



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104630325 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201510058314. 1

(22) 申请日 2015. 02. 04

(71) 申请人 上海长岛生物技术有限公司

地址 201400 上海市奉贤区工业综合开发区  
庄行工业园区航南支路 288 号

(72) 发明人 艾峰 肖国伟 潘仁斌

(74) 专利代理机构 上海百一领御专利代理事务  
所(普通合伙) 31243

代理人 陈贞健

(51) Int. Cl.

C12Q 1/56(2006. 01)

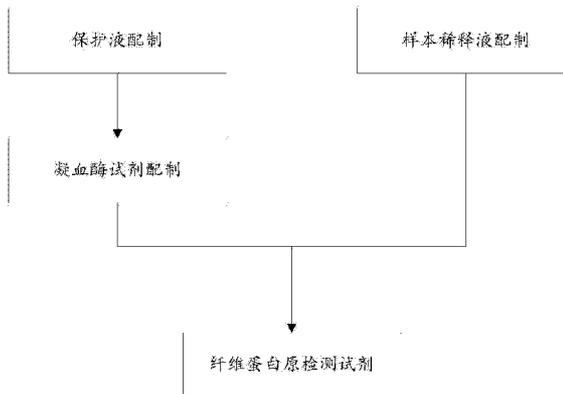
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种液体型纤维蛋白原检测试剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种液体型纤维蛋白原检测试剂及其制备方法,制备方法包括 1) 保护液配制:将缓冲剂、含氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇、防腐剂溶解于水中搅拌溶解,并调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0 ;2) 凝血酶试剂配制:用步骤 2) 得到的保护液溶解凝血酶冻干粉得到凝血酶试剂。一种液体型纤维蛋白原检测试剂,包括:凝血酶试剂,其包括凝血酶、缓冲剂、氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇、防腐剂和水。本发明试剂生产过程简化,生产设备简单,生产成本低;即开即用型,瓶间差异小;试剂稳定性高。



1. 一种液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，包括：  
凝血酶试剂，其包括凝血酶、氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇，溶剂为水；  
样本稀释液，其包括咪唑、氯化钠，溶剂为水。
2. 根据权利要求 1 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述凝血酶试剂的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。
3. 根据权利要求 2 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述凝血酶试剂的凝血酶酶活力 2000 ~ 35000IU/mL。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述氨基酸的质量分数为 3% ~ 10%；  
所述表面活性剂的体积分数为 0.1% ~ 0.5%；  
所述牛血清白蛋白的质量分数为 6% ~ 15%；  
所述明胶的质量分数为 0.1% ~ 0.5%；  
所述甘露醇的质量分数为 3% ~ 10%。
5. 根据权利要求 4 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述氨基酸为甘氨酸。
6. 根据权利要求 5 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述表面活性剂为吐温 60 或吐温 80。
7. 根据权利要求 1 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，所述样本稀释溶液的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。
8. 根据权利要求 1 或 7 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂，其特征在于，  
所述咪唑质量分数为 0.15% ~ 0.5%；  
所述氯化钠质量分数为 0.5% ~ 2%。
9. 一种液体型纤维蛋白原检测试剂的制备方法，其特征在于，包括：  
保护液配制：将甘氨酸、吐温 60 或吐温 80、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇溶解于水中搅拌溶解，并调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0；  
凝血酶试剂配制：用保护液溶解凝血酶冻干粉得到凝血酶试剂。
10. 根据权利要求 9 所述的液体型纤维蛋白原检测试剂制备方法，其特征在于，样本稀释液配制：称取咪唑和氯化钠，加入纯化水，搅拌进行溶解，调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0，得到样本稀释液。

## 一种液体型纤维蛋白原检测试剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种稳定的液体型纤维蛋白原检测试剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 纤维蛋白原 (Fibrinogen, FIB) 是肝脏合成的一种血浆球蛋白,是体内重要的凝血因子,其主要的生理功能是作为凝血因子 I 参与体内凝血过程。血浆中的纤维蛋白原在过量纤维蛋白原的作用下,它会由可溶的蛋白转变为不可溶的聚合物,从而形成纤维蛋白凝块。血浆的凝集时间和纤维蛋白质量分数成反比,在纤维蛋白原过量的情况下,测定的血浆的凝集时间,通过纤维蛋白原标准曲线计算公式便可得到待测纤维蛋白原质量分数。

[0003] 随着血栓与止血检测在临床上的广泛应用,纤维蛋白原 (FIB) 检测已成为出血和血栓检验的常规检测项目,具有重要的临床诊断意义。

[0004] 纤维蛋白原的测定过程受多种因素的影响,其中试剂的质量是最关键因素,由于目前国产的纤维蛋白原检测试剂普遍存在产品质量不稳定、敏感性差的问题,致使检测结果不稳定,不同的临床检验实验室之间测得的结果难以比较,因此目前临床实验室所使用的试剂绝大部分为进口产品,价格昂贵。另一方面,由于试剂的稳定性问题,目前国内外的纤维蛋白原检测试剂几乎均为冻干粉剂型,使用前需要进行复溶,操作麻烦、瓶间差异大,且试剂复溶后质量稳定性差。

### 发明内容

[0005] 基于此,为了克服上述现有技术的缺陷,本发明提供了一种液体型纤维蛋白原检测试剂及其制备方法。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0007] 一种液体型纤维蛋白原检测试剂,包括:

[0008] 凝血酶试剂,其包括凝血酶、氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇和水;

[0009] 样本稀释液,其包括咪唑、氯化钠和水。

[0010] 所述凝血酶试剂的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。

[0011] 所述凝血酶试剂的凝血酶酶活力 2000 ~ 35000IU/mL。

[0012] 所述氨基酸的质量分数为 3% ~ 10%;

[0013] 所述表面活性剂的体积分数为 0.1% ~ 0.5%;

[0014] 所述牛血清白蛋白的质量分数为 6% ~ 15%;

[0015] 所述明胶的质量分数为 0.1% ~ 0.5%;

[0016] 所述甘露醇的质量分数为 3% ~ 10%。

[0017] 还包括缓冲盐,且其浓度为 40 ~ 500mmol/L。

[0018] 还包括防腐剂,且其质量分数为 0.1%。

- [0019] 所述样本稀释溶液的 pH 值为 6.0 ~ 8.0。
- [0020] 所述咪唑质量分数为 0.15% ~ 0.5%；
- [0021] 所述氯化钠质量分数为 0.5% ~ 2%；
- [0022] 所述氨基酸为甘氨酸；
- [0023] 所述表面活性剂为吐温 60 或吐温 80。
- [0024] 一种液体型纤维蛋白原检测试剂的制备方法,包括：
- [0025] 保护液配制：将甘氨酸、吐温 60 或吐温 80、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇溶解于水中搅拌溶解,并调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0；
- [0026] 凝血酶试剂配制：用保护液溶解凝血酶冻干粉得到凝血酶试剂。
- [0027] 样本稀释液配制：称取咪唑和氯化钠,加入纯化水,搅拌进行溶解,调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0,得到样本稀释液。
- [0028] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果：
- [0029] 1) 试剂生产过程简化,生产设备简单,无冻干过程,生产成本低；
- [0030] 2) 使用为即开即用型,不需复溶,操作方便；
- [0031] 3) 不存在因所用水的质量或体积差异造成的差异,瓶间差异在 3% 以内；
- [0032] 试剂稳定性高,瓶间一致性好,37℃ 热稳定在 30 天以上,2 ~ 8℃ 密封储存可稳定 18 个月以上。

#### 附图说明

- [0033] 图 1 为本发明一种液体型纤维蛋白原检测试剂的制备方法流程图示意图。

#### 具体实施方式

[0034] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体图示进一步阐述本发明。

[0035] 如图 1 所示,一种液体型纤维蛋白原检测试剂制备方法,包括凝血酶试剂的配制包括：

[0036] 保护液配制：将缓冲剂、含氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶、甘露醇、防腐剂溶解于水中搅拌溶解,并调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0；

[0037] 凝血酶试剂配制：用保护液溶解凝血酶冻干粉得到凝血酶试剂。

[0038] 样本稀释液配制：称取咪唑和氯化钠,加入纯化水,搅拌进行溶解,调节 pH 值为 6.0 ~ 8.0,得到样本稀释液。

[0039] 缓冲剂为 Tris,浓度为 40 ~ 500mmol/L,氨基酸为甘氨酸,质量分数为 3% ~ 10%,表面活性剂为 Tween - 60 (吐温 60) 或 Tween - 80,用量 (v/v) 为 0.1% ~ 0.5%;BSA 质量分数为 6% ~ 15%,明胶质量分数为 0.1% ~ 0.5%,甘露醇质量分数为 3% ~ 10%,防腐剂为叠氮钠,质量分数 0.1%。

[0040] 凝血酶试剂配制：用保护液溶解凝血酶冻干粉得到凝血酶试剂；

[0041] 凝血酶为商品化的牛源凝血酶冻干粉,终浓度为 2000IU ~ 3500IU/mL。

[0042] 样本稀释液配制：称取咪唑和氯化钠,加入纯化水,搅拌进行溶解,pH 值为 6.0 ~ 8.0,

[0043] 得到样本稀释液；样本稀释液咪唑的质量分数为 0.15%~0.5%，氯化钠的质量分数为 0.5%~2%。

[0044] 凝血酶试剂的配制可先于或晚于样本稀释液配制进行，也可以同时进行。

[0045] 本申请还公开了一种液体型纤维蛋白原检测试剂，包括凝血酶试剂和样本稀释液，该凝血酶试剂中含有凝血酶、氨基酸、表面活性剂、牛血清白蛋白、明胶和甘露醇，溶剂为水，pH 为 6.0-8.0。其中，氨基酸优选甘氨酸，表面活性剂优选吐温 60 或吐温 80。该样本稀释液含有咪唑和氯化钠，溶剂为水。

[0046] 本申请中甘氨酸、甘露醇与其他试剂组分配合能够很好地保持凝血酶在液体试剂中的稳定性，制备的液体型试剂在 2~8℃密封储存 18 个月后，用该试剂进行纤维蛋白原检测，检测结果偏移在 10%以内。另外，该凝血酶试剂还可以含有缓冲盐更好地维持试剂的 pH 值，以更好地保持凝血酶的活性。该凝血酶试剂还可以含有防腐剂，以可以抑制试剂中微生物的生长，有利于试剂长期保存。常用的诊断试剂的防腐剂均可使用，例如叠氮钠。

[0047] 下面以一个具体实施例具体介绍一个液体型纤维蛋白原检测试剂的组成、制备方法，以及稳定性性能。

[0048] 实施例 1 液体型纤维蛋白原检测试剂的制备方法

[0049] 1 保护液配制：称取 Tris 6.06g (50mmol/L)、甘氨酸 50g (质量分数为 5%)、BSA 100g (质量分数为 10%)、明胶 2g (质量分数为 0.2%)、甘露醇 40g (质量分数为 4%)、Tween-60 2mL (v/v 为 0.2%)、叠氮钠 1g (质量分数为 0.1%)，加入 1L 纯化水，搅拌使其充分溶解，用 0.1mol/L 的 NaOH 调 pH 为 7.0。

[0050] 2 过滤除菌：用水润湿 0.45 μm 的三醋酸纤维素，紧贴放在抽滤过滤器砂芯上对保护液进行抽滤，收集滤液得到滤清的保护液，去除配制过程中的少量不溶物。

[0051] 3 凝血酶试剂配制：取 10 支 1mL 规格、200000IU/mL 的凝血酶冻干品，分别用 1mL 保护液溶解 10 分钟后，转移至盛保护液的容器中，清洗 3 次，也全部转移至盛保护液的容器中，合并得到约 1L 凝血酶试剂。

[0052] 4 样本稀释液配制：称取 2g 咪唑、10g 氯化钠，用 1L 纯化水进行溶解，用 0.1mol/L 的盐酸调整 pH 值为 7.4，得到样本稀释液。

[0053] 5 纤维蛋白原 (FIB) 检测试剂性能检测：

[0054] 检测方法为：待测血浆或质控品用样本稀释液先以 1:10 稀释，然后取 200 μL 作为样本，37℃ 育温 3 分钟后加入 100 μL 凝血酶试剂，以 Sysmex CA-1500 血凝仪凝固法进行检测。

[0055] 1) 准确性检测

[0056] 上述凝血酶试剂及样本稀释液按上述检测方法在 Sysmex CA-1500 血凝仪上用 Siemens FIB 试剂校准按说明书操作进行校准，检测 WHO 纤维蛋白原标准物 Blood Coagulation Fibrinogen Plasma (09/264)，结果如下表 1：

[0057] 表 1 试剂的校准及准确性检测结果 (单位 :mg/dL)

[0058]

样本序号	校准点浓度	凝固时间 (s)	双对数曲线相关性
1	522	4.4	0.995
2	391.5	5.1	
3	261	6.9	
4	130.5	12.3	
5	87.0	19.3	
标准物质 09/264	靶值:270	检测结果	267.5

[0059] 上述结果显示,本试剂校准曲线相关性良好,检测 WHO 标准物质偏差为 0.93%,远优于行业标准不超过 15%的要求。

[0060] 2) 线性范围检测

[0061] 从医院收集临床报告纤维蛋白原结果异常升高的新鲜血浆样本,使用生理盐水进行梯度稀释为 4 个浓度点,在 Sysmex CA-1500 血凝仪用上述校准后的 FIB 检测试剂对各点以及生理盐水共 5 个点进行检测,结果如下表 2:

[0062] 表 2 试剂的线性范围检测结果 (单位 :mg/dL)

[0063]

样本序号	报告结果	相关系数
1	24.8	R <sup>2</sup> =0.997
2	192.5	
3	361.6	
4	694.3	
5	1235.4	

[0064] 上述结果本发明中所配制的本试剂线性范围在 0 ~ 1200mg/dL 内相关性良好,大于正常样本范围 (200 ~ 400mg/dL)。

[0065] 3) 瓶间一致性检测

[0066] 将配制的凝血酶试剂和样本稀释液按 4mL 每支分装于 7mL 洁净玻璃瓶中,随机抽取 5 支用上述的检测方法上 Sysmex CA-1500 血凝仪对 Siemens 血凝正常水平质控品 Ci-Trol 1 和新鲜正常血浆、异常血浆各 1 例样本进行测试,结果如表 2:

[0067] 表 2 凝血酶试剂瓶间一致性测试结果 (单位 :mg/dL)

[0068]

样品 (s)	瓶 1	瓶 2	瓶 3	瓶 4	瓶 5	CV
Ci-Trol 1	262.8	268.9	262.8	268.9	268.9	1.25%
正常血浆	273.4	274.3	274.4	274.1	274.1	0.14%
异常血浆	147.9	150.9	148.1	149.2	150.2	0.87%

[0069] 上述结果显示 5 瓶试剂测试各样本的一致性均较好,瓶间差异在 2%以内。

[0070] 实施例 2 液体型纤维蛋白原检测试剂的热稳定性检测

[0071] 1 试剂配制 :按下表 3 的组合配制各种凝血酶试剂及样本稀释液,得到各 F I B 检测试剂。

[0072] 表 3 各 FIB 试剂成分组合

[0073]

	成分/试剂	试剂 1	试剂 2	试剂 3	试剂 4	对比 1	对比 2
凝血酶试剂	Tris	40mmol/L	40mmol/L	500mmol/L	500mmol/L	40mmol/L	500mmol/L
	甘氨酸	3%	3	10%	10%		5%
	Tween-60	0.10%		0.50%		0.10%	0.10%
	Tween-80		0.10%		0.50%		
	BSA	6%	6%	15%	15%	6%	6%
	明胶	0.10%	0.50%	0.10%	0.50%	0.10%	0.10%

[0074]

稀释液	甘露醇	3%	10%	10%	3%		
	叠氮钠	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
	凝血酶	2000IU/mL	3500IU/mL	2000IU/mL	3500IU/mL	2000IU/mL	2000IU/mL
	pH 值	6	6	8	8	6	8
	氯化钠	2%	0.50%	0.50%	2%	0.5%	0.50%
	咪唑	0.15%	0.15%	0.50%	0.50%	0.3%	0.3%
	pH 值	6	6	8	8	7	7

[0075] 2 37℃热稳定性检测

[0076] 将上述配制的各 FIB 试剂 (试剂 1 ~ 试剂 4) 与对比试剂 1 和 2 进行平行试验,凝血酶试剂和样本稀释液各按 4mL 每支分装于 7mL 洁净玻璃瓶中,加盖密封,各 30 支置 37℃烘箱中进行热破坏,每天各取一支对新复溶的同批号的 Siemens 血凝正常水平质控品 Ci-Trol 1 进行检测,检测方法同上。结果如下表 4 :

[0077] 表 4 各 FIB 试剂 37℃热稳定性检测结果 (单位 :mg/dL)

[0078]

本发明结果 天数	试剂 1	试剂 2	试剂 3	试剂 4	对比结果 天数	对比试 剂 1	对比试 剂 2
Day 1	255.9	255.2	252.1	254.1	Day 1	251.4	240.8
Day 2	250.8	252	254.7	252.8	Day 2	250.9	242.1
Day 3	255.0	255.5	256.2	256.1	Day 3	252.1	240.5
Day 4	253.4	258.3	258.2	257.8	Day 4	252.5	240.9
Day 5	258.1	258.3	257.5	257.6	Day 5	255.4	245
Day 6	259.1	256.8	256.2	258.7	Day 6	254.6	242.7
Day 7	259.8	259.7	259.1	259.4	Day 7	256.7	245.2
Day 8	254.5	259	258.9	261	Day 8	257.1	249.5
Day 9	261.0	258.4	258.6	259.8	Day 9	260.3	248.1
Day 10	260.5	258.5	258.8	258.5	Day 10	259.8	248.8
Day 11	259.5	260.3	259.7	261	Day 11	258.8	248.8
Day 12	264.8	259.8	259.2	258.4	Day 12	261.3	249.8
Day 13	258.2	258.6	258.9	260.5	Day 13	265.9	249.8
Day 14	259.0	260.2	259.4	260.2	Day 14	265.4	249.1
Day 15	259.9	260.6	259.9	258.6	Day 15	265.1	250
Day 16	260.8	261.1	260.2	257.5	Day 16	268.7	250.8
Day 17	261.5	260.3	259.7	256	Day 17	269.9	252.7
Day 18	258.5	260.7	260.1	262.5	Day 18	269.2	250
Day 19	260.2	263.1	260.7	261.8	Day 19	269.4	250.9
Day 20	259.6	263.1	260.5	260.5	Day 20	269.1	257.8

[0079]

Day 21	260.5	261.7	260.5	260.3	Day 21	270	251.1
Day 22	262.6	264.3	260.9	261.2	Day 22	270.1	255.5
Day 23	255.1	261.6	260.5	262.2	Day 23	274	256.4
Day 24	260.5	261.5	260.3	260.9	Day 24	274.1	254
Day 25	254.8	264.8	261	262.9	Day 25	276.2	260.4
Day 26	259.9	268.8	262.1	263.5	Day 26	275	265.4
Day 27	259.0	268.8	262.3	264.8	Day 27	278.5	266.8
Day 28	260.5	267.3	261.5	267.5	Day 28	278.5	265.4
Day 29	267.2	268	264.5	269.8	Day 29	274.5	265.4
Day 30	268.7	269.3	269	268.7	Day 30	279.5	266.8
最大偏移	17.9	17.3	16.9	17.0	最大偏移	28.6	26.3

[0080] 上表结果显示,在 37℃热破坏 30 天内,本发明中的液体型纤维蛋白原检测试剂对样本的检测结果偏移在 18mg/dL(约 6%)以内,而对比试剂 1 和试剂 2 在同样条件下偏移接近 30mg/dL(超出 10%),说明本发明试剂在 37℃高温下 30 天的稳定性优于对比试剂。

[0081] 实施例 3 液体型纤维蛋白原检测试剂的长期稳定性检测

[0082] 1, 试剂配制:按组合 150mmol/L Tris、7.5%甘氨酸、0.3% Tween-60、10% BSA、0.3%明胶、5%甘露醇、0.1%叠氮钠、凝血酶 3000IU/mL、pH=7.4 配制凝血酶试剂;按质量分数 0.3%咪唑、1.2%氯化钠配制样本稀释液,得到液体型纤维蛋白原检测试剂。

[0083] 2 长期稳定性检测 :将上述 FIB 试剂各按 4mL 每支分装于 7mL 洁净玻璃瓶中,加密封,20 支置冰箱 2 ~ 8℃ 储存,每月 15 日各取一支对新复溶的同批号 Siemens 血凝正常水平质控品 Ci-Tro11 进行检测,检测方法同上。结果如下表 5 :

[0084] 表 5FIB 试剂长期稳定性检测结果 (单位 :mg/dL)

[0085]

结果 月数	2~8℃	结果 月数	2~8℃
Month 1	258.8	Month 10	261.0
Month 2	260.3	Month 11	265.4
Month 3	259.9	Month 12	262.8
Month 4	260.8	Month 13	267.9
Month 5	261.9	Month 14	263.9
Month 6	261.7	Month 15	268.7
Month 7	262.5	Month 16	271.4
Month 8	266.9	Month 17	273.4
Month 9	265.9	Month 18	277.1
最大偏移			18.6

[0086] 上表结果显示,在 2 ~ 8℃ 储存 18 个月内,本发明中的液体型纤维蛋白原检测试剂对样本的检测结果偏移在 20mg/dL (约 7%) 以内,说明试剂储存有效期可达 18 个月以上。

[0087] 现有的纤维蛋白原检测试剂多为冻干型的试剂,试剂配制好后,冻干为干粉,以保持凝血酶的活性,用于检测前需要加水复溶。申请人为了开发液体型的纤维蛋白原检测试剂,通过大量的研究发现,氨基酸,特别是甘氨酸;吐温 60 或 80;甘露醇;牛血清白蛋白和明胶,这几个组分配伍,可以很好地保持凝血酶在液体 FIB 试剂中的稳定性。通过实施例 2 和实施例 3 的对比可知,加入甘氨酸与其他组分配伍可以提高试剂稳定性,甘氨酸和甘露醇联合使用,效果更好,并且质量体积百分比为 3% ~ 5% 甘氨酸;质量体积百分比为 0.1% ~ 0.5% 的吐温 60 或吐温 80;质量体积百分比为 3% ~ 10% 的甘露醇;质量体积百分比为 6% ~ 15% 的牛血清白蛋白;质量体积百分比为 0.1% ~ 0.5% 的明胶,pH 为 6-8 的液体型 FIB 试剂的性能完全可以满足商品化的要求。

[0088] 以上所述仅为本申请的较佳实施例而已,并不用以限制本申请,凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

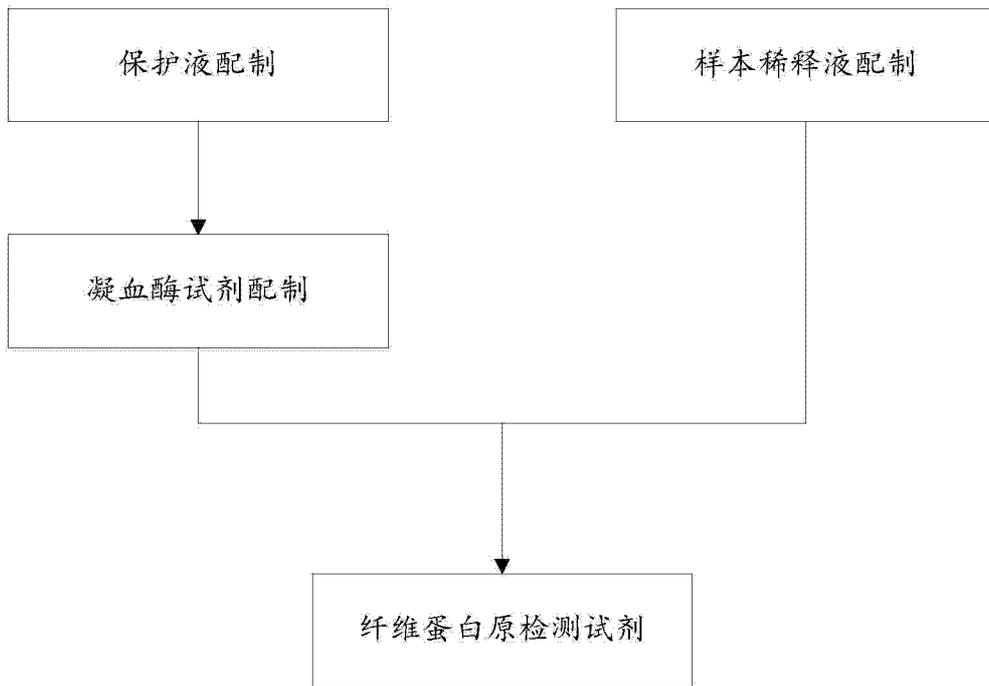


图 1