



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0616.7—2020

一次性使用医用手套 第 7 部分：抗原性蛋白质含量 免疫学测定方法

Medical gloves for single use—Part 7: Test method for the
immunological measurement of antigenic protein

2020-09-27 发布

2021-09-01 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 0616 的总标题为《一次性使用医用手套》，由以下部分组成：

- 第 1 部分：生物学评价要求与试验；
- 第 2 部分：测定货架寿命的要求和试验；
- 第 3 部分：用仓储中的成品手套确定实际时间失效日期的方法；
- 第 4 部分：抗穿刺试验方法；
- 第 5 部分：抗化学品渗透 持续接触试验方法；
- 第 6 部分：抗化疗药物渗透性能评定试验方法；
- 第 7 部分：抗原性蛋白质含量免疫学测定方法；
-

本部分为 YY/T 0616 的第 7 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由山东省医疗器械产品质量检验中心归口。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、山东大学。

本部分主要起草人：刘佳、张建、孙晓霞、韩秋菊、盖潇潇、屈秋锦。

引 言

医护人员在工作中可能会接触到一些对健康人群产生危害的化学品,为避免此类危害,医护人员需要佩戴具备相应防护性能的产品(如医用手套),以达到有效防护的目的。医用橡胶手套按原料材质的不同通常分为天然胶乳手套与合成橡胶手套两大类。天然胶乳手套中含有天然胶乳蛋白,能诱发 I 型超敏反应,表现为皮肤局部荨麻疹、过敏性鼻结膜炎和哮喘等症状。在天然胶乳来源的产品中存在多种能够引发(I 型)过敏反应的蛋白。由于天然胶乳手套中化学添加剂的干扰,依据 GB/T 21870—2008 对天然胶乳产品中的蛋白水平进行定量可能产生假阳性结果。此外,产品中天然胶乳蛋白含量常常低于标准比色蛋白分析的检测限度。

一次性使用医用手套

第7部分:抗原性蛋白质含量

免疫学测定方法

1 范围

YY/T 0616 的本部分规定了一次性使用医用天然胶乳手套中抗原性蛋白质含量的免疫学测定的试验原理、仪器、试剂和耗材、测定方法和试验报告。

本部分适用于一次性使用医用天然胶乳手套中抗原性蛋白质含量的定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分:风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分:医疗器械免疫毒理学试验原则和方法

3 术语和定义

GB/T 16886.1、GB/T 16886.20 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗体 antibody

作为免疫应答的一部分产生的免疫球蛋白,能够与抗原特异性结合。

3.2

抗原 antigen

能引起机体产生免疫反应的物质。

3.3

一抗 primary antibody

在反应体系中最先使用的与抗原特异性结合的抗体。

3.4

二抗 secondary antibody

在反应体系中与一抗重链特异性结合的酶结合抗体。

3.5

封闭液 blocking solution

用于防止非特异性抗体反应的非反应性蛋白溶液。

3.6

偏差 deviation

平均测定值与参考值(真值)之间的差异。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay)

HRP:辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

IRM:工业标准物质(industry reference material)

NRL:天然胶乳(natural rubber latex)

OD:光密度(optical density)

OPD:邻苯二胺(*o*-phenylenediamine)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline)

StAg:抗原标准品(standard reference antigen)

T-PBS:吐温磷酸盐缓冲液(PBS tween)

TMB:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)

5 试验原理

本部分是采用天然胶乳(NRL)蛋白特异性抗体测定天然胶乳手套中抗原蛋白含量的免疫学方法。将试验样品和特异性 NRL 蛋白特异性抗体共同孵育。分离剩余的 NRL 蛋白抗体并将其与预先包被在固相载体上的过量 NRL 蛋白抗原结合,加底物显色。通过底物显色反应导致颜色变化,测定 OD 值。

6 仪器

天平;离心机(离心力可调节为 500*g*)和相应离心管;恒温箱;酶标仪(用于 96 孔微量测定板读数,并可选计算机进行数据分析)。

7 试剂和耗材

7.1 试剂

7.1.1 缓冲液

7.1.1.1 碳酸盐缓冲液

用天平称量并将 0.795 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、1.465 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)、0.100 g 叠氮化钠(NaN_3)溶于蒸馏水中,定容至 500 mL。检查 pH 并在必要时进行调整。

注:碳酸盐缓冲液可在 $(4\pm 3)^\circ\text{C}$ 储存至少 1 个月。

7.1.1.2 PBS 缓冲液

用天平称量 5.125 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、45.000 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)并溶于 1.5 L 蒸馏水中,并调整 pH 至 7.4。加入 175.3 g 氯化钠(NaCl),定容至 2 L,即为 10 倍贮存液。使用前用蒸馏水将 10 倍贮存液稀释为 PBS 工作液。

7.1.1.3 T-PBS 洗液

在 1 L PBS 工作液中加入 0.5 mL 吐温 20(Tween 20),混匀。

7.1.2 封闭液和抗体稀释液

7.1.2.1 封闭液

含 3 g/mL 脱脂奶粉的 T-PBS,100 mL(用于测定板和稀释板的封闭处理)。

7.1.2.2 稀释液

含 0.2 g/mL 脱脂奶粉的 T-PBS,100 mL(用于抗体稀释和竞争抑制步骤中的封闭)。

7.1.3 参考品试剂

7.1.3.1 StAg 溶液

用蒸馏水制备的浓度为 1 mg/mL 的 NRL 蛋白溶液。聚丙烯管分装储存于 $(-20\pm 10)^{\circ}\text{C}$,解冻后储存于 $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 。

注:市售 StAg 标准品溶液可选 IRM-913。

7.1.3.2 包被抗原

用碳酸盐缓冲液将 StAg 溶液配制成浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,用于包被测定板。

7.1.3.3 参考标准品

用稀释液将 StAg 溶液配制成浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,用于竞争抑制。为了减少可能的蛋白质损失,所有涉及含蛋白质溶液的步骤应在聚丙烯管或容器中进行。避免使用聚苯乙烯或玻璃容器。

7.1.4 抗体

7.1.4.1 一抗

可采用市售的抗 NRL 抗体 IRM-914。

7.1.4.2 二抗

辣根过氧化物酶(HRP)结合的抗兔 IgG,用于检测固相上 NRL 蛋白结合一抗。推荐用稀释液 1:5 稀释并分装储存于 $(-20\pm 10)^{\circ}\text{C}$ 。

7.1.5 底物显色溶液

可将邻苯二胺(OPD)和过氧化氢(H_2O_2)用于黄色显色反应。将市售 OPD 片剂溶解于蒸馏水中,并按照操作说明加入适量的 H_2O_2 。如将 10 mg OPD 片剂溶解于 10 mL 蒸馏水中,并在使用前加入 30 μL 30% H_2O_2 。

注:亦可采用 TMB 试剂盒显色。

7.2 耗材

96 孔微量测定板;稀释板,低蛋白结合的 96 孔板用于样品稀释和抗体反应;多通道移液器;ELISA

板密封带或塑料盖子。

8 测定方法

8.1 样品制备

8.1.1 宜使用 7.1.1.2 的 PBS 工作液为浸提液。

8.1.2 称量天然胶乳手套,并记录质量及表面积;每克天然胶乳手套宜加入 5 mL 的浸提介质。浸提温度为 $(25\pm 5)^{\circ}\text{C}$;浸提时间为 $(120\pm 5)\text{min}$ 。浸提过程应持续搅动,以确保样品与浸提介质充分接触。或在浸提过程的开始、中间和结束阶段分别振荡 3 次,间隔 15 s/次。

8.1.3 取出浸提液至聚丙烯管中,置入离心机内离心 15 min(离心力 $500g$),弃去颗粒等沉淀;或通过低蛋白结合的 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器过滤收集浸提液至聚丙烯管中。

注 1: 在聚丙烯容器中进行浸提,以减少由于吸附到容器壁内表面而损失蛋白质的可能。

注 2: 一般可立即使用所得浸提液,但可在 $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 下储存至多 2 d。

8.2 试验步骤

8.2.1 稀释板的封闭

向 96 孔稀释板每孔加入 300 μL 封闭液, $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

8.2.2 测定板的包被

向 96 孔测定板每孔加入 100 μL 包被抗原(StAg , $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$),用 ELISA 板密封带或塑料盖子封板, $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 孵育 $(120\pm 5)\text{min}$ 。用 T-PBS 洗板 1 次,弃去上清。或在 $(4\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 包被抗原过夜,并在后续试验开始前 T-PBS 洗板 1 次。每孔加入 300 μL 封闭液并封板, $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 于恒温箱内孵育 1 h。

8.2.3 抑制步骤

8.2.3.1 在 96 孔稀释板中,用 T-PBS 洗板 2 次;如表 1 所示,除 A 行外,每孔加入 100 μL 稀释缓冲液;向 A 行中 A1 和 A2 孔各加入 200 μL 抗原标准品(StAg , $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$),向 A3 至 A12 孔各加入 200 μL 待测样品(每个样品至少 2 复孔);通过从 A 行取 100 μL /孔至 B 行各孔,再从 B 行依次至 G 行,将抗原标准品或待测样品进行 7 个系列梯度稀释(每次通过上下吸液 5 次来混匀,最后在 G 行混匀后弃去 100 μL /孔);H 行为无抑制行,其各孔含 100 μL 稀释液。

注: 每个待测样品具有 3 个稀释倍数(至少具有 2 个稀释倍数),且每 1 稀释倍数具有 2 个重复。

8.2.3.2 准备适宜稀释度的一抗,使“无抑制”孔的最大 OD 值为 $0.8\sim 2.0$ 。根据表 1 所示,加入一抗 100 μL /孔,无一抗的对照孔则加入 100 μL 稀释液,使最终各孔体积均为 200 μL 。封板, $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 孵育 $(120\pm 5)\text{min}$ 。

表 1 抑制步骤中 96 孔稀释板操作举例

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	StAg 2 μg/mL		浸提液 1 1 : 1		浸提液 2 1 : 1		浸提液 3 1 : 1		浸提液 4 1 : 1		浸提液 5 1 : 1	
B	StAg 1 μg/mL		浸提液 1 1 : 2		浸提液 2 1 : 2		浸提液 3 1 : 2		浸提液 4 1 : 2		浸提液 5 1 : 2	
C	StAg 0.5 μg/mL		浸提液 1 1 : 4		浸提液 2 1 : 4		浸提液 3 1 : 4		浸提液 4 1 : 4		浸提液 5 1 : 4	
D	StAg 0.25 μg/mL		浸提液 1 1 : 8		浸提液 2 1 : 8		浸提液 3 1 : 8		浸提液 4 1 : 8		浸提液 5 1 : 8	
E	StAg 0.125 μg/mL		浸提液 1 1 : 16		浸提液 2 1 : 16		浸提液 3 1 : 16		浸提液 4 1 : 16		浸提液 5 1 : 16	
F	StAg 0.063 μg/mL		浸提液 1 1 : 32		浸提液 2 1 : 32		浸提液 3 1 : 32		浸提液 4 1 : 32		浸提液 5 1 : 32	
G	StAg 0.031 μg/mL		浸提液 1 1 : 64		浸提液 2 1 : 64		浸提液 3 1 : 64		浸提液 4 1 : 64		浸提液 5 1 : 64	

8.2.4 将样品加至测定板

在 96 孔测定板中,用 T-PBS 洗板 2 次。在加入抑制混合物之前,应确保尽可能弃除测定板中残留液体且该板未干燥。从抑制步骤所用的稀释板中取出 100 μL/孔加至测定板。封板,(37±1)℃ 孵育 (120±5)min。

8.2.5 与二抗(HRP 结合的抗兔 IgG)孵育

在 96 孔测定板中,用 T-PBS 洗板 3 次。除了“无二抗”组加入 100 μL/孔稀释液,其余各孔加入 100 μL 适当稀释的二抗,(37±1)℃ 孵育(60±5) min。

8.2.6 底物反应与光度计读数

在 96 孔测定板中,用 T-PBS 洗板 3 次。加入 100 μL/孔底物显色液,室温孵育 5 min~30 min,注意最终检测的 OD 值不宜超过 2.0。用终止液[$c(\text{H}_2\text{SO}_4)=2\text{ mol/L}$ 硫酸溶液]终止显色反应。宜在加入终止液 5 min 后,用酶标仪在 450 nm 检测波长下读数。

注: T-PBS 洗液温度可能影响 ELISA 检测并出现“边缘效应”,即板周边孔的 OD 值始终高于或低于内部重复孔。对于这些结果的可能的解释是,如果在室温下洗板,然后将其置于较高温度如 37℃ 的孵箱中,则微孔板的冷热不均。可以通过确保洗液的温度与孵育的温度相同,来减少温度分布不均匀的影响。

8.3 结果计算

将标准品的平均吸光度值减去本底吸光度值(无二抗)并与标准品浓度绘制拟合曲线。相关系数(r)宜不小于 0.96。待测样品应至少有 2 个稀释度的吸光度值在试验设置的标准品读数范围内,宜在 40%~65% 的抑制率之间。取至少 2 个抑制率 40%~65% 的待测样品的吸光度(推荐 3 个稀释度),将其代入标准曲线,计算相应 NRL 蛋白浓度,取其平均值作为待测样品浸提液中所含 NRL 蛋白浓度

($\mu\text{g/mL}$)。将浸提液中测定的蛋白浓度转化为手套蛋白含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$)。

注 1: 由于测试的抗原水平是由测试方法专门定义的,该测试方法不存在参考值,因此不能确定偏差。

注 2: 物质如洗涤剂或表面活性剂具有防止抗体与抗原结合的可能,并可能干扰 ELISA 测定。然而,由于 ELISA 检测的敏感性,这些干扰常常可以通过连续稀释样品来控制。

9 试验报告

试验报告中宜至少包含下列信息:

- a) 试验样品名称、规格型号和批号;
- b) 试验样品制备方法;
- c) 试验条件和试验步骤;
- d) 试验结果;
- e) 结论。

参 考 文 献

- [1] GB/T 21870—2008 天然胶乳医用手套水抽提蛋白质的测定 改进 Lowry 法
-