



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699659 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201610060798. 8

(22) 申请日 2016. 01. 29

(71) 申请人 苏州联辰生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市昆山开发区前进
东路科技广场 9 楼

(72) 发明人 翁濬一 孙京海 马雪林

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

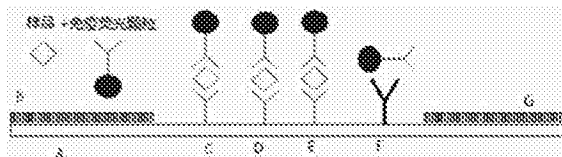
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒包括硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜的一端设置有样品垫,在硝酸纤维素膜的另一端设置有吸水垫,所述硝酸纤维素膜的位于吸水垫和样品垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白 I,肌红蛋白,CK-MB 的抗体和内部质控抗体。本发明利用不同直径荧光颗粒的荧光特性,结合化学交联标记技术和免疫层析技术,在优化试纸条各组成部件的基础上,实现的免疫荧光定量检测。与常规胶体金免疫层析方法相比,本发明具有标记稳定性好、非特异性低、灵敏度高、交叉干扰小以及定量准确的优势。



1. 一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒包括硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜的一端设置有样品垫,在硝酸纤维素膜的另一端设置有吸水垫,所述硝酸纤维素膜的位于吸水垫和样品垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I,肌红蛋白,CK-MB的抗体和内部质控抗体。

2. 如权利要求1所述的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述心肌梗塞检测的抗体为配对的抗体,每一对抗体分别对应一个检测指标;所述抗肌钙蛋白I检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体;肌红蛋白检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体;CK-MB检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体。

3. 如权利要求1所述的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜为亲水性多孔层状材料,各抗体在硝酸纤维素膜上的包被位置互不交叉。

4. 如权利要求1所述的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,还包括经标记物标记的抗肌钙蛋白I、CK-MB,肌红蛋白检测抗体混合液和抗肌钙蛋白I、CK-MB,肌红蛋白检测质控品。

5. 如权利要求1所述的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述抗肌钙蛋白I检测试剂物为经荧光颗粒标记的抗肌钙蛋白I检测抗体,所述肌红蛋白检测物为经荧光颗粒标记的肌红蛋白检测抗体;所述CK-MB检测物为经荧光颗粒标记的CK-MB检测抗体。

6. 如权利要求1所述的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,其特征在于,所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒还包括样品液,标记有对应抗体的不同尺寸的免疫荧光颗粒,荧光颗粒直径为300nm和390nm。

7. 一种包含权利要求1-6任意一项所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒的检测系统。

8. 如权利要求6所述的检测系统,其特征在于,所述检测系统包括:

样品液;内装标记有对应抗体的免疫荧光颗粒;

荧光免疫层析试纸卡盒,包括试剂卡,内装硝酸纤维素膜,上面有样品垫,吸水垫,以及膜的上端样品垫和吸水垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I, CK-MB,肌红蛋白的抗体和内部质量控制的抗体;利用荧光颗粒的高灵敏度特征,结合和相应抗体的特异性标记,配以优化的样品液,使检测物平滑流过硝酸纤维素膜的表面;

检测仪;用于获取数据,并计算得到高灵敏度检测结果。

9. 如权利要求8所述的检测系统,其特征在于,所述试剂卡中试剂样品液包含表面活性剂,阻断剂,防腐剂 and 标记的抗人肌钙蛋白抗体,标记的肌红蛋白抗体,及标记CK-MB抗体的乳胶颗粒,试剂中各个标记抗体与乳胶颗粒颗粒之间通过肽链系统连接;所述校准品包含保护剂、防腐剂、缓冲液及重组肌钙蛋白;所述试剂中的荧光载体直径为300nm和390nm的乳胶颗粒;

所述试剂中的抗人肌钙蛋白抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体中的一种;所述肌钙蛋白抗体可为鼠源、兔源或羊源抗体;

所述试剂中的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶颗粒是通过制备抗体与乳胶胶乳颗粒混

合并化学反应交联而制成,在所述对应抗体-荧光颗粒制备中,所述抗体与乳胶颗粒的质量比为1:10 - 1:100;

所述试剂胶乳颗粒的表面修饰基团供与抗人肌钙蛋白抗体化学反应交联有多种,羧基,氨基,醛基,羰基,首选醛基;

所述试剂的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶胶乳颗粒质量体积比终浓度为0.04-0.4%;

所述保护剂选用牛血清白蛋白、卵清蛋白和明胶,浓度为0.310mg/ml;

所述试剂中包括样品液,其中样品液使用的缓冲液选自Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种;样品液的浓度为10mM-100mM,pH为6.10,优选7.28. 5;所述各个抗体标记的缓冲液选自硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种,缓冲液的浓度为10mM ,pH为7.2;

所述反应增强剂选自吐温20,吐温100;反应增强剂的质量体积比为 0.02-0.4%;

所述防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞和PrOClin300中的一种或多种,所述防腐剂的质量体积比为0.1- 2%;

10.如权利要求9所述的检测系统,其特征在于,抗体和颗粒复合物的制备方法包括以下步骤:

胶乳颗粒的活化、洗涤,此步骤需要将乳胶表面修饰的基团活化,取商品化的直径为390nm乳胶胶乳溶液离心,弃上清,沉淀用洗涤缓冲液重复洗涤3次;将末次沉淀重悬于所述洗涤缓冲液中,使胶乳颗粒的质量体积比终浓度为1%,所述洗涤缓冲液选自PBS缓冲液和MES缓冲液中的一种;

肌钙蛋白I抗体包被胶乳颗粒,取1 ml活化洗涤后的390nm胶乳溶液,加入肌钙蛋白I抗体,使肌钙蛋白I抗体,终浓度为1 mg/ml ;混匀后,置437° C摇床以220rpm转速包被218h;用PBS缓冲液洗涤未与胶乳粒子结合的肌钙蛋白I抗体,重复3次;封闭:将洗涤后的包被肌钙蛋白I抗体的胶乳颗粒溶于包含所述保护剂的缓冲液中,使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0.1-0. 14%;

抗人肌钙蛋白抗体和乳胶颗粒结合后的封闭,将所述乳胶颗粒与所述抗人肌钙蛋白抗体混合物,加入脱脂奶粉0.3%,室温下反应2 h,离心,除去其中少量的沉淀物;

清洗,将形成的乳胶颗粒-抗人肌钙蛋白抗体复合物溶液离心,弃上清,加入磷酸盐缓冲液重复清洗3次;将末次沉淀溶于含所述保护剂和防腐剂的缓冲液中,使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0. 04%-0.14%;

抗体包被硝酸纤维素膜是用市场上常见的划膜仪将相关抗体分别以1mg/ml的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥而得,干燥条件为37° C干燥4小时。

一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,尤其涉及一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒。

[0002]

背景技术

[0003] 急性心肌梗塞(AMI)严重威胁人类健康,而对于此类疾病的尽早诊断和治疗是降低病人死亡率的重要手段之一。心肌梗死(myocardial infarction, MI)是冠状动脉闭塞,血流中断,使部分心肌因严重的持久性缺血而发生局部坏死的病症。临床症状有剧烈而较持久的胸骨后疼痛,发热、白细胞增多、红细胞沉降率加快,血清心肌酶活力增高及进行性心电图变化,可发生心律失常、休克或心力衰竭。心肌梗死是属于冠状动脉粥样硬化性的一种心脏病。心脏标志物是指在血液中可测定出的一系列生物化学物质,它们能够敏感、特异的反映心肌损伤(异常)及其严重程度,因而可用作心肌损伤的筛查、诊断、评定预后和治疗效果的监测标志。心脏标志物在人体正常情况下主要存在于心脏,发生异常时由心肌细胞大量释放进入血液。2000年AMI全球定义提出检测cTnI、MYO、CK-MB作为诊断AMI的第一标准,2007和2012年欧美和全球AMI指南中cTn I做为临床诊断依据。三联检测可使AMI的检测时间窗达到最大,并且具有更高的敏感性和较强的特异性(避免假阳性)。当前国内医院多用单独检测cTnI、Myo、CKMB。单独指标不能早、中、晚全程判断AMI,目前市场也开始应用多指标试剂,常见多采用以胶体金纳米颗粒结合抗体形成复合物,用来检测标志物。胶体金纳米颗粒与抗体蛋白之间通过范德华力进行结合,其结合力不牢固,易造成检测灵敏度不稳和下降、产品批内和批间一致性较低,差异达不到小于15%要求。免疫荧光定量检测技术作为一种新的免疫学方法,其发展十分迅速,在生物医学各研究领域,特别是在医学检验中得到了日益广泛的应用。免疫荧光定量检测已成为继荧光素、放射同位素和酶之后,在免疫标记技术中较为常用的一种非放射性检测方法。免疫荧光定量检测是由利用荧光颗粒的高敏感性,并用表面特异化学基团对可以产生免疫反应的相应蛋白进行化学交联而产生免疫荧光颗粒,此方法远比其他静电吸附等方法得到的颗粒稳定和灵敏度高,它还具有能与多种生物大分子结合的特点。当这些免疫荧光标记物在相应的配体处大量聚集时,在激发光源照射下,产生特定波长下可由光学传感器获取的信号,经过数据处理,得到定量的快速免疫检测结果。由于免疫荧光定量检测试剂盒与放免、酶标试剂盒相比,具有操作使用安全、简便、易单人份检测和快速等优点,因此近几年来免疫荧光定量诊断试剂盒正日益流行,已逐渐替代了放免、酶标试剂盒等。层析技术(immunochromatography)是近十年来兴起的一种快速诊断技术,具有精确、快速和操作简单等优点。其利用荧光颗粒的免疫层析技术已经在临床检验中得到应用,其基本原理是通过荧光标记物与分析物及包被抗体或抗原反应形成免疫荧光复合物,可通过光学检测仪观察检测结果。可以用于抗原或抗体含量极低的样本,是生物检测领域的前沿科学。采用中心包裹荧光素的乳胶颗粒,其表面带有不同修饰基团供和抗体蛋白结合,成为超灵敏和多组分生物化学分析的荧光探针。将荧光乳胶颗

粒与抗体结合,配合以荧光检测仪可应用于定量荧光免疫分析和检测。免疫荧光定量免疫层析技术检测是由检测仪对乳胶荧光-抗体-待检测物-抗体的反应方式进行信号收集,通过设定数学模型,优化算法,来决定血液中这些微量物质的变化,为临床提供高灵敏度,高特异性的辅助诊断手段。肌钙蛋白I、肌红蛋白和肌酸激酶同工酶(CK-MB)是心肌的三种特异性蛋白,它们以及它们的复合物在发生心肌梗死后立即释放到血液中,以发生心肌梗死后大约6~8 h直到10~15 d均可检测到较高水平的标记物,肌钙蛋白I(CTnI)、肌红蛋白(Mb)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)都是心肌损伤的敏感性指标,三者联合检测对早期诊断AMI有着较高的临床价值,对评估病危程度,具有床边和现场快速应用等优点。能够实现危险度分层,达到全程监测AMI目标。肌红蛋白是存在于肌肉组织中的一种亚铁血红素蛋白,当肌肉细胞损伤后,由于分子量小,肌红蛋白迅速释放到血液中,2小时可异常增高。肌红蛋白虽不够特异但灵敏度很高,是目前心肌受损后最早发生异常的心血管标志物,并具有很高的阴性排除价值。肌红蛋白是一种细胞浆蛋白质,存在于心脏和骨骼的横纹肌中,具有转运氧气和储存氧气的功能,分子量17.8KD,由于分子量较小,当肌细胞受损时,肌红蛋白很快被释放进入血液循环中。1、检测肌红蛋白是诊断急性心肌梗死,早期再度梗死以及观察溶栓治疗后成功再灌注的重要指标。急性心梗后最早(1-2h)出现升高,梗死发生后4-12小时,肌红蛋白的血浓度达到最高值。24小时后恢复到正常值水平成“多峰”现象,灵敏度优于CK-MB。2、灵敏度高,最早排除AMI;阴性预测率为99%。3、多种肌病(如急性肌损伤、肌营养不良、肌萎缩、多发性肌炎等)升高。4、急慢性肾功能极度衰竭、严重充血性心力衰竭、长期休克等会升高。CK是由两种不同亚基(M和B)组成的二聚体,这样正常人体组织主要含3种同工酶,即CK-MM、CK-BB, CK-MB。CK-MM主要存在于肌肉细胞中,CK-BB主要存在于脑细胞中,CK-MB主要存在于心肌细胞中。CK-MB是目前常用的心肌损伤标志物,曾一度被视为诊断AMI的“金标准”。CK-MB在急性心肌梗死发病后48h内增高,24h达峰值,两三天恢复正常。检测血液CK-MB含量是诊断心肌缺血性损伤的重要指标,如:急性心肌梗死、心肌炎等。症状发生3-8小时就可在血中测到,并可根据病情维持可测水平至较长一段时间。其他一些临床情况,如横纹肌溶解和中风,CK-MB也可以升高就实验室诊断而言,检测CK-MB、TNT和肌红蛋白就能够对以上疾病作鉴别诊断。CK-MB检测的灵敏度取决于标本采集的时间,因此,系列动态检测具有实际意义。测定含量与测定活性方法相比,其优点是灵敏度和特异性高,不受体液中其他物质的影响,特别是抑制剂和激活剂的影响,有利于疾病诊断和科学研究。因而肌酸激酶同工酶MB(CKMB)含量测定对疾病的诊断价值高。心肌肌钙蛋白是由cTnI、cTnC以及cTnT组成的复合物,在肌肉收缩和舒张过程中起重要调节作用。其中,cTnC没有心肌特异性,较少用于心肌损伤的检查。在正常状态下,cTnI和cTnT均不能透过细胞膜进入血液循环,故健康人血内不含或含极低量的cTnI、肌红蛋白;当心肌细胞受损后,cTnI及肌红蛋白弥散进入细胞间质,较早的出现在外周血中。通常,心肌肌钙蛋白在发病后35h即可升高,1524h达高峰,持续时间久,510天后降至正常。cTnI在心肌中无其它亚型,特异性高于肌红蛋白,此外其分子量亦小于肌红蛋白,在AMI发病时,更早被释放于血液中,因此cTnI更优于肌红蛋白,可谓目前诊断心肌梗死最好的心肌损伤标志物。中国专利申请号CN200510025494.X和CN200520041211.6公布了一种心血管疾病的诊断和预测多指标蛋白芯片检测试剂盒,该试剂盒利用化学发光在蛋白芯片上进行心肌肌钙蛋白I、肌红蛋白等八项指标同时定性检测。此法虽较敏感、准确,但存在着操作繁琐,检测耗时较长等缺点。中国

专利申请号CN200720140932.1公布了一种人肌红蛋白/肌酸激酶同工酶/心肌钙蛋白I诊断试纸,该试纸利用颜色颗粒(如胶体金颗粒、染料颗粒)在常规试纸条进行三项指标的定性检测。胶体金免疫层析法虽然具有简便快速便宜的优势,然而当样本中抗原或抗体含量极低时,胶体金的颜色将很浅,很难用肉眼来判断结果,容易出现误判,灵敏度较低,且三项指标同时检测时,有一定的交叉干扰,易产生假阳性。中国专利申请号 CN 102520192 B公布了一种定量检测肌钙蛋白i/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白的荧光免疫层析试剂盒,该专利利用了量子点,由于量子点尺寸极小,常常有CV问题,所以难以稳定生产。

[0004] 现有技术中检测多项生化标志物灵敏度低和标志物间相互干扰。

[0005]

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,旨在解决现有技术中检测多项生化标志物灵敏度低和标志物间相互干扰的问题。

[0007] 本发明是这样实现的,一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒包括硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜的一端设置有样品垫,在硝酸纤维素膜的另一端设置有吸水垫,所述硝酸纤维素膜的位于吸水垫和样品垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I,肌红蛋白,CK-MB的抗体和内部质控抗体。此4个抗体包被在一条膜上,一个质控抗体能够一次检测能够同时监测3个指标的反应过程,使一步检测3个指标成为可能。

[0008] 进一步,所述心肌梗塞检测的抗体为配对的抗体,每一对抗体分别对应一个检测指标;所述抗肌钙蛋白I检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体;肌红蛋白检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体;CK-MB检测抗体为一个包被抗体和一个标记抗体。

[0009] 进一步,所述硝酸纤维素膜为亲水性多孔层状材料,各抗体在硝酸纤维素膜上的包被位置互不交叉。

[0010] 进一步,还包括经标记物标记的抗肌钙蛋白I、CK-MB,肌红蛋白检测抗体混合液和抗肌钙蛋白I、CK-MB,肌红蛋白检测质控品。

[0011] 进一步,所述抗肌钙蛋白I检测试剂物为经荧光颗粒标记的抗肌钙蛋白I检测抗体,所述肌红蛋白检测物为经荧光颗粒标记的肌红蛋白检测抗体;所述CK-MB检测物为经荧光颗粒标记的CK-MB检测抗体。

[0012] 进一步,所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒还包括样品液,标记有抗体对应抗体的不同尺寸的免疫荧光颗粒,荧光颗粒直径为300nm和390nm。

[0013] 本发明的另一目的在于提供一种包含所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒的检测系统。

[0014] 进一步,所述检测系统包括:

样品液:内装标记有抗体对应抗体的免疫荧光颗粒;

荧光免疫层析试纸卡盒:包括试剂卡,内装硝酸纤维素膜,上面有样品垫,吸水垫,以及膜的上端样品垫和吸水垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I, CK-MB,肌红蛋白的抗体和内部质量控制的抗体;利用荧光的高灵敏度特征,结合不同直接荧光颗粒和相应抗体的特异性标记,使检测物平滑流过硝酸纤维素膜的表面;

检测仪：用于获取数据，并计算得到高灵敏度检测结果。

[0015] 进一步，所述试剂卡中试剂样品液包含表面活性剂，阻断剂，防腐剂 and 标记的抗人肌钙蛋白抗体，标记的肌红蛋白抗体，及标记CK-MB抗体的乳胶颗粒，试剂中各个标记抗体与乳胶颗粒颗粒之间通过肽链系统连接；所述校准品包含保护剂、防腐剂、缓冲液及重组肌钙蛋白；所述试剂中的荧光载体直径为300nm和390nm的乳胶颗粒；

所述试剂中的抗人肌钙蛋白抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体中的一种；所述肌钙蛋白抗体可为鼠源、兔源或羊源抗体；

所述试剂中的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶颗粒是通过制备抗体与乳胶胶乳颗粒混合并化学反应交联而制成，在所述对应抗体-荧光颗粒制备中，所述抗抗体与乳胶颗粒的质量比为1:10 - 1:100；

所述试剂胶乳颗粒的表面修饰基团供与抗人肌钙蛋白抗体化学反应交联有多种，羧基，氨基，醛基，羰基，首选醛基；

所述试剂的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶胶乳颗粒质量体积比终浓度为0.04-0.4%；

所述保护剂选用牛血清白蛋白、卵清蛋白和明胶，浓度为0.310mg/ml；

所述试剂中包括样品液，其中缓冲液选自Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种；样品液的浓度为10mM-100mM，pH为6.10，优选7.28.5；所述各个抗体标记的缓冲液选自硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种，缓冲液的浓度为10mM，pH为7.2；

所述反应增强剂选自吐温20，吐温100；反应增强剂的质量体积比为0.02-0.4%；

所述防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞和PrOClin300中的一种或多种，所述防腐剂的质量体积比为0.1-2%；

进一步，抗体和颗粒复合物的制备方法包括以下步骤：

胶乳颗粒的活化、洗涤，此步骤需要将乳胶表面修饰的基团活化，取商品化的直径为390nm乳胶胶乳溶液离心，弃上清，沉淀用洗涤缓冲液重复洗涤3次；将末次沉淀重悬于所述洗涤缓冲液中，使胶乳颗粒的质量体积比终浓度为1%，所述洗涤缓冲液选自PBS缓冲液和MES缓冲液中的一种；

肌钙蛋白I抗体包被胶乳颗粒，取1 ml活化洗涤后的390nm胶乳溶液，加入肌钙蛋白I抗体，使肌钙蛋白I抗体，终浓度为1 mg/ml；混匀后，置437°C摇床以220rpm转速包被218h；用PBS缓冲液洗涤未与胶乳粒子结合的肌钙蛋白I抗体，重复3次；封闭：将洗涤后的包被肌钙蛋白I抗体的胶乳颗粒溶于包含所述保护剂的缓冲液中，使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0.1-0.14%；

抗人肌钙蛋白抗体和乳胶颗粒结合后的封闭，将所述乳胶颗粒与所述抗人肌钙蛋白抗体混合物，加入脱脂奶粉0.3%，室温下反应2 h，离心，除去其中少量的沉淀物；

清洗，将形成的乳胶颗粒-抗人肌钙蛋白抗体复合物溶液离心，弃上清，加入磷酸盐缓冲液重复清洗3次；将末次沉淀溶于含所述保护剂和防腐剂的缓冲液中，使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0.04%-0.14%；

抗体包被硝酸纤维素膜是用市场上常见的划膜仪将相关抗体分别以1mg/ml的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥而得，干燥条件为37°C干燥4小时。

[0016] 本发明提供的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒，用于在15分

钟内一步检测血液肌钙蛋白I, 肌红蛋白, CK-MB, 此3指标是目前临床常用的快速诊断心肌梗塞的指标, 一次检测3个指标极大节约患者的等待时间和诊疗成本。本专利公开了利用一种不同尺寸荧光颗粒作为标记物用于定量检测多项心血管疾病标志物的方法, 即肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白的试剂盒; 利用不同直径荧光颗粒的荧光特性, 结合化学交联标记技术和免疫层析技术, 在优化试纸条各组成部件的基础上, 实现的免疫荧光定量检测。与常规胶体金免疫层析方法相比, 本发明试剂盒对肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白同时进行定量检测, 适用于全血、血清和血浆样本的检测, 可为心脑血管疾病诊断提供参考, 可广泛用于基层医院和诊所。本发明要解决的技术问题为针对现有技术中检测多项生化标志物灵敏度低和标志物间相互干扰的缺点, 利用不同直径的荧光颗粒作为心肌梗塞的探针, 得到符合相应单个检测要求的结果, 提供了一种替代单一检测的多指标荧光免疫层析方法。

[0017]

附图说明

[0018] 图1是本发明实施例提供的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒结构示意图。

[0019] 图2是本发明实施例提供的单指标和多指标测定CK-MB蛋白的回归曲线。

[0020] 图3是本发明实施例提供的单指标和多指标测定肌红蛋白结果的回归曲线。

图4是本发明实施例提供的单指标和多指标测定cTnI蛋白的回归曲线。

[0021]

具体实施方式

[0022] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本发明进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

[0023] 下面结合附图对本发明的应用原理作详细的描述。

[0024] 本发明实施例的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒是一种定量检测心肌肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白的荧光免疫层析试剂盒, 包括: 样品液, 样品液内装标记有抗体对应抗体的免疫荧光颗粒; 荧光免疫层析试纸卡盒, 它包括试剂卡, 内装硝酸纤维素膜, 上面有样品垫, 吸水垫, 以及膜的上端样品垫和吸水垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I, CK-MB, 肌红蛋白的抗体和内部质量控制的抗体; 检测仪。本发明将测心肌梗塞标志物的3个单独的免疫反应系统组合到心肌梗塞的一个检测试剂盒中, 通过一次检测即可同时获得三个心肌梗塞的检测项目结果, 同时具有对应单个检测的灵敏度、准确性和可靠性。

[0025] 参看图1, 一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒包括硝酸纤维素膜A, 在硝酸纤维素膜A上端设置的样品垫B, 在硝酸纤维素膜A上端设置的吸水垫G。

[0026] 在硝酸纤维素膜A的位于上端样品垫B和吸水垫G之间的区域内分别喷有抗TnI抗体条带(C), 抗肌红蛋白抗体(D), 抗CK-MB抗体条带(E)和抗抗体条带(F)。

[0027] 在本实施例中, 免疫荧光颗粒分别是和抗TnI抗体, 抗肌红蛋白(Mb)抗体, 和抗CK-

MB抗体交联的结合物。抗抗体条带是羊抗鼠二抗。

[0028] 图2是实施例中单指标和多指标测定CK-MB蛋白的回归曲线。

[0029] 图3是实施例中单指标和多指标测定肌红蛋白结果的回归曲线。

图4是实施例中单指标和多指标测定cTnI蛋白的回归曲线。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0031] 本发明是一种定量检测肌钙蛋白I,肌红蛋白,CK-MB的免疫荧光试剂盒,利用荧光的高灵敏度特征,结合不同直接荧光颗粒和相应抗体的特异性标记,配合优化的工艺,使检测物平滑流过硝酸纤维素膜的表面,经配套荧光检测仪获取数据,并计算得到高灵敏度检测结果。试剂样品液包含表面活性剂,阻断剂,防腐剂、和标记的抗人肌钙蛋白抗体,标记的肌红蛋白抗体,及标记CK-MB抗体的乳胶颗粒,所述试剂中各个标记抗体与乳胶颗粒颗粒之间通过肽链系统连接;所述校准品包含保护剂、防腐剂、缓冲液及重组肌钙蛋白。

[0032] 所述试剂中的荧光载体直径为300nm和390nm的乳胶颗粒。

[0033] 上述技术方案中所述硝酸纤维素膜有多种品牌德国sartorius 的 NC95,NC140,美国millipore 公司的 HF135, HF180, 中国依能公司的类似膜,首选NC95。

[0034] 所述试剂中的抗人肌钙蛋白抗体选自多克隆抗体和单克隆抗体中的一种,优选多克隆抗体。所述肌钙蛋白抗体可为鼠源、兔源或羊源抗体,优选羊源抗体和鼠源。

[0035] 所述试剂中的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶颗粒是通过制备抗体与乳胶胶乳颗粒混合并化学反应交联而制成,在所述对应抗体-荧光颗粒制备中,所述抗抗体与乳胶颗粒的质量比为1:10 - 1:100,优选 1:20。

[0036] 所述试剂中的胶乳颗粒的表面修饰基团供与抗人肌钙蛋白抗体化学反应交联有多种,羧基,氨基,醛基,羰基,首选醛基,该系统可提高检测方法的灵敏度,同时不增加非特异干扰。将抗体和颗粒表面交联,此标记反应温和,很少抑制抗体活性,标记抗体稳定,且背景水平很低,结合紧密迅速。此外,抗体和颗粒的结合很稳定,不会因反应试剂的高度稀释而受影响,保证了检测结果的准确性。

[0037] 上述技术方案中所述包被抗体的乳胶胶乳颗粒保存液为优化的配方。

[0038] 所述技术方案中所述试剂中的包被抗人肌钙蛋白抗体的乳胶胶乳颗粒质量体积比终浓度为0.04-0.4% 优选0.2 %。

[0039] 所述技术方案中所用保护剂可选用牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)和明胶,能够保护胶乳颗粒表面交联的抗体。可选用一种或多种,优选牛血清白蛋白,其浓度为0.310mg/ml,优选0.3-1mg/ml。

[0040] 所述试剂中包括样品液,其中所述缓冲液选自Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种,优选磷酸盐缓冲液;所述样品液的浓度为10mM-100mM,优选 10 mM,pH为6-10,优选7.28. 5 ;所述各个抗体标记的缓冲液选自硼酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液和甘氨酸缓冲液中的一种或多种,优选磷酸盐缓冲液;所述缓冲液的浓度为10mM ,pH为7.2。

[0041] 上述技术方案中所述反应增强剂选自吐温20,吐温100,优选吐温20 ;所述反应增强剂的质量体积比为 0.02-0.4%,优选0.02%。吐温20是非离子型水溶性聚合物,有很强的

亲水性,可以破坏溶液中蛋白质周围的电子云和水化层,促进特异性的抗原和抗体分子靠近并结合形成大分子复合物。

[0042] 所述防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞和PrOClin300中的一种或多种,优选ProcIin300,所述防腐剂的质量体积比为0.1-2%,优选0.1%。

[0043] 上述技术方案中所述抗体和颗粒复合物的制备方法包括以下步骤:以肌钙蛋白I抗体为例;

肌红蛋白抗体和CK-MB抗体的标记方法类似,不同处为所使用荧光颗粒直径为300nm。

[0044] 1)胶乳颗粒的活化、洗涤,此步骤需要将乳胶表面修饰的基团活化,

取适量商品化的直径为390nm乳胶胶乳溶液离心,弃上清,沉淀用洗涤缓冲液重复洗涤3次;将末次沉淀重悬于所述洗涤缓冲液中,使胶乳颗粒的质量体积比终浓度为1%,所述洗涤缓冲液选自PBS缓冲液和MES缓冲液中的一种;

2)肌钙蛋白I抗体包被胶乳颗粒

①取1 mL活化洗涤后的390nm胶乳溶液,加入肌钙蛋白I抗体,使肌钙蛋白I抗体终浓度为1 mg/mL;混匀后,置437°C摇床以220rpm转速包被218h;

②用PBS缓冲液洗涤未与胶乳粒子结合的肌钙蛋白I抗体,重复3次;

③封闭:将洗涤后的包被肌钙蛋白I抗体的胶乳颗粒溶于包含所述保护剂的缓冲液中,使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0.1-0.14%。

[0045] 3)抗人肌钙蛋白抗体和乳胶颗粒结合后的封闭,将所述乳胶颗粒与所述抗人肌钙蛋白抗体混合物,加入脱脂奶粉0.3%,室温下反应2 h,离心,除去其中少量的沉淀物。

[0046] 4)清洗,将步骤3)中形成的乳胶颗粒-抗人肌钙蛋白抗体复合物溶液离心,弃上清,加入磷酸盐缓冲液重复清洗3次;将末次沉淀溶于含所述保护剂和防腐剂的缓冲液中,使所述胶乳颗粒的质量体积比终浓度为0.04%-0.14%。

[0047] 抗体包被硝酸纤维素膜是用市场上常见的划膜仪将相关抗体分别以1mg/mL的浓度划到硝酸纤维素膜上包被并干燥而得,干燥条件为37°C干燥4小时。

[0048] 试纸膜的组装,戴上手套,将包被抗体的硝酸纤维素膜(NC)组装到卡盒底部的规定位置,然后将样品垫和吸水垫分别放置在膜的2边,盖上卡盒上盖,加上0.5g干燥剂一包放入包装袋内。

[0049] 样品液配制过程:取适量磷酸缓冲液,逐步加入动物血清,阻断剂,表面活性剂,并调整pH到7.2+/-0.05。

[0050] 经上所述方法生产的多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量层析检测试剂盒可在免疫荧光检测仪上用于定量检测人体血液中肌钙蛋白,肌红蛋白和CK-MB的含量,其中所述血液包括全血、血清及血浆。

[0051] 不同直径荧光颗粒购自ThermoFisher公司。

[0052] 硝酸纤维素膜CN95购自德国Sartorius公司

cTnI抗体、肌红蛋白抗体、CK-MB抗体购自Hytest公司。

[0053] 羊抗鼠抗体购自Trend Pharma]&Tech Ltd.公司。

[0054] 相应标准品均购自罗氏公司。

[0055] 10% (w/v)BSA溶液的配制:10g BSA加入100mL PBS溶液中,混匀,4°C保存。

[0056] 含有0.05%(v/v)Tween-20的PBS溶液的配制(pH7.2):50 uL Tween-20 加入

100 mL PBS 溶液中,混匀,4°C 保存。

[0057] PBS 溶液(磷酸盐缓冲液)配方:氯化钠(NaCl) 8g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.44g,磷酸二氢钠(NaH_2PO_4) 0.24g,调 pH 7.2 \pm 0.05,定容 为 1L。

[0058] 检测试剂盒包括:实施例中的硝酸纤维素膜由 Biodot 公司生产的点膜仪,将相关抗体和抗抗体均匀划在硝酸纤维素膜中间 3cm 的位置,间隔 0.5cm。然后干燥,并在二头分别放上样品垫和吸水垫,小心放入卡盒内,关上卡盒盖。置于湿度不大于 20%,温度 10-25°C 环境保存。

[0059] 样本液有磷酸缓冲液为基础,添加牛血清,表面活性剂并调整 pH 为 7.2 \pm 0.05 范围。

[0060] 1. 样本来源:正常全血血清来自 Scandibody 公司,按照浓度需要计算并加入适量标准品得到不同浓度的检测样品。

[0061] 2. 样本检测:将全血样品 30 μ l 加入 0.3ml 的样品液,然后吸取 85 μ l 混合物,加入卡盒的样品孔中,放入检测仪等检测槽里。

[0062] 3, 将硝酸纤维素膜卡盒放于检测仪中检测,曝光时间 12 min,并获得各个抗体条带的信号。

[0063] 4,按上述方法测定样品数据,有检测仪自带软件处理。同时,实验结果与单个检测所得结果进行了对比。

[0064] ND 表示未检测到。

[0065] 本发明的目的是提供一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒,通过一次检测即可同时获得 3 个心肌梗塞的检测项目结果;包括硝酸纤维素膜,在硝酸纤维素膜下端设置的样品垫,在硝酸纤维素膜上端设置的吸水垫,以及在硝酸纤维素膜的位于样品垫和吸水垫之间的区域内分别喷有抗肌钙蛋白 I,肌红蛋白,CK-MB 抗体和抗抗体条带,本试剂盒采用全血分离系统,在样品垫上滴加待测全血后,通过全血分离膜的分离,血浆中的待测指标物和样品液中的免疫荧光颗粒结合并被分离开来,进一步流过硝酸纤维素膜,被包被的各个抗体反应结合,并固定在各个抗体的位置。

[0066] 所述抗抗体条是包被了羊抗鼠二抗。本发明将测心肌梗塞标志物的 3 个单独的免疫反应系统组合到心肌梗塞的一个检测试剂盒中,运用于免疫荧光检测技术,其检测的检出率、灵敏度指标符合临床检测要求,提高了检测的准确性和可靠性。使用本发明时,可将 3 个心肌梗塞检测项目放在一块检测合内,一次检测即可同时获得两个或多个检测项目结果,快速而又简便,提高了效率。通过多个项目的联合检测,增加了检测的特异性,提高了检测的灵敏度,准确、可靠,更有助于作出准确的诊断。本发明的产品由于省却了重复操作的材料,所以其生产成本低于各单项检测板相加之和的成本。

[0067] 本发明的多指标检测心肌梗塞标志物的试剂盒可以有多种形式,如: Mb-肌红蛋白联检试剂盒, cTnI-CK-MB, cTnI-肌红蛋白-CK-MB 联检试剂盒等。由于采用了全血分离膜,因此可同时适用于血浆、全血;试剂盒采用全血分离系统、双抗体夹心免疫检测系统、其检测原理如下: 1、在样品垫上滴加全血后,通过全血分离膜的分离,血浆被分离开来,进一步运动到免疫荧光定量检测垫。使用时,撕开外包装,取出卡盒和样品液瓶,需将检测卡恢复至室温,由合适医务人员抽取患者外周静脉血液 1ml,常规心肌梗塞的检测需依据不同时间各指标的变化,因此检测者自胸口不适起就应检测, 2~4 小时后再测一次,观察血液中 Mb 与

肌红蛋白浓度的变化。

[0068] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

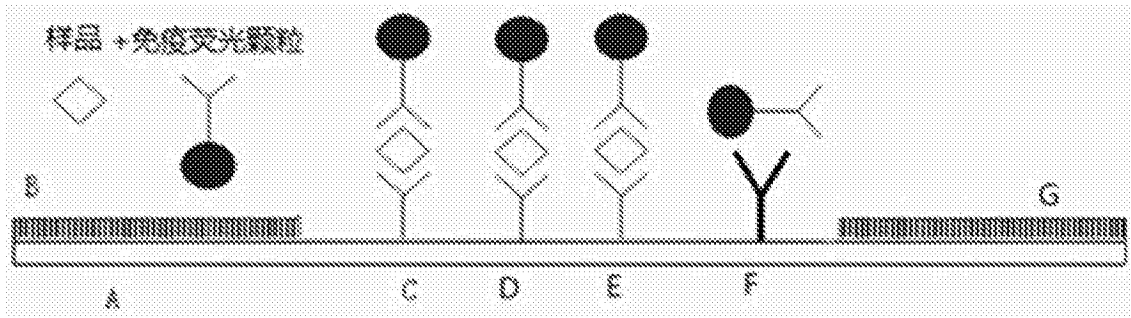


图1

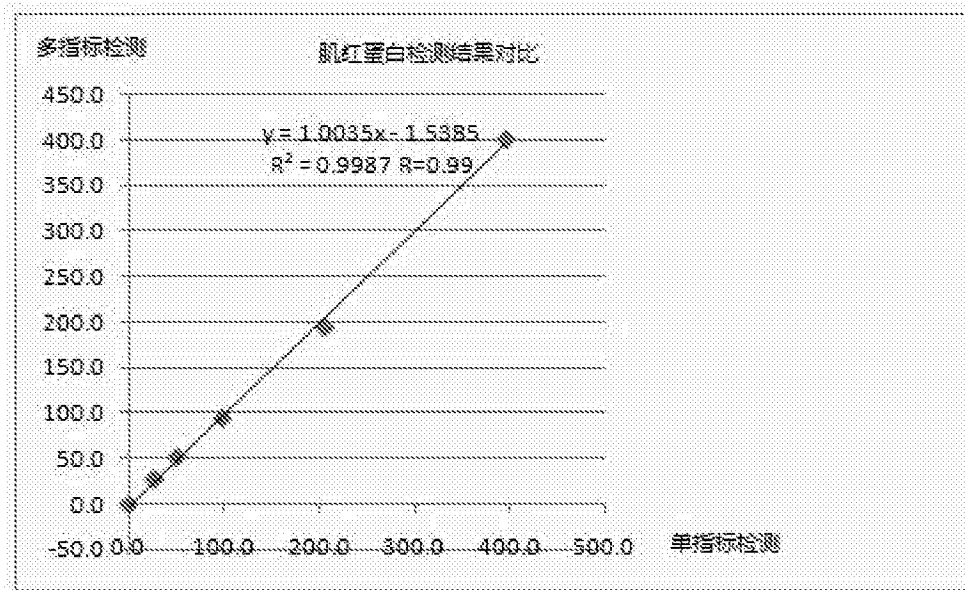


图2

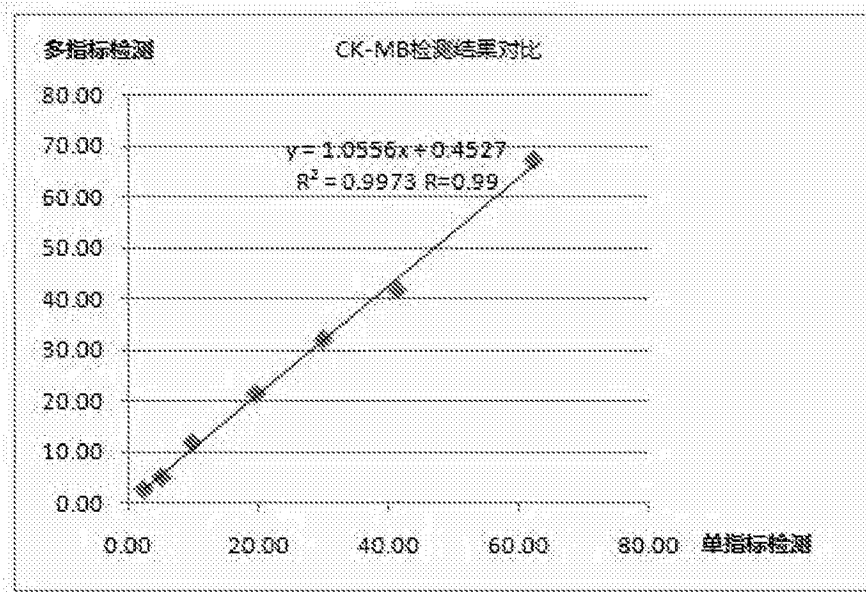


图3

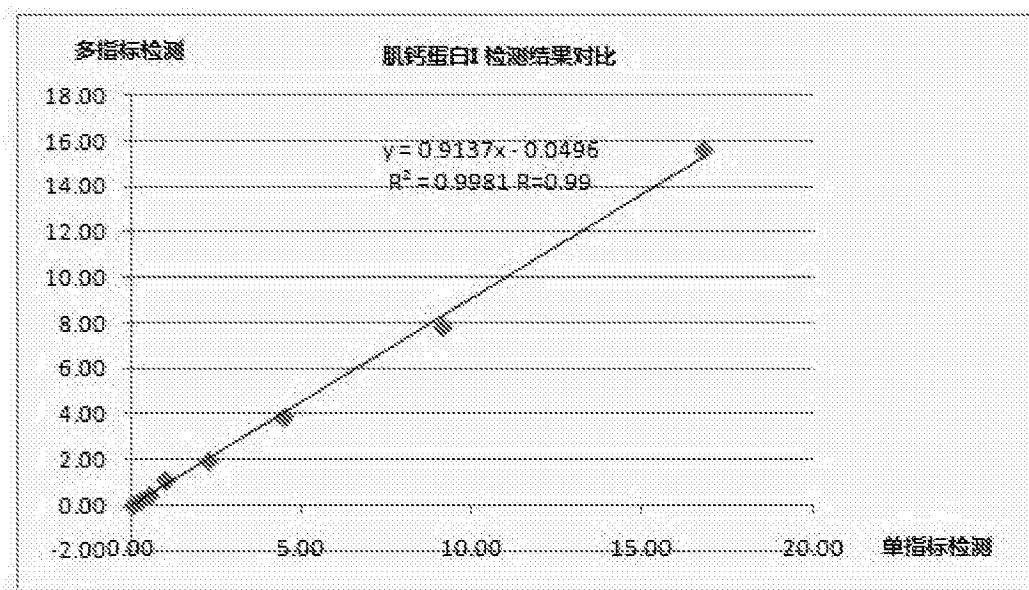


图4

专利名称(译)	一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105699659A	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201610060798.8	申请日	2016-01-29
[标]发明人	翁濬一 孙京海 马雪林		
发明人	翁濬一 孙京海 马雪林		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒，所述多指标检测心肌梗塞的快速免疫荧光定量检测试剂盒包括硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜的一端设置有样品垫，在硝酸纤维素膜的另一端设置有吸水垫，所述硝酸纤维素膜的位于吸水垫和样品垫之间的区域内分别包被有抗肌钙蛋白I，肌红蛋白，CK-MB的抗体和内部质控抗体。本发明利用不同直径荧光颗粒的荧光特性，结合化学交联标记技术和免疫层析技术，在优化试纸条各组成部件的基础上，实现的免疫荧光定量检测。与常规胶体金免疫层析方法相比，本发明具有标记稳定性好、非特异性低、灵敏度高、交叉干扰小以及定量准确的优势。

