



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018465 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210545717. 5

(22) 申请日 2012. 12. 16

(71) 申请人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区宏达南路 5 号

(72) 发明人 不公告发明人

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种人胱抑素 C 化学发光定量检测方法

(57) 摘要

本发明提供了一种人胱抑素 C 的定量检测方法。该方法将磁微粒分离技术和酶促化学发光技术相结合,采用双抗体夹心一步反应法原理,可用于血清、血浆和尿液样本中人胱抑素 C 的含量测定,辅助各种肾功能损害疾病的诊断和治疗。该方法灵敏度 $\leq 0.01 \mu\text{g/L}$,定量检测范围:0.05-8 $\mu\text{g/L}$,分析内精密度 $< 5\%$,检测用时 10min,血清和尿液添加回收率在 90-115% 之间,与胶乳增强免疫比浊法试剂血清测值相关分析 $R^2=0.9862$ 。

1. 一种人朐抑素 C 的化学发光定量检测方法,其特征在于其是一种基于磁微粒分离技术和酶促化学发光技术的双抗体夹心一步反应法免疫检测方法,该检测方法包含了免疫反应、洗涤和加底物溶液检测发光强度的步骤,使用的试剂盒主要由试剂 1、试剂 2 和磁分离试剂组成,其中试剂 1 为含荧光素(FITC)标记的抗人朐抑素 C 抗体的缓冲液,试剂 2 为含碱性磷酸酶(ALP)标记的抗人朐抑素 C 抗体的缓冲液,磁分离试剂为含包被有抗 FITC 抗体的磁微粒的缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于其检测步骤包含:

- 1) 免疫反应:将待测样本原液与试剂 1、试剂 2 和磁分离试剂混匀,温育;
- 2) 洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入清洗液,去除磁场,震荡,磁分离,再去除上清,此步骤重复 2-3 次;
- 3) 加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入碱性磷酸酶催化的化学发光底物,震荡,检测单位时间内发光强度。

3. 根据权利要求书 1 或 2 所述的检测方法,其特征在于其检测步骤包含:

- 1) 免疫反应:在检测管中加入 2-10 μ l 待测样本原液,然后加入 100-200 μ l 试剂 1, 100-200 μ l 试剂 2, 20-100 μ l 磁分离试剂,混匀,37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 2-15min;
- 2) 洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入 300-1000 μ l 的清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清;此步骤重复 2-3 次;
- 3) 加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入 100-300 μ l 碱性磷酸酶催化的化学发光底物,震荡使磁微粒充分混悬,检测单位时间内发光强度。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的试剂盒,其特征在于主要由试剂 1、试剂 2 和磁分离试剂组成,其中试剂 1 为含荧光素(FITC)标记的抗人朐抑素 C 抗体的缓冲液,试剂 2 为含碱性磷酸酶(ALP)标记的抗人朐抑素 C 抗体的缓冲液,磁分离试剂为含包被有抗 FITC 抗体的磁微粒的缓冲液。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,磁分离试剂由下述方法制备:用碳二亚胺(EDC)作偶联剂,将抗 FITC 抗体共价连接在含羧基的磁微粒的表面,然后用缓冲液稀释到工作浓度;试剂 1 由下述方法制备:将抗人 CYS-C 抗体与 FITC 混合,室温反应,将抗人 CYS-C 抗体-FITC 连接物与游离 FITC 分离,稀释分离得到的溶液;试剂 2 由下述方法制备:将抗人 CYS-C 抗体与 ALP 进行交联,纯化,将获得的连接 ALP 的抗人 CYS-C 抗体浓溶液稀释。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的试剂盒,其特征在于,磁分离试剂由下述方法制备:用碳二亚胺(EDC)作偶联剂,将抗 FITC 抗体共价连接在含羧基的磁微粒的表面,然后用缓冲液稀释到工作浓度;试剂 1 由下述方法制备:将抗人 CYS-C 抗体与 FITC 按摩尔比 1:20-1:200 在 0.1-0.2mol/L pH=9.0-10.0 的碳酸盐缓冲液内混合,室温反应超过 12h,用 G-25 凝胶柱将抗人 CYS-C 抗体-FITC 连接物与游离 FITC 分离,获得偶联有 FITC 分子的抗人 CYS-C 抗体浓溶液,然后将该溶液用缓冲液稀释到工作浓度;试剂 2 由下述方法制备:将抗人 CYS-C 抗体与 ALP 用 SMCC、2IT 作为交联剂进行连接,抗人 CYS-C 抗体与 ALP 摩尔比为 1:1-1:2,交联后用凝胶层析的方法纯化,获得连接 ALP 的抗人 CYS-C 抗体浓溶液,将该溶液用缓冲液稀释到工作浓度。

一种人胱抑素 C 化学发光定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,提供了一种准确、灵敏、快速、定量检测人血清、血浆和尿液样本中胱抑素 C(CYS-C) 的化学发光免疫检测方法。

背景技术

[0002] 胱抑素 C 是一种非糖化的蛋白质,是半胱氨酸蛋白酶抑制剂的一种,由 122 个氨基酸组成,相对分子量约为 13kDa。它由大多数有核细胞以一种恒定的方式产生,由肾小球滤过,在近曲小管完全冲吸收并分解。其分子量小,生成率稳定,由于其在血清中的浓度与肾小球滤过率(GFR)有密切的关系,并且对肾小球滤过率比肌酐更为敏感,因此胱抑素 C 对测定肾小球滤过率有极其重要的意义。胱抑素 C 完全由近曲小管重吸收,正常情况下不出现在尿液中。如果近曲小管重吸收功能有损害,尿液中胱抑素 C 浓度会出现明显升高。血清和血浆胱抑素 C 参考值范围,正常男性:(0.63-1.25) $\mu\text{g/ml}$,正常女性:(0.54-1.15) $\mu\text{g/ml}$,大于 50 岁正常人:(0.6-1.55) $\mu\text{g/ml}$ 。正常人尿液参考值范围:0.25-0.317 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0003] 目前检测胱抑素 C 的方法主要有胶乳增强免疫比浊法、酶联免疫法、化学发光法等。乳胶增强免疫比浊法的优点是检测特异性好、操作简单、精密度高、检测范围宽,缺点是灵敏度较低。酶联免疫法和化学发光法(申请号:201010245894.2)灵敏度很高,但是操作复杂,检测耗时长,检测范围窄,样本需要预稀释处理。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种新的化学发光免疫检测方法。该方法准确性好、精密度高、灵敏度高,样本无需预稀释,操作简单省时,检测范围宽。

[0005] 本发明制备的人胱抑素 C(CYS-C)定量测定试剂盒(磁微粒化学发光法)的试剂组成和试剂主要成分包括:

[0006] 试剂 1(R1):含荧光素(FITC)标记的抗人 CYS-C 抗体的溶液;

[0007] 试剂 2(R2):含碱性磷酸酶(ALP)标记的抗人 CYS-C 抗体的溶液;

[0008] 磁分离试剂:含包被着抗 FITC 抗体的磁微粒的悬浊液。

[0009] 本发明的技术解决方案如下:

[0010] 磁分离试剂的制备:用碳二亚胺(EDC)作偶联剂,将抗 FITC 抗体共价连接在含羧基(COOH)的磁微粒的表面,然后用缓冲液稀释到工作浓度,完成磁分离试剂的制备。

[0011] 试剂 1 的制备:将抗人 CYS-C 抗体与 FITC 按摩尔比 1:20-1:200 在 0.1-0.2mol/L pH=9.0-10.0 的碳酸盐缓冲液内混合,室温反应超过 12h。用 G-25 凝胶柱将抗人 CYS-C 抗体-FITC 连接物与游离 FITC 分离,获得偶联有 FITC 分子的抗人 CYS-C 抗体浓溶液,然后将该溶液用缓冲液稀释到工作浓度,完成试剂 1 的制备。

[0012] 试剂 2 的制备:将抗人 CYS-C 抗体与 ALP 用 SMCC、2IT 作为交联剂进行连接。抗人 CYS-C 抗体与 ALP 摩尔比为 1:1-1:2。交联后用凝胶层析的方法纯化,获得连接 ALP 的抗人 CYS-C 抗体浓溶液,将该溶液用缓冲液稀释到工作浓度完成试剂 2 的制备。

附图说明

[0013] 图 1. 血清样本检测结果相关性

具体实施方式

[0014] 实施例 1 :抗 FITC 抗体与磁微粒偶联,制备磁分离试剂。

[0015] 材料与仪器

[0016] 1. 磁微粒 :含羧基(COOH) 活性基团,每克(g) 磁微粒(干重) 羧基含量不低于 0.4 毫摩尔(mmol),具有超顺磁性,直径在 0.5-2 μm 之间。

[0017] 2. 抗 FITC 抗体 :可以是多克隆抗体,也可以是单克隆抗体,纯度应超过 90%,稀释效价应超过 1:100 万。

[0018] 3. 2- 吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0019] 操作步骤

[0020] 1. 取 100mg 磁微粒,磁分离去上清,用 0.05mol/L, pH=4.5-5.0 的 MES 缓冲液 10ml 重悬 ;

[0021] 2. 加入 2-4mg 的抗 FITC 抗体,室温混悬 30-60min ;

[0022] 3. 加入 0.5-1ml,新鲜配制的 10mg/ml 的 EDC 水溶液,室温混悬 2-12h ;

[0023] 4. 磁分离,去上清,用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH=8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/ml,完成磁分离试剂的制备。

[0024] 实施例 2 : FITC 与抗 CYS-C 抗体连接制备试剂 1

[0025] 材料与仪器

[0026] 1. 抗人 CYS-C 单克隆抗体,由北京利德曼生化股份有限公司制备,纯度超过 95%,浓度超过 1mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存 ;

[0027] 2. 异硫氰酸荧光素(FITC),碳酸钠等试剂应达到化学纯 ;

[0028] 3. G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。

[0029] 操作步骤

[0030] 1. 用 0.1-0.2 mol/L pH=9.0-10.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/ml 的 FITC 溶液 ;

[0031] 2. 按照抗人 CYS-C 抗体与 FITC 摩尔比为 1:20-1:200 的比例在抗人 CYS-C 抗体溶液中加入 FITC 溶液,混合均匀,室温静置超过 12h ;

[0032] 3. 用 G-25 凝胶柱将抗人 CYS-C 抗体 -FITC 连接物与游离 FITC 分离,获得偶联有 FITC 分子的抗人 CYS-C 抗体浓溶液,将该溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH=8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$,完成试剂 1 的制备。

[0033] 实施例 3 : ALP 与抗人 CYS-C 抗体连接制备试剂 2

[0034] 材料与仪器

[0035] 1. 抗人 CYS-C 单克隆抗体,由北京利德曼生化股份有限公司制备,纯度超过 95%,浓度超过 5mg/ml,以磷酸盐缓冲液保存 ;

[0036] 2. 碱性磷酸酶纯度应超过 95%,比活性应超过 1000 U/mg,浓度超过 5mg/ml ;

[0037] 3. 偶联剂 SMCC, 2-IT 购自 THERMO 公司 , TRIS 等化学试剂应达到化学纯 ;

[0038] 4. AKTA-purifier 蛋白纯化仪和 Supperdex200 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0039] 操作步骤

[0040] 1. 取 1mg 抗人 CYS-C 抗体, 加入 10mg/ml 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μ l, 室温静置 20min, 加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μ l, 室温静置 5min。用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后的抗体, 2-8℃ 保存备用;

[0041] 2. 取 1.5mg 的 ALP 溶液, 加入 5mg/ml 的 SMCC 溶液 10-20 μ l, 室温静置 30min, 用 G-25 凝胶柱除盐, 收集活化后抗体, 2-8℃ 保存备用;

[0042] 3. 将上述活化的抗人 CYS-C 抗体与活化的 ALP 混合, 2-8℃ 条件下静置 12-24h, 用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物, 获得抗人 CYS-C 抗体-ALP 连接物浓溶液, 2-8℃ 保存备用。

[0043] 4. 将抗人 CYS-C 抗体-ALP 连接物浓溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) pH=8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5-1 μ g/ml, 完成试剂 2 的制备。

[0044] 实施例 3: 检测的实施和检测效果的评价

[0045] 材料与仪器

[0046] 1. 胱抑素 C 试剂 1, 胱抑素 C 试剂 2 和磁分离试剂, 由上述实施例 1、2、3 制备。

[0047] 2. 胱抑素 C 校准品、胱抑素 C 质控品、发光底物、清洗液、胱抑素 C 测定试剂盒 (免疫比浊法) 由北京利德曼生化股份有限公司生产。

[0048] 3. CI1000 全自动化学发光分析仪由北京利德曼生化股份有限公司生产。

[0049] 4. AU400 生化分析仪由奥林巴斯生产。

[0050] 检测实施

[0051] 下述检测步骤由全自动化学发光分析仪自动完成, 也可手工操作完成。

[0052] 1. 检测管内依次加入 5 μ l 样本、100 μ l 试剂 1、100 μ l 试剂 2、50 μ l 磁分离试剂, 混合均匀, 37 $\pm$ 0.5℃ 条件下反应 5min;

[0053] 2. 使磁微粒在磁场中沉降, 去除上清, 加入 600 μ l 的清洗液, 去除磁场, 震荡使磁微粒充分混悬。重复此操作, 共操作 3 次。

[0054] 3. 将磁微粒在磁场中沉降, 去除上清, 加入 100 μ l 的发光底物, 去除磁场, 充分混悬后检测 1 秒内相对发光强度值 (RLU)。

[0055] 灵敏度评价

[0056] 检测“0”浓度样本, 重复检测 20 次, 计算相对发光强度 (RLU) 的平均值 (M) 和标准差 (SD), 并计算 M+2SD 值, 根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程, 将 M+2SD 值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为最低检测限。本方法灵敏度 $\leq$ 0.01 μ g/ml。

[0057] 线性评价

[0058] 将 (8.0 $\pm$ 1.0) μ g/ml 的样本 2 倍稀释为 9 个浓度水平。将每一浓度的样本重复检测 2 次, 计算检测结果平均值, 将结果平均值和稀释比例进行直线拟合, 计算线性相关系数 r。本方法在 0.05-8 μ g/ml 检测范围内, 相关系数 $r \geq 0.9990$ 。

[0059] 精密度评价

[0060] 用 (1.0 $\pm$ 0.2) μ g/ml 和 (3.0 $\pm$ 0.6) μ g/ml 的样本各重复检测 10 次, 计算 10 次测量结果的平均值 M 和标准差 SD, 根据公式 $CV=SD/M \times 100\%$ 计算变异系数 CV。本方法 $CV \leq 5\%$ 。

[0061] 准确度评价

[0062] 在 1 例混合血清样本和 1 例混合尿液样本中添加不同量人 CYS-C 国际标准品, 形成 3 个浓度水平的血清或尿液添加样本, 添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度, 按下述公式计算回收率。本方法尿液和血清基质回收率在 90-115% 之间。数据参见表 1。

$$[0063] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0064] R:回收率;

[0065] V:加入标准溶液的体积;

[0066] V_0 :人源样品的体积;

[0067] C:人源样品加入标准溶液后的检测浓度;

[0068] C_0 :人源样品的检测浓度;

[0069] C_s :标准溶液的浓度。

[0070] 表 1. 准确度评价——添加回收实验数据

[0071]

样本	添加标准溶液体积(ml)	检测浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	添加质量 (μg)	回收量 (μg)	回收率%
混合血清样本	0	0.512	—	—	—
血清添加 1	0.01	1.652	1.0	1.14	114.00%
血清添加 2	0.02	2.421	2.0	1.909	95.45%
血清添加 3	0.04	4.536	4.0	4.024	100.60%
混合尿液样本	0	0.124	—	—	—
尿液添加 1	0.01	1.215	1.0	1.091	109.10%
尿液添加 2	0.02	2.259	2.0	2.135	106.75%
尿液添加 3	0.04	4.036	4.0	3.912	97.80%

[0072] 注:人 CYS-C 标准溶液浓度 =100 $\mu\text{g/ml}$;添加前样本体积 =1.0ml。相关性评价

[0073] 用研制方法和胱抑素 C 测定试剂盒(免疫比浊法)同时检测 100 例血清样本。以胶乳增强比浊法测值为横坐标, 研制方法测值为纵坐标做相关分析, 相关系数 $R^2=0.9862$, 斜率 =1.01, 截距 =0.0581。参见图 1。

[0074] 热稳定性评价

[0075] 取有效期内的样品, 在 37℃ 放置 7 天后, 检测准确性、最低检测限、线性、重复性仍符合上述要求。

[0076] 参考文献

[0077] [1]. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. Biochem J, 268:287-94.

[0078] [2]. 弓孟春, 胡蓉蓉, 李雪梅, 等. 胱抑素 C 的临床应用进展. 中华内科杂志,

2009 年 48 卷 10 期。

[0079] [3].Ying Ma, Qi Li, Jiuping Wang, Zhuwei Xu, et al. Cystatin C, a novel urinary biomarker for sensitive detection of acute kidney injury during haemorrhagic fever with renal syndrome. Biomarkers, 2010, 15(5): 410 - 417。

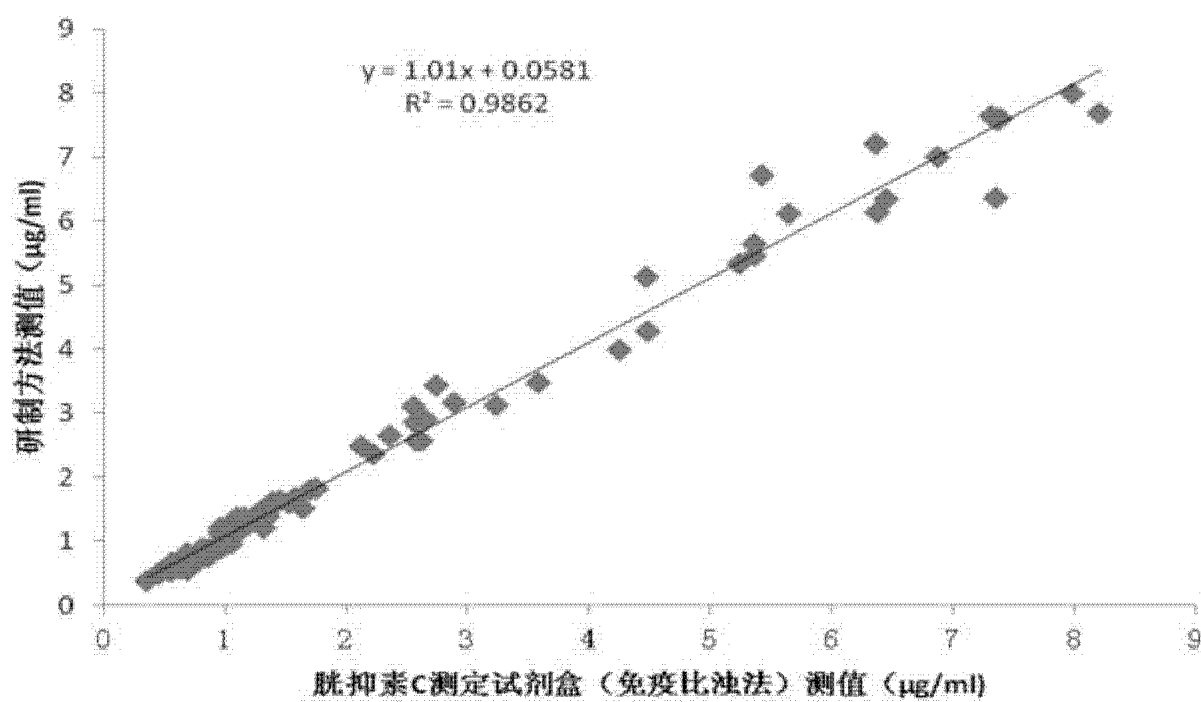


图 1

专利名称(译)	一种人朐抑素C化学发光定量检测方法		
公开(公告)号	CN103018465A	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210545717.5	申请日	2012-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种人朐抑素C的定量检测方法。该方法将磁微粒分离技术和酶促化学发光技术相结合,采用双抗体夹心一步反应法原理,可用于血清、血浆和尿液样本中人朐抑素C的含量测定,辅助各种肾功能损害疾病的诊断和治疗。该方法灵敏度 $\leq 0.01\mu\text{g/L}$,定量检测范围:0.05-8 $\mu\text{g/L}$,分析内精密度 $< 5\%$,检测用时10min,血清和尿液添加回收率在90-115%之间,与胶乳增强免疫比浊法试剂血清测值相关分析 $R^2=0.9862$ 。

