



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102809654 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201210302775. 5

(22) 申请日 2012. 08. 23

(71) 申请人 上海睿康生物科技有限公司

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 室、302 室

(72) 发明人 房君江 李伟奇 张秀文 林清玉

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/536 (2006. 01)

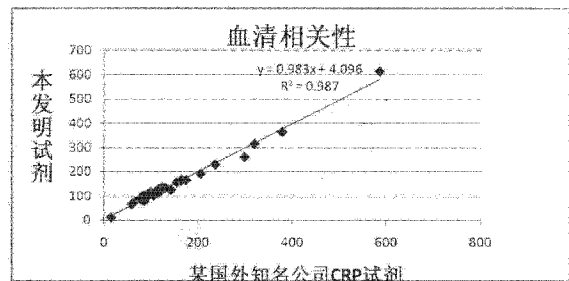
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒

(57) 摘要

一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒, 它涉及医学免疫体外诊断领域, 它由 R1 试剂、R2 试剂及校准品三部分组成, R1 试剂为磷酸盐缓冲体系, 其质量比组成为: pH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液 30-80mmol/l、聚乙二醇 6000-1000060-120mm/l 和乙二胺四乙酸二钠 10-20mmol/L ; R2 试剂为抗体致敏颗粒悬浮液, 其组成为复合 CRP 抗体致敏颗粒, pH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液和乙二胺四乙酸二钠等 ; 校准品为牛血清基质, 包括叠氮钠 0.2-2.2%、吐温 -20 1-10%、牛血清白蛋白 1-3%, 它采用复合胶乳颗粒包被抗体, 灵敏度高, 能够检测到 0.2mg/l 样本, 提高了线性值。



1. 一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒,其特征在於它由 R1 试剂、R2 试剂及校准品三部分组成,R1 试剂为磷酸盐缓冲体系,其质量比组成为:PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液 30-80mmol/l、聚乙二醇 6000-1000060-120mm/l 和乙二胺四乙酸二钠 10-20mmol/l;R2 试剂为抗体致敏颗粒悬浮液,其组成为复合 CRP 抗体致敏颗粒,PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液和乙二胺四乙酸二钠等;校准品为牛血清基质,包括叠氮钠 0.2-2.2%、吐温 -20 1-10%、牛血清白蛋白 1-3%,上述的百分比为人血清基质体积用量的百分比。

2. 根据权利要求 1 所述的一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒,其特征在於所述的试剂 R2 中 2 种复合 CRP 抗体致敏颗粒,特征为小粒径胶乳颗粒直径在 40-100nm 之间,大粒径胶乳颗粒直径在 150-190nm 之间。

3. 根据权利要求 1 所述的一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒,其特征在於所述的试剂 R2 抗体包被过程中,大粒径胶乳与小粒径胶乳以 1/3-1/6 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和聚苯乙烯胶乳包被质量比为 1/10-6/10。

4. 根据权利要求 1 所述的一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒,其特征在於所述的试剂 R2 的制备方法为:将 156nm 的聚苯乙烯胶乳粒子与 61nm 的聚苯乙烯胶乳粒子按照 1 : 5 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和混合后的聚苯乙烯胶乳以 50 : 100 的质量比混合,缓冲液采用 0.02M 的磷酸缓冲液,将两者混匀后 37°C 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% 脱脂奶粉、0.2mm 的甘氨酸,封闭 2 小时,离心去上清,用 PH7.4 磷酸盐缓冲液 45mmol/l,乙二胺四乙酸二钠 10.2mmol/l,0.05% 脱脂奶粉,0.9% NaN₃ 稀释至 0.18%。

5. 根据权利要求 1 所述的一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒,其特征在於所述的校准品制备方法为:将经过处理的牛血清,加入 BAS 0.1%, NaN₃0.9% 得到校准品稀释液,用重组 CRP 蛋白溶于制备的类似人血清基质的溶液,制备不同浓度的标准品。

一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及医学免疫体外诊断领域，具体涉及一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒。

背景技术：

[0002] C 反应蛋白，1930 年 Tillet 和 Francis 在急性大叶性肺炎患者血清中发现能在钙离子存在时与肺炎球菌 C 多糖起沉淀反应而得名，是人类重要的急性期反应蛋白，急性期浓度可升高上千倍，循环中的 CRP 半衰期为 19 小时。人类 CRP 是由肝脏产生，由五个相同的亚基依靠非共价键形成的环状五聚体，这一特征性结构使其归类于五聚素（一组具有免疫防御特性的钙结合蛋白）家族。低等动物同样存在 CRP，如在鲨、河蚌等中也发现过，但并不一定起急性期反应蛋白的作用。CRP 特征反应是能在钙离子存在的条件下特异性结合磷酸胆碱基团。

[0003] 胶乳颗粒增强比浊法是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。PETIA 法大体分为两种。一种是散射比浊检测法；另一种是透射比浊检测法。这两种方法的基本原理非常相似，都是在高分子胶乳微球的表面交联单克隆抗体，当交联有抗体的微球与抗原结合后，在短时间内会迅速聚集在一起，改变了反应液的散光性能或透光性能。而且，反应液散光性能或透光性能（即吸光度）的改变与被测抗原的浓度有较强的相关性，在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA 检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定。

[0004] 由于血清 CRP 的含量分布差异较大从零点几毫克每升到几百毫克每升，其测定方法需要较高的灵敏度和特异性。目前，免疫比浊法是最为普遍通用的方法，但是免疫比浊法最高检测限只能达到 8mg/l，线性只能达到 150mg/l，在临床应用上存在着局限性。

发明内容：

[0005] 本发明的目的是提供一种双粒子复合的 C- 反应蛋白检测试剂盒，它采用复合胶乳颗粒包被抗体，灵敏度高，能够检测到 0.2mg/l 样本，提高了线性值，同时大大提高了抗体的纯度和效价，最大限度避免了非特异反应，使结果准确性有了较大提高。

[0006] 为了解决背景技术所存在的问题，本发明是采用以下技术方案：它由 R1 试剂、R2 试剂及校准品三部分组成，R1 试剂为磷酸盐缓冲体系，其质量比组成为：PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液 30-80mmol/l、聚乙二醇 6000-1000060-120mmol/l 和乙二胺四乙酸二钠 10-20mmol/L；R2 试剂为抗体致敏颗粒悬浮液，其组成为复合 CRP 抗体致敏颗粒，PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液和乙二胺四乙酸二钠等；校准品为牛血清基质，包括叠氮钠 0.2-2.2%、吐温-20 1-10%、牛血清白蛋白 1-3%，上述的百分比为人血清基质体积用量的百分比。

[0007] 所述的试剂 R2 中 2 种复合 CRP 抗体致敏颗粒，特征为小粒径胶乳颗粒直径在 40-100nm 之间，大粒径胶乳颗粒直径在 150-190nm 之间；

[0008] 所述的试剂 R2 抗体包被过程中,大粒径胶乳与小粒径胶乳以 1/3-1/6 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和聚苯乙烯胶乳包被质量比为 1/10-6/10。

[0009] 所述的试剂 R2 的制备方法为:将 156nm 的聚苯乙烯胶乳粒子与 61nm 的聚苯乙烯胶乳粒子按照 1 : 5 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和混合后的聚苯乙烯胶乳以 50 : 100 的质量比混合,缓冲液采用 0.02M 的磷酸缓冲液,将两者混匀后 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% 脱脂奶粉、0.2mm 的甘氨酸,封闭 2 小时,离心去上清,用 PH7.4 磷酸盐缓冲液 45mmol/l,乙二胺四乙酸二钠 10.2mmol/l,0.05% 脱脂奶粉,0.9% NaN₃ 稀释至 0.18%。

[0010] 所述的校准品制备方法为:将经过处理的牛血清,加入 BAS 0.1%,NaN₃ 0.9% 得到校准品稀释液,用重组 CRP 蛋白溶于制备的类似人血清基质的溶液,制备不同浓度的标准品。

[0011] 本发明具有以下有益效果:它采用复合胶乳颗粒包被抗体,灵敏度高,能够检测到 0.2mg/l 样本,提高了线性值,同时大大提高了抗体的纯度和效价,最大限度避免了非特异反应,使结果准确性有了较大提高。

附图说明:

[0012] 图 1 为本发明中实施例的结构示意图。

具体实施方式:

[0013] 本具体实施方式采取以下技术方案:它由 R1 试剂、R2 试剂及校准品三部分组成,R1 试剂为磷酸盐缓冲体系,其质量比组成为:PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液 30-80mmol/l、聚乙二醇 6000-1000060-120mm/l 和乙二胺四乙酸二钠 10-20mmol/L;R2 试剂为抗体致敏颗粒悬浮液,其组成为复合 CRP 抗体致敏颗粒,PH = 7.0-7.6 的磷酸盐缓冲液和乙二胺四乙酸二钠等;校准品为牛血清基质,包括叠氮钠 0.2-2.2%、吐温 -201-10%、牛血清白蛋白 1-3%,上述的百分比为人血清基质体积用量的百分比。

[0014] 所述的试剂 R2 中 2 种复合 CRP 抗体致敏颗粒,特征为小粒径胶乳颗粒直径在 40-100nm 之间,大粒径胶乳颗粒直径在 150-190nm 之间;

[0015] 所述的试剂 R2 抗体包被过程中,大粒径胶乳与小粒径胶乳以 1/3-1/6 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和聚苯乙烯胶乳包被质量比为 1/10-6/10。

[0016] 所述的试剂 R2 的制备方法为:将 156nm 的聚苯乙烯胶乳粒子与 61nm 的聚苯乙烯胶乳粒子按照 1 : 5 的比例混合,羊抗人 CRP 多克隆抗体和混合后的聚苯乙烯胶乳以 50 : 100 的质量比混合,缓冲液采用 0.02M 的磷酸缓冲液,将两者混匀后 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% 脱脂奶粉、0.2mm 的甘氨酸,封闭 2 小时,离心去上清,用 PH7.4 磷酸盐缓冲液 45mmol/l,乙二胺四乙酸二钠 10.2mmol/l,0.05% 脱脂奶粉,0.9% NaN₃ 稀释至 0.18%。

[0017] 所述的校准品制备方法为:将经过处理的牛血清,加入 BAS 0.1%,NaN₃ 0.9% 得到校准品稀释液,用重组 CRP 蛋白溶于制备的类似人血清基质的溶液,制备不同浓度的标准品。

[0018] 本具体实施方式具有以下有益效果:它采用复合胶乳颗粒包被抗体,灵敏度高,能

够检测到 0.2mg/l 样本,提高了线性值,同时大大提高了抗体的纯度和效价,最大限度避免了非特异反应,使结果准确性有了较大提高。

[0019] 实施例 1:相关性试验,参照图 1:使用本法发明试剂和对照试剂 A 公司的 CRP 胶乳增强型试剂,采用自动 7170 全自动生化分析仪对 85 份人血清按各自参数同时进行测定,对测定值进行相关性分析。按照与上述”CRP 测定方法”中的参数进行测定, X, Y 轴均为测定值 (CRP 的含量 mg/L)。

[0020] 由图 1 的结果看出,两种试剂的相关系数为 $R^2 = 0.987$, 回归方程为 $y = 0.983x + 4.096$, 结果表明本试剂与进口试剂测定病人血清相关性良好,具有很好的特异性和准确性。

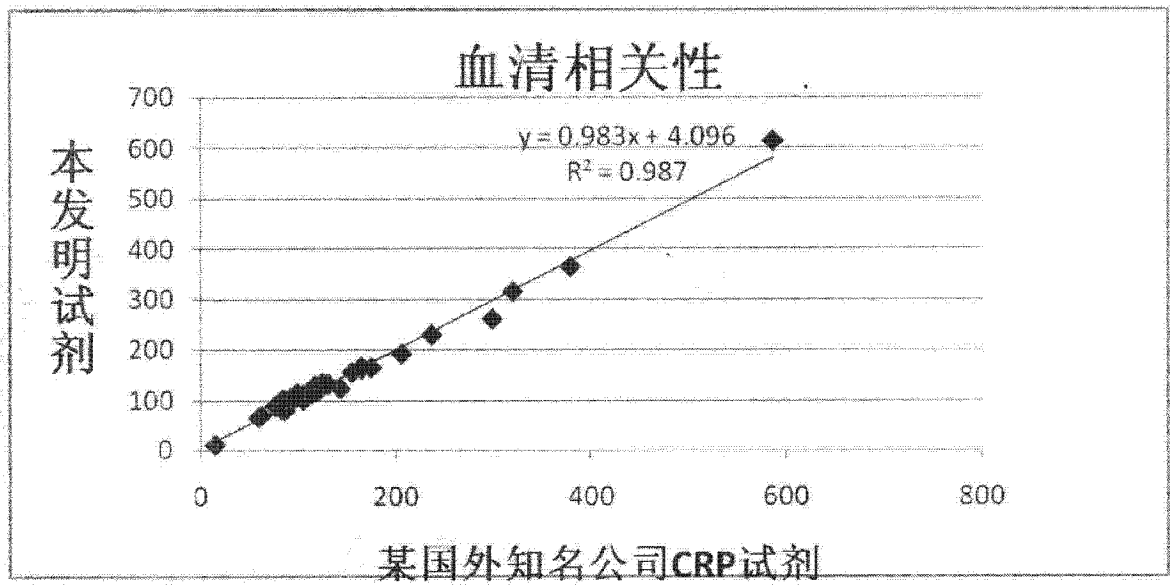


图 1

专利名称(译)	一种双粒子复合的C-反应蛋白检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102809654A	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN201210302775.5	申请日	2012-08-23
[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	房君江 李伟奇 张秀文 林清玉		
发明人	房君江 李伟奇 张秀文 林清玉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种双粒子复合的C-反应蛋白检测试剂盒，它涉及医学免疫体外诊断领域，它由R1试剂、R2试剂及校准品三部分组成，R1试剂为磷酸盐缓冲体系，其质量比组成为：pH = 7.0-7.6的磷酸盐缓冲液30-80mmol/l、聚乙二醇6000-1000060-120mm/l和乙二胺四乙酸二钠10-20mmol/L；R2试剂为抗体致敏颗粒悬浮液，其组成为复合CRP抗体致敏颗粒，pH = 7.0-7.6的磷酸盐缓冲液和乙二胺四乙酸二钠等；校准品为牛血清基质，包括叠氮钠0.2-2.2%、吐温-20 1-10%、牛血清白蛋白1-3%，它采用复合胶乳颗粒包被抗体，灵敏度高，能够检测到0.2mg/l样本，提高了线性值。

