



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569410 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510003917. 1

(22) 申请日 2015. 01. 04

(71) 申请人 深圳市艾瑞生物科技有限公司

地址 518100 广东省深圳市宝安区西乡街道  
臣田社区宝田三路宝田工业区 22 栋 5  
楼西边

(72) 发明人 谢爱武

(74) 专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11411

代理人 朱广存

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

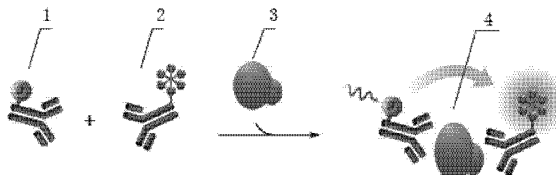
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂组及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂组及其制备方法。本发明所述的快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂组,包括稀土元素螯合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体 (anti-DD)、近红外荧光化合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体和系列浓度的 D- 二聚体校准品。本发明可同时检测高值和低值 D-dimer, 尤其是低值 D-dimer, 且成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,只需要配套专用均相荧光免疫检测仪,因此可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展,对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。



1. 一种快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 包括稀土元素螯合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体、近红外荧光化合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体和系列浓度的 D- 二聚体校准品。

2. 根据权利要求 1 所述的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 稀土元素螯合物为  $\text{Eu}^{3+}$  螯合物。

3. 根据权利要求 2 所述的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 稀土元素螯合物为 BHHCT- $\text{Eu}^{3+}$  或 BHHBCB- $\text{Eu}^{3+}$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 所述近红外荧光化合物为 Alexa 系列近红外荧光化合物、DyLight 系列近红外荧光化合物和 CF 系列近红外荧光化合物中的至少一种。

5. 根据权利要求 4 所述的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 所述近红外荧光化合物 Alexa647、DyLight-DY647 和 CF647 中的至少一种。

6. 根据权利要求 1 所述的均相荧光免疫试剂组, 其特征在于, 所述系列浓度的 D- 二聚体校准品由校准品稀释液稀释 D- 二聚体配制而成, 所述校准品稀释液为含 0.01-0.5wt% PEG800、1-5wt% BSA、5-20wt% 甘油、0.01-0.05wt% 表面活性剂的 Tris 缓冲液缓冲液。

7. 一种权利要求 1-6 中任意一项所述的均相荧光免疫试剂组的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 稀土元素螯合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体的制备:

取 0.5-5mg/ml 的抗 D- 二聚体单克隆抗体溶液, 加入 0.05-0.5mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液后, 调 pH 至 8.5-10, 滴加 10-100  $\mu\text{g/ml}$  配体化合物溶液, 搅拌反应 0.6-2h, 分离得到配体化合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体, 加入终浓度为 0.05-0.5wt% 的 BSA 和 0.01-1wt% 的  $\text{NaN}_3$ , 调 pH 至 5.5-6.5, 免疫分析前, 加入  $\text{Eu}^{3+}$  溶液, 使配体化合物与  $\text{Eu}^{3+}$  等摩尔浓度, 即得, 其中, 抗 D- 二聚体单克隆抗体溶液、 $\text{NaHCO}_3$  溶液和配体化合物溶液的体积比为 0.1-1 : 1 : 0.01-0.05;

2) 近红外荧光化合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体的制备:

将抗 D- 二聚体单克隆抗体用 0.05-0.5mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液稀释至 0.5-5mg/ml, 加入近红外荧光化合物溶解液, 搅匀, 室温孵育 0.5-2h, 分离得到近红外荧光化合物标记的抗 D- 二聚体单克隆抗体;

3) 系列浓度的 D- 二聚体校准品的制备:

将 D- 二聚体用校准品稀释液稀释配制成系列浓度, 即得, 其中, 1)、2) 和 3) 的顺序可以任意颠倒。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于, 抗 D- 二聚体单克隆抗体在于配体化合物反应之前, 先进行透析处理。

## 一种快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂组及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及一种快速定量检测 D- 二聚体的均相荧光免疫试剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 在血凝过程中,纤维蛋白原在凝血酶的作用下,释放出肽 A、肽 B 后,生成纤维蛋白单体 (FM),FM 在钙离子及 x III 因子的作用下,形成交联纤维蛋白,其在纤溶酶的作用下发生降解,降解产物之一就是 D- 二聚体 (D-dimer,DD)。它是交联纤维蛋白的特异性降解产物,血液中 D- 二聚体升高,说明有纤维蛋白的形成和降解,有继发纤溶的发生。DD 的含量变化可以作为体内高凝状态、血栓形成和纤溶亢进的分子标志物之一。DD 反映出的特异性并不是指在某一种特定的具体疾病中的表现,而是针对有凝血和纤溶过程的这一大类疾病的共同病理特点。大量研究表明,静脉血栓栓塞病人、肺栓塞病人及深静脉栓塞的病人,体内循环的 D- 二聚体含量明显增加。

[0003] D- 二聚体在临床检验中应用的十分广泛。研究表明,发生弥漫性内出血 (DIC) 时,由于广泛的微血栓形成,以及继发性纤溶亢进,导致 D-Dimer 水平显著增高,其敏感性和特异性显著高于血小板计数、纤维蛋白原定量、纤维蛋白 (原) 降解产物 (FDP) 等筛选检测试验。急性心肌梗死及脑血栓患者急性发病时血浆 D-Dimer 水平明显增高,D-Dimer 检测不仅可作为观察心肌梗死病情的一项指标,而且也是观察溶栓治疗的一种理想检测方法。深静脉血栓 (DVT) 形成时几乎所有的 DVT 患者 D-Dimer 呈阳性,血浆 D-Dimer 阴性可以基本排除 DVT 可能。D-Dimer 可反映血栓大小的变化,因此可作为溶栓治疗和肝素抗凝的用药指导及疗效观察:治疗期间持续较高,说明治疗无效;含量再升高,预示血栓再发生。继发性纤溶亢进时,D-Dimer 水平显著增高,原发性纤溶症时,D-Dimer 不增高。陈旧性血栓形成时,D-Dimer 不增高。正常妊娠后期的生理性高凝状态下,D-Dimer 水平增高,孕妇血浆 D- 二聚体水平明显高于非孕妇女 ( $p < 0.05$ ),但低于妊高征孕妇 ( $p < 0.05$ ),测定血浆 D- 二聚体含量对妊高征患者高凝状态的诊断、疗效检测和预后判定有重要意义。组织损伤后对凝血系统的激活可使 D-Dimer 水平显著增高,另外,除组织损伤可以导致出现血栓形成趋势外,如果患者自身存在遗传性抗凝缺陷,或者存在风险因素的情况下,易发生静脉血栓,导致 D-Dimer 水平显著增高。

[0004] 目前临床检测 D- 二聚体的方法有自身红细胞凝集法、乳胶凝集法、酶联免疫吸附法 (ELISA)、基于酶免疫法的荧光抗体检测法和免疫金标法。自身红细胞凝集法为半定量方法,其优点是可在全血中检测,省略了离心制备血浆的步骤。乳胶凝集法用于定性或根据其稀释度半定量测定标本中的 D- 二聚体的含量。酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 D- 二聚体不受胆红素、血红蛋白、纤维蛋白原、FDP 干扰,因此更精确,敏感性更高。但操作要求严格费时,每次均需同时做标准曲线,不适于单个标本的测定。荧光抗体检测法是目前研究最多的一种检测方法,敏感性很高,与经典 ELISA 法有很好的一致性,但需要在专用的免疫分析仪

上进行,设备成本昂贵。免疫金标法通过肉眼观察或用折射仪读数。与提供的标准色价或者测定标准品的折射读数,可计算出标本中 D-二聚体的含量。该法既具有胶乳凝集法的操作简单、快速,适用于急诊测定的优点,不受胆红素、Hb、纤维蛋白原、可溶性的纤维蛋白及 FDP 等干扰,但对类风湿因子、肝素及脂血等有一定的干扰。

[0005] 均相荧光分析法 (homogeneous fluoroimmunoassay, HFIA) 是在时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 技术的基础上形成的一种新的荧光免疫分析技术。TRFIA 技术采用的荧光物质与传统的荧光染料完全不同,采用的是镧系元素铕 (Eu)、铽 (Tb) 等作为荧光材料,灵敏度非常高,稳定性好,低温条件可保存三年,因而成为二十一世纪最热门的免疫分析技术。

[0006] 均相荧光免疫检测法是用同一抗原的两个抗体分别标记  $\text{Eu}^{3+}$  和荧光染料 Alexa647。  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体在游离状态时,受到 340nm 光线激发,只发射平均波长为 615nm 荧光,而在抗原、抗体复合物形成时,发生能量传递,激发荧光染料 Alexa647 发射出 665nm 荧光。标记抗体直接与待测样品进行抗原、抗体反应,如果能形成抗原、抗体复合物,则在 665nm 出可测得荧光信号。这种方法省却了酶联免疫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。并且,此法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。此外,  $\text{Eu}^{3+}$  和 Alexa647 这对荧光物质的最大发射光波长之间相差较大,未发生抗原抗体反应的本底荧光值就非常低。而人血清中非特异性物质产生的 300 ~ 500nm 荧光,不能激发 Alexa647 发射荧光信号 650nm 激发光。因此非特异性荧光非常低。

[0007] 本发明采用均相荧光免疫快速检测技术,利用荧光的高灵敏特点,同样也避免了胶体金或者荧光 D-Dimer 干式免疫试纸中的硝酸纤维素膜本身孔隙不均一特性对检测准确度和重复性的不良影响。由于均相荧光免疫检测中样品与荧光标记抗体全过程都在液相中全面接触,反应充分,因此可大幅度提高检测灵敏度和线性范围,同时反应在液相进行也增加了样品的稀释倍数,消除了样品的基质效应影响,使定量结果有很好的可重复性,提高了定量结果的精密度和准确度,可满足临床诊断大规模检测的要求。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有 D-Dimer 检测技术的不足,提供一种快速定量检测 D-Dimer 的均相荧光免疫试剂组。本发明根据荧光免疫技术特点和 D-Dimer 抗原抗体系统特点,设计新的原材料,试剂和工艺流程,应用本发明提供的试剂组检测 D-Dimer 水平,具有简单,快速,灵敏和特异性好等特点,可同时定量检测高值和低值样品,并且性价比高,适用于临床快速检测。

[0009] 本发明的第一个方面是提供一种快速定量检测 D-二聚体的均相荧光免疫试剂组,包括稀土元素螯合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体 (anti-DD)、近红外荧光化合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体和系列浓度的 D-二聚体校准品。

[0010] 优选地,稀土元素螯合物为  $\text{Eu}^{3+}$  螯合物。

[0011] 更优选地,稀土元素螯合物为 BHHCT- $\text{Eu}^{3+}$  或 1,2-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己二酮-6''-基-对苄基)-4-氯磺酰基苯与铕(III)的配合物(BHHBCB- $\text{Eu}^{3+}$ )。

[0012] 优选地,所述近红外荧光化合物为 Alexa 系列近红外荧光化合物、DyLight 系列近

红外荧光化合物和 CF 系列近红外荧光化合物中的至少一种。

[0013] 更优选地,所述近红外荧光化合物 Alexa647、DyLight-DY647 和 CF647 中的至少一种。

[0014] 优选地,所述系列浓度的 D-二聚体校准品由校准品稀释液稀释 D-二聚体配制而成,所述校准品稀释液为含 0.01-0.5wt% PEG800、1-5wt% BSA、5-20wt% 甘油、0.01-0.05wt% 表面活性剂的 Tris 缓冲液。

[0015] D-二聚体校准品可用塑料瓶密封包装。

[0016] 本发明的第二个方面是提供本发明第一个方面所述的均相荧光免疫试剂组的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 稀土元素螯合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体的制备:

[0018] 取 0.5-5mg/ml 的抗 D-二聚体单克隆抗体溶液,加入 0.05-0.5mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液后,调 pH 至 8.5-10,滴加 10-100  $\mu\text{g/ml}$  配体化合物溶液,搅拌反应 0.6-2h,分离得到配体化合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体,加入终浓度为 0.05-0.5wt% 的 BSA 和 0.01-1wt% 的  $\text{NaN}_3$ ,调 pH 至 5.5-6.5,免疫分析前,加入  $\text{Eu}^{3+}$  溶液,使配体化合物与  $\text{Eu}^{3+}$  等摩尔浓度,即得,其中,抗 D-二聚体单克隆抗体溶液、 $\text{NaHCO}_3$  溶液和配体化合物溶液的体积比为 0.1-1 : 1 : 0.01-0.05;

[0019] 2) 近红外荧光化合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体的制备:

[0020] 将抗 D-二聚体单克隆抗体用 0.05-0.5mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液稀释至 0.5-5mg/ml,加入近红外荧光化合物溶解液,搅匀,室温孵育 0.5-2h,分离得到近红外荧光化合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体;

[0021] 3) 系列浓度的 D-二聚体校准品的制备:

[0022] 将 D-二聚体用校准品稀释液稀释配制成系列浓度,即得,

[0023] 其中,1)、2) 和 3) 的顺序可以任意颠倒。

[0024] 其中,稀土元素螯合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8 $^{\circ}\text{C}$  分装保存。

[0025] 其中,近红外荧光化合物标记的抗 D-二聚体单克隆抗体用磷酸盐缓冲液稀释,2-6 $^{\circ}\text{C}$  保存。

[0026] 其中,D-二聚体校准品 2-6 $^{\circ}\text{C}$  保存。

[0027] 优选地,抗 D-二聚体单克隆抗体在于配体化合物反应之前,先进行透析处理。

[0028] 优选地,步骤 1) 中配体化合物为 BHHCT 或 BHHBCB。

[0029] 优选地,步骤 1) 中分离得到配体化合物标记的 anti-D-Dimer 通过离心和柱层析方式进行。柱层析采用 SephadexG-50 柱,0.01-0.1mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH8.0) 洗脱。

[0030] 优选地,步骤 2) 中,分离得到近红外荧光化合物标记的 anti-D-Dimer 通过柱层析的方式进行。

[0031] 进一步优选地,步骤 2) 中,柱层析采用 G25 凝胶柱。

[0032] 优选地,步骤 2) 中,室温孵育时,每隔 10-20min 混匀一次。

[0033] 本发明的均相荧光免疫试剂的使用:先将稀土元素螯合物标记的 anti-D-Dimer 溶液加入反应微孔中,再加入近红外荧光化合物标记的 anti-D-Dimer 溶液,最后分别加入 D-Dimer 校准品和临床检测样品,37 $^{\circ}\text{C}$  反应 20 分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测判读结

果。

[0034] 本发明提供的快速定量检测 D-二聚体的均相荧光免疫试剂组,其反应原理为双抗体夹心法的均相荧光免疫法。待测样品与适当比例的稀土元素(例如  $\text{Eu}^{3+}$ )和荧光标记抗体在液相均质介质中充分混和均匀,在此过程中样品中的 D-Dimer 既能专一性地与稀土元素标记的抗 D-Dimer 抗体充分结合,也能与荧光标记的 D-Dimer 抗体充分反应,形成“稀土元素-anti-DD-DD-anti-DD-荧光化合物”免疫复合物,荧光强度可用专用均相荧光免疫分析仪器定量测定,荧光强度与样品中 D-Dimer 浓度成正比。

[0035] 本发明可同时检测高值和低值 D-Dimer,尤其是低值 D-Dimer,且成本低廉,操作简单、快速、灵敏,且特异性好,只需要配套专用均相荧光免疫检测仪,因此可广泛应用于各级医疗检验场所,尤其是基层医疗机构,包括乡镇卫生院等均可开展,对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

### 附图说明

[0036] 图 1 为本发明的一种实施例的作用原理图,其中,1:  $\text{Eu}^{3+}$  标记 anti-DD, 2: Alexa647 标记 anti-DD, 3: 校准品或待测样本中 D-Dimer, 4:  $\text{Eu}^{3+}$ -anti-DD-DD-anti-DD-Alexa647 免疫复合物;

[0037] 图 2 为 D-Dimer 浓度的标准曲线;

[0038] 图 3 为 D-Dimer 相关性分析曲线。

### 具体实施方式

[0039] 下面参照附图,结合具体的实施例对本发明做进一步的说明,以更好地理解本发明。其中,下述内容中若无特别规定物质浓度均为质量百分比浓度。

[0040] 实施例 1

[0041] 1、标记用 anti-DD 的准备:

[0042] 选用纯化的基因工程表达的抗 D-二聚体单克隆抗体。 $\text{Eu}^{3+}$  标记用抗 D-二聚体单克隆抗体商品编号为 DD1; 荧光素标记用抗 D-二聚体单克隆抗体商品编号为 DD4 和 DD6。

[0043] 2、稀土元素螯合物标记 anti-DD 的制备:

[0044] 用 3L 0.9% NaCl 于 4℃ 透析鼠抗人 D-Dimer 单抗 DD1 溶液 (3mg/ml) 两次,每次 24hr。加水调浓度至 1.5mg/ml。取 0.6ml 该抗体溶液,加入 1ml  $\text{NaHCO}_3$  (0.2mol/L),并用 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.1。将 20  $\mu$ l BHHCT 甲醇溶液 (30  $\mu$ g/ml) 滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应 1hr。离心 (10000rpm, 10min) 除去不溶物后,上 SephadexG-50 柱,用 0.05mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH8.0) 洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的  $A_{330}$  值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为 0.1% 的 BSA 和 0.05% 的  $\text{NaN}_3$ ,用 1mol/L HCl 调 pH 至 6.2。分装后 -20℃ 储存备用。用于免疫分析前,加入  $\text{EuCl}_3$  溶液 (BHHCT 与  $\text{Eu}^{3+}$  等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃ 分装保存。

[0045] 3、Alexa647 标记抗体的制备:

[0046] 将抗 D-Dimer 单克隆抗体 DD4、DD6,分别用 0.1M 碳酸氢钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 30mg 荧光素 Alexa647 溶解液,搅匀,室温孵育 1 小时,每隔 15 分

钟混匀一次。最后用 G25 凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含 0.02% PEG800、2.5% BSA、5% 甘油、0.01% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于 4℃ 保存。

[0047] 4、系列浓度 D-Dimer 校准品的制备:

[0048] 用含 0.05% PEG、2.5% BSA、10% 甘油、0.025% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液,按照 0mg/L、500ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml、10000ng/ml 的浓度稀释溶解 D-Dimer 纯品,混匀后于 4℃ 保存。

[0049] 实施例 2

[0050] 本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同,不同点在于:

[0051] 步骤 2 中,稀土元素螯合物标记 anti-D-Dimer 的制备方法是:用 3L 0.9% NaCl 于 4℃ 透析鼠抗人 D-Dimer 溶液 (3mg/ml) 两次,每次 24hr。加水调浓度至 1.5mg/ml。取 0.6ml 该抗体溶液,加入 1ml  $\text{NaHCO}_3$  (0.2mol/L),并用 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.1。将 20  $\mu\text{l}$  BHHBCB 甲醇溶液 (30  $\mu\text{g/ml}$ ) 滴加到搅拌下的抗体溶液中,并继续搅拌反应 1hr。离心 (10000rpm, 10min) 除去不溶物后,上 SephadexG-25 柱,用 0.05mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH8.0) 洗脱,分离标记蛋白质和游离的标记物。紫外/可见分光光度计检测各收集液的  $A_{330}$  值,合并含有标记抗体的溶液。加入终浓度为 0.1% 的 BSA 和 0.05% 的  $\text{NaN}_3$ ,用 1mol/L HCl 调 pH 至 6.2。分装后 -20℃ 储存备用。用于免疫分析前,加入  $\text{EuCl}_3$  溶液 (BHHBCB 与  $\text{Eu}^{3+}$  等摩尔浓度)。用于免疫分析时,用标记物稀释液稀释使用,2-8℃ 分装保存。

[0052] 实施例 3

[0053] 本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同,不同点在于:

[0054] 步骤 3 中,将抗 D-Dimer 单克隆抗体 DD4、DD6,分别用 0.1M 碳酸氢钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 40mg 荧光素 DyLight-DY647 溶解液,搅匀,室温孵育 1.5 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用 G25 凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含 0.025% PEG600、2.5% BSA、10% 甘油、0.03% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于 4℃ 保存。

[0055] 实施例 4

[0056] 本实施例的制备方法与实施例 1 基本相同,不同点在于:

[0057] 步骤 3 中,将抗 D-Dimer 单克隆抗体 DD4、DD6,分别用 0.1M 碳酸氢钠溶液稀释至 1mg/ml,各取 5ml 抗体溶液,分别加入 50mg 荧光素 CF647 溶解液,搅匀,室温孵育 2 小时,每隔 15 分钟混匀一次。最后用 G25 凝胶柱过柱分离纯化,收集标记好的荧光素标记抗体,用含 0.035% PEG600、5.5% BSA、8% 甘油、0.025% 表面活性剂的 0.01M 磷酸盐缓冲液稀释,用塑料瓶密封包装,于 4℃ 保存。

[0058] 实施例 5

[0059] 在临床检测中,实验步骤为:先将 50  $\mu\text{l}$  的稀土元素螯合物标记 anti-D-Dimer 溶液加入反应微孔中,再加入 50  $\mu\text{l}$  的近红外荧光化合物标记的 anti-D-Dimer 溶液,最后分别加入 50  $\mu\text{l}$  的 D-Dimer 校准品、临床检测样品,37℃ 反应 20 分钟后,用均相荧光免疫分析仪检测判读结果。

[0060] 实施例 6

[0061] 用专用的均相荧光免疫分析仪检测荧光强度,各浓度校准品检测结果如下:

[0062]

D-Dimer 浓度 (ng/ml)	0	500	2500	5000	10000
相对荧光强度	623	1078	2856	4937	8364

[0063] 依据相对荧光强度数据,制作 D-Dimer 的标准曲线,见图 2。D-Dimer 的标准曲线计算公式为  $Y = 0.7753X + 780.37$ ,  $R^2 = 0.9961$ 。

[0064] 实施例 7

[0065] 采用本发明实施例 1,用专用的均相荧光免疫分析仪检测 51 例临床冠心病患者血清样本,同步采用瑞士 Roche 公司的电化学法 D-Dimer 试剂进行对比检测,进行相关性分析,见图 3,结果说明本研究方法与以上市产品检测结果一致,具有临床等效性。实施例 2-4 的临床试验结果与实施例 1 一致。

[0066] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

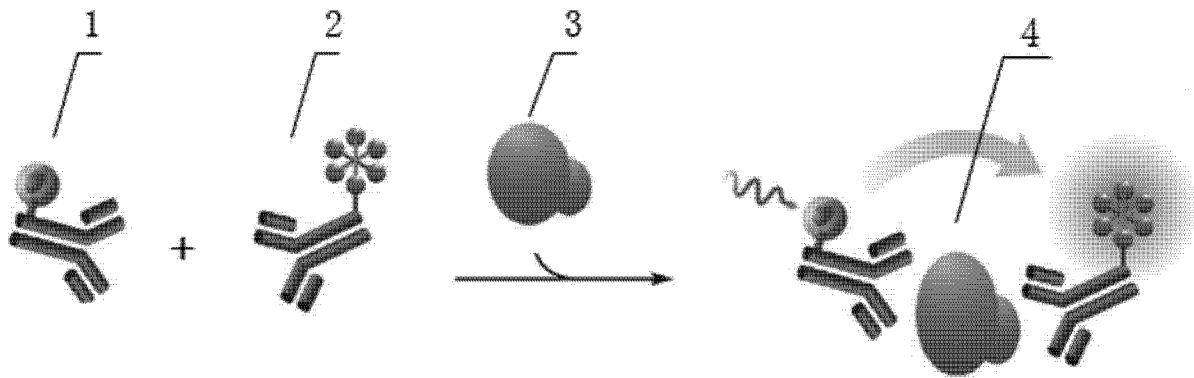


图 1

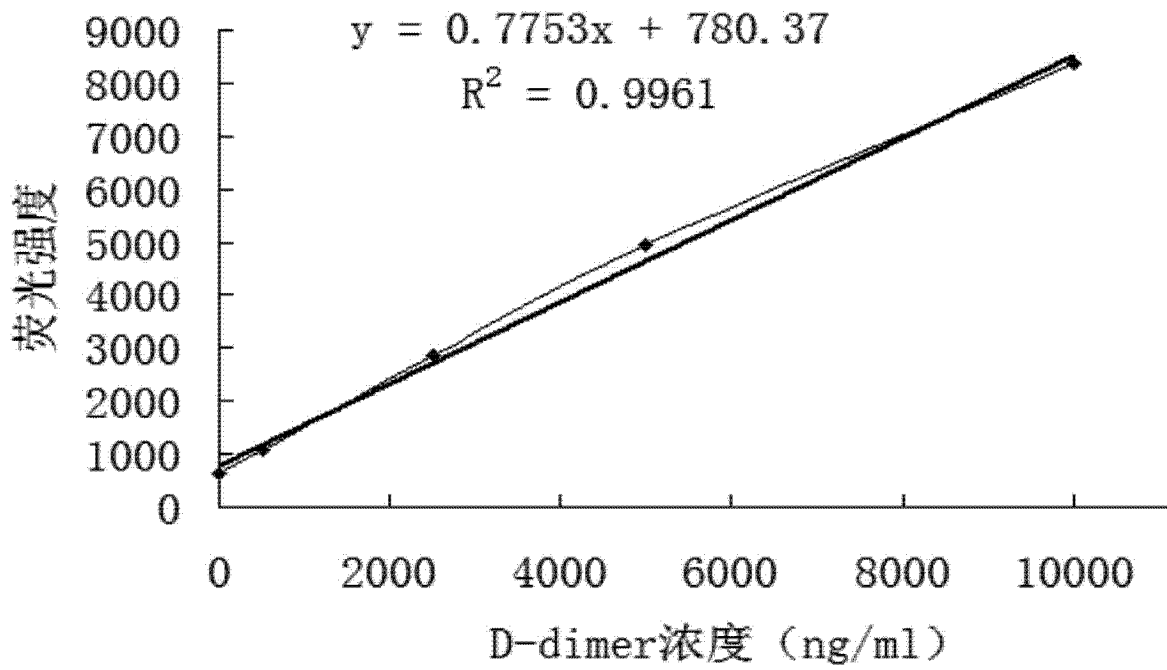


图 2

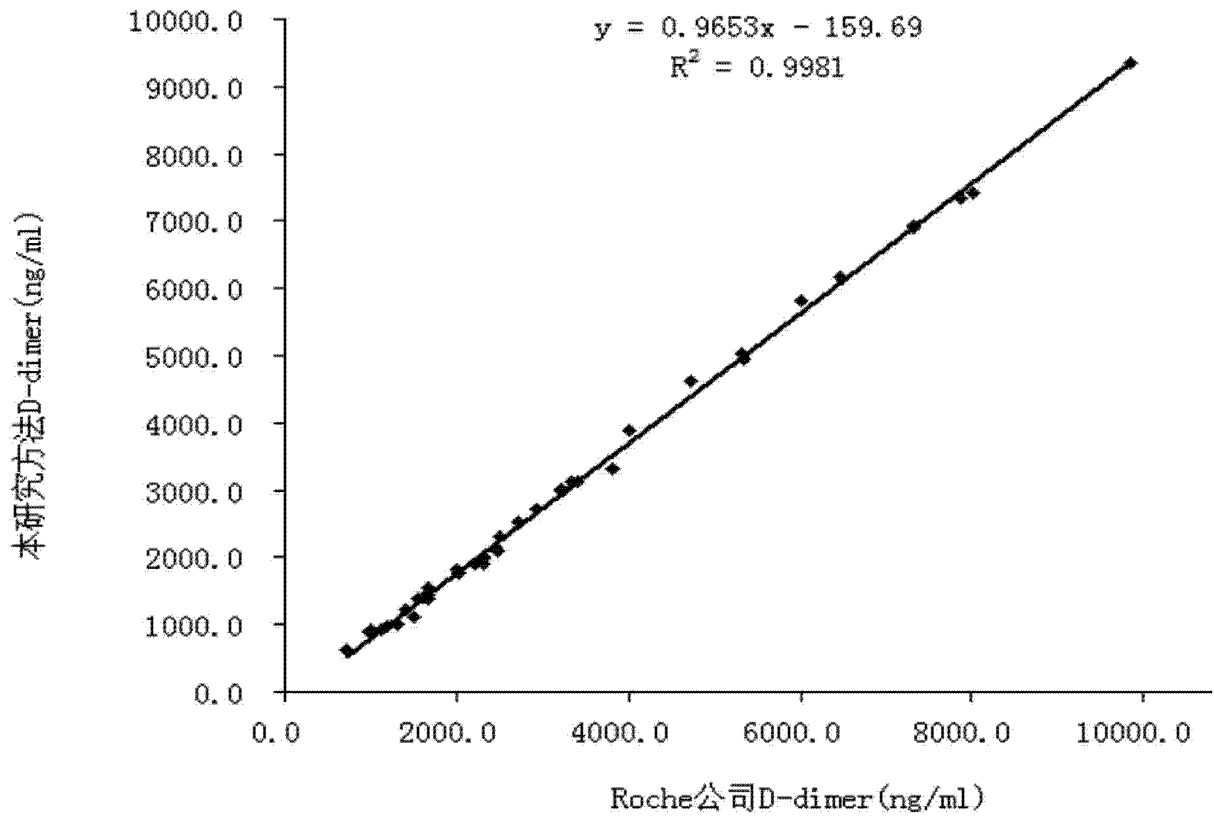


图 3

专利名称(译)	一种快速定量检测D-二聚体的均相荧光免疫试剂组及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104569410A</a>	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510003917.1	申请日	2015-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市艾瑞生物科技有限公司		
[标]发明人	谢爱武		
发明人	谢爱武		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577		
代理人(译)	朱广存		
其他公开文献	CN104569410B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种快速定量检测D-二聚体的均相荧光免疫试剂组及其制备方法。本发明所述的快速定量检测D-二聚体的均相荧光免疫试剂组，包括稀土元素螯合物标记的抗D-二聚体单克隆抗体(anti-DD)、近红外荧光化合物标记的抗D-二聚体单克隆抗体和系列浓度的D-二聚体校准品。本发明可同时检测高值和低值D-dimer，尤其是低值D-dimer，且成本低廉，操作简单、快速、灵敏，且特异性好，只需要配套专用均相荧光免疫检测仪，因此可广泛应用于各级医疗检验场所，尤其是基层医疗机构，包括乡镇卫生院等均可开展，对于心脑血管事件发生的预防有极为重要的意义。

