



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044364 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510227795. 4

(22) 申请日 2015. 05. 02

(71) 申请人 王贤俊

地址 325000 浙江省温州市瓯海娄桥工业园
区森茂路 28 号

(72) 发明人 王贤俊 郭二豪 郑蓓蕾 江新涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/92(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种采用联合遮蔽法制备的 LDL-C 检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及了一种采用联合遮蔽法制备的用于 LDL-C 检测的试剂盒。该试剂由分别放置的试剂 1 和试剂 2 组成,其中,所述试剂 1 含有金属氯化物、LDL-C 单克隆抗体及定量酶试剂;所述试剂 2 含有表面活性剂、显色剂、防腐剂、抗干扰物质及反应促进剂。本发明具有显色特性好、准确度高、试剂成分稳定、操作简单适用于临床各种全自动生化分析仪的特点。用于检测人体血清中 LDL-C 的含量。

1. 一种采用联合遮蔽法制备的用于 LDL-C 检测的试剂盒,其特征在于:该试剂由分别放置的试剂 1 和试剂 2 组成,其中,所述试剂 1 含有金属氯化物、LDL-C 单克隆抗体、表面活性剂 1、胆固醇脂酶;所述试剂 2 含有表面活性剂 2、4- 氨基安替比林、过氧化物酶、胆固醇氧化酶。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 1 中金属氯化物可使游离 LDL-C 发生凝集,并与 LDL-C 单克隆抗体发生抗原抗体反应形成抗原抗体复合物,达到联合遮蔽的效果。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 1 中金属氯化物为二价金属氯化物氯化钙,其浓度范围在 0.4g/L-0.5g/L。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 1 中 LDL-C 单克隆抗体为载脂蛋白 B 单克隆抗体,其浓度范围在 50ml/L-150ml/L。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 1 中表面活性剂 1 为辛基苯基聚氧乙烯醚,其浓度范围在 2ml/L-4ml/L。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 1 中胆固醇脂酶含量为 10KU/L-14KU/L。

7. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 2 中表面活性剂 2 为聚乙二醇 8000,其浓度范围在 40g/L-60g/L。

8. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂 2 中 4- 氨基安替比林含量为 0.05-0.2g/L、胆固醇氧化酶含量为 0.4KU/L-0.8KU/L、过氧化物酶含量为 1KU/L-2KU/L。

一种采用联合遮蔽法制备的 LDL-C 检测试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种测定血清中 LDL-C 的检测试剂盒,属于生物技术领域。

背景技术：

[0002] 低密度脂蛋白 (LDL) 是人的血液中含有最多的脂蛋白,它所携带的胆固醇 (LDL-C) 被认为是动脉粥样硬化和冠心病的主要致病因素,临床检测已日益重要。

[0003] 目前尚没有真正意义的测定 LDL-C 的参考方法。CDC 测定 LDL-C 暂定的参考方法为超速离心法 (Betaquantification, β -定量法/BQ法),也为 NCEP 所推荐。此法测定的 LDL-C,实际上包括脂蛋白 (a) [Lp(a)] 和中间密度脂蛋白 (IDL) 的胆固醇含量,也是评价其他检测方法正确性的基础。此法需昂贵的设备、操纵复杂、费时且技术要求高,不易在普通实验室开展。Friedewald 公式计算法是目前应用较广的估测 LDL-C 的方法,被 NCEP 推荐为常规测定方法。其以 VLDL 组成恒定 ($VLDL-C/TG = 0.2$,均以 mg/dl 计) 的假设为条件,具有简便、直接、快速等优点。应用此公式计算由 LDL-C 常受 TC、TG 和 HDL-C 变异的影响,总变异可达 9.5%。但在血清中存在 CM、血清 $TG > 4.52\text{mmol/L}$ (400mg/dl)、血清中存在异常 β 脂蛋白时 [III 型高脂血症 (HLP)] 时不宜采用 Friedewald 公式法计算。色谱法和电泳法因仪器、操纵要求高等种种原因临床常规实验室也较少应用,多用于脂蛋白的研究。

[0004] 匀相法因其样本用量少、不需作离心沉淀分离处理、具精密度高、与 F 公式法相关性好、可实现自动化而为临床实验所瞩目。匀相法推广应用的技术关键是其检测试剂的研发,方法很多,但其原理相似,在反应体系中有选择地使 LDL-C 在显色反应中被测定,但匀相法由于技术操作难度原因可能导致屏蔽 LDL-C 不完全,直接影响测定结果的准确性。匀相法测定 LDL-C 国外 (如日本、美国) 起步较早,技术也较成熟,其中以表面活性剂法组成的商品试剂盒以日本第一化学株式会社、英国朗道德产品为代表。目前国内临床实验室采用匀相法测定 LDL-C 的试剂多从日本进口,如日本一化、和光出品的试剂,或国内采用国外技术生产的试剂,如利得曼、申索公司的产品,其价格较高。

发明内容：

[0005] 本发明的目的在于,克服上述技术背景的不足,提供一种价格较低,具有准确度高、重复性好、抗干扰能力强、基质稳定、可用于全自动生化分析仪等特点的达到国际水平的用于检测 LDL-C 的检测试剂盒。本检测试剂盒由分别放置的试剂 1 和试剂 2 组成,其中,所述试剂 1 主要含有金属氯化物、LDL-C 单克隆抗体、表面活性剂 1、胆固醇脂酶;所述试剂 2 主要含有表面活性剂 2、4-氨基安替比林、过氧化物酶、胆固醇氧化酶。

[0006] 本发明的技术方案:试剂 1 中聚阴离子氯化钙和 LDL-C 单克隆抗体共同作用下,使血清中游离 LDL-C 产生凝集效应并发生抗原抗体反应形成抗原抗体复合物,达到联合遮蔽 LDL-C 的效果。血清中 HDL、VLDL 及 CM 则在表面活性剂辛基苯基聚氧乙烯醚作用下被解离并释出来的微粒化 Chol 分子与胆固醇脂酶试剂产生不完整的 TRINDER 反应。当加入试剂 2 时,含有对 LDL 有特异作用的表面活性剂聚乙二醇 8000 能水解 LDL,释放出微粒化 Chol 分

子,参与完整的 TRINDER 反应,在全自动生化分析仪即可得出血清中 LDL-C 的浓度。

[0007] 本发明的具体实施基本操作如下:

[0008] 1. 试剂 1 的制备:

[0009] 在烧杯中加入 500ml-700ml 纯化水,加入 MOPS08-10g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入 MOPS0 钠盐 9-11g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入胆酸钠 15-25g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入氯化钙 0.4-0.5g,常温下搅拌 2-3 分钟,加入乙二胺四乙酸二钠盐 0.1-0.2g,常温下搅拌 2-3 分钟,加入辛基苯基聚氧乙烯醚 2-4ml,常温下搅拌 2-3 分钟,加入胆固醇酯酶 10-14KU,常温下搅拌 2-3 分钟,加入硫酸葡聚糖 8-12g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入载脂蛋白 B 单克隆抗体 50-150ml,常温下搅拌 3-5 分钟,最后加入 N-乙基间甲基苯胺-乙羟丙基磺酸钠 0.1-0.3g,常温下搅拌 2-3 分钟,其余用纯化水补足到 1000ml。

[0010] 2. 试剂 2 的制备:

[0011] 在烧杯中加入 500ml-700ml 纯化水,加入 MOPS08-10g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入 MOPS0 钠盐 9-11g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入聚乙二醇 800040-60g,常温下搅拌 3-5 分钟,加入 4-氨基安替比林 0.05-0.2g,常温下搅拌 2-3 分钟,加入过氧化物酶 1-2KU,常温下搅拌 2-3 分钟,加入胆固醇氧化酶 0.4-0.8KU,常温下搅拌 2-3 分钟,加入叠氮钠 0.01-0.02g,常温下搅拌 2-3 分钟,其余用纯化水补足到 1000ml。

[0012] 3. 本 LDL-C 检测试剂盒的使用

[0013] (1) 检测仪器:本发明涉及的 LDL-C 检测试剂盒,适用于各类全自动生化分析仪。

[0014] (2) 待测血清:不溶血血清,2-8℃可稳定一周,避免脂浊。

[0015] (3) 具体检测程序如下表 1:

[0016] 表 1 样本检测操作程序

[0017]

加入物	空白管 (B)	校准管 (S)	样品管 (T)
R1 (μl)	240	240	240
蒸馏水 (μl)	4	—	—
校准品 (μl)	—	4	—
样品 (μl)	—	—	4
R2 (μl)	60	60	60
混匀, 37℃预温 10 秒钟后, 在测定波长 540nm 下, 读取第一点吸光度 A1, 2 分钟后读取第二点吸光度 A2, 计算 $\Delta A = (A2 - A1)$ 。			

[0018] 计算结果:样品中的 LDL-C 含量 (mmol/L) = $\Delta AT / \Delta AS \times$ 校准液浓度

[0019] 参考值范围:中、老年人平均约 2.7-3.1mmol/L

具体实施方式:

[0020] 实施例 1

[0021] 1. 试剂 1 的配制:

[0022]

MOPSO	8g
MOPSO 钠盐	9g
胆酸钠	15g
氯化钙	0.4g
乙二胺四乙酸二钠盐	0.1g
辛基苯基聚氧乙烯醚	2ml
胆固醇酯酶	10KU
硫酸葡聚糖	8g
载脂蛋白 B 单克隆抗体	50ml
N-乙基间甲基苯胺-乙羟丙基磺酸钠	0.1g
其余用纯化水补足到 1000ml。	

[0023] 2. 试剂 2 的制备：

[0024]

MOPSO	8g
MOPSO 钠盐	9g
聚乙二醇 8000	40g
4-氨基安替比林	0.05g
过氧化物酶	1KU
胆固醇氧化酶	0.4KU
叠氮钠	0.01g
其余用纯化水补足到 1000ml。	

[0025] 表 2 为本实例 1 配制的 LDL-C 检测试剂盒在外部条件相同的条件下, 在日立 7180 全自动生化分析仪上连续测定标准定值血清 10 次的结果数据。

[0026] 表 2 准确度测定结果表

[0027]

测定次数	结果 (mmol/L)
1	2.91
2	2.89

[0028]

3	3.00
4	2.98
5	2.85
6	2.92
7	2.78
8	2.88
9	2.94
10	2.88
均值	2.90

[0029] 从表 2 可知, 本实例 1 配制的 LDL-C 检测试剂盒准确度为 :0.69%

[0030] 表 3 为本实例 1 LDL-C 检测试剂盒在外部条件相同的条件下, 在日立 7180 全自动生化分析仪上连续测定质控血清 20 次的结果数据。

[0031] 表 3 精密度测定结果表

[0032]

测定次数	结果 (mmol/L)
1	2.51
2	2.50
3	2.50
4	2.49

5	2.48
6	2.51
7	2.48
8	2.47
9	2.48
10	2.48
11	2.49
12	2.47
13	2.50
14	2.53
15	2.51
16	2.52
17	2.52
18	2.51
19	2.49
20	2.53
均值	2.49
SD	0.0182
CV	0.73%

[0033] 从表 3 可知,本实例 1 配制的 LDL-C 检测试剂盒精密密度为 :0.73%

[0034] 表 4 为本实例 1LDL-C 检测试剂盒测定值与日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值的对照表。

[0035] 表 4 测定值对照表

[0036]

样本号	本实例 1 测定值 (mmol/L)	日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值 (mmol/L)
1	3.02	3.10
2	2.70	2.73
3	2.89	2.98
4	2.89	2.97
5	2.77	2.82
6	2.48	2.53

[0037]

7	2.82	2.90
8	2.70	2.77
9	2.52	2.55
10	2.68	2.75
11	2.44	2.47
12	2.56	2.63
13	2.71	2.75
14	2.81	2.87
15	2.82	2.88
16	2.46	2.51
17	2.57	2.62
18	2.85	2.88
19	2.72	2.77
20	2.54	2.56
21	2.46	2.46
22	2.69	2.77
23	2.81	2.90
24	2.34	2.34

25	2.67	2.70
26	2.49	2.51
27	2.89	2.93
28	2.35	2.39
29	2.51	2.57
30	2.51	2.55
31	2.72	2.77
32	2.17	2.19
33	2.39	2.43
34	2.33	2.36
35	2.23	2.23
36	2.42	2.43
37	2.60	2.62
38	2.39	2.44
39	2.75	2.79
40	2.70	2.71

[0038] 从表 4 可知,本实例 1LDL-C 检测试剂盒测定值与日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值的相关系数 R^2 为 0.992,两者显示了极好的相关性。

[0039] 实施例 2

[0040] 1. 试剂 1 的配制:

[0041]

MOPSO	10g
MOPSO 钠盐	11g
胆酸钠	25g
氯化钙	0.5g
乙二胺四乙酸二钠盐	0.2g
辛基苯基聚氧乙烯醚	4ml
胆固醇酯酶	14KU
硫酸葡聚糖	12g
载脂蛋白 B 单克隆抗体	150ml

[0042]

N-乙基间甲基苯胺-乙羟丙基磺酸钠	0.3g
其余用纯化水补足到 1000ml。	

[0043] 2. 试剂 2 的制备:

[0044]

MOPSO	10g
MOPSO 钠盐	11g
聚乙二醇 8000	60g
4-氨基安替比林	0.2g
过氧化物酶	2KU
胆固醇氧化酶	0.8KU
叠氮钠	0.02g
其余用纯化水补足到 1000ml。	

[0045] 表 2 为本实例 2 配制的 LDL-C 检测试剂盒在外部条件相同的条件下,在日立 7180 全自动生化分析仪上连续测定标准值血清 10 次的结果数据。

[0046] 表 2 准确度测定结果表

[0047]

测定次数	结果 (mmol/L)
1	2.58
2	2.64
3	2.56
4	2.57
5	2.62
6	2.53
7	2.56
8	2.59
9	2.59
10	2.62
均值	2.59

[0048] 从表 2 可知,本实例 2 配制的 LDL-C 检测试剂盒准确度为 :0.81%

[0049] 表 3 为本实例 2LDL-C 检测试剂盒在外部条件相同的条件下,在日立 7180 全自动生化分析仪上连续测定质控血清 20 次的结果数据。

[0050] 表 3 精密度测定结果表

[0051]

测定次数	结果 (mmol/L)
1	2.37
2	2.36
3	2.40
4	2.39
5	2.38
6	2.34
7	2.37
8	2.37
9	2.33
10	2.37
11	2.36
12	2.36
13	2.41
14	2.35
15	2.34
16	2.39
17	2.38
18	2.39

[0052]

19	2.34
20	2.37
均值	2.37
SD	0.0197
CV	0.83%

[0053] 从表 3 可知,本实例 2 配制的 LDL-C 检测试剂盒精密度为 :0.83%

[0054] 表 4 为本实例 2LDL-C 检测试剂盒测定值与日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值的对照表。

[0055] 表 4 测定值对照表

[0056]

样本号	本实例 2 测定值 (mmol/L)	日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值 (mmol/L)
-----	--------------------	------------------------------

1	2.85	2.90
2	2.55	2.55
3	2.62	2.67
4	2.61	2.68
5	2.71	2.78
6	2.45	2.46
7	2.73	2.74
8	2.20	2.23
9	2.83	2.88
10	2.13	2.19
11	2.61	2.61
12	2.51	2.52
13	2.98	2.98
14	2.62	2.67
15	2.57	2.63
16	2.42	2.48
17	2.78	2.82
18	2.39	2.39
19	2.98	3.07
20	2.48	2.55
21	2.90	2.93
22	2.79	2.84
23	2.55	2.57
24	2.84	2.91
25	2.84	2.89
26	2.55	2.62
27	2.23	2.27
28	2.95	3.03
29	2.27	2.30
30	2.97	3.04
31	2.77	2.82
32	2.33	2.38
33	2.79	2.85
34	2.45	2.48
35	2.61	2.65
36	2.40	2.41

[0057]

37	2.51	2.53
38	2.63	2.64
39	2.53	2.55
40	2.18	2.23

[0058] 从表 4 可知, 本实例 2LDL-C 检测试剂盒测定值与日本一化 LDL-C 检测试剂盒测定值的相关系数 R^2 为 0.991, 两者显示了极好的相关性。

专利名称(译)	一种采用联合遮蔽法制备的LDL-C检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105044364A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510227795.4	申请日	2015-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	王贤俊		
申请(专利权)人(译)	王贤俊		
当前申请(专利权)人(译)	王贤俊		
[标]发明人	王贤俊 郭二豪 郑蓓蕾 江新涛		
发明人	王贤俊 郭二豪 郑蓓蕾 江新涛		
IPC分类号	G01N33/92 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/92 G01N2800/323 G01N2800/324		
其他公开文献	CN105044364B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种采用联合遮蔽法制备的用于LDL-C检测的试剂盒。该试剂由分别放置的试剂1和试剂2组成，其中，所述试剂1含有金属氯化物、LDL-C单克隆抗体及定量酶试剂；所述试剂2含有表面活性剂、显色剂、防腐剂、抗干扰物质及反应促进剂。本发明具有显色特性好、准确度高、试剂成分稳定、操作简单适用于临床各种全自动生化分析仪的特点。用于检测人体血清中LDL-C的含量。

加入物	空白管 (B)	校准管 (S)	样品管 (T)
R1 (μl)	240	240	240
蒸馏水 (μl)	4	—	—
校准品 (μl)	—	4	—
样品 (μl)	—	—	4
R2 (μl)	60	60	60
混匀，37℃预温 10 秒钟后，在测定波长 540nm 下，读取第一点吸光度 A1，2 分钟后读取第二点吸光度 A2，计算 $\Delta A=(A2-A1)$ 。			