



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104215771 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201410401483. 6

EP 0303980 A2, 1989. 02. 22,

(22) 申请日 2014. 08. 14

US 5756363 A, 1998. 05. 26,

(73) 专利权人 上海睿康生物科技有限公司

审查员 肖吉

地址 201112 上海市闵行区联航路 1588 号 1
幢软件孵化大楼 1# 楼 301、302 室

(72) 发明人 李伟奇 赵小凤 房君江 张秀文
林清玉

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101881777 A, 2010. 11. 10,

CN 102749454 A, 2012. 10. 24,

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

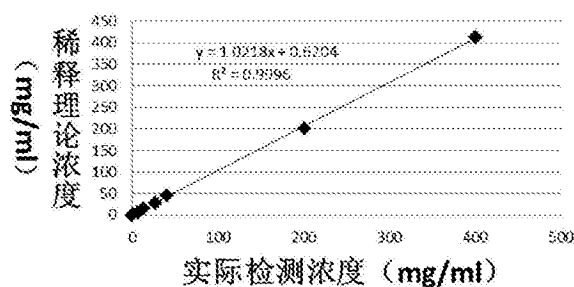
(54) 发明名称

一种基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 该试剂盒包括 R1 试剂、R2 试剂和校准品; 所述 R1 试剂为甘氨酸缓冲体系; 所述 R2 试剂为 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液; 所述校准品含 6 支 CRP 的重组蛋白浓度不同、溶质及其含量均相同的牛血清基质。本发明的试剂盒是一种利用乳胶增强免疫比浊法的试剂盒, CRP 抗体通过化学键结合于脂质体表面。与现有市售产品相比, 本发明超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒具有更高灵敏度、更宽的线性。

线性范围验证试验



1. 一种基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 包括 R1 试剂、R2 试剂和校准品;

所述 R1 试剂为甘氨酸缓冲体系;

所述 R2 试剂为基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液; 所述脂质体为磷脂酰胆碱与合成磷脂的 1: (1 ~ 20) 混合物; 所述合成磷脂由二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱中的一种或多种合成;

所述校准品含 6 支 CRP 的重组蛋白浓度不同、溶质及其含量均相同的牛血清基质;

所述甘氨酸缓冲体系, 溶剂为 10 ~ 50mM、pH 6.0 ~ 6.5 甘氨酸缓冲液, 溶质及其在所述甘氨酸缓冲体系中的含量为 NaCl 200 ~ 400mM, Tween200.5 ~ 1.5ml/L, EDTA 100 ~ 200mM, 加速剂 200 ~ 500mM, 防腐剂 0.1 ~ 2%;

所述基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液, 溶剂为 10 ~ 50mM、pH 6.0 ~ 6.5 的甘氨酸缓冲液, 溶质及其在悬浮液中的含量为: 基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒 10 ~ 50mg/L, 乙二胺四乙酸二钠 0.5 ~ 5mmol/L, 牛血清白蛋白 0.1 ~ 4mg/L、NaN₃ 0.1 ~ 2%; 所述基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒中 CRP 抗体通过化学键结合于脂质体表面;

所述校准品中 CRP 的重组蛋白浓度不同具体是指 CRP 的重组蛋白在校准品中的浓度分别为 0mg/ml、20mg/ml、40mg/ml、80mg/ml、160mg/ml、320mg/ml; 所述校准品中的溶质及其在所述校准品中的体积含量为叠氮钠 0.2 ~ 2.2%、吐温 201 ~ 10%、牛血清白蛋白 1 ~ 3%;

所述基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液的制备方法为: 将表面带有化学基的 150 ~ 300nm 的脂质体与 CRP 抗体以 10 : 1.5 的质量比混合, 溶于 0.02M、pH5.0 ~ 6.0 的磷酸缓冲液, 脂质体的体积百分比为 0.1 ~ 1.5%, 抗体的浓度为 10mg/L; 室温孵育半小时, 再加入活化剂溶液活化, 使活化剂在反应体系中的浓度达到 50 ~ 100 μ g/mL; 混合均匀, 37°C 结合 8 小时; 透析除去未连接上的抗体, 加入封闭液封闭 2 小时, 离心去上清, 用 pH 6.0 ~ 6.5 的含有 0.5 ~ 5mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、0.1 ~ 4% 牛血清白蛋白、0.1 ~ 2% NaN₃ 的甘氨酸缓冲液稀释; 所述封闭液为含 0.1% 牛血清白蛋白的 pH 7.4 的 MOPS0 缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 所述加速剂包括葡聚糖系列、PVP 系列中的一种; 所述防腐剂包括叠氮化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫柳汞、Proclin-300、苯酚中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 所述的基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 所述基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液的制备方法中化学基包括羧基、羟基、氨基、磺酸基基团中的一种或几种。

4. 根据权利要求 1 所述的基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 所述基于脂质体包被的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液的制备方法中活化过程具体为: 100ml 1% 浓度脂质体中, 分别加入 0.15 ~ 1ml 戊二醛以及 30mg 活化剂, 室温振荡 1 小时, 透析除去多余的戊二醛和活化剂。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征在于, 所述活化剂为碳化二亚胺、EDC/(sulfo)NHS、N, N' - 羰基二咪唑、对甲苯磺酰氯、溴化氰、N, N' - 二琥珀酰亚胺基碳酸酯、双环氧基化合物、硼氢化氰中的一种或多种。

6. 根据权利要求 1 所述的基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 其特征

在于,所述 CRP 抗体包括羊抗人 CRP 抗体、兔抗人 CRP 抗体、鼠抗人 CRP 抗体中的一种或多种。

一种基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于脂质体信号放大的超敏 C- 反应蛋白检测试剂盒, 具体涉及一种以脂质体为信号放大载体的 CRP 检测试剂盒。

背景技术

[0002] 超敏 C 反应蛋白 (hypersensitive3C-reactive protein, hs-CRP) 是血浆中的一种 C 反应蛋白。C 反应蛋白是由肝脏合成的一种全身性炎症反应急性期的非特异性标志物, 是心血管事件危险最强有力的预测因子之一。hs-CRP 超敏 C 反应蛋白是区分低水平炎症状态的灵敏指标, 血清 hs-CRP 水平与动脉粥样硬化及急性脑梗死 (ACI) 的发生、严重程度及预后密切相关。临床实验室通过超敏感检测技术, 准确的检测低浓度 C 反应蛋白, 提高了试验的灵敏度和准确度。近年来, 随着检测技术的进步, 大量的文章研究显示, 它在冠心病、中风、周围血管栓塞等疾病诊断和预测中发挥越来越重要的作用。

[0003] CRP 在健康的人体中只含有微量, 在新的刺激出现前, 其浓度可保持长期稳定, 半衰期长 (约 18 ~ 20 小时), 且不受性别、食物或昼夜的影响。当出现感染性疾病, 血清中 CRP 在感染发生后 5 ~ 8 小时即开始升高, 48 小时达到峰值, 且高峰值可达正常的数百倍。随着感染控制, 它可在 24 ~ 48 小时迅速下降, 1 周内恢复正常。CRP 的水平和持续时间与感染程度呈正相关, 当 CRP 持续升高或再度升高时, 提示临床应重视病情的变化。

[0004] 有研究显示, 在急性脑梗死老年患者中, CRP 升高者预后不佳; hs-CRP 含量与梗死面积、神经功能缺损程度相关, 是脑梗死患者病变程度的指标之一; 而且 CRP 也参与了血栓形成和动脉硬化的病理过程, 是脑卒中的危险因素之一。动脉粥样硬化斑块的炎症反应是斑块破裂和不稳定的重要原因, 在动脉粥样硬化斑块的形成过程中, CRP 补体复合物和泡沫细胞等沉积在动脉壁内, CRP 可与脂蛋白结合, 激活补体系统, 产生大量炎症介质, 释放氧自由基, 造成血管内膜损伤, 血管痉挛及不稳定斑块脱落, 加重动脉粥样硬化所致的管腔狭窄以及 ACI 的发生。越来越多的证据表明, 低水平 CRP 与心血管疾病的其他危险因素密切相关, 如高血压、高脂血症; 同时 CRP 升高可增加高血压患者心脏病、脑卒中的发病率; 因此 CRP 是与动脉粥样硬化发生、演变和发展都有关的促炎因子。流行病学调查也显示, hs-CRP 水平升高者发生急性脑卒中的几率是正常健康人的 2 倍, 发生心肌梗死的几率是正常者的 3 倍。2003 年欧洲高血压防治指南 (ESH/ESC) 正式推荐, 高血压患者需检测 hs-CRP 水平。

[0005] 超敏 C 反应蛋白的临床指导作用主要表现在对心血管疾病, 新生儿细菌感染, 肾移植等方面。

[0006] 目前, 市场上的 CRP 检测试剂盒, 存在着灵敏度低, 线性范围窄, 本底高的缺点。这主要是因为 CRP 检测试剂需要同时具备较高的灵敏度和线性范围, 常规的乳胶增强免疫比浊法采用聚苯乙烯微球包被, 由于聚苯乙烯微球为乳白色不透明小球, 光透过性比较差, 因此具有很难同时保证同时具备高灵敏度和线性。而脂质体作为均相的小球, 具有透明度高, 与抗体结合力强, 制备简易等优点。但是目前国内还没有有关采用脂质体作为免疫比浊法信号放大系统的报道。本发明国内首次采用透明的脂质体作为抗体包被载体具有本底低、

抗体包被率高的优点,采用脂质体作为包被载体具有高灵敏度和高线性特点。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的是提供一种基于脂质体信号放大的超敏 C-反应蛋白 (hs-CRP) 检测试剂盒,建立一种胶乳增强比浊法来测定人体血清中 CRP 的含量的方法,运用该方法的试剂应具有操作简单,准确度高,重复性好,灵敏度高,且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用。

[0008] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0009] 本发明提供一种基于脂质体信号放大的超敏 C-反应蛋白 (hs-CRP) 检测试剂盒,包括 R1 试剂、R2 试剂和校准品;

[0010] 所述 R1 试剂为甘氨酸缓冲体系;

[0011] 所述 R2 试剂为基于脂质体包括的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液;所述脂质体为磷脂酰胆碱与合成磷脂的 1:(1~20) 混合物;所述合成磷脂由二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱中的一种或多种合成;

[0012] 所述校准品含 6 支 CRP 的重组蛋白浓度不同、溶质及其含量均相同的牛血清基质。

[0013] 优选地,所述甘氨酸缓冲体系,溶剂为 10~50mM、pH6.0~6.5 甘氨酸缓冲液,溶质及其在所述甘氨酸缓冲体系中的含量为 NaCl 200~400mM, Tween20 0.5~1.5ml/L, EDTA 100~200mM,加速剂 200~500mM,防腐剂 0.1~2%。

[0014] 优选地,所述加速剂包括葡聚糖系列、PEG 系列、PVP 系列中的一种;更优选地,所述加速剂为葡聚糖系列。

[0015] 优选地,所述防腐剂包括叠氮化钠、苯甲酸钠、山梨酸钾、硫柳汞、Proclin-300、苯酚中的一种或多种。

[0016] 优选地,所述 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液,溶剂为 10~50mM、pH6.0~6.5 的甘氨酸缓冲液,溶质及其在悬浮液中的含量为:基于脂质体包括的 CRP 抗体致敏颗粒 10~50mg/L,乙二胺四乙酸二钠 0.5~5mmol/L,牛血清白蛋白 (BSA) 0.1~4mg/L、NaN₃ 0.1~2%;所述基于脂质体包括的 CRP 抗体致敏颗粒中 CRP 抗体通过化学键结合于脂质体表面。

[0017] 优选地,所述基于脂质体包括的 CRP 抗体致敏颗粒悬浮液的制备方法为:将表面带有化学基的 150~300nm 的脂质体与抗人 CRP 抗体以 10:1.5 的质量比混合,溶于 0.02M、pH5.0~6.0 的磷酸缓冲液,脂质体的体积百分比为 0.1~1.5%,抗体的浓度为 10mg/L;室温孵育半小时,再加入活化剂溶液活化,使活化剂在反应体系中的浓度达到 50~100 μg/ml;混合均匀,37℃ 结合 8 小时;透析除去未连接上的抗体,加入封闭液封闭 2 小时,离心去上清,用 pH6.0~6.5 的含有 0.5~5mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、0.1~4% 牛血清白蛋白 (BSA)、0.1~2% NaN₃ 的甘氨酸缓冲液稀释;所述封闭液为含 0.1% 牛血清白蛋白的 pH7.4 的 MOPS0 缓冲液。

[0018] 优选地,所述化学基包括羧基、羟基、氨基、磺酸基基团中的一种或几种。

[0019] 优选地,所述抗人 CRP 抗体为羊抗人 CRP 抗体、兔抗人 CRP 抗体、鼠抗人 CRP 抗体中的一种或多种。

[0020] 优选地,所述活化的过程具体为:100ml 1% 浓度脂质体中,分别加入 0.15~1ml 戊二醛以及 30mg 活化剂,室温振荡 1 小时,透析除去多余的戊二醛和活化剂。

[0021] 优选地,所述活化剂包括碳化二亚胺(EDC)、EDC/(sulfo)NHS、N,N'-羰基二咪唑(CDI)、对甲苯磺酰氯、溴化氰、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、双环氧基化合物、硼氢化氰中的一种或多种。

[0022] 优选地,所述校准品中CRP的重组蛋白浓度不同具体是指CRP的重组蛋白在校准品中的浓度分别为0mg/ml、20mg/ml、40mg/ml、80mg/ml、160mg/ml、320mg/ml。

[0023] 优选地,所述校准品中的溶质及其在所述校准品中的体积含量为叠氮钠0.2~2.2%、吐温-20 1~10%、牛血清白蛋白(BSA)1~3%。

[0024] 脂质体(liposome)是一种人工膜。在水中磷脂分子亲水头部插入水中,脂质体疏水尾部伸向空气,搅动后形成双层脂分子的球形脂质体,直径25~1000nm不等。在碳二亚胺的作用下,脂质体外层表面的羧基活化,活化后的羧基与蛋白通过形成酰胺而偶联。国内试剂通常采用白色不透明的纳米乳胶微球包被抗体,纳米微球越大试剂的灵敏度就会越高,但是同时,试剂透光性就会越差,造成了试剂本底越高,极大的受到了检测仪器的限制。而采用脂质体具有透光性高的优点,因而可以使用直径比较大的脂质体进行包被。达到了提高灵敏度而不提高试剂本底的有益效果。

[0025] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0026] (1) 本发明是一种基于脂质体信号放大的检测试剂盒,在保证高灵敏度的基础上,明显扩大了检测线性范围,实现了C反应蛋白检测试剂盒在高灵敏度和宽线性范围的统一,符合hs-CRP临床测量的要求;

[0027] (2) 微球偶联CRP多克隆抗体制备乳胶微球增强免疫比浊试剂,存在本底偏高,检测灵敏度差的缺点,无法同时测定高浓度和低浓度水平下的CRP含量,而本发明将透明的表面羧基化的150~300nm的脂质体与抗人CRP抗体通过化学交联制得R2试剂悬浮溶液,攻克了试剂本底过高,检测灵敏度不够的难题;

[0028] (4) 本发明采用脂质体包被CRP单克隆抗体,通过优化溶剂、溶质种类及含量,可使包被率达95%以上,保证了抗体稳定性和试剂盒灵敏度,这是现有技术无法比拟的;

[0029] (5) 本发明采用天然脂质体与合成脂质体混合制备包被CRP单克隆抗体,增强抗体与载体的亲和性能、增加脂质体之间的动态平衡、增加包埋率,同时增强试剂盒试剂天然属性,使其在检测样品中与样品不产生排斥,使得检测结果更准确。

附图说明

[0030] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0031] 图1为显示6种不同含量的hs-CRP参考标准的标准曲线;

[0032] 其中,每个点代表不同含量hs-CRP的参考标准,X轴表示hs-CRP的含量,Y轴表示吸光度;

[0033] 图2为对本试剂盒的线性范围进行验证;

[0034] 其中,X轴表示的是本发明试剂实际测试结果,Y轴表示的是稀释理论浓度,相关系数为 $R^2 = 0.9996$,回归方程为 $y = 1.0218x + 0.6204$ 。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0036] 实施例 1

[0037] 本实施例涉及一种超敏 C- 反应蛋白 (hs-CRP) 检测试剂盒,其制备如下:

[0038] 试剂 R1:

[0039]

甘氨酸缓冲液	pH6.0 ~ 6.5 25mM
NaCl	200mM
Tween20	0.9ml/L
EDTA	100mM
葡聚糖 6000	300mM
NaN ₃	1%

[0040] 各种成分可以室温下依次添加,密封保存,备用。

[0041] 试剂 R2:将 EDC 溶于纯化水中,配置成 5mg/ml 溶液,在配置前半小时置于室温平衡。将表面羧基化的直径为 180 ~ 235nm 的脂质体 (磷脂酰胆碱 :DPPC = 1:1) 与鼠抗人 CRP 单克隆抗体以质量比为 10:1.5 的量混合,加入 0.02M、pH5.0 ~ 6.0 的磷酸缓冲液,DPPC 脂质体浓度为 0.1 ~ 1.5% (体积比),混合,室温孵育半小时,再加入 5mg/ml 的 EDC 溶液 (含戊二醛),使 EDC 在反应体系中的浓度达到 80 μ g/ml;混匀后 37℃ 吸附 8 小时,之后透析除去未连接上的抗体,加入封闭液 0.1% 牛血清白蛋白,封闭 2 小时,离心去上清,用 10mM pH6.0 ~ 6.5 的含有 1.2mmol/L 乙二胺四乙酸二钠、0.3% BSA、0.9% NaN₃ 的甘氨酸缓冲液稀释。

[0042] hs-CRP 校准品的制备:

[0043] 校准品稀释液溶剂为牛血清基质,包括叠氮钠 1%、吐温 -205%、牛血清白蛋白 (BSA) 2%,上述的百分比为牛血清基质体积用量的百分比。

[0044] 将 CRP 的重组蛋白溶于上述牛血清基质,制备不同浓度的校准品 (0mg/ml、25mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、200mg/ml、400mg/ml)。

[0045] 实施例 2

[0046] 本实施例描述的 hs-CRP 检测试剂盒,适用于各种类型的全自动生化仪,此处以日立 7170 全自动生化仪为例。

[0047] 分析方法:两点终点法,即试剂 R1、试剂 R2 的用量分别为 140 μ l 和 140 μ l,样本量 2 μ l。采用本试剂及上述测定方法,采用日立 7170 生化分析仪测得的 6 种不同含量的 hs-CRP 校准品 (自制) 的曲线 (如图 1 所示),每个点代表一个含量的参考校准品,其中 X 轴表示 hs-CRP 含量 (mg/ml);Y 轴表示吸光度。

[0048] 实施例 3 :线性范围

[0049] 将接近线性范围上限的 hs-CRP 的高浓度样本 (320.62mg/ml), 用 hs-CRP 稀释液将其按 1/2, 1/10, 1/15, 1/30, 1/60 稀释和低值样本 (0.11mg/ml), 共 7 个不同浓度的溶液, 用实施例 2 所述方法检测各浓度, 每浓度重复测定 3 次, 将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析, 计算回归方程为 $y = 1.0218x + 0.6204$, 相关系数为 $R^2 = 0.9996$, 表明本发明试剂盒在 0.1mg/ml ~ 400mg/ml 线性范围内相关性较好, 见图 2。

[0050] 实施例 4 :干扰物质的影响

[0051] 将浓度为 320.62mg/ml hs-CRP 校准品溶液, 分别加入相同体积的各干扰物质溶液, 加入后浓度分别为胆红素 (50mg/L)、血红蛋白 (400mg/L), 乳糜 (福尔马肼) 浊度为 4000 和类风湿因子 (RF) (400IU/ml), 每个样本重复测定 3 次, 取平均值, 与加入同体积的蒸馏水比较, 观察加入干扰物质与加入蒸馏水后 RBP 测定值的相对误差。结果表明: 加入以上浓度干扰物质的与加入同体积蒸馏水后测定值的相对误差不超过 2%, 可以认为在中轻度溶血、黄疸或乳糜时, 此测定方法的检测结果基本不受干扰。

[0052] 表 1 本发明所述试剂盒的干扰物质影响实验

[0053]

加入的抗干扰物质	测定均值 (mg/L)	相对误差
蒸馏水	123.56	
胆红素 (50mg/L)	121.35	-1.79%
血红蛋白 (400mg/L)	125.24	1.36%
乳糜 (福尔马肼) 浊度为 4000	123.26	-0.24%
类风湿因子 (RF) (500IU/ml)	122.31	-1.01%

[0054] 实施例 5

[0055] 本实施例的总体技术方案与实施例 1 相同, 所涉参数有所在发明内容基础上有所变动, 具体如下所述:

[0056] (1) 试剂 R1:

[0057]

甘氨酸缓冲液	pH6.0 ~ 6.5 10mM
NaCl	300mM
Tween20	0.5ml/L
EDTA	150mM
葡聚糖 6000	200mM

苯甲酸钠	0.1‰
------	------

[0058] (2) 试剂 R2 :

[0059] 溶剂为 25mM、pH6.0 ~ 6.5 的甘氨酸缓冲液, 溶质及其在悬浮液中的含量为 :CRP 抗体致敏颗粒 30mg/L, 乙二胺四乙酸二钠 0.5mmol/L, BSA 0.1mg/L、NaN₃ 0.1‰ ;

[0060] 活化的过程中 :100ml 1% 浓度脂质体中, 分别加入 0.5ml 戊二醛以及 30mg 活化剂 ;

[0061] 活化剂为 EDC/(sulfo)NHS, 在制备体系中的浓度为 50 μg/ml ;

[0062] 脂质体表面带有羟基, 磷脂酰胆碱 :二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE) 为 1:10 ;

[0063] 抗体种类为羊抗人 CRP 抗体。

[0064] (3) 校准品 :

[0065] 校准品中的溶质及其在所述校准品中的体积含量为叠氮钠 1.5‰、吐温 -20 1%、牛血清白蛋白 (BSA) 1%。

[0066] 实施例 6

[0067] 本实施例的总体技术方案与实施例 1 相同, 所涉参数有所在发明内容基础上有所变动, 具体如下所述 :

[0068] (1) 试剂 R1 :

[0069]

甘氨酸缓冲液	pH6.0 ~ 6.5 50mM
NaCl	400mM
Tween20	1.5ml/L
EDTA	200mM
葡聚糖 6000	500mM
硫柳汞	2‰

[0070] (2) 试剂 R2 :

[0071] 溶剂为 50mM、pH6.0 ~ 6.5 的甘氨酸缓冲液, 溶质及其在悬浮液中的含量为 :CRP 抗体致敏颗粒 50mg/L, 乙二胺四乙酸二钠 5mmol/L, BSA 4mg/L、NaN₃ 2‰ ;

[0072] 活化的过程中 :100ml 1% 浓度脂质体中, 分别加入 1ml 戊二醛以及 30mg 活化剂 ;

[0073] 活化剂为对甲苯磺酰氯 ;在制备体系中的浓度为 100 μg/ml ;

[0074] 脂质体表面带有磺酸基, 磷脂酰胆碱 :二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 为 1:20 ;

[0075] 抗体种类为兔抗人 CRP 抗体。

[0076] (3) 校准品 :

[0077] 校准品中的溶质及其在所述校准品中的体积含量为叠氮钠 2.2‰、吐温 -20 10%、牛血清白蛋白 (BSA) 3%。

[0078] 实施例 7

[0079] 本实施例以日本生研株式会社 CRP 检测试剂为对照, 检测本发明试剂盒与对照试

剂盒在线性范围、灵敏度、和本底三方面的性能,检测方法采用常规检测方法,检测结果如下表所示。结果显示,本发明线性范围宽、灵敏度高、本底水平低。

[0080]

	本发明	对比试剂盒
线性范围	0.01 ~ 400mg/L	0.05 ~ 320mg/L
灵敏度	0.01mg/L	0.05
本底	0.5A	1.5A

[0081] 实施例 8

[0082] 本实施例与实施例 2 技术方案相同,不同的是本实施例在活化过程中没有加入戊二醛。结果表明,戊二醛的加入对试剂盒的线性范围、灵敏度和包埋率产生了意想不到的效果,戊二醛通过与各组分的互相作用,明显扩大了试剂盒的线性范围、灵敏度和包埋率。

[0083]

	实施例 2 试剂 (加入戊二醛)	实施例 8 试剂 (不加戊二醛)
线性范围	0.01 ~ 400mg/L	0.1 ~ 250mg/L
灵敏度	0.01mg/L	0.1mg/L
包被率	97%	60%

[0084] 实施例 9

[0085] 本实施例与实施例 2 技术方案相同,不同的是本实施例仅以磷脂酰胆碱或合成磷脂做载体,检测线性范围、灵敏度和包埋率如下表所述,结果表明天然脂质体与合成脂质体的混合比单独使用的效果更好。

[0086]

	实施例 2 试剂	实施例 9 试剂	
		磷脂酰胆碱脂质体	DSPC 脂质体
线性范围	0.01~400mg/L	0.2~300mg/L	0.18~280mg/L
灵敏度	0.01 mg/L	0.089 mg/L	0.077 mg/L
包被率	97%	73%	65%

[0087] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

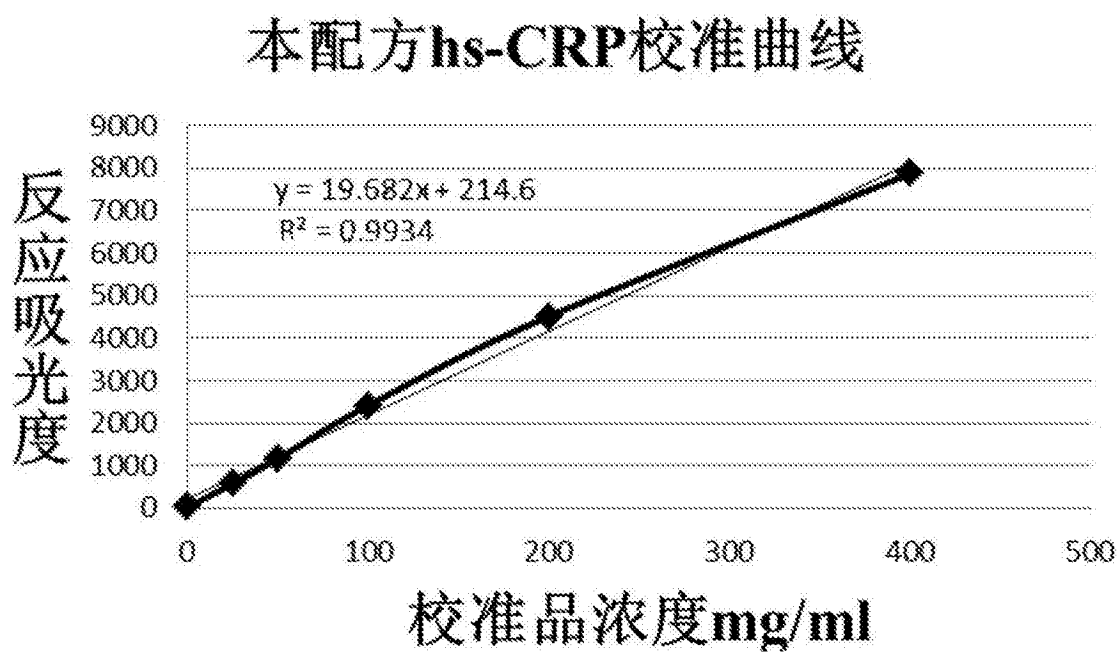


图 1

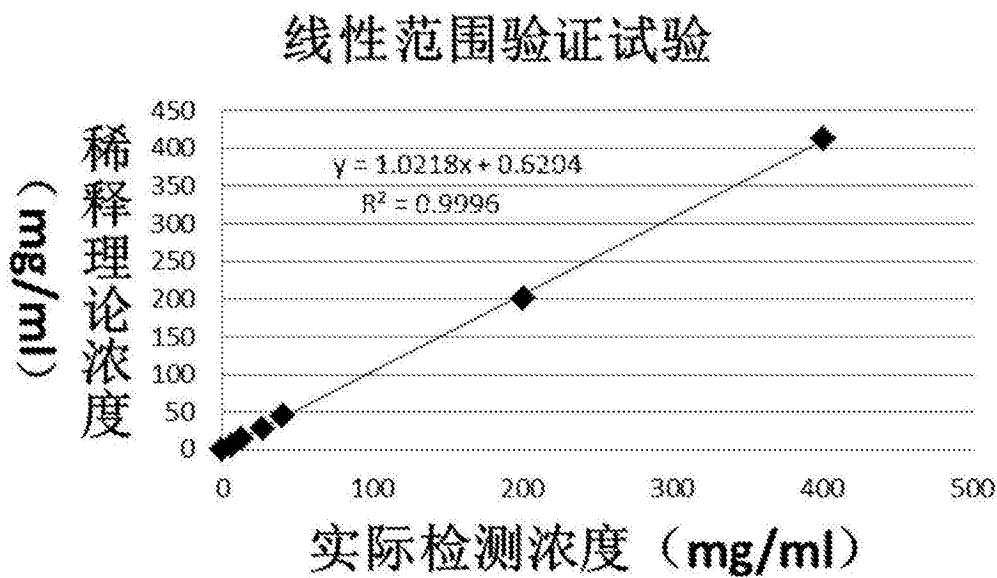


图 2

专利名称(译)	一种基于脂质体信号放大的超敏C-反应蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104215771B	公开(公告)日	2015-12-30
申请号	CN201410401483.6	申请日	2014-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海睿康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海睿康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海睿康生物科技有限公司		
[标]发明人	李伟奇 赵小凤 房君江 张秀文 林清玉		
发明人	李伟奇 赵小凤 房君江 张秀文 林清玉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/96		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN104215771A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于脂质体信号放大的超敏C-反应蛋白检测试剂盒，该试剂盒包括R1试剂、R2试剂和校准品；所述R1试剂为甘氨酸缓冲体系；所述R2试剂为CRP抗体致敏颗粒悬浮液；所述校准品含6支CRP的重组蛋白浓度不同、溶质及其含量均相同的牛血清基质。本发明的试剂盒是一种利用乳胶增强免疫比浊法的试剂盒，CRP抗体通过化学键结合于脂质体表面。与现有市售产品相比，本发明超敏C-反应蛋白检测试剂盒具有更高灵敏度、更宽的线性。

线性范围验证试验

