

快速检测心型脂肪酸结合蛋白的荧光免疫微流体测试卡

孟凡达^{1,2} 霍卫松¹ 贺美琳^{1,2} 李昊^{1,2} 廉洁³ 石西增⁴ 高云华^{*1}

¹(中国科学院理化技术研究所光化学转换和功能材料重点实验室,北京 100190)

²(中国科学院大学,北京 100049) ³(中国人民公安大学刑事科学技术系,北京 100038)

⁴(东莞博识生物科技有限公司,东莞 523808)

摘要 研制出一种以时间分辨荧光微球作为标记,自驱动快速检测 H-FABP 的荧光免疫微流体测试卡。利用激光切割法在双面胶上简便、快速地切割出所设计的微通道结构,并采用激光切割法制作出聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)测试卡底板及上盖。使用提拉涂膜的方法在 PMMA 底板表面修饰马来酸酐官能团,有效地解决了捕获抗体在 PMMA 表面的固定问题。使用等离子体处理测试卡上盖改善其亲水性,使液体能够在微通道内自行流动。使用此测试卡可以实现对心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)的快速检测,线性检测范围为 0.5~100 ng/mL,检出限为 0.1 ng/mL($S/N=3$),检测时间少于 10 min,批内相对标准偏差(RSD)<10%,批间 RSD<15%。本方法具有灵敏度高、检测时间短、结果准确等优点,可以满足临床检测的需求,具有良好的应用前景。

关键词 心型脂肪酸结合蛋白;检测;微流体;时间分辨荧光

1 引言

微流控技术的发展为蛋白的快速及其高通量的检测提供了一个新的思路及平台^[1~6],并且大大降低了检测成本。与传统的分析方法相比,微流体检测具有高效、快速、试剂消耗少、自动化等优点。目前,用于制作微通道的材料主要有单晶硅、无定形硅、玻璃、石英、高分子聚合物,如环氧树脂、聚脲、聚氨、聚苯乙烯(PS)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)以及聚二甲基硅氧烷(PDMS)等^[7~10]。高分子聚合物相比于无机材料具有种类多、价格低廉、加工方法多种多样以及容易实现批量生产等优势,已成为制作微流体芯片的首选材料。其中 PMMA 因其出色的光学性能、良好的加工特性、生物亲和性好等优点而被广泛用于体外诊断领域^[11]。但是 PMMA 仍旧存在着表面难以修饰蛋白、表面疏水性强、背景荧光相对较高等缺点,因而限制了其在微流体器件制作中的应用。此外,简单、高精度微通道的加工制作仍是微流体检测技术的主要难点之一。

心脏型脂肪酸结合蛋白(Heart-type fatty acid binding protein, H-FABP)是一种低分子量蛋白质(相对分子量为 15000)^[12],主要担负结合脂肪酸并调节其细胞内代谢的功能。作为心肌细胞质特异性蛋白,H-FABP 能够在心肌损伤的早期释放入血液,因此可作为心肌损伤的一种新的标志物,用于急性心肌梗塞(Acute myocardial infarction, AMI)的早期诊断。目前,H-FABP 的检测方法主要有酶联免疫法、侧向层析法、免疫比浊法等^[13~16],但它们或存在着操作费时繁琐,或存在着灵敏度、准确性差,或过分依赖于大型检测仪器等缺点,从而限制了其在即时检测(Pointcare of test, POCT)中的应用。

时间分辨荧光免疫分析法(Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是在传统荧光免疫分析基础上,利用稀土离子的螯合物作为标记物的一种新型的非放射性免疫分析技术^[17~19]。由于该螯合物的荧光具有长寿命的特点,利用时间分辨的方法可以有效地排除生物样品中某些蛋白荧光以及基底材料背景荧光的干扰,从而大大地提高检测的灵敏度。

本研究将微流体技术与 TRFIA 技术相结合,使用激光打印技术切割 PMMA,并且在双面胶上快速打印出所需要的微通道,使用等离子技术改善 PMMA 的表面性质,制作出一种易组装的自驱动测试卡,

2016-01-16 收稿;2016-03-03 接受

本文系东莞市重大科技项目(No. 2014215102)和 SEM 技术创新基金(No. 14C26214402622)资助

* E-mail: yhgao@mail.ipc.ac.cn

实现了对血清中 H-FABP 的一步法快速检测。本方法在灵敏度、准确度、检测范围等方面均能够满足临床需求,并且具有制作简易、操作简便等特点,具有广阔的应用前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

EnSpire 多模式微孔板分析仪(德国 PerkinElmer 公司);3K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Laser Systems 激光切割机(美国 Universal 公司);GeSim Nano-Plotter 超微量点样仪(德国 GeSim 公司);高聚合度有机玻璃板 PMMA(1 mm,深圳市鸿年金属材料有限公司);3M 双面胶(100 μm ,深圳市凯诚兴科技有限公司);鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

H-FABP 抗原标准品,捕获抗体 FA03 和标记抗体 FA01 为两种不同的抗 H-FABP 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,上海微测生物科技有限公司);小牛血清、吐温-20(北京欣经科生物科技有限公司);聚苯乙烯(PS)接枝马来酸酐、甲苯(北京蓝戈化工产品有限责任公司);健康人血清(军事医学科学院赠予);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、硼酸、硼砂、NaCl、无水碳酸钠、NaHCO₃(美国 Sigma-Aldrich 公司);其它试剂均为分析纯;实验用水均为超纯水(EASY pure LF,美国 Barnstead 公司)。

2.2 时间分辨荧光测试卡检测原理及组装

测试卡检测 H-FABP 的原理是基于一步夹心免疫检测法,设计原理如图 1A 所示。在微通道检测区内包被捕获抗体,在微通道的入口处储存标记抗体修饰的时间分辨荧光微球,当血液样品加入时,血液样品内抗原与标记抗体修饰的荧光微球(简称标记抗体微球)结合形成复合物,在流过微通道检测区时与固定在微通道内的捕获抗体结合形成捕获抗体-抗原-标记抗体微球的免疫复合物,最终的时间分辨荧光微球的固定量与抗原的浓度呈正相关,通过测试检测区荧光强度从而实现检测靶标的定量。

时间分辨荧光测试卡由底板、双面胶微通道、上盖 3 部分组成,组成的测试卡可分为加样区、标记抗体储存区、时间阀 1,检测区、时间阀 2、废液区等几个结构。首先使用激光切割机在双面胶上切割出微通道的基本结构,将双面胶粘贴到用激光切割机切割的表面预修饰的 PMMA 底板上后,在粘贴好双面胶微通道的 PMMA 底板的相应位置使用点样仪点样包被捕获抗体,在标记抗体储存区使用移液枪滴加一定量的标记抗体微球溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,最后将等离子体处理的表面亲水性的上盖粘帖到底板上,完成检测卡的组装,如图 1B 所示。

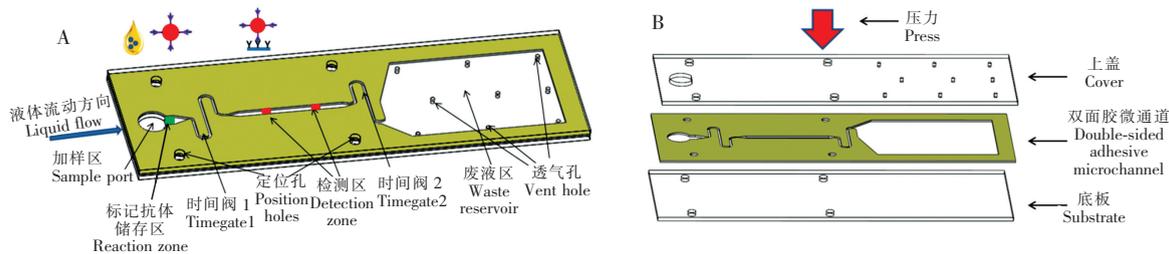


图 1 时间分辨荧光测试卡的结构示意图(A)和组装过程(B)

Fig. 1 Schematic illustration (A) and assembly (B) of time-resolved fluorescence (TRF) test card

2.3 实验方法

2.3.1 缓冲溶液、稀释液等溶液的配制 (1) 硼酸缓冲液的配制 称取硼酸 4.02 g, 硼砂 3.34 g, NaCl 0.95 g, 用超纯水溶解, 用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节至 pH 8.20, 定容至 500 mL。(2) 标记抗体微球稀释液的配制 称取蔗糖 2 g, 牛血清白蛋白(BSA) 0.20 g, 吐温-20 100 μL , 使用 pH 8.20 硼酸缓冲液溶解并稀释至 10 mL。(3) 碳酸盐缓冲液的配制 称取 1.59 g 无水 Na₂CO₃、2.93 g NaHCO₃, 用超纯水溶解, 使用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节至 pH 9.60, 定容至 1000 mL。(4) 捕获抗体点样缓冲液的配制 称取海藻糖 1 g, 用 pH 9.60 碳酸盐缓冲液溶解定容至 10 mL。(5) H-FABP 标准

溶液的配制 用小牛血清将 H-FABP 标准品配制所需浓度待用。(6)H-FABP 实际血清溶液的配制在混合健康人血清中添加一定量的 H-FABP 抗原,配制成一定浓度梯度的血清溶液。

2.3.2 标记抗体荧光微球的制备 取 100 μL 微球,用 pH 8.20 硼酸缓冲溶液稀释至 500 μL ;加入 10 mg/mL EDC,室温振荡活化 15 min; 10000 r/min 离心,移去上清液,硼酸缓冲液重悬微球至 500 μL ;加入 100 μg FABP 抗体 FA01,4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡反应 12 h;加入 50 μL 含 10% BSA 的硼酸缓冲液,振荡反应 2 h; 10000 r/min 离心,移去上清液,以含有 0.1% BSA 硼酸缓冲液重悬复溶微球,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

2.3.3 捕获抗体的固定 PMMA 底板表面不能稳定有效的固定捕获抗体,本研究采用提拉法涂膜的方法对底板进行表面修饰:将测试卡底板浸入一定浓度的 PS 接枝马来酸酐甲苯溶液中后缓慢提出,置于通风橱中晾干。用 GeSim Nano-Plotter 超微量点样仪在测试卡底板指定位置点上捕获抗体,在湿度为 70% 的环境中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 后,组装测试卡。

2.3.4 免疫分析过程 向测试卡加样区中滴加 80 μL 血清样品,样品由于毛细作用进入微通道,首先将干燥储存在微通道前端的标记抗体微球复溶,样品中的抗原与标记抗体微球形成抗原-标记抗体微球复合物;样品在微通道内继续向前流动,流经检测区时,抗原-标记抗体微球复合物与捕获抗体反应形成捕获抗体-抗原-标记抗体微球的免疫复合物固定在检测区,待样品最终全部流入废液区后,使用多模式微孔板分析仪对测试卡检测区位置荧光强度进行测试。整个检测过程在 10 min 内完成。

3 结果与讨论

3.1 检测条件的选择

时间分辨荧光微球的激发光谱和不同延迟时间的发射光谱如图 2A 所示,微球的最大激发波长为 340 nm,最大发射波长为 615 nm。因此在实验中设定激发波长和发射波长分别为 340 和 615 nm;延迟一定时间检测,荧光微球仍然具有较强的荧光信号,说明微球可以用于时间分辨检测。

评估了延迟时间检测对背景噪音的影响。图 2B 和图 2C 为微通道中充满人血清的空白测试卡的检测区在 340 nm 激发时,不同延迟时间下的发射光谱。结果显示,当延迟时间为 0 μs 时,在检测波长 615 nm 处荧光值较高,说明测试卡本身及血清带来的背景荧光值相对较高;当延迟时间达到 600 μs 时,背景荧光对检测带来的影响很小,所以实验采用延迟时间 600 μs 作为最终检测条件。

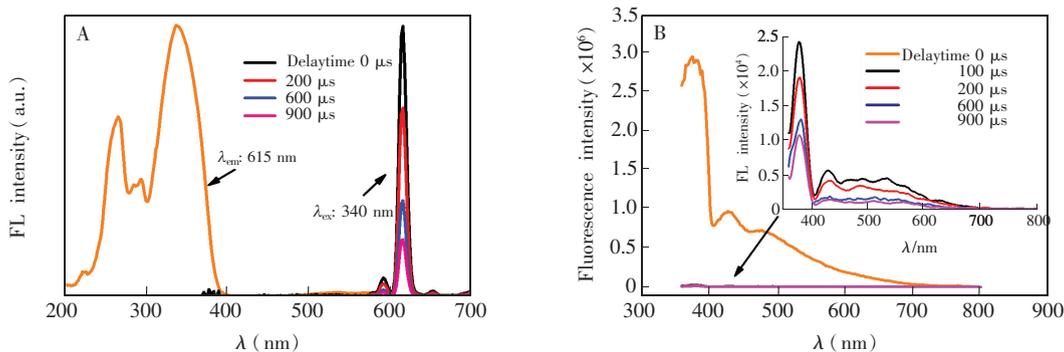


图2 时间分辨荧光微球光谱图(A)、延迟时间对检测背景的影响(B)和局部放大图

Fig.2 Excitation and emission spectra of TRF beads (A) and effect of delay-time on detection (B) Inset: partial enlarged view

3.2 表面修饰条件选择

3.2.1 捕获抗体的固定方法选择 本研究采用提拉法涂膜的方法,在 PMMA 表面涂镀上一层 PS 接枝马来酸酐薄膜,有效地解决了捕获抗体在 PMMA 表面的固定。图 3A 为 PS 接枝马来酸酐的红外光谱图,可以明显的看出其在 1860 cm^{-1} 处的酞基的吸收峰;图 3B 为 PMMA 表面修饰前后对捕获抗体固定能力对比图,结果表明,修饰后的 PMMA 表面固定捕获抗体能力有了极大提高,从而提高了检测灵敏度。

3.2.2 表面修饰溶液浓度的优化 分别使用 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5% (w/V) 的 PS 接枝马来酸

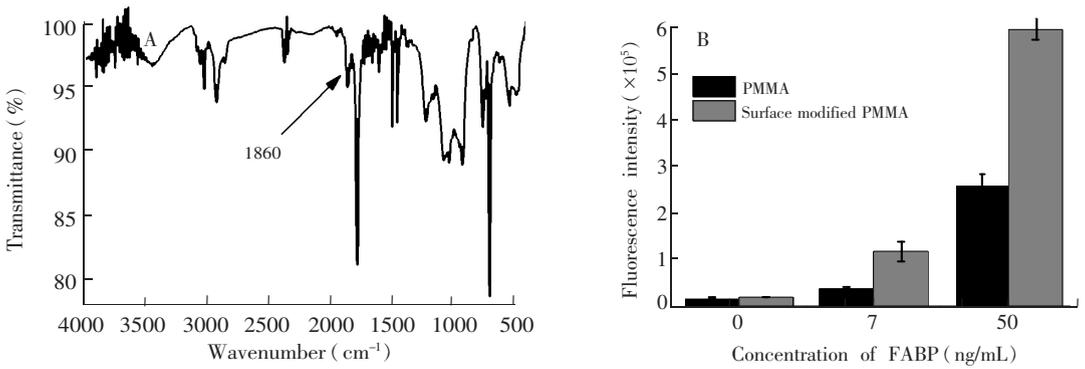
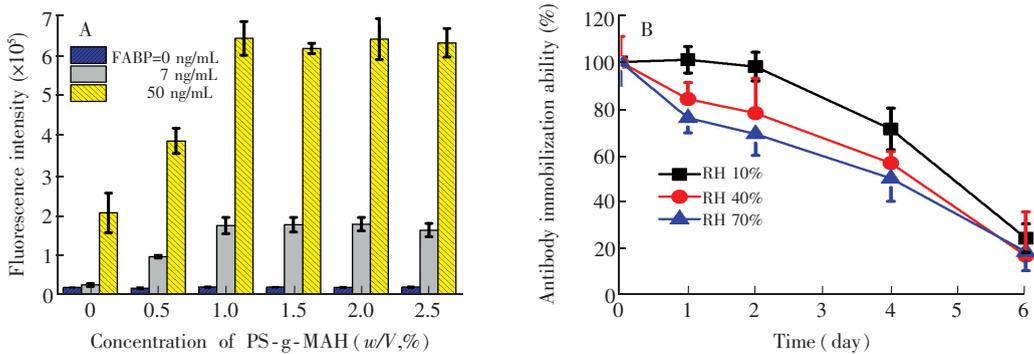


图 3 PS 接枝马来酸酐红外吸收光谱图(A)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)修饰前后抗体固定能力对比图(B)

Fig. 3 Infrared (IR) spectrum of poly styrene (PS) grafted maleic anhydride (A) and antibody immobilizing ability of different polymethyl methacrylate (PMMA) surface (B)

酐的甲苯溶液在高聚合度 PMMA 表面采用提拉法涂膜,由于高聚合度的 PMMA 难溶于冷的甲苯溶液,所以采用提拉法可以在其表面涂镀,形成一层均匀的 PS 接枝马来酸酐的薄膜。在薄膜表面固定 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ H-FABP 捕获抗体,分别用含有 0, 7 和 50 ng/mL 的小牛血清溶液进行一步法夹心免疫反应,评估薄膜固定抗体的性能。如图 4A 所示,当 PS 接枝马来酸酐的浓度达到 1.0% 以上时,荧光强度不再随浓度的增加而增加,说明捕获抗体固定量达到饱和值。为保证足够的蛋白固定量,本实验采用 2.0% PS 接枝马来酸酐溶液作为涂膜溶液。

3.2.3 表面固定捕获抗体条件的选择 由于马来酸酐暴露在空气中容易吸收水分水解,降低表面固定抗体的能力,因此,制备好的 PS 接枝马来酸酐薄膜应当在干燥条件下使用,或置于干燥条件下储存备用。考察了修饰 PS 接枝马来酸酐薄膜的测试卡底板在恒温恒湿箱中不同湿度下放置一定时间对表面固定捕获抗体能力的影响,如图 4B 所示。当 H-FABP 浓度为 10 ng/mL 时,随着放置时间的延长以及湿度增加,薄膜表面固定蛋白的能力大幅下降。但是,薄膜在相对湿度 10% 条件下放置 2 天,表面固定抗体的能力基本稳定。为保证薄膜表面固定抗体量的一致性,本实验在底板修饰后在 10% 湿度条件下 1 天内完成捕获抗体的固定。



接枝马来酸酐浓度对检测结果的影响(A)和不同湿度放置一定时间后表面固定蛋白能力的变化(B)

Fig. 4 (A) Effect of PS grafted maleic anhydride concentration on detection and (B) change of antibody immobilizing ability of PS grafted maleic anhydride surface under different relative humidity

3.2.4 捕获抗体点样浓度的选择 在 H-FABP 浓度为 0, 7 和 50 ng/mL 的条件下,考察捕获抗体点样浓度对免疫反应的影响。如图 5A 所示,当捕获抗体浓度达到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,检测的荧光信号值不再随抗体浓度的增加而增加,说明在测试卡表面捕获抗体的量达到饱和。后续实验中,确定捕获抗体的点样浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2.5 捕获抗体稳定性研究 包被在底板上的捕获抗体的稳定性会影响测试卡检测样品的精密度及

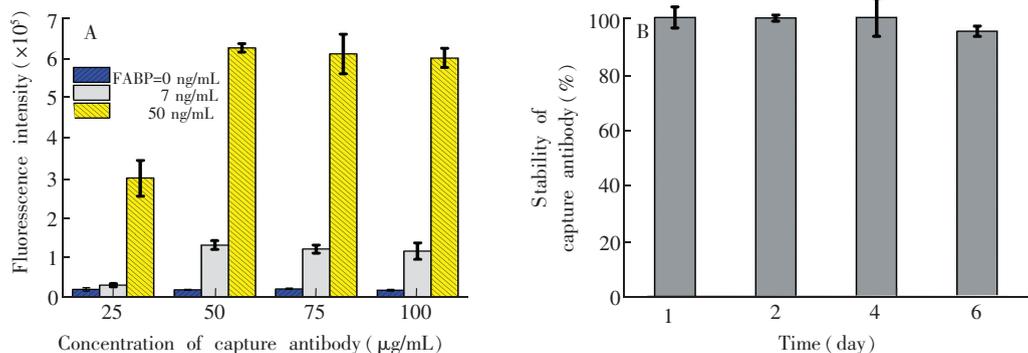


图5 不同浓度的捕获抗体点样检测结果(A)和表面固定的捕获抗体的稳定性(B)实验

Fig. 5 (A) Effect of capture antibody concentration on detection and (B) stability of immobilized capture antibody

准确性。考察了测试卡在 37℃ 放置一定时间对捕获抗体免疫反应性能的影响,其中 H-FABP 的浓度为 10 ng/mL。如图 5B 所示,在 37℃ 放置 6 天后,捕获抗体仍能保持很高的反应活性。

3.2.6 其它条件的确定 由于微通道检测区的体积仅为 4.5 μL,相对来说,80 μL 的样品量足够大,相当于一部分样品充当了清洗液的作用,因此反应不需要额外的冲洗步骤。此外,由于免疫反应时间较短,而且相对于抗原来说血液样品内的其它蛋白的含量要远远高于抗原的含量,微球在非反应区吸附量极低,非反应区的非特异性吸附带来的背景信号很低,所以实验中未对微通道表面进行封闭。

3.3 方法的分析特性

3.3.1 标准曲线 在最佳的检测条件下,荧光强度与 H-FABP 浓度在 0.5 ~ 100 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,线性方程为 $y = 11823x + 24725$ ($n = 4$),如图 6A 所示,相关系数 (R^2) 为 0.9966,检出限为 0.1 ng/mL ($S/N = 3$)。

3.3.2 特异性 当 H-FABP 浓度为 10 ng/mL 时,在小牛血清中添加临床上常与 H-FABP 同检的心脏标志物检测抗原 10 μg/mL C 反应蛋白 (CRP) 和 50 ng/mL 人心肌肌钙蛋白 T (cTnT),从图 6B 可见,加入其它抗原,对 H-FABP 的检测没有显著影响,检测信号变化小于 5%,说明此检测方法的特异性良好。

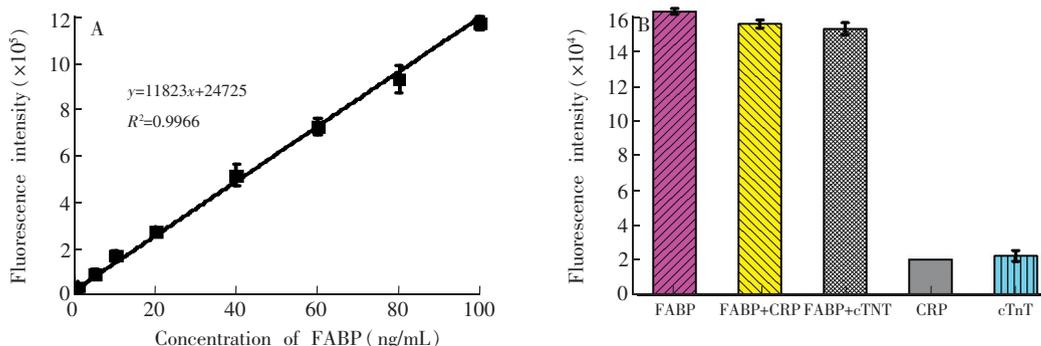


图6 H-FABP 检测的标准曲线(A)和检测卡的检测特异性(B)

Fig. 6 Standard curve for heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) detection (A) and specificity of test card (B)

3.3.3 回收率和精密度 采用标准加入法考察了测试卡在 H-FABP 的 Cut-off 值 (7 ng/mL) 及其临近浓度的批内及批间精密度 (RSD)。如表 1 所示,平均回收率为 97.3% ~ 102.1%,批内 RSD 小于 10%,批间 RSD 小于 15%,说明此方法检测 H-FABP 具有良好的精密度和重现性。

3.4 实际人血清添加法测试对比研究

将 30 人份的健康人血清混合,使用制作的微流体时间分辨荧光测试卡测定,其中 H-FABP 的含量

表 1 血清中 H-FABP 的回收率、批内和批间精密度 ($n=4$)Table 1 Recovery and precision of H-FABP detection at different spiked levels in serum ($n=4$)

序号 No.	H-FABP 添加浓度 Added concentration of H-FABP (ng/mL)	平均回收率 Average recovery (%)	批内精密度 Intra-assay precision (RSD, %)	批间精密度 Inter-assay precision (RSD, %)
1	1	100.5	1.8	12.8
2	7	97.3	3.8	9.0
3	20	102.1	3.5	5.3
4	50	97.5	6.8	11.1

为 1.88 ng/mL。分别在其中添加 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 40, 60, 80 和 100 ng/mL 的 H-FABP 标准品, 荧光测试卡测试(每个浓度至少测试 4 次)。将测得浓度与实际添加浓度进行相关分析, 如图 7 所示, 两者的相关系数 $R^2=0.99$ 。平均回收率大于 90%, 相对标准偏差小于 15%, 说明本方法具有良好的实际应用能力。

4 结论

以时间分辨荧光微球作为标记, 制作了快速检测 H-FABP 的荧光免疫微流体测试卡。对 H-FABP 的检测范围和检出限和均可达到临床检测要求, 具有简便、快速的特点。本方法适用于大多数蛋白的检测。此外, 本测试卡还可以拓展到多靶标的高通量检测, 具有十分广阔的应用前景。

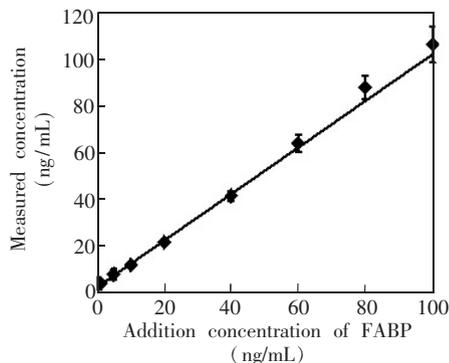


图 7 实际血清添加值与测试值结果相关性

Fig. 7 Correlation of added concentration and measured results

References

- Mohammed M I, Desmulliez M P. *Lab Chip*, **2011**, 11(4): 569–595
- WANG Wei-Xin, LIU Wei-Ping, WU Bin, LIANG Guang-Tie, LIU Da-Yu. *Chinese J. Anal Chem.*, **2015**, 43(5): 637–642
王伟鑫, 刘未平, 吴斌, 梁广铁, 刘大渔. *分析化学*, **2015**, 43(5): 637–642
- Melin J, Rundstrom G, Peterson C, Bakker J, MacCraith B D, Read M, Ohman O, Jonsson C. *Anal. Biochem.*, **2011**, 409(1): 7–13
- GAO Yu-Zhe, ZHANG Lei, HUO Wei-Song, SHI Stone, LIAN Jie, GAO Yun-Hua. *Chinese J. Anal Chem.*, **2015**, 43(6): 802–807
高宇哲, 张磊, 霍卫松, 石西增, 廉洁, 高云华. *分析化学*, **2015**, 43(6): 802–807
- SU Wen-Tao, FENG Ke, QIN Jian-Hua. *Chinese J. Anal Chem.*, **2015**, 43(10): 1490–1498
苏文涛, 冯可, 秦建华. *分析化学*, **2015**, 43(10): 1490–1498
- Kim Y G, Moon S, Kuritzkes D R, Demirci U. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 25(1): 253–258
- Gubala V, Harris L F, Ricco A J, Tan M X, Williams D E. *Anal. Chim.*, **2012**, 84(2): 487–515
- Bange A, Halsall H B, Heineman W R. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20(12): 2488–2503
- Darain F, Yager P, Gan K L, Tjin S C. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(6): 1744–1750
- Ng A H C, Uddayasankar U, Wheeler A R. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397(3): 991–1007
- Toossi A, Moghadas H, Daneshmand M, Sameoto D. *J. Micromech. Microeng.*, **2015**, 25(8): 085008
- Zimmermann-Ivol C G, Burkhard P R, Le Floch-Rohr J, Allard L, Hochstrasser D F, Sanchez J C. *Mol. Cell Proteomics.*, **2004**, 3(1): 66–72
- Mihailescu C M, Stan D, Iosub R, Moldovan C, Savin M. *Talanta*, **2015**, 132: 37–43
- Ecollan P, Collet J P, Boon G, Tanguy M L, Fievet M L, Haas R, Bertho N, Siami S, Hubert J C, Coriat P, Montalescot G. *Int. J. Cardiol.*, **2007**, 119(3): 349–354

- 15 Chan C P Y, Sum K W, Cheung K Y, Glatz J F C, Sanderson J E, Hempel A, Lehmann M, Renneberg I, Renneberg R. *J Immunol Methods.*, **2003**, 279(1-2): 91-100
- 16 Chan C P, Wan T S, Watkins K L, Pelsers M M, van der Voort D, Tang F P, Lam K H, Mill J, Yuan Y, Lehmann M, Hempel A, Sanderson J E, Glatz J F, Renneberg R. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20(12): 2566-2580
- 17 Song X, Knotts M. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 626(2): 186-192
- 18 Chen M J, Wu Y S, Lin G F, Hou J Y, Li M, Liu T C. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 741: 100-105
- 19 Blomberg K R, Mukkala V M, Hakala H H, Makinen P H, Suonpaa M U, Hemmila I A. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399(4): 1677-1682

A Microfluidic Fluorescence Immunoassay Test Card for Rapid Detection of Heart-type Fatty Acid Binding Protein

MENG Fan-Da^{1,2}, HUO Wei-Song¹, HE Mei-Lin^{1,2}, LI Hao^{1,2}, LIAN Jie³, SHI Xi-Zeng⁴, GAO Yun-Hua^{*1}

¹(Key Laboratory of Photochemical Conversion and Optoelectronic Materials,

Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³(Department of Forensic Science, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China)

⁴(Dongguan Bosh Biotechnologies, LTD, Dongguan 523808, China)

Abstract A kind of easily assembled self-driving test card was developed for the rapid detection and quantification of heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) by using time-resolved fluorescence microspheres as signal probes. It was easy to make microfluidic channel structures with double-sided adhesive and cut out of test card substrate and cover based on polymethyl methacrylate (PMMA) material by laser cutting technology. The membrane of polystyrene containing maleic anhydride functional groups was coated on PMMA plate surface by dip-coating method. Further, the capture antibody was immobilized effectively on PMMA surface by covalent binding with maleic anhydride groups. The cover was treated with plasma treatment to improve the hydrophilic ability, so that liquid could flow smoothly in the microchannel. The whole analysis process could be completed within 10 min. There was a very good linear correlation between response and H-FABP concentration in the range of 0.5-100 ng/mL ($R^2=0.9966$), and the detection limit was 0.1 ng/mL ($S/N=3$). The intra-assay precision (RSD) was less than 10% and the inter-assay RSD was less than 15%. This detection method has the advantages such as high sensitivity, fast detection and good accuracy.

Keywords Heart-type fatty acid binding protein; Detection; Microfluidic system; Time-resolved fluorescence

(Received 16 January 2016; accepted 3 March 2016)