



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102659939 A

(43) 申请公布日 2012.09.12

(21) 申请号 201210125535.2

(22) 申请日 2012.04.26

(71) 申请人 嘉兴九七九生物技术有限公司

地址 314300 浙江省嘉兴市海盐县武原街道
盐北路 211 号西区 2 幢 105 室

(72) 发明人 虞留明 田军 袁红霞 孟雷
蔡江丽

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

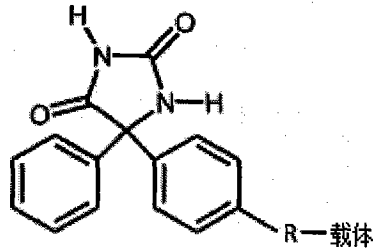
(54) 发明名称

苯妥因免疫原、抗苯妥因特异性抗体和苯妥因检测试剂

(57) 摘要

本发明公开了一种苯妥因免疫原及其合成方法,以及由该免疫原获得的抗苯妥因特异性抗体、检测试剂及其制备方法。本发明由高效价的抗苯妥因特异性抗体研制的免疫试剂可精确的测定血清中苯妥因的浓度。与现有技术方法相比,本发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强,并具有操作简单、速度快、检测结果准确等特点,对临床疾病的诊断和治疗具有重要的指导意义。

1. 一种苯妥因免疫原,其结构式如式(I)所示:



式 (I)

式中, R 为连接基团,载体具有免疫原性,

其中 R 选自 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 或 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 中的一种, n 是 1 至 20 之间的整数,优选 n 值为 1 至 10; 优选 R 为 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$,更优选为 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}-$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的苯妥因免疫原,其特征在于载体为具有免疫原性的蛋白质,选自血清蛋白,血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种,优选为牛血清蛋白。

3. 一种如权利要求 1-2 中任一项所述的苯妥因免疫原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 用 50-200ml 有机溶剂 A 溶解 1.0-10.0g 的羟基二苯酮和 1.0-5.0g 的碳酸盐,得到溶液 1;将 1.0-10.0g 的 5-溴戊酸乙酯加入到溶液 1 中,反应完成后用 5-20ml 的有机溶剂 A 溶解反应物,经有机溶剂 B 萃取、干燥、浓缩得到白色固体状化合物 3;

(2) 用 50-200ml 有机溶剂 C 溶解 1.0-10.0g 的化合物 3,加入强碱溶液反应,得到白色固体;将此白色固体经有机溶剂 C 萃取、无机酸溶液酸化、干燥、浓缩、纯化等步骤得到白色固体状化合物 4;

(3) 用 10-50ml 的有机溶剂 A 溶解下列化合物:1.0-5.0g 化合物 4,0.1-2.0g 氰化钾,1.0-10.0g 碳酸铵和 1-10ml 水。经加热反应得到的物质用强碱溶液溶解,经无机酸中和、有机溶剂 B 萃取、干燥、浓缩和纯化等步骤得到白色固体粉末状苯妥因衍生物;

(4) 将具有免疫原性的蛋白质 100-300mg 溶于 10-100ml 的 0.2M, pH 8.5 磷酸盐缓冲液中;

(5) 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的苯妥因衍生物,通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)Carbodiimide, EDAC) 的方法^[1]进行活化并与载体溶液进行交联反应,经透析纯化后得到具有免疫原性的苯妥因免疫原;

所述的有机溶剂 A 选自二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甲醇或乙醇中的一种,优选为二甲基甲酰胺;

所述的有机溶剂 B 选自乙酸乙酯,乙醚或氯仿中的一种,优选为乙酸乙酯;所述的有机溶剂 C 为:乙酸乙酯,乙醚,甲基叔丁基醚或氯仿,优选为甲基叔丁基醚;

所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液,优选为盐酸溶液。

4. 一种抗苯妥因特异性抗体,由权利要求 1~2 任意一项所述的苯妥因免疫原免疫宿主动物后生产得到。

5. 根据权利要求 4 所述的抗苯妥因特异性抗体,其特征在于所述的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体,优选为多克隆抗体,所述的宿主动物选自家兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马中的一种,优选为家兔。

6. 一种如权利要求 4-5 中任一项所述的抗苯妥因特异性抗体的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 用磷酸盐缓冲液将合成的苯妥因免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL;

(2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射,注射后抽取动物特异抗血清,得到有效的抗体。

上述步骤(1)中,优选地用磷酸盐缓冲液将苯妥因免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。

7. 一种苯妥因检测试剂,含有权利要求 4-5 所述的抗苯妥因特异性抗体和指示试剂,所述的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中的一种。

8. 根据权利要求 7 所述的苯妥因检测试剂,其特征在于所述的指示试剂为酶试剂,由苯妥因酶标偶联物和酶底物所组成。

9. 根据权利要求 8 所述的苯妥因检测试剂,其特征在于所述的苯妥因酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

(1) 称取酶,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/mL;

(2) 用有机溶剂溶解苯妥因衍生物,使其终浓度为 1-50mg/mL,通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到苯妥因酶标偶联物。

10. 根据权利要求 9 所述的苯妥因检测试剂,其特征在于所述的苯妥因酶标偶联物的制备方法还可以通过以下优选的方案实现:

(1) 称取酶,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 3-5mg/mL;

(2) 用有机溶剂溶解苯妥因衍生物,使其终浓度为 1-20mg/mL,通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到苯妥因酶标偶联物,

所述的酶标偶联物的酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶中的一种,优选为辣根过氧化物酶;所述的有机溶剂选自二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲醇或乙醇中的一种,优选为二甲基甲酰胺。

苯妥因免疫原、抗苯妥因特异性抗体和苯妥因检测试剂

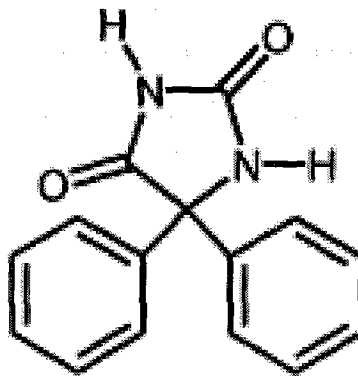
技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及苯妥因免疫原、抗苯妥因特异性抗体和苯妥因检测试剂。

背景技术

[0002] 苯妥因 (5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione)，其结构式如式 (II) 所示。

[0003]



式 (II)

[0004] 苯妥因是一种抗癫痫药物。癫痫是一种常见的神经系统疾病，也是我国神经系统疾病中仅次于脑血管疾病的第二大顽症，目前，抗癫痫类药物仍然是控制癫痫发作的主要手段。传统的抗癫痫类药物苯妥因由于治疗窗窄、个体差异大、疗效和毒性反应与血药浓度密切相关，临床医生仅凭经验给药往往达不到有效血药浓度。因此，苯妥因血药浓度的监测对癫痫的诊断和治疗具有重要的临床指导意义。

[0005] 利用抗苯妥因特异性抗体建立的免疫检验方法已经运用于病人血液中苯妥因的跟踪和监测。现有的抗苯妥因特异性抗体都是利用与苯妥因咪唑啉环上其中一个氨基偶联的免疫原而获得的（即苯妥因通过其氨基基团与载体蛋白进行偶联）（美国专利号 5306617，美国专利号 5747352）。但是通过这种衍生方法制备的抗体使咪唑啉环不能够充分体现其整体免疫性，本发明的衍生物则能够规避这个缺陷，使咪唑啉环保持其完整的免疫特性，得到更加特异性的抗体。

发明内容

[0006] 本发明就是为了克服现有技术存在的缺陷，采用一种苯妥因全新衍生物制备出的特异性抗体的免疫检验试剂弥补了这些缺点。本发明提供了一种检测方便、灵敏度高的检测试剂。本发明是通过以下技术方案实现的：

[0007] 本发明的一个目的是提供一种苯妥因免疫原。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种苯妥因免疫原的合成方法。

[0009] 本发明的另一个目的是提供使用本发明苯妥因免疫原制备得到的抗苯妥因特异

性抗体。

[0010] 本发明的另一目的是提供抗苯妥因特异性抗体的制备方法。

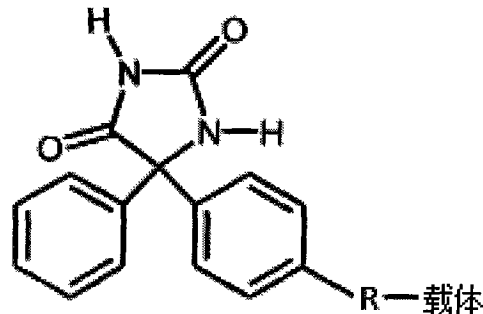
[0011] 本发明的再一个目的是提供一种含有本发明抗苯妥因特异性抗体的检测试剂。

[0012] 本发明的苯妥因免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗苯妥因特异性抗体。高效价的苯妥因特异性抗体研制的免疫试剂可直接测定血清中苯妥因的浓度。本发明提供的免疫检测试剂具有操作简单、速度快、检测结果准确等优点。

[0013] 本发明所采取的技术方案如下:

[0014] 一种苯妥因免疫原,其结构式如式(I)所示:

[0015]



[0016] 式(I)苯妥因免疫原

[0017] 式中,R为连接基团,载体具有免疫原性。

[0018] R可以为 $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$ 或 $-NH-(CH_2)_n-COO-$ 等,n是1至20之间的整数。优选R为 $-O-(CH_2)_n-COO-$,n值为1至10。更优选R为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

[0019] 载体为具有免疫原性的物质,常选用蛋白质。优选为血清蛋白,血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。更优选为牛血清蛋白。

[0020] 当R为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 时,该苯妥因免疫原的合成途径和方法如下:

[0021] 1. 苯妥因衍生物的合成

[0022] (1)用50-200ml有机溶剂A溶解1.0-10.0g的羟基二苯酮和1.0-5.0g的碳酸盐,得到溶液1;将1.0-10.0g的5-溴戊酸乙酯加入到溶液1中,反应完成后用5-20ml的有机溶剂A溶解反应物,经有机溶剂B萃取、干燥、浓缩得到白色固体状化合物3。

[0023] (2)用50-200ml有机溶剂C溶解1.0-10.0g的化合物3,加入强碱溶液反应,得到白色固体;将此白色固体经有机溶剂C萃取、无机酸溶液酸化、干燥、浓缩、纯化等步骤得到白色固体状化合物4。

[0024] (3)用10-50ml的有机溶剂A溶解下列化合物:1.0-5.0g化合物4,0.1-2.0g氰化钾(KCN),1.0-10.0g碳酸铵 $((NH_4)_2CO_3)$ 和1-10ml水。经加热反应得到的物质用强碱溶液溶解,经无机酸中和、有机溶剂B萃取、干燥、浓缩和纯化等步骤得到白色固体粉末状苯妥因衍生物。

[0025] 2. 载体溶液的制备:将具有免疫原性的蛋白质100-300mg溶于10-100ml的0.2M,pH 8.5磷酸盐缓冲液中。

[0026] 3. 苯妥因衍生物的活化及免疫原的合成:用1.0-5.0ml的有机溶剂A溶解50-500mg的苯妥因衍生物,通过1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(1-Ethyl-3-(3-

dimethylaminopropyl) Carbodiimide, EDAC) 的方法^[1]进行活化并与载体溶液进行交联反应,经透析纯化后得到具有免疫原性的苯妥因免疫原。

[0027] 上述方法中所述的有机溶剂 A 为二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇,优选 DMF;所述的有机溶剂 B 为:乙酸乙酯 (Ethyl acetate, EtOAc),乙醚或氯仿,优选乙酸乙酯;所述的有机溶剂 C 为:乙酸乙酯,乙醚,甲基叔丁基醚 (methyl tertbutyl ether) 或氯仿,优选甲基叔丁基醚;所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液,优选盐酸溶液;所述强碱溶液为氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液。

[0028] 当 R 为 $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$ 或 $-NH-(CH_2)_n-COO-$ 等时,苯妥因免疫原的合成途径与 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 时基本相同。

[0029] 一种抗苯妥因特异性抗体,由上述苯妥因免疫原免疫动物后生产得到。

[0030] 所述的抗苯妥因特异性抗体的制备方法如下:

[0031] (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的苯妥因免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL;

[0032] (2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射,注射后抽取动物特异性抗血清,得到有效的抗体。

[0033] 上述方法中,优选用磷酸盐缓冲液将苯妥因免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。

[0034] 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。

[0035] 本发明的抗体可以通过现有技术制备得到。获得多克隆抗体的典型方法是使用单一的免疫原,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:家兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马,优选地,上述宿主动物为家兔。动物定时采血得到适量的特异抗血清,抗血清可以纯化。单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0036] 本发明提供一种苯妥因检测试剂,由上述抗苯妥因特异性抗体和指示试剂组成。

[0037] 指示试剂可以是酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选地,指示试剂是酶试剂,由苯妥因酶标偶联物和酶底物所组成。

[0038] 酶标偶联物的酶可以选自辣根过氧化物酶 (Horse Radish Peroxidase, HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AP) 或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH) 等,优选酶为 HRP。所述酶底物为对应酶的底物,优选为 HRP 酶的底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)。

[0039] 苯妥因酶标偶联物的制备方法如下:

[0040] (1) 酶溶液制备

[0041] 称取酶,选自 HRP、AP 或 G6PDH,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/mL;

[0042] (2) 苯妥因衍生物的活化及偶联物的合成

[0043] 用有机溶剂溶解上文所述的苯妥因衍生物,使其终浓度为 1-50mg/mL,通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到苯妥因衍生物酶标偶联物。

[0044] 上述制备方法中所述的有机溶剂为:DMF、DMSO、甲醇或乙醇,优选为 DMF。

[0045] 酶标偶联物的制备方法还可以通过以下优选的技术方案实现：

[0046] (1) 酶溶液制备

[0047] 称取 HRP 在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中，终浓度为 3-5mg/mL；

[0048] (2) 苯妥因衍生物的活化及偶联物的合成

[0049] 用 DMF 溶解苯妥因衍生物，浓度为 1-20mg/mL，通过 EDAC 的方法进行活化，并与酶溶液进行交联反应，经纯化和透析后得到苯妥因酶标偶联物。

[0050] 本发明的苯妥因检测试剂，所包含的抗体是由全新的免疫原制备得到，具有灵敏度高，特异性强，可以检测血清和尿液中的苯妥因浓度，优选为血清样本，从而达到操作简便、周期短、成本低的要求。

附图说明

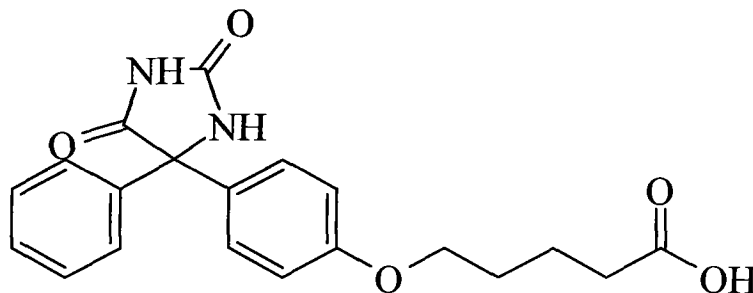
[0051] 图 1 是苯妥因 ELISA 检测反应曲线；

具体实施方式

[0052] 实施例 1 苯妥因免疫原的合成

[0053] 1. 苯妥因衍生物的合成，其化学结构式如式 (III) 所示

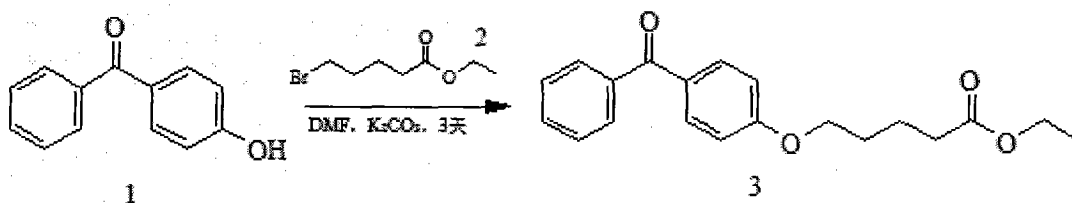
[0054]



[0055] 式 (III) 苯妥因衍生物

[0056] (1) 合成化学物 3

[0057]



[0058] 1) 准确称取 5.3g, 26.6mmol 的化合物 1 (羟基二苯酮) 和 1.9g, 14mmol 无水碳酸钾 (K_2CO_3), 将这两个化合物加入长颈瓶中。

[0059] 2) 加入 150mL DMF, 66555555 超声 15min 溶解化合物。

[0060] 3) 加入 6.5g, 31.2 mmol 化学物 2 (5-溴戊酸乙酯), 在 55°C 下搅拌 72h。

[0061] 4) 将溶液降至室温后过滤, 用 5 mL DMF 溶解反应物, 真空干燥。

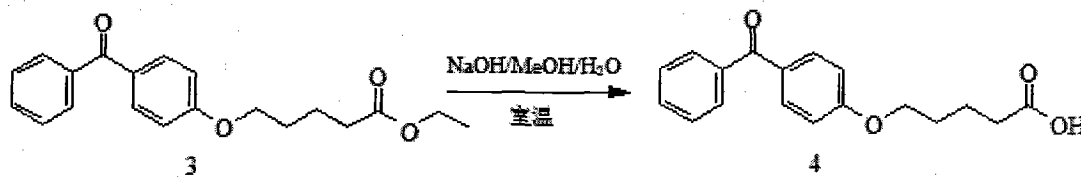
[0062] 5) 用 150 mL 浓碳酸氢钠 ($NaHCO_3$) 溶液溶解残留物, 经 150 mL EtOAc 萃取, 得到的有机相加入硫酸钠 (Na_2SO_4) 进行干燥。

[0063] 6) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 最后得到白色固体化学物 3 (7.8

g, 80%)。

[0064] (2) 合成化学物 4

[0065]



[0066] 1) 称取 5.0g, 15mmol 化学物 3 至 100ml 甲醇 (MeOH) 中, 加入 80mL 2MNaOH 溶液, 液体逐渐由澄清的无色溶液变为白色沉淀。

[0067] 2) 继续加入 2M NaOH 溶液至溶液重新变为澄清的无色溶液, 室温快速搅拌过夜。

[0068] 3) 将该混合溶液浓缩, 加 150mL 水溶解白色固体, 用 80mL 甲基叔丁基醚 (Methyl tertbutyl ether) 洗涤两次。

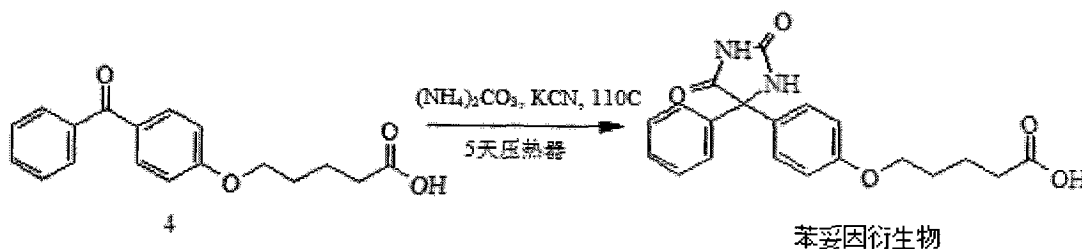
[0069] 4) 将该混合溶液浓缩并用 4M 盐酸 (HCl) 酸化至水层 pH 值为 2-3。用 100mL EtOAc 萃取两次。

[0070] 5) 得到的有机相加入硫酸钠 (Na_2SO_4) 进行干燥, 获得油状粗提化合物。

[0071] 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体化学物 4 (4.5g, 92%)。

[0072] (3) 苯妥因衍生物的合成

[0073]



[0074] 1) 把下列材料加入到一个不锈钢的压热器中：

[0075] 3.0g 10mmol 化学物 4, 0.8g 12mmol KCN, 6.0g 30mmol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5mL 水, 35mL DMF。

[0076] 2) 加热至 120°C 并保温 120h。

[0077] 3) 降温至室温, 用 100mL 2.5M NaOH 溶解混合体, 用 80mL 乙醚 (ether) 洗涤两次。

[0078] 4) 将该混合溶液用 6N 盐酸 (HCl) 酸化至水层 pH 值为 4-5。用 100mL EtOAc 萃取两次。

[0079] 5) 用盐水洗涤有机合成物, 干燥, 浓缩后获得油状粗提化合物。

[0080] 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色粉末状的苯妥因衍生物 (1.2g)。

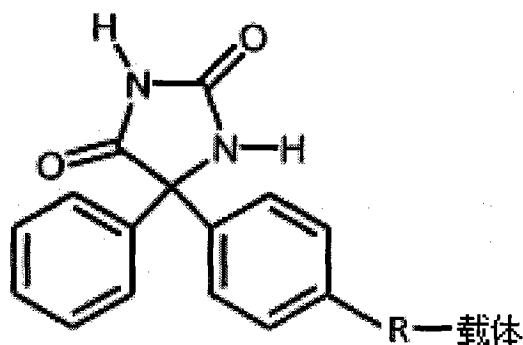
[0081] 7) 采用质谱和核磁对得到的衍生物进行分析鉴定。

[0082] 利用色谱 / 质谱技术 (LC/MS) 对得到的衍生物进行分析鉴定, 仪器为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, 5μm), 柱温为 30°C, 流速为 1.5mL/min, 流动相为乙腈 - 水比例为 5% - 60%。

[0083] LCMS 结果显示:纯度为 99.65%,保留时间为 3.65 min,分子量 368,分子离子为 367(M-1)。利用 Bruker Avance III plus 400 MHz 对该苯妥因衍生物进行核磁共振光谱扫描,内标采用 TMS。结果如下:NMR(400MHz,6d-DMSO):1.63-1.72(4H, m),2.25-2.29(2H, m),3.94-3.97(2H, m),6.93-6.96(2H, m),7.22-7.25(2H, m),7.33-7.39(5H, m),9.23(1H, s),11.04(1H, s),12.04(1H, s)。表征为式(III)的苯妥因衍生物。

[0084] 2. 苯妥因免疫原的合成,其结构式如式(I)所示:

[0085]



[0086] 式(I) 苯妥因免疫原

[0087] 苯妥因免疫原由血清蛋白,血蓝蛋白和甲状腺球蛋白与苯妥因通过 $-O-(CH_2)_4-COOH$ 基团连接而成,以牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)为例,具体的合成方法如下:

[0088] (1) 将 200mg BSA 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0089] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg 合成的苯妥因衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mgEDAC、50mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS),将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30min;

[0090] (3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中,并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到苯妥因免疫原。

[0091] 实施例 2 抗苯妥因特异性抗体的制备

[0092] (1) 用 PBS 将合成的苯妥因免疫原稀释至 1.5mg/ml,得到抗原溶液,然后用抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对家兔进行注射;

[0093] (2) $2 \sim 3$ 周后,再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合后对家兔注射一次,之后每隔四周一次,共两次,抽取家兔的抗血清,获得有效的抗体。

[0094] 实施例 3 苯妥因检测试剂的制备,该检测试剂:

[0095] 1. 含有上述实施例 2 中的抗苯妥因特异性抗体

[0096] 2. 含有苯妥因酶标偶联物,以 HRP 为例,制备方法如下:

[0097] (1) 称取 20mg HRP 在室温条件下溶解于 5ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0098] (2) 活化苯妥因衍生物:称取 5mg 的苯妥因衍生物于小烧杯中,并依次加入 $350 \mu\text{L}$ DMF、 $350 \mu\text{L}$ 无水乙醇、 $700 \mu\text{L}$ 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、20mg EDAC 和 3mg Sulfo-NHS,在室温条件下搅拌反应 30min;

[0099] (3) 随后将活化的苯妥因衍生物滴加到 HRP 溶液中,在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下搅拌过夜,并

将偶联的抗原进行透析纯化得到 HRP- 苯妥因偶联物。

[0100] 3. 含有常规的 ELISA 检测的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 的底物溶液。

[0101] 实施例 4 苯妥因的 ELISA 检验及定标结果

[0102] 1. 苯妥因 ELISA 检验

[0103] (1) 用 PBS 将实施例 2 的抗苯妥因抗体稀释成 1 : 10000 的终浓度溶液, 100 μ L/孔包被在 96 孔酶联板上, 4 $^{\circ}$ C 过夜 ;

[0104] (2) PBS 洗涤 3 次后, 加入 200 μ L/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液, 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。PBS 洗涤 3 次 ;

[0105] (3) 加入 20 μ L/ 孔的标准品 ;

[0106] (4) 加入 100 μ L/ 孔工作浓度的 HRP- 苯妥因偶联物 ;

[0107] (5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次 ;

[0108] (6) 每孔加入 100 μ L TMB 底物, 室温孵育 30min。

[0109] (7) 每孔加入 100 μ L 终止液 (2M 硫酸)。

[0110] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0111] 2. 定标结果如附图 1 所示。

[0112] 实施例 5 应用苯妥因检测试剂进行样本中苯妥因的回收试验

[0113] 该回收实验的目的是确定所述的苯妥因检测试剂可以用于血清样本中苯妥因的检测。

[0114] 1. 通过苯妥因的 ELISA 检验的定标曲线, 测定空白、低、中、高浓度血清样本 (将苯妥因粉末 (购买于 Sigma) 溶解于甲醇溶液, 制成 1mg/mL 的储存液, 再将此储存液稀释于空白血清中, 至终浓度分别为 0.0, 2.50, 10.00, 40.00 μ g/mL), 每个样本进行 3 个复孔测定计算回收率, 结果样品的回收率高 (> 90%)。

[0115] 2. 测定方法 : 如实施例 4 中的苯妥因的 ELISA 方法所述, 结果见表 1。

[0116] 表 1 苯妥因的 ELISA 检测回收实验

[0117]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 (μ g/ml)	0.00	2.50	10.00	40.00
测试 1	0.10	2.56	11.90	43.30
测试 2	0.07	2.97	8.24	46.42
测试 3	0.08	2.78	8.12	39.33
平均值 (μ g/ml)	0.08	2.77	9.42	43.01
回收率 (%)	-	111	94	108

[0118] 该实验结果显示 : 不同浓度的样品中的苯妥因回收率高, 均 > 90%, 说明所述的

苯妥因检测试剂可以用于样本中苯妥因的检测,并且结果准确,可信。

[0119] 实施例 6 药物干扰检测

[0120] 选取 46 种常用化合物和药物进行药物干扰检测,调整其浓度为 10.0 $\mu\text{g/ml}$,采用实施例 4 所述的苯妥因的 ELISA 检验方法进行复孔测定。

[0121] 干扰试验的具体步骤如下:

[0122] (1) 用 PBS 将实施例 2 的抗苯妥因抗体稀释成 1 : 10000 的终浓度溶液,100 μL /孔包被在 96 孔酶联板上,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;

[0123] (2) PBS 洗涤 3 次后,加入 200 μL /孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。PBS 洗涤 3 次;

[0124] (3) 加入 20 μL /孔的浓度为 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的干扰药物;

[0125] (4) 加入 100 μL /孔工作浓度的 HRP- 苯妥因偶联物;

[0126] (5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

[0127] (6) 每孔加入 100 μL TMB 底物,室温孵育 30min。

[0128] (7) 每孔加入 100 μL 终止液 (2M 硫酸)。

[0129] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0130] 依据实施例 4 中的定标曲线结果,将干扰物的 OD450 值换算成等价于苯妥因的浓度。结果如表 2 所示。

[0131] 表 2 苯妥因的药物干扰检测结果

[0132]

	化合物名称	等价于苯妥因的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	阿司匹林	< 0.1
2	氨苄西林	< 0.1
3	β -) 苯乙胺	< 0.1
4	咖啡因	< 0.1
5	氯氮卓	< 0.1
6	氯丙嗪	< 0.1
7	非诺洛芬	< 0.1

[0133]

8	吉非贝齐	< 0.1
9	龙胆酸	< 0.1
10	氢可酮	< 0.1
11	布洛芬	< 0.1
12	丙米嗪	< 0.1
13	麻黄碱	< 0.1
14	度冷丁	< 0.1
15	萘普生	< 0.1
16	烟酰胺	< 0.1
17	青霉素	< 0.1
18	去氧肾上腺素	< 0.1
19	苯丙醇胺	< 0.1
20	普鲁卡因胺	< 0.1
21	普鲁卡因	< 0.1
22	奎尼丁	< 0.1
23	佐美酸	< 0.1
24	安定	< 0.1
25	阿替洛尔	< 0.1
26	心得安	< 0.1
27	氢氯噻嗪	< 0.1
28	氨苯砜	< 0.1
29	雷尼替丁	< 0.1
30	沙丁胺醇	< 0.1

31	纳布啡	< 0.1
32	大麻酚	< 0.1
33	洛哌丁胺	< 0.1
34	托美汀	< 0.1
35	异克舒令	< 0.1
36	苯丙氨酸	< 0.1
37	硫代硫酸盐	< 0.1
38	氟西汀	< 0.1
39	氯胺酮	< 0.1
40	盐酸苯海拉明	< 0.1
41	芬特明	< 0.1
42	阿托品	< 0.1
43	对乙酰氨基酚	< 0.1
44	双氢可待因	< 0.1
45	芬氟拉明	< 0.1
46	制霉菌素	< 0.1

[0134] 由表 2 的结果得出,所有干扰药物的测定结果等价于苯妥因的浓度均 < 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由此可见,本发明的抗体是抗苯妥因的特异性抗体,与其它药物无交叉反应。

[0135] 参考文献

[0136] [1]Hermanson. Bioconjugate techniques. 2nd edition, 215-221.

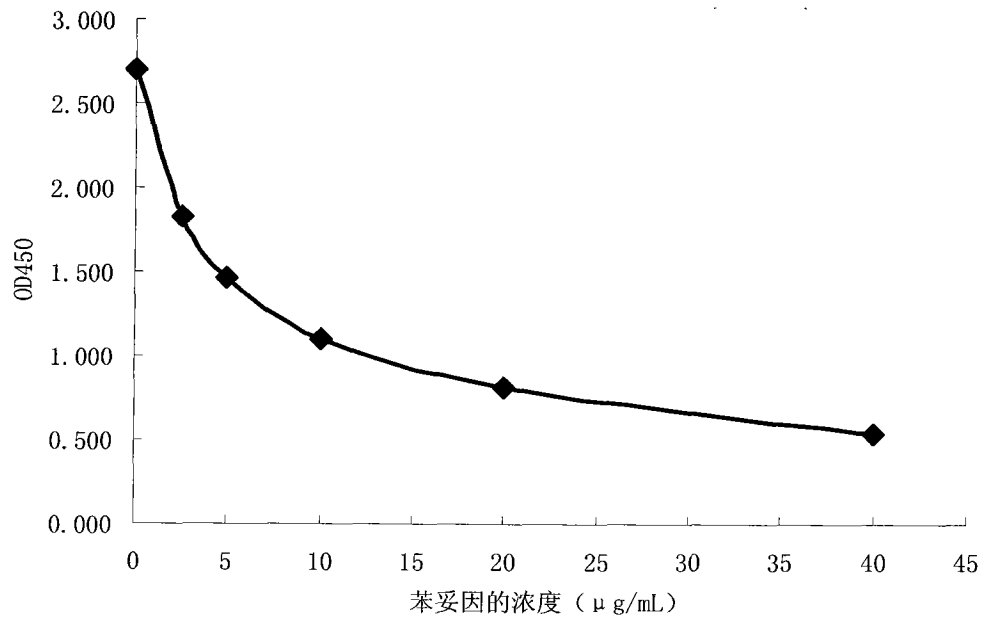
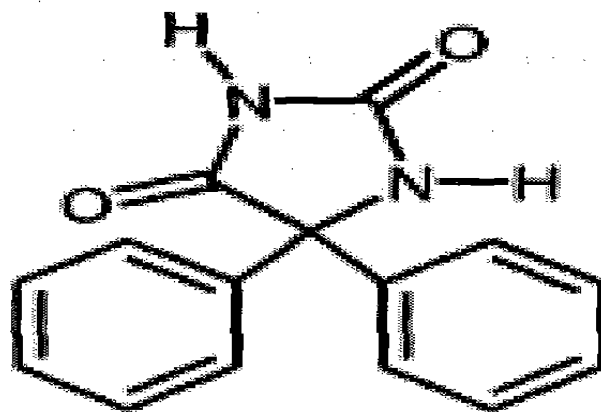


图 1

专利名称(译)	苯妥因免疫原、抗苯妥因特异性抗体和苯妥因检测试剂		
公开(公告)号	CN102659939A	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN201210125535.2	申请日	2012-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
[标]发明人	虞留明 田军 袁红霞 孟雷 蔡江丽		
发明人	虞留明 田军 袁红霞 孟雷 蔡江丽		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/47 C07K1/113 C07K16/44 C07K16/06 G01N33/532		
其他公开文献	CN102659939B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种苯妥因免疫原及其合成方法，以及由该免疫原获得的抗苯妥因特异性抗体、检测试剂及其制备方法。本发明由高效价的抗苯妥因特异性抗体研制的免疫试剂可精确的测定血清中苯妥因的浓度。与现有技术方法相比，本发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强，并具有操作简单、速度快、检测结果准确等特点，对临床疾病的诊断和治疗具有重要的指导意义。



式 (II)