



# 技术报告

临床和研究领域

心肌标志物



肾病



## 人胱抑素C



**胱**抑素C是一种低分子量（13.4kDa蛋白质，是血液中各种半胱氨酸蛋白酶的抑制剂。它可以抑制内源性蛋白酶，例如溶酶体组织蛋白酶，以及寄生虫和微生物的蛋白酶。胱抑素C与目标分子以竞争可逆性方式结合，结合常数在 $\mu\text{M}$ 到低于 $\text{pM}$ 范围内（1）。基于它的重要功能，胱抑素C在大多数有核细胞的表达很稳定。胱抑素C含有120个氨基酸残基，其基因长7.3kb，位于20号染色体（2）。其序列上的Leu68Gln突变与遗传性胱抑素C淀粉样血管病（HCCAA）有直接的关系，有这种疾病的患者会出现反复的脑出血（3）。

在临床实践中，胱抑素C是一个大家熟悉的肾功能衰竭血清标记物，其浓度不受年龄、性别和肌肉多少的影响（4，5）。与此同时，胱抑素C已成为心血管病并发症（例如心肌梗死和中风）死亡风险上升的一个标记物（5）。胱抑素C体内生成率稳定、分子量低导致被肾小球自由过滤，以及带正电荷（理论等电点9.3）等特点使其成为目前临床实践中肾功能血清标记物的首选。以肌酐为基础的计算方法来估计肾小球滤过率（GFR）对某些非肾源性因素敏感，例如年龄、性别、种族和肌肉量。由于不受这些因素影响，越来越多的报道证实胱抑素C应是检测GFR的首选，而不是肌酐（5）。

胱抑素C还是一个比肌酐更灵敏的轻度肾功能不全的标记物（6）。由于检测方法不同，健康个体血浆（血清）胱抑素C的浓度在0.8到1.2mg/l范围内（7）。血清中胱抑素C浓度的升高几乎都与GFR降低有关。多种肾脏疾病均会导致血清胱抑素C的浓度升高大约2倍（7）。血清胱抑素C浓度的升高同样是老年人心血管病死亡风险的有效标记物（5）。

由于胱抑素C经肾小球滤过后，被近端肾小管代谢，所以它在尿液中浓度很低（健康人的浓度为 $100\mu\text{g/l}$ ）。但是，患有肾小管疾病的患者尿液中胱抑素C的浓度可升高大约200倍（8）。从人尿液中提取的胱抑素C一部分已不完整，所以不适用于作为免疫检测系统标准品（9）。

HyTest公司提供开发胱抑素C免疫检测系统的所有试剂—人重组胱抑素C、人体血液中提纯的天然胱抑素C、抗胱抑素C多克隆抗体以及一系列高亲和力识别人胱抑素C分子不同部位的单克隆抗体。我们还提供给我们的客户用于体液胱抑素C定量夹心免疫检测系统的最佳单抗组合。

## 人胱抑素C抗原

HyTest公司提供大肠杆菌中表达的全长重组人胱抑素C，其N端有一个额外的蛋氨酸残基。此蛋白是通过多种层析株提纯获得（图1）。

在大肠杆菌中表达的人重组胱抑素C、混合人血清中纯化的胱抑素C和人尿液中纯化的胱抑素C的免疫化学性质，通过7种HyTest胱抑素C原型免疫测定试剂进行了分析（图2）。

在所有的检测中，我公司的人重组胱抑素C和人混合血清中提取的胱抑素C都与入血清中的胱抑素C有非常相似的免疫活性。但是，在7个免疫检测系统的4个结果中，人尿液中纯化的胱抑素C的免疫活性却明显降低。这可能是由于人尿液中纯化的胱抑素C被截断。这些数据表明重组和血液中提纯的抗原比尿液中提纯的蛋白更适合被用作胱抑素C免疫检测系统的标准品和校准品。

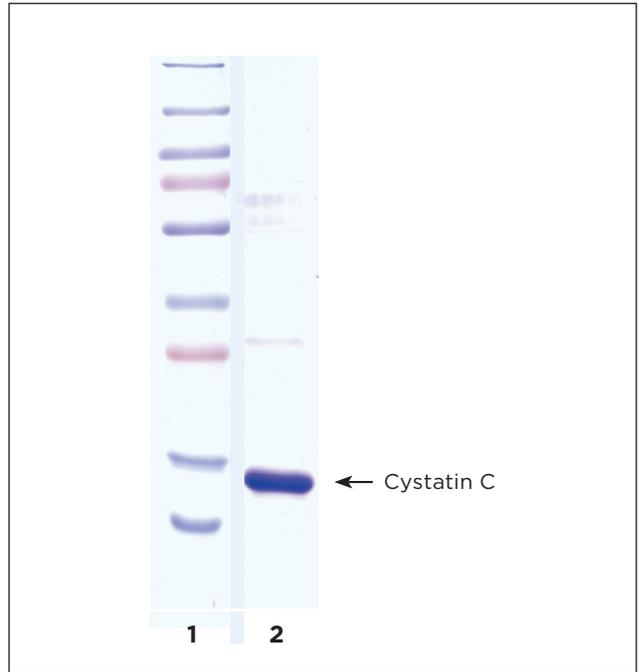


图1.大肠杆菌中表达的人重组胱抑素C还原性SDS-PAGE结果

泳道1：分子量标准品，Fermentas（250，130，92，75，55，36，28，17和11 kDa）

泳道2：大肠杆菌中表达的人重组胱抑素C，5 μg。

凝胶染色：考马斯亮蓝R-250。

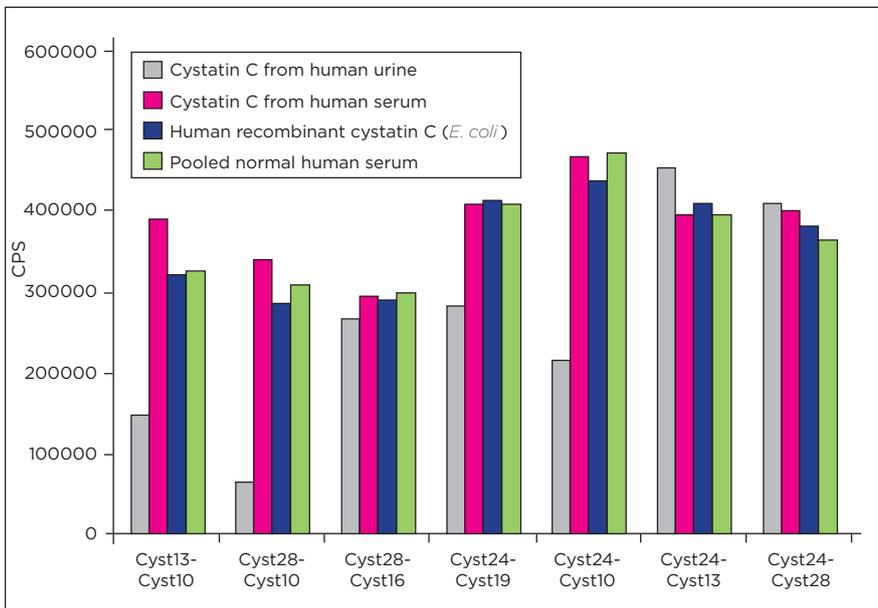


图2. 3种形式的胱抑素C蛋白与正常人混合血清中抗原的免疫化学性质对比。分析物为胱抑素C溶液（浓度都为10ng/ml）与稀释的正常人混合血清。

夹心法荧光免疫测定法测定胱抑素C：

捕获抗体：Cyst13、Cyst28和Cyst24。

检测抗体：Cyst10、Cyst16、Cyst13、Cyst19和Cyst28，Eu<sup>3+</sup>标记。

### 胱抑素C单克隆抗体

杂交瘤细胞由Sp2/O骨髓瘤细胞和用人尿液中提取的胱抑素C免疫的Balb/c小鼠的脾细胞融合而产生。选出了能与胱抑素C特异性和高亲和力反应的单抗。

### 胱抑素C免疫印记检测

单克隆抗体Cyst13、Cyst19cc可被用于胱抑素C免疫印记检测（图3）。

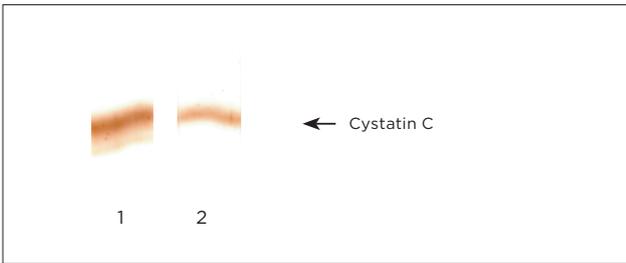


图3.胱抑素C还原性Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳不同单克隆抗体进行免疫印记检测。

泳道1：单抗Cyst13  
泳道2：单抗Cyst19cc  
抗原：人尿液（RDI）中提纯的胱抑素C，0.2 μg/泳道。

### 与其他动物血清的交叉反应

在使用人抗原产生的胱抑素C单抗的所有可能夹心配对中，我们选出了与狗、猫或马血清有强交叉反应的抗体对（表1）。

表1. 胱抑素C单抗与不同动物血清的交叉反应。

通过夹心荧光免疫检测法检测交叉反应；捕获单抗-检测单抗配对如表所示，所有配对都识别正常人混合血清。无交叉反应（-），7-30%交叉反应（+），或30-90%交叉反应（++）。

	狗	猫	马
Cyst29 - Cyst11	+	+	-
Cyst29 - Cyst16	+	++	-
Cyst11 - Cyst20	++	+	-
Cyst29 - Cyst20	+	++	++
Cyst11 - Cyst29	+	+	-
Cyst16 - Cyst29	+	+	-
Cyst20 - Cyst29	-	+	++
Cyst20 - Cyst13	-	-	++
Cyst29 - Cyst13	-	-	++

### 胱抑素C定量夹心免疫分析

所有筛选出的单抗都作为捕获抗体和检测抗体经定量夹心免疫方法测试，此法使用了纯化人抗原和混合血清样品（图4和5）。我公司推荐最佳抗体配对（捕获抗体-检测抗体）为：

Cyst24cc - Cyst19cc  
Cyst24cc - Cyst28  
Cyst23cc - Cyst13

这些抗体对展示了高灵敏度和极佳的血液样品抗原识别能力。

最佳单抗组合甚至可以在100,000倍稀释的血清中检测到抗原（图5）。对于所有的检测系统，我们都观察到纯化人胱抑素C和系列稀释混合血清样品滴定曲线的高度平行性。

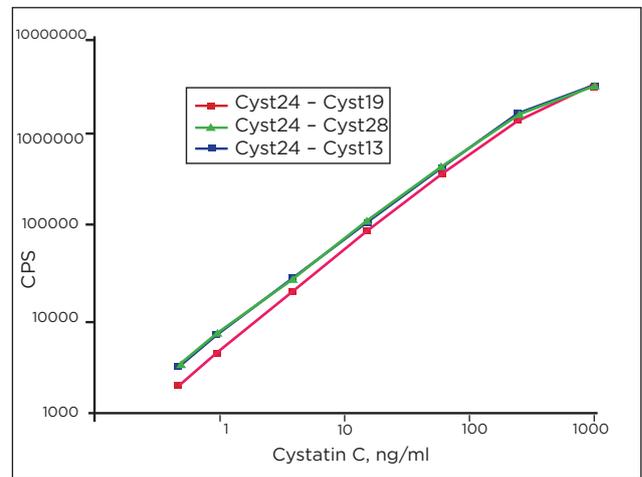


图4. 最佳免疫检测系统的校准曲线

链酶亲和素包被在微孔板上，一步法荧光免疫检测系统。  
捕获单抗：生物素化Cyst24和Cyst23（200 ng/孔）。  
检测单抗：镧标记Cyst19、Cyst28或Cyst13（200 ng/孔）。  
反应体积：100 μl。  
反应时间：室温下30分钟。

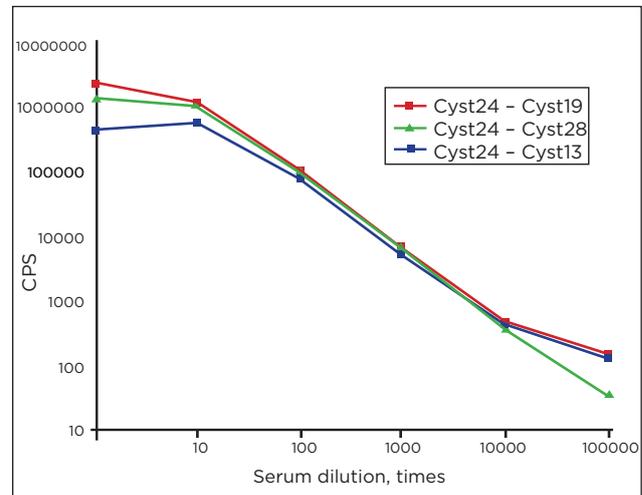


图5. Cyst24-Cyst19、Cyst24-Cyst28和Cyst23-Cyst13（捕获抗体-检测抗体）夹心荧光免疫检测系统检测正常人混合血清的滴定曲线

## 胱抑素C多克隆抗体

胱抑素 C 多克隆抗体通过用高度纯化 (>95%) 的大肠杆菌表达的人重组胱抑素 C 免疫山羊产生的。亲和层析使用人重组胱抑素 C 琼脂糖,从而确保了制备高度纯化的且不含有山羊血清蛋白和非特异性免疫球蛋白的胱抑素 C 多克隆抗体。

## 胱抑素C基质

胱抑素 C 基质由正常人混合血清通过免疫亲和层析制备。胱抑素 C 基质可用于制备标准品和校准品。

## 订购信息

### 单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	备注
胱抑素 C	4CC1	Cyst10	IgG3	EIA
		Cyst11	IgG1	EIA, 与犬和猫血清有交叉反应
		Cyst13	IgG1	EIA, WB, 与马血清有交叉反应
		Cyst16	IgG1	EIA, 与犬和猫血清有交叉反应
		Cyst19cc	IgG1	体外生产, EIA,WB
		Cyst20	IgG1	EIA, 与犬、猫和马血清有交叉反应
		Cyst23	IgG1	EIA
		Cyst24cc	IgG1	体外生产, EIA
		Cyst28	IgG1	EIA
		Cyst29	IgG2a	EIA, 与犬、猫和马血清有交叉反应

### 多克隆抗体

产品名称	货号	宿主	备注
胱抑素 C	PCC2	山羊	EIA, WB, IP

### 基质

产品名称	货号	来源
胱抑素 C 基质	8CCFS	混合正常人血清

请注意技术资料中所呈现的数据使用的是体内生产版本的单克隆抗体。体外生产版本的单克隆抗体具有相同的性能。

## 参考文献

- Turk B, Turk D and Salvesen GS:** Regulating Cysteine Protease Activity: Essential Role of Protease Inhibitors As Guardians and Regulators. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8, 1623-1637.
- Schnittger S, Rao VV, Abrahamson M, Hansmann I:** Cystatin C (CST3), the candidate gene for hereditary cystatin C amyloid angiopathy (HCCAA), and other members of the cystatin gene family are clustered on chromosome 20p11.2. *Genomics*. 1993; 16(1): 50-5.
- Palsdottir A, Snorraddottir AO, Thorsteinsson L:** Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain Pathol*. 2006; 16(1): 55-9.
- Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP:** Cystatin C: current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(12): 1664-86.
- Taglieri N, Koenig W, Kaski JC:** Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem*. 2009; 55(11): 1932-43.
- Artunc FH, Fisher IU, Risler T, Erley CM:** Improved estimation of GFR by serum cystatin C in patients undergoing cardiac catheterization. *Int J Cardiol*. 2005; 102(2): 173-8.
- Roos JF, Doust J, Tett SE, Kirkpatrick CM:** Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children-A meta-analysis. *Clin Biochem*. 2007; 40(5-6): 383-91.
- Uchida K, Gotoh A:** Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta*. 2002; 323(1-2): 121-128.
- Popović T, Brzin J, Ritonja A, Turk V:** Different forms of human cystatin C. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990; 371(7): 575-80.