



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645744 A

(43)申请公布日 2017. 05. 10

(21)申请号 201610908943.3

(22)申请日 2016.10.19

(71)申请人 山东大学齐鲁医院

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路107号

(72)发明人 黄亚丽 李新华 魏芳 赵珂  
谢爱武

(74)专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 杨磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

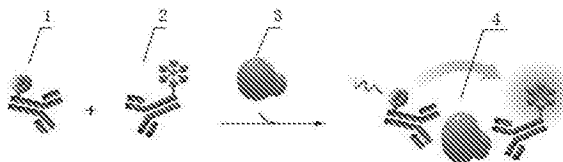
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

### (54)发明名称

一种快速定量检测肌钙蛋白T 的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法

### (57)摘要

本发明公开了一种快速定量检测肌钙蛋白T 的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法。本发明的快速定量检测肌钙蛋白T 的均相荧光免疫试剂,是由稀土元素螯合物标记的anti-cTnT和近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT,以及系列浓度的cTnT校准品组成。本发明采用均相荧光免疫快速检测技术,利用荧光的高灵敏特点,同样也避免了胶体金或者荧光cTnT干式免疫试纸中的硝酸纤维素膜本身孔隙不均一特性对检测准确度和重复性的不良影响,可大幅度提高检测灵敏度和线性范围。应用本发明所提供的试剂检测人血液、血清或血浆中肌钙蛋白T,操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点,具有良好的临床应用前景。



1. 一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,该试剂包括稀土元素螯合物标记的anti-cTnT、近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT和系列浓度的cTnT校准品。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的稀土元素螯合物为铕离子( $\text{Eu}^{3+}$ )螯合物。

3. 根据权利要求2所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的铕离子( $\text{Eu}^{3+}$ )螯合物为BHHCT- $\text{Eu}^{3+}$ 或BHHBCB- $\text{Eu}^{3+}$ 。

4. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的近红外荧光化合物为Alexa Fluor®、DyLight®或CF®系列染料,优选Alexa Fluor 647、DyLight-DY647或CF647的染料。

5. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的cTnT校准品是用磷酸盐缓冲液稀释溶解cTnT纯品得到;

优选的,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,磷酸盐缓冲液中含有0.01%-0.5%PEG、1%-5%BSA、0.01%-0.05%表面活性剂,均为质量百分比含量。

6. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的cTnT校准品的浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL。

7. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的稀土元素螯合物标记的anti-cTnT的制备方法,包括步骤如下:

将鼠抗人cTnT溶液透析后,加入 $\text{NaHCO}_3$ ,调pH至9.1,得抗体溶液;将BHHCT或BHHBCB的甲醇溶液滴加到抗体溶液中,搅拌反应,离心除去不溶物后,色谱柱分离标记蛋白质和游离的标记物;紫外/可见分光光度计检测各收集液的 $A_{330}$ 值,合并含有标记抗体的溶液;加入最终质量百分比浓度为0.1%的BSA和0.05%的 $\text{NaN}_3$ ,调pH至6.2;加入 $\text{EuCl}_3$ 溶液,即得稀土元素螯合物标记的anti-cTnT。

8. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT的制备方法,包括步骤如下:

将anti-cTnT单克隆抗体,用碳酸氢钠溶液稀释,加入近红外荧光化合物溶解液,搅匀,室温孵育;过柱分离纯化,收集标记好的荧光化合物标记抗体,用磷酸盐缓冲液稀释混匀,即得近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT。

9. 根据权利要求1所述的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,其特征在于,所述的系列浓度的cTnT校准品的制备方法,包括步骤如下:

用含质量百分比浓度为0.01%-0.5%PEG1000、1%-5%BSA、0.01%-0.05%表面活性剂的磷酸盐缓冲液,按照0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL的浓度稀释溶解cTnT纯品,混合均匀,即得系列浓度的cTnT校准品。

10. 利用权利要求1-9任一项所述的均相荧光免疫试剂快速定量检测肌钙蛋白T的方法,包括步骤如下:

先将稀土元素螯合物标记anti-cTnT溶液加入反应微孔中,再加入近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT溶液,最后加入cTnT校准品,37℃反应20分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,依据相对荧光强度数据,制作cTnT浓度-荧光强度的标准曲线;

将临床检测样品代替cTnT校准品,重复上述过程,根据相对荧光强度数据对应标准曲

线,得到肌钙蛋白T含量。

## 一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法。

### 背景技术

[0002] 冠心病已成为影响人群健康的主要疾病。急性心肌梗死则是造成冠心病人死亡的主要原因。如何及时地发现急性心肌梗死病人及其相应的治疗是挽救心肌梗死病人生命的关键所在。传统的诊断主要是根据典型的临床表现,心电图的改变及实验室酶学检查。但相当一部分心肌梗死病人临床表现不明显,早期心电图无明显改变。在这种情况下,心肌损伤特异性标志物的应用对心肌梗死的早期确诊就起到了关键的作用。肌钙蛋白T(Cardiac troponin T,cTnT)是一重要的心肌组织损伤特异性标识物,临床用于急性心肌梗死及其它心肌损伤性疾病的诊断。

[0003] 肌钙蛋白是横纹肌的结构蛋白,由TnI、TnT和TnC三种亚单位组成。TnT是与原肌球蛋白结合的亚单位,TnI是肌原纤维ATP酶的抑制性亚单位,TnC是钙离子结合亚单位。这三种亚单位与原肌球蛋白一起构成肌凝蛋白(Tm)一肌钙蛋白(Tn)复合体。在钙离子的诱导下,调节肌肉收缩和舒张的力量和速度。骨骼肌与心肌中的TnT和TnI是由不同的基因编码的,导致其氨基酸组成序列的差异,因此可以用免疫学的方法加以区分。TnC在骨骼肌和心肌中则是相同的。

[0004] cTnT是仅存在于心肌细胞中的特异性调节蛋白,分两种形式存在:游离形式存在于细胞浆中,占6%~8%;结合形式存在于心肌收缩单位中肌纤维的细肌丝上,占92%~94%。当出现可逆性心肌缺血,心肌细胞尚未坏死,但细胞膜受到损伤,胞浆中的cTnT可短暂释放入血;当发生不可逆性心肌缺血,心肌细胞坏死,细肌丝降解,可导致结合池cTnT释放入血。因此不稳定型心绞痛(UAP)患者血液中cTnT仅短暂轻度升高随后恢复正常;而急性心肌梗塞(AMI)患者血中cTnT可显著升高且维持较长时间。cTnT在心肌损伤后2~8小时释放入血,12~24小时达高峰,在血中可维持14天左右,所以它的最大有效诊断窗口宽至2小时~14天。在心肌损伤后,cTnT较cTnI更早释放入血,更易被检测到,血中浓度更高,对检测心肌损伤的价值也就可能更高。cTnT仅存在于心肌细胞中,可用免疫酶标定量法测得,对心肌损伤的诊断具高度敏感和特异性。虽然早期的测定方法不成熟,使cTnT与骨骼肌TnT有微量交叉反应,采用心脏特异和非心脏特异两种抗体测定cTnT,发现cTnT与骨骼肌TnT有1%~2%的交叉反应。检测方法改进后,采用两种均为心脏特异的单克隆抗体作为检测抗体测定cTnT时,与骨骼肌TnT的交叉反应阳性率<0.5%。对75名无心脏病的骨骼肌损伤患者(其中33名Duchenne病,42名运动员马拉松长跑后)用第二代检测方法检测cTnT,未发现1例假阳性反应。另据Rottbauer报道,用同样的方法检测横纹肌溶解症患者或健康人马拉松长跑后,虽然他们的CK可升至正常高限的300倍,却检测不到cTnT,另1例因乙醇中毒导致严重骨骼肌损伤的患者,虽CK达35000IU/L(正常高限是200IU/L),而cTnT却阴性。

[0005] 自1991年首次发表cTnT有诊断AMI价值的文章以来,全世界已经有十多个大型临床试验证实其对AMI有重要的诊断价值。Katus等人最早报道了cTnT对诊断AMI是高度敏感和特异的。他们选取387例因胸痛而怀疑AMI的患者测定cTnT,发现所有AMI患者cTnT均升高( $>0.1\text{ng/mL}$ ),胸痛发作24小时内cTnT诊断AMI的敏感性和特异性分别为99%和93%,第2天敏感性和特异性均为100%,因cTnT的升高在血清中持续时间较长,故到第6天仍均达100%;而头24小时内CK和CK-MB的敏感性分别为99%和98%,特异性分别为75%和92%。cTnT的价值优于CK、CK-MB,在AMI后,cTnT升高幅度是CK-MB升高幅度的5倍,诊断AMI的绝对敏感窗(以症状发作后时间计)在cTnT也远较CK和CK-MB宽,cTnT为10.5~140小时,CK和CK-MB为9~31小时。cTnT诊断AMI的价值优于CK、CK-MB的可能原因有:(1)心肌中cTnT的含量较高,每克心室肌(湿重)含10~8mg的cTnT,cTnT总量中的6%~8%存在于胞浆中,而这胞浆中的cTnT量已经相当于心肌中CK的总量,所以cTnT在AMI后的升高幅度要远高于CK(cTnT可达30~40倍,而CK仅升高9倍)。(2)cTnT在心肌损伤后释放入血也较CK要早,它最早可在症状发作后1小时在血中检出,3~4小时其敏感性可达50%。(3)其在血中持续升高的时间较长。cTnT大部分(94%)以结合形式存在于心肌细胞收缩单位中,它从细肌丝的肌钙蛋白复合物中分离出来的过程是一个消耗时间的过程,且此过程不断进行,因此虽然cTnT在血浆中的半衰期只有120分钟,但却可在血中持续升高达2周左右。在10.5~140小时的绝对敏感诊断窗中,100%的AMI患者cTnT均升高,敏感性是CK的6倍。

[0006] cTnT的测定始于20世纪90年代初,多采用双抗体竞争放射免疫法和竞争性ELISA测定法。有研究者将金标记或硒标记单克隆抗体与免疫层析技术相结合,用纸条法半定量床边检测cTnT浓度,最低检测值为 $0.1\mu\text{g/L}$ 。

[0007] 目前cTnT的检测多采用化学发光法,用化学发光物质标记后作为检测抗体,大大提高了测定的精确性和敏感性,但需要昂贵的检测设备。目前的床旁检测方法(胶体金试纸法),不能满足临床诊断准确定量的要求,无法对AMI的病程起到很好的疗效监测作用。因此,建立一种检测时间尽量缩短,并且检测除了能在实验室进行外,还要求能够进行床旁检测,同时能定量测定cTnT的检测方法,从而为临床提供准确的诊断依据,是十分必要的。

[0008] 均相荧光分析法(homogeneous fluoroimmunoassay, HFIA)是在时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)技术的基础上形成的一种新的荧光免疫分析技术。TRFIA技术采用的荧光物质与传统的荧光染料完全不同,采用的是镧系元素铕(Eu)、铽(Tb)等作为荧光材料,灵敏度非常高,稳定性好,低温条件可保存三年,因而成为二十一世纪最热门的免疫分析技术。

[0009] 均相荧光免疫检测法是用同一抗原的两个抗体分别标记 $\text{Eu}^{3+}$ 和荧光染料Alexa647。 $\text{Eu}^{3+}$ 标记抗体在游离状态时,受到340nm光线激发,只发射平均波长为615nm荧光,而在抗原、抗体复合物形成时,发生能量传递,激发荧光染料Alexa647发射出665nm荧光。标记抗体直接与待测样品进行抗原、抗体反应,如果能形成抗原、抗体复合物,则在665nm出可测得荧光信号。这种方法省却了酶联免疫法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果,省时省力。并且,此法也相应地避免了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰,稳定性和重复性都较好,能较真实地反映被测物质的含量。此外, $\text{Eu}^{3+}$ 和Alexa647这对荧光物质的最大发射光波长之间相差较大,未发生抗原抗体反应的本底荧光值就非常低。而人血清中非特异性物质产生的300~500nm荧光,不能激发Alexa647发射荧光信号

650nm激发光,因此非特异性荧光非常低。

[0010] 中国专利文件CN 102841206A(申请号:201110168449.5)公开了一种测定血清中的肌钙蛋白T含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足,提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于各种类型的全自动生化分析仪以及各种特种蛋白仪的免疫比浊法检测肌钙蛋白T含量的试剂盒。技术方案是:免疫增强比浊法检测肌钙蛋白T试剂盒,包括:a、试剂R1:缓冲液、防腐剂、加速剂、无机盐、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂R2:缓冲液、结合有抗人的肌钙蛋白抗体、防腐剂,乳胶微球直径为60-150nm;c、参考校准品:缓冲液,稳定剂,防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组人蛋白肌钙蛋白T纯品,其余为纯化水。但该方法灵敏度偏低,线性范围偏窄,很少应用于临床检测。

[0011] 中国专利文件CN 102565422A(申请号:201110451623.7)公开了一种定量检测心肌肌钙蛋白T(cTnT)的荧光免疫层析方法及其试剂盒。本发明的定量检测cTnT荧光免疫层析方法是利用量子点的优良荧光特性,结合双色标记技术及免疫层析技术,在优化试纸条各组成部件基础上,实现的荧光定量检测。中国专利文件CN104502595A(申请号:201410629661.0)公开了一种肌钙蛋白的检测方法及试剂盒,尤其涉及一种肌钙蛋白的双波长荧光免疫层析检测方法及其检测试剂盒。包括以下步骤:1)免疫层析试纸条制备;2)冻干探针制备;3)样品稀释液制备;4)样品检验。但是,这两种方法均受硝酸纤维素膜本身的非均一性缺陷而导致检测重复性较差。

## 发明内容

[0012] 针对现有cTnT检测技术的不足,本发明提供一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂及其制备方法与检测方法。本发明根据免疫荧光技术特点和cTnT抗原抗体系统特点,设计新的原材料,试剂和工艺流程。应用本发明提供的试剂检测cTnT水平,具有简单,快速,灵敏和特异性好等特点,可同时定量检测高值和低值样品,并且性价比高,适用于临床快速检测。

[0013] 本发明的技术方案如下:

[0014] 一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂,包括稀土元素螯合物标记的anti-cTnT、近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT和系列浓度的cTnT校准品。

[0015] 根据本发明,优选的,所述的稀土元素螯合物为铕离子( $\text{Eu}^{3+}$ )螯合物,进一步优选BHHCT- $\text{Eu}^{3+}$ 、BHHBCB- $\text{Eu}^{3+}$ 。稀土元素螯合物标记的anti-cTnT独立包装。

[0016] 根据本发明,优选的,所述的近红外荧光化合物为Alexa Fluor®、DyLight®或CF®系列染料,进一步优选Alexa Fluor 647、DyLight-DY647或CF647的染料。近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT独立包装。

[0017] 根据本发明,优选的,所述的cTnT校准品是用磷酸盐缓冲液稀释溶解cTnT纯品得到;进一步优选的,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,磷酸盐缓冲液中含有0.01%-0.5% PEG、1%-5% BSA、0.01%-0.05%表面活性剂,均为质量百分比含量;优选的,所述的表面活性剂为吐温20。系列浓度的cTnT校准品独立包装。

[0018] 根据本发明,优选的,所述的cTnT校准品的浓度分别为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL。

[0019] 根据本发明,所述的稀土元素螯合物标记的anti-cTnT的制备方法,包括步骤如下:

[0020] 将鼠抗人cTnT溶液透析后,加入NaHCO<sub>3</sub>,调pH至9.1,得抗体溶液;将BHHCT或BHHBCB的甲醇溶液滴加到抗体溶液中,搅拌反应,离心除去不溶物后,色谱柱分离标记蛋白质和游离的标记物;紫外/可见分光光度计检测各收集液的A<sub>330</sub>值,合并含有标记抗体的溶液;加入最终质量百分比浓度为0.1%的BSA和0.05%的NaN<sub>3</sub>,调pH至6.2;加入EuCl<sub>3</sub>溶液,即得稀土元素螯合物标记的anti-cTnT。

[0021] 根据本发明,所述的近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT的制备方法,包括步骤如下:

[0022] 将anti-cTnT单克隆抗体,用碳酸氢钠溶液稀释,加入近红外荧光化合物溶解液,搅匀,室温孵育;过柱分离纯化,收集标记好的荧光化合物标记抗体,用磷酸盐缓冲液稀释混匀,即得近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT。

[0023] 根据本发明,所述的系列浓度的cTnT校准品的制备方法,包括步骤如下:

[0024] 用含质量百分比浓度为0.01%-0.5%PEG1000、1%-5%BSA、0.01%-0.05%表面活性剂的磷酸盐缓冲液,按照0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL的浓度稀释溶解cTnT纯品,混合均匀,即得系列浓度的cTnT校准品。

[0025] 根据本发明,利用上述均相荧光免疫试剂快速定量检测肌钙蛋白T的方法,包括步骤如下:

[0026] 先将稀土元素螯合物标记anti-cTnT溶液加入反应微孔中,再加入近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT溶液,最后加入cTnT校准品,37℃反应20分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,依据相对荧光强度数据,制作cTnT浓度-荧光强度的标准曲线;

[0027] 将临床检测样品代替cTnT校准品,重复上述过程,根据相对荧光强度数据对应标准曲线,得到肌钙蛋白T含量。

[0028] 本发明的原理:

[0029] 本发明提供的快速定量检测cTnT的均相荧光免疫法,其反应原理为双抗体夹心法的均相荧光免疫法。待测样品与适当比例的Eu<sup>3+</sup>和荧光标记抗体在液相均质介质中充分混和均匀,在此过程中样品中的cTnT既能专一性地与Eu<sup>3+</sup>标记抗cTnT抗体充分结合,也能与荧光标记cTnT抗体充分反应,形成的Eu<sup>3+</sup>-anti-cTnT1-cTnT-anti-cTnT2-Alexa Fluor 647免疫复合物,荧光强度可用均相荧光免疫分析仪器定量测定,荧光强度与样品中cTnT浓度成正比。

[0030] 本发明的有益效果如下:

[0031] 1、本发明采用均相荧光免疫快速检测技术,利用荧光的高灵敏特点,同样也避免了胶体金或者荧光cTnT干式免疫试纸中的硝酸纤维素膜本身孔隙不均一特性对检测准确度和重复性的不良影响。由于均相荧光免疫检测中样品与荧光标记抗体全过程都在液相中全面接触,反应充分,因此可大幅度提高检测灵敏度和线性范围,最低检测限可达0.01ng/mL,线性范围为0.1-50ng/mL。同时反应在液相进行也增加了样品的稀释倍数,消除了样品的基质效应影响,使定量结果有很好的可重复性,提高了定量结果的精密度和准确度,可满足临床诊断大规模检测的要求。

[0032] 2、应用本发明提供的试剂检测人体内cTnT水平,成本低廉,操作简单、快速、灵敏,

且特异性好,只需要配套均相荧光免疫检测仪。因此,可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展。

[0033] 3、本发明可同时检测高值和低值cTnT,尤其是低值cTnT,其对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

## 附图说明

[0034] 图1为本发明免疫检测原理结构示意图。

[0035] 其中,1:Eu<sup>3+</sup>标记anti-cTnT;2:Alexa Fluor 647标记anti-cTnT;3:校准品或待测样本中cTnT;4:Eu<sup>3+</sup>-anti-cTnT—cTnT—anti-cTnT-Alexa Fluor 647免疫复合物。

[0036] 图2为本发明试验例1中cTnT浓度的标准曲线。

[0037] 图3为本发明试验例2中cTnT相关性分析曲线。

## 具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明,凡依照本发明公开内容所作出的本领域等同替换,均属于本发明的保护范围。

[0039] 实施例中“%”均为质量百分比。

[0040] 实施例1:

[0041] 定量检测肌钙蛋白T(cTnT)均相荧光免疫试剂的制备方法,包括如下步骤:

[0042] 1、标记用anti-cTnT的准备:

[0043] 选用纯化的基因工程表达的抗cTnT单克隆抗体。Eu<sup>3+</sup>标记用抗cTnT单克隆抗体商品编号为19C7;荧光素标记用抗cTnT单克隆抗体商品编号为16A11和560。

[0044] 2、稀土元素螯合物标记anti-cTnT的制备:

[0045] 用3L 0.9%NaCl于4℃透析鼠抗人cTnT单抗19C7溶液(3mg/mL)两次,每次24hr。加水调浓度至1.5mg/mL。取0.6mL该抗体溶液,加入1mL NaHCO<sub>3</sub>(0.2mol/L),并用1mol/L NaOH调pH至9.1。将20μL BHHCT甲醇溶液(30μg/mL)滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应1hr。离心(10000rpm,10min)除去不溶物后,上SephadexG-50柱,用0.05mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(pH=8.0)洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的A<sub>330</sub>值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为0.1%的BSA和0.05%的NaN<sub>3</sub>,用1mol/LHCl调pH至6.2。分装后-20℃储存备用。用于免疫分析前,加入EuCl<sub>3</sub>溶液(BHHCT与Eu<sup>3+</sup>等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃分装保存。

[0046] 3、Alexa Fluor 647标记抗体的制备:

[0047] 将抗cTnT单克隆抗体16A11、560,分别用0.1mol/L碳酸氢钠溶液稀释至1mg/mL,各取5mL抗体溶液,分别加入30mg荧光染料Alexa Fluor 647溶解液,搅匀,室温孵育1小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光染料标记抗体,用含0.01%PEG、1%BSA、5%甘油、0.01%表面活性剂吐温20的0.01mol/L磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0048] 4、系列浓度cTnT校准品的制备:

[0049] 用含0.08%PEG1000、4.5%BSA、0.045%表面活性剂吐温20的0.01mol/L磷酸盐缓冲液,按照0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL的浓度稀释溶解cTnT纯品,混匀后于



4℃保存。

[0050] 实施例2:

[0051] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0052] 2、稀土元素螯合物标记anti-cTnT的制备方法是:

[0053] 用3L 0.9%NaCl于4℃透析鼠抗人cTnT溶液(3mg/mL)两次,每次24hr。加水调浓度至1.5mg/mL。取0.6mL该抗体溶液,加入1mL NaHCO<sub>3</sub>(0.2mol/L),并用1mol/L NaOH调pH至9.1。将20μL BHHBCB甲醇溶液(30μg/mL)滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应1hr。离心(10000rpm,10min)除去不溶物后,上SephadexG-25柱,用0.05mol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(pH=8.0)洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的A<sub>330</sub>值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为0.1%的BSA和0.05%的NaN<sub>3</sub>,用1mol/L HCl调pH至6.2。分装后-20℃储存备用。用于免疫分析前,加入EuCl<sub>3</sub>溶液(BHHBCB与Eu<sup>3+</sup>等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃分装保存。

[0054] 实施例3:

[0055] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0056] 3、将抗cTnT单克隆抗体16A11、560,分别用0.1M碳酸氢钠溶液稀释至1mg/mL,各取5mL抗体溶液,分别加入40mg荧光素DyLight-DY647溶解液,搅匀,室温孵育1.5小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含0.05%PEG600、3.5%BSA、10%甘油、0.05%表面活性剂的0.01mol/L磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0057] 实施例4:

[0058] 本实施例的制备方法与实施例1基本相同,不同点在于:

[0059] 3、将抗cTnT单克隆抗体16A11、560,分别用0.1mol/L碳酸氢钠溶液稀释至1mg/mL,各取5mL抗体溶液,分别加入50mg荧光染料CF647溶解液,搅匀,室温孵育2小时,每隔15分钟混匀一次。最后用G25凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光染料标记抗体,用含0.03%PEG、5%BSA、10%甘油、0.05%表面活性剂的0.01mol/L磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于4℃保存。

[0060] 实施例5:

[0061] 在临床检测中,实验步骤为:

[0062] 先将50μL的稀土元素螯合物标记anti-cTnT溶液加入反应微孔中,再加入50μL的近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT溶液,最后加入cTnT校准品,37℃反应20分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,依据相对荧光强度数据,制作cTnT浓度-荧光强度的标准曲线;

[0063] 将临床检测样品代替cTnT校准品,重复上述过程,根据相对荧光强度数据对应标准曲线,得到肌钙蛋白T含量。用均相荧光免疫分析仪检测判读结果。

[0064] 试验例1:

[0065] 用均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,各浓度校准品检测结果如下:

[0066]

cTnT浓度(ng/mL)	0.1	0.5	5.0	25	50
相对荧光强度	466	685	1253	3162	6316

[0067] 依据相对荧光强度数据,制作cTnT的标准曲线,如图2所示,线性范围为0.1-50ng/mL。cTnT的标准曲线计算公式为 $y=113.43x+547.83$ ,  $R^2=0.996$ 。对浓度为0.1ng/ml校准品进行系列稀释检测,本方法最低检测限可达0.01ng/mL。

[0068] 试验例2:

[0069] 采用本发明试剂,用均相荧光免疫分析仪检测48例临床冠心病患者血清样本,同步采用瑞士Roche公司的电化学法cTnT试剂进行对比检测,进行相关性分析,结果如图3所示。

[0070] 由图3可知,本发明与已上市产品检测结果一致,具有临床等效性。

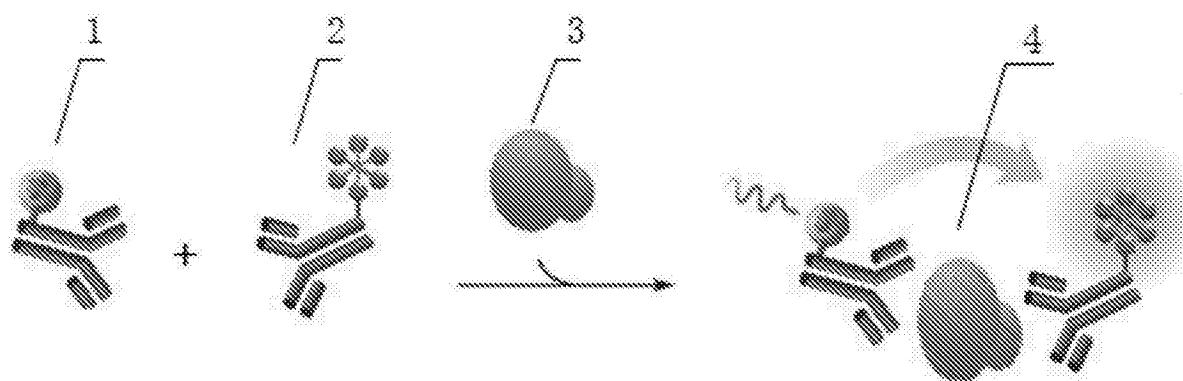


图1

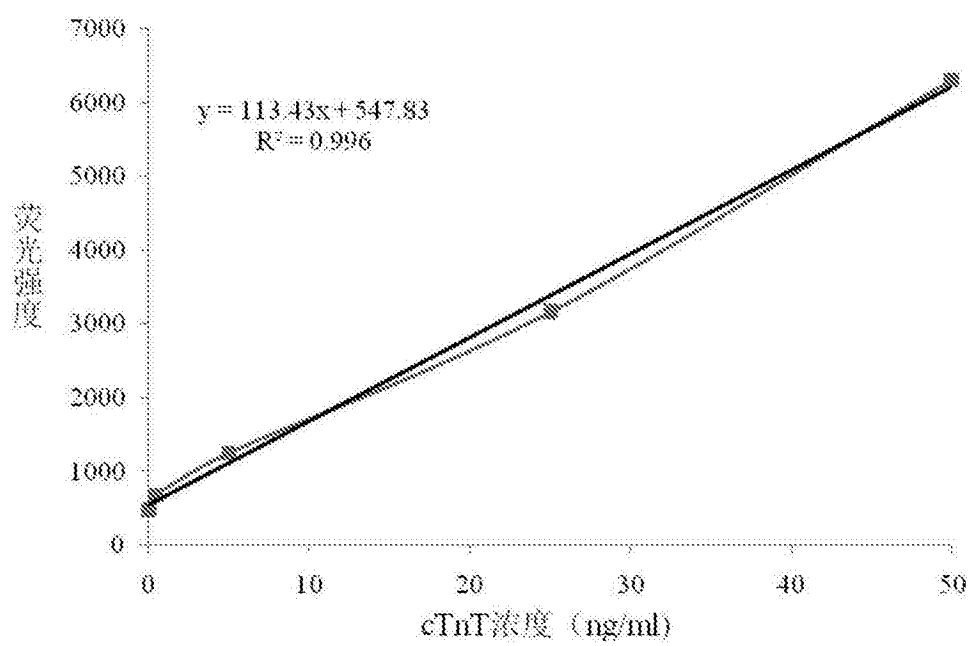


图2

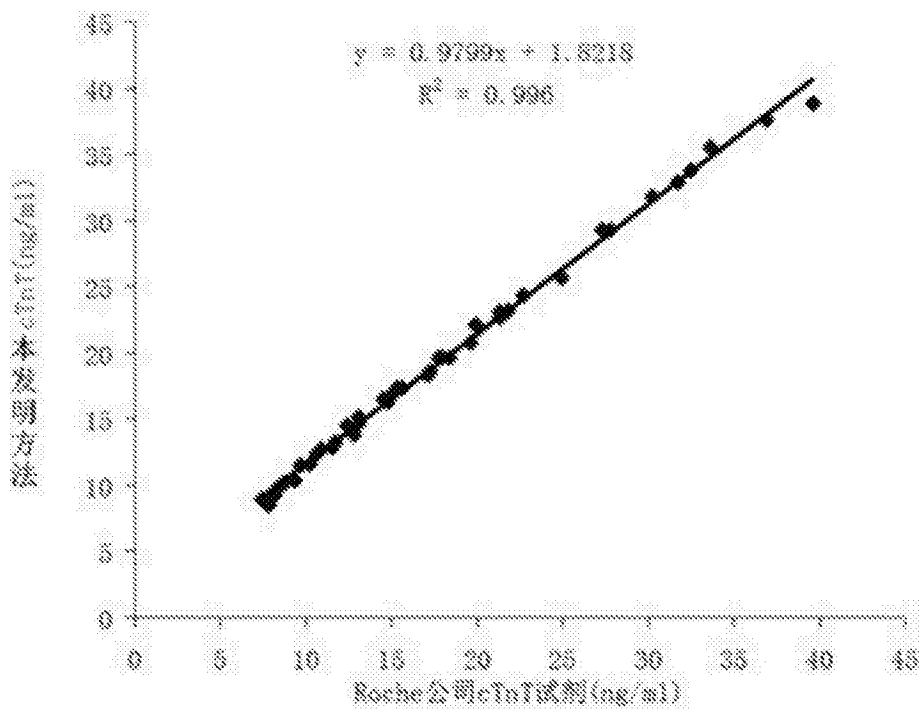


图3

专利名称(译)	一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106645744A</a>	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610908943.3	申请日	2016-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
[标]发明人	黄亚丽 李新华 魏芳 赵珂 谢爱武		
发明人	黄亚丽 李新华 魏芳 赵珂 谢爱武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/536 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/533 G01N33/536 G01N2333/4712 G01N2800/324		
代理人(译)	杨磊		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂及其制备与检测方法。本发明的快速定量检测肌钙蛋白T的均相荧光免疫试剂，是由稀土元素螯合物标记的anti-cTnT和近红外荧光化合物标记的另一个anti-cTnT，以及系列浓度的cTnT校准品组成。本发明采用均相荧光免疫快速检测技术，利用荧光的高灵敏特点，同样也避免了胶体金或者荧光cTnT干式免疫试纸中的硝酸纤维素膜本身孔隙不均一特性对检测准确度和重复性的不良影响，可大幅度提高检测灵敏度和线性范围。应用本发明所提供的试剂检测人血液、血清或血浆中肌钙蛋白T，操作简单、快速、灵敏和特异性好等特点，具有良好的临床应用前景。

