



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406771 A

(43)申请公布日 2019. 03. 01

(21)申请号 201811257253.1

(22)申请日 2018.10.26

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司

地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工业园繁华大道工投·立恒工业广场B12C

(72)发明人 芮双印 符修乐

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限公司 34148

代理人 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书3页 说明书17页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

胰抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

(57)摘要

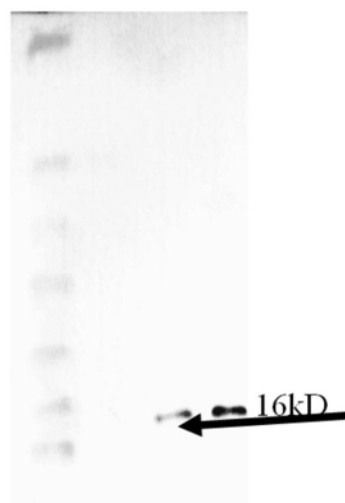
本发明提供了一种胰抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2双液体组分;试剂R1包括:缓冲液10~100mM/L,稳定剂5~50g/L,防腐剂0.1~1g/L,溶剂为纯化水;试剂R2包括:缓冲液10~100mM/L,表面活性剂0.1%~1%,稳定剂5~50g/L,防腐剂0.1~1g/L,交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球1~10%,交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球2~15%,溶剂为纯化水。本发明还提供了胰抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒制备和使用方法。本发明试剂盒结合了多克隆抗体和单克隆抗体类检测试剂盒的优点,能同时提高检测的特异度和灵敏度。

M 1 2 3

25kD

18.4kD

14.4kD



1. 一种胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

缓冲液	10~100mM/L
稳定剂	5~50g/L
防腐剂	0.1~1g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

缓冲液	10~100 mM/L
表面活性剂	0.1%~1%
稳定剂	5~50 g/L
防腐剂	0.1~1 g/L
交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球	1%~10%
交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球	2%~15%

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液具体为Tris-HCL缓冲液、PBS缓冲液、PB缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述表面活性剂具体为曲拉通-100、曲拉通-114、吐温-20和吐温-80中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂具体为PEG6000、PEG8000、DTT、BSA和EDTA中的一种或多种。

5. 根据权利要求1所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述防腐剂具体为硫柳汞钠、叠氮钠和硫酸庆大霉素中的一种或多种。

6. 根据权利要求1-5任一所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,所述交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球的获取方法如下:

(1) 先通过设计胱抑素C特异性引物,从人全血中提取基因组DNA,进行PCR反应;再将扩增出的胱抑素C基因连接到克隆载体pMD-18T载体中,并导入到DH5 α 克隆菌中进行复制;接着,再提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中;最后,将其导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;

(2) 对表达产物进行纯化和鉴定;

(3) 利用纯化产物分别免疫BALB/c小鼠和山羊;BALB/c小鼠免疫达到指定抗体水平后,取脾脏,制备杂交瘤细胞,筛选抗胱抑素C阳性的细胞株,扩大培养后,收获阳性细胞;提取阳性细胞的总RNA,使用小鼠Ig简并引物扩增出小鼠Ig轻重链可变区;测序获得该胱抑素C

单克隆抗体的基因序列,针对该VH和VL设计OverLap PCR引物,并使用上述提取的阳性细胞的总RNA逆转录产物cDNA为模板扩增出VH-VL的融合基因片段;将该融合基因片段连接到克隆载体pMD-18T载体中,导入到DH5 α 克隆菌中进行复制,提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中,并导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;最后,将该表达产物进行纯化、鉴定后备用;

山羊免疫达到指定抗体水平后,无菌采血,制备抗血清,将抗血清纯化后获得免疫球蛋白,鉴定后备用;

(4) 将上述所得两种抗体分别交联至直径80~130nm聚苯乙烯胶乳微球,分别得到交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球。

7. 一种如权利要求1-6任一所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1) 制备交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球以及交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球:

A. 先通过设计胱抑素C特异性引物,从人全血中提取基因组DNA,进行PCR反应;再将扩增出的胱抑素C基因连接到克隆载体pMD-18T载体中,并导入到DH5 α 克隆菌中进行复制;接着,再提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中;最后,将其导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;

B. 对表达产物进行纯化和鉴定;

C. 利用纯化产物分别免疫BALB/c小鼠和山羊;BALB/c小鼠免疫达到指定抗体水平后,取脾脏,制备杂交瘤细胞,筛选抗胱抑素C阳性的细胞株,扩大培养后,收获阳性细胞;提取阳性细胞的总RNA,使用小鼠Ig简并引物扩增出小鼠Ig轻重链可变区;测序获得该胱抑素C单克隆抗体的基因序列,针对该VH和VL设计OverLap PCR引物,并使用上述提取的阳性细胞的总RNA逆转录产物cDNA为模板扩增出VH-VL的融合基因片段;将该融合基因片段连接到克隆载体pMD-18T载体中,导入到DH5 α 克隆菌中进行复制,提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中,并导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;最后,将该表达产物进行纯化、鉴定后备用;

山羊免疫达到指定抗体水平后,无菌采血,制备抗血清,将抗血清纯化后获得免疫球蛋白,鉴定后备用;

D. 将上述所得两种抗体分别交联至直径80~130nm聚苯乙烯胶乳微球,分别得到交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球,备用。

(2) 配制试剂R1

按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

(3) 配制试剂R2

按照试剂R2的组分含量,将步骤(1)制得的交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球、交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

8. 一种如权利要求1-6任一所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1) 吸取5 μ L样本,加入180 μ L试剂R1,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

- (2) 再加入90 μ L试剂R2进行混合,并使其充分反应;
- (3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;
- (4) 根据吸光度变化值 ΔA 计算出样本中Cys-C含量。

9. 根据权利要求8所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(3)中,采用全自动生化分析仪,于570nm波长处测定吸光值。

10. 根据权利要求8所述的胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述步骤(4)中,依据定标值,根据 ΔA 测算样本中Cys-C含量;所述定标方法为:6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,设置校准品浓度分别为:0 μ g/mL、5 μ g/mL、20 μ g/mL、80 μ g/mL、320 μ g/mL和1480 μ g/mL。

胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术及免疫学测定分析领域,尤其涉及一种胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

背景技术

[0002] 胱抑素C (Cystatin C, Cys-C) 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族2中的成员之一,是一种由122个氨基酸残基组成的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,其为管家基因在有核细胞上恒定表达的产物。血液中的Cys-C基本上由肾小球滤过,因此,血清或血浆中的Cys-C含量完全由肾小球滤过率 (Glomerular filtration rate, GFR) 决定。因其具有:①稳定的生成率;②稳定的血浓度,不受其他病理变化的影响,不与蛋白质结合;③肾小球自由滤过,不被重吸收或分泌;是理想的GFR检测的内源性标志物。近期众多研究表明,Cys-C作为内源性标志物检测GFR,较尿素 (Urea)、肌酐 (Cr)、尿酸 (UA) 以及 β 2微球蛋白 (β 2-MG) 和视黄醇结合蛋白 (REP) 等低分子量蛋白而言,具有更好的敏感性和特异性,能够作为评估肾功能的新指标,特别是早期肾功能损坏的指标。

[0003] 检测Cys-C的方法,主要基于抗原抗体反应。最初检测Cys-C,采用单向免疫扩散法 (RID) 及酶免疫测定法。但此两种方法的操作复杂,且无法定量;此后,又有学者采用放射免疫分析 (RIA)、固相酶联免疫测定 (EIA)、荧光免疫测定法 (FIA) 等进行,但上述各方法均为非均相检测,无法实现检测的自动化,且重复性和稳定性较差,临床上难以推广应用。二十世纪九十年代,增强透射免疫比浊法作为一种均相测定方法,开始用于Cys-C测定的常规研究;该方法可于生化仪自动化检测,便于临床检验使用。目前临床中应用的Cys-C的增强比浊法检测试剂盒,从抗体使用角度,可分为多克隆抗体和单克隆抗体两大类;其中,多克隆抗体类试剂的检测特异度较差,而单克隆抗体类试剂的灵敏度较差,二者均存在相应缺陷。

[0004] 原核表达技术是一种将外源目的基因通过基因克隆技术导入到克隆载体和表达载体,再将构建的表达载体导入到原核表达生物 (细胞) 中去,使其在原核生物 (细胞) 中表达的一种技术。

[0005] 抗体 (Antibody) 是一种存在于脊椎动物血液等体液中及其B细胞膜表面由浆细胞 (效应B细胞) 分泌的在免疫反应中用于鉴别及中和外来物质 (如细菌、病毒等) 的免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig)。Ig由四条异源性多肽链组成,肽链之间由数量不等的链间二硫键连接,依据分子量大小分为重链 (heavy chain, H) 和轻链 (Light chain, L)。抗体的基本单位是“Y”字型结构的Ig单体,含有两条H链和两条L链,天然Ig中的两条H链和L链的氨基酸组成完全相同,但H链和L链在靠近N端有约110个氨基酸序列的变化,其位置氨基酸序列相对恒定,以此将Ig H链和L链中靠近N端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区 (variable region, V), 分别占重链和轻链的1/4和1/2;将靠近C端的氨基酸序列相对稳定的区域,称为恒定区 (constant region, C), 分别占重链和轻链的3/4和1/2。重链和轻链的V区分别称为VH和VL。VH和VL中各含有3个氨基酸组成和排列顺序高度可变的区域,称为高变区 (hypervariable region, HVR) 或互补决定区 (complementarity determining region,

CDR),包括HVR1(CDR1)、HVR2(CDR2)和HVR3(CDR3),其中,HVR3(CDR3)氨基酸序列可变程度更高,VH和VL的3个CDR共同组成Ig的抗原结合部位(antigen-binding site),决定抗体的特异性,是抗体识别及结合抗原的部位。单克隆抗体(Monclone antibody,Mab)是指由一种抗原决定簇刺激机体,由单个B淋巴细胞接受该抗原刺激所产生的抗体。抗原通常由多种抗原决定簇组成,而机体内多个B淋巴细胞接受刺激,产生的众多的单克隆抗体在体内混杂在一起就形成了多克隆抗体。而单链抗体(single chain antibody fragment,scFv),是由抗体VH和VL通过15~20个氨基酸的短肽(linker)连接而成的抗体。

[0006] 据此,针对现有技术中多克隆抗体类检测试剂盒特异度低、单克隆抗体类检测试剂盒灵敏度低的问题,目前急需一种可结合多克隆抗体和单克隆抗体类检测试剂盒优点,以同时提高检测的特异度与灵敏度的胰抑素C胶乳增强比浊检测试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种可结合多克隆抗体和单克隆抗体类检测试剂盒优点,以同时提高检测的特异度与灵敏度的胰抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

[0008] 本发明采用以下技术方案解决上述技术问题:

[0009] 一种胰抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0010] 试剂R1:

[0011] 缓冲液 10~100mM/L

[0012] 稳定剂 5~50g/L

[0013] 防腐剂 0.1~1g/L

[0014] 其溶剂为纯化水;

[0015] 试剂R2:

缓冲液 10~100 mM/L

表面活性剂 0.1%~1%

稳定剂 5~50 g/L

[0016] 防腐剂 0.1~1 g/L

交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球 1%~10%

交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球 2%~15%

[0017] 其溶剂为纯化水。

[0018] 作为本发明的优选方式之一,所述缓冲液具体为Tris-HCL缓冲液、PBS缓冲液、PB缓冲液和HEPES缓冲液中的一种或多种。

[0019] 作为本发明的优选方式之一,所述表面活性剂具体为曲拉通-100、曲拉通-114、吐温-20和吐温-80中的一种或多种。

[0020] 作为本发明的优选方式之一,所述稳定剂具体为PEG6000、PEG8000、DTT、BSA和EDTA中的一种或多种。

[0021] 作为本发明的优选方式之一,所述防腐剂具体为硫柳汞钠、叠氮钠和硫酸庆大霉素中的一种或多种。

[0022] 作为本发明的优选方式之一,所述交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球以及交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球的获取方法如下:

[0023] (1) 先通过设计胱抑素C特异性引物,从人全血中提取基因组DNA,进行PCR反应;再将扩增出的胱抑素C基因连接到克隆载体pMD-18T载体中,并导入到DH5 α 克隆菌中进行复制;接着,再提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中;最后,将其导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;

[0024] (2) 对表达产物进行纯化和鉴定;

[0025] (3) 利用纯化产物分别免疫BALB/c小鼠和山羊;BALB/c小鼠免疫达到指定抗体水平后,取脾脏,制备杂交瘤细胞,筛选抗胱抑素C阳性的细胞株,扩大培养后,收获阳性细胞;提取阳性细胞的总RNA,使用小鼠Ig简并引物扩增出小鼠Ig轻重链可变区;测序获得该胱抑素C单克隆抗体的基因序列,针对该VH和VL设计OverLap PCR引物,并使用上述提取的阳性细胞的总RNA逆转录产物cDNA为模板扩增出VH-VL的融合基因片段;将该融合基因片段连接到克隆载体pMD-18T载体中,导入到DH5 α 克隆菌中进行复制,提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中,并导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;最后,将该表达产物进行纯化、鉴定后备用;

[0026] 山羊免疫达到指定抗体水平后,无菌采血,制备抗血清,将抗血清纯化后获得免疫球蛋白,鉴定后备用;

[0027] (4) 将上述所得两种抗体分别交联至直径80~130nm聚苯乙烯胶乳微球,分别得到交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球。

[0028] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(1)中,胱抑素C特异性引物的上游引物序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物序列如SEQ ID NO.2所示;重组人Cys-C序列如SEQ ID NO.3所示。

[0029] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中,BALB/c小鼠免疫的具体方式为:取2mL rCys-C抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只小鼠注射0.3mL乳化抗原,14日后使用乳化抗原加强免疫一次,28日再次加强免疫一次,42日使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫,45日摘除眼球取血,处死小鼠,取脾脏。

[0030] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中,使用小鼠Ig简并引物扩增出小鼠Ig轻重链可变区;其中,小鼠抗人Cys-C蛋白轻链可变区基因序列如SEQ ID NO.4所示;小鼠抗人Cys-C蛋白重链可变区基因序列如SEQ ID NO.5所示;扩增出轻链的上游引物序列如SEQ ID NO.6所示,扩增出轻链的下游引物序列如SEQ ID NO.7所示;扩增出重链的上游引物序列如SEQ ID NO.8所示,扩增出重链的下游引物序列如SEQ ID NO.9所示。

[0031] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中,将VH-VL的融合基因片段连接到克隆载体pMD-18T载体中,导入到DH5 α 克隆菌中进行复制,提取质粒进行双酶切;其中,在提取质粒后,还将其送往测序公司进行重组基因的测序,最终确定的重组基因片段的序列如SEQ ID NO.11所示。

[0032] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中,山羊免疫的具体方式为:选择7月龄体重45kg左右雌性山羊,取1mL rCys-C抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL rCys-C抗原;55日取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血。

[0033] 一种上述朐抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下具体步骤:

[0034] (1) 制备交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球以及交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球:

[0035] A. 先通过设计朐抑素C特异性引物,从人全血中提取基因组DNA,进行PCR反应;再将扩增出的朐抑素C基因连接到克隆载体pMD-18T载体中,并导入到DH5 α 克隆菌中进行复制;接着,再提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中;最后,将其导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;

[0036] B. 对表达产物进行纯化和鉴定;

[0037] C. 利用纯化产物分别免疫BALB/c小鼠和山羊;BALB/c小鼠免疫达到指定抗体水平后,取脾脏,制备杂交瘤细胞,筛选抗朐抑素C阳性的细胞株,扩大培养后,收获阳性细胞;提取阳性细胞的总RNA,使用小鼠Ig简并引物扩增出小鼠Ig轻重链可变区;测序获得该朐抑素C单克隆抗体的基因序列,针对该VH和VL设计OverLap PCR引物,并使用上述提取的阳性细胞的总RNA逆转录产物cDNA为模板扩增出VH-VL的融合基因片段;将该融合基因片段连接到克隆载体pMD-18T载体中,导入到DH5 α 克隆菌中进行复制,提取质粒进行双酶切,并将酶切产物连接到表达载体pET-32a中,并导入到表达菌BL-21中进行发酵表达;最后,将该表达产物进行纯化、鉴定后备用;

[0038] 山羊免疫达到指定抗体水平后,无菌采血,制备抗血清,将抗血清纯化后获得免疫球蛋白,鉴定后备用;

[0039] D. 将上述所得两种抗体分别交联至直径80~130nm聚苯乙烯胶乳微球,分别得到交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球,备用。

[0040] (2) 配制试剂R1

[0041] 按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0042] (3) 配制试剂R2

[0043] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(1)制得的交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球、交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

[0044] 一种上述朐抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,包括如下具体步骤:

[0045] (1) 吸取5 μ L样本,加入180 μ L试剂R1,37 $^{\circ}$ C孵育5min;

[0046] (2) 再加入90 μ L试剂R2进行混合,并使其充分反应;

[0047] (3) 1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA ;

[0048] (4) 根据吸光度变化值 ΔA 计算出样本中Cys-C含量。

[0049] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(3)中,采用全自动生化分析仪,于570nm波长处测定吸光值。

[0050] 作为本发明的优选方式之一,所述步骤(4)中,依据定标值,根据 ΔA 测算样本中Cys-C含量;所述定标方法为:6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,设置校准品浓度分别为:0 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、320 $\mu\text{g/mL}$ 和1480 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0051] 本发明相比现有技术的优点在于:

[0052] (1)相比其他方法,本发明试剂盒利用胶乳增强免疫透射比浊法测定胱抑素C,检测信号倍数放大,提高了检测灵敏度;并且,可用于全自动生化分析仪,省时节约;

[0053] (2)与同类胶乳增强免疫透射比浊法测定胱抑素C的试剂盒相比,本发明试剂盒采用抗人Cys-C的单克隆抗体与多克隆抗体联用的方式;其较单一使用单克隆抗体试剂盒而言,具有更高的灵敏度;较单一使用多克隆抗体试剂盒而言,具有更好的特异性;其中,本发明试剂盒还采用了直径均一的聚苯乙烯胶乳微球,较其他使用大小不一聚苯乙烯胶乳微球的试剂盒而言,进一步提高了线性;此外,本发明试剂盒中还加入了一定量的抗干扰蛋白和表面活性剂,大大增加了试剂盒的稳定性和精密度;

[0054] (3)本发明可在全自动生化分析仪上使用,成本低廉,且自动化高,节省检测时间;在高稳定性和高精密度情况下,相比同类产品,具有更高的灵敏度和特异性,提升了胱抑素C检测的应用价值。

附图说明

[0055] 图1是实施例5中重组Cys-C蛋白Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker 26610;泳道1:空菌对照;泳道2:重组人Cys-C纯化后样本;泳道3:abcam公司人Cys-C对照);

[0056] 图2是实施例5中重组Cys-C单链抗体Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker26610;泳道1:BSA对照;泳道2:重组人Cys-C纯化后样本;泳道3:abcam公司Cys-C单抗对照);

[0057] 图3是实施例5中山羊抗Cys-C多克隆抗体Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker26610;泳道1:BSA对照;泳道2:山羊抗Cys-C多克隆抗体纯化后样本;泳道3:abcam公司Cys-C单抗对照);

[0058] 图4是实施例8中本发明试剂盒与商品化Cys-C检测试剂盒的线性关系曲线图;

[0059] 图5是实施例8中本发明试剂盒的线性范围线性回归图。

具体实施方式

[0060] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0061] 实施例1

[0062] 本实施例的一种胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0063] 试剂R1:

- | | | |
|--------|--|----------|
| [0064] | Tris-HCL缓冲液 | 10mM/L |
| [0065] | PEG6000 | 5g/L |
| [0066] | 硫柳汞钠 | 0.1g/L |
| [0067] | 其溶剂为纯化水； | |
| [0068] | 试剂R2： | |
| | Tris-HCL 缓冲液 | 10 mM/L |
| | 曲拉通-100 | 0.1% |
| | PEG6000 | 5 g/L |
| [0069] | 硫柳汞钠 | |
| | | 0.1 g/L |
| | 交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球 | 1% |
| | 交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球 | 2% |
| [0070] | 其溶剂为纯化水。 | |
| [0071] | 实施例2 | |
| [0072] | 本实施例的一种朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为: | |
| [0073] | 试剂R1: | |
| [0074] | PBS缓冲液 | 100mM/L |
| [0075] | PEG8000 | 50g/L |
| [0076] | 叠氮钠 | 1g/L |
| [0077] | 其溶剂为纯化水; | |
| [0078] | 试剂R2: | |
| | PBS 缓冲液 | 100 mM/L |
| | 曲拉通-114 | 1% |
| | PEG8000 | 50 g/L |
| [0079] | 叠氮钠 | |
| | | 1 g/L |
| | 交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球 | 10% |
| | 交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球 | 15% |
| [0080] | 其溶剂为纯化水。 | |
| [0081] | 实施例3 | |
| [0082] | 本实施例的一种朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为: | |

- [0083] 试剂R1:
- [0084] PB缓冲液 50mM/L
- [0085] DTT 25g/L
- [0086] 硫酸庆大霉素 0.5g/L
- [0087] 其溶剂为纯化水;
- [0088] 试剂R2:
- PB 缓冲液 50 mM/L
- 吐温-20 0.5%
- DTT 25 g/L
- [0089] 硫酸庆大霉素 0.5 g/L
- 交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球 5%
- 交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球 8 %
- [0090] 其溶剂为纯化水。
- [0091] 实施例4
- [0092] 本实施例的一种朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:
- [0093] 试剂R1:
- HEPES 缓冲液 60 mM/L
- BSA 10 g/L
- [0094] EDTA 20 g/L
- 叠氮钠 0.6 g/L
- [0095] 其溶剂为纯化水;
- [0096] 试剂R2:

	HEPES 缓冲液	60 mM/L
	吐温-80	0.6%
	BSA	10 g/L
[0097]	EDTA	20 g/L
	叠氮钠	0.6 g/L
	交联重组抗人 Cys-C 单链抗体的胶乳微球	6%
	交联山羊抗人 Cys-C 多克隆抗体的胶乳微球	10%
[0098]	其溶剂为纯化水。	
[0099]	实施例5	
[0100]	本实施例的一种上述实施例试剂盒中交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球、交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球的具体制备方法,包括如下步骤:	
[0101]	一、重组人Cys-C的制备	
[0102]	(1) 人Cys-C基因的获取:	
[0103]	采用大连宝生物公司DNA提取试剂盒从人全血中提取DNA,并利用人Cys-C基因引物进行PCR反应;其中,人Cys-C基因引物的上游引物序列如SEQ ID NO.1所示,下游引物序列如SEQ ID NO.2所示;该上游引物带有Nco I酶切位点,下游引物带有EcoR V酶切位点,上下游引物均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化。	
[0104]	重组人Cys-C序列如SEQ ID NO.3所示;	
[0105]	使用大连宝生物公司预混PCR反应试剂进行PCR,PCR反应条件:95℃预变性4min,94℃变性45S,62℃退火45S,72℃延伸90S,循环35次,最后72℃延伸10min,获得PCR扩增产物。	
[0106]	(2) 表达载体构建:	
[0107]	步骤(1)中PCR产物经测序无误后,使用连接酶连接到克隆载体pMD-18T载体中,再导入到克隆菌感受态细胞DH5α中;	
[0108]	LB培养基37℃培养过夜,使用大连宝生物公司质粒提取试剂盒提取质粒,Nco I酶和EcoR V酶进行双酶切,将双酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,将453bp大小的片段切下使用大连宝生物公司胶回收试剂盒回收DNA,将回收的DNA使用连接酶连接到pET32a上,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;	
[0109]	LB培养基37℃、220rpm摇菌2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂培养基平板培养过夜,取LB平板上生长的菌落经PCR鉴定目的基因,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rCys-C。	
[0110]	(3) 重组人Cys-C的表达:	
[0111]	挑取pET-32a/rCys-C工程菌于含氨苄青霉素100μg/mL的LB培养基中37℃摇菌1h复苏工程菌活性,后在LB培养基(含氨苄青霉素100μg/mL)中放大培养4h后,测OD值达到1.0	

时,加入IPTG,32℃诱导表达(终浓度100μg/mL) 5h,收集细菌,破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白重组人Cys-C,记为rCys-C。

[0112] (4) 重组人Cys-C粗制品的制备:

[0113] 离心收集细菌,加入质量体积比1:2的PBS重悬沉淀,-20℃与4℃反复冻融沉淀3次,4℃超声裂解细菌沉淀,功率:400W,工作15s,间隔3s,超声破碎6min,重复4次;再于4℃、12000r/min下离心15min,接着分别取上清、沉淀,即得到相应粗制蛋白;

[0114] (5) 重组人Cys-C粗制品纯化:

[0115] ①肠激酶酶切:将粗制蛋白使用大连宝生物公司肠激酶,于23℃环境下酶切过夜。

[0116] ②亲和层析:对酶切后粗制蛋白进行过滤处理,过滤处理后过GST亲和层析柱,用Elution buffer (50mMTris-Cl,40mM Glutathione,pH 7.0) 梯度洗脱,收集rCys-C峰。

[0117] ③脱盐、缓冲液置换:将第一步纯化的rCys-C过脱盐柱,用缓冲液(50mMTris-Cl pH9.0) 置换,准备下一步离子交换层析;

[0118] ④离子交换层析:分别用Loading buffer (50mMTris-Cl pH7.0) 平衡好柱体,上样后用Elution buffer (50mMTris-Cl,1M NaCl pH7.0) 梯度洗脱,收集rCys-C峰;

[0119] ⑤分子筛层析:离子交换层析收集到的rCys-C过分子筛层析柱,Elution buffer (50mM Na₂HPO₄,0.15MNaCl pH7.0) 收集rCys-C峰;

[0120] ⑥取收集rCys-C做Wersten Blot验证:使用abcam公司Cys-C单克隆抗体(ab24327) 为抗体,使用abcam公司山羊抗鼠IgG (HRP标记) 为第二抗体做WB,沉淀与上清样本在16kD处均有阳性条带;Wersten Blot验证结果具体见图1,从图中泳道2阳性片段和泳道3阳性片段位置大小基本一致,可以判定重组Cys-C构建成功,并成功表达;表明,纯化后所得rCys-C为Cys-C。

[0121] ⑦加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

[0122] 二、重组抗人Cys-C单链抗体的制备:

[0123] (1) BALB/c小鼠的免疫:

[0124] 取2mL rCys-C抗原(1mg/mL) 与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液(记为乳化抗原,每只小鼠注射0.3mL乳化抗原,14日后使用乳化抗原加强免疫一次,28日再次加强免疫一次,42日使用未乳化的纯抗原再次进行加强免疫,45日摘除眼球取血,处死小鼠,取脾脏。

[0125] (2) 融合细胞的制备:

[0126] 8-Ag选择性培养基筛选依赖型SP2/0细胞。脾脏制备成单个悬浮细胞,分别计数,取含 1×10^8 个脾细胞和 2×10^7 个SP2/0细胞的悬液加入同一支50mL离心管中,补加不完全培养液至30mL,充分混匀;1500r/min离心15min,吸去上清,将沉积的融合细胞悬浮在200mL的HAT培养基中;将细胞接种到10个96孔平底细胞板(96孔板),每孔0.2mL,置37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。

[0127] (3) 间接ELISA法筛选阳性融合细胞株:

[0128] 用rCys-C抗原1μg/mL包被聚苯乙烯微孔板,每孔100μL;用含有5%小牛血清的封闭液于37℃封闭60min;用含有0.05%Toween的PBST洗涤液洗涤3次,5min/次;取杂交瘤上清液100μL加入包被板中,置湿盒37℃孵育60min,用PBST液洗涤3次,5min/次;加入羊抗鼠HRP-IgG (1:2000倍稀释),每孔100μL,置湿盒37℃孵育60min;用PBST液洗涤3次,5min/次(每次实验均设阴性、阳性、空白对照各3孔);加入OPD底物液,100μL/孔,置室温15min观察;

当阳性对照孔出现明显颜色变化后,每孔加入终止液50 μ l终止反应,并测定各孔OD值;选取阳性孔杂交瘤细胞,将其克隆化并扩大培养;取细胞培养上清,作为一抗,使用abcam山羊抗鼠IgG (HRP标记) 作为二抗,使用已验证的rCys-C作为抗原,使用abcam抗人Cys-C单克隆抗体作为参照一抗,经WB验证该融合杂交瘤细胞为抗rCys-C阳性。

[0129] (4) 克隆载体的制备:

[0130] 取上述阳性杂交瘤细胞使用大连宝生物公司RNA提取试剂盒提取RNA,逆转录,使用Novagen公司的小鼠Ig简并引物扩增出小鼠IgG轻重链可变区;连接pMD-18T克隆载体,导入DH5 α 感受态细胞中,发酵提取质粒,送三家测序公司进行轻重链可变区基因的测序,确定轻重链可变区的基因序列。

[0131] 小鼠抗人Cys-C蛋白轻链可变区基因序列如SEQ ID NO.4所示;小鼠抗人Cys-C蛋白重链可变区基因序列如SEQ ID NO.5所示;轻链的上游引物序列如SEQ ID NO.6所示,轻链的下游引物序列如SEQ ID NO.7所示;重链的上游引物序列如SEQ ID NO.8所示,重链的下游引物序列如SEQ ID NO.9所示。

[0132] 其中,轻链的上游引物带有Nco I酶切位点,重链的下游引物带有EcoR V酶切位点;轻链的上游引物和重链的下游引物还均带有肠激酶酶切位点,且该序列经大肠杆菌偏好密码子优化,轻链的下游引物和重链的上游引物均含有柔性linker(linker序列如SEQ ID NO.10所示)。

[0133] 以上述逆转录所得cDNA为模板,分别以轻链的上下游引物、重链的上下游引物进行PCR,得到PCR产物记为L和H,以轻链的上游引物和重链的下游引物,以L和H为模板进行OVERLAP PCR,得到PCR产物记为VLH;将VLH使用连接酶连接到pMD-18T克隆载体,导入到导入DH5 α 感受态细胞中,发酵提取质粒,送三家测序公司进行重组基因的测序,确定重组基因片段的序列(记为rCys-C-mb)符合设计序列。其中,目的基因序列如SEQ ID NO.11所示。

[0134] 将上述rCys-C-mb基因经双酶切后,与双酶切后的pET-32a(+) 表达载体,使用T4连接酶连接,接着导入到BL-21感受态表达菌中,即为目的表达载体。

[0135] (5) 重组抗人Cys-C单链抗体的表达:

[0136] 挑取上述工程菌于含100 μ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C摇菌1h复苏工程菌活性,接着在LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/mL)中放大培养4h后,测OD值达到1.0时,加入IPTG,32 $^{\circ}$ C诱导表达(终浓度100 μ g/mL) 8h,收集细菌,破碎后获得上清和沉淀,即为带HIS标签的目的蛋白rCys-C-mb。

[0137] (6) 重组抗人Cys-C单链抗体粗制品的制备:

[0138] 离心收集细菌,加入质量体积比1:2的PBS重悬沉淀,-20 $^{\circ}$ C与4 $^{\circ}$ C反复冻融沉淀3次,4 $^{\circ}$ C超声裂解细菌沉淀,功率:400W,工作15s,间隔3s,超声破碎5min,重复5次,于4 $^{\circ}$ C、12000r/min离心15min,分别取上清、沉淀,得到粗制蛋白。

[0139] (7) 重组抗人Cys-C单链抗体粗制品纯化:

[0140] ①肠激酶酶切:将粗制单链抗体使用大连宝生物公司肠激酶,于23 $^{\circ}$ C环境下酶切过夜。

[0141] ②亲和层析:将酶切后粗制蛋白过滤处理,过滤处理后过GST亲和层析柱,用Elution buffer(50mMTris-Cl,40mM Glutathione pH7.0)梯度洗脱,收集rCys-C-mb波峰。

[0142] ③脱盐、缓冲液置换:将上述纯化的rCys-C-mb过脱盐柱,用缓冲液(50mMTris-Cl

pH6.0) 置换,准备下一步离子交换层析。

[0143] ④离子交换层析:分别用Loading buffer (50mMTris-Cl pH6.0) 平衡好柱体,上样后用Elution buffer (50mMTris-Cl,1M NaCl pH6.0) 梯度洗脱,收集rCys-C-mb波峰。

[0144] ⑤分子筛层析:离子交换层析收集到的rCys-C-mb过分子筛层析柱,Elution buffer (50mMNa₂HPO₄,0.15MNaCl pH7.0) 收集rCys-C-mb峰。

[0145] ⑥取收集rCys-C-mb做Wersten Blot验证:使用上述制备的rCys-C为抗原,上述收集的rCys-C-mb为第一抗体,使用abcam公司山羊抗鼠IgG (HRP标记) 为第二抗体做WB,抗原在16kD处有阳性条带产生;

[0146] Wersten Blot验证结果见图2,因rCys-C已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用rCys-C-mb验证rCys-C同样出现阳性条带,表明单链抗体rCys-C-mb制备成功。

[0147] ⑦加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

[0148] 三、山羊抗人Cys-C多克隆抗体的制备:

[0149] (1) 山羊的免疫:

[0150] 选择7月龄体重45kg左右雌性山羊,取1mL rCys-C抗原 (5mg/mL) 与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液 (记为乳化抗原);每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL rCys-C抗原 (2.5mg/mL);55日取耳缘静脉血使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血。

[0151] (2) 多克隆抗体的纯化:

[0152] 全血于室温划十字口静置2h,取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min条件下离心15min,获得血清;加入等体积的PBS混匀得混合液,向混合液中再缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置3h以上;接着于4℃、4200r/min条件下离心30min;上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,调整硫酸铵饱和度为33%,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;上清中Ig含量较低弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,硫酸铵饱和度33%,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;沉淀用200mL的PBS溶解,装入透析袋 (10kD),4℃下透析 (20倍体积的PBS透析液) 6h除盐,即为山羊抗人Cys-C多克隆抗体。

[0153] (3) 多克隆抗体的Western Blot验证

[0154] 使用上述制备的rCys-C为抗原,上述制备的多克隆抗体为第一抗体,使用abcam公司驴抗山羊IgG (HRP标记,ab6885) 为第二抗体做WB,抗原在16kD处有阳性条带产生;Western Blot验证结果见图3,因rCys-C已经商品化单抗验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rCys-C同样出现阳性条带,表明多克隆抗体制备成功。

[0155] 四、交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球以及交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球的制备:

[0156] 采用化学交联法将上述所得两种抗体分别交联至直径80~130nm聚苯乙烯胶乳微球上,分别得到交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球和交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球。

[0157] 实施例6

[0158] 本实施例的一种上述实施例中胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,

包括如下步骤:

[0159] (1) 按照实施例5方法,制备交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球以及交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球:

[0160] (2) 配制试剂R1

[0161] 按照上述实施例中试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0162] (3) 配制试剂R2

[0163] 按照上述实施例中试剂R2的组分含量,将制得的交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球、交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2。

[0164] 实施例7

[0165] 本实施例的一种上述实施例中胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法。

[0166] 分析方法:两点终点法;

[0167] 反应方向:上升反应;

[0168] 校准方式:Logit-Log (4P);

[0169] 测定波长:570nm;

[0170] 测定温度:37℃;

[0171] 样本:试剂R1:试剂R2=5:180:90 (μL);

[0172] Cys-C校准品:

[0173] Tris-HCl缓冲液 • • • • • 50mM/L

[0174] PEG6000 • • • • • 25g/L

[0175] BSA • • • • • 10g/L

[0176] NaCl • • • • • 9g/L

[0177] rCys-C • • • • • 0~10mg/L

[0178] NaN₃ • • • • • 0.65g/L

[0179] EDTA • • • • • 0.58g/L。

[0180] 测试步骤:

[0181] (1) 吸取5μL样本,加入180μL试剂R1,37℃孵育5min;

[0182] (2) 再加入90μL试剂R2进行混合,并使其充分反应;

[0183] (3) 采用全自动生化分析仪,于570nm波长处测定吸光值;分反应1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算 ΔA;

[0184] (4) 依据定标值,根据 ΔA测算样本中Cys-C含量;定标方法为:6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,设置校准品浓度分别为:0μg/mL、5μg/mL、20μg/mL、80μg/mL、320μg/mL和1480μg/mL。

[0185] 实施例8

[0186] 本实施例用以评价上述胱抑素C胶乳增强免疫比浊法试剂盒的使用效果。

[0187] 1、线性相关性验证:

[0188] 利用上述实施例配方配制试剂,与国家食品药品监督管理局认可的某上市公司的Cys-C检测试剂盒进行对照检测,检测100份临床血清样本,检测结果如下表1,获得了本

发明试剂盒与上市某公司在售Cys-C检测试剂的相关性曲线(见图4);通过检测结果显示,两试剂盒的线性相关曲线为 $y=0.01486+0.99876X$,相关系数 $R^2=0.99995$,说明两者具有较大的相关性。

[0189] 表1本发明试剂盒(测试样品)与某上市公司在售Cys-C检测试剂盒(作为对照)线性相关性比对值

[0190]

序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值
1	1.22	1.22	35	14.32	14.33	69	2.09	2.22
2	0.11	0.10	36	8.25	8.22	70	0.37	0.38
3	0.27	0.28	37	7.09	7.11	71	1.00	1.1

[0191]

4	1.38	1.36	38	4.00	4.09	72	0.48	0.54
5	0.33	0.35	39	12.3	12.21	73	0.96	0.99
6	9.41	9.39	40	0.78	0.77	74	0.87	1.00
7	10.21	10.23	41	3.24	3.22	75	3.33	3.24
8	2.18	2.19	42	5.22	5.30	76	7.20	7.10
9	10.65	10.67	43	1.09	1.09	77	4.63	4.59
10	0.49	0.45	44	15.03	15.05	78	9.88	9.77
11	1.29	1.25	45	12.01	12.02	79	13.24	13.23
12	0.17	0.14	46	14.23	14.24	80	14.68	14.59
13	10.20	10.09	47	17.09	17.10	81	10.09	10.11
14	4.83	4.88	48	4.34	4.33	82	9.77	9.76
15	0.12	0.12	49	7.87	7.88	83	0.40	0.37
16	5.24	5.25	50	10.11	10.10	84	15.09	15.09
17	0.77	0.69	51	12.31	12.33	85	13.22	13.20
18	3.91	3.92	52	2.87	2.89	86	14.9	14.98
19	3.37	3.41	53	3.76	3.73	87	2.10	2.07
20	0.65	0.66	54	0.98	1.00	88	3.45	3.45
21	9.28	9.26	55	1.03	1.01	89	14.88	14.87
22	2.77	2.74	56	1.28	1.27	90	13.27	13.25
23	11.21	11.2	57	8.89	8.89	91	12.36	12.34
24	14.56	14.45	58	4.87	4.79	92	3.09	3.07
25	9.28	9.30	59	4.34	4.33	93	2.78	2.75

[0192]

26	1.88	1.87	60	2.56	2.55	94	1.94	1.89
27	13.76	13.77	61	2.12	2.13	95	14.98	14.96
28	17.90	17.89	62	7.19	7.22	96	2.73	2.77
29	3.88	3.89	63	2.14	2.20	97	1.69	1.71
30	3.32	3.31	64	0.9	1.01	98	12.66	12.58
31	0.99	0.95	65	3.12	3.14	99	0.34	0.40
32	1.65	1.66	66	5.10	5.09	100	14.50	14.20
33	2.37	2.34	67	6.10	6.10			
34	8.89	8.90	68	7.01	7.09			

[0193] 2、线性范围验证：

[0194] 使用重组Cys-C纯化品和生理盐水配制成浓度200mg/L、100mg/L、50mg/L、25mg/L、12.5mg/L、6.25mg/L、3.125mg/L、1.5625mg/L和0mg/L (生理盐水对照) 的测试品,使用本发明试剂盒测定各测试品浓度,以稀释浓度为自变量,以测定结果为因变量求出线性回归方程,计算测定结果的相对偏差。测定与计算结果如表2所示,由表2可知,测定结果与稀释浓度之间的线性回归方程为 $y = -0.02171 + 1.00252X$ (如图5所示),相关系数 $R^2 = 1.0000$,说明线性关系良好,线性范围可达200mg/L。

[0195] 表2本发明试剂盒线性范围验证表

[0196]

序号	稀释浓度	测试值 1	测试值 2	测试值 3	平均数	绝对偏差	相对偏差
1	200.00	200.87	201.03	199.50	200.47	0.64	0.32%
2	100.00	99.89	100.65	100.40	100.31	0.28	0.28%
3	50.00	49.96	50.07	50.02	50.02	0.04	0.08%

[0197]

4	25.00	24.94	25.09	24.97	25.00	0.06	0.24%
5	12.50	12.50	12.45	12.53	12.49	0.03	0.23%
6	6.25	6.30	6.22	6.23	6.25	0.03	0.53%
7	3.13	3.12	3.18	3.13	3.14	0.02	0.78%
8	1.56	1.58	1.57	1.55	1.57	0.01	0.71%
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

[0198] 3、准确度验证：

[0199] 取具有溯源性高值血清质控和低值血清质控各一份，使用本发明试剂盒检测6次，取均值，与质控靶值进行比对。结果如表3所示，表明检测值较靶值相对偏差较小，准确度较高。

[0200] 表3本发明试剂盒的准确度验证结果统计表

[0201]

测定值 1	测定值 2	测定值 3	测定值 4	测定值 5	测定值 6	测定均 值	血清靶 值	相对偏 差
160.55	159.89	160.07	161.00	160.03	159.98	160.25	160.00	0.16%
5.01	5.23	5.19	4.98	5.11	5.07	5.10	5.00	1.97%

[0202] 4、精密度验证：

[0203] 取经在售试剂盒检测的临床血清样本高值和低值各一份，使用本发明试剂盒对同一份血清样本连续检测10次，计算所述试剂盒的变异系数。精密度检测数据如表4所示，检测结果表明，本发明试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小，且分别为0.34%和1.73%，精密度较好。

[0204] 表4所述试剂盒精密度验证结果

[0205]

检测值1	检测值2	检测值3	检测值4	检测值5
67.17	66.98	67.25	66.99	67.76
0.73	0.75	0.74	0.77	0.76
检测值6	检测值7	检测值8	检测值9	检测值10
67.23	67.15	66.9	67.09	67.03
0.76	0.75	0.77	0.74	0.74
检测均值	标准差	变异系数		
67.16	0.23	0.34%		

0.75	0.01	1.73%		
------	------	-------	--	--

[0206] 5、灵敏度及特异度验证：

[0207] 采用进口间接ELISA法Cys-C检测试剂盒来检测筛选50份阳性血清、50份阴性血清，选择市售采用抗Cys-C多克隆抗体制备的胶乳增强免疫比浊法试剂盒、市售采用抗单克隆抗体制备的胶乳增强免疫比浊法试剂盒与本发明试剂盒同步检测此100份血清样本，再按照各试剂盒判定标准，设高于参考标准为阳性，低于参考标准为阴性，以进口间接ELISA法检测试剂盒为金标准计算各试剂盒的灵敏度和特异度，结果见表5。结果表明，较市售两款试剂盒而言，本发明试剂盒具有较高的灵敏度及特异度。本发明的突出优点是：较单克隆抗体制备试剂盒，本发明试剂盒具有更高的灵敏度；较多克隆抗体制备的试剂盒，本发明试剂盒具有更高的特异度，从而大大地提高了临床检测的准确性，满足临床检测的需求。

[0208] 表5本发明试剂盒与市售试剂盒的灵敏度、特异度比较表

[0209]	试剂盒	检测项	金标准		灵敏	特异度
			真阳性	真阴性	度	
[0210]	本发明所述 试剂盒	检测阳性	49	1	98%	98%
		检测阴性	1	49		
	单克隆抗体 制备试剂盒	检测阳性	43	4	86%	92%
		检测阴性	7	46		
	多克隆抗体 制备试剂盒	检测阳性	45	8	90%	84%
		检测阴性	5	42		

[0211] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 安徽大千生物工程有限公司

<120> 胱抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

<130> 2018

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ccatgggatg atgatgataa aatggccggg cccctgcgcg ccccgct 47

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gatactctac tactactatt tctaggcgtc ctgacaggtg g 41

<210> 3

<211> 483

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ccatgggatg atgatgataa aatggccggg cccctgcgcg ccccgctgct cctgctggcc 60
atcctggccg tggccctggc cgtgagcccc gcggccggct ccagtcccgg caagccgccg 120
cgcctggtgg gaggcccat ggacgccagc gtggaggagg aggggtgtgcg gcgtgcactg 180
gactttgccg tcggcgagta caacaaagcc agcaacgaca tgtaccacag ccgcgcgctg 240
caggtggtgc gcgcccga a gcagatcgta gctgggggtga actacttctt ggacgtggag 300
ctgggccgaa ccacgtgtac caagaccag cccaacttgg acaactgccc cttccatgac 360
cagccacatc tgaaaaggaa agcattctgc tttttccaga tctacgtgt gccttggcag 420
ggcacaatga ccttgtcgaa atccacctgt caggacgcct agtttatcat catcatccta 480
tga 483

<210> 4

<211> 444

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gagacagaca cactcctgct atgggtgctg ctgctctggg ttccaggctc cactggtgac 60

atttgtctca cccaatctcc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag agccaccatc 120
tcctgcagag ccagtgatag tgttgaatat catggcgcaa gtttaatgca gaggtaccaa 180
cagaaaccag gacagccacc caaactcctc atctatgctg catccaacgt agaatctggg 240
gtccctgccca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcagcctcaa catccatcct 300
gtggaggagg atgatattgc aatgtatttc tgtcagcaga gtaggaaggt tccgtggacg 360
ttcggtaggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc 420
ttcccacccat ccagtaagct tggg 444

<210> 5

<211> 467

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

atggaatgga ccttgatctt tatcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg ggtcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggatgc attgggtgaa gcagaggcct 180
atacaaggcc ttgaatggat tggtaacatt gacccttctg atagtgaaac tcactacaat 240
caaaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acggacctac 360
tatgattacg cccactggta cttcgatgtc tggggcgag ggaccacggt caccgtctcc 420
tcagagagtc agtccttccc aaatgtcttc cccctcgtaa gcttggg 467

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

ccatgggatg atgatgataa agagacagac acactcctgc tatgggtgct 50

<210> 7

<211> 90

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 60
cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 90

<210> 8

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 60

atggaatgga ccttgatctt t 81

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

gatactctac tactactatt tcccaagctt acgaggggga agacat 46

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc 60

<210> 11

<211> 1013

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

ccatgggatg atgatgataa agagacagac aactcctgc tatgggtgct gctgctctgg 60
gttccaggct ccactggtga cattgtgctc acccaatctc cagcttcttt ggctgtgtct 120
ctagggcaga gagccaccat ctctgcaga gccagtata gtgttgaata tcatggcgca 180
agtttaaatgc agaggtagca acagaaacca ggacagccac ccaaactcct catctatgct 240
gcatccaacg tagaatctgg ggtccctgcc aggttttagtg gcagtgggtc tgggacagac 300
ttcagcctca acatccatcc tgtggaggag gatgatattg caatgtattt ctgtcagcag 360
agtaggaagg ttccgtggac gttcgggtgga ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat 420
gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca tccagtaagc ttgggggcgg cggcggcagc 480
ggcggcggcg gcagcggcgg cggcggcagc ggcggcggcg gcagcatgga atggaccttg 540
atcttttatct tcttggtagc aacagctaca ggtgtccact cccaggtcca actgcagcag 600
cctggggctg agctggtgag gcctgggtct tcagtgaagc tgtcctgcaa ggcttctggc 660
tacaccttca ccagctactg gatgcattgg gtgaagcaga ggcctataca aggccttgaa 720
tggtattgta acattgaccc ttctgatagt gaaactcact acaatcaaaa gttcaaggac 780
aaggccacat tgactgtaga caaatcctcc agcacagcct acatgcagct cagcagcctg 840
acatctgagg actctgcggt ctattactgt gcaagacgga cctactatga ttacgcccac 900
tggtacttcg atgtctgggg cgcagggacc acggtcaccg tctcctcaga gagtcagtc 960
ttcccaaata tcttccccct cgtaagcttg ggaaatagta gtagtagagt atc 1013

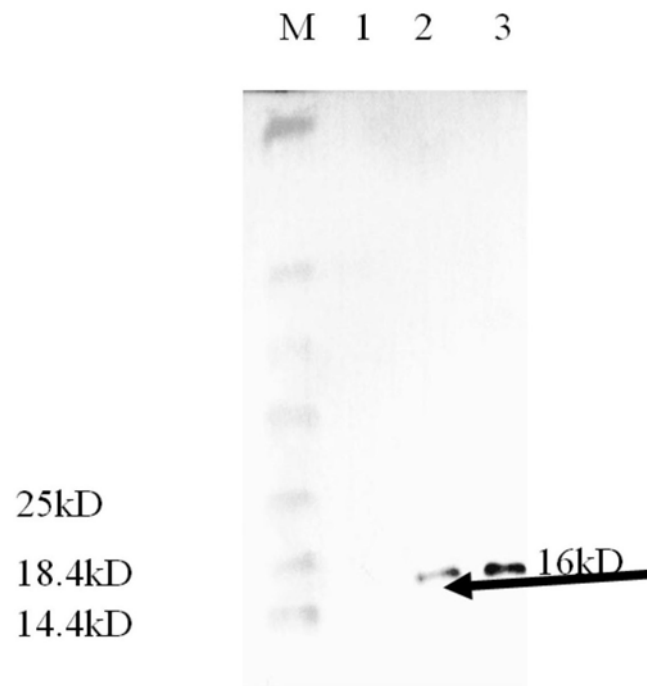


图1

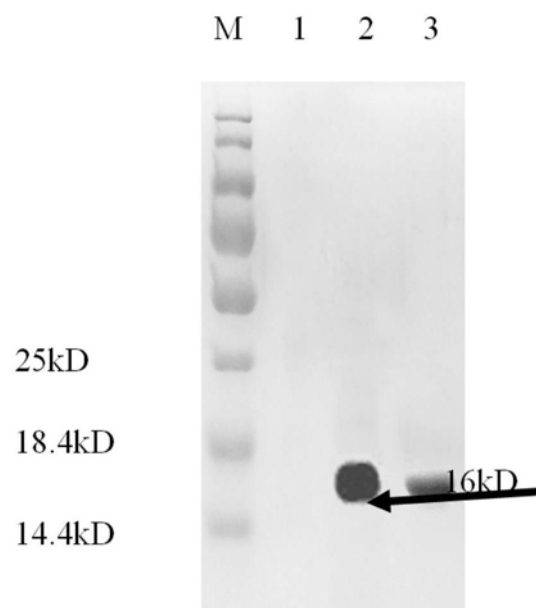


图2

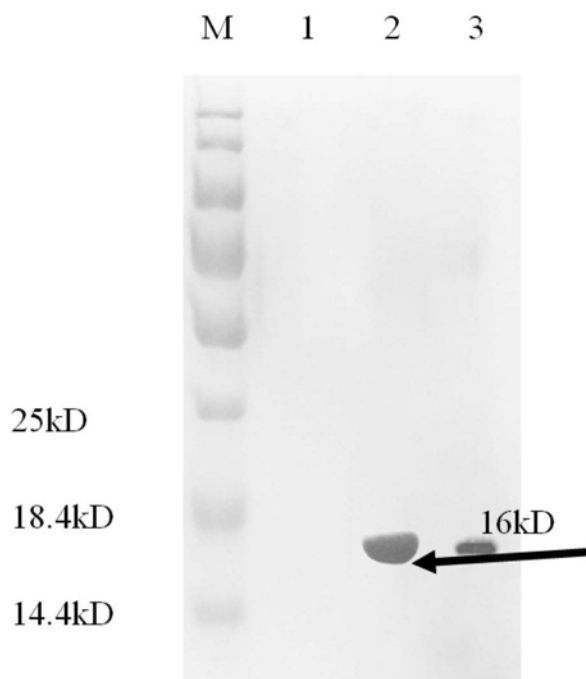


图3

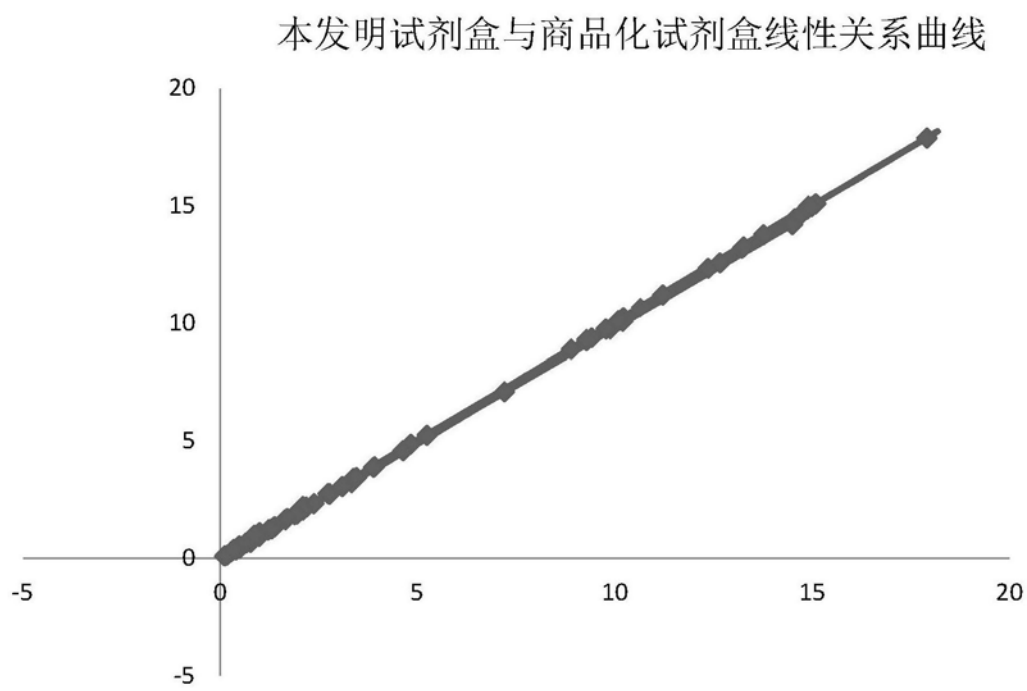


图4

本发明试剂盒线性范围线性回归图

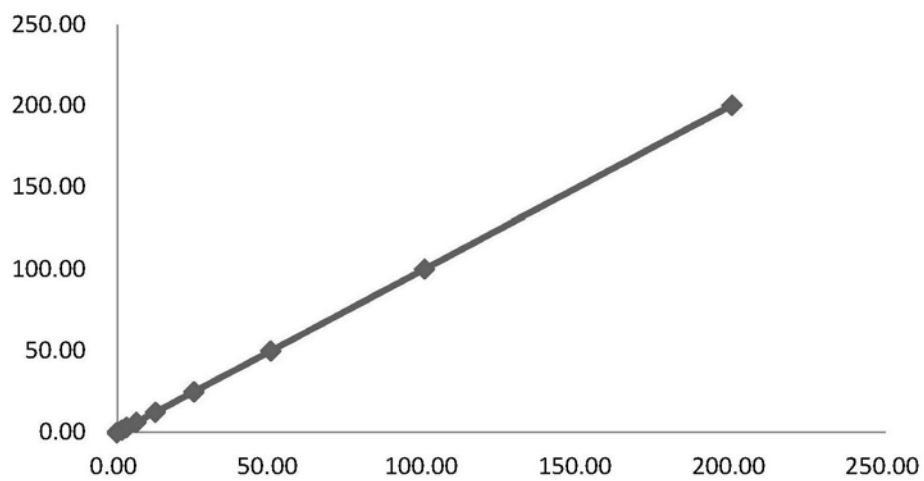


图5

专利名称(译)	朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	CN109406771A	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811257253.1	申请日	2018-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	芮双印 符修乐		
发明人	芮双印 符修乐		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 C12N15/70 C12N15/13		
CPC分类号	G01N33/54313 C07K16/38 C12N15/70 G01N33/531 G01N33/54393 G01N2800/347		
代理人(译)	王伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒，包括试剂R1和试剂R2双液体组分；试剂R1包括：缓冲液10~100mM/L，稳定剂5~50g/L，防腐剂0.1~1g/L，溶剂为纯化水；试剂R2包括：缓冲液10~100mM/L，表面活性剂0.1%~1%，稳定剂5~50g/L，防腐剂0.1~1g/L，交联重组抗人Cys-C单链抗体的胶乳微球1~10%，交联山羊抗人Cys-C多克隆抗体的胶乳微球2~15%，溶剂为纯化水。本发明还提供了朊抑素C胶乳增强比浊法检测试剂盒制备和使用方法。本发明试剂盒结合了多克隆抗体和单克隆抗体类检测试剂盒的优点，能同时提高检测的特异度和灵敏度。

