



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104402991 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201410631056. 7

(22) 申请日 2014. 11. 12

(71) 申请人 重庆金域医学检验所有限公司

地址 400039 重庆市九龙坡区科城路 77 号
留学生创业园 A 栋九楼

(72) 发明人 燕启江 梁耀铭 虞留明 胡朝晖

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/00(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页

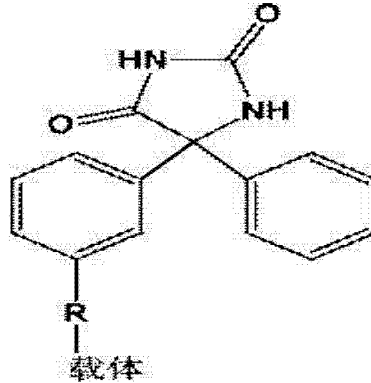
(54) 发明名称

苯妥因均相酶免疫检测试剂盒及其多克隆抗体的制备方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种高度特异性的苯妥因多克隆抗体及苯妥因均相酶免疫检测试剂盒的制备方法, 包括苯妥因特异性多克隆抗体的制备, 葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯妥因偶联物的制备, 定标液的制备。本发明的苯妥因多克隆抗体特异性强, 效价高, 在药物交叉反应试验中, 对测试的 31 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应, 适合临床检验苯妥因的血药浓度。本发明的苯妥因药物浓度均相酶免疫检验试剂盒灵敏度高, 能够准确检测 10g/mL 的样本, 苯妥因药物浓度的有效检测范围为 5ng/mL-60 μg/mL。本发明试剂盒的准确率高, 回收率在 90% 以上, 简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。

1. 一种苯妥因免疫原,其通过苯妥因衍生物与载体偶联获得,其结构式如式 I 所示:



式 I

式中, R 为连接基团,载体为血清蛋白,血蓝蛋白或甲状腺球蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的苯妥因免疫原,其特征在于, R 选自如下基团: $-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 、 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}-$ 或 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{COO}-$ 等, n 是 1 至 20 之间的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的苯妥因免疫原,其特征在于, R 优选为 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{COO}-$ 。

4. 一种抗苯妥因特异性多克隆抗体,其由权利要求 1 所述的苯妥因免疫原免疫宿主动物后生产而得到的,具体步骤如下:

步骤 a:

苯妥因衍生物的活化:将苯妥因衍生物置于容器中,并依次加入纯二甲基酰胺、无水乙醇、10 mM pH 为 5.0 的磷酸钾缓冲液、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌溶解反应 30 分钟;

步骤 b:抗原的偶联和纯化:将牛血清白蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白溶解于 10mL 0.2 M pH 为 8.5 的磷酸缓冲液中得到溶液 A,将步骤 a 活化的苯妥因衍生物滴加到所得的溶液 A 中,在 2~8°C 条件下搅拌 12-16 小时,得到偶联的苯妥因抗原,将得到的偶联的苯妥因抗原进行透析纯化,得到苯妥因免疫抗原;

步骤 c:采用步骤 b 得到的苯妥因免疫抗原免疫动物,得到苯妥因特异性多克隆抗体。

5. 一种苯妥因均相酶免疫检测试剂盒,所述苯妥因均相酶免疫检测试剂盒上设置有 R1 试剂、R2 试剂、定标液。

6. 根据权利要求 5 所述的免疫检测试剂盒,其特征在于,

所述 R1 试剂由以下组分组成:质量百分比为 0.02-0.1% 的苯妥因特异性多克隆抗体, 55 mM/L 的 Tris, 质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白, 145.4 mM/L 的 NaCl, 3 mM/L 的 MgCl_2 , 2.02 g/L 脱氢辅酶 I 和 0.86 g/L 葡萄糖-6-磷酸,余量为水, pH 值为 8.0。

7. 所述 R2 试剂为质量体积比为 0.03-0.25% 的葡萄糖六磷酸脱氢酶苯妥因偶联物酶标抗原的 Tris 缓冲液,所述 Tris 缓冲液 pH 为 8.2,所述 Tris 缓冲液中各组分浓度为 120 mM Tris、质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白、145.4 mM NaCl、3 mM MgCl_2 ;

定标液为含有不同浓度苯妥因的空白血清。

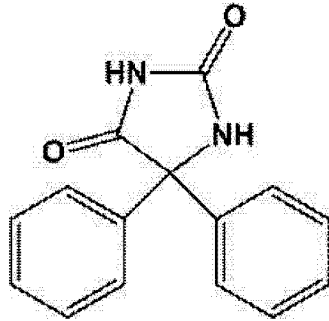
苯妥因均相酶免疫检测试剂盒及其多克隆抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,具体涉及苯妥因均相酶免疫检测试剂盒及其多克隆抗体的制备方法。

背景技术

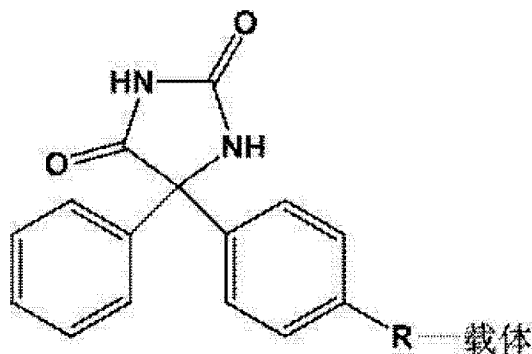
[0002] 癫痫是一种常见的神经系统疾病,也是我国神经系统疾病中仅次于脑血管疾病的第二大顽症。目前,抗癫痫类药物仍然是控制癫痫发作的主要手段。传统的抗癫痫类药物苯妥因(结构式如下)治疗窗窄、个体差异大、疗效和毒性反应与血药浓度密切相关,临床医生仅凭经验给药往往达不到有效血药浓度。因此,苯妥因血药浓度的监测对癫痫的诊断和治疗具有重要的临床指导意义。



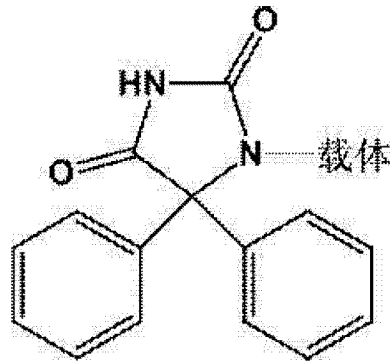
[0003] 苯妥因

目前,国内外测定苯妥因血药浓度的方法主要是高效液相色谱(HPLC)、荧光偏振免疫分析(FPIA)、微粒酶免法、免疫比浊法、酶联免疫吸附测定(ELISA)等方法。采用HPLC法,需要样本前处理,操作相对复杂、且检测成本昂贵;ELISA检测法灵敏度较高,但无法精确定量;荧光偏振免疫分析(FPIA)具有操作简单、灵敏度高等优点,但试剂成本高,不适合常规治疗药物的检测,阻碍个性化治疗的推广。

[0004] 专利CN2012101255333公开了一种苯妥因均相酶检测试剂盒用的抗苯妥因特异性抗体,其通过对苯妥因中苯环对位进行取代后与免疫原偶联而获得的,其苯妥因免疫原结构式如下:



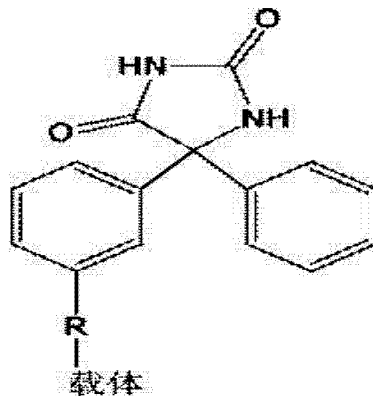
美国专利US5306617及US5747352也公开了类似的苯妥因均相酶检测试剂盒用的抗苯妥因特异性抗体,其利用与苯妥因咪唑啉环上的一个氨基偶联的免疫原而获得的,其苯妥因免疫原结构式如下:



但是通过上述衍生方法制备的抗体不能够充分体现其整体免疫性,从而影响苯妥因均相酶检测试剂盒的灵敏度及特异性。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的是提供一种苯妥因免疫原,其通过苯妥因衍生物与载体偶联获得,其结构式如式 I 所示:



式 I

式中, R 为连接基团,载体为具有免疫原性的蛋白质。

[0006] R 选自如下基团: $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$ 或 $-O-(CH_2)_n-NH-COO-$ 等, n 是 1 至 20 之间的整数。

[0007] 在本发明更进一步地实施方案中, R 优选为 $-O-CH_2-NH-COO-$ 。载体优选为血清蛋白,血蓝蛋白或甲状腺球蛋白;更优选为牛血清蛋白。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种抗苯妥因特异性多克隆抗体,其由所述苯妥因免疫原免疫宿主动物后生产而得到的。

[0009] 所述抗苯妥因特异性多克隆抗体的制备方法为:

步骤 a:

苯妥因衍生物的活化:将苯妥因衍生物置于容器中,并依次加入纯二甲基酰胺、无水乙醇、10 mM pH 为 5.0 的磷酸钾缓冲液、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌溶解反应 30 分钟;

步骤 b:抗原的偶联和纯化:将牛血清白蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白溶解于 10mL 0.2 M pH 为 8.5 的磷酸缓冲液中得到溶液 A,将步骤 a 活化的苯妥因衍生物滴加到所得的溶液 A 中,在 2~8°C 条件下搅拌 12-16 小时,得到偶联的苯妥因抗原,将得到的偶联的苯妥因抗原进行透析纯化,得到苯妥因免疫抗原;

步骤 c :采用步骤 b 得到的苯妥因免疫抗原免疫动物,得到苯妥因特异性多克隆抗体。

[0010] 优选的所述步骤 a 为 :

苯妥因衍生物的活化 :将 20 mg 特异的苯妥因衍生物置于容器中,并依次加入 700 μ L 纯二甲基酰胺、700 μ L 无水乙醇、1.4 mL 10 mM pH 为 5.0 的磷酸钾缓冲液、80 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 10 mg N-羟基琥珀酰亚胺,搅拌溶解反应 30 分钟 ;

步骤 b :抗原的偶联和纯化 :将 40 mg 牛血清白蛋白溶解于 10 mL 0.2 M pH8.5 的磷酸缓冲液中得到牛血清白蛋白溶液 A,将步骤 a 活化的苯妥因衍生物滴加到所得的牛血清白蛋白溶液 A 中,在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 12 -16 小时,将得到的偶联的苯妥因抗原进行透析纯化,得到苯妥因免疫抗原 ;

优选的,所述步骤 c 为 :用 0.2 M 的 pH 为 8.5 的磷酸缓冲液将合成的所述步骤 b 中的苯妥因免疫抗原稀释至 1.0 mg/mL,然后用 1.0 mL 的苯妥因免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对家兔进行注射,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家兔注射一次,之后每隔 28 天注射一次,注射两次后,获得苯妥因特异性多克隆抗体。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种苯妥因均相酶免疫检测试剂盒,所述苯妥因均相酶免疫检测试剂盒上设置有 R1 试剂、R2 试剂、定标液。

[0012] 所述 R1 试剂由以下组分组成 :质量百分比为 0.02-0.1% 的苯妥因特异性多克隆抗体,55 mM/L 的 Tris,质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白,145.4 mM/L 的 NaCl,3 mM/L 的 MgCl₂,2.02 g/L 脱氢辅酶 I 和 0.86 g/L 葡萄糖-6-磷酸,余量为水,pH 值为 8.0。

[0013] 所述 R2 试剂为质量体积比为 0.03-0.25% 的葡萄糖六磷酸脱氢酶苯妥因偶联物酶标抗原的 Tris 缓冲液,所述 Tris 缓冲液 pH 为 8.2,所述 Tris 缓冲液中各组分浓度为 120 mM Tris、质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白、145.4 mM NaCl、3 mM MgCl₂ ;

定标液为含有不同浓度苯妥因的空白血清。

[0014] 更进一步地,所述苯妥因均相酶免疫检测试剂盒的制备方法包括以下步骤 :R1 试剂的制备,R2 试剂的制备,定标液的制备,

所述 R1 试剂的制备为 :在 1L Tris 缓冲液中依次加入 2.02 g 脱氢辅酶 I 和 0.86g 葡萄糖-6-磷酸,在室温下搅拌 10 分钟,所述 Tris 缓冲液 pH 为 8.0,所述 Tris 缓冲液中各组分浓度为 55mM Tris、质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白、145.4 mM NaCl、3mM MgCl₂,然后将步骤 c 中得到的苯妥因衍生物特异性多克隆抗体加入该溶液中,稀释比例为 1 :3000,得到 R1 试剂 ;

所述 R2 试剂的制备为 :

步骤 a、将 30 mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶,溶解于 24 mL 0.05 M 的 Tris 缓冲液中,然后依次加入 200-500 mg 还原型辅酶 I、1.0-2.0 mL 的卡必醇和 2.0-6.0 mL 的二甲基亚砷混匀 ;

步骤 b、将 20 mg 的苯妥因衍生物溶解于 840 μ L 二甲基亚砷 和 360 μ L 纯二甲基酰胺的混合溶液中,加入 12 μ L 三丁胺和 6 μ L 氯甲酸异丁酯,在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 30 分钟 ;

步骤 c、将步骤 a 和步骤 b 得到的两种溶液混合,在 2 ~ 8°C 条件下搅拌过夜,得到偶联的酶标抗原,再进行 G-25 凝胶层析柱纯化得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯妥因偶联物 ;

步骤 d、将步骤 c 中的葡萄糖六磷酸脱氢酶苯妥因偶联物酶标抗原稀释于 Tris 缓冲液中, 稀释比例为 1:1000, 得到 R2 试剂; 所述 Tris 缓冲液 pH 为 8.2, 所述 Tris 缓冲液中各组分浓度为 120 mM Tris、质量体积百分比为 0.1% 的牛血清白蛋白、145.4 mM NaCl、3 mM MgCl₂;

定标液的制备为: 将苯妥因校准品溶于空白血清中配制成。

[0015] 优选的, 所述 R1 试剂的制备中的步骤 c 为: 用 0.2 M 的 pH8.5 的磷酸缓冲液将合成的所述步骤 b 中的苯妥因免疫抗原稀释至 1.0 mg/mL, 然后用 1.0 mL 的苯妥因免疫抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对家兔进行注射, 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家兔注射一次, 之后每隔 28 天注射一次, 注射两次后, 获得苯妥因特异性多克隆抗体。

[0016] 优选的, 所述定标液的制备为将苯妥因校准品溶于空白血清中并配制成 0 μg/mL、2.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 共 6 种系列浓度的定标液。

[0017] 本发明的有益效果为本发明的苯妥因特异性多克隆抗体的特异性强, 效价高, 在药物交叉反应试验中, 对测试的 32 种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应, 适合临床检验苯妥因的血药浓度。本发明的苯妥因药物浓度均相酶免疫检验试剂盒灵敏度高, 能够准确检测 1 ng/mL 的标本, 苯妥因药物浓度的有效检测范围为 5 ng/mL-60 μg/mL。本发明试剂盒的准确率高, 回收率在 90% 以上, 简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。

具体实施方式

[0018] 本发明中的检验方法是一种均相酶免疫测定法, 该检验的基本原理基于一种竞争反应, 即液体样本中游离的苯妥因与偶联在葡萄糖六磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH) 上的苯妥因衍生物竞争结合特异性抗体的位点。G6PDH-苯妥因衍生物偶联物是酶标半抗原, 具有抗原和酶的活性, G6PDH-苯妥因衍生物偶联物可以被抗体识别。G6PDH 既能够氧化磷酸葡萄糖脱氢, 同时将氧化型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺) 还原为 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。抗体与酶-苯妥因衍生物结合后, G6PDH 的活性被抑制, 液体样本中的苯妥因竞争性的取代与抗体结合的苯妥因酶偶联物, 并使其从抗体的结合位点上释放出来, 从而使 G6PDH 恢复活性。因此, 液体样本中苯妥因的含量越多, 游离的 G6PDH-苯妥因衍生物偶联物就越多, 从而能得到更强的信号。

[0019] 本发明的要点是提供一种简便、快速、灵敏度高和全自动化的苯妥因药物浓度检测试剂盒和制备方法。本发明的核心技术为均相酶免疫检测方法, 其中试剂和待测样品均为液相, 测定过程中不存在分离步骤, 样品与抗体反应后再加入标记的抗原进行反应。本发明的技术方案包括苯妥因免疫原的合成, 抗苯妥因特异性抗体的制备, 酶标偶联物的制备以及样本的测定。分别通过化学合成的方法制备出 G6PDH-苯妥因偶联物和 BSA-苯妥因免疫原, 并由 BSA-苯妥因免疫原免疫动物, 制备出特异性的抗苯妥因多克隆抗体。将制备好的抗体和酶标偶联物配制成均相酶免疫试剂 R1 和 R2, 在全自动生化分析仪上进行苯妥因样本的测定。

[0020] 实施例 1 苯妥因衍生物的制备

步骤 1) 化合物 3 的合成: 准确称取 5.3g 的化合物 1 和 1.9g 无水碳酸钾, 将这两个化

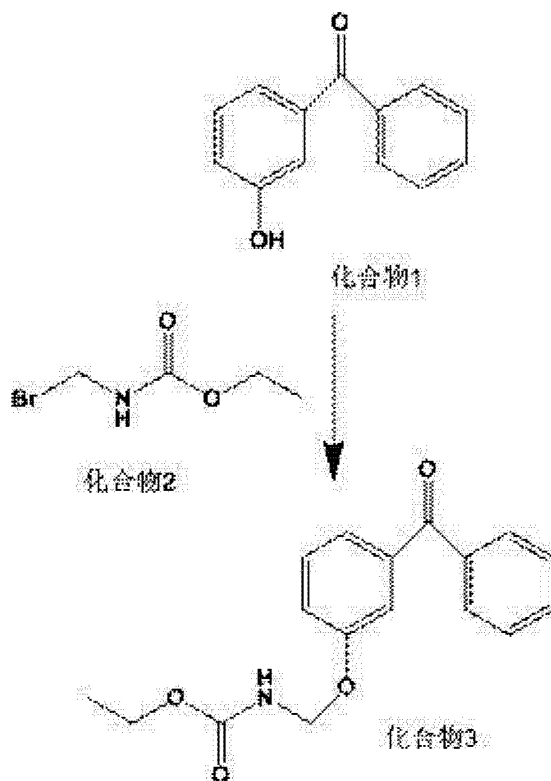
合物加入长颈瓶中；加入 150mL DMF, 超声 15min 溶解化合物, 加入 5.0g 化合物 2, 在 55℃ 下搅拌 72h, 将溶液降至室温后过滤, 用 5mL DMF 溶解反应物, 真空干燥, 用 150mL 浓碳酸氢钠溶液溶解残留物, 经 150mL EtOAc 萃取, 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥, 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 最后得到化合物 3;

化合物 3 的质谱分析表明:

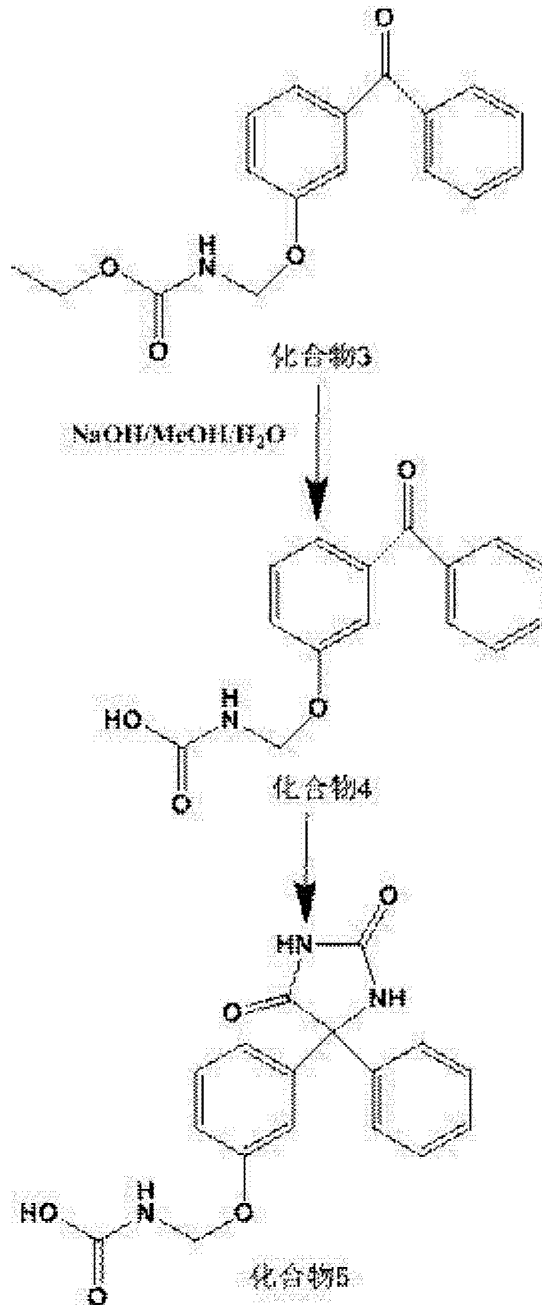
ESI-MS :300.27[M+H]⁺

元素分析: 理论值 / 实测值, C(68.13/68.22), H(5.79/5.72), N(4.64/4.68), O(21.44/21.38)。

[0021]



步骤 2) 称取 6.0g 化合物 3 至 100ml 甲醇中, 加入 80mL2M NaOH 溶液, 液体逐渐由澄清的无色溶液变为白色沉淀, 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, 将该混合溶液浓缩, 加 150mL 水溶解白色固体, 用 80mL 甲基叔丁基醚洗涤两次, 将该混合溶液浓缩并用 4M 盐酸酸化至水层 pH 值为 2-3, 用 100mL EtOAc 萃取两次, 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥, 获得油状粗提化合物, 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到化合物 4, 把 2.0g 化合物 4, 0.8gKCN, 6.0g (NH₄)₂CO₃, 5mL 水, 35mL DMF, 加热至 120℃ 并保温 120h, 降温至室温, 用 100mL2.5M NaOH 溶解混合体, 用 80mL 乙醚洗涤两次, 将该混合溶液用 6N 盐酸酸化至水层 pH 值为 4-5, 用 100mL EtOAc 萃取两次, 用盐水洗涤有机合成物, 干燥, 浓缩后获得油状粗提化合物, 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体的苯妥因衍生物(化合物 5); 合成路线如下:



利用 Bruker Avance III plus 300 MHz 对化合物 5 进行核磁共振光谱扫描, 采用 TMS 作为内标。结果如下: ¹HNMR(DMSO-d₆, 300MHz): 12.15(s, 1H), 11.17 (s, 1H), 10.81 (s, 1H), 9.18(s, 1H), 7.27-7.33(m, 6H), 6.97(m, 2H), 6.91 (s, 1H), 5.61 (s, 2H)。

[0022] ESI-MS :342.27[M+H]⁺

元素分析: 理论值 / 实测值, C(59.88/59.82), H(4.41/4.43), N(12.36/12.31), O(23.35/23.44)。

[0023] 实施例 2

苯妥因特异性多克隆抗体的制备:

a、苯妥因免疫抗原的合成

1) 苯妥因衍生物的活化, 称取 20 mg 实施例 1 制备的苯妥因衍生物于小烧杯中, 并依次加入 700 μL 纯二甲基酰胺(dimethylformamide, DMF)、700 μL 无水乙醇、1.4 mL 10 mM

的 pH 为 5.0 的磷酸钾缓冲液、80 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 10 mg N-羧基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 将这些化学品在室温条件下搅拌溶解反应 30 min;

2) BSA 溶液的制备, 称取 40 mg 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) 并在室温条件下溶解于 10 mL 0.2 M 的 pH8.5 的磷酸缓冲液中;

3) 抗原的偶联和纯化, 将活化的苯妥因衍生物滴加到 BSA 溶液中, 在 2 ~ 8°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。

[0024] b、采用常规方法制备抗体, 大致步骤如下:

用磷酸缓冲液将合成的苯妥因免疫抗原稀释至 1.0 mg/mL, 然后用 1.0 mL 的抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对家兔进行注射; 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 1:120000。

[0025] 实施例 3

苯妥因均相酶免疫检测试剂盒的制备, 包括以下步骤: 苯妥因衍生物特异多克隆抗体的制备, 葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯妥因偶联物的制备, 定标液的制备, 均相酶免疫试剂的制备和利用全自动生化分析仪进行样本测试

a、按实施例 2 的方法制备苯妥因特异性多克隆抗体。

[0026] b、苯妥因酶标抗原的制备

1) 称取 30 mg 葡萄糖六磷酸脱氢酶, 溶解于 24 mL, 0.05M Tris 缓冲液中, 然后依次加入 200-500 mg NADH、1.0-2.0 mL 的卡必醇和 2-6.0 mL 的二甲基亚砷混匀;

2) 将 20 mg 的实施例 1 制备的苯妥因衍生物溶解于 840 μ L 二甲基亚砷和 360 μ L DMF 中, 加入 12 μ L 三丁胺(tributylamine) 和 6 μ L 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate), 在 2 ~ 8°C 条件下搅拌 30 min;

3) 将上述两种溶液混合, 在 2 ~ 8°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。

[0027] c、定标液的制备

将苯妥因校准品溶于空白血清中并配制成 0、2.5、5、10、20、40 μ g/mL 共 6 种系列浓度的定标液, 定标液的工作体积为 10-35 μ L。

[0028] d、均相酶免疫试剂的制备

1) R1 试剂的制备

在 1 L Tris 缓冲液(55 mM Tris, 0.1% BSA, 145.4 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 为 8.0) 中依次加入 2.02 g NAD(辅脱氢酶 I) 和 0.86 g G6P(葡萄糖-6-磷酸), 在室温下搅拌 10 min。然后将实施例 1 中苯妥因衍生物特异多克隆抗体制备中得到的抗体加入溶液中, 稀释比例为 1:3000。

[0029] 2) R2 试剂的制备

在 1 L Tris 缓冲液(120 mM Tris, 0.1% BSA, 145.4 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH 8.2) 中加入 G6PDH—苯妥因衍生物酶标抗原, 稀释比例为 1:1000。

[0030] 然后加入 100 μ L 试剂 R1 和 100 μ L 试剂 R2, 采用两点速率法, 检测主波长为 340 nm、副波长为 405 nm 的吸光度变化率, 建立并优化苯妥因均相酶免疫定标曲线, 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。

[0031] e、利用全自动生化分析仪进行样本测试

1) 血清标本的收集，按照常规方法收集血清标本；

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；

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 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 的苯妥因定标液放入样品盘 2(S2) 的指定位置；

4) 仪器在 Stand by 状态时，设定苯妥因的操作程序和检测参数，具体检测参数如表一：

表一 血清中苯妥因药物浓度检测参数

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	100-200 μL
测光点	21 至 31 点
检测波长 (主 / 副)	340/405nm
定标类型	Logit-Log(4P)
定标液 1	0 $\mu\text{g/mL}$
定标液 2	2.5 $\mu\text{g/mL}$
定标液 3	5 $\mu\text{g/mL}$
定标液 4	10 $\mu\text{g/mL}$
定标液 5	20 $\mu\text{g/mL}$
定标液 6	40 $\mu\text{g/mL}$

5) 按照设定的检测参数，首先进行定标实验，建立苯妥因的定标曲线，然后根据建立的定标曲线，检测血清标本中苯妥因的浓度。

[0032] 6) 检测血清标本中苯妥因的浓度，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。

[0033] 实施例 4

实施例 3 制备的苯妥因检验试剂盒产品的检验实验

a、回收实验

利用建立的苯妥因定标曲线，测定低 (2.5 $\mu\text{g/mL}$)、中 (10 $\mu\text{g/mL}$)、高 (40 $\mu\text{g/mL}$) 三种浓度的苯妥因血清标本，每个标本重复测定 5 次。

[0034] 表二：苯妥因试剂盒的回收实验

测试 (n=5)	低 (2.5 $\mu\text{g/mL}$)	中 (10 $\mu\text{g/mL}$)	高 (40 $\mu\text{g/mL}$)
平均值	2.52	9.89	39.57
回收率	100.80%	98.90%	98.92%
标准差	0.24	0.46	0.87
相关系数偏差	6.11%	5.43%	3.26%

b、药物干扰实验

选取 31 种常用化合物和药物，调整其工作浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，在日立 7180 型全自动生化分析仪上进行干扰试验测定，试验结果如表三所示：

表三：苯妥因试剂盒的药物干扰实验

ID#	化合物名称	等价于苯妥因的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	乙酰水杨酸	<0.01
2	异戊巴比妥	<0.01
3	氨苄青霉素	<0.01
4	苯乙胺	<0.01
5	咖啡因	<0.01
6	甲氨二氮卓	<0.01
7	氯丙嗪	<0.01
8	氯氮卓	<0.01
9	d- 甲基苯丙胺	<0.01
10	非诺洛芬	<0.01
11	吉非贝齐	<0.01
12	龙胆酸	<0.01
13	二氢可待因酮	<0.01
14	布洛芬	<0.01
15	丙咪嗪	<0.01
16	(L)- 麻黄素	<0.01
17	利多卡因	<0.01
18	萘普生	<0.01
19	烟酰胺	<0.01
20	青霉素	<0.01
21	苯肾上腺素	<0.01
22	苯丙醇胺	<0.01
23	普鲁卡因胺	<0.01
24	普鲁卡因	<0.01
25	奎尼丁	<0.01
26	佐美酸	<0.01
27	芽子碱甲基酯	<0.01
28	芽子碱	<0.01
29	安定	<0.01
30	可替宁	<0.01
31	反式-4- 可替宁羧酸	<0.01

根据苯妥因均相酶免疫测定结果分析,32 种常用化合物和药物对苯妥因的干扰非常小,说明本发明的抗体是抗苯妥因特异性抗体。

[0035] c、灵敏度实验

将苯妥因标准品溶于空白血清中,系列稀释浓度为 0、1、5ng/mL 的样品,用苯妥因均相酶免疫检测试剂测定苯妥因的吸光度,重复测定 5 次,计算平均值和标准差。

[0036] 表四:苯妥因试剂盒的灵敏度试验

测试次数(n=5)	0ng/mL	1ng/mL	5ng/mL
平均值	0.0	0.14	0.64
标准差	0.0	0.02	0.08
平均值 \pm SD	0.0 \pm 0.0	0.14 \pm 0.02	0.64 \pm 0.08
平均值 \pm 2SD	0.0 \pm 0.0	0.14 \pm 0.04	0.64 \pm 0.16

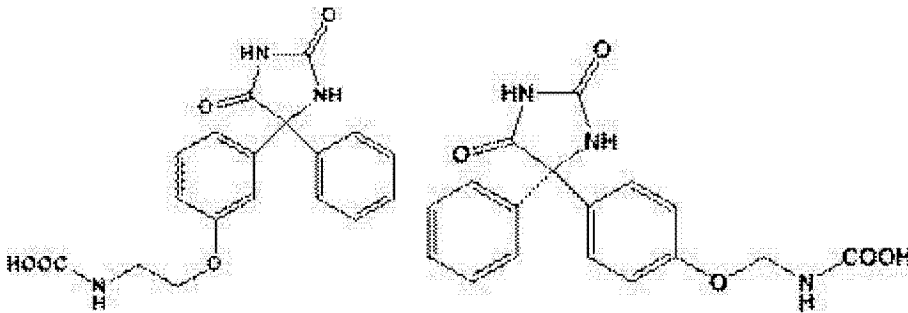
d、精密度实验

表五 苯妥因试剂盒的精密度试验结果

浓度 ($\mu\text{g/mL}$) (n=5)	2.5	10	40
批内标准差	0.11	0.32	1.24
批内变异系数 (CV%)	2.04	1.39	1.87
批间标准差	0.02	0.11	1.08
批间变异系数 (CV%)	1.36	1.13	2.21

对比试验

为了说明本发明的苯妥因均相酶检测试剂盒的优越性,采用不同但结构与本发明结构类似的苯妥因衍生物,按照实施例 1-32 所述的方法制备相应的人工抗原、多克隆抗体及均相酶试剂盒,并对所制备的均相酶试剂盒进行实施例 4 所列出的实验,各对比比例采用的苯妥因衍生物结构如下:



对比比例 1

对比比例 2

对比比例 3:来自专利文献 CN201210125533 的说明书第 079 段所示的化合物式 III,具体结果如下:

(1) 灵敏度试验

按照实施例 4 的测试方法,对各对比比例制备的苯妥因均相酶试剂盒进行了测试,各对比比例的灵敏度结果如下:

N=5	对比比例 1	对比比例 2	对比比例 3
灵敏度 $\mu\text{g/mL}$	5.0	10.0	5.0

(2) 药物干扰试验

等价于苯妥因的 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	药物浓度 ($10\mu\text{g/mL}$)		
	对比比例 1	对比比例 2	对比比例 3
乙酰水杨酸	0.15	0.19	0.24
异戊巴比妥	0.09	0.05	0.04
氟苯青霉素	0.12	0.14	0.19

(3) 精密度试验

苯妥因 (10 μ g /mL)	对比例 1	对比例 2	对比例 3
intra-CV%	3.84	4.27	4.34
inter-CV%	3.68	2.75	3.79

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。

专利名称(译)	苯妥因均相酶免疫检测试剂盒及其多克隆抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN104402991A	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201410631056.7	申请日	2014-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	重庆金城医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆金城医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆金城医学检验所有限公司		
[标]发明人	燕启江 梁耀铭 虞留明 胡朝晖		
发明人	燕启江 梁耀铭 虞留明 胡朝晖		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/00 C07K16/44 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/00 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535		
其他公开文献	CN104402991B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种高度特异性的苯妥因多克隆抗体及苯妥因均相酶免疫检测试剂盒的制备方法,包括苯妥因特异性多克隆抗体的制备,葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯妥因偶联物的制备,定标液的制备。本发明的苯妥因多克隆抗体特异性强,效价高,在药物交叉反应试验中,对测试的31种常见药物和化合物几乎无任何交叉反应,适合临床检验苯妥因的血药浓度。本发明的苯妥因药物浓度均相酶免疫检验试剂盒灵敏度高,能够准确检测10g/mL的样本,苯妥因药物浓度的有效检测范围为5ng/mL-60μg/mL。本发明试剂盒的准确率高,回收率在90%以上,简便、快速、成本低、灵敏度高、可全自动化。

浓度 (μg/mL) (n=5)	2.5	10	40
批内标准差	0.11	0.32	1.24
批内变异系数 (CV%)	2.04	1.39	1.87
批间标准差	0.02	0.11	1.08
批间变异系数 (CV%)	1.36	1.13	2.21