



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107796940 A

(43)申请公布日 2018.03.13

(21)申请号 201610745285.0

(22)申请日 2016.08.29

(71)申请人 山东博科生物产业有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘明水经济  
开发区(经十东路与明埠路交界山东  
博科产业园)

(72)发明人 甘宜梧 李敏 胡晓飞 王美丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

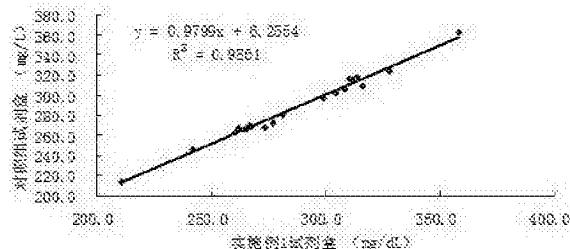
权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54)发明名称

一种抗凝血酶III检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种抗凝血酶III检测试剂盒，本试剂盒采用免疫透射比浊法检测血液中的抗凝血酶III，属于临床体外检测试剂技术领域。本发明试剂盒包括试剂R1和试剂R2。通过将试剂R1与试剂R2中缓冲液更换为pH 6.8的PIPES缓冲液，同时往试剂R2中添加2%的聚乙二醇6000，提高了试剂盒的稳定性，线性范围较好，试剂的准确度也较好，有利于在市场中进一步推广使用。



1. 一种抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于,它包含试剂R1和试剂R2。
2. 其中试剂R1组成为:pH为6.8 P1PES缓冲液、1% TritonX-100、50mmol/L氯化钠、10mmol/L叠氮钠;试剂R2组成为:pH为6.8 P1PES缓冲液、2mg/mL羊抗人抗凝血酶III抗体、2%聚乙二醇6000、10mmol/L叠氮钠。
3. 根据权利要求1所述的抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于试剂R1中缓冲液为25℃,pH为6.8的P1PES缓冲液。
4. 根据权利要求1所述的抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于试剂R2中缓冲液为25℃,pH为6.8的P1PES缓冲液。
5. 根据权利要求1所述的抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于所述稳定剂为聚乙二醇6000。
6. 根据权利要求1所述的抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于,使用全自动生化分析仪采用终点法进行测定,检测主波长为340nm。
7. 根据权利要求1所述的抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于,所述试剂R1和试剂R2在使用时的比例为R1:R2=200:100。

## 一种抗凝血酶III检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及临床体外检测试剂技术领域,特别涉及一种抗凝血酶III免疫比浊法检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 抗凝系统是维持机体出血与止血平衡的重要因素之一,当抗凝系统中某些因子的数量或功能发生改变的时候,就有可能导致出血或血栓形成。抗凝血酶(Antithrombin,AT)是人体抗凝系统的主要因子之一,约占抗凝系统总活性的50%~70%,它与人体各类疾病的发生有着密切的联系。

[0003] 抗凝血酶III是由肝脏合成的,含糖15%且具有一定耐热性的一种 $\alpha$ 2-微球蛋白。它具有分解脂蛋白的作用,对凝血系统中几乎所有的活性丝氨酸蛋白酶都有抑制作用,在肝素的协同作用下,可以和凝血因子中的Ⅱa、Ⅲa、Ⅺa、Ⅸa、Xa等结合,抑制这些因子,特别是抑制凝血酶的活性。近年来,抗凝血酶III的临床价值越来越受到广泛关注。动脉疾病(动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗塞和其它血栓疾病)、血液疾病(急性早幼粒细胞白血病、原发性血小板减少性紫癜)、急性胰腺炎、败血症导致的休克、含雌激素的避孕药等都会导致抗凝血酶III活性下降。先天性抗凝血酶III缺陷患者中抗凝血酶III活性为正常人的30%~60%。往往幼年就易出现血栓,发病常在儿童期。肝脏是抗凝血酶III合成的重要器官,因此,肝病时对抗凝血酶III影响很大,测定抗凝血酶III的活性有诊断价值。

[0004] 目前,用于抗凝血酶III的检测方法主要有免疫透射比浊法和发色底物法,本发明提供一种用免疫透射比浊法检测抗凝血酶III的试剂盒,优化其反应体系,使其操作简单、重复性好、稳定性好、可进行批量样本全自动化检测,从而有利于在市场中进一步的推广使用。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种稳定性好的用于检测抗凝血酶III的试剂盒,该试剂盒采用免疫透射比浊法。该试剂盒与常规的试剂盒相比,稳定性和线性相关性比常规的检测试剂盒要好,有利于试剂在临幊上推广应用。

[0006] 基本原理:

以免疫透射比浊法为测定原理,当样本与试剂混合后,样本中的抗凝血酶III与羊抗人抗凝血酶III抗体特异性的结合,形成抗原-抗体复合物,使溶液产生浊度,在340nm波长下检测,该浊度的高低在一定量抗体存在时与抗原的含量成正比。通过与同样处理的校准液比较,计算未知样本中抗凝血酶III的含量。

[0007] 发明是通过以下步骤得到的:

一种抗凝血酶III检测试剂盒,其特征在于,它包含试剂R1和试剂R2。试剂组成如下:试剂R1为 pH 6.8 P1PES缓冲液、1% TritonX-100、50mmol/L氯化钠、10mmol/L叠氮钠;试剂R2为 pH 6.8 P1PES缓冲液、2mg/mL羊抗人抗凝血酶III抗体、2%聚乙二醇6000、10mmol/L叠氮

钠。

[0008] 所述的抗凝血酶III检测试剂,试剂R1和试剂R2在使用时的比例为R1:R2=200:100,在具有双试剂功能的全自动生化分析仪上利用终点法进行测定,检测主波长为340nm,其具体使用方法如下:

加入生理盐水、样本或校准品3μl,再加入200μl 的R1试剂,预孵育5min后读取吸光度A1,之后再加入100μl的R2试剂,反应5min后读取吸光度A2,并计算Δ A。

[0009] 本发明的有益效果:

- 1)采用新的缓冲体系,改善了试剂的稳定性;
- 2)添加2%的聚乙二醇6000,增强了试剂的稳定性,而且不会对试剂的准确度产生影响;
- 3)试剂的准确度和稳定性好,价格便宜,使用方便,有利于该试剂在市场中进一步推广。

## 附图说明

[0010] 图1为两种试剂的相关性曲线图,

图2为两种试剂效期稳定性曲线图;

图3 准确度验证试验中该发明试剂与市场认可的抗凝血酶III检测试剂对比检测结果;

图4 实施例1试剂与对照组试剂线性相关验证实验检测结果;

图5 实施例1试剂与对照组试剂稳定性验证实验检测结果。

## 具体实施方式

[0011] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步说明:

### 实施例1

一种常规的抗凝血酶III检测试剂盒,它包括试剂R1和试剂R2。

[0012] 其中试剂R1组成为:

P1PES缓冲液	pH 6.8
TritonX-100	1%
氯化钠	50mmol/L
叠氮钠	10mmol/L

试剂R2组成为:

PP1PES缓冲液	pH 6.8
羊抗人抗凝血酶III抗体	2mg/mL
聚乙二醇6000	2%
叠氮钠	10mmol/L。

[0013] 本实施例所述试剂R1和试剂R2,配置时需先配制P1PES缓冲液,用盐酸调节pH,调到适当pH值后,再添加其它物质。本实施例所述试剂盒,在使用时,其测定方法是采用具有双试剂功能的迈瑞800全自动生化分析仪,利用终点法进行测定,检测主波长为340nm,操作如下:

加入生理盐水、样本或校准品3μl,再加入200μl 的R1试剂,预孵育5min后读取吸光度A1,之后再加入100μl的R2试剂,反应5min后读取吸光度A2,并计算Δ A。

[0014]  $\Delta A = A_2 - A_1$

抗凝血酶III含量 (mg/L) = ( $\Delta A$ 测定  $\div$   $\Delta A$ 标准)  $\times$  C标准。

[0015] 测定: 检测样本  $\Delta A$ 标准: 标准品

实施例2

准确度验证试验: 将实施例1的抗凝血酶III检测试剂作为实验组, 市场上获得认可的一种准确度好、稳定性好的抗凝血酶III检测试剂作为对照组进行检测, 对20个临床血清样本进行检测, 检测结果如图3所示。获得了两种试剂的相关性曲线(如图1所示), 结果表明, 两组试剂盒的相关系数为0.9930, 说明两者相关性比较好。证明本发明试剂盒添加及更改的组分对其准确性不会造成影响, 试剂盒依然保持较好的准确度。

[0016] 实施例3

线性相关性验证试验: 选取抗凝血酶III含量为400mg/L的高值样本, 用生理盐水进行系列稀释, 配制6个不同浓度的样本, 浓度依次为400mg/dL、320mg/dL、240mg/dL、160mg/dL、80mg/dL、0mg/dL。分别利用实施例1试剂及对照组试剂进行检测, 每个浓度的样本分别测定三次, 分别取平均值, 检测结果如图4所示。

[0017] 如图4所示, 实施例1与对照组试剂检测结果相关系数均大于0.990, 且实施例1试剂检测结果的相关系数略大于对照组试剂检测结果的相关系数, 这表明本发明试剂具有更好的线性相关性。

[0018] 实施例4

稳定性验证实验: 在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存试剂, 检测实施例1及对照组试剂的稳定性。每月1号分别用两组试剂测定同一混合血清样本, 测定三次取平均值, 检测数据如图5所示。

[0019] 实验结果显示, 实施例1试剂在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存15个月稳定, 而对照组试剂在2℃~8℃、无腐蚀性气体的避光环境中贮存12个月后开始不稳定, 说明本发明试剂更换缓冲液及添加聚乙二醇6000后稳定性增强。

[0020] 综上所述, 本发明提供的抗凝血酶III检测试剂盒, 试剂R1与试剂R2中的缓冲液更换为pH 6.8的P1PES缓冲液, 同时往试剂R2中添加2%的聚乙二醇6000, 提高了试剂盒的稳定性, 线性范围较好, 试剂的准确度也较好。因此, 本发明提供的抗凝血酶III检测试剂盒有利于在市场中进一步推广使用。

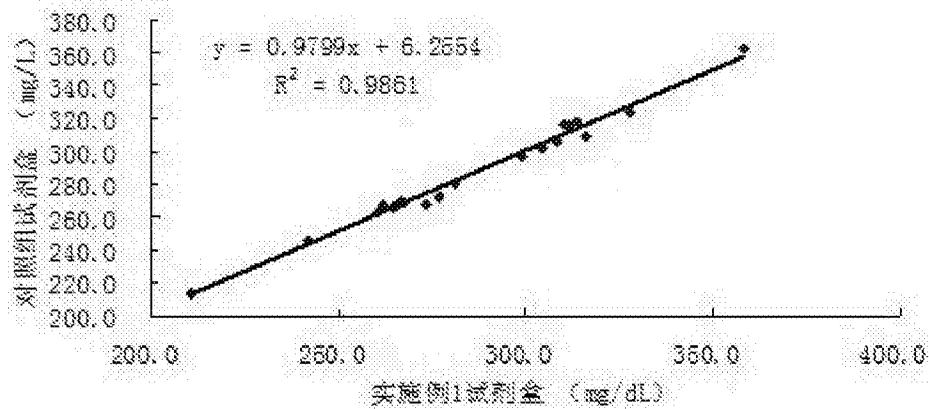


图1

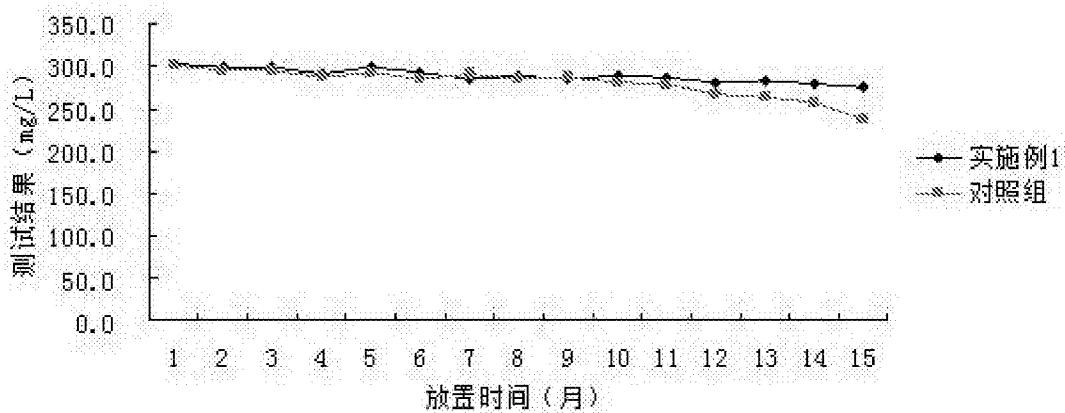


图2

## 实施例 1 试剂与市场认可的抗凝血酶III检测试剂对比检测结果

样本号	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)	相对偏差 (%)
1	260.3	263.0	-1.02%
2	316.2	309.3	2.24%
3	262.1	267.3	-1.93%
4	304.4	301.5	0.97%
5	327.8	323.9	1.21%
6	299.0	296.1	0.97%
7	358.4	362.8	-1.21%
8	273.3	268.1	1.94%
9	308.5	303.9	0.87%
10	266.8	269.0	-0.81%
11	311.6	315.5	-1.23%
12	287.7	289.0	-0.43%
13	276.9	271.9	1.86%
14	242.1	243.6	-1.42%
15	210.8	214.1	-1.55%
16	281.2	280.8	0.15%
17	313.7	317.8	-1.23%
18	265.9	266.8	-0.30%
19	318.2	317.1	-2.18%
20	264.5	266.3	-0.73%
相关系数 R	0.9930		

图3

## 实施例 1 试剂线性相关验证实验检测结果

理论浓度 (mg/L)	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)
0	0.2	0.3
80	79.2	82.3
160	163.7	155.2
240	240.9	237.5
320	329.6	327.6
400	410.7	415.8
相关系数 R	0.9998	0.9993

图4

## 实施例 1 试剂稳定性验证实验检测结果

时间	实施例 1 试剂 (mg/L)	对照组试剂 (mg/L)
1 个月	302.6	301.2
2 个月	299.1	294.3
3 个月	297.9	294.9
4 个月	298.1	286.3
5 个月	297.6	292.5
6 个月	292.6	284.9
7 个月	285.6	290.2
8 个月	288.5	284.2
9 个月	284.0	286.3
10 个月	288.0	281.4
11 个月	287.0	278.3
12 个月	280.2	266.5
13 个月	283.3	262.5
14 个月	279.0	256.5
15 个月	275.2	238.1

图5

专利名称(译)	一种抗凝血酶III检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107796940A</a>	公开(公告)日	2018-03-13
申请号	CN201610745285.0	申请日	2016-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	济南鑫贝西生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
[标]发明人	甘宜梧 李敏 胡晓飞 王美丽		
发明人	甘宜梧 李敏 胡晓飞 王美丽		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/536		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种抗凝血酶III检测试剂盒，本试剂盒采用免疫透射比浊法检测血液中的抗凝血酶III，属于临床体外检测试剂技术领域。本发明试剂盒包括试剂R1和试剂R2。通过将试剂R1与试剂R2中缓冲液更换为pH 6.8的PIPES缓冲液，同时往试剂R2中添加2%的聚乙二醇6000，提高了试剂盒的稳定性，线性范围较好，试剂的准确度也较好，有利于在市场中进一步推广使用。

