

VIII 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 μM 到低于 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7.3 kb,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1.2 mg/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)。

我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。

1 人胰抑素C抗原

1.1 人重组胰抑素C

来源： 重组，大肠杆菌中表达
纯度： >95%
物理状态： 冷冻干燥品
应用： 胰抑素C免疫检测系统的标准品和校准品，胰抑素C生物化学和免疫化学研究
保存： -20℃

我公司提供大肠杆菌中表达的全长重组人胰抑素C，其N端有一个多出的蛋氨酸残基。这个蛋白是通过几种层析方法提纯的（图64）。

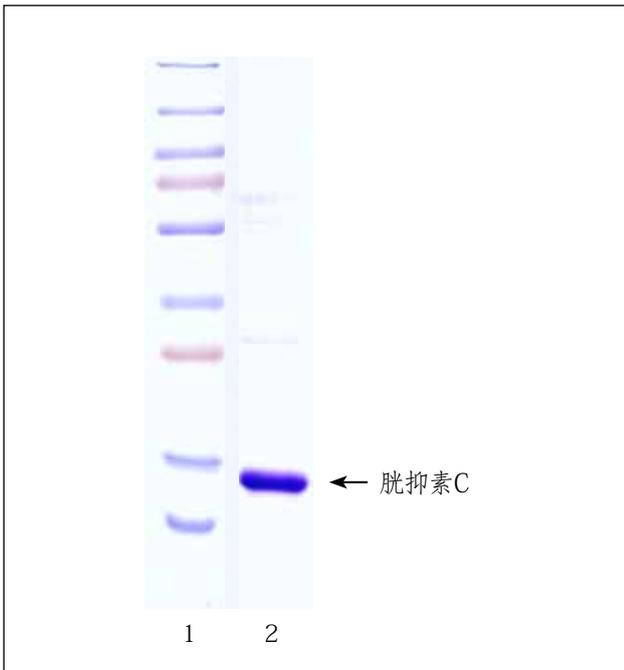


图64 大肠杆菌中表达的人重组胰抑素C还原性SDS-PAGE结果
泳道1：分子量标准品，Fermentas (250, 130, 92, 75, 55, 36, 28, 17和11 kDa)
泳道2：大肠杆菌中表达的人重组胰抑素C, 5 μ g。
凝胶染色：考马斯亮蓝R-250。

1.2 人血液中提纯的胰抑素C 新产品!

来源： 人混合血清
纯度： >95%
物理状态： 冷冻干燥品
应用： 胰抑素C免疫检测系统的标准品和校准品，胰抑素C生物化学和免疫化学研究
保存： -20℃

我公司提供从正常人混合血清中提纯的天然人胰抑素C。这个蛋白是通过几种层析方法提纯的（图65）。

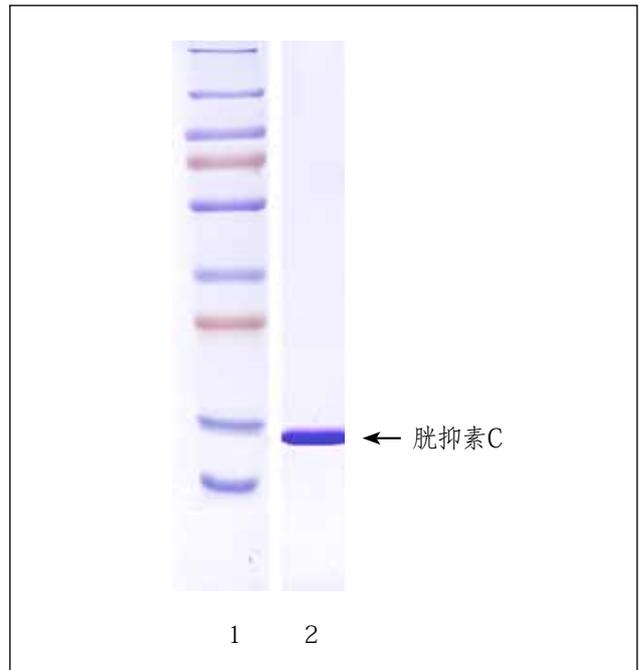


图65 正常人混合血清中胰抑素C还原性SDS-PAGE结果
泳道1：分子量标准品，Fermentas (250, 130, 92, 75, 55, 36, 28, 17和11 kDa)
泳道2：正常人混合血清中胰抑素C, 5 μ g。
凝胶染色：考马斯亮蓝R-250。

大肠杆菌中表达的人重组胱抑素C、人混合血清中提取的胱抑素C, 以及人尿液 (RDI) 中提取的胱抑素C都经过了本公司7个胱抑素C原始免疫检测系统分析 (图66)。

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, 人尿液中提取的胱抑素C的免疫活性却明显降低。这可能是由于人尿液中提取的胱抑素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。

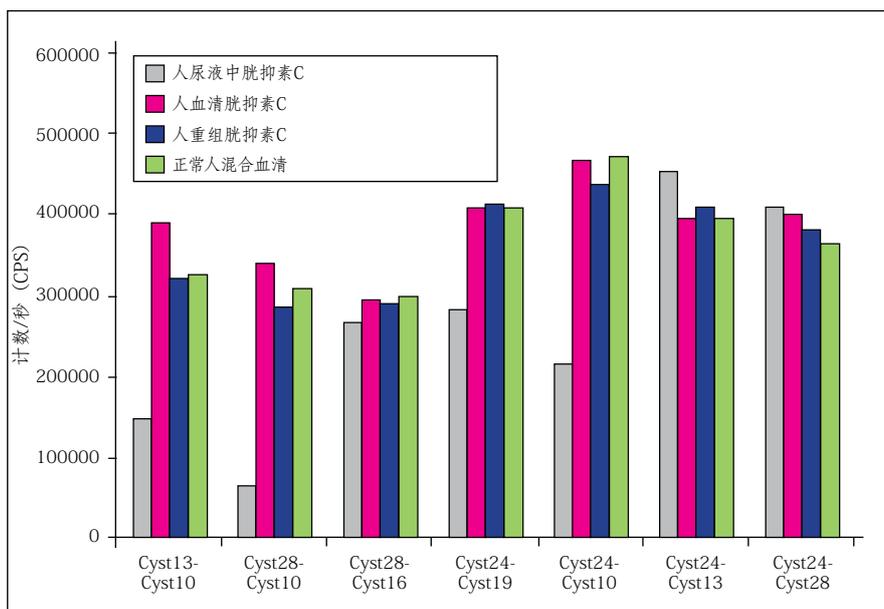


图66 三种形式的胱抑素C蛋白与正常人混合血清中抗原的免疫化学性质对比
分析物为胱抑素C溶液 (浓度都为10 ng/ml) 与稀释的正常人混合血清。
使用夹心荧光免疫检测系统检测胱抑素C:
捕获单抗: Cyst13、Cyst28和Cyst24。
检测单抗: Cyst10、Cyst16、Cyst13、Cyst19和Cyst28为锚标记。

订购信息

产品名称	目录号	纯度	来源
人重组胱抑素C	8CY5	>95%	大肠杆菌
人内源性胱抑素C	8CN4	>95%	人混合血清

2 抗胱抑素C单克隆抗体

宿主动物: Balb/c小鼠
融合用细胞系: Sp2/0
抗原: 人胱抑素C
提纯方法: 蛋白A亲和层析
物理状态: 单抗溶于PBS, 并含有0.1%叠氮钠
应用: 胱抑素C免疫检测系统, 胱抑素C免疫印记检测

杂交瘤细胞由Sp2/0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。

8株能与胱抑素C特异性和高亲和力反应的单抗被筛选出。

2.1 应用

2.1.1 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67和68）。我公司推荐最佳抗体对（捕获抗体-检测抗体）为：

Cyst24 - Cyst19

Cyst24 - Cyst28

Cyst23 - 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68）。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。

Biacore技术测定得出的单抗Cyst10和Cyst24（RDI中的人胱抑素C作为抗原）的亲合和常数：

Cyst24 - 1.09×10^{-8} M

Cyst10 - 5.55×10^{-8} M

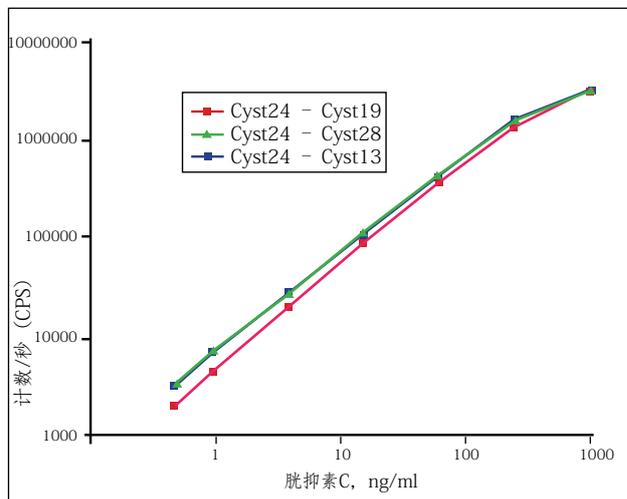


图67 最佳免疫检测系统的校准曲线
链酶亲和素包被板上一步荧光免疫检测系统。
捕获单抗：生物素化Cyst24和Cyst23（200 ng/孔）。
检测单抗：钕标记Cyst19、Cyst28或Cyst13（200 ng/孔）。
反应体积：100 μ l。
反应时间：室温下30分钟。

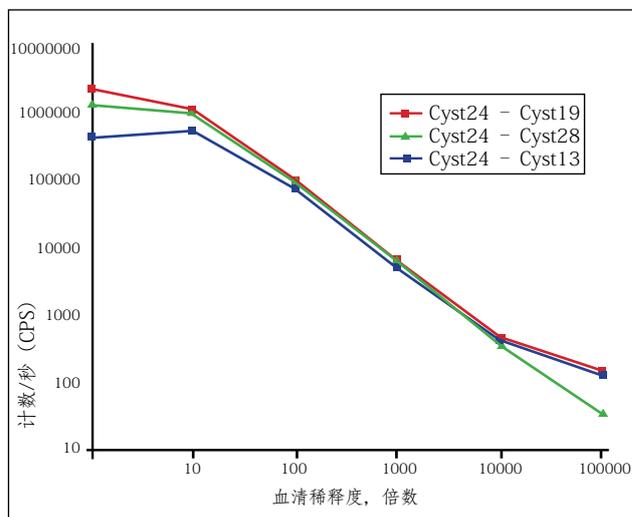
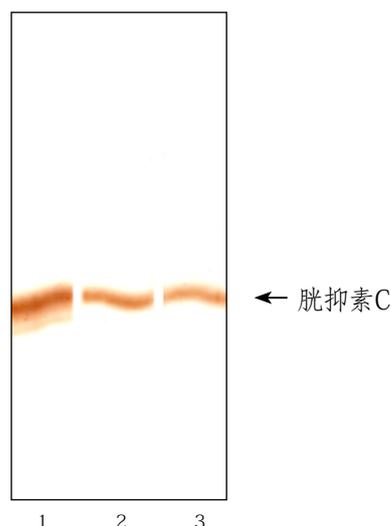


图68 Cyst24 - Cyst19、Cyst24 - Cyst28和Cyst23 - Cyst13（捕获抗体 - 检测抗体）夹心荧光免疫检测系统检测正常人混合血清的滴定曲线

2.1.2 胱抑素C免疫印记检测

单克隆抗体—Cyst13、Cyst18和Cyst19—可被用于胱抑素C免疫印记检测(图69)。

图69 胱抑素C经还原性Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳后通过不同的单克隆抗体进行免疫印记检测
泳道1: 单抗Cyst13
泳道2: 单抗Cyst18
泳道3: 单抗Cyst19
抗原: 人尿液(RDI)中提纯的胱抑素C, 0.2 μg/泳道。



2.1.3 与其他动物血清的交叉反应 **新资料!**

在使用人抗原产生的抗胱抑素C单抗的所有可能夹心组合中, 我们选出了与狗、猫或马血清有强交叉反应的抗体对(表9)。

表9 抗胱抑素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	-	-	++

订购信息

单抗名称	目录号	特异性	类别	应用
Cyst10	4CC1	人胱抑素C	IgG3	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst11	4CC1	人胱抑素C, 与狗和猫血清有交叉反应	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst13	4CC1	人胱抑素C, 与马血清有交叉反应	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay, WB
Cyst16	4CC1	人胱抑素C, 与狗和猫血清有交叉反应	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst18	4CC1	人胱抑素C	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay, WB
Cyst19	4CC1	人胱抑素C	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay, WB
Cyst20	4CC1	人胱抑素C, 与狗、猫和马血清有交叉反应	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst23	4CC1	人胱抑素C	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst24	4CC1	人胱抑素C	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst28	4CC1	人胱抑素C	IgG1	EIA, Sandwich immunoassay
Cyst29	4CC1	人胱抑素C, 与狗、猫和马血清有交叉反应	IgG2a	EIA, Sandwich immunoassay

a.a.r.: 氨基酸残基 EIA: 酶免疫分析 Sandwich immunoassay: 夹心免疫分析
WB: 免疫印记分析 capture: 捕获抗体 detection: 检测抗体

3 抗胱抑素C多克隆抗体 新产品!

宿主动物: 兔
抗原: 人重组胱抑素C
提纯方法: 亲和层析, 使用人重组胱抑素C琼脂糖
物理状态: 多抗溶于PBS, 并含有0.1%叠氮钠

抗胱抑素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免疫兔而产生。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, 不含有兔血清蛋白和非特异性免疫球蛋白的抗胱抑素C多克隆抗体。

订购信息

产品名称	目录号	宿主动物	备注
抗胱抑素C多克隆抗体	PCC2	兔	酶免疫分析, 免疫印记分析, 免疫沉淀分析

4 无胱抑素C血清

来源: 正常人混合血清
提纯方法: 免疫亲和层析
物理状态: 冰冻液体
保存: -20°C

无胱抑素C血清由正常人混合血清通过免疫亲和层析制备。无胱抑素C血清可用作制备标准品和校准品的基质。

血清样品	胱抑素C浓度 (ng/ml)
混合血清 (去除胱抑素C之前)	800
无胱抑素C血清	0.4

订购信息

产品名称	目录号	来源
无胱抑素C血清	SCCFS	正常人混合血清

参考文献:

1. 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.
2. Schnittger S, Rao VV, Abrahamson M, Hansmann I: Cystatin C (CST3), the candidate gene for hereditary cystatin C amyloid angiopathy (HCAA), and other members of the cystatin gene family are clustered on chromosome 20p11.2. *Genomics*. 1993; 16(1):50-5.
3. Palsdottir A, Snorraddottir AO, Thorsteinsson L: Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain Pathol*. 2006; 16(1):55-9.
4. S é ronie-Vivien S, Delanaye P, Pi é ron L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP: Cystatin C: current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46(12):1664-86.
5. Naruse H, Ishii J, Kawai T, Hattori K, Ishikawa M, Okumura M, Kan S, Nakano T, Matsui S, Nomura M, Hishida H, Ozaki Y: Cystatin C in Acute Heart Failure Without Advanced Renal Impairment. *Am J Med*. 2009 Apr [Epub ahead of print]
6. 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.
7. 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.
8. Uchida K, Gotoh A: Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta*. 2002; 323(1-2): 121-128.
9. Popovi T, Brzin J, Ritonja A, Turk V: Different forms of human cystatin C. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990; 371(7):575-80.