



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102768284 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201210272607. 6

(22) 申请日 2012. 08. 01

(71) 申请人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215163 江苏省苏州市苏州市高新区科  
灵路 78 号

(72) 发明人 虞留明 田军 蔡江丽

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限  
公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

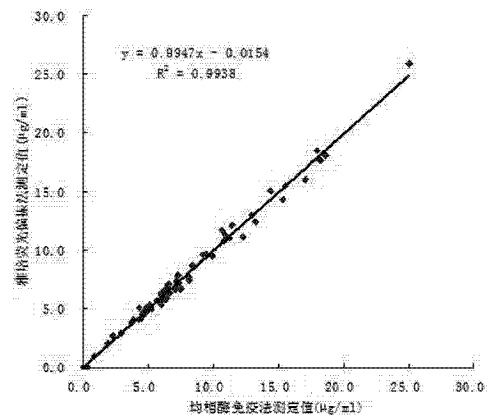
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54) 发明名称

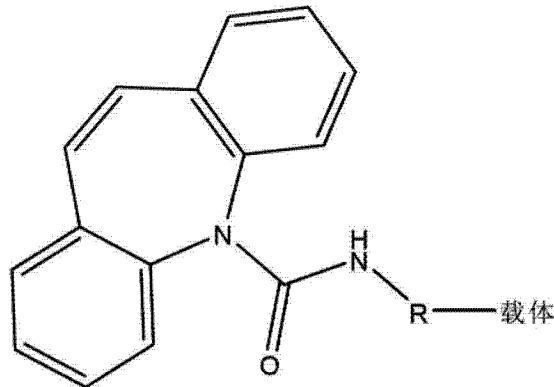
一种卡马西平均相酶免疫检测试剂及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种卡马西平免疫原、由此免疫原直接得到的卡马西平特异性抗体、含有上述特异性抗体的检测试剂以及检测待测样本中卡马西平含量的方法。本发明的有益之处在于：本发明的卡马西平免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗卡马西平特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见 45 种药物无任何交叉反应；含有上述抗卡马西平特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的卡马西平含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现卡马西平的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。



1. 一种卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗卡马西平特异性抗体,用于检测抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物的指示试剂;上述抗卡马西平特异性抗体由卡马西平免疫原免疫动物得到,上述卡马西平免疫原的结构式如式(I)所示:



式 (I)

式中, R 为连接基团,载体具有免疫原性;上述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。

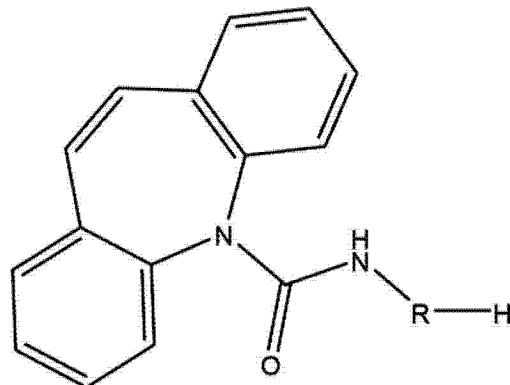
2. 根据权利要求 1 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述 R 为  $-(CH_2)_n-COO-$ , n 为 1 至 20 之间的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述 R 为  $-(CH_2)_4-COO-$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述载体为具有免疫原性的蛋白质,优选的,载体为牛血清白蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

6. 根据权利要求 5 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与卡马西平衍生物偶联形成,上述卡马西平衍生物的结构式如式(II)所示:



式 (II)

上述 R 为  $-(CH_2)_n-COO-$ , n 为 1 至 20 之间的整数。

7. 根据权利要求 6 所述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述 R 为  $-(CH_2)_4-COO-$ 。

8. 利用权利要求 1 至 7 任意一项权利要求所述的检测试剂检测卡马西平的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与上述抗卡马西平特异性抗体接触;

2) 根据待测样本中卡马西平与上述抗卡马西平特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中卡马西平的含量。

9. 根据权利要求 8 所述的检测卡马西平的方法,其特征在于,上述待测样本为生理样本。

10. 根据权利要求 9 所述的检测卡马西平的方法,其特征在于,上述生理样本为血清或血浆。

## 一种卡马西平均相酶免疫检测试剂及其检测方法

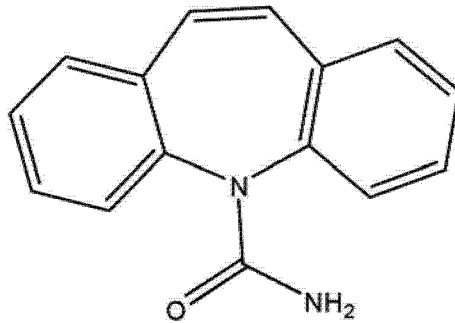
### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂及检测方法,具体涉及一种卡马西平均相酶免疫检测试剂及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 卡马西平 (Carbamazepine) 结构式如(III)所示:

[0003]



[0004] 式(III)

[0005] 卡马西平是一种常见的精神类药物,具有抗癫痫、抗三叉神经痛、抗舌咽神经痛和预防治疗躁狂抑郁症及抗心律失常等作用。但由于其有效治疗浓度范围较窄,浓度较低时达不到治疗效果,而过量用药后又会导致头晕嗜睡、乏力、呕吐、再生障碍性贫血、中毒性肝炎以及休克等副作用。因此,在治疗过程中进行药物浓度监测是非常必要的。

[0006] 目前,卡马西平进行药物浓度监测的方法主要有高效液相色谱法,放免法和荧光偏振法。高效液相色谱法耗用时间长,样品前处理和操作过程及其复杂,对检测人员技术水平要求高;放免法的放射性射线对操作人员的健康产生了极大的危害,目前国际上已很少使用;荧光偏振法需要的试剂主要依赖进口且费用极其昂贵,同时需要购置价格昂贵的分析仪器。

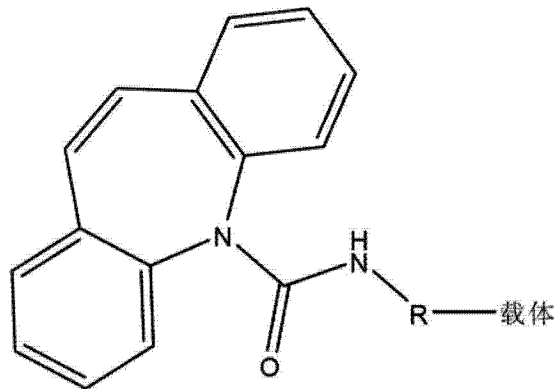
### 发明内容

[0007] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种既安全又可快速、高效、灵敏、准确检测出待测样本中卡马西平含量的检测试剂,以及可以与各种类型的自动生化分析仪联用、对检测人员要求不高的检测方法。

[0008] 为了实现上述目标,本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗卡马西平特异性抗体,用于检测抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物的指示试剂;上述抗卡马西平特异性抗体由卡马西平免疫原免疫动物得到,上述卡马西平免疫原的结构式如式(I)所示:

[0010]



[0011] 式 (I)

[0012] 式中, R 为连接基团,载体具有免疫原性;上述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。

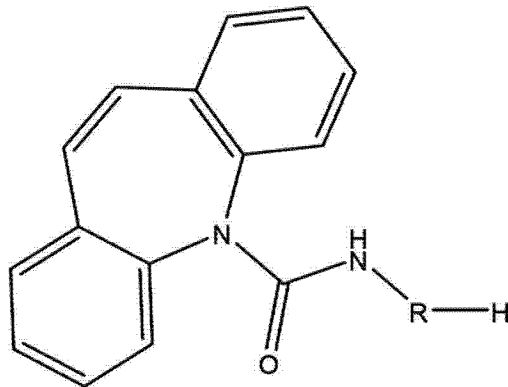
[0013] 前述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述 R 为  $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ , n 为 1 至 20 之间的整数;优选的,上述 R 为  $-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}-$ 。

[0014] 前述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述载体为具有免疫原性的蛋白质,优选的,载体为牛血清白蛋白。

[0015] 前述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0016] 前述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与卡马西平衍生物偶联形成,上述卡马西平衍生物的结构式如式 (II) 所示:

[0017]



[0018] 式 (II)

[0019] 上述 R 为  $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ , n 为 1 至 20 之间的整数。

[0020] 前述的卡马西平均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述 R 为  $-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}-$ 。

[0021] 利用前述的检测试剂检测卡马西平的方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0022] 1) 将待测样本与上述抗卡马西平特异性抗体接触;

[0023] 2) 根据待测样本中卡马西平与上述抗卡马西平特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中卡马西平的含量。

[0024] 前述的检测卡马西平的方法,其特征在于,上述待测样本为生理样本。

[0025] 前述的检测卡马西平的方法,其特征在于,上述生理样本为血清或血浆。

[0026] 本发明的有益之处在于：本发明的卡马西平免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗卡马西平特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见 45 种药物无任何交叉反应；含有上述抗卡马西平特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的卡马西平含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现卡马西平的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

#### 附图说明

[0027] 图 1 是卡马西平均相酶免疫反应标准曲线图；

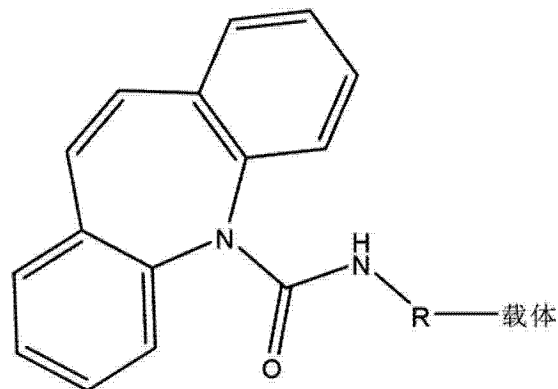
[0028] 图 2 是卡马西平均相酶免疫相关性分析图。

#### 具体实施方式

[0029] 本发明所采取的技术方案是：

[0030] 卡马西平免疫原，其结构式如式 (I) 所示：

[0031]



[0032] 式 (I)

[0033] 式中，R 为连接基团，可以是  $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ ，n 为 1 至 20 之间的整数，特别的，R 为  $-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}-$ ；载体具有免疫原性，优选的，载体为具有免疫原性的蛋白质。虽然其他足够大的具备免疫原性的物质也可以作为载体，但通常情况下选用蛋白质作为载体。最常用的免疫原性载体包括血清蛋白，血蓝蛋白 (KLH) 和甲状腺球蛋白。载体的选择是本领域技术人员的基本常识。

[0034] 一种抗卡马西平特异性抗体，由式 (I) 所示的卡马西平免疫原免疫动物得到。

[0035] 本发明中所指的“抗体”不仅仅指完整的抗体分子，也包括保留完整抗体特异性结合能力的抗体片断或者衍生物。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体，优选为多克隆抗体。

[0036] 获得多克隆抗体的方法是使用式 (I) 所示的卡马西平免疫原，在加或者不加佐剂后，在动物的一个或者多个部位进行免疫，宿主动物包括：兔，山羊，小鼠，绵羊，豚鼠或马。持续免疫一直进行，直至抗体效价达到最高。动物定时采血得到适量的特异抗血清，抗血清可以纯化。

[0037] 单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0038] 一种卡马西平均相酶免疫检测试剂，包括：上述抗卡马西平特异性抗体、用于检测

抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0039] 检测卡马西平的方法,包括以下步骤:

[0040] 1) 将待测样本与上述抗卡马西平特异性抗体接触;

[0041] 2) 根据待测样本中卡马西平与上述抗卡马西平特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中卡马西平的含量。

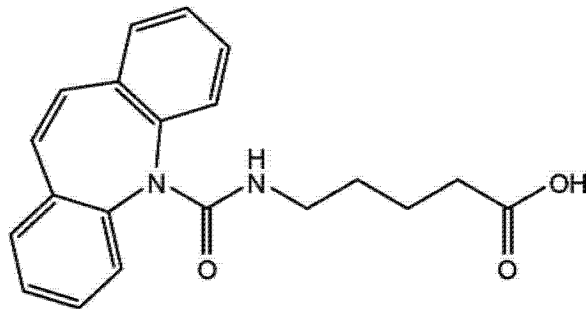
[0042] 待测样本为各种生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0043] 下面结合具体的实施例,进一步说明本发明。

[0044] 实施例一:卡马西平衍生物的合成及其结构确认

[0045] 以下实施例中使用的卡马西平衍生物化学结构如式(IV)所示:

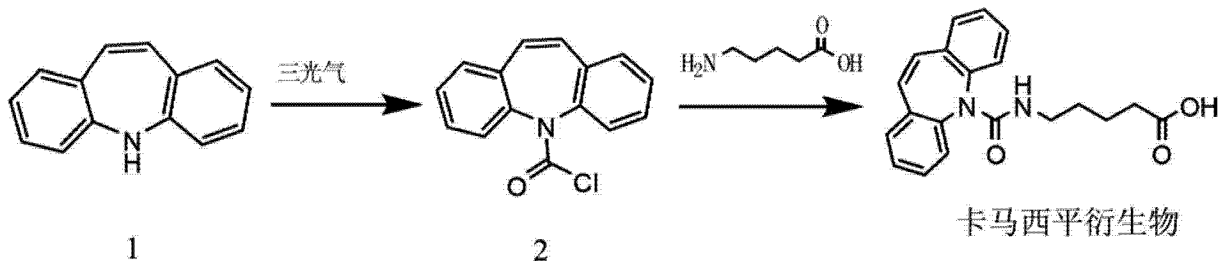
[0046]



[0047] 式(IV)

[0048] 该卡马西平衍生物的合成路线如下:

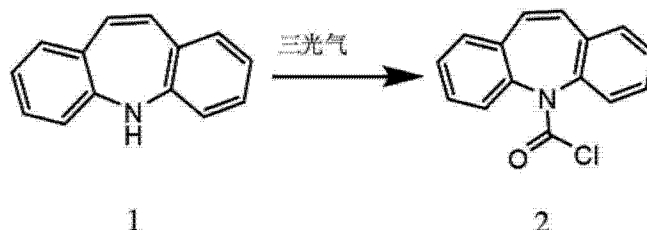
[0049]



[0050] 具体的合成步骤如下:

[0051] 化合物 2 的合成

[0052]



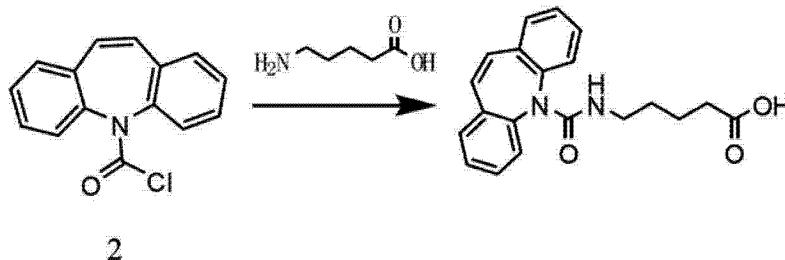
[0053] 1)准确称取 10.0g (51.8mmol)化合物 1 5H-二苯并[b, f]氮杂卓,化合物 1 购于 Sigma 公司;

[0054] 2) 将化合物 1 溶解于 1500mL 二氯甲烷中,加入 5.4g (18.1mmol) 三光气进行处理,再加入 100ml (126.6mmol) 嘧啶,室温搅拌过夜,得到混合物;

[0055] 3) 使用水和卤水冲洗上述混合物,加入  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,真空干燥浓缩并通过硅胶填充的色谱柱进行纯化,流动相采用体积比为 10:1 的石油醚 / 乙酸乙酯混合流动相,最后干燥得到 12.9g 白色固体化合物 2,即 5H-二苯并 [b, f] 氮杂卓 -5- 碳酰氯,产率 95%。

[0056] 卡马西平衍生物的合成

[0057]



[0058] 1) 称取 4.65g (39.6mmol)  $\epsilon$ -氨基戊酸,溶解于 2800mL 甲苯与 120mL 三乙胺的混合溶液中;

[0059] 2) 室温下加入 9.22g (36mmol) 化合物 2,90℃ 搅拌反应过夜;

[0060] 3) 温度降至室温,真空浓缩,加入 500mL 二氯甲烷,用水和卤水冲洗,加入  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,浓缩,得到黄色化合物;

[0061] 4) 将上述黄色化合物用体积比为 1:10 的乙酸乙酯 / 石油醚结晶,干燥后得到 1.636g 白色固体纯化产物,即式 (IV) 所示的卡马西平衍生物,产率 12%。

[0062] 对上述白色固体纯化产物进行结构鉴定

[0063] 1、利用 Bruker Avance III plus400MHz 对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下: $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.39-1.30(m, 4H), 2.14(2H, t,  $J=7.4\text{Hz}$ ), 2.93(2H, q,  $J=6.0\text{Hz}$ ), 5.53(2H, t,  $J=5.6\text{Hz}$ ), 7.00(s, 1H), 7.36-7.48(m, 8H)。表征为式 (IV) 所示的卡马西平衍生物。

[0064] 2、利用色谱 / 质谱技术 (LCMS) 对得到的衍生物进行分析鉴定,采用安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 系列,离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为: Welchrom XB-C18 (50×4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ ),柱温为 30℃,流速为 1.5mL/min,流动相为 95% 水和 5% 乙腈,6min,此条件下最后持续 0.5min。

[0065] LCMS 结果显示:纯度为 98.62%;保留时间 2.682min;分子量 336.4;分子离子 337.2 ( $[\text{M}+1]^+$ )。

[0066] 综合上述结果,可以确定该白色固体化合物为式 (IV) 所示的卡马西平衍生物。

[0067] 类似的,当采用  $\epsilon$ -氨基戊酸的类似物参加反应时,可以得到如式 (IV) 所示的卡马西平衍生物的类似物,其不同之处仅在于  $-\text{CH}_2-$  的个数  $n$  的不同。在此, $\epsilon$ -氨基戊酸及其类似物均记做化合物 A, $n$  取不同值时,添加化合物 A 的量以及得到的卡马西平衍生物的关系见表 1。

[0068] 表 1 不同  $n$  值时需要的化合物质量与收率

|                     |       |       |       |       |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| n 取值                | 1     | 4     | 10    | 20    |
| 化合物 1 质量(g)         | 10    | 10    | 10    | 10    |
| 化合物 2 收率            | 95%   | 95%   | 95%   | 95%   |
| [0069] 化合物 2 质量(g)  | 9.22  | 9.22  | 9.22  | 9.22  |
| 化合物 A 质量(g)         | 2.75  | 4.65  | 8.44  | 14.76 |
| 获得的卡马西平<br>衍生物质量(g) | 2.753 | 1.636 | 1.124 | 0.898 |
| 卡马西平<br>衍生物产率       | 15%   | 12%   | 10%   | 8%    |

[0070] 实施例二 :BSA-卡马西平免疫原的合成

[0071] BSA-卡马西平免疫原由牛血清白蛋白 BSA 与式(II)所示的卡马西平衍生物的  $-(CH_2)_n-COO-$  基团连接而成,在本实施例中,以  $n=4$  为例详细说明该免疫原的合成方法,具体步骤如下:

[0072] 1) 将 20mg BSA 溶解于 5ml 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS) 中,上述溶液置于烧杯 A 中;

[0073] 2) 将如下化学品加入到烧杯 B 中搅拌溶解:20mg 卡马西平衍生物,0.35ml 二甲基酰胺(dimethylformamide, DMF),0.35ml 乙醇,0.7ml 10mM pH5.0 的磷酸钾缓冲液。40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,5mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS),于室温下搅拌溶解,反应 30 分钟;

[0074] 3) 将烧杯 B 中的溶液滴加至烧杯 A 中,得到混合溶液,在  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  下搅拌过夜;将上述搅拌后的混合溶液经过中性磷酸盐缓冲液透析( $4 \times 4\text{L}$ )纯化,得到 BSA-卡马西平免疫原,储存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

[0075] 类似的,  $n$  取  $1 \sim 20$  范围内的其他整数时,用同样的方法可以制备出如式(I)所示的卡马西平免疫原。当然,载体仍为具有免疫原性的蛋白质,可以是血清蛋白,血蓝蛋白(KLH)和甲状腺球蛋白。优选的,载体为牛血清白蛋白。

[0076] 实施例三:抗卡马西平特异性抗体的制备

[0077] 将上述制得的 BSA-卡马西平免疫原采用常规方法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0078] 用 PBS 将上述合成的 BSA-卡马西平免疫原稀释至  $1.0\text{mg/ml}$ ,得到抗原溶液,然后用  $1.0\text{ml}$  抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对家兔进行注射;

[0079]  $2 \sim 3$  周后,再用  $1.0\text{ml}$  相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对家兔注射一次,之后每隔四周一次,共计注射 4 次。

[0080] 对上述实验动物兔取血,分离纯化得到抗卡马西平特异性抗体,经测定,该抗体的效价为  $1:30000$ 。

[0081] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0082] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0083] 1) 称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 准确称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg  $MgCl_2$  (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 pH=9.0。

[0084] 2) 在上述烧杯 C 中加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NADH, 135mg 葡萄糖-6-磷酸 G-6-P 以及 0.75mL 卡必醇 (Carbitol)。

[0085] 3) 在上述烧杯 C 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)。

[0086] 2. 卡马西平衍生物的激活

[0087] 1) 在无水状态下称取 10mg 上述卡马西平衍生物, 溶解于 600  $\mu$ L DMF 中。

[0088] 2) 使上述溶液温度降到  $-2^{\circ}\text{C}$ ~ $-8^{\circ}\text{C}$ 。

[0089] 3) 加入 3  $\mu$ L 三丁胺 (tributylamine)。

[0090] 4) 加入 1.5  $\mu$ L 氯甲酸异丁酯 (isobutylchloroformate)。

[0091] 5)  $-2^{\circ}\text{C}$ ~ $-8^{\circ}\text{C}$  搅拌 30 分钟。

[0092] 3. G6PDH 与卡马西平衍生物的连接

[0093] 1) 将上述激活的卡马西平衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。

[0094] 2)  $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$  搅拌过夜。

[0095] 4. 纯化产物

[0096] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化步骤 3 中的溶液, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于  $2^{\circ}\text{C}$ ~ $8^{\circ}\text{C}$  下储存。

[0097] 实施例五: 卡马西平均相酶免疫检测试剂的制备

[0098] 卡马西平均相酶免疫检测试剂, 包括: 上述抗卡马西平特异性抗体, 用于检测抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的, 指示试剂为酶试剂, 包括: 酶标偶联物和酶的底物。其中, 酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物, 其通过上述化学合成方法得到。

[0099] 卡马西平均相酶免疫检测试剂在使用之前, 为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应, 酶标偶联物和酶的底物是分开放置的, 不混合, 所以将酶的底物与上述抗卡马西平特异性抗体混合在一起。也就是说, 卡马西平均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂, 具体如下:

[0100] 1. 试剂 A 的制备: 将 4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸 G6P 置于烧杯 D 中, 用 1L 55mM、pH=8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物; 将上述制备的抗卡马西平特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗体与均相酶底物的体积比可以为 1:100 ~ 1:10000, 在本实施例中具体的比例为 1:2000。

[0101] 2. 试剂 B 的制备: 将上述制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到 120mM、pH=8.2 的 Tris 缓冲液中, 上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比可以为 1:100 ~ 1:10000, 在本实施例中具体的比例为 1:1500。

[0102] 利用上述的均相酶免疫检测试剂检测卡马西平的方法, 包括以下步骤:

[0103] 1) 将待测样本与上述抗卡马西平特异性抗体接触;

[0104] 2) 根据待测样本中卡马西平与上述抗卡马西平特异性抗体的结合情况, 利用指示试剂判断待测样本中卡马西平的含量。

[0105] 具体的,检测时,将待测样本加到试剂 A 中,待测样本中的卡马西平与试剂 A 中的抗卡马西平特异性抗体发生特异性结合,生成抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物;再加入试剂 B,此时试剂 B 中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与试剂 A 中的酶的底物混合、接触,发生酶促反应,构成检测抗卡马西平特异性抗体-卡马西平复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中卡马西平与上述抗卡马西平特异性抗体的结合情况判断待测样本中卡马西平的含量。

[0106] 由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与待测样本中的卡马西平竞争性结合抗卡马西平特异性抗体,所以,待测样本中卡马西平的量越多,均相酶溶液中游离的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的量越多,酶促反应快,导致 OD<sub>340</sub> 上升。

[0107] 上述待测样本为生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等。

[0108] 作为一种优选的方案,上述待测样本为血清或血浆。

[0109] 实施例六:卡马西平均相酶免疫检验

[0110] 1、获得标准曲线:设置迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数(见表 2),操作过程为:先加试剂 A,再加入标准品,最后加入试剂 B。加入试剂 B 后,测定不同时间点的 OD<sub>340</sub> 吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂 A 和试剂 B 的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图 1 所示。

[0111] 表 2 迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数

[0112]

| 迈瑞 BS-200 参数 |                                   |
|--------------|-----------------------------------|
| 项目名称         | 卡马西平                              |
| 试剂 1         | 150 μl                            |
| 试剂 2         | 150 μl                            |
| 样本量          | 10 μl                             |
| 分析方法         | 动力学方法                             |
| 主波长          | 340                               |
| 次波长          | 405                               |
| 反应时间         | 10 - 20                           |
| 孵育时间         | 5                                 |
| 反应方向         | 上升                                |
| 结果           | mg/L                              |
| 结果精度         | 0.01                              |
| 定标方法         | Logistic-Log 5P                   |
| 标准品浓度        | 0.0, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20 μg/mL |

[0113] 通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本 10 次,上述质控样本为:将卡马西平标准品溶解于人血清或血浆中,至浓度分别为 1.75, 3.75, 15.0 μg/ml。检测数据及数据分析见表 3。

[0114] 表 3 样品测定及精密度和回收率评估

[0115]

| 血液样品                      | 低    | 中    | 高     |
|---------------------------|------|------|-------|
| 样品浓度 ( $\mu\text{l/ml}$ ) | 1.75 | 3.75 | 15.0  |
| 1                         | 1.68 | 3.46 | 14.90 |
| 2                         | 1.80 | 3.43 | 15.46 |
| 3                         | 1.77 | 3.57 | 15.12 |
| 4                         | 1.76 | 3.67 | 14.39 |
| 5                         | 1.76 | 3.71 | 15.05 |
| 6                         | 1.76 | 3.47 | 15.57 |
| 7                         | 1.76 | 3.55 | 15.25 |
| 8                         | 1.74 | 3.58 | 15.10 |
| 9                         | 1.76 | 3.76 | 14.81 |
| 10                        | 1.75 | 3.64 | 15.11 |

[0116]

|                          |        |        |        |
|--------------------------|--------|--------|--------|
| 平均值 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1.75   | 3.58   | 15.08  |
| 标准差 (SD)                 | 0.0303 | 0.1110 | 0.3160 |
| 精密度 (CV%)                | 1.73   | 3.10   | 2.10   |
| 回收率%                     | 100.0  | 95.5   | 100.5  |

[0117] 检测结果：本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率达到95% -105%，精密度高，CV均低于4%。

[0118] 实施例七：药物干扰试验

[0119] 选取45种常用药物，调整其浓度为 $10.0\mu\text{g/ml}$ ，进行干扰试验测定，常见的45种药物及测定数据参见表4。

[0120] 表4 常见干扰药物及测定结果

[0121]

| ID# | 化合物名称  | 等价于苯巴比妥的浓度 (µg/ml) | ID# | 化合物名称  | 等价于苯巴比妥的浓度 (µg/ml) |
|-----|--------|--------------------|-----|--------|--------------------|
| 1   | 阿司匹林   | 0.0                | 24  | 苯丙醇胺   | 0.0                |
| 2   | β-苯基乙胺 | 0.0                | 25  | 普鲁卡因胺  | 0.0                |
| 3   | 安非他命   | 0.0                | 26  | 普鲁卡因   | 0.0                |
| 4   | 氨苄青霉素  | 0.0                | 27  | 奎尼丁    | 0.0                |
| 5   | 甲氨二氮卓  | 0.0                | 28  | 佐美酸    | 0.0                |
| 6   | 氯丙嗪    | 0.0                | 29  | 苯肾上腺素  | 0.0                |
| 7   | 氯拉卓酸   | 0.0                | 30  | 桂皮酰艾克宁 | 0.0                |
| 8   | 二甲苯氧庚酸 | 0.0                | 31  | 芽子碱    | 0.0                |
| 9   | 非诺洛芬   | 0.0                | 32  | 地西洋    | 0.0                |
| 10  | 甲基苯丙胺  | 0.0                | 33  | 可替宁    | 0.0                |
| 11  | 龙胆酸    | 0.0                | 34  | 阿替洛尔   | 0.0                |
| 12  | 吉非贝齐   | 0.0                | 35  | 心得安    | 0.0                |
| 13  | 氢可酮    | 0.0                | 36  | 苯乙哌啶酮  | 0.0                |
| 14  | 布洛芬    | 0.0                | 37  | 苯基丁氮酮  | 0.0                |

[0122]

| ID# | 化合物名称  | 等价于苯巴比妥的浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | ID# | 化合物名称    | 等价于苯巴比妥的浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----|--------|---------------------------------|-----|----------|---------------------------------|
| 15  | 丙咪嗪    | 0.0                             | 38  | 麦角酸二乙基酰胺 | 0.0                             |
| 16  | 二氨基二苯砒 | 0.0                             | 39  | 大麻酚      | 0.0                             |
| 17  | 萘普生    | 0.0                             | 40  | 洛哌丁胺     | 0.0                             |
| 18  | 氢氯噻嗪   | 0.0                             | 41  | 异克舒令     | 0.0                             |
| 19  | 哌替啶    | 0.0                             | 42  | 苯基丙氨酸    | 0.0                             |
| 20  | 烯丙羟吗啡酮 | 0.0                             | 43  | 盐酸氟西汀    | 0.0                             |
| 21  | 麻黄素    | 0.0                             | 44  | 柳丁氨醇     | 0.0                             |
| 22  | 烟酰胺    | 0.0                             | 45  | 青霉素      | 0.0                             |
| 23  | 甲胺咪硫   | 0.0                             |     |          |                                 |

[0123] 检测结果:均小于  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。可见,本发明的抗体是抗卡马西平的特异性抗体。

[0124] 实施例八:相关性分析

[0125] 对包括 66 例阳性标本和 17 例阴性标本在内的 83 例临床标本分别使用雅培的荧光偏振法和本发明的均相酶免疫法进行相关性分析,测定的数据参见表 5。

[0126] 表 5 真实样本测定值

[0127]

| 样本号 | 均相酶免疫法测定值 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 荧光偏振法测定值 ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|
| 1   | 6.61                           | 7.05                          |
| 2   | 5.99                           | 6.30                          |
| 3   | 4.85                           | 5.05                          |
| 4   | 1.84                           | 2.10                          |
| 5   | 5.12                           | 5.33                          |
| 6   | 6.02                           | 5.34                          |
| 7   | 10.79                          | 10.76                         |
| 8   | 8.11                           | 7.72                          |
| 9   | 7.17                           | 7.31                          |

[0128]

|    |       |       |
|----|-------|-------|
| 10 | 6.35  | 6.67  |
| 11 | 2.28  | 2.70  |
| 12 | 7.22  | 7.81  |
| 13 | 11.49 | 12.14 |
| 14 | 17.06 | 16.07 |
| 15 | 5.99  | 6.20  |
| 16 | 7.34  | 7.85  |
| 17 | 7.17  | 6.79  |
| 18 | 6.09  | 5.78  |
| 19 | 4.76  | 4.72  |
| 20 | 7.28  | 7.25  |
| 21 | 15.56 | 15.52 |
| 22 | 13.26 | 12.40 |
| 23 | 3.88  | 4.09  |
| 24 | 3.88  | 4.07  |
| 25 | 0.88  | 0.98  |
| 26 | 7.40  | 6.86  |
| 27 | 4.33  | 5.09  |
| 28 | 17.97 | 18.49 |
| 29 | 6.33  | 5.82  |
| 30 | 6.65  | 6.38  |
| 31 | 7.29  | 7.15  |
| 32 | 5.07  | 4.89  |
| 33 | 8.12  | 7.46  |
| 34 | 2.94  | 2.90  |
| 35 | 4.83  | 4.67  |
| 36 | 4.75  | 4.52  |
| 37 | 9.88  | 9.50  |
| 38 | 6.98  | 6.70  |
| 39 | 4.59  | 4.55  |
| 40 | 4.63  | 4.73  |
| 41 | 4.31  | 4.08  |
| 42 | 9.19  | 9.59  |
| 43 | 6.13  | 5.93  |
| 44 | 3.70  | 3.79  |
| 45 | 4.46  | 4.16  |
| 46 | 6.42  | 5.93  |
| 47 | 8.41  | 8.67  |
| 48 | 7.49  | 6.70  |
| 49 | 5.71  | 5.71  |
| 50 | 9.41  | 9.72  |
| 51 | 4.79  | 4.61  |
| 52 | 5.25  | 4.99  |

[0129]

|    |       |       |
|----|-------|-------|
| 53 | 6.54  | 6.14  |
| 54 | 7.04  | 6.61  |
| 55 | 6.15  | 5.92  |
| 56 | 10.69 | 11.72 |
| 57 | 10.86 | 11.33 |
| 58 | 12.96 | 13.00 |
| 59 | 11.26 | 11.07 |
| 60 | 25.07 | 25.91 |
| 61 | 12.30 | 11.19 |
| 62 | 15.38 | 14.29 |
| 63 | 18.20 | 17.66 |
| 64 | 18.58 | 18.16 |
| 65 | 14.35 | 15.09 |
| 66 | 0.34  | 0.00  |
| 67 | 0.00  | 0.00  |
| 68 | 0.00  | 0.00  |
| 69 | 0.00  | 0.00  |
| 70 | 0.00  | 0.00  |
| 71 | 0.00  | 0.00  |
| 72 | 0.00  | 0.00  |
| 73 | 0.00  | 0.00  |
| 74 | 0.00  | 0.00  |
| 75 | 0.00  | 0.00  |
| 76 | 0.00  | 0.00  |
| 77 | 0.00  | 0.00  |
| 78 | 0.00  | 0.00  |
| 79 | 0.01  | 0.00  |
| 80 | 0.00  | 0.00  |
| 81 | 0.00  | 0.00  |
| 82 | 0.00  | 0.00  |
| 83 | 0.00  | 0.00  |

[0130] 对上述数据作图,参见图2,得到的线性方程为: $y=0.9947x-0.0154$ ,相关系数 $R^2=0.9938$ ,表明本发明的检测试剂测定的卡马西平临床标本准确度高。

[0131] 由于本发明的检测过程是由仪器全自动化完成,所以对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用。

[0132] 需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

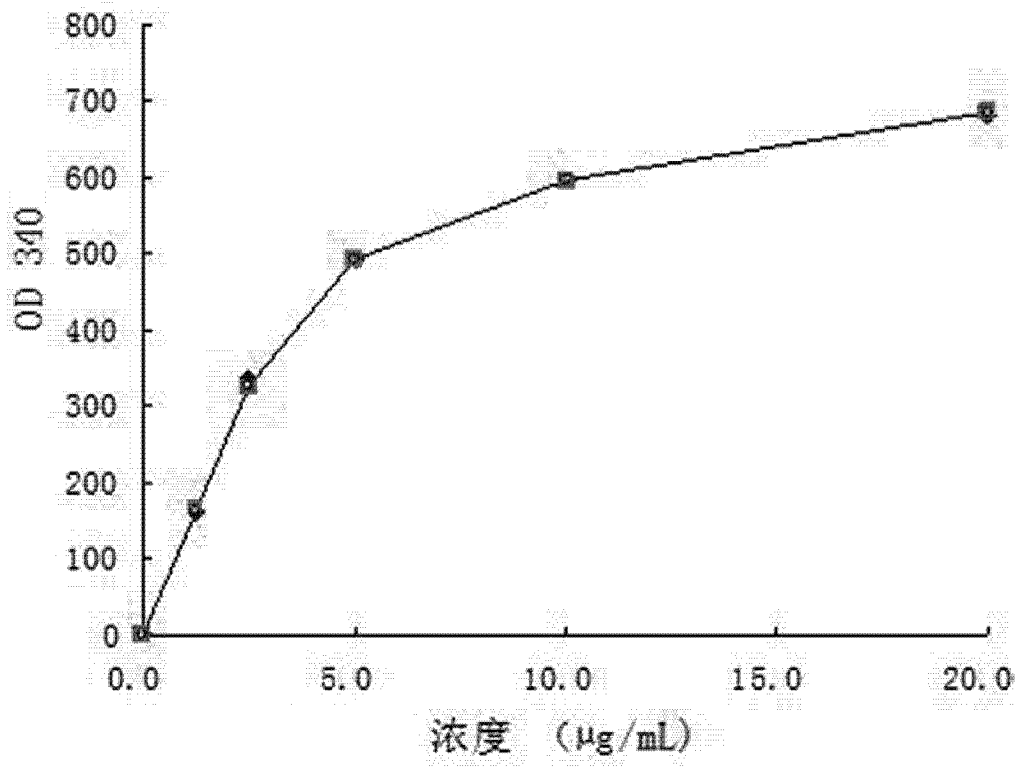


图 1

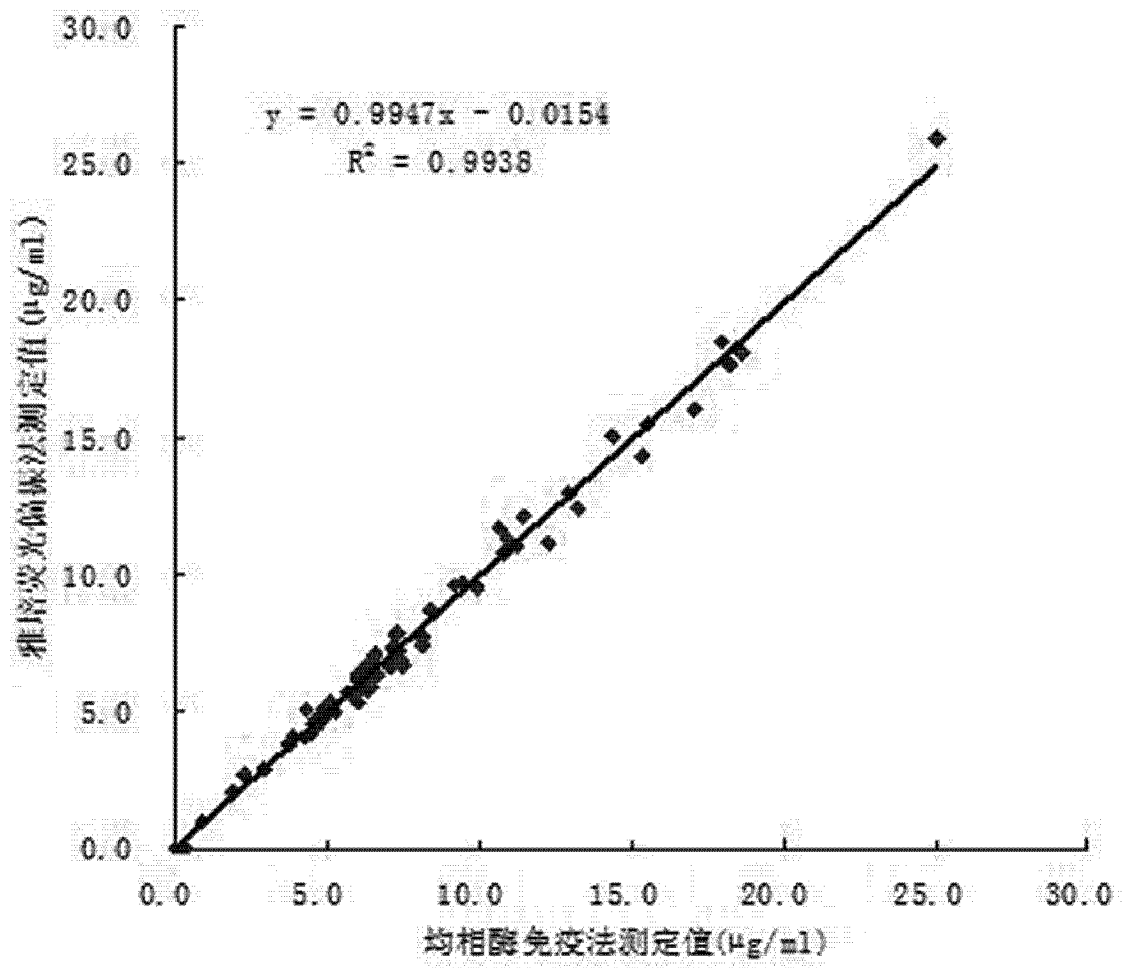


图 2

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种卡马西平均相酶免疫检测试剂及其检测方法                          |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102768284A</a>                   | 公开(公告)日 | 2012-11-07 |
| 申请号            | CN201210272607.6                               | 申请日     | 2012-08-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 苏州博源医疗科技有限公司                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 苏州博源医疗科技有限公司                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 苏州博源医疗科技有限公司                                   |         |            |
| [标]发明人         | 虞留明<br>田军<br>蔡江丽                               |         |            |
| 发明人            | 虞留明<br>田军<br>蔡江丽                               |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/96 G01N33/531                           |         |            |
| 代理人(译)         | 董建林  |         |            |
| 其他公开文献         | CN102768284B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明公开了一种卡马西平免疫原、由此免疫原直接得到的卡马西平特异性抗体、含有上述特异性抗体的检测试剂以及检测待测样本中卡马西平含量的方法。本发明的有益之处在于：本发明的卡马西平免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗卡马西平特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见45种药物无任何交叉反应；含有上述抗卡马西平特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的卡马西平含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现卡马西平的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

