



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702895 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201811626319.X

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 上海长岛生物技术有限公司

地址 201400 上海市奉贤区庄行工业园航
南支路288号

申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公
司

(72)发明人 李珂珂 赵玉梅 雷霆

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 李小焦 郭燕

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

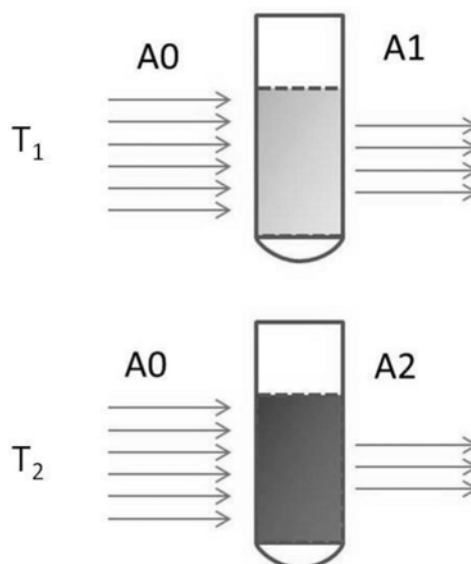
权利要求书4页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

D-二聚体检测试剂和方法、试剂制备方法及
聚乙二醇应用

(57)摘要

本申请公开了一种D-二聚体检测试剂和方法、试剂制备方法及聚乙二醇的应用。本申请D-二聚体检测试剂,包括聚乙二醇、缓冲液体系和无机盐;聚乙二醇为相对分子量6000-10000的聚乙二醇;无机盐用于调节缓冲液体系离子强度。本申请D-二聚体检测试剂或检测方法,利用低分子量聚乙二醇对血红蛋白与D-二聚体相互作用进行干扰,减小血红蛋白对D-二聚体与特异性抗体反应的影响,起到抗血红蛋白干扰的作用,提高了D-二聚体检测的准确性。并且,由于本申请的D-二聚体检测试剂能够抗血红蛋白干扰,使得D-二聚体检测时,无需采用双波法检测或采用高波长来消除由血红蛋白带来的影响,降低了D-二聚体检测的难度和仪器成本。



1. 一种D-二聚体检测试剂,其特征在于:包括聚乙二醇、缓冲液体系 and 无机盐;
所述聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇;
所述无机盐用于调节缓冲液体系的离子强度;
优选的,所述低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L;
优选的,所述缓冲液体系的pH为5.0-8.5。
2. 根据权利要求1所述的D-二聚体检测试剂,其特征在于:所述缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种;
优选的,所述无机盐选自氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾和硝酸钠中的至少一种;更优选的,所述无机盐选自氯化钾、氯化钠、氯化锌和氯化镁中的至少一种。
3. 根据权利要求1或2所述的D-二聚体检测试剂,其特征在于:还包括蛋白保护剂;
优选的,所述蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的D-二聚体检测试剂,其特征在于:还包括助悬剂;
优选的,所述助悬剂为吐温20和/或triton-X 100。
5. 根据权利要求1-4任一项所述的D-二聚体检测试剂,其特征在于:还包括防腐剂;
优选的,所述防腐剂选自Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮钠中的至少一种。
6. 根据权利要求1-5任一项所述的D-二聚体检测试剂,其特征在于:所有试剂分为试剂一和试剂二;
所述试剂一中包含聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂;
所述试剂二中包含包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂;
优选的,所述试剂一中:缓冲液体系的pH值为5.0-7.0,缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种,优选为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS或MES缓冲液;防腐剂为Proclin300、硫柳汞或叠氮钠;蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白和山梨醇中的至少一种;
优选的,所述试剂二中:包被D-二聚体特异性抗体的微粒为聚苯乙烯微球;缓冲液体系的pH值为6.5-8.5,缓冲液体系为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种。
7. 一种D-二聚体检测试剂,其特征在于:由试剂一和试剂二组成;
所述试剂一由5-50g/L的相对分子量为6000-10000的低分子量聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂组成;
所述试剂二由包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂组成;
优选的,所述无机盐选自氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾和硝酸钠中的至少一种;更优选的,所述无机盐选自氯化钾、氯化钠、氯化锌和氯化镁中的至少一种;
优选的,所述助悬剂为吐温20和/或triton-X 100;
优选的,试剂一的防腐剂选自Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮

钠中的至少一种；更优选的，试剂一的防腐剂为Proclin300、硫柳汞或叠氮钠；

优选的，试剂一的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种；更优选的，试剂一的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白和山梨醇中的至少一种；

优选的，试剂一的溶液采用的缓冲液体系的pH值为5.0-7.0，缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种；优选为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS或MES缓冲液；

优选的，试剂二中包被D-二聚体特异性抗体的微粒为聚苯乙烯微球；

优选的，试剂二的防腐剂选自Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮钠中的至少一种；

优选的，试剂二的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种；

优选的，试剂二的溶液的缓冲液体系的pH值为6.5-8.5，缓冲液体系为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种。

8. 低分子量聚乙二醇在制备减少血红蛋白干扰的D-二聚体检测试剂中的应用，所述低分子量聚乙二醇为相对分子量6000-10000的聚乙二醇；

优选的，所述D-二聚体检测试剂为免疫比浊法检测试剂；

优选的，所述D-二聚体检测试剂中低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L。

9. 一种D-二聚体检测方法，其特征在于：包括以下步骤，

获取枸橼酸钠处理过的待测血液样本；然后采取以下操作中的一种：

操作一：将待测血液样本与试剂一混合均匀，并温浴至反应温度；然后加入试剂二进行反应；优选的，试剂二预先温浴至反应温度；

操作二：将待测血液样本温浴至反应温度，然后加入D-二聚体检测试剂进行反应；优选的，D-二聚体检测试剂预先温浴至反应温度；

经过以上操作一或操作二后，无需使用双波长校正或高波长消除血红蛋白的干扰，直接通过单波长检测反应体系透光值的变化，根据透光值变化计算D-二聚体含量；

所述试剂一包含聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂；

所述试剂二包含包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂；

所述D-二聚体检测试剂包含聚乙二醇、包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系 and 无机盐；优选的，所述D-二聚体检测试剂还包含蛋白保护剂、助悬剂和防腐剂中的至少一种；

优选的，所述试剂一或所述D-二聚体检测试剂的聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇；

优选的，所述低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种；

优选的，所述试剂一的缓冲液体系的pH值为5.0-7.0，试剂一的缓冲液体系为硼酸缓冲

液、磷酸缓冲液、MOPS或MES缓冲液；

优选的，所述试剂二的缓冲液体系的pH值为6.5-8.5；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的防腐剂选自Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮钠中的至少一种；

优选的，所述试剂一的防腐剂为Proclin300、硫柳汞或叠氮钠；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种；

优选的，所述试剂一的蛋白保护剂为牛血清白蛋白、免疫球蛋白和山梨醇中的至少一种；

优选的，所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的包被D-二聚体特异性抗体的微粒为聚苯乙烯微球；

优选的，所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的助悬剂为吐温20和/或triton-X 100；

优选的，所述试剂一的无机盐选自氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾和硝酸钠中的至少一种；优选为氯化钾、氯化钠、氯化锌和氯化镁中的至少一种。

10. 一种D-二聚体检测试剂的制备方法，其特征在于：

包括将聚乙二醇、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂分散到缓冲液体系中，制成试剂一；将包被D-二聚体特异性抗体的微粒、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂分散到缓冲液体系中，制成试剂二；

或者，将聚乙二醇、包被D-二聚体特异性抗体的微粒和无机盐分散到缓冲液体系中，制成D-二聚体检测试剂；

优选的，还包括将蛋白保护剂、助悬剂和防腐剂中的至少一种分散到所述D-二聚体检测试剂中；

优选的，所述试剂一或所述D-二聚体检测试剂的聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇；

优选的，所述低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种；

优选的，所述试剂一的缓冲液体系的pH值为5.0-7.0，试剂一的缓冲液体系为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS或MES缓冲液；

优选的，所述试剂二的缓冲液体系的pH值为6.5-8.5；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的防腐剂选自Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮钠中的至少一种；

优选的，所述试剂一的防腐剂为Proclin300、硫柳汞或叠氮钠；

优选的，所述试剂一、所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种；

优选的，所述试剂一的蛋白保护剂为牛血清白蛋白、免疫球蛋白和山梨醇中的至少一种；

优选的，所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的包被D-二聚体特异性抗体的微粒为聚

苯乙烯微球；

优选的，所述试剂二或所述D-二聚体检测试剂的助悬剂为吐温20和/或triton-X 100；

优选的，所述试剂一的无机盐选自氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾和硝酸钠中的至少一种；优选为氯化钾、氯化钠、氯化锌和氯化镁中的至少一种。

D-二聚体检测试剂和方法、试剂制备方法及聚乙二醇应用

技术领域

[0001] 本申请涉及D-二聚体检测试剂领域,特别是涉及一种D-二聚体检测试剂和方法、检测试剂的制备方法,以及聚乙二醇的应用。

背景技术

[0002] D-二聚体(缩写DD),是由纤维蛋白降解生成的最小片段;DD作为血栓形成与血栓降解的直接证据,对众多疾病的诊疗有着重要意义。在病理及生理条件下,当凝血系统被激活,凝血酶作用于纤维蛋白原,将其转化变成纤维蛋白单体(α 、 β 、 γ)₂,即D-E-D结构并有规则的交联为可溶性纤维蛋白单体聚合物(SFMC)。可溶性纤维蛋白单体在Ca²⁺和XIIIa的作用下,在纤维蛋白单体之间的 α 和 γ 链相互交联形成不溶性纤维蛋白单体聚合物。交联的纤维蛋白集的生成会激活纤溶酶溶解系统。纤维酶溶解系统是由纤维蛋白溶酶(即纤溶酶)、纤溶酶激活剂、纤溶酶抑制物三个主要组分构成。在纤维蛋白凝块存在的条件下,纤维蛋白溶解酶原被激活转化形成纤溶酶,纤维蛋白溶解过程由此开始,纤溶酶降解纤维蛋白凝块,生成分子量不同的可溶片段,如X'Y'、D、E等片段。其中D-二聚体是两个通过 γ 链连接在一起的片段,包括DD、DXD、DD/E、YXD等交联纤维蛋白特异降解的产物。

[0003] 生理条件下,2%-3%的血浆纤维蛋白原转化成纤维蛋白后发生降解,在正常生理条件下,血浆中的D-二聚体含量很少。因此体内高D-二聚体含量,往往预示体内纤溶系统被异常激活,是血管内微血栓形成的重要指标。因此D-二聚体已成为临床凝血检查的常规项目为众多疾病的鉴别诊断和治疗提供主要依据。

[0004] 目前DD检测方法主要包括乳胶凝聚法、酶联免疫吸附法、胶体金免疫渗滤法和免疫比浊法。其中乳胶凝聚法是通过胶乳颗粒吸附D-二聚体特异抗体,与血浆中的DD形成肉眼可见的凝聚块,借以判断阴阳性;该方法操作简单、快速。但因检测结果是通过肉眼观测,具有较强的主观性,且检测结果不准确容易出现假性结果。酶联免疫吸附法是采用双抗夹心法,将DD的抗体包被在固相载体上,当血浆中的DD与抗体结合后,再使用酶标的第二标记DD单克隆抗体发生结合,形成抗体-抗原-酶标抗体夹心复合产物,最后通过加入酶底物,通过显色定量测定血浆中DD含量。该方法测试DD时,不受胆红素、纤维蛋白原等的干扰,测试结果较为准确,但不适合少量样本检测,且测试过程耗时较长。胶体金免疫渗透法,是将DD单克隆抗体包被在多孔薄膜上,血浆中的DD与抗体结合后发生颜色变化,借助仪器测试540nm红色强度定量检测血浆中D-二聚体含量,该方法测试仪器小巧,且试剂不易污染,成本低,但其对VTE的排查诊断灵敏度低、阴性预测值相关性比较差。免疫比浊法是预先将DD单克隆抗体偶联到聚苯乙烯颗粒,通过血浆中的DD与抗体发生特异反应,引起聚集反应,使反应体系的浊度发生改变,当入射波长小于聚集物直径时,吸光度发生改变,根据吸光度变化可定量测试血浆样本中D-二聚体含量。免疫比浊法具有操作快速、简单、灵敏度高、抗干扰能力强的特点,可为临床检测提供可靠的测试数据,同时借助全自动血凝仪可实现大批量样本的全自动化测试,因此成为全自动血凝仪最常用的检测DD的方法学。

[0005] 因血浆成分较为复杂,使用不同方法测定血浆中DD含量时往往存在多种干扰因

素,如胆红素、血红蛋白、类风湿因子、HAMA等的干扰。在上述的各种方法中,免疫比浊法可有效地避免纤维蛋白原和胆红素引起的干扰,除此外通过抗干扰剂的引入可消除因类风湿因子、HAMA等对DD测试结果造成的干扰。但对血红蛋白引起的干扰,目前较为流行的解决方案为通过采用双波法检测或采用高波长来消除由血红蛋白带来的影响,这会大幅度提高仪器的光学系统复杂度和仪器的成本。

[0006] 因此,业内需要研发能减少样本中的血红蛋白对DD检测干扰的方法。

发明内容

[0007] 本申请的目的是提供一种D-二聚体检测试剂、检测方法、检测试剂的制备方法以及聚乙二醇的新用途。

[0008] 为了实现上述目的,本申请采用了以下技术方案:

[0009] 本申请的一方面公开了一种D-二聚体检测试剂,包括聚乙二醇、缓冲液体系和无机盐;聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇;无机盐用于调节缓冲液体系的离子强度。

[0010] 需要说明的是,在D-二聚体(缩写DD)的检测过程中,特别是DD与其特异性抗体反应时,如果样品或反应体系中存在血红蛋白,血红蛋白会与DD相互作用,从而影响DD与特异性抗体的反应,进而干扰测试结果。本申请研究发现聚乙二醇(缩写PEG)能够影响血红蛋白与DD的相互作用,从而避免或减小血红蛋白对DD与特异性抗体反应的影响,即PEG能够抗血红蛋白干扰;特别是低分子量聚乙二醇的抗干扰能力更好,例如PEG6000、PEG8000和PEG10000等;可以理解,如果对抗干扰能力要求不高,也可以采用其它分子量的聚乙二醇。因此,本申请特别提供了一种包含相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇的D-二聚体检测试剂。本申请的D-二聚体检测试剂中,缓冲液体系和无机盐可以参考现有的D-二聚体检测试剂,特别是可以参考现有的D-二聚体免疫比浊法检测试剂;但是,考虑到D-二聚体检测试剂的检测效果,本申请的优选技术方案中对缓冲液体系、无机盐等组份进行了限定,详见后续的优选技术方案。

[0011] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂中,低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L。

[0012] 需要说明的是,本申请研究发现低分子量聚乙二醇在5-50g/L的工作浓度下的抗血红蛋白干扰能力是最好的;可以理解,在对抗干扰能力要求不高的应用中,也可以采用更低或更高浓度的聚乙二醇。

[0013] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂中,缓冲液体系的pH为5.0-8.5。

[0014] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂中,缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种。

[0015] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂中,无机盐选自氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾和硝酸钠中的至少一种。

[0016] 更优选的,本申请的D-二聚体检测试剂中,无机盐选自氯化钾、氯化钠、氯化锌和氯化镁中的至少一种。

[0017] 需要说明的是,无机盐的作用是为D-二聚体与特异性抗体反应提供合适的离子强

度;因此,只要能够调节离子强度,并且不会抑制D-二聚体与特异性抗体反应的无机盐都可以用于本申请,例如,氯化钾、氯化锂、氯化钠、氯化锌、氯化镁、硝酸钾、硝酸钠等。

[0018] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂还包括蛋白保护剂。

[0019] 需要说明的是,本申请的蛋白保护剂就是蛋白稳定剂,其作用是保护蛋白稳定性,因此,原则上能够使保护蛋白使其稳定的试剂,都可以用于本申请。但是,本申请的优选方案中,蛋白保护剂选自牛血清白蛋白(缩写BSA)、免疫球蛋白(缩写IgG)、甘氨酸、多聚糖和山梨醇中的至少一种。

[0020] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂还包括助悬剂。

[0021] 需要说明的是,助悬剂的作用是促进不溶于溶剂的物质均匀悬浮,因此,能够促进微粒或凝胶悬浮的助悬剂都可以用于本申请。但是,本申请的优选方案中,助悬剂为吐温20和/或triton-X 100。

[0022] 优选的,本申请的D-二聚体检测试剂还包括防腐剂。

[0023] 需要说明的是,防腐剂的作用是用于消除微生物引起的试剂性能发生改变的问题,因此,常规使用的防腐剂都可以用于本申请。但是,本申请优选采用Proclin300、硫柳汞、苯甲酸钠、硝酸盐、亚硝酸盐和叠氮钠中的至少一种。

[0024] 本申请的一种使用方式中,D-二聚体检测试剂中的所有试剂分为试剂一和试剂二;试剂一中包含聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂;试剂二中包含包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂。虽然不希望受理论约束,本申请人通过大量试验发现,低分子量聚乙二醇放在试剂一中,有利于试剂系统的长期性能的稳定。

[0025] 优选的,试剂一的缓冲液体系的pH值为5.0-7.0,缓冲液体系为硼酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、甘氨酸缓冲液、磷酸缓冲液、MES、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种。

[0026] 更优选的,试剂一的缓冲液体系为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、MOPS或MES缓冲液。

[0027] 优选的,试剂一的防腐剂为Proclin300、硫柳汞或叠氮钠。

[0028] 优选的,试剂一的蛋白保护剂选自牛血清白蛋白、免疫球蛋白和山梨醇中的至少一种。

[0029] 优选的,试剂二中包被D-二聚体特异性抗体的微粒为聚苯乙烯微球。

[0030] 优选的,试剂二的缓冲液体系的pH值为6.5-8.5,缓冲液体系为硼酸缓冲液、磷酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液、HEPES和MOPS缓冲液中的至少一种。

[0031] 需要说明的是,本申请中,试剂一的作用是事先与样品混合,对样品进行处理;试剂二的作用是存放包被D-二聚体特异性抗体的微粒。例如,本申请的一种使用方式中,试剂一和试剂二作为免疫比浊法检测试剂使用。

[0032] 还需要说明的是,试剂一和试剂二作为免疫比浊法检测试剂使用时,为了消除如类风湿因子、HAMA等自身免疫蛋白通过非特异性结合引起D-二聚体测试偏盖的影响,在试剂一中还可以添加相应的阻断剂。本申请的关键在于通过添加特定含量的低分子量聚乙二醇消除血红蛋白的干扰,因此,阻断剂可以参考常规使用的抗类风湿因子、HAMA等干扰的阻断剂,在此不作具体限定。

[0033] 本申请的另一面公开了一种D-二聚体检测试剂,该试剂由试剂一和试剂二组成;试剂一由5-50g/L的相对分子量为6000-10000的低分子量聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、

防腐剂和蛋白保护剂组成;试剂二由包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂组成。

[0034] 本申请中,在试剂一中添加特定含量的低分子量聚乙二醇,使得本申请的D-二聚体检测试剂能够减少血红蛋白对D-二聚体检测的干扰。现有技术中测定D-二聚体试剂,特别是D-二聚体免疫比浊法检测试剂中的包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、无机盐、防腐剂、蛋白保护剂和助悬剂等组分,如果通过实验能够适用的,也可以用于本申请的试剂中。

[0035] 本申请的再一面公开了低分子量聚乙二醇在制备减少血红蛋白干扰的D-二聚体检测试剂中的应用,其中,低分子量聚乙二醇为相对分子量6000-10000的聚乙二醇。

[0036] 需要说明的是,本申请的关键在于研究发现聚乙二醇(缩写PEG)能够影响血红蛋白与D-二聚体的相互作用,从而避免或减小血红蛋白对D-二聚体与特异性抗体反应的影响;因此,本申请提出了聚乙二醇的一种新用途,即在制备减少血红蛋白干扰的D-二聚体检测试剂中的应用。

[0037] 优选的,本申请的应用中,D-二聚体检测试剂为免疫比浊法检测试剂。

[0038] 优选的,本申请的应用中,D-二聚体检测试剂中低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L。

[0039] 本申请的再一面公开了一种D-二聚体检测方法,包括以下步骤,

[0040] 获取枸橼酸钠处理过的待测血液样本;然后采取以下操作中的一种:

[0041] 操作一:将待测血液样本与试剂一混合均匀,并温浴至反应温度;然后加入已温浴至反应温度的试剂二混合均匀进行反应;

[0042] 操作二:将待测血液样本和D-二聚体检测试剂分别温浴至反应温度,然后混合均匀进行反应;

[0043] 经过以上操作一或操作二后,无需使用双波长校正或高波长消除血红蛋白的干扰,直接通过单波长检测反应体系透光值的变化,根据透光值变化计算D-二聚体含量;

[0044] 其中,试剂一中包含聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂;试剂二中包含包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂;D-二聚体检测试剂中含有聚乙二醇、包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系 and 无机盐。

[0045] 优选的,D-二聚体检测试剂中还含有蛋白保护剂、助悬剂和防腐剂中的至少一种。

[0046] 优选的,试剂一中或D-二聚体检测试剂中的聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇。

[0047] 优选的,低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L。

[0048] 需要说明的是,本申请的关键在于在试剂一中或D-二聚体检测试剂中加入低分子量聚乙二醇,使得本申请的检测方法,无需使用双波长校正或高波长,也能够消除血红蛋白对检测结果的干扰,简化了试验操作,也避免了使用光学系统复杂的昂贵仪器设备,减小了检测成本。可以理解,本申请的关键在于试剂一中或D-二聚体检测试剂中添加有低分子量聚乙二醇;至于其它组分,例如包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、无机盐、防腐剂、蛋白保护剂和助悬剂等都可以参考现有的D-二聚体检测试剂,尤其是可以参考现有的D-二聚体免疫比浊法检测试剂。

[0049] 本申请的再一面公开了一种D-二聚体检测试剂的制备方法,

[0050] 包括将聚乙二醇、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂分散到缓冲液体系中,制成试剂一;将包被D-二聚体特异性抗体的微粒、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂分散到缓冲液体系中,制成试剂二;

[0051] 或者,将聚乙二醇、包被D-二聚体特异性抗体的微粒和无机盐分散到缓冲液体系中,制成D-二聚体检测试剂。

[0052] 优选的,本申请的制备方法还包括将蛋白保护剂、助悬剂和防腐剂中的至少一种分散到D-二聚体检测试剂中。

[0053] 优选的,本申请的制备方法中,试剂一或所述D-二聚体检测试剂的聚乙二醇为相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇。

[0054] 优选的,低分子量聚乙二醇的工作浓度为5-50g/L。

[0055] 需要说明的是,本申请的D-二聚体检测试剂制备方法,其关键在于在试剂一中或D-二聚体检测试剂中加入低分子量聚乙二醇,使得本申请制备方法制备的D-二聚体检测试剂能够减少血红蛋白对D-二聚体检测的干扰。至于制备方法中涉及的其它组分,例如包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、无机盐、防腐剂、蛋白保护剂和助悬剂等都可以参考现有的D-二聚体检测试剂,尤其是可以参考现有的D-二聚体免疫比浊法检测试剂。

[0056] 由于采用以上技术方案,本申请的有益效果在于:

[0057] 本申请的D-二聚体检测试剂或检测方法,利用低分子量聚乙二醇对血红蛋白与D-二聚体的相互作用进行干扰,从而减小血红蛋白对D-二聚体与特异性抗体反应的影响,起到抗血红蛋白干扰的作用,提高了D-二聚体检测的准确性。并且,由于本申请的D-二聚体检测试剂能够抗血红蛋白干扰,使得D-二聚体检测时,无需采用双波法检测或采用高波长来消除由血红蛋白带来的影响,降低了D-二聚体检测的难度和仪器成本。

附图说明

[0058] 图1是本申请实施例中免疫比浊法检测的测试示意图;

[0059] 图2是本申请实施例一中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0060] 图3是本申请实施例二中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0061] 图4是本申请实施例三中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0062] 图5是本申请实施例四中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0063] 图6是本申请实施例五中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0064] 图7是本申请实施例六中临床样本的D-二聚体检测结果图;

[0065] 图8是本申请实施例七中临床样本的D-二聚体检测结果图。

具体实施方式

[0066] 现有的D-二聚体检测方法,在面临血红蛋白干扰时,通常采用双波法检测或采用高波长来消除由血红蛋白带来的影响,这会大幅度提高仪器的光学系统复杂度和仪器的成本。

[0067] 本申请创造性的发现,特定浓度的低分子量聚乙二醇对血红蛋白具有较好的抗干扰效果。在D-二聚体检测过程中,如果D-二聚体与血红蛋白相互作用,则不能正常的与D-二聚体特异性抗体反应,从而影响检测结果的准确性;本申请深入研究发现,低分子量聚乙二

醇能够影响血红蛋白与D-二聚体的相互作用,特别是特定浓度下的低分子量聚乙二醇效果更佳,因此,可以起到抗血红蛋白干扰的效果。

[0068] 基于以上研究发现,本申请研发了D-二聚体检测试剂和D-二聚体检测方法。

[0069] 其中,D-二聚体检测试剂包括相对分子量6000-10000的低分子量聚乙二醇、缓冲液体系和无机盐。利用低分子量聚乙二醇的抗血红蛋白干扰效果,使得本申请的D-二聚体检测试剂能够准确的对D-二聚体进行检测,而且采用本申请的D-二聚体检测试剂,无需使用复杂的光学系统消除血红蛋白的影响。

[0070] 本申请的一种实现方式中,D-二聚体检测试剂由试剂一和试剂二组成;试剂一由5-50g/L的相对分子量为6000-10000的低分子量聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐、防腐剂和蛋白保护剂组成;试剂二由包被D-二聚体特异性抗体的微粒、缓冲液体系、蛋白保护剂、防腐剂和助悬剂组成。同样的,本申请的D-二聚体检测试剂,也是利用低分子量聚乙二醇的抗血红蛋白干扰效果,使其能够准确的对D-二聚体进行检测,无需使用复杂的光学系统消除血红蛋白的影响。

[0071] D-二聚体检测方法,包括在D-二聚体检测时,通过向试剂中添加抗干扰剂的方式消除血红蛋白对检测结果的干扰,无需使用双波长校正或高波长。也是利用低分子量聚乙二醇的抗血红蛋白干扰效果,使得本申请的检测方法更加简单、方便,且仪器成本更低。

[0072] 与此同时,本申请也提出了低分子量聚乙二醇的一种新的用途,即低分子量聚乙二醇在制备减少血红蛋白干扰的D-二聚体检测试剂中的应用。该应用为D-二聚体检测中消除血红蛋白干扰提供了一种新的思路和方法,无需采用昂贵而复杂的光学系统就能够有效的解决血红蛋白干扰的问题。

[0073] 以免疫比浊法检测对本申请的D-二聚体检测试剂和检测方法进行说明,详细说明如下:

[0074] 在进行D-二聚体测试时,在经抗凝剂处理过的样本加入反应杯后,将样本移至恒温37℃孵育位进行温浴,随后向反应杯内加入试剂一,混合均匀后预热为抗体抗原反应提供适宜反应环境,即37℃的反应环境,然后加入试剂二。并在575nm下检测反应体系透光值的变化。根据20秒至150秒内的透光值变化计算不同浓度样本对应的吸光度值,测试示意图如图1所示,图1中T₁时间点时,照射到反应杯上的光强为A₀,经过反应杯后,透过的光强为A₁;在T₂时间点时,照射到反应杯上的光强为A₀,在此时反应体系已经发生反应,透光的光强为A₂,以A₂与A₁的差异作为测试信号值。

[0075] 此外,本申请的检测方法还可以结合普利生C3510全自动血凝仪实现自动测试,样本测试过程如下:

[0076] 1、使用含有一定量D-二聚体抗原的标准品对普利生全自动血凝仪进行校准,并用相应质控品检测测量系统,检测合格后进行样本测定。

[0077] 2、样本测定过程主要为:首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37℃温浴60秒,随后加入试剂一混匀后,温浴90s,随后加入试剂二,并搅拌均匀。血浆内的D-二聚体与聚乙烯颗粒上包被的抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入胶乳后反应体系透光值的变化。根据反应曲线计算血浆样本中D-二聚体的含量。

[0078] 以上是将本申请的试剂分为试剂一和试剂二进行检测的情况,如果不将试剂分为

试剂一和试剂二,而是单一的混合试剂,即聚乙二醇、缓冲液体系、无机盐和包被D-二聚体特异性抗体的微粒都在一个混合的D-二聚体检测试剂中,优选的该混合D-二聚体检测试剂还可以包含蛋白保护剂、助悬剂和防腐剂中的至少一种,更优选的该D-二聚体检测试剂还可以包含抗其它物质干扰的添加剂,例如抗类风湿因子、HAMA等干扰的阻断剂,这种单一混合检测试剂的检测方法如下:

[0079] 首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37℃温浴60秒,随后加入单一混合D-二聚体检测试剂,并搅拌均匀,血浆内的D-二聚体与微粒(例如聚乙烯颗粒)上包被的抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入检测试剂后反应体系透光值的变化。其检测原理,与试剂一和试剂二的检测原理类似,在此不累述。

[0080] 需要说明的是,将本申请的试剂分为试剂一和试剂二,或者单一混合D-二聚体检测试剂,都可以采用普利生全自动血凝仪进行D-二聚体检测,只需要对检测装置进行相应的调整设置即可。

[0081] 本申请涉及的专业名词解释如下:

[0082] MES是指2-(N-吗啉基)乙磺酸缓冲液;

[0083] MOPS是指3-(N-吗啡啉)丙磺酸缓冲液;

[0084] HEPES是指4-羟乙基哌嗪乙磺酸;

[0085] triton-X 100是指聚乙二醇辛基苯基醚。

[0086] 下面通过具体实施例对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

[0087] 除非特别说明,实施例中使用到的仪器、设备和溶液均为常规选择。

[0088] 实施例一

[0089] 本例的D-二聚体检测试剂配方为:0.2M pH6.5磷酸盐缓冲液、0.05M的KCl、0.05%的NaN₃、0.3%的Tween20、0.15g/mL的胶乳以及2%的BSA;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为200μL。

[0090] 本例使用D-二聚体浓度为0.5μg/mL的贫血病人的临床样本进行试验,并采用北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。具体检测方法如下:

[0091] 首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37℃温浴60秒,随后加入本例的D-二聚体检测试剂,搅拌均匀,血浆内的D-二聚体与包被的D-二聚体抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入检测试剂后反应体系透光值的变化。

[0092] 本例分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。具体试验设计如下:

[0093] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为0.5μg/mL的贫血病人临床样本进行测试;

[0094] 测试2:向临床样本中添加300mg/dL的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0095] 测试3:与测试2一样,向临床样本中添加300mg/dL的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂中添加25g/L的PEG8000进行测试。

[0096] 以上三个测试的结果如图2所示。图2中,曲线1为临床样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为0.5 μ g/mL;曲线2为临床样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为0.25 μ g/mL;曲线3为临床样本添加血红蛋白后使用添加25g/LPEG8000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为0.49 μ g/mL。

[0097] 图2的结果显示,血红蛋白会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加25g/L的PEG8000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG8000能够降低血红蛋白的干扰。

[0098] 实施例二

[0099] 本例参考实施例一分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。所不同的是,本例的D-二聚体检测试剂配方与实施例一不同,并且测试的D-二聚体样本也与实施例一不同,其余,包括检测方法都与实施例一相同。

[0100] 具体的,本例的D-二聚体检测试剂配方为:0.3M pH 7.0磷酸盐缓冲液、0.10M的LiCl、0.05%的NaN₃、0.2%山梨醇、0.6%的triton-X 100、0.2g/mL的胶乳和1%的BSA;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为200 μ L。

[0101] 本例使用D-二聚体浓度为1.20 μ g/mL的贫血病人的临床样本进行试验,采用实施例一相同的北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。本例的三个对比测试具体如下:

[0102] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为1.20 μ g/mL的贫血病人临床样本进行测试;

[0103] 测试2:向临床样本中添加300mg/dL的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0104] 测试3:与测试2一样,向临床样本中添加300mg/dL的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂中添加5g/L的PEG8000进行测试。

[0105] 以上三个测试的结果如图3所示。图3中,曲线1为临床样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为1.21 μ g/mL;曲线2为临床样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为0.92 μ g/mL;曲线3为临床样本添加血红蛋白后使用添加5g/LPEG8000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为1.18 μ g/mL。

[0106] 图3的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加5g/L的PEG8000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG8000能够降低血红蛋白的干扰。

[0107] 实施例三

[0108] 本例参考实施例一分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。所不同的是,本例的D-二聚体检测试剂配方与实施例一不同,并且测试的D-二聚体样本也与实施例一不同,其余,包括检测方法都与实施例一相同。

[0109] 具体的,本例的D-二聚体检测试剂配方为:0.25M pH6.4柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、0.10M的MgCl₂、0.04%的Proclin300、0.2%的Tween20、0.15g/mL的胶乳和0.1g/L的鼠IgG;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为200 μ L。

[0110] 本例使用D-二聚体浓度为 $2.20\mu\text{g/mL}$ 的临床贫血样本进行试验,采用实施例一相同的北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。本例的三个对比测试具体如下:

[0111] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为 $2.20\mu\text{g/mL}$ 的临床贫血样本进行测试;

[0112] 测试2:向临床贫血样本中添加 300mg/dL 的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0113] 测试3:与测试2一样,向临床贫血样本中添加 300mg/dL 的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂中添加 35g/L 的PEG6000进行测试。

[0114] 以上三个测试的结果如图4所示。图4中,曲线1为临床贫血样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为 $2.21\mu\text{g/mL}$;曲线2为临床贫血样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为 $1.86\mu\text{g/mL}$;曲线3为临床贫血样本添加血红蛋白后使用添加 35g/L PEG6000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为 $2.19\mu\text{g/mL}$ 。

[0115] 图4的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加 35g/L 的PEG6000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG6000能够降低血红蛋白的干扰。

[0116] 实施例四

[0117] 本例参考实施例一分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。所不同的是,本例的D-二聚体检测试剂配方与实施例一不同,并且测试的D-二聚体样本也与实施例一不同,其余,包括检测方法都与实施例一相同。

[0118] 具体的,本例的D-二聚体检测试剂配方为: 0.15M pH7.2的Tris缓冲液、 0.20M 的 ZnCl_2 、 0.05% 的Proclin300、 2.5% 的葡聚糖20000、 0.2g/mL 的胶乳和 0.3g/L 的鼠IgG;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为 $200\mu\text{L}$ 。

[0119] 本例使用D-二聚体浓度为 $3.10\mu\text{g/mL}$ 的临床贫血样本进行试验,采用实施例一相同的北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。本例的三个对比测试具体如下:

[0120] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为 $3.10\mu\text{g/mL}$ 的临床贫血样本进行测试;

[0121] 测试2:向临床贫血样本中添加 300mg/dL 的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0122] 测试3:与测试2一样,向临床贫血样本中添加 300mg/dL 的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂中添加 45g/L 的PEG6000进行测试。

[0123] 以上三个测试的结果如图5所示。图5中,曲线1为临床贫血样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为 $3.10\mu\text{g/mL}$;曲线2为临床贫血样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为 $2.56\mu\text{g/mL}$;曲线3为临床贫血样本添加血红蛋白后使用添加 45g/L PEG6000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为 $3.08\mu\text{g/mL}$ 。

[0124] 图5的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加 45g/L 的PEG6000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG6000

能够降低血红蛋白的干扰。

[0125] 实施例五

[0126] 本例的D-二聚体检测试剂由试剂一和试剂二组成,两者的配方如下:

[0127] 试剂一:0.30M pH6.8磷酸盐缓冲液、0.20M的KCl、0.05%的Proclin300和0.5g/L IgG;加入体积为100 μ L。

[0128] 试剂二:0.05MpH7.0HEPES溶液、1.5%葡聚糖40000、0.5g/L的triton-X 100、0.3g/mL的胶乳和2%的BSA;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为100 μ L。

[0129] 本例使用D-二聚体浓度为5.5 μ g/mL的临床贫血样本进行试验,并采用北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪的测试过程如下:

[0130] 首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37 $^{\circ}$ C温浴60秒,随后加入试剂一混匀后,温浴90s,随后加入试剂二,并搅拌均匀。血浆内的D-二聚体与聚乙烯颗粒上包被的抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入胶乳后反应体系透光值得变化。根据反应曲线计算血浆样本中D-二聚体的含量。

[0131] 本例分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。具体如下:

[0132] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为5.5 μ g/mL的临床贫血样本进行测试;

[0133] 测试2:向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0134] 测试3:与测试2一样,向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂一中添加10g/L的PEG10000进行测试。

[0135] 以上三个测试的结果如图6所示。图6中,曲线1为临床贫血样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为5.49 μ g/mL;曲线2为临床贫血样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为4.15 μ g/mL;曲线3为临床贫血样本添加血红蛋白后使用添加10g/L PEG10000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为5.45 μ g/mL。

[0136] 图6的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加10g/L的PEG10000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG10000能够降低血红蛋白的干扰。

[0137] 实施例六

[0138] 本例的D-二聚体检测试剂由试剂一和试剂二组成,两者的配方如下:

[0139] 试剂一:0.30M的pH6.8磷酸盐缓冲液、0.20M的KCl、0.03%的Proclin300和0.2g/L的IgG;加入体积为100 μ L。

[0140] 试剂二:0.05MpH7.0的HEPES溶液、1.5%葡聚糖40000、0.5g/L的Tween20、0.3g/mL的胶乳和2%的BSA;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为100 μ L。

[0141] 本例使用D-二聚体浓度为2.50 μ g/mL的临床贫血样本进行试验,并采用北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪的测试过程如下:

[0142] 首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37℃温浴60秒,随后加入试剂一混匀后,温浴90s,随后加入试剂二,并搅拌均匀。血浆内的D-二聚体与聚乙烯颗粒上包被的抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入胶乳后反应体系透光值得变化。根据反应曲线计算血浆样本中D-二聚体的含量。

[0143] 本例分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。具体如下:

[0144] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为2.50μg/mL的临床贫血样本进行测试;

[0145] 测试2:向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进行测试;

[0146] 测试3:与测试2一样,向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂一中添加50g/L的PEG6000进行测试。

[0147] 以上三个测试的结果如图7所示。图7中,曲线1为临床贫血样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为2.50μg/mL;曲线2为临床贫血样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为1.15μg/mL;曲线3为临床贫血样本添加血红蛋白后使用添加50g/LPEG6000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为2.42μg/mL。

[0148] 图7的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加50g/L的PEG6000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG6000能够降低血红蛋白的干扰。

[0149] 实施例七

[0150] 本例的D-二聚体检测试剂由试剂一和试剂二组成,两者的配方如下:

[0151] 试剂一:0.50M pH7.0磷酸盐缓冲液、0.20M的KCl、0.05%的Proclin300和0.5g/L IgG;加入体积为100μL。

[0152] 试剂二:0.04MpH6.0HEPES溶液、1.5%葡聚糖40000、0.2g/L的triton-X 100、0.3g/mL的胶乳和1.5%的BSA;其中,胶乳中包被有D-二聚体抗体,试剂加入体积为100μL。

[0153] 本例使用D-二聚体浓度为3.26μg/mL的临床贫血样本进行试验,并采用北京普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪进行测试。普利生仪器有限公司C3510全自动凝血分析仪的测试过程如下:

[0154] 首先将采用枸缘酸钠抗凝剂的血浆样本加入普利生全自动血凝仪的反应杯内,37℃温浴60秒,随后加入试剂一混匀后,温浴90s,随后加入试剂二,并搅拌均匀。血浆内的D-二聚体与聚乙烯颗粒上包被的抗体发生特异反应并引起聚集反应,借助普利生全自动血凝仪,检测加入胶乳后反应体系透光值得变化。根据反应曲线计算血浆样本中D-二聚体的含量。

[0155] 本例分别试验了添加或不添加血红蛋白对D-二聚体检测的影响,以及添加血红蛋白后添加低分子量聚乙二醇对测试的影响。具体如下:

[0156] 测试1:直接采用本例的检测试剂,对D-二聚体浓度为3.26μg/mL的临床贫血样本进行测试;

[0157] 测试2:向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,然后采用本例的检测试剂进

行测试；

[0158] 测试3:与测试2一样,向临床贫血样本中添加300mg/dL的血红蛋白,但是,测试时,向本例配制的检测试剂一中添加15g/L的PEG8000进行测试。

[0159] 以上三个测试的结果如图8所示。图8中,曲线1为临床贫血样本使用本例检测试剂直接测试的反应曲线,测试浓度值为3.26 μ g/mL;曲线2为临床贫血样本内添加血红蛋白后使用本例检测试剂测试的反应曲线,测试浓度为2.35 μ g/mL;曲线3为临床贫血样本添加血红蛋白后使用添加15g/LPEG8000的检测试剂的反应曲线,测试浓度为3.53 μ g/mL。

[0160] 图8的结果显示,血红蛋白的加入会对D-二聚体的检测造成干扰,使得检测结果偏离D-二聚体的真实值,而添加15g/L的PEG8000后,检测结果更加接近真实值,说明PEG8000能够降低血红蛋白的干扰。

[0161] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

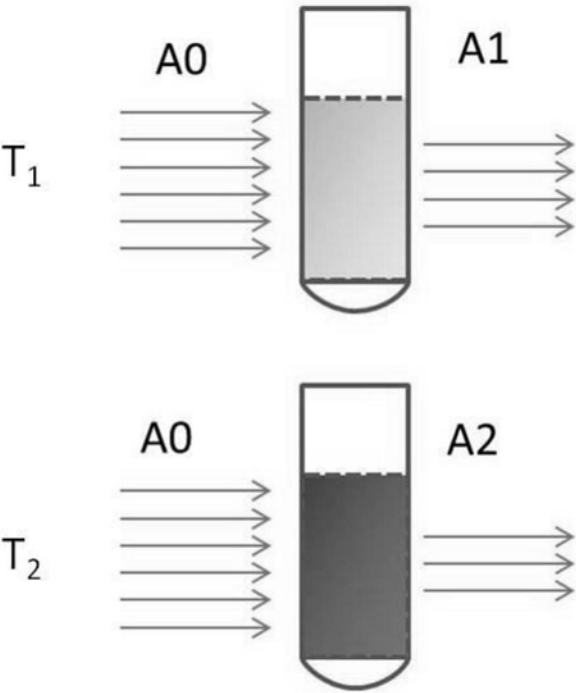


图1

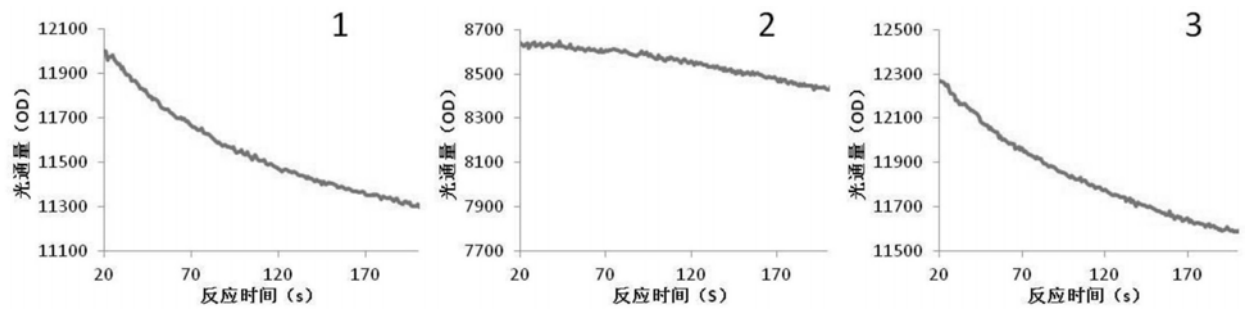


图2

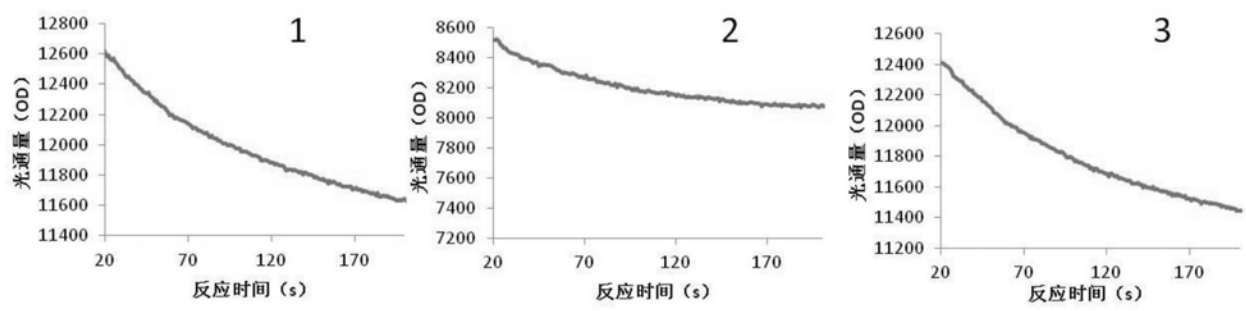


图3

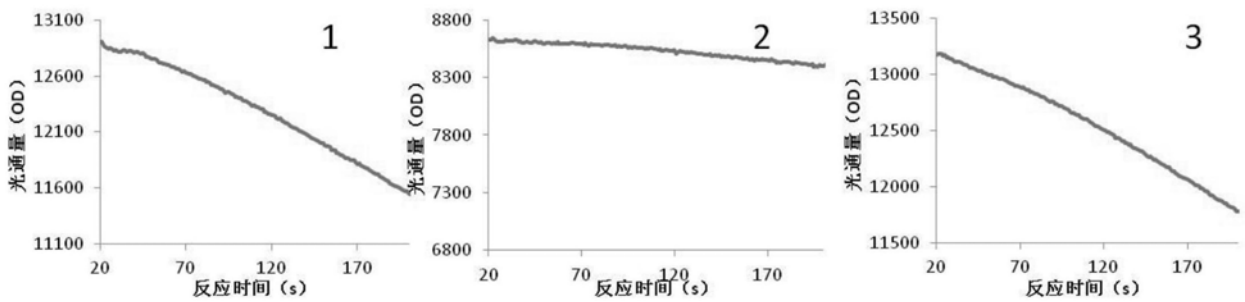


图4

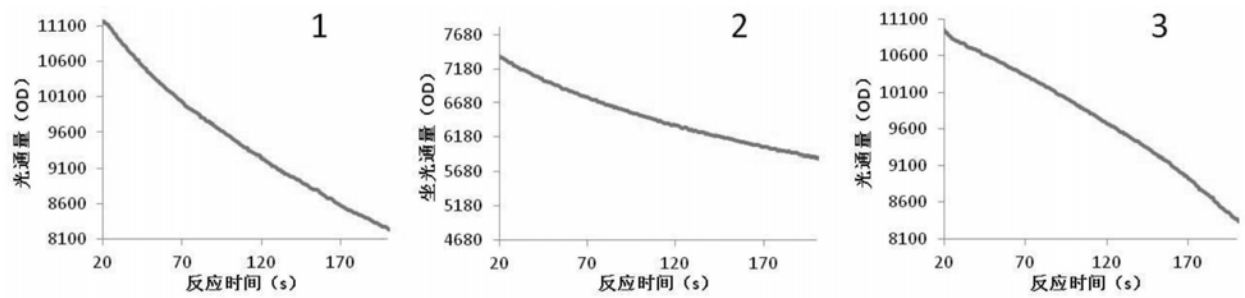


图5

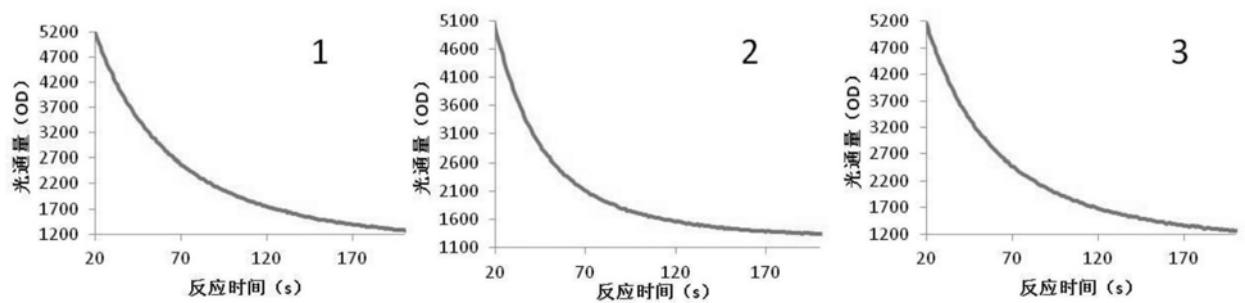


图6

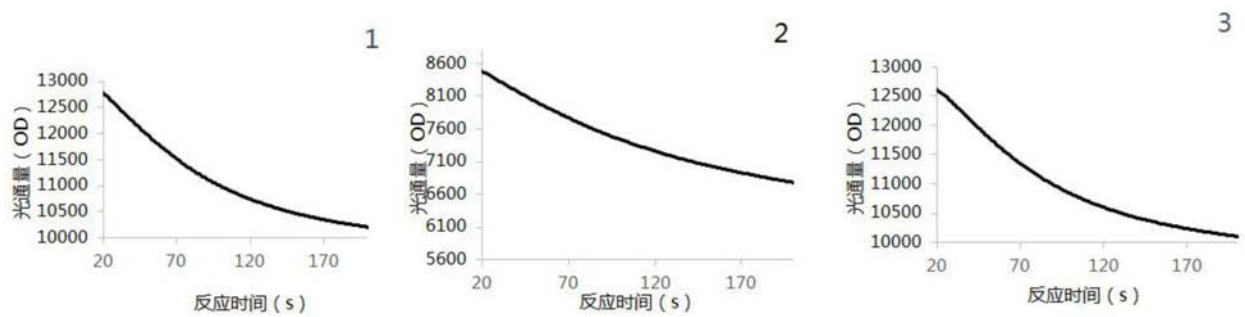


图7

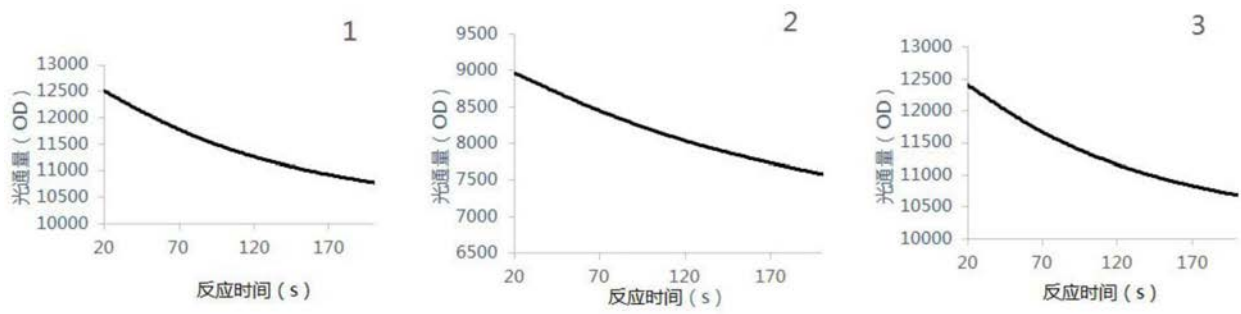


图8

专利名称(译)	D-二聚体检测试剂和方法、试剂制备方法及聚乙二醇应用		
公开(公告)号	CN110702895A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201811626319.X	申请日	2018-12-28
[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	赵玉梅 雷霆		
发明人	李珂珂 赵玉梅 雷霆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	郭燕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开了一种D-二聚体检测试剂和方法、试剂制备方法及聚乙二醇的应用。本申请D-二聚体检测试剂，包括聚乙二醇、缓冲液体系和无机盐；聚乙二醇为相对分子量6000-10000的聚乙二醇；无机盐用于调节缓冲液体系离子强度。本申请D-二聚体检测试剂或检测方法，利用低分子量聚乙二醇对血红蛋白与D-二聚体相互作用进行干扰，减小血红蛋白对D-二聚体与特异性抗体反应的影响，起到抗血红蛋白干扰的作用，提高了D-二聚体检测的准确性。并且，由于本申请的D-二聚体检测试剂能够抗血红蛋白干扰，使得D-二聚体检测时，无需采用双波法检测或采用高波长来消除由血红蛋白带来的影响，降低了D-二聚体检测的难度和仪器成本。

