

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810036418.2

G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/558 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101566634A

[22] 申请日 2008.4.22

[21] 申请号 200810036418.2

[71] 申请人 上海一滴准生物科技有限公司

地址 200060 上海市静安区陕西北路1283弄  
9号玉城大厦3006室

[72] 发明人 宣生良

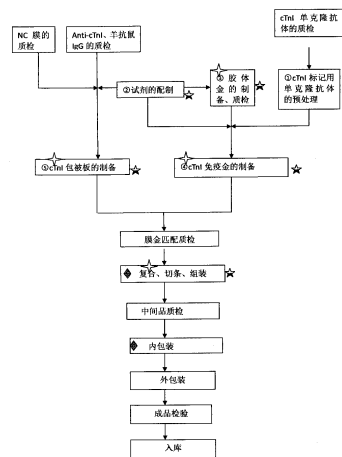
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

## [54] 发明名称

肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒(胶体金法)

## [57] 摘要

本发明属于生物科技领域，本发明公开了一种肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒(胶体金法)制作及工艺，采用了金标法测定人血清样品中 cTnI 的量，心肌钙蛋白 I(cTnI)的分子量为 22.5KD，其连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 构成结构复合物，在心脏中的细胞间钙信号肌动蛋白 - 肌球蛋白相互作用的转化过程中起着重要作用，本试剂盒采用双抗夹心免疫法，当标本加入样品槽后，通过结合垫和金抗体结合，复合物沿膜流动和抗体在检测区域反应。如果标本中存在有可检出浓度或更浓的标志物，就会在检测区出现一条色带。如果没有就会保持无色。标本继续移动至控制区域，出现粉红 - 玫瑰红的色带，说明试验正常结果有效。本发明的有益效果是肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒，性能极其稳定，用户使用极其方便、能准确快速检测。



1. 心肌钙蛋白 I (cTnI) 的分子量为 22.5KD, 其连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 构成结构复合物, 在心脏中的细胞间钙信号肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的转化过程中起着重要作用, 本试剂盒采用双抗夹心免疫法, 当标本加入样品槽后, 通过结合垫和金抗体结合, 复合物沿膜流动和抗体在检测区域反应。如果标本中存在有可检出浓度或更浓的标志物, 就会在检测区出现一条色带。如果没有就会保持无色。标本继续移动至控制区域, 出现粉红-玫瑰红的色带, 说明试验正常结果有效。

2. 根据权利要求 1 所述的肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒(胶体金法), 其特征在于: 心肌钙蛋白 I (cTnI) 的分子量为 22.5KD, 其连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 构成结构复合物。

3. 根据权利要求 1 所述的肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒 (胶体金法) 的配制, 其特征在于: 1%的柠檬酸三钠, 1%的氯金酸, 0.01%的氯金酸, 0.1 ml/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10%的氯化钠, 1%的叠氮钠, 10%的 BSA, 1 mol/l PBS, 0.05 mol/l PBS, 胶体金复溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒(胶体金法), 包括如下工艺步骤:

第一步 cTnI 标记用单克隆抗体的预处理

- 1.1 透析 (纯化水, 24 小时)
- 1.2 离心去上清 (4~10°C, 10000 转/分钟、5 分钟)
- 1.3 BCA 法则浓度 (物料平衡)
- 1.4 PH 的调节 (0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 量的确定)
- 1.5 最佳标记量的确定
- 1.6 分装 (5000 人份量/支)、-20 度冻存

第二步胶体金的制备

- 2.1 量取 0.01%的 HAuCl<sub>4</sub> 溶液 (加热至沸腾)
- 2.2 迅速加入 1 %柠檬酸三钠溶液, 搅拌均匀

(比例: 100ml 0.01%的 HAuCl<sub>4</sub> 溶液加 1.6 ml 1 %柠檬酸三钠溶液) (继续加热 10 分钟)

- 2.3 冷却至室温, 用超纯水恢复至原体积
- 2.4 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌
- 2.5 送检、装瓶、贴标签

第三步 cTnI 免疫金的制备和干燥

- 3.1 cTnI 标记抗体的稀释

按照每生产 5000 人份 4mm 宽的 cTnI 试纸条需 1 支 cTnI 标记抗体计算, 领取相应量的抗体, 用 0.05mol/l PBS 稀释到 0.5mg/ml。

- 3.2 生产前小试:

取 1ml 胶体金

- 1) 调 PH (0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的量, 混匀 5min)
- 2) 根据生产指令加入 CTnIAb1, 混匀 10min
- 3) 加入 100ul10%BSA, 混匀 10min
- 4) 离心 1000 转/min, 30min(要求环境温度 4-10℃)
- 5) 30%复溶, 浸泡聚酯膜 0.8ml/条 (0.6cm×30cm)
- 6) 温度 20-30℃, 相对湿度 30-35%干燥 5 小时
- 7) 送质检部检验

### 3.3 cTnI 抗体标记

- 1) 标记小试质检质检合格
- 2) 取胶体金, 电磁搅拌  
(以生产 1000 人份 5mm 宽的肌钙蛋白 I 胶体金试纸条约需 50ml 胶体金来计算。)
- 3) 调 PH (0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的量), 混匀 5min
- 4) 根据最适标记量加入 CTnIAb1, 混匀 10min
- 5) 加入 100ul10%BSA, 混匀 10min
- 6) 离心 1000 转/min, 30min, 4-10℃
- 7) 30%复溶, 浸泡聚酯膜 25.3ml/张 (20cm×30cm)
- 8) 温度 20-30℃, 相对湿度 30-35%干燥 5 小时
- 9) 抽一条 0.6cm 宽送质检部做膜金匹配检测
- 10) cTnI 免疫金送中间品室暂存

## 第四步 cTnI 包被板的制备

### 4.1 包被抗体的稀释

羊抗鼠 Ig0.05mol/LPBS 稀释到 1.2mg/ml 工作浓度  
cTnI 捕获抗体用 0.05mol/LPBS 稀释到 1.1mg/ml 工作浓度  
4.2 包被前小试

- 1) 各取 20ul 试包被 1 条 20cm 长的膜, 线浓度 1.0ul/cm
- 2) 2°C-8°C过夜
- 3) 贴膜
- 4) 温度 20-30°C、相对湿度 30-35%干燥 5 小时, 送质检部检验质检合格。

#### 4.3 包被生产

- 1) cTnI 包被小试质检合格单
- 2) 羊抗鼠 IgG、cTnI 捕获抗体工作浓度包被质控线和检测线, 线浓度 1.0ul/cm
- 3) 2°C-8°C过夜
- 4) 贴膜
- 5) 温度 20-30°C、相对湿度 30-35%干燥 5 小时
- 6) 抽 1 板送质检部作膜金匹配
- 7) 密封后送中间品库暂存

## 肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒（胶体金法）

### 技术领域

本发明提供了一种心肌梗死快速检测的肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒及检测方法。

### 背景技术

心肌缺血性损伤,特别是急性心肌梗塞(AMI)是威胁人类生命的主要疾病之一,临床化学家和临床科学家一直努力寻找和探索特异性好、灵敏度高的血清指标。心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 具有高度的心肌特异性,当心肌细胞受损时,血液中的 cTnI 出现时间早,持续时间长,与心肌损伤程度及预后密切相关,因此,它可作为心肌损伤的一种特异性指标。

### 发明内容

本发明提供了一种心肌梗死快速检测的肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒及检测方法。

本发明通过如下技术解决方案实现的:一种肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒,其特征在于:一种肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒,其特征在于:心肌钙蛋白 I (cTnI) 的分子量为 22.5KD,其连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 构成结构复合物。在心脏中的细胞间钙信号肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的转化过程中起着重要作用。人的 cTnI 与骨骼肌中的形式在结构上有所不同,它的氨基端上多了一个氨基酸残基。使得 cTnI 成为一个特异性的标志物。在心肌梗死 (AMI) 发生后, cTnI 便迅速释放入血液循环中

#### 1. cTnI 标记用单克隆抗体的预处理

1.1 透析 (纯化水, 24 小时)

1.2 离心去上清 (4~10℃, 10000 转/分钟、5 分钟)

1.3 BCA 法则浓度 (物料平衡)

1.4 PH 的调节 (0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 量的确定)

1.5 最佳标记量的确定

1.6 分装 (5000 人份量/支)、-20 度冻存

## 2. 试剂的配制

- 2.1 1%的柠檬酸三钠的配制
- 2.2 1%的氯金酸的配制
- 2.3 0.01%的氯金酸的配制
- 2.4 0.1 ml/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的配制
- 2.5 10%的氯化钠的配制
- 2.6 1%的叠氮钠的配制
- 2.7 10%的 BSA 的配制
- 2.8 1 mol/l PBS 的配制
- 2.9 0.05 mol/l PBS 的配制
- 2.10 胶体金复溶液的的配制

## 3. 胶体金的制备

- 3.1 量取 0.01%的 HAuCL<sub>4</sub> 溶液
- 3.2 加热至沸腾  
迅速加入 1%柠檬酸三钠溶液,搅拌均匀  
(比例: 100ml 0.01%的 HAuCL<sub>4</sub> 溶液加 1.6 ml 1%柠檬酸三钠溶液)
- 3.3 继续加热 10 分钟  
冷却至室温,用超纯水恢复至原体积
- 3.4 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌
- 3.5 送检、装瓶、贴标签

## 4. cTnI 免疫金的制备和干燥

### 4.1 cTnI 标记抗体的稀释

按照每生产 5000 人份 4mm 宽的 cTnI 试纸条需 1 支 cTnI 标记抗体计算,领取相应量的抗体,用 0.05mol/l PBS 稀释到 0.5mg/ml。

### 4.2 生产前小试:

- a 取 1ml 胶体金
- b 调 PH (0.1mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 的量, 混匀 5min)
- c 根据生产指令加入 CTnIAbl, 混匀 10min
- d 加入 100ul10%BSA, 混匀 10min
- e 离心 1000 转/min, 30min(要求环境温度 4-10℃)
- f 30%复溶, 浸泡聚酯膜 0.8ml/条 (0.6cm×30cm)
- g 温度 20-30℃, 相对湿度 30-35%干燥 5 小时

#### h 送质检部检验

### 4.3 cTnI 抗体标记

- 1) 标记小试质检合格,取胶体金,电磁搅拌  
(以生产 1000 人份 5mm 宽的肌钙蛋白 I 胶体金试纸条约需 50ml 胶体金来计算。)
- 2) 调 PH (0.1mol/L  $K_2CO_3$  的量), 混匀 5min
- 3) 根据最适标记量加入 CTnIAb1, 混匀 10min
- 4) 加入 100ul10%BSA, 混匀 10min
- 5) 离心 1000 转/min, 30min, 4-10℃
- 6) 30%复溶, 浸泡聚酯膜 25.3ml/张 (20cm×30cm)
- 7) 温度 20-30℃, 相对湿度 30-35%干燥 5 小时
- 8) 抽一条 0.6cm 宽送质检部做膜金匹配检测
- 9) cTnI 免疫金送中间品室暂存

### 5. cTnI 包被板的制备

#### 5.1 包被抗体的稀释

羊抗鼠 Ig0.05mol/LPBS 稀释到 1.2mg/ml 工作浓度

cTnI 捕获抗体用 0.05mol/LPBS 稀释到 1.1mg/ml 工作浓度

#### 5.2 包被前小试

- 1) 各取 20ul 试包被 1 条 20cm 长的膜, 线浓度 1.0ul/cm
- 2) 2℃-8℃过夜
- 3) 贴膜
- 4) 温度 20-30℃、相对湿度 30-35%干燥 5 小时  
最后送质检部检验质检合格。

#### 5.3 包被生产

- 1) cTnI 包被小试质检合格单


- 2) 羊抗鼠 IgG、cTnI 捕获抗体工作浓度包被质控线和检测线，线浓度 1.0 $\mu$ l/cm
- 3) 2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C过夜
- 4) 贴膜
- 5) 温度 20-30 $^{\circ}$ C、相对湿度 30-35%干燥 5 小时
- 6) 抽 1 板送质检部作膜金匹配
- 7) 密封后送中间品库暂存


本发明的有益效果是肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒，性能极其稳定，用户使用极其方便、能准确快速检测。

## 附图说明

制作肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒的工艺流程图

注：1. “” 所代表的过程必须在净化车间内操作

2. “” 所代表的过程必须在温度 20-30 度、湿度 30-35 度操作，另外 cTnI 包被板的制备以及 cTnI 免疫金的制备的干燥过程也必须在温度 20-30 度、湿度 30-35 度进行。

3 “” 代表关键控制点

## 具体实施方式

肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒的配制操作如下：

心肌钙蛋白 I (cTnI) 的分子量为 22.5KD，其连同肌钙蛋白 T 和肌钙蛋白 C 构成结构复合物。在心脏中的细胞间钙信号肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的转化过程中起着重要作用。人的 cTnI 与骨骼肌中的形式在结构上有所不同，它的氨基端上多了一个氨基酸残基。使得 cTnI 成为一个特异性的标志物。在心肌梗死 (AMI) 发生后，cTnI 便迅速释放入血液循环中。释放的模式和 CK-MB 相同 (在 AMI 发生 4-6 个小时以后)。然而，CK-MB 的水平在 36-48 小时后恢复正常，cTnI 可以持续升高 6-10 天。在正常健康人体内，cTnI 水平是非常低的，在骨骼肌受损的病人体内也检测不到 cTnI。因此 cTnI 是诊断心肌梗死的一个特异性指标。

本试剂盒采用双抗夹心免疫法，当标本加入样品槽后，通过结合垫和金抗体结合，复合物沿膜流动和抗体在检测区域反应。如果标本中存在有可检出浓度或更浓的标志物，就会在检测区出现一条色带。如果没有就会保持无色。标本继续移动至控制区域，出现粉红-玫瑰红的色带，说明试验正常结果有效。

【产品名称】肌钙蛋白 I 血清快速检测试剂盒 (胶体金法)

**【规格】** 25 人份/盒**【适用范围】**

本试剂盒是免疫层析基础上的一步法体外诊断试剂盒。用来对发生心肌梗死时人血清中的心肌钙蛋白 I 进行定性检测。

**【检测原理】** 胶体金法

应用双抗体夹心法原理，以胶体金作为指示标记，交联抗肌钙蛋白 I 抗体，另一抗体为捕获抗体，与血液中的肌钙蛋白 I 结合并显色。测试时，样本向检测区及质控区移动，如果样品中含有肌钙蛋白 I，它就会和试剂中的金标抗体组成抗原抗体复合物，再和检测区中的相对应的捕获抗体形成紫红色的色带。如果样品中肌钙蛋白 I 水平低于最低检测限，检测区中就不会有色带出现。在任何情况下，质控区色带都应出现。质控区色带的出现表明反应系统有效。

**【主要组成成分】**

测试卡片和一份干燥剂、一个滴管一起装于铝箔袋中，每个试剂盒有 25 个相同的铝箔袋。

**【自备材料】**

- 1、 血清收集设备
- 2、 计时装置

**【样本要求】**

- 1、 必须在标准实验室环境下采集血清标本。
- 2、 标本采集后最好马上就做检测。如不能在 24 小时内检测，血清标本应冷冻起来，在试验以前使标本回复到室温。
- 3、 可以加 0.1%的叠氮钠作为防腐剂，不会影响试验结果。

**【质控方法】**

1. 控制线是内对照试剂和步骤控制。只要正确操作试剂有效控制线总会 出现。
2. 建议每次都使用对照品以确保试剂盒的有效性。本试剂盒内没有提供 对照品，可外购。

**【操作步骤】**

1. 使用前，将所有的试剂成分和病人样本置于室温。
2. 把测试卡片从铝箔袋中取出。
3. 用微量移液器吸取 150 $\mu$ l 样本。
4. 移液器垂直，加标本 2-3 滴（100-150 $\mu$ l）至样品槽中。
5. 15 分钟读取显示结果。

**【对试验结果的解释】**

阳性：

15 分钟后出现两条色带，说明结果阳性试验有效。只要在检测区域出现有色带即可以读取结果。

注：很低浓度的 cTnI 会在长于 15 分钟的时候出现两条带。

阴性：

如果在检测区域没有条带而控制区域有条带，说明结果阴性而试验有效。

无效试验：

如果在控制区域没有任何条带，说明试验无效，标本应用一个新的卡片重新测试。

**【产品性能指标】**

本试剂盒在 cTnI  $\geq 1.5\text{ng/ml}$  时出现阳性结果。

**【注意事项】**

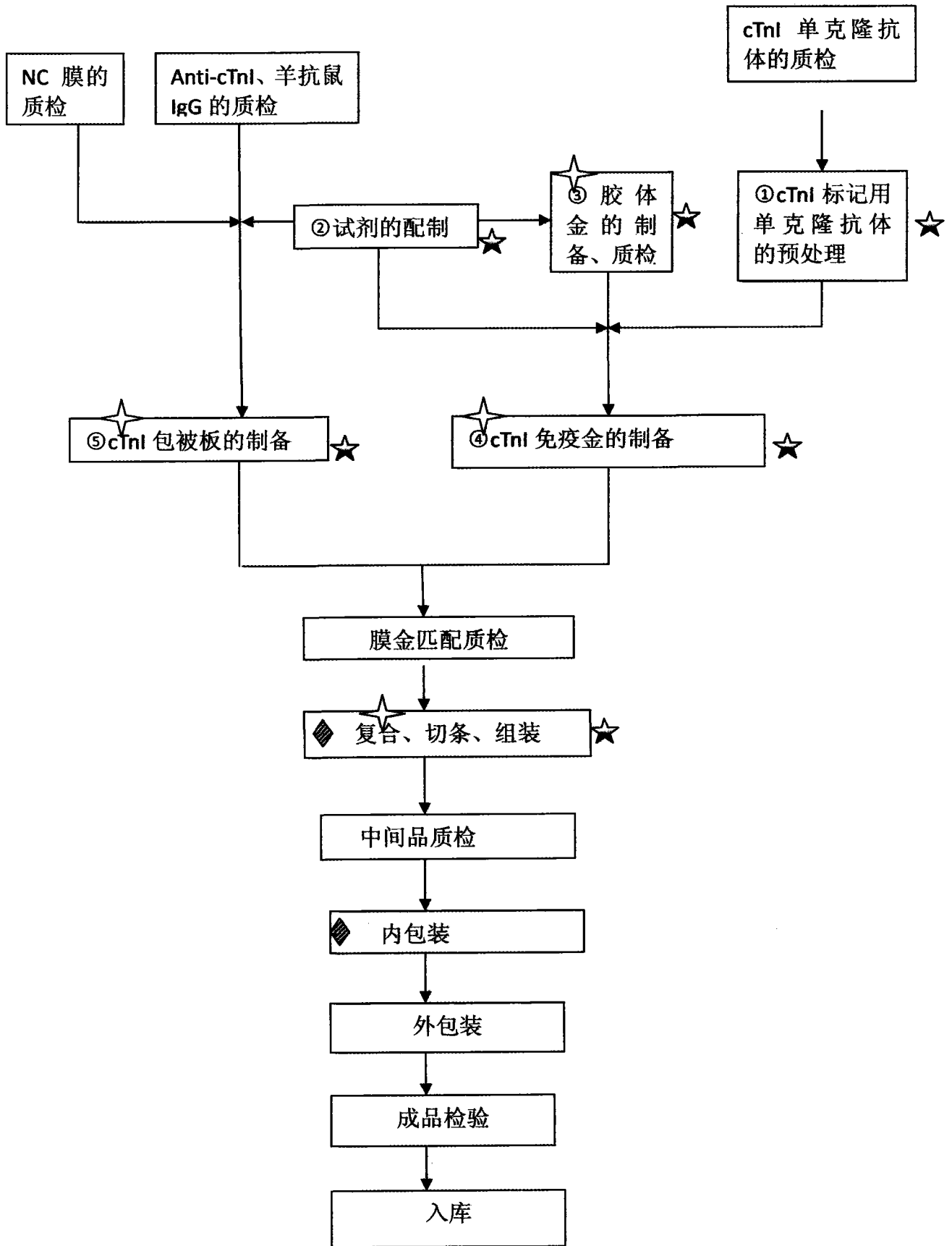
1. 处理样品时，请戴一次性手套。
2. 测试时，测试卡应水平放置，不要倾斜。
3. 加样 15 分钟后显示的结果无诊断意义。
4. 测试结束，请彻底清洗双手剩余标本和废弃物应用 1：25 稀释的 84 消毒液浸泡 30 分钟以上才能丢弃。
5. 一个吸管只能吸取一个样品，以免交叉污染。
6. 若用微量滴管头滴加样本，应迅速一次性加入到样品槽中，避免断续加入。
7. 本试剂结果仅供定性的辅助诊断，对实验结果解释需与临床症状相结合。

**【贮存】** 2-8℃ 保存。

**【有效期】** 12 个月。

**【医疗器械注册证书编号】**

**【产品标准编号】** Q/YZ 021-2006



专利名称(译)	肌钙蛋白I血清快速检测试剂盒(胶体金法)		
公开(公告)号	<a href="#">CN101566634A</a>	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200810036418.2	申请日	2008-04-22
[标]发明人	宣生良		
发明人	宣生良		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物科技领域，本发明公开了一种肌钙蛋白I血清快速检测试剂盒(胶体金法)制作及工艺，采用了金标法测定人血清样品中cTnI的量，心肌钙蛋白I(cTnI)的分子量为22.5KD，其连同肌钙蛋白T和肌钙蛋白C构成结构复合物，在心脏中的细胞间钙信号肌动蛋白 - 肌球蛋白相互作用的转化过程中起着重要作用，本试剂盒采用双抗夹心免疫法，当标本加入样品槽后，通过结合垫和金抗体结合，复合物沿膜流动和抗体在检测区域反应。如果标本中存在有可检出浓度或更浓的标志物，就会在检测区出现一条色带。如果没有就会保持无色。标本继续移动至控制区域，出现粉红 - 玫瑰红的色带，说明试验正常结果有效。本发明的有益效果是肌钙蛋白I血清快速检测试剂盒，性能极其稳定，用户使用极其方便、能准确快速检测。

