



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104569374 B

(45)授权公告日 2017.01.11

(21)申请号 201510003779.7

(22)申请日 2015.01.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104569374 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(73)专利权人 深圳市艾瑞生物科技有限公司

地址 518100 广东省深圳市宝安区西乡街道臣田社区宝田三路宝田工业区22栋5楼西边

(72)发明人 谢爱武

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理事务所(普通合伙) 11411

代理人 朱广存

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(56)对比文件

CN 1482459 A,2008.06.04,

CN 1482459 A,2004.03.17,

CN 101221169 A,2008.07.16,

US 2008199481 A1,2008.08.21,

CN 101995396 A,2011.03.30,

Noam Cohen等.Rapid Homogenous Time-Resolved Fluorescence (HTRF) Immunoassay for Anthrax Detection.《J Fluoresc》.2014,第24卷

Tiina Kokko等.Homogeneous Dual-Parameter Assay for Prostate-Specific Antigen Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer.《Anal.Chem.》.2008,第80卷(第24期),

审查员 黄晓丽

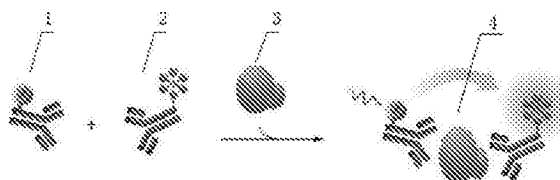
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组及其制备方法。本发明所述的快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,包括稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体(anti-CRP)、荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体和系列浓度的C-反应蛋白校准品。本发明可同时检测高值和低值CRP,尤其是低值CRP,且成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,只需要配套专用均相荧光免疫检测仪,因此可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展,对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。



1. 一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,其特征在于,包括稀土元素螯合物BHHBCB-Eu³⁺标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体、荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体和系列浓度的C-反应蛋白校准品,其中荧光化合物Alexa647、DyLight-DY647和CF647中的至少一种;

快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组的制备方法,包括以下步骤:

1)稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体的制备:

取0.5-5mg/ml的抗C-反应蛋白单克隆抗体溶液,加入0.05-0.5mol/L的NaHCO₃溶液后,调pH至8.5-10,滴加10-100μg/ml配体化合物溶液,搅拌反应0.6-2h,分离得到配体化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体,加入终浓度为0.05-0.5wt%的BSA和0.01-1wt%的NaN₃,调pH至5.5-6.5,免疫分析前,加入Eu³⁺溶液,使配体化合物与Eu³⁺等摩尔浓度,即得,其中,抗C-反应蛋白单克隆抗体溶液、NaHCO₃溶液和配体化合物溶液的体积比为0.1-1:1:0.01-0.05;

2)荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体的制备:

将抗C-反应蛋白单克隆抗体用0.05-0.5mol/L的NaHCO₃溶液稀释至0.5-5mg/ml,加入荧光化合物溶解液,搅匀,室温孵育0.5-2h,分离得到荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体;

3)系列浓度的C-反应蛋白校准品的制备:

将C-反应蛋白用校准品稀释液稀释配制成系列浓度,即得,

其中,1)、2)和3)的顺序可以任意颠倒。

2. 根据权利要求1所述的一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,其特征在于,所述系列浓度的C-反应蛋白校准品由校准品稀释液稀释C-反应蛋白配制而成,所述校准品稀释液为含0.01-0.5wt%PEG、1-5wt%BSA、0.01-0.05wt%表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,其特征在于,抗C-反应蛋白单克隆抗体在于配体化合物反应之前,先进行透析处理。

一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] C-反应蛋白(C-reactive protein,CRP)被公认为是最有价值的急性时相反应蛋白,它的升高可以提示许多炎症事件的发生,因此,很久以来被广泛应用于临床感染性疾病的检测。近年来有研究者发现,炎症在动脉粥样硬化的起始、形成、发展过程中扮演了重要的角色,所以C-反应蛋白这个极其灵敏的炎症指标在各种类型心血管疾病中得到了广泛的研究。由于CRP在感染发生后6~8h即开始升高,24~48h达到高峰,高峰值可达正常的数百倍,在感染消除后其含量急骤下降,一周内可恢复正常。而CRP在病毒感染时无显著升高,这为疾病早期感染类型的鉴别提供了极其重要的依据。

[0003] 常规CRP检验方法可在感染或组织损伤时检测出CRP>10mg/L,但不能很好地检测出低水平(0.1~10mg/L)的CRP变化。该水平的CRP与心血管疾病的发生有着密切的关系,所以日益受到研究者的关注。随着一些高灵敏度检测方法的出现,低水平的CRP也可以被检测出来,由于应用的检测方法具有较高的灵敏度,因此,这个水平的C-反应蛋白又被称为较高的超敏C-反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein,hs-CRP)。研究显示,在无明显症状的健康男性中,CRP的升高程度与初次发生冠心病的危险性呈正相关,hs-CRP浓度处于高值的那部分人群未来发生中风、心肌梗死、周围血管疾病的危险分别是低值的2倍($RR=1.9, 95\%CI\ 1.1\sim3.3$)、3倍($RR=2.9, 95\%CI\ 1.8\sim6.0$)和4倍($RR=4.1, 95\%CI\ 1.2\sim6.0$),并且证实不受吸烟因素的影响而独立于冠心病的其他危险因子之外。Hs-CRP对于女性也是一个强有力的未来心血管发病的预测因子($RR=4.4, 95\%CI\ 2.2\sim8.9$)。hs-CRP对于急性冠脉综合征的诊断也有十分重要的作用。不稳定性心绞痛或非ST段抬高的心肌梗死患者有hs-CRP升高、则示来可能会发生各种不利事件,如心绞痛的再发、ST段抬高的心肌梗死或冠心病引起的死亡。

[0004] 临床实验室CRP检测一直采用透射免疫和散射免疫方法,这些方法的参考值范围变动很大,从3mg/L到超过200mg/L。随着人们对于低水平CRP与心血管疾病关系的认识,这些测定方法的灵敏度远远不能满足要求。疾病的早期诊断和及时治疗是至关重要的。但目前的检测方法,不能兼顾高值和低值的检测要求,且需要昂贵的仪器设备和试剂。因此,建立一种检测时间尽量缩短,并且检测除了能在实验室进行外,还要求能够进行床旁检测,同时对高值和低值CRP都适用的检测方法,从而为临床提供准确的诊断依据,是十分必要的。

[0005] 均相荧光分析法(homogeneous fluoroimmunoassay, HFIA)是在时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)技术的基础上形成的一种新的荧光免疫分析技术。TRFIA技术采用的荧光物质与传统的荧光染料完全不同,采用的是镧系元素铕(Eu)、铽(Tb)等作为荧光材料,灵敏度非常高,稳定性好,低温条件可保存三年,因而成为二

十一世纪最热门的免疫分析技术。

[0006] 均相荧光免疫检测法是用同一抗原的两个抗体分别标记 Eu^{3+} 和荧光染料Alexa647。 Eu^{3+} 标记抗体在游离状态时,受到340nm光线激发,只发射平均波长为615nm荧光,而在抗原、抗体复合物形成时,发生能量传递,激发荧光染料Alexa647发射出665nm荧光。标记抗体直接与待测样品进行抗原、抗体反应,如果能形成抗原、抗体复合物,则在665nm出可测得荧光信号。这种方法省却了酶联免疫法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果,省时省力。并且,此法也相应地避免了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量。此外, Eu^{3+} 和Alexa647这对荧光物质的最大发射光波长之间相差较大,未发生抗原抗体反应的本底荧光值就非常低。而人血清中非特异性物质产生的300~500nm荧光,不能激发Alexa647发射荧光信号650nm激发光。因此非特异性荧光非常低。

[0007] 本发明采用均相荧光免疫快速检测技术,利用荧光的高灵敏特点,同样也避免了胶体金或者荧光CRP干式免疫试纸中的硝酸纤维素膜本身孔隙不均一特性对检测准确度和重复性的不良影响。由于均相荧光免疫检测中样品与荧光标记抗体全过程都在液相中全面接触,反应充分,因此可大幅度提高检测灵敏度和线性范围,同时反应在液相进行也增加了样品的稀释倍数,消除了样品的基质效应影响,使定量结果有很好的可重复性,提高了定量结果的精密度和准确度,可满足临床诊断大规模检测的要求。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有CRP检测技术的不足,提供一种快速定量检测CRP的均相荧光免疫试剂组。本发明根据荧光免疫技术特点和CRP抗原抗体系统特点,设计新的原材料,试剂和工艺流程,应用本发明提供的试剂组检测CRP水平,具有简单,快速,灵敏和特异性好等特点,可同时定量检测高值和低值样品,并且性价比高,适用于临床快速检测。

[0009] 本发明的第一个方面是提供一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,包括稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体(anti-CRP)、荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体和系列浓度的C-反应蛋白校准品。

[0010] 优选地,稀土元素螯合物为 Eu^{3+} 螯合物。

[0011] 更优选地,稀土元素螯合物为 BHHCT-Eu^{3+} 或1,2-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基-对苄基)-4-氯磺酰基苯与铕(III)的配合物(BHHBCB-Eu^{3+})。

[0012] 优选地,所述荧光化合物为Alexa系列荧光化合物、DyLight系列荧光化合物和CF系列荧光化合物中的至少一种。

[0013] 更优选地,所述荧光化合物Alexa647、DyLight-DY647和CF647中的至少一种。

[0014] 优选地,所述系列浓度的C-反应蛋白校准品由校准品稀释液稀释C-反应蛋白配制而成,所述校准品稀释液为含0.01-0.5wt%PEG、1-5wt%BSA、0.01-0.05wt%表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

[0015] C-反应蛋白校准品可用塑料瓶密封包装。

[0016] 本发明的第二个方面是提供本发明第一个方面所述的均相荧光免疫试剂组的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1)稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体的制备:

[0018] 取0.5–5mg/ml的抗C-反应蛋白单克隆抗体溶液,加入0.05–0.5mol/L的NaHCO₃溶液后,调pH至8.5–10,滴加10–100μg/ml配体化合物溶液,搅拌反应0.6–2h,分离得到配体化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体,加入终浓度为0.05–0.5wt%的BSA和0.01–1wt%的NaN₃,调pH至5.5–6.5,免疫分析前,加入Eu³⁺溶液,使配体化合物与Eu³⁺等摩尔浓度,即得,其中,抗C-反应蛋白单克隆抗体溶液、NaHCO₃溶液和配体化合物溶液的体积比为0.1–1:1:0.01–0.05;

[0019] 2)荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体的制备:

[0020] 将抗C-反应蛋白单克隆抗体用0.05–0.5mol/L的NaHCO₃溶液稀释至0.5–5mg/ml,加入荧光化合物溶解液,搅匀,室温孵育0.5–2h,分离得到荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体;

[0021] 3)系列浓度的C-反应蛋白校准品的制备:

[0022] 将C-反应蛋白用校准品稀释液稀释配制成系列浓度,即得,

[0023] 其中,1)、2)和3)的顺序可以任意颠倒。

[0024] 其中,稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2–8℃分装保存。

[0025] 其中,荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释,2–6℃保存。

[0026] 其中,C-反应蛋白校准品2–6℃保存。

[0027] 优选地,抗C-反应蛋白单克隆抗体在于配体化合物反应之前,先进行透析处理。

[0028] 优选地,步骤1)中配体化合物为BHHCT或BHHBCB。

[0029] 优选地,步骤1)中分离得到配体化合物标记的anti-CRP通过离心和柱层析方式进行。柱层析采用SephadexG-50柱,0.01–0.1mol/L NH₄HCO₃(pH8.0)洗脱。

[0030] 优选地,步骤2)中,分离得到荧光化合物标记的anti-CRP通过柱层析的方式进行。

[0031] 进一步优选地,步骤2)中,柱层析采用G25凝胶柱。

[0032] 优选地,步骤2)中,室温孵育时,每隔10–20min混匀一次。

[0033] 本发明的均相荧光免疫试剂的使用:先将稀土元素螯合物标记的anti-CRP溶液加入反应微孔中,再加入荧光化合物标记的anti-CRP溶液,最后分别加入CRP校准品和临床检测样品,37℃反应20分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测判读结果。

[0034] 本发明提供的快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组,其反应原理为双抗体夹心法的均相荧光免疫法。待测样品与适当比例的稀土元素(例如Eu³⁺)和荧光标记抗体在液相均质介质中充分混和均匀,在此过程中样品中的CRP既能专一性地与稀土元素标记的抗CRP抗体充分结合,也能与荧光标记的CRP抗体充分反应,形成“稀土元素–anti-CRP–CRP–anti-CRP–荧光化合物”免疫复合物,荧光强度可用专用均相荧光免疫分析仪器定量测定,荧光强度与样品中CRP浓度成正比。

[0035] 本发明可同时检测高值和低值CRP,尤其是低值CRP,且成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,只需要配套专用均相荧光免疫检测仪,因此可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展,对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

附图说明

[0036] 图1为本发明的一种实施例的作用原理图,其中,1:Eu³⁺标记anti-CRP,2:Alexa647标记anti-CRP,3:校准品或待测样本中CRP,4:Eu³⁺-anti-CRP—CRP—anti-CRP—Alexa647免疫复合物;

[0037] 图2为CRP浓度的标准曲线;

[0038] 图3为CRP相关性分析曲线。

具体实施方式

[0039] 下面参照附图,结合具体的实施例对本发明做进一步的说明,以更好地理解本发明。其中,下述内容中若无特别规定物质浓度均为质量百分比浓度。

[0040] 实施例1

[0041] 1、标记用anti-CRP的准备:

[0042] 选用纯化的基因工程表达的抗C-反应蛋白单克隆抗体。Eu³⁺标记用抗C-反应蛋白单克隆抗体商品编号为12D8;荧光素标记用抗C-反应蛋白单克隆抗体商品编号为7D9和10C11。

[0043] 2、稀土元素螯合物标记anti-CRP的制备:

[0044] 用3L 0.9%NaCl于4℃透析鼠抗人CRP单抗12D8溶液(3mg/ml)两次,每次24hr。加水调浓度至1.5mg/ml。取0.6ml该抗体溶液,加入1ml NaHCO₃(0.2mol/L),并用1mol/L NaOH调pH至9.1。将20μl BHHCT甲醇溶液(30μg/ml)滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应1hr。离心(10000rpm,10min)除去不溶物后,上SephadexG-50柱,用0.05mol/L NH₄HCO₃(pH8.0)洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的A₃₃₀值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为0.1%的BSA和0.05%的NaN₃,用1mol/L HCl调pH至6.2。分装后-20℃储存备用。用于免疫分析前,加入EuCl₃溶液(BHHCT与Eu³⁺等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃分装保存。

[0045] 3、Alexa647标记抗体的制备:

[0046] 将抗CRP单克隆抗体7D9、10C11,分别用0.1M碳酸氢钠溶液稀释至1mg/ml,各取5ml抗体溶液,分别加入30mg荧光素Alexa647溶解液,搅匀,室温孵育1小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含0.01%PEG、1%BSA、5%甘油、0.01%表面活性剂的0.01M磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0047] 4、系列浓度CRP校准品的制备:

[0048] 用含0.05%PEG、2.5%BSA、0.025%表面活性剂的0.01M磷酸盐缓冲液,按照0mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L、500mg/L的浓度稀释溶解CRP纯品,混匀后于4℃保存。

[0049] 实施例2

[0050] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0051] 步骤2中,稀土元素螯合物标记anti-CRP的制备方法是:用3L 0.9%NaCl于4℃透析鼠抗人CRP溶液(3mg/ml)两次,每次24hr。加水调浓度至1.5mg/ml。取0.6ml该抗体溶液,加入1ml NaHCO₃(0.2mol/L),并用1mol/L NaOH调pH至9.1。将20μl BHHBCB甲醇溶液(30μg/

ml)滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应1hr。离心(10000rpm,10min)除去不溶物后,上SephadexG-25柱,用0.05mol/L NH_4HCO_3 (pH8.0)洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的 A_{330} 值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为0.1%的BSA和0.05%的 NaN_3 ,用1mol/L HCl调pH至6.2。分装后-20℃储存备用。用于免疫分析前,加入 EuCl_3 溶液(BHHBCB与 Eu^{3+} 等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃分装保存。

[0052] 实施例3

[0053] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0054] 步骤3中,将抗CRP单克隆抗体7D9、10C11,分别用0.1M碳酸氢钠溶液稀释至1mg/ml,各取5ml抗体溶液,分别加入40mg荧光素DyLight-DY647溶解液,搅匀,室温孵育1.5小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含0.025%PEG、2.5%BSA、15%甘油、0.03%表面活性剂的0.01M磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0055] 实施例4

[0056] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0057] 步骤3中,将抗CRP单克隆抗体7D9、10C11,分别用0.1M碳酸氢钠溶液稀释至1mg/ml,各取5ml抗体溶液,分别加入50mg荧光素CF647溶解液,搅匀,室温孵育2小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含0.03%PEG、5%BSA、10%甘油、0.05%表面活性剂的0.01M磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0058] 实施例5

[0059] 在临床检测中,实验步骤为:先将50 μ l的稀土元素螯合物标记anti-CRP溶液加入反应微孔中,再加入50 μ l的荧光化合物标记的anti-CRP溶液,最后分别加入50 μ l的CRP校准品、临床检测样品,37℃反应20分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测判读结果。

[0060] 实施例6

[0061] 用专用的均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,各浓度校准品检测结果如下:

[0062]

CRP浓度(mg/L)	0	50	100	200	500
相对荧光强度	866	1443	2256	3672	7432

[0063] 依据相对荧光强度数据,制作CRP的标准曲线,见图2。CRP的标准曲线计算公式为 $Y = 13.193X + 891.07$, $R^2 = 0.9986$ 。

[0064] 实施例7

[0065] 采用本发明实施例1,用专用的均相荧光免疫分析仪检测43例临床冠心病患者血清样本,同步采用瑞士Roche公司的电化学法CRP试剂进行对比检测,进行相关性分析,见图3,结果说明本研究与以上市产品检测结果一致,具有临床等效性。实施例2-4的临床试验结果与实施例1一致。

[0066] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和

修改,都应涵盖在本发明的范围内。

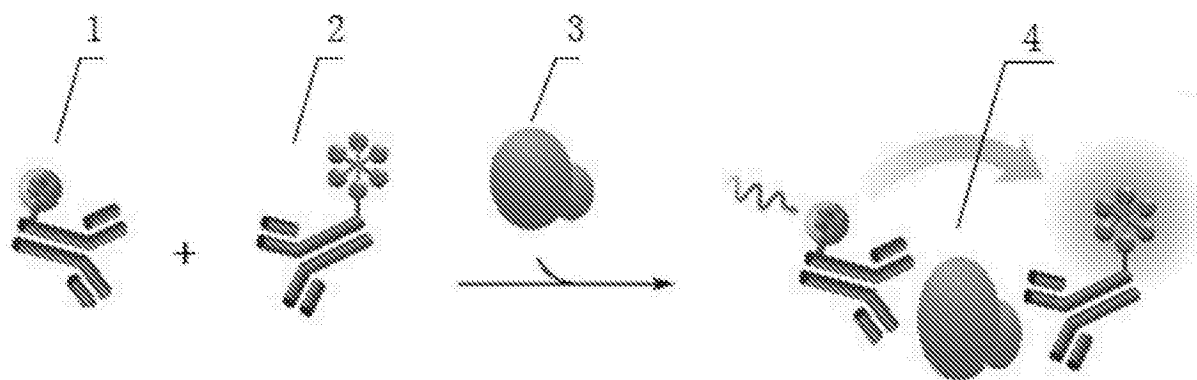


图1

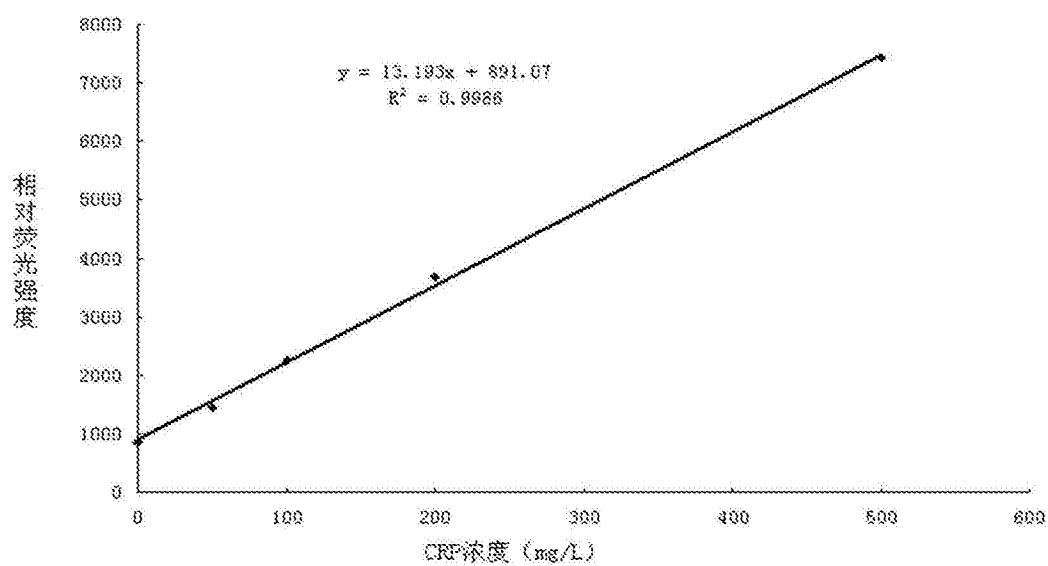


图2

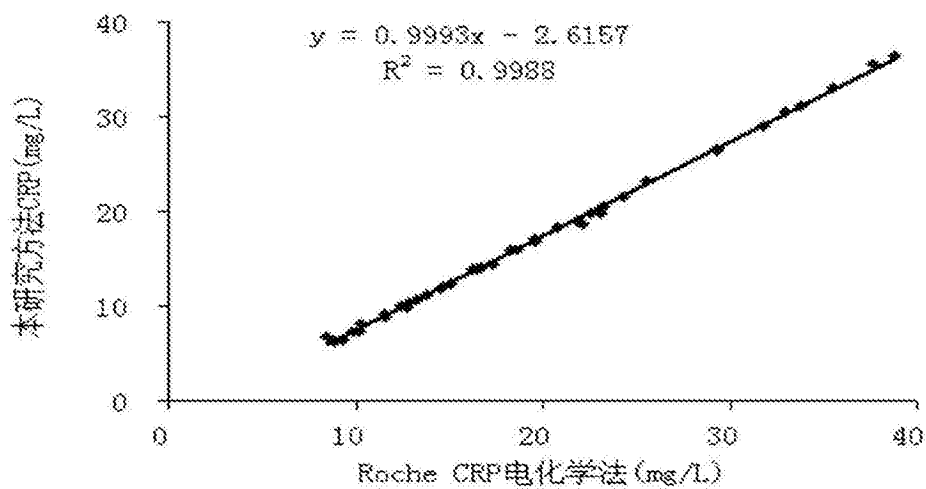


图3

专利名称(译)	一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组及其制备方法		
公开(公告)号	CN104569374B	公开(公告)日	2017-01-11
申请号	CN201510003779.7	申请日	2015-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	谢爱武		
发明人	谢爱武		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	朱广存		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN104569374A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组及其制备方法。本发明所述的快速定量检测C-反应蛋白的均相荧光免疫试剂组，包括稀土元素螯合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体(anti-CRP)、荧光化合物标记的抗C-反应蛋白单克隆抗体和系列浓度的C-反应蛋白校准品。本发明可同时检测高值和低值CRP，尤其是低值CRP，且成本低廉，操作简单、快速、灵敏，且特异性好，只需要配套专用均相荧光免疫检测仪，因此可广泛应用于各级医疗检验场所，尤其是基层医疗机构，包括乡镇卫生院等均可开展，对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

