

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610130403.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101206225A

[22] 申请日 2006.12.19

[21] 申请号 200610130403.3

[71] 申请人 天津天美生物技术有限公司

地址 300457 天津市经济技术开发区第三大街 A3 楼 2506 室

[72] 发明人 苏殿杰 王仁芝 魏桂梅 韩 苏

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

化学发光免疫分析检测心肌钙蛋白 T 的方法

[57] 摘要

一种用化学发光免疫分析法检测心肌钙蛋白 T(cTnT)的分析方法。

-
- 1、心肌钙蛋白 T (cTnT) 化学发光免疫分析方法，其特征在于用辣根过氧化物酶促化学发光体系。
 - 2、根据权利要求 1 所述免疫分析方法，其特征在于用双单抗夹心法和/或竞争法检测 cTnT。
 - 3、根据权利要求 1 所述辣根过氧化物酶促化学发光体系，其特征在于用二酰基胍衍生物作为发光底物，过氧硼酸钠-H₂O₂ 作为复合氧化剂，对羟基肉硅酸-对碘酚作为复合增强剂，辣根过氧化物酶作为酶促催化剂。

化学发光免疫分析检测心肌钙蛋白 T 的方法

技术领域

本发明属于临床血液免疫分析领域，建立了化学发光免疫分析法检测心肌钙蛋白 T 以早期、敏感、特异地诊断急性心肌梗死。此外本发明也可用于实验室作生理、病理、药理等多项研究。

技术背景

心血管疾病是常见病和多发病，是威胁人类健康的首要疾病。急性心肌梗死（acute myocardial infarction, AMI）是常见的心血管疾病，正确诊断及及时救治对挽救濒死心肌，改善预后降低急性期病死率和死亡率具有重要意义。在 AMI 的生化诊断方面，肌酸激酶（CK）及其同工酶（CK-MB）、乳酸脱氢酶（LDH）等是目前常用的心肌酶谱。但是心肌酶谱并非心脏所特有，在正常人骨骼肌中也有少量存在。非心脏手术或骨骼肌损伤患者 CK-MB 也可升高，且 CK-MB 在 AMI 发病后 4—8 小时才开始升高，持续时间又短（48-72 小时），因而临床应用受到限制。1987 年英国 Cummins 等首先报告用测定周围血中心肌钙蛋白(cTn)浓度来诊断 AMI（Cummins ,et al. infarction Am heart J, 1987,113:1333-1334）。1991 年 Katus 等人最早报道了 cTnT 对诊断 AMI 具有高度敏感性和特异性（clin.chem.1991;83:902-912.）。近年来研究表明，心肌钙蛋白（Cardiac Troponin）是心肌特异的调节蛋白，其亚单位肌钙蛋白 T（cTnT）和肌钙蛋白 I（cTnI）在 AMI 时释放入血是心肌损伤的特异性标志物，并具有灵敏度高，在血中出现时间早，诊断窗口时间长等优点。此外 cTnT 在预测梗塞面积，评价溶栓疗效，AMI 预后心功能判定，不稳定心绞痛预后评估，围手术期心肌损伤的判定等方面均具有重要的临床价值。

以往学者们对 cTnT 诊断 AMI 的特异性有些争论。1991 年 katus 发现 cTnT 与骨骼肌有 1%-2%交叉反应（clin. Chem. 1991; 83 : 902-912.）。但也有学者认为 cTnT 与骨骼肌的基因编码不同，两者在结构和免疫原方面有很大差别。在检测 cTnT 的方法改进后，用两种均为心

肌特异的单克隆抗体检测 cTnT 时, 与骨骼肌交叉反应阳性率 $<0.5\%$ (Katus HA. etal. Clin. chem. 1992, 38: 386)。Baum 等人对 75 名无心脏病的骨骼肌患者 (其中 33 名 Duchenne 病, 42 例马拉松运动员长跑后) 用改进后的检测方法检测 cTnT, 未发现一例阳性反应 (Bodor GS. etal. Clin. chem. 1992, 38: 2203.)。由此可以认为, 在无心脏病的骨骼肌中及运动员血浆中未发现 cTnT 存在, 所以 cTnT 对诊断急性心肌梗死与 cTnI 同样具有心肌特异性。然而当发生 AMI 时, cTnT 在升高倍数和持续时间上优于 cTnI, 因为 cTnT 在正常人血清中含量很低, 在心肌细胞中含量高, 一旦少量释放入血浆, cTnT 即可升高 30-200 倍, 而 cTnI 仅升高 10-20 倍 (杨振华: 中华医学杂志。1992, 72 (1) 51-52)。另外 cTnT 在血液和淋巴液中消除速率慢, AMI 时 cTnT 升高可持续 2—3 周, 较 cTnI 持续时间长。

因为 cTnT 在血中正常含量很低, 测定方法需有很低的可测限和较高的灵敏度。最初建立检测血清 cTnT 的 ELISA 方法是基于亲和纯的一种多抗和一种单抗建立起来的, 以后又发展了更敏感特异的 ELISA 单抗一步法, 整个反应 90 分钟完成, 检测范围 $0.1-15 \mu\text{g/L}$ 。由于全部采用单抗, 检测结果重复性较高, 与骨骼肌交叉反应性率 $<0.5\%$ (Katus HA. etal. Clin. chem., 1992, 38:386)。快速定性测定方法采用金免疫层析法 (郑佐娅, 陶义训, 上海医学检验杂志, 1996, 11, 57-58.)。

1977 年 Arakawe 创建了化学发光免疫分析 (Chemiluminescent immunoassay, CLIA)。该方法可以使检测范围达到 6 个数量级, 并且敏感度可达 10^{-18} 的负 18 次方摩尔水平。

同化学发光免疫分析方法相比, 酶免疫分析法和金免疫层析法在敏感度上要低得多。

发明内容

亲合素—生物素双单抗夹心一步法检测 cTnT 方法: 该方法需要两种同 cTnT 反应具有不同结合位点的单抗。需制备单抗 (1) 同生物素的复合物, 单抗 (2) 同酶的复合物, 将链霉亲合素固化于固相载体上。当单抗 (1) 同生物素的复合物、单抗 (2) 同酶的复合物和样品 (或标准品) 一起加入反应池后, 通过一步法生成复合物: 固相载体—链霉亲合素—生物素—单抗 (1)—cTnT—单抗 (2)—酶, 经过洗涤后加入底物、氧化剂、增强剂便可发光。

竞争法检测 cTnT 的方法只需用一种单抗。首先制备 cTnT—链霉亲合素的复合物, 酶—生物素的复合物, 将单抗固化于固相载体上。当样品 (或标准品) 同 cTnT—链亲合素复合物、

酶-生物素复合物一起加入反应池, 经过反应、洗涤后加入酶的底物、氧化剂、增强剂便可发光。

若底物是二酰基肼的衍生物, 则单抗(2)所结合的酶为辣根过氧化物酶; 若底物是环 1, 2-二氧乙烷衍生物 (AMPPD), 则单抗(2)所结合的酶为碱性磷酸酶。

酶促化学发光免疫分析法可采用全自动检测仪, 也可采用半自动发光仪。根据需要, 固相载体可选用多孔板或磁微粒。

单克隆抗体同酶或生物素的结合已有多处报道, 现已成常规方法:

- 1、J. Immunological Methods , 1979, 31:231-236。
- 2、J. Histochem. Cytochem , 1979, 22:1084-1091。
- 3、尹伯元、王仁芝、李振甲、许以平等编著《标记免疫学》: 41-50 页。
- 4、Peters JH , Baumgarten H eds. Monoklonale Antikörper. 1988:1349-53 。

具体实施方式

实施例 1

cTnT 的提取、纯化及其单克隆抗体的制备。参照文献 (Jin J-P, J. Biol. Chem. 1988, 263(15):7309 ; 傅朝平等细胞与分子免疫学杂志, 1996, 12 (1): 39 ; 周国华等, 中国生理学杂志, 2004, 6 (2): 198; 张海珠等, 郑州大学学报 (医学版), 2003 年, 03 期; 李志梁、傅朝平等, 生物化学与生物物理进展, 1996, 第五期), 将新鲜无心脏病的心肌组织匀浆, 70℃高盐萃取, 硫酸铵盐析, DEAE 纤维素柱层析, 获得 cTnT 纯品。100g 心肌组织获得 4.5mg cTnT。经凝胶电泳 cTnT 为一条带, 经免疫印迹鉴定证实 DEAE 纤维柱层析第二峰为 cTnT 的活性峰。

cTnT 免疫 BALB/c 小鼠。首次用 35 μg cTnT 同等体积不完全佐剂混合 (含 2.0mg 卡介苗) 腹腔注射, 以后每周脾内注射 cTnT 35 μg, 共免疫 3 次。第 4 次为加强免疫, cTnT 50 μg 脾内注射, 3-5 天内进行融合。

细胞融合及单抗产生: 小鼠脾细胞同 Sp2/0 骨髓瘤细胞按 1: 5 进行融合。克隆化培养, 3 次间接 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株。接种 BALB/c: 成年小鼠基础免疫用 0.2ml 降植烷和不完全佐剂腹腔注射, 1 周后腹腔注射杂交瘤细胞悬液, 10-12 天处死接种小鼠, 收集腹水, 其效价在 1.5×10^6 的负 6 次至 1.0×10^7 的负 7 次方。经硫酸铵分级沉淀、透析、浓缩后加甘

油置-20℃保存。。相加试验证实, A3、D6 可识别 cTnT 不同位点。该单抗不与 cTnI 及骨骼肌反应。A3 称为单抗 (1), D6 称为单抗 (2)。

实施例 2

辣根过氧化物酶发光体系的配制方法: 发光底物二酰基胍的衍生物 (优选鲁米诺) 浓度为 1.0mMol/L。复合氧化剂: 过硼酸钠-H₂O₂ 各为 1.0mMol/L。复合增强剂: 对羟基肉硅酸-对碘酚各为 0.05mMol/L。用 0.1Mol/L, pH8.60 的 Tris-HCl 缓冲液调整 pH。

实施例 3

亲合素-生物素双单抗夹心一步法检测 cTnT 化学发光免疫分析方法的建立:

- 1、按前述文献制备单抗 (1) 同生物素的复合物, 单抗 (2) 同辣根过氧化物酶的复合物, 将链霉亲合素结合于 Nunc 板上。
- 2、建立亲合素-生物素双单抗夹心一步法检测 cTnT 的 CLIA 法。将待测血清 (或 cTnT 的标准品)、单抗 (1) 同生物素的复合物、单抗 (2) 同辣根过氧化物酶的复合物各 50 μl 加入经链霉亲合素包被的 Nanc 板孔中, 37℃ 温育 60 分钟, 用 PBST 洗涤 3 次, 加入鲁米诺底物溶液 (具体配制见实施例 2), 用化学发光免疫分析仪检测 425nm 发光值, 由微机软件算出样品含量。该方法的灵敏度经测定 (Bo+2SD) 为 0.005ng/ml, 检测范围 0.01-1.50 ng/ml。

实施例 4

正常人与 AMI 患者血液内 cTnT 含量测定。正常人 51 例, AMI 患者 19 例, 正常人组 cTnT 的含量为 0.02±0.01ng/mL, AMI 组为 0.95±0.22 ng/mL。

专利名称(译)	化学发光免疫分析检测心肌钙蛋白T的方法		
公开(公告)号	CN101206225A	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200610130403.3	申请日	2006-12-19
[标]发明人	苏殿杰 王仁芝 魏桂梅 韩苏		
发明人	苏殿杰 王仁芝 魏桂梅 韩苏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/577 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用化学发光免疫分析法检测心肌钙蛋白T(cTnT)的分析方法。