

## 33 株抗心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 的单克隆抗体制备、鉴定及应用

胡月红<sup>1\*</sup>, 陈自敏<sup>2\*</sup>, 陈宇翔<sup>1</sup>, 杨映晖<sup>1</sup>, 魏淑英<sup>2</sup>, 宋浏伟<sup>2</sup>, 周国梁<sup>2</sup>, 葛胜祥<sup>2</sup>

1 厦门大学附属第一医院杏林分院 肺科实验室, 福建 厦门 361022

2 厦门大学 生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102

胡月红, 陈自敏, 陈宇翔, 等. 33 株抗心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 的单克隆抗体制备、鉴定及应用. 生物工程学报, 2016, 32(12): 1694–1703.

Hu YH, Chen ZM, Chen YX, et al. Development, identification and application of 33 monoclonal antibodies against cardiac troponin T. Chin J Biotech, 2016, 32(12): 1694–1703.

**摘要:** 旨在制备抗心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 的单克隆抗体 (mAb), 对单抗进行初步评价鉴定, 并建立 (cTnT) 的化学发光定量检测试剂。首先利用外购的 cTnT 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 利用常规 mAb 制备技术和间接 ELISA 法筛选 mAb, 以表达和合成的 cTnT 片段对筛选到的 mAb 进行表位鉴定。使用双抗体夹心 ELISA 方法筛选检测 cTnT 抗原的配对 mAb, 并建立 cTnT 全自动化学发光定量检测试剂。使用 220 例临床标本评价该试剂与罗氏试剂的检测一致性, 另外使用 238 例临床样本和 784 例体检人群样本评价该试剂的临床应用。我们成功筛选到 33 株稳定分泌抗 cTnT 抗体的杂交瘤细胞株, 并对单抗的表位进行初步鉴定。我们筛选到能检测 10 pg/mL cTnT 抗原的配对 mAb E16H8 和 C8G11, 并使用该配对研制出全自动化学发光定量试剂。该试剂与罗氏试剂相关系数  $r$  达到 0.959 9, 检测一致率 95%, 利用该试剂盒检测临床样本灵敏度为 97.5%, 特异性为 99.15%, 99% 体检人群的 cTnT 浓度分布小于 0.080 6 ng/mL, 符合 WHO 对急性心肌梗死的定义标准。综上, 初步建立了 cTnT 诊断优势表位单抗, 并利用这些优势表位的单抗建立全自动管式化学发光定量检测试剂, 与罗氏试剂检测结果符合率高。

**关键词:** 心肌肌钙蛋白 T (cTnT), 急性心肌梗死 (AMI), 单克隆抗体, 化学发光

**Received:** March 29, 2016; **Accepted:** May 16, 2016

**Supported by:** Xiamen Science and Technology Program (No. 3502Z20126007).

**Corresponding author:** Shengxiang Ge. Tel/Fax: +86-592-6536555; E-mail: sxge@xmu.edu.cn

\*These authors contributed equally to this work

厦门市科技计划 (No. 3502Z20126007) 资助。

网络出版时间: 2016-06-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160613.1509.003.html>

# Development, identification and application of 33 monoclonal antibodies against cardiac troponin T

Yuehong Hu<sup>1\*</sup>, Zimin Chen<sup>2\*</sup>, Yuxiang Chen<sup>1</sup>, Yinghui Yang<sup>1</sup>, Shuying Wei<sup>2</sup>, Liuwei Song<sup>2</sup>, Guoliang Zhou<sup>2</sup>, and Shengxiang Ge<sup>2</sup>

1 Laboratory of Lung, Xinglin Branch of the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361022, Fujian, China

2 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China

**Abstract:** The aim of this study is to prepare and characterize cardiac troponin T (cTnT) monoclonal antibodies (mAb), and further develop a chemiluminescence quantitative detection assay for cTnT. BALB/c mice were immunized with recombinant cTnT antigen, and specific mAbs were prepared using conventional hybridoma technique and screened by indirect ELISA method. To identify the epitopes, several cTnT peptide fragments were synthesized or expressed by genetic engineering. A double antibody sandwich ELISA method was used to screen the mAb pairs for cTnT detection, and the automatic chemiluminescence detection assay for cTnT was developed. In total 220 clinical specimens were used for system comparison between our assay and Roche cTnT assay; further performance characteristics was evaluated by testing 238 clinical samples and 784 physical examination samples. We successfully screened 33 strains of hybridoms against cTnT, and the mAbs' epitopes were identified. Mab E16H8 and C8G11 with a detection limit of 10 pg/mL cTnT antigen were selected to develop the full automatic chemiluminescence quantitative assay. The correlation coefficient of our reagent with Roche's was 0.959 9, with a coincidence rate of 95%. The assay presented a sensitivity of 97.5%, and a specificity of 99.15% in detection of clinical samples. The cTnT concentration was less than 0.080 6 ng/mL in 99% of general population, which agrees with the definition of WHO on patients with acute myocardial infarction (AMI). In summary, we developed monoclonal antibodies against predominant epitopes for diagnostics of cTnT, and an automatic tubular chemiluminescence quantitative detection assay was further developed, which presents a high coincidence rate with Roche's.

**Keywords:** cardiac troponin T, acute myocardial infarction (AMI), monoclonal antibodies, chemiluminescence

心血管疾病是我国最常见的疾病之一，死亡率很高<sup>[1]</sup>。随着基础医学临床医学和检验医学的不断发展，陆续有许多心脏标志物先后应用于临床，在心脏疾病的诊断危险性评估疗效观察预后估计等方面起了重要作用。目前，临床应用的标志物按功能可大致分为 3 类：一是主要反映心脏组织损伤的标志物；二是了解心脏功能及预测冠状动脉粥样硬化标志物；三是作为心血管炎症性疾病的标志物<sup>[2-7]</sup>。因此检测心脏标志物对指导心脏病人的治疗、监测血栓病人的溶栓疗效、判断愈后都有着重要的意义<sup>[8]</sup>。

心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 是心肌损伤 (如心肌梗死) 的特异性和高敏感性的标志物, 由于分子量小 (37 000 Da), 所以发病后血中浓度迅速升高。心肌肌钙蛋白 T (cTnT) 是能预测急性冠状动脉综合症短期、中期甚至长期结局的 1 种独立的预后诊断标志物。低浓度的肌钙蛋白 T 是心血管事件 (包括初发和再发的心房颤动) 的独立预测指标<sup>[9]</sup>。血中 cTnT 浓度增高也可见于其他疾病, 如心肌炎、心脏挫伤、肺栓塞和药物引起的心脏毒作用<sup>[10-13]</sup>。本研究目的就是特异性单抗的原料制备以及基于全自动管式化

学发光免疫检测试剂的建立。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

心肌肌钙蛋白 T 抗原购买于 International laboratory USA (产品货号 :CMT866525A) ;cTnI 抗原 (购买于 International Laboratory USA 货号 CM583262) ; Human troponin C (TnC) 购买于 HyTest (货号 :8T57)。小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 为本公司保存。BALB/c 小鼠为上海斯莱克动物中心提供。PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基喋呤、DMSO、HRP、磁微粒 Dynabeads M-270 购自美国 Life technologies 公司。吡啶酯等购自 Sigma 公司。RPMI 1640 基础培养基购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 PAA 公司。羊抗鼠标记辣根过氧化物酶、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 为 Serotec 公司产品。

### 1.2 样本

#### 1.2.1 临床样本

选取 2013 年 11 月-2013 年 12 月福建医科大学附属协和医院及厦门大学附属中山医院收集的临床样本,来源于门诊住院病人,其中确诊 AMI 的 118 例,排除 AMI 的 120 例 (AMI 的诊断标准参照全国中西医结合防治冠心病、心绞痛、心律失常研究座谈会修订的诊断标准和 WHO 缺血性心脏病诊断标准) 其次还选择了厦门大学附属中山医院收集有罗氏 E170 检测背景的标本 220 份。

#### 1.2.2 体检样本

均来自体检中心健康体检者。

#### 1.2.3 样本采集

所有检测对象均为肝素抗凝的血浆。

### 1.3 仪器

Caris200 为厦门优迈科医学仪器有限公司的产品。

### 1.4 多抗、单抗制备

选择 6 只雌性 BALB/c 小鼠用外购的 cTnT 抗原乳化完全弗氏佐剂 (CFA) (Sigma, St. Louis, MO) 皮下免疫 50  $\mu$ g/只、免疫总体积是 500  $\mu$ L,两周后使用同样的抗原乳化不完全弗氏佐剂 (IFA) (Sigma, St. Louis, MO) 进行皮下免疫,剂量、免疫体积同初次免疫,间隔 2 周继续免疫加强 2 针。最后利用相同的抗原 PBS 稀释至 1 mg/mL 脾脏免疫 100  $\mu$ L,采集眼球血清监测血清效价 3 d 后开展细胞融合。细胞融合、克隆化、腹水制备以及纯化均按照常规方法进行<sup>[14]</sup>。其中融合、克隆化的筛选模式是利用间接法筛选检测,利用外购抗原 300 ng/孔包被于聚苯乙烯微孔板上,包被缓冲液是碳酸缓冲液,而后加入细胞上清反应,最后利用羊抗鼠标记的辣根过氧化物酶二抗捕获反应。选择 1 只 3 月龄新西兰兔利用外购的 cTnT 抗原免疫制备多抗 (剂量是 200  $\mu$ g/只;皮下免疫;免疫体积 1 mL),免疫周期 3 周一次,免疫 3 针后处死采集血清<sup>[15]</sup>。

### 1.5 抗原制备以及鉴定

利用 PTO-T7 载体 (本实验室构建) 构建 cTnT 全长以及不同区段的克隆,在 cTnT 全长以及不同区段 N 端再引入 6 个 His 的标签,并在大肠杆菌中获得表达,命名为 r-cTnT、B6-71-285、B6-71-130、B6-101-160、B6-131-190 和 B6-161-220。经过金属螯合层析获得纯化抗原。利用兔多抗血清评价制备的抗原:利用获得不同的截断抗原包被,而后加入兔多抗血清评价。

## 1.6 单抗特征分析

1) mAb 滴度测定: 杂交瘤细胞培养上清及 mAb 滴度的测定采用间接 ELISA 法, 包被的抗原为外购的 cTnT 抗原。2) mAb 的亚型鉴定: 采用间接 ELISA 法分析。将抗体稀释至 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加入预先包被外购的 cTnT 抗原的微孔板中反应, 其中抗原的包被量是 300 ng/孔, 所用酶标二抗为商品化购买的 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 的酶标二抗, 根据说明书进行使用。3) mAb 识别表位的分析: 将不同表达的区段分别进行包被后, 用间接 ELISA 法测定各株 mAb 与之的反应性, 从而分析各株 mAb 的识别表位<sup>[16]</sup>。

## 1.7 酶联免疫吸附试验平台检测系统的建立

1) 单抗之间阻断试验验证: 利用 r-cTnT 包被评价 32 株单抗之间的相互阻断关系, 并初步分类。用间接阻断 ELISA 分析 mAb 间与 cTnT 抗原反应的相互阻断情况, 以便为双抗体夹心检测 cTnT 抗原选择配伍 mAb 提供参考。mAb 辣根过氧化物酶 (HRP) 的标记采用改良过碘酸钠法<sup>[17]</sup>。将各株单抗分别加入预先包被 r-cTnT 抗原的微孔板中 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 对照孔加 PBS, 而后利用 PBST 洗板后, 正交加入各合适稀释度的单抗标记的酶液 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, PBST 洗板后并显色读值。最后依据各阻断孔  $OD_{450}$  值与相应对照孔的  $OD_{450}$  值之差与对照孔  $OD_{450}$  值的百分比值作为某 mAb 对相应 HRP-mAb 的阻断值, 大于 50% 认为有阻断效果, 小于 50% 认为无阻断效果<sup>[18]</sup>。2) 采用方正滴定法<sup>[18]</sup> 筛选配对单抗, 以灵敏度高、本底低、线性范围广为选择标准, 最终确定 E16H8 为包被单抗, C8G11 为酶标单抗初步建立酶免试剂。

## 1.8 磁微粒包被单克隆抗体

取 1 mg 磁微粒用 200  $\mu\text{L}$  EDC 溶液 (10 mg

EDC 溶于 1 mL 去离子水) 活化, 然后加入 10  $\mu\text{g}$  单克隆抗体并置于旋转混匀仪上孵育偶联 2 h, 孵育后洗液洗涤 3 次后用 1 mL 甘氨酸溶液 (pH 7.4) 进行封闭, 完成封闭后保存在含酪蛋白的 PBS 缓冲液中<sup>[19]</sup>。

## 1.9 吡啶酯标记单克隆抗体

取 100  $\mu\text{g}$  单克隆抗体稀释到合适浓度后加入 15  $\mu\text{L}$  吡啶酯 (溶于甲基甲酰胺中), 混匀, 室温避光反应 30 min; 加入 1 mL 赖氨酸溶液 (pH 8.0) 封闭; 最后透析到 PBS 缓冲液中, 用含酪蛋白的 PBS 缓冲液稀释后使用<sup>[19]</sup>。

## 1.10 心肌钙蛋白 T 定量测定试剂盒的配制以及免疫分析方法

将包被好的磁微粒及标记好的吡啶酯按照一定的稀释比例进行稀释, 稀释后进行罐装、组装及贴签, 即为心肌钙蛋白 T 定量测定试剂盒。

取 50  $\mu\text{L}$  标记了单抗的磁珠缓冲液加入 U 型微孔板中并加入 50  $\mu\text{L}$  待检测样品, 贴上封板膜后放置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱内孵育。15 min 后将微孔板置于磁力板架上, 磁珠完全被吸附后, PBST 清洗 3 遍, 吸干残余洗涤液, 加入吡啶酯标记的抗体缓冲液 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 10 min, PBST 清洗 3 遍, 将每孔磁珠转移至发光管中, 加入激发液 A 100  $\mu\text{L}$ , 上机检测时加入激发液 B 100  $\mu\text{L}$ , 检测发光值<sup>[20]</sup>。

## 1.11 参考品的配制

cTnT 抗原用基质血 (购买于 Trina 公司) 稀释后用罗氏 E170 试剂定量, 而后将定量的抗原用基质血稀释成 L 系列参考品, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.12 分析灵敏度的确定

用试剂检测 L 系列参考品 (L1-L8, 浓度分别为 0.01、0.1、0.4、1、2、5、10、25 ng/mL),

用 GraphPad Prism 进行四参数拟合试剂剂量反应曲线。然后重复测定基质血清 20 次, 计算其平均发光值、标准差, 得出  $M+2SD$ , 然后将  $M+2SD$  的 RLU 值代入试剂盒剂量反应曲线方程中, 求出对应的浓度值, 即为其分析灵敏度。

### 1.13 统计学处理

分析灵敏度的结果采用 GraphPad Prism5 分析; 与对照试剂相关性分析采用 GraphPad Prism5; Bland-Altman 分析采用 SPSS18.0 统计软件进行处理; 本试剂的 Kappa 值采用 SPSS18.0 统计软件计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组抗原的制备以及鉴定

利用 PTO-T7 载体表达 N 端带有 6 个 His 标签的 cTnT 区段抗原。由于 cTnT N 端 1-71 aa 是不稳定的易变区, 而且发生急性心肌梗死时产生的 cTnT 为 cTnT-ND, 此时外周血中 cTnT-ND 含量上升, 通过试剂检出的 cTnT 大部分为 cTnT-ND<sup>[21]</sup>, 因此从 71 aa 开始进行不同截短抗原表达利用亲和层析纯化截短抗原 (图 1) 利用购买的 cTnT 抗原免疫获得的兔多抗血清评价, 均显示具有抗原性。

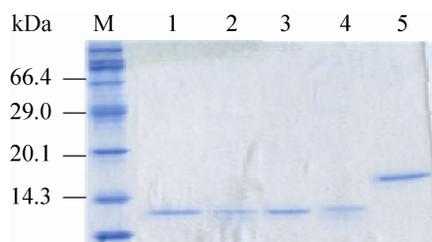


图 1 纯化 cTnT 截短抗原图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of truncated cTnT antigen. M: protein marker; 1: B6-71-130; 2: B6-101-160; 3: B6-131-190; 4: B6-161-220; 5: B6: 71-285.

### 2.2 cTnT 单克隆抗体的制备与鉴定

利用常规单抗制备筛选技术, 开展了 4 个融合获得了 33 株抗-cTnT 单抗。

#### 2.2.1 cTnT 单抗表位鉴定

将这些单抗分别与上述制备的全长抗原以及截短抗原、合成肽 (120-150 aa) 进行反应, 结果见图 2。发现大多数单抗的识别表位都是位于 71-101 aa 或者 120-160 aa。评价这些单抗与 cTnI 抗原的反应性, 结果显示其与 cTnI 抗原无交叉反应。

#### 2.2.2 单抗相互阻断实验

通过间接阻断 ELISA 方法获得不同单抗之间的相互阻断情况的数据 (图 2), 利用组间连接聚类方法进行系统聚类分析<sup>[22]</sup>, 结果可以将上述制备的 33 株单抗分为 3 类, 其中 1B7/3G8/5E12/5F7/8G7/14D3/3F7 分为一类, 主要是识别 71-101 aa 的偏线性表位单抗, 这一类单抗基本识别表位一致; 第二类单抗是 7D2/E2G10/E16H8/E3F2/E18E11/E2G2/E13B7/8D5/C8G11/C8B2/E12C10, 主要是识别 120-160 aa 的偏线性表位单抗以及对这些表位都不反应的单抗, 但是可能也存在偏构象单抗类似 120-160 aa 表位的单抗; 第三类单抗是完全偏构象型单抗对现有区段抗原都不反应。

#### 2.2.3 单抗配对筛选

将获得的 33 株单抗分别标记 HRP, 使用定量的抗原以及一份高浓度血清作为样品进行单抗与酶标记单抗的正交配对检测, 根据检测灵敏度以及特异性筛选到 4 个配对: D2G11-4F12-HRP; E4G6-B12D8-HRP; E16H8-C8G11-HRP; E4G6-8D5-HRP。这 4 个配对又进行灵敏度的平行比较以及选择 3 份阳性样本和山羊血清、人血清白蛋白进行配对的特异性评价, 结果见图 3。从结果显示 E16H8-C8G11 对抗原检测的灵敏度最优, 对样本检测较好且无非特异性反应, 因此

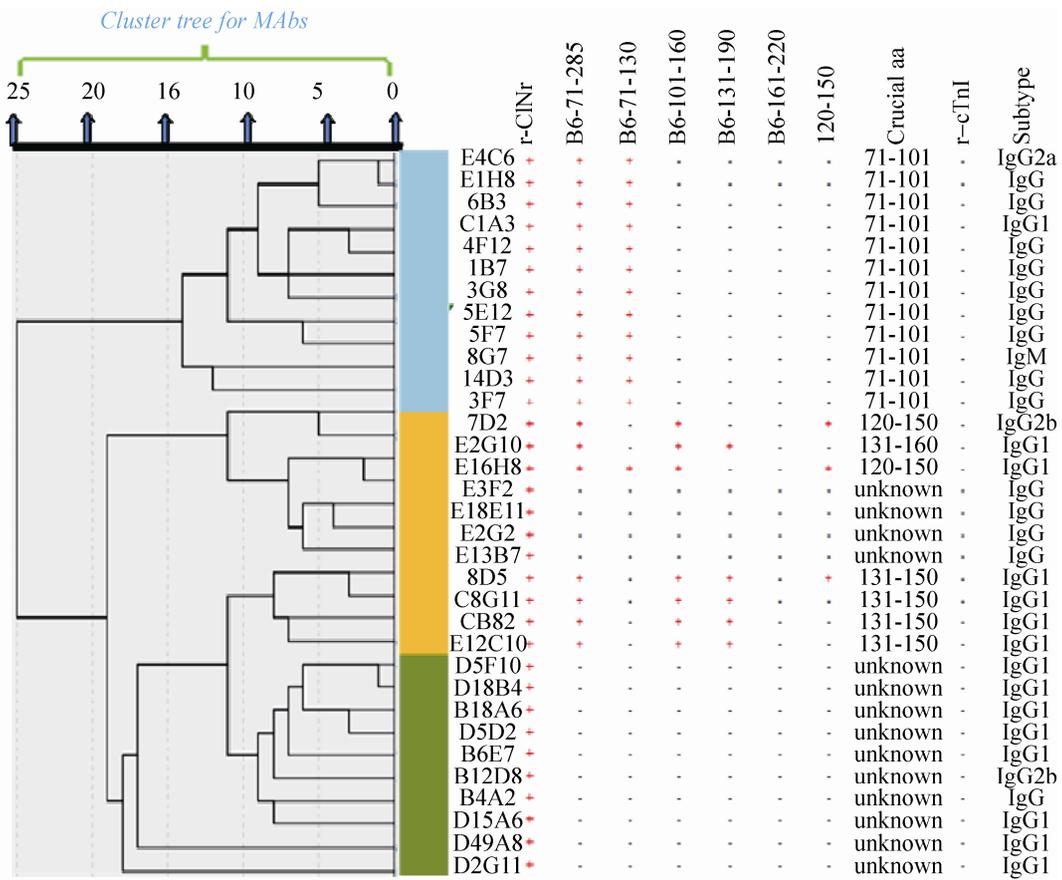


图 2 单抗的阻断试验及性质鉴定图谱

Fig. 2 Blocking test and characterization of monoclonal antibodies.

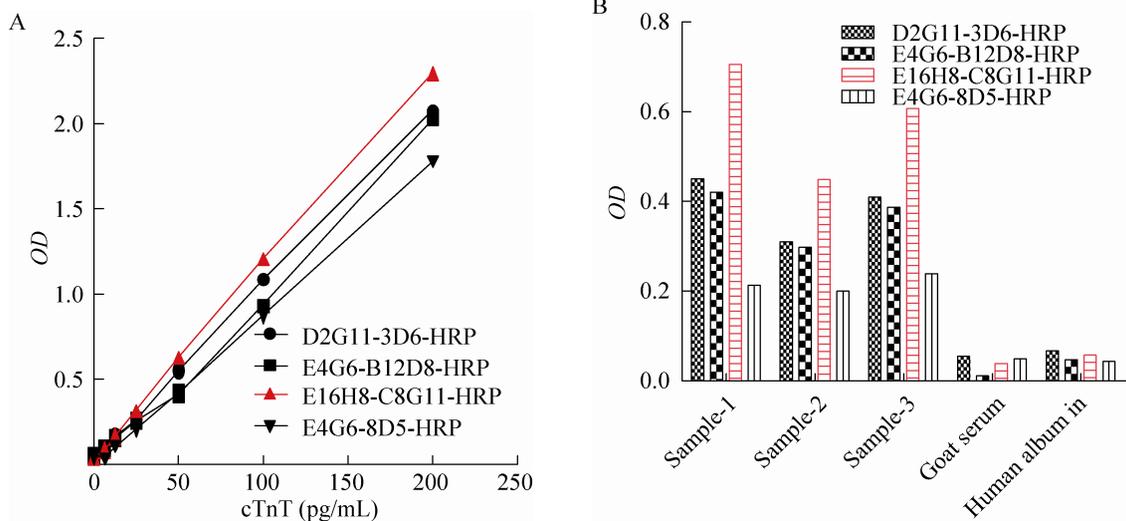


图 3 比较不同抗体配对检测 (A) cTnT 抗原和 (B) 样本

Fig. 3 Comparison of different pairs of antibodies in detection of cTnT antigen (A) and samples (B).

最终选择该配对用于 cTnT 管式化学发光试剂的研制。最后还选用 E16H8-C8G11 配对评价 cTnI 以及 TnC 的交叉反应情况,结果显示对二者无交叉。

## 2.3 cTnT 管式化学发光平台检测系统的建立及应用

### 2.3.1 试剂分析灵敏度

以 L 系列参考品建立四参数拟合试剂剂量反应曲线,通过重复测定基质血清得出所建立化学发光试剂的分析灵敏度为 0.009 2 ng/mL (图 4)。

### 2.3.2 试剂与同类产品的比较

检测有对比试剂罗氏 E170 检测背景的标本 220 份,根据定量结果,以 < 0.1 ng/mL 为正常参考值,将 220 份标本的结果判定为正常或异常,考核其判定符合率。本研发试剂与罗氏试剂的结果总体符合率为 95.00%,表明本试剂有良好检测性能,对临床 cTnT 的异常与否判定准确,结果如图 5、6 和表 1 所示。

检测有罗氏 E170 检测背景的标本 220 份,将定量结果与罗氏的定量结果进行相关性比较。对其进行线性回归,考察其定量相关性程度。本试剂与罗氏的定量值经过直线回归后,

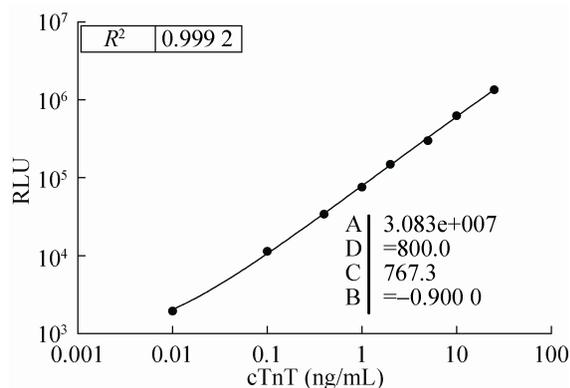


图 4 试剂分析灵敏度结果

Fig. 4 The analytical sensitivity of the assay.

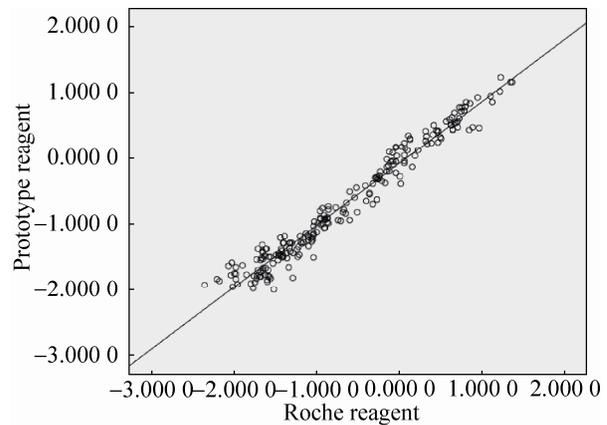


图 5 相关性分析散点图

Fig. 5 Scatter plots of correlation analysis.

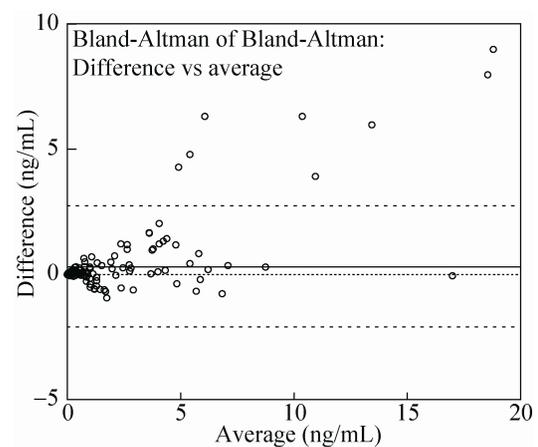


图 6 两试剂检测结果 Bland-Altman 图

Fig. 6 Bland-Altman analysis of the two assays.

得到的直线斜率为 1.065、截距 -0.078 26, 相关系数  $r$  达到 0.959 9, 表明两试剂有良好的相关性。其中漏检的 10 份标本主要都是灰区的标本。

### 2.3.3 临床样本检测

检测临床样本 238 例,其中正常人样本 120 例,AMI 病人 118 例。试剂灵敏度为 97.5%,特异性为 99.15%,总符合率为 98.32%,Kappa 值为 0.966 ( $P < 0.001$ ),一致性为最强。结果见表 2。

表 1 与 Roche 检测结果的符合率

Table 1 Coincidence rate with the Roche kit

|                                   |                              | Detection results of Roche reagent |                              |       |
|-----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------|
|                                   |                              | Positive<br>( $\geq 0.1$ ng/mL)    | Negative<br>( $< 0.1$ ng/mL) | Total |
| Detection results of this reagent | Positive ( $\geq 0.1$ ng/mL) | 99                                 | 1                            | 100   |
|                                   | Negative ( $< 0.1$ ng/mL)    | 10                                 | 110                          | 120   |
|                                   | Total                        | 109                                | 111                          | 220   |

表 2 试剂检测结果与临床样本背景的比较

Table 2 Comparison of test results with clinical samples

|             |                    | AMI<br>(case) | Normal<br>(case) | Total |
|-------------|--------------------|---------------|------------------|-------|
| Test result | Abnormal<br>(case) | 117           | 1                | 118   |
|             | Normal<br>(case)   | 3             | 117              | 120   |
|             | Total<br>(case)    | 120           | 118              | 238   |

### 2.3.4 体检人群样本检测

检测 784 例排除了近期有服用处方及自服药、血压异常及有心脑血管相关疾病的体检人群样本。结果显示 95% 体检人群的 cTnT 浓度小于 0.016 3 ng/mL, 99% 体检人群的 cTnT 浓度小于 0.080 6 ng/mL, 符合 WHO<sup>[23]</sup> 对急性心肌梗死的定义标准。

## 3 讨论

心肌肌钙蛋白 (Cardiac troponin, cTn) 是由 3 种亚基组成: 心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌钙蛋白 C (TnC)。所以在检测的过程中要求较高的特异性, 根据这个要求心肌肌钙蛋白 T 定量测定试剂盒 (化学发光微粒子免疫检测法) 中使用的是能与 cTnT 特异性反应的一对单克隆抗体。本研究主要目的是建立高特异性以及高灵敏度的化学发光微粒

子免疫检测试剂, 为此我们首先需要获得高特异性以及高灵敏度的心肌肌钙蛋白 T 的单克隆抗体。我们利用大肠杆菌表达的 cTnT 免疫筛选获得大量的单抗, 并对单抗进行表位分析以及特异性分析, 结果显色大多数单抗的识别表位都是在 71–130 aa 与 120–160 aa 之间, 而且对 cTnI 等都无交叉。没有鉴定出表位的几个单抗, 有可能是 1–71 aa 的单抗, 也有可能是构象表位的单抗。本研究制备的心肌肌钙蛋白 T 的特异性单抗为建立心肌肌钙蛋白 T 定量测定试剂盒解决了关键原料的来源, 促进国产化定量试剂研发的速度。

我们利用心肌肌钙蛋白 T 的特异性单抗 E16H8 以及 C8G11 建立定量检测试剂。通过试剂性能验证, 表明心肌肌钙蛋白 T 定量测定试剂盒能达到罗氏试剂的水平, 与罗氏试剂的结果总体符合率为 95.00%, 与罗氏的定量值经过直线回归后, 得到的直线斜率为 1.065, 截距为  $-0.078 26$ , 相关系数  $r$  达到 0.959 9。

对心肌损伤的诊断在诸多诊断急性心肌梗死 (AMI) 的临床生化指标中, CK-MB (血清心肌酶) 曾一度被认为是诊断 AMI 的“金标准”, 已广泛应用多年。随着对心肌肌钙蛋白 (cTn) 深入研究, 无论是对心肌的特异性还是诊断敏感性, CK-MB 的作用受到越来越多人的质疑。

cTn 被认为是目前最好的确定标志物,正逐步取代 CK-MB 成为 AMI 的诊断“金标准”。检测 238 例临床样本,灵敏度为 97.5%,特异性为 99.15%,其中有 4 例不符的样本都是在临界值附近属于灰区样本。

目前除了罗氏有成熟的化学发光检测试剂外,其他公司大部分都是有 cTnI 检测试剂而较少有 cTnT 检测试剂,价格昂贵。虽然国内已有一些公司已经研发出一些利用荧光免疫层析法和胶体金免疫层析法的检测试剂,但是灵敏度还未能达到要求,而化学发光免疫分析具有更高的灵敏度、更宽的线性范围、更好的重复性及更容易实现高通量的检测<sup>[24-25]</sup>。故研究国产心肌肌钙蛋白 T 定量发光检测试剂盒已经迫在眉睫。

总之,本研究建立的心肌肌钙蛋白 T 的全自动管式化学发光免疫检测试剂是一种准确、可靠、可定量、高通量的检测方法,有利于国内各级医院以及临床单位广泛开展 cTnT 指标检测,有利于提高我国对急性心肌梗死 (AMI) 病人进行早期诊断和治疗,降低病人的死亡风险。

## REFERENCES

- [1] World Health Organization. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation*, 1979, 59: 607-609.
- [2] Thygesen K, Alpert JS, White HD on behalf of the joint ESC/ACCF/AHA/WHF task force for redefinition of myocardial infarction. *JACC*, 2007, 50: 2173-2195.
- [3] Huang JF, Zhang XF, Chen PJ. Values of D-dimer, cTnT and myocardial enzymogram detections in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Int J Lab Med*, 2015, 36(10): 1325-1326, 1329 (in Chinese).
- 黄建锋, 张小锋, 陈丕绩. D-二聚体、cTnT 及心肌酶谱检测在急性心肌梗死诊断中的价值. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(10): 1325-1326, 1329.
- [4] Hu XB, Xiang XJ, Guo XC, et al. Significance investigation of high-sensitivity cardiac troponin T for viral myocarditis in children. *Labor Med*, 2014, 29(4): 307-311 (in Chinese).
- 胡孝彬, 向小节, 郭晓聪, 等. 高敏肌钙蛋白 T 对儿童病毒性心肌炎诊断价值探讨. *检验医学*, 2014, 29(4): 307-311.
- [5] Lin HM, Sun QK, Hu LY. Clinical significance of NT-proBNP, cTnT, hs-CRP measurements in patients with chronic heart failure. *Int J Lab Med*, 2013, 34(15): 1965-1966, 1968 (in Chinese).
- 林慧铭, 孙全昆, 胡礼仪. 慢性心衰患者血 NT-proBNP、cTnT、hs-CRP 检测的临床意义. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(15): 1965-1966, 1968.
- [6] Kitamura M, Hata N, Takayama T, et al. High-sensitivity cardiac troponin T for earlier diagnosis of acute myocardial infarction in patients with initially negative troponin T test-comparison between cardiac markers. *J Cardiol*, 2013, 62(6): 336-342.
- [7] Roberts A. Biomarkers: hs-cTnT measurement to rule out MI. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11: 311.
- [8] Heeschen C, Hamm CW, Goldmann BU, et al. for PRISM study investigators. Troponin concentrations for stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. *Lancet*, 1999, 354: 1757-1762.
- [9] Masson S, Pirelli S, Pulitano G, et al. Circulating markers of myocyte injury predict first recurrence of atrial fibrillation. New Orleans: AHA, 2008, 11: 8-12.
- [10] Lauer B, Niederau C, Kühl U, et al. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *JACC*, 1997, 30(5): 1354-1359.
- [11] Swaanenburg CJM, Klaase JM, DeJongste MJL, et al. Troponin I, troponin T, CKMB-activity and CKMB-mass as markers for the detection of myocardial contusion in patients who experienced

- blunt trauma. *Clin Chim Acta*, 1998, 272(2): 171–181.
- [12] Giannitsis E, Müller-Bardorff M, Kurowski V, et al. Independent prognostic value of cardiac troponin T in patients with confirmed pulmonary embolism. *Circulation*, 2000, 102(2): 211–217.
- [13] Herman EH, Lipshultz SE, Rifai N, et al. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Res*, 1998, 58(2): 195–197.
- [14] Harlow E, Lane D. Monoclonal antibodies//Harlow E, Lane D, Eds. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 139–312.
- [15] Liu PG, Li GQ, Chen YX, et al. Chemiluminescent immunoassay for high-sensitivity C-reactive protein. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1150–1156 (in Chinese).  
刘平果, 李国强, 陈毅歆, 等. 一种定量检测人血清高敏 C 反应蛋白的化学发光免疫方法. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1150–1156.
- [16] Liu YN, Li XY, Li ZH, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) VP4. *Chin J Biotech*, 2014, 30(12): 1660–1668 (in Chinese).  
柳亚楠, 李夏莹, 李忠华, 等. 传染性法氏囊病毒 VP4 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. *生物工程学报*, 2014, 30(11): 1660–1668.
- [17] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal Biochem*, 1984, 136(2): 451–457.
- [18] Guo YL, Chen YX, Huang DD, et al. Preparation and selection of the monoclonal antibody used for kits to detect the p24 antigen of HIV-1. *Chin J Zoon*, 2007, 23(6): 527–531 (in Chinese).  
郭永利, 陈毅歆, 黄德党, 等. 适于 HIV-1 p24 抗原检测试剂的单抗制备与筛选. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(6): 527–531.
- [19] Chen LY, Lin HJ, Weng ZX, et al. Development of detection kit for T cell infected with *Mycobacterium tuberculosis* based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer. *J Mol Diagn Ther*, 2015, 7(5): 296–301 (in Chinese).  
陈鹭颖, 林海军, 翁祖星, 等. 基于全自动管式化学发光免疫检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立. *分子诊断与治疗杂志*, 2015, 7(5): 296–301.
- [20] Qi JL, Shao J, Peng K, et al. Preparation of monoclonal antibodies against neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and development of an antibody-based chemiluminescence immune quantification assay. *Chin J Biochem Drugs*, 2015, 35(4): 5–9 (in Chinese).  
齐家龙, 劲佳, 彭宽, 等. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的单克隆抗体制备及化学发光免疫定量检测试剂研究. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(4): 5–9.
- [21] Feng HZ, Biesiadecki BJ, Yu ZB, et al. Restricted N-terminal truncation of cardiac troponin T: a novel mechanism for functional adaptation to energetic crisis. *J Physiol*, 2008, 586(14): 3537–3550.
- [22] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol*, 2012, 57(4): 720–729.
- [23] Müller-Bardorff M, Hallermayer K, Schröder A, et al. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical validation. *Clin Chem*, 1997, 43(3): 458–466.
- [24] Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Soto-Chinchilla JJ, et al. Analysis of pesticides by chemiluminescence detection in the liquid phase. *TrAC Trends Analyt Chem*, 2005, 24(11): 927–942.
- [25] Arakawa H, Maeda M, Tsuji A. Enzyme immunoassay of cortisol by chemiluminescence reaction of luminol-peroxidase. *Bunseki Kagaku*, 1977, 26(5): 322–327.

(本文责编 陈宏宇)