



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109765382 B

(45) 授权公告日 2021.10.08

(21) 申请号 201910003537.6

(22) 申请日 2019.01.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109765382 A

(43) 申请公布日 2019.05.17

(66) 本国优先权数据
201811517535.0 2018.12.12 CN

(73) 专利权人 北京九强生物技术股份有限公司
地址 100083 北京市海淀区花园东路15号
旷怡大厦5层

(72) 发明人 韩成莲 刘瑶 刘希

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 程云

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102841206 A, 2012.12.26

CN 101341408 A, 2009.01.07

CN 101341408 A, 2009.01.07

CN 105403693 A, 2016.03.16

CN 108546602 A, 2018.09.18

CN 108431607 A, 2018.08.21

CN 108535491 A, 2018.09.14

审查员 刘彦宁

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种心肌肌钙蛋白T的胶乳增强免疫比浊检测试剂盒

(57) 摘要

本申请涉及一种心肌肌钙蛋白T的胶乳增强免疫比浊检测试剂盒。具体而言,其包含第一试剂和第二试剂;其中所述第一试剂包含缓冲液、稳定剂、2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物、防腐剂;所述第二试剂包含缓冲液、结合有抗人肌钙蛋白T抗体的胶乳颗粒、稳定剂、防腐剂。本申请的试剂盒具有约0.1ng/ml的定量检测限;与市售化学发光法试剂的相关性良好,可以应用于cTnT的临床检测。

1. 一种心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂;其中:
所述第一试剂包含:
甘氨酸缓冲液100mM,pH为7.5、
0.5%w/v牛血清白蛋白、
0.1%w/v Biolipidure 405或0.2%w/v Biolipidure103、
0.1%w/v NaN₃;
所述第二试剂包含:
甘氨酸缓冲液100mM,pH为8.0、
0.1%w/v结合有抗人肌钙蛋白T单克隆抗体的胶乳颗粒、
0.5%w/v牛血清白蛋白、
0.1%w/v NaN₃;
所述胶乳颗粒的平均粒径为200nm至400nm;
所述胶乳颗粒的羧基含量为30μeq/g至80μeq/g;
所述心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒不含PEG;
所述单克隆抗体源自:鼠、兔、羊、禽。
2. 根据权利要求1所述的心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,其还包含校准品,所述校准品含有1ng/mL至30ng/mL的肌钙蛋白T。
3. 根据权利要求2所述的心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,所述校准品还含有50mM Heps缓冲液pH7.4、0.9%NaCl、0.5%牛血清白蛋白、和0.1%NaN₃。
4. 根据权利要求2所述的心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,所述校准品含有1.5ng/mL、3ng/mL、6ng/mL、12ng/mL或24ng/mL肌钙蛋白T。
5. 根据权利要求1所述的心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,所述胶乳颗粒的平均粒径为300nm。
6. 根据权利要求1-5任一项所述的心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,其还包括质控品。
7. Biolipidure103或Biolipidure 405在提高检测试剂灵敏度中的用途,其中所述的检测试剂包含权利要求1所限定的第一试剂和第二试剂。

一种心肌肌钙蛋白T的胶乳增强免疫比浊检测试剂盒

技术领域

[0001] 本公开涉及医学、免疫和体外诊断领域,具体涉及一种用免疫比浊法检测肌钙蛋白T的试剂盒。

背景技术

[0002] 肌钙蛋白T (TnT) 分子量为37kD,是原肌球蛋白结合亚基。TnT有三种亚型,其中骨骼肌肌钙蛋白T (sTnT) 包括快骨骼肌型和慢骨骼肌型;此外还有心肌型 (cTnT)。cTnT相对于两种骨骼肌亚型有40%的非同源性。

[0003] 鉴于cTnT分子稳定、亲水、特异性抗原决定簇的反应性好,其作为心肌损伤的特异性标志物。cTnT的血清半衰期仅为120min,但急性心肌梗塞 (AMI) 患者其血清浓度升高可以持续几天至三周,最长可达27天。在心肌细胞受到可逆性损伤时,细胞膜的完整性被破坏,游离的cTnT首先释放入血中,构成短暂而迅速的升高峰。如发生不可逆的心肌损伤,结合部分的cTnT继续从细肌丝上释放出来,导致血清cTnT的持续升高。

[0004] 血清中cTnT诊断AMI的临床意义在于:

[0005] 1) cTnT对急性胸痛患者 (无论有无骨骼肌损伤) 的诊断均优于CK-MB。研究表明:在对AMI的诊断方面cTnI和cTnT无显著差异,都能鉴别出CK-MB所不能检测出的心肌损伤。相对cTnT而言,cTnI显示出较低的初始灵敏性和较高的特异性。就上升的相对值来说,cTnT比cTnI高;在不稳定心绞痛患者中cTnT上升的频度比cTnI高。在AMI后30天死亡率的预报方面,cTnT优于cTnI。

[0006] 2) 无论是不稳定心绞痛还是无Q波的心肌梗死,最初24小时的cTnT最具预后价值。对不稳定冠状动脉疾患患者的随访发现,cTnT和运动试验两项都正常者,死亡或AMI仅为1%;若异常,死亡或AMI可达50%。

[0007] 3) 对急性冠状动脉疾患 (包括心肌梗死) 患者的随访研究发现,cTnT小于0.1 μ g/L的患者的死亡率仅为4%。相比而言,大于0.1 μ g/L的患者的死亡率则高3倍,发生休克的百分率高3倍,发生充血性心功能衰竭的百分率也增加1倍。对cTnI的观察研究得到了类似的结果。

[0008] 4) cTnT是围手术期心肌梗死的敏感和特异的标志物,能够鉴别出没有达到常规围手术期心肌梗死判断标准的微小的围手术期心肌损伤。

[0009] 常用的cTnT的检测方法有酶联免疫吸附实验 (ELISA)、胶体金免疫层析技术 (GICA)、电化学发光 (ECL)。采用酶联免疫法检测cTnT所存在的主要缺点是测定过程中需要进行洗涤分离步骤、耗时长、自动化程度不高、批间差和重复性相对较大。采用化学发光法检测cTnT虽然灵敏度和线性都较高,但试剂成本相对较高且配套的大型仪器比较昂贵。

[0010] CN102841206A公开了一种采用胶乳增强免疫比浊法检测TNT含量的试剂盒,其包含试剂R1、R2以及校准品。所述试剂R1包含pH值为6.5-8.0的缓冲液、无机盐、加速剂和防腐剂;所述试剂R2包含抗人TNT抗体胶乳 (颗粒直径为60至150nm) 和稳定剂 (选自0.05-0.5% 小牛白蛋白、甘氨酸、明胶、吐温20、曲拉通)。CN102841206A中的试剂盒具有0.12ng/mL的灵

敏度,7.2%和5.7%精密度,并且在0.12至43.2ng/mL范围内有良好的线性。

[0011] 在本领域中,仍需要一种灵敏度高、准确性好、方便快捷、成本较低、可在全自动生化分析仪上使用的cTnT检测试剂盒。

发明内容

[0012] 根据一些实施方案,提供了一种心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂。

[0013] 在一些实施方案中,所述第一试剂包含:

[0014] 10mM至200mM 缓冲液、

[0015] 0.1%至1%w/v 稳定剂、

[0016] 0.05%至0.5%w/v 2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物、

[0017] 0.05%至0.5%w/v 防腐剂、

[0018] pH 7至8;

[0019] 所述第二试剂包含:

[0020] 10mM至200mM 缓冲液、

[0021] 0.05%至0.5%w/v 结合有抗人肌钙蛋白T抗体的胶乳颗粒、

[0022] 0.1%至1%w/v 稳定剂、

[0023] 0.05%至0.5%w/v 防腐剂、

[0024] pH 8至9。

[0025] 在一些实施方案中,胶乳颗粒的平均粒径为100nm至400nm,优选200nm至400nm,更优选300nm。

[0026] 在一些实施方案中,所述胶乳颗粒的羧基含量为10 μ eq/g至100 μ eq/g。在一些具体的实施方案中,所述胶乳颗粒的羧基含量为30 μ eq/g至80 μ eq/g。

[0027] 在一些实施方案中,缓冲液选自:Mes缓冲液、Heps缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液。

[0028] 在一些实施方案中,所述电解质选自:氯化钠、氯化钙或氯化钾。

[0029] 在一些实施方案中,稳定剂选自:甘露糖、葡萄糖、壳聚糖、山梨醇、牛血清白蛋白、酪蛋白、多聚赖氨酸、脱脂奶粉、海藻糖、果糖、蔗糖。

[0030] 在一些实施方案中,防腐剂选自:叠氮钠、苯酚、对羟基苯甲酸、PC300、硫柳汞。

[0031] 在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

[0032] 在一些实施方案中,单克隆抗体源自:鼠、兔、羊、禽。

[0033] 根据另一些实施方案中,心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒还任选包含校准品。在一些实施方案中,校准品含有1ng/mL至30ng/mL的肌钙蛋白T,包括例如但不限于1.5ng/mL、3ng/mL、6ng/mL、12ng/mL或24ng/mL肌钙蛋白T。在一些实施方案中,校准品可以是市售购买的产品。在一些实施方案中,校准品还含有50mM Heps缓冲液pH7.4、0.9%NaCl、0.5%牛血清白蛋白、和0.1%NaN₃。

[0034] 在一些实施方案中,所述的2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱的共聚物选自:Biolipidure 103、Biolipidure 203、Biolipidure 205、Biolipidure 206、Biolipidure 401、Biolipidure 402、Biolipidure 405、Biolipidure 406、Biolipidure 407、

Biolipidure 408、Biolipidure 802、Biolipidure 803、Biolipidure 804、Biolipidure 1002、Biolipidure 1103、Biolipidure 1201、Biolipidure 1202、Biolipidure 1301；优选 Biolipidure 103 和 Biolipidure 405。

[0035] 在具体的实施方案中，提供了一种心肌肌钙蛋白T的检测试剂盒，其包含第一试剂和第二试剂；其中：

[0036] 所述第一试剂包含：

[0037] 甘氨酸缓冲液100mM，pH为7.5、

[0038] 0.5%w/v牛血清白蛋白、

[0039] 0.1%w/v Biolipidure 405或103、

[0040] 0.1%w/v NaN_3 ；

[0041] 所述第二试剂包含：

[0042] 甘氨酸缓冲液100mM，pH为8.0、

[0043] 0.1%w/v结合有抗人肌钙蛋白T单克隆抗体的胶乳颗粒、

[0044] 0.5%w/v牛血清白蛋白、

[0045] 0.1%w/v NaN_3 ；

[0046] 所述胶乳颗粒的平均粒径为200nm至400nm；

[0047] 所述胶乳颗粒的羧基含量为30 $\mu\text{eq/g}$ 至80 $\mu\text{eq/g}$ 。

[0048] 在一些实施方案中，本申请的试剂盒不含PEG。

附图说明

[0049] 图1：本发明cTnT胶乳增强免疫比浊试剂盒的定标曲线。

具体实施方式

[0050] 实施例1. 结合有抗体的胶乳颗粒的制备方法

[0051] (1) 用10mL MES缓冲液冲洗10mg/mL胶乳颗粒两遍（平均粒径300nm，购于JSR）（平均粒径200nm和平均粒径400nm的颗粒可替代使用）；

[0052] (2) 在10mL活性缓冲液（10mM MES，pH6.0）中重悬颗粒，使颗粒浓度为0.1%w/v，采用超声或者搅拌的方法确保颗粒重悬良好；

[0053] (3) 向步骤2的颗粒中加入5mg/mL EDC（EDC用量为胶乳上羧基含量的0.5至2.5倍），在25℃至45℃反应15至30分钟，持续混合，进行活化；

[0054] (4) 用10mM硼酸缓冲液pH9.0冲洗活化后的颗粒两次，并重悬在5mL硼酸缓冲液（10mM，pH9.0）中；

[0055] (5) 将cTnT抗体（鼠源单抗）溶解于5mL硼酸缓冲液中；

[0056] (6) 将步骤4的颗粒悬液和步骤5的抗体溶液混合，在25℃至45℃（优选37至45℃）反应1至4小时；

[0057] (7) 离心冲洗，重悬于10mL 100mM甘氨酸缓冲液pH8.0中，超声使颗粒分散；

[0058] (8) 储存在4℃直到使用。

[0059] 实施例2. 本公开的试剂盒的制备方法

[0060] 按照下列组分含量配制试剂：

[0061] 1. 第一试剂的组成:

[0062] Gly缓冲液100mM

[0063] 牛血清白蛋白0.5%w/v

[0064] Biolipidure 405 0.1% (或者0.2%w/v的biolipidure103)

[0065] NaN_3 0.1%w/v

[0066] 其pH为7.5。

[0067] 2. 第二试剂的组成:

[0068] Gly缓冲液100mM;

[0069] cTnT抗体包被的胶乳颗粒0.1%w/v;

[0070] 牛血清白蛋白0.5%w/v;

[0071] NaN_3 0.1%w/v

[0072] 其pH为8.0。

[0073] 3. 校准品的制备:

[0074] 可以自行配制校准品:将市售人cTnT重组蛋白(购买的商业化抗原)溶于稀释液中(pH7.4、NaCl 0.9%、牛血清白蛋白0.5%、 NaN_3 0.1%)制成6个浓度的校准品(0、1.5、3、6、12、24ng/mL)。也可以使用市售cTnT校准品。

[0075] 实施例3. 对比试剂盒的制备

[0076] 按照实施例2的方法,区别仅在于将Biolipidure替换成0.5%w/v浓度的PEG-12000。

[0077] 实施例4. 试剂盒的使用方法

[0078] 本公开试剂盒的使用方法如下:在生化分析仪(日立7180)上检测校准品,具体参数见表1。

[0079] 表1. 检测参数

[0080]	分析类型	时间/点	波长	样本量	R1/R3	校正类型	校正点
	2点法	10/18-34	600	20 μl	150/50	spline	6点

[0081] 实施例5. 定量检测限的评价

[0082] 1. 实验方法

[0083] 用实施例2制备的试剂盒对空白样本(零值血清)及用空白样本稀释的5份梯度样本各测15次,计算各个反应浓度样本吸光度信号、平均值、SD、CV。绘制浓度,获得CV(%)曲线,拟合选取指数或者幂函数,通过公式求出其CV=20%时,浓度值为定量检测限(也作功能灵敏度)。

[0084] 同时,与实施例3的对比试剂盒做比较。

[0085] 2. 实验结果

[0086] 试剂盒定量检测限的评价实验结果见表2。

[0087] 表2. 试剂盒定量检测限评价实验

[0088]

编号	实施例2的试剂盒					实施例3的试剂盒				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	0.02	0.03	0.08	0.09	0.21	0.06	0.06	0.16	0.18	0.42
2	0.00	0.04	0.05	0.11	0.17	0.00	0.08	0.10	0.22	0.48
3	0.02	0.04	0.05	0.09	0.19	0.02	0.10	0.10	0.16	0.38
4	0.00	0.04	0.05	0.12	0.20	0.05	0.05	0.10	0.24	0.40
5	0.01	0.04	0.07	0.09	0.21	0.08	0.08	0.14	0.17	0.42
6	0.01	0.03	0.05	0.13	0.18	0.01	0.06	0.10	0.26	0.36
7	0.02	0.02	0.05	0.14	0.19	0.02	0.04	0.10	0.28	0.38
8	0.00	0.04	0.02	0.10	0.18	0.04	0.08	0.04	0.20	0.36
9	0.01	0.04	0.06	0.13	0.16	0.08	0.08	0.12	0.26	0.32
10	0.02	0.02	0.05	0.09	0.21	0.02	0.04	0.10	0.18	0.42
11	0.01	0.03	0.06	0.12	0.20	0.01	0.06	0.14	0.24	0.40
12	0.02	0.04	0.05	0.09	0.24	0.07	0.08	0.10	0.16	0.50
13	0.02	0.03	0.06	0.13	0.18	0.02	0.06	0.15	0.26	0.36
14	0.00	0.04	0.06	0.09	0.20	0.00	0.08	0.12	0.18	0.40
15	0.00	0.06	0.05	0.14	0.21	0.00	0.12	0.09	0.28	0.42
平均值	0.011	0.036	0.054	0.111	0.195	0.032	0.071	0.111	0.218	0.401
SD	0.0088	0.0099	0.0130	0.0202	0.0200	0.0291	0.0217	0.0294	0.0444	0.0463
CV%	82.85	27.38	24.04	18.22	10.21	90.88	30.38	26.56	20.38	11.53

[0089] 定量检测限测定结果显示,本公开试剂盒的空白检测值低,约为0.03ng/ml (均值+2SD),定量检测限可达0.1ng/mL。与实施例3的试剂盒对比,在灵敏度上提升了2倍,大大提高了试剂盒检测的准确性。

[0090] 实验例6.本公开的试剂盒与化学发光法试剂盒的相关性实验

[0091] 1.实验方法

[0092] 用实施例2制备的试剂盒检测20例以上的患者(异常样本不少于5例),用线性回归方法计算与对照(已上市产品,化学发光法试剂盒)结果的相关系数及每个浓度点的相对偏差。

[0093] 2.实验结果

[0094] 相关性的评价实验结果见表3。

[0095] 表3. 试剂盒相关性的评价实验结果 (ng/mL)

[0096]

样本	化学发光法试剂盒	本公开的试剂盒
1	1.03	0.856
2	1.17	1.731
3	1.15	1.026
4	1.36	1.216
5	1.47	1.300
6	1.11	1.225
7	1.15	1.260
8	1.55	1.439
9	1.45	1.592
10	2.33	2.256
11	2.18	2.253
12	3.13	2.895
13	2.12	2.057
14	2.09	2.384
15	3.57	3.224

16	3.58	3.213
17	4.55	4.068
18	5.54	5.536
19	4.19	3.989
20	4.44	4.853
21	20.34	20.022
22	64.92	58.465
23	7.86	8.076
24	9.18	10.083

[0097] 从相关性实验结果可见,本公开的试剂盒与市售化学发光法试剂相关性较好:相关方程为 $y=0.904x+0.332$, $R^2=0.998$ 。

[0098] 本申请解决了现有市场上胶乳增强比浊法心肌肌钙蛋白T检测试剂盒灵敏度低、低值检测准确性差的问题。通过使用PEG的替代物2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱来提升灵敏度,解决低值测值准确性问题。Biolipidure 103、Biolipidure 405以及Biolipidure 1201的技术效果相当(数据未显示)。发明人还采用其它类型的Biolipidure(例如Biolipidure 206和Biolipidure 1002),发现对定量检测限的改善并不令人满意,和对照试剂无统计学意义上的差异(数据未显示)。

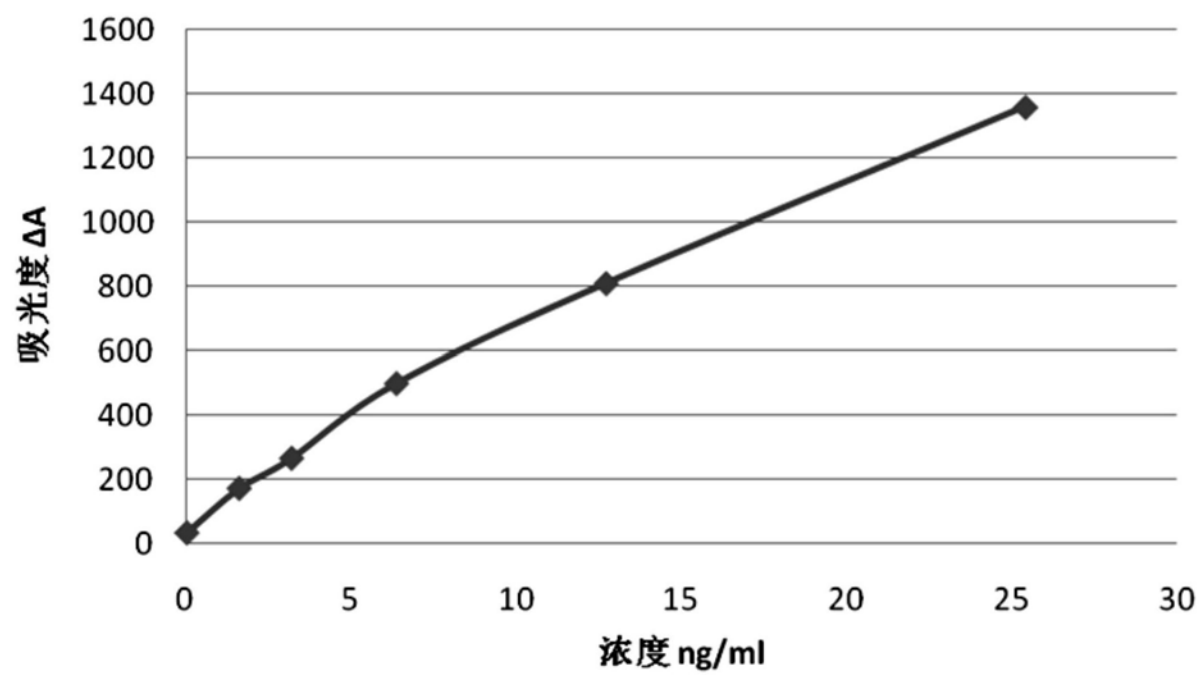


图1