

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105044364 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201510227795.4

审查员 毕秀华

(22)申请日 2015.05.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105044364 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(73)专利权人 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

(74)专利代理机构 温州名创知识产权代理有限公司 33258

代理人 陈加利

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书8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、胆固醇酯酶;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,所述试剂1 中金属氯化物为氯化钙,其浓度范围在0.4g/L-0.5g/L,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2m1/L-4m1/L,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。

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LDL-C 单克隆抗体为载脂蛋白B 单克隆抗体,其浓度范围在50m1/L-150m1/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 中胆固醇酯酶含量为10KU/L-14KU/L。

5. 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-0.8K U/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)是人的血液中含量最多的脂蛋白,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。应用此公式计算山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>4.52mmol/L(400mg/dl)、血清中存在异常β脂蛋白时[111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、胆固醇酯酶;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分子与胆固醇酯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TR1NDER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

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△A=(A2-A1)。			

[0017] [0018] 计算结果:样品中的LDL-C含量(mmol/L)= $\Delta A T / \Delta A S \times$ 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:

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
[0022] 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：

MOPSO	8g
MOPSO 钠盐	9g
聚乙二醇 8000	40g
[0024] 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1LDL-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<sup>2</sup>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:

MOPSO	10g
MOPSO 钠盐	11g
胆酸钠	25g
氯化钙	0.5g
[0041] 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：	
MOPSO	10g
MOPSO 钠盐	11g
聚乙二醇 8000	60g
[0044] 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定值血清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<sup>2</sup>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	<a href="#">CN105044364B</a>	公开(公告)日	2016-09-14
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		
代理人(译)	陈加利		
其他公开文献	<a href="#">CN105044364A</a>		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**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 ( $\mu$ l)	240	240	240
蒸馏水 ( $\mu$ l)	4	—	—
校准品 ( $\mu$ l)	—	4	—
样品 ( $\mu$ l)	—	—	4
R2 ( $\mu$ l)	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 $\Delta A = (A2 - A1)$ 。			