

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/543

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02137044.3

[43] 公开日 2003 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 1402005A

[22] 申请日 2002.9.19 [21] 申请号 02137044.3

[71] 申请人 上海第二医科大学

地址 200025 上海市重庆南路 227 号

[72] 发明人 郑佐娅 王鸿利

[74] 专利代理机构 上海东亚专利代理有限公司

代理人 董梅

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称 试剂盒

[57] 摘要

本发明试剂盒涉及生物技术，尤其是一种可用于酶标记免疫检测技术，将链亲和素、生物素捕获技术应用于酶联免疫技术中，建立板式链亲和素双位点夹心一步法定量酶联免疫吸附试验，用于检测患者血清 cTnI 水平。本发明在 ELISA 方法基础上，通过链亲和素—生物素捕获系统将抗体、抗原或免疫复合物间接地固定于固相上，建立板式链亲和素双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI。本发明是用链亲和素预包被酶标板，生物素标记抗 cTnI 单克隆抗体，辣根过氧化物酶标记另一株抗 cTnI 单克隆抗体。本发明具有简便、快速、低阴性本底等优点。与相关进口试剂对比二者有较高的符合率，本发明用于检测血清 cTnI 有良好的开发使用价值。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1, 一种试剂盒, 在 ELISA 试剂盒基础上, 其特征是: 通过链亲和素-生物素捕获系统将抗体、抗原或免疫复合物间接地固定于固相上, 建立板式链亲和素双位点夹心一步法。

2, 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 其特征是: 所述板式链亲和素固相双位点夹心一步法是用链亲和素预包被酶标板, 生物素标记抗 cTnI 单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记另一株抗 cTnI 单克隆抗体。

3, 根据权利要求 1、2 所述的试剂盒的用途, 其特征是: 用板式链亲和素固相双位点夹心一步法定量检测血清 cTnI。

4, 根据权利要求 1、2 所述的试剂盒制备方法, 其特征是: 板式链亲和素固相双位点夹心一步法的制备方法, 第一, 链亲和素固相的制备: 取 50 μ l、1mg/ml 链亲和素加入 200 μ l 蒸馏水稀释, 再加 50 μ l 3mol/l 醋酸, 室温放置 5min, 用 2mol/l Tris 调至 pH 6.0, 然后用包被缓冲液(0.05mol/l, pH 9.5 碳酸缓冲液)稀释成 2 μ g/ml, 加入聚苯乙烯 ELISA 微孔板, 120 μ l/孔 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗涤液洗 3 次, 加入 0.5%BSA、0.02mol/l、pH 7.2 PBS 封闭液, 37 $^{\circ}$ C、1 小时, 弃去封闭液, 吹干备用; 第二, 生物素化抗体的制备: 单克隆抗体腹水提纯采用辛酸法, 生物素标记单克隆抗体 1mg/ml 抗体溶液中以 1:100 摩尔数之比加入 NHS-LC-biotin, 混匀后室温放置 2 小时, 装入透析袋, 对 0.02mol/l、pH 7.2 PBS 透析 48 小时, 加入等体积甘油, 在 -20 $^{\circ}$ C 储存备用; 第三, 酶标记抗体的制备: 辣根过氧化物

酶 5mg 溶于 0.5 ml 双蒸水中，加 0.06 mol/l 过碘酸钠 0.5ml、4℃ 反应 30 分钟，再加入 0.16mol/l 乙二醇室温反应 30 分钟后，与 1ml 浓度为 2mg/ml 的抗体溶液混合，对 0.05 mol/l，pH 9.5 的碳酸缓冲液 4℃ 透析过夜，透析物与 0.2ml，0.5% 的四氢硼酸钠 4℃ 反应 2 小时，加等量饱和硫酸铵 4℃ 搅拌 30 分钟，1000g 离心 15 分钟，沉淀溶于 pH 7.4、0.02mol/l PBS 中，对同样缓冲液透析过夜，加稳定剂-30℃ 保存。

5, 根据权利要求 3 所述的试剂盒的使用方法, 其特征是用板式链亲和素固相双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI 的方法, 链亲和素预包被微孔板, 每孔加入 20 μ l 抗原标准品或待测血清样品, 然后加 100 μ l 生物素化抗 TnI 单抗 2 μ g/ml 及辣根过氧化物酶标记另一抗 TnI 单抗的混和液, 用 pH 7.2、0.02 mol/l 磷酸缓冲液, 37℃ 反应 90 分钟后洗涤; 加邻苯二胺(OPD)底物液, 37℃、15 分钟, 加 2 mol/l 硫酸终止反应; 酶标仪上测 490nm 处的吸光值(A), 以 A490nm 为纵坐标, 各 TnI 浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 所述标准曲线是用纯化的牛心肌 TnI 抗原, 经 Bayer 公司的 TnI 试剂盒(TnI)定量后, 用正常人血清 TnI 含量 < 0.01ng/ml, 稀释成 TnI 含量为 0.3、1.0、3.0、8.0、15、30ng/ml 各参照标准品, 进行定量, 以 A490nm 为纵坐标, 各 TnI 参照标准品含量为横坐标绘制标准曲线, 其中, 最低检测量: 用 TnI 为 0 的标准品, 作 12 复管测定, 计算平均吸光值, 以平均值+2SD 计算, 最低检测限是 0.3ng/ml。

试剂盒

技术领域

本发明试剂盒涉及生物技术，尤其是一种酶标记免疫检测技术，将链亲和素、生物素捕获技术应用于酶联免疫技术中，建立板式链亲和素双位点夹心一步法定量酶联免疫吸附试验 (Streptavidin—ELISA)，用于检测患者血清 cTnI 水平。

背景技术

在我国，随着国民经济的发展和人民生活水平的提高，心血管疾病的发病率和病死率逐年上升，故加强早期 AMI 的诊断十分必要。缺血性心脏病的诊断分三个方面：生化检查、心电图改变和持续胸痛。在生化检查中，被认为有效的诊断心肌缺血性损伤的指标是：肌钙蛋白 T(TnT)和 I(TnI)。TnT、TnI 和 TnC 是肌钙蛋白复合体(Troponin, Tn)的三个亚单位，与原肌球蛋白(Tropomyosin, Tm)一起构成 Tm—Tn 复合物，参与调节肌细胞的收缩力和速度。其中，TnT 是与原肌球蛋白结合的亚单位，分子量 39kD。TnI 是肌原纤维(myofibril)ATP 酶的抑制性亚单位，分子量 23.8kD。TnC 是钙离子结合亚单位，分子量 18kD。

在所有横纹肌中肌钙蛋白复合体的功能相近，但是心肌 TnT、TnI(cTnT, cTnI)与骨骼肌的 TnT、TnI 在结构上有很大的不同，分别

由不同的基因编码。编码心肌 TnT 的基因只在胚胎期在骨骼肌中有短暂表达，因此可用免疫学方法将心肌和骨骼肌的 TnT、TnI 区别开来。心肌 TnC 与骨骼肌 TnC 相同，因此检测方法应用价值不大。

心肌 TnT 检测方法由 Katus 等人于 1989 年报道[Katus HA, Remppis A, Looser S et al: J mol cell cardiol 1989; 21: 1349]。该方法是基于亲和纯的多抗和一种单抗建立起来。1992 年罗氏(当时为宝灵曼)诊断产品公司推出了第一代心肌 TnT EIA 检测试剂盒。固相采用链亲和素(Streptavidin, SA) - 牛血清白蛋白复合物包被的聚苯乙烯管，第一单抗用生物素标记，通过 SA 间接固定到固相上，第二单抗用辣根过氧化物酶标记。检测范围 0.1—15 $\mu\text{g/L}$ 。与骨骼肌的交叉反应性约 2%，在不存在肌肉损伤的情况下，该水平的交叉反应性对诊断特异性影响不大。但是对有肌肉损伤或肌病患者，检测结果可能会受到影响。因此为了提高检测方法的特异性，1997 年推出了第二代 TnT EIA 检测试剂盒，骨骼肌 TnT 浓度达到 1000 $\mu\text{g/L}$ 时，用第二代方法也不会出现交叉反应。1999 年第三代以钨作标记的电化学发光 TnT Elecsys1010&2010 也已推向市场。

1987 年 Cummins 等人首先报道检测 cTnI 的 RIA 法[Cummins B, Auckland MC, Cummins P et al: Am Heart J. 1987; 113: 1333]。目前，心肌 TnI 的定量和定性检测方法已有多种，包括竞争放免测定法、酶免疫测定法、金免疫层析法等。由于各种方法的灵敏度不一样，TnI 的正常参考值变动较大 10 $\mu\text{g/L}$ 、3.8 $\mu\text{g/L}$ 、0.35 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 均有报道。研究资料表明，cTnT 与 cTnI 水平的符合率可达

90%，cTnT+ / cTnI-为 8.9%，cTnT- / cTnI+ 1.1% [Robert H, Christenson, Snow-Hong D et al: Clinical Chemistry 1998, 44(3): 494]。近年的研究认为，对于某些肾功能不全的病人及肌病患者，TnI 的特异性高一些。

目前，cTnT 和 cTnI 作为诊断心肌损伤的确定标志物，因其诊断灵敏性高、特异性强，有逐渐替代“金标准”CK—MB 的趋势。国内均使用相应的进口试剂盒，价格昂贵，难在临床广泛使用。

正常情况下，心肌肌钙蛋白 I 在血中的含量很低($<0.1 \mu\text{g/L}$)，一般酶免疫测定方法的敏感度达不到此要求。为了提高检测系统的敏感度，本发明提出一种新的技术方案。

发明内容

本发明的目的在于：提供一种试剂盒，系板式链亲和素双位点夹心一步法。

本发明目的可通过下述技术方案实现的：为了提高检测系统的敏感度，本发明是通过链亲和素—生物素捕获系统将抗体、抗原或免疫复合物间接地固定于固相之上。以链亲和素固相捕获技术及酶免疫技术为基础，建立板式链亲和素固相双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI，可供心肌梗死确诊使用，对于怀疑有 AMI 的胸痛病人，可以通过连续动态监测 cTnI 方法判断其预后。

在上述技术方案基础上，采用链亲和素固相，生物素标记一种抗

cTnI 单克隆抗体，辣根过氧化物酶标记另一种单克隆抗体，建立板式链亲和素固相双位点夹心一步法。

在本发明中，与普通亲和素相比，链亲和素是一种偏酸性的蛋白质，等电点为 5—6，且不含碳水化合物。因此用链亲和素包被酶标板可使阴性本底明显降低。应用该技术制备的酶标板具有稳定性能好、用途广泛等优点。有些物质，如半抗原、多肽、核酸等，很难直接包被到聚苯乙烯板上，但很容易制备成生物素化的结合物而对 SA 酶标板作间接包被。但 SA 直接包被需包被量较大。据文献报道，对抗体进行酸处理或热变性后 [Conradie JD, Govender M, Visser L, et al: J. Immunol Method 1983; 59: 289]，可改善抗体的包被效果，检测灵敏度可提高 2—6 倍。其机理可能是①改善了抗体的方向性，即更多的 Fc 段与固相结合；②暴露了更多的疏水性基团；③变性引起的聚合作用增加了聚合单体的质量。本发明采用酸处理 SA 后，发现包被量可比未处理 SA 降低二倍以上，阴性本底更低，从而可使检测系统的敏感度得到明显改善，应用于 cTnI 的检测，能够基本上符合缺血性心肌损伤的诊断要求。

生物素化单克隆抗体的制备以及辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体的制备采用常用的方法。标记结合物分别加等体积的甘油，-4℃可保存 2 年以上。

本发明优越性在于：板式链亲和素—ELISA 定量检测血清 cTnI 的方法具有简便、快速、低阴性本底和低成本。方法学考核表明本发明方法的最低检测限可达 0.3ng/ml，批内差异 3.5%—5.0%，批间差

异 7.6%—9.3%。与进口试剂对比试验证实,用本发明方法测得的 cTnI 水平与 ELC cTnT (Elecsys 2010, Roche)测得的 cTnT 水平的符合率为 88.2%, ECL cTnT 阳性 / 本法 cTnI 阴性为 9.8%, ECL cTnT 阴性 / 本法 cTnI 阳性为 2.0%; 与化学发光法测得的 cTnI (ACS: 180, Bayer) 的阳性符合率为 83.3%, 阴性符合率为 100%。说明本方法对检测血清 cTnI 有商用开发价值。

通过下述附图和实施例对本发明作进一步阐述,但并不限制本发明范围。

附图说明

图 1 是本发明创建的板式链亲和素固相双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI 的操作流程图。

图 2 是板式链亲和素固相双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI 的定量标准曲线。

图 3 是用本方法测定的 cTnI 水平与采用进口电化学发光 cTnT 试剂测定的 cTnT 水平的符合率。

图 4 是本方法与进口化学发光 cTnI 试剂的对比测定结果。

具体实施方式

实施例一

通过链亲和素—生物素捕获系统将抗体、抗原或免疫复合物间接地固定于固相上,建立板式链亲和素双位点夹心一步法。其中,所述板式

链亲和素固相双位点夹心一步法是用链亲和素预包被酶标板，生物素标记抗 cTnI 单克隆抗体，辣根过氧化物酶标记另一株抗 cTnI 单克隆抗体。

链亲和素固相的制备：取 $50 \mu\text{l}$ 链亲和素 (1mg/ml) 加入 $200 \mu\text{l}$ 蒸馏水稀释，再加 $50 \mu\text{l}$ 3mol/l 醋酸，室温放置 5min ，用 2mol/l Tris 调至 $\text{pH } 6.0$ ，然后用包被缓冲液 (0.05mol/l , $\text{pH } 9.5$ 碳酸缓冲液) 稀释成 $2 \mu\text{g/ml}$ ，加入聚苯乙烯 ELISA 微孔板， $120 \mu\text{l}/\text{孔}$ 4°C 过夜，用洗涤液洗涤 3 次，加入封闭液 (0.5% BSA, 0.02mol/l , $\text{pH } 7.2$ PBS) 37°C 1 小时，弃去封闭液，吹干备用。

生物素化抗体的制备：单克隆抗体腹水提纯采用辛酸法，生物素标记单克隆抗体方法参考文献 [Ternynck T, Avramer S: Methods in Enzymology 1990; 184: 469]， 1mg/ml 抗体溶液中以 1:100 摩尔数之比加入 NHS-LC-biotin，混匀后室温放置 2 小时，装入透析袋对 PBS, 0.02mol/l , $\text{pH } 7.2$ 透析 48 小时，加等体积甘油， -20°C 储存备用。

酶标记抗体的制备：辣根过氧化物酶 (HRP) 5mg 溶于 0.5ml 双蒸水中，加 0.06mol/l 过碘酸钠 0.5ml 4°C 反应 30 分钟，然后，再加 0.16mol/l 乙二醇室温反应 30 分钟后，与 1ml 浓度为 2mg/ml 的抗体溶液混合，对 0.05mol/l , $\text{pH } 9.5$ 的碳酸缓冲液 4°C 透析过夜。透析物与 0.2ml , 0.5% 的四氢硼酸钠 4°C 反应 2 小时，加等量饱和硫酸铵 4°C 搅拌 30 分钟， 1000g 离心 15 分钟。沉淀溶于 $\text{pH } 7.4$, 0.02mol/l PBS 中，对同样缓冲液透析过夜，加稳定剂 -30°C 保存。

实施例二

双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI 方法

如图1是本发明创建的板式链亲和素固相双位点夹心一步法ELISA定量检测血清 cTnI 的操作流程图所示,链亲和素预包被微孔板每孔加入 20 μ l 抗原标准品或待测血清样品,然后加 100 μ l 生物素化抗 TnI 单抗(约 2 μ g / ml)及辣根过氧化物酶标记另一抗 TnI 单抗的混和液(pH7.2, 0.02mol / l 磷酸缓冲液), 37 $^{\circ}$ C 反应 90 分钟,洗涤。加邻苯二胺(OPD)底物液, 37 $^{\circ}$ C, 15 分钟,加 2mol / l 硫酸终止反应。酶标仪上测 490nm 处的吸光值(A),以 A490nm 为纵坐标,各 TnI 浓度为横坐标,绘制标准曲线。

方法学考核:

标准曲线:用纯化的牛心肌 TnI 抗原,经 Bayer 公司的 TnI 试剂盒(TnI)定量后,用正常人血清(TnI 含量 \leq 0.01ng / ml)稀释成 TnI 含量为 0.3, 1.0, 3.0, 8.0, 15, 30ng / ml 各参照标准品,用本发明建立的方法进行定量,以 A490nm 为纵坐标,各 TnI 参照标准品含量为横坐标绘制标准曲线,如图 2 板式链亲和素固相双位点夹心一步法 ELISA 定量检测血清 cTnI 的定量标准曲线所示。

最低检测量:用 TnI 为 0 的标准品,作 12 复管测定,计算平均吸光值为 0.196 (SD 0.027)。以平均值+2SD 计算,0.3ng / ml 标准品的 OD 值高于此计算值,所以最低检测限是 0.3ng / ml。

精密度:取 TnI 含量高(15ng / ml)、低(约 3ng / ml)的 2 份血清标本分别做批内(8 复管)和批间(连续 8 天)检测,结果批内 CV3.5%,

5.0%，批间 CV 为 7.6%，9.3%。

对比试验：

见图 3 用本发明方法测定的 cTnI 水平与采用进口电化学发光 cTnT 试剂测定的 cTnT 水平的符合率，图中，

1—n=45, 88.2%;

2—n=5, 9.8%+ cTnT/- cTnT;

3—n=1, 2.0%, - cTnT/+ cTnT

图 4 本发明与进口化学发光 cTnI 试剂的对比测定结果所示，51 例病人的血清经电化学发光 cTnT 试剂 (ECL cTnT; Elecsys 2010, Roche) 测定，阳性 cut-off 值定 $>0.1 \text{ ng/ml}$ 时，阳性例数 15 例，阴性例数 36 例。用本发明建立的方法对比测定，cTnI 水平与 cTnT 水平同时升高例数 10 例，符合率为 66.7%，cTnI 和 cTnT 水平均正常的例数 35 例，符合率 97.2%，总符合率 88.2%，ECL cTnT 阳性 / 本法 cTnI 阴性例数 5 例，占 9.8%，ECL cTnT 阴性 / 本法 cTnI 的阳性数有 1 例，占 2.0%。与进口化学发光 cTnI 试剂 (ACS: 180, Bayer) 的阳性符合率为 83.3%，阴性符合率为 100%。

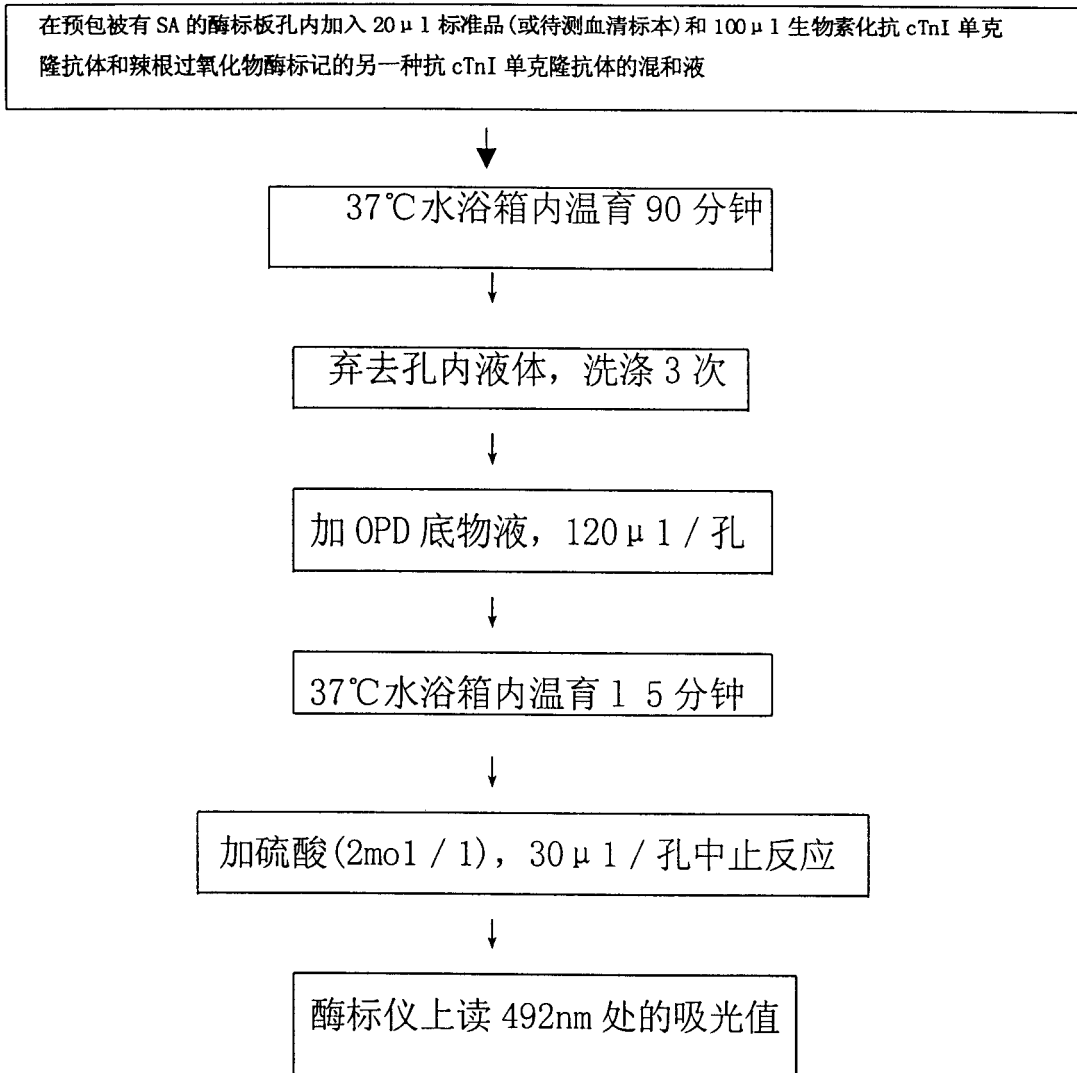


图 1

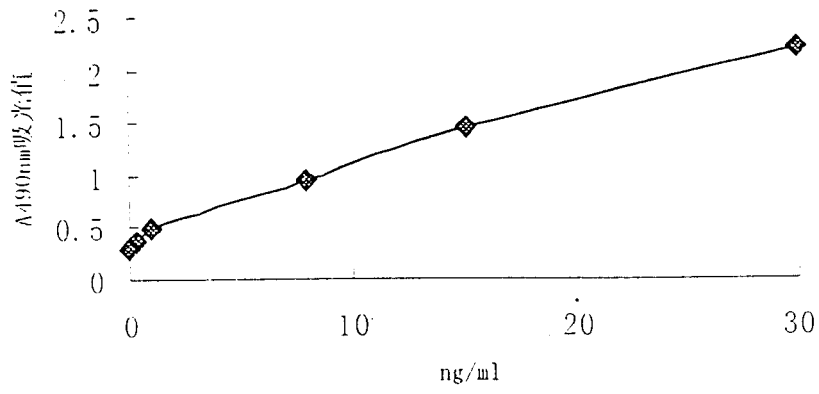


图 2

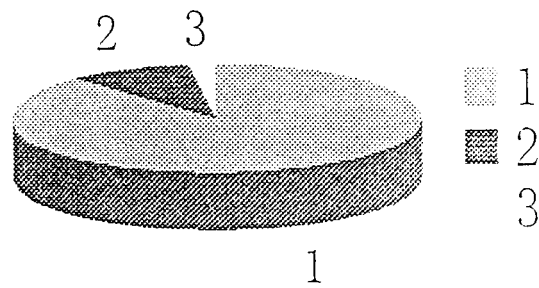


图 3

20 例临床标本对比测定结果

ACS: 180	本 法		合 计
	+	-	
+	5	1	6
-	0	14	14
合 计	5	15	20

图 4

专利名称(译)	试剂盒		
公开(公告)号	CN1402005A	公开(公告)日	2003-03-12
申请号	CN02137044.3	申请日	2002-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学		
申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学		
[标]发明人	郑佐娅 王鸿利		
发明人	郑佐娅 王鸿利		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
代理人(译)	董梅		
其他公开文献	CN1191476C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明试剂盒涉及生物技术，尤其是一种可用于酶标记免疫检测技术，将链亲和素、生物素捕获技术应用于酶联免疫技术中，建立板式链亲和素双位点夹心一步法定量酶联免疫吸附试验，用于检测患者血清cTnI水平。本发明在ELISA方法基础上，通过链亲和素—生物素捕获系统将抗体、抗原或免疫复合物间接地固定于固相上，建立板式链亲和素双位点夹心一步法ELISA定量检测血清cTnI。本发明是用链亲和素预包被酶标板，生物素标记抗cTnI单克隆抗体，辣根过氧化物酶标记另一株抗cTnI单克隆抗体。本发明具有简便、快速、低阴性本底等优点。与相关进口试剂对比二者有较高的符合率，本发明用于检测血清cTnI有良好的开发使用价值。

在预包装有 SA 的酶标板孔内加入 20 μl 标准品 (或待测血清标本) 和 100 μl 生物素化抗 cTnI 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的另一种抗 cTnI 单克隆抗体的混和液

