



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107505459 B

(45)授权公告日 2019.12.24

(21)申请号 201710534042.7

(22)申请日 2017.07.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107505459 A

(43)申请公布日 2017.12.22

(73)专利权人 广州瑞博奥生物科技有限公司
地址 510530 广东省广州市萝岗区瑞和路
79号

(72)发明人 周腊梅 黄若磐 胡守旺 宋旭东

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 万志香

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

(56)对比文件

CN 104714015 A,2015.06.17,说明书第

[0006]-[0014]段,实施例1.

CN 102746382 A,2012.10.24,说明书实施
例1-3.

US 2006019265 A1,2006.01.26,说明书第
[0005]-[0007]、[0032]-[0034]段,图1.

CN 103045541 A,2013.04.17,说明书实施
例1-3.

CN 102659937 A,2012.09.12,说明书实施
例1,序列2、3.

CN 106461648 A,2017.02.22,权利要求16-
23、26-27,说明书第[0057]、[0074]-[0134]段,
实施例2,图1.

CN 104422772 A,2015.03.18,全文.

CN 102520194 A,2012.06.27,全文.

CN 204287199 U,2015.04.22,全文.

CN 106568948 A,2017.04.19,说明书第
[0009]-[0014]段.

审查员 许珊萍

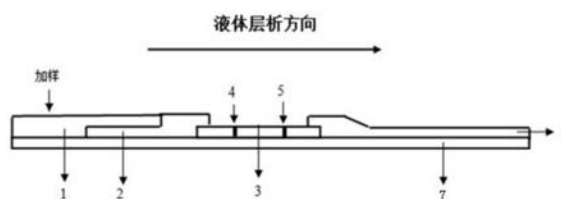
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层
析试纸条、试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括底板、以及依次设在所述底板上的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区,所述检测区包被有H-FABP单克隆捕获抗体,所述对照区包被有羊抗鼠IgG抗体,所述H-FABP单克隆检测抗体对应具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:4任一所示氨基酸序列的抗原表位。本发明实现了H-FABP的单人份定量检测,且灵敏度高,标记物稳定,抗干扰强,检测结果重复性好;操作简便,检测时间短,为临床使用提供了极大便利。



1. 一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,包括底板、以及依次设在所述底板上的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区,所述检测区包被有H-FABP单克隆捕获抗体,所述对照区包被有羊抗鼠IgG抗体,所述H-FABP单克隆检测抗体对应如SEQ ID No:3所示氨基酸序列的抗原表位。

2. 根据权利要求1所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述包被膜为化学交联结合有聚合物的硝酸纤维膜,所述聚合物为在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有90%以上的透光率的材料。

3. 根据权利要求2所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述聚合物为聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯丙烯腈、聚丙烯酸酯、聚丁酸酯、聚碳酸酯、乙二醇改性的聚对苯二甲酸乙二醇酯中的一种或者几种。

4. 根据权利要求1所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体中,H-FABP单克隆检测抗体的浓度为1~4mg/ml,所述H-FABP单克隆检测抗体与荧光微球的质量比为1:5~6,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体在所述结合垫上的包被量为3~5ul/cm。

5. 根据权利要求4所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体中,H-FABP单克隆检测抗体的浓度为1mg/ml,所述H-FABP单克隆检测抗体与荧光微球的质量比为1:5,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体在所述结合垫上的包被量为4ul/cm。

6. 根据权利要求5所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球的直径为290-350nm。

7. 根据权利要求1所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于,所述H-FABP单克隆捕获抗体的浓度为1~1.5mg/ml,在所述检测区的包被量为1ul/cm;所述羊抗鼠IgG抗体的浓度为1~1.5mg/ml,在所述对照区的包被量为1ul/cm。

8. 权利要求1~7任一项所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)、在包被膜上分别固定识别与所述H-FABP单克隆检测抗体不同抗原表位的H-FABP单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成检测区和对照区;

(2)、制备荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,并喷涂在结合垫上;所述H-FABP单克隆检测抗体对应如SEQ ID No:3所示氨基酸序列的抗原表位;

(3)、在底板上搭接粘贴样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,即得。

9. 一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,其特征在于,包括权利要求1~7任一项所述的定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体地说,本发明涉及一种定量检测心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)的时间分辨荧光免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 心脏型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)是心脏中富含的一种新型小分子蛋白,和两个脂肪酸分子结合并参与脂肪的代谢,为心肌细胞提供能量,它具有高度心脏特异性,在心脏中H-FABP浓度比骨骼肌中高2-10倍,当心肌细胞受损时可快速释放到血液中,作为标志物诊断早期AMI的敏感性为77.4%,特异性为89.4%,并且H-FABP浓度能够估测心肌的受损面积。因此H-FABP可作为AMI的代表成为急性冠症候群(ACS)的早期诊断标志物。

[0003] H-FABP是一种心肌缺血的高敏早期标志物,缺血性发3分钟后即可检。和肌钙蛋白一起,可以促进疑似ACS患者的早期管理。脂肪酸结合蛋白(FABPs)在活性脂肪酸代谢的组织中大量存在,如心脏和肝脏,它们的主要功能促进细胞内的长链脂肪酸运输。现已确定九个不同类型的FABP,其中,H-FABP是最广泛的,因为它大量存在于心肌细胞。其低分子量和胞质的位置相结合,使H-FABP成为急性冠脉综合症(尤其是胸痛发作6小时内)的一个高敏的早期标志物,缺血性发作30分钟后即可检测。这可能是因为在心肌缺血和心肌坏死以后,它迅速从细胞质进入血液循环。H-FABP在6-8小时左右达到浓度峰值,然后在24-30小时左右恢复至正常水平。如此迅速恢复至正常水平得益于高肾清除率,这意味着H-FABP不仅能够用作AMI早期标志物,还是理想的心肌梗死复发诊断标志物。尽管H-FABP的释放特点与肌红蛋白相似,但其心肌特异性是肌红蛋白的15-20倍;因此H-FABP是更有效的心肌损伤标志物。此外,H-FABP的正常血清/血浆值比肌红蛋白低,从而降低假阳性比率。

[0004] AMI发作后,H-FABP返回到基线浓度如此之快(通常20-24小时),它也可以用作AMI复发的标志物。这点与CKMB一样,由于其比肌钙蛋白相比,有更快速的清除率(3-4天vs10-14天)。

[0005] H-FABP是在体外非常稳定的蛋白质,研究表明,血清和血浆样品可经受高达8次冷冻/解冻循环而没有免疫反应性的损失。

[0006] 相较于单独使用肌钙蛋白的情况,使用H-FABP和肌钙蛋白的组合已证实,在症状出现后的早期(<4小时或<6小时),可显著改善MI/ACS的诊断敏感性。关于预后,一些大型临床试验中肌钙蛋白阳性和肌钙蛋白阴性的患者分层长期ACS的风险已经说明了H-FABP的价值。即使在使用高度敏感的肌钙蛋白的情况下,诊断和预后也常增添H-FABP。除了ACS,H-FABP还用于其他范围,例如肺栓塞(PE),冠状动脉搭桥手术(CABG)和脑血管疾病。

[0007] 目前,心脏型脂肪酸结合蛋白H-FABP的测定主要采用双抗体夹心的免疫学方法,检测方法包括:

[0008] 1、双抗夹心免疫化学发光法——该法操作简便,特异性强,敏感性高。

[0009] 2、金标法——该法具有快速简便,易观察的特点,但是灵敏度不高。

[0010] 3、透射免疫浊度法——该测定方法简便、快速,可自动化,适合于批量检测,但是免疫透射比浊的方法学及临床应用尚需做进一步的验证。

[0011] 目前POCT无可靠的质量保证。POCT每一个测试单元都是独立的,因此无法保证每个测试单元质量都是一样。其中光学法检测的仪器会受到标本中溶血和乳糜的干扰,化学发光法会受到外源性氧化还原物质的影响。基于免疫层析,色谱和干化学技术的各种试纸条和仪器都会因温度,湿度和pH值的不同影响基质中微蛋白的活性,进而影响结果。部分POCT仪器方法学的缺陷,灵敏性和重复性欠佳,线性范围窄,只是急诊或者急求时用于参考,必要时还需送到检验科进行复查。

[0012] 目前采用的免疫荧光层析装置采用反射法检测多孔膜上的荧光信号,荧光检测仪捕捉到的是多孔膜表面荧光染料修饰的特异性抗体,而检测不到多孔膜内部的荧光信号,导致检测灵敏度下降。

[0013] 时间分辨荧光分析法(TRFIA)是在荧光分析(FIA)的基础上发展起来的,它是一种特殊的荧光分析。荧光分析利用了荧光的波长与其激发波长的巨大差异克服了普通紫外-可见分光分析法中杂色光的影响,同时,荧光分析与普通分光不同,光电接受器与激发光不在同一直线上,激发光不能直接到达光电接受器,从而大幅度地提高了光学分析的灵敏度。

发明内容

[0014] 基于此,为了克服上述现有技术的缺陷,本发明提供了一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法,该试纸条具有检测时间短、特异性好,能实现定量检测且经济成本低等优点。

[0015] 为了实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0016] 一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括底板、以及依次设在所述底板上的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,所述结合垫上包被有荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区,所述检测区包被有H-FABP单克隆捕获抗体,所述对照区包被有羊抗鼠IgG抗体,所述H-FABP单克隆检测抗体对应具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:4任一所示氨基酸序列的抗原表位。

[0017] 在其中一些实施例中,所述H-FABP单克隆检测抗体对应具有如SEQ ID No:3所示氨基酸序列的抗原表位。

[0018] 在其中一些实施例中,所述包被膜为化学交联结合有聚合物的硝酸纤维膜,所述聚合物为在小于450nm波长具有10%以下透光率,在500nm波长以上具有90%以上的透光率的材料。

[0019] 在其中一些实施例中,所述聚合物为聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯丙烯腈、聚丙烯酸酯、聚丁酸酯、聚碳酸酯、乙二醇改性的聚对苯二甲酸乙二醇酯中的一种或者几种。所述聚合物可以允许绝大多数的可见光透过,光检测器能够捕捉多层多孔膜表面和内部的荧光信号,使检测结果更准确。

[0020] 在其中一些实施例中,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体中,H-FABP单克隆检测抗体的浓度为1~4mg/ml,所述H-FABP单克隆检测抗体与荧光微球的质量比为1:5~6,所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体在所述结合垫上的包被量为3~5 μ l/cm。所述结合垫优选为聚酯膜,其能够载有足量的荧光微球,且遇样品后又能迅速释放微球。

[0021] 在其中一些实施例中,所述荧光微球选用本领域公知的用于标记抗体的任何镧系元素微球,微球表面带有活性基团,可以连接蛋白、糖类等生物物质,内含荧光素,优选的荧光微球的直径为290-350nm。

[0022] 在其中一些实施例中,所述检测区靠近所述结合垫,所述对照区靠近所述吸水纸,所述检测区和所述对照区的间隔为0.5~1.0cm。

[0023] 在其中一些实施例中,所述H-FABP单克隆捕获抗体的浓度为1~1.5mg/ml,在所述检测区的包被量为1ul/cm。所述羊抗鼠IgG抗体的浓度为1~1.5mg/ml,在所述对照区的包被量为1ul/cm。

[0024] 本发明还提供了上述定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0025] (1)、在包被膜上分别固定识别不同抗原表位的H-FABP单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体,形成检测区和对照区;

[0026] (2)、制备荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,并喷涂在结合垫上;所述H-FABP单克隆检测抗体具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:4任一所示氨基酸序列的抗原表位;

[0027] (3)、在底板上搭接粘贴样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,即得。

[0028] 在其中一些实施例中,步骤(1)中所述H-FABP单克隆检测抗体的制备方法为:根据H-FABP全蛋白序列设计不同肽段,免疫动物获得特异性抗体;将特异性抗体进行配对,筛选得到灵敏度最高的抗体,即得。

[0029] 本发明还提供了一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,包括上述定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0030] 本发明的试纸条与经典的时间分辨荧光免疫分析方法不同,时间分辨荧光免疫层析技术采用荧光纳米微球作为标记物,当将含有待测抗原(抗体)的样品滴在加样区,待测样品中的抗原(抗体)与结合垫中的荧光纳米微球标记的抗体(抗原)结合并通过毛细作用向前层析,当达到检测区后,与检测线上固定的抗体(抗原)结合,形成微粒-抗体-抗原-抗体夹心复合物并被固定在检测线上,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,与固定在对照线二抗(羊抗鼠IgG抗体)结合。反应结束后,用紫外光源(365nm)对检测区扫描检测,检测线和对照线上荧光纳米微球发出高强度的荧光(615nm),且衰变时间也较长。利用延缓测量时间,待样品基质中自然发生的短寿命荧光(1-10ns)全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,这样就可以完全排除特异本底荧光的干扰。通过检测线和对照线荧光强度的强弱及其比值,即可分析出样品中待测物的浓度。与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0031] 1、通过对试纸条的改进,将时间分辨荧光免疫层析技术引入H-FABP的定量检测中,结合时间分辨荧光检测仪,实现了H-FABP的单人份定量检测,且灵敏度高,比金标、普通荧光灵敏度高2-3个数量级,批内、批间CV小于15%;标记物稳定,抗干扰强,检测结果重复性好;为临床使用提供了极大便利;

[0032] 2、本发明的试纸条,采用特殊的透光材料,既可以达到化学发光法的定量分析,又能达到金标法的快速检测,且保证了试验结果的准确可靠;

[0033] 3、本发明的试纸条操作简便,检测时间短,可用于现场筛查,适合大规模生产,对于H-FABP的定量检测有着积极的意义;

[0034] 4、本发明的试纸条成本相对便宜,性价比高。

附图说明

- [0035] 图1为本发明实施例1的时间分辨荧光免疫层析试纸条的结构示意图；
- [0036] 图2为本发明试验例1中采用抗H-FABP-3抗体作为检测抗体的相关性验证结果；
- [0037] 图3为本发明试验例2中定量检测H-FABP的标准曲线图；
- [0038] 图4为本发明试验例2中试纸条测量稀释线性曲线结果图；
- [0039] 图5为本发明试验例2中试纸条与进口试剂盒对临床样本测试的相关性结果图；
- [0040] 附图标记：1、样品垫；2、结合垫；3、包被膜；4、检测区；5、对照区；6、吸水纸；7、底板。

具体实施方式

- [0041] 以下通过附图和具体实施例来详细说明本发明。
- [0042] 以下实施例中所使用的原料如无特殊说明，均来源于市售。
- [0043] 实施例1定量检测H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条
- [0044] 本实施例的一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条，包括底板7、以及依次设在所述底板7上的样品垫1、结合垫2、包被膜3和吸水纸6，所述结合垫2上包被有荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体，所述包被膜3包括平行设置、且相互间隔的检测区4和对照区5，所述检测区4包被有H-FABP单克隆捕获抗体 (Raybiotech)，所述对照区5包被有羊抗鼠IgG抗体 (Raybiotech)，所述H-FABP单克隆检测抗体对应具有如SEQ ID No:3所示氨基酸序列的抗原表位。
- [0045] 在该实施例中，所述包被膜3为化学交联结合有聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈（聚合物）的硝酸纤维膜，所述聚碳酸酯与聚苯乙烯丙烯腈聚合物在小于450nm波长具有10%以下透光率，在500nm波长以上具有95%以上的透光率的材料。这种材料可以允许绝大多数的可见光透过，光检测器能够捕捉多层多孔膜表面和内部的荧光信号，使检测结果更准确。
- [0046] 在该实施例中，所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体中，H-FABP单克隆检测抗体的浓度为1mg/ml，所述H-FABP单克隆检测抗体与荧光微球的质量比为1:5，所述荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体在所述结合垫上的包被量为4 μ l/cm。所述结合垫2为聚酯膜，其能够载有足量的荧光微球，且遇样品后又能迅速释放微球。
- [0047] 在该实施例中，所述荧光微球选用本领域公知的用于标记抗体的镧系元素微球Eu³⁺，微球表面带有活性基团，可以连接蛋白、糖类等生物物质，内含荧光素，荧光微球的直径为290nm。
- [0048] 在该实施例中，所述检测区4靠近所述结合垫，所述对照区5靠近所述吸水纸6，所述检测区4和所述对照区5的间隔为0.5cm。
- [0049] 在该实施例中，所述H-FABP单克隆捕获抗体的浓度为1mg/ml，在所述检测区的包被量为1 μ l/cm。在该实施例中，所述羊抗鼠IgG抗体的浓度为1mg/ml，在所述对照区的包被量为1 μ l/cm。
- [0050] 本实施例的试纸条制备方法包括以下步骤：
- [0051] (1) 在包被膜的不同位置分别固定H-FABP单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体，形成检测区和对照区；具体为：使用含有1%蔗糖的0.01mol/L的pH为7.2的磷酸盐缓冲液，分别将H-FABP单克隆捕获抗体和羊抗鼠IgG抗体稀释到1mg/ml的浓度，使用定量喷膜仪以1 μ l/

cm的量将二者以0.5cm的间隔喷于硝酸纤维素膜上,35℃烘干1h,加入干燥剂封存备用。

[0052] (2) 制备荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体,并喷涂在结合垫上;具体为:(a) 将H-FABP单克隆检测抗体用0.02-0.05mol/L的pH为7.2的磷酸盐缓冲液在4℃温度下透析过夜,之后调整浓度为1mg/ml;(b) 使用0.01-0.05mol/L的pH为7.2的MES活化缓冲液洗涤微球,加入碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),终浓度为20mmol/L,室温反应15分钟,充分洗涤微球,用0.01-0.05mol/L的pH为7.2的磷酸盐缓冲液复溶后加入透析过的H-FABP单克隆检测抗体,使H-FABP单克隆检测抗体与微球的质量比为1:5,室温反应2小时,加入含有1%BSA的0.01mol/L的pH为7.2的磷酸盐缓冲液,室温反应30分钟,洗涤微球,用含有0.05%BSA,0.05%Tween-20,0.01mol/L的pH为7.2的磷酸盐缓冲液保存液复溶至原体积,使用定量喷膜仪以4 μ l/cm喷涂于聚酯膜上,避光,在30℃烘干2小时,加入干燥剂封存备用;

[0053] (3) 在底板上依次相互交错的黏贴上样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸,然后切割成宽度为0.5cm大小。

[0054] 本实施例的时间分辨荧光免疫层析试纸条在使用时,血液样本浸入到样品垫上,当样品垫上的样本达到饱和状态后,通过毛细管作用将样本输送到结合垫。当血液样本中含有H-FABP时,H-FABP与荧光微球上的抗体形成抗原-抗体复合物,随着层析作用,复合物向前移动,到达包被识别单一抗原表位的H-FABP单克隆捕获抗体的检测区T处,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,聚集在检测区T处。未结合H-FABP单克隆抗体的稀土离子微球(Eu³⁺镧系元素)继续前行,到达对照区C时,羊抗鼠IgG抗体与稀土离子微球上的鼠源性单抗(即H-FABP单克隆检测抗体)结合,在C线处出现稀土离子微球的聚集。整个反应在10分钟内完成,并进行上机读卡。在激发光源下产生的荧光强度与试纸条上的结合物含量成正比,当光源照射到试纸条的检测区和对照区时,激发附着的荧光物质,发射光收集并转化为电信号,电信号的强弱和荧光分子数量相关,检测仪计算样品中待测物的含量。

[0055] 实施例2定量检测H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试剂盒

[0056] 本实施例的检测H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括:塑料卡壳、以及实施例1所述的试纸条;所述试纸条装于所述塑料卡壳内。所述试剂盒的组装需在操作过程必须在湿度小于35%,温度为20-25℃的房间内进行。

[0057] 试验例1 H-FABP单克隆检测抗体的制备

[0058] 根据H-FABP全蛋白序列设计不同肽段,免疫动物获得特异性抗体

[0059] (1) H-FABP重组蛋白的制备

[0060] 根据Genbank中提供的人H-FABP的DNA序列设计一对引物,由两个引物的5'端分别引入NdeI+XhoI酶切位点,通过PCR扩增得到H-FABP的目的基因,将载体pET-28a及经过琼脂糖凝胶纯化的H-FABP基因片段,用NdeI+XhoI进行双酶切处理,用T4DNA连接酶将纯化后酶切产物连接,得到重组质粒pET-28a-H-FABP,并连接产物转化进入大肠杆菌DH5 α ,在含有氨苄青霉素的LB平板上挑选克隆,小量制备质粒,通过双酶切/PCR鉴定筛选出阳性克隆,测序结果表明重组的H-FABP片段与设计的序列完全一致。

[0061] 重组质粒pET-28a-H-FABP经测序验证后,转化进入大肠杆菌(BL21),在含有氨苄青霉素的LB培养基中培养,可在LB平板上挑选阳性克隆并进行质粒酶切鉴定,小量制备质粒,用双酶切PCR鉴定筛选出阳性克隆,最终获得含有H-FABP的重组质粒工程菌。

[0062] 在表达时,将H-FABP的重组质粒工程菌于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中培

养, A600达到0.5-0.6之间, 然后加入终浓度为0.5mM的Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 于37 $^{\circ}$ C诱导4h, 诱导完成后的菌液4,000rpm离心10min, 收集菌体, 并用PBS洗涤沉淀; PBS重悬沉淀后置于冰浴中, 超声破菌后12000rpm离心20min, 上清和沉淀分别进行SDS-PAGE电泳, 结果表明: 表达的H-FABP重组蛋白为胞浆不可溶性表达, 将该重组蛋白命名为BL21 (DE3) -H-FABP。

[0063] 将大量表达得到的菌体, 经超声破碎后离心, 再进行包涵体洗涤, 洗涤完成后用GE Healthcare公司的His Trap FF纯化柱将蛋白进行纯化(按照产品说明书进行试剂配制和纯化)。最终获得的蛋白用SDS-PAGE电泳进行分析, 用BCA蛋白定量试剂盒测得其浓度为0.25mg/ml, 即为H-FABP重组蛋白。

[0064] (2) H-FABP肽段的制备

[0065] 首先将H-FABP重组蛋白导入在线抗原表位设计软件, 将位于蛋白构象外部氨基酸序列统计出来。再将全H-FABP重组蛋白序列导入DNASTAR软件, 通过抗原表位预测工具统计肽段组合。将两组数据进行比对得出最有可能为抗原表位的5组肽段。通过上海吉尔生化生物公司合成4组肽段:

[0066] 1肽段1: NH₂-C VASMTKPTTIIEDNGDILTLK (SEQ ID No:1)

[0067] 2肽段2: NH₂-C STFKNTEISFKLGVEFDETTARD (SEQ ID No:2)

[0068] 3肽段3: NH₂-C EFDETTADDDKVVKSIVTLDG (SEQ ID No:3)

[0069] 4肽段4: NH₂-C DGGKLVELQKWDGQETT (SEQ ID No:4)

[0070] 注: 下划线字体代表可突变的氨基酸

[0071] (3)、特异性抗体的制备与纯化

[0072] 采用H-FABP重组蛋白以及4组肽段免疫8周龄、体重18g左右且健康的雌性BALB/c小鼠各2只, 适应性饲养1周后, 采集阴性血作为对照用; 采用中程免疫方案(0.3ml/只, 2周/次), 首次免疫时(50 μ g/只)按免疫原与等体积的弗氏完全佐剂搅拌乳化, 背部皮下多点注射, 此后按免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂搅拌乳化进行常规免疫; 3次免疫时, 一般50 μ g抗原+TiterMax等量混合乳化后背部多点注射, 7天后测效价。小鼠效价明显达到一定要求后加强免疫, 加强免疫不加佐剂, 加强免疫剂量为50 μ g, 加强免疫后3天, 摘眼球采血, 分离血清保存。同时取脾脏进行融合。细胞融合时, 将脾细胞与骨髓瘤细胞按4:1左右进行混合, 并在聚乙二醇(PEG, 分子量为1450)的促融作用下进行融合, 融合细胞再HAT选择性培养液中进行培养, 10天后通过间接ELISA方法筛选出能与H-FABP天然蛋白反应的阳性杂交瘤细胞, 并将初筛得到的阳性杂交瘤细胞扩大培养, 用有限稀释法将获得的阳性杂交瘤细胞连续亚克隆至少两次以上, 每次亚克隆用HT选择性培养基进行培养, 亚克隆8-10天后进行ELISA筛选, 直至单克隆细胞阳性率为100%为止, 获得能稳定分泌针对H-FABP重组蛋白与肽段的特异性抗体的单克隆细胞株。

[0073] 选择8-12周龄雌性健康BALB/c小鼠, 腹腔注射降植烷, 0.5ml/只; 7-10天后, 给每只小鼠腹腔注射 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个单克隆杂交瘤细胞, 注意吹下细胞或稀释细胞需用PBS或无血清培养基; 将腹水10,000r/min离心15min, 除去细胞成分和其他的沉淀物、脂肪以及油层等, 收集中间层, 测定抗体效价, 分装, 置-70 $^{\circ}$ C冻存备用。饱和硫酸铵沉淀: 吸取5ml处理好的腹水移入小烧杯中, 在搅拌下, 逐滴加入过0.22 μ m滤膜的PBS5.0ml; 混合均匀后, 再逐滴加入10ml饱和硫酸铵溶液(pH7.4), 继续缓慢搅拌30min; 静置2h后10,000r/min离心15分

钟,弃去上清,沉淀物用过0.22 μ m滤膜的PBS重悬,然后再将该重悬液过0.22 μ m滤膜;根据抗体不同亚型,选定不同的GE Healthcare公司的纯化柱,收集抗体峰;用PBS缓冲液将抗体进行透析,用BCA蛋白定量试剂盒测定抗体浓度,并将抗体分装保存。

[0074] (4) 重组蛋白制备的抗体作为捕获抗体,而肽段制备的抗体作为检测抗体。通过配对实验检测配对的抗体对。

检测抗体	抗	抗	抗	抗
	H-FABP-1 抗体	H-FABP-2 抗体	H-FABP-3 抗体	H-FABP-4 抗体
H-FABP	肽段 1	肽段 2	肽段 3	肽段 4
100ng	2.166	1.978	2.514	2.632
50ng	1.474	1.513	2.022	1.73
25ng	0.905	1.108	1.551	1.206
12.5ng	0.685	0.888	1.245	0.799
6.25ng	0.522	0.605	0.941	0.576

[0075]

3.125ng	0.368	0.422	0.729	0.38
1.5625ng	0.229	0.342	0.426	0.266
NC	0.102	0.144	0.145	0.15

[0076]

[0077] 结果表明由抗H-FABP-4抗体作为检测抗体,抗H-FABP抗体作为捕获抗体可获得针对H-FABP重组蛋白效价最高的抗体对。在后续的血清学验证实验中采用抗H-FABP-1抗体,抗H-FABP-3抗体和抗H-FABP-4抗体进行验证。

[0078] (5) 血清学验证特异性抗体对

[0079] 采用抗H-FABP抗体作为捕获抗体,抗H-FABP-1抗体,抗H-FABP-3抗体,抗H-FABP-4抗体作为检测抗体分别测定了20例样本,结果证明抗H-FABP-1抗体,抗H-FABP-4抗体对血清中的H-FABP识别比较弱,抗H-FABP-3抗体(SEQ ID No:3)对血清中的H-FABP识别比较高。采用抗H-FABP-3作为检测抗体的相关性验证结果如图2所示。

[0080] 试验例2实施例1的试纸条的性能测定

[0081] A、绘制标准曲线

[0082] 在制备好的H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条的加样区加入不同浓度的H-FABP标准品(取8个不同的浓度,分别为120ng/ml、60ng/ml、30ng/ml、15ng/ml、7.5ng/ml、3.75ng/ml、1.875ng/ml,0ng/ml每个浓度做5个平行样)。膜层析反应15分钟后,仪器读取对照线C、检测线T信号,以检测的样品荧光值信号为纵坐标,H-FABP标准品浓度为横坐标取双对数拟合,建立方程并拟合成标准曲线,拟合标准曲线如图3所示。由标准曲线可以看出,该标准曲线的 R^2 为0.993,线性较好,可以通过该标准曲线对样品中所含H-FABP浓度进行定量分析。

[0083] B、试纸条的分析性能检测

[0084] 1)、准确度(相对偏差)

[0085] 用经标定的H-FABP浓度为60ng/ml、15ng/ml、7.5ng/ml的样本重复3次,平均值结果记为M,根据公式(1)计算测量浓度的相对偏差B,结果应符合 $B \leq 10\%$ 。

[0086] $B = (M - T) / T \times 100\%$ (1)

[0087] 式中:

[0088] B——相对偏差;

[0089] M——测量浓度的均值;

[0090] T——标定浓度。

[0091] 产品试纸条经测量,相对偏差结果如下:

标定抗原浓度 (ng/ml)	60	15	7.5
T/C值	2.370934	0.469139	0.227816
	2.343161	0.817802	0.344842
	2.140223	0.390618	0.30476
测量抗原浓度 (ng/ml)	65.53376	11.86557	5.53834
	64.72429	21.32363	8.575952
	58.82584	9.780922	7.527989
AVERAGE	63.02797	14.32337	7.214094
相对偏差	5%	-5%	-4%

[0092] 从以上数据可以看出,试纸条的偏差准确率低于10%。

[0094] 2)、测量稀释线性

[0095] 将高值H-FABP样本按比例稀释成100ng/ml、50ng/ml、25ng/ml、12.5ng/ml、6.25ng/ml。对每一个浓度的样本均重复3次,计算其平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数 R_2 ,满足相关系数 $R_2 \geq 0.98$ 的要求,试纸条测量稀释线性数据及曲线结果如下表和图4所示。

标定抗原浓度 (ng/ml)	100	50	25	12.5	6.25
T/C	2.77067	1.336591	0.82548	0.475134	0.210418
	4.407087	1.743898	0.960704	0.572068	0.256938
	3.837119	1.711991	0.738258	0.625668	0.250806
测量浓度 (ng/ml)	77.23932	35.80167	21.53487	12.02558	5.093157
	126.0234	47.3976	25.27176	14.62701	6.287626
	108.8952	46.48333	19.14194	16.0762	6.129439
AVERAGE	104.0526	43.22753	21.98286	14.24293	5.836741

[0096] 从以上结果可以看出,试纸条的稀释线性 $R_2 \geq 0.98$,分析性能满足要求;

[0098] 3)、试纸条的最低检测限检测

[0099] 使用空白对照品重复测定20次求平均值M,并求得SD,M+2SD应不高于2ng/ml;

[0100] 经最低检测限测量,测量的结果如下:

	20次空白T/C值	测量浓度 (ng/ml)
	0.052995	1.129783169
	0.039004	1.093965257
	0.04033	1.097312891
	0.049626	1.121053655
	0.0438	1.106115409
	0.03703	1.089005859
	0.030952	1.073869746
	0.039438	1.095059008
	0.033886	1.081149926
[0101]	0.049288	1.101797259
	0.038372	1.092374977
	0.047031	1.114372985
	0.047222	1.114865297
	0.065946	1.163982512
	0.041827	1.101101296
	0.026946	1.06401151
	0.09221	1.236544404
	0.044177	1.107075842
	0.043487	1.105317215
	0.07624	1.191900486
	AVERAGE	1.047789588
	STDEV	0.37695183

[0102] 最低检测限=20个浓度平均值+2倍20个浓度的SD为:1.78 (ng/ml)。

[0103] 4)、试纸条的重复性检测

[0104] 用经标定的H-FABP浓度为60ng/ml、7.5ng/ml的样本分别进行重复检测10次,计算10次测量结果的平均值M和标准差SD,根据公式(2)得出其变异系数CV,结果不大于15%。

[0105] $CV = SD/M \times 100\% \dots\dots\dots (2)$

[0106] 式中:

[0107] CV——变异系数;

[0108] SD——10次测量结果的标准差;

[0109] M——10次测量结果的平均值。

[0110] 重复性测量结果如下:

定标抗原浓度 (pg/ml)		60ng/ml	7.5ng/ml
[0111]	10次测值	57.02046	7.31063
		70.78653	5.90844
		56.18102	8.248665
		68.01366	5.783529
		56.06971	6.179422
		49.22366	7.318681
		53.94924	6.994936
		60.34563	6.666894
		54.14236	5.179836
		55.09938	7.744636
AVERAGE		58.08316	6.733567
STDEV		6.615836	0.964392
CV		11.39%	14.32%

[0112] 从以上重复性测量结果可以看出,以上两个浓度的CV都不大于15%。

[0113] C、临床样本相关性检测

[0114] 与进口试剂对比进行50例临床样本的测试,相关性>95%,相关性测试结果如图5所示。

[0115] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0116] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 广州瑞博奥生物科技有限公司

<120> 定量检测人 H-FABP 的时间分辨荧光免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法

<140> 2017105340427

<141> 2017-07-03

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Cys Val Ala Ser Met Thr Lys Pro Thr Thr Ile Ile Glu Asp Asn Gly

1 5 10 15

Asp Ile Leu Thr Leu Lys

[0001] 20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Cys Ser Thr Phe Lys Asn Thr Glu Ile Ser Phe Lys Leu Gly Val Glu

1 5 10 15

Phe Asp Glu Thr Thr Ala Arg Asp

20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Cys Glu Phe Asp Glu Thr Thr Ala Asp Asp Asp Lys Val Val Lys Ser

1 5 10 15

Ile Val Thr Leu Asp Gly

20

- <210> 4
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0002]

<400> 4
Cys Asp Gly Gly Lys Leu Val Glu Leu Gln Lys Trp Asp Gly Gln Glu
1 5 10 15
Thr Thr

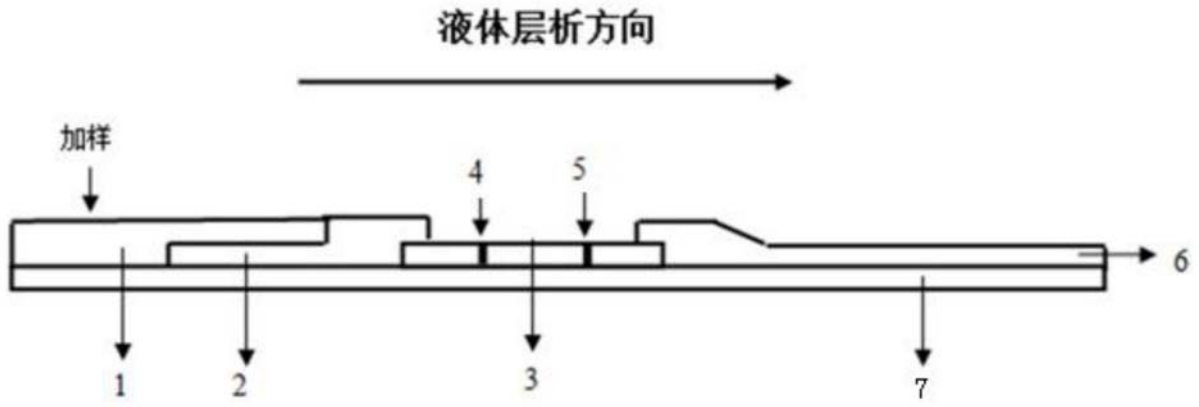


图1

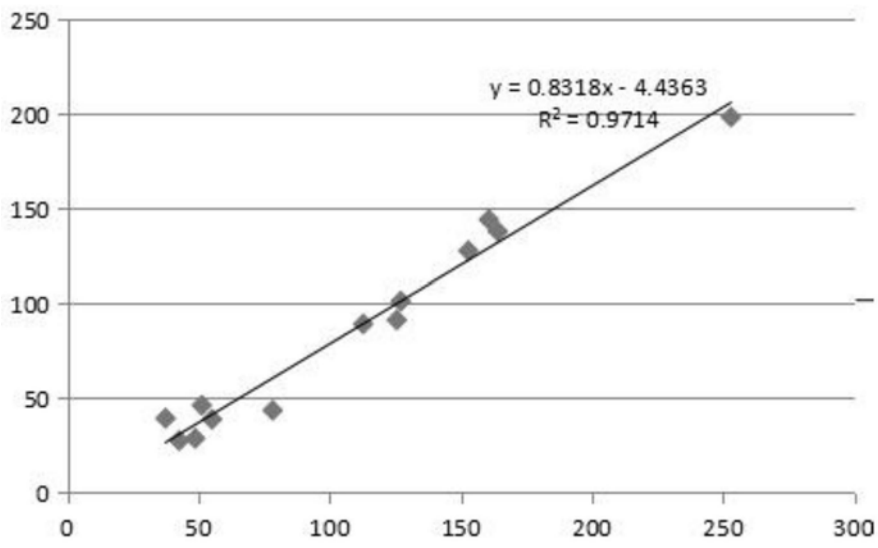


图2

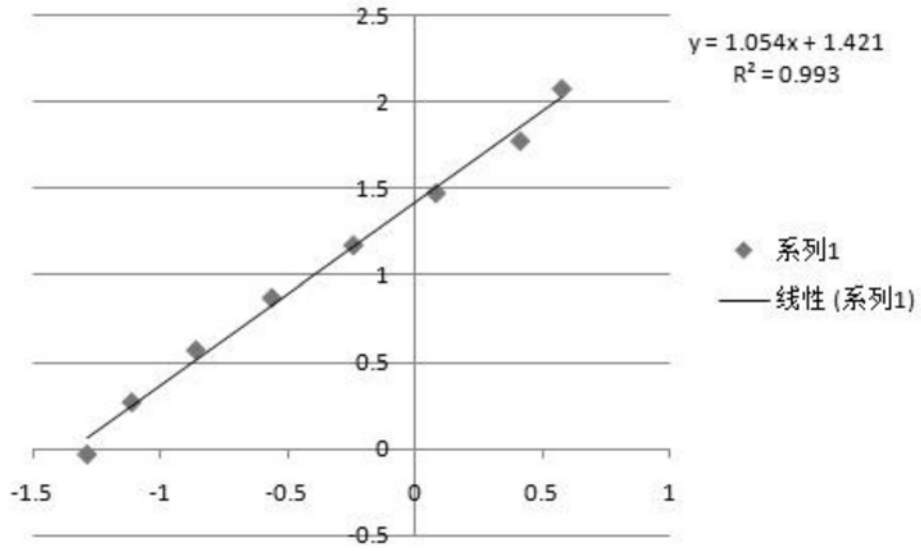


图3

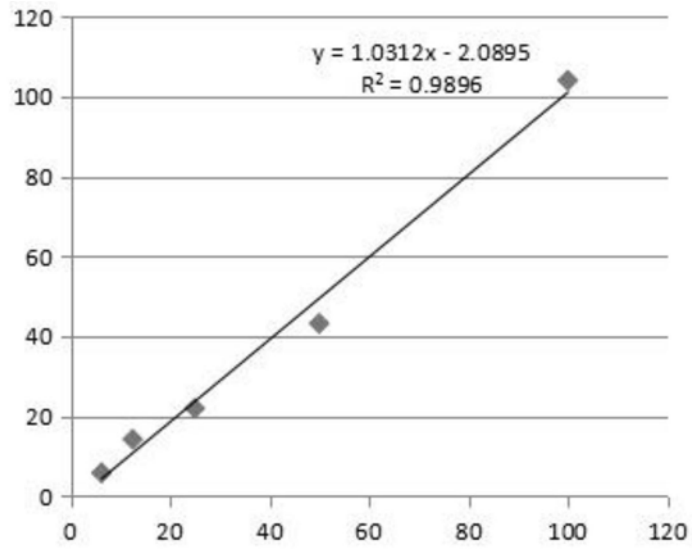


图4

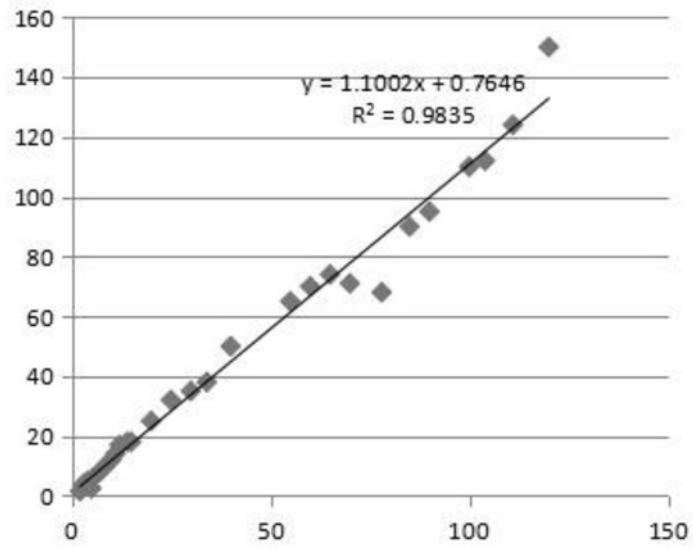


图5

专利名称(译)	定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条、试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107505459B	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN2017110534042.7	申请日	2017-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州瑞博奥生物科技有限公司		
[标]发明人	周腊梅 黄若馨 胡守旺 宋旭东		
发明人	周腊梅 黄若馨 胡守旺 宋旭东		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
其他公开文献	CN107505459A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测人H-FABP的时间分辨荧光免疫层析试纸条，包括底板、以及依次设在所述底板上的样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸，所述结合垫上包被有荧光微球标记的H-FABP单克隆检测抗体，所述包被膜包括平行设置、且相互间隔的检测区和对照区，所述检测区包被有H-FABP单克隆捕获抗体，所述对照区包被有羊抗鼠IgG抗体，所述H-FABP单克隆检测抗体对应具有如SEQ ID No:1~SEQ ID No:4任一所示氨基酸序列的抗原表位。本发明实现了H-FABP的单人份定量检测，且灵敏度高，标记物稳定，抗干扰强，检测结果重复性好；操作简便，检测时间短，为临床使用提供了极大便利。

