



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104360081 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201410735830. 9

CN 102095872 A, 2011. 06. 15,

(22) 申请日 2014. 12. 05

审查员 段晓露

(73) 专利权人 重庆中元生物技术有限公司

地址 400039 重庆市九龙坡区科园四街
70-1、70-2 号 J 座三层

(72) 发明人 李元丽

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧 许亦琳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102279269 A, 2011. 12. 14,

CN 102749458 A, 2012. 10. 24,

CN 103217525 A, 2013. 07. 24,

CN 103645323 A, 2014. 03. 19,

WO 2008/142057 A1, 2008. 11. 27,

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

一种改良的胱抑素 C 检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种定量检测胱抑素 C (胱抑素 C) 的胶乳增强免疫比浊试剂盒, 包括彼此独立的试剂 R1 和试剂 R2, 所述试剂 R1 主要由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成; 所述试剂 R2 主要由交联胱抑素 C 抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成, 其中聚苯乙烯胶乳微球与胱抑素 C 抗体之间以共价交联方式连接。本发明检测试剂盒制备成本低廉, 稳定性好, 易于保存, 数据重复性好, 检测灵敏度高, 可广泛应用于临床生化仪。

1. 一种胱抑素 C 检测试剂盒,包括彼此独立的试剂 R1 和试剂 R2,所述试剂 R1 主要由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成;所述试剂 R1 中的缓冲液 1 包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5—7.5g/L,缓冲液 1 的 pH 值为 7.2—7.6;所述试剂 R2 主要由交联胱抑素 C 抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成,其中聚苯乙烯胶乳微球与胱抑素 C 抗体之间以共价交联方式连接。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R1 中的稳定剂 1 选自 KCl、NaCl、CaCl₂中的任意一种或多种的组合,其质量浓度为 0.5%~10%;所述试剂 R2 中的稳定剂 2 采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用;其中离子稳定剂为 NaCl、KCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 或者 K₂SO₄,悬浮稳定剂为 PEG8000、蔗糖、甘油或者葡萄糖。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R1 中的防腐剂 1 为叠氮钠、硫柳汞或者 ProClin300;所述试剂 R2 中的防腐剂 2 为叠氮钠、硫柳汞或 ProClin300。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R1 中的增凝剂为 PEG8000 或者葡聚糖。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 中的聚苯乙烯胶乳微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼、醛基或环氧基,聚苯乙烯胶乳微球的粒径在 100~600nm。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R1 中的保护剂 1 为牛血清白蛋白;所述试剂 R2 中的保护剂 2 为牛血清白蛋白。

7. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 R1 中的 EDTA 的浓度为 10~100mmol/L。

8. 根据权利要求 1~7 任一权利要求所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,具体包括如下步骤:

(1) 试剂 R1 的制备:

在缓冲液 1 中加入稳定剂 1、增凝剂、防腐剂 1、保护剂 1 和 EDTA,搅拌混合均匀,即得试剂 R1;

(2) 试剂 R2 的制备:

步骤一:将胱抑素 C 抗体进行 4℃透析,再用缓冲液 2 将胱抑素 C 抗体稀释至 2mg/ml,得到胱抑素 C 抗体稀释液;将聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水离心、洗涤 3 次;

步骤二:用缓冲液 2 将经过步骤一洗涤后的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%,再加入质量浓度为 0.01%~0.1%的 EDC,在室温下搅拌反应 30min,反应结束后 15000rpm 离心洗涤以除去未反应的 EDC,然后加入步骤一得到的胱抑素 C 抗体稀释液,室温下搅拌反应 30min,再加入终止液终止反应,将得到的反应液 15000rpm 离心,用缓冲液 2 洗涤沉淀,重复离心洗涤 3 次,最后加入缓冲液 2、防腐剂 2、稳定剂 2、保护剂 2 搅拌混合均匀即得试剂 R2。

一种改良的胱抑素 C 检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种改良的胱抑素 C 检测试剂盒及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 临床评价肾脏疾病进展和严重程度,一般以肾功能为参考,肾功能一般以肾小球滤过率(GFR)反映。它是反映肾功能最重要的指标。根据肾小球滤过率(GFR)标志物来源,分外源性和内源性。外源性标志物包括菊粉(inulin)、碘海醇(iohexol)、⁵¹Cr-EDTA、^{99m}Tc-DTPA等。内源性标志物包括血清肌酐(Scr)、尿素(Urea)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -M)、 β -痕迹蛋白(BTP)以及血清胱抑素 C(Cystatin C, Cys C)。

[0003] 胱抑素 C(Cystatin C, Cys C),又名 γ_2 痕迹碱性蛋白或后 γ 球蛋白,是半胱氨酸蛋白酶抑制剂蛋白质中的一种。编码 Cys C 的基因属于管家基因,能在所有的有核细胞内以恒定速度持续转录与表达,无组织特异性,故 Cys C 可在体内以恒定速度产生,并存在于各种体液之中,尤以脑脊液和精浆中含量为高,尿液中最低,不受年龄、性别、体重、炎症等因素影响。胱抑素 C 分子量小(13KD),生理条件下带正电荷,能自由从肾小球滤过,完全被肾小管上皮细胞重吸收并于细胞内降解,不重新回到血液中,同时肾小管上皮细胞也不分泌 Cys C 至管腔内,因此,其血清浓度主要由 GFR 决定。近年来有许多试验证明胱抑素 C 是迄今基本满足理想内源性 GFR 标志物要求的内源性物质。是新近发展起来的评估肾功能的一种敏感性好、特异性高的指标。Cystatin C 在一系列生理病理过程中也发挥着作用,有重要的临床意义。

[0004] 目前临床对胱抑素 C 的检测,主要通过免疫学的方法,借助抗原抗体特异性的结合,以双抗夹心的方式定量检测血清中胱抑素 C 的含量。具体的检测方法包括酶联免疫吸附测定法、化学发光法和免疫比浊法。酶联免疫吸附测定法和化学发光法由于操作繁琐、耗时长、费用高等不足,限制了其广泛应用。而免疫比浊法随着全自动生化仪的普及和多种快速免疫比浊检测技术的发展,拥有反应时间短,精密度好,检测范围宽,黄疸、溶血和脂血标本影响小,易于自动化等优点,已成为临床胱抑素 C 的主流检测方法。

[0005] 但是,由于免疫比浊法的检测原理缺乏酶促放大反应,导致现有的胱抑素 C 免疫比浊检测试剂盒不给避免的出现灵敏度较低等不足。同时,在试剂盒制备过程中,为保证产品达到所需灵敏度,较酶联免疫吸附测定法和化学发光法,其对所用抗体的质量要求更高,包被量 和抗体使用量更大,增加了试剂盒的成本。且目前广泛使用的鼠单克隆抗体、兔多克隆抗体或羊多克隆抗体由于自身属性,在使用过程中都不可避免的会受到类风湿因子和异嗜性抗体等的干扰,影响最终的检测结果。

[0006] 卵黄抗体(Egg yolk antibodies, eyAb),也称卵黄免疫球蛋白(Egg yolk immunoglobulin, IgY),是一种从免疫禽蛋中提取出的针对特定抗原的抗体,与传统鼠单克隆抗体、兔多克隆抗体或羊多克隆抗体相比,卵黄抗体具有以下优点:(1)产量高,免疫时间短,易于大量制备;(2)物理性质稳定性强;(3)与哺乳动物种系差别大,可识别更多表位;(4)

特异性强,同一家族抗原无交叉反应;(5)干扰小,不能识别哺乳动物体内的补体和人 Fc 受体,不会和类风湿因子及 HAMA(人抗鼠抗体)反应。由于其自身优点突出,IgY 抗体将来有望越来越多的进入诊断试剂的领域,在诊断试剂的开发中发挥更加重要的作用。

发明内容

[0007] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种改良的胱抑素 C 检测试剂盒,该试剂盒与现有胱抑素 C 检测试剂盒相比,能进一步提高血清中胱抑素 C 的检测灵敏度,不受类风湿因子和异嗜性抗体的干扰,具灵敏度高,特异性好、线性范围宽和稳定性佳的特点,且成本更低,易于推广使用。

[0008] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种定量检测胱抑素 C 的胶乳增强免疫比浊试剂盒,包括彼此独立的试剂 R1 和试剂 R2,所述试剂 R1 主要由缓冲液 1、稳定剂 1、防腐剂 1、EDTA、增凝剂和保护剂 1 组成;所述试剂 R2 主要由交联胱抑素 C 抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液 2、稳定剂 2、防腐剂 2、保护剂 2 组成,其中聚苯乙烯胶乳微球与胱抑素 C 抗体之间以共价交联方式连接。

[0009] 本发明中的防腐剂 1 和 2 是指可以抑制试剂中细菌和微生物污染的一类试剂,对试剂具有防腐杀菌的作用。试剂 R2 中的保护剂 2 是一类能够保护胶乳颗粒表面的抗体的试剂。稳定剂 1 和 2 可以保持试剂内的电荷平衡。

[0010] 本技术方案中的胱抑素 C 胶乳增强免疫比浊试剂盒,将胱抑素 C 抗体交联在聚苯乙烯胶乳微球表面,当血液中的胱抑素 C 与胱抑素 C 抗体反应时,带动聚苯乙烯胶乳微球聚集产生一定浊度,而浊度与血液中的胱抑素 C 含量在一定范围成正比,可以用全自动生化仪在 400-800nm 波长下检测血液中胱抑素 C 的含量。

[0011] 优选地,所述试剂 R1 中的缓冲液 1 选自 Hepes 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、MOPS 缓冲液、PBS 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼砂缓冲液中的任意一种或多种的组合,其 pH 为 7.0 ~ 9.0,浓度为 25 ~ 500mmol/L;所述试剂 R2 中的缓冲液 2 选自 PBS 缓冲液、硼砂缓冲液、甘氨酸缓冲液、Hepes 缓冲液、GOODS 缓冲液、MOPS 缓冲液中任意一种或多种的组合,其 pH 为 7.0 ~ 9.0,浓度为 25 ~ 500mmol/L。

[0012] 优选地,为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明对所述试剂 R1 中的缓冲液 1 进行了改进,所述试剂 R1 中的缓冲液 1 包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 - 7.5g/L,生物缓冲液 1 的 pH 值为 7.2 - 7.6。

[0013] 优选地,各组分在缓冲液 1 中的浓度为:

[0014]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0015] 所述缓冲液 1 的溶剂为水。

[0016] 所述缓冲液 1 可以采用本领域内公知的各种 pH 调节剂来进行 pH 调节。

[0017] 优选地,所述试剂 R1 中的稳定剂 1 选自 KCl、NaCl、CaCl₂中的任意一种或多种的组合,其质量浓度为 0.5%~10%,这样的稳定剂 1 具有价格低廉、原料易得的优点。所述试剂 R2 中的稳定剂 2 采用离子稳定剂和悬浮稳定剂配合使用;其中离子稳定剂为 NaCl、KCl、Na₂CO₃、Na₂SO₄ 或者 K₂SO₄,悬浮稳定剂为 PEG8000、蔗糖、甘油或者葡萄糖;其中优选 NaCl 和蔗糖配合使用,这样可以保持体系长期稳定。

[0018] 优选地,所述试剂 R1 中的防腐剂 1 为叠氮钠、硫柳汞或者 ProClin300;所述试剂 R2 中的防腐剂 2 为叠氮钠、硫柳汞或 ProClin300。这样的防腐剂 1 和 2 具有优良的防腐杀菌性能。

[0019] 优选地,所述试剂 R1 中的增凝剂为 PEG8000 或者葡聚糖。更优选 PEG8000,是由于 PEG8000 属于非离子型水溶性聚合物,在水中的溶解性比较大,可以调节试剂 R1 的粘度,促进抗原和抗体分子结合为复合物。

[0020] 优选地,所述试剂 R2 中的聚苯乙烯乳胶微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼、醛基或环氧基,聚苯乙烯乳胶微球的粒径在 50~150nm。优选表面官能团为羧基的聚苯乙烯胶乳微球,这是由于聚苯乙烯胶乳微球表面为羧基的官能团很容易被 EDC 活化,从而快速与 PCT 抗体结合,增加偶联效果,保证测试结果的稳定性及准确性。

[0021] 优选地,所述试剂 R2 中的脱抑素 C 抗体为鼠抗人脱抑素 C 抗体、山羊抗人脱抑素 C IgG 抗体或兔抗人脱抑素 C IgG 抗体的一种或者多种的组合。

[0022] 更优选地,所述试剂 R2 中的脱抑素 C 抗体为鸡抗人脱抑素 C 卵黄抗体,具有更高的特异性和亲和力。

[0023] 优选地,所述试剂 R1 中的保护剂 1 为牛血清白蛋白;所述试剂 R2 中的保护剂 2 为牛血清白蛋白。所述保护剂 1 和 2 可以保护聚苯乙烯胶乳颗粒表面的脱抑素 C 抗体的活性。

[0024] 优选地,所述试剂 R1 中的 EDTA 的浓度为 10~100mmol/L。

[0025] 本发明第二方面提供了所述脱抑素 C 检测试剂盒的制备方法,具体包括如下步骤:

[0026] (1) 试剂 R1 的制备:

[0027] 在缓冲液 1 中加入稳定剂 1、增凝剂、防腐剂 1、保护剂 1 和 EDTA,搅拌混合均匀,即得试剂 R1;

[0028] (2) 试剂 R2 的制备:

[0029] 步骤一:将脱抑素 C 抗体进行 4℃透析,再用缓冲液 2 将脱抑素 C 抗体稀释至 2mg/ml,得到脱抑素 C 抗体稀释液;将聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水离心、洗涤 3 次;

[0030] 步骤二:用缓冲液 2 将经过步骤一洗涤后的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%,再加入质量浓度为 0.01%~0.1%的 EDC,在室温下搅拌反应 30min,反应结束后 15000rpm 离心洗涤以除去未反应的 EDC,然后加入步骤一得到的脱抑素 C 抗体稀释液,室温下搅拌反应 30min,再加入终止液终止反应,将得到的反应液 15000rpm 离心,用缓冲液 2 洗涤沉淀,重复离心洗涤 3 次,最后加入缓冲液 2、防腐剂 2、稳定剂 2、保护剂 2 搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0031] 优选地,为了使得试剂盒具有更佳的灵敏度和显色效果,本发明对所述试剂 R1 中的缓冲液 1 进行了改进,所述试剂 R1 中的缓冲液 1 包括下列组分:水苏糖、明矾、果糖二磷

酸钠、六偏磷酸钠和甘氨酸,且水苏糖、明矾、果糖二磷酸钠、六偏磷酸钠、甘氨酸的总浓度为 3.5 — 7.5g/L,生物缓冲液 1 的 pH 值为 7.2 — 7.6。

[0032] 优选地,各组分在缓冲液 1 中的浓度为:

[0033]

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;

[0034] 所述缓冲液 1 的溶剂为水。

[0035] 所述缓冲液 1 可以采用本领域内公知的各种 pH 调节剂来进行 pH 调节。

[0036] 与现有检测技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0037] 1. 采用胶乳增强免疫比浊法,当血液中的胱抑素 C 与胱抑素 C 抗体反应时,带动了聚苯乙烯胶乳聚集产生一定的浊度,而浊度与血液中的胱抑素 C 含量在一定范围内成正比,可以在 400 ~ 800nm 的波长下进行检测,检测更为方便,容易在临床中应用。

[0038] 2. 聚苯乙烯胶乳微球的表面官能团为氨基、羧基、酰肼或者环氧基等,其表面的官能团可以和抗体表面的氨基等结合形成共价偶联结构,使胱抑素 C 抗体牢固的结合在胶乳微球表面,保证了 R2 的稳定性,延长了试剂有效期。

[0039] 3. 采用粒径为 100 ~ 600nm 的大颗粒聚苯乙烯胶乳颗粒,具有较大的粒径,增加了血液中胱抑素 C 和胱抑素 C 抗体反应时的浊度,从而增加测试反应的灵敏度、缩短了反应时间。

[0040] 4. 试剂 R2 中采用离子稳定剂和悬浮稳定剂结合使用,使试剂的电荷平衡状态,提高了胱抑素 C 胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性,使得胱抑素 C 胶乳增强免疫比浊试剂盒的稳定性可达 18 个月。

具体实施方式

[0041] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0042] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0043] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本

发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0044] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 and Third edition,2001;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley&Sons, New York,1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego;Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego,1998 ;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol.304, Chromatin(P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego,1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.119, Chromatin Protocols(P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa,1999 等。

[0045] 实施例 1:

[0046] 本发明的试剂盒举例是双试剂,其中:

[0047] 试剂 R1:

[0048]

水苏糖	0.8-3g/L
明矾	0.1-1g/L
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L
甘氨酸	1.5-2.25g/L
PEG8000	2.7g/L
叠氮钠	1.6g/L
牛血清白蛋白	2.2g/L
乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L
氯化钠	2.5g/L

[0049] 试剂 R2:

[0050]

氨基丁三醇缓冲液	75mmol/L, PH7.2
PEG8000	2.7g/L
叠氮钠	1.6g/L
牛血清白蛋白	2.2g/L
乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L

[0051]

氯化钠	2.5g/L
-----	--------

[0052] 包被有鸡抗人胰抑素 C 卵黄抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒, 粒径 100nm, 浓度 1%。

[0053] 校准品:

[0054]

氨基丁三醇缓冲液	75mmol/L, PH7.2
----------	-----------------

叠氮钠	1.6g/L
-----	--------

牛血清白蛋白	2.2g/L
--------	--------

乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L
----------	--------

氯化钠	2.5g/L
-----	--------

[0055] 按照需要的胰抑素 C 参考校准品浓度将相应的胰抑素 C 标准品分别加入上述缓冲液, 制备得到不同浓度的一组校准品。

[0056] 实施例 2: 试剂盒使用方法。

[0057] 1. 试剂准备, 试剂为液体双试剂, 开瓶即用, 其中:

[0058] (1) 试剂 R1 的制备:

[0059] 配置缓冲液 1: 水苏糖 0.8-3g/L、明矾 0.1-1g/L、果糖二磷酸钠 0.8-3g/L 六偏磷酸钠 0.05-0.5g/L、甘氨酸 1.5-2.25g/L、溶剂为水, PH7.4。

[0060] 在缓冲液 1 中加入 PEG8000 2.7g/L、叠氮钠 1.6g/L、牛血清白蛋白 2.2g/L、乙二胺四乙酸二钠 4.5g/L、氯化钠 2.5g/L, 搅拌混合均匀, 即得试剂 R1;

[0061] (2) 试剂 R2 的制备:

[0062] 步骤一: 将胰抑素 C 抗体进行 4℃ 透析, 再用缓冲液 2 将胰抑素 C 抗体稀释至 2mg/ml, 得到胰抑素 C 抗体稀释液; 将聚苯乙烯胶乳微球用蒸馏水离心、洗涤 3 次;

[0063] 步骤二: 用缓冲液 2 (氨基丁三醇缓冲液 75mmol/L, PH7.2) 将经过步骤一洗涤后的聚苯乙烯胶乳微球稀释到质量浓度为 1%, 再加入质量浓度为 0.01% - 0.1% 的 EDC, 在室温下搅拌反应 30min, 反应结束后 15000rpm 离心洗涤以除去未反应的 EDC, 然后加入步骤一得到的胰抑素 C 抗体稀释液, 室温下搅拌反应 30min, 再加入终止液终止反应, 将得到的反应液 15000rpm 离心, 用缓冲液 2 (氨基丁三醇缓冲液 75mmol/L, PH7.2) 洗涤沉淀, 重复离心洗涤 3 次, 最后加入缓冲液 2 (氨基丁三醇缓冲液 75mmol/L, PH7.2)、加入 PEG8000 2.7g/L、叠氮钠 1.6g/L、牛血清白蛋白 2.2g/L、乙二胺四乙酸二钠 4.5g/L、氯化钠 2.5g/L, 搅拌混合均匀即得试剂 R2。

[0064] (3) 校准品的制备: 按照需要的胰抑素 C 参考校准品浓度将相应的胰抑素 C 标准品分别加入上述缓冲液, 制备得到不同浓度的一组校准品。

[0065] 2. 全自动生化仪参数设置

[0066] (a) 检测波长: 主波长为 600nm, 副波长为 none;

[0067] (b) 检测温度: 37℃;

[0068] (c) 反应时间: 10min, 其中, 孵育时间 5min, 加入试剂 R2 后立即测定读取吸光度 A1, 5 分钟后读取吸光度 A2, 计算吸光度变化 $\Delta A = A2 - A1$;

[0069] (d) 反应方向: 负方向

[0070] 3. 检测步骤

[0071] (a) 取 200ul 试剂 R1 与 5ul 血清样本（避免溶血）混匀；

[0072] (b) 将混匀后的溶液在 37℃ 孵育时间 5min；

[0073] (c) 再加入 50ul 试剂 R2, 立即测定读取吸光度 A1, 5 分钟后读取吸光度 A2, 计算吸光度变化 $\Delta A = A2 - A1$ 。

[0074] 4. 通过校准曲线计算出样本中胱抑素 C 胱抑素 C 的含量。

[0075]

$$CG \text{ 浓度 (mg/L)} = \frac{\text{样品管吸光度}}{\text{校准品吸光度}} \times \text{校准品浓度}$$

[0076] 下述测试为对实施例 1 试剂盒的性能测试

[0077] 将实施例 1 制备的胱抑素 C 检测试剂盒进行性能测试, 主要测试其分析最低检出限、准确度、重复性、及抗干扰性等。

[0078] 1) 最低检测限: 采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本, 空白样本应不含被测物。在生化分析仪上连续重复检测 20 次, 记录检测结果。结果显示其最低检测限为 0.01 ug/L。

[0079] 2) 准确性: 选择合适浓度的常规检测样本, 向常规样本中加入不同量的定值标准品制作成回收样本, 定值样本用去离子水作为溶剂; 在常规样本中加入同样量的去离子水制作成基础样本, 加入的定值标准品的量不超过总体积的 1/10, 每个重复 3 次检测取其均值为回收浓度。结果显示平均回收率为 100.34%, 准确度较高。

[0080] 3) 稳定性: 取胱抑素 C 检测试剂盒进行常规贮存稳定性试验, 2-8℃ 放置分别按时间 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 个月进行检测; 开盖稳定性试验分别按 2-8℃ 放置 0 天、7 天、14 天、16 天、18 天、20 天、22 天、24 天、26 天、28 天、30 天、32 天进行测定。结果显示胱抑素 C 检测试剂盒贮存于 2-8℃、避光环境中, 有效期为 18 个月。开盖贮存于 2-8℃、避光环境中, 有效期为 60 天。

[0081] 4) 抗干扰性: 将不同浓度的干扰物加入到血清标本中, 对照组加入蒸馏水, 以加入干扰物质的血清三次检测平均值, 作为实测值, 以加入蒸馏水的血清的对照组三次检测平均值为基准值。实测值减去基准值然后除以基准值得偏差。结果显示样本中胆红素 $\leq 300 \mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白 $\leq 1\text{mg/mL}$ 、乳糜 $\leq 0.30\%$ 时对胱抑素 C 检测试剂盒检测结果的干扰小于 10%。

[0082] 实施例 3

[0083] 对比试剂盒的制备及使用:

[0084] 试剂 R1 中的缓冲液采用氨基丁三醇缓冲液 75mmol/L, PH7.2, 其他试剂及实验方法均同实施例 1 和 2。

[0085] 试剂 R1:

[0086]

氨基丁三醇缓冲液	75mmol/L, PH7.2
PEG8000	2.7g/L
叠氮钠	1.6g/L
牛血清白蛋白	2.2g/L
乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L
氯化钠	2.5g/L

[0087] 试剂 R2:

[0088]

氨基丁三醇缓冲液	75mmol/L, PH7.2
PEG8000	2.7g/L
叠氮钠	1.6g/L
牛血清白蛋白	2.2g/L
乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L
氯化钠	2.5g/L

[0089] 包被有鸡抗人胰抑素 C 卵黄抗体致敏聚苯乙烯胶乳颗粒, 粒径 100nm, 浓度 1%。

[0090] 校准品:

[0091]

氨基丁三醇缓冲液	75mmol/L, PH7.2
叠氮钠	1.6g/L
牛血清白蛋白	2.2g/L
乙二胺四乙酸二钠	4.5g/L
氯化钠	2.5g/L

[0092] 按照需要的胰抑素 C 参考校准品浓度将相应的胰抑素 C 标准品分别加入上述缓冲液, 制备得到不同浓度的一组校准品。

[0093] 将实施例 3 制备的胰抑素 C 检测试剂盒进行性能测试, 方法同实施例 2。

[0094] 1) 最低检测限: 采用 5% BSA 生理盐水溶液作为空白样本, 空白样本应不含被测物。在生化分析仪上连续重复检测 20 次, 记录检测结果。结果显示其最低检测限为 1ug/L。

[0095] 2) 准确性: 选择合适浓度的常规检测样本, 向常规样本中加入不同量的定值标准品制作成回收样本, 定值样本用去离子水作为溶剂; 在常规样本中加入同样量的去离子水制作成基础样本, 加入的定值标准品的量不超过总体积的 1/10, 每个重复 3 次检测取其均值为回收浓度。结果显示平均回收率为 98.90.00%, 准确度较高。

[0096] 3) 稳定性: 取本实施例的检测试剂盒进行常规贮存稳定性试验, 2-8℃ 放置分别按时间 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 个月进行检测; 开盖稳定性试验分别按 2-8℃ 放置 0 天、7 天、14 天、16 天、18 天、20 天、22 天、24 天、26 天、28 天、30 天、32 天进行测定。结果显

示本实施例的检测试剂盒贮存于 2-8℃、避光环境中,有效期为 10 个月。开盖贮存于 2-8℃、避光环境中,有效期为 25 天。

[0097] 4) 抗干扰性:将不同浓度的干扰物加入到血清标本中,对照组加入蒸馏水,以加入干扰物质的血清三次检测平均值,作为实测值,以加入蒸馏水的血清的对照组三次检测平均值为基准值。实测值减去基准值然后除以基准值得偏差。结果显示样本中胆红素 $\leq 300 \mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白 $\leq 1\text{mg/mL}$ 、乳糜 $\leq 0.30\%$ 时对胱抑素 C 检测试剂盒检测结果的干扰小于 18%。

[0098] 综上所述,本发明所提供的检测试剂盒具有良好的抗干扰性和特异性,且具有很好的灵敏性,阳性显色强,阴性本底更低,有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0099] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种改良的胱抑素C检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104360081B	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201410735830.9	申请日	2014-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆中元生物技术有限公司		
[标]发明人	李元丽		
发明人	李元丽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313		
代理人(译)	郭婧婧		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN104360081A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种定量检测胱抑素C (胱抑素C) 的胶乳增强免疫比浊试剂盒，包括彼此独立的试剂R1和试剂R2，所述试剂R1主要由缓冲液1、稳定剂1、防腐剂1、EDTA、增凝剂和保护剂1组成；所述试剂R2主要由交联胱抑素C抗体的聚苯乙烯胶乳微球、缓冲液2、稳定剂2、防腐剂2、保护剂2组成，其中聚苯乙烯胶乳微球与胱抑素C抗体之间以共价交联方式连接。本发明检测试剂盒制备成本低廉，稳定性好，易于保存，数据重复性好，检测灵敏度高，可广泛应用于临床生化仪。

水苏糖	0.8-3g/L;
明矾	0.1-1g/L;
果糖二磷酸钠	0.8-3 g/L;
六偏磷酸钠	0.05-0.5 g/L;
甘氨酸	1.5-2.25g/L;