



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107490692 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201610401854.X

(22)申请日 2016.06.09

(71)申请人 常州博闻迪医药科技有限公司

地址 213025 江苏省常州市戚墅堰区东方  
东路167号

(72)发明人 李亚星 刘凤鸣 刘冰

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂  
酶A2的荧光免疫层析方法

(57)摘要

本发明涉及免疫检测分析的技术领域,尤其  
是一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶  
A2的荧光免疫层析方法,包含有血液、抗超敏C反  
应蛋白抗体、抗脂蛋白磷脂酶A2抗体、荧光试剂  
和检测器。抗超敏C反应蛋白抗体为抗超敏C反应  
蛋白单克隆抗体和抗超敏C反应蛋白多克隆抗体  
的一种或组合;抗脂蛋白磷脂酶A2抗体为抗脂蛋  
白磷脂酶A2单克隆抗体和抗脂蛋白磷脂酶A2多  
克隆抗体的一种或组合;荧光试剂为含有所述荧  
光物质的液相和/或固相材料,荧光物质为有机  
荧光染料或稀土元素荧光染料的一种或组合;检  
测器为荧光检测器。以人体血液为检测样本,可  
有效监测血液中超敏C反应蛋白及脂蛋白磷脂酶  
A2,特异性强,重复性好,灵敏度高,操作简单,不  
需特殊仪器设备,不需专业培训,结果清晰易辨,  
易于推广,适合于现场检测。

1. 一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析方法,包含有血液、抗超敏C反应蛋白抗体、抗脂蛋白磷脂酶A2抗体、荧光试剂和检测器,具有如下特征:

1)所述超敏C反应蛋白抗体为抗超敏C反应蛋白单克隆抗体和抗超敏C反应蛋白多克隆抗体的一种或组合;

2)所述抗脂蛋白磷脂酶A2抗体为抗脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体和抗脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体的一种或组合;

3)所述荧光试剂为含有所述荧光物质的液相和/或固相材料,所述荧光物质为有机荧光染料或稀土元素荧光染料的一种或组合;

4)所述检测器为荧光检测器。

2. 根据权利要求1所述的一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫检测方法,其特征在于所述方法包括如下步骤:

1)用化学交联或生物分子间特异性作用将荧光染料偶联到特异性抗体1表面,得到荧光染料修饰的特异性抗体载体,荧光染料的发射波长范围为300~1300nm;

2)制备荧光免疫层析试纸条,所述荧光免疫层析试纸条包括标记垫、层析膜、吸水垫和底板;

3)配置清洗缓冲液,所述清洗缓冲液包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂,pH值为7.0~8.0,其中,牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%,蔗糖的浓度为1~15%,表面活性剂的浓度为0.05~2%;

4)将步骤1)得到的所述荧光染料修饰的特异性抗体1固定到所述标记垫上;

5)在所述层析膜上分别设置一条检测线和一条质控线,其中,质控线上固定有能与所述荧光染料修饰的特异性抗体载体相结合的生物分子,检测线上固定有特异性抗体2;

6)将所述标记垫、层析膜、吸水垫和底板组合,构建成荧光免疫层析试纸条;

7)将收集的血液加载到所述标记垫上,所述血液中所含有的所述抗原与所述荧光染料修饰的特异性抗体结合,形成“荧光染料-特异性抗体1-抗原”复合物,即复合物1;

8)含有所述复合物1的液相流经层析膜,形成“荧光染料-特异性抗体1-抗原-特异性抗体2”复合物,即复合物2,并被捕获固定在所述固相膜上;

9)用所述荧光检测器检测被间接固定到所述固相膜上的荧光染料产生的荧光值,以检测所述血液中抗原的含量。

3. 根据权利要求2所述的一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫检测试剂盒,其特征在于:所述的标记垫上的荧光染料发射波长为550~800nm。

4. 根据权利要求2所述的一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫检测试剂盒,其特征在于:所述层析膜和所述底板在大于550nm时荧光很弱或不含有荧光剂,优选底板为白色,表面附有不干胶,且两者均不含荧光剂。

## 一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,尤其涉及一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫方法。

### 背景技术

[0002] 心脑血管疾病是严重威胁人类,特别是中老年人健康的常见病,全世界每年死于心脑血管病的人数高达千万人,居各种死因首位。经研究证实,心脑血管疾病发生发展很大程度上与动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)相关。定性定量的评估AS的严重性,有助于有效的预测和判断心脑血管栓塞状态,预防心脑血管事件的发生。AS是一种炎性疾病,炎症反应参与了其发生的各个环节,在AS的起始、发展以及稳定性丧失和斑块破裂脱落中均起着重要作用。Lp-PLA2是目前国际上公认的一种新的炎性反应标志物,血液中的Lp-PLA2主要由单核-巨噬细胞和淋巴细胞等炎症细胞合成和分泌。血液中Lp-PLA2含量是预测心血管病、冠心病、脑卒中等疾病的风险预测因子。Lp-PLA2又称血小板活化因子乙酰水解酶,是一类催化脂蛋白和细胞膜上的甘油磷脂二位酰基酯键水解形成非酯化脂肪酸和溶血磷脂的酶族,属于扩大的磷脂酶A2超家族,但是与其他磷脂酶A2超家族成员不同,其生物活性不依赖于钙离子。Lp-PLA2编码基因(PLA2G7)于1995年首次被克隆,具有12个外显子,定位于6号染色体p21.2~12,由441个氨基酸残基组成的一种丝氨酸酯酶,分子量为45 KDa。Lp-PLA2分两类,即在循环中分泌型的Lp-PLA2和存在于动脉粥样斑块中的Lp-PLA2。循环分泌型的Lp-PLA2约70%~80%与低密度脂蛋白LDL结合,20%~30%与高密度脂蛋白或其他脂蛋白结合。Lp-PLA2与LDL结合,生成溶血卵磷脂(Lysophosphatidylcholine,Lyo-PC)和氧化型游离脂肪酸(Oxidized Free Fatty Acids,0x-FA),两者为促炎性物质,通过刺激产生黏附因子和细胞因子,而促进单核细胞由血管腔向血管内膜聚集。然后,单核细胞在内膜下聚集后衍生为巨噬细胞。最后巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白变成泡沫细胞,最终聚集成AS斑块。AS因为其普及面广,在人体内潜伏期长,最后往往以局部缺血、心绞痛、心肌梗塞、中风、冠心病或心力衰竭等致命病的形式爆发。从根本上说心脑血管事件的发生很大程度上取决于AS斑块的稳定性。Lp-PLA2活性反应动脉粥样硬化病变程度,与易损斑块的稳定性有关,相对于稳定性斑块,不稳定斑块的Lp-PLA2的活性明显升高。Lp-PLA2与其他炎性因子如C-反应蛋白等相比,因受其他危险因素的影响较小,继而检测具有更高的灵敏度和特异性。

[0003] CRP是一种 $\gamma$ 球蛋白,分子量为105KD,,是在感染和组织损伤时血浆浓度快速,急剧升高的主要的急性期蛋白。CRP可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,从而清除入侵机体的病原微生物和损伤,坏死,凋亡的组织细胞,在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。1930年,研究人员发现,某些急性感染患者的血清能与肺炎链球菌荚膜C多糖发生沉淀反应,并证实造成沉淀反应的是一种蛋白质,且急、慢性炎症均存在此种反应。这种非特异性炎症蛋白被称为C-反应蛋白(CRP)。CRP由5个含206个氨基酸的相同单体以非共价键构成,蛋白的排列类似淀粉样蛋白P.CRP结构中含结晶样的钙结合环,一个亚单

位与另一个亚单位的钙部位相连成五聚体结构。CRP由炎性淋巴因子刺激肝脏和上皮细胞合成,目前尚未发现CRP先天性缺乏。CRP通过终末协调复合物(C5b-9)参与早期AS的形成。在斑块表面的脆弱部位,单核细胞(巨噬细胞)、T淋巴细胞大量渗入,使斑块不稳定而破裂。在此过程白细胞介素(IL)-6引起肝脏合成CRP增加。动脉粥样硬化(atherosclerosis)斑块内CRPmRNA较正常动脉和肝脏中高7~10倍。AS斑块内激活的补体和CRP,使斑块不稳定和破裂,最终导致血栓形成。因此,升高的CRP有引起血栓形成的危险。临幊上超敏C反应蛋白(hs-CRP)在严重冠心病猝死患者中显着升高,hs-CRP与免疫组化染色的AS薄帽的强度和数量有关。总之,hs-CRP与AS的程度密切相关,成为反映AS炎性活动的指标。

[0004] 将两者结合,进行联合检测可以更加准确有效地评估AS的严重性,诊断心肌损伤及其程度。

[0005] Lp-PLA2在临幊上的检测方法,主要有免疫比浊法、化学发光法、酶联免疫法及胶体金法。hs-CRP的检测方法有单向免疫扩散法、胶乳凝集法、酶联吸附法、速率散射比浊法等。胶体金法是最为常用的快速检测手段之一。因此,采用胶体金法,开发一快速、简便、准确并且费用低廉的心脑血管疾病的诊断试剂盒具有重要的临幊意义。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是针对上述现有技术中存在的不足,提供一种灵敏度高、准确性强、操作简便、能够快速诊断超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析检测方法。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用荧光免疫层析技术,具体的技术方案为:为解决上述技术问题,本发明采用荧光免疫层析技术,具体的技术方案为:一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析方法,包含有血液、抗超敏C反应蛋白抗体、抗脂蛋白磷脂酶A2抗体、荧光试剂和检测器。所述超敏C反应蛋白抗体为抗超敏C反应蛋白单克隆抗体和抗超敏C反应蛋白多克隆抗体的一种或组合;所述抗脂蛋白磷脂酶A2抗体为抗脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体和抗脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体的一种或组合;所述荧光试剂为含有所述荧光物质的液相和/或固相材料,所述荧光物质为有机荧光染料或稀土元素荧光染料的一种或组合;所述检测器为荧光检测器。

[0008] 进一步的,所述的检测方法包括如下步骤:

步骤(1):用化学交联或生物分子间特异性作用分别将荧光染料偶联到单克隆抗体,得到荧光染料修饰的单克隆抗体,波长范围为300~1300nm;

步骤(2):将步骤(1)得到的荧光染料修饰的单克隆抗体固定到标记垫上;

步骤(3):在层析膜上分别设置一条定量检测线和一条质控线,其中,质控线上固定有能与单克隆抗体特异性结合的羊抗小鼠IgG,试剂条定量检测线上固定有多克隆抗体,且该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫上的荧光染料修饰的单克隆抗体所识别的抗原决定簇不同;

步骤(4):将样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫和底板构建成荧光免疫层析试纸条;

步骤(5):将荧光免疫层析试纸条装卡。

[0009] 本发明采用化学交联或生物分子间特异性作用将荧光染料偶联到单克隆抗体的表面,得到荧光染料修饰的单克隆抗体。在本发明中,当荧光染料表面存在活性基团时,可将其直接与特异性抗体反应,不需用化学交联剂;反之,则需通过化学交联剂偶联。其中,化

学交联剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及戊二醛等。

[0010] 在本发明的一个优选实施例中,采用有活性基团的荧光染料修饰单克隆抗体,步骤为:将纯化后的荧光染料溶解,然后加入一定量的单克隆抗体,以缓冲液作为反应介质,反应2~4小时,加入盐酸羟胺终止反应,用色谱、层析柱或超滤离心等方式纯化,得到荧光染料修饰的单克隆抗体。

[0011] 为了提高信号与背景的区分度,本发明中荧光染料的波长范围为300~1300nm,优选为550~800nm。此外,层析膜、底板和扣卡一般在近红外区域(600~800nm)荧光强度极弱,因此,优选波长范围为550~800nm的荧光染料以进一步提高灵敏度,更优选荧光染料发射波长为665nm。

[0012] 荧光染料包括有机荧光染料和稀土元素荧光染料。荧光染料可以是单一化合物的荧光染料或者由几种化合物组成的复合荧光染料,但优选单一化合物荧光染料、且优选具有较强的光稳定性的荧光染料。

[0013] 为了降低对荧光染料荧光信号的影响,本发明采用弱荧光的层析膜、底板以及扣卡,其荧光噪声在大于550nm是会很弱,从而保证获得高荧光信背比,能良好区分信号与背景,进而提高检测灵敏度。优选底板为白色,表面附有不干胶,且扣卡、层析膜、底板及不干胶均不含有荧光剂。

[0014] 本发明的荧光免疫层析试剂盒对血液样品中的超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2进行定量检测。检测时,将血液样品通过加样孔加入到样品垫中,样品沿层析膜向吸水垫方向层析运动。样品层析时间通常为8~25分钟,优选15分钟。层析过后,用Wash缓冲液清洗层析膜,时间为3~8分钟,优选5分钟,以降低本底,提高检测灵敏度。本发明的Wash缓冲液中包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂,pH值为7.0~8.0,其中,牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%,蔗糖的浓度为1~15%,表面活性剂的浓度为0.05~2%。表面活性剂优选吐温20、曲拉通X-100,缓冲液优选Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液。

[0015] 层析结束后,用荧光定量仪判断检测窗中的检测线和质控线,以得出结果。

## 附图说明

[0016] 图1是超敏C反应蛋白线性检测标准工作曲线图;

图2是脂蛋白磷脂酶A2线性检测标准工作曲线图。

## 具体实施方式

[0017] 实施例1:超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光免疫检测试剂盒的制备

### 1) 荧光染料与超敏C反应蛋白抗体的偶联

将发射波长为665nm的荧光染料罗丹明与1 mg/ml的超敏C反应蛋白单克隆抗体混合,室温反应3h,加入1mol/L盐酸羟胺终止反应,并用色谱柱或层析柱分离纯化,得到荧光染料修饰的超敏C反应蛋白单克隆抗体,荧光染料的发射波长为665nm;

### 2) 荧光染料与脂蛋白磷脂酶A2抗体的偶联

将发射波长为665nm的荧光染料罗丹明与1 mg/ml的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体混合,室温反应3h,加入1mol/L盐酸羟胺终止反应,并用色谱柱或层析柱分离纯化,得到荧光

染料修饰的脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体,荧光发射波长为665nm;

### 3)试剂盒的构建

取荧光染料标记物,加入牛血清白蛋白(含量为1%)、蔗糖(含量为10%)以及表面活性剂曲拉通X-100(含量为0.8%),随后均匀喷涂在标记垫上,40℃干燥后密封,室温下保存;

组装超敏C反应蛋白荧光检测试剂条,由样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫组成,顺次粘贴于白色底板上。其中,样品垫为孔状隔膜,选择玻璃纤维,为待测样品收集区;结合垫中含有荧光染料修饰超敏C反应蛋白单克隆抗体;层析膜上固定有定量检测线和质控线,检测线和质控线的间隔为5mm,且检测线固定有区别于标记垫中羊抗人超敏C反应蛋白多克隆抗体,质控线固定有羊抗鼠IgG;

组装脂蛋白磷脂酶A2荧光检测试剂条,由样品垫、标记垫、层析膜、吸水垫组成,顺次粘贴于白色底板上。其中,样品垫为孔状隔膜,选择玻璃纤维,为待测样品收集区;结合垫中含有荧光染料修饰脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体;层析膜上固定有定量检测线和质控线,检测线和质控线的间隔为5mm,且检测线固定有区别于标记垫中羊抗人脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体,质控线固定有羊抗鼠IgG;

组装好后,按照要求切割为所需宽度,并置于扣卡内,加入干燥剂封装,与Wash缓冲液共同构建为超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光检测试剂盒。

#### [0018] 实施例2:超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2荧光检测试剂盒的检测方式

1)取出待检测的血液样本;

2)滴加80uL于加样孔中,正向层析反应15min;

3)配制Wash缓冲液,pH值为7.5,缓冲系统为20mM的磷酸盐,加入牛血清白蛋白(浓度为1%)、蔗糖(浓度为10%)以及表面活性剂曲拉通X-100(浓度为0.8%),在样品孔加入50uL,静置5min;

4)置于荧光定量仪中获取荧光信号强度,得出所检样品的浓度。

#### [0019] 实施例3:试剂盒性能评估试验

1)标准工作曲线的绘制:

取超敏C反应蛋白抗原用阴性血清稀释成浓度为30、20、10、5、0.5、0.1、0ng/mL的标本,取脂蛋白磷脂酶A2抗原用阴性血清稀释成浓度为 800、400、200、100、60、0ng/mL的标本,再分别测定其超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2,以配成值为X,荧光实测值为Y绘制标准工作曲线,经统计拟合标准工作曲线的表达式列出回归方程为: $Y_{超敏C反应蛋白}=0.016423X_{超敏C反应蛋白}+0.11849$ ,拟合系数的平方为 $R^2=0.983$ ,结果见附图1; $Y_{脂蛋白磷脂酶A2}=0.00070X_{脂蛋白磷脂酶A2}+0.05713$ ,拟合系数的平方为 $R^2=0.985$ 结果见附图2;

图1为超敏C反应蛋白线性检测标准工作曲线,测定范围为0.1~30ng/ml;

图2为脂蛋白磷脂酶A2线性检测标准工作曲线,脂蛋白磷脂酶A2测定范围为60~800ng/ml;

2)准确性试验

取同一患者血液标本,用同一批次的试纸条重复检测3次,计算出相对偏差 $B_{超敏C反应蛋白}$ 值为5.23%, $B_{脂蛋白磷脂酶A2}$ 值为7.41%,符合产品设计要求;

3)重复性试验

取同一患者血液标本,用同一批次的试纸条同时检测20次,计算出变异系数CV<sub>超敏C反应蛋白</sub>值为3.75%,CV<sub>脂蛋白酶A2</sub>值为4.74%。符合产品设计要求。

[0020] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

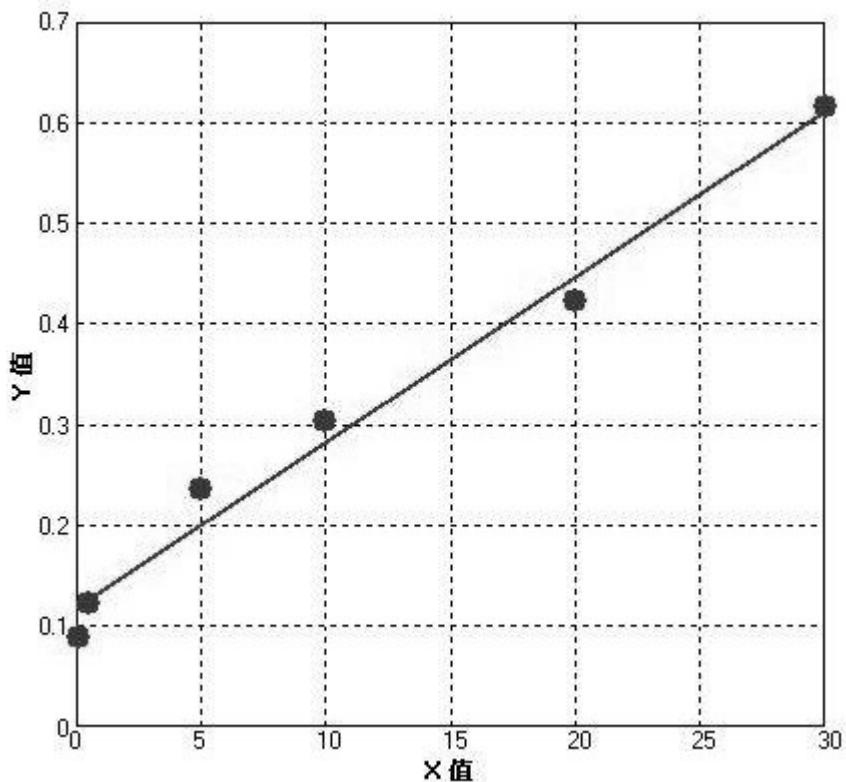


图 1

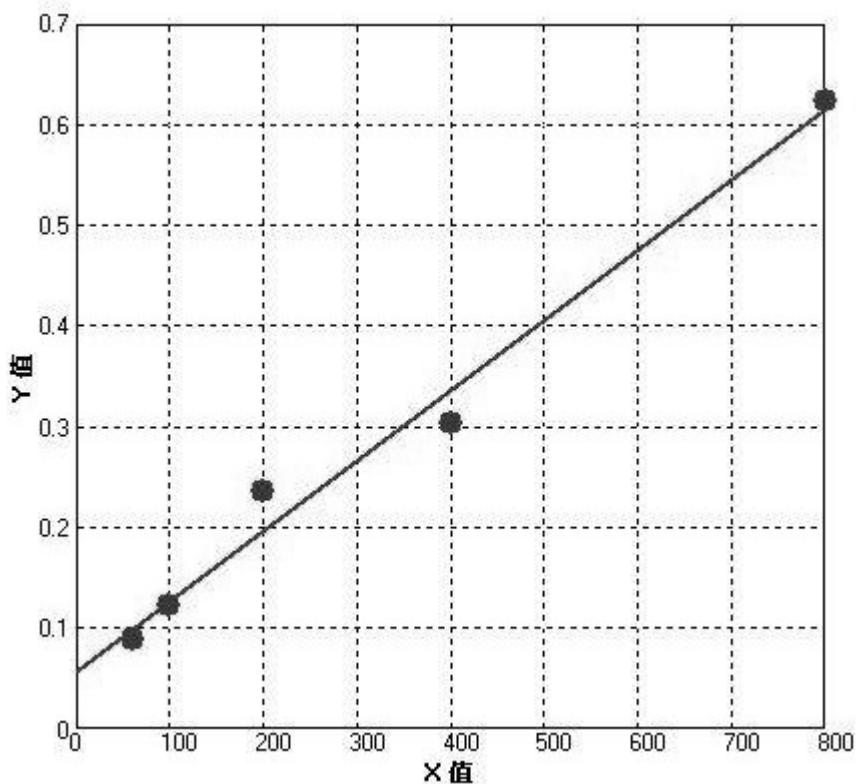


图 2

专利名称(译)	一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107490692A</a>	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN201610401854.X	申请日	2016-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州博闻迪医药科技有限公司		
[标]发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
发明人	李亚星 刘凤鸣 刘冰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/92 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/92		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫检测分析的技术领域，尤其是一种定量检测超敏C反应蛋白和脂蛋白磷脂酶A2的荧光免疫层析方法，包含有血液、抗超敏C反应蛋白抗体、抗脂蛋白磷脂酶A2抗体、荧光试剂和检测器。抗超敏C反应蛋白抗体为抗超敏C反应蛋白单克隆抗体和抗超敏C反应蛋白多克隆抗体的一种或组合；抗脂蛋白磷脂酶A2抗体为抗脂蛋白磷脂酶A2单克隆抗体和抗脂蛋白磷脂酶A2多克隆抗体的一种或组合；荧光试剂为含有所述荧光物质的液相和/或固相材料，荧光物质为有机荧光染料或稀土元素荧光染料的一种或组合；检测器为荧光检测器。以人体血液为检测样本，可有效监测血液中超敏C反应蛋白及脂蛋白磷脂酶A2，特异性强，重复性好，灵敏度高，操作简单，不需特殊仪器设备，不需专业培训，结果清晰易辨，易于推广，适合于现场检测。

