



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110658336 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201911133829.8

(22)申请日 2019.11.19

(71)申请人 北京赛科希德科技股份有限公司

地址 102206 北京市昌平区科学园路7号院
1号楼8层(博雅CC-11号楼)

(72)发明人 丁重辉 颜川 胡晓娟 杨娟

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂

(57)摘要

本申请属于临床体外检测试剂领域,公开了一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂,包括组分R1和R2,所述R1为缓冲液,所述R2由S1和S2两种试剂组成,所述试剂S1和S2分别包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A和B;所述乳胶颗粒A平均粒径为180nm,乳胶颗粒B平均粒径为220nm~310nm。本发明所述试剂操作安全简便、稳定性佳、重复性好、准确度高,广泛适用于医院临床及实验室常规检验用全自动凝血测试仪。本发明所述试剂的敏感性,特异性和线性检测范围良好,可作为体外诊断试剂用于医院临床检测人血浆D-二聚体,临床检测性能良好、稳定期长、批间差小、直接检测线性范围宽。

1. 一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂,包括组分R1和R2,所述R1为缓冲液,所述R2由S1和S2两种试剂组成,所述试剂S1和S2分别包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A和B;所述乳胶颗粒A平均粒径为180nm,乳胶颗粒B平均粒径为220nm~310nm。

2. 根据权利要求1所述的试剂,所述乳胶颗粒B平均粒径为270nm。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂,所述乳胶颗粒A和B为聚苯乙烯乳胶用EDC和NHS活化后经化学交联而成,其中所述乳胶颗粒A的活化剂加入量为EDC 0.6~0.8g/L,NHS 0.9~1.2g/L;所述乳胶颗粒B的活化剂加入量为EDC 0.2~0.3g/L;NHS 0.3~0.45g/L。

4. 根据权利要求3所述的试剂,所述乳胶颗粒A和B的活化剂中EDC与NHS的用量比为1:1.5。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的试剂,所述组分R2中乳胶颗粒A和B的比例为1:4~4:1。

6. 根据权利要求5所述的试剂,所述组分R2中乳胶颗粒A和B的比例为1B:4A、2B:3A或4B:1A。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的试剂,所述组分R1包含10mM~35mM Tris,500mM~1M氯化钠,0.5‰~1‰Chaps,0.5‰~5‰Procline300,pH为7.85~8.25。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的试剂,所述组分R2中试剂S1包含<4.5mg/ml包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A,15~25mM Mopos,0.5‰~5‰Procline300,0.5%~1%牛血清蛋白,PH为7.0~8.0。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的试剂,所述组分R2中试剂S2包含<2.5mg/ml包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒B,15~25mM Mopos,0.5‰~5‰Procline300,0.5%~1%牛血清蛋白,PH为7.0~8.0。

一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂

技术领域

[0001] 本发明属于临床体外检测试剂领域,具体涉及一种乳胶免疫比浊法检测试剂,尤其是涉及D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂

背景技术

[0002] 纤维蛋白溶解系统是人体最重要的抗凝系统,当纤维蛋白凝结块形成时,在纤溶酶原激活剂的存在下,纤溶酶原激活转化为纤溶酶,纤维蛋白溶解过程开始,纤溶酶降解纤维蛋白凝结块形成各种可溶片段。血液中有纤维蛋白,纤维蛋白经过活化和水解,产生特异的降解产物称为纤维蛋白降解产物。D-二聚体(D-Dimer,DD)是交联纤维蛋白特异的降解产物,最简单的纤维蛋白降解产物,它的生成或增高反映了凝血和纤溶系统的激活,说明体内存在高凝状态和继发性的纤维蛋白溶解亢进。D-二聚体质量浓度对于诊断与治疗纤溶系统疾病(如DIC、各种血栓)及与纤溶系统有关疾病(如肿瘤、妊娠综合症)以及溶栓治疗监测有着重要的意义。纤维蛋白降解产物D-二聚体的水平升高,表明体内存在着频繁的纤维蛋白降解过程。因此,D-二聚体是深静脉血栓(DVT)、肺栓塞(PE)、弥漫性血管内凝血(DIC)的关键指标。

[0003] D-二聚体的检测方法有多种,主要包括基于乳胶凝集原理的定性或半定量实验(如乳胶凝集试验法)、基于ELISA原理的定量测定(如酶联免疫吸附试验(ELISA)法),也有采用免疫浊度原理或免疫荧光原理测定,如光电散射比浊试验法、胶体金免疫渗透试验(GIA)和乳胶免疫比浊法等。其中ELISA法具有定量、敏感性高等优点,但操作较为繁琐、费时,不适合单份标本测定。光电散射比浊法具有高敏感性和特异性,但需要有大型设备。而且现有D-二聚体测定试剂中有些乳胶活化不完全导致抗体偶联的效率低下,使得试剂线性范围较窄,有些乳胶选择不当而使得试剂灵敏度过低或是线性范围较窄。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明旨在提供一种基于免疫比浊原理的D-Dimer检测试剂,将能识别D-Dimer抗原的抗体偶联于聚苯乙烯乳胶颗粒上,重复性准确性良好,灵敏度高,线性范围宽。

[0005] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂,包括组分R1和R2,所述R1为缓冲液,所述R2由S1和S2两种试剂组成,所述试剂S1和S2分别包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A和B;所述乳胶颗粒A平均粒径为180nm,乳胶颗粒B平均粒径为220nm~310nm。

[0007] 本发明所述D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂的检测线性范围较宽(0.25 μ g/ml~16 μ g/ml),避免了临床高值样本由于试剂直接检测范围的狭窄需进行重新稀释后再测量而提高检测效率;该试剂在16 μ g/ml的浓度检测范围内不需进行重稀释,从而提高了临床检验结果的准确性。

[0008] 本发明中,所述组分R2由S1和S2两种试剂组成,所述试剂S1包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A,平均粒径为180nm;所述试剂S2包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒B,平均粒径为220nm~310nm。

[0009] 在一些实施方案中,所述试剂S2中所述乳胶颗粒B平均粒径为270nm。

[0010] 本发明中,所述乳胶颗粒A和B为聚苯乙烯乳胶用EDC和NHS活化后经化学交联而成,具体步骤为:

[0011] 1.将聚苯乙烯乳胶用EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和NHS (N-羟基丁二酰亚胺)溶液进行室温搅拌活化15~35min;

[0012] 2.向活化好的乳胶颗粒溶液中加入鼠抗人D-二聚体单克隆抗体,室温搅拌化学交联60~120min;

[0013] 3.向化学交联后的乳胶溶液中加入3%~5%的牛血清白蛋白继续室温搅拌60~120min后通过离心超声方式获得最终的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。

[0014] 其中所述乳胶颗粒A的活化剂加入量为EDC 0.6~0.8g/L,NHS 0.9~1.2g/L;所述乳胶颗粒B的活化剂加入量为EDC 0.2~0.3g/L;NHS 0.3~0.45g/L。

[0015] 本发明中,所述步骤1中活化的时间为30min;所述步骤2化学交联为90min;所述步骤3中室温搅拌为90min。

[0016] 本发明中,所述乳胶颗粒A和B的活化剂中EDC与NHS的用量比为1:1.5。

[0017] 本发明中,所述组分R2中S1和S2两种试剂中的乳胶颗粒A和B的比例为1:4~4:1。

[0018] 在一些实施方案中,所述组分R2中乳胶颗粒A和B的比例为1B:4A。在一些实施方案中,所述组分R2中乳胶颗粒A和B的比例为2B:3A。在一些实施方案中,所述组分R2中乳胶颗粒A和B的比例为4B:1A。

[0019] 本发明中,所述组分R1包含10mM~35mM Tris,500mM~1M氯化钠,0.5%~1% Chaps,0.5%~5%Procline300,pH为7.85~8.25。在一些实施方案中,所述组分R1中各成分的工作浓度为25mM Tris,750mM氯化钠,0.8%Chaps,1%Procline300。

[0020] 本发明中,所述组分R2中试剂S1包含<4.5mg/ml包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A,15~25mM Mopos,0.5%~5%Procline300,0.5%~1%牛血清蛋白,PH为7.0~8.0。在一些实施方案中,所述组分R2中试剂S1各成分的工作浓度为3.5mg/ml包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A,20mM Mopos,750mM氯化钠,0.5%牛血清蛋白,1%Procline300。

[0021] 本发明中,所述组分R2中试剂S2包含<2.5mg/ml包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒B,15~25mM Mopos,0.5%~5%Procline300,0.5%~1%牛血清蛋白,PH为7.0~8.0。在一些实施方案中,所述组分R2中试剂S2各成分的工作浓度为2.2mg/ml,20mM Mopos,750mM氯化钠,0.5%牛血清蛋白,1%Procline300。

[0022] 由上述技术方案可知,本发明提供了一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂,包括组分R1和R2,所述R1为缓冲液,所述R2由S1和S2两种试剂组成,所述试剂S1和S2分别包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A和B;所述乳胶颗粒A平均粒径为180nm,乳胶颗粒B平均粒径为220nm~310nm。本发明所述D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂操作安全简便、稳定性佳、重复性好、准确度高,广泛适用于医院临床及实验室常规检验用全自动凝血测试仪。本发明所述D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂的敏感性,特异性和

线性检测范围良好,D-二聚体在检测浓度在16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的临床样本测试值准确度和可控性较好。本发明所述D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂为液体型,可作为体外诊断试剂用于医院临床检测人血浆D-二聚体,临床检测性能良好、稳定期长、批间差小、直接检测线性范围宽,为临床诊断治疗血栓与止血类疾病提供可靠的检测数据,有利于在市场上进一步推广使用。

具体实施方式

[0023] 本发明公开了一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂。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。本发明的方法及产品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进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0024] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。

[0026] 本发明的试剂组分R2是由包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒,防腐剂及缓冲液组成,检测需配套使用该试剂组分R1。所述的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒是由聚苯乙烯乳胶与鼠抗人D-二聚体单克隆抗体经化学交联而成,主要步骤如下:

[0027] 1.将聚苯乙烯乳胶用EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和NHS (N-羟基丁二酰亚胺)溶液进行室温搅拌活化15~35min;

[0028] 2.向活化好的乳胶颗粒溶液中加入鼠抗人D-二聚体单克隆抗体,室温搅拌化学交联60~120min;

[0029] 3.向化学交联后的乳胶溶液中加入3%~5%的牛血清白蛋白继续室温搅拌60~120min后通过离心超声方式获得最终的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。

[0030] 实施例1、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中乳胶颗粒B活化剂的用量

[0031] 按照上述方法采用不同用量的活化剂活化,然后加入鼠抗人D-二聚体单克隆抗体进行化学交联,之后加入牛血清白蛋白制备包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。比较获得的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒B(平均粒径为270nm)的偶联效果,结果见表1。

[0032] 表1不同活化剂用量对乳胶颗粒B偶联结果的影响

活化剂的用量	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	16 $\mu\text{g}/\text{ml}$
EDC 0.1g/L;NHS 0.15g/L	0.0004	0.0168	0.0257	0.0646	0.1606	0.3166	0.5486
EDC 0.2g/L;NHS 0.3g/L	0.0003	0.0164	0.0428	0.1049	0.2438	0.5208	0.7022
EDC 0.3g/L;NHS 0.45g/L	0.0005	0.0196	0.0438	0.1069	0.2429	0.5128	0.7028
EDC 0.4g/L;NHS 0.6g/L	0.0005	0.0172	0.0346	0.0827	0.1798	0.3898	0.5989
EDC 0.5g/L;NHS 0.75g/L	0.0004	0.0176	0.0345	0.0828	0.1804	0.3902	0.6024

[0034] 由表1结果可见,针对于中乳胶免疫比浊试剂组分R2乳胶颗粒B的活化偶联效果,

随着活化剂的量的增加偶联效果也随之增强,但并非随着活化剂无限的增加而获得更好的偶联效果,达到一定量后活化剂的用量越多,偶联效果越差。结果表明,对于乳胶免疫比浊试剂组分R2乳胶颗粒B合适的活化剂加入量为EDC 0.2~0.3g/L;NHS 0.3~0.45g/L。

[0035] 实施例2、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中乳胶颗粒A活化剂的用量

[0036] 按照上述方法采用不同用量的活化剂活化,然后加入鼠抗人D-二聚体单克隆抗体进行化学交联,之后加入牛血清白蛋白制备包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。比较获得的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A(平均粒径为180nm)的偶联效果,结果见表2。

[0037] 表2不同活化剂用量对乳胶颗粒A偶联结果的影响

[0038]	活化剂的用量	0μg/ml	0.5μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
	EDC 0.2g/L; NHS 0.3g/L	0.0001	0.0032	0.0088	0.0186	0.062	0.1528	0.3288
[0039]	EDC 0.4g/L; NHS 0.6g/L	0.0001	0.0046	0.0096	0.0208	0.075	0.1519	0.4386
	EDC 0.6g/L; NHS 0.9g/L	0.0000	0.0048	0.0106	0.0268	0.085	0.1919	0.5132
	EDC 0.8g/L; NHS 1.2g/L	0.0001	0.0032	0.0106	0.0268	0.086	0.1918	0.5134
	EDC 1.0g/L; NHS 1.5g/L	0.0001	0.0038	0.0104	0.0258	0.072	0.1908	0.5032

[0040] 由表2结果可见,针对于中乳胶免疫比浊试剂组分R2乳胶颗粒A的活化偶联效果,随着活化剂的量的增加偶联效果也随之增强,但并非随着活化剂无限的增加而获得更好的偶联效果,达到一定量后活化剂的用量越多,偶联效果越差。结果表明,对于乳胶免疫比浊试剂组分R2乳胶颗粒A合适的活化剂加入量为EDC 0.6~0.8g/L;NHS 0.9~1.2g/L。

[0041] 综合表1和表2的数据分析可知,不同乳胶颗粒应选择不同量的活化剂,根据粒径的大小来大小确定活化剂的用量。

[0042] 实施例3、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中乳胶颗粒B的活化剂EDC与NHS的最适配比

[0043] 通过上述实施例确定了乳胶颗粒B合适的活化剂EDC和NHS的用量。进一步按照上述方法采用不同比例用量的活化剂活化,然后加入鼠抗人D-二聚体单克隆抗体进行化学交联,之后加入牛血清白蛋白制备包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。比较获得的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒B(平均粒径为270nm)的偶联效果,结果见表3。

[0044] 表3不同比例的活化剂对乳胶颗粒B偶联结果的影响

活化剂的用量比例EDC:NHS	0μg/ml	0.5μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
EDC:NHS=1:0.5	0.0001	0.0165	0.0398	0.1028	0.2284	0.4892	0.6898
EDC:NHS=1:1	0.0002	0.0172	0.0408	0.1038	0.2302	0.4768	0.6982
EDC:NHS=1:1.5	0.0001	0.0186	0.0428	0.1058	0.2416	0.5008	0.7016
EDC:NHS=1:2	0.0002	0.0172	0.0418	0.1036	0.2238	0.4678	0.6882
EDC:NHS=1:2.5	0.0001	0.0176	0.0402	0.1038	0.2242	0.4588	0.6786

[0046] 由表3结果可见,针对于乳胶颗粒B,在EDC:NHS=1:1.5时能获得最佳的活化偶联效果。

[0047] 实施例4、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中乳胶颗粒A的活化剂EDC与NHS的最适配比

[0048] 通过上述实施例确定了乳胶颗粒A合适的活化剂EDC和NHS的用量。进一步按照上述方法采用不同比例用量的活化剂活化,然后加入的鼠抗人D-二聚体单克隆抗体进行化学

交联,之后加入牛血清白蛋白制备包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。比较获得的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A(平均粒径为180nm)的偶联效果,结果见表1。

[0049] 表4不同比例的活化剂对乳胶颗粒A偶联结果的影响

活化剂的用量比例EDC:NHS	0 μ g/ml	0.5 μ g/ml	1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml	16 μ g/ml
EDC:NHS=1:0.5	0.0001	0.0032	0.0098	0.0218	0.082	0.1802	0.4998
EDC:NHS=1:1	0.0002	0.0038	0.0098	0.0238	0.076	0.1768	0.4982
EDC:NHS=1:1.5	0.0000	0.0042	0.0106	0.0268	0.085	0.1919	0.5132
EDC:NHS=1:2	0.0002	0.0038	0.0101	0.0246	0.078	0.1862	0.4896
EDC:NHS=1:2.5	0.0001	0.0034	0.0102	0.0242	0.082	0.1888	0.4786

[0051] 由表4结果可见,针对于乳胶颗粒A,在EDC:NHS=1:1.5时能获得最佳的活化偶联效果。

[0052] 综合表3和表4数据分析可知,对乳胶颗粒的处理,粒径大小的不同,均适用于活化剂EDC:NHS=1:1.5的使用比例。

[0053] 实施例5、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中不同粒径乳胶颗粒的使用

[0054] 通过上述实施例确定了乳胶颗粒A、B合适的活化剂EDC和NHS的用量。进一步按照上述方法采用EDC:NHS=1:1.5比例的活化剂活化,然后加入的鼠抗人D-二聚体单克隆抗体进行化学交联,之后加入牛血清白蛋白制备不同粒径的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒。比较获得的包被鼠单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒的偶联效果,结果见表5。

[0055] 表5按EDC:NHS=1:1.5加入活化剂,不同粒径乳胶颗粒偶联结果

乳胶粒径	0 μ g/ml	0.5 μ g/ml	1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml	16 μ g/ml
220nm	0.0000	0.0196	0.0416	0.1018	0.2338	0.4898	0.6998
240nm	0.0002	0.0188	0.0408	0.1024	0.2326	0.4988	0.7046
270nm	0.0001	0.0198	0.0428	0.1048	0.2316	0.4998	0.7026
280nm	0.0004	0.0202	0.0418	0.1028	0.2296	0.5008	0.7056
300nm	0.0000	0.0194	0.0426	0.1034	0.2316	0.5004	0.7026
310nm	0.0000	0.0184	0.0422	0.1014	0.2306	0.5012	0.7036

[0057] 由表5结果可见,以上数据显示,针对于220~310nm乳胶的活化偶联效果在EDC:NHS=1:1.5的时能获得最佳偶联效果。

[0058] 综合表1~5数据,如选择在700nm波长处测量,适合的粒径为220~310nm的胶乳,在8 μ g/ml以内可以满足测试要求,在0.5 μ g/ml处有较好的灵敏度。

[0059] 综合表1~4的数据可知,对于在波长为700nm处检测的凝血仪,合适的乳胶粒径选择在270nm处能获得比较好的灵敏度,而对于180nm以下的乳胶不适用于在700nm处检测,在0.5 μ g/ml处检测在低值出的测量会变得不太灵敏。其中表2与表4明显在0.5 μ g/ml处 Δ OD极小,不易区分。

[0060] 实施例6、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中混有不同粒径乳胶的测试效果

[0061] 乳胶颗粒A(平均粒径为180nm)与乳胶颗粒B(平均粒径为270)按不同比例混合作为组分R2进行检测,结果见表6。

[0062] 表6乳胶颗粒A(180nm)与B(270nm)不同比例混合的检测结果

[0063]

配比 \ 含量 ΔOD	0μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
A	0.0001	0.0106	0.0268	0.0850	0.1919	0.5132
1B: 4A	0.0000	0.0219	0.0471	0.1302	0.3835	0.8961
2B: 3A	0.0005	0.0223	0.0458	0.1618	0.3637	0.8615
1B: 1A	0.0008	0.0243	0.0640	0.1343	0.3786	0.7376
3B: 2A	0.0002	0.0266	0.0541	0.1643	0.4415	0.7695
4B: 1A	0.0004	0.0317	0.0755	0.1979	0.4156	0.8348
B	0.0005	0.0438	0.1069	0.2429	0.5128	0.7028

[0064] 由表6结果可见,如果试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒B(平均粒径为270),其检测范8μg/ml~16μg/ml之间不能有效的区分开,因此检测范围只能到达8μg/ml;而当试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒A,虽能在8μg/ml~16μg/ml之间能有效的区分开,但其在低浓度的检测灵敏度明显降低,而试剂的阈值是在0.5μg/ml,在其阈值处能明显分辨区分是尤为重要的;当乳胶颗粒A与乳胶颗粒B(平均粒径为270nm)按不同比例配制时,以1B:4A,2B:3A,4B:1A的配比可以满足低浓度的灵敏度和高浓度的检测范围。

[0065] 乳胶颗粒A(平均粒径为180nm)与乳胶颗粒B(平均粒径为310nm)按不同比例混合作为组分R2进行检测,结果见表7。

[0066] 表7乳胶颗粒A(180nm)与B(310nm)不同比例混合的检测结果

[0067]

配比 \ 含量 ΔOD	0μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
A	0.0001	0.0106	0.0268	0.0850	0.1919	0.5132
1B: 4A	0.0000	0.0236	0.0481	0.1298	0.3885	0.8961
2B: 3A	0.0005	0.0263	0.0526	0.1678	0.3737	0.8615
4B: 1A	0.0004	0.0337	0.0785	0.2088	0.4256	0.8538
B	0.0000	0.0422	0.1014	0.2306	0.5012	0.7036

[0068] 由表7结果可见,如果试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒B(平均粒径为310),其检测范8μg/ml~16μg/ml之间不能有效的区分开,因此检测范围只能到达8μg/ml;而当试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒A,虽能在8μg/ml~16μg/ml之间能有效的区分开,但其在低浓度的检测灵敏度明显降低,而试剂的阈值是在0.5μg/ml,在其阈值处能明显分辨区分是尤为重要的;当乳胶颗粒A与B(平均粒径为310nm)按不同比例配制时,以1B:4A,2B:3A,4B:1A的配比可以满足低浓度的灵敏度和高浓度的检测范围。

[0069] 乳胶颗粒A(平均粒径为180nm)与乳胶颗粒B(平均粒径为220nm)按不同比例混合作为组分R2进行检测,结果见表8。

[0070] 表8乳胶颗粒A(180nm)与B(220nm)不同比例混合的检测结果

[0071]

配比 \ 含量 ΔOD	0μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
A	0.0001	0.0106	0.0268	0.0850	0.1919	0.5132
1B: 4A	0.0000	0.0206	0.0451	0.1168	0.3985	0.9061
2B: 3A	0.0005	0.0223	0.0486	0.1476	0.4037	0.8815
4B: 1A	0.0004	0.0247	0.0505	0.1668	0.3996	0.8648
B	0.0000	0.0416	0.1018	0.2338	0.4898	0.6998

[0072] 由表8结果可见,如果试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒B(平均粒径为220),其检测范围8μg/ml~16μg/ml之间不能有效的区分开,因此检测范围只能到达8μg/ml;而当试剂组分R2只含有一种乳胶颗粒A,虽能在8μg/ml~16μg/ml之间能有效的区分开,但其在低浓度的检测灵敏度明显降低,而试剂的阈值是在0.5μg/ml,在其阈值处能明显分辨区分是尤为重要的;当乳胶颗粒A与B(平均粒径为220nm)按不同比例配制时,以1B:4A,2B:3A,4B:1A的配比可以满足低浓度的灵敏度和高浓度的检测范。

[0073] 综合表6~8数据,220nm~310nm的乳胶颗粒混合粒径180nm的乳胶颗粒在700nm处可以将检测范围从8μg/ml扩增至16μg/ml。

[0074] 实施例7、本发明乳胶免疫比浊试剂组分R2中乳胶颗粒不同配比线性相关性

[0075] 采用A(平均粒径为180nm)与B(平均粒径为270nm)的乳胶颗粒按照不同比例(4B:1A、2B:3A、1B:4A)混合,选取接近本发明试剂检测范围上限的高浓度样本分别标记为L与H,按10L+0H、9.83L+0.17L、9L+1H、7L+3H、5L+5H、3L+7H、0L+10H的比例混合后上机测量,结果见表9-11。

[0076] 表9乳胶颗粒配制比例为4B:1A的乳胶免疫比浊试剂的线性相关性

1B: 4A	理论浓度	测试 1	测试 2	测试 3	均值	绝对偏差	相对偏差
10L+0H	0.0	0.05	0.06	0.08	0.06	0.06	
9.83L+0.17H	0.272	0.27	0.3	0.29	0.29	0.01	
9L+1H	1.6	1.33	1.45	1.33	1.37	-0.23	
7L+3H	4.8	4.77	4.71	4.78	4.75		-0.97%
5L+5H	8.0	7.5	7.57	7.57	7.55		-5.67%
3L+7H	11.2	11.14	11.53	11.79	11.49		2.56%
0L+10H	16.0	17.03	15.97	16.18	16.39		2.46%
r=0.9991 斜率: 1.0309 截距: -0.2218							

[0077]

[0078] 表10乳胶颗粒配制比例为2B:3A的乳胶免疫比浊试剂的线性相关性

4B:1A	理论浓度	测试 1	测试 2	测试 3	均值	绝对偏差	相对偏差
10L+0H	0.000	0.11	0.05	0.03	0.06	0.06	
9.83L+0.17H	0.272	0.27	0.26	0.29	0.27	0.00	
9L+1H	1.600	1.33	1.35	1.30	1.33	0.27	
7L+3H	4.800	4.72	4.82	4.61	4.72		-1.74%
5L+5H	8.000	7.52	7.74	7.80	7.69		-3.92%
3L+7H	11.200	11.08	11.28	10.96	11.11		-0.83%
0L+10H	16.000	16.33	15.65	16.97	16.32		1.98%
r=0.9994 斜率: 1.021 截距: -0.2219							

[0079]

[0080] 表11乳胶颗粒配制比例为1B:4A的乳胶免疫比浊试剂的线性相关性

[0081]

2B: 3A	理论浓度	测试 1	测试 2	测试 3	均值	绝对偏差	相对偏差
10L+0H	0.000	0.13	0.14	0.16	0.14	0.14	
9.83L+0.17H	0.272	0.32	0.25	0.30	0.29	0.02	
9L+1H	1.600	1.38	1.38	1.41	1.39	0.21	
7L+3H	4.800	4.99	5.14	5.09	5.07		5.69%
5L+5H	8.000	8.12	8.17	8.26	8.18		2.29%
3L+7H	11.200	11.57	11.85	11.86	11.76		5.00%
0L+10H	16.000	16.67	17.07	17.00	16.91		5.71%
r=0.9991 斜率: 1.061 截距: -0.1414							

[0082] 由表9~11的结果可见,理论含量与实际测得的含量相关系数 $R=0.998$ 。

[0083] 实施例8、本发明乳胶免疫比浊试剂与市售同类试剂的临床比对

[0084] 1、样品及试剂的准备:

[0085] (1) 制备待测血浆样品:静脉采血,109mmol/L枸橼酸钠与全血按1:9比例混合均匀,以2500g离心15分钟,上机测量;

[0086] (2) D-Dimer检测试剂:取出R1和R2,将R2轻轻混匀,放置10分钟平衡至室温后备用。

[0087] 2、测试D-Dimer的操作步骤

[0088] (1) 15 μ L取样品血浆加入测试杯中;

[0089] (2) 将180 μ L D-Dimer试剂组分R1加入测试杯中;

[0090] (3) 37 $^{\circ}$ C预温区中预温180秒;

[0091] (4) 将60 μ L D-Dimer试剂组分R2加入测试杯中;

[0092] (5) 仪器在波长为700nm处进行自动测试记录OD,最终取40S,260S处的 ΔOD 。

[0093] 按照上述方法采用本发明所述乳胶免疫比浊试剂按不同比例乳胶颗粒混合进行检测,结果见表12。

[0094] 表12本发明乳胶免疫比浊试剂按不同比例混合与D-Dimer临床结果比对

[0095]

样本号	临床结果 ($\mu\text{g/ml}$)	市售试剂 ($\mu\text{g/ml}$)	A ($\mu\text{g/ml}$)	1B: 4A ($\mu\text{g/ml}$)	2B: 3A ($\mu\text{g/ml}$)	4B: 1A ($\mu\text{g/ml}$)	B ($\mu\text{g/ml}$)
1	15.12	> MAX	14.64	14.56	14.56	14.72	> 8
2	14.56	> MAX	14.96	14.84	14.72	14.72	> 8
3	14.36	> MAX	14.36	14.32	14.32	14.36	> 8
4	13.58	> MAX	13.12	13.44	13.56	13.52	> 8
5	13.16	> MAX	13.28	13.44	13.12	13.52	> 8
6	12.48	> MAX	12.76	12.52	12.28	12.56	> 8
7	11.36	> MAX	10.76	10.76	10.52	12.84	> 8
8	10.52	> MAX	10.16	10.24	10.08	10.28	> 8
9	10.16	> MAX	9.96	9.84	9.84	9.96	> 8
10	7.96	> MAX	8.08	8.04	7.96	7.92	7.92
11	7.12	> MAX	6.96	7.32	7.44	7.28	6.68
12	6.16	> MAX	6.08	5.92	5.96	6.04	5.96
13	5.96	> MAX	5.88	6.16	6.04	5.36	6.04
14	5.36	> MAX	5.16	5.56	4.96	5.08	5.44
15	4.52	4.12	4.32	4.16	4.2	4.24	4.84
16	3.96	3.92	3.92	4.16	4.08	3.84	4.08
17	3.56	2.76	3.16	3.36	3.64	3.44	3.08
18	2.76	2.02	2.56	2.84	2.52	2.92	2.36
19	1.92	1.66	1.72	1.76	1.78	1.88	2.24
20	1.72	0.58	1.56	1.64	1.76	1.76	1.68
21	1.26	0.86	1.22	1.16	1.12	1.44	1.32
22	1.12	1.1	1.06	1.02	1.2	1.08	1.06
23	1.04	0.98	1	1.1	1.04	1.02	1.12
24	1.1	0.72	1.02	1.06	1.12	1.02	1.1
25	0.96	0.94	0.92	0.98	0.82	0.78	0.82
26	0.84	1.06	0.64	0.58	0.56	0.58	0.62
27	0.62	0.34	0.48	0.5	0.48	0.54	0.52
28	0.5	0.44	0.48	0.38	0.42	0.52	0.5

[0096] 由表12可见,按不同的乳胶颗粒配比,其中1B:4A,2B:3A,4B:1A的配制比例在 $16\mu\text{g/ml}$ 以内的浓度可以直接测量,不需要重新稀释,提高检测效率且和临床结果具有相关性,相关系数 ≥ 0.98 。

[0097] 实施例9、本发明乳胶免疫比浊试剂在超出试剂检测范围稀释后测试与临床结果比:

[0098] 将超出试剂检测范围的测试样本用生理盐水按1:3的比例稀释4倍后,上机做检测,检测结果如下表13。

[0099] 表13本发明所述试剂在超出试剂检测范围稀释后测试与临床结果比对

[0100]

样本号	临床结果 ($\mu\text{g/ml}$)	市售试剂 ($\mu\text{g/ml}$) 稀释 4 倍	A ($\mu\text{g/ml}$) 稀释 4 倍	1B: 4A ($\mu\text{g/ml}$) 稀释 4 倍	2B: 3A ($\mu\text{g/ml}$) 稀释 4 倍	4B: 1A ($\mu\text{g/ml}$) 稀释 4 倍
1	16.78	16.56	16.54	16.56	16.00	16.32
2	16.82	0.82	16.60	16.20	16.60	16.00
3	16.98	0.44	18.68	18.00	18.64	18.80
4	17.62	15.68	16.62	16.72	16.44	16.44
5	18.92	0.32	19.08	17.80	17.60	18.60
6	19.82	18.04	20.20	21.00	20.04	20.40

[0101] 结果显示,对于超出本发明所述乳胶免疫比浊试剂直接检测线性范围 $16\mu\text{g/ml}$ 的临床样本,通过进行4倍稀释的方法测量,测出的结果与临床的测量的结果具有相关性,与

市售试剂相比,和临床测量结果更为一致。

[0102] 实施例10、本发明所述乳胶免疫比浊试剂稳定性实验:

[0103] 根据临床检测实际情况,测试本发明所述乳胶免疫比浊试剂开封后2℃~8℃冷藏稳定性、室温振荡稳定性及16℃在机稳定性,每个检测重复两次取平均值,模拟试剂处于正常储存、运输保存及在机检测的情况。企业标准要求试剂在监测期内正常质控测试值绝对偏差不超过±0.25,异常质控测试值相对偏差不超过±5%可判定为合格。详细数据如表14-16所示。

[0104] 1、模拟试剂开封后冷藏的稳定性情况

[0105] 本发明所述乳胶免疫比浊试剂开封后置于2℃~8℃5天后进行D-Dimer测试,结果见表14。

[0106] 表14试剂开封后置于2℃~8℃/5天的D-Dimer测试值

时间	D-Dimer (μg/ml) 正常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差
第 1 天	0.38	0	0.41	0	0.36	0
第 2 天	0.40	0.02	0.38	-0.03	0.28	-0.08
第 3 天	0.28	-0.1	0.27	-0.14	0.27	-0.09
第 4 天	0.24	-0.14	0.26	-0.15	0.32	-0.04
第 5 天	0.42	0.04	0.38	-0.03	0.40	0.04
时间	D-Dimer (μg/ml) 异常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	相对偏差	均值	相对偏差	均值	相对偏差
第 1 天	6.93	0	7.23	0	7.11	0
第 2 天	6.86	-1.01%	7.27	0.55%	7.39	3.94%
第 3 天	6.88	-0.72%	7.31	1.11%	7.32	2.95%
第 4 天	6.87	-0.87%	7.42	2.63%	7.30	2.67%
第 5 天	6.88	-0.72%	7.28	0.69%	7.21	1.41%

[0109] 2、模拟试剂运输过程中保存稳定性情况

[0110] 本发明所述乳胶免疫比浊试剂置于室温震荡摇床上5天后进行D-Dimer测试,结果见表15。

[0111] 表15试剂置于室温震荡摇床上测定5天的D-Dimer测试值

[0112]

时间	D-Dimer (μg/ml) 正常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差
第 1 天	0.38	0	0.41	0	0.36	0
第 2 天	0.26	-0.08	0.35	-0.06	0.27	-0.09
第 3 天	0.26	-0.08	0.38	-0.03	0.27	-0.09
第 4 天	0.32	-0.06	0.29	-0.12	0.42	0.06
第 5 天	0.32	-0.06	0.26	-0.15	0.39	0.03
时间	D-Dimer (μg/ml) 异常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	相对偏差	均值	相对偏差	均值	相对偏差
第 1 天	6.93	0	7.23	0	7.11	0
第 2 天	6.86	-1.01%	7.28	0.69%	7.24	1.83%
第 3 天	6.88	-0.72%	7.28	0.69%	7.12	0.14%
第 4 天	6.87	-0.87%	7.45	3.04%	7.26	2.11%
第 5 天	6.88	-0.72%	7.23	0.00%	7.18	0.98%

[0113] 3、模拟试剂开封后在机检测的稳定性情况

[0114] 本发明所述乳胶免疫比浊试剂开封后置于16℃5天后进行D-Dimer测试,结果见表16。

[0115] 表16试剂置于16℃/5天的D-Dimer测试值

[0116]

时间	D-Dimer (μg/ml) 正常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差	均值	绝对偏差
第 1 天	0.38	0	0.41	0	0.36	0
第 2 天	0.33	-0.05	0.41	0	0.41	0.05
第 3 天	0.41	-0.03	0.35	-0.06	0.32	-0.04

[0117]

第 4 天	0.32	-0.06	0.34	-0.07	0.41	0.05
第 5 天	0.43	0.05	0.34	-0.07	0.32	-0.04
时间	D-Dimer (μg/ml) 异常质控					
	本发明所述试剂批次 1		本发明所述试剂批次 2		本发明所述试剂批次 3	
	均值	相对偏差	均值	相对偏差	均值	相对偏差
第 1 天	6.93	0	7.23	0	7.11	0
第 2 天	6.95	0.29%	7.24	0.14%	7.26	2.11%
第 3 天	6.71	-3.17%	7.18	-0.69%	7.16	0.70%
第 4 天	6.86	-1.01%	7.28	0.69%	7.20	1.27%
第 5 天	6.76	-2.45%	7.30	0.97%	7.19	1.13%

[0118] 以上检测结果显示:本发明所述乳胶免疫比浊试剂在监测期内的检测结果均达到企业标准要求,综合判定为合格。试剂开封后放于2℃~8℃冷藏,室温震荡及在机16℃检测环境中,可稳定至少5天。

[0119] 综合以上分析,本发明所述D-dimer乳胶免疫比浊试剂的基本性能达到行业标准要求,最大特点在于其在700nm波长处具有0.25μg/ml~16μg/ml的线性检测范围、对16μg/ml以内的临床样本无需再稀释直接进行测量,可以大大提高检测效率,且与临床数据具有

较好的线性相关。

专利名称(译)	一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂		
公开(公告)号	CN110658336A	公开(公告)日	2020-01-07
申请号	CN201911133829.8	申请日	2019-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	北京赛科希德科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京赛科希德科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京赛科希德科技股份有限公司		
[标]发明人	丁重辉 颜川 胡晓娟 杨娟		
发明人	丁重辉 颜川 胡晓娟 杨娟		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/543 G01N2800/224 G01N2800/226		
代理人(译)	刘伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请属于临床体外检测试剂领域，公开了一种D-二聚体乳胶免疫比浊法检测试剂，包括组分R1和R2，所述R1为缓冲液，所述R2由S1和S2两种试剂组成，所述试剂S1和S2分别包含包被鼠抗人D-二聚体单克隆抗体的聚苯乙烯乳胶颗粒A和B；所述乳胶颗粒A平均粒径为180nm，乳胶颗粒B平均粒径为220nm~310nm。本发明所述试剂操作安全简便、稳定性佳、重复性好、准确度高，广泛适用于医院临床及实验室常规检验用全自动凝血测试仪。本发明所述试剂的敏感性，特异性和线性检测范围良好，可作为体外诊断试剂用于医院临床检测人血浆D-二聚体，临床检测性能良好、稳定期长、批间差小、直接检测线性范围宽。

活化剂用量	0μg/ml	0.5μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	4μg/ml	8μg/ml	16μg/ml
EDC 0.2g/L, NHS 0.3g/L	0.0001	0.0032	0.0088	0.0186	0.062	0.1328	0.3288