



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110308290 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910624180.3

(22)申请日 2019.07.11

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路  
3333号

(72)发明人 唐仁陶 高阳 胡雪淞 高威  
孙成艳 何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理  
有限公司 22214

代理人 王莹

(51)Int.Cl.

G01N 33/94(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

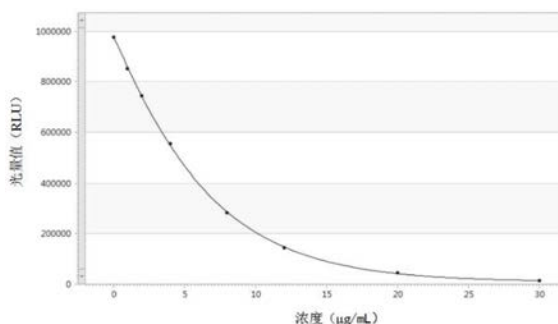
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

### (54)发明名称

卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法

### (57)摘要

本发明涉及一种卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法,属于化学发光体外诊断技术领域。解决了现有技术中卡马西平检测试剂盒存在测试耗时长,重复性差,稳定性差,空白高,灵敏度差,准确度差的技术问题。本发明的试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;其中,R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I;R2试剂包括偶联标记物标记的卡马西平类似物和缓冲液II;R3试剂包括化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体和缓冲液III。该试剂盒线性范围宽、检测时间短、空白低、灵敏度高、稳定性好、准确度高、重复性好。



1. 卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

所述R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I, R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度 $>0.03\%$ ;

所述R2试剂包括偶联标记物标记的卡马西平类似物和缓冲液II, R2试剂中偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ ;

所述R3试剂包括化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体和缓冲液III, R3试剂中化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度 $\geq 0.05\mu\text{g/ml}$ 。

2. 根据权利要求1所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述链霉亲和素磁颗粒的粒径为 $1-3\mu\text{m}$ 。

3. 根据权利要求1所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述偶联标记物标记的卡马西平类似物中, 卡马西平类似物与偶联标记物的标记摩尔比为 $1:(1-10)$ ; 偶联标记物为生物素、长臂生物素或长长臂生物素; 卡马西平类似物为卡马西平偶联人血清白蛋白、卡马西平偶联牛 $\gamma$ 球蛋白或卡马西平偶联鸡卵清蛋白。

4. 根据权利要求1所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体中, 卡马西平单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为 $1:(1-10)$ ; 化学发光标记物为吖啶酯或吖啶酯的NHS酯。

5. 根据权利要求1所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 缓冲液I为含有 $20\text{mmol/L PB}$ 、 $150\text{mmol/L NaCl}$ 和 $0.1\%\text{ProClin300}$ 的 $\text{pH}7.2$ 的缓冲液, 缓冲液II为含有 $20\text{mmol/L PB}$ 、 $150\text{mmol/L NaCl}$ 、 $0.05\%\text{Tween20}$ 、 $1\%\text{BSA}$ 和 $0.1\%\text{ProClin300}$ 的 $\text{pH}6.0$ 的缓冲液, 缓冲液III为含有 $20\text{mmol/L PB}$ 、 $150\text{mmol/L NaCl}$ 、 $0.05\%\text{Tween20}$ 、 $1\%\text{BSA}$ 和 $0.1\%\text{ProClin300}$ 的 $\text{pH}6.0$ 的缓冲液。

6. 根据权利要求1所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒, 其特征在于, 该试剂盒中还包括卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2; 卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2均为含卡马西平的缓冲液, 卡马西平校准品L中卡马西平的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平校准品H中卡马西平的浓度为 $15\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平质控品C1中卡马西平的浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平质控品C2中卡马西平的浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 。

7. 权利要求1-5任何一项所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

#### 步骤一、制备R1试剂

将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中, 充分混匀后, 放置于磁分离器上, 直至上清无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒, 使用缓冲液I清洗磁颗粒后, 再用缓冲液I配成磁颗粒浓度 $>0.03\%$ 的固相试剂, 即为R1试剂;

#### 步骤二、制备R2试剂

取卡马西平类似物, 用离心管进行超滤离心, 将缓冲液置换为标记缓冲液;

按照偶联标记物: 卡马西平类似物摩尔比为 $(1-10):1$ 加入偶联标记物原液, 混匀,  $37^\circ\text{C}$ , 标记4h;

标记反应结束后, 加入封闭缓冲液, 封闭1h, 封闭后用离心管进行超滤离心, 除去未偶

联的偶联标记物,用缓冲液Ⅱ配制成偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ 的R2试剂;

步骤三、制备R3试剂

取卡马西平单克隆抗体,用离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液;

按照化学发光标记物:卡马西平单克隆抗体摩尔比为(1-10):1加入化学发光标记物原液,混匀,37℃,标记4h;

标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;

封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的化学发光标记物,用缓冲液配Ⅲ制成化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度 $\geq 0.05\mu\text{g/ml}$ 的R3试剂。

8. 权利要求7所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤二和步骤三中,离心管均为30KDa超滤离心管,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min。

9. 权利要求7所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤二和步骤三中,所述标记缓冲液均为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl, pH为8.0的缓冲液。

10. 权利要求7所述的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述步骤二和步骤三中,所述封闭缓冲液均为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸, pH为8.0的缓冲液。

## 卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学发光体外诊断技术领域,具体涉及一种卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 卡马西平(Carbamazepine,CBZ),是治疗癫痫全身或局部性大发作的首选药物之一,由于其疗效确切,没有认知功能方面的不良反应,已被公认是治疗儿童癫痫的一线用药。癫痫病常在儿童期发生,需长期用药以预防和控制其发作;又由于其具有吸收不规则,易与血清中蛋白结合,代谢酶诱导作用,治疗浓度范围窄(4-12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )等特点,使药物动力学存在着明显的个体差异,因此检测卡马西平的血浆浓度并对其实施个体化给药是临床安全用药的保障。服用卡马西平的患儿血药浓度、每日给药剂量与临床疗效密切相关。检测患儿血药浓度,有助于确定癫痫患儿口服卡马西平的最佳治疗范围及适宜的每日剂量,为临床个体化给药提供参考依据。

[0003] 现有技术中,测定样本中卡马西平含量的测试方法主要有酶联免疫分析技术和高效液相色谱(HPLC)分析技术。但二者在实际应用中均存在一些固有缺陷,如这两种测试方法均存在耗时长的问题,且酶联免疫分析法的重复性较差。现有技术中还存在利用化学发光检测卡马西平的方法,这种方法虽然检测时间较快,但使用抗体包被磁微粒,磁微粒稳定性差,容易凝集,导致检测结果重复性差。

[0004] 有鉴于此,有必要提供一种耗时短、重复性好、稳定性好、空白低、灵敏度高、准确度高的卡马西平的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是解决现有技术中卡马西平检测试剂盒存在测试耗时长,重复性差,稳定性差,空白高,灵敏度差,准确度差的技术问题,提供一种卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题采取的技术方案如下:

[0007] 本发明提供的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂;

[0008] 所述R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度 $>0.03\%$ ;

[0009] 所述R2试剂包括偶联标记物标记的卡马西平类似物和缓冲液II,R2试剂中偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ;

[0010] 所述R3试剂包括化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体和缓冲液III,R3试剂中化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度 $\geq 0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0011] 优选的是,所述链霉亲和素磁颗粒的粒径为1-3 $\mu\text{m}$ 。

[0012] 优选的是,所述偶联标记物标记的卡马西平类似物中,卡马西平类似物与偶联标

记物的标记摩尔比为1: (1-10); 偶联标记物为生物素、长臂生物素或长长臂生物素; 卡马西平类似物为卡马西平偶联人血清白蛋白、卡马西平偶联牛  $\gamma$  球蛋白或卡马西平偶联鸡卵清蛋白。

[0013] 优选的是, 所述化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体中, 卡马西平单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1: (1-10); 化学发光标记物为吖啶酯或吖啶酯的NHS酯。

[0014] 优选的是, 缓冲液I为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.1%ProClin300的pH7.2的缓冲液, 缓冲液II为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300的pH6.0的缓冲液, 缓冲液III为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300的pH6.0的缓冲液。

[0015] 优选的是, 该试剂盒中还包括卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2; 卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2均为含卡马西平的缓冲液, 卡马西平校准品L中卡马西平的浓度为2 $\mu$ g/ml, 卡马西平校准品H中卡马西平的浓度为15 $\mu$ g/ml, 卡马西平质控品C1中卡马西平的浓度为5 $\mu$ g/ml, 卡马西平质控品C2中卡马西平的浓度为10 $\mu$ g/ml。

[0016] 本发明还提供上述卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0017] 步骤一、制备R1试剂

[0018] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中, 充分混匀后, 放置于磁分离器上, 直至上清无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒, 使用缓冲液I清洗磁颗粒后, 再用缓冲液I配成磁颗粒浓度 $>0.03\%$ 的固相试剂, 即为R1试剂;

[0019] 步骤二、制备R2试剂

[0020] 取卡马西平类似物, 用离心管进行超滤离心, 将缓冲液置换为标记缓冲液;

[0021] 按照偶联标记物: 卡马西平类似物摩尔比为(1-10): 1加入偶联标记物原液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C, 标记4h;

[0022] 标记反应结束后, 加入封闭缓冲液, 封闭1h, 封闭后用离心管进行超滤离心, 除去未偶联的偶联标记物, 用缓冲液II配制成偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu$ g/ml的R2试剂;

[0023] 步骤三、制备R3试剂

[0024] 取卡马西平单克隆抗体, 用离心管进行超滤离心, 将缓冲液置换为标记缓冲液;

[0025] 按照化学发光标记物: 卡马西平单克隆抗体摩尔比为(1-10): 1加入化学发光标记物原液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C, 标记4h;

[0026] 标记反应结束后, 加入封闭缓冲液, 封闭1h;

[0027] 封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心, 除去未偶联的化学发光标记物, 用缓冲液III制成化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度 $\geq 0.05\mu$ g/ml的R3试剂。

[0028] 优选的是, 所述步骤二和步骤三中, 离心管均为30KDa超滤离心管, 离心机转速为9000rpm, 离心时间为30min。

[0029] 优选的是, 所述步骤二和步骤三中, 所述标记缓冲液均为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl, pH为8.0的缓冲液。

[0030] 优选的是,所述步骤二和步骤三中,所述封闭缓冲液均为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液。

[0031] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0032] 本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒采用均相的磁微粒发光技术和竞争法直接测量血清中的卡马西平浓度,具有线性范围宽、检测时间短、空白低、灵敏度高、稳定性好、准确度高、重复性好的特点,优于市场上现有的其它产品,市场潜力巨大,具体的:

[0033] 1、本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒线性范围宽,现有试剂盒检测卡马西平的线性范围普遍为0-20 $\mu$ g/ml,本发明的试剂盒线性范围可达到0-30 $\mu$ g/ml,比同类产品线性范围宽50%,大幅提高了检测范围上限;

[0034] 2、本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒采用全自动化,操作简便,检测时间显著缩短,25min内出结果;

[0035] 3、本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒采用吖啶酯直接发光,降低了本底空白,提高了灵敏度,经过实验,其检测灵敏度达到0.5 $\mu$ g/ml。

[0036] 4、本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒使用生物素-亲和素体系,生物素-亲和素体系是通过链霉亲和素-生物素之间特异性相互作用,将偶联标记物标记的卡马西平类似物连接到磁微粒上,这一结合过程是在检测样本时发生的,试剂盒在使用之前,链霉亲和素包被的磁珠和偶联标记物标记的卡马西平类似物是分开存放的,因此可以避免抗体直接包被磁珠导致的磁珠凝集,解决了现有试剂盒稳定性差的问题。

[0037] 5、本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒使用的校准品和质控品,均溯源到欧洲药典标准品,保证了测试结果的准确度,且方便实验室间比对。

## 附图说明

[0038] 图1为以欧洲药典标准品理论浓度和测试欧洲药典标准品的光量为横纵坐标,绘制的标准曲线。

[0039] 图2为以各点浓度值(30 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、12 $\mu$ g/mL、8 $\mu$ g/mL、4 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL)和发光值为横纵坐标绘制的主校准曲线。

## 具体实施方式

[0040] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0041] 本发明的卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒,包括R1试剂、R2试剂和R3试剂。

[0042] 其中,R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I,R1试剂中链霉亲和素磁颗粒的浓度 $>0.03\%$ ,优选为 $0.05-0.1\%$ 。链霉亲和素磁颗粒的粒径为1-3 $\mu$ m。

[0043] R2试剂包括偶联标记物标记的卡马西平类似物和缓冲液II,R2试剂中偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu$ g/ml,优选为 $0.5\mu$ g/ml。偶联标记物标记的卡马西平类似物中,卡马西平类似物与偶联标记物的标记摩尔比为1:(1-10)。偶联标记物为生物素或生物素衍生物,如长臂生物素或长长臂生物素。卡马西平类似物为卡马西平偶联人血清

白蛋白、卡马西平偶联牛  $\gamma$  球蛋白或卡马西平偶联鸡卵清蛋白。

[0044] R3试剂包括化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体和缓冲液Ⅲ, R3试剂中化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度 $\geq 0.05\mu\text{g/ml}$ , 优选为 $0.05\mu\text{g/ml}$ 。化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体中, 卡马西平单克隆抗体与化学发光标记物的标记的摩尔比为1:(1-10); 化学发光标记物为吖啶酯或吖啶酯衍生物(吖啶酯的NHS酯)。

[0045] 上述技术方案中, 缓冲液I、缓冲液Ⅱ和缓冲液Ⅲ均为缓冲液, I、Ⅱ和Ⅲ仅是为了区分不同试剂中的缓冲液添加的标号。优选, 缓冲液I为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.1%ProClin300的pH7.2的缓冲液, 缓冲液Ⅱ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300的pH6.0的缓冲液, 缓冲液Ⅲ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300的pH6.0的缓冲液。

[0046] 上述技术方案中, 本发明的试剂盒中还可以包括卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2; 卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2均为含卡马西平的缓冲液, 卡马西平校准品L中卡马西平的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平校准品H中卡马西平的浓度为 $15\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平质控品C1中卡马西平的浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ , 卡马西平质控品C2中卡马西平的浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 。

[0047] 本发明还提供上述卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

[0048] 步骤一、制备R1试剂

[0049] 将链霉亲和素磁颗粒溶液加入TBST溶液中, 充分混匀后, 放置于磁分离器上, 直至上清无混浊, 弃上清, 留取磁颗粒, 使用缓冲液I清洗磁颗粒后, 再用缓冲液I配成磁颗粒浓度 $>0.03\%$ 的固相试剂, 即为R1试剂;

[0050] 其中, 链霉亲和素磁颗粒溶液(商购, 选自Thermo)的浓度优选为50-100mg/ml; 链霉亲和素磁颗粒溶液和TBST溶液的体积比优选为(0.5-1):(5-10); 混匀时间优选为10-15min; 一般重复清洗3-5次。

[0051] 步骤二、制备R2试剂

[0052] 取卡马西平类似物, 用离心管进行超滤离心, 将缓冲液置换为标记缓冲液; 按照生物素:卡马西平类似物摩尔比为(1-10):1加入偶联标记物原液, 混匀,  $37^{\circ}\text{C}$ , 标记4h; 标记反应结束后, 加入封闭缓冲液, 封闭1h, 封闭后用离心管进行超滤离心, 除去未偶联的偶联标记物, 用缓冲液Ⅱ, 配制成偶联标记物标记的卡马西平类似物的浓度 $\geq 0.5\mu\text{g/ml}$ 的R2试剂;

[0053] 其中, 离心管为30KDa超滤离心管; 超滤离心的离心机转速为9000rpm, 离心时间为30min; 标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl, pH为8.0的缓冲液; 偶联标记物原液指仅含有偶联标记物的溶液, 通常为偶联标记物的DMF溶液, 偶联标记物的浓度优选为2-3mg/mL; 封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸, pH为8.0的缓冲液。

[0054] 步骤三、制备R3试剂

[0055] 取卡马西平单克隆抗体, 用离心管进行超滤离心, 将缓冲液置换为标记缓冲液; 按照化学发光标记物:卡马西平单克隆抗体摩尔比为(1-10):1加入化学发光标记物原液, 混匀,  $37^{\circ}\text{C}$ , 标记4h; 标记反应结束后, 加入封闭缓冲液, 封闭1h; 封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心, 除去未偶联的化学发光标记物, 用缓冲液Ⅲ配制成化学发光标记物标记的卡

马西平单克隆抗体的浓度为0.05 $\mu$ g/ml的R3试剂。

[0056] 其中,离心管为30KDa超滤离心管;离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;化学发光标记物原液指仅含有化学发光标记物的溶液,通常为含有化学发光标记物的DMF溶液,化学发光标记物浓度优选为2-2.5mg/mL;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液。

[0057] 步骤四、将R1试剂、R2试剂和R3试剂分别灌封于不同的试剂瓶,得到卡马西平化学发光免疫定量检测试剂盒。

[0058] 上述技术方案中,如包括校准品和质控品,还需制备校准品和质控品,即将卡马西平原液(卡马西平原液指仅含有卡马西平的溶液,通常采用浓度为1mg/ml)用缓冲液分别配制成卡马西平浓度分别为2 $\mu$ g/ml、15 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml的卡马西平校准品L、卡马西平校准品H、卡马西平质控品C1和卡马西平质控品C2,等量分装;

[0059] 其中,缓冲液为含20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、1%明胶、1%蔗糖和0.1%ProClin300,pH6.8的缓冲液。

[0060] 本发明的卡马西平化学发光免疫检测试剂盒用于卡马西平检测时,利用全自动化学发光免疫分析仪对卡马西平主校准品进行检测,绘制主校准曲线,内置于射频卡;接着测试两点校准,对主校准曲线进行校准;接着测试质控品,质控品测试结果落在靶值范围内认为校准合格。测试实际样本(血清或血浆),根据样本发光值计算样本浓度;最后对卡马西平全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、线性、精密度、干扰性)的评价。

[0061] 本发明的卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的使用方法:以全自动化学发光免疫分析仪(CM-180)为检测工具,方法学模式为竞争法,即仪器依次加入20 $\mu$ l的样品和50 $\mu$ l的R2试剂,反应10min后,再加40 $\mu$ l的R1试剂和50 $\mu$ l的R3试剂,反应10min后,进行磁分离,加入清洗液清洗5次,仪器将反应复合物送入检测器,依次加入预激发液和激发液进行发光反应,采集光信号,记录发光值。

[0062] 以下结合实施例进一步说明本发明。

[0063] 实施例1

[0064] 卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,步骤如下:

[0065] 步骤一、R1试剂的制备

[0066] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径3 $\mu$ m)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.03%的固相试剂,即为R1试剂;

[0067] 缓冲液I为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.1%ProClin300,pH7.2的缓冲液。

[0068] 步骤二、R2试剂的制备

[0069] 取500 $\mu$ g卡马西平偶联人血清白蛋白,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照生物素:卡马西平类似物摩尔比为10:1加入生物素原液(2mg/mL),混匀,37 $^{\circ}$ C,标记4h;标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的生物素分子,用缓冲液II配制成生物素标记的卡马西平类似物的浓度为0.5 $\mu$ g/ml的R2试剂。

[0070] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅱ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0071] 步骤三、R3试剂的制备

[0072] 取500μg卡马西平单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照吖啶酯:单克隆抗体摩尔比为10:1加入吖啶酯原液(2mg/mL),混匀,37℃,标记4h;标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的吖啶酯分子,用缓冲液Ⅲ配制成化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度为0.05μg/mL的R3试剂。

[0073] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅲ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0074] 步骤四、卡马西平校准品、质控品的制备

[0075] 取10mg/mL的卡马西平原液1mL,加入到99mL校准品基质缓冲液中,稀释成0.1mg/mL的校准品母液。

[0076] 将校准品母液6mL,加入到34mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为15μg/mL高浓度校准品。

[0077] 将校准品母液0.8mL,加入到39.2mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为2μg/mL低浓度校准品。

[0078] 将校准品母液2mL,加入到38mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为5μg/mL高浓度质控品。

[0079] 将校准品母液4mL,加入到36mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为10μg/mL低浓度质控品。

[0080] 其中,校准品基质缓冲液为含20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、1%明胶、1%蔗糖和0.1%ProClin300,pH6.8的缓冲液。

[0081] 实施例2

[0082] 卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,步骤如下:

[0083] 步骤一、R1试剂的制备

[0084] 取浓度是100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒(粒径3μm)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.03%的固相试剂,即为R1试剂;

[0085] 缓冲液I为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.1%ProClin300,pH7.2的缓冲液。

[0086] 步骤二、R2试剂的制备

[0087] 取500μg卡马西平偶联牛γ球蛋白,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照生物素:卡马西平类似物摩尔比为10:1加入生物素原液(2mg/mL),混匀,37℃,标记4h;标记反应结束后,加入封闭

缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的生物素分子,用缓冲液Ⅱ配制成生物素标记的卡马西平类似物的浓度为1.0 $\mu$ g/ml的R2试剂。

[0088] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅱ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0089] 步骤三、R3试剂的制备

[0090] 取500 $\mu$ g卡马西平单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照吖啶酯:单克隆抗体摩尔比为10:1加入吖啶酯原液(2.5mg/mL),混匀,37 $^{\circ}$ C,标记4h;标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的吖啶酯分子,用缓冲液Ⅲ配制成化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度为0.1 $\mu$ g/ml的R3试剂。

[0091] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅲ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0092] 步骤四、卡马西平校准品、质控品的制备

[0093] 取10mg/mL的卡马西平原液1ml,加入到99ml校准品基质缓冲液中,稀释成0.1mg/mL的校准品母液。

[0094] 将校准品母液6ml,加入到34ml校准品基质缓冲液中,配制成40ml浓度为15 $\mu$ g/mL高浓度校准品。

[0095] 将校准品母液0.8ml,加入到39.2ml校准品基质缓冲液中,配制成40ml浓度为2 $\mu$ g/mL低浓度校准品。

[0096] 将校准品母液2ml,加入到38ml校准品基质缓冲液中,配制成40ml浓度为5 $\mu$ g/mL高浓度质控品。

[0097] 将校准品母液4ml,加入到36ml校准品基质缓冲液中,配制成40ml浓度为10 $\mu$ g/mL低浓度质控品。

[0098] 其中,校准品基质缓冲液为含20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、1%明胶、1%蔗糖和0.1%ProClin300,pH6.8的缓冲液。

[0099] 实施例3

[0100] 卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,步骤如下:

[0101] 步骤一、R1试剂的制备

[0102] 取浓度是100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒(粒径1 $\mu$ m)溶液0.5毫升(50mg)加入TBST溶液中,充分混匀后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒,使用缓冲液I清洗三次,清洗后,再用缓冲液I配成磁颗粒浓度为0.03%的固相试剂,即为R1试剂;

[0103] 缓冲液I为含20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和0.1%ProClin300,pH7.2的缓冲液。

[0104] 步骤二、R2试剂的制备

[0105] 取500 $\mu$ g卡马西平偶联鸡卵清蛋白,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照生物素:卡马西平类似

物摩尔比为10:1加入生物素原液(3mg/mL),混匀,37℃,标记4h;标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的生物素分子,用缓冲液Ⅱ配制成生物素标记的卡马西平类似物的浓度为0.5μg/mL的R2试剂。

[0106] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅱ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0107] 步骤三、R3试剂的制备

[0108] 取500μg卡马西平单克隆抗体,用30KDa超滤离心管进行超滤离心,将缓冲液置换为标记缓冲液,离心机转速为9000rpm,离心时间为30min;按照吖啶酯:单克隆抗体摩尔比为10:1加入吖啶酯原液(2.5mg/mL),混匀,37℃,标记4h;标记反应结束后,加入封闭缓冲液,封闭1h;封闭后用30KDa超滤离心管进行超滤离心,除去未偶联的吖啶酯分子,用缓冲液Ⅲ配制成化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体的浓度为0.05μg/mL的R3试剂。

[0109] 其中,标记缓冲液为含有20mmol/L PB和150mmol/L NaCl,pH为8.0的缓冲液;封闭缓冲液为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl和10%赖氨酸,pH为8.0的缓冲液;缓冲液Ⅲ为含有20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、0.05%Tween20、1%BSA和0.1%ProClin300,pH6.0的缓冲液。

[0110] 步骤四、卡马西平校准品、质控品的制备

[0111] 取10mg/mL的卡马西平原液1mL,加入到99mL校准品基质缓冲液中,稀释成0.1mg/mL的校准品母液。

[0112] 将校准品母液6mL,加入到34mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为15μg/mL高浓度校准品。

[0113] 将校准品母液0.8mL,加入到39.2mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为2μg/mL低浓度校准品。

[0114] 将校准品母液2mL,加入到38mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为5μg/mL高浓度质控品。

[0115] 将校准品母液4mL,加入到36mL校准品基质缓冲液中,配制成40mL浓度为10μg/mL低浓度质控品。

[0116] 其中,校准品基质缓冲液为含20mmol/L PB、150mmol/L NaCl、1%明胶、1%蔗糖、0.1%ProClin300,pH6.8的缓冲液。

[0117] 对实施例1的卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的性能进行评价。卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的使用方法见具体实施方式。

[0118] 1、用实施例1的卡马西平化学发光免疫检测试剂盒测试欧洲药典标准品的光量,数据如表1所示,以欧洲药典标准品理论浓度和测试欧洲药典标准品的光量为横纵坐标,绘制标准曲线,曲线如图1所示。

[0119] 将校准品母液依次稀释成浓度为30μg/mL、20μg/mL、12μg/mL、8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL的各浓度点获得,将校准品基质缓冲液作为0μg/mL浓度的点。测量各浓度点发光值,以各点浓度值和发光值为横纵坐标绘制主校准曲线,结果如表2和图2所示。

[0120] 接着测试产品校准品L和H,对主校准曲线进行两点校准。

[0121] 校准通过后,测试质控品C1、C2,质控品测试结果须在靶值范围内,认为测试系统满足测试要求。可以继续对样本进行测试,再根据样本发光值计算样本浓度。

[0122] 表1

[0123]

| 国际标准物质理论浓度 | 测试光量   |
|------------|--------|
| μg/ml      | RLU    |
| 0          | 974835 |
| 1          | 850324 |
| 2          | 742851 |
| 4          | 554467 |
| 8          | 283423 |
| 12         | 144201 |
| 20         | 45525  |
| 30         | 13254  |

[0124] 表2

[0125]

| 校准品理论浓度 | 测试光量   | 校准品用国家标准物质赋值<br>浓度 (5P 加权) |
|---------|--------|----------------------------|
| μg/ml   | RLU    | μg/ml                      |
| 0       | 977465 | 0                          |
| 1       | 848312 | 1.08                       |
| 2       | 722541 | 2.19                       |
| 4       | 525310 | 4.25                       |
| 8       | 257448 | 8.65                       |
| 12      | 121087 | 13.20                      |
| 20      | 44955  | 19.50                      |

[0126]

|         |        |       |
|---------|--------|-------|
| 30      | 15685  | 28.64 |
| L (2)   | 702854 | 2.37  |
| H (15)  | 88473  | 15.13 |
| C1 (5)  | 452610 | 5.19  |
| C2 (10) | 187219 | 10.57 |

[0127] 2、灵敏度的检测：

[0128] 参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案，计算卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度，求得的灵敏度 $<0.5\mu\text{g/mL}$ 。

[0129] 3、线性的检测：

[0130] 对浓度为 $0\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $12\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $30\mu\text{g/mL}$ 标准品做线性分析，计算线性相关系数， $r=0.998$ ，另外，该试剂盒对卡马西平样品检测的线性范围为 $0-30\mu\text{g/mL}$ 。

[0131] 4、精密度测定：

[0132] 取浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ 的低浓度卡马西平样品和 $15\mu\text{g/mL}$ 高浓度卡马西平样品，每个样本每个浓度各做3次平行测试，用3批试剂盒进行检测，计算试剂盒批内及批间差，结果表明该试剂盒批内及批间差均 $<5\%$ 。

[0133] 5、干扰性实验：

[0134] 取混合血清分别添加干扰物，包括：胆红素、血红蛋白、甘油三酯、人白蛋白，其中胆红素浓度为 $30\text{mg/dL}$ ，血红蛋白浓度为 $500\text{mg/dL}$ ，甘油三酯浓度为 $3000\text{mg/dL}$ ，人白蛋白浓度为 $12\text{g/L}$ ，分别测定添加干扰物质的血清和未添加干扰物质的血清，计算测试偏差，偏差 $<\pm 15\%$ 。结果表明，干扰性均达到NCCLS的文件标准，可用于临床实验室卡马西平状况的准确评估。

[0135] 6、卡马西平化学发光免疫检测试剂盒的对比实验

[0136] 分别用化学发光检测方法和现有的ELISA法对浓度 $0\mu\text{g/mL}$ 、 $1\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $8\mu\text{g/mL}$ 、 $12\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $30\mu\text{g/mL}$ 的卡马西平样品做检测，两种方法检测灵敏度相比，数据如表3所示。

[0137] 表3

[0138]

| 校准品         | 发光        | ELISA     | 空白值 20 次重复测试结果 |        |         |       |
|-------------|-----------|-----------|----------------|--------|---------|-------|
|             |           |           | 发光             |        | ELISA   |       |
| 单位<br>μg/mL | RLU       | OD450     | 971941         | 968162 | 2.404   | 2.345 |
| 0           | 975814    | 2.406     | 959155         | 970184 | 2.411   | 2.405 |
| 1           | 848127    | 2.387     | 969012         | 967482 | 2.502   | 2.473 |
| 2           | 735566    | 1.986     | 930116         | 952054 | 2.432   | 2.341 |
| 4           | 536221    | 1.221     | 972556         | 965428 | 2.418   | 2.456 |
| 8           | 227062    | 0.862     | 941145         | 968668 | 2.514   | 2.479 |
| 12          | 130021    | 0.332     | 967110         | 946224 | 2.408   | 2.505 |
| 20          | 45921     | 0.011     | 958313         | 970024 | 2.521   | 2.423 |
| 30          | 17442     | 0.013     | 960453         | 942057 | 2.354   | 2.512 |
| 灵敏度         | 0.22μg/mL | 2.80μg/mL | 965717         | 970129 | 2.321   | 2.405 |
| CV          |           |           | 1.27%          |        | 2.56%   |       |
| M           |           |           | 960797         |        | 2.43145 |       |
| SD          |           |           | 12168          |        | 0.062   |       |
| 2SD         |           |           | 24336          |        | 0.124   |       |
| M-2SD       |           |           | 936460         |        | 2.31    |       |

[0139] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

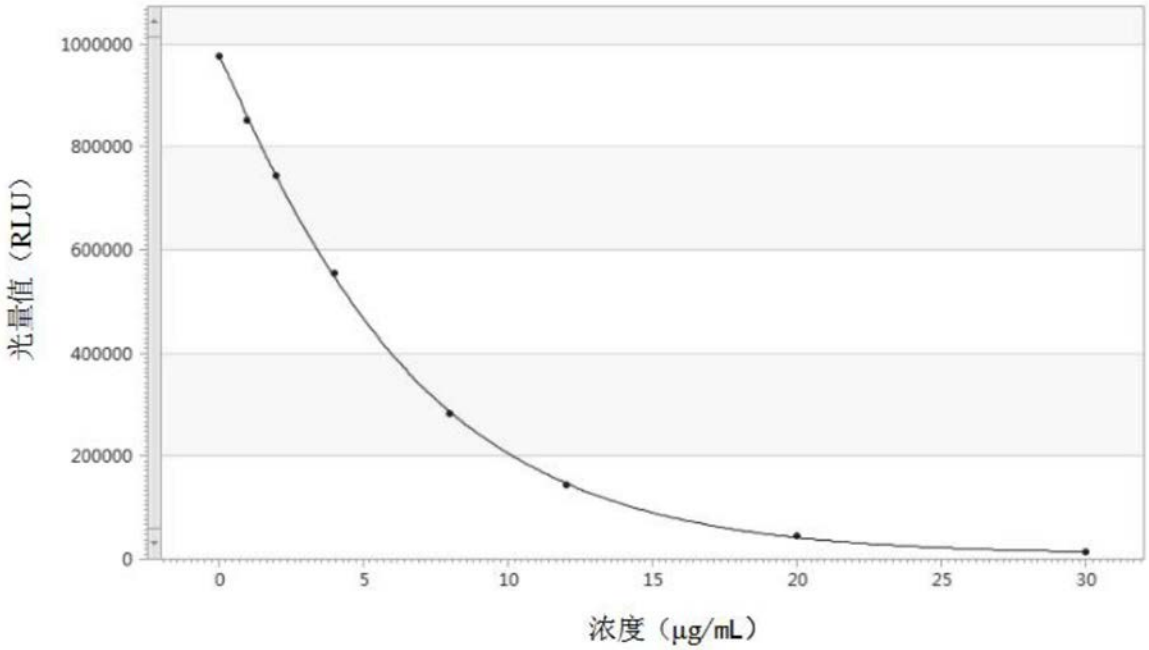


图1

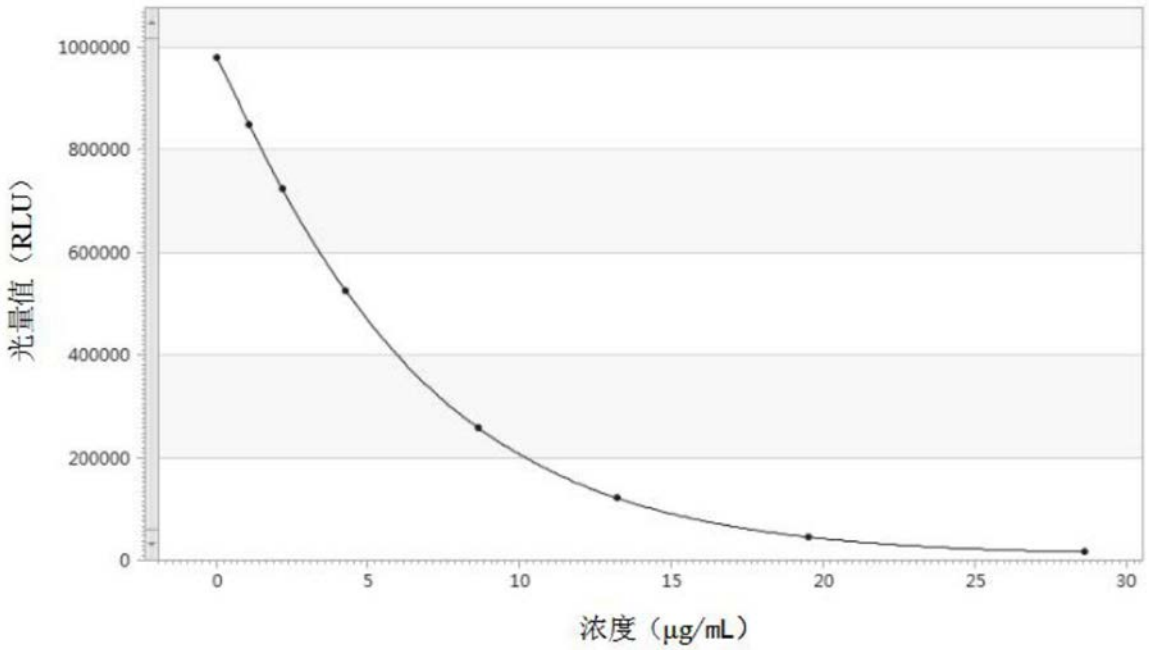


图2

|         |                                                |         |            |
|---------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法                            |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN110308290A</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-10-08 |
| 申请号     | CN201910624180.3                               | 申请日     | 2019-07-11 |
| [标]发明人  | 唐仁陶<br>高阳<br>胡雪崧<br>高威<br>孙成艳<br>何浩会           |         |            |
| 发明人     | 唐仁陶<br>高阳<br>胡雪崧<br>高威<br>孙成艳<br>何浩会           |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/94 G01N33/58 G01N33/531                 |         |            |
| CPC分类号  | G01N33/531 G01N33/585 G01N33/94                |         |            |
| 代理人(译)  | 王莹                                             |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种卡马西平化学发光检测试剂盒及其制备方法，属于化学发光体外诊断技术领域。解决了现有技术中卡马西平检测试剂盒存在测试耗时长，重复性差，稳定性差，空白高，灵敏度差，准确度差的技术问题。本发明的试剂盒，包括R1试剂、R2试剂和R3试剂；其中，R1试剂包括链霉亲和素磁颗粒和缓冲液I；R2试剂包括偶联标记物标记的卡马西平类似物和缓冲液II；R3试剂包括化学发光标记物标记的卡马西平单克隆抗体和缓冲液III。该试剂盒线性范围宽、检测时间短、空白低、灵敏度高、稳定性好、准确度高、重复性好。

