



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813693 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201910020000.0

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.01.09

(71)申请人 北京丹大生物技术有限公司

地址 100000 北京市通州区中关村科技园
区通州园光机电一体化产业基地嘉创
路5号1号楼301-303室

(72)发明人 许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

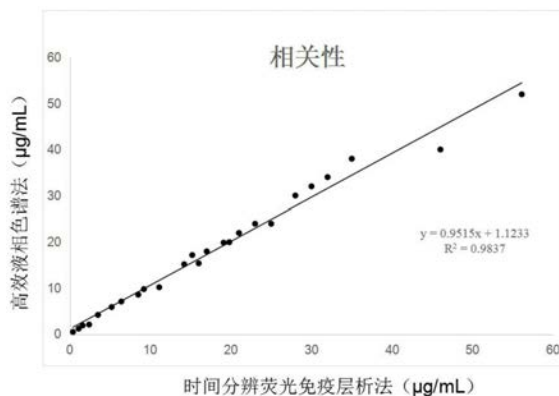
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用,属于体外诊断试剂中药物浓度检测技术领域,所述试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、荧光微球垫、包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜和吸水垫,所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体;所述万古霉素单克隆抗体是以万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原制备获得。本发明的试纸条与多种万古霉素类似物无交叉反应,具有检测准确度高、特异性强的优点。



1. 一种万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的制备方法,包括以下步骤:

1) 将高碘酸钠水溶液与万古霉素水溶液混合,进行氧化还原反应,得到万古霉素预偶联物;

2) 将牛血清白蛋白与碳酸盐缓冲液混合,得到牛血清白蛋白溶液;

3) 将步骤1)所述万古霉素预偶联物与步骤2)所述牛血清白蛋白溶液混合,进行偶联反应,得到万古霉素-牛血清白蛋白偶联物;

所述步骤1)和步骤2)没有时间顺序限制。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3)所述偶联反应的时间为10~15h;所述偶联反应的温度为15~37℃。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤1)所述氧化还原反应的时间为0.8~1.5h;所述氧化还原反应的温度为18~26℃。

4. 权利要求1~3任意一项所述制备方法制备得到的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物。

5. 一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,所述试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、荧光微球垫、包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜和吸水垫,其特征在于:

所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体;所述万古霉素单克隆抗体是以权利要求4所述的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

6. 根据权利要求5所述的试纸条,其特征在于,所述荧光微球的直径为100~300nm;所述荧光微球表面含有羧基基团。

7. 根据权利要求6所述的试纸条,其特征在于,所述荧光微球为聚苯乙烯包裹稀土离子Eu³⁺的微球。

8. 根据权利要求5所述的试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

I将荧光微球悬液、MES缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺混合,进行活化处理,得到活化的荧光微球;

II将步骤I所述活化的荧光微球和万古霉素单克隆抗体混合,进行偶联,得到荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体。

9. 权利要求5~8任意一项所述的试纸条在万古霉素检测中的应用,步骤如下:

将不同浓度的万古霉素纯品添加到不含万古霉素的人血清基质中制备校准品;所述校准品中万古霉素的浓度依次为40μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL和0μg/mL;将所述校准品稀释100~1000倍后加样于试纸条的样品吸收垫,进行免疫层析,测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值(T/C比值),获得校准品中浓度与T/C比值的函数关系;

取待测样本,加样于试纸条的样品吸收垫,进行免疫层析,测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,根据上述获得得函数公式计算待测样品中万古霉素的含量。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述待测样本的加样量为1~100μL。

一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂中药物浓度检测技术领域,尤其涉及一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 万古霉素为一种三环糖肽类抗生素,是临床上用于治疗耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRS1)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE)和耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)所致重症感染的首选抗生素。它对革兰阳性菌有较强的杀菌作用,但治疗指数窄,个体代谢差异显著,且具有显著的耳毒性和肾毒性,所以临床上需要监测其血药浓度来调整用药。

[0003] 目前,国内外监测万古霉素类药物浓度的方法,有薄层色谱法(thin layer chromatography,TL3),毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis,CE),高效液相色谱法(HPL3),生物化学法,但是这些方法都不适合临床大规模推广使用。虽然目前市场上有免疫比浊法(Turbidimetric inhibition immuno assay,TI1)、均相酶免法、化学发光法及荧光偏振法用于测定万古霉素,但是其成本高,均为国外进口厂商垄断,不能满足不断增长的临床监测需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用,该试纸条具有检测准确度高、特异性强的优点。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 将高碘酸钠水溶液与万古霉素水溶液混合,进行氧化还原反应,得到万古霉素预偶联物;

[0008] 2) 将牛血清白蛋白与碳酸盐缓冲液混合,得到牛血清白蛋白溶液;

[0009] 3) 将步骤1)所述万古霉素预偶联物与步骤2)所述牛血清白蛋白溶液混合,进行偶联反应,得到万古霉素-牛血清白蛋白偶联物;

[0010] 所述步骤1)和步骤2)没有时间顺序限制。

[0011] 优选的,步骤3)所述偶联反应的时间为10~15h;所述偶联反应的温度为15~37℃。

[0012] 优选的,步骤1)所述氧化还原反应的时间为0.8~1.5h;所述氧化还原反应的温度为18~26℃。

[0013] 本发明提供了上述方案所述制备方法制备得到的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物。

[0014] 本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,所述试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、荧光微球垫、包被有万古霉素-载体蛋白偶

联物的硝酸纤维素膜和吸水垫；所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体；所述万古霉素单克隆抗体是以上述方案所述的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

[0015] 优选的，所述荧光微球的直径为100~300nm；所述荧光微球表面含有羧基基团。

[0016] 优选的，所述荧光微球为聚苯乙烯包裹稀土离子Eu⁺的微球。

[0017] 优选的，所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

[0018] I将荧光微球悬液、MES缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺混合，进行活化处理，得到活化的荧光微球；

[0019] II将步骤I所述活化的荧光微球和万古霉素单克隆抗体混合，进行偶联，得到荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体。

[0020] 本发明提供了上述方案所述的试纸条在万古霉素检测中的应用，步骤如下：

[0021] 将不同浓度的万古霉素纯品添加到不含万古霉素的人血清基质中制备校准品；所述校准品中万古霉素的浓度依次为40μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL和0μg/mL；将所述校准品稀释100~1000倍后加样于试纸条的样品吸收垫，进行免疫层析，测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值(T/C比值)，获得校准品中浓度与T/C比值的函数关系；

[0022] 取待测样本，加样于试纸条的样品吸收垫，进行免疫层析，测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值，根据上述获得得函数公式计算待测样品中万古霉素的含量。

[0023] 优选的，所述待测样本的加样量为1~100μL。

[0024] 本发明的有益效果：本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条，以万古霉素-牛血清白蛋白偶联物为免疫原，特异性强、免疫原性好，制备出的万古霉素单克隆抗体特异性强、效价高。此外，本发明的试纸条能够提高荧光检测稳定性，消除环境中荧光物质对待测物的干扰，降低本底荧光强度，提高分辨率。经过试验验证，本发明的试纸条与多种万古霉素类似物无交叉反应，具有检测准确度高、特异性强的优点。

附图说明

[0025] 图1表示实施例4中对本发明实施例1的试纸条测定结果相关性分析图。

具体实施方式

[0026] 本发明提供了一种万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的制备方法，包括以下步骤：

[0027] 1) 将高碘酸钠水溶液与万古霉素水溶液混合，进行氧化还原反应，得到万古霉素预偶联物；

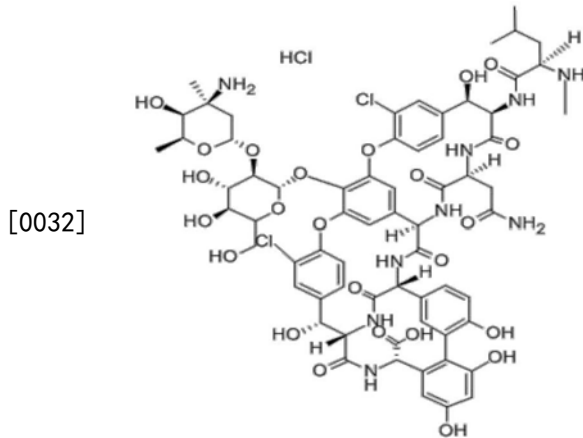
[0028] 2) 将牛血清白蛋白与碳酸盐缓冲液混合，得到牛血清白蛋白溶液；

[0029] 3) 将步骤1)所述万古霉素预偶联物与步骤2)所述牛血清白蛋白溶液混合，进行偶联反应，得到万古霉素-牛血清白蛋白偶联物；

[0030] 所述步骤1)和步骤2)没有时间顺序限制。

[0031] 本发明中，所述制备万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的原因是万古霉素是小分子物质，只有免疫反应性，没有免疫原性，不能诱发机体产生免疫应答，因此将万古霉素同载

体蛋白偶联而使万古霉素具有免疫原性。盐酸万古霉素 (Vancomycin, Vm) 结构式如下式:



[0033] 在本发明中,将高碘酸钠水溶液与万古霉素水溶液混合,进行氧化还原反应,得到万古霉素预偶联物。

[0034] 本发明中,所述高碘酸钠水溶液的浓度优选为8~12mg/mL,更优选为 10mg/mL;所述万古霉素水溶液的浓度优选为8~12mg/mL,更优选为 10mg/mL;所述万古霉素水溶液的溶剂优选为超纯水;所述高碘酸钠水溶液和万古霉素水溶液的体积比优选为1~3:0.5~1.5,更优选2:1。

[0035] 本发明中,所述氧化还原反应的时间优选为0.8~1.5h,更优选为1~1.2h;所述氧化还原反应的温度优选为18~26℃,更优选为20℃;所述氧化还原反应优选为避光进行;所述氧化还原反应优选为在搅拌条件下进行;所述搅拌的转速优选为500~3000rpm,更优选为800~2000rpm,最优选为1500rpm。

[0036] 在本发明中,将牛血清白蛋白与碳酸盐缓冲液混合,得到牛血清白蛋白溶液。

[0037] 本发明中,所述牛血清白蛋白和碳酸盐缓冲液的质量体积比为 4~6mg:0.5~1.5mL,更优选为5mg:1mL;所述碳酸盐缓冲液的浓度优选为 40~60mmol/L,更优选为50mmol/L;所述碳酸盐缓冲液的pH值优选为 9.4~9.8,更优选为9.6;所述混合的温度优选为15~37℃,更优选为20~30℃,最优选为25℃;所述混合的时间优选为0.5~3h,更优选为1~2h,最优选为 1.5h。

[0038] 本发明在获得万古霉素预偶联物和牛血清白蛋白溶液后,将所述万古霉素预偶联物与所述牛血清白蛋白溶液混合,进行偶联反应,得到万古霉素-牛血清白蛋白偶联物。

[0039] 本发明中,所述万古霉素预偶联物与牛血清白蛋白溶液的体积比优选为 1~2:0.5~1.5,更优选为1.5:1;所述偶联反应的时间优选为10~15h,更优选为12h;所述偶联反应的温度优选为15~37℃,更优选为25℃;所述偶联反应优选的在搅拌条件下进行;所述搅拌的转速优选为500~3000rpm,更优选为 800~2000rpm,最优选为1500rpm。

[0040] 本发明在所述万古霉素预偶联物与所述牛血清白蛋白溶液混合后,优选的还包括调节pH;所述调节后的pH值优选为8.5~9.5,更优选为9;所述调节pH的试剂优选为碳酸钠溶液;所述碳酸钠溶液的浓度优选为 0.5~1.5mol/L,更优选为1mol/L。

[0041] 本发明在所述偶联反应后,优选的还包括将偶联反应物对水透析,选用 8K截留的透析袋,每次透析12h以上,以去除未反应的万古霉素分子及偶联剂;所述对水透析的次数优选为3~7次,更优选为5次。

[0042] 在本发明制备获得所述万古霉素-牛血清白蛋白偶联物后优选的将所述万古霉素-牛血清白蛋白偶联物保存于-40~-80℃,更优选的保存于-70℃。

[0043] 本发明在得到万古霉素-牛血清白蛋白偶联物后,优选的还包括对万古霉素-牛血清白蛋白偶联物进行鉴定;所述鉴定的方法,步骤如下:比较万古霉素-牛血清白蛋白偶联物和牛血清白蛋白的分子量,当万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的分子量明显大于牛血清白蛋白时,表示万古霉素已成功偶联到牛血清白蛋白上;所述分子量测定的方式优选为Native SDS-PAGE电泳。

[0044] 本发明提供了上述方案所述制备方法制备得到的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物;所述万古霉素偶联物具有免疫原性,能够作为制备万古霉素单克隆抗体的免疫原。

[0045] 本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,所述试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、荧光微球垫、包被有抗体的硝酸纤维素膜和吸水垫。

[0046] 本发明中,所述试纸条的优选的按照以下方法进行组装:将样品吸收垫、荧光微球垫、包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜和吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,样品吸收垫的末端与荧光微球垫始段相连,荧光微球垫的末端与包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜的始端相连,包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡;所述小条的宽度优选为3.8~4mm,更优选为3.96mm。

[0047] 在本发明中,所述样品吸水垫优选的采用以下方法制备获得,步骤如下:将吸收垫置于牛血清白蛋白溶液中,进行浸泡,干燥,得到样品吸收垫。

[0048] 本发明中,所述牛血清白蛋白溶液中牛血清白蛋白的体积百分含量优选为0.3%~0.8%,更优选为0.5%;所述牛血清白蛋白溶液的溶剂优选为磷酸盐缓冲液;所述磷酸盐缓冲液的浓度优选为0.05~0.15mol/L,更优选为0.1mol/L;所述磷酸盐缓冲液的pH值优选为7.1~7.5,更优选为7.2;所述浸泡的时间优选为1.5~2.5h,更优选为2h;所述浸泡的温度优选为15~37℃,更优选为25℃;所述干燥的温度优选为35~40℃,更优选为37℃;所述干燥的时间优选为1~3h,更优选为2h;所述干燥的方式优选为烘干。

[0049] 在本发明中,所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体;所述荧光微球垫优选的采用以下方法制备获得:将所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体加样至玻璃纤维素膜,干燥,得到荧光微球垫;所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体的加样量优选为10~100μg,更优选为20~50μg,最优选为30μg;所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体的加样设备优选为金标点膜喷金仪;所述干燥的时间优选为12~18h,更优选为15h;所述干燥的温度优选为35~40℃,更优选为37℃。

[0050] 在本发明中,所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体优选的采用以下方法制备获得:

[0051] I将荧光微球悬液、MES缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺混合,进行活化处理,得到活化的荧光微球;

[0052] II将步骤I所述活化的荧光微球和万古霉素单克隆抗体混合,进行偶联,得到荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体。

[0053] 在本发明中,将荧光微球悬液、MES缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺混合,进行活化处理,得到活化的荧光微球。

[0054] 本发明中,所述荧光微球的直径优选为100~300nm,更优选为150~280nm,最优选为200nm;优选的,所述荧光微球表面含有羧基基团;所述荧光微球优选为聚苯乙烯包裹稀土离子Eu³⁺的微球;所述荧光微球悬液中荧光微球的含量优选为1% (W/V);所述MES的浓度优选为40~60mM,更优选为50mM;所述MES缓冲液的pH值优选为5.5~6.5,更优选为6;所述荧光微球悬液、MES缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基丁二酰亚胺的比例优选为80~120μL:300~500μL:0.3~1mg:0.3~1mg,更优选为100μL:400μL:0.5mg:0.5mg。本发明中,所述活化处理的时间优选为10~20min,更优选为15min;所述活化处理的温度优选为18~26℃,更优选为20℃;所述活化处理优选的在震荡条件下进行。

[0055] 本发明在得到活化的荧光微球后,优选的还包括对活化的荧光微球进行离心,重悬沉淀;所述离心的转速优选为8000~12000rpm,更优选为10000rpm;所述离心的温度优选为0~5℃,更优选为4℃;所述离心的时间优选为8~12min,更优选为10min;所述重悬沉淀的溶剂优选为MES缓冲液。

[0056] 本发明将所述活化的荧光微球和万古霉素单克隆抗体混合,进行偶联,得到荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体。

[0057] 本发明中,所述活化的荧光微球和万古霉素单克隆抗体的体积质量比优选为400~600μL:1~3μg,更优选为500μL:2μg;所述偶联的时间优选为100~150min,更优选为120min;所述偶联的温度优选为18~26℃,更优选为20℃;所述偶联优选的在震荡条件下进行。

[0058] 本发明中,在得到荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体后,优选的还包括将荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体和牛血清白蛋白水溶液混合,进行封闭处理,得到封闭后的荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体;所述荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体与牛血清白蛋白水溶液的体积比优选为4~6:0.5~1.5,更优选为5:1;所述牛血清白蛋白水溶液中牛血清白蛋白的质量百分含量优选为8%~12%,更优选为10%;所述封闭的温度优选为18~26℃,更优选为20℃;所述封闭的时间优选为10~15h,更优选为12h。

[0059] 本发明中,所述封闭后的荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体的贮存方法,步骤如下:将封闭后的荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体离心,重悬沉淀,洗涤沉淀,保存。本发明中,所述离心的转速优选为8000~12000rpm,更优选为10000rpm;所述离心的温度优选为0~5℃,更优选为4℃;所述离心的时间优选为8~12min,更优选为10min;所述重悬沉淀的溶剂优选为贮存缓冲液;所述贮存缓冲液优选为含有NaN₃和牛血清白蛋白的磷酸缓冲液;所述磷酸缓冲液中NaN₃的质量百分含量优选为0.01%~0.02%;所述磷酸缓冲液中牛血清白蛋白的质量百分含量优选为0.1%~0.2%;所述磷酸缓冲液的pH值优选为7.2~7.5,更优选为7.4;所述洗涤沉淀的次数优选为1~2次;所述洗涤沉淀的方法为再次离心,重悬沉淀;所述保存的温度优选为0~5℃,更优选为4℃;所述保存优选为避光保存。

[0060] 本发明中,所述万古霉素单克隆抗体优选的是以上述方案所述的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原制备获得;更优选的,所述万古霉素单克隆抗体采用以下方法制备获得:

[0061] i) 利用上述方案所述万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原免疫第一Balb/c

小鼠,加强免疫后得到能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞;

[0062] ii) 将步骤i)所述能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,测定细胞上清液,筛选阳性孔;

[0063] iii) 对步骤ii)所述阳性孔中的融合细胞进行克隆化,得到产单克隆抗体的杂交瘤细胞;

[0064] iv) 在第二Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油后,腹腔注射步骤iii)所述杂交瘤细胞,采集腹水,纯化腹水,得到万古霉素单克隆抗体。

[0065] 在本发明中,利用上述方案所述万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原免疫第一Balb/c小鼠,得到能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞。

[0066] 本发明对免疫的方法没有特殊限制,本领域常规免疫方法即可;本发明对加强免疫的次数和每次加强免疫使用的万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的剂量没有特殊要求,以第一Balb/c小鼠能够产生特异性抗体为准;本发明对获得能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞的方法没有特殊限制,本领域常规免疫方法即可。

[0067] 本发明在得到能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞后,将所述能产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,测定细胞上清液,筛选阳性孔。

[0068] 本发明中,所述测定细胞上清液的方法优选为间接竞争酶联免疫分析法;本发明对所述筛选阳性孔的方法没有特殊限制,本领域常规筛选方法即可。

[0069] 本发明在得到阳性孔后,对所述阳性孔中的融合细胞进行克隆化,得到产单克隆抗体的杂交瘤细胞。本发明对所述克隆化的方法没有特殊限制,本领域常规方法即可。

[0070] 本发明在得到杂交瘤细胞后,在第二Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油后,腹腔注射所述杂交瘤细胞,采集腹水,纯化腹水,得到万古霉素单克隆抗体。

[0071] 本发明中,所述第二Balb/c小鼠的周龄优选为7~9周龄,更优选为8周龄;本发明对所述灭菌石蜡油的注入量没有特殊限制,本领域常规剂量即可;所述在第二Balb/c小鼠腹腔注入灭菌石蜡油与所述腹腔注射所述杂交瘤细胞之间的时间间隔优选为7~14d,更优选为10~12d;所述腹腔注射所述杂交瘤细胞与采集腹水之间的时间间隔优选为7~10d,更优选为8~9d;所述纯化腹水的方法优选为辛酸-饱和硫酸铵法。

[0072] 本发明中,在纯化腹水后,优选的还包括万古霉素单克隆抗体纯度鉴定;所述鉴定的方法优选为SDS-PAGE电泳。

[0073] 在本发明的具体实施过程中,所述万古霉素单克隆抗体的保存温度优选为-15~-30℃,更优选为-20℃。

[0074] 在本发明中,所述包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜优选的包括检测区(T)和质控区(C);所述检测区优选的包被有万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物;所述质控区优选的包被有羊抗鼠抗抗体。本发明中,所述包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜优选的采用以下方法制备获得:检测区包被万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物,质控区包被羊抗鼠抗抗体,干燥,得到包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜;所述干燥的温度优选为35~40℃,更优选为37℃;所述干燥的时间优选为4~6h,更优选为5h。

[0075] 本发明中,所述检测区包被万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物优选的采用以下方法进行:将万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区域,制成检测区。本发明中,所述万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物的浓度优选为150~280μg/mL,更优选为200

$\mu\text{g}/\text{mL}$;所述万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物的喷涂量优选为 $1\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$,更优选为 $1.2\mu\text{L}/\text{cm}$;所述喷涂的设备优选为金标点膜喷金仪;本发明中,在将万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区域前,优选的包括对万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物进行稀释处理;所述稀释溶液优选为磷酸缓冲液;所述磷酸缓冲液的浓度优选为 $0.03\sim 0.08\text{mol}/\text{L}$,更优选为 $0.05\text{mol}/\text{L}$;所述磷酸缓冲液的pH值优选为 $7.0\sim 7.5$,更优选为 7.2 。

[0076] 本发明中,所述万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物优选的采用以下方法制备获得:

[0077] ①将鸡卵清白蛋白与磷酸盐缓冲液混合,得到鸡卵清白蛋白溶液;

[0078] ②将步骤①所述鸡卵清白蛋白溶液、万古霉素、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合,进行偶联反应,偶联产物对水透析,得到万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物。

[0079] 在本发明中,将鸡卵清白蛋白与磷酸盐缓冲液混合,得到鸡卵清白蛋白溶液。

[0080] 本发明中,所述鸡卵清白蛋白和磷酸盐缓冲液的质量体积比优选为 $8\sim 12\text{mg}:1\sim 3\text{mL}$,更优选为 $10\text{mg}:2\text{mL}$;所述磷酸盐缓冲液的浓度优选为 $0.05\sim 0.15\text{M}$,更优选为 0.1M ;所述磷酸盐缓冲液的pH值优选为 $7.2\sim 7.5$,更优选为 7.4 。

[0081] 本发明在得到鸡卵清白蛋白溶液后,将所述鸡卵清白蛋白溶液、万古霉素、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺混合,进行偶联反应,偶联产物对水透析,得到万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物。

[0082] 本发明中,所述鸡卵清白蛋白溶液、万古霉素、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的比例优选为 $1\sim 3\text{mL}:8\sim 12\text{mg}:2\sim 4\text{mg}:4\sim 6\text{mg}$,更优选为 $2\text{mL}:10\text{mg}:3\text{mg}:5\text{mg}$;所述偶联的时间优选为 $0.5\sim 1.5\text{h}$,更优选为 1h ;所述偶联的温度优选为 $18\sim 26^\circ\text{C}$,更优选为 20°C ;所述偶联反应优选的在搅拌条件下进行;所述对水透析的次数优选为 $3\sim 7$ 次,更优选为 5 次;所述万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物的储存温度优选为 $-40\sim -80^\circ\text{C}$,更优选为 -70°C 。

[0083] 本发明在得到万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物后,优选的还包括对万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物进行鉴定;所述鉴定的方法,步骤如下:比较万古霉素-鸡卵清白蛋白和鸡卵清白蛋白的分子量,当万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物的分子量明显大于鸡卵清白蛋白时,表示万古霉素已成功偶联到鸡卵清白蛋白上;所述分子量测定的方式优选为Native SDS-PAGE电泳。

[0084] 本发明中,所述质控区包被羊抗鼠抗抗体优选的采用以下方法进行:将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区域,制成质控区。本发明中,所述羊抗鼠抗抗体的浓度优选为 $150\sim 280\mu\text{g}/\text{mL}$,更优选为 $200\mu\text{g}/\text{mL}$;所述羊抗鼠抗抗体的喷涂量优选为 $1.0\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$,更优选为 $1.2\mu\text{L}/\text{cm}$;所述喷涂的设备优选为金标点膜喷金仪;本发明中,在将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区域前,优选的包括对羊抗鼠抗抗体进行稀释处理;所述稀释溶液优选为磷酸缓冲液;所述磷酸缓冲液的浓度优选为 $0.03\sim 0.08\text{mol}/\text{L}$,更优选为 $0.05\text{mol}/\text{L}$;所述磷酸缓冲液的pH值优选为 $7.0\sim 7.5$,更优选为 7.2 。

[0085] 本发明还提供了上述方案所述的试纸条在万古霉素检测中的应用,步骤如下:

[0086] 将不同浓度的万古霉素纯品添加到不含万古霉素的人血清基质中制备校准品;所述校准品中万古霉素的浓度依次为 $40\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0\mu\text{g}/\text{mL}$;将所述校准品稀释 $100\sim 1000$ 倍后加样于试纸条的样品吸收垫,进行免疫层析,测定检测区时间分

辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值(T/C比值),获得校准品中浓度与T/C比值的函数关系。

[0087] 取待测样本,加样于试纸条的样品吸收垫,进行免疫层析,测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,根据上述获得得函数公式计算待测样品中万古霉素的含量。

[0088] 本发明中,若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0089] 本发明中,所述待测样本的加样量优选为1~100 μ L,更优选为20~90 μ L,最优选为80 μ L;所述免疫层析的时间优选为10~20min,更优选为15min;所述免疫层析的温度优选为20~25 $^{\circ}$ C,更优选为22~24 $^{\circ}$ C;所述测定检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值的设备优选为荧光检测仪。

[0090] 下面结合实施例对本发明提供的一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0091] 实施例1一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法

[0092] 1. 万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的合成和鉴定

[0093] (1) 万古霉素-牛血清白蛋白偶联物的制备:

[0094] 在1mL 10mg/mL NaIO₄溶液中,加入0.5mL溶解万古霉素5mg的超纯水,室温避光搅拌反应1h。将反应混合物加入至1mL 5mg/mL的牛血清白蛋白溶液(50mmol/L碳酸盐缓冲液,pH9.6)中,用1mol/L的Na₂CO₃溶液调节至pH9左右,搅拌12h,对水透析5次,-70 $^{\circ}$ C保存,备用。

[0095] (2) 万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物的制备:

[0096] 将10mg鸡卵清白蛋白溶解于2mL 0.1M pH7.4的磷酸盐缓冲液中;在上述溶液中加入10mg万古霉素,并搅拌均匀,再加入3mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、5mg N-羧基琥珀酰亚胺溶于上述溶液中,于室温下搅拌,反应1h。对水透析5次,储存于-70 $^{\circ}$ C。

[0097] (3) 万古霉素半抗原-载体蛋白偶联物的鉴定

[0098] 用Native SDS-PAGE电泳同时进行牛血清白蛋白、万古霉素-牛血清白蛋白偶联物,鸡卵清白蛋白,万古霉素-鸡卵清白蛋白偶联物四种蛋白质的分子量分析。结果显示万古霉素-牛血清白蛋白卵清蛋白肽的分子量明显大于牛血清白蛋白,万古霉素-鸡卵清白蛋白卵清蛋白肽的分子量明显大于鸡卵清白蛋白,表明万古霉素均已成功偶联到牛血清白蛋白和鸡卵清白蛋白上。

[0099] 2. 万古霉素单克隆抗体的制备

[0100] 将上述制得的万古霉素-牛血清白蛋白免疫原采用常规方法免疫Balb/c,加强免疫后取产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0101] 将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7~10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经 SDS-PAGE电泳鉴定,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0102] 3. 荧光微球标记万古霉素单克隆抗体的制备

[0103] (1) 活化:取购自南京微测生物技术有限公司的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μ L混悬于400 μ L活化缓冲液中(50mM MES pH6.0),加入0.5mg EDC和0.5mgNHS,混匀后室温震荡活化15min;

[0104] (2) 偶联:将(1)所述混悬液于4 $^{\circ}$ C 10000r/min离心10min后弃上清,重悬于活化缓冲液中,加入2 μ g万古霉素单克隆抗体溶液,混匀后室温震荡偶联 120min;

[0105] (3) 封闭:将(2)所述混悬液加入10%的牛血清白蛋白溶液100 μ L,混匀后室温震荡封闭过夜;

[0106] (4) 贮存:将(3)所述混悬液于4 $^{\circ}$ C 10000r/min离心10min后弃上清,重悬于贮存缓冲液中(0.01%Na₃N、0.1%牛血清白蛋白的pH 7.4的PB缓冲液),以此法洗涤微球1次,混匀后于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0107] 4. 荧光微球垫的制备

[0108] 将贮存的荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体以贮存缓冲液稀释为 2 μ g/mL,用金标点膜喷金仪喷金,37 $^{\circ}$ C干燥15h,取出密封保存。

[0109] 5. 包被有抗体的硝酸纤维素(NC)膜的制备

[0110] 用0.05mol/L、pH 7.2的PB缓冲液将万古霉素半抗原-鸡卵清白蛋白偶联物稀释到200 μ g/mL,用金标点膜喷金仪将其喷涂于NC膜上的检测区(T),喷膜量为1.2 μ L/cm;用0.05mol/L、pH7.2的PB缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μ g/mL,用金标点膜喷金仪将其喷涂于NC膜上的检测区(C),喷膜量为1.2 μ L/cm;37 $^{\circ}$ C干燥5h,备用。

[0111] 6. 样品吸收垫的制备

[0112] 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH 7.2、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液浸泡2h,37 $^{\circ}$ C下烘干2h,备用。

[0113] 7. 试纸条的组装

[0114] 将样品吸收垫、玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,样品吸收垫的末端与玻璃纤维垫始段相连,玻璃纤维垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成3.96mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡。

[0115] 实施例2实施例1的试纸条的应用

[0116] 1、样品前处理

[0117] 准确吸取20 μ L样本加入到180 μ L样本稀释液,充分混匀。

[0118] 2、用试纸条检测

[0119] 用微量移液器准确吸取80 μ L待检样品溶液于试纸条加样孔中,20 $^{\circ}$ C作用15min;将试纸卡插入荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试;通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0120] 3、检测结果分析

[0121] 定量检测

[0122] 测试完成后,仪器获得试纸卡上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,根据如下公式计算待测样品中万古霉素的含量。

[0123] $Y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D;$

[0124] $A=0.44001, B=0.57869, C=3.22910, D=0.16687$;

[0125] Y为试纸卡上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值;X为样本中万古霉素的浓度。

[0126] 无效:若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0127] 实施例3实施例1的试纸条的交叉反应率测定

[0128] 选择几种万古霉素的类似物和常见药物,进行干扰试验。将以下各种化合物加入到万古霉素浓度为 $20\mu\text{g/mL}$ 的人血清样本中,采用实施例1的试纸条检测样本,将加入了化合物的样本检测结果与对照样本的结果进行比较,试验结果见表1。结果表明,本发明实施例1的万古霉素检测试纸条特异性高,同多种药物无交叉反应。

[0129] 表1实施例1的试纸条的交叉反应率测定结果

化合物名称	测试浓度	交叉反应率 a
万古霉素	$20\mu\text{g/mL}$	100%
去甲万古霉素	$100\mu\text{g/mL}$	<1%
水杨酸	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
阿司匹林	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
[0130] 丙戊酸	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
卡马西平	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
地高辛	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
苯妥英	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%
茶碱	$1000\mu\text{g/mL}$	<0.001%

[0131] a 交叉反应率= $100\times\frac{\text{加入交叉化合物的样本检测结果}-\text{对照样本的结果}}{\text{加入的交叉反应物的浓度}}$

[0132] 实施例4本发明实施例1的试纸条测定结果相关性分析

[0133] 将本发明实施例1的试纸条与高效液相色谱法测定人血清中万古霉素方法比较,其中人血清为临床血清样本。高效液相色谱法按照如下方案:采用 Waters 2695型高效液相色谱仪,C18柱($150\text{mm}\times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$),流动相: pH3.2的 50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈(90:10);检测波长:230nm;流速: 1mL/min ;400 μl 血清样本加入50 μl 10%的硫酸锌沉淀蛋白,离心 5000r/min后取20 μl 进样,测定万古霉素峰高。结果见表2。相关性曲线见图1,可见二者拟合良好。

[0134] 表2本发明实施例1的试纸条与高效液相色谱法测定人血清中万古霉素方法比较

[0135]

血清样本编号	荧光免疫层析($\mu\text{g/mL}$)	高效液相色谱($\mu\text{g/mL}$)
--------	----------------------------	----------------------------

样品1	0.4	0.5
样品2	1.1	1.2
样品3	1.6	1.9
样品4	2.4	2.1
样品5	3.5	4.2
样品6	5.2	5.9
样品7	6.4	7.1
样品8	8.5	8.6
样品9	9.2	9.8
样品10	11.1	10.2
样品11	14.2	15.2
样品12	15.2	17.2
样品13	16	15.4
样品14	17	18
样品15	19.1	19.9
样品16	19.8	20
样品17	21	22
样品18	23	24
样品19	32	34
样品20	25	24
样品21	28	30
样品22	30	32
样品23	35	38
样品24	46	40
样品25	56.1	52

[0136] 由以上实施例可知,本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,该试纸条与多种万古霉素类似物无交叉反应,具有检测准确度高、特异性强的优点。

[0137] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

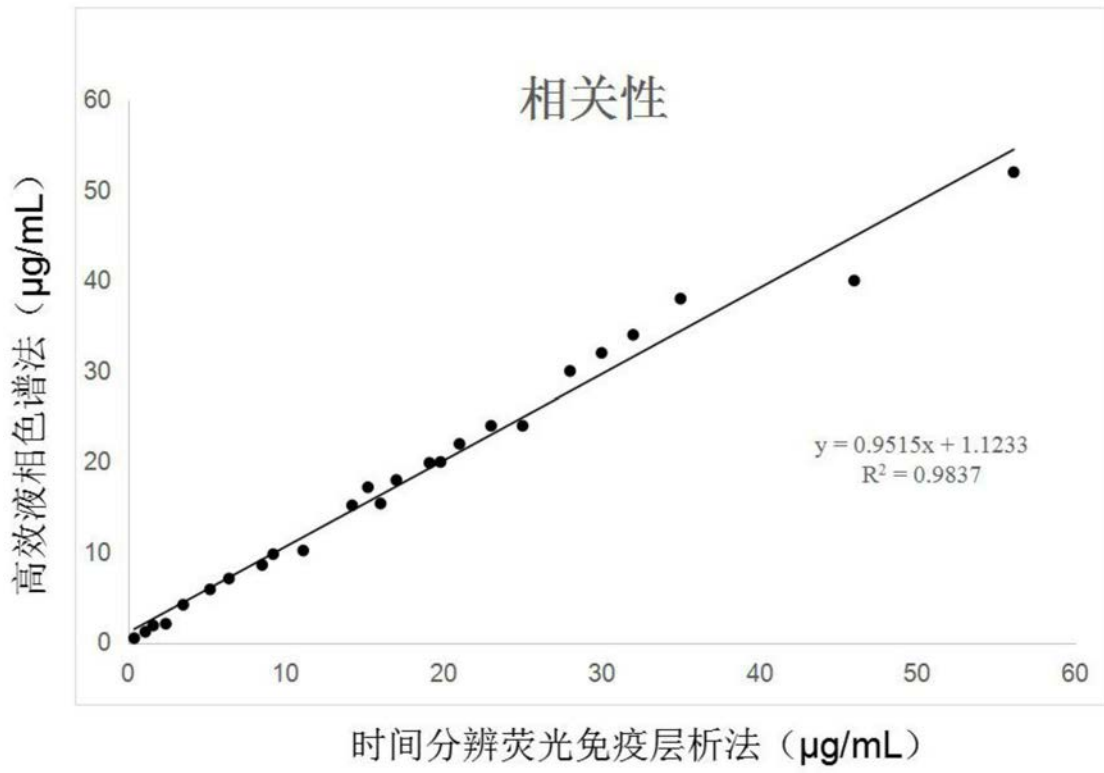


图1

专利名称(译)	一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109813693A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN201910020000.0	申请日	2019-01-09
[标]发明人	许秀丽 王艳新 周建平		
发明人	许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	C07K9/008 C07K14/765 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/5306 G01N33/533 G01N33/5432 G01N33/54366 G01N33/9446		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测万古霉素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用，属于体外诊断试剂中药物浓度检测技术领域，所述试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、荧光微球垫、包被有万古霉素-载体蛋白偶联物的硝酸纤维素膜和吸水垫，所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的万古霉素单克隆抗体；所述万古霉素单克隆抗体是以万古霉素-牛血清白蛋白偶联物作为免疫原制备获得。本发明的试纸条与多种万古霉素类似物无交叉反应，具有检测准确度高、特异性强的优点。

