



## 基于肌钙蛋白复合物的新一代心肌肌钙蛋白I检测系统



心肌肌钙蛋白I (cTnI) 作为心肌损伤最敏感特异的标志物，目前在急性心肌梗死以及急性冠状动脉综合症的诊疗中已被广泛应用。根据相关指南的建议，cTnI的检测已经被推荐为急性心血管疾病诊断的必要环节。

cTnI试剂的性能对于诊断结果的判断至关重要。然而，肌钙蛋白复杂的生化性质，使得开发高敏感特异的检测试剂成为一项艰巨的挑战。根据HyTest科学家对于肌钙蛋白20余年的研究结果，针对cTnI分子本身的干扰因素如图1所示。其中，cTnI分子末端的水解以及中间区域的自身抗体被认为是目前cTnI检测试剂开发的两大主要难题。

然而，肌钙蛋白复杂的生化性质，使得开发高敏感特异的检测试剂成为一项艰巨的挑战。根据HyTest科学家对于肌钙蛋白20余年的研究结果，针对cTnI分子本身的干扰因素如图1所示。其中，cTnI分子末端的水解以及中间区域的自身抗体被认为是目前cTnI检测试剂开发的两大主要难题。

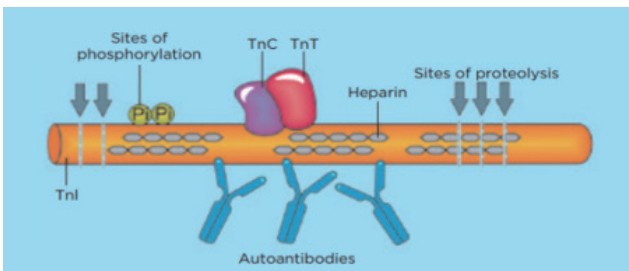


图1. 血液中心肌肌钙蛋白I的干扰因素

传统的cTnI检测试剂所使用的抗体均仅识别cTnI分子本身。HyTest科学家的研究结果显示，心梗患者血液中的cTnI分子除了全长分子之外，还存在11种末端不同程度降解的分子片段。其中，cTnI分子最稳定的区域约为24-110的氨基酸区域。因此，为了更好地检出cTnI，识别分子中间区域的抗体成为了首选。然而，目前的研究发现，肌钙蛋白最主要的自身抗体所识别的区域也是cTnI分子的中间区域，这无疑是在开发高特异cTnI试剂的最大阻碍。

根据HyTest科学家关于肌钙蛋白存在形式的最新研究，当患者心梗发作后，cTnI会以ITC复合物的形式释放进入

血液。随后，ITC复合物中的cTnI和cTnT会逐步降解，并形成低分子量的ITC复合物。随着cTnT进一步从ITC复合物中游离出来，最终形成了IC复合物。心梗患者血液中肌钙蛋白形式的变化如图2所示。尽管随着心梗发病的进展，患者血液中存在多种不同形式的肌钙蛋白复合物，然而，我们发现cTnI始终与TnC结合在一起，且未发现游离cTnI的存在。由于心梗患者血液中肌钙蛋白存在形式的多样性，为了能够等效检出不同形式的复合物，我们推荐使用识别复合物的抗体配对开发新一代的高敏心肌肌钙蛋白I试剂。另一方面，由于待测物为肌钙蛋白复合物，因此可以直接在抗体选择的层面规避cTnI试剂开发的两大难题，即末端水解和自身抗体的干扰。识别肌钙蛋白复合物的检测模型如图3所示。

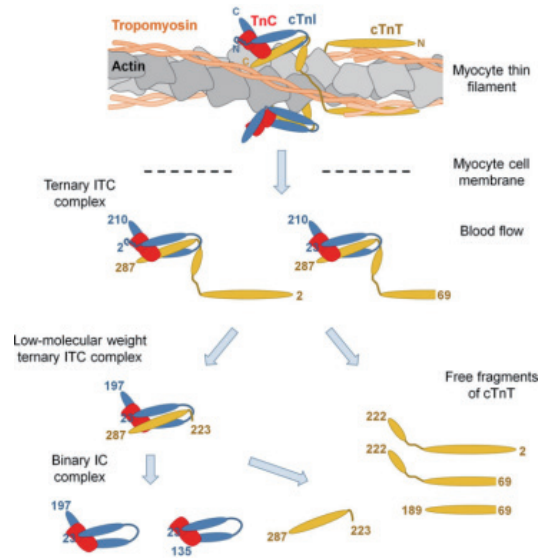


图2. 心梗患者血液肌钙蛋白复合物的释放及其存在形式的变化过程

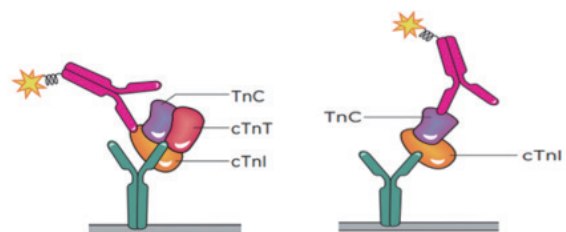


图3. 肌钙蛋白复合物检测模型示意图

针对这种肌钙蛋白复合物的检测模型，我们分别在内部应用实验室的化学发光和荧光侧向层析平台上进行了原型试剂的开发。经过上百种不同的抗体配对组合的尝试，我们最终筛选出了适用于化学发光平台（吖啶酯和碱性磷酸酶）和荧光侧向层析平台的最优推荐配对，具体配对推荐如表1所示。首先，我们推荐使用“1+1”的抗体配对模式进行初始的系统搭建，该模式所使用的抗体的表位分别为cTnI 24-40aar和cTn复合物构象位点，前者位于cTnI分子的中间稳定区域且与skTnI无交叉，可确保对血液cTnI的高效识别；后者则特异性针对肌钙蛋白的存在形式，可稳定检出血液中不同形式的cTnI。为了进一步提升试剂的灵敏度和特异性，我们还建议尝试“2+1”或“2+2”的配对模式，以实现反应性能的最优化。以化学发光平台为例，HyTest开发的肌钙蛋白复合物检测模型如图4所示。

表1. 肌钙蛋白I抗体配对推荐

化学发光平台		荧光侧向层析平台	
捕获抗体	检测抗体	捕获抗体	检测抗体
RecR33+560cc	20C6cc*	20C6cc	RecR33
RecR33+560cc	20C6cc*+7B9cc	20C6cc	RecR85
RecR1+560cc	20C6cc	RecR33+20C6cc	560cc+7B9cc
RecR33+560cc	20C6cc		
RecR33	20C6cc		
RecR85	20C6cc		
RecR1	20C6cc		

\* 我们还提供嵌合抗体版本的20C6抗体（货号RC4TC2，RecChim20C6），可以有助于进一步提升反应灵敏度和特异性。

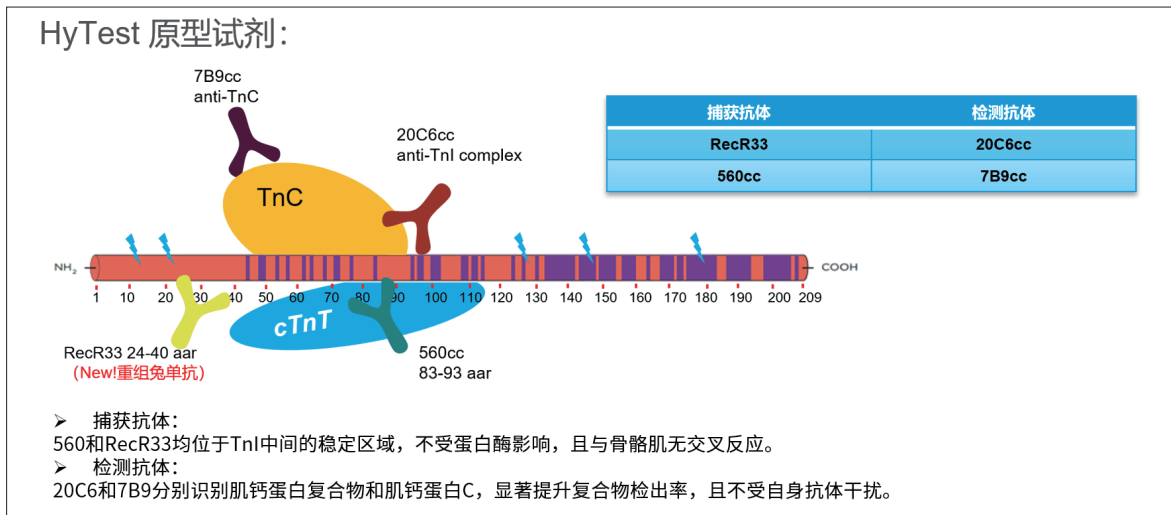


图4. HyTest 肌钙蛋白复合物检测原型试剂

我们对上述原型试剂进行了相关的分析性能评估。发光平台推荐配对的校准曲线如图5A所示，使用内部的肌钙蛋白IC复合物作为校准品进行评测，结果显示该模型的线性范围为0.002-60 ng/mL，最低检出限LoB为2 pg/mL。我们还通过98例的临床样本测试，对该模型的相关性进行了评价，结果显示该原型试剂的检测结果与目前市场上某主流商品化cTnI试剂盒之间存在良好的相关性（图5B）。荧光侧向层析平台的代表性配对的校准曲线如图6A和6C所示，使用内部的肌钙蛋白IC复合物作为校准品进行评测，结果显示该模型的线性范围为0.01-40 ng/mL，最低检出限LoB为0.01 ng/mL。我们还通过若干例的临床样本测试，对该模型的相关性进行了评价，结果显示该原型试剂的检测结果与目前市场上某主流商品化cTnI试剂盒之间存在良好的相关性（图6B和6D）。

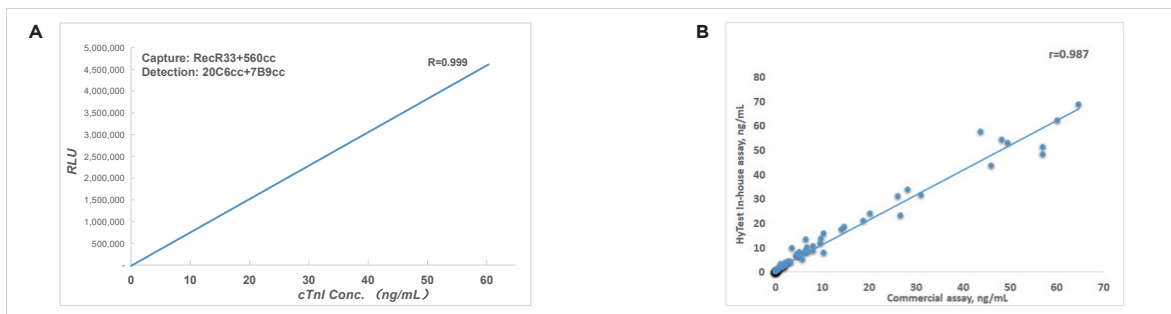


图5. 化学发光代表性配对的校准曲线以及样本相关性结果

A: 校准曲线  
待测抗原：肌钙蛋白IC复合物；磁微粒：MS160链霉素亲和素磁微粒（JSR）  
化学发光仪：科斯迈500S；反应时间：10min

B: 样本相关性结果  
样本数：98例

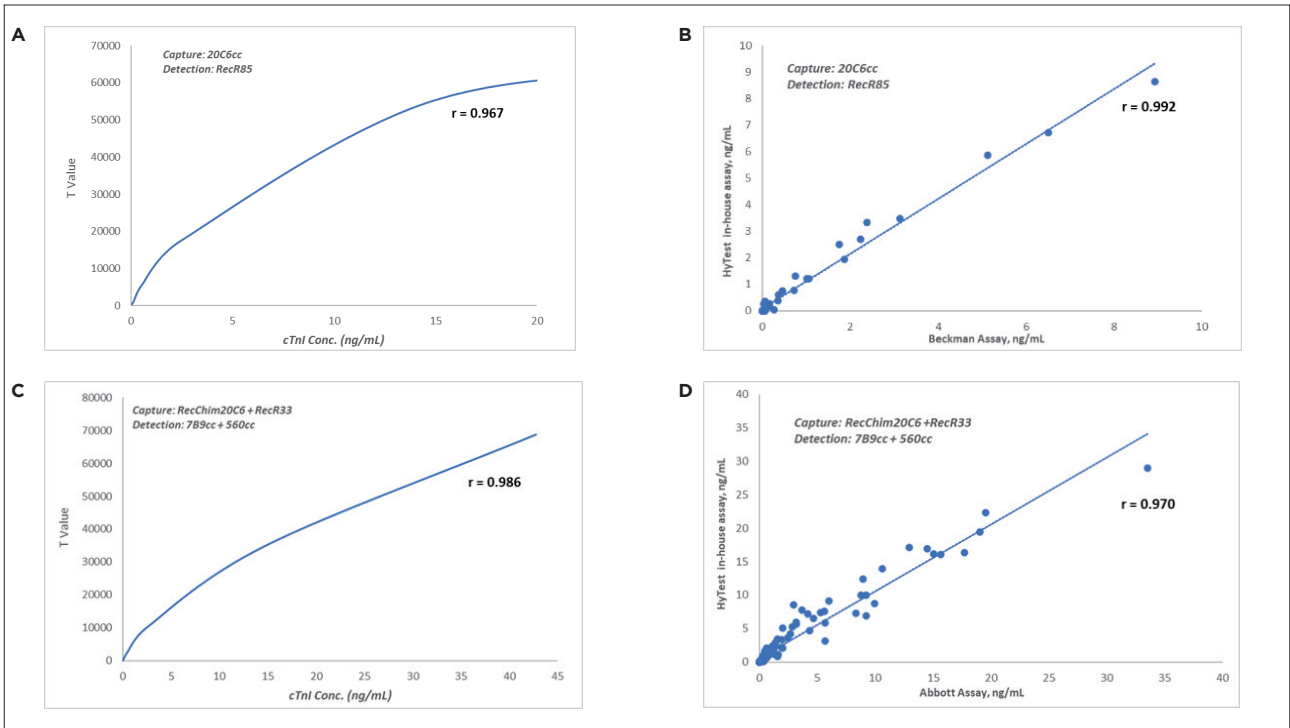


图6. 荧光侧向层析代表性配对的校准曲线以及样本相关性结果

A, B: “1+1”配对的校准曲线以及样本相关性结果（样本数47）。  
C, D: “2+2”配对的校准曲线以及样本相关性结果（样本数109）。  
待测抗原：肌钙蛋白Ic复合物；

T线：链霉亲和素  
结合垫：生物素标记抗体；荧光微球标记抗体  
反应时间：20min

为了进一步提升试剂的反应性能，我们开发了20C6cc抗体的重组嵌合抗体，使用嵌合抗体还可以进一步提升试剂的反应性和特异性。对于测值的准确性没有影响，使用了嵌合抗体的配对评测结果如图7所示，结果显示嵌合抗体可以使整体反应信号进一步提升20-50%，并且对于样本测值的准确性没有影响。同时我们还发现，嵌合抗体的使用可以进一步提升试剂的灵敏度以及正常人群的检出率，结果如图8所示。

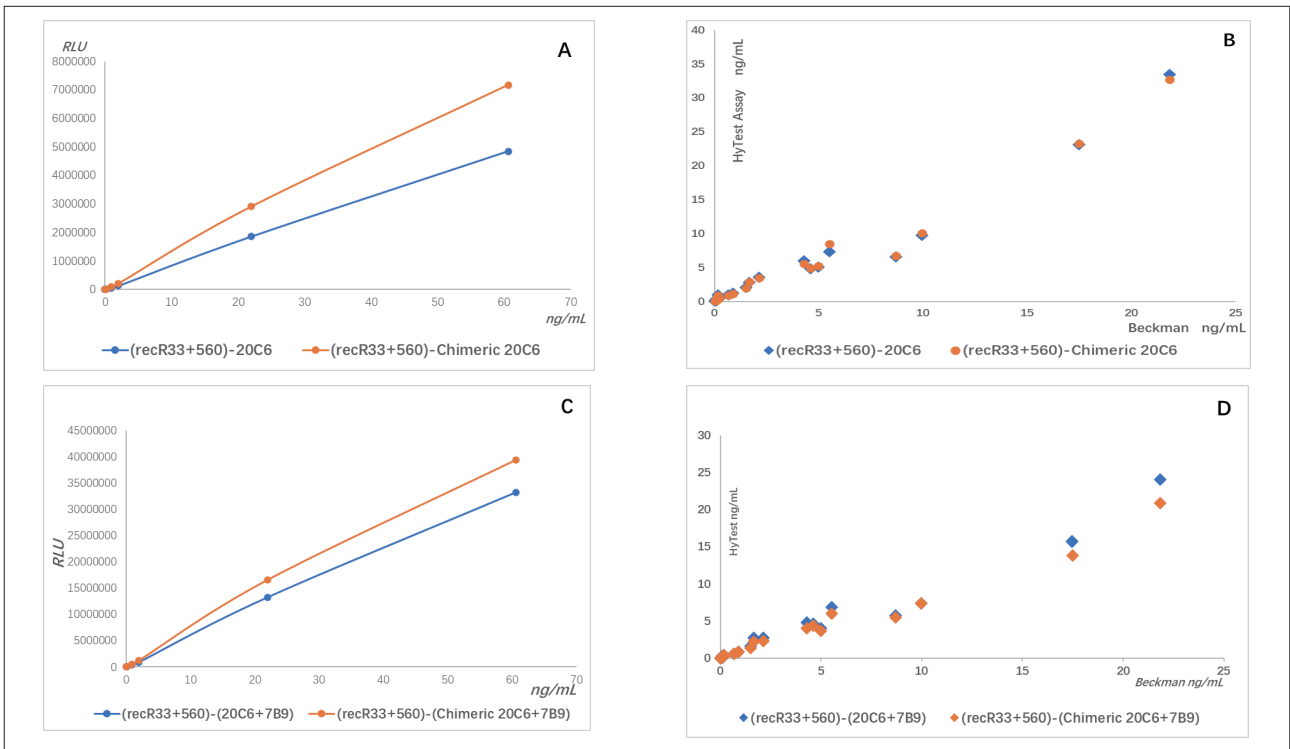


图7. 嵌合抗体20C6在不同标记平台上的评测结果

吡啶酯标记条件下的反应曲线和临床样本比对结果如A和B所示，碱性磷酸酶标记条件下的反应曲线和临床样本比对结果如C和D所示。

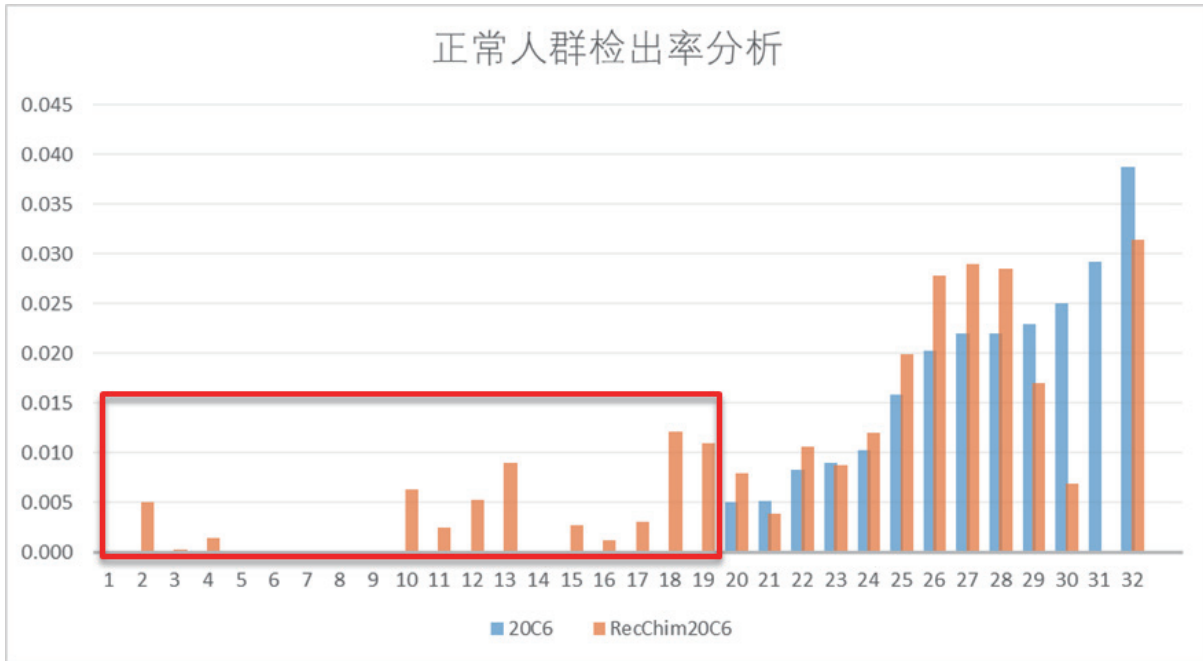


图8. 嵌合抗体的正常人群测试性能 (样本数: 32例)

使用原始20C6cc的正常人群检出率为40%; 使用嵌合20C6 (RecChim20C6) 的正常人群检出率为71%。

对于高敏肌钙蛋白试剂而言, 抗体配对的分析特异性也不容忽视, 因为即使抗体与骨骼肌肌钙蛋白仅存在极小的交叉反应也有可能导致结果的假阳性。我们将HyTest原型试剂与若干交叉反应物进行了测试, 结果显示, 在干扰物浓度高达1000µg/L的情况下, 该配对与其均无交叉反应, 结果见表2。

表2 HyTest原型试剂的分析特异性。

干扰物质 (1000 µg/L)	货号	交叉反应率
重组人骨骼肌肌钙蛋白C亚型2	8RKC3	0.00%
重组人慢型骨骼肌/心肌肌钙蛋白C	8RSC4	0.00%
人骨骼肌肌钙蛋白I	8T25	0.00%
人心肌肌钙蛋白T	8T13	0.03%
人肌钙蛋白C	8T57	0.01%
肌红蛋白	8M50	0.00%
髓过氧化物酶	8M80	0.00%

此外, 我们还提供两种不同形式肌钙蛋白复合物重组抗原, 可用于制备试剂的校准品以及质控品。重组抗原与天然抗原的对比数据如图9所示, 结果显示, 我们提供的重组ITC复合物 (货号8ITCR) 和IC复合物 (货号8ICR3), 与天然抗原具有相似的免疫活性。

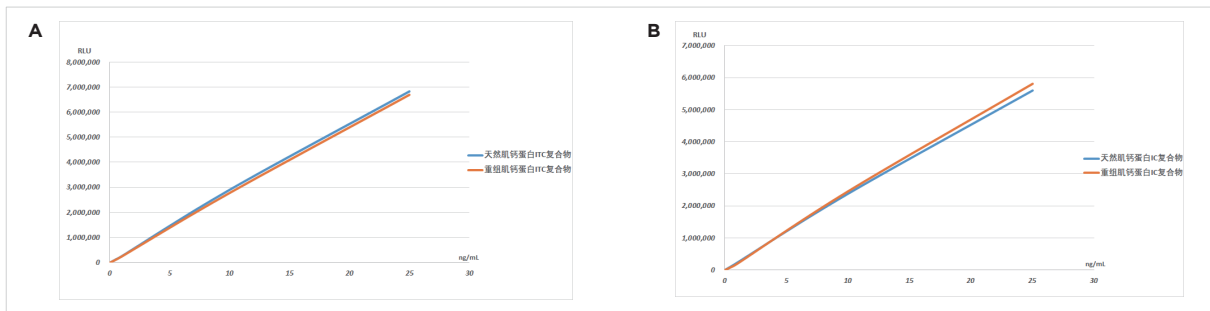


图9. 不同肌钙蛋白复合物重组抗原与天然抗原的免疫活性对比

A: 重组ITC复合物 (货号8ITCR)

B: 重组IC复合物 (货号8ICR3)

抗体配对: 560cc + RecR33 - 20C6cc + 7B9cc (化学发光)

加样量: 50 µL

## 订购信息

### 单克隆抗体

产品名称	货号	单抗	亚型	备注
心肌肌钙蛋白I	RC4T21	RecR1	IgG	EIA, a.a.r. 24-40, 重组兔单抗
		RecR23	IgG	EIA, a.a.r. 24-40, 重组兔单抗
		RecR33	IgG	EIA, a.a.r. 24-40, 重组兔单抗
		RecR85	IgG	EIA, a.a.r. 24-40, 重组兔单抗
		RC560	IgG1	EIA, 重组嵌合抗体
	4T21cc	560cc	IgG1	体外生产, EIA, WB, a.a.r. 83-93
心肌肌钙蛋白复合物	4TC2	20C6cc	IgG2b	体外生产, EIA
	RC4TC2	RecChim20C6	IgG1	EIA, 重组嵌合抗体
肌钙蛋白C	4T27cc	RC7B9	IgG1	EIA, 重组嵌合抗体
		7B9cc	IgG1	体外生产, EIA, WB

即将上市!

即将上市!

### 抗原

产品名称	货号	纯度	来源
肌钙蛋白ITC复合物, 重组	8ITCR	>95%	重组
肌钙蛋白IC复合物, 重组	8ICR3	>95%	重组

## 参考文献

1. **Alexandra V. Vylegzhanina, et al.** Anti-Cardiac Troponin Autoantibodies Are Specific to the Conformational Epitopes Formed by Cardiac Troponin I and Troponin T in the Ternary Troponin Complex. *Clinical Chemistry*. 2017, 63 (1): 343-350.
2. **Ivan A. Katrukha, et al.** Full-Size Cardiac Troponin I and Its Proteolytic Fragments in Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction: Antibody Selection for Assay Development. *Clinical Chemistry*. 2018, 64 (7).
3. **Alexandra V. Vylegzhanina, et al.** Full-Size and Partially Truncated Cardiac Troponin Complexes in the Blood of Patients with Acute Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*. 2019, 65 (7): 882-892.
4. **Sander A.J. Damen, et al.** Cardiac Troponin Composition Characterization after Non ST-Elevation Myocardial Infarction: Relation with Culprit Artery, Ischemic Time Window, and Severity of Injury. *Clinical Chemistry*. 2021, 67 (1): 227-236.
5. **Ivan A. Katrukha, et al.** Myocardial Injury and the Release of Troponins I and T in the Blood of Patients. *Clinical Chemistry*. 2021, 67 (1): 124 -130.