



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102147413 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 10

(21) 申请号 201010583920. 2

(22) 申请日 2010. 12. 08

(71) 申请人 武汉生之源生物科技有限公司  
地址 430223 湖北省武汉市东湖开发区大学  
园路武大科技园创业楼四楼西 13

(72) 发明人 华权高 沈鹤霄 周岱 许可

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

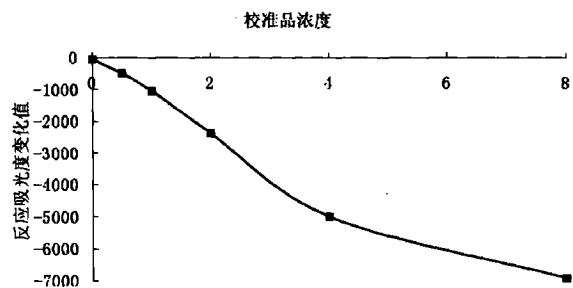
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 免疫测定试剂盒及其制备方法。使用本发明的试剂盒能检测血清或血浆中胱抑素 C 的含量。所述的匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 免疫测定试剂盒,其胶体金颗粒直径为 26-32nm。本发明的试剂盒具有高灵敏度及高稳定性的特点。



1. 一种小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其用于测定胱抑素 C 的含量。
2. 根据权利要求 1 记载的小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其特征在于,它是基于免疫胶体金法定量检测样本中胱抑素 C 含量的试剂盒。
3. 根据权利要求 1 记载的小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其特征在于,其中胶体金颗粒直径为 26-32nm。
4. 根据权利要求 1 记载的小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒性能比国际上知名的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒较优。
5. 根据权利要求 4 记载的小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒的优异性能包括但不限于试剂盒的稳定性等。

## 一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒及其制备方法,特别是小粒径的匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 免疫检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 1983 年 Anastasi 等首次在鸡蛋清中分离纯化得到高纯度的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine proteinase inhibitor, CPI),后被命名为胱抑素 C(CysC)。胱抑素 C 是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,也被称为  $\gamma$ -微量蛋白及  $\gamma$ -后球蛋白,属非糖基化的碱性蛋白质,分子量约为 13KD,几乎所有的有核细胞均能产生,经由肾小球滤过并几乎全部被近曲小管重吸收和分解,产生率多处在相对恒定状态。胱抑素 C 是一种比较接近理想的反映肾小球率过滤的内源性标志物,研究表明该物质不受生理、性别、年龄、炎症等因素影响,体内含量恒定,能早期敏感提示肾功能损害,是近几年新发现用来诊断肾脏疾病的一个理想指标。

[0003] 研究资料已表明,胱抑素 C 较血清 BUN、Cr 有更高的敏感性和特异性,对于评价肾小球滤过率有非常重要的价值。目前对于胱抑素 C 的检测方法比较常用的有颗粒增强免疫比浊法和匀相溶胶颗粒型免疫测定法。由于颗粒增强免疫比浊法测定时间短,而且可以在自动生化分析仪上进行,所以成为胱抑素 C 检测的常规应用技术,但是上述方法反应后会产生沉淀,不利于生化仪的清洗。而后者不仅具有前者的那些优点,也不会产生沉淀,所以在胱抑素 C 的常规临床应用中可以优先选择匀相溶胶颗粒型免疫测定法。目前该技术已趋于成熟,而且操作简便,干扰因素少,对各种疾病的诊断及病情观察具有重要的临床意义。

[0004] 匀相溶胶颗粒型免疫测定法的基本原理是:采用标记了抗胱抑素 C 抗体的胶体金,与待测标本中的胱抑素 C 发生凝聚反应使胶体金颜色发生变化,用 540nm 检测这种变化,以胱抑素 C 标准品的标准曲线测出样本中目标检测物胱抑素 C 的浓度。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的问题是建立一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 检测试剂盒,提供一种特异性的高稳定性的匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,可以测定 0.027mg/L 的胱抑素 C 含量。另外,本发明的目的还在于提供使用本发明匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒测定胱抑素 C 含量的方法。

[0006] 为了解决上述问题,本发明采用 26-32nm 胶体金颗粒标记于抗胱抑素 C 抗体,通过匀相溶胶颗粒免疫测定法检测血清或血浆中胱抑素 C 含量。采用开瓶稳定性实验检测了该试剂盒与国际知名企业相关产品的稳定性差异。

[0007] 本发明提供以下的技术方案。

[0008] 1. 根据权利要求 1-3 记载的一种小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其用于测定胱抑素 C 的含量,该试剂盒包含试剂 R1 和试剂 R2 以及胱抑素 C 标准品,试剂 R1 和试剂 R2 的体积比为 4 : 1,所述试剂 R1 为含有多聚物的缓冲溶液,所述试剂 R2 为结合有抗人

胱抑素 C 抗体的胶体金的缓冲溶液,其中胶体金颗粒的直径为 26-32nm。

[0009] 2. 根据权利要求 4-5 记载的小粒径匀相溶胶颗粒型免疫测定试剂盒,其特征在在于,我们利用开瓶实验检测了本发明和某国际知名品牌试剂盒的稳定性相比较为优。

[0010] 我们使用本发明的方法灵敏度高,能够检测极低水平(约 0.027mg/L)的胱抑素 C,具有很高的临床实用价值。另外,本发明的试剂盒为液体双试剂,因此具有特异性好,灵敏度高,准确性好及抗干扰能力强等优点,可用于检测血清或血浆中胱抑素 C 的浓度,适用于临床全自动生化分析仪。

### 附图说明

[0011] 图 1 显示 6 种不同含量的胱抑素 C 参考标准的标准曲线,每个点代表不同含量的胱抑素 C 参考标准,其中, x 轴表示胱抑素 C 的含量, y 轴表示吸光度。

[0012] 图 2 显示本发明的试剂和对照试剂(某国际知名公司胱抑素 C 试剂盒)的相关性。图中的 X、Y 轴均为测定值(胱抑素 C 含量 mg/L)。

### 具体实施方式

[0013] 实施例 1

[0014] 一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素 C 测定试剂盒及其制备方法。

[0015] 1. 本发明试剂 R1 的配制

[0016] 按照常规方法进行制备。

[0017] 2. 本发明试剂 R2 的配制

[0018] I. 胶体金溶液的制备

[0019] (1) 用超纯水配制 1% 氯金酸和 10% 柠檬酸三钠;

[0020] (2) 超纯水配制万分之四氯金酸 500ml (20ml 1% 氯金酸加 480ml 超纯水);

[0021] (3) 加热搅拌至微沸,快速加入与氯金酸质量比为 1.2 : 1 的柠檬酸三钠(即 4ml 10% 柠檬酸三钠);

[0022] (5) 加热搅拌至颜色变为酒红色,继续加热搅拌 5-8min 后停止;

[0023] (6) 用紫外分光光度计检测 500nm-560nm 处的吸光度值,根据吸光度值分析出波峰的位置,以此大致确定金颗粒的粒径。

[0024] II. 抗体标记(以标记 100ml 胶体金为例)

[0025] (1) 100ml 胶体金加 10ml 0.1M pH8.4 硼酸盐缓冲液再加 2mg 1mg/ml CysC 多抗,混匀放置 30min;

[0026] (2) 加 10ml 10% BSA,混匀放置 30min;

[0027] (3) 11000rpm 离心 30min;

[0028] (4) 去上清,用含 0.4% PEG8000 的 Tris 缓冲液(10mM/L, PH7.5)重悬,离心 30min;

[0029] (5) 同上重复洗涤两次;

[0030] (6) 用上述缓冲液复溶至 30ml。

[0031] 实施例 2 工作曲线测定

[0032] 本发明的用量:本发明试剂 R1 和本发明试剂 R2 用量分别为 160ul 和 40ul,样本

用量为 2ul。

[0033] 本发明采用终点法进行测定：160ul R1 加入 2ul 样本，于 37℃ 5min 后加入 40ul 试剂 R2，即开始读点，反应 5min 后再次读点，得到吸光度差值。

[0034] 制作本发明的标准曲线：采用本发明的标准品（选择 6 点校准，校准品胱抑素 C 含量分别为 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0mg/ml），使用迈瑞 BS300 全自动生化仪，检测主波长为 546nm，副波长为 660nm；

[0035] 按照上述测定步骤测得本发明胱抑素 C 标准品的标准曲线（如图 1 所示）。图 1 中曲线上的每个点代表一个含量的标准品。其中 x 轴表示胱抑素 C 的含量，y 轴表示吸光度。

[0036] 实施例 3 准确性、精密度测定

[0037] 利用中国九强公司提供的质控品，选取了两个浓度（较低和较高浓度），用本发明的试剂盒进行测定，结果如下表。

[0038] 表 1

[0039]

类别	质控品	样本 1	样本 2
	靶值 (mg/L)	0.85	1.70
CysC	1	0.81	1.67
	2	0.82	1.67
	3	0.79	1.68
	均值	0.81	1.67
	RE (%)	-5.10	-1.57

[0040] 相关性实验：使用本发明的试剂和对照试剂（某国际知名公司胱抑素 C 试剂盒）。采用迈瑞 BS300 全自动生化分析仪对 30 份人血清进行测定，对测定值进行相关性分析。测定结果见图 2，图中的 X、Y 轴均为测定值（胱抑素 C 含量 mg/L）。

[0041] 精密度测定：随机抽取一个正常血清样本和肾病病人血清样本连续进行 20 次测定，按照  $CV(\%) = SD/Mean \times 100$  进行计算。

[0042] 表 2

[0043]

测定	血清样本 1	血清样本 2
1	0.78	1.95
2	0.82	1.97
3	0.83	1.94
4	0.85	2.01
5	0.77	1.99

6	0.79	1.98
7	0.79	1.97
8	0.81	1.96
9	0.82	1.96
10	0.79	1.93
11	0.81	1.97
12	0.81	2.02
13	0.78	1.96
14	0.81	1.95
15	0.78	1.99
16	0.79	1.98
17	0.79	1.96
18	0.8	1.98
19	0.8	1.95
20	0.82	1.95
MIN	0.77	1.93
MAX	0.85	2.02
RANGE	0.08	0.09
SD	0.020	0.023
MEAN	0.80	1.97
CV(%)	2.48	1.15

[0044]

[0045] 结果显示本发明的试剂盒具有良好的特异性,准确性和精密度。

[0046] 实施例 4 灵敏度实验:

[0047] 检测 20 次水和 0.7mg/L 的样本,记录吸光度数值,计算平均值和标准偏差,测定的灵敏度实验数据如表 3 所示。

[0048] 下表中,  $\Delta A$  表示吸光度的差值。

[0049] 表 3

[0050]

测定次数	水 $\Delta A$	低值样本 $\Delta A/\text{min}$ (浓度 0.7mg/L)
1	23	1200
2	19	1189
3	29	1201
4	35	1223
5	21	1196
6	18	1245

[0051]

7	15	1236
8	27	1255
9	29	1244
10	24	1236
11	35	1247
12	33	1210
13	30	1213
14	19	1249
15	20	1287
16	19	1264
17	25	1255
18	32	1246
19	36	1203
20	38	1244

均值	26.35	1232.15
SD	6.998	26.360

[0052] 本发明试剂的灵敏度 =  $0.70 \times 47.344 / 1232 = 0.027 \text{mg/L}$

[0053] 最低检测限 (LLD) =  $26.35 + 3 \times 6.998 = 47.344$

[0054] 实施例 5 稳定性实验

[0055] 将实施例 1 中制备的本发明试剂和对照试剂 (某国际知名公司胱抑素 C 试剂盒, 胶体金颗粒直径约 70nm), 分别进行了开瓶实验, 对试剂盒的稳定性进行了检测。数据结果如表 4 和表 5 所示。

[0056] 表 4

[0057]

天数	测定次数	样本 1	样本 2
0	1	0.81	1.67
	2	0.82	1.67
	3	0.79	1.68
	均值	0.81	1.67
2	1	0.68	1.51
	2	0.68	1.55
	3	0.63	1.58
	均值	0.66	1.55
	RE (%)	-17.77	-7.57
5	1	0.71	1.63
	2	0.72	1.65
	3	0.72	1.63
	均值	0.72	1.64
	RE (%)	-11.16	-2.19
7	1	0.76	1.58
	2	0.74	1.6
	3	0.7	1.6
	均值	0.73	1.59
	RE (%)	-9.09	-4.78

[0058]

[0059] 表 5

[0060]

天数	测定次数	样本 1	样本 2
0	1	0.85	1.70
	2	0.84	1.68
	均值	0.85	1.69
2	1	0.83	1.64
	2	0.82	1.63
	均值	0.83	1.64
	CV (%)	-2.37%	-3.25%
5	1	0.68	1.41
	2	0.70	1.40
	均值	0.69	1.41
	CV (%)	-18.34%	-16.86%
7	1	0.46	1.11
	2	0.45	1.09
	均值	0.46	1.10
	CV (%)	-46.15%	-34.91%

[0061] 结果显示本发明的稳定性高于对照试剂的稳定性,可见本发明实现了稳定性提高的效果。

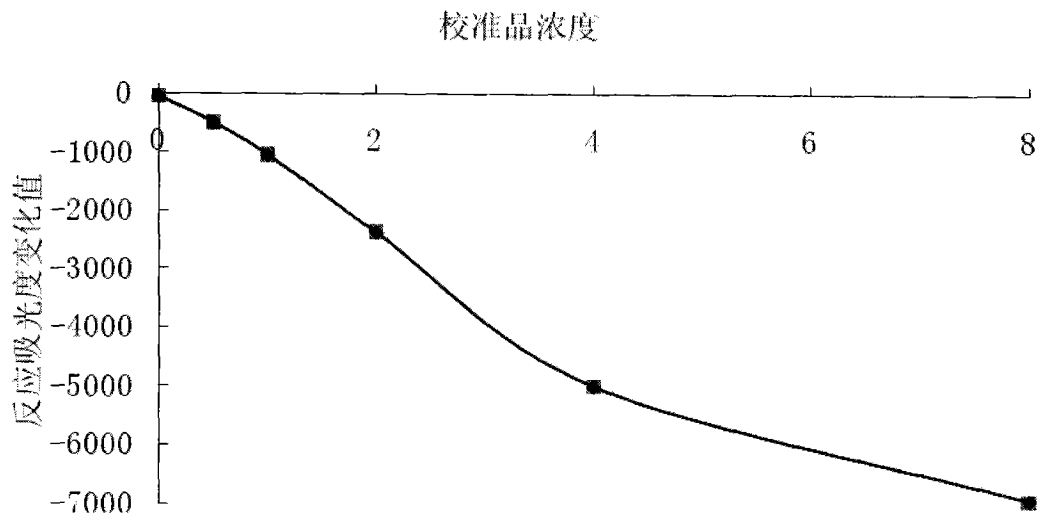


图 1

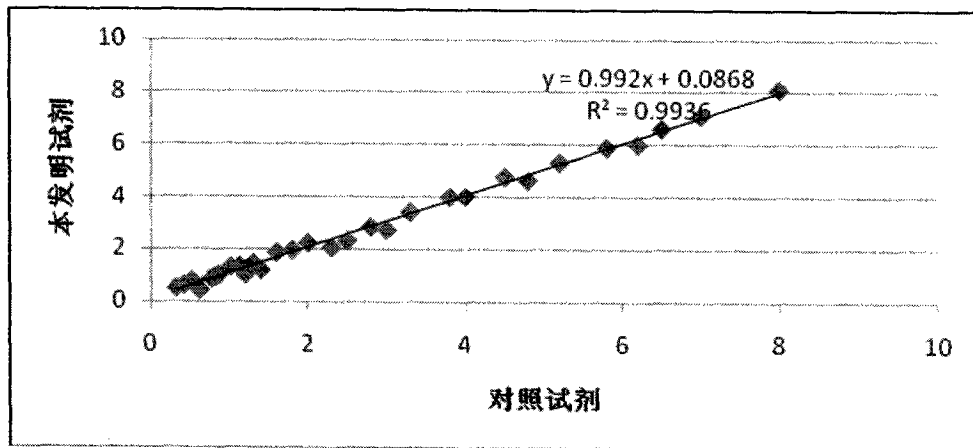


图 2

专利名称(译)	一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素C测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102147413A</a>	公开(公告)日	2011-08-10
申请号	CN201010583920.2	申请日	2010-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉生之源生物科技有限公司		
[标]发明人	华权高 沈鹤霄 UNKNOWN 许可		
发明人	华权高 沈鹤霄 周 许可		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种小粒径匀相溶胶颗粒型胱抑素C免疫测定试剂盒及其制备方法。使用本发明的试剂盒能检测血清或血浆中胱抑素C的含量。所述的匀相溶胶颗粒型胱抑素C免疫测定试剂盒，其胶体金颗粒直径为26-32nm。本发明的试剂盒具有高灵敏度及高稳定性的特点。

