(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102608325 B
(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201110215292.7

(22)申请日 2012.02.24

(73)专利权人 南京诺尔曼生物技术有限公司
地址 210031 江苏省南京市高新技术开发区星火路10号人才大厦E楼四层

(72)发明人 何仕钊

(74)专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298
代理人 杨本良 文琦

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

审查员 许珊萍

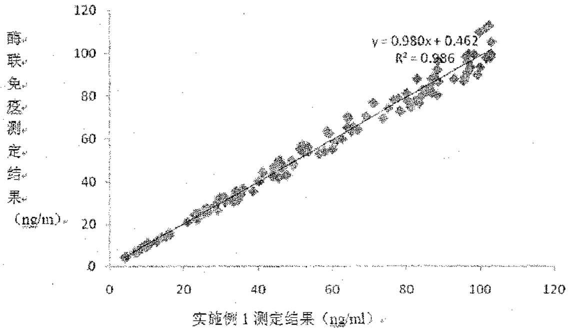
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

心型脂肪酸结合蛋白(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。



CN 102608325 B

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,

包含试剂R1、R2以及标准品,所述试剂R1是pH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

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pH 6.5的溶液中活化;

步骤2:洗涤去掉溶液中的碳化二亚胺,加pH 7.5-9.0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pH 7.5-9.0的固定液固定6小时;

步骤4:将步骤3所得的液体用pH 7.5-9.0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,

其中,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-羟基硫代琥珀酰亚胺中的一种或者二种,

其中,步骤3所述固定液含有6-氨基己酸或甘氨酸,

其中,步骤5所述缓冲液含有的稳定剂选自甘氨酸、小牛血清、吐温-20、曲拉通、氯化钠、氯化镁中的一种或者几种,所述甘氨酸或所述小牛血清的浓度为0.05-0.5%质量分数,所述吐温-20或者所述曲拉通浓度为0.005-0.01%体积分数,所述氯化镁或所述氯化钠的浓度为0.05-0.15%质量分数。

心型脂肪酸结合蛋白(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。

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白蛋白,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20-100mmoI/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-羟基硫代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] 15 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] 16 本发明与现有技术相比,具有如下特点:

[0030] 17 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/mI,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] 18 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] 19 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50mI的含有1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺200mg/L的PH7.0,0.4moI/L的MES缓冲液中,反应2小时。

[0041] 2:将反应液分成25mI/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0.4moI/L的磷酸盐缓冲液5mI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0.4moI/L的磷酸盐缓冲液25mI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-氨基已酸PH 8.0的磷酸盐缓冲液10mI。

[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0.4moI/L PBS缓冲液分散即可。

[0046] 三、H-FABP试剂R1即样品缓冲液的制备

[0047]

磷酸二氢钠	2.86g/L
磷酸氢二钠	28.65g/L

[0048]

氯化钠	6.87g/L
氯化镁	0.34g/L
聚乙二醇 6000	24g/L
叠氮钠	1.5g/L
纯水	1L

[0049] 四H-FABP试剂中校准品的制备

[0050] 1)校准品稀释液

[0051]

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

[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2mI的缓冲液中，制备得到160ng/mI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] 五)H-FABP测定方法(日立7060全自动生化分析仪)

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

[0055] 测定波长:主波长:600nm 副波长:800nm

[0056] 试剂比例:R1:R2:S＝200uI:50uI:20uI

[0057] 校准方式:spIine

[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] 六)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/mI。

[0063] 2.线性范围。

[0064] 2.线性评估

[0065] 取浓度将近200ng/mI(184.5ng/mI)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] $$b=\frac{n\sum X_iY_i-\sum X_i\cdot\sum Y_i}{n\sum X_i^{\ 2}-(\sum X_i)^2}\quad\cdots\cdots(1)$$

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

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

[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，……，n；

[0075] n-测定样本数。

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

[0077] 3与酶联免疫方法的试剂盒测定结果的相关性。

[0078] 通过测定标本本试剂盒与酶联免疫方法的试剂盒的相关系数R^2＝0.9860，相关方程为：Y＝0.980X+0.46。

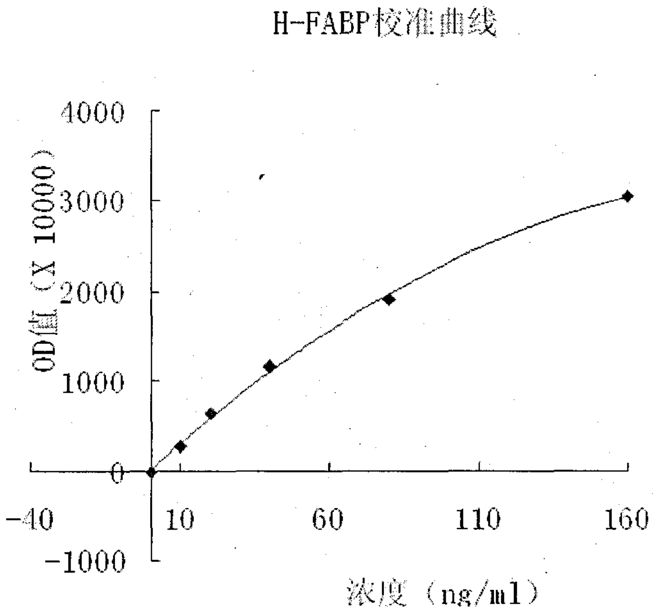

H-FABP校准曲线
4000
3000
2000
1000
0
-1000
OD值（X 10000）
-40
10
60
110
160
浓度（ng/ml）

图1

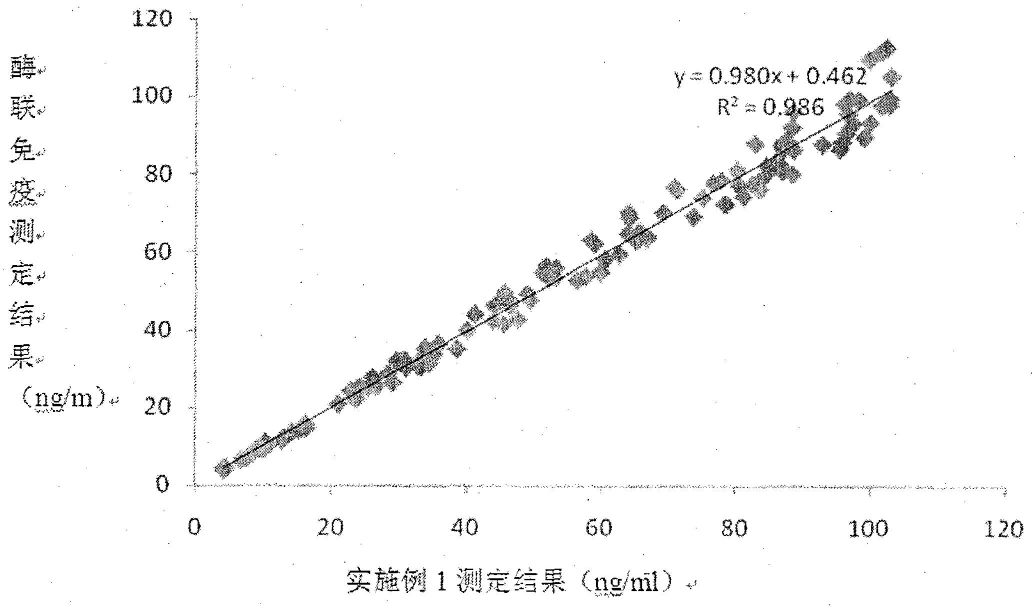
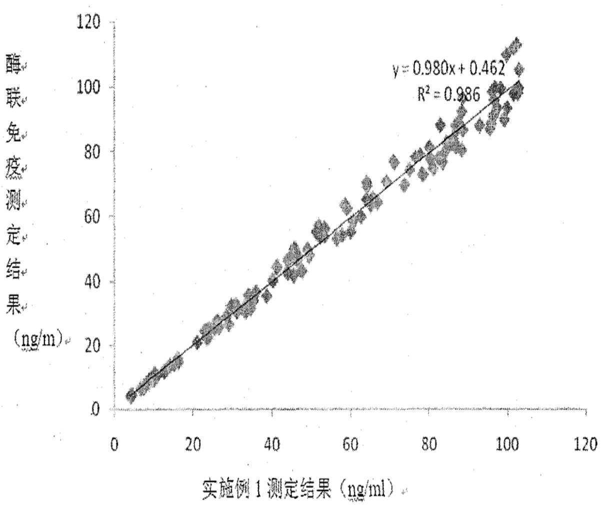

120
100
80
60
40
20
0
酶联免疫测定结果（ng/m）
y = 0.980x + 0.462
R² = 0.986
0
20
40
60
80
100
120
实施例 1 测定结果（ng/ml）

图2

专利名称(译)	心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)测定试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	CN102608325B	公开(公告)日	2016-08-24
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		
代理人(译)	文琦		
其他公开文献	CN102608325A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。