



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102690862 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201210189573. 4

(22) 申请日 2012. 06. 08

(73) 专利权人 上海太阳生物技术有限公司

地址 201108 上海市闵行区金都路 3419 号

(72) 发明人 谢永华

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 冯琼 李玉秋

(51) Int. Cl.

C12Q 1/56 (2006. 01)

C12P 19/12 (2006. 01)

审查员 魏春宝

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

抗凝血酶III(AT-III)测定试剂盒(发色底物法)

(57) 摘要

本发明公开了一种发色底物法检测血浆中抗凝血酶 III (AT-III)活性的试剂盒。本发明试剂盒包含肝素衍生物、凝血酶和发色底物试剂;所述肝素衍生物由肝素通过肝素酶 II 降解,从肝素上裂解出一个或多个不饱和双糖而得。本发明检测试剂盒能够避开血浆样本中肝素辅助因子 II (HC-II)的干扰,具有抗干扰能力强、灵敏度高、线性范围宽、操作简单、快速、仪器兼容性强等优点,具有广泛的应用前景。

1. 一种抗凝血酶 III 活性检测试剂盒,包括 R1 试剂和 R2 试剂以及 R1 复溶试剂,所述 R1 试剂包含肝素衍生物、凝血酶,所述 R2 试剂包含发色底物试剂;所述肝素衍生物是由肝素通过肝素酶 II 降解,从肝素上裂解出一个或多个不饱和双糖而得,所述 R1 复溶试剂包含工作浓度为 0.1M-0.2M 氯化钾以及缓冲液,所述 R1 试剂、R2 试剂为冷冻干燥试剂;

所述肝素衍生物的制备方法包括以下步骤:

步骤 1:将肝素溶于 pH 值为 6.0-8.0 的磷酸盐缓冲液,得肝素母液;

步骤 2:将肝素酶 II 加入上述肝素母液中,所得混合物于 25-40℃ 反应 20-40 小时;

步骤 3:将上述反应后的混合物于 80-100℃ 灭活肝素酶 II。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 中所述肝素为人、牛或猪肝素中的任意一种。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 中所述肝素在所述磷酸盐缓冲液中的浓度为 1000 ~ 4000U/ml。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 1 中所述肝素在所述磷酸盐缓冲液中的浓度为 2000U/ml。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 2 所述肝素酶 II 与肝素母液中所述肝素的量之比为 1IU:5000 ~ 10000U。

6. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 2 所述肝素酶 II 与肝素母液中所述肝素的量之比为 1IU:8000U。

7. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 2 还包括用紫外分光光度计分别检测所述反应前、后,反应混合物在 232nm 处的吸光度值,将所述反应后的混合物吸光度较反应前增强 5% -20% 认定为生成了所述肝素衍生物。

8. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,步骤 3 还包括将所述肝素衍生物从反应混合物中分离纯化的步骤。

9. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述肝素衍生物的工作浓度为 0.25-3.0U/ml。

10. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述肝素衍生物的工作浓度为 1.6U/ml。

11. 如权利要求 1、9-10 任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述凝血酶的工作浓度为 5-20IU/ml。

12. 如权利要求 1、9-10 任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述凝血酶的工作浓度为 10.9IU/ml。

抗凝血酶III(AT-III)测定试剂盒(发色底物法)

技术领域

[0001] 本发明涉及医学体外诊断领域,特别涉及一种发色底物法检测抗凝血酶 III 的试剂盒。

背景技术

[0002] 抗凝血酶 III (antithrombin III, AT-III) 是一种依赖于肝素的丝氨酸蛋白酶抑制剂,是一种重要的抗凝血因子,在血浆中承担着 60%~70% 的抗凝血酶活性,在维持血液生理性凝血与抗凝血平衡中起着重要的作用。AT-III 由肝脏、血管内皮细胞和巨核细胞合成,分子量约为 60000Da,属于 $\alpha 2$ -球蛋白,其基因位于第 1 号染色体(1p23)。

[0003] 在血栓形成过程中,AT-III 是一个非常重要的调节剂,在肝素的催化下,通过与凝血酶或凝血因子 IXa、Xa、XIa、XIIa、纤溶酶等丝氨酸蛋白酶以 1:1 的比例形成复合物,从而使这些酶失去活性,发挥抗凝作用。

[0004] 正常人 AT-III 的血浆浓度为 20 ~ 30mg/dl,活性为 80% ~ 130%,波动范围相对狭窄,当血液中 AT-III 水平低于正常范围,则增加形成血栓的风险,是发生静脉血栓和肺栓塞的常见原因之一。血液中 AT-III 缺乏可由多种原因造成,如 AT-III 合成降低,主要见于肝硬化、重症肝炎、肝癌晚期等;AT-III 丢失增加,见于肾病综合症;AT-III 消耗增加,见于血栓前期和血栓性疾病,如弥散性血管内凝血(DIC)、心绞痛、心肌梗死等;先天性 AT-III 缺陷或异常。因此,AT-III 在临床诊断中是一个非常重要的指标。

[0005] 目前,测定 AT-III 的方法主要分为三类:免疫学分析方法、凝固法和发色底物法。

[0006] 免疫学分析方法是通过单向放射免疫扩散法、免疫比浊法以及酶联免疫吸附法测定样本中 AT-III 的浓度。这种方法比较特异和灵敏,但是操作繁琐、耗时,由于该方法在测定 AT-III 过程中,非活性的 AT-III 也参与了免疫学反应,检测的 AT-III 浓度并不能完全反映 AT-III 活性水平,这对于由于 AT-III 活性降低而导致的 AT-III 缺乏 II 型的病人,检出的高值结果明显是不合适的。

[0007] 凝固法是通过血浆凝固时间直接或间接地测定样本中 AT-III 活性,主要包括一步法和两步法。一步法是将检测样本与 AT-III 缺乏的血浆混合,通过加入相应试剂激活外源性凝血途径或内源性凝血途径,测定凝固时间,与参考标准进行对照,从而求得 AT-III 的活性,该方法有多种蛋白酶参与反应,测定易受影响。两步法是将血浆通过加热进行脱纤维蛋白处理,再与过量的凝血酶孵育,残余的凝血酶活性通过测定加入血浆或纤维蛋白原后的凝固时间而换算出样本中 AT-III 的活性,该方法缺点在于操作比较繁琐、费时,需要将血浆加热变性进行脱纤维,从而会导致 AT-III 水平的降低。

[0008] 发色底物法是在待测血浆中加入过量的凝血酶,在肝素存在下,凝血酶与血浆中的 AT-III 形成 1:1 复合物,剩余的凝血酶作用于底物,裂解出显色基团,显色程度与剩余凝血酶的量呈正相关,而与血浆中 AT-III 活性呈负相关。由于该方法灵敏度高、准确性好、检测时间短,且能够适用于多种自动化分析仪器,目前,临床上已广泛应用。但是该方法也存在一定的缺陷,该法是通过加入外源性凝血酶来分析样本中 AT-III 活性,由于样本中也存

在另一个肝素催化的凝血酶抑制剂——肝素辅助因子 II(HCII),因而测定剩余凝血酶的活性是凝血酶与 AT-III 和 HCII 反应后剩余的活性,这在 HCII 水平正常的病人,AT-III 的缺乏将有可能由于 HCII 的抗凝血酶活性而掩盖。因此,该法易受样本中 HCII 的干扰而导致 AT-III 的测定不准确,尤其是在 AT-III 缺乏的样本中。

[0009] 有研究显示,在肝素存在下 HCII 对凝血酶的抑制作用取决于离子强度。美国专利 US5646007 通过提高盐的浓度,使凝血酶的构象发生变化,HCII 对凝血酶测定的干扰降低,但凝血酶对发色底物的敏感度也随之降低。

[0010] Demers 等人(Thrombosis and Hemostasia,69 (3),pp.231-235 (1993))报道采用 FXa 替代凝血酶,不会受到 HCII 的抑制,但是用 FXa 分析价格更加昂贵,而且 FXa 不太稳定,分析时需要大量稀释,不太适合自动分析仪。

发明内容

[0011] 针对目前现有技术存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种发色底物法检测抗凝血酶 III(AT-III)活性的试剂盒,该试剂盒抗干扰能力强、灵敏度高,具有广泛的应用前景。

[0012] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种抗凝血酶 III 活性检测试剂盒,该试剂盒包括 R1 试剂和 R2 试剂,所述 R1 试剂包含肝素衍生物、凝血酶,所述 R2 试剂包含发色底物试剂;所述肝素衍生物是由肝素通过肝素酶 II 降解,从肝素上裂解出一个或多个不饱和双糖而得。

[0013] 上述试剂盒中,所述肝素衍生物能够增强 AT-III 的抗凝血酶活性,但并不增强 HCII 的抗凝血酶活性,从而可以消除 HCII 对 AT-III 活性测定的影响。

[0014] 所述肝素衍生物的制备方法包括以下步骤:

[0015] 步骤 1:将肝素溶于 pH 值为 6.0-8.0 的磷酸盐缓冲液,得肝素母液;

[0016] 步骤 2:将肝素酶 II 加入上述肝素母液中,所得混合物于 25-40℃ 反应 20-40 小时;

[0017] 步骤 3:将上述反应后的混合物于 80-100℃ 灭活肝素酶 II。

[0018] 上述制备方法中,步骤 1 中所述肝素为人、牛或猪肝素中的任意一种,优选猪肝素;所述肝素在所述磷酸盐缓冲液中的浓度为 1000 ~ 4000U/ml,优选浓度为 2000U/ml。

[0019] 步骤 2 中所述肝素酶 II 来源于肝素黄杆菌,可由商业化途径获得。

[0020] 步骤 2 所述肝素酶 II 与肝素母液中所述肝素的量之比为 1IU:5000 ~ 10000U,优选比例为 1IU:8000U。

[0021] 上述制备方法中,步骤 2 还包括用紫外分光光度计分别检测所述反应前、后,反应混合物在 232nm 处的吸光度值,将所述反应后的混合物吸光度较反应前增强 5%-20% 认定为生成了所述肝素衍生物。优选地,将所述反应后的混合物吸光度较反应前增强 15% 认定为生成了所述肝素衍生物。

[0022] 上述制备方法中,步骤 3 所得包含肝素衍生物的反应混合物,可以直接配制 R1 试剂,也可以用本领域技术人员已知的分离方法从所述混合物中分离出肝素衍生物作为 R1 试剂配制的原料,例如,使用根据粒子大小分离的葡聚糖凝胶色谱柱纯化获得肝素衍生物。

[0023] 上述试剂盒中,所述凝血酶选自人、牛、猪凝血酶中的任意一种,优选牛凝血酶。

[0024] 作为优选,上述试剂盒中所述 R1 试剂、R2 试剂为冷冻干燥试剂。

[0025] 所述 R1 冷冻干燥剂由包含肝素衍生物、凝血酶以及缓冲剂、表面活性剂、稳定剂、防腐剂的试剂经冷冻干燥制成。

[0026] 所述 R2 冷冻干燥剂由包含发色底物、赋形剂和防腐剂的试剂经冷冻干燥制成；所述 R2 试剂中的赋形剂选自甘露醇、葡萄糖、乳糖、B SA 中的任意一种，防腐剂选择本领域技术人员已知的防腐剂，如叠氮钠。

[0027] 作为优选，上述试剂盒还包括 R1 复溶试剂，所述 R1 复溶试剂包含无机盐和缓冲液，用于 R1 冷冻干燥剂的复溶重建。

[0028] 上述 R1 复溶试剂中，所述无机盐为氯化钠或氯化钾，优选氯化钾。

[0029] 工作浓度的定义：在用上述试剂盒检测样本 AT-III 活性的过程中，所述 R1 冷冻干燥剂用 R1 复溶试剂复溶后，与稀释样本混合，所形成的分析混合物中各组分的浓度被定义为其工作浓度。

[0030] 上述试剂盒中，所述肝素衍生物的工作浓度为 0.25-3.0U/ml，优选工作浓度为 1.6U/ml。

[0031] 所述凝血酶的工作浓度为 5-20IU/ml，优选工作浓度为 10.9IU/ml。

[0032] 所述氯化钠或氯化钾的工作浓度为 0.1M-0.3M。此浓度范围的氯化盐不会引起凝血酶不利的构象变化，R1 试剂中的肝素衍生物能够增强 AT-III 的抗凝血酶活性，且 HCII 对 AT-III 活性测定的影响率不超过 5%。

[0033] 在发色底物法检测 AT-III 活性的过程中，作为凝血酶底物，要求具有较高的敏感性和较好的水溶性，才能有效提高检测的灵敏度，且具有较宽的线性范围，保证检测结果的准确性。如果底物的溶解度过低，试剂接近饱和状态，检测过程中易产生沉淀而导致测定结果的不准确。

[0034] 本发明试剂盒中，所述 R2 试剂中的发色底物为

[0035] Bz-Phe-Val-Arg-pNA (S-2160)、H-D-Phe-Pip-Arg-pNA · 2HCl (S-2238)、Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH)、H-D-Phe-Pro-Arg-pNA 中的任意一种；优选发色底物为 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA · 2HCl，其工作浓度为 0.2-1.7 μmol/ml，优选工作浓度为 0.42 μmol/ml。

[0036] 作为优选，上述试剂盒还包括 AT-III 的校准品，所述校准品由正常健康人血浆添加稳定剂和防腐剂，经冷冻干燥制成。正常健康人血浆可以从商业途径获得，也可以从健康个体获得，将收集的正常健康人血浆混合后进行 AT-III 活性检测，检测值应在 80%-120%。血浆中加入适当的甘氨酸、叠氮钠，混合后通过过滤除去不溶颗粒，调节 pH 值至 6.0-9.0，优选 7.5，分装后冻干，并用 WHO 抗凝血酶国际标准品血浆对 AT-III 校准品进行定值。

[0037] 与现有技术相比，本发明试剂盒具有如下特点：

[0038] (1) 特异性强，不受血浆样本中 HCII 的干扰。

[0039] (2) 灵敏度高，最低检测限在 5% 以下。

[0040] (3) 检测线性范围宽，最高检测限能达到 150%。

[0041] (4) 适用面广，仪器兼容性强，可适用于多种血凝分析仪。

附图说明

[0042] 图 1 为本发明试剂盒的校准曲线；

[0043] 图 2 为本发明试剂盒的线性范围相关性分析；

[0044] 图 3 为本发明试剂盒与现有市售试剂盒检测结果的相关性分析。

具体实施方式

[0045] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明。

[0046] 实施例 1 肝素衍生物的制备

[0047] 步骤 1：将肝素(购自 sigma 公司, 货号 :H3393, 活性 190USP/mg) 溶于 50mM、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液中, 配成浓度为 2000U/ml 的肝素母液。

[0048] 步骤 2：肝素酶 II (购自北京艾德豪克国际技术有限公司, 货号 HS6512, 9.8IU/mg) 用蒸馏水复溶至浓度为 20IU/ml。将肝素酶 II 溶液加到步骤 1 所得肝素母液中, 肝素酶 II 与肝素在该混合物中的浓度比例为 1IU :8000U。

[0049] 混合液在 30℃ 密闭条件下孵育 30 小时后, 在 232nm 测定吸光度, 用磷酸盐缓冲液作为空白对照, 相对于原始值提高 15%, 表明酶消化反应已经发生, 不饱和二糖已从肝素上裂解形成肝素衍生物。

[0050] 步骤 3：将步骤 2 所得反应液浸入沸水浴中 5 分钟, 灭活肝素酶 II。经检测, 肝素衍生物的活性浓度为 885U/ml。

[0051] 实施例 2 检测试剂盒的组成及制备方法

[0052] R1 试剂主要由以下原料配制而成：牛凝血酶浓度为 60IU/ml, 肝素衍生物(实施例 1 所制) 为 9.0U/ml, Tris 为 10mM、吐温 -80 为 0.2mg/ml、明胶为 0.05mg/ml、BSA 为 1.2mg/ml、聚乙二醇 -8000 为 5mg/ml 及叠氮钠为 0.5mg/ml, 以 1ml/ 瓶分装冻干。

[0053] R1 试剂复溶试剂由以下原料配制而成：Tris 浓度为 40mM, KCl 为 0.2M, EDTA-K2 为 3.75mM, NaN3 为 0.5mg/ml, 在 25℃ 以 1mol/LHCl 调节 pH 值至 8.40。

[0054] R2 试剂由以下试剂配制而成：发色底物

[0055] H-D-Phe-Pip-Arg-pNA • 2HCl 为 3.6 μ mol/ml, 甘露醇为 30mg/ml, 叠氮钠为 3mg/ml, 以 1ml/ 瓶分装冻干。

[0056] AT-III 校准品为将收集的健康正常人血浆混合后加入甘氨酸、叠氮钠溶解, 并调节 pH 值为 7.5, 甘氨酸浓度为 10mM, 叠氮钠为 1mg/ml, 以 1ml/ 瓶分装冻干。用 WHO 抗凝血酶国际标准品血浆 06/166 对 AT-III 校准品进行定值, 定值为 94%。

[0057] 实施例 3 检测试剂盒的测定方法

[0058] (1) 将实施例 2 所得 R1 试剂、R2 试剂以及 AT-III 标准品进行复溶重建：

[0059] 每瓶 R1 试剂用 3ml R1 复溶试剂复溶, 每瓶 R2 试剂用 3ml 蒸馏水复溶, 每瓶 AT-III 校准品用 1ml 蒸馏水复溶。

[0060] (2) 以日本东亚 CA530 血凝仪操作为例, 根据仪器说明, 设定分析程序：测定波长为 405nm；

[0061] 取 5 μ l 血浆样本, 加入生理盐水 120 μ l 稀释, 稀释比例为 1:25, 在 37℃ 孵育 30 秒, 取 50 μ l 稀释后样本, 加入 60 μ l R1 试剂在 37℃ 孵育 90 秒, 再加入 60 μ l R2 试剂在 37℃ 孵育, 测定第 10 秒和第 40 秒的吸光度差值 (Δ OD)。仪器自动将校准品稀释成 144%、96%、48%、24%、0% 5 个标准点, 每管重复测定 2 次, 以 Δ OD 的均值为纵坐标, 对应的活性为横

坐标,制作“活性-吸光度差值”校准曲线: $y=-0.0081x+1.4413$,相关系数 $r=0.9993$,见图 1。

[0062] 取待测样本,同上方法测定样本的吸光度差值,代入校准曲线,即可以计算出待测样本中 AT-III 的活性。

[0063] 本试剂盒不仅适用于日本东亚 CA530 血凝仪,而且还适用于其它品牌、型号的凝血分析仪,如法国思达高 STA Compact 血凝仪、美国贝克曼库尔特 ACL elite 血凝仪、德国 BE Compact X 血凝仪等,具体参数可根据仪器不同进行适当调整。

[0064] 实施例 4 本发明试剂盒的分析性能评估

[0065] (1) 线性范围

[0066] 将接近线性范围上限的高活性样本(AT-III 活性 147%)用生理盐水分别按 2/3、1/3、1/6、1/12 的比例稀释,并以生理盐水为空白样本,加上稀释前原样本,共得到 6 份不同活性的样本,使用实施例 2 所得本发明试剂盒、实施例 3 所述检测方法检测各样本,每份样本重复测定 2 次,将测定浓度的平均值与理论浓度进行线性回归分析,计算回归方程 $Y=0.9944X+0.4903$,相关系数 $r=0.9991$,见图 2,表明本发明试剂盒在 0% ~ 150% 线性范围内相关性较好。

[0067] (2) 灵敏度

[0068] 以 5% 人血清白蛋白为空白样本,使用实施例 2 所得本发明试剂盒、实施例 3 所述检测方法,重复测定 20 次,计算空白样本 ΔOD 均值(\bar{X})和标准差(SD),以空白均值减两倍标准差代入校准曲线方程,计算最低检测限,其结果如表 1 所示。

[0069] 表 1 最低检测极限分析

[0070]	序 号	ΔOD	序 号	ΔOD
	1	1.456	11	1.454
	2	1.462	12	1.443
	3	1.462	13	1.458
	4	1.456	14	1.431
	5	1.458	15	1.448
	6	1.463	16	1.422
	7	1.412	17	1.431
	8	1.448	18	1.423
	9	1.439	19	1.465
	10	1.432	20	1.442
	\bar{X}		1.4453	
	SD		0.0157	
	$\bar{X}-2SD$		1.4138	
	最低检测限		3.4%	

[0071] 表 1 结果显示：本发明试剂盒检测 AT-III 的最低检测限可达 3.4%。

[0072] (3) 干扰物质 HCII 的影响

[0073] 将已知 AT-III 活性为 94% 的德国 Siemens 公司 AT-III 校准品, 用 HCII 活性正常的 AT-III 免疫清除的血浆(AT-III 活性小于 1%) 系列稀释, 分别获得 AT-III 活性为 94%、70.5%、47%、23.5%、0% 的样本, 分别用实施例 2 所得本发明试剂盒、以肝素替代肝素衍生物的试剂盒按实施例 3 所述检测方法进行 AT-III 活性测定, 每个样本重复测定 3 次, 取平均值, 结果如表 2 所示。上述肝素替代衍生物的试剂盒, 是指除了将肝素衍生物替代为肝素, 其余试剂组成与实施例 2 所得试剂盒的试剂组成完全相同的试剂盒。

[0074] 表 2HC II 的影响实验

[0075]	AT-III 活性 (%)	肝素衍生物试剂盒		肝素试剂盒	
		测定均值	相对误差	测定均值	相对误差
		(%)		(%)	
	94.0	96.4	2.55%	102.7	9.26%
	70.5	71.6	1.56%	78.5	11.35%
	47.0	45.9	-2.34%	54.6	16.17%
	23.5	24.1	2.55%	34.3	45.96%
	0	2.8		24.3	

[0076] 对于上述系列稀释的 AT-III 活性血浆的检测结果表明：

[0077] 使用本发明试剂盒的检测活性与其理论活性的相对误差均在 5% 之内，且随着稀释液（HCII 活性正常的 AT-III 免疫清除的血浆）的比例增加，其相对误差没有进一步加大，表明 AT-III 活性的检测基本不受 HC II 的干扰；

[0078] 而使用肝素替代肝素衍生物的试剂盒的检测活性与理论活性的相对误差较大（大于 5%），且随着稀释液（HCII 活性正常的 AT-III 免疫清除的血浆）的比例增加，其相对误差增大，表明 AT-III 活性的检测受到了 HC II 的干扰。

[0079] 结论：本发明试剂盒以肝素衍生物替代了现有技术的肝素，可以较好地避开干扰物质 HCII 对 AT-III 活性检测的影响。

[0080] 实施例 5 与已上市产品的比较

[0081] 从上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海中医药大学附属龙华医院的住院及门诊随机抽取正常人和患者的血液样本共 200 份，其中男 107 例，女 93 例。血液按 9 : 1 的比例与 0.109mol/L 枸橼酸钠抗凝液混匀后，3000r/min 离心 15 分钟，分离得到血浆。用实施例 2 所得本发明试剂盒和德国 Siemens 公司 AT-III 检测试剂盒（货号：0WWR17）分别对样本测定，计算两者的相关系数，并进行线性回归。结果显示两种试剂盒的相关系数 $r=0.9922$ ，线性回归方程为 $y=1.0298x-2.6331$ ，见图 3。

[0082] 根据美国临床实验室标准化组织（CLSI）文件的要求（ $r > 0.975$ ），本发明试剂盒和德国 Siemens 公司进口试剂盒的检测数据具有良好的一致性。由此可见两种试剂盒在临床上对于遗传学 AT-III 缺乏、肝硬化、重症肝炎、弥散性血管内凝血、血友病 A、血友病 B、口服抗凝药等疾病的诊断和病程检测具有等同作用，本发明的试剂盒在临床上可以替代进口试剂盒使用，降低检测成本，减轻患者的经济负担。

[0083] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

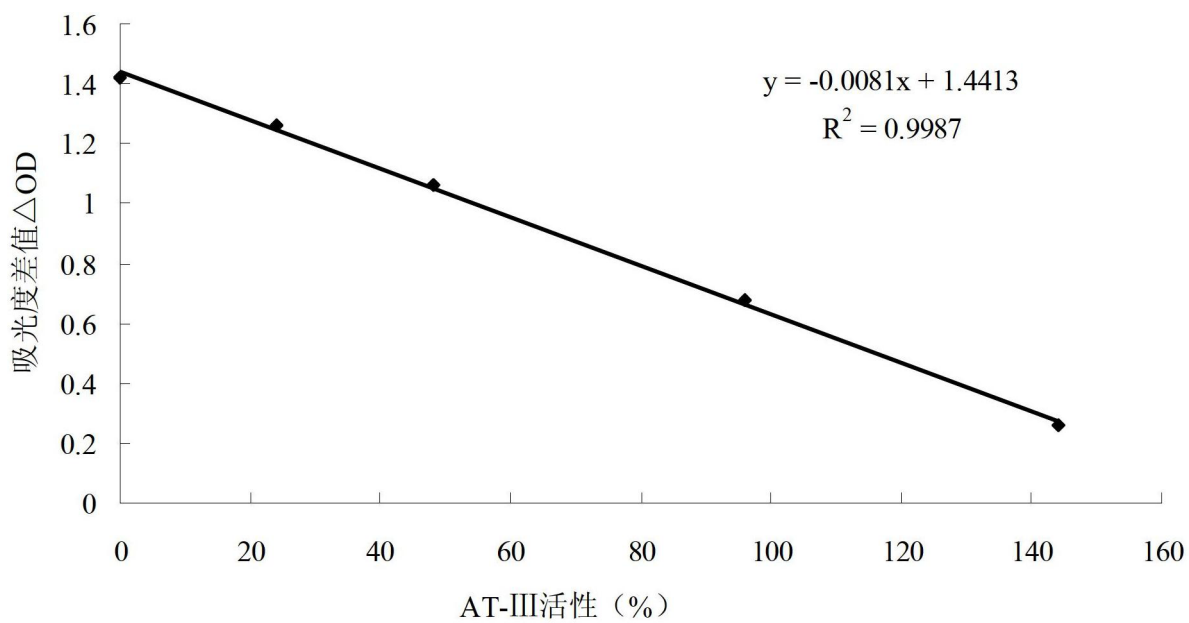


图 1

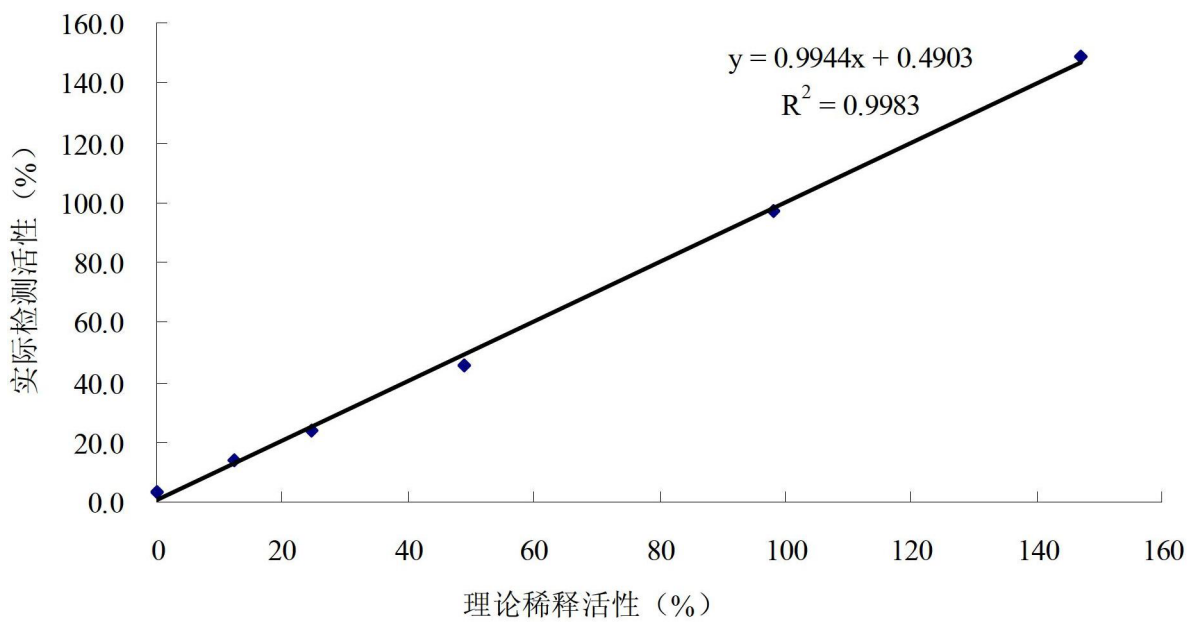


图 2

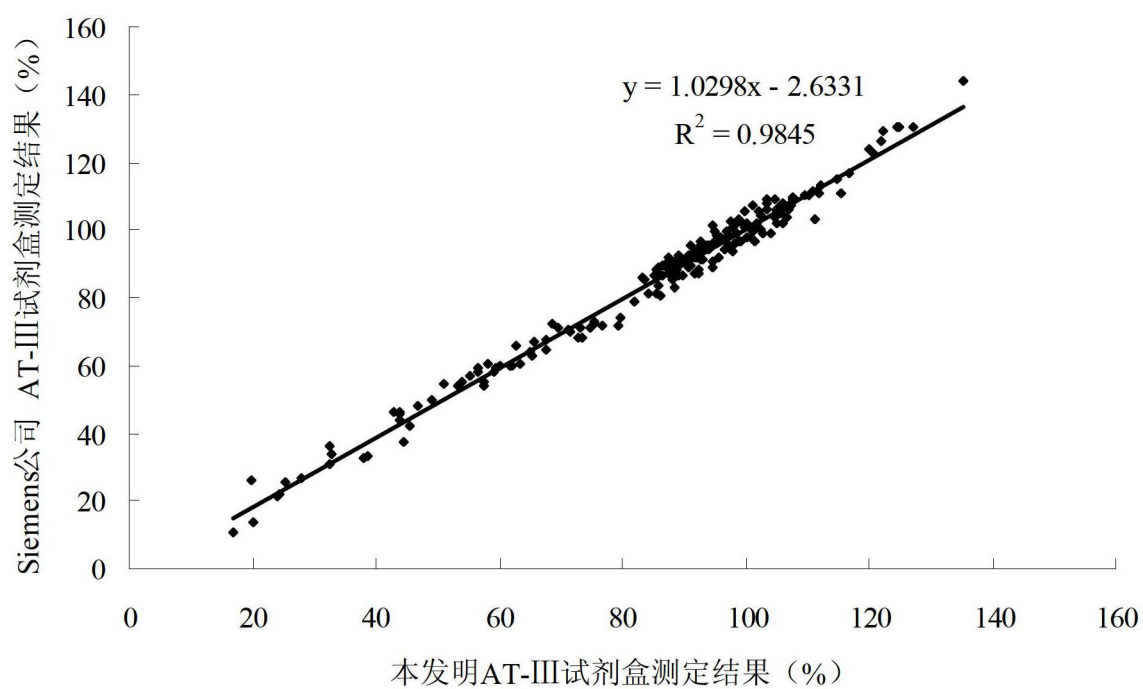


图 3