



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102323414 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 201110150942. 4

C07K 16/44 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 07

(71) 申请人 西安金域医学检验所有限公司

地址 710043 陕西省西安市东开发区火炬路
2 号楼 2 层

(72) 发明人 虞留明 王金文 梁晓翠 李冬
胡朝晖

(74) 专利代理机构 深圳市博锐专利事务所
44275

代理人 张明

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/573 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

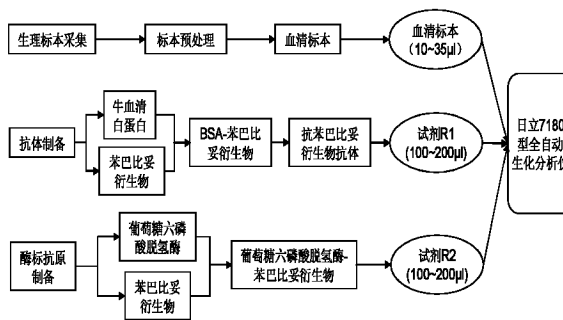
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的苯巴比妥药物浓度检测设备及其制备方法,为了解决上述技术问题,本发明提供一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法,包括苯巴比妥免疫原的合成,抗苯巴比妥特异性抗体的制备,酶标偶联物的制备以及样本的测定。本发明的苯巴比妥药物浓度均相酶免疫检测试剂盒准确度和精确度高,血清标本的平均回收率大于 95%,相关系数偏差小于 2.5%。该试剂盒中提供的苯巴比妥抗体的特异性强,药物交叉反应试验中,对测试的 30 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应,适合临床检测苯巴比妥的血药浓度。本发明的试剂盒简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。



1. 一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:
试剂 R1 :苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体 ;
试剂 R2 :葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物 ;
试剂 R3 :定标液 ;
所述定标液为苯巴比妥校准品溶于空白血清中制得 ;
所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物为苯巴比妥衍生物与葡萄糖六磷酸脱氢酶偶联产物,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物能与苯巴比妥衍生物特异抗体特异性结合 ;
所述苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体是以苯巴比妥衍生物与牛血清白蛋白偶联的产物为免疫抗原制得。
2. 根据权利要求 1 所述的苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述定标液为 6 种不同苯巴比妥质量浓度的溶液,所述定标液苯巴比妥质量浓度分别为 $0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $10\ \mu\text{g/mL}$ 、 $20\ \mu\text{g/mL}$ 、 $40\ \mu\text{g/mL}$ 、 $80\ \mu\text{g/mL}$ 。
3. 根据权利要求 1 所述的一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物稀释度为 $1 : 1000$ – $1 : 3000$,苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体稀释度为 $1 : 500$ – $1 : 4000$ 。
4. 一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:苯巴比妥衍生物特异的单克隆或多克隆抗体的制备;葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的特异苯巴比妥衍生物的制备;定标液的制备。
5. 根据权利要求 4 所述的一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述苯巴比妥衍生物特异多克隆抗体的制备包括以下步骤:
步骤 a :
将牛血清白蛋白溶解于 0.2mol/L 的 $\text{pH}8.5$ 的磷酸缓冲液中 ;
苯巴比妥衍生物的活化:将特异的苯巴比妥衍生物 10mg 置于容器中,并依次加入 $350\ \mu\text{L}$ 二甲基酰胺、 $350\ \mu\text{L}$ 乙醇、 $700\ \mu\text{L}$ 磷酸钾缓冲液、 40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 5mg N-羟基琥珀酰亚胺;所述磷酸钾缓冲液浓度为 10mmol/L , pH 值为 5.0 ;
步骤 b :苯巴比妥衍生物免疫抗原的偶联和纯化:将步骤 a 活化的苯巴比妥衍生物滴加到步骤 a 所得的牛血清白蛋白溶液中,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下搅拌 12–16 小时,将偶联的抗原进行孔径为 8KD 的透析袋透析纯化 ;
步骤 c :采用步骤 b 得到的苯巴比妥衍免疫抗原制备苯巴比妥衍生物抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤 c 为:
将步骤 b 合成的苯巴比妥免疫抗原用 10mmol/L , $\text{pH}7.4$ 的磷酸缓冲液稀释至 1.0mg/mL ,然后用苯巴比妥免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对兔子进行注射,14–21 天后,再用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 28 天注射一次,从兔子进行初次注射开始,经过 4 个月后获得的抗体。
7. 根据权利要求 6 所述的一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物的制备包括以下步骤:

a、将 15mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于 12mL Tris 缓冲液中, 然后依次加入 225mg 还原型辅酶 I、135mg 葡萄糖-6-磷酸、0.75mL 卡必醇和 2.25mL 二甲基亚砷; 所述 Tris 缓冲液 pH 为 9.0, 各组分浓度为: 0.05mol/L Tris、3.3mmol/L 氯化镁, 145.4mmol/L 氯化钠;

b、苯巴比妥衍生物的活化: 将 10mg 苯巴比妥衍生物溶解于 420 μ L 二甲基亚砷和 180 μ L 二甲基甲酰胺中, 加入 6 μ L 三丁胺和 350 μ L 氯甲酸异丁酯在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 30 分钟;

c、将所述步骤 a 和 b 所得溶液混合, 在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 12-16 小时, 并将偶联的酶标抗原进行 G-25 凝胶层析柱纯化, 得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物。

一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 苯巴比妥(1-(4-carboxybutyle)-5-ethyl-5-phenylbarbituricacid,1-(4-羧丁基)-5-乙基-5-苯基-巴比妥酸)是临床上常用的抗癫痫、抗惊厥、稳定情绪类的药物,由于治疗的有效血药浓度范围狭窄,药物的药动学个体间差异显著,血药浓度与治疗效果密切相关,血药浓度过高时可产生严重的毒副作用,可导致呼吸中枢衰竭,甚至危及生命,血药浓度过低则无治疗效果,因此在治疗期间对病人的血药浓度进行监测,对开展个性化治疗具有重要的临床指导意义。

[0003] 目前,国内外测定苯巴比妥血药浓度的方法主要是高效液相色谱(HPLC)、微粒酶免法、免疫比浊法、发光免疫、酶联免疫吸附剂测定(ELISA)等免疫法。采用HPLC法,需要样本前处理,操作较复杂、周期较长、且成本昂贵;ELISA检测法灵敏度高,但只能半定量;发光免疫检测法虽然具有操作简单、灵敏度高等优点,但试剂成本昂贵,不适合常规治疗药物的检测,不利于个性化治疗的推广。

[0004] 因此开发一种操作简便、周期短、成本低、灵敏度高的检测方法成为急待解决的问题。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的苯巴比妥药物浓度检测试剂盒和制备方法。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是提供一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,包括以下几种组分:

[0007] 试剂R1:苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体;

[0008] 试剂R2:葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物;

[0009] 试剂R3:定标液;

[0010] 所述定标液为苯巴比妥校准品溶于空白血清中制得;

[0011] 所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物为苯巴比妥衍生物与葡萄糖六磷酸脱氢酶偶联产物,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物能与苯巴比妥衍生物特异抗体特异性结合;

[0012] 所述苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体是以苯巴比妥衍生物与牛血清白蛋白偶联的产物为免疫抗原制得。

[0013] 优选的,所述定标液为6种不同苯巴比妥质量浓度的溶液,所述定标液苯巴比妥质量浓度分别为 $0\mu\text{g/mL}$ 、 $5\mu\text{g/mL}$ 、 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $40\mu\text{g/mL}$ 、 $80\mu\text{g/mL}$ 。

[0014] 优选的,所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物稀释度为

1 : 1000-1 : 3000, 苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体稀释度为 1 : 500-1 : 4000。

[0015] 为了解决上述技术问题, 本发明所采用的另一个技术方案是提供一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

[0016] 苯巴比妥衍生物特异的单克隆或多克隆抗体的制备; 葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的特异抗原的制备; 定标液的制备。

[0017] 优选的, 所述苯巴比妥衍生物特异的多克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0018] 步骤 a:

[0019] 将牛血清白蛋白溶解于 0.2mol/L 的 pH8.5 的磷酸缓冲液中;

[0020] 苯巴比妥衍生物的活化: 将特异的苯巴比妥衍生物 10mg 置于容器中, 并依次加入 350 μ L 二甲基酰胺、350 μ L 乙醇、700 μ L 磷酸钾缓冲液、40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 5mg N-羟基琥珀酰亚胺; 所述磷酸钾缓冲液浓度为 10mmol/L, pH 值为 5.0;

[0021] 步骤 b: 苯巴比妥衍生物免疫抗原的偶联和纯化: 将步骤 a 活化的苯巴比妥衍生物滴加到步骤 a 所得的牛血清白蛋白溶液中, 在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 12-16 小时, 将偶联的抗原进行孔径为 8KD 的透析袋透析纯化;

[0022] 步骤 c: 采用步骤 b 得到的苯巴比妥衍免疫抗原制备苯巴比妥衍生物抗体。

[0023] 优选的, 所述步骤 c 为:

[0024] 将步骤 b 合成的苯巴比妥免疫抗原用 10mmol/L, pH7.4 的磷酸缓冲液稀释至 1.0mg/mL, 然后用苯巴比妥免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对兔子进行注射, 14-21 天后, 再用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 28 天注射一次, 从兔子进行初次注射开始, 经过 4 个月后获得的抗体。

[0025] 优选的, 所述葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物的制备包括以下步骤:

[0026] a、将 15mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于 12mL Tris 缓冲液中, 然后依次加入 225mg 还原型辅酶 I、135mg 葡萄糖-6-磷酸、0.75mL 卡必醇和 2.25mL 二甲基亚砷; 所述 Tris 缓冲液 pH 为 9.0, 各组分浓度为: 0.05mol/L Tris、3.3mmol/L 氯化镁, 145.4mmol/L 氯化钠;

[0027] b、苯巴比妥衍生物的活化: 将 10mg 苯巴比妥衍生物溶解于 420 μ L 二甲基亚砷和 180 μ L 二甲基甲酰胺中, 加入 6 μ L 三丁胺和 350 μ L 氯甲酸异丁酯在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 30 分钟;

[0028] c、将所述步骤 a 和 b 所得溶液混合, 在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 12-16 小时, 并将偶联的酶标抗原进行 G-25 凝胶层析柱纯化, 得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物。

[0029] 本发明的有益效果为本发明的苯巴比妥药物浓度均相酶免疫检测试剂盒准确度和精确度非常高, 检测的标准差 (SD) 小于 1.7%, 血清标本的平均回收率 (Recovery) 大于 95%, 相关系数偏差 (CV) 小于 2.5%。该试剂盒中提供的苯巴比妥抗体的特异性强, 药物交叉反应试验中, 对测试的 30 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应, 适合临床检测苯巴比妥的血药浓度。本试剂盒的药物浓度的有效检测范围 10ng-80 μ g/mL, 灵敏度达到 10ng/mL。本试剂盒简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。

附图说明

[0030] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明:

[0031] 图 1 是苯巴比妥免疫检测试剂盒使用原理示意图;

[0032] 图 2 是苯巴比妥均相酶免疫测定的定标曲线。

具体实施方式

[0033] 为详细说明本发明的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合实施方式并配合附图详予说明。

[0034] 本发明中的均相酶免疫测定是一种竞争性反应,该检测的基本原理是液体样本中游离的苯巴比妥与偶联在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH)上的苯巴比妥衍生物对特异性抗体的位点进行竞争结合。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-苯巴比妥衍生物偶联物是酶标半抗原,具有抗原和酶的活性,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-苯巴比妥衍生物偶联物可以被抗体识别。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶既能够转化磷酸葡萄糖也能够将尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化成 6-磷酸葡萄糖和还原型辅酶 I(NADH)。这个过程导致吸光度的变化,可以在 340nm 波长光源下被检测到。一旦抗体与酶-苯巴比妥结合物结合上,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性即被抑制,液体样本中的苯巴比妥竞争性的取代与抗体结合的苯巴比妥酶偶联物,并使其从抗体的结合位点上释放出来,从而使葡萄糖-6-磷酸脱氢酶恢复活性。因此,液体样本中苯巴比妥的含量越多,游离的苯巴比妥衍生物-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联物就越多,从而能得到更强的信号。

[0035] 请参阅图 1 苯巴比妥免疫检测试剂盒使用原理示意图。

[0036] 实施例一

[0037] a、牛血清白蛋白-苯巴比妥衍生物免疫抗原的合成:

[0038] 1、BSA 溶液的制备,称取 20mg 牛血清白蛋白(BSA)并在室温条件下溶解于 5mL 0.2mol/L, pH8.5 的磷酸缓冲液中;

[0039] 2、苯巴比妥衍生物的活化,称取 10mg 特异的苯巴比妥衍生物于小烧杯中,并依次加入 350 μ L 二甲基酰胺(DMF)、350 μ L 乙醇、700 μ L 10mmol/L, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 5mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),将这些化学品在室温条件下搅拌溶解反应 30 分钟;

[0040] 3、抗原的偶联和纯化,将活化的苯巴比妥衍生物滴加到 BSA 溶液中,在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下搅拌过夜,得到抗原;并将偶联的抗原进行透析纯化。

[0041] b、抗苯巴比妥衍生物抗体的制备,步骤如下:

[0042] 用磷酸缓冲液将合成的苯巴比妥免疫抗原稀释至 1.0mg/mL,然后用 1.0mL 的抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对家兔进行注射。

[0043] 2~3 周后,再用 1.0mL 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,共两次,获得的抗体效价约为 1:30000。

[0044] c、葡萄糖六磷酸脱氢酶-苯巴比妥衍生物酶标抗原的制备:

[0045] 称取 15mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶,溶解于 12mL, 0.05mmol/L Tris 缓冲液中,然后依次加入 100-250mg NADH、0.5-1.0mL 的卡必醇和 1-3.0mL 的二甲基亚砷混匀;

[0046] 将 10mg 的苯巴比妥衍生物溶解于 420 μ L 二甲基亚砷和 180 μ L DMF 中,加入 6 μ L 三丁胺和 3 μ L 氯甲酸异丁酯,在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 30 分钟。

[0047] 将上述两种溶液混合,在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下搅拌过夜,并将偶联的酶标抗原进行 G-25 凝胶层析柱纯化。

[0048] d、均相免疫试剂的制备

[0049] R1 试剂的制备,将抗体制备中的抗体按 1 : 1000 到 1 : 3000 的比例添加到 R1 Base(50mmol Tris, pH8.0) 中,其中含有 0.1% (w/v) 的 BSA。

[0050] R2 试剂的制备,将制备的酶标抗原按 1 : 500-1 : 4000 的比例稀释到 R2 Base(50mmol Tris, pH8.0) 中,其中含有 0.1% (w/v) 的 BSA。

[0051] 通过调节抗体和酶标抗原在缓冲液中的浓度,优化测定工作曲线的范围。

[0052] 实施例二苯巴比妥检测试剂盒产品的检测实验

[0053] 1. 定标实验

[0054] 请参阅图 2,苯巴比妥校准品溶于空白血清中并配制成 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 共 6 种系列浓度的定标液,定标液的工作体积为 10-35 μL ,然后加入 100-200 μL 试剂 R1 和 100-200 μL 试剂 R2,采用两点速率法,检测主波长为 340nm、副波长为 405nm 的吸光度变化率,建立并优化苯巴比妥均相酶免疫定标曲线(图 2),定标曲线的建立和优化在日立 7180 型全自动生化分析仪上完成。

[0055] 2. 回收实验

[0056] 利用建立的苯巴比妥定标曲线,测定低 (20 $\mu\text{g/mL}$)、中 (40 $\mu\text{g/mL}$)、高 (80 $\mu\text{g/mL}$) 三种浓度的苯巴比妥血清标本,每个标本完成 10 个测试。

[0057] 表一:苯巴比妥试剂盒的回收实验

[0058]

测试 (n=10)	低 (20 $\mu\text{g/mL}$)	中 (40 $\mu\text{g/mL}$)	高 (80 $\mu\text{g/mL}$)
1	19.73	39.93	73.96
2	19.34	38.06	74.95
3	18.91	40.34	73.50
4	19.52	38.89	76.64
5	20.08	38.74	74.53
6	19.18	39.80	77.17
7	19.33	38.11	72.44
8	19.11	40.59	75.37
9	18.36	39.69	71.74
10	19.11	39.74	74.53
平均值	19.27	39.39	74.48
回收率	96%	98%	93%
标准差	0.47	0.89	1.69
相关系数偏	2.42%	2.25%	2.27%

[0059]

差

[0060] 具体结果如表一所示, 样本测试的平均回复率 (Recovery) 大于 95%, 标准差 (SD) 小于 1.7, 相关系数偏差 (CV) 小于 2.5%。

[0061] 3. 药物干扰实验

[0062] 选取 30 种常用化合物和药物, 调整其工作浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$, 在日立 7180 型全自动生化分析仪上进行干扰试验测定。

[0063] 表二: 苯巴比妥试剂盒的药物干扰实验

ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	乙酰水杨酸	0.001
2	氟苄青霉素	0.000
3	苯乙胺	0.004
4	咖啡因	0.002
5	甲氧二氮卓	0.004
6	氯丙嗪	0.002
7	氯氮卓	0.008
8	d-甲基苯丙胺	0.004
9	非诺洛芬	0.008
[0064] 10	吉非贝齐	0.002
11	龙胆酸	0.005
12	二氢可待因酮	0.003
13	布洛芬	0.004
14	丙咪嗪	0.005
15	(L)-麻黄素	0.003
16	利多卡因	0.003
17	萘普生	0.005
18	烟酰胺	0.003
19	青霉素	0.004
20	苯肾上腺素	0.002

[0065]

ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
21	苯丙醇胺	0.003
22	普鲁卡因胺	0.001
23	普鲁卡因	0.002
24	奎尼丁	0.001
25	佐美酸	0.003
26	芽子碱甲基酯	0.004
27	芽子碱	0.003
28	安定	0.001
29	可替宁	0.000
30	顺式-4-可替宁 羧酸	0.017

[0066] 试验结果如表二所示,根据苯巴比妥均相酶免疫测定结果分析,30种常用化合物和药物对苯巴比妥的干扰非常小,说明本发明的抗体是抗苯巴比妥异性抗体。

[0067] 4. 灵敏度实验

[0068] 将苯巴比妥标准品溶于空白血清中,制备浓度为 0、5、10ng/mL 的血清样品,用苯巴比妥均相酶免疫检测试剂测定苯巴比妥的药物浓度,连续测定 5 次,计算平均值和标准差。

[0069] 表三:苯巴比妥试剂盒的灵敏试验实验

[0070]

测试次数 (n=5)	0ng/mL	5ng/mL	10ng/mL
1	13.0	2.0	7.0
2	0.0	3.0	8.0
3	1.0	7.0	8.0
4	0.0	6.0	7.0
5	2.0	4.0	8.0
平均值	1.0	4.4	7.6
标准差	1.0	2.1	0.5

	变异系数 (%)	100.0%	47.1%	7.2%
[0071]	平均值 \pm SD	1.0 \pm 1.0	4.4 \pm 2.1	7.6 \pm 0.5
	平均值 \pm 2SD	1.0 \pm 2.0	4.4 \pm 2.1	7.6 \pm 0.5

[0072] 如表三,结果表明 10ng/mL 样品的测试结果在 95% 的置信区间内 (平均值 \pm 2SD) 与 0.0ng/mL 样品无交叉,因此本发明中苯巴比妥均相酶免疫检测试剂的灵敏度可达为 10ng/mL。

[0073] 5. 精密度实验

[0074] 表四苯巴比妥试剂盒的精密度试验结果

	浓度 ($\mu\text{g/mL}$) (n=5)	15	30	50
[0075]	批内标准差	0.24	0.89	1.11
	批内变异系数 (CV%)	2.24	3.32	2.34
	批间标准差	0.75	1.86	2.59
	批间变异系数 (CV%)	6.75	6.83	5.46

[0076] 将苯巴比妥标准品溶于空白血清中,分别制备浓度为 15(低)、30(中)、50(高) $\mu\text{g/mL}$ 的血清样品,每种血清样品用苯巴比妥试剂重复测定 10 次,连续测定 5 天,分别计算 3 种浓度批内、批间精密度。如表四,结果表明本试剂盒精密度高。

[0077] 实施例三利用全自动生化分析仪进行样本测试

[0078] (1). 血清标本的收集,按照常规方法收集血清标本;

[0079] (2). 根据日立 7180 型全自动生化仪的操作说明,打开仪器,进行仪器光密度检测和探针的清洗,检测仪器是否运行正常;

[0080] (3). 仪器检测运行正常后,将试剂 R1、R2 依次放入 R1、R2 试剂仓,血清标本放入样品盘 1(S1),将 0 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 的苯巴比妥定标液放入样品盘 2(S2) 的指定位置;

[0081] (4). 仪器在 Stand by 状态时,设定苯巴比妥的操作程序和检测参数,具体检测参数如表五:

[0082] 表五血清中苯巴比妥药物浓度检测参数

[0083]

[0084]

检测方法	两点速率法
样本量	10-35 μL
T1	0 分钟
T2	1.5 分钟
试剂 R1	100-200 μL
试剂 R2	100-201 μL
测光点	21 至 31 点
检测波长(主/副)	340/405
定标类型	Logit-Log (4P)
定标液 1	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
定标液 2	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
定标液 3	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
定标液 4	20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
定标液 5	40 $\mu\text{g}/\text{mL}$
定标液 6	80 $\mu\text{g}/\text{mL}$

[0085] (5) 按照设定的检测参数,首先进行定标实验,建立苯巴比妥的定标曲线,然后根据建立的定标曲线,检测血清标本中苯巴比妥的浓度。

[0086] (6) 检测血清标本中苯巴比妥的浓度,仪器将测得的吸光度变化率根据标准曲线换算成药物浓度,并由终端显示打印检测报告。

[0087] 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作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的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

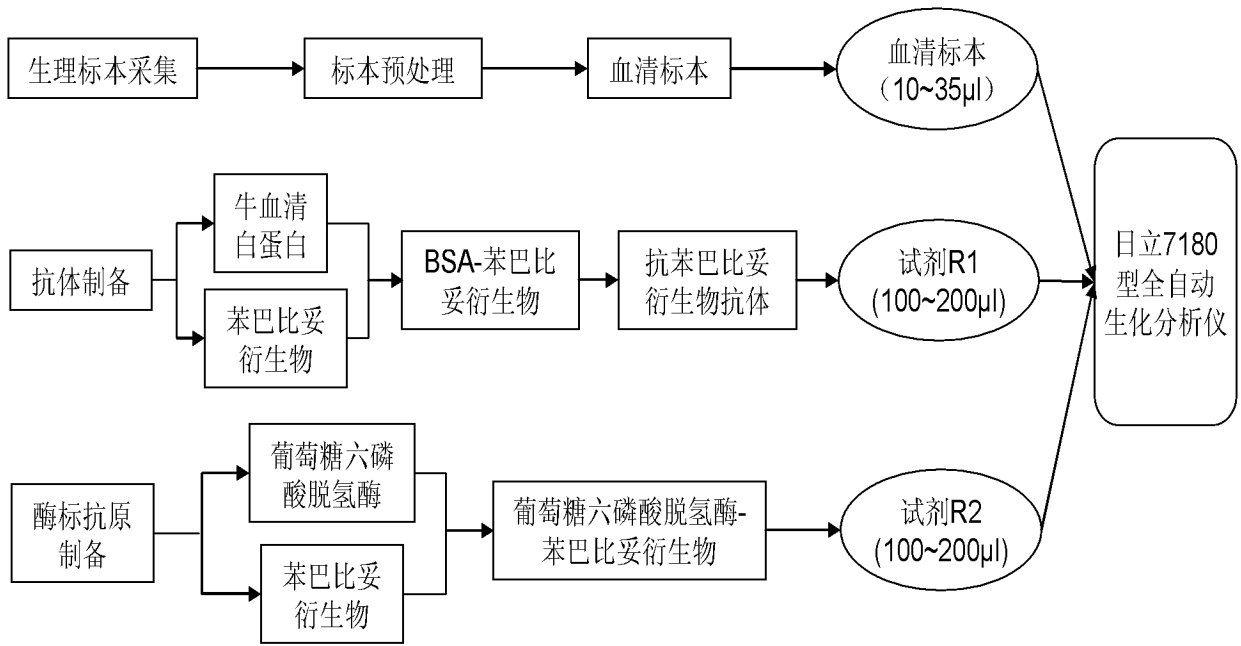


图 1

苯巴比妥均相酶免疫测定的定标曲线

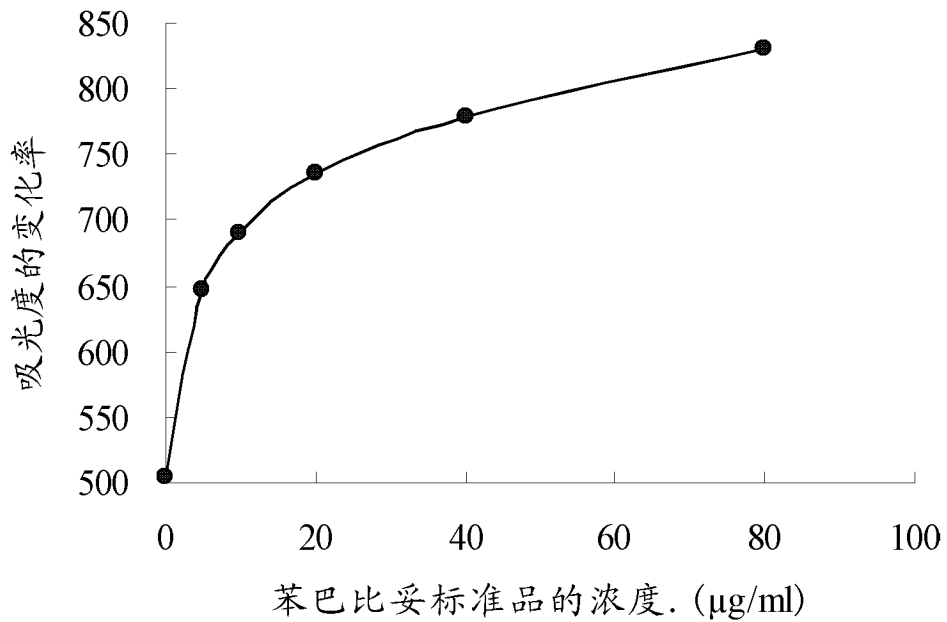


图 2

专利名称(译)	一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102323414A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN201110150942.4	申请日	2011-06-07
[标]发明人	虞留明 王金文 梁晓翠 李冬 胡朝晖		
发明人	虞留明 王金文 梁晓翠 李冬 胡朝晖		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/573 G01N33/531 C07K16/44		
代理人(译)	张明		
其他公开文献	CN102323414B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的苯巴比妥药物浓度检测设备及其制备方法，为了解决上述技术问题，本发明提供一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法，包括苯巴比妥免疫原的合成，抗苯巴比妥特异性抗体的制备，酶标偶联物的制备以及样本的测定。本发明的苯巴比妥药物浓度均相酶免疫检测试剂盒准确度和精确度高，血清标本的平均回收率大于95%，相关系数偏差小于2.5%。该试剂盒中提供的苯巴比妥抗体的特异性强，药物交叉反应试验中，对测试的30种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应，适合临床检测苯巴比妥的血药浓度。本发明的试剂盒简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。

