



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110981791 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911075730.7

(22)申请日 2019.11.06

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8
号9号楼101、201室

(72)发明人 虞留明 茹庆科 梁超

(51)Int.Cl.

C07D 213/04(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

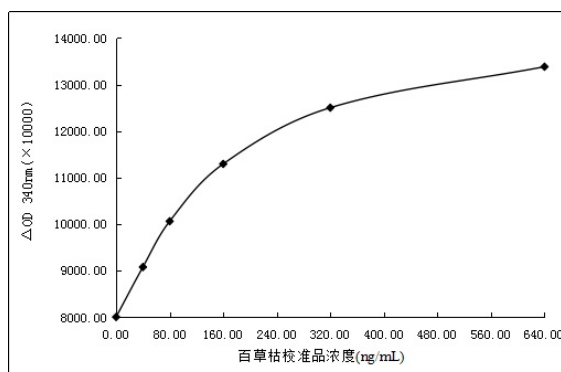
权利要求书6页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

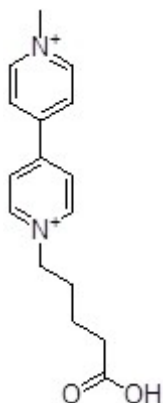
一种百草枯衍生物及其制备方法与百草枯
检测试剂

(57)摘要

本发明公开了一种用于人体生物样本中百草枯含量检测的百草枯衍生物及其制备方法。利用本发明的新型百草枯衍生物研制的系列抗百草枯特异性抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的百草枯免疫学检验试剂。本发明还提供了3种百草枯免疫检验试剂的制备方法及相应的使用方法。本发明提供的3种百草枯免疫检测方法操作方便、检测快速、结果准确、灵敏度高、特异性强,能够对人体血液样本中的百草枯含量进行定量检测。克服了现有技术中百草枯检测方法存在的操作复杂、自动化程度低等缺陷,能有效指导临床个体化合理用药。

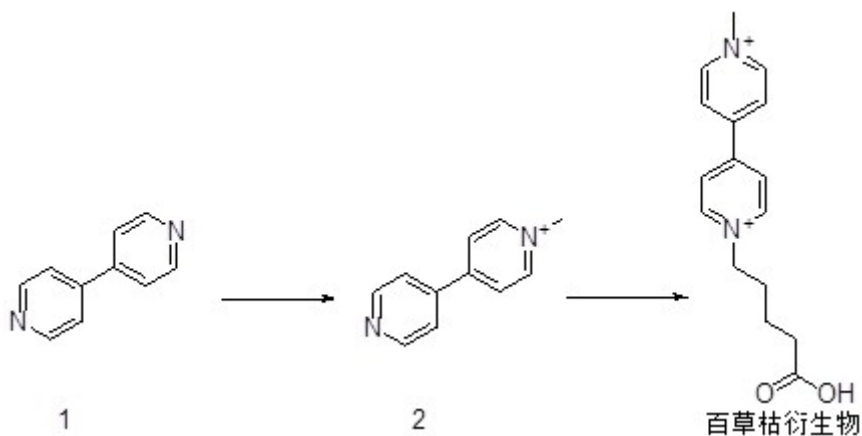


1. 一种百草枯衍生物, 其特征在于, 其结构式如式 I 所示:

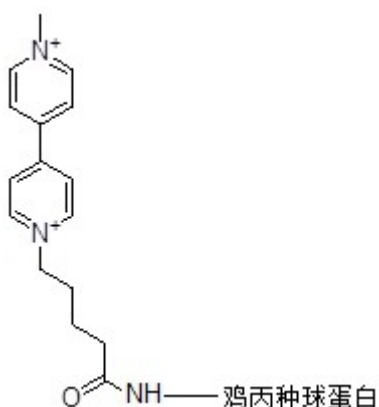


式 I。

2. 一种如权利要求 1 所述的百草枯衍生物的合成方法, 其特征在于, 所述合成方法的具体路线如下所示:



3. 一种百草枯均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 由 R1 试剂与 R2 试剂组成, 所述 R1 试剂包含抗百草枯特异性抗体 1 与 R1 缓冲液, 所述 R2 试剂包含百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物与 R2 缓冲液; 所述抗百草枯特异性抗体 1 为百草枯鸡丙种球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体; 所述的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原, 由权利要求 1 所述的百草枯衍生物与鸡丙种球蛋白偶联而成, 其结构式如式 II 所示:



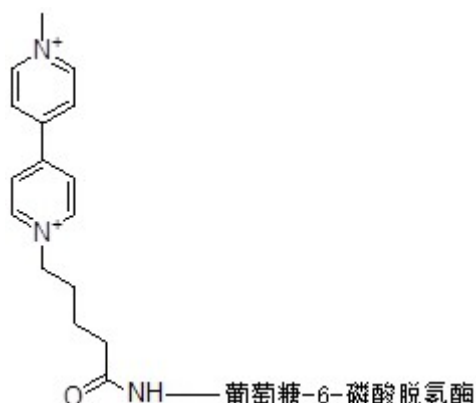
式 II;

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种;

所述的 R1 缓冲液含有酶底物、辅酶、牛血清白蛋白及 Tris 缓冲液, 所述的酶底物为葡萄

糖-6-磷酸,所述的辅酶为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型;

所述的百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物由权利要求1所述的百草枯衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联而成;其结构式如式III所示:



式III;

所述的R2缓冲液为含有牛血清白蛋白的Tris缓冲液。

4. 一种如权利要求3所述的百草枯均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的制备方法包含以下步骤:

(1) 将0.25%牛血清白蛋白、50mmol/L葡萄糖-6-磷酸及50mmol/L烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型依次加入50mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R1缓冲液,再将抗百草枯特异性抗体1以1:500-1:5000的体积比加入到上述R1缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至8.0,制成R1试剂;

(2) 将0.25%牛血清白蛋白加入100mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R2缓冲液,再将百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物以1:1000-1:8000的体积比加入到上述R2缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至7.6,制成R2试剂;

所述抗百草枯特异性抗体1的制备方法,包含以下步骤:

1) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯鸡丙种球蛋白免疫原稀释至终浓度为0.5-5.0mg/mL;
2) 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射,注射3-8次后抽取动物血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体1;

所述的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

①将100-300mg的鸡丙种球蛋白溶解于10-100ml浓度为0.2 mol/L, pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液;

②用1.0-5.0ml的有机溶剂A溶解50-500mg的权利要求1所述的百草枯衍生物,通过偶联活化剂进行活化并与步骤①中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原;

所述的有机溶剂A为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种;

所述的百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

<1>称取葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,在室温条件下溶解于pH为8.0的磷酸缓冲液中,使其终浓度为2-6 mg/mL,制成酶溶液;

<2>使用上述的有机溶剂A溶解权利要求1所述的百草枯衍生物,使其终浓度为10-50mg/mL,通过偶联活化剂进行活化,并与步骤<1>中制备的酶溶液进行偶联反应,反应结束

后经透析纯化得到百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物；

所述的偶联活化剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

5. 一种如权利要求3所述的百草枯均相酶免疫检测试剂的使用方法，其特征在于，包括以下操作步骤：

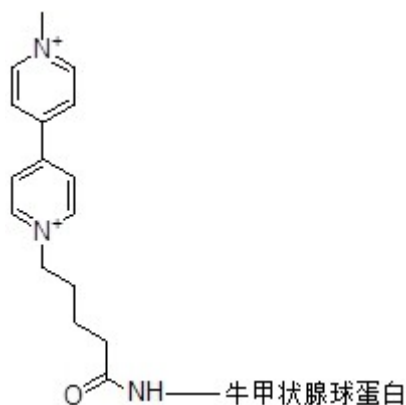
(一) 在全自动生化分析仪中加入校准品、R1试剂，混匀，37℃温育3-5分钟；加入R2试剂，混匀，37℃恒温5-10分钟后，340nm主波长/405nm次波长进行检测，连续监测3分钟内的吸光度变化率，由全自动生化分析仪制作校准曲线；

(二) 在全自动生化分析仪中加入待测样本、R1试剂，混匀，37℃温育3-5分钟；加入R2试剂，混匀，37℃恒温5-10分钟后，340nm主波长/405nm次波长进行检测，连续监测3分钟内的吸光度变化率，由全自动生化分析仪根据步骤(一)中制作的校准曲线自动计算待测样本中百草枯的含量；

所述试剂R1与试剂R2按1:1~4:1的体积比使用；所述的待测样本为血清、血浆、尿液、唾液、组织液或脑脊液中的任意一种。

6. 一种百草枯ELISA检测试剂，其特征在于，该检测试剂含有：抗百草枯特异性抗体2、百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物及反应底物；

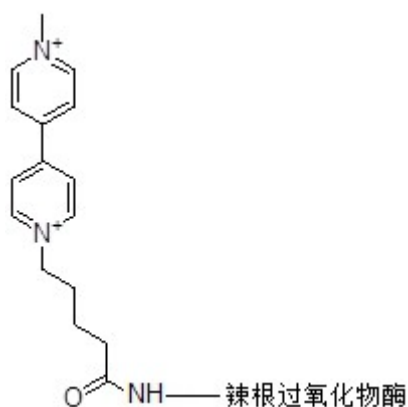
所述抗百草枯特异性抗体2为百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体；所述的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原，由权利要求1所述的百草枯衍生物与牛甲状腺球蛋白偶联而成，其结构式如式IV所示：



式IV；

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种；

所述的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物由权利要求1所述的百草枯衍生物与辣根过氧化物酶偶联而成；其结构式如式V所示：



式 V；

所述的反应底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺；

所述抗百草枯特异性抗体2的制备方法,包含以下步骤:

A. 使用磷酸盐缓冲液将百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原稀释至终浓度为0.5-5.0mg/mL；

B. 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射,注射3-8次后抽取动物血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体2；

所述的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

a. 将100-300mg的牛甲状腺球蛋白溶解于10-100ml浓度为0.2 mol/L, pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液；

b. 用1.0-5.0ml的有机溶剂A溶解50-500mg的权利要求1所述的百草枯衍生物,通过偶联活化剂进行活化并与步骤a中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原；

所述的有机溶剂A为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种；

所述的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

(a) 称取辣根过氧化物酶,在室温条件下溶解于pH为8.0的磷酸缓冲液中,使其终浓度为2-6 mg/mL,制成酶溶液；

(b) 使用上述的有机溶剂A溶解权利要求1所述的百草枯衍生物,使其终浓度为10-50mg/mL,通过偶联活化剂进行活化,并与步骤(a)中制备的酶溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物；

所述的偶联活化剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

7. 一种如权利要求6所述的百草枯ELISA检测试剂的使用方法,其特征在于,包括以下操作步骤:

(i) 将抗百草枯特异性抗体2用磷酸盐缓冲液按1:1000-1:20000的比例进行稀释,制成抗体溶液,将抗体溶液按 100μL/孔的用量包被在96孔酶联板上,4℃过夜；

(ii) 用磷酸盐缓冲液洗涤3次后,加入200μL/孔的0.5%的牛甲状腺球蛋白溶液,4℃封闭过夜,磷酸盐缓冲液洗涤3次；

(iii) 加入20μL/孔的标准品及待测样本；

(iv) 加入100μL/孔工作浓度的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物；

(v) 室温下孵育30分钟,磷酸盐缓冲液洗板5次；

(vi) 每孔加入100 μ L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺,室温孵育30分钟;

(vii) 每孔加入100 μ L 的浓度为2mol/L的硫酸,终止反应;

(viii) 使用酶标仪测定450nm波长的吸光值;

(ix) 根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线,并根据校准曲线与待测样本的吸光值计算待测样本中百草枯的含量;

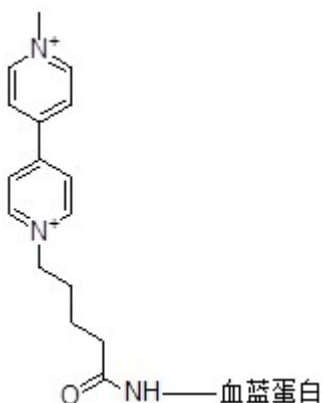
所述的待测样本为血清、血浆、尿液、唾液、组织液或脑脊液中的任意一种。

8. 一种百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂,其特征在于,包括:L1试剂与L2试剂;

所述的L1试剂由抗百草枯特异性抗体3、pH=8.0的缓冲液、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸、促凝剂以及防腐剂组成;

所述的L2试剂由百草枯-人血清白蛋白复合体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒、pH=8.0的缓冲液、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸以及防腐剂组成;

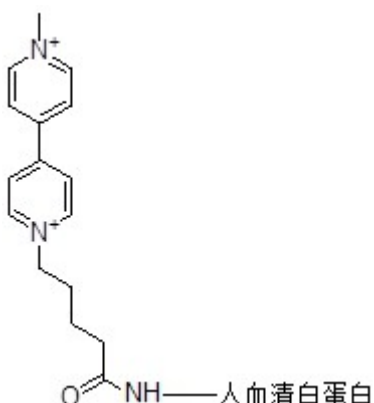
所述的抗百草枯特异性抗体3为百草枯血蓝蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的百草枯血蓝蛋白免疫原,由权利要求1所述的百草枯衍生物与血蓝蛋白偶联而成,其结构式如式VI所示:



式VI;

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种;

所述的百草枯-人血清白蛋白复合体由权利要求1所述的百草枯衍生物与人血清白蛋白偶联而成,其结构式如式VII所示:



式VII;

所述的聚苯乙烯胶乳颗粒直径范围为50-250nm;

所述的缓冲液为磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓

冲液或巴比妥缓冲液中的任意一种；

所述促凝剂为PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000或硫酸葡聚糖钠中的任意一种；

所述防腐剂为叠氮钠、硫柳汞、苯酚或乙基汞硫代硫酸钠中的任意一种。

9. 一种如权利要求8所述的百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备方法，其特征在于，所述的制备方法包含以下步骤：

将0.5mg/mL的抗百草枯特异性抗体3溶解于50mmol/L pH=8.0的磷酸盐缓冲液中，然后添加质量分数为0.5%-2.5%的牛血清白蛋白、0.25%-1.0%的氯化钠、0.1%-0.5%的吐温-20、1.0%-5.0%的丙三醇、0.1%-1.0%的乙二胺四乙酸、0.5%-2.5%的PEG-4000以及0.01%-0.1%的叠氮钠，搅拌均匀，调节pH=7.5，制成L1试剂；

将0.5mg表面带有羧基的直径为150nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入4.5mL 0.05mol/L pH=6.2的MES缓冲液中，然后加入5mg 碳二亚胺，在37℃下反应1小时，制成胶乳颗粒溶液，再将0.5mg百草枯-人血清白蛋白复合体用4.5mL 0.05mol/L pH=9.2的硼酸盐缓冲液稀释后，立即加入到上述胶乳颗粒溶液中，在37℃下反应12小时，然后加入1mL 0.1 mol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时，反应终止后离心去除上清液，再将沉淀物用10mL 50mmol/L pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次，再用25mL 50mmol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液稀释成胶乳悬浊液，最后加入质量分数为0.5%-2.5%的牛血清白蛋白、0.25%-1.0%的氯化钠、0.1%-0.5%的吐温-20、1.0%-5.0%的丙三醇、0.1%-1.0%的乙二胺四乙酸以及0.01%-0.1%的叠氮钠，搅拌均匀，制成L2试剂；

所述抗百草枯特异性抗体3的制备方法，包含以下步骤：

(A) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯血蓝蛋白免疫原稀释至终浓度为0.5-5.0mg/mL；

(B) 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射，注射3-8次后抽取动物血液，分离纯化抗血清，得到抗百草枯特异性抗体3；

所述的百草枯血蓝蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

<a>将100-300mg的血蓝蛋白溶解于10-100mL浓度为0.2 mol/L，pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液；

用1.0-5.0mL的有机溶剂A溶解50-500mg的权利要求1所述的百草枯衍生物，通过偶联活化剂进行活化并与步骤<a>中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应，反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯血蓝蛋白免疫原；

所述的有机溶剂A为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种；

所述的百草枯-人血清白蛋白复合体的制备方法，包含以下步骤：

将10mg人血清白蛋白用5mL 0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液稀释，然后加入100mg权利要求1所述的百草枯衍生物，再加入50mg的偶联活化剂，在4℃下反应12 小时，再用0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液在4℃下透析18小时，得到百草枯-人血清白蛋白复合体；

所述的偶联活化剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

10. 根据权利要求5或7中任一项所述的校准品，其特征在于，所述校准品是由浓度分别为0ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL、320ng/mL、640ng/mL的百草枯，质量分数为0.1-1.0%的氯化钠、0.2-2.0%的牛血清白蛋白、0.25-1.5%的乙二胺四乙酸、0.01%-0.1%的叠氮钠，50mmol/L pH=7.2的Tris-HCl缓冲液组成。

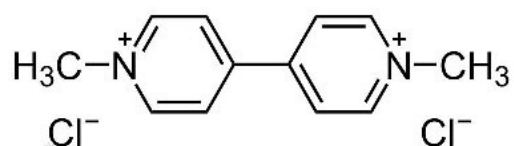
一种百草枯衍生物及其制备方法与百草枯检测试剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种百草枯衍生物及其制备方法与百草枯检测试剂。

背景技术

[0002] 百草枯的化学名称是1,1-二甲基-4,4-联吡啶阳离子盐,其化学结构式如式VIII所示:



式VIII

百草枯是一种快速除草剂,具有触杀作用与一定的内吸作用,能迅速被植物绿色组织吸收使其枯死,对绿色植物有着显著的杀伤力,对非绿色组织没有作用,在土壤中迅速与土壤结合而钝化,对植物根部及多年生地下茎及宿根无效。百草枯属于剧毒农药,对人体毒性极大,且无特效解毒药,对皮肤粘膜有刺激和腐蚀作用,口服3克即可导致系统性中毒,全身中毒可引起多系统损害,尤其以肺损害较严重,可引起肺充血、出血、水肿、透明膜形成和变性、增生、纤维化等改变,此外可致肝、肾损害并累及循环、神经、血液、胃肠道和膀胱等系统和器官,口服中毒死亡率极高。目前百草枯已被20多个国家禁止使用或者严格限制使用。百草枯中毒前期的治疗黄金期内症状并不明显,容易被误诊或忽视。

[0003] 百草枯致毒机制目前尚未阐明,多数学者认为百草枯是一种电子受体,可被肺I型和II型细胞主动转运而摄取到细胞内,作用于细胞的氧化还原反应,在细胞内活化为氧自由基是其致毒作用的基础,所形成的过量超氧化阴离子自由基及过氧化氢等可引起肺、肝及其他许多组织器官细胞膜脂质过氧化,从而造成多系统组织器官的损害。测定临床血浆样本中百草枯的含量,对百草枯中毒患者的临床治疗及预后预测具有重要作用。

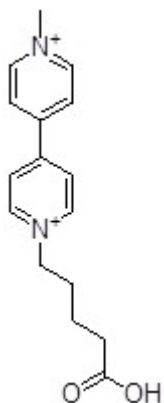
[0004] 传统的百草枯检验方法主要有:高效液相色谱法与反相高效液相色谱法等,这些方法操作复杂、速度较慢、且成本较高。而利用新型百草枯衍生物研制的抗百草枯特异性系列抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的百草枯免疫检验试剂,能有效弥补传统方法的缺点。本发明的3种百草枯检测方法检测速度快、结果准确度、灵敏度高,可用于临床百草枯中毒患者血浆样品的定量检测,对于提高百草枯中毒患者救治成功率具有重要意义。与传统方法相比,本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、检测快速快、结果准确、费用低廉等优势,有利于将来临床推广应用,特别是对于缺乏昂贵仪器的基层医院具有良好的应用前景。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明所采用的技术方案是:

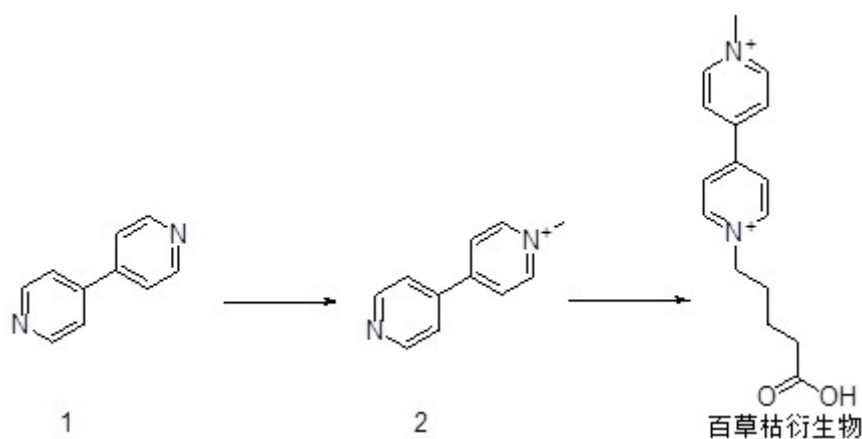
一、提供一种百草枯衍生物,该衍生物为新合成物质,自然界中不存在,其结构式如式I

所示：

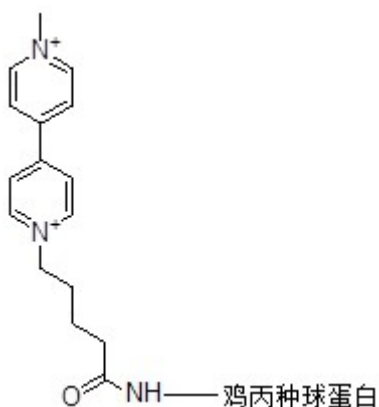


式I。

[0006] 二、提供一种如上所述的百草枯衍生物的合成方法，该合成方法有别于常规合成方法，并具有良好的合成效果，显著提高百草枯衍生物的合成效率，具体合成路线如下所示：



[0007] 三、提供一种百草枯均相酶免疫检测试剂，该检测试剂由R1试剂与R2试剂组成，所述R1试剂包含抗百草枯特异性抗体1与R1缓冲液，所述R2试剂包含百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物与R2缓冲液；所述抗百草枯特异性抗体1为百草枯鸡丙种球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体；所述的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原，由上述的百草枯衍生物与鸡丙种球蛋白偶联而成，其结构式如式II所示：

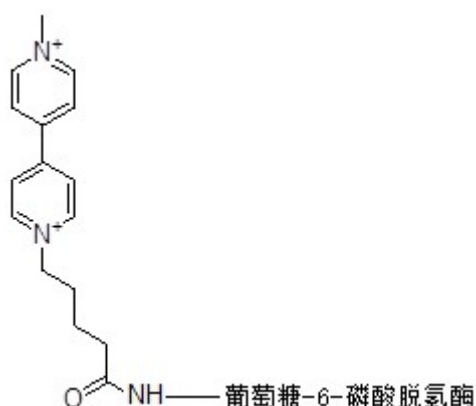


式II；

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种；

所述的R1缓冲液含有酶底物、辅酶、牛血清白蛋白及Tris缓冲液,所述的酶底物为葡萄糖-6-磷酸,所述的辅酶为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型;

所述的百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物由上述的百草枯衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联而成;其结构式如式III所示:



式III;

所述的R2缓冲液为含有牛血清白蛋白的Tris缓冲液。

[0008] 四、提供一种如上所述的百草枯均相酶免疫检测试剂的制备方法,包含以下步骤:

(1) 将0.25%牛血清白蛋白、50mmol/L葡萄糖-6-磷酸及50mmol/L烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型依次加入50mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R1缓冲液,再将抗百草枯特异性抗体1以1:500-1:5000的体积比加入到上述R1缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至8.0,制成R1试剂;

(2) 将0.25%牛血清白蛋白加入100mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R2缓冲液,再将百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物以1:1000-1:8000的体积比加入到上述R2缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至7.6,制成R2试剂;

所述抗百草枯特异性抗体1的制备方法,包含以下步骤:

1) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯鸡丙种球蛋白免疫原稀释至终浓度为0.5-5.0mg/mL;
2) 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射,注射3-8次后抽取动物血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体1;

所述的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

①将100-300mg的鸡丙种球蛋白溶解于10-100ml浓度为0.2 mol/L, pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液;

②用1.0-5.0ml的有机溶剂A溶解50-500mg的上述的百草枯衍生物,通过偶联活化剂进行活化并与步骤①中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原;

所述的有机溶剂A为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种;

所述的百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

<1>称取葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,在室温条件下溶解于pH为8.0的磷酸缓冲液中,使其终浓度为2-6 mg/mL,制成酶溶液;

<2>使用上述的有机溶剂A溶解上述的百草枯衍生物,使其终浓度为10-50mg/mL,通过偶联活化剂进行活化,并与步骤<1>中制备的酶溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化

得到百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物；

所述的偶联活化剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

[0009] 五、提供一种如上所述的百草枯均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

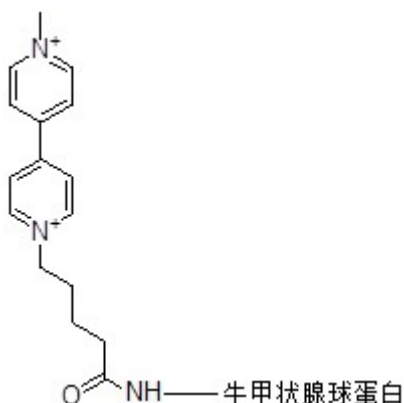
(一)在全自动生化分析仪中加入校准品、R1试剂,混匀,37℃温育3-5分钟;加入R2试剂,混匀,37℃恒温5-10分钟后,340nm主波长/405nm次波长进行检测,连续监测3分钟内的吸光度变化率,由全自动生化分析仪制作校准曲线;

(二)在全自动生化分析仪中加入待测样本、R1试剂,混匀,37℃温育3-5分钟;加入R2试剂,混匀,37℃恒温5-10分钟后,340nm主波长/405nm次波长进行检测,连续监测3分钟内的吸光度变化率,由全自动生化分析仪根据步骤(一)中制作的校准曲线自动计算待测样本中百草枯的含量;

所述试剂R1与试剂R2按1:1~4:1的体积比使用;所述的待测样本为血清、血浆、尿液、唾液、组织液或脑脊液中的任意一种。

[0010] 六、提供一种百草枯酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂,该检测试剂含有:抗百草枯特异性抗体2、百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物及反应底物;

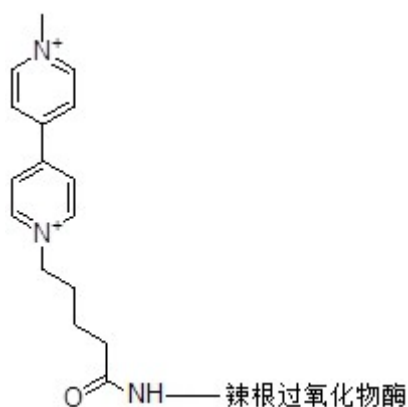
所述抗百草枯特异性抗体2为百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原,由上述的百草枯衍生物与牛甲状腺球蛋白偶联而成,其结构式如式IV所示:



式IV;

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种;

所述的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物由上述的百草枯衍生物与辣根过氧化物酶偶联而成;其结构式如式V所示:



式 V；

所述的反应底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺；

所述抗百草枯特异性抗体 2 的制备方法，包含以下步骤：

A. 使用磷酸盐缓冲液将百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原稀释至终浓度为 0.5-5.0mg/mL；

B. 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射，注射 3-8 次后抽取动物血液，分离纯化抗血清，得到抗百草枯特异性抗体 2；

所述的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a. 将 100-300mg 的牛甲状腺球蛋白溶解于 10-100ml 浓度为 0.2 mol/L, pH 为 8.5 的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液；

b. 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的上述的百草枯衍生物，通过偶联活化剂进行活化并与步骤 a 中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应，反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原；

所述的有机溶剂 A 为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种；

所述的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物的制备方法，包含以下步骤：

(a) 称取辣根过氧化物酶，在室温条件下溶解于 pH 为 8.0 的磷酸缓冲液中，使其终浓度为 2-6 mg/mL，制成酶溶液；

(b) 使用上述的有机溶剂 A 溶解上述的百草枯衍生物，使其终浓度为 10-50mg/mL，通过偶联活化剂进行活化，并与步骤 (a) 中制备的酶溶液进行偶联反应，反应结束后经透析纯化得到百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物；

所述的偶联活化剂为 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

[0011] 七、提供一种如上所述的百草枯 ELISA 检测试剂的使用方法，包括以下操作步骤：

(i) 将抗百草枯特异性抗体 2 用磷酸盐缓冲液按 1:1000-1:20000 的比例进行稀释，制成抗体溶液，将抗体溶液按 100μL/孔的用量包被在 96 孔酶联板上，4℃ 过夜；

(ii) 用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次后，加入 200μL/孔的 0.5% 的牛甲状腺球蛋白溶液，4℃ 封闭过夜，磷酸盐缓冲液洗涤 3 次；

(iii) 加入 20μL/孔的标准品及待测样本；

(iv) 加入 100μL/孔工作浓度的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物；

(v) 室温下孵育 30 分钟，磷酸盐缓冲液洗板 5 次；

(vi) 每孔加入 100μL 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺，室温孵育 30 分钟；

(vii) 每孔加入100 μ L 的浓度为2mol/L的硫酸,终止反应;

(viii) 使用酶标仪测定450nm波长的吸光值;

(ix) 根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线,并根据校准曲线与待测样本的吸光值计算待测样本中百草枯的含量;

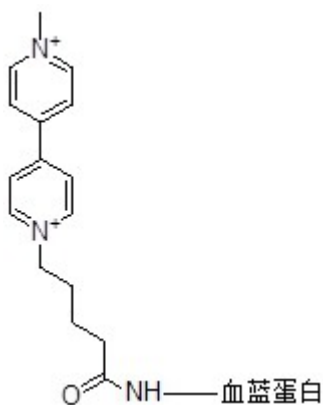
所述的待测样本为血清、血浆、尿液、唾液、组织液或脑脊液中的任意一种。

[0012] 八、提供一种百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂,该检测试剂包括:L1试剂与L2试剂;

所述的L1试剂由抗百草枯特异性抗体3、pH=8.0的缓冲液、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸、促凝剂以及防腐剂组成;

所述的L2试剂由百草枯-人血清白蛋白复合体包被的聚苯乙烯胶乳颗粒、pH=8.0的缓冲液、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸以及防腐剂组成;

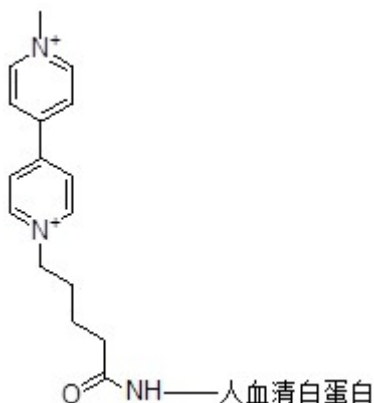
所述的抗百草枯特异性抗体3为百草枯血蓝蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的百草枯血蓝蛋白免疫原,由上述的百草枯衍生物与血蓝蛋白偶联而成,其结构式如式VI所示:



式VI:

所述的实验动物为家兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的任意一种;

所述的百草枯-人血清白蛋白复合体由上述的百草枯衍生物与人血清白蛋白偶联而成,其结构式如式VII所示:



式VII:

所述的聚苯乙烯胶乳颗粒直径范围为50-250nm;

所述的缓冲液为磷酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、硼酸盐缓冲液、Tris-HCl缓

冲液或巴比妥缓冲液中的任意一种；

所述促凝剂为PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000或硫酸葡聚糖钠中的任意一种；

所述防腐剂为叠氮钠、硫柳汞、苯酚或乙基汞硫代硫酸钠中的任意一种。

[0013] 九、提供一种如上所述的百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备方法，包含以下步骤：

将0.5mg/mL的抗百草枯特异性抗体3溶解于50mmol/L pH=8.0的磷酸盐缓冲液中，然后添加质量分数为0.5%-2.5%的牛血清白蛋白、0.25%-1.0%的氯化钠、0.1%-0.5%的吐温-20、1.0%-5.0%的丙三醇、0.1%-1.0%的乙二胺四乙酸、0.5%-2.5%的PEG-4000以及0.01%-0.1%的叠氮钠，搅拌均匀，调节pH=7.5，制成L1试剂；

将0.5mg表面带有羧基的直径为150nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入4.5mL 0.05mol/L pH=6.2的MES缓冲液中，然后加入5mg 碳二亚胺，在37℃下反应1小时，制成胶乳颗粒溶液，再将0.5mg百草枯-人血清白蛋白复合体用4.5mL 0.05mol/L pH=9.2的硼酸盐缓冲液稀释后，立即加入到上述胶乳颗粒溶液中，在37℃下反应12小时，然后加入1mL 0.1 mol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时，反应终止后离心去除上清液，再将沉淀物用10mL 50mmol/L pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次，再用25mL 50mmol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液稀释成胶乳悬浊液，最后加入质量分数为0.5%-2.5%的牛血清白蛋白、0.25%-1.0%的氯化钠、0.1%-0.5%的吐温-20、1.0%-5.0%的丙三醇、0.1%-1.0%的乙二胺四乙酸以及0.01%-0.1%的叠氮钠，搅拌均匀，制成L2试剂；

所述抗百草枯特异性抗体3的制备方法，包含以下步骤：

(A) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯血蓝蛋白免疫原稀释至终浓度为0.5-5.0mg/mL；

(B) 使用弗氏佐剂法对实验动物进行免疫注射，注射3-8次后抽取动物血液，分离纯化抗血清，得到抗百草枯特异性抗体3；

所述的百草枯血蓝蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

<a>将100-300mg的血蓝蛋白溶解于10-100ml浓度为0.2 mol/L，pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液；

用1.0-5.0ml的有机溶剂A溶解50-500mg的上述的百草枯衍生物，通过偶联活化剂进行活化并与步骤<a>中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应，反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯血蓝蛋白免疫原；

所述的有机溶剂A为二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、异丙醇、甲醇或乙醇中的任意一种；

所述的百草枯-人血清白蛋白复合体的制备方法，包含以下步骤：

将10mg人血清白蛋白用5mL 0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液稀释，然后加入100mg上述的百草枯衍生物，再加入50mg的偶联活化剂，在4℃下反应12 小时，再用0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液在4℃下透析18小时，得到百草枯-人血清白蛋白复合体；

所述的偶联活化剂为1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、三丁胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的任意一种。

[0014] 所述的百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的使用方法与上述的百草枯均相酶免疫检验试剂的使用方法基本相同。

[0015] 所述的校准品是由浓度分别为0ng/ml、40ng/ml、80ng/ml、160ng/ml、320ng/ml、640ng/ml的百草枯，质量分数为0.1-1.0%的氯化钠、0.2-2.0%的牛血清白蛋白、0.25-1.5%

的乙二胺四乙酸、0.01%-0.1%的叠氮钠,50mmol/L pH=7.2的Tris-HCl缓冲液组成。

[0016] 本发明利用一种新型百草枯衍生物研制的系列抗百草枯特异性抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的百草枯免疫检验试剂。本发明还提供了3种百草枯免疫检验试剂的制备方法及其相应的使用方法。本发明提供的3种百草枯免疫检测方法操作方便、检测快速、结果准确、灵敏度高、特异性强,能够对人体血清、血浆等样本中的百草枯含量进行定量检测。克服了现有技术中百草枯检测方法存在的操作复杂、自动化程度低等缺陷,能有效指导临床个体化合理用药。

附图说明

[0017] 图1是百草枯均相酶免疫检测试剂的校准曲线;

图2是百草枯ELISA检测试剂的校准曲线;

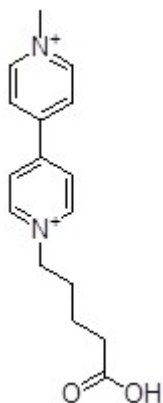
图3是百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的校准曲线。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,这些附图均为简化的示意图,仅以示意方式说明本发明的基本结构,因此其仅显示与本发明有关的构成。除非特别指明,以下实施例中所用的试剂、仪器、设备、耗材均可从正规渠道商购买获得。

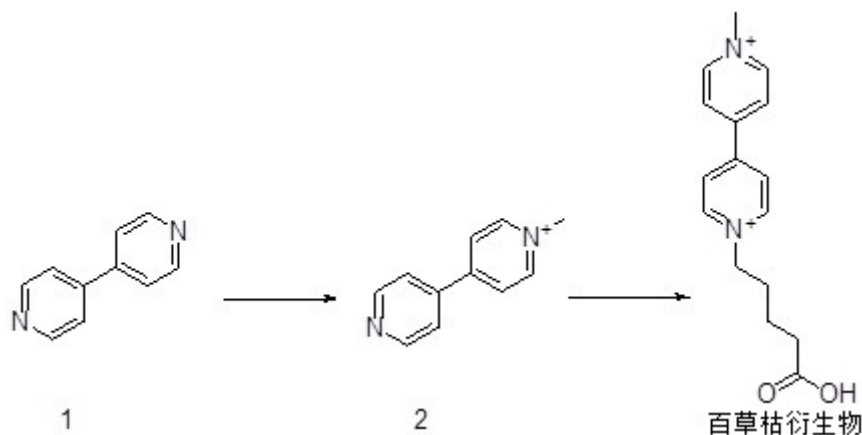
[0019] 实施例1. 百草枯衍生物的合成

百草枯衍生物的化学结构如式I所示:



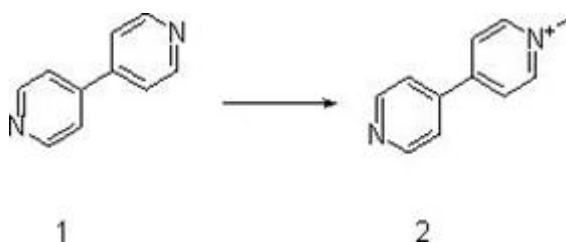
式I。

[0020] 上述百草枯衍生物的合成方法的具体路线如下所示:



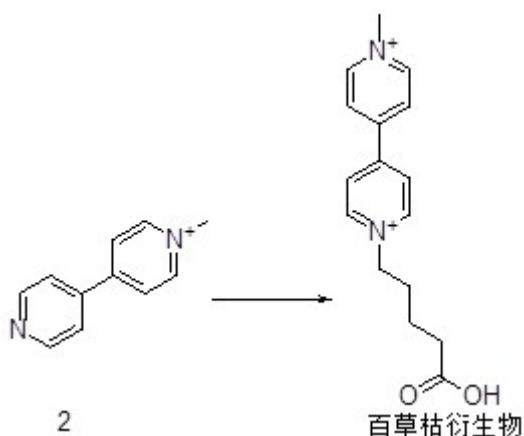
[0021] 具体的合成步骤如下：

1. 化合物2的合成



将10 g 化合物1溶解于100 mL DMF 中,然后加入20 mL DIEA与8.5 g MeI 配制成反应溶液,将此反应溶液在室温下搅拌过夜,在反应后的混合物中加入200 mL纯化水,过滤,将过滤所得滤饼在真空中干燥,得到10 g化合物2为白色固体,收率为91%。

[0022] 2. 百草枯衍生物的合成



将5.0 g化合物2溶解于50 mL DMF中,然后在0 °C下加入5.3 g 5-溴戊酸配制成反应溶液,将反应溶液在室温下搅拌过夜,然后将反应后溶液减压蒸发,并通过SiO₂快速柱层析法纯化得到2.3 g百草枯衍生物为黄色固体,收率为29%。

[0023] 实施例2. 百草枯均相酶免疫检测试剂的制备

百草枯均相酶免疫检测试剂的制备方法,具体步骤如下：

(1) 将0.25%牛血清白蛋白、50mmol/L葡萄糖-6-磷酸及50mmol/L烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型依次加入50mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R1缓冲液,再将抗百草枯特异性抗体1以1:1500的体积比加入到上述R1缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至8.0,制成R1试剂；

(2) 将0.25%牛血清白蛋白加入100mmol/L Tris缓冲液中搅拌溶解制成R2缓冲液,再将百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物以1:3000的体积比加入到上述R2缓冲液中混匀,再用6 mol/L的盐酸调节pH至7.6,制成R2试剂。

[0024] 所述抗百草枯特异性抗体1的制备方法,包含以下步骤：

- 1) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯鸡丙种球蛋白免疫原稀释至终浓度为2.5mg/mL；
- 2) 使用弗氏佐剂法对实验动物家兔进行免疫注射,注射5次后抽取家兔血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体1；

所述的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤：

- ①将200mg的鸡丙种球蛋白溶解于50ml浓度为0.2 mol/L,pH为8.5的磷酸盐缓冲液中

制成载体蛋白溶液；

②用3.0ml的二甲基亚砷溶解300mg的实施例1中所述的百草枯衍生物,通过N-羟基琥珀酰亚胺进行活化并与步骤①中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯鸡丙种球蛋白免疫原。

[0025] 所述的百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

<1>称取葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,在室温条件下溶解于pH为8.0的磷酸缓冲液中,使其终浓度为4.5mg/mL,制成酶溶液;

<2>使用二甲基甲酰胺溶解实施例1中所述的百草枯衍生物,使其终浓度为25mg/mL,通过N,N'-二环己基碳二亚胺进行活化,并与步骤<1>中制备的酶溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到百草枯葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物。

[0026] 实施例3.百草枯校准品的制备

将百草枯纯品粉末分别加入5份浓度为50mmol/L pH=7.2的Tris-HCl缓冲液中,搅拌溶解,至终浓度分别为0ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL、320ng/mL、640ng/mL,然后在每份溶液中分别加入质量分数为0.5%的氯化钠、1.0%的牛血清白蛋白、0.75%的乙二胺四乙酸、0.05%的叠氮钠,搅拌均匀,即为百草枯校准品(6个浓度)。

[0027] 实施例4. 百草枯均相酶免疫检测试剂校准曲线制作及质控实验

1. 制作均相酶免疫检测校准曲线:

在迈瑞 BS480全自动生化分析仪中放入R1试剂、R2试剂及校准品,然后对生化分析仪进行反应参数设置,具体参数详见表1;实际操作过程中需不断调整R1试剂和R2试剂的体积比例,同时调整测光点,最后由生化分析仪自动得出均相酶免疫检测校准曲线,如图1所示。

[0028] 表1. 迈瑞 BS480全自动生化分析仪反应参数

项目名称	百草枯
R1试剂	180μl
R2试剂	60μl
样本量	20μl
定标方法	终点法
主波长	340nm
次波长	405nm
反应时间	10分钟
温育时间	8分钟
反应方向	上升
结果	ng/ml
结果精度	0.01
拟合方法	Line graph
标准品浓度	0ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL、320ng/mL、640ng/mL

2. 质控实验:

将百草枯纯品粉末溶解于甲醇中制成1mg/mL 的储存液,并将此储存液稀释于不含百草枯的健康人血浆中,至终浓度分别为0.00、20.00、200.00、600.00ng/mL,制成空白、低、中、高浓度的质控样本。利用上述的百草枯均相酶免疫检测方法,对质控样本进行测定,并

根据步骤1中制作的均相酶免疫检测校准曲线,计算每个质控样本中百草枯的含量,每个质控样本重复测定10次,检测结果及数据分析详见表2。

[0029] 表2. 百草枯均相酶免疫检验试剂检测结果及数据分析

质控样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/ml)	0.00	20.00	200.00	600.00
测试1	0.00	20.52	205.03	593.27
测试2	0.01	20.76	202.74	595.51
测试3	0.00	19.89	203.91	608.89
测试4	0.00	20.45	207.30	612.21
测试5	0.00	20.05	196.82	589.60
测试6	0.02	20.17	199.40	614.98
测试7	0.00	20.33	205.79	606.66
测试8	0.00	19.96	198.58	592.50
测试9	0.00	20.27	200.87	590.45
测试10	0.00	19.88	197.33	608.99
平均值 (ng/ml)	0.00	20.23	201.78	601.31
标准差 (SD)	/	0.29	3.71	9.90
精密度 (CV%)	/	1.43	1.84	1.65
回收率 (%)	/	101.15	100.89	100.22

实验结果表明:测定不同浓度质控样品中百草枯含量的CV值均低于5%,回收率均在95%-105%之间,说明本发明的百草枯均相酶免疫检测试剂测定生物样本中百草枯含量的精密度较高,结果准确。

[0030] 实施例5. 百草枯 ELISA检测试剂中关键组分的制备

1. 抗百草枯特异性抗体2的制备方法,包含以下步骤:

A. 使用磷酸盐缓冲液将百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原稀释至终浓度为3.0mg/mL;

B. 使用弗氏佐剂法对实验动物绵羊进行免疫注射,注射4次后抽取绵羊血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体2;

所述的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

a. 将150mg的牛甲状腺球蛋白溶解于75ml浓度为0.2 mol/L, pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液;

b. 用2.5ml的二甲基甲酰胺溶解250mg的实施例1中所述的百草枯衍生物,通过三丁胺进行活化并与步骤a中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯牛甲状腺球蛋白免疫原;

2. 百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

(a) 称取辣根过氧化物酶,在室温条件下溶解于pH为8.0的磷酸缓冲液中,使其终浓度为3.5mg/mL,制成酶溶液;

(b) 使用异丙醇溶解实施例1中所述的百草枯衍生物,使其终浓度为35mg/mL,通过N, N'-二环己基碳二亚胺进行活化,并与步骤(a)中制备的酶溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物。

[0031] 实施例6. 百草枯 ELISA检测试剂性能评估实验

1. 百草枯 ELISA检测校准曲线的制作

(i) 将抗百草枯特异性抗体2用磷酸盐缓冲液按1:10000的比例进行稀释,制成抗体溶液,将抗体溶液按 100 μ L/孔的用量包被在96孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C过夜;

(ii) 用磷酸盐缓冲液洗涤3次后,加入200 μ L/孔的0.5%的牛甲状腺球蛋白溶液,4 $^{\circ}$ C封闭过夜,磷酸盐缓冲液洗涤3次;

(iii) 加入20 μ L/孔的标准品

(iv) 加入100 μ L/孔工作浓度的百草枯辣根过氧化物酶标记偶联物;

(v) 室温下孵育30分钟,磷酸盐缓冲液洗板5次;

(vi) 每孔加入100 μ L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺,室温孵育30分钟;

(vii) 每孔加入100 μ L 的浓度为2mol/L的硫酸,终止反应;

(viii) 使用酶标仪测定450nm波长的吸光值;

(ix) 根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线,如图2所示。

[0032] 2. 质控实验

将百草枯纯品粉末溶解于甲醇中制成1mg/mL 的储存液,并将此储存液稀释于不含百草枯的健康人血浆中,至终浓度分别为0.00、20.00、200.00、600.00ng/mL,制成空白、低、中、高浓度的质控样本。利用上述的百草枯ELISA检测方法,测定上述空白、低、中、高浓度的质控样本在450nm 的吸光值。对照图2所示的百草枯ELISA检测的校准曲线,计算每个质控样本中百草枯的含量,每个质控样本重复测定3次,根据测定结果计算回收率,检测数据详见表3。

[0033] 表3. 百草枯 ELISA检测试剂性能评估数据

质控样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/mL)	0.00	20.00	200.00	600.00
测试1	0.00	20.37	205.26	592.36
测试2	0.00	20.72	207.04	583.50
测试3	0.00	20.15	193.85	615.29
平均值 (ng/mL)	0.00	20.41	202.05	597.05
回收率 (%)	/	102.07	101.03	99.51

实验结果显示:本发明百草枯ELISA检测试剂测定不同浓度样品中百草枯含量的回收率都在95%-105%的范围之内,说明本发明的百草枯ELISA检测试剂测定生物样本中百草枯含量的准确度较高。

[0034] 实施例7. 百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备

百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备方法,包含以下步骤:

将0.5mg/mL的抗百草枯特异性抗体3溶解于50mmol/L pH=8.0的磷酸盐缓冲液中,然后添加质量分数为1.25%的牛血清白蛋白、0.75%的氯化钠、0.25%的吐温-20、2.75%的丙三醇、0.5%的乙二醇四乙酸、1.25%的PEG-4000以及0.03%的叠氮钠,搅拌均匀,调节pH=7.5,制成L1试剂;

将0.5mg表面带有羧基的直径为150nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入4.5mL 0.05mol/L pH=6.2的MES缓冲液中,然后加入5mg 碳二亚胺,在37 $^{\circ}$ C下反应1小时,制成胶乳颗粒溶液,再将

0.5mg百草枯-人血清白蛋白复合体用4.5mL 0.05mol/L pH=9.2的硼酸盐缓冲液稀释后,立即加入到上述胶乳颗粒溶液中,在37℃下反应12小时,然后加入1mL 0.1 mol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时,反应终止后离心去除上清液,再将沉淀物用10mL 50mmol/L pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次,再用25mL 50mmol/L pH=8.5的甘氨酸缓冲液稀释成胶乳悬浊液,最后加入质量分数为1.25%的牛血清白蛋白、0.55%的氯化钠、0.25%的吐温-20、3.0%的丙三醇、0.45%的乙二胺四乙酸以及0.03%的叠氮钠,搅拌均匀,制成L2试剂;

所述抗百草枯特异性抗体3的制备方法,包含以下步骤:

(A) 使用磷酸盐缓冲液将百草枯血蓝蛋白免疫原稀释至终浓度为2.5mg/mL;

(B) 使用弗氏佐剂法对实验动物马进行免疫注射,注射6次后抽取马血液,分离纯化抗血清,得到抗百草枯特异性抗体3;

所述的百草枯血蓝蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

<a>将200mg的血蓝蛋白溶解于60ml浓度为0.2 mol/L, pH为8.5的磷酸盐缓冲液中制成载体蛋白溶液;

用2.5ml的二甲基甲酰胺溶解250mg的上述的百草枯衍生物,通过1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺进行活化并与步骤<a>中制备的载体蛋白溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到具有免疫原性的百草枯血蓝蛋白免疫原;

所述的百草枯-人血清白蛋白复合体的制备方法,包含以下步骤:

将10mg人血清白蛋白用5mL 0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液稀释,然后加入100mg上述的百草枯衍生物,再加入50mg的N-羟基琥珀酰亚胺,在4℃下反应12 小时,再用0.1 mol/L pH=7.8的磷酸盐缓冲液在4℃下透析18小时,得到百草枯-人血清白蛋白复合体。

[0035] 实施例8. 百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂校准曲线制作及质控实验

1. 制作胶乳增强免疫比浊检测试剂校准曲线:

在奥林巴斯AU480全自动生化分析仪中放入R1试剂、R2试剂及校准品,然后对生化分析仪进行反应参数设置,具体参数详见表4;实际操作过程中需不断调整R1试剂和R2试剂的体积比例,同时调整测光点,最后由生化分析仪自动得出胶乳增强免疫比浊检测校准曲线,如图3所示。

[0036] 表4. 奥林巴斯AU480全自动生化分析仪反应参数

项目名称	百草枯
R1试剂	240μl
R2试剂	80μl
样本量	30μl
定标方法	终点法
主波长	570nm
次波长	412nm
反应时间	8分钟
温育时间	5分钟
反应方向	下降
结果	ng/ml
结果精度	0.01

拟合方法	Line graph
标准品浓度	0ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL、320ng/mL、640ng/mL

2. 质控实验:

将百草枯纯品粉末溶解于甲醇中制成1mg/mL 的储存液,并将此储存液稀释于不含百草枯的健康人血浆中,至终浓度分别为0.00、20.00、200.00、600.00ng/mL,制成空白、低、中、高浓度的质控样本。利用上述的胶乳增强免疫比浊检测方法,对质控样本进行测定,并根据步骤1中制作的胶乳增强免疫比浊检测校准曲线,计算每个质控样本中百草枯的含量,每个质控样本重复测定10次,检测结果及数据分析详见表5。

[0037] 表5. 百草枯胶乳增强免疫比浊试剂检测结果及数据分析

质控样品	空白	低	中	高
样品浓度 (ng/ml)	0.00	20.00	200.00	600.00
测试1	0.00	20.34	202.53	586.08
测试2	0.00	20.88	205.99	593.41
测试3	0.01	19.75	203.36	602.29
测试4	0.00	20.28	206.51	608.46
测试5	0.00	20.09	196.83	589.81
测试6	0.00	20.52	194.54	610.98
测试7	0.00	20.16	202.70	603.00
测试8	0.00	19.89	198.00	595.28
测试9	0.01	20.55	200.01	598.76
测试10	0.00	19.61	207.55	611.90
平均值 (ng/ml)	0.00	20.21	201.80	600.00
标准差(SD)	/	0.39	4.37	8.90
精密度(CV%)	/	1.93	2.17	1.48
回收率(%)	/	101.05	100.90	100.00

实验结果表明:测定不同浓度质控样品中百草枯含量的CV值均低于5%,回收率均在95%-105%之间,说明本发明的百草枯胶乳增强免疫比浊检测试剂测定生物样本中百草枯含量的精密度较高,结果准确。

[0038] 以上依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关技术人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

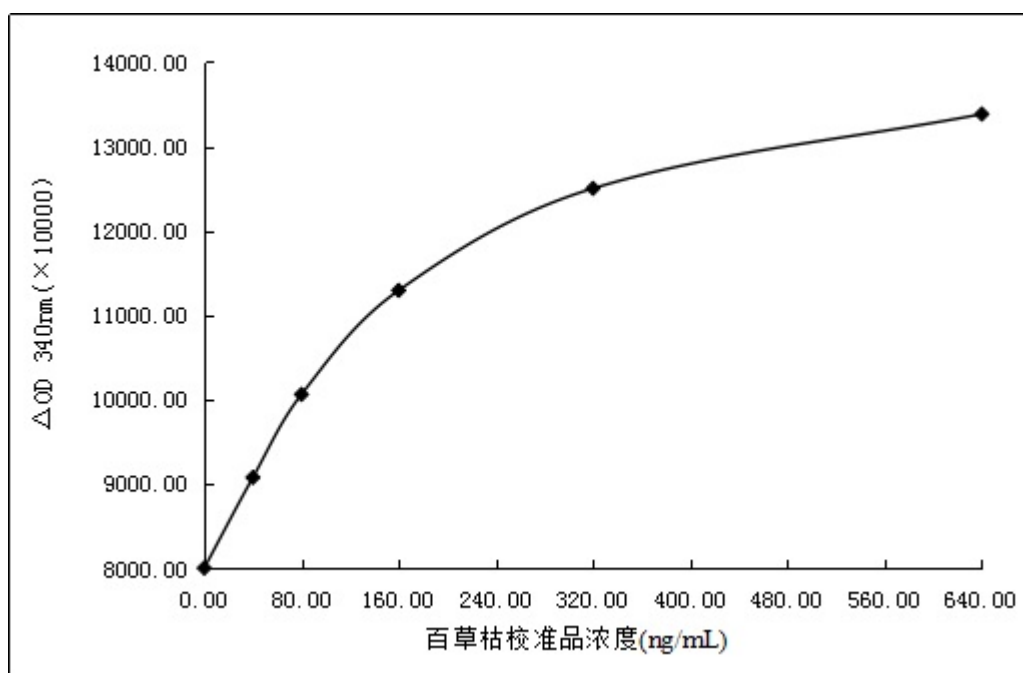


图1

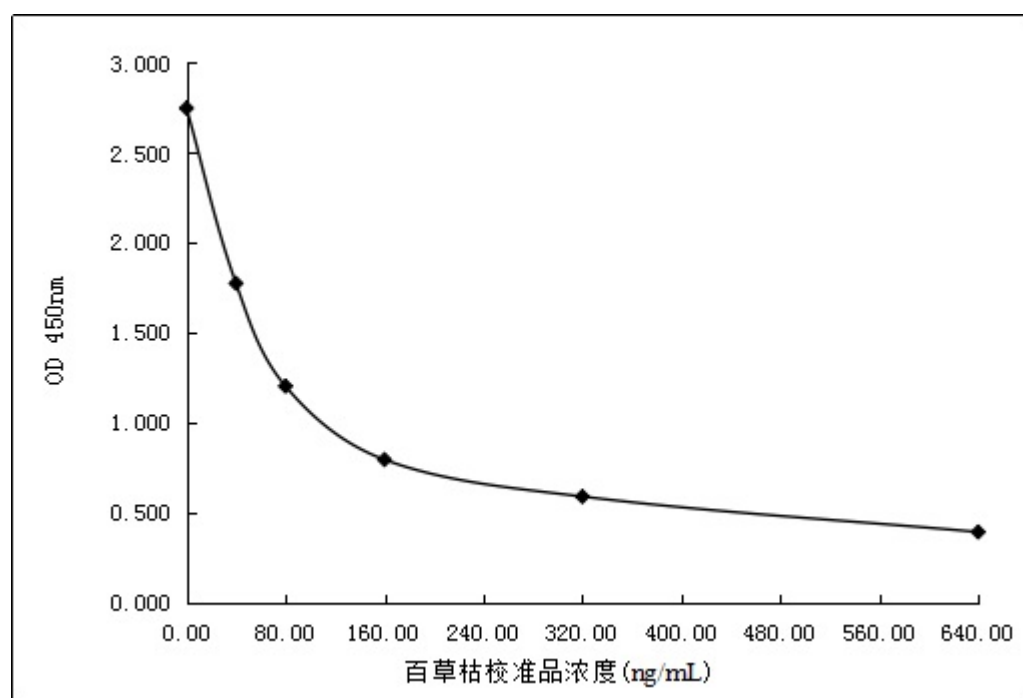


图2

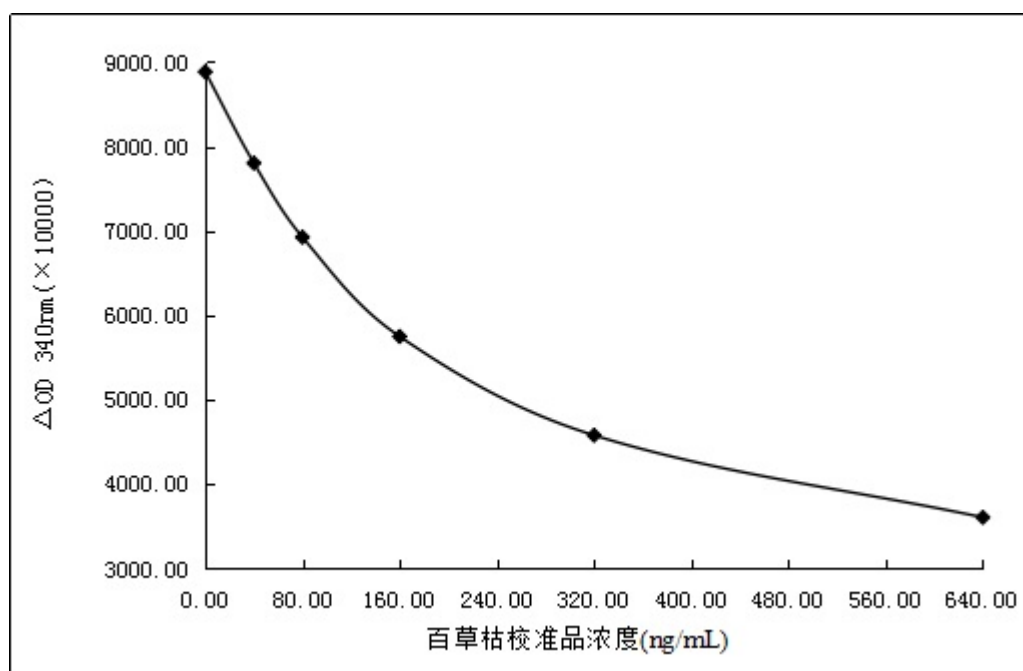


图3

专利名称(译)	一种百草枯衍生物及其制备方法与百草枯检测试剂		
公开(公告)号	CN110981791A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911075730.7	申请日	2019-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 梁超		
发明人	虞留明 茹庆科 梁超		
IPC分类号	C07D213/04 C07K16/44 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/795 G01N33/535 G01N33/539 G01N33/543		
CPC分类号	C07D213/04 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/539 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于人体生物样本中百草枯含量检测的百草枯衍生物及其制备方法。利用本发明的新型百草枯衍生物研制的系列抗百草枯特异性抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的百草枯免疫学检验试剂。本发明还提供了3种百草枯免疫检验试剂的制备方法及其相应的使用方法。本发明提供的3种百草枯免疫检测方法操作方便、检测快速、结果准确、灵敏度高、特异性强，能够对人体血液样本中的百草枯含量进行定量检测。克服了现有技术中百草枯检测方法存在的操作复杂、自动化程度低等缺陷，能有效指导临床个体化合理用药。

