



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572386 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610050605. 0

(22) 申请日 2016. 01. 26

(71) 申请人 河南生生医疗器械有限公司

地址 450046 河南省郑州市郑东新区金水东路南、东风东路东 1 幢东 1 单元 8 层 06 号

(72) 发明人 王嘎 程自卿 王辉武

(74) 专利代理机构 郑州先风专利代理有限公司
41127

代理人 黄伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

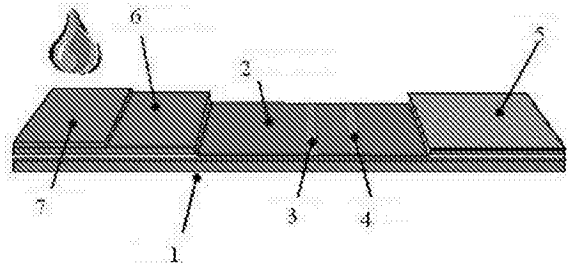
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

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

(57) 摘要

本发明涉及医疗用品技术领域,具体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/ μ 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 μ g/ μ l 荧光标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;试剂卡包括塑料垫板,塑料垫板上设置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上左右间隔设置检测线和质控线,检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜,质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸,玻璃纤维素膜上设置滤血膜;检测线上包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体;质控线上包被羊抗兔抗体。该试剂盒具有好的线性范围、灵敏度和准确度高。



1. 一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;

所述第一缓冲液为含有 $0.83\sim 2\text{ng}/\mu\text{l}$ 兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;所述第二缓冲液为含有 $0.05\sim 0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 荧光标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;

所述试剂卡包括试纸条,所述试纸条包括塑料垫板,塑料垫板上设置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上左右间隔设置检测线和质控线,检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜,质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸,玻璃纤维素膜上设置滤血膜;所述检测线上包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体;所述质控线上包被羊抗兔抗体。

2. 如权利要求1所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述试剂卡还包括外壳,所述外壳包括连接在一起的上盖和下盖,所述上盖上设置有血样孔和检测窗;所述血样孔的位置对应滤血膜的位置;所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中。

3. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述检测线上鼠抗人肝素结合蛋白抗体的包被量为 $0.2\sim 0.8\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

4. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述质控线上羊抗兔抗体的包被量为 $0.5\sim 1.4\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

5. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述荧光标记的鸡抗兔二抗为异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗。

6. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述检测线和质控线之间的间隔距离为 $5\text{mm}\sim 10\text{mm}$ 。

7. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述试纸条的宽度为 $3\sim 6\text{mm}$ 。

8. 如权利要求1或2所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液的 $\text{pH}=6.5\sim 7.3$,磷酸盐浓度为 $30\sim 80\text{mmol}/\text{L}$ 。

9. 如权利要求5所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,其特征在于,所述试剂盒的使用方法的操作步骤包括:

I:取不同浓度的肝素结合蛋白标准品加入到第一缓冲液中,然后再加入第二缓冲液,混合均匀后加入到试剂卡的滤血膜上,室温水平放置 $10\sim 15\text{min}$ 后,将试剂卡插入荧光免疫读数仪,设定激发光为 494nm ,发射光为 518nm ,读取不同浓度肝素结合蛋白标准品的荧光值,并将荧光值与肝素结合蛋白的标准品的浓度值进行线性分析,绘制荧光值和肝素结合蛋白浓度值标准曲线,得到荧光值和肝素结合蛋白浓度关系式;

II:取待测样品加入到第一缓冲液中,然后再加入第二缓冲液,混合均匀,加入到试剂卡的滤血膜上,室温水平放置 $10\sim 15\text{min}$,将试剂卡插入荧光免疫读数仪,设定激发光波长为 494nm ,发射光波长为 518nm ,读取待测样品的荧光值,将该荧光值带入步骤I得到的关系式中,计算得到待测样品肝素结合蛋白的浓度。

10. 一种如权利要求1所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下操作步骤:

1)制备第一缓冲液:取兔抗人肝素结合蛋白抗体加入磷酸盐缓冲液中,混合均匀,即得第一缓冲液;

2)制备第二缓冲液:取荧光标记的鸡抗兔二抗加入磷酸盐缓冲液中,混合均匀,即得第一缓冲液;

3)制备试剂卡:取硝酸纤维素膜,标记出检测线和质控线,然后在检测线上喷点包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体,在质控线上喷点包被羊抗兔抗体,然后将硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水纸、滤血膜依次搭接在塑料垫板上,并切割成所需宽度的试剂卡;

4)将步骤1)制备的第一缓冲液、步骤2)制备的第二缓冲液、步骤3)制备的试剂卡,组装,即得所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒。

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

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗用品技术领域,尤其涉及生物和医学检测用医疗用品技术领域,具体涉及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。

背景技术

[0002] 感染性疾病是一类对健康威胁比较严重的疾病,脓毒症和一些严重的感染性疾病已成为发病和死亡的主要原因。测定感染最常用的传统指标有:降钙素原、C反应蛋白、白细胞计数、中性粒细胞比、血沉、体温等,但这些指标都不同程度的存在滞后、敏感度低、特异性不高的缺陷。在感染性疾病的预防和治疗中,如果能及早准确的诊断,就可以及早的采取合理的应对措施,进而提高感染性疾病的治疗成功率。

[0003] 肝素结合蛋白(heparin-binding protein,HBP)是中性粒细胞来源的颗粒蛋白,是一个包含222个氨基酸的单链蛋白,当有细菌感染发生时,部分细菌侵入到血管中,细菌本身或细菌释放的毒素刺激中性粒细胞释放HBP,从而导致血中HBP含量升高。HBP与其它传统指标相比,除具有灵敏度高、特异性强、阳性/阴性检出率高之外,还具有出现早,只在急性细菌感染时浓度极度升高,而在病毒感染和非特异性炎症时保持较低的水平。因此,HBP作为临床新的炎症标志物,具有早期、高特异性、高灵敏度的特点,明显优于传统的标志物,在临床应用具有对病情的早期评估,预后评价,疗效观察等价值,同时可以指导抗生素的应用,减少抗生素的滥用,减少耐药菌的发生。因此,研究开发出一种快速、特异、敏感、准确的测定肝素结合蛋白的浓度,具有重大的临床应用价值和经济意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,该试剂盒能够快速、特异、灵敏、准确地测定肝素结合蛋白。

[0005] 同时,本发明的目的还在于提供一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法。

[0006] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:

[0007] 一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;

[0008] 所述第一缓冲液为含有 $0.83\sim 2\text{ng}/\mu\text{l}$ 兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;所述第二缓冲液为含有 $0.05\sim 0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 荧光标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;

[0009] 所述试剂卡包括试纸条,所述试纸条包括塑料垫板,塑料垫板上设置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上左右间隔设置检测线和质控线,检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜,质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸,玻璃纤维素膜上设置滤血膜;所述检测线上包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体;所述质控线上包被羊抗兔抗体。

[0010] 所述试剂卡还包括外壳,所述外壳包括连接在一起的上盖和下盖,所述上盖上设

置有血样孔和检测窗；所述血样孔的位置对应滤血膜的位置；所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置，使检测线和质控线处在检测窗中。

[0011] 所述检测线上鼠抗人肝素结合蛋白抗体的包被量为 $0.2\sim 0.8\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

[0012] 所述质控线上羊抗兔抗体的包被量为 $0.5\sim 1.4\mu\text{g}/\text{cm}$ 。

[0013] 所述荧光标记的鸡抗兔二抗为异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗。

[0014] 所述检测线和质控线之间的间隔距离为 $5\text{mm}\sim 10\text{mm}$ 。

[0015] 所述试纸条的宽度为 $3\text{mm}\sim 6\text{mm}$ 。

[0016] 所述磷酸盐缓冲液的 $\text{pH}=6.5\sim 7.3$ ，磷酸盐浓度为 $30\sim 80\text{mmol}/\text{L}$ 。

[0017] 所述试剂盒的使用方法包括以下操作步骤：

[0018] I：取不同浓度的肝素结合蛋白标准品加入到第一缓冲液中，然后再加入第二缓冲液，混合均匀后加入到试剂卡的滤血膜上，室温水平放置 $10\sim 15\text{min}$ 后，将试剂卡插入荧光免疫读数仪，设定激发光波长为 494nm ，发射光波长为 518nm ，读取不同浓度肝素结合蛋白标准品的荧光值，并将荧光值与肝素结合蛋白的标准品的浓度值进行线性分析，绘制荧光值和肝素结合蛋白浓度标准曲线，得到荧光值和肝素结合蛋白浓度关系式；

[0019] II：取待测样品加入到第一缓冲液中，然后再加入第二缓冲液，混合均匀，加入到试剂卡的滤血膜上，室温水平放置 $10\sim 15\text{min}$ ，将试剂卡插入荧光免疫读数仪，设定激发光波长为 494nm ，发射光波长为 518nm ，读取待测样品的荧光值，将该荧光值带入步骤I得到的关系式中，计算得到待测样品肝素结合蛋白的浓度。

[0020] 所述试剂盒储存在 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 环境下，在使用时首先将第一缓冲液在室温下平衡15分钟后再使用。

[0021] 上述免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法，包括以下操作步骤：

[0022] 1)制备第一缓冲液：取兔抗人肝素结合蛋白抗体加入磷酸盐缓冲液中，混合均匀，即得第一缓冲液；

[0023] 2)制备第二缓冲液：取荧光标记的鸡抗兔二抗加入磷酸盐缓冲液中，混合均匀，即得第二缓冲液；

[0024] 3)制备试剂卡：取硝酸纤维素膜，标记出检测线和质控线，然后在检测线上喷点包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体，在质控线上喷点包被羊抗兔抗体，然后将硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水纸、滤血膜依次搭接在塑料垫板上，并切割成所需宽度的试剂卡；

[0025] 4)将步骤1)制备的第一缓冲液、步骤2)制备的第二缓冲液、步骤3)制备的试剂卡，组装，即得所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒。

[0026] 本发明免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒，第一缓冲液中包括兔抗人肝素结合蛋白抗体，第二缓冲液中包括荧光标记的鸡抗兔二抗，试剂卡检测线上包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体，采用荧光免疫层析抗体夹心法的原理实现对血清中肝素结合蛋白浓度的检测。该试剂盒检测肝素结合蛋白具有好的线性范围，线性范围为 $1\sim 200\mu\text{g}/\text{L}$ ，线性相关系数 $R\geq 0.990$ ，阳性预测值范围 $\geq 11\mu\text{g}/\text{L}$ ；具有好的重复性，标准品重复测试所得结果的变异系数 $\text{CV}\leq 8\%$ ；具有好的准确度，标准品重复测试结果的相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

[0027] 本发明免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法，操作简便，易于控制，适于工业化推广应用。

附图说明：

[0028] 图1为本发明实施例1提供的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒中的试剂卡结构示意图；

[0029] 图2为本发明实施例1提供的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒外壳结构示意图。

具体实施方式

[0030] 下面通过具体实施例对本发明的技术方案进行详细说明。

[0031] 下述实施例中兔抗人肝素结合蛋白抗体购自Abnova,商品名为H00000566-K;异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗购自Abnova,商品名为PAB29109;鼠抗人肝素结合蛋白抗体购自Abnova,商品名为H00000566-B01P;肝素结合蛋白标准品购自Abnova。

[0032] 实施例1

[0033] 一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;

[0034] 所述第一缓冲液为含有1.5ng/ μ l兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;所述第二缓冲液为含有0.12 μ g/ μ l异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;其中磷酸盐缓冲液的pH=7.2,磷酸盐浓度为50mmol/L;

[0035] 所述试剂卡包括试纸条,所述试纸条如图1所示,宽度为5mm,包括塑料垫板1,塑料垫板上设置硝酸纤维素膜2,硝酸纤维素膜2上左右间隔7mm设置检测线3和质控线4,检测线3左侧硝酸纤维素膜2上设置玻璃纤维素膜5,质控线4右侧硝酸纤维素膜2上设置吸水纸6,玻璃纤维素膜5上设置滤血膜7;所述检测线上包被0.5 μ g/cm鼠抗人肝素结合蛋白抗体;所述质控线上包被1.0 μ g/cm羊抗兔抗体;

[0036] 所述试剂卡还包括外壳,所述试纸条放置于所述外壳内,如图2所示,所述外壳包括连接在一起的上盖和下盖,所述上盖上设置有血样孔8和检测窗9;所述血样孔8的位置对应滤血膜的位置;所述检测窗9的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中;所述外壳上盖检测窗右侧空白处可作为用于记录数据的记录面10。

[0037] 上述免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法,具体操作步骤为:

[0038] 1)制备第一缓冲液:取60 μ l,pH=7.2、磷酸盐浓度为50mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入90ng的兔抗人肝素结合蛋白抗体,混合均匀,即得第一缓冲液;

[0039] 2)制备第二缓冲液:取250 μ l,pH=7.2、磷酸盐浓度为50mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入30 μ g异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗,混合均匀,即得第二缓冲液;

[0040] 3)制备试剂卡:取硝酸纤维素膜,标记出检测线和质控线,然后在检测线上喷点包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体,在质控线上喷点包被羊抗兔抗体,然后将硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水纸、滤血膜依次搭接在塑料垫板上,并切割成所需宽度,然后装入由上盖和下盖连接在一起形成的外壳中,即得所述的试剂卡;其中外壳上盖上设置有血样孔和检测窗,所述血样孔的位置对应滤血膜的位置,所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中,所述外壳上盖检测窗右侧空白处可作为记录数据的记录面;

[0041] 4)将步骤1)制备的第一缓冲液、步骤2)制备的第二缓冲液、步骤3)制备的试剂卡, 组装,即得所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒。

[0042] 本实施例试剂盒储存在4~8℃环境下。

[0043] 实施例2

[0044] 一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;

[0045] 所述第一缓冲液为含有0.83ng/ μ l兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;所述第二缓冲液为含有0.05 μ g/ μ l异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;其中磷酸盐缓冲液的pH=6.5,磷酸盐浓度为80mmol/L;

[0046] 所述试剂卡包括试纸条,所述试纸条宽度为3mm,包括塑料垫板,塑料垫板上设置硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上左右间隔5mm设置检测线和质控线,检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜,质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸,玻璃纤维素膜上设置滤血膜;所述检测线上包被0.2 μ g/cm鼠抗人肝素结合蛋白抗体;所述质控线上包被0.5 μ g/cm羊抗兔抗体;

[0047] 所述试剂卡还包括外壳,所述试纸条放置与所述外壳内,所述外壳包括连接在一起的上盖和下盖,所述上盖上设置有血样孔和检测窗;所述血样孔的位置对应滤血膜的位置;所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中。

[0048] 上述免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法,具体操作步骤为:

[0049] 1)制备第一缓冲液:取60 μ l,pH=6.5、磷酸盐浓度为80mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入50ng的兔抗人肝素结合蛋白抗体,混合均匀,即得第一缓冲液;

[0050] 2)制备第二缓冲液:取250 μ l,pH=6.5、磷酸盐浓度为80mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入12.5 μ g异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗,混合均匀,即得第二缓冲液;

[0051] 3)制备试剂卡:取硝酸纤维素膜,标记出检测线和质控线,然后在检测线上喷点包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体,在质控线上喷点包被羊抗兔抗体,然后将硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水纸、滤血膜依次搭接在塑料垫板上,并切割成所需宽度,然后装入由上盖和下盖连接在一起形成的外壳中,即得所述的试剂卡;其中外壳上盖上设置有血样孔和检测窗,所述血样孔的位置对应滤血膜的位置,所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中,所述外壳上盖检测窗右侧空白处可作为记录数据的记录面;

[0052] 4)将步骤1)制备的第一缓冲液、步骤2)制备的第二缓冲液、步骤3)制备的试剂卡, 组装,即得所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒。

[0053] 本实施例试剂盒储存在4~8℃环境下。

[0054] 实施例3

[0055] 一种免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒,包括第一缓冲液、第二缓冲液和试剂卡;

[0056] 所述第一缓冲液为含有2ng/ μ l兔抗人肝素结合蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;所述第二缓冲液为含有0.2 μ g/ μ l异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液;其中磷酸盐缓冲液的pH=7.3,磷酸盐浓度为30mmol/L;

[0057] 所述试剂卡包括试纸条,所述试纸条宽度为6mm,包括塑料垫板,塑料垫板上设置

硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜上左右间隔10mm设置检测线和质控线,检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜,质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸,玻璃纤维素膜上设置滤血膜;所述检测线上包被0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 鼠抗人肝素结合蛋白抗体;所述质控线上包被1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}$ 羊抗兔抗体;

[0058] 所述试剂卡还包括外壳,所述试纸条放置在所述外壳内,所述外壳包括连接在一起的上盖和下盖,所述上盖上设置有血样孔和检测窗;所述血样孔的位置对应滤血膜的位置;所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中。

[0059] 上述免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的制备方法,具体操作步骤为:

[0060] 1)制备第一缓冲液:取60 μl ,pH=7.3、磷酸盐浓度为30mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入120ng的兔抗人肝素结合蛋白抗体,混合均匀,即得第一缓冲液;

[0061] 2)制备第二缓冲液:取250 μl ,pH=7.3、磷酸盐浓度为30mmol/L的磷酸盐缓冲液,加入50 μg 异硫氰酸荧光素标记的鸡抗兔二抗,混合均匀,即得第二缓冲液;

[0062] 3)制备试剂卡:取硝酸纤维素膜,标记出检测线和质控线,然后在检测线上喷点包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体,在质控线上喷点包被羊抗兔抗体,然后将硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、吸水纸、滤血膜依次搭接在塑料垫板上,并切割成所需宽度,然后装入由上盖和下盖连接在一起形成的外壳中,即得所述的试剂卡;其中外壳上盖上设置有血样孔和检测窗,所述血样孔的位置对应滤血膜的位置,所述检测窗的位置对应检测线和质控线的位置,使检测线和质控线处在检测窗中,所述外壳上盖检测窗右侧空白处可作为记录数据的记录面;

[0063] 4)将步骤1)制备的第一缓冲液、步骤2)制备的第二缓冲液、步骤3)制备的试剂卡,组装,即得所述的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒。

[0064] 本实施例试剂盒储存在4~8 $^{\circ}\text{C}$ 环境下。

[0065] 实施例4

[0066] 上述实施例1~3提供的免疫荧光层析法检测肝素结合蛋白用试剂盒的使用方法,具体操作步骤为:

[0067] I:肝素结合蛋白标准品预处理:取1 μg 肝素结合蛋白标准品加入1ml的无肝素结合蛋白的正常人血清中,制成1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的母液;用无肝素结合蛋白的血清将该母液分别稀释成200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的肝素结合蛋白标准溶液;

[0068] II:取第一缓冲液,静置平衡10~15分钟后,取步骤I制备的不同浓度的肝素结合蛋白标准溶液各100 μl 分别加入到60 μl 平衡后的第一缓冲液中,然后再分别加入10 μl 第二缓冲液,混合均匀后分别通过血样孔加入到试剂卡的滤血膜上,室温水平放置15min后,将试剂卡插入荧光免疫读数仪,设定激发光波长为494nm,发射光波长为518nm,读取不同浓度肝素结合蛋白标准溶液的荧光值,每个浓度的肝素结合蛋白标准溶液检测五次,并计算荧光值的平均值;以每种荧光值的平均值为纵坐标,分别对应的肝素结合蛋白标准溶液的浓度值为横坐标做回归曲线,得出回归曲线方程,得到荧光值与肝素结合蛋白浓度关系式;

[0069] III:取60 μl 第一缓冲液,静置平衡15分钟后,加入100 μl 待测样品,然后再加入10 μl 第二缓冲液,混合均匀后通过试剂卡的血样孔加入到试剂卡的滤血膜上,室温水平放置15分钟,然后把试剂卡插入免疫荧光读数仪,设定激发光波长为494nm,发射光波长为518nm,

读取待测样品的荧光值,将该荧光值带入步骤Ⅱ得到的关系式中,计算得到待测样品肝素结合蛋白浓度。

[0070] 试验例

[0071] 1、使用实施例1提供的试剂盒采用实施例4所述的方法分别测定浓度为35 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、150 $\mu\text{g/L}$ 的肝素结合蛋白标准品的浓度,每个标准品重复测试5次,计算得到实施例1提供的试剂盒检测肝素结合蛋白浓度的相对偏差 $\leq 10\%$,同一标准品重复测试所得结果的变异系数 $CV \leq 8\%$,表明本发明试剂盒准确度高、重复性好。

[0072] 2、使用实施例1提供的试剂盒采用实施例4所述的方法分别测定从医院取来的15例健康人的血清样本和15例病人血清样本中肝素结合蛋白的浓度($\mu\text{g/L}$),其结果如下表1所示:

[0073] 表1

[0074]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
健康人	3.8	9.9	5.5	6.2	3.2	4.4	4.1	5.2	6.1	4.3	8.2	7.1	3.2	4.9	2.3
病人	24	18.2	54.1	99.5	23.9	31	21.3	16.8	66.3	43.7	29.1	35.5	26.4	13.2	19.4

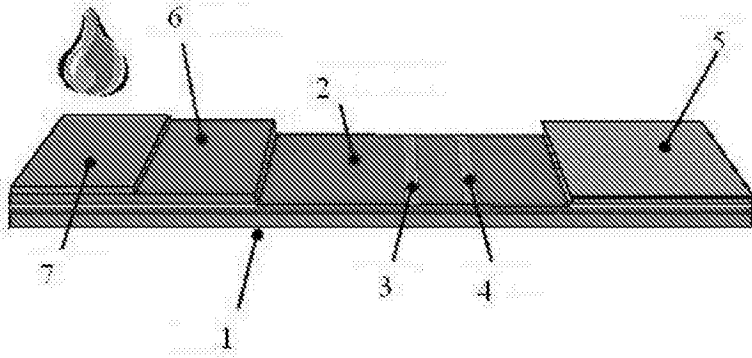


图1

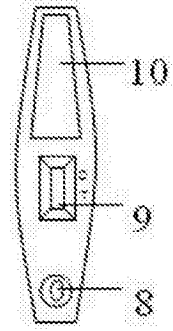


图2

专利名称(译)	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		
公开(公告)号	CN105572386A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201610050605.0	申请日	2016-01-26
[标]发明人	王嘎 程自卿 王辉武		
发明人	王嘎 程自卿 王辉武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/6854		
代理人(译)	黄伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及医疗用品技术领域，具体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/μl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0.05~0.2μg/μl荧光标记的鸡抗兔二抗的磷酸盐缓冲液；试剂卡包括塑料垫板，塑料垫板上设置硝酸纤维素膜，硝酸纤维素膜上左右间隔设置检测线和质控线，检测线左侧硝酸纤维素膜上设置玻璃纤维素膜，质控线右侧硝酸纤维素膜上设置吸水纸，玻璃纤维素膜上设置滤血膜；检测线上包被鼠抗人肝素结合蛋白抗体；质控线上包被羊抗兔抗体。该试剂盒具有好的线性范围、灵敏度和准确度高。

