



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110346575 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201810318417.0

(22)申请日 2018.04.04

(71)申请人 南京东纳生物科技有限公司

地址 211112 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技创新园2号楼北区6-7层

(72)发明人 张宇 王建国 韩国志

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

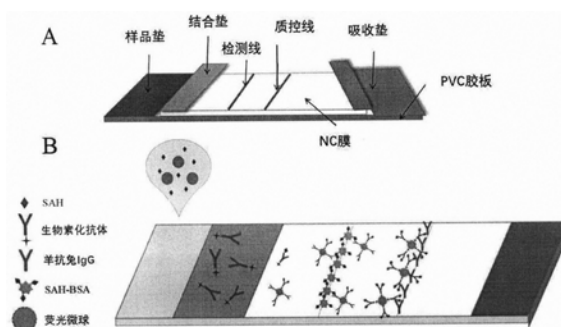
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其检测方法

## (57)摘要

本发明公开了一种基于竞争法的同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其使用方法。该试剂盒包括试剂I,试剂II和荧光免疫层析试纸条,试剂I含有二硫苏糖醇(DTT)、腺苷甲硫氨酸、同型半胱氨酸甲基转移酶、缓冲液、稳定剂;试剂II含有生物素化聚苯乙烯荧光微球、缓冲液、稳定剂;试纸条由样品垫、包被有生物素化抗体的结合垫、包含检测线和质控线的NC膜、吸水纸以及PVC胶板。利用竞争式荧光免疫层析法检测腺苷同型半胱氨酸来达到检测同型半胱氨酸的目的,该检测方法,操作简单,可同时检测大量样本,受干扰因素少,成本低廉。



1. 一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于: 包含试剂I、试剂II和荧光免疫层析试纸条三个部分, 其中试剂I含有二硫苏糖醇、腺苷甲硫氨酸、同型半胱氨酸甲基转移酶、缓冲液、稳定剂; 试剂II含有亲和素修饰聚苯乙烯荧光微球、缓冲液、稳定剂; 荧光免疫层析试纸条包括五部: 样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸及PVC胶板, 腺苷同型半胱氨酸的生物素化抗体固定在结合垫上, 硝酸纤维素膜上固定有腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物和二抗作为检测线和质控线, 通过竞争法定量检测由同型半胱氨酸转化形成的腺苷同型半胱氨酸。

2. 根据权利要求1所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于: 每升试剂I溶液中各组分的含量是:

同型半胱氨酸甲基转移酶	10 ~ 100KU
腺苷甲硫氨酸	1 ~ 10mM
二硫苏糖醇	1 ~ 20mM
缓冲液	5 ~ 100mM
稳定剂	0.01 ~ 10%

每升试剂II溶液中各组分的含量是:

亲和素修饰的聚苯乙烯荧光微球	0.05~5g/L
缓冲液	5~100mM
稳定剂	0.01~10%

每厘米荧光免疫层析试纸条各组分的含量是:

生物素化腺苷同型半胱氨酸抗体	1~4μL/cm
腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物	0.5~2μL/cm
二抗	0.5~2μL/cm

3. 根据权利要求2所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于, 每升试剂I溶液中各组分的含量是:

同型半胱氨酸甲基转移酶	40-60KU
腺苷甲硫氨酸	3-7mM
二硫苏糖醇	5-15mM
缓冲液	10-15mM
稳定剂	0.1-0.3%

每升试剂II溶液中各组分的含量是:

亲和素修饰的聚苯乙烯荧光微球	0.1-1g/L
缓冲液	10-15mM
稳定剂	0.1-0.3%

每厘米荧光免疫层析试纸条各组分的含量是:

生物素化腺苷同型半胱氨酸抗体	2-3μL/cm
腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物	1-1.5μL/cm

二抗

0.8-1 $\mu$ L/cm

4. 根据权利要求2所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于: 所述的稳定剂为叠氮钠、叠氮锂、PC300、苯甲酸钠、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、聚乙二醇、聚乙烯醇、乙二胺四乙酸二钠中的一种或几种。

5. 根据权利要求2所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒, 其特征在于: 所述缓冲液为PBS、PB、Tris中的一种或几种。

6. 根据权利要求1所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒的检测方法为: 将样本 (10-50 $\mu$ L) 与试剂I (10-50 $\mu$ L) 混合, 反应10-30分钟, 所得溶液与试剂II (900-980 $\mu$ L) 混合, 取100 $\mu$ L该混合样本加样到试纸条上, 5-15分钟后在荧光免疫定量分析仪上读取检测线的荧光信号值, 得到对应的同型半胱氨酸样本含量。

## 一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其检测方法,属于快速体外诊断技术领域。

### 背景技术

[0002] 同型半胱氨酸(Homocysteine,以下简称为Hcy)是甲硫氨酸代谢过程中的重要中间产物,在疾病条件下,酶的代谢出现障碍,血液中的Hcy浓度升高。1932年Du Vigneaud首次论及Hcy,1932年Carson和Neil在先天性智力障碍儿童中发现同型半胱氨酸尿症,并发现这些患者易患血栓栓塞性疾病,1969年McCuilly首次撰文提出了Hcy水平可能与动脉粥样硬化有关的观点,1976年Wilcken等人通过流行病学调查提出Hcy是心血管疾病的一个独立危险因素。90年代以来,有大量研究围绕Hcy与心血管疾病的关系展开,现在比较公认的观点是由Hcy的代谢异常导致的高同型半胱氨酸血症是心脑血管疾病及血管栓塞性疾病发病的独立危险因子,流行病学研究认为不存在所谓的Hcy的安全范围,当Hcy的血浆浓度大于 $6.3\mu\text{mol/L}$ 时,就会迅速增加患心脏疾病的危险。Boushey等人对4000例血管疾病临床病人的分析发现,血浆总Hcy水平每升高 $5\mu\text{mol/L}$ ,冠状动脉疾病的危险度增加1.6倍,脑血管疾病危险度增加1.8倍,外周血管疾病危险度增加6.8倍,其对心脑血管疾病危险性和胆固醇升高 $0.5\text{mmol/L}$ 对心脑血管疾病的危险度相当。因此,测定血液中Hcy的浓度对监测病情尤其是早期血管炎症、观察治疗效果、进行临床研究、探讨发病机理具有重要意义。

[0003] Hcy作为一个小分子,其检测较为困难,对血液中Hcy的检测从八十年代逐步发展起来后,先后出现了多种检测方法,包括放射酶法、气相色谱、液相色谱法(HPLC)、氨基酸分析仪法、循环酶法和荧光偏振免疫法(FPIA)。应用最广泛的是HPLC法和FPIA,HPLC高效液相色谱法以液体为流动相,HPLC采用高压输液系统,将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,在柱内各成分被分离后,进入检测器进行检测,从而实现对试样的分析。FPIA测量Hcy是近年来使用最为广泛的方法之一,由Mohammed在1995年首次提出,该法中,首先加入还原剂二硫苏糖醇,同时加入腺苷,在S-腺苷-L同型半胱氨酸水解酶的作用下,将Hcy转化为SAH,然后,加入荧光标记的SAH和SAH单抗,使SAH和荧光标记的SAH与单抗竞争结合,最后测定免疫结合物的荧光偏振度,可测算出由Hcy转化产生的SAH的浓度。这两种方法具有较高的灵敏和精密度,但两者的成本相对较大。循环酶法是最近推出的较新的检测方法,于1961年由Lowry OH等人提出,最初用来检测6-磷酸葡萄糖。在循环酶反应中,两种工具酶循环利用底物,不断生成待测物,而底物保持稳态浓度,以足够低的浓度产生准一级反应,由此底物的稳态浓度和总体测定的速度线性相关,通过测量反应速度可即可确定底物的量。循环酶测定有时称为“扩增”测定,因为方法通常使分析物的测量敏感性增加100到1000倍。该方法操作简单、成本较低,但需要借助全自动生化分析仪等大型仪器,无法实现快速诊断。综上所述,发展简单、快速、低成本并且准确可靠的新型同型半胱氨酸检测技术具有重要的意义,也是未来分级诊疗和心脑血管疾病早期筛查的迫切需求。

## 发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是：开发一种简单、快速、低成本的样本处理联合竞争法荧光免疫层析检测同型半胱氨酸的试剂盒，以满足上述应用需求。

[0005] 为实现上述发明目的，本发明采用的技术方案是：

[0006] 建立一种同型半胱氨酸转化及荧光免疫层析定量检测方法，在二硫苏糖醇的作用下，氧化型同型半胱氨酸转化为还原型同型半胱氨酸，以腺苷甲硫氨酸作为底物，在同型半胱氨酸甲基转移酶的作用下，同型半胱氨酸和腺苷甲硫氨酸分别转化为加硫氨酸和腺苷同型半胱氨酸。产物与亲和素修饰的荧光微球混合上样到试纸条上，通过竞争法荧光免疫层析试纸条，并采用便携式荧光免疫定量分析仪检测试纸条检测线的荧光信号值，定量同型半胱氨酸的浓度水平。

[0007] 一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：包含试剂I、试剂II和荧光免疫层析试纸条三个部分，其中试剂I含有二硫苏糖醇、腺苷甲硫氨酸、同型半胱氨酸甲基转移酶、缓冲液、稳定剂；试剂II含有亲和素修饰聚苯乙烯荧光微球、缓冲液、稳定剂；荧光免疫层析试纸条包括五部：样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸及PVC胶板，腺苷同型半胱氨酸的生物素化抗体固定在结合垫上，硝酸纤维素膜上固定有腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物和二抗作为检测线和质控线，通过竞争法定量检测由同型半胱氨酸转化形成的腺苷同型半胱氨酸。

[0008] 所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于：

[0009] (1) 每升试剂I溶液中各组分的含量是：

同型半胱氨酸甲基转移酶	10 ~ 100KU
腺苷甲硫氨酸	1 ~ 10mM
二硫苏糖醇	1 ~ 20mM
缓冲液	5 ~ 100mM
稳定剂	0.01 ~ 10%

[0011] (2) 每升试剂II溶液中各组分的含量是：

亲和素修饰的聚苯乙烯荧光微球	0.05~5g/L
缓冲液	5~100mM
稳定剂	0.01~10%

[0015] (3) 每厘米荧光免疫层析试纸条各组分的含量是：

生物素化腺苷同型半胱氨酸抗体	1~4μL/cm
腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物	0.5~2μL/cm
二抗	0.5~2μL/cm

[0019] 所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒，其特征在于优选的条件为：

[0020] (1) 每升试剂I溶液中各组分的含量是：

- |              |          |
|--------------|----------|
| 同型半胱氨酸甲基转移酶  | 40-60KU  |
| 腺苷甲硫氨酸       | 3-7mM    |
| [0021] 二硫苏糖醇 | 5-15mM   |
| 缓冲液          | 10-15mM  |
| 稳定剂          | 0.1-0.3% |
- [0022] (2) 每升试剂II溶液中各组分的含量是：
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| [0023] 亲和素修饰的聚苯乙烯荧光微球 | 0.1-1g/L |
| [0024] 缓冲液            | 10-15mM  |
| [0025] 稳定剂            | 0.1-0.3% |
- [0026] (3) 每厘米荧光免疫层析试纸条各组分的含量是：
- |                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| [0027] 生物素化腺苷同型半胱氨酸抗体     | 2-3 $\mu$ L/cm   |
| [0028] 腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物 | 1-1.5 $\mu$ L/cm |
| [0029] 二抗                 | 0.8-1 $\mu$ L/cm |
- [0030] 所述的稳定剂为叠氮钠、叠氮锂、PC300、苯甲酸钠、山梨酸钾、对羟基苯甲酸丙酯、聚乙二醇、聚乙烯醇、乙二胺四乙酸二钠中的一种或几种。
- [0031] 所述缓冲液为PBS、PB、Tris中的一种或几种。
- [0032] 所述的一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒，其检测方法为：将样本(10-50 $\mu$ L)与试剂I(10-50 $\mu$ L)混合，反应10-30分钟，所得溶液与试剂II(900-980 $\mu$ L)混合，取100 $\mu$ L该混合样本加样到试纸条上，5-15分钟后在荧光免疫定量分析仪上读取检测线的荧光信号值，得到对应的同型半胱氨酸样本含量。
- [0033] 本发明的有益效果是：建立了基于竞争法荧光免疫层析的同型半胱氨酸检测试剂盒，无需大型生化仪器，通过便携式荧光免疫层析定量分析仪即可实现检测，便于同型半胱氨酸的床边快速检测。这种同型半胱氨酸的间接检测方法特异性强，不会受到样本中腺苷甲硫氨酸、半胱氨酸等同型半胱氨酸结构类似物的干扰，不需要大型的生化分析仪，操作简便，成本低，便于在临床及社区家庭推广。

## 附图说明

- [0034] 下面结合附图对本发明进一步说明。
- [0035] 图1是本发明制备的试剂盒工作原理图。
- [0036] 图2是本发明制备的试剂盒检测线性范围图。
- [0037] 图3是本发明制备的试剂盒检测特异性图。
- [0038] 图4是本发明制备的试剂盒检测稳定性图。

## 具体实施方式

[0039] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明中的附图，对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0040] 实施例1:试剂盒制备及检测方法:

[0041] 制备检测人血清中同型半胱氨酸的竞争法荧光免疫层析试纸的试剂盒:

[0042] 试剂I:在1L 10mmol/L的PBS缓冲液中,添加5mmol/L腺苷甲硫氨酸,50KU/L同型半胱氨酸甲基转移酶,10mmol/L二硫苏糖醇,0.1%叠氮钠,搅拌均匀即试剂I。

[0043] 试剂II:在1L 10mmol/L的PBS缓冲液中,添加100mg亲和素荧光微球,0.1%叠氮钠,搅拌均匀即试剂II。

[0044] 试纸条:其结构如图1所示。在每4mm的试纸条上,结合垫上有0.8μL生物素化腺苷同型半胱氨酸抗体,硝酸纤维素膜上有0.4μL腺苷同型半胱氨酸-牛血清白蛋白结合物,0.32μL二抗。

[0045] 检测方法如下:

[0046] 以荧光免疫层析定量分析仪为例:样品量为20μL,试剂I为20μL,试剂II为960μL。样品与试剂I混合后,反应20分钟,加入试剂II,取100μL样本加样到试纸条上,8分钟后在荧光免疫定量分析仪上读取检测线的荧光信号值,得到对应的同型半胱氨酸样本含量。

[0047] 1.线性检测范围测定:

[0048] 用小牛血清配制浓度梯度的同型半胱氨酸(1,5,10,15,30,40,50μmol/L)标准液,每个样本检测三次,取其平均值,将规范化荧光信号值与同型半胱氨酸浓度值进行拟合,得到线性回归方程: $y = -0.00928x + 0.92122$ ,  $r^2 = 0.99238$ ,  $P < 0.05$ ,该方法在1-50μmol/L浓度范围内线性较好,如附图2所示。

[0049] 2.抗干扰性实验

[0050] 由于血清中含有半胱氨酸和腺苷甲硫氨酸,同时在R1试剂反应中有腺苷甲硫氨酸参与,因此对同型半胱氨酸竞争式荧光免疫层析检测试纸的特异性进行了验证。将同型半胱氨酸,腺苷甲硫氨酸及半胱氨酸配置成1.0,5.0,10.0,20.0,30.0,40.0,50.0μmol/L的梯度溶液,检测其规范化荧光信号值随浓度变化的关系,如附图3所示,本发明试剂盒受腺苷甲硫氨酸及半胱氨酸等同型半胱氨酸结构类似物的干扰较小,具有很好的检测特异性。

[0051] 3.检测精密度实验

[0052] 配制低值,中值和高值的同型半胱氨酸标准液5,15,和40μmol/L,每个样本检测15次,计算其变异系数。结果表明本发明检测重复性较好,水平1(7μmol/L)的变异系数(CV值)为8.51%,水平2(15μmol/L)的CV值为4.00%,水平3(40μmol/L)的CV值为4.47%,符合检测要求。

[0053] 4.稳定性实验

[0054] 制备一批同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒,4℃贮存一年,每间隔一个月检测同一浓度同型半胱氨酸样本,观察其规范化荧光信号值的变化,如附图4所示。可以看出,本发明试剂盒在一年的贮存过程中检测值基本保持不变,性能稳定,为实际应用奠定基础。

[0055] 本发明利用同型半胱氨酸甲基转移酶,以腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,同型半胱氨酸作为底物,将腺苷甲硫氨酸转化为腺苷同型半胱氨酸,同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸,所得腺苷同型半胱氨酸与同型半胱氨酸浓度成正比。该试剂盒的检测线性范围是1-50μmol/L,本发明受腺苷甲硫氨酸和半胱氨酸等结构类似物的干扰小,提高了同型半胱氨酸检测的准确度和灵敏度。本试剂盒只需在便携式荧光免疫层析定量分析仪上完成检测,操作简单,价格相对于其他同型半胱氨酸检测方法更为低廉,有利于试剂盒的市场推广。

[0056] 以上述本发明试剂盒的实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。



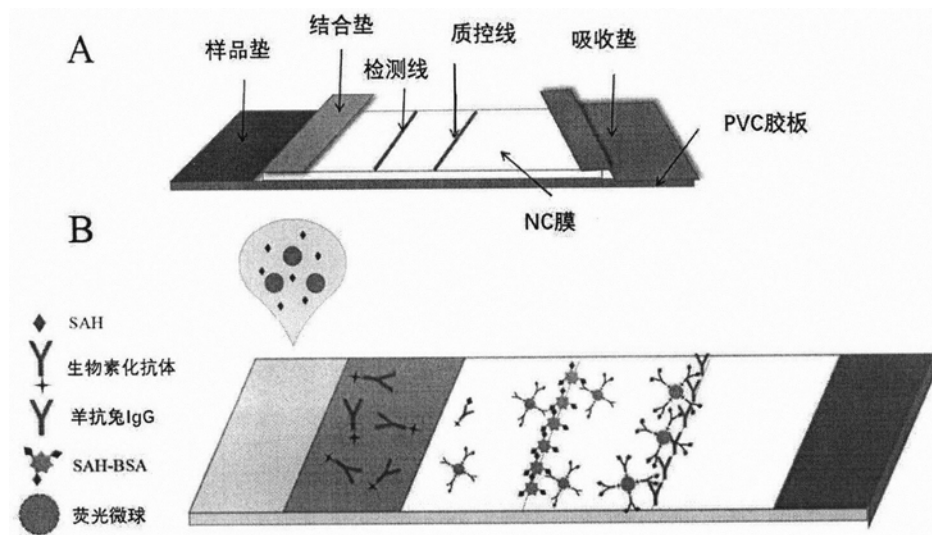


图1

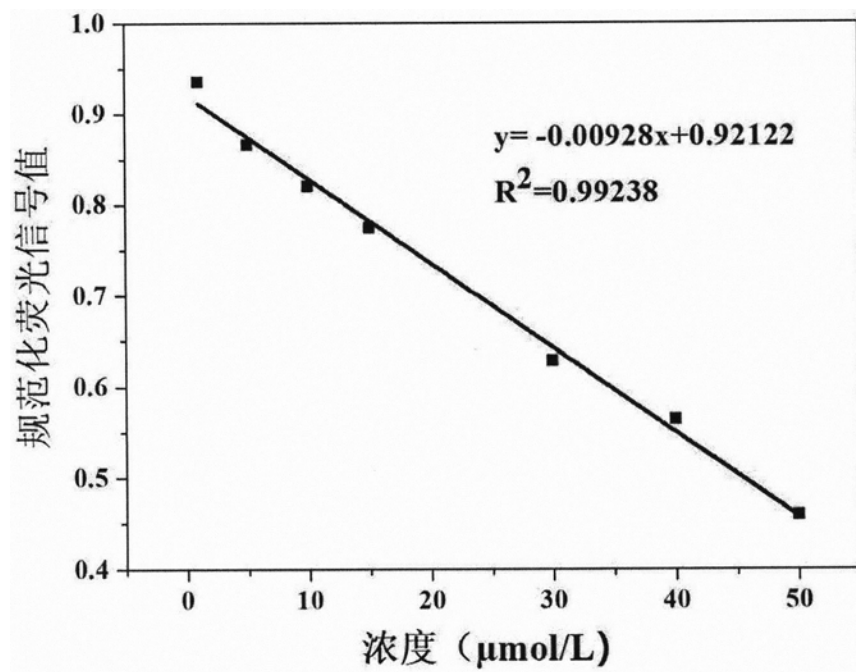


图2

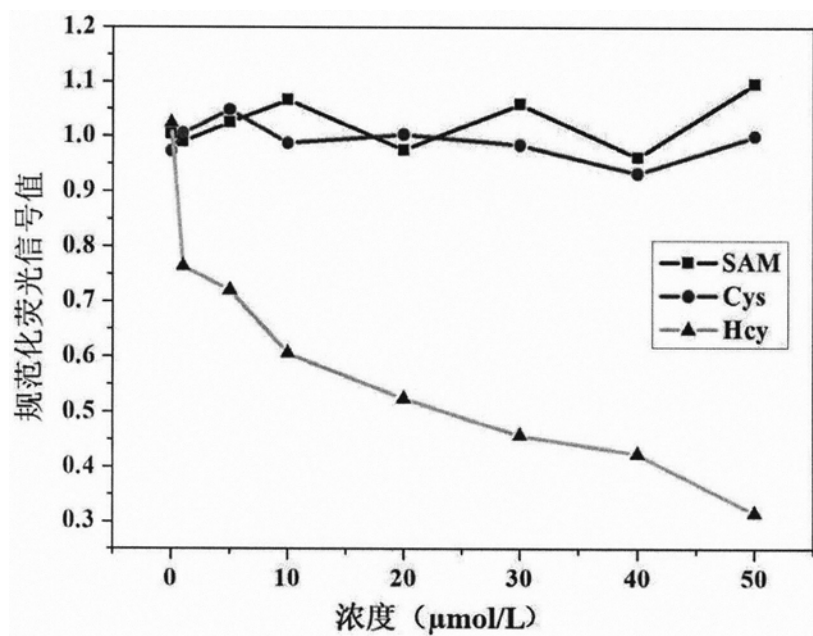


图3

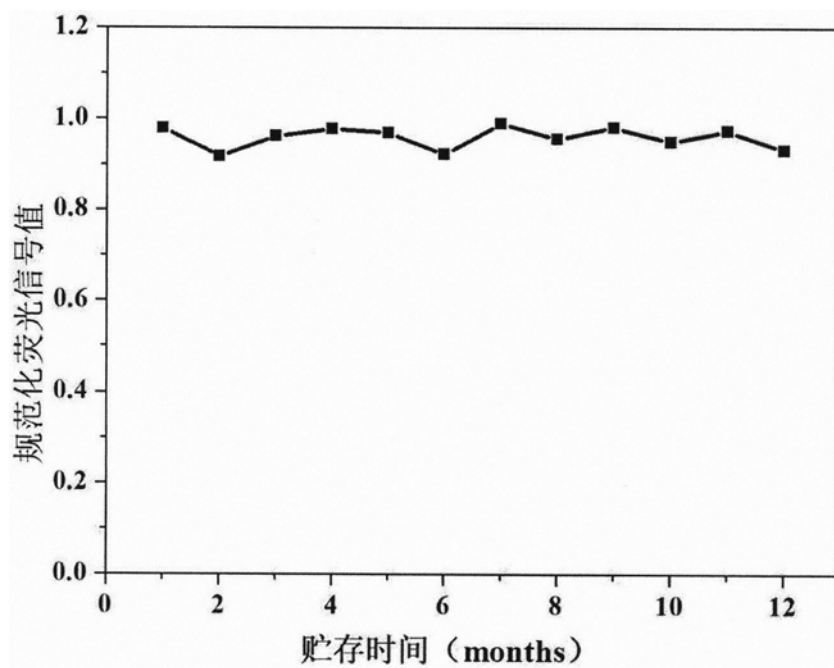


图4

专利名称(译)	一种同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110346575A</a>	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201810318417.0	申请日	2018-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
[标]发明人	张宇 王建国 韩国志		
发明人	张宇 王建国 韩国志		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种基于竞争法的同型半胱氨酸荧光免疫层析检测试剂盒及其使用方法。该试剂盒包括试剂I，试剂II和荧光免疫层析试纸条，试剂I含有二硫苏糖醇(DTT)、腺苷甲硫氨酸、同型半胱氨酸甲基转移酶、缓冲液、稳定剂；试剂II含有生物素化聚苯乙烯荧光微球、缓冲液、稳定剂；试纸条由样品垫、包被有生物素化抗体的结合垫、包含检测线和质控线的NC膜、吸水纸以及PVC胶板。利用竞争式荧光免疫层析法检测腺苷同型半胱氨酸来达到检测同型半胱氨酸的目的，该检测方法，操作简单，可同时检测大量样本，受干扰因素少，成本低廉。

