



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105548567 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201610031801. 3

G01N 33/543(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 18

G01N 33/533(2006. 01)

(71) 申请人 武汉菲恩生物科技有限公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖高新区高新大道 666 号光谷生物城创新园 C6328

(72) 发明人 郑忠亮 董垚 夏其林 王会妙 孙秋菊 张丽媛

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 程殿军 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

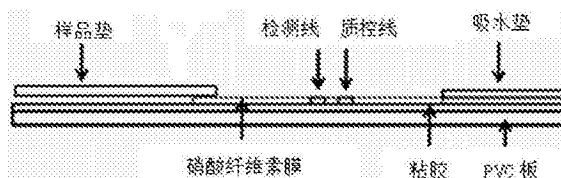
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种时间分辨荧光定量检测 PCT 的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种时间分辨荧光定量检测 PCT 的试剂盒,包括荧光微球抗体复合物和免疫荧光试纸卡,其中,荧光微球抗体复合物是将 PCT 单抗标记于稀土荧光微球形成的复合物,将该复合物添加到枪头中并冻干而成,作为检测抗体;免疫荧光试纸卡包括检测试纸卡,检测试纸卡由样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并贴于衬板上构成;其中,硝酸纤维素膜上的检测线位置包被有另一 PCT 单抗,质控线位置包被有羊抗小鼠多抗。该试剂盒可避免样品本身的荧光影响,使用稀土荧光微球作为标记载体,稳定性好,标记通过共价键将微球和抗体连接,标记产物稳定。对于样本的检测快速简便、敏感性高,可进行全定量检测。



1. 一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,包括荧光微球抗体复合物和免疫荧光试纸卡,其特征在于,

荧光微球抗体复合物:是将PCT单抗标记于稀土荧光微球形成的复合体,将该复合体添加到枪头中并冻干而成,作为检测抗体;

免疫荧光试纸卡包括检测试纸卡,检测试纸卡由样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并贴于衬板上构成;其中,硝酸纤维素膜上的检测线位置包被有另一PCT单抗,质控线位置包被有羊抗小鼠多抗。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,所述复合体采用羧基化的稀土荧光微球作为载体,通过碳二亚胺和羟基硫代琥珀酰亚胺将羧基活化,活化的羧基与PCT单抗中的-NH₂共价结合,形成的荧光微球复合体。

3. 根据权利要求2所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,所述复合体的具体制备方法为:

(1)取稀土荧光微球,离心取沉淀,用pH6.0的MES缓冲液洗涤;

(2)活化:在洗涤后的微球中加入等体积等摩尔浓度的碳二亚胺和羟基硫代琥珀酰亚胺,室温震荡进行羧基活化反应;

(3)标记抗体:步骤(2)活化后的微球离心取沉淀,用PB缓冲液洗涤后加入适量PCT单抗,室温震荡使羧基与-NH₂的共价结合,实现抗体标记;

(4)将经过抗体标记的微球离心取沉淀,加入羟胺缓冲液淬灭反应;

(5)经过淬灭反应的微球离心取沉淀,加入封闭液进行封闭,最后加入储存液保存;

所述封闭液为10mM PB溶液,其中含0.5wt%酪蛋白;

所述储存液为10mM PB溶液,其中含0.5wt%BSA,0.5%(v/v)Tween-20,0.02wt%叠氮化钠。

4. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,所述样品垫为经过含3wt%BSA的0.01M PB缓冲液封闭的玻璃纤维膜。

5. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,所述检测线和质控线之间的距离为4mm。

6. 根据权利要求5所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,检测线与样品垫端的最短距离为7mm,质控线距离吸水垫的最短距离为11mm。

7. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,免疫荧光试纸卡是由检测试纸卡固定在塑料底卡上,试纸表面用面卡压紧而成,且面卡在对应样品垫和硝酸纤维素膜的部位分别预留加样孔和观察窗。

8. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,还包括样品缓冲液,其为含有0.25wt%酪蛋白和40mM EDTA的PB溶液。

9. 根据权利要求1~8任一所述的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,其特征在于,还包括稀释液,稀释液成分为含有6wt%BSA和5mM葡萄糖的PB溶液。

一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒。

背景技术

[0002] 降钙素原(PCT)是一种蛋白质,当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时它在血浆中的水平升高。PCT具有出现早、半衰期短、不受免疫抑制影响、且在全身和局部感染下都呈现正相关的增长等特点。基于此,PCT较大多数经典的炎症因子(如TNF- α 、IL-16、IL-6、CRP等)有更好的敏感性、特异性和实时性,在临床检测和监测有重要的实用价值。

[0003] 现阶段,临床上PCT的检测方法多见双抗夹心免疫化学发光法、放射性免疫法、酶联免疫法(ELISA)、免疫层析法等。

[0004] 双抗夹心免疫化学发光法具有敏感度高、所需时间短等优点,但是不能检测正常人血中的PCT。

[0005] 放射性免疫法是通过将放射活性分子共价交联至PCT抗体免疫反应后测定放射活性分子的放射信号来间接定量检测PCT的一种超微量分析方法。具有特异性好、灵敏度高(可达ng和pg级)、操作简便、样品制备简单、精确定量等优点,但是该方法中操作人员会接触到放射性物质,可能会损害操作人员的身体,而且检测完成后怎样处置放射性材料也是个严重的问题。

[0006] PCT的酶联免疫检测方法是双抗夹心ELISA方法,将一对PCT单抗分别进行酶标板固化和酶标记,抗原抗体反应后,通过底物与酶的呈色反应,即可显示特定抗原是否存在,并可根据呈色之深浅进行定量分析。具有特异性强、灵敏度高、操作简便、快速、样品能量大等特点,不但能进行定性检测也能定量检测,但是耗时较长。

[0007] 侧向免疫层析法在疾病快速诊断、小分子快速检测等领域已得到了广泛的应用。其原理是将特异性的抗原或抗体包被到硝酸纤维素膜上,构成检测线,将二抗包被在距离检测线在2~3毫米的区域构成质控线。当样本中的目标分子与带有特定标记物的检测抗体结合后,从硝酸纤维素酶的上样端向吸水端层析。由于毛细管作用,复合物将沿着膜向前移动,但移动到检测线时,样品中的目标分子将被检测线中的捕获抗体捕捉而停留在检测线,多余的检测抗体则通过检测线后被质控线的二抗所捕捉。常用的标记物为胶体金颗粒、荧光微球等。

[0008] PCT的胶体金免疫层析法通过静电吸附将PCT抗体标记到胶体金颗粒表面,通过观察胶体金颗粒在检测线上的聚集显色判断检测结果。具有快速、简便、直观等优点,但同时存在着以存在依靠肉眼识别、灵敏度低、无法精确定量、标记通过静电吸附,标记产物不稳定等缺点。

[0009] PCT的免疫荧光层析技术是将PCT抗体共价结合于荧光微球表面的活性基团(-COOH、-NH₂)上,通过激发后检测线是否产生荧光来判断检测结果,延续了胶体金免疫层析

方法的优势,同时具有高敏感度、完全定量、标记物稳定的优点。在医学、动植物检疫、食品安全监督各领域得到了日益广泛的应用。

[0010] 在生物流体和血清中的许多复合物和蛋白本身就可以发荧光,因此使用传统的发色团进而进行荧光检测的灵敏度就会严重下降。大部分背景荧光信号是短时存在的,因此将长衰减寿命的标记物与时间分辨荧光技术相结合,就可以使瞬时荧光干扰减到最小化。

发明内容

[0011] 为了解决现有的几种检测PCT技术存在的上述缺陷,本发明提供了一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒。

[0012] 本发明提供的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,包括荧光微球抗体复合物和免疫荧光试纸卡,其中,

[0013] 荧光微球抗体复合物:是将PCT单抗标记于稀土荧光微球形成的复合体,将该复合体添加到枪头中并冻干而成,作为检测抗体;

[0014] 免疫荧光试纸卡包括检测试纸卡,检测试纸卡由样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并贴于衬板上构成;其中,硝酸纤维素膜上的检测线位置包被有另一PCT单抗,质控线位置包被有羊抗小鼠多抗。

[0015] PCT单抗是由PCT抗原免疫小鼠获得的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞产生,因此羊抗小鼠多抗可以与PCT单抗结合。

[0016] 时间分辨荧光免疫分析(Timed-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是一种灵敏的高端定量免疫检测技术,是以稀土荧光微球(镧系稀土离子)作为标记物来标记抗原或抗体,因镧系稀土离子Stokes位移大,避免了激发光和发射光的重叠二影响结果,而且镧系稀土离子荧光寿命长,可以通过延长检测时间来消除检测物质本底荧光的干扰,提高了灵敏度,另外稀土元素的荧光强度高,同样能够提高检测的灵敏度。常用的稀土荧光微球为EU荧光微球。

[0017] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,所述复合体采用羧基化的稀土荧光微球作为载体,通过碳二亚胺和羟基硫代琥珀酰亚胺将羧基活化,活化的羧基与PCT单抗中的-NH₂共价结合,形成的荧光微球复合体。

[0018] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,所述复合体的具体制备方法为:

[0019] (1)取稀土荧光微球,离心取沉淀,用pH6.0的MES缓冲液洗涤;

[0020] (2)活化:在洗涤后的微球中加入等体积等摩尔浓度的碳二亚胺和羟基硫代琥珀酰亚胺,室温震荡进行羧基活化反应;

[0021] (3)标记抗体:步骤(2)活化后的微球离心取沉淀,用PB缓冲液洗涤后加入适量PCT单抗,室温震荡使羧基与-NH₂的共价结合,实现抗体标记;

[0022] (4)将经过抗体标记的微球离心取沉淀,加入羟胺缓冲液淬灭反应;

[0023] (5)经过淬灭反应的微球离心取沉淀,加入封闭液进行封闭,最后加入储存液保存;

[0024] 所述封闭液为10mM PB溶液,其中含0.5wt%酪蛋白;

[0025] 所述储存液为10mM PB溶液,其中含0.5wt%BSA,0.5%(v/v)Tween-20,0.02wt%

叠氮化钠。

[0026] 本发明中,所用的PB缓冲液的pH值是7.5,浓度为10mM。为常规试剂,可直接购买商品或自行配制。所述羟胺缓冲液是指羟胺的水溶液,其中常用的羟胺摩尔浓度为50mM。

[0027] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,所述样品垫为经过含3wt%BSA的0.01M PB缓冲液封闭的玻璃纤维膜。

[0028] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,所述检测线和质控线之间的距离为4mm。

[0029] 更优选地,检测线与样品垫端的最短距离为7mm,质控线距离吸水垫的最短距离为11mm。

[0030] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,免疫荧光试纸卡是由检测试纸卡固定在塑料底卡上,试纸表面用面卡压紧而成,且面卡在对应样品垫和硝酸纤维素膜的部位分别预留加样孔和观察窗。

[0031] 作为优选方案,上述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,还包括样品缓冲液,其为含有0.25wt%酪蛋白和40mM EDTA的PB溶液。样品缓冲液用于层析样品。

[0032] 作为优选方案,以上任一所述时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒中,还包括稀释液,稀释液成分为含有6wt%BSA和5mM葡萄糖的PB溶液。稀释液用来稀释样品,试剂盒中添加稀释液后无需操作人员另外配制,使用更加方便。

[0033] 本发明提供的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒,检测原理如下:

[0034] 将稀释好的样品与荧光检测抗体混合后,加入到试纸卡一端的加样口,通过毛细作用向前移动,反应一段时间后,利用荧光扫描仪,扫描试纸卡的观察框,捕捉质控线和检测线被激发的荧光强度,如果样品中含有相应的PCT抗原,包被在检测线上的PCT单抗和荧光微球抗体复合物中的PCT单抗均与样品中的抗原结合,形成免疫复合物,多余的未结合的荧光微球抗体复合物中的PCT单抗将会因毛细作用移至质控线与质控线包被的羊抗小鼠多抗结合,这样检测线和质控线均会产生荧光;如果待检样品中没有相应抗原,荧光微球抗体复合物中的PCT单抗将不会与包被在检测线上的另一PCT单抗结合,荧光微球抗体复合物不会富集,则检测线上不会产生荧光,而荧光微球抗体复合物中的PCT单抗只与质控线包被的羊抗小鼠多抗结合,质控线会出现荧光。

[0035] 与现有检测技术相比,本发明的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒具有以下有益效果:

[0036] (1)可避免样品本身的荧光影响。

[0037] (2)标记载体稳定。

[0038] (3)标记通过共价键将微球和抗体连接,标记产物稳定。

[0039] (4)检测快速简便、敏感性高。

[0040] (5)可全定量检测。

附图说明

[0041] 图1为本发明提供的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒结构组成示意图。

[0042] 图2为不同浓度PCT在免疫荧光试纸卡上的层析曲线。

[0043] 图3为使用本发明试剂盒得出的PCT标准曲线。

[0044] 图4:使用本发明试剂盒和ELISA方法检测血液样本的准确度的相关性。

具体实施方式

[0045] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面结合优选的具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0046] 实施例1时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒制备

[0047] (1)荧光微球抗体复合物的制备

[0048] ①取0.5mL稀土荧光微球(镧系元素)(购自上海微柯力,货号:DF020EU),离心取沉淀,加入pH6.0的MES缓冲液洗涤两次。MES缓冲液配方:称量9.76g MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)、29.22g NaCl、5ml10%的Brij35,溶于1L蒸馏水,用3mol/L NaOH调节pH=6.0。

[0049] ②活化:在洗涤后的微球中分别加入114 μ L的50mM的碳二亚胺(EDAC)和114 μ L的50mM的羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),室温震荡1h。

[0050] ③标记抗体:离心微球取沉淀,用PB缓冲液洗涤两次。

[0051] ④加入适当量的PCT单抗A,室温震荡2h,使羧基与-NH₂的共价结合,实现抗体标记。

[0052] ⑤离心微球取沉淀,加入50mM的羟胺/10mM pH7.5PB缓冲液淬灭反应,室温震荡5min;然后离心微球,加入50mM的羟胺缓冲液彻底淬灭反应,室温震荡30min

[0053] ⑥离心微球,加入封闭液(0.5%酪蛋白,10mM PB),室温震荡2h。

[0054] ⑦加入400 μ L储存液(0.5wt%BSA,0.5%(v/v)Tween-20,0.02wt%叠氮化钠,10mM PB)保存于4 $^{\circ}$ C。

[0055] (2)荧光微球抗体复合物的制备:

[0056] 将制备好的标记有PCT单抗的荧光微球喷点于枪头中,每个枪头2.5 μ L,-80 $^{\circ}$ C冰箱冷冻过夜后,冷冻真空干燥2h后即为荧光微球抗体复合物,可用于组装试剂盒。

[0057] (3)包被膜的制备:

[0058] ①包被

[0059] 揭开PVC底板中间宽度25mm的保护膜,将硝酸纤维素膜粘贴于此,即可用于T线和C线抗体的包被。

[0060] 调整划线的位置,是T线距NC膜下缘(样品垫端)7mm,C线距NC膜下缘(吸水垫端)11mm,T线和C线间距为4mm。

[0061] 检测线(T线):用0.01M的PBS(pH7.4,包含3%甲醇)将抗PCT抗体(鼠源)稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s。

[0062] 质控线(C线):用0.01M的PBS(pH7.4,包含3%甲醇)将羊抗小鼠多克隆抗体稀释到1mg/mL进行包被,划线浓度为1 μ L/cm,速度100mm/s。

[0063] ②干燥

[0064] 放入37 $^{\circ}$ C烘箱,干燥30-40min。

[0065] (4)样品垫的制备:

[0066] 将玻璃纤维膜裁剪至31mm \times 100mm,用枪头将1.91mL封闭液(0.01M PB缓冲液,包含3wt%BSA)均匀涂布于玻璃纤维膜表面,置37 $^{\circ}$ C烘箱过夜干燥。

[0067] (5)检测试纸卡的组装与剪切

[0068] 在已粘贴硝酸纤维素膜(NC膜,包被有PCT单抗检测区和羊抗小鼠质控区)的PVC底板(宽77mm)上下两端分别粘贴吸水垫和已处理好的样品垫,吸水垫在较窄一端,宽度为25mm,与包被膜交联2mm;样品垫在较宽一端,宽度为31mm,与包被膜交联2mm。

[0069] 组装完成,切条机切成5mm宽度,即为检测试纸卡。具体组装方式如图1所示。

[0070] (6)免疫荧光试纸卡的制备

[0071] 把一条检测试纸卡固定在塑料底卡上,试纸卡表面用面卡压紧,面卡在对应检测试纸卡的样品垫和NC膜的部位分别预留加样孔和观察窗。即为免疫荧光试纸卡。

[0072] (7)试剂盒的制备

[0073] 将免疫荧光试纸卡、含冻干荧光微球抗体复合物的枪头、含样品稀释液(6%BSA,5mM葡萄糖,PB)的冻存管、两包1g干燥剂共同放入铝箔袋,真空封口后4℃保存,即制备完成检测PCT的免疫荧光试剂盒。

[0074] 实施例2使用本发明试剂盒检测PCT标准品

[0075] 连续稀释PCT标准品(本公司),用样品稀释液将标准品进行10倍稀释,制成100000ng/L、10000ng/L、1000ng/L、100ng/L、10ng/L的样品。用含冻干荧光微球复合物的枪头安装在移液器上取75μL样品溶液,加入到300μL的样品缓冲液(0.25%酪蛋白,40mMEDTA,PB)中,混匀后取75μL点加到试纸卡的加样孔中。室温静置20min,将试纸卡放到荧光扫描仪中读数。用检测线荧光值除以质控线荧光值为测量值。每个样品浓度进行测量三次,取平均值后,以测量值对样品浓度作图。检测线和质控线的峰形图如图2所示,峰形非常灵敏。标准品的线性结果如图3所示,线性也非常好。

[0076] 实施例3临床血样中PCT的检测

[0077] 采集医院PCT的阳性和阴性样本,用本试剂盒(方法同上)和EISA两种方法进行检测,分别计算检出率。结果如表1所示,本发明的时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒的检出率明显高于ELISA的方法。

[0078] 表1、临床血样中PCT的检测

[0079]

	阴性样本数	阳性样本数	阴性检出率	阳性检出率
ELISA	128	356	95%	97%
本发明试剂盒	128	356	97%	99%

[0080] 同时对血样进行准确度相关性的实验,以时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒的检测结果对ELISA的检测结果进行作图,如图4所示,点的分布主要分布在45度角直线附近,拟合得到相关曲线,得到两种方法的相关系数为0.9946,可见两种方法的检测结果非常一致。

[0081] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的核心思想。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,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

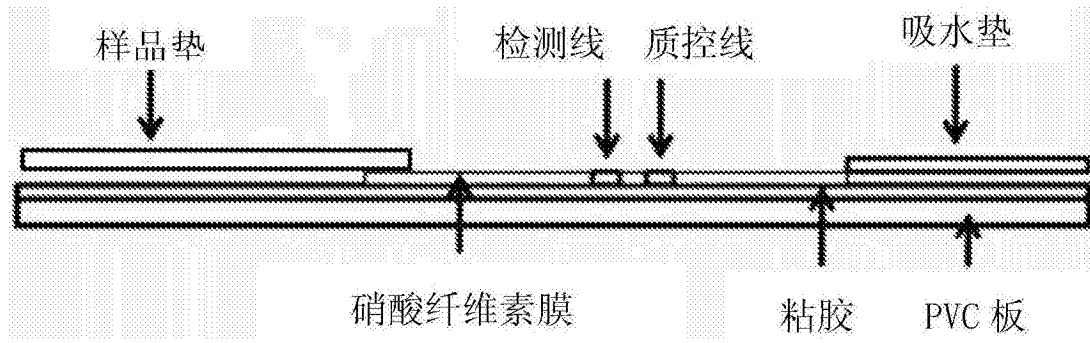


图1

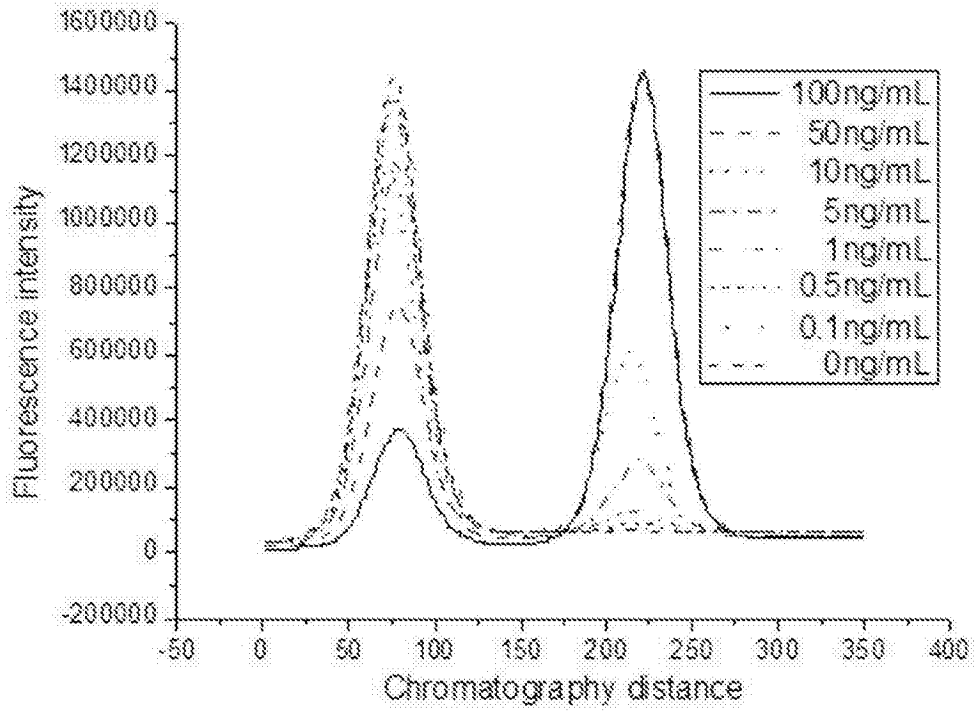


图2

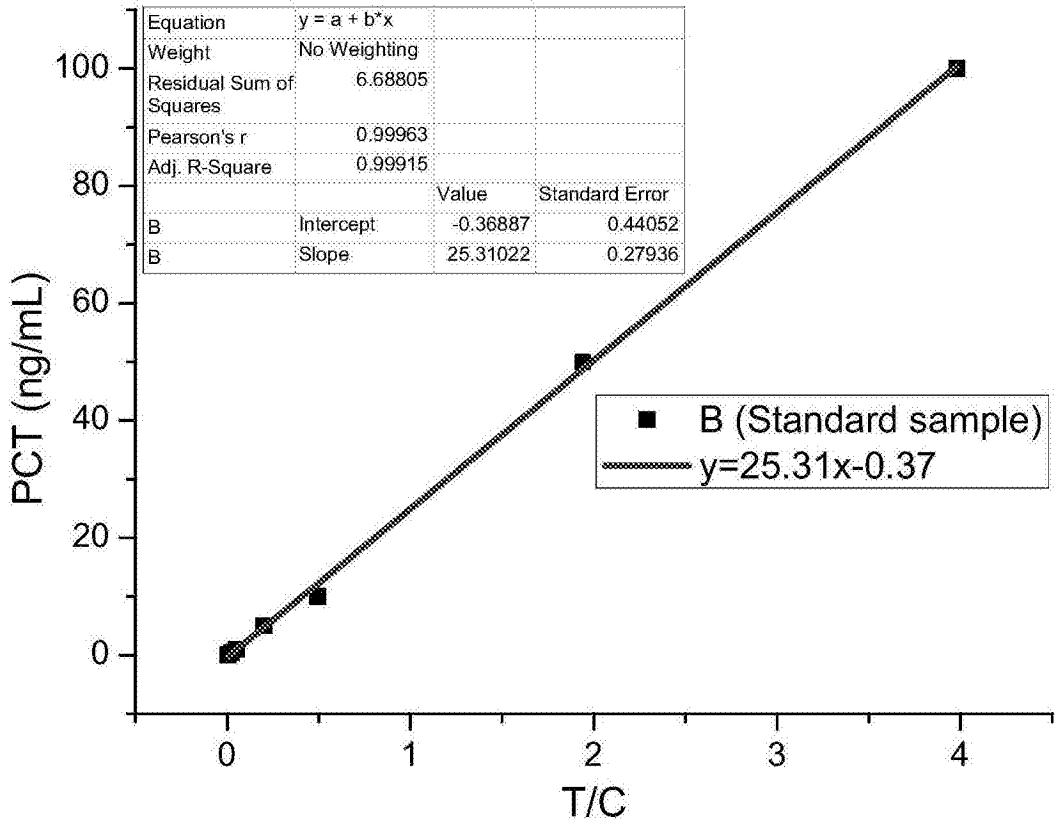


图3

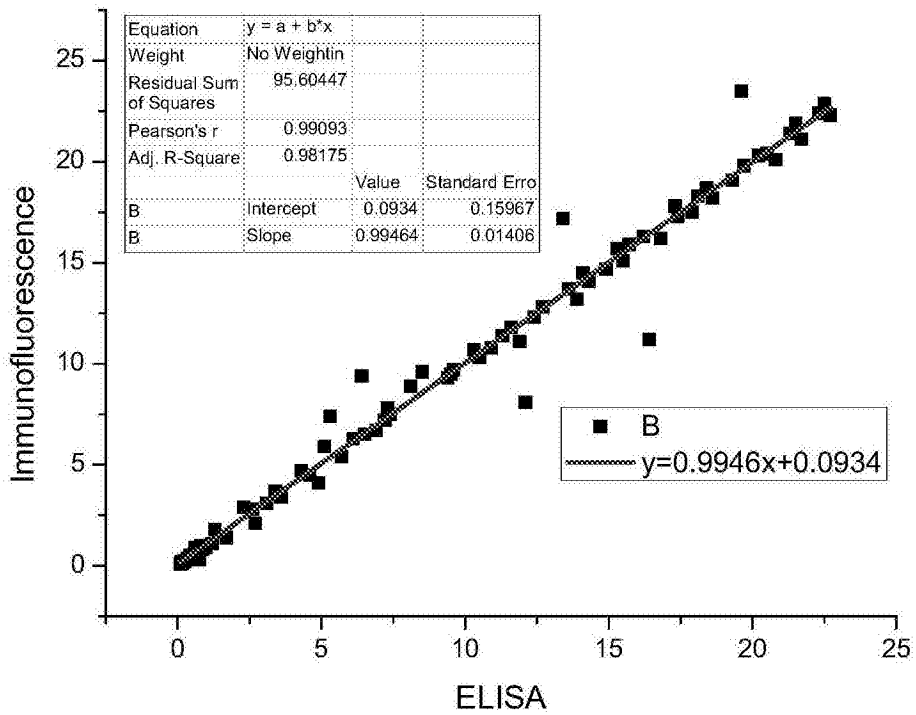


图4

专利名称(译)	一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒		
公开(公告)号	CN105548567A	公开(公告)日	2016-05-04
申请号	CN201610031801.3	申请日	2016-01-18
[标]发明人	郑忠亮 董焱 夏其林 王会妙 孙秋菊 张丽媛		
发明人	郑忠亮 董焱 夏其林 王会妙 孙秋菊 张丽媛		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N2333/585		
代理人(译)	张瑾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种时间分辨荧光定量检测PCT的试剂盒，包括荧光微球抗体复合物和免疫荧光试纸卡，其中，荧光微球抗体复合物是将PCT单抗标记于稀土荧光微球形成的复合物，将该复合物添加到枪头中并冻干而成，作为检测抗体；免疫荧光试纸卡包括检测试纸卡，检测试纸卡由样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接并贴于衬板上构成；其中，硝酸纤维素膜上的检测线位置包被有另一PCT单抗，质控线位置包被有羊抗小鼠多抗。该试剂盒可避免样品本身的荧光影响，使用稀土荧光微球作为标记载体，稳定性好，标记通过共价键将微球和抗体连接，标记产物稳定。对于样本的检测快速简便、敏感性高，可进行全定量检测。

