



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771253 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710031385.1

(22)申请日 2017.01.17

(71)申请人 安徽同致生物工程股份有限公司  
地址 230000 安徽省合肥市包河区包河工  
业园上海路7号

(72)发明人 沈秀军

(51)Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

肝素结合蛋白测定试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种肝素结合蛋白测定试剂盒,采用双抗体夹心法,酶标包被板的微孔内包被了HBP单克隆抗体,在初次孵育期间,利用样本稀释液稀释血浆中的HBP作为抗原物质与固相上包被的HBP单克隆抗体结合,形成固相抗体抗原复合物;利用洗涤缓冲液充分洗涤以除去未结合的成分,加入酶结合物孵育,酶结合物与固相抗体抗原复合物结合;进一步洗涤,除去未结合的成分,再加入底物孵育,底物被酶催化成为有色产物,再加入终止液以终止反应,通过酶标仪检测各孔光密度值;光密度值的大小与血浆中HBP浓度成正相关。本发明以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。为医学检验和人类健康贡献出一份力量。

1. 一种肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,包括:酶标包被板、样本稀释液、洗涤缓冲液、终止液、酶结合物、底物、校准品、质控品;

该试剂盒采用双抗体夹心法,酶标包被板的微孔内包被了HBP单克隆抗体,在初次孵育期间,利用样本稀释液稀释血浆中的HBP作为抗原物质与固相上包被的HBP单克隆抗体结合,形成固相抗体抗原复合物;

利用洗涤缓冲液充分洗涤以除去未结合的成分,加入酶结合物孵育,酶结合物与固相抗体抗原复合物结合;

进一步洗涤,除去未结合的成分,再加入底物孵育,底物被酶催化成为有色产物,再加入终止液以终止反应,通过酶标仪检测各孔光密度值;光密度值的大小与血浆中HBP浓度成正相关。

2. 根据权利要求1所述的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于:所述酶结合物为酶标记的HBP单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于:所述样本稀释液由25mmol/L DTT、100mmol/L pH8.0的Tris缓冲液、2mmol/L pH8.0的EDTA和 200mmol/L NaCl组成。

4. 根据权利要求1所述的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于:所述洗涤缓冲液包含:20mmol/L磷酸二氢钾、20mmol/L磷酸氢二钠、20mmol/L氯化钠、20mmol/L氯化钾溶液和2mol/L NaCl,pH7.4。

5. 根据权利要求1所述的肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于:所述终止液为硫酸,所述底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

6. 利用权利要求1所述试剂盒测定肝素结合蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)准备工作:将酶标包被板及试剂盒中其他组分在18-25℃平衡约30min,各试剂使用前充分摇匀,将试剂盒中的洗涤缓冲液25mL使用纯化225mL10倍稀释待用;稀释质控品及样本:用样本稀释液390μL按1:40 稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本10μL,充分混匀;

(2)加样:加100μL校准品1-6、预稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本至相应的孔中,各做两个重复;

(3)孵育:18-25℃条件下,孵育60 min;

(4)洗涤:快速翻转酶标包被板,轻轻倒出反应孔中的溶液,将酶标包被板在吸水纸上倒扣拍干,每孔至少加入300 μL洗涤缓冲液冲洗反应孔,轻轻倒出反应孔中的溶液,倒置于吸水纸上拍干,使反应孔内无肉眼可见的液体和气泡。按上述操作,重复洗涤3次;

(5)加酶结合物:每孔加100μL的酶结合物,18-25℃条件下,孵育60 min;

(6)洗涤:同步骤(5);

(7)显色:每孔加100μL底物,18-25℃条件下,孵育10 min;

(8)终止反应:每孔加100μL终止液,轻摇酶标板混匀,确保无肉眼可见的气泡,终止反应;

(9)读取吸光度值:酶标仪下450nm下读取光密度值;

(10)计算结果:以校准品1-6 的平均光密度值为纵坐标,以校准品的浓度值为横坐标,使用酶标仪系统软件绘图,使用线性回归拟合绘制校准曲线通过样本光密度值,即可在校

准曲线上找到其所对应的样本浓度值。

7. 根据权利要求6所述的测定肝素结合蛋白的方法, 其特征在于: 所述样本稀释液由 25mmol/L DTT、100mmol/L pH8.0的Tris缓冲液、2mmol/L pH8.0的EDTA和 200mmol/L NaCl 组成。

8. 根据权利要求6所述的测定肝素结合蛋白的方法, 其特征在于: 所述洗涤缓冲液包含: 20mmol/L磷酸二氢钾、20mmol/L磷酸氢二钠、20mmol/L氯化钠、20mmol/L氯化钾溶液和 2mol/L NaCl, pH7.4。

9. 根据权利要求6所述的测定肝素结合蛋白的方法, 其特征在于: 所述终止液为硫酸, 所述底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺, 所述酶结合物为酶标记的HBP单克隆抗体。

## 肝素结合蛋白测定试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫测定及疾病检测技术领域,尤其涉及一种肝素结合蛋白测定试剂盒。

### 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 response syndrome, 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,耗时长,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(BPT1)结合,使BPT1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BPT1亲和性,证实了HBP与BPT1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的整体结构同源於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- $\alpha$  (Tumornecrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 和干扰素- $\gamma$  (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ) 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- $\alpha$ 就扮演着促进炎症反应发生的重要角色。TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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,又因为肝素结合蛋白测定试剂盒(酶联免疫法)属于国家重点的高新技术领域中的生物与新医药范畴,因此作为一种重大疾病和重大传染病快速早期检测与诊断技术,肝素结合蛋白测定试剂盒(酶联免疫法)有很广阔的市场前景,将是未来几年的重点项目。

## 发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种肝素结合蛋白测定试剂盒,以解决上述技术问题。是以体外定量测定人血浆中的肝素结合蛋白为目的,研发出肝素结合蛋白测定试剂盒(酶联免疫法)的配方。

[0012] 本发明所要解决的技术问题采用以下技术方案来实现:

一种肝素结合蛋白测定试剂盒,其特征在于,包括:酶标包被板、样本稀释液、洗涤缓冲液、终止液、酶结合物、底物、校准品、质控品;

该试剂盒采用双抗体夹心法,酶标包被板的微孔内包被了HBP单克隆抗体,在初次孵育期间,利用样本稀释液稀释血浆中的HBP作为抗原物质与固相上包被的HBP单克隆抗体结合,形成固相抗体抗原复合物;

利用洗涤缓冲液充分洗涤以除去未结合的成分,加入酶结合物孵育,酶结合物与固相抗体抗原复合物结合;

进一步洗涤,除去未结合的成分,再加入底物孵育,底物被酶催化成为有色产物,再加入终止液以终止反应,通过酶标仪检测各孔光密度值;光密度值的大小与血浆中HBP浓度成正相关。

[0013] 作为优选,所述酶结合物为酶标记的HBP单克隆抗体。

[0014] 作为优选,所述样本稀释液由25mmol/L DTT、100mmol/L pH8.0的Tris缓冲液、2mmol/L pH8.0的EDTA和 200mmol/L NaCl组成。

[0015] 作为优选,所述洗涤缓冲液包含:20mmol/L磷酸二氢钾、20mmol/L磷酸氢二钠、20mmol/L氯化钠、20mmol/L氯化钾溶液和2mol/L NaCl,pH7.4。

[0016] 作为优选,所述终止液为硫酸,所述底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0017] 本发明的另一个目的是:

提供一种利用上述试剂盒测定肝素结合蛋白的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)准备工作:将酶标包被板及试剂盒中其他组分在18-25℃平衡约30min,各试剂使用前充分摇匀,将试剂盒中的洗涤缓冲液25mL使用纯化225mL10倍稀释待用;稀释质控品及样本:用样本稀释液390μL按1:40 稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本10μL,充分混匀;

(2)加样:加100μL校准品1-6、预稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本至相应的孔中,各做两个重复;

(3)孵育:18-25℃条件下,孵育60 min;

(4)洗涤:快速翻转酶标包被板,轻轻倒出反应孔中的溶液,将酶标包被板在吸水纸上倒扣拍干,每孔至少加入300 μL洗涤缓冲液冲洗反应孔,轻轻倒出反应孔中的溶液,倒置于吸水纸上拍干,使反应孔内无肉眼可见的液体和气泡。按上述操作,重复洗涤3次;

(5)加酶结合物:每孔加100μL的酶结合物,18-25℃条件下,孵育60 min;

(6)洗涤:同步骤(5);

(7)显色:每孔加100μL底物,18-25℃条件下,孵育10 min;

(8)终止反应:每孔加100μL终止液,轻摇酶标板混匀,确保无肉眼可见的气泡,终止反应;

(9)读取吸光度值:酶标仪下450nm下读取光密度值;

(10)计算结果:以校准品1-6 的平均光密度值为纵坐标,以校准品的浓度值为横坐标,使用酶标仪系统软件绘图,使用线性回归拟合绘制校准曲线通过样本光密度值,即可在校准曲线上找到其所对应的样本浓度值。

[0018] 作为优选,所述样本稀释液由25mmol/L DTT、100mmol/L pH8.0的Tris缓冲液、2mmol/L pH8.0的EDTA和 200mmol/L NaCl组成。

[0019] 作为优选,所述洗涤缓冲液包含:20mmol/L磷酸二氢钾、20mmol/L磷酸氢二钠、20mmol/L氯化钠、20mmol/L氯化钾溶液和2mol/L NaCl,pH7.4。

[0020] 作为优选,所述终止液为硫酸,所述底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺,所述酶结合物为酶标记的HBP单克隆抗体。

[0021] 基本原理:

使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。

[0022] 使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

[0023] ELISA可用于测定抗原,也可用于测定抗体。在这种测定方法中有3种必要的试剂:

固相的抗原或抗体

酶标记的抗原或抗体

酶作用的底物。

[0024] 本发明的有益效果是:

本发明以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。为医学检验和人类健康贡献出一份力量。

## 具体实施方式

[0025] 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,但下述实施例仅仅为本发明的优选实施例,并非全部。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。

[0026] 实施例1

肝素结合蛋白测定试剂盒,包括:酶标包被板、样本稀释液、洗涤缓冲液、终止液、酶结合物、底物、校准品、质控品;

该试剂盒采用双抗体夹心法,酶标包被板的微孔内包被了HBP单克隆抗体,在初次孵育期间,利用样本稀释液稀释血浆中的HBP作为抗原物质与固相上包被的HBP单克隆抗体结合,形成固相抗体抗原复合物;

利用洗涤缓冲液充分洗涤以除去未结合的成分,加入酶结合物孵育,酶结合物与固相抗体抗原复合物结合;

进一步洗涤,除去未结合的成分,再加入底物孵育,底物被酶催化成为有色产物,再加入终止液以终止反应,通过酶标仪检测各孔光密度值;光密度值的大小与血浆中HBP浓度成正相关。

[0027] 其中:

样本稀释液:由25mmol/L DTT、100mmol/L pH8.0的Tris缓冲液、2mmol/L pH8.0的EDTA和 200mmol/L NaCl组成。

[0028] 洗涤缓冲液:包含:20mmol/L磷酸二氢钾、20mmol/L磷酸氢二钠、20mmol/L氯化钠、

20mmol/L氯化钾溶液和2mol/L NaCl,pH7.4。

[0029] 终止液:硫酸

酶结合物:酶标记的HBP单克隆抗体

底物:3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0030] 准备材料

Infinite 50分光光度计、KDC-2046低速冷冻离心机、0.5-50 $\mu$ l、50-200 $\mu$ l、200-1000 $\mu$ l移液器、加样枪头、枸橼酸钠抗凝真空管、EP管、一次性塑胶手套、试管架。

[0031] 样本采集

收集并记录完临床资料后,采集外周静脉血4mL,置于枸橼酸钠抗凝真空管内,3000r/min离心5min后分离出血浆备用。

[0032] 技术路线

(1)准备工作:将酶标包被板(酶标板)及试剂盒中其他组分在18-25 $^{\circ}$ C平衡约30min,各试剂使用前充分摇匀,将试剂盒中的洗涤缓冲液(25mL)使用纯化(225mL)10倍稀释待用;稀释质控品及样本:用样本稀释液(390 $\mu$ L)按1:40稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本(10 $\mu$ L),充分混匀;

(2)加样:加100 $\mu$ L校准品1-6、预稀释低值质控品、中值质控品、高值质控品及样本至相应的孔中,各做两个重复;

(3)孵育:18-25 $^{\circ}$ C条件下,孵育60 min;

(4)洗涤:快速翻转酶标包被板,轻轻倒出反应孔中的溶液,将酶标包被板在吸水纸上倒扣拍干,每孔至少加入300 $\mu$ L洗涤缓冲液冲洗反应孔,轻轻倒出反应孔中的溶液,倒置于吸水纸上拍干,使反应孔内无肉眼可见的液体和气泡。按上述操作,重复洗涤3次;

(5)加酶结合物:每孔加100 $\mu$ L的酶结合物,18-25 $^{\circ}$ C条件下,孵育60 min;

(6)洗涤:同步骤(5);

(7)显色:每孔加100 $\mu$ L底物,18-25 $^{\circ}$ C条件下,孵育10 min;

(8)终止反应:每孔加100 $\mu$ L终止液,轻摇酶标板混匀,确保无肉眼可见的气泡,终止反应;

(9)读取吸光度值:酶标仪下450nm下读取光密度值;

(10)计算结果:以校准品1-6的平均光密度值为纵坐标,以校准品的浓度值为横坐标,使用酶标仪系统软件绘图,使用线性回归拟合绘制校准曲线通过样本光密度值,即可在校准曲线上找到其所对应的样本浓度值。

[0033] 肝素结合蛋白在临床感染性疾病中的应用:

HBP诊断脓毒症

机体发生感染时外渗的血浆和中性粒细胞聚集到感染的部位是炎症过程的重要起始步骤,进一步加重导致全身炎症反应综合征(SIRS)的发生,最终发展为脓毒症。近年来,虽然抗感染治疗和器官功能支持技术取得了长足的进步,但仍然是导致危重患者死亡的主要原因,因此尽早地诊断及采取合理的应对措施是成功的关键。有研究认为,HBP可能在脓毒症的发生、发展过程中起着非常重要的作用。HBP是一种由激活的中性粒细胞释放的蛋白,是血管渗透性增强的蛋白指标。Linder等对233例疑似感染的成人发热病例进行了前瞻性研究,所有患者根据SIRS、器官衰竭和最后诊断情况分为5组。血液标本进行HBP浓度、C反应

蛋白、乳酸、血浆降钙素原、IL-6和白细胞计数检测。有26例患者被诊断为严重脓毒症合并感染性休克,44例为无感染性休克的严重脓毒症,100例为脓毒症,43例为非脓毒症感染,20例有非感染引起的慢性炎症反应。血浆HBP浓度15ng/mL诊断脓毒血症(合并或不合并感染性休克)优于其他实验室指标(灵敏度87.1%,特异度95.1%,阳性预测值为88.4%,阴性预测值为94.5%)。对32例脓毒症患者在接受循环衰竭征兆前12h进行检测显示,其中29例HBP浓度已明显升高。可见早期检测血浆中HBP水平,对脓毒症患者的诊疗具有重要的临床价值。另外,发热患者高浓度HBP水平有助于鉴别患者是否发展为脓毒症循环衰竭。

#### [0034] HBP诊断细菌性脑膜炎

为探讨脑脊液中HBP水平与脑部感染的相关性,Linder等对174例疑似中枢神经系统感染的患者进行检测,其中37例急性细菌性脑膜炎、4例神经外科术后细菌性脑膜炎、29例病毒性脑膜炎、7例神经包柔螺旋体病,另外97例脑脊液中细胞水平正常者纳入对照组,结果显示急性细菌性脑膜炎的患者脑脊液中HBP的水平(平均376ng/mL),明显高于病毒性神经系统感染患者(平均4.7ng/mL)、神经包柔螺旋体病(平均3.6ng/mL)及对照组患者(平均3.5ng/mL),并且当脑脊液中HBP浓度大于20ng/mL时,诊断急性细菌性脑膜炎的灵敏度为96.2%,特异度为100.0%,阳性预测值为96.2%,阴性预测值为100.0%。可以推断,在细菌性脑膜炎时,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,有助于更早采取适当的治疗措施。

#### [0035] HBP诊断细菌性皮肤感染

丹毒是一种主要由A组β溶血性链球菌引起的急性真皮细菌感染而导致的炎症,感染常向四周迅速蔓延,并伴有高热、畏寒及皮肤烧灼样痛等。Linder等的研究中,选取了12例腿部有丹毒的患者,在腿部有感染的区域和没有感染的区域分别取样进行检测,结果显示感染区域的标本HBP水平明显升高,而未受感染的区域未发现HBP,这一研究表明溶血性链球菌在皮肤感染时导致HBP释放增加,检测HBP可能有助于丹毒的诊断。Lundqvist等报道在细菌感染的慢性下肢静脉溃疡伤口分泌物中HBP的水平明显高于对照组,对照组标本来自无感染的乳房切除术后患者的引流液,慢性溃疡组和对照组平均值分别为28.2、4.2ng/mL,说明HBP对局部感染也有诊断价值。

#### [0036] HBP诊断急性呼吸窘迫综合征(ARDS)

ARDS是指严重感染、创伤、休克等肺内外疾病袭击后出现的以肺泡毛细血管损伤为主要表现的临床综合征。在创伤、脓毒血症、病毒感染等情况下,中性粒细胞受到刺激并释放HBP,使血管内皮通透性增高,液体渗透到肺泡中,从而引起肺损伤。Kaukonen等最近进行的一项前瞻性研究,收集了四例ICU病房的重症型A型流感(H1N1)患者,采用PCR检测H1N1病毒,发现确诊的患者血浆中HBP水平明显升高,在第1天和第2天分别能达到98ng/mL(62-183ng/mL)和93ng/mL(62-271ng/mL),同时发现HBP水平与呼吸功能障碍之间有很大关系。Johansson等也发现HBP可以作为创伤后的ARDS早期检测的潜在生物指标,进一步证实了HBP与呼吸系统也有很密切的联系。HBP在脓毒症导致的ARDS发病中也起到重要作用。有研究显示,根据是否出现ARDS将脓毒症患者分为ARDS组及非ARDS组,ARDS组患者HBP水平明显升高,而HBP预测ARDS发生的受试者特征曲线下面积(AUC)为0.796,这可能提示存在ARDS的脓毒症患者病情更加严重,所以HBP在脓毒症早期升高,它可以作为预测脓毒症相关ARDS的预测指标。可以看出这些发现都与HBP能导致内皮细胞通透性增加的特性有着千丝万缕的

关系。

[0037] 本实施例的技术方案的风险分析

1、安全特征问题清单

该清单依据YY/T 0316标准的附录C的问题清单,补充了有关肝素结合蛋白测定试剂盒(酶联免疫法)的特有的安全性问题。

问题内容	特征判定	可能发生的危害	危害标识
C.2.1 医疗器械的预期用途是什么和怎样使用医疗器械?	用于人血浆中肝素结合蛋白的含量进行测定	错误使用样品导致至结果错误	H1
C.2.2 医疗器械是否预期植入?	否		
C.2.3 医疗器械是否预期和患者或其他人员接触?	本产品预期不与患者或使用者接触		
C.2.4 在医疗器械中利用何种材料或组分,或与医疗器械共同使用或与其接触?	否		
C.2.5 是否有能量给予患者或从患者身上获取?	否		
C.2.6 是否有物质提供给患者或从患者身上提取?	从患者身上提取血液	1、检验剩余样本处置不当而导致的危害	H2
		2、不适当的样本提取及保存方式导致的危害	H3
C.2.7 医疗器械是否处理生物材料用于随后的再次使用、输液/血或移植?	否		
C.2.8 医疗器械是否以无菌形式提供或预期由使用者灭菌,或用其它微生物学控制方法灭菌?	否		
C.2.9 医疗器械是否预期由用户进行常规清洁和消毒?	否		
C.2.10 医疗器械是否预期改善患者的环境?	否		
C.2.11 是否进行测量?	是,对血浆中肝素结合蛋白的含量进行测定	1、参考范围错误导致的危害	H4
		2、不准确度过大导致的危害	H5
		3、精密度过大导致的危害	H6
C.2.12 医疗器械是否进行分析处理?	否		
C.2.13 医疗器械是否预期和其它医疗器械、医药或其它医疗技术联合使用?	与全自动生化分析仪一起使用	使用不当的仪器导致的危害	H7

## [0038] 2、危害分析,包括可预见的事件序列、危害处境和可发生的损害

序号	问题	性质	产品的影响及后果	采取措施
1	运输中贮存温度不当造成试剂盒失效	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	运输包装前,根据包装箱的大小及试剂盒的多少,放入一定数量的冰块,再用保温泡沫箱进行二次包装
2	参数设置不正确	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	对试剂盒所应用的机型参数进行规范化整理,在最大程度减少因参数设置不当而造成的影响
3	用户对试剂盒的使用不当	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	产品应用工程师到现场进行技术服务
4	与试剂盒不配套的校准品或质控品的使用	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	常规试剂盒在提供参数时,提醒并建议用户选用与之配套的校准品或定标液,对于特列项目,无公认的第三方质控时,公司要免费提供与试剂盒配套的校准品或定标液
5	长时间不定标	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	建议用户对试剂盒进行定标

## 3、风险评价、风险控制措施记录表

风险分析	后果	发生频率	严重程度	风险可接受性	采取措施
潜在风险	漏液对皮肤有轻微腐蚀	2	1	ACC	灌装过程中，逐一检查试剂瓶盖是否有垫片。同时，将拧好瓶盖的试剂瓶倒置，用力挤压瓶壁，检查试剂瓶的密封性。如有漏液，重新更换瓶盖。若试剂接触皮肤，立即用大量清水冲洗，溅到眼睛内，冲洗后要及时去医院就医
生物学危害	漏液对皮肤有轻微腐蚀	2	1	ACC	灌装过程中，逐一检查试剂瓶盖是否有垫片。同时，将拧好瓶盖的试剂瓶倒置，用力挤压瓶壁，检查试剂瓶的密封性。如有漏液，重新更换瓶盖
环境危害	漏液对环境造成的轻微污染	2	1	ACC	及时将用专用抹布将漏液擦拭干净，再用自来水对漏液地点擦拭三遍
不适当的标记及说明	临床测定结果不准确，影响临床诊断	2	2	ACC	制定生产过程中各岗位的标准操作规程，并要求岗位操作人员严格执行，每一岗位工作都要进行复核
没有使用说明书或说明书遗失	操作不准确，导致测定结果不准确，影响临床诊断	2	2	ACC	试剂盒封口前，QA要逐一核对试剂盒中的各组分是否剂全、正确。或用户说明书遗失，影响操作，厂家要及时将说明书提供给用户
由不熟悉或未培训的人员使用	操作不准确，导致测定结果不准确，影响临床诊断	4	2	ALARP	操作人员要具备相关专业知识，操作前经培训
合理预见性误用	临床测定结果不准确，影响临床诊断	4	2	ALARP	操作前，仔细阅读说明书，认真核对试剂瓶标签。

以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解，本发明不受上述实施例的限制，上述实施例和说明书中描述的仅为本发明的优选例，并不用来限制本发明，在不脱离本发明精神和范围的前提下，本发明还会有各种变化和改进，这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

专利名称(译)	肝素结合蛋白测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106771253A</a>	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201710031385.1	申请日	2017-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	安徽同致生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽同致生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽同致生物工程股份有限公司		
[标]发明人	沈秀军		
发明人	沈秀军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种肝素结合蛋白测定试剂盒，采用双抗体夹心法，酶标包被板的微孔内包被了HBP单克隆抗体，在初次孵育期间，利用样本稀释液稀释血浆中的HBP作为抗原物质与固相上包被的HBP单克隆抗体结合，形成固相抗体抗原复合物；利用洗涤缓冲液充分洗涤以除去未结合的成分，加入酶结合物孵育，酶结合物与固相抗体抗原复合物结合；进一步洗涤，除去未结合的成分，再加入底物孵育，底物被酶催化成为有色产物，再加入终止液以终止反应，通过酶标仪检测各孔光密度值；光密度值的大小与血浆中HBP浓度成正相关。本发明以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。为医学检验和人类健康贡献出一份力量。

序号	问题	性质	产品的影响及后果	采取措施
1	运输中贮存温度不当造成试剂盒失效	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	运输包装前,根据包装箱的大小及试剂盒的多少,放入一定数量的冰块,再用保温泡沫箱进行二次包装
2	参数设置不正确	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	对试剂盒所应用的机型参数进行规范化整理,在最大程度减少因参数设置不当而造成的影响
3	用户对试剂盒的使用不当	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	产品应用工程师到现场进行技术服务
4	与试剂盒不配套的校准品或质控品的使用	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	常规试剂盒在提供参数时,提醒并建议用户选用与之配套的校准品或定标液,对于特别项目,无公认的第三方质控时,公司要免费提供与试剂盒配套的校准品或定标液
5	长时间不定标	不良事件	患者血浆测定结果不准确,而有可能延误临床诊断	建议用户对试剂盒进行定标