



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956998 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810318917.4

(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 王涛 洪龙斌 龚庆 姚静岚
潘慧慧 陈莹菲 刘文春 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 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

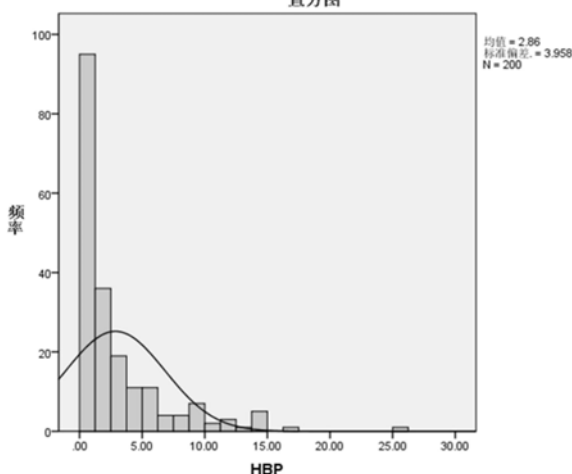
(54)发明名称

一种应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒及测定方法

(57)摘要

本发明涉及免疫测定技术领域,尤其涉及一种应用免疫荧光干式定量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。本发明使用免疫荧光干式定量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。

直方图



1. 一种应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒包括:检测反应板和检测缓冲液;

所述检测反应板包括:检测试纸条、滤血垫和吸水纸;

所述检测试纸条包括:包被有肝素结合蛋白单克隆抗体的硝酸纤维素膜和载膜底板;

所述检测缓冲液包括:荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体的溶液。

2. 根据权利要求1所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述检测试纸的硝酸纤维素膜上还包被有羊抗兔单克隆抗体;所述检测缓冲液中还包括荧光标记的兔单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述检测缓冲液的pH为7.2。

4. 根据权利要求1所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述检测缓冲溶液还包括:NaCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、PVP、BSA、吐温-20、叠氮钠、proclin300。

5. 根据权利要求4所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,所述检测缓冲溶液包括:8.00~60.00g/L NaCl、0.1~5.5 g/L Na₂HPO₄、0.1~5.5 g/L KH₂PO₄、0.5~5% PVP、0.5~5% BSA、0.05~1.0% 吐温-20、0.01~1.0% 叠氮钠、0.05~1.0% proclin300的溶液。

6. 一种应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,所述应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白的测定方法应用权利要求1-5中任意一项所述的肝素结合蛋白测定试剂盒。

7. 根据权利要求6所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,将待测样本与检测缓冲溶液混合均匀,检测缓冲溶液中的荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体与待测样本中的肝素结合蛋白抗原相结合,将混合后的检测缓冲溶液加至检测反应板的加样孔后,荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体与肝素结合蛋白抗原的结合物在检测试纸条的检测区被包被有肝素结合蛋白单克隆抗体的硝酸纤维素膜捕获,形成肝素结合蛋白单克隆抗体-肝素结合蛋白抗原-荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体的复合物,复合物的荧光抗体信号与肝素结合蛋白的浓度成正比,最后由免疫分析仪汇总分析计算得到样本中肝素结合蛋白抗原的浓度。

8. 根据权利要求7所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,在检测试纸的硝酸纤维素膜上包被有羊抗兔单克隆抗体,在检测缓冲液中添加荧光标记的兔单克隆抗体,检测缓冲溶液中的荧光标记的兔单克隆抗体被检测试纸上包被有羊抗兔单克隆抗体的硝酸纤维素膜捕获,形成羊抗兔单克隆抗体-荧光标记的兔单克隆抗体的复合物,该复合物的荧光标记信号作为试剂盒的内控指标,用于判断是否有足够的样本,层析过程是否正常。

9. 根据权利要求6所述的应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白的测定方法,其特征在于,所述肝素结合蛋白的测定方法的优选参数为:样本S为50 μl、检测缓冲液R为150 μl,检测缓冲液R+样本S的孵育时间为18 min,反应方法为免疫荧光法,反应温度为20~37℃,激发波长/接收波长为635 nm/680 nm。

一种应用免疫荧光干式定量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,尤其涉及一种应用免疫荧光干式定量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(systemicinflammatoryresponsesyndrome,SIRS),临床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,给临床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床广泛应用,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,在临床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。HBP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。Pduzzi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,目前在临床上应用较广,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,目前为实验室和临床应用;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床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,诱导血管内皮细胞反应应答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- α (Tumornecrosisfactoralpha, TNF- α) 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络系统,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- α 就扮演着促进炎症反应发生的重要角色。TNF- α 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- α 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] HBP在临床上的应用:

[0010] (1) HBP作为局部感染的诊断指标

[0011] HBP可以帮助诊断急性细菌性脑膜炎 (acute bacterial meningitis, ABM)。对HBP作为诊断指标的研究发现,当脑脊液中HBP水平超过20ng/mL时,诊断急性细菌性脑膜炎可以达到100%的敏感性和99.2%的特异性以及96.2%的阳性预测值和100%的阴性预测值,综合考量这4个指标,HBP显著高于以单核细胞数量或者白细胞数量作为判断标准得到的结果。鉴于上述突出特性,通过检测脑脊液中HBP水平可以提高区分细菌性和病毒性神经系统感染的准确性,有助于更早的采取适当的治疗措施。

[0012] HBP可以帮助诊断儿童尿道感染。采用32ng/mL U-HBP含量作为分界值,U-HBP作为判断尿路感染的敏感性和特异性分别为93.3%和90.3%,同时阴性预测值也达到98.3%,单 U-HBP的阳性预测值不太理想,只能达到70%,亚硝酸盐则在这方向能弥补它的不足。由此可见,U-HBP和亚硝酸盐结合起来将是一个很好的生化指标,通过这一指标可以判断病人是否需要抗生素治疗,以避免抗生素的滥用。

[0013] (2) HBP预测休克和循环衰竭的发生

[0014] HBP对感染致休克发生的预测:普通炎症患者血清中HBP水平与健康人血清中HBP的水平没有显著差异,但患有非脓毒性休克和脓毒性休克的患者血清中HBP水平要显著高于健康人,单脓毒性休克和非脓毒性秀和患者之间血清中HBP水平却没有显著性差异。因此,发生感染的病人的血中HBP水平不一定显著升高,但发生休克的病人HBP水平一定会显著升高。造成这一现象发生的原因与HBP改变血管通透性的特性密不可分,因为当HBP含量升高到一定程度极有可能导致休克的发生。

[0015] HBP对败血症中循环衰竭的预测:目前,临床上将HBP \geq 15ng/mL作为严重败血症的标志,其敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别可以达到87.1%、95.1%、88.4%以及94.5%;在以上指标中,肝素结合蛋白水平、IL-6水平、乳铁蛋白水平、CRP水平、白细胞数量等指标可能在某一项表现突出,但其它项却很低,甚至低至30%左右。严重败血症往往导致循环衰竭的发生,因此,在发热病人中,血液HBP含量的高低是预测病人是否会发展为循环衰竭优选指标。

[0016] (3) HBP可作为ICU病房中的监控指标

[0017] 鉴于HBP能预测休克和循环衰竭的发生,而严重的休克和循环衰竭常导致死亡,目前已有报道将HBP作为ICU病人的一项检测指标。HBP水平与病情严重性息息相关,进入ICU时血液中HBP含量较高的病人有更高的死亡风险。用15ng/mL的HBP作为判断标准时,纳入监测范围的病人中87% HBP水平都超过这一水平,而超过这一水平的病人绝大多数都伴随有严重败血症或者循环衰竭。这提示HBP可以作为ICU中严重败血症和循环衰竭的早期标志。HBP水平随着时间上升也是病情恶化的一种预兆。因此在ICU病房中进行持续的HBP水平检测可以帮助监控治疗效果,还能预测严重细菌感染病人的发展结果。这些特性凸显了HBP作为一种诊断工具的潜力。

[0018] 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。

[0019] 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

[0020] 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,基于免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒。

[0021] 为此,本发明的上述目的通过以下技术方案来实现:

[0022] 一种肝素结合蛋白测定试剂盒,所述肝素结合蛋白测定试剂盒包括:检测反应板和检测缓冲液;

[0023] 所述检测反应板包括:检测试纸条、滤血垫和吸水纸;

[0024] 所述检测试纸条包括:包被有肝素结合蛋白单克隆抗体的硝酸纤维素膜和载膜底板;

[0025] 所述检测缓冲液包括:荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体的溶液;

[0026] 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:

[0027] 优选地,所述检测缓冲液的pH为7.2。

[0028] 优选地,所述检测试纸的硝酸纤维素膜上还包被有羊抗兔单克隆抗体;所述检测缓冲液中还包括荧光标记的兔单克隆抗体。

[0029] 优选地,所述检测缓冲溶液还包括:NaCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、PVP、BSA、吐温-20、叠氮钠、proclin300。

[0030] 优选地,所述检测缓冲溶液包括:8.00~60.00g/L NaCl、0.1~5.5g/L Na₂HPO₄、0.1~5.5g/L KH₂PO₄、0.5~5%PVP、0.5~5%BSA、0.05~1.0%吐温-20、0.01~1.0%叠氮钠、0.05~1.0% proclin300的溶液。

[0031] 本发明还有一个目的在于,针对现有技术中存在的不足,提供一种肝素结合蛋白的测定方法。

[0032] 为此,本发明的上述目的通过以下技术方案来实现:

[0033] 一种肝素结合蛋白的测定方法,所述肝素结合蛋白的测定方法应用前面所述的肝素结合蛋白测定试剂盒。

[0034] 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:

[0035] 优选地,将待测样本与检测缓冲溶液混合均匀,检测缓冲溶液中的荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体与待测样本中的肝素结合蛋白抗原相结合,将混合后的检测缓冲溶液加至检测反应板的加样孔后,荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体与肝素结合蛋白抗原的结合物在检测试纸条的检测区被包被有肝素结合蛋白单克隆抗体的硝酸纤维素膜捕获,形成肝素结合蛋白单克隆抗体-肝素结合蛋白抗原-荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体的复合物,复合物的荧光抗体信号与肝素结合蛋白的浓度成正比,并由免疫分析仪分析计算得到样本中肝素结合蛋白抗原的浓度。

[0036] 优选地,在检测试纸的硝酸纤维素膜上包被有羊抗兔单克隆抗体,在检测缓冲液中添加荧光标记的兔单克隆抗体,检测缓冲溶液中的荧光标记的兔单克隆抗体被检测试纸上包被有羊抗兔单克隆抗体的硝酸纤维素膜捕获,形成羊抗兔单克隆抗体-荧光标记的兔单克隆抗体的复合物,该复合物的荧光标记信号作为试剂盒的内控指标,用于判断是否有足够的样本,层析过程是否正常。

[0037] 优选地,所述肝素结合蛋白的测定方法的优选参数为:样本S为50 μ l、检测缓冲液R为150 μ l,检测缓冲液R+样本S的孵育时间为18min,反应方法为免疫荧光法,反应温度为37 $^{\circ}$ C,主波长为650nm。

[0038] 上述推荐参数,请参考免疫分析仪使用说明书。

[0039] 按样本类型排序放置于不同的试管架上,在仪器触摸屏上,输入、更改(或默认)检测信息,仪器自动进样扫描、摇匀穿刺、混匀稀释液和样本、加样孵育、检测判读、输出结果。

[0040] 计算方法:仪器读取产品配套的二维码,获取产品的曲线信息。再将样本测定的吸光度变化值按曲线公式进行计算,即可得出样本中肝素结合蛋白的浓度。

[0041] 基本原理:

[0042] 免疫层析法(immunochromatography)是近几年来国外兴起的一种快速诊断技术,其原理是将特异的抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品(尿液或血清)后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体的区域时,样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合,若用免疫胶体金或免疫酶染

色可使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断。抗原、抗体反应后,直接测定反应板上的荧光信号强度,省却了ELISA法反复孵育和洗板等烦琐操作步骤,几分钟就能获得结果,省时省力。此外,配套的全自动免疫分析仪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。

[0043] 本发明的有益效果是:

[0044] 本发明使用免疫荧光干式定量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。

附图说明

[0045] 图1为200例健康体检人群的测试结果的直方图;

[0046] 图2为单样本的K-S检验结果图;

[0047] 图3为正态Q-Q图。

具体实施方式

[0048] 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。

[0049] 实施例1

[0050] 一种肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:检测反应板和检测缓冲液;

[0051] 检测反应板包括:检测试纸条、滤血垫和吸水纸;

[0052] 检测试纸条包括:包被有肝素结合蛋白单克隆抗体、羊抗兔单克隆抗体的硝酸纤维素膜和载膜底板;

[0053] 检测缓冲溶液包括:8.00g/L NaCl、0.1g/L Na₂HP04、0.1g/L KH₂P04、0.5%wt PVP、0.5%wt BSA、0.05%wt吐温-20、0.01%wt叠氮钠、0.05%wt proclin300、0.0008mg/mL荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体和0.00005mg/mL荧光标记的兔单克隆抗体的溶液;检测缓冲液的pH为7.2。

[0054] 实施例2

[0055] 一种肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:检测反应板和检测缓冲液;

[0056] 检测反应板包括:检测试纸条、滤血垫和吸水纸;

[0057] 检测试纸条包括:包被有肝素结合蛋白单克隆抗体、羊抗兔单克隆抗体的硝酸纤维素膜和载膜底板;

[0058] 检测缓冲溶液包括:60.00g/L NaCl、5.5g/L Na₂HP04、5.5g/L KH₂P04、5%wt PVP、5% wt BSA、1.0%wt吐温-20、1.0%wt叠氮钠、1.0%wt proclin300的溶液、0.0015荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体和0.00015mg/mL荧光标记的兔单克隆抗体;检测缓冲液的pH

为 7.2。

[0059] 实施例3

[0060] 一种肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:检测反应板和检测缓冲液;

[0061] 检测反应板包括:检测试纸条、滤血垫和吸水纸;

[0062] 检测试纸条包括:包被有肝素结合蛋白单克隆抗体、羊抗兔单克隆抗体的硝酸纤维素膜和载膜底板;

[0063] 检测缓冲溶液包括:30.00g/L NaCl、2.75g/L Na₂HP04、0.75g/L KH₂P04、2.5%wt PVP、2.5%wt BSA、0.5%wt吐温-20、0.5%wt叠氮钠、0.5%wt proclin300的溶液、0.0010mg/mL 荧光标记的肝素结合蛋白单克隆抗体和0.00010mg/mL荧光标记的兔单克隆抗体;检测缓冲液的pH为7.2。

[0064] 实施例4

[0065] 1、准备材料

[0066] Jet-iStar 3000全自动免疫分析仪、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、无抗凝采血管、EP管、反应杯、清洗液、一次性塑胶手套、试管架。

[0067] 2、样本采集

[0068] 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,转移到无抗凝采血管备用。

[0069] 3、技术路线

[0070] (1) 开机,检查检测反应板、检测缓冲液、清洗液是否足够,废液桶是否清空。

[0071] (2) 按样本类型排序放置于不同的试管架上,要求标本条码平整、裸露、便于仪器自动读码;未接实验室信息管理系统(LIS系统)的需要手动添加任务,按要求输入试管架类型、试管编号及检测项目。

[0072] (3) 在仪器触摸屏上,输入、更改(或默认)检测信息。

[0073] (4) 仪器自动进样扫描、摇匀穿刺、混匀稀释液和样本、加样孵育、检测判读、输出结果。

[0074] 实施例5

[0075] 根据实施例1和实施例2分别制备得到的应用免疫荧光干式定量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所制备得到的应用免疫荧光干式定量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所制备得到的应用免疫荧光干式定量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。

[0076] 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。

[0077] 表1

[0078]

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	3.42	HBPRI026	7.14	HBPRI051	1.00	HBPRI076	2.32
HBPRI002	0.40	HBPRI027	1.39	HBPRI052	1.90	HBPRI077	4.40
HBPRI003	0.60	HBPRI028	0.10	HBPRI053	0.74	HBPRI078	0.99
HBPRI004	1.06	HBPRI029	0.67	HBPRI054	2.11	HBPRI079	0.70
HBPRI005	7.47	HBPRI030	5.82	HBPRI055	4.20	HBPRI080	2.28
HBPRI006	1.41	HBPRI031	2.09	HBPRI056	1.04	HBPRI081	1.03
HBPRI007	1.36	HBPRI032	1.65	HBPRI057	1.47	HBPRI082	0.52
HBPRI008	11.29	HBPRI033	1.16	HBPRI058	1.63	HBPRI083	1.04
HBPRI009	5.95	HBPRI034	9.01	HBPRI059	0.95	HBPRI084	5.89
HBPRI010	4.84	HBPRI035	9.21	HBPRI060	1.01	HBPRI085	3.40
HBPRI011	0.99	HBPRI036	1.25	HBPRI061	1.04	HBPRI086	9.70
HBPRI012	2.02	HBPRI037	6.24	HBPRI062	6.75	HBPRI087	0.38
HBPRI013	14.77	HBPRI038	14.07	HBPRI063	0.98	HBPRI088	1.01
HBPRI014	3.82	HBPRI039	1.92	HBPRI064	0.97	HBPRI089	9.02
HBPRI015	0.48	HBPRI040	0.97	HBPRI065	1.05	HBPRI090	1.02
HBPRI016	0.40	HBPRI041	1.04	HBPRI066	0.63	HBPRI091	1.52
HBPRI017	18.06	HBPRI042	0.95	HBPRI067	0.10	HBPRI092	2.16
HBPRI018	12.19	HBPRI043	0.99	HBPRI068	4.80	HBPRI093	0.92
HBPRI019	3.15	HBPRI044	2.60	HBPRI069	0.78	HBPRI094	11.86
HBPRI020	0.21	HBPRI045	0.58	HBPRI070	1.49	HBPRI095	0.20
HBPRI021	0.21	HBPRI046	0.98	HBPRI071	0.97	HBPRI096	0.97
HBPRI022	9.21	HBPRI047	1.03	HBPRI072	0.99	HBPRI097	8.08
HBPRI023	1.36	HBPRI048	0.51	HBPRI073	0.40	HBPRI098	3.78
HBPRI024	1.03	HBPRI049	5.63	HBPRI074	4.13	HBPRI099	0.98
HBPRI025	3.19	HBPRI050	3.89	HBPRI075	0.97	HBPRI100	11.55

[0079] 表2

[0080]

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	1.07	HBPRI126	0.98	HBPRI151	0.21	HBPRI176	14.30
HBPRI102	9.77	HBPRI127	1.02	HBPRI152	0.21	HBPRI177	2.32
HBPRI103	1.58	HBPRI128	3.01	HBPRI153	1.12	HBPRI178	0.99
HBPRI104	1.29	HBPRI129	5.71	HBPRI154	2.99	HBPRI179	0.10
HBPRI105	1.76	HBPRI130	2.14	HBPRI155	1.18	HBPRI180	2.14
HBPRI106	2.88	HBPRI131	0.98	HBPRI156	26.73	HBPRI181	5.36
HBPRI107	3.07	HBPRI132	1.04	HBPRI157	0.48	HBPRI182	2.94
HBPRI108	0.97	HBPRI133	7.79	HBPRI158	0.10	HBPRI183	1.04
HBPRI109	0.41	HBPRI134	0.49	HBPRI159	0.98	HBPRI184	0.96
HBPRI110	0.98	HBPRI135	2.75	HBPRI160	7.97	HBPRI185	4.47
HBPRI111	0.21	HBPRI136	1.00	HBPRI161	5.30	HBPRI186	14.45
HBPRI112	0.10	HBPRI137	1.03	HBPRI162	11.98	HBPRI187	0.95
HBPRI113	0.97	HBPRI138	0.87	HBPRI163	3.23	HBPRI188	2.68
HBPRI114	2.81	HBPRI139	0.21	HBPRI164	0.97	HBPRI189	3.40
HBPRI115	1.65	HBPRI140	0.71	HBPRI165	13.62	HBPRI190	5.64
HBPRI116	1.71	HBPRI141	9.60	HBPRI166	0.10	HBPRI191	3.20
HBPRI117	1.01	HBPRI142	7.58	HBPRI167	0.10	HBPRI192	4.08
HBPRI118	5.00	HBPRI143	1.26	HBPRI168	4.44	HBPRI193	0.11
HBPRI119	1.43	HBPRI144	0.95	HBPRI169	1.41	HBPRI194	1.04
HBPRI120	1.46	HBPRI145	0.59	HBPRI170	0.97	HBPRI195	1.03
HBPRI121	0.93	HBPRI146	2.19	HBPRI171	2.00	HBPRI196	2.12
HBPRI122	1.71	HBPRI147	0.97	HBPRI172	6.94	HBPRI197	1.90
HBPRI123	1.05	HBPRI148	3.78	HBPRI173	0.95	HBPRI198	2.14
HBPRI124	3.96	HBPRI149	9.80	HBPRI174	6.04	HBPRI199	1.27
HBPRI125	3.33	HBPRI150	1.21	HBPRI175	1.02	HBPRI200	0.39

[0081] 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。

[0082] 表3

[0083]

N	有效	200
	缺失	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

[0084]	峰度	6.646
	峰度的标准误	.342
	百分位数 95	11.4000

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 表4

[0088]

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	

[0089] 表5

非参数法(百分位数法)				
[0090] 单侧95%参考上限	r		取整	参考值
		0.95 (200+1)	190.95	191

[0091] 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。

[0092] 实施例6

[0093] 根据实施例1和实施例2分别制备得到的应用免疫荧光干式定量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>11.4 ng/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所制备得到的应用免疫荧光干式定量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所制备得到的应用免疫荧光干式定量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:

[0094] 表6

[0095]

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	462.95
2	57	男	1-03 病区	脓毒症	23.75
3	81	男	1-13 病区	脓毒症, 脓毒症休克	147.21
4	62	女	1-03 病区	脓毒症	48.48
5	71	女	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	105.88
6	49	女	EICU 病区	脓毒症, 脓毒症休克	112.1
7	49	男	EICU 病区	脓毒症	15.58
8	56	男	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	89.56
9	57	男	5-5 东病区	脓毒症, 脓毒症休克	120.48
10	89	男	EICU 病区	脓毒症, 脓毒症休克	68.19
11	41	男	1-03 病区	脓毒症	33.86
12	31	女	1-20 病区	脓毒症, 脓毒症休克	35.86
13	54	女	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	120.02
14	68	男	1-03 病区	脓毒症	52.38
15	68	男	5-1 西病区	脓毒症	20.3
16	67	男	EICU 病区	脓毒症	18.61
17	65	女	1-22 病区	脓毒症, 脓毒症休克	274.94
18	56	男	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	160.92

[0096]

19	53	男	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	104.28
20	62	男	1-03 病区	脓毒症, 脓毒症休克	69.26

[0097] 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。

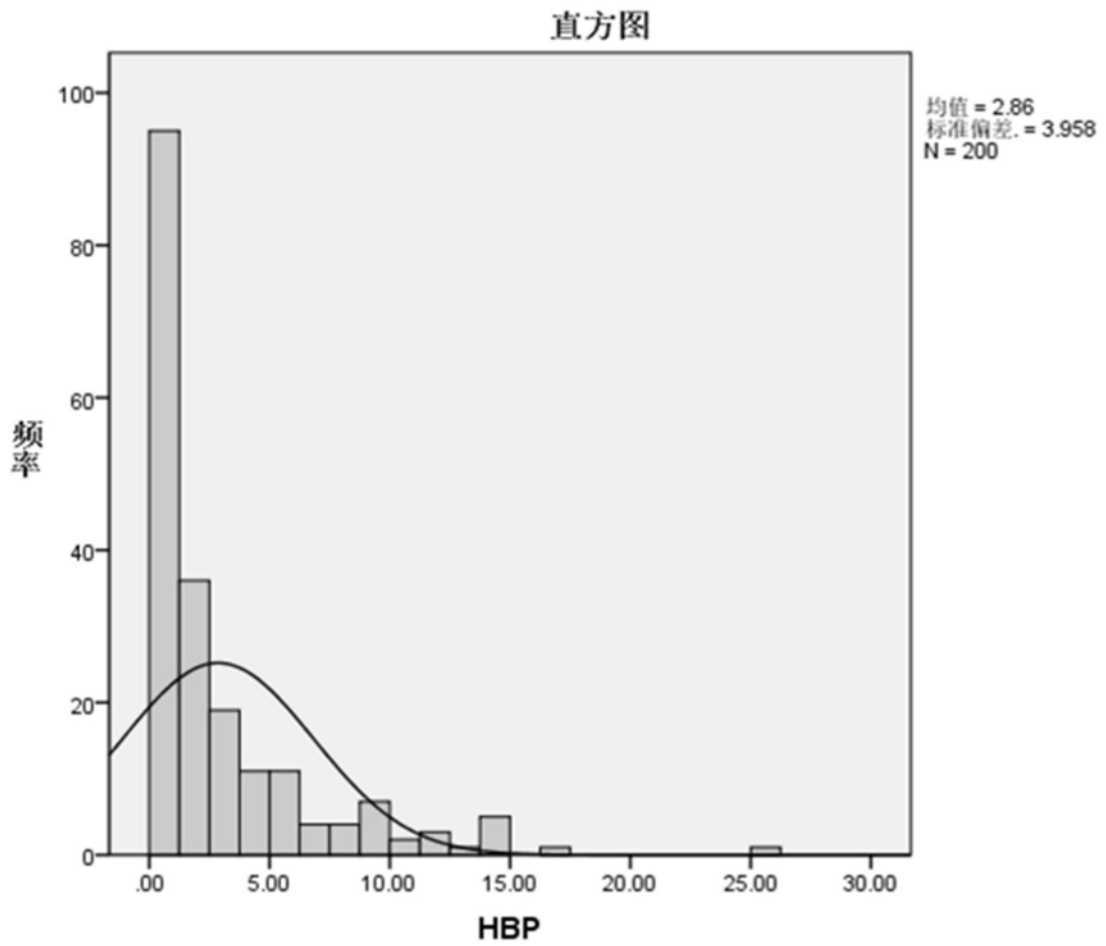
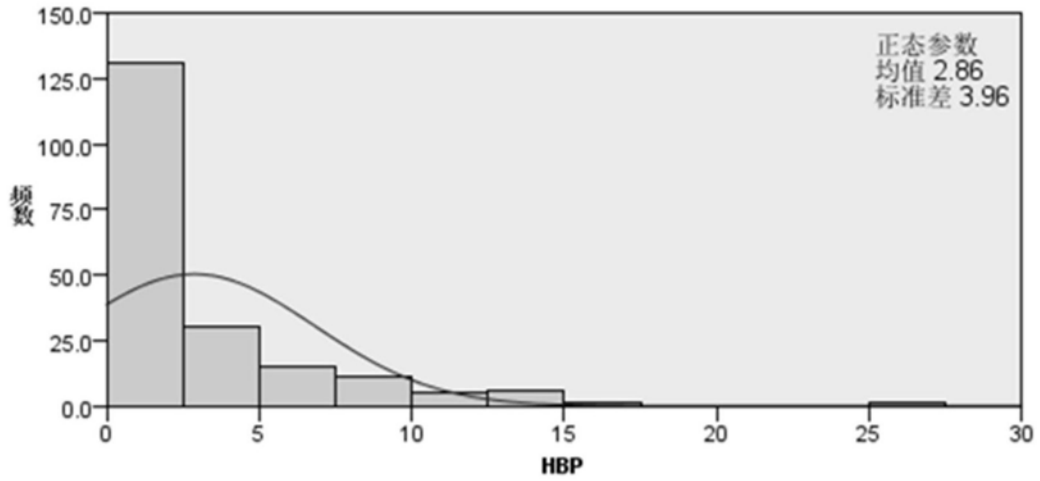


图1

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

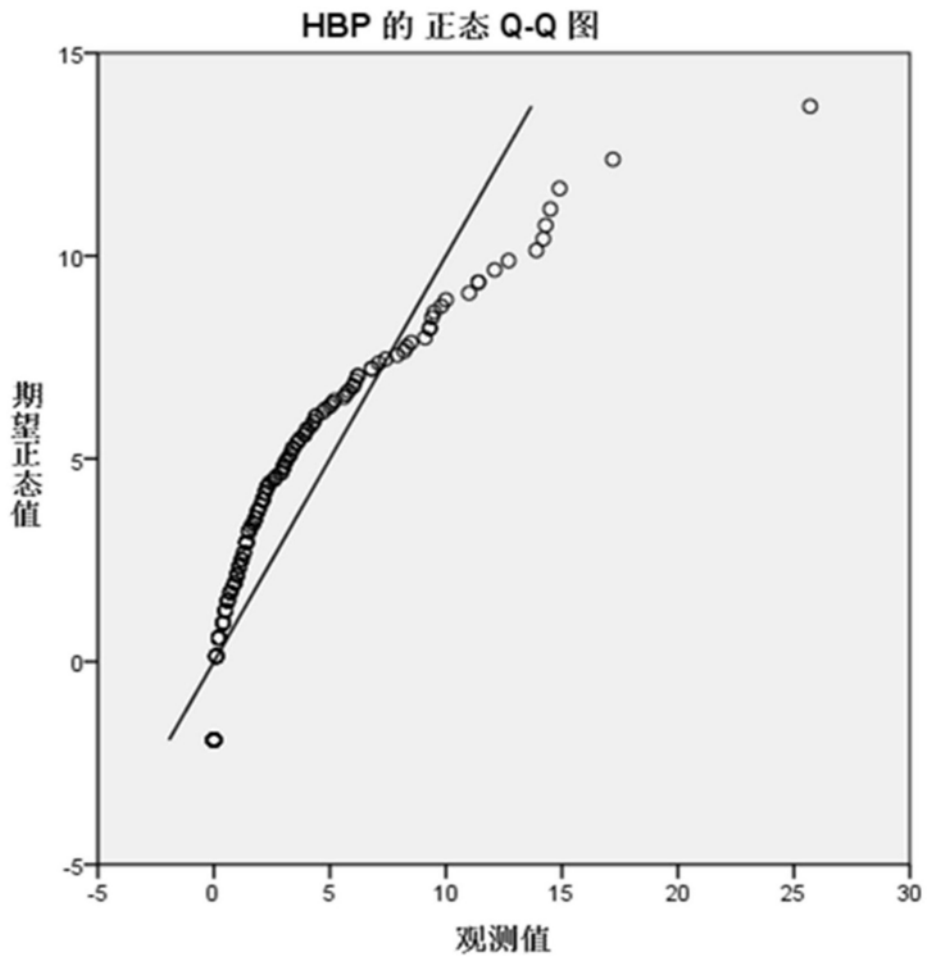


图3

专利名称(译)	一种应用免疫荧光干式定量法的肝素结合蛋白测定试剂盒及测定方法		
公开(公告)号	CN108956998A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810318917.4	申请日	2018-04-11
[标]发明人	王涛 洪龙斌 龚庆 姚静岚 潘慧慧 陈莹菲 刘文春 周旭一		
发明人	王涛 洪龙斌 龚庆 姚静岚 潘慧慧 陈莹菲 刘文春 周旭一		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N2333/47		
代理人(译)	刘晓春		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫测定技术领域，尤其涉及一种应用免疫荧光干式定量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。本发明使用免疫荧光干式定量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。

