



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007259 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201410193254. X

(22) 申请日 2014. 05. 08

(71) 申请人 北京玖佳宜科技有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地信息路 12  
号 2 层 D204 室

(72) 发明人 侯淑霞 王万霞

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/553 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

胱抑素 C 检测试剂盒及其制备

(57) 摘要

本发明提供一种胱抑素 C 检测试剂盒, 所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法, 包括试剂 R2, 所述试剂 R2 为含有标记了胱抑素 C 抗体的金纳米颗粒的溶液, 其特征在于, 所述金纳米颗粒的粒径为 62. 2nm-79. 1nm, 所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50 : 20 - 60。还本发明还提供该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒具有灵敏度高, 特异性强, 反应迅速, 稳定性好的特点, 反应后不产生沉淀, 便于生化仪的清洗, 延长了生化仪的使用寿命。

1. 一种朊抑素 C 检测试剂盒,所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法,包括试剂 R2,所述试剂 R2 为含有标记了朊抑素 C 抗体的金纳米颗粒的溶液,其特征在于,所述金纳米颗粒的粒径为 62.2nm-79.1nm,所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50:20-60。

2. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于,所述金纳米颗粒的粒径为 67.2nm-72.4nm。

3. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于,所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50:40-60。

4. 权利要求 2 或 3 任意一项所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为 PH 值 5.0-9.5 的溶液。

5. 权利要求 4 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为 PH 值 6.0-8.5 的溶液。

6. 权利要求 5 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 还含有促凝剂、稳定剂、蔗糖和甘油,其中,所述稳定剂为蛋白质、PEG、糖和可溶性的碱金属和碱土金属的无机盐中的一种或多种;所述蛋白质为牛血清白蛋白或明胶;所述糖为单糖、二糖或者多糖;所述无机盐为卤素碱金属和碱土金属的无机盐;试剂 R2 为是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液和 HEPES 缓冲液中的一种或多种的组合。

7. 权利要求 6 所述试剂盒,其特征在于,所述促凝剂为重量体积比 0.4% 以内的 PEG20000,所述稳定剂为重量体积比 2% 以内的牛血清白蛋白,所述蔗糖的重量体积比为 20% 以下,所述甘油的重量体积比为 20% 以下。

8. 权利要求 7 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为含有粒径为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$  且标记了朊抑素 C 抗体的金纳米颗粒、重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH7.2 的磷酸盐缓冲液,其中,金纳米颗粒和抗体的重量比为 50:40-60。

9. 权利要求 7 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括试剂 R1,所述试剂 R1 为含有重量体积比 0.2% BSA、重量体积比 0.1% 的  $\text{NaN}_3$  和重量体积比 0.05% Tween20 的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液。

10. 制备权利要求 1-9 任意一项所述试剂盒的方法,其特征在于,所述方法包括:

制备金纳米颗粒;

将抗体偶联到金纳米颗粒,得偶联抗体的纳米金颗粒溶液;

偶联抗体的纳米金颗粒溶液中加入稳定剂和促凝剂;

2800rpm 离心 2 小时;

离心沉淀用含重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液重悬,调整浓度至  $\text{OD}_{540\text{nm}}$  为 0.2。

## 胱抑素 C 检测试剂盒及其制备

### 技术领域

[0001] 本申请涉及一种基于胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒及其制备。

### 背景技术

[0002] 1983 年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,后被命名为胱抑素 C,它是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,也被称为  $\gamma$ -微量蛋白或  $\gamma$ -后球蛋白,广泛存在于各种组织的细胞内和体液中,是一种碱性的低分子量的非糖基化蛋白质,分子量为 13.3kD,由 122 个氨基酸残基组成,可由所有有核细胞产生,产生率恒定。循环中的胱抑素 C 仅经肾小球滤过而被清除,是一种反映肾小球滤过率变化的内源性标志物,并在近曲小管重吸收,但重吸收后被完全代谢分解,不返回血液,因此,其血中浓度同肾小球滤过决定,而不依赖任何外来因素,如性别、年龄、饮食的影响,是一种反映肾小球滤过率变化的理想同源性标志物。

[0003] 胱抑素 C 的常用检测有免疫比浊法和酶联免疫吸附法等。由于酶联免疫吸附法检测耗时且操作复杂,已经不能满足大型医院快速定量检测的要求,而免疫比浊法随着全自动生化仪的普及,已经发展出来多种快速免疫比浊检测技术。

[0004] 乳胶增强免疫透射比浊法的基本原理是,首先将抗体吸附在一种胶乳颗粒上,当遇到相应的抗原时,抗原抗体结合而出现乳胶凝集。单个乳胶颗粒的大小在入射波长之内,光线可透过,当两个以上的乳胶颗粒凝集时,可阻碍光线透过,使得透射光减少,其减少程度与抗原的量成正比。此法提高了检测的灵敏度和准确度,得到了广泛的应用。然而,乳胶增强免疫比浊法反应后会产生沉淀,不利于生化仪的清洗,干扰试验结果,且乳胶制造成本较高,导致免疫比浊试剂盒价格和检测成本偏高。因此又出现了纳米颗粒增强的免疫比浊法,如专利 CN101680890 便公开了一种通过比浊法测量人抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 的比浊免疫测定方法和试剂组合,以及中国专利 CN101819208 中公开了一种利用微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒。专利 CN101680890 中具体公开了,表面修饰了抗体的由聚苯乙烯、聚氯乙烯、环氧树脂、聚偏 1,1-二氯乙烯、聚- $\alpha$ -萘基甲基丙烯酸酯、聚乙烯萘以及它们相应的共聚物制成的粒径在 80-105nm 的有机高分子胶体纳米颗粒。

[0005] 本发明研究表明,许多纳米颗粒此范围之内并不满足试验的要求,比如:氧化铁等磁性纳米颗粒在 40nm 以上时由于顺磁性和比重等因素而容易聚沉无法达到应有的稳定性;金纳米颗粒在粒径 80-150nm 的范围内稳定性太差而不合适等。根据中国专利 CN102749454 的教导,本发明以直径为 35nm-60nm 的胶体金颗粒进行试验,发现,灵敏度较差,无法满足临床中对灵敏度小于 1ng/mL 的要求,和最低检测限 5ng/mL 的要求,且线性范围不覆盖临床中正常生理和病理情况的浓度区间,因此常常造成假阴性的结果;同时还存在反应时间长(平衡时间 5-10min),无法达到快速检验的要求。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有技术存在的错误教导,解决现有技术中存在的上述缺陷,本发明提

供一种基于胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒。该试剂盒线性范围宽、灵敏度高,制造成本低,反应后不产生沉淀,方便生化仪清洗。

[0007] 根据本发明的一方面,提供一种基于胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒,该试剂盒包括试剂 R2,所述试剂 R2 为含有标记了胱抑素 C 抗体的金纳米颗粒的溶液,所述金纳米颗粒的粒径为 62.2nm-79.1nm,优选 67.2nm-72.4nm;所述金纳米颗粒和抗体质量比在 50:20-60,优选 50:40-60。

[0008] 具体来讲,所述试剂 R2 为 PH 值 5.0-9.5,优选 6.0-8.5 的溶液。

[0009] 进一步地,所述试剂 R2 还含有促凝剂、稳定剂、蔗糖和甘油,其中,促凝剂为重量体积比 0.4% 以内的 PEG20000,稳定剂为重量体积比 2% 以内的 BSA,蔗糖的重量体积比为 20% 以下,甘油的重量体积比为 20% 以下。

[0010] 作为优选,上述 R2 为含有粒径为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$  且标记了胱抑素 C 的金纳米颗粒、重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液,其中,金纳米颗粒和抗体的重量比为 50:40-60。

[0011] 更进一步地,所述基于胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒还包括起缓冲和稳定作用的试剂 R1,所述试剂 R1 为含有重量体积比 0.2% BSA、重量体积比 0.1% 的 NaN<sub>3</sub> 和重量体积比 0.05% Tween20 的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液。在本发明的试剂盒中,发明点主要在试剂 R2,试剂 R1 也可以使用现有免疫比浊法中检测试剂盒的试剂 R1。

[0012] 上述试剂 R2 通过如下方法制备:

[0013] 制备金纳米颗粒;

[0014] 将抗体偶联到金纳米颗粒,得偶联抗体的纳米金颗粒溶液;

[0015] 偶联抗体的纳米金颗粒溶液中加入稳定剂和促凝剂;

[0016] 2800rpm 离心 2 小时;

[0017] 离心沉淀用含重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液重悬,调整浓度至 OD<sub>540nm</sub> 为 0.2。

[0018] 抗体的活性容易受到蛋白酶的分解、高温变性、渗透压等影响,可加入稳定剂来稳定抗体的结构和活性。所述稳定剂可以是蛋白质、PEG、糖和可溶性的碱金属和碱土金属的无机盐中的一种或多种;其中,所述蛋白质优选牛血清白蛋白 (BSA) 或明胶;所述糖可以是单糖、二糖或者多糖,其中,单糖优选甘露糖、半乳糖和 / 或葡萄糖;二糖优选乳糖和 / 或蔗糖;多糖优选海藻糖、葡聚糖、甘露糖和葡萄糖中的一种或多种;所述无机盐优选卤素碱金属和碱土金属的无机盐,更优选氯化钠、氯化钾、氯化钙中的一种或多种。

[0019] 本发明的试剂盒中,试剂 R2 还可以加入促凝剂,以增加抗原抗体反应速率。

[0020] 本发明所提供试剂盒中 R2 可以是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液和 HEPES 缓冲液中的一种或多种缓冲液体系;优选磷酸盐缓冲液体系。

[0021] 本发明至少实现了如下有益效果:

[0022] 本发明试剂盒具有灵敏度高,特异性强,稳定性好的特点,反应时间短,显色反应时间小于 30s,平衡时间小于 2min,可用于检测血清或血浆中胱抑素 C 含量,适用于临床全自动生化分析仪。本发明试剂盒检测胱抑素 C 的灵敏度可以达到 0.002mg/L,检测线性范围达 0 ~ 8.0mg/L。

- [0023] 本发明试剂盒反应后不产生沉淀,便于生化仪的清洗,延长了生化仪的使用寿命。
- [0024] 本发明的试剂盒采用胶体金标记抗体,降低了胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒的制造成本,具有较大的市场竞争力。

#### 附图说明

- [0025] 图 1:本发明实施例 1-7 检测的标准曲线。
- [0026] 图 2:本发明实施例 9-15 检测的标准曲线。

#### 具体实施方式

[0027] 以下,将详细说明本发明的具体实施例,以便本领域技术人员能够更详细地理解本发明。

[0028] 金纳米颗粒以类似胶体状态存在,又称胶体金。

[0029] 本发明所提供基于胶体金免疫比浊法的胱抑素 C 检测试剂盒中,试剂 R1 可以使用现有技术中免疫比浊法检测试剂盒中的试剂 R1,即已有的商用品。具体来讲,试剂 R1 可以是含有 0.2% BSA(w/v) 作为稳定剂、0.1% NaN<sub>3</sub>(w/v) 作为防腐剂和 0.05% Tween20(w/v) 作为促凝剂的,50mM 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2),是一种促使抗原位点暴露促进抗原抗体反应的缓存液。

[0030] 以下各实施例仅制备试剂 R2。

[0031] 实施例 1

[0032] 本实施例试剂 R2 的制备分为三步,首先制备胶体金溶液,然后将抗体偶联到金纳米颗粒上,最后和缓冲盐、促凝剂和防腐剂等混溶成完整的体系。

[0033] 具体过程如下:

[0034] 1) 50nm 的胶体金的制备按如下步骤:

[0035] 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚,加入 500ml 超纯水;

[0036] 加入 5ml 浓度为 1% (w/v) 氯金酸,600rpm 左右高速搅拌,并加热至溶液沸腾,然后迅速将 6ml 浓度为 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中,保持加热和剧烈搅拌 10min,溶液颜色先变黑色,然后逐渐变紫红色;

[0037] 关闭加热开关并继续搅拌 10min,然后停止搅拌冷却至室温,用超纯水恢复到原体积 500ml;

[0038] 使用透射电镜观察制得的胶体金颗粒的大小,对 1000 粒进行统计后直径约为  $50.4 \pm 1.2$  nm,超滤除掉小分子后备用。

[0039] 2) 将抗体偶联到金纳米颗粒上,具体过程如下:

[0040] 将待标记的抗体移入透析袋内,在 10mM 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中透析,以除去抗体溶液中的其他小分子物质;

[0041] 透析后的抗体转移到离心管内,15000rpm 离心 60min,收集上清;

[0042] 在紫外-可见分光光度计上测量溶液 OD<sub>260nm</sub> 吸收值,计算出溶液中抗体的浓度,并用 10mM 磷酸盐缓冲液将抗体稀释至 1mg/ml (w/v);

[0043] 取 10 支 1.5 毫升的离心管,加入 1 毫升制备好的胶体金溶液;

[0044] 用 10% 的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH9;

[0045] 将 1、2、4、8、10、20、40、60、80、100u1 的抗体分别加到上述 10 支离心管中,震荡 30 分钟,此时每支试管中金纳米颗粒和抗体的质量比分别为 50 :1、50 :2、50 :4、50 :8、50 :10、50 :20、50 :40、50 :60、50 :80、50 :100 ;

[0046] 向上述溶液中加入 100u1 浓度为 10% 的 NaCl 溶液,混匀,静置 2h 后观察各管,发现在金纳米颗粒和抗体的质量比达到 50 :100 时,有颜色改变和少量的沉淀析出,这表明当比例达 50 :100 时,是标记蛋白的最大需求量,金纳米颗粒和抗体的质量比小于 50 :100 无颜色改变和无沉淀析出 ;

[0047] 根据以上结果,将 500ml 胶体金溶液加入三角瓶中,边搅拌边用 10% 的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 9 ;

[0048] 将小于 50ml 的抗体加入到上述溶液中,继续搅拌 30 分钟,在此过程中抗体同纳米颗粒在库仑力和范德华力的作用下,突破胶体颗粒表面的水化层实现接触,在静电力和范德瓦尔德力的相互作用,胶体颗粒同蛋白质分子实现偶联 ;

[0049] 3) 试剂 R2 的配制按如下步骤进行 :

[0050] 在偶联后的胶体金溶液中加入一定量的 BSA 作为稳定剂,终浓度为 1% (w/v),搅拌 5min 使之完全溶解 ;

[0051] 在上述溶液中加入一定量的 PEG20000,终浓度为 0.2% (w/v),搅拌 10 分钟 ;

[0052] 将上述溶液移至离心管中,用 2800rpm 离心 2h,弃上清,保留沉淀 ;

[0053] 用浓度为 20% 蔗糖作为稳定剂、0.2% PEG20000 作为促凝剂、0.5% BSA 作为稳定剂、和 5% 甘油作为稳定剂的 10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 重悬沉淀物,调整浓度至  $OD_{540nm}$  为 0.2 ;

[0054] 得到 R2 溶液,分装备用。

[0055] 实施例 2

[0056] 实施例 2 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 2 制备的胶体金颗粒粒径为 55nm。

[0057] 制备 55nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.6ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $56.2 \pm 1.5nm$ 。

[0058] 实施例 3

[0059] 实施例 3 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 3 制备的胶体金颗粒粒径为 62.2nm。

[0060] 制备 62.2nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.4ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $62.2 \pm 1.1nm$ 。

[0061] 实施例 4

[0062] 实施例 4 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 4 制备的胶体金颗粒粒径为 67nm。

[0063] 制备 67nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.2ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $67.2 \pm 1.5nm$ 。

[0064] 实施例 5

[0065] 实施例 5 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 5 制备的胶体金颗粒粒径为 72nm。

[0066] 制备 72nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.1ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ 。

[0067] 实施例 6

[0068] 实施例 6 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 6 制备的胶体金颗粒粒径为 79nm。

[0069] 制备 79nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 4.9ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $79.1 \pm 1.6\text{nm}$ 。

[0070] 实施例 7

[0071] 实施例 7 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 7 制备的胶体金颗粒粒径为 83nm。

[0072] 制备 83nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 4.7ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为  $83.5 \pm 1.6\text{nm}$ 。

[0073] 实施例 8

[0074] 基于胶体金免疫比浊的胱抑素 C 检测试剂盒的临床使用效果测定:

[0075] (1) 本发明试剂盒的测试条件及参数如下

[0076] a) 测定步骤:先加入 240ul 试剂 R1,然后加入 3ul 样本,37℃ 孵育 5min 后加入 60ul 试剂 R2,在 540nm 波长测量吸光度,三秒后读取第一点数据,反应 5 分钟后读取另一点,得到吸光度值的差值。

[0077] b) 计算方法:6 点定标法,以样条函数为计算模式。根据吸光度与参考血清的值做工作曲线,样品含量可根据其吸光度值在工作曲线上算出。

[0078] (2) 检测标准曲线

[0079] 通过本发明的方法,采用日立 7180 型自动分析仪检测 6 种不同含量的胱抑素 C 参考品,根据结果做标准曲线,X 轴表示胱抑素 C 的含量,Y 轴表示吸光度差值。

[0080] (3) 通过上述的方法对上述实施例中制备的 7 个试剂盒测定标准曲线,分析最优粒径。结果如下:

[0081] 金纳米颗粒大小为 50.4nm 时,  $y = -0.0012x + 1.5876$ ,  $R^2 = 0.3735$ ;

[0082] 金纳米颗粒大小为 56.2nm 时,  $y = -0.0058x + 1.6005$ ,  $R^2 = 0.9316$ ;

[0083] 金纳米颗粒大小为 62.2nm 时,  $y = -0.1228x + 1.5824$ ,  $R^2 = 0.9838$ ;

[0084] 金纳米颗粒大小为 67.2nm 时,  $y = -0.1229x + 1.5839$ ,  $R^2 = 0.982$ ;

[0085] 金纳米颗粒大小为 72.4nm 时,  $y = -0.1359x + 1.6044$ ,  $R^2 = 0.9892$ ;

[0086] 金纳米颗粒大小为 79.1nm 时,  $y = -0.1283x + 1.4942$ ,  $R^2 = 0.9423$ ;

[0087] 金纳米颗粒大小为 83.5nm 时,  $y = -0.1107x + 1.0179$ ,  $R^2 = 0.3897$ 。

[0088] (4) 对上述结果,进行灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性分析。

[0089] 灵敏度定义为测试体系对不同浓度的标准样品测试值的差异,差异越大表明约灵敏,没有差异则表明体系过于稳定,不能引起比浊改变。灵敏度可以通过拟合后的标准曲线的斜率的绝对值表征。

[0090] 线性相关系数即相关性方程的 R 值,表明试验测试结果和拟合曲线的重合度,R 值越高,表明线性越好。

[0091] 线性范围即测试对应的结果中呈线性关系的区间,线性范围宽有利于测试更大范

围浓度的样品。

[0092] 稳定性是指在该体系中胶体金稳定存在、不发生团聚或沉淀的程度,一般来讲颗粒越大越容易聚沉,引起浊度的改变,颗粒越小越稳定,对待测试剂浓度变化不敏感,即灵敏度差。将待测试剂放置在 40℃ 的环境中,以稳定性时间的长短来表示稳定性的好坏,测试时间是 12 月。

[0093] 通过上述四个参数的对比,我们可以从中选出最适合的粒径范围,将各种金颗粒尺寸条件下的结果汇总于表 1。

[0094] 表 1

[0095]

金纳米颗粒粒径	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (mg/L)	稳定性(月)
50.4 nm	0.0012	0.3735	0-8	12
56.2 nm	0.0058	0.9316	0-8	12
62.2 nm	0.1228	0.9838	0-8	12
67.2 nm	0.1229	0.982	0-8	12
72.4 nm	0.1359	0.9892	0-8	12
79.1 nm	0.1283	0.9423	0-8	12
83.5 nm	0.1107	0.3897	0-1	0.5

[0096] 综合比较以上结果,可发现,粒径大于等于 62.2nm 的纳米颗粒,灵敏度才能达到要求,可以选择 62.2nm-79.1nm 胶体金纳米颗粒,而大于 83.5nm 的胶体金颗粒由于太大,稳定性较差。

[0097] 实施例 9

[0098] 试剂 R2 的制备过程参照实施例 1。根据实施例 8 的测试结果,选择具有较优性质的 72.4nm 的胶体金纳米颗粒作为本体系,改变胶体表面偶联的抗体量。将抗体偶联到直径约为 72.4±1.5nm 金纳米颗粒上,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :100。

[0099] 实施例 10

[0100] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :80。

[0101] 实施例 11

[0102] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :60。

[0103] 实施例 12

[0104] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :40。

[0105] 实施例 13

[0106] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :20。

[0107] 实施例 14

[0108] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :10。

[0109] 实施例 15



[0110] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :1。

[0111] 实施例 16

[0112] 采用实施例 8 中的方法,对实施例 9 至 15 中制备的试剂盒进行分析比较。测试结果如下。

[0113] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :1 时,  $y = -0.00029x + 1.58252$ ,  $R^2 = 0.31624$

[0114] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :10 时,  $y = -0.007x + 1.5986$ ,  $R^2 = 0.4516$

[0115] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :20 时,  $y = -0.0555x + 1.5943$ ,  $R^2 = 0.9618$

[0116] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :40 时,  $y = -0.1348x + 1.5737$ ,  $R^2 = 0.9302$

[0117] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :60 时,  $y = -0.1327x + 1.4899$ ,  $R^2 = 0.9134$

[0118] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :80 时,  $y = -0.1233x + 1.1525$ ,  $R^2 = 0.5216$

[0119] 金颗粒的量 :抗体的量为 50 :100 时,  $y = -0.0999x + 0.965$ ,  $R^2 = 0.3345$

[0120] 将上述七种试剂盒结果汇总比较到表 2 :

[0121] 表 2

	金纳米颗粒: 抗体	灵敏度	线性相关系数	线性范围	稳定性
				( mg/L)	(月)
	50: 1	0.00029	0.311624	0-8	12
	50: 10	0.007	0.4516	0-8	12
[0122]	50: 20	0.0555	0.9618	0-8	12
	50: 40	0.1348	0.9302	0-8	12
	50: 60	0.1327	0.9134	0-8	12
	50: 80	0.1233	0.5216	0-2	10
	50: 100	0.0999	0.3345	0-1	1

[0123] 综合以上结果,金纳米颗粒和抗体浓度之比在 50 :20-60 之间时灵敏度高、线性关系好,同时线性范围广以及稳定性较好,可以选择,更优选是 50 :40-60。

[0124] 实施例 17

[0125] 通过实施例 8 和实施例 16,我们已经优化出了试剂盒 R2 的最佳条件,现在对 R2 中稳定剂、促凝剂的条件进行优化。

[0126] 选用金纳米颗粒为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ ,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,试剂 R2 选择为磷酸盐缓冲液溶液,分别选择 pH4.0、5.0、6.0、7.2、8.5、9.5、10.0 七个点,表 3 为三个条件下灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果。

[0127] 表 3

[0128]

pH	灵敏度	线性相关系数	线性范围 ( mg/L)	稳定性 (月)
4.0	0.0129	0.311624	0-2	3
5.0	0.0178	0.6516	0-6	8
6.0	0.1355	0.9618	0-8	12
7.2	0.1358	0.9852	0-8	12
8.5	0.1337	0.934	0-8	12
9.5	0.1233	0.7216	0-8	10
10.0	0.1099	0.345	0-2	4

[0129] 从上表中得数据可以看出,在 pH 为 4.0 和 10.0 时,该试剂盒无论在灵敏度、线性相关系数、线性范围还是稳定性上都不满足试验室的要求,因此 pH 的边界范围是 5.0-9.5,其中在 6.0-8.5 范围内灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果最好,且数值相近,表明该范围内 pH 影响不显著。

[0130] 同上,选择金纳米颗粒为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ ,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,促凝剂选择 PEG20000,浓度的范围为 0 ~ 0.4% (w/v),选择 0、0.1%、0.2%和 0.4% 4 个水平,见表 4。

[0131] 表 4

[0132]

PEG20000 浓度	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (mg/L)	稳定性 (月)
0	0.1028	0.8516	0-8	12
0.1%	0.1315	0.918	0-8	12
0.2%	0.135	0.986	0-8	12
0.4%	0.134	0.942	0-6	12

[0133] 从上表中得数据可以看出,在凝剂选择 PEG20000 在 0 ~ 0.4% (w/v) 范围内灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果相近,表且在 0.2%最优。

[0134] 同上,选择金纳米颗粒为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ ,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,稳定剂选择 BSA、蔗糖和甘油,其中 BSA 浓度分别选择 0、0.5%、和 1%和 2% 4 个水平;蔗糖选择 0、5%、10%和 20% 4 个水平;甘油选择 0、5%、10%和 20% 4 个水平;对以上进行 3 因素和 4 水平的正交试验,建立 L16(4<sup>3</sup>) 正交表,进行 16 次试验,从中选出最优条件,见表 5 和表 6。

[0135] 表 5 :稳定剂的 3 因素和 4 水平表

[0136]

因素 水平	A: BSA	B: 蔗糖	C: 甘油
1	0	0	0
2	0.5%	5%	5%
3	1%	10%	10%
4	2%	20%	20%

[0137] 表 6 :正交试验方案及正交试验结果

[0138]

试验 序号	组合方案	灵敏度	线性相关系 数	线性范围 ( mg/L)	稳定性 (月)
1	A1 B1 C1	0.0239	0.3624	0-4	1
2	A1 B2 C2	0.1278	0.9516	0-8	12
3	A1 B3 C3	0.0665	0.829	0-6	3
4	A1 B4 C4	0.1358	0.9852	0-8	4
5	A2 B1 C2	0.1337	0.934	0-8	12
6	A2 B2 C1	0.0745	0.711	0-6	5
7	A2 B3 C4	0.0951	0.832	0-6	12
8	A2 B4 C3	0.0662	0.835	0-6	12
9	A3 B1 C3	0.0475	0.819	0-6	5
10	A3 B2 C4	0.0473	0.573	0-4	12
11	A3 B3 C1	0.0778	0.516	0-2	3
12	A3 B4 C2	0.1355	0.9818	0-6	12
13	A4 B1 C4	0.1358	0.9862	0-8	12
14	A4 B2 C3	0.1317	0.94	0-8	12
15	A4 B3 C2	0.1233	0.9216	0-8	12
16	A4 B4 C1	0.0415	0.7532	0-4	10

[0139] 通过以上的正交试验,最佳的灵敏度和精密度以及线性范围出现在,金纳米颗粒为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ ,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :40-60,10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7. 2) 中含有 20%蔗糖作为稳定剂、0. 2% PEG20000 作为促凝剂、0. 5% BSA 作为稳定剂和 5% 甘油作为稳定剂。

[0140] 实施例 18

[0141] 试剂 R2 金纳米颗粒为  $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ ,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7. 2) 中含有 20%蔗糖作为稳定剂、0. 2% PEG20000 作为促凝剂、0. 5% BSA 作为稳定剂和 5% 甘油作为稳定剂。

[0142] (1) 灵敏度试验

[0143] 上述试剂盒的最佳灵敏度达 0. 002mg/L。

[0144] (2) 线性测定

[0145] 取病人的异常高值血清 1 份 (①) 和正常人血清 1 份 (⑤),取等体积的①和⑤混合构成③,取等体积的①和③混合构成②,取等体积的③和⑤混合构成④。测定①~⑤血清

中胱抑素 C 的含量。测定结果表明,上述试剂盒血清稀释效应不明显,具有良好的线性。

[0146] (3) 精密度试验

[0147] 用检测蛋白定值质控、正常人混合血清和肾功异常病人混合血清一份,连续测定 20 天,每天测定三次,计算日内及日间精密度。测定结果表明定值质控的平均值为 1.2mg/L, 其日内不精密度为 2.0%, 日间不精密度为 1.8%。正常人混合血清的平均值为 2.2mg/L, 日内不精密度为 3.1%, 日间不精密度为 2.7%。肾功异常病人血清的平均值为 6.7mg/L, 日内不精密度为 1.7%, 日间不精密度为 0.9%。这些测定结果表明此试剂盒的精密度可满足临床要求。

[0148] (4) 干扰试验

[0149] 在正常人血清中各自添加一定量的胆红素、牛血红蛋白、脂肪乳剂和类风湿因子,使其达到表 7 中所示的浓度,同时加入同等体积的去离子水作为无干扰物血清,同时测定这些标本的浓度,结果见表 7。表 7 的结果表明以干扰程度为 10% 作为该测定系统对干扰物的最高忍受限,血清中抗坏血酸在 4.5g/L, 胆红素在 500M 以下, 血红蛋白在 5g/L 以下, 脂肪乳剂在 0.3% 以下, 肝素钠在 62.5U/ml 以下, 类风湿因子在 100IU/mL 以下, 不影响测定, 结果见表 7。

[0150] 表 7

[0151]

干扰物种类机浓度	测量值	理论值	抗干扰程度 (%)
抗坏血酸 4.5g/L	0.77	0.75	2.67
脂浊 0.3%	0.83	0.81	-2.47
血红蛋白 5g/L	0.75	0.71	-5.63
胆红素 500umol/L	0.76	0.73	-4.11
肝素钠 62.5U/ml	0.85	0.82	-4.94
类风湿因子 (100IU/ml)	0.56	0.58	3.49

[0152] 尽管已参照优选实施例表示和描述了本发明,但本领域技术人员应该理解,在不脱离由权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下,可以对这些实施例进行各种修改和变换。

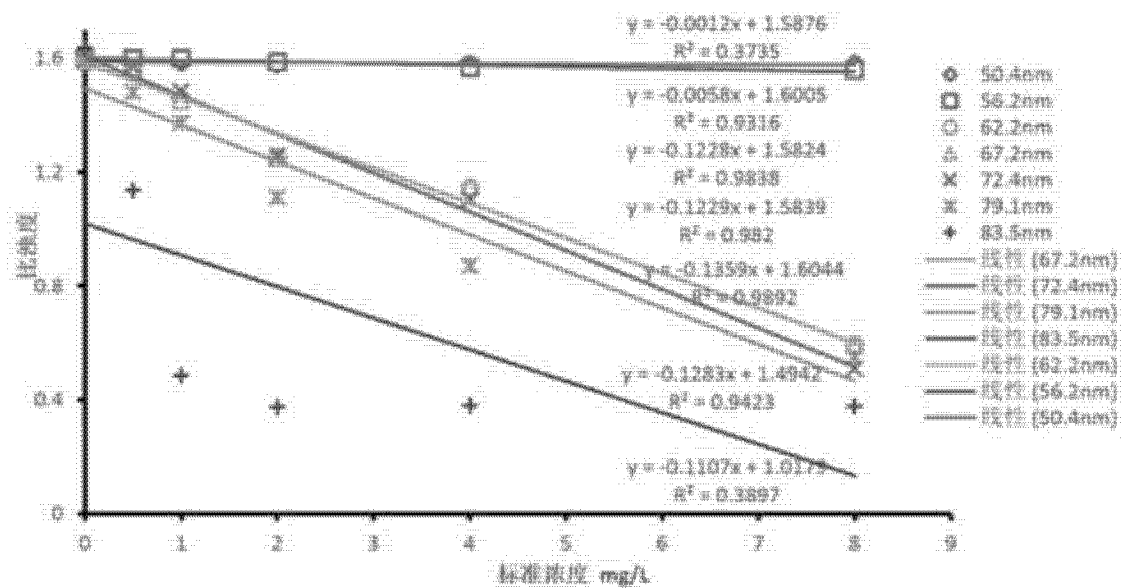


图 1

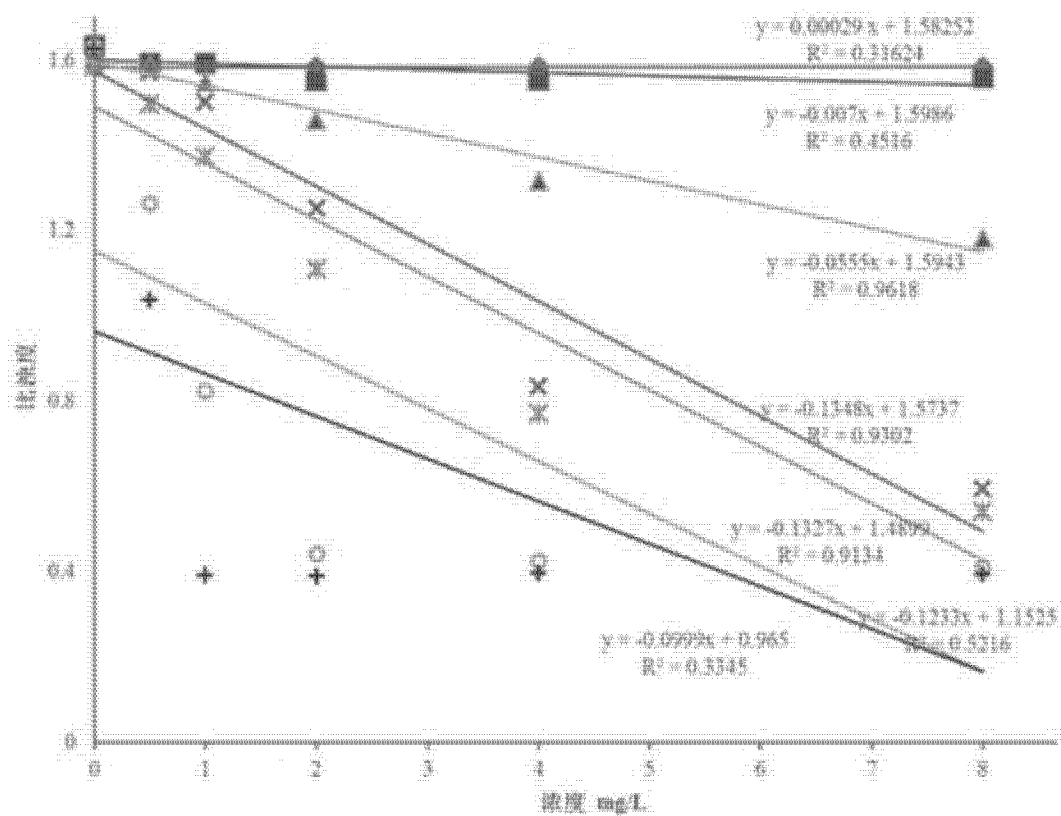


图 2

专利名称(译)	胱抑素C检测试剂盒及其制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN104007259A</a>	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201410193254.X	申请日	2014-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
[标]发明人	侯淑霞 王万霞		
发明人	侯淑霞 王万霞		
IPC分类号	G01N33/553 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54393 G01N2333/8139		
代理人(译)	张瑾		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种胱抑素C检测试剂盒，所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法，包括试剂R2，所述试剂R2为含有标记了胱抑素C抗体的金纳米颗粒的溶液，其特征在于，所述金纳米颗粒的粒径为62.2nm-79.1nm，所述金纳米颗粒和抗体质量比为50：20-60。还本发明还提供该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒具有灵敏度高，特异性强，反应迅速，稳定性好的特点，反应后不产生沉淀，便于生化仪的清洗，延长了生化仪的使用寿命。

