



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106324239 B

(45)授权公告日 2018.06.19

(21)申请号 201610604720.8

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.07.28

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 105067615 A, 2015.11.18, 摘要, 权利要求1-10, 说明书第9-28段, 实施例1-2.

申请公布号 CN 106324239 A

CN 102628868 A, 2012.08.08, 说明书第30段, 实施例2.

(43)申请公布日 2017.01.11

(73)专利权人 武汉景川诊断技术股份有限公司

CN 102749454 A, 2012.10.24, 全文.

地址 430206 湖北省武汉市东湖新技术开

CN 102023211 A, 2011.04.20, 全文.

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

WO 2006064807 A1, 2006.06.22, 全文.

EP 2146207 A1, 2010.01.20, 全文.

(72)发明人 王明 吴艳芳 陈莹

审查员 胡晓佳

(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)

权利要求书2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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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;

其中,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;

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50~60μL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;

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;

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,然后加入包含防腐剂2的贮存液至贮存浓度,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。

6. 根据权利要求4或5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;

其中,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的乙二醇四乙酸二钠、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。

7. 根据权利要求6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。

8. 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Na₃N;

[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Na₃N;

[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	CN106324239B	公开(公告)日	2018-06-19
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		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN106324239A		
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%