin, KAT) 的多克隆抗体。

[0169] 具体步骤与实施例 5 相同。

[0170] 实施例 8, 抗体的检测

[0171] 1. Tricine-SDS-PAGE 电泳检测

[0172] 对实施例 4 制得的抗体进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳,对得到的凝胶进行固定后染色。实验结果见图 1(M 泳道为蛋白 Marker,另一泳道为多抗)。由图中可看出,在 2.3KD、3.6KD 和 6.8KD 分子量区有清晰明显的条带,说明抗体纯度很高。

[0173] 2. 效价测定

[0174] 用间接 ELISA 法对抗体效价进行测定。所用酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,阴性对照为 PBS 溶液。检测结果见图 2。从结果可看出,该抗体效价很高,大于 1 : 1×10⁶。

[0175] 在本发明基础上做出的改进仍属本发明范畴。

[0176] 实施例 9, 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0177] 一、酶标板的制备

[0178] 1、包被液的配置：

[0179] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.01M 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L pH7.0 ~ pH7.4。

[0180] 2、封闭液的配制：

[0181] 1) 所述的封闭液，采用 0.01M 磷酸盐缓冲溶液，其 pH7.0 ~ pH7.4；

[0182] 2) 将 3% 的脱脂奶粉加入上述溶液中，配制成封闭液。

[0183] 3、酶标板的包被方法：

[0184] 1) 将配制的包被液加入酶标板孔中，每孔分别加入 60 μ L 包被液；

[0185] 2) 上述酶标板置于 2-8 $^{\circ}$ C 环境下包被 8h；

[0186] 3) 将配制的封闭液加入酶标板孔中，每孔分别加入 60 μ L 封闭液，置于 37 $^{\circ}$ C 温箱，30 分钟；

[0187] 4) 从温箱取出酶标板后弃去封闭液，37 $^{\circ}$ C 恒温 30 分钟。

[0188] 二、标准品的制备（定量标准曲线的建立）

[0189] 标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成，稀释浓度分别是 10ng/ml, 5ng/ml, 2ng/ml, 0.5ng/ml, 0.25ng/ml。

[0190] 三、辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

[0191] 辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 2000 的比例稀释而成。

[0192] 四、浓缩洗液 (20 \times 0.01M PBS)

[0193] 浓缩洗液：氯化钠 96.0 份，氯化钾 2.40 份，十二水合磷酸氢二钠 42.96 份，磷酸二氢钾 2.88 份，吐温 -200.05 份，超纯水 1000 份。

[0194] 五、底物溶液 (TMB)

[0195] 六、终止液 (2mol/L 硫酸溶液)

[0196] 将浓硫酸与超纯水 1 : 8 稀释，配置成终止液

[0197] 实施例 10 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0198] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L, pH7.6 ~ pH8.0, 其余步骤同实施例 9。

[0199] 实施例 11 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0200] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.2mol/L 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L, pH7.6 ~ pH8.0, 其余步骤同实施例 9。

[0201] 实施例 12 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0202] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L, pH9.0 ~ pH9.6, 其余步骤同实施例 9。

[0203] 实施例 13 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0204] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L, pH9.0 ~ pH9.6, 其余步骤同实施例 9。

[0205] 实施例 14 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0206] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液，采用 0.2mol/L 碳酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗

稀释至 25ng/100 μ L, pH9.0 ~ pH9.6, 其余步骤同实施例 9。

[0207] 实施例 15 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0208] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液, 采用 0.05mol/L Tris 缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 25ng/100 μ L, pH8.0 ~ pH8.6, 其余步骤同实施例 9。

[0209] 实施例 16 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0210] 一、酶标板的制备

[0211] 1、包被液的配置:

[0212] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液, 采用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 500ng/100 μ L, 其 pH7.2 ~ pH7.4。

[0213] 2、封闭液的配制:

[0214] 1) 所述的封闭液, 采用 0.1mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液, 其 pH7.2 ~ pH7.4;

[0215] 2) 将 4% 的脱脂奶粉加入上述溶液中, 配制成封闭液。

[0216] 3、酶标板的包被方法:

[0217] 1) 将配制的包被液加入酶标板孔中, 每孔分别加入 100 μ L 包被液;

[0218] 2) 上述酶标板置于 2-8℃ 环境下包被 12h;

[0219] 3) 将配制的封闭液加入酶标板孔中, 每孔分别加入 100 μ L 封闭液, 置于 37℃ 温箱, 60 分钟;

[0220] 4) 从温箱取出酶标板后弃去封闭液, 37℃ 恒温 60 分钟。

[0221] 二、标准品的制备 (定量标准曲线的建立)

[0222] 标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成, 稀释浓度分别是 10ng/ml, 5ng/ml, 2ng/ml, 0.5ng/ml, 0.25ng/ml。

[0223] 三、辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

[0224] 辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 20000 的比例稀释而成。

[0225] 四、浓缩洗液 (20×0.01M PBS)

[0226] 浓缩洗液: 氯化钠 96.0 份, 氯化钾 2.40 份, 十二水合磷酸氢二钠 42.96 份, 磷酸二氢钾 2.88 份, 吐温-20 0.05 份, 超纯水 1000 份。

[0227] 五、底物溶液 (TMB)

[0228] 六、终止液 (2mol/L 硫酸溶液)

[0229] 将浓硫酸与超纯水 1 : 8 稀释, 配置成终止液。

[0230] 实施例 17 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0231] 封闭液采用 0.2mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液, 其 pH7.6 ~ pH8.0, 将 5% 的脱脂奶粉加入上述溶液中, 配制成封闭液, 其余步骤同实施例 16。

[0232] 实施例 18 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0233] 所述的的封闭液, 采用 0.2mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液, 其 pH7.6 ~ pH8.0, 将 1% 的 BSA (牛血清白蛋白) 加入上述溶液中, 配制成封闭液, 其余步骤同实施例 16。

[0234] 实施例 19 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0235] 所述的的封闭液, 采用 0.2mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液, 其 pH7.6 ~ pH8.0, 将 2% 的 BSA (牛血清白蛋白) 加入上述溶液中, 配制成封闭液, 其余步骤同实施例 16。

[0236] 实施例 20 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0237] 所述的封闭液,采用 0.2mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液,其 pH7.6 ~ pH8.0,将 4% 的 BSA(牛血清白蛋白)加入上述溶液中,配制成封闭液,其余步骤同实施例 16。

[0238] 实施例 21 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0239] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液,采用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 2 μg/100 μL,其 pH7.2 ~ pH7.4。

[0240] 2、封闭液的配制:

[0241] 1) 所述的封闭液,采用 0.1mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液,其 pH7.2 ~ pH7.4;

[0242] 2) 将 4% BSA(牛血清白蛋白)加入上述溶液中,配制成封闭液。

[0243] 3、酶标板的包被方法:

[0244] 1) 将配制的包被液加入酶标板孔中,每孔分别加入 200 μL 包被液;

[0245] 2) 上述酶标板置于 2-8℃ 环境下包被 16h;

[0246] 3) 将配制的封闭液加入酶标板孔中,每孔分别加入 100 μL 封闭液,置于 37℃ 温箱,60 分钟;

[0247] 4) 从温箱取出酶标板后弃去封闭液,37℃ 恒温 90 分钟。

[0248] 二、标准品的制备(定量标准曲线的建立)

[0249] 标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成,稀释浓度分别是 10ng/ml,5ng/ml,2ng/ml,0.5ng/ml,0.25ng/ml。

[0250] 三、辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

[0251] 辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 20000 的比例稀释而成。

[0252] 四、浓缩洗液(20×0.01M PBS)

[0253] 浓缩洗液:氯化钠 96.0 份,氯化钾 2.40 份,十二水合磷酸氢二钠 42.96 份,磷酸二氢钾 2.88 份,吐温-200.05 份,超纯水 1000 份。

[0254] 五、底物溶液(TMB)

[0255] 六、终止液(2mol/L 硫酸溶液)

[0256] 将浓硫酸与超纯水 1 : 8 稀释,配置成终止液。

[0257] 实施例 22 人降钙素原检测试剂盒的制备

[0258] 所述的 PCT 单克隆多抗包被液,采用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液将 PCT 单克隆多抗稀释至 2 μg/100 μL,其 pH7.2 ~ pH7.4。

[0259] 2、封闭液的配制:

[0260] 1) 所述的封闭液,采用 0.2mol/L PBS 磷酸盐缓冲溶液,其 pH7.2 ~ pH7.4;

[0261] 2) 将 3% BSA(牛血清白蛋白)加入上述溶液中,配制成封闭液。

[0262] 3、酶标板的包被方法:

[0263] 1) 将配制的包被液加入酶标板孔中,每孔分别加入 200 μL 包被液;

[0264] 2) 上述酶标板置于 2-8℃ 环境下包被 16h;

[0265] 3) 将配制的封闭液加入酶标板孔中,每孔分别加入 100 μL 封闭液,置于 37℃ 温箱,60 分钟;

[0266] 4) 从温箱取出酶标板后弃去封闭液,37℃ 恒温 90 分钟。

[0267] 二、标准品的制备（定量标准曲线的建立）

[0268] 标准品的制备是将 PCT 抗原用含稳定剂的磷酸盐缓冲液稀释而成，稀释浓度分别是 10ng/ml, 5ng/ml, 2ng/ml, 0.5ng/ml, 0.25ng/ml。

[0269] 三、辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制

[0270] 辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗溶液的配制是将辣根过氧化物酶标记的抗 PCT 的单克隆多抗用偶联物稳定剂以 1 : 10000 的比例稀释而成。

[0271] 四、浓缩洗液 (20×0.01M PBS)

[0272] 浓缩洗液 : 氯化钠 96.0 份, 氯化钾 2.40 份, 十二水合磷酸氢二钠 42.96 份, 磷酸二氢钾 2.88 份, 吐温 -200.05 份, 超纯水 1000 份。

[0273] 五、底物溶液 (TMB)

[0274] 六、终止液 (2mol/L 硫酸溶液)

[0275] 将浓硫酸与超纯水 1 : 8 稀释, 配置成终止液。

[0276] 实施例 22PCT 免疫检测试剂盒检测步骤

[0277] 一、检测步骤

[0278] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板 ;

[0279] 2) 配制工作洗涤液 : 浓缩洗液稀释 20× (1 份浓缩洗液 (20×0.01M PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水) ;

[0280] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组, 其中

[0281] 标准曲线组 : 各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 10ng/ml)

[0282] 待测样本组 : 待测样本

[0283] 4) 将标准品与待测样本分别取 40 μL 加入到酶标板中, 同时加入 40 μL 的辣根过氧化物酶标记的 PCT 抗体。孵育 30min。

[0284] 5) 洗涤 : 甩掉反应液, 每孔每次加入不少于 300 μL 的洗液, 静置 40s 后拍干, 重复上述洗涤操作, 共洗涤 2 次 ;

[0285] 6) 显色 : 洗涤结束后, 每孔加入底物溶液 100 μL, 在 37℃ 孵育 20min, 避光 ;

[0286] 7) 终止 : 每孔内加入 50 μL 终止液, 混匀后, 在 OD450nm 处读数 ;

[0287] 8) 结果判断 : 在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值, 根据计算软件绘制的标准曲线和方程, 即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。

[0288] 实施例 23PCT 免疫检测试剂盒检测步骤

[0289] 一、检测步骤

[0290] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板 ;

[0291] 2) 配制工作洗涤液 : 浓缩洗液稀释 20× (1 份浓缩洗液 (20×0.01M PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水) ;

[0292] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组, 其中

[0293] 标准曲线组 : 各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 10ng/ml)

[0294] 待测样本组 : 待测样本

[0295] 4) 将标准品与待测样本分别取 50 μL 加入到酶标板中, 同时加入 50 μL 的辣根过氧化物酶标记的 PCT 抗体。孵育 10min。

[0296] 5) 洗涤 : 甩掉反应液, 每孔每次加入不少于 300 μL 的洗液, 静置 40s 后拍干, 重复

上述洗涤操作,共洗涤 3 次;

[0297] 6) 显色:洗涤结束后,每孔加入底物溶液 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,避光;

[0298] 7) 终止:每孔内加入 50 μ L 终止液,混匀后,在 OD450nm 处读数;

[0299] 8) 结果判断:在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值,根据计算软件绘制的标准曲线和方程,即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。

[0300] 实施例 24PCT 免疫检测试剂盒检测步骤

[0301] 一、检测步骤

[0302] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板;

[0303] 2) 配制工作洗涤液:浓缩洗液稀释 20 \times (1 份浓缩洗液 (20 \times 0.01M PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水);

[0304] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组,其中

[0305] 标准曲线组:各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 10ng/ml)

[0306] 待测样本组:待测样本

[0307] 4) 将标准品与待测样本分别取 80 μ L 加入到酶标板中,同时加入 80 μ L 的辣根过氧化物酶标记的 PCT 抗体。孵育 20min。

[0308] 5) 洗涤:甩掉反应液,每孔每次加入不少于 300 μ L 的洗液,静置 40s 后拍干,重复上述洗涤操作,共洗涤 4 次;

[0309] 6) 显色:洗涤结束后,每孔加入底物溶液 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min,避光;

[0310] 7) 终止:每孔内加入 50 μ L 终止液,混匀后,在 OD450nm 处读数;

[0311] 8) 结果判断:在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值,根据计算软件绘制的标准曲线和方程,即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。

[0312] 实施例 25PCT 免疫检测试剂盒检测步骤

[0313] 一、检测步骤

[0314] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板;

[0315] 2) 配制工作洗涤液:浓缩洗液稀释 20 \times (1 份浓缩洗液 (20 \times 0.01M PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水);

[0316] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组,其中

[0317] 标准曲线组:各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 10ng/ml)

[0318] 待测样本组:待测样本

[0319] 4) 将标准品与待测样本分别取 100 μ L 加入到酶标板中,同时加入 100 μ L 的辣根过氧化物酶标记的 PCT 抗体。孵育 15min。

[0320] 5) 洗涤:甩掉反应液,每孔每次加入不少于 300 μ L 的洗液,静置 40s 后拍干,重复上述洗涤操作,共洗涤 5 次;

[0321] 6) 显色:洗涤结束后,每孔加入底物溶液 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min,避光;

[0322] 7) 终止:每孔内加入 50 μ L 终止液,混匀后,在 OD450nm 处读数;

[0323] 8) 结果判断:在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值,根据计算软件绘制的标准曲线和方程,即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。

[0324] 实施例 26PCT 免疫检测试剂盒检测步骤

[0325] 一、检测步骤

- [0326] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板；
- [0327] 2) 配制工作洗涤液：浓缩洗液稀释 $20\times$ (1 份浓缩洗液 ($20\times 0.01\text{M}$ PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水)；
- [0328] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组，其中
- [0329] 标准曲线组：各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 5ng/ml)
- [0330] 待测样本组：处理后的待测样本
- [0331] 4 将标准品与待测样本分别取 $100\ \mu\text{L}$ 加入到酶标板中，孵育 30min。
- [0332] 4) 洗涤：甩掉反应液，每孔每次加入不少于 $300\ \mu\text{L}$ 的洗液，静置 40s 后拍干，重复上述洗涤操作，共洗涤 3 次；
- [0333] 5) 加入酶标抗体：洗涤结束后，每孔加入辣根过氧化物酶标记的 PCT 单克隆多抗 $100\ \mu\text{L}$ ，在 37°C 下孵育 30min；
- [0334] 6) 洗涤：同步骤 4)；
- [0335] 7) 显色：洗涤结束后，每孔加入底物溶液 $100\ \mu\text{L}$ ，在 37°C 孵育 15min，避光；
- [0336] 8) 终止：每孔内加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液，混匀后，在 OD450nm 处读数；
- [0337] 9) 结果判断：在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值，根据计算软件绘制的半对数标准曲线和方程，即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。
- [0338] 实施例 27PCT 免疫检测试剂盒检测步骤
- [0339] 一、检测步骤
- [0340] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板；
- [0341] 2) 配制工作洗涤液：浓缩洗液稀释 $20\times$ (1 份浓缩洗液 ($20\times 0.01\text{M}$ PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水)；
- [0342] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组，其中
- [0343] 标准曲线组：各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 5ng/ml)
- [0344] 待测样本组：处理后的待测样本
- [0345] 4 将标准品与待测样本分别取 $50\ \mu\text{L}$ 加入到酶标板中，孵育 60min。
- [0346] 4) 洗涤：甩掉反应液，每孔每次加入不少于 $300\ \mu\text{L}$ 的洗液，静置 40s 后拍干，重复上述洗涤操作，共洗涤 2 次；
- [0347] 5) 加入酶标抗体：洗涤结束后，每孔加入辣根过氧化物酶标记的 PCT 单克隆多抗 $50\ \mu\text{L}$ ，在 37°C 下孵育 30min；
- [0348] 6) 洗涤：同步骤 4)；
- [0349] 7) 显色：洗涤结束后，每孔加入底物溶液 $100\ \mu\text{L}$ ，在 37°C 孵育 20min，避光；
- [0350] 8) 终止：每孔内加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液，混匀后，在 OD450nm 处读数；
- [0351] 9) 结果判断：在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值，根据计算软件绘制的半对数标准曲线和方程，即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。
- [0352] 实施例 28PCT 免疫检测试剂盒检测步骤
- [0353] 一、检测步骤
- [0354] 1) 取出已预包被抗原的 96 孔酶标板；
- [0355] 2) 配制工作洗涤液：浓缩洗液稀释 $20\times$ (1 份浓缩洗液 ($20\times 0.01\text{M}$ PBS) 加 19 份的无菌去离子水或超纯水)；

- [0356] 3) 分别设标准曲线组、待测样品组, 其中
- [0357] 标准曲线组: 各标准曲线点 (0.25ng/ml ~ 5ng/ml)
- [0358] 待测样本组: 处理后的待测样本
- [0359] 4 将标准品与待测样本分别取 150 μ L 加入到酶标板中, 孵育 20min。
- [0360] 4) 洗涤: 甩掉反应液, 每孔每次加入不少于 300 μ L 的洗液, 静置 40s 后拍干, 重复上述洗涤操作, 共洗涤 4 次;
- [0361] 5) 加入酶标抗体: 洗涤结束后, 每孔加入辣根过氧化物酶标记的 PCT 单克隆多抗 150 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20min;
- [0362] 6) 洗涤: 同步骤 4);
- [0363] 7) 显色: 洗涤结束后, 每孔加入底物溶液 100 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min, 避光;
- [0364] 8) 终止: 每孔内加入 50 μ L 终止液, 混匀后, 在 OD450nm 处读数;
- [0365] 9) 结果判断: 在计算机中分别输入标准液和待测样品的吸光度测定值, 根据计算软件绘制的半对数标准曲线和方程, 即可自动计算出各待测样品中 PCT 的浓度值。
- [0366] 实施例 29 试剂盒的临床应用
- [0367] (应用了实施例 10 的试剂盒和实施例 23 的检测步骤)
- [0368] 上述检测得到的标准品浓度与吸光度对应关系如下表 1 所示:
- [0369] 表 1 检测标准曲线

[0370]

抗原浓度 (ng/ml)	OD450
10	2.030
5	1.062
2	0.440
0.5	0.124
0.25	0.082

[0371] 将表 1 所得数据绘制成图, 即为附图 1 的标准曲线, 通过附图可以看出, 本发明的试剂盒用于 PCT 浓度检测具有极好的线性, 可以非常准确的用于待测样品 PCT 浓度检测。

[0372] 实施例 30 人降钙素原免疫检测试剂盒参考值的确定

[0373] 临床确诊为 PCT 阳性样本 60 例, 同时检测正常人样本 200 例, 测定 OD450 值, 根据标准曲线计算抗原浓度值, 最终确定参考值判断标准, 如下表 2 所示:

[0374] 表 2: 参考值判断标准

[0375]

阳性	疑似	阴性
抗原浓度 ≥ 0.5 ng/ml	0.5 ng/ml \leq 抗原浓度 ≤ 0.25 ng/ml	抗原浓度 ≤ 0.25 ng/ml

[0376] 如果样本的检测结果落在可疑区间, 则需要进行第二次检测。

[0377] 表 3 PCT 免疫检测试剂盒参考值的确定 ELISA 临床检测结果

组别	例数	PCT浓度	阳性率 (%)
		$\bar{x} \pm s$ (ng/ml)	
正常人	200	0.12±0.06	0(0/200)
阳性病人	60	1.75±0.63	100* (30/30)

[0379] 注:*表示与正常人比较 $P < 0.01$;

[0380] 根据标准曲线的结果计算检测抗原的浓度,通过检测 200 例正常人样本,取 95% 置信区间的抗原的浓度值为 Cut-off 上限: \bar{x} (平均值)+2s(标准偏差) = 0.12+2*0.06 = 0.25,通过检测 60 例阳性病人,取 95% 置信区间的抗原的浓度值为 Cut-off 下限: \bar{x} (平均值)-2s(标准偏差) = 1.75-2*0.63 = 0.50,抗原的浓度值 0.25ng/ml ~ 0.50ng/ml 之间为疑似病人。

[0381] 实施例 30 本发明试剂盒与传统二步法试剂盒的临床对比试验

[0382] 本次临床试验实际检测样本总量为 219 例,经法国梅里埃 VIDAS PCT 试剂盒检测其中阳性样本 73 例,阴性样本 146 例。

[0383] 用本发明试剂盒对 73 例 PCT 抗原阳性样本和 146 例 PCT 抗原阴性样本进行检测。73 例 PCT 抗原阳性样本中,本发明产品结果有 68 例为阳性,5 例为疑似。146 例 PCT 抗原阴性样本中,本发明产品结果 143 例为阴性,3 例为疑似。

[0384] 敏感性和特异性分析,统计结果如下表 4 所示:

[0385] 表 4:本发明试剂盒与已有 VIDAS 试剂盒检测结果对比

		VIDAS 结果		
		阳性	阴性	合计
[0386] 本发明产品结果	阳性	68	0	68
	疑似	5	3	8
	阴性	0	143	143
合计		73	146	219

[0387] (1) 敏感性: $\frac{A}{A+C+E} \times 100\% = \frac{68}{73} \times 100\% = 93.2\%$

[0388] (2) 特异性: $\frac{F}{B+D+F} \times 100\% = \frac{143}{146} \times 100\% = 97.9\%$

[0389] 本发明产品检测的样本数量为 219 例,敏感性 93.2%,特异性 97.9%。

[0390] 2. 将上述数据进行 ROC 分析,得到附图 2 的 ROC 曲线。其对应的数学含义为:

[0391] 表 5:ROC 曲线下面积

[0392]

曲线下的面积				
检验结果变量:VAR00001				
面积	标准误 ^a	渐进 Sig. ^b	渐进 95% 置信区间	
			下限	上限
.991	.006	.000	.979	1.000
检验结果变量:VAR00001 在正的和负的实际状态组之间至少有一个结。统计量可能会出现偏差。				
a. 在非参数假设下				
b. 零假设: 实面积 = 0.5				

[0393] ROC 曲线下面积达 0.991,说明本发明产品的检测性能优越,有较高准确性。

[0394] 同时,从上述结果我们还可以看到,本发明的试剂盒由于具有更好的检测灵敏度、准确度,能够更好地区分患者 PCT 抗原的阴性、阳性和疑似,以提供准确的诊疗依据,而已有的试剂盒由于检测灵敏度不足,会导致部分误诊。

[0395] 实施例 31 试剂盒的方法学考察

[0396] (应用了实施例 10 的试剂盒和实施例 30 的检测步骤)

[0397] 1、敏感性实验

[0398] 收集临床确诊样本 20 例进行检验。

[0399] 诊断敏感性=阳性样本检出例数 / 阳性样本总例数 × 100%,由实验结果见表 7,说明本实验的敏感性在 95%以上。

[0400] 表 6 敏感性检测实验结果

[0401]

序号	OD450	计算抗原浓度 (μg/L)	结果判断
1	2.339	11.48	阳性
2	0.661	3.12	阳性
3	0.804	3.83	阳性
4	0.110	0.42	疑似
5	0.280	1.22	阳性
6	0.535	2.49	阳性
7	0.896	4.29	阳性
8	0.336	1.5	阳性
9	0.338	1.51	阳性

10	0.202	0.83	阴性
11	0.276	1.2	阳性
12	0.407	1.85	阳性
13	0.192	0.78	阳似
14	0.760	3.61	阳性
15	0.232	0.98	阳性
16	1.534	7.47	阳性
17	0.180	0.72	阳似
18	0.256	1.1	阳似
19	0.332	1.48	阳性
20	0.206	0.85	阳性

[0402]

[0403] 2、特异性实验

[0404] 检测 20 例健康人样本。

[0405] 特异性 = 阴性样本检出例数 / 阴性样本总例数 × 100%，由实验结果见表 8，说明本实验的特异性在 95% 以上。

[0406] 表 7 特异性检测实验结果

[0407]

序号	OD450	计算抗原浓度 (μg/L)	结果判断
1	0.053	0.09	阴性
2	0.045	0.05	阴性
3	0.045	0.05	阴性
4	0.051	0.08	阴性
5	0.045	0.05	阴性
6	0.047	0.06	阴性
7	0.051	0.08	阴性

8	0.051	0.08	阴性
9	0.047	0.06	阴性
10	0.049	0.07	阴性
11	0.049	0.07	阴性
12	0.047	0.06	阴性
13	0.051	0.08	阴性
14	0.051	0.08	阴性
15	0.047	0.06	阴性
16	0.051	0.08	阴性
17	0.051	0.08	阴性
18	0.049	0.07	阴性
19	0.047	0.06	阴性
20	0.053	0.09	阴性

[0408] 3、回收率实验

[0409] 选择正常人血液添加人降钙素原抗原 $2\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 后检测, 计算真实值与期望值的比值, 得到回收率, 见表 9。回收率介于 80-120% 之间认为合格。由实验结果说明本实验的回收率介于 80% -120% 之间, 回收率良好。

[0410] 表 8 回收率结果实验

[0411]

	OD450	计算抗原浓($\mu\text{g/L}$)	回收率
添加抗原浓度 为 $2\mu\text{g/L}$	0.412	1.88	94%
	0.377	1.70	85%
	0.404	1.84	92%
	0.417	1.90	95%
	0.402	1.83	91%
	0.410	1.87	93%
	0.400	1.82	91%
添加抗原浓度 为 $1\mu\text{g/L}$	0.214	0.89	89%
	0.211	0.88	88%
	0.207	0.86	86%
	0.239	1.02	102%
	0.235	1.00	100%
	0.231	0.97	97%
	0.209	0.87	87%

[0412] 4、重复性实验

[0413] 1) 批间精密度

[0414] 合格标准:将同一标本每天一次测试,连续 11 个工作日,计算其均值 M、标准差 SD 与变异系数 CV,变异系数 $CV \leq 25\%$ 为合格,见表 9。结论:本产品批间精密度(即变异系数 CV)为 2%,小于 25%,符合标准,证明本产品批间精密度良好。

[0415] 表 9 批间精密度结果实验

[0416]

批间精密度汇总	
工作日(d)	计算抗原浓度($\mu\text{g/L}$)
1	1.82
2	1.88
3	1.90
4	1.94
5	1.92
6	1.92

[0417]

7	1.95
8	1.85
9	1.87
10	1.83
11	1.84
M	1.88
SD	0.046
CV	2%

[0418] 2) 批内精密度

[0419] 合格标准:将同一标本在同一批次实验中平行测定 10 组数据。计算其均值 M、标准差 SD 与变异系数 CV,变异系数 $CV \leq 15\%$ 为合格,见表 10。本产品批内精密度(即变异系数 CV)为 3%,小于 15%,符合标准,验证合格。

[0420] 表 10:批内精密度结果实验

[0421]

序号	OD450	计算抗原浓度 ($\mu\text{g/L}$)
1	0.376	1.70
2	0.394	1.79
3	0.360	1.62
4	0.386	1.75
5	0.398	1.81
6	0.384	1.74
7	0.392	1.78
8	0.376	1.70
9	0.384	1.74
10	0.380	1.72
	M	1.74
	SD	0.05
	CV	3%

[0422] 5、稳定性实验

[0423] 将组装好的试剂盒在 37℃ 环境中放置, 每天做标准曲线检测已知浓度的抗原溶液, 连续检测 5 天, 检测值变化率 (即变异系数 CV) 小于 20%, 见表 11, 证明试剂盒稳定。其结果显示 5 天的变异系数 $CV \leq 20\%$, 说明本发明稳定性良好。

[0424] 表 11 稳定性试验结果

[0425]

		1	2	3	4	5	CV
	blank	0.077	0.071	0.080	0.080	0.065	
抗原浓度 ($\mu\text{g/L}$)	10	2.030	2.043	2.056	2.023	2.021	
	5	1.062	1.072	1.054	1.048	1.049	
	2	0.440	0.437	0.432	0.427	0.426	
	0.5	0.124	0.126	0.119	0.115	0.111	
	0.25	0.082	0.078	0.076	0.075	0.074	
质控点 ($\mu\text{g/L}$)	OD450	0.453	0.436	0.441	0.445	0.446	
	抗原浓度 ($\mu\text{g/L}$)	2.08	1.99	2.03	2.04	2.05	1.6%

[0426] 上述参照具体实施方式对本发明人降钙素原免疫检测试剂盒及其制备方法与应用进行的详细描述, 是说明性的而不是限定性的, 可按照所限定范围列举出若干个实施例, 因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改, 应属本发明的保护范围之内。

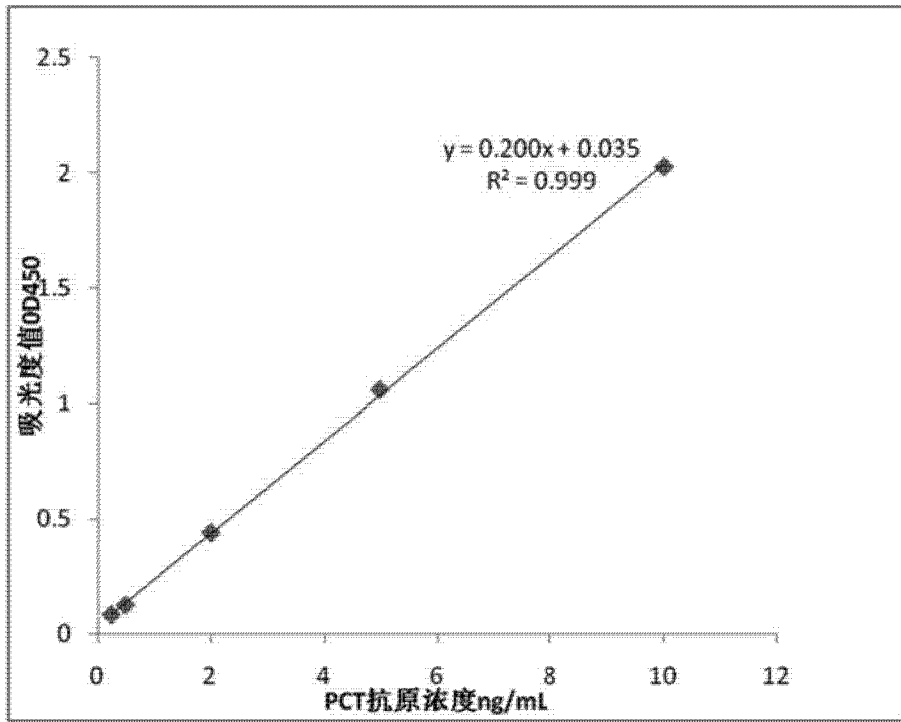


图 1

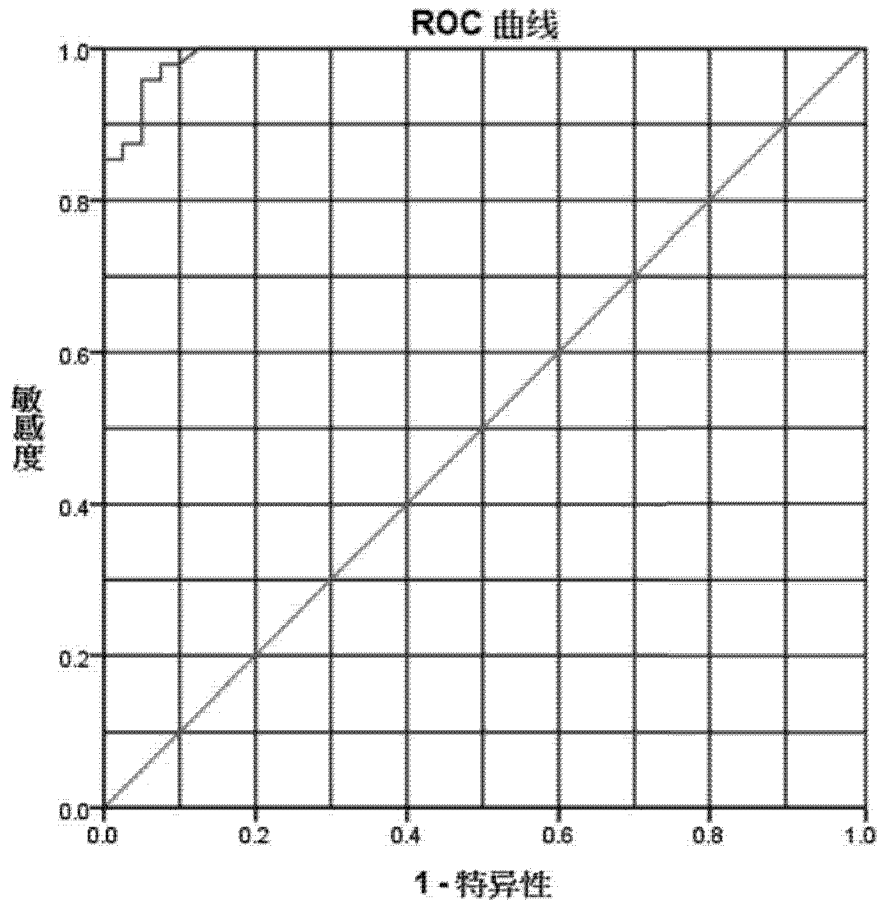


图 2

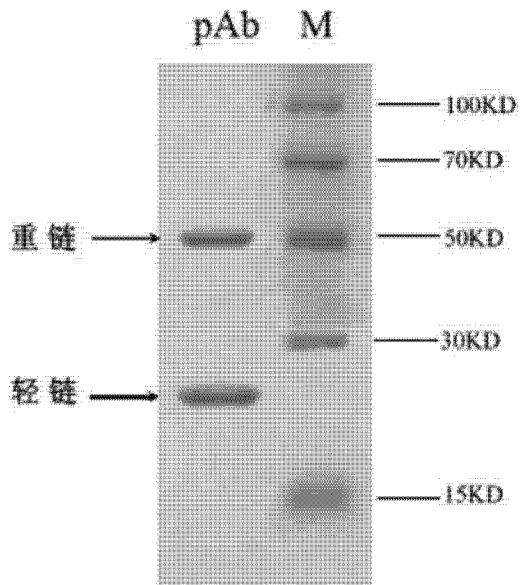


图 3

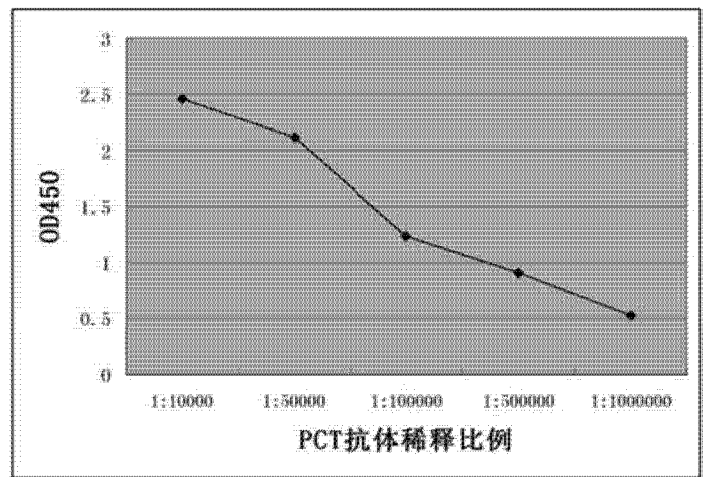


图 4

专利名称(译)	一种人降钙素原免疫检测试剂盒及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104792997A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201410029667.4	申请日	2014-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	天津汇滨生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津汇滨生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津汇滨生物科技有限公司		
[标]发明人	周泽奇		
发明人	周泽奇		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	方挺		
其他公开文献	CN104792997B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人降钙素原免疫检测试剂盒，试剂盒内包括PCT单克隆多抗包被的酶标板；至少两个PCT标准品试剂瓶，每个PCT标准品试剂瓶中装有不同浓度的PCT标准品；酶标试剂瓶，其中装有酶标记的抗PCT的单克隆多抗。本发明的检测试剂盒具有较好的敏感性和特异性，结果与参比试剂符合率高，能提供更准确可靠的检验结果，所述试剂盒操作简便易行，检测快速灵敏，所用酶标仪简单、普及，价格低廉，该检测试剂盒为人降钙素原检测提供了一种有效工具。

