



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108845147 A

(43)申请公布日 2018. 11. 20

(21)申请号 201810725038.3

(22)申请日 2018.07.04

(71)申请人 浙江伊利康生物技术有限公司

地址 325000 浙江省温州市经济技术开发区
滨海一道1655号

(72)发明人 王贤理 邓慰 池万余 刘思琪

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种胱抑素C检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及体外诊断技术领域,尤其是一种胱抑素C检测试剂盒,包括R1试剂和R2试剂,R1试剂配制:第一反应缓冲液为25-75mM,反应增强剂为0.5%-3%(w/v),第一防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第一稳定剂,第一表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R1试剂的PH值控制在7.0-8.0;R2试剂配制:包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒为0.2%-1%(w/v),第二反应缓冲液为25-75mM,第二防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第二稳定剂,第二表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R2试剂的PH值控制在7.0-8.0。本发明具有反应灵敏,稳定性好,抗体偶联效率高,且能维持抗体活性,适用于大批量试剂生产,并且操作方便适用全自动生化分析仪。

1. 一种朊抑素C检测试剂盒,包括R1试剂和R2试剂,其特征在于,R1试剂配制:第一反应缓冲液为25-75mM,反应增强剂为0.5%-3%(w/v),第一防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第一稳定剂,第一表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R1试剂的PH值控制在7.0-8.0;R2试剂配制:包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒为0.2%-1%(w/v),第二反应缓冲液为25-75mM,第二防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第二稳定剂,第二表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R2试剂的PH值控制在7.0-8.0。

2. 根据权利要求1所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,所述第一反应缓冲液和第二反应缓冲液为PBS缓冲溶液、Tris-HCl缓冲溶液、MOPOS缓冲溶液、HEPES缓冲溶液中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,所述反应增强剂为PEG2000、PEG6000、PEG8000或PEG12000中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,所述第一防腐剂和第二防腐剂为Proclin-300、庆大霉素或NaN₃中的一种。

5. 根据权利要求1所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,所述第一稳定剂为EDTA-Na或NaCl和水配制而成;所述第二稳定剂为甘油、EDTA-Na、BSA、NaCl和水配制而成。

6. 根据权利要求1所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,所述第一表面活性剂和第二表面活性剂为Tween20、TritonX-100或TergitolNP9中的一种或几种。

7. 根据权利要求1-6所述的一种朊抑素C检测试剂盒,其特征在于,其原料配制如下:

R1试剂:缓冲液为50mMPBS,PEG8000为20g/L,NaN₃为0.95g/L,NaCl为0.9g/L,Tween20为0.2%,R1试剂的PH值控制在7.0;

R2试剂配制:包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒为1%(w/v),PBS缓冲液为50mM,NaN₃为0.95g/L,甘油为1%,EDTA-Na为1.2%,BSA为1g/L,NaCl为2.9g/L,Tween20为0.2%,R2试剂的PH值控制在7.0。

8. 一种根据权利要求1所述的包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、将羧基胶乳微球用50mmol/L (PH值为6.0) PBS缓冲液稀释至1%悬浮液(w/v);

S2、在该悬浮液中加入适量EDC和NHS,搅拌混匀,室温反应15分钟;

S3、用50mmol/L (PH6.0)的PBS缓冲液洗涤羧基胶乳微球,除去未反应的NHS和EDC,并将胶乳微球在纯化水中悬浮,使其浓度为1%(w/v);

S4、将cys-c抗体迅速加入胶乳悬浮液中,37摄氏度不断搅拌,反应3小时;

S5、将反应完成的胶乳抗体溶液连接上超滤膜系统,循环清洗,去除未结合的蛋白;

S6、清洗完毕后便得到了包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒。

9. 一种根据权利要求8所述包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒的制备方法,其特征在于,所述S5中,超滤系统由反应釜,蠕动泵,超滤膜包组成,在大批量生产时将胶乳抗体溶液用蠕动泵泵入超滤膜包中进行循环清洗,同时将清洗废液另外收集排出,过程中不断补充缓冲液;超滤膜包采用切向流过滤原理,溶液切向流过膜表面,流体产生的跨膜压力将部分溶液压过滤膜,截留部分则在系统中循环回流,过滤的同时对膜进行冲刷,使膜表面不会形成凝胶层,保证了清洗效率,胶乳抗体溶液不会有损耗,免去了超速离心后再次悬浮清洗的繁琐,利于试剂的大批量生产。

一种胱抑素C检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,尤其涉及一种胱抑素C检测试剂盒。

背景技术

[0002] CysC是一个含120个氨基酸残基的碱性非糖基化低分子量蛋白质,分子量为13359,等电点为9.3,为胱氨酸蛋白酶抑制因子。CysC是一种分泌性的蛋白质,在生理液中分布广泛,主要存在于人体的各种细胞外液中如脑脊液、血液、尿液、羊水、精液、胸腔液等。正常人脑脊液中的CysC浓度最高,尿中的浓度最低。CysC如其他的低分子量蛋白质一样可自由通过肾小球,几乎完全在近曲小管重吸收和分解。它在血清中的浓度主要与肾小球滤过率有关,是理想的评价肾小球滤过率的内源性生化标志物。

[0003] 肾小球滤过率(GFR)是反映肾功能的一项重要指标。菊粉和 ^{51}Cr -EDTA外源性标记物清除率被认为是评价GFR的理想方法,但菊粉清除率试验因操作繁琐等多种原因未能应用于临床, ^{51}Cr -EDTA清除率试验由于价格昂贵,具放射性,某些患者如孕妇不适用等也未能得到广泛应用。临床上常采用测定内源性标志物如血尿素氮和血清肌酐评估GFR,虽应用较为广泛,但这些内源性标志物并不是理想的反映GFR的指标。胱抑素C可经肾小球自由滤过,在近端肾小管上皮细胞被完全分解代谢,不再重返血流,也不被肾小管上皮细胞分泌,肾脏是唯一清除循环中胱抑素C的器官,机体产生胱抑素C速率也相当恒定。因此,胱抑素C是较血清肌酐有更高的敏感性和特异性,较为理想的反映GFR的内源性标志物。

[0004] CysC属于小分子多肽,以抗原抗体反应为理论基础的免疫学检测方法均能对其进行检测,包括单向免疫扩散法(RID)、放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、颗粒增强散射免疫比浊法(PENIA)、颗粒增强透射免疫比浊法(PETIA)和溶胶颗粒免疫分析(SPIA)。RID法精密度高,可靠性好但灵敏度差测定时间长,操作复杂,不利于临床操作。RIA法结果准确,但存在放射性污染,检测时间长,实际具有半衰期不易保存,操作不方便等缺点。FIA法灵敏度高,结果准确,测定快速,检测限低,但是所需设备昂贵,测定成本高,不利于临床推广。ELISA法费时费力,不适合于急诊测定。SPIA法监测速度快,变异系数小,但由于其检测限太高(1.5mg/L),限制了该方法的使用。

发明内容

[0005] 本发明提出了一种胱抑素C检测试剂盒,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0006] 本发明提出了一种胱抑素C检测试剂盒,包括R1试剂和R2试剂,

R1试剂配制:第一反应缓冲液为25-75mM,反应增强剂为0.5%-3%(w/v),第一防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第一稳定剂,第一表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R1试剂的PH值控制在7.0-8.0;

R2试剂配制:包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒为0.2%-1%(w/v),第二反应缓冲液为25-75mM,第二防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第二稳定剂,第二表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R2试剂的PH值控制在7.0-8.0。

[0007] 优选的,所述第一反应缓冲液和第二反应缓冲液为PBS缓冲溶液、Tris-HCl缓冲溶液、MOPOS缓冲溶液、HEPES缓冲溶液中的一种或几种。

[0008] 优选的,所述反应增强剂为PEG2000、PEG6000、PEG8000或PEG12000中的一种或几种。

[0009] 优选的,所述第一防腐剂和第二防腐剂为Proclin-300、庆大霉素或NaN₃中的一种。

[0010] 优选的,所述第一稳定剂为EDTA-Na或NaCl和水配制而成;所述第二稳定剂为甘油、EDTA-Na、BSA、NaCl和水配制而成。

[0011] 优选的,所述第一表面活性剂和第二表面活性剂为Tween20、TritonX-100或TergitolNP9中的一种或几种。

[0012] 优选的,其原料配制如下:

R1试剂:缓冲液为50mMPBS,PEG8000为20g/L,NaN₃为0.95g/L,NaCl为0.9g/L,Tween20为0.2%,R1试剂的PH值控制在7.0;

R2试剂配制:包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒为1%(w/v),PBS缓冲液为50mM,NaN₃为0.95g/L,甘油为1%,EDTA-Na为1.2%,BSA为1g/L,NaCl为2.9g/L,Tween20为0.2%,R2试剂的PH值控制在7.0。

[0013] 本发明还提供了一种包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

S1、将羧基胶乳微球用50mmol/L (PH值为6.0) PBS缓冲液稀释至1%悬浮液 (w/v);

S2、在该悬浮液中加入适量EDC和NHS,搅拌混匀,室温反应15分钟;

S3、用50mmol/L (PH6.0) 的PBS缓冲液洗涤羧基胶乳微球,除去未反应的NHS和EDC,并将胶乳微球在纯化水中悬浮,使其浓度为1%(w/v);

S4、将cys-c抗体迅速加入胶乳悬浮液中,37摄氏度不断搅拌,反应3小时;

S5、将反应完成的胶乳抗体溶液连接上超滤膜系统,循环清洗,去除未结合的蛋白;

S6、清洗完毕后便得到了包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒。

[0014] 优选的,所述S5中,超滤系统由反应釜,蠕动泵,超滤膜包组成,在大批量生产时将胶乳抗体溶液用蠕动泵泵入超滤膜包中进行循环清洗,同时将清洗废液另外收集排出,过程中不断补充缓冲液;超滤膜包采用切向流过滤原理,溶液切向流过膜表面,流体产生的跨膜压力将部分溶液压过滤膜,截留部分则在系统中循环回流,过滤的同时对膜进行冲刷,使膜表面不会形成凝胶层,保证了清洗效率,胶乳抗体溶液不会有损耗,免去了超速离心后再次悬浮清洗的繁琐,利于试剂的大批量生产。

[0015] 本发明提出的一种胱抑素C检测试剂盒,有益效果在于:本发明提供一种灵敏且稳定的血清胱抑素C检测试剂盒,试剂盒采用新型胶乳增强免疫比浊法,在EDAC的存在下,NHS通过与微球上的羧基反应形成中间活化酯,与进口cys-c抗体偶联,从而使cys-c检测试剂盒更灵敏,更稳定。同时采用切向流超滤系统对偶联后的胶乳抗体进行清洗,免去了超速离心后再次重悬复溶的繁琐操作,有利于试剂大批量的投产,本发明具有反应灵敏,稳定性好,抗体偶联效率高,且能维持抗体活性,适用于大批量试剂生产,并且操作方便适用全自动生化分析仪。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施例来对本发明做进一步说明。

[0017] 本发明提出了一种朊抑素C检测试剂盒,包括R1试剂和R2试剂,R1试剂配制:第一反应缓冲液为25-75mM,反应增强剂为0.5%-3%(w/v),第一防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第一稳定剂,第一表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R1试剂的PH值控制在7.0-8.0,其中,第一反应缓冲液可以是PBS缓冲溶液、Tris-HCl缓冲溶液、MOPOS缓冲溶液、HEPES缓冲溶液中的一种或几种,反应增强剂为PEG2000、PEG6000、PEG8000或PEG12000中的一种或几种,所述第一防腐剂为Proclin-300、庆大霉素或NaN3中的一种,所述第一稳定剂为EDTA-Na或NaCl和水配制而成,第一表面活性剂为Tween20、TritonX-100或TergitolNP9中的一种或几种;

R2试剂配制:包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒为0.2%-1%(w/v),第二反应缓冲液为25-75mM,第二防腐剂为0.1%-0.5%(w/v),第二稳定剂,第二表面活性剂为0.1%-2%(w/v),R2试剂的PH值控制在7.0-8.0,其中,第二反应缓冲液为PBS缓冲溶液、Tris-HCl缓冲溶液、MOPOS缓冲溶液、HEPES缓冲溶液中的一种或几种,第二防腐剂为Proclin-300、庆大霉素或NaN3中的一种,所述第二稳定剂为甘油、EDTA-Na、BSA、NaCl和水配制而成,第二表面活性剂为Tween20、TritonX-100或TergitolNP9中的一种或几种。

[0018] 本发明还提供一种包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

- S1、将羧基胶乳微球用50mmol/L (PH值为6.0) PBS缓冲液稀释至1%悬浮液 (w/v);
- S2、在该悬浮液中加入适量EDC和NHS,搅拌混匀,室温反应15分钟;
- S3、用50mmol/L (PH6.0) 的PBS缓冲液洗涤羧基胶乳微球,除去未反应的NHS和EDC,并将胶乳微球在纯化水中悬浮,使其浓度为1%(w/v);
- S4、将cys-c抗体迅速加入胶乳悬浮液中,37摄氏度不断搅拌,反应3小时;
- S5、将反应完成的胶乳抗体溶液连接上超滤膜系统,循环清洗,去除未结合的蛋白;超滤系统由反应釜,蠕动泵,超滤膜包组成,在大批量生产时将胶乳抗体溶液用蠕动泵泵入超滤膜包中进行循环清洗,同时将清洗废液另外收集排出,过程中不断补充缓冲液;超滤膜包采用切向流过滤原理,溶液切向流过膜表面,流体产生的跨膜压力将部分溶液压过滤膜,截留部分则在系统中循环回流,过滤的同时对膜进行冲刷,使膜表面不会形成凝胶层,保证了清洗效率,胶乳抗体溶液不会有损耗,免去了超速离心后再次悬浮清洗的繁琐,利于试剂的大批量生产。

[0019] S6、清洗完毕后便得到了包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒。

[0020] 本发明还提供一种优选方案,其原料配制如下:

R1试剂:缓冲液为50mMPBS,PEG8000为20g/L,NaN3为0.95g/L,NaCl为0.9g/L,Tween20为0.2%,R1试剂的PH值控制在7.0;

R2试剂配制:包被有朊抑素C抗体的胶乳颗粒为1%(w/v),PBS缓冲液为50mM,NaN3为0.95g/L,甘油为1%,EDTA-Na为1.2%,BSA为1g/L,NaCl为2.9g/L,Tween20为0.2%,R2试剂的PH值控制在7.0。

[0021]

全自动生化分析仪进行试剂盒性能研究

检测参数:

Assay Code	2 Piont End
Wavelength (2nd/Primary)	570nm

Assay Point	18-34
S.Vol (Normal)	2
Reagent T1	160
T3	40
Calibration Type	Spline
Inc/Dec	Inc

校准结果:

校准品	S1		S2		S3		S4		S5		S6	
	0		0.5		1.0		2.0		4.0		8.0	
吸光度	-8	2935	346	3215	738	3521	1563	4832	4125	7862	9563	15203
	-6	3026	362	3326	712	3425	1498	4795	4038	7359	9426	14862

线性分析实验:r=0.9994

测试1	测试2	平均值	理论值
0.41	0.43	0.42	0.5
1.06	1.05	1.055	1
2.06	2.08	2.07	2
3.95	4.02	3.985	4
8.26	8.31	8.285	8

临床样本比对分析

编号	本发明实施例	参比试剂	编号	本发明实施例	参比试剂
1	4.58	4.57	21	1.75	1.75
2	0.72	0.74	22	1.23	1.3
3	1.55	1.59	23	1.48	1.53
4	3.78	3.76	24	1.64	1.76
5	0.62	0.63	25	1.83	1.89
6	0.64	0.64	26	0.77	0.8
7	0.75	0.78	27	1.81	1.88
8	0.7	0.74	28	7.06	6.97
9	2.82	2.85	29	4.03	4.04
10	0.77	0.8	30	1.87	1.82
11	3.79	3.8	31	2.03	2.08
12	0.77	0.79	32	1.01	1.01
13	1.77	1.84	33	1.04	1.07
14	0.92	0.98	34	1.43	1.47
15	0.55	0.56	35	1.06	1.16
16	0.66	0.68	36	0.96	0.95
17	2.43	2.46	37	7.55	7.58
18	1.7	1.69	38	0.89	0.93

19	0.9	0.89	39	0.83	0.83
20	1.37	1.45	40	1.46	1.52

以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种胱抑素C检测试剂盒		
公开(公告)号	CN108845147A	公开(公告)日	2018-11-20
申请号	CN201810725038.3	申请日	2018-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江伊利康生物技术有限公司		
[标]发明人	王贤理 邓慰 池万余 刘思琪		
发明人	王贤理 邓慰 池万余 刘思琪		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N2333/8139		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外诊断技术领域，尤其是一种胱抑素C检测试剂盒，包括R1试剂和R2试剂，R1试剂配制：第一反应缓冲液为25-75mM，反应增强剂为0.5%-3% (w/v)，第一防腐剂为0.1%-0.5% (w/v)，第一稳定剂，第一表面活性剂为0.1%-2% (w/v)，R1试剂的PH值控制在7.0-8.0；R2试剂配制：包被有胱抑素C抗体的胶乳颗粒为0.2%-1% (w/v)，第二反应缓冲液为25-75mM，第二防腐剂为0.1%-0.5% (w/v)，第二稳定剂，第二表面活性剂为0.1%-2% (w/v)，R2试剂的PH值控制在7.0-8.0。本发明具有反应灵敏，稳定性好，抗体偶联效率高，且能维持抗体活性，适用于大批量试剂生产，并且操作方便适用全自动生化分析仪。

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
标准品	0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
吸光度	-8 2935	346 3215	738 3521	1563 4832	4125 7862	9563 15203
	-6 3026	352 3326	712 3425	1498 4795	4038 7359	9426 14862