



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569373 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510039620. 0

(22) 申请日 2015. 01. 27

(71) 申请人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路 8 号

(72) 发明人 虞留明 卢忠心 胡瑜 娄金丽
成志鹏

(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 33/531(2006. 01)

G01N 33/544(2006. 01)

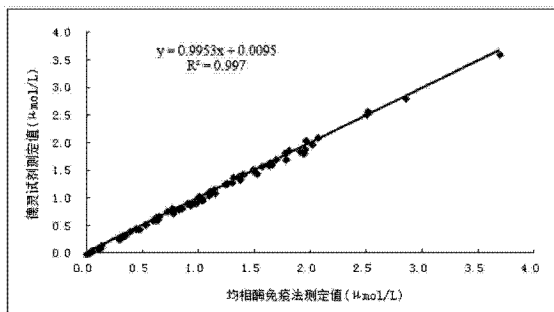
权利要求书5页 说明书20页 附图1页

(54) 发明名称

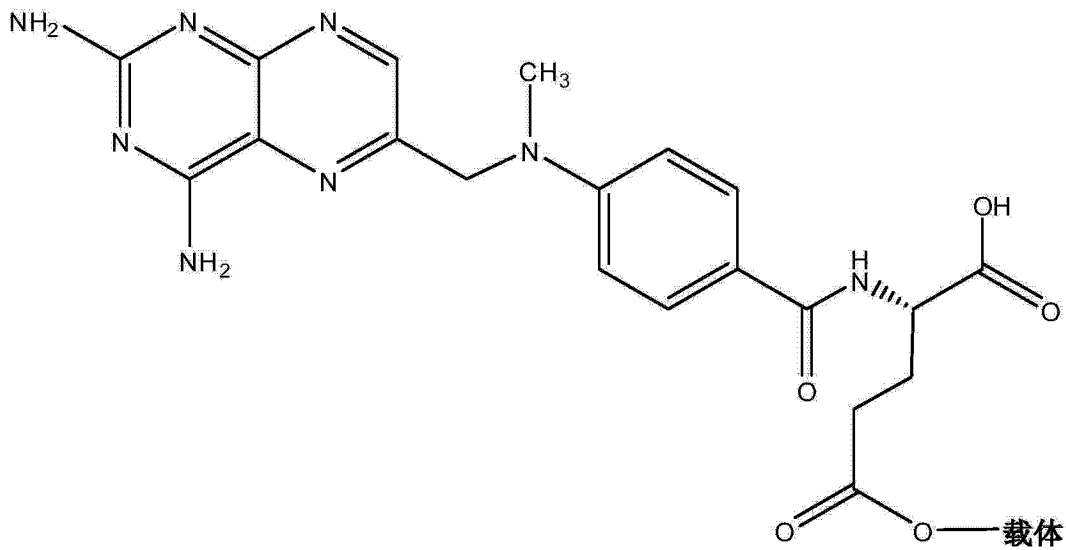
一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种甲氨蝶呤检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法,包括:抗甲氨蝶呤特异性抗体、用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂;上述抗甲氨蝶呤特异性抗体由甲氨蝶呤免疫原免疫动物得到。本发明的有益之处在于:本发明的甲氨蝶呤免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗甲氨蝶呤特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的 62 种药物无任何交叉反应;含有上述抗甲氨蝶呤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甲氨蝶呤含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现甲氨蝶呤的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率有了较大的提高。



1. 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 包括: 抗甲氨蝶呤特异性抗体、用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂; 上述抗甲氨蝶呤特异性抗体由甲氨蝶呤免疫原免疫动物得到, 甲氨蝶呤免疫原的结构式如式 (I) 所示:

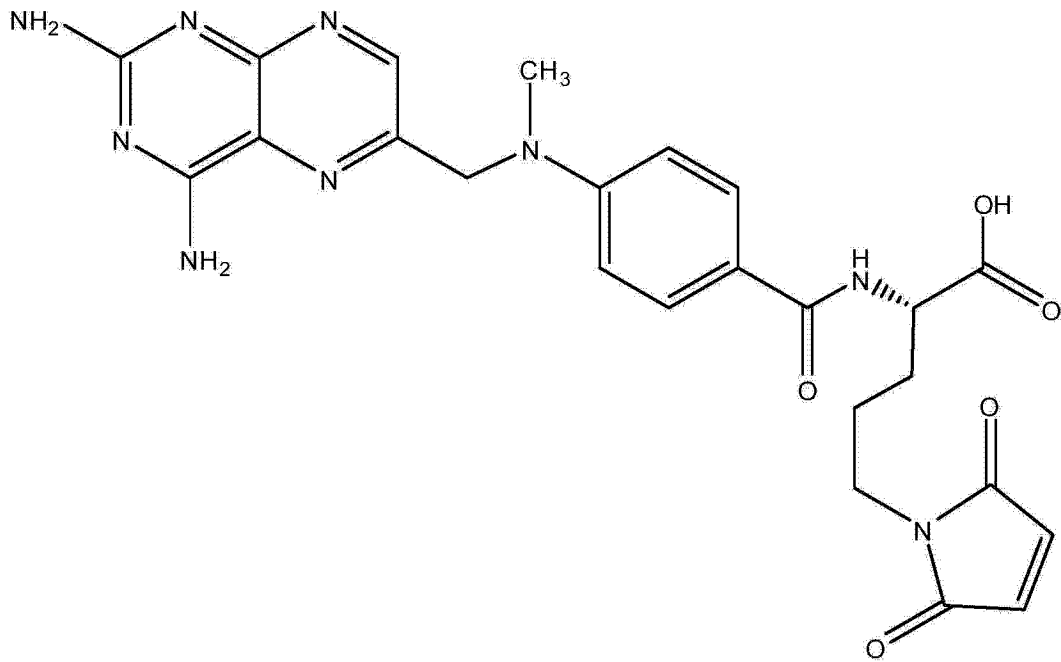


式 (I)

式中, 载体为具有免疫原性的蛋白质; 上述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

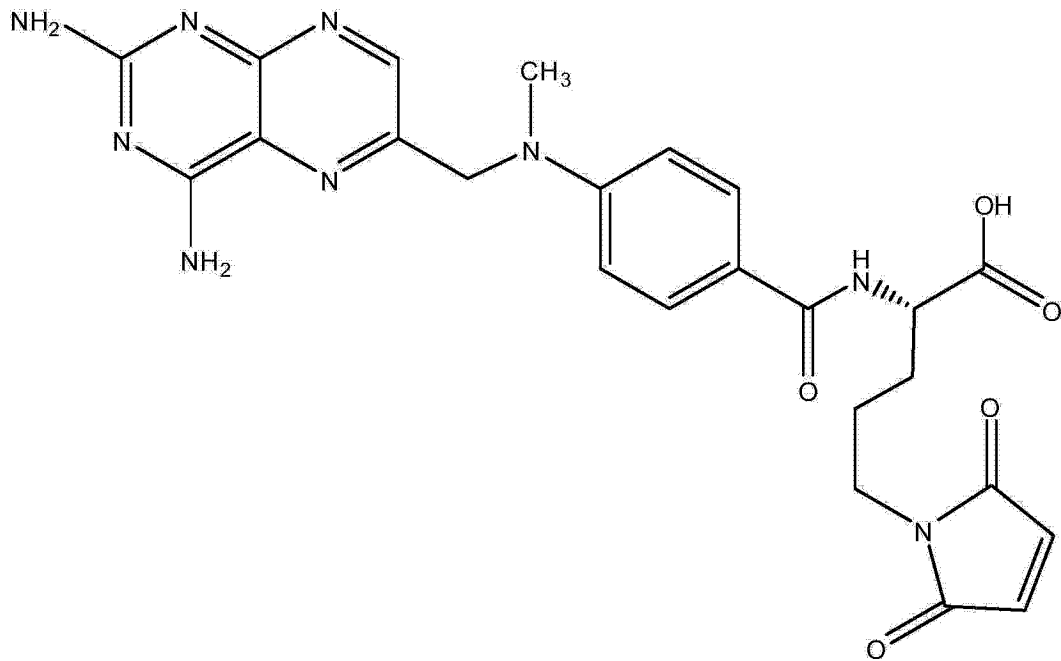
2. 根据权利要求 1 所述的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 上述指示试剂选自酶试剂, 包括: 酶标偶联物和酶的底物; 上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物; 上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸; 所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤衍生物反应形成。

3. 根据权利要求 2 所述的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 上述甲氨蝶呤衍生物的结构式如式 (II) 所示:



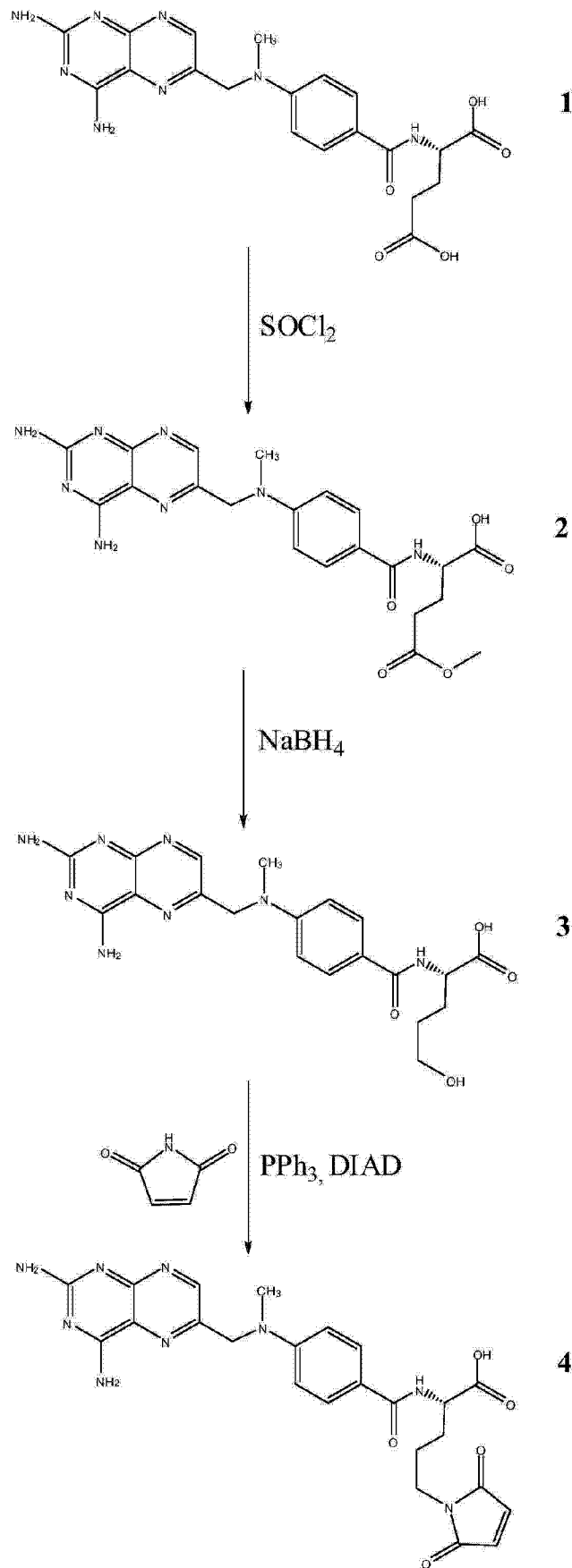
式 (II)

4. 甲氨蝶呤衍生物, 结构式如式 (II) 所示:



式 (II)

5. 根据权利要求 4 所述的甲氨蝶呤衍生物, 其特征在于, 其合成路线为:



6. 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 权利要求 4 或 5 所述的甲氨蝶呤衍生物的合成与纯化,并进行结构鉴定;

(2) 甲氨蝶呤免疫原的合成:使甲氨蝶呤衍生物的末端羧基与具有免疫原性的蛋白质载体连接;

(3) 用甲氨蝶呤免疫原免疫动物,制备并纯化抗甲氨蝶呤特异性抗体;

(4) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备:制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液,制备甲氨蝶呤衍生物溶液,使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤的末端羧基连接,纯化连接产物;

(5) 甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂 A 的制备:由抗甲氨蝶呤特异性抗体和均相酶底物混合而成;试剂 B 的制备:由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与 Tris 缓冲液混合而成。

7. 根据权利要求 6 所述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤 (2) 中,蛋白质载体为 BSA,具体合成步骤如下:

a. 称取 2.72g 磷酸二氢钾、4.26g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁,共同溶解于 1L 去离子水中,调节 pH 至 7.4,制成缓冲溶液 A;

b. 称取 3mg BSA,室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 A 中,制成 BSA 溶液;

c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物,溶解于 300 μ l 上述缓冲溶液 A 中,制成甲氨蝶呤衍生物溶液;

d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述 BSA 溶液中,然后将此混合溶液在 2-8 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时;

e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 A 进行透析,透析后所得溶液即为甲氨蝶呤免疫原溶液,在甲氨蝶呤免疫原溶液中加入质量分数 0.1% 的 NaN_3 ,于 -20 $^{\circ}$ C 下储存。

8. 根据权利要求 6 所述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤 (4) 具体过程为:

a. 称取 1.09g 磷酸二氢钾、1.70g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁,共同溶解于 1L 去离子水中,调节 pH 至 7.4,制成缓冲溶液 B;

b. 称取 3mg 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 B 中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物,溶解于 300 μ l 上述缓冲溶液 B 中,制成甲氨蝶呤衍生物溶液;

d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在 2-8 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时;

e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 B 进行透析,透析后所得溶液即为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液中加入质量分数 0.5% 的 BSA 和质量分数 0.1% 的 NaN_3 ,于 2-8 $^{\circ}$ C 下储存。

9. 根据权利要求 6 所述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤 (5) 的具体过程如下:

试剂 A 的制备:将 4.036g 11.25mM 的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、1.711g 11.25mM 的葡萄糖-6-磷酸用 1L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物;将制备的抗甲氨蝶呤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为 1:100 ~ 1:10000;

试剂 B 的制备 : 将制备的葡萄糖 -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 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000。

10. 利用权利要求 1 至 3 任意一项所述的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

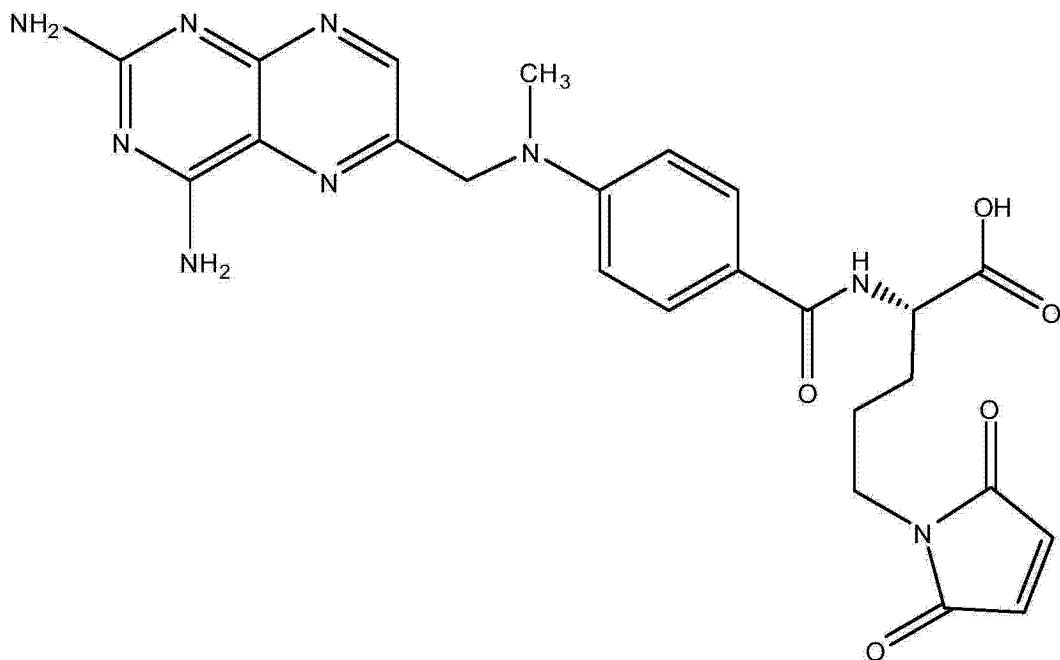
(1) 将待测样本与抗甲氨蝶呤特异性抗体接触;

(2) 根据待测样本中甲氨蝶呤与抗甲氨蝶呤特异性抗体的结合情况, 利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量;

所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液;

上述酶试剂包括: 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;

上述葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原酶标偶联物由葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤衍生物反应形成, 上述甲氨蝶呤衍生物的结构式如式 (II) 所示:



式 (II)

一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法

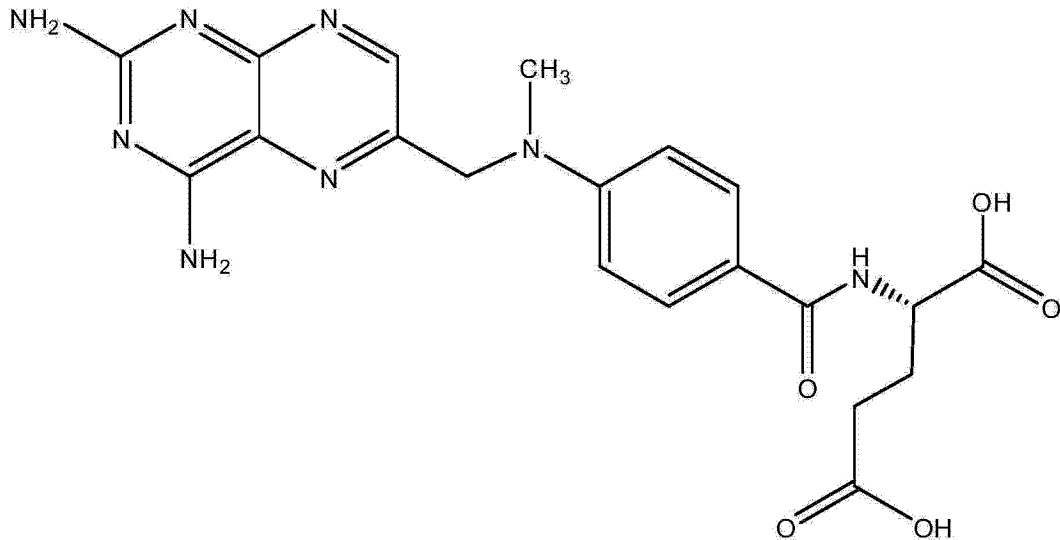
技术领域

[0001] 本发明涉及一种甲氨蝶呤检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 甲氨蝶呤 (Methotrexate) 结构式如式 (III) 所示:

[0003]



式 (III)

[0004] 甲氨蝶呤是一种叶酸还原酶抑制剂,为抗叶酸类抗肿瘤药物,主要通过抑制二氢叶酸还原酶的抑制作用阻碍肿瘤细胞 DNA 的合成,从而抑制肿瘤细胞的生长和繁殖。其选择性地作用于 S 期,属于细胞周期特异性药物。临床上在急性白血病 (尤其是急性淋巴细胞性白血病)、绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎等方面治疗效果较好。对头颈部肿瘤、乳腺癌、肺癌及盆腔肿瘤均有一定疗效,也可与其他药物联合治疗 Burkitts 淋巴瘤,晚期淋巴瘤 (III 和 IV 期, Peter 氏阶段系统) 和晚期蕈样真菌病。甲氨蝶呤安全范围窄,服药后人体代谢和排泄的个体化差异大,低于其有效血药浓度无法抑制肿瘤生长,高于其有效血药浓度则会引起胃肠道反应、肝硬化、肾脏损害等副作用。该药细胞毒性较大,不良反应较多,应密切监测患者血药浓度,做到个体化给药。因此,对服用甲氨蝶呤的患者进行血药浓度监测,对减少不良反应及指导临床个体化安全用药具有重要意义。

[0005] 目前,测定甲氨蝶呤的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、荧光偏振免疫分析法 (FPIA) 等, HPLC 法操作繁琐,主要用于实验室分析, FPIA 法需要配备昂贵的专用仪器,成本较高。因此,这些方法在临床应用上都具有一定的缺陷性。国外厂家虽然已有可应用于生化分析仪的甲氨蝶呤测定试剂盒上市,但产品数量远不能满足临床需求。目前市场上仍缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的甲氨蝶呤检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的甲氨

蝶呤测定试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。本发明的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对甲氨蝶呤的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低甲氨蝶呤检测成本,有利于临床推广使用。

发明内容

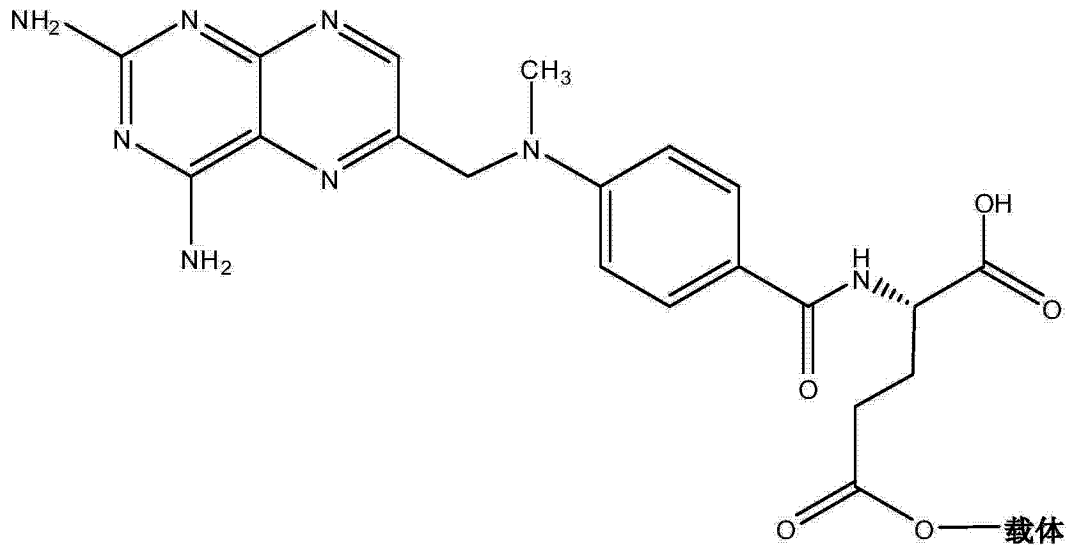
[0006] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种既安全又可快速、高效、灵敏、准确检测出待测样本中甲氨蝶呤含量的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备方法,以及可以与各种类型的自动生化分析仪联用、对检测人员要求不高的甲氨蝶呤均相酶免疫检测方法。

[0007] 本发明的另一个目的为提供一种有助于制备快速准确地测定甲氨蝶呤含量的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的甲氨蝶呤衍生物。

[0008] 为了实现上述目标,本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗甲氨蝶呤特异性抗体、用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂;上述抗甲氨蝶呤特异性抗体由甲氨蝶呤免疫原免疫动物得到,甲氨蝶呤免疫原的结构式如式(I)所示:

[0010]



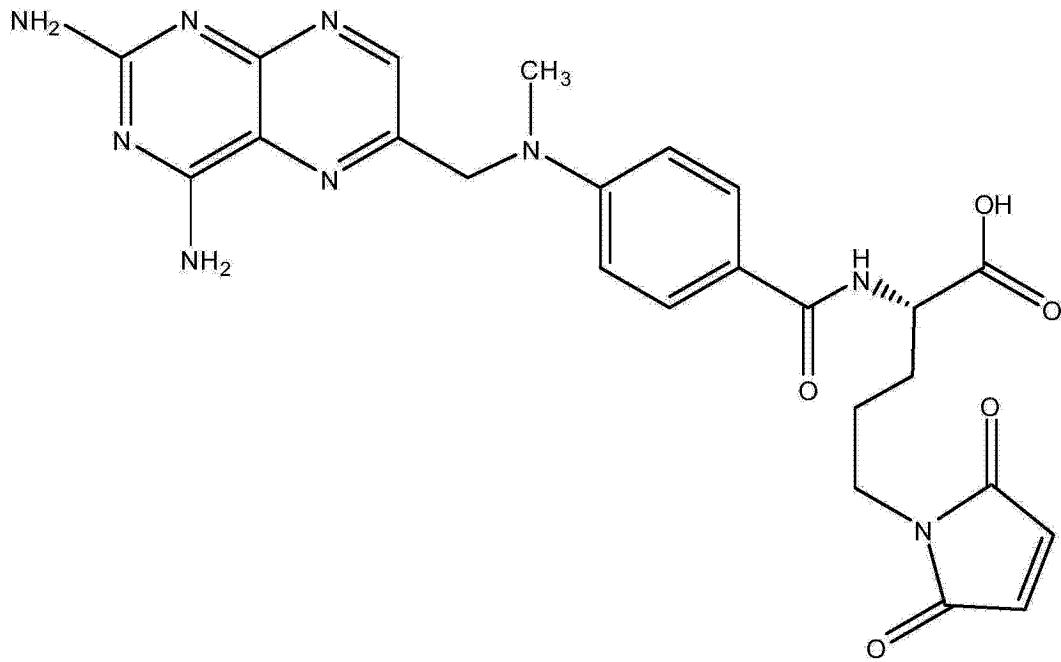
式(I)

[0011] 式中,载体为具有免疫原性的蛋白质,优选为血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白;上述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

[0012] 前述的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂,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。

[0013] 前述的甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂,上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤衍生物反应形成,上述甲氨蝶呤衍生物的结构式如式(II)所示:

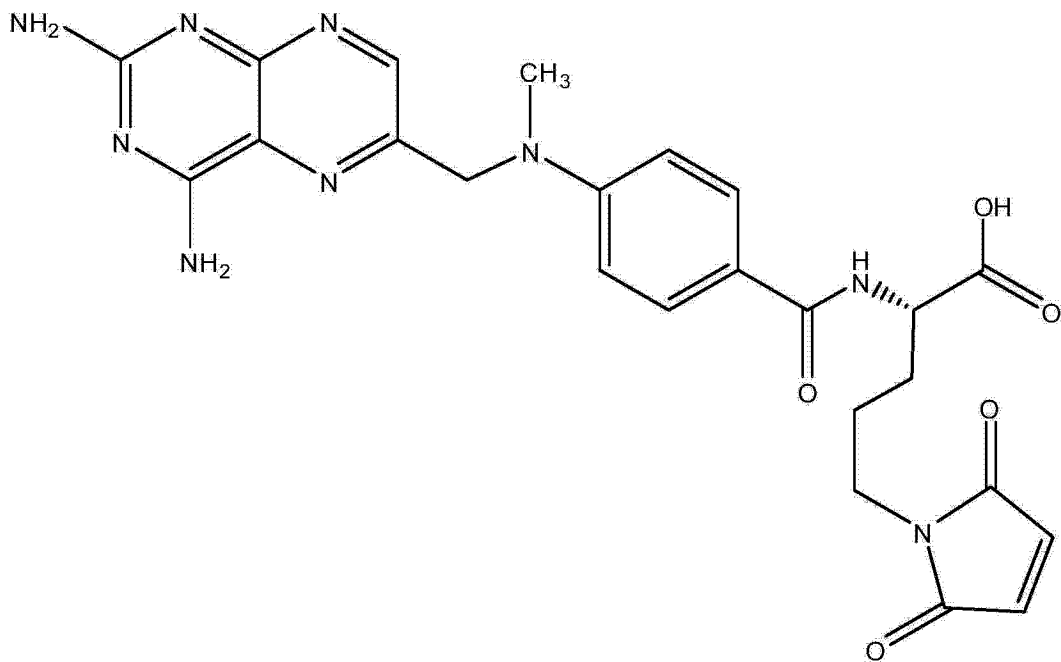
[0014]



式 (II)

[0015] 甲氨蝶呤衍生物, 结构式如式 (II) 所示:

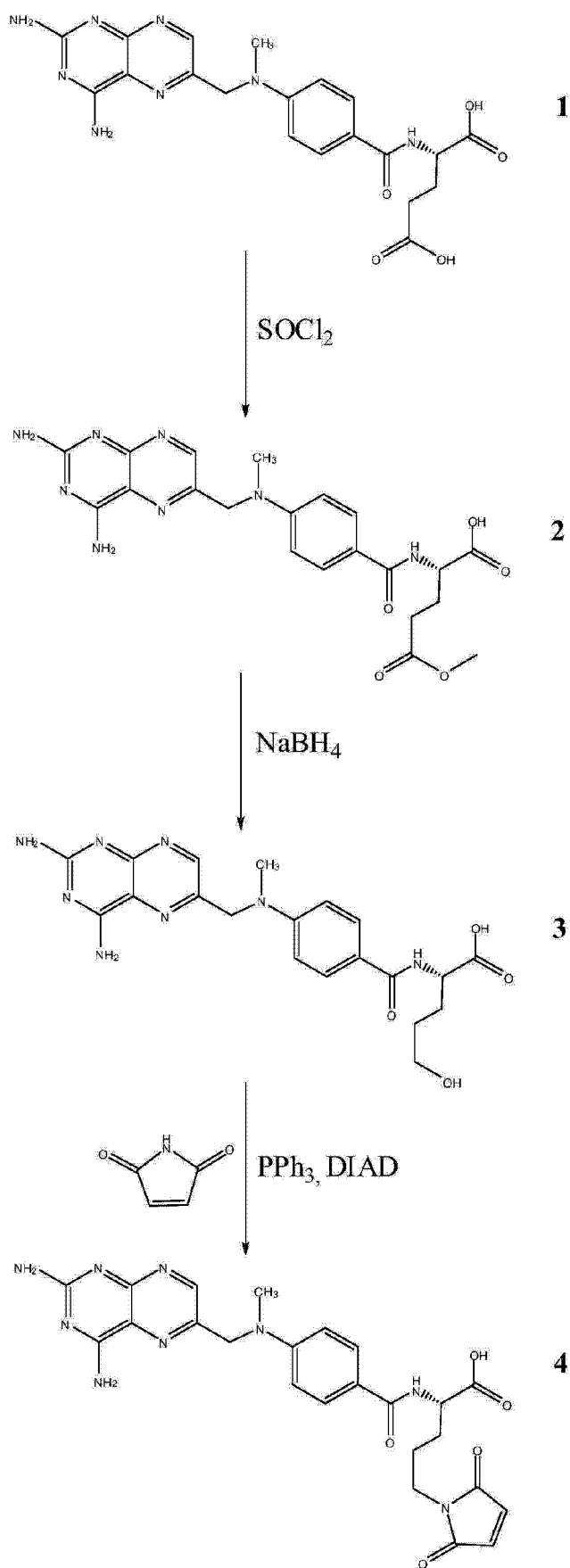
[0016]



式 (II)

[0017] 其合成路线为:

[0018]



[0019] 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0020] (1) 甲氨蝶呤衍生物的合成与纯化,并进行结构鉴定;

[0021] (2) 甲氨蝶呤免疫原的合成:使甲氨蝶呤的末端羧基与具有免疫原性的蛋白质载体连接;

[0022] (3) 用甲氨蝶呤免疫原免疫动物,制备并纯化抗甲氨蝶呤特异性抗体;

[0023] (4) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备:制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液,制备甲氨蝶呤衍生物溶液,使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤的末端羧基连接,纯化连接产物;

[0024] (5) 甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备:

[0025] 试剂 A 的制备:由抗甲氨蝶呤特异性抗体和均相酶底物混合而成;试剂 B 的制备:由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与 Tris 缓冲液混合而成。

[0026] 前述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,所述的步骤(2)中,蛋白质载体为 BSA,具体合成步骤如下:

[0027] a. 称取 2.72g 磷酸二氢钾、4.26g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁,共同溶解于 1L 去离子水中,调节 pH 至 7.4,制成缓冲溶液 A;

[0028] b. 称取 3mg BSA,室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 A 中,制成 BSA 溶液;

[0029] c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物,溶解于 300ul 上述缓冲溶液 A 中,制成甲氨蝶呤衍生物溶液;

[0030] d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述 BSA 溶液中,然后将此混合溶液在 2-8°C 下搅拌 1 小时;

[0031] e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 A 进行透析,透析后所得溶液即为甲氨蝶呤免疫原溶液,在甲氨蝶呤免疫原溶液中加入质量分数 0.1% 的 NaN_3 ,于 -20°C 下储存。

[0032] 前述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,所述的步骤(4)具体过程为:

[0033] a. 称取 1.09g 磷酸二氢钾、1.70g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁,共同溶解于 1L 去离子水中,调节 pH 至 7.4,制成缓冲溶液 B;

[0034] b. 称取 3mg 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 B 中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0035] c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物,溶解于 300ul 上述缓冲溶液 B 中,制成甲氨蝶呤衍生物溶液;

[0036] d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在 2-8°C 下搅拌 1 小时;

[0037] e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 B 进行透析,透析后所得溶液即为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液,在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物溶液中加入质量分数 0.5% 的 BSA 和质量分数 0.1% 的 NaN_3 ,于 2-8°C 下储存。

[0038] 前述的一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备方法,步骤(5)的具体过程如下:

[0039] 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 (G-6-P) 用 1L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物;将制备的抗甲氨蝶呤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为 1:100 ~ 1:10000;

[0040] 试剂B的制备:将制备的葡萄糖-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缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0041] 利用甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0042] 1) 将待测样本与抗甲氨蝶呤特异性抗体接触;

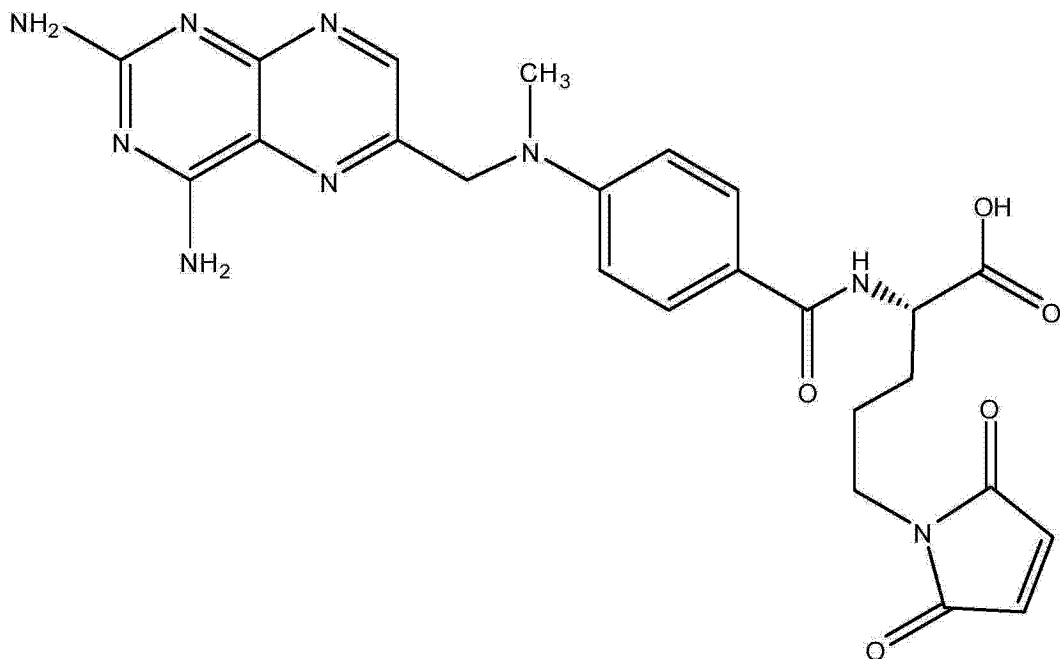
[0043] 2) 根据待测样本中甲氨蝶呤与抗甲氨蝶呤特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量;

[0044] 所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0045] 上述酶试剂包括: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;

[0046] 上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甲氨蝶呤衍生物反应形成,上述甲氨蝶呤衍生物的结构式如式(II)所示:

[0047]



式(II)

[0048] 本发明的有益之处在于:本发明的甲氨蝶呤免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗甲氨蝶呤特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的62种药物无任何交叉反应;含有上述抗甲氨蝶呤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甲氨蝶呤含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现甲氨蝶呤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

[0049] 图1是甲氨蝶呤均相酶免疫反应标准曲线图;

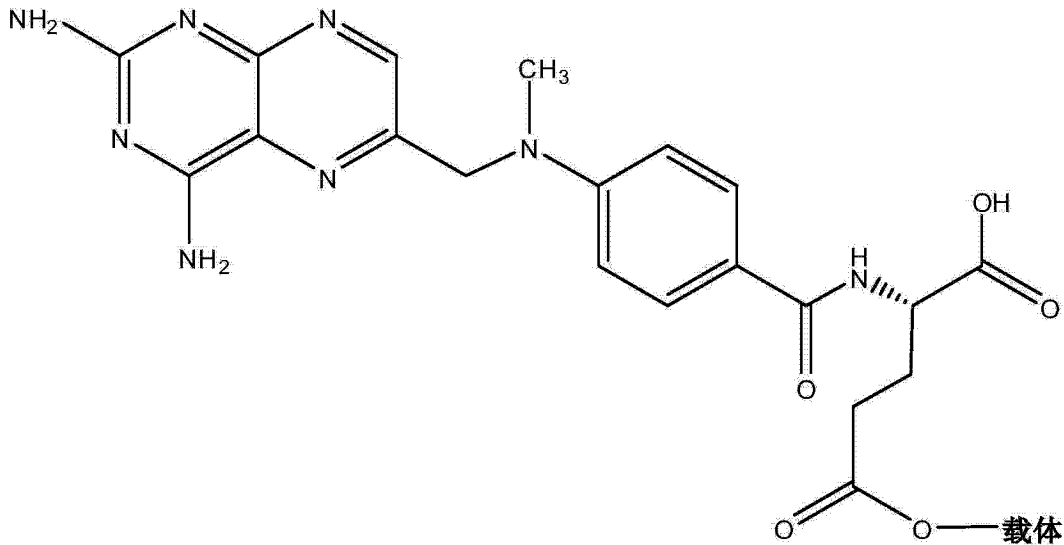
[0050] 图2是甲氨蝶呤均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0051] 本发明所采取的技术方案是：

[0052] 甲氨蝶呤免疫原，其结构式如式（I）所示：

[0053]



式（I）

[0054] 式中，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。本发明中的载体优选为血清蛋白。

[0055] 一种抗甲氨蝶呤特异性抗体，由式（I）所示的甲氨蝶呤免疫原免疫动物得到。

[0056] 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。

[0057] 获得多克隆抗体的方法是使用式（I）所示的甲氨蝶呤免疫原，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。

[0058] 单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0059] 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂，包括：上述抗甲氨蝶呤特异性抗体、用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂。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。

[0060] 上述甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的使用方法，包括以下步骤：

[0061] 1) 将待测样本与上述抗甲氨蝶呤特异性抗体接触；

[0062] 2) 根据待测样本中甲氨蝶呤与上述抗甲氨蝶呤特异性抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量。

[0063] 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

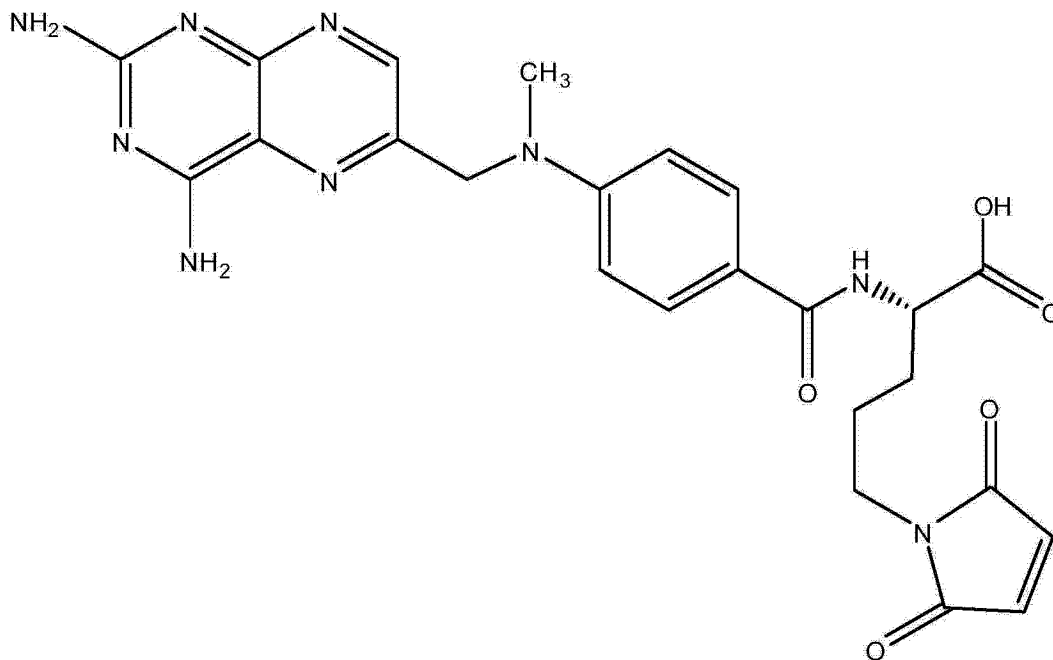
清或血浆。

[0064] 下面结合具体的实施例,进一步说明本发明。

[0065] 实施例一:甲氨蝶呤衍生物的合成及其结构确认

[0066] 以下实施例中使用的甲氨蝶呤衍生物化学结构如式(II)所示:

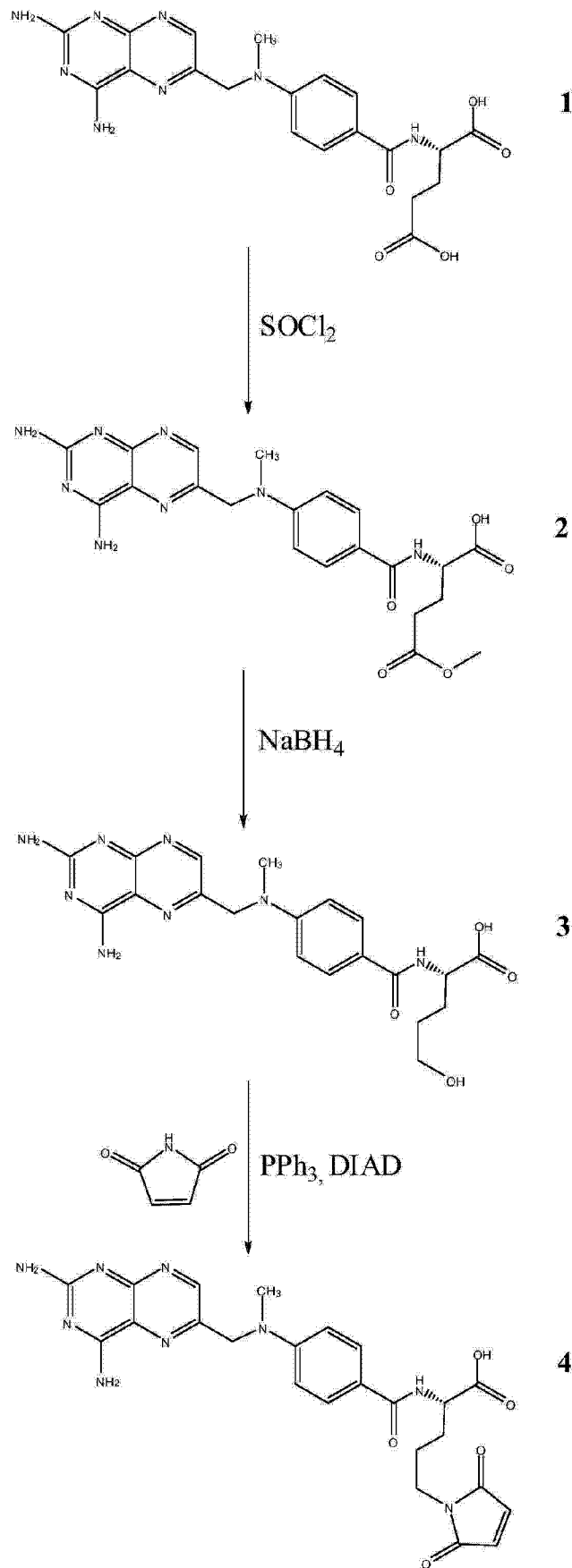
[0067]



式(II)

[0068] 该甲氨蝶呤衍生物的合成路线如下:

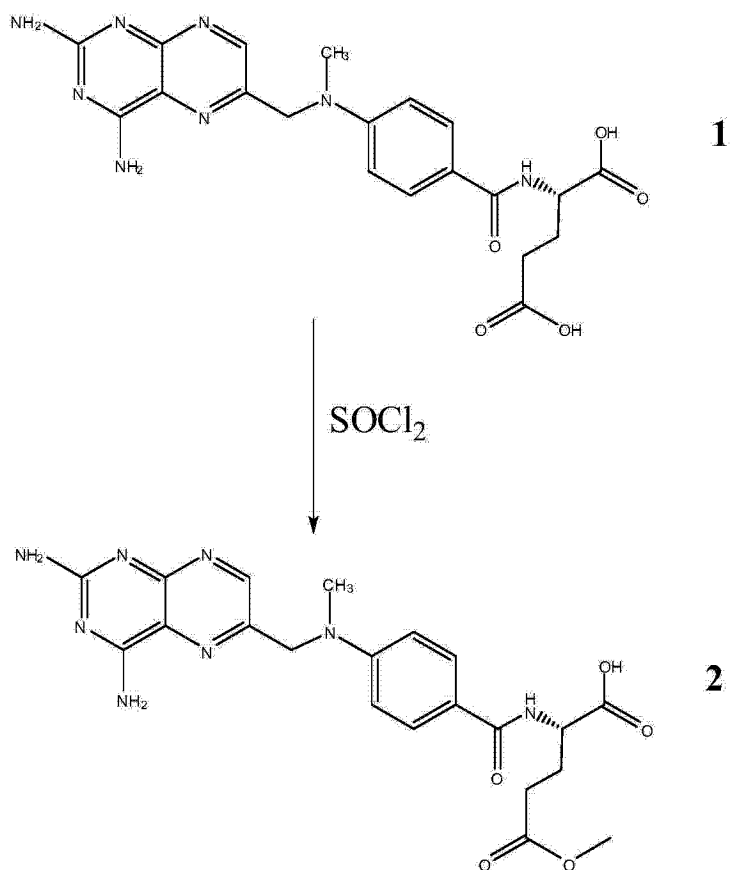
[0069]



[0070] 具体的合成步骤如下：

[0071] 化合物 2 的合成

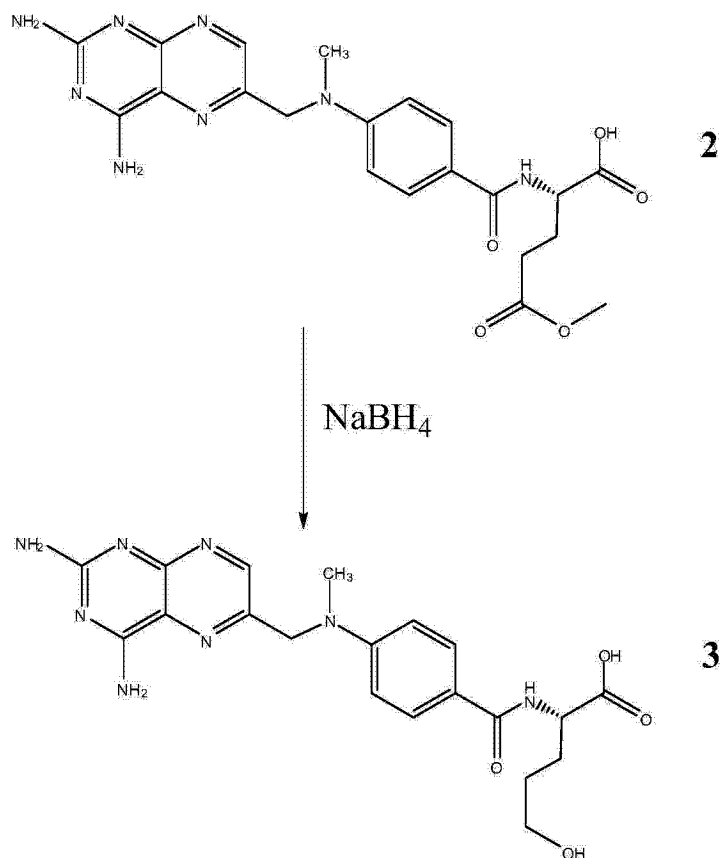
[0072]



[0073] 称取 5.0g 化合物 1, 溶解于 50mL 的 MeOH 中, 0°C 下逐滴加入 4.0g (34.1mmol) SOCl_2 , 然后将此反应混合液在 70°C 下搅拌过夜, 通过减压方法使溶剂蒸发, 将残留物通过 200mL 的 DCM 和 200mL 的 NaHCO_3 饱和水溶液进行分离, 将有机相用卤水冲洗, 然后通过 Na_2SO_4 进行干燥, 并进行浓缩得到 5.1g 白色固体化合物 2, 产率 96%。

[0074] 化合物 3 的合成

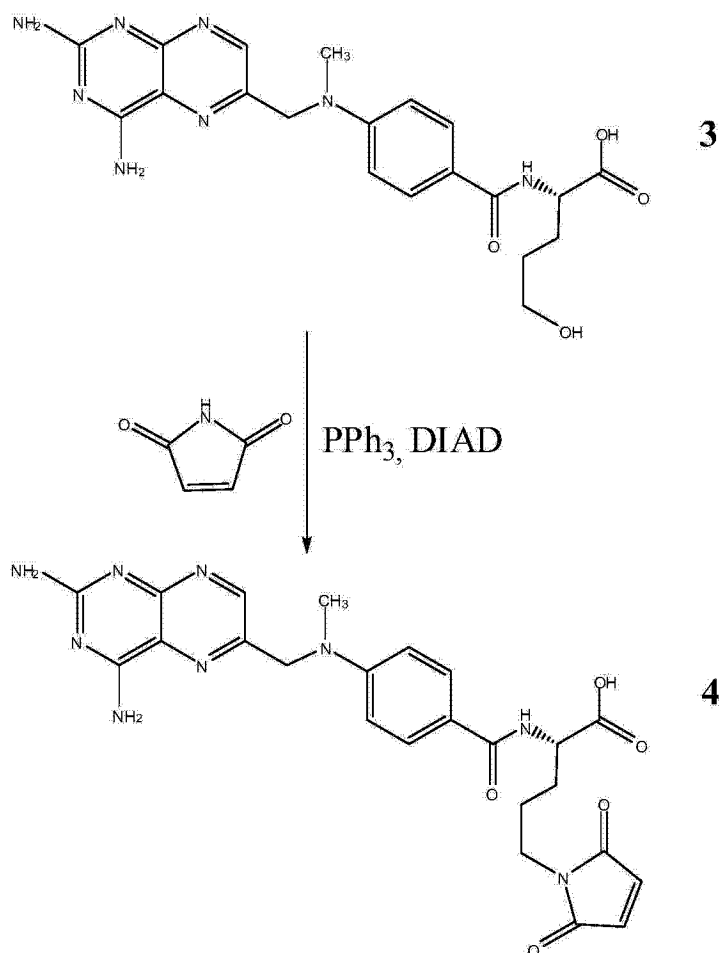
[0075]



[0076] 称取 5.1g 化合物 2, 溶解于 100mL 的 MeOH 中, 0℃ 下分多次加入 1.3g (33.3mmol) NaBH₄, 然后将此反应混合液在室温下搅拌过夜, 将反应后的混合物进行浓缩, 浓缩后得到的残渣通过硅胶干燥柱 (DCM:MeOH = 10:1) 进行纯化, 得到 4.0g 无色油状的化合物 3, 产率 92%。

[0077] 甲氨蝶呤衍生物的合成

[0078]



[0079] 称取 2.5g 化合物 3, 溶解于 40mL 的 THF 中, 在 0℃ 和氮气保护条件下加入 1.2g (12.6mmol) 马来酰亚胺、3.8g (14.56mmol) PPh₃ 及 2.9g (14.56mmol) DIAD, 然后将此反应混合液在 70℃ 下搅拌过夜, 将反应后的混合物进行浓缩, 浓缩后得到的残渣通过硅胶干燥柱 (DCM:MeOH = 50:1) 进行纯化, 最终得到 500mg 黄褐色固体化合物 4, 产率 15%。该化合物 4 即为式 (II) 所示的甲氨蝶呤衍生物。

[0080] 实施例二: BSA-甲氨蝶呤免疫原的合成

[0081] BSA-甲氨蝶呤免疫原由牛血清白蛋白 (BSA) 与式 (III) 所示的甲氨蝶呤的末端羧基连接而成, 该免疫原的具体合成步骤如下:

[0082] a. 称取 2.72g 磷酸二氢钾、4.26g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁, 共同溶解于 1L 去离子水中, 调节 pH 至 7.4, 制成缓冲溶液 A;

[0083] b. 称取 3mg BSA, 室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 A 中, 制成 BSA 溶液;

[0084] c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物, 溶解于 300μl 上述缓冲溶液 A 中, 制成甲氨蝶呤衍生物溶液;

[0085] d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时, 将其逐滴加入上述 BSA 溶液中, 然后将此混合溶液在 2-8℃ 下搅拌 1 小时;

[0086] e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 A 进行透析, 透析后所得溶液即为甲氨蝶呤免疫原溶液, 在甲氨蝶呤免疫原溶液中加入 0.1% 的 NaN₃, 于 -20℃ 下储存。0.1% 的 NaN₃ 是指加入量占最终所得的免疫原溶液的质量百分比, 具体的加入量根据透析后所得的免疫原溶液的具体质量而定。

[0087] 实施例三：抗甲氨蝶呤特异性抗体的制备

[0088] 将上述制得的 BSA- 甲氨蝶呤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：

[0089] 用 PBS 将上述合成的 BSA- 甲氨蝶呤免疫原稀释至 1.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合，对实验动物兔进行注射。

[0090] 2~3 周后，再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次，之后每隔四周注射一次，共计注射 4 次。

[0091] 对上述实验动物兔取血，分离纯化得到效价为 1 : 30000-1 : 50000 的抗甲氨蝶呤特异性抗体。

[0092] 实施例四：葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物的制备

[0093] a. 称取 1.09g 磷酸二氢钾、1.70g 磷酸氢二钠、8.5g 氯化钠、0.95g 氯化镁，共同溶解于 1L 去离子水中，调节 pH 至 7.4，制成缓冲溶液 B；

[0094] b. 称取 3mg 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶，室温下溶解于 3mL 上述缓冲溶液 B 中，制成葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶溶液；

[0095] c. 称取 3mg 甲氨蝶呤衍生物，溶解于 300ul 上述缓冲溶液 B 中，制成甲氨蝶呤衍生物溶液；

[0096] d. 当上述甲氨蝶呤衍生物溶液刚变澄清时，将其逐滴加入上述葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶溶液中，然后将此混合溶液在 2-8℃ 下搅拌 1 小时；e. 将反应后的上述混合溶液用上述缓冲溶液 B 进行透析，透析后所得溶液即为葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物溶液，在葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物溶液中加入 0.5% 的 BSA 和 0.1% 的 NaN_3 ，于 2-8℃ 下储存。0.5% 的 BSA 和 0.1% 的 NaN_3 是指加入量占最终所得的偶联物溶液的质量百分比，具体的加入量根据透析后所得的偶联物溶液的具体质量而定。

[0097] 实施例五：甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备

[0098] 甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂，包括：上述抗甲氨蝶呤特异性抗体，用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体 - 甲氨蝶呤复合物的指示试剂。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] 甲氨蝶呤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甲氨蝶呤特异性抗体混合在一起。也就是说，甲氨蝶呤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 (G-6-P) 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；将上述制备的抗甲氨蝶呤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 1:400。

[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] 上述甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

[0103] 1) 将待测样本与上述抗甲氨蝶呤特异性抗体接触;

[0104] 2) 根据待测样本中甲氨蝶呤与上述抗甲氨蝶呤特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断待测样本中甲氨蝶呤的含量。

[0105] 具体的,检测时,将待测样本加到试剂 A 中,待测样本中的甲氨蝶呤与试剂 A 中的抗甲氨蝶呤特异性抗体发生特异性结合,生成抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物;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,构成检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中甲氨蝶呤与上述抗甲氨蝶呤特异性抗体的结合情况判断待测样本中甲氨蝶呤的含量。

[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甲氨蝶呤竞争性结合抗甲氨蝶呤特异性抗体,所以,待测样本中甲氨蝶呤的量越多,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,酶促反应越快,导致 OD₃₄₀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:甲氨蝶呤均相酶免疫检验

[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 1),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 OD₃₄₀ 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 1 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	甲氨蝶呤
试剂 1	160 μL
试剂 2	40 μL
样本量	20 μL
分析方法	终点法

[0113]

主波长	340 nm
次波长	405 nm
反应时间	10 mins
孵育时间	5 mins
反应方向	上升
结果	μmol/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 0.13, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 μmol/L

[0114] 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:将甲氨蝶呤标准品溶解于人血清中,至浓度分别为 0.25、1.00、2.00 $\mu\text{mol/L}$ 。检测数据及数据分析见表 2。

[0115] 表 2 样品测定及精密度和回收率评估

[0116]

血液样品	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.25	1.00	2.00
1	0.24	1.06	1.90
2	0.26	1.05	2.05
3	0.25	0.98	2.11
4	0.25	0.93	1.99
5	0.26	1.03	2.07
6	0.24	0.97	1.92
7	0.24	1.06	2.01
8	0.26	1.00	1.88
9	0.23	1.03	2.13
10	0.25	0.96	1.91
平均值 ($\mu\text{mol/L}$)	0.25	1.01	2.00
标准差 (SD)	0.0103	0.0457	0.0915
精密度 (CV%)	4.12	4.52	4.58
回收率%	100.0	101.0	100.0

[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 5%。

[0118] 实施例七:药物干扰试验

[0119] 选取 62 种常见药物,调整浓度至 10.0 $\mu\text{mol/L}$,进行干扰试验测定。常见的 62 种药物以及测定结果具体参见表 3。

[0120] 表 3 常见干扰药物及测定结果

[0121]

ID#	化合物名称	等价于甲氨蝶呤的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于甲氨蝶呤的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	β -苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0
4	氨基青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砒	0.0	47	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0

[0122]

ID#	化合物名称	等价于甲氨蝶呤的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于甲氨蝶呤的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苯非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0123] 测定结果：上述 62 种常见药物等价于甲氨蝶呤的浓度均小于 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 。可见，本发明的抗体是抗甲氨蝶呤的特异性抗体。

[0124] 实施例八：相关性分析

[0125] 对 100 例临床标本分别使用德灵诊断产品（上海）有限公司的甲氨蝶呤检测试剂（采用酶放大免疫测定法）和本发明的均相酶免疫试剂进行相关性分析，测定的数据参见表 4。

[0126] 表 4 临床样本测定值

[0127]

样本号	均相酶免疫法测定值 ($\mu\text{mol/L}$)	德灵试剂测定值 ($\mu\text{mol/L}$)
1	0.62	0.61
2	1.91	1.87
3	0.13	0.16
4	2.85	2.83
5	0.32	0.32
6	1.52	1.47
7	0.02	0.01

[0128]

8	0.39	0.41
9	1.37	1.35
10	0.98	0.93
11	0.29	0.27
12	0.44	0.47
13	1.31	1.39
14	1.69	1.72
15	2.51	2.58
16	1.94	1.83
17	0.33	0.32
18	0.59	0.62
19	1.30	1.30
20	0.85	0.83
21	1.15	1.11
22	0.12	0.11
23	2.01	1.99
24	0.90	0.93
25	1.01	1.00
26	1.24	1.26
27	0.53	0.54
28	0.47	0.45
29	0.95	0.92
30	1.49	1.53
31	0.52	0.54
32	0.78	0.79
33	1.14	1.18
34	1.81	1.89
35	3.69	3.61
36	0.00	0.00
37	1.10	1.14
38	2.07	2.11
39	0.99	0.95
40	1.03	0.98
41	0.62	0.67
42	0.91	0.93
43	1.40	1.45
44	1.66	1.62
45	0.77	0.75
46	1.95	1.90
47	0.76	0.83
48	0.32	0.32
49	1.36	1.41
50	1.64	1.67

[0129]

51	0.05	0.05
52	0.72	0.77
53	1.96	2.06
54	0.76	0.79
55	1.78	1.71
56	1.03	1.01
57	0.92	0.88
58	1.00	1.04
59	0.04	0.05
60	2.50	2.53
61	0.05	0.06
62	1.77	1.82
63	0.34	0.35
64	1.09	1.06
65	1.50	1.49
66	0.83	0.81
67	1.25	1.28
68	1.57	1.59
69	1.09	1.12
70	1.63	1.61
71	0.11	0.09
72	0.65	0.69
73	0.44	0.45
74	1.37	1.36
75	0.64	0.63
76	1.34	1.27
77	0.68	0.71
78	0.08	0.09
79	3.25	3.12
80	1.03	1.07
81	2.00	2.05
82	1.26	1.29
83	0.35	0.36
84	1.00	1.01
85	3.40	3.51
86	0.68	0.70
87	0.35	0.33
88	1.20	1.25
89	1.67	1.72
90	0.98	1.01
91	1.71	1.74
92	0.44	0.42
93	1.21	1.20

[0130]

94	2.01	2.05
95	1.98	1.95
96	1.03	1.06
97	0.31	0.35
98	0.48	0.53
99	1.24	1.27
100	1.01	1.03

[0131] 对上述数据作图,参见图 2,得到的线性方程为 : $y = 0.9953x + 0.0095$,相关系数 $R^2 = 0.9970$,表明本发明的检测试剂测定甲氨蝶呤临床标本的准确度高。

[0132] 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。

[0133] 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。

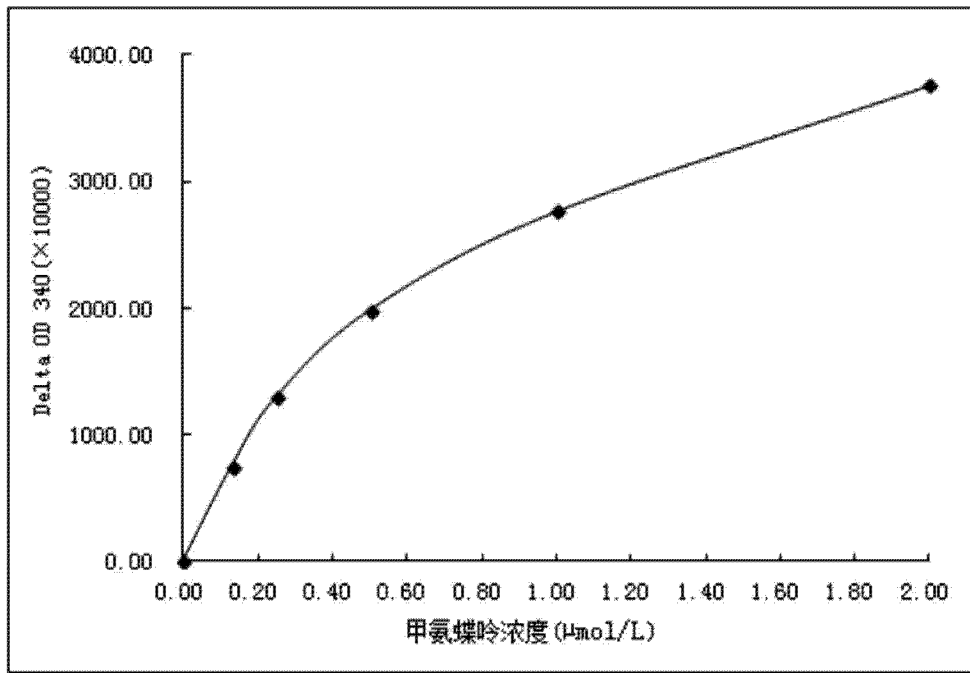


图 1

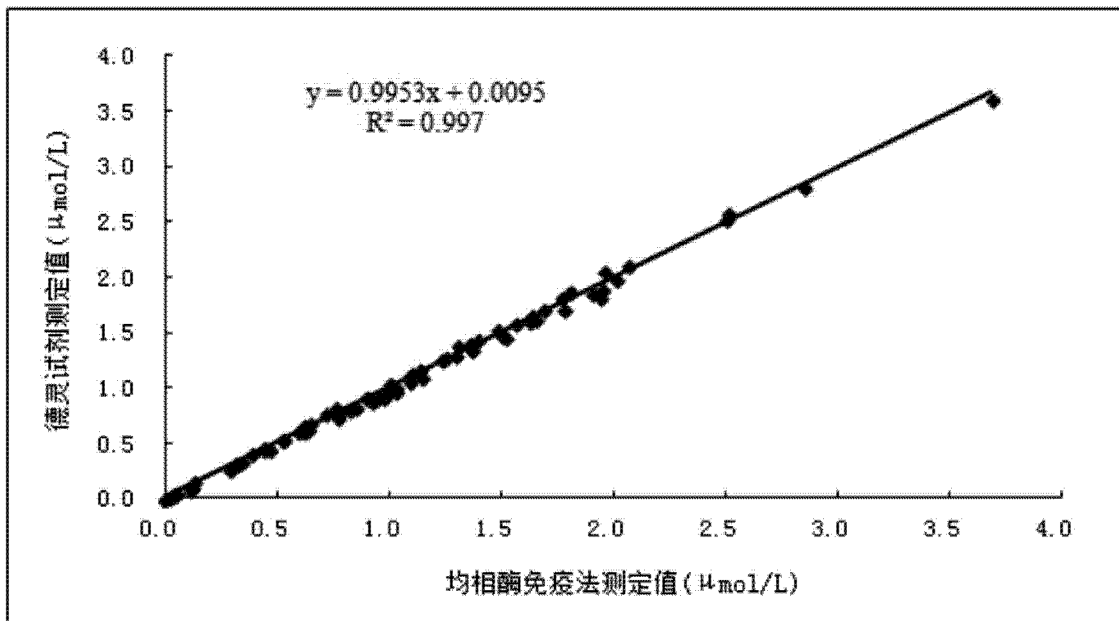


图 2

专利名称(译)	一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN104569373A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510039620.0	申请日	2015-01-27
[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 卢忠心 胡瑜 娄金丽 成志鹏		
发明人	虞留明 卢忠心 胡瑜 娄金丽 成志鹏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/544		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN104569373B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种甲氨蝶呤检测试剂及其制备和检测方法，具体涉及一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法，包括：抗甲氨蝶呤特异性抗体、用于检测抗甲氨蝶呤特异性抗体-甲氨蝶呤复合物的指示试剂；上述抗甲氨蝶呤特异性抗体由甲氨蝶呤免疫原免疫动物得到。发明的有益之处在于：发明的甲氨蝶呤免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗甲氨蝶呤特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；含有上述抗甲氨蝶呤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甲氨蝶呤含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现甲氨蝶呤的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率有了较大的提高。

