



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104330576 A

(43) 申请公布日 2015.02.04

(21) 申请号 201410648637.1

(22) 申请日 2014.11.17

(71) 申请人 中国人民解放军第三〇五医院  
地址 100017 北京市西城区文津街甲13号

(72) 发明人 王会中

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

### (54) 发明名称

一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法,其由试剂一和试剂二配合而成,其中,所述试剂一和试剂二的体积比为5:1;所述试剂一中包括:20~50mmol/L的缓冲液、2% w/v的促凝剂、2% w/v的BSA、0.1%~0.5% w/v的防腐剂;所述试剂二中包括:0.1%~0.5% w/v标记有抗人H-FABP抗体的胶体金颗粒、2%~5% w/v的稳定剂、20~50mmol/L的缓冲液、0.1%~0.5% w/v的防腐剂,所述标记有抗人H-FABP抗体的胶体金颗粒的直径为60nm~90nm。本发明具有检测灵敏度高,检测线性范围大,且检测简单快速,操作性好等诸多优点。

1. 一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:由试剂一和试剂二配合而成,其中,所述试剂一和试剂二的体积比为 5 : 1;所述试剂一中包括:20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、2% w/v 的促凝剂、2% w/v 的 BSA、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂;所述试剂二中包括:0.1% ~ 0.5% w/v 标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒、2% ~ 5% w/v 的稳定剂、20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂,所述标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒的直径为 60nm ~ 90nm。

2. 如权利要求 1 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述试剂一和试剂二中的缓冲液具体为含有 0.5% ~ 5.0% w/v BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液中的一种或几种。

3. 如权利要求 2 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述试剂一、试剂二的 pH 值为 7.0 ~ 9.0。

4. 如权利要求 2 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述 BSA 浓度为 1% w/v,试剂一、试剂二的 pH 值为  $8.0 \pm 0.2$ 。

5. 如权利要求 1 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述试剂一中的促凝剂为 PEG6000 或 Brij-35 中的至少任一种。

6. 如权利要求 1 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述试剂二中的胶体金颗粒直径为 75nm ~ 85nm,颗粒含量为 0.08 ~ 0.8mg/mL。

7. 如权利要求 6 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述胶体金颗粒含量为 0.4mg/mL。

8. 如权利要求 1 所述的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其特征在于:所述标记有抗人 H-FABP 抗体为具有不同免疫活性位点多个克隆株单抗的混合物。

9. 一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

1),将促凝剂、BSA 和防腐剂加入到缓冲液,制得试剂一;

2),将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1 : 1 加热煮沸制得胶体金溶液;将 H-FABP 抗体加入到胶体金溶液中,并加入稳定剂、缓冲液、防腐剂,制得试剂二;所述配置氯金酸与柠檬酸三钠溶液时,使用 0.2um 滤膜过滤;

3),将试剂一和试剂二按照 5 : 1 的体积比配合使用,即得心型脂肪酸结合蛋白检测试剂。

10. 一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(一),胶体金颗粒的制备

1) 将玻璃容器先用洗洁剂洗涤并用流水冲洗干净,然后用硅化试剂浸泡过夜,对所用金属器皿的内表面做硅化处理,再用蒸馏水冲洗干净,备用;

2) 配制 1% (w/v) 氯金酸和 1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液,使用 0.2um 滤膜过滤;

3) 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚,加入 1000ml 超纯水;

4) 加入浓度为 1% (w/v) 氯金酸,600rpm 高速搅拌,并加热至溶液沸腾,然后将浓度为 1% 柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中,保持加热和剧烈搅拌 10min,溶液颜色先变黑色,然后逐渐变紫红色;

5) 冷却:关闭加热开关并继续搅拌 10min,然后停止搅拌冷却至室温,用超纯水恢复到原体积;

(二), 试剂一的制备

将 Tris-HCl 缓冲液、0.9 % NaCl(w/v)、2 % BSA(w/v)、0.1 % NaN<sub>3</sub>(w/v)、0.05 % Tween20(w/v) 混合, 并根据 Tris 的质量控制缓冲液的浓度, 根据 HCl 的使用量来调整缓冲液的 pH 值;

(三), 标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒的制备

取 1 毫升制备好的胶体金液体加入到 1.5 毫升的离心管内;

用 10% 的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH9 ~ 10 之间;

将抗体到上述的离心管中, 震荡 30 分钟;

向上述溶液中加入 100  $\mu$  110% 的 NaCl 溶液, 混匀, 静置 2h 后观察各管是否有颜色改变或者沉淀析出, 当无颜色改变和无沉淀析出表明加入的抗体分子小于蛋白最大需求量;

将 500ml 胶体金溶液加入三角瓶中, 边搅拌边用 10% 的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 8 ~ 10, 并用 pH 试纸检测调整过程;

将确定的抗体用量加入到上述溶液中, 继续搅拌 30 分钟, 超滤收集标记物;

(四), 试剂二的制备

将 Tris-HCl 缓冲液、0.9 % (w/v) NaCl、2 % (w/v) BSA、0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>、0.05 % (w/v) Tween20、5 % (w/v) 蔗糖或海藻糖、2 % (w/v) 甘氨酸、2 % (w/v) PEG6000 以及步骤 (三) 的标记物相混合制得试剂二;

(五), 将试剂一和试剂二按照 5 : 1 的体积比配合使用, 即得 H-FABP 检测试剂。

## 一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法,具体涉及用于检测血清或血浆中 H-FABP 的匀相溶胶颗粒型 H-FABP 免疫测定试剂,属于医疗器械体外诊断试剂领域。

### 【背景技术】

[0002] 心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP) 是心脏中富含的一种新型小胞质蛋白,它具有高度心脏特异性 (也就是主要在心脏组织中表达),但在心脏以外的组织中也有低浓度表达。心肌缺血性损伤出现后,H-FABP 可以早在胸痛发作后 1~3 小时在血液中被发现,6~8 小时达到峰值而且血浆水平在 24~30 小时内恢复正常。心脏脂肪酸结合胞质蛋白由 132 个氨基酸组成,分子量为 15kDa。心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP) 基因位于染色体 I 上。它是心脏最丰富的蛋白质之一。H-FABP 结合两个脂肪酸分子并参与脂肪酰基辅酶 A 的运输,活跃于氧化过程,从而在线粒体中产生能量。

[0003] H-FABP 的几个生物学方面表明它可能是一种对心肌损伤的早期诊断有用的生物标志物:(1) 在心肌中高浓度;(2) 在细胞质中限制;(3) 低分子量和面积小;(4) 相对组织特异性;(5) 与心脏以外组织中 CK-MB 的分布相似,以及 (6) 在心肌损伤后早释进入血浆和尿液。

[0004] 缺血损伤后快速出现 H-FABP 表明它可能通过经内皮途径到达循环。几项临床观察结果表明这种蛋白质主要通过肾排除。症状发作后不久 H-FABP 出现在患者的尿液中。

[0005] H-FABP 的特征看似与肌红蛋白的相似。这两种在心肌和骨骼组织中表达的低分子量胞质蛋白是线粒体氧化的基质而且在症状发作后 2 小时内释放,6 小时出现最大浓度,24 小时内恢复基线浓度。然而,他们在心脏和肌肉组织中的浓度不同。心脏中 H-FABP 浓度比骨骼肌中高 2~10 倍 ((净重 0.5 vs. 0.05~0.2mg/g)。与此相反,心脏细胞中肌红蛋白浓度比骨骼细胞中低 2 倍 (2.5 和 4.0mg/g 净重)。肌红蛋白的正常血浆浓度 (20~80  $\mu$ g/l) 比 H-FABP 的 (<5  $\mu$ g/l) 高 10~15 倍。游离血浆肌红蛋白水平升高是被广泛接受的早期心肌损伤标志而且在 1994 年 Bhayana 等人证明了血浆肌红蛋白水平升高比 CK-MB 和 cTnT 水平升高在症状发作后 3~6 小时内排除急性心肌梗塞 (AMI) 上具有优越性。尽管在发表的几个准则中肌红蛋白被推荐为心脏损伤的早期标志物,但 H-FABP 更加具有心脏特异性而且由于其生物学特性它可能被认为是一种更准确的诊断试验。

[0006] 如先前讨论的那样,H-FABP 和肌红蛋白还存在于骨骼肌中但是缺少心脏特异性。由于这些蛋白质在心脏和骨骼肌中不同程度地表达,肌红蛋白/H-FABP 比率被用于更好地区别心脏和肌肉特异性损害。比值为 5 被认为具有心脏特异性而比值在 21~70 之间表明更倾向于骨骼肌损害。Furuhashi 等人发现这个比值对肾功能障碍患者有用,他们确定 H-FABP/肌红蛋白比值为 0.147 是心脏病变的临界值。其他作者质疑肌红蛋白/H-FABP 比值作为一种有助于检测急性缺血性损伤的试验的优势。

[0007] H-FABP 与急性心肌梗塞的关系

[0008] 1988年, Glatz等人提出H-FABP用作鼠类AMI的新型生物化学标志物。1991年, 这一观察结果被Abe等人和Tanaka等人在人类中得到确认, 表明人类H-FABP可被用作一种对心肌梗塞检测具有高灵敏度和检测率的良好生物标志物。后来的研究证实了这一假设。H-FABP在症状发作后早期释放到血流中而且在20分钟后可以被检测到。最大浓度在胸痛发作后3~5小时出现, 在20小时内恢复正常基线值。Kleine等人报告在症状发作后30~210分钟内诊断出AMI的灵敏度高于80%。2004年, Chan等人报告了对218位入院时伴随胸痛的疑似AMI患者进行的研究结果。对于在症状发作后24小时内入院的患者来说, 在第一份监测样本中H-FABP的灵敏度和阴性预测值(72和67%)好于CPK(54和55%)及H-FABP(51和51%)。此外, 对于入院后1小时被监测的样本, 与CPK或H-FABP测定相比H-FABP的灵敏度和阴性预测值增加到100%。因此, 连续两个样本H-FABP监测可以在1小时内确定几乎所有患持续AMI的患者而且可以100%排除非AMI患者, 不会有假阴性结果。对于其他心脏标志物比如CK-MB、H-FABP和cTnT, 据报道在症状发作后间隔0~6小时内检测出AMI的灵敏度约为64%。在一项前瞻性多中心试验中, Nakata等人研究了133位到达急诊室时疑似患有急性冠状动脉综合征(ACS)的患者, 证明与肌红蛋白、TnT和CK-MB相比H-FABP在症状发作后12小时内检测出ACS和AMI的ROC曲线下面积最高(对于ACS, H-FABP的曲线下面积为0.936, 肌红蛋白0.862, TnT 0.734以及CK-MB 0.793; 对于AMI, H-FABP 0.907, 肌红蛋白0.860, TnT 0.838以及CK-MB 0.880)。ROC分析结果表明在这些生物标志物中H-FABP提供最强的诊断能力, 尤其是在急性缺血事件的前6小时内, 有助于快速危险分层和更早预测患者预后。

[0009] H-FABP的早期使用可以克服急性胸痛早期心肌肌钙蛋白检测的陷阱。心肌肌钙蛋白在循环中越持久, 可能越有助于急性心肌损伤的后期诊断。

[0010] 在大多数研究中, 用于诊断ACS的H-FABP临界值是6.2ng/ml, 但是Nakata等人呈现的结果显示9.5和13ng/ml分别是更适于诊断ACS和AMI的临界值。H-FABP通过肾从血流中排除。AMI患者尿液中H-FABP浓度高于正常值。在症状发作后1.5小时内发现尿液浓度升高。进行了不同的动物研究以调查尿液中H-FABP的浓度曲线。结果显示只有在冠状动脉结扎30分钟后H-FABP才对AMI有诊断意义。市场上可以买到几种测量H-FABP尿液浓度的试验。但是, 用尿液H-FABP进行AMI早期诊断时必须谨慎因为结果可能受几种因素的影响, 比如异常肾血流、灌注压力、肾小球滤过率、肾小管吸收和肾衰竭, 可能低估或高估AMI的面积。

[0011] 在肾衰竭患者中, 基线梗塞前H-FABP血浆浓度通常高于正常值因为肾清除率降低, 血清浓度升高和循环时间延长。由于肌肉注射、心脏电复律和心肺复苏术引起的骨骼肌损伤可能导致H-FABP血浆浓度显著升高, 也可能干预试验结果, 使得AMI诊断更困难。只有少数研究评估了H-FABP用于检测ACS的情况。Ishii等人比较了104位健康志愿者和165位胸痛发作后6小时内入院的患者。ACS患者和健康志愿者之间的H-FABP(0.946, 95%置信区间(CI) = 0.913~0.979)和肌红蛋白(0.895, 95% CI = 0.846~0.944)的ROC曲线明显大于肌红蛋白/H-FABP比率以下的面积(0.823, 95% CI = 0.765~0.881)。在ACS患者中, H-FABP灵敏度为81%、特异性86%和预测准确度84%。作者总结对于AMI早期诊断而言H-FABP是比肌红蛋白更灵敏和特效的标志物。Tsuji等人观察到97位疑似ACS患者的H-FABP浓度为 $3.5 \pm 1.7 \mu\text{g/l}$ (正常范围值 $0.0 \sim 0.6 \mu\text{g/l}$ 和上限 $3 \mu\text{g/l}$ )。在症状

发作后 3 小时内和 3 ~ 6 小时之间被检测的 91.4% (64/70) 和 100% (111/111) 样本显示 AMI 患者的血清 H-FABP 水平高于正常值。在 0 ~ 3 和 3 ~ 6 小时之间分别有 20% (8/40) 和 66.3% (53/80) 血清样本显示 AMI 患者的 CK-MB 活性呈阳性。Alhadi 和 Fox 进行的先导研究初步结果表明 H-FABP 可能在诊断不稳定心绞痛中起作用。Kleine 等人报告说 H-FABP 比 CK-MB 更适合作为 AMI 早期标志。

[0012] Abe 等人在 1991 年报告说 H-FABP 还对血栓溶解疗法后再灌注检测灵敏。他们表示血栓溶解疗法后 30 分钟 H-FABP 比率基线升至  $> 1.5$  与再灌注检测 100% 绝对准确度有关。血栓溶解疗法 1 小时后, 准确度降低至 94%。Ishii 等人在 1997 年证实了这些结果, 表示 H-FABP 比率  $> 1.8$  对再灌注检测的准确度在 15 分钟时为 93%, 在 30 分钟时为 98% 以及在 60 分钟时为 100%。Groot 等人给出了相同结果, 证实了对于冠状动脉再灌注检测的检验高可靠性。

[0013] H-FABP, 由于 AMI 确诊后其在血清中的释放模式, 也可用作早期再梗塞检测的理想标志物。与以前的数值相比, 血清中 H-FABP 浓度快速升高表示再梗塞。只有达到最高血浆浓度后 6 小时 H-FABP 才能充分灵敏地检测到再梗塞。

[0014] H-FABP 可用于梗塞面积的早期估计。1993 年, Sohmiya 等人在一个实验模型中证明了通过 H-FABP 血浆浓度估计心肌梗塞面积与氯化三苯四唑染色之间的良好相关。Glatz 等人用 CK-MB、 $\alpha$ -羟丁酸脱氢酶替代氯化三苯四唑在人类中发现了相似的结果。用 H-FABP 的主要优势是比用其他标志物更早完成 ACS 估计 (H-FABP24 小时而 CK-MB48 小时)。

[0015] H-FABP 和手术后急性心肌损伤的关系

[0016] H-FABP 用于早期检测心肌损伤还被延伸到心脏手术。在心脏手术中松开主动脉钳夹后 H-FABP 血清浓度比 CK-MB 和 TnT 更早达到最高水平。Suzuki 等人证明 H-FABP 在冠状动脉患者释放主动脉交叉钳夹后  $47.3 \pm 2$  分钟时达到最高值。Fransen 等人表示围手术期心肌损伤可从有各种心脏疾病和手术的患者再灌注后 0.5 小时 H-FABP 释放进血浆诊断出来。Hayashida 等人发现 H-FABP 达到最高浓度的时间为松开主动脉钳夹后  $1.4 \pm 0.5$  小时, CK-MB 为  $2.5 \pm 0.5$  小时而 cTnT 为  $6.6 \pm 1.3$  小时。Petzold 等人早在再灌注开始后 1 小时确定了平均最高水平。Fransen 等人和 Suzuki 等人也提到了这点, 他们报告说围手术期心肌梗塞患者的一个 H-FABP 水平模型等于常见病例。Petzold 等人和 Fransen 等人关于“上升和下降模型”修改的观察报告已被其他作者证实。Adams 表示, 在心肌损伤的情况下, 每个标志蛋白质都有一个典型的浓度模型, 而且在缺少这种模型的情况下高血清水平可能导致假阳性结果。Fransen 等人指出在一组接受非体外循环手术的冠状动脉疾病患者中 H-FABP 血清水平好像不受手术创伤的影响。

[0017] Hanegawa 等人证明在他们的研究中, 儿童手术前基线血清 H-FABP 水平 (平均值 =  $4.3 \pm 0.2$  ng/ml) 与以前报道的成年患者的 (平均值 =  $3.8 \pm 0.2$  ng/ml) 相似。另一方面, 心肌损伤后儿童患者的血清最高 H-FABP 水平比成年患者更易升高。在 Hanegawa 的文章中接受外科手术不包括心室切开术的儿童的血清最高 H-FABP 水平在 48 和 1,200 ng/ml 之间变化 (平均值 =  $260 \pm 25.7$  ng/ml), 但是 Suzuki 等人报告说成人的水平范围是 64.9 ~ 139.0 ng/ml (平均值 =  $93.2 \pm 5.4$  ng/ml)。Toyoda 等人暗示血清 H-FABP 在儿科心脏手术松开主动脉钳夹后 1 小时达到最高水平。普遍认为 H-FABP 释放量反映心肌损伤的程度。

**【发明内容】**

[0018] 为解决上述问题,本发明的目的在于提供一种检测灵敏度高,检测线性范围大,且检测简单快速,操作性好的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂。

[0019] 本发明的第二目的在于提供一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法。

[0020] 为实现上述第一目的,本发明采取的技术方案为:一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其由试剂一和试剂二配合而成,其中,所述试剂一和试剂二的体积比为 5 : 1 ;所述试剂一中包括:20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、2% w/v 的促凝剂、2% w/v 的 BSA、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂;所述试剂二中包括:0.1% ~ 0.5% w/v 标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒、2% ~ 5% w/v 的稳定剂、20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂,所述标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒的直径为 60nm ~ 90nm。

[0021] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述试剂一和试剂二中的缓冲液具体为含有 0.5% ~ 5.0% w/v BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液中的一种或几种。

[0022] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述试剂一、试剂二的 pH 值为 7.0 ~ 9.0。

[0023] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述 BSA 浓度为 1% w/v,试剂一、试剂二的 pH 值为  $8.0 \pm 0.2$ 。

[0024] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述试剂一中的促凝剂为 PEG6000 或 Brij-35 中的至少任一种。

[0025] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述试剂二中的胶体金颗粒直径为 75nm ~ 85nm,颗粒含量为 0.08 ~ 0.8mg/mL。

[0026] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂进一步为:所述胶体金颗粒含量为 0.4mg/mL。

[0027] 本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂还可为:所述标记有抗人 H-FABP 抗体为具有不同免疫活性位点多个克隆株单抗的混合物。

[0028] 为实现上述第二目的,本发明采取的技术方案为:一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法,其包括如下步骤:

[0029] 1),将促凝剂、BSA 和防腐剂加入到缓冲液,制得试剂一;

[0030] 2),将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1 : 1 加热煮沸制得胶体金溶液;将 H-FABP 抗体加入到胶体金溶液中,并加入稳定剂、缓冲液、防腐剂,制得试剂二;所述配置氯金酸与柠檬酸三钠溶液时,使用 0.2um 滤膜过滤;

[0031] 3),将试剂一和试剂二按照 5 : 1 的体积比配合使用,即得心型脂肪酸结合蛋白检测试剂。

[0032] 为实现上述第二目的,本发明采取的另一技术方案为:一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法,其包括如下步骤:

[0033] (一),胶体金颗粒的制备

[0034] 1) 将玻璃容器先用洗洁剂洗涤并用流水冲洗干净,然后用硅化试剂浸泡过夜,对所用金属器皿的内表面做硅化处理,再用蒸馏水冲洗干净,备用;

[0035] 2) 配制 1% (w/v) 氯金酸和 1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液,使用 0.2um 滤膜过滤;

[0036] 3) 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚,加入 1000ml 超纯水;

[0037] 4) 加入浓度为 1% (w/v) 氯金酸,600rpm 高速搅拌,并加热至溶液沸腾,然后将浓度为 1% 柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中,保持加热和剧烈搅拌 10min,溶液颜色先变黑色,然后逐渐变紫红色;

[0038] 5) 冷却:关闭加热开关并继续搅拌 10min,然后停止搅拌冷却至室温,用超纯水恢复到原体积;

[0039] (二),试剂一的制备

[0040] 将 Tris-HCl 缓冲液、0.9% NaCl (w/v)、2% BSA (w/v)、0.1% NaN<sub>3</sub> (w/v)、0.05% Tween20 (w/v) 混合,并根据 Tris 的质量控制缓冲液的浓度,根据 HCl 的使用量来调整缓冲液的 pH 值;

[0041] (三),标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒的制备

[0042] 取 1 毫升制备好的胶体金液体加入到 1.5 毫升的离心管内;

[0043] 用 10% 的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH8 ~ 10 之间;

[0044] 将抗体到上述的离心管中,震荡 30 分钟;

[0045] 向上述溶液中加入 100  $\mu$ l 10% 的 NaCl 溶液,混匀,静置 2h 后观察各管是否有颜色改变或者沉淀析出,当无颜色改变和无沉淀析出表明加入的抗体分子小于蛋白最大需求量;

[0046] 将 500ml 胶体金溶液加入三角瓶中,边搅拌边用 10% 的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 8 ~ 10,并用 pH 试纸检测调整过程;

[0047] 将确定的抗体用量加入到上述溶液中,继续搅拌 30 分钟,超滤收集标记物;

[0048] (四),试剂二的制备

[0049] 将 Tris-HCl 缓冲液、0.9% (w/v) NaCl、2% (w/v) BSA、0.1% (w/v) NaN<sub>3</sub>、0.05% (w/v) Tween20、5% (w/v) 蔗糖或海藻糖、2% (w/v) 甘氨酸、2% (w/v) PEG6000 以及步骤 (三) 的标记物相混合制得试剂二;

[0050] (五),将试剂一和试剂二按照 5 : 1 的体积比配合使用,即得肌钙蛋白 I 检测试剂。

[0051] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0052] 1. 本发明利用胶体金匀相颗粒特性,将特定的 H-FABP 抗体标记于胶体金颗粒表面,当检测系统或检测环境中存在 H-FABP 时,胶体金颗粒表面的抗体即将与之对应的抗原捕获,并形成抗原-抗体复合物,进而造成局部胶体金颗粒的聚合或堆积,使胶体金匀相试剂透光光谱由红色向蓝色光谱移动,从而达到定量检测检体中 H-FABP 抗原的目的,同时避免了同类检测项目乳胶增强免疫比浊法试剂在反应后产生胶乳微球交联物吸附比色杯不易清洗的缺点。

[0053] 2. 本发明可用于检测血清或血浆中 H-FABP 含量,适用于临床检测过程中使用的分光光度计、半自动生化分析仪和全自动生化分析仪等仪器。

[0054] 3. 本发明检测 H-FABP 的灵敏度可以达到 20ng/mL,检测线性范围达 10 ~ 1200ng/mL,具有高分析灵敏度,高特异性等特点。

## 【附图说明】

[0055] 图 1 是为不同颗粒大小的胶体金标记物校准曲线图。

[0056] 图 2 是本发明试剂与市售相关试剂分析线性比较图。

### 【具体实施方式】

[0057] 首先,需要说明的是,本发明中涉及的重体积比记为“w/v”,单位为“g/mL”。

[0058] 本发明为一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂,其由试剂一和试剂二配合而成,其中,所述试剂一和试剂二的体积比为 5 : 1。

[0059] 所述试剂一中包括:20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、2% w/v 的促凝剂、2% w/v 的 BSA、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂。其中,所述试剂一的缓冲液具体为含有 0.5% ~ 5.0% w/v BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液中的一种或几种。所述试剂一的 pH 值为 7.0 ~ 9.0,优选的 pH 值为 8.0 ± 0.2。所述 BSA 浓度为 1% w/v。所述促凝剂为 PEG6000 或 Brij-35 中的至少任一种。

[0060] 所述试剂二中包括:0.1% ~ 0.5% w/v 标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒、2% ~ 5% w/v 的稳定剂、20 ~ 50mmol/L 的缓冲液、0.1% ~ 0.5% w/v 的防腐剂。其中,所述标记有抗人 H-FABP 抗体的胶体金颗粒的直径为 60nm ~ 90nm。所述试剂二的缓冲液具体为含有 0.5% ~ 5.0% w/v BSA 的 Tris-HCl 缓冲液、HEPES 缓冲液、硼酸盐缓冲液或甘氨酸缓冲液中的一种或几种。所述试剂二的 pH 值为 7.0 ~ 9.0,优选的 pH 值为 8.0 ± 0.2。优先的胶体金颗粒直径为 75nm ~ 85nm,颗粒不宜过小,否则会造成反应速度变慢;颗粒也不宜过大,会造成标记物聚集沉降进一步影响测定结果。所述胶体金颗粒颗粒含量为 0.08 ~ 0.8mg/mL,优先的颗粒含量为 0.4mg/mL。所述标记有抗人 H-FABP 抗体为具有不同免疫活性位点多个克隆株单抗的混合物。

[0061] 所述心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的制备方法如下:

[0062] 1),将促凝剂、BSA 和防腐剂加入到缓冲液,制得试剂一;

[0063] 2),将氯金酸与柠檬酸三钠按照质量比 1 : 1 加热煮沸制得胶体金溶液;将 H-FABP 抗体加入到胶体金溶液中,并加入稳定剂、缓冲液、防腐剂,制得试剂二;其中,配置氯金酸与柠檬酸三钠溶液时,使用 0.2um 滤膜过滤;

[0064] 3),将试剂一和试剂二按照 5 : 1 的体积比配合使用,即得心型脂肪酸结合蛋白检测试剂。

[0065] 以下为本发明的心型脂肪酸结合蛋白检测试剂的具体实施例。

[0066] 实施例一

[0067] 胶体金颗粒的制备(以下所有操作需在高洁净度无尘空间内完成)

[0068] 1) 准备工作:所有用到的玻璃容器先用洗洁剂洗涤并用流水冲洗干净,然后用硅化试剂浸泡过夜,对所用金属器皿的内表面做硅化处理,再用蒸馏水冲洗干净,备用;

[0069] 2) 配制 1% (w/v) 氯金酸和 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液,使用 0.2um 滤膜过滤;

[0070] 3) 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚,加入 1000ml 超纯水;

[0071] 4) 加入一定体积浓度为 1% (w/v) 氯金酸,600rpm 左右高速搅拌,并加热至溶液沸腾,然后迅速将一定体积浓度为 1% 柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中,保持加热和剧烈搅拌 10min,溶液颜色先变黑色,然后逐渐变紫红色;

[0072] 5) 冷却:关闭加热开关并继续搅拌 10min,然后停止搅拌冷却至室温,用超纯水恢

复到原体积；

[0073] 6) 不同粒径的胶体金颗粒可根据加入氯金酸和柠檬酸钠的比例进行控制,最终以电子粒度仪检测 10mL 胶体金溶液,以粒度仪显示结果为金颗粒的粒径结果使用。

[0074] 实施例二

[0075] 试剂一的制备

[0076] 试剂一的配方如下:Tris-HCl 缓冲液、0.9% NaCl(w/v)、2% BSA(w/v)、0.1% Na<sub>3</sub>N(w/v)、0.05% Tween20(w/v),可根据 Tris 的质量控制缓冲液的浓度,根据 HCl 的使用量来调整缓冲液的 pH 值。

[0077] 实施例三

[0078] 标记物的制备

[0079] 取 1 毫升制备好的胶体金液体加入到 1.5 毫升的离心管内；

[0080] 用 10%的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH8 ~ 10 之间；

[0081] 将一定量抗体到上述的离心管中,震荡 30 分钟；

[0082] 向上述溶液中加入 100 μ 110%的 NaCl 溶液,混匀,静置 2h 后观察各管是否有颜色改变或者沉淀析出,当无颜色改变和无沉淀析出表明加入的抗体分子小于蛋白最大需求量；

[0083] 将 500ml 胶体金溶液加入三角瓶中,边搅拌边用 10%的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 8 ~ 10,并用精密 pH 试纸检测调整过程；

[0084] 按所述的方法将确定的抗体用量加入到上述溶液中,继续搅拌 30 分钟,超滤收集标记物。

[0085] 实施例四

[0086] 试剂二的制备

[0087] 试剂二缓冲液中溶解的生物大分子和化学物质为 Tris-HCl 缓冲液、0.9% (w/v) NaCl、2% (w/v) BSA、0.1% (w/v) Na<sub>3</sub>N、0.05% (w/v) Tween20、5% (w/v) 蔗糖或海藻糖,2% (w/v) 甘氨酸,2% (w/v) PEG6000,本部分缓冲液配制同试剂一保持一致,再次不再赘述。

[0088] 将配制好的试剂儿缓冲溶液同超滤收集得到的标记物相混合,最终控制标记物金颗粒浓度为 0.4mg/mL 即可。

[0089] 实施例五

[0090] 校准品的制备

[0091] 将市售的人源 H-FABP 蛋白纯品用 2% (w/v) BSA 溶液溶解或稀释,制得 1200ng/mL 校准品,使用时根据所需要浓度梯度用 0.9% (w/v) NaCl 稀释即可。

[0092] 实施例六

[0093] 不同颗粒度胶体金颗粒的选择

[0094] 根据以上实施例中胶体金颗粒的制备不同粒径的胶体金颗粒完成标记制得试剂二,选择同一缓冲液浓度和 pH 进行实验。

[0095] 实验方法：

[0096] 将校准品、试剂一和试剂二按照体积比为 3 : 250 : 50 依次混合,37℃下充分反应。

[0097] 在 7180 全自动生化分析仪上记录 540 ± 10nm 处吸光度值。

[0098] 比较不同颗粒大小胶体金标记物校准曲线最终确定最佳颗粒大小。

[0099] 根据校准曲线（附图 1）判断选择 75nm ~ 85nm 范围的金颗粒较为合适，大颗粒分析灵敏度较好但是易产生 HOOK 效应不利于检测，而小颗粒在高值区的分析能力却明显不如 75nm ~ 85nm 颗粒。

[0100] 本发明试剂与市售相关项目试剂分析线性比较

[0101] 试验方法：以一临床高值样本为例，将其倍比稀释如下梯度，分别用对照试剂和本发明试剂检测，并拟合其线性，结果如附图 2 所示：

[0102] 表 1 线性数据结果

[0103]

浓度梯度倍数	稀释目标浓度 (ng/mL)	对照试剂检测结果 (ng/mL)	本发明试剂检测结果 (ng/mL)
64	1198	1198	1192
32	599	605	584
16	299	290	286
8	149	18	143
4	74	9	74
2	37	6	37
1	18	2	18

[0104]

[0105] 本发明试剂线性  $y = 0.9935x - 3.478$   $r = 0.9999$

[0106] 对照方法试剂线性  $y = 1.0533x - 53.5388$   $r = 0.9955$

[0107] 从相关数据统计可以看出，本发明试剂线性结果明显优于对照试剂线性测试结果。

[0108] 实施例七

[0109] (4) 干扰试验

[0110] 在正常人血清中各自添加一定量的胆红素、牛血红蛋白、脂肪乳剂和类风湿因子，先测定样本初始值，之后根据下表干扰物质浓度添加干扰物质在样本中，每次只添加一种干扰物，使其达下表中所示的浓度，同时根据测量结果和体积变化反算稀释倍数计算测量后的结果，结果见表 2。

[0111] 表 2 抗干扰检测结果

[0112]

干扰物种类及浓度	测量值	理论值	抗干扰程度
抗坏血酸 4.5g/L	110	103	6.80%
脂浊 0.3%	97	103	-5.83%
血红蛋白 5g/L	95	103	-7.77%
胆红素 500umol/L	106	103	2.91%
肝素钠 62.5U/ml	108	103	4.85%
类风湿因子 (100IU/ml)	96	103	-6.80%

[0113] 根据以上数据表明,本发明试剂在此干扰物存在范围内满足临床检测要求,说明本发明试剂具有良好的抗干扰性能。

[0114] 以上的具体实施方式仅为本创作的较佳实施例,并不用以限制本创作,凡在本创作的精神及原则之内所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本创作的保护范围之内。

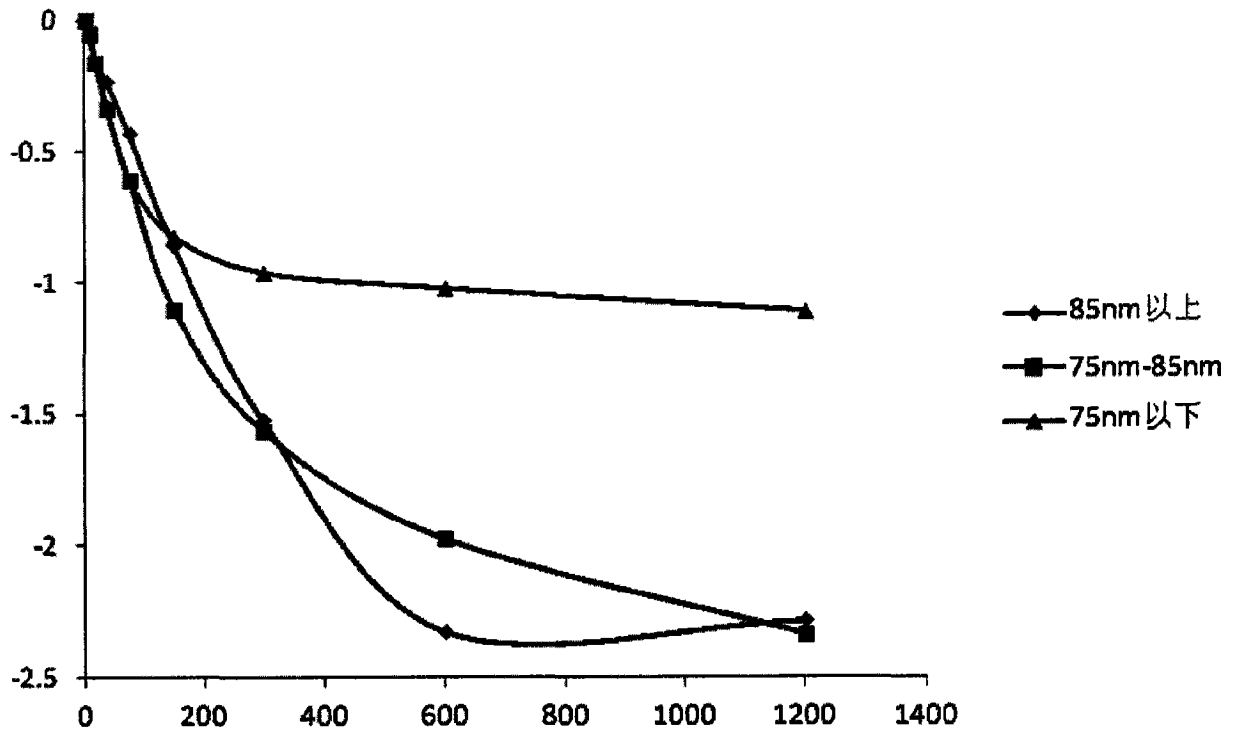


图 1

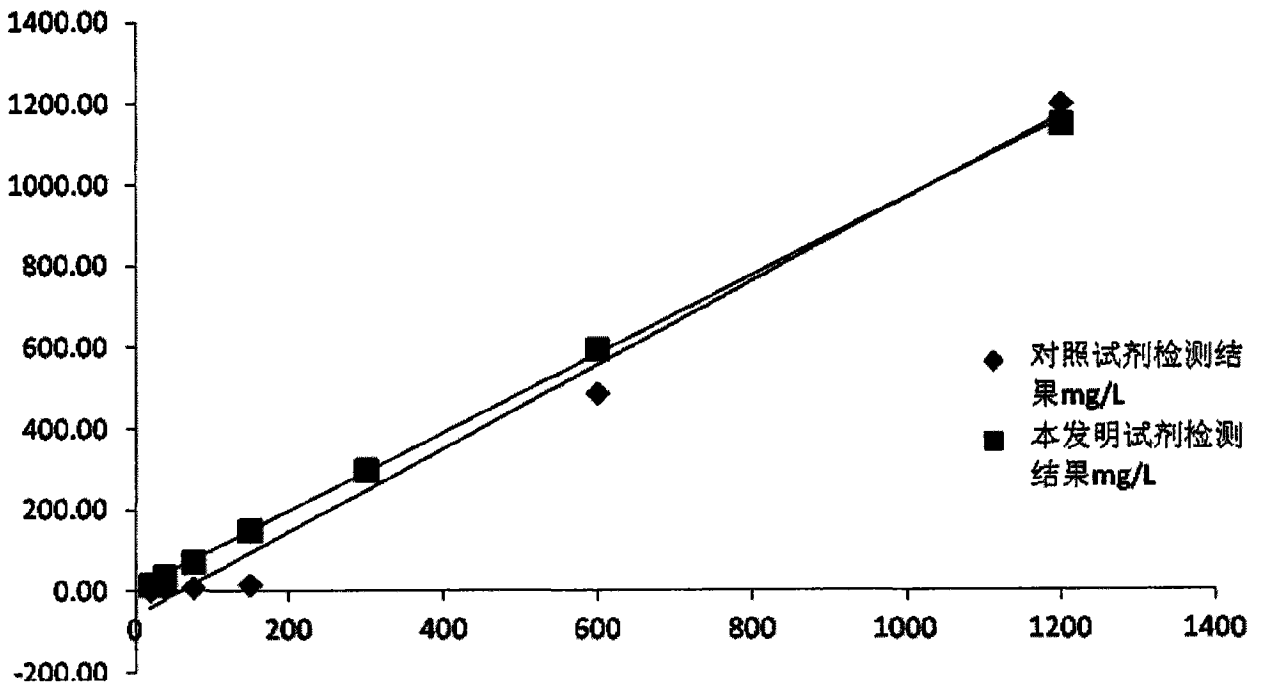


图 2

专利名称(译)	一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104330576A</a>	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201410648637.1	申请日	2014-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇五医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇五医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇五医院		
[标]发明人	王会中		
发明人	王会中		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6887		
其他公开文献	CN104330576B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种心型脂肪酸结合蛋白检测试剂及其制备方法，其由试剂一和试剂二配合而成，其中，所述试剂一和试剂二的体积比为5:1；所述试剂一中包括：20~50mmol/L的缓冲液、2%w/v的促凝剂、2%w/v的BSA、0.1%~0.5%w/v的防腐剂；所述试剂二中包括：0.1%~0.5%w/v标记有抗人H-FABP抗体的胶体金颗粒、2%~5%w/v的稳定剂、20~50mmol/L的缓冲液、0.1%~0.5%w/v的防腐剂，所述标记有抗人H-FABP抗体的胶体金颗粒的直径为60nm~90nm。本发明具有检测灵敏度高，检测线性范围大，且检测简单快速，操作性好等诸多优点。