



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105911288 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610210052.0

(22)申请日 2016.04.06

(71)申请人 上海奥普生物医药有限公司

地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路526号

(72)发明人 石晓强 杨晶 周奕璇 李福刚
徐建新

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227

代理人 吴泽群

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

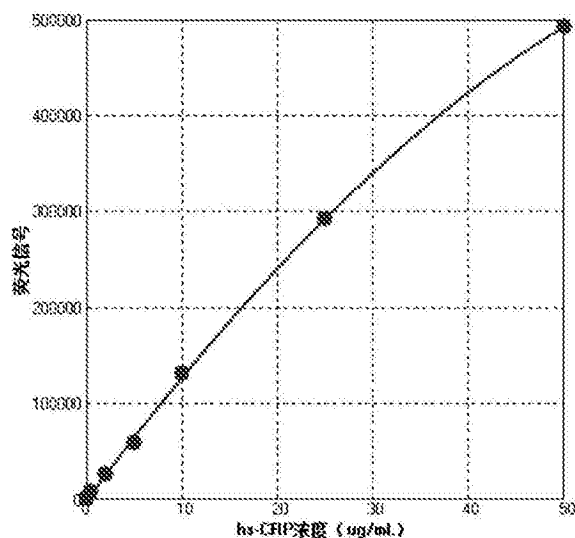
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明属于临床医学诊断领域,特别涉及一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒及其制备方法和应用,该试剂盒由检测反应杯、荧光标记抗体及清洗液组成。在具体检测时,先绘制标准曲线,然后将待测样品加入检测反应杯内,再加入荧光标记抗体,30℃-40℃温育,用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体;然后将荧光信号与标准曲线比对,获得所述待测样品的超敏C反应蛋白浓度。所述超敏C反应蛋白的检测方法,由于其超高的灵敏度,易于实现自动化操作,而且反应温度均一,不受环境因素影响,准确性更好,精密度也非常优异。



1. 一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒,其特征在于:该试剂盒由检测反应杯、荧光标记抗体及清洗液组成;

所述检测反应杯的固相表面包被有超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体;

所述荧光标记抗体为时间分辨荧光微球与超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体通过共价键交联。

2. 根据权利要求1所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒,其特征在于:所述时间分辨荧光微球中填充了镧系元素螯合物,其粒径为100-1000nm。

3. 根据权利要求2所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒,其特征在于:所述镧系元素螯合物为铕螯合物。

4. 根据权利要求1所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法,其步骤包括,

(1)、检测反应杯的制备:将超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体稀释后37℃包被,并用封闭缓冲液封闭、拍干;置于37℃的干燥箱中烘干、密封保存;

(2)、荧光标记抗体的制备:将时间分辨荧光微球活化;然后加入超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体混匀、封闭、清洗,并用反应缓冲液稀释,获得终浓度到20μg/ml的荧光标记抗体;

(3)清洗液的制备:该清洗液中含有PB,NaCl,Tween 20,该清洗液的pH值为7-9。

5. 根据权利要求4所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤(2)中,时间分辨荧光微球活化的步骤为,在羧基时间分辨荧光微球中加入MES和EDC进行初次活化处理,加入氨基己酸室温混匀15-60min,加入MES、NHS和EDC进行再次活化处理;每1mg羧基时间分辨荧光微球对应10-100μL 50mmol/L氨基己酸。

6. 根据权利要求5所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于:所述初次活化处理包括:每1mg羧基时间分辨荧光微球,加60μL 500mmol/L pH5.0-7.0的MES,0.02-0.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,加纯化水至终体积400μL,室温混匀15-60min;

所述再次活化处理包括:加入所述氨基己酸室温混匀后,加1mL 100mmol/L的MES pH6.0,离心清洗15000rpm 20min,弃去上清;加400μL的100mmol/L的MES pH6.0,超声分离,加0.02-0.2mg N-羟基琥珀酰亚胺,加0.01-0.1mgEDC,室温混匀15min;加1mL 100mmol/L的MES pH5.0-7.0缓冲液,离心清洗15000rpm20min,弃去上清;100mmol/L MES pH5.0-7.0缓冲液恢复到1mL。

7. 根据权利要求4所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤(3)中的清洗液中含有5mmol/L的PB,0.9%NaCl,0.05%Tween 20,该清洗液的pH值为7.8。

8. 权利要求1所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法,其步骤包括,

(A)、标准曲线的绘制:采用基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒测定不同浓度的校准品,并根据荧光读数仪上的荧光信号值,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号值为纵坐标,绘制成标准曲线;

(B)、将待测样品加入检测反应杯内,再加入荧光标记抗体,30℃-40℃温育,用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体;

(C)在340-380nm激发光激发下,测试检测反应杯中荧光信号,检测波长为600-630nm;

(D)将所述荧光信号与步骤(A)中的标准曲线比对,获得所述待测样品的超敏C反应蛋白浓度。

9.权利要求8所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法,其特征在于:所述步骤(A)中,浓度为0、0.05、0.5、2、5、10、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的校准品中加入荧光标记抗体,37℃温育5-25min,然后用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体,所述校准品与荧光标记抗体的体积比为2-4:100。

10.权利要求8所述的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法,其特征在于:所述步骤(B)中,待测样品与荧光标记抗的体积比为2-4:100,温育温度为37℃。

一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析 试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学诊断领域,特别涉及一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 心血管疾病是危害人类健康及生命的严重疾病,已成为21世纪人类健康的头号杀手。2009年8月拜耳医药在欧洲心脏病学会年会上报道指出2005年全球约有1750万人死于心血管疾病,预计2015年这一数字将攀升到2000万人,大约有一半病例发生在亚太地区。生活条件的改善和生活方式的转变,使中国人发生心血管疾病的风险迅速赶超美国等发达国家。

[0003] 我国1990年城市居民心血管疾病死亡率为92/10万人,2000年为106/10万人,平均每年死亡增长率为1.3%。2008年死亡率已达到121/10万人,相比2000年时,平均死亡增长率为1.4%,其中急性心肌梗塞的死亡率占到其中的三分之一,说明心肌梗塞死亡率仍呈不断增长趋势。随着中国人口老龄化趋势,按平均死亡增长率为1.5%计算,到2015年,血管疾病死亡率将达到141/10万人,急性心肌梗塞的死亡率将达到47/10万人。

[0004] 中国卫生部2008年公布的急性心肌梗塞的死亡率为39.72/10万人,每年急性心肌梗塞的发病人数超过500万人,至少有超过200万的人群去医院就医进行心肌梗塞疾病的相关检测,这并不包含每年因胸痛怀疑为心肌梗塞的病人人数,实际医院每年检测人数已达千万人次。

[0005] C-反应蛋白(CRP:C-reactive protein)是一种能与肺炎链球菌C多糖体反应的急性期反应蛋白,是一种非特异性的免疫应答组分。它广泛分布于人体,产生于抗原进入机体的早期,是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎性刺激时肝细胞合成的急性时相蛋白。在炎症开始数小时CRP就升高,48小时即可达到峰值,随着病变消退、组织结构和功能的恢复降至正常水平。此反应不受放疗、化疗、皮质激素治疗的影响。因此,CRP的检测在临床应用相当广泛,包括急性感染性疾病的诊断和鉴别诊断;手术后感染的监测;抗生素疗效的观察、疗程监测及预后判断等。

[0006] 最新的临床追踪调查结果表明,健康人无感染时的C反应蛋白水平可预测将来心肌梗塞及中风的危险性。C反应蛋白含量 $>2.1\text{mg/L}$ 的人,较C反应蛋白含量 $<1\text{mg/L}$ 者,将来发生心肌梗塞的危险性为后者的2.9倍;发生缺血性中风的危险性为后者的1.9倍;发生外周动脉血管性疾病的危险性为后者的4.1倍。C反应蛋白和总胆固醇:高密度脂蛋白胆固醇的比值结合,较其他的危险因子更能预示发生心、脑血管疾病的危险性。

[0007] 传统上多用免疫比浊、化学发光法及胶体金免疫层析法或者荧光免疫层析法等测定CRP。乳胶比浊法一般采用多克隆抗体包被乳胶微球,灵敏度和特异性都不理想,如果采用单克隆抗体包被乳胶微球,则试剂成本很高。化学发光法对技术要求高,操作步骤相对比较繁琐,需要多步试剂添加过程,不易在临床实验室中进行常规开展。胶体金免疫层析法虽

然具有标本用量少,简便快速,便宜的优势,然而当遇到某些样品中抗原或抗体含量极低时,胶体金的颜色将很浅甚至无显色,很难用肉眼来判断结果,容易出现误判,灵敏度较低。荧光免疫层析法虽然灵敏度比胶体金免疫层析法要高,但是其检测精密度并不理想,灵敏度与大型化学发光或者电化学发光仪器仍有差距。

[0008] 时间分辨荧光(Time-resolved Fluorescence, TRF)是一种非同位素荧光标记物,与普通荧光相比,具有stock位移大,荧光寿命长等特点,可以有效的避免样品中的本底荧光,以及激发光等杂散光的影响,因此相比普通荧光具有更高的灵敏度和抗干扰能力。

[0009] 目前市面上采用时间分辨荧光检测的试剂均采用解离增强镧系元素荧光免疫分析(DELFI A),它采用具有双功能基团结构的螯合物,使其一段与铕(Eu)连接,另一端与抗体/抗原分子上的自由氨基连接,形成EU标记的抗体/抗原,经过免疫反应后形成免疫复合物,由于这种复合物在水中的荧光强度非常弱,需要加入一种解离增强剂,使得铕离子从复合物上解离下来,并与增强剂中的另一种螯合剂形成胶态分子团,这种分子团在紫外光的激发下能发出很强的荧光。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒,该试剂盒能在较短的检测时间内完成超敏C反应蛋白的检测,检测时间短,检测灵敏度高。

[0011] 本发明还提供了基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法。

[0012] 本发明还提供了基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法。

[0013] 为了实现以上技术效果,本发明是通过如下步骤实现:

[0014] 一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒,其特征在于:该试剂盒由检测反应杯、荧光标记抗体及清洗液组成;

[0015] 所述检测反应杯的固相表面包被有超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体;

[0016] 所述荧光标记抗体为时间分辨荧光微球与超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体通过共价键交联。

[0017] 所述时间分辨荧光微球中填充了镧系元素螯合物,其粒径为100-1000nm。优选的,所述镧系元素螯合物为铕螯合物。进一步优选的,该铕螯合物为Eu(TTA)₃/TOPO或Eu(TTA)₃/Phen。

[0018] 上述基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒的制备方法,其步骤包括,

[0019] (1)、检测反应杯的制备:将超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体稀释后37℃包被,并用封闭缓冲液封闭、拍干;置于37℃的干燥箱中烘干、密封保存;

[0020] 优选的,将超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体用0.2mol/L的磷酸缓冲液稀释至10μg/mL,100μL/孔,37℃包被2小时,并用封闭缓冲液按200μL/孔加入反应杯,37℃封闭2小时,弃去包被反应杯中的封闭液,拍干,置于37℃的干燥箱中烘干、密封保存;

[0021] (2)、荧光标记抗体的制备:将时间分辨荧光微球活化;然后加入超敏C反应蛋白单克隆抗体或多克隆抗体混匀、封闭、清洗,并用反应缓冲液稀释,获得终浓度到5-20μg/mL的

荧光标记抗体；

[0022] (3)清洗液的制备：该清洗液中含有PB,NaCl,Tween 20,该清洗液的pH值为7-9。优选的,清洗液中含有5mmol/L的PB,0.9%NaCl,0.05%Tween 20,该清洗液的pH值为7.8。

[0023] 所述步骤(2)中,时间分辨荧光微球活化的步骤为,在羧基时间分辨荧光微球中加入MES和EDC进行初次活化处理,加入氨基己酸室温混匀15-60min,加入MES、NHS和EDC进行再次活化处理；每1mg羧基时间分辨荧光微球对应10-100μL 50mmol/L氨基己酸。

[0024] 优选的,所述初次活化处理包括：每1mg羧基时间分辨荧光微球,加60μL500mmol/L pH5.0-7.0的MES,0.02-0.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,加纯化水至终体积400μL,室温混匀15~60min；

[0025] 所述再次活化处理包括：加入所述氨基己酸室温混匀后,加1mL 100mmol/L的MES pH6.0,离心清洗15000rpm 20min,弃去上清；加400μL的100mmol/L的MES pH6.0,超声分离,加0.02-0.2mg N-羟基琥珀酰亚胺,加0.01-0.1mgEDC,室温混匀15min；加1mL 100mmol/L的MES pH5.0-7.0缓冲液,离心清洗15000rpm20min,弃去上清；100mmol/L MES pH5.0-7.0缓冲液恢复到1mL。荧光微粒活化过程中添加氨基己酸作为手臂,使得抗体与微球之间的距离增加,有效的降低了空间位阻效应,提高了检测系统灵敏度。

[0026] 上述基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法,其步骤包括,

[0027] (A)、标准曲线的绘制：采用基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒测定不同浓度的校准品,并根据荧光读数仪上的荧光信号值,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号值为纵坐标,绘制成标准曲线；

[0028] (B)、将待测样品加入检测反应杯内,再加入荧光标记抗体,30℃-40℃温育,用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体；

[0029] (C)在340-380nm激发光激发下,测试检测反应杯中荧光信号,检测波长为600-630nm；

[0030] (D)将所述荧光信号与步骤(A)中的标准曲线比对,获得所述待测样品的超敏C反应蛋白浓度。

[0031] 所述步骤(A)中,浓度为0、0.05、0.5、2、5、10、25、50μg/mL的校准品中加入荧光标记抗体,37℃温育5-25min,然后用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体,所述校准品与荧光标记抗体的体积比为2-4:100。

[0032] 所述步骤(B)中,待测样品与荧光标记抗的体积比为2-4:100,温育温度为37℃。

[0033] 本发明的有益效果是：

[0034] 1)本发明所制备的荧光标记物为时间分辨荧光乳胶微球,每个微球中填充了几万到几十万个稀土元素离子螯合物,检测过程中并不需要解离增强过程,便可发出很强的荧光,简化了时间分辨荧光检测步骤,解离增强时间分辨荧光检测往往需要1个小时左右时间才能得到检测结果,而采用时间分辨荧光微球作为标记物,由于每个微球中填充了大量的镧系元素螯合物,荧光信号放大数千倍以上,因此可以在5-20分钟的检测时间内完成检测,缩短了检测时间,并有效的提高了检测灵敏度。

[0035] 2)荧光微粒活化过程中添加氨基己酸作为手臂,使得抗体与微球之间的距离增加,有效的降低了空间位阻效应,提高了检测系统灵敏度。

[0036] 3)本发明提供的基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白的检测方法,由于

其超高的灵敏度,易于实现自动化操作,而且反应温度均一,不受环境因素影响,准确性更好,精密度也非常优异。

附图说明

[0037] 图1是本发明的原理示意图。

[0038] 图2是本发明根据荧光读数仪上的荧光信号值,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号值为纵坐标,绘制成的标准曲线。

[0039] 图1中:1为荧光标记抗体,2为超敏C反应蛋白抗原,3为包被抗体,4为反应杯固相表面,5为光免疫复合物。

具体实施方式

[0040] 下面结合实施例,对本发明作进一步说明:

[0041] 实验所用到的设备:PerkinElmer公司的Victor X4多功能酶标仪。

[0042] 本发明的原理示意图如图1所示,包被抗体3结合在反应杯固相表面4上,在反应杯中添加一定量的样品使得样品中的超敏C反应蛋白抗原2与反应杯固相表面结合的抗体3结合,再加入荧光标记抗体1,温育形成发光免疫复合物5,采用清洗液清洗反应杯后去除未结合的抗原及荧光标记抗体,检测反应杯中的荧光信号,与标准曲线进行对比,得到待测样本中超敏C反应蛋白的浓度。

[0043] 实施例1

[0044] (1)、检测反应杯的制备:

[0045] A、检测反应杯包被:C反应蛋白抗体6404(Medix公司)用0.2mol/L的磷酸缓冲液(pH7.8)稀释成10 μ g/ml,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C包被两小时,洗板。

[0046] B、检测反应杯封闭:用封闭缓冲液按200 μ L/孔加入反应杯,37 $^{\circ}$ C封闭两小时,弃去包被反应杯中的封闭液,拍干。

[0047] C、检测反应杯干燥:将上述封闭好的反应杯放置于湿度低于30%的37 $^{\circ}$ C干燥箱中烘干4小时,密封干燥保存。

[0048] (2)、荧光标记抗体的制备:

[0049] A、荧光微粒活化:

[0050] 取1mg羧基时间分辨荧光微球(300nm,0.1ml,10mg/mL,Bangslab公司),加60 μ L 500mmol/L的MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液,pH6.0,加0.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),加纯化水至终体积400 μ L,室温混匀15min。加100 μ L 50mmol/L 氨基己酸,室温混匀30min。加1mL 100mmol/L MES pH6.0,离心清洗15000rpm 20min,弃去上清。加400 μ L 100mmol/L MES pH6.0,超声分离,加0.2mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),加0.1mgEDC,室温混匀15min。加1mL 100mmol/L MES pH6.0缓冲液,离心清洗15000rpm 20min,弃去上清。100mmol/L MES pH6.0缓冲液恢复到1ml。

[0051] B、抗体交联:加0.2mg的超敏C反应蛋白单克隆抗体6405(Medix公司),室温25 $^{\circ}$ C混匀30min。

[0052] C、封闭:加BSA封闭液,至终浓度10mg/mL BSA,室温25 $^{\circ}$ C混匀过夜。

[0053] D、清洗:加3mL交联缓冲液,25000rpm离心清洗30min,弃去上清。加500 μ L缓冲液,

超声分离,终浓度2mg/mL。

[0054] E、工作用荧光标记抗体配制:

[0055] 配制反应缓冲液:缓冲液中含有50mmol/L tris,1%BSA,0.9%NaCl,2%葡聚糖,0.5% tween 20,pH7.2。

[0056] 用反应缓冲液将上述清洗好的荧光标记抗体稀释到终浓度到20 μ g/ml,作为检测用荧光标记抗体。

[0057] (3)、清洗液的制备

[0058] 配制清洗缓冲液,含5mmol/L PB,0.9%NaCl,0.05%Tween 20,pH7.8。

[0059] 实施例2

[0060] (1)标准曲线的绘制:

[0061] 采用实施例1中制备的试剂组合成超敏C反应蛋白时间分辨荧光定量试剂盒,测定校准品,每个浓度重复10次。

[0062] 每个检测中加入校准品3 μ L,荧光标记抗体100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育20min,然后清洗检测杯,在PerkinElmer公司的Victor X4荧光读数仪上进行读数(激发波长340-380nm,检测波长600-630nm)具体数据如表1所示。

[0063] 表1

[0064]

校准品浓度 (μ g/ml)								
	0	0.05	0.5	2	5	10	25	50
信号均值	168	814	7503	26583	58933	131762	292151	492529
CV	13.5%	7.4%	5.4%	5.0%	3.4%	2.3%	2.5%	1.4%

[0065] 根据表1中的数据,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号均值为纵坐标,绘制成标准曲线。标准曲线如图2所示。该标准曲线线性良好,可以通过该标准曲线对样本中所含的超敏C反应蛋白浓度进行定量分析。

[0066] 通过表1结果可知,检测试剂盒的批内精密度良好,校准品各浓度点精密度均小于10%,且试剂灵敏度良好(0值校准品除外),在0.05 μ g/mL水平与0值校准品有显著区分。

[0067] (2)、样本检测

[0068] 采用实施例1中制备的试剂组合成超敏C反应蛋白时间分辨荧光定量试剂盒,测定高低浓度质控品,每个浓度做10次。

[0069] 每个检测中加入样品3 μ L,荧光标记抗体100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育15min,然后清洗检测杯,在PerkinElmer公司的Victor X4荧光读数仪上进行读数(激发波长340-380nm,检测波长600-630nm),将测试结果带入图2标准曲线,计算样品测试浓度,测试结果如表2所示,检测结果显示试剂精密度良好。

[0070] 表2质控品测试结果

[0071]

编号	QCL(μ g/ml)	QCH(μ g/ml)
1	0.55	9.70
2	0.61	9.60

3	0.60	10.20
4	0.61	9.70
5	0.67	10.10
6	0.52	9.90
7	0.54	10.00
8	0.54	9.70
9	0.65	9.90
10	0.64	10.00
信号均值	0.593	9.88
SD	0.052	0.198
CV	8.9%	2.0%

[0072] 实施例3

[0073] (1)、检测反应杯的制备:

[0074] A、检测反应杯包被:C反应蛋白抗体6404(Medix公司)用0.2mol/L的磷酸缓冲液(pH7.8)稀释成10 μ g/ml,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C包被两小时,洗板。

[0075] B、检测反应杯封闭:用封闭缓冲液按200 μ L/孔加入反应杯,37 $^{\circ}$ C封闭两小时,弃去包被反应杯中的封闭液,拍干。

[0076] C、检测反应杯干燥:将上述封闭好的反应杯放置于湿度低于30%的37 $^{\circ}$ C干燥箱中烘干4小时,密封干燥保存。

[0077] (2)、荧光标记抗体的制备:

[0078] A、荧光微粒活化:

[0079] 取1mg羧基时间分辨荧光微球(300nm,0.1ml,10mg/mL,Bangslab公司),加60 μ L 500mM MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液,pH6.0,加0.2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),加0.4mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,40 μ L,10mg/mL),加纯化水至终体积600 μ L,室温混匀15min。加1mL 100mmol/L MES pH6.0,离心清洗15000rpm 20min,弃去上清。

[0080] B、抗体交联:加0.2mg的超敏C反应蛋白单克隆抗体6405(Medix公司),室温25 $^{\circ}$ C混匀60min。

[0081] C、封闭:加BSA封闭液,至终浓度10mg/mL BSA,室温25 $^{\circ}$ C混匀过夜。

[0082] D、清洗:加3mL交联缓冲液,25000rpm离心清洗30min,弃去上清。加500 μ L缓冲液,超声分离,终浓度2mg/mL。

[0083] E、工作用荧光标记抗体配制:

[0084] 配制反应缓冲液:缓冲液中含有50mmol/L tris,1%BSA,0.9%NaCl,2%葡聚糖,0.5% tween 20,pH7.2。

[0085] 用反应缓冲液将上述清洗好的荧光标记抗体稀释到终浓度到20 μ g/ml,作为检测用荧光标记抗体。

[0086] (3)、清洗液的制备

[0087] 配制清洗缓冲液,含5mmol/L PB,0.9%NaCl,0.05%Tween 20,pH7.8。

[0088] (4)、校准品测试

[0089] 采用上述方法制备的试剂组合成超敏C反应蛋白时间分辨荧光定量试剂盒,测定校准品,每个浓度重复10次。

[0090] 每个检测中加入样品3 μ L,荧光标记抗体100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育15min,然后清洗检测杯,在PerkinElmer公司的Victor X4荧光读数仪上进行读数。

[0091] 通过表3结果可知,检测试剂盒的批内精密度良好,校准品各浓度点荧光信号精密度均小于10%(除0和0.5ng/ml水平以外),试剂灵敏度相比实施例1来说有所降低,仅在2ng/mL水平与0值校准品有较为显著区分。说明荧光微粒前处理过程中通过添加手臂的方式能有有效的提升检测的灵敏度。

[0092] 表3超敏C反应蛋白定量检测标准曲线数据

[0093]

校准品浓度 (μ g/ml)								
	0	0.05	0.2	2	5	10	25	50
信号均值	179	169	621	6316	14744	28085	69627	88054
CV	15.5%	19.3%	9.6%	4.2%	1.8%	3.7%	5.6%	5.9%

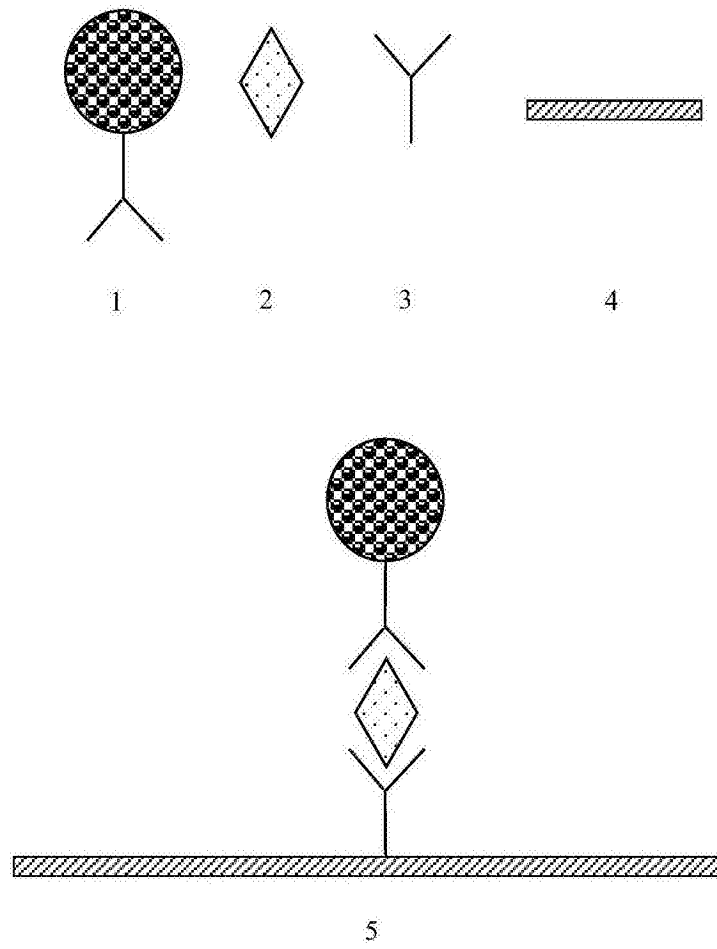


图1

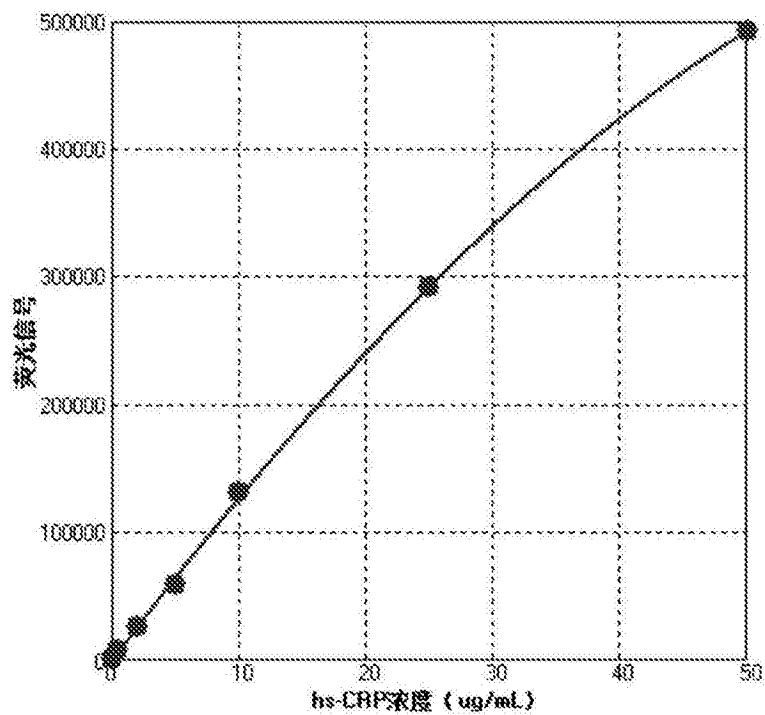


图2

专利名称(译)	一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105911288A	公开(公告)日	2016-08-31
申请号	CN201610210052.0	申请日	2016-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海奥普生物医药有限公司		
[标]发明人	石晓强 杨晶 周奕璇 李福刚 徐建新		
发明人	石晓强 杨晶 周奕璇 李福刚 徐建新		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/68 G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/577 G01N2800/32		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床医学诊断领域，特别涉及一种基于微球的杯式时间分辨荧光超敏C反应蛋白免疫分析试剂盒及其制备方法和应用，该试剂盒由检测反应杯、荧光标记抗体及清洗液组成。在具体检测时，先绘制标准曲线，然后将待测样品加入检测反应杯内，再加入荧光标记抗体，30℃-40℃温育，用清洗液清洗去除未结合的抗原及荧光标记抗体；然后将荧光信号与标准曲线比对，获得所述待测样品的超敏C反应蛋白浓度。所述超敏C反应蛋白的检测方法，由于其超高的灵敏度，易于实现自动化操作，而且反应温度均一，不受环境因素影响，准确性更好，精密度也非常优异。

