



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107167589 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710488823.7

(22)申请日 2017.06.23

(71)申请人 宁波艾科生物科技有限公司

地址 315201 浙江省宁波市庄市街道中官  
西路777号科创大厦1708

(72)发明人 赖增祖 叶欣 杨奎东 徐健

(74)专利代理机构 南京艾普利德知识产权代理  
事务所(特殊普通合伙)  
32297

代理人 张铂

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的  
方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法,采用胶乳增强免疫比浊法,使用胶乳颗粒包被肝素结合蛋白抗体,制得抗体-胶乳颗粒复合物,当抗体-胶乳颗粒复合物与血液中的肝素结合蛋白特异性结合后,通过检测血液样本的吸光度测定肝素结合蛋白浓度。本发明所述方法操作简单,准确度高,能准确定量,适用于肝素结合蛋白的检测。

1. 一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法,其特征在于采用胶乳增强免疫比浊法,使用胶乳颗粒包被肝素结合蛋白抗体,制得抗体-胶乳颗粒复合物,当抗体-胶乳颗粒复合物与血液中的肝素结合蛋白特异性结合后,通过检测吸光度测定肝素结合蛋白浓度。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于所述胶乳选自羧基化聚苯乙烯胶、氨基化聚苯乙烯胶,羧基化硅胶、氨基化硅胶,聚甲基丙烯酸甲酯胶,聚苯乙烯-二乙烯基苯胶中的一种或几种。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于采用如下方法制备抗体-胶乳颗粒复合物:将胶乳颗粒溶液加入缓冲液中,加入交联剂,搅拌孵育制得活化的胶乳颗粒溶液,之后与抗肝素结合蛋白抗体混合,搅拌孵育、离心、洗涤后用缓冲液重悬制得抗体-胶乳颗粒复合物溶液。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于所述胶乳颗粒溶液浓度为5-20mg/ml,活化的胶乳颗粒溶液浓度为5-20mg/ml,抗体-胶乳颗粒复合物浓度为5-20mg/ml。

5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于所述交联剂选自EDAC和/或CMC。

6. 一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的试剂,其特征在于包括试剂1和试剂2,试剂1包括缓冲液,多聚乙醇和表面活性剂,试剂2包括缓冲液、稳定剂和抗体-胶乳颗粒复合物。

7. 如权利要求6所述的试剂,其特征在于所述缓冲液选自pH为6.5-9.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,三羟甲基氨基甲烷-咪唑缓冲液或者咪唑-盐酸缓冲液。

8. 如权利要求6所述的试剂,其特征在于所述表面活性剂为PEG6000、Tween-20、Tween-80、Triton X-100中的一种或几种。

9. 如权利要求6所述的试剂,其特征在于所述试剂1包括pH 8.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,Tween-20,PEG-6000,NaCl和NaN<sub>3</sub>;试剂2包括pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,牛血清白蛋白BSA和抗体-胶乳颗粒复合物和NaN<sub>3</sub>。

10. 如权利要求9所述的试剂,其特征在于所述试剂1包括pH8.0的0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,0.9%NaCl,4%PEG6000,0.05%Tween-20和0.05%NaN<sub>3</sub>;试剂2包括pH为8.0的0.05mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,10g/L的牛血清白蛋白,0.1~0.25%抗体-胶乳颗粒复合物和0.05%NaN<sub>3</sub>。

## 一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学诊断技术领域,具体涉及一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法及相应的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 肝素结合蛋白是分子量为37kDa的糖蛋白,主要是在嗜中性粒细胞中合成。结构上肝素结合蛋白属于丝氨酸蛋白酶超家族,尽管它与人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶具有45%的序列同一性,但其作为蛋白酶是无活性的。对肝素结合蛋白的研究最初是由于其具有抗菌的活性,后来的研究发现肝素结合蛋白参与多个炎症反应过程。嗜中性粒细胞与内皮细胞接触时被活化,活化嗜中性粒细胞释放肝素结合蛋白。肝素结合蛋白引起内皮细胞钙依赖性细胞骨架重排,从而导致细胞收缩并增加内皮细胞的通透性。它被内皮细胞内化,以防止细胞凋亡。当M蛋白质从细菌细胞表面释放时,M蛋白质和纤维蛋白原形成的M蛋白/纤维蛋白原复合物。M蛋白/纤维蛋白原复合物与嗜中性粒细胞表面上的整合素相互作用,嗜中性粒细胞被活化释放肝素结合蛋白。在感染部位,在吞噬过程中,azurophil颗粒可以分泌肝素结合蛋白,肝素结合蛋白表现出其抗菌活性。并且肝素结合蛋白激活单核细胞和其它炎症介质,并将这些活化的炎症介质吸引到感染的部位。肝素结合蛋白可被单核细胞吞噬内化,内化的肝素结合蛋白可延长单核细胞的生命,刺激单核细胞分泌其它细胞因子。这些结果显示肝素结合蛋白直接参与炎症过程。大量的临床数据表明在发生败血症之前的几个小时患者血浆肝素结合蛋白水平增加显著增加。肝素结合蛋白可以作为一个检测败血症发生的有效的生物靶标。

[0003] 脓毒症是身体对感染的全身炎症反应,可以进展到严重的败血症,甚至败血性休克,最终多器官功能衰竭导致死亡。全世界每年有超过1800万例严重脓毒病例,美国每年有215,000例因脓毒引起的死亡病例,远远超过因前列腺癌,结肠直肠癌和乳腺癌而死亡人数之和。近年来由于抗生素的滥用,导致细菌耐药性上升,以及免疫抑制剂的使用,和人口老龄化脓毒症病例数量每年都在增加。早期准确诊断和治疗对于严重脓毒症的患者的生存至关重要-有研究表明对于脓毒症治疗每延迟的一小时,因严重脓毒症而死亡机率增加7.5%。

[0004] 目前检测感染炎症发生的指标主要有PCT,CRP,WBC,LACTATE以及IL6。大量的研究表明肝素结合蛋白(HBP)可作为感染炎症发生检测的一个重要的指标(Clinical Infectious Diseases 2009;49:1044-50)。

	HBP 15ng/mL	PCT 2ng/mL	IL-6 0.1ng/mL	Lactate 2.5mM/L	CRP 100mg/L	WBC 14x10 <sup>9</sup> /L
灵敏度%	87.1	74.0	80.2	25.0	75.7	34.3
特异性%	95.1	81.1	72.8	97.5	56.2	75.5
阳性准确率%	88.4	63.2	49.1	81.0	37.0	35.4
阴性准确率%	94.5	88.4	88.4	75.1	89.2	72

从表中的结果可看到以肝素结合蛋白为检测靶标更能准确的,特异的预测败血症的发

生。

[0005] 目前在国外检测肝素结合蛋白的方法主要是基于酶联免疫的检测试剂盒。酶联免疫检测方法准确性好,灵敏度高,但检测速度不快,耗时耗力,最快也要4个小时才能出结果。目前临床上尚无快速定量的肝素结合蛋白检测方法。例如,中国专利CN204882574U公开了一种用于肝素结合蛋白定量检测试剂盒的检测板,利用胶体金免疫层析法检测肝素结合蛋白的浓度,该方法操作简单,快速,但不能定量,准确度较低。中国专利CN105572386A公开了一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;第一缓冲液为含有0.83~2ng/ $\mu$ l兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;第二缓冲液为含有0.05~0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l荧光标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液。CN204882575U公开了一种用于肝素结合蛋白荧光免疫层析法定量检测试剂盒的检测板。这些文献中使用的免疫荧光流相层析法都有方法本身的缺陷,首先免疫荧光流相层析法只能进行半定量的检测,很难准确测定,再者由于包被的抗体有限,在抗原浓度高时很容易产生倒钩效应,出现假阴性结果,因此线性范围不是很大。此外,这种方法每次只能测一个样品,没法进行自动化,而且对操作人员操作要求很高。由于抗原抗体反应是一个动态的过程,受到抗体浓度,反应温度,反应时间的影响。不同的人操作,加样量的差异,培育时间的差异,检测环境温度的差异,都可能导致不同的测定结果。

## 发明内容

[0006] 本发明技术方案针对现有技术不足,基于免疫胶乳浊度分析法,利用抗体和胶乳颗粒共价交联后与抗原结合形成复合物,根据浊度增加来测定抗原浓度,提供了一种定量检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法及试剂盒。本发明所述方法操作简单,准确度高,能准确定量,可以用在自动生化仪上对人肝素结合蛋白的检测,适合用于人肝素结合蛋白的检测。

[0007] 本发明技术方案如下:

一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法,采用胶乳增强免疫比浊法,使用肝素结合蛋白抗体和胶乳颗粒共价交联,制得抗体-胶乳颗粒复合物,当抗体-胶乳颗粒复合物与血液中的肝素结合蛋白特异性结合后,抗体-胶乳颗粒复合物发生聚合形成更大的颗粒,从而使得溶液的吸光度增加,吸光度的增加和血液中的肝素结合蛋白浓度成正比,通过检测吸光度测定肝素结合蛋白浓度。

[0008] 本发明所述胶乳选自自羧基化聚苯乙烯胶、氨基化聚苯乙烯胶,羧基化硅胶、氨基化硅胶,聚甲基丙烯酸甲酯胶,聚苯乙烯-二乙烯基苯胶中的一种或几种。优选羧基化聚苯乙烯胶。

[0009] 可采用如下方法制备抗体-胶乳颗粒复合物:将胶乳颗粒溶液加入MES缓冲液中,加入交联剂,搅拌孵育制得活化的胶乳颗粒溶液,之后与抗肝素结合蛋白抗体混合,搅拌孵育、离心、洗涤后用TRIS缓冲液重悬制得抗体-胶乳颗粒复合物。

[0010] 所述胶乳颗粒溶液浓度为5-20mg/ml,活化的胶乳颗粒溶液浓度为5-20mg/ml,抗体-胶乳颗粒复合物浓度为5-20mg/ml。

[0011] 所述交联剂选自EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride) 和/或CMC (1-Cyclohexyl-2-(2-morpholinoethyl) carbodiimide Metho-

p-toluenesulfonate)。优选EDAC。

[0012] 本发明的另一目的在于提供一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的试剂,包括试剂1和试剂2,试剂1包括缓冲液和表面活性剂,试剂2包括缓冲液、稳定剂和抗体-胶乳颗粒复合物。

[0013] 所述缓冲液选自pH为6.5-9.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,三羟甲基氨基甲烷-咪唑缓冲液或者咪唑-盐酸缓冲液。为了保证缓冲溶液中的离子强度,可以选择添加无机盐如氯化钾和/或氯化钠等,优选工作浓度为0.01-0.25mol/L。

[0014] 进一步的,所述试剂1和试剂2还可以含有防腐剂,如叠氮钠或者Proclin300,优选工作浓度为0.02-0.5%。

[0015] 本发明的一个优选方案,试剂1包括pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,NaCl、PEG6000、Tween-20和NaN<sub>3</sub>。进一步优选pH为8.0的0.05mol/L三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,0.9%NaCl,2%PEG6000和0.05%Tween-20,0.05%NaN<sub>3</sub>。(为重量体积百分比)。

[0016] 试剂2包括pH为8.0的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,牛血清白蛋白BSA和抗体-胶乳颗粒复合物和NaN<sub>3</sub>。进一步优选pH为8.0的0.05mol/L三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,10g/L的牛血清白蛋白BSA、0.1~0.25%抗体-胶乳颗粒复合物、0.05%NaN<sub>3</sub>。(为重量体积百分比)。

[0017] 本发明优点:

本发明采用的免疫比浊法是基于抗原抗体结合形成复合物,使得浊度增加来测定抗原或抗体的浓度的一种方法,操作简单,准确度高,且能准确定量,可以用在自动生化仪上对人肝素结合蛋白的检测,最适合用于人肝素结合蛋白的检测。

## 附图说明

[0018] 图1为本发明实施例4的标准曲线。

[0019] 图2为本发明实施例6的线性回归曲线。

## 具体实施方式

[0020] 在本发明中所使用的术语,除非另有说明,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0021] 下面结合具体实施例并参照数据进一步详细描述本发明。应理解,该实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0022] 在以下实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。下述实例中所用的材料、试剂、装置、仪器、设备等,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0023] 实施例1抗人肝素结合蛋白单克隆抗体的制备

重组人肝素结合蛋白可以购买。按照参考文献的方法来制备抗人肝素结合蛋白单克隆抗体(Nature,1975,256:495-497)。具体说,将完全福氏佐剂与人肝素结合蛋白溶液按1:1的比例混合制成乳剂。腹腔注射免疫6-8周龄雌性Balb/c小鼠(每只小鼠100 $\mu$ l,含10 $\mu$ g人肝素结合蛋白)。两周后以不完全福氏佐剂腹腔注射10 $\mu$ g人肝素结合蛋白加强免疫小鼠。两周后取血测定抗体的效价。经尾静脉注射10 $\mu$ g人肝素结合蛋白加强免疫小鼠,四天后,将小鼠处死,分离脾脏细胞,将分离的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞以50%PEG介导融合。

阳性克隆用酶联免疫法筛选。参照中国专利CN104020289A公开的方法筛选出配对抗体1和抗体2。

[0024] 实施例2抗人肝素结合蛋白抗体-胶乳颗粒复合物的制备

(1) 胶乳颗粒的活化

将100 $\mu$ l浓度为10%的羧基化聚苯乙烯胶乳颗粒溶液加入1.0mL, pH 5.4的50mM MES缓冲液中, 混匀, 再加入20 $\mu$ l浓度为10mg/mL的EDAC, 在37 $^{\circ}$ C的条件下, 搅拌孵育0.5~1h, 13000rpm离心30分钟, 小心弃去上清液。将沉淀悬浮于50mM、pH 7.4的PBS缓冲液中, 13000rpm离心30分钟, 小心弃去上清液, 重复洗涤两次, 最后将沉淀重悬浮于1mL pH 7.4的50mM PBS缓冲液中, 使最终溶液中聚苯乙烯胶乳颗粒的固体百分含量为20mg/ml。

[0025] (2) 交联缓冲液的选择

按步骤(1)将胶乳活化, 将化后的胶乳分别重悬浮于MES, MOPOS或PBS缓冲液中, 将活化后的羧基化聚苯乙烯胶乳微球溶液与等体积的浓度为20mg/ml的抗肝素结合蛋白抗体溶液混合, 在37 $^{\circ}$ C的条件下, 搅拌孵育2h。13000rpm离心20分钟, 收集上清液, 测定上清液中抗体蛋白质含量, 计算交联量 = (抗体交联的起始量 - 上清的抗体含量) / 抗体交联的起始量  $\times$  100%。结果如表1所示。

[0026] 表1不同交联缓冲液的交联率

抗体	MES	MOPOS	PBS
抗体1	40%	70%	80%
抗体2	60%	50%	90%

结果显示利用PBS作为交联缓冲液, 配对抗体的两个抗体, 抗体1和抗体2交联率都很高。选取PBS作为交联缓冲液。

[0027] (3) 抗体和胶乳得共价交联

将100 $\mu$ l浓度为100mg/ml的羧基化聚苯乙烯胶乳颗粒溶液加入1.0mL, pH 5.4的50mM MES缓冲液中, 混匀, 再加入20 $\mu$ l浓度为10mg/mL的EDAC, 在37 $^{\circ}$ C的条件下, 搅拌孵育0.5~1h, 13000rpm离心30分钟, 小心弃去上清液。将沉淀悬浮于50mM、pH 7.4的PBS缓冲液中, 13000rpm离心30分钟, 小心弃去上清液, 重复洗涤两次, 最后将沉淀重悬浮于1mL pH 7.4的50mM PBS缓冲液中, 使最终溶液中聚苯乙烯胶乳颗粒的固体百分含量为20mg/ml, 加入等体积得浓度为20mg/ml的抗肝素结合蛋白抗体溶液(10mg/ml抗体1和10mg/ml抗体2), 混合均匀, 在37 $^{\circ}$ C的条件下, 搅拌孵育2h。13000rpm离心20分钟, 去上清液, 再用50mM、pH 7.4的PBS缓冲液洗涤两次, 最后用50mM Tris-HCl、1%BSA、0.05%叠氮钠pH 7.4的缓冲液重悬浮抗体-胶乳颗粒复合物, 使最终致敏聚苯乙烯胶乳颗粒的固体含量约为0.1~0.25%。

[0028] 实施例3肝素结合蛋白检测试剂的制备

(1) 试剂1的配制

称取6.06g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、9g氯化钠、40g PEG6000、0.5mL Tween-20、0.5g NaN<sub>3</sub>溶于0.8L去离子水, 用稀盐酸调pH至7.4, 定容至1L即得试剂1。试剂1中各组分的含量分别为0.05mol/L Tris, 0.9%NaCl, 2%PEG6000, 0.05%Tween-20, 0.05%NaN<sub>3</sub>, pH8.0。

[0029] (2) 试剂2的配制

用浓度为50mM/L的Tris-HCl缓冲液将实施例2制备的抗体-胶乳颗粒复合物按一定的比例进行稀释, 使浮抗体-胶乳颗粒复合物的固体含量约为0.1~0.25%, 加入牛血清白蛋

白BSA,使其终浓度为10g/L,加入叠氮钠,其终浓度为0.5g/L,即可制成试剂2。

#### [0030] 实施例4标准曲线的建立

测定条件:样品量为5 $\mu$ l,200 $\mu$ l试剂1,,40 $\mu$ l试剂2,用两点终止法,主波长为575纳米,副波长为700纳米。

[0031] 测定方法:将标准品稀释成浓度分别为0,5,10,25,50,100ng/ml,取5 $\mu$ l样品,加入200 $\mu$ l试剂1孵育3分钟,加入40 $\mu$ l的试剂2,用两点终止法测定反应度的变化,每个浓度测3次,取平均值,以浓度为横坐标,反应度为纵坐标作标准曲线,结果如图1所示。

#### [0032] 实施例5胶乳颗粒大小的选择

按照实例2将抗肝素结合蛋白抗体与粒径大小分别为100nm,200nm,300nm的聚苯乙烯胶乳颗粒交联,按照实例3制备肝素结合蛋白检测试剂,按照实例4建立标准曲线,对浓度为1ng/ml的肝素结合蛋白质控品进行测定,共测定10次取平均值。计算CV。结果如表2所示。

#### [0033] 表2不同大小的胶乳颗粒对精确度的影响

	100nm	200nm	300nm
1	1.00	1.31	1.15
2	1.02	1.15	1.12
3	0.99	1.14	1.14
4	1.1	1.09	1.09
5	0.98	1.05	1.08
6	1.2	1.02	1.05
7	0.99	1.01	1.21
8	0.98	1.07	1.15
9	0.99	1.19	1.03
10	1.03	1.03	1.17
平均值	1.028	1.106	1.119
CV	2.8%	10.6%	11.9%

结果显示利用粒径大小为100nm的聚苯乙烯胶乳颗粒制备肝素结合蛋白检测试剂,精确度最好。

#### [0034] 实例6线性范围的测定

将接近浓度为110ng/ml的高值样本用缓冲液稀释成浓度为80,30,7.5,3ng/ml共得4个不同浓度的溶液,按实施例5所述方法测定,每个浓度测定3次,对实测平均值与相应理论值作回归分析,表明本发明所述试剂在3-110ng/ml线性范围内相关性较好( $R^2 > 0.99$ ),结果如图2所示。

#### [0035] 实例7稳定性的测定

将本发明所述试剂1和试剂2置于4 $^{\circ}$ C,37 $^{\circ}$ C每隔7天检测一次,取出按实例5所述方法测定标示值为25ng/mL的校准品,各重复测定3次,计算检测平均值实验。结果如表3所示,结果表明,本发明所述试剂稳定性较好。

#### [0036] 表3稳定性的测定结果

天数	4 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C
0	25.2ng/mL	25.2ng/mL

7	25.3ng/mL	25.1ng/mL
14	25.4ng/mL	25.3ng/mL
21	25.2ng/mL	24.8ng/mL
28	25.6ng/mL	25.1ng/mL

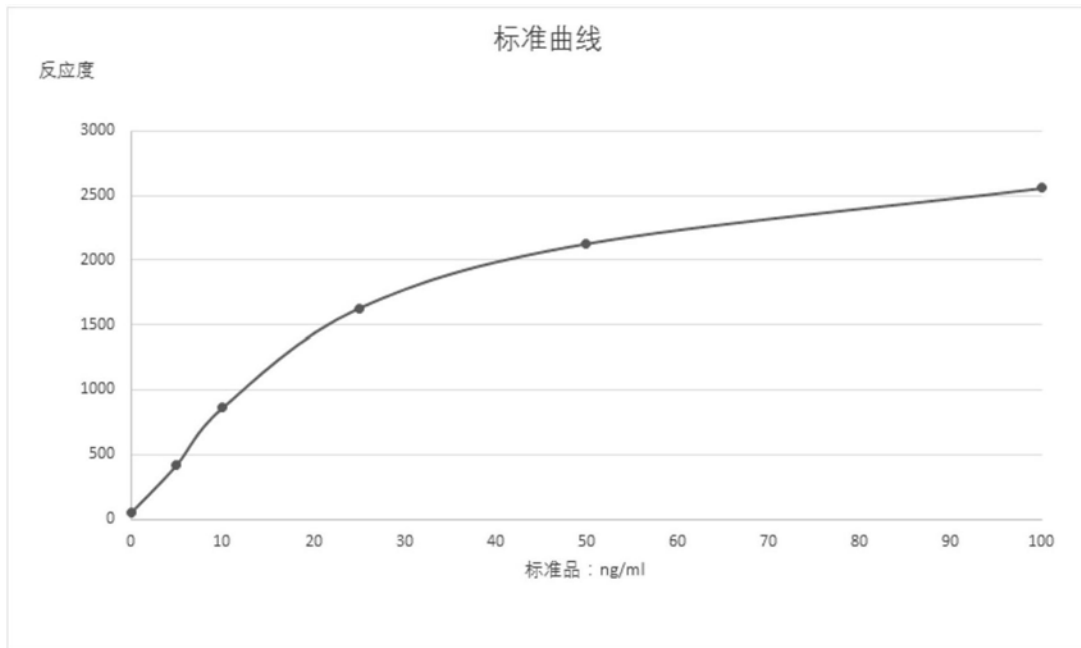


图1

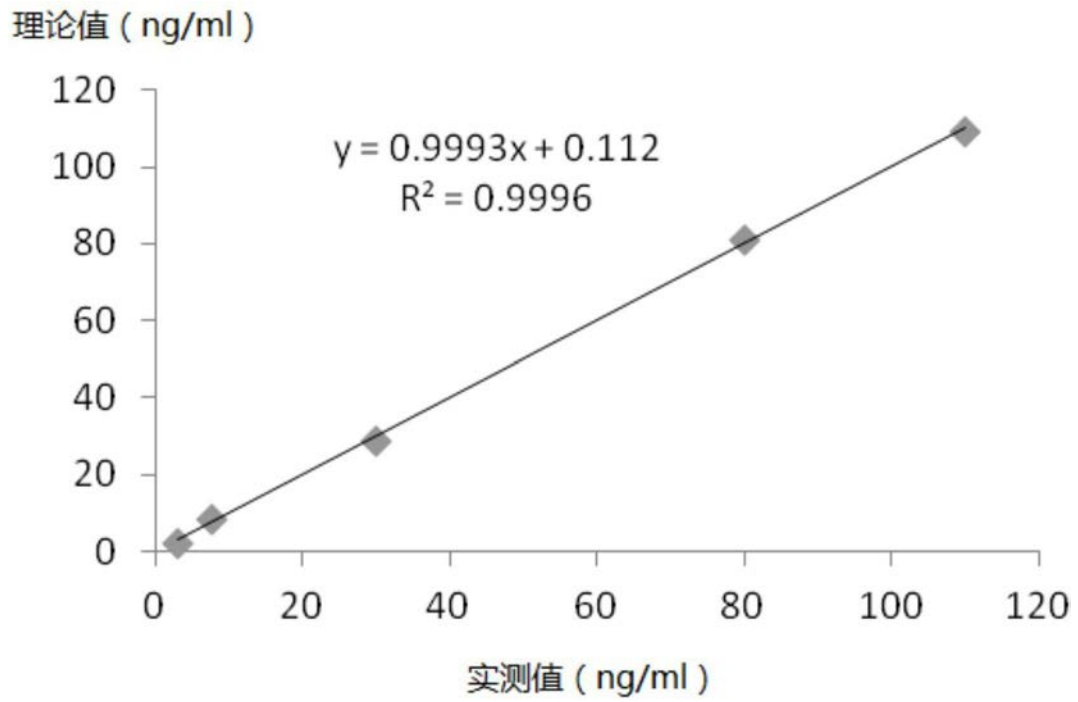


图2

专利名称(译)	一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107167589A</a>	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN2017110488823.7	申请日	2017-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	宁波艾科生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波艾科生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波艾科生物科技有限公司		
[标]发明人	赖增祖 叶欣 杨奎东 徐健		
发明人	赖增祖 叶欣 杨奎东 徐健		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/535 G01N33/577		
代理人(译)	张铂		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种快速检测血液中肝素结合蛋白浓度的方法，采用胶乳增强免疫比浊法，使用胶乳颗粒包被肝素结合蛋白抗体，制得抗体-胶乳颗粒复合物，当抗体-胶乳颗粒复合物与血液中的肝素结合蛋白特异性结合后，通过检测血液样本的吸光度测定肝素结合蛋白浓度。本发明所述方法操作简单，准确度高，能准确定量，适合用于肝素结合蛋白的检测。

	HBP	PCT	IL-6	Lactate	CRP	WBC
	15ng/mL	2ng/mL	0.1ng/mL	2.5mM/L	100mg/L	14x10 <sup>9</sup> /L
灵敏度%	87.1	74.0	80.2	25.0	75.7	34.3
特异性%	95.1	81.1	72.8	97.5	56.2	75.5
阳性准确率%	88.4	63.2	49.1	81.0	37.0	35.4
阴性准确率%	94.5	88.4	88.4	75.1	89.2	72