



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106324239 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(21)申请号 201610604720.8

(22)申请日 2016.07.28

(71)申请人 武汉景川诊断技术股份有限公司

地址 430206 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新二路388号武汉光谷国际生
物医药企业加速器1.1期6号楼

(72)发明人 王明 吴艳芳 陈莹

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 倪娅 陈卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

(54)发明名称

C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用,C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法优化化学交联方法,将聚苯乙烯微球的羧基在低pH条件下活化,与高pH条件溶解的抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,在低温下偶联12~24h,既保证了抗体的偶联效率,同时极大程度的降低了活化剂对抗体活性的破坏。采用本发明方法制备的免疫胶乳微球制成的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒具有灵敏度高、定量准确、重复性好、性质稳定的特点,其定量的线性范围在0.1~20mg/L,可应用于全自动生化分析仪或凝血分析仪,操作快速、简单,从检测至采集结果只需5~10分钟,具有较好的临床应用前景。

1. 一种C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法,步骤如下:

1)准备粒径范围50~200nm的聚苯乙烯微球,聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度0.8~1.2%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液;

2)以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液;

3)以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60 μ L的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,2~8℃震荡活化1h,震荡速度为30~50r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

4)将浓度 $\geq$ 10mg/mL的CRP多克隆抗体在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在0.5~2mg/mL之间,得到CRP多克隆抗体溶液,储存于2~8℃备用;

5)将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续4~7min,使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,之后0~4℃震荡12~24h,震荡速度为30~50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球。

2.根据权利要求1所述的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法,其特征在于:所述步骤3)中震荡活化条件为:4℃震荡活化1h,震荡速度为50r/min。

3.根据权利要求1或2所述的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法,其特征在于:所述步骤5)中使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合时,4℃震荡16h,震荡速度为50r/min。

4.一种胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:包括C-反应蛋白检测试剂R1和C-反应蛋白检测试剂R2;

所述C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为:0.01~13%稳定剂1、10~200mM的缓冲液1、1~6%的促凝剂1、0.02~0.1%的防腐剂1;

所述C-反应蛋白检测试剂R2中各组分及含量为:0.01~23%稳定剂2、1~5mg/mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球、10~200mM的缓冲液2、0.02~0.1%的防腐剂2;

所述C-反应蛋白检测试剂R2的制备方法为:

1)准备粒径范围50~200nm的聚苯乙烯微球,聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度0.8~1.2%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液;

2)以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液,

3)以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60 μ L的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,2~8℃震荡活化1h,震荡速度为30~50r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

4)将浓度 $\geq$ 10mg/mL的CRP多克隆抗体在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在0.5~2mg/mL之间,得到CRP多克隆抗体溶液,储存于2~8℃备用;

5)将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续4~7min,使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,之后0~4℃震荡12~24h,震荡速度为30~50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球;

6)向C-反应蛋白免疫胶乳微球中加入含有稳定剂2和缓冲液2的封闭液,震荡得到胶乳

溶液；

7)胶乳溶液离心,去上清液,以除去其中残留的活化剂,然后加入防腐剂2至贮存浓度,超声分散,即得。

5.根据权利要求4所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:

所述稳定剂1选自0.5~1.8%的氯化钠、0.1~1%的BSA、1~20mM的乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100中的一种或两种以上;

所述缓冲液1选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上;

所述促凝剂1选自聚乙二醇6000、聚乙二醇8000或硫酸葡聚糖中的一种;

所述防腐剂1选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种;

所述稳定剂2选自0.5~1.8%的氯化钠、0.2~3%的BSA、1~20mM乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100、1~10%的丙三醇中的一种或两种以上;

所述缓冲液2选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上;

所述防腐剂2选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种。

6.根据权利要求4所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:

所述C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、pH7.4的100~200mM Tris、1~3%的PEG、0.05%的NaN₃;

所述C-反应蛋白检测试剂R2中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、1~5mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、pH7.4的25~50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.05%的NaN₃;

或所述C-反应蛋白检测试剂R1和所述C-反应蛋白检测试剂R2中0.05%的NaN₃替换为0.1%的Proclin 300。

7.根据权利要求4~6任一项所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括C-反应蛋白校准品,其各组分及含量为:0.01~13%的校准品稳定剂、20mg/L的C-反应蛋白、10~200mM的校准品缓冲液、0.02~0.1%的校准品防腐剂。

8.根据权利要求7所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:

所述校准品稳定剂选自0.5~1.8%的氯化钠、0.1~1%的BSA、1~20mM的乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100中的一种或两种以上;

所述校准品缓冲液选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上;

所述校准品防腐剂选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种。

9.根据权利要求7所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,其特征在于:

所述C-反应蛋白校准品中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、pH7.4的25~50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.05%的NaN₃;

或所述C-反应蛋白校准品中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、pH7.4的25~50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.1%的Proclin 300。

10. 根据权利要求4所述的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒, 其特征在于: 所述步骤6) 中震荡条件为: 25℃震荡2h, 然后转入4℃震荡24h, 震荡速度为50r/min。

C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫诊断领域,具体地指一种C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用。

背景技术

[0002] C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)是一种在白介素-6的介导下主要由肝脏产生的急性期反应蛋白,急性期浓度可升高上千倍。

[0003] CRP无论在人或动物体内均是急性时相反应蛋白中重要的蛋白之一,是一种敏感的炎症标志物,在急性创伤和感染时其血浓度急剧升高。正常动物血清CRP含量很低,但在感染、炎性、手术及肿瘤等情况下,几个小时迅速升高,在狗体内24~48小时可达高峰。病变消退后,CRP可迅速下降至正常,所以可作为动物细菌和病毒感染的一个首选指标,防止抗生素滥用和减少食品带来的健康问题。

[0004] 1977年Sternberg创建了速率散射比浊法,是以测定的溶液对光的散射程度来判断样品中抗原的含量。一定波长的光沿水平轴照射,碰到小颗粒的免疫复合物可导致光散射,散射强度与抗原抗体免疫复合物的含量成正比。但免疫比浊法由于检测灵敏度达不到临床的要求,于是出现了胶乳增强免疫比浊法。其基本原理是首先将抗体吸附在一种胶乳颗粒上,当遇到相应的抗原时,抗原抗体结合而出现胶乳凝集。单个胶乳颗粒的大小在入射光波长之内,光线可透过。当两个以上胶乳颗粒凝集可阻碍光线透过,使透射光减少,其减少程度与胶乳凝集的程度成正比,亦与抗原成反比。

[0005] 现有技术中常采用聚苯乙烯微球偶联抗体,得到用于检测的胶乳试剂,但偶联效率普遍偏低,只有60~80%,且偶联时碳化二亚胺类活化剂对抗体活性破坏较大,导致产品成品率低。

发明内容

[0006] 本发明的目的就是要克服现有C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法产品成品率低的缺陷,提供一种偶联效率高、偶联后抗体活性影响小的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法以及由采用该C-反应蛋白免疫胶乳微球的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒。

[0007] 为实现上述目的,本发明所提供的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法,步骤如下:

[0008] 1)准备粒径范围50~200nm的聚苯乙烯微球,聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度0.8~1.2%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液;

[0009] 2)以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液;

[0010] 3)以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60μL的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,2~8℃震荡活化1h,震荡速度为30~50r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

[0011] 4)将浓度≥10mg/mL的CRP多克隆抗体在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L

的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在0.5~2mg/mL之间,得到CRP多克隆抗体溶液,储存于2~8℃备用;

[0012] 5)将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续4~7min,使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,之后0~4℃震荡12~24h,震荡速度为30~50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球。

[0013] 优选地,所述步骤3)中震荡活化条件为:4℃震荡活化1h,震荡速度为50r/min。

[0014] 优选地,所述步骤5)中使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合时,4℃震荡16h,震荡速度为50r/min。

[0015] 本发明还提供了一种胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒,包括C-反应蛋白检测试剂R1和C-反应蛋白检测试剂R2;

[0016] 所述C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为:0.01~13%稳定剂1、10~200mM的缓冲液1、1~6%的促凝剂1、0.02~0.1%的防腐剂1;

[0017] 所述C-反应蛋白检测试剂R2中各组分及含量为:0.01~23%稳定剂2、1~5mg/mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球、10~200mM的缓冲液2、0.02~0.1%的防腐剂2;

[0018] 所述C-反应蛋白检测试剂R2的制备方法为:

[0019] 1)准备粒径范围50~200nm的聚苯乙烯微球,聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度0.8~1.2%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液;

[0020] 2)以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液,

[0021] 3)以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60μL的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,2~8℃震荡活化1h,震荡速度为30~50r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

[0022] 4)将浓度≥10mg/mL的CRP多克隆抗体在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在0.5~2mg/mL之间,得到CRP多克隆抗体溶液,储存于2~8℃备用;

[0023] 5)将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续4~7min,使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,之后0~4℃震荡12~24h,震荡速度为30~50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球;

[0024] 6)向C-反应蛋白免疫胶乳微球中加入含有稳定剂2和缓冲液2的封闭液,震荡得到胶乳溶液;

[0025] 7)胶乳溶液离心,去上清液,以除去其中残留的活化剂,然后加入防腐剂2至贮存浓度,超声分散,即得。

[0026] 优选地,所述稳定剂1选自0.5~1.8%的氯化钠、0.1~1%的BSA、1~20mM的乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100中的一种或两种以上;

[0027] 所述缓冲液1选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液(Hepes)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris)、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液(Mopso)、磷酸盐缓冲液(PBS)、硼酸盐缓冲液(BBS)、甘氨酸缓冲液(Glycine)中的一种或两种以上;

- [0028] 所述促凝剂1选自聚乙二醇6000、聚乙二醇8000或硫酸葡聚糖中的一种；
- [0029] 所述防腐剂1选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种；
- [0030] 所述稳定剂2选自0.5~1.8%的氯化钠、0.2~3%的BSA、1~20mM乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100、1~10%的丙三醇中的一种或两种以上；
- [0031] 所述缓冲液2选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上；
- [0032] 所述防腐剂2选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种。
- [0033] 进一步优选地,所述C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、pH7.4的100~200mM Tris、1~3%的PEG、0.05%的NaN₃；
- [0034] 所述C-反应蛋白检测试剂R2中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、1~5mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、pH7.4的25-50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.05%的NaN₃；
- [0035] 或所述C-反应蛋白检测试剂R1和所述C-反应蛋白检测试剂R2中0.05%的NaN₃替换为0.1%的Proclin 300。
- [0036] 进一步地,上述试剂盒还包括C-反应蛋白校准品,其各组分及含量为:0.01~13%的校准品稳定剂、20mg/L的C-反应蛋白、10~200mM的校准品缓冲液、0.02~0.1%的校准品防腐剂。
- [0037] 优选地,所述校准品稳定剂选自0.5~1.8%的氯化钠、0.1~1%的BSA、1~20mM的乙二胺四乙酸二钠、0.01~1%的Triton X-100中的一种或两种以上；
- [0038] 所述校准品缓冲液选自4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上；
- [0039] 所述校准品防腐剂选自叠氮钠、Proclin300或硫柳汞中的一种。
- [0040] 进一步优选地,所述C-反应蛋白校准品中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、pH7.4的25-50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.05%的NaN₃；
- [0041] 或所述C-反应蛋白校准品中各组分及含量为:0.4~0.8%的BSA、0.5~0.9%的NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、pH7.4的25-50mmol/L甘氨酸缓冲液、0.1%的Proclin 300。
- [0042] 优选地,上述试剂盒的技术方案中,所述步骤3)中震荡活化条件为:4℃震荡活化1h,震荡速度为50r/min。
- [0043] 优选地,上述试剂盒的技术方案中,所述步骤5)中使活化聚苯乙烯微球与抗体上的氨基耦合时,4℃震荡16h,震荡速度为50r/min。
- [0044] 优选地,上述试剂盒的技术方案中,所述步骤6)中震荡条件为:25℃震荡2h,然后转入4℃震荡24h,震荡速度为50r/min。
- [0045] 本发明的有益效果:
- [0046] (1)本发明在制备的C-反应蛋白免疫胶乳微球时优化化学交联方法,将聚苯乙烯微球的羧基在低pH条件下活化,与高pH条件溶解的抗体上的氨基耦合,两者的混合液呈中性,在低温下偶联12~24h,既保证了抗体的偶联效率,同时极大程度的降低了活化剂对抗体活性的破坏。
- [0047] (2)本发明的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒具有灵敏度高、定量准

确、重复性好、性质稳定的特点,其定量的线性范围在0.1~20mg/L。

[0048] (3)可应用于全自动生化分析仪或凝血分析仪,操作快速、简单,从检测至采集结果只需5~10分钟,具有较好的临床应用前景。

具体实施方式

[0049] 以下结合具体实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0050] 实施例1

[0051] 本发明所提供的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法如下:

[0052] 1、准备粒径120nm的聚苯乙烯微球,浓度为10%,取用5ml;聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度1%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液,溶液的体积是50mL;

[0053] 2、以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液;

[0054] 3、以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60μL的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,共滴加250μL,4℃震荡活化1h,震荡速度为50r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

[0055] 4、将CRP多克隆抗体(市售,浓度≥10mg/mL)在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在1.2mg/mL,得到CRP多克隆抗体溶液,溶液的体积是50mL,储存于4℃备用;

[0056] 5、将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续4min,两者的混合液呈中性,之后4℃震荡16h,震荡速度为50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球1。

[0057] 实施例2

[0058] 本发明所提供的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法如下:

[0059] 1、准备粒径50nm的聚苯乙烯微球,浓度为10%,取用5ml;聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度0.8%w/v,得到pH为5.5~6.5的微球溶液,溶液的体积是50mL;

[0060] 2、以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺,得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液;

[0061] 3、以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计,按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60μL的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中,共滴加240μL,8℃震荡活化1h,震荡速度为30r/min,得到活化聚苯乙烯微球溶液;

[0062] 4、将CRP多克隆抗体(市售,浓度≥10mg/mL)在pH8.5~9.5条件下溶解,溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液,使抗体终浓度在0.5mg/mL,得到CRP多克隆抗体溶液,溶液的体积是50mL,储存于8℃备用;

[0063] 5、将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中,直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1,整个滴加过程持续5min,两者的混合液呈中性,之后2℃震荡24h,震荡速度为50r/min,即得C-反应蛋白免疫胶乳微球2。

[0064] 实施例3

[0065] 本发明所提供的C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法如下：

[0066] 1、准备粒径200nm的聚苯乙烯微球，浓度为10%，取用5ml；聚苯乙烯微球首先用浓度为50mmol/L的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至终浓度1.2%w/v，得到pH为5.5~6.5的微球溶液，溶液的体积是50mL；

[0067] 2、以2-吗啉乙磺酸缓冲液溶解碳化二亚胺，得到浓度为10mg/mL的碳化二亚胺溶液；

[0068] 3、以微球溶液中所含聚苯乙烯微球的重量为计，按每10mg聚苯乙烯微球添加50~60μL的比例将碳化二亚胺溶液滴加至微球溶液中，共滴加300μL，2℃震荡活化1h，震荡速度为50r/min，得到活化聚苯乙烯微球溶液；

[0069] 4、将CRP多克隆抗体（市售，浓度≥10mg/mL）在pH8.5~9.5条件下溶解，溶剂是50mmol/L的硼酸盐缓冲液，使抗体终浓度在2mg/mL，得到CRP多克隆抗体溶液，溶液的体积是50mL，储存于2℃备用；

[0070] 5、将CRP多克隆抗体溶液滴加至活化聚苯乙烯微球溶液中，直至抗体与微球质量比为0.05~0.2:1，整个滴加过程持续7min，两者的混合液呈中性，之后0℃震荡12h，震荡速度为30r/min，即得C-反应蛋白免疫胶乳微球3。

[0071] 实施例4

[0072] 以实施例1制备的C-反应蛋白免疫胶乳微球1为原料，制备胶乳增强免疫比浊法测定C-反应蛋白的试剂盒。其各组分如下：

[0073] C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为：0.8%BSA、0.5%NaCl、200mM Tris(pH=7.4)、3%PEG6000、0.05%NaN₃；

[0074] C-反应蛋白检测试剂R2中各组分的及含量为：0.4%BSA、2mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、25mmol/L的甘氨酸缓冲液(pH=7.4)、0.05%NaN₃；

[0075] C-反应蛋白校准品中各组分及含量为：0.4%BSA、0.5%NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、25mmol/L的甘氨酸缓冲液、0.05%NaN₃。

[0076] 其中，C-反应蛋白检测试剂R2的制备步骤如下：

[0077] 1、向100mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球1的溶液中加入50mL封闭液，25℃震荡2h，然后转入4℃震荡24h，震荡速度为50r/min，得到胶乳溶液；封闭液组分为：3%w/v的BSA、100mmol/L的甘氨酸缓冲液(pH=8.5不含防腐剂)。

[0078] 2、胶乳溶液以15000r/min离心30~45min，去掉上清液，然后加入含有NaN₃成分的贮存液至贮存浓度，超声分散即得。

[0079] 实施例5

[0080] 以实施例1制备的C-反应蛋白免疫胶乳微球1为原料，制备胶乳增强免疫比浊法测定C-反应蛋白的试剂盒。其各组分如下：

[0081] C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为：0.8%BSA、0.9%NaCl、100mM Tris(pH=7.4)、1%PEG8000、0.1%Proclin 300；

[0082] C-反应蛋白检测试剂R2中各组分的及含量为：0.8%BSA、2mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、50mmol/L的甘氨酸缓冲液(pH=7.4)、0.1%Proclin 300；

[0083] C-反应蛋白校准品中各组分及含量为：0.8%BSA、0.9%NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、50mmol/L的甘氨酸缓冲液、0.1%Proclin300。

[0084] 其中,C-反应蛋白检测试剂R2的制备步骤如下:

[0085] 1、向100mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球1的溶液中加入50mL封闭液,25℃震荡2h,然后转入4℃震荡24h,震荡速度为50r/min,得到胶乳溶液;封闭液组分为:3%w/v的BSA、100mmol/L的甘氨酸缓冲液(pH=8.5不含防腐剂)。

[0086] 2、胶乳溶液以15000r/min离心30~45min,去掉上清液,然后加入含有Proclin 300成分的贮存液至贮存浓度,超声分散即得。

[0087] 实施例6

[0088] 以实施例1制备的C-反应蛋白免疫胶乳微球1为原料,制备胶乳增强免疫比浊法测定C-反应蛋白的试剂盒。其各组分如下:

[0089] C-反应蛋白检测试剂R1中各组分及含量为:1%BSA、20mM乙二胺四乙酸二钠、1.8%的NaCl、1%的Triton X-100、10mM的磷酸盐缓冲液(PBS)、100mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钠缓冲液(Hepes)、1%的PEG6000、0.02%的硫柳汞;

[0090] C-反应蛋白检测试剂R2中各组分的含量为:5%的丙三醇、1mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、10mM的3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液(Mopso)、0.04%的硫柳汞;

[0091] C-反应蛋白校准品中各组分的含量为:1%的Triton X-100、20mg/L的C-反应蛋白、200mM的硼酸盐缓冲液(BBS)、0.04%的硫柳汞;

[0092] 其中,C-反应蛋白检测试剂R2的制备步骤如下:

[0093] 1、向100mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球1的溶液中加入50mL封闭液,25℃震荡2h,然后转入4℃震荡24h,震荡速度为50r/min,得到胶乳溶液;封闭液中含丙三醇和3-(N-吗啉基)-2-羟基丙磺酸-氢氧化钠缓冲液(Mopso)。

[0094] 2、胶乳溶液以15000r/min离心30~45min,去掉上清液,然后加入含有硫柳汞成分的贮存液至贮存浓度1mg/mL,超声分散即得。

[0095] 实施例7

[0096] 以实施例1制备的C-反应蛋白免疫胶乳微球1为原料,制备胶乳增强免疫比浊法测定C-反应蛋白的试剂盒。其各组分如下:

[0097] C-反应蛋白检测试剂R1中各组分的含量为:10mM乙二胺四乙酸二钠、50mmol/L的甘氨酸缓冲液、6%的硫酸葡聚糖、0.08%的Na₃;

[0098] C-反应蛋白检测试剂R2中各组分的含量为:1.8%的NaCl、3%BSA、20mM乙二胺四乙酸二钠、1%的Triton X-100、10%的丙三醇、5mg/ml的C-反应蛋白免疫胶乳微球、110mM的Tris、0.05%的Proclin 300;

[0099] C-反应蛋白校准品中各组分的含量为:1%的NaCl、20mg/L的C-反应蛋白、50mM的磷酸盐缓冲液(PBS)、0.02%的Na₃;

[0100] 其中,C-反应蛋白检测试剂R2的制备步骤如下:

[0101] 1、向100mL的C-反应蛋白免疫胶乳微球1的溶液中加入50mL封闭液,25℃震荡2h,然后转入4℃震荡24h,震荡速度为50r/min,得到胶乳溶液;封闭液中含NaCl、BSA、乙二胺四乙酸二钠、Triton X-100、丙三醇及Tris。

[0102] 2、胶乳溶液以15000r/min离心30~45min,去掉上清液,然后加入含有Proclin 300成分的贮存液至贮存浓度5mg/mL,超声分散即得。

[0103] 试验例

[0104] 一、C-反应蛋白免疫胶乳微球偶联效率及活性检测

[0105] (1)准备4份50mg的CRP多克隆抗体及4份粒径120nm的聚苯乙烯胶乳颗粒,三份采用实施例1~3所提供的制备方法,制得C-反应蛋白免疫胶乳微球1~3;

[0106] (2)另一份采用现有C-反应蛋白免疫胶乳微球的制备方法,制得对照C-反应蛋白免疫胶乳微球;

[0107] 对照C-反应蛋白免疫胶乳微球的制备方法步骤如下:

[0108] 1)取5ml的表面带有羧基基团的聚苯乙烯胶乳颗粒(颗粒直径120nm)用50mM的pH=6.0的2-吗啉乙磺酸缓冲液稀释至50ml,终浓度为1%w/v。

[0109] 2)再加入0.5%w/v的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和0.5%w/v的硫代N羟基琥珀酰胺进行活化胶乳,37℃水浴1小时。

[0110] 3)离心,去上清液(含残留活化交联剂),用2-吗啉乙磺酸缓冲液清洗一遍,再加入50mg的CRP多克隆抗体进行交联反应,37℃水浴4小时,即得。

[0111] (3)对C-反应蛋白免疫胶乳微球1~3和对照C-反应蛋白免疫胶乳微球分别离心分离,以收集上清中未偶联的抗体,然后再对上述微球分别加入封闭液,封闭胶乳表面残留活化位点。

[0112] 针对上述免疫胶乳微球的检测试验如下:

[0113] 1、通过在封闭前离心分离未偶联的抗体,采用BCA蛋白浓度测定法得到未偶联抗体的质量,即可求出偶联效率,得到实施例1~3的制备方法偶联效率分别为93%、88%、90%,而现有制备方法的偶联效率为78.4%。

[0114] 2、通过酶联免疫吸附法检测上述已封闭的免疫胶乳微球的抗体效价,计算得出C-反应蛋白免疫胶乳微球1~3的活性分别为1:3200、1:1600和1:3200,对照C-反应蛋白免疫胶乳微球的活性为1:400。

[0115] 上述试验证明本发明方法既保证了抗体的偶联效率,同时极大程度的降低了活化剂对抗体活性的破坏。

[0116] 二、试剂盒在蛋白分析仪上的应用

[0117] 1、将实施例4中的C-反应蛋白校准品配置成5个浓度梯度和一个空白对照,采用透射比浊蛋白分析仪进行检测,检测步骤为:将10u1的各校准品分别加入到装有400u1的C-反应蛋白检测试剂R1试剂和搅拌子的比色杯中,将比色杯放入检测口,仪器自动检测到比色杯,再加入80u1 C-反应蛋白检测试剂R2试剂加入到比色杯中,仪器自动搅拌混匀10s,测定吸光度OD1,反应1min后,测定吸光度OD2,仪器自动计算吸光度的差值: $\Delta OD = OD2 - OD1$ 。每个浓度检测5次,测得的各浓度校准品的 ΔOD 的平均值作纵坐标,相应的浓度作横坐标,制作浓度-吸光度差值校准曲线,通过excel计算得到曲线方程为 $Y = 0.0331X + 0.0032$ 。

[0118] 2、然后放入待测品1人的血浆,测定得到其吸光度差值 ΔOD ,然后根据上述浓度-吸光度差值校准曲线,计算得到待测品1中C-反应蛋白的浓度。

[0119] 3、同一份人血待测品1稀释100倍,然后采用实施例4的试剂盒进行检测,测定得到其吸光度差值,然后根据上述浓度-吸光度差值校准曲线,计算得到人血待测品1稀释100倍后,其中C-反应蛋白的浓度。

[0120] 重复上述人血待测品1检测5次,所得的结果见下表1

[0121] 表1人血待测品中CRP浓度检测重复试验

[0122]

试验次数	人血待测品检测 ΔOD	人血待测品中CRP浓度	稀释 100 倍的人血待测品检测 ΔOD	稀释 100 倍的人血待测品中CRP浓度
1	0.5709	17.15mg/L	0.0088	0.17mg/L
2	0.5784	17.38mg/L	0.0075	0.13
3	0.5725	17.20mg/L	0.0098	0.20
4	0.5745	17.26mg/L	0.0082	0.14
5	0.5778	17.36mg/L	0.0078	0.15
Cv%	0.57%	0.57%	10.9%	17.6%

[0123] 4、同一份人血待测品1再采用实施例5~7的试剂盒进行检测,测定得到其吸光度差值,然后根据各个试剂盒的浓度-吸光度差值校准曲线,计算得到待测品1中C-反应蛋白的浓度,重复5次取平均值,并计算Cv%,所得的结果见下表2。

[0124] 表1不同试剂盒针对同一人血待测品检测试验

[0125]

试剂盒实施例编号	实施例4	实施例5	实施例6	实施例7
人血待测品中CRP浓度	17.27mg/L	17.25mg/L	17.40mg/L	17.18mg/L
Cv%	0.57%	0.61%	3.04%	3.56%

[0126] 上述试验表明,本发明的试剂盒线性范围在0.1~20mg/L,灵敏度高、定量准确、重复性好、性质稳定。

专利名称(译)	C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106324239A	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201610604720.8	申请日	2016-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	武汉景川诊断技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉景川诊断技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉景川诊断技术股份有限公司		
[标]发明人	王明 吴艳芳 陈莹		
发明人	王明 吴艳芳 陈莹		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/6893 G01N2333/4737		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN106324239B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法及应用，C-反应蛋白免疫胶乳微球制备方法优化化学交联方法，将聚苯乙烯微球的羧基在低pH条件下活化，与高pH条件溶解的抗体上的氨基耦合，两者的混合液呈中性，在低温下偶联12~24h，既保证了抗体的偶联效率，同时极大程度的降低了活化剂对抗体活性的破坏。采用本发明方法制备的免疫胶乳微球制成的胶乳增强免疫比浊法C-反应蛋白测定试剂盒具有灵敏度高、定量准确、重复性好、性质稳定的特点，其定量的线性范围在0.1~20mg/L，可应用于全自动生化分析仪或凝血分析仪，操作快速、简单，从检测至采集结果只需5~10分钟，具有较好的临床应用前景。

试验次数	人血待测品检测 Δ OD	人血待测品中CRP浓度	稀释 100 倍的人血待测品检测 Δ OD	稀释 100 倍的人血待测品中CRP浓度
1	0.5709	17.15mg/L	0.0088	0.17mg/L
2	0.5784	17.38mg/L	0.0075	0.13
3	0.5725	17.20mg/L	0.0098	0.20
4	0.5745	17.26mg/L	0.0082	0.14
5	0.5778	17.36mg/L	0.0078	0.15
Cv%	0.57%	0.57%	10.9%	17.6%