



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956978 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810318813.3

(22)申请日 2018.04.11

(71)申请人 中翰盛泰生物技术股份有限公司

地址 311106 浙江省杭州市余杭经济技术
开发区兴国路519号综合大楼10层

(72)发明人 李翔 洪龙斌 解瑞雪 张玉
胡珊珊 孙磊 隋淑敏 周旭一

(74)专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 刘晓春

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

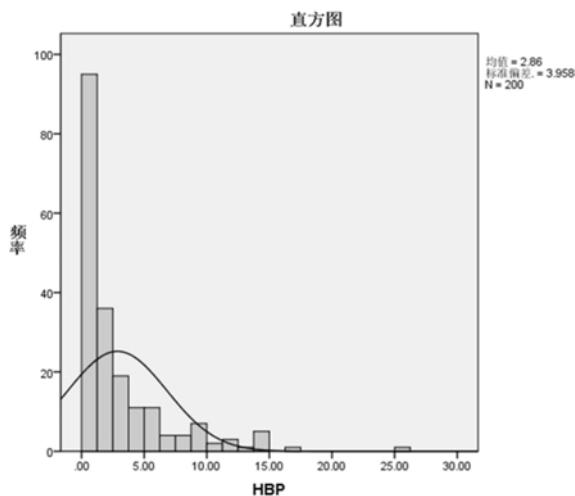
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白
测定试剂盒及测定方法

(57)摘要

本发明公开了一种应用胶乳免疫比浊法的
肝素结合蛋白测定试剂盒，本发明所用试剂R1和
试剂R2均采用PBS作为缓冲溶液，与Tris缓冲溶
液相比，其pH受温度变化的影响小并且经其他组
分稀释后pH变化小，具有使整个反应体系在反应
过程中保持均一pH的优点。本发明所述试剂R2中
还加入了乙二胺四乙酸二钠作为金属螯合剂，有
效克服了PBS作为缓冲溶液时易与常见的钙离
子、镁离子以及重金属离子缔合生成沉淀的缺
点，具有使整个反应体系在反应过程保持均衡稳
定的优点。本发明所选测定方法中，样本加样量
为14 μl，能有效降低加样量过低所造成的加样
误差；主波长选定为600nm，能有效降低溶血、脂
血、黄疸样本对测定过程造成的干扰。



1. 一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒包括:试剂R1、试剂R2和校准品;

所述试剂R1包括:磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、PEG6000和吐温-20;

所述试剂R2包括:肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、乙二胺四乙酸二钠和BSA;

所述校准品包括:重组肝素结合蛋白抗原。

2. 根据权利要求1所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R1包括:1.01~6.44 g/L的磷酸氢二钠、1.01~5.24 g/L的磷酸二氢钾、1.0~20.0 g/L的氯化钠、1.01~5.5 g/L的氯化钾、5~25 g/L的PEG6000和1.1~4.0 g/L的吐温-20。

3. 根据权利要求1所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述试剂R2包括:0.08%~0.52%的肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、1.01~6.44 g/L的磷酸氢二钠、1.01~5.24 g/L的磷酸二氢钾、1.0~20.0 g/L的氯化钠、1.01~5.5 g/L的氯化钾、0.4~10.4 g/L的乙二胺四乙酸二钠和5~30 g/L的BSA。

4. 一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法应用权利要求1-3中任意一项所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒。

5. 根据权利要求4所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法的优选参数为:样本S为14 μ l、试剂R1为175 μ l、试剂R2为35 μ l,试剂R1+样本S的孵育时间为300秒,试剂R1+样本S+试剂R2的孵育时间为15~35秒,试剂R1+样本S+试剂R2的反应时间为255~305秒,反应方法为终点法,反应方向为向上,反应温度为37℃,主波长为600 nm。

6. 根据权利要求4所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法包括:加入14 μ l样本S,加入175 μ l试剂R1,然后混匀,置37℃孵育300秒,之后加入35 μ l试剂R2并混匀,置37℃孵育15~35秒,测定波长下的吸光度值A1,反应255~305秒,测定波长下的吸光度值A2;

分别计算校准品的吸光度变化值 $\Delta A'$,并绘制校准曲线,校准曲线使用多点非线性拟合;将样本测定的吸光度变化值按拟合的公式进行计算,即可得出样本中肝素结合蛋白的浓度,其中 $\Delta A' = A2' - A1'$, $A1'$ 和 $A2'$ 分别为与样品的吸光度A1和A2相对应的校准品的吸光度值。

一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒及测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫测定技术领域，尤其涉及一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒及肝素结合蛋白的测定方法。

背景技术

[0002] 感染性疾病是一类严重威胁人类健康的疾病。脓毒症是病死率较高的感染性疾病之一，尽早诊断及治疗对提高脓毒症疗效及预后有重要的作用，所以现在临床面临的最大挑战是如何尽早对脓毒症患者明确诊断。近年来肝素结合蛋白(HBP)被证实可以作为脓毒症早期诊断标志物之一。

[0003] 脓毒血症是指由感染引起的全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory responsesyndrome,SIRS)，临幊上证实有感染或高度可疑感染。尽管脓毒血症是由感染引起的，但是一旦发生后，其发生及发展遵循自身的病理生理过程和规律，因此，从本质上来说脓毒血症是机体对感染性因素的反应。严重脓毒血症，是指脓毒血症并且伴有组织器官功能障碍及组织灌注不良或低血压。脓毒血症一旦发生，病情发展迅速，病死率高，给临幊医疗活动带来巨大的挑战。近年来由于抗生素的不合理应用，耐药菌不断增加、糖皮质激素类药物及免疫抑制剂等广泛使用、人口老龄化等多种因素，脓毒血症发生率很高，流行病学调查研究结果显示，在过去的十年里，脓毒血症的发病率在不断攀升，全球每年有数百万人罹患脓毒血症，在美国严重脓毒血症发病率平均每年增长13.0%-13.3%，成为美国人口常见死亡原因之一。能够引起脓毒血症的病原微生物有很多，细菌、真菌、病毒及寄生虫均可以导致脓毒血症的发生，其根本的发病机制目前还不是很清楚，涉及到全身性炎症网络效应、组织损伤、凝血功能异常、免疫功能障碍以及机体对不同致病因素的异常反应等多个方面。近年来，尽管有效抗感染治疗措施和器官功能支持技术在临幊广泛应用，使得脓毒血症的病死率有所下降，但总死亡率仍然在上升，超过肺癌及乳腺癌死亡率总和，在全世界人口死亡原因排行榜上处于前10的位置，每天全球有十几万人死于脓毒血症并发症，现如今脓毒血症已经成为重症监护室病房里非心血管病人的首要死亡原因。就概念上来讲，脓毒血症被定义为机体对感染性因素产生的全身性炎症反应，多种血浆标志物，例如内毒素、细胞因子、趋化因子、前列环素、氧自由基等，参与其病理生理过程，扮演着重要角色，调控疾病的进程，并可能对机体造成潜在的伤害，常常以体温、心率、呼吸频率等非特异性生理参数的改变为特征。血培养阳性是确诊脓毒血症的金标准，但其结果很容易受到其他因素干扰影响，耗时久，在临幊诊疗活动中具有明显的延后性，并且阳性率低，仅约45%的脓毒血症性休克患者出现血培养阳性结果(脓毒血症性休克是严重脓毒血症的一种特殊形式，即严重脓毒血症给予足够液体复苏后排除其他可解释因素，仍有持续性低血压)，同时其医疗成本高，造成一定的资源浪费，这些因素共同限制了血培养在脓毒血症诊断中的应用。

[0004] HBP也被称为天青杀素或者阳离子抗菌蛋白37，是1984年被Shafer等首先分离提

取的中性粒细胞衍生颗粒蛋白。HBP主要存在中性粒细胞的分泌颗粒和嗜天青颗粒中,相关研究显示其对炎症反应和血管渗漏的调节可能起到重要的作用。IBP是从251个氨基酸的前体中,在N末端去除26个氨基酸残基、C末端去除3个氨基酸残基而合成的一个单链糖蛋白。成熟的HBP由上述剩余的222个氨基酸残基构成,相对分子质量为24000。序列分析表明其与人的中性粒细胞弹性蛋白酶有45%的同源性,与蛋白酶3有42%的同源性,与人的嗜中性粒细胞中的组织蛋白酶G有32%的同源性。HBP上具有一个有催化作用的三联体,当其中的41号组氨酸和175号丝氨酸分别被丝氨酸和甘氨酸所替换,使其无法与二异丙基氟磷酸结合,并无法裂解人工或天然的蛋白水解酶底物,三联体中的89号天冬氨酸被保留。尽管HBP失去蛋白水解活性,但它仍然可以与胰蛋白酶抑制剂(BPTI)结合,使BPTI亲和色谱法成为提纯HBP的一种高效方法,而175号甘氨酸被大量谷氨酰胺残基所取代,能够消除天青杀素的BPTI亲和性,证实了HBP与BPTI亲和是作用于HBP活化中心三联体上的。从HBP的重组体中分离出三联体结构,发现三联体是由两个类似胰蛋白酶的蛋白酶类区域组成的,这两个区域是由6个反向平行的13氨基酸组成的13圆柱形,HBP的整体结构同源于中性粒细胞弹性蛋白酶,差别只是在某些位置存在环形区域及电荷分布不同,而在分子表面存在酸性及碱性氨基酸组成的独立板块。

[0005] HBP作为一种颗粒释放蛋白,其产生及释放机制尚需进一步研究;但它作为临床新的炎性标志物,具有早期、特异、敏感的特性,优于传统的炎性标志物,可在临床广泛应用。而且它具有对病情的早期评估,预后评价及疗效观察的价值;将它作为指导临床抗生素的应用,还可大大减少抗生素的滥用,减少耐药菌群的产生,有重要的临床和经济学意义。并且HBP有很强的导致血管渗漏的功能,在临床治疗尤其在循环衰竭或休克的治疗中很有必要将其作为一种治疗靶标,以减少病人死亡的几率。如何将HBP和传统炎症指标结合,寻求更加快速、特异、敏感的诊断感染的指征,尚需进一步研究和观察。

[0006] 目前临床常用于判断感染的传统炎症指标如白细胞、中性粒细胞、乳酸、C反应蛋白及降钙素原等的影响因素较多,尤其是老年人常伴有免疫功能和机体反应低下,这些指标的升高水平不一定能准确反映病情的严重程度。Pdduzzi等发现,白细胞及中性粒细胞的升高不是感染的独立预测指标,且用于诊断感染的准确性很低,同时无法反映预后。而C反应蛋白是一种急性期反应蛋白,由肝脏合成并分泌,目前在临幊上应用较广,但除细菌感染外,病毒感染、心血管系统疾病、哮喘、心搏骤停等均可引起C反应蛋白的升高,而且一般炎症反应需12h后才能检出,因而存在延迟反应,且对感染的诊断缺乏特异性。降钙素原作为一个早期诊断靶标,是严重细菌感染诊断与治疗监测指标,目前为实验室和临幊应用;但其只在机体感染产生全身反应时才会产生,在局部感染和慢性感染时其血浆水平正常或轻微升高,且有Meta分析表明降钙素原并不能有效区分是细菌感染还是非细菌感染所引起的全身性炎症反应综合征,降钙素原在严重的感染性疾病中早期诊断的地位再次受到挑战。

[0007] 近期有研究发现肝素结合蛋白(heparin-binding protein,HBP)可以作为新兴的诊断严重脓毒血症及脓毒血症性休克的早期生物标志物,可以对严重感染患者即将发生的休克进行预测。但未提及与PCT之间是否存在相关性,并且,其在脓毒血症诊断中的临幊应用价值仍有待进一步研究。HBP具有较强的结合肝素的能力,因而被命名为肝素结合蛋白,其是中性粒细胞嗜天青颗粒中的可分泌多功能蛋白质,也被称为天青杀素,具有显著的杀菌活性、趋化作用以及调节炎症反应。释放入血液循环的HBP可以调节血管内皮细胞的功

能,诱导血管内皮细症反应往往起始于细胞内的结构改变,尤其是细胞骨架和线粒体的改变。同时由此所致的凝血功能障碍在脓毒血症的发生发展中发挥重要作用,决定着疾病的预后。同时,细胞外液中的HBP还可进一步促进中性粒细胞渗出并脱颗粒。大量的HBP释放,可激活单核/巨噬细胞系统,诱导肿瘤坏死因子-a (Tumornecrosisfactoralpha, TNF-a) 和干扰素-γ (interferongamma, IFN-γ) 及白细胞介素 (Interleukin, IL) 的释放,并且,炎症反应与凝血反应之间相互影响,两者的相互作用主要表现在以下两个方面:一方面炎症反应时内皮细胞及单核细胞等多种细胞均表达组织生长因子,激活凝血系统,凝血因子激活后引发生理性的抗凝途径下调,而另一方面有很多凝血因子其自身也是炎症介质,在炎症反应过程中可以激活其他炎症反应介质,也可以被其他炎症反应介质激活。

[0008] 众所周知,在脓毒血症的生理病理过程中,大量的中性粒细胞和单核/巨噬细胞激活并释放一系列的细胞因子,各种细胞因子之间相互作用并形成网格系统,这在调控炎症反应的发生以及发展过程中具有至关重要的作用。其中TNF-a就扮演着促进炎症反应发生的重要角色。TNF-a可辅助白细胞黏附于血管内皮细胞,有助于白细胞在炎症部位聚集并激活中性粒细胞释放蛋白水解酶和氧自由基,放大炎症反应。更有研究发现,对于手术后患者,血浆TNF-a水平可用于鉴别脓毒血症和非脓毒血症SIRS。IL-6也是促进炎症反应介质的核心成员,能激活T细胞,诱导B细胞分化。有文献报道,一般感染患儿血浆IL-6浓度轻度升高,脓毒血症患儿血浆IL-6浓度会显著升高,脓毒血症患者血浆IL-6水平与疾病严重程度评分及死亡率正相关,IL-6有望成为严重脓毒血症独立预警生物标志物。综上所述,我们有理由推测HBP在脓毒血症的发展进程中发挥重要作用。

[0009] 综上所述,HBP与细菌感染有紧密的关系,对于细菌引起的感染有较高的灵敏度和特异度,是一项非常有应用价值的诊断感染状态的炎性指标,同时也可能是细菌感染新的治疗途径。但是有关HBP在体内作用的分子机制及临床应用方面的研究尚存在许多空白点,如何早期确诊脓毒血症并评估疾病的严重程度,以达到早期及时的干预治疗,提高患者的治愈率,改善患者预后,降低总死亡率,从而节约医疗资源,减轻患者及社会经济负担仍然是目前临床工作中面临的一大难题。脓毒血症的致病机制复杂多样,以此为背景的脓毒血症早期生物标志物研究为脓毒血症的早期诊断和治疗提供了新的思路。这都有待研究工作者的进一步探索和努力。

[0010] 肝素结合蛋白在诊断感染病方面优于降钙素原和C反应蛋白,尤其是对于脓毒血症的诊断和预后观察,近些年体外诊断试剂行业生产厂家数量大幅度增加,但都以普通品种居多,并无高新技术。

发明内容

[0011] 本发明的第一个目的在于,为了解决上述存在的技术问题,提供一种以体外定量测定人血浆中的肝素结合蛋白为目的,基于胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒。

[0012] 为此,本发明的上述目的通过以下技术方案来实现:

[0013] 一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒,所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒包括:试剂R1、试剂R2和校准品;

[0014] 所述试剂R1包括:磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、PEG6000和吐温-20;

[0015] 所述试剂R2包括:肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、

氯化钠、氯化钾、乙二胺四乙酸二钠和BSA；

[0016] 所述校准品包括：重组肝素结合蛋白抗原。

[0017] 为了取得进一步的技术效果，本发明还可以采用以下进一步的技术方案：

[0018] 优选地，所述试剂R1包括：1.01~6.44g/L的磷酸氢二钠、1.01~5.24g/L的磷酸二氢钾、1.0~20.0g/L的氯化钠、1.01~5.5g/L的氯化钾、5~25g/L的PEG6000和1.1~4.0g/L的吐温-20。

[0019] 优选地，所述试剂R2包括：0.08%~0.52%的肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、1.01~6.44g/L的磷酸氢二钠、1.01~5.24g/L的磷酸二氢钾、1.0~20.0g/L的氯化钠、1.01~5.5g/L的氯化钾、0.4~10.4g/L的乙二胺四乙酸二钠和5~30g/L的BSA。

[0020] 本发明还有一个目的在于，针对现有技术中存在的不足，提供一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法。

[0021] 为此，本发明的上述目的通过以下技术方案来实现：

[0022] 一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法，所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法应用前面所述的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒。

[0023] 为了取得进一步的技术效果，本发明还可以采用以下进一步的技术方案：

[0024] 优选地，所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法的优选参数为：样本S为14μl、试剂R1为175μl、试剂R2为35μl，试剂R1+样本S的孵育时间为300秒，试剂R1+样本S+试剂R2的孵育时间为15~35秒，试剂R1+样本S+试剂R2的反应时间为255~305秒，反应方法为终点法，反应方向为向上，反应温度为37℃，主波长为600nm。

[0025] 优选地，所述应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白的测定方法包括：加入14μl样本S，加入175μl试剂R1，然后混匀，置37℃孵育300秒，之后加入35μl试剂R2并混匀，置37℃孵育15~35秒，测定波长下的吸光度值A1，反应255~305秒，测定波长下的吸光度值A2；

[0026] 分别计算校准品的吸光度变化值 $\Delta A'$ ，并绘制校准曲线，校准曲线使用多点非线性拟合；将样本测定的吸光度变化值按拟合的公式进行计算，即可得出样本中肝素结合蛋白的浓度，其中 $\Delta A' = A2' - A1'$ ，A1' 和 A2' 分别为与样品的吸光度A1和A2相对应的校准品的吸光度值。

[0027] 本发明的基本原理为如下所述：

[0028] 胶乳免疫比浊法(Particle-Enhanced Turbidimetric Immunoassay, PETIA)是近年来出现的一种较为稳定、准确的体液蛋白均相免疫比浊检测方法。PETIA法大体分为两种：一种是散射比浊检测法；另一种是透射比浊检测法。这两种方法的基本原理非常相似，都是在高分子乳胶微球的表面交联抗原或抗体，当交联有抗原或抗体的微球与抗体或抗原结合后，在短时间内会迅速聚集在一起，改变了反应液的散光性能或透光性能。而且，反应液散光性能或透光性能(即吸光度)的改变与被测抗原或抗体的浓度有较强的相关性，在一定范围内可以反映被测抗原的浓度。PETIA检测方法是在均相反应体系中进行抗原、抗体反应及结果的测定。抗原、抗体反应后，直接测定反应液的吸光度值，省却了ELISA法反复孵育和洗板等繁琐操作步骤，几分钟就能获得结果，省时省力。此外，胶乳免疫比浊法操作步骤的简化也相应地避免了许多人为操作因素和试剂、环境等外界因素的干扰，稳定性和重复性都较好，能较真实地反映被测物质的含量。

[0029] 目前, PETIA检测试剂所采用的乳胶颗粒多为惰性微球、羧基化微球及氨基化微球。表面修饰的胶乳粒子与抗体的结合是通过其表面的羧基或氨基与抗体的氨基端共价结合, 在微球与抗体之间有一个桥联化学臂, 降低了位阻效应, 不仅提高了抗体的结合率, 而且还为抗体提供合适的三维空间立体结构, 有效地保护了抗体与抗原结合的活性区域。

[0030] 本发明的有益效果是:

[0031] 本发明使用胶乳免疫比浊法体外定量测定人血浆中的肝素结合蛋白, 是一种新型的免疫测定试剂盒, 克服了EIA法在操作人员技术(例如: 手法、温度、时间及结果判断等) 方面的人为误差, 并可通过定量客观反映HBP的存在, 为临床诊断及疗效观察和预后判断提供了更有力的实验诊断依据, 深受医患的广泛认可。本发明所提供的肝素结合蛋白的测定方法特异性高, 重复性好, 检测灵敏度高, 线性范围宽, 自动化程度高, 操作简便快速; 与EIA法比较, 具有快速、简便、准确、干扰小的优点。本发明所用试剂R1和试剂R2均采用PBS作为缓冲溶液, 与Tris等缓冲溶液相比, 其pH受温度变化的影响小(试剂R1和试剂R2均在2~8℃保存, 反应过程是在37℃下完成) 并且经其他组分稀释后pH变化小, 具有使整个反应体系在反应过程中保持均一pH的优点。本发明所述试剂R2中还加入了乙二胺四乙酸二钠作为金属螯合剂, 有效克服了PBS作为缓冲溶液时易与常见的钙离子、镁离子以及重金属离子结合生成沉淀的缺点, 具有使整个反应体系在反应过程保持均衡稳定的优点。本发明所选测定方法中, 样本加样量为14μl, 能有效降低加样量过低所造成的加样误差; 主波长选定为600nm, 能有效降低溶血、脂血、黄疸样本对测定过程造成的干扰。

附图说明

[0032] 图1为200例健康体检人群的测试结果的直方图;

[0033] 图2为单样本的K-S检验结果图;

[0034] 图3为正态Q-Q图。

具体实施方式

[0035] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解, 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明, 但下述实施例仅为本发明的优选实施例, 并非对本发明所要求保护范围的限定。基于实施方式中的实施例, 本领域技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得其它实施例, 都属于本发明的保护范围。

[0036] 实施例1

[0037] 肝素结合蛋白测定试剂盒, 包括: 试剂R1、试剂R2和校准品;

[0038] 该试剂盒采用胶乳免疫比浊法, 肝素结合蛋白多克隆抗体吸附在乳胶颗粒上, 可与样本中的肝素结合蛋白产生凝集反应, 形成抗原抗体复合物, 其浊度的变化通过测定特定波长, 例如在本实施例中为600nm的吸光度值, 即可计算出样本中肝素结合蛋白的浓度。

[0039] 其中, 试剂R1由1.01g/L的磷酸氢二钠、1.51g/L的磷酸二氢钾、1.0g/L的氯化钠、1.01g/L的氯化钾、5g/L的PEG6000和1.1g/L的吐温-20。

[0040] 试剂R2由0.08%的肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、1.01g/L的磷酸氢二钠、1.51g/L的磷酸二氢钾、1.0g/L的氯化钠、1.01g/L的氯化钾、0.4g/L的乙二胺四乙酸二钠和5g/L的BSA。

[0041] 实施例2

[0042] 肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:试剂R1、试剂R2和校准品;

[0043] 该试剂盒采用胶乳免疫比浊法,肝素结合蛋白多克隆抗体吸附在乳胶颗粒上,可与样本中的肝素结合蛋白产生凝集反应,形成抗原抗体复合物,其浊度的变化通过测定特定波长,例如在本实施例中为600nm的吸光度值,即可计算出样本中肝素结合蛋白的浓度。

[0044] 其中,试剂R1由6.44g/L的磷酸氢二钠、5.24g/L的磷酸二氢钾、20.0g/L的氯化钠、5.5g/L的氯化钾、25g/L的PEG6000和4.0g/L的吐温-20。

[0045] 试剂R2由0.52%的肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、6.44g/L的磷酸氢二钠、5.24g/L的磷酸二氢钾、20.0g/L的氯化钠、5.5g/L的氯化钾、10.4g/L的乙二胺四乙酸二钠和30g/L的BSA。

[0046] 实施例3

[0047] 肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:试剂R1、试剂R2和校准品;

[0048] 该试剂盒采用胶乳免疫比浊法,肝素结合蛋白多克隆抗体吸附在乳胶颗粒上,可与样本中的肝素结合蛋白产生凝集反应,形成抗原抗体复合物,其浊度的变化通过测定特定波长,例如在本实施例中为600nm的吸光度值,即可计算出样本中肝素结合蛋白的浓度。

[0049] 其中,试剂R1由1.44g/L的磷酸氢二钠、0.24g/L的磷酸二氢钾、8.0g/L的氯化钠、0.2g/L的氯化钾、20g/L的PEG6000、1g/L的吐温-20组成。

[0050] 试剂R2由0.2%的肝素结合蛋白多克隆抗体乳胶颗粒、1.44g/L的磷酸氢二钠、0.24g/L的磷酸二氢钾、8.0g/L的氯化钠、0.2g/L的氯化钾、7.4g/L的乙二胺四乙酸二钠、10g/L的BSA组成。

[0051] 实施例4

[0052] 1、准备材料

[0053] 日立7180型生化分析仪、湘仪H1650台式高速离心机、10-100 μ l、100-1000 μ l移液器、加样枪头、枸橼酸钠抗凝(1:9)真空管采血管、EP管、生化杯、一次性塑胶手套、试管架。

[0054] 2、样本采集

[0055] 收集并记录完临床资料后,采集外周静脉血2.7mL,置于枸橼酸钠抗凝真空管内,1500RCF(g)离心15min后分离出血浆备用。

[0056] 3、技术路线

[0057] (1) 在日立7180型生化分析仪上设置参数,14 μ l样本S、175 μ l试剂R1、35 μ l试剂R2,试剂R1+样本S的孵育时间为300秒,试剂R1+样本S+试剂R2的孵育时间为35秒,试剂R1+样本S+试剂R2反应时间为305秒,反应方法为终点法,反应方向为向上,反应温度为37℃,主波长为600nm。并将试剂R1和试剂R2放入试剂盘中相应位置。校准使用Logit-Log (4P) 方法拟合。

[0058] (2) 吸取校准品1-6各100 μ l于生化杯中,将装有校准品的生化杯放入日立7180型生化分析仪的校准盘中,选中并开始校准。仪器将会自动开始校准程序并输出校准曲线。

[0059] (3) 校准完成后,吸取待测样本各100 μ l于生化杯中,将装有待测样本的生化杯放入日立7180型生化分析仪的样本盘中,点击开始,仪器将会自动测定样本在600nm下的吸光度,并根据校准曲线自动输出结果,即样本对应的浓度值。

[0060] 实施例5

[0061] 根据实施例1和实施例2分别制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测

定试剂盒对200例健康体检人群进行参考值范围研究,表1为根据实施例1所制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒对100例健康体检人群的测试结果;表2为根据实施例2所制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒对100例健康体检人群的测试结果。

[0062] 用SPSS软件分别检验数据是否呈正态分布。若数据呈正态分布,则按照公式计算均值和标准差;若数据呈偏态分布,则采用非参数法计算。

[0063] 表1

[0064]

编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)
HBPRI001	3.6	HBPRI026	6.8	HBPRI051	0	HBPRI076	2.3
HBPRI002	0.4	HBPRI027	1.4	HBPRI052	1.9	HBPRI077	4.4
HBPRI003	0.6	HBPRI028	0.1	HBPRI053	0.7	HBPRI078	0
HBPRI004	1.1	HBPRI029	0.7	HBPRI054	2.2	HBPRI079	0.7
HBPRI005	7.4	HBPRI030	6	HBPRI055	4.2	HBPRI080	2.4
HBPRI006	1.4	HBPRI031	2.2	HBPRI056	0	HBPRI081	0
HBPRI007	1.4	HBPRI032	1.7	HBPRI057	1.4	HBPRI082	0.5
HBPRI008	11.4	HBPRI033	1.2	HBPRI058	1.7	HBPRI083	0
HBPRI009	6.2	HBPRI034	9.1	HBPRI059	0	HBPRI084	6.2
HBPRI010	4.7	HBPRI035	9.3	HBPRI060	0	HBPRI085	3.4
HBPRI011	0	HBPRI036	1.3	HBPRI061	0	HBPRI086	10
HBPRI012	2	HBPRI037	6	HBPRI062	7.1	HBPRI087	0.4
HBPRI013	14.2	HBPRI038	14.5	HBPRI063	0	HBPRI088	0
HBPRI014	3.9	HBPRI039	1.9	HBPRI064	0	HBPRI089	9.4
HBPRI015	0.5	HBPRI040	1	HBPRI065	0	HBPRI090	0
HBPRI016	0.4	HBPRI041	0	HBPRI066	0.6	HBPRI091	1.5
HBPRI017	17.2	HBPRI042	0	HBPRI067	0.1	HBPRI092	2.1
HBPRI018	12.7	HBPRI043	0	HBPRI068	4.8	HBPRI093	0.9
HBPRI019	3	HBPRI044	2.6	HBPRI069	0.8	HBPRI094	11.4
HBPRI020	0.2	HBPRI045	0.6	HBPRI070	1.5	HBPRI095	0.2
HBPRI021	0.2	HBPRI046	0	HBPRI071	0	HBPRI096	0
HBPRI022	9.3	HBPRI047	0	HBPRI072	0	HBPRI097	8.5
HBPRI023	1.4	HBPRI048	0.5	HBPRI073	0.4	HBPRI098	3.9
HBPRI024	0	HBPRI049	5.8	HBPRI074	4.3	HBPRI099	0
HBPRI025	3.1	HBPRI050	3.7	HBPRI075	0	HBPRI100	11

[0065] 表2

[0066]

编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)	编号	结果 (ng/ml)
HBPRI101	1.1	HBPRI126	0	HBPRI151	0.2	HBPRI176	14.3
HBPRI102	9.3	HBPRI127	0	HBPRI152	0.2	HBPRI177	2.3
HBPRI103	1.5	HBPRI128	3.1	HBPRI153	1.1	HBPRI178	0
HBPRI104	1.3	HBPRI129	5.6	HBPRI154	2.9	HBPRI179	0.1
HBPRI105	1.8	HBPRI130	2.1	HBPRI155	1.2	HBPRI180	2.1
HBPRI106	3	HBPRI131	0	HBPRI156	25.7	HBPRI181	5.1
HBPRI107	3.2	HBPRI132	0	HBPRI157	0.5	HBPRI182	3
HBPRI108	0	HBPRI133	8.2	HBPRI158	0.1	HBPRI183	0
HBPRI109	0.4	HBPRI134	0.5	HBPRI159	0	HBPRI184	0
HBPRI110	0	HBPRI135	2.7	HBPRI160	8.3	HBPRI185	4.3

[0067]

HBPRI111	0.2	HBPRI136	0	HBPRI161	5.2	HBPRI186	14.9
HBPRI112	0.1	HBPRI137	0	HBPRI162	12.1	HBPRI187	1
HBPRI113	1	HBPRI138	0.9	HBPRI163	3.3	HBPRI188	2.6
HBPRI114	2.9	HBPRI139	0.2	HBPRI164	1	HBPRI189	3.4
HBPRI115	1.6	HBPRI140	0.7	HBPRI165	13.9	HBPRI190	5.7
HBPRI116	1.8	HBPRI141	9.5	HBPRI166	0.1	HBPRI191	3.3
HBPRI117	0	HBPRI142	7.9	HBPRI167	0.1	HBPRI192	4
HBPRI118	5	HBPRI143	1.2	HBPRI168	4.4	HBPRI193	0.1
HBPRI119	1.5	HBPRI144	0	HBPRI169	1.4	HBPRI194	0
HBPRI120	1.4	HBPRI145	0.6	HBPRI170	0	HBPRI195	0
HBPRI121	0.9	HBPRI146	2.3	HBPRI171	1.9	HBPRI196	2.1
HBPRI122	1.8	HBPRI147	1	HBPRI172	6.8	HBPRI197	1.9
HBPRI123	0	HBPRI148	3.6	HBPRI173	0	HBPRI198	2.1
HBPRI124	4	HBPRI149	9.8	HBPRI174	6.1	HBPRI199	1.3
HBPRI125	3.4	HBPRI150	1.2	HBPRI175	0	HBPRI200	0.4

[0068] 使用SPSS软件对表1、2中的测试结果进行正态分布检验及计算,统计量结果见表3所示,并将表1、2中的测试结果绘制成如图1所示的直方图。

[0069] 表3

[0070]	N	有效 缺失	200 0
	均值	2.8620	
	中值	1.4000	
	众数	.00	
	标准差	3.95799	
	方差	15.666	
	偏度	2.274	
	偏度的标准误	.172	
	峰度	6.646	
	峰度的标准误	.342	
	百分位数 95	11.4000	

[0071] 如图1所示,从直方图中可以看出,偏度系数=2.274,峰度系数=6.646,初步判断其不符合正态分布。更进一步地,通过单个样本的K-S检验和Q-Q图检验来确定是否符合正态分布。如图2所示,图2为单样本的K-S检验结果图,从结果中可以看出,P=0.000<0.05;如图3所示,图3为正态Q-Q图,图3中各点偏离直线较远。因此,综上所述,表1、2中的测试结果不符合正态分布。

[0072] 因为数据不符合正态分布,肝素结合蛋白浓度过高属于异常,参考值采用非参数法(即是,百分位数法)进行数据处理确定单侧95%位数的参考上限,表4为表1、2中的测试结果的统计结果;表5为采用非参数法的统计结果。

[0073] 表4

[0074]

HBP (ng/ml)	频率	累积百分比
0.0	45	22.5
1.0	5	44.0
2.0	1	60.0
2.1-10.0	68	94.0
11.4	2	95.5
12.1-25.7	9	100.0
合计	200	

[0075] 表5

非参数法(百分位数法)			
单侧95%参考上限	r	取整	参考值
	0.95 (200+1)	190.95	191 11.4ng/ml

[0077] 经验证200例健康人血浆样本,最终确定应用乳胶免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒的参考值为≤11.4ng/ml。

[0078] 实施例6

[0079] 根据实施例1和实施例2分别制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒对20例已经确诊为脓毒症患者进行临床研究,研究结果表明:20例实验结果均>

11.4ng/ml,结果均为阳性,具体数据参见下表6,其中,试验序号1-10为根据实施例1所制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒对10例已经确诊为脓毒症患者的临床研究结果,试验序号11-20为根据实施例2所制备得到的应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒对10例已经确诊为脓毒症患者的临床研究结果:

[0080] 表6

[0081]

试验序号	年龄	性别	病人科别	临床诊断	HBP结果ng/ml
1	42	女	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	440.9
2	57	男	1-03病区	脓毒症	25
3	81	男	1-13病区	脓毒症,脓毒症休克	148.7
4	62	女	1-03病区	脓毒症	48
5	71	女	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	102.8
6	49	女	EICU病区	脓毒症,脓毒症休克	118
7	49	男	EICU病区	脓毒症	16.4
8	56	男	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	87.8
9	57	男	5-5东病区	脓毒症,脓毒症休克	125.5
10	89	男	EICU病区	脓毒症,脓毒症休克	70.3
11	41	男	1-03病区	脓毒症	34.2
12	31	女	1-20病区	脓毒症,脓毒症休克	35.5
13	54	女	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	114.3
14	68	男	1-03病区	脓毒症	54
15	68	男	5-1西病区	脓毒症	20.3
16	67	男	EICU病区	脓毒症	18.8
17	65	女	1-22病区	脓毒症,脓毒症休克	286.4
18	56	男	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	164.2
19	53	男	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	107.5
20	62	男	1-03病区	脓毒症,脓毒症休克	67.9

[0082] 上述具体实施方式用来解释说明本发明,仅为本发明的优选实施例,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改、等同替换、改进等,都落入本发明的保护范围。

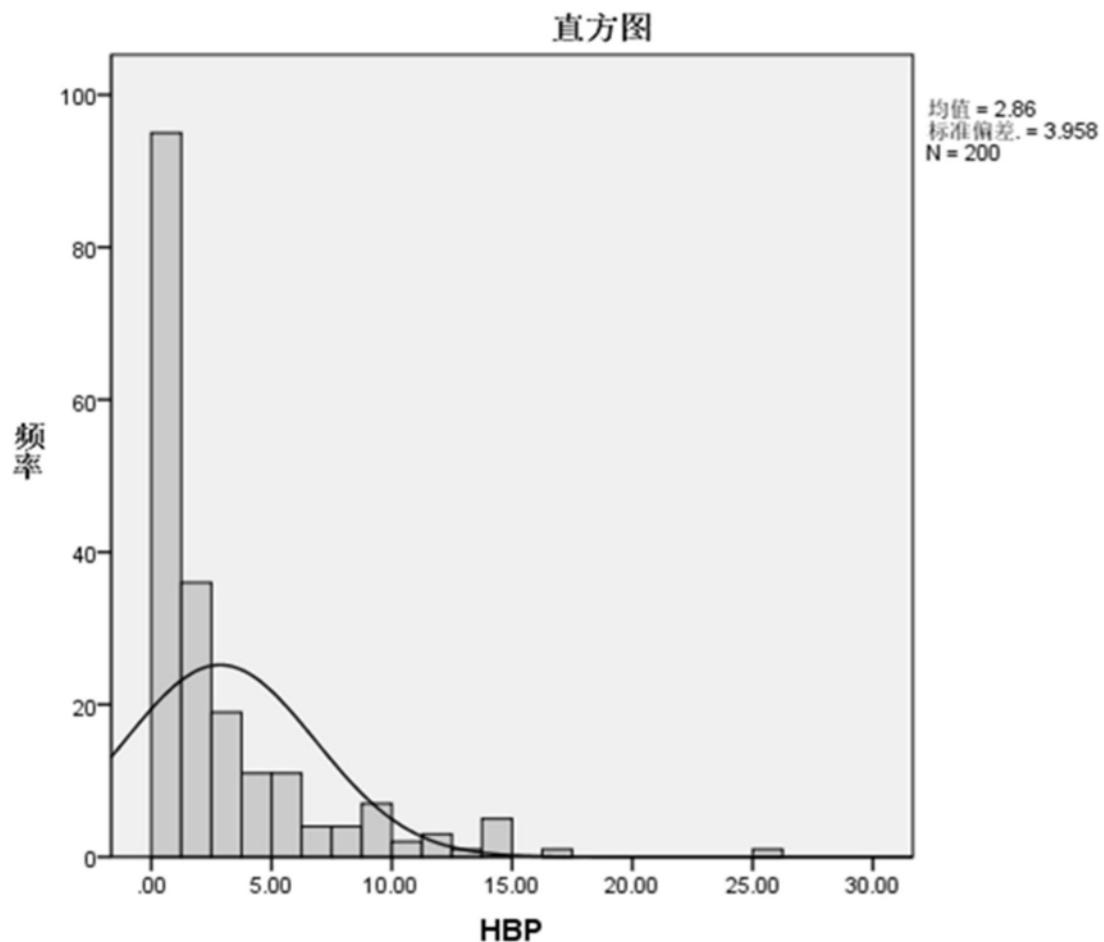
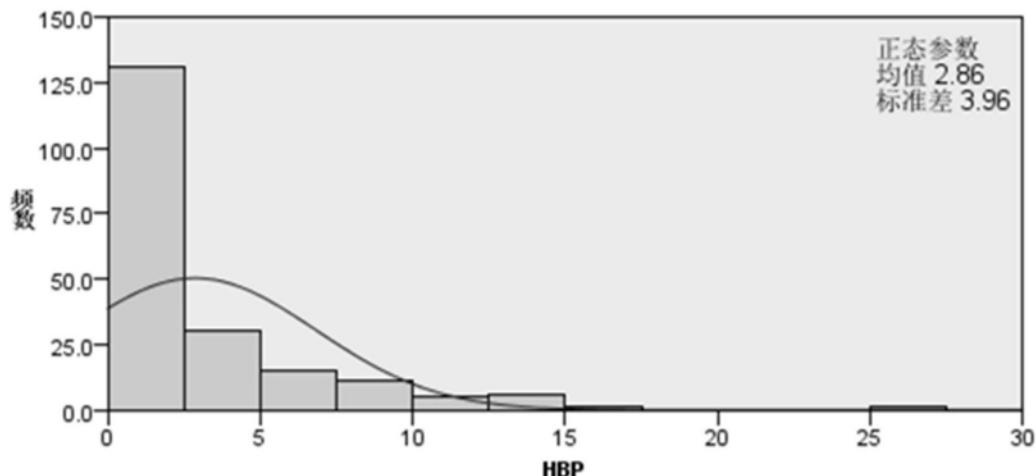


图1

单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验



总计 N	200
绝对值	.235
最大极差 正	.206
负	-.235
检验统计量	3.321
渐进显著性 (2-sided 检验)	.000

图2

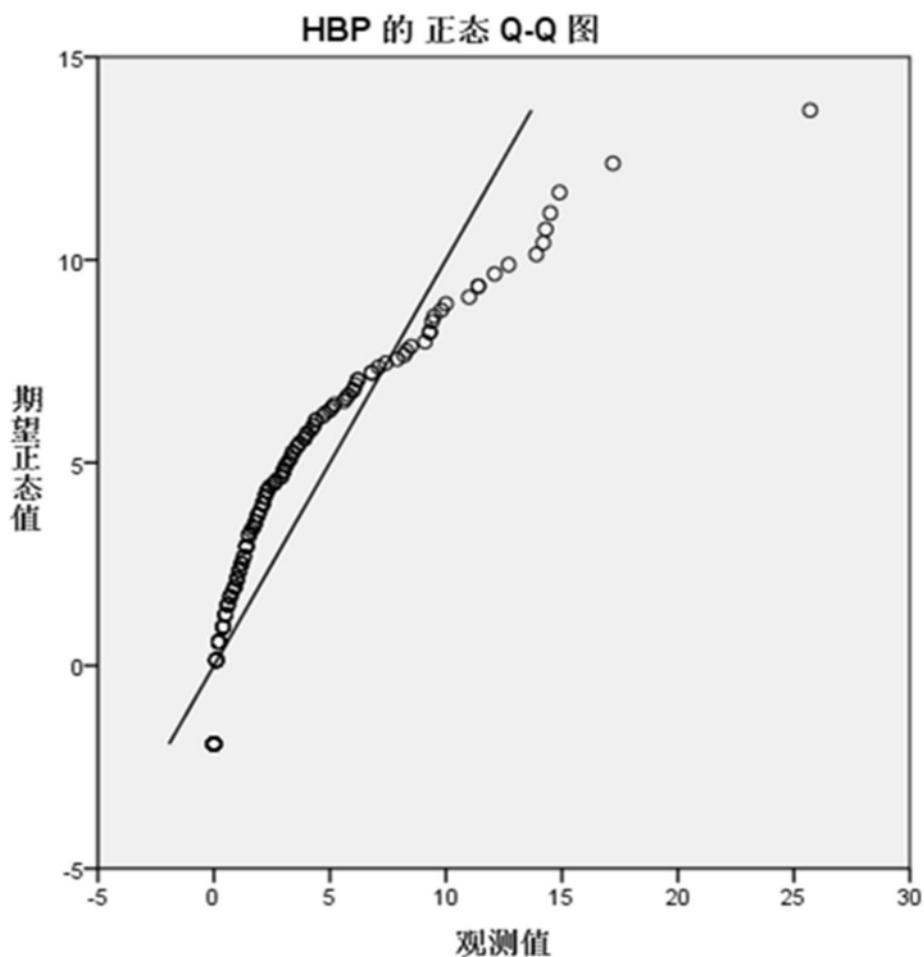


图3

专利名称(译)	一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒及测定方法		
公开(公告)号	CN108956978A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810318813.3	申请日	2018-04-11
[标]发明人	李翔 洪龙斌 解瑞雪 张玉 胡珊珊 孙磊 随淑敏 周旭一		
发明人	李翔 洪龙斌 解瑞雪 张玉 胡珊珊 孙磊 随淑敏 周旭一		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/68		
代理人(译)	刘晓春		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种应用胶乳免疫比浊法的肝素结合蛋白测定试剂盒，本发明所用试剂R1和试剂R2均采用PBS作为缓冲溶液，与Tris缓冲溶液相比，其pH受温度变化的影响小并且经其他组分稀释后pH变化小，具有使整个反应体系在反应过程中保持均一pH的优点。本发明所述试剂R2中还加入了乙二胺四乙酸二钠作为金属螯合剂，有效克服了PBS作为缓冲溶液时易与常见的钙离子、镁离子以及重金属离子结合生成沉淀的缺点，具有使整个反应体系在反应过程保持均衡稳定的优点。本发明所选测定方法中，样本加样量为14μl，能有效降低加样量过低所造成的加样误差；主波长选定为600nm，能有效降低溶血、脂血、黄疸样本对测定过程造成的干扰。

