(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106546455 A
(43)申请公布日 2017.03.29

(21)申请号 201510590637.5

(22)申请日 2015.09.16

(71)申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦

(72)发明人 刘林 张子千 左淼 陈庚文 崔双

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51)Int.Cl.
G01N 1/28(2006.01)
G01N 21/82(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页 附图3页

(54)发明名称

溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒

(57)摘要

溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒。本发明提供了硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理的方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定的试剂盒。该溶血剂用于免疫比浊测定。利用硼酸缓冲体系制备的溶血剂在用于免疫比浊测定时,具有下列优点的至少一种:灵敏度高、检测过程快速简便以及特异性强。

1.硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途,所述溶血剂用于免疫比浊测定,

任选地,所述免疫比浊测定包括C-反应蛋白检测、降钙素原检测、D-二聚体检测、胱抑素C检测、肌钙蛋白检测和糖化血红蛋白检测的至少一种。

2.一种用于免疫比浊测定的溶血剂,其特征在于,含有:

表面活性剂;

硼酸缓冲体系;以及

水,

其中,所述溶血剂的pH值为5~9,

任选地,所述免疫比浊测定用于检测C-反应蛋白。

3.根据权利要求2所述的溶血剂,其特征在于,所述表面活性剂为非离子型表面活性剂,

任选地,所述非离子型表面活性剂包括选自皂苷、曲拉通、吐温、苄泽和Tetronic的至少一种,

任选地,所述表面活性剂为皂苷,并且基于所述溶血剂的总体积,所述表面活性剂的含量为0.01~30克/升,

任选地,所述表面活性剂的含量为0.1~30克/升,

任选地,所述表面活性剂的含量为0.5~30克/升。

4.根据权利要求2所述的溶血剂,其特征在于,所述硼酸缓冲体系含有:

硼酸;以及

弱酸盐,所述弱酸盐包括选自硼酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、有机磺酸盐和有机羧酸盐的至少一种,

任选地,所述弱酸盐为碱金属盐,优选钠盐或者钾盐,

任选地,所述硼酸盐包括选自四硼酸钠、硼酸钠和硼酸钾的至少一种,

任选地,所述四硼酸钠是以硼砂的形式提供的,

任选地,所述有机磺酸盐包括2-吗啉代乙磺酸、3-吗啉丙磺酸、4-羟乙基哌嗪乙磺酸和哌嗪-1,4-二乙磺酸的钠盐或者钾盐,

任选地,所述硼酸与所述弱酸盐的重量比为1:0.2~5。

5.一种生物样品的预处理方法,所述生物样品用于免疫比浊测定,其特征在于,包括:

使所述生物样品与权利要求2~4任一项所述的溶血剂接触,

任选地,所述免疫比浊测定用于检测C-反应蛋白、降钙素原、D-二聚体、胱抑素C、肌钙蛋白和糖化血红蛋白的至少一种,

任选地,所述生物样品包括选自全血、脑脊液、体液、血清和血浆的至少一种,

任选地,所述全血包括选自末梢全血和抗凝静脉全血的至少一种,

任选地,所述接触是通过将所述全血与所述溶血剂在37摄氏度下混合而进行的,

任选地,所述接触是通过将所述全血加入到所述溶血剂中进行的,

任选地,所述接触进行10~90秒,优选20~50秒。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述溶血剂与所述全血的体积比为1:10~80,优选1:20~50。

7.一种生物样本中目标物含量的测定方法,其特征在于,包括:

将所述生物样本与溶血剂接触，以便获得试液，所述溶血剂含有表面活性剂和硼酸缓冲体系；以及

将所述试液与含有目标物抗体的免疫试剂孵育，以便进行免疫比浊测定确定所述目标物含量。

8.根据权利要求7所述的方法，其特征在于，所述生物样品包括选自全血、脑脊液、体液、血清和血浆的至少一种，

任选地，所述全血包括选自末梢全血和抗凝静脉全血的至少一种，

任选地，所述目标物为C-反应蛋白，并且所述免疫比浊测定包括：

(a)将所述试液与免疫试剂混合，所述免疫试剂含有特异性识别C-反应蛋白的抗体；

(b)测定步骤(a)中所得到混合物在预定时间段内针对预定波长光的吸光度变化；以及

(c)基于所述吸光度变化，确定所述目标物含量，

任选地，在步骤(a)中，将所述试液未经稀释直接与所述免疫试剂混合，和/或

所述抗体负载在载体上，所述载体包括选自胶乳、磁珠和胶体金的至少一种，

任选地，步骤(c)进一步包括：

基于所述吸光度变化，确定所述生物样品的变化率；和

基于所述生物样品的变化率，利用预先建立的标准曲线，确定所述目标物含量，

任选地，进一步包括：

利用血细胞体积占比换算，对所述目标物含量进行校正。

9.一种用于免疫比浊测定的试剂盒，其特征在于，含有：

表面活性剂；以及

硼酸缓冲体系，

其中，所述表面活性剂和所述硼酸缓冲体系是如权利要求2～4任一项中所限定的，

任选地，进一步包括：

弱酸和碱，所述弱酸和碱适于通过中和反应生成所述弱酸盐。

10.根据权利要求9所述的试剂盒，其特征在于，进一步包括：

抗体，所述抗体特异性识别目标物，

任选地，所述目标物包括C-反应蛋白，

任选地，所述抗体负载在载体上，所述载体包括胶乳、磁珠、胶体金，

任选地，所述试剂盒的组分的至少一部分设置在独立的容器中。

溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒

技术领域

[0001]　本发明涉及分析领域。具体地，本发明涉及溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒，更具体的，本发明涉及硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理的方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定的试剂盒。

背景技术

[0002]　免疫比浊测定的原理是：当抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适（通常是抗体过量）时，所形成的可溶性免疫复合物在促聚剂（例如聚乙二醇等）的作用下，自液相析出，形成微粒，使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时，所形成免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加，反应液的浊度也随之增加。因此，通过测定反应液的浊度并与一系列标准品对照，能够计算出检样中抗原的含量。

[0003]　然而，目前的免疫比浊测定的手段仍有待改进。

发明内容

[0004]　本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。

[0005]　本发明是基于发明人的下列发现而完成的：

[0006]　首先，目前，通过免疫比浊测定对血液中的目标物进行检测，为了避免血液内容物对免疫比浊测定的干扰，通常需要对血液样品进行离心，进而对所得到的血浆或血清进行免疫比浊测定。因此，常规的免疫比浊测定需要离心设备，成本高，采血量大，检测速度较慢，不能够与其他常规的全血检测手段同时进行，无法满足医院急诊与门诊快速诊断的要求。

[0007]　第二，现有的溶血剂在对全血样本进行溶血处理后的产物如果直接应用于免疫比浊测定，通常免疫反应的浊度不够理想，推测这是由于溶血处理所释放的细胞成分对免疫反应存在一定干扰。

[0008]　另外，发明人发现目前的溶血剂在对全血进行溶血处理后，所得到的溶血产物中的溶血剂成分会干扰免疫比浊测定中抗原与抗体的反应，为了避免这类干扰作用，通常需要降低溶血剂中溶血成分的含量，这样会造成溶血处理时间相应地进行延长，或者对溶血产物进行稀释，这样会使得免疫比浊测定在对全血进行检测时难以获得较低的检测限。

[0009]　本发明的发明人对溶血剂进行深入研究后发现，溶血剂的缓冲体系能够显著影响溶血剂处理全血所得到的溶血产物应用于免疫比浊测定时的表现。进一步，发明人对大量的缓冲体系进行筛选，发现采用硼酸缓冲体系的溶血剂能够实现提高免疫比浊测定的特异性和／或灵敏度，且能够和较高浓度的表面活性剂，特别是非离子表面活性剂，优选皂苷类表面活性剂，有良好的协同作用，使得溶血后的试液无需稀释，直接用于免疫比浊测定。

[0010]　有鉴于此，在本发明的第一方面，本发明提出了硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的

用途，所述溶血剂用于免疫比浊测定。

[0011] 发明人惊奇地发现，采用硼酸缓冲体系所制备的溶血剂，在对生物样品例如全血进行溶血处理后所得到的试液可以直接应用于免疫比浊测定，而不需要对试液进行稀释。另外，发明人发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的特异性。进一步，发明人还发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。由此，避免了对生物样品例如全血的离心处理，节省了离心设备的成本，缩短了检测时间，降低了生物样品的采集量，例如针对全血样本时的采血量，提高了检测速度。另外，利用该溶血剂的免疫比浊测定方法可以同时与其他不需要离心的常规生物检验项目例如血常规检测项目同步实施，例如可以在相同的设备中进行，从而满足快速诊断的要求。

[0012] 在本发明的第二方面，本发明提出了一种用于免疫比浊测定的溶血剂。根据本发明的实施例，所述溶血剂含有：表面活性剂；硼酸缓冲体系；以及水，其中，所述溶血剂的 pH 值为 5 ～ 9。由此，利用该溶血剂，通过表面活性剂和硼酸缓冲体系的共同作用，能够有效地对生物样品例如全血中的血细胞进行裂解，同时不会使得裂解细胞所释放的物质对后续的免疫比浊测定造成负面影响。另外，由于该溶血剂的 pH 为 5 ～ 9，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的相关信息。

[0013] 在本发明的第三方面，本发明提出了一种生物样品的预处理方法，所述生物样品用于免疫比浊测定，根据本发明的实施例，该预处理方法包括：使所述生物样品与前面描述的溶血剂接触。如前所述，通过将根据本发明实施例的溶血剂与生物样品接触，在表面活性剂和硼酸缓冲体系的共同作用下，生物样品例如全血中的血细胞能够有效地被裂解，避免了血细胞对后续免疫比浊测定的影响，同时也降低该裂解所释放的物质对后续的免疫比浊测定的影响。另外，由于该溶血剂的 pH 为 5 ～ 9，因此，使得生物样品例如全血中的目标物在与溶血剂接触后仍能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的相关信息。

[0014] 在本发明的第四方面，本发明提出了一种生物样本中目标物含量的测定方法。根据本发明的实施例，该方法包括：将所述生物样本与溶血剂接触，以便获得试液，所述溶血剂含有表面活性剂和硼酸缓冲体系；以及将所述试液与含有目标物抗体的免疫试剂孵育，以便进行免疫比浊测定确定所述目标物含量。根据本发明的实施例，在进行免疫比浊测定之前，预先将生物样本例如全血与含有表面活性剂以及硼酸缓冲体系的溶血剂接触，可以利用表面活性剂和硼酸缓冲体系的共同作用，有效地将生物样品例如全血中的血细胞进行裂解，同时发明人意外地发现，利用该溶血剂裂解细胞所得到的试液中细胞裂解释放的物质，对接下来的免疫比浊测定造成的负面影响较小。另外，由于该溶血剂的 pH 为 5 ～ 9，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的相关信息。由此，根据本发明实施例的生物样本中目标物含量的测定方法具有下列优点的至少一种：灵敏度高、检测过程快速、简便以及特异性强。

[0015] 在本发明的第五方面，本发明提出了一种用于免疫比浊测定的试剂盒。该试剂盒含有：表面活性剂；以及硼酸缓冲体系。由此，利用该试剂盒可以有效地提供前面所述的溶

血剂。如前所述,利用该试剂盒提供的溶血剂,能够有效地对生物样品例如全血中的血细胞进行裂解,同时不会使得裂解细胞所释放的物质对后续的免疫比浊测定造成负面影响。另外,根据本发明的实施例,该溶血剂的pH可以被配制为5～9,因此,使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态,进而,通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的真实信息。

[0016] 此外,根据本发明的实施例,本发明的硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定的试剂盒具有下列优点的至少一种 :

[0017] 1、根据本发明的实施例,硼酸缓冲体系能够用于对目标物进行检测,可以为抗原抗体反应提供较好的反应体系,降低干扰物质与抗体结合,有效地促进免疫反应的发生。

[0018] 2、由于C-反应蛋白存在于血浆中,所以现有技术通常需要采集大量血液且需要进行离心处理,使得检测速度较慢。根据本发明的实施例,能够直接利用全血进行预处理,克服了采血量大以及检测速度慢等缺陷,能够满足快速检验的需求。

[0019] 3、根据本发明的实施例,生物样品经预处理得到的试剂无需稀释即可直接与免疫试剂混合,节约时间,提高检测效率。

[0020] 4、根据本发明的实施例,发明人意外地发现硼酸缓冲体系能够有效地降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰作用,因此,硼酸缓冲体系可以与较高浓度的表面活性剂联合作用,快速地实现对生物样本例如全血的溶血作用。并且,由于硼酸缓冲体系能够有效地降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰作用,因此,即使表面活性剂的用量较大,溶血处理所得到的试液中的表面活性剂也不会对免疫比浊测定造成干扰,进而在得到试液后,可以直接与免疫试剂混合进行免疫比浊测定,而不需要对试液进行稀释,从而节省了检测时间,提高了检测效率。

[0021] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0022] 图1显示了根据本发明一个实施例的标准曲线。

[0023] 图2显示了根据本发明另一个实施例的标准曲线。

[0024] 图3显示了根据本发明另一个实施例的标准曲线。

[0025] 图4显示了根据本发明另一个实施例的线性关系评价结果。

[0026] 图5显示了根据本发明另一个实施例的线性关系评价结果。

[0027] 图6显示了根据本发明一个实施例的生物样本中目标物含量的测定方法的流程示意图。

具体实施方式

[0028] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0029] 本发明提出了硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理的方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定

的试剂盒，下面将分别进行详细描述。

[0030] 硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途

[0031] 本发明提出了硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途，所述溶血剂用于免疫比浊测定。

[0032] 发明人惊奇地发现，采用硼酸缓冲体系所制备的溶血剂，在对生物样品例如全血进行溶血处理后所得到的试液可以直接应用于免疫比浊测定，而不需要对试液进行稀释。另外，发明人发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的特异性。进一步，发明人还发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。由此，避免了对生物样品例如全血的离心处理，节省了离心设备的成本，缩短了检测时间，降低了生物样品的采集量，例如针对全血样本时的采血量，提高了检测速度。另外，利用该溶血剂的免疫比浊测定方法可以同时与其他不需要离心的常规生物检验项目例如血常规检测项目同步实施，例如可以在相同的设备中进行，从而满足快速诊断的要求。

[0033] 根据本发明的实施例，该溶血剂可以用于检测的对象并不受特别限制。根据本发明的一些实例，该免疫比浊测定可以包括C-反应蛋白检测、降钙素原检测、D-二聚体检测、胱抑素C检测、肌钙蛋白检测和糖化血红蛋白检测的至少一种。本发明的发明人发现，在将根据本发明实施例的溶血剂应用于免疫比浊测定时，能够有效地对C-反应蛋白、降钙素原、D-二聚体、胱抑素C、肌钙蛋白和糖化血红蛋白进行检测，尤其是C-反应蛋白。并且可以进一步有效地对全血样本进行这些目标物的检测，提高了检测的特异性、灵敏度、节省了检测成本、缩短了检测时间、降低了生物样品的采集量，例如针对全血样本时的采血量，提高了检测速度。另外，利用该溶血剂的免疫比浊测定方法可以同时与其他不需要离心的常规生物检验项目例如血常规检测项目同步实施，例如可以在相同的设备中进行，从而满足快速诊断的要求。

[0034] 用于免疫比浊测定的溶血剂

[0035] 在本发明的第二方面，本发明提出了一种用于免疫比浊测定的溶血剂。根据本发明的实施例，该溶血剂含有：表面活性剂；硼酸缓冲体系；以及水，其中，溶血剂的pH值为5～9。

[0036] 根据本发明的实施例，表面活性剂具有两亲性的表面活性剂，能够与血细胞上同样具有两亲性的膜脂质相互作用，溶解膜脂质并形成胶束颗粒，进而表面活性剂能够渗入双层脂质之间和脂质层内，使两层脂质之间距离加大，结构疏松，脂质层局部断裂，最终使得细胞膜崩裂，细胞浆流出。进一步，在将溶血产物作为试液用于免疫比浊反应时，硼酸缓冲体系能够有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的特异性，并且可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。另外，利用该溶血剂的免疫比浊测定方法可以同时与其他不需要离心的常规生物检验项目例如血常规检测项目同步实施，例如可以在相同的设备中进行，从而满足快速诊断的要求。

[0037] 本发明的发明人还发现，利用该溶血剂，通过表面活性剂和硼酸缓冲体系的共同作用，能够有效地对生物样品例如全血中的血细胞进行裂解，同时不会使得裂解细胞所释放的物质对后续的免疫比浊测定造成负面影响，由于该溶血剂的pH为5～9，优选地该溶血剂的pH为7，接近人体自然状态的pH值，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持

自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的相关信息。

[0038] 根据本发明的实施例，可以采用的表面活性剂的类型并不受特别限制，只要能够使得血细胞的细胞膜崩裂即可。根据本发明的实施例，优选表面活性剂为非离子型表面活性剂，根据本发明的具体示例，非离子型表面活性剂包括选自皂苷、曲拉通(Triton)、吐温(Tween)、苄泽(Brij)和Tetronic的至少一种。发明人发现，硼酸缓冲体系能够有效地降低这些表面活性剂在免疫比浊测定中的干扰作用。从而，在溶血剂中，可以采用较高用量的表面活性剂，从而能够缩短溶血处理的时间。

[0039] 优选地，在该溶血剂中，可以采用皂苷作为表面活性剂。皂苷别称皂角素、皂素、皂角、碱皂体、皂甙、皂角苷或皂草苷，是一类较复杂的苷类化合物。皂苷在植物界分布很广，许多植物例如人参、三七、知母、远志、甘草、桔梗、柴胡、皂树、油茶、蔷薇等都含有皂苷。皂苷由皂苷配基与糖、糖醛酸或其他有机酸组成，组成皂苷的糖常见的有D-葡萄糖、L-鼠李糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖、L-木糖。常见的糖醛酸有葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸等。皂苷按皂苷配基的结构分为两类：一类是甾族皂苷，其皂苷配基是螺甾烷的衍生物，多由27个碳原子所组成(如薯蓣皂苷)，大多存在于百合科和薯蓣科植物中；第二类是三萜皂苷，其皂苷配基是三萜的衍生物，大多由30个碳原子组成。三萜皂苷分为四环三萜和五环三萜，大多存在于五加科和伞形科等植物中。在本发明中，优选采用三萜皂苷。

[0040] 与传统表面活性剂相比，皂苷作为表面活性剂具有来源广泛、无毒、无刺激性、对人体皮肤温和、生物降解迅速且彻底、原料来自可再生资源等优点。

[0041] 发明人通过实验发现，皂苷具有溶血快、溶血性小的特性，能够有效地提高目标物与抗体的免疫反应。此外，皂苷本身具有较强的稳定性，不易被降解。但是，发明人经过研究发现，在溶血剂对生物样本例如全血进行溶血处理所得到的试液中，表面活性剂例如皂苷的存在会干扰免疫比浊测定的效率。为此，通常在采用皂苷等表面活性剂进行溶血处理时，为了避免表面活性剂例如皂苷对免疫比浊测定的干扰，通常采用较低浓度的表面活性剂例如皂苷，或者在进行免疫比浊测定之前，需要对溶血处理所得到的试液进行稀释处理，但这样会延长溶血处理时间或者影响免疫比浊测定的获得更低的检测限。发明人发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系，能够有效地避免表面活性剂例如皂苷对免疫比浊测定的干扰，从而可以采用比较高的表面活性剂用量，进而可以缩短溶血剂进行溶血处理的时间，实现快速的溶血处理。由此，根据本发明实施例的用于免疫比浊测定的溶血剂可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0042] 根据本发明的具体示例，基于溶血剂的总体积，溶血剂中皂苷的含量为0.01～30克/升，根据本发明的具体示例，皂苷的含量为0.1～30克/升，根据本发明的具体示例，皂苷的含量为0.5～30克/升。发明人发现，通过采用该用量的皂苷，能够有效地与硼酸缓冲体系共同作用进一步提高后续对溶血剂处理生物样品例如全血所得到的试液进行免疫比浊测定的灵敏度和/或特异性。发明人发现，采用高浓度的表面活性剂可以显著地加快溶血剂进行溶血处理的溶血速度，但所获得的试液直接用于免疫比浊测定时，效果不好，需要在进行免疫比浊测定之前对试液进行稀释，但稀释会增加检测时间，并且影响灵敏度，在自动化的样本分析仪上使用，无法满足速度和灵敏度的要求。根据本发明的实施例，通过采用硼酸缓冲体系，能够降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰，因此，可以采用较高浓度

的皂苷，从而缩短了溶血处理的时间，而且不需要稀释，可以直接将试液与免疫试剂混合从而进行免疫比浊测定。因此，溶血剂中使用硼酸缓冲体系，能够使得高浓度表面活性剂制备的试液可以直接用于免疫测定，满足高速的自动化样本分析仪的要求。

[0043]　根据本发明的实施例，硼酸缓冲体系含有硼酸以及弱酸盐。根据本发明的实施例，弱酸盐包括选自硼酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、有机磺酸盐、有机羧酸盐的至少一种。根据本发明的一些实例，弱酸盐可以为碱金属盐。根据本发明的实施例，碱金属盐可以为钠盐或者钾盐，更优选地，硼酸盐包括选自四硼酸钠、硼酸钠和硼酸钾的至少一种。根据本发明的实施例，四硼酸钠是以硼砂的形式提供的。根据本发明的实施例，有机磺酸盐包括 2- 吗啉代乙磺酸 (MES)、3- 吗啉丙磺酸 (MOPS)、4- 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 和哌嗪 -1,4- 二乙磺酸 (PIPES) 的钠盐或者钾盐。发明人通过研究发现，碱金属离子例如钠离子或者钾离子的存在，不会对免疫比浊测定的免疫反应造成干扰。

[0044]　本领域技术人员能够理解，硼酸的用量，以及和弱酸盐的配比并不受特别限制，只要提供合适的缓冲能力，且不干扰后续的免疫测定即可。根据本发明的实施例，硼酸浓度可以为 0.01M-1M，优选 0.02M-0.5M，最优选 0.05M-0.2M。根据本发明的实施例，硼酸与弱酸盐的重量比为 1:0.2 ～ 5，优选为 1:0.5 ～ 2。

[0045]　需要说明的是，本领域技术人员能够理解，在该溶血剂中，还可以含有其他的常规组分，例如渗透压调节剂和防腐剂。

[0046]　根据本发明的实施例，可以在溶血剂中添加渗透压调节剂，以便将渗透压调节在适当的范围内，例如 10mOsm 到 400mOsm 之间，由此能够有助于溶解红细胞和血小板，进而可以降低表面活性剂的用量。渗透压调节剂的类型并不受特别限制，可以采用 NaCI 或者 KCI，由此，渗透压调节剂的加入，在能够提高溶血效率的同时，并不会对后续免疫比浊测定造成负面影响。并且，如前所述，碱金属离子例如钠离子或者钾离子的存在，不会对免疫比浊测定的免疫反应造成干扰。

[0047]　根据本发明的实施例，可以在溶血剂中添加防腐剂，以有助于试剂的防腐和长期保存。对于防腐剂的种类没有特殊的要求，市场上常见的防腐剂如苯氧乙醇、凯松、庆大霉素、叠氮化钠均可。

[0048]　生物样品的预处理方法

[0049]　在本发明的第三方面，本发明提出了一种生物样品的预处理方法，该生物样品用于免疫比浊测定，根据本发明的实施例，该预处理方法包括 ：使生物样品与前面描述的溶血剂接触。

[0050]　如前所述，发明人发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的特异性。进一步，发明人还发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。另外，通过采用根据本发明实施例的溶血剂，即采用表面活性剂和硼酸缓冲体系的溶血剂在对生物样品例如全血进行溶血处理后所得到的试液可以直接应用于免疫比浊测定，而不需要对试液进行稀释。另外，由于该溶血剂的 pH 为 5 ～ 9，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的真实信息。

[0051]　根据本发明的实施例，该生物样本预处理的方法可以用于检测的对象并不受特别

限制。根据本发明的一些实例，该免疫比浊测定可以包括C-反应蛋白检测、降钙素原检测、D-二聚体检测、胱抑素C检测、肌钙蛋白检测和糖化血红蛋白检测的至少一种。如前所述，本发明的发明人发现，在将根据本发明实施例的溶血剂应用于免疫比浊测定时，能够有效地对C-反应蛋白、降钙素原、D-二聚体、胱抑素C、肌钙蛋白和糖化血红蛋白进行检测，尤其是C-反应蛋白。

[0052] 根据本发明的实施例，生物样品包括选自全血、脑脊液、体液、血清和血浆的至少一种。根据本发明的优选示例，全血包括选自末梢全血和抗凝静脉全血的至少一种。由此，根据本发明实施例的生物样品的预处理的方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0053] 根据本发明的实施例，所述溶血剂与所述全血的体积比为1:10～80，优选1:20～50。由此，根据本发明实施例的生物样品的预处理的方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0054] 根据本发明的实施例，接触是通过将全血与溶血剂在37摄氏度下混合而进行的，根据本发明的具体示例，接触是通过将全血加入到溶血剂中进行的，根据本发明的具体示例，接触进行10～90秒，优选20～50秒。

[0055] 如前所述，由于表面活性剂例如皂苷对于免疫比浊测定具有干扰作用，因此，为了能够将溶血处理所得到的试液可以直接用于免疫比浊测定，需要控制表面活性剂的用量不能过高，因此溶血处理的时间就需要延长。根据本发明实施例的溶血剂采用的是表面活性剂和硼酸缓冲体系的组合，能够降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰，因此，可以采用较高浓度的皂苷，从而缩短了溶血处理的时间，例如10～90秒优选20～50秒，而且可以不需要稀释，直接将试液与免疫试剂混合从而进行免疫比浊测定。由此，根据本发明实施例的生物样品的预处理方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0056] 根据本发明的实施例，全血与溶血剂接触的方式并不受特别限制，可以是将全血加入到溶血剂中，也可以将溶血剂加入到全血中以便通过混合使得全血与溶血剂充分接触。根据本发明的一个具体实例，通过将全血加入到预先设置有溶血剂的容器例如检测池中来实现全血与溶血剂的接触，由此，可以避免这样一种不利的情形，即将全血加入到空容器中造成部分全血样品会粘附在容器壁上，进而造成全血不能充分与溶血剂接触，后续检测结果不准确。

[0057] 本领域技术人员能够理解的是，上述对用于免疫比浊测定的溶血剂所描述的特征和优点同样适用于该生物样品的预处理方法，在此不再赘述。

[0058] 生物样本中目标物含量的测定方法

[0059] 在本发明的第四方面，本发明提出了一种生物样本中目标物含量的测定方法。根据本发明的实施例，该方法包括：

[0060] S100：溶血处理

[0061] 在该步骤中，首先对生物样本进行溶血处理，具体的，将生物样本与溶血剂接触，以便获得试液，该溶血剂含有表面活性剂和硼酸缓冲体系。

[0062] 发明人发现，通过在溶血剂中采用硼酸缓冲体系可以有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的特异性。进一步，发明人还发现，通过在溶血剂

中采用硼酸缓冲体系可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。另外，溶血剂中的硼酸缓冲体系能够与较高浓度的表面活性剂配合，对生物样品例如全血进行溶血处理后，所得到的试液可以直接应用于免疫比浊测定，而不需要对试液进行稀释。另外，由于该溶血剂的 pH 为 5 ～ 9，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的真实信息。

[0063] 根据本发明的实施例，该方法可以用于检测的对象并不受特别限制。根据本发明的一些实例，该免疫比浊测定可以包括 C- 反应蛋白检测、降钙素原检测、D- 二聚体检测、胱抑素 C 检测、肌钙蛋白检测和糖化血红蛋白检测的至少一种。如前所述，本发明的发明人发现，在将含有表面活性剂和硼酸缓冲体系的溶血剂应用于免疫比浊测定时，能够有效地对 C- 反应蛋白、降钙素原、D- 二聚体、胱抑素 C、肌钙蛋白和糖化血红蛋白进行检测，尤其是 C- 反应蛋白。

[0064] 根据本发明的实施例，生物样品包括选自全血、脑脊液、体液、血清和血浆的至少一种。根据本发明的优选示例，全血包括选自末梢全血和抗凝静脉全血的至少一种。由此，根据本发明实施例的生物样本中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0065] 根据本发明的实施例，溶血剂与全血的体积比为 1:10 ～ 80，优选 1:20 ～ 50。由此，根据本发明实施例的生物样本中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0066] 根据本发明的实施例，接触是通过将全血与溶血剂在 37 摄氏度下混合而进行的，根据本发明的具体示例，接触是通过将全血加入到溶血剂中进行的，根据本发明的具体示例，接触进行 10 ～ 90 秒，优选 20 ～ 50 秒。

[0067] 如前所述，由于表面活性剂例如皂苷对于免疫比浊测定具有干扰作用，因此，为了能够将溶血处理所得到的试液可以直接用于免疫比浊测定，需要控制表面活性剂的用量不能过高，因此溶血处理的时间就需要延长。根据本发明实施例的溶血剂采用的是表面活性剂和硼酸缓冲体系的组合，能够降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰，因此，可以采用较高浓度的皂苷，从而缩短了溶血处理的时间例如 10 ～ 90 秒优选 20 ～ 50 秒，而且不需要稀释，可以直接将试液与免疫试剂混合从而进行免疫比浊测定。由此，根据本发明实施例的生物样本中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0068] 根据本发明的实施例，全血与溶血剂接触的方式并不受特别限制，可以是将全血加入到溶血剂中，也可以将溶血剂加入到全血中以便通过混合使得全血与溶血剂充分接触。根据本发明的一个具体实例，通过将全血加入到预先设置有溶血剂的容器例如检测池中来实现全血与溶血剂的接触，由此，可以避免这样一种不利的情形，即将全血加入到空容器中造成部分全血样品会粘附在容器壁上，进而造成全血不能充分与溶血剂接触，后续检测结果不准确。

[0069] S200 :免疫比浊测定

[0070] 在该步骤中，在通过对生物样本进行溶血处理并获得试液之后，对所得到的试液进行免疫比浊测定，具体地，在获得试液之后，将试液与含有目标物抗体的免疫试剂孵育，

以便进行免疫比浊测定确定目标物含量。

[0071] 根据本发明的实施例，目标物可以为C-反应蛋白、降钙素原、D-二聚体、胱抑素C、肌钙蛋白和糖化血红蛋白的至少一种，优选为C-反应蛋白，并且免疫比浊测定包括：

[0072] (a)将试液与免疫试剂混合，免疫试剂含有特异性识别C-反应蛋白的抗体。

[0073] 根据本发明的实施例，在步骤(a)中，可以将试液未经稀释直接与免疫试剂混合，和/或抗体负载在载体上，载体包括选自胶乳、磁珠和胶体金的至少一种。发明人意外发现，试液无需经过稀释则可直接与免疫试剂混合，减少了检测步骤，进一步缩短了检测时间，提高了效率。由此，根据本发明实施例的生物样本例如全血样本中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0074] (b)测定步骤(a)中所得到混合物在预定时间段内针对预定波长光的吸光度变化。

[0075] 根据本发明的实施例，在步骤(b)中，预定波长为850nm，和/或预定时间段的长度为120秒，根据本发明的具体示例，预定时间段包括混合后第30秒至第120秒。由此，根据本发明实施例的生物样本例如全血中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0076] (c)基于吸光度变化，确定目标物含量。

[0077] 根据本发明的实施例，步骤(c)进一步包括：基于吸光度变化，确定生物样品的变化率；和基于生物样品的变化率，利用预先建立的标准曲线，确定所述目标物含量，根据本发明的具体示例，进一步包括：利用血细胞体积占比换算，对所述目标物含量进行校正。由此，根据本发明实施例的生物样本例如全血中目标物含量的测定方法可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。根据本发明的实施例，可以通过测试已知不同浓度的目标物例如C反应蛋白校准品与溶血剂、免疫试剂反应，在光度计上读取反应时间内的比浊度变化，并计算比浊度变化率，建立浓度-比浊度变化率的标准曲线。

[0078] 根据本发明的实施例，变化率 $\Delta A=(A2-A1)/(T2-T1)$，其中A2是指步骤(b)中混合后的第T2秒时混合物的比浊度，A1是指步骤(b)中混合后的第T1秒时混合物的比浊度。

[0079] 本领域技术人员能够理解的是，上述对生物样品的预处理方法以及溶血剂所描述的特征和优点同样适用于该全血样本中目标物含量的测定方法。

[0080] 用于免疫比浊测定的试剂盒

[0081] 在本发明的第五个方面，本发明提出了一种用于免疫比浊测定的试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒含有：表面活性剂；以及硼酸缓冲体系，其中，表面活性剂和硼酸缓冲体系是前面用于免疫比浊测定的溶血剂描述所限定的。由此，根据本发明实施例的用于免疫比浊测定的试剂盒具有下列优点的至少一种：灵敏度高、检测过程快速、简便以及特异性强。

[0082] 具体地，根据本发明的实施例，表面活性剂具有两亲性的表面活性剂，能够与血细胞上同样具有两亲性的膜脂质相互作用，溶解膜脂质并形成胶束颗粒，进而表面活性剂能够渗入双层脂质之间和脂质层内，使两层脂质之间距离加大，结构疏松，脂质层局部断裂，最终使得细胞膜崩裂，细胞浆流出。进一步，在将溶血产物作为试液用于免疫比浊反应时，硼酸缓冲体系能够有效地防止试液中的干扰物质与抗体结合，进而提高了免疫比浊测定的

特异性，并且可以有效地增强抗体与目标物的免疫反应，进而提高了免疫比浊测定的灵敏度。

[0083] 本发明的发明人还发现，利用该溶血剂，通过表面活性剂和硼酸缓冲体系的共同作用，能够有效地对生物样品例如全血中的血细胞进行裂解，同时不会使得裂解细胞所释放的物质对后续的免疫比浊测定造成负面影响，由于该溶血剂的pH为5～9，优选地该溶血剂的pH为7，接近人体自然状态的pH值，因此，使得生物样品例如全血中的目标物能够保持自然状态，进而，通过后续免疫比浊测定所获得的结果能够更真实地反映相关目标物的相关信息。

[0084] 根据本发明的实施例，可以采用的表面活性剂的类型并不受特别限制，只要能够使得血细胞的细胞膜崩裂即可。根据本发明的实施例，优选表面活性剂为非离子型表面活性剂，根据本发明的具体示例，非离子型表面活性剂包括选自皂苷、曲拉通(Triton)、吐温(Tween)、苄泽(Brij)和Tetronic的至少一种。发明人发现，硼酸缓冲体系能够有效地降低这些表面活性剂在免疫比浊测定中的干扰作用。从而，在溶血剂中，可以采用较高用量的表面活性剂，从而能够缩短溶血处理的时间。

[0085] 根据本发明的具体示例，基于溶血剂的总体积，溶血剂中皂苷的含量为0.01～30克/升，根据本发明的具体示例，皂苷的含量为0.1～30克/升，根据本发明的具体示例，皂苷的含量为0.5～30克/升。发明人发现，通过采用该用量的皂苷，能够有效地与硼酸缓冲体系共同作用进一步提高后续对溶血剂处理生物样品例如全血所得到的试液进行免疫比浊测定的灵敏度和/或特异性。发明人发现，采用高浓度的表面活性剂可以显著地加快溶血剂进行溶血处理的溶血速度，但所获得的试液直接用于免疫比浊测定时，效果不好，需要在进行免疫比浊测定之前对试液进行稀释，但稀释会增加检测时间，并且影响灵敏度，在自动化的样本分析仪上使用，无法满足速度和灵敏度的要求。根据本发明的实施例，通过采用硼酸缓冲体系，能够降低表面活性剂对免疫比浊测定的干扰，因此，可以采用较高浓度的皂苷，从而缩短了溶血处理的时间，而且不需要稀释，可以直接将试液与免疫试剂混合从而进行免疫比浊测定。因此，溶血剂中使用硼酸缓冲体系，能够使得高浓度表面活性剂制备的试液可以直接用于免疫测定，满足高速的自动化样本分析仪的要求。

[0086] 根据本发明的实施例，硼酸缓冲体系含有硼酸以及弱酸盐。根据本发明的实施例，弱酸盐包括选自硼酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、有机磺酸盐、有机羧酸盐的至少一种。根据本发明的一些实例，弱酸盐可以为碱金属盐。根据本发明的实施例，钠盐或者钾盐，更优选地，硼酸盐包括选自四硼酸钠、硼酸钠和硼酸钾的至少一种。根据本发明的实施例，四硼酸钠是以硼砂的形式提供的。根据本发明的实施例，有机磺酸盐包括2-吗啉代乙磺酸(MES)、3-吗啉丙磺酸(MOPS)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES)的钠盐或者钾盐。发明人通过研究发现，碱金属离子例如钠离子或者钾离子的存在，不会对免疫比浊测定的免疫反应造成干扰。由此，根据本发明实施例的用于免疫比浊测定的试剂盒可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0087] 本领域技术人员能够理解，硼酸的用量，以及和弱酸盐的配比并不受特别限制，只要提供合适的缓冲能力，且不干扰后续的免疫测定即可。根据本发明的实施例，硼酸浓度可以为0.01M-1M，优选0.02M-0.5M，最优选0.05M-0.2M。根据本发明的实施例，所述硼酸与所述弱酸盐的重量比为1:0.2～5，优选为1:0.5～2。

[0088] 根据本发明的实施例，在利用试剂盒形成溶血处理体系时，硼酸缓冲体系中的弱酸盐的添加方式并不受特别限制，可以直接将弱酸盐与其他组分直接混合，也可以添加弱酸和碱，从而通过中和反应生成新鲜的弱酸盐。由此，根据本发明的实施例，该试剂盒可以进一步包括：弱酸和碱，弱酸和碱适于通过中和反应生成弱酸盐。由此，方便试剂盒的保存，降低生产成本。

[0089] 根据本发明的实施例，该试剂盒可以进一步包括：抗体，该抗体特异性识别目标物，根据本发明的具体示例，目标物包括C-反应蛋白，根据本发明的具体示例，抗体负载在载体上，载体包括胶乳、磁珠和胶体金。由此，根据本发明实施例的用于免疫比浊测定的试剂盒可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0090] 根据本发明的实施例，试剂盒的组分的至少一部分设置在独立的容器中。由此，根据本发明实施例的用于免疫比浊测定的试剂盒可以进一步具有较高的灵敏度、较快速、简便的检测过程或者特异性强。

[0091] 本领域技术人员能够理解的是，根据本发明的实施例，可将预先配置好的硼酸缓冲体系设置于一个独立的容器中，也可以分别将硼酸和弱酸盐分别置于两个容器中，待需要使用时按比例进行混合，又可以将硼酸、弱酸和碱分别置于三个容器中，待需要使用时按比例进行混合。例如，可以通过将配方量的各组分混合后，用水补齐至最终体积，从而可以容易得到根据本发明实施例的溶血剂。

[0092] 需要说明的是，本领域技术人员能够理解，在该试剂盒中，还可以含有其他的常规组分，例如渗透压调节剂和防腐剂。

[0093] 根据本发明的实施例，可以在试剂盒中添加渗透压调节剂，以便将渗透压调节在适当的范围内，例如10mOsm到400mOsm之间，由此能够有助于溶解红细胞和血小板，进而可以降低表面活性剂的用量。渗透压调节剂的类型并不受特别限制，可以采用NaCI或者KCI，由此渗透压调节剂的加入，在能够提高溶血效率的同时，并不会对后续免疫比浊测定造成负面影响。并且，如前所述，碱金属离子例如钠离子或者钾离子的存在，不会对免疫比浊测定的免疫反应造成干扰。

[0094] 根据本发明的实施例，可以在试剂盒中添加防腐剂，以有助于试剂的防腐和长期保存。对于防腐剂的种类没有特殊的要求，市场上常见的防腐剂如苯氧乙醇、凯松、庆大霉素均可。

[0095] 本领域技术人员能够理解的是，上面针对硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理的方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定的试剂盒所描述的特征和优点是可以相互适用的，在此不再赘述。

[0096] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0097] 实施例1

[0098] 按照下列配方制备全血C-反应蛋白检测用溶血剂A：

[0099] Triton X-114 8.0g

[0100]　硼酸　　　　　　　　　　　　5.6g

[0101]　4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠　　　　2.5g

[0102]　加去离子水溶解，适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0，补去离子水至终体积 1L。

[0103]　在该实施例中，将已知浓度的 C-反应蛋白校准品（浓度在 0-320mg/L 的范围内）8 微升加入到所制备的 0.2mL 溶血剂 A 中。在温度保持 37℃的条件下，将所得到的混合物静置溶血处理 90 秒后，再向该混合物中加入 0.2mL C-反应蛋白免疫试剂，混匀后测试 850nm 的吸光度信号变化，以便计算免疫试剂加入后第 30 秒至第 120 秒的比浊度变化率（也称为“反应度”）$\Delta A=(A2-A1)/(T2-T1)$。

[0104]　其中，ΔA 表示比浊度变化率，T2 和 T1 分别表示免疫试剂加入后的不同时间点，A2 为时间点 T2 时的 850nm 处吸光度，A1 为时间点 T1 时的 850nm 处吸光度。

[0105]　针对一系列已知不同浓度的 C 反应蛋白校准品，进行上述测试，并按照纵坐标为比浊度变化率，横坐标为 C 反应蛋白（CRP）浓度，建立溶血剂 A 的标准曲线，结果显示在图 1 所示。

[0106]　对比例 1

[0107]　按照下列配方制备全血 C-反应蛋白检测用溶血剂 B：

[0108]　Triton X-114　　　　　　　　8.0g

[0109]　磷酸氢二钠·十二水　　　　　11.6g

[0110]　磷酸二氢钠·二水　　　　　　1.18g

[0111]　利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0112]　按照与实施例 1 基本相同的方法，建立溶血剂 B 的标准曲线，区别仅在于采用溶血剂 B 替换实施例 1 中的溶血剂 A，溶血剂 B 的标准曲线显示在图 1 中。

[0113]　从图 1 中可以看出，实施例 1 溶血剂 A 的反应度显著高于对比例 1 溶血剂 B，进而溶血剂 A 相对于溶血剂 B 可以显著增强 C-反应蛋白的免疫反应效果。由此，可以得出结论，硼酸缓冲体系相对于其他缓冲体系能够有效地增强免疫比浊测定中的免疫反应，并且 Triton X-114 可以有效地作为溶血剂的表面活性剂与硼酸缓冲体系联合使用。

[0114]　实施例 2

[0115]　按照下列配方制备全血 C-反应蛋白检测用溶血剂 C：

[0116]　十二烷基二甲基甜菜碱　　　　0.05g

[0117]　硼酸　　　　　　　　　　　　5.6g

[0118]　4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠　　　　2.5g

[0119]　利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0120]　按照与实施例 1 基本相同的方法，建立溶血剂 C 的标准曲线，区别仅在于采用溶血剂 C 替换实施例 1 中的溶血剂 A，溶血剂 C 的标准曲线显示在图 2 中。

[0121]　对比例 2

[0122]　按照下列配方制备全血 C-反应蛋白检测用溶血剂 D：

[0123]　十二烷基二甲基甜菜碱　　　　0.05g

[0124]　磷酸氢二钠·十二水　　　　　11.6 g

[0125]　磷酸二氢钠·二水　　　　　　　　1.18g

[0126]　利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0127]　按照与实施例 1 基本相同的方法，建立溶血剂 D 的标准曲线，区别仅在于采用溶血剂 D 替换实施例 1 中的溶血剂 A，溶血剂 D 的标准曲线显示在图 2 中。

[0128]　从图 2 中可以看出，实施例 2 溶血剂 C 的反应度显著高于对比例 2 溶血剂 D，进而溶血剂 C 相对于溶血剂 D 可以显著增强 C- 反应蛋白的免疫反应效果。由此，可以得出结论，硼酸缓冲体系相对于其他缓冲体系能够有效地增强免疫比浊测定中的免疫反应，并且十二烷基二甲基甜菜碱可以有效地作为溶血剂的表面活性剂与硼酸缓冲体系联合使用。

[0129]　实施例 3

[0130]　按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 E：

[0131]　皂苷　　　　　　　　4.0g

[0132]　硼酸　　　　　　　　5.6g

[0133]　4- 羟乙基哌嗪乙磺酸钠　　　　2.5g

[0134]　利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0135]　按照与实施例 1 基本相同的方法，建立溶血剂 E 的标准曲线，区别仅在于采用溶血剂 E 替换实施例 1 中的溶血剂 A，并将溶血剂与样本混合后静置溶血处理的时间缩减为 30 秒，溶血剂 E 的标准曲线显示在图 3 中。

[0136]　对比例 3

[0137]　按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 F：

[0138]　皂苷　　　　　　　　4.0g

[0139]　磷酸氢二钠·十二水　　　　11.6g

[0140]　磷酸二氢钠·二水　　　　1.18g

[0141]　利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCI 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0142]　按照与实施例 1 基本相同的方法，建立溶血剂 F 的标准曲线，区别仅在于采用溶血剂 F 替换实施例 1 中的溶血剂 A，并将溶血剂与样本混合后静置溶血处理的时间缩减为 30 秒，溶血剂 F 的标准曲线显示在图 3 中。

[0143]　从图 3 可以看出，对于同一浓度的校准品测试，采用溶血剂 E 测试的反应度数值显著高于溶血剂 F，进而，溶血剂 E 相对于溶血剂 F 可以显著增强 C- 反应蛋白的免疫反应效果。由此，可以得出结论，硼酸缓冲体系相对于其他缓冲体系能够有效地增强免疫比浊测定中的免疫反应，并且皂苷可以有效地作为溶血剂的表面活性剂与硼酸缓冲体系联合使用，在 30 秒内有效地进行溶血处理，并且增强 C- 反应蛋白的免疫反应效果。

[0144]　性能测试

[0145]　1、免疫反应测试：

[0146]　采用溶血剂 E 和 F，按照实施例 3 所述方法，测试临床抗凝全血测试结果比对，结果如下表所示，结果表明溶血剂 E 对免疫反应的增强作用使其检测结果具有较高的灵敏度和检测限。

[0147]

样本序号	溶血剂 E 结果 (mg/L)	溶血剂 F 结果 (mg/L)	绝对偏差 （mg/L)	相对偏差
样本 1	0.27	0	-0.27	-100%
样本 2	0.42	0	-0.42	-100%
样本 3	0.69	0.46	-0.23	-33%
样本 4	1.31	0.95	-0.36	-27%
样本 5	3.09	2.82	-0.27	-9%
样本 6	3.4	3.22	-0.18	-5%
样本 7	4.37	3.68	-0.69	-16%
样本 8	10.86	10.51	-0.35	-3%
样本 9	44.4	39.61	-4.79	-11%
样本 10	91.21	85.27	-5.94	-7%
样本 11	121.32	116.62	-4.7	-4%
样本 12	207.55	182.72	-24.83	-12%
样本 13	262.7	242.26	-20.44	-8%

[0148]

[0149]　溶血剂E和溶血剂F的免疫反应测试结果对比发现，对于3mg/L以下的低值样本，溶血剂E测试结果显著高于溶血剂F测试结果，甚至对于1mg/L以下的样本，同样能更有效地检测区分，因此溶血剂E中的硼酸缓冲体系，能够有效地增强免疫反应并提高低值检测灵敏度。

[0150]　2、测试线性

[0151]　采用溶血剂E，按照实施例3所述方法，取已知C-反应蛋白浓度为310mg/L的样本，采用生理盐水进行梯度稀释，每个点测试三次，计算测试结果平均值与理论浓度的回归方程及回归系数r的平方，线性回归曲线如图4所示，测试结果如下：

[0152]

理论浓度	测试 1	测试 2	测试 3	平均值
0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
62.5	62.2	62.8	62.0	62.3
124.6	125.1	124.3	125.6	125.0

188.9	192.7	191.5	190.3	191.5
254.3	251.2	250.3	252.1	251.2
310.0	319.9	316.4	314.1	316.8

[0153] 回归方程：以理论浓度为x，测试浓度的平均值为y，y＝1.012x-0.7835，回归系数r的平方＝0.9993，线性测试结果表明本发明的方法性能优良。

[0154] 3、抗干扰评价

[0155] 采用溶血剂E，按照实施例3中所描述的方法，将对照样本和干扰物样本分别测试3次，以对照样本的测试均值，计算干扰物样品的测试均值与对照样本的相对偏差，结果如下表所示，测试结果的均不超过±10％，表明本方法抗干扰性能优良。

[0156]

抗坏血酸						
样品	干扰物浓度 (mg/dL)	1	2	3	均值	偏差%
对照样本	0	10.70	11.02	10.81	10.84	/
干扰样本	150	11.20	11.40	11.20	11.27	3.90%
内源性酯						
样品	干扰物浓度 (mg/dL)	1	2	3	均值	偏差%
对照样本	0	19.12	18.36	18.78	18.75	/
干扰样本	2000	19.17	19.45	18.73	19.12	1.94%
胆红素						
样品	干扰物浓度 (mg/dL)	1	2	3	均值	偏差%
对照样本	0	11.64	11.39	11.43	11.49	/
干扰样本	100	10.94	11.14	10.87	10.98	-4.38%

[0157]

[0158] 4、方法学比对（全血－血清）

[0159] 采用溶血剂E，按照实施例3中所描述的方法，将同组样本用溶血剂E与迈瑞超敏C-反应蛋白(HS-CRP)测定试剂盒（乳胶免疫比浊法）（注册证书编号：粤食药监械（准）字2011第2400474号）进行方法学比对测试，结果如图5所示，以迈瑞超敏C-反应蛋白(HS-CRP)测定试剂盒结果为x轴，实施例3的测试结果为y轴，线性回归方程y＝

0.9716x+0.2966，回归系数 r 平方＝0.9948，说明本方法与临床已上市产品等效。

[0160] 对比例 4

[0161] 按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 G：

[0162] 皂苷 30.0g

[0163] 磷酸氢二钠·十二水 11.6g

[0164] 磷酸二氢钠·二水 1.18g

[0165] 利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCl 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0166] 按照与实施例 1 基本相同的方法，区别仅在于采用溶血剂 G 替换实施例 1 中的溶血剂 A，并将溶血剂与样本混合后静置溶血处理的时间缩减为 10 秒，测试已知浓度校准品建立标准曲线后测试已知浓度质控品，质控品偏差如下表，大于 ±10％：

[0167]

[0168]

	理论值 mg/L	测试值 mg/L	相对偏差
质控品 1	11.8	13.8	16.9%
质控品 2	58.6	67.2	14.7%

[0169] 由此可见，当皂苷的用量达到 30 克 / 升时，虽然可以快速地在 10 秒内完成溶血处理，但是如果没有将试液稀释后直接与免疫试剂混合，则免疫比浊测定会受到干扰，相对偏差比较大。

[0170] 实施例 4

[0171] 配制如下全血 C- 反应蛋白检测用缓冲液 H：

[0172] 磷酸氢二钠．十二水 11.6g

[0173] 磷酸二氢钠．二水 1.18g

[0174] 利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCl 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L

[0175] 按照与对比例 4 基本相同的方法，确定质控品偏差，其中，区别在于，在加入 C- 反应蛋白免疫试剂之前，增加一个步骤，添加 0.2mL 缓冲液 H 混合 80 秒后，再加入 0.2mL C 反应蛋白免疫试剂，即稀释试液后再加入免疫试剂。质控品偏差结果如下表，均不大于 ±10％：

[0176]

	理论值 mg/L	测试值 mg/L	相对偏差
质控品 1	11.8	12.8	8.5%
质控品 2	58.6	63.1	7.7%

[0177] 由此可以看出，没有将试液稀释后直接与免疫试剂混合，则免疫比浊测定会受到干扰，相对偏差比较大，通过溶血后的试液经过稀释后在加入免疫试剂，可以降低该干扰，显著地降低了相对偏差。

[0178] 实施例 5

[0179] 按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 I：

[0180] 皂苷 30.0g

[0181] 硼酸 15.0g

[0182] 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸钠 9.5g

[0183] 利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCl 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L；

[0184] 按照实施例 1 中所述方法，仅将实施例 1 所用溶血剂 A 替换为溶血剂 1，并将溶血剂与样本混合时间减为 10 秒，其他参数不变，测试已知浓度校准品建立标准曲线后测试已知浓度质控品，质控品偏差如下表，均不大于 ±10%：

[0185]

	理论值 mg/L	测试值 mg/L	相对偏差
质控品 1	11.8	12.7	7.6%
质控品 2	58.6	62.2	6.1%

[0186] 由此可以看出，没有将试液稀释后直接与免疫试剂混合，则会对免疫比浊测定造成干扰，而通过利用在溶血剂中采用硼酸缓冲体系，可以有效地降低该干扰，显著地降低了相对偏差，和加稀释步骤的结果类似，但却可以获得更低的检测限和更快的检测速度。

[0187] 实施例 6

[0188] 按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 J：

[0189] 皂苷 0.1g

[0190] 硼酸 2.7g

[0191] 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸钠 1.4g

[0192] 利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCl 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0193] 按照实施例 1 中所述方法，仅将实施例 1 所用溶血剂 A 替换为溶血剂 J，样本体积改为 4 微升，并将溶血剂与样本混合时间延长为 90 秒，其他参数不变，测试已知浓度校准品建立标准曲线后测试已知浓度质控品，质控品偏差如下表，均不大于 ±10%：

[0194]

	理论值 mg/L	测试值 mg/L	相对偏差
质控品 1	11.8	11.3	-4.2%
质控品 2	58.6	58.9	0.5%

[0195] 由此，可以看出当皂苷的用量较低时，只需要适当延长溶血处理的时间，就能够实现有效地溶血处理，并且所得到的溶血产物并不会对免疫比浊测定造成干扰。

[0196] 实施例 7

[0197] 按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 K：

[0198] 皂苷 0.5g

[0199] 硼酸 2.7g

[0200] 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸钠 1.4g

[0201] 利用去离子水溶解上述组分，并利用适量 NaOH 或 HCl 调节至 7.0 后，补充去离子水至终体积 1L。

[0202] 按照实施例 1 中所述方法，仅将实施例 1 所用溶血剂 A 替换为溶血剂 K，并将溶血剂与样本混合时间延长为 80 秒，其他参数不变，测试已知浓度校准品建立标准曲线后测试已知浓度质控品，质控品偏差如下表，均不大于 ±10%：

[0203]

	理论值 mg/L	测试值 mg/L	相对偏差
质控品 1	11.8	12.1	2.5%
质控品 2	58.6	57.7	-1.5%

[0204] 由此，可以看出当皂苷的用量较低时，只需要适当延长溶血处理的时间，就能够实现有效地溶血处理，并且所得到的溶血产物并不会对免疫比浊测定造成干扰。

[0205] 实施例 8

[0206] 配置如下表所示按照下列配方制备全血 C- 反应蛋白检测用溶血剂 L-Q，按照实施例 1 中所述方法，仅将实施例 1 所用溶血剂 A 替换为溶血剂 L-Q，测试已知浓度校准品建立标准曲线后测试已知浓度质控品，质控品偏差均不大于 ±10%。

[0207]

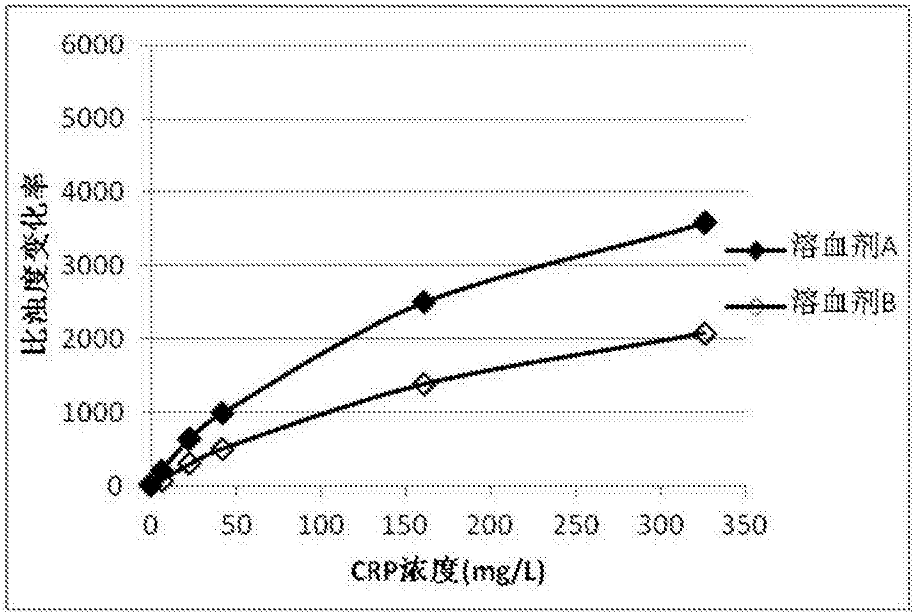
单位 g	溶血剂 L	溶血剂 M	溶血剂 N	溶血剂 O	溶血剂 P	溶血剂 Q
皂苷	8.0	1.0	3.0	5.0	10.0	6.0
硼酸	11.1	9.0	5.6	7.5	22.2	15.7
硼砂	/	2.3	/	/	/	/
磷酸氢二钠	5.6	/	/	/	/	/
3-吗啉丙磺酸钠	/	/	/	/	/	10.0
哌嗪-1,4-二乙磺酸二钾	/	/	/	/	11.8	/
4-羟乙基哌嗪乙磺酸钠	/	/	2.0	/	/	/
2-吗啉代乙磺酸钠	/	/	/	13.4	3.2	/
水	1L	1L	1L	1L	1L	1L

[0208]

[0209] 由此,可以看出采用硼酸缓冲体系的适用范围是比较广的。

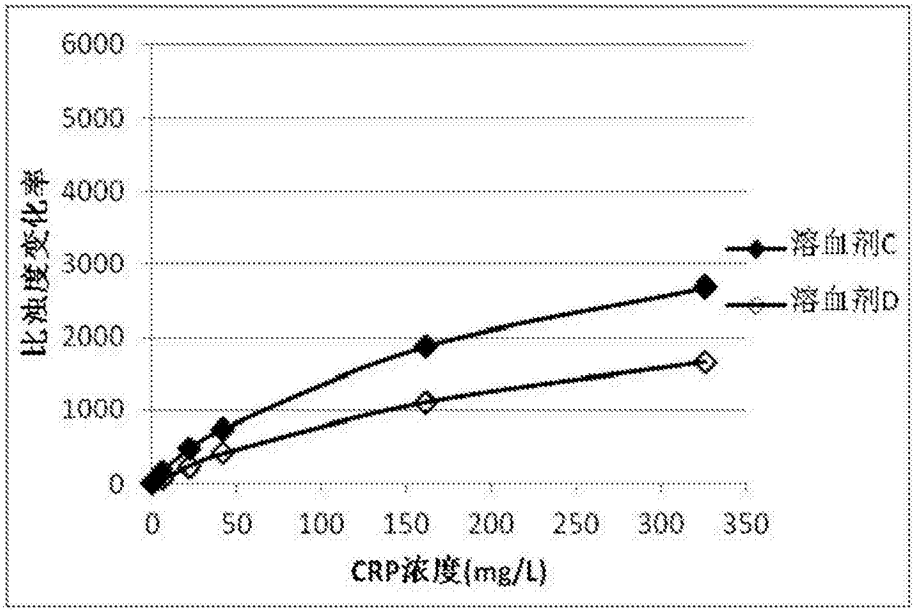
[0210] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0211] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。



6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
比浊度变化率
0
50
100
150
200
250
300
350
CRP浓度(mg/L)
溶血剂A
溶血剂B

图 1



6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
比浊度变化率
0
50
100
150
200
250
300
350
CRP浓度(mg/L)
溶血剂C
溶血剂D

图 2

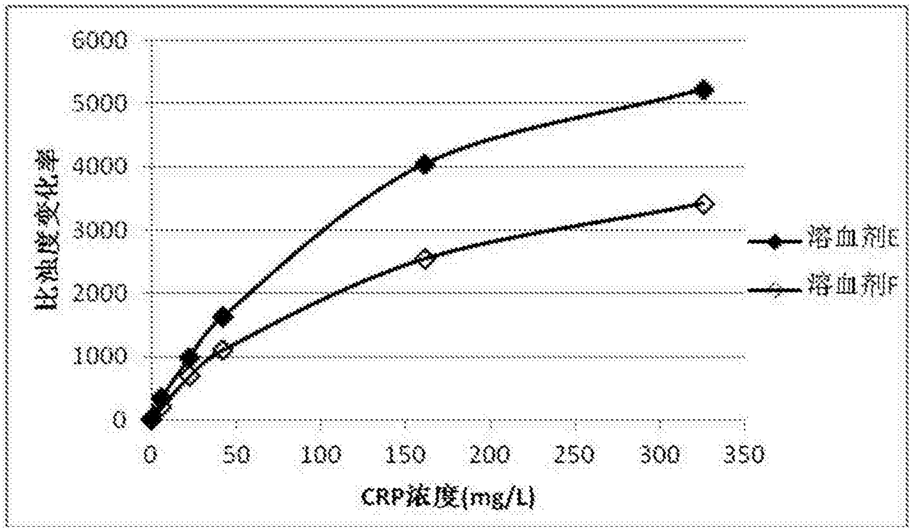

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
比浊度变化率
0
50
100
150
200
250
300
350
CRP浓度(mg/L)
溶血剂E
溶血剂F

图 3

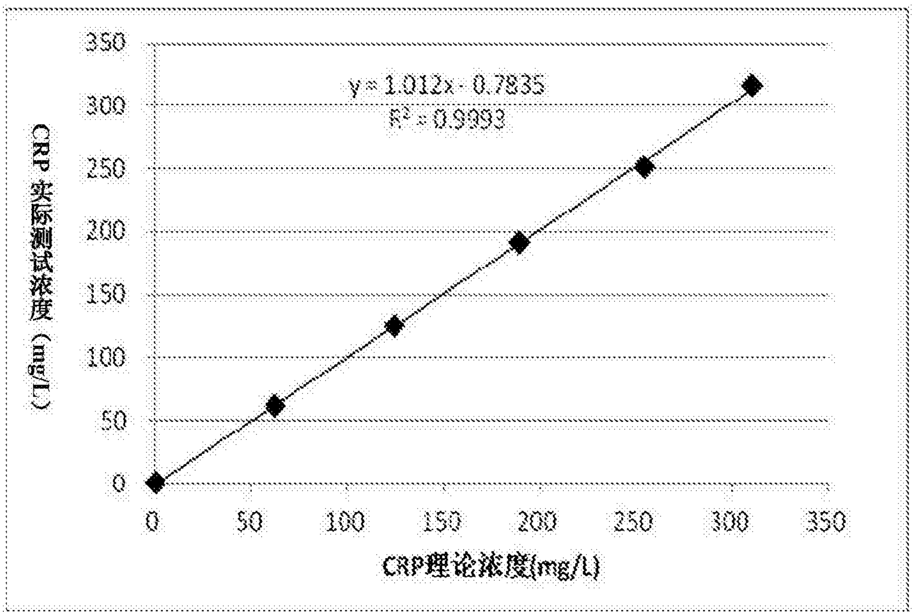

y = 1.012x - 0.7835
R² = 0.9993
350
300
250
200
150
100
50
0
CRP 实际测试浓度（mg/L）
0
50
100
150
200
250
300
350
CRP理论浓度(mg/L)

图 4

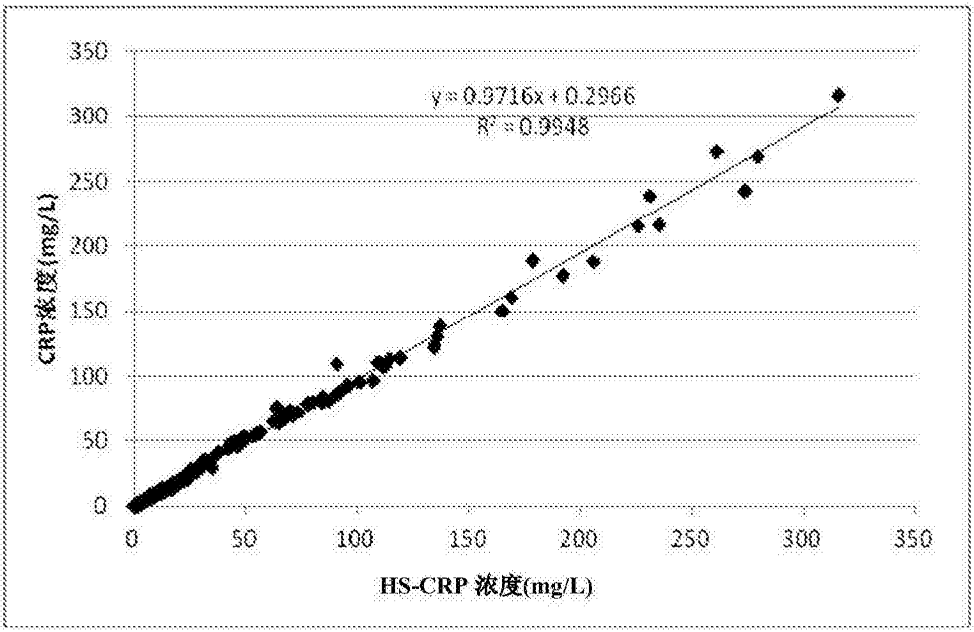

y = 0.3716x + 0.2966
R² = 0.9948
CRP浓度(mg/L)
HS-CRP 浓度(mg/L)
0
50
100
150
200
250
300
350

图 5

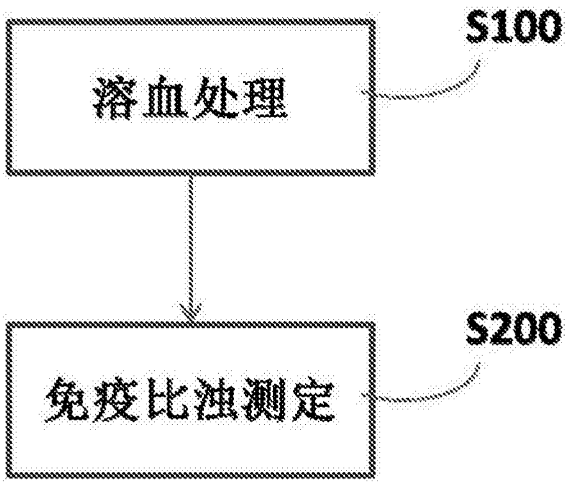

S100
溶血处理
S200
免疫比浊测定

图 6

专利名称(译)	溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒		
公开(公告)号	CN106546455A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201510590637.5	申请日	2015-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
[标]发明人	刘林 张子千 左淼 陈庚文 崔双		
发明人	刘林 张子千 左淼 陈庚文 崔双		
IPC分类号	G01N1/28 G01N21/82 G01N33/53		
代理人(译)	李志东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

溶血剂、生物样品的预处理的方法、目标物含量的测定方法以及试剂盒。本发明提供了硼酸缓冲体系在制备溶血剂中的用途、用于免疫比浊测定的溶血剂、生物样品的预处理的方法、生物样本中目标物含量的测定方法以及用于免疫比浊测定的试剂盒。该溶血剂用于免疫比浊测定。利用硼酸缓冲体系制备的溶血剂在用于免疫比浊测定时，具有下列优点的至少一种：灵敏度高、检测过程快速简便以及特异性强。

样本序号	溶血剂E结果 (mg/L)	溶血剂F结果 (mg/L)	绝对偏差 (mg/L)	相对偏差
样本1	0.27	0	-0.27	-100%
样本2	0.42	0	-0.42	-100%
样本3	0.69	0.46	-0.23	-33%
样本4	1.31	0.95	-0.36	-27%
样本5	3.09	2.82	-0.27	-9%
样本6	3.4	3.22	-0.18	-5%
样本7	4.37	3.68	-0.69	-16%
样本8	10.86	10.51	-0.35	-3%
样本9	44.4	39.61	-4.79	-11%
样本10	91.21	85.27	-5.94	-7%
样本11	121.32	116.62	-4.7	-4%