

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610028913. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 16 日

[11] 公开号 CN 101105497 A

[22] 申请日 2006.7.13

[21] 申请号 200610028913. X

[71] 申请人 上海凯创生物技术有限公司

地址 201317 上海市南汇区下沙镇工业园区  
鹤立路

[72] 发明人 张国华

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所  
代理人 余明伟

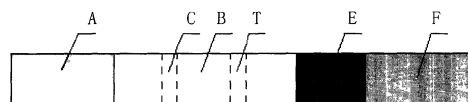
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

一种检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒及其制备方法

## [57] 摘要

本发明涉及一种检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒及其制备方法。本发明提供的试剂盒包含试剂条，试剂条上含有胶体金标记的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及未标记的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗，本发明还提供了上述检测试剂盒的制备方法。该检测试剂盒的优点在于可以快速、方便、灵敏地检测人血液样本中出现的心肌肌钙蛋白 I，用于诊断心肌梗塞。



1. 一种检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒，包含试剂条，其特征在于：试剂条上含有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体以及抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗。
2. 如权利要求 1 所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒，其特征在于，所述的试剂条由吸水垫片、硝酸纤维素膜片、玻璃纤维垫片、滤样垫片四部分组成，其中玻璃纤维垫片上包被有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体，硝酸纤维素膜片上的检测线和质控线分别喷点有未标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗。
3. 如权利要求 1~2 中任一权利要求所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒，其特征在于，所述的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体是通过下述方法制备的：
  - a) 提取人心肌组织中的心肌肌钙蛋白 I 粗品，经 68℃加热处理及 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析和 Sephadex G75 凝胶过滤层析纯化而获得心肌肌钙蛋白 I 纯品；
  - b) 取步骤 a) 中所述纯品用杂交瘤单克隆抗体技术筛选出高抗体分泌细胞株，制得抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。
4. 如权利要求 3 所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒，其特征在于，其中步骤 a) 所述的粗品为 68℃加热处理 3 分钟，10000rpm 离心 30 分钟取上清，上 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析处理，洗脱液为 PH5.6, 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液，洗脱流速为 60ml/h，洗脱 3 个柱体积；收集洗脱液，上 Sephadex G75 凝胶过滤层析柱，洗脱液为 PH7.0-7.4, 0.2M 磷酸盐缓冲液，洗脱流速为 20ml/h，收集流出液第一峰。

5. 如权利要求 3 所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒,其特征在于,其中步骤 b) 所述的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,经蛋白 A-Sepharose 4B 层析柱亲和层析纯化处理,洗脱液为 PH7.2, 0.2M 磷酸盐缓冲液,洗脱流速为 15ml/h,收集流出液第二峰。
6. 一种如权利要求 1 或 2 所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒的制备方法,包括以下步骤:
  - a) 用人心肌组织中的心肌肌钙蛋白 I 粗品,经 68℃加热处理,以及 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析和 Sephadex G75 凝胶过滤层析纯化而获得心肌肌钙蛋白 I 纯品用杂交瘤单克隆抗体技术制备抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体;
  - b) 制备胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,并用标记好的单克隆抗体加至玻璃纤维垫片上获得免疫胶体金垫片;
  - c) 将抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗固定在硝酸纤维素膜片不同区域上,得到免疫硝酸纤维素膜片;
  - d) 将制得的免疫胶体金垫片、免疫硝酸纤维素膜片和滤样垫片、吸水垫片按照吸水垫片、免疫硝酸纤维素膜片、免疫胶体金垫片、滤样垫片的顺序,粘贴组装成试剂条;
  - e) 将试剂条组装到塑料卡内,形成完整的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。
7. 如权利要求 6 所述的检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒的制备方法,其特征在于,其中步骤 a) 所述的粗品纯化条件为 68℃加热处理 3 分钟,10000rpm 离心 30 分钟取上清,上 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析处理,洗脱液为 PH5.6, 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液,洗脱流速为 60ml/h,洗脱 3 个柱体积;收集洗脱液,上

Sephadex G75 凝胶过滤层析柱，洗脱液为 PH7.0-7.4，0.2M 磷酸盐缓冲液，洗脱流速为 20ml/h，收集流出液第一峰；所述的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体，经蛋白 A-Sepharose 4B 层析柱亲和层析纯化处理，洗脱液为 PH7.2，0.2M 磷酸盐缓冲液，洗脱流速为 15ml/h，收集流出液第二峰。

## 一种检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种检测用的试剂盒,尤其涉及一种利用心肌肌钙蛋白相关的免疫反应免疫层析显色来诊断心肌梗塞的检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

作为危害人类生命和健康的第一杀手——心脑血管疾病的发病率呈逐年上升趋势,每年在急诊部门美国有 4.5 亿急性心肌梗塞(AMI)症状的病人,有 4 亿的病人被确定为 AMI,有 2.7 亿病人并非 AMI,有约 500 万病人被确诊为非 AMI,但其中 2-3%的人真正有 AMI 并且由于 AMI 的症状多种多样,合并症多在临床存在着相当大的误诊及漏诊,有一些已经存在的心肌损伤因为不典型的发作被医生及患者忽视,没有及时的进行治疗出现了再次发作危及生命。

鉴于急性心肌梗死发病急、死亡率高的特点,以及 AMI 的早期诊断和及时治疗对于降低 AMI 死亡率的重要性,研制出一种灵敏度高、特异性好、临床诊断符合率高、检测快捷方便的急性心肌梗塞检测试剂成为急性心肌梗塞临床诊断的发展方向。

目前我国 AMI 的诊断标准是临床症状、心电图异常及血清心脏酶学标志物含量测定三项中的两项。但由于大约 25%的 AMI 病人发病早期没有典型的临床症状,约 50%的病人心电图无典型变化,若单独依靠心电图改变和临床症状,AMI 的诊断符合率仅为 75%。血清酶肌酸激酶(CK)及其同工酶虽然具有较高的灵敏度,但心肌特异性不高、“窗口期”短(开始升高的时间较晚及持续时间较短),

易造成漏诊。早期标志物——肌红蛋白、脂肪酸结合蛋白、碳酸酐酶III等的联合运用，大大有助于提高早期检出率，但尚缺乏特异性。

心肌肌钙蛋白 I（英文名称为 Cardiac Troponin I，英文缩写 cTnI）和肌钙蛋白 T（cTnT）与其他的心肌梗塞血清生化标记物相比，具有：1）特异性强、灵敏度高；2）“窗口期”长的优点。经国际临床化学及实验室联合会（IFCC）和欧洲心脏病协会（ESC）证明：cTnI 和 cTnT 在临床诊断中，cTnI 比 cTnT 特异性更高。其原理是 cTnT 与骨骼肌肌钙蛋白有交叉反应，且在肾脏损伤时也有无法解释的 cTnT 升高。cTnI 是唯一存在心肌细胞中，迄今为止诊断 AMI 灵敏度和特异性最高的血清生化指标，被广泛地研究作为心肌损伤的确定性标志物，正成为当今诊断心肌梗塞（AMI）的“金标准”。文献还表明，正常人血液中的 cTnI 水平在 0.5 ng/ml 以下，发生心肌梗塞后会在 4-6 个小时内会上升到 0.5 ng/ml 以上，所以 0.5ng/ml 的灵敏度对心肌梗塞诊断有典型的临床意义。

现有的 cTnI 检测方法主要有酶联免疫法和免疫荧光法。两者的主要缺点是需要专用设备、操作复杂，检测耗时长，需要 3 个小时以上，需经严格训练的专业人员完成，难以在普通病患中普及。而且在临床应用中发现，这些 cTnI 检测试剂对样本的测定值存在着差异，不同的 cTnI 分析方法对同一份标本的检测值最大可相差 30 余倍。造成这一结果的主要原因是不同试剂盒采用不同 cTnI 抗体为原料，cTnI 抗体原料质量差异大。因此，cTnI 抗体质量的好坏决定了试剂盒质量的优劣。

国内现有类似的心肌肌钙蛋白 I 检测方法的相关专利有：申请号 200310119332.3，且其提供的一步法快速测定 cTnI 的方法操作步骤繁杂，需采用专用设备测定 cTnI 的含量。申请号 200410093480.7，该专利技术缺陷是没有

提供相关的纯化心肌肌钙蛋白 I 制备方法,且采用双抗夹心 ELISA 法检测病人血清,该法检测过程复杂,操作耗时,不利于对病患者争取宝贵的诊断治疗时间。

## 发明内容

本发明的目的是克服现有技术,如酶联免疫检测法和发光法免疫检测法等检测心肌肌钙蛋白 I 速度慢,操作复杂,灵敏度低的缺点,提供一种快速、方便、灵敏地不依靠专门设备的心肌肌钙蛋白 I 检测试剂盒。

本发明的另一目的是提供上述检测试剂盒的制备方法。

本发明的一方面,提供了一种检测心肌肌钙蛋白 I 的检测试剂盒,它包含试剂条,试剂条上含有抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体及胶体金标记的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,以及抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗。

较佳的,试剂条由玻璃纤维垫片、硝酸纤维素膜片、滤样垫片和吸水垫片四部分组成。玻璃纤维垫片上包被有胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,硝酸纤维素膜片不同的区域上分别上喷点有未标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗。

制备本试剂盒的原料需要的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体是通过下述方法制备的:

- a) 提取人心肌组织中的心肌肌钙蛋白 I 粗品,经 68℃ 加热处理及 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析和 Sephadex G75 凝胶过滤层析纯化而获得心肌肌钙蛋白 I 纯品;
- b) 取步骤 a 中所述纯品用杂交瘤技术并筛选出高抗体分泌细胞株,经分离纯化制得抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体。

上述步骤 a) 所述的纯品为人心肌细胞中游离的人心肌肌钙蛋白 I，而非通过基因工程重组的心肌肌钙蛋白 I，由于原有构象得以保护，故以人心肌肌钙蛋白 I 作为免疫原而获得的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体在特异性和灵敏度方面比用重组心肌肌钙蛋白 I 作为免疫原获得的单克隆抗体要好。此外，发明人还发现，经 68℃ 处理不仅有利于除去无关杂蛋白，且不破坏心肌肌钙蛋白 I 的构象，是之后获得高效价、高特异性的单抗的关键。在本发明提供的优选实施例中，粗品经 68℃ 加热处理 3 分钟，10000rpm 离心 30 分钟取上清，上 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析处理，洗脱液为 PH5.6，0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液，洗脱流速为 60ml/h，洗脱 3 个柱体积；收集洗脱液，上 Sephadex G75 凝胶过滤层析柱，洗脱液为 PH7.0-7.4，0.2M 磷酸盐缓冲液，洗脱流速为 20ml/h，收集流出液第一峰；用杂交瘤技术并筛选出高抗体分泌细胞株后，表达获得的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体，经蛋白 A-Sepharose 4B 层析柱亲和层析纯化处理，洗脱液为 PH7.2，0.2M 磷酸盐缓冲液，洗脱流速为 15ml/h，收集流出液第二峰。用 SDS-PAGE 法测定其纯度大于 95%，用 ELISA 法测定效价，和心肌肌钙蛋白 I 反应，效价大于 1:10<sup>6</sup> 倍稀释。

上述步骤 b) 中所指的杂交瘤单克隆抗体技术优选 BALB/c 小鼠脾细胞及 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合。

本发明的另一方面，提供了一种检测心肌钙蛋白 I 的试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

- (1) 用人心肌组织中的心肌肌钙蛋白 I 粗品，经 68℃ 加热处理，以及 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析和 Sephadex G75 凝胶过滤层析纯化而获得心肌肌钙蛋白 I 纯品用杂交瘤技术制备抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体；

- (2) 制备胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体,并用标记好的单克隆抗体包被在玻璃纤维垫片上获得免疫胶体金垫片;
- (3) 将心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗(如羊抗鼠 IgG) 分别固定硝酸纤维素膜片的检测线和质控线上,得到免疫硝酸纤维素膜片;
- (4) 将制得的免疫胶体金垫片、免疫硝酸纤维素膜片和滤样垫片、吸水垫片按照吸水垫片、免疫硝酸纤维素膜片、免疫胶体金垫片、滤样垫片的顺序,粘贴组装成试剂条(图 1);
- (5) 将试剂条组装入塑料卡内,即获得心肌肌钙蛋白 I 检测试剂盒。

本发明的其它方面,所属技术领域的人员可根据现有技术得知。

本发明的原理:本发明是采用胶体金免疫层析技术以及双抗体夹心法原理定性检测人血清或血浆或全血样本中的心肌肌钙蛋白 I (cTnI)。检测时,样本从试剂盒加样孔中加入,渗透到试剂条的加样垫片上,被检样本首先与试剂盒内试剂条玻璃纤维片上的胶体金标记的抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体混合,并继续往试剂条硝酸纤维素膜片流过,顺序通过硝酸纤维素膜上喷点了抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的检测线和喷点了抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体二抗(如羊抗鼠 IgG)的质控线。如果样品中有 cTnI 存在, cTnI 首先和标记了胶体金的抗 cTnI 单克隆抗体结合,形成“cTnI-抗 cTnI 单克隆抗体-胶体金复合物”,在层析至检测线时,会被预先包被在检测区域的抗 cTnI 单克隆抗体捕获,形成“抗 cTnI 单克隆抗体-cTnI-抗 cTnI 单克隆抗体-胶体金”的双抗体夹心复合物,由于复合物中胶体金呈红色,因此在检测线位置便显示出一条红色线条,为阳性结果。如果样本中没有 cTnI,则不会在检测线位置显示红色,为阴性结果。

另外,通过观察质控线位置的红色线条是否出现来判断检测操作是否正确,因为包被在质控线抗 cTnI 二抗(如羊抗鼠 IgG)总是能捕获 cTnI 单克隆抗体-胶体金复合物,因此,无论样本中有无 cTnI,喷点了抗 cTnI 二抗(如羊抗鼠 IgG)的质控线位置总应有红色线条出现,该红色线条的表示检测操作正确;如果没有红色线条出现,则表示操作不正确,应换新的试剂盒重新检测。

本发明的有益效果在于:

- (1) 本发明制备的人心肌肌钙蛋白 I 是高纯度人心肌细胞中游离的 cTnI,将其作为抗原免疫小鼠建立的单克隆抗体细胞株能分泌高效价、高特异性的抗 cTnI 单克隆抗体;
- (2) 本发明制备的抗 cTnI 单克隆抗体具有纯度高(SDS-PAGE 检测纯度>95%)、效价高(ELISA 效价至少  $1:10^6$ )、特异性好,可大批量制备等优点;
- (3) 本发明制备的心肌钙蛋白 I 检测试剂盒,具有灵敏度高,可检出血液样品中 0.5ng/ml 的 cTnI,可以及早诊断心肌梗塞;特异性强,当胆固醇、血红蛋白、甘油三酯浓度分别不高于 8.0mg/ml、2.5mg/ml、2.5mg/ml 时均不影响检测结果;临床符合率高;操作简单;检测结果肉眼判断,无需特殊试验仪器和专业技术人员;检测快速,10-15 分钟内显示检测结果;而且检测费用低廉,储存和运输方便等优点。

## 附图说明

图 1 为试剂条组成结构图

其中 A 区为吸水垫片;B 区为硝酸纤维素膜片;E 区为玻璃纤维垫片;F 区为滤样垫片;C 区对应的条带区为质控区即质控线,即喷点了羊抗鼠 IgG 的区域,

T 区对应的条带区为检测区即检测线，即包被了心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的区域；C 区及 T 区包括在 B 区内。

### 具体实施方式

本发明中术语“抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体”指用人心肌肌钙蛋白 I 纯品采用杂交瘤技术（见 Kohler 等人，Nature256:495，1975:Kohler 等人，Eur-J. Jmmunol. 6:511，1976:Kohler 等人，Eur. J. Jmmunol.6:292，1976:Hammerling 等人，In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981）来制备的单克隆抗体，该单克隆抗体能与心肌肌钙蛋白 I 特异性结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子。

本发明中术语“抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的二抗”、“抗 cTnI 二抗”均指能与上述抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体特异性结合的抗体。

下面结合实施例进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明，而非限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：试验手册（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）中所述的条件或者制造商建议的条件进行或配置，未注明来源的产品均可通过市场途径获得。

### 实施例 1

#### 心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的制备。

##### （1）心肌肌钙蛋白 I 的分离纯化

- a) 取心脏疾病死亡者心肌，加 PH 值为 5.6，0.2M 的醋酸-醋酸钠缓冲液浸泡，经高速搅拌机匀浆，7000~10000rpm 离心 30 分钟，3 次，取上

清液, 于 68℃ 加热处理 3 分钟, 10000rpm 离心 30 分钟取上清, 上 DEAE 纤维素层析柱离子交换层析处理, 洗脱液为 PH5.6, 0.1M 醋酸-醋酸钠缓冲液, 洗脱流速为 60ml/h, 洗脱 3 个柱体积; 收集洗脱液, 上 Sephadex G75 凝胶过滤层析柱, 洗脱液为 PH7.0-7.4, 0.2M 磷酸盐缓冲液, 洗脱流速为 20ml/h, 收集流出液第一峰。

- b) 将层析收集的纯品经 SDS-PAGE 测定分子量和纯度, 检测分子量为 29KD, 纯度在 80%以上, 用罗氏公司 ELISA 心肌肌钙蛋白 I 检测试剂盒检测, 检测结果为阳性, 证明获得了心肌肌钙蛋白 I。

## (2) 抗心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的制备

- c) 取纯化的心肌肌钙蛋白 I 1mg/ml, 总量 1 ml, 经腹腔注射免疫 BALB/c 小鼠。每间隔 2 周以同样方法加强免疫 1 次, 共免疫 3 次, 末次免疫后的第 4 天, 取免疫小鼠的脾细胞和 SP2/O 骨髓瘤细胞进行融合;
- d) 用 HAT 培养基筛选出高抗体分泌细胞, 将筛选出的细胞进行克隆, 用 ELISA 法筛选出高分泌特异性的细胞株 (即 ELISA 效价在 1: 10000 以上的阳性克隆), 再行克隆化, 制备特异具有稳定滴度的大量分泌 cTnI 单克隆抗体的细胞株;
- e) 将上述筛选出的杂交瘤细胞株注入 BALB/c 小鼠腹腔进行扩增培养, 2—3 周后收集腹水;
- f) 腹水经硫酸铵沉淀后, 用蛋白 A-Sepharose 4B 层析柱亲和层析纯化, 洗脱液为 PH7.2, 0.2M 磷酸盐缓冲液, 洗脱流速为 15ml/h, 收集流出液第二峰。用 SDS-PAGE 法测定其纯度大于 95%, 用 ELISA 法测定效价, 和心肌肌钙蛋白 I 反应, 效价大于 1: 10<sup>6</sup> 倍稀释。

## 实施例 2

### 诊断心肌梗塞的检测试剂盒的制备

- (1) 胶体金的制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸制得粒径在 40~60nm 的胶体金
  - a) 分别配制 0.01% 的  $\text{HauCl}$  水溶液和 1.0% 枸橼酸三钠水溶液；
  - b) 将 0.01% 的  $\text{HauCl}$  溶液 1000ml 置烧杯中，在电炉上加热至沸腾。加入 1.0% 枸橼酸三钠水溶液 6.5ml，边加边搅拌。并继续加热煮沸 10~15 分钟至溶液呈透明的红色。冷却至室温，加纯化水恢复至原体积。
- (2) 胶体金标记的抗 cTnI 单克隆抗体的制备：
  - a) 将经实施例 1 获得的抗 cTnI 单克隆抗体用 PH7.2、0.1M 磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度为 1.2 mg/ml；
  - b) 将稀释的抗 cTnI 单克隆抗体溶液加入到胶体金溶液中，室温反应 10min 并不时缓缓搅拌；
  - c) 加入 PH7.2，0.01M 磷酸盐—0.01%BSA 缓冲液纯化浓缩胶体金标记的抗 cTnI 单克隆抗体。
- (3) 将胶体金标记的抗 cTnI 单克隆抗体包被到玻璃纤维素纸片上制得免疫胶体金纸片；
- (4) 将实施例 1 制得的抗 cTnI 单克隆抗体稀释至 2.0 mg/ml，羊抗鼠 IgG（为抗 cTnI 单克隆抗体的二抗，来源于罗氏公司）稀释至 2.5 mg/ml，将两种溶液喷点于硝酸纤维素膜上的检测线和质控线(图 1)，干燥，得到免疫硝酸纤维素膜片。
- (5) 试剂盒的组装：将制得的免疫胶体金垫片、免疫硝酸纤维素膜片和滤样垫片、吸水垫片按照吸水垫片、免疫硝酸纤维素膜片、免疫胶体金垫片、滤

样垫片的顺序，粘贴组装成试剂条。最后将试剂条装配到塑料卡内，组装成检测心肌肌钙蛋白 I 的试剂盒。

### 实施例 3

#### 心肌肌钙蛋白 I 检测试剂盒的临床使用：

- (1) 取上述实施例 2 制得的试剂盒 45 份，选取 20 份心肌梗塞病人血样及 25 份正常人血样，一对一分别在该试剂盒加样孔加二~三滴血样，在滴加样品后 10~15 分钟内 45 份试剂盒均已显色。达到 15 分钟内显示肉眼可见结果的预期目的。结果 20 份心急梗塞病人检测结果全部为阳性，25 份正常人的检测结果全部为阴性，无未显色的试剂盒，表明试剂盒检测准确迅速。
- (2) 结果判读：在滴加样品后 10~15 分钟内判读结果。如果在检测线和质控线位置各出现一条红色色带，说明被检样品中有 cTnI 存在，结果为阳性。若只在质控区出现一条红色色带，表明样品中无 cTnI 存在，结果为阴性，质控区如不出现色带则说明操作错误检测结果无效，应换新的试剂盒重新测试。

### 实施例 4

#### 检测试剂盒灵敏度检测

取实施例 2 制得的检测试剂盒，用 cTnI 质控参考品，按实施例 3 的方式检测，分别选取稀释后浓度为 0.1 ng/ml，0.5ng/ml，1.0/ng/ml, 2.5ng/ml，5.0ng/ml 的系列质控参考品按下表检测，结果表明：0.1ng/ml 的 cTnI 检测结果为阴性，0.5ng/ml 以上的 cTnI 检测结果均为阳性，说明该检测试剂盒对 cTnI 的检出灵敏度为 0.5ng/ml。正常人血液中的 cTnI 水平在 0.5 ng/ml 以下，发

生心肌梗塞后会在 4-6 个小时内会上升到 0.5 ng/ml 以上，所以 0.5ng/ml 的灵敏度对心肌梗塞诊断有典型的临床意义。

| CTnI 浓度  | 试剂盒检测结果 |
|----------|---------|
| 0.1ng/ml | 阴性      |
| 0.5ng/ml | 阳性      |
| 2.5ng/ml | 阳性      |
| 5.0ng/ml | 阳性      |

## 实施例 5

### 检测试剂盒特异性检测

取实施例 2 制得的检测试剂盒，按下述表格分别加样检测，检测结果如下：

| 样品        | 浓度 1<br>(mg/ml) | 浓度 2<br>(mg/ml) | 浓度 3<br>(mg/ml) | 结果   |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 胆红素       | 0.8             | 8.0             | 80.0            | 均为阴性 |
| 胆固醇       | 0.8             | 8.0             | 80.0            | 均为阴性 |
| 血红蛋白      | 0.25            | 2.5             | 25.0            | 均为阴性 |
| 甘油三酯      | 0.25            | 2.5             | 25.0            | 均为阴性 |
| 骨骼肌肌钙蛋白 I | 0.005           | 0.05            | 0.5             | 均为阴性 |
| 心肌肌钙蛋白 C  | 0.005           | 0.05            | 0.5             | 均为阴性 |
| 心肌肌钙蛋白 T  | 0.005           | 0.05            | 0.5             | 均为阴性 |

由此可见，该试剂盒和血液中常见的物质，如高浓度的胆红素、胆固醇、血红蛋白、骨骼肌肌钙蛋白 I、心肌肌钙蛋白 C、心肌肌钙蛋白 T 均没有交叉反应，特异性好。

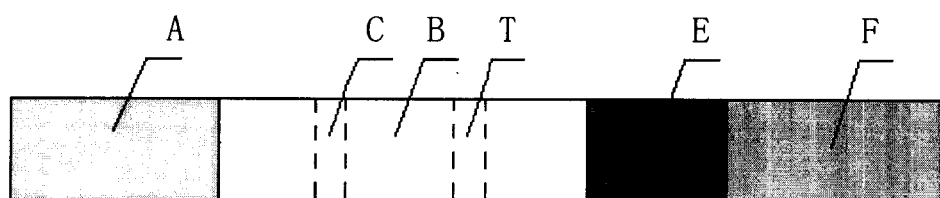


图 1

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种检测心肌肌钙蛋白I的试剂盒及其制备方法                          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN101105497A</a>                   | 公开(公告)日 | 2008-01-16 |
| 申请号            | CN200610028913.X                               | 申请日     | 2006-07-13 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 上海凯创生物技术有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 张国华                                            |         |            |
| 发明人            | 张国华                                            |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/549 G01N33/531               |         |            |
| 代理人(译)         | 余明伟                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN101105497B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明涉及一种检测心肌肌钙蛋白I的试剂盒及其制备方法。本发明提供的试剂盒包含试剂条，试剂条上含有胶体金标记的心肌肌钙蛋白I单克隆抗体及未标记的心肌肌钙蛋白I单克隆抗体及抗心肌肌钙蛋白I单克隆抗体的二抗，本发明还提供了上述检测试剂盒的制备方法。该检测试剂盒的优点在于可以快速、方便、灵敏地检测人血液样本中出现的心肌肌钙蛋白I，用于诊断心肌梗塞。

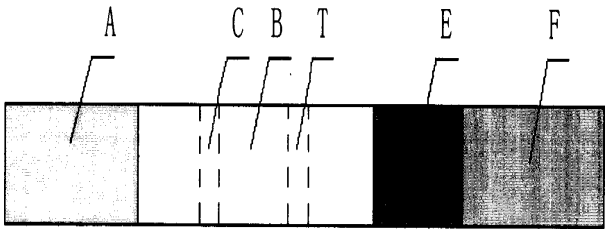


图 1