



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102608325 A

(43) 申请公布日 2012.07.25

(21) 申请号 201110215292.7

(22) 申请日 2012.02.24

(71) 申请人 南京诺尔曼生物技术有限公司

地址 210029 江苏省南京市雨花台区铁心桥  
街道马家店工业园区 66-1 号软件楼 5  
楼

(72) 发明人 何仕钊

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

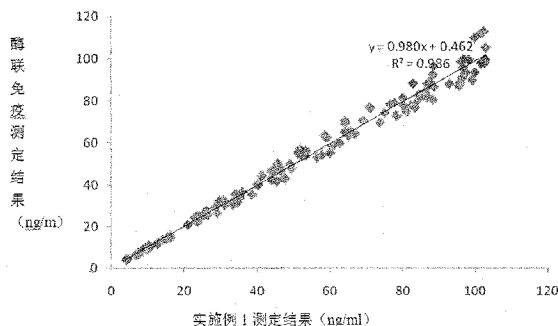
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

脂肪酸结合蛋白 (fatty acid-binding proteins, H-FABP) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及一种测定血清中心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP) 含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足,提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好,适用于各种类型的全自动生化分析仪以及各种特种蛋白仪的免疫比浊法检测脂肪酸结合蛋白含量的试剂盒。技术方案是:免疫增强比浊法检测肌心型脂肪酸结合蛋白试剂盒,包括:a、试剂 R1:缓冲液、防腐剂、加速剂、无机盐、表面活性剂,其余为纯化水;b、试剂 R2:缓冲液、结合有抗人的心型脂肪酸结合蛋白抗体、防腐剂,乳胶微球直径为 60-300nm;c、参考校准品:缓冲液,稳定剂,防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组心型脂肪酸结合蛋白纯品,其余为纯化水。通过以上试剂组合,建立 H-FABP 含量的校准曲线,在全自动生化分析仪上快速的测定血清中 H-FABP 的含量与酶联免疫方法测定的结果有很好的符合性。



1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测人血清中 H-FABP 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1, R2 以及校准液;所述试剂 R1PH 值为 7.0-8.0 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 H-FABP 抗体胶乳试剂;所述标准品为含有定量的 H-FABP 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 H-FABP。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗人 H-FABP 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

步骤 1:将羧化的胶乳在 PH6.5 的溶液活化。

步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 PH7.5-9.0 的缓冲液,加入 H-FABP 抗体,在 37 度反应 4 小时。

步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 PH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

步骤 4:将步骤 3 所得的液体用 PH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

步骤 5:将步骤 4 所得的液体离心去上清液,取沉淀后用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 所述溶液为含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者二种。

4. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 3 所述溶液含有 6-氨基己酸,甘氨酸

5. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述溶液含有的稳定剂选自甘氨酸,小牛血清,以及吐温-20、曲拉通等表面活性剂以及氯化钠、氯化镁中的一种或者几种。

6. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述溶液含有的甘氨酸,小牛血清的浓度为 0.05-0.5% (质量分数) 吐温-20 或者曲拉通浓度为 0.005-0.01% (体积分数) 氯化镁、氯化钠的浓度为 0.05-0.15% (质量分数)。

## 脂肪酸结合蛋白 (fatty acid-binding proteins, H-FABP) 测定试剂盒 (胶乳增强免疫比浊法)

### 技术领域:

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种采用乳胶增强免疫比浊法测定人血清中心型脂肪酸结合蛋白含量的试剂盒。

### 一、背景技术

[0002] H-FABP 是分子量为 14~15kd 的可溶性胞浆蛋白,主要分布于心肌组织中,约占心肌细胞可溶性蛋白的 4%~8%,正常人心肌湿重中所占比例约为 0.5mg/g。在骨骼肌、肾小管、脑组织、乳腺、胎盘组织中也有少量分布。H-FABP 是由 132 个氨基酸残基组成酸性蛋白质,其等电点 (PI) 为 5,其基因定位于 1 号染色体。

[0003] 在正常情况下,长链脂肪酸是心肌细胞的主要能量来源。H-FABP 作为脂肪酸的载体蛋白与心肌内的长链脂肪酸相结合,将其从细胞质膜向线粒体运输,从而进入能量代谢体系中氧化分解,生成三磷酸腺苷,为心肌收缩提供能量。此外,还参与旁路信号传导:如通过脂肪酸信号易位至过氧化物酶体增生物激活受体间接调控基因表达,并被认为是当心肌缺血造成局部长链脂肪酸聚集时,H-FABP 对心肌有保护作用。

[0004] 生理条件下,血浆和尿中不含 H-FABP 或含量很少,正常人血液中可以检测到低浓度的 H-FABP。性别、年龄和昼夜节律均可引起 H-FABP 含量的变化如男性肌肉比例高于女性,因此男性血浆 H-FABP 浓度高于女性;血中 H-FABP 主要由肾脏清除,血浆 H-FABP 浓度随年龄升高。

[0005] H-FABP 具有很强的组织特异性,在心肌损伤后被迅速释放入血,在急性心肌梗死 (AMI) 发病 1 小时开始升高,快速达峰值,约 20h 恢复至基线水平,变化规律与 Mb 相似,但比 Mb 有更高的心肌组织特异性,可以作为 AMI 等心肌损伤早期检测的生化标志物。

### [0006] 二、H-FABP 的检测

[0007] H-FABP 是一种相对稳定的蛋白质,血浆中的 H-FABP 在反复冻溶 8 次后仍具有稳定的免疫活性。在 -80℃ 中其血浆标本可以保存至少 2 年。目前已有多种定性和定量的检测方法可用。最早是 Ockner 于 1974 年提出的放射免疫法,通过测定免疫沉淀中放射性比活度来定量检测 FABP。后又研制出夹心 ELISA 法、免疫传感器法 (an enzyme-linked immunosensor) 等测定方法。近年来的全血小板测定方法,是在一步免疫层析的基础上,采用具有两种相同单克隆抗体的夹层 ELISA 法来测定血浆中的 H-FABP,可在 15 分钟内检测出 H-FABP 的浓度。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的是建立一种新的检测方法,通过羊抗人的心型脂肪酸结合蛋白抗体 (或者单抗) 与胶乳颗粒偶联,采用胶乳增强比浊法来测定人体血清中 H-FABP 的含量,运用该方法的试剂应具有不需要预处理标本,操作简单,准确度高,重复性好,且能够在全自动生化分析仪或者特种蛋白仪以及分光光度计上使用。

[0009] 为了解决上述的技术问题,本发明实现了以下技术:

[0010] 1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法检测 H-FABP 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1,R2 以及校准品;所述试剂 R1:PH 值为 6.5-8.0 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 H-FABP 抗体胶乳试剂;所述标准品为含有定量的 H-FABP 的重组蛋白或者是从人血清中提取出来的天然 H-FABP。

[0011] 2. 所述的 H-FABP 检测试剂盒中的 R1 试剂主要包含缓冲液,无机盐,加速剂和防腐剂。

[0012] 3. 所述的 H-FABP 检测试剂盒中 R2 试剂主要包含稳定剂,抗人单(多)克隆抗体胶乳颗粒,缓冲液,稳定剂和防腐剂。其中乳胶微球直径为 60-300nm,通过不同的乳胶颗粒组合,可以使 H-FABP 达到很好的灵敏度以及更宽的检测范围。

[0013] 4. 试剂 R1 所述的无机盐选自氯化钠,氯化镁,氯化钾一种或几种。缓冲液为:磷酸盐缓冲液,碳酸盐缓冲液,甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。加速剂为聚乙二醇 4000,聚乙二醇 6000,聚乙二醇 8000

[0014] 5. 试剂 R2 所选用的抗体为鼠抗人 H-FABP 单克隆抗体,羊抗人 H-FABP 单克隆抗体,兔抗人 H-FABP 单克隆抗体一种或者几种混合。也可以选鼠抗人 H-FABP 多克隆抗体,羊抗人 H-FABP 多克隆抗体,兔抗人 H-FABP 多克隆抗体其中一种。

[0015] 6. 试剂 R2 中的稳定剂选自小牛自蛋白,甘氨酸,明胶,吐温 20,曲拉通一种或者几种。

[0016] 7. 本发明所述的试剂 R2 为抗人 H-FABP 抗体胶乳试剂,采用的是抗人的 H-FABP 抗体与胶乳颗粒相偶联。经过离心(过滤)的方法去掉未反应的偶联剂以及未反应的抗体,在含有稳定剂和防腐剂的缓冲液中分散而成。

[0017] 8. 所述抗人 H-FABP 抗体的胶乳试剂的制备包括以下步骤。

[0018] 步骤 1:将胶乳在 PH6.5 的溶液中活化。

[0019] 步骤 2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加 PH7.5-9.0 的缓冲液,加入 H-FABP 抗体,在 37 度反应 4 小时。

[0020] 步骤 3:将步骤 2 所得的液体用 PH7.5-9.0 的固定液固定 6 小时。

[0021] 步骤 4:将步骤 3 所得的液体用 PH7.5-9.0 的封闭液体封闭 12 小时。

[0022] 步骤 5:将步骤 4 所得的液体洗涤去掉未结合抗体,溶液用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

[0023] 9. 作为优选,步骤 1 中所用的缓冲液为 PBS 缓冲液, MES 缓冲液,碳酸盐缓冲液中的任何一种缓冲液,且浓度在 20-100mmol/L,PH 在 5.5-6.5 之间。

[0024] 10. 作为优选,步骤 1 中所用的胶乳可以是羧基化的聚苯乙烯胶乳或者是氨基化的聚苯乙烯胶乳。其孔径在 60nm-300nm 均可,胶乳颗粒可以是单一的孔径,也可以是不同孔径大小的乳胶颗粒进行组合,可以达到更高的灵敏度以及检测上限。

[0025] 11. 作为优选,步骤 1 中含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐或 N-羟基琥珀酰亚胺中的一种或者多种。

[0026] 12. 作为优选,在步骤 2 中,去掉溶液 1 中所含的未反应的物质,采用的是高速冷冻离心机或者超微孔径的过滤膜进行过滤。

[0027] 13. 作为优选,在步骤 5 中,所用的稳定剂是小牛血清白蛋白,明胶,甘氨酸,脱脂

奶粉一种或者几种相混合。

[0028] 14. 本发明检测的原理是：利用抗原抗体反应，先加入试剂 R1，使血清中的 H-FABP 的位点暴露，当加入抗人的 H-FABP 胶乳颗粒溶液，使溶液中的抗原抗体反应形成不溶于溶液的抗原抗体复合物，从而产生一定的浊度，在人血清中 H-FABP 的含量在一定的范围内 H-FABP 的含量与浊度成正比。再通过标准曲线进行计算，从而得到 H-FABP 的含量。

[0029] 15. 本发明与现有技术相比，具有如下特点：

[0030] 1) 本发明试剂盒具有较高的检测灵敏度，最低检测能够达到 0.1ng/ml，操作简单，快速，从检测到出结果最多只需要 10 分钟，甚至更短。

[0031] 2) 本发明的试剂盒 R2 试剂中的抗体乳胶的制备由于采用的化学偶联法，稳定性好，在 2-8 度至少可以保存 12 个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂，批间差异比较大，而且稳定性不好。

[0032] 3) 本发明试剂盒与进口试剂盒对样品中 H-FABP 含量检测的数据经统计分析，无显著性差异，检测结果可靠，在临床上可以替代进口试剂或者化学发光试剂，大幅降低成本以及检测时间。

#### 附图说明

[0033] 图 1 为本发明实施例 1 的校准曲线（乳胶颗粒的孔径大小为 150nm）

[0034] 图 2 为本发明实施例 1 的测定结果与酶联免疫测定结果的对照分析

[0035] 实施案例

[0036] 本发明公开了一种检测 H-FABP 含量的试剂盒，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，他们都被视为包括在本发明内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围对本文所述的方法和 应用进行改动或者适当变更与组合，本实现和应用本发明技术。

[0037] 下面以具体的实施例对本发明做进一步说明。

[0038] 实施案例一

[0039] 一、H-FABP 试剂 R2 即抗人 H-FABP 抗体胶乳试剂的制备

[0040] 1：将 2g 孔径大小为 150nm 的羧基化的胶乳加入到 50ml 的含有 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 200mg/L 的 PH7.0, 0.4mol/L 的 MES 缓冲液中，反应 2 小时。

[0041] 2：将反应液分成 25ml/管，在转速为 16000 转/分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后，去掉上清液，每管加浓度为 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液 5ml 混匀。继续在速为 16000 转/分的高速冷冻离心机中离心 30 分钟后，去掉上清液，每管加浓度为 0.4mol/L 的磷酸盐缓冲液 25ml 混匀。

[0042] 3：每管加入羊抗人 H-FABP 抗体 50mg，在 37 度反应 6 小时。

[0043] 4：向每管中加入还有 5g/L 的 6-氨基己酸 PH8.0 的磷酸盐缓冲液 10ml。

[0044] 5：每管液体加小牛白蛋白 0.8g，摇匀反应 12 小时。

[0045] 6：将所得的液体通过 2 次离心，转速为 16000 转/分，洗涤去掉未结合抗体，溶液用含有 0.5g/L 的明胶和 0.2g/L 小牛白蛋白和 0.05% 的曲拉通以及 0.1g/L 叠氮钠的 0.4mol/L PBS 缓冲液分散即可。

[0046] 二、H-FABP 试剂 R1 即样品缓冲液的制备

[0047]

<b>磷酸二氢钠</b>	<b>2.86g/L</b>
<b>磷酸氢二钠</b>	<b>28.65g/L</b>
<b>氯化钠</b>	<b>6.87g/L</b>

[0048]

<b>氯化镁</b>	<b>0.34g/L</b>
<b>聚乙二醇 6000</b>	<b>24g/L</b>
<b>叠氮钠</b>	<b>1.5g/L</b>
<b>纯水</b>	<b>1L</b>

[0049] 三 H-FABP 试剂中校准品的制备

[0050] 1 校准品稀释液

[0051]

<b>磷酸二氢钠</b>	<b>2.86g/L</b>
<b>磷酸氢二钠</b>	<b>28.65g/L</b>
<b>氯化钠</b>	<b>9g/L</b>
<b>小牛白蛋白</b>	<b>50g/L</b>
<b>叠氮钠</b>	<b>2.5g/L</b>
<b>稳定剂</b>	<b>10g/L</b>

[0052] 2 按照需要的 H-FABP 参考校准品浓度将相应的重组 H-FABP 纯品 320ng 加入校准品稀释液 2ml 的缓冲液中,制备得到 160ng/ml 浓度的 H-FABP 校准品在使用的时候在用缓冲液按照比例稀释成多个浓度。

[0053] 四 H-FABP 测定方法 (日立 7060 全自动生化分析仪)

[0054] 校准品浓度 :160ng/ml 80ng/ml 40ng/ml 20ng/ml 0ng/ml

[0055] 测定波长 :主波长 :600nm 副波长 :800nm

[0056] 试剂比例 :R1 : R2 : S = 200ul : 50ul : 20ul

[0057] 校准方式 :spline

[0058] 读点方式 :在试剂 R1 与样品加入,反应 5 分钟,读点 A1,然后加入 R2 后,反应 5 分钟,再读点 A2,计算吸光度的变化。

[0059] 校准曲线见图 1

[0060] 五本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0061] 1. 灵敏度测定

[0062] 用本发明所述的试剂盒对空白样本 (含有 5%牛血清的生理盐水)重复测定 20 次,最低检测限度为空白的均值浓度加上二个标准差,得到最低检测限度为 0.1ng/ml。

[0063] 2. 线性范围。

[0064] 3. 线性评估

[0065] 取浓度将近 200ng/ml (184.5ng/ml) 的临床血清标本,进行稀释,至少稀释 6 个点,每个点重复测定 3 次,根据式 (1), (2), (3) 计算出直线方程  $y = a+bx$  :

$$[0066] \quad b = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{n\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \dots\dots\dots (1)$$

$$[0067] \quad |a| = \frac{|\sum Y_i - b\sum X_i|}{n} \dots\dots\dots (2)$$

$$[0068] \quad r = \frac{n\sum X_i Y_i - \sum X_i \cdot \sum Y_i}{\sqrt{[n \cdot \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n \cdot \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \dots\dots\dots (3)$$

[0069] 式中 :b- 回归线的斜率 ;

[0070] |a|- 回归线截距的绝对值 ;

[0071] r- 回归系数 ;

[0072]  $X_i$ - 测定管溶液的浓度 ;

[0073]  $Y_i$ -3 次重复测定的与测定管溶液浓度对应的吸光度均值 ;

[0074]  $i=1, 2, 3, \dots\dots, n$  ;

[0075] n- 测定样本数。

[0076] 经计算得出,在 0.1ng/ml 到 184. ng/ml 的范围内,本试剂盒能达到很好的曲线。

[0077] 4. 与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性。

[0078] 通过测定 100 例标本 (其中阳性血清 70 例,阴性血清 30 例) 本试剂盒与酶联免疫方法的试剂盒的相关系数  $R^2 = 0.920$ , 相关方程为 :

$$[0079] \quad Y = 0.995X + 0.052 \text{ 。}$$

H-FABP校准曲线

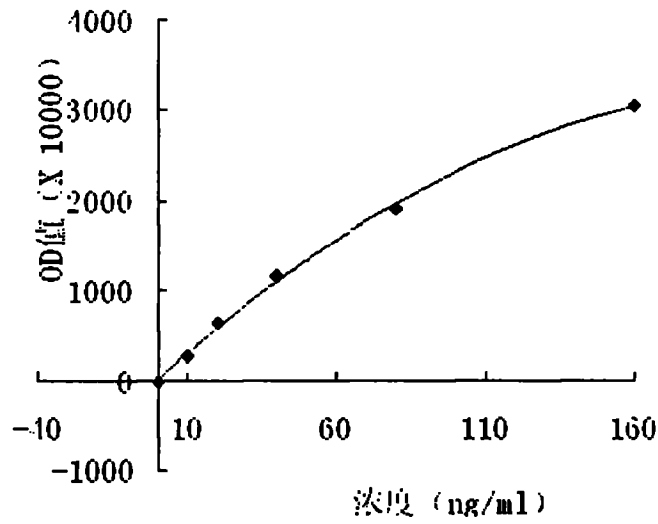


图 1:

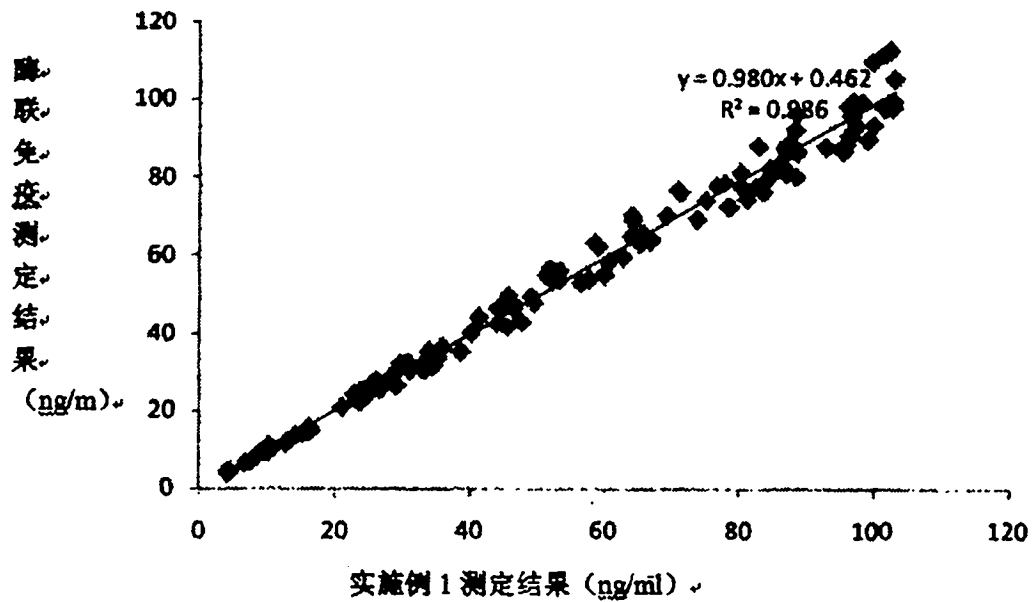


图 2:

专利名称(译)	脂肪酸结合蛋白(fatty acid-binding proteins,H-FABP)测定试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	<a href="#">CN102608325A</a>	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201110215292.7	申请日	2012-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺尔曼生物技术有限公司		
[标]发明人	何仕钊		
发明人	何仕钊		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
其他公开文献	CN102608325B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

摘要(译)

本发明涉及一种测定血清中心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)含量测定的试剂盒。所要解决的技术问题是克服上述背景技术的不足，提供一种样本无需稀释、操作简单、准确度高、重复性好，适用于各种类型的全自动生化分析仪以及各种特种蛋白仪的免疫比浊法检测脂肪酸结合蛋白含量的试剂盒。技术方案是：免疫增强比浊法检测肌心型脂肪酸结合蛋白试剂盒，包括；a、试剂R1：缓冲液、防腐剂、加速剂、无机盐、表面活性剂，其余为纯化水；b、试剂R2：缓冲液、结合有抗人的心型脂肪酸结合蛋白抗体、防腐剂，乳胶微球直径为60-300nm；c、参考校准品：缓冲液，稳定剂，防腐剂以及根据浓度需要确定的一定量的重组心型脂肪酸结合蛋白纯品，其余为纯化水。通过以上试剂组合，建立H-FABP含量的校准曲线，在全自动生化分析仪上快速的测定血清中H-FABP的含量与酶联免疫方法测定的结果有很好的符合性。

