



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109470848 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201811620176.1

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 广州市红十字会医院(暨南大学医学院附属广州红十字会医院)

地址 510000 广东省广州市海珠区同福中路396号

(72)发明人 吴伟东 刘清峰 姜峰

(74)专利代理机构 北京科家知识产权代理事务所(普通合伙) 11427

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

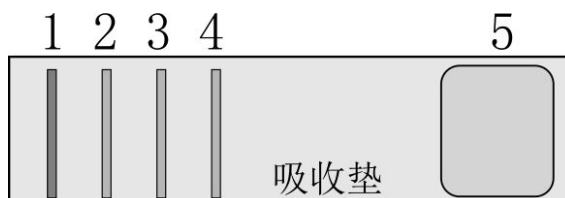
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种医学检测技术领域,尤指一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法,所述试剂盒主要组成:荧光标记探针、抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体、抗鼠IgG抗体、固相膜、检测卡,本发明首先建立MMPs、TIMPs并结合cTnI的检测,用于心肌损伤的组合检测和诊断方案,优于传统心衰标志物配组,为临床判断心肌梗死和基质重构相关的心力衰竭提供更准确的科学依据,其次基于荧光胶乳免疫层析定量技术的免疫层析荧光定量检测方法,组合及分别检测MMPs、TIMPs及cTnI,心肌损伤检测体系,建立了免疫层析,荧光定量检测方法,突破传统的酶联免疫法(ELISA),率先在国内建立基于荧光胶乳免疫层析定量技术的心肌损伤检测体系,具有快速、准确、灵敏度高、特异性高的特点。



1. 一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于,所述试剂盒主要组成: 荧光标记探针、抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体、抗鼠IgG抗体、固相膜、检测卡。
2. 根据权利要求1所述的一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于, 所述荧光标记探针为纳米级高保真荧光标记探针;其制备方法为:利用胶乳表面的羧基与蛋白质的胺基连接,将蛋白质连接到胶乳颗粒的表面以制备荧光标记探针。
3. 根据权利要求1所述的一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于, 所述抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体为荧光胶乳微粒标记抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体,其制备方法包括:
 - 1) 将荧光胶乳微球溶解于磷酸缓冲液中;
 - 2) 加入N-羟基琥珀酰亚胺和碳化二亚胺,进行超声清洗,时间为30s;
 - 3) 放置于室温避光孵育30min以进行活化;
 - 4) 对其离心后沉淀用柠檬酸缓冲液溶解;
 - 5) 活化后的荧光胶乳以0.5mg/ml的比例将抗 MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体加入至荧光胶乳中;
 - 6) 混合均匀后于室温搅拌反应,时间为2h;
 - 7) 采用磷酸缓冲液离心洗涤,重复3次操作;
 - 8) 沉淀后采用磷酸缓冲液溶解,并置于4℃的条件下储存备用。
4. 根据权利要求1所述的一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于, 所述的固相膜为硝酸纤维素膜。
5. 根据权利要求1所述的一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于, 所述检测卡的制备方法包括:首先采用包被缓冲液分别将抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体和抗鼠IgG抗体稀释至1.0mg/ml,然后喷洒至硝酸纤维素膜上相对应的检测区和质控区,在室温处晾干以完成包被,最后在底衬上依次黏贴样品垫、包被膜及吸水纸,组装成试剂检测卡,置于4-30℃条件下储存备用。
6. 根据权利要求5所述的一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于, 所述的包被缓冲液的制备方法包括:将荧光胶乳微粒标记抗 MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体以 1:50~1000比例稀释到磷酸缓冲液中,并将其加入至结合垫中。
7. 一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒的检测方法,其特征在于,所述的检测方法主要包括:
 - S1、建立标准曲:

对MMPs、TIMPs及cTnI质控品稀释为不同浓度,分别对每一种浓度重复测定若干次取均值,以质控品浓度为横坐标,荧光信号强度测试值为纵坐标,建立拟合标准曲线;
 - S2、精密度与准确度测试:

抽取两个批次的MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂,分别对MMPs、TIMPs及cTnI质控品中浓度为0.5、10.0、65.0ug/L的质控品进行测定,每个浓度重复20次,计算批内和批间各浓度测试结果的精密度,并统计各浓度测试结果偏倚情况;
 - S3、干扰试验:

用试剂盒分别检测含有2.0g/L胆红素、30.0g/L三酰甘油、15.0g/L胆固醇的MMPs、TIMPs及cTnI质控品,质控品浓度分别为5.0ug/L和50.0ug/L;若测试结果相对偏差在±

20%以内时,干扰物不影响标本测试;

S4、稳定性测试:

将成品试剂置于阴凉库密封保存,于14个月内,期间每个月分别测试浓度为0.5、1.0、22.0、65.0ug/L的MMPs、TIMPs及cTnI质控品,每个浓度重复5次,检测结果用均值 \pm SD表示,若测试结果相对偏差在 $\pm 20\%$ 以内,则判定试剂稳定性良好。

心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种医学检测技术领域,尤指一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 过去认为心脏重构只是由于心肌细胞内源性的变化,现在认识到心肌细胞外基质中胶原的数量、组成和结构的变化也参与了心脏重构,即基质组织修复再生的过程,并且是心室重构的重要原因,又称为心肌基质重构;心肌基质重构是决定心脏病患者心功能及其预后的主要因素之一,是心脏基质成分合成或降解代谢失衡的结果,心脏基质在维持心脏结构和功能完整性方面起着重要的作用;基质组织修复再生引起心肌纤维化和进行性心室扩张,最终导致心力衰竭。

[0003] 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在心肌中存在的能降解所有心脏基质成分,是重构过程中心脏基质降解的主要因素;在衰竭的心脏中,MMPs活性升高导致纤维胶原降解、细胞外基质重构,导致左室进行性扩张、收缩功能逐渐下降,MMPs在转录前和转录后水平都可被调节,而且可以通过底物间的相互作用和通过内源性生理抑制剂即基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)来调节;因此MMPs、TIMPs及其调节因子间的相互作用决定了心肌纤维化过程的进展,调节心肌MMPs、TIMPs的表达和活性,成为控制心衰进展中心脏基质的组织修复和再生的重要治疗手段。

[0004] 经多项研究表明,MMPs、TIMPs在心肌损伤中,较以往所检测的标志物而言,具有更加敏感,更加准确地反映心肌损伤程度的特性;但是目前国内对心肌损伤标志物以及MMPs、TIMPs的检测方法均步骤繁多,检测速度慢,硬件要求高,且价格成本非常昂贵,大多限于在中心实验室使用,不能满足临床快速诊断、准确诊断的要求和大管理的需求,同时在基层医院、现场急救大规模推广应用方面也受到严重制约;因此研究相关简便低耗的新型检测方式及开发新型、低成本、简便易用的检测产品成为快速诊断的重要战略问题。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明旨在公开一种医学检测技术领域,尤指一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒,其特征在于,所述试剂盒主要组成:荧光标记探针、抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体、抗鼠IgG抗体、固相膜、检测卡。

[0007] 优选地,所述荧光标记探针为纳米级高保真荧光标记探针;其制备方法为:利用胶乳表面的羧基与蛋白质的胺基连接,将蛋白质连接到胶乳颗粒的表面以制备荧光标记探针。

[0008] 优选地,所述抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体为荧光胶乳微粒标记抗MMPs、TIMPs

及cTnI单克隆抗体,其制备方法包括:

- 1) 将荧光胶乳微球溶解于磷酸缓冲液中;
- 2) 加入N-羟基琥珀酰亚胺和碳化二亚胺,进行超声清洗,时间为30S;
- 3) 放置于室温避光孵育30min以进行活化;
- 4) 对其离心后沉淀用柠檬酸缓冲液溶解;
- 5) 活化后的荧光胶乳以0.5mg/ml的比例将抗 MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体加入至荧光胶乳中;
- 6) 混合均匀后于室温搅拌反应,时间为2h;
- 7) 采用磷酸缓冲液离心洗涤,重复3次操作;
- 8) 沉淀后采用磷酸缓冲液溶解,并置于4℃的条件下储存备用。

[0009] 优选地,所述的固相膜为硝酸纤维素膜。

[0010] 优选地,所述检测卡的制备方法包括:首先采用包被缓冲液分别将抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体和抗鼠IgG抗体稀释至1.0mg/ml,然后喷洒至硝酸纤维素膜上相对应的检测区和质控区,在室温处晾干以完成包被,最后在底衬上依次黏接贴样品垫、包被膜及吸水纸,组装成试剂检测卡,置于4-30℃条件下储存备用。

[0011] 优选地,所述的包被缓冲液的制备方法包括:将荧光胶乳微粒标记抗 MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体以 1:50~1000比例稀释到磷酸缓冲液中,并将其加入至结合垫中。

[0012] 一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒的检测方法,其特征在于,所述的检测方法主要包括:

S1、建立标准曲:

对MMPs、TIMPs及cTnI质控品稀释为不同浓度,包括以下浓度:0、0.3、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、22.0、65.0、125.0 ug/L,分别对每一种浓度重复测定若干次取均值,优选为20次,以质控品浓度为横坐标,荧光信号强度测试值为纵坐标,建立拟合标准曲线;

S2、精密度与准确度测试:

抽取两个批次的MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂,分别对MMPs、TIMPs及cTnI质控品中浓度为0.5、10.0、65.0ug/L的质控品进行测定,每个浓度重复20次,计算批内和批间各浓度测试结果的精密度,并统计各浓度测试结果偏倚情况;

S3、干扰试验:

用试剂盒分别检测含有2.0g/L胆红素、30.0g/L三酰甘油、15.0g/L胆固醇的MMPs、TIMPs及cTnI质控品,质控品浓度分别为5.0ug/L和50.0ug/L;若测试结果相对偏差在±20%以内时,干扰物不影响标本测试;

S4、稳定性测试:

将成品试剂置于阴凉库密封保存,于14个月内,期间每个月分别测试浓度为0.5、1.0、22.0、65.0ug/L的MMPs、TIMPs及cTnI质控品,每个浓度重复5次,检测结果用均值±SD表示,若测试结果相对偏差在±20%以内,则判定试剂稳定性良好。

[0013] 本发明的有益效果体现在:本发明首先建立MMPs、TIMPs并结合cTnI的检测,用于心肌损伤的组合检测和诊断方案,优于传统心衰标志物配组,为临床判断心肌梗死和基质重构相关的心力衰竭提供更准确的科学依据,其次基于荧光胶乳免疫层析定量技术的免疫层析荧光定量检测方法,组合及分别检测MMPs、TIMPs及cTnI,心肌损伤检测体系,建立了

免疫层析, 荧光定量检测方法, 突破传统的酶联免疫法 (ELISA), 率先在国内建立基于荧光胶乳免疫层析定量技术的心肌损伤检测体系, 与传统方法相比, 具有快速、准确、灵敏度高、特异性高的特点; 且自主制备高特异性的单克隆、多克隆抗体, 能大幅度地降低检测成本, 满足生产所需, 利于cTnI试剂盒的产业化, 最终降低患者治疗成本, 利于广泛应用。

附图说明

[0014] 图1是本发明的免疫层析荧光定量检测卡结构图。

[0015] 图2是本发明的免疫层析荧光定量标准曲线。

[0016] 附图标注说明: 1-控制线, 2-MMPs包被线, 3-TIMPs包被线, 4-cTnI包被线; 5-样品垫。

具体实施方式

[0017] 下面结合附图详细说明本发明的具体实施方式:

一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI试剂盒, 所述试剂盒主要组成: 荧光标记探针、抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体、抗鼠IgG抗体、固相膜、检测卡;

进一步地, 所述荧光标记探针为纳米级高保真荧光标记探针; 其制备方法为: 利用胶乳表面的羧基与蛋白质的胺基连接, 将蛋白质连接到胶乳颗粒的表面以制备荧光标记探针; 筛选高度保真的荧光信号胶乳时, 通过优化反应物的比例、连接方法、温度、时间、介质、pH值等, 提高荧光信号的稳定性;

进一步地, 所述抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体为荧光胶乳微粒标记抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体, 其制备方法包括:

- 1) 将荧光胶乳微球溶解于磷酸缓冲液中;
- 2) 加入N-羟基琥珀酰亚胺和碳化二亚胺, 进行超声清洗, 时间为30S; 优选功率为200W的超声波清洗机;
- 3) 放置于室温避光孵育30min以进行活化;
- 4) 对其离心后沉淀用柠檬酸缓冲液溶解;
- 5) 活化后的荧光胶乳以0.5mg/ml的比例将抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体加入至荧光胶乳中;
- 6) 混合均匀后于室温搅拌反应, 时间为2h;
- 7) 采用磷酸缓冲液离心洗涤, 重复3次操作;
- 8) 沉淀后采用磷酸缓冲液溶解, 并置于4℃的条件下储存备用;

进一步地, 所述的固相膜为硝酸纤维素膜; 选择固相膜时, 从材质、孔径等指标筛选合适的膜, 优化膜的预处理工艺, 降低非特异性反应; 优化蛋白与膜的结合工艺, 包括溶液配方, 喷涂参数, 优化多通道检测模式条件: 包括反应体系的优化, 蛋白材料的匹配优化, 保障各指标的灵敏度、特异性不会相互干扰;

进一步地, 所述检测卡的制备方法包括: 首先采用包被缓冲液分别将抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体和抗鼠IgG抗体稀释至1.0mg/ml, 然后喷洒至硝酸纤维素膜上相对应的检测区和质控区, 在室温处晾干以完成包被, 最后在底衬上依次黏接贴样品垫、包被膜及吸水纸, 组装成试剂检测卡, 置于4-30℃条件下储存备用;

进一步地,所述的包被缓冲液的制备方法包括:将荧光胶乳微粒标记抗 MMPs、TIMPs 及 cTnI 单克隆抗体以 1:50~1000 比例稀释到磷酸缓冲液中,并将其加入至结合垫中;

本发明利用微激光、微校准技术,分析各显示信号与检测实际浓度的线性关系,确定检测阈值,定标曲线,确定试剂盒的灵敏度、特异性、稳定性,批差,进行试剂盒性能考核,确定质量标准,检定流程,确定生产和质量规程,从而优化优化荧光定量免疫层析系统。

[0018] 一种心肌损伤标志物 MMPs、TIMPs 及 cTnI 检测试剂盒的检测方法,所述的检测方法主要包括:

S1、建立标准曲:

对 MMPs、TIMPs 及 cTnI 质控品稀释为不同浓度,包括以下浓度:0.0.3、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、22.0、65.0、125.0 ug/L,分别对每一种浓度重复测定若干次取均值,优选为 20 次,以质控品浓度为横坐标,荧光信号强度测试值为纵坐标,建立拟合标准曲线;

S2、精密度 (coefficient of variation, CV) 与准确度 (偏倚) 测试:

抽取两个批次的 MMPs、TIMPs 及 cTnI 检测试剂,分别对 MMPs、TIMPs 及 cTnI 质控品中浓度为 0.5、10.0、65.0 ug/L 的质控品进行测定,每个浓度重复 20 次,计算批内和批间各浓度测试结果的精密度,并统计各浓度测试结果偏倚情况;

S3、干扰试验:

用试剂盒分别检测含有 2.0g/L 胆红素、30.0g/L 三酰甘油、15.0g/L 胆固醇的 MMPs、TIMPs 及 cTnI 质控品,质控品浓度分别为 5.0ug/L 和 50.0ug/L;若测试结果相对偏差在 $\pm 20\%$ 以内时,干扰物不影响标本测试;

S4、稳定性测试:

将成品试剂置于阴凉库密封保存,于 14 个月内,期间每个月分别测试浓度为 0.5、1.0、22.0、65.0 ug/L 的 MMPs、TIMPs 及 cTnI 质控品,每个浓度重复 5 次,检测结果用均值 \pm SD 表示,若测试结果相对偏差在 $\pm 20\%$ 以内,则判定试剂稳定性良好。

[0019] 一种心肌损伤标志物 MMPs、TIMPs 及 cTnI 检测试剂盒,所述的抗 MMPs、TIMPs 及 cTnI 单克隆抗体的制备还包括:

A1、单克隆抗体原材料制备与筛选;

A2、单克隆抗体应用效率检测;

A3、定量曲线的拟合校正与优化;

A4、检测模式条件的优化;

A5、仪器的匹配研究;

A6、定量曲线的拟合校正与优化;

工艺还包括:

B1、蛋白与功能性载体标记工艺的研究;

B2、膜与辅料处理工艺及处理配方研究;

B3、蛋白与固相膜固化包被工艺;

B4、试剂反应体系开发;

B5、试剂性能指标匹配和优化;

B6、试剂特异性曲线及批次校正;

B7、试剂性能确认及临床试验;

- B8、数据拟合程序重新设计；
- B9、荧光定量检测仪；
- B10、仪器与试剂联调工艺研究；
- B11、操作过程程序化与标准化；
- B12、定量曲线的拟合校正与优化；
- B13、仪器与试剂质控标准SOP；
- B14、试剂与仪器的批量化生产。

[0020] 本发明首先建立MMPs、TIMPs并结合cTnI的检测,用于心肌损伤的组合检测和诊断方案,优于传统心衰标志物配组,为临床判断心肌梗死和基质重构相关的心力衰竭提供更准确的科学依据,其次基于荧光胶乳免疫层析定量技术的免疫层析荧光定量检测方法,组合及分别检测MMPs、TIMPs及cTnI,心肌损伤检测体系,建立了免疫层析,荧光定量检测方法,突破传统的酶联免疫法(ELISA),率先在国内建立基于荧光胶乳免疫层析定量技术的心肌损伤检测体系,与传统方法相比,具有快速、准确、灵敏度高、特异性高的特点;且自主制备高特异性的单克隆、多克隆抗体,能大幅度地降低检测成本,满足生产所需,利于cTnI试剂盒的产业化,最终降低患者治疗成本,利于广泛应用。

[0021] 如图1-2,本发明的新型心肌损伤标记物MMPs、TIMPs具有明显的检测价值,其在心肌损伤极早期就会出现含量变化,特异性高,较以往所检测的标志物而言,具有更加早期,更加准确,更好的推广使用的特性。应用本发明标志物检测技术,即荧光胶乳免疫层析定量技术进行检测,在检测卡上的硝酸纤维素膜包被抗MMPs、TIMPs及cTnI抗体,结合垫含有荧光标记的抗MMPs、TIMPs及cTnI抗体,然后将血清标本加入样品垫处,结合垫中的荧光标记抗MMPs、TIMPs及cTnI抗体和血清中的MMPs、TIMPs及cTnI抗原结合,形成复合物;在层析作用下反应复合物沿着硝酸纤维素膜向前移动,被硝酸纤维素膜上检测区预先包被的抗MMPs、TIMPs及cTnI抗体捕获,血清标本中的MMPs、TIMPs及cTnI越多,检测线上的复合物积聚越多,荧光信号强度反映了被捕获的MMPs、TIMPs及cTnI数量,通过免疫荧光检测仪可检测出血清标本中MMPs、TIMPs及cTnI的浓度;同时需要注意:不同疾病的MMPs和TIMPs的表达水平存在差异,通过差异性可对不同疾病进行分析以完成分类检测;病人的样本量大,可先将病人按疾病谱分类筛选、分类检测,以分析不同疾病的MMPs和TIMPs的表达水平差异;血液的采集严格遵守无菌操作和相关原则,样本的收集和储存合理,从而确保后续研究结果的准确性和稳定性;蛋白样本的提取和制备准确按照试验步骤进行,凝胶电泳和图像采集准确,且化学发光显影和定影时杜绝污染和干扰。

[0022] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明的技术范围作任何限制,本行业的技术人员,在本技术方案的启迪下,可以做出一些变形与修改,凡是依据本发明的技术实质对以上的实施例所作的任何修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围。

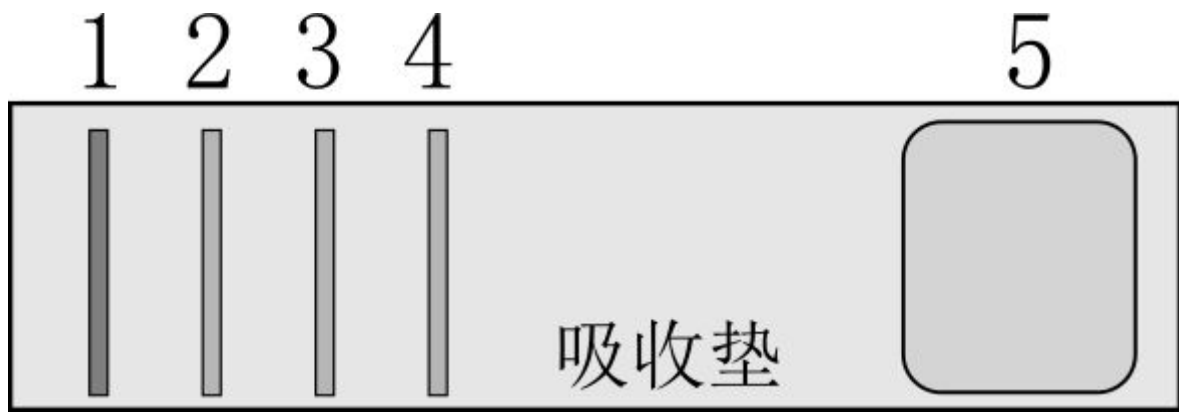


图1

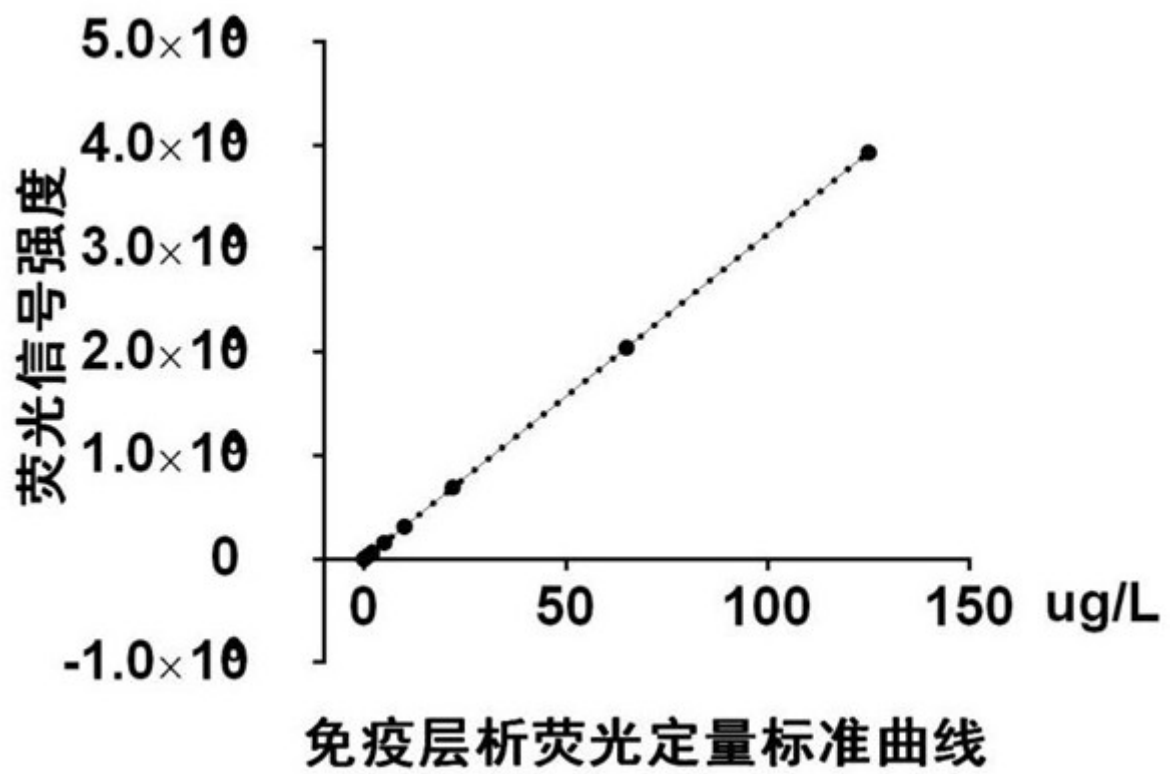


图2

| | | | |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN109470848A | 公开(公告)日 | 2019-03-15 |
| 申请号 | CN201811620176.1 | 申请日 | 2018-12-28 |
| [标]发明人 | 吴伟东 刘清峰 姜峰 | | |
| 发明人 | 吴伟东 刘清峰 姜峰 | | |
| IPC分类号 | G01N33/533 G01N33/577 G01N33/558 | | |
| CPC分类号 | G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 | | |
| 代理人(译) | 陈娟 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一种医学检测技术领域，尤指一种心肌损伤标志物MMPs、TIMPs及cTnI检测试剂盒及检测方法，所述试剂盒主要组成：荧光标记探针、抗MMPs、TIMPs及cTnI单克隆抗体、抗鼠IgG抗体、固相膜、检测卡，本发明首先建立MMPs、TIMPs并结合cTnI的检测，用于心肌损伤的组合检测和诊断方案，优于传统心衰标志物配组，为临床判断心肌梗死和基质重构相关的心力衰竭提供更准确的科学依据，其次基于荧光胶乳免疫层析定量技术的免疫层析荧光定量检测方法，组合及分别检测MMPs、TIMPs及cTnI，心肌损伤检测体系，建立了免疫层析，荧光定量检测方法，突破传统的酶联免疫法（ELISA），率先在国内建立基于荧光胶乳免疫层析定量技术的心肌损伤检测体系，具有快速、准确、灵敏度高、特异性高的特点。

