

• 论 著 •

心脏疾病标志物 cTnT 和 H-FABP 联合检测 微流体测试卡的开发及评价*

孙雪梅, 许 强, 孙晓萌, 王轶鹏, 吕衍民, 孙晓艳, 孟凡达[△]

山东省医学科学院基础医学研究所/山东第一医科大学, 山东济南 250062

摘要:目的 建立一种在自驱动微流体测试卡上快速联合检测心脏疾病标志物心肌钙蛋白(cTn)T和心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)的方法。方法 使用激光切割的方式快速简便构建微流体结构,使用时间分辨微球作为标记,优化捕获抗体,标记抗体的浓度,评价测试卡的稳定性、特异性,并进行血清检测。结果 该检测方法能够在 10 min 内完成 2 种心脏疾病标志物的联合检测,cTnT 在 0.1~100.0 ng/mL 范围内有良好的线性关系,检出限为 0.02 ng/mL($s/n=3$);H-FABP 在 0.5~100.0 ng/mL 范围内有良好的线性关系,检出限为 0.05 ng/mL($s/n=3$)。进行血清检测时,该方法与市场化检测方法比较,相关系数 >0.95 ,相关性良好。结论 该研究建立的检测方法有特异性良好、检测时间短、检测结果准确等优点,实现了心脏病标志物的联合检测,能够满足临床的需求,有良好的应用前景。

关键词:微流体; 早期诊断; 联合检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.014

中图法分类号:R-331

文章编号:1673-4130(2021)01-0059-05

文献标志码:A

Development and evaluation of microfluidic test card for simultaneous detection of cardiac disease markers cTnT and H-FABP*

SUN Xuemei, XU Qiang, SUN Xiaomeng, WANG Yipeng, LYU Yanmin, SUN Xiaoyan, MENG Fanda[△]

Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University/Shandong

Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China

Abstract: Objective To establish a method for rapid detection of cardiac disease markers cardiac troponin (cTn)T and heart fatty acid binding protein (H-FABP) on self driving microfluidic test card. **Methods** The microfluidic structure was constructed fastly and simply by laser cutting. The time-resolved fluorescence microspheres were used as signal probes. The capture and detection antibody concentration were optimized. The stability and specificity of the test card were evaluated, and clinical serum samples were detected. **Results** The simultaneous detection of two cardiac disease markers could be completed within 10 min. cTnT detection had a good linear relationship in the range of 0.1–100.0 ng/mL, and the detection limit was 0.02 ng/mL($s/n=3$); the linear range of H-FABP detection was 0.5–100.0 ng/mL, and the detection limit was 0.05 ng/mL($s/n=3$). Compared with commercial method, the test card showed good correlation over 0.95 in clinical blood samples detection. **Conclusion** The detection method established in this study has the advantages of high sensitivity, short detection time and accurate detection results. It realizes the simultaneous detection of heart disease markers, which can meet the clinical needs and has a good application prospect.

Key words: microfluidic; early diagnosis; simultaneous detection

心脏疾病发病时急且危重,严重时甚至会危及到患者的生命,心脏疾病生物学标志物应用于心脏疾病患者的早期检测能够帮助临床医生快速而准确地诊断,从而做出进一步的治疗决策,挽救患者的生命^[1-7]。在

心脏疾病发展的不同阶段患者血清中存在相应的标志物,直接或间接反映疾病状况。心肌钙蛋白(cTn)被视为心脏疾病诊断的“金标准”,广泛用于心脏疾病的诊断中^[8-9],cTn具有T、I、C 3种亚型,其中

* 基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2019PH114);山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS075,2015WS0196)。

作者简介:孙雪梅,女,研究实习员,主要从事食品检测及体外诊断快速检测方法相关研究。△ 通信作者,E-mail:mengfind@163.com。

本文引用格式:孙雪梅,许强,孙晓萌,等.心脏疾病标志物 cTnT 和 H-FABP 联合检测微流体测试卡的开发及评价[J].国际检验医学杂志,2021,42(1):59-63.

cTnT 和 cTnI 是心肌特异性蛋白,但是,在心脏疾病患者胸痛发作后 4~6 h 内其反应敏感性相对较差。心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)在发生心肌缺血或损伤时能够迅速穿透细胞膜释放到血液中,早期诊断灵敏度高^[10]。临床上,进行 cTn 与 H-FABP 的联合检测能够结合 2 种标志物的优势,极大提高诊断的灵敏度和特异度。

即时检测(POCT)能够实现床旁诊断,在采样现场即刻进行分析,快速得到检测结果。微流体技术与 POCT 检测方法相结合在心脏疾病的临床诊断上已经得到了广泛的应用^[11-15]。POCT 应用于心脏疾病标志物的快速检测可辅助医生对患者采取及时的治疗措施,对个性化治疗的发展、医疗水平的提高、医疗费用的减控有重要意义。因此,建立一种低成本的,能够同时进行多种靶标快速检测的,灵敏度较高的心脏疾病标志物检测方法意义重大。

本研究建立了一种在自驱动微流体测试卡上快速联合检测心脏疾病标志物 cTnT 和 H-FABP 的方法。本研究建立的检测方法有特异性良好、检测时间短、检测结果准确等优点,实现了心脏疾病标志物的联合检测,能够满足临床需求,有良好的应用前景。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 激光切割机购自美国 Universal 公司;Nano-Plotter 超微量点样仪购自德国 GeSim 公司;鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司;冷冻离心机购自德国 Sigma 公司;多模式微孔板分析仪购自德国 PerkinElmer 公司;高聚合度有机玻璃板 PMMA(1 mm)购自深圳鸿年金属材料有限公司;3M 双面胶(100 μm)购自深圳凯诚兴科技有限公司。H-FABP 抗原标准品、捕获抗体 F2 和标记抗体 F1(2 种不同的抗 H-FABP 单克隆抗体)、cTnT 抗原标准品、捕获抗体 T2 和标记抗体 T1(2 种不同的抗 cTnT 单克隆抗体)均购自芬兰 Hytest 公司;羧基修饰 Eu 时间分辨荧光微球(200 nm)购自上海微测生物科技有限公司;吐温-20、硼酸、硼砂、氯化钠、无水碳酸钠、碳酸氢钠、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、1-3-二甲氨基丙基-3-乙基碳二亚胺(EDC)、戊二醛、小牛血清均购自北京欣经科生物科技有限公司;聚苯乙烯接枝马来酸酐、甲苯购自北京蓝弋化工产品有限责任公司;海藻糖购自日本林原公司;其他未提及试剂均为分析纯;实验用水均为超纯水。

1.2 缓冲溶液、稀释液等溶液的配制 (1)碳酸盐缓冲液的配制:称取无水碳酸钠 1.59 g,碳酸氢钠 2.93 g,用超纯水溶解至 900 mL,使用 0.1 mol/L 盐酸和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 9.60 后,定容至 1 000 mL。(2)捕获抗体点样缓冲液的配

制:称取海藻糖 1 g,使用 pH 值为 9.60 的碳酸盐缓冲液溶解至 10 mL。(3)2-N-吗啉代-乙基磺酸(MES)缓冲液的配制:称取 MES 10.6 g,用超纯水溶解至 450 mL,使用 0.1 mol/L 盐酸和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 5.80 后,定容至 500 mL。(4)硼酸缓冲液的配制:称取硼酸 4.02 g,硼砂 3.34 g,氯化钠 0.95 g,用超纯水溶解至 450 mL,用 0.1 mol/L 盐酸和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 8.20 后,定容至 500 mL。(5)标记抗体微球稀释液的配制:称取蔗糖 2 g,牛血清清蛋白 0.20 g,吐温-20 100 μL ,使用 pH 值为 8.20 硼酸缓冲液溶解至 10 mL。

1.3 时间分辨微球的标记 取 50 μL 荧光微球,使用 pH 值为 5.80 的 MES 缓冲溶液清洗,11 000 r/min 离心 5 min 去除上清液,将微球使用 500 μL MES 缓冲液超声重悬;加入 10 μL EDC(50 mg/mL)溶液,室温反应 20 min;11 000 r/min 离心 5 min 去除上清液,使用 pH 值为 8.20 的硼酸缓冲液超声重悬微球至 500 μL ;加入 50 μg 标记抗体,室温振荡反应 2 h;加入 50 μL 含 10% 牛血清清蛋白的硼酸缓冲液,封闭反应 1 h;11 000 r/min 离心 5 min 去除上清液,使用 1 mL 标记抗体微球稀释液超声重悬微球,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.4 测试卡的设计及组装 使用激光切割机分别将 PMMA 切割成上盖和底板,将 3M 双面胶切割成通道结构。上盖使用等离子表面活化后,使用 pH 值为 2.00 硫酸溶液浸泡处理后,烘干备用;底板使用等离子表面活化后,APTES 溶液浸泡 10 min, N_2 吹干后浸泡于戊二醛溶液中 10 min, N_2 吹干后分别在指定区域固定捕获抗体及标记微球,按步骤组装成微流体测试卡。

1.5 免疫反应流程 检测时,直接向加样区滴加 80 μL 血清,固定在通道中的标记微球首先与标本中待测抗原反应形成抗原-标记微球复合物;在标本流经捕获抗体固定区时,抗原-标记抗体复合物与固定在检测区的捕获抗体反应,形成捕获抗体-抗原-标记微球复合物;检测区微球的捕获量与标本中抗原浓度相关。在激发波长 340 nm、发射波长 615 nm、延迟时间 600 μs 条件下使用多模式微孔板分析仪测定检测区荧光强度,从而实现对标本中待测抗原的定量。整个检测过程能够在 10 min 以内完成。见图 1。

1.6 统计学处理 构建标准曲线时,每个标准点测量 3 次,建立与标准浓度之间的参考曲线,使用 origin 进行线性拟合并计算相关系数。进行方法学比较时,每个实际血清样本测试 1 次,并将测试结果与商业化平台测试结果进行比对,使用 origin 进行线性关系对照,并计算两者之间的线性相关系数。

2 结果

2.1 捕获抗体点样浓度优化 分别使用不同浓度的

捕获抗体进行点样,测定不同 cTnT 和 H-FABP 浓度的标本,考察捕获抗体点样浓度对免疫反应的影响。对于 2 种抗原的检测,当捕获抗体的点样浓度达到 50

$\mu\text{g/mL}$ 时,检测的荧光信号值均不再随点样抗体浓度的增加而增加。在测试卡制作时,针对 2 种标记物的检测捕获抗体点样浓度均确立为 $50 \mu\text{g/mL}$ 。见图 2。

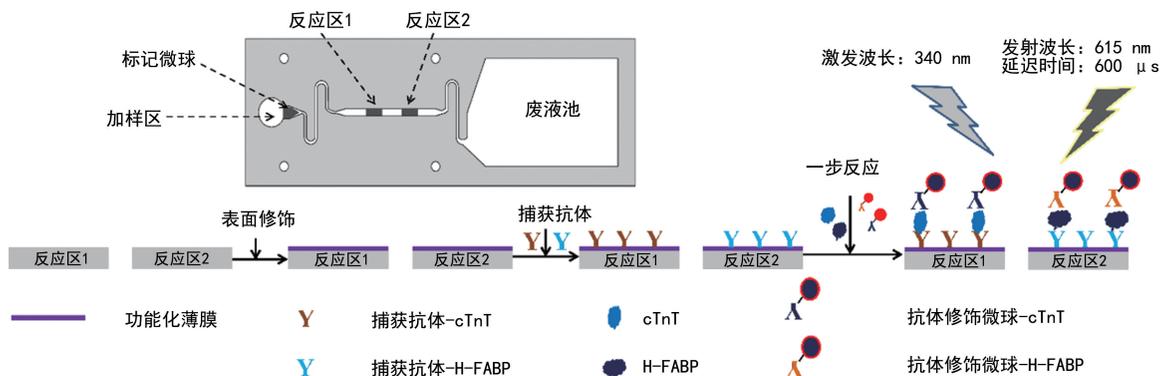
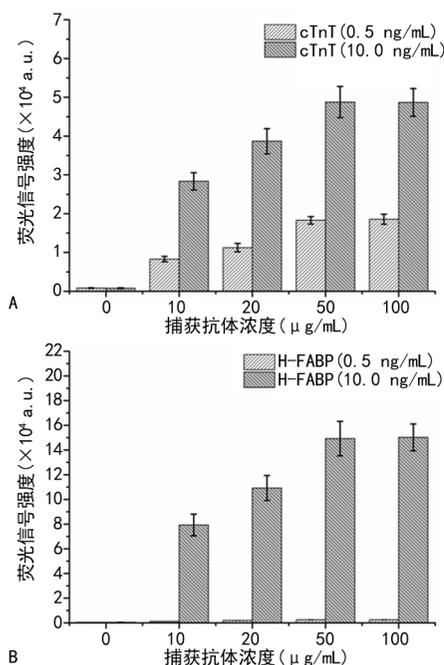


图 1 免疫分析反应流程图



注:A 为不同捕获抗体浓度检测 cTnT; B 为不同捕获抗体浓度检测 H-FABP。

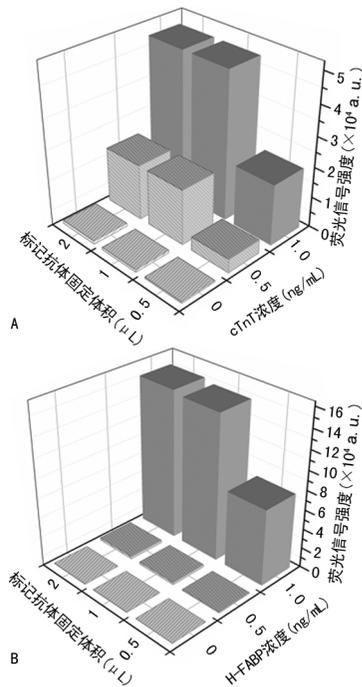
图 2 不同捕获抗体浓度检测 cTnT 和 H-FABP 的结果

2.2 标记抗体使用量优化 分别使用不同体积标记微球固定在通道内,测定不同 cTnT 和 H-FABP 浓度的标本,考察标记抗体使用量对免疫反应的影响。当标记微球使用量达到 $1 \mu\text{L}$ 时,检测的荧光信号值达到饱和值。在后续实验中,针对 2 种标志物检测标记微球使用量均选择 $1 \mu\text{L}$ 。见图 3。

2.3 标准曲线 在设定好的检测条件下,建立 cTnT 在 $0.1 \sim 100.0 \text{ ng/mL}$ 范围的标准工作曲线 ($n=3$),标准曲线的相关系数 > 0.99 ,检出限为 0.02 ng/mL ($s/n=3$);建立 H-FABP 在 $0.5 \sim 100.0 \text{ ng/mL}$ 范围的标准工作曲线 ($n=3$),标准曲线的相关系数 > 0.99 ,检出限为 0.05 ng/mL ($s/n=3$)。针对 2 个指标检测的线性关系均良好,可以满足临床标本的定量

检测的需求。

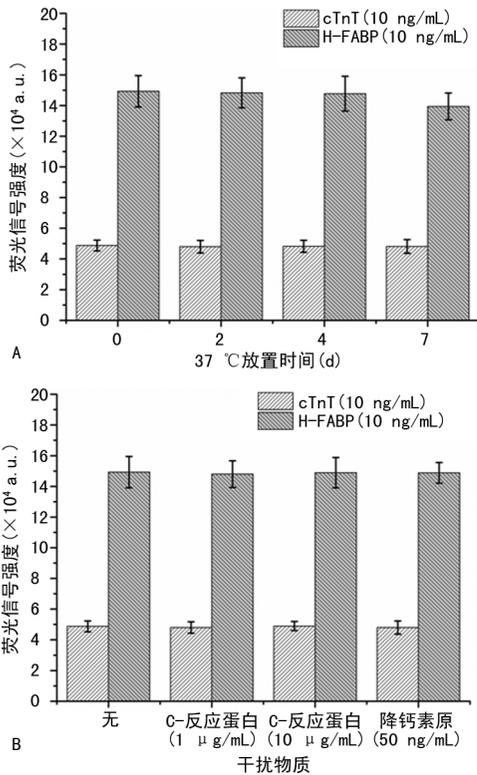
2.4 稳定性 考察了组装好的测试卡在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置一定时间后的检测性能,其中 cTnT 和 H-FABP 的浓度均为 10 ng/mL 。在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 7 d 后,测试卡对 2 种标志物的检测均能保持良好的检测性能,说明测试卡的稳定性良好。见图 4。



注:A 为不同标记抗体量检测 cTnT; B 为不同标记抗体量检测 H-FABP。

图 3 不同标记抗体量检测 cTnT 和 H-FABP 结果

2.5 特异性 考察了 cTnT 和 H-FABP 的浓度均为 10 ng/mL 时,在待测标本中分别加入 $1, 10 \mu\text{g/mL}$ 的 C-反应蛋白、 50 ng/mL 的降钙素原,测试不同浓度、不同类别干扰物对检测结果的影响,结果显示干扰物的加入对 2 种抗原的检测没有影响,说明该测试卡对 2 种标志物的检测特异性良好。见图 4。



注:A为测试卡稳定性;B为测试卡特异性。

图 4 测试卡稳定性和特异性评价

2.6 血清测试方法学比较 利用建立起的微流体荧光免疫测试卡,检测了 31 份 cTnT 的临床血清标本,将这些标本的检测结果与罗氏公司的 cobas® e411 电化学发光全自动免疫分析仪的测试结果进行比较。 $R^2=0.9814$,说明两者测试结果一致,系统之间相关性良好;利用建立起的微流体荧光免疫测试卡,检测了 33 份 H-FABP 的临床血清标本,将这些标本的检测结果与酶标试剂盒的测试结果进行比较。 $R^2=0.9575$,说明两者测试结果一致,系统之间相关性良好。

2.7 联合检测性能评估 使用添加法配制 cTnT 和 H-FABP 的混合血样,利用测试卡进行了人血清中 2 种靶标的联合检测。测试卡对 2 种标志物进行联合检测时,平均回收率 > 90%,批内精密度 < 15%,说明该方法有良好的检测效果,能够满足临床上的检测需求。见表 1。

表 1 2 种标志物联合检测性能评估 (n=4)

指标	浓度 (ng/mL)	测试值 (ng/mL)	回收率 (%)	批内精密度 (%)
H-FABP	0.5	0.52	104.0	6.7
	5.0	5.31	106.2	9.5
	20.0	21.90	109.5	8.6
	100.0	96.50	96.5	10.1
cTnT	0.5	0.47	94.0	9.0
	5.0	5.22	104.4	8.1
	20.0	19.60	98.0	11.4
	100.0	98.40	98.4	5.9

3 讨论

临床上,几种生物学标志物的联合检测能够极大地提高诊断的稳定性及特异性,多靶标同时检测可减少标本的使用量,减轻患者的痛苦;传统的免疫比浊法、酶联免疫吸附测定、免疫侧向的方法难以满足多靶标同时检测的要求。微流体技术与免疫测定技术相结合,使用时间分辨荧光的方式进行标记,能够综合几种方法的优势,极大地降低荧光检测中背景荧光的干扰,提高检测的稳定性和特异性。

本研究建立了一种能够实现心脏疾病标志物 cTnT 和 H-FABP 联合检测的微流体测试卡,为了使测试卡的性能达到最佳,本研究分别对捕获抗体点样浓度和标记抗体使用量进行了优化,结果表明,捕获抗体点样浓度达到 50 μg/mL 时,免疫反应达到饱和;标记微球使用量 1 μL 时,免疫反应达到饱和;加急反应显示测试卡在 37 °C 放置 7 d 仍能保持较高的反应性。在设定好的反应条件下,该测试卡在 10 min 内即可实现 2 种心脏疾病标志物的联合检测,cTnT 在 0.1~100.0 ng/mL 范围内有良好的线性关系,检出限为 0.02 ng/mL;H-FABP 在 0.5~100.0 ng/mL 范围内有良好的线性关系,检出限为 0.05 ng/mL。针对于 2 种标志物的检测,该方法回收率为 94.0%~109.5%,批内精密度均 < 15%,呈现出良好的精密度和重现性。同时,进行血清检测时,与商业化的检测方法比较,相关系数均 > 0.95,测试结果一致,相关性良好。

该测试卡可以应用于肿瘤、过敏原等其他标志物的检测,与电化学等传感器平台集成,能够实现更广泛的应用,从而更适用于临床的快速检测。

综上所述,本研究建立了微流体测试卡对心脏疾病标记物 cTnT 和 H-FABP 的联合检测方法,与临床上使用的商业化仪器和方法比较一致性良好;使用添加法进行了 cTnT 和 H-FABP 的联合检测,回收率、精密度均能满足临床要求,说明该检测方法能够应用于心脏疾病标志物的检测。同时,该检测方法检测成本低、制作方法简单、操作简便、能够在 10 min 内完成相关标志物的检测,检测特异性和检测范围均能满足临床检测的需求。

参考文献

[1] BIVONA G, AGNELLO L, BELLIA C, et al. Diagnostic and prognostic value of H-FABP in acute coronary syndrome: still evidence to bring[J]. Clin Biochem, 2018; 581-584.

[2] THYGESEN K, ALPERT J S, JAFFE A S, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018) [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2231-2264.

- [3] LIU J, WANG D, XIONG Y, et al. Association of elevated high sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) levels with hemorrhagic transformation and 3-month mortality in acute ischemic stroke patients with rheumatic heart disease in china [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148444.
- [4] BOEDDINGHAUS J, NESTELBERGER T, KOECHLIN L, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with point-of-care high-sensitivity cardiac troponin I [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(10): 1111-1124.
- [5] NEAL B, PERKOVIC V, MAHAFFEY K W, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2017, 377(21): 2099.
- [6] RYMER J A, GRANGER C B. Review: a single hs-cTnT with a cutpoint < limit of detection plus a nonischemic ecg can rule out acute MI [J]. Ann Intern Med, 2017, 167(4): JC23.
- [7] 霍卫松, 张磊, 高宇哲, 等. 心衰标志物可视化联合检测方法研究 [J]. 影像科学与光化学, 2015, 33(4): 275-284.
- [8] EGGERS K M, VENGE P, LINDAHL B. High-sensitive cardiac troponin t outperforms novel diagnostic biomarkers in patients with acute chest pain [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(13/14): 1135-1140.
- [9] SANCHIS-GOMAR F, ALIS R, RAMPININI E, et al. Hs-cTnT levels in professional soccer players throughout a season: no evidence of sustained cardiac damage [J]. Int J Cardiol, 2015, 197: 292-293.
- [10] GURURAJAN P, GURUMURTHY P, NAYAR P, et al. Heart fatty acid binding protein (H-FABP) as a diagnostic biomarker in patients with acute coronary syndrome [J]. Heart Lung Circ, 2010, 19(11): 660-664.
- [11] HAUSFATER P, HAJAGE D, BULSEI J, et al. Impact of point of care testing on length of stay of patients in the emergency department: a cluster randomized controlled study [J]. Acad Emerg Med, 2020, 27(10): 974-983.
- [12] LOEFFELHOLZ M J, TANG Y W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 747-756.
- [13] MENG F D, HUO W S, HE M L, et al. A microfluidic fluorescence immunoassay test card for rapid detection of heart-type fatty acid binding protein. [J]. Chinese J Analyt Chem, 2016, 44(4): 633-639.
- [14] KOST G J. Geospatial science and point-of-care testing: creating solutions for population access, emergencies, outbreaks, and disasters [J]. Front Public Health, 2019, 7: 329.
- [15] 高宇哲, 张磊, 霍卫松, 等. 巨磁阻微流体免疫传感器快速定量检测 d-二聚体 [J]. 分析化学, 2015, 43(6): 802-807.

(收稿日期: 2020-05-03 修回日期: 2020-08-26)

(上接第 58 页)

- 床比较分析 [J]. 中国当代医药, 2017, 10(36): 36-38.
- [3] MIHANFAR A, NEJABATI H R, FATTAHI A, et al. The role of sphingosine 1 phosphate in coronary artery disease and ischemia reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2083-2094.
- [4] ELIZABETH M, CHARLES S. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 581-609.
- [5] ZHOU H, SHI C, HU S Y, et al. B11 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways [J]. Angiogenesis, 2018, 21(3): 599-615.
- [6] ZHU B M, YU L L, CHEN D, et al. Electrical acupuncture moderately decreases cardiac ischemiareperfusion injury in rats [J]. Acupunct Ele Therap Res, 2017, 42(3): 203-216.
- [7] 孙红琼, 柯亭羽. 脂联素在糖尿病心肌缺血再灌注损伤中的变化研究 [J]. 健康之路, 2017, 74(12): 8.
- [8] 陈福晖, 刘达兴, 容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. 安徽医药, 2017, 21(12): 2145-2148.
- [9] JANG S, LEWIS T S, POWERS C, et al. Elucidating mitochondrial electron transport chain supercomplexes in the heart during ischemia-reperfusion [J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 27(1): 57-69.
- [10] 陈福晖, 刘达兴, 容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. 安徽医药, 2017, 21(12): 2145-2148.
- [11] DAI S H, XU Q R, LIU S, et al. Role of autophagy and its signaling pathways in ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(10): 4470-4480.
- [12] 王玉玉, 崔昕龙, 薛富善, 等. PI3K/Akt 或 JAK/STAT-3 信号通路在肢体缺血联合吗啡后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(3): 361-365.
- [13] 孙洋洋. 表观遗传调控在心肌缺血作用机制中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(12): 3802-3812.
- [14] 沈继龙, 朱克军, 顾红军, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤不同相氧化应激相关指标的变化 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(3): 177-178.
- [15] 张宏考, 方明, 肖俊会, 等. 黄连素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 湖北医药学院学报, 2009, 28(1): 20-22.
- [16] 王国权, 庞素秋, 邱飞, 等. 熊果酸对心肌缺血再灌注损伤的 H9c2 细胞的保护作用 (英文) [J]. 华侨大学学报 (自然科学版), 2018, 39(1): 62-69.
- [17] 张煜, 邱朝晖, 郭新贵, 等. Caspase-3 特异性抑制剂对缺血再灌注损伤诱导的大鼠心肌细胞凋亡的作用 [J]. 中国临床医学, 2009, 16(1): 17-20.

(收稿日期: 2020-05-11 修回日期: 2020-09-03)