



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398563 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810134340.1

(22)申请日 2018.02.09

(71)申请人 广州源起健康科技有限公司

地址 510530 广东省广州市广州高新技术  
产业开发区瑞泰路2号

(72)发明人 李根平

(74)专利代理机构 广州市深研专利事务所  
44229

代理人 姜若天

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

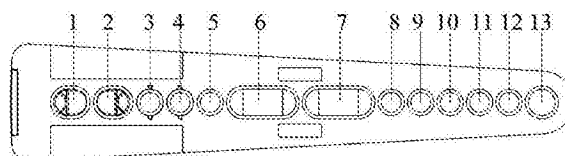
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

### (54)发明名称

一种双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒

### (57)摘要

本发明公开了一种双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,包括包被cTnI单克隆抗体的免疫磁珠、包被H-FABP单克隆抗体的免疫磁珠、cTnI和H-FABP的校准品溶液、钕标记的cTnI单克隆抗体溶液和钐标记的H-FABP单克隆抗体溶液、清洗液和增强液。所述的包被cTnI和H-FABP免疫磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μm的超顺磁珠分别与cTnI、H-FABP的抗体共价偶联物。本发明的灵敏度高,cTnI的灵敏度为0.05ng/mL,H-FABP的灵敏度为1ng/mL,血清(浆)样本不需要稀释;检测时间短,30min出报告;样品需求量少,一次上样只需100 μL;配套全自动时间分辨免疫分析仪,操作简单,节省人力。



1. 一种双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于包括:包被cTnI单克隆抗体的免疫磁珠、包被H-FABP单克隆抗体的免疫磁珠、cTnI和H-FABP的校准品溶液、铕标记的cTnI单克隆抗体溶液和钐标记的H-FABP单克隆抗体溶液、清洗液和增强液。

2. 如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述的包被cTnI和H-FABP免疫磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 $\mu$ m的超顺磁珠分别与cTnI、H-FABP的抗体共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

3. 如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述包被cTnI单克隆抗体的免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入20mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和20mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入单克隆抗体,室温持续旋转孵育3~5小时;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5%BSA 0.1M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60分钟;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。

4. 如权利要求3所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述的保存液为含5%(w/v) BSA,10% (w/v)海藻糖,0.1%(v/v)Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

5. 如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述包被H-FABP单克隆抗体的免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1mL 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入1mL 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和30mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入单克隆抗体,室温持续旋转孵育5~8小时;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。

6. 如权利要求5所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述的保存液为含8%(w/v) BSA,5% (w/v)蔗糖,0.5%(v/v)Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

7. 如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述的铕标记的cTnI单克隆抗体溶液中,cTnI抗体与Eu<sup>3+</sup>的质量比为5:1;所述的钐标记的H-FABP单克隆抗体溶液中,H-FABP抗体与Sm<sup>3+</sup>的质量比为2:1。

8. 如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,

其特征在于,所述清洗液的配方为:0.8~1.5% Tween-20,0.02%Proclin300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-Hcl缓冲液;

所述增强液的配方为:0.03%乙酸钠、0.0002~0.0009%β-NTA、0.0024% TOPO 、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

9.如权利要求1所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,其特征在于,所述cTnI校准品的制备方法为:用含1.5% Tween-20,0.02%Proclin300,pH 7.5 0.02M Tris-Hcl缓冲液将cTnI抗原稀释至0、0.05、0.1、0.5、1、5、25、50ng/ml;

所述H-FABP校准品的制备方法为:用含0.02%Proclin300,pH 7.5 0.02M PBS缓冲液将H-FABP抗原稀释0、1、5、10、50、100、180ng/ml。

## 一种双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外试剂检测技术领域,具体地说,本发明涉及一种双标记时间分辨荧光免疫磁微粒定量检测cTnI和H-FABP试剂盒。

### 背景技术

[0002] 急性心梗(acute myocardial infarction,AMI)近年来在世界范围内发病持续升高,而对AMI的治疗,再灌注治疗的效果与时间呈显著负相关,早期发现AMI对及时、正确治疗非常关键。目前常用诊断AMI的生化指标有肌红蛋白(myoglobin,MYO)、肌钙蛋白(troponin I,cTnI或troponin T,cTnT)和肌酸激酶同工酶(creatine kinase,CK-MB)。这些指标对早期诊断AMI的灵敏度或特异性都存在一定的缺陷,MYO半衰期短,峰值到达早,但是特异性差容易受到干扰,得到假阳性的检查结果;CK-MB特异性比较好,但是半衰期相对MYO长,需要更长的时间才能反馈病情,延迟医生的诊断和治疗。cTnI是目前诊断心肌梗死的金标准,但cTnI在心肌受损时释放入血的时间晚,一般也要发病6h后才具备诊断价值。对于AMI患者来讲,时间就是生命,为了实现对胸痛患者的早期识别并进行危险分层,我们需要更快提供准确结果的检测仪器以及更快的心肌损伤早期诊断标志物。

[0003] 心脏型脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid-binding protein,H-FABP)是一种新型的心肌标志物,也是目前国内外研究较多的早期诊断AMI敏感高、特异性高的生化指标。在心肌细胞损伤后,H-FABP可先于心肌肌钙蛋白,迅速被释放进入血液循环。最早在AMI发病后30分钟后,血浆中H-FABP就可被检测到。因此,联合检测H-FABP、cTnI,使H-FABP、cTnI诊断的时间窗口期互补,弥补单项检测的不足,将大大提高AMI诊断率,在AMI早期诊断、疗效观察和预后判断中发挥越来越重要的作用。

[0004] 为此,本发明将双标记时间分辨荧光免疫分析技术与磁微粒相结合,提供了一种基于磁微粒的双标记时间分辨荧光免疫分析试剂盒及其制备方法和检测方法,不仅能够同时检测样品中的H-FABP和cTnI含量,而且还保证检测结果更加准确可靠,具有更高的检测灵敏度和特异性,并达到了较佳的性能参数。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种成本低廉、操作简单、准确、灵敏的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0007] 一种双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒,包括:包被cTnI单克隆抗体的免疫磁珠、包被H-FABP单克隆抗体的免疫磁珠、cTnI和H-FABP的校准品溶液、钕标记的cTnI单克隆抗体溶液和钐标记的H-FABP单克隆抗体溶液、清洗液和增强液。

[0008] 在上述双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒中,所述的包被cTnI和H-FABP免疫磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 $\mu$ m的超顺磁珠分别与cTnI、H-FABP

的抗体共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种。

[0009] 在上述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒中,所述免疫磁珠的制备方法为直径1~3 $\mu$ m的活化的磁微粒与所述对应单克隆抗体经洗涤、活化、偶联、封闭制备得到。

[0010] 所述cTnI免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入20mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和20mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入单克隆抗体,室温持续旋转孵育3~5小时,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5% BSA 0.1M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60分钟;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。所述的保存液为含5% (w/v) BSA,10% (w/v) 海藻糖,0.1% (v/v) Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0011] 所述H-FABP免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1mL 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入1mL 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和30mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入单克隆抗体,室温持续旋转孵育5~8小时,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5% BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。所述的保存液为含8% (w/v) BSA,5% (w/v) 蔗糖,0.5% (v/v) Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0012] 在所述的钕标记cTnI抗体的制备方法中:cTnI抗体与Eu<sup>3+</sup>的质量比为5:1。

[0013] 在所述的钐标记H-FABP抗体的制备方法中:H-FABP抗体与Sm<sup>3+</sup>的质量比为2:1。

[0014] 所述清洗液的配方为:0.8~1.5% Tween-20,0.02% Proclin300,pH 7.2~7.50.05M Tris-HCl缓冲液。

[0015] 所述增强液的配方为:0.03% 乙酸钠、0.0002~0.0009%  $\beta$ -NTA、0.0024% TOPO、0.08% 醋酸、0.1% 无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

[0016] 所述cTnI校准品的制备方法为:用含1.5% Tween-20,0.02% Proclin300,pH7.5 0.02M Tris-HCl缓冲液将cTnI抗原稀释至0、0.05、0.1、0.5、1、5、25、50ng/mL。

[0017] 所述H-FABP校准品的制备方法为:用含0.02% Proclin300,pH 7.5 0.02M PBS缓冲液将H-FABP抗原稀释0、1、5、10、50、100、180ng/mL。

[0018] 所述荧光物质的激发波长为300~350nm,发射波长为500~650nm。

[0019] 本发明所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒的检测原理为夹心法,试剂条的反应孔中预装有cTnI和H-FABP免疫磁珠,测试时,先将待测样本

(血清或血浆)或者校准品加到试剂的反应孔中,再加入铈标cTnI抗体和钐标H-FABP抗体,振荡孵育20min,形成免疫磁珠-抗原-铈标/钐标抗体复合物。洗涤后,再加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被免疫荧光检测仪识别,样本中被测物越多,产生的荧光信号强度越强。将cTnI和H-FABP浓度与荧光信号值拟合剂量-反应曲线,即可按此测值得到未知样本中cTnI和H-FABP的浓度。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0021] (1) 采用磁分离技术,形成的免疫复合物在外加磁场中直接沉淀,不需离心即可以将免疫复合物与未结合物质分离。因磁珠具有更大的结合面积与能在液相中分散而充分反应,大大提高检测范围,缩短反应时间,提高灵敏度。由于磁珠与抗原或抗体为共价偶联,克服了物理吸附的不稳定性,因此免疫磁珠保存时间久且更稳定。

[0022] (2) 采用时间分辨荧光免疫分析技术,采用镧系螯合物铈、铽、钐、镱作为标记物,其具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱,有利于降低本底,提高灵敏度;紫外光激发具有较高量子产率、较大Stokes位移,避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合,荧光衰变时间长等优点,比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0023] (3) 配套全自动检测仪器,实现自动化操作,可同时检测一份或多份样本中cTnI和H-FABP含量,样本用量少,操作简便快速(30分钟即可出结果)、为早期诊断AMI提供重要依据,为病人节约了宝贵的时间。

## 附图说明

[0024] 图1是双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条的结构俯视示意图。

[0025] 图2是双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒利用试剂条进行检测,试剂条的结构示意图。

[0026] 1、测试孔1,2、测试孔2,3、荧光标记物1,4、荧光标记物2,6、洗液,7、洗液,8、样本稀释液1,9、样本稀释液2,12、增强液,5、10、11、13均为预备孔。

## 具体实施方式

[0027] 本发明所述的cTnI和H-FABP包被磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 $\mu$ m的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠有羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠等其中的一种或几种。

[0028] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0029] 实施例1

[0030] 在该实施例中,双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒由试剂条和cTnI、H-FABP校准品组成。

[0031] 其中,试剂条由测试孔1(cTnI单克隆抗体包被羧基磁珠、H-FABP单克隆抗体包被羧基磁珠)、第3孔(铈标cTnI单克隆抗体、钐标H-FABP单克隆抗体)、清洗液孔6与7、增强液孔12组成,如图1和图2所示。

[0032] 该双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒的制备过程如下,

其中

[0033] (1) cTnI免疫磁珠的制备方法:

[0034] ①洗涤磁珠

[0035] 吸取1mg直径1 $\mu$ m羧基磁珠到1.5ml离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1ml 0.1M pH6.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)洗涤磁珠3~5次。

[0036] ②磁珠活化

[0037] 向上述洗涤好的磁珠中加入1ml 0.1M pH6.0的MES,加入20 $\mu$ L 20mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液(EDC)和20 $\mu$ L 20mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温震荡反应0.5~1小时。

[0038] ③cTnI抗体与磁珠的偶联

[0039] 上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入0.05~1mg cTnI单克隆抗体,室温持续旋转孵育3~5小时,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度。

[0040] ④封闭

[0041] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入含有5%BSA 0.1M pH8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联cTnI单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60min。

[0042] ⑤储存

[0043] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入500 $\mu$ L免疫磁珠保存液。

[0044] 所述的保存液为含5% (w/v) BSA,10% (w/v) 海藻糖,0.1% (v/v) Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0045] 将上述制备好的免疫磁珠稀释,使cTnI单克隆抗体的终浓度为0.0025~0.0100g/L,分装至试剂条第1孔(测试孔1)中。

[0046] (2) H-FABP免疫磁珠的制备方法:

[0047] ①洗涤磁珠

[0048] 吸取1mg直径3 $\mu$ m羧基磁珠到1.5ml离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1ml 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)洗涤磁珠3~5次。

[0049] ②磁珠活化

[0050] 向上述洗涤好的磁珠中加入1ml 0.1M pH5.0的MES,加入20 $\mu$ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液(EDC)和20 $\mu$ L 30mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温震荡反应0.5~1小时。

[0051] ③H-FABP单克隆抗体与磁珠的偶联

[0052] 上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入0.05~1mg H-FABP单克隆抗体,室温持续旋转孵育5~8小时,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度。

[0053] ④封闭

[0054] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入含有5%BSA 0.05M pH8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联H-FABP单克隆抗体的活化羧基位点,反应30~60min。

[0055] ⑤储存

[0056] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入200 $\mu$ L免疫磁珠保存液。

[0057] 所述的保存液为含8% (w/v) BSA,5% (w/v) 蔗糖,0.5% (v/v) Tween-20的0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0058] 将上述制备好的免疫磁珠稀释,使H-FABP单克隆抗体的终浓度为0.0080~0.0200g/L,分装至试剂条第1孔(测试孔1)中。

[0059] (3) 铕标记cTnI抗体制备方法:

[0060] ①铕标cTnI单抗的制备

[0061] (1) 取出1mg cTnI单克隆抗体置于30KD超滤离心管,10000rpm离心10min,弃去滤液。

[0062] (2) 加入标记缓冲液(0.05M pH9.0碳酸盐缓冲液) 200 $\mu$ L,10000rpm离心10min,弃去滤液。重复此操作4~5次。

[0063] (3) 将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。加入200 $\mu$ L标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的SA。

[0064] (4) 按照质量比cTnI单克隆抗体:铕螯合物DTTA-Eu=5:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应16~24小时。

[0065] ②铕标cTnI单抗的纯化

[0066] 用SepHdex<sup>TM</sup> G-75凝胶柱纯化铕标cTnI单抗,然后加入铕标cTnI单抗保存剂(15% (w/v) BSA+5% (w/v) Proclin300),使BSA和Proclin300终浓度为0.3%,经0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0067] 将上述制备好的铕标cTnI单抗稀释,使cTnI单抗的终浓度为0.005~0.010g/L,分装至试剂条第3孔中。

[0068] 所述的荧光物质铕的激发波长为340nm,发射波长为615nm。

[0069] (4) 钐标记H-FABP抗体制备方法:

[0070] ①钐标H-FABP单抗的制备

[0071] (1) 取出1mg H-FABP单抗置于30KD超滤离心管,10000rpm离心10min,弃去滤液。

[0072] (2) 加入标记缓冲液(0.05M pH9.0碳酸盐缓冲液) 200 $\mu$ L,10000rpm离心10min,弃去滤液。重复此操作4~5次。

[0073] (3) 将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的抗体。加入200 $\mu$ L标记缓冲液,静置3~5min,再将离心管滤膜反转,3000rpm离心6min,收集浓缩的SA。

[0074] (4) 按照质量比H-FABP单抗:钐螯合物DTTA-Sm=2:1的比例充分混匀,放入旋转培养器,室温反应20~24小时。

[0075] ②钐标H-FABP单抗的纯化

[0076] 用SepHdex<sup>TM</sup> G-75凝胶柱纯化钐标H-FABP单抗,然后加入钐标H-FABP单抗保存剂(10% (w/v) BSA+3% (w/v) Proclin300),使BSA和Proclin300终浓度为0.5%,经0.22 $\mu$ m滤膜过滤,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0077] 将上述制备好的钐标H-FABP单抗稀释,使H-FABP单抗的终浓度为0.010~0.030g/L,分装至试剂条第4孔中。

[0078] 所述的荧光物质钐的激发波长为340nm,发射波长为642nm。

[0079] (5) 洗液的制备方法:

[0080] 配制含有0.8~1.5%Tween-20,0.02%Proclin300,pH 7.2~7.5 0.05M Tris-Hcl缓冲液,将配制好的溶液以每孔2000μL分装至洗液孔6和7中。

[0081] (6) 增强液的制备方法:

[0082] 配制含有0.03%乙酸钠、0.0002~0.0009%β-NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。将配制好的溶液以每孔400μL分装至试剂条第12孔(增强液孔)。

[0083] (7) 校准品制备方法:

[0084] 所述cTnI校准品的制备方法为:用含1.5%Tween-20,0.02%Proclin300,pH7.5 0.02M Tris-Hcl缓冲液将cTnI抗原稀释至0、0.05、0.1、0.5、1、5、25、50ng/ml。

[0085] 所述H-FABP校准品的制备方法为:用含0.02%Proclin300,pH 7.5 0.02M PBS缓冲液将H-FABP抗原稀释0、1、5、10、50、100、180ng/ml。

[0086] 实施例2试剂条的制作与检测

[0087] 本实施例中的试剂条,半成品通过以下工序组装而成:在第1、3、6、7、12分别分装50μLcTnI免疫磁珠和50μLH-FABP免疫磁珠、100μL钨标cTnI抗体和100μL钐标H-FABP抗体、2000μL清洗液、2000μL清洗液、400μL增强液,然后用封膜机封口,所述的封板膜上涂有可供全自动荧光检测分析仪扫描识别的产品信息标识包括企业标准曲线、批次、生产日期、有效期。成品试剂条、分装好的cTnI校准品和H-FABP校准品与其他配件组装成试剂盒。

[0088] 样本检测:

[0089] ①加样:

[0090] 将待测样本或者校准品放入全自动仪器的装载系统,将试剂条插入试剂条卡槽,仪器自动识别封板膜的产品信息。在试剂条测试孔1中加入100μL待测样本,然后加入50μL钨标cTnI抗体和50μL钐标H-FABP抗体。

[0091] ②孵育:

[0092] 加样完成后37℃震荡孵育20min。

[0093] ③洗涤:

[0094] 孵育完成后,仪器自动洗孔5次,每次洗液200μL/孔。

[0095] ④加入增强液:

[0096] 洗涤完成后,加入增强液100μL/孔,37℃孵育3min。

[0097] ⑤检测:

[0098] 试剂条被推入暗室,仪器自动检测并出结果。

[0099] 用来测试试剂条的全自动磁珠时间分辨荧光免疫分析仪包含样本装载系统、条码读取系统、加样系统、温育系统、荧光光源检测系统及自动软件分析控制系统。

[0100] 本发明所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP和试剂盒,检测样本时只需将试剂条插入全自动仪器中,仪器自动完成加样、孵育、磁分离、检测过程,全程只需要30min即可以读取检测报告。

[0101] 实施例3与市售试剂盒的比较

[0102] 分别采用市售的高敏肌钙蛋白-I测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)(雅培贸易有限公司)和心脏型脂肪酸结合蛋白定量检测试剂盒(时间分辨免疫荧光分析法)(苏州新波生物技术有限公司)与实施例1中的方法检测样品(所述样品中cTnI浓度范围为0.05

~50ng/mL, H-FABP浓度范围为1~180ng/mL) 重复三次, 验证本发明的试剂盒的检测结果正确性, 结果见下表1。

[0103] 表1样本检测结果

| cTnI   | 低值样本   |       | 中值样本   |        | 高值样本   |        |
|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
|        | 雅培试剂   | 本试剂   | 雅培试剂   | 本试剂    | 雅培试剂   | 本试剂    |
| 1      | 0.264  | 0.251 | 1.023  | 1.215  | 20.002 | 21.003 |
| 2      | 0.256  | 0.271 | 1.584  | 1.483  | 19.006 | 20.189 |
| 3      | 0.285  | 0.276 | 1.256  | 1.318  | 19.786 | 21.214 |
| 均值     | 0.268  | 0.266 | 1.288  | 1.339  | 19.598 | 20.802 |
| 偏差     | -0.87% |       | 3.96%  |        | 6.14%  |        |
| H-FABP | 低值样本   |       | 中值样本   |        | 高值样本   |        |
|        | 苏州新波试剂 | 本试剂   | 苏州新波试剂 | 本试剂    | 苏州新波试剂 | 本试剂    |
| 1      | 6.32   | 6.45  | 50.23  | 51.87  | 100.56 | 99.87  |
| 2      | 6.85   | 6.89  | 49.29  | 49.78  | 105.65 | 98.56  |
| 3      | 7.05   | 6.97  | 48.18  | 49.19  | 109.12 | 94.12  |
| 均值     | 6.74   | 6.77  | 49.233 | 50.280 | 105.11 | 97.52  |
| 偏差     | 0.45%  |       | 2.13%  |        | -7.22% |        |

[0106] 与市售试剂比较, 本试剂偏差均小于±10%, 本试剂的检测结果准确可靠。说明本发明所述的双标记磁珠时间分辨荧光免疫定量检测cTnI和H-FABP试剂盒, 具有如下优势: 1) 灵敏度高, cTnI的灵敏度为0.05ng/mL, H-FABP的灵敏度为1ng/mL, 血清(浆)样本不需要稀释; 2) 检测时间短, 30min出报告; 3) 样品需求量少, 一次上样只需100μL; 4) 配套全自动时间分辨免疫分析仪, 操作简单, 节省人力。

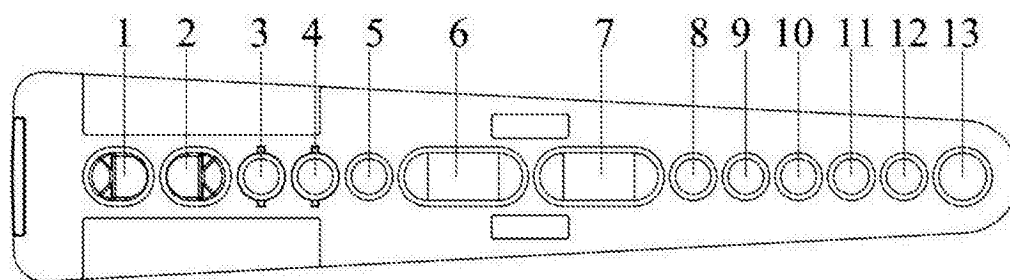


图1

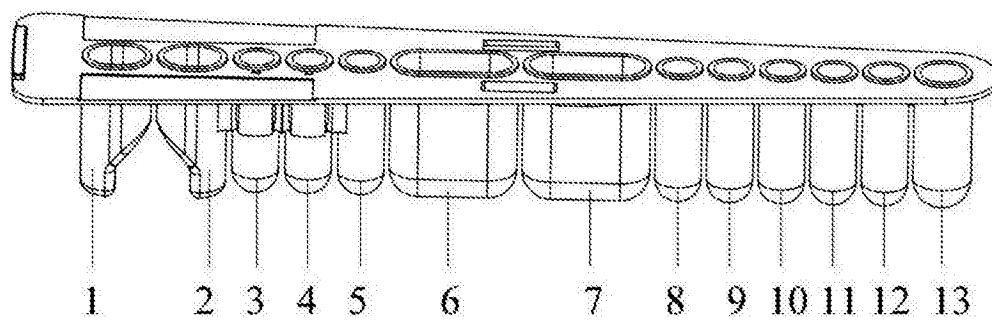


图2