



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106053788 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(21)申请号 201610574864.3

(22)申请日 2016.07.21

(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9号楼北二层

(72)发明人 虞留明 周桓 汪兴周

(51) Int. Cl.
G01N 33/535(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

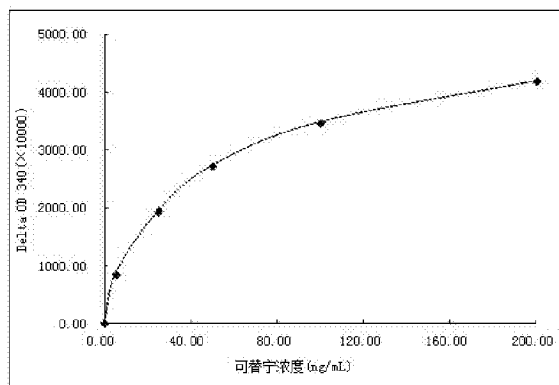
权利要求书3页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

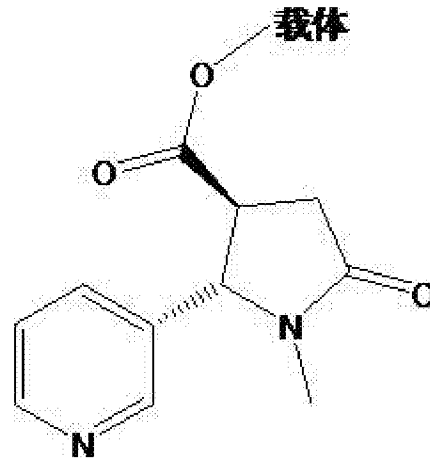
一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种可替宁检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法,包括:抗可替宁特异性抗体、用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂;上述抗可替宁特异性抗体由可替宁免疫原免疫动物得到。本发明的有益之处在于:本发明的可替宁免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗可替宁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;含有上述抗可替宁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可替宁含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现可替宁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. 一种可替宁均相酶免疫检测试剂,包括:抗可替宁特异性抗体、用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂;上述抗可替宁特异性抗体由可替宁免疫原免疫动物得到,可替宁免疫原的结构式如式(I)所示:

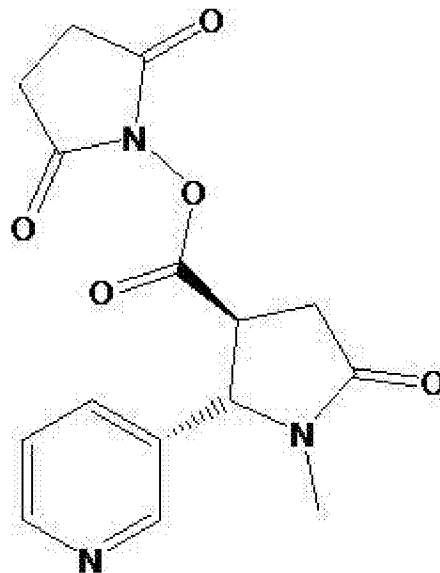


式(I)

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。

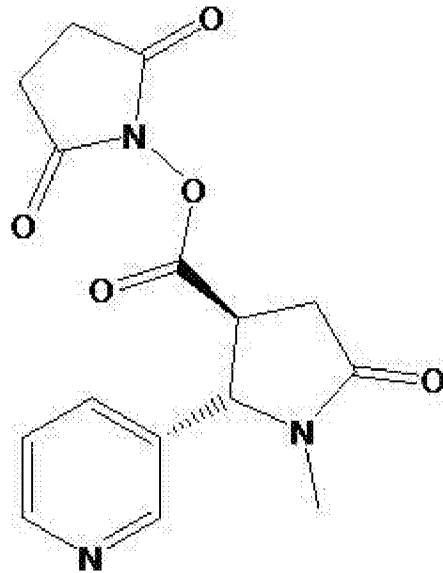
2. 根据权利要求1所述的一种可替宁均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸;所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物反应形成。

3. 根据权利要求2所述的可替宁均相酶免疫检测试剂,其特征在于,上述可替宁衍生物的结构式如式(II)所示:



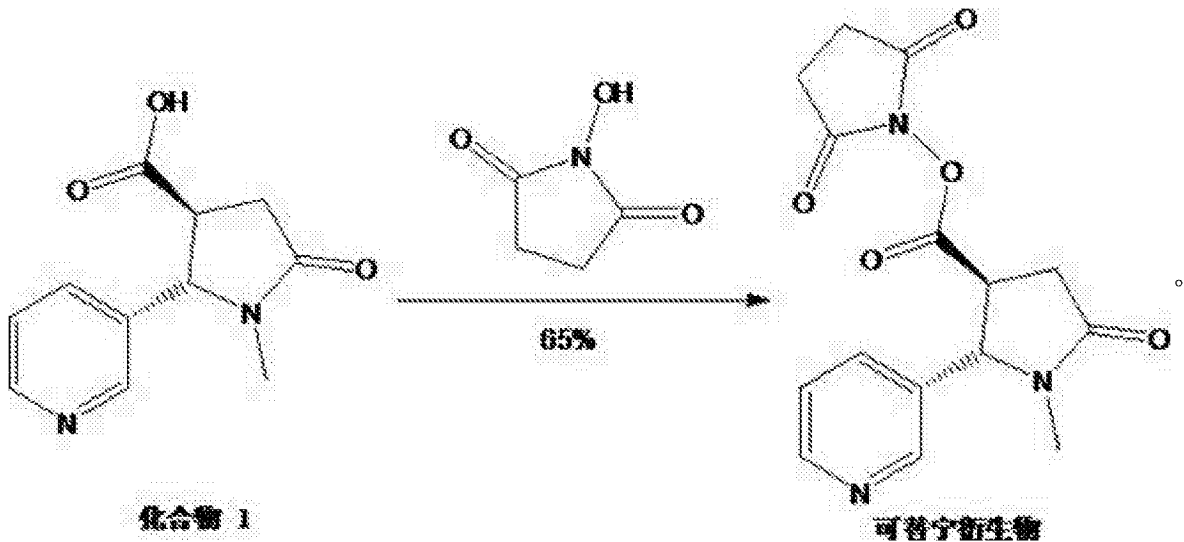
式(II)。

4. 可替宁衍生物,结构式如式(II)所示:



式(II)。

5. 根据权利要求4所述的可替宁衍生物,其特征在于,合成路线为:



6. 一种可替宁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3、4或5所述的可替宁衍生物的合成与纯化,并进行结构鉴定;
- (2) 可替宁免疫原的合成:使可替宁衍生物与具有免疫原性的蛋白质载体连接;
- (3) 用可替宁免疫原免疫动物,制备并纯化抗可替宁特异性抗体;

(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,激活可替宁衍生物,使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物连接,纯化连接产物;

(5) 可替宁均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂A的制备:由抗可替宁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所述的一种可替宁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1.0~5.0 g磷酸二氢钾、2.0~8.0 g磷酸氢二钠、5.0~15.0 g氯化钠、0.5~1.5 g氯化镁,共同溶解于1.0~3.0 L去离子水中,调节pH至7.0~8.0,制成缓冲溶液A;

b. 称取2.0~5.0 mg BSA, 室温下溶解于2.0~5.0 mL上述缓冲溶液A中, 制成BSA溶液;
c. 称取2.0~5.0 mg可替宁衍生物, 溶解于200.0~500.0 μ l上述缓冲溶液A中, 制成可替宁衍生物溶液;

d. 当上述可替宁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0.5~3.0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可替宁免疫原溶液, 在可替宁免疫原溶液中加入质量分数0.05%~0.3%的 NaN_3 , 于-20 $^{\circ}$ C下储存。

8. 根据权利要求6所述的一种可替宁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1.0~5.0 g磷酸二氢钾、1.0~5.0 g磷酸氢二钠、5.0~15.0 g氯化钠、0.5~1.5 g氯化镁, 共同溶解于1.0~3.0 L去离子水中, 调节pH至7.0~8.0, 制成缓冲溶液B;

b. 称取5.0~20.0 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 室温下溶解于2.5~15.0 mL上述缓冲溶液B中, 调节pH至8.5, 制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c. 称取2.0~5.0 mg可替宁衍生物, 溶解于100.0~500.0 μ l 干燥的二甲基甲酰胺(DMF)中, 震荡溶解, 制成可替宁衍生物溶液;

d. 当上述可替宁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, 30秒内完成滴加, 然后将此混合溶液在2~8 $^{\circ}$ C下搅拌0.5~3.0小时;

e. 将反应后的上述混合溶液通过G-25凝胶层析柱进行纯化, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 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0.3%~0.8%的BSA和质量分数0.05%~0.3%的 NaN_3 , 于2~8 $^{\circ}$ C下储存。

9. 根据权利要求6所述的一种可替宁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2.0~8.0 g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、1.0~3.0 g的葡萄糖-6-磷酸用0.5~3.0 L 浓度为55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物; 将制备的抗可替宁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-半抗原偶联物加到浓度为120 mM、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任意一项所述的可替宁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) 将待测样本与抗可替宁特异性抗体接触;

(2) 根据待测样本中可替宁与抗可替宁特异性抗体的结合情况, 利用指示试剂判断样本中可替宁的含量;

所述待测样本为血清、血浆、唾液、尿液、精液或乳汁;

所述的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-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物反应形成。

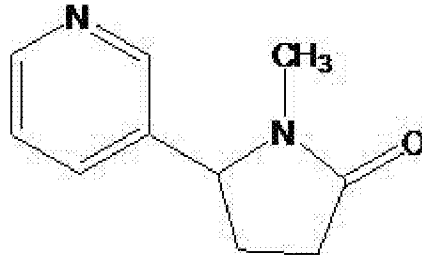
一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可替宁检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 可替宁(Cotinine)结构式如式(III)所示:



式(III)

随着时代的发展,吸烟引起的危害已成为当今世界最严重的公共卫生问题之一。各国政府对吸烟及二手烟的暴露所引起的社会健康问题给予了极大关注和巨大的经济投入。国内外已有众多研究报道了烟草中各种成分对于人体的危害,烟草在燃烧过程中释放出4000多种化学成分,能引发多种疾病,严重危害人体健康。2005年,中国作为履约国签署《烟草控制框架公约》,使控烟具有法律依据;2012年,中国政府发布《中国烟草控制规划(2012-2015年)》,提出创造无烟环境,实施公共场所全面禁烟。

[0003] 烟碱,俗称尼古丁(nicotine),是一种存在于茄科植物烟草中的主要生物碱,在烟草中平均含量达4%,约占烟草中生物碱总量的90%以上,烟碱是导致吸烟成瘾或烟草依赖的主要因素。烟草中的烟碱约有40%直接转移到卷烟主流烟气和侧流烟气中,进入人体内的尼古丁经口腔、喉部、气管以及肺泡吸收进入血液循环,其中约80%在肝脏中的细胞色素氧化酶P450-2A6 (CYP450-2A6)的作用下首先被代谢为可替宁(cotinine),再经肝脏进一步代谢,形成多种代谢产物,之后通过尿液、唾液、汗液等途径排出体外。尼古丁主要代谢产物有可替宁及其糖苷、3-羟基可替宁及其糖苷、尼古丁糖苷、降烟碱、降可替宁、尼古丁氮氧化物、可替宁氮氧化物,这些代谢产物约占人体吸收尼古丁总量的90%以上,其中可替宁占所有代谢物的70%-80%。研究证明:烟碱及其代谢物对人体的生理作用主要包括对中枢神经系统、心血管系统和内分泌系统等的影响。主动吸烟时,烟碱大量吸收会加快心率,升高血压,并降低食欲,大剂量的尼古丁会引起恶心呕吐,严重时会上诱发癌症,导致死亡;被动吸烟时,低含量生物碱虽没有大剂量烟碱毒性大,但也会对身体健康产生不利影响,如导致呼吸系统疾病、心血管疾病等多种疾病。

[0004] 尼古丁及其主要代谢物可替宁能随血液分布到人体各个部位,血液、尿液、乳汁、唾液、精液和头发等生物样品中都可检测到这些物质。但是,尼古丁在体内的半衰期仅为2~3h,仅能反映过去几个小时的摄入情况,而可替宁的半衰期长达70~100h,可以反映过去3~4d的摄入情况,并且由于尼古丁是可替宁的唯一来源,且受饮食因素的影响较小,因此可替宁已成为目前公认的评估受检者烟气暴露程度、吸烟量以及吸烟对人体健康影响程度

最有效的生物标志物。

[0005] 目前,文献报道的可替宁测定方法主要有:酶联免疫法、薄层色谱、巴比妥酸法、毛细管电泳化学发光法、气相色谱法、气液色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、液相色谱-串联质谱法、放射免疫分析法等。但是这些传统检测方法大都具有仪器设备价格昂贵,检测时间长,操作繁琐,需要使用大量有毒有害的有机溶剂,易对环境造成污染,且对实验人员有较高的技术要求等诸多缺陷,因此不利于推广使用。目前,国内外尚无实用性强、性价比高的可替宁等烟碱代谢物快速检测方法和产品。因此,研究开发快速、灵敏、高通量、自动化的可替宁检测分析方法及产品,已受到了生物学、烟草科技、医疗健康及环境卫生等多个领域的广泛重视。

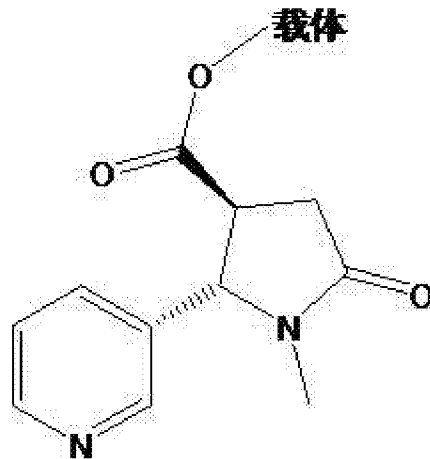
发明内容

[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可替宁含量的可替宁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可替宁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测定可替宁含量的可替宁均相酶免疫检测试剂的可替宁衍生物。

[0008] 为了实现上述目标,本发明采用的技术方案是:

一种可替宁均相酶免疫检测试剂,包括:抗可替宁特异性抗体、用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂;上述抗可替宁特异性抗体由可替宁免疫原免疫动物得到,可替宁免疫原的结构式如式(I)所示:



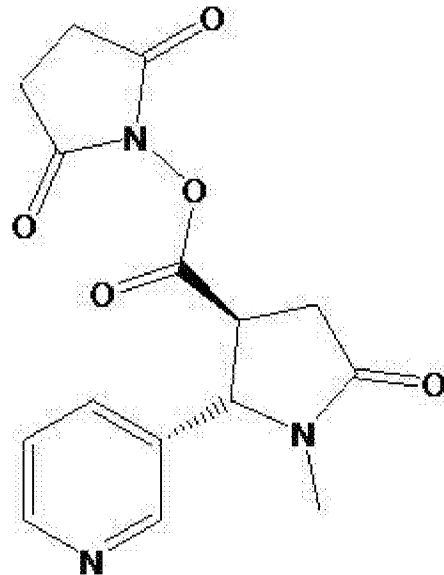
式(I)

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。

[0009] 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;

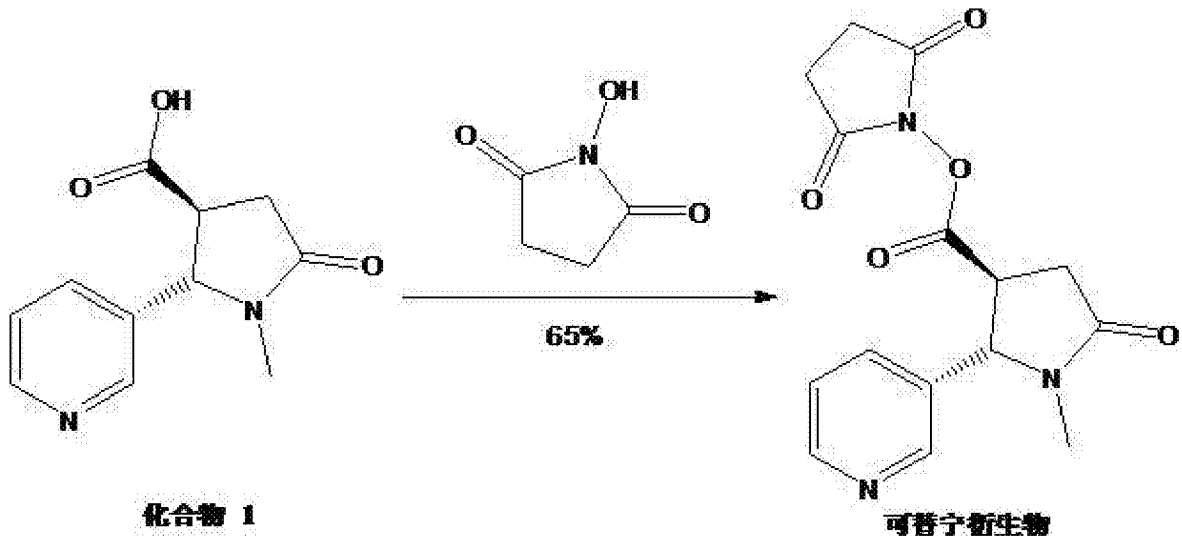
所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物反应形成。

[0010] 上述可替宁衍生物的结构式如式(II)所示:



式(II)

可替宁衍生物的合成方法,其特征在于,合成路线为:



一种可替宁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)可替宁衍生物的合成与纯化,并进行结构鉴定;
- (2)可替宁免疫原的合成:使可替宁衍生物与具有免疫原性的蛋白质载体连接;
- (3)用可替宁免疫原免疫动物,制备并纯化抗可替宁特异性抗体;
- (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,激活可替宁衍生物,使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物连接,纯化连接产物;
- (5)可替宁均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂A的制备:由抗可替宁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。

[0011] 前述的一种可替宁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:

- a.称取1.0~5.0 g磷酸二氢钾、2.0~8.0 g磷酸氢二钠、5.0~15.0 g氯化钠、0.5~1.5 g氯化镁,共同溶解于1.0~3.0 L去离子水中,调节pH至7.0~8.0,制成缓冲溶液A;

b. 称取2.0~5.0 mg BSA, 室温下溶解于2.0~5.0 mL上述缓冲溶液A中, 制成BSA溶液;
c. 称取2.0~5.0 mg可替宁衍生物, 溶解于200.0~500.0 μ l上述缓冲溶液A中, 制成可替宁衍生物溶液;

d. 当上述可替宁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0.5~3.0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可替宁免疫原溶液, 在可替宁免疫原溶液中加入质量分数0.05%~0.3%的NaN₃, 于-20 $^{\circ}$ C下储存。

[0012] 前述的一种可替宁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:

a. 称取1.0~5.0 g磷酸二氢钾、1.0~5.0 g磷酸氢二钠、5.0~15.0 g氯化钠、0.5~1.5 g氯化镁, 共同溶解于1.0~3.0 L去离子水中, 调节pH至7.0~8.0, 制成缓冲溶液B;

b. 称取5.0~20.0 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 室温下溶解于2.5~15.0 mL上述缓冲溶液B中, 调节pH至8.5, 制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c. 称取2.0~5.0 mg可替宁衍生物, 溶解于100.0~500.0 μ l干燥的二甲基甲酰胺(DMF)中, 震荡溶解, 制成可替宁衍生物溶液;

d. 当上述可替宁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, 30秒内完成滴加, 然后将此混合溶液在2~8 $^{\circ}$ C下搅拌0.5~3.0小时;

e. 将反应后的上述混合溶液通过G-25凝胶层析柱进行纯化, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 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0.3%~0.8%的BSA和质量分数0.05%~0.3%的NaN₃, 于2~8 $^{\circ}$ C下储存。

[0013] 前述的一种可替宁均相酶免疫检测试剂的制备方法, 步骤(5)的具体过程如下:

试剂A的制备: 将2.0~8.0 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.0~3.0 g葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)用0.5~3.0 L浓度为55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物; 将制备的抗可替宁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-半抗原偶联物加到浓度为120 mM、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。

[0014] 利用可替宁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) 将待测样本与抗可替宁特异性抗体接触;

2) 根据待测样本中可替宁与抗可替宁特异性抗体的结合情况, 利用指示试剂判断样本中可替宁的含量;

所述待测样本为血清、血浆、唾液、尿液、精液或乳汁;

所述的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-磷酸脱氢酶与可替宁衍生物反应形成。

[0015] 本发明的有益之处在于: 本发明的可替宁免疫原特异性强、免疫原性高, 制备出的抗可替宁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; 含有上述抗可替宁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可替宁含量, 并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品, 实现可替宁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。

[0016]

附图说明

[0017] 图1是可替宁均相酶免疫反应标准曲线图;

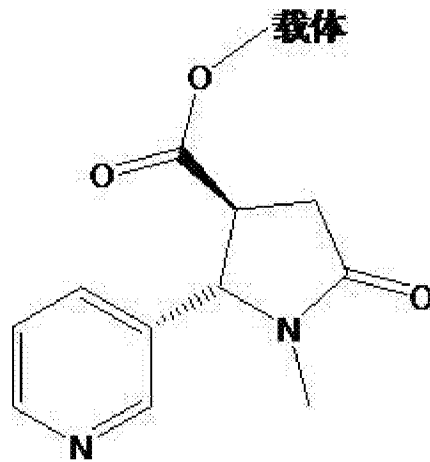
图2是可替宁均相酶免疫相关性分析图。

[0018]

具体实施方式

[0019] 本发明所采取的技术方案是:

可替宁免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

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。

[0020] 一种抗可替宁特异性抗体,由式(I)所示的可替宁免疫原免疫动物得到。

[0021] 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。

[0022] 获得多克隆抗体的方法是使用式(I)所示的可替宁免疫原,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。

[0023] 单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0024] 一种可替宁均相酶免疫检测试剂,包括:上述抗可替宁特异性抗体、用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂。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。

[0025] 上述可替宁均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1)将待测样本与上述抗可替宁特异性抗体接触;

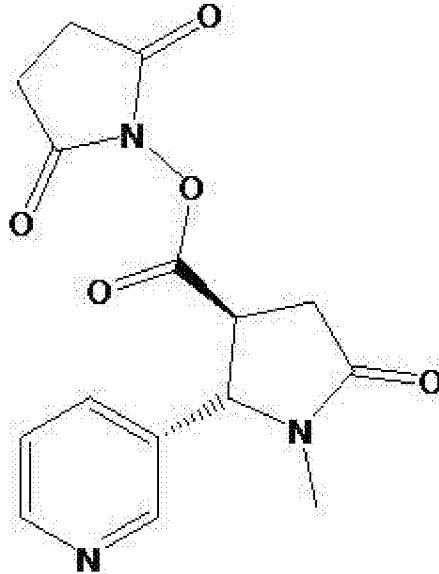
2)根据待测样本中可替宁与上述抗可替宁特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中可替宁的含量。

[0026] 待测样本为各种生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液、精液、乳汁等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0027] 下面结合具体的实施例,进一步说明本发明。

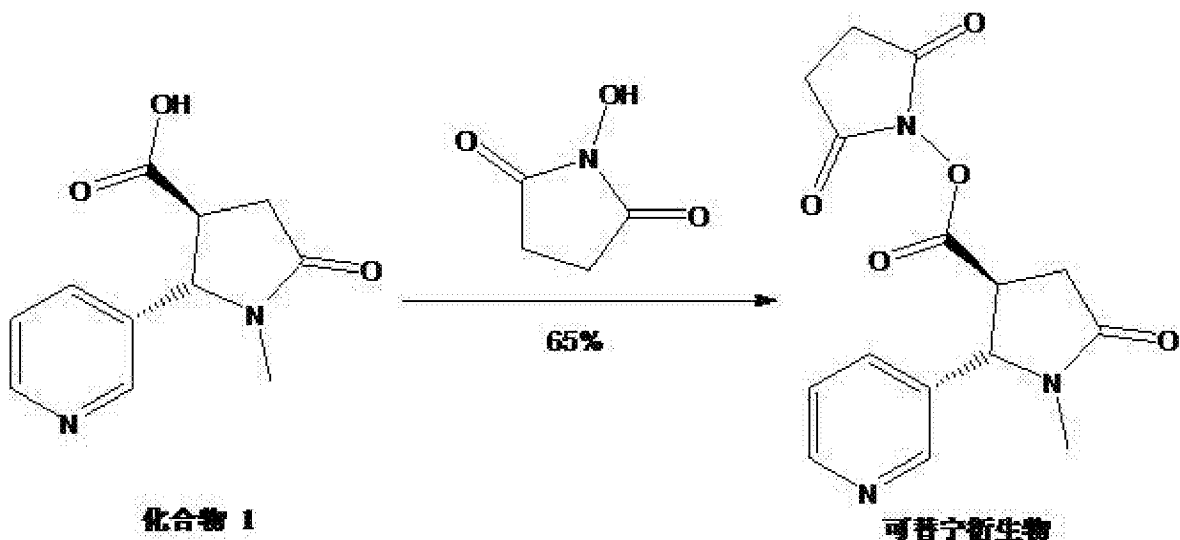
[0028] 实施例一:可替宁衍生物的合成及其结构确认

以下实施例中使用的可替宁衍生物化学结构如式(II)所示:



式(II)

该可替宁衍生物的合成路线如下:



具体的合成步骤如下:

称取1.4 g(6.35 mmol)化合物1,溶解于20 mL的二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入0.73 g(6.35 mmol)的N-羟基琥珀酰亚胺与1.46 g(7.62 mmol)的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳亚二胺(EDC1),制成反应混合溶液,然后将此反应混合溶液在室温下搅拌过夜。反应完成

后,将混合溶液的溶剂去除,残余的固体物质重新溶解于50 mL的丙烯酸乙酯(EA)中,然后用纯化水和卤水洗涤,洗涤之后的有机相通过 Na_2SO_4 进行干燥处理,最后进行浓缩以得到1.1 g亮黄色固体状的可替宁衍生物(Trans-4 Cotinine Derivative)。

[0029] 对上述亮黄色固体状的可替宁衍生物(Trans-4 Cotinine Derivative)进行结构鉴定:利用Bruker Avance 111 plus 400 MHz 和VARIAN MERCURY plus 300M对上述亮黄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: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 2.67-2.741 (m, 4H), 1.33-1.43 (m, 2H), 2.82-2.90 (m, 4H), 2.98-3.04 (m, 1H), 3.31-3.39 (m, 1H), 4.88 (d, 1H), 7.39-7.46 (m, 1H), 7.66-7.73 (m, 1H), 8.61-8.69 (m, 2H)。表征为式(II)所示的可替宁衍生物。

[0030]

实施例二:BSA-可替宁免疫原的合成

BSA-可替宁免疫原由牛血清白蛋白(BSA)与式(II)所示的可替宁衍生物连接而成,该免疫原的具体合成步骤如下:

a.称取2.72 g磷酸二氢钾、4.26 g磷酸氢二钠、8.5 g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3 mg BSA,室温下溶解于3 mL上述缓冲溶液A中,制成BSA溶液;

c.称取3 mg可替宁衍生物,溶解于300 μl 上述缓冲溶液A中,制成可替宁衍生物溶液;

d.当上述可替宁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 $^{\circ}\text{C}$ 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可替宁免疫原溶液,在可替宁免疫原溶液中加入0.1%的 NaN_3 ,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。0.1%的 NaN_3 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。

[0031] 实施例三:抗可替宁特异性抗体的制备

将上述制得的BSA-可替宁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:

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

[0032] 2~3周后,再用1.0 ml 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。

[0033] 对上述实验动物兔取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗可替宁特异性抗体。

[0034] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

a.称取1.09 g磷酸二氢钾、1.70 g磷酸氢二钠、8.5 g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10 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于7.5 mL上述缓冲溶液B中,调节pH至8.5,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

c.称取3 mg可替宁衍生物,溶解于200 μl 干燥的二甲基甲酰胺(DMF)中,震荡溶解,制成可替宁衍生物溶液;

d. 当上述可替宁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,30秒内完成滴加,然后将此混合溶液在2-8℃下搅拌2小时;

e. 将反应后的上述混合溶液通过G-25凝胶层析柱进行纯化,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,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NaN₃,于2-8℃下储存。0.5%的BSA和0.1%的NaN₃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。

[0035] 实施例五:可替宁均相酶免疫检测试剂的制备

可替宁均相酶免疫检测试剂,包括:上述抗可替宁特异性抗体,用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂。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。

[0036] 可替宁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可替宁特异性抗体混合在一起。也就是说,可替宁均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂,具体如下:

1. 试剂A的制备:将4.036g(11.25 mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g(11.25 mM)葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯D中,用1L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗可替宁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1:500。

[0037] 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1:1250。

[0038] 上述可替宁均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1)将待测样本与上述抗可替宁特异性抗体接触;

2)根据待测样本中可替宁与上述抗可替宁特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断待测样本中可替宁的含量。

[0039] 具体的,检测时,将待测样本加到试剂A中,待测样本中的可替宁与试剂A中的抗可替宁特异性抗体发生特异性结合,生成抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物;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,构成检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中可替宁与上述抗可替宁特异性抗体的结合情况判断待测样本中可替宁的含量。

[0040] 由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与待测样本中的可替宁竞争性结合抗可替宁特异性抗体,所以,待测样本中可替宁的量越多,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。

[0041] 上述待测样本为生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液、精液、乳汁等。

[0042] 作为一种优选的方案,上述待测样本为血清或血浆。

[0043] 实施例六:可替宁均相酶免疫检验

1、获得标准曲线:设置贝克曼 AU480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。

[0044] 表1 贝克曼 AU480全自动生化分析仪反应参数

贝克曼 AU480 参数	
项目名称	可替宁
试剂 1	160 μL
试剂 2	40 μL
样本量	3 μL
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	405 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	ng/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 5.00, 25.00, 50.00, 100.00, 200.00 0 ng/mL

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:将可替宁标准品溶解于人血清中,至浓度分别为1.00、30.00、150.00 ng/ml。检测数据及数据分析见表2。

[0045] 表2 样品测定及精密度和回收率评估

血液样品	低	中	高
样品浓度 (ng/ml)	1.00	30.00	150.00
1	0.98	31.34	149.00
2	0.94	30.98	152.95
3	1.03	29.66	150.86
4	1.00	32.07	151.71
5	0.93	31.45	155.32
6	1.05	30.99	148.50
7	0.96	28.92	146.25
8	1.02	31.73	151.03
9	1.04	30.64	150.36
10	0.99	32.03	153.41
平均值(ng/ml)	1.00	30.98	150.94
标准差(SD)	0.0424	1.0168	2.6243
精密度(CV%)	4.24	3.28	1.74
回收率 %	100.0	103.3	100.6

检测结果:本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高,回收率在95%-105%范围之

内,精密度高,CV均低于5%。

[0046] 实施例七:药物干扰试验

选取62种常见药物,调整浓度至100.0 ng/ml,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。

[0047] 表3 常见干扰药物及测定结果

ID#	化合物名称	等价于可替宁的浓度 (ng/ml)	ID#	化合物名称	等价于可替宁的浓度 (ng/ml)
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	氨苄青霉素	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	茶普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氯氯噻嗪	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
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氢醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺咪硫	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	苯非他命	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

测定结果:上述62种常见药物等价于可替宁的浓度均小于0.1 ng/ml。可见,本发明的抗体是抗可替宁的特异性抗体。

[0048] 实施例八:相关性分析

对100例临床标本分别使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测定方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。

[0049] 表4 临床样本测定值

样本号	均相酶免疫法测定值(ng/ml)	液相色谱-串联质谱测定值(ng/ml)
1	4.67	4.70
2	24.82	24.94
3	1.60	1.61

4	3.84	3.90
5	6.42	6.43
6	236.51	238.40
7	107.02	109.00
8	54.93	55.11
9	11.39	11.32
10	304.99	299.26
11	122.45	125.03
12	58.44	59.32
13	8.35	8.49
14	100.69	101.77
15	27.51	28.05
16	99.93	100.00
17	3.30	3.25
18	70.58	69.54
19	105.33	107.01
20	76.90	78.39
21	15.01	14.95
22	35.02	37.00
23	250.99	247.79
24	2.90	2.98
25	30.00	30.15
26	4.24	4.25
27	7.03	7.07
28	84.53	85.50
29	31.95	31.09
30	18.21	18.23
31	333.52	330.06
32	67.77	68.29
33	111.59	112.84
34	2.01	2.00
35	7.63	7.92
36	100.00	100.96
37	86.10	88.59
38	4.07	4.01
39	14.92	15.76
40	135.03	133.12
41	20.55	20.78
42	103.22	101.99

43	65.12	66.43
44	5.66	6.01
45	1.99	2.00
46	233.58	237.17
47	3.09	3.22
48	142.92	140.04
49	98.04	100.51
50	9.62	10.26
51	135.01	135.95
52	211.33	215.03
53	186.49	188.88
54	2.00	1.97
55	17.78	17.89
56	109.25	111.10
57	4.95	4.86
58	19.43	19.14
59	2.89	2.82
60	7.52	7.51
61	36.07	36.07
62	4.51	4.70
63	84.39	86.33
64	301.21	298.27
65	12.50	12.86
66	173.27	176.11
67	3.22	3.25
68	32.75	33.09
69	3.09	3.25
70	11.03	11.60
71	253.10	255.00
72	22.65	22.70
73	100.41	101.57
74	15.37	15.30
75	217.33	220.84
76	6.39	6.21
77	8.61	8.53
78	91.03	91.88
79	187.20	189.04
80	7.00	7.11
81	214.55	215.98

82	13.26	13.75
83	2.53	2.55
84	92.39	91.00
85	5.18	5.16
86	29.67	29.77
87	3.07	3.03
88	195.01	198.39
89	3.69	3.72
90	33.04	33.78
91	281.74	285.06
92	4.40	4.50
93	2.21	2.25
94	8.52	8.59
95	11.99	11.77
96	100.03	99.16
97	289.38	291.08
98	10.44	9.86
99	73.25	74.20
100	3.01	3.04

对上述数据作图,参见图2,得到的线性方程为: $y = 0.9987x + 0.482$,相关系数 $R^2 = 0.9997$,表明本发明的检测试剂测定可替宁临床标本的准确度高。

[0050] 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。

[0051] 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。

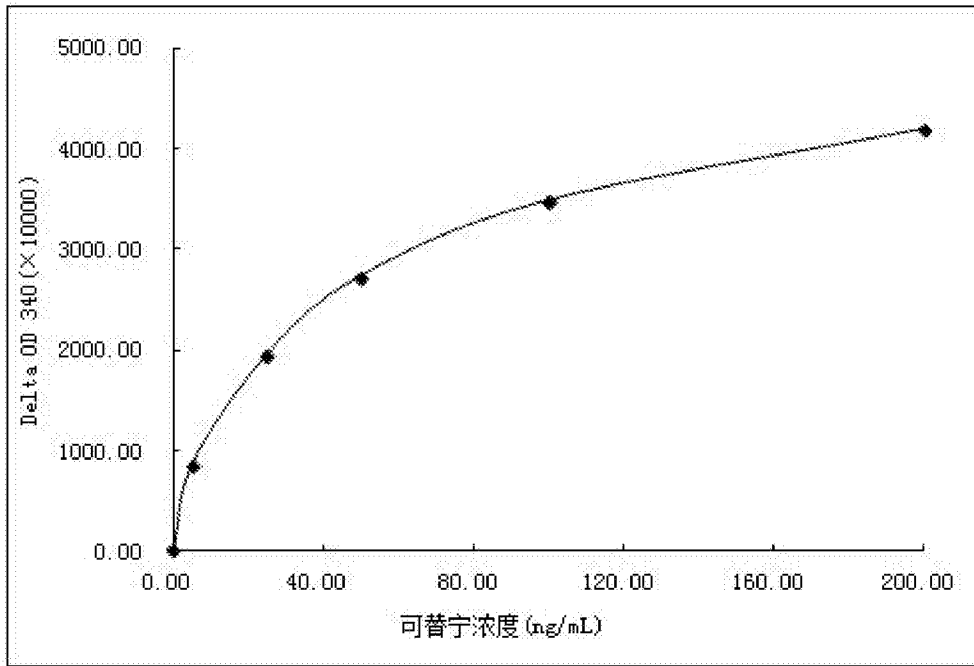


图1

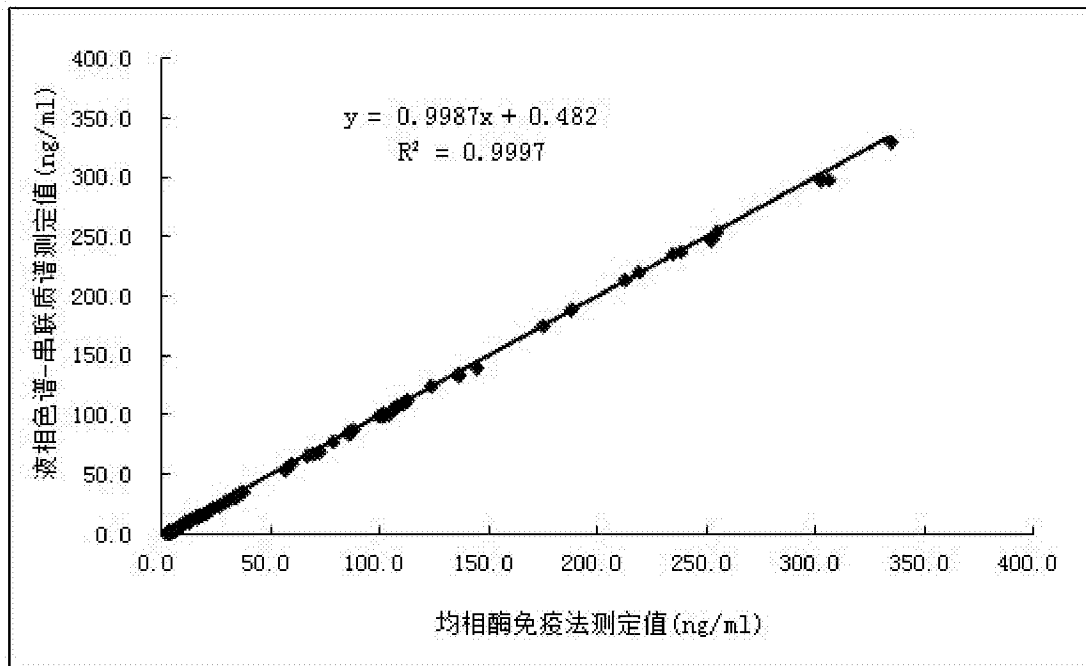


图2

专利名称(译)	一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN106053788A	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	CN201610574864.3	申请日	2016-07-21
[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 周桓 汪兴周		
发明人	虞留明 周桓 汪兴周		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54393		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可替宁检测试剂及其制备和检测方法，具体涉及一种可替宁均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法，包括：抗可替宁特异性抗体、用于检测抗可替宁特异性抗体-可替宁复合物的指示试剂；上述抗可替宁特异性抗体由可替宁免疫原免疫动物得到。本发明的有益之处在于：本发明的可替宁免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗可替宁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；含有上述抗可替宁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可替宁含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现可替宁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。

