



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702908 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910957603.3

(22)申请日 2019.10.10

(71)申请人 南京欧凯生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江北新区浦滨
路211号扬子科创中心一期A栋11层

(72)发明人 戴瞻

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 李枝玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/537(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

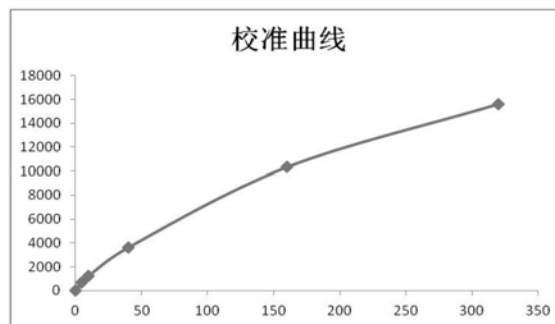
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种全量程C反应蛋白检测试剂盒

(57)摘要

一种全量程c反应蛋白检测试剂盒,通过免疫透射比浊法,检测样本中c反应蛋白的含量,达到定量检测的目的。该试剂盒包含试剂R1、试剂R2,所述的试剂R1为磷酸盐缓冲溶液,试剂R2为两种大小粒径的胶乳分别与两种抗人c反应蛋白抗体交联形成的偶联物。同时,该试剂盒与全自动生化分析仪联合使用,提高了检测的灵敏度与准确度,缩短了检测时间。本发明的全量程C反应蛋白检测试剂盒既可以测定高浓度CRP含量,又可以测定低浓度CRP含量,且灵敏度高、稳定性强、线性范围宽、重复性好,具有良好的抗干扰性、准确度和精密度,能够满足临床检验要求。



1. 一种全量程C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括试剂R1和试剂R2,所述的试剂R1的组分为、50m磷酸盐缓冲溶液、0.1% tween-20、0.1%的BSA、2%PEG-6000及0.1%的防腐剂;所述试剂R2为大、小粒径的两种胶乳微球分别与两种抗人CRP单克隆抗体交联形成的偶联物;所述胶乳微球为羧基修饰的羧基化聚苯乙烯胶乳微球;所述抗人CRP单克隆抗体与所述羧基化聚苯乙烯胶乳微球的交联方式为共价交联与化学交联相结合;

所述的试剂R2的制备方法如下:将两种抗人CRP单克隆抗体分别致敏两种大、小粒径不同的羧基化聚苯乙烯胶乳微球,其中,大粒径的羧基聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为200-400nm,小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球平均粒径范围为50-200nm,分别将所述大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球和所述小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球溶于脂肪酸甲酯磺酸盐反应液中混合,再加入EDC溶液,0.1mg/mL EDC溶液加入10mg的胶乳质量进行配制,得到试剂R2。

2. 根据权利要求1所述的全量程C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为250-350nm;所述小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为60-100nm。

3. 根据权利要求1所述的全量程C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:还包含C反应蛋白标准品,所述C反应蛋白标准品中C反应蛋白含量为0.1~300mg/L。

4. 根据权利要求1所述的全量程C反应蛋白检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1和所述试剂R2在2℃~8℃的条件下密闭储存均稳定12个月。

5. 一种根据权利要求1所述的全量程C反应蛋白检测试剂盒在检测全量程C反应蛋白浓度上的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,在使用时,将所述全量程C反应蛋白检测试剂盒与全自动生化分析仪联合使用,检测过程中,样本用量为2.1μL,检测时间为5min;其检测步骤为:取2.1μL样本和210μL试剂R1混匀后于37℃孵育3min,在600nm处读取第1读数点吸光度A1,随即加入70μL试剂R2,混匀后于37℃孵育5min,在600nm处读取第2读数点吸光度A2;以吸光度差值 $\Delta A = A2 - A1$ 为y轴,校准品浓度值为x轴,以多点非线性的校准方式绘制校准曲线,根据校准曲线计算所得值,即得出样本中C-反应蛋白含量。

一种全量程C反应蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫类领域,涉及一种全量程C反应蛋白检测试剂盒,尤其涉及一种全量程C反应蛋白胶乳增强免疫比浊检测试剂盒。

背景技术

[0002] C-反应蛋白(C-reactive protein,CRP)是一种急性时相反应蛋白,是机体受微生物入侵或组织损伤等刺激时由肝脏分泌,在数小时内急剧上升,但随着组织结构和功能的复原其含量在疾病恢复期迅速下降,因此在感染、炎症等疾病的早期诊断、病程、预后等方面具有重要临床意义。其产生机理是:当机体受感染或组织受损伤时巨噬细胞和其他白细胞等被激活,产生白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等细胞因子及其他介导体,这些细胞因子和介导体到达肝脏,刺激肝细胞和上皮细胞合成CRP。根据检测方法灵敏度的不同,C反应蛋白可分为普通CRP、超敏CRP(hs-CRP)和全量程CRP。普通CRP临床上主要用于评价感染、组织损伤和炎症性疾病,同时为炎症性疾病的诊断、治疗和监控提供信息。超敏CRP是诊断低水平炎症状态的灵敏指标,同时也对心血管疾病风险的评判起着重要作用。全量程CRP可用于感染性疾病的诊断和疗效监控,也可作为心血管疾病的独立预测因子以及用于评价疾病感染的程度。

[0003] 所谓全量程CRP是基于其测定方法更敏感,测定范围更宽广而命名。临床常规测定CRP的方法为免疫比浊法,测定范围一般为3~200mg/L,线性范围宽但灵敏度低,无法准确测定3mg/L以下水平的CRP含量。临床超敏CRP测定范围为0.3~100mg/L,灵敏度虽高但无法准确测定高浓度水平的CRP含量,因此,无法用于感染性疾病的诊断或疗效观察。

[0004] 目前,用于临床上的CRP检测试剂有多种。比如,授权公告号为CN 103941017B的中国发明专利公开的C反应蛋白检测试剂盒、授权公告号为CN 105158476B和授权公告号为CN 101769932 B的中国发明专利公开的全量程C反应蛋白检测试剂盒等。这些检测试剂盒中CN 105158476 B与CN 101769932 B两个公开的C反应蛋白检测试剂盒虽然能够同时保证高灵敏度和较宽的检测范围,但其使用的检测试剂盒中的R2制备过程采用二步法,需要1-2天的时间完成待测抗原单克隆抗体包被到乳胶微球上,不仅增加了操作步骤,费时费力,还加大了对原料的需求,灵敏度不高,增加了生产成本。

[0005] 因此,如何解决上述问题,是本领域技术人员着重要研究的内容。

发明内容

[0006] 为克服上述现有技术中的不足,本发明目的在于提供一种全量程C反应蛋白检测试剂盒,该试剂盒为全量程C反应蛋白胶乳增强免疫比浊检测试剂盒,既能测定高浓度C反应蛋白含量,又可以测定低浓度C反应蛋白含量,且灵敏度高、稳定性强、线性范围宽、重复性好及价格优惠。

[0007] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种全量程C反应蛋白检测试剂盒,所述试剂盒包括试剂R1和试剂R2,所述的试剂R1的组分为、50m磷酸盐缓冲溶液、0.1%

tween-20、0.1%的BSA、2%PEG-6000及0.1%的防腐剂；所述试剂R2为大、小粒径的两种胶乳微球分别与两种抗人CRP单克隆抗体交联形成的偶联物；所述胶乳微球为羧基修饰的羧基化聚苯乙烯胶乳微球；所述抗人CRP单克隆抗体与所述羧基化聚苯乙烯胶乳微球的交联方式为共价交联与化学交联相结合；

[0008] 所述的试剂R2的制备方法如下：将两种抗人CRP单克隆抗体分别致敏两种大、小粒径不同的羧基化聚苯乙烯胶乳微球，其中，大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为200-400nm，小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球平均粒径范围为50-200nm，分别将所述大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球和所述小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球溶于脂肪酸甲酯磺酸盐反应液中混合，再加入EDC溶液，0.1mg/mL EDC溶液加入10mg的胶乳质量进行配制，得到试剂R2。

[0009] 进一步地，将抗人CRP单克隆抗体和MES反应液按1mg:0.5mL进行混合然后放于旋涡混匀仪上混匀10S以上；将羧基化聚苯乙烯胶乳微球和MES反应液进行混合然后放于旋涡混匀仪上混匀10S以上；将EDC和MES反应液混合然后放于旋涡混匀仪上混匀10S以上；将羧基化聚苯乙烯胶乳微球加入抗人CRP单克隆抗体中，置于旋涡混匀仪上混匀10S，再把配好的EDC溶液加入到上述混合液中，置于旋涡混匀仪上混匀10S；室温混匀3h。

[0010] 进一步的，每管取10%BSA加入纯化水进行溶解，然后加入到微球中进行封闭，防止微球出现非特异性凝集。

[0011] 进一步地，所述大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为250-350nm；更为优选地，粒径为278nm。所述小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为60-100nm；更为优选地，粒径范围为60nm，以保证所制备的检测试剂盒使得抗原抗体反应试验能够在一个较宽的范围内进行，并且能够延长稳定的时间。本发明所述的不同粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球，其平均粒径在50-400nm之间，粒径小于50nm时，胶乳颗粒聚集产生的吸光度变化很小，结果很难实现试验敏感度的要求，但当粒径大于400nm的胶乳颗粒在测量高浓度检测物时，其聚集产生的吸光度变化超过了检测限，而且颗粒较大会加速自聚集，分散性降低。

[0012] 进一步地，大、小粒径的羧基化聚苯乙烯微球，通过EDC溶液将抗人CRP单克隆抗体活化偶联到微球表面，形成稳定的酰胺键。再经过封闭、清洗步骤，将制备好的微球保存于特定缓冲液中，4度保存。然后使用全自动生化分析仪测试试剂性能。

[0013] 进一步地，所述全量程C反应蛋白检测试剂盒还包含C反应蛋白标准品，所述C反应蛋白标准品中C反应蛋白含量为0.1~300mg/L。

[0014] 进一步地，所述试剂R1和所述试剂R2在2℃~8℃的条件下密闭储存均稳定12个月。

[0015] 本发明还提供一种全量程C反应蛋白检测试剂盒在检测全量程C反应蛋白浓度上的应用。

[0016] 进一步地，在使用时，将所述全量程C反应蛋白检测试剂盒与全自动生化分析仪联合使用，检测过程中，样本用量为2.1μL，检测时间为5min；其检测步骤为：取2.1μL样本和210μL试剂R1混匀后于37℃孵育3min，在600nm处读取第1读数点吸光度A1，随即加入70μL试剂R2，混匀后于37℃孵育5min，在600nm处读取第2读数点吸光度A2；以吸光度差值 $\Delta A = A2 - A1$ 为y轴，校准品浓度值为x轴，以多点非线性的校准方式绘制校准曲线，根据校准曲线计算

所得值,即得出样本中C-反应蛋白含量。

[0017] 本发明的检测原理:本发明采用的胶乳增强免疫比浊法,使用化学交联与共价交联相结合的方式,使得反应更快,试剂更稳定,灵敏度更高。小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球能够确保试剂的线性,而大粒径羧基化聚苯乙烯胶乳微球使试剂具有较高的灵敏度,可以检测到低浓度范围内被检测物的含量。本发明采用两种不同粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球分别与两种不同的抗人CRP单克隆抗体交联形成的偶联物做试剂R2,且将大小粒径胶乳联合使用,使得试剂的灵敏度和线性得到提高。

[0018] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有的有益效果如下:

[0019] (1) 本发明将两种不同粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球分别与两种抗人CRP单克隆抗体交联形成的偶联物做试剂R2,使得试剂在保证高灵敏度的同时也保证了线性范围,同时拓宽了试剂的检测范围。普通C反应蛋白检测试剂盒仅限于检测3mg/L以上的C反应蛋白含量,不能用于预测将来心血管疾病发生的危险性以及局部感染或小病灶的检测。然而,本发明的试剂盒不仅可以准确测定3mg/L以下水平的C反应蛋白含量,灵敏度可达0.1mg/L,能够用于心血管疾病发生的危险性预测以及局部感染的检测,而且还可以测定高浓度水平C反应蛋白含量(含量高达300mg/L),因而能够用于诊断各种感染性和炎症等疾病。

[0020] (2) 本发明检测试剂盒的检测灵敏度高。试剂缓冲液、表面活性剂等成分的配比提高了反应的灵敏度。

[0021] (3) 本发明检测试剂盒的准确度高。与对照试剂血清全量程C反应蛋白检测试剂的相关性达到0.990。

[0022] (4) 本发明检测试剂盒的试剂稳定。试剂各成分配比优化,试剂R1和R2在2℃~8℃条件下密闭储存均可稳定12个月。

[0023] (5) 本发明检测试剂盒可批量检测。适用于全自动生化分析仪,可实现快速、批量检测。

[0024] (6) 本发明中微球共价结合抗体的方法采用的是一步法,较两步法其省时且减少成本。

[0025] (7) 本发明适用的全自动生化分析分析仪比较广泛。型号如:日立7080/7180/7600奥林巴斯AU480/640/680/5400/5800等。

附图说明

[0026] 图1本发明全量程CRP检测试剂盒(60nm与278nm微球3:1包被的试剂盒)灵敏度的测定结果示意图;

[0027] 图2本发明检测试剂与国外知名品牌CRP检测试剂精密度结果图。

具体实施方式

[0028] 以下由特定的具体实施例结合附图说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0029] 实施例1:

[0030] 一种全量程C反应蛋白检测试剂盒,所述试剂盒包括试剂R1和试剂R2,所述的试剂R1的组分为、50m磷酸盐缓冲溶液、0.1% tween-20、0.1%的BSA、2% PEG-6000及0.1%的防

腐剂;所述试剂R2为大、小粒径的两种胶乳微球分别与两种抗人CRP单克隆抗体交联形成的偶联物;所述胶乳微球为羧基修饰的羧基化聚苯乙烯胶乳微球;所述抗人CRP单克隆抗体与所述羧基化聚苯乙烯胶乳微球的交联方式为共价交联与化学交联相结合;

[0031] 所述的试剂R2的制备方法如下:将两种抗人CRP单克隆抗体分别致敏两种大、小粒径不同的羧基化聚苯乙烯胶乳微球,其中,大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球的平均粒径范围为200-400nm,小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球平均粒径范围为50-200nm,分别将所述大粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球和所述小粒径的羧基化聚苯乙烯胶乳微球溶于脂肪酸甲酯磺酸盐反应液中混合,再加入EDC溶液,0.1mg/mL EDC溶液加入10mg的胶乳质量进行配制,得到试剂R2。

[0032] 全量程C反应蛋白检测试剂盒的制备:

[0033] (1) 本试剂盒涉及的主要原材料如下:

[0034] 抗人CRP单克隆抗体,货号分别为Cat.K1016和Cat.K1017;苯乙烯胶乳(JSR货号:P0001、P0221)、PEG6000(聚乙二醇)。

[0035] (2) 本发明主要试剂的配制方案如下:

[0036] 试剂R1:2%PEG6000(聚乙二醇)、1.482g/L的二水合磷酸二氢钠、14.5g/L的十二水合磷酸氢二钠、9.0g/L氯化钠、1.0g/L的Tween-20、1.0g/L的BSA、1.0g/L的proclin-300配制的磷酸盐缓冲液,该试剂为无色透明溶液。聚乙二醇是一种敏化剂,可以提高试剂的分析灵敏,氯化钠保持试剂的电离强度。

[0037] 试剂R2:将两种抗人CRP单克隆抗体和反应液按合适的比例进行混合后放于旋涡混匀仪上混匀10S以上;分别致敏粒径为60nm和278nm的两种羧基化聚苯乙烯胶乳颗粒,然后将EDC和反应液混合然后放于旋涡混匀仪上混匀10S以上;将微球分别加入对应的抗体中,置于旋涡混匀仪上混匀10S,再把配好的EDC溶液加入到上述混合液中,置于旋涡混匀仪上混匀10S。室温混匀3h。每管取10%BSA加入纯化水进行溶解,然后加入到微球中进行封闭,室温混匀60min防止微球出现非特异性凝集。在2-8℃下10000rpm离心10min,弃上清,加入保存液,小粒径的微球浓度配成0.33%,大粒径的微球浓度配成0.25%,6#探头超声5min,20%功率,1s工作,5s间歇。

[0038] (3) 本试剂盒的具体检测过程:

[0039] 检测工具:日立7080型全自动分析仪。

[0040] 检测条件:两点终点法;

[0041] 样品量:试剂R1:试剂R2=2.1μL:210μL:70μL;

[0042] 校准方式:样条函数Spline;测定温度:37℃;样品与R1混匀,37℃恒温3-5分钟,空白管调零600nm处测吸光度;然后加入试剂R2混匀,37℃恒温5分钟,空白管调零600nm处测定反应开始时吸光度A1和结束时吸光度A2。计算吸光度差值 $\Delta A(A2-A1)$ 。

[0043] 其检测步骤为:取2.1μL样本和210μL试剂R1混匀后于37℃孵育3min,在600nm处读取第1读数点吸光度A1,随即加入70μL试剂R2,混匀后于37℃孵育5min,在600nm处读取第2读数点吸光度A2;以吸光度差值 $\Delta A=A2-A1$ 为y轴,校准品浓度值为x轴,以多点非线性的校准方式绘制校准曲线,根据校准曲线计算所得值,即得出样本中C-反应蛋白含量。

[0044] 计算方法:以吸光度差值 $\Delta A(A2-A1)$ 为y轴,校准品浓度值为x轴,以多点非线性的校准方式绘制校准曲线,根据校准曲线计算所得值得出样本中C-反应蛋白含量。

[0045] 参考范围：血清C反应蛋白 $\leq 10\text{mg/L}$ （成人），健康人无感染时C反应蛋白 $\geq 1\text{mg/L}$ ，能预示将来发生心血管疾病的危险性；血清 $>8.0\text{mg/L}$ ，用于感染性疾病的诊断或疗效观察。

[0046] 进一步地，所述全量程C反应蛋白检测试剂盒还包含C反应蛋白标准品，所述C反应蛋白标准品中C反应蛋白含量为 $0.1\sim 300\text{mg/L}$ 。

[0047] 一种全量程C反应蛋白检测试剂盒在检测全量程C反应蛋白浓度上的应用。

[0048] 本发明采用胶乳增强免疫比浊法检测C反应蛋白，其具体原理是采用免疫透射比浊法，检测样本中C反应蛋白的含量。C反应蛋白与其相应抗体致敏乳胶颗粒在溶液中相遇，形成抗原-抗体复合物，发生凝集，产生浊度变化。该浊度变化的高低与样本中C反应蛋白的含量成正比，在 600nm 波长下，通过与已知浓度的校准品比较，可定量检测出样品中C反应蛋白的含量。

[0049] 实施例2

[0050] 全量程CRP检测试剂盒各项性能指标测定

[0051] 灵敏度实验：

[0052] 用 60nm 和 278nm 粒径的羧基化聚苯乙烯乳胶微球分别包被两个不同的抗人CRP单克隆抗体，将其3:1混合后测试6种不同稀释度的样品，结果见表1与图1。

[0053] 表1

CRP浓度 (mg/L)	灵敏度 ΔA
0	45.5
5	664
10	1257.5
40	3636.5
160	10316
320	15566

[0055] 本发明检测试剂与国外进口知名品牌CRP检测试剂的精密度实验：

[0056] 随机抽取某医院检验科30例样本，分别采用本发明检测试剂（采用实施例1配的R1和R2试剂）和国外进口知名品牌CRP检测试剂盒试剂进行精密度实验，结果见表2与图2，两种试剂之间差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），相关系数 $r\geq 0.990$ 。

[0057] 表2

[0058]

样本编号	浓度 (mg/L)	
	CRP 对照试剂	CRP 自制试剂
1	5.85	4.94
2	60.23	54.18
3	84.7	77.13
4	0.33	0.23
5	7.17	5.39
6	5.37	3.64
7	0.53	0.59
8	96.89	88.85
9	26.18	21.77
10	0.99	1.10
11	0.57	0.59
12	3.61	2.31
13	45.76	40.56
14	99.68	90.74
15	100.18	94.64
16	140.55	139.03
17	1.44	1.32
18	14.6	13.10
19	12.06	8.95
20	33.29	28.60
21	76.21	68.49
22	1.23	1.03
23	0.10	0.00
24	168.7	179.17
25	125.32	120
26	133.08	130.3
27	1.76	0.34

[0059]

28	0.39	0.64
29	0.66	0.80
30	16.21	12.72

[0060] 精密度实验:

[0061] 分别重复测试两个不同浓度水平 (5mg/L和50mg/L) 的控制物质,结果显示得到的变异系数CV分别为2.82%和1.75%。

[0062]

样本重复编号	样本 1	样本 2
	浓度	
	5mg/L	50mg/L
1	4.93	54.42
2	4.78	54.97
3	5.13	54.32
4	5.04	54.8
5	4.81	53.68
6	4.78	52.77
7	4.83	51.92
8	4.68	52.69
9	4.86	53.89
10	4.76	53.62
平均值	4.86	53.71
SD	0.14	0.94
CV	2.82%	1.75%

[0063] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

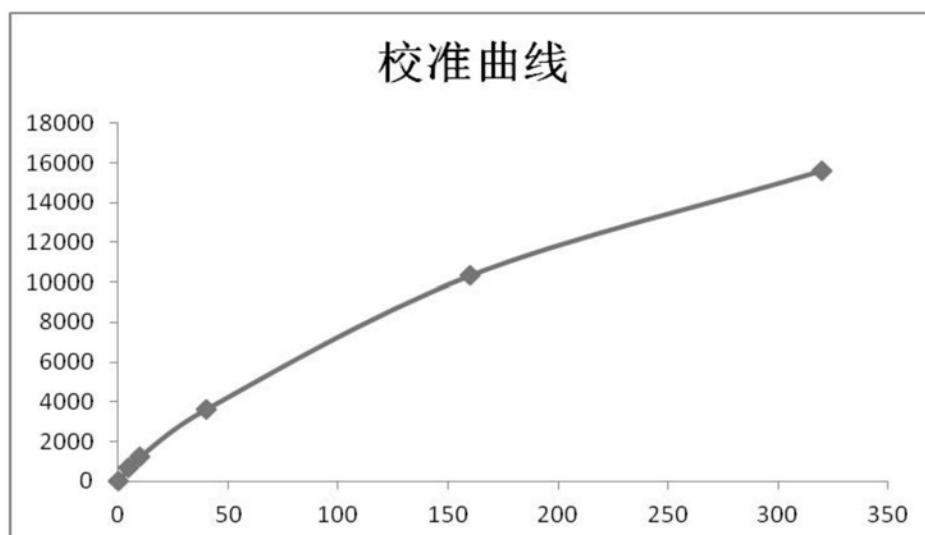


图1

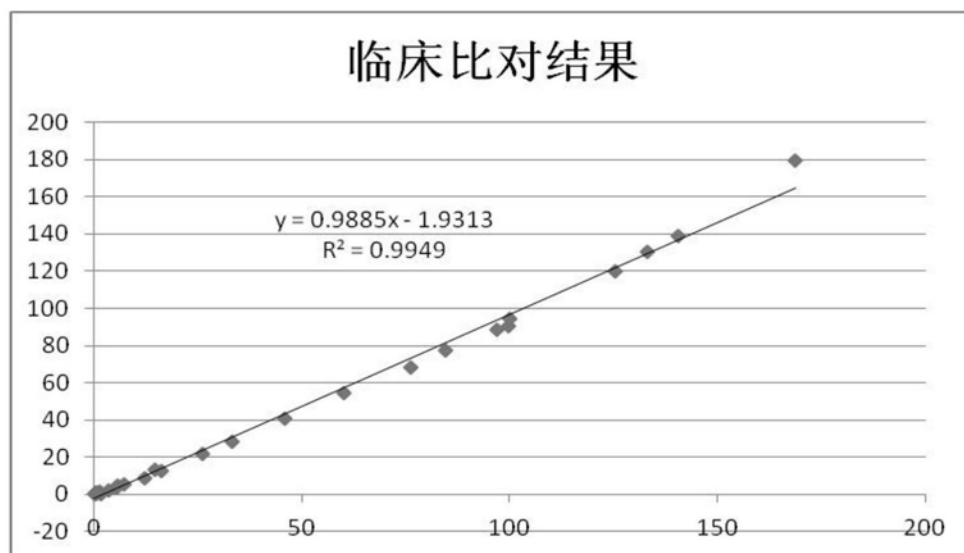


图2

专利名称(译)	一种全量程C反应蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110702908A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910957603.3	申请日	2019-10-10
[标]发明人	戴瞻		
发明人	戴瞻		
IPC分类号	G01N33/537 G01N21/31 G01N21/82		
CPC分类号	G01N21/31 G01N21/82 G01N33/537		
代理人(译)	李枝玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种全量程c反应蛋白检测试剂盒，通过免疫透射比浊法，检测样本中c反应蛋白的含量，达到定量检测的目的。该试剂盒包含试剂R1、试剂R2，所述的试剂R1为磷酸盐缓冲溶液，试剂R2为两种大小粒径的胶乳分别与两种抗人c反应蛋白抗体交联形成的偶联物。同时，该试剂盒与全自动生化分析仪联合使用，提高了检测的灵敏度与准确度，缩短了检测时间。本发明的全量程C反应蛋白检测试剂盒既可以测定高浓度CRP含量，又可以测定低浓度CRP含量，且灵敏度高、稳定性强、线性范围宽、重复性好，具有良好的抗干扰性、准确度和精密度，能够满足临床检验要求。

