

胱抑素 C 抗体的质量评价及应用分析

李茂森(重庆市铜梁县人民医院检验科 402560)

【摘要】 目的 将日本进口的胱抑素 C(Cys C)抗体与某公司制备的兔抗 Cys C 抗体、羊抗 Cys C 抗体进行质量检测,初步应用试验评估这 3 种抗体能否用于定量检测血清 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒的研发。**方法** 分别用紫外分光光度法、二喹啉甲酸(BCA)法检测 3 种 Cys C 抗体浓度;以聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测效价;然后将这 3 种 Cys C 抗体分别标记胶体金颗粒,以胶体金免疫比浊法测定血清 Cys C,比较其初步应用性。**结果** 日本进口 Cys C 抗体浓度高达 15.0~16.0 mg/mL,某公司自制兔抗 Cys C 抗体、羊抗 Cys C 抗体浓度范围在 3.0~4.0 mg/mL 之间;聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 3 种抗体纯度相近,结果为 85%。其抗体效价大于或等于 1:104;胶体金免疫比浊法测定 Cys C 的临床比对结果证实公司自制抗体与日本进口 Cys C 抗体有较好的可比性。**结论** 某公司的兔抗 Cys C、羊抗 Cys C 抗体与日本进口 Cys C 抗体虽浓度不同,但均具有高纯度和高效价的特点,可用于定量检测血清 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒的研发。

【关键词】 胱抑素 C 抗体; 紫外分光光度法; 二喹啉甲酸法; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 酶联免疫吸附法; 胶体金免疫比浊法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.17.027 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)17-2264-02

Quality evaluation and application analysis of Cys C antibody LI Mao-sen (Clinical Laboratory, Peoples' Hospital of Tongliang Country, Chongqing 402560, China)

【Abstract】 Objective To evaluate quality of three different cystatin C (Cys C) antibodies. **Methods** Imported Cys C antibody, rabbit anti-Cys C antibody and goat anti-Cys C antibody made by a company were detected for concentration by using ultraviolet spectrophotometry and bicinchoninic acid (BCA) method, for purity by using polyacrylamide gel electrophoresis and for titer by using indirect enzyme linked immunosorbent assay. Then the three kinds of Cys C antibody were labeled by colloidal gold particles, and the application value was assessed by detecting serum Cys C concentration in clinical samples. **Results** The concentration of imported Cys C antibody was 15.0—16.0 mg/mL, and that of the company made antibodies were 3.0—4.0 mg/mL. The purities of the three kinds of antibody were similar and reached 85%, the antibody titer were all at least 1:104, and the detected results of Cys C concentration in clinical samples were with fine comparability among the three different test reagents, made by different antibodies. **Conclusion** Concentration of rabbit anti-Cys C antibody and goat anti-Cys C antibody made by a company might different with that of imported antibody, but all of them could be with high purity and titer, and could be used to establish quantitative colloidal gold immunoturbidimetry kit for Cys C detection.

【Key words】 cystatin C antibody; ultraviolet spectrophotometry; bicinchoninic acid method; polyacrylamide gel electrophoresis; enzyme linked immunosorbent assay; colloidal gold immunoturbidimetry

胱抑素 C(Cys C),又称半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C,所有有核细胞都可以合成表达^[1-2],其合成速率十分稳定,不受年龄、性别、体质量、炎症等因素影响。它在体内唯一代谢途径是通过肾脏排泄,因而血清中 Cys C 的浓度主要由肾小球滤过率(GFR)决定^[3]。自 20 世纪中期研究发现 Cys C 能作为一项反映 GFR 的灵敏新指标后^[4],国内外进一步研究结果证实 Cys C 是目前较血清肌酐(Cr)和肌酐清除率(Ccr)更理想的反映 GFR 的内源性标志物。它对评价 GFR 具有较高的灵敏度和阳性率的特点^[5],可作为肾功能损伤的早期评价指标。

市场销售的 Cys C 检测试剂盒多为进口,价格昂贵,影响 Cys C 在临床检测的推广应用^[6]。为提高 Cys C 测定的普及率,建立自动化、快速且准确、检测通量高的定量检测 Cys C 的胶体金免疫比浊法,某公司自制了两种 Cys C 抗体作为标记胶体金的原材料,预用于检测 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒的研发。抗体质量控制是试剂盒的研发的重要环节之一,因而本文将某公司自制的抗体与进口抗体做质量检测及其初步应用比较,评估其是否能够用于检测 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒的研发,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 分光光度计购自通气 GE 医疗器械公司,型号为 GeneQuant1300;漩涡振荡器购自江苏省姜堰市康泰医疗器械厂,型号为 XK95-B;通风柜购自苏州安泰空气技术有限公司,型号为 FM;电热恒温水浴箱购自上海医疗器械七厂,型号为 HH. S2-6。蛋白质电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司,型号为 KX-FC318CN;酶标仪购自美国 Thermo 公司,型号为 MK3;洗板机购自美国 Thermo 公司,型号为 MK2;高速低温离心机购自德国 eppendorf 公司,型号为 5418;电子天平购自德国 Sartorius 公司,型号为 BS110S;水浴恒温振荡器购自江苏金坛市金城国胜实验仪器厂,型号为 WD-9405B;日立全自动生化仪 7170。

1.1.2 试剂 进口 Cys C 抗体(由某公司购自日本);兔抗 Cys C 抗体(由某公司提供);羊抗 Cys C 抗体(由某公司提供)。牛血清清蛋白购自美国 Amresco 公司;BCA 法蛋白质测定试剂盒购自康为世纪有限公司;考马斯亮蓝 G-250 购自德国 AppliChem 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG

购自美国 Thermo 公司; 四甲基联苯胺 (TMB) 购自 TIAN-GEN 公司; PBS 使用液、30% 聚丙烯酰胺由研发中心配制; 蛋白分子量标准 (Marker) 购自 Fermentals 公司; 某公司生产的 Cys C (胶体金免疫比浊法) 测定试剂盒 (批号: 0910241); 某公司的 Cys C (胶体金免疫比浊法) 测定试剂由研发中心标记配制, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗体浓度的检测 紫外分光光度计法检测抗体浓度。测定 3 种 Cys C 抗体的 280 nm 与 260 nm 波长的吸光度, 以及相应的浓度, 在一般测定工作中, 可利用 280 nm 及 260 nm 下的吸收差求出样品浓度。

样品浓度 (mg/ml) = 1.45A₂₈₀ - 0.74 A₂₆₀

GE 分光光度计直接测得 A₂₈₀、A₂₆₀ 及浓度, 可求得样品稀释后浓度平均值与总浓度。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 检测抗体纯度

1.2.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清抗体的效价

1.2.4 抗体标记胶体金试剂的初步应用 (1) 胶体金免疫比浊法的原理: 采用胶体金免疫比浊法测定 Cys C, 试剂中含有 Cys C 抗体标记的胶体金颗粒, 该颗粒在 540 nm 左右的波长范围具有最大吸收波长, 与样本中 Cys C 抗原发生特异性反应时, 最大吸收波长处的吸光度下降, 其下降程度与 Cys C 的浓度相关。根据工作曲线即可计算出样本中 Cys C 的含量。(2) 参数设定与校准: 按日立 7170 型全自动生化分析仪标准操作 SOP 设定测定参数, 将校准品密闭避光轻轻混匀 10 min, 用前颠倒混匀数次即可, 防止起泡沫。设置多浓度多点校标 (校准类型 Log-4P), 选重复校标, 将校准品以及试剂放在系统设置的相应位置。根据多点校准品浓度和对应吸光度变化值 ΔA, 采用多点非线性校准法 Log-4P 确定工作曲线, 所测样本吸光度变化在工作曲线上相对应的浓度值即为所测浓度。(3) 临床比对: 按上述操作方法将某公司胱抑素 C 检测试剂盒 (胶体金免疫比浊法) 进行校准后, 与上述的三种抗体标记的胶体金试剂一起分别测定不同的 40 份临床血清标本。

1.3 统计学方法 用 SPSS10.0 软件统计分析处理。

2 结 果

2.1 抗体浓度的检测 紫外分光光度计法测定 3 种 Cys C 抗体浓度结果见表 1。

表 1 3 种 Cys C 抗体的浓度检测结果

抗体样本	A ₂₈₀	A ₂₆₀	稀释后浓度 平均值 (mg/mL)	总浓度 (mg/mL)
进口 Cys C 抗体	0.301	0.199	0.314	15.70
自制兔抗 Cys C 抗体	0.875	0.766	0.773	3.87
自制羊抗 Cys C 抗体	0.296	0.191	0.313	3.13

2.1.2 BCA 法 用分光光度计测定 562 nm 波长处各浓度标准品相应的吸光度值, 建立 BCA 法测定蛋白的校准曲线。根据分光光度计测定 562 nm 波长处各抗体样本的相应的吸光度值, 通过 BCA 法测定蛋白的校准曲线得出抗体样本浓度, 见表 2。

2.2 SDS-PAGE 检测抗体的纯度 自制抗体经纯化后, 杂蛋白被去掉, 在约 45.0 × 10³ 以目的蛋白为主, 且 3 种 Cys C 抗体的重链、轻链显示清楚, 初步估计其纯度达 85%, 见图 2。

2.3 ELISA 间接法检测 Cys C 抗体的效价 抗体的阳性判定标准为: 抗体的 OD450 绝对值大于或等于 0.2, 且同稀释度

抗体组的 OD450 值大于或等于 2.1 倍阴性对照组 (正常血清测定组)。通过 ELISA 检测 3 种不同的 Cys C 抗体的结果: 进口 Cys C 抗体效价高达 1 : 105, 自制兔抗 Cys C 抗体与自制羊抗 Cys C 抗体也具有较高的抗体效价, 均为 1 : 104。

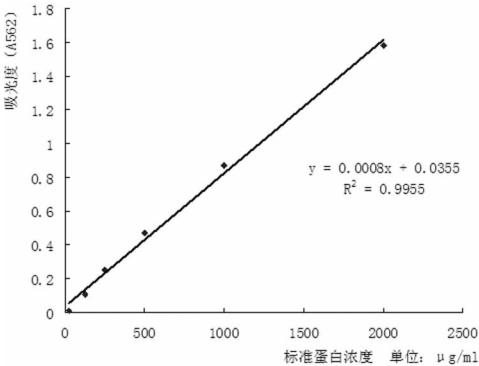
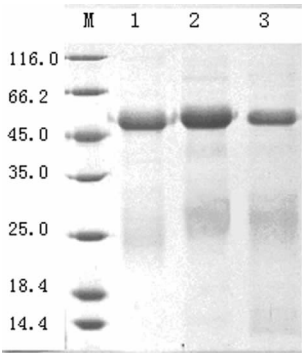


图 1 BCA 法测定蛋白的校准曲线

表 2 3 种 Cys C 抗体的浓度检测结果

抗体样本	稀释后浓度 (mg/mL)	总浓度 (mg/mL)
进口 Cys C 抗体	0.320	16.00
自制兔抗 Cys C 抗体	0.745	3.73
自制羊抗 Cys C 抗体	0.318	3.18



注: M: 蛋白质标准相对分子质量 (Marker); 1: 进口 Cys C 抗体; 2: 自制兔抗 Cys C 抗体; 3: 自制羊抗 Cys C 抗体。

图 2 3 种 Cys C 抗体的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳图

2.4 抗体标记胶体金试剂的初步应用

2.4.1 校准 根据试验数据建立胶体金免疫法测定 Cys C 的校准曲线, 见图 3。

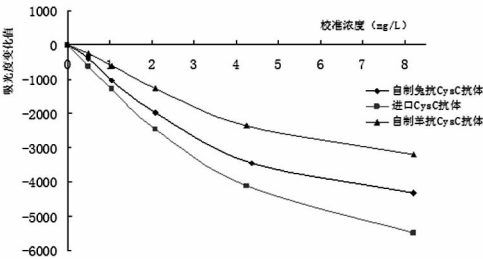


图 3 3 种 Cys C 抗体标记胶体金配制试剂的校准曲线

2.4.2 临床比对 3 种抗体标记的胶体金试剂分别测定不同的 40 份临床血清标本, 其检测值与某公司胱抑素 C 检测试剂盒 (胶体金免疫比浊法) 的检测值的相关图, 见图 4。

性高血压患者的血清 Hcy 浓度明显增高,差异具有统计学意义($P<0.05$);同时,随着患者危险程度的上升,血清 Hcy 的浓度也逐步升高,对照组的 Hcy 浓度明显低于患者组,高血压中危组 Hcy 浓度明显低于高危组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。这与相关报道^[7-8]原发性高血压危险分层和 Hcy 浓度水平呈正相关关系的结论一致。

Hcy 是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的重要产物,只有少量以还原型同型半胱氨酸存在于血浆中,大部分都与蛋白质结合,其主要代谢器官为肝脏和肾脏^[9]。Hcy 不仅能引起血管内皮细胞的损伤,促进平滑肌细胞的增值、迁移,还能够促进血栓形成,从而导致冠状动脉硬化的发生发展,同时当它与其他心血管危险因素合并时,能够极大增加对血管的破坏^[10]。有研究显示^[11] Hcy 可能引起原发性高血压的机制有以下几种:(1) Hcy 可以促进血管壁中的弹性纤维溶解,刺激平滑肌细胞增生,导致血管壁结果改变;(2) Hcy 抑制内皮细胞 DNA 合成,促使自由基和活性氧化物大量生成,改变血管壁弹性,导致炎症和管壁斑块形成,形成血栓或动脉粥样硬化,最终导致心脏血流受阻,形成高血压。

综上所述,高 Hcy 血症很可能是诱发原发性高血压并能显示其发展程度的一个独立危险因素,同时测定 Hcy 还可以预测心血管疾病的发生,因此它对预防高血压具有重要的临床意义,可以为临床诊断和治疗提供理论依据。

参考文献

[1] 徐艳秋. 原发性高血压患者血清同型半胱氨酸浓度变化的观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(1): 7-8.
[2] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南

(2010 修订版; 第三版)[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-743.
[3] 普永冰, 黄树华, 何芳. 同型半胱氨酸在高血压患者中检测分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 09(6): 709.
[4] 杨炳强, 吴甲文. 同型半胱氨酸与高血压的相关性探讨[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 05(5): 91-92.
[5] 邵宏斌, 吕金龙. 血同型半胱氨酸检测在高血压病及其血管性疾病中的应用[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(7): 1614.
[6] 高丽平, 张耀华, 张红旗. 同型半胱氨酸与高血压相关性分析[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(34): 8396-8397.
[7] 费凤英, 王金金, 祝新华. 血浆同型半胱氨酸与原发性高血压关系的研究[J]. 医学信息: 下旬刊, 2010, 23(5): 1233-1234.
[8] 姚光辉, 余新, 朱红梅. 高血压患者血浆同型半胱氨酸水平与危险分层的关系[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(9): 751-752.
[9] 马如华, 阎晓英, 卢星文. 同型半胱氨酸与脑梗死及原发性高血压病的相关性研究[J]. 海南医学, 2012, 23(7): 24-25.
[10] 韦叙. 同型半胱氨酸与心血管疾病的关系[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(3): 280-282.
[11] 高嵩, 危春英, 陈开森. 原发性高血压患者血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白及叶酸的变化及意义[J]. 检验医学与临床, 2011, 08(18): 2243-2244.

(收稿日期: 2013-01-18 修回日期: 2013-04-19)

(上接第 2265 页)

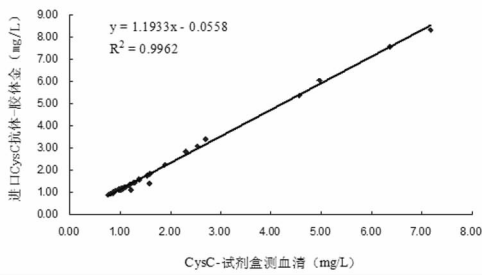


图 4 进口 Cys C 抗体标记胶体金配制试剂与某公司 Cys C 检测试剂盒(胶体金免疫比浊法)的检测值的相关图

3 讨 论

进口 Cys C 抗体与自制 Cys C 抗体的浓度有较大差异,进口的抗体浓度较大,达 15.0~16.0 mg/mL,而两种自制抗体浓度在 3.0~4.0 mg/mL 之间,这主要在于抗体的制备和纯化技术上存在差异,需进一步改进。通过 SDS-PAGE 电泳图可以看到,洗脱纯化后的抗体,几乎无杂蛋白,其纯度相近,均达 85%。ELISA 检测该 3 种 Cys C 抗体效价,结果进口 Cys C 抗体偏高。3 种 Cys C 抗体分别标记胶体金的试剂校准曲线表现了其反应性差异,自制抗体较进口抗体低,尤其是羊抗 Cys C 抗体。临床比对实验证实 3 种抗体标记的胶体金试剂的检测值与其他试剂比较,具有较好的正相关性,并且 b 接近 1, a 接近 0, $R^2>0.98$, 可以认为符合临床要求^[7]。

综上所述,3 种 Cys C 抗体的质量检测,浓度不同、纯度相同、效价不同,但临床对比检测结果之间的可比性较好。即某公司的 Cys C 抗体制备成功,虽存在反应性较低的缺点,但可

经调整后用于检测 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒的研发。希望在以后的研发中,通过进一步系统的方法学评价和优化条件,能提高反应性,降低检测成本,为检测 Cys C(胶体金免疫比浊法)试剂盒提供原料基础,推动其临床应用。

参考文献

[1] Filer G, Prien F, Vollmerl, et al. Diagnostic sensitivity of serum cystatin for impaired glomerular filtration rate[J]. Pediatr Nephrol, 2004, 13(6): 501-505.
[2] Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review[J]. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(4): 389-395.
[3] 胡琼, 郑锦仁, 杨靖. 胱抑素 C 的临床研究进展与应用[J]. 中国医学检验杂志, 2008, 9(5): 299-302.
[4] 刘欣. 血清胱抑素 C 测定及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 473-474, 477.
[5] 李海霞, 吴红花, 徐国宾, 等. 血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与肌酐在评价糖尿病患者肾小球滤过功能中的比较研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(6): 602-605.
[6] 任爱英, 王凡. 血清胱抑素 C 的临床应用及研究[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(1): 32-34.
[7] 陈婷梅, 俸家富, 涂植光. 人胱抑素 C 单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(9): 828-830.

(收稿日期: 2013-01-21 修回日期: 2013-04-12)