



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103562726 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201380000791. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 05. 01

G01N 33/92(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/642, 845 2012. 05. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 08. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/039082 2013. 05. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/166160 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 聚合物技术系统公司

地址 美国印第安纳

(72) 发明人 T·瑞利 A·帕特瓦尔丹

F·拉杜卡

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

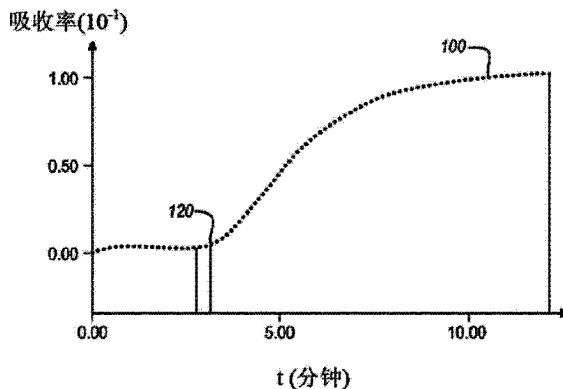
权利要求书3页 说明书13页 附图11页

(54) 发明名称

用于非空腹的 LDL 胆固醇检测的体系和方法

(57) 摘要

在一个实施方案中,用于测试全血中胆固醇-相关的血液分析物的测试条包括红细胞分离层,其中当施加至所述测试条的血样向下流经所述红细胞分离层时,所述红细胞分离层从所述血样分离红细胞。测试条还包括从红细胞分离层接收血样的反应层,反应层包括 POE-POP-POE 嵌段共聚物、表面活性剂和反射率变化反应物, POE-POP-POE 嵌段共聚物基本上仅溶解非-LDL 胆固醇分析物,非-LDL 胆固醇分析物与反射率变化反应物反应以改变血样的反射率。



1. 用于测试全血中的胆固醇相关的血液分析物的测试条,所述测试条包括:  
红细胞分离层,其中当施加至所述测试条的血样向下流经所述红细胞分离层时,所述红细胞分离层从所述血样分离红细胞;和  
反应层,其中所述反应层从所述红细胞分离层接收所述血样,所述反应层包括 POE-POP-POE 嵌段共聚物、表面活性剂和反射率变化反应物,所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物基本上仅溶解非-LDL 胆固醇分析物,所述非-LDL 胆固醇分析物与所述反射率变化反应物反应以改变所述血样的反射率。
2. 权利要求 1 的测试条,其还包括铺展层,所述铺展层定位于所述红细胞分离层的顶部。
3. 权利要求 1 的测试条,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物选自以下组中:Pluronic L101:MW3800, POE<sub>7</sub>-POP<sub>54</sub>-POE<sub>7</sub>;Pluronic L121:MW4400, POE<sub>5</sub>-POP<sub>68</sub>-POE<sub>5</sub>;Pluronic P123:MW5750, POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub>;和 Pluronic F127:MW12600;POE<sub>106</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>106</sub>。
4. 权利要求 3 的测试条,其中所述表面活性剂是 Triton-X。
5. 权利要求 4 的测试条,其还包括与所述红细胞分离层相邻的第二血液分离层,所述第二血液分离层从所述血样分离另外的红细胞。
6. 权利要求 5 的测试条,其中所述第二血液分离层还包含硫酸葡聚糖。
7. 权利要求 6 的测试条,其中所述硫酸葡聚糖的分子量为 10K-1000K。
8. 权利要求 6 的测试条,其中所述硫酸葡聚糖的分子量为 50K-750K。
9. 权利要求 6 的测试条,其中所述硫酸葡聚糖的分子量为 500K。
10. 权利要求 4 的测试条,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物是 Pluronic P123:MW5750;POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub>。
11. 权利要求 10 的测试条,其中 POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub> 嵌段共聚物与 Triton-X 之比为 10 份 POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub> 嵌段共聚物比 1 份 Triton-X。
12. 权利要求 11 的测试条,其中所述 Triton-X 的浓度为至少 0.01%。
13. 权利要求 11 的测试条,其中所述 Triton-X 为至少 0.1%。
14. 权利要求 11 的测试条,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 1%。
15. 权利要求 11 的测试条,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 2%。
16. 权利要求 11 的测试条,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 3%。
17. 权利要求 11 的测试条,其中所述反应层的 pH 为至少 5.4。
18. 权利要求 11 的测试条,其中所述反应层的 pH 为至少 6.8。
19. 权利要求 11 的测试条,其中所述反应层的 pH 为至少 7.4。
20. 权利要求 11 的测试条,其中所述反应层的 pH 为 6.8。
21. 权利要求 1 的测试条,其中所述血液分离层包括浸渍有菜豆 (PHA-P) 凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃纤维。
22. 使用干相测试条测定全血样品中的非-LDL 胆固醇的浓度的方法,所述方法包括:  
使所述全血样品接触所述测试条的血液分离层;  
从所述全血样品分离血细胞,产生血浆;  
使所述血浆流经所述血液分离层至测试层;  
使非-LDL 部分优先于 LDL 部分反应;

在所述测试层中产生基本上正比于所述样品中非-LDL 部分的浓度的颜色 ;和  
测量所产生的颜色。

23. 用于测定全血样品中 LDL 胆固醇的浓度的测试条,其包括 :

测试基体 ( 条 ),其具有至少两个堆叠物,所述至少两个堆叠物的第一堆叠物用于总胆固醇,并且所述至少两个堆叠物的第二堆叠物用于非-LDL ;

所述第一堆叠物中包含产生正比于所述样品中总胆固醇量的比色响应的试剂 ;和

所述第二堆叠物中包含产生正比于所述样品中非-LDL 胆固醇量的比色响应的试剂,

所述测试条构造为能通过测试计读取,所述测试计从所述第二堆叠物获得非-LDL 胆固醇值,并将所述非-LDL 胆固醇值从由所述第一堆叠物获得的总胆固醇值中减去,以得到所述样品中的 LDL 胆固醇值。

24. 用于测定全血样品中的 LDL 胆固醇浓度的测试条和测试计的组合,其包括 :

测试条,其包括 :

测试基体 ( 条 ),其具有至少两个堆叠物,所述至少两个堆叠物的第一堆叠物用于总胆固醇,并且所述至少两个堆叠物的第二堆叠物用于非-LDL ;

所述第一堆叠物中包含产生正比于所述样品中总胆固醇量的比色响应的试剂 ;和

所述第二堆叠物中包含产生正比于所述样品中非-LDL 胆固醇量的比色响应的试剂 ;

测试计,其构造为能读取所述测试条,所述测试计从所述第二堆叠物获得非-LDL 胆固醇值,并将所述非-LDL 胆固醇值从由所述第一堆叠物获得的总胆固醇值中减去,以得到所述样品中的 LDL 胆固醇值。

25. 从提供血样的人对象测量 LDL 胆固醇的方法,所述方法包括 :

提供干测试条 ;

在所述干测试条处接收所述血样 ;

在所述干测试条的第一层中从所述血样分离红细胞 ;

在反应层中使所述血样中的非-LDL 胆固醇反应 ;

产生正比于所述非-LDL 胆固醇的颜色变化 ;

测量所述颜色变化以测定所述血样中的非-LDL 胆固醇量 ;和

将所述非-LDL 胆固醇量从所述血样中的总胆固醇量中减去,以得到所述血样中的 LDL 胆固醇量。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述血样来自于未经禁食的个体,并且所得的 LDL 胆固醇量比 Friedwald 公式更精确。

27. 权利要求 26 的方法,其中 LDL 胆固醇的最终斜率为 0.90-1.10。

28. 权利要求 26 的方法,其中 VLDL 胆固醇不作为 LDL 胆固醇测定。

29. 权利要求 25 的方法,其中所述反应层包括 POE-POP-POE 嵌段共聚物、表面活性剂和反射率变化反应物,其中所述反应包括基本上仅溶解来自非-LDL 分析物的胆固醇,所述来自非-LDL 分析物的胆固醇与所述反射率变化反应物反应以改变所述血样的反射率。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述 POE-POP-POE 嵌段共聚物选自以下组中 :Pluronic L101:MW3800, POE<sub>7</sub>-POP<sub>54</sub>-POE<sub>7</sub> ;Pluronic L121:MW4400, POE<sub>5</sub>-POP<sub>68</sub>-POE<sub>5</sub> ;Pluronic P123:MW5750, POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub> ;和 Pluronic F127:MW12600 ;POE<sub>106</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>106</sub>。

31. 权利要求 29 的方法,其中所述表面活性剂是 Triton-X。

32. 权利要求 25 的方法,其还包括:

将所述血样用铺展层铺展,所述铺展层定位于所述第一层的顶部。

33. 权利要求 32 的方法,其还包括:

使所述血样在总胆固醇反应层中反应,所述总胆固醇反应层被定位以接收来自所述铺展层的部分血样;

产生正比于总胆固醇的颜色变化;和

测试颜色变化以确定所述血样中的总胆固醇量。

34. 权利要求 25 的方法,其中所述测试条包括与所述红细胞分离层相邻的第二血液分离层,所述第二血液分离层从所述血样分离另外的红细胞,其中所述第二血液分离层还包含硫酸葡聚糖。

35. 权利要求 25 的方法,其中所述第一层包含浸渍有菜豆 (PHA-P) 凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃纤维。

## 用于非空腹的 LDL 胆固醇检测的体系和方法

### 背景技术

[0001] 低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇的检测在健康,特别是心血管健康中是重要的健康度量。希望具有用于 LDL 的快速的现场检测体系,其不需要实验室或其他设施。以该方式,健康专业人员可在取样之后立即告知病患,而不必为了从实验室返回的测试结果等待数日。以该方式,病患的病历和状况将被即刻记忆在其脑海中,并因此对病患的健康产生更好的结果和分析。

[0002] 目前有 5 种已知的方法在临床化学分析仪上以湿法化学用于定量低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇。所述方法中的 4 种是两步反应,其中第一反应物与所有的非 -LDL (HDL 和 VLDL) 反应而产生无色的产物。一旦第一步反应完成,利用在预设时间下加入另一试剂来定量剩余的 LDL。这些方法与测试条技术不相容,这是因为不能在所需的关键时刻可靠地引入多种试剂。由 Kyowa-Medex 制造的最后一种方法据称具有这样的方法,其中通过糖化合物(环糊精)掩蔽 HDL 和 VLDL,而 LDL 选择性地与特定的表面活性剂和酶胶体化。最重要地,该方法据称在一个反应中进行,这与测试条化学互补。

### 发明内容

[0003] 在一个实施方案中,用于测量全血中胆固醇 - 相关的血液分析物的测试条包括红细胞分离层,其中当施加至所述测试条的血样向下流经所述红细胞分离层时,所述红细胞分离层从所述血样分离红细胞。测试条还包括从红细胞分离层接收血样的反应层,反应层包括 POE-POP-POE 嵌段共聚物、表面活性剂和反射率变化反应物,POE-POP-POE 嵌段共聚物基本上仅溶解非 -LDL 胆固醇分析物,非 -LDL 胆固醇分析物与反射率变化反应物反应以改变血样的反射率。可选地,测试条包括铺展层,其定位于红细胞分离层的顶部。在一个可选方案中,POE-POP-POE 嵌段共聚物选自以下组中:Pluronic L101:MW3800, POE<sub>7</sub>-POP<sub>54</sub>-POE<sub>7</sub>;Pluronic L121:MW4400, POE<sub>5</sub>-POP<sub>68</sub>-POE<sub>5</sub>;Pluronic P123:MW5750, POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub>;和 Pluronic F127:MW12600;POE<sub>106</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>106</sub>。可选地,表面活性剂是 Triton-X。测试条还可包括与红细胞分离层相邻的第二血液分离层,第二血液分离层从血样分离另外的红细胞。任选地,第二血液分离层还包含硫酸葡聚糖。可选地,硫酸葡聚糖的分子量为 10K-1000K 之间。可选地,可以相似的量使用氯化镁(或镁离子)。在另一可选方案中,硫酸葡聚糖的分子量为 50K-750K 之间。任选地,硫酸葡聚糖的分子量为 500K。可选地,POE-POP-POE 嵌段共聚物是 Pluronic P123:MW5750, POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub>。任选地,POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub> 嵌段共聚物与 Triton-X 之比为 10 份 POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub> 嵌段共聚物比 1 份 Triton-X。在一个可选方案中,Triton-X 的浓度为至少 0.01%。在另一个可选方案中,Triton-X 为至少 0.1%。在又一个可选方案中,POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 1%。任选地,POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 2%。可选地,POE-POP-POE 嵌段共聚物的浓度为至少 3%。任选地,反应层的 pH 为至少 5.4。可选地,反应层的 pH 为至少 6.8。在另一个可选方案中,反应层的 pH 为至少 7.4。任选地,反应层的 pH 为 6.8。可选地,血液分离层包括浸渍有菜豆 (Phaseolus vulgaris) (PHA-P) 凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃纤维。

[0004] 在一个实施方案中,使用干相测试条测定全血样品中非-LDL 胆固醇的浓度的方法包括使全血样品接触测试条的血液分离层。所述方法还包括从全血样品分离血细胞,产生血浆,并使血浆流经血液分离层至测试层。所述方法还包括使非-LDL 部分优先于 LDL 部分反应,并在测试层中产生基本上正比于样品中非-LDL 部分的浓度的颜色。所述方法还包括测试所产生的颜色。

[0005] 在另一个实施方案中,用于测定全血样品中 LDL 胆固醇的浓度的测试条包括具有至少两个堆叠物的测试基体(条),至少两个堆叠物的第一堆叠物用于总胆固醇,并且至少两个堆叠物的第二堆叠物用于非-LDL。第一堆叠物中包含有产生正比于样品中的总胆固醇量的比色响应的试剂。第二堆叠物中包含有产生正比于样品中的非-LDL 胆固醇的量的比色响应的试剂。测试条构造为可通过测试计读取,测试计从第二堆叠物得到非-LDL 胆固醇值,并从第一堆叠物得到的总胆固醇值减去非-LDL 胆固醇值以得到样品中的 LDL 胆固醇值。

[0006] 在另一个实施方案中,用于测定全血样品中的 LDL 胆固醇浓度的测试条和测试计的组合包括测试条。测试条包括测试基体(条),其具有至少两个堆叠物,至少两个堆叠物的第一堆叠物用于总胆固醇,并且至少两个堆叠物的第二堆叠物用于非-LDL。第一堆叠物中包含有产生正比于样品中的总胆固醇量的比色响应的试剂。第二堆叠物中包含有试剂以产生正比于样品中的非-LDL 胆固醇的量的比色响应的试剂。该组合包括测试计,其构造为读取测试条。测试计构造为从第二堆叠物得到非-LDL 胆固醇值,并从第一堆叠物得到的总胆固醇值减去非-LDL 胆固醇值而得到样品中的 LDL 胆固醇值。

[0007] 在另一个实施方案中,从提供血样的人对象测试 LDL 胆固醇的方法包括提供干测试条和在干测试条处接收血样。所述方法包括在干测试条的第一层中从血样分离红细胞,以及在反应层中使血样中的非-LDL 胆固醇反应。所述方法包括产生正比于非-LDL 胆固醇的颜色变化,以及测试该颜色变化以测定血样中的非-LDL 胆固醇量。所述方法包括从血样中的总胆固醇量减去非-LDL 胆固醇量而得到此血样的 LDL 胆固醇量。任选地,血样来自于未经禁食的个体,并且所得的 LDL 胆固醇量比 Friedwald 公式更精确。可选地,用以确定非-LDL 胆固醇的曲线斜率在 0.90-1.10 之间。任选地, VLDL 胆固醇不作为 LDL 胆固醇测定。可选地,反应层包括 POE-POP-POE 嵌段共聚物、表面活性剂和反射率变化反应物,其中反应包括基本上仅溶解非-LDL 胆固醇分析物,非-LDL 胆固醇分析物与反射率变化反应物反应以改变血样的反射率。可选地, POE-POP-POE 嵌段共聚物选自以下组中: Pluronic L101:MW3800, POE<sub>7</sub>-POP<sub>54</sub>-POE<sub>7</sub>; Pluronic L121:MW4400, POE<sub>5</sub>-POP<sub>68</sub>-POE<sub>5</sub>; Pluronic P123:MW5750, POE<sub>20</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>20</sub>; 和 Pluronic F127:MW12600; POE<sub>106</sub>-POP<sub>70</sub>-POE<sub>106</sub>。在一个可选方案中,表面活性剂是 Triton-X。任选地,所述方法包括将血样用铺展层铺展,所述铺展层定位于为第一层的顶部。在一个可选方案中,所述方法还包括在总胆固醇反应层使血样反应,所述总胆固醇反应层被定位以接收来自铺展层的部分血样;产生正比于总胆固醇的颜色变化;和测试颜色变化以确定血样中的总胆固醇量。任选地,测试条包括与红细胞分离层相邻的第二血液分离层,第二血液分离层从血样分离另外的红细胞,其中第二血液分离层还包含硫酸葡聚糖。可选地,第一层包含浸渍有菜豆 (PHA-P) 凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃纤维。

## 附图说明

[0008] 图 1a 和 1b 显示了在临床化学分析仪（例如 Roche Cobas Integra400+）上对于利用 Pluronic L121 和 Triton X-100 的两个试剂体系收集的反应动力学数据以验证对于非-LDL 胆固醇的选择性；

[0009] 图 2a 和 2b 显示了在具有和不具有 Triton X 和 Pluronic P123 的基于试剂的体系中反应的 HDL 和 LDL 部分（动力学）的对比；

[0010] 图 3a 显示对于反射率 (%R) 和试验测试 (P123 和 Triton-X) 而言的反应动力学；

[0011] 图 3b 显示使用图 3a 的 Kubelka-Munk 公式的 %R 图的线性；

[0012] 图 4a-4b 显示对于使用两个不同血液供体测试的条的 K/S 而言的动力学图，条件 1 是使用 Triton X-100 的对照，而条件 2 是包含 P123 和 Triton X-100 的试验测试条；

[0013] 图 5a-5h 显示了使用 P123 和 Triton X-100 的测试图，其仅显示出与多种分析物的相关性；

[0014] 图 6 显示 P123 和 Triton X-100 的混合物的非溶血性质；

[0015] 图 7 显示目前的 Polymer Technology Systems, Inc. (PTS) 的对照测试，其反应层包含 2% 的 P123 和 0.1% 的 Triton X-100；和

[0016] 图 8a-8d 显示对于多种的硫酸葡聚糖组合的浓度测试。

## 具体实施方式

[0017] 特定术语在本文中仅出于便利使用，并且不作为对于非-空腹的 LDL 测试条的实施方案的限制。在附图中，相同的附图标记用于指示多个附图中的相同要素。

[0018] 词语“右”、“左”、“前”和“后”指示附图中标记的方向。词语“向内”和“向外”分别是朝向和远离非空腹的 LDL 测试条及其指示部分的几何中心的方向。术语包括以上特别提及的词语、其衍生词和相似意义的词语。附图是按比例的。

[0019] 在不同的视角下并特别参照如下描绘的各附图，相似的附图标记指示相似或相应的部分。

[0020] 简言之，已产生非空腹的 LDL 测试，其中使所有的非-LDL 反应并测试，然后将其从总胆固醇量中减去，以确定 LDL 浓度。该测试基于提供溶解所有的胆固醇而非-LDL 的化学品以用于测试。在一些实施方案中，该化学品包括 Triton X-100 和 Pluronic P123。在一些实施方案中，包括初始不完全的沉淀步骤以改进所得 LDL 的去除。在一些实施方案中，提供此初始的不完全沉淀，并为了增强 Triton X-100 和 Pluronic P123 的选择性，此初始的不完全沉淀包括另外加入硫酸葡聚糖 /Mg<sup>2+</sup>，其带来 10% 以内的测试偏差。测试是指非空腹的，因为该测试足够特异而使其精确性不会受到乳糜微粒存在的不利影响。在该实施方案中，在不使用标准超速离心下测试分离脂蛋白密度类别的能力是独特的，这是由于除了 LDL 之外的密度不同的脂蛋白颗粒的选择性溶解。

[0021] 如上所述，希望有直接的 LDL 测试技术，其不依赖于从总胆固醇的预测性计算。由于希望有这样的测试，申请人分析了 Kyowa-Medex 的专利。Kyowa-Medex 专利 (US6,794,157B1) 的作者 Hirochi Sugiuchi 描述了聚氧乙烯-聚氧丙烯 (POE-POP) 三嵌段共聚物—Pluronic L121 作为关键组分用于在基于两个试剂的水性体系（“湿法化学”）直接测试 LDL，其适用于 Roche 的临床化学分析仪，例如 Integra917, Modula P 和 Cobas

Integra400+。湿法化学体系根据干测试条体系而显著变化,因为在湿法化学体系中,反应物可在特定时间下加入,并因此可精细地控制时机。此外,在湿法化学体系中,相对于干测试条,所有反应物倾向于移动并具有活性,由于降解和其他移动问题,这要求更高浓度的反应物。对该组分的研究证实对于它对 LDL 本身不具有选择性。该专利简单地提及使用多种助表面活性剂(其一个实例是使用 Emulgen L40)、 $\alpha$ -磺化环糊精和酶,这使得初步认为它们在反应中起相对次要的作用。但是,对于在如 Sugiuchi 的两个试剂形式中的 LDL 选择性,在未成功筛选 Pluronic L121 后,开始明白这些添加剂比之前想象的更关键。此外,发现 Emulgen L40(由 Kao Corporation 生产)不是市售可得的;并且我们相信 Kyowa-Medex 对于该助表面活性剂具有专有权。本申请人已重复且彻底测试美国专利 6,794,157B1 中概述的方法;但是,相信专有的方法和反应物未公开或不是公众可得的。

[0022] 在如上所述地对所涵盖的许多表面活性剂、酶和糖化合物进行深入研究和筛选尝试之后,开始明白 Kyowa-Medex 专利是不易于重现的。一些专有方法是例外性的,其阻碍了产生另一成功的单步骤的 LDL 测试。但是,在临床化学分析仪上观察基于两种试剂的体系中,已知不区别测试条脂蛋白的一些 Pluronic L121 和 Triton X-100 的组合产生有趣的结果。

[0023] 在尝试鉴定对 LDL 的选择测试中(其导致干测试条),进行更基础的方法以完全理解 L121 和 Triton X-100 的作用。初始采用相似的基于两个试剂(“湿法化学”)方法。如从以下的反应动力学可见(图 1a 和 1b;在临床化学分析仪上收集数据),HDL(趋势线 100)以比 LDL 部分(趋势线 110)以更快的速率反应。在这些图中,在点 120 添加样品。该结果是非常不可预期的,因为 Triton X-100 传统上被用作常规表面活性剂以溶解所有的脂蛋白,并主要用作总胆固醇测试中所选择的表面活性剂。因此,已知溶解所有脂蛋白的化合物与被认为仅溶解 LDL 的化合物的组合实际上产生溶解所有非-LDL 的结果。图 1a(HDL)和图 1b(LDL)显示与酶/MAOS N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺/4AAP(pH6.8)的钠盐溶液组合而得到最终的表面活性剂溶液 0.25%TX100/0.5%L121 的 TX100/L121 溶液的吸光率对时间的图。然后该试剂在标记 120 处与样品组合,并在设定的时间间隔下进行测试,直至反应结束。应注意,所使用的 Triton-X 的量比常规用以溶解所有脂蛋白的量少得多。简言之,在按照美国专利 6,794,157B1 重复 LDL 测试,并实现直接的 LDL 测试的尝试中,得到非常不同的结果。按照表 1 中列出的专利实施例,作者采用 0.2%Pluronic L121 和 0.1%Emulgen911 以实现高的 LDL 对 HDL 的选择性。但是,在我们的实验室中重复相同的浓度时,我们发现高的 HDL 对 LDL 的选择性,这与美国专利 6,794,157B1 的主张相反。滴定不同的 Emulgen911 和 L121 的组合仅给出相同的选择性(高 HDL:LDL),并且有时相反无选择性。该选择性的逆转促进了使用 TX-100 和其他的辛基酚和壬基酚的测试。

[0024] 初始时认为这将导致可仅反应 LDL 的测试。但相反地,测试结果显示反应所有组分而非-LDL 的测试的可能性。虽然这与初始希望的反应相反,但是已确定使所有的非-LDL 反应,并从已知的总胆固醇值减去该值的测试。虽然不是直接的,但是该方法仍然比 Friedwald 公式具有多个益处。Friedwald 公式最大的不足在于 VLDL 预计假定为三甘油酯浓度的 1/5。对于许多人来说并不如此,并且 Friedwald 公式通常低估对于未经禁食的个体的 LDL。这些问题将通过测试非-LDL(HDL+VLDL+CM)解决,其给出与直接 LDL 测试相同的 LDL 值。



[0025] 当用 Triton X-100 溶解时, Pluronic L121 证实了出人意料的 HDL 选择性。因此, 总结出 Triton X-100 和  $POE_x-POP_y-POE_x$  的组合可得到对于 HDL 和对所有的非-LDL 的高特异性。尝试不同的 Pluronic 系列以尝试提高该选择性被认为是值得的试验。在一些实施方案中, 任选使用不同的 Pluronic, 其包括但不限于:

[0026] • Pluronic L101:MW3800,  $POE_7-POP_{54}-POE_7$ ;

[0027] • Pluronic L121:MW4400,  $POE_5-POP_{68}-POE_5$ ;

[0028] • Pluronic P123:MW5750,  $POE_{20}-POP_{70}-POE_{20}$ ;

[0029] • Pluronic F127:MW12600,  $POE_{106}-POP_{70}-POE_{106}$ 。

[0030] 通过组合在 MOPS 缓冲剂中的 0.7ku 的胆固醇酯酶、0.5ku 的胆固醇氧化酶、12ku 的辣根过氧化物酶与 0.58mM4-氨基安替比林和 2.9mM MAOS、其后是以下浓度的 Pluronic(P123) 和 Triton X-100 混合物来制备试剂。该试剂在自动化的临床化学分析仪 (即 Roche 的 Cobas Integra400+) 上测试以确定选择性。下表显示其选择性。在 P123:Triton X-100 为 10:1 时观察到 ~ 15:1HDL:LDL 的最高选择性。图 2a 和 2b 中所显示的是在与图 1a 和 1b 条件相似且终表面活性剂浓缩物由 0.01%P123/0.0005%TX100 组成下反应的 HDL 和 LDL 部分的对比。第 28 次循环, 标记 22 表示在加入样品后约 2 分钟的反应, 其表示对于测试条读数器如 Cardiochek 测试可能的时间限制。图 2a 显示 P123 与 Triton X-100 的组合, 其显示 HDL 趋势线 205、LDL 趋势线 215 和 VLDL 趋势线 210。图 2b 显示仅有 P123 而无 Triton X-100 的条件, 其显示 HDL 趋势线 240、LDL 趋势线 250 和 VLDL 趋势线 245。这清楚地表明对 HDL 的选择性超过 LDL。

[0031] 表 1 :P123 和 Triton X-100 的选择性和浓度

[0032]

P123:Triton X-100 比值和浓度	HDL:LDL 选择性
1:1	
1%:1%	1.17
0.1%:0.1%	2.32
0.01%:0.01%	2.57
3:1	
1%:0.33%	1.84
0.1%:0.033%	3.86
0.01%:0.0033%	5.40
6:1	
1%:0.165%	6.28

0.1%:0.0165%	9.65
0.01%:0.00165%	5.29
10:1	
1:0.1%	10.71
0.1%:0.01%	14.82
0.01%:0.001%	5.22
20:1	
0.1%:0.005%	9.56
0.01%:0.0005%	8.72

[0033] 根据表 1,对于“湿法化学”的最佳浓度出现在约 10:1。

[0034] P123 是较大的、更亲水的 POE-POP 共聚物,并且发现比 L121 更以溶解,使得可以测试更大的浓度和比值。HDL 对 LDL 的选择性是在第 28 次循环处是非常高的 (10:1),使得将 P123 用作最优的表面活性剂以与 Triton X-100 一起使用以选择性地溶解非-LDL。

[0035] 因此,非-LDL 胆固醇的选择性试剂组合的实施方案包括 Triton X-100 和  $POE_x-POP_y-POE_x$ 。任选地,这些组合包括分子量为 2,500-15,000 的  $POE_x-POP_y-POE_x$ 。任选地,其分子量为 4,000-10,000。任选地,其分子量为 5,000-7,000。任选地, $POE_x-POP_y-POE_x$  的分子量为 5,750。

[0036] 用于确定这些表面活性剂性质的“湿法化学”方法需要筛选许多测试的表面活性剂/成分。但是,转入干测试条很大程度上需要重新优化浓度和比值。基于两个试剂的“湿法化学”方法不再用于临床分析仪上其他目的。初始时两个试剂的体系是感兴趣的,因为在干测试条中,在不同时间不可加入多个试剂以进行反应的不同部分。当施加样品时,所有的试剂必须存在于测试条中。在湿法化学测试中需要的试剂越多,试剂将相互作用的机会越大,当它们都置于干测试条中并同时润湿时影响测试效率。此外,在转至干测试条时,通常需要浓度高得多的试剂。

[0037] 为了开发工作测试条体系,在一个实施方案中,如下配置测试条。在基于两个试剂的体系中,10 份 P123 对 1 份 Triton X-100 的比值提供最佳效果,Triton X-100 的浓度为 0.01%。在以前的 Polymer Technology Systems, Inc. (PTS) 的总胆固醇测试中,Triton X-100 的浓度为 0.1%。用于干测试条的试剂制备如下:通过使用含 5mM 4-氨基安替比林的 MOPS 缓冲剂中的 241ku/L 胆固醇酯酶、74ku/L 胆固醇氧化酶、232ku/L 过氧化物酶,和 40mM MAOS (N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲基苯胺的钠盐),然后是以下浓度 P123:Triton X-100 体系的溶液浸渍来自 Pall 的 Biodyne A。在制备干测试条之前在恒温干燥通道中干燥该板。在测试条中需要更高浓度的组分以得到与在湿法化学环境中相似的结果。作为对于非-LDL 测试的起点,TX-100 浓度保持在 0.1%,用于与总胆固醇条的直接比

较。酶浓度也保持与 PTS 总胆固醇反应膜的浓度相同。为了维持 10:1 的比值,将 P123 的浓度提高至 1%,并且 pH 提高至 6.8。然后将试剂涂布在 0.45  $\mu$  Biodyne A 膜上,并在室温下干燥。

[0038] 将非-LDL Biodyne 塑造成使用以下模式的单一分析物测试条:

[0039]

血液分离层	Petex
血液分离层	Alhstrom144
第二血液分离层	Cytosep1660
反应膜	非-LDL 反应膜

[0040] 表 2:显示根据当前描述的方法的非-LDL 的实例。

[0041] 然后将测试条使用 HDL 部分 (178mg/dL)、LDL 部分 (188mg/dL) 和混合物部分 (368mg/dL) 在记录反射率百分比 (%R) 的测试仪上,如在 **CardioChek®** 测试仪上测试,直至反应完全。图 3a 和 3b 分别显示出对于显示出 HDL 为 325、360, LDL 为 320、365, (HDL:LDL) 的混合物为 330、350 的样品的试验测试 (P123 和 Triton-X) 的 %R 和 K/S。使用 Kubelka-Munk 公式将反射率转换为 K/S 单位以形成对于浓度 (与吸光率相似) 的线性关系,其中浓度的降低直接正比于 K/S 的降低。

[0042] 包含 P123 的试验条的结果是令人鼓舞的。LDL 和 HDL 部份的浓度几乎相当 (通过另一测试方法 (Integra) 确认),并且混合物的约为单个部分两者的反应的两倍。P123:Triton X-100 混合物的加入大幅降低了 LDL 部分和混合物的动力学轨迹,同时仅略微抑制 HDL 部分。这暗示了对于 P123 条观察到的混合物反应的主体由 HDL 组成。对于浓度降低的脂蛋白部分观察到相似的结果。如结果显示的,相对于由大致相当浓度的 HDL 部分产生的反射率,由 LDL 部分产生的反射率降低。反射率与样品中反应的部分的量相关。反射率越高,反应可用的分析物越少。因此,如所示的 LDL 部分的高反射率体现出可用于检测的 LDL 胆固醇的量低。由于反应率不与分析物的浓度线性相关,产生 K/S 图,其提供与分析物浓度的线性关系。出于定量和确定可观察的降低的 LDL 反应性的目的,以下将仅适用 K/S 图。

[0043] 用以确定这些表面活性剂性质的“湿法化学”方法需要筛选许多测试的表面活性剂/成分。但是,转入干测试条需要很大程度上再优化浓度和比值。基于两个试剂的“湿法化学”方法在临床分析仪上不再起其他目的。在湿法化学方法中,在合适的时机加入反应物。相反地,该时机机理通常在干测试条是不可能的,因为试剂必须在干测试条预浸渍。此外,测试条所需的试剂浓度通常大得多,因为试剂在干燥过程中可能失活。

[0044] 最后,测试全血以确定是否血液基质将干扰 P123 和 TX100 的功能。减少颜色,并且在两个血样之间的 P123 条的 K/S 值正比于本地血样中的非-LDL 的量。图 4a-4b 显示使用两个不同的血液供体,样品 #254 和供体 ID#66 测试的条的动力学图。条件 1、415、435 表示对照物,而条件 2、420、440 表示含 P123 的条。为了该测试,将测试仪的端值增至每两秒 0.01R% 变化,以观察完全的动力学反应。红色的数据值表示在反应进展时使用 <0.2% 的反

射率变化作为常规测试仪端值。

[0045] 从全血测试的数据显示在干测试条模式中将非-LDL 与 LDL 区分的可重现的方法是可能的。为了该测试,将测试仪的端值增至每两秒 0.01R% 变化,以观察完全的动力学反应。红色的数据值表示在反应时使用 <0.2% 的反射率变化作为常规测试仪端值。这样做以确认非-LDL 的动力学曲线移动至完成。

[0046] 干测试条的成功关键在于优先对于 HDL 的最高水平的配制选择性,例如 5:1(HDL:LDL) 比值表示高水平的 HDL 选择性。由此,如下表中所示,比值为 20:1 的 P123:Triton X-100 给出理想的选择性。

[0047] 表 3:选择 P123 对 Triton X-100 的比值

[0048]

P123:Triton X-100 比值和浓度	HDL:LDL 选择性
10:1	
0.5%:0.05%	2.29
1%:0.1%	3.62
2%:0.2%	3.72
15:1	
0.75%:0.05%	4.95
1.5%:0.1%	3.69
3%:0.2%	3.50
20:1	
1%:0.05%	3.56
2%:0.1%	5.11
4%:0.2%	4.00

[0049] 图 7 显示包括目前的 Polymer Technology Systems, Inc. (PTS), 包含 2%P123 和 0.1%Triton X-100 的反应层的试验测试条,趋势线 810 表示 LDL 和 HDL 混合物,线 815 表示 HDL 和线 820 表示 LDL。在 5:1HDL:LDL 的选择性下观察到 LDL 的良好抑制,混合物由相等浓度的 LDL 和 HDL 部分组成,其给出与总 HDL 部分相似的值。

[0050] 之前的研究已描述了干测试条技术的第一尝试,发现定量反应动力学的方法,并验证化学可能性。

[0051] 干测试条化学的前景似乎是非常有前途的,但结果不再能够使用脂蛋白部分和反应动力学定量。使用新鲜的血清样品,包含 P123/Triton X-100 的测试条与临床化学分析

仪上得到的非-LDL 相关,得到将各数据点设为非-LDL 值的校正曲线。然后将各数据点从 Integra 测定的总胆固醇中减去,而得到“测得的 LDL”值。将测得的 LDL 值与 Integra 的直接 LDL 值相关联给出在非-LDL 测试中任何偏差的指示。

[0052] 表 4:在三个不同的 pH 水平下,来自三个不同的 P123 浓度的相关性结果的列表  
[0053]

条件	非-LDL R <sup>2</sup>	非-LDL v K/S 公式	LDL 公式	LDL R <sup>2</sup>
pH5.4;1%P123	0.6212	y=0.0183x+0.119	y=0.7731x+30.224	0.8729
pH5.4;2%P123	0.661	y=0.0159x+0.1843	y=0.7662x+31.028	0.9041
pH5.4;3%P123	0.6511	y=0.0165x-0.0285	y=0.7941x+27.424	0.8882
pH6.8;1%P123	0.8017	y=0.0163x-0.0632	y=0.8533x+19.451	0.9544
pH6.8;2%P123	0.8503	y=0.0126+0.025	y=0.86x+19	0.9736
pH6.8;3%P123	0.8253	y=0.0108x-0.0231	y=0.8612x+18.517	0.9625
pH7.4;1%P123	0.7916	y=0.0105x+0.0206	y=0.813x+24.918	0.9635
pH7.4;2%P123	0.7182	y=0.0099x+0.0193	y=0.7707x+30.691	0.9418
pH7.4;3%P123	0.8278	y=0.0098x-0.0368	y=0.8553x+19.841	0.9661

[0054] 使用血清测试 pH 研究外加在 10:1 的恒定 P123:Triton X-100 比值下改变 P123 浓度,以检测任何依赖性。使用 12 个不同的血清样品在同一天测试所有 9 个条件,一次通过 5 个测试仪。

[0055] 根据以上数据,很清楚 P123 对于非-LDL 提供一些选择性。pH 为 5.4 似乎是较不理想的,因为非-LDL 曲线看上去于总胆固醇测试条非常相似;并且 pH 为 7.4 也似乎比 pH6.8 的条的线性更差。在 pH6.8 的条中,1%P123 就精确性和 LDL 偏差而言排在最后。2%P123 比 3%P123 具有更好的 R<sup>2</sup>,但含 3%P123 的条具有略微更低的 LDL 偏差。表示测试中的偏差水平的最终的 LDL 公式的斜率暗示了一些 LDL 仍与非-LDL 条相互作用。

[0056] 因此,已确定用于测试条的 Triton X-100 和 POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub> 的组合在 pH 为约 5.4-约 8 下是可操作的。任选地,该 pH 为 6-7.5。任选地,pH 为 6.8。因此,已确定用于测试条的 Triton X-100 和 POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub> 的组合为 0.1%Triton X-100 与 0.5%-5%的 POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub> 的比值。任选地,该比值为 0.1%Triton X-100 比 1%-3%POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub>。任选地,该比值为 0.1%Triton X-100 比 2%POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub>。在一些实施方案中,选择 P123 用于各种 pH 和 Triton X-100 的组合。

[0057] 值得注意,在科学研究过程中,确定来自 IW Treamont 的浸渍有菜豆凝集素 PHA-P 的新硼酸盐玻璃纤维膜 D-23 比来自 Pall 的无纺的 Tuffglass (Alhstrom144) 表现更佳。

[0058] 以下的目的是提高一致性(斜率),并使其相对于在 Roche LDL C+ 上得到 LDL 值接近一致或在 0.90-1.10 的范围,并将截距优选降低至 ≤ 5mg/dL。

[0059] 在一些可选方案中,曲线的斜率通过非-LDL胆固醇的流动之前沉淀部分 LDL 而改进。这使得 P123/TX100 体系和 LDL 曲线的斜率超过 0.9x,其对于成功的测试被认为是理想的。尽管许多化学品可用于 LDL 的预沉淀,但是在一些实施方案中选择硫酸葡聚糖。在一些实施方案中,聚乙烯基硫酸盐可用以在上述的 Triton X-100 和 POE<sub>x</sub>-POP<sub>y</sub>-POE<sub>x</sub> 处理之前沉淀 LDL。

[0060] Boehringer Mannheim(聚乙烯基硫酸盐)和 Immuno AG(硫酸葡聚糖)的早期 LDL 测试使用聚阴离子沉淀以沉淀 LDL,并测试沉淀之前和之后的总胆固醇的差异。Siekmeir, Rudiger, *Clinical Chemistry*, 1990;36(12):2109-2113 研究了这些测试的可靠性和相关性以更好地定量。经历在聚阴离子浓度下的一些 VLDL 共沉淀的两种测试需要沉淀样品中的所有 LDL,而葡聚糖方法沉淀较少的 VLDL。

[0061] 虽然以上方法单独不足以精确地测试 LDL,但是痕量的多阴离子被用以去除一些 LDL,但以足够低的浓度使 VLDL 完好。其后的想法是可在 LDL 颗粒与非-LDL 反应膜反应之前减少 LDL 颗粒,减少非-LDL 膜已排除的 LDL 的量。过多的聚阴离子(例如硫酸葡聚糖)破坏 LDL 的选择性。

[0062] 该方法的第一步需要试验验证一些 LDL 可沉淀而不影响非-LDL。使用 150mM MgCl<sub>2</sub> 测试 MW5K、10K、50K 和 500K 的硫酸葡聚糖,而 500K 的硫酸葡聚糖被鉴别为最合适。

[0063] 表 5:使用 1 份 DS 试剂(对于对照物为盐水)与 20 份 LDL 部分组合的结果

[0064]

比值(LDL 部分:试剂)		Integra TC (mg/dL)	Integra HDL (mg/dL)	Integra LDL (mg/dL)	VLDL (TC-HDL-LDL)
20:1	对照物(盐水)	216.5	2.1	171.9	42.5
	0.15% 500K 硫酸葡聚糖/150mM MgCl	179.9	1.9	134.9	43.1

[0065] 在添加试剂之后立即离心样品,并在 Integra 上测试上清液的总胆固醇、HDL 和 LDL。

[0066] 表 5 显示了 LDL 浓度降低而不影响 VLDL 或 HDL 的浓度。从筛选硫酸葡聚糖的结果使得相信约 20% 的 LDL 可在任何非-LDL 沉淀之前从样品被去除。

[0067] 具有 MW5K ;50K ;500K ;>500K 的各种硫酸葡聚糖(DS)与宽范围的 MgCl<sub>2</sub> 浓度一起测试。测试大部分在 Cobas Integra400+ 作为试剂进行以确定最优的浓度。测试含 150mM MgCl<sub>2</sub> 的 0.15%w/v 的分子量为 500K 的硫酸葡聚糖储备液以测定在哪一点仅沉淀 LDL。

[0068] 下表 6 显示 20 份的含盐水的固定含量的 LDL 部分与 1 份储备液混合产生优选的组合。当与使用盐水处理的作为对照物的等份相同样品(参见标记行)对比时,LDL 的浓度降低~33mg/dL,同时保持 VLDL 的浓度在 43.3mg/dL 基本不变。这证实了在 VLDL 存在下至少一些 LDL 已沉淀而不影响 VLDL 的浓度。

[0069] 表 6:不同硫酸葡聚糖浓度的效果

[0070]

硫酸葡聚糖 /MgCl <sub>2</sub> 的储备液浓度	LDL:储备液的DS/MgCl <sub>2</sub> 比值	最后的 DS/Mg <sup>+2</sup> 浓度	测试描述	TC (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (TC-HDL-LDL) (mg/dL)
0.15% DS/150mM MgCl <sub>2</sub>	1:1	0.075%DS/75mM MgCl <sub>2</sub>	对照物 (盐水)	117.3	3	93.5	20.8
			试剂	1	0	0	1
0.15% DS/150mM MgCl <sub>2</sub>	5:1	0.025%DS/25mM MgCl <sub>2</sub>	对照物 (盐水)	192.2	2.3	153.5	36.4
			试剂	0.9	0.2	0	0
0.15% DS/150mM MgCl <sub>2</sub>	10:1	0.014%DS/13.64mM MgCl <sub>2</sub>	对照物 (盐水)	216.2	2.2	173.1	40.9
			试剂	49.7	2	35.5	12.2
0.15% DS/150mM MgCl <sub>2</sub>	20:1	0.007%DS/7.14mM MgCl <sub>2</sub>	对照物 (盐水)	229.5	1.9	182.2	45.5
			试剂	194.3	2.2	148.8	43.3
0.15% DS/150mM MgCl <sub>2</sub>	50:1	0.0029%DS/2.94mM MgCl <sub>2</sub>	对照物 (盐水)	231.5	2.1	187.9	41.5
			试剂	237.6	1.6	185.1	50.9

[0071] 由于硫酸葡聚糖 /MgCl<sub>2</sub> 与 LDL 的瞬时反应,为了 LDL 沉淀和去除而将其放置的最佳层是 Cytosep。将浸渍有 0.15% 硫酸葡聚糖 (MW500K) 和 150mM MgCl<sub>2</sub> 的 Cytosep1660 放置在条中,其高于包含 P123:Triton X-100 的非 -LDL 反应膜。使用全血样品的测试给出极佳的对于 LDL 的最后相关性。这表明与以下标记的测试样品中观察到的相似的血浆与硫酸葡聚糖 /MgCl<sub>2</sub> 的相互作用比值被维持或存在于测试条中。

[0072] 在已知的浓度下使用 LDL 部分进行滴定研究以确定在测试条中的硫酸葡聚糖 /MgCl<sub>2</sub> 浓度水平。测试三个浓度 :i)0.007%DS/7.5mM MgCl<sub>2</sub>, 图 8a, 趋势线 910 ; ii)0.015%DS/15mM MgCl<sub>2</sub>, 图 8C, 趋势线 930 ; 和 iii)0.075%DS/75mM MgCl<sub>2</sub>, 图 8B, 趋势线 920 ; 在包含非 -LDL 胆固醇膜以及并排对照物的测试条中。对照物条包含非 -LDL 反应膜,但在 Cytosep1660 中不具有硫酸葡聚糖 /MgCl<sub>2</sub>, 图 8D, 趋势线 940。以下的相关性显示仅 0.075%DS/75mM MgCl<sub>2</sub> 展示良好的相关性和与 Integra LDL 的一致性。但是,当使用全血测试时,该浓度需加倍。

[0073] 硫酸葡聚糖 /Mg<sup>+2</sup> 的滴定显示出 0.15% 硫酸葡聚糖对于血清样品是理想的。Cytosep 包含 0.15% 硫酸葡聚糖 /150mM MgCl<sub>2</sub>, 并且位于 P123/TX100 反应膜顶端。

[0074] 图 5a-5h 中的图显示了仅对于非 -LDL 的相关性。在图 5a 中,图显示了根据本文所述方法测试的非 -LDL 的量与根据工业接受的技术测定的 Integra 非 -LDL 量的对比。在该情况中,术语 Integra 用以表示使用 Integra917, Modula P 和 Cobas Integra400+ 选择性的分析物测试。趋势线 510 显示对于接受标准的相关性是高的。图 5B 和趋势线 520 显示根据本文所述方法的非 -LDL 相对于 Integra 总胆固醇之间的关系。图 5B 应对比 5C,显

示出 Integra 非-LDL 测试与 Integra 总胆固醇（趋势线 530）的对比。在这两种情况中，相关性低且非常相似，显示出根据本文所述的 Integra 非-LDL 和非-LDL 两者是相似的，且与总胆固醇不相关。图 5D 显示趋势线 520, 530 的组合图作为对比。图 5E 和趋势线 550 显示根据本文所述的方法的非-LDL 与 Integra LDL 对比之间的关系。图 5E 应与 5F 对比，显示出 Integra 非-LDL 测试与 Integra LDL（趋势线 560）的对比。在这两种情况中，相关性低且非常相似，显示出根据本文所述的 Integra 非-LDL 和非-LDL 两者是相似的，且与 LDL 不相关。图 5G 显示趋势线 550, 560 的组合图作为对比。

[0075] 图 5h 中的最后的 LDL 曲线似乎极佳，由于对于 Integra 没有 LDL 偏差（0.99 的斜率），并且相关性非常好（ $R^2=0.9813$ ）。这将根据本文所述的技术的 LDL 与 Integra LDL 测试对比。趋势线 540 显示非常高的相关性。作为对照物，当相同选择性的膜与总胆固醇反应膜一起放置（其仅由 Triton X-100 组成）时，未观察到非-LDL 的相关性，表明 P-123 在非-LDL 反应膜中起着非常重要的作用。

[0076] 也就是说，趋势线 520 显示非-LDL 对总胆固醇的相关性。趋势线 520 和 550 显示出实际上分别对于总胆固醇和 LDL 没有相关性。在图 5h 中，趋势线 540 显示出在从 integra LDL 测试中测得的 LDL 和从本文所述和前一段落中的测试中的实施方案中测得的 LDL 之间的相关性。清楚地是，存在非常高的相关性，几乎为 1:1，其提示所得方法是高精确性的。

[0077] 图 5h 中的最后的 LDL 曲线似乎极佳，由于对于 Integra 没有 LDL 偏差（0.99 的斜率），并且相关性非常好（ $R^2=0.9813$ ）。作为对照物，当相同选择性的膜与总胆固醇反应膜一起放置（其仅由 Triton X-100 组成）时，未观察到非-LDL 的相关性，表明 P-123 在非-LDL 反应膜中起着非常重要的作用。

[0078] 在可开始全血测试之前，考虑表面活性剂对于溶血性的影响。已知 Triton X-100 是非常溶血的，其在一定程度上使得需要良好的血液分离膜。图 6 验证了 P123 是不溶血的，并且当与 Triton X-100 组合时，防止任何溶血性活动，管 610 表示盐水中全血的结果，管 620 表示在 Triton X-100 中全血的结果，管 630 表示在 2%P123 中全血的结果，管 640 表示在 0.1%Triton X-100 和 2%P123 中全血以及全血与盐水、TX100、P123 及它们的混合物组合的结果。可清楚观察到 P123 是非溶血性的，并且当与 Triton X-100 组合时，防止任何溶血性活动。

[0079] 溶血性数据是激动人心的，因为其表明当与 P123 组合时 TX100 性质的变化不明显。对于 TX100 缺少任何增大的溶血性使得可对全血测试，而无增大的溶血性误差的担忧。

[0080] 在 4 种不同的情况下，在试验测试条上继续全血测试。下表汇总了 LDL 分析物的校正曲线和最后相关性的结果。

[0081] 表 7:4 个不同系列的全血测试对比结果表

[0082]

条目	非-LDL $R^2$	非-LDL v K/S 公式	LDL 公式	LDL $R^2$
1	0.8548	$Y=0.01x-0.1826$	$Y=0.9629x+4.2732$	0.9802
2	0.5979	$Y=0.0102x-0.2011$	$Y=0.9313x+6.897$	0.9529



3	0.9333	$Y=0.0098x-0.1936$	$Y=0.973x+3.3117$	0.9765
4	0.874	$Y=0.0104x-0.2372$	$Y=0.9835x+0.9834$	0.9203

[0083] 所有的条由下述的模式组成。

[0084] 对于全血的数据似乎在 LDL 偏差和相关性上极佳。本领域技术人员可从之前的数据中总结出以下模式已产生从可靠的总胆固醇测试计算 LDL 的成功非-LDL 条：

[0085]

血液分离层	Petex
血液分离层	含菜豆凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃
第二血液分离层	Cytosep(0.15% 硫酸葡聚糖 /150mM MgCl)
反应膜	非-LDL 反应膜 (3%P123/0.2%TX100)

[0086] 重要的是注意以单分析物的条的该构造处于概念验证阶段。在最后的研发阶段，非-LDL 测试将位于至少具有胆固醇和以下显示的另一分析物的平板上。

[0087]

层	总胆固醇	LDL	任何分析物
血液铺展层	聚醚砜(PES) 18/13 TW Hyphil		
血液分离层	含凝集素的 D-23 硼硅酸盐玻璃		
第二血液分离层	Cytosep 1660	LDL 选择性	相应的膜
反应膜	总胆固醇反应膜	非-LDL 反应膜	对于分析物的反应膜
粘合剂	粘合剂		

[0088] 还应注意，本报告中可见的各 LDL 曲线已通过将非-LDL 值从 Integra 总胆固醇测试中减去来计算。研发最佳的非-LDL 测试需要完成大量的工作，例如确定制备方法、干扰物和稳定性。但是，已证明与非-LDL 的初始化学反应在单分析物的条模式下工作。如果化学品在该模式下工作，则合理推断它可放置于使用 Polymer Technology Systems, Inc. (PTS), 胆固醇测试的平板模式中，以得出简单的 LDL 测试与 Integra 直接 LDL 测试的相关性良好。

[0089] 虽然在以上详述的说明书中说明详细描述和在附图中说明了具体实施方案，但是本领域技术人员将理解根据其公开和宽泛的发明概念可发展对于那些细节的各种变化和替换。因此，应理解本公开的范围不限于和本文公开的特定的实施例和实施，而意图覆盖其精神和范围内的修改，其是如随附的权利要求及其任何或全部等同所限定的。应注意，尽管显示了特定实施方案，但在实施方案之间可互换各从属的特征。

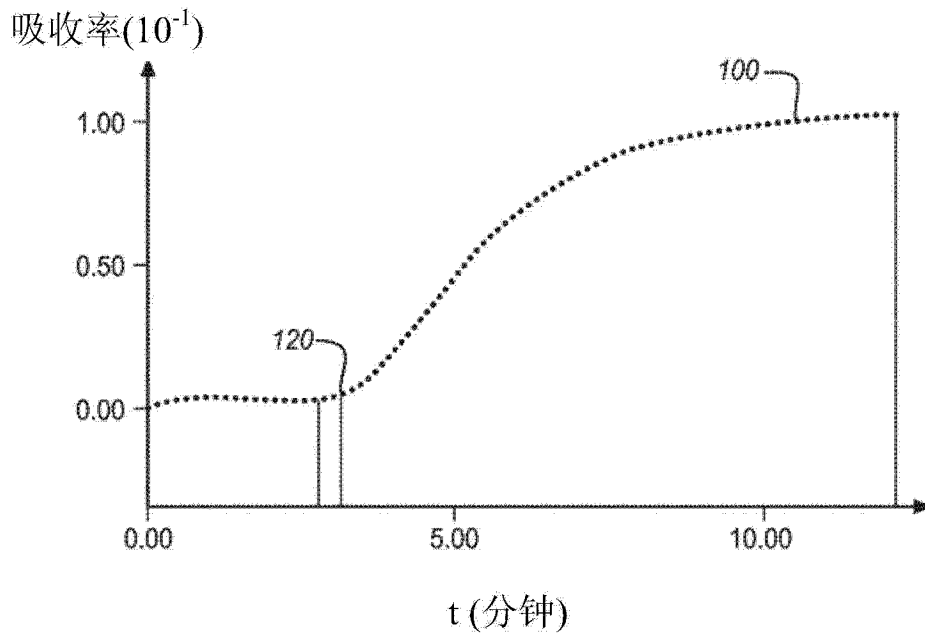


图 1A

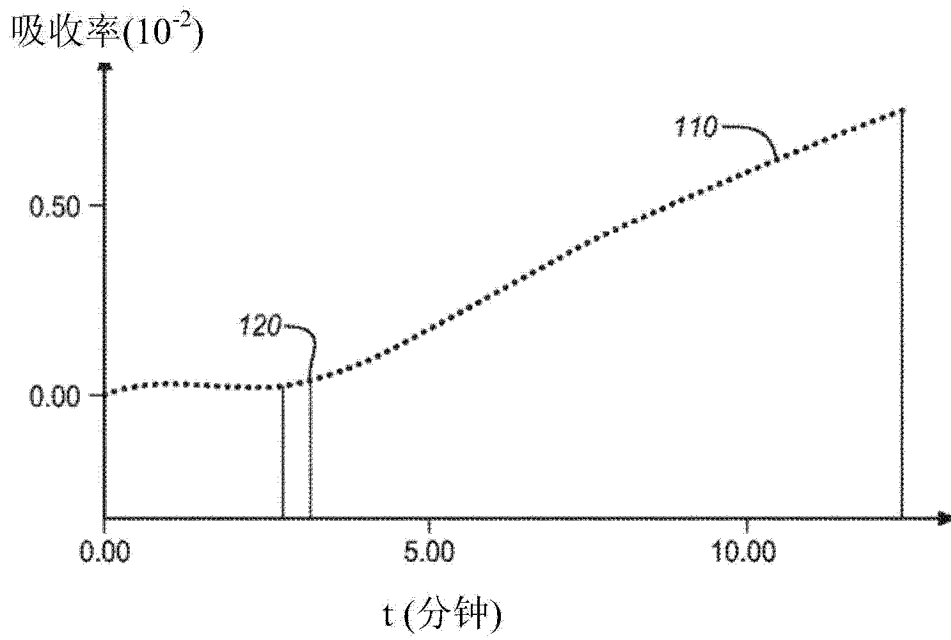


图 1B

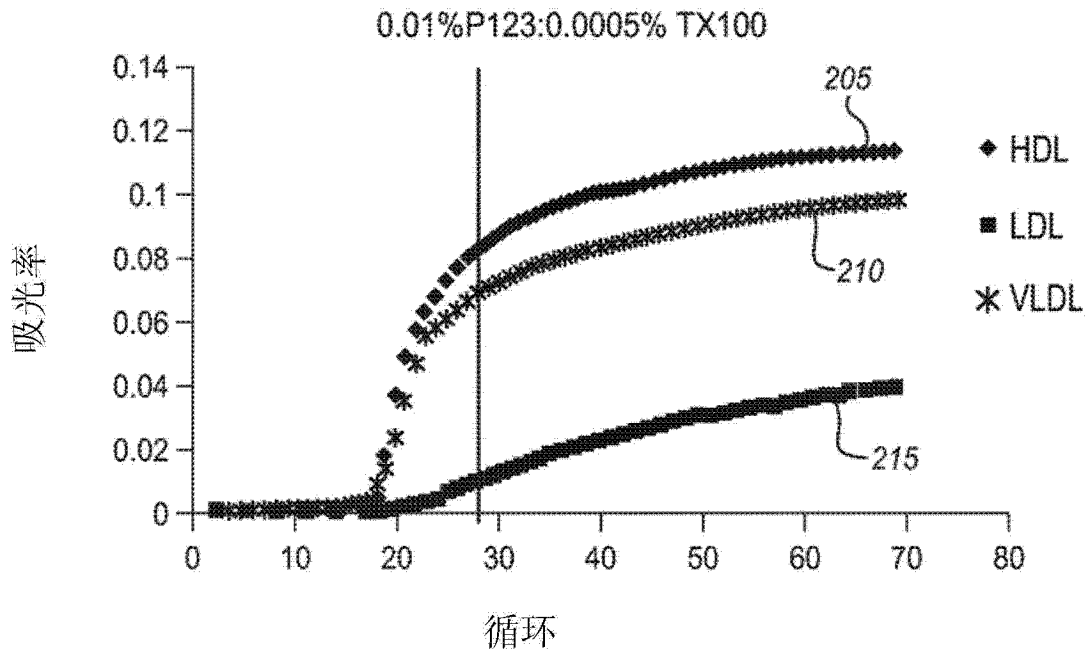


图 2A

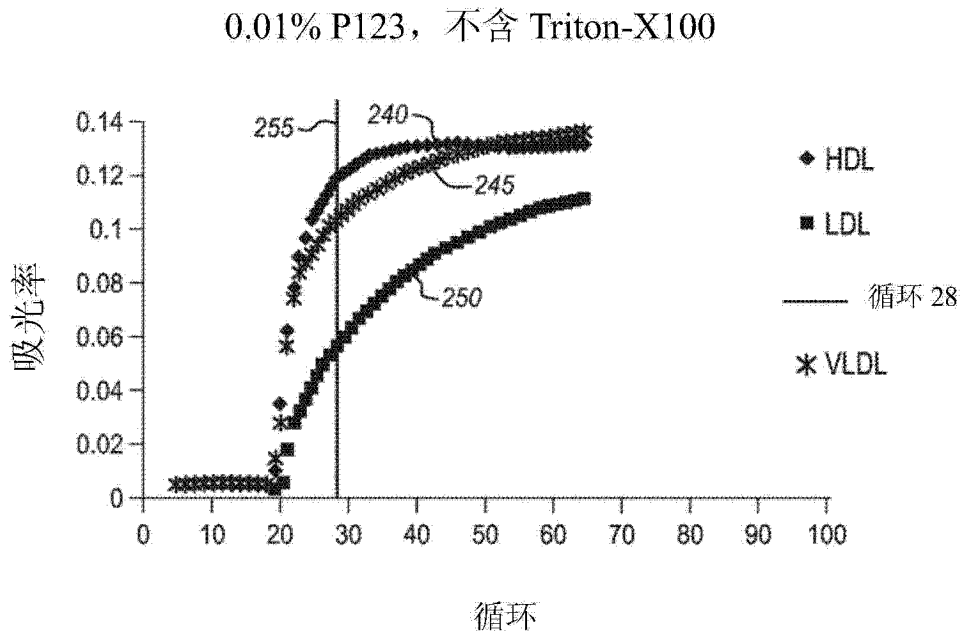


图 2B

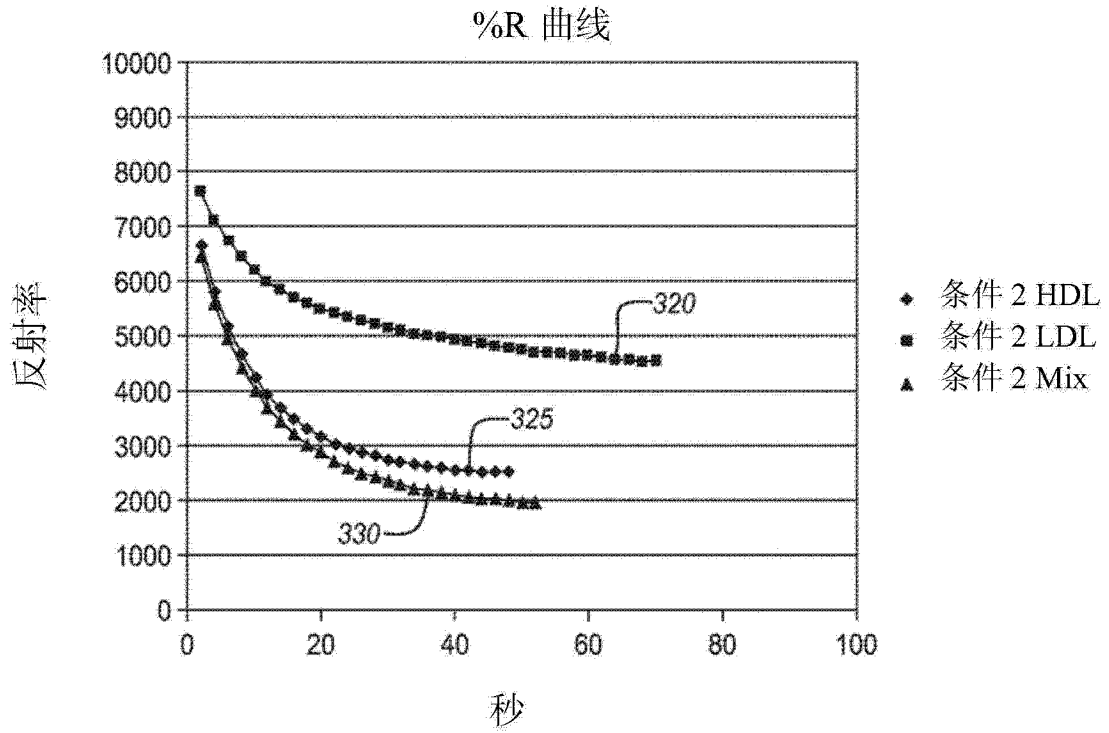


图 3A

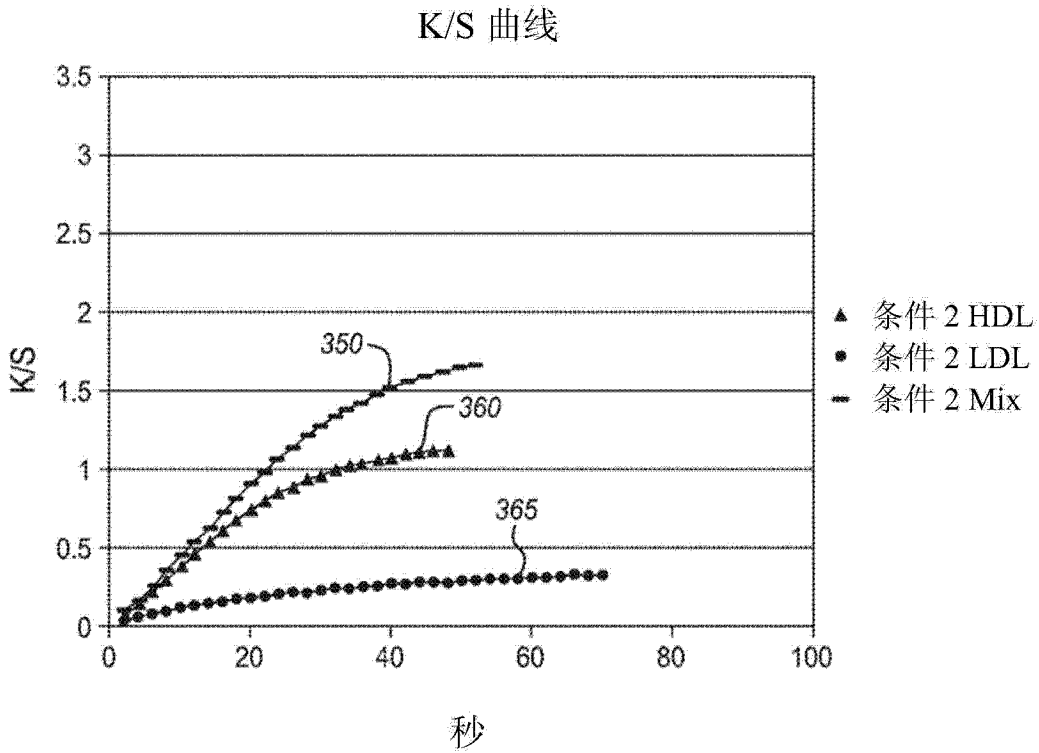
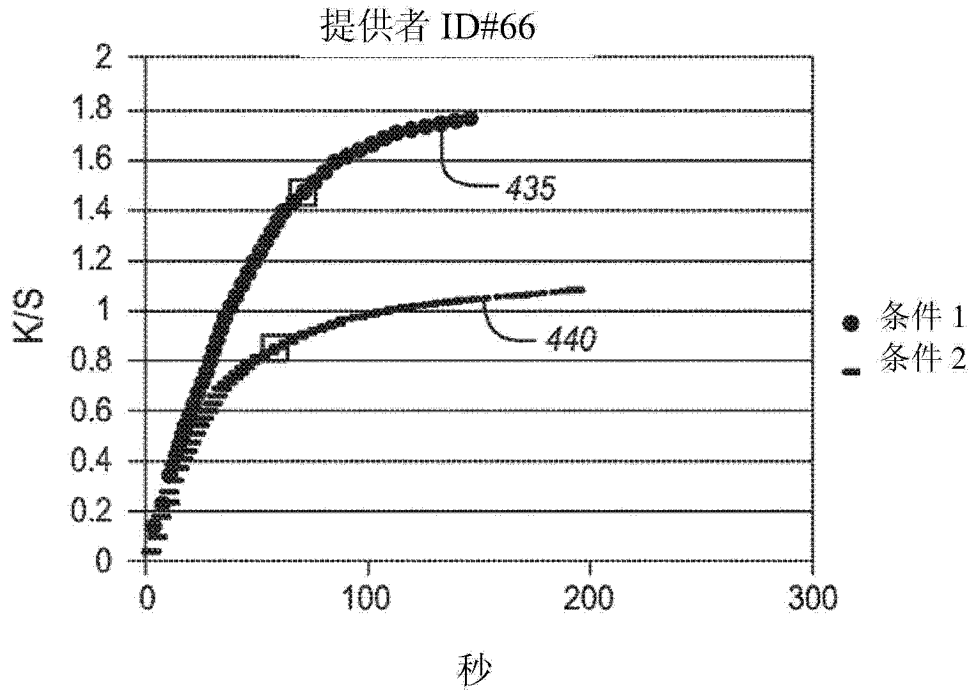
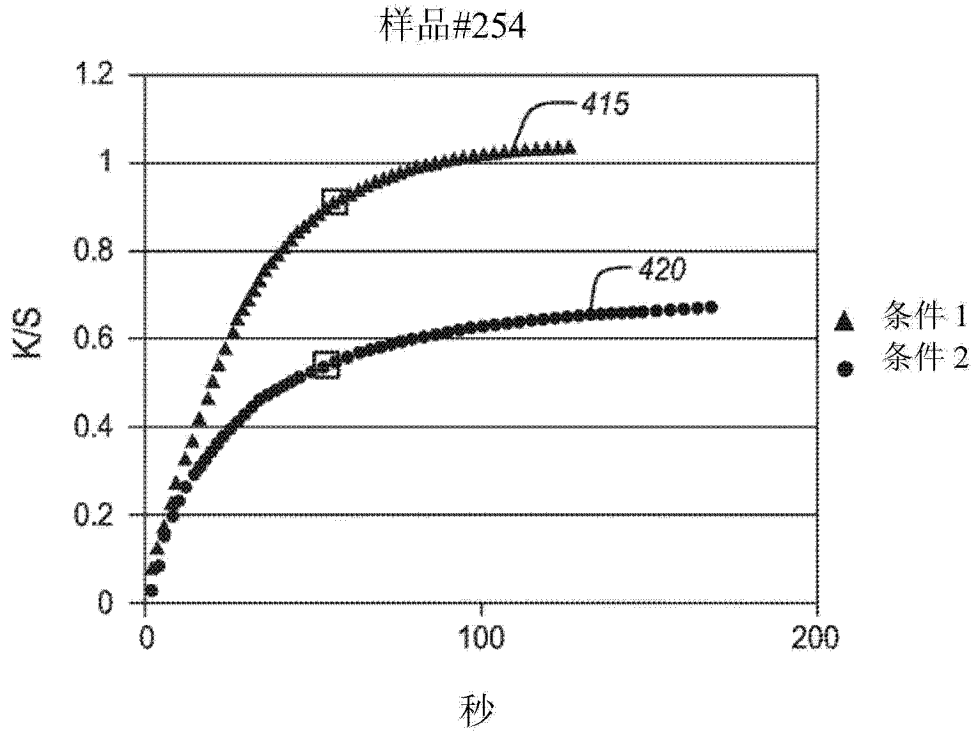


图 3B



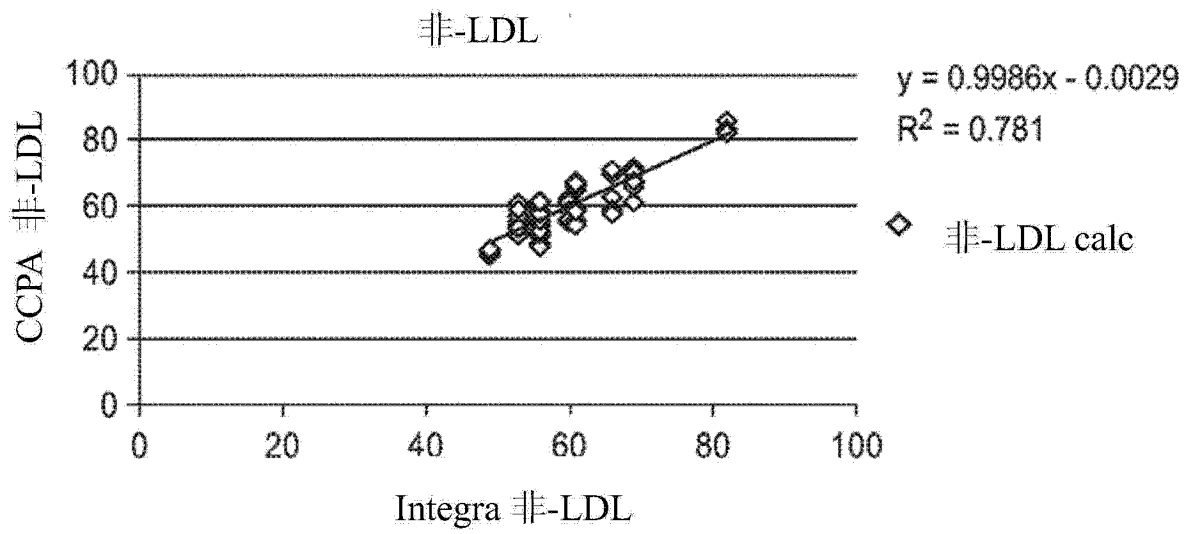


图 5A

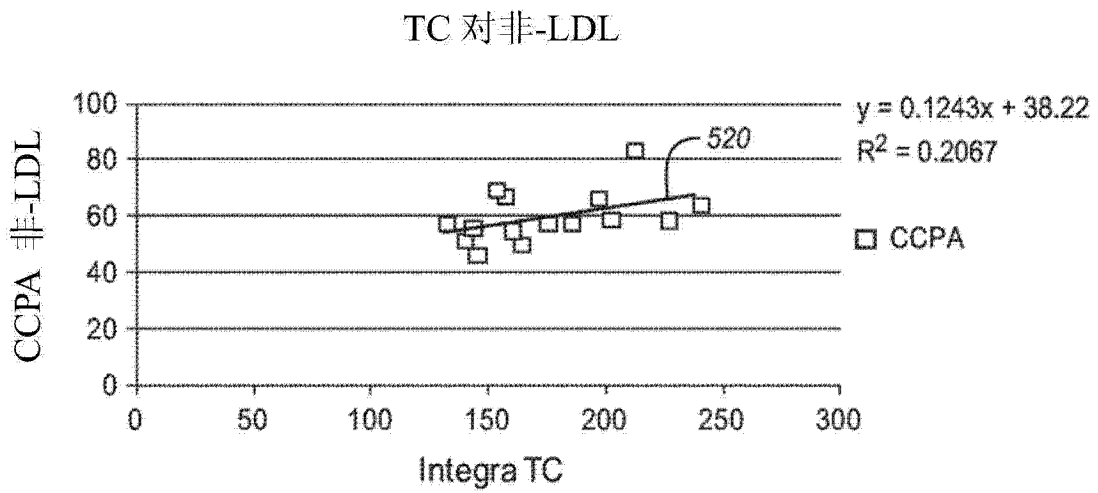


图 5B

TC 对非-LDL

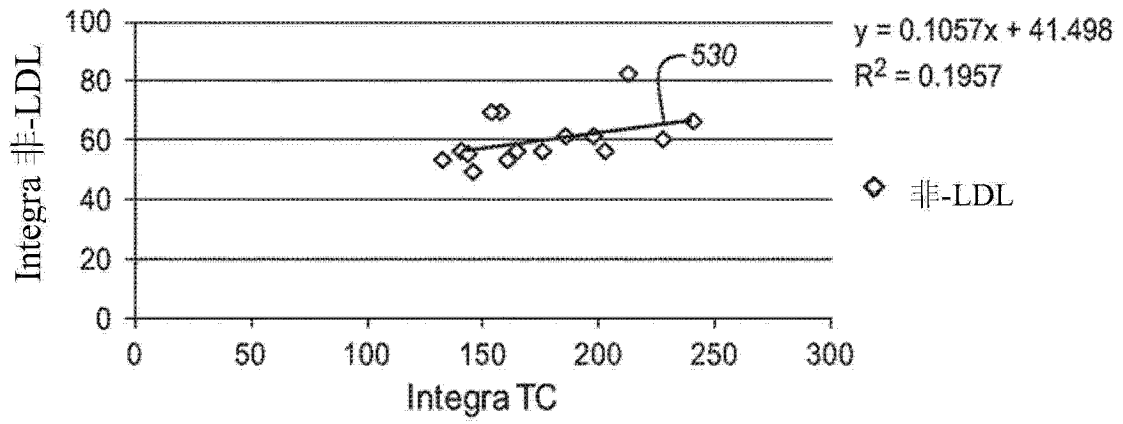


图 5C

TC 对非-LDL

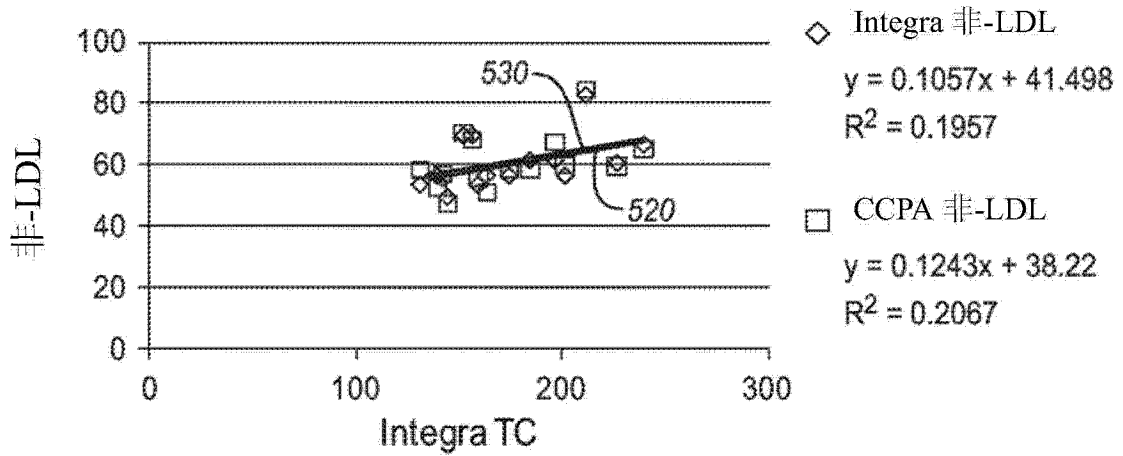


图 5D

LDL 对非-LDL

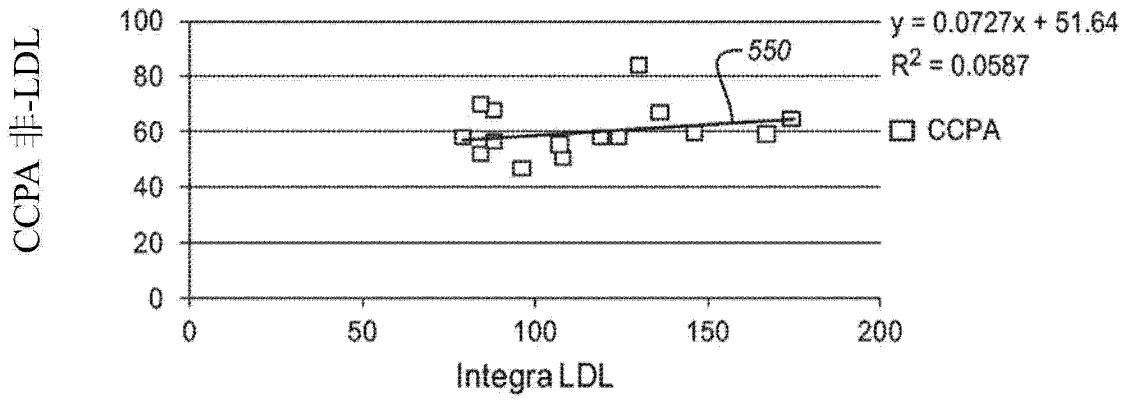


图 5E

LDL 对非-LDL

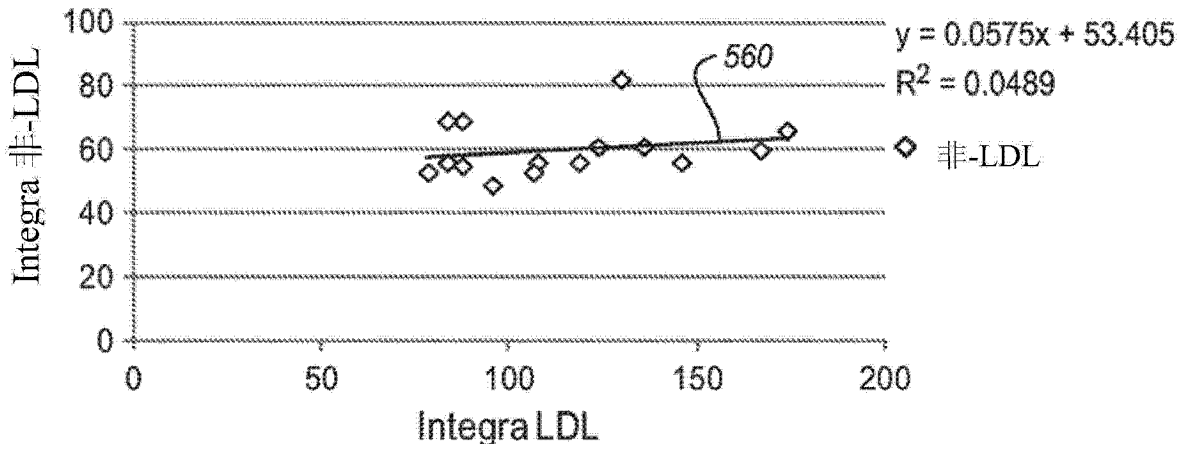


图 5F



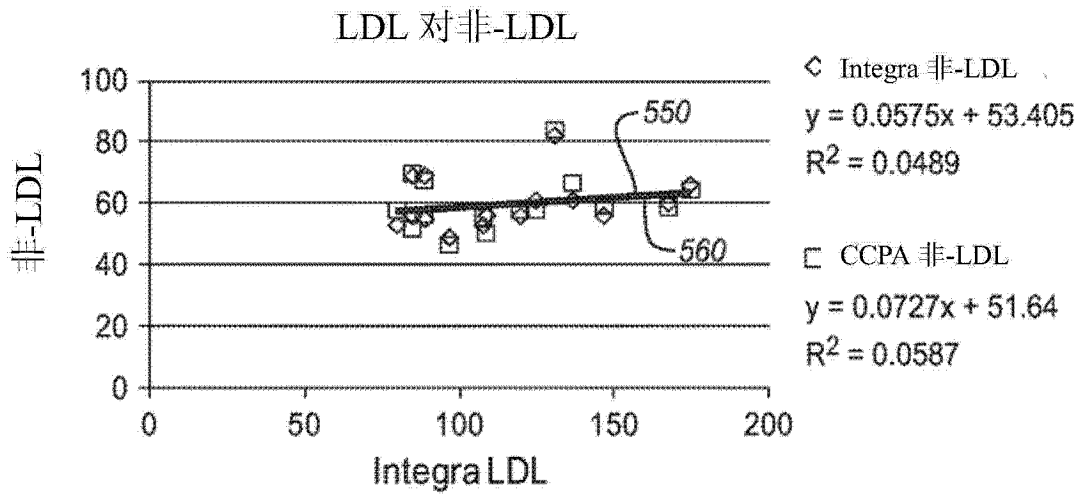


图 5G

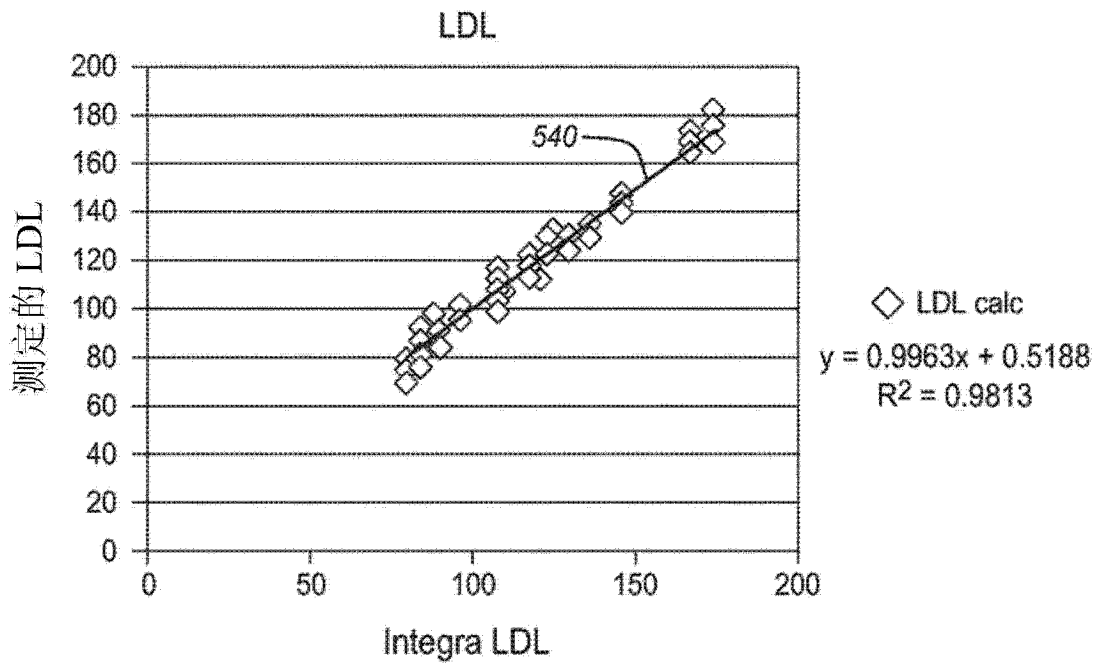


图 5H

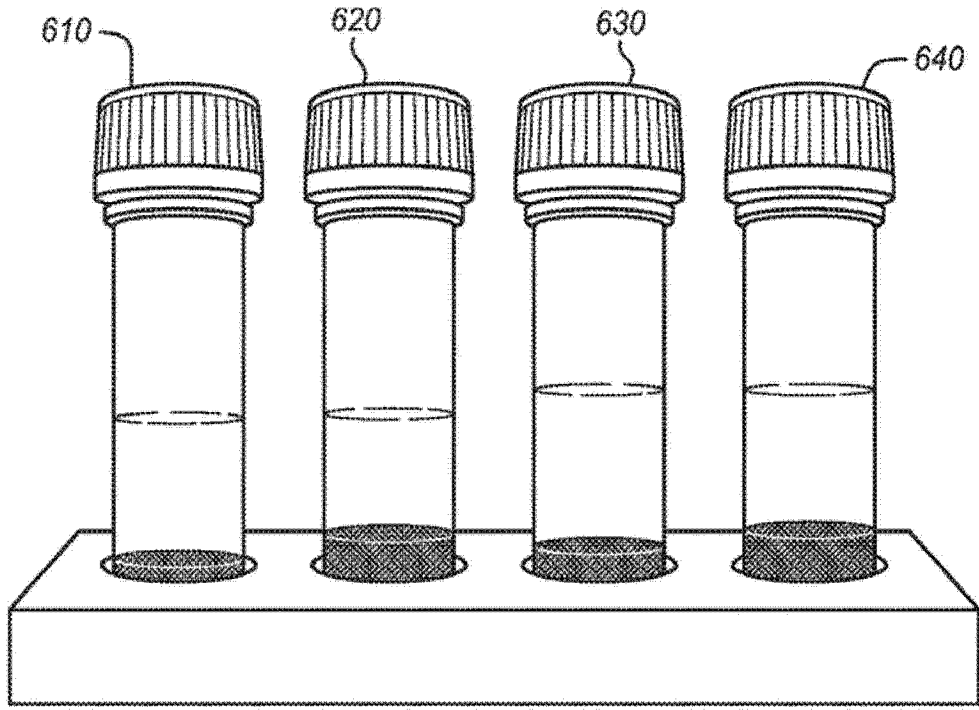


图 6

包含 2% P123:0.1% TX100  
的实验测试条

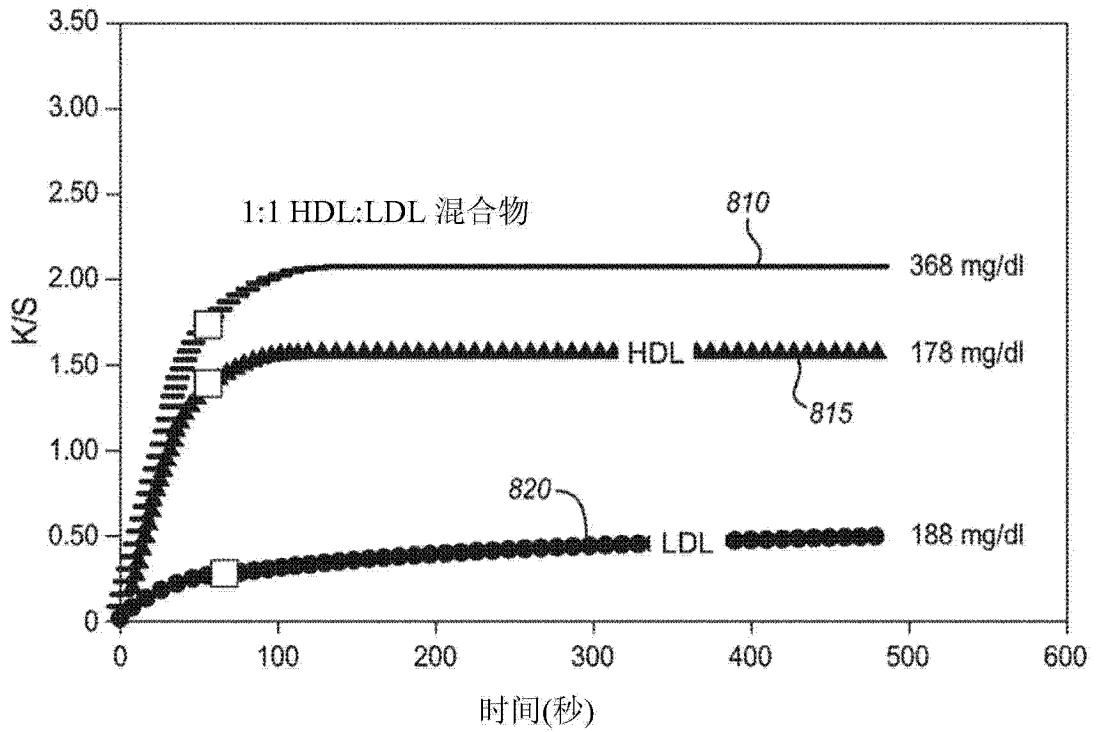


图 7

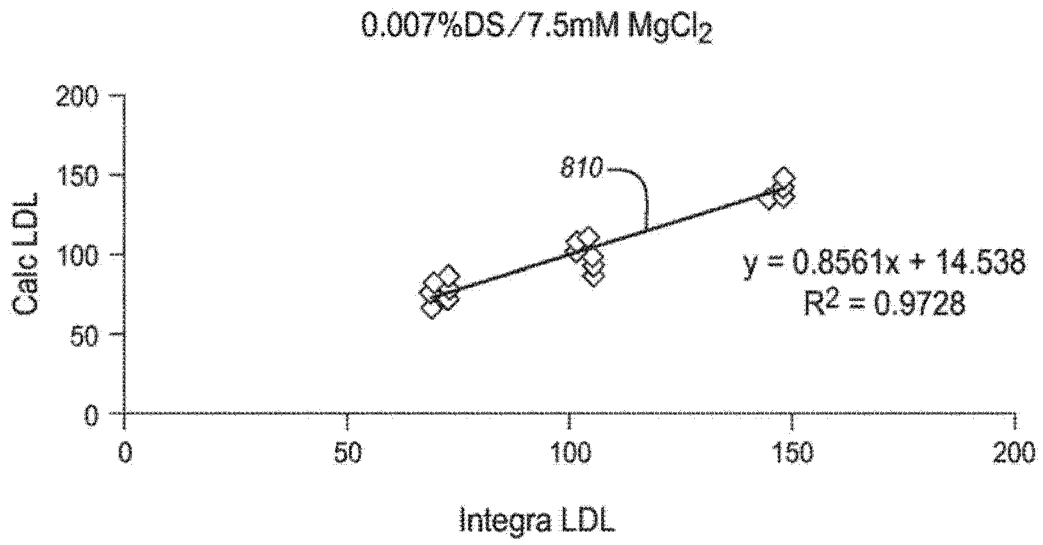


图 8A

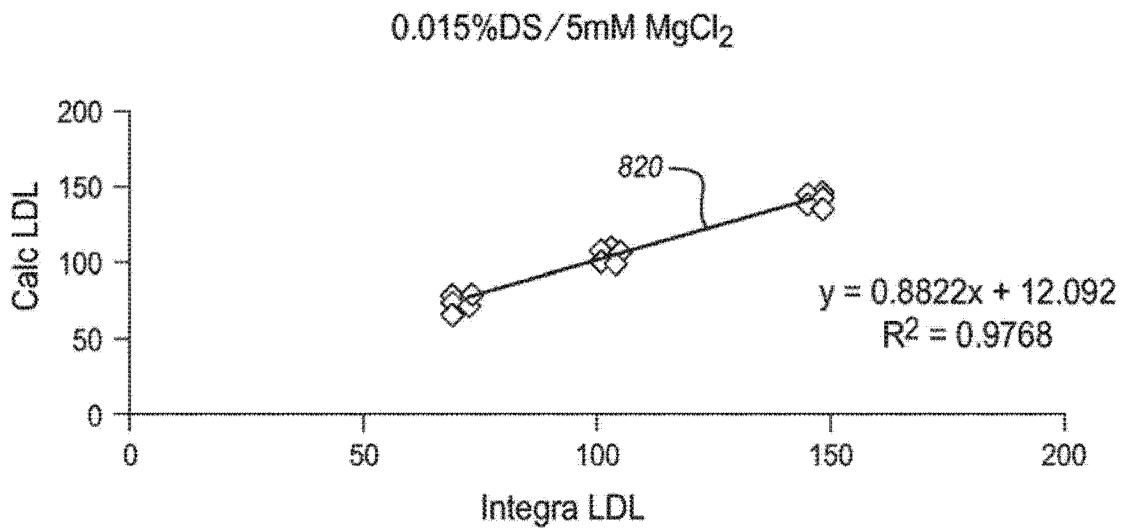


图 8B

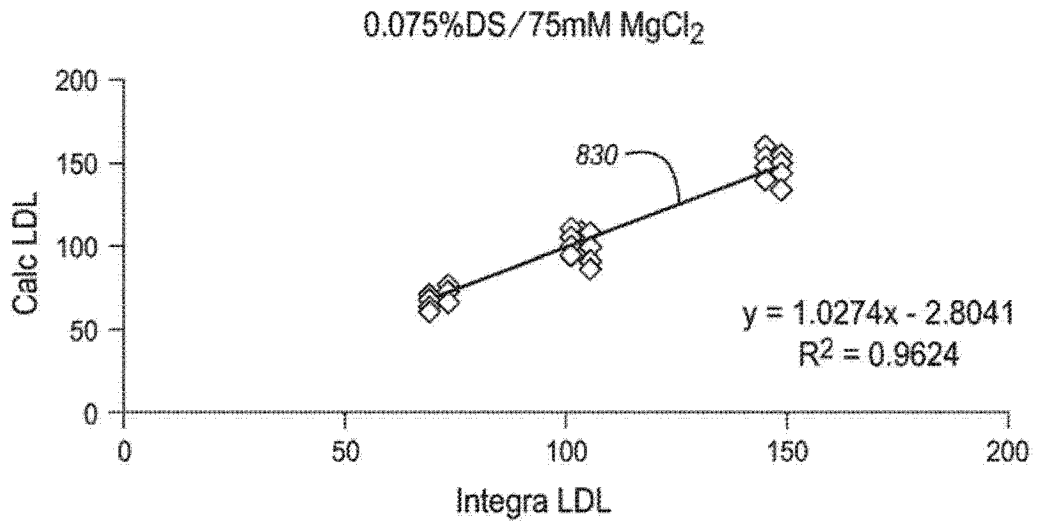


图 8C

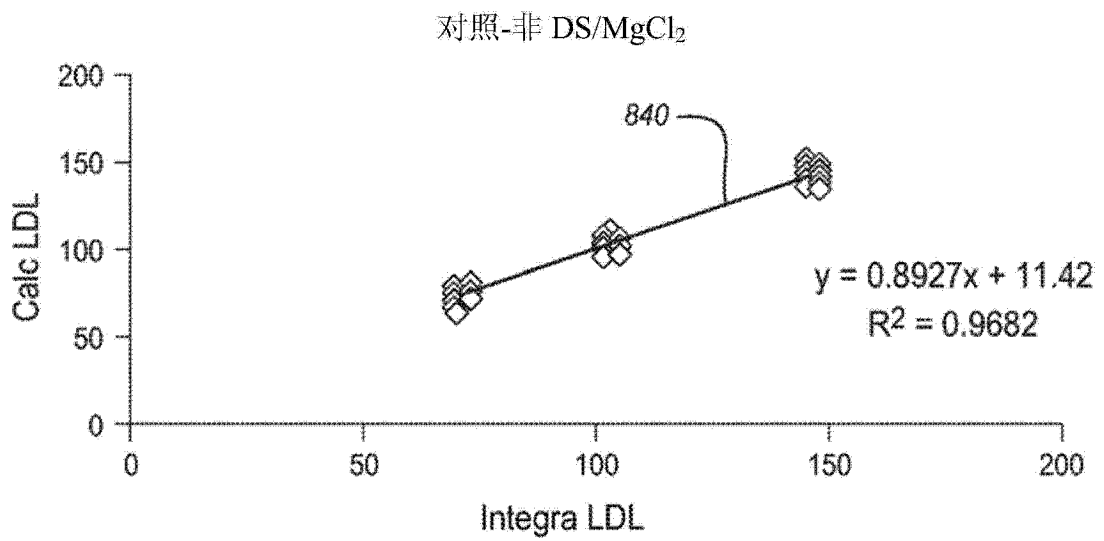


图 8D