



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105911298 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610359613.3

(22)申请日 2016.05.27

(71)申请人 安徽伊普诺康生物技术股份有限公司

地址 230000 安徽省合肥市包河工业区大连路与北京路交叉口西南角合肥华云印务有限公司综合东楼一至五层

(72)发明人 蔡晓辉 庄庆华 吴铮 徐运

(74)专利代理机构 杭州君度专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33240

代理人 王桂名

(51)Int. Cl.

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/546(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种测定肌红蛋白的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定肌红蛋白的试剂盒。本试剂盒由R1、R2双试剂组成,试剂R1的组分为:Tris缓冲液15~145 mmol/L、氯化钠50~200 mmol/L、聚乙二醇-8000 5~20 g/L、叠氮钠0.4~1.2 g/L、牛血清白蛋白12~32 g/L、溶剂为纯化水;试剂R1的组分为:Tris缓冲液50~150 mmol/L、牛血清白蛋白4~26 g/L、甘油5~15 g/L、叠氮钠0.6~1.2 g/L、乳胶包被抗人肌红蛋白抗体1~4 g/L、溶剂为纯化水。样品中肌红蛋白(MYO)可与试剂R2中相应的特异性抗-MYO抗体结合形成抗原-抗体复合物,产生一定浊度。该浊度高低在一定抗体存在时与抗原的含量成正比。在一定波长下测定浊度并通过多点定标曲线可进行肌红蛋白的定量测定。本发明具有准确度高、操作方便等优点。

1. 一种测定肌红蛋白的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,其特征在于:所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

| | |
|-----------|---------------|
| Tris缓冲液 | 15~145 mmol/L |
| 氯化钠 | 50~200 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 5~20 g/L |
| 叠氮钠 | 0.4~1.2 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

| | |
|--------------|---------------|
| Tris缓冲液 | 50~150 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 4~26 g/L |
| 甘油 | 5~15 g/L |
| 叠氮钠 | 0.6~1.2 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 1~4 g/L |

其溶剂为纯化水。

2. 如权利要求1所述的一种测定肌红蛋白的试剂盒,其特征在于:所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

| | |
|-----------|------------|
| Tris缓冲液 | 80 mmol/L |
| 氯化钠 | 125 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 13 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

| | |
|--------------|------------|
| Tris缓冲液 | 100 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 15 g/L |
| 甘油 | 10 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 3 g/L |

其溶剂为纯化水。

3. 如权利要求1所述的一种测定人肌红蛋白的试剂盒,其特征在于:所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体为含有能与人肌红蛋白特异性结合的Fab功能部位的完整抗体或抗体片段。

4. 如权利要求1所述的一种测定人肌红蛋白的试剂盒,其特征在于:所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体的粒径在40~500nm之间。

5. 如权利要求1所述的一种测定人肌红蛋白的试剂盒,其特征在于:试剂盒的制备方法和使用方法包括以下步骤:

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂:

| | |
|-----------|---------------|
| Tris缓冲液 | 15~145 mmol/L |
| 氯化钠 | 50~200 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 5~20 g/L |
| 叠氮钠 | 0.4~1.2 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水;

(b)按照下列组分含量配制好R2试剂:

| | |
|--------------|---------------|
| Tris缓冲液 | 50~150 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 4~26 g/L |
| 甘油 | 5~15 g/L |
| 叠氮钠 | 0.6~1.2 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 1~4 g/L |

其溶剂为纯化水;

(c)将待测样本与试剂R1和试剂R2混合,使其充分反应;

(d)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值;

(e)根据吸光度变化值计算出样本中的人肌红蛋白的值。

6.如权利要求1所述的一种测定人肌红蛋白的试剂盒,其特征在于:所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体制备步骤如下:

(a)将粒径为80nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到3 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应2小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为6.0 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的抗人肌红蛋白抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终浓度为3.0 g/L;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为3g/L,超声分散即可制得乳胶包被抗人肌红蛋白抗体。

7.根据权利要求5所述的一种测定肌红蛋白的试剂盒的制备方法和使用方法,其特征在于:步骤(c)中,所述的试剂R1与试剂R2的体积比为 3:1。

8.根据权利要求5所述的一种测定肌红蛋白的试剂盒的制备方法和使用方法,其特征在于:步骤(c)中,所述的待测样本与试剂R1和试剂R2的总体积的体积比在1:20到1:60之间。

一种测定肌红蛋白的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学及生物化学技术领域,具体来说是一种测定肌红蛋白的试剂盒。

背景技术

[0002] 肌红蛋白(Myoglobin,Mb)是一种氧结合血红素蛋白,主要分布于心肌和骨骼肌组织约占肌肉总量的0.1%~0.2%。在急性心肌损伤时,Mb最先被释放入血液中,在症状出现约2-3小时后,血中Mb可超出正常上限,9-12小时达到峰值,24-36小时后恢复正常。对于怀疑ACS的病人建议连续采样测定,因为症状出现和蛋白标志物释放到血液之间有一段延迟。Mb阴性有助于排除心梗。

[0003] 测定血清肌红蛋白肌红蛋白可作为急性心肌梗死(AMI)诊断的早期最灵敏的指标。但特异性差,骨骼肌损伤、创伤、肾功能衰竭等疾病,都可导致其升高。Myo 阳性虽不能确诊AMI,但可用于早期排除AMI诊断的重要指标,如Myo 阴性,则基本排除心肌梗死,还可用于再梗死的诊断,结合临床,如Myo 重新升高,应考虑为再梗死或者梗死延展。

[0004] 目前肌红蛋白的检测方法主要有放射免疫法、酶联免疫吸附法、化学发光等。放射免疫法有放射性物质,会造成放射性污染;酶联免疫吸附法操作复杂、耗时长,对操作人员有较高的专业要求;化学发光成本较高,且检测所需仪器较为昂贵。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中肌红蛋白检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,提供一种测定肌红蛋白的试剂盒。

[0006] 本发明解决上述技术问题提供的技术方案是:一种测定肌红蛋白的试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

| | |
|-----------|---------------|
| Tris缓冲液 | 15~145 mmol/L |
| 氯化钠 | 50~200 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 5~20 g/L |
| 叠氮钠 | 0.4~1.2 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0007] 试剂R2:

| | |
|--------------|---------------|
| Tris缓冲液 | 50~150 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 4~26 g/L |
| 甘油 | 5~15 g/L |
| 叠氮钠 | 0.6~1.2 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 1~4 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0008] 作为优选,所述的彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

| | |
|-----------|------------|
| Tris缓冲液 | 80 mmol/L |
| 氯化钠 | 125 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 13 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0009] 试剂R2:

| | |
|--------------|------------|
| Tris缓冲液 | 100 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 15 g/L |
| 甘油 | 10 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 3 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0010] 作为优选,所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体为含有能与人肌红蛋白特异性结合的Fab功能部位的完整抗体或抗体片段。

[0011] 作为优选,所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体的粒径在40~500nm之间。

[0012] 作为优选,试剂盒的制备方法和使用方法包括以下步骤:

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂:

| | |
|-----------|---------------|
| Tris缓冲液 | 15~145 mmol/L |
| 氯化钠 | 50~200 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 5~20 g/L |
| 叠氮钠 | 0.4~1.2 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0013] (b)按照下列组分含量配制好R2试剂:

| | |
|--------------|---------------|
| Tris缓冲液 | 50~150 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 4~26 g/L |
| 甘油 | 5~15 g/L |
| 叠氮钠 | 0.6~1.2 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 1~4 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0014] (c)将待测样本与试剂R1和试剂R2混合,使其充分反应作为进一步的优选,试剂R1与试剂R2的体积比为 3:1,待测样本与试剂R1和试剂R2的总体积的体积比在1:20到1:60之间。

[0015] (d)用全自动生化分析仪测定反应后的吸光度差值;

(e)根据吸光度变化值计算出样本中的人肌红蛋白的值。

[0016] 作为优选,所述的乳胶包被抗人肌红蛋白抗体制备步骤如下:

(a)将粒径为80nm的胶乳颗粒,用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到3 g/L,每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg,室温反应2小时,在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟,去上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,超声分散;

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000rpm转速下离心30分钟,弃上清,将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中,使得胶乳颗粒最终浓度为6.0 g/L,超声分散,边搅拌边加入等体积的抗人肌红蛋白抗体的MES稀释液,混合搅拌,室温反应2小时,胶乳颗粒最终浓度为3.0 g/L;

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟,弃上清,沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散,加入BSA,4℃封闭过夜;离心去上清,用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒,使胶乳颗粒终浓度为3g/1,超声分散即可制得乳胶包被抗人肌红蛋白抗体。

[0017] 本发明所采用的胶乳增强免疫比浊法的反应原理是利用抗原抗体反应,样品中肌红蛋白(MYO)可与试剂中相应的特异性抗-MYO抗体结合形成抗原-抗体复合物,产生一定浊度。该浊度高低在一定抗体存在时与抗原的含量成正比。在一定波长下测定浊度并通过多点定标曲线可进行肌红蛋白的定量测定。

[0018] 样本中肌红蛋白(MYO)的活性(ng/mL)= $CS \times \frac{\Delta A_T}{\Delta A_S}$ (ng/mL)

式中: ΔA_T 以空白管吸光度作对照的样品管吸光度值

ΔA_S 以空白管吸光度作对照的校准管吸光度值

CS 校准液中 α 1-MG的浓度

与现有技术相比,本发明具有以下有益优点:对肌红蛋白的检测灵敏度更高,检测准确性更好,另外检测也比较方便。

[0019] 附图说明:

图1为本试剂盒与化学发光法的检测结果对比。

具体实施方式

[0020] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。

[0021] 实施例1

本发明的试剂盒包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,其中

试剂R1:

| | |
|-----------|------------|
| Tris缓冲液 | 80 mmol/L |
| 氯化钠 | 125 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 13 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0022] 试剂R2:

| | |
|--------------|------------|
| Tris缓冲液 | 100 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 15 g/L |
| 甘油 | 10 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 3 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0023] 实施例2

试剂盒的制备和使用方法

1、乳胶包被抗人肌红蛋白抗体制备：

(a)将粒径为80nm的胶乳颗粒，用50 mmol/L的MES缓冲液稀释胶乳颗粒到3 g/L，每mL溶液中加入EDAC 1.0 mg，室温反应2小时，在离心机内15000 rpm转速下离心30分钟，去上清，将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中，超声分散；

(b)将步骤(a)的产物在离心机内15000rpm转速下离心30分钟，弃上清，将沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中，使得胶乳颗粒最终浓度为6.0 g/L，超声分散，边搅拌边加入等体积的抗人肌红蛋白抗体的MES稀释液，混合搅拌，室温反应2小时，胶乳颗粒最终浓度为3.0 g/L；

(c)将步骤(b)的产物在离心机内15000 rpm转速离心30分钟，弃上清，沉淀悬浮于50 mmol/L的MES缓冲液中超声分散，加入BSA，4℃封闭过夜；离心去上清，用步骤(b)制得的分散液溶解胶乳颗粒，使胶乳颗粒终浓度为3g/L，超声分散即可制得乳胶包被抗人肌红蛋白抗体。

[0024] 2、按照下列组分含量配制好试剂：

(a)按照下列组分含量配制好R1试剂：

| | |
|-----------|------------|
| Tris缓冲液 | 80 mmol/L |
| 氯化钠 | 125 mmol/L |
| 聚乙二醇-8000 | 13 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 牛血清白蛋白 | 12~32 g/L |

其溶剂为纯化水

(b)按照下列组分含量配制好R2试剂：

| | |
|--------------|------------|
| Tris缓冲液 | 100 mmol/L |
| 牛血清白蛋白 | 15 g/L |
| 甘油 | 10 g/L |
| 叠氮钠 | 0.8 g/L |
| 乳胶包被抗人肌红蛋白抗体 | 3 g/L |

其溶剂为纯化水。

[0025]

3、全自动生化分析仪参数设置

(a)检测温度：37℃；

(b)检测波长：主波长570nm；

(c)反应时间 :10min,其中,孵育时间 5min,加入试剂 R2 后立即测定读取吸光度 A1,5min后读取吸光度 A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 反应方向:正反应;

4、检测步骤

(a)取180 μ l试剂R1与6 μ l待测样本混匀;

(b)将混匀后的溶液在37 $^{\circ}$ C的条件下孵育5min;

(c)加入60 μ l试剂R2,立即测定读取吸光度A1,5min后读取吸光度A2,计算吸光度变化 $\Delta A = A2-A1$;

(d) 肌红蛋白(MYO)的活性(ng/mL)= CS \times $\frac{\Delta A_T}{\Delta A_S}$ (ng/mL)计算出样本中的肌红蛋白的活度。

[0026] 参照附图1,附图1为用实施例1所制得的一种测定肌红蛋白的试剂盒多次测定不同样本中肌红蛋白的测定结果,以及在同等条件下与化学发光法测定结果的对比分析。从相关性实验结果可见,本试剂盒与化学发光检测结果相关性很好,相关方程 $y=0.9781x+1.165$, $R^2=0.9955$,从结果可以看出本试剂盒结果准确性可靠,相关性良好,可以应用于肌红蛋白的检测。

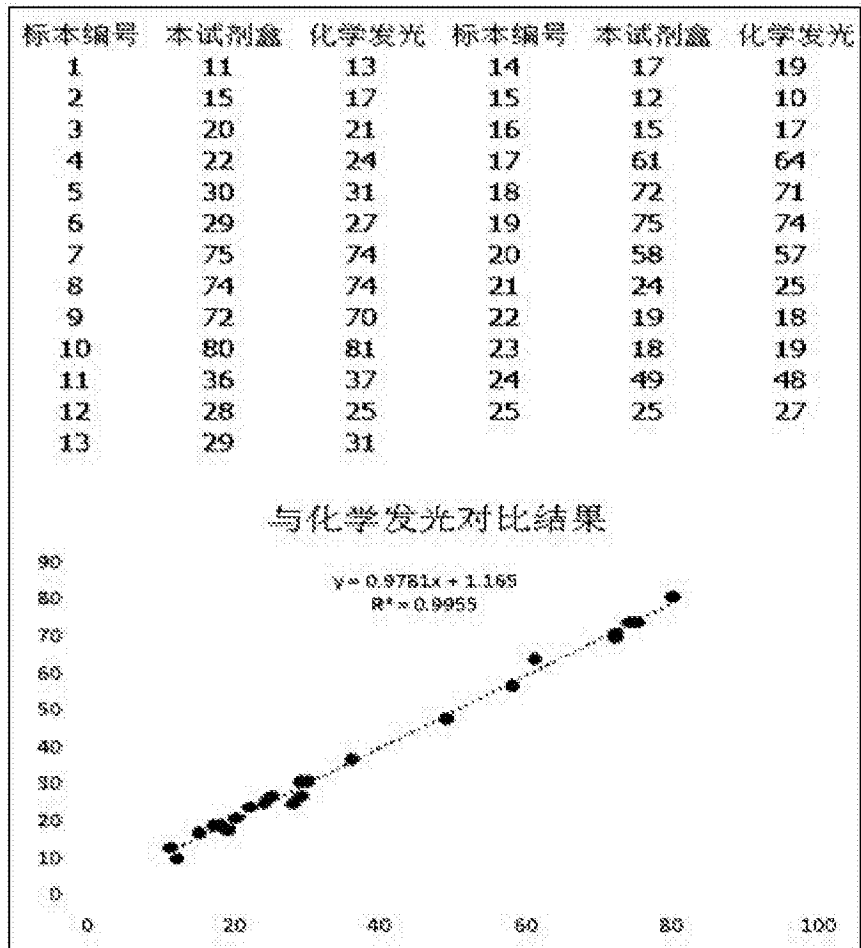


图1