



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102507917 A

(43) 申请公布日 2012.06.20

(21) 申请号 201110340440.8

(22) 申请日 2011.11.01

(71) 申请人 四川金域医学检验中心有限公司

地址 610081 四川省成都市成华区龙潭工业
总部基地成济路1号

(72) 发明人 虞留明 王金文 王文峰 陈美才
梁耀铭

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

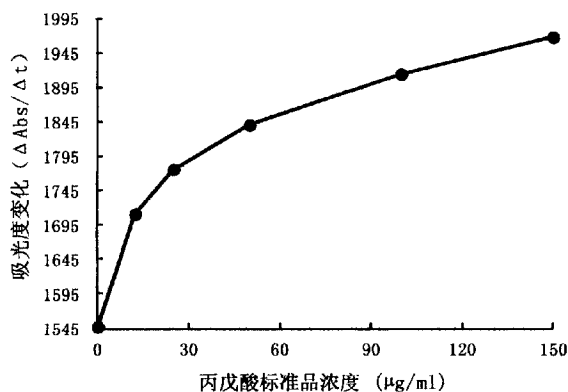
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于丙戊酸血药浓度监测技术领域，具体公开了一种丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒，通过合成衍生物将丙戊酸连接到小牛血清白蛋白 (BSA) 上制得免疫抗原，获得的多克隆抗体具有丙戊酸特异性。实验数据表明利用该试剂检测丙戊酸与其他常用药物无交叉反应；分析灵敏度达到 25ng/ml 以下；批间精密度、批内精密度变异系数 (CV) 均小于 4.7%；与免疫荧光偏振法 (FPIA) 进行方法比对， R^2 值达到 0.98。可运用于多种常规分析仪，由于操作简便、快速、成本低、灵敏度高，该试剂盒易于实现自动化检测，可指导临床个性化用药，降低药物的毒副作用，达到疗效最优化。



1. 一种丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒,其特征在于由以下几种组分组成:
反应液 R1,为酶反应底物稀释的抗丙戊酸特异性抗体;
反应液 R2,为丙戊酸酶标偶联物;
定标液,由丙戊酸校准品溶于空白缓冲溶液中制得。
2. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述抗丙戊酸特异性抗体为单克隆或多克隆体。
3. 根据权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述反应液 R1 和反应液 R2 的总量为 $75 \sim 150 \mu\text{L}$,定标液为 $5 \sim 20 \mu\text{L}$ 。
4. 根据权利要求1至3任一项所述的检测试剂盒,其特征在于,所述反应液 R1 的制备过程为:先通过向丙戊酸衍生物溶液中加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDAc)以及N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)使丙戊酸衍生物活化,随后与载体蛋白质在室温下进行偶联制备免疫抗原;将制备的免疫抗原免疫动物后生产丙戊酸特异性抗体;最后用酶反应底物按 $1:300 \sim 1:5000$ 稀释特异性抗体而制得。
5. 根据权利要求4所述的检测试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白质包括血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)或匙孔血蓝蛋白(KLH)。
6. 根据权利要求4所述的检测试剂盒,特征在于,所述酶反应底物含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和6磷酸葡萄糖(G6P),两者的浓度总量为 $2.81 \sim 11.25 \text{mmol/L}$ 。
7. 根据权利要求1至3任一项所述的丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述反应液 R2 由葡萄糖6磷酸脱氢酶(G6PDH)标记的丙戊酸组成。
8. 根据权利要求7所述的丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒,其特征在于,所述反应液 R2 的制备过程为:先通过向丙戊酸衍生物溶液中加入三丁胺和氯甲酸异丁酯活化丙戊酸衍生物;随后与葡萄糖6磷酸脱氢酶(G6PDH)在 $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 条件下进行偶联,利用凝胶层析柱进行纯化,得到丙戊酸酶标偶联物;最后用缓冲溶液按 $1:300 \sim 1:5000$ 稀释丙戊酸酶标偶联物制得。
9. 根据权利要求1所述检测试剂盒的应用,其特征在于,在对丙戊酸进行测定的过程中,反应体系在均一的液相中进行,无需分离步骤。

丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于丙戊酸临床样本检测技术领域,具体涉及一种快速检测丙戊酸浓度的试剂盒。

技术背景

[0002] 在目前众多的抗癫痫药物中,丙戊酸是一个临床应用广、疗效高和安全性好的首选、广谱药物。丙戊酸不仅可以用于治疗各类癫痫的全身性发作,尤其是失神发作和强直-阵挛发作,还可用于部分性发作。此外,丙戊酸很少影响患者的认知功能,并极少引起癫痫的发作加重。在治疗过程中由于患者个体药物代谢动力学差异,造成丙戊酸给药量与血药浓度之间相关性较差。按常规剂量给药测得的血药浓度,通常有 50% 低于或超出丙戊酸的有效治疗范围 ($50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$),因此对患者的丙戊酸血药浓度进行监测,对及时调整剂量,提高丙戊酸治疗癫痫的安全有效性具有重要的临床指导意义。

[0003] 目前,国内外运用于血药浓度检测的方法主要有色谱分析法和免疫分析法。色谱法包括高效液相色谱 (HPLC)、液质联用 (LC-MS/MS) 等,该方法对待测物具有高度特异性,但需要对样品进行前期处理,操作过程复杂、周期较长,仪器设备昂贵且对操作人员要求较高。而免疫分析法具有操作简单、灵敏度高等优点,国内目前应用于丙戊酸分析的免疫法主要有发光免疫、酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 等。ELISA 检测法灵敏度高,但准确度不足,只能半定量。同时国内目前尚无自主开发的发光免疫试剂,主要通过购买国外分析试剂盒在封闭型发光仪上进行检测。受仪器及试剂成本限制,该方法不利于在全国范围内推广。

发明内容

[0004] 本发明基于均相酶免疫法建立的丙戊酸药物浓度检测方法,提供一种简便、快速、高灵敏度、全自动化的检测试剂盒,具有特异性强、精确度高和高通量检验等优点。能够弥补现有检测技术的不足,满足国内丙戊酸药物浓度检测需要,具有重要的社会意义和应用价值。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案是:一种丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒,其特征在于由以下几种组分组成:

[0006] 反应液 R1,为酶反应底物稀释的抗丙戊酸特异性抗体;

[0007] 反应液 R2,为丙戊酸酶标偶联物;

[0008] 定标液,由丙戊酸校准品溶于空白缓冲溶液中制得。

[0009] 所述抗丙戊酸特异性抗体为单克隆或多克隆体。

[0010] 所述反应液 R1 和反应液 R2 的总量为 $75 \sim 150 \mu\text{l}$,定标液为 $5 \sim 20 \mu\text{l}$ 。

[0011] 所述反应液 R1 的制备过程为:先通过向丙戊酸衍生物溶液中加入 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (EDAC) 以及 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 使丙戊酸衍生物活化,随后与载体蛋白质在室温下进行偶联制备免疫抗原;将制备的免疫抗原免疫动物后生产丙戊酸特异性抗体;最后用酶反应底物按 1 : 300 ~ 1 : 5000 稀释特异性

抗体而制得。

[0012] 所述载体蛋白质包括血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 或匙孔血蓝蛋白 (KLH)。

[0013] 所述酶反应底物含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 和 6 磷酸葡萄糖 (G6P), 两者的浓度总量为 2.81 ~ 11.25mmol/L。

[0014] 所述反应液 R2 由葡萄糖 6 磷酸脱氢酶 (G6PDH) 标记的丙戊酸组成。

[0015] 所述反应液 R2 的制备过程为: 先通过向丙戊酸衍生物溶液中加入三丁胺和氯甲酸异丁酯活化丙戊酸衍生物; 随后与葡萄糖 6 磷酸脱氢酶 (G6PDH) 在 -2 ~ -8℃ 条件下进行偶联, 利用凝胶层析柱进行纯化, 得到丙戊酸酶标偶联物; 最后用缓冲溶液按 1 : 300 ~ 1 : 5000 稀释丙戊酸酶标偶联物制得。

[0016] 在对丙戊酸进行测定的过程中, 反应体系在均一的液相中进行, 无需分离步骤。

[0017] 本发明提供的丙戊酸检测试剂盒可应用于血液丙戊酸浓度的精确定量分析, 在临床应用方面具有显著优势。

[0018] 1、准确度好、精密度高、特异性及灵敏度强。试剂验证结果表明运用本发明提供的均相酶免疫检测试剂盒进行丙戊酸分析, 样品的平均回收率 (Recovery) 均为 95.7 ± 3.2%, 批内、批间精密度相关系数偏差 (CV) 小于 4.7%, 检测灵敏度达到 25ng/ml 以下。该试剂盒中提供的丙戊酸抗体的特异性强, 药物交叉反应试验中, 对测试的 32 种常见药物和化合物无任何交叉反应, 适合临床检验丙戊酸的血药浓度。

[0019] 2、操作简便、自动化快速检测、对检测仪器要求较低。检测试剂盒针对国内大多数医院检验设备较差的现状而设计, 在一般的生化分析仪上即能进行。在已经设置好运行参数的分析仪上, 将定标液、样本及试剂放入相应的样品盘及试剂盘中, 点击运行程序即可自动完成检测。排除人为操作造成的实验误差, 检测结果准确可靠。

[0020] 3、节约试剂成本。丙戊酸检测试剂盒可运用于开放性生化分析仪, 实现检测试剂自主化生产。初步估计实现生化检验从封闭型向开放型转变, 至少降低 50% 的试剂成本费用。

附图说明

[0021] 图 1 为丙戊酸免疫快速检测试剂盒定标曲线。

[0022] 图 2 为丙戊酸均相酶免疫检测与免疫荧光偏振方法比对。

具体实施方式

[0023] 本发明基于均相酶免疫法建立丙戊酸检测方法, 其原理主要运用了竞争性免疫反应原理, 反应过程为液体样本中游离的丙戊酸与偶联在 G6PDH 上的丙戊酸竞争性结合特异性抗体。G6PDH-丙戊酸偶联物具有免疫反应和酶催化活性, 能够催化氧化还原反应, 转化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 还原生成 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。一旦偶联物与抗体结合, 偶联物的酶催化活性即被抑制, 因此液体样本中丙戊酸含量越多, 使更多的 G6PDH-丙戊酸偶联物游离出来, 导致吸收值上升。

[0024] 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予以说明。

[0025] 一、反应液 R1 试剂的制备

[0026] 1、丙戊酸免疫抗原合成

[0027] 首先制备 BSA 溶液：将 20mg BSA 溶解于 5ml 磷酸缓冲液 ($0.2\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$, pH8.5) 中；同时制备丙戊酸衍生物溶液，将 20mg 丙戊酸衍生物、350 μl 二甲基甲酰胺 (DMF)、350 μl 乙醇、7.0ml (10mmol/L , pH 5.0) 磷酸钾缓冲液、40mg 的 EDAc、5mg 的 Sulfo-NHS 加入烧杯中搅拌溶解，搅拌溶解反应 30min；将制备好的丙戊酸溶液滴加到 BSA 溶液中于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 温度下持续搅拌 12 小时，随后经过透析进行纯化，得到丙戊酸免疫抗原。

[0028] 2、抗丙戊酸特异性抗体的制备

[0029] 用 PBS 磷酸缓冲液将合成的丙戊酸免疫原稀释至 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；14 ~ 21 天后，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，4 个月后获得的抗体约为 $1 : 300 \sim 1 : 5000$ 。

[0030] 3、反应液 R1 试剂的配制

[0031] 量取 1L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 缓冲液 (55mmol/L Tris , $0.1\% \text{BSA}$, 145.4mmol/L NaCl , 3mmol/L MgCl_2 , pH8.0)，依次加入 2.02 ~ 8.07gNAD 和 0.86 ~ 3.42gG6P，在室温下搅拌 10min。然后将丙戊酸特异性抗体按稀释比例添加到上述溶液中，稀释比例为 $1 : 300 \sim 1 : 5000$ 。

[0032] 二、反应液 R2 试剂的制备

[0033] 1、丙戊酸酶标偶联物的合成

[0034] G6PDH 溶液制备：将 10mg 的 G6PDH 溶解于 12ml Tris 缓冲液 (pH7.5) 中，然后依次加入 150mg 的 NADH、90mg G6P 及 0.5ml 卡必醇，随后逐滴加入 1.5ml 二甲亚砜 (DMSO)。

[0035] 丙戊酸衍生物溶液制备：将 8mg 丙戊酸衍生物溶解于 600 μl 二甲基甲酰胺 (DMF)，然后将溶液冷却至 $-2\sim -8^\circ\text{C}$ 后，加入 4 μl 三丁胺和 2 μl 氯甲酸异丁酯，在 $-2\sim -8^\circ\text{C}$ 下持续搅拌 30min；最后将制备好的丙戊酸衍生物溶液逐滴加入 G6PDH 溶液中在 $-2\sim -8^\circ\text{C}$ 下持续搅拌 1 小时。

[0036] 将偶联物过凝胶层析柱进行纯化，得到了丙戊酸酶标偶联物。

[0037] 2、反应液 R2 试剂的配制

[0038] 将丙戊酸酶标偶联物按稀释比例添加到 1L Tris 缓冲液 (pH8.0) 中，稀释比例为 $1 : 300 \sim 1 : 5000$ 。

[0039] 三、定标液的制备

[0040] 定标液为 6 种不同丙戊酸质量浓度的溶液，由丙戊酸校准品溶于空白缓冲溶液中制得。

[0041] 定标液中的丙戊酸质量浓度分别为 $0\mu\text{g/ml}$ 、 $12.5\mu\text{g/ml}$ 、 $25.0\mu\text{g/ml}$ 、 $50.0\mu\text{g/ml}$ 、 $100.0\mu\text{g/ml}$ 、 $150.0\mu\text{g/ml}$ 。

[0042] 四、丙戊酸检测试剂盒在全自动生化分析仪上的使用

[0043] 1、设置仪器的运行参数：反应液 R1 和反应液 R2 试剂的总体积为 $75\sim 150\mu\text{l}$ ，样本及定标液的总体积为 $5\sim 20\mu\text{l}$ ，分析方法为两点速率法，检测主波长为 340nm、副波长为 405nm，测光范围为 10 至 20 点。指定反应液 R1 及反应液 R2 试剂位置、丙戊酸定标液的位置及对应质量浓度。

[0044] 2、将试剂盒按分类放入生化仪中,运行仪器进行自动测试及标准曲线的拟合,定标结果存储于仪器中。随后将待测临床血液样本加入样品杯并放入样品盘中,样品测试申请后运行仪器进行自动测试,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,并由终端显示和打印。

[0045] 五、丙戊酸检测试剂盒方法验证

[0046] 1、精密度分析

[0047] 将丙戊酸标准品溶于缓冲溶液中,分别制备浓度为 37.5 μg/ml(低)、75 μg/ml(中)、125 μg/ml(高)的样品。将每种样品分装 5 份,用丙戊酸均相酶免疫试剂盒进行测定,计算平均值、标准差获得批内精密度(CV%);同时取丙戊酸低、中、高样品连续测定 5 天,计算平均值、标准差获得批内精密度。结果如表 1 所示,丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒具有良好的精密度,其中批内、批间精密度 CV 均小于 4.7%。

[0048] 表 1 丙戊酸均相酶免疫检测精密度分析

	靶值(μg/ml)	平均值	批内	批间
[0049]	37.50	38.38	4.57%	4.62%
	75.00	76.36	2.09%	4.32%
	125.00	127.64	2.62%	3.87%

[0050] 2、回收实验

[0051] 利用建立的丙戊酸定标曲线,测定由低到高 6 个浓度的丙戊酸样品,每个样品连续测定 10 次。结果如表 2 所示,样品测试的回收率范围在 90.9%~98.7%之间,平均回收率为 95.7±3.2%。显示丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒准确度较高。

[0052] 表 2 丙戊酸均相酶免疫检测回收实验

	靶值(μg/ml)	平均值	标准差	变异系数(%)	回收率(%)
	0.00	0.01	—	—	—
	12.50	11.37	0.95	8.34%	90.9%
[0053]	25.00	23.49	1.19	5.06%	93.9%
	50.00	48.82	4.00	8.19%	97.7%
	100.00	97.32	5.69	5.84%	97.4%
	150.00	148.06	12.22	8.25%	98.7%

[0054] 3、最低检测下限分析

[0055] 将丙戊酸标准品溶于缓冲溶液中,制备样品浓度为 0ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml。用丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒连续测定 5 次,计算平均值和标准差。结果表明 25ng/ml 样品的测试结果在 95%的置信区间内(平均值±2SD)与 0ng/ml 样

品无交叉 (表 3)。

[0056] 表 3 丙戊酸均相酶免疫检测灵敏度分析

	测试次数 (n=5)	0ng/ml	25ng/ml
	平均值	0.04	20.63
[0057]	SD	0.07	9.63
	平均值+2SD	0.18	39.90
	平均值-2SD	-0.11	1.37

[0058] 4、药物干扰实验

[0059] 选取 32 种常用化合物和药物 (表 4), 调整其工作浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$, 利用已经建立的丙戊酸均相酶免疫试剂进行干扰试验测定。实验结果显示所有检测药物与丙戊酸均无任何交叉, 本发明获得的丙戊酸抗体具有很强的特异性。

[0060] 表 4 丙戊酸均相酶免疫检测药物干扰实验

[0061]

乙酰水杨酸	(L)- 麻黄素	氯氮卓	普鲁卡因
苯巴比妥	利多卡因	d- 甲基苯丙胺	奎尼丁
异戊巴比妥	萘普生	非诺洛芬	佐美酸
氨苄青霉素	烟酰胺	吉非贝齐	芽子碱甲基酯
苯乙胺	青霉素	龙胆酸	芽子碱
咖啡因	苯肾上腺素	二氢可待因酮	安定
甲氨二氮卓	苯丙醇胺	布洛芬	可替宁
氯丙嗪	普鲁卡因胺	丙咪嗪	顺式 -4- 可替宁羧酸

[0062] 5、与 FPIA 方法相关性分析

[0063] 取得 40 例病人血清标本, 分别用均相酶免疫检测法和雅培公司免疫荧光偏振 (FPIA) 检测法进行测定。如图 2 所示丙戊酸均相酶免疫检测法与 FPIA 具有良好的相关性, 线性回归方程为 $y = 0.889x - 2.9915$, R^2 值达到大于 0.98。进一步验证了本发明提供的丙戊酸均相酶免疫检测试剂盒的准确性。

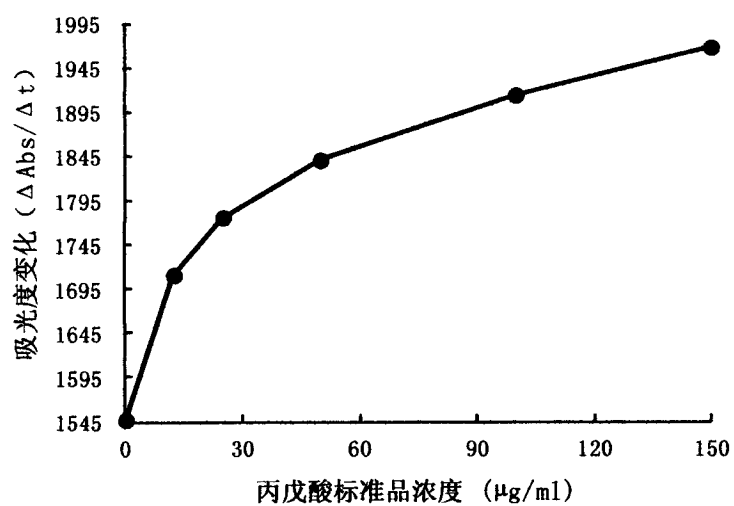


图 1

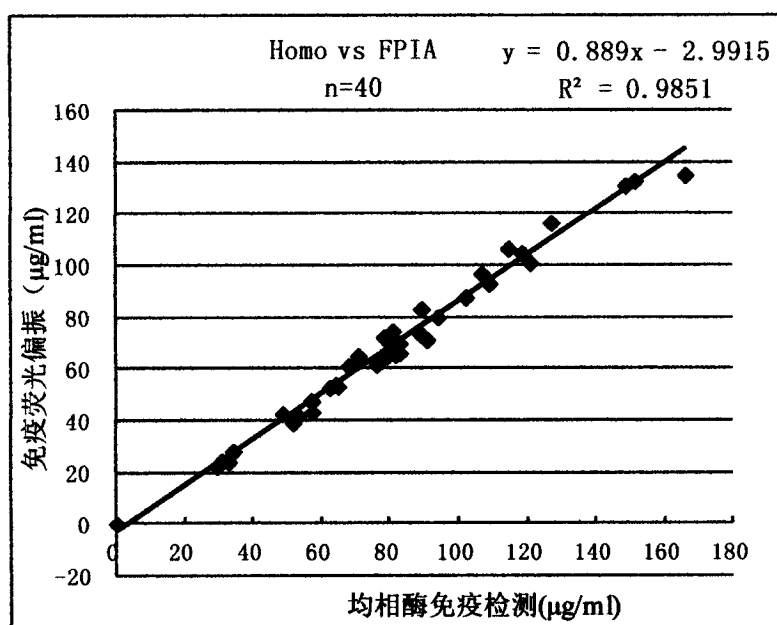


图 2

专利名称(译)	丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102507917A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110340440.8	申请日	2011-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	四川金域医学检验中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	四川金域医学检验中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	四川金域医学检验中心有限公司		
[标]发明人	虞留明 王金文 王文峰 陈美才 梁耀铭		
发明人	虞留明 王金文 王文峰 陈美才 梁耀铭		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于丙戊酸血药浓度监测技术领域，具体公开了一种丙戊酸均相酶免疫快速检测试剂盒，通过合成衍生物将丙戊酸连接到小牛血清白蛋白(BSA)上制得免疫抗原，获得的多克隆抗体具有丙戊酸特异性。实验数据表明利用该试剂检测丙戊酸与其他常用药物无交叉反应；分析灵敏度达到25ng/ml以下；批间精密度、批内精密度变异系数(CV)均小于4.7%；与免疫荧光偏振法(FPIA)进行方法比对，R2值达到0.98。可运用于多种常规分析仪，由于操作简便、快速、成本低、灵敏度高，该试剂盒易于实现自动化检测，可指导临床个性化用药，降低药物的毒副作用，达到疗效最优化。

