



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103940986 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410111785. X

(22) 申请日 2014. 03. 24

(71) 申请人 安徽省煦棠医疗科技有限公司

地址 246000 安徽省安庆市经济开发区天柱
山路 80 号科技园 1 号楼 305 室

(72) 发明人 李传响

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务
所 11305

代理人 郑明

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及检测试剂盒。本发明是采用定点水解法获得所需人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的三条肽段, 再通过免疫原性修饰后进行动物免疫获得高效价免疫血清, 分别利用水解所提取的三条肽段作为配体, 聚丙烯酰胺为配基制备亲和层析柱, 将获得的高效价血清进行免疫亲和层析, 从而获得针对该肽段特异性识别的多克隆抗体。该抗体其优点是亲和力和高于相应单克隆抗体, 特异性与相应单克隆抗体相当, 且制备成本低, 相对于单克隆抗体制备流程简单。利用获得的三组多克隆抗体制备成免疫乳胶试剂盒可用于半自动或全自动生发分析仪器测定血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量。

1. 一种肌钙蛋白 I 特定位点抗体检测试剂盒,其特征在于该试剂盒包括针对肌钙蛋白 I 氨基端、羧基端和中心区域三条目的肽段的特异性抗体制备的免疫胶乳试剂,缓冲液,促凝剂和氯化钠组成的反应剂。

2. 权利要求 1 所述肌钙蛋白 I 特定位点抗体检测试剂盒,其特征在于其免疫胶乳试剂是按以下方法制备的:

(1) 通过蛋白水解法将如序列 1 所述序列的 cTnI 蛋白序列分解成氨基端,羧基端及中心区域三条如序列 2、序列 3 和序列 4 所述序列目的肽段,并进行纯化的到相应具有半抗原性质的肽段;

(2) 将以上所获得三个肽段经牛血清白蛋白修饰后进行动物免疫,获取作用于该肽段抗原决定簇的抗血清,再利用该肽段制备亲和层析柱进行亲和层析后获取该肽段特异性多克隆抗体纯品;

(3) 利用(2)获取的三种抗体分别与微球进行共价偶联后得到的三种抗体微球按一定比例混合后制备成免疫胶乳试剂。

肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒。本发明是应用作用于人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 单肽链特定位点的抗体, 及采用该抗体制备测定血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量的免疫乳胶试剂的方法。该发明制备的试剂盒可用于半自动或全自动生发分析仪器。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 是心肌损伤敏感及特异性最强的标志物之一, 在急性心肌损伤及心肌炎中作为判断心肌细胞损伤的金标准, 也作为冠心病综合征危险分层及预后的关键生化标志物。肌钙蛋白属于调节蛋白, 分子呈球形, 由肌钙蛋白 T (TnT)、肌钙蛋白 I (TnI)、肌钙蛋白 C (TnC) 三条肽段组成, 其中肌钙蛋白 I (cTnI) 属于一种碱性蛋白, 共 210 个氨基酸, 在血清中游离形式只占 4.1%, 大部分与肌钙蛋白 T 及 C 亚单位结合在一起, 以复合体形式存在 (Ward DG, Cornes MP, Trayer IP. Structural consequences of cardiac troponin I phosphorylation. J Biol Chem, 2002, 277 (44): 41795), 此外还有可能以氧化型、还原型、磷酸化、去磷酸化及蛋白降解形式释放 (Ward DG, Ashton PR, Trayer HR, et al. Additional PKA phosphorylation sites in human cardiac troponin I. Eur J Biochem, 2001, 268 (1): 179), 属于心肌损伤高敏感指标性物质, 在“微型心肌损伤”中肌钙蛋白 I 即可出现阳性结果, 因此是临床上作为心肌细胞损伤的标志性生化检测项目之一。

[0003] 由于肌钙蛋白 I (cTnI) 在血清中存在的形式多样, 而且衰减周期短, 因此对识别肌钙蛋白 I (cTnI) 的抗体有很高要求, 且不同方法制备的抗体在测定肌钙蛋白 I (cTnI) 含量时, 所得结果也完全不同, 使得临床上对肌钙蛋白 I (cTnI) 含量测定无法标准化。

[0004] 临床上对肌钙蛋白 I (cTnI) 的检测灵敏度及特异性要求很高, 虽然测定肌钙蛋白 I (cTnI) 的方法很多, 但是定量测定受到许多因素的影响, 从而导致各种检测结果之间相差很大。其中最主要原因是在患者血清中肌钙蛋白 I (cTnI) 会有不同程度的降解、游离、复合物形式及不同的清除率, 形成肌钙蛋白 I (cTnI) 在血清中的不同半衰期, 因此各种检测方法中分别使用针对上述不同抗原决定簇的抗体, 其免疫反应必然有很大差异。

[0005] 目前关于比浊测定法测定肌钙蛋白 I (cTnI) 的试剂有很多厂家, 但是不管是试剂灵敏度, 还是特异性都很难满足临床检测要求, 这是因为肌钙蛋白 I (cTnI) 在正常人血清中含量极低, 在 0.08ng/ml 以下, 而大多比浊法检测极限在 1ng/ml, 而且在此检测极限情况下, 影响测定结果的因素也被成倍放大。

发明内容

[0006] 本发明的目的是为了解决以上现有技术测定肌钙蛋白 I (cTnI) 的试剂中存在灵敏度, 还是特异性都很难满足临床检测要求的问题, 使得临床上对肌钙蛋白 I (cTnI) 含量测定标准化; 本发明是应用作用于人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 单肽链特定位点的抗体, 及采用该抗体制备测定血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量的免疫乳胶试剂, 该免疫乳胶试剂可用

于半自动或全自动生化分析仪器准确、特异性的测定血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量。

[0007] 本发明的技术方案

[0008] 1 本发明所涉及的肌钙蛋白 I 特定位点抗体检测试剂盒, 包括针对肌钙蛋白 I 氨基端、羧基端和中心区域三条目的肽段的特定位点抗体制备的免疫胶乳试剂, 缓冲液, 促凝剂和氯化钠组成的反应剂。

[0009] 2. 该试剂盒中的免疫胶乳试剂是按以下方法制备的:

[0010] (1) 通过蛋白水解法将如序列 1 所述序列的 cTnI 蛋白序列分解成氨基端, 羧基端及中心区域三条如序列 2、序列 3 和序列 4 所述序列目的肽段, 并进行纯化的到相应具有半抗原性质的肽段;

[0011] (2) 将以上所获得三个肽段经牛血清白蛋白修饰后进行动物免疫, 获取作用于该肽段抗原决定簇的抗血清, 再利用该肽段制备亲和层析柱进行亲和层析后获取该肽段特异性多克隆抗体纯品;

[0012] (3) 利用(2)获取的三种抗体分别与微球进行共价偶联后得到的三种抗体微球按一定比例混合后制备成免疫胶乳试剂。

具体实施方案

[0013] 本发明是采用定点水解法获得所需人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的三条肽段, 再通过免疫原性修饰后进行动物免疫获得高效价免疫血清, 分别利用水解所提取的三条肽段作为配体, 聚丙烯酰胺为配基制备的亲和层析柱, 将获得的高效价血清进行免疫亲和层析, 从而获得针对该肽段特异性识别的多克隆抗体。该抗体其优点是亲和力高于相应单克隆抗体, 特异性与相应单克隆抗体相当, 且制备成本低, 相对于单克隆抗体制备流程简单(Katrukha A, Bereznikova A, Filatov V, et al. Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(11/12):1091)。

[0014] 将上述方法获得的抗体分别与不同粒径的羧基聚苯乙烯胶乳微球进行化学固定后, 在优化反应剂作用的条件下, 与样本中肌钙蛋白 I (cTnI) 发生免疫复合反应, 形成致密立体空间网状结构, 在分光光度检测条件下达到定量测定的目的。

[0015] 具体操作步骤如下:

[0016] 1. 肌钙蛋白 I (cTnI) 不同肽段抗体的制备:

[0017] (1) 按常规方法(D. R. 马歇克 J. T. 门永 R. R. 布格斯等著, 朱厚础译. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 科技出版社, 2000 版。)提取自人血清中的肌钙蛋白 I (cTnI) 肽链, 并进行氨基酸序列测序, 所得氨基酸序列(序列 1):

[0018]

Met Ala Asp gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
 Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
 Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
 Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gin Glu Leu Glu Arg Glu
 Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys
 Gin Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu
 Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr
 Asp Ile GLU Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu
 Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu
 Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gin Ala Leu Leu Gly
 Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val
 Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg
 Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe
 Glu Ser

[0019] (2) 利用蛋白水解酶定点水解肌钙蛋白 I (cTnI) 肽链, 采用凝胶排阻色谱法和反相高效液相色谱法进行肽段分布测定和纯化, 收集需要的肽段。

[0020] 1) 氨基端肽段: 长度为 70 个氨基酸残基, 氨基酸序列在氨基端 1 ~ 70 残基之内 (序列 2):

[0021]

Met Ala Asp gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
 Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
 Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
 Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gin Glu Leu Glu Arg Glu
 Ala Glu Glu Arg Arg Gly

[0022] 2) 中心区肽段: 长度为 82 个氨基酸残基, 氨基酸序列在氨基端 34 ~ 116 残基之内 (序列 3):

[0023]

His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu
 Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gin Glu Leu Glu Arg Glu Ala
 Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Gin
 Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu Cys
 Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp
 Ile Glu

[0024] 3) 羧基端肽段: 长度为 101 个氨基酸残基, 氨基酸序列在氨基端 110 ~ 210 残基之内 (序列 4):

[0025]

Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile
 Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg
 Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gin Ala
 Leu Leu Gly Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu
 Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly
 Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys
 Lys Lys Phe Glu Ser

[0026] 上述水解用蛋白酶可以蛋白酶 K,胰凝乳蛋白酶,无花果蛋白酶,胃蛋白酶,链霉蛋白酶,菠萝蛋白酶,羧肽酶 Y。水解时间为 0.5 ~ 4 小时,本发明优选蛋白酶 K 和羧肽酶 Y,水解时间为 1 小时。

[0027] (3) 用牛血清白蛋白分别将以上氨基端肽段、中心区肽段和羧基端肽段进行修饰,与弗氏佐剂混合对兔进行免疫,也可选用山羊,本发明优选兔。

[0028] 上述选用的肽段修饰载体也可选用鸡卵清蛋白,兔血清白蛋白,纤维蛋白原,优选牛血清白蛋白。

[0029] (4) 获取兔抗人肌钙蛋白 I (cTnI) 各肽段的高效价混合免疫血清,采用高效液相色谱分离纯化获得各区段目标多肽为配体,聚丙烯酰胺为配基的亲合层析柱,将多克隆抗体血清进行亲和层析

[0030] 获得的具有高亲和力和特异性的抗体,分别编号:

[0031] 识别氨基端肽段的抗体为:cTnI-Ab-1

[0032] 识别中心区肽段的抗体为:cTnI-Ab-2

[0033] 识别羧基端肽段的抗体为:cTnI-Ab-3

[0034] 2. 抗人心肌肌钙蛋白 I 抗体致敏的胶乳微球试剂的制备

[0035] (1) 将 cTnI-Ab-1 通过共价连接的方法固定于 160nm 的羧基聚苯乙烯胶乳微球表面。

[0036] (2) 将 cTnI-Ab-2 与 60nm 的羧基聚苯乙烯胶乳微球通过步骤 1 中同样的方法进行固定。

[0037] (3) 将 cTnI-Ab-3 于 250nm 的羧基聚苯乙烯胶乳微球通过步骤 1 中同样的方法进行固定。

[0038] (4) 关于上述将抗体与微球固定过程中可以选择抗体上羧基残基与氨基微球进行固定,上述 3 个步骤中微球粒径可以选择 50 ~ 300nm 中任意三种微球。本发明优选 160nm, 60nm 和 250nm 的羧基微球。

[0039] (5) 将上述三组微球进行 1:2:1 (按质量比) 进行混合,配制成胶乳试剂,混合比例还可以是:1:2:3,1:3:1,2:3:2 三种。

[0040] (6) 反应剂主要成分如下:

[0041]

缓冲液 20~50mmol/L

促凝剂 10~30g/L

氯化钠溶液 9g/L

加纯水至 1000ml

[0042] 其中促凝剂主要选用：聚凝胺，葡聚糖或者聚蔗糖中的一种或两种。

[0043] (7) 胶乳试剂主要成分如下：

[0044]

缓冲液 20~50mmol/L

cTnI-Ab-1 胶乳微球 0.5g/L

cTnI-Ab-2 胶乳微球 1.0g/L

cTnI-Ab-3 胶乳微球 0.5g/L

[0045] 将三组胶乳微球按上述比例混合，加纯水至 1000ml

[0046] 3. 试剂盒的组装

[0047] (1) 试剂 1 (反应剂)

[0048]

缓冲液 20mmol/L

促凝剂 30g/L

氯化钠 9g/L

加纯水至 1000ml。

[0049] (2) 试剂 2 (胶乳试剂)

[0050]

缓冲液 20mmol/L

cTnI-Ab-1 乳胶微球 0.5g/L

[0051]

cTnI-Ab-2 乳胶微球 1.0g/L

cTnI-Ab-3 乳胶微球 0.5g/L

[0052] 将三组胶乳微球按上述比例混合，加纯水至 1000ml

[0053] (3) 标准品：纯化人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 5ng/ml

[0054] pH=5.8 的 PBS 缓冲液

[0055] 备注：测定时，用 pH=5.8 的 PBS 缓冲液将 5ng/ml 标准液按倍比稀释的方法稀释成浓度分别为 5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml、0.313ng/ml 五组标准液，采用五点定标的方式做标准曲线。

[0056] 4. 用该试剂盒定量测定样本中人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的步骤

[0057] (1) 检测仪器及试剂：奥林巴斯 AU640 全自动生化分析仪，本发明配制的液体双试剂(反应试剂和胶乳试剂)。

[0058] (2) 可采用新鲜人血清或重组人心肌肌钙蛋白 I (cTnI)。

[0059] (3) 操作步骤如下表 1:

[0060] 表 1 定量测定样本中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的术式

[0061]

加入物	空白管 (B)	标准管 (Q)	样品管 (T)
R1 (μl)	225	225	225
蒸馏水 (μl)	8	—	—
质控品 (μl)	—	8	—
样 本 (μl)	—	—	8
混合, 37°C 预温 3min 600nm 波长读取各管相对空白管吸光度 A1			
R2 (μl)	75	75	75
混匀, 37°C 预温 2min, 在 600nm 处读取各管相对空白吸光度 A2, 读取吸光度 $\Delta A = A2 - A1$			

[0062] 结果计算: 样品中肌钙蛋白值 ($\mu\text{g/L}$) = $\Delta AT / \Delta AS \times$ 校准液浓度

[0063] 式中: ΔAT : 样本管吸光度值

[0064] ΔAS : 校准管吸光度值

附图说明

[0065] 图 1 目的心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 多肽片段纯度电泳图图中所示 M: Marker, 1: 心肌肌钙蛋白 I (cTnI), 2: 羧基端肽段, 3: 中心区肽段, 4: 氨基端肽段

[0066] 图 2 不同位点抗体与不同肽段的免疫电泳图图中所示 (a) cTnI-Ab-3 分别与氨基端肽段(1), 中心区肽段(2), 羧基端肽段(3)免疫电泳图; (b) cTnI-Ab-2 分别与氨基端肽段(1), 中心区肽段(2), 羧基端肽段(3)免疫电泳图; (c) cTnI-Ab-1 分别与氨基端肽段(1), 中心区肽段(2), 羧基端肽段(3)免疫电泳图

[0067] 图 3 实施例 3 测定结果与 ELISA 法的相关性

[0068] 图 4 实施例 4 测定结果与 ELISA 法的相关性

[0069] 图 5 实施例 5 测定结果与 ELISA 法的相关性

[0070] 本发明的积极意义

[0071] 本发明涉及肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒。本发明是采用定点水解法获得所需人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的三条肽段, 再通过免疫原性修饰后进行动物免疫获得高效价免疫血清, 分别利用水解所提取的三条肽段作为配体, 聚丙烯酰胺为配基制备亲和层析柱, 将获得的高效价血清进行免疫亲和层析, 从而获得针对该肽段特异性识别的多克隆抗体。该抗体其优点是亲和力高于相应单克隆抗体, 特异性与相应单克隆抗体相当, 且制备成本低, 相对于单克隆抗体制备流程简单。利用该免疫乳胶试剂制备的试剂盒可用于半自动或全自动生发分析仪器测定血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量。

[0072] 本发明中使用的试剂购置于国内相关生物试剂公司,

[0073] 实施例

[0074] 以下实施例是为更好的说明本发明,而不对本发明要求保护的技术方案产生限制。

[0075] 实施例 1

[0076] ——抗人心肌钙蛋白 I 抗体致敏的胶乳微球试剂的制备

[0077] 1. 取 pH=7.4 的 0.1M 的 PBS 缓冲液 20ml,加入纯化的人心肌钙蛋白 I(cTnI,本申请人按常规方法制备),配制浓度为 100mg/L,先加入蛋白酶 K,最终活力浓度为 50KU/L,反应 1 小时后,加入蛋白酶 K 特异性抑制剂(EGTA 二钠盐),终浓度为 100mmol/L,混匀反应 10min,然后加入羧肽酶 Y,最终浓度为 25KU/L 充分混匀反应 30min。加入羧肽酶抑制剂(二异丙基氟磷酸),终浓度为 30mmol/L,混匀反应 20min。

[0078] 2. 将上述混合液加入 TSKgel4000SW 色谱柱,用 0.1M,pH=7.4 的 PBS 进行洗脱,在 280nm 波长条件下对分离样品进行收集和检测(见图 1 中 1 泳道)。分别收集相对分子量在 7KD (见图 1 中 4 泳道),9KD (见图 1 中 3 泳道),12KD (见图 1 中 2 泳道)的多肽片段,并收集获得的目的多肽片段后,保存于 50mmol/L 的 MES,150mmol/L 的氯化钠溶液中,-20℃冷冻保存。

[0079] 3. 将上述步骤收集的多肽片段用 pH=6.0 的 MES 缓冲液稀释成浓度为 10mg/L,与 3 倍体积的同浓度牛血清白蛋白进行混合,加入 1mg 的碳化二亚胺,室温快速混合反应 3 小时后,转入 4℃环境反应 24 小时,将混合反应液用 70KD 半透膜进行透析四次,收集透析液,用 10KD 超滤膜柱浓缩至 100ml,在波长 280nm 波长条件下测定浓缩液中蛋白浓度,根据加入的牛血清白蛋白量和透析液中牛血清白蛋白量计算肽段与牛血清白蛋白的连接率,当连接率大于 75% 时,则达到修饰要求,则收集经牛血清白蛋白修饰后的肽段。

[0080] 4. 选择 3~4 个月龄的白兔作为免疫对象,按 1.5 μg/kg 剂量进行淋巴结注射免疫,,每半个月免疫一次,免疫四次后,颈静脉取血,离心法收集血清。

[0081] 5. 同时将步骤 2 收集的多肽片段分别与琼脂糖凝胶 4B 配基进行固化,制备亲和层析柱。

[0082] 6. 将收集到的血清用 2 倍体积的 pH=7.4 的 10mmol/L 的 PBS 稀释,与制备琼脂糖凝胶 4B 在室温慢速混合(每个肽段免疫获得的血清用对应肽段琼脂糖凝胶 4B 混合),3 小时后,将混合后的琼脂糖凝胶 4B 上柱,先用 pH=7.4 的 10mmol/L 的 PBS 缓冲液洗脱,去除杂蛋白后改用 pH=3.0 的甘氨酸缓冲液进行洗脱,并收集其洗脱液,将洗脱液改用 10KD 飓风超滤膜柱进行浓缩,并用 30mmol/L 的 PBS 缓冲液进行置换,即获得 cTnI-Ab-1,cTnI-Ab-2,cTnI-Ab-3 三组兔抗人 cTnI 的特定位点抗体,分别用获取的三组肽段与三组抗体进行免疫电泳(见免疫电泳图)

[0083] 6. 分别取 160nm,60nm 和 250nm 的三组改性羧基聚苯乙烯微球,分别用碳化二亚胺室温反应 15min 后,分别加入 cTnI-Ab-1,cTnI-Ab-2 和 cTnI-Ab-3,室温反应 4 小时,20000r/min 离心 20min,弃上清,将沉淀物用 20mmol/L 的 PBS 分散重悬,即获得各自的抗体致敏胶乳微球。

[0084] 7. 将步骤 6 获得胶乳微球按 cTnI-Ab-1:cTnI-Ab-2:cTnI-Ab-3 为一定浓度比例进行配比混合,制备成胶乳试剂。

[0085] 实施例 2

[0086] 用实施例 1 中所获取的修饰后多肽片段进行山羊免疫,按 $7 \mu\text{g/ml}$ 的浓度与弗氏佐剂混合,进行羊免疫,初始免疫后,每隔 14 天加强免疫一次,共免疫四次。其他步骤与实施例 1 相同。

[0087] 实施例 3

[0088] ——试剂盒中各组分的配比

[0089] 反应剂:

[0090]

pH=5.0 的磷酸缓冲液	30mM
聚凝胺	15g/L
氯化钠	9g/L
加纯水至 1000ml	

[0091] 胶乳试剂:(1 : 2 : 1)

[0092]

pH=7.0 的磷酸缓冲液	30mM
cTnI-Ab-1 乳胶微球	0.5g/L
cTnI-Ab-2 乳胶微球	1.0g/L
cTnI-Ab-3 乳胶微球	0.5g/L

[0093] 将三组胶乳微球按上述比例混合,加纯水至 1000ml

[0094] 校准品:

[0095] pH=5.8 的 PBS 缓冲液 20mM

[0096] 纯化人心肌肌钙蛋白 I 5ng/mL

[0097] 按本实施例中胶乳配比浓度的试剂盒对样本测定结果见表 2 所示。

[0098] 实施例 4

[0099] ——试剂盒中各组分的配比

[0100] 反应剂:

[0101]

pH=7.0 的 Tris 缓冲液	50mM
硫酸葡聚糖	23g/L
氯化钠	9g/L
加纯水至 1000ml	

[0102] 胶乳试剂:(1:2:3)

[0103]

pH=7.4 的 Tris 缓冲液	50mM
cTnI-Ab-1 乳胶微球	0.5g/L
cTnI-Ab-2 乳胶微球	1.0g/L
cTnI-Ab-3 乳胶微球	1.5g/L

[0104] 将三组胶乳微球按上述比例混合,加纯水至 1000ml

[0105] 校准品:

[0106] pH=5.8 的 PBS 缓冲液 20mM

[0107] 纯化人心肌肌钙蛋白 I 5ng/mL

[0108] 按本实施例中胶乳配比浓度的试剂盒对样本测定结果见表 2 所示。

[0109] 实施例 5

[0110] ——试剂盒中各组分的配比

[0111] 反应剂:

[0112]

pH=6.4 的 MES 缓冲液	35mM
聚蔗糖	10g/L
硫酸葡聚糖	15g/L
氯化钠	9g/L
加纯水至 1000ml	

[0113] 胶乳试剂:(2:3:1)

[0114]

pH=7.5 的 HEPES 缓冲液	35mM
cTnI-Ab-1 乳胶微球	1g/L
cTnI-Ab-2 乳胶微球	1.5g/L
cTnI-Ab-3 乳胶微球	0.5g/L

[0115] 将三组胶乳微球按上述比例混合,加纯水至 1000ml

[0116] 校准品:

[0117] pH=5.8 的 PBS 缓冲液 20mM

[0118] 纯化人心肌肌钙蛋白 I 5ng/mL

[0119] 按本实施例中胶乳配比浓度的试剂盒对样本测定结果见表 2 所示。

[0120] 实施例 6

[0121] 按上述实施例制备不同胶乳配比浓度的试剂盒测定同组样本,分别与 ELISA 法测定结果进行比较,,其结果见表 2:

[0122] 表 2 不同胶乳配比浓度的试剂盒测定同组样本与 ELISA 法测试结果的比较

[0123]

样本号	cTnI 检测结果 (ng/ml)			
	实施例 4	实施例 5	实施例 6	ELISA
1	0.46	0.45	0.49	0.48
2	0.51	0.53	0.58	0.52
3	0.62	0.65	0.67	0.64
4	0.73	0.75	0.79	0.77
5	0.79	0.80	0.84	0.81
6	0.89	0.91	0.95	0.93
7	1.11	1.14	1.18	1.16
8	1.32	1.35	1.37	1.34
9	1.85	1.86	1.88	1.82
10	2.08	2.02	2.08	2.03
11	2.46	2.45	2.47	2.43
12	3.28	3.28	3.22	3.25
13	3.82	3.77	3.80	3.76
14	4.66	4.55	4.56	4.54
15	5.18	5.09	5.15	5.11
16	5.29	5.25	5.31	5.29
17	5.56	5.61	5.56	5.57

[0124] 表 2 中结果说明,本发明中三种不同胶乳配比浓度的试剂盒测定同组样本的结果与 ELISA 法测试结果比较显示出良好相关性(见图 3、图 4 和图 5 所示)。

[0001]

序列表

<110> 申请人安徽省煦堂医疗科技有限公司

<120> 肌钙蛋白 I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒

<130>

<160> 4

<170> Patentin version 3.5

<210> 1

<211> 210

<212> PRT

<213> 人肌钙蛋白 I

<223> 肌钙蛋白 I (cTnI) 肽链氨基酸序列

<400> 1

```

Met Ala Asp gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
                5                10                15
Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
                20                25                30
Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
                35                40                45
Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu
                50                55                60
Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys
65                70                75                80
Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu
                85                90                95
Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr
                100               105               110
Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu
                115               120               125

```

[0002]

Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu
 130 135 140
 Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gin Ala Leu Leu Gly
 145 150 155 160
 Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val
 165 170 175
 Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg
 180 185 190
 Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe
 195 200 205
 Glu Ser
 210

<210> 2

<211> 70

<212> PRT

<213> 人肌钙蛋白I

<223> 肌钙蛋白I (cTnI) 肽链氨基端肽段氨基酸序列

<400> 2

Met Ala Asp gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
 5 10 15
 Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
 20 25 30
 Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
 35 40 45
 Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gin Glu Leu Glu Arg Glu
 50 55 60
 Ala Glu Glu Arg Arg Gly
 65 70

[0003]

<210> 3

<211> 82

<212> PRT

<213> 人肌钙蛋白 I

<223> 肌钙蛋白 I (cTnI) 肽链中心区肽段氨基酸序列

<400> 3

```

His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu
          5              10              15
Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gin Glu Leu Glu Arg Glu Ala
          20              25              30
Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Gin
          35              40              45
Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu Cys
          50              55              60
Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr Asp
          65              70              75              80
Ile Glu

```

<210> 4

<211> 101

<212> PRT

<213> 人肌钙蛋白 I

<223> 肌钙蛋白 I (cTnI) 肽链羧基端肽段氨基酸序列

<400> 4

```

Glu Arg Tyr Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile
          5              10              15

```

[0004]

Ala Asp Leu Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg
20 25 30
Pro Thr Leu Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gin Ala
35 40 45
Leu Leu Gly Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu
50 55 60
Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly
65 70 75 80
Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys
85 90 95
Lys Lys Phe Glu Ser
100

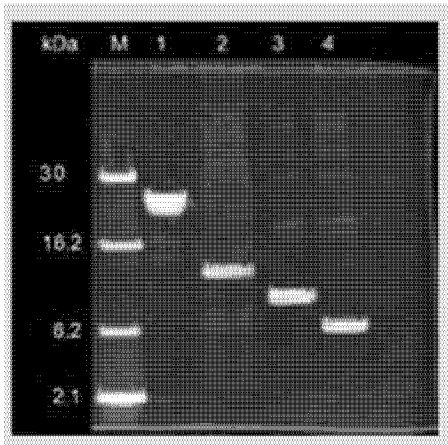


图 1

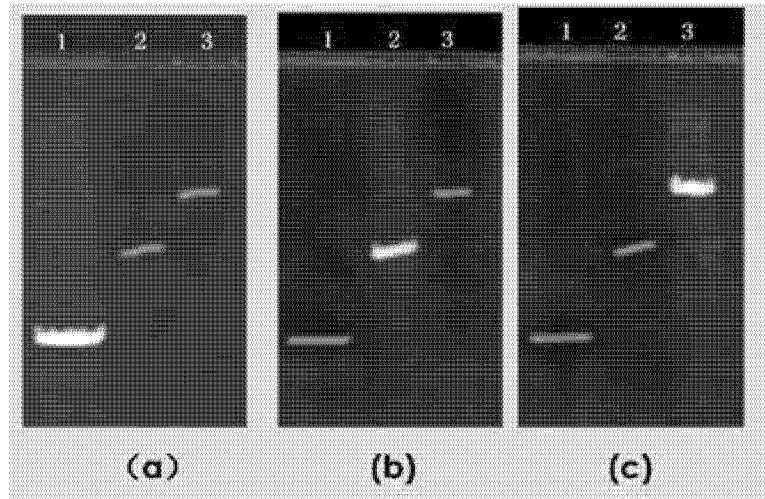


图 2

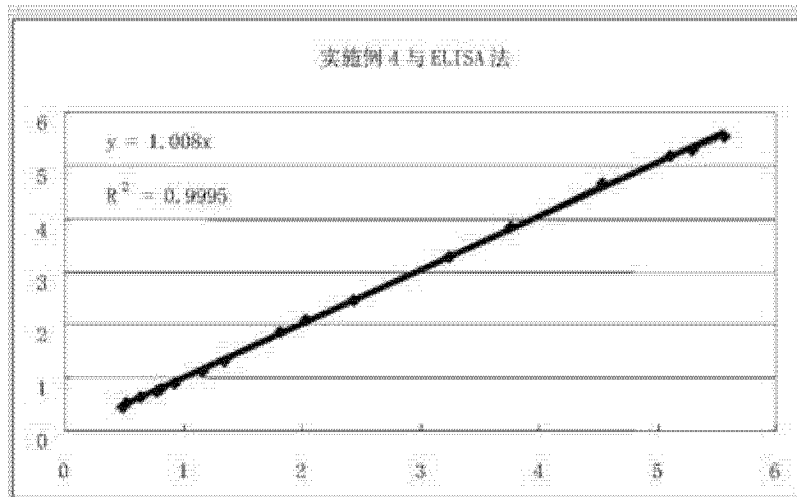


图 3

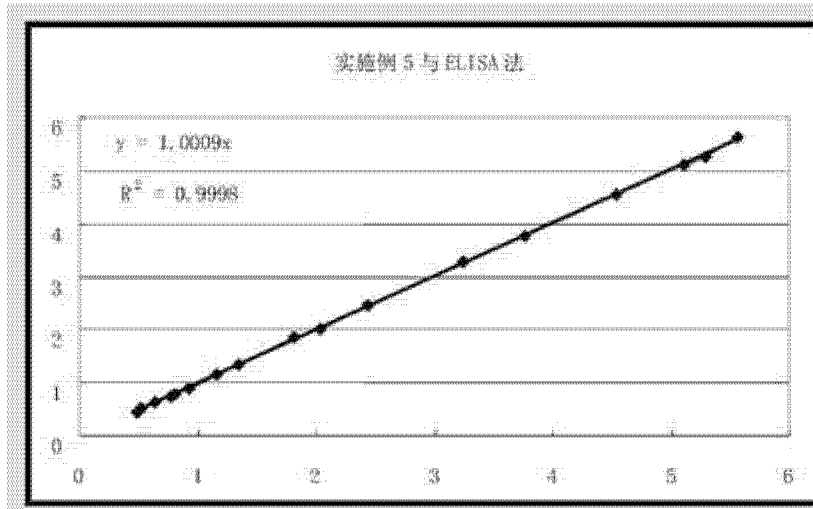


图 4

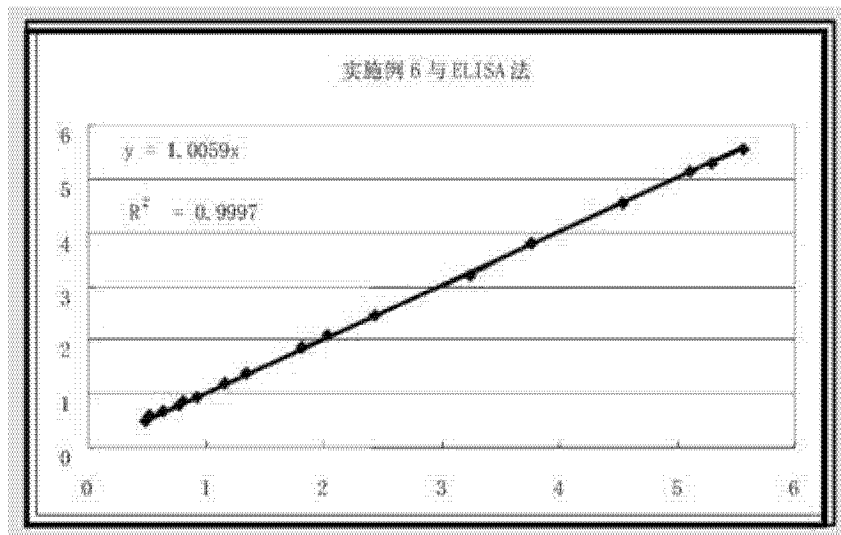


图 5

专利名称(译)	肌钙蛋白I 特定位点抗体制备及其检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103940986A	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	CN201410111785.X	申请日	2014-03-24
[标]发明人	李传响		
发明人	李传响		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/6887		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN103940986B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种肌钙蛋白I特定位点抗体制备及检测试剂盒。本发明是采用定点水解法获得所需人心肌肌钙蛋白I (cTnI) 的三条肽段,再通过免疫原性修饰后进行动物免疫获得高效价免疫血清,分别利用水解所提取的三条肽段作为配体,聚丙烯酰胺为配基制备亲和层析柱,将获得的高效价血清进行免疫亲和层析,从而获得针对该肽段特异性识别的多克隆抗体。该抗体其优点是亲和力高于相应单克隆抗体,特异性与相应单克隆抗体相当,且制备成本低,相对于单克隆抗体制备流程简单。利用获得的三组多克隆抗体制备成免疫乳胶试剂盒可用于半自动或全自动生发分析仪器测定血清中心肌肌钙蛋白I (cTnI) 含量。

