



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405076 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610788738.8

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 上海科华生物工程股份有限公司

地址 200233 上海市徐汇区钦州北路1189号

(72)发明人 韩利敏 李基 薛精诚 王会杨君

(74)专利代理机构 上海晨皓知识产权代理事务所(普通合伙) 31260

代理人 成丽杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

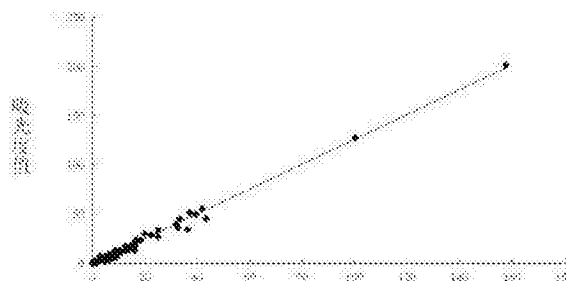
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

D-二聚体检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种D-二聚体检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含:缓冲液、D-二聚体、促凝剂、稳定剂以及防腐剂,其中,促凝剂为聚乙烯吡咯烷酮。本发明的实施方式通过在D-二聚体检测试剂盒加入作为促凝剂的聚乙烯吡咯烷酮(PVP),使得D-二聚体检测试剂盒不仅可以促进抗原抗体的结合,使其快速形成复合物,又能抑制免疫复合物的解离,使沉淀出现快,提高了检测的速度;而且还会因此而扩大非特异性范围,使得D-二聚体检测试剂盒保持一个宽的线性范围。另外,PVP可将D-二聚体单克隆抗体固定在乳胶微粒上,可特异性的增强浊度的变化,从而提高试剂盒的检测灵敏度。



1. 一种D-二聚体检测试剂盒,其特征在于,包含:缓冲液、D-二聚体、促凝剂、稳定剂以及防腐剂,其中,所述促凝剂为聚乙烯吡咯烷酮。

2. 根据权利要求1所述的D-二聚体检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为以下之一或其组合:三羟甲基氨基甲烷缓冲液、磷酸盐缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的D-二聚体检测试剂盒,其特征在于,所述D-二聚体为聚苯乙烯微球包被的D-二聚体。

4. 根据权利要求1所述的D-二聚体检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为以下之一或其任意组合:离子稳定剂、悬浮稳定剂;所述防腐剂为以下之一或其任意组合:叠氮钠、硫柳汞、苯酚、乙基汞硫代硫酸钠。

5. 根据权利要求5所述的D-二聚体检测试剂盒,其特征在于,所述离子稳定剂为以下之一或其组合:氯化钠、氯化钾,所述悬浮稳定剂为聚乙二醇。

6. 一种D-二聚体检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包含以下步骤:

聚苯乙烯微球的活化:用缓冲液将聚苯乙烯粒子稀释后,加入N-羟基琥珀酰亚胺溶液,混合均匀、搅拌,在搅拌中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,继续搅拌反应30~60min之后离心、超声洗涤溶解到缓冲液中,即得到聚苯乙烯微球溶液;

抗体的偶联:向所述聚苯乙烯微球溶液中加入抗体溶液,震荡反应90~120min;

微球的封闭:向所述震荡反应过程中的混合液加入牛血清白蛋白;

洗涤、溶解:将所述震荡反应结束后的混合物经过离心、超声洗涤后,溶解到缓冲液中,即得D-二聚体检测试剂盒。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述聚苯乙烯微球的活化步骤中的缓冲液为2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液,其中,所述缓冲液的浓度为25~50mM,pH为5.5~6.5。

8. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述N-羟基琥珀酰亚胺溶液以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液的浓度分别为80~100mg/mL和8~10mg/mL。

9. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述聚苯乙烯微球的活化步骤中的聚苯乙烯粒子的粒径为60~500nm。

10. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,在所述聚苯乙烯微球的活化以及所述洗涤、溶解步骤中,所述离心的速率为18000~20000rpm,所述离心的时间为1~30min;所述超声的时间为1~5min。

D-二聚体检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种D-二聚体检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 纤维蛋白溶解系统是人体最重要的抗凝系统,它对保持血管壁的正常通透性及维持血液的流动状态和组织修复起着重要作用,该系统主要由4部分组成:纤溶酶原、纤溶酶原激活剂、纤溶酶、纤溶酶抑制物。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,纤维蛋白开始溶解,纤溶酶降解纤维蛋白原和交联纤维蛋白形成各种可溶性片段,统称纤维蛋白原降解产物(FDP)。其中,D-二聚体是降解产物中最小片段,是交联纤维蛋白的特异性降解产物。

[0003] 在正常生理状态下,人体正常D-二聚体的水平小于 $200\mu\text{g/L}$,机体内维持着凝血与纤溶系统的动态平衡,以保证纤维蛋白的及时形成与清除。一旦这种动态平衡被破坏,血管内凝血倾向增强,纤维蛋白增多,纤维蛋白降解产物增加,D-二聚体含量增加。因此,D-二聚体含量的升高反映了体内凝血和纤溶系统的双重激活,可作为体内高凝状态和纤溶亢进的敏感标记物(参见《临床血液学杂志》,2011年,邓家栋,临床血液学[M]),因此D-二聚体的含量变化可以用来检测具有凝血和纤溶过程的一类疾病,如深静脉血栓、肺栓塞(PE)、弥散性血管内凝血(DIC)、重症肝炎等疾病的检测。另外D-二聚体测定法还可作为PE的敏感、快速的初步筛选指标(参见《临床肺科杂志》,2011年11卷,陈晓燕;定量测定血浆D-二聚体在肺栓塞诊断中的意义)。

[0004] 目前临床常用的D-二聚体检测方法主要包括:乳胶凝集法、酶联免疫吸附法(ELISA)、胶乳增强免疫比浊法、免疫金标法等。其中乳胶凝集法操作简单,快速,适用于急诊检测,但是只能用于定性或半定量的检测,常作为筛查用;酶联免疫吸附实验法精确,定量,敏感性高,但操作要求严格,步骤繁琐,不适用于急诊和临床病人的快速诊断和监测;免疫金标法具有乳胶凝集法的易于操作、快速,又具有ELISA法准确、定量的特点,但类风湿因子、肝素及血脂等对其检测的结果具有一定的干扰,不适于大规模推广使用;胶乳免疫比浊法具有操作简便、快速、定量准确、特异性强、敏感度高等优点,可满足门诊和急诊的需要,在临床应用中越来越广泛。但现有的利用胶乳免疫比浊法制备的D-二聚体测定试剂盒大多使用聚乙二醇或葡聚糖作为促凝剂,这也导致了下述缺点,例如在试剂盒灵敏度提高时,就会造成了线性范围窄、稳定性欠佳等缺点;而进口试剂盒价格昂贵、检测成本高,不利于该检测项目在临床诊断中的推广应用。

[0005] 综上所述,提供一种线性范围广、稳定性好、成本低廉的D-二聚体测定试剂盒是目前我们亟需解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种D-二聚体检测试剂盒及其制备方法,使得D-二聚体测定试剂盒线性范围广、稳定性好、成本低廉。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的实施方式提供了一种D-二聚体检测试剂盒,该试剂盒包含:缓冲液、D-二聚体、促凝剂、稳定剂以及防腐剂,其中,促凝剂为聚乙烯吡咯烷酮。

[0008] 另外,本实施方式还提供了一种D-二聚体检测试剂盒的制备方法,该方法包含以下步骤:聚苯乙烯微球的活化:用缓冲液将聚苯乙烯粒子稀释后,加入N-羟基琥珀酰亚胺溶液,混合均匀、搅拌,在搅拌中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,继续搅拌反应30~60min之后离心、超声洗涤溶解到缓冲液中,即得到聚苯乙烯微球溶液;抗体的偶联:向聚苯乙烯微球溶液中加入抗体溶液,震荡反应90~120min;微球的封闭:向震荡反应过程中的混合液加入牛血清白蛋白;洗涤、溶解:将震荡反应结束后的混合物经过离心、超声洗涤后,溶解到缓冲液中,即得D-二聚体检测试剂盒。

[0009] 本发明实施方式相对于现有技术而言,通过在D-二聚体检测试剂盒加入作为促凝剂的聚乙烯吡咯烷酮(PVP),使得D-二聚体检测试剂盒不仅可以促进抗原抗体的结合,使其快速形成复合物,又能抑制免疫复合物的解离,使沉淀出现快,提高了检测的速度;而且还不会因此而扩大非特异性范围,使得D-二聚体检测试剂盒保持一个宽的线性范围。另外,PVP可将D-二聚体单克隆抗体固定在乳胶微粒上,可特异性的增强浊度的变化,从而提高试剂盒的检测灵敏度。

[0010] 另外,要求R1和R2试剂中的缓冲液的可调节pH范围在7.0~9.0之间,优选为以下之一:三羟甲基氨基甲烷缓冲液、磷酸盐缓冲液,与其他缓冲液相比,这两种缓冲液具有缓冲能力强、溶解度高、很好的生物相容性和反应惰性,且pH随温度和稀释度的改变而改变很小的优点。

[0011] 另外,D-二聚体为聚苯乙烯微球包被的D-二聚体。聚苯乙烯微球与D-二聚体的包被是通过化学偶联完成反应,其结合力要比物理吸附更强,不容易被洗脱,试剂的稳定性更好。

[0012] 另外,稳定剂为以下之一或其任意组合:离子稳定剂、悬浮稳定剂;防腐剂为以下之一或其任意组合:叠氮钠、硫柳汞、苯酚、乙基汞硫代硫酸钠,这些防腐剂防腐效果好,毒性低,为比较常用的防腐剂。

[0013] 另外,离子稳定剂为以下之一或其组合:氯化钠、氯化钾,悬浮稳定剂为聚乙二醇,少量的聚乙二醇既可以起到稳定剂的作用,与离子稳定剂一起作用可以使试剂的稳定性提高。

[0014] 另外,聚苯乙烯微球的活化步骤中的缓冲液为2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液,其中,缓冲液的浓度为25~50mM,pH为5.5~6.5。在此条件下聚苯乙烯微球上的羧基活化程度最大,有利于结合更多的抗体,提高偶联率,从而增加试剂检测的灵敏度。

[0015] 另外,通过实验探索的结果,最终优选N-羟基琥珀酰亚胺溶液以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液的浓度分别为80~100mg/mL和8~10mg/mL。

[0016] 另外,聚苯乙烯微球的活化步骤中的聚苯乙烯粒子的粒径为60~500nm。这一宽的粒径范围,有利于在制备过程中,改善试剂的灵敏度和提高线性范围。

[0017] 另外,通过实验探索,在聚苯乙烯微球的活化以及洗涤、溶解步骤中,最佳的离心的速率为18000~20000rpm,离心的时间为1~30min;超声的时间为1~5min,这样可以保证抗体可以在粒子很快均匀分散,增加抗体与粒子的偶联率。

附图说明

- [0018] 图1是根据本发明第一实施方式中的校准曲线；
[0019] 图2是根据本发明第一实施方式中的灵敏度检测曲线；
[0020] 图3是根据本发明第一实施方式中的相关性检测曲线。

具体实施方式

[0021] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图对本发明的各实施方式进行详细的阐述。然而，本领域的普通技术人员可以理解，在本发明各实施方式中，为了使读者更好地理解本申请而提出了许多技术细节。但是，即使没有这些技术细节和基于以下各实施方式的种种变化和修改，也可以实现本申请所要求保护的技术方案。

[0022] 本发明的第一实施方式涉及一种D-二聚体检测试剂盒，该试剂盒包含：缓冲液、D-二聚体、促凝剂、稳定剂以及防腐剂，其中，促凝剂为聚乙烯吡咯烷酮（简称：PVP）。

[0023] 值得注意的是，在本实施方式中，缓冲液可以是三羟甲基氨基甲烷缓冲液，缓冲液还可以是磷酸盐缓冲液；或者缓冲液也可以是上述两种缓冲液的组合。

[0024] 值得注意的是，在本实施方式中，D-二聚体可以为聚苯乙烯微球包被的D-二聚体。

[0025] 进一步地，在本实施方式中，稳定剂可以是离子稳定剂；稳定剂还可以是悬浮稳定剂；或者稳定剂还可以是上述两种稳定剂的组合，另外，防腐剂可以是叠氮钠；或者硫柳汞；或者苯酚；或者乙基汞硫代硫酸钠；或者上述4种防腐剂的组合，本实施方式不应以此为限。

[0026] 另外，在本实施方式中，离子稳定剂可以是氯化钠；或者氯化钾，悬浮稳定剂可以为聚乙二醇。

[0027] 在实际使用D-二聚体检测试剂盒过程中，通常将D-二聚体检测试剂盒分成R1试剂、R2试剂以及校准品，其中，R1试剂成分中含有缓冲液、促凝剂、稳定剂、防腐剂；R2试剂成分中含有缓冲液、包被了抗D-二聚体抗体的聚苯乙烯粒子、防腐剂；校准品含有：纤维蛋白降解产物D-二聚体、缓冲液、稳定剂、防腐剂。

[0028] 具体地，R1试剂的缓冲液优选HEPES缓冲液，pH在7.0-8.5之间；促凝剂选择PVP-K90和PVP-K25混合，可以加快免疫反应的速度，缩短检测时间，终浓度为1.6-5.0%之间；稳定剂可以为NaCl，浓度为0.2-0.5%之间；防腐剂叠氮钠的浓度可以为0.1%；

[0029] R2试剂是由抗人D-二聚体单克隆抗体与羧基化的聚苯乙烯微球在MES缓冲液中通过化学交联法致敏，之后经过离心，洗涤后，在含有稳定剂和防腐剂的Good's缓冲液中分散而成。

[0030] 下面通过实验检测本实施方式配置的D-二聚体检测试剂盒的各项参数：1.D-二聚体检测试剂盒R1试剂的制备

[0031] D-二聚体检测试剂盒R1试剂的配方如表1：

	物料	浓度
	HEPES	50 mM(摩尔浓度)
	Nacl	0.8%(质量分数)
[0032]	PVP-K90/ 25	2.5%(质量分数)
	叠氮钠	0.1%(质量分数)
	用氢氧化钠(NaOH)把 pH 调至 7.4±0.5	

[0033] 2.D-二聚体检测试剂盒R2试剂的配制

[0034] D-二聚体检测试剂盒R2试剂稀释液的配方如表2:

	物料	浓度
	HEPES	50 mM(摩尔浓度)
	Nacl	100 mM(摩尔浓度)
[0035]	BSA	0.1%(质量分数)
	叠氮钠	0.1%(质量分数)
	用氢氧化钠(NaOH)把 pH 调至 7.4±0.5	

[0036] 3.洗涤液配方如表3:

[0037]

物料	浓度	pH
MES	25 mM(摩尔浓度)	6.1
MOPSO	50 mM(摩尔浓度)	7.4
用氢氧化钠(NaOH)把 pH 调至合适的值		

[0038] 4.羧基化聚苯乙烯微球与抗体的偶联过程

[0039] a.取20mg粒径为160nm羧基化聚苯乙烯微球,用25mM pH6.0的MES缓冲液通过离心、超声洗涤1-2次;

[0040] b.将沉淀用MES稀释到10mg/mL混匀之后,加入0.5mL和0.75mL的EDC(10mg/mL)和NHS(100mg/mL)溶液活化聚苯乙烯微球上的羧基,室温下震荡反应30min;

[0041] c.活化结束之后,离心弃去上清,取2.0mL 25mM pH6.0的MES溶解,并用超声混合均匀之后,加入18mg/mL的D-二聚体单克隆抗体,室温震荡下交联90min,之后加入0.1%的

BSA,室温震荡封闭30min;

[0042] d.用25mM pH6.0的MES缓冲液洗涤2次;再用50mM pH7.4的MOPS0洗涤一次;

[0043] e.加入4.0mL含有50mM pH7.4的HEPES,100mM,0.1%BSA溶液中,2-8℃保存。

[0044] 5.校准品的配制

[0045] a.取适量的纤维蛋白溶解于HEPES缓冲液中,使其浓度为20mg/mL,加入适量的纤溶酶(终浓度为2.0u/mL),在37℃下搅拌过夜反应,最后离心得到纤维蛋白的降解产物D-二聚体溶液;

[0046] b.以积水的D-二聚体校准品为标准,采用其D-二聚体检测试剂盒进行测试,求出其平均值,得到D-二聚体溶液的初始浓度。

[0047] c.将d-二聚体用HEPES缓冲液稀释几个不同的浓度,再加入终浓度分别为50mg/mL、20mg/mL、0.9%、0.15%的BSA、甘露醇、氯化钠、叠氮钠混合均匀,以每瓶0.5mL分装进行冷冻干燥,每次使用时加入0.5mL纯化水复溶30min左右。

[0048] 6.检测样本的方法

[0049] (1)取出试剂盒中D-二聚体校准品,精准加入0.5mL的纯化水复溶,并用生理盐水配制成9个浓度梯度,分别为1.0mg/mL、5.0mg/mL、10mg/mL、15mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL;

[0050] (2)以东芝7100为例:测定主波长为570nm,副波长800nm;分别取不同浓度的校准品溶液8.0uL,加入d-二聚体稀释液8.0uL,在37℃下反应30s后加入D-二聚体R1试剂240uL,反应60s后加入D-二聚体R2试剂60uL,在37℃下混合均匀,孵育约20s后读取第一次吸光度(A1),在孵育约5min,读取第二次吸光度(A2),计算吸光度变化 $\Delta A = A2 - A1$;

[0051] (3)6点非线性校准曲线定标法:以空白样本定值为0.0mg/L,依次对校准品a、b、c、d、e测定相应的 $\Delta A (A2 - A1)$ 值,以 ΔA 为Y轴,浓度为X轴;校准曲线 $y = 18.827x + 14.031$,相关系数 $R^2 = 0.998$ (见附图1)。

[0052] 使用上述反应所得的聚苯乙烯微球-D-二聚体单克隆抗体试剂,使用上述检测方法进行灵敏度检测。以5%人血清白蛋白为空白,平均测定15次,计算结果如表4所示,均值为0.6,标准差S为0.23。再以稀释后的D-二聚体校准品溶液测定,在R1试剂中加入不同浓度的和不同类型的促凝剂。

	校准品	浓度	0%PVP-	2.5%PVP-	2.5%DT- 70
		ug/mL	K90/25	K90/25	
[0053]	校准品 1	0	-9	1	-6
	校准品 2	0.05	12	45	20
	校准品 3	0.5	103	201	122
	校准品 4	1.0	405	639	411
	校准品 5	2.0	846	1431	1109
	校准品 6	3.0	1227	3233	2017

[0054] 从表4的结果可以看出,使用PVP和DT处理的R1试剂,与空白相比灵敏度都有了很大的提高,但是在同样的浓度下,PVP处理过后的效果要比DT的更好,灵敏度提高了很多,这说明作为促凝剂PVP的效果更好。因此再以下实例中都加入2.5%的PVP-K90/25的R1试剂测试。

[0055] 将接近线性范围上限的D-二聚体高值样本(1000ug/L),用生理盐水按照1/640、1/320、1/160、1/80、1/40、1/20、1/10-1稀释,共配制16个浓度梯度,用实施例1中的测试样本的方法测试,将测定的平均值与理论浓度进行线性回归分析最终得出结果为,相关系数 $R^2=0.9963$,线性回归方程为 $y=1.0627x-0.4014$ (见附图2)。

[0056] 将浓度为0.05mg/mL的D-二聚体校准品溶液,分别加入相同体积的各干扰物质溶液,加入后的浓度分别为游离型胆红素(450mg/mL)、血红蛋白(5g/L)、甘油三酯(15mM)、Vc(600mg/mL)、乳糜(福尔马肼)浊度为(2940)。用本发明提供的试剂盒与市售对照试剂盒分别对每个样本重复测定3次,求取平均值,与加入相同体积的纯化水比较,观察加入干扰物质与加入纯化水后D-二聚体测定结果的相对误差。结果如表5所示:

[0057]

干扰物	本发明试剂盒 均值 ($\mu\text{g/mL}$)	相 对 误 差	对照试剂盒 均 值 ($\mu\text{g/mL}$)	相对误差
纯化水	0.979		1.153	
游离型胆红素	0.986	0.72%	1.162	0.78%
血红蛋白	0.993	1.43%	1.201	4.16%
甘油三酯	1.002	2.35%	1.176	1.99%
Vc	0.983	0.42%	1.242	7.72%
乳糜浊度	1.001	2.25%	1.184	2.69%

[0058] 从表中的结果可以看出本发明提供的试剂盒在对加入以上干扰物与加入同体积纯化水后测定值的相对误差小于3%，即认为在中轻度溶血、黄疸、或乳糜时，本发明提供的试剂盒的检测结果几乎不受干扰；二对照试剂盒的测试结果相对误差较大，容易受胆红素、血红蛋白等物质的影响，不利于疾病的正确诊断。

[0059] 取正常人血和患者的血液样本共90份，加入肝素钠抗凝混合均匀之后，离心获得血浆。用本发明实施方式中的试剂盒和积水公司生产的D-二聚体检测试剂盒分别对样本检测，分别计算检测均值，得出两者的相关系数，并进行线性回归。最终得出结果为，两种试剂盒的相关系数 $R^2=0.9903$ ，线性回归方程为 $y=1.261x+0.026$ （见附图3）。由此可见本发明提供的试剂盒在临床上对于深静脉血栓、弥漫性血管内凝血及肺栓塞等疾病的诊断和病程检测具有同样的准确率，可在临床上代替进口试剂盒的使用，减低检测成本。

[0060] 不难发现，与现有技术相比，本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒具有下述优点：

[0061] (1) 本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒具有较高的检测灵敏度，最低检测限可达到 $0.1\mu\text{g/mL}$ ；操作简单，快速。

[0062] (2) 本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒特异性强，在一定范围内不受其他物质的干扰；

[0063] (3) 本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒线性范围广，在 $(0.5\sim 40)\text{mg/L}$ 范围内线性相关系数 $r\geq 0.99$ ， $(0.5\sim 10)\text{mg/L}$ 范围内，线性绝对偏差应不超过 $\pm 1.0\text{mg/L}$ ；

[0064] (4) 本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒稳定性好，在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 至少可保存24个月，试剂开瓶后可以保存45天；比现有市售的试剂盒开瓶后保存时间久；

[0065] (5) 本发明实施方式中的D-二聚体检测试剂盒与对照试剂相比，其检测的结果准确可靠，且成本低，可在医院中推广使用。

[0066] 本发明的第二实施方式涉及一种D-二聚体检测试剂盒的制备方法，该方法包含以下步骤：

[0067] 聚苯乙烯微球的活化:用缓冲液将聚苯乙烯粒子稀释后,加入N-羟基琥珀酰亚胺溶液,混合均匀、搅拌,在搅拌中加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液,继续搅拌反应30~60min之后离心、超声洗涤溶解到缓冲液中,即得到聚苯乙烯微球溶液;

[0068] 抗体的偶联:向聚苯乙烯微球溶液中加入抗体溶液,震荡反应90~120min;

[0069] 微球的封闭:向震荡反应过程中的混合液加入牛血清白蛋白;

[0070] 洗涤、溶解:将震荡反应结束后的混合物经过离心、超声洗涤后,溶解到缓冲液中。

[0071] 进一步地,聚苯乙烯微球的活化步骤中的缓冲液可以为2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液,其中,缓冲液的浓度可以为25~50mM,pH为5.5~6.5。

[0072] 具体地,N-羟基琥珀酰亚胺溶液以及1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液的浓度分别可以为80~100mg/mL和8~10mg/mL。

[0073] 值得一提的是,聚苯乙烯微球的活化步骤中的聚苯乙烯粒子的粒径可以为60~500nm。

[0074] 另外,在聚苯乙烯微球的活化以及洗涤、溶解步骤中,离心的速率可以为18000~20000rpm,离心的时间可以为1~30min;超声的时间可以为1~5min。

[0075] 具体地,本实施方式详细地反应步骤如下:

[0076] (1) 聚苯乙烯微球的活化:取0.2mL粒径为500nm的聚苯乙烯粒子用浓度为25mM,pH为5.5的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液稀释到质量体积比(即:溶质的质量与溶液的体积之比)为20mg/mL后,再加入200μL、浓度为100mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,混合均匀,然后搅拌中加入80μL、浓度为10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液,室温下搅拌反应30min之后离心洗涤超声溶解到缓冲液中。

[0077] (2) 抗体的偶联:向第一步活化洗涤过的微球溶液中加入2mg的抗体溶液,在室温下震荡反应90min。

[0078] (3) 微球的封闭:在偶联完成时向步骤(2)中的混合液中加入6mg的牛血清白蛋白对微球表面没有偶联蛋白质的残留位点进行封闭,室温震荡封闭30min。

[0079] (4) 洗涤、溶解:将反应结束的混合物经过离心、超声洗涤2~3次,其中,离心的速率可以为20000rpm,离心的时间可以为30min;超声的时间可以为5min,最后溶解到Good's缓冲液中,即完成D-二聚体检测试剂盒的制备。

[0080] 本发明的第三实施方式涉及一种D-二聚体检测试剂盒的制备方法,该方法包含以下步骤:

[0081] (1) 聚苯乙烯微球的活化:取0.2mL粒径为500nm的聚苯乙烯粒子用浓度为50mM,pH为6.5的2-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲液稀释到稀释到质量体积比(即:溶质的质量与溶液的体积之比)为10mg/mL后,再加入200μL、浓度为80mg/mL的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,混合均匀,然后搅拌中加入80μL、浓度为8mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液,室温下搅拌反应30min之后离心洗涤超声溶解到缓冲液中。

[0082] (2) 抗体的偶联:向第一步活化洗涤过的微球溶液中加入2mg的抗体溶液,在室温下震荡反应90min。

[0083] (3) 微球的封闭:在偶联完成时向步骤(2)中的混合液中加入6mg的牛血清白蛋白对微球表面没有偶联蛋白质的残留位点进行封闭,室温震荡封闭30min。

[0084] (4) 洗涤、溶解:将反应结束的混合物经过离心、超声洗涤2~3次,其中,离心的速率

可以为18000rpm,离心的时间可以为1min;超声的时间可以为1min,最后溶解到Good's缓冲液中,即完成D-二聚体检测试剂盒的制备。

[0085] 本领域的普通技术人员可以理解,上述各实施方式是实现本发明的具体实施例,而在实际应用中,可以在形式上和细节上对其作各种改变,而不偏离本发明的精神和范围。

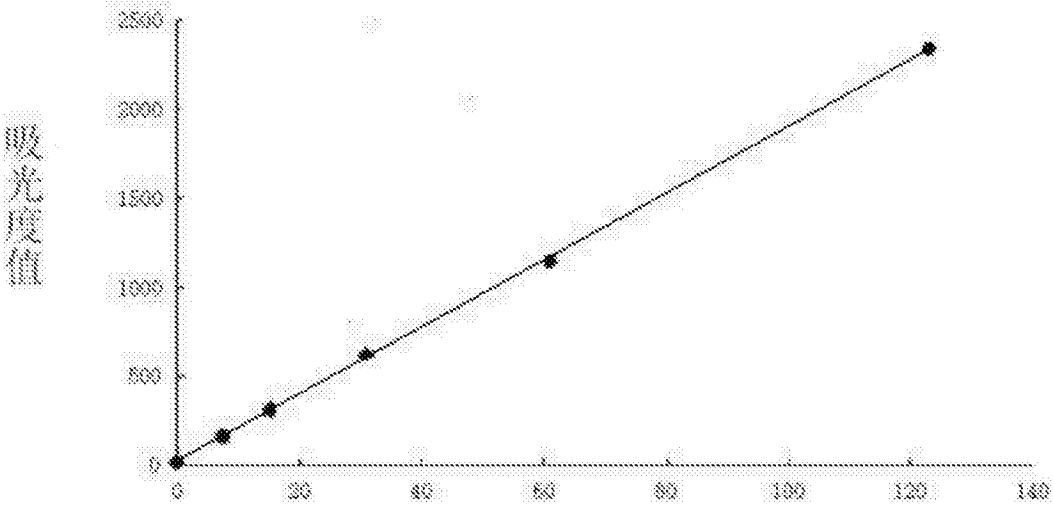


图1

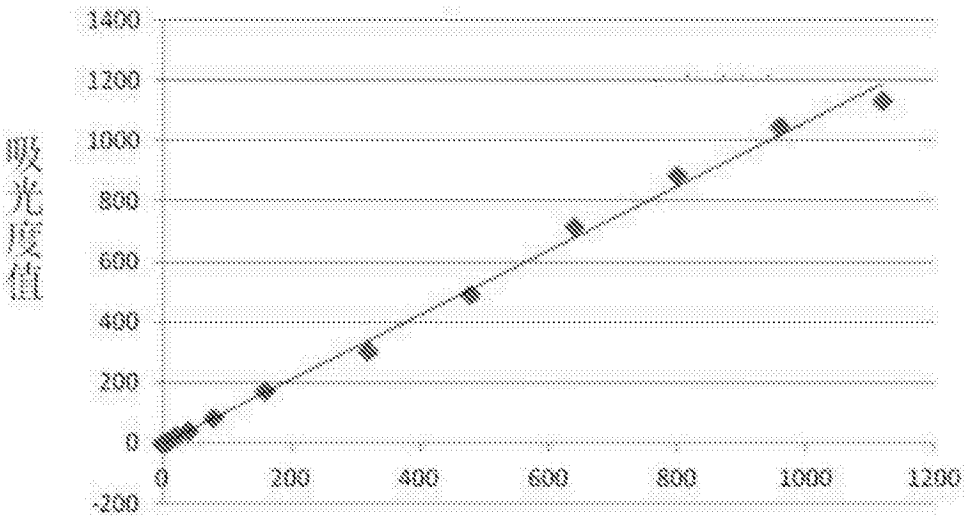


图2

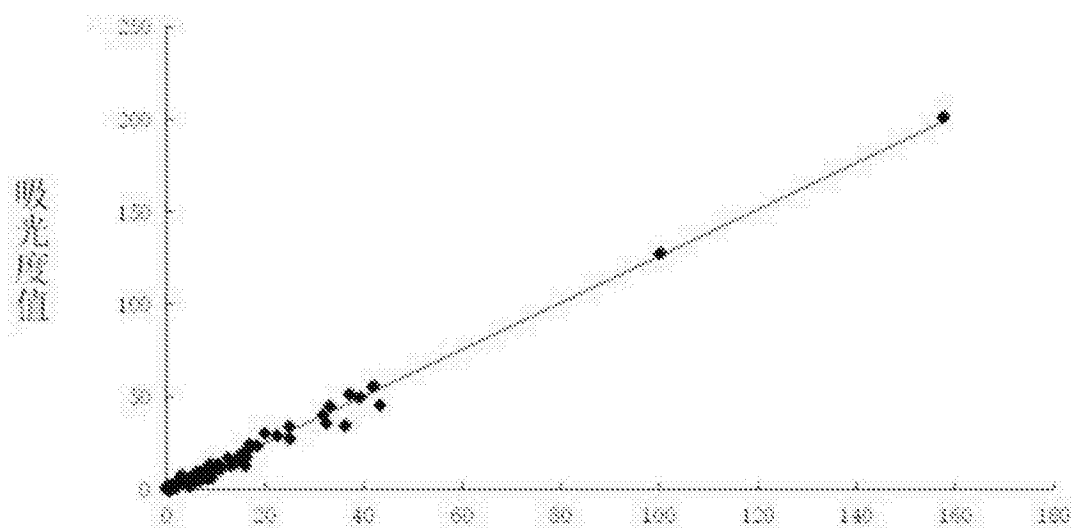


图3

专利名称(译)	D-二聚体检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106405076A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610788738.8	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
[标]发明人	韩利敏 李基 薛精诚 王会 杨君		
发明人	韩利敏 李基 薛精诚 王会 杨君		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/539 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/531 G01N33/539 G01N33/54393 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，公开了一种D-二聚体检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包含：缓冲液、D-二聚体、促凝剂、稳定剂以及防腐剂，其中，促凝剂为聚乙烯吡咯烷酮。本发明的实施方式通过在D-二聚体检测试剂盒加入作为促凝剂的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，使得D-二聚体检测试剂盒不仅可以促进抗原抗体的结合，使其快速形成复合物，又能抑制免疫复合物的解离，使沉淀出现快，提高了检测的速度；而且还不会因此而扩大非特异性范围，使得D-二聚体检测试剂盒保持一个宽的线性范围。另外，PVP可将D-二聚体单克隆抗体固定在乳胶微粒上，可特异性的增强浊度的变化，从而提高试剂盒的检测灵敏度。

