



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103543272 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310524449. 3

(22) 申请日 2013. 10. 17

(71) 申请人 天津中新科炬生物制药有限公司

地址 300457 天津市天津开发区第6大街65号

(72) 发明人 李洲 杨发青 周鸿锐

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54) 发明名称

同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法

### (57) 摘要

一种同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法, 其特征在于装置由相互独立的心型脂肪酸结合蛋白 (FABP) 和肌钙蛋白 I (CTNI) 检测试纸、双联卡壳和内置了相应标准曲线和结果判定的免疫层析结果判读记录仪组成。免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统, 用于对检测结果的定量判定, 对 FABP 和 CTNI 检测范围分别为 5-200ng/mL 和 1-100ng/mL。检测在 15-20 分钟内完成。具有联合检测、操作简便、反应快速、结果准确、适合现场检测等优点, 适合临床对更为准确、简便检测的需要。

1. 一种同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法, 其特征在于装置由相互独立的心型脂肪酸结合蛋白 (FABP) 和肌钙蛋白 I (CTNI) 检测试纸、双联卡壳和内置了相应标准曲线和判定方法的免疫层析结果判读记录仪组成。

2. 根据权利要求 1 所述的检测装置, 其特征在于 FABP 检测试剂试纸由含有胶体金标记的抗人 FABP 抗体的胶体金垫、包被有配对 FABP 抗体 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。CTNI 检测试剂试纸由含有胶体金标记的抗人 CTNI 抗体的胶体金垫、包被有配对 CTNI 抗体 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。每个试纸的宽度为 3-5mm, 长度为 7-8cm。样品垫、胶体金垫、NC 膜和吸样垫从塑料底板一端依次排列至另一端。

3. 根据权利要求 1 所述的检测装置, 其特征在于双联卡壳包含上盖和下盖两个部分, 内部可平行放置两条检测试纸。卡壳上盖的下部对应样品垫部分设置了样品孔和稀释液孔, 用于加入样本和稀释液, 卡壳上盖的中间部分应对试纸 NC 膜中部设置了视窗口, 用于观察 NC 膜上的 C、T 线, 判定结果。

4. 根据权利要求 1 和 2 所述的检测装置, 其特征在于所述 NC 膜是一种由硝酸纤维素构成的多孔结构的膜, 孔径为 8-12 $\mu$ m。稀释液垫为玻璃纤维膜或无纺布, 吸样垫为吸水滤纸。

5. 根据权利要求 1 所述的检测装置, 其特征在于包被有配对抗体的 NC 膜制备过程为: 以 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将配对的 FABP 或 CTNI 抗体配制成合适的浓度, 在喷膜仪在 NC 膜上以 1.2-1.5 $\mu$ l/cm 的参数进行划线, 包被 T 线, 同时在 NC 膜上部包被 1-2mg/ml 的抗鼠 IgG 作为 C 线。干燥, 备用。

6. 根据权利要求 1 和 2 所述检测装置, 其特征在于胶体金垫的制备过程为: 取 100ml 胶体金液放在烧杯内, 用 0.2M  $K_2CO_3$  调至 pH7.5-8.5, 再加入 0.5-1.5mg 标记用 FABP 或 CTNI 抗体, 室温搅拌 30min, 封闭, 12000rpm 离心 30 分钟, 弃上清, 用工作液复溶至 50ml, 然后用喷金机分别均匀地喷涂在胶体金垫上, 干燥备用。

7. 根据权利要求 1 和 2 所述的检测装置, 其特征在于检测卡装配方法为: 在相对湿度小于 40% 的条件下, 取塑料底板, 将已包被 FABP 或 CTNI 的 NC 膜粘贴在底板的中部, 在 NC 膜 T 线一侧粘贴胶体金垫, 在胶体金垫另一侧粘贴样品垫; 在 NC 膜 C 线一侧粘贴吸样垫; 各粘贴组分接口相互叠压 1-2mm, 粘贴好的大板切成 3-5mm 宽的试纸条。然后将两种试纸条分别放置于卡壳下盖的槽中, 然后盖上上盖, 压紧, 完成装配。

8. 根据权利要求 1 所述的检测装置, 其特征在于免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统, 内置了对 FABP 和 CTNI 试纸的标准曲线和判定方法, 用于对检测结果的定量判定, 对 FABP 和 CTNI 检测范围分别为 5-200ng/mL 和 1-100ng/mL。

9. 根据权利要求 1 所述的检测装置, 其特征在于检测方法为: 检测时将 50 $\mu$ l 的被检样本如血清、血浆、全血加入到样本孔中, 然后在稀释液孔中加入 50 $\mu$ l 样品稀释液, 在 15-20 分钟内, 用免疫层析结果判读记录仪对检测结果进行判定。

## 同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明专利是涉及医学临床诊断技术领域,特别是涉及一种以免疫胶体金快速检测方法制备的同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法。

### 背景技术

[0002] 心型脂肪酸结合蛋白 (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,在心脏以外的组织中只有低浓度表达。心肌缺血性损伤出现后,hFABP 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。FABP 基因位于染色体 I 上。它是心脏最丰富的蛋白质之一。FABP 的生物学方表现说明其可作为一种对心肌损伤的早期诊断有用的生物标志物。

[0003] 作为心肌损伤的早期诊断有用的生物标志物,FABP 比传统的肌红蛋白 (MYO) 更好,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。FABP 浓度比骨骼肌中高 2-10 倍,与此相反,心脏细胞中肌红蛋白浓度比骨骼细胞中低 2 倍。肌红蛋白的正常血浆浓度比 FABP 的高 10-15 倍。因而 FABP 较肌红蛋白具有相似的灵敏度和更高的特异性。

[0004] 肌钙蛋白是由 C, T, I 三个亚单位组成的复合体,调节肌肉的收缩和舒张。肌钙蛋白 I 是心肌细胞所特有,是复合物中的抑制亚单位,抑制肌球蛋白与肌钙蛋白连接,有防止肌肉收缩的作用。cTnI 分子量为 22.5KD,多肽的 N 端较骨骼肌 TnI 多 26 个氨基酸,氨基酸顺序差异达 40%,因而抗原性与骨骼肌明显不同。cTnI 约 3%游离在胞浆内,其余同心肌结构蛋白相结合,当心肌损伤时,游离于胞浆内的 cTnI 快速释放入血循环,血清 cTnI 水平 3~5 小时升高,其后肌原纤维不断崩解破坏,cTnI 不断释出,血清水平于 24 小时达高峰,5~10 天后降至正常,cTnI 增高预示着心肌组织的改变。随着对 cTnI 深入研究,无论是对心肌的特异性还是诊断敏感性,传统的肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 的地位都受到了严重挑战。cTn 被认为是目前最好的确定标志物,正逐步取代 CK-MB 成为 AMI 的诊断“金标准”。

[0005] 目前在急性心梗的快速检测方面,采用 CTNI、CKMB、CTNI 联测是一种常用的方法,然而,如果用 FABP 和 CTNI 来替代 3 联测,应该具有更好的检测性能,特别是如果采用定量检测,将能更全面的反映心肌损伤的状况。目前尚没有同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置报道出现。

### 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的检测装置及检测方法,用来检测血清、血浆和全血样本中的 FABP 和 CTNI。具有操作简便、反应快速、

结果准确、可信、适合现场检测等优点。发明内容如下：

[0007] 一种同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法,其特征在于装置由相互独立的心型脂肪酸结合蛋白 (FABP) 和肌钙蛋白 I (CTNI) 检测试纸、双联卡壳和内置了相应标准曲线和判定方法的免疫层析结果判读记录仪组成。

[0008] 所述的检测装置,其特征在于 FABP 检测试剂试纸由含有胶体金标记的抗人 FABP 抗体的胶体金垫、包被有配对 FABP 抗体 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。CTNI 检测试剂试纸由含有胶体金标记的抗人 CTNI 抗体的胶体金垫、包被有配对 CTNI 抗体 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。每个试纸的宽度为 3-5mm,长度为 7-8cm。样品垫、胶体金垫、NC 膜和吸样垫从塑料底板一端依次排列至另一端。

[0009] 所述的检测装置,其特征在于双联卡壳包含上盖和下盖两个部分,内部可平行放置两条检测试纸。卡壳上盖的下部对应样品垫部分设置了样品孔和稀释液孔,用于加入样本和稀释液,卡壳上盖的中间部分应对试纸 NC 膜中部设置了视窗口,用于观察 NC 膜上的 C、T 线,判定结果。

[0010] 所述的检测装置,其特征在于所述 NC 膜是一种由硝酸纤维素构成的多孔结构的膜,孔径为 8-12um。稀释液垫为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

[0011] 所述的检测装置,其特征在于包被有配对抗体的 NC 膜制备过程为:以 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将配对的 FABP 或 CTNI 抗体配制成合适的浓度,在喷膜仪在 NC 膜上以 1.2-1.5ul/cm 的参数进行划线,包被 T 线,同时在 NC 膜上部包被 1-2mg/ml 的抗鼠 IgG 作为 C 线。干燥,备用。

[0012] 所述检测装置,其特征在于胶体金垫的制备过程为:取 100ml 胶体金液放在烧杯内,用 0.2M  $K_2CO_3$  调至 pH7.5-8.5,再加入 0.5-1.5mg 标记用 FABP 或 CTNI 抗体,室温搅拌 30min,封闭,12000rpm 离心 30 分钟,弃上清,用工作液复溶至 50ml,然后用喷金机分别均匀地喷涂在胶体金垫上,干燥备用。

[0013] 所述的检测装置,其特征在检测卡装配方法为:在相对湿度小于 40% 的条件下,取塑料底板,将已包被 FABP 或 CTNI 的 NC 膜粘贴在底板的中部,在 NC 膜 T 线一侧粘贴胶体金垫,在胶体金垫另一侧粘贴样品垫;在 NC 膜 C 线一侧粘贴吸样垫;各粘贴组分接口相互叠压 1-2mm,粘贴好的大板切成 3-5mm 宽的试纸条。然后将两种试纸条分别放置于卡壳下盖的槽中,然后盖上上盖,压紧,完成装配。

[0014] 所述的检测装置,其特征在于免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统,内置了对 FABP 和 CTNI 试纸的标准曲线和判定方法,用于对检测结果的定量判定,对 FABP 和 CTNI 检测范围分别为 5-200ng/mL 和 1-100ng/mL。

[0015] 所述的检测装置,其特征在于检测方法为:检测时将 50ul 的被检样本如血清、血浆、全血加入到样本孔中,然后在稀释液孔中加入 50ul 样品稀释液,在 15-20 分钟内,用免疫层析结果判读记录仪对检测结果进行判定。

[0016] 本发明的有益效果是:提供一种检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白 I 的快速定量检测装置及检测方法,用来检测血清、血浆和全血样本中的 FABP 和 CTNI。具有操作简便、反应快速、结果准确、可信、适合现场检测等优点。

**附图说明：**

[0017] 图 1 是检测试纸结构图

[0018] 图 2 是双联卡壳结构图

**具体实施方式**

[0019] 实施例：同时检测 FABP 和 CTNI 的快速定量检测装置制备及运用

[0020] 1 主要材料

[0021] 1.1 生物原料 FABP 和 CTNI 配对抗体，从芬兰 HYTEST 公司购买；鼠抗人 IgG 抗体，羊抗鼠 IgG：自制；氯金酸：Sigma 公司产品；NC 膜：Sartorius 公司产品；水解酪蛋白，聚乙二醇 PEG20000：Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0022] 1.2 临床样本由公司在相关医院获得，共 120 份，其中确诊为急性心梗的病人血清样本 60 份，FABP 检测值从 0.6-160ng/mL，CTNI 检测值从 0.1-80ng/mL。正常人血清样本 60 份，未检测 FABP 和 CTNI。

[0023] 1.3 双联卡壳：由本公司设计，相关公司按要求生产、提供。

[0024] 1.4 免疫层析结果判读记录仪：型号：NS3001，天津中新科炬生物制药有限公司产品。

[0025] 2 方法

[0026] 2.1 FABP 和 CTNI 抗体胶体金标记采用氯金酸-柠檬酸三钠法制备直径为  $40 \pm 5\text{nm}$  的胶体金溶液，取三份胶体金溶液，分别用  $0.2\text{M K}_2\text{CO}_3$  将溶液调到 pH7.5、pH8.0 和 pH8.5，然后将胶体金缓慢搅拌，按每 ml 溶液加入 5 $\mu\text{g}$ 、10 $\mu\text{g}$ 、15 $\mu\text{g}$  将 FABP 标记抗体加入到溶液中，继续搅拌 30 分钟，再加入到终浓度为 0.5% 的 PEG2000 和 0.5% 的水解酪蛋白进行封闭，标记结束后以 12000g 离心，弃上清，沉淀按 50% 原体积复溶至不同配比的胶体金工作液中（pH8.0，含水解酪蛋白，羊血清，蔗糖和表面活性剂）。然后将标记胶体金溶液用喷膜机喷在胶体金垫上，在温度 20-25℃，相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 3-4 小时，制成胶体金垫。CTNI 抗体标记方法和 FABP 一致，只是加入的抗体为 CTNI 抗体。

[0027] 2.2 NC 膜包被用  $0.01\text{M pH}7.4\text{PBS}$  将配对的 FABP 抗体配制成 0.6, 1.0 和 1.4mg/mL，羊抗鼠 IgG 分别稀释成 1mg/ml、2mg/ml，然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.2 $\mu\text{l/cm}$  进行分别划线包被，包被完成后将 NC 膜在在温度 20-25℃，相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 3-5 小时。CTNI 抗体包被方法和 FABP 一致，只是配制的为 FABP 抗体。

[0028] 2.3 在相对湿度小于 40% 的条件下，取塑料底板，将已包被 FABP 或 CTNI 的 NC 膜粘贴在底板的中部，在 NC 膜 T 线一侧粘贴胶体金垫，在胶体金垫另一侧粘贴样品垫；在 NC 膜 C 线一侧粘贴吸样垫；各粘贴组分接口相互叠压 1-2mm，粘贴好的大板切成 3-5mm 宽的试纸条。然后将两种试纸条分别放置于卡壳下盖的槽中，然后盖上上盖，压紧，完成装配。

[0029] 2.4 检测卡工艺参数调试将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配对，制备小样，利用质控品对试剂进行测试，寻找最佳组合。

[0030] 2.5 内置标准曲线曲线和参数设置确定好试纸工艺参数后，分别用 0, 5, 20, 50、100、200ng/mL 的 FABP 标准品对试剂进行测定，不同浓度的标准品显示出不同强度色带，用免疫层析判读记录仪将相应强度的色带数字化后，计算出标准曲线，并输入免疫层析结果判读记录仪中，完成 FABP 标准曲线参数设置；分别用 0, 1, 2.5, 10、25、50、100ng/mL 的 CTNI

标准品对试剂进行测定,不同浓度的标准品显示出不同强度色带,用免疫层析判读记录仪将相应强度的色带数字化后,计算出标准曲线,并输入免疫层析结果判读记录仪中,完成 CTNI 标准曲线参数设置。将 FABP 的 Cutoff 值设为 10ng/mL, CTNI 的 Cutoff 值设为 1ng/mL,若两种检测均为阴性,综合结果判定为阴性,若两种结果检测为阳性,综合结果判定为阳性。若两种结果检测为不一致,判定为结果可疑,完成结果判定参数设置。

[0031] 2.6 检测方法 1) 将检测试剂及样本平衡至室温,取出试纸卡,平放;2) 分别精确吸取 50  $\mu$  l 血清、血浆或全血样本,加入到两个样本孔中,立即分别在下部的稀释液孔中加入 50  $\mu$  L 样本稀释液 (0.01M PBS),15-20 分钟内用免疫层析结果判读记录定量判定结果;3) 设置好仪器相关参数后将试纸卡放入仓内进行检测,仪器将显示分别出 FABP 和 CTNI 样品浓度的定量测定结果;以及对心梗的综合测试结果。

[0032] 2.7 临床样本检测试剂制备完成后,按检测方法对所有临床样本进行检测,并分析检测结果。

### [0033] 3 结果

[0034] 3.1 试纸参数确定根据小样的检测结果,确定了 FABP 和 CTNI 抗体最佳标记 pH 值分别为 7.5、8.0;最佳标记量为 5-10ug/ml 胶体金溶液;最佳的胶体金工作液为 0.1MTris.Cl 缓冲液, pH8.0,含 0.5%水解酪蛋白、3%蔗糖,1% Tween20;最佳包抗原的浓度为 FABP 为 0.6mg/mL、CTNI 为 1.4mg/mL。检测结果的最佳判定时间为 15-20 分钟。但以上参数在制备不同批次产品时因生物原料活性变化可能需要适当调整。

[0035] 3.2 临床样本检测对 120 份临床样本进行检测,两种检测均为阳性的为 55 例,均为阴性的为 57 例,和临床相比,阳性、阴性预期值均为 100%。另外 8 例为可疑结果。综合结果的一致率为 93.3%。和单独检测相比,符合一致率相当,但阳性、阴性预期值明显上升。和定值的量进行定量分析,相关系数 r 均大于 0.95,不一致的检测离群值 < 3%,t 检验 P > 0.05,。定量检测效果较好。通过以上结果可以判定检测装置的性能良好,具有操作简便、反应快速、结果准确、可信、适合现场检测等优点,特别其良好的综合阳性、阴性预期值适合临床对更为准确、简便检测的需要。

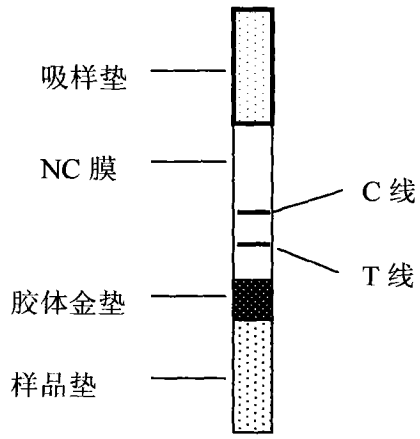


图 1

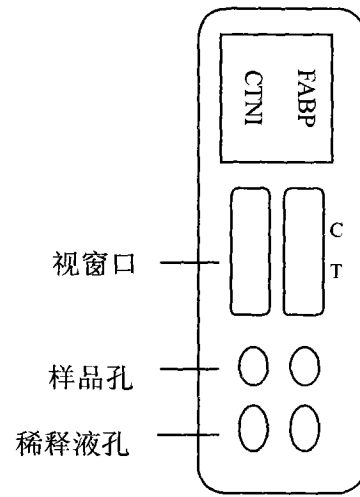


图 2

专利名称(译)	同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白I的快速定量检测装置及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103543272A</a>	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201310524449.3	申请日	2013-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 杨发青 周鸿锐		
发明人	李洲 杨发青 周鸿锐		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/532 G01N33/54386 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种同时检测心型脂肪酸结合蛋白和肌钙蛋白I的快速定量检测装置及检测方法，其特征在于装置由相互独立的心型脂肪酸结合蛋白(FABP)和肌钙蛋白I(CTNI)检测试纸、双联卡壳和内置了相应标准曲线和结果判定的免疫层析结果判读记录仪组成。免疫层析结果判读记录仪是一种光学检测系统，用于对检测结果的定量判定，对FABP和CTNI检测范围分别为5-200ng/mL和1-100ng/mL。检测在15-20分钟内完成。具有联合检测、操作简便、反应快速、结果准确、适合现场检测等优点，适合临床对更为准确、简便检测的需要。

