



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108535473 A

(43)申请公布日 2018.09.14

(21)申请号 201810245118.9

(22)申请日 2018.03.22

(71)申请人 瑞莱生物科技江苏有限公司

地址 215300 江苏省泰州市泰州中国医药城口泰路东侧新阳路北侧G30幢

(72)发明人 朱奇峰 刘建源 潘荣华 陈俏梅 陈子健

(74)专利代理机构 南京汇盛专利商标事务所 (普通合伙) 32238

代理人 袁静

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

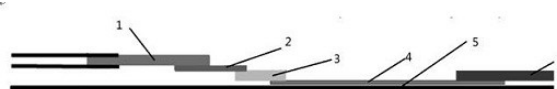
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,涉及生物技术领域。该试剂盒包括免疫荧光试剂条,试纸条包括支撑垫片、检测膜、过滤垫片、吸水垫片和样本垫片;样本垫片包被有红细胞阻断剂,检测膜上依次设有心肌肌钙蛋白I、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带,心肌肌钙蛋白I、心型脂肪酸结合蛋白测试带分别包被有心肌肌钙蛋白I抗体A和心型脂肪酸结合蛋白抗体A,质控带上包被有抗链霉亲和素抗体,偶合物垫片上包被有异嗜性抗体阻断剂、荧光染料偶合物。本发明免疫荧光试剂盒能够快速、准确、高灵敏度的同时检测样本中的心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白,有助于快速诊断心肌梗死和微小型心肌损伤。



1. 一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于包括免疫荧光试剂条,所述试纸条包括支撑垫片、设置于所述支撑垫片上的检测膜,所述检测膜的两端分别连接有过滤垫片和吸水垫片,所述过滤垫片连接有偶合物垫片,所述偶合物垫片的另一端连接有样本垫片;所述样本垫片包被有红细胞阻断剂,自样本垫片至吸水垫片方向所述检测膜上依次设有心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带,所述心肌肌钙蛋白I测试带包被有心肌肌钙蛋白I抗体A,所述心型脂肪酸结合蛋白测试带包被有心型脂肪酸结合蛋白抗体A,所述质控带上包被有抗链霉亲和素抗体,所述偶合物垫片上包被有异嗜性抗体阻断剂、荧光染料标记的心肌肌钙蛋白I抗体B和心型脂肪酸结合蛋白抗体B。

2. 根据权利要求1所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述心肌肌钙蛋白I抗体A是购自Hytest公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体,货号4T21;所述心型脂肪酸结合蛋白抗体A是购自Medix公司的鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体,货号:100292;所述抗链霉亲和素抗体购自Prospec公司,货号:ANT-345。

3. 根据权利要求1或2所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述异嗜性抗体阻断剂购自Scantibodies Laboratory公司,货号:3KG775。

4. 根据权利要求3所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述红细胞阻断剂是小鼠抗人红细胞单克隆抗体。

5. 根据权利要求4所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述心肌肌钙蛋白I抗体B是Hytest公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体,货号为17F3,所述心型脂肪酸结合蛋白抗体B是Medix公司的鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体,货号:100293。

6. 根据权利要求5所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述样本垫片、偶合物垫片、过滤垫片、检测膜和吸水垫片均设置于支撑垫片上、且呈直线排布。

7. 根据权利要求6所述一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带三者平行。

一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的 免疫荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白I(cTnI)与心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)均是目前认为较好的心肌损害标志物,可用于诊断心肌梗塞MI、评价溶栓治疗的效果、评价再栓塞或栓塞范围和危险程度。心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)是早期标志物(症状出现6小时内血中就有增高);心肌肌钙蛋白I(cTnI)是确定标志物(发病后6-9小时血中出现增高并持续数天,对心肌酸上的敏感性和特异性都较高) cTnI/h-FABP联合检测具有一定得临床价值,可应用于心内科,急诊科,检验科,儿科,外科病房,血液科,肿瘤科等多个科室以及各基层医院,可大大缩短出报告时间。这项应用使医生能在第一时间获得临床检验结果,有利于迅速做出决策并采取干预措施,使急危重症患者得到及时诊断、救治,大大加快患者接受进一步治疗的进程,同时可以更好地实施急诊流程管理,提高患者满意度。

[0003] 现有技术中,检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)与心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)的方法,灵敏度低,对于无心电图改变和无临床典型症状的微型心肌损伤患者,不能更早发现心肌损伤。另外,现有检测方法还存在耗时长的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,能够快速、准确、高灵敏度的同时检测全血、血清或血浆中的心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白,有助于快速诊断心肌梗死和微型心肌损伤。

[0005] 本发明的目的采用如下技术方案实现。

[0006] 一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒,包括免疫荧光试剂条,所述试纸条包括支撑垫片、设置于所述支撑垫片上的检测膜,所述检测膜的两端分别连接有过滤垫片和吸水垫片,所述过滤垫片连接有偶合物垫片,所述偶合物垫片的另一端连接有样本垫片;所述样本垫片包被有红细胞阻断剂,自样本垫片至吸水垫片方向所述检测膜上依次设有心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带,所述心肌肌钙蛋白I测试带包被有心肌肌钙蛋白I抗体A,所述心型脂肪酸结合蛋白测试带包被有心型脂肪酸结合蛋白抗体A,所述质控带上包被有抗链霉亲和素抗体,所述偶合物垫片上包被有异嗜性抗体阻断剂、荧光染料标记的心肌肌钙蛋白I抗体B和心型脂肪酸结合蛋白抗体B。

[0007] 在本发明中,所述心肌肌钙蛋白I抗体A是购自Hytest公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体,货号4T21;所述心型脂肪酸结合蛋白抗体A是购自 Medix公司的鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体,货号:100292;所述抗链霉亲和素抗体购自Prospec公司,货号:ANT-

345。

[0008] 在本发明中,所述异嗜性抗体阻断剂购自Scantibodies Laboratory公司,货号:3KG775。

[0009] 在本发明中,所述红细胞阻断剂是小鼠抗人红细胞单克隆抗体。

[0010] 在本发明中,所述心肌肌钙蛋白I抗体B是Hytest公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体,货号为17F3,所述心型脂肪酸结合蛋白抗体B是Medix公司的鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体,货号:100293。

[0011] 在本发明中,所述样本垫片、偶合物垫片、过滤垫片、检测膜和吸水垫片均设置于支撑垫片上、且呈直线排布。

[0012] 在本发明中,所述心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带三者平行。

[0013] 本发明试剂盒可以用于快速、准确、高灵敏度的检测全血、血清和血浆中的 cTnI 和H-FABP,有助于快速诊断心肌梗死。本发明试纸条对样本中cTnI的检测限为0.04ng/ml,检测的线性范围是0.06ng/ml~40ng/ml;对H-FABP的检测限为2ng/ml,检测的线性范围是2ng/ml~256ng/ml。在线性范围内,剂量-反应曲线相关系数(r)不低于0.990。由于本发明试剂盒的检测限浓度较低,因此对于无心电图改变和无临床典型症状的微小型心肌损伤患者,能被更早发现。另外,本发明试纸条重复性检测结果的变异系数均<10%,说明本试剂盒检测结果重复性好,精密度高。

附图说明

[0014] 图1是本发明中试纸条的结构简图,其中1-样本垫片,2-偶合物垫片,3-过滤垫片,4-检测膜,5-支撑垫片,6-吸水垫片。

具体实施方式

[0015] 实施例1制备定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光

[0016] 试剂条

[0017] 定量检测心肌肌钙蛋白I与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂条,该试纸条包括支撑垫片5、设置于支撑垫片上的检测膜4,检测膜的两端分别连接有过滤垫片3和吸水垫片6,过滤垫片连接偶合物垫片2,偶合物垫片的另一端连接样本垫片1,其中样本垫片包被有红细胞阻断剂,自样本垫片至吸水垫片方向检测膜上依次设有心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带,心肌肌钙蛋白I测试带包被有心肌肌钙蛋白I抗体,心型脂肪酸结合蛋白测试带包被有心型脂肪酸结合蛋白抗体,质控带上包被有抗链霉亲和素抗体,偶合物垫片上包被有异嗜性抗体阻断剂、荧光染料标记的心肌肌钙蛋白I抗体和心型脂肪酸结合蛋白抗体。

[0018] 样本垫片采用如下方法制备:将小鼠抗人红细胞单克隆抗体采用含有0.5% (质量百分浓度)牛血清白蛋白的PBS缓冲液,配制成终浓度为1.35mg/ml的溶液,使用均匀喷涂的方法对玻璃纤维垫片进行包被,包被后37℃烘干24小时,得到样本垫片,保存备用。

[0019] 偶合物垫片采用如下方法制备:将鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体(购自Hytest公司,货号17F3)采用生物素进行标记,采用链霉亲和素标记荧光染料 ALEXA FLUOR

488(购自Invitrogen公司,货号A10266),然后将两者按链霉亲和素与生物素的摩尔比为1:4混合于pH=8.4的磷酸缓冲液中,25℃孵育30min,两者桥连形成心肌肌钙蛋白I抗体-生物素-链霉亲和素-荧光偶合物(缩写为偶合物A)。以含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液为溶剂,配制0.34mg/ml的偶合物A溶液。将鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体(购自Medix公司,货号:100293)采用生物素进行标记,采用链霉亲和素标记荧光染料ALEXA FLUOR 488(购自Invitrogen公司,货号A10266),然后将两者按链霉亲和素与生物素的摩尔比为1:4混合于pH=8.4的磷酸缓冲液中,25℃孵育30min,两者桥连形成心型脂肪酸结合蛋白抗体-生物素-链霉亲和素-荧光偶合物(缩写为偶合物B)。以含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液为溶剂,配制浓度为0.21mg/ml的偶合物B溶液。将偶合物A、偶合物B溶液用均匀划线的方式分别包被在同一张玻璃纤维垫片上,包被区域均为带状、且相互平行,然后用均匀喷涂的方式封闭0.7mg/ml的异嗜性抗体阻断剂(购自Scantibodies Laboratory公司,货号:3KG775),真空抽干,得到偶合物垫片,备用。

[0020] 检测膜采用如下方法制备:自样本垫片至吸水垫片方向(即按样本流动的方向),在硝酸纤维素膜上依次包被心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带。将鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体(购自Hytest公司,货号4T21)用磷酸缓冲液稀释成终浓度为0.65mg/ml的溶液,使用均匀划线的方式包被在硝酸纤维素膜上形成心肌肌钙蛋白I测试带。将鼠抗人心型脂肪酸结合蛋白抗体(购自Medix公司,货号:100292)用磷酸缓冲液稀释成终浓度为0.36mg/ml的溶液,使用均匀划线的方式包被在硝酸纤维素膜上形成心型脂肪酸结合蛋白测试带。将鼠抗链霉亲和素抗体(购自Prospec公司,货号:ANT-345)加入含有0.5%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液,配制成终浓度为0.018mg/ml的溶液,使用均匀划线的方式包被在硝酸纤维素膜上形成质控带。

[0021] 支撑垫片的材质为聚氯乙烯。

[0022] 吸水垫片的材质为玻璃纤维和棉绒混合(购自Ahlstrom公司,货号:320)。

[0023] 过滤垫片的材料为棉纤维。

[0024] 样本垫片1、偶合物垫片2、过滤垫片3、检测膜4和吸水垫片6均设置于支撑垫片5上、且呈直线排布。

[0025] 心肌肌钙蛋白I测试带、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带三者平行。

[0026] 在支撑垫片上,将样本垫片、偶合物垫片、过滤垫片和检测膜沿着样本流动方向依次搭接,吸水垫片搭接在检测膜样本流动方向的末端,得到免疫荧光试纸条。

[0027] 实施例2免疫荧光试纸条的灵敏度及检测线性范围

[0028] 本发明免疫荧光试纸条(实施例1制备)的使用方法:取临床病人血浆样本60ul滴加在免疫荧光试纸条的样本垫片上,在18℃条件下孵育8min后,置于瑞莱TZ-301型免疫荧光检测仪中进行检测,按照常规方法,计算获得cTnI和H-FABP浓度,具体来说通过检测测试带与质控带上的荧光强度,计算相对光密度,然后通过相对光密度-浓度标准曲线计算得出cTnI和H-FABP浓度。将临床cTnI阳性血浆样本倍比稀释,并使用贝克曼库尔特Enhanced Accu TnI试剂(国食药监械(进)字2013第2401177号)检测cTnI的浓度,其结果为0.06ng/ml、0.3125ng/ml、0.625ng/ml、2.5ng/ml、10ng/ml、40ng/ml。将临床H-FABP阳性样本倍比稀释并使用Biolinks心型脂肪酸结合蛋白H-FABP检测试剂盒(国食药监械(进)字2012第2402682号)定值,其结果2ng/ml、8ng/ml、32ng/ml、128ng/ml、256ng/ml。采用本发明免疫

荧光试纸条检测各浓度临床cTnI阳性样本和临床 H-FABP阳性样本,每个稀释浓度测试3次,分别求出检测结果的均值。以现有检测方法检测到的浓度为自变量x,以本发明免疫荧光试纸条检测结果均值为因变量y,对两组数据进行回归分析,求出线性回归方程(即剂量-反应曲线),计算线性回归的相关系数。结果如下表1和表2。

[0029] 表1现有检测方法 with 本发明试纸条对cTnI的检测结果

[0030]

现有检测方法对cTnI的定值结果 (ng/ml)	本发明试纸条测试结果平均值 (ng/ml)
0.06	0.06
0.3125	0.25
0.625	0.58
2.5	2.66
10	9.48
40	38.74
线性回归相关系数	0.9951

[0031] 表2现有检测方法 with 本发明试纸条对H-FABP的检测结果

[0032]

现有检测方法对 H-FABP 的定值结果 (ng/ml)	本发明试纸条测试结果平均值 (ng/ml)
2	1.56
6	6.42
32	27.09
128	112.88
256	223.19
线性回归相关系数	1.0000

[0033] 结果可知,本发明试纸条对cTnI检测的线性范围是0.06ng/ml~40ng/ml,对H-FABP检测的线性范围是2ng/ml~256ng/ml,在线性范围内,剂量-反应曲线相关系数(r)不低于0.990。

[0034] 采用上述方法检测本发明试纸条对全血样本中cTnI和H-FABP的检测灵敏度,结果发现本发明试纸条对全血样本中cTnI的检测限为0.04ng/ml,对H-FABP 的检测限为2ng/ml。

[0035] 实施例3

[0036] 采用本发明试纸条检测2份临床样本,每个样本重复10次检测。具体检测方法:取临床病人样本(血清)60u1加入本发明试纸条的样本垫片上,在18℃条件下孵育8min后,置于瑞莱TZ-301型免疫荧光检测仪中进行检测,通过检测测试带与质控带上的荧光强度,并根据预设的计算公式和换算曲线得出cTnI 和H-FABP浓度,对同一样本检测结果进行平均数、方差分析,并计算变异系数,结果如表3和表4。

[0037] 表3本发明试纸条对样本1中的cTnI和H-FABP浓度的检测结果

样本 1	cTnI 检测结果 (ng/ml)	H-FABP 检测结果 (ng/ml)
1	0.12	8.17
2	0.13	8.25
3	0.15	6.99
4	0.15	8.39
5	0.14	8.16
6	0.15	8.45
[0038] 7	0.12	8.21
8	0.14	8.36
9	0.15	7.84
10	0.13	7.68
n=10		
平均数	0.14	8.05
方差	0.0123	0.4433
变异系数	8.91%	5.51%

[0039] 表4本发明试纸条对样本2中的cTnI和H-FABP浓度的检测结果

样本 2	cTnI 检测结果 (ng/ml)	H-FABP 检测结果 (ng/ml)
1	10.23	47.11
2	10.32	51.19
3	10.01	48.22
[0040] 4	9.78	42.98
5	9.83	45.33
6	9.93	49.12
7	9.63	44.22
8	9.65	49.32
9	10.31	45.25
10	9.89	48.13
n=10		
[0041] 平均数	9.959	47.09
方差	0.2566	2.5793
变异系数	2.58%	5.48%

[0042] 上述结果显示:重复性检测结果变异系数均<10%,说明本试剂检测结果重复性好,精密度高。

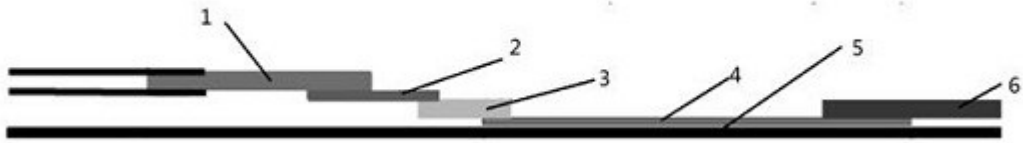


图1

专利名称(译)	一种快速定量检测心肌肌钙蛋白 I 与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN108535473A	公开(公告)日	2018-09-14
申请号	CN201810245118.9	申请日	2018-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	瑞莱生物科技(江苏)有限公司		
[标]发明人	朱奇峰 潘荣华		
发明人	朱奇峰 刘建源 潘荣华 陈俏梅 陈子健		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/6887		
代理人(译)	袁静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种快速定量检测心肌肌钙蛋白 I 与心型脂肪酸结合蛋白的免疫荧光试剂盒，涉及生物技术领域。该试剂盒包括免疫荧光试剂条，试纸条包括支撑垫片、检测膜、过滤垫片、吸水垫片和样本垫片；样本垫片包被有红细胞阻断剂，检测膜上依次设有心肌肌钙蛋白 I、心型脂肪酸结合蛋白测试带和质控带，心肌肌钙蛋白 I、心型脂肪酸结合蛋白测试带分别包被有心肌肌钙蛋白 I 抗体A和心型脂肪酸结合蛋白抗体A，质控带上包被有抗链霉亲和素抗体，偶合物垫片上包被有异嗜性抗体阻断剂、荧光染料偶合物。本发明免疫荧光试剂盒能够快速、准确、高灵敏度的同时检测样本中的心肌肌钙蛋白 I 与心型脂肪酸结合蛋白，有助于快速诊断心肌梗死和微小型心肌损伤。

