



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646618 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910876430.2

(22)申请日 2019.09.17

(71)申请人 广州市伊川生物科技有限公司

地址 510535 广东省广州市萝岗区开源大道188号E栋6层、F栋6层

(72)发明人 刘光华 杨玉军

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 21/82(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

(54)发明名称

一种C反应蛋白测定试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种C反应蛋白(CRP)测定试剂盒及其制备方法和应用,属于体外诊断试剂技术领域。本发明提供的C反应蛋白CRP测定试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;其中,所述试剂R1包括缓冲液、无机盐、表面活性剂、稳定剂和防腐剂;所述试剂R2包括缓冲液、表面活性剂、封闭剂、抗人CRP抗体胶乳结合物和防腐剂。本发明提供的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒在现有的胶乳免疫比浊法的基础上,通过特定的制备方法以及抗冻剂优化反应体系,进一步提高了测定试剂的检测准确度、分析灵敏度及精密度,且未提高试剂研发成本,更易适应现代化临床检验医学的发展。

1. 一种C反应蛋白CRP测定试剂盒,其特征在于,包括试剂R1和试剂R2;其中,所述试剂R1包括缓冲液、无机盐、表面活性剂、稳定剂和防腐剂;所述试剂R2包括缓冲液、表面活性剂、封闭剂、抗人CRP抗体胶乳结合物和防腐剂。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂R2还包括抗冻剂。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂R1中各组分的浓度为:缓冲液15~150mmol/L、无机盐5~50g/L、表面活性剂5~50g/L、稳定剂5~100g/L和防腐剂0.05~2g/L;所述试剂R2中各组分的浓度为:缓冲液90~200mmol/L、表面活性剂5~25g/L、封闭剂5~25g/L、抗人CRP抗体胶乳结合物5~15g/L和防腐剂0.05~2g/L。

4. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述抗冻剂浓度为10g/L,所述抗冻剂为赤藓糖醇。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂R1和所述试剂R2中的所述缓冲液选自TRIS/HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、PBS缓冲液、MES缓冲液、硼砂缓冲液中的至少一种;所述试剂R1和所述试剂R2中的所述表面活性剂选自吐温-20、吐温80、十二烷基硫酸钠、曲拉通X-100中的至少一种;所述试剂R1和所述试剂R2中的所述防腐剂选自叠氮化钠、庆大霉素、硫柳汞、Proclin300中的至少一种;

所述试剂R1中的无机盐选自KCl、CaCl<sub>2</sub>、NaCl、BaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>中的至少一种;所述试剂R1中的稳定剂选自蔗糖、乙二胺四乙酸二钠、海藻糖、甘油、明胶中的至少一种;

所述试剂R2中的封闭剂选自小牛血清白蛋白、明胶、吐温-20、酪蛋白中的至少一种。

6. 如权利要求1~5任一项所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述R2试剂中的抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法包括如下步骤:

(1) 取羧基化的胶乳微球用甘氨酸缓冲液稀释5倍;

(2) 往步骤(1)的溶液中加入N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐进行活化,搅拌均匀后进行孵育;

(3) 往步骤(2)的溶液中加入磷酸盐缓冲液,室温搅拌混匀;

(4) 往步骤(3)的溶液中加入抗人CRP多克隆抗体,然后37℃孵育2~4小时;

(5) 加入3~5mL终止液终止反应,室温下搅拌2~3小时后,2~8℃保存备用,所述终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述羧基化的胶乳微球的粒径为100~150nm、固含量为10%;所述步骤(2)中,所述N-羟基丁二酰亚胺的规格为0.5~3mL、20~30g/L,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的规格为1~3mL、8~10g/L,所述3孵育温度为37℃,所述孵育时间为15~25min;所述步骤(3)中,所述磷酸盐缓冲液的加入量为1~5mL;所述步骤(4)中,所述抗人CRP多克隆抗体的加入的量为0.1~3.0g。

8. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述羧基化的胶乳微球的粒径100nm。

9. 如权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,所述抗人CRP多克隆抗体为羊抗人C反应蛋白抗体、兔抗人C反应蛋白抗体、鼠抗人C反应蛋白抗体中的一种。

10. 如权利要求1~5所述的试剂盒在检测C反应蛋白CRP中的应用。

## 一种C反应蛋白测定试剂盒及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种C反应蛋白(CRP)测定试剂盒及其制备方法和应用,属于体外诊断试剂技术领域。

### 背景技术

[0002] C-反应蛋白(C-reactive protein,简称CRP),是在机体受到感染或组织损伤时血浆中一些急剧上升的蛋白质(急性蛋白),是1930年由Tillet和Francis发现的蛋白质物质。最初他们观察到一些急性病人的血清可与肺炎链球菌的荚膜C-多糖发生反应,随后证实能与C-多糖反应的物质是一种蛋白质,便将其命名为C-反应蛋白(C-reactive Protein,CRP)。C-反应蛋白(CRP)是由5个完全相同的非糖基化的亚单位非共价联结,每个亚单位相对分子质量23017,由206个氨基酸残基组成,CRP这种盘状五聚体特征结构使其归于五聚素(Pentraxins)家族。CRP在健康人血清中浓度很低,且细菌感染或组织损伤时,其浓度显著(10倍甚至百倍)升高,而且上升和下降都很迅速。其作为一种急性时相反应蛋白,在感染、炎性疾病、组织损伤、恶性肿瘤、手术创伤及组织坏死等多种病理生理情况下,几小时内迅速升高,并在24h-72h达高峰,可超过正常水平的十、百、甚至千倍。疾病好转后,CRP水平可迅速下降至正常。CRP上升速度、幅度及持续时间与病情及组织损伤的严重程度密切相关。因此对感染、炎性疾病、恶性肿瘤、结缔组织疾病、心血管疾病及外伤等多种疾病的诊断、辅助诊断、疗效观察及预后判断均有较好的临床意义。

[0003] 目前现有检测技术中,CRP的测定方法通常可以归为两大类,一类是标记免疫技术,另一类是非标记免疫技术。前者主要包括免疫层析法、ELISA、放射免疫法、直接化学发光法和电化学发光法等,后者的主要包括单项免疫扩散法、胶乳凝集法和免疫比浊法等。

[0004] 免疫层析法技术的检测在快速检测中应用广泛,但是本底高,易衰减,只定性不定量且灵敏度低;同时ELISA也有许多缺点,其灵敏度相对较低、操作复杂且耗时长,自动化程度低,并有逐渐被化学发光代替的趋势;而放射免疫法,由于试剂保存时间短、自动化程度低,同时会造成放射性物质环境污染,基本已被淘汰。而化学发光法与电化学发光法,两者都有灵敏度高、试剂稳定等优势,但相对来说试剂成本都较高,设备昂贵,存在中、小医院难以开展的不足。

[0005] 单项免疫扩散法及乳胶凝集法,操作简单快速、特异性高、但两种方法灵敏度低,前者抗体过量时易出现假阴性,后者易受补体、类风湿因子等干扰出现假阳性。免疫比浊法,又可分为散射比浊和透射比浊,两者在CRP反应原理上相似,只是在光波接收方式上不同。散射比浊由于其光波接受方式的特点,通常测试结果的灵敏度与测速要优于透射比浊,但同时需特定的自动化分析仪器,且试剂价格高,不易于在基层医院中推广使用。透射比浊操作简便适用性强,普通自动生化分析仪和分光光度计均可使用,几乎所有的各实验室、基层医院均能开展,不足的是灵敏度和精密度均不够理想。

[0006] 随着检验医学的飞速发展,临床上也不断发现新指标和新技术,对于检验医学的要求越来越精确量化,对于低浓度检测物质的检测越来越多,对体外诊断试剂产品的质量

性能如稳定性、灵敏度、特异性、检测线性范围等也提出了更高要求。

[0007] 目前市场上用于比浊法检测的试剂绝大部分为液态的双试剂,且体外诊断试剂常用的运输手段主要为冷藏车和冷藏(保温)箱。但由于试剂供应商众多且品种供应分散以及运输成本等问题,绝大多数采用冷藏(保温)箱加冷冻冰袋配送。且在实际工作中,使用的冷藏(保温)箱大小不一,冷藏(保温)箱厚薄不均,密封性能也各有差异。在冰袋的使用上,也没有明确规定,随意性很大。冷藏(保温)箱中,试剂盒和冰袋的摆放,毫无规律,需冷藏保存的试剂如果裸露与冰袋混装,可能存在试剂冻融致使试剂中的某些因子失活的风险,从而影响测定结果,因此解决试剂在运输过程中的冻融问题就成了较大的难题。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有技术的不足提供一种灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒。

[0009] 本发明的另一目的是提供所述C反应蛋白(CRP)测定试剂盒的制备制备方法。

[0010] 本发明的再一目的是提供所述C反应蛋白(CRP)测定试剂盒在检测C反应蛋白(CRP)中的应用。

[0011] 本发明所述试剂盒基于胶乳免疫透射比浊法(PETIA),其原理是采用化学偶联法将特异性抗体结合于一定粒径的胶乳颗粒表面,当交联有抗体的微球与抗原结合后,短时间内迅速聚集在一起,从而改变反应液的吸光度。根据吸光度增加量,即可在波长600nm处测定免疫复合物浊度,定量检测血清中的CRP含量。胶乳免疫透射比浊法由于其适用性强、测试方便等特性,已广泛应用于临床检测中。但随着医学的飞速发展,对于检验医学的要求越来越精确量化,同时对体外诊断试剂产品的质量性能如稳定性、灵敏度、特异性、检测线性范围等也提出了更高要求。本发明在现有的胶乳免疫比浊法的基础上,通过特定的制备方法以及添加抗冻剂等优化反应体系,进一步提高了测定试剂的分析灵敏度及精密度,同时保证了试剂的稳定性,即使C反应蛋白(CRP)测定试剂盒的温度低于0℃,甚至低于-20℃贮存一周,也能实现对CRP的准确检测,且未提高试剂研发成本,更易适应现代化临床检验医学的发展。

[0012] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种C反应蛋白CRP测定试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;其中,所述试剂R1包括缓冲液、无机盐、表面活性剂、稳定剂和防腐剂;所述试剂R2包括缓冲液、表面活性剂、封闭剂、抗人CRP抗体胶乳结合物和防腐剂。

[0013] 优选地,所述试剂R2还包括抗冻剂。

[0014] 优选地,所述试剂R1中各组分的浓度为:缓冲液15~150mmol/L、无机盐5~50g/L、表面活性剂5~50g/L、稳定剂5~100g/L和防腐剂0.05~2g/L。

[0015] 优选地,所述试剂R2中各组分的浓度为:缓冲液90~200mmol/L、表面活性剂5~25g/L、封闭剂5~25g/L、抗人CRP抗体胶乳结合物5~15g/L和防腐剂0.05~2g/L。

[0016] 优选地,所述抗冻剂浓度为10g/L,所述抗冻剂为赤藓糖醇。

[0017] 优选地,所述试剂R1和所述试剂R2中的所述缓冲液选自TRIS/HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、PBS缓冲液、MES缓冲液、硼砂缓冲液中的至少一种。

[0018] 优选地,所述试剂R1和所述试剂R2中的所述表面活性剂选自吐温-20、吐温80、十二烷基硫酸钠、曲拉通X-100中的至少一种。

[0019] 优选地,所述试剂R1和所述试剂R2中的所述防腐剂选自叠氮化钠、庆大霉素、硫柳汞、Proclin300中的至少一种。

[0020] 优选地,所述试剂R1中的无机盐选自KCl、CaCl<sub>2</sub>、NaCl、BaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>中的至少一种。

[0021] 优选地,所述试剂R1中的稳定剂选自蔗糖、乙二胺四乙酸二钠、海藻糖、甘油、明胶中的至少一种。

[0022] 优选地,所述试剂R2中的封闭剂选自小牛血清白蛋白、明胶、吐温-20、酪蛋白中的至少一种。

[0023] 本发明所述的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒的制备方法,其中,所述试剂R1中的各组分按照常规方法制备;所述试剂R2中的缓冲液、表面活性剂、封闭剂和防腐剂按照常规方法制备;所述R2试剂中的抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法包括如下步骤:

[0024] (1) 取羧基化的胶乳微球用甘氨酸缓冲液稀释5倍;

[0025] (2) 往步骤(1)的溶液中加入N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐进行活化,搅拌均匀后进行孵育;

[0026] (3) 往步骤(2)的溶液中加入磷酸盐缓冲液,室温搅拌混匀;

[0027] (4) 往步骤(3)的溶液中加入抗人CRP多克隆抗体,然后37℃孵育2~4小时;

[0028] (5) 加入终止液终止反应,室温下搅拌2~3小时后,2~8℃保存备用,所述终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0029] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述步骤(1)中,所述羧基化的胶乳微球的粒径为100~150nm、固含量为10%;

[0030] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述羧基化的胶乳微球的粒径为100nm。

[0031] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述步骤(2)中,所述N-羟基丁二酰亚胺的规格为0.5~3mL、20~30g/L,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的规格为1~3mL、8~10g/L,所述3孵育温度为37℃,所述孵育时间为15~25min;

[0032] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述步骤(3)中,所述磷酸盐缓冲液的加入量为1~5mL;

[0033] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述步骤(4)中,所述抗人CRP多克隆抗体的加入的量0.1~3.0g。

[0034] 所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法操作步骤的优选实施方式,所述抗人CRP多克隆抗体为羊抗人C反应蛋白抗体、兔抗人C反应蛋白抗体、鼠抗人C反应蛋白抗体中的一种。

[0035] 本发明所述的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒在检测C反应蛋白(CRP)中的应用。

[0036] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0037] (1) 本发明提供的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒在现有的胶乳免疫比浊法的基础上,通过特定的制备方法以及抗冻剂优化反应体系,进一步提高了测定试剂的检测准确度、分析灵敏度及精密性,且未提高试剂研发成本,更易适应现代化临床检验医学的发展;

[0038] (2) 本发明提供的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒特地添加了抗冻剂赤藓糖醇,并调

整其用量为10g/L,有效提高了试剂的抗冻性和稳定性,即使C反应蛋白(CRP)测定试剂盒的温度低于0℃,甚至低至-20℃贮存1周,也能有效保证其试剂的稳定性,同时其检测灵敏度高、特异性强、精密度好、成本较低,可以实现对CRP的准确检测;

[0039] (3) 本发明试剂盒可在具备有400-800nm波长的全自动生化分析仪上检测C反应蛋白(CRP)的含量,直接上机使用,快速精准,自动化程度高,大大提高工作效率,且在检测样本量少时,可进行少量样本和急诊样本的测定。

### 具体实施方式

[0040] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0041] 实施例1

[0042] 本实施例为本发明的一种C反应蛋白(CRP)测定试剂盒

[0043] 一种C反应蛋白(CRP)测定试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;

[0044] 试剂R1包括的组分:

[0045]	TRIS/HCl缓冲液	100mmol/L
	NaCl	25g/L
	吐温-20(Tween-20)	10g/L
	蔗糖	10g/L
	叠氮钠	0.5g/L

[0046] 试剂R2包括的组分如下:

	TRIS/HCL 缓冲液	150mmol/L
[0047]	吐温-20 (Tween-20)	10g/L
	小牛血清白蛋白 (BSA)	25g/L
	抗人 CRP 抗体胶乳结合物	10g/L
[0048]	赤藓糖醇	10g/L
	叠氮钠	0.5g/L

[0049] 上述C反应蛋白(CRP)测定试剂盒的制备方法:上述试剂R1中的各组分按照常规方法制备,上述试剂R2中的TRIS/HCL缓冲液、吐温-20(Tween-20)、小牛血清白蛋白(BSA)、赤藓糖醇和叠氮钠按照常规方法制备;上述R2试剂中的抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法包括如下步骤:

[0050] 上述试剂R2中的所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法,包括以下步骤:

[0051] (1) 取1mL羧基化的胶乳微球(100nm,10%固含量)用甘氨酸缓冲液稀释至5ml;

[0052] (2) 往步骤(1)的溶液中加入1.5ml 25g/L的N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和1.5ml 9.0g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)进行活化,搅拌均匀后37℃孵育20min;

[0053] (3) 往步骤(2)的溶液中加入3mL磷酸盐缓冲液,室温搅拌均匀;

[0054] (4) 往步骤(3)的溶液中加入1.3g羊抗人C反应蛋白抗体,37℃孵育4小时;

[0055] (5) 加入终止液终止反应, 室温下搅拌3小时后, 4℃保存备用, 终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例为本发明的一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒

[0058] 一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒, 包括试剂R1和试剂R2;

[0059] 试剂R1包括的组分:

[0060]	TRIS/HCl缓冲液	100mmol/L
	NaCl	25g/L
	吐温-20 (Tween-20)	10g/L
	蔗糖	10g/L
	叠氮钠	0.5g/L

[0061] 试剂R2包括的组分:

[0062]	TRIS/HCL缓冲液	150mmol/L
	吐温-20 (Tween-20)	10g/L
	小牛血清白蛋白 (BSA)	25g/L
	抗人CRP抗体胶乳结合物	10g/L
	叠氮钠	0.5g/L

[0063] 上述C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒的制备方法: 上述试剂R1中的各组分按照常规方法制备, 上述试剂R2中除抗人CRP抗体胶乳结合物之外的各组分均按照常规方法制备; 上述试剂R2中的所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法, 包括以下步骤:

[0064] (1) 取1mL羧基化的胶乳微球 (100nm, 10%固含量) 用甘氨酸缓冲液稀释5倍;

[0065] (2) 往步骤 (1) 的溶液中加入1.5ml 25g/L的N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和1.5ml 9.0g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 进行活化, 搅拌均匀后37℃孵育20min;

[0066] (3) 往步骤 (2) 的溶液中加入3mL磷酸盐缓冲液, 室温搅拌均匀;

[0067] (4) 往步骤 (3) 的溶液中加入1.3g羊抗人C反应蛋白抗体, 37℃孵育4小时;

[0068] (5) 加入终止液终止反应, 室温下搅拌3小时后, 4℃保存备用, 终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0069] 实施例3

[0070] 本实施例为本发明的一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒

[0071] 一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒, 包括试剂R1和试剂R2;

[0072] 试剂R1包括的组分:

[0073]	磷酸盐缓冲液	100mmol/L
	PBS 缓冲液	50mmol/L
	KCl	25g/L

[0074]	CaCl <sub>2</sub>	25g/L
	吐温 80	50g/L
	蔗糖	80g/L
	庆大霉素	2g/L

[0075] 试剂R2包括的组分如下：

[0076]	甘氨酸缓冲液	150mmol/L
	磷酸盐缓冲液	50mmol/L
	吐温80	25g/L
	酪蛋白	25g/L
	抗人CRP抗体胶乳结合物	7g/L
	赤藓糖醇	10g/L
	硫柳汞	2g/L

[0077] 上述C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒的制备方法：上述试剂R1中的各组分按照常规方法制备，上述试剂R2中除抗人CRP抗体胶乳结合物之外的各组分均按照常规方法制备；上述试剂R2中的所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法，包括以下步骤：

[0078] (1) 取1mL羧基化的胶乳微球 (150nm, 10%固含量) 用甘氨酸缓冲液稀释5倍；

[0079] (2) 往步骤 (1) 的溶液中加入0.5ml 20g/L的N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和1ml 8g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 进行活化，搅拌均匀后37℃孵育15min；

[0080] (3) 往步骤 (2) 的溶液中加入1mL磷酸盐缓冲液，室温搅拌均匀；

[0081] (4) 往步骤 (3) 的溶液中加入0.1g鼠抗人C反应蛋白抗体，37℃孵育2小时；

[0082] (5) 加入终止液终止反应，室温下搅拌2小时后，4℃保存备用，终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0083] 实施例4

[0084] 本实施例为本发明的一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒

[0085] 一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒，包括试剂R1和试剂R2；

[0086] 试剂R1包括的组分：

[0087]	MES缓冲液	15mmol/L
	BaCl <sub>2</sub>	5g/L
	十二烷基硫酸钠	5g/L
	乙二胺四乙酸二钠	8g/L
	甘油	10g/L
	Proclin300	0.05g/L

[0088] 试剂R2包括的组分如下：

[0089]	MES缓冲液	90mmol/L
	吐温-20 (Tween-20)	5g/L
	小牛血清白蛋白 (BSA)	15g/L

明胶	5g/L
抗人CRP抗体胶乳结合物	5g/L
赤藓糖醇	10g/L
Proclin300	0.5g/L

[0090] 上述C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒的制备方法:上述试剂R1中的各组分按照常规方法制备,上述试剂R2中除抗人CRP抗体胶乳结合物之外的各组分均按照常规方法制备;上述试剂R2中的所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法,包括以下步骤:

[0091] (1) 取1mL羧基化的胶乳微球 (120nm,10%固含量) 用甘氨酸缓冲液稀释5倍;

[0092] (2) 往步骤(1)的溶液中加入3ml 30g/L的N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和3ml 10g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 进行活化,搅拌均匀后37℃孵育25min;

[0093] (3) 往步骤(2)的溶液中加入5mL磷酸盐缓冲液,室温搅拌均匀;

[0094] (4) 往步骤(3)的溶液中加入3g鼠抗人C反应蛋白抗体,37℃孵育4小时;

[0095] (5) 加入终止液终止反应,室温下搅拌3小时后,2℃保存备用,终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0096] 实施例5

[0097] 本实施例为本发明的一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒

[0098] 一种C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;

[0099] 试剂R1包括的组分:

硼砂缓冲液	100mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	25g/L
AlCl <sub>3</sub>	5g/L
曲拉通X-100	20g/L
海藻糖	90g/L
明胶	8g/L
P300	0.1g/L

[0101] 试剂R2包括的组分如下:

硼砂缓冲液	150mmol/L
吐温-20 (Tween-20)	10g/L
小牛血清白蛋白 (BSA)	15g/L
抗人CRP抗体胶乳结合物	15g/L
P300	1g/L

[0103] 上述C反应蛋白 (CRP) 测定试剂盒的制备方法:上述试剂R1中的各组分按照常规方法制备,上述试剂R2中除抗人CRP抗体胶乳结合物之外的各组分均按照常规方法制备;上述试剂R2中的所述抗人CRP抗体胶乳结合物的制备方法,包括以下步骤:

[0104] (1) 取1mL羧基化的胶乳微球 (100nm,10%固含量) 用甘氨酸缓冲液稀释5倍;

[0105] (2) 往步骤(1)的溶液中加入2.5ml 25g/L的N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和2.5ml 8.5g/L的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 进行活化,搅拌均匀后37℃孵育20min;

[0106] (3) 往步骤(2)的溶液中加入4mL磷酸盐缓冲液,室温搅拌均匀;

[0107] (4) 往步骤(3)的溶液中加入2g羊抗人C反应蛋白抗体,37℃孵育3小时;  
 [0108] (5) 加入终止液终止反应,室温下搅拌3小时后,8℃保存备用,终止液为含20%BSA的磷酸盐缓冲液。

[0109] 实验例1

[0110] 本实验例1为本发明试剂盒检测CRP的准确度分析

[0111] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0112] 检测样本:40例随机血清样本和一份CRP血清样本(靶值为8.0mg/L)

[0113] 对照试剂盒:国家食品药品监督管理局已批准上市的某厂家CRP检测试剂盒(胶乳免疫比浊法)(包括试剂R1和R2,但成分与本发明不同,以下简称为对照试剂)

[0114] 实验方法:将本发明实施例1、实施例2检测试剂同时放入2~8℃(正常存放条件为2~8℃)、-20℃冷冻1天(24h)、-20℃冷冻7天进行抗冻试验,分别同时定标后用本领域的常规检测方法同时测定40例血清样品,以考察其组分的抗冻性能,实验结果如表1所示;表1中检测的CRP含量的单位为mg/L。

[0115] 平均下降幅度=(未冷冻时的均值-冷冻一定天数的均值)/未冷冻时的均值。

[0116] 表1实施例1和2试剂盒对不同温度存放下的CRP血清样本检测结果

[0117]

检测试剂	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

[0118]

实 施 例 1	未冷冻	7.68	26.86	12.15	8.89	2.49	6.25	3.80	8.55	3.42	16.07
	冷冻 1天	7.49	26.54	11.87	8.63	2.21	6.24	3.55	8.23	3.19	15.74
	冷冻 7天	6.87	25.81	11.27	7.81	1.85	6.22	2.81	7.62	2.89	14.82
	样品 序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未冷冻	32.82	1.85	5.77	3.77	8.13	50.73	12.24	7.76	6.45	8.09
	冷冻 1天	32.61	1.68	5.54	3.56	7.85	49.96	11.62	7.05	5.82	7.67
	冷冻 7天	31.88	1.27	5.11	3.14	7.49	49.57	11.38	6.83	5.38	7.41
	样品 序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未冷冻	47.02	3.07	24.44	7.58	2.43	5.42	12.15	52.43	4.98	35.65
	冷冻 1天	46.40	2.74	24.05	7.24	2.20	4.80	11.51	52.10	4.61	35.32
	冷冻 7天	45.99	2.67	23.88	6.81	2.07	4.37	11.27	51.85	4.31	35.18
	样品 序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未冷冻	7.11	7.21	42.58	4.61	32.34	1.67	25.79	22.64	4.87	11.25
	冷冻 1天	6.75	6.98	42.13	4.58	32.01	1.34	25.35	22.20	4.55	11.06
	冷冻 7天	6.00	6.75	41.48	4.54	31.88	1.12	25.02	21.87	4.19	10.87
检 测 试 剂	样品 序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

[0119]	实施例2	未冷冻	7.61	26.76	11.95	8.79	2.45	6.12	3.71	8.43	3.35	15.88
		冷冻 1天	3.03	17.27	5.04	3.02	0.16	1.97	1.11	3.01	0.75	8.27
		冷冻 7天	2.45	16.80	4.31	2.56	0.09	1.56	0.61	2.49	0.39	7.61
		样品 序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		未冷冻	32.72	1.79	5.69	3.74	7.95	50.71	12.11	7.71	6.21	7.98
		冷冻 1天	25.22	0.19	2.07	1.00	3.26	43.25	6.86	3.02	1.81	2.44
		冷冻 7天	24.61	0.06	1.49	0.67	2.79	42.46	6.44	2.11	1.40	1.30
		样品 序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
		未冷冻	46.89	3.01	24.41	7.51	2.34	5.34	12.10	52.34	4.81	35.51
		冷冻 1天	39.51	0.86	16.06	2.10	0.61	2.02	5.65	43.14	1.01	26.51
		冷冻 7天	39.33	0.56	15.62	1.64	0.25	1.51	4.85	42.77	0.58	25.14
		样品 序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
		未冷冻	7.10	7.11	42.51	4.51	32.21	1.58	25.69	22.61	4.78	11.14
		冷冻 1天	2.19	2.08	34.43	1.19	26.31	0.55	16.37	16.41	1.01	5.39
		冷冻 7天	1.40	1.69	33.87	0.60	25.61	0.29	15.67	15.66	0.75	4.78

[0120] 从表1可知,未冷冻时,实施例1、2的40例样品检测结果平均值分别为14.73mg/L、14.63mg/L,二者检测结果基本相当;经-20℃冷冻处理1天后,实施例1的检测结果平均值为14.37mg/L,实施例2的检测结果平均值为9.40mg/L;经-20℃冷冻处理7天后,实施例1的检测结果平均值为13.99mg/L,实施例2的检测结果平均值为8.87mg/L。

[0121] 实施例2经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果均显著下降,平均下降幅度达到了35.82%,而实施例1由于含有一定量的赤藓糖醇作为抗冻剂,经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果平均下降幅度仅为2.44%,属于合理范围,且较实施例2有明显改善;经-20℃冷冻处理7天后的实施例1、2的样品检测结果平均下降幅度分别为5.02%和39.37%,与经-20℃冷冻处理1天后的样品检测结果无明显差异,可能原因:试剂在-20℃冷冻处理1-7天,

试剂均处于稳定状态,试剂组分变化小。

[0122] 以上结果表明,添加赤藓糖醇的实施例1试剂抗冻性能好于未添加赤藓糖醇的实施例2,可见,赤藓糖醇作为一种抗冻剂增强了试剂的抗冻能力,在试剂冷链运输过程中能有效保证试剂的稳定性。

[0123] 实验例2

[0124] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0125] 检测样本:一份CRP血清样本(靶值为8.0mg/L)

[0126] 对照试剂盒:国家食品药品监督管理局已批准上市的某厂家CRP检测试剂盒(胶乳免疫比浊法)(包括试剂R1和R2,但成分与本发明不同,以下简称为对照试剂)

[0127] 本实验例用实施例1、2的试剂和对比试剂按本领域的常规检测方法分别同时定标后同时检测一份CRP血清样本(靶值为8.0mg/L),实验结果如表2。

[0128] 表2实施例1和2的试剂与对比试剂按同时定标后同时检测一份CRP血清样本

[0129]	检测试剂	样本靶值	检测次数			平均值	相对偏差 (%)
	实施例 1	8.0	7.93	7.94	7.92	7.93	0.88
实施例 2	7.89		7.89	7.9	7.89	1.33	
对照试剂	7.94		7.95	7.92	7.94	0.79	

[0130] 由表2的结果显示,根据实施例1、2检测结果计算出的相对偏差分别为0.88%、1.33%,表明本发明所述试剂盒检测CRP的检测结果与对照试剂盒结果无明显差异,具有较高准确度(符合度),而且实施例1为最优的选择。

[0131] 实验例3

[0132] 本实验例为本发明试剂盒的检测CRP的灵敏度分析

[0133] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0134] 检测样本:1份纯化水、1份浓度为3.05mg/L的CRP低值样本

[0135] 实验方法:用实施例1的试剂和对照试剂(某厂家检测试剂盒)用各自的检测方法同时定标同时对每份待测样本重复检测20次,记录吸光度数值,计算平均值和标准偏差(SD);水的吸光度平均值加上2SD作为最低检出限对应的吸光度值,由于吸光度与浓度的关系基本为线性关系,可以通过和3.05mg/L样本的吸光度平均值比较计算出最低检测限的浓度,即灵敏度。检测结果见表3。

[0136] 灵敏度 = (水吸光度差值平均值 + 2SD) \* 样本浓度 / 样本吸光度差值平均值

[0137] 表3实施例1试剂与对照试剂灵敏度分析结果(单位:mg/L)

检测次数	实施例 1 试剂检测结果		对照试剂检测结果	
	水的吸光度差值	低值样本 (3.05 mg/L) 吸光度差值	水的吸光度差值	低值样本 (3.05mg/L)吸光度差值
[0138] 1	17	198.5	18	101
2	11	235	12	115
3	9	285	19	103
4	15	240	16	114
5	13	264	15	99
6	12	239	8	108
7	10	245	17	121
8	11	253	16	147
[0139] 9	9	269	15	132
10	13	340	17	141
11	14	236	14	128
12	15	242	19	137
13	9	199	13	107
14	10	309	13	116
15	13	278	26	114
16	16	269	17	104
17	11	189	16	131
18	15	260	15	149
19	14	315	19	107
20	13	267	15	109
平均值	12.500	256.625	16.000	217.735
SD	2.44	38.36	3.55	37.01
灵敏度	0.21		0.32	

[0140] 由表3的结果显示,本发明实施例1的灵敏度为0.21mg/L,对照试剂的灵敏度为0.32mg/L,表明本发明提供的试剂盒检测CRP具有较高的灵敏度。

[0141] 实验例4

[0142] 本实验例为本发明试剂盒检测CRP的精密度分析:

[0143] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪;

[0144] 检测样本:1份临床血清样本(低值样本)、1份CRP血清样本20.50mg/L(高值样

本)；

[0145] 实验方法：用实施例1的试剂盒对每份待测样本按照本领域的常规检测方法重复检测10次，检测结果见表4。

[0146] 表4实施例1精剂和密度分析结果(单位:mg/L)

检测次数	实施例 1		实施例 2	
	低值	高值	低值	高值
1	7.47	20.49	7.53	20.61
2	7.45	20.47	7.57	20.39
3	7.47	20.45	7.46	20.56
4	7.53	20.45	7.45	20.41
5	7.55	20.50	7.46	20.38
6	7.49	20.55	7.59	20.52
7	7.47	20.52	7.49	20.36
8	7.53	20.55	7.55	20.53
9	7.48	20.53	7.53	20.60
10	7.46	20.53	7.56	20.40
平均值	7.490	20.53	7.519	20.476
标准差	0.034	0.043	0.051	0.097
CV (%)	0.46	0.21	0.67	0.48

[0149] 结果显示，本发明的精密度：CV低值为0.46%、CV高值为0.21%，均小于等于10%，而对照试剂CV低值为0.67%、CV高值为0.48%，表明本发明所述试剂盒检测CRP具有较高的精密度。

[0150] 实验例5

[0151] 本实验例为本发明试剂盒检测CRP的稳定性分析(不同检测试剂的加速稳定性考察)

[0152] 试验仪器：日立7170全自动生化分析仪；

[0153] 检测样本：40例随机血清样本；

[0154] 实验方法：将2~8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的本发明实施例1检测试剂进行37度加速破坏性实验，以考察其组分的稳定性，结果如表6所示，(单位:mg/L)。

[0155] 平均下降幅度=(未加速时的均值-加速1周的均值)/未加速时的均值。

[0156] 表5实施例1的试剂盒经加速破坏性实验1周后对样品检测结果

[0157]

检测试剂	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2~8℃	未加速	4.37	37.06	2.15	60.08	2.46	6.25	33.86	0.59	13.45	6.14
	加速1周	4.30	36.90	2.10	60.96	2.32	6.12	33.76	0.48	13.34	5.95
	样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未加速	28.89	1.91	15.79	3.80	8.23	20.79	20.29	7.79	6.45	8.08
	加速1周	28.74	1.79	15.64	3.70	8.12	20.67	20.15	7.68	6.38	7.93
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未加速	17.06	30.20	4.52	17.65	2.43	50.49	20.20	4.98	20.43	15.65
	加速1周	16.95	30.06	4.39	17.55	2.35	50.39	20.09	4.90	20.32	15.57
	样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未加速	70.79	7.29	27.70	4.69	2.41	5.89	18.87	2.72	40.93	1.35
	加速1周	70.66	7.19	27.63	4.58	2.30	5.76	18.70	2.60	40.84	1.27
	-20℃冷冻1天	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
未加速		4.34	36.98	2.09	60.00	2.40	6.18	33.79	0.50	13.35	6.05
加速1周		4.19	36.81	1.91	59.88	2.21	6.02	33.67	0.39	13.21	5.87
样品序号		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
未加速		28.78	1.80	15.66	3.71	8.08	20.70	20.17	7.66	6.38	8.01
加速		28.65	1.68	15.51	3.62	8.01	20.61	20.03	7.51	6.27	7.85

[0158]	1周										
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	未加速	16.94	30.00	4.40	17.51	2.40	50.40	20.10	4.91	20.32	15.60
	加速1周	16.88	29.91	4.31	17.39	2.30	50.32	20.01	4.82	20.25	15.49
	样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	未加速	70.63	7.19	27.59	4.58	2.29	5.74	18.63	2.60	40.83	1.23
	加速1周	70.59	7.12	27.51	4.50	2.22	5.70	18.60	2.57	40.76	1.20
	样品序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	未加速	4.18	36.83	2.00	59.86	2.29	6.10	33.65	0.40	13.25	5.90
	加速1周	4.06	36.66	1.85	59.72	2.13	5.87	33.56	0.30	13.10	5.76
	样品序号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	未加速	28.65	1.70	15.61	3.62	7.97	20.54	20.03	7.51	6.30	7.83
	加速1周	28.54	1.53	15.40	3.50	7.82	20.40	19.82	7.40	6.16	7.62
	样品序号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
未加速	16.86	29.82	4.28	17.40	2.25	50.31	20.02	4.82	20.27	15.47	
加速1周	16.70	29.60	4.13	17.23	2.10	50.10	19.86	4.67	20.01	15.31	
样品序号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
未加速	70.50	7.10	27.42	4.37	2.17	5.57	18.50	2.42	40.72	1.14	
加速1周	70.32	7.01	27.30	4.16	2.03	5.38	18.34	2.28	40.60	1.01	

[0159] 从表6可知,未加速时,2~8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的实施例1的40例样品检测结果平均值分别为16.37mg/L、16.26mg/L、16.14mg/L,三者结果无明显差异;经37度加速破坏性实验1周后,2~8℃、-20℃冷冻1天、-20℃冷冻7天的实施例1的检测结果平均值分别为16.28mg/L、16.16mg/L、15.98mg/L,较未加速时,检测结果平均值下降幅度分别为0.55%、0.62%、1.00%,均小于10%,属于合理范围。

[0160] 以上结果表明,实施例1由于含有一定量的赤藓糖醇作为抗冻剂,经-20℃冷冻1

天、-20℃冷冻7天,再经破坏性实验1周后的样品检测结果均未发生明显变化,且与2~8℃的检测结果基本相当,属于合理范围。可见赤藓糖醇的添加不仅增强了试剂的抗冻性,也能有效的保证试剂的稳定性。

[0161] 实验例6

[0162] 本实验例为本发明试剂盒检测CRP的线性分析

[0163] 试验仪器:日立7170全自动生化分析仪

[0164] 检测样本:高CRP血清样本(95.0mg/L)

[0165] 实验方法:将高CRP血清样本(95.0mg/L)用校准品稀释液稀释成6个不同浓度,分别为0mg/L、19mg/L、38mg/L、57mg/L、76mg/L、95mg/L,采用实施例一的检测方法对上述样品的每个浓度进行检测,每个浓度检测三次,计算相关系数R值,实施例1的检测样本的线性结果见表5。

[0166] 表6实施例1线性分析结果(单位:mg/L)

理论值(mg/L)	检测值(mg/L)			检测平均值(mg/L)
0.00	0.10	0.00	0.07	0.043
19	17.69	17.26	17.54	17.497
38	37.26	36.29	36.16	36.570
57	55.01	55.92	55.21	55.380
76	74.21	73.34	74.06	73.870
95	94.32	94.02	93.22	93.853
回归方程式	$y = 0.9878x - 0.7179$			
$R^2$	$R^2 = 0.9997$			

[0168] 结果显示,根据实施例1检测结果得到的回归方程为 $y = 0.9878x - 0.7179$ ,相关系数 $R^2 = 0.9997$ ,表明本发明试剂在0mg/L~95.0mg/L范围内具有良好的线性度。

[0169] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

专利名称(译)	一种C反应蛋白测定试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110646618A</a>	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201910876430.2	申请日	2019-09-17
[标]发明人	刘光华 杨玉军		
发明人	刘光华 杨玉军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/536 G01N21/82 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/82 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/54313 G01N33/6854 G01N2800/7095		
代理人(译)	颜希文		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种C反应蛋白(CRP)测定试剂盒及其制备方法和应用,属于体外诊断试剂技术领域。本发明提供的C反应蛋白CRP测定试剂盒,包括试剂R1和试剂R2;其中,所述试剂R1包括缓冲液、无机盐、表面活性剂、稳定剂和防腐剂;所述试剂R2包括缓冲液、表面活性剂、封闭剂、抗人CRP抗体胶乳结合物和防腐剂。本发明提供的C反应蛋白(CRP)测定试剂盒在现有的胶乳免疫比浊法的基础上,通过特定的制备方法以及抗冻剂优化反应体系,进一步提高了测定试剂的检测准确度、分析灵敏度及精密度,且未提高试剂研发成本,更易适应现代化临床检验医学的发展。

TRIS/HCL 缓冲液	150mmol/L
吐温-20 (Tween-20)	10g/L
小牛血清白蛋白 (BSA)	25g/L
抗人 CRP 抗体胶乳结合物	10g/L