



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101833010 B

(45) 授权公告日 2013.02.13

(21) 申请号 201010140329.X

说明书第 11 栏 16 — 17 行

(22) 申请日 2010.03.29

说明书第 11 栏 16 — 42 行

说明书第 11 栏第 41 行。

(73) 专利权人 上海太阳生物技术有限公司

地址 201108 上海市金都路 3419 号

EP 1072887 B1, 2005.11.16, 说明书第 11 页第 85 自然段。

(72) 发明人 谢永华 朱美萍 许付

CN 1773283 A, 2006.05.17, 全文。

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

EP 1072887 B1, 2005.11.16, 说明书第 11 页第 85 自然段。

代理人 魏晓波 逯长明

审查员 刘文瀚

(51) Int. Cl.

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5175112 A, 1992.12.29, 说明书第 7 栏 57 — 66 行

说明书第 13 栏实施例 5。

EP 1610128 A1, 2005.12.28, 说明书第 11 栏 21 — 23 行。

US 6248597 B1, 2001.06.19, 说明书第 10 栏至第 11 栏所包含的实施例 1 的 b 部分

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54) 发明名称

纤维蛋白(原)降解产物(FDP)测定试剂盒
(胶乳免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体公开一种采用胶乳免疫比浊法检测纤维蛋白(原)降解产物(FDP)含量的试剂盒,所述试剂盒包含将酸化的抗人 FDP 抗体与聚乙烯基苯基氯胶乳颗粒发生化学交联并封闭后形成的抗人 FDP 抗体胶乳试剂。本发明所述试剂盒采用胶乳免疫比浊法检测 FDP 含量,灵敏度高,可达到 0.10 μg/ml;稳定性好,操作简单、快速,从检测到出结果仅需 5-10 分钟;特异性强,不易受干扰;定量准确,具有广泛的应用前景。

1. 一种采用胶乳免疫比浊法检测 FDP 含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1、试剂 R2、稀释液、FDP 校准品;所述试剂 R1 为 pH 值 7.0-9.0 的缓冲液,所述试剂 R2 为抗人 FDP 抗体胶乳试剂,抗人 FDP 抗体胶乳试剂由以下方法制备:

步骤 1:将抗人 FDP 抗体在 pH 值为 2.5-3.0 的溶液中进行酸化;

步骤 2:将步骤 1 所得溶液用碱溶液调节 pH 至 7.5-8.0,加入粒径为 100-200nm 的聚乙烯基苄基氯胶乳溶液,在 20-25℃ 搅拌 0.5-2 小时,再在 37℃ 孵育 2-4 小时;

步骤 3:将步骤 2 所得溶液用 pH 值为 7.5-8.5 的封闭液在 37℃ 封闭 1-8 小时;

步骤 4:将步骤 3 所得溶液经离心后,取沉淀用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散即得。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 所述溶液为甘氨酸、盐酸或磷酸溶液中的一种。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 2 所述碱溶液为三羟甲基氨基甲烷溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 3 所述封闭液为含 BSA 的 0.1mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液,BSA 浓度质量体积百分比以 g/ml 计为 0.1-0.5%。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述缓冲液为 Tris/HCl 缓冲液。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 4 所述稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂、抗氧剂中的一种或多种。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为质量体积百分比以 g/ml 计为 0.1-0.5% 的 BSA、4-6% 的丝氨酸、0.7-0.9% 的氯化钠、0.01% 的抗氧剂二叔丁基对甲酚和体积百分比为 0.1-0.6% 的表面活性剂吐温 40、1-10% 的助悬剂丙三醇。

8. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述缓冲液选自 Tris/HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种或多种的组合。

9. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为 10-70mmol/L 的 Tris/HCl 缓冲液,含有促凝剂 PEG-6000,质量体积百分比以 g/ml 计为 2-6%。

纤维蛋白（原）降解产物（FDP）测定试剂盒（胶乳免疫比浊法）

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种采用胶乳免疫比浊法检测纤维蛋白（原）降解产物（FDP）含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 纤维蛋白溶解系统，简称纤溶系统，是人体最重要的抗凝系统，对保持血管壁的正常通透性，维持血液的流动状态和组织修复起着重要作用，由 4 种主要部分组成：纤溶酶原、纤溶酶原激活剂（如 t-PA、u-PA）、纤溶酶、纤溶酶抑制物。纤维蛋白（原）降解产物（Fibrin(ogen) Degradation Products, FDP）是在纤溶系统被激活后产生的纤溶酶的作用下，人体内的纤维蛋白原和纤维蛋白被降解，所产生的各种二聚体、多聚体及复合物的统称，生成的 FDP 反映机体纤溶活性的总水平。

[0003] 纤溶系统的激活有多种途径，主要分为内激活、外激活和外源性激活途径。内激活途径是在内源性凝血途径中凝血因子 XIIa 使激肽释放酶原转变激肽释放酶，激肽释放酶使单链尿激酶型纤溶酶原激活物转变为双链尿激酶型纤溶酶原激活物，从而激活纤溶酶原变为纤溶酶，表现为继发性纤溶亢进；而外激活途径是通过血管内皮细胞释放组织型纤溶酶原激活物（t-PA），将纤溶酶原裂解成为纤溶酶，表现为原发性纤溶亢进。另外，外源性激活途径是通过外界进入体内的溶栓药物如 SK、UK 和 t-PA 等，将纤溶酶原激活成纤溶酶。在纤溶酶的存在下，纤维蛋白原和纤维蛋白降解成各种可溶片段，形成纤维蛋白降解产物（FDP）。由此可见，体内 FDP 水平在原发性和继发性纤溶亢进均可升高，是综合反映纤溶亢进的敏感指标，同时 FDP 的检测也可以反映溶栓药物的治疗疗效。

[0004] 近几年来，FDP 含量的检测在临床诊断、筛查上应用广泛，其含量升高可证明有纤溶亢进，如恶性肿瘤、弥散性血管内凝血、深静脉血栓形成、肺栓塞、严重细菌感染、慢性肝病、器官移植的排斥反应、妊娠高血压综合症等疾病所致的继发性及原发性纤溶亢进，FDP 含量均出现升高。在溶栓药物的治疗过程中，大量纤溶酶的生成，加速血栓的溶解，血液中 FDP 升高，对血清或血浆 FDP 浓度的检测，可以监控溶栓药物的治疗效果。另由于血管内凝血，纤溶异常，大量 FDP 经肾脏排出或由于肾炎导致纤维蛋白在肾小管沉积同时继发激活纤维蛋白降解系统生成 FDP 从尿中排出，因此尿液中出现 FDP 也意味着体内或肾脏有血管内凝血和纤溶现象。动态地观察尿 FDP 的变化，对肾移植后排斥反应的诊断有重要意义。因此，检测样本包括血清、血浆、尿液中 FDP 的含量对纤溶系统疾病的早期、快速、准确诊断及对溶栓药物治疗的疗程监测和疗效考核具有重要的应用价值。

[0005] 目前在临床上使用的 FDP 检测方法有：乙醇胶试验、鱼精蛋白副凝试验、乳胶凝集法、酶联免疫吸附（ELISA）法和胶乳免疫比浊法等。但都存在一定局限性。

[0006] 乙醇胶试验、鱼精蛋白副凝试验是只能通过与 FDP 产物中 X、Y 片段产生凝块，对 FDP 进行定性检测；乳胶凝集法虽具有快速，操作简便、费用不高等优点，但是其灵敏度低，通过肉眼观察，仅能检出 $5 \mu\text{g/ml}$ 水平的 FDP，常用于定性或半定量测定作为筛查；酶联免

疫吸附 (ELISA) 法虽具有灵敏度高, 检测结果准确可靠, 是一种经典的方法, 但是操作要求严格费时, 检测成本高, 易受多种因素影响, 不适用于临床病人和急诊病人及时诊断及治疗的需要。

[0007] 胶乳免疫比浊法具有操作简便、快速、检测灵敏度高、特异、定量准确等优点, 在临床应用上得到广泛认可。但现有市场上采用该法测定纤维蛋白 (原) 降解产物 (FDP) 含量的试剂盒在样本 FDP 浓度低于 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 时一般不能准确定量, 检测灵敏度欠佳。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对现有胶乳免疫比浊法检测 FDP 的方法敏感度低的缺陷, 提供一种定量检测血浆、血清、尿液等样本中 FDP 含量, 且操作简单、快速、定量准确、敏感度更高的诊断试剂盒。

[0009] 为了解决上述技术问题, 本发明是这样实现的:

[0010] 一种采用胶乳免疫比浊法检测 FDP 含量的试剂盒, 包含试剂 R1、试剂 R2、稀释液、FDP 校准品。

[0011] 本发明所述试剂 R2 为抗人 FDP 抗体胶乳试剂, 所述抗人 FDP 抗体胶乳试剂的制备包含以下步骤:

[0012] 步骤 1: 将抗人 FDP 抗体在 pH 值为 2.5-3.0 的溶液中进行酸化;

[0013] 步骤 2: 将步骤 1 所得溶液用碱溶液调节 pH 至 7.5-8.0, 加入粒径为 100-200nm 的聚乙烯苄基氯胶乳溶液, 在 20-25°C 搅拌 0.5-2 小时, 再在 37°C 孵育 2-4 小时;

[0014] 步骤 3: 将步骤 2 所得溶液用 pH 值为 7.5-8.5 的封闭液在 37°C 封闭 1-8 小时;

[0015] 步骤 4: 将步骤 3 所得溶液经离心后, 取沉淀用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散后即得。

[0016] 作为优选, 步骤 1 所述溶液为甘氨酸、盐酸或磷酸溶液中的一种。在具体实施方式中, 步骤 1 所述酸化选择甘氨酸溶液, 调节溶液的 pH 值为 2.5-3.0, 并在 20-25°C 保持 30-40min。

[0017] 作为优选, 步骤 2 所述碱溶液为三羟甲基氨基甲烷溶液。步骤 2 将抗人 FDP 抗体酸化后, 用三羟甲基氨基甲烷溶液调节 pH 至中性, 在 10min 之内与粒径为 100-200nm 的聚乙烯苄基氯胶乳颗粒溶液化学交联致敏, 形成共价抗体-胶乳复合物, 否则酸化后抗体在中性溶液中的空间三维结构容易回复到没有活性的自然构象。

[0018] 步骤 3 将形成的共价抗体-胶乳复合物溶液, 用 pH 值为 7.5-8.5 含 BSA 的 0.1mol/L 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液封闭胶乳颗粒未结合抗体的表面活性基团氨基氯。

[0019] 更优选地, 步骤 3 所述缓冲液中的 BSA 浓度质量体积百分比以 g/ml 计为 0.1-0.5%。

[0020] 步骤 4 所述缓冲液优选为 Tris/HCl 缓冲液, 将封闭后的溶液用含有稳定剂和防腐剂的 Tris/HCl 缓冲液洗涤分散, 即得到稳定的试剂 R2。

[0021] 聚乙烯苄基氯胶乳颗粒是一种核壳形式的胶乳颗粒, 其胶乳核是甲苯乙烯聚合物, 胶乳壳为乙烯基苄基氯的聚合物, 是一种疏水性胶乳。在壳的表面具有高密度的氯甲基基团, 这些活性表面功能基团能够在温和的水溶液中直接与抗体、抗原或其它配体的氨基基团反应, 通过一步反应产生一种稳定的共价化合物。通过加入适当的表面活性剂, 该胶乳

粒子的表面形成机械性或电性的保护膜,可以抑制胶乳颗粒的絮凝;根据胶乳颗粒的比重,通过适当助悬剂调节缓冲液比重和粘度,能够使胶乳颗粒稳定悬浮而不会沉降。

[0022] 抗人 FDP 抗体通过适当的酸处理后,抗体的铰链区三维空间结构进行了一定的修饰改变,导致包埋的铰链区疏水性 FC 片段暴露,使得更易与疏水性胶乳颗粒结合,FC 特殊的位点与胶乳表面活性基团甲基氯发生共价键结合,形成稳定的抗体-胶乳颗粒。FC 片段活性位点吸附在胶乳颗粒的表面,由于空间立体结构的影响,FC 片段不能与类风湿因子 Rf 和补体 C1Q 等血液中干扰物质反应,从而降低了血液中干扰物质的影响。抗体经酸处理后,由于更多可利用的 FDP 抗原结合位点暴露,提高胶乳抗体的反应活性,从而可以减少胶乳试剂制备中抗体的用量,降低成本,同时也提高分析灵敏度。

[0023] 稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂、抗氧剂中的一种或多种。

[0024] 本领域技术人员可以根据稳定剂所起的稳定作用原理及需求,选择以下的多种进行组合:牛血清白蛋白和明胶,能够对胶乳颗粒表面交联的抗体起到很好的胶体保护稳定作用,优选 BSA,其终浓度质量体积百分比以 g/ml 计为 0.1-0.5%;乙二醇、丙三醇、麦芽糖等作为一种助悬剂,可以提高溶液的密度和粘度,使胶乳颗粒能够长期悬浮在溶液中不会沉降而起到很好的稳定作用,优选丙三醇,其终浓度体积百分比为 1-10%;甘氨酸、丝氨酸、精氨酸等氨基酸能够与金属离子形成稳定的络合物,可以防止溶液中进入金属离子干扰,优选丝氨酸,其终浓度质量体积百分比以 g/ml 计为 4-6%;表面活性剂包括阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、非离子型表面活性剂选择,能够吸附在胶乳颗粒的表面,降低胶乳颗粒表面张力,使胶乳颗粒不易聚集,有效地提高胶乳颗粒在溶液中稳定性,优选吐温 40,其终浓度体积百分比为 0.1-0.6%;抗氧剂选择二叔丁对甲酚,终浓度质量体积百分比以 g/ml 计为 0.01%;选择适当浓度的无机盐,如质量体积百分比以 g/ml 计为 0.80%的氯化钠。

[0025] 更优选地,所述稳定剂为:BSA 0.1-0.5% (g/ml),丝氨酸 4-6% (g/ml)、助悬剂丙三醇 1-10%、表面活性剂吐温 40 0.1-0.6%、抗氧剂二叔丁对甲酚 (BHT) 0.01% (g/ml) 和氯化钠 0.7-0.9% (g/ml) 的组合。

[0026] 所述防腐剂选自本领域技术人员已知的适当防腐剂,如 0.1% (g/ml) 的叠氮钠。

[0027] 本发明所述试剂 R1 为 pH 值 7.0-9.0 的缓冲液。

[0028] 作为优选,所述缓冲液选自 Tris/HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种或多种的组合。

[0029] 更优选地,所述缓冲液为 10-70mmol/L 的 Tris/HCl 缓冲液。

[0030] 作为优选,所述缓冲液中含有促凝剂 PEG-6000,质量体积百分比以 g/ml 计为 2-6%,可以加快抗原抗体的免疫反应速度,缩短检测时间;含有无机盐氯化钠,质量体积百分比以 g/ml 计为 0.7-0.9%。

[0031] 本发明所述稀释液选自生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水中的一种。

[0032] 作为优选,所述稀释液选择 pH7.4 的磷酸盐缓冲生理盐水。

[0033] 本发明所述 FDP 校准品可由市场购得或通过自制获得。在具体实施方式中,公开了一种制备 FDP 校准品的方法:将人纤维蛋白原在 Tris/HCl 缓冲液中加入纤溶酶降解,将

得到的纤维蛋白原降解产物 (FDP) 溶液用 Tris/HCl 缓冲液稀释成 FDP 浓度为 27-33 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 再添加稳定剂 BSA、赋形剂甘露醇和防腐剂后通过冻干制成。其中 Tris/HCl 缓冲液的浓度 30-70mmol/L, pH 为 7.0-8.0; BSA 的终浓度为 20-60mg/ml; 甘露醇的终浓度为 10-30mg/ml。

[0034] 胶乳免疫比浊法的基本原理是将 FDP 抗体吸附于大小适中、均匀的胶乳颗粒上, 当遇到样本中的 FDP 抗原时, 抗原与抗体胶乳结合, 则使胶乳颗粒发生聚集, 胶乳的粒径发生改变, 从而引起浊度的改变, 反应体系的透光率降低, 当达到稳定的下降速率即线性期时, 透光率变化速率与 FDP 浓度呈正比。采用血凝分析仪或生化分析仪测定在一定波长下反应体系在线性期的透光率的变化率, 通过绘制校准曲线可以计算出样本中 FDP 的含量。

[0035] 用本发明所述试剂盒采用胶乳免疫比浊法对 FDP 校准品进行 FDP 含量检测, 在血凝分析仪或生化分析仪上测定其透光率的变化率与 FDP 浓度建立校准曲线。取待测样本同法测定其透光率的变化率, 即可在校准曲线上求得待测样本中 FDP 的含量。

[0036] 本发明所述试剂盒与现有技术相比, 具有如下特点:

[0037] 1、灵敏度高, 可达到 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$;

[0038] 2、0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 线性范围内高度相关, 重复性好;

[0039] 3、特异性强, 且不易受干扰;

[0040] 4、本发明试剂盒稳定性好, 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 可保存 18 个月, 各试剂开瓶后至少可以保存 15 天。

[0041] 5、操作简单、快速, 从检测到出结果仅需 5-10 分钟。

附图说明

[0042] 图 1 为本发明所述试剂盒的校准曲线;

[0043] 图 2 示本发明所述试剂盒线性范围相关性;

[0044] 图 3 为本发明所述试剂盒与市售进口试剂盒检测结果相关性比较。

具体实施方式:

[0045] 本发明公开了一种检测纤维蛋白(原)降解产物(FDP)含量的试剂盒, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

[0046] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明, 但不作为对本发明的限定。

[0047] 实施例 1: 本发明所述试剂盒的组成及制备方法

[0048] 试剂 R2 即抗人 FDP 抗体胶乳试剂的制备: 将含有 500 μg 鼠抗人 FDP 单克隆抗体(购自 American Diagnostica Inc., 产品货号 ADINo. 313) 冻干品, 加入 0.5ml 去离子蒸馏水复溶, 取 50 μl 溶液用 3ml 0.1M 氯化钠溶液(含叠氮钠 0.1% (g/ml)) 稀释, 向溶液中加入 2.0ml 0.05M 甘氨酸缓冲液(pH2.3, 0.1M 氯化钠), 溶液的 pH 值为 2.8。酸化的抗体溶液在室温下(20-25 $^{\circ}\text{C}$) 保持 30-40min, 然后向溶液中加入 100 μl 1M 的三羟甲基氨基甲烷溶液, 将 pH 值调为 7.5-8.0 之间。

[0049] 取 1.25ml 4% (g/ml) 聚乙烯苄基氯胶乳颗粒混悬液 (美国 INVITROGEN 公司, 产品货号为 C37345, 平均粒径为 200nm), 加入 3.75ml 去离子蒸馏水稀释, 将调节至中性后的酸活化的抗体溶液立即在 300rpm 磁力搅拌下加入稀释后的胶乳混悬液中充分混合, 在室温 (20-25°C) 下继续搅拌 45 分钟, 再在 37°C 孵育 3 小时, 形成稳定的胶乳颗粒-抗体复合物。然后加入 2.8ml 封闭液 (含 0.2% (g/ml) BSA 的 0.1mol/L 甘氨酸缓冲液, pH 8.0) 在 37°C 封闭 1 小时, 离心倾去上清液, 用 20ml 30mmol/L Tris/HCl 缓冲液 (含 0.2% BSA、6% 丙三醇、5% 丝氨酸、0.1% 吐温 40、0.8% 氯化钠、0.01% BHT、0.1% 叠氮钠, pH 为 8.0) 洗涤 1 次, 再以同样的 20ml Tris 缓冲液分散成乳白色混悬液, 使致敏的抗体胶乳颗粒浓度为 2.5mg/ml。

[0050] 试剂 R1 为缓冲液, 其配制方法: 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 浓度为 50mmol/L, 用盐酸调节后 pH 值为 8.0。再加入氯化钠、PEG-6000、叠氮钠, 其终浓度分别: 氯化钠 0.85%、PEG-6000 5%、叠氮钠 0.1%。

[0051] 本领域技术人员也可选择常规的其他缓冲液, 如磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种或多种。

[0052] 稀释液: 添加防腐剂的磷酸盐缓冲生理盐水 (pH = 7.4), 其组成为 Na_2HPO_4 10mmol/L, NaH_2PO_4 2mmol/L, NaCl 135mmol/L, KCl 4.7mmol/L, 叠氮钠 0.1%。

[0053] FDP 校准品的制备: 将市售人纤维蛋白原加入到 50mmol/L Tris/HCl 缓冲溶液 (Tris 50mM、NaCl 0.15mM、pH 值 7.4), 使浓度达到 5.0mg/ml, 向溶液中加入纤溶酶 (终浓度为 10mU/ml), 在 37°C 搅拌 6 小时。再在 56°C 水浴 2 小时, 将纤溶酶灭活终止反应。以每分钟 3000 转离心 10 分钟, 得到的上清液即为纤维蛋白原降解产物 (FDP) 溶液。以进口的日本积水医疗株式会社生产 FDP 校准品为原始标准, 采用其 FDP 检测试剂盒 (胶乳免疫比浊法) 进行测定 20 次, 求出均值。

[0054] 将得到的 FDP 溶液用上述 50mmol/L Tris/HCl 缓冲液稀释成 FDP 浓度为 27-33 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 然后再加入终浓度分别为 50mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA)、20mg/ml 甘露醇、0.1% 叠氮钠混合均匀。以 0.5ml/瓶分装后进行冷冻干燥, 即可得到 FDP 校准品的冻干疏松固体。取校准品 10 瓶, 分别用 0.5ml 蒸馏水复溶, 作为样本用日本积水医疗株式会社 FDP 试剂盒每瓶重复测定 2 次, 计算总均值即为标示值, 浓度为 30.640 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0055] 实施例 2: 本发明所述试剂盒的测定方法

[0056] 将试剂盒中 FDP 校准品, 精确加入 0.5ml 蒸馏水溶解, 用稀释液配制成 6 个不同浓度的校准品溶液, 浓度分别为 0.958、1.915、3.830、7.660、15.320、30.640 $\mu\text{g/ml}$ 。以日本东亚 CA550 血凝分析仪操作为例: 反应温度为 37°C, 测定波长为 575nm, 分别取不同浓度的校准品溶液 10 μl , 加入稀释液 10 μl , 反应 30 秒后加入试剂 R1 100 μl , 再反应 60 秒后加入实施例 1 制备的试剂 R2 100 μl , 测定反应第 50 秒、第 300 秒的吸光度值 (A_1 、 A_2), 计算吸光度差值 $\Delta A = A_2 - A_1$, 每管重复测定 3 次, 将各校准管 3 次测得的吸光度差值 ΔA 的均值为纵坐标, 对应的浓度为横坐标, 制作“浓度-吸光度差值”校准曲线: $y = 0.01252x - 0.00249$, 相关系数 $r = 0.9995$, 见图 1。

[0057] 取待测样本, 同上方法测定样本的吸光度差值, 代入校准曲线, 即可以计算出待测样本中 FDP 的含量。如果样本中 FDP 的检测浓度超出校准曲线范围, 为了保证检测的准确性, 需要用 FDP 稀释液进行适当稀释后再行检测。

[0058] 本试剂盒不仅适用于日本东亚 CA550 血凝仪,而且还适用于其它品牌、型号的血凝分析仪和生化分析仪,具体参数可根据仪器不同进行适当调整。

[0059] 实施例 3:本发明所述试剂盒的分析性能评估

[0060] 1. 线性范围

[0061] 将接近线性范围上限的 FDP 的高浓度样本 (30.42 $\mu\text{g/ml}$),用 FDP 稀释液将其按 1/2, 1/10, 1/15, 1/30, 1/60 稀释,共配制成 6 个不同浓度的溶液,用实施例 2 所述方法检测各浓度,每浓度重复测定 3 次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程为 $Y = 1.03917X - 0.08011$,相关系数为 $r = 0.9996$,表明本发明试剂盒在 0.50 $\mu\text{g/ml} \sim 30.0 \mu\text{g/ml}$ 线性范围内相关性较好,见图 2。

[0062] 2. 灵敏度即最低检测限

[0063] 以 5% 人血清白蛋白为空白样本,按实施例 2 所述方法进行测定,重复测定 20 次,计算结果均值为 0.0008,标准差 SD 为 0.00025,根据以空白均值加两倍标准差报告方法计算吸光度变化量为 0.0013,用稀释后浓度为 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、0.10 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 的 FDP 校准品溶液测定,吸光度变化值分别为 0.0007、0.0014、0.0020,其中浓度为 0.10 $\mu\text{g/ml}$ FDP 校准品 ΔA 高于 +2SD 的计算值,因此本发明试剂盒检测 FDP 的灵敏度为 0.10 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0064] 3. 重复性和准确度

[0065] 用日本积水医疗株式会社标示值分别为 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 28.6 $\mu\text{g/ml}$ 的 FDP 校准品作为样本,按实施例 2 所述的方法测定,各浓度分别重复测定 10 次,分别计算测定均值 \bar{X} 和标准差 (S)。分别以 $S/\bar{X} \times 100\%$ 计算变异系数进行重复性考察,结果显示变异系数分别为 1.62% 和 1.21%;以 $(1 - \bar{X} / \text{标示值}) \times 100\%$ 计算相对偏差进行准确度考察,其相对偏差分别为 1.71% 和 1.13%。

[0066] 表 1 本发明所述试剂盒的重复性和准确度考察

[0067]

序号	标示值为 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 的检测值 ($\mu\text{g/ml}$)	标示值为 28.6 $\mu\text{g/ml}$ 的检测值 ($\mu\text{g/ml}$)
1	4.52	28.35
2	4.45	28.08
3	4.32	28.03
4	4.46	28.18
5	4.37	27.95
6	4.38	29.14

[0068]

7	4.53	28.45
8	4.41	28.34
9	4.45	28.13
10	4.34	28.12
平均值 (\bar{X})	4.42	28.28
标准差 (S)	0.071	0.341
变异系数 (CV%)	1.62%	1.21%
相对偏差 (Bias%)	1.71%	1.13%

[0069] 4. 批间精密度 (批间差)

[0070] 用 3 个批号的本发明实施例 1 组成的试剂盒分别测定同一份血浆样本各 3 次, 分别计算每个批号 3 次的测定均值 (\bar{X}) 和 3 个批号的总均值 (\bar{X}_T), 以 $(\bar{X}_{\max} - \bar{X}_{\min}) / \bar{X}_T \times 100\%$ 进行批间精密度计算, 结果显示批间精密度为 2.38%。

[0071] 表 2 本发明所述试剂盒的批间差考察

[0072]

序号	批号 1 检测结果 ($\mu\text{g/ml}$)	批号 2 检测结果 ($\mu\text{g/ml}$)	批号 3 检测结果 ($\mu\text{g/ml}$)
1	5.48	5.42	5.41
2	5.59	5.56	5.34
3	5.52	5.44	5.45
平均值 (\bar{X})	5.530	5.473	5.400
总均值 (\bar{X}_T)	5.468		

[0073] 5. 干扰物质的影响

[0074] 将浓度为 $16.1 \mu\text{g/ml}$ FDP 校准品溶液, 分别加入相同体积的各干扰物质溶液, 加入后浓度分别为胆红素 (18mg/L)、血红蛋白 (470mg/L), 乳糜 (福尔马胂) 浊度为 2800 和类风湿因子 (RF) (470IU/ml), 每个样本重复测定 3 次, 取平均值, 与加入同体积的蒸馏水比较, 观察加入干扰物质与加入蒸馏水后 FDP 测定值的相对误差。结果表明: 加入以上浓度干扰物质的与加入同体积蒸馏水后测定值的相对误差不超过 3%, 可以认为在中轻度溶血、黄疸或乳糜时, 此测定方法的检测结果基本不受干扰。

[0075] 表 3 本发明所述试剂盒的干扰物质影响实验

[0076]

加入的干扰物质	测定均值 ($\mu\text{g/ml}$)	相对误差
蒸馏水	5.82	

胆红素 (18mg/L)	5.67	-2.58%
血红蛋白 (470mg/L)	5.72	-1.72%
乳糜 (福尔马肼) 浊度为 2800	5.85	0.52%
类风湿因子 (RF) (470IU/ml)	5.76	-1.03%

[0077] 实施例 4:检测试剂盒的稳定性

[0078] 将本发明试剂盒开瓶后置于 2-8℃ 保存 15 天后,取出按实施例 2 所述方法测定日本积水医疗株式会社标示值分别为 4.5 μg/ml 和 28.6 μg/ml 两个不同浓度的校准品,各重复测定 3 次,计算平均值及与标示值的相对偏差。实验结果表明,开瓶 15 天后本发明试剂盒检测值与标示值的相对偏差都小于 3%,稳定性较好。

[0079] 将本发明试剂盒置于 2-8℃ 保存 18 个月后,检测日本积水医疗株式会社标示值分别为 4.6 μg/ml 和 29.8 μg/ml 两个不同浓度的校准品,各重复测定 3 次,计算平均值及与标示值的相对偏差。实验结果显示检测值与标示值的相对偏差都小于 3%,表明本发明试剂盒在此 2-8℃ 保存 18 个月是比较稳定的。

[0080] 表 4 本发明所述试剂盒的稳定性实验数据

[0081]

序号	开瓶后+2--+8℃放置 15 天		+2--+8℃长期放置 18 个月	
	标示值为 4.5 μg/ml 的检测值	标示值为 28.6 μg/ml 的检测值	标示值为 4.6 μg/ml 的检测值	标示值为 29.8 μg/ml 的检测值
1	4.51	28.65	4.46	29.21
2	4.43	28.32	4.51	29.46
3	4.38	28.44	4.42	29.61
平均值	4.44	28.47	4.46	29.43
相对偏差 (Bias%)	1.33%	0.45%	2.97%	1.25%

[0082] 实施例 5:本发明所述试剂盒与已上市产品的比较

[0083] 1. 重复性和准确度的比较

[0084] 用本发明试剂盒和市售进口 FDP 试剂盒同时测定日本积水医疗株式会社浓度为 4.5 μg/ml 的 FDP 校准品,分别重复测定 10 次,计算均值(\bar{X}),方差 S^2 ,进行统计分析,采用 F 检验和 t 检验比较两者的差异。

[0085] 表 5 对浓度为 4.5 μg/ml 校准品检测结果比较

[0086]

序号	本发明试剂盒检测值 ($\mu\text{g/ml}$)	市售进口试剂盒检测值 ($\mu\text{g/ml}$)
1	4.52	4.55
2	4.45	4.42
3	4.32	4.41
4	4.46	4.56
5	4.37	4.32
6	4.38	4.35
7	4.53	4.46
8	4.41	4.56
9	4.45	4.37
10	4.34	4.48
平均值 (\bar{X})	4.42	4.45
标准差 (S)	0.071	0.089
变异系数	1.62%	2.00%
方差 (S^2)	0.00511	0.00788
F 值	1.5423	
t 值	- 0.6935	

[0087] 对 2 组检测数据的总体方差显著性差异进行单侧 F 检验:查表 $\alpha = 0.05$, $v_1 = 9$, $v_2 = 9$, $F_{\alpha(v_1, v_2)} = 3.19$;两组数据方差比的 F 值为 1.5423, 则 P 值大于 0.05, 两者的总体方差没有显著性差异。对 2 组检测数据总体均数显著性差异进行双侧 t 检验:查表可知 $\alpha = 0.1$, $v = 18$, $t_{\alpha(v)} = 1.734$;根据统计学计算, 两组数据的 $t = -0.6935$, 则 P 值大于 0.1, 两者的总体均数没有显著性差异。通过比较结果表明:本发明试剂盒与市售进口 FDP 试剂盒在重复性和准确度的性能方面基本一致。

[0088] 2. 对医院正常人群和患者血浆样本检测的相关性比较

[0089] 从上海市瑞金医院住院及门诊随机抽取正常人群和患者的血液样本共 70 份, 其中男 42 例, 女 28 例。血液按 9 : 1 的比例与 0.109mol/L 枸橼酸钠抗凝液混匀后, 3000r/min 离心 15 分钟, 分离得到血浆。用本发明试剂盒和市售进口 FDP 试剂盒分别对样本重复测定 2 次, 分别计算测定均值, 计算两者的相关系数, 并进行线性回归。

[0090] 血浆 FDP 的检测浓度小于 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 的样本为 12 份, 此浓度水平应为正常人的血浆, 超出了市售进口 FDP 试剂盒的检测范围, 定量不是很准确;浓度在 $2.5 \mu\text{g/ml}$ - $180 \mu\text{g/ml}$ 的样本为 58 份, 两种试剂盒的相关系数 $r = 0.9989$, 线性回归方程为 $y = 1.011x - 0.1238$ (见图 3)。根据美国临床实验室标准化组织 (CLSI) 文件的要求 ($r >$

0.975), 本发明试剂盒和市售进口试剂盒的检测数据具有很好的一致性。由此可见两种试剂盒在临床上对于弥漫性血管内凝血 (DIC)、深静脉血栓 (DVT) 及肺栓塞 (PE) 等疾病的诊断和病程检测具有等同作用。

[0091] 以上所述仅是本发明的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

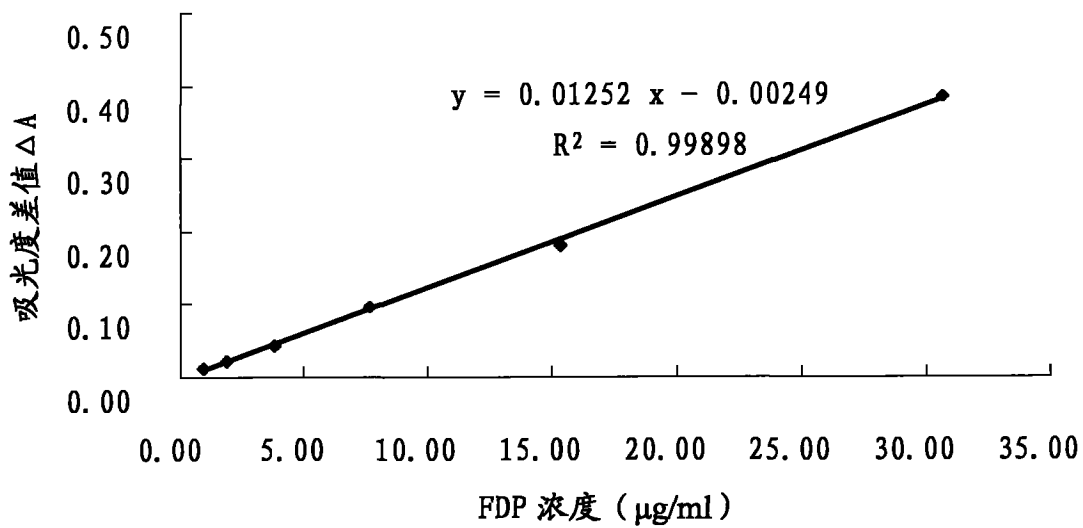


图 1

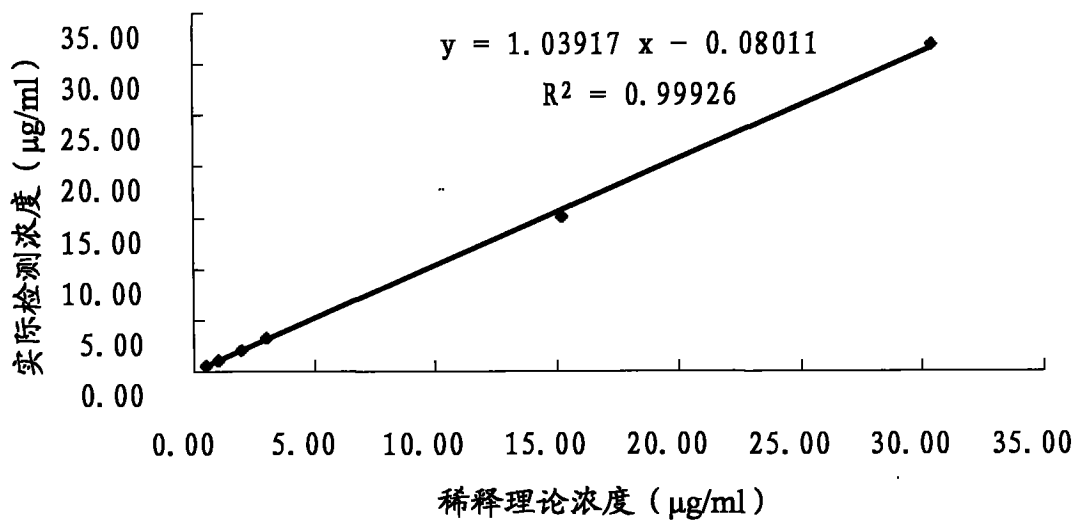


图 2

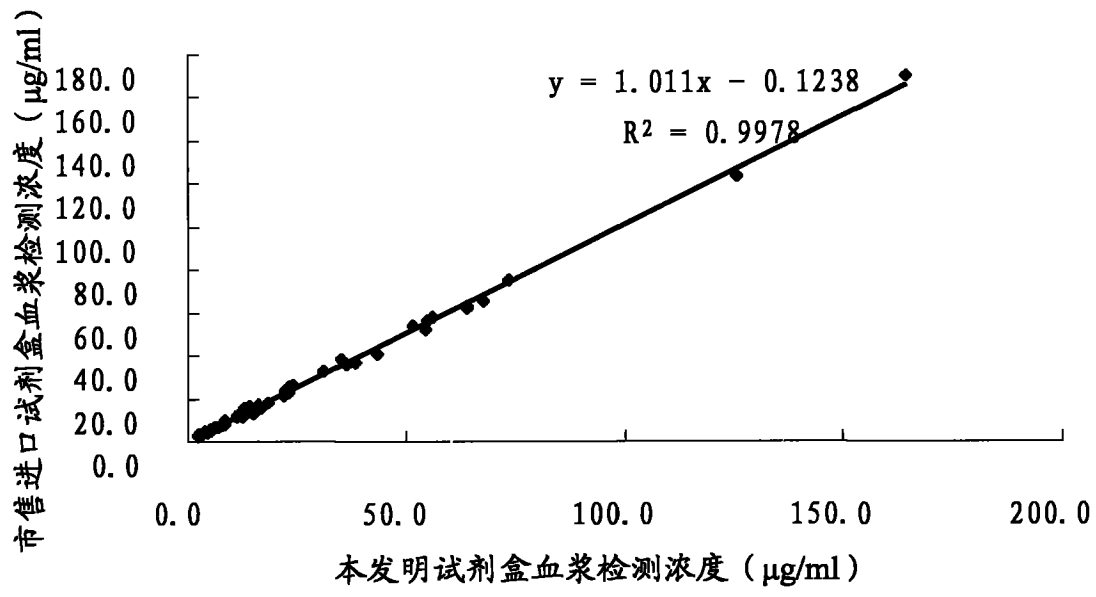


图 3

专利名称(译)	纤维蛋白(原)降解产物(FDP)测定试剂盒(胶乳免疫比浊法)		
公开(公告)号	CN101833010B	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201010140329.X	申请日	2010-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海太阳生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海太阳生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海太阳生物技术有限公司		
[标]发明人	谢永华 朱美萍 许付		
发明人	谢永华 朱美萍 许付		
IPC分类号	G01N33/86 G01N33/531		
代理人(译)	魏晓波		
审查员(译)	刘文瀚		
其他公开文献	CN101833010A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，具体公开一种采用胶乳免疫比浊法检测纤维蛋白(原)降解产物(FDP)含量的试剂盒，所述试剂盒包含将酸化的抗人FDP抗体与聚乙烯基苄基氯胶乳颗粒发生化学交联并封闭后形成的抗人FDP抗体胶乳试剂。本发明所述试剂盒采用胶乳免疫比浊法检测FDP含量，灵敏度高，可达到0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；稳定性好，操作简单、快速，从检测到出结果仅需5-10分钟；特异性强，不易受干扰；定量准确，具有广泛的应用前景。

序号	标示值为 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的检测值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	标示值为 28.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的检测值 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	4.52	28.35
2	4.45	28.08
3	4.32	28.03
4	4.46	28.18
5	4.37	27.95
6	4.38	29.14