



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114152755 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 08

(21) 申请号 202111480632.9

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.06

(71) 申请人 石家庄斯巴克生物科技有限公司  
地址 050000 河北省石家庄市高新区太行大街769号京津冀协作创新示范园201厂房C栋305

(72) 发明人 汪卉 陈东茵 杨美玲 梁晓丹  
闫承夫 夏皓男

(74) 专利代理机构 郑州汇诚众远专利代理事务所(普通合伙) 41211  
代理人 刘存波

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

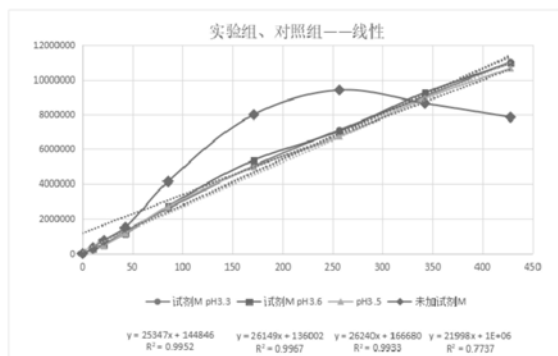
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法,其中处理液包括以下组分:柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20,该处理液的pH值为3.3~3.6。通过对处理液的pH值的设定,可以降低C反应蛋白检测时整体反应体系的pH,缩短孵育时间,使得整体反应时间相对同类产品较短,结果产出快;另外还能控制反应速率,提高低端灵敏度的准确性,扩大检测的线性范围,解决HOOK效应。



1. 一种C反应蛋白检测试剂处理液,其特征在于:处理液包括以下组分:柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20,该处理液的pH值为3.3~3.6。
2. 根据权利要求1所述的一种C反应蛋白检测试剂处理液,其特征在于:所述处理液中,柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20的配制质量比为4.5~5.5:2.5~3.5:1。
3. 一种试剂盒,包括权利要求1所述的C反应蛋白检测试剂处理液,其特征在于:还包括R1试剂和R2试剂;  
所述R1试剂为被Tris缓冲液稀释的偶联磁珠,所述偶联磁珠包被着C反应蛋白抗体;  
所述R2试剂为被MES缓冲液稀释的标记抗体。
4. 根据权利要求3所述的一种试剂盒,其特征在于:所述处理液中,柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20的添加量的比例为4.5~5.5:2.5~3.5:1。
5. 根据权利要求3所述的一种试剂盒,其特征在于:所述标记抗体包括C反应蛋白抗体和吡啶酮类化合物。
6. 根据权利要求4所述的一种试剂盒,其特征在于:所述吡啶酮类化合物为吡啶酯。
7. 一种检测方法,包括任一项权利要求3-6所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒用于检测C反应蛋白样本中C反应蛋白的浓度,所述C反应蛋白血清样本、处理液、R1试剂和R2试剂参与化学发光检验的测试体积比为1:8~12:5:10。
8. 根据权利要求7所述的一种检测方法,其特征在于:所述处理液、R1试剂和R2试剂与C反应蛋白血清样本的孵育时间为5~7min。

## 一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光检测技术领域,具体涉及一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法。

### 背景技术

[0002] C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)包括常规C反应蛋白和超敏C反应蛋白,是一种急性时相反应蛋白,在胎儿时期产生,非母体胎盘传递,健康人血清浓度低。其产生机理是:当机体受感染或组织受损伤时巨噬细胞和其他白细胞等被激活,产生白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1(IL-1)等细胞因子及其他介导体,这些细胞因子和介导体到达肝脏,刺激肝细胞和上皮细胞合成CRP,可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,从而清除入侵机体的病原微生物和损伤、坏死、凋亡的组织细胞,在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。在结构上,人类的CRP由5个相同的非糖基化多肽亚基组成,每个亚基包含206个氨基酸残基和两个钙离子结合位点,具有很好的稳定性及精确性,是炎症和组织损伤的非特异性标志物。

[0003] 在健康人体中,血清CRP含量一般低于5mg/L,在细菌感染时显著升高,早期细菌和严重病毒感染轻度升高,一般病毒感染不升高。在炎症、组织损伤和手术后,CRP浓度显著增高;疾病后4-6h开始升高,6-12h就可以检测到血液中升高的CRP,24-48h达到高峰,比正常值高100-1000倍,升高幅度与感染程度呈正相关,持续时间与病程相当。因此通过不同浓度的CRP不仅可以鉴别细菌感染和病毒感染,还能反应机体炎症的严重程度等,是一项灵敏度高、特异性强的指标,已被公认为是目前最敏感的脓毒血症诊断指标,其对感染前期的诊断、鉴别感染类型和感染程度,指导抗生素应用等方面有很高的价值,因此,检测血清CRP浓度在临床上有很高的指导意义。

[0004] C反应蛋白一般是通过化学发光检测法进行检测,但检测反应时间长,结果产出慢,并且检测线性范围比较窄,对于低浓度的C反应蛋白检测敏感度不高,影响检测效果,因此如何提高C反应蛋白试剂盒低端灵敏度,以及如何扩大检测线性范围成为C反应蛋白检测技术的研究方向。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法,以解决现有技术检测C反应蛋白的时间长,结果产出慢,并且检测线性范围较窄的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:一种C反应蛋白检测试剂处理液,处理液包括以下组分:柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20,该处理液的pH值为3.3~3.6。

[0007] 进一步优选,所述处理液中,柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20的配制质量比为4.5~5.5:2.5~3.5:1。

[0008] 一种试剂盒,包括权利要求1所述的C反应蛋白检测试剂处理液,还包括 R1试剂和R2试剂;

- [0009] 所述R1试剂为被Tris缓冲液稀释的偶联磁珠,所述偶联磁珠包被着C反应蛋白抗体;
- [0010] 所述R2试剂为被MES缓冲液稀释的标记抗体。
- [0011] 进一步优选,所述处理液中,柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20的添加量的比例为4.5~5.5:2.5~3.5:1。
- [0012] 进一步优选,所述标记抗体包括C反应蛋白抗体和吡啶酮类化合物。
- [0013] 进一步优选,所述吡啶酮类化合物为吡啶酯。
- [0014] 一种检测方法,包括上述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒用于检测C反应蛋白样本中C反应蛋白的浓度,所述C反应蛋白血清样本、处理液、R1试剂和R2试剂参与化学发光检验的测试体积比为1:8~12:5:10。
- [0015] 进一步优选,所述处理液、R1试剂和R2试剂与含有C反应蛋白的血清样本的孵育时间为5~7min。
- [0016] 有益效果:一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法,其中处理液包括以下组分:柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20,试剂M的pH值为3.3~3.6,通过对处理液的pH值的设定,降低整体反应体系的pH,可以控制C反应蛋白检测的反应速率,消除HOOK效应,并且使样本中较低浓度的C反应蛋白也能被准确的检测出,从而达到提高检测的低端灵敏度的目的。

#### 附图说明

- [0017] 图1是不同pH的试剂M制成的试剂盒对第一样品组检测结果的线性关系图;
- [0018] 图2是不同pH的试剂M制成的试剂盒对第二样品组检测结果的线性关系图;
- [0019] 图3是试剂M不同参与量对第一样品组检测结果的线性关系图;
- [0020] 图4是试剂M不同参与量对第二样品组检测结果的线性关系图。

#### 具体实施方式

- [0021] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。
- [0022] 实施例1:
- [0023] 一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法,是通过将处理液、R1试剂和R2试剂加入到试剂盒中,并设定各试剂的反应量,对含有C反应蛋白的血清进行孵育,不仅能提高试剂盒检测的低端灵敏度、扩大其线性范围,还能缩短孵育时间,快速完成检测。
- [0024] 其中处理液为试剂M,是将柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20按照质量比为4.5~5.5:2.5~3.5:1溶于水中制得;R1试剂为被Tris缓冲液稀释的偶联磁珠,偶联磁珠包被着C反应蛋白抗体;R2试剂为被MES缓冲液稀释的标记抗体。
- [0025] 包括试剂M、R1试剂和R2试剂的试剂盒,包括以下步骤制成:
- [0026] R1试剂的配制:
- [0027] a、制备超顺磁性微粒:选用亲水性的tosyl磁珠,且tosyl磁珠的粒径为3.0 $\mu$ m,将tosyl磁珠与CRP抗体进行偶联制得超顺磁性微粒,在偶联过程中使用1M的硫酸铵进行反应催化,其中催化温度为37 $^{\circ}$ C,催化时间为24h;
- [0028] b、通过浓度为50mmol/L的Tris缓冲液、浓度为0.5g/L的Proclin 300和浓度为

0.8g/L的叠氮钠溶液对超顺磁性微粒进行稀释,稀释至超顺磁性微粒的浓度为0.25mg/mL,得到R1试剂。

[0029] R2试剂的配制:

[0030] c、将吡啶酮类化合物和CRP抗体在25℃下进行混合,之后通过脱盐纯化得到CRP抗体-吡啶酯标记物;

[0031] d、通过浓度为50mmol/L的MES缓冲液、浓度为0.5g/L的Proclin 300和浓度为0.8g/L的叠氮钠溶液对CRP抗体-吡啶酯标记物按照1/3000的比例稀释,得到R2试剂,R2试剂中CRP抗体-吡啶酯标记物浓度为0.02μg/mL。

[0032] 试剂M的配制:

[0033] e、称取16.43g的柠檬酸(一水)添加到500ml的一级纯净水内,并在磁力搅拌机上混合溶解;

[0034] f、柠檬酸溶解后加入7.58g的柠檬酸三钠进行溶解;

[0035] g、在柠檬酸三钠溶解完全后依次加入0.5g的PC300和3g的Tween20;

[0036] h、在步骤g完全溶解后加入500ml的一级纯净水,最终得到pH值为3.3的试剂M。

[0037] 制备试剂盒:

[0038] 将试剂M加入到试剂盒中的腔体内,并将上述配制好的R1试剂和R2试剂分别加入到对应的磁珠腔和吡啶腔,即可得到C反应蛋白试剂盒。在检测血清中C反应蛋白时,通过试剂M降低整体反应体系的pH,营造一个适宜的孵育环境,缩短孵化时间,实现快速检测。

[0039] C反应蛋白的检测:

[0040] 样品准备:

[0041] 第一样本组:准备不同C反应蛋白浓度的血清样本:0、10.7、21.4、42.8、85.6、171.2、256.8、342.4、428(单位:mg/L);

[0042] 第二样本组,用于测试低端灵敏度:准备不同C反应蛋白浓度的血清样本:0、2.14、4.28、6.42、8.56、10.7(单位:mg/L);

[0043] 设置实验组:将上述制得的C反应蛋白试剂盒放入到全自动化学发光免疫分析仪试剂仓相应位置,同时将第一样本组和第二样本组放到对应的样本位,并设置方法学为:(10μL)样本+(100μL)试剂M+(50μL)R1+(100μL)R2,时间:5min,之后申请测试即可。

[0044] 另外还设置有对照组,即在检测中不添加试剂M,按照实验组的方法对第一样本组和第二样本组进行检测。

[0045] 在其他实施例中,分别调整试剂M的pH,使其pH分别为3.5和3.6,之后将试剂M、R1试剂和R2试剂加入到试剂盒中不同的腔体内;并将试剂盒分别放入到全自动化学发光免疫分析仪试剂仓相应位置,同时将第一样本组和第二样本组放到对应的样本位,设置实验组,并设置方法学为:(10μL)样本+(100 μL)试剂M+(50μL)R1+(100μL)R2,时间:5min,之后申请测试即可。

[0046] 上述实施例中不同pH的试剂M制成的C反应蛋白试剂盒,检测第一样本组时,所测出的发光值如下表1所示;且上述实施例测得的发光值的线性曲线如图1所示,其中以样本浓度(单位:mg/L)为横坐标,发光值为纵坐标绘出标准曲线。

[0047] 表1不同pH的试剂M制成的试剂盒对第一样本组的检测结果

第一样品组 (浓度)	对照组-未加入试剂 M 的发光值	实验组-试剂 M pH3. 3	实验组-试剂 M pH3. 5	实验组-试剂 M pH3. 6
0	2201	927	1004	1125
10. 7	308312	216474	236956	241488
21. 4	742053	444269	478335	498885
[0048] 42. 8	1495505	1167131	1278037	1132212
85. 6	4117852	2702925	2587137	2726690
171. 2	7969349	4941406	5012494	5338411
256. 8	9394082	6708730	7094950	7025932
342. 4	8636954	8917788	9028015	9246450
428	7823691	10648175	11041563	10946818

[0049] 通过表1和图1可以看出,对照组的试剂盒对C反应蛋白检测过程中出现 HOOK效应;而包括pH=3.3~3.6的试剂M的试剂盒,在检测第一样本组时,发光值与C反应蛋白的浓度线性相关性强,r值均大于0.99,可以解决HOOK效应。并且在试剂盒内加入pH为3.3~3.6的试剂M,孵育过程仅需要5min,就可以有效的检测出发光值,缩短了整体的反应时间,从而达到快速出结果的目的。

[0050] 上述实施例中不同pH的试剂M制成的C反应蛋白试剂盒,在检测第二样本组时,所测出的发光值如下表2所示;且上述实施例测得的发光值的线性曲线如图2所示,其中以样本浓度(单位:mg/L)为横坐标,发光值为纵坐标绘出标准曲线

[0051] 表2不同pH的试剂M制成的试剂盒对第二样品组的检测结果

第二样品组(浓度)	未加入试剂 M	试剂 M pH3. 3	试剂 M pH3. 5	试剂 M pH3. 6
	发光值			
0	2199	936	1028	1147
2. 14	8033	47235	49701	52125
4. 28	10659	90339	94083	96223
[0053] 6. 42	15254	112561	133764	142223
8. 56	170340	168962	189960	192550
10. 7	305692	216520	242035	256474

[0054] 从表2和图2中可以看出,对照组在低浓度C反应蛋白检测过程中灵敏度不高,不能有效的检测出低浓度的C反应蛋白的含量;包括pH=3.3~3.6的试剂M的试剂盒,在检测不同C反应蛋白浓度的样本时,发光值与C反应蛋白的浓度线性相关性强相关,系数均大于0.99,能准确的检测出低浓度的C反应蛋白含量,提高了低端灵敏度。

[0055] 实施例2:

[0056] 一种C反应蛋白检测试剂处理液、试剂盒及检测方法,是通过将处理液、R1试剂和R2试剂加入到试剂盒中,并设定各试剂的反应量,对含有C反应蛋白的血清进行孵育,不仅

能提高试剂盒检测的低端灵敏度、扩大线性范围,还能缩短孵育时间,实现快速检测。

[0057] 其中处理液为试剂M,是将柠檬酸、柠檬酸三钠、Tween-20按照质量比为 4.5~5.5:2.5~3.5:1溶于水中制得;R1试剂为被Tris缓冲液稀释的偶联磁珠,偶联磁珠包被着C反应蛋白抗体;R2试剂为被MES缓冲液稀释的标记抗体。

[0058] 包括上述试剂的试剂盒,包括试剂M、R1试剂和R2试剂,其制备方法如下:

[0059] R1试剂的配制:

[0060] a、制备超顺磁性微粒:选用亲水性的tosyl磁珠,且tosyl磁珠的粒径为 3.0 $\mu$ m,将tosyl磁珠与CRP抗体进行偶联制得超顺磁性微粒,在偶联过程中使用1M的硫酸铵进行反应催化,其中催化温度为37 $^{\circ}$ C,催化时间为24h;

[0061] b、通过浓度为50mmol/L的Tris缓冲液、浓度为0.5g/L的Proclin 300 和浓度为0.2g/L的叠氮钠溶液对超顺磁性微粒进行稀释,稀释至超顺磁性微粒的浓度为0.25mg/mL,得到R1试剂。

[0062] R2试剂的配制:

[0063] c、将吡啶酮类化合物和CRP抗体在25 $^{\circ}$ C下进行混合,之后通过脱盐纯化得到CRP抗体-吡啶酯标记物;

[0064] d、通过浓度为50mmol/L的MES缓冲液、浓度为0.5g/L的Proclin 300和浓度为0.2g/L的叠氮钠溶液对CRP抗体-吡啶酯标记物按照1/3000的比例稀释,得到R2试剂,R2试剂中CRP抗体-吡啶酯标记物浓度为0.02 $\mu$ g/mL。试剂M的配制:

[0065] e、称取13.45g/L的柠檬酸(一水)添加到500ml一级纯净水内,并在磁力搅拌机上混合溶解;

[0066] f、柠檬酸溶解后加入10.56g/L的柠檬酸三钠进行溶解;

[0067] g、在柠檬酸三钠溶解完全后依次加入0.5g/L的PC300和3.0g/L的Tween20;

[0068] h、在步骤g完全溶解后加入500ml的一级纯净水;最终得到pH值为3.6 的试剂M。

[0069] 制备试剂盒:

[0070] 将试剂M加入到试剂盒中的腔体内,并将上述配制好的R1试剂和R2试剂分别加入到对应的磁珠腔和吡啶腔,即可得到C反应蛋白试剂盒。在检测血清中C反应蛋白时,通过试剂M降低整体反应体系的pH,营造一个适宜的孵育环境,缩短孵育时间。

[0071] C反应蛋白的检测:

[0072] 样品准备:

[0073] 第一样本组:准备不同C反应蛋白浓度的血清样本:0、10.7、21.4、42.8、85.6、171.2、256.8、342.4、428(单位:mg/L);

[0074] 第二样本组,测试低端灵敏度:准备不同C反应蛋白浓度的血清样本:0、2.14、4.28、6.42、8.56、10.7(单位:mg/L);

[0075] 设置实验组:将上述制得的C反应蛋白试剂盒放入到全自动化学发光免疫分析仪试剂仓相应位置,同时将第一样本组和第二样本组放到对应的样本位,并设置方法学为:(10 $\mu$ L)样本+(80 $\mu$ L)试剂M+(50 $\mu$ L)R1+(100 $\mu$ L)R2,时间:7min,之后申请测试即可。

[0076] 另外还设置有对照组,即在试剂盒中不添加试剂M,按照实验组的方法对第一样本组和第二样本组进行检测。

[0077] 在其他实施例中,试剂盒中的不同腔体内加入试剂M、R1试剂和R2试剂,之后将试

剂盒分别放入到全自动化学发光免疫分析仪试剂仓相应位置,同时将第一样本组和第二样本组放到对应的样本位,设置实验组,并设置试剂M的添加量而分别为100 $\mu$ L和120 $\mu$ L,时间:7min,之后申请测试即可。

[0078] 上述实施例中设置试剂M不同反应量,在检测第一样本组时,所测出的发光值如下表3所示;且上述实施例测得的发光值的线性曲线如图3所示,其中以样本浓度(单位:mg/L)为横坐标,发光值为纵坐标绘出标准曲线。

[0079] 表3试剂M不同反应量对第一样品组的检测结果

第一样品组 (浓度)	未加试剂 M	试剂 M 80 $\mu$ L	试剂 M 100 $\mu$ L	试剂 M 120 $\mu$ L
	发光值			
0	2500	952	1021	988
10.7	318502	231863	252668	227035
21.4	750565	458232	501672	464406
42.8	1318747	1208471	1112891	1113765
85.6	4327347	2738448	2888550	2629229
171.2	8187922	4924811	5419312	4913725
256.8	9841907	6925623	6929622	6887505
342.4	8312294	9008873	9346703	8797538
428	7431143	11494698	11712219	10945112

[0082] 通过表3和图3可以看出,对照组在没有试剂M参与的情况下,检测C反应蛋白,出现了HOOK效应,而试剂M参与反应的实验组,在检测过程中内均有良好的线性关系,且无HOOK效应。并且试剂M、R1试剂和R2试剂的参与反应的体积比在8~12:5:10的范围内,孵育时间均比较短,仅需要7min,就可以有效的检测出发光值,缩短了整体的反应时间,从而达到快速出结果的目的。

[0083] 上述实施例中试剂M不同反应量,在检测第二样本组,所测出的发光值如下表4所示;且上述实施例测得的发光值的线性曲线如图4所示,其中以样本浓度(单位:mg/L)为横坐标,发光值为纵坐标绘出标准曲线。

[0084] 表4不同试剂M添加量对第二样品的组检测结果

第二样品组 (浓度)	未加试剂 M	试剂 M 80 $\mu$ L	试剂 M 100 $\mu$ L	试剂 M 120 $\mu$ L
	发光值			
0	2541	905	1010	975
2.14	9035	51258	54136	46852
4.28	11258	93226	98144	89456
6.42	16365	132256	153695	128569
8.56	184972	182359	200487	172550
10.7	325693	242981	265891	231853



[0086] 从表4和图4中可以看出,对照组在没有试剂M参与的情况下,对于低浓度的C反应蛋白的检测灵敏度低,不能有效的检测出低浓度的C反应蛋白的含量;而试剂M、R1试剂和R2试剂的参与反应的体积比在8~12:5:10的范围内时,在检测不同低端C反应蛋白浓度时,均有良好的线性关系,并且对低浓度的C反应蛋白含量的血清进行检测均具有较高的灵敏度,可以有效的提高试剂盒检测C反应蛋白时的低端灵敏度。

[0087] 本发明不局限于上述最佳实施方式,任何人在本发明的启示下都可得出其他各种形式的产品,但不论在其形状或结构上作任何变化,凡是具有与本申请相同或相近似的技术方案,均落在本发明的保护范围之内。

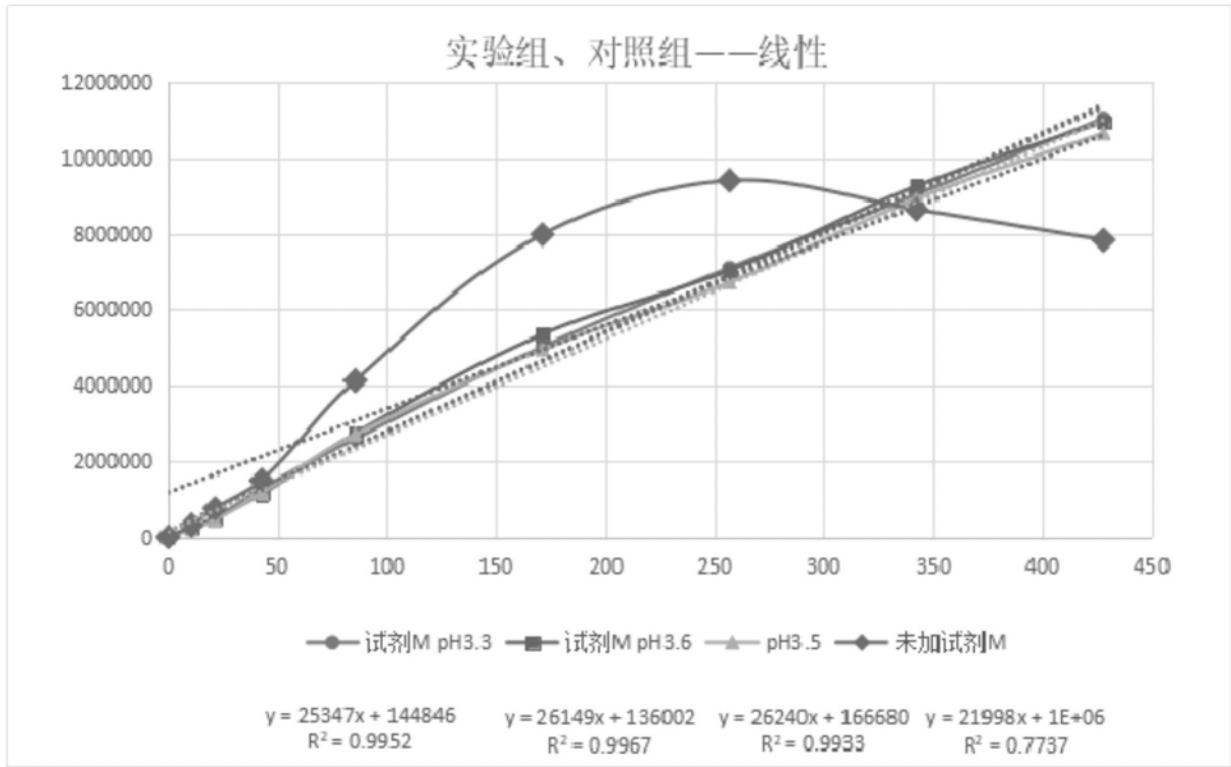


图1

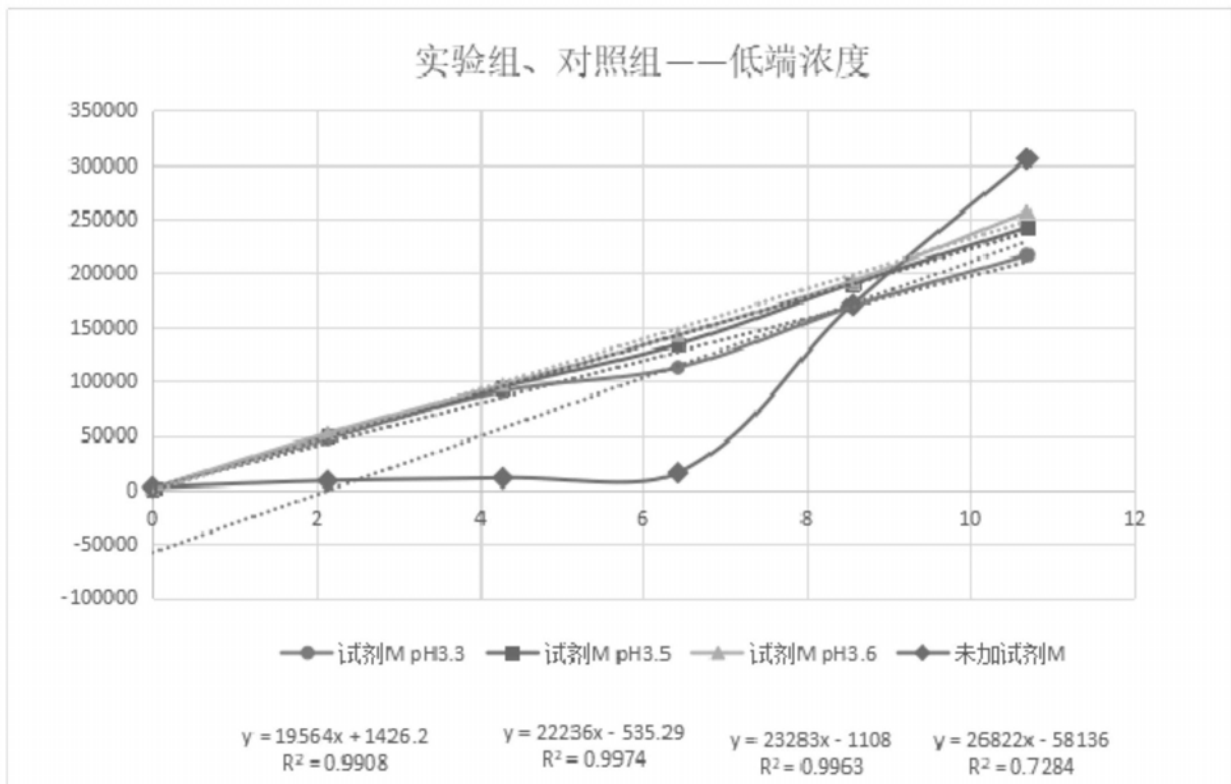


图2

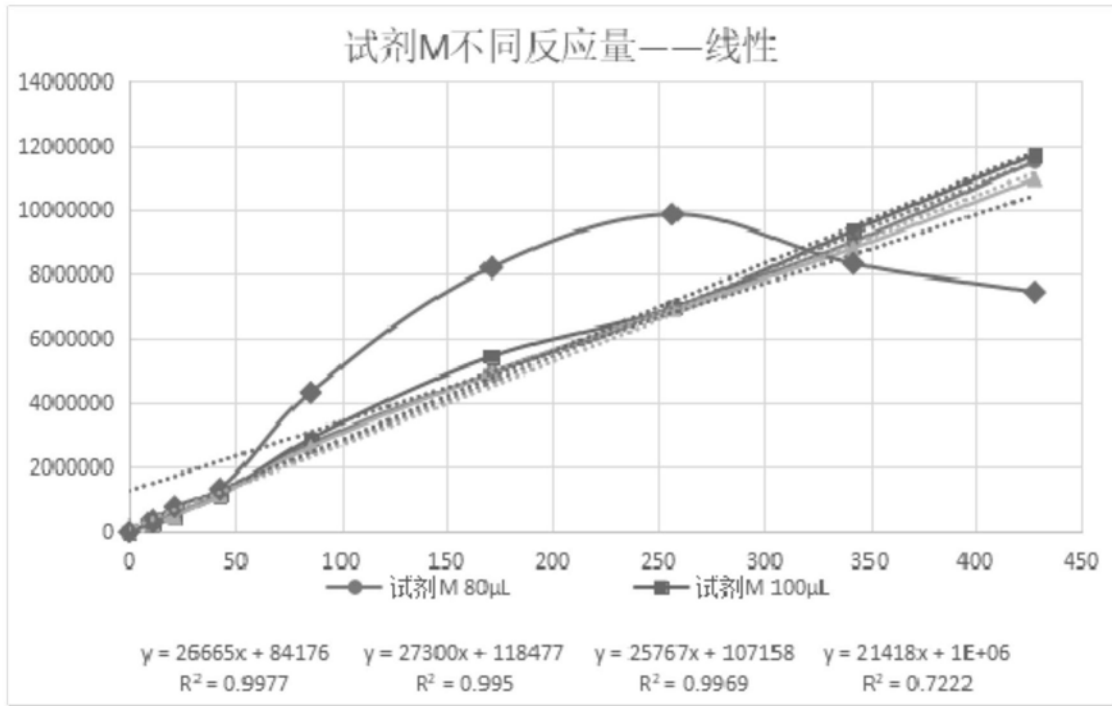


图3

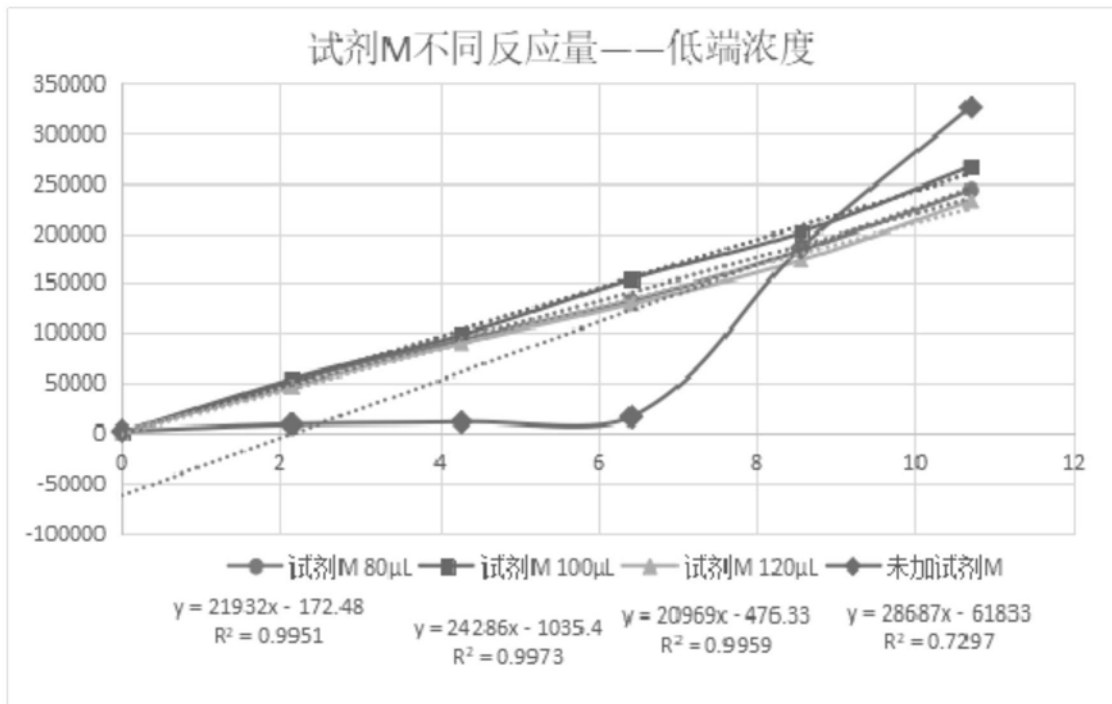


图4