



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103278623 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 04

(21) 申请号 201310233530. 6

(22) 申请日 2013. 06. 14

(71) 申请人 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司  
地址 300300 天津市东丽区开发区四纬路  
10 号

(72) 发明人 刘萍 栾大伟 宋启超 董婷婷  
李克锦

(74) 专利代理机构 天津滨海科纬知识产权代理  
有限公司 12211

代理人 李莉华

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/70 (2006. 01)

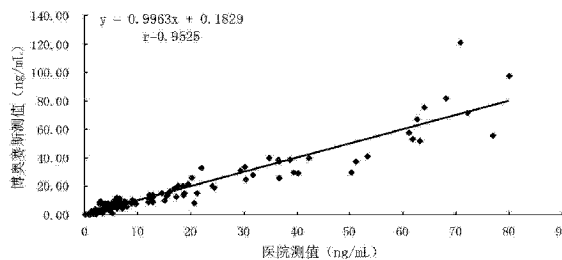
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种肌酸激酶同功酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种肌酸激酶同功酶(CK-MB)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,所述试剂盒包括:肌酸激酶同功酶校准品;偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体;肌酸激酶同功酶抗体酶结合物,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度 RZ ≥ 3.0,活性 ≥ 250U/mL;肌酸激酶同功酶质控品;化学发光液 A 液和 B 液;20 倍浓缩洗液;反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测自动化程度高等优点。



1. 一种肌酸激酶同功酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

1) 肌酸激酶同功酶校准品,浓度为 0, 3, 15, 50, 200, 800ng/mL;

2) 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液;

3) 生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体,所述抗体为单克隆抗体;

4) 肌酸激酶同功酶抗体酶结合物,所述抗体为单克隆抗体,与生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体不为同一株,所用的酶为辣根过氧化物酶,辣根过氧化物酶纯度  $RZ \geq 3.0$ ,活性  $\geq 250U/mL$ ;

5) 肌酸激酶同功酶质控品;质控品包括浓度 12ng/mL 的低值质控品和 300ng/mL 的高值质控品;

6) 化学发光液 A 液和 B 液;A 液为 5mmol/L, pH8.6 的 Tris-HCl 缓冲液,且该缓冲液中含有终浓度 0.7g/L 鲁米诺和终浓度 0.165g/L 对碘酚;B 液为 0.675g/L 过氧化脲;

7) 20 倍浓缩洗液;

8) 反应管。

2. 根据权利要求 1 所述的肌酸激酶同功酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁,粒径 10-50nm。

3. 根据权利要求 1 所述的肌酸激酶同功酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,其特征在于,所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

4. 一种制备所述权利要求 1-3 任一权利要求所述的试剂盒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 肌酸激酶同功酶校准品的配制:

将肌酸激酶同功酶抗原用校准品稀释液,所述校准品稀释液是用含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液配制成校准品浓储液,以企业标准品进行定标,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 3, 15, 50, 200, 800ng/mL;

(2) 肌酸激酶同功酶质控品的配制:

用人血清将肌酸激酶同功酶抗原稀释配制成浓储液,并以企业校准品进行定标,将浓储液用人血清稀释至 12ng/mL 和 300ng/mL;

(3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  和  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度  $65^\circ C$ ,反应时间 45min;3) 反应结束后,用蒸馏水洗涤至中性,弃上清,于  $60^\circ C$  烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

B、纳米磁珠表面羧基的偶联

采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至  $60 \pm 1^\circ C$ ,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰,用

量为磁流体用量的 3%，搅拌速度约为 500rpm，苯乙烯体积同磁流体溶液，丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4，保持氮气气流，其余条件保持不变，反应 8-10h，所得产物静置，用蒸馏水反复洗涤，再用盐酸调节 pH=1，浸泡 24h，静置；再用蒸馏水反复洗涤，除去未包覆的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁粉，把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50℃ 下干燥 24h，得到表面联有羧基的纳米磁微粒；

C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备，配制 1L，方法如下：

取 100mL 0.1M MES 缓冲液，加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒，室温搅拌 40min，之后加入 3.5mg 链霉亲和素，然后加入 8mg/mL EDC 溶液，2-8℃ 反应 1h 后，用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次，最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可；

(4) 生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体的制备

取 0.6mg 肌酸激酶同功酶抗体，用硼酸盐缓冲液在 2 ~ 8℃ 下透析 1 ~ 3h；将透析后的抗体加入 32ug 生物素，同时加入二甲基亚砜，使二甲基亚砜最终质量浓度为 5-10%，缓慢振荡，避光反应 2.5h；在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液，常温避光反应 30-60min；用 0.01M PBS 溶液在 2 ~ 8℃ 下透析 24h，期间换液 2-4 次；

(5) 肌酸激酶同功酶抗体酶结合物的制备

采用改良高碘酸钠氧化法将肌酸激酶同功酶抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后，用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4000，并加入 10% 酶稳定剂，储存于 2 ~ 8℃；

(6) 20 倍浓缩洗液的配制

20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠，5.92g/L 磷酸二氢钠，180g/L NaCl，10mL/L Tween-20 和 2% Proclin300；

(7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

A 液为 0.7g/L 鲁米诺，0.165g/L 对碘酚，缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl，避光保存；B 液为 0.675g/L 过氧化脲，用工艺用水配制；A 液和 B 液在使用前 5min 混合；

(8) 组装：将上述试剂组装成盒，储存于 2 ~ 8℃，每种试剂各一瓶；

(9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查，对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

## 一种肌酸激酶同工酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析医学领域,具体的,本发明提供了一种肌酸激酶同工酶(CK-MB)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 肌酸磷酸激酶(Creatine Kinase, CK)大量存在于心肌、骨骼肌和脑等组织,是一个与细胞内能量运转、肌肉收缩、ATP再生有直接关系的重要激酶。天然的CK分子是一个紧密的球状结构,是由两个亚基(M型亚基和B型亚基)组成的二聚体。CK有三种主要的同工酶,即CK-MM, CK-MB, CK-BB。其中CK-BB主要存在于大脑、前列腺、肠、肺;骨骼肌中存在大量的CK-MM和少量的CK-MB;而心肌组织虽以CK-MM为主,但CK-MB所占比例远较其他组织高。

[0003] 由于心肌是唯一含CK-MB较多的器官,因此与其它几种可能反映心肌损伤的酶相比,CK-MB的测定最宜作为心肌损伤的定量观察指标。CK-MB诊断透壁型心肌梗死的敏感性和特异性均极高,在起病4h后增高。16-24h后达高峰,3-4d恢复正常。

[0004] CK-MB在急性心肌梗死(AMI)后仍保存在高水平,则意味着心肌坏死还继续进行;若恢复正常后再次升高,提示原梗死部位扩展或有新的梗死出现,由于半衰期短,CK-MB和亚型在监测再发损伤中比肌钙蛋白更为敏感,因为肌钙蛋白可在血中保持高值数天;其增高的程度能较准确地反映梗死的范围;其高峰出现时间是否提前有助于判断溶栓治疗是否成功。若单独进行检测,CK-MB是很理想的标志物;与心肌肌钙蛋白进行联合检测,更有助于提高AMI的诊断阳性率。

[0005] 目前,临床领域应用的CK-MB检测方法主要有电泳、免疫抑制法、酶联免疫测定法和化学发光免疫测定法等。

[0006] 电泳法和免疫抑制法均会受到溶血和巨CK的干扰,免疫抑制法还会受到CK-BB的干扰,限制了这两种检测方法的应用。

[0007] 酶联免疫测定法具备其操作简单、试剂有效期长无污染、高于胶体金的敏感性、特异性好、结果可用仪器测定等特点得以推广,但由于敏感性相对较低,所用标记酶与底物可定量测定范围窄,及仪器测定范围窄等缺点,限制了其在微量免疫定量测定中的应用。

[0008] 化学发光免疫测定其研究起步于80年代初,快速发展应用于90年代,为当今最为敏感的微量免疫测定法。目前主要采用发光板方法,板间差异大,测值重复性较差。

### 发明内容

[0009] 本发明要解决的问题是提供肌酸激酶同工酶的化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法,避免了测值重复性差,酶联免疫法灵敏度低,检测范围窄等缺陷。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:肌酸激酶同工酶(CK-MB)纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒,包括:肌酸激酶同工酶校准品;偶联有链霉亲和素

的纳米磁微粒悬浮液；生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体；肌酸激酶同功酶抗体酶结合物，所用的酶为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶纯度  $RZ \geq 3.0$ ，活性  $\geq 250U/mL$ ；肌酸激酶同功酶质控品，质控品包括浓度  $12ng/mL$  的低值质控品和  $300ng/mL$  的高值质控品；化学发光液 A 液和 B 液，A 液为  $5mmol/L$ ， $pH8.6$  的 Tris-HCl 缓冲液，且该缓冲液中含有终浓度  $0.7g/L$  鲁米诺和终浓度  $0.165g/L$  对碘酚；B 液为  $0.675g/L$  过氧化脲；20 倍浓缩洗液；反应管。

[0011] 进一步，所述的纳米磁微粒是表面包裹带有氨基或羧基活性基团的四氧化三铁，粒径  $10-50nm$ 。

[0012] 进一步，所述的反应管的材料是透明聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯或玻璃。

[0013] 试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

[0014] (1) 肌酸激酶同功酶校准品的配制：

[0015] 将肌酸激酶同功酶抗原用校准品稀释液(含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液)配制成校准品浓储液，以企业标准品进行定标，将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度，分别为 0, 3, 15, 50, 200, 800ng/mL；

[0016] 企业标准品制备方法：用含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液将 CK-MB 抗原按照  $1:10$ 、 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ 、 $1:10^6$ 、 $1:10^7$  的比例进行稀释，使用罗氏公司 CK-MB 定量检测试剂盒(货号：11821598，规格 100 人份)测定，根据测定结果，建立稀释比例与测定浓度的曲线。按照曲线方程分别计算出浓度为 3, 15, 50, 200, 800ng/mL 的稀释比例，按此比例配制企业标准品，使用罗氏产品进行多次测定，确定企业标准品浓度。配制的企业标准品以  $0.5mL/$ 管分装，用冷冻干燥机冻干， $-20^{\circ}C$  保存。

[0017] (2) 肌酸激酶同功酶质控品的配制：

[0018] 用校准品稀释液将上述浓储液稀释至  $12ng/mL$  和  $300ng/mL$ ， $12ng/mL$  为低值质控， $300ng/mL$  为高质质控；

[0019] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备：

[0020] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0021] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒，具体制备方法如下：1) 将  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  和  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中，剧烈搅拌溶解；2) 在氮气环境下加  $0.5M$  氨水于上述铁盐溶液中，调  $pH9-10$ ，反应温度  $65^{\circ}C$ ，反应时间  $45min$ ；3) 反应结束后，用蒸馏水洗涤至中性，弃上清，于  $60^{\circ}C$  烘干，即得  $10-50nm$  的四氧化三铁纳米磁微粒；

[0022] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0023] 采用分散聚合法进行偶联，具体制备方法如下：取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中，得磁流体溶液，向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇，搅拌 30min 后，移入带有搅拌器，冷凝管，氮气入口的三颈瓶中，加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺；在氮气的保护下，升温至  $60 \pm 1^{\circ}C$ ，恒温搅拌 30min，之后依次加入过氧化苯甲酰，用量为磁流体用量的 3%，搅拌速度约为 500rpm，苯乙烯体积同磁流体溶液，丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4，保持氮气气流，其余条件保持不变，反应 8-10h，所得产物静置，用蒸馏水反复洗涤，再用盐酸调节  $pH=1$ ，浸泡 24h，静置；再用蒸馏水反复洗涤，除去未包覆的  $Fe_3O_4$  磁粉，把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中  $50^{\circ}C$  下干燥 24h，得到表面联有羧基的纳米磁微粒；

[0024] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0025] 取 100mL 0.1M 2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 链霉亲和素,然后加入 8mg/mL 碳二亚胺(EDC)溶液,2-8℃ 反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0026] (4) 生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体的制备

[0027] 取 0.6mg 肌酸激酶同功酶抗体,用硼酸盐缓冲液在 2~8℃ 下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 32ug 生物素,同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终浓度为 5-10%,缓慢振荡,避光反应 2.5h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 30-60min;用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃ 下透析 24h,期间换液 2-4 次;

[0028] (5) 肌酸激酶同功酶抗体酶结合物的制备

[0029] 采用改良高碘酸钠氧化法将肌酸激酶同功酶抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4000,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 2~8℃;

[0030] 改良过碘酸钠氧化法步骤包括:

[0031] A:HRP 活化

[0032] 1) 配置 10mg/mL HRP 溶液;

[0033] 2) 配置 12.8mg/mL 过碘酸钠  $\text{NaIO}_4$  溶液;

[0034] 3) 将上述 1) 和 2) 配制溶液按体积比 1:1 混匀,4℃ 避光反应 30min;

[0035] 4) 配置浓度为 20uL/mL 的乙二醇水溶液,与上述溶液 3) 以相同体积混合,常温避光反应 20min,活化即完成,放 -20℃ 保存(保存时间不超过 3 个月)。

[0036] B、CK-MB 单克隆抗体标记

[0037] 1) 将待标记原料装入透析袋中,用 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓冲液,透析 30min;

[0038] 2) 将标记原料与活化的 HRP 按质量比 1:2 进行混合,之后用 0.05M 碳酸盐缓冲液于 4℃ 透析 24h (期间换液 2-3 次);

[0039] 3) 配置浓度为 2mg/mL 的  $\text{NaBH}_4$  水溶液,按 1mgHRP 加 80uL 配制好的  $\text{NaBH}_4$  水溶液的比例进行混合,并于 4℃ 避光反应 2h;

[0040] 4) 将上述步骤 3) 完成的标记液用 0.01M PBS 于 4℃ 透析 24h,加入等体积甘油,-20℃ 保存。

[0041] 酶稀释液中包括 10mL/L 2M NaOH,15g/L NaCl,10g/L BSA,5g/L 葡聚糖 T-2000 (Dextran T-2000),1.05g/L 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),2.5mL/L 硫酸庆大霉素,1mL/L 胭脂红(胭脂红为粉末固体,配制成浓度 40mg/mL 以后使用),2g/L Tween-20 (购自 Sigma 公司),1mL/L ProClin300 (购自 Sigma 公司);

[0042] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0043] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠,5.92g/L 磷酸二氢钠,180g/L NaCl,10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300;

[0044] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0045] A 液为 0.7g/L 鲁米诺,0.165g/L 对碘酚,缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl,避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲,用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0046] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃,每种试剂各一瓶;

[0047] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线

性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0048] 本发明的原理是,采用双抗体夹心法测定血清或血浆中的 CK-MB,在亲和素-纳米磁微粒悬浮液中加入生物素-CK-MB 抗体结合物,通过亲和素和生物素的亲和反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-CK-MB 抗体复合物,加入样本和酶,通过抗原抗体反应,形成磁微粒-亲和素-生物素-CK-MB 抗体-CK-MB 抗原-CK-MB 抗体-HRP 复合物,用磁场将复合物吸附在试管底部,清洗掉游离的成分,加入底物工作液,在氧化剂作用下,HRP 催化鲁米诺生成处于激发态的氨基邻苯二甲酸离子,其恢复到基态时,释放出 425nm 的光子,于第 5 分钟测定各加样孔的发光值 RLU。样本的 RLU 与样本 CK-MB 浓度呈正相关。样本中的 CK-MB 浓度依据由校准品 CK-MB 浓度和对应的 RLU 建立的  $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$  数学模型进行定量,从而检测人血清、血浆中的 CK-MB 含量。

[0049] 本专利发明的肌酸激酶同工酶纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒,具有以下优点:

[0050] (1) 灵敏度高,本试剂盒的分析灵敏度不高于 0.3ng/mL。

[0051] (2) 特异性良好,本产品对肌酸磷酸激酶同工酶 MM (500ng/mL)、肌酸磷酸激酶同工酶 BB (500mg/mL) 未出现交叉反应。

[0052] (3) 精密性良好,批内不精密度不高于 5%,批间不精密度不高于 10%。

[0053] (4) 成本低,与市场上同类产品比较,本试剂盒性能良好,成本低,具有临床应用价值。

[0054] (5) 稳定性良好,本产品可在 37°C 可存放 7 天以上,在 2 ~ 8°C 可存放 1 年。

#### 附图说明

[0055] 图 1 是本发明的试剂盒测定肌酸激酶同工酶与罗氏测定肌酸激酶同工酶的测定结果比较图,其中纵坐标为本试剂盒测得的肌酸激酶同工酶值,横坐标为罗氏试剂盒测定肌酸激酶同工酶值,两种方法相关系数  $r=0.9525$ ,直线方程  $y=0.9963x+0.1829$ 。

#### 具体实施方式

[0056] 实施例 1:制备肌酸激酶同工酶纳米磁微粒化学发光免疫定量测定试剂盒

[0057] (1) 肌酸激酶同工酶校准品的配制:

[0058] 将肌酸激酶同工酶抗原(购自 Fitzgerald 公司)用校准品稀释液(含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液)配制成校准品浓储液,以企业标准品进行定标,将浓储液用校准品稀释液稀释至工作浓度,分别为 0, 3, 15, 50, 200, 800ng/mL;

[0059] (2) 肌酸激酶同工酶质控品的配制:

[0060] 用校准品稀释液将上述浓储液稀释至 12ng/mL 和 300ng/mL, 12ng/mL 为低值质控, 300ng/mL 为高质质控;

[0061] (3) 纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备:

[0062] A、四氧化三铁纳米磁微粒制备

[0063] 采用沉淀法制备四氧化三铁纳米磁微粒,具体制备方法如下:1) 将  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  以摩尔比 2:1 加入到蒸馏水中,剧烈搅拌溶解;2) 在氮气环境下加 0.5M 氨水于上述铁盐溶液中,调 pH9-10,反应温度 65°C,反应时间 45min;3) 反应结束后,用蒸馏水洗

涤至中性,弃上清,于 60℃烘干,即得 10-50nm 的四氧化三铁纳米磁微粒;

[0064] B、纳米磁珠表面羧基的偶联

[0065] 采用分散聚合法进行偶联,具体制备方法如下:取上述制备的纳米磁微粒超声分散在 10%PEG8000 溶液中,得磁流体溶液,向磁流体溶液中按体积比 1:10 加入无水乙醇,搅拌 30min 后,移入带有搅拌器,冷凝管,氮气入口的三颈瓶中,加入交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺;在氮气的保护下,升温至 60±1℃,恒温搅拌 30min,之后依次加入过氧化苯甲酰,用量为磁流体用量的 3%,搅拌速度约为 500rpm,苯乙烯体积同磁流体溶液,丙烯酸体积为磁流体溶液的 1/4,保持氮气气流,其余条件保持不变,反应 8-10h,所得产物静置,用蒸馏水反复洗涤,再用盐酸调节 pH=1,浸泡 24h,静置;再用蒸馏水反复洗涤,除去未包覆的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁粉,把沉淀下来的产品放入真空干燥箱中 50℃下干燥 24h,得到表面联有羧基的纳米磁微粒;

[0066] C、纳米磁微粒-链霉亲和素悬浮液的制备,配制 1L,方法如下:

[0067] 取 100mL 0.1M MES 缓冲液,加入 10mg 表面联有羧基的纳米磁微粒,室温搅拌 40min,之后加入 3.5mg 链霉亲和素(购自 Sigma 公司),然后加入 8mg/mL EDC 溶液,2-8℃反应 1h 后,用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,最后用 0.01M PBS 定溶至 1L 即可;

[0068] (4) 生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体的制备

[0069] 取 0.6mg 肌酸激酶同功酶抗体(购自 Fitzgerald 公司),用硼酸盐缓冲液在 2~8℃下透析 1~3h;将透析后的抗体加入 32ug 生物素(购自 Sigma 公司),同时加入二甲基亚砜,使二甲基亚砜最终质量浓度为 5-10%,缓慢振荡,避光反应 2.5h;在上述溶液中加入 250uL 1M 氯化铵溶液,常温避光反应 30-60min;用 0.01M PBS 溶液在 2~8℃下透析 24h,期间换液 2-4 次;

[0070] (5) 肌酸激酶同功酶抗体酶结合物的制备

[0071] 采用改良高碘酸钠氧化法将肌酸激酶同功酶抗体与辣根过氧化物酶进行偶联后,用酶稀释液将其稀释至工作浓度 1:4000,并加入 10% 酶稳定剂,储存于 2~8℃;

[0072] 酶稀释液中包括 10mL/L 2M NaOH, 15g/L NaCl, 10g/L BSA, 5g/L Dextran T-2000(购自 Sigma 公司), 1.05g/L Triton X-100 (购自 Sigma 公司), 2.5mL/L 硫酸庆大霉素, 1mL/L 胭脂红(胭脂红为粉末固体,配制成浓度 40mg/mL 以后使用), 2g/L Tween-20(购自 Sigma 公司), 1mL/L ProClin300 (购自 Sigma 公司);

[0073] (6) 20 倍浓缩洗液的配制

[0074] 20 倍浓缩洗液包括 58g/L 磷酸氢二钠, 5.92g/L 磷酸二氢钠, 180g/L NaCl, 10mL/L Tween-20 和 2%Proclin300;

[0075] (7) 化学发光液 A 液和 B 液的配制

[0076] A 液为 0.7g/L 鲁米诺, 0.165g/L 对碘酚, 缓冲液为 pH8.6 的 5mmol/L Tris-HCl, 避光保存;B 液为 0.675g/L 过氧化脲, 用工艺用水配制;A 液和 B 液在使用前 5min 混合;

[0077] (8) 组装:将上述试剂组装成盒,储存于 2~8℃,每种试剂各一瓶;

[0078] (9) 对采用该方法制备的试剂盒进行物理检查,对准确度、剂量-反应曲线的线性、精密度、特异性、灵敏度、质控品的测定值和稳定性进行测定。

[0079] 实施例 2:本发明试剂盒的检查

[0080] (1) 物理检查:液体组分应澄清,无沉淀或絮状物;其他组分应无包装破损。

[0081] (2)准确性:试剂盒校准品与国家标准品系列同时进行分析测定,用双对数数学模型拟合,要求两条剂量-反应曲线不明显偏离平行(t 检验,  $|t| < 2.447$ );以肌酸激酶同工酶企业标准品为对照品,用双对数数学模型拟合,试剂盒校准品的实测值与标示值比值的平均值应在 0.90 ~ 1.10 范围内。

[0082] (3)剂量-反应曲线的线性:用双对数数学模型拟合,剂量-反应曲线在 5-500ng/mL 浓度范围内相关系数 r 绝对值不低于 0.9900。

[0083] (4)分析灵敏度:试剂盒分析灵敏度不高于 0.3ng/mL。

[0084] (5)精密度:10 孔平行测定高值和低值质控品,计算测定结果的平均浓度( $\bar{X}$ )与标准差(SD),批内不精密度(CV%) =  $SD / \bar{X} \times 100\%$ ;使用 3 批产品进行 3 次试验,计算测定结果的平均浓度( $\bar{X}$ )与标准差(SD),批间不精密度(CV%) =  $SD / \bar{X} \times 100\%$ ,结果应符合批内不精密度(CV%) 应不高于 5%;批间不精密度(CV%) 应不高于 10%。

[0085] (6)质控品的测定值:平行测定 10 孔高值和低值的质控品,用  $\text{Log}(X) - \text{Log}(Y)$  数学模型拟合,质控品测值应在允许范围内,低值质控品测值在 12ng/mL,高值质控品测值在 300ng/mL。

[0086] (7)特异性:

[0087] 交叉反应符合下表要求:

	交叉反应因子	浓度	测定值
[0088]	肌酸磷酸激酶同工酶 MM	500ng/mL	<5ng/mL
	肌酸磷酸激酶同工酶 BB	500ng/mL	<5ng/mL

[0089] (8.) 稳定性:37°C 放置 7 天,测定值应符合上述各项要求。

[0090] 实施例 3:本发明试剂盒的使用方法

[0091] (1) 将待检试剂盒在室温(18 ~ 25°C)下平衡 30 分钟。

[0092] (2)配制洗液:用蒸馏水将浓缩洗液按 1:20 稀释(1mL 洗液加 19mL 蒸馏水)。若浓缩洗液有结晶,可将浓缩洗液置于室温或 37°C,待结晶溶解后再进行稀释。

[0093] (3)配制发光液:使用前 5 分钟取适量发光液 A 与发光液 B 等体积混合。

[0094] (4)将反应管编号,向试管中依次加入 20uL 校准品或血清标本、50uL 磁性颗粒-链霉素亲和素悬浮液、50uL 生物素-肌酸激酶同工酶抗体结合物、100uL 肌酸激酶同工酶抗体酶结合物,37°C 下振荡反应 30min,将试管架置于磁分离器上分离 5min,然后倒出上清液,加入 500uL 洗液,充分混匀后,于磁分离器上分离,倒出洗液,重复 3 次,在各管中加入化学发光底物液 100uL,充分混匀,暗置 5min,在管式化学发光仪上测定各管的发光值(RLU),以校准品浓度的 Log 值为横坐标,以发光值的 Log 为纵坐标,绘制标准曲线,根据血清标本的发光值即可计算出肌酸激酶同工酶的浓度。

[0095] 实施例 4:本试剂盒的方法学评价结果

[0096] 检测范围:范围为 5-500ng/mL,对于浓度大于 500ng/mL 的标本应先进行稀释后再进行测定。

[0097] 灵敏度:0.3ng/mL。

[0098] 精密度:小于 5%。

- [0099] 准确性 :回收率的平均值在 0.90 ~ 1.10 范围内。
- [0100] 特异性 :肌酸磷酸激酶同工酶 BB、肌酸磷酸激酶同工酶 MM 交叉反应系数小于 1%。
- [0101] 质控品测值 :低值质控品 QcL 和高值质控品 QcH 的测值均在允许范围内,低值质控品测值在 12ng/mL,高值质控品测值在 300ng/mL。
- [0102] 稳定性 :将试剂盒中各试剂组分于 37℃ 下放置 7d,稳定性良好。
- [0103] 实施例 5 :本试剂盒的临床对比实验
- [0104] 本专利发明的试剂盒已进行了临床考核,本次临床试验的样本总数 232 例,先以肌酸激酶同工酶罗氏检测试剂盒测试后,再用本专利发明的试剂盒(化学发光)进行测定,结果表明,直线方程为  $y=0.9963x+0.1829$ ,相关系数  $r=0.9525$ 。可见本方法制备的试剂盒与医院测值有较好的一致性。以 SPSS13.0 统计分析软件对相关系数进行 t 检验(检验水准  $\alpha =0.05$ ),  $P<0.001$ ,两种方法测定的肌酸激酶同工酶值的相关密切程度是显著性的,可见两种方法测定的肌酸激酶同工酶值密切相关,说明试剂盒的诊断能力较强,可推广临床应用。
- [0105] 为了确定本试剂盒的临床参考值,对 400 份正常人血清、血浆样本采用本试剂盒进行了检测,结果表明本试剂盒的参考值(参考范围)为 0-7.0ng/mL。

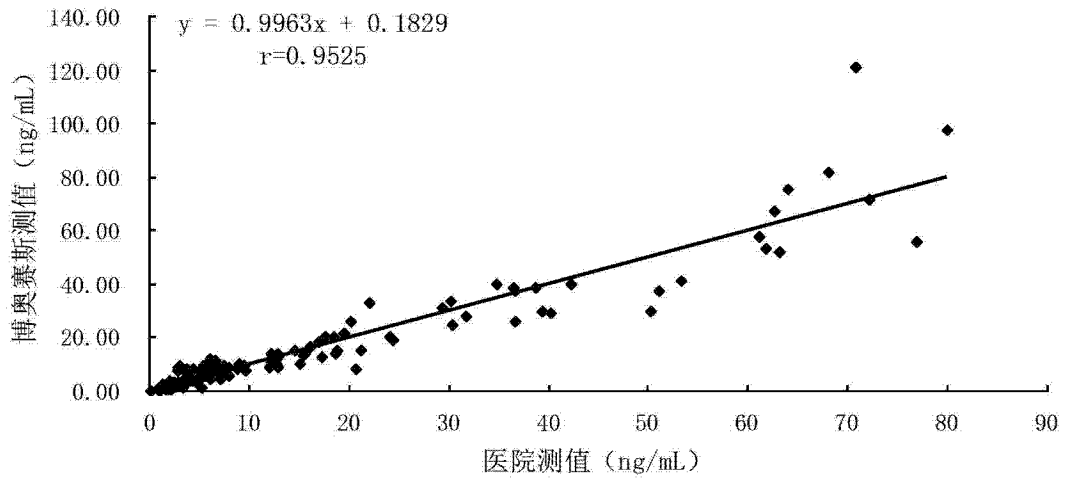


图 1

专利名称(译)	一种肌酸激酶同功酶纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103278623A</a>	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201310233530.6	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博奥赛斯(天津)生物科技有限公司		
[标]发明人	刘萍 栾大伟 宋启超 董婷婷 李克锦		
发明人	刘萍 栾大伟 宋启超 董婷婷 李克锦		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N33/70		
代理人(译)	李莉华		
其他公开文献	CN103278623B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种肌酸激酶同功酶 (CK-MB) 纳米磁微粒化学发光免疫定量检测试剂盒, 所述试剂盒包括: 肌酸激酶同功酶校准品; 偶联有链霉亲和素的纳米磁微粒悬浮液; 生物素标记的肌酸激酶同功酶抗体; 肌酸激酶同功酶抗体酶结合物, 所用的酶为辣根过氧化物酶, 辣根过氧化物酶纯度RZ≥3.0, 活性≥250U/mL; 肌酸激酶同功酶质控品; 化学发光液A液和B液; 20倍浓缩洗液; 反应管。另外本发明还公开了本发明试剂盒的制备方法。本发明试剂盒与现有试剂盒相比灵敏度高、可测定浓度范围宽、试剂有效期长、操作简单、检测自动化程度高等优点。

