



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101937000 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010245894. 2

(22) 申请日 2010. 08. 05

(71) 申请人 北京倍爱康生物技术有限公司
地址 100070 北京市丰台区海鹰路 1 号院 6
号楼

(72) 发明人 郭健夫 张雪莲 鲁衡 全文斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种人胱抑素 C 的磁微粒分离化学发光免疫
分析检测方法

(57) 摘要

本发明提供了人胱抑素 C 的体外检测方法，该方法采用了磁微粒分离化学发光免疫分析技术，它是酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物，兼具灵敏度高、特异性好、重复性好等特点。可用于人血清、血浆和尿液中胱抑素 C 含量的测定，临床上该指标多用于评价肾功能，主要用于监测肾小球滤过率、肾小管功能障碍和各类继发性肾病。

1. 一种人朊抑素 C 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于结合了酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术,并生成了检测试剂盒。

2. 根据权利要求 1 所述的酶标记技术,其特征在于生物酶标记朊抑素 C 抗体的方法如下:

所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP),也可以是碱性磷酸酶 (ALP)。偶联方法可以是过碘酸钠氧化法、戊二醛法或 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)、2-Iminothiolane · HCl (2IT) 交联等多种方法。

3. 根据权利要求 1 所述的磁分离技术,其特征在于磁分离试剂的制备方法如下:

将 FITC 抗体连接在磁微粒表面。所述的磁微粒直径在 0.01-5.0 μm 之间,具有超顺磁性,表面含有氨基 (NH₂-) 或羧基 (COOH-) 活性基团。所述的 FITC 抗体与磁微粒可以通过化学交联剂,如戊二醛、1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) 等以共价键的形式,也可以通过物理吸附(静电作用、离子键或疏水作用等)的形式进行偶联。

4. 根据权利要求 1 所述的化学发光检测技术,其特征在于化学发光所用的底物溶液可以是 HRP 催化的发光底物鲁米诺 (Luminol),也可以是 ALP 催化的发光底物 AMPPD, CSPD 和 CSPD-Star 等。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于试剂盒中的质控品是选取经灭活的人血清,将其混合后用稀释液按一定比例稀释而成。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于试剂盒中朊抑素 C 抗试剂包含偶联有生物酶的朊抑素 C 抗体和偶联有 FITC 的朊抑素 C 抗体。

7. 根据权利要求 6 所述的用于偶联 FITC 的抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

8. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于检测步骤如下:

(1) 加样与免疫反应:在试管中加入 5-100 μL 处理好的样本、和质控品,然后加入 10-500 μL 朊抑素 C 抗试剂,混匀,37°C 温育 5-60 分钟;

(2) 免疫复合物与磁微粒结合:向试管中加入 20-100 μL,0.1-10mg/mL 磁分离试剂,混匀,37°C 温育 0-30 分钟(也可不温育);

(3) 磁分离与洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;加入 100-600 μL 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;可再次加入清洗液清洗一次(也可省去);

(4) 加底物溶液并读出样本浓度:每管加入 50-300 μL 生物酶催化的发光底物,酶促底物发光,根据样本的发光值从标准曲线上读出样本中朊抑素 C 含量。

一种人胱抑素 C 的磁微粒分离化学发光免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及到临床上评价肾功能的一项诊断指标胱抑素 C,提供了一种人胱抑素 C 的磁分离化学发光免疫检测方法,适用于人血清、血浆或尿液中胱抑素 C 的定量检测。

背景技术

[0002] 胱抑素 C(Cystatin C) 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族中的一员,是一种非糖基化的碱性蛋白质,相对分子质量为 13.395Da,等电点为 8.0 ~ 9.5,由 122 个氨基酸组成。胱抑素 C 编码基因位于人类第 20 号染色体,具有与“看家基因”的启动子区相同的特征,因此胱抑素基因被视为“看家基因”。胱抑素 C 广泛存在于植物、动物及原虫中,由有核细胞以恒定的速率产生,在人体大部分组织中稳定表达,存在于各种体液中,在脑脊液和精液中浓度最高,尿液中最低,其生理功能是调节半胱氨酸蛋白酶的活性,在细胞内肽类和蛋白质的代谢中起重要作用,特别是在胶原代谢中,能使一些前激素的蛋白水解,释放于靶组织中发挥各自的生物学作用。胱抑素 C 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的简称,以前也被称作 γ -痕迹蛋白(γ -traceprotein) 或 γ -后球蛋白(post- γ -globulin)。

[0003] 胱抑素 C 在临床上被视为监测肾功能的一项高灵敏度,高特异性的指标。胱抑素 C 因其低相对分子质量,且在生理 pH 环境中带正电荷,故可自由通过肾小球滤过膜,在近曲小管几乎完全被重吸收并降解,不再回到血循环中。血清胱抑素 C 被认为是比肌酐、尿素氮等更理想、更灵敏的测定肾小球滤过率的内源性指标;尿胱抑素 C 水平可反映肾小管功能;另外胱抑素 C 在肾衰竭、肾移植、糖尿病肾病、高血压肾病等继发性肾病的早期检测及预后监测中也有应用。

[0004] 目前临床检验用胱抑素 C 试剂盒主要是采用免疫比浊法,与酶联免疫法、免疫荧光技术、化学发光免疫等分析技术相比其灵敏度、精密度和特异性明显较差。本发明所采用的磁微粒分离化学发光免疫检测方法是酶标记技术、磁分离技术和化学发光检测技术的结合,酶促底物发光的专一性高、反应高效、反应条件温和、发光值稳定且受外界条件影响较小;磁分离技术中采用的 0.01-5 μ m 磁性微粒子作为载体,免疫反应在准液相条件下进行并通过外加磁场对免疫复合物与未反应物进行分离,使得免疫反应和分离快速而彻底,相对于固相载体其灵敏度、特异性好和精度都得到了很大提高。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种具有灵敏度高、特异性好、适用性广的检测人胱抑素 C 的磁微粒分离化学发光免疫检测方法。

[0006] 本发明生成的胱抑素 C 磁微粒分离化学发光免疫的试剂盒组成包括:①胱抑素 C 校准品(含一系列浓度的胱抑素 C,用于建立标准曲线);②胱抑素 C 质控品(由人血清配制而成,含一定浓度胱抑素 C);③胱抑素 C 稀释液(用于稀释高浓度样本);④胱抑素 C 抗试剂(偶联有生物酶的胱抑素 C 抗体和偶联有 FITC 的胱抑素 C 抗体的混合溶液);⑤磁分

离试剂（结合抗 FITC 的磁微粒混悬液）⑥清洗液浓缩液（用于配制清洗液）；⑦底物溶液（生物酶催化的发光底物）。

[0007] 所述的胱抑素 C 磁微粒分离化学发光免疫检测方法的检测步骤如下：

[0008] (1) 加样与免疫反应：在试管中加入 5-100 μ L 处理好的样本和质控品，然后加入 10-500 μ L 胱抑素 C 抗试剂，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 5-60 分钟；

[0009] (2) 免疫复合物与磁微粒结合：向试管中加入 20-100 μ L 磁分离试剂，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 0-30 分钟（也可不温育）；

[0010] (3) 磁分离与洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去除上清；加入 100-600 μ L 清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬，然后再次使磁微粒在磁场中沉降，去除上清；可再次加入洗液清洗一次（也可省去）；

[0011] (4) 加底物溶液并读出样本浓度：每管加入 50-300 μ L 生物酶催化的发光底物，酶促底物发光，根据样本的发光值从标准曲线上读出样本中胱抑素 C 含量。

[0012] 所述的胱抑素 C 磁微粒分离化学发光免疫检测方法的原理是：首先，待检样本与酶标记抗体、FITC 标记抗体特异性结合形成“三明治”结构的夹心复合物，夹心复合物再与磁微粒特异性结合（通过抗体上偶联的 FITC 与磁微粒上的抗 FITC 结合）；经过洗涤，结合物通过外加磁场被留下，未结合的抗原、抗体和其他物质被去除；加入底物，用化学发光分析仪检测其发光值。在一定浓度范围内，待测样本中的胱抑素 C 浓度与发光值成正比，最后通过用四参数拟合出的标准曲线计算出样本的浓度。

[0013] 本发明的技术解决方案如下：

[0014] (1) 磁分离试剂的制备：将 FITC 抗体连接在磁微粒表面。所述的磁微粒直径在 0.01-5.0 μ m 之间，具有超顺磁性，表面含有氨基 (NH₂-) 或羧基 (COOH-) 活性基团。所述的 FITC 抗体与磁微粒可以通过化学交联剂，如戊二醛、1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC) 等以共价键的形式，也可以通过物理吸附（静电作用、离子键或疏水作用等）的形式进行偶联。

[0015] (2) 胱抑素 C 抗试剂中酶标抗体的制备：将生物酶与胱抑素 C 抗体偶联，所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP)，也可以是碱性磷酸酶 (ALP)。偶联方法可以是过碘酸钠氧化法、戊二醛法或 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)、2-Iminothiolane · HCl (2IT) 交联等多种方法。

[0016] (3) 底物溶液：所述的底物溶液可以是 HRP 催化的发光底物鲁米诺 (Luminol)，也可以是 ALP 催化的发光底物 AMPPD, CSPD 和 CSPD-Star 等。

[0017] (4) 质控品：选取经灭活的人血清，将其混合后用稀释液按一定比例稀释而成。

附图说明

[0018] 图 1 为血清样本的线性图，图 2 为尿液样本的线性图。

具体实施方式

[0019] 实施例 1：抗 FITC 抗原与表面氨基 (COOH-) 磁微粒偶联，制备磁分离试剂

[0020] 取 100mg 表面含羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒用 0.1M MES(2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid), pH 4.5-5 溶液 10ml 洗涤 3 次。磁微粒用该溶液 1ml 重悬，加入

2mg 抗 FITC 抗体,混合均匀。加入 100 μ l 10mg/ml EDC 溶液,混合均匀后室温反应 2 小时。用 10ml 含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.4 洗涤磁珠 3 次后,用该溶液配制成 2.5mg/ml 的磁分离试剂工作液。

[0021] 实施例 2:碱性磷酸酶 (ALP) 与胱抑素 C 抗体的偶联

[0022] 取 5mg 胱抑素 C 抗体,浓缩至 5mg/ml,加入 13.76mg/mL 的活化剂 2-Iminothiolane·HCl (2IT) 溶液 10 μ l,室温放置 20 分钟后加甘氨酸终止活化反应,室温下放置 5 分钟。使用 PG10 柱子除盐,收集洗脱蛋白。

[0023] 取 5mg ALP 溶液,加入 6.69mg/mL 的 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 溶液 50 μ l,室温放置 30 分钟,加入甘氨酸终止活化反应,室温放置 5 分钟。使用 PG10 柱子除盐,收集洗脱蛋白。

[0024] 将收集的胱抑素 C 抗体与收集的 ALP 混合,4 $^{\circ}$ C 反应 20 个小时,然后使用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,收集第二峰和第三峰即偶联物,并将其保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0025] 实施例 3:检测血清中胱抑素 C 含量

[0026] 用本试剂盒对 500 例体检者血清进行检测,其中男女各半,分析体检人群中胱抑素 C 的血清水平。

[0027] 材料与仪器

[0028] (1) 胱抑素 C 试剂盒;

[0029] (2) 化学发光免疫分析仪 MAGLIA60:北京倍爱康生物技术有限公司生产;

[0030] (3) 磁分离器:北京倍爱康生物技术有限公司生产;

[0031] (4) 水浴箱(用于 37 $^{\circ}$ C 温浴)。

[0032] 检测步骤如下:

[0033] (1) 加样与免疫反应:在试管中加入 15 μ l 处理好的样本、和质控品,然后加入 90 μ l 胱抑素 C 抗试剂,混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;

[0034] (2) 免疫复合物与磁微粒结合:向试管中加入 40 μ l 磁分离试剂,混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟;

[0035] (3) 磁分离与洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;加入 300 μ l 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清。再次加入 300 μ l 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;

[0036] (4) 加底物溶液并读出浓度:每管加入 200 μ l 底物溶液,酶促底物发光,根据样本的发光值从标准曲线上读出样本中胱抑素 C 含量。

[0037] 检测结果:

[0038] 90% 的人群 (500 例) 血清水平为 465.352 ~ 1072.231ng/ml,符合文献报道。

[0039] 实施例 4:本试剂盒的性能评价

[0040] 根据体外诊断试剂的特点,按惯例检测本试剂盒的灵敏度、线性、准确性、精密度和特异性。材料与仪器、检测步骤同实施例 3。

[0041] 检测结果:

[0042] (1) 灵敏度:0.001mg/L 以下;免疫比浊法 A (申请号:200810084390.X) 灵敏度为 0.1mg/L,免疫比浊法 B (申请号:200910090689.0) 灵敏度为 0.06mg/L (均按同一方法进行

计算)；

[0043] (2) 线性： $r^2 = 0.9991$ (将 1 例血清样本用稀释液分别按 1/4、1/8、1/32、1/64、1/256 稀释；将 1 例尿液样本用稀释液按 1/1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64；用试剂盒检测稀释后样本，以稀释比例和检测浓度做回归曲线，求出相关系数 r 的平方值，回归曲线见图 1、图 2)；

[0044] (3) 准确性：通过加样回收评价其准确性，即向样本中添加已知量的胱抑素 C 的纯品，血清、尿液中加样回收率在 89%~110%，数据见表 1；

[0045]

	添加前样本值	添加量	添加后样本值	加样回收率 (%)
血清 1	632.23	970.29	1762.33	109.97
血清 1	632.23	1940.57	2439.96	94.84
血清 2	675.33	970.29	1686.47	102.48
血清 2	675.33	1940.57	2649.46	101.28
尿液 1	61.03	970.29	918.50	89.06
尿液 1	61.03	1940.57	1860.93	92.97
尿液 2	53.97	970.29	1067.64	104.24
尿液 2	53.97	1940.57	1912.95	95.91

[0046] 表 1 加样回收实验 (加样回收率 = 添加后样本值 / (添加前样本值 + 添加量) * 100, 浓度单位： $\mu\text{g/L}$) (4) 精密度：用两批试剂盒测试同一例血清样本，第一批批内变异系数为 1.75%，第一批批内变异系数为 2.31%；两批批间变异系数为 2.08%。

[0047]

第一批	821.26	838.56	843.22	838.94	861.66	837.82	851.06	847.12	865.78	821.26
第二批	873.03	863.24	859.44	864.76	870.17	843.31	820.38	859.28	816.94	854.74

[0048] 表 2 精密度实验 (变异系数 = 标准偏差 / 平均值 * 100%, 浓度单位 : $\mu\text{g/L}$)

[0049] (5) 特异性 : 据了解, 胱抑素 C 可能的交叉反应物有胱抑素 D、胱抑素 A 等, 本试剂盒与胱抑素 D 的交叉反应率为 0.023%, 与胱抑素 A 的交叉反应率为 0.0022%。

[0050] 参考文献

- [0051] [1] 北京九强生物技术有限公司. 胱抑素 C 测定试剂盒. 中国, 101377492A(P). 2009-3-4.
- [0052] [2] 北京利德曼生化股份有限公司. 匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制备方法. 中国, 101699287A(P). 2010-4-8.
- [0053] [3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 / 中华人民共和国卫生部医政司. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006. 559 ~ 560.
- [0054] [4] 林金明, 赵利霞, 王栩. 化学发光免疫分析. 北京: 化学工业出版社, 2008. 9 ~ 12.
- [0055] [5] 唐秋艳, 王云龙, 陈兴业. 免疫诊断实用技术. 北京: 海洋出版社, 2009. 163 ~ 165.
- [0056] [6] 其木格, 孙秀丽. Cystatin C 在肾脏病领域中的应用研究 [J]. 医学研究杂志, 2007, 36(11): 21-23.
- [0057] [7] 杨继红, 王雪东, 吴华. Cystatin C 的临床应用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(8): 430-432.

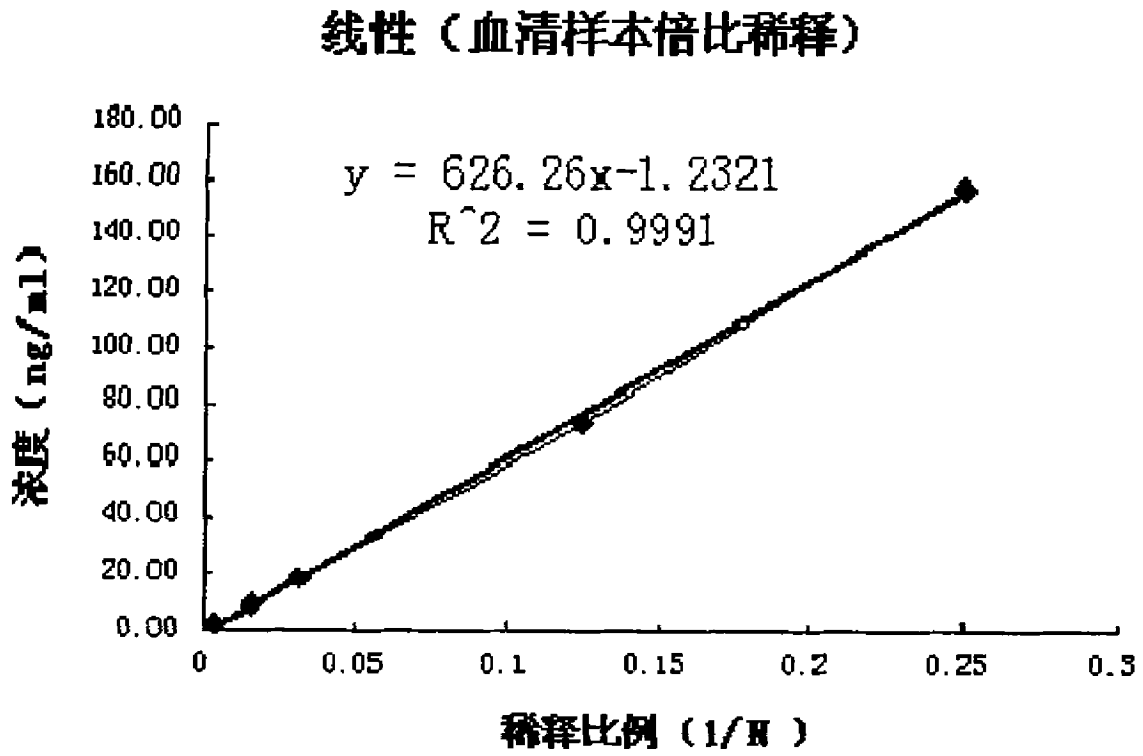


图 1

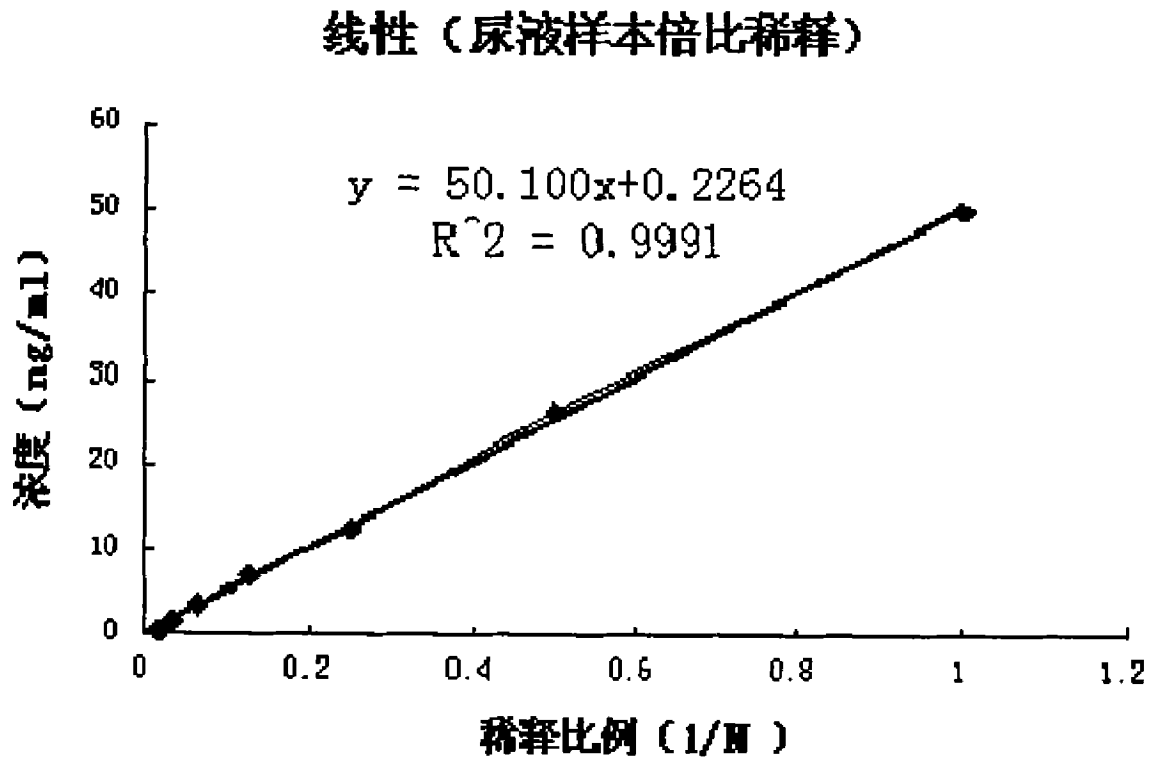


图 2

专利名称(译)	一种人朊抑素C的磁微粒分离化学发光免疫分析检测方法		
公开(公告)号	CN101937000A	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	CN201010245894.2	申请日	2010-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
[标]发明人	郭健夫 张雪莲 鲁衡 全文斌		
发明人	郭健夫 张雪莲 鲁衡 全文斌		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了人朊抑素C的体外检测方法，该方法采用了磁微粒分离化学发光免疫分析技术，它是酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物，兼具灵敏度高、特异性好、重复性好等特点。可用于人血清、血浆和尿液中朊抑素C含量的测定，临床上该指标多用于评价肾功能，主要用于监测肾小球滤过率、肾小管功能障碍和各类继发性肾病。

[0045]

	添加前样本值	添加量	添加后样本值	加样回收率(%)
血清1	632.23	970.29	1762.33	109.97
血清1	632.23	1940.57	2439.96	94.84
血清2	675.33	970.29	1686.47	102.48
血清2	675.33	1940.57	2649.46	101.28
尿液1	61.03	970.29	918.50	89.06
尿液1	61.03	1940.57	1860.93	92.97
尿液2	53.97	970.29	1067.64	104.24
尿液2	53.97	1940.57	1912.95	95.91

[0046] 表1 加样回收实验 (加样回收率=添加后样本值/(添加前样本值+添加量)*100%)