



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152512 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711412733.6

(22)申请日 2017.12.25

(71)申请人 苏州康和顺医疗技术有限公司
地址 215010 江苏省苏州市高新区鹿山路
369号29幢403-3室

(72)发明人 陈胜胜 刘向晖 王明

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)

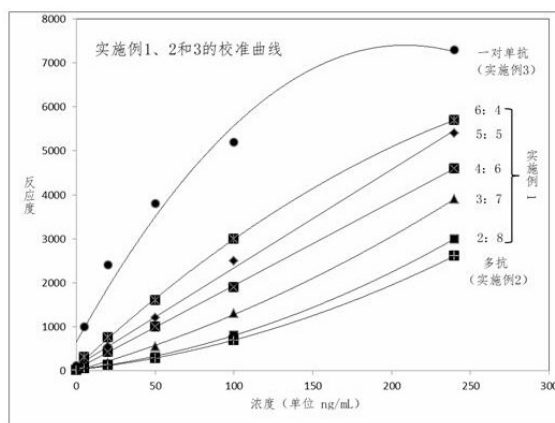
权利要求书2页 说明书14页 附图4页

(54)发明名称

肝素结合蛋白检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了肝素结合蛋白(HBP-Heparin Binding Protein)的检测试剂盒及其制备方法,该试剂盒为胶乳增强免疫比浊检测试剂。该胶乳增强免疫比浊试剂盒的主要成分是含有缓冲溶液、表面活性剂、盐和防腐剂的稀释液R1以及含有HBP抗体标记的胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂的反应液R2,以及HBP校准品和质控品。本发明还公开了使用该试剂盒利用透射或者散射比浊原理检测血样中肝素结合蛋白(HBP)的浓度的方法。本发明采用双试剂,操作简单,灵敏度高,线性范围广,可以广泛应用于各种透射或者散射分析仪,包括普通生化分析仪、特定蛋白分析仪等。



1. 肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述肝素结合蛋白检测试剂盒包括稀释液R1和反应液R2以及校准品和质控品,所述反应液R2包含HBP抗体标记的胶乳微粒。

2. 根据权利要求1所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述稀释液R1包括缓冲溶液、表面活性剂、盐和防腐剂,所述反应液R2包括缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂,所述校准品和质控品包括肝素结合蛋白、缓冲溶液、盐、稳定剂和防腐剂。

3. 根据权利要求2所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述HBP抗体标记的胶乳微粒为单抗标记的胶乳微粒或多抗标记的胶乳微粒或是HBP单抗标记的胶乳微粒与HBP多抗标记的胶乳微粒的混合物,所述单抗是一对或者几对配对的HBP单抗。

4. 根据权利要求3所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,所述HBP抗体标记的胶乳微粒为单抗标记的胶乳微粒和多抗标记的胶乳微粒的混合物,所述HBP抗体标记的胶乳微粒为单抗标记的胶乳微粒和多抗标记的胶乳微粒的质量比范围是2:8至8:2。

5. 根据权利要求3所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述HBP抗体标记的胶乳微粒中使用的胶乳微粒直径为100nm~400nm,所述胶乳微粒为化学交联型胶乳微粒或物理吸附型胶乳微粒。

6. 根据权利要求5所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述化学交联型胶乳微粒其表面修饰基团为-COOH、-NH₂、-SH、-OH、-CHO 中的一种。

7. 根据权利要求4所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述HBP抗体标记的胶乳微粒质量浓度为0.01%~1%。

8. 根据权利要求2所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶中的一种;所述盐为氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硫酸钾中的一种、两种或两种以上的组合;所述表面活性剂为NP40、曲拉通X-100、吐温20、吐温40、吐温80、十二烷基硫酸钠(SDS)、司盘40、司盘60中的一种、两种或两种以上的组合;所述助悬剂为蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、甘露醇、乙二醇、丙三醇、乳糖中的一种、两种或两种以上的组合;所述的防腐剂为叠氮化钠、硫柳汞、Proclin-300 中的一种。

9. 根据权利要求8所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为牛血清白蛋白,所述牛血清白蛋白浓度0.2%~2%;所述助悬剂为浓度海藻糖,所述海藻糖浓度0.2%~5%;所述防腐剂为Proclin-300,所述防腐剂浓度为0.05%~2%;所述表面活性剂的浓度为0.1%~2%。

10. 根据权利要求2所述的肝素结合蛋白检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为甘氨酸缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液、3-(N-吗啉)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲液、三羟基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)缓冲液、磷酸生理盐水(PBS)缓冲液和2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液的其中任一种,所述缓冲液浓度范围为10-200mmol/L。

11. 肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述方法使用权利要求1~10项任意一种配方组成所述肝素结合蛋白检测试剂盒,所述HBP抗体标记的胶乳微粒标记抗体的方法为物理吸附法、中间酯法、一步法或两步法中的任意一种。

12. 根据权利要求10所述的肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述中间酯法为使用碳化二亚胺类和琥珀酰亚胺酯催化剂活化胶乳微粒表面的羧基,形成表面带有琥珀酰亚胺酯中间体的胶乳微粒,再加入HBP抗体,HBP抗体表面的氨基与胶乳微粒表面的琥珀酰亚胺酯缩合,即完成HBP抗体标记过程。

13. 根据权利要求10所述的肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述一步法为把HBP抗体先同胶乳微粒混合,HBP抗体吸附在胶乳微粒表面,然后加入碳化二亚胺类催化剂,HBP抗体表面的羧基或氨基与聚苯乙烯胶乳微粒表面的羧基或氨基缩合,完成HBP抗体标记过程。

14. 根据权利要求10所述的肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述二步法为使用碳化二亚胺类催化剂活化胶乳微粒表面的羧基,然后加入HBP抗体,二者的氨基和羧基直接缩合,完成HBP抗体标记过程。

15. 根据权利要求10所述的肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述物理吸附法为使用不带任何表面活性基团的聚苯乙烯胶乳微粒,然后加入HBP抗体,HBP抗体吸附在聚苯乙烯胶乳微粒表面,完成HBP抗体标记过程。

16. 一种采用双试剂的胶乳增强免疫比浊试剂检测肝素结合蛋白的方法,其特征在于,采用权利要求1~10中任一种肝素结合蛋白检测试剂盒,在生化分析仪或者特定蛋白分析仪上通过透射比浊或者散射比浊的方法来测定待测样品中的HBP含量。

17. 根据权利要求16所述的检测方法,其特征在于,所使用的检测样品是6小时以内提取的新鲜血清或者血浆样本。

肝素结合蛋白检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫诊断试剂领域,特别涉及肝素结合蛋白的检测。

背景技术

[0002] 肝素结合蛋白(Heparin Binding Protein-简称HBP)是一种中性粒细胞分泌的颗粒蛋白,具有杀菌作用,同时也参与炎症反应和凝血过程的调节。1984年,Shafer等人首次发现并分离出这种蛋白,根据其正电性的特征和杀菌的功能命名为CAP37(Cationic Antimicrobial Protein,分子量37k)。后来又陆续有人从多形核白细胞中的嗜苯胺蓝颗粒中分离出天青杀素(Azurocidin),以及与肝素有很强结合能力的肝素结合蛋白(HBP-Heparin Binding Protein)。进一步的蛋白质结构和基因测序的研究表明,这三种蛋白实际上是同一种蛋白,在本发明中统一用肝素结合蛋白来代表。肝素结合蛋白是一种多功能的蛋白,可以通过结合血管上皮细胞,改变血管通透性,诱导血浆渗漏和炎症反应。肝素结合蛋白还能够趋化和激活单核白细胞和巨噬细胞,应对细菌感染,参与调节免疫反应。最近的一些研究工作表明,血浆中的肝素结合蛋白的浓度与脓毒症以及脓毒症休克有很强的相关性。脓毒症是全身性的感染炎症反应,会引起体温改变、心率加快、呼吸急促等症状,导致全身凝血功能紊乱和免疫炎症反应失衡,诱发器官功能衰竭,严重时会发生脓毒症休克甚至死亡。医学界对脓毒症的病原机理还不是十分清楚,及早地预测脓毒症的发生能有效地防止脓毒症引起的器官衰竭以及死亡。Linder等人(Adam Linder et al,Critical Care Medicine,2015,43:2378-2386)的研究表明作为参与炎症反应的肝素结合蛋白,能够有效地预测脓毒症以及脓毒症休克的发生,是一个很好的临床诊断指标。

[0003] 肝素结合蛋白(HBP)已经被国家药监局批准的检测方法是酶联免疫分析法(ELISA),其代表产品是英国Axis-Shield公司的酶联免疫试剂盒(国械注进20162400300)。酶联免疫分析法是在96孔板上包覆捕捉抗体,当含有抗原的样品在孔中培养时,包覆在孔内的抗体通过抗体抗原反应捕捉样品中的抗原,然后用酶标记的抗体与抗原结合,形成抗体-抗原-抗体的三明治结构。标记好的酶可以与相应的底物定量地发生反应,产生颜色变化。通过测量特定波长下的吸光度变化,可以定量检出样品中的抗原浓度。酶联免疫分析法可以准确地检测样品中的肝素结合蛋白浓度,但是实际操作中ELISA实验耗时比较长,需要孵育、清洗、移液等多项手工操作,过程比较复杂,一般需要3到5小时才能得到检测结果,不能够很好地满足门诊或者急诊的快速检测的需求。其他报道的检测方法还有CN204882574U公开的胶体金法和CN204882575U公开的免疫荧光层析的方法。胶体金法和免疫荧光层析法虽然可以快速检测,但是只能进行定性或者半定量的检测,准确度低,无法提供精确的临床判断依据。同时受限于方法本身,检测的精密度差,使得测试的重复性和一致性不能得到保障。最近在中国专利CN107167589A中公开了用胶乳增强免疫比浊法来检测HBP的方法,但其仅能在生化分析仪上使用。胶乳增强免疫比浊法可以快速定量测量血液中的HBP,是对现有检测方法的一个很好补充。但是,CN107167589A公开的方法中采用的是测量透射吸光度的检测方法,只能在生化分析仪上使用,不适合门诊快速检测的要求。同时该

专利在抗体标记胶乳方法的多样性、抗体选择、样本条件、样本比对相关性等方面都存在一定缺陷。在检测试剂的具体组成成分的选择上也存在问题,例如使用多聚乙醇可能会产生非特异性反应即假阳性。诸多问题使得通过该发明得到检测试剂在灵敏度、特异性、线性范围等方面都不理想,试剂的准确性也无法和现有上市试剂做到很好的相关性。

发明内容

[0004] 为了解决上述现有各种方法的不足,本发明的目的是提供操作简单、能够快速检测血液样本中的肝素结合蛋白(HBP)浓度的肝素结合蛋白检测试剂盒及其制备方法,该检测试剂盒为胶乳增强免疫比浊检测试剂。该试剂盒既可以在大型自动生化分析仪上进行测试,也可以在特定蛋白仪等小型POCT设备上进行测试。

[0005] 本发明提供的一种技术方案是一种基于双试剂形式的肝素结合蛋白(HBP)胶乳增强免疫比浊检测试剂盒。

[0006] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,肝素结合蛋白检测试剂盒为液体双试剂,肝素结合蛋白检测试剂盒包括稀释液R1和反应液R2以及校准品和质控品,所述反应液R2包含HBP抗体标记的胶乳微粒。

[0007] 本发明提供的试剂盒是供胶乳增强免疫比浊法(Particles Enhanced Turbidity Immuno-Assay-PETIA)使用,该方法是利用吸附在直径几十到几百纳米的胶乳微粒上的HBP抗体捕捉测试样品中的肝素结合蛋白(HBP),形成微粒之间的交联,改变了溶液的散射度或者透射吸光度。通过测量溶液的散射度或者透射吸光度的变化,根据定标曲线定量地计算出测试样品中肝素结合蛋白的浓度。本发明提供的试剂盒既可以在通用的大型自动生化分析仪上运用,也可以在特定蛋白分析仪等小型的POCT(即时检测)设备上采用,有很强的适用性,可以很好地满足我国从大型三甲医院到社区基层医院的使用需求。本发明和酶联免疫试剂盒相比,由于采用胶乳增强免疫比浊法,本发明的试剂盒在使用中具有操作简单、检测快速、测试结果重复性好、测量线性范围广等优点。

[0008] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,稀释液R1包括缓冲溶液、表面活性剂、盐和防腐剂,反应液R2包括缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂,校准品和质控品包括肝素结合蛋白、缓冲溶液、盐、稳定剂和防腐剂。

[0009] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,HBP抗体标记的胶乳微粒为HBP单抗标记的胶乳微粒或HBP多抗标记的胶乳微粒或HBP单抗与HBP多抗的组合抗体标记的胶乳微粒,其中HBP单抗是一对或者几对配对的HBP单抗。

[0010] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,HBP抗体标记的胶乳微粒为HBP单抗标记的胶乳微粒和HBP多抗标记的胶乳微粒的混合物,HBP抗体标记的胶乳微粒为单抗标记的胶乳微粒和多抗标记的胶乳微粒的质量比范围是2:8至8:2。单抗能提升反应液R2对抗原的识别能力,很好地提高试剂的灵敏度和特异性,多抗能大幅提升反应体系的线性范围。

[0011] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,HBP抗体标记的胶乳微粒中使用的胶乳微粒直径为100nm~400nm,胶乳微粒为化学交联型胶乳微粒或物理吸附型胶乳微粒。

[0012] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,化学交联型胶乳微

粒,其表面修饰基团为-COOH、-NH₂、-SH、-OH、-CHO中的一种。

[0013] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,本发明的试剂盒中使用的胶乳微粒为表面带羧基的聚苯乙烯胶乳微粒,其直径为 200~350nm,且表面修饰基团为-COOH。

[0014] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,HBP抗体标记的胶乳微粒的浓度为0.01%~1%。

[0015] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,稳定剂为牛血清白蛋白、酪蛋白、明胶中的一种;盐为氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硫酸钾中的一种、两种或两种以上的组合;表面活性剂为NP40、曲拉通X-100、吐温 20、吐温40、吐温80、十二烷基硫酸钠(SDS)、司盘40、司盘60中的一种、两种或两种以上的组合;助悬剂为蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、甘露醇、乙二醇、丙三醇、乳糖中的一种、两种或两种以上的组合;防腐剂为叠氮化钠、硫柳汞、Proclin-300中的一种。

[0016] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,盐为氯化钠。

[0017] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,对表面活性剂进行了优选,优选的表面活性剂为曲拉通X-100、NP40、吐温20中的一种,浓度为0.1%~1%。在该优化的组合和浓度下,表面活性剂具有降低抗原与HBP 抗体标记的胶乳微粒产生非特异性反应的效果。

[0018] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,稳定剂为牛血清白蛋白,牛血清白蛋白浓度0.2%-2%;助悬剂为浓度海藻糖,海藻糖浓度0.2%-5%;防腐剂为Proclin-300,防腐剂浓度为0.05%-2%;表面活性剂的浓度为0.1%~2%。

[0019] 根据本发明的一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒,缓冲液为甘氨酸缓冲液、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液、3-(N-吗啉)-2-羟基丙磺酸(MOPSO)缓冲液、三羟甲基甲烷盐酸(Tris-HCl)缓冲液、磷酸生理盐水(PBS)缓冲液和2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液的其中任一种,所述缓冲液浓度范围为10~200mmol/L。

[0020] 根据本发明的一方面,本发明提供的试剂盒中包含肝素结合蛋白标准品和质控品,本发明的肝素结合蛋白的标准品为一系列低值浓度到高值浓度的HBP 抗原溶液,浓度范围从0到240ng/mL,用于建立测试所需要的定标曲线。

[0021] 根据本发明的另一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,该方法使用上述任意一种配方组成肝素结合蛋白检测试剂盒,本试剂盒制备方法中HBP抗体标记的胶乳微粒标记抗体的方法为中间酯法、一步法、两步法或物理吸附法中的任意一种。

[0022] 根据本发明的另一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,中间酯法为使用碳化二亚胺类和琥珀酰亚胺酯催化剂活化胶乳微粒表面的羧基,形成表面带有琥珀酰亚胺酯中间体的胶乳微粒,再加入HBP抗体,HBP抗体表面的氨基与胶乳微粒表面的琥珀酰亚胺酯缩合,即完成HBP抗体标记过程。

[0023] 根据本发明的另一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,一步法为把HBP抗体先同胶乳微粒混合,HBP抗体吸附在胶乳微粒表面,然后加入碳化二亚胺类催化剂,HBP抗体表面的羧基或氨基与聚苯乙烯胶乳微粒表面的羧基或氨基缩合,完成HBP抗体标记过程。

[0024] 根据本发明的另一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,二步

法为使用碳化二亚胺类催化剂活化胶乳微粒表面的羧基,然后加入HBP 抗体,二者的氨基和羧基直接缩合,完成HBP抗体标记过程。

[0025] 根据本发明的另一方面,提供了一种肝素结合蛋白检测试剂盒的制备方法,物理吸附法为使用不带任何表面活性基团的聚苯乙烯微粒,然后加入HBP 抗体,HBP抗体吸附在聚苯乙烯微粒表面,完成HBP抗体标记过程。

[0026] 根据本发明的还有一方面,提供了一种采用双试剂的胶乳增强免疫比浊试剂检测肝素结合蛋白的方法,上述任一种肝素结合蛋白检测试剂盒,在生化分析仪或者特定蛋白分析仪上通过透射比浊或者散射比浊的方法来测定待测样品中的HBP含量。

[0027] 根据本发明的还有一方面,提供了一种采用双试剂的胶乳增强免疫比浊试剂检测肝素结合蛋白的方法,所使用的检测样品是6小时以内提取的新鲜血清或者血浆样本。

[0028] 检测样品时,本发明提供的试剂中胶乳微粒上的HBP抗体与样品中的 HBP抗原发生抗体抗原反应,从而使得胶乳逐渐凝聚,改变了测试液的浊度。浊度的变化可以通过透射仪或者散射仪来测定。一般地,在大型自动化的生化仪上采用透射比浊的方法,其优点是自动化程度高,线性范围广,重复性好。在特定蛋白分析仪等POCT设备上采用散射比浊的方法,具有检测速度快、灵敏度高等优点。透射的吸光度或者散射光强度与样品中的HBP浓度在一定浓度范围内成线性关系。通过参考HBP标准品建立的定标曲线,可以定量地计算出被测样品中HBP的浓度。

[0029] 本发明提供的肝素结合蛋白检测试剂盒,可以适应于各种透射仪或散射仪等设备。

[0030] 本发明的有益效果还包括:

1. 检测试剂的组成简单,操作步骤少。本发明提供的试剂盒只有双试剂,无需稀释抗原,不需要像市场上已有的进口ELISA试剂那样在测试时进行抗原稀释、多步清洗、加底物和终止液以及控制各步骤反应时间的操作,简化了测试程序,为操作人员带来极大的便利,同时也更好地保障了测试的精确性。

[0031] 2. 检测快速,本发明方法在小型POCT上1-3分钟左右即可以完成检测,在全自动生化分析仪上10-12分钟也能完成检测。而现有的ELISA方法需要3 到5小时完成检测。

[0032] 3. 试剂量程宽,线性范围广,可以不用稀释直接测量浓度高达240ng/mL 的样品,同时抗原浓度高达600ng/mL也不会出现钩状(Hook)效应。

[0033] 4. 试剂适用性好,可以在透射或者散射仪上使用。本发明所提供的胶乳增强免疫比浊法检测试剂盒既可以在全自动大型生化仪上使用,也可以在小型 POCT设备上使用。可以同时满足大型医院检验科、小型医院门诊、以及急诊科室的检测需要。

附图说明

[0034] 图1为实施例1、2和3在生化仪上的反应标准曲线;

图2为实施例4在POCT设备上的反应标准曲线;

图3为实施例5在POCT设备上的反应标准曲线;

图4为实施例1的线性范围;

图5为实施例4的线性范围;

图6为实施例9的钩状效应曲线;

图7为实施例10的相关性分析。

具体实施方式

[0035] 下面结合附图对本发明作进一步的说明。

[0036] 下述的实施例是为了进一步说明本发明的一些优选实施例,并非全部实施例。本领域专业人员在没有进行创造性劳动的前提下做出的基于本发明的其他实施例,都属于本发明的权利保护范围。

[0037] 实施例1

1) 单抗与多抗组合标记的胶乳试剂(333nm,反应液R2)的制备

中间酯法标记粒径为333nm的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳微粒(分类号P0323,厂家JSR Life Sciences Corporatiion)。将粒径为333nm表面羧基化的微粒在MES 缓冲溶液中稀释至1%,室温下搅拌。投入EDC和Sulfo-NHS固体粉末,搅拌 2小时后10000RPM离心20分钟。胶乳用MES缓冲溶液清洗两次后重悬,分成两份。一份加入HBP单克隆抗体,搅拌反应2小时,另一份加入HBP多克隆抗体,搅拌反应2小时。然后两份胶乳均在10000RPM离心20分钟,去掉上清液。两份沉淀的胶乳均在储存液中重悬并超声分散,分别搅拌1小时,再按下述比例混合HBP单抗标记的胶乳微粒和多抗标记的胶乳微粒。本例中反应液 R2包括胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂,其中HBP抗体标记的胶乳微粒浓度为0.15%,HBP单抗标记的胶乳微粒与多抗标记的胶乳微粒的质量比分别是2:8、3:7、4:6、5:5和4:6,缓冲溶液是50mM MES pH=6.5,稳定剂是0.5%牛血清白蛋白,防腐剂是0.1%ProClin 300,助悬剂是3%海藻糖,盐是2.7%氯化钠。

[0038] 2) 稀释液R1的配制

该试剂包括缓冲溶液、表面活性剂、盐和防腐剂,缓冲溶液是50mM MOPSO pH=7.0,0.1%ProClin 300,表面活性剂是0.5%曲拉通X-100,盐是0.9%氯化钠。

[0039] 3) 标准品的制备

将市售的HBP抗原用标准品稀释液配制成一系列标准品,浓度分别为0ng/mL, 5ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 240ng/mL,标准品稀释液的组成是50mM PBS pH7.4,0.1% Proclin 300,0.1%曲拉通X-100,1.8%氯化钠,1%牛血清白蛋白。

[0040] 4) 质控品的制备

将高浓度的HBP样品(80ng/mL)用标准品稀释液稀释成8ng/mL和40ng/mL,分别作为低值质控品和高值质控品。

[0041] 5) 在生化仪上建立定标曲线

将6个HBP标准品,浓度从0到240ng/mL,放于生化仪(本例中使用迈瑞全自动生化仪BS-400)中样品盘内,分别与配制的HBP稀释液R1和反应液R2反应,样本:R1:R2=10 μ l:160 μ l:40 μ l,进行检测,记录反应度,试剂参数设置完成和试剂位置放置正确后,生化分析仪自动完成吸取试剂和采样步骤,整个过程大约耗时10-12分钟。检测波长为700nm,采用两点终点法,反应时间300秒,计算两点反应度差值。根据浓度和反应度差值可以建立定标曲线。图1是实施例1中胶乳试剂建立的定标曲线。

[0042] 实施例2

1) 多抗标记的胶乳试剂(333nm,反应液R2)的制备

中间酯法标记粒径为333nm的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳微粒(分类号P0323, 厂家JSR Life Sciences Corporation)。将粒径为333nm表面羧基化的微粒在MES 缓冲溶液中稀释至1%, 室温下搅拌。投入EDC和Sulfo-NHS固体粉末, 搅拌 2小时后10000RPM离心20分钟。然后胶乳在10000RPM离心10分钟, 去掉上清液。沉淀的胶乳在储存液中重悬并超声分散, 搅拌1小时后备用。本例中反应液R2包括胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂, 其中HBP抗体标记的胶乳微粒浓度为0.15%, 缓冲溶液是50mM MES pH=6.5, 稳定剂是0.5%牛血清白蛋白, 防腐剂是0.1%ProClin 300, 助悬剂是3%海藻糖, 盐是2.7%氯化钠。

[0043] R1和校准品、质控品的配制以及检测过程与实施例1相同, 在迈瑞全自动生化仪BS-400上建立定标曲线。图1包括实施例2中胶乳试剂建立的定标曲线。

[0044] 实施例3

1) 一对单抗的胶乳试剂(333nm, 反应液R2)的制备

中间酯法标记粒径为333nm的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳微粒(分类号P0323, 厂家JSR Life Sciences Corporation)。将粒径为333nm表面羧基化的微粒在MES 缓冲溶液中稀释至1%, 室温下搅拌。投入EDC和Sulfo-NHS固体粉末, 搅拌 2小时后10000RPM离心20分钟。胶乳用MES缓冲溶液清洗两次后重悬, 分成两份。各加入HBP单克隆抗体, 搅拌反应2小时。然后两份胶乳均在10000RPM 离心20分钟, 去掉上清液。两份沉淀的胶乳均在储存液中重悬并超声分散, 分别搅拌1小时。本例中反应液R2包括胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂, 其中HBP抗体标记的胶乳微粒浓度为0.15%, 缓冲溶液是50mM MES pH=6.5, 稳定剂是0.5%牛血清白蛋白, 防腐剂是0.1%ProClin 300, 助悬剂是3%海藻糖, 盐是2.7%氯化钠。

[0045] R1和校准品、质控品的配制以及检测过程与实施例1相同, 在迈瑞全自动生化仪BS-400上建立定标曲线。图1包括实施例3中胶乳试剂建立的定标曲线。

[0046] 实施例4

1) 多抗标记胶乳试剂(198nm, 反应液R2)的制备

二步法标记198nm的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳微粒(分类号P0113, 厂家JSR Life Sciences Corporation)。将粒径为198nm表面羧基化的微粒在MES缓冲溶液中稀释至1%, 室温下搅拌。投入EDC固体粉末, 搅拌2小时后10000RPM 离心10分钟。胶乳用MES缓冲溶液清洗两次后重悬。加入HBP多克隆抗体, 搅拌反应2小时。然后胶乳在10000RPM离心10分钟, 去掉上清液。沉淀的胶乳在储存液中重悬并超声分散, 搅拌1小时后备用。本例中反应液R2包括胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂, 其中HBP抗体标记的胶乳微粒浓度为0.10%, 缓冲溶液是100mM Tris pH=7.4, 稳定剂是1%牛血清白蛋白, 防腐剂是0.1% ProClin 300, 助悬剂是1%蔗糖, 盐是3.0%氯化钾。

[0047] 2) 稀释液R1的配制

该试剂包括缓冲溶液、表面活性剂、盐、稳定剂和防腐剂, 缓冲溶液是100mM PBS pH=7.4, 防腐剂是0.1%ProClin 300, 表面活性剂是0.1%SDS和0.1%NP-40的组合, 盐是1.2%氯化钠。

[0048] 3) 标准品的制备

将市售的HBP抗原用标准品稀释液配制成一系列标准品, 浓度分别为0ng/mL, 5ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 240ng/mL, 标准品稀释液的组成成分是 50mM PBS pH7.4,

0.1%Proclin 300,0.1%曲拉通X-100,1.8%氯化钠,1%牛血清白蛋白。

[0049] 4) 质控品的制备

将高浓度的HBP样品(80ng/mL)用标准品稀释液稀释成8ng/mL和40ng/mL,分别作为低值质控品和高值质控品。

[0050] 5) 在小型POCT上建立定标曲线

将6个HBP标准品,浓度从0到240ng/mL,分别与稀释液R1直接混合后,放于POCT的测试孔中(本例中使用劳拉电子半自动特定蛋白分析仪EZ-400),最后加入HBP抗体标记的胶乳微粒所组成的反应液R2,进行检测,样本:R1: R2=10 μ l:160 μ l:40 μ l,记录反应度。检测波长为650nm,采用两点速率法,反应时间180秒,计算两点反应度差值。根据浓度和反应度差值可以建立定标曲线。图2是实施例4中胶乳试剂建立的定标曲线。

[0051] 实施例5

1) 一对单抗标记的胶乳试剂(210nm,反应液R2)的制备

物理吸附法标记210nm的聚苯乙烯胶乳微粒(分类号PS02N,厂家Bangs Laboratories)。将粒径为210nm的微粒在PBS缓冲溶液中稀释至1%,室温下搅拌。加入一对HBP单克隆抗体,搅拌反应2小时。然后胶乳在10000RPM离心10分钟,去掉上清液。沉淀的胶乳在储存液中重悬并超声分散,搅拌1小时后备用。本例中反应液R2包括胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂,其中胶乳微粒浓度为0.10%,缓冲溶液是100mM PBS pH=7.4,稳定剂是2%牛血清白蛋白,防腐剂是0.1%ProClin 300,助悬剂是4%海藻糖,盐是1.8%氯化钠。

[0052] 2) 稀释液R1的配制

该试剂包括缓冲溶液、表面活性剂、盐、稳定剂和防腐剂,缓冲溶液是100mM PBS pH=7.4,防腐剂是0.1%ProClin 300,表面活性剂是0.1%吐温20,盐是1.8%氯化钠。

[0053] 3) 标准品的制备

将市售的HBP抗原用标准品稀释液配制成一系列标准品,浓度分别为0ng/mL, 5ng/mL, 20ng/mL, 50ng/mL, 100ng/mL, 240ng/mL,标准品稀释液的组成是50mM PBS pH7.4,0.1% Proclin 300,0.1%曲拉通X-100,1.8%氯化钠,1%牛血清白蛋白。

[0054] 4) 质控品的制备

将高浓度的HBP样品(80ng/mL)用标准品稀释液稀释成8ng/mL和40ng/mL,分别作为低值质控品和高值质控品。

[0055] 5) 在小型POCT上建立定标曲线

将6个HBP标准品,浓度从0到240ng/mL,分别与稀释液R1直接混合后,放于POCT的测试孔中(本例中使用劳拉电子半自动特定蛋白分析仪EZ-400),最后加入HBP抗体标记的胶乳微粒所组成的反应液R2,进行检测,样本:R1: R2=10 μ l:160 μ l:40 μ l,记录反应度。检测波长为650nm,采用两点速率法,反应时间180秒,计算两点反应度差值。根据浓度和反应度差值可以建立定标曲线。图3是实施例5中胶乳试剂建立的定标曲线。

[0056] 实施例6

试剂的分析灵敏度(空白限)

使用实施例1(HBP单抗标记的胶乳微粒微粒与多抗标记的胶乳微粒的质量比是5:5)、2和3中的试剂,选用零值标准品作为空白样本测试,在全自动生化分析仪(迈瑞BS-400)上,

温度37℃,700nm波长,1cm光径条件下,测试吸光度值。重复测试20次,根据图1建立的标准曲线,计算20次测试结果的平均值(\bar{x})和标准差(SD), $\bar{x} + 2SD$ 作为试剂的分析灵敏度(空白限)。3组测试结果如表1所示,显示分析灵敏度分别为2.745、3.353和 1.298ng/mL,证明单抗标记的胶乳试剂的灵敏度最高,在多抗标记的胶乳中加入单抗标记的胶乳可以提升试剂的灵敏度。肝素结合蛋白(HBP)的检测临床参考值在30ng/mL左右,本发明试剂的灵敏度比参考值要小一个数量级,完全符合使用的需要。

[0057] 表1. 实施例1、2和3的试剂分析灵敏度测试结果

组别	实施例 1 (单抗与多抗标记胶乳质量比 5: 5)	实施例 2 (多抗标记的胶乳)	实施例 1 (一对单抗标记的胶乳)
测试序号	测定结果 (ng/mL)	测定结果 (ng/mL)	测定结果 (ng/mL)
1	0.51	2.99	0.8
2	1.13	1.21	0.7
3	1.36	2.19	0.31
4	1.00	1.58	0.16

5	1.45	0.26	0.41
6	2.20	1.01	0.55
7	0.44	2.59	0.74
8	1.38	0.32	0.86
9	0.31	2.99	0.78
10	1.37	1.51	0.88
11	0.76	0.48	0.45
12	0.95	1.82	0.86
13	1.36	0.57	0.76
14	1.68	1.67	1.47
15	1.43	1.21	1.22
16	1.16	0.2	0.41
17	1.07	1.43	0.41
18	1.23	2.08	0.36
19	1.09	2.27	0.33
20	1.92	2.66	0.36
平均值	1.2535	1.5520	0.6410
\bar{x} ()			
SD	0.7458	0.9003	0.3283
$\bar{x} + 2SD$	2.745	3.353	1.298

实施例7

试剂的线性范围

用零值HBP标准品稀释浓度240ng/mL的高浓度HBP标准品,分别制成 240ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、20ng/mL、5ng/mL、0ng/mL共6个不同的稀释浓度样本。使用实施例1(HBP单抗标记的胶乳微粒与多抗标记的胶乳微粒的质量比是6:4)和实施例4中制备的试剂分别对这些样本进行测试,每个稀释浓度测试3次,求出每个稀释浓度检测结果的均值。测量结果见表2。以稀释浓度为自变量,以检测结果均值为因变量求出线性回归方程,计算线性回归的相

关系数(r)。线性相关曲线见图4和图5。

[0058] 表2. 实施例1和实施例4的线性范围测量结果

组别	理论浓度 (ng/mL)	240	100	50	20	5	0
实施例 1 测试值	Y1	215.27	104.93	45.85	20.36	4.85	0.47
	Y2	257.98	93.88	45.37	18.60	4.95	1.01
	Y3	264.18	88.40	48.07	18.22	4.77	2.20
	均值	245.81	95.74	46.43	19.06	4.86	1.23
实施例 4 测试值	Y1	218.69	90.10	52.76	21.30	5.11	2.30
	Y2	267.14	107.59	52.32	21.72	5.39	1.55
	Y3	250.49	90.68	48.75	21.83	5.36	0.65
	均值	245.44	96.12	51.28	21.62	5.29	1.50

实施例8

试剂的重复性

用实施例2中制备的试剂测试HBP浓度为8ng/mL左右的正常值水平的控制物质和HBP浓度为40ng/mL左右的异常值水平的控制物质,各重复测试10次,计算测量值的平均值(\bar{x})和标准差(SD)。按式(1)计算变异系数(CV)。测试结果见表3。根据测量结果,计算出变异系数CV=7.66%和4.32%,符合试剂CV≤10%的技术要求。

$$[0059] \quad CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

CV——变异系数;

SD——标准差;

\bar{x} ——测量值的平均值。

[0060] 表3. 实施例2的重复性测量结果

实施例 2	正常值 8ng/mL	异常值 40ng/mL
测定序号	测定结果	测定结果
1	9.35	40.82
2	8.47	42.76
3	7.32	41.43
4	7.90	42.04
5	8.84	39.35
6	8.05	38.97
7	9.26	38.78
8	8.81	43.02
9	8.86	38.40
10	8.04	42.20
\bar{x} 平均值 ()	8.490	40.777
SD	0.6505	1.7623
CV	7.66%	4.32%

用实施例1中制备的5组试剂测试HBP浓度为8ng/mL左右的正常值水平的控制物质和HBP浓度为40ng/mL左右的异常值水平的控制物质,各重复测试10次,计算测量值的平均值(\bar{x})和标准差(SD)。按式(1)计算变异系数(CV)。测试结果见表4和表5。根据测量结果,计算出HBP浓度为8ng/mL的控制物质的变异系数分别为CV=10.39%、12.06%、8.44%、7.98%和6.44%;HBP浓度为40ng/mL的控制物质的变异系数分别为CV=5.12%、5.42%、5.27%、4.14%和3.42%,结果表明单抗与多抗标记胶乳质量比为2:8和3:7时不符合试剂CV≤10%的技术要求,单抗与多抗标记胶乳质量比为4:6、5:5和6:4时,符合试剂CV≤10%的技术要求。

[0061] 表4. 实施例1的重复性测量结果(质控浓度8ng/mL)

实施例 1(质控浓度 8ng/mL)	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5
测定序号	单抗与多抗标记胶乳质量比 2: 8	单抗与多抗标记胶乳质量比 3: 7	单抗与多抗标记胶乳质量比 4: 6	单抗与多抗标记胶乳质量比 5: 5	单抗与多抗标记胶乳质量比 6: 4
1	6.46	6.67	8.81	8.96	8.05
2	7.10	8.62	8.70	8.46	9.05
3	7.46	8.81	7.46	7.69	8.29
4	6.26	7.32	8.17	8.83	8.70
5	7.00	6.74	7.39	8.74	8.97
6	6.53	7.88	7.71	9.29	7.69
7	6.81	8.87	8.91	8.13	8.02
8	8.62	7.05	7.40	7.10	9.01
9	8.07	8.46	8.22	9.08	9.18
10	7.50	6.62	9.25	8.33	9.20
平均值	7.181	7.704	8.202	8.461	8.616
\bar{x} ()					
SD	0.7461	0.9293	0.6923	0.6755	0.5552
CV	10.39%	12.06%	8.44%	7.98%	6.44%

表5. 实施例1的重复性测量结果(质控浓度40ng/mL)

实施例 1(质控 浓度 40ng/mL)	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5
测定序号	单抗与多 抗标记胶 乳质量比 2: 8	单抗与多 抗标记胶 乳质量比 3: 7	单抗与多 抗标记胶 乳质量比 4: 6	单抗与多 抗标记胶 乳质量比 5: 5	单抗与多 抗标记胶 乳质量比 6: 4
1	41.95	38.39	39.05	41.87	40.56
2	43.06	43.64	40.90	38.83	41.65
3	39.31	41.76	39.58	43.71	42.2
4	41.06	42.51	43.76	38.95	39.64
5	38.43	40.19	41.58	39.24	40.16
6	37.66	37.43	37.50	38.87	39.35
7	43.59	38.74	39.39	40.07	42.2
8	39.23	43.51	37.83	40.57	38.6
9	38.70	39.97	37.26	41.05	42.83
10	41.73	39.23	37.93	42.32	40.65
平 均 值 \bar{x} ()	40.472	40.537	39.478	40.548	40.784
SD	2.0721	2.1984	2.0796	1.6799	1.3960
CV	5.12%	5.42%	5.27%	4.14%	3.42%

实施例9

钩状 (Hook) 效应

将市售的HBP抗原用标准品稀释液配制成一系列浓度的抗原溶液,浓度分别为 240ng/mL, 3000ng/mL, 400ng/mL, 500ng/mL, 600ng/mL, 700ng/mL, 800ng/mL, 900ng/mL, 1000ng/mL。图6是实施例9中反应度随抗原浓度的变化关系。本发明提供的胶乳增强免疫比浊试剂盒在600ng/mL时不出现Hook效应。图6为实施例9的钩状效应曲线。

[0062] 实施例10

与进口ELISA试剂盒的相关性分析

在本实施例中,我们收集了264个临床血清或血浆样本,采用实施例2中的试剂和POCT

设备进行检测,检测结果与市场上的进口试剂盒的检测结果进行了相关性分析。分析结果如图7所示。相关性直线拟合的结果显示拟合方程为 $y=0.968x+0.5102$,其中Y轴截距为0.5102,斜率为0.968,相关系数 $R=0.9817$ 。这个结果表明本发明中的试剂盒和进口上市试剂盒相关性高,准确性非常一致。如图7所示相关性分析图。

[0063]

实施例11

与市场上其他试剂盒的性能参数对比

本发明试剂与市场上其他HBP试剂盒的性能参数对比情况如表6所列。从表中可以看出,本发明的盒试剂主要在检测样本类型、需要的试剂数量和种类、试剂的线性范围、试剂的检测速度和精密度方面明显优于市场上的对比试剂盒。

[0064] 表6.HBP试剂盒性能参数对比

试剂盒来源	本发明试剂盒	进口上市试剂盒
测试方法	胶乳增强免疫比浊法	酶联免疫法 (ELISA)
样本类型	新鲜血清和血浆	新鲜血清和血浆
试剂类型	液体	板条和液体试剂
试剂数量	2	6
试剂种类	稀释液 R1 和反应液 R2	抗体标记的聚苯乙烯板条、抗原稀释液、酶标抗体溶液、底物溶液、终止液
线性范围	0-240ng/mL	0-200ng/mL
检测耗时	POCT 1-3min; 生化分析仪 10-12min	3-5 小时
精密度	≤10%	≤15%
是否需要配备抗原稀释液	否	是
是否配备标准品和质控品	是, 6 个浓度标准品和 2 个浓度质控品	是, 6 个浓度标准品和 3 个浓度质控品
有效期	12 个月	12 个月

以上所述的仅是本发明的一些实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的创造构思的前提下,还可以做出其它变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

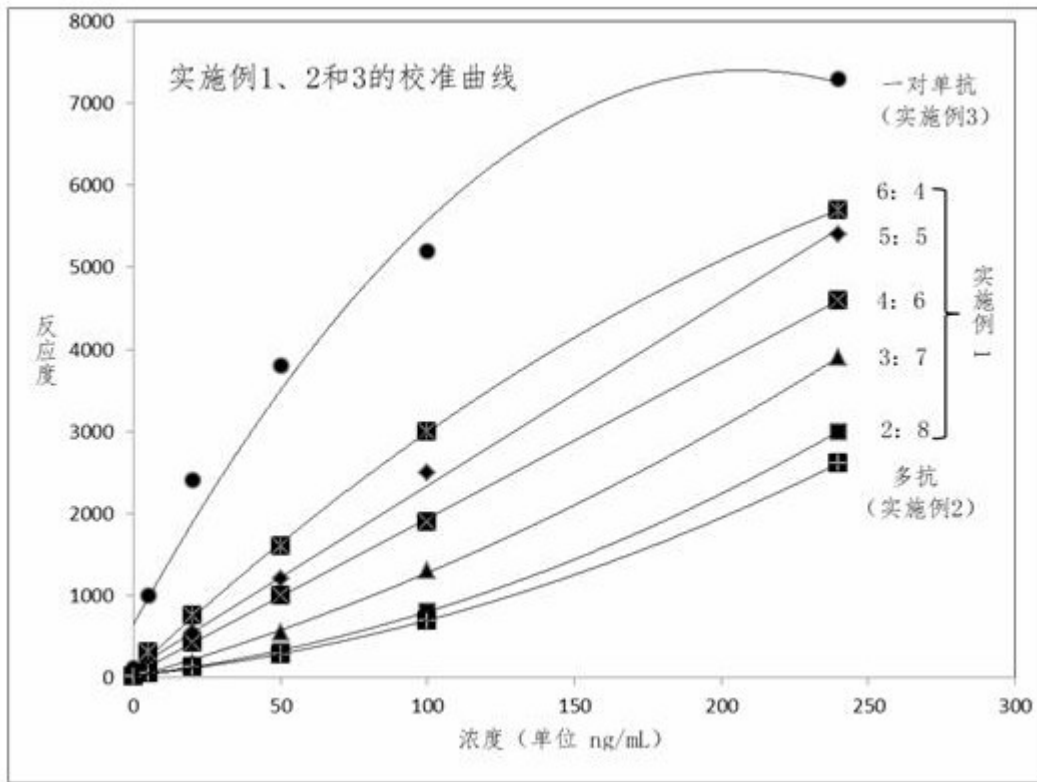


图1

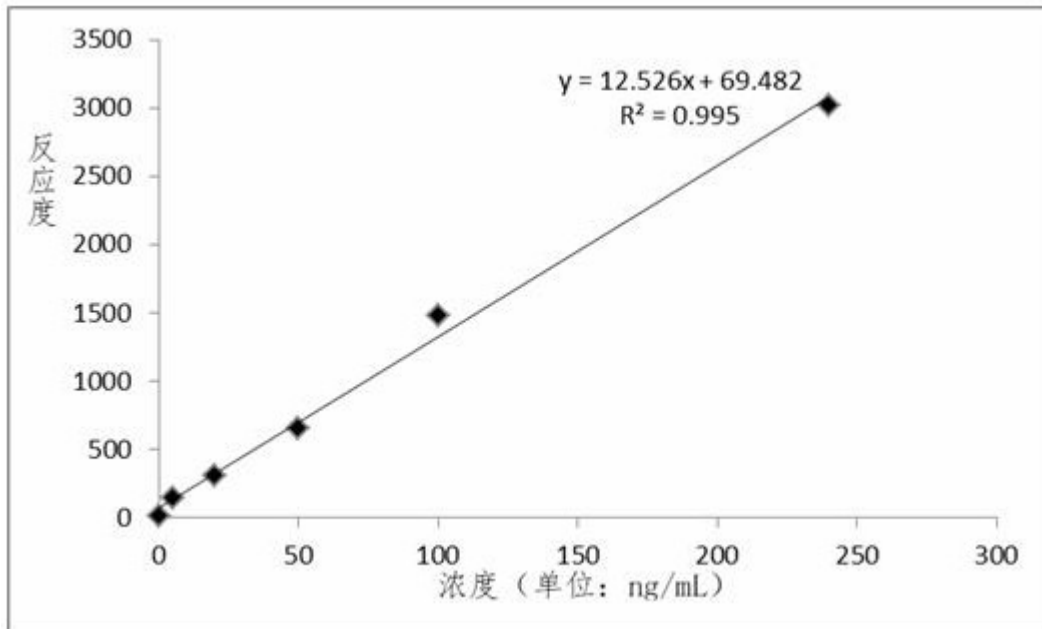


图2

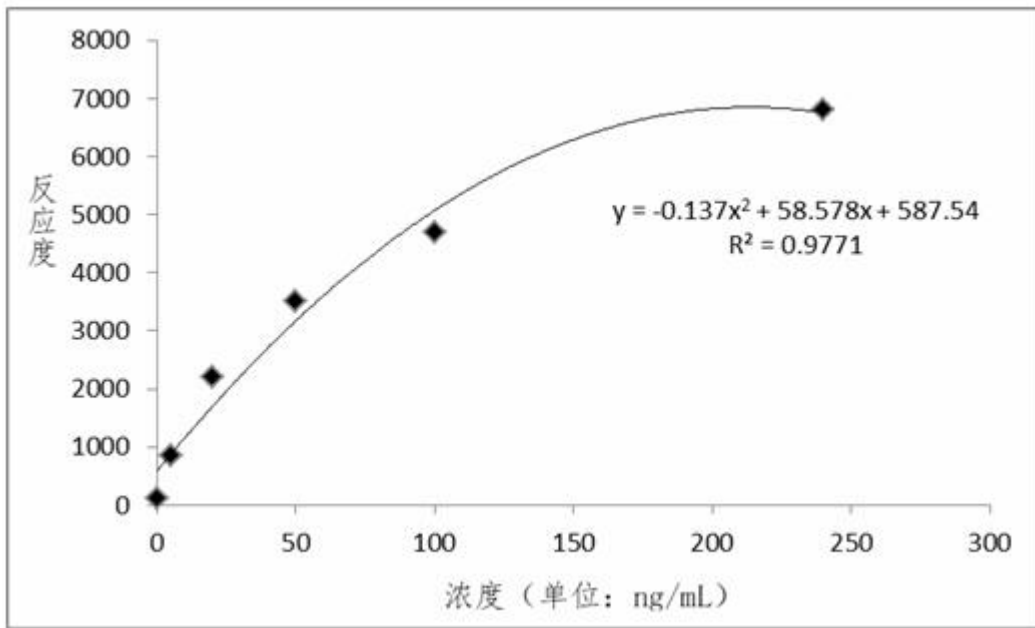


图3

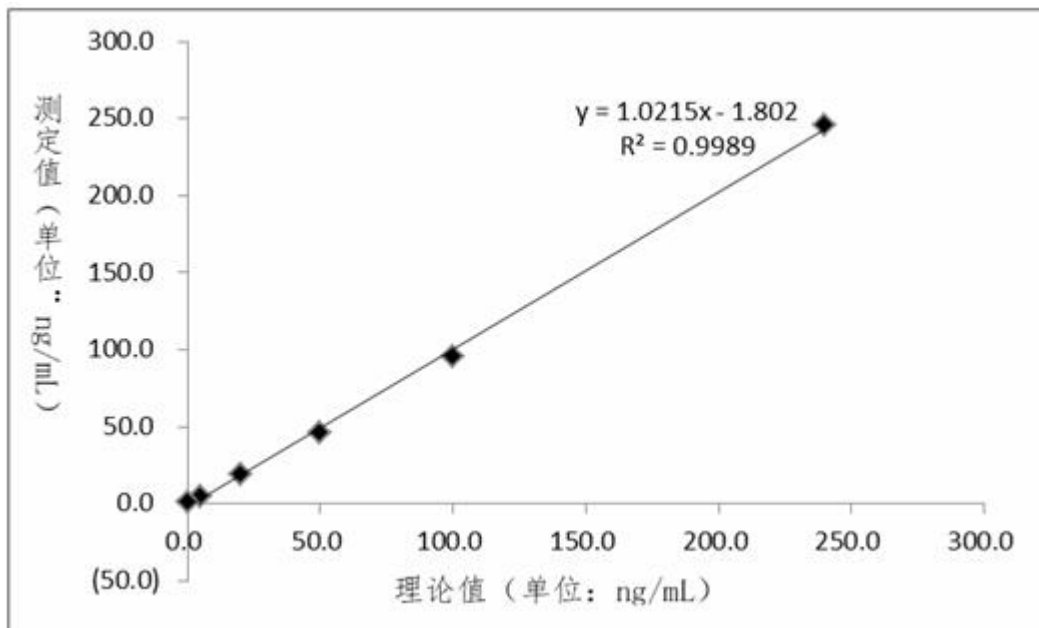


图4

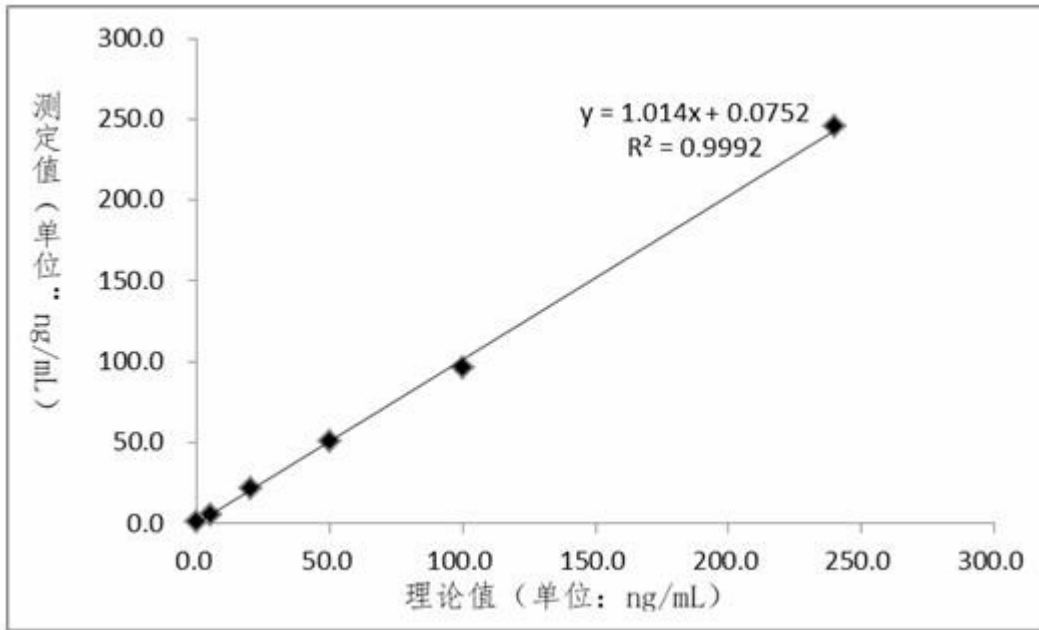


图5

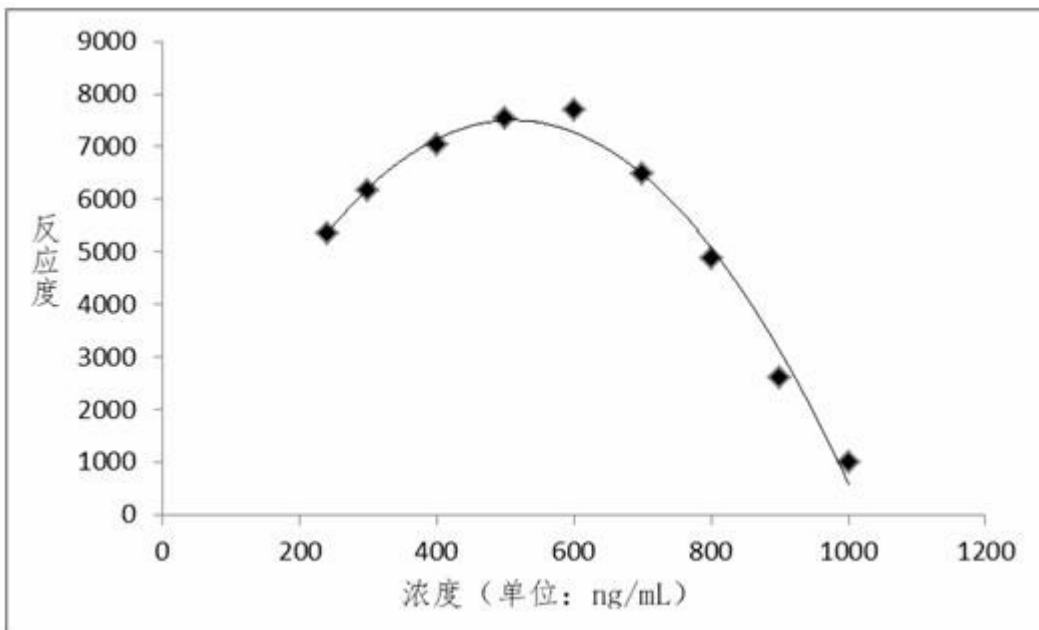


图6

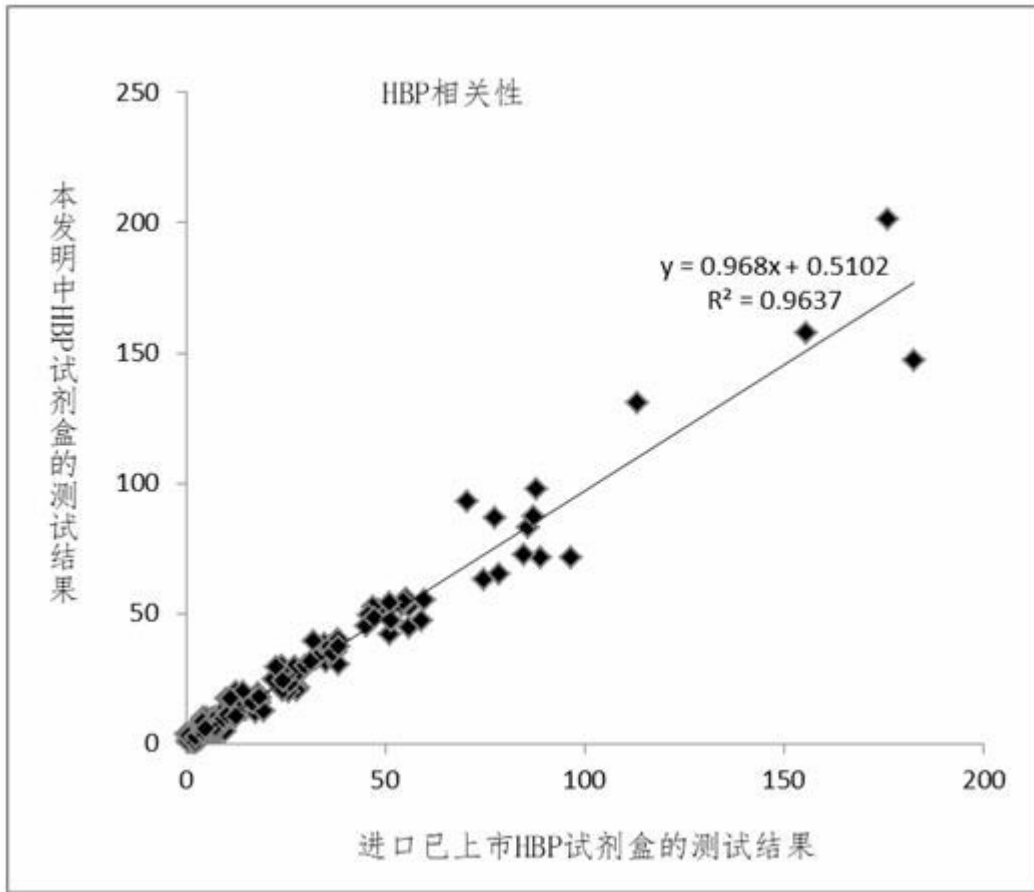


图7

专利名称(译)	肝素结合蛋白检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN108152512A	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN2017111412733.6	申请日	2017-12-25
[标]发明人	陈胜胜 刘向晖 王明		
发明人	陈胜胜 刘向晖 王明		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了肝素结合蛋白 (HBP-Heparin Binding Protein) 的检测试剂盒及其制备方法, 该试剂盒为胶乳增强免疫比浊检测试剂。该胶乳增强免疫比浊试剂盒的主要成分是含有缓冲溶液、表面活性剂、盐和防腐剂的稀释液R1以及含有HBP抗体标记的胶乳微粒、缓冲溶液、盐、稳定剂、助悬剂和防腐剂的反应液R2, 以及HBP校准品和质控品。本发明还公开了使用该试剂盒利用透射或者散射比浊原理检测血样中肝素结合蛋白 (HBP) 的浓度的方法。本发明采用双试剂, 操作简单, 灵敏度高, 线性范围广, 可以广泛应用于各种透射或者散射分析仪, 包括普通生化分析仪、特定蛋白分析仪等。

