



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107664700 A

(43)申请公布日 2018.02.06

(21)申请号 201710852525.1

(22)申请日 2017.09.19

(71)申请人 威海纽普生物技术有限公司

地址 264200 山东省威海市高区火炬路-
213-1号创新创业基地C座301-303室

(72)发明人 王鹏浩 宋璐琳 张培镇 于鸿翔
孙宁宁

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202
代理人 初姣姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域,具体地说是一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及制备方法,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡设有由下自上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为60-120nm,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一抗原表位的单克隆抗体细胞株,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。

1. 一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒, 设有试纸卡, 其特征在于所述试纸卡设有由下自上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫, 其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体, 所述稀土荧光微球的直径为60-120nm, 稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素, 在基态下稳定, 在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光; 所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体, 来源于针对2-6个不同的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一抗原表位的单克隆抗体细胞株。

2. 根据权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒, 其特征在于所述结合垫的稀土荧光微球的直径优选是90-110nm; 所述稀土荧光微球掺杂有稀土镧系元素。

3. 根据权利要求2所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒, 其特征在于所述稀土荧光微球掺杂稀土络合物; 结合垫上稀土荧光微球标记的抗体来源于针对3个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

4. 根据权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一质检测试剂盒, 其特征在于所述结合垫采用如下步骤制得: 将玻璃纤维膜浸泡于200mM Tris-HCL处理液中, 4℃浸泡4小时, 然后取出37℃烘箱烘干4小时, 备用, 将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上, 用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体喷到玻璃纤维膜, 37℃烘干2小时后制得。

5. 根据权利要求4所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一质检测试剂盒, 其特征在于结合垫上的所述稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体采用如下步骤制得:

步骤1: 单克隆抗体细胞株的获得: 参照心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一氨基酸序列, 选择抗原性强的位点人工合成20个氨基酸左右的多肽序列, 交联到KLH上, 采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株, 将所获得的细胞株对应的单克隆抗体进行配对实验和亲和力测定实验, 根据实验结果确定捕获抗体和检测抗体;

步骤2: 单克隆抗体的制备: 采用标准的腹水生产工艺制备并纯化用于检测的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体, 分装后保存于-20℃备用;

步骤3: 稀土荧光微球的醛基化: 取3mg稀土荧光微球, 用50mM, pH9.5的碳酸盐缓冲液, 采用离心法洗涤3遍, 离心速度为12000rpm, 时间为5分钟, 最后重悬于100μI的上述碳酸盐缓冲液中, 加入300μI醛基化的葡聚糖, 混匀, 室温下暗反应4小时, 采用同样的离心法洗涤和重悬到100μI的上述碳酸盐缓冲液中, 置于4℃备用;

步骤4: 稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体的制备: 将2mg用于检测的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜, 然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合, 4℃反应过夜; 然后, 加入硼氢化钠至终浓度10mM, 4℃反应4小时; 再加入等体积的封闭液(100mM Tris-HCL, pH7.5, 含2% BSA, 5%蔗糖), 4℃封闭过夜; 然后用100mM Tris-HCL, pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍, 重悬于100μI的100mM Tris-HCL缓冲液中, 4℃避光保

存备用。

6. 根据权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一质检测试剂盒,其特征就在于所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

步骤1:根据前述配对实验和亲和力测定实验,选择用于捕获的抗体对应的单克隆抗体细胞株,按照标准的腹水生产工艺制备并纯化用于捕获的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,保存于-20℃备用;

步骤2:分别用包被稀释液将心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/mL,膜液量为1-2 μ L/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

7. 根据权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一质检测试剂盒,其特征就在于所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0% Triton X-100,2%BSA,0.1M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及其制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，具体地说是一种能够快速准确的对心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一进行定量分析的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及其制备方法。

背景技术：

[0002] cTnI是心肌结构蛋白，有高度的组织特异性，是一个十分敏感和特异的急性心肌梗死标志物，心肌内cTnI很丰富，心肌损伤后4小时～6小时释放入血，达到诊断决定值，发作14小时～36小时出现高峰，持续3天～7天左右。窗口期较长，可达10天左右，有利于诊断延迟的AMI和不稳性心绞痛。CK-MB是肌酸激酶(CK)的同功酶，CK是早期诊断AMI采用最广泛的心肌损伤指标，AMI发生，CK-MB2小时～4小时开始升高，4小时～6小时可超过正常上限，18小时～36小时达到峰值，持续约2天～4天。若血清中CK-MB明显升高，则提示心肌受累，但其特异性稍差，在骨骼病变和慢性肾功能不全时也可增高。Myo是一种氧结合血红素蛋白，主要分布于心肌和骨骼肌组织，在急性心肌梗死(AMI)时，心肌细胞坏死，Myo释放入血液中。在症状出现约2小时～3小时后，血中Myo可超出正常上限，9小时～12小时达到峰值，24小时～36小时后恢复正常。Myo在急性心梗发作9小时内诊断敏感性很高，有利于早期诊断，是现今血清中出现最早的急性心梗标志物。Myo阴性还有助于除外心肌梗死。

[0003] cTnI、CK-MB和Myo三者单独使用都存在一定的局限性，如cTnI在心肌损伤发病6小时以内敏感度较低，对确定是否早期使用溶栓疗法价值较小；Myo特异性较差，窗口期太短；CK-MB特异性也较差。同时检测cTnI，CK-MB和Myo三项指标，可以看出在AMI发病的不同时段，阳性率均有不同程度的升高，为心梗的早期排除和诊断提供了及时有效的依据。

[0004] 免疫分析技术是利用微量抗原与相应的高特异性抗体之间的免疫反应，来检测如激素、药物、蛋白质、多肽、酶、肿瘤相关抗原、微生素、病毒、细菌及金属元素等生物体内活性物质。免疫分析技术包括标记免疫分析、非标记免疫分析和仪器免疫分析。本试剂盒利用的含有稀土元素的羧基乳胶微球标记免疫分析技术是属于标记免疫分析之一。

[0005] 荧光免疫分析(FIA)和放射免疫分析(RIA)自问世以来，经历了几十年的发展，但是人们越来越感觉到FIA因自然本地太高，干扰检测结果；RIA采用同位素标记，对人体有极大危害并给实验带来不便。酶免疫分析(EIA)也因酶本身不稳定，受其他影响因素较大，推广应用受到限制。80年代初，人们开始研究用稀土元素代替荧光物质和同位素标记蛋白质或抗体，将时间分辨技术引入到生物检测领域，建立了新型的超微量时间分辨荧光免疫分析技术(Time resolved Fluoroimmunoassay, 简称TrFIA)。该技术采用多学科先进技术，集结了其他免疫分析的特点，在免疫学、分子生物学、细胞学和医学等领域，取得长足的发展和广泛应用。

[0006] TrFIA利用了具有独特荧光特性的3价稀土离子及螯合物为示踪物代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质，标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞，待反

应体系(如抗原抗体反应、核酸探针杂交、生物素亲和素反应以及靶细胞对效应细胞的杀伤效应等)发生后,用TrFIA检测仪测定反应产物中的荧光强度。根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析。在通常的荧光测定中,由于测试样品中含有多种荧光成分,背景荧光(来自样品中的胶体颗粒和溶剂分子引起的散射光以及血清中蛋白质和其他化合物发出的非特异性荧光)强度大、干扰强,成为荧光分析法大范围推广的瓶颈。TrFIA之所以能够成为继EIA、RIA之后一种新的灵敏的检测方法,主要取决于镧系元素独特的荧光特点、检测中采用的波长分辨和时间延迟技术以及解离-增强技术。

[0007] 镧系元素(Lanthanide, Ln)属于稀土元素,共有17种,常用于TrFIA主要有铕(Eu)、钐(Sm)、铽(Tb)、镝(Dy)。镧系元素具有独特的荧光发光特点,与普通荧光相比,镧系离子螯合物荧光衰变时间长,为传统荧光的 10^3 – 10^6 倍。如镧系离子螯合物的荧光衰变时间在60–900 μ s,常用的Eu³⁺荧光衰变时间为714 μ s,普通荧光免疫分析中荧光团的荧光衰变时间只有1–100 μ s,样品中一些蛋白质的荧光衰变时间仅为1–10 μ s,因此利用时间分辨技术,延迟一定时间后测量,便可获得Eu³⁺特异性荧光信号。同时由于衰变时间长, Eu³⁺标记物在测量时间里可以反复被激发,每次激发后由激发态很快跃迁到基态,就有荧光发出,然后又可被重新激发,如此每秒可有1000次激发,使得TrFIA荧光标记物的相对比活性很高。镧系元素荧光光谱的最大特征是激发光与发射光之间的Stokes位移较大, Eu³⁺激发波长为337nm,发射波长为615nm, Stokes位移可达278nm;同时Eu³⁺被激发的荧光光带极窄,荧光的发射峰非常尖锐,可使仪器调整在极窄的波长范围内测定,这样就几乎完全消除了背景荧光的干扰,继而通过时间延迟和波长分辨,将强特异性荧光和背景荧光分开(故称为时间分辨),使干扰达到几乎为零。

[0008] 鉴于以上标记方法及检测技术的应用,本试剂盒具有良好的检测特异性、较高的灵敏度、操作的简便性以及稳定的荧光标记物保证了检测的准确性。

发明内容:

[0009] 本发明针对现有技术中存在的缺点和不足,提出了一种利用荧光免疫层析的灵敏性,结合荧光免疫层析分析仪实现的灵敏度高、快捷简便,可以准确定量的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及制备方法。

[0010] 本发明可以通过以下措施达到:

[0011] 一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒,设有试纸卡,其特征在于所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为60–120nm,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在340–380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540–600nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2–6个不同的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一抗原表位的单克隆抗体细胞株。

[0012] 本发明所述结合垫的稀土荧光微球的直径优选是90–110nm;所述稀土荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述稀土荧光微球优选掺杂稀土络合物;结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优

选来源于针对3个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

[0013] 本发明所述结合垫采用如下步骤制得：将玻璃纤维膜浸泡于200mM Tris-HCL处理液中(含1.5%Triton X-100,1.5%BSA,pH7.5),4℃浸泡4小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用,将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时后制得。

[0014] 本发明中结合垫上的所述稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体采用如下步骤制得：

[0015] 步骤1:单克隆抗体细胞株的获得:参照心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一氨基酸序列,选择抗原性强的位点人工合成20个氨基酸左右的多肽序列,交联到KLH上,采用标准的单克隆抗体制备方法制备特异性高亲和力的单克隆抗体细胞株,将所获得的细胞株对应的单克隆抗体进行配对实验和亲和力测定实验,根据实验结果确定捕获抗体和检测抗体;

[0016] 步骤2:单克隆抗体的制备:采用标准的腹水生产工艺制备并纯化用于检测的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,分装后保存于-20℃备用;

[0017] 步骤3:稀土荧光微球的醛基化:取3mg稀土荧光微球,用50mM,pH 9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100μI的上述碳酸盐缓冲液中,加入300μI醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μI的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0018] 步骤4:稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体的制备:将2mg用于检测的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度10mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(100mM Tris-HCL,pH7.5,含2%BSA,5%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用100mM Tris-HCL,pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μI的100mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2%NaCL,0.5%BSA,0.2%Tween 20),4℃避光保存备用。

[0019] 本发明所述包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜通过以下步骤制得:

[0020] 步骤1:根据前述配对实验和亲和力测定实验,选择用于捕获的抗体对应的单克隆抗体细胞株,按照标准的腹水生产工艺制备并纯化用于捕获的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,保存于-20℃备用;

[0021] 步骤2:分别用包被稀释液将心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/ml,膜液量为1-2μI/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0022] 本发明所述样品垫通过以下步骤制得:将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0%Triton X-100,2%BSA,0.1M Tris缓冲液,pH7.5的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。

[0023] 本发明还提供了一种如上所述试剂盒实现的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一制备方法,其特征在于包括以下步骤:

[0024] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0025] 步骤2:精确吸取25 μ l血清样本,样本为全血时吸取40 μ l样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100 μ l样本稀释液,样本稀释液采用生理盐水或PBS,15-30分钟内用荧光免疫层析分析仪定量判定结果;

[0026] 步骤3:设置好荧光免疫层析分析仪的相关参数后,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,所述荧光免疫层析分析仪是一种光学检测系统,对心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一的检测范围为0-20ng/ml。

[0027] 本发明提供一种利用稀土荧光免疫层析技术制备的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一快速定量免疫层析检测试剂盒,同时适合血清和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一定性胶体金试剂,能定量检测样本中的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

附图说明:

[0028] 附图1是本发明中试纸卡的结构示意图。

[0029] 附图2是本发明中实施例2的准确度分析结果示意图。

[0030] 附表3是本发明中实施例3的精密度分析结果数据。

[0031] 附图标记:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4、吸水垫5。

具体实施方式:

[0032] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明:

[0033] 如附图1所示,本发明首先提出了一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒,盒内设有试纸卡,所述试纸卡由下至上依次设有:PVC板1、样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水垫5,其中结合垫3上吸附有稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,所述稀土荧光微球的直径为60-120nm,稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素,在基态下稳定,在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光;所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体,来源于针对2-6个不同的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一抗原表位的单克隆抗体细胞株;

[0034] 所述结合垫3的稀土荧光微球的直径优选是90-110nm;所述稀土荧光微球优选掺杂有稀土镧系元素,为铕(Eu)、钐(Sm)、铒(Er)、钕(Nd)等镧系元素的任意一种或几种的混合物;所述稀土荧光微球优选掺杂稀土络合物;结合垫上稀土荧光微球标记的抗体优选来源于针对3个不同抗原表位的单克隆细胞细胞株。

[0035] 实施例1:

[0036] 心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒中试纸卡的各组成部分可以通过以下措施制得:

[0037] 1、样品垫2的制备:

[0038] 将玻璃纤维膜浸泡于含有2.0% Triton X-100,2% BSA,0.1M Tris缓冲液,pH7.5

的处理液中,于4℃浸泡4个小时,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时。2、吸附荧光微球标记抗体的结合垫3的制备:

[0039] 将玻璃纤维膜浸泡于200mM Tris-HCL处理液中(含1.5%Triton X-100,1.5%BSA,pH7.5),4℃浸泡4小时,然后取出37℃烘箱烘干4小时,备用。将玻璃纤维膜在Bio-DotXYZ3050三维喷点平台上,用Bio-Jet Quanti300非接触式微量喷头将稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体喷到玻璃纤维膜,37℃烘干2小时,备用;

[0040] 稀土荧光纳米微球的醛基化:取3mg稀土荧光纳米微球,用50mM,pH9.5的碳酸盐缓冲液,采用离心法洗涤3遍,离心速度为12000rpm,时间为5分钟,最后重悬于100μI的上述碳酸盐缓冲液中,加入300μI醛基化的葡聚糖,混匀,室温下暗反应4小时,采用同样的离心法洗涤和重悬到100μI的上述碳酸盐缓冲液中,置于4℃备用;

[0041] 稀土荧光纳米微球标记心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体的制备:将2mg用于检测的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体用上述碳酸盐缓冲液于4℃透析过夜,然后与上述醛基化的稀土荧光微球混合,4℃反应过夜;然后,加入硼氢化钠至终浓度10mM,4℃反应4小时;再加入等体积的封闭液(100mM Tris-HCL,pH7.5,含2%BSA,5%蔗糖),4℃封闭过夜;然后用100mM Tris-HCL,pH7.5的缓冲液采用离心法洗涤3遍,重悬于100μI的100mM Tris-HCL缓冲液中(含1.2%NaCl,0.5%BSA,0.2%Tween 20),4℃避光保存备用;

[0042] 3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4的制备:

[0043] 根据前述配对实验和亲和力测定实验,选择用于捕获的抗体对应的单克隆抗体细胞株,按照标准的腹水生产工艺制备并纯化用于捕获的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体,保存于-20℃备用;

[0044] 分别用包被稀释液将心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体和羊抗小鼠IgG抗体调整浓度到1-5mg/mL,膜液量为1-2μI/cm,将它们分别作为检测线和质控线平行喷洒于硝酸纤维素膜上进行包被,检测线和质控线间隔为3-7mm,然后置于烘箱中,37℃烘干2小时;

[0045] 试纸卡的组装:在PVC板1上依次粘贴经过处理的样品垫2、吸附有稀土荧光标记的抗体的结合垫3、包被有检测线和质控线的硝酸纤维素膜4和吸水垫5,组装后得到试纸大板,按照要求切割成4mm宽,将试纸装入塑料卡内形成试纸卡。

[0046] 上述各步骤中选用的设备及原料优选以下原料:

[0047] 心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一特异性配对抗体;心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一质控品:英国朗道实验诊断有限公司;稀土荧光微球:上海甄准生物科技有限公司;硝酸纤维素(NC)膜:Millipore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。

[0048] 实施例2:准确度试验

[0049] 选用上述试纸卡以及荧光免疫层析分析仪(型号:NEO-007),

[0050] 荧光免疫分析仪参数的设定:在荧光免疫分析仪上设定好试纸卡工艺参数后,取上述组装好的试纸卡,分别用0.2、0.5、1、2、5、20ng/mL的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一校准品,用试纸卡进行测定,得到各校准品的荧光强度值,将结果输入到

分析仪的参数中,完成分析仪的参数设定。

[0051] 主要检测材料:临床样本由相关医院获得,共200份Roche电化学发光免疫法定值样本,其中血清样本100份,全血样本100份,心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一含量分布区间为0-20ng/mL之间。

[0052] 制备方法:

[0053] 步骤1:将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;

[0054] 步骤2:精确吸取25 μ L血清样本,样本为全血时吸取50 μ L样本,加入到样本孔中,再立即在下部的缓冲液孔中加入100 μ L样本稀释液(生理盐水或PBS),15-30分钟内用荧光免疫层析分析仪定量判定结果;

[0055] 步骤3: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。

[0056] 试验结果分析:

[0057] 临床样本检测试剂制备完成后,按制备方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0058] 试验结果:

[0059] 如附图2所示,以实验系统的检测值为Y轴,以对照系统的测验值为X轴,绘制散点图,并进行相关性分析。临床样本检测对200份临床定值样本检测,样本平均偏差值均小于10%,最大偏差小于25%, $R^2 > 0.98$,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,满足不同客户不同检测场合的差异化需要。

[0060] 实施例3:精密度试验

[0061] 采用实施例2的试纸卡和测量系统,对本发明的试纸卡和荧光免疫层析分析仪进行精密度实验。

[0062] 主要检测材料:临床样本由相关医院获得,共2份化学发光免疫法定值血清样本,其中低值定值样本临床测量值为0.24ng/mL,高值定值样本临床测量值为1.78ng/mL。

[0063] 制备方法:

[0064] 采用实施例2的试纸卡和测量系统,对2份定值样本各进行重复测定20次。

[0065] 试验结果分析:

[0066] 临床样本检测试剂制备完成后,按制备方法对临床样本进行检测,并分析检测结果。

[0067] 试验结果:

[0068] 如表1所示,对临床测量值为0.24ng/mL的低值定值样本和临床测量值为1.78ng/mL的高值定值样本重复测定20次后计算平均值,标准差和CV,所得结果显示用本发明的实验系统测试低值定值样本CV为8.13%,测试高值定值样本CV为5.61%。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。

[0069] 本发明提供一种利用稀土荧光免疫层析技术制备的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一快速定量免疫层析检测试剂盒,同时适合血清和全血样本,并适合临床上单人份检测,相对于心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一定性胶体金试剂,能定量检测样本中的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一含量,具有更明确的临床指导意义,具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强、适合现场检测和

经济实用等优点。

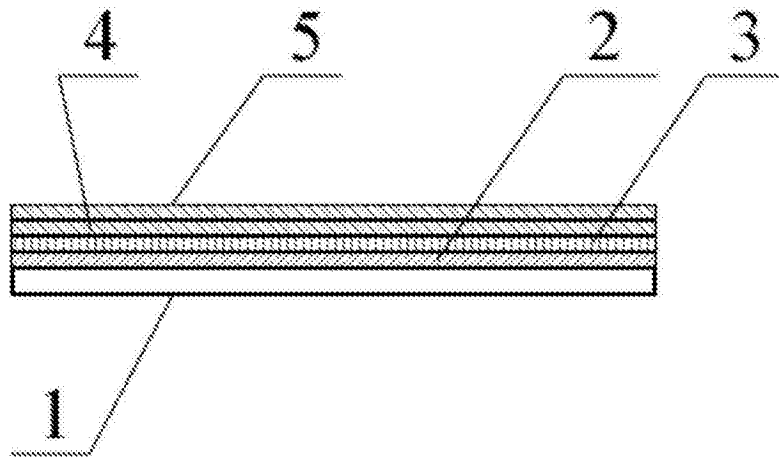


图1

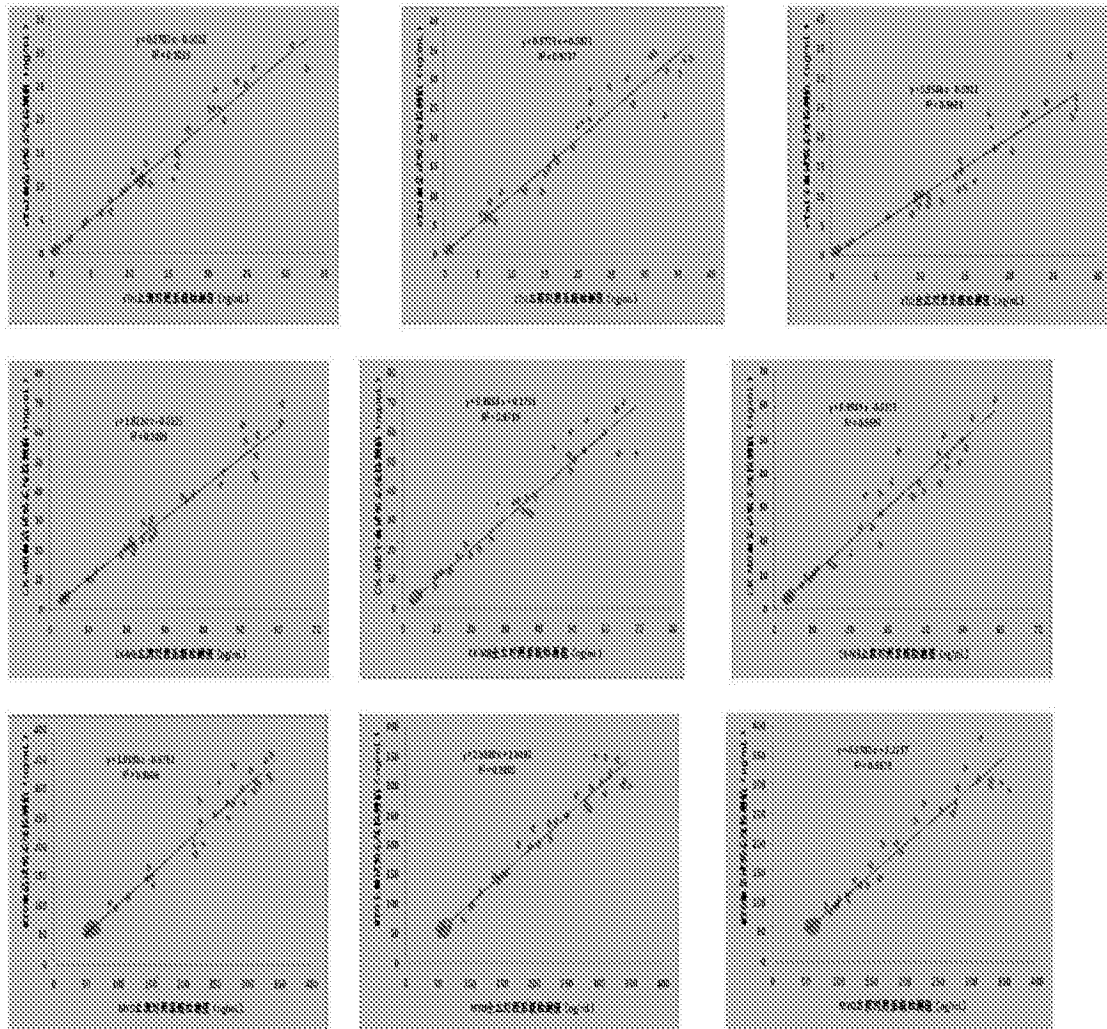


图2

专利名称(译)	心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107664700A	公开(公告)日	2018-02-06
申请号	CN2017110852525.1	申请日	2017-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海纽普生物技术有限公司		
[标]发明人	王鹏浩 张培镇 于鸿翔 孙宁宁		
发明人	王鹏浩 宋璐琳 张培镇 于鸿翔 孙宁宁		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/573 G01N33/577 G01N2333/4712 G01N2800/324		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医学免疫学中荧光免疫层析技术领域，具体地说是一种心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一检测试剂盒及制备方法，设有试纸卡，其特征在于所述试纸卡设有由下自上依次设有：PVC板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，其中结合垫上吸附有稀土荧光微球标记的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一单克隆抗体，所述稀土荧光微球的直径为60-120nm，稀土荧光微球掺杂稀土镧系元素，在基态下稳定，在340-380nm的激发光源作用下发射出波长范围在540-600nm的荧光；所述单克隆抗体为纯化后混合的单克隆抗体，来源于针对2-6个不同的心肌肌钙蛋白I及肌酸激酶同工酶及肌红蛋白三合一抗原表位的单克隆抗体细胞株，具有操作简便、反应快速、灵敏度高、特异性强等优点。