



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101718780 A

(43) 申请公布日 2010.06.02

(21) 申请号 200910114506.4

(22) 申请日 2009.10.29

(71) 申请人 广西师范大学

地址 541004 广西壮族自治区桂林市育才路
15号

(72) 发明人 李纪顺 黄文鑫 蒋治良

(74) 专利代理机构 桂林市华杰专利商标事务所
有限责任公司 45112

代理人 罗玉荣 周兆阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法,本试剂盒由下述三种试剂组成,其中试剂 1 为校准品,含补体 3 冻干血浆蛋白参考血清,试剂 2 含 111.5 ~ 164.5mM Na_2HPO_4 和 17.5 ~ 45.0mM 柠檬酸溶液和 50 ~ 70g/mL PEG6000,试剂 3 含金标记羊抗人 C3 抗体和 0.03-0.06g/L PEG20000。使用时,先制备 C3 标准系列,按一定比例加入试剂 1、试剂 2 及试剂 3 定容后,在超声波反应器中温育 15min 后,用荧光分光光度计扫描同步散射光谱,测定其同步散射值,根据标准曲线求出 C3 含量。本发明试剂盒可以精确定量检测补体 3,适用于临床和科研血清、血浆等样品中的补体 3 分析,具有操作简便、快速、灵敏、检出限低、线性范围宽,不需繁琐的相分离步骤,样品消耗量少的优点。

1. 一种检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒,其特征是:它由下述三种试剂组成,其中试剂 1 为校准品,含补体 3 冻干血浆蛋白参考血清,试剂 2 含 111.5 ~ 164.5mMNa₂HPO₄ 和 17.5 ~ 45.0mM 柠檬酸溶液和 50 ~ 70g/mL PEG6000,试剂 3 含金标记羊抗人 C3 抗体和 0.03-0.06g/L PEG20000。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征是:试剂盒的标准曲线线性范围为 6.0ng/mL-200ng/mL,相关系数 ≥ 0.9909 ,检测限为 2.0ng \cdot mL⁻¹。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征是:试剂 3 是取 200.0mL 浓度为 58.0 μ g \cdot mL⁻¹ 胶体金溶液,加入 0.2-0.4mL 30g/L PEG20000 作稳定剂,然后用 0.20mol \cdot L⁻¹K₂CO₃ 调 pH 值至 6.5-8.0,在磁力搅拌下,逐滴滴加 2.0mg 的羊抗人 C3 抗体溶液,继续搅拌 15min 制成,然后放置 4°C 冰箱保存。

4. 权利要求 1 所述的使用方法,其特征是:包括如下步骤:

(1)、制备标准曲线

1) 准备 6 支试管,各试管依次加入不同体积的试剂 1,一管不加参考血清作为空白对照管;

2) 每支试管加入 800 μ L 试剂 2,混匀;

3) 每支试管加入 500 μ L 试剂 3,混匀;

4) 每支试管加入蒸馏水定容,使每根试管溶液最终体积为 3.0mL,混匀后,在超声波反应器中温育 15min 后,取适量于石英池中,置于荧光分光光度计上,在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描,得到体系的同步散射光谱,测定同步散射峰处的同步散射光强度 I,不加补体 3 作空白,测其同步散射光强度 I_b;最终同步散射值按下式计算:最终同步散射值 $\Delta I = I - I_b$;

5) 以浓度 c 与最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线;

(2)、制备样品测定体系

用步骤 (1) 的 1) ~ 4) 的方法制备样品测定体系,并求出其 $\Delta I_{\text{样}}$;

(3)、样品的最终同步散射值参照标准曲线,得到浓度值。

检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生化分析技术,具体是一种检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法。

背景技术

[0002] 人类补体 3(complement component 3,简称 C3) 成分是补体激活的经典途径、替代途径以及甘露聚糖结合凝聚素途径三者的交汇点,也是补体系统的核心。急、慢性肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎等疾病常引起人血清补体减少。补体 C3 含量过低常导致严重的化脓性感染、肺炎、脑膜炎和败血症等,这可能与机体抗感染能力大大降低, C3 介导的循环免疫复合物(CIC) 溶解和清除功能丧失有关;而 C3 含量过高也会引起急性炎症和恶性肿瘤等病症。因此,人体血清中 C3 含量的检测,对阐明一些自身免疫性和变态性疾病的发病机理以及临床诊断与病情变化观察具有重要意义。

[0003] 补体 3 的测定过去多采用溶血试验,但灵敏度较低。近来,免疫比浊法(immunonephelometry)、免疫扩散法(RID)、电泳免疫扩散法(EID)、时间分辨荧光测定法(TrFIA)、放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)、火箭免疫电泳法(RIE)、电化学免疫传感器技术、固体基质室温磷光免疫分析法(SS-RTP-IA)、高效液相色谱分析法(HPLC) 等也用于补体 C3 的测定。在这些方法中,免疫比浊法简便但灵敏度较低。RID 法简单,但灵敏度低、重复性较差且操作流程长。EID 法的影响因素较多,每块板检测样品较少。RIA 法灵敏度较高,需要的抗血清量少,但操作过程复杂且以放射性元素做为示踪物,应用受到限制。TrFIA 法以镧系元素位标记物,灵敏度高、线性范围宽,由于在近紫外激发光谱,对生物分子的活性有影响。其检测补体 C3 的线性范围为 $0.7\text{--}3650\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 检出限达 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。ELISA 法需抗血清量少,检出限 $1.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。RIE 法比 RID 法缩短了检测时间,但需经醛化处理,在应用过程醛化影响因素较多。电化学免疫传感器技术也可直接快速检测抗原或抗体,但固定抗体的方法效果欠佳,传感器再生性能受到限制^[16]。其中电位法的线性范围为 $0.12\text{--}117.3\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检出限达 $0.02\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 阳极溶出免疫法的线性范围为 $7.2\text{--}7330\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限达 $7.0\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 电容型免疫传感器的线性范围在 $18.2\text{--}292.5\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检出限 $9.1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 压电免疫传感器的线性范围在 $0.078\text{--}24.81\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 $0.078\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。SS-RTP-IA 法有标记法和夹心法两种方式,其中有标记法用异硫氰酸曙红(Eosin-ITC) 做标记物, CaCl_2 做增强剂检测补体 C_3 的线性范围为 $0.391\text{--}12.5\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限达 $0.3\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 夹心法的线性范围为 $6.25\text{--}100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检出限 $1.37\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。HPLC 法检测补体 C3 浓度范围在 $12.5\text{--}400\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 但操作时间长。目前,在众多检测补体 C3 的方法中,只有免疫透射比浊法有商品化的试剂盒,该试剂盒使用简便,但是线性范围窄,而且灵敏度不高,限制了其在检测低浓度样品中的应用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种操作简便、快速、灵敏、检出限低、检测浓度范围宽,不需繁琐步骤的检测人血清补体 3 的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法。

[0005] 实现本发明目的的技术方案是:

[0006] 本发明利用 C3 和金标羊抗人 C3 抗体发生特异性反应后,胶体金发生聚集,使得体系同步散射峰急剧增强,且增强的同步散射强度增强值与 C3 浓度成正比,通过测定同步散射强度增强值,可对照标准工作曲线确定样品中 C3 的含量。

[0007] 本发明试剂盒由下述三种试剂组成,其中试剂 1 为校准品,含补体 3 冻干血浆蛋白参考血清,试剂 2 含 111.5 ~ 164.5mM Na_2HPO_4 、17.5 ~ 45.0mM 柠檬酸溶液和 50 ~ 70g/mL PEG6000,试剂 3 含金标记羊抗人 C3 抗体和 0.03-0.06g/L PEG20000。

[0008] 试剂 3 是取 200.0mL 浓度为 $58.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胶体金溶液,加入 0.2-0.4mL 30g/L PEG20000 作稳定剂,然后用 $0.20\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{CO}_3$ 调 pH 值至 6.5-8.0。在磁力搅拌下,逐滴滴加 2.0mg 的羊抗人 C3 抗体溶液,继续搅拌 15min 制成,然后放置 4℃ 冰箱保存。

[0009] 本发明免疫金同步散射光谱试剂盒检测人血清补体 3 的使用方法,包括如下步骤:

[0010] 1、制备标准曲线

[0011] (1) 准备 6 支试管,各试管依次加入不同体积的试剂 1,一管不加参考血清作为空白对照管;

[0012] (2) 每支试管加入 800 μL 试剂 2,混匀;

[0013] (3) 每支试管加入 500 μL 试剂 3,混匀;

[0014] (4) 每支试管加入蒸馏水定容,使每根试管溶液最终体积为 3.0mL,混匀后,在超声波反应器中温育 15min 后,取适量于石英池中,置于荧光分光光度计上,在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描,得到体系的同步散射光谱,测定同步散射峰处的同步散射光强度 I ,不加补体 3 作空白,测其同步散射光强度 I_0 ;最终同步散射值按下式计算:最终同步散射值 $\Delta I = I - I_0$;

[0015] (5) 以浓度 c 与最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线;

[0016] 2、制备样品测定体系

[0017] 用步骤 1 的 (1) ~ (4) 的方法制备样品测定体系,并求出其 $\Delta I_{\text{样}}$;

[0018] 3、样品的最终同步散射值参照标准曲线,得到浓度值。

[0019] 本试剂盒测定的线性范围为 6.0ng/mL-200ng/mL;相关系数 ≥ 0.9909 ;检测限为 $2.0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0020] 在相对误差在 $\pm 5\%$ 之间时,1530 倍 L-酪氨酸、3846 倍甘氨酸、2423 倍尿素、2500 倍组氨酸、1277 倍叶酸、16 倍 VB_2 、254 倍 IgA、8 倍 BSA、154 倍 HSA、2307 倍天冬氨酸、169 倍 L-精氨酸、2077 倍色氨酸、6410 倍蔗糖、2154 倍 L-胱氨酸、354 倍 IgG、923 倍抗坏血酸、461 倍 MnSO_4 、923 倍 ZnSO_4 、138 倍 IgM、923 倍 DL-甲硫氨酸、615 倍 DL-色氨酸、60 倍 α -酸性糖蛋白不干扰 C3 测定。

[0021] 储存与有效期:试剂避光储存于 4℃ 冰箱中,可稳定半年。

[0022] 本发明试剂盒操作简便、快速、灵敏、检出限低、检测浓度范围宽,不需繁琐的相分离步骤,样品消耗量少,仅需几微升,适用于大多数生物样品分析。

具体实施方式：

[0023] 下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0024] 实施例

[0025] 主要仪器和试剂：5mL 刻度试管若干，可加 0 ~ 1000 μ L 的加样枪一支，RF-540 型荧光分光光度计（日本岛津），SY SK8200LH 型超声波反应器（上海科导超声仪器有限公司，工作频率为 59KHz）。

[0026] 试剂 1 为校准品，含 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 补体 3 冻干血浆蛋白参考血清，试剂 2 含 $145.5\text{mMNa}_2\text{HPO}_4$ 和 27.25mM 柠檬酸溶液和 60g/mL PEG6000，试剂 3 含金标记羊抗人 C3 抗体和 0.04g/L PEG20000。冻干血浆蛋白参考血清（补体 C3 含量为 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）。样品人血清由桂林市第五医院提供，所用试剂均为分析纯，实验用水为二次蒸馏水。

[0027] 测定方法包括如下步骤：

[0028] 1、制备标准曲线

[0029] (1) 用 7 支试管，各试管依次加入 $6.0\mu\text{L}$ 、 $25.0\mu\text{L}$ 、 $50.0\mu\text{L}$ 、 $100.0\mu\text{L}$ 、 $150.0\mu\text{L}$ 、 $200.0\mu\text{L}$ 补体 C3 含量为 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的冻干血浆蛋白参考血清，其中第一管不加参考血清作为空白对照管；

[0030] (2) 每支试管加入 $800\mu\text{L}$ 试剂 2，混匀；

[0031] (3) 每支试管加入 $500\mu\text{L}$ 试剂 3，混匀；

[0032] (4) 每支试管加入蒸馏水定容，使每根试管溶液最终体积为 3.0mL ，混匀后，在超声波反应器中温育 15min 后，取适量于石英池中，置于荧光分光光度计上，用灵敏度为 2，纵坐标为 6，在激发波长等于发射波长的条件下同步扫描，得到体系的同步散射光谱，确定同步散射测量波长为 560nm 。测定 560nm 同步散射峰的同步散射光强度 I ，不加补体 C3 作空白，测其同步散射光强度 I_0 ；最终同步散射值按下式计算：最终同步散射值 $\Delta I = I - I_0$ 。

[0033] (5) 以浓度 c 与最终同步散射值 ΔI 绘制标准曲线。

[0034] 2、制备样品测定体系

[0035] 以步骤 1 的 (1) ~ (4) 的方法制备样品测定体系，加入的是从医院取到的正常人的血清，用蒸馏水将人血清稀释 100 倍，取稀释后的样品 $30.0\mu\text{L}$ ，按实验方法测定，并求出其 $\Delta I_{\text{样}}$ ；

[0036] 3、样品的最终同步散射值参照标准曲线，得到浓度值。

[0037] 本试剂盒测定的线性范围为 6.0ng/mL – 200ng/mL ；相关系数 ≥ 0.9909 ；检测限为 $2.0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0038] 对比试验，用本检测方法检测正常人血清 10 份，检测的结果人血清补体 C3 含量为 0.80 – $1.90\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与正常人的血清补体含量一致，在置信水平为 95% 时，与用透射比浊法所得的结果基本一致，证明了本发明测定方法的可靠性。

专利名称(译)	检测人血清补体3的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN101718780A	公开(公告)日	2010-06-02
申请号	CN200910114506.4	申请日	2009-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西师范大学		
[标]发明人	李纪顺 黄文鑫 蒋治良		
发明人	李纪顺 黄文鑫 蒋治良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64 G01N21/47		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人血清补体3的免疫金同步散射光谱试剂盒及使用方法，本试剂盒由下述三种试剂组成，其中试剂1为校准品，含补体3冻干血浆蛋白参考血清，试剂2含111.5~164.5mM Na₂HPO₄和17.5~45.0mM柠檬酸溶液和50~70g/mL PEG6000，试剂3含金标记羊抗人C3抗体和0.03-0.06g/L PEG20000。使用时，先制备C3标准系列，按一定比例加入试剂1、试剂2及试剂3定容后，在超声波反应器中温育15min后，用荧光分光光度计扫描同步散射光谱，测定其同步散射值，根据标准曲线求出C3含量。本发明试剂盒可以精确定量检测补体3，适用于临床和科研血清、血浆等样品中的补体3分析，具有操作简便、快速、灵敏、检出限低、线性范围宽，不需繁琐的相分离步骤，样品消耗量少的优点。