



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680713 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201210200347. 1

(22) 申请日 2012. 06. 18

(73) 专利权人 王钊

地址 610000 四川省成都市青羊区玉宇路  
998 号 3 栋 5 单元 1804 号

(72) 发明人 王钊

(74) 专利代理机构 成都顶峰专利事务所 (普通  
合伙) 51224

代理人 成实

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102253217 A, 2011. 11. 23,

CN 1178580 A, 1998. 04. 08,

CN 101833010 A, 2010. 09. 15,

WO 2012010881 A1, 2012. 01. 26,

Opheim 等. Particle-Enhanced

Turbidimetric Inhibition Immunoassay for  
Theophylline Evaluated with the Du Pont

aca. 《CLINICAL CHEMISTRY》. 1984, 第 30 卷 (第  
11 期),

Opheim 等. Particle-Enhanced  
Turbidimetric Inhibition Immunoassay for  
Theophylline Evaluated with the Du Pont  
aca. 《CLINICAL CHEMISTRY》. 1984, 第 30 卷 (第  
11 期),

胡修全. 胶乳增强免疫透射比浊法测定血清  
胱抑素 C 的方法学评价. 《实用医学杂志》. 2012,  
第 28 卷 (第 13 期),

审查员 胡晓佳

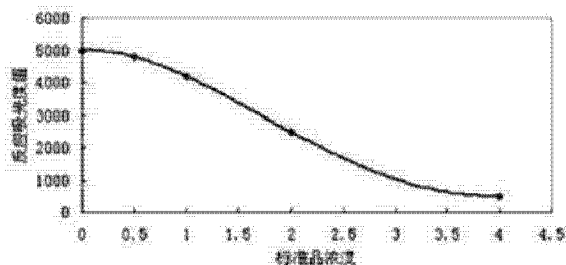
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂  
盒及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊  
C 肽检测试剂盒及制备方法, 解决了目前夹心法  
检测 C 肽难度较高, 检测时间长等问题。本发明的  
试剂盒, 由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成, 其特征  
在于: 所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基  
酸序列: EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X;  
X 由 2 ~ 4 个 K 组成。本发明还提供了该试剂盒  
的制备方法。本发明具有准确性高、检测时间短、  
可靠性高等优点。



1. 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒, 由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成, 其特征在于: 所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:

EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X; X 由 2 ~ 4 个 K 组成;

其中, 反应缓冲液为 100mM 的 MES 缓冲液, 且 MES 缓冲液中含有终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体, MES 缓冲液的 pH 为 5.0 ~ 7.5;

所述试剂盒是基于免疫竞争法对检测样本中的 C 肽进行定量测定。

2. 根据权利要求 1 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒的制备方法, 包括胶乳颗粒的制备和反应缓冲液的制备, 其特征在于, 所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

(a1) 活化胶乳颗粒, 离心, 去上清, 使用 HEPES 缓冲液复溶;

(a2) 加入人工合成的氨基酸序列 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X, 室温下反应 2 小时;

(a3) 加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸, 以及 10%BSA 溶液, 反应 30min;

(a4) 离心, 去上清, 使用 HEPES 缓冲液复溶即制成成品。

3. 根据权利要求 2 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述离心的条件为 22000rpm, 离心的时间为 10min。

4. 根据权利要求 3 所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述(a1)中活化胶乳颗粒所采用的试剂为 EDC 和 S-NHS。

5. 根据权利要求 2 ~ 4 任一项所述的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述反应缓冲液制备过程如下:

在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体。

## 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及的是生物技术领域,具体涉及的是竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒,本发明还涉及该试剂盒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 测定 C 肽能得知胰岛细胞的功能,对糖尿病的诊断和治疗具有很大的意义,C 肽没有胰岛素的功能,而胰岛 B 细胞分泌的胰岛素和 C 肽呈等分子关系,这也就是说,分泌几个胰岛素分子,同时必然分泌几个 C 肽分子。血清 C 肽浓度可间接反应胰岛素浓度。C 肽不受肝脏酶灭活,半衰期比胰岛素长,经肾脏直接在尿中排泄,故血中 C 肽的浓度可更好地反映胰岛素的功能。

[0003] 正常基础状态下 C 肽水平为  $0.4 \pm 0.2$  纳摩 / 升。在口服葡萄糖耐量试验(标准馒头餐试验)的同时可抽血测定空腹血糖负荷后 1 小时、2 小时、3 小时的血清 C 肽水平,正常人在服糖 60 分钟后 C 肽水平升高至基础水平的 3 倍以上。1 型糖尿病 C 水平极低( $< 0.2$  纳摩 / 升),胰岛功能减退者餐后 C 肽升主的幅度常低于 3 倍。对于接受胰岛素治疗的患者,用测定血中胰岛素水平不能评价自身胰岛功能时,可以测定 C 肽水平来评价自身胰岛 B 细胞功能。

[0004] 目前已有的 C 肽测定方法有化学 / 电化学发光免疫检测、放射免疫检测、酶联免疫检测,其缺点是检测时间普遍较长(约 30min),且检测费用昂贵。

[0005] 传统的胶乳颗粒增强免疫比浊法检测抗原物质时采用的是夹心法检测原理,即被检测物抗原与样本稀释液(试剂 1)混合后孵育一定时间,再与包被有对应抗体的纳米颗粒(试剂 2)发生抗原抗体反应,形成不容性的免疫复合物,在全自动生化仪上表现为吸光度上升(形成一定的吸光度变化值),这种吸光度的变化值与被测物质抗原含量正相关,使用已知浓度的标准品绘制标准曲线,则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。其要求是抗原物质要有两个以上的无空间位阻的抗原表位。但是, C 肽由于只有 31 个氨基酸,无空间位阻的抗原表位较少,采用夹心法检测难度较高。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于解决目前夹心法检测 C 肽难度较高,检测时间长的问题,提供一种速度快、检测简便的竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒及制备方法。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒,由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成,所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:

[0009] EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X ;X 由 2 ~ 4 个 K 组成。

[0010] 进一步,所述反应缓冲液中含有抗 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体。

[0011] 更进一步地,所述竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒是基于免疫竞争

法对检测样本中的 C 肽进行定量测定。

[0012] 竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊 C 肽检测试剂盒的制备方法,包括胶乳颗粒的制备和反应缓冲液的制备,所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

[0013] (a1) 活化胶乳颗粒,离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶;

[0014] (a2) 加入人工合成的氨基酸序列 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X,室温下反应 2 小时;

[0015] (a3) 加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸,以及 10%BSA 溶液,反应 30min;

[0016] (a4) 离心,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶即制成成品。

[0017] 为了更有效的得到所需胶乳颗粒;所述离心的条件为 22000rpm,离心的时间为 10min。

[0018] 作为一种优选,所述(a1)中活化胶乳颗粒所采用的试剂为 EDC 和 S-NHS。

[0019] 进一步,所述反应缓冲液制备过程如下:

[0020] 在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体。

[0021] 本发明原理是:纳米颗粒包被的是和被测抗原物质相同或相似的抗原,与一定量的对应的抗体发生抗原抗体反应,形成不容性的免疫复合物,在全自动生化仪上表现为形成一定的吸光度变化值。当被测物中含有此种抗原时,由于竞争原理,所形成的吸光度变化值与无被测物质时相比下降,在竞争法中吸光度的变化值与被测物质抗原含量负相关,使用已知浓度的标准品绘制标准曲线,则可根据被测标本的反应吸光度变化计算出其含量。

[0022] 本发明具有以下优点及有益效果:

[0023] 1、在 C 肽的抗原测定中,由于其抗原太小,较难提供形成夹心免疫复合物的多个抗原表位;使用本发明无需形成多个抗原表位,即可有效的对 C 肽进行检测,使检测方法更简便,检测结果更准确。

[0024] 2、采用本发明的试剂盒可快速对 C 肽进行检测,检测时间仅需要 10min。

[0025] 3、本发明采用包被有人工合成的氨基酸 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X 的胶乳颗粒以及含有抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体的反应缓冲液对 C 肽进行检测;因此,本发明具有特异性好、准确性高的优点。

[0026] 4、通过本发明的试剂盒进行检测,其检测成本相对低廉,适合推广应用。

[0027] 5、本发明的免疫竞争法同时适用于其他小分子抗原的测定。

#### 附图说明

[0028] 图 1 为本发明不同含量的 C 肽参考标准的标准曲线。

#### 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但本发明的实施方式不限于下列实施例。

[0030] 实施例 1

[0031] 本发明由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成。

[0032] 所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列:EAEDLQVGQV

ELGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X;X 由 2 ~ 4 个 K 组成。所述反应缓冲液中含有抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体。该 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 为现有的氨基酸序列。

[0033] 所述人工合成的氨基酸序列:EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X,由生工生物工程(上海)有限公司合成。抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体由 Abcam 公司提供。

[0034] (a)所述胶乳颗粒的制备方法由以下步骤组成:

[0035] (a1)采用 EDC 和 S-NHS 活化胶乳颗粒,活化时间为 15min,活化后的物质在 22000rpm 的条件下离心 10min,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶;

[0036] (a2)加入人工合成的氨基酸序列 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQKK,在室温下反应 2 小时;

[0037] (a3)加入上述反应体积 1/100 的 1M 甘氨酸,以及 10%BSA 溶液,反应 30min;

[0038] (a4)在 22000rpm 的条件下离心 10min,去上清,使用 HEPES 缓冲液复溶。

[0039] 根据上述步骤即可制备出本发明所需的胶乳颗粒。上述步骤中 EDC 为 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐;上述 S-NHS 为 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0040] (b)所述反应缓冲液制备过程如下:

[0041] 在 100mM 的 MES 缓冲液中加入终浓度为 0.001 ~ 0.1mg/ml 的抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体。所述 MES 为脂肪酸甲酯磺酸盐;MES 缓冲液的 pH 为 5.0 ~ 7.5。本实施例中采用的抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.001 mg/ml。

[0042] 采用上述步骤制备出的胶乳颗粒和反应缓冲液,检测出不同浓度下的 C 肽标准品的吸光度,通过该浓度和吸光度制成本发明的标准曲线;其检测过程如下:

[0043] 往日立 7060 全自动生化分析仪器中加入本发明的胶乳颗粒和反应缓冲液,胶乳颗粒 200ul,反应缓冲液 50ul。再向该全自动生化仪中加入 30ul 的样本。进行检测,检测参数:反应时间 10min,18 ~ 31 读点,570nm 单波长。

[0044] 标准曲线的制作过程如下:采用以下标准样本校准点浓度 0.00nmol/l、0.5nmol/l、1.0nmol/l、2.0nmol/l、4.0nmol/l;用 5 点 Spline 或 Log4p 模式校准,通过检测结果制作出本发明标准曲线。本实施例的标准曲线如图 1 所示,其中 X 轴代表 C 肽含量,Y 轴表示吸光度变化值。

[0045] 完成标准曲线后,即可进行标本测定,由仪器自动计算样本中 C 肽含量。

[0046] 本实施例对 9 份样本进行检测;同时,采用德国拜耳公司的 CENTAUR 自动冷光免疫分析仪和 C peptide 检测试剂对样本进行检测作为对照实验,检测结果如表 1。

[0047] 实施例 2

[0048] 本实施例与实施例 1 的不同点在于胶乳颗粒包被的人工合成的氨基酸序列不同;同时,本实施例中所采用的抗 EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.05 mg/ml。本实施例采用的人工合成的氨基酸序列为:EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQKKK。检测结果如表 1。

[0049] 实施例 3

[0050] 本实施例与实施例 1 的不同点在于胶乳颗粒包被的人工合成的氨基酸序列不同;

同时,本实施例中所采用的抗 EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQ 抗原表位的单克隆抗体的终浓度为 0.1 mg/ml。本实施例采用的人工合成的氨基酸序列为 :EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKKKK。检测结果如表 1。

[0051] 表 1

[0052]

样本	实施例 1	实施例 2	实施例 3	对照实验
1	0.121	0.128	0.129	0.132
2	0.580	0.591	0.592	0.610
3	0.383	0.393	0.391	0.383
4	0.628	0.639	0.634	0.667
5	1.075	1.099	1.089	1.113
6	0.945	0.968	0.973	0.983
7	0.239	0.245	0.248	0.251
8	0.101	0.111	0.114	0.114
9	0.745	0.762	0.777	0.790

[0053] 通过上表 1,即可有效的表明 :通过本发明即可有效的检测出样本中 C 肽的含量 (nmol/l),且其准确性高、检测时间短、可靠性高,方法简便,适合推广应用。

[0054] 按照上述实施例,便可很好地实现本发明。

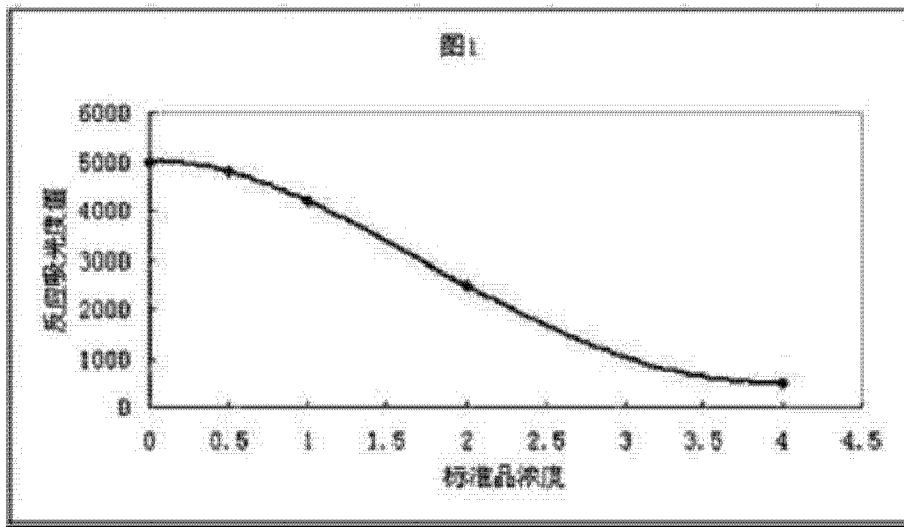


图 1

专利名称(译)	竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊C肽检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102680713B</a>	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	CN201210200347.1	申请日	2012-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	王钊		
申请(专利权)人(译)	王钊		
当前申请(专利权)人(译)	王钊		
[标]发明人	王钊		
发明人	王钊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	成实		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN102680713A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了竞争法胶乳颗粒增强免疫比浊C肽检测试剂盒及制备方法，解决了目前夹心法检测C肽难度较高，检测时间长等问题。本发明的试剂盒，由胶乳颗粒以及反应缓冲液组成，其特征在于：所述胶乳颗粒包被有以下人工合成的氨基酸序列：  
EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ-X；X由2~4个K组成。  
本发明还提供了该试剂盒的制备方法。本发明具有准确性高、检测时间短、可靠性高等优点。

