



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110231475 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201810182912.3

(22)申请日 2018.03.06

(71)申请人 深圳市帝迈生物技术有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区桃源街  
道留仙大道4093号南山云谷创新产业  
园南风楼2楼B

(72)发明人 李春晖 王业红 张文琪 张志花

(74)专利代理机构 深圳中细软知识产权代理有  
限公司 44528

代理人 安秀梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

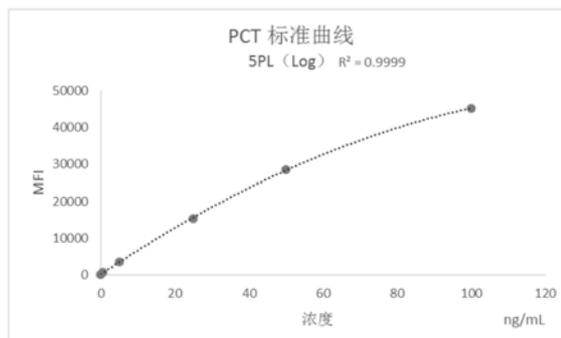
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

### (54)发明名称

一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物  
检测试剂盒

### (57)摘要

本发明涉及一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒,解决了现有技术中检测炎症标志物的检测范围较窄、灵敏度不高、需手动操作且对气候条件要求高的问题。本发明的炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒检测范围更宽,且准确度和灵敏度更高,可以同时检测SAA、PCT、CRP,操作方便,检测结果稳定。



1. 一种炎症标志物的检测方法,其特征在于,包括:

S1、将C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)中的至少一种待测炎症标志物的第一抗体共价偶联在相对应的编码磁性荧光微球表面,形成表面包被第一抗体的编码磁性荧光微球溶液;

S2、将待测炎症标志物的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液;

S3、将待测样本与所述编码磁性荧光微球溶液混合,编码磁性荧光微球表面包被的第一抗体捕获待测样本中的待测抗原,发生免疫反应,形成“炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第一复合物;

S4、将所述第一复合物与所述荧光标记溶液混合,与第二抗体发生免疫反应,形成“荧光标记的第二抗体-炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第二复合物;

S5、对所述第二复合物进行荧光分析检测,根据不同的编码磁性荧光微球识别待测样本中的炎症标志物以及根据荧光信号强弱检测待测样本中的不同炎症标志物的浓度。

2. 根据权利要求1所述的炎症标志物的检测方法,其特征在于,在步骤S1之前还包括步骤S0:将编码磁性荧光微球进行活化。

3. 根据权利要求1所述的炎症标志物的检测方法,其特征在于,所述编码磁性荧光微球是在表面偶联有羟基、氨基、羧基、磺酸基、亲和素中的至少一种功能基团的编码磁性荧光微球。

4. 根据权利要求1所述的炎症标志物的检测方法,其特征在于,所述编码磁性荧光微球的平均粒径为2-8 $\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的炎症标志物的检测方法,其特征在于,具体地,在步骤S2中,利用荧光标记物偶联在待测炎症标志物的第二抗体,形成荧光标记溶液;

或者,待测炎症标志物的第二抗体为生物素化的第二抗体,利用亲和素化的荧光分子对生物素化的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液。

6. 一种炎症标志物检测试剂盒,其特征在于,包括:

第一组分:含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)中的至少一种炎症标志物的第一抗体;

第二组分:含有与所述第一组分相同的炎症标志物的第二抗体。

7. 根据权利要求6所述的炎症标志物检测试剂盒,其特征在于,所述第二抗体为荧光标记物标记的第二抗体。

8. 根据权利要求6所述的炎症标志物检测试剂盒,其特征在于,所述第二抗体为生物素化的第二抗体;

且同时所述炎症标志物检测试剂盒还包括第三组分,所述第三组分含有亲和素化的荧光分子,亲和素化的所述荧光分子的浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

9. 根据权利要求6所述的炎症标志物检测试剂盒,其特征在于,

所述第一组分含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)的第一抗体;

所述第二组分含有C-反应蛋白(CRP)的第二抗体、降钙素原(PCT)的第二抗体、血清淀

粉样蛋白A (SAA) 的第二抗体。

10. 根据权利要求6所述的炎症标志物检测试剂盒, 其特征在于, 所述炎症标志物检测试剂盒还包括第四组分和第五组分;

所述第四组分与所述第一组分相同的炎症标志物的待测物的校准品, 用于制作不同待测物的标准曲线;

所述第五组分含有与所述第一组分相同的炎症标志物的待测物的质控品, 用于检测系统的质量控制。

## 一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断的技术领域,更具体地说,涉及一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 血清淀粉样蛋白A (SAA) 作为急性时相反应蛋白,在细菌、病毒、真菌感染时均有不同程度的升高,在炎症反应时,巨噬细胞释放的IL-1和TNF使IL-6分泌增加,后者刺激肝细胞分泌SAA。4-6小时内SAA浓度快速增加,可达原水平的1000倍。

[0003] C反应蛋白 (CRP) 作为急性时相反应的一个极灵敏的指标,是在机体受到感染或组织损伤时在血浆中的浓度急剧上升。同时CRP直接参与了炎症与动脉粥样硬化等心血管疾病,并且是心血管疾病最强有力的预示因子与危险因子。

[0004] 降钙素原 (PCT) 反映了全身炎症的活跃程度,影响PCT水平的因素包括被感染器官的大小和类型、细菌的种类、炎症的程度和免疫反应的状况。PCT的升高还可能出现在严重的休克、全身性炎症反应综合征和多器官功能紊乱综合征。

[0005] PCT对严重细菌感染诊断具有较高的灵敏度和特异性,要优于CRP和SAA等炎症标志物。但是PCT在自身免疫疾病的活动期间,含量无明显升高,而CRP浓度会升高。在小儿感染类疾病早期,CRP对病毒性感染缺乏敏感性,很难鉴别是细菌感染还是病毒感染,而SAA在细菌和病毒感染早期均可升高,相对于CRP, SAA在监测感染的急性期反应要更敏感。

[0006] 在诊断感染、炎症相关疾病时,单独使用SAA、CRP、PCT中的一种标志物不能有效准确的进行诊断,因此临床上将SAA、CRP、PCT等相关标志物结合监测,对感染性疾病具有重要的意义。

[0007] 目前公开的专利201420797771.3中提到一种同时定量检测SAA-PCT-CRP的方法,该方法使用的是胶体金法。该方法检测人血清淀粉样蛋白A、人降钙素原和C-反应蛋白的检测范围分别为5-100mg/L、0.5-20mg/L和1-200mg/L,此方法的检测范围较窄,灵敏度不高,并且需手动进行操作,较为繁琐,且对于环境湿度要求较为严格,限制了部分地区与气候条件的使用。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒,解决了现有技术中检测炎症标志物的检测范围较窄、灵敏度不高、需手动操作且对气候条件要求高的问题。

[0009] 本发明解决技术问题所采用的技术方案是:一种炎症标志物的检测方法,包括:

[0010] S1、将C-反应蛋白 (CRP)、降钙素原 (PCT)、血清淀粉样蛋白A (SAA) 中的至少一种待测炎症标志物的第一抗体共价偶联在相对应的编码磁性荧光微球表面,形成表面包被第一抗体的编码磁性荧光微球溶液;

[0011] S2、将待测炎症标志物的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液;

[0012] S3、将待测样本与所述编码磁性荧光微球溶液混合,编码磁性荧光微球表面包被的第一抗体捕获待测样本中的待测抗原,发生免疫反应,形成“炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第一复合物;

[0013] S4、将所述第一复合物与所述荧光标记溶液混合,与第二抗体发生免疫反应,形成“荧光标记的第二抗体-炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第二复合物;

[0014] S5、对所述第二复合物进行荧光分析检测,根据不同的编码磁性荧光微球识别待测样本中的炎症标志物以及根据荧光信号强弱检测待测样本中的不同炎症标志物的浓度。

[0015] 在本发明的检测方法中,在步骤S1之前还包括步骤S0:将编码磁性荧光微球进行活化。

[0016] 在本发明的检测方法中,所述编码磁性荧光微球是在表面偶联有羟基、氨基、羧基、磺酸基、亲和素中的至少一种功能基团的编码磁性荧光微球。

[0017] 在本发明的检测方法中,所述编码磁性荧光微球的平均粒径为2-8 $\mu\text{m}$ 。

[0018] 在本发明的检测方法中,具体地,在步骤S2中,利用荧光标记物偶联在待测炎症标志物的第二抗体,形成荧光标记溶液;

[0019] 或者,待测炎症标志物的第二抗体为生物素化的第二抗体,利用亲和素化的荧光分子对生物素化的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液。

[0020] 本发明还提供一种炎症标志物检测试剂盒,包括:

[0021] 第一组分:含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)中的至少一种炎症标志物的第一抗体;第二组分:含有与所述第一组分相同的炎症标志物的第二抗体。

[0022] 在本发明的炎症标志物检测试剂盒中,所述第二抗体为荧光标记物标记的第二抗体。

[0023] 在本发明的炎症标志物检测试剂盒中,所述第二抗体为生物素化的第二抗体;且同时所述炎症标志物检测试剂盒还包括第三组分,所述第三组分含有亲和素化的荧光分子,亲和素化的所述荧光分子的浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 在本发明的炎症标志物检测试剂盒中,所述第一组分含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)的第一抗体;所述第二组分含有C-反应蛋白(CRP)的第二抗体、降钙素原(PCT)的第二抗体、血清淀粉样蛋白A(SAA)的第二抗体。

[0025] 在本发明的炎症标志物检测试剂盒中,所述炎症标志物检测试剂盒还包括第四组分和第五组分;所述第四组分与所述第一组分相同的炎症标志物的待测物的校准品,用于制作不同待测物的标准曲线;所述第五组分含有与所述第一组分相同的炎症标志物的待测物的质控品,用于检测系统的质量控制。

[0026] 实施本发明的炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒,具有以下有益效果:本发明的炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒检测范围更宽,且准确度和灵敏度更高,可以同时检测SAA、PCT、CRP,操作方便,检测结果稳定。

## 附图说明

[0027] 图1是本发明第一实施例中的PCT的标准曲线图;

- [0028] 图2是本发明第一实施例中的SAA的标准曲线图；  
[0029] 图3是本发明第一实施例中的CRP的标准曲线图；  
[0030] 图4是本发明第二实施例中的PCT的标准曲线图；  
[0031] 图5是本发明第二实施例中的SAA的标准曲线图；  
[0032] 图6是本发明第二实施例中的CRP的标准曲线图。

### 具体实施方式

[0033] 下面结合附图和实施例,对本发明的炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒作进一步说明:

[0034] 本发明涉及一种检测范围更宽、准确度和灵敏度更高的炎症标志物的检测方法。

[0035] 该检测方法包括:

[0036] S0、将编码磁性荧光微球进行活化;其中活化方法为现有技术,这里不再进行详细赘述;

[0037] S1、将C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)中的至少一种待测炎症标志物的第一抗体共价偶联在相对应的编码磁性荧光微球表面,形成表面包被第一抗体的编码磁性荧光微球溶液;

[0038] S2、将待测炎症标志物的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液;

[0039] S3、将待测样本与编码磁性荧光微球溶液混合,编码磁性荧光微球表面包被的第一抗体捕获待测样本中的待测抗原,发生免疫反应,形成“炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第一复合物;

[0040] S4、将第一复合物与荧光标记溶液混合,与第二抗体发生免疫反应,形成“荧光标记的第二抗体-炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第二复合物;

[0041] S5、对第二复合物进行荧光分析检测,根据不同的编码磁性荧光微球识别待测样本中的炎症标志物以及根据荧光信号强弱检测待测样本中的不同炎症标志物的浓度。

[0042] 其中,编码磁性荧光微球是在表面偶联有羟基、氨基、羧基、磺酸基、亲和素中的至少一种功能基团的编码磁性荧光微球。进一步地,编码磁性荧光微球的平均粒径为2-8 $\mu\text{m}$ 。

[0043] 其中,在步骤S2中,利用荧光标记物偶联在待测炎症标志物的第二抗体,具体可以为第二抗体的Fc区等,形成荧光标记溶液。或者,待测炎症标志物的第二抗体为生物素化的第二抗体,利用亲和素化的荧光分子对生物素化的第二抗体进行荧光标记,形成荧光标记溶液。

[0044] 进一步地,本发明涉及的炎症标志物的检测方法可以同时检测C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测炎症标志物,则在步骤S1中,将C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测炎症标志物的第一抗体分别共价偶联在各自相对应的编码磁性荧光微球表面,形成混合的表面包被第一抗体的编码磁性荧光微球溶液;而在步骤S2中,分别将C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测炎症标志物的第二抗体进行荧光标记,形成混合的荧光标记溶液。

[0045] 具体地,以降钙素原(PCT)待测物为例,该检测方法包括:

[0046] (1)活化编码磁性荧光微球,使用该活化的编码磁性荧光微球,并且在微球表面偶联羟基、氨基、羧基、磺酸基、亲和素等功能基团;

[0047] (2) 将一种待测物(如PCT)的第一抗体共价偶联至一种编码磁性荧光微球的表面(如①号荧光微球),得到包被待测物的第一抗体的编码磁性荧光微球(第I溶液);不同的待测物的第一抗体会偶联至不同编码的磁性荧光微球表面:

[0048] M-F bead-Antibody  $X_1$ ;

[0049] (3) 加入该待测物(如PCT)与包被待测物的第一抗体的编码磁性荧光微球混合,编码磁性荧光微球表面包被的第一抗体捕获待测抗原,发生免疫反应,得到“炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第一复合物:

[0050] M-F bead-Antibody  $X_1$ -Antigen  $X_1$ ;

[0051] (4) 将待测物(如PCT)的第二抗体进行荧光修饰(第II溶液),可将荧光标志物,即荧光分子,偶联在第二抗体,具体可以是第二抗体的Fc区,也可通过生物素-亲和素体系进行桥接;第二抗体是待测物的另一种抗体,能与上述第一复合物混合,发生免疫反应,得到“荧光标记的第二抗体-炎症标志物抗原-第一抗体-编码磁性荧光微球”的第二复合物:

[0052] M-F bead-antibody  $X_1$ -Antigen  $X_1$ -Antibody  $X_2$ ;

[0053] (5) 该第二复合物依次通过荧光检测系统,检测第二复合物上携带的荧光信号强弱,根据荧光信号的强弱来定量待测物(如PCT)的浓度。

[0054] 当需要同时检测C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测炎症标志物时,则可以将(2)步中制备的不同待测物的第I溶液混合得到同时含有不同编码磁性荧光微球分别包被了PCT、CRP、SAA的第一抗体的混合溶液A,并将(4)步中制备的不同待测物的第II溶液混合得到同时含有荧光标记的PCT、CRP、SAA第二抗体的混合溶液B。含有不同待测物第一抗体的编码磁性荧光微球的混合溶液A可同时分别捕获待测样本中的PCT、CRP、SAA抗原,之后再加入混合溶液B,结合形成带有荧光信号的四元复合物;通过荧光分析系统,根据不同编码识别不同待测物项目的编码磁性荧光微球及第二复合物中的荧光信号强弱来识别和检测不同待测物的浓度。

[0055] 以上待测物是样本中的PCT、CRP、SAA抗原。抗体则是分别抗PCT、CRP、SAA的第一抗体及第二抗体,第一抗体和第二抗体同时能与待测物的不同位点进行结合。

[0056] 上述步骤中:

[0057] M-F bead:表示编码磁性荧光微球;

[0058] X:众多炎症标志物中的一种;

[0059] antibody  $X_1$ :表示一种炎症标志物的第一抗体;

[0060] antibody  $X_2$ :表示一种炎症标志物的第二抗体;

[0061] Antigen  $X_1$ :表示一种炎症标志物本身。

[0062] 优选的编码磁性荧光微球平均粒径在2-8 $\mu\text{m}$ ,表面含有羟基、氨基、羧基、磺酸基、亲和素等功能基团及不同种类、强度的荧光分子。

[0063] 混合溶液A及混合溶液B分别含有以下组分:

[0064] 混合溶液A:含有不同编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)第一抗体、降钙素原(PCT)第一抗体、血清淀粉样蛋白A(SAA)第一抗体;

[0065] 混合溶液B:含有荧光标记物标记的C-反应蛋白(CRP)第二抗体、荧光标记物标记的降钙素原(PCT)第二抗体、荧光标记物标记的血清淀粉样蛋白A(SAA)第二抗体。

[0066] 更优选的可将混合溶液B拆分为两种:

[0067] 混合溶液(B1):含有生物素化的C-反应蛋白(CRP)第二抗体、生物素化的降钙素原(PCT)第二抗体、生物素化的血清淀粉样蛋白A(SAA)第二抗体;

[0068] 混合溶液(B2):含有一定浓度的亲和素化的荧光分子。

[0069] 本发明的基本原理是液相芯片技术、流式细胞技术及双抗夹心法,配套检测仪器共同完成。即先制备编码的磁性荧光微球(M-F beads),然后将不同待测物的第一抗体固定在微球表面,然后待测物与第一抗体发生免疫反应,之后再与荧光标记物标记的第二抗体反应。最后这些复合物被仪器送到荧光检测系统,单个成列依次通过检测器,经采集、处理、分析不同的荧光信号,可检测出不同编码的编码磁性荧光微球(每一种编码的编码磁性荧光微球上固定一种待测物的第一抗体)从而识别出待测物的种类,同时可检测出第二抗体上荧光分子的荧光强度,根据强度经算法处理后得出待测物的含量。

[0070] 下面进行详细说明。

[0071] A、“第一抗体-编码磁性荧光微球”复合物的形成:

[0072] M-F bead-Antibody X<sub>1</sub>

[0073] M-F bead:表示编码磁性荧光微球;X:众多炎症标志物中的一种;antibody X<sub>1</sub>:表示一种炎症标志物的第一抗体;

[0074] 第一抗体固定在编码磁性荧光微球表面的操作方法:

[0075] A1、将1mg编码磁性荧光微球活化后,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;

[0076] A2、加入一定量的pH5.0~6.0的MES缓冲液(10~100mM),将编码磁性荧光微球涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液。该步骤重复三次;

[0077] A3、加入一定量上述的MES缓冲液,将编码磁性荧光微球涡旋震荡20s,往编码磁性荧光微球溶液中加入5~100μg第一抗体,将编码磁性荧光微球涡旋震荡20s,然后室温震荡1.5~3.0个小时;

[0078] A4、用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;

[0079] A5、再取一定量的上述的MES缓冲液,将编码磁性荧光微球涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液,该步骤重复三次;

[0080] A6、加入一定量的封闭剂(如1%BSA、PBS,pH7.4),将编码磁性荧光微球涡旋震荡20s,然后室温震荡2.0~6.0个小时进行封闭;

[0081] A7、用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;

[0082] A8、再用pH7.0~9.0的PBS-TBN缓冲液进行清洗,涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液。该步骤重复三次;

[0083] A9、加入一定量的pH7.0~9.0的PBS-TBN缓冲液,2-8℃避光保存。

[0084] B、“荧光标记第二抗体”的过程

[0085] B1、生物素化第二抗体

[0086] B11、分别取一定量的待测物的第二抗体,用PBS(10~100mM,pH7.0~9.0)或NaHCO<sub>3</sub>(10~100mM,pH7.0~9.0)溶液稀释,至终浓度保持在2mg/mL以上;

[0087] B12、用DMSO配制Biotin-NHS成10mM~20mM浓度,溶解混匀后取一定量分别加入待测物的第二抗体溶液中,37℃孵育2h-6h或4℃过夜;

[0088] B2、纯化生物素化的抗体,去除未反应的原料;

[0089] B3、加入PBS-TBN溶液,2-8℃保存;

[0090] B4、将上述制备的生物素化的第二抗体,加入至同一管PBS-TBN溶液中,每种抗体浓度稀释至一定浓度,混匀;

[0091] B5、往混匀了的待测物第二抗体溶液中添加一定浓度的亲和素化的荧光分子,混匀,2-8℃避光保存。

[0092] 本发明还提供了一种炎症标志物检测试剂盒,该炎症标志物检测试剂盒包括:

[0093] 第一组分:含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)中的至少一种炎症标志物的第一抗体;

[0094] 第二组分:含有与所述第一组分相同的炎症标志物的第二抗体;

[0095] 在一实施例中,第二抗体为荧光标记物标记的第二抗体;

[0096] 在另一实施例中,第二抗体为生物素化的第二抗体;且同时炎症标志物检测试剂盒还包括第三组分,第三组分含有亲和素化的荧光分子,亲和素化的所述荧光分子的浓度为0.1μg/mL~100μg/mL;

[0097] 炎症标志物检测试剂盒还包括第四组分和第五组分;第四组分与第一组分相同的炎症标志物的待测物的校准品,用于制作不同待测物的标准曲线;第五组分含有与所述第一组分相同的炎症标志物的待测物的质控品,用于检测系统的质量控制。

[0098] 优选地,第一组分含有编码磁性荧光微球包被的C-反应蛋白(CRP)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的降钙素原(PCT)的第一抗体、编码磁性荧光微球包被的血清淀粉样蛋白A(SAA)的第一抗体;第二组分含有C-反应蛋白(CRP)的第二抗体、降钙素原(PCT)的第二抗体、血清淀粉样蛋白A(SAA)的第二抗体;

[0099] 在一实施例中,第二组分含有荧光标记物标记的C-反应蛋白(CRP)的第二抗体、荧光标记物标记的降钙素原(PCT)的第二抗体、荧光标记物标记的血清淀粉样蛋白A(SAA)的第二抗体;

[0100] 在另一实施例中,第二组分含有生物素化的C-反应蛋白(CRP)的第二抗体、生物素化的降钙素原(PCT)的第二抗体、生物素化的血清淀粉样蛋白A(SAA)的第二抗体;且同时炎症标志物检测试剂盒还包括第三组分,第三组分含有亲和素化的荧光分子;亲和素化的荧光分子的浓度为0.1μg/mL~100μg/mL;

[0101] 炎症标志物检测试剂盒还包括第四组分和第五组分;第四组分含有C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)和血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测物的混合校准品,用于制作不同待测物的标准曲线;第五组分含有C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)和血清淀粉样蛋白A(SAA)三种待测物的混合质控品,用于检测系统的质量控制。

[0102] 通过该优选的炎症标志物检测试剂盒可以同时检测待测样本中的C-反应蛋白(CRP)、降钙素原(PCT)、血清淀粉样蛋白A(SAA)。

[0103] 具体地,优选的炎症标志物检测试剂盒至少含有以下内容:

[0104] 第一组分:含有3种不同的编码磁性荧光微球包被的第一抗体,即含有C-反应蛋白(CRP)第一抗体、降钙素原(PCT)第一抗体、血清淀粉样蛋白A(SAA)第一抗体;

[0105] 第二组分:含有3种荧光标记物标记的第二抗体,即含有荧光标记物标记的C-反应蛋白(CRP)第二抗体、荧光标记物标记的降钙素原(PCT)第二抗体、含有荧光标记物标记的血清淀粉样蛋白A(SAA)第二抗体;

[0106] 第三组分:含有3种待测物的校准品,即CRP/PCT/SAA的混合校准品,用于制作不同待测物的标准曲线。

[0107] 另一优选的炎症标志物检测试剂盒组分:

[0108] 第一组分:含有3种不同的编码磁性荧光微球包被的第一抗体,即含有C-反应蛋白(CRP)第一抗体、降钙素原(PCT)第一抗体、血清淀粉样蛋白A(SAA)第一抗体;

[0109] 第二组分:含有生物素化的C-反应蛋白(CRP)第二抗体、生物素化的降钙素原(PCT)第二抗体、生物素化的血清淀粉样蛋白A(SAA)第二抗体;

[0110] 第三组分:含有亲和素化的荧光分子,浓度为 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

[0111] 第四组分:含有3种待测物的校准品,即CRP/PCT/SAA的混合校准品,用于制作不同待测物的标准曲线;

[0112] 第五组分:含有3种待测物的质控品,即CRP/PCT/SAA的混合质控品,用于检测系统的质量控制。

[0113] 下面通过具体实施例进行详细说明。

[0114] 实施例一:三种标志物SAA/PCT/CRP同时检测

[0115] 1.准备

[0116] 1.1按不同项目选择不同的可编码磁性荧光微球

[0117] SAA→8号微球

[0118] PCT→1号微球

[0119] CRP→15号微球;

[0120] 1.2分别取制备好的1/8/15号微球各1mg,用pH5.5的MES缓冲液(50mM)进行清洗;

[0121] 1.3用 $0.1\text{M}$  pH6.2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液进行活化,涡旋震荡20s;之后分别加入的NHS和EDC各 $100\mu\text{g}$ (NHS和EDC用50mM pH5.5的MES缓冲液溶解,现用现配),涡旋震荡20s,室温震荡30min;

[0122] 1.4用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;加入 $500\mu\text{L}$  pH5.5的MES缓冲液(50mM),将微球涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液,该步骤重复三次;

[0123] 1.5加入 $500\mu\text{L}$  pH5.5的MES缓冲液(50mM),将微球涡旋震荡20s,分别往1/8/15号微球溶液中加入PCT第一抗体/SAA第一抗体/CRP第一抗体各 $400\mu\text{g}$ 、 $400\mu\text{g}$ 、 $40\mu\text{g}$ ,将微球涡旋震荡20s,然后室温震荡2.0个小时;

[0124] 1.6用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;

[0125] 1.7加入 $500\mu\text{L}$  pH5.5的MES缓冲液(50mM),将微球涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液,该步骤重复三次;

[0126] 1.8加入 $500\mu\text{L}$ 封闭剂(1%BSA,PBS,pH7.4),将微球涡旋震荡20s,然后室温震荡3.0个小时进行封闭;

[0127] 1.9用磁分离板进行磁分离,吸取上清液;

[0128] 1.10加入 $500\mu\text{L}$  pH7.4的PBS-TBN缓冲液,涡旋震荡20s,用磁分离板进行磁分离,吸取上清液,该步骤重复三次;

[0129] 1.11将包被好第一抗体1/8/15号微球,按1:1:1的比例添加至一个容器中,用pH7.4的PBS-TBN缓冲液稀释,每种微球的终浓度为 $0.2\text{mg}/\text{mL}$ 。2-8℃避光保存。

[0130] 2.荧光分子标记第二抗体

[0131] 2.1生物素化PCT/SAA/CRP的第二抗体

[0132] 2.1.1PCT/SAA/CRP的第二抗体分别取4mg、4mg、40μg，分别用NaHCO<sub>3</sub> (100mM，pH8.3) 溶液稀释，至终浓度为2mg/mL；

[0133] 2.1.2用DMSO配制Biotin-NHS成10mM浓度，溶解混匀后取1.5μL分别加入PCT/SAA/CRP的第二抗体溶液中，37℃孵育2h；

[0134] 2.1.3过Sephadex G-25层析柱，纯化生物素化的抗体，去除未反应的原料；

[0135] 2.1.4加入1mL的PBS-TBN，pH7.4溶液2-8℃保存。

[0136] 2.2加入荧光标记分子

[0137] 2.2.1将2.1中制备的生物素化的PCT/SAA/CRP的第二抗体，加入至同一管PBS-TBN中，每种抗体浓度稀释至10μg/mL，混匀；

[0138] 2.2.2往混匀了的PCT/SAA/CRP第二抗体溶液中添加1mg/mL的SA-PE，使SA-PE的终浓度为40μg/mL，混匀，2-8℃避光保存。

[0139] 3.PCT/SAA/CRP的校准品/质控品的制备

[0140] 用含pH7.4,0.1%BSA的PBS按下表配制：

[0141]

项目	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6	Con-1	Con-2
PCT	0ng/mL	0.5ng/mL	5ng/mL	25ng/mL	50ng/mL	100ng/mL	0.5ng/mL	10ng/mL
SAA	0mg/L	20mg/L	40mg/L	80mg/L	160mg/L	320mg/L	10mg/L	50mg/L
CRP	0mg/L	10mg/L	40mg/L	80mg/L	160mg/L	320mg/L	5mg/L	20mg/L

[0142] 4. 样本准备

[0143] 4.1收集病人血清样本10份，每份1mL，然后放入配套测试仪器，即开始自动添加试剂、样本及清洗，40min左右即可得到结果。

[0144] 4.2先定标得到该项目的标准曲线如图1-3所示。

[0145] 4.3测试质控及样本，检测结果如下表：

[0146]

项目	PCT	SAA	CRP
Con-1	0.44ng/mL	10.24mg/L	4.96mg/L
Con-2	11.21ng/mL	48.36mg/L	21.37mg/L
样本-1	0.66ng/mL	31.62mg/L	42.67mg/L
样本-2	7.25ng/mL	172.54mg/L	92.36mg/L
样本-3	2.15ng/mL	213.61mg/L	112.85mg/L
样本-4	0.92ng/mL	85.68mg/L	56.31mg/L
样本-5	0.11ng/mL	14.63mg/L	25.32mg/L
样本-6	15.62ng/mL	253.61mg/L	88.34mg/L
样本-7	5.31ng/mL	115.6mg/L	76.82mg/L
样本-8	0.54ng/mL	216.33mg/L	152.36mg/L
样本-9	1.16ng/mL	15.69mg/L	55.39mg/L
样本-10	4.14ng/mL	56.37mg/L	88.39mg/L

[0147] 结果表明本发明的检测方法可同时检测多个炎症标志物，可以为临床诊断提供辅

助性的依据。

[0148] 实施例二：三种标志物PCT/SAA/CRP同时检测

[0149] 1.准备

[0150] 1.1按不同项目选择不同的可编码磁性荧光微球

[0151] PCT→16号微球

[0152] SAA→24号微球

[0153] CRP→26号微球；

[0154] 1.2分别取制备好的16/24/26号微球各1mg，用pH5.0的MES缓冲液(20mM)进行清洗；

[0155] 1.3用0.1M pH6.2Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>溶液进行活化，涡旋震荡20s；之后分别加入的NHS和EDC各100μg(NHS和EDC用20mM pH5.0的MES缓冲液溶解，现用现配)，涡旋震荡20s，室温震荡30min。

[0156] 1.4用磁分离板进行磁分离，吸取上清液；加入500μL pH5.0的MES缓冲液(20mM)，将微球涡旋震荡20s，用磁分离板进行磁分离，吸取上清液，该步骤重复三次；

[0157] 1.5加入500μL pH5.0的MES缓冲液(20mM)，将微球涡旋震荡20s，分别往16/24/26号微球溶液中加入PCT/SAA/CRP的第一抗体各200μg、500μg、500μg，将微球涡旋震荡20s，然后室温震荡2.0个小时；

[0158] 1.6用磁分离板进行磁分离，吸取上清液；

[0159] 1.7加入500μL pH5.0的MES缓冲液(20mM)，将微球涡旋震荡20s，用磁分离板进行磁分离，吸取上清液，该步骤重复三次；

[0160] 1.8加入500μL封闭剂(1%BSA,PBS,pH8.0)，将微球涡旋震荡20s，然后室温震荡3.0个小时进行封闭；

[0161] 1.9用磁分离板进行磁分离，吸取上清液；

[0162] 1.10加入500μL pH8.0的PBS-TBN缓冲液，涡旋震荡20s，用磁分离板进行磁分离，吸取上清液，该步骤重复三次；

[0163] 1.11将包被好第一抗体16/24/26号微球，按1:1:1的比例添加至一个容器中，用pH8.0的PBS-TBN缓冲液稀释，每种微球的终浓度为0.2mg/mL。2-8℃避光保存。

[0164] 2.荧光分子标记第二抗体

[0165] 2.1生物素化PCT/SAA/CRP的第二抗体

[0166] 2.1.1PCT/SAA/CRP的第二抗体分别取200μg、500μg、500μg，分别用NaHCO<sub>3</sub>(100mM，pH8.3)溶液稀释，至终浓度为2mg/mL；

[0167] 2.1.2用DMSO配制Biotin-NHS成10mM浓度，溶解混匀后取1.5μL分别加入PCT/SAA/CRP的第二抗体溶液中，37℃孵育3h；

[0168] 2.1.3过Sephadex G-25层析柱，纯化生物素化的抗体，去除未反应的原料；

[0169] 2.1.4加入1mL的PBS-TBN，pH8.0溶液2-8℃保存。

[0170] 2.2加入荧光标记分子

[0171] 2.2.1将2.1中制备的生物素化的200μg、5mg、5mg的第二抗体，加入至同一管PBS-TBN中，每种抗体浓度稀释至10μg/mL，混匀；

[0172] 2.2.2往混匀了的200μg、5mg、5mg第二抗体溶液中添加1mg/mL的SA-PE，使SA-PE的

终浓度为40 $\mu$ g/mL,混匀,2-8 $^{\circ}$ C避光保存。

[0173] 3.PCT/SAA/CRP的校准品/质控品的制备,同上一实施例中的(3),按下表所示。

[0174]

项目	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6
PCT	0ng/mL	0.5ng/mL	5ng/mL	25ng/mL	50ng/mL	100ng/mL
SAA	0mg/L	20mg/L	40mg/L	80mg/L	160mg/L	320mg/L
CRP	0mg/L	10mg/L	40mg/L	80mg/L	160mg/L	320mg/L

[0175] 4.样本准备

[0176] 4.1收集病人血清样本10份,每份1mL,然后放入配套测试仪器,即开始自动添加试剂、样本及清洗,40min左右即可得到结果。

[0177] 4.2先定标得到该项目的标准曲线如图4-6所示。

[0178] 4.3测试质控及样本,检测结果如下表:

[0179]

项目	PCT	SAA	CRP
样本-1	1.45ng/mL	18.24mg/L	7.96mg/L
样本-2	0.21ng/mL	8.12mg/L	3.62mg/L
样本-3	12.17ng/mL	41.02mg/L	36.07mg/L
样本-4	0.65ng/mL	315.62mg/L	67.13mg/L
样本-5	0.17ng/mL	73.86mg/L	12.45mg/L
样本-6	1.11ng/mL	85.97mg/L	87.05mg/L
样本-7	0.40ng/mL	55.68mg/L	28.40mg/L
样本-8	2.67ng/mL	176.15mg/L	98.55mg/L
样本-9	3.48ng/mL	152.67mg/L	59.32mg/L
样本-10	3.45ng/mL	136.93mg/L	72.92mg/L

[0180] 结果表明本发明的检测方法可同时检测多个炎症标志物,可以为临床在心血管等疾病诊断上提供辅助性的依据。

[0181] 需要说明的是,文中所述待测物是指待测样本中的PCT、CRP、SAA抗原。抗体则是分别抗PCT、CRP、SAA的第一抗体及第二抗体,第一抗体和第二抗体同时能与待测物的不同位点进行结合。文中所述的荧光标记物是现有技术中常用的荧光标记物,这里不再进行详细赘述。

[0182] 应当理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进或变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围之内。

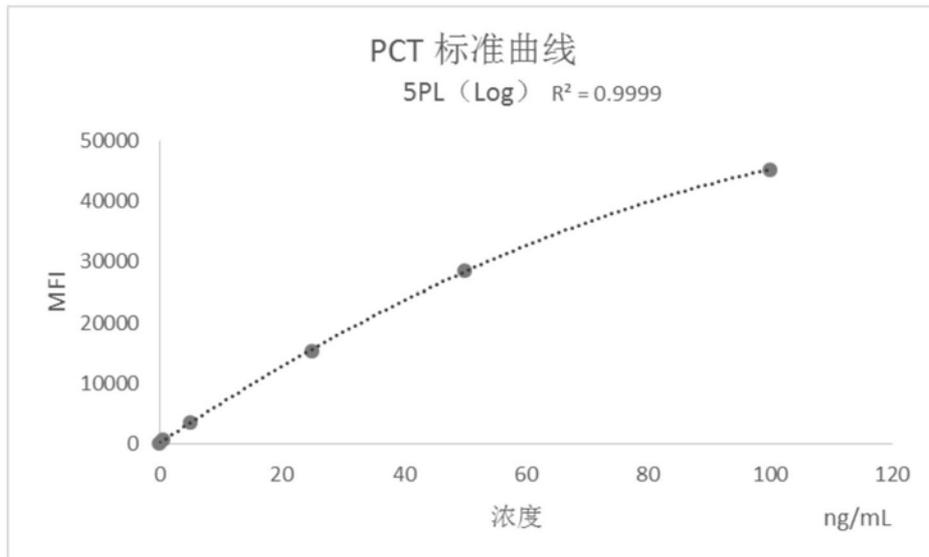


图1

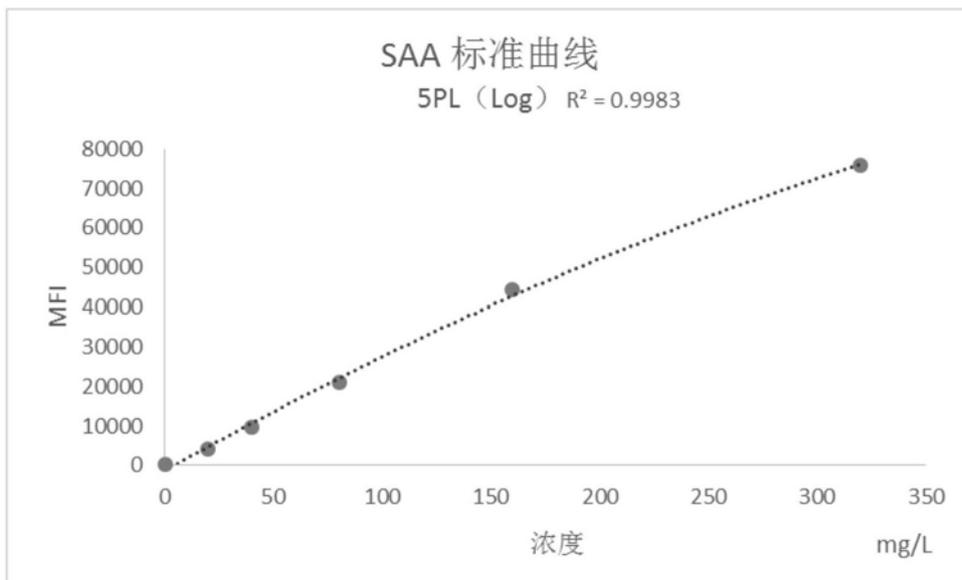


图2

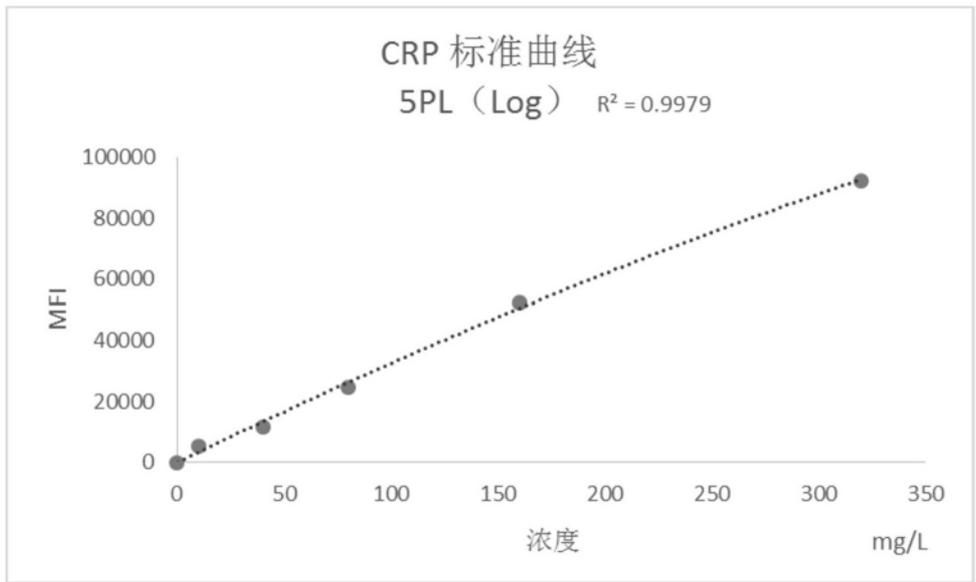


图3

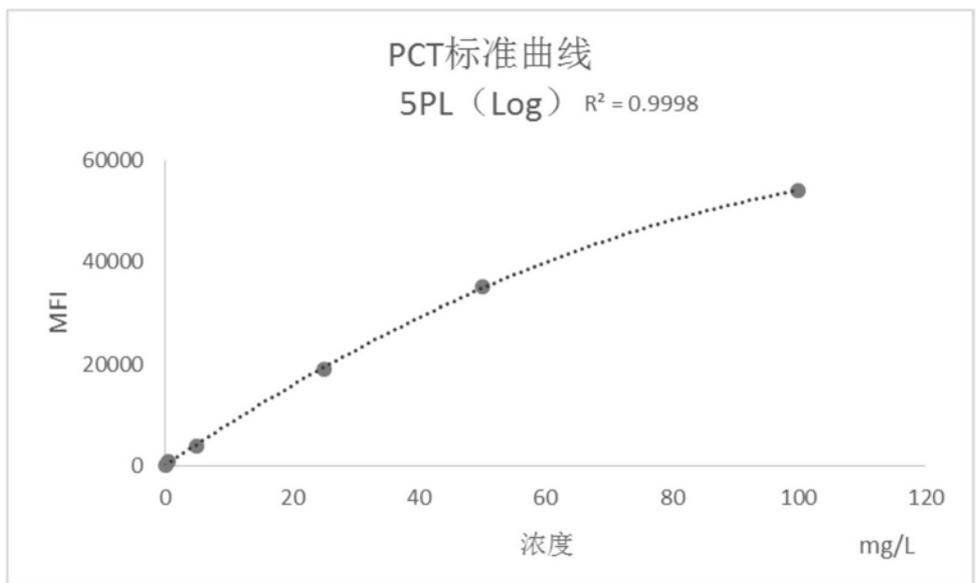


图4

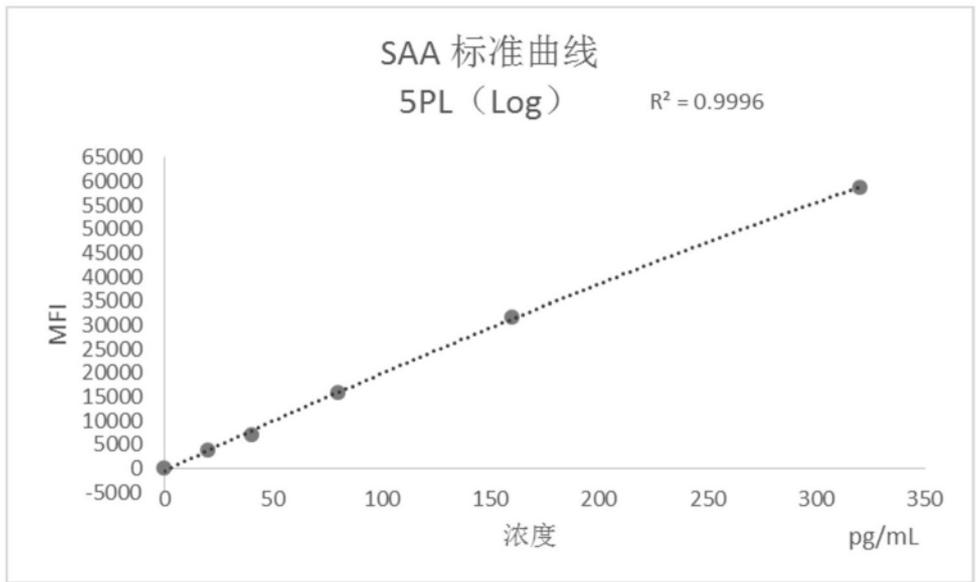


图5

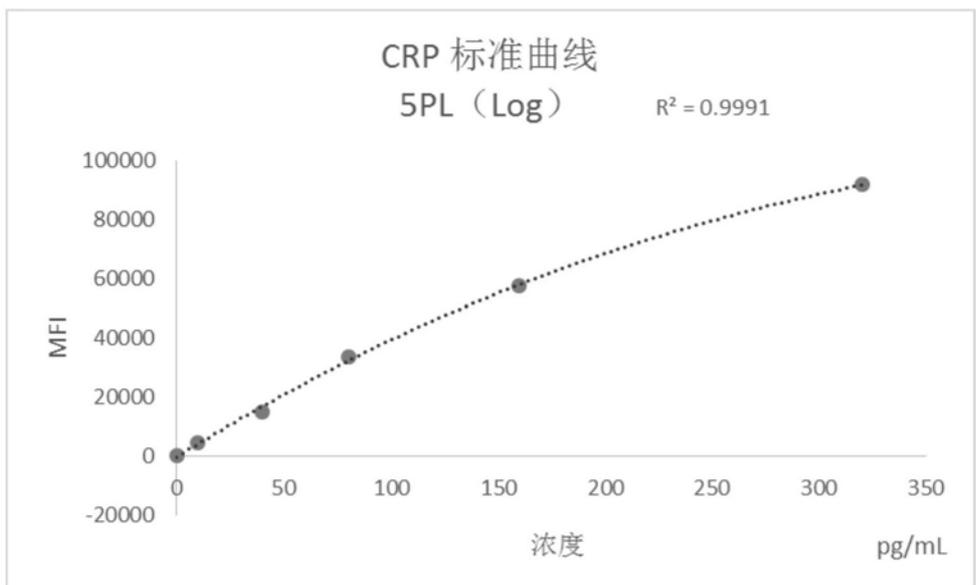


图6

专利名称(译)	一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110231475A</a>	公开(公告)日	2019-09-13
申请号	CN201810182912.3	申请日	2018-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市帝迈生物技术有限公司		
[标]发明人	李春晖 王业红 张文琪 张志花		
发明人	李春晖 王业红 张文琪 张志花		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/5434		
代理人(译)	安秀梅		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒，解决了现有技术中检测炎症标志物的检测范围较窄、灵敏度不高、需手动操作且对气候条件要求高的问题。本发明的炎症标志物的检测方法及炎症标志物检测试剂盒检测范围更宽，且准确度和灵敏度更高，可以同时检测SAA、PCT、CRP，操作方便，检测结果稳定。

