

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03136491.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006年7月26日

[11] 授权公告号 CN 1266478C

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03136491.8

[71] 专利权人 马旭

地址 100081 北京市海淀区大慧寺12号
国家计划生育委员会出生缺陷干预
工程技术中心

[72] 发明人 马旭 吴尔若

审查员 姜涛

权利要求书1页 说明书9页

[54] 发明名称

用胰岛素生长因子结合蛋白-4水解酶检测急性冠状动脉综合症的试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种胰岛素生长因子结合蛋白-4水解酶检测急性冠状动脉综合症的试剂盒，它由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。本发明还涉及这种试剂盒的制作及检测方法。本发明试剂盒可用于急性冠状动脉综合症诊断，尤其可用于发生不稳定心绞痛和急性心肌梗塞的危险性评估。本试剂盒采用定量双抗体夹心酶联免疫反应法，具有良好的精密度和灵敏度，组配合理，操作简便。

1. 一种用于诊断急性冠状动脉综合症的胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶酶联免疫检测试剂盒，其特征在于它由胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶标准品、多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶标记的胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。
2. 根据权利要求 1 中所述的试剂盒，其中胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶标准品是用人血清经离子交换层析、肝素亲和层析、分子筛层析分离纯化而获得的胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶纯品制备的。
3. 根据权利要求 2 中所述的试剂盒，其中多克隆抗体包被板是用胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶纯品免疫动物而获得的胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶多克隆抗体包被酶标板而制作的。
4. 根据权利要求 3 的试剂盒，其中所述胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶多克隆抗体是从胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶纯品免疫小鼠而获得的腹水中纯化而得到的。
5. 根据权利要求 4 的试剂盒，其中所述多克隆抗体包被板的制作是将胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶多克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释后滴入酶标板各孔内，经吸附、洗板、封闭、吹干步骤处理后而制作的。
6. 根据权利要求 5 中所述的试剂盒，其中辣根过氧化物酶标记的胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶单克隆抗体是用胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶纯品免疫小鼠后制备的单克隆抗体，经辣根过氧化物酶标记而制备的。
7. 根据权利要求 1-6 之一的试剂盒，其中所述质控品是用混合足月正常妊娠孕妇血清稀释调配而获得的。
8. 根据权利要求 7 的试剂盒，其中所述辅助试剂包括酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液及清洗缓冲液。
9. 根据权利要求 1-8 之一的试剂盒用于检测和/或诊断急性冠状动脉综合症的用途。

用胰岛素生长因子结合蛋白-4 水解酶检测急性冠状动脉综合症的试剂盒

5 技术领域

本发明属于医学和生物学检测领域，具体而言，本发明涉及一种用胰岛素生长因子结合蛋白-4（即 Insuline Growth Factor Binding Protein-4，简称 IGFBP-4）水解酶检测急性冠状动脉综合症的试剂盒，这种试剂盒可以用于急性冠状动脉综合症的诊断，尤其可用于发生急性心肌梗塞的危险性评估，本发明还涉及该试剂盒的制作方法

10 盒的制作方法和测定方法。

背景技术

急性冠状动脉综合征（Acute Coronary Syndrome, ACS）在欧美国家具有很高的死亡率，我国近年来有明显增加的趋势。ACS 是指动脉粥样硬化斑块脱落、血小板聚集、血栓形成，致使冠状动脉狭窄、阻塞，引起心肌缺血和心肌梗死的病理现象。临床表现可以症状不明显、稳定心绞痛、或不稳定心绞痛及急性心肌梗死。典型病例可以根据病史、症状及心电图的特殊改变进行诊断，然而临床实践表明约有 25% 的急性心肌梗死病人早期没有典型的临床症状，约有 50% 病人缺乏心电图的特异性改变。当冠状动脉发生急性病变时，梗塞部位的心肌细胞受到损伤，会将一些化学物质释放到外周血液中去。因此检测血液中的这些生化标志物对于诊断 ACS 具有非常重要的意义。目前临床上应用的生化标志物包括心肌酶谱和心肌损伤蛋白标志物。心肌酶谱是过去 30 年中临床应用的重要指标，包括天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、肌酸激酶（CK）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）、乳酸脱氢酶（LDH）、 α -羟丁酸脱氢酶（ α -HBDH）等，其中 CK-MB 曾在八十年代被认为是诊断急性心肌梗死的金标准。然而酶学指标的特异性较差，它们在人体其它组织中尤其是骨骼肌中亦大量存在；而且酶学指标一般在发病后一段时间才出现升高，因而对早期诊断不敏感。心肌酶谱虽然目前仍在临床上被使用，但已存在被蛋白标志物取代的趋势。目前临床上使用的心肌损伤蛋白标志物主要有肌钙蛋白 I（Tn I）和肌钙蛋白 T（Tn T），虽然它们的特异性和敏感性都明显优于酶学指标，但是由于肌钙蛋白在血液中极易被蛋白酶降解，因此影响了检测结果的准确性。而且不论是 Tn I 还是 Tn T，它们对不稳定心绞痛的检测敏感性都不够高。本发明的目的正是为了克服上述已有检测指标的缺点和不足，将 IGFBP-4 蛋白水解酶作为一种新的蛋白标志物用于急性冠状动脉综合征（ACS）的检测；同时发明了 IGFBP-4 蛋白水解酶的酶免定量检测试剂盒和测定方法，从而可以提高 ACS 诊断的敏感性，尤其提高对不稳定心绞痛诊断的敏感性，并可对急性心肌梗死的危险性进行评估。

15

20

25

30

发明内容

因此,本发明的目的是提供了一种用胰岛素生长因子结合蛋白-4 (IGFBP-4) 水解酶检测急性冠状动脉综合症的试剂盒。

本发明的上述目的是通过下列技术方案实施的:

一种 IGFBP-4 蛋白水解酶酶联免疫检测试剂盒,其特征 在于它由 IGFBP-4 蛋白
5 水解酶标准品、多克隆抗体包被板、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IGFBP-4 蛋白
水解酶单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。

本发明试剂盒的制作方法包括标准品的制备、多克隆抗体包被板的制备、酶标
单克隆抗体的制备、质控品的制备以及辅助试剂的配制。

IGFBP-4 蛋白水解酶标准品可外购 (比如, DSL 公司), 也可自行制备。本发明
10 试剂盒中的标准品是从人血清中提取制备的。一种制备步骤包括: 收集孕周大于 36
周的孕妇静脉血, 及时分离血清, 低温贮存备用; 上述血清经离子交换层析、亲
和层析、分子筛三步层析进行 IGFBP-4 蛋白水解酶的分离纯化, 三步层析的顺序
可以变换, 本发明试剂盒使用的一种顺序依次为离子交换层析、亲和层析、分子
筛层析, 将获得的 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品按试剂盒的标准曲线最高点浓度进行
15 稀释, 然后进行分装、冷冻干燥, 即获得 IGFBP-4 蛋白水解酶标准品。

本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板可用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品对兔或鼠免
疫而获得的多克隆抗体包被酶标板而制作。本发明试剂盒中的多克隆抗体包被板
是用经三次层析分离纯化得到的 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品对小鼠免疫而获得的鼠
抗人多克隆抗体包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板; 规格可以
20 是 96 孔平板或 12 x 8、6 x 8 可拆条板。本发明试剂盒采用一种进口酶标板 (Costar
公司产品)。一种多克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下:

- a) 制备多克隆抗体: 用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品按常规对 Balb/c 小鼠进行免
疫后, 再在腹腔内注射小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0; 收集腹水经重组 Protein G
预装层析柱纯化后即获得 IGFBP-4 蛋白水解酶多克隆抗体;
- 25 b) 包被: 将上述多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释后加入酶标板各孔,
每孔 100ul, 吸附过夜, 用吐温磷酸盐缓冲液洗板, 再用吐温磷酸盐缓冲
液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得多克隆抗体包被酶标板。

本发明试剂盒中的酶标单克隆抗体是用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品免疫小鼠、获
取脾细胞、在体外经过与骨髓瘤细胞融合等步骤获得单克隆抗体, 再将单克隆抗
30 体用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记而制备的。一种酶标单克隆抗体的制备步骤如下:

- a) 获取免疫小鼠脾细胞: 用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品作为抗原免疫 Balb/c 小
鼠, 免疫程序结束后获取脾细胞, 在二氧化碳孵育箱中按常规方法进行培

养;

- b) 细胞融合和细胞筛选: 将上述脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 在 IMDM 甲基纤维素半固体培养基中进行选择性培养; 筛选阳性融合细胞, 进行克隆化培养, 可获得强阳性单克隆杂交瘤细胞株;
- 5 c) 获取腹水和腹水纯化: 将上述杂交瘤细胞注入小鼠腹腔, 获得小鼠腹水; 使用重组 Protein G 亲和层析预装柱从小鼠腹水中纯化 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体。
- d) HRP 酶标: 在纯化好的 IGFBP-4 单抗溶液中加入稀释好的 SATA (即 N-羟基琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酯) 溶液, 在室温反应后加入去乙酰化溶液, 室温孵育 2 小时; 用脱盐柱分离出去乙酰化 SATA 衍生物 (即单抗) 和副产品 (盐酸羟胺); 将上述单抗溶液与用马来酰胺 (Maleimide) 活化的 HRP 在室温反应 1 小时, 即获得 HRP 酶标 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体。
- 10

本发明试剂盒中的质控品是用混合的足月孕妇血清经非孕妇女血清稀释, 并按
15 照本试剂盒的标准曲线范围要求而调制备的。本发明试剂盒采用的一种质控品制备方法包括如下步骤:

- a) 收集足月孕妇静脉血 (经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者), 经离心后收集血清于 -20°C 保存;
- b) 将积累的各个血清混合, 用 ELISA 方法测定 IGFBP-4 蛋白水解酶浓度, 并按标准曲线要求, 用非孕妇女血清将两份混合血清的浓度分别调至 6 ± 2
20 mIU/L、 20 ± 4 mIU/L 范围;
- c) 将步骤 b) 所获得的两份血清按每个试剂盒的需要量分装, 冷冻干燥, 即制备成低、高值质控品。

本发明试剂盒中的辅助试剂包括酶联反应底物溶液, 显色液, 反应终止液和清
25 洗缓冲液。一种配制辅助试剂的方法如下:

- a) 底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3% 过氧化氢溶液;
- b) 显色液: 四甲基联苯胺 (TMB) 甲醇溶液, 浓度为 0.1 mg/ml;
- c) 反应终止液: 2M 硫酸
- d) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20X): PBS (pH7.4) 配制的 0.05% 吐
30 温 20 溶液。

本发明试剂盒的测定方法, 其特征在于它依次按下述步骤进行:

- a) 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品, 或待测血清样品, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟; 然后用清洗缓冲液 (1X) 重复洗板 4 次。
- b) 酶联反应: 将 HRP-单克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次。
- c) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、显色液各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
- d) 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 值并记录。
- e) 结果计算:
- A. 制作标准曲线: 以标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 OD 值为纵坐标, 作出标准曲线; 计算标准曲线回归系数 R^2 , 当 $R^2 > 0.98$ 时本次测定有效;
- B. 评判质控品浓度: 根据质控品的 OD 值, 从标准曲线上读取相应的浓度值; 当低值质控品、高值质控品的浓度均在给定范围内时, 本次测定判为有效;
- C. 计算待测血清样品浓度: 当标准曲线和质控品均被判定有效时, 根据待测样品的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的浓度。

本发明试剂盒在检测急性冠状动脉综合征 (ACS) 时与已有的检测指标和技术相比较具有以下优点:

- a) 与心肌酶谱的各项检测指标相比较, IGFBP-4 蛋白水解酶在急性冠状动脉综合征发病早期就有改变, 克服了心肌酶谱指标一般在发病后一段时间才出现升高的缺点。本发明试剂盒采用双抗体夹心酶联免疫反应法 (ELISA) 比心肌酶谱指标常用的琼脂糖凝胶电泳法或免疫抑制法在操作上更加简便、快速;
- b) 与肌钙蛋白指标相比较, IGFBP-4 蛋白水解酶对于急性心肌梗塞发病前期的不稳定心绞痛的检测敏感度明显提高, 比肌钙蛋白 I (Tn I) 提高 2-3 倍, 比肌钙蛋白 T (Tn T) 提高 3-4 倍。本发明试剂盒采用的 ELISA 固相载体为微孔板, 比肌钙蛋白测定常用的试管 ELISA 法减少了血清用量, 在操作上更加简便、快速, 适合大样本量的检测。

具体实施方式

- 下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是, 本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范畴。除非另有说明, 本发明中的百分数是重量百分数。

实施例一: IGFBP-4 蛋白水解酶定量酶免检测试剂盒制作方法的使用实例

IGFBP-4 蛋白水解酶定量酶免检测试剂盒 (48 人份), 其组成包括:

IGFBP-4 蛋白水解酶冻干标准品 1 瓶;

IGFBP-4 蛋白水解酶多克隆抗体包被板 (48 孔) 1 块;

5 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

冻干低值质控品 1 瓶;

冻干高值质控品 1 瓶;

底物溶液 1 瓶, 3ml/瓶;

显色液 (TMB) 1 瓶, 3ml/瓶;

10 反应终止液 1 瓶, 3ml/瓶;

清洗缓冲液 (20X 浓缩) 1 瓶, 15ml/瓶。

具体操作如下:

1. 制备 IGFBP-4 蛋白水解酶标准品:

15 1) 收集血清: 从产房获得健康足月孕妇静脉血, 3000rpm 离心 15 分钟, 分离血清于-70℃保存备用。

2) IGFBP-4 蛋白水解酶的分离纯化: 使用 AKTA 蛋白纯化仪 (Pharmacia 公司产品, 型号 Purifier 100) 从上述血清中分离纯化 IGFBP-4 蛋白水解酶。选用的操作步骤依次为: a) DEAE 离子交换层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl (PH7.2), 1M NaCl, 流速 3 ml/min; b) Heparin 亲和层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl (PH7.2), 1M NaCl, 流速 1.5 ml/min; c) 分子筛 S-200 层析, 缓冲液为 0.02M Tris-HCl, (PH7.2), 流速 2 ml/min。层析过程中用 UNICRN V400 软件控制 NaCl 的浓度梯度及蛋白峰的紫外吸收监测。每一步层析所获蛋白峰的活性检测采用 ELISA 法。最后将活性蛋白洗脱峰合并, 装透析袋, 透析除盐后浓缩, 贮存于-70℃。

25 3) IGFBP-4 蛋白水解酶纯品按试剂盒说明书中标准曲线第一点所需要浓度分装 (64mIU/L)、冷冻干燥、贮存于 4℃。

2. 制作 IGFBP-4 蛋白水解酶多克隆抗体包被板:

1) IGFBP-4 蛋白水解酶多克隆抗体制备:

30 选用体重为 20-22g 的 Balb/c 雄性小鼠 10 只 (购自北京实验动物中心), 每只用含 100μg IGFBP-4 蛋白水解酶纯品的生理盐水与 2 倍体积的弗氏完全佐剂制成 0.5ml 乳剂, 注射于小鼠腹腔内。两周后用含 50μg IGFBP-4 蛋白水解酶纯品的生理盐水与 2 倍体积的弗氏不完全佐剂制成 0.5ml 乳剂作加强注

射, 再过 2 周重复加强注射一次。重复加强注射后的次日, 每只小鼠腹腔内注射小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 $2 \times 10^6/0.5\text{ml}$ 。一周后小鼠产生腹水, 用 9 号针头从小鼠腹腔采集腹水。数日内连续收集腹水 2-3 次, 直至小鼠死亡。

5 将所有收集的腹水合并后, 分装成 15ml/支存于 -20°C 备用。小鼠腹水经重组 Protein G 亲和层析柱 (Parmacia 公司) 纯化后获得鼠抗人 IGFBP-4 蛋白水解酶多克隆抗体。亲和层析时缓冲液为 0.02M 磷酸缓冲液, pH7.0; 洗脱液为 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, pH 2.7。

2) 包被:

10 酶标板采用 Costar 公司生产的 6 X 8 可拆条板。将步骤 1) 所获多克隆抗体用 0.05M 碳酸盐缓冲液稀释为 $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 后加入酶标板各孔, 每孔 100ul, 吸附过夜, 用 1X 清洗缓冲液洗板, 再用该缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得多克隆抗体包被酶标板。按 48 孔/块用锡箔纸包装、真空封闭。

3. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体

15 1) 获取免疫小鼠脾细胞: 用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品作为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 免疫程序结束后获取脾细胞, 在二氧化碳孵育箱中按常规方法进行培养;

2) 细胞融合和细胞筛选: 将步骤 1) 所得脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 在 IMDM 甲基纤维素半固体培养基中进行选择性培养、阳性融合细胞筛选, 再进行克隆化培养, 即获得强阳性单克隆杂交瘤细胞株;

20 3) 获取腹水和腹水纯化: 将步骤 2) 获得的杂交瘤细胞注入小鼠腹腔进行扩大培养, 5 只小鼠在注入杂交瘤细胞前一周先注射 0.5ml 石蜡油, 每只小鼠注射的杂交瘤细胞数为 $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 个, 约 10 天后可收获小鼠腹水, 每次 3~5ml, 每只小鼠可收集 2~3 次。用重组 Protein G 亲和层析预装柱从小鼠腹水中纯化 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体, 缓冲液为 0.02M 磷酸缓冲液, PH7.0; 洗脱液为 0.1M 甘氨酸-盐酸缓冲液, PH 2.7。

25 4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记: 在一支 5mg/ml 纯化好的 IGFBP-4 单抗溶液中加入稀释好的 N-羧基琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酯 (SATA) 溶液 20ul, 室温孵育 30 分钟后; 加入 100ul 去乙酰化溶液 (即用马来酰胺醋酸缓冲液溶解的盐酸羟胺溶液), 室温孵育 2 小时; 用脱盐柱分离去乙酰化 SATA 衍生物 (即单抗) 和盐酸羟胺; 将上述单抗溶液 2ml 与 5mg 马来酰胺活化的 HRP 在室
30 温反应 1 小时, 即获得 HRP 酶记 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体。

5) 纯化 HRP 标记的 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗体: 用聚丙烯酰胺预装柱去除游离的 HRP, 获得克分子比接近 1: 8 的酶标 IGFBP-4 蛋白水解酶单克隆抗

体。

6) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 5) 获得的酶标单克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃。

5 4. 制备质控品:

收集足月正常孕妇静脉血 (经 HIV、肝类病毒、AIDS、梅毒等测定均为阴性者), 3000rpm 离心 15 分钟后收集血清于 -20℃ 保存。将积累的各个血清混合, 用 ELISA 方法测定 IGFBP-4 蛋白水解酶浓度, 并用非孕妇女血清将两份混合血清的浓度调至 6 ± 2 mIU/L、 20 ± 4 mIU/L 范围, 制备成低、高质控品。按每个试剂盒的需要量分装, 冷冻干燥后贮存于 4℃。每个试剂盒中含低浓度质控品和高浓度质控品各一瓶。

10 5. 配制底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液, 按 3ml/瓶分装。

6. 配制显色液: TMB (0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 3ml/瓶分装。

15 7. 配制反应终止液: 2M H₂SO₄, 按 3ml/瓶分装。

8. 配制清洗缓冲液 (20 倍浓缩液): PBS (pH7.4) 配制的 1% 吐温 20 溶液, 按 15ml/瓶分装。

应用本发明技术制备 IGFBP-4 蛋白水解酶定量酶免检测试剂盒的质量检测:

20 1) 准确性: 取三份待测样品混合后分为三份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 0、10 mIU、50 mIU 的 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品, 制成回收试验血清标本 #1、#2、#3。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按回收率计算公式计算回收率。标本 #2、#3 的回收率分别为 96.6% 和 98.1%, 平均回收率为 97.4%, 即试剂盒的比例偏差为 2.6%, 准确性为 97.4%。

25 2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份待测样本按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果, 求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV ≤ 15%

30 3) 线性范围: 用 IGFBP-4 蛋白水解酶纯品稀释成一系列不同浓度的纯品溶液: 128mIU/L、64mIU/L、32mIU/L、16mIU/L、8mIU/L、4mIU/L、2mIU/L。按照说明书操作步骤进行测定。以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制曲线。线性范围内最高检测上限值为 64mIU/L, 最低检测下限值为 4mIU/L。试剂盒的线性范围为 4~64 mIU/L。

- 4) 检测灵敏度: 根据上述线性范围测定结果, 本试剂盒的检测灵敏度为 4.0 mIU/L。
- 5) 特异性: 取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 50ng 剂量的 IGFBP-1、IGFBP-3 或 IGFBP-5 后制成干扰试验血清标本#1、#2、#3, 未加任何干扰物的#4 混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本#1、#2、#3 的干扰误差均小于 2.0%。

实施例二: IGFBP-4 蛋白水解酶定量酶免检测试剂盒的使用实例

- 10 1. 清洗缓冲液配制: 将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水 20 倍稀释。
2. 将试剂盒提供的标准品第一点冻干粉 (浓度 64 mIU/L) 用 500 μ l 清洗缓冲液溶解, 然后进行倍比稀释 4 次。试剂盒中的标准曲线由 5 个不同浓度的 IGFBP-4 蛋白水解酶标准品组成, 标准曲线各点浓度分别为 64 mIU/L、32 mIU/L、16 mIU/L、8 mIU/L, 4 mIU/L。
- 15 3. 质控品的稀释: 将试剂盒提供的低、高质控品冻干粉分别用 110 μ l 清洗缓冲液溶解。
4. 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品、质控品, 或待测血清样品, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。然后用清洗缓冲液重复洗板 4 次, 每次 3min。
- 20 5. 酶联反应: 将 HRP-单克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次, 每次 3min。
6. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、TMB 显色液各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。
7. 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 平均值; 记录各孔吸光值; 计算双孔标准品 OD 值的平均值。
- 25 8. 结果计算:
 - 1) 标准曲线的绘制: 以标准品浓度为横坐标、标准品测定的平均 OD 值为纵坐标, 绘制本次测定的标准曲线; 计算标准曲线回归系数 R^2 , 当 $R^2 > 0.98$ 时本次实验有效。
 - 30 2) 质控品浓度的评判: 根据质控品的 OD 值, 从标准曲线上读取相应的质控品浓度值。当低值质控品浓度在 6 ± 2 mIU/L、高值质控品浓度在 20 ± 4 mIU/L 范围内时, 本次测定判为有效;

3) 计算待测血清样品浓度: 当标准曲线和质控品均被判定有效时, 根据待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品中的 IGFBP-4 蛋白水解酶浓度。

专利名称(译)	用胰岛素生长因子结合蛋白 - 4水解酶检测急性冠状动脉综合征的试剂盒		
公开(公告)号	CN1266478C	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN03136491.8	申请日	2003-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	马旭		
申请(专利权)人(译)	马旭		
当前申请(专利权)人(译)	马旭		
[标]发明人	马旭 吴尔若		
发明人	马旭 吴尔若		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/96		
其他公开文献	CN1553194A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种胰岛素生长因子结合蛋白-4水解酶检测急性冠状动脉综合征的试剂盒，它由标准品、多克隆抗体包被板、酶标单克隆抗体、质控品和辅助试剂组成。本发明还涉及这种试剂盒的制作及检测方法。本发明试剂盒可用于急性冠状动脉综合征诊断，尤其可用于发生不稳定心绞痛和急性心肌梗塞的危险性评估。本试剂盒采用定量双抗体夹心酶联免疫反应法，具有良好的精密度和灵敏度，组配合理，操作简便。