



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918883 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810479921.9

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.05.18

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

(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 陈子健 刘建源 郁靛 朱奇峰
宗荣芳 钱亦妮 李娜 於敏
高月秀 解慧梅 郝福星 邱树磊
郭方超

(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 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

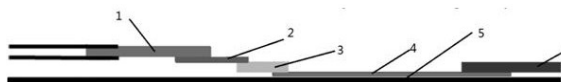
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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、肌酸激酶同工酶与肌红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纸条,试纸条包括支撑垫片、检测膜、偶合物垫片、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,检测膜上设有心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白测试带和质控带,心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白测试带分别包被有心肌肌钙蛋白I抗体A、肌酸激酶同工酶抗体A与肌红蛋白抗体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、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白,有助于急性心肌梗死的早期快速诊断。



1. 一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红蛋白的免疫荧光试剂盒, 其特征在于包括免疫荧光试纸条, 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, 所述检测膜上设有心肌肌钙蛋白I测试带、肌酸激酶同工酶测试带、肌红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, 所述肌酸激酶同工酶测试带包被有肌酸激酶同工酶抗体A, 所述肌红蛋白测试带包被有肌红蛋白抗体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、肌酸激酶同工酶抗体B与肌红蛋白抗体B。

2. 根据权利要求1所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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4TC2; 所述肌酸激酶同工酶抗体A是购自Biospecific公司的鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体, 货号:A27020067P; 所述肌红蛋白抗体A是购自Biospecific公司的鼠抗人肌红蛋白抗体, 货号:A27340228P; 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所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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Biospecific公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体, 货号为A34600384P, 所述肌酸激酶同工酶抗体B是购自Biospecific公司的鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体, 货号:A27080359P; 所述肌红蛋白抗体B是购自Fitzgerald公司的鼠抗人肌红蛋白抗体, 货号: 10-M50C。

6. 根据权利要求5所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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所述快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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、肌酸激酶同工酶测试带、肌红蛋白测试带和质控带四者平行。

一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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、肌酸激酶同工酶和肌红蛋白的免疫荧光试剂盒。

背景技术

[0002] 急性心肌梗死(AMI)是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死。临床上多有剧烈而持久的胸骨后疼痛,休息及硝酸酯类药物不能完全缓解,伴有血清心肌酶活性增高及进行性心电图变化,可并发心律失常、休克或心力衰竭,常可危及生命。急性心肌梗死发生后,如果在数小时内不能得到明确诊断及适当治疗,心肌将因缺血、缺氧造成不可逆坏死;在急性心肌梗死的诊断过程中,心电图是不可缺少的检测项目之一,但大量临床资料显示其敏感性只有50%,因此,血清心肌损伤标志物的联合检测成为目前急性心肌梗死诊断的主流趋势。

[0003] 心肌肌钙蛋白I(cTnI):肌钙蛋白为肌肉收缩调节蛋白,包括三个结构不同的亚基,即肌钙蛋白T(TnT)、肌钙蛋白I(TnI)和肌钙蛋白C(TnC)。心肌肌钙蛋白I是一种结构蛋白,与肌动球蛋白在静止状态时相结合,抑制肌动球蛋白的ATP酶活性。心肌中I亚基结构(cTnI)不同于其他肌肉组织,具有心肌特异性;同时心肌肌钙蛋白I分子量小,心肌损伤后,迅速释放至血液中,4-6小时后血中浓度升高,并可维持4-10天。由于其高度的心肌特异性和灵敏度,肌钙蛋白I已成为目前最理想的心肌梗死标志物。全球心肌梗死工作组、欧洲心脏病学会(ESC)、美国心脏病学会(ACC)、美国心脏学会(AHA)、欧洲高血压学会(EHS)和世界卫生组织(WHO),将心肌肌钙蛋白I定为急性心肌梗死(AMI)诊断的“金标准”、急性冠脉综合征(ACS)危险分层的首选标志物。

[0004] 肌酸激酶同工酶(CK-MB):肌酸激酶(CK)同工酶是由M亚基和B亚基以不同方式组合成的二聚体,主要存在骨骼肌和心肌细胞,有三种同工酶:CK-MM, CK-MB, CK-BB,其中肌酸激酶同工酶在心肌中的活性是骨骼肌中的5倍,肌酸激酶同工酶在急性心肌梗死发病后4-8小时升高,12-20小时达到高峰,对于急性心肌梗死诊断的特异性和敏感性均较优。

[0005] 肌红蛋白(Myoglobin):肌红蛋白是存在于心肌和骨骼肌胞浆中的色素蛋白,在急性心肌梗死(AMI)发病后1-4小时就可在血中检测到升高,6-7小时达到峰值,是代表心肌损伤的最早期生化标志物之一,具有高度的敏感性。但肌红蛋白无心肌特异性,其与心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶联合检测可有助于急性心肌梗死的早期诊断。

[0006] 现有技术中,缺乏准确性高、灵敏度高、检测时间短的心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白的试剂盒。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶和肌红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、肌酸激酶同工酶和肌红蛋白,有助于急性心肌梗死的早期快速诊断。

[0008] 本发明的目的采用如下技术方案实现。

[0009] 一种快速定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红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、肌酸激酶同工酶测试带、肌红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,所述肌酸激酶同工酶测试带包被有肌酸激酶同工酶抗体A,所述肌红蛋白测试带包被有肌红蛋白抗体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、肌酸激酶同工酶抗体B与肌红蛋白抗体B。

[0010] 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4TC2;所述肌酸激酶同工酶抗体A是购自Biospacific公司的鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体,货号:A27020067P;所述肌红蛋白抗体A是购自Biospacific公司的鼠抗人肌红蛋白抗体,货号:A27340228P;所述抗链霉亲和素抗体购自Prospec公司,货号:ANT-345。

[0011] 在本发明中,所述异嗜性抗体阻断剂购自Scantibodies Laboratory公司,货号:3KG775。

[0012] 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。

[0013] 在本发明中,所述心肌肌钙蛋白I抗体B是Biospacific公司的鼠抗人心肌肌钙蛋白I单克隆抗体,货号为A34600384P,所述肌酸激酶同工酶抗体B是购自Biospacific公司的鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体,货号:A27080359P;所述肌红蛋白抗体B是购自Fitzgerald公司的鼠抗人肌红蛋白抗体,货号:10-M50C。

[0014] 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。

[0015] 在本发明中,所述心肌肌钙蛋白I测试带、肌酸激酶同工酶测试带、肌红蛋白测试带和质控带四者平行。

[0016] 本发明试剂盒可以用于快速、准确、高灵敏度的检测全血、血清和血浆中的心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白,有助于急性心肌梗死的早期快速诊断。本发明试纸条对样本中cTnI的检测限为0.08ng/ml,检测的线性范围是0.1ng/ml~40ng/ml;对CK-MB的检测限为0.5ng/ml,检测的线性范围是1ng/ml~50ng/ml;对Myoglobin的检测限为5ng/ml,检测的线性范围是15ng/ml~400ng/ml。在线性范围内,剂量-反应曲线相关系数(r)不低于0.990。另外,本发明试纸条重复性检测结果的变异系数均<10.0%,说明本试剂检测结果重复性好,精密度高。本发明免疫荧光试剂盒的临床意义在于(1)有助于急性冠状动脉综合症的早期诊断和危险分层;(2)估计心肌缺血损伤面积;(3)各种胸痛原因的鉴别诊断;(4)左心室功能评估;(5)某些治疗药物的临床疗效评估;(6)更加频繁地早期检测cTnI或CK-MB,尤其是联合检测Myoglobin,可以帮助尽早诊断出心肌梗死并且有利于尽早启动治疗;(7)诊断各种心肌损伤:心肌炎,心肌创伤,心脏手术,围手术期心脏并发症,严重脓毒血症和脓毒血症导致的左心衰竭,充血性心功能不全等疾病。

附图说明

[0017] 图1是本发明试纸条的结构简图,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

[0018] 实施例1制备定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白的免疫荧光试剂条

[0019] 如图1,定量检测心肌肌钙蛋白I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白的免疫荧光试纸条,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,过滤垫片连接有过偶合物垫片2,偶合物垫片的另一端连接有样本垫片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、肌酸激酶同工酶测试带、肌红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,肌酸激酶同工酶测试带包被有肌酸激酶同工酶抗体,肌红蛋白测试带包被有肌红蛋白抗体,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、肌酸激酶同工酶抗体与肌红蛋白抗体。

[0020] 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。

[0021] 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Biospacific公司,货号A34600384P)采用生物素进行标记,采用链霉亲和素标记荧光染料Dylight™800NHS Ester(购自Thermo Scientific公司,货号:46421),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0.1mg/ml的偶合物A溶液。将鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体(购自Biospacific 公司,货号:A27080359P)采用生物素进行标记,采用链霉亲和素标记荧光染料Dylight™800NHS Ester(购自Thermo Scientific公司,货号46421),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,两者桥连形成肌酸激酶同工酶抗体-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0.2mg/ml的偶合物B溶液。将鼠抗人肌红蛋白抗体(购自Fitzgerald公司,货号:10-M50C)采用生物素进行标记,采用链霉亲和素标记荧光染料Dylight™800 NHS Ester(购自Thermo Scientific公司,货号46421),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,两者桥连形成肌红蛋白抗体-生物素-链霉亲和素-荧光偶合物(缩写为偶合物C)。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0.1mg/ml的偶合物C溶液。自样本垫片至吸水垫片方向,在玻璃纤维垫片上用均匀划线的方式依次采用偶合物A、偶合物B和偶合物C溶液进行包被,包被区域均为带状、且相互平行,然后用均匀喷涂的方式在该玻璃纤维垫片上封闭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。

[0022] 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、肌酸激酶同工酶测试带、肌红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4TC2)用磷酸缓冲液稀释成终浓度为2mg/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。将鼠抗人肌酸激酶同工酶抗体(购自Biospecific公司,货号:A27020067P)用磷酸缓冲液稀释成终浓度为0.5mg/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肌酸激酶同工酶测试带。将鼠抗人肌红蛋白抗体(购自Biospecific公司,货号:A27340228P)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肌红蛋白测试带。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0.015mg/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。

[0023] 支撑垫片的材质为聚氯乙烯。

[0024] 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)。

[0025] 过滤垫片的材料为棉纤维。

[0026] 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。

[0027] 心肌肌钙蛋白I测试带、肌酸激酶同工酶测试带、肌红蛋白测试带和质控带四者平行。

[0028] 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。

[0029] 实施例2本发明试剂盒的灵敏度及检测线性范围

[0030] 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 60 μ l滴加在免疫荧光试纸条的样本垫片上,在18 $^{\circ}$ C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、CK-MB 和Myoglobin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(心肌肌钙蛋白I)、CK-MB(肌酸激酶同工酶)和Myoglobin(肌红蛋白)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CK-MB阳性血浆样本倍比稀释并使用肌酸激酶同工酶(CK-MB)检测试剂盒(免疫荧光法)(苏械注准 20152401210)定值,其结果0.78125ng/ml、1.5625ng/ml、3.125ng/ml、12.5ng/ml、50ng/ml。将临床Myoglobin阳性血浆样本倍比稀释并使用肌红蛋白(Myoglobin)检测试剂盒(免疫荧光法)(苏械注准 20152401211)定值,其结果12.5ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、400ng/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、临床CK-MB阳性样本和临床Myoglobin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、表2和表3。

[0031] 表1现有检测方法与本发明试纸条对cTnI的检测结果

[0032]

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	0.10
0.3125	0.29
0.625	0.58
2.5	2.71
10	11.54
40	39.63
线性回归相关系数	0.99911

[0033] 表2现有检测方法与本发明试纸条对CK-MB的检测结果

[0034]

现有检测方法对CK-MB的定值结果 (ng/ml)	本发明试纸条测试结果平均值 (ng/ml)
0.78125	1.13
1.5625	2.08
3.125	4.22
12.5	13.69
50	48.74
线性回归相关系数	0.99965

[0035] 表3现有检测方法与本发明试纸条对Myoglobin的检测结果

[0036]

现有检测方法对 Myoglobin 的定值结果 (ng/ml)	本发明试纸条测试结果平均值 (ng/ml)
12.5	15.23
25	30.87
50	53.19
100	111.20
400	394.65
线性回归相关系数	0.99964

[0037] 结果可知,本发明试纸条对cTnI检测的线性范围是0.1ng/ml~40ng/ml,对 CK-MB检测的线性范围是1ng/ml~50ng/ml,对Myoglobin检测的线性范围是 15ng/ml~400ng/ml,在线性范围内,剂量-反应曲线相关系数(r)不低于0.990。

[0038] 采用上述方法检测本发明试纸条对血浆样本中cTnI、CK-MB和Myoglobin 的检测灵敏度,结果发现本发明试纸条对血浆样本中cTnI的检测限为0.08ng/ml,对CK-MB的检测限为0.5ng/ml,对Myoglobin的检测限为5ng/ml。

[0039] 实施例3本发明试剂盒的重复性和精密度

[0040] 采用本发明试纸条(实施例1制备)检测1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)60ul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、CK-MB和Myoglobin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4。

[0041] 表4本发明试纸条对临床样本中的cTnI、CK-MB和Myoglobin浓度的检测结果

[0042]

临床样本	cTnI 检测结果 (ng/ml)	CK-MB 检测结果 (ng/ml)	MYO 检测结果 (ng/ml)
------	-------------------	--------------------	------------------

[0043]

重复 1	15.21	36.97	204.88
重复 2	14.96	34.25	192.56
重复 3	14.77	35.19	197.14
重复 4	15.98	35.67	210.76
重复 5	16.07	34.1	209.84
重复 6	14.55	34.55	198.45
重复 7	14.97	37.03	188.23
重复 8	15.08	37.04	189.64
重复 9	16.34	36.48	198.31
重复 10	16.21	36.99	206.69
n=10			
平均数	15.4140	35.8270	199.6500
方差	0.663	1.226	8.128
变异系数	4.30%	3.42%	4.07%

[0044] 上述结果显示:重复性检测结果变异系数均<6%,说明本试剂检测结果重复性好,精密度高。

[0045] 实施例4本发明试剂盒的抗干扰性能

[0046] 为了验证实施例1中方法制备的免疫荧光试纸条(表5中2#)检测结果的准确性,以及在检测过程中,该试纸条上的多种抗体不会干扰重要检测对象心肌肌钙蛋白I的检测,进行了如下实验。

[0047] 采用实施例1中方法制备1#、3#、4#、5#试纸条,不同之处在于改变检测膜上心肌肌钙蛋白I测试带(缩写为cTnI测试带)的包被抗体和偶合物垫片上偶合物A中的心肌肌钙蛋白I抗体。具体见表5。

[0048] 表5各试纸条中cTnI抗体配对情况

试纸条编号	cTnI 测试带包被抗体		偶合物 A 中的心肌肌钙蛋白 I 抗体	
	来源	货号	来源	货号
1#	Biospacific	A34600384P	Hyttest	4T21
2#	Hyttest	4TC2	Biospacific	A34600384P
3#	Hyttest	4TC2	Hyttest	4T27
4#	Hyttest	4T21	Hyttest	17F3
5#	Hyttest	4T27	Hyttest	17F3

[0050] 采用1#、2#、3#、4#、5#试纸条同时检测1份cTnI质控品,重复5次检测。cTnI质控品含有0.15ng/mL心肌肌钙蛋白I、0ng/mL肌酸激酶同工酶和0ng/mL 肌红蛋白。具体检测方

法：取cTnI质控品60u1加入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 浓度，对质控品检测结果进行平均数、方差、偏差、灵敏度分析并计算变异系数，结果如表6。

[0051] 表6各试纸条对质控品中cTnI浓度的检测结果

[0052]

cTnI 真实浓度	1#结果 (ng/ml)	2#结果 (ng/ml)	3#结果 (ng/ml)	4#结果 (ng/ml)	5#结果 (ng/ml)
0.15ng/ml	0.11	0.15	0.16	0.15	0.21
0.15ng/ml	0.12	0.15	0.17	0.16	0.19
0.15ng/ml	0.11	0.16	0.15	0.20	0.18
0.15ng/ml	0.17	0.15	0.15	0.21	0.19
0.15ng/ml	0.12	0.17	0.17	0.15	0.20
平均数	0.1260	0.1560	0.1600	0.1740	0.1940
方差	0.025	0.009	0.010	0.029	0.011
变异系数	19.92%	5.73%	6.25%	16.56%	5.88%
偏差	-16.00%	4.00%	6.67%	16.00%	29.33%

[0053] 从表6可以看到，1#、4#、5#试纸条检测结果偏差较大，2#、3#试纸条检测结果的方差、变异系数和偏差均较小。

[0054] 为了确定2#、3#试纸条检测时，样本中肌酸激酶同工酶和肌红蛋白不会干扰心肌肌钙蛋白I的检测结果，配制了含有心肌肌钙蛋白I、肌红蛋白和肌酸激酶同工酶的5种样品，如表7。采用2#、3#试纸条分别检测该5种样品，每个样本重复3次检测。检测测试带与质控带上的荧光强度，计算测试带的荧光强度/ 质控带的荧光强度，其中心肌肌钙蛋白I测试带的荧光强度/质控带的荧光强度缩写为cTnI/C，肌酸激酶同工酶测试带的荧光强度/质控带的荧光强度缩写为 CK/C，肌红蛋白测试带的荧光强度/质控带的荧光强度缩写为MYO/C。检测结果见表8、9。

[0055] 表75种样品中心肌肌钙蛋白I、肌红蛋白、肌酸激酶同工酶的含量

[0056]

样品编号	心肌肌钙蛋白I	肌红蛋白	肌酸激酶同工酶
1	0.15ng/mL	0ng/mL	0ng/mL
2	0.15ng/mL	70ng/mL	0ng/mL
3	0.15ng/mL	400ng/mL	0ng/mL
4	0.15ng/mL	0ng/mL	6ng/mL
5	0.15ng/mL	0ng/mL	50ng/mL

[0057] 表8采用2#试纸条分别检测5种样品的结果与数据分析

[0058]

样品 1	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.0158	0.0831	0
重复 2	0.0071	0.0786	0
重复 3	0.0042	0.0738	0.002
平均值	0.0090	0.0785	0.0007
标准差	0.0060	0.0047	0.0012
变异系数	66.8%	5.9%	173.2%
样品 2	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.2888	0.0751	0.0041
重复 2	0.3075	0.0787	0.0036
重复 3	0.3016	0.0732	0.0027
平均值	0.2993	0.0757	0.0035
标准差	0.0096	0.0028	0.0007
变异系数	3.2%	3.7%	20.5%
样品 3	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	1.2735	0.0791	0.0036
重复 2	1.2597	0.0708	0
重复 3	1.2389	0.0779	0
平均值	1.2574	0.0759	0.0012
标准差	0.0174	0.0045	0.0021
变异系数	1.4%	5.9%	173.2%
样品 4	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.0043	0.0831	0.385
重复 2	0.0241	0.0801	0.3763
重复 3	0.0079	0.0766	0.4051
平均值	0.0121	0.0799	0.3888
标准差	0.0105	0.0033	0.0148
变异系数	87.2%	4.1%	3.8%
样品 5	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.0091	0.0811	2.6176
重复 2	0.0038	0.0762	2.6089

[0059]

重复 3	0.0079	0.0808	2.542
平均值	0.0069	0.0794	2.5895
标准差	0.0028	0.0027	0.0414
变异系数	40.1%	3.5%	1.6%

[0060] 从2#试纸条对样品1、2、3的检测数据(表8)可以看出,随着肌红蛋白浓度的增加,cTnI/C的平均值几乎没有变化;从2#试纸条对样品1、4、5的检测数据可以看出,随着肌酸激酶同工酶浓度的增加,cTnI/C的平均值几乎没有变化。因此,本发明试剂盒中试纸条各测试带对心肌肌钙蛋白I浓度检测没有干扰,条带间的相互干扰交叉反应可以忽略。

[0061] 表9采用3#试纸条分别检测5种样品的结果与数据分析

[0062]

样品 1	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.0099	0.0836	0.0034
重复 2	0.0123	0.0887	0.0021
重复 3	0.0047	0.0779	0
平均值	0.0090	0.0834	0.0018
标准差	0.0039	0.0054	0.0017
变异系数	43.3%	6.5%	93.6%
样品 2	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.3188	0.1054	0.0045
重复 2	0.2964	0.0963	0.0027
重复 3	0.3215	0.1023	0.0014
平均值	0.3122	0.1013	0.0029
标准差	0.0138	0.0046	0.0016
变异系数	4.4%	4.6%	54.3%
样品 3	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	1.3689	0.1392	0
重复 2	1.4012	0.1425	0.0038
重复 3	1.3082	0.1129	0.0015
平均值	1.3594	0.1315	0.0018
标准差	0.0472	0.0162	0.0019
变异系数	3.5%	12.3%	108.3%
样品 4	MYO/C	cTnI/C	CK/C
重复 1	0.0065	0.0948	0.4031
重复 2	0.0172	0.1036	0.3868
重复 3	0.0076	0.1079	0.4219
平均值	0.0104	0.1021	0.4039
标准差	0.0059	0.0067	0.0176
变异系数	56.4%	6.5%	4.3%
样品 5	MYO/C	cTnI/C	CK/C

[0063]

重复 1	0.0089	0.1252	2.7545
重复 2	0.002	0.1366	2.8013
重复 3	0.0047	0.1429	2.5583
平均值	0.0052	0.1349	2.7047
标准差	0.0035	0.0090	0.1289
变异系数	66.9%	6.7%	4.8%

[0064] 从3#试纸条对样品1、2、3的检测数据(表9)可以看出,随着肌红蛋白浓度的增加,cTnI/C的平均值逐渐增大;从3#试纸条对样品1、4、5的检测数据可以看出,随着肌酸激酶同工酶浓度的增加,cTnI/C的平均值逐渐增大。因此,3#试纸条其他测试带对心肌肌钙蛋白I浓度检测有显著干扰,条带间的相互干扰交叉反应较大。

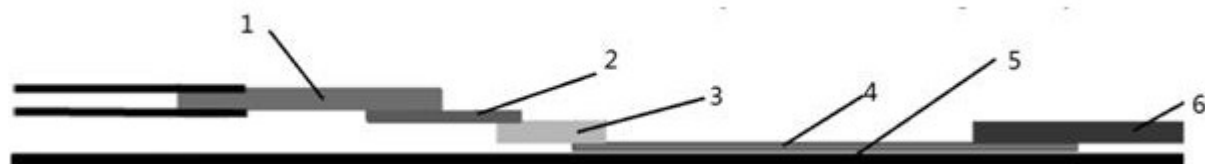


图1

专利名称(译)	一种快速定量检测心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶和肌红蛋白的免疫荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN108918883A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810479921.9	申请日	2018-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	瑞莱生物科技(江苏)有限公司		
[标]发明人	郁靛 朱奇峰 宗荣芳 钱亦妮 李娜 於敏 高月秀 郝福星 邱树磊 郭方超		
发明人	陈子健 刘建源 郁靛 朱奇峰 宗荣芳 钱亦妮 李娜 於敏 高月秀 解慧梅 郝福星 邱树磊 郭方超		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/6887 G01N2800/325		
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、肌酸激酶同工酶与肌红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纸条，试纸条包括支撑垫片、检测膜、偶合物垫片、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，检测膜上设有心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白测试带和质控带，心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白测试带分别包被有心肌肌钙蛋白 I 抗体 A、肌酸激酶同工酶抗体 A 与肌红蛋白抗体 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、肌酸激酶同工酶与肌红蛋白，有助于急性心肌梗死的早期快速诊断。

