

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510018714.6

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 100422742C

[22] 申请日 2005.5.16

[21] 申请号 200510018714.6

[73] 专利权人 艾博(武汉)生物技术有限公司  
地址 430074 湖北省武汉市洪山区东信路  
数码港

[72] 发明人 钱金红 廖园园

[56] 参考文献

CN1363839A 2002.8.14

WO0167108A3 2001.9.13

WO02089657A2 2002.11.14

WO0142793A2 2001.6.14

审查员 李 冰

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限责任公  
司  
代理人 唐正玉

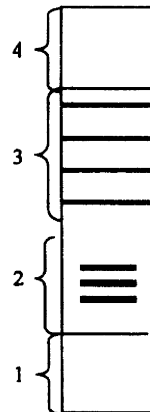
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板

[57] 摘要

本发明涉及一种急性心肌梗死(AMI)早期诊断三合一检测试剂板,属于早期诊断急性心肌梗死的技术领域。本发明利用糖原磷酸化酶 BB 型同工酶(GPBB)、心脏型脂肪酸结合蛋白(h-FABP)和血栓前体蛋白(TpP)作为 AMI 早期诊断的生化指标,在一步法检测条或检测板上分别固定胶体金标记的三种针对不同抗原的抗体以及固相化的三种未标记的抗体,以达到一次性检测三种心梗指标的目的。本发明提供的试剂板简便、快速,不需仪器设备,仅用肉眼即可判读结果,适合在任何场所检测,且每份试剂均为单独包装,可存放于室温下,便于保存。本发明检测灵敏性高,特异性强,能够在 AMI 发病早期即开始检测,适合 AMI 早期筛选和诊断。



1、一种急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板，包括胶体金标记的糖原磷酸化酶 BB 型同工酶抗体、心脏型脂肪酸结合蛋白抗体和血栓前体蛋白抗体及未标记的糖原磷酸化酶 BB 型同工酶抗体、心脏型脂肪酸结合蛋白抗体、血栓前体蛋白抗体，羊抗鼠 IgG 抗体，聚乙烯板，聚氯乙烯衬膜，滤膜，玻璃纤维纸，聚酯膜，免疫层析膜和吸水纸组成，检测试剂板水平面自下而上依次为：样品吸收区、金标单抗区、固相化抗体区和吸水区，其特征在于：样品吸收区铺设的为在聚乙烯板及聚氯乙烯衬膜上铺设滤膜和玻璃纤维纸，金标单抗区为：将胶体金标记的抗糖原磷酸化酶 BB 型同工酶、心脏型脂肪酸结合蛋白和血栓前体蛋白的单克隆抗体均匀喷洒于单位面积的聚酯膜上；固相化抗体区为：将未标记的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体固定在单位面积的免疫层析膜上，吸水区为吸水纸。

2、如权利要求 1 所述的急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板的胶体金标记 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体的制备方法，分别取半径为 40nm 的胶体金及相应的 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体，在 pH 8.2 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合，加 3%BSA 作为稳定剂，采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物，在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-单克隆抗体复合物。

## 急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板

### 技术领域

本发明涉及糖原磷酸化酶 BB 型同工酶 (GPBB)、心脏型脂肪酸结合蛋白 (h-FABP) 和血栓前体蛋白 (TpP) 的抗体对的制备, 胶体金标记显色的免疫层析反应技术和利用 GPBB、h-FABP 和 TpP 的抗体来早期诊断急性心肌梗死 (AMI) 的技术领域。尤其涉及一种急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板。

### 技术背景

急性心肌梗死 (曾称为急性心肌梗塞, AMI) 是冠心病发展到严重阶段的一种类型, 诱发急性心肌梗死的主要原因是因为心脏供血的冠状动脉突然堵塞, 从而导致由冠状动脉供应的心肌发生变性坏死。急性心肌梗死发病后 0-3 小时是溶栓治疗和介入手术治疗的黄金时间, 发病后超过 6 小时则上述治疗效果不佳, 因此, 快速识别出早期急性心肌梗死 (发病时间 6 小时内) 患者并及时治疗是提高其存活率的关键。目前急性心肌梗死 (AMI) 的诊断仍主要依靠持续心绞痛症状、心电图心肌梗死演变经过和血清心肌酶学动态改变。然而, 我国约 25% AMI 病人无症状, 约 30% 病例无典型心绞痛表现; 心电图诊断 AMI 的准确性平均约 50%, 具有确诊意义的病理性 Q 波常在发病 6~8 小时以后才出现, 因此, AMI 早期心电图确诊率很低。在心肌坏死时血清心肌标志物及酶类的检测方面, 也存在着敏感性和特异性两方面的问题, 从被检测物质本身来说, 对早期 AMI 的诊断价值有限。如: 常用的血清酶活性 (LDH、CPK、GOT 等) 发病 8~10 小时后才开始升高, 且特异性低, 已逐渐被大医院淘汰, 但基层医院由于条件有限仍在继续使用这些指标, 对早期急性心肌梗死诊断价值不大; 而目前大医院普遍采用的心肌标记物 (肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白) 的检测对发病 6 小时以内的 AMI 患者的诊断率也较低, 因为肌钙蛋白 I 和 CK-MB 在 AMI 发病 6 小时左右才显著升高, 对发病 6 小时内的 AMI 诊断敏感性低; 肌红蛋白虽在 AMI 发病后 2 小时即升高, 但特异性很差, 在骨骼肌中的含量高于心肌中的含量。本发明 (急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板) 针对目前基层医院和各级医院的急诊室缺乏快速筛选诊断早期 AMI 有效手段的局面, 采用的设计思路为将三种可用于 AMI 早期诊断的心肌标志物 (一种特异性高, 二种对于极早期急性心肌梗死的敏感性高) 与一种成熟的快速诊断技术结合起来, 从而研制出一种新的 AMI 早期诊断试剂。本发明不仅避免了目前市场上的同类产品只能单独检测血液中的某个心梗指标的缺点, 并且具备了更具高灵敏性和强特异性的指标。大量研究结果显示该三种物质联合诊断早期 AMI 的特异性、敏感性较高, 明显优于肌钙蛋白 I、CK-MB、肌红蛋白, 俗称“心三联”。本发明必将逐步取代现有的“心三联”而成为 AMI 早期筛选诊断的

“新心三联”。

三明治双抗体技术是建立在单克隆抗体技术之上的生物技术领域较新的后抗体技术。双抗体夹心法应用抗体对识别抗原的两个位点来捕捉抗原，避免了抗体与抗原的同一位点的竞争结合，减少了抗原决定簇的空间位阻现象，所以较一般的抗原捕捉法更敏感，特异性更强，重复性更好，尤其适用于抗原含量很少的标本的检测。本发明结合此技术开发的针对糖原磷酸化酶 BB 型同工酶 (GPBB)、心脏型脂肪酸结合蛋白 (h-FABP) 和血栓前体蛋白 (TpP) 的抗体对，对早期检测 AMI 病人血液中微量心梗指标 (抗原) 更突显其重要意义。

#### 发明内容：

本发明的目的是提供一种利用糖原磷酸化酶 BB 型同工酶 (GPBB)、心脏型脂肪酸结合蛋白 (h-FABP) 和血栓前体蛋白 (TpP) 的单克隆抗体对作为 AMI 早期诊断的生化指标，建立一种能在现场快速检测的试剂板，本方法不需要任何的辅助仪器，检测时间仅 5—15 分钟，通过测定人血液中的 GPBB、h-FABP 和 TpP 的浓度，来早期诊断 AMI，提高了 AMI 早期诊断的敏感性和特异性。

本发明的目的是这样实现的：一种急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板，包括胶体金标记的糖原磷酸化酶 BB 型同工酶 (GPBB) 抗体、心脏型脂肪酸结合蛋白 (h-FABP) 抗体和血栓前体蛋白 (TpP) 抗体及未标记抗 GPBB、h-FABP、TpP 的抗体，羊抗鼠 IgG 抗体，聚乙烯板、聚氯乙烯衬膜、滤膜、玻璃纤维纸、聚酯膜、免疫层析膜和吸水纸组成。所述抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的抗体为单克隆抗体对。

所述抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体分别用纯化的抗原免疫 BALB/c 小鼠，得到抗原刺激的脾脏细胞，融合该脾脏细胞和小鼠的骨髓瘤细胞系，利用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞，用 ELISA 方法鉴定分别抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的细胞株，进行三次克隆化后得到分泌高特异性的单克隆抗体的细胞株，通过小鼠腹水生产抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体。

抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体对的筛选，主要采用抑制法筛选高亲和力的亚克隆，进而在克隆化和 ELISA 相加实验结果的基础上进行竞争抑制表位分析和亲和力的测定，得到不同表位的单抗细胞株，进一步腹水生产并纯化得到多量抗体，进行单株标记，采用 ELISA 直接法进行标记抗体的工作浓度滴定，然后采用 ELISA 竞争抑制法进行单标抗体表位测定，从而筛选出高效亲和力的三明治抗体对。

将胶体金标记的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体均匀喷洒于单位面积的聚酯膜上；将未标记抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 抗体固定在单位面积的免疫层析膜上。

金标抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体的制备方法为分别取半径为 40nm 的胶体金及相应的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体，在 pH 8.2 的条件下通过磁力搅拌振

荡使其结合，加 3%BSA 作为稳定剂，采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物，在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金—单克隆抗体复合物。

该检测板水平面自下而上依次包括：样品吸收区，可溶解的金标抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体，三条固相化抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体，一条固相化羊抗鼠 IgG 抗体和吸水片区。

本发明所提供的急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂板，是以 GPBB、h-FABP 和 TpP 作为生化指标来早期诊断 AMI。这包括制备上述 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体对的方法，以及利用胶体金标记抗体和免疫层析方法测定血液或血清中的 GPBB、h-FABP 和 TpP 的浓度，以诊断 AMI。

本方法利用金标记抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单抗作为第一抗体，用来捕捉抗原；精确呈横条状分布于免疫层析膜上的未标记抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体用来识别抗原，通过显示免疫层析膜上的条纹，来判定检测样品中的 GPBB、h-FABP 和 TpP 的含量，从而筛选和诊断 AMI。

本检测试剂板由聚乙烯板、聚氯乙烯衬膜、滤膜、玻璃纤维纸、聚酯膜、免疫层析膜、胶体金标记的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单抗、未标记抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单抗、羊抗鼠 IgG 抗体和吸水纸组成。

与现有技术相比，本发明有突出的优点和实用性：

1、检测敏感性高、特异性强：在 AMI 发病早期阶段（0~3 小时）h-FABP 的临床灵敏度为 91.4%，显著高于 CK-MB 及其他指标；AMI 的主要病理变化是血栓形成，血栓前体蛋白（TpP）是血凝过程中一个重要产物，血栓形成时升高，发病 6 小时内的 AMI 患者进行测定发现 100% 的患者 TpP 出现升高，而 47% 的患者 CK-MB 还在正常范围。灵敏度高于 CK-MB；糖原磷酸化酶（GP）的 BB 型分子量约为 188kD，比 MM、LL 型大，在正常生理条件下以相同亚基组成的二聚体形式存在。研究结果表明 GP 三种同功酶分别由三个不同基因编码，一级结构比较发现 GPBB 与 GPMM、GPLL 的同源性分别为 83% 和 80%，但在 C 末端 BB 型比 MM、LL 型分别多出 21 个和 16 个氨基酸残基。这就说明 GPBB 具有高度的心肌特异性结构。缺血早期 GPBB 释放入血与 GPBB 在心肌能量代谢中起主要作用有关。研究发现在心肌梗死发作后 2~3 小时内，GPBB 的敏感性最强，出现最早，增幅最高；无论心电图有无病理性 Q 波，GPBB 均升高。表一反应了 AMI 不同时间内各指标的浓度变化。

2、避免了目前市场上的同类产品只能单独检测血液中的某个心梗指标的缺点。

3、检测快速：检测时间 5—15 分钟，能够满足现场检测的需要。

4、携带方便、操作简便：本发明改变了对 AMI 筛选和诊断必须由专业人员或专用仪器才能进行检测的局限性。样本可为全血、血清或血浆，即可直接用指血检测，操作

简单快速。

5、本发明制备工艺简单，成本低；检测试纸板在常温下即可保存，无需特殊设备和仪器。保存期可达两年。

AMI 不同时间内各指标的浓度变化（表一）

AMI 指标		发病后达诊断水平时间(h)	达峰值时间(h)	恢复到正常水平时间(h)	分布
新三联	糖原磷酸化酶 BB (GPBB)	1~4	6	24~48	心肌
	脂肪酸结合蛋白 (FABP)	0.5~2	4-10	12~24	心肌、骨骼肌
	血栓前体蛋白 (TpP)	1~3	6	12~24	还见于栓塞疾病，如深部静脉栓塞、肺梗塞和脑血管意外等
心三联	肌酸磷酸激酶同工酶 (CK-MB)	3~8	9~36	72~96	心肌、骨骼肌
	肌钙蛋白 (cTnT)	3~6	10~24	240~360	肾功能衰竭、肺部疾病、骨骼肌损伤时也升高
	肌红蛋白	0.5~2	5~12	18~30	心肌、骨骼肌

#### 附图说明

下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

图 1：AMI 早期诊断三合一检测试剂板平面结构区域图。

图 2：AMI 早期诊断三合一检测试剂板纵切面结构图。

图 3：AMI 早期诊断三合一检测试剂板中免疫层析膜平面图。

图中：1、样品吸收区；2、金标单抗区；3、固相化抗体区；4、吸水区；5、底板和一层 PVC 片材；6、免疫层析膜，6a 为固相化抗 GPBB 单抗、6b 为固相化抗 h-FABP 单抗、6c 为固相化抗 TpP 单抗、6d 为固相化羊抗鼠 IgG 抗体；7、金标单抗复合物的聚酯膜，7a 为金标 GPBB 单抗复合物、7b 为金标 h-FABP 单抗复合物、7c 为金标 TpP 单抗复合物；8、样品吸收区，8a 为一层玻璃纤维纸、8b 为一层滤膜；9、一层滤纸组成的吸水区。

#### 具体实施方式：

##### 实施例一

AMI 早期诊断三合一检测试剂板的生产方法：

1、GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体对的制备

用纯化的 GPBB、h-FABP 和 TpP 作为抗原分别免疫 BALB/c 小鼠，间隔 21 天免疫第二次，以后每间隔 10 天免疫一次，共免疫 3-4 次，然后取出免疫小鼠的脾脏细胞，用

PEG 将该脾脏细胞与小鼠的骨髓瘤细胞系 F/0 进行融合, 利用 HAT 选择性培养基在 96 孔细胞培养板上筛选杂交瘤细胞, 用 ELISA 方法鉴定分别抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的细胞株, 进行三次克隆化后得到稳定分泌高特异性单克隆抗体的细胞株, 在相同抗原包被板上采用 ELISA 抑制法, 即参照组中加入细胞培养上清, 在抑制组加入细胞培养上清和抗原混合物, 比较两组 OD 值差异从而筛选出高亲和力的亚克隆。然后在间接 ELISA 实验上进行相加法表位分析, 即参照组中分别加入两个单株细胞培养上清, 测定组中同时加入两株细胞培养上清, 比较两组 OD 值 ( $A_1$ 、 $A_2$  和  $A_{1+2}$ ), 通过下面公式计算:

$$AI = \left[ \frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right] \times 100\%$$

在比较计算结果的基础上进行表位分析和亲和力的测定, AI 值小于 50% 为相加阴性, 即两细胞株分泌的抗体识别抗原的表位相同, AI 值大于 50% 为相加阳性, 表示两细胞株之间无竞争, 即两细胞株分泌的抗体识别抗原的两个不同的表位, 从而初步得到针对抗原不同表位的单抗细胞株。进一步将得到的单抗细胞株分别注射入小鼠腹腔进行腹水生产, 利用 Protein A-Sepharose 亲和层析柱纯化腹水得到多量单克隆抗体, 用 HRP 酶对纯化的抗体进行单株标记, 用 ELISA 直接法进行标记抗体的工作浓度滴定, 然后用 ELISA 竞争抑制法在参照组中加入酶标抗体, 在测定组中加入酶标抗体和未标记待测抗体混合物, 比较两组 OD 值, 参照组 OD 值大于测定组 OD 值的表示存在竞争抑制, 视为两抗体识别抗原的表位相同。反之, 两抗体不存在竞争抑制时视为两抗体识别抗原的表位不同, 从而最终筛选得到高效亲和力的三明治抗体对。

## 2、胶体金标记抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体的方法

分别取半径为 40nm 的胶体金及相应的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 的单克隆抗体, 在 pH8.2 的条件下通过磁力搅拌振荡使其结合, 加 3% BSA 作为稳定剂, BSA 为牛血清白蛋白。采用高速离心法除去未结合的单克隆抗体和未稳定的胶体金颗粒及其凝集物, 在离心管底部的深红色沉淀即为胶体金-单克隆抗体复合物。

## 3、将金标复合物喷涂于聚酯膜上

用聚乙二醇洗涤胶体金-单克隆抗体复合物, 离心除去上清液, 得到深红色沉淀, 纯化后的沉淀用缓冲液溶解, 用喷涂设备涂于聚酯膜上, 烘干。

## 4、免疫层析膜的包被

用纯化的抗 GPBB、h-FABP 和 TpP 单克隆抗体对中的另一单抗溶液和羊抗鼠 IgG 抗体溶液用喷涂设备于硝酸纤维素膜上划线, 线的长度为 3mm, 每条线在 3mm 宽的硝酸纤维素膜上的滴加量为 5-7ng。四种抗体由下至上分别为 GPBB、h-FABP、TpP 和羊抗鼠

IgG 抗体，每条线间隔 3mm。包被好的免疫层析膜用 3%BSA 溶液进行封闭。

#### 5、试剂板装备

塑料聚乙烯板作为支撑载体，上面粘有一层聚氯乙烯片材作为衬膜，由下至上由一层滤膜和一层玻璃纤维组成的样品吸收区，其次是三层吸附了胶体金—单抗复合物的聚酯膜。然后是硝酸纤维膜，最上一层是吸水层，由一层滤纸组成，外面用特制胶带包封。

#### 实施例二

AMI 早期诊断三合一检测试剂板的使用方法：

##### 1、对全血的检测

用滴管取指血 100ul 滴入检测板的孔中，5—15 分钟观察结果。出现两条或多条带时为阳性。只有一条带时为阴性。一条带都无时表示检测板失效。

##### 2、对血清、血浆的检测

用滴管取离心好的血清、血浆 100ul 垂直滴入检测板的孔中，5—15 分钟观察结果。出现两条或多条带时为阳性。只有一条带时为阴性。一条带都无时表示检测板失效。

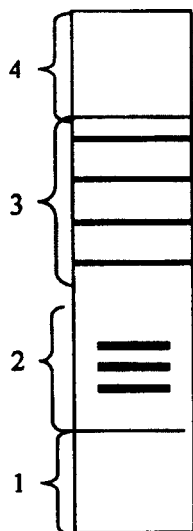


图 1

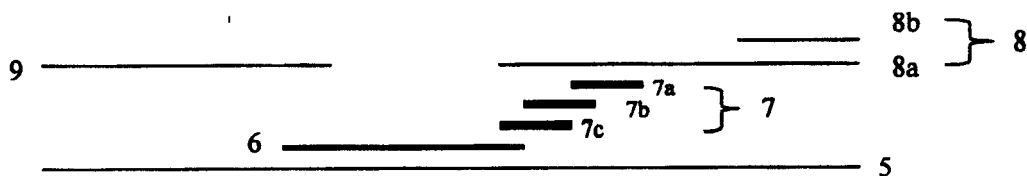


图 2

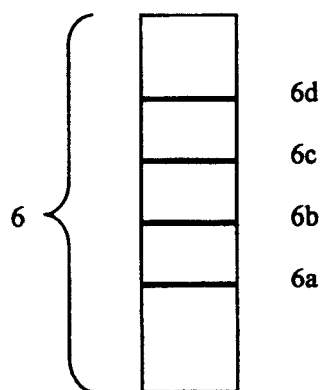


图 3

专利名称(译)	急性心肌梗死早期诊断三合一检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN100422742C</a>	公开(公告)日	2008-10-01
申请号	CN200510018714.6	申请日	2005-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾博(武汉)生物技术有限公司		
[标]发明人	钱金红 廖园园		
发明人	钱金红 廖园园		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531 G01N21/31		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1866017A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种急性心肌梗死(AMI)早期诊断三合一检测试剂盒,属于早期诊断急性心肌梗死的技术领域。本发明利用糖原磷酸化酶BB同工酶(GPBB)、心脏型脂肪酸结合蛋白(h-FABP)和血栓前体蛋白(TpP)作为AMI早期诊断的生化指标,在一步法检测条或检测板上分别固定胶体金标记的三种针对不同抗原的抗体以及固相化的三种未标记的抗体,以达到一次性检测三种心梗指标的目的。本发明提供的试剂盒简便、快速,不需仪器设备,仅用肉眼即可判读结果,适合在任何场所检测,且每份试剂均为单独包装,可存放于室温下,便于保存。本发明检测灵敏度高,特异性强,能够在AMI发病早期即开始检测,适合AMI早期筛选和诊断。

AMI 指标	发病后达诊断水平时间(h)	达峰值时间(h)	恢复到正常水平时间(h)	分布	
新三联	糖原磷酸化酶BB (GPBB)	1~4	6	24~48	心肌
	脂肪酸结合蛋白 (FABP)	0.5~2	4~10	12~24	心肌、骨骼肌
	血栓前体蛋白 (TpP)	1~3	6	12~24	还见于栓塞疾病,如深部静脉栓塞、肺梗塞和脑血管意外等
心三联	肌酸磷酸激酶同工酶 (CK-MB)	3~8	9~36	72~96	心肌、骨骼肌
	肌钙蛋白 (cTnT)	3~6	10~24	240~360	肾功能衰竭、肺部疾病、骨骼肌损伤时也升高
	肌红蛋白	0.5~2	5~12	18~30	心肌、骨骼肌