

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710044730.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 101320041A

[22] 申请日 2007.8.9

[21] 申请号 200710044730.1

[71] 申请人 上海奥普生物医药有限公司

地址 201102 上海市浦东新区碧波路 328 号  
C 座 3 楼

[72] 发明人 徐建新

[74] 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所

代理人 黄志达 谢文凯

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

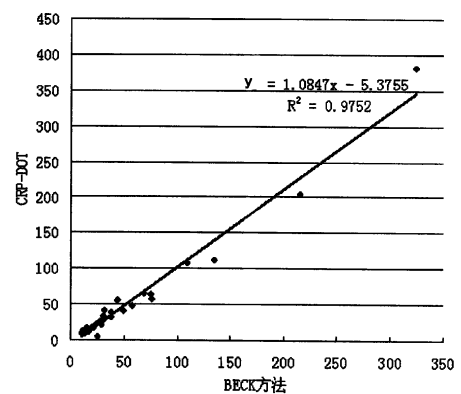
## [54] 发明名称

一种快速定量检测 C - 反应蛋白的胶体金法及其应用

## [57] 摘要

本发明克服了常规 C - 反应蛋白 (CRP) 定量检测方法不适合单人份测试、检测时间较长等缺点, 提供了一种快速、简便、准确的快速定量检测 C - 反应蛋白的胶体金法。反应原理为固相双抗体夹心法的金标免疫斑点渗滤试验, 待测样品经 40 - 480 倍稀释后与免疫胶体金在液相均质介质中混和均匀, 再转加到反应板上, 其中所含的、已与免疫胶体金在一起的待测物能为膜上固定的抗待测物另一决定簇的单抗或多抗特异性地捕获, 呈红色斑点, 斑点色泽与样品中 CRP 浓度呈正比。

瑞金医院临床比对结果



1. 一种快速定量检测 C-反应蛋白 (CRP) 的胶体金法, 其特征在于: 待测样品经 40—480 倍稀释后与适当比例的抗待测物免疫胶体金在液相均质介质中充分混和均匀, 再转加到反应板上, 具体包括下列步骤:
  - (1) 从冷藏处取出抗 CRP 金标液冻干品, 室温至少平衡半小时, 在抗 CRP 金标液冻干品中, 准确加入标贴或说明书中规定体积的冻干品复溶液摇匀;
  - (2) 吸取复溶后的金标液, 加入空的反应管;
  - (3) 待测样品加入样品稀释液进行 40—480 倍稀释, 充分混匀;
  - (4) 将反应板平放于实验台上, 于反应孔内滴加封闭液, 待完全渗入;
  - (5) 吸取稀释样品到反应管金标液中, 充分混匀后将反应混合物全部加入到封闭后的反应板孔中;
  - (6) 待完全渗入后, 加入洗涤液;
  - (7) 待洗涤液完全渗入后, 测读 CRP 值。
2. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (1) 中所述的抗 CRP 金标液中包被胶体金的是纯化 CRP 单抗。
3. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (3) 的样品稀释液为甘氨酸—NaOH 缓冲液, 离子强度 20—200mM/L, pH 7.0—8.0。
4. 如权利要求 3 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 所述的甘氨酸—NaOH 缓冲液 pH 7.4—7.6。
5. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (3) 中待测样品加入样品稀释液进行 160 倍稀释。
6. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (4) 中的封闭液为 50mM PBS, 含 1%BSA(小牛血清白蛋白), pH7.4—7.6。
7. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (5) 中所述的反应板中包被反应板上硝基纤维膜的是针对不同反应决定簇的另一纯化 CRP 单抗。
8. 如权利要求 1 所述的一种快速定量检测 CRP 的胶体金法, 其特征在于: 步骤 (6) 中所述的洗涤液为 0.01MPBS 溶液, 含 Tween-20, pH7.6。
9. 一种快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法在制备 C-反应蛋白快速定量试剂盒(胶体金法)中的应用。

## 一种快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法及其应用

### 技术领域

本发明属于临床免疫学检测领域，具体涉及一种快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法及其在诊断试剂盒制备中的应用。

### 背景技术

C 反应蛋白(CRP)是一种能和肺炎链球菌的荚膜 C 多糖结合，由 Tillett and Francis (1930)发现并由 Abernethy and Avery(1941)得到研究，CRP 是由 5 个相同的亚单位(23KD)以非共价链聚集形成的环状五聚体蛋白，分子量为 115KD，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，随着组织结构和功能的复原其含量恢复正常。因此，CRP 的测定对病程监测、治疗效果判断和预后评价有重大意义。

健康人无感染时的 CRP 水平还可预测将来心肌梗塞及中风的危险性。健康人 CRP 参考范围的中位数基本为 0.58—1.13mg / L。CRP 含量 >2.1mg / L 的人，比较 CRP 含量 ≤1mg / 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。CRP 与血脂(总胆固醇，总胆固醇：高密度脂蛋白胆固醇的比值)的联合测定，较其他的危险因子更能预示发生心脑血管疾病的危险性，是目前进行冠心病危险评估的最佳模型。

免疫金标记技术(Immunogold labelling technique)主要利用了金颗粒具有高电子密度的特性，在金标蛋白结合处，在显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标记物在相应的配体处大量聚集时，肉眼可见红色或粉红色斑点，因而用于定性或半定量的快速免疫检测方法中，这种方法由于快速、简便、准确和无污染等优点，在检测抗原、抗体中得到了广泛使用。免疫胶体金在医学检验中最常使用的有二个方法：1) 免疫胶体金斑点渗滤试验 2) 免疫胶体金层析试验。免疫胶体金斑点渗滤技术快速又简便，广受欢迎，但要测定结果非常敏感、非常可重复，免疫胶体金与样品中待测物之间的呈色标记反应在均相介质中进行，使反应充分，才能使测定结果更敏感、重复性更好。这在免疫胶体金斑点渗滤定量检测中尤为重要，是发展敏感度和准确性更好的金标法快速斑点渗滤定量检测诊断试剂盒的前提。

C-反应蛋白在人体细菌感染的早期就迅速产生，是细菌感染性疾病诊断的敏感指标，在国外广泛应用于早期的细菌感染性疾病的诊断，但需要昂贵的仪器和配套试剂，测定往

往在中心实验室进行，不能立等结果。近年国际上已有商品化免疫胶体金斑点渗滤定量检测试剂盒供应，较有代表性的是挪威 Axis-Shield 公司生产的 NycoCard C 反应蛋白定量试剂盒。挪威 Axis-Shield 公司生产的 NycoCard C 反应蛋白定量试剂盒将稀释样品直接加在反应小盒中，样品中待测物和膜上致敏配基先起免疫反应，被捕获在膜上的待测物和随后加在膜上的免疫胶体金再起呈色标记反应。这样的反应模式导致免疫胶体金与待测物之间的呈色标记反应只在免疫胶体金试剂流经膜上时瞬间进行，缺点是反应均相性差、反应时间短 (NycoCard1114365. Ed. 581 July 2001)。

本发明采用样品与胶体金在试管内反应后再加入反应板的新斑点渗滤试验操作方法，由于样品与胶体金在液相中全面接触，反应充分，因此可大幅度提高反应灵敏度，增加样品稀释倍数，去除样品介质效应，使定量结果有很好的可重复性，而且此方法省略了直接加样步骤，提高了定量结果的精密度和准确度。

### 发明内容

本发明所要解决的技术问题之一是克服常规 C-反应蛋白检测方法不适合单人份测试、检测时间较长、反应均相性差的缺点，提供了一种快速、简便、准确的快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法。

本发明提供的快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法，其反应原理为固相双抗体夹心法的金标免疫斑点渗滤法，待测样品经 40—480 倍稀释后与适当比例的免疫胶体金在液相均质介质中充分混和均匀并起专一性呈色标记反应，在此过程中样品中的待测物能专一性地与胶体金抗此待测物单抗缀合物充分结合，然后再转加到反应板上，流经反应板中的硝基纤维素膜时，其中所含的、已反应结合在一起的待测物—抗待测呈色复合物能为膜上固定的抗待测物另一侧决定簇的单抗或多抗特异性地捕获，呈红色斑点(固定在膜上的抗待测物单抗或多抗与缀合胶体金的抗待测物单抗是二株不同的抗体，有不同的结合位点)，斑点红色强度可用仪器定量测试，它与样品中 CRP 浓度成正比。

具体包括如下步骤：

1. 从冷藏处取出抗 CRP 金标液冻干品，室温至少平衡半小时，在抗 CRP 金标液冻干品中，准确加入标贴或说明书中规定体积的冻干品复溶液摇匀。
2. 吸取复溶后的金标液，加入空的反应管；
3. 待测样品加入样品稀释液进行 40—480 倍稀释，充分混匀。
4. 将反应板平放于实验台上，于反应孔内滴加 2 滴封闭液，待完全渗入；

5. 吸取稀释样品到反应管金标液中，充分混匀后立刻将反应混合物全部加入到封闭后的反应板孔中；
6. 待完全渗入后，加入 4 滴洗涤液；
7. 待洗涤液完全渗入后，于 5 分钟内在 U2 金标定量仪 CRP 项目下测读 CRP 值。

冷冻干燥抗 CRP 免疫胶体金和反应板的制备：按吕绳凯等介绍的方法（中华微生物学和免疫学杂志，13（2）：125，1993；上海医学检验杂志，5（1）：62，1990）制备胶体金和抗 CRP 免疫胶体金缀合物。但包被胶体金的是纯化 CRP 单抗，0.15mgCRP 单抗用于包被 10ml 胶体金，2500ml 胶体金在包被离心洗涤后，最终以 pH 7.4，0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液恢复到 1500 ml 抗 CRP 免疫胶体金应用液，缓冲液含 1%BSA、0.5mg/ml PEG 20 M、0.1%叠氮钠。冷冻干燥预冷温度-38℃，最高升温 30℃，抽真空时间 20 小时，瓶分装量按需设定，但液体厚度不超过 1cm（本公司冻干胶体金制备发明专利 ZL 2004 1 00180513）。包被反应板上硝基纤维膜的是针对不同反应决定簇的另一纯化 CRP 单抗，浓度 1mg/ml，点样量 3ul/点，点样用的稀释 CRP 单抗稀释液是 20mM/L 醋酸盐缓冲液，pH4.0，内含 3%乙醇，反应板是胶体金定量检测板（本公司中国外观设计专利，专利号：ZL 033435278）。

反应板点样用的稀释 CRP 单抗或多抗纯化物指定稀释液是 20mM/L 以下的甘氨酸-HCl 或醋酸盐缓冲液，pH2.4—6.0，内含 3%乙醇。样品稀释液是甘氨酸—NaOH 缓冲液，离子强度 20-200mM/L，pH 7.0-8.0，确保样品中的 CRP 与免疫胶体金在混匀后、加入反应板前快速地完全反应。

本发明的液相反应方法与常规金标免疫渗滤法的比较见表 1

表 1 液相反应操作模式与常规金标免疫渗滤法的比较

	常规金标免疫渗滤法	液相反应操作模式
样品稀释倍数	不稀释或 20~80 倍	40~480 倍
定量结果 CV%（变异系数）	15%~20%	<10%
体液样品种类不同对结果的影响	不可忽略	可忽略

根据本发明提供的快速定量检测 C-反应蛋白的胶体金法制备成 C-反应蛋白快速定量试剂盒（胶体金法）。所制备的试剂盒 CRP-DOT 在 U2 仪上测读与同类进口试剂盒 NycoCard 比较结果见表 2：

表 2 CRTP-DOT 试剂盒与同类进口试剂盒 NycoCard 比较

	进口试剂盒 NycoCard	本发明 CRP-DOT 试剂盒
免疫胶体金	液体	冻干品（更稳定）
样品稀释倍数	1:80	多数在 1: 320 以上
加样方式	分别加样品-洗涤-加免疫胶体金在反应板中(敏感度较低, 反应均一性较差)	样品和免疫胶体金先混合再加入反应板(简便, 敏感)
测定范围	5-150 mg/L	5-160mg/L

所制备的 CRP-DOT 试剂盒在瑞金医院与国际著名的进口 IMAGE BECKMAN COULTER 仪器及配套 C-reaction protein reagent 定量试剂盒（批号 M606025）做平行比较测定的结果如图 1 所示。

Beckman 仪器和配套微颗粒胶乳免疫浊度 CRP 定量测定试剂盒是很高级的进口仪器和原装试剂盒，价格昂贵，一般只有大医院中心实验室才有配置，其精度和结果公认可靠。由图 1 显示可知本发明的试剂盒测定结果与 Beckman 仪器和配套微颗粒胶乳免疫浊度 CRP 定量测定试剂盒测定的结果相关系数为 0.9752，相关性很好。

本发明可以在人体发生疾病时医生当场可获 CRP 测定结果，能快速判断病人有否细菌感染，是否需抗生素治疗，从而更有针对性地对病人进行有效处理，缩短治愈时间，减低医疗费用。

#### 附图说明

图 1 CRP-DOT 和 Beckman CRP 定量的结果对比；

图 2 CRP-DOT 在 U2 上的标准曲线图。Tn 是 U2 仪器原始测定值

#### 具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

#### 实例 1 使用二个单抗的 CRP 金标法快速定量检测试剂的制备

1. 冷冻干燥抗 CRP 免疫胶体金和反应板的制备：按吕绳凯等介绍的方法（中华微生物

学和免疫学杂志, 13 (2): 125, 1993; 上海医学检验杂志, 5 (1): 62, 1990) 制备胶体金和抗 CRP 免疫胶体金缀合物。但包被胶体金的是纯化 CRP 单抗, 0.15mgCRP 单抗用于包被 10ml 胶体金, 2500ml 胶体金在包被离心洗涤后, 最终以 pH 7.4, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液恢复到 1500 ml 抗 CRP 免疫胶体金应用液, 缓冲液含 1%BSA、0.5mg/ml PEG 20 M、0.1%叠氮钠。冷冻干燥预冷温度-35℃, 最高升温 30℃, 抽真空时间 20 小时, 瓶分装量按需设定, 但液体厚度不超过 1cm(本公司冻干胶体金制备发明专利 ZL 2004 1 00180513)。包被反应板上硝基纤维膜的是针对另一反应决定簇的另一纯化 CRP 单抗, 浓度 1mg/ml, 点样量 3ul/点, 点样用的稀释 CRP 单抗稀释液是 20mM/L 醋酸盐缓冲液, pH4.0, 内含 3%乙醇, 反应板是胶体金定量检测板(本公司中国外观设计专利, 专利号: ZL 033435278)。

2. 样品稀释液的制备: 样品稀释液按以下配方制备, PH7.4~7.6。

原料名称	用量
甘氨酸	7.5g
0.2N NaOH	4ml
NaN <sub>3</sub>	1.0g
双蒸水	1000ml

3. 冻干胶体金恢复液: 含 0.5mg NaN<sub>3</sub>/ml 纯净水。

4. 洗涤液制备: pH7.6

原料名称	用量
NaN <sub>3</sub>	1.5g
Tween-20	1ml
0.01M PBS 溶液	1000ml

5. 封闭液制备: pH7.4~7.6、50mM PBS、含 1%BSA(小牛血清白蛋白)。

纯化 CRP 单抗购自芬兰 Medix Biochemica 公司。

测试方法采用本发明所述的稀释样品与胶体金在试管内反应后再加入反应板的斑点渗滤试验液相反应操作模式, 测试 CRP 标准品(参照国际标准 CRM 470), U2 在出厂前输入各 CRP 标准品浓度测定值(见图 2), 固定贮存于 U2 仪器, 医院立即可用 U2 做样品的定量测试。

#### 实例 2 CRP 胶体金法快速定量检测方法

1. 从冷藏处取出试剂, 室温至少平衡半小时, 在抗 CRP 金标液冻干品中, 准确加入

- CRP 冻干品复溶液 1.1ml 摇匀。
2. 使用清洁吸头吸取 100  $\mu$ l 复溶后的 CRP 金标液，加入空的反应管，该吸头只吸 CRP 金标液，防止任何污染。
  3. 将 CRP 反应板平放于实验台上，于反应孔内滴加 2 滴 CRP 封闭液，待完全渗入
  4. 新鲜血清样品不需要预处理，冰冻或 4~8 $^{\circ}$ C 存储多日的血清离心后取上清使用；精确吸取 10  $\mu$ l 血清加入 CRP 稀释管（稀释液体积见瓶贴，稀释倍数一般不低于 1:160），充分混匀。
  5. 吸取 100  $\mu$ l 稀释样品到反应管 100  $\mu$ l CRP 金标液中，充分混匀（移液器反覆吸注 10 次必能混匀），立刻将混匀物全部加入到封闭后的 CRP 反应板孔中。
  6. 待完全渗入后，加入 4 滴 CRP 洗涤液
  7. 待洗涤液完全渗入后，于 5 分钟内在 U2 金标定量仪 CRP 项目下测读 CRP 值。
  8. Upper Gold U-2 金标法定量读数仪按该仪器说明书操作。

瑞金医院临床比对结果

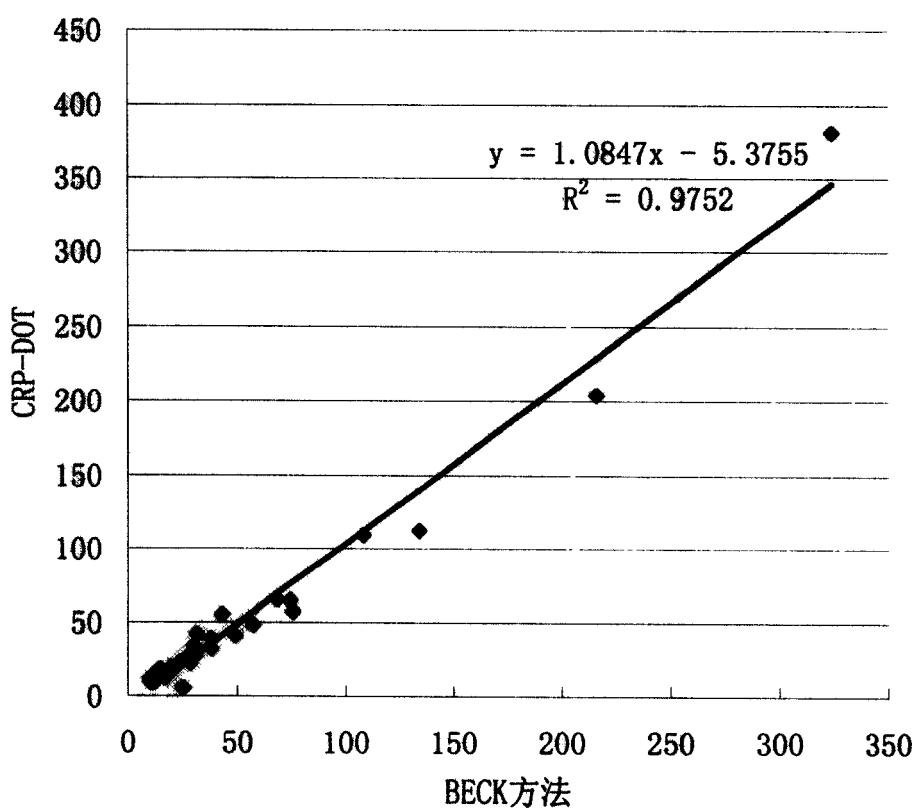


图 1

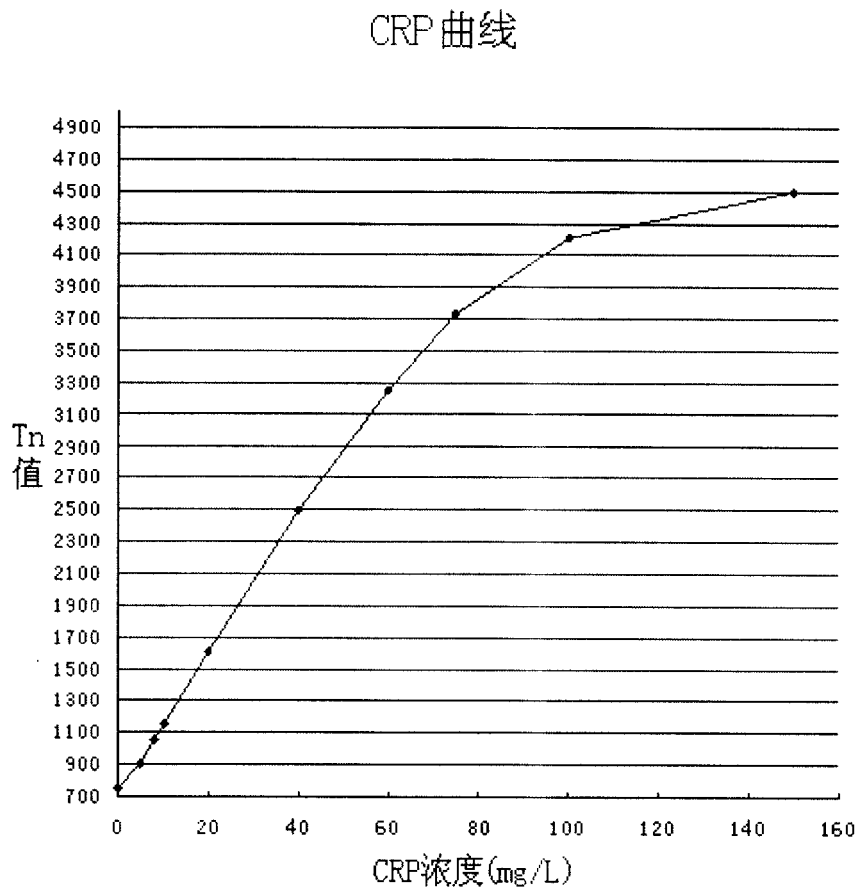


图 2

专利名称(译)	一种快速定量检测C - 反应蛋白的胶体金法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101320041A</a>	公开(公告)日	2008-12-10
申请号	CN200710044730.1	申请日	2007-08-09
[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	徐建新		
发明人	徐建新		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/577		
代理人(译)	黄志达 谢文凯		
其他公开文献	CN101320041B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明克服了常规C - 反应蛋白(CRP)定量检测方法不适合单人份测试、检测时间较长等缺点,提供了一种快速、简便、准确的快速定量检测C - 反应蛋白的胶体金法。反应原理为固相双抗体夹心法的金标免疫斑点渗滤试验,待测样品经40 - 480倍稀释后与免疫胶体金在液相均质介质中混和均匀,再转加到反应板上,其中所含的、已与免疫胶体金在一起的待测物能为膜上固定的抗待测物另一决定簇的单抗或多抗特异性地捕获,呈红色斑点,斑点色泽与样品中CRP浓度呈正比。

