



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101699287 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 200910090689.0

(22) 申请日 2009.09.08

(73) 专利权人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市亦庄经济技术开发区宏
达南路 5 号

(72) 发明人 不公告发明人

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限
公司 11243

代理人 钟晶

粒径控制.《稀有金属》.2005,第29卷(第4
期),471-474.

M.Tanaka等.A sol particle homogeneous
immunoassay for measuring serum cystatin
C.《Clinical Biochemistry》.2004,27-35.

C.DE ROE等.A Model of
Protein-Colloidal Gold Interactions.《J
Histochem Cytochem》.1987,第35卷(第11
期),1191-1198.

审查员 温婧

(51) Int. Cl.

G01N 33/538(2006.01)

G01N 33/542(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101377492 A, 2009.03.04, 全文.

祁金友.糖尿病患者血清中胱抑素 C 含量测
定的临床意义.《检验医学与临床》.2007,第4卷
(第1期),35-36.

戴婉如等.免疫胶体金技术测定血清胱抑素
C 及其对早期肾损害的诊断价值.《检验医学与临
床》.2009,第6卷(第5期),336-337.

贺昕等.免疫检测用纳米胶体金的制备及

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制
备方法

(57) 摘要

本发明提供一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试
剂盒及其制造方法。所述匀相溶胶颗粒型免疫测
定试剂盒包含试剂 R1 和试剂 R2,所述试剂 R1 为
含有多聚物的缓冲溶液;所述试剂 R2 为标记有抗
人胱抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液,其中胶体
金颗粒直径为 65 ~ 85nm。本发明的试剂盒能够
特异性地高灵敏度地测定血清或血浆中胱抑素 C
的含量。

1. 一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
将多聚物溶解于缓冲液中,制成含有多聚物的缓冲溶液,即试剂 R1 ;
使用氯金酸为原料制备胶体金溶液,溶液中的胶体金颗粒的粒径为 65 ~ 85nm ;将抗人胱抑素 C 抗体用缓冲液稀释后,向其中加入上述胶体金溶液,使胶体金和抗人胱抑素 C 抗体结合,制成结合有抗人胱抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液,根据需要进行纯化,得到试剂 R2,其中使胶体金和抗人胱抑素 C 抗体结合的步骤中所用的缓冲液为硼酸盐缓冲液或 HEPES 缓冲液,该缓冲液的浓度为 0.004 ~ 0.02mol/L, pH 值为 7.5 ~ 8.5。
2. 根据权利要求 1 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒的制备方法,其中,使胶体金和抗人胱抑素 C 抗体结合的步骤中所用的缓冲液为硼酸盐缓冲液。
3. 通过权利要求 1 或 2 记载的方法制备的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其用于测定胱抑素 C 的含量,该试剂盒包含试剂 R1 和试剂 R2,以体积比计,试剂 R1 和试剂 R2 的含量比例为 4 :1,该试剂盒中任选地含有胱抑素 C 标准品,所述试剂 R1 为含有多聚物的缓冲溶液,所述试剂 R2 为结合有抗人胱抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液,其中胶体金颗粒直径为 65 ~ 85nm。
4. 根据权利要求 3 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其中,所述胶体金颗粒直径为 70 ~ 80nm。
5. 根据权利要求 3 或 4 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其中,所述胶体金的缓冲溶液中,金含量为 0.1 ~ 1.0mg/mL。
6. 根据权利要求 3 或 4 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其中,试剂 R1 中的所述多聚物的含量,以重量体积比 g/ml 计,为 0.1 ~ 5.0%。
7. 根据权利要求 3 或 4 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其中,所述多聚物为 PEG20000 或 Brij-35 中的至少任一种。
8. 根据权利要求 3 或 4 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其中,试剂 R1 的 pH 值为 6.5 ~ 8.5。
9. 一种胱抑素 C 含量测定方法,其特征在于,使用权利要求 3 ~ 8 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒。

匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒及其制备方法,更具体地,涉及用于测定血清或血浆中胱抑素 C 的匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 免疫测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 胱抑素 C(CystatinC) 是一种低分子量蛋白质,可由机体所有有核细胞产生,产生率恒定。循环中的胱抑素 C 仅经肾小球滤过而被清除,是一种反映肾小球滤过率变化的理想的内源性标志物,而肾小球的滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 是监测肾功能的一个重要指标,尤其对于肾移植的病人,快速准确的掌握肾小球滤过率的变化是十分重要的。此外由于胱抑素 C 分子量大于肌酐,且带正电荷,所以它更容易反映肾小球滤过膜通透性的早期变化,可以在肾小球滤过率轻微降低时升高,较肌酐更敏感,作为肾功能试验优于血清肌酐,具有重要的临床应用价值。

[0003] 胱抑素 C,是一种由 120 个氨基酸残基组成的分子量仅 13KD 的低分子量分泌性蛋白质,是半胱氨酸蛋白酶抑制物超家族的成员之一。胱抑素 C 基因 5' 侧翼序列与“看家基因”的启动子区具有相同的特性,也属于“看家基因”即此基因在所有组织恒定持续地转录及表达,无组织学特异性,广泛地存在于各种体液中,如脑脊液、血液、唾液、精液等,机体胱抑素 C 产生率相当恒定。而胱抑素 C 是一种低分子量蛋白质,可经肾小球自由滤过,肾脏是清除循环中胱抑素 C 的唯一器官,所以血清胱抑素 C 浓度主要由 GFR 决定,由此可见胱抑素 C 是一种理想的反映 GFR 变化的内源性标志物。

[0004] 临床研究低分子量蛋白质 (β 2- 微球蛋白、视黄醇结合蛋白、胱抑素 C) 浓度与 GFR (^{51}Cr -EDTA 清除率或其金标准 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA 清除率) 的相关性,血清胱抑素 C、肌酐浓度诊断异常 GFR 的敏感性分别为 78.1% 及 57.1%,各自浓度倒数与 GFR (^{51}Cr -EDTA 清除率) 的相关系数分别为:0.81 和 0.50 (参见非专利文献 1)。表明胱抑素 C 是低分子量蛋白质中与 GFR 最相关的内源性标志物,甚至优于血清肌酐。血清 β 2- 微球蛋白浓度由于在炎症、肿瘤及免疫疾病时也可升高,故不是理想的 GFR 内源性标志物。而胱抑素 C 即使在炎症状态下,其产生率也不会改变,血清浓度受年龄、性别、疾病的病情变化的影响较小。说明胱抑素 C 的诊断准确性明显优于血清肌酐。

[0005] 胱抑素 C 的检测方法学经历了大概 4 个阶段的发展过程,从最初的单向免疫扩散到酶免疫测定,再到后来的胶乳增强法及匀相溶胶颗粒法等,几种方法都属于免疫检测法。免疫浊度测定的基本原理是:抗原抗体在特殊缓冲液中快速形成抗原抗体复合物,使反应液出现浊度。当反应液中保持抗体过量时,形成的复合物随抗原量增加而增加,反应液的浊度亦随之增加,与一系列的标准品对照,即可计算出待检测物的含量。但含量低分子量小的抗原抗体复合物极难形成浊度,除非放置较长时间;如形成较大的复合物,则抗原和抗体用量也较大,显然不符合微量化的要求。于是发展了免疫胶乳浊度测定法,是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫浊度测定法,其基本原理是:将抗体吸

附在大小适中、均匀一致的胶乳颗粒上,当遇到相应抗原时,则使胶乳颗粒发生凝集。单个胶乳颗粒在入射光波之内不阻碍光线透过,两个或两个以上胶乳颗粒凝聚时则使透过光减少,这种减少的程度与胶乳颗粒凝聚的程度呈正比,当然也与待测抗原量呈正比,由此可测出标本中待测物的含量。这种方法会产生免疫沉淀。后来又出现了匀相溶胶颗粒免疫测定法,其基本原理是:将抗体吸附在大小适中、均匀一致的胶体金颗粒上,当遇到相应抗原时,由于抗原抗体的相互作用使吸附抗体的胶体金颗粒发生凝聚。金颗粒凝聚后颜色由红变蓝,在波长 540nm 处吸光度会逐渐降低。而这种降低的程度与胶体金颗粒凝聚的程度呈正比,当然也与待测抗原量呈正比,由此可测出标本中待测物的含量。但是,目前的匀相溶胶颗粒免疫测定法,其分析灵敏度还不令人满意,期待着进一步提高该方法的检测灵敏度。

[0006] 由于血清中胱抑素 C 浓度较低,故其测定方法需较高的分析灵敏度及特异性。最早采用单向免疫扩散法 (RID) 及酶免疫测定法 (EIA) 对胱抑素 C 含量进行测定,而这两种方法不仅费时,灵敏度也较差。较简单且更灵敏的放射、荧光及各种酶免疫测定 (RIA、FIA 及 EIA) 的方法能改善胱抑素 C 测定的可靠性,但测定时间仍较长,无法常规应用,更无法用于急诊测定。以上各种测定方法均属非均相测定方法,很难自动化,因此限制了胱抑素 C 的广泛临床应用。采用上述的胶乳增强免疫均相测定方法,即在胶乳颗粒上包被抗体,与抗原结合时颗粒发生凝集,此方法很容易自动化。Kabanda 等于 1994 年报道的测定胱抑素 C 的胶乳颗粒凝集法是一种颗粒计数免疫测定法 (参见非专利文献 2)。Kyhse Andersen 等于同年报道了一种颗粒增强透射免疫比浊法 (particle-enhanced turbidimetric immunoassay, PETIA),使胱抑素 C 测定的时间缩短至 5 分钟左右,且可在自动生化分析仪上进行,使胱抑素 C 测定的常规应用成为可能 (参见非专利文献 3)。Finney 等在 1997 年报道了颗粒增强散射免疫比浊法 (particle-enhanced nephelometric immunoassay, PENIA),其原理是将抗人胱抑素 C 单克隆抗体标记在聚苯乙烯胶乳颗粒上,采用胶乳颗粒增强的免疫散射比浊度法来测定 (参见非专利文献 4)。匀相溶胶颗粒免疫测定法 (sol particle immunoassays, SPIAs) 最早是由 Leuvering 等提出的 (参见非专利文献 5),2004 年 Tanaka 等对该方法作了改进,检测范围 0.15 ~ 8mg/L (参见非专利文献 6)。该法反应时间短,可用于自动生化仪。

[0007] 就检测灵敏度而言,RID 法最差,而 EIA、RIA 及 FIA 法均优于 PETIA、PENIA 及 SPIAs 法。由于 RTA 法存在放射性污染,FIA 法需昂贵的仪器,以及 RIA、FIA、EIA 法测定时间长,且不能全自动化,无法用于临床大批量标本的测定。PETIA、PENIA 及 SPIAs 法虽然检测灵敏度差些,但仍可达 0.15mg/L 左右,远远低于健康人血清胱抑素 C 浓度 (小于 1.0mg/L) 的下限值,可满足临床需要;这三种测定方法基本上不受血红蛋白、胆红素、类风湿因子、甘油三酯的影响,回收率可达 95% ~ 109%,批内及批间变异系数均较小 (< 4.5%);但由于 PETIA 和 PENIA 两种方法反应后会产生沉淀,不利于生化仪的清洗。而 SPIAs 法则不会产生沉淀。故在血清胱抑素 C 测定的常规临床应用中可首选 SPIAs 法。Tanaka 对 SPIAs 法进行了研究 (非专利文献 6),但其提出的方法的灵敏度仍有待提高。

[0008] 非专利文献 1:Newman DJ. Serum cysC measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.* 1995, 47:312-318.

[0009] 非专利文献 2:Kabamda A. Determinants of the serum con-centrations

of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Int.* 1994, 45(6):1689 ~ 1696

[0010] 非专利文献 3: Kyhse, Andersen J. Serum Cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 1994, 40(10):1921 ~ 1926

[0011] 非专利文献 4: Finney H. Initial evaluation of Cystatin C measurement by particle enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer 2 systems (BNA, BN II). *Clin Chem.* 1997, 43(6):1016 ~ 1022

[0012] 非专利文献 5: Leuvers JHW. Sol particle immunoassay (SPIA). *J Immunoassay.* 1980, 1:77-91.

[0013] 非专利文献 6: Tanaka M. A sol particle homogeneous immunoassay for measuring serum cystatin C, *Clinical Biochemistry.* 2004, 37:27-35

发明内容

[0014] 本发明要解决的问题是进一步提高测定胱抑素 C 含量时的分析灵敏度, 提供一种特异性的高灵敏度的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 可以用于测定 0.06mg/L ~ 8mg/L 的胱抑素 C 含量。本发明的目的还在于提供上述试剂盒的制备方法。另外, 本发明的目的还在于提供使用本发明匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒测定胱抑素 C 含量的方法。

[0015] 为了解决上述问题, 本发明采用匀相溶胶颗粒免疫测定法 (SPIAs) 检测血清或血浆中胱抑素 C 含量。采用标记于胶体金的抗胱抑素 C 的抗体, 与待测标本中的胱抑素 C 发生凝聚反应使胶体金颜色发生变化, 用 540nm 检测这种变化, 以胱抑素 C 标准品的标准曲线得出样本中目标检测物胱抑素 C 的浓度。

[0016] 本发明提供以下的技术方案。

[0017] 1. 一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其用于测定胱抑素 C 的含量, 该试剂盒包含试剂 R1 和试剂 R2, 以体积比计, 试剂 R1 和试剂 R2 的含量比例为 4 : 1, 该试剂盒中任选地含有胱抑素 C 标准品, 所述试剂 R1 为含有多聚物的缓冲溶液, 所述试剂 R2 为结合有抗人胱抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液, 其中胶体金颗粒直径为 65 ~ 85nm。

[0018] 2. 根据权利要求 1 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其中, 所述胶体金颗粒直径为 70 ~ 80nm。

[0019] 3. 根据权利要求 1 或 2 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其中, 所述胶体金的缓冲溶液中, 金含量为 0.1 ~ 1.0mg/mL。

[0020] 4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其中, 试剂 R1 中的所述多聚物的含量, 以重量体积比 g/mL 计, 为 0.1 ~ 5.0%。

[0021] 5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其中, 所述多聚物包含 PEG 2 万或 Brij-35 中的至少任一种。

[0022] 6. 根据权利要求 1 ~ 5 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒, 其中, 试剂 R1 的 pH 值为 6.5 ~ 8.5。

[0023] 7. 权利要求 1 ~ 6 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

[0024] 将多聚物溶解于缓冲液中,制成含有多聚物的缓冲溶液,即试剂 R1;

[0025] 使用氯金酸为原料制备胶体金溶液,溶液中的胶体金颗粒的粒径为 65 ~ 85nm;将抗人胰抑素 C 抗体用缓冲液稀释后,向其中加入上述胶体金溶液,使胶体金和抗人胰抑素 C 抗体结合,制成结合有抗人胰抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液,根据需要进行纯化,得到试剂 R2。

[0026] 8. 根据权利要求 7 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒的制备方法,其中,使胶体金和抗人胰抑素 C 抗体结合的步骤中所用的缓冲液浓度为 0.004 ~ 0.02mol/L,缓冲液 pH 为 7.5 ~ 8.5。

[0027] 9. 根据权利要求 8 记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒的制备方法,其中,所述缓冲液为硼酸盐缓冲液或 HEPES 缓冲液。

[0028] 10. 一种胰抑素 C 含量测定方法,其特征在于,使用权利要求 1 ~ 6 中任一项记载的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒。

[0029] 使用本发明的方法灵敏度高保证能够检测极低水平 (0.06mg/L) 的胰抑素 C,具有很高的临床实用价值。另外,本发明的试剂盒为液体双试剂,因此具有特异性好,灵敏度高,准确性好及抗干扰能力强等优点,可用于检测血清或血浆中胰抑素 C 的浓度,适用于临床全自动生化分析仪。

附图说明

[0030] 图 1 显示 6 种不同含量的胰抑素 C 参考标准的标准曲线,每个点代表不同含量的胰抑素 C 参考标准,其中, x 轴表示胰抑素 C 的含量, Y 轴表示吸光度。

[0031] 图 2 为分别采用本发明制备例 1 的试剂和对照试剂 (市售的胰抑素 C 匀相溶胶颗粒免疫测定试剂,购自日本 Alfresa 公司),采用奥林巴斯公司制造的 AU400 全自动生化分析仪对 50 份人血清进行测定,对测定值进行相关分析。其中 X 轴表示的是本发明制备例 1 的试剂测定的病人血清结果; Y 轴表示的是胰抑素 C 试剂比较品测定的病人血清结果,相关系数 $R^2 = 0.9922$,回归方程为 $y = 0.9109x + 0.05$ 。

具体实施方式

[0032] 本发明的目的在于特异性地高灵敏度地测定胰抑素 C 含量,本发明中,在制备匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂时,通过选择具有合适粒径的胶体金颗粒,在用抗体标记胶体金时选择合适的标记条件,实现了上述目的。

[0033] 具体来说,本发明提供一种特异的高灵敏度的能够测定 0.06mg/L ~ 8mg/L 的胰抑素 C 含量的匀相溶胶颗粒免疫测定试剂盒,所述的试剂盒包含试剂 R1 和试剂 R2,以体积比计,试剂 R1 和试剂 R2 的含量比例为 4 : 1。所述的试剂 R1 为含有多聚物的缓冲液;所述的试剂 R2 为结合有抗人胰抑素 C 抗体的胶体金缓冲溶液。试剂 R1 和试剂 R2 的 pH 值可以为 6.5 ~ 8.5。在不影响本发明效果的范围内,本发明的试剂 R1 中也可以含有适当的防腐剂,例如 NaN_3 等,本发明的试剂 R2 中也可以含有适当的稳定剂,常用的稳定剂例如有胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万,加入量分别可以是胎牛血清 (BSA) 终浓度 0.5 ~ 2% 和 PEG 2 万终浓度 0.1 ~ 1%。

[0034] 所述胶体金颗粒直径为优选为 65 ~ 85nm,进一步优选为 70 ~ 80nm,更进一步优

选为 72 ~ 78nm, 特别优选为 73 ~ 77nm。胶体金颗粒直径如果小于 65nm, 会影响灵敏度, 如果大于 85nm, 会使胶体金易形成沉淀, 影响测定结果。

[0035] 本发明中, 通过波谱扫描法, 使用分光光度计, 在 37℃ 扫描胶体金溶液的最大吸收峰, 根据该最大吸收峰来得到胶体金颗粒的粒径。

[0036] 胶体金与 IgG 分子结合 (即标记抗体) 时所用的缓冲液的种类、浓度和 pH 值对标记结果影响较大, 此时, 通过选用合适的缓冲液, 可以更好地实现本发明的技术效果。本发明中, 标记抗体时所用的缓冲液的浓度优选为 0.004 ~ 0.02mol/L, 更优选为 0.005 ~ 0.01mol/L, 特别优选 0.005 ~ 0.008mol/L, pH 值优选在 7.0 ~ 9.0, 更优选 7.5 ~ 8.5, 该缓冲液优选为硼酸盐缓冲液或 HEPES 缓冲液, 特别优选使用硼酸盐缓冲液。本发明中, 用 0.005mol/L 且 pH 值为 8.0 的硼酸盐缓冲液效果最好。

[0037] 在本发明所述的匀相溶胶颗粒胰抑素 C 测定试剂盒试剂 R1 中, 所述的多聚物包括分子量为 2 万的聚乙二醇 (以下简称为“PEG 2 万”)、聚氧乙烯月桂醚 (以下简称为“Brij-35”) 等; 在试剂 R2 中, 结合有抗人胰抑素 C 抗体的胶体金溶液中, 金含量为 0.1 ~ 1.0mg/mL, 优选为 0.3 ~ 0.7mg/mL, 更优选为 0.4 ~ 0.6mg/mL, 最优选为 0.5mg/mL。试剂 R1 中, 所述的多聚物包括 PEG 2 万、Brij-35 等, 其含量为 0.1 ~ 5.0% (g/ml); 试剂 2 中抗人胰抑素 C 抗体与胶体金的标记采用物理吸附法来进行。

[0038] 在本发明所述的匀相溶胶颗粒胰抑素 C 测定试剂盒, 其中还包括胰抑素 C 标准品。胰抑素 C 含量为 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L 的六个梯度标准品, 所述标准品是添加有重组人胰抑素 C 纯品的人血清或其它类似血清基质的液体, 所述重组人胰抑素 C 纯品可以通过公知的方法制备得到或者购买市售产品。所述标准品可以根据需要采用适当的梯度和常规方法来制备

[0039] 在本发明中, 胰抑素 C 测定试剂盒中, 除了上述用于标记时特别选用的缓冲液以外, 作为可以用于试剂 R1 和试剂 R2 的缓冲液, 还可以使用但不限于 TRIS 缓冲液以及其它具有相似性质的缓冲液。缓冲液的 pH 值为 6.5 ~ 9.0, 更优选 pH 值为 7.0 ~ 8.5。

[0040] 本发明中采用的匀相溶胶颗粒免疫测定法即 SPIAs 法的原理为: 吸附有胰抑素 C 抗体的大小适中、均匀一致的胶体金溶胶颗粒, 当遇到相应抗原 (胰抑素 C) 时, 由于抗原抗体的相互作用使吸附抗体的胶体金颗粒发生凝聚。金颗粒凝聚后颜色由红变蓝, 在波长 540nm 处吸光度会逐渐降低。而这种降低的程度与胶体金颗粒凝聚的程度呈正比, 也与待测抗原量呈正比, 测定特定波长下反应体系的颜色变化, 通过标准曲线 (该曲线为标准物浓度与色度关系曲线) 即可测出目的检测物的浓度。

[0041] 本发明中, 采用自制的胶体金和胰抑素 C 抗体, 标记后与待测标本 (血清或血浆) 中的胰抑素 C 发生结合反应, 形成免疫复合物并使标记胶体金发生聚集颜色由红变蓝, 用光透射强度检测这种变化, 以胰抑素 C 标准品的标准曲线得出样本中目标检测物胰抑素 C 的浓度。

[0042] 实施例

[0043] 实施例中的“重量体积比”, 除特殊说明外均为“g/ml”。

[0044] 以下, 制备本发明的检测试剂及胰抑素 C 标准品。

[0045] < 制备本发明检测试剂及标准品所使用的主要原料 >

[0046] 1. 鼠抗人胰抑素 C 单克隆抗体 (单抗): 按照常规方法制造得到, 该抗体仅与人胰

抑素 C 反应,与其他抗原无免疫交叉反应,效价能够满足本试剂要求。

[0047] 2. 氯金酸:购自 sigma 公司,用于制备本发明中使用的胶体金。

[0048] 3. 重组人朊抑素 C 蛋白:按照常规方法制造得到,用于制备标准品。

[0049] 4. 人朊抑素 C 标准液:购自 Dako 公司,产品名:X0974,浓度 7.5mg/L,用于给标准品赋值。

[0050] < 本发明朊抑素 C 标准品的制备 >

[0051] 用重组人朊抑素 C 蛋白溶于类似人血清基质的溶液 (0.9% NaCl, 0.1% BSA, 0.1% NaN_3 , 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 pH8.0), 制备不同浓度的标准品。以 Dako 人朊抑素 C 标准液为原始标准,采用胶体金凝集反应法,分别对制备的标准品进行测定,分别检测 20 次,求出均值达到标准品所要求的浓度,即 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0mg/L。

[0052] < 本发明检测试剂的制备 >

[0053] 制备例 1

[0054] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0055] 向 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5)80ml 中加入 PEG2 万 2g、Brij-350.5g 和 NaN_3 0.1g,充分溶解后用蒸馏水将体积补充至 100ml,用 0.22 μm 的滤膜过滤,制成试剂 R1。该试剂 R1 中,PEG2 万的含量为 2% (重量体积比),Brij-35 的含量为 0.5% (重量体积比), NaN_3 的含量为 0.1% (重量体积比)。由此制得本发明的试剂 R1。

[0056] 虽然,本制备例中的多聚物是 PEG2 万和 Brij-35 两者,但本发明试剂 R1 中的多聚物也可以是 PEG2 万或 Brij-35 中的任一种。

[0057] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0058] I. 胶体金溶液的制备

[0059] (1) 配制 0.01% 的氯金酸 (HAuCl_4) 水溶液,将 1L 该溶液加热至沸。

[0060] (2) 搅动下准确加入 1ml 1mol/L 的 NaOH 溶液,2 分钟后准确加入 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液 7ml。

[0061] (3) 继续加热煮沸 15 分钟,观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变成灰色,继而变成黑色,随后逐渐变成深红色并稳定。

[0062] (4) 冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积即 1L。

[0063] (5) 制成胶体金溶液,其中胶体金颗粒的粒径约为 75nm。

[0064] II. 单抗标记胶体金

[0065] (1) 胶体金与标记蛋白 (单抗) 用量之比的确定

[0066] 1) 用 0.2mol/L K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 至 8.0,分装 12 管,每管 1ml。

[0067] 2) 将标记单抗分别用 0.005mol/L (pH8.0) 硼酸盐缓冲液稀释至浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、15 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 、35 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、45 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、55 $\mu\text{g/ml}$ 、60 $\mu\text{g/ml}$,分别取 0.1ml,加入上述胶体金溶液中,混匀。对照管只加 0.1ml 硼酸盐缓冲液。

[0068] 3) 5 分钟后,在上述各管中加入 0.1ml 10% NaCl 溶液,混匀后静置 2 小时。

[0069] 4) 结果观察:对照管 (未加单抗) 和加入单抗的量不足以稳定胶体金的各管,均会呈现出由红变蓝的聚沉现象;而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的各管会仍保持红色不变。以稳定 1ml 胶体金溶液红色不变的最低蛋白质用量作为该标记单抗的最低用量,根

据情况,该用量可以适当增加 10%~20%。

[0070] (2) 胶体金与单抗 (IgG) 的结合 (标记)

[0071] 1) 用 0.005mol/L (pH8.0) 硼酸盐缓冲液将单抗稀释至 40ug/ml。

[0072] 2) 将 100ml 胶体金溶液和上述 10ml 单抗溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0 后,一边电磁搅拌 IgG 溶液,一边向其中加入胶体金溶液,完全加入后继续搅拌 10 分钟。

[0073] 3) 加入适量稳定剂以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。本制备例中使用的稳定剂是胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万。加入的量:BSA 终浓度为 1%;PEG 2 万终浓度为 0.2%。

[0074] III. 标记 IgG 后胶体金溶液的纯化:

[0075] 标记胶体金溶液用 15000g 离心 30 分钟,弃去上清,沉淀物用含 1% BSA 和 0.2% PEG 2 万的 Tris 缓冲液 (10mmol/L, pH7.5) 重悬,恢复原体积后再离心。如此洗涤 3 次。以彻底除去未结合的蛋白质。

[0076] 弃去上清液,沉淀物用上述缓冲液重悬为原体积的 1/10,制成本发明试剂 R2,该试剂颜色为紫红色。

[0077] 制备例 2

[0078] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0079] 按照与制备例 1 相同的方法制备本发明试剂 R1。

[0080] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0081] I. 胶体金溶液的制备

[0082] (1) 配制 0.01% 的氯金酸 ($HAuCl_4$) 水溶液,将 1L 该溶液加热至沸。

[0083] (2) 搅动下准确加入 1ml 1mol/L K_2CO_3 溶液,1 分钟后准确加入 1% 柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 水溶液 8ml。

[0084] (3) 继续加热煮沸 15 分钟,观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变成灰色,继而变成黑色,随后逐渐变成深红色并稳定。

[0085] (4) 冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积即 1L。

[0086] (5) 制成胶体金溶液,其中胶体金颗粒的粒径约为 70nm。

[0087] II. 单抗标记胶体金

[0088] (1) 胶体金与标记蛋白 (单抗) 用量之比的确定

[0089] 除了使用 0.004mol/L (pH7.5) 硼酸盐缓冲液稀释标记单抗以外,按照与制备例 1 中相同的方式来确定胶体金与标记蛋白的用量比。

[0090] (2) 胶体金与单抗 (IgG) 的结合 (标记)

[0091] 1) 用 0.004mol/L (pH7.5) 硼酸盐缓冲液将单抗稀释至 40ug/ml。

[0092] 2) 将 100ml 胶体金溶液和上述 10ml 单抗溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 7.5 后,一边电磁搅拌 IgG 溶液,一边向其中加入胶体金溶液,完全加入后继续搅拌 10 分钟。

[0093] 3) 加入适量稳定剂以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。本制备例中使用的稳定剂是胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万。加入的量:BSA 终浓度为 0.5%;PEG 2 万终浓度为 1%。

[0094] III. 标记 IgG 后胶体金溶液的纯化:

[0095] 按照与制备例 1 相同的方法对标记 IgG 后胶体金溶液进行纯化,制成本发明试剂 R2,该试剂颜色为紫红色。

[0096] 制备例 3

[0097] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0098] 按照与制备例 1 相同的方法制备本发明试剂 R1。

[0099] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0100] I. 胶体金溶液的制备

[0101] (1) 配制 0.01% 的氯金酸 (HAuCl_4) 水溶液, 将 1L 该溶液加热至沸。

[0102] (2) 搅动下准确加入 0.5ml 1mol/L NaOH 溶液, 3 分钟后准确加入 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液 6ml。

[0103] (3) 继续加热煮沸 15 分钟, 观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变成灰色, 继而变成黑色, 随后逐渐变成深红色并稳定。

[0104] (4) 冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积即 1L。

[0105] (5) 制成胶体金溶液, 其中胶体金颗粒的粒径约为 80nm。

[0106] II. 单抗标记胶体金

[0107] (1) 胶体金与标记蛋白 (单抗) 用量之比的确定

[0108] 除了使用 0.02mol/L (pH8.5) HEPES 缓冲液稀释标记单抗以外, 按照与制备例 1 中相同的方式来确定胶体金与标记蛋白的用量比。

[0109] (2) 胶体金与单抗 (IgG) 的结合 (标记)

[0110] 1) 用 0.02mol/L (pH8.5) HEPES 缓冲液将单抗稀释至 40ug/ml。

[0111] 2) 将 100ml 胶体金溶液和上述 10ml 单抗溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.5 后, 一边电磁搅拌 IgG 溶液, 一边向其中加入胶体金溶液, 完全加入后继续搅拌 10 分钟。

[0112] 3) 加入适量稳定剂以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。本制备例中使用的稳定剂是胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万。加入的量: BSA 终浓度为 2%; PEG 2 万终浓度为 0.1%。

[0113] III. 标记 IgG 后胶体金溶液的纯化:

[0114] 按照与制备例 1 相同的方法对标记 IgG 后胶体金溶液进行纯化, 制成本发明试剂 R2, 该试剂颜色为紫红色。

[0115] 制备例 4

[0116] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0117] 按照与制备例 1 相同的方法制备本发明试剂 R1。

[0118] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0119] I. 胶体金溶液的制备

[0120] (1) 配制 0.01% 的氯金酸 (HAuCl_4) 水溶液, 将 1L 该溶液加热至沸。

[0121] (2) 搅动下准确加入 1.5ml 1mol/L NaOH 溶液, 4 分钟后准确加入 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液 9ml。

[0122] (3) 继续加热煮沸 15 分钟, 观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变成灰色, 继而变成黑色, 随后逐渐变成深红色并稳定。

[0123] (4) 冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积即 1L。

[0124] (5) 制成胶体金溶液, 其中胶体金颗粒的粒径约为 65nm。

[0125] II. 单抗标记胶体金

[0126] (1) 胶体金与标记蛋白 (单抗) 用量之比的确定

[0127] 除了使用 0.01mol/L (pH8.3) HEPES 缓冲液稀释标记单抗以外,按照与制备例 1 中相同的方式来确定胶体金与标记蛋白的用量比。

[0128] (2) 胶体金与单抗 (IgG) 的结合 (标记)

[0129] 1) 用 0.01mol/L (pH8.3) HEPES 缓冲液将单抗稀释至 40ug/ml。

[0130] 2) 将 100ml 胶体金溶液和上述 10ml 单抗溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.2 后,一边电磁搅拌 IgG 溶液,一边向其中加入胶体金溶液,完全加入后继续搅拌 10 分钟。

[0131] 3) 加入适量稳定剂以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。本制备例中使用的稳定剂是胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万。加入的量:BSA 终浓度为 1.4%;PEG 2 万终浓度为 0.1%。

[0132] III. 标记 IgG 后胶体金溶液的纯化:

[0133] 按照与制备例 1 相同的方法对标记 IgG 后胶体金溶液进行纯化,制成本发明试剂 R2,该试剂颜色为紫红色。

[0134] 制备例 5

[0135] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0136] 按照与制备例 1 相同的方法制备本发明试剂 R1。

[0137] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0138] I. 胶体金溶液的制备

[0139] (1) 配制 0.01% 的氯金酸 ($HAuCl_4$) 水溶液,将 1L 该溶液加热至沸。

[0140] (2) 搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 水溶液 5ml。

[0141] (3) 继续加热煮沸 15 分钟,观察到淡黄色的氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快变成灰色,继而变成黑色,随后逐渐变成深红色并稳定。

[0142] (4) 冷却至室温后用蒸馏水恢复至原体积即 1L。

[0143] (5) 制成胶体金溶液,其中胶体金颗粒的粒径约为 85nm。

[0144] II. 单抗标记胶体金

[0145] (1) 胶体金与标记蛋白 (单抗) 用量之比的确定

[0146] 除了使用 0.008mol/L (pH7.8) 硼酸盐缓冲液稀释标记单抗以外,按照与制备例 1 中相同的方式来确定胶体金与标记蛋白的用量比。

[0147] (2) 胶体金与单抗 (IgG) 的结合 (标记)

[0148] 1) 用 0.008mol/L (pH7.8) 硼酸盐缓冲液将单抗稀释至 40ug/ml。

[0149] 2) 将 100ml 胶体金溶液和上述 10ml 单抗溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 7.8 后,一边电磁搅拌 IgG 溶液,一边向其中加入胶体金溶液,完全加入后继续搅拌 10 分钟。

[0150] 3) 加入适量稳定剂以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。本制备例中使用的稳定剂是胎牛血清 (BSA) 和 PEG 2 万。加入的量:BSA 终浓度为 1%;PEG 2 万终浓度为 0.6%。

[0151] III. 标记 IgG 后胶体金溶液的纯化:

[0152] 按照与制备例 1 相同的方法对标记 IgG 后胶体金溶液进行纯化,制成本发明试剂 R2,该试剂颜色为紫红色。

[0153] 以下,通过试验例来检测本发明试剂的性能。

[0154] < 胱抑素 C 测定方法及实验参数 >

[0155] 分析方法:两点终点法;

- [0156] 本发明试剂的用量:本发明试剂 R1 和本发明试剂 R2,用量分别为 200 μ l 和 50 μ l ;
- [0157] 样本的用量:2 μ l ;
- [0158] 检测波长:分别为主波长 540nm 和副波长 700nm。
- [0159] 测定步骤:200 μ l 试剂 R1 加入 2 μ l 样本,于 37℃ 5 分钟后加入 50 μ l 试剂 R2,即开始读点,反应 5 分钟后读取另一点,得到吸光度的差值。
- [0160] 试验例 1:制作本发明胱抑素 C 标准品的标准曲线
- [0161] 采用本发明的标准品(前述制备的 6 种不同含量 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/L 的胱抑素 C 标准品),采用自动奥林巴斯公司制造的 AU400 生化分析仪,按照上述测定步骤测得本发明胱抑素 C 标准品的标准曲线(如图 1 所示)。图 1 中曲线上的每个点代表一个含量的标准品。其中 X 轴表示胱抑素 C 的含量(mg/L);Y 轴表示的是吸光度。
- [0162] 试验例 2 相关性试验
- [0163] 使用本发明制备例 1 的试剂(本试验例中,简称“本发明试剂”)和对照试剂(市售的胱抑素 C 匀相溶胶颗粒免疫测定试剂,购自日本 Alfresa 公司),采用奥林巴斯公司制造的 AU400 全自动生化分析仪对 50 份人血清进行测定,对测定值进行相关分析。按照与上述“胱抑素 C 测定方法”中相同的参数进行测定,测定结果见图 2,图中的 X、Y 轴均为测定值(胱抑素 C 的含量 mg/L)。
- [0164] 由图 2 的结果可知,本发明试剂和对照试剂的相关系数为 $R^2 = 0.9922$,回归方程为 $y = 0.9109x + 0.05$ 。该结果表明本试剂与对照试剂测定病人血清中胱抑素 C 含量的效果相关性良好,具有很好的特异性和准确性。
- [0165] 此外,以上的试验是采用奥林巴斯公司制造的 AU400 全自动生化分析仪进行的,但本发明的试剂不限于上述仪器,还适用于其他全自动或半自动生化分析仪,并且本领域技术人员可以根据情况对测定参数做适当调整。
- [0166] 试验例 3 灵敏度试验
- [0167] 按照如下的操作方法检测试剂的灵敏度:
- [0168] 1. 确定一个试剂可以检测准确的较低浓度值来与水空白比较,本试验选用 0.5mg/L 的样本。
- [0169] 2. 检测 20 次水,记录吸光度数值,计算平均值($X_{\text{水}}$)和标准偏差(SD)。
- [0170] 3. 检测 20 次浓度 0.5mg/L 的样本,记录吸光度数值,计算平均值($X_{0.5}$)和标准偏差(SD)。
- [0171] 4. 水的吸光度平均值加上 3SD 作为最低检测限对应的吸光度值,由于吸光度与浓度的关系基本为线性关系,可以通过和 0.5mg/L 样本的吸光度平均值比较计算出最低检测限的浓度即灵敏度。公式为 $0.5 \times (X_{\text{水}} + 3SD) / X_{0.5}$
- [0172] 制备例 1 中制造的本发明试剂(本试验例中,简称“本发明试剂”)和对照试剂(市售的胱抑素 C 匀相溶胶颗粒免疫测定试剂,购自日本 Alfresa 公司,粒径约为 50nm)的灵敏度试验的数据结果如表 1 所示。
- [0173] 下表中, ΔA 表示吸光度的差值。
- [0174] 表 1
- [0175]

次数	本发明试剂		对照试剂	
	水 ΔA	低值样本 ΔA (浓度 0.5mg/L)	水 ΔA	低值样本 ΔA (浓度 0.5mg/L)
1	39	435	9	341
2	29	429	18	342
3	31	430	9	374
4	30	423	12	323
5	24	425	7	345
6	30	435	12	330
7	25	442	53	351
8	43	421	5	348
9	18	432	54	311
10	23	425	8	315
11	28	419	50	307
12	35	428	17	300
13	23	432	63	331
14	32	434	15	373
15	41	421	72	352
16	38	424	27	341
17	34	428	8	313
18	31	442	51	328
19	35	427	16	392
20	19	428	36	381
均值	30.4	429	27.1	339.9
SD	7	6.41	21.8	25.6

[0176] 本发明试剂的灵敏度 = $0.5 \times (30.4 + 3 \times 7) / 429 = 0.06\text{mg/L}$

[0177] 对照试剂的灵敏度 = $0.5 \times 27.1 + (3 \times 21.8) / 339.9 = 0.14\text{mg/L}$

[0178] 结果显示本发明试剂的灵敏度可达 0.06mg/L, 优于对照试剂。

[0179] 由上述表 1 的结果可知, 本发明试剂的灵敏度高于对照试剂的灵敏度, 可见本发明试剂实现了灵敏度提高的效果。

[0180] 试验例 4 ~ 7 灵敏度试验

[0181] 按照与上述试验例 6 相同的方法, 检测制备例 2 ~ 5 中制备的本发明试剂的灵敏度, 结果如下述表 2 所示。

[0182] 表 2

[0183]

	制备例 2	制备例 3	制备例 4	制备例 5
灵敏度 (mg/L)	0.11	0.10	0.13	0.09

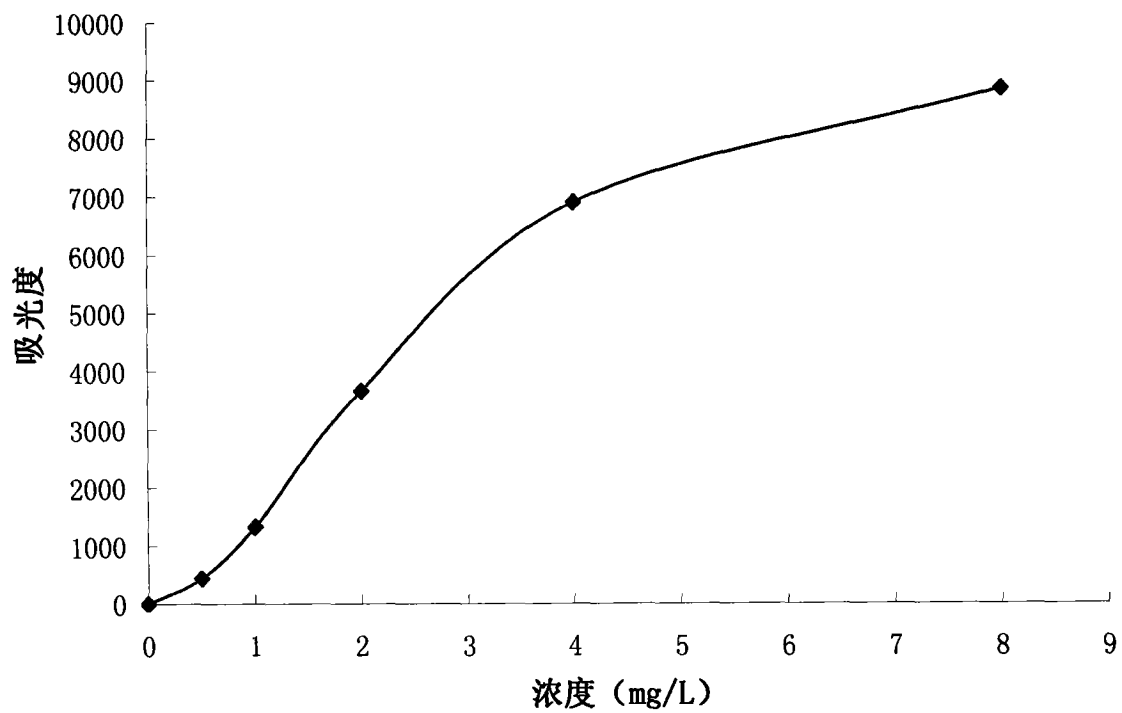


图 1

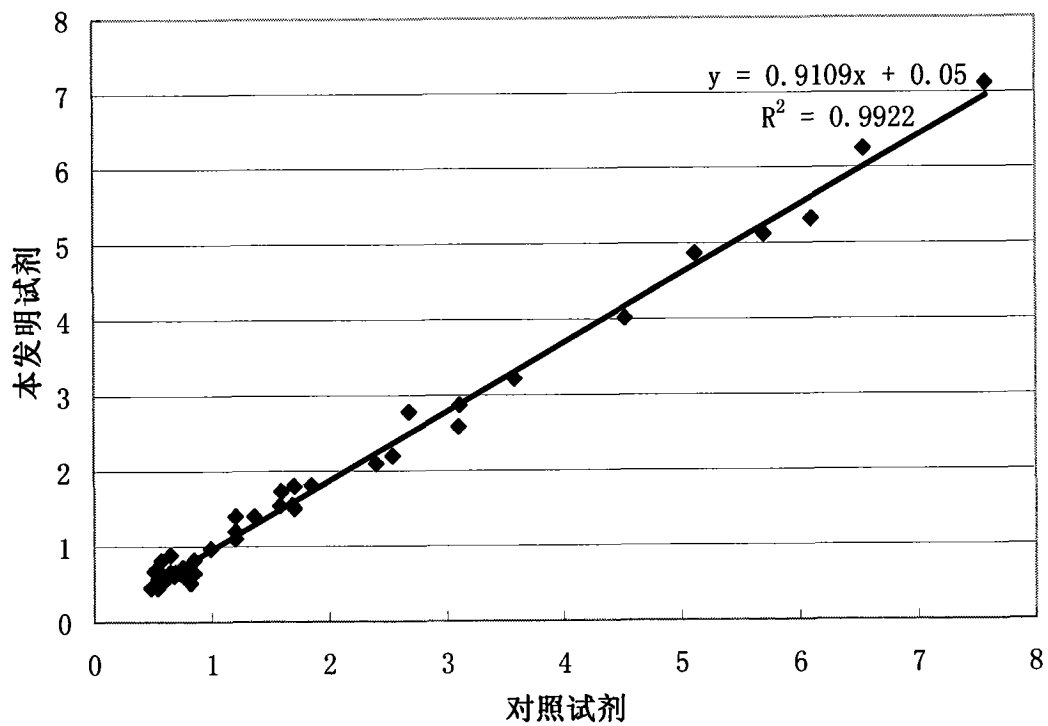


图 2

专利名称(译)	匀相溶胶颗粒型胱抑素C测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101699287B	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN200910090689.0	申请日	2009-09-08
[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		
当前申请(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	G01N33/538 G01N33/542		
代理人(译)	钟晶		
审查员(译)	温婧		
其他公开文献	CN101699287A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒及其制造方法。所述匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒包含试剂R1和试剂R2，所述试剂R1为含有多聚物的缓冲溶液；所述试剂R2为标记有抗人胱抑素C抗体的胶体金的缓冲溶液，其中胶体金颗粒直径为65~85nm。本发明的试剂盒能够特异性地高灵敏度地测定血清或血浆中胱抑素C的含量。

次数	本发明试剂		对照试剂	
	水 ΔA	低值样本 ΔA (浓度 0.5mg/L)	水 ΔA	低值样本 ΔA (浓度 0.5mg/L)
1	39	435	9	341
2	29	429	18	342
3	31	430	9	374
4	30	423	12	323
5	24	425	7	345
6	30	435	12	330
7	25	442	53	351
8	43	421	5	348
9	18	432	54	311
10	23	425	8	315
11	28	419	50	307
12	35	428	17	300
13	23	432	63	331
14	32	434	15	373
15	41	421	72	352
16	38	424	27	341
17	34	428	8	313
18	31	442	51	328
19	35	427	16	392
20	19	428	36	381
均值	30.4	429	27.1	339.9
SD	7	6.41	21.8	25.6