



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106950381 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710169136.9

(22)申请日 2017.03.21

(71)申请人 中国人民解放军第四五八医院

地址 510602 广东省广州市越秀区东风东
路801号门诊三楼检验科

(72)发明人 郑凤娇 郑小玲

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代
理事务所 12201

代理人 陆艺

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

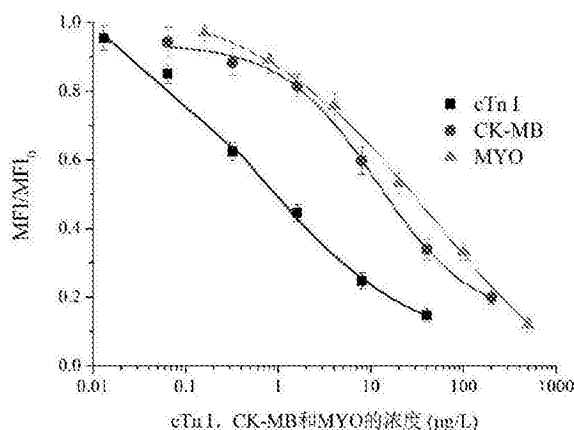
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的
试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;本发明的试剂盒建立了AMI生物标志物的高通量检测方法,可对cTn I、CK-MB和MYO同时进行快速检测,时间小于2h,适用于AMI的早期诊断、发现,提高对AMI的诊断率,并可在AMI早期筛查、病情监测、疗效观察与复发判断预测等各阶段都具有较高的临床检验应用价值。



1. 一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;

所述工作微球探针溶液用下述方法制成:

(1) 取编码为35,42和52号的羧基荧光编码微球分别置于三支的离心管中,用100μL pH 7.4的PBS重悬后,使所述羧基荧光编码微球的浓度为 1.25×10^7 个微球/mL,分别加入100μL pH 8.0 0.1mol/L的PBS,分别加入新鲜配制的10μL浓度为50mg/mL的EDC水溶液和10μL浓度为50mg/mL的S-NHS水溶液,室温下搅拌10-30min,使羧基荧光编码微球活化;

所述EDC为1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐的简称;

所述S-NHS为N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐的简称;

(2) 在装有活化后的35号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg cTn I;在装有活化后的42号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg CK-MB;在装有活化后的52号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg MYO;分别加pH 7.4的PBS使终体积到500μL,室温下以500-800rpm旋涡混匀2-4h,以12,000-16,000g离心3-6min,弃去上清液;分别加入100μL封闭缓冲液重悬并封闭交联微球保持20min;离心,弃上清,用pH 7.4的PBS清洗;

所述cTn I为肌钙蛋白的简写;CK-MB为肌酸激酶同工酶的简写;MYO为肌红蛋白的简写;

所述封闭缓冲液为:PBS中含有1wt%BSA,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4;

(3) 分别用150μL储备缓冲液重悬步骤(2)获得的微球,用血球计数器确定浓度,用储备缓冲液稀释到3000个/μL,分别得到偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液;

(4) 分别取偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液50μL,混合,得工作微球探针溶液,工作微球探针溶液中偶联有cTn I探针微球的浓度为1000个/μL,偶联有CK-MB探针微球的浓度为1000个/μL,偶联有MYO探针微球的浓度为1000个/μL,4℃储存;

所述储备缓冲液为PBS中含有0.1wt%BSA,0.02wt%吐温-20,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4。

2. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是所述人cTn I系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.013、0.064、0.32、1.6、8和40μg/L的溶液。

3. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是所述人CK-MB系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.064、0.32、1.6、8、40和200μg/L的溶液。

4. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是所述人MYO系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.16、0.8、4、20、100和500μg/L的溶液。

5. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液用下述方法制成:

(1) 取浓度为2mg/mL的cTn I单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的cTn I单抗溶液;

(2) 取浓度为1mg/mL的CK-MB单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的CK-MB单抗溶液;

(3) 取浓度为1mg/mL的MYO单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的MYO单抗溶液;

(4) 各取等体积步骤(1)、(2)和(3)获得的单抗溶液,混合,得到人cTn I单抗溶液浓度为50 μ g/mL,人CK-MB单抗溶液浓度为50 μ g/mL,人MYO单抗溶液浓度为50 μ g/mL的三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;4 $^{\circ}$ C储存。

6. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是所述100 \times 稀释的链霉亲和素藻红蛋白中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

7. 根据权利要求1所述的一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,其特征是所述200 \times 稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测生物标志物的试剂盒,特别是涉及一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒。

背景技术

[0002] 冠心病中主要导致患者死亡最重要的因素之一是急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction,AMI),是严重危害人类健康的心血管疾病^[1]。AMI是在冠状动脉病变基础上,发生冠状动脉血供急剧减少或中断,使得相应的心肌严重而持久地急性缺血导致而心肌短时间内坏死^[2]。因此,在AMI发病早期及时诊断并进行再灌注治疗能明显降低死亡率,改善预后。根据中华医学会心血管分会制定的诊断标准,至少应当满足缺血性胸痛等临床症状、动态心电图变化和心肌坏死标志物血清浓度动态改变这三项诊断标准中的2项,强调了实验室检查对于诊断AMI的重要性^[3]。

[0003] 在诊断AMI时,血清学诊断凭借其特异度及灵敏度占有重要位置,但单一的心脏标志物检测有时并不能在两方面达到理想的效果,因此临床上探讨采用多个标志物联合检测,互补不足,使诊断的特异度及灵敏度均达到较高水平,以达到准确诊断的目的。目前,诊断和排除AMI应用最多的生化指标是cTnI、CK-MB和MYO^[4],在发生AMI后,由于这三种物质释放到血液的时间和达到峰值的时间各不相同,因此可通过这三项指标的联合检测来达到互补,以提高AMI的快速诊断率^[5]。心肌标志物的检测方法主要有金标层析法、酶联免疫法、化学发光法和生物芯片法,但临床应用中发现各种方法之间差异很大^[6],各有所长。

[0004] 随着生物芯片技术的发展,高通量悬浮芯片技术逐渐兴起。它也被称为多功能多指标同步分析系统(flexible multiple-analyte profiling, xMAP[®])、多功能悬浮阵列(multi-analyte suspension arrays, MASA)或液体芯片(liquid chip)。2001年12月美国食品药品监督管理局(FDA)已批准将其用于临床进行自身免疫病、人类白细胞抗原分型的诊断,这是唯一被美国FDA批准用于临床诊断的生物芯片产品^[7]。

[0005] 目前,尚未有可同时对肌钙蛋白T I(cardiac troponin I, cTn I)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)和肌红蛋白(myoglobin, MYO)进行快速联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服现技术的不足,提供一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒。

[0007] 本发明的技术方案概述如下:

[0008] 一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;

[0009] 所述工作微球探针溶液用下述方法制成：

[0010] (1) 取编码为35,42和52号的羧基荧光编码微球分别置于三支的离心管中,用100 μ L pH 7.4的PBS重悬后,使所述羧基荧光编码微球的浓度为 1.25×10^7 个微球/mL,分别加入100 μ L pH 8.0 0.1mol/L的PBS,分别加入新鲜配制的10 μ L浓度为50mg/mL的EDC水溶液和10 μ L浓度为50mg/mL的S-NHS水溶液,室温下搅拌10-30min,使羧基荧光编码微球活化;

[0011] 所述EDC为1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的简称;

[0012] 所述S-NHS为N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐的简称;

[0013] (2) 在装有活化后的35号羧基荧光编码微球的离心管中加入10 μ g cTn I;在装有活化后的42号羧基荧光编码微球的离心管中加入10 μ g CK-MB;在装有活化后的52号羧基荧光编码微球的离心管中加入10 μ g MYO;分别加pH 7.4的PBS使终体积到500 μ L,室温下以500-800rpm旋涡混匀2-4h,以12,000-16,000g离心3-6min,弃去上清液;分别加入100 μ L封闭缓冲液重悬并封闭交联微球保持20min;离心,弃上清,用pH 7.4的PBS清洗;

[0014] 所述cTn I为肌钙蛋白的简写;CK-MB为肌酸激酶同工酶的简写;MYO为肌红蛋白的简写;

[0015] 所述封闭缓冲液为:PBS中含有1wt%BSA,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4;

[0016] (3) 分别用150 μ L储备缓冲液重悬步骤(2)获得的微球,用血球计数器确定浓度,用储备缓冲液稀释到3000个/ μ L,分别得到偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液;

[0017] (4) 分别取偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液50 μ L,混合,得工作微球探针溶液,工作微球探针溶液中偶联有cTn I探针微球的浓度为1000个/ μ L,偶联有CK-MB探针微球的浓度为1000个/ μ L,偶联有MYO探针微球的浓度为1000个/ μ L,4 $^{\circ}$ C储存;

[0018] 所述储备缓冲液为PBS中含有0.1wt%BSA,0.02wt%吐温-20,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4。

[0019] 优选地,人cTn I系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.013、0.064、0.32、1.6、8和40 μ g/L的溶液。

[0020] 优选地,人CK-MB系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.064、0.32、1.6、8、40和200 μ g/L的溶液。

[0021] 优选地,人MYO系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.16、0.8、4、20、100和500 μ g/L的溶液。

[0022] 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液用下述方法制成:

[0023] (1) 取浓度为2mg/mL的cTn I单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的cTn I单抗溶液;

[0024] (2) 取浓度为1mg/mL的CK-MB单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的CK-MB单抗溶液;

[0025] (3) 取浓度为1mg/mL的MYO单抗原液100 μ L,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150 μ g/mL的MYO单抗溶液;

[0026] (4) 各取等体积步骤(1)、(2)和(3)获得的单抗溶液,混合,得到人cTn I单抗溶液浓度为50 μ g/mL,人CK-MB单抗溶液浓度为50 μ g/mL,人MYO单抗溶液浓度为50 μ g/mL的三联急

性心肌梗死生物标志物单抗溶液;4℃储存。

[0027] 优选地,100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0028] 优选地,200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0029] 本发明的试剂盒建立了AMI生物标志物的高通量检测,可对cTn I、CK-MB和MYO同时进行快速检测,时间小于2h,适用于AMI的早期诊断、发现,提高对AMI的诊断率,并可在AMI早期筛查、病情监测、疗效观察与复发判断预测等各阶段都具有较高的临床检验应用价值。

附图说明

[0030] 图1为悬浮芯片检测三种AMI标志物标准曲线方程图。

具体实施方式

[0031] 人cTn I标准品(Fitzgerald Biotech公司,货号:30R-AT033,100μg,5mg/mL溶于150mM NaCl,5mM CaCl₂,20mM Tris,pH 7.5的缓冲液,来源:人类心肌)。

[0032] 人CK-MB标准品(Fitzgerald Biotech公司,货号:30-1082,250μg,纯度>90%,5mg/mL溶于50%甘油、Tris缓冲液,pH 6.3-7.2,来源:人类心肌)。

[0033] 人MYO标准品(Fitzgerald Biotech公司,货号:30-1005,1mg,纯度>95%,2mg/mL溶于50%甘油、150mM NaCl、10mM磷酸钠、0.05%叠氮化钠,pH值7的缓冲液,来源:人类心肌)

[0034] 链霉亲和素藻红蛋白(Life Science公司,货号:S866,1mg/mL,纯度>99%)

[0035] 生物素化鼠抗人二抗IgG(武汉博士德公司,货号:BM2001,生物素标记抗体含1mg左右亲和纯化特异性抗体,1:20的生物素标记,0.01M PBS,1%BSA,0.01%硫柳汞)

[0036] 人cTn I单克隆抗体(Fitzgerald Biotech公司,货号:10R-T123M,1mg,2mg/mL溶于PBS、0.1%NaN₃缓冲液,pH 7.5,来源:小鼠P45-10IgG 1)。

[0037] CK-MB单克隆抗体(Fitzgerald Biotech公司,货号:10R-3127-AF,1mg,1mg/mL溶于PBS缓冲液,pH 7.3,来源:小鼠M120222IgG 1κ)。

[0038] MYO单克隆抗体(Fitzgerald Biotech公司,货号:10-M50C,1mg,1mg/mL溶于PBS、0.1%NaN₃缓冲液,pH 7.5,来源:小鼠IgG 1M0110519)。

[0039] 在各实施例中:

[0040] EDC为1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐的简称;

[0041] S-NHS为N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐的简称;

[0042] cTn I为肌钙蛋白的简写;CK-MB为肌酸激酶同工酶的简写;MYO为肌红蛋白的简写;

[0043] 封闭缓冲液为:PBS中含有1wt%BSA,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4;

[0044] 储备缓冲液为PBS中含有0.1wt%BSA,0.02wt%吐温-20,0.05wt%叠氮钠,pH 7.4。

[0045] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

[0046] 实施例1

[0047] 一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;

[0048] 所述工作微球探针溶液用下述方法制成:

[0049] (1) 取编码为35,42和52号的羧基荧光编码微球分别置于三支的离心管中,用100μL pH 7.4的PBS重悬后,使所述羧基荧光编码微球的浓度为 1.25×10^7 个微球/mL,分别加入100μL pH 8.0 0.1mol/L的PBS,分别加入新鲜配制的10μL浓度为50mg/mL的EDC水溶液和10μL浓度为50mg/mL的S-NHS水溶液,室温下搅拌20min,使羧基荧光编码微球活化;

[0050] (2) 在装有活化后的35号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg cTn I;在装有活化后的42号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg CK-MB;在装有活化后的52号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg MYO;分别加pH 7.4的PBS使终体积到500μL,室温下以700rpm旋涡混匀3h,以14,000g离心5min,弃去上清液;分别加入100μL封闭缓冲液重悬并封闭交联微球保持20min;离心,弃上清,用pH 7.4的PBS清洗;

[0051] (3) 分别用150μL储备缓冲液重悬步骤(2)获得的微球,用血球计数器确定浓度,用储备缓冲液稀释到3000个/μL,分别得到偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液;

[0052] (4) 分别取偶联有cTn I探针微球溶液、偶联有CK-MB探针微球溶液和偶联有MYO探针微球溶液50μL,混合,得工作微球探针溶液,工作微球探针溶液中偶联有cTn I探针微球的浓度为1000个/μL,偶联有CK-MB探针微球的浓度为1000个/μL,偶联有MYO探针微球的浓度为1000个/μL,4℃储存;

[0053] 人cTn I系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.013、0.064、0.32、1.6、8和40μg/L的溶液。

[0054] 人CK-MB系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.064、0.32、1.6、8、40和200μg/L的溶液。

[0055] 人MYO系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.16、0.8、4、20、100和500μg/L的溶液。

[0056] 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液用下述方法制成:

[0057] (1) 取浓度为2mg/mL的cTn I单抗原液100μL,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150μg/mL的cTn I单抗溶液;

[0058] (2) 取浓度为1mg/mL的CK-MB单抗原液100μL,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150μg/mL的CK-MB单抗溶液;

[0059] (3) 取浓度为1mg/mL的MYO单抗原液100μL,加pH=7.4的PBS缓冲液,配成浓度为150μg/mL的MYO单抗溶液;

[0060] (4) 各取567μL的步骤(1)、(2)和(3)获得的单抗溶液,混合,得到人cTn I单抗溶液浓度为50μg/mL,人CK-MB单抗溶液浓度为50μg/mL,人MYO单抗溶液浓度为50μg/mL的三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;4℃储存。

[0061] 100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0062] 200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0063] 实施例2

[0064] 一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;

[0065] 所述工作微球探针溶液用下述方法制成:

[0066] (1)除室温搅拌时间为10min外,其它同实施例1的工作微球探针溶液制备方法中的步骤(1);(2)在装有活化后的35号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg cTn I;在装有活化后的42号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg CK-MB;在装有活化后的52号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg MYO;分别加pH 7.4的PBS使终体积到500μL,室温下以500rpm旋涡混匀4h,以12,000g离心6min,弃去上清液;分别加入100μL封闭缓冲液重悬并封闭交联微球保持20min;离心,弃上清,用pH 7.4的PBS清洗;

[0067] (3)、(4)同实施例1的工作微球探针溶液制备方法中的步骤(3)、(4)。

[0068] 人cTn I系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.013、0.064、0.32、1.6、8和40μg/L的溶液。

[0069] 人CK-MB系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.064、0.32、1.6、8、40和200μg/L的溶液。

[0070] 人MYO系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.16、0.8、4、20、100和500μg/L的溶液。

[0071] 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液的制备同实施例1的三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液的制备。

[0072] 100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0073] 200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG中的稀释剂为pH=7.4的PBS缓冲液。

[0074] 实施例3

[0075] 一种联合检测急性心肌梗死生物标志物的试剂盒,包括:工作微球探针溶液、人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液;100×稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液和200×稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液;

[0076] 所述工作微球探针溶液用下述方法制成:

[0077] (1)除室温搅拌时间为30min外,其它同实施例1的工作微球探针溶液制备方法中步骤(1);(2)在装有活化后的35号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg cTn I;在装有活化后的42号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg CK-MB;在装有活化后的52号羧基荧光编码微球的离心管中加入10μg MYO;分别加pH 7.4的PBS使终体积到500μL,室温下以800rpm旋涡混匀2h,以16,000g离心3min,弃去上清液;分别加入100μL封闭缓冲液重悬并封闭交联微球保持20min;离心,弃上清,用pH 7.4的PBS清洗;

[0078] (3)、(4)同实施例1的工作微球探针溶液制备方法中的步骤(3)、(4)。

[0079] 人cTn I系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.013、0.064、0.32、1.6、8和40μg/L的溶液。

[0080] 人CK-MB系列梯度标准品溶液是用pH=7.4的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别

为0、0.064、0.32、1.6、8、40和200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的溶液。

[0081] 人MYO系列梯度标准品溶液是用 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液为溶剂,配制的浓度分别为0、0.16、0.8、4、20、100和500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的溶液。

[0082] 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液的制备同实施例1的三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液的制备。

[0083] 100 \times 稀释的链霉亲和素藻红蛋白中的稀释剂为 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液。

[0084] 200 \times 稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG中的稀释剂为 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液。

[0085] 实施例4

[0086] 检测实验(使用实施例1试剂盒)

[0087] (1)取试剂盒中人cTn I系列梯度标准品溶液、人CK-MB系列梯度标准品溶液、人MYO系列梯度标准品溶液,以10 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 分别加入96孔微滴定板的反应孔中,每孔分别加入10 μL 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液,再每孔再加入2 μL 工作微球探针溶液, $\text{pH}=7.4$ 的PBS补足50 μL 反应体系,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下,中速振荡1h。然后加入200 \times 稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG溶液50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,再次漩涡振荡器上37 $^{\circ}\text{C}$ 中速振荡1h。然后进行磁分离,再加入 $\text{pH}=7.4$ 的PBS,重复磁分离三次。最后加入100 \times 稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 中速振荡反应0.5h,用Luminex悬浮芯片检测系统进行测定,获得cTn I、CK-MB和MYO系列标准品溶液各个不同浓度的中位荧光强度值,由这些中位荧光强度值获得cTn I、CK-MB和MYO的检测标准曲线,见图1。

[0088] (2)对10例AMI住院患者和5例健康体检人员,抽取每名患者静脉血5mL,并编号,将血样以5000rpm/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10min,取上清后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测时各取10 μL 加入到96孔微滴定板的反应孔中;

[0089] (3)用移液器分别吸取 $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液28 μL ,对每孔加入的血清进行吹打混匀;

[0090] (4)用移液器分别于每孔加入10 μL 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液,再用移液器分别取工作微球探针溶液2 μL 加入到上述孔中,在漩涡振荡器上37 $^{\circ}\text{C}$ 中速振荡1h。反应后加入200 \times 稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,再次漩涡振荡器上37 $^{\circ}\text{C}$ 中速振荡1h。然后进行磁分离,PBS清洗三次,弃上清;

[0091] (5)加入100 \times 稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 中速振荡反应0.5h;

[0092] (6)悬浮芯片系统读取100个微球/孔,获得中位荧光强度值,代入获得的标准曲线中,计算10例AMI住院患者和5例健康体检人员血清中样品cTn I、CK-MB和MYO的检测值,具体检测结果如表1所示。从表1可以看出,针对10例AMI住院患者血清样品,检出cTn I、CK-MB和MYO值分别为 12.27 ± 3.47 、 19.83 ± 3.37 和 $547.74 \pm 121.22 \mu\text{g}/\text{L}$,全部超过阳性限值标准;对5例健康体检人员检测的三种AMI标志物分别为: 0.40 ± 0.05 、 2.88 ± 1.51 和 $23.37 \pm 9.51 \mu\text{g}/\text{L}$,未发现有超过阳性限值标准。经过配对t检验发现,AMI患者与健康体检人员血清样品cTn I、CK-MB和MYO检测值有显著性差异($P < 0.01$)。

[0093] 表1 10例AMI住院患者和5例健康体检人员血清cTn I、CK-MB和MYO检测值

[0094]

血清分类	编号	cTn I ($\mu\text{g/L}$)	CK-MB ($\mu\text{g/L}$)	MYO ($\mu\text{g/L}$)
住院患者 血清	1	11.86	25.79	629.37
	2	14.63	17.19	427.28
	3	18.24	20.60	591.73
	4	9.53	18.52	550.57
	5	10.25	23.74	663.45
	6	11.48	15.02	681.38
	7	16.74	17.36	446.04
	8	7.82	22.45	385.36
	9	13.49	20.28	407.67
	10	8.62	17.39	694.56
健康体检 人员血清	1	0.36	3.62	18.46
	2	0.49	3.62	14.83
	3	0.38	4.54	38.47
	4	0.37	1.67	26.72
	5	0.42	0.94	18.35

[0095] 实施例5

[0096] 检测实验(使用实施例1试剂盒)

[0097] (1) 抽取1名疑似患者静脉血5mL,将血样以5000rpm/min 4℃离心10min,取上清后置于-20℃保存。检测时取10 μL 加入到96孔微滴定板的反应孔中;

[0098] (2) 用移液器吸取pH=7.4的PBS缓冲液28 μL ,对该孔加入的血清进行吹打混匀;

[0099] (3) 用移液器在该孔加入10 μL 三联急性心肌梗死生物标志物单抗溶液,再用移液器取工作微球探针溶液2 μL 加入到该孔中,在漩涡振荡器上37℃中速振荡1h。反应后加入200 \times 稀释的生物素化鼠抗人二抗IgG 50 μL ,再次漩涡振荡器上37℃中速振荡1h。然后进行磁分离,PBS清洗三次,弃上清;

[0100] (4) 加入100 \times 稀释的链霉亲和素藻红蛋白溶液,50 μL ,37℃中速振荡反应0.5h;

[0101] (5) 悬浮芯片系统读取100个微球,获得中位荧光强度值,代入实施例4步骤(1)获得的标准曲线中,得到该疑似患者的cTn I、CK-MB和MYO值分别为:11.3,15.5和236.7 $\mu\text{g/L}$ 。获得检测值跟正常参考范围(cTn I、CK-MB和MYO的正常参考范围分别是0~0.5 $\mu\text{g/L}$,0~5.0 $\mu\text{g/L}$ 和0~80 $\mu\text{g/L}$)相比,可确认该患者是AMI患者。

[0102] 实验证明,实施例2和实施例3的试剂盒也可以用于检测急性心肌梗死生物标志物。

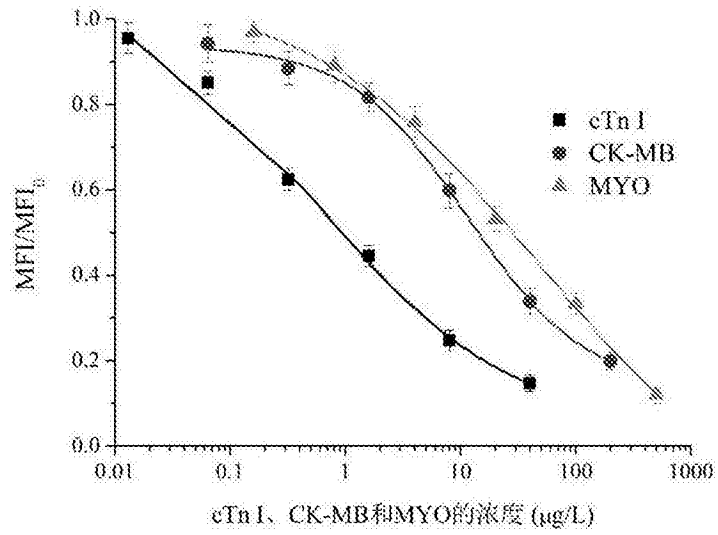


图1