

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 03131931.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1271409C

[22] 申请日 2003.6.19 [21] 申请号 03131931.9
[71] 专利权人 南京医科大学第一附属医院
地址 210029 江苏省南京市广州路 300 号
[72] 发明人 苏恩本
审查员 颜 丛

[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公
司
代理人 徐冬涛 刘成群

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

三抗法快速定量测定心肌肌钙蛋白 I

[57] 摘要

本发明专利涉及一种新的根据酶联免疫原理建立的快速定量测定人体外周血或组织心肌肌钙蛋白 I 含量的方法。因心肌肌钙蛋白 I 在血中含量极微，目前普通酶联法测定的灵敏度较低，最低检测灵敏度约为 0.2ng/ml，很难达到 0.1ng/ml 以下，测定速度也较慢，需 1 小时以上。为提高测定速度及测定灵敏度，本发明成功研制出三抗法心肌肌钙蛋白 I 快速定量测定试剂盒，用二株单克隆抗体替代传统方法中的一株单克隆抗体为捕获抗体，提高了抗体捕获能力，同时结合链亲和素 - 生物素放大系统，有效地缩短了检测时间，提高了测定灵敏度，使在普通酶联仪等仪器上快速定量检测心肌肌钙蛋白 I 能达到检验与临床要求。

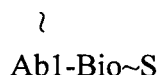
1、一种以三株抗人体心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体为基础建立快速定量测定心肌肌钙蛋白 I 含量的方法,其特征是以二株作用于心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体为捕获抗体,以另一株作用于心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体为标记抗体,结合链亲和素-生物素放大系统,运用酶联免疫原理,建立心肌肌钙蛋白 I 快速定量检测的方法。

2、根据权利要求 1 所述方法,二株捕获抗体,分别简称为 Ab1 和 Ab2,联结生物素或长链生物素后,分别简称为 Ab1-Bio 和 Ab2-Bio;另一株标记抗体简称为 Ab3,联结辣根过氧化物酶后,简称为 Ab3-POD,联结生物素或长链生物素后,简称为 Ab3-Bio;链亲和素或亲和素简称为 S;链亲和素辣根过氧化物酶简称 S-POD;心肌肌钙蛋白 I 抗原包括已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品、质控品与待测样品中的心肌肌钙蛋白 I,简称为 cTnI;三抗法快速定量测定心肌肌钙蛋白 I 方法的反应途径具体包括如下几种方案:

方案一:

(1) 96 孔酶联板、酶联条或其它固项支持物联结好 S,白蛋白或其它封闭液封闭;

(2) Ab1-Bio 及 Ab2-Bio 与 S 结合, cTnI 与 Ab1-Bio 及 Ab2-Bio 结合, cTnI 与 Ab3-POD 结合,形成

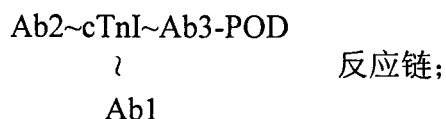


(3) POD 使显色底物显色或使化学发光底物发光,再通过相应仪器测定,根据标准曲线计算待测样品心肌肌钙蛋白 I 含量;

方案二:

(1) 96 孔酶联板、酶联条或其它固项支持物联结好 Ab1 及 Ab2,白蛋白或其它封闭液封闭;

(2) Ab1 及 Ab2 与 cTnI 结合, cTnI 与 Ab3-POD 结合,形成



(3) POD 使显色底物显色或使化学发光底物发光,再通过相应仪器测定,根据标准曲线计算待测样品心肌肌钙蛋白 I 含量;

方案三:

(1) 96 孔酶联板、酶联条或其它固项支持物联结好 Ab1 及 Ab2,白蛋白或其它封

闭液封闭;

(2) Ab1+Ab2 与 cTnI 结合, cTnI 与 Ab3-Bio 结合, Ab3-Bio 与 S-POD 结合, 形成

Ab2 ~cTnI~ Ab3-Bio~S-POD

↓

反应链;

Ab1

(3) POD 使显色底物显色或使化学发光底物发光, 再通过相应仪器测定, 根据标准曲线计算待测样品心肌肌钙蛋白 I 含量。

3、根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于显色底物为四甲基联胺 TMB。

三抗法快速定量测定心肌肌钙蛋白 I

技术领域 本发明专利涉及一种新的根据酶联免疫原理建立的快速定量测定人体外周血或组织心肌肌钙蛋白 I 含量的方法。

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 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，在心脏病的诊断及预后判断中具有十分重要的意义。

心肌肌钙蛋白 I 测定可分为定性与定量测定两种方法，定性测定主要运用层析原理，制作试纸片完成，目前已开展临床应用，其优点是速度快、操作方便，但其缺点是仅能显示阳性、阴性结果，无具体数值，不能观察其动态变化和根据数值判断梗死时间、面积及预后，且敏感性低，易受多种因素干扰，即使改进的半定量小型仪器测定方法同样也有上述缺点。定量测定主要依据酶联免疫与化学发光原理设计，绝大部分运用了二株单克隆抗体（少部分仅用一株单克隆抗体或其中一株用多克隆抗体），一株单克隆抗体为捕获抗体，另一株单克隆抗体为标记抗体，形成酶联夹心法测定。测定中依靠与辅助的仪器有自动化与非自动化的化学发光仪、荧光测定仪及酶联仪等，其中酶联仪价格低，在数千元至数万元之间，国内大中小型医院较为普及，而化学发光仪与荧光测定仪等价格昂贵，数十万元至数百万元，国外已有数家大公司生产大型自动化化学发光或荧光仪完成定量测定，但其价格昂贵，且需配套试剂，国内大部分医院尚难以推广应用。故依靠酶联仪建立心肌肌钙蛋白 I 定量酶联法测定在国内非常必要，但普通酶联法建立的心肌肌钙蛋白 I 测定的灵敏度较低，最低检测灵敏度约为 0.2ng/ml，很难达到 0.1ng/ml 以下，测定速度也较慢，需 1 小时以上。

发明内容 因心肌肌钙蛋白 I 在血中含量极微，为提高测定速度及测定灵敏度，本发明成功研制出三抗法心肌肌钙蛋白 I 快速定量测定试剂盒，用二株单克隆抗体替代传统方法中的一株单克隆抗体为捕获抗体，提高了抗体捕获能力，同时结合链亲和素-生物素放大系统，有效地缩短了检测时间，提高了测定灵敏度，使在普通酶联仪等仪器上快速定量检测心肌肌钙蛋白 I 达到检验与临床要求。

本发明技术方案：二株作用于心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体为捕获抗体，简称为 Ab1+Ab2，联结生物素或长链生物素后，简称为 Ab1-Bio+Ab2-Bio。另一株作用于心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体为标记抗体，简称为 Ab3，联结辣根过氧化物酶后，简称为 Ab3-POD，联结生物素或长链生物素后，简称为 Ab3-Bio。Ab1、Ab2、Ab3 要求作用于 cTnI 抗原的不同位点，Ab1+Ab2 与 Ab3 配对后对 cTnI 抗原有较强的结合力及较高的特异性，单克隆抗体及其它原料可来源于合格商用产品（如 Sigma, Roch 公司等）。运用酶联免疫原理其反应途径具体包括如下几种方案：

方案一：

- (1). 96 孔酶联板、酶联条或其它固项支持物联结好链亲和素或亲和素（简称为 S），白蛋白或其它封闭液封闭。
- (2). Ab1-Bio+Ab2-Bio 与 S 结合，心肌肌钙蛋白 I 抗原（包括已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品、质控品与待测样品中的心肌肌钙蛋白 I，简称为 cTnI）与 Ab1-Bio+Ab2-Bio 结合，cTnI 与 Ab3-POD 结合。先后形成 S~Ab1-Bio+Ab2-Bio~cTnI~Ab3-POD 反应链。
- (3). POD 使显色底物（如四甲基联苯胺 TMB 等）显色或化学发光底物发光，再通过相应仪器测定，根据标准曲线计算待测样品心肌肌钙蛋白 I 含量。

方案二:

- (1). 96 孔酶联板、酶联条或其它固项支持物联结好 Ab1+Ab2, 白蛋白或其它封闭液封闭。
- (2). Ab1+Ab2 与 cTnI 结合, cTnI 与 Ab3-POD 结合, 先后形成 Ab1+Ab2~cTnI~Ab3-POD 反应链。
- (3). 同方案一中(3)。

方案三:

- (1). 同方案二中 1。
- (2). Ab1+Ab2 与 cTnI 结合, cTnI 与 Ab3-Bio 结合, Ab3-Bio 与链亲和素辣根过氧化物酶(简称 S-POD) 结合, 先后形成 Ab1+Ab2~cTnI~Ab3-Bio~S-POD 反应链。
- (3). 同方案一中(3)。

经上述创新后, 本法测定时间可缩短至 35 分钟左右, 其最低检测灵敏度为 0.05ng/ml, 等同或超过国外同类试剂盒水平, 且仅需普通酶联仪即能测定, 快速出具检测结果, 能灵活分次用于急诊与常规不同病例数的检测, 更加方便了临床应用, 适合于大、中、小型医院广泛推广应用, 这对进一步提高国内心血管病诊断水平有不可估量的推动作用。

具体实施方式 按上述三种方案途径具体实施方式为:

方案一:

- (1). 96 孔酶联板或酶联条联结好链亲和素, 0.5~1%白蛋白或其它封闭液封闭好备用。
- (2). 加入一定量的 Ab1+Ab2-Bio, 37℃孵育一定时间(优选 60 分钟)或 4℃过夜, 密封后包装在试剂盒内, 样本测定时打开应用。
- (3). 测定时孔内已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品或待测样品(已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品也可预先冷冻在设置的标准孔内, 检测时加标准稀释液溶解即可), 再加入一定量的 Ab3-POD 反应液, 轻振后 37℃孵育一定时间(优选 20 分钟)。
- (4). 倾去孔内液体, 洗液(PBS, 含 0.05%Tween-20)洗数次, 每次每孔加洗液量最适为 250~300μl。
- (5). 加入显色液四甲基联苯胺(TMB), 37℃孵育一定时间(优选 15 分钟)。
- (6). 每孔加终止液(0.5~2M H₂SO₄) 50μl 或滴注一滴, 轻轻振匀 10 分钟内酶联仪 450nm 阅读 OD 值。
- (7). 根据标准曲线计算待测样品心肌肌钙蛋白 I 含量。

方案二:

- (1). 96 孔酶联板或酶联条内加入一定量的 Ab1 与 Ab2 预包被, 37℃孵育一定时间(优选 60 分钟)或 4℃过夜, 0.5~1%白蛋白或其它封闭液封闭好备用。
- (2). 以下步骤同方案一中(3)至(7)。

方案三:

- (1). 同方案二中(1)。
- (2). 测定时孔内已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品或待测样品(已知的心肌肌钙蛋白 I 标准品也可预先冷冻在设置的标准孔内, 检测时加标准稀释液溶解即可), 再加入一定量的 Ab3 与 S-POD 的混合反应液, 轻振后 37℃孵育一定时间(优选 20 分钟)。
- (3). 以下步骤同方案一中(3)至(7)。

上述所述方法中反应液 PH 在 6.5~7.5 之间, 优选于 6.8~7.2。所用洗液 PH6.5~7.5, 优选 6.8~7.2; 温度在 2~37℃, 优选低于 15℃; 洗液洗 3~6 次, 优选洗 5 次。

按方案一加工的三抗法心肌肌钙蛋白 I 快速定量测定试剂盒组成及操作说明书:

试剂盒组成

- 1、酶联架 1 块。
- 2、酶联条 12 条, 其中标准条 6 条, 样品条 6 条(试用品标准条与样品条各为 2 条)。标准条第一孔为空白对照, 2~6 孔为标准点(心肌肌钙蛋白 I 浓度分别为 3.2、1.6、0.8、0.4、0.2ng/ml, 已冷冻干燥在孔内), 第 7 孔为样品孔, 可用作急诊或常规病例检测。样品条第 2~

7 孔为检测样品孔。标准条与样品条数量比例可根据用户需要特别订购, 仍以测定孔数目为据, 不另收费用。

3、标准稀释液 10ml(白瓶蓝盖)。

4、4. 洗液 200ml(大瓶)。

5、反应液 10ml(白瓶红盖)。

6、6. 显色液 A(白瓶黑盖)。

7、显色液 B 20ml(白瓶紫盖)。

8、终止液 10ml(滴瓶)。

9、说明书 1 份。

操作说明书

1. 原理

以三株高特异性与高敏感性抗人心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体, 其中两株为捕获抗体, 一株为标记抗体, 结合链亲和素-生物素放大系统, 应用酶联免疫原理检测人血或其它样品中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 的含量, 用于多种疾病引起心肌损伤的诊断。

2. 样品采集及处理

干燥管或肝素抗凝管采血 2ml。干燥管需室温放置 30 分钟后离心 (2000rpm, 5 分钟), 取血清用于检测。肝素抗凝管可即刻离心 (同上) 后, 取血浆用于检测, 样品如需长期保存, 需分离血浆或血清置 -20℃ 以下保存。

3. 仪器

酶联仪 微量加样器 37℃ 恒温水浴箱

4. 操作步骤

(1) 近期所用试剂盒可提前一天置 2~8℃ 解冻或室温快速解冻。检测前取出所用酶联条, 打开并去除标准条第 7 孔封口膜后压到酶联架上, 以备检测。取洗液 6ml 加入反应液瓶 (红盖) 中并充分混匀 (切勿再冻融, 用后置 2~8℃ 保存)。

注意: ① 试剂盒解冻后放置 2~8℃ 保存, 2~3 周内用完, 避免反复冻融;

② 不用作本次检测的酶联条不要拆封;

③ 试剂应用后仍置 2~8℃ 保存。

(2) 标准条 1~6 孔加入标准稀释液 100μl。

标准条第 7 孔与样品条第 2~7 检测孔加入待测样品血浆或血清 100μl。

(3) 每孔内加入反应液 50μl, 振荡 10~30 秒, 置 37℃ 水浴 20 分钟 (酶联条底部接触水面或部分浸入水中)。注意: 第 (2)(3) 步加样时间间隔 < 3 分钟。

(4) 倾去孔内液体, 洗液洗 5 次, 每次每孔加洗液量最适为 250~300μl, 如洗液用量较多, 可稀释 1 倍后使用 (不推荐使用, 因各地水质不能保证)。

(5) 以 1:20 体积比取所需显色液 A 与显色液 B 并充分混匀, 每孔加 150μl, 37℃ 水浴 15 分钟。

(6) 每孔加终止液 50μl 或滴注一滴, 以标准条第一孔为空白对照, 轻轻振匀 10 分钟内酶联仪 450nm 阅读 OD 值。

5. 计算结果

标准计算: 根据标准孔 2~6 孔 OD 值与对应的 cTnI 浓度 (3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 ng/ml) 分别为 X 轴与 Y 轴, 计算出直线回归方程 $Y=aX\pm b$, Y 为 cTnI 浓度, X 为 OD 值, 由此公式代入样品 OD 值, 算出样品的 cTnI 浓度 (ng/ml), 有条件者可用计算机或酶联仪自动化处理。

简捷计算: 选待测样品与标准点 OD 相近者直接比较计算

样品 cTnI 浓度 (ng/ml) = (标准点浓度 × 待测样品 OD 值) / 标准点 OD 值。

6. 结果判断

200 例健康人测定统计分析示, 正常参考值 < 0.15 ng/ml, ≥ 0.15 ng/ml 提示 cTnI 升高, 0.15~0.5 ng/ml 提示轻度心肌损伤, ≥ 0.5 ng/ml 提示急性心肌梗死或严重的心肌损伤。< 0.15 ng/ml 为正

常。检测范围 0.05~4.0ng/ml，最低检测值为 0.05ng/ml，如结果>4.0ng/ml，需用阴性血清稀释适当倍数后检测。

专利名称(译)	三抗法快速定量测定心肌肌钙蛋白I		
公开(公告)号	CN1271409C	公开(公告)日	2006-08-23
申请号	CN03131931.9	申请日	2003-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏恩本		
申请(专利权)人(译)	苏恩本		
当前申请(专利权)人(译)	南京医科大学第一附属医院		
[标]发明人	苏恩本		
发明人	苏恩本		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 G01N21/64 G01N21/76		
代理人(译)	刘成群		
其他公开文献	CN1470875A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明专利涉及一种新的根据酶联免疫原理建立的快速定量测定人体外周血或组织心肌肌钙蛋白I含量的方法。因心肌肌钙蛋白I在血中含量极微，目前普通酶联法测定的灵敏度较低，最低检测灵敏度约为0.2ng/ml，很难达到0.1ng/ml以下，测定速度也较慢，需1小时以上。为提高测定速度及测定灵敏度，本发明成功研制出三抗法心肌肌钙蛋白I快速定量测定试剂盒，用二株单克隆抗体替代传统方法中的一株单克隆抗体为捕获抗体，提高了抗体捕获能力，同时结合链亲和素-生物素放大系统，有效地缩短了检测时间，提高了测定灵敏度，使在普通酶联仪等仪器上快速定量检测心肌肌钙蛋白I能达到检验与临床要求。