



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569433 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510012402. 8

(22) 申请日 2015. 01. 09

(66) 本国优先权数据

201410217355. 6 2014. 05. 22 CN

(71) 申请人 江苏金标世纪生物科技有限公司

地址 215600 江苏省苏州市张家港市国泰北路 1 号科技创业园 F 栋 5 层

申请人 胡文波

(72) 发明人 胡文波 李静

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有

限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页

(54) 发明名称

一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法, 试剂盒包括试纸, 该试纸能够同时检测人髓过氧化物酶 (MPO)、心脏型脂肪酸结合蛋白 (FABP3) 和心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 三种标志物。试纸包括样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜及吸样垫, 结合垫上同时标记有所述三种标志物的抗体, 层析膜的检测线有三条, 这三条检测线分别通过包被所述三种标志物的配对抗体形成, 所述三种标志物的配对抗体分别能够与所述三种标志物的抗体特异性结合。本发明试剂盒具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

1. 一种心肌梗塞快速检测试剂盒,包括试纸,其特征在于:所述试纸能够同时检测人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和心肌肌钙蛋白 I 三种标志物。

2. 根据权利要求 1 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述试纸包括样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜及吸样垫,所述结合垫上同时标记有所述三种标志物的抗体,所述层析膜的检测线有三条,这三条检测线相互分离且分别通过包被所述三种标志物的配对抗体形成,所述三种标志物的配对抗体分别能够与所述三种标志物的抗体特异性结合。

3. 根据权利要求 2 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述的结合垫为胶体金垫,所述的检测试剂盒为免疫胶体金试剂盒;或者,所述结合垫为免疫荧光微球结合垫,所述的检测试剂盒为免疫荧光微球试剂盒。

4. 根据权利要求 3 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括比色卡和 / 或胶体金定量读数仪,或者所述试剂盒还包括免疫荧光定量读数仪。

5. 根据权利要求 4 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒为免疫胶体金试剂盒,所述试剂盒包括比色卡,所述比色卡为白色背景上印有三排系列不同深浅红色线条,分别为所述三种标志物的标准线,每排红色线条的不同深浅处分别对应相应标准品的不同浓度。

6. 根据权利要求 3 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述结合垫为胶体金垫,所述三种标志物的抗体分别为抗人髓过氧化物酶特异性鼠单克隆抗体、抗心脏型脂肪酸结合蛋白特异性鼠单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 特异性鼠单克隆抗体;所述的三种标志物的配对抗体分别为特异性的抗人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体或多克隆抗体。

7. 根据权利要求 2 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述试纸由所述样品垫、结合垫、层析膜及吸样垫依次相互交错粘贴在底板上构成,所述层析膜的三条检测线平行且沿着层析膜的长度方向依次设置,且三条检测线中靠近所述结合垫的检测线处包被人髓过氧化物酶的配对抗体,靠近吸样垫的检测线处包被心肌肌钙蛋白 I 的配对抗体,中间的检测线处包被心脏型脂肪酸结合蛋白的配对抗体。

8. 根据权利要求 3 所述的心肌梗塞快速检测试剂盒,其特征在于:所述结合垫为免疫荧光微球结合垫,所述三种标志物的抗体分别为抗人髓过氧化物酶特异性鼠抗体、抗心脏型脂肪酸结合蛋白抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 抗体;所述三种标志物的配对抗体分别为特异性的抗人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体或多克隆抗体。

9. 一种权利要求 2 及 5-7 中任一项权利要求所述的心肌梗塞快速检测试剂盒的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 胶体金垫的制备:制取胶体金溶液,取三份胶体金溶液并分别调节 pH 为 7.5 ~ 8.5,按 100ml 胶体金溶液加入 0.5 ~ 2mg 的抗体将所述三种标志物的抗体分别加入到胶体金溶液中,室温搅拌 1.5 ~ 3 小时,加入牛血清蛋白和聚乙二醇封闭,离心,弃上清,沉淀用胶体金工作溶液复溶,然后均匀铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时制成胶体金垫,所述胶体金工作溶液为 pH 等于 7.9 ~ 8.1,含牛血清白蛋白 0.8wt% ~ 1.2wt%、羊血清 8wt% ~ 12wt%、蔗糖 1.5wt% ~ 2.5wt%

和表面活性剂 0.1wt%~0.5wt%的硼酸盐缓冲液；

(2) 包被膜的制备：用 pH 7~8 的缓冲溶液将所述三种标志物的配对抗体分别配成 0.5~2mg/ml 的溶液，将羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体配制成 0.5~2mg/ml 的溶液，用喷膜仪在硝酸纤维素膜的上部、中部以及下部以 1~1.5ul/cm 的参数进行分别划线，得到三条检测线和一条质控线，划线后，置于温度 20~25℃，湿度小于 30% 的干燥间，干燥 2~5 小时；

(3) 试纸卡的组装：在温度 20~25℃，湿度小于 40% 的干燥间内，取塑料底板，在底板上依次相互交错地粘上样品垫、胶体金垫、包被膜和吸样垫，切割，形成所述试纸。

10. 一种权利要求 2 及 7-8 中任一项权利要求所述的心肌梗塞快速检测试剂盒的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 制备免疫荧光微球结合垫：首先，将荧光微球与所述三种标志物的抗体混合得到含有标记抗体的荧光微球；然后，将含有标记抗体的荧光微球涂布于玻璃纤维布或无纺布上制成免疫荧光微球结合垫；

(2) 包被膜的制备：用 pH 7~8 的缓冲溶液将所述三种标志物的配对抗体分别配成 0.5~2mg/ml 的溶液，将羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体配制成 0.5~2mg/ml 的溶液，用喷膜仪在硝酸纤维素膜的上部、中部以及下部以 1~1.5ul/cm 的参数进行分别划线，得到三条检测线和一条质控线，划线后，置于温度 20~25℃，湿度小于 30% 的干燥间，干燥 2~5 小时；

(3) 试纸卡的组装：在温度 20~25℃，湿度小于 40% 的干燥间内，取塑料底板，在底板上依次相互交错地粘上样品垫、免疫荧光微球结合垫、包被膜和吸样垫，切割，形成所述试纸。

一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 急性心肌梗塞 (AMI) 严重威胁人类健康, 是全球范围内致死和致残的主要疾病之一, 快速诊断早期急性心肌梗塞并及时治疗是降低病人死亡率的关键。对于无典型胸痛和心电图改变不明显的心肌梗死患者, 仅依靠心电图、超声心动图和心脏核磁共振, 难以准确诊断。因此, 检测血清心肌标志物是诊断 AMI 的必要依据。

[0003] 心肌标志物是指在血液中可测定出的一系列生物化学物质, 它们具有心肌特异性, 当心肌组织损伤时, 可大量释放至循环血液中, 通过检测其血浓度变化, 可诊断心肌损伤的物质, 因此可用作心肌损伤的筛查、诊断、评定预后和治疗效果的监测标志。临床实践中已陆续发现多种反映心肌组织损伤的标志物, 包括反映心肌缺血损伤的标志物, 如缺血修饰白蛋白、髓过氧化物酶等; 心肌组织损伤坏死的确定标志物, 如心肌肌钙蛋白等。心肌标志物为临床提供了方便, 使鉴别诊断、诊断预后的能力大大提高。

[0004] 急性心肌梗死发生在一瞬间, 具有无特异性前兆症状的特点。心肌梗死的及时诊断通常是很困难的, 特别是梗死前的心肌缺血阶段更是不易诊断。因此, 在心肌发生缺血时就能高度表达的标志物才能作为急性心肌梗死的预警信号, 使患者及时得到救助, 避免心肌梗死的发生。近年来的临床研究资料提示心肌脂肪酸结合蛋白、髓过氧化物酶等标志物变化与急性冠脉综合征患者的诊断和预后相关。它们是新一代早期预警心脏生物标示物。

[0005] 髓过氧化物酶 (MPO) 是冠状动脉粥样硬化病灶不稳定和中性白细胞应激的标志物, 也是早期预警信号。MPO 是一种过氧化物酶, 主要存在于嗜中性粒细胞或单核细胞的嗜天青颗粒中。炎症时激活的嗜中性粒细胞发生脱颗粒并释放髓过氧化物酶, 它能导致冠状动脉粥样硬化病灶不稳定甚至是破裂, 使血管内皮下胶原组织暴露, 随之发生血小板粘附聚集和血栓形成, 造成冠状动脉阻塞, 发生急性冠状动脉综合症, 甚至是严重的心肌不可逆缺血损伤。因此, 髓过氧化物酶可以反映心血管局部激活的嗜中性粒细胞激活、浸润和脱颗粒这个急性心肌缺血或再灌注损伤的共同发病通路。大量临床研究资料表明, 急性冠状动脉综合症的病人血清中髓过氧化物酶水平显著地升高, 是预测 ACS 患者发生不良心血管事件的一个新的预测因子。MPO 水平在没有发生心肌梗死和肌钙蛋白检测不到的心肌缺血的早期 2 小时之内就已经升高, 可在无心肌坏死的情况下预测和预警发生心脏事件的危险患者, 显示了 MPO 对胸痛患者进行危险分层的潜在作用。因此, 血清髓过氧化物酶水平检测可以作为动态实时观测冠心病治疗和预后的预警信号。

[0006] 心脏型脂肪酸结合蛋白 (FABP3) 是一种重要的细胞内脂肪酸结合蛋白的小分子蛋白质, 大量地存在于心肌组织中, 具有高度的心肌特异性。急性心肌缺血时心肌细胞膜通透性显著改变, 细胞膜破裂的早期, 心肌细胞内的心脏型脂肪酸结合蛋白漏出到细胞外液或血液循环中。FABP3 可以早在胸痛发作后 1-3 小时在血液中被发现, 6-8 小时达到峰值而且血浆水平在 24-30 小时内恢复正常。有研究表明, 胸痛发作 3h 以内 FABP3 的敏感性和阳

性预测值显著高于 cTnI,对于早期排除 AMI 非常有利。FABP3 作为心肌标志物早期诊断 AMI 的代表,能更早的预测心脏事件的相对危险。

[0007] 心肌肌钙蛋白 (cTn) 是组成横纹肌丝的结构蛋白,具有调节肌细胞收缩功能,其由三种不同基因的亚基:心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI) 和肌钙蛋白 C(TnC) 组成,在控制心肌收缩中起重要作用。正常人血液中 cTnI 的含量一般低于 $0.3 \mu\text{g/L}$,由于分子量不大,当心肌严重缺血导致心肌细胞膜的完整性被破坏时,cTn 极易释放入血,胸痛发作 4~6h 升高,增高可持续 6~7d,由于心肌肌钙蛋白仅存在于心肌收缩肌上,因此,它是评价心肌坏死的首选标志物,是检测心肌损伤的金标准。目前,心肌肌钙蛋白主要用于心肌缺血损伤的临床诊断、危险性评估和预后判断。

[0008] 目前检测 MPO、FABP3、cTnI 的方法主要有酶联免疫法、化学发光法、免疫比浊法、金标免疫法等。金标免疫法需要标本量少,简便快速,适合于 AMI 的快速检测,不受时间、地点的限制。不过目前上市的多为单一指标的胶体金试纸、试剂盒等,得到的数据单一、不全面,检测灵敏度和特异性都比较低,不能全面反映病患心梗早期的情况,容易出现误诊或漏诊。MPO 可以预警心肌梗塞发生前 3 小时的风险,但其他炎症也可导致 MPO 指标的升高。FABP3 仅能表示发生心肌梗塞后 1-3 小时的情况,不能在心肌梗塞发生前预警。cTnI 胸痛发作 4~6h 才释放入血被检测到。

[0009] 目前临床使用的三联检测试剂盒多为检测肌红蛋白、肌酸激酶 MB 同工酶和肌钙蛋白为主,而这些检测试剂的缺陷是:1. 诊断时间点晚,并不能提前预警;2. 诊断准确性低;3. 灵敏度低;4. 特异性差。虽然肌钙蛋白是 AMI 诊断金标准,但肌钙蛋白在心梗发生 4-6 小时后才出现在血清中,AMI 发生 12 小时后才达到峰值,由于出现时间滞后,它不是心肌坏死的早期标志物,以至于多达 24% 的病人因为心电图检测正常、肌钙蛋白检测正常而被误诊,回家后发生 AMI,甚至导致死亡。同样的,CK-MB 水平在胸痛发生后 4-8 小时升高,在 12-24 小时达到峰值,48 小时后回到正常水平;肌红蛋白水平在梗塞发生后 2-4 小时升高,6-12 小时达到峰值,24-36 小时回到正常水平。肌钙蛋白、CK-MB 水平升高发生在心肌梗塞 4 小时后,无法对 AMI 进行早期预警,而肌红蛋白释放入血的时间虽然较前者早 2 小时左右,但心脏特异性差,其水平的升高也可发生在肾脏或骨骼肌损伤情况下。AMI 三项在临床使用中因灵敏度和特异性的不足造成一定数量的 AMI 漏诊病人。所述陈旧的检测试剂只能显示已发生心梗,不能预警心肌梗塞。

[0010] 心电图虽然也可反映病人的病情,但在刚发生胸痛的病人中,虽然有已经开始了急性心梗的进程,却有半数以上的心电图表现为正常,从而造成很多病人因延误救治而死亡。

[0011] 纵观已有产品和文献报道,心梗老三项检测滞后和准确度低;或者 MPO、FABP3、cTnI 的现有技术和产品形式针对单一指标进行检测,不能全面地、特异性地预警心肌梗塞的发生、发展全程。由于目前 MPO、FABP3、cTnI 均以不同的产品形式在临床上应用,制作原理及操作程序不同,兼容性比较差,很难在短时间内同时、快速地检测出三项指标,故极大地影响了对急性 ACS 患者进行心梗风险的合理综合判定。

[0012] 本发明将带来的有益效果是:1. 提高心肌梗塞诊断的灵敏度。2. 提高心肌梗塞诊断的准确性。3. 提前预警心肌梗塞的发生。4. 动态监测心肌梗塞的进程和愈后。

发明内容

[0013] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种能够快速、准确进行心肌梗塞早期预警及病情风险判断的试剂盒。

[0014] 本发明同时还提供该试剂盒的制备方法。

[0015] 为解决以上技术问题,本发明采取的一种技术方案是:

[0016] 一种心肌梗塞快速检测试剂盒,包括试纸,该试纸能够同时检测人髓过氧化物酶(MPO)、心脏型脂肪酸结合蛋白(FABP3)和心肌肌钙蛋白 I(cTnI) 三种标志物。

[0017] 进一步地,所述试纸包括样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜及吸样垫,结合垫上同时标记有所述三种标志物的抗体,层析膜的检测线有三条,这三条检测线相互分离且分别通过包被所述三种标志物的配对抗体形成,所述三种标志物的配对抗体分别能够与所述三种标志物的抗体特异性结合。

[0018] 根据本发明的一个具体方面,所述的结合垫可以为胶体金垫,检测试剂盒为免疫胶体金试剂盒;或者,所述结合垫还可以为免疫荧光微球结合垫,则检测试剂盒为免疫荧光微球试剂盒。

[0019] 优选地,所述试剂盒还进一步包括比色卡和 / 或胶体金定量读数仪,或者进一步包括免疫荧光定量读数仪。

[0020] 根据一个具体方面,所述试剂盒为免疫胶体金试剂盒,该试剂盒包括比色卡,比色卡为白色背景上印有三排系列不同深浅红色线条,分别为所述三种标志物的标准线,每排红色线条的不同深浅处分别对应相应标准品的不同浓度。进一步地,所述的试剂盒对人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和心肌肌钙蛋白 I 的检测临界值分别为 3ng/ml, 3ng/ml 和 0.1ng/ml。进一步地,所述的试剂盒对人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和心肌肌钙蛋白 I 的检测临界值分别为 6.25ng/ml, 3.125ng/ml 和 0.1ng/ml。进一步地,对应人髓过氧化物酶的一排不同深浅红色线条共有 7 条,分别对应浓度为 400、200、100、50、25、12.5、6.25ng/ml;对应心脏型脂肪酸结合蛋白的一排不同深浅红色线条共有 7 条,分别对应浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125ng/ml;对应心肌肌钙蛋白 I 的一排不同深浅红色线条共有 6 条,分别对应浓度为 20.0、10.0、5.0、2.0、0.5、0.1ng/ml。

[0021] 进一步地,所述结合垫为胶体金垫,所述三种标志物的抗体优选分别为抗人髓过氧化物酶特异性鼠单克隆抗体、抗心脏型脂肪酸结合蛋白特异性鼠单克隆抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 特异性鼠单克隆抗体;所述的三种标志物的配对抗体分别为特异性的抗人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白抗体和心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0022] 优选地,所述试纸由所述样品垫、结合垫、层析膜及吸样垫依次相互交错粘贴在底板上构成,层析膜的三条检测线平行且沿着层析膜的长度方向依次设置,且三条检测线中靠近结合垫的检测线处包被人髓过氧化物酶的配对抗体,靠近吸样垫的检测线处包括心肌肌钙蛋白 I 的配对抗体,中间的检测线处包被心脏型脂肪酸结合蛋白的配对抗体。

[0023] 根据本发明的又一具体方面,所述结合垫为免疫荧光微球结合垫,所述三种标志物的抗体分别优选为抗人髓过氧化物酶特异性鼠抗体、抗心脏型脂肪酸结合蛋白抗体和抗心肌肌钙蛋白 I 抗体;所述三种标志物的配对抗体分别为特异性的抗人髓过氧化物酶、心脏型脂肪酸结合蛋白抗体和心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0024] 优选地,根据本发明的又一具体且优选方面,所述的结合垫为免疫荧光微球结合

垫,所述检测试剂盒为免疫荧光微球试剂盒,该试剂盒还包括免疫荧光定量读数仪。

[0025] 优选地,免疫荧光微球结合垫的制备方法为:首先,将荧光微球与所述三种标志物的抗体混合得到含有标记抗体的荧光微球;然后,将含有标记抗体的荧光微球涂布于玻璃纤维布或无纺布上制成免疫荧光微球结合垫。

[0026] 优选地,所述荧光物质为激发荧光物质。

[0027] 本发明采取的又一技术方案是:一种上述心肌梗塞快速检测试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0028] (1) 胶体金垫的制备:制取胶体金溶液,取三份胶体金溶液并分别调节 pH 为 7.5 ~ 8.5,按 100ml 胶体金溶液加入 0.5 ~ 2mg 的抗体将所述三种标志物的抗体分别加入到胶体金溶液中,室温搅拌 1.5 ~ 3 小时,加入牛血清蛋白和聚乙二醇封闭,离心,弃上清,沉淀用胶体金工作溶液复溶,然后均匀铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时制成胶体金垫,所述胶体金工作溶液为 pH 等于 7.9 ~ 8.1,含牛血清白蛋白 0.8wt% ~ 1.2wt%、羊血清 8wt% ~ 12wt%、蔗糖 1.5wt% ~ 2.5wt% 和表面活性剂 0.1wt% ~ 0.5wt% 的硼酸盐缓冲液;

[0029] (2) 包被膜的制备:用 pH 7 ~ 8 的缓冲溶液将所述三种标志物的配对抗体分别配成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,将羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体配制成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,用喷膜仪在硝酸纤维素膜的上部、中部以及下部以 1 ~ 1.5u1/cm 的参数进行分别划线,得到三条检测线和一条质控线,划线后,置于温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时;

[0030] (3) 试纸卡的组装:在温度 20 ~ 25℃,湿度小于 40% 的干燥间内,取塑料底板,在底板上依次相互交错地粘上样品垫、胶体金垫、包被膜和吸样垫,切割,形成所述试纸。

[0031] 优选地,步骤 (1) 中,调节胶体金溶液的 pH 为 8.1 ~ 8.3,具体为例如 8.2。

[0032] 优选地,步骤 (1) 中,每 100ml 胶体金溶液加入 0.8 ~ 1.2mg 人髓过氧化物酶抗体 A。每 100ml 胶体金溶液加入 1.3 ~ 1.7mg 心脏型脂肪酸结合蛋白抗体 A。每 100ml 胶体金溶液加入 0.8 ~ 1.2mg 心肌肌钙蛋白 I 抗体 A。

[0033] 优选地,步骤 (1) 中,胶体金工作溶液中硼酸盐的浓度为 18 ~ 22mM,具体可以为例如 20mM。

[0034] 优选地,步骤 (2) 中,分别将所述人髓过氧化物酶抗体 B 和心脏型脂肪酸结合蛋白抗体 B 配成 1.2 ~ 1.8mg/ml 的溶液,具体可以为例如 1.5mg/ml;将心肌肌钙蛋白 I 抗体 B 配成 0.8 ~ 1.2mg/ml 的溶液,具体可以为例如 1.0mg/ml。

[0035] 本发明采取的又一技术方案是:一种上述心肌梗塞快速检测试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0036] (1) 胶体金垫的制备:制取胶体金溶液,取三份胶体金溶液并分别调节 pH 为 7.5 ~ 8.5,按 100ml 胶体金溶液加入 0.5 ~ 2mg 的抗体将所述三种抗体分别加入到胶体金溶液中,室温搅拌 1.5 ~ 3 小时,加入牛血清蛋白和聚乙二醇封闭,离心,弃上清,沉淀用胶体金工作溶液复溶,得溶液 A;生物素标记的肌钙蛋白配对抗体用 PBS 稀释至 0.5-2mg/ml 得溶液 B;将 A 和 B 均匀铺在玻璃纤维膜或无纺布上,再置温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时制成胶体金垫;

[0037] (2) 包被膜的制备:用 pH 7 ~ 8 的缓冲溶液将所述 MPO、FABP3 的配对抗体分别配

成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,将链酶亲和素配成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,将羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体配制成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,用喷膜仪在硝酸纤维素膜的上部、中部以及下部以 1 ~ 1.5ul/cm 的参数进行分别划线,得到三条检测线和一条质控线,划线后,置于温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时;

[0038] (3) 试纸卡的组装:在温度 20 ~ 25℃,湿度小于 40% 的干燥间内,取塑料底板,在底板上依次相互交错地粘上样品垫、胶体金垫、包被膜和吸样垫,切割,形成所述试纸。

[0039] 优选地,步骤 (1) 中,调节胶体金溶液的 pH 为 8.1 ~ 8.3,具体为例如 8.2。

[0040] 优选地,步骤 (1) 中,每 100ml 胶体金溶液加入 0.8 ~ 1.2mg 人髓过氧化物酶抗体 A。每 100ml 胶体金溶液加入 1.3 ~ 1.7mg 心脏型脂肪酸结合蛋白抗体 A。每 100ml 胶体金溶液加入 0.8 ~ 1.2mg 心肌肌钙蛋白 I 抗体 A。

[0041] 优选地,步骤 (1) 中,胶体金工作溶液中硼酸盐的浓度为 18 ~ 22mM,具体可以为例如 20mM。

[0042] 优选地,步骤 (2) 中,分别将所述人髓过氧化物酶抗体 B 和心脏型脂肪酸结合蛋白抗体 B 配成 1.2 ~ 1.8mg/ml 的溶液,具体可以为例如 1.5mg/ml;将心肌肌钙蛋白 I 抗体 B 配成 0.8 ~ 1.2mg/ml 的溶液,具体可以为例如 1.0mg/ml。

[0043] 本发明同时还提供又一种心肌梗塞快速检测试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:

[0044] (1) 制备免疫荧光微球结合垫:首先,将荧光微球与所述三种标志物的抗体混合得到含有标记抗体的荧光微球;然后,将含有标记抗体的荧光微球涂布于玻璃纤维布或无纺布上制成免疫荧光微球结合垫;

[0045] (2) 包被膜的制备:用 pH 7 ~ 8 的缓冲溶液将所述三种标志物的配对抗体分别配成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,将羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体配制成 0.5 ~ 2mg/ml 的溶液,用喷膜仪在硝酸纤维素膜的上部、中部以及下部以 1 ~ 1.5ul/cm 的参数进行分别划线,得到三条检测线和一条质控线,划线后,置于温度 20 ~ 25℃,湿度小于 30% 的干燥间,干燥 2 ~ 5 小时;

[0046] (3) 试纸卡的组装:在温度 20 ~ 25℃,湿度小于 40% 的干燥间内,取塑料底板,在底板上依次相互交错地粘上样品垫、免疫荧光微球结合垫、包被膜和吸样垫,切割,形成所述试纸。

[0047] 进一步地,所述荧光标记的荧光物质为激发荧光物质。

[0048] 根据本发明,上述的层析膜优选为硝酸纤维素膜。层析膜上的质控线优选通过包被羊抗鼠 IgG 的单克隆或多克隆抗体形成。

[0049] 优选地,将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0050] 优选地,本发明所述的三种标志物的抗体和配对抗体均为超敏的特异性抗体,为公司自有产品和外购产品。

[0051] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有以下优点:

[0052] 本发明试剂盒将特定的三个心肌梗塞标志物组合在同一试纸中进行检测,具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点,对胸痛患者进行心肌梗塞早期预警、分型和临床诊断,填补现有检测技术的不足,实现经济和社会效益最大化。

具体实施方式

[0053] 心梗是危及生命的急性发作疾病,在诊断和抢救方面,时效性非常强,能够对它进行快速和自我诊断的意义大于其他任何一种疾病。传统单一指标灵敏度和准确度较低,在缺乏其他检测设备如心电图仪、心动超声仪等条件下,患者或医生不能做出是否心梗还是其他疾病的判断(如其他炎症也可造成MPO升高)。通过本发明的试剂盒进行检测,如有两项指标显示为阳性的就可以确诊为心梗,可避免现有试剂盒单一指标检测的片面性和不准确性。通过对临床目前使用的cTnI诊断试剂诊断为阴性及阳性的病人各16例进行检测结果显示本发明试剂盒能更全面、准确的对心梗病人作出早期预警及诊断。此外,本发明检测试剂盒检测方便,病人可自行在家中或其他任何场所检测,避免患者因忽视病情而发生严重心梗事件(心梗发病的一些前兆与普通的肩周炎或胃病相似,不易判断,容易被忽视而引起严重后果,甚至是死亡)。该发明产品则彻底改变这一现状,有心梗风险的患者,如有家族史、三高、糖尿病等,可将此试剂盒作为家庭常备物品,出现任何不舒服症状(如胃痛、肩膀痛、胳膊麻、头晕、甚至恶心、呕吐、大汗、心动过缓、呼吸困难等),都可通过自己或家人帮助进行检测,如出现一条阳性线,建议赶紧去医院急诊;出现2条以上阳性线,说明已有95%以上的几率是心梗,需立即叫120急救车;3条阳性线,那就直接告诉医生已经心梗了,需立刻抢救。此外,本发明试剂盒自我检测时间短,快速,5-15分钟就可出结果,避免因检测时间长而贻误病情导致危险事件的发生。

[0054] 与现有同类产品的生产方法比较,本发明产品属多指标组合产品,需要更特异性的标记、更精细的定位,工艺和处方筛选非常复杂。特异性抗体的筛选和纯化、抗体标记浓度的选择、交叉反应控制等条件需要反复试验、验证。

[0055] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明,但本发明不限于以下实施例。

[0056] 实施例一人髓过氧化物酶-心脏脂肪酸结合蛋白-肌钙蛋白I三联胶体金快速定量检测试剂盒(下称MPO-FABP3-cTnI三联胶体金试剂盒)的制备方法和检测方法

[0057] 例1:MPO-FABP3-cTnI三联胶体金试剂盒的制备

[0058] 1. 主要材料

[0059] MPO、FABP3及cTnI标准品:中检所;MPO、FABP3抗体及特异性配对抗体为上海酶联生物科技有限公司产品,cTnI抗体及特异性配对抗体为上海领潮生物科技有限公司产品;链酶亲和素:Thermo产品;羊抗鼠IgG抗体:杭州启泰生物技术有限公司产品;氯金酸:Sigma公司产品;硝酸纤维素(NC)膜:SARTORIUS(德国),CN140;牛血清白蛋白(BSA),聚乙二醇PEG20000,水解酪蛋白:Sigma产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0060] 临床样本:由公司在相关医院获得,共200份,MPO、FABP3及cTnI含量分布区间分别为6.25-400ng/ml、3.125-200ng/ml、0.1-25ng/ml之间的定值血清。

[0061] 2. MPO-FABP3-cTnI三联胶体金试剂盒的制备方法包括如下步骤:

[0062] (1)MPO抗体、FABP3抗体及cTnI抗体胶体金标记

[0063] 枸橼酸三钠还原方法制备直径为15nm-50nm的胶体金溶液,制备完成后取三份胶体金溶液,分别用0.2M K_2CO_3 将溶液调到pH7.5、pH8.0和pH8.5。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,按每100ml溶液加入0.5mg、1mg、1.5mg将标记用MPO抗体、FABP3抗体及cTnI抗体缓慢滴加到胶体金溶液中,继续搅拌2小时,再加入到终浓度为1%的PEG20000

和 1% 的 BSA 进行封闭 20min, 标记结束后以 12000r/m 离心, 弃上清, 沉淀按 50% 原体积复溶至胶体金工作液中 (20mM 硼酸盐缓冲液, pH8.0, 其中含 BSA1%、羊血清 10%、蔗糖 2% 和吐温 200.2%)。然后将标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 20cm² 的比例加样于玻璃纤维膜或无纺布上, 在温度 20 ~ 25℃, 相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时, 制成胶体金垫。

[0064] (2) NC 膜包被

[0065] 用 0.01M pH7.4 PBS 将 MPO 配对抗体、FABP3 配对抗体及 cTnI 配对抗体稀释成 0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml, 羊抗鼠 IgG 分别稀释成 1mg/ml、2mg/ml, 然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.2u1/cm 进行分别划线包被, 包被完成后将 NC 膜在温度 20 ~ 25℃, 相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时, 三条检测线和一条质控线平行, 且沿着层析膜的长度方向依次设置。

[0066] (3) 试纸卡组装

[0067] 在干燥室内, 温度 20 ~ 25℃, 湿度小于 40%, 取塑底板, 将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴, 将胶体金垫裁切成合适的宽度, 在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫, 搭接胶体金垫的 1/4 粘贴, 在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫, 搭接胶体金垫的 1/3 粘贴; 在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫, 搭接吸样垫的 1/10 粘贴; 最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3 ~ 5mm 宽的试纸条, 再装入塑料卡内, 形成试纸卡, 形成的试纸中靠近胶体金垫的检测线由 MPO 的配对抗体形成, 靠近吸样垫的检测线由 cTnI 的配对抗体形成, 中间检测线由 FABP3 的配对抗体形成。

[0068] (4) 比色卡制备和仪器曲线参数设置

[0069] 分别用 400、200、100、50、25、12.5、6.25ng/ml 的 MPO 标准品; 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125ng/ml 的 FABP3 标准品及 20.0、10.0、5.0、2.0、0.5、0.1ng/ml 的 cTnI 标准品对试纸进行测定, 不同浓度的标准品显示出不同强度色带, 将相应强度的色带印刷到比色卡上, 完成比色卡制备; 将相应强度的色带数字化后输入胶体金定量读数仪中, 完成仪器曲线参数设置。

[0070] 例 2: MPO-FABP3-cTnI 三联胶体金试剂盒的制备

[0071] 1. 主要材料

[0072] MPO、FABP3 及 cTnI 标准品: 中检所; MPO、FABP3 抗体及特异性配对抗体为上海酶联生物科技有限公司产品, cTnI 抗体及特异性配对抗体为上海领潮生物科技有限公司产品; 羊抗鼠 IgG 抗体: 杭州启泰生物技术有限公司产品; 氯金酸: Sigma 公司产品; 硝酸纤维素 (NC) 膜: SARTORIUS (德国), CN140; 德国赛多利斯公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA), 聚乙二醇 PEG20000, 水解酪蛋白: Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0073] 临床样本: 由公司在相关医院获得, 共 200 份, MPO、FABP3 及 cTnI 含量分布区间分别为 6.25-400ng/ml、3.125-200ng/ml、0.1-25ng/ml 之间的定值血清。

[0074] 2. MPO-FABP3-cTnI 三联胶体金试剂盒的制备方法包括如下步骤:

[0075] (1) MPO 抗体、FABP3 抗体及 cTnI 抗体胶体金标记

[0076] 枸橼酸三钠还原方法制备直径为 15nm-50nm 的胶体金溶液, 制备完成后取三份胶体金溶液, 分别用 0.2M K₂CO₃ 将溶液调到 pH7.5、pH8.0 和 pH8.5。然后将溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌, 按每 100ml 溶液加入 0.5mg、1mg、1.5mg 将标记用 MPO 抗体、FABP3 抗体及 cTnI 抗体缓慢滴加到胶体金溶液中, 继续搅拌 2 小时, 再加入到终浓度为 1% 的 PEG20000

和 1% 的 BSA 进行封闭 20min, 标记结束后以 12000r/m 离心, 弃上清, 沉淀按 50% 原体积复溶至胶体金工作液中。将生物素标记的 cTnI 配对抗体稀释至 1mg/ml, 然后将其和标记胶体金溶液按 1ml 溶液铺 20cm² 的比例加样于玻璃纤维膜或无纺布上, 在温度 20 ~ 25℃, 相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时, 制成胶体金垫。

[0077] (2) NC 膜包被

[0078] 用 0.01M pH7.4PBS 将 MPO 配对抗体、FABP3 配对抗体稀释成 0.5mg/ml、1mg/ml, 链霉亲和素稀释至 0.5mg/ml, 羊抗鼠 IgG 分别稀释成 1mg/ml、2mg/ml, 然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.2u1/cm 进行分别划线包被, 包被完成后将 NC 膜在温度 20 ~ 25℃, 相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时, 三条检测线和一条质控线平行, 且沿着层析膜的长度方向依次设置。

[0079] (3) 试纸卡组装

[0080] 在干燥室内, 温度 20 ~ 25℃, 湿度小于 40%, 取塑底板, 将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴, 将胶体金垫裁切成合适的宽度, 在 NC 膜 T 线一侧搭接胶体金垫, 搭接胶体金垫的 1/4 粘贴, 在胶体金垫另一侧搭接粘贴上样垫, 搭接胶体金垫的 1/3 粘贴; 在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫, 搭接吸样垫的 1/10 粘贴; 最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3 ~ 5mm 宽的试纸条, 再装入塑料卡内, 形成试纸卡, 形成的试纸中靠近胶体金垫的检测线由 MPO 的配对抗体形成, 靠近吸样垫的检测线由 cTnI 的配对抗体形成, 中间的检测线由 FABP3 的配对抗体形成。

[0081] (4) 比色卡制备和仪器曲线参数设置

[0082] 分别用 400、200、100、50、25、12.5、6.25ng/ml 的 MPO 标准品; 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125ng/ml 的 FABP3 标准品及 30、20、10、5、1、0.5、0.1ng/ml cTnI 标准品对试纸进行测定, 不同浓度的标准品显示出不同强度色带, 将相应强度的色带印刷到比色卡上, 完成比色卡制备; 将相应强度的色带数字化后输入胶体金定量读数仪中, 完成仪器曲线参数设置。

[0083] 例 3: MPO-FABP3-cTnI 三联胶体金试剂盒的检测方法

[0084] 按如下步骤进行检测:

[0085] (1) 将检测试剂及样本平衡至室温, 取出试纸卡, 平放;

[0086] (2) 精确吸取 10 μ l 血清、血浆样本, 样本为全血时吸取 20 μ l, 加入洁净的离心管中, 用样本稀释液 (PBS) 进行 10 倍稀释, 充分混匀;

[0087] (3) 用移液枪吸取 50-100 μ l 稀释后的样本加入到样本孔中, 15 ~ 20 分钟内用胶体金定量读数仪或比色卡 (半) 定量判定结果。

[0088] 仪器判定时, 设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测, 仪器将显示出样品浓度的定量测定结果;

[0089] 用比色卡判定结果时, 将试纸卡 T 线的颜色和比色卡上标准线的颜色深浅进行对比, 半定量判定样品的浓度区间。用例 1 方法生产的试纸条, 对 100 份临床定值样本检测, 用胶体金检测仪判定结果, 在检测范围内的 95 份样品平均偏差值均小 15%, 最大偏差小于 20%, R²>0.97, 一致性系数 >0.88。用比色卡判定结果时, 区间判定结果和样本值的符合率为 95.5%, 一致性系数 >0.85。

[0090] 本发明检测结果的判定标准: 当检测线出现 2 条阳性条带, 即可诊断为心肌梗塞。

[0091] 检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测,满足不同客户不同检测场合的差异化需要。

[0092] 例 4. 临床样本检测结果 -1

[0093] 取用例 1 方法生产的试纸条,对临床诊断为心肌梗塞患者进行检测。随机抽取 16 份心梗患者血清样本进行检测验证,MPO 和 FABP3 的检测值均在临床决定水平之上,即显示病人发生心梗,心梗预测准确率 100%;肌钙蛋白的检测心梗预测准确率 50%。说明本发明在心梗诊断的准确性和预警方面可明显优于陈旧的检测指标。检测结果详见表 1。

[0094] 表 1. MPO-FABP3-cTnI 三联胶体金试剂盒对心梗患者血清检测结果

[0095]

	序号	年龄	cTnI(ng/ml)	MPO(ng/ml)	FABP3(ng/ml)
	1	81	0.1	4173.51	108.21
	2	69	0.1	613.57	85.46
	3	85	0.1	730.76	82.04
	4	66	0.1	982.57	60.20
	5	84	0.2	3020.53	115.98
	6	71	0.3	843.48	55.72
	7	76	0.3	1127.26	142.40
	8	74	0.6	669.95	47.35
	9	80	0.7	1387.99	86.25

[0096]

	10	76	0.8	1607.77	67.34
	11	64	1.7	1809	78.18
	12	70	1.8	1990	53.95
	13	67	1.8	1973.09	75.3
	14	3	2.3	2585.02	120.78
	15	69	4.6	4195.51	91.44
	16	60	24.3	675.08	98.55

[0097] 例 5. 临床样本检测结果 2

[0098] 用例 2 方法生产的试纸条,用胶体金检测仪判定结果,平均偏差值小于 15%,最大偏差小于 20%, $R^2 > 0.98$ 。用比色卡判定结果时,区间判定结果和样本值的符合率为 95%,一致性系数 > 0.95 。

[0099] 对 32 份肌红蛋白临床检测阴性、医学影像综合诊断结果阳性的心梗病人样本进行检测验证, MPO 和 FABP3 的检测值均在临床决定水平之上,即显示病人发生心梗,心梗预测准确率 100%;肌钙蛋白的检测结果有 23 例大于临界值,显示已发生心梗,心梗预测准确率 71.8%。进一步地说明肌红蛋白的诊断准确性有待商榷。本发明在心梗预测的准确性和预警方面可明显优于陈旧的检测指标。检测结果详见表 2。

[0100] 表 2. MPO-FABP3-cTnI 三联胶体金试剂盒对肌红蛋白阴性患者血清检测结果

[0101]

肌红蛋白阴性	序号	年龄	cTnI(ng/ml)	MPO(ng/ml)	FABP3(ng/ml)
	1	64	2	500	171.41
	2	83	9.5	1252	15.32
	3	66	0.1	982	60.20
	4	85	0.1	730	82.04
	5	40	1.3	1014	10.07
	6	82	3.3	1051	95.69
	7	90	5.6	1921	26.61
	8	67	<0.1	471	185.00
	9	78	<0.1	760	161.63
	10	3	2.3	2585	120.78
	11	69	6	2184	46.14
	12	74	0.6	669	47.35
	13	47	0.7	441	14.79
	14	82	0.7	770	186.77
	15	70	2.2	1213	24.14
	16	80	3.5	853	39.22
	17	69	7.3	6792	36.65
18	80	0.7	1387	86.25	

[0102]

19	70	1.8	1990	53.95
20	47	6.3	827	19.84
21	60	24.3	675	98.55
22	88	12.1	626	17.07
23	83	<0.1	714	69.81
24	84	<0.1	1385	193.55
25	67	1.4	1680	52.10
26	82	1.5	787	20.06
27	67	0.5	1503	18.84
28	82	5.4	1038	14.52
29	76	0.3	1127	142.40
30	79	2.6	1062	229.77
31	47	<0.1	1990	69.51
32	69	0.1	613	85.46

[0103] 实施例二人髓过氧化物酶-心脏脂肪酸结合蛋白-肌钙蛋白 I 三联免疫荧光快速定量检测试剂盒（下称 MPO-FABP3-cTnI 三联免疫荧光试剂盒）的制备方法及检测方法

[0104] 例 1. MPO-FABP3-cTnI 三联免疫荧光试剂盒的制备

[0105] 1. 主要材料

[0106] MPO、FABP3 及 cTnI 标准品：中检所；MPO、FABP3 抗体及特异性配对抗体为上海酶联生物科技有限公司产品，cTnI 抗体及特异性配对抗体为上海领潮生物科技有限公司产品；EU- 荧光微球：型号 RM100-010-EU，上海微测生物公司产品；硝酸纤维素 (NC) 膜：

SARTORIUS(德国), CN140;牛血清白蛋白(BSA), 聚乙二醇 PEG20000, 水解酪蛋白;Sigma 产品;羊抗鼠 IgG 抗体:杭州启泰产品;其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0107] 临床样本由公司在相关医院获得,共 200 份血清。

[0108] 2. 制备方法包括如下步骤:

[0109] (1)MPO 抗体、FABP3 抗体及 cTnI 抗体免疫荧光标记

[0110] 将 PB 缓冲液到离心管中,加入荧光微球溶液,用枪吹打,充分混匀,记作微球体系;用 PB 缓冲液配置 EDC 溶液,向微球体系中加入 EDC 溶液,立即用枪吹打混匀,活化微球表面羧基 30min,期间多次用枪吹打,记作活化体系;取含有 MPO 抗体、FABP3 抗体及 cTnI 抗体的溶液,稀释于 PB 缓冲液中,记作稀释抗体;待活化时间到,将稀释抗体加入活化体系中,立即用枪吹打混匀,室温反应 2h,期间多次用枪吹打混匀,记作反应体系。将反应完全的反应体系在 8℃,14000rpm 条件下离心 20min,弃上清,用 100 μL 重悬液重悬,即得含有标记抗体的荧光微球的溶液。

[0111] (2) 免疫荧光结合垫制备:将步骤(1)所得荧光微球的溶液涂布于玻璃纤维素膜或是无纺布上,在温度 20 ~ 25℃,相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时即得。

[0112] (3)NC 膜包被:用 0.01M pH7.4PBS 将包被 MPO 抗体、FABP3 抗体及 cTnI 抗体稀释成 1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml,羊抗鼠 IgG 分别稀释成 0.5mg/ml、1mg/ml,然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.0ul/cm 进行分别划线包被,包被完成后将 NC 膜在温度 20 ~ 25℃,相对湿度 < 30% 的干燥间干燥 2 ~ 5 小时。将干燥后的 NC 膜置于封闭液(含 1% BSA、1% 蔗糖的 0.01M pH7.4PBS)中 37℃ 封闭 1 小时,取出后置 37℃ 下烘干处理 2 小时,封袋备用。

[0113] (4) 试纸卡组装:在干燥室内(温度 20 ~ 25℃,湿度小于 40%),取塑料底板,将已包被的 NC 膜放置在塑料底板的中部粘贴,将结合垫裁切成合适的宽度,在 NC 膜 T 线一侧搭接结合垫,在结合垫另一侧搭接粘贴上样垫,在 NC 膜 C 线一侧搭接吸样垫,最后用裁剪机将贴好塑料板切成 3 ~ 5mm 宽的试纸条,再装入塑料卡内,形成试纸卡。

[0114] 例 2. MPO-FABP3-cTnI 三联免疫荧光试剂盒的检测方法

[0115] 包括如下步骤:

[0116] (1) 将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0117] (2) 精确吸取 10 μl 血清,加入洁净的离心管中,用样本稀释液(PBS 或生理盐水)进行 10 倍稀释,充分混匀;

[0118] (3) 用移液枪吸取 50-100ul 稀释后的样本加入到样本孔中,15 分钟内用荧光定量读数仪进行定量判定结果;

[0119] 仪器判定时,设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示出样品浓度的定量测定结果。

[0120] 取 20 个试纸条,分别加入 30ul 含 0.5ng/ml cTnI、60ng/ml MPO、6ng/ml FABP3 的标准血清,用荧光检测仪进行定量判读,在检测范围内的样品平均偏差值均小 15%,最大偏差小于 15%,R2>0.98,一致性系数 >0.90。检测结果表明制备的检测试剂盒性能良好,适合用于临床检测。

[0121] 例 3. 临床样本检测

[0122] 对 36 份临床诊断为心肌梗塞的病人血清进行样本检测,临床 CKMB 的检测结果为阴性。采用本发明所述荧光试剂盒检测,MPO 和 FABP3 检测结果均在医学决定水平之上,诊

断符合率 100%；肌钙蛋白诊断 16 例显示阳性，诊断准确率 44%，进一步验证了肌钙蛋白出现时间滞后。检验结果见表 3。

[0123] 表 3. MPO-FABP3-cTnI 三联荧光检测试剂盒对 CKMB 阴性患者血清检测结果

[0124]

序号	年龄	cTnI (ng/ml)	MPO 检测结果 (ng/ml)	FABP 检测结果 (ng/ml)
1	73	0.3	725.6	5.9
2	69	7.3	6792.2	36.65
3	47	0.7	441.0	14.79
4	61	<0.1	4195.5	15.72
5	53	<0.1	1419.7	20.81
6	83	<0.1	714.3	69.81
7	87	<0.1	969.8	23.20
8	87	<0.1	1225	36.65
9	74	0.6	669.95	47.35
10	68	<0.1	1134.59	24.63
11	70	<0.1	2440.62	21.77
12	55	0.9	3459.21	102.86
13	80	3.5	853.85	39.22
14	85	<0.1	3410.99	42.42
15	73	0.2	1724.27	6.56
16	78	0.2	6789.07	31.90
17	82	0.7	770.64	186.77
18	70	2.2	1213.67	24.14
19	69	0.1	613.57	85.46
20	80	0.2	880	5
21	88	6.8	450.25	51.23
22	82	1.5	787.14	20.06
23	88	6.8	756	18.3
24	68	<0.1	2423.43	37.29
25	85	0.5	5363.27	36.32
26	73	0.1	666.4	18.44
27	84	0.2	3020.53	115.98
28	84	<0.1	2825.78	179.14
29	88	12.1	626.4	17.07
30	73	3.4	809.39	50.75
31	64	2	500.95	171.41
32	83	9.5	1252.36	15.32
33	82	5.8	1000.83	14.75
34	70	0.1	2878.59	37.01
35	84	<0.1	1385.89	193.55

[0125]

36	84	0.3	3633.45	115.13
----	----	-----	---------	--------

[0126] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明

精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104569433A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510012402.8	申请日	2015-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司 胡文博		
申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司 胡文波		
当前申请(专利权)人(译)	江苏金标世纪生物科技有限公司 胡文波		
[标]发明人	胡文波 李静		
发明人	胡文波 李静		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/6803 G01N2333/916 G01N2800/324 G01N33/6893 G01N2333/4712 G01N2333/70567 G01N2333/908 G01N33/54313 G01N2333/47 G01N2333/4704		
代理人(译)	汪青		
优先权	201410217355.6 2014-05-22 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种心肌梗塞快速检测试剂盒及其制备方法，试剂盒包括试纸，该试纸能够同时检测人髓过氧化物酶(MPO)、心脏型脂肪酸结合蛋白(FABP3)和心肌肌钙蛋白I(cTnI)三种标志物。试纸包括样品垫、结合垫、包被有检测线和质控线的层析膜及吸样垫，结合垫上同时标记有所述三种标志物的抗体，层析膜的检测线有三条，这三条检测线分别通过包被所述三种标志物的配对抗体形成，所述三种标志物的配对抗体分别能够与所述三种标志物的抗体特异性结合。本发明试剂盒具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

序号	年龄	cTnI(ng/ml)	MPO(ng/ml)	FABP3(ng/ml)
1	81	0.1	4173.51	108.21
2	69	0.1	613.57	85.46
3	85	0.1	730.76	82.04
4	66	0.1	982.57	60.20
5	84	0.2	3020.53	115.98
6	71	0.3	843.48	55.72
7	76	0.3	1127.26	142.40
8	74	0.6	669.95	47.35
9	80	0.7	1387.99	86.25