



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106932571 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201710237072.1

(22)申请日 2017.04.12

(71)申请人 广东国盛医学科技有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城开源大道11号C1栋第四  
层

(72)发明人 邓杏飞 林芳 邱明

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限  
公司 11212

代理人 谈杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

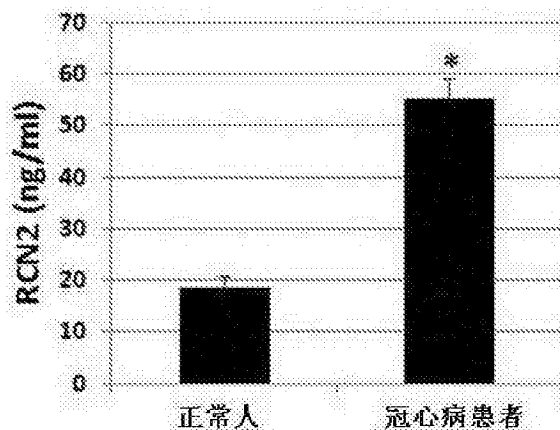
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法  
及试剂盒

## (57)摘要

本发明提供一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法及使用该方法的试剂盒,属于心血管病体外检测技术领域,其利用亲和素-生物素结合ELISA的方法检测人血液样品中RCN2浓度水平从而检测心血管病,通过使用酶标仪测定吸光度得出RCN2的浓度,当RCN2浓度水平为小于20ng/ml,样品所属人体为健康个体,当RCN2浓度水平为大于20ng/ml,样品所属人体为高患病风险个体。本发明提供的检测方法具有特异性强、检测准确率高的优点。



1. 一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法,其特征在于,其通过检测RCN2浓度水平从而检测心血管病。

2. 根据权利要求1所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法,其特征在于,其利用亲和素-生物素结合ELISA的方法检测RCN2浓度水平从而检测心血管病。

3. 根据权利要求2所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法,其特征在于,其包括如下步骤:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释固著于ELISA微孔板上;

步骤S112加入样本:将待测样品与标准蛋白稀释后加至ELISA酶标板孔中,25~40℃孵育1-2小时;

步骤S113加入检测抗体:分别加入生物素标记的RCN2特异抗体,25~40℃孵育1-2小时后,洗涤液洗涤1~5次,每次1~5min;

步骤S114引入酶标:分别加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,25~40℃孵育1-2小时后,洗涤液洗涤1~5次,每次1~5min;

步骤S115底物反应:分别加入显色底物显色15~30min,加入终止液中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,计算出RCN2浓度;

步骤S117结果判断:当RCN2浓度水平为小于20ng/ml,样品所属人体为健康个体,当RCN2浓度水平为大于20ng/ml,样品所属人体为高患病风险个体。

4. 一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒是ELISA检测试剂盒,包括:包被有RCN2抗体的ELISA酶标板、检测RCN2抗原的抗体、酶结合物、标准蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、酶标板洗涤液、显色液和终止液。

5. 根据权利要求4所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒,其特征在于,所述的ELISA检测试剂盒中:

所述的酶标板包被抗体为鼠抗人RCN2单克隆抗体;

所述的检测抗体是生物素标记的兔抗人RCN2抗体;

所述的酶结合物是亲和素交联辣根过氧化物酶结合物;

所述的标准蛋白是重组人RCN2蛋白;

所述的包被缓冲液是1×PBS, pH:7.4;

所述的封闭液是5%牛血清白蛋白+PBS溶液的封闭液;

所述的酶标板洗涤液是含0.25%Tween-20的1×PBS溶液;

所述的样品稀释液是1×PBS;

所述的显色液是3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述的终止液是2mol/L的硫酸溶液。

6. 根据权利要求4所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒,其特征在于,其所使用的检测方法包括以下步骤:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释,在ELISA酶标板的每孔中加入100u1,封板后置于4℃孵育过夜,备用;

步骤S112加入样本:将待检样本用样品稀释液以一定比例稀释,以100u1/孔的体积加样;标准蛋白用样品稀释液稀释成不同浓度梯度,以100u1/孔的体积加样,37℃孵育2小时;

步骤S113加入检测抗体:弃去孔内样本,加入生物素标记的RCN2特异抗体,每孔100u1,

37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤3次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S114引入酶标:加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤5次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S115底物反应:加入TMB显色底物,每孔90u1,显色20min后,每孔加入50u1终止液中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,校正波长为540nm或者570nm,计算出RCN2浓度。

7.一种如权利要求4至6任一所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒在心血管诊断中的应用。

8.根据权利要求7所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒在心血管诊断中的应用,其特征在于,所述的心血管病包括冠心病(CHD)、周围动脉疾病(PAD)。

9.根据权利要求8所述的基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒在心血管诊断中的应用,健康人RCN2浓度水平为小于20ng/ml,当大于20ng/ml时,则代表具有较高患病风险。

## 基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于心血管病体外检测技术领域,尤其涉及一种基于人体血液样品中RCN2标志物的浓度水平的心血管病检测方法以及RCN2标志物在心血管病检测中的应用。

### 背景技术

[0002] 心血管病是心脏血管疾病的统称,泛指由于高脂血症、血液黏稠、动脉粥样硬化、高血压等所导致的心脏、大脑及全身组织发生的缺血性或出血性疾病。心血管病是一种严重威胁人类,特别是50岁以上中老年人健康的常见病,具有高患病率、高致残率和高死亡率的特点,即使应用目前最先进、完善的治疗手段,仍可有50%以上的脑血管意外幸存者生活不能完全自理,全世界每年死于心血管病的人数高达1500万人,居各种死因首位。

[0003] 动脉粥样硬化是冠心病、缺血性中风和外周动脉疾病发生的主要原因。虽然动脉粥样硬化的死亡率在过去三十年来由于有效的预防和他汀类降脂药物的治疗急剧下降,但这种疾病仍然比任何其他疾病剥夺更多人生命。氧化低密度脂蛋白附着在内皮下层引起的动脉炎症反应是动脉粥样硬化斑块发生、发展甚至破裂的关键过程。目前最有价值的动脉粥样硬化标志物是C-reactive protein (CRP),CRP 主要在肝脏中产生,并不是动脉粥样硬化特定的。高水平的 CRP 表明发生了炎症诱导的急性期反应,比如感染、外伤、过敏等。而且CRP的基础水平由基因决定,个人因为基因升高的 CRP 常常显示没有进一步增加患心血管疾病的风险。因此,建立一个能准确地预测氧化低密度脂蛋白诱导的血管壁炎症的标记物将是对抗心血管疾病的一个重要进程。

[0004] RCN2(网钙蛋白2)是属于钙腔蛋白中的一种,是一种位于哺乳动物体内的低亲和力钙结合蛋白,在内质网/肌浆网和高尔基体中均有表达。

[0005] 血小板活化是动脉粥样硬化发生和血栓形成的重要发病机制之一。研究发现经凝血酶等激活后,血小板可释放其胞质中的RCN2作为分泌性蛋白,RCN2能通过自分泌和旁分泌方式参与粥样硬化斑块和血栓形成的病理机制。免疫组化分析显示,在人类有动脉粥样硬化斑块的血管壁上可检测到RCN2存在,而正常血管段则未发现RCN2的表达,进一步的研究发现RCN2是血管内血栓形成的重要条件因素,同时RCN2可影响纤维细胞的表现,促其转化为肌成纤维细胞,参与动脉粥样硬化病灶的形成。

[0006] 存在上述情况,本发明提供一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法及使用该方法的试剂盒,其利用亲和素-生物素结合ELISA的方法检测RCN2浓度水平从而检测心血管病,通过使用酶标仪测定吸光度得出RCN2的浓度,当RCN2浓度水平为小于20ng/ml,样品所属人体为健康个体,当RCN2浓度水平为大于20ng/ml,样品所属人体为高患病风险个体。本发明提供的检测方法具有特异性强、检测准确率高的优点。

[0007] 一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法,其通过检测RCN2浓度水平从而检测心血管病。

[0008] 优选地,基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法利用亲和素-生物素结合ELISA的方法检测RCN2浓度水平从而检测心血管病。

[0009] 优选地,基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法包括如下步骤:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释固著于ELISA微孔板上;

步骤S112加入样本:将待测样品与标准蛋白稀释后加至ELISA酶标板孔中,25~40℃孵育1-2小时;

步骤S113加入检测抗体:分别加入生物素标记的RCN2特异抗体,25~40℃孵育1-2小时后,洗涤液洗涤1~5次,每次1~5min;

步骤S114引入酶标:分别加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,25~40℃孵育1-2小时后,洗涤液洗涤1~5次,每次1~5min;

步骤S115底物反应:分别加入显色底物显色15~30min,加入终止液中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,计算出RCN2浓度;

步骤S117结果判断:当RCN2浓度水平为小于20ng/ml,样品所属人体为健康个体,当RCN2浓度水平为大于20ng/ml,样品所属人体为高患病风险个体。

[0010] 一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒,该试剂盒是ELISA检测试剂盒,包括:包被有RCN2抗体的ELISA酶标板、检测RCN2抗原的抗体、酶结合物、标准蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、酶标板洗涤液、显色液和终止液。

[0011] 优选地,所述的ELISA检测试剂盒中:

所述的酶标板包被抗体为鼠抗人RCN2单克隆抗体;

所述的检测抗体是生物素标记的兔抗人RCN2抗体;

所述的酶结合物是亲和素交联辣根过氧化物酶结合物;

所述的标准蛋白是重组人RCN2蛋白;

所述的包被缓冲液是1×PBS,pH:7.4;

所述的封闭液是5%牛血清白蛋白+PBS溶液的封闭液;

所述的酶标板洗涤液是含0.25%Tween-20的1×PBS溶液;

所述的样品稀释液是1×PBS;

所述的显色液是3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述的终止液是2mol/L的硫酸溶液。

[0012] 进一步,所述的检测试剂盒所使用的检测方法包括以下步骤:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释,在ELISA酶标板的每孔中加入100u1,封板后置于4℃孵育过夜,备用;

步骤S112加入样本:将待检样本用样品稀释液以一定比例稀释,以100u1/孔的体积加样;标准蛋白用样品稀释液稀释成不同浓度梯度,以100u1/孔的体积加样,37℃孵育2小时;

步骤S113加入检测抗体:弃去孔内样本,加入生物素标记的RCN2特异抗体,每孔100u1,37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤3次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S114引入酶标:加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤5次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S115底物反应:加入TMB显色底物,每孔90u1,显色20min后,每孔加入50u1终止液中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,校正波长为540nm或者570nm,计算出RCN2浓度。

[0013] 进一步,上述基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒在心血管诊断中应用。

[0014] 其中,所述的心血管病包括冠心病(CHD)、周围动脉疾病(PAD)。

[0015] 其中,在判断患病风险时,健康人RCN2浓度水平为小于20ng/ml,当大于20ng/ml时,则代表具有较高患病风险。

### 附图说明

[0016] 图1,基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒检测正常人群和冠心病患者的RCN2浓度结果对比图。

[0017] 图2,基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒检测正常人群和周围动脉疾病患者的RCN2浓度结果对比图。

[0018] 图3,92个CHD患者血液样本中RCN2浓度和高密度脂蛋白浓度的统计学相关关系图。

[0019] 图4,92个CHD患者血液样本中RCN2浓度和舒张压的统计学相关关系图。

### 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的描述。

[0021] 实施例一:一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒。

[0022] 该试剂盒是ELISA检测试剂盒,包括:包被有RCN2抗体的ELISA酶标板、检测RCN2抗原的抗体、酶结合物、标准蛋白、样品稀释液、包被缓冲液、封闭液、酶标板洗涤液、显色液和终止液,其中:

所述的酶标板包被抗体为鼠抗人RCN2单克隆抗体;

所述的检测抗体是生物素标记的兔抗人RCN2抗体;

所述的酶结合物是亲和素交联辣根过氧化物酶结合物;

所述的标准蛋白是重组人RCN2蛋白;

所述的包被缓冲液是1×PBS,pH:7.4;

所述的封闭液是5%牛血清白蛋白+PBS溶液的封闭液;

所述的酶标板洗涤液是含0.25%Tween-20的1×PBS溶液;

所述的样品稀释液是1×PBS;

所述的显色液是3,3',5,5'-四甲基联苯胺;

所述的终止液是2mol/L的硫酸溶液。

[0023] 与该试剂盒所匹配使用的检测方法包括以下步骤:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释,在ELISA酶标板的每孔中加入100u1,封板后置于4℃孵育过夜,备用;

步骤S112加入样本:将待检样本用样品稀释液以一定比例稀释,以100u1/孔的体积加样;标准蛋白用样品稀释液稀释成不同浓度梯度,以100u1/孔的体积加样,37℃孵育2小时;

步骤S113加入检测抗体:弃去孔内样本,加入生物素标记的RCN2特异抗体,每孔100u1,37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤3次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S114引入酶标:加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,37℃孵育1小时后,弃去孔内抗体,加入洗涤液洗涤5次,每孔300u1,每次2min,甩干;

步骤S115底物反应:加入TMB显色底物,每孔90ul,显色20min后,每孔加入50ul终止液中中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,校正波长为540nm或者570nm,计算出RCN2浓度。

[0024] 实施例二:一种基于RCN2标志物检测的心血管病检测方法。

[0025] 按以下步骤使用基于RCN2标志物检测的心血管病检测试剂盒对健康正常人、冠心病患者和周围动脉疾病患者的血液样品进行RCN2浓度水平检测:

步骤S111包被抗体:包被缓冲液将RCN2特异性抗体稀释固著于ELISA微孔板上;

步骤S112加入样本:将待检样本与标准蛋白稀释后加至ELISA酶标板孔中,35℃孵育1.52小时;

步骤S113加入检测抗体:分别加入生物素标记的RCN2特异抗体,35℃孵育1.5小时后,洗涤液洗涤3次,每次3min;

步骤S114引入酶标:分别加入亲和素交联辣根过氧化物酶结合物,35℃孵育1.5小时后,洗涤液洗涤3次,每次3min;

步骤S115底物反应:分别加入显色底物显色20min,加入终止液中中止反应;

步骤S116检测:使用酶标仪在450nm处测定样品吸光度,计算出RCN2浓度;

步骤S117结果判断:当RCN2浓度水平为小于20ng/ml,样品所属人体为健康个体,当RCN2浓度水平为大于20ng/ml,样品所属人体为高患病风险个体。

[0026] 结果如附图1和附图2所示,健康正常人的RCN2浓度为18 ng/ml,冠心病患者的RCN2浓度为55ng/ml,周围动脉疾病患者的的RCN2浓度为92ng/ml。

[0027] 实施例三:RCN2浓度与患者体内相关变量的相关关系检测。

[0028] 按以下步骤测量RCN2浓度与人体高密度脂蛋白浓度水平、血管舒张压的相关关系:

步骤S111测量RCN2浓度:抽取92个心血管病患者的血液样品作为实验样本,使用实施例一提供的试剂盒和试剂盒使用的检测方法检测92个样本的RCN2浓度;

步骤S112测量高密度脂蛋白浓度:使用常规高密度脂蛋白浓度检测方法检测患者的高密度脂蛋白浓度,并使用统计学方法对RCN2浓度和高密度脂蛋白浓度进行统计分析;

步骤S113测量舒张压:使用常规血压检测方法检测患者血压舒张压,并使用统计学方法对RCN2浓度和舒张压进行统计分析。

[0029] 统计分析结果如附图3所示,RCN2浓度和高密度脂蛋白浓度呈显著负相关,表明RCN2浓度越大,高密度脂蛋白浓度越小。高密度脂蛋白运载周围组织中的胆固醇,再转化为胆汁酸或直接通过胆汁从肠道排出,动脉造影证明高密度脂蛋白胆固醇含量与动脉管腔狭窄程度呈显著的负相关。所以高密度脂蛋白是一种抗动脉粥样硬化的血浆脂蛋白,是冠心病的保护因子,俗称“血管清道夫”。证明RCN2的浓度与心血管病患病风险存在一定关系,RCN2能够作为检测标志物,在心血管病检测中进行应用。

[0030] 另外从附图4中也可以看出,RCN2浓度和舒张压呈显著正相关,表明RCN2浓度越大,舒张压的压力越大,心血管病患病风险越大。证明RCN2的浓度与心血管病患病风险存在一定关系,RCN2能够作为检测标志物,在心血管病检测中进行应用。

[0031] 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

不能因此而理解为对本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,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。



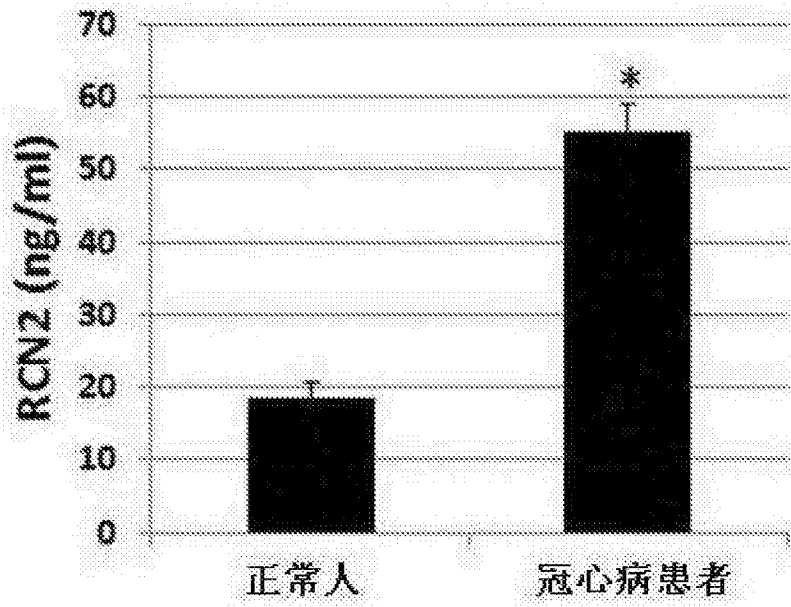


图1

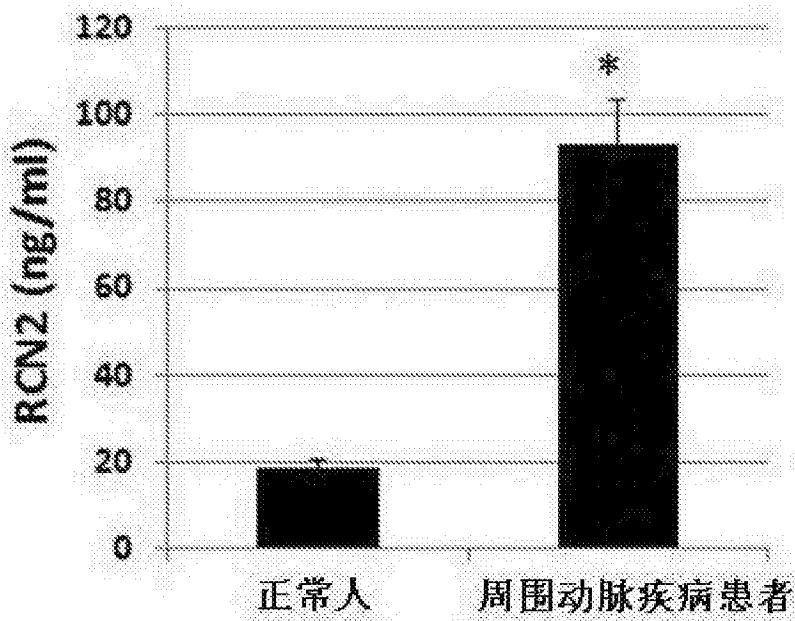


图2

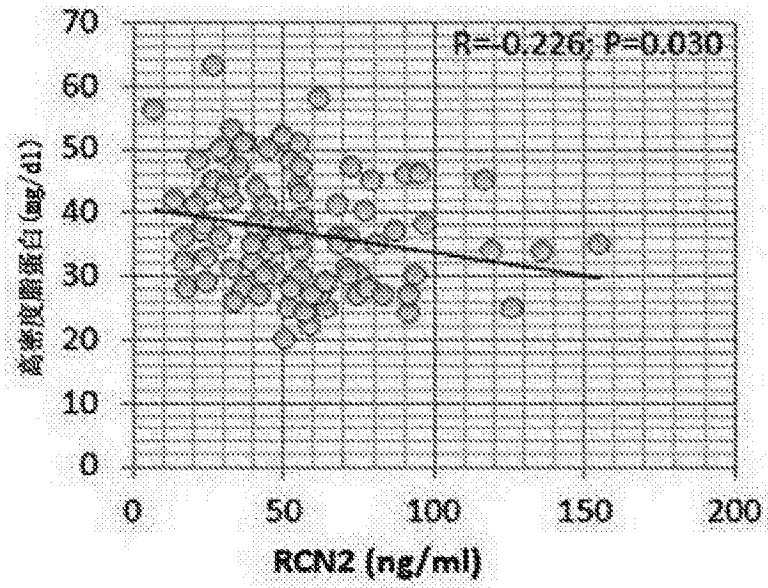


图3

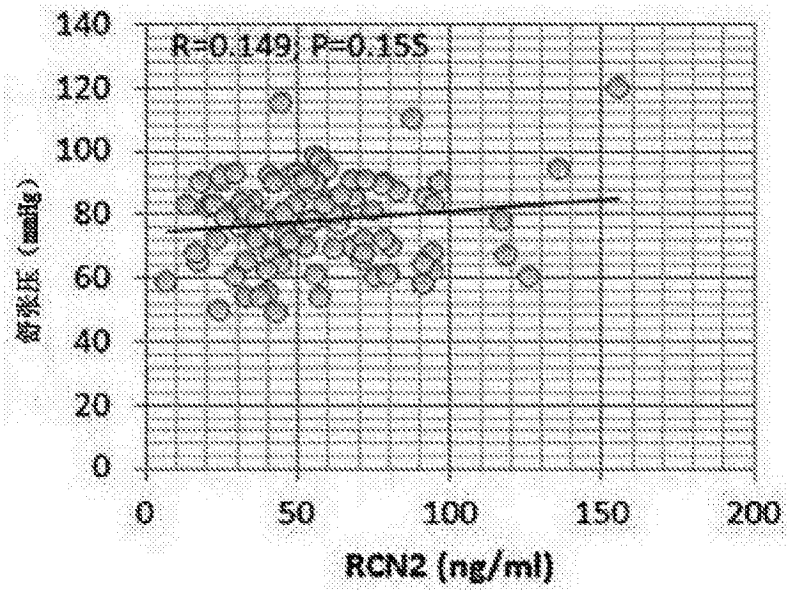


图4