



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110780082 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201911080408.3

(22)申请日 2019.11.04

(71)申请人 上海昆涑实业发展有限公司

地址 201800 上海市嘉定区龙盘路666号6
幢三层

(72)发明人 张卫国 李玉君 杨卫冲 沈坤雪

(74)专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11463

代理人 李双艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/96(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用,涉及生化免疫试剂领域,制备方法包括将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9中的至少两种与基质混合制得第一混合液;基质为血清基质。本发明通过提供总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用,可以对实验室或医院的生化免疫检测设备及试剂进行总补体活性检测水平的校准。从而保证实验数据或临床检测的准确性,降低设备、试剂及人员操作带来的误差。

1. 一种总补体活性质控品的制备方法,其特征在于,其包括将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9中的至少两种与基质混合制得第一混合液;所述基质为血清基质。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述血清基质为牛血清;

优选的,所述血清基质为56-57℃灭活30-35min的新生牛血清;

优选的,所述血清基质的pH为7.00-8.50,所述血清基质中总蛋白含量为35-50g/L,所述血清基质中血红蛋白含量为0-200mg/L。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,其包括将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9与基质混合制得第一混合液;

优选的,所述第一混合液中各补体成分的浓度为:补体C1 10-60U/mL、补体C2 10-60U/mL、补体C3 10-60U/mL、补体C4 10-60U/mL、补体C5 10-60U/mL、补体C6 10-60U/mL、补体C7 10-60U/mL、补体C8 10-60U/mL和补体C9 10-60U/mL。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括在第一混合液中添加防腐剂,蛋白稳定剂和冻干保护剂;

优选的,所述防腐剂为Proclin300,NaN₃或硫柳汞;

优选的,所述蛋白稳定剂为海藻糖,明胶或聚乙烯吡咯烷酮;

优选的,所述冻干保护剂为蔗糖,乳糖或甘露醇。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述防腐剂的添加质量占第一混合液质量的0.005-0.05%,所述蛋白稳定剂的添加质量占第一混合液质量的0.1-5%,所述冻干保护剂的添加质量占第一混合液质量的0.5-5%。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,将添加防腐剂,蛋白稳定剂和冻干保护剂的第一混合液冻干制粉;

优选的,采用低温真空干燥制粉。

7. 一种由权利要求1-6任一项所述的制备方法制备获得总补体活性质控品。

8. 一种试剂,其特征在于,所述试剂包括权利要求7所述的总补体活性质控品。

9. 一种权利要求7所述的总补体活性质控品在生化免疫分析中的应用,其特征在于,其包括如下步骤:

取出总补体活性质控品,按照说明书操作,用于生化分析仪和相应分析试剂的质控,计算测量结果的均值和标准差,分析每次的测试结果是否在可控范围内,若出现失控则分析失控原因。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述生化免疫分析仪为cobas8000生化免疫分析仪;

优选的,所述分析试剂为wako CH50 kits。

一种总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生化免疫试剂领域,具体而言,涉及一种总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用。

背景技术

[0002] 补体是一种血清蛋白质,存在于人和脊椎动物血清及组织液中,不耐热,活化后具有酶活性、可介导免疫应答和炎症反应。可被抗原-抗体复合物或微生物所激活,导致病原微生物裂解或被吞噬。可通过三条既独立又交叉的途径被激活,即经典途径、旁路途径和凝集素途径。补体是机体重要的免疫效应系统之一,它既可参与机体的防御效应和自身稳定,亦可引起免疫损伤。总补体活性(CH50)检测反映了补体C1~C9成分的综合水平,可以对疾病的进程和疗效判断提供重要的依据,进一步作为疾病活动的参考指标。

[0003] 在总补体活性检测的质量管理体系中,应用质控品进行室内质控和参加实验室室间的质量评价是保证实验室检查结果质量,减少误差的重要措施。

[0004] 目前,市场上尚无总补体活性的质控品。

[0005] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种总补体活性质控品,试剂,制备方法及应用以解决上述技术问题。

[0007] 本发明是这样实现的:

[0008] 一种总补体活性质控品的制备方法,其包括将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9中的至少两种与基质混合制得第一混合液;基质为血清基质。

[0009] 补体C1为补体经典激活途径的固有成分,包括C1q、C1r和C1s三个亚单位,在钙离子存在下按1:2:2组成五聚体大分子复合物(C1qC1r2C1s2)。C1q通过其胶原样区与其他激活剂结合;C1s为丝氨酸蛋白酶原,其活化后作用的底物是C4和C2。

[0010] 补体C2为补体经典激活途径的固有成分,属丝氨酸蛋白酶原。在补体经典激活途径中,C2被C1s丝氨酸蛋白酶裂解,生成大片段C2b和小片段C2a。C2b含酶催化部位,可与C4b/C3b片段结合,形成C3转化酶和C5转化酶。

[0011] 补体C3是血清中含量最高的补体成分,分子量为195000,主要有巨噬细胞和肝脏合成,在C3转化酶的作用下,裂解成C3a和C3b两个片段,在补体经典激活途径和旁路激活途径中均发挥重要作用。

[0012] C3正常参考值为0.9~1.8g/L,C3增高常见于各种传染病、急性炎症和组织损伤、急性肾炎、肝癌等,类风湿性关节炎患者正常或略有升高。C3降低常见于:免疫复合物引起的增殖性慢性肾小球肾炎(MPGN)、急性链球菌感染后肾小球肾炎(AGN)、狼疮性肾炎、反复性感染、皮疹、肝炎、肝硬化等严重肝脏疾患和关节疼痛等。因此,C3的测定对于疾病的诊

断、治疗和病因探讨具有重要作用。

[0013] 补体C4为补体经典激活途径的固有成分,在 Mg^{2+} 存在下,可被活化的C1s裂解为小片段C4a和大片段C4b。C4b能与C2b结合而形成C3转化酶;与免疫复合物、微生物、高分子物质或细胞膜结合,介导调理作用和免疫黏附作用。C4正常参考值为0.1~0.4g/L,C4增高常见于各种传染病、急性肾炎、组织损伤、多发性骨髓瘤等。C4降低常见于免疫复合物引起的肾炎、系统性红斑狼疮、病毒性感染、狼疮性症候群、肝硬化、肝炎等。

[0014] 补体C5参与3条补体活化途径的固有成分,可被C5转化酶裂解为小片段C5a和大片段C5b:C5a游离于液相,具有过敏毒素、趋化因子等活性;C5b可与C6结合为稳定的C5b6复合物,继而自发与C7、C8、C9结合为C5b~9复合物。

[0015] 补体C6为补体活化共同末端效应的组分,可与C5b结合为C5b6,继而与C7、C8、C9结合为C5b~9复合物。

[0016] 补体C7为补体活化共同末端效应的组分,可与C5b6以及C8、C9组成C5b~9复合物。

[0017] 补体C8为补体活化共同末端效应的组分,可与C5b67和C9结合为C5b~9复合物。

[0018] 补体C9为补体活化共同末端效应的组分,其分子结构与穿孔素高度同源。C5b~8生成后,1~16个C9可与之聚合为C9圆柱体跨膜通道,形成攻膜复合物。

[0019] 本发明通过提供含有上述多种补体活性成分的总补体活性质控品可以对实验室或医院的生化检测设备及试剂进行总补体检测水平的校准。从而保证试验数据或临床检测的准确性,降低设备及仪器本身带来的误差。

[0020] 在本发明应用较佳的实施例中,上述血清基质为牛血清;

[0021] 优选的,血清基质为56-57℃灭活30-35min的新生牛血清;

[0022] 优选的,血清基质的pH为7.00-8.50,血清基质中总蛋白含量为35-50g/L,血清基质中血红蛋白含量为0-200mg/L。

[0023] 在本发明提供的pH范围内,能保证血清基质中蛋白的活性,也有利于控制后续补体因子加入时的活性。

[0024] 在本发明应用较佳的实施例中,将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9与基质混合制得第一混合液;

[0025] 优选的,第一混合液中各补体成分的浓度为:补体C1 20-120U/mL、补体C2 10-60U/mL、补体C3 10-60U/mL、补体C4 10-60U/mL、补体C5 10-60U/mL、补体C6 10-60U/mL、补体C7 10-60U/mL、补体C8 10-60U/mL和补体C9 10-60U/mL。

[0026] 在本发明应用较佳的实施例中,上述制备方法还包括在第一混合液中添加防腐剂,蛋白稳定剂和冻干保护剂;

[0027] 优选的,防腐剂为Proclin300,NaN₃或硫柳汞;

[0028] 优选的,蛋白稳定剂为海藻糖,明胶或聚乙烯吡咯烷酮;

[0029] 优选的,冻干保护剂为蔗糖,乳糖或甘露醇。

[0030] 通过添加防腐剂可以延长总补体活性质控品的保质期,添加蛋白稳定剂有利于保证总补体活性质控品中蛋白构象稳定性,从而保证设备及试剂校准的准确性,添加冻干保护剂可以防止低温冻干对蛋白结构的破坏导致活性的下降。

[0031] 在本发明应用较佳的实施例中,上述防腐剂的添加质量占第一混合液质量的0.005-0.05%,蛋白稳定剂的添加质量占第一混合液质量的0.1-5%,冻干保护剂的添加质

量占第一混合液质量的0.5-5%。

[0032] 在本发明应用较佳的实施例中,上述将添加防腐剂,蛋白稳定剂和冻干保护剂的第一混合液冻干制粉;

[0033] 优选的,采用低温真空干燥制粉。

[0034] 通过低温真空干燥可以制得固体粉末,有利于长期保存和运输,在其他实施例中,制备过程不进行低温冻干,直接现配现用液体试剂。

[0035] 一种由上述制备方法制备获得总补体活性质控品。总补体活性质控品的形态可以是固态也可以是液态,可以根据需要选择冻干处理。

[0036] 一种试剂,试剂包括总补体活性质控品。

[0037] 一种总补体活性质控品在生化免疫分析中的应用,其包括如下步骤:取出总补体活性质控品,按照说明书操作,用于生化分析仪和相应试剂的质控,计算测量结果的均值和标准差,分析每次的测试结果是否在可控范围内,若出现失控则分析失控原因。

[0038] 在本发明应用较佳的实施例中,生化免疫分析仪为cobas8000生化免疫分析仪;

[0039] 优选的,生化分析试剂为wako CH50kits。

[0040] 本发明具有以下有益效果:

[0041] 本发明提供了一种总补体活性质控品,试剂及应用,该总补体活性质控品含有多补体成分,可以对实验室或医院的生化检测设备及试剂进行总补体检测水平的校准,从而保证试验数据或临床检测的准确性,降低设备及仪器本身带来的误差。本发明提供的制备总补体活性质控品的方法简单,制备出的成品间差异小。

具体实施方式

[0042] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0043] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0044] 实施例1

[0045] 本实施例提供了一种总补体活性质控品的制备方法,具体包括如下步骤:

[0046] 选择pH为7.79,总蛋白质含量43g/L,血红蛋白含量70g/L,无菌试验阴性,支原体检测阴性,56℃灭活30分钟的新生牛血清。在上述新生牛血清中加入补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9制得第一混合液,保证第一混合液中各补体成分的浓度为:补体C130U/mL、补体C215U/mL、补体C3 15U/mL、补体C4 15U/mL、补体C5 15U/mL、补体C6 15U/mL、补体C7 15U/mL、补体C8 15U/mL和补体C9 15U/mL,再在第一混合液中加入占第一混合液质量比为0.02%的Proclin300,3%的海藻糖以及5%的甘露醇;低温真空干燥制成冻干粉,制得总补体活性质控品1。

[0047] 实施例2

[0048] 本实施例提供了一种总补体活性质控品的制备方法,具体包括如下步骤:

[0049] 选择pH为7.82,总蛋白质含量45g/L,血红蛋白含量67g/L,无菌试验阴性,支原体检测阴性,56℃灭活30分钟的新生牛血清。在上述新生牛血清中加入补体C1、补体C2、补体

C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9制得第一混合液,保证第一混合液中各补体成分的浓度为:补体C160U/mL、补体C230U/mL、补体C3 30U/mL、补体C4 30U/mL、补体C5 30U/mL、补体C6 30U/mL、补体C7 30U/mL、补体C8 30U/mL和补体C9 30U/mL,再在第一混合液中加入占第一混合液质量比为0.02%的叠氮钠,2%的明胶以及3%的乳糖;低温真空干燥制成冻干粉,制得总补体活性质控品2。

[0050] 实施例3

[0051] 本实施例提供了一种总补体活性质控品的制备方法,具体包括如下步骤:

[0052] 选择pH为7.66,总蛋白质含量38g/L,血红蛋白含量58g/L,无菌试验阴性,支原体检测阴性,56℃灭活30分钟的新生牛血清。在上述新生牛血清中加入补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9制得第一混合液,保证第一混合液中各补体成分的浓度为:补体C1100U/mL、补体C250U/mL、补体C3 50U/mL、补体C4 50U/mL、补体C5 50U/mL、补体C6 50U/mL、补体C7 50U/mL、补体C8 50U/mL和补体C9 50U/mL,再在第一混合液中加入占第一混合液质量比为0.05%的硫柳汞,1.5%的聚乙烯吡咯烷酮K30以及3%的蔗糖;低温真空干燥制成冻干粉,制得总补体活性质控品3。

[0053] 取实施例1-3制得的总补体活性质控品1-3在cobas8000生化免疫分析仪进行性能评估,包括均匀性验证和稳定性验证,评估步骤如下所示:

[0054] (1) 均匀性验证

[0055] 分别取实施例1-3制得的总补体活性质控品1-3,每种总补体活性质控品取10瓶,每瓶总补体活性质控品质控品分别用和光纯药工业株式会社(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)生产的总补体活性检测试剂盒测试1次,按公式1、2计算10次测量结果的均值(\bar{X}_1)、标准差(S_1)。

[0056] 另取上述10瓶质控品中的任意1瓶连续测试10次,按公式1、2计算10次测试结果的均值(\bar{X}_2)、标准差(S_2)。3种总补体活性质控品操作步骤一致。

[0057] 按公式3、4计算瓶间变异系数CV,结果应不大于10%。

[0058] (2) 稳定性验证

[0059] 分别取实施例1-3制得的总补体活性质控品1-3,在2~8℃储存条件下进行参考值范围符合性测试,分别在生产后第0天,第3个月,第6个月,第12个月,第15个月批次的产品取出复溶,每个生产批次的产品测试5次,按公式1、2计算、测量结果的均值和标准差。

[0060] 计算公式如下:

$$[0061] \quad \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (1)$$

[0062] 式中:

[0063] X_i ——第i个测量值;

[0064] \bar{X} ——测量值的平均值。

$$[0065] \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2)$$

[0066] 式中:

[0067] S——标准差;

[0068] n——测量次数。

$$[0069] \quad S_{\text{瓶间}} = \sqrt{S_1^2 - S_2^2} \quad (3)$$

$$[0070] \quad CV_{\text{瓶间}}(\%) = \frac{S_{\text{瓶间}}}{\bar{X}_1} * 100 \quad (4)$$

[0071] 式中：

[0072] CV——精密度(变异系数)。

[0073] 当 $S_1 < S_2$ 时,令 $CV_{\text{瓶间}} = 0$ 。

[0074] 实验例1

[0075] 实施例1中的总补体活性质控品1的均匀性验证结果和稳定性验证结果分别参照表1和表2所示,由表1可知瓶间总补体活性质控品1的CV均小于10%,均匀性符合产品性能指标。由表2可知总补体活性质控品1在2~8℃条件下储存,在第15个月时检测结果符合要求,故其在2~8℃条件下有效期至少可为12个月。

[0076] 表1总补体活性质控品1的均匀性验证结果

[0077]	均匀性	\bar{X}_1	S_1	\bar{X}_2	S_2	CV%
	结果	13.6	0.34	13.7	0.26	1.61%

[0078] 表2总补体活性质控品1的稳定性验证结果

[0079]	稳定性	第0天	第3个月	第6个月	第12个月	第15个月
	参考值范围	11.1-15.1 U/mL				
	均值	13.8	13.6	13.7	13.4	13.5
	SD	0.68	0.46	0.47	0.76	0.84
	CV%	2.22%	2.54%	2.66%	2.83%	3.39%

[0080] 实验例2

[0081] 实施例2中的总补体活性质控品2的均匀性验证结果和稳定性验证结果分别参照表3和表4所示,由表3可知瓶间总补体活性质控品2的CV均小于10%,均匀性符合产品性能指标。由表4可知总补体活性质控品1在2~8℃条件下储存,在第15个月时检测结果符合要求,故其在2~8℃条件下有效期至少可为12个月。

[0082] 表3总补体活性质控品2的均匀性验证结果

[0083]	均匀性	\bar{X}_1	S_1	\bar{X}_2	S_2	CV%
	结果	26.1	1.36	26.3	1.29	0%

[0084] 表4总补体活性质控品2的稳定性验证结果

[0085]	稳定性	第0天	第3个月	第6个月	第12个月	第15个月
--------	-----	-----	------	------	-------	-------

[0086]

参考值范围	20.7-30.7 U/mL				
均值	26.5	25.6	26.1	25.8	25.4
SD	0.68	1.17	1.09	0.77	1.13
CV%	2.55%	2.58%	3.36%	3.12%	3.45%

[0087] 实验例3

[0088] 实施例3中的总补体活性质控品3的均匀性验证结果和稳定性验证结果分别参照表5和表6所示,由表5可知瓶间总补体活性质控品3的CV均小于10%,均匀性符合产品性能指标。由表6可知总补体活性质控品3在2~8℃条件下储存,在第15个月时检测结果符合要求,故其在2~8℃条件下有效期至少可为12个月。

[0089] 表5总补体活性质控品3的均匀性验证结果

[0090]

均匀性	\bar{X}_1	S_1	\bar{X}_2	S_2	CV%
结果	45.2	2.33	45.1	1.86	3.10%

[0091] 表6总补体活性质控品3的稳定性验证结果

[0092]

稳定性	第0天	第3个月	第6个月	第12个月	第15个月
参考值范围	39.4-49.4 U/mL				
均值	45.4	45.0	46.1	45.5	44.7
SD	1.50	1.82	1.52	1.91	1.93
CV%	3.31%	4.06%	3.33%	4.19%	4.34%

[0093] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种总补体活性质控品，试剂，制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110780082A	公开(公告)日	2020-02-11
申请号	CN201911080408.3	申请日	2019-11-04
[标]发明人	张卫国 李玉君 杨卫冲		
发明人	张卫国 李玉君 杨卫冲 沈坤雪		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/96		
代理人(译)	李双艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种总补体活性质控品，试剂，制备方法及应用，涉及生化免疫试剂领域，制备方法包括将补体C1、补体C2、补体C3、补体C4、补体C5、补体C6、补体C7、补体C8和补体C9中的至少两种与基质混合制得第一混合液；基质为血清基质。本发明通过提供总补体活性质控品，试剂，制备方法及应用，可以对实验室或医院的生化免疫检测设备及试剂进行总补体活性检测水平的校准。从而保证实验数据或临床检测的准确性，降低设备、试剂及人员操作带来的误差。

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i(1)$$