

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510122334.7

[43] 公开日 2007年6月20日

[11] 公开号 CN 1982337A

[22] 申请日 2005.12.14

[21] 申请号 200510122334.7

[71] 申请人 中国医学科学院放射医学研究所

地址 300192 天津市南开区白堤路 238 号

[72] 发明人 张春明 王德芝 陈冀莹 赵启仁
穆传杰 秦丽莉 李玉彬 胡晓林

[74] 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司

代理人 朱红星

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称

抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种抗人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 合成多肽抗体及其制备方法与应用。其制备方法是：以 cTnI 氨基酸序列中的一段 (N 端 98 - 110 氨基酸) 合成多肽，其氨基酸序列 RQLHARVDKVDDEE，以此作为半抗原与蛋白载体连接后，制备出人工免疫原，对动物进行免疫，有效的诱导机体产生免疫应答，从而得到抗体。本发明制备的 cTnI 合成多肽抗体可与天然心肌肌钙蛋白 I 分子发生特异性结合反应。用该抗体包被微孔硝酸纤维素膜，用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒标记该抗体，并结合层析技术制备的 cTnI 胶体金免疫检测卡，其具有较高的灵敏度和特异性。为急性心肌梗的早期诊断提供了特异、灵敏、简便、快速的诊断技术。

1、一种抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体,其特征在于,该抗体的效价为 1:200000,亲和常数为 $0.985 \times 10^9 \text{L/mol}$; 制备该抗体的抗原为合成多肽,其氨基酸序列为人心肌肌钙蛋白 I N 端 98—110 的 RQLHARVDKVDEE 氨基酸序列。

2、一种抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体的制备方法,其特征在于,以人心肌肌钙蛋白 I 氨基酸序列中 N 端 98—110 的 RQLHARVDKVDEE 氨基酸肽段序列作为抗原肽,合成人心肌肌钙蛋白 I 抗原肽;纯化的抗原肽与血蓝蛋白载体偶联成人工抗原,经高效液相层析纯化后,免疫动物,制备多肽抗体,经检测抗血清效价,达到要求后,收获抗血清,并经辛酸—硫酸铵沉淀法纯化而成。

3、如权利要求 1 所述的抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体在制备心肌损伤胶体金免疫检测卡中的应用。

4、一种检测人心肌肌钙蛋白 I 的胶体金免疫检测卡,其特征在于,所述免疫检测卡它是由样品垫、含有胶体金标记抗体的玻璃纤维、包被有人心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体、羊抗兔 IgG 的硝酸纤维素膜、吸收垫组成。

5、一种检测人心肌肌钙蛋白 I 胶体金免疫检测卡的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

(1) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液,用纳米级胶体金颗粒标记制备的抗体并将玻璃纤维浸泡在该抗体溶液中;用纯化的人心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体包被微孔硝酸纤维素膜,使抗体包被在硝酸纤维素膜上,以捕捉样品中的抗原;用羊抗兔 IgG 的多克隆抗体另划一条线,以捕捉胶体金标记的多克隆抗体,作为免疫检测卡的质量控制线;

(2). 晾干后完全浸泡于含 1% 牛血清白蛋白的 pH7.2 的磷酸盐缓冲液中,以封闭纤维素膜的残余吸附能力,4℃ 冰箱过夜;

(3). 取出封闭的纤维素膜,用磷酸盐缓冲液洗涤,每次将纤维素膜浸泡洗涤,置于室温中干燥,再放于通风干燥箱内通风干燥,密封于塑料袋中,保存于 4℃ 冰箱备用。

抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及以抗体为特征的体外实验用的生物制品，更具体的说，是一种抗人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 合成多肽抗体及其制备方法和测定 cTnI 的胶体金免疫检测卡。

背景技术

目前在工业化国家，心血管疾病是威胁人类生命的主要疾病之一，发病率和死亡率均很高，对此类疾病进行早期诊断和治疗具有重大意义。心脏病的诊断包括临床表现，心电图的变化和心肌损伤生化标志物的实验室检测，其中心肌损伤生化标志物的检测在心肌损伤和急性心肌梗死的诊断方面起重要作用。而寻找和筛选早期、灵敏、特异的心肌损伤标志物和简便、快捷、灵敏的检测分析方法，一直是该领域的重要研究内容。

随着对心肌损伤标志物的深入研究和长期的临床实践验证，以前常用的标志物如 AST (门冬氨酸氨基转移酶)，LDH (乳酸脱氢酶) 及其同工酶，CK (肌酸磷酸激酶) 及 CK-MB (肌酸磷酸激酶同工酶) 存在许多缺陷和不足，特异性不强是其最主要的缺点。此外，在早期诊断和灵敏度方面也不理想，有可能造成漏诊或误诊，因此已呈现出逐渐被新标志物取代的趋势。如目前常用的采用免疫学技术测定血清 cTnI (心肌肌钙蛋白 I)、cTnT (心肌肌钙蛋白 T) 和 Mb (肌红蛋白) 等，它们在诊断心肌损伤方面价值更高，有取代心肌酶学指标的趋势。

在这些生化指标中，抗人心肌肌钙蛋白 cTnI 尤为突出，它是心肌损伤的一种特异、灵敏的血清标志物，具有以下特点：在急性心肌梗死发生后 4-12h 即有明显升高，可持续 4-10d，可作为早期诊断的指标，且对心肌损伤的灵敏度和特异性都很高，因此 cTnI 的检测不仅可以用来早期诊断急性心肌梗死和心绞痛等，还可作为晚入院病人的回顾诊断和动态诊断指标。

人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 是含 210 个氨基酸的蛋白质, 相对分子量为 24KD, 据 NCBI Protein 提供的 cTnI 氨基酸序列为:

```
1 madgssdaar eprpapapir rrssnyraya tephakksk isasrklqlk tlllqiakqe
61 lereaeerrg ekgralstrc qpleltglgf aelqdlcrql harvdkvdee rydieakvtk
121 niteiadltq kifdlrgkfk rptlrrvris adammqallg arakesldlr ahlkqvkked
181 tekenrevgd wrknidalsg megrkkkfes
```

据报道, cTnI 中心区域的第 96—116 的氨基酸残基因为含有抑制性区域, 能促进与 cTnC 相结合, 进而具有更强的抵抗蛋白水解酶的水解作用。也就是说, 当心肌损伤时包含这段氨基酸残基的 cTnI 可与 cTnC 相结合, 被 cTnC 所保护大量存在血液循环中, 因此将这段肽段作为抗原进行免疫制备抗体进而组装成胶体金免疫检测卡可以提高检测敏感性和特异性。

但是由于人心肌组织难以获得, 因此从组织中大量提取纯化 cTnI, 把它作为研究或者诊断用的抗原是极其困难的, 不但价格昂贵, 提取纯化成本高, 临床上很难满足早期诊断急性心肌梗死和心绞痛的需要。

发明内容

本发明的目的是提供一种特异性高的抗人心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 合成多肽抗体。

本发明的另一个目的是提供一种抗 cTnI 多克隆抗体的制备方法。

本发明的再一个目的是公开了抗人 cTnI 合成多肽抗体在制备心肌损伤胶体金免疫检测卡中的应用及其使用方法。

本发明的还一个目的是提供一种用于检测心肌损伤的包被有 cTnI- PcAb 和羊抗兔 IgG 的硝酸纤维素膜的胶体金免疫检测卡。

本发明的目的是通过如下的技术方案加以实现:

一种抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体, 其特征在于该抗体的效价为 1: 200000, 亲和常数为 $0.985 \times 10^9 \text{L/mol}$, 作为合成多肽的氨基酸序列为 N 端 98—110 的氨基酸序列 Arg-Gln-leu-His-Ala-Arg-Val-Asp-Lys-Val-Asp-Glu-Glu。

本发明的抗人心肌肌钙蛋白 I 合成多肽抗体的制备方法, 它是以人心肌肌钙蛋白氨

基酸序列中 N 端 98—110 的氨基酸肽段序列 RQLHARVDKVDDEE 作为抗原肽，在氨基酸 C 端加入 Cys（半胱氨酸）残基，使合成肽具有游离的巯基，蛋白载体具有游离的氨基，将它设计与血蓝蛋白（KLH）相偶联，合成人心肌肌钙蛋白 I 抗原肽。经高效液相层析纯化后，免疫动物，制备多肽抗体，经检测抗血清效价，达到要求后，收获抗血清，并经辛酸—硫酸铵沉淀法纯化而成。

本发明所述的胶体金免疫检测卡，它是由样品垫、含有胶体金标记抗体的玻璃纤维、包被有人心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体、羊抗兔 IgG 的硝酸纤维素膜、吸收垫组成，其制备方法如下：

(1) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，用纳米级胶体金颗粒标记制备的抗体并将玻璃纤维浸泡在该抗体溶液中；用纯化的人心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体包被微孔硝酸纤维素膜，即在硝酸纤维素膜上划线，使抗体包被在硝酸纤维素膜上，以捕捉样品中的抗原；用羊抗兔 IgG 的多克隆抗体另划一条线，以捕捉胶体金标记的多克隆抗体，作为免疫检测卡的质量控制线；

(2). 晾干后完全浸泡于含 1% 牛血清白蛋白的 pH7.2 的磷酸盐缓冲液中，以封闭纤维素膜的残余吸附能力，4℃ 冰箱过夜；

(3). 取出封闭的纤维素膜，用磷酸盐缓冲液洗涤，每次将纤维素膜浸泡洗涤，置于室温中干燥，再放于通风干燥箱内通风干燥，密封于塑料袋中，保存于 4℃ 冰箱备用。

本发明选取 cTnI 上 N 端第 98—110 的氨基酸，为 13 个氨基酸的多肽，合成肽主要通过固相多肽合成方法制备。以 Fmoc 保护氨基酸为原料，在固相载体（树脂）上以逐步缩合的方式合成所需肽段，最后以适当的方法从载体上“切”下肽段，并脱去所有的保护基团。将此多肽用高效液相色谱分析纯化纯度可达 95%，制得纯的合成肽抗原，其特点是选择合成天然 cTnI 蛋白上的一段氨基酸多肽，具有免疫原性、且水溶性好，经高效液相层析纯化和质谱分析证实所合成多肽达到后续实验的要求。同时为了加强这段多肽的免疫原性，把它和血蓝蛋白（KLH）载体偶联，用该连接物免疫家兔，采用经典的多克隆抗体制备技术制备 cTnI 合成多肽抗体，采用酶联免疫吸附试验法（ELISA）对 cTnI 抗体进行检测，达到实验要求。采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液，用纳米级胶体

金颗粒标记制备的抗体并将玻璃纤维浸泡在该抗体溶液中；用纯化的人心肌肌钙蛋白 I 多克隆抗体包被微孔硝酸纤维素膜，(nitrocellulose membrane, NCM)，并结合层析技术建立了 cTnI 的胶体金免疫层析分析法 (colloidal gold immuno-chromatographic assay, GICA)，从而制备了简便、快速的胶体金免疫检测卡，以满足临床检测、诊断的需要，具体表现为：

一、高质量的兔抗人 cTnI 合成肽段多克隆抗血清

本实验用连接物免疫家兔，制备多克隆抗体，用间接 ELISA 法测家兔血清抗体效价水平，用 cTnI 合成肽纯品制备抗原包被板，抗体效价可达到 1: 200000，说明选取的肽段是暴露于蛋白质外部的亲水区，具有较高抗原性，可产生效价较高的抗肽抗体，可进行后续实验。同时用天然人 cTnI 抗原制备抗原包被板，抗体效价可达到 1: 10000，说明本实验选取的 cTnI 合成肽段与天然 cTnI 抗原具有很好的交叉反应，证实 cTnI 合成肽段与天然 cTnI 抗原在空间构象上具有相似性，同时用辛酸-硫酸铵法进行抗体的纯化，获得纯化抗体浓度为 3.8 mg /ml。抗体亲和常数 K_a 为 $0.985 \times 10^9 \text{L/mol}$ ，亲和力强；特异性高，与人 cTnT、CK-MB 无交叉反应。经免疫 3 只雌性处于成长期的纯系新西兰大耳白家兔，经过初次免疫和加强免疫，于加强免疫 2 周后用间接 ELISA 法测家兔血清抗体效价水平，发现 1 号、2 号和 3 号家兔的抗体效价均较高，抗体效价可达到 1: 200000。（见表 1）

表 1 免疫家兔 ELISA 法检测结果 OD_{492nm} （连接物抗原包被浓度 $5 \mu \text{g/ml}$ ）

| 稀 释 度 | 家 兔 编 号 | | |
|-----------|---------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1: 200000 | 0.848 | 0.925 | 0.925 |
| 1: 100000 | 0.929 | 0.894 | 0.953 |
| 1: 50000 | 1.128 | 1.191 | 1.192 |
| 1: 10000 | 0.965 | 0.935 | 0.923 |
| 1: 5000 | 1.155 | 1.145 | 1.111 |
| 1: 1000 | 0.894 | 0.867 | 0.828 |

| | | | |
|--------|-------|-------|-------|
| 1: 100 | 1.182 | 1.170 | 1.156 |
| 空白对照 | 0.122 | | |
| 阴性对照 | 0.142 | | |

注：以上数值均为酶标仪在 492nm 处测定的 OD 值，P/N 比值 ≥ 2.1 为阳性，其中 P 和 N 分别为阳性孔和阴性孔的 OD_{492nm} 值。

检验本发明选取的 cTnI 肽段与天然 cTnI 的交叉反应。其中 3 号家兔血清抗体效价可达到 1: 10000 (见表 2)，说明本实验课题选取的 cTnI 肽段制备的抗体与天然 cTnI 具有很好的交叉反应，用此抗体可进行后续实验，制备胶体金免疫检测卡。

表 2 免疫家兔 ELISA 法检测结果 OD_{492nm} (天然 cTnI 抗原包被浓度 $5 \mu g/ml$)

| 家兔编号 | | | |
|----------|-------|-------|-------|
| 稀释度 | 1 | 2 | 3 |
| 1: 20000 | 0.102 | 0.117 | 0.199 |
| 1: 10000 | 0.117 | 0.155 | 0.288 |
| 1: 5000 | 0.128 | 0.191 | 0.356 |
| 1: 2000 | 0.173 | 0.283 | 0.496 |
| 1: 1000 | 0.296 | 0.371 | 0.582 |
| 1: 100 | 0.452 | 0.476 | 0.765 |
| 1: 10 | 0.620 | 0.590 | 0.826 |
| 空白对照 | 0.112 | | |
| 阴性对照 | 0.136 | | |

注：以上数值均为酶标仪在 492nm 处测定的 OD 值，P/N 比值 ≥ 2.1 为阳性，其中 P 和 N 分别为阳性孔和阴性孔的 OD_{492nm} 值。

二、兔抗人 cTnI 合成肽多克隆抗体亲和力的鉴定

亲和力表示抗体与抗原结合的紧密程度，以亲和常数 K_a 表示，亲和常数以浓度的倒数为单位，即：克分子浓度⁻¹ (mol^{-1})。其值越高表示抗原抗体结合的紧密程度越高。

对不同抗体，亲和常数具有一个很大的范围可从 $10^{12} \sim 10^5 mol^{-1}$ 或更小。本实验采用非

竞争性 ELSA 法测定抗体的亲和常数，这是美国 David Beaty 用包被抗原检测抗体的方法，通过质量作用定律归纳出一个以抗体浓度计算抗体亲和常数的方法。本实验中以 cTnI 合成肽制备抗原包被板，包被浓度梯度为 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $2.5\mu\text{g/ml}$ 、 $1.25\mu\text{g/ml}$ 、 $0.625\mu\text{g/ml}$ (8: 4: 2: 1 共 4 个浓度梯度)；将纯化的抗体以磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释成 10 个浓度梯度 40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、 0.3125×10^{-1} 、 7.8×10^{-2} ($\mu\text{g/ml}$) 均加入各浓度包被的抗原孔中，测定 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值并作出曲线，最佳的抗体的亲和常数 $K_a = 0.985 \times 10^9 \text{L/mol}$ 。

三、人 cTnI 胶体金免疫检测卡测定结果：

本实验采用柠檬酸三钠还原法制备出酒红色的胶体金溶液，通过紫外可见分光光度计在 400—700nm 处进行扫描，在 520nm 处具有最大吸收峰。通过胶体金溶液的颜色以及紫外最大吸收值进一步证实了本实验制备的胶体金颗粒直径为 24nm 左右。制备直径在 24nm 的胶体金粒子是因为此粒径既能保证胶体金在 NCM 上合适的泳动速度，又是肉眼观察时最敏感的颜色，因而保证了检测的快速性和敏感性。

在硝酸纤维素膜上包被 cTnI PcAb，最佳包被浓度 3.5mg/ml ，本实验选定喷涂量为 $2\mu\text{l} / 0.05\text{cm}^2$ ；硝酸纤维素膜上包被羊抗兔 IgG 的多克隆抗体，最佳包被浓度 2mg/ml ，选定喷涂量为 $3\mu\text{l} / 0.05\text{cm}^2$ 。是根据表 12 中 Millipore 公司提供 HF135 的 Hi-Flow Plus 膜对羊 IgG 的吸附能力 $>95\mu\text{g/cm}^2$ ，本实验中对于 0.05cm^2 膜面积选定包被抗体的量为 $5-7\mu\text{g}$ ，达到最适吸附蛋白量使检测线、质控线最为清晰。

通过对反应条件的优化和选择，确立了人 cTnI 合成肽胶体金免疫检测卡分析法的最佳方案。包括胶体金最佳标记抗体浓度测定，以及硝酸纤维膜上最佳包被抗体浓度的测定等最佳反应体系的选择。并进行方法学鉴定：

本发明的人 cTnI GICA 法制备的胶体金免疫检测卡的积极效果在于：使复杂的操作简化为只需加样一步操作；只需微量检样；用肉眼观察试纸条显色与否即可判断阳性、阴性结果，无需任何仪器，也不受场地限制；检测只需 10—15min 就可知道结果。所以，该方法既可单人份检测，又可批量检测，无需特殊仪器设备，肉眼观察即可判断结果，具有简便、快速、直观、单份测定的优点，尤其适用于基层医院和大规模普查。

附图说明

图 1 cTnI 合成肽-KLH 连接物的高效液相层析图;

图 2 合成肽与 KLH 连接物的质谱图;

图 3 胶体金免疫检测卡组装示意图;

图 4 检测卡各种检测结果示意图, 其中 1 为操作方法, 2 为阴性结果, 3 为阳性结果, 4 为试纸条失效, a 为质控线, b 为检测线。

具体实施方式

实施例 1

抗人心肌肌钙蛋白 I 多肽的合成

用 Protscale 软件中的 Hopp&Woods 模型预测 cTnI 分子的亲水性、抗原型及同源性分析, 选取 cTnI 上 N 端第 98—110 的氨基酸, 为 13 个氨基酸的多肽, 合成肽主要通过固相多肽合成方法制备。以 Fmoc 保护氨基酸为原料, 在固相载体(树脂)上以逐步缩合的方式合成所需肽段 RQLHARVDKVDDEE 氨基酸序列。最后以适当的方法从载体上“切”下肽段, 并脱去所有的保护基团。将此多肽用高效液相色谱分析纯化可达 95%(具体见图 1), 制得纯的合成肽抗原。

实施例 2

合成肽与载体蛋白 (KLH) 的连接 (MBS 连接法)

(1) 将 5mg KLH 溶于 0.5ml PBS 中, 置透析袋内, 于 4℃用 PBS 透析过夜后, 转入玻璃试管内。(2) 加入 MBS/DMF 70 μ l, 室温搅拌 30 分钟。(3) 取经 PB 预平衡的 PD-10 层析柱, 缓慢加样, PB 洗脱, 大约收集 12-20 管, 每管 0.5ml, 通过紫外可见分光光度计测定洗脱液 280nm OD 值。第一峰代表 MBS/KLH 结合物, 呈絮状; 第二峰含游离的 MBS。收集 MBS/KLH 结合物部分。(4) 将 5mg 合成肽溶于 PBS 中, 如合成肽不溶于 PBS, 则可溶于 6mol/0.1mol/l PB 中。(5) 将合成肽溶液与 MBS/KLH 结合物混合, 以 0.1mol/l 盐酸或 0.1mol/l 氢氧化钠调 PH 至 7.3, 室温磁力搅拌 3h, 置 4℃蒸馏水透析过夜, 换一次蒸馏水后, 继续透析 \geq 4h。连接物置 -20℃保存备用, 质谱鉴定见图 2。

实施例 3

cTnI 合成肽抗原的多克隆抗体制备

多克隆抗体制备技术的具体流程包括：动物免疫，抗血清效价检测，收获抗血清，抗体纯化以及抗体质量鉴定几个部分，现分述如下：

一、动物免疫：选择新西兰大耳白家兔体重 1.5—1.8Kg，经初次及多次加强免疫制备人 cTnI 多肽合成抗体：

(1) .免疫效果的检测：在第二次加强免疫后 10—14 天于家兔耳缘静脉少量采血，分离血清，用间接 ELISA 法检测家兔血清中的抗体效价。

(2) .收集抗血清：一次性大量放血，当抗血清效价达到最大并不再升高（或开始下降）时，采用颈动脉放血收集血清：

(a)实验兔的四肢和头部固定在实验台上：用手术剪剪开颈部皮肤，暴露出颈动脉，将颈动脉用眼科剪剪一小口，插入一段细塑料管，放开止血钳，用三只 50ml 离心管接血，血液总量约 100—150ml。

(b)将采集的血液置于室温，静置 2 小时后，置 4℃冰箱过夜，用长玻璃吸管剥离凝血块，使血清便于析出。

(c)将血液在 1000rpm×10min 离心，收集血清（血清总量 40—50ml），加 0.1%叠氮钠防腐，按 1ml/管和 0.5ml/管分装后置于-20℃冰箱保存备用。

二、ELISA 法检测家兔血清效价

(a)包被抗原，用包被缓冲液将抗原分别稀释至 2 μ g/ml、5 μ g/ml 和 10 μ g/ml，共铺两块抗原包被板（聚苯乙烯酶联板），每孔 100 μ l，4℃过夜，然后弃去孔内液体，缓冲液洗三次，每次 3 分钟，拍干。空白对照孔加入不含抗原的缓冲液。

(b)每孔加入含 0.5%BSA 的封闭液 100 μ l，4℃过夜，洗涤液洗三次，每次 3 分钟，拍干。

(c)于家兔耳缘静脉少量采血，静置沉淀 4 小时后，分离血清，将血清分别稀释至 1:100、1:2000、1:5000、1:1万、1:5万、1:10万、1:20万，分别取不同稀释度血清加入抗原包被板，每孔 100 μ l，37℃水浴 2 小时，洗涤液洗三次，每次 3 分钟，拍干。阴性对照孔加入未经免疫的正常家兔的血清。

(d)将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体用含0.05%Tween-20的 PBS 稀释100倍,每孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴2小时,洗涤液洗三次,每次3分钟,拍干;每孔加入邻苯二胺底物溶液100 μ l, 室温避光放置30分钟;每孔加入2mol/L 的浓硫酸50 μ l 终止反应;用酶标仪于492nm 处测 OD 值并判断结果。

三、cTnI 合成多肽抗血清的纯化

采用辛酸—硫酸铵沉淀法纯化。

(1) 取 cTnI 抗血清 1 ml, 加入 4 ml 的 0.06 mol/L pH4.0 乙酸—乙酸钠缓冲液。用 1 mol/L Tris 溶液调上液 pH 至 4.5。缓慢滴加 125 μ l 的辛酸溶液, 常温搅拌 30min, 然后, 10000rpm (4 $^{\circ}$ C), 离心 30min。弃沉淀, 上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后, 用 1 mol/L Tris 溶液调 pH 至 7.4。

(2) 加等量饱和硫酸铵后, 调 pH 至 7.0, 然后 4 $^{\circ}$ C 搅拌 30 min, 10000rpm (4 $^{\circ}$ C), 离心 15min, 弃上清, 沉淀用三蒸水溶解后, 透析 48 小时 (以三蒸水透析)。

(3) 透析袋内溶液在 280nm 处测 O.D 值。

四、纯化后的 cTnI 合成多肽抗血清蛋白含量的测定

紫外吸收法测定蛋白质含量。原理: 由于蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键, 因此蛋白质具有吸收紫外光的性质, 吸收高峰在 280nm 处。本实验将纯化后的抗血清稀释 20 倍后, 测 O.D260nm 和 O.D280nm。

实施例 4

人 cTnI 胶体金免疫检测卡的制备:

(1) 胶体金的制备: 玻璃容器的硅化: 按使用说明书将硅烷化试剂 (Sigmacote) 加入玻璃容器中, 轻轻晃动, 使容器内壁表面与试剂充分作用, 室温干燥后即可使用。专用的清洁器皿以第一次生成的胶体金稳定其表面, 弃去后以三蒸水淋洗, 即可继续使用。

称取氯金酸 (HAuCl_4) 1 克, 溶解于 100ml 去离子水中, 配成 1% 的氯金酸溶液。取 1ml 该溶液置于 250ml 烧杯内, 加入 99ml 去离子水, 加热至沸腾, 立即加入 2ml 1% 的柠檬酸三钠溶液, 迅速搅拌均匀, 观察颜色变化, 1 分钟后出现蓝色, 继续加热, 变为

灰色继而黑色，2—3 分钟后出现浅紫—深紫—深红—橙红—酒红，颜色稳定不变。继续加热 10min，冷却至室温，补充去离子水至 100ml。经一次性灭菌过滤器过滤，装入洁净玻璃瓶中，4℃保存备用。

(2) 胶体金的鉴定：用紫外可见分光光度计在 400—700nm 处进行扫描，在 520nm 处具有最大吸收峰。

(3) cTnI 多克隆抗体 (PcAb) 胶体金标记最佳 pH 值的选定：

(a) 取 7 支试管，每管各加入上述制备的胶体金溶液 2ml。用 0.1 mol/L 的碳酸钾溶液将其 pH 值分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0。

(b) 将上述不同 pH 值的胶体金溶液分别各取 1ml 分别转移至另外的 7 支试管中，每管加入 10 μg 纯化的 cTnI PcAb，混合均匀，室温反应 10min 后加入 10% 的氯化钠溶液 100 μl，静置 2h，观察溶液颜色变化。

(c) 然后，12000rpm 离心 10min，去掉上清，加入含 1% BSA 的 PBS 溶解沉淀，观察各管底部胶体金的颜色和溶解情况。以沉淀完全溶解呈均匀的透明紫红色溶液管的 pH 值为最佳 pH 值。最佳 pH 值为 8.0。

(4) cTnI -PcAb 胶体金标记最佳蛋白浓度的选择：

(a) 用 0.1mol/L 的碳酸钾溶液调节胶体金溶液的 pH 值至 8.0 的最佳值，在 6 支试管中各加入 1ml 胶体金溶液。然后，分别加入 1 μg、2.5 μg、5.0 μg、7.5 μg、10 μg、15 μg 纯化的 PcAb，反应 10min 后，各管加入 10% 氯化钠溶液 100 μl，静置 2h，观察各管颜色变化。

(b) 然后，12000rpm 离心 20min，去掉上清，加入含 1% BSA 的 PBS 溶解沉淀，观察各管底部胶体金的颜色和溶解情况，以沉淀完全溶解成均匀的紫红色溶液管的最低蛋白浓度加其 20% 为最佳蛋白浓度。

(5) cTnI- PcAb 的胶体金标记

(a) 将 100ml 制备好的胶体金溶液的 pH 值调节到 8.0，从中取 1ml 加入纯化的 cTnI PcAb 6 μg 混匀，室温反应 10min，2000rpm，4℃，离心 20 min，去掉沉淀。上清液 12000rpm，4℃，离心 20min，弃上清。

(b) 沉淀分别溶于 100 μ l、200 μ l、300 μ l、400 μ l 含 0.2% BSA 的 0.01 mol/L pH8.0 的 PBS 溶液，即制备成 10%、5%、3%、2.5% 浓缩的胶体金标记物。

(c) 将玻璃纤维浸泡在不同浓缩度的胶体金标记的抗体溶液中，充分浸泡 30min 后取出。室温干燥 18h 以上，塑料袋密封，4℃ 冰箱保存。

(6) 抗体在硝酸纤维素膜上的包被：

(a) 将纯化的 cTnI-PcAb 用 0.01mol/L 含 0.14M 氯化钠的 PBS (pH7.2) 稀释至浓度为 3.5mg /ml, 3.0mg /ml, 2mg /ml, 1mg /ml, 0.5 mg /ml 各 1ml。用微量注射器分别吸取 5 μ l, 分别在硝酸纤维素膜 (NCM) 上划线，线宽 1mm, 喷涂量为 0.4 μ g/mm², 使抗体包被在 NCM 上，以捕捉样品中的抗原。

(b) 在离抗体划线 4mm 处用浓度为 3 mg /ml , 2 mg /ml , 1 mg /ml, 0.5 mg /ml 的羊抗兔 IgG 的多克隆抗体另划一条线，喷涂量为 0.8 μ g/mm² 以捕捉胶体金标记的 PcAb, 作为试纸条的质量控制线。

(c) 半小时晾干后完全浸泡于含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 pH7.2 的 PBS 溶液中，以封闭纤维素膜的残余吸附能力，4℃ 冰箱过夜。次日取出封闭的纤维素膜，用 PBS 洗涤 3 次，每次将纤维素膜浸泡 5min, 洗涤后的纤维素膜置于室温中干燥 3h 以上，再放于 30℃ 通风干燥箱内通风干燥 1h, 密封于塑料袋中，保存于 4℃ 冰箱备用。

(7). 人 cTnI 胶体金免疫检测卡的组装、切割

免疫层析分析试纸条切割尺寸：

样品垫 (2cm×0.5cm)

吸收垫 (1.7 cm×0.5 cm)

玻璃纤维结合垫 (1 cm×0.5 cm)

白色聚苯乙烯塑料垫板 PVC (6 cm×0.5 cm)

粘合胶条 (2 cm×0.5 cm)

NCM (2.5 cm×0.5 cm)

取切割好的 PVC 板一块，将包被有 cTnI PcAb 和羊抗兔 IgG 的硝酸纤维素膜沿 PVC 板长径粘贴于 PVC 板中央，将吸收垫 (引水纤维) 贴于靠近包被有羊抗兔 IgG 的多克隆

抗体的一端，并与硝酸纤维素膜密切接触，约重叠 2mm。将含有胶体金标记抗体的玻璃纤维（宽 0.5mm）贴于 NCM 膜下方与之相接触重叠。将样品垫贴于 PVC 板上，与结合垫相重叠约 2mm。组装成 0.5×6cm 的胶体金免疫检测卡（具体见附图 3）。

实施例 5

胶体金免疫检测卡质量鉴定

（1）检测结果判断：按检测卡操作方法，在室温条件下（15—30℃），检测以正常人阴性血清配制的 cTnI 合成肽纯品标准溶液，上样 10—15min，5ng/ml 的 cTnI 合成肽纯品即可被检出，5ng/ml 以下的 cTnI 标准品则不出现检测带，即为阴性结果。因此我们把观察结果的最佳时间定为上样后 15min。检测灵敏度为 5ng/ml，而高 cTnI 含量的样品，当其渗过检测区时，即可看见检测线出现，而不必等到 15min。

检测结果可能有三种情形：1. 在检测区和质控区各出现一条紫红色的条带，表示检测结果为阳性。2. 只在质控区出现一条紫红色的条带，表示检测结果为阴性。3. 在检测区和质控区均无紫红色条带出现，表示检测试纸条失效。（具体见附图 4）

（2）检测范围的测定：

检测以正常人阴性血清配制的 cTnI 合成肽纯品标准溶液，5ng/ml 以下的 cTnI 合成肽纯品不能被检出，对 5ng/ml 到 1μg/ml cTnI 合成肽纯品其检测带的颜色，呈现肉眼可见的由浅到深紫红色变化，对浓度 >1μg/ml cTnI 样品其检测线颜色肉眼判断无差别。故该试纸条半定量检测血清 cTnI 的适用范围为 5ng/ml—1μg/ml，

（3）特异性的检测：在检测样本中加入几种相关的蛋白质 cTnT、CK-MB 对检测结果无交叉反应。

（4）反应温度的测定：在 4℃ 条件下操作，上样后 15min 观察结果，5ng/ml cTnI 标准品的检测线不出现，将观察时间延长到 20min，检测线才出现，故 4℃ 条件下操作，应在上样后 20min 时观察结果。

（5）保存时间：37℃ 保存的试纸条第 2、3、4 和 5 天检测结果与第 1 天检测结果相同，检测线和控制线的颜色深浅在正常范围内。从第 6 天起，检测线和质控线的颜色均变浅，但仍在正常范围内，故 37℃ 至少可保存 5 天。4℃ 保存的试纸条，至第 12 周其

检测结果仍在正常范围内，故该检测试纸条在4℃至少可保存12周。

(6) 检测结果保存时间：检测过的试纸条放室温干燥，等完全干燥后重新判断一次结果，与15min时判断的结果一致。干燥后的试纸条4℃保存12周，检测结果无变化，故检测结果至少可保存12周。

实施例 6

胶体金免疫检测卡使用方法

(1) 检测时，将标有“marker”字样的一端插入待测样本中，等混合有胶体金的样品出现在NCM上时，将试纸条取出，放在干净、水平的台面上，观察结果。

(2) 灵敏度测试：将cTnI合成肽纯品浓度为1.0 mg/ml的贮备液用健康人血清配制成0ng/ml、2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、100ng/ml、500ng/ml、1μg/ml、5μg/ml的标准系列溶液，将本实验制备的试纸条分别插入上述标准系列溶液中，5秒后取出，观察各含量标准品出现阳性检测带，其中最低的cTnI浓度就是分析灵敏度。

(3) 测定范围的确定：将cTnI合成肽纯品用健康人血清配成10μg/ml、5μg/ml、1μg/ml、500ng/ml、250ng/ml、100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、10ng/ml、5ng/ml、2ng/ml和1ng/ml浓度系列。按上述方法用试纸条分别检测之，观察检测线颜色深浅的变化，以确定该试纸条用于半定量检测时的适用范围。

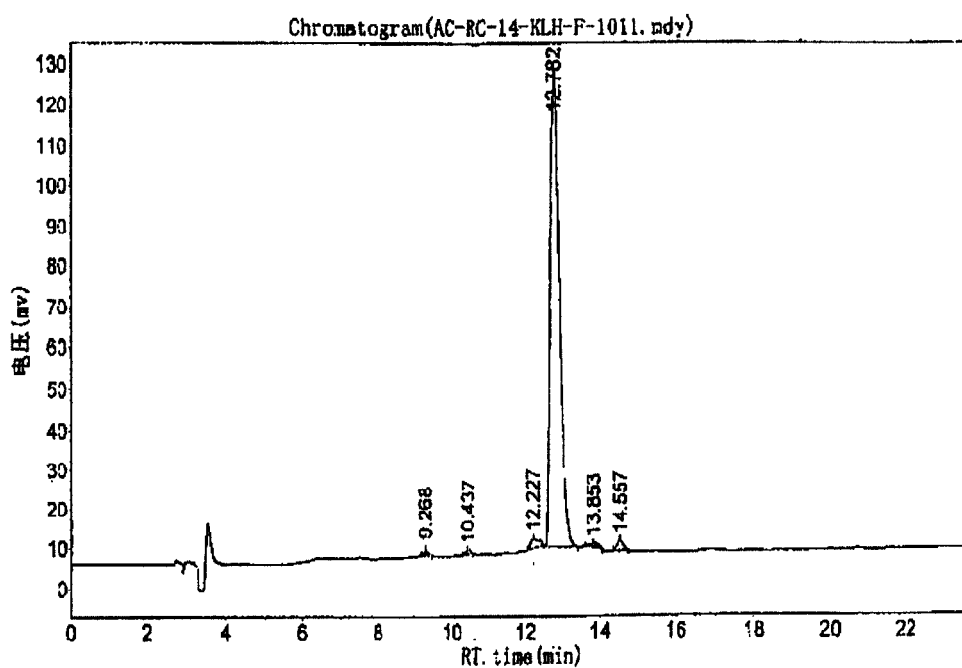
(4) 特异性的检测：在检测样本中加入几种相关的蛋白质cTnT、CK-MB观察检测结果有无交叉反应。

(5) 反应温度对实验结果的影响：在室温（约25℃）、4℃条件下进行检测操作，观察不同温度对检测结果的影响。

(6) 保存条件和保存时间的确定：将切割好的检测试纸条分别存放于37℃和4℃，观察温度对试纸条的影响。保存于37℃的试纸条每天取出3条分别检测0ng/ml、5ng/ml、50ng/ml的cTnI合成肽纯品，直至第12周。

(7) 检测结果保存时间的观察：上述检测过的试纸条干燥后密封于塑料袋内，室温保存，每周观察一次结果，以观察检测结果的保存时间。

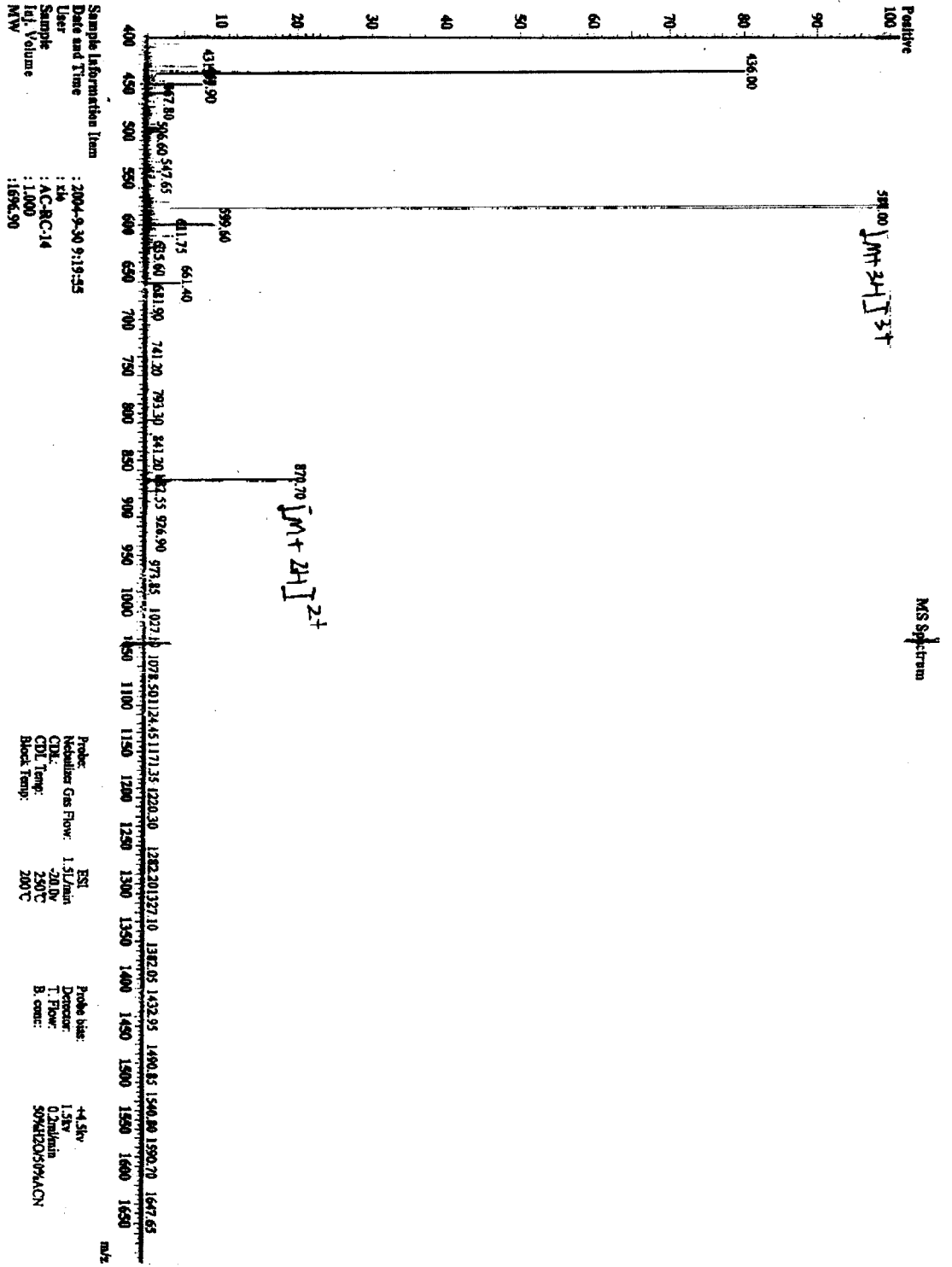
Summary:
 Structure : AC-RC-14-KLH
 Column : 4.6×250mm, ODS-2 Hypersil
 Solvent A : 0.1% trifluoroacetic in 100% acetonitrile
 Solvent B : 0.1% trifluoroacetic in 100% water
 Gradient :
 A B
 0.01min 15% 85%
 25min 30% 70%
 25.1min 100% 0%
 30min STOP
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Wavelength : 220nm



RESULTS

| Peak No. | Peak ID | Ret Time | Height | Area | Conc |
|----------|---------|----------|------------|-------------|----------|
| 1 | | 9.268 | 929.339 | 8828.106 | 0.4263 |
| 2 | | 10.437 | 1109.661 | 10854.942 | 0.5241 |
| 3 | | 12.227 | 2478.331 | 37699.590 | 1.8203 |
| 4 | | 12.782 | 118348.516 | 1968134.000 | 95.0305 |
| 5 | | 13.853 | 1058.620 | 18007.600 | 0.8695 |
| 6 | | 14.557 | 2492.609 | 27531.684 | 1.3294 |
| TOTAL | | | 126417.076 | 2071055.922 | 100.0000 |

图 1



1/2

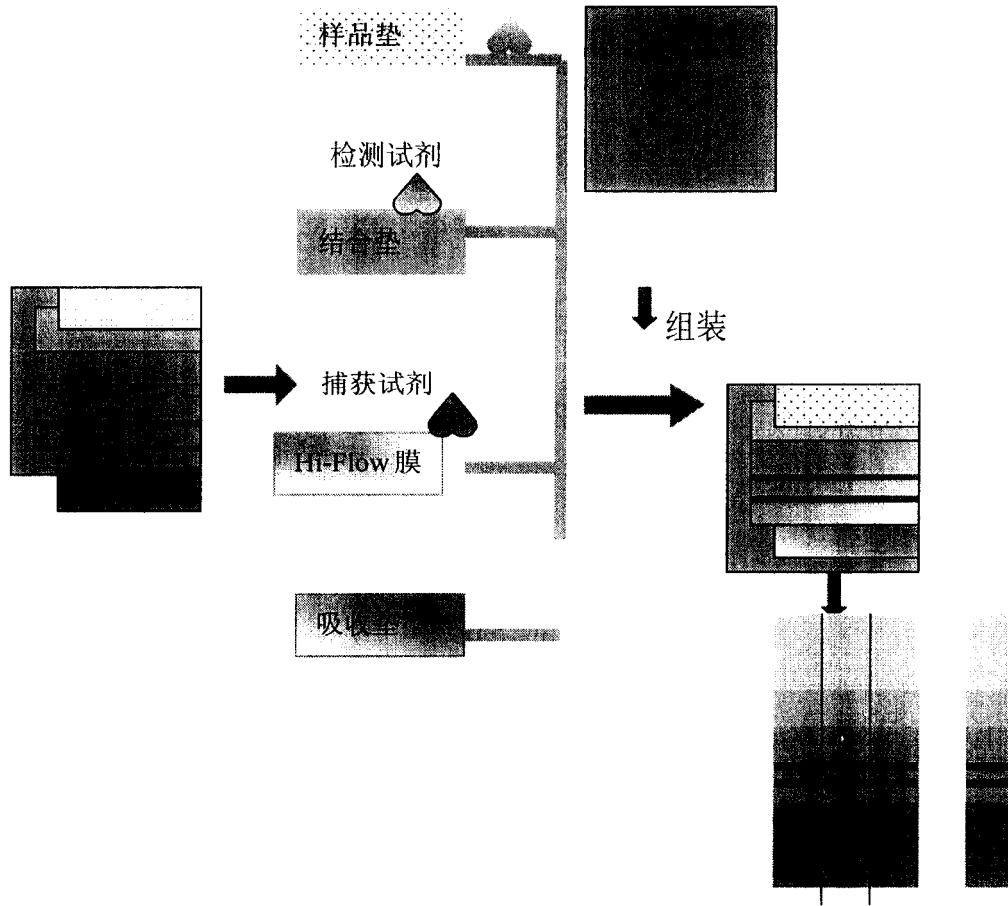


图 3

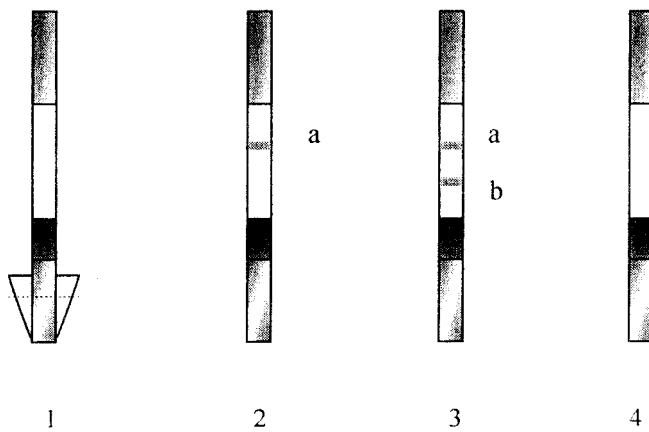


图 4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗人心肌肌钙蛋白I合成多肽抗体及其制备方法与应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN1982337A | 公开(公告)日 | 2007-06-20 |
| 申请号 | CN200510122334.7 | 申请日 | 2005-12-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国医学科学院放射医学研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国医学科学院放射医学研究所 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国医学科学院放射医学研究所 | | |
| [标]发明人 | 张春明 王德芝 陈冀莹 赵启仁 穆传杰 秦丽莉 李玉彬 胡晓林 | | |
| 发明人 | 张春明 王德芝 陈冀莹 赵启仁 穆传杰 秦丽莉 李玉彬 胡晓林 | | |
| IPC分类号 | C07K16/18 G01N33/53 | | |
| 代理人(译) | 朱红星 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种抗人心肌肌钙蛋白(cTnI)合成多肽抗体及其制备方法与应用。其制备方法是以cTnI氨基酸序列中的一段(N端98 - 110氨基酸)合成多肽，其氨基酸序列RQLHARVDKVDEE，以此作为半抗原与蛋白载体连接后，制备出人工免疫原，对动物进行免疫，有效的诱导机体产生免疫应答，从而得到抗体。本发明制备的cTnI合成多肽抗体可与天然心肌肌钙蛋白I分子发生特异性结合反应。用该抗体包被微孔硝酸纤维素膜，用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金颗粒标记该抗体，并结合层析技术制备的cTnI胶体金免疫检测卡，其具有较高的灵敏度和特异性。为急性心肌梗的早期诊断提供了特异、灵敏、简便、快速的诊断技术。

| 稀 释 度 | 家 兔 编 号 | | |
|----------|---------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1: 20000 | 0.102 | 0.117 | 0.199 |
| 1: 10000 | 0.117 | 0.155 | 0.288 |
| 1: 5000 | 0.128 | 0.191 | 0.356 |
| 1: 2000 | 0.173 | 0.283 | 0.496 |
| 1: 1000 | 0.296 | 0.371 | 0.582 |
| 1: 100 | 0.452 | 0.476 | 0.765 |
| 1: 10 | 0.620 | 0.590 | 0.826 |
| 空白对照 | 0.112 | | |
| 阴性对照 | 0.136 | | |