

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/435

C07K 16/18 C12Q 1/28



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00112156.1

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1165548C

[22] 申请日 2000.3.21 [21] 申请号 00112156.1

[71] 专利权人 上海润东生物科技有限公司

地址 上海市浦东桃林路 18 号 B 楼 2405 室

[72] 发明人 张寄南 苏恩本

审查员 王亦然

[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公
司

代理人 徐冬涛

权利要求书 1 页 说明书 13 页

[54] 发明名称 人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化方法

[57] 摘要

本发明公开了人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化和其单克隆抗体的制备方法以及一步法测定其含量的方法。其特点是采用亲和层析法纯化人体心肌肌钙蛋白 I，利用该纯化的心肌肌钙蛋白 I 与 BALB/c 小鼠免疫制备该心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体，并建立了一步法测定心肌肌钙蛋白 I 含量的方法。其优点是所得抗体的同源性好，特异性和敏感性高。其检测方法操作简单，成本低。可广泛用于心脏病的检查。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化方法，其特征在于包含如下步骤：

(1) 取人体新鲜或速冻冷藏的心肌组织，去脂肪及纤维，经匀浆、离心、沉淀、抽提、高盐溶解等步骤处理后，在层析介质为 CM Sephadex-C50、Cellulose-DE52，缓冲体系为 Tris-HCl，pH 值为 7.2~7.8，尿素含量为 6~8mol/L 条件下依次进行层析，分别收集含心肌肌钙蛋白 C(cTnC)和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的蛋白峰；

(2) 取上述步骤 (1) 所得心肌肌钙蛋白 C，在偶联溶液为 0.1~0.3mol/L NaHCO₃，pH 值为 7.8~8.5，3~6mmol/L CaCl₂，平衡缓冲液为 45~55mmol/L Tris-HCl，8~10mol/L 尿素，0.8~1.2mmol/L CaCl₂，12~18mmol/L β 巯基乙醇，pH 值为 7.8~8.2 的条件下与 Sepharose 4B 亲和层析柱相偶联，制备成 Sepharose 4B 亲和层析柱；

(3) 取上述步骤 (1) 经 CM Sephadex-C50 层析后的粗提品的心肌肌钙蛋白 I 峰收集液，再加入步骤 (2) 所得 Sepharose 4B 亲和层析柱进行亲和层析，即得纯化的心肌肌钙蛋白 I。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于纯化的心肌肌钙蛋白 C、I 来源于新鲜或液氮速冻后的-75℃贮存的人心肌组织。

人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化方法

技术领域

本发明涉及一种亲和层析法纯化人体心肌肌钙蛋白 I 的方法和制备该心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体的方法以及一步法测定其含量的方法。

背景技术

心肌缺血性损伤，特别是急性心肌梗死（AMI）是威胁人类生命的主要疾病之一。临床上一直在努力寻找特异性好、灵敏度高的血清指标，以对其进行诊断。目前，肌酸激酶同工酸（CK-MB）已用作诊断心肌梗死的重要指标，但 CK-MB 并非心脏特有，正常人的骨骼肌中也少量存在，横纹肌源性疾病则更多，非心脏手术或骨骼肌损伤病人常有 CK-MB 增高，易造成 AMI 诊断假阳性。近年来的研究表明，心肌肌钙蛋白 I（cardiac troponin I, cTnI）具有高度的心肌特异性，当心肌细胞受损时，血液中 cTnI 出现时间早，持续时间长，与心肌损伤程度及预后密切相关。它可作为心肌损伤的一种特异性指标，对心脏病的诊断有十分重要的意义。

因此，对人体心肌肌钙蛋白 I 进行纯化并寻找其相应的抗体，用于对心脏病人的诊断以成为当今心脏病诊断研究的前沿学科。1999 年欧洲和世界临床化学协会(IFCC)已经提出将心肌肌钙蛋白 I(cTnI) 作为诊断 AMI 的指标。

目前,对心肌肌钙蛋白 I 的提取大多采用动物提取,尚没见利用人体心肌提取的报道,如 Bodor GS (Bodor GS, Porter S, Landt Y, et al. The development of monoclonal antibodies and an assay for cardiac troponin I with preliminary results in suspected myocardial infarction. *Chin Chem*, 1992;38:2203-2214)、Thulin E (Thulin E, Vogel HJ. Purification of rabbit skeletal muscle troponin C. *Clin Chem Acta*, 1988;211-215)、Syska H (Syska H, Perry SV, Trayer. A new method of preparation of troponin I using affinity chromatography. *FEBS Letters*, 1974;40:253-257)、Pharmacia LKB Biotechnology Ltd Co: (Affinity chromatography principle and methods. 1988, p15, Sweden)等的文献对提取心肌肌钙蛋白 I 都有报道。但其利用动物提取,主要缺点是同源性差,用于培育产生心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体,其特异性较差,敏感性较差。用于对心脏病的诊断准确率仍有待提高。

目前,用心肌肌钙蛋白 I 制备其抗体,大多用动物心肌组织提取心肌肌钙蛋白 I 制备其单抗或多抗抗体。Cummins 等 (Cummins P, Young A, Auckand ML, et al. Comparison of serum cardiac specific toponin I with creatine kinase, creatine kinase MB isoenzyme, tropomyosin, myoglobin and C reactive protein release in marathon runners: cardiac or skeletal muscle trauma? *Eur J Clin Invest*, 1987;17:317) 于 1987 年首先用心肌肌钙蛋白 I 给兔和羊注射后,培育和制备了心肌肌钙蛋白 I 的多克隆抗体,并以核素碘标记。建立了放射免疫法对心肌肌钙蛋白 I 的定量测量。采用动物制备单克隆抗体,

用于检测人体心肌肌钙蛋白 I 的含量，主要存在抗体同源性差，特异性、敏感性较差的缺陷，还不能使心脏病诊断的准确率进一步提高。

目前，对于心脏疾病的患者的心肌肌钙蛋白 I 的含量检测，有定性、半定性和定量三种方法。由于单克隆抗体的来源不同，参照值不完全一致。测定原理主要以各种免疫酶检测法与放射免疫检测为主。国外主要通过免疫酶检测法，利用自动化分析仪来完成（如 Status、Access 等自动化分析仪），可在 1 小时内出结果，但需要购买涂有抗体的醋纤膜等配套试剂，且该类试剂价格昂贵。也有采用 ELISA 双夹心定量法检测的，但该法一般用手工系统操作，需较长时间，不利于对疾病患者争取宝贵的诊断治疗时间。

发明内容

本发明的目的是提供一种利用亲和层析法纯化人体心肌肌钙蛋白 I 的方法，以及利用该心肌肌钙蛋白 I 制备其单克隆抗体的方法。同时提供一种利用由该方法获得的心肌肌钙蛋白 I 及单克隆抗体建立一步法快速测定心脏病患者心肌肌钙蛋白 I 含量的方法。

本发明的目的是通过如下技术方案实现的：

（一）依据本发明，人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化方法如下：

（1）取人体新鲜或速冻冷藏的心肌组织，去脂肪及纤维，经匀浆、离心、沉淀、抽提、高盐溶解等步骤处理后，在层析介质为 CM Sephadex-C50、Cellulose-DE52，缓冲体系为 Tris-HCl，pH 值为 7.2~7.8，尿素含量为 6~8mol/L 条件下依次进行层析，分别收集含心肌肌钙蛋白 C(cTnC)和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的蛋白峰；

(2) 取上述步骤(1)所得心肌肌钙蛋白 C, 在耦联溶液为 0.1~0.3mol/L NaHCO_3 , pH 值为 7.8~8.5, 3~6mmol/L CaCl_2 , 平衡缓冲液为 45~55mmol/L Tris-HCl, 8~10mol/L 尿素, 0.8~1.2mmol/L CaCl_2 , 12~18mmol/L β 巯基乙醇, pH 值为 7.8~8.2 的条件下与 Sepharose 4B 亲和层析柱相耦联, 制备成 Sepharose 4B 亲和层析柱;

(3) 取上述步骤(1)经 CM Sephadex-C50 层析后的粗提品的心肌肌钙蛋白 I 峰收集液, 再加入步骤(2)所得 Sepharose 4B 亲和层析柱进行亲和层析, 即得纯化的心肌肌钙蛋白 I。

(二) 依据本发明, 人体心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体制备方法如下:

(1) 取前述(一)所制得心肌肌钙蛋白 I, 多次注入 BALB/c 小鼠腹腔免疫小鼠, 间隔时间为 2~3 周, 至小鼠血清抗心肌肌钙蛋白 I 抗体滴度大于 1: 2000, 取小鼠脾细胞和 SP2/0 骨髓瘤细胞;

(2) 上述步骤(1)的二种细胞混匀, 加入 DMEM 无血清培养液处理, 再加入含 15~20% 胎牛血清的 HAT 培养液, 置培养箱培养, 进行细胞融合;

(3) 取上述步骤(2)的培养液上清, 用 ELISA 法检测培养液中的杂交瘤细胞, 即心肌肌钙蛋白 I 的特异性抗体;

(4) 上述步骤(3)检测出的杂交瘤细胞采用有限稀释法培养, 制得增殖的同源性细胞克隆, 即单克隆细胞株;

(5) 将上述步骤(4)制得的单克隆细胞株, 与标准单克隆抗体 2B1.9、2F6.6 进行对照, 采用 Western blot 及 ELISA 法测定, 检测出

抗心肌肌钙蛋白 I 捕捉单克隆抗体 IgG₁ (联有辣根过氧化物酶的单克隆抗体) 和抗心肌肌钙蛋白 I 标记生物素抗体 IgG_{2b} (联有生物素的单克隆抗体), 上述二单克隆抗体即为本方法所得的具有高特异性、高敏感性的心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体。

(三) 依据本发明, 人体心肌肌钙蛋白 I 的一步法快速测定方法如下:

(1) 用 50~150mmol/L, pH 值为 9.4~9.6 的碳酸氢盐缓冲液、链亲和素包被 96 孔聚苯乙烯酶联板;

(2) 取待测样品和标准品, 分别与联有生物素的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体和联有辣根过氧化物酶的抗心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体相接触后, 分别加入上述酶联板包被孔中;

(3) 将步骤 (2) 之酶联板进行孵育;

(4) 取孵育后的酶联板, 在其包被孔中分别加入底物过氧化氢与 2, 2'-连氧-双-3-乙基苯噻唑林-6-磺酸盐进行酶促显色;

(5) 读取上述步骤 (4) 酶促显色后波长 405nm 时的吸光度, 将待测样品与标准品进行对照, 计算出待测样品中的心肌肌钙蛋白 I 的含量。

本发明的优点是: 利用人体心肌组织来提纯心肌肌钙蛋白 I, 所得心肌肌钙蛋白 I 用于培育制备其相应的单克隆抗体, 具有所得抗体的同源性好, 特异性和敏感性高的优点, 用于检测心脏病患者的心肌肌钙蛋白 I 的含量准确性高, 可使对心脏病的诊断准确率进一步提高。而且用本发明培育心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体可以大量制备, 成功

率高，适应工业化生产。采用本发明制备心肌肌钙蛋白 I 的单克隆抗体可以取代进口，大大降低进口的昂贵费用，节约成本。此外采用本发明的测定心肌肌钙蛋白 I 的方法，操作十分简单，且测定时间快，一般为 30 分钟出结果，便于推广应用。一方面可为病人节约宝贵的诊断时间，另一方面，本发明的测定方法无需购买昂贵的自动化设备，不需采用价格昂贵的进口试剂，大大降低了检测成本，减轻了病人的费用负担。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明上述方法作进一步详细说明：

(一) 本发明对人体心肌肌钙蛋白 I 的纯化方法：

1. 人体心肌肌钙蛋白 C (cTnC) 的纯化

(1) 取 100g 新鲜或液氮速冻后-75℃贮存的人心室肌组织，去除脂肪及纤维并剪碎，加入 3~5 倍体积的匀浆缓冲液 (Tris-HCl 50mmol/L, KCl 50mmol/L, EDTA 1mmol/L, pH7.5) 充分匀浆，离心 30 分钟，去上清，取沉淀，重复上述步骤 10 次；每次均需充分匀浆。取沉淀用乙醇和乙醚抽提 2 次以上，抽干成干粉状。干粉用缓冲液 1mol/L KCl 溶解 12~24 小时，10000g 离心 30 分钟，去沉淀，取上清；

(2) 述上清用 40~60% (NH₄)₂SO₄ 沉淀。用 50ml CM Sephadex-C50 层析柱平衡缓冲液溶解，并置此缓冲液中透析 3 次，10000g 离心 30 分钟，去沉淀，取上清；

(3) 用平衡好的 CM Sephadex -C50 装柱 (2.5×30cm)，平衡缓

冲液平衡 5 个柱体积，将上述（2）之上清上样（上样蛋白量一般为 200-400mg），平衡缓冲液平衡 5 个柱体积后，用 NaCl 0~0.5mol/L 梯度洗脱，自动收集器收集，每管 6mL，速度 0.4mL/min；

（4）收集 CM Sephadex -C50 层析柱 NaCl 梯度洗脱第一蛋白峰，平衡液透析后再经 Cellulose-DE52 层析柱 NaCl 0~0.3mol/L 梯度洗脱，后面一蛋白高峰即为 cTnC；

2. 亲和层析法纯化人心肌肌钙蛋白 I

（1）制备 cTnC Sepharose 4B 亲和层析柱：取 50mg 人 cTnC（浓缩后终体积为 20mL），置偶联溶液（0.1mol/L NaHCO₃，pH8.3，5mmol/L CaCl₂）中透析 3 次。取 7.5g 溴化氰活化的 Sepharose 4B 凝胶干粉，用 1mol/L HCl 1500mL 在 15 分钟内洗涤并抽干，再用上述偶联溶液洗涤并抽干后，与 20mL cTnC 混匀在 4℃下缓慢摇动 20 小时。取出后反复用前述偶联溶液洗涤至流出液 A280 值为零后抽干。悬浮于 0.1mol/L，pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中，并在 4℃下缓慢摇动 12 小时。取出抽干后，分别用 5 个柱体积的 0.1mol/L 乙酸盐缓冲液（pH4.0，含 0.5mol/L NaCl）和 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.0，含 0.5mol/L NaCl）洗 3 轮。再用平衡缓冲液（50mmol/L Tris-HCl，9mol/L 尿素，1mmol/L CaCl₂，15mmol/L β-巯基乙醇，pH8.0）洗涤，并装柱（1.2×15cm）平衡备用；

（2）亲和层析法纯化人 cTnI：取步骤 1（1）之上清，置步骤 2

（1）所述偶联溶液中透析 3 次，上 cTnC Sepharose 4B 层析柱。用 50 倍柱体积的平衡缓冲液洗去杂蛋白，再用洗脱缓冲液（50mmol/L

Tris-HCl, 9mol/L 尿素, 10mmol/L EGTA, 15mmol/L β -巯基乙醇, pH8.0) 洗脱, 自动收集器收集, 每管 2mL, 速度 0.1mL/min。收集所得即为纯化的心肌肌钙蛋白 I;

3. cTnI 活性测定与蛋白定量: 用双抗 ELISA 夹心法测定 cTnI 活性, 考马斯亮兰法测定收集管蛋白含量, SDS-PAGE 电泳测定 cTnI 分子量。

(二) 心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体的制备

1. 免疫动物: 取 8~12 周龄与骨髓瘤细胞同种系的 BALB/c 小鼠, 以含蛋白质 100 μ g/只的 cTnI 抗原与等量福氏完全佐剂充分混匀, 注入小鼠腹腔内, 每隔 2 周 100 μ g/只的 cTnI 抗原与等量福氏不完全佐剂充分混匀, 多次注入小鼠腹腔内加强免疫。经检测小鼠血清 (间接 ELISA 法), 滴度在 1: 2000 以上者可用于融合, 融合前 3 天经小鼠腹腔内再次加强免疫, 剂量为 50 μ g/只;

2. 细胞融合

(1) 取 40mL HAT 培养液, 15mL DMEM 无血清培养液和 1mL 50% PEG (M_w 2000) 分别置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预温;

(2) 分别取上述免疫的 BALB/c 小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞 ($2-5 \times 10^7$)、脾细胞 (10^8) 悬液加入 50mL 离心管中混匀, 并加 DMEM 无血清培养液至 40mL。离心 10 分钟, 倒尽上清液, 混匀成糊状;

(3) 将离心管置于 37 $^{\circ}$ C 预温的盛水烧杯中, 取 0.7mL 预温的 50%PEG 溶液, 1 分钟内加完, 静置 90 秒钟。立即滴加 37 $^{\circ}$ C 15mL 预温的无血清培养液, 使 PEG 稀释而停止作用。滴加方法是前 30 秒

加 1mL；后 30 秒加 3mL；然后在 1 分钟内加完；

(4) 补加 DMEM 无血清培养液至 40mL，离心 10 分钟，倒尽上清液。加 40mL 含 15%~20%胎牛血清的 HAT 培养液。用吸管轻轻混匀，滴加到已含有饲养细胞的 4 块 96 孔细胞培养板的小孔中，每孔 2 滴，置 37℃、7%CO₂ 的培养箱中培养；

3. 杂交瘤细胞的选择培养

免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞，经 PEG 处理后，形成多种细胞成分的混合体，其中包括未融合的骨髓瘤细胞和免疫脾细胞；骨髓瘤细胞的共核体和免疫脾细胞的共核体，以及骨髓瘤细胞和免疫脾细胞的导核体。仅后者才能形成杂交瘤细胞。为此，在这多种细胞混合体中必须除去未融合的细胞和同种融合的共核体，并选择出真正的杂交细胞。因此，在细胞融合后第 1, 3, 5, 7 天用前述的 HAT 培养液换液培养；

4. 特异性抗体的检测及杂交瘤细胞克隆化

吸取每个培养孔的上清液，用间接 ELISA 法检测出培养液中含 cTnI 的特异性抗体的培养孔。采用有限稀释法使杂交瘤细胞克隆化。经过培养后单个细胞可增殖为同源性细胞克隆；

5. 杂交瘤细胞的冻存

杂交瘤细胞一经建立应尽快冻存，保存杂交瘤细胞不致因传代污染或因变异而丢失。必须在得到分泌特异性抗体的杂交瘤细胞后的早期即保存几批细胞于液氮中。用于细胞融合的骨髓瘤细胞株也用同法保存，以取得稳定可靠的亲本细胞来源。

取生长旺盛，形态良好的 cTnI 克隆化细胞制成细胞悬液，离心 5 分钟，去上清液，加 4℃冻存液（9 份完全培养液加 1 份二甲基亚砷 DMSO），最终使细胞密度为 $3-5 \times 10^6$ 细胞/mL，以 1mL 细胞悬液分装于 2mL 冻存管冻存或液氮内长期保存；

6. 单克隆抗体的大量制备

在接种杂交瘤细胞前，先给 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 降植烷 (pristane) 或液体石蜡，然后每只小鼠腹腔注射 $5 \times 10^5 - 10^6$ 个杂交瘤细胞。接种杂交瘤细胞至 7-10 日后，取其腹水，离心 10 分钟，吸取上清液，加入 0.02% 叠氮钠，分装保存于 -70℃；

7. 单克隆抗体的纯化

单克隆抗体在高 pH 环境下能和蛋白 A 结合，且在低 pH 环境下能从蛋白 A 上洗脱，操作步骤如下：

(1) 取 5mL Protein A-Sepharose (Repligen, Cat. No. IPA-300) 加柱。50mL 结合缓冲液流洗；

(2) 取 10~15mL 腹水与等量 PBS 缓冲液(磷酸盐 100mmol/L, pH7.4)混匀加柱。杂交瘤细胞上清液用 NaOH 调至 pH9.0 后加柱。50mL 结合缓冲液流洗；

(3) 洗脱缓冲液洗脱，每管收集 1mL 与等量的 0.1mol/L Tris, pH9.0 混匀；

(4) A280 比色。收集高峰管合并，PBS 溶液内透析，4℃贮藏；

8. 高特异性、高敏感性 cTnI 单克隆抗体的筛选

经上述过程，最终共获得 16 株单克隆抗体株。用 ELISA 双抗夹

心法替代检测，选择出两株单克隆抗体株。命名为 JS09（即联有生物素的抗 cTnI 单克隆抗体）和 JS05（即联有辣根过氧化酶的抗 cTnI 单克隆抗体），与国外两株抗 cTnI 单克隆抗体 2B1.9, 2F6.6（此两株抗体是目前唯一经美国 FDA 批准且应用最广泛的一对单抗）对比。取少量新鲜匀浆后的人心肌、骨骼肌与平滑肌标本、纯化的 cTnI、cTnT(肌钙蛋白 T)与 cTnC，通过 Western Blot 法与 ELISA 双抗夹心法测定其与 JS09、JS05 单克隆抗体株的特异结合，发现 JS09、JS05 单克隆抗体仅与人心肌组织的 cTnI 结合，而与骨骼肌、平滑肌、cTnC 及 cTnT 无交叉反应。JS09 与 JS05 二株单克隆抗体的亚型经免疫竞争法检测，分别为 IgG₁ 与 IgG_{2b}。

（三）人体心肌肌钙蛋白 I 的一步法快速测定

1. 检测试剂盒组成

（1）链亲和素预包被的 96 孔酶联板，其准备过程为：

- a. 链亲和素 10 μ g/mL 溶解于碳酸氢盐缓冲液（100mmol/L, pH9.5），每孔 100 μ L，包被 96 孔聚苯乙烯酶联板，4 $^{\circ}$ C，18 小时。
- b. 倾去包被液，以 1%BSA 封闭，37 $^{\circ}$ C，30min,或 4 $^{\circ}$ C，12 小时。
- c. 倾去封闭液，清洗液（含 Tween 0.04%）清洗 2 次，保鲜膜密封于 4 $^{\circ}$ C 待用或-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

（2）cTnI 标准品 5 份，含量分别为 1, 2, 4, 8, 16 μ g/L。

（3）阳性与阴性质控血清各 1 份。

（4）联有生物素的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体（JS09—生物素）与联有辣根过氧化酶的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体（JS05—PODs）

各一份。

(5) 抗体与样品稀释缓冲液 PBS (磷酸盐 40 mmol/L, pH7.2, NaCl 150mmol/L) 1 份。

(6) 清洗缓冲液 (Tween 0.04%, NaCl 150mmol/L) 1 份。

(7) 底物过氧化氢 (H_2O_2) 与 2, 2'-连氧-双-3-乙基苯噻唑林-6-磺酸盐 (ABTS) 各 1 份。

(8) 底物稀释缓冲液柠檬酸磷酸盐缓冲液 (100 mmol/L, pH4.2) 1 份。

2. 检测操作过程

(1) 取 cTnI 标准品 (1, 2, 4, 8, 16 μ g/L) 或待测样品、质控血清 50 μ L /mL, 取联有生物素的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 (JS09-生物素) 及另一联有辣根过氧化酶的心肌肌钙蛋白 I 单克隆抗体 (JS05-PODs) 共 50 μ L, 混匀加入酶联板孵育, 37 $^{\circ}$ C, 30min, 稀释缓冲液为 PBS。

(2) 清洗液清洗 3 次, 加入底物过氧化氢 (H_2O_2) 与 2, 2'-连氧-双-3-乙基苯噻唑林-6-磺酸盐 (ABTS) 100 μ L, 稀释缓冲液为柠檬酸磷酸盐缓冲液, 37 $^{\circ}$ C, 15min。

(3) 通过读取波长 405nm 时的吸光度, 以标准品为对照计算待测样品中所含心肌肌钙蛋白 I 的量。

3. 检测中的相关参数

(1) 链亲和素包被浓度 6 μ g/mL 时反应达平台期, 取链亲和素 10 μ g/mL 为固定包被浓度, 结果稳定。包被时间在 4 $^{\circ}$ C 18 小时达最大

量。包被缓冲液 pH9.5 时最稳定。保鲜膜密封 4℃ 贮存 1 月与 -20℃ 贮存 6 月测定结果无统计差异。

(2) cTnI 标准品含量分别为 1, 2, 4, 8, 16 μ g/L 时, 直线相关系数 $\gamma=0.994$ 。

(3) JS09、JS05 反应浓度分别为 1 μ g/mL 与 2 μ g/mL 时敏感性高且结果稳定。抗体与样品稀释缓冲液 PBS pH7.2 时反应最佳。

(4) 底物过氧化氢 (H_2O_2) 浓度范围为 0.01-0.03%, 2, 2'-连氧-双-3-乙基苯噻唑林-6-磺酸盐 (ABTS) 浓度为 1.9mmol/L 时本底低, 且敏感性高。底物稀释缓冲液 pH4.0—4.4 为最佳。显色时间 37℃ 15min 时本底低, 反应接近平台期。

(5) cTnI 标准品或待测样品、质控血清, 与 JS09、JS05 混匀孵育 37℃, 30min 时达平台期。

(6) 组间差异为 8%, 批间差异为 6%。

(7) 100 例正常人血清 cTnI 参照值为 1.5 μ g/L。