(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111018924 A
(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911316831.9

(22)申请日 2019.12.19

(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.
C07H 1/00(2006.01)
C07H 15/252(2006.01)
C07K 14/795(2006.01)
C12N 9/04(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

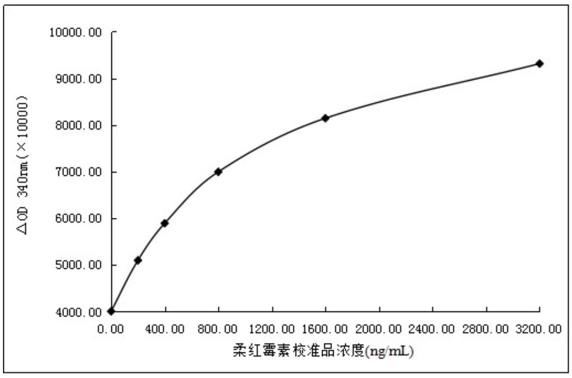
权利要求书7页　说明书17页　附图2页

(54)发明名称

一种柔红霉素衍生物及其制备方法与柔红霉素检测试剂

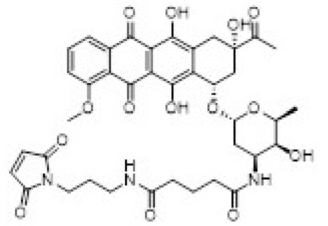
(57)摘要

本发明公开了一种用于人体生物样本中柔红霉素含量检测的柔红霉素衍生物及其制备方法。使用该柔红霉素衍生物获得了3种高免疫原性的柔红霉素免疫原与相应的3种抗柔红霉素特异性抗体以及3种柔红霉素酶标偶联物，并制备出了3种灵敏度高、特异性强、检测效果好的柔红霉素免疫学检验试剂。本发明还提供了3种柔红霉素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种柔红霉素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柔红霉素含量进行定量检测。克服了现有技术中柔红霉素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。



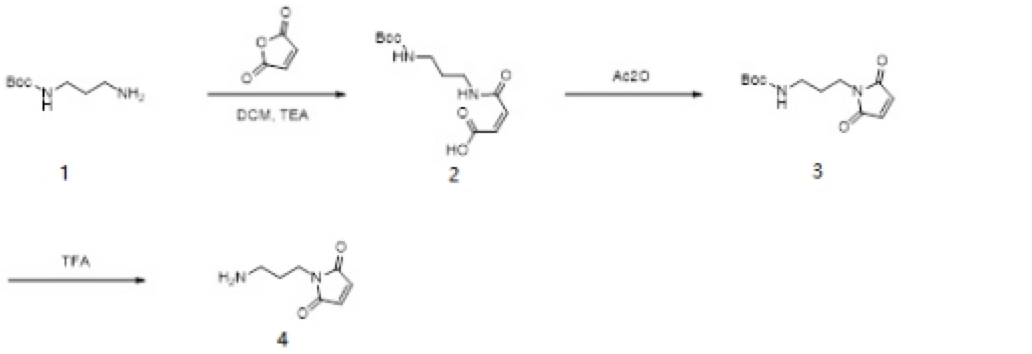
CN 111018924 A

1.一种柔红霉素衍生物,其特征在于,其结构式如式I所示:

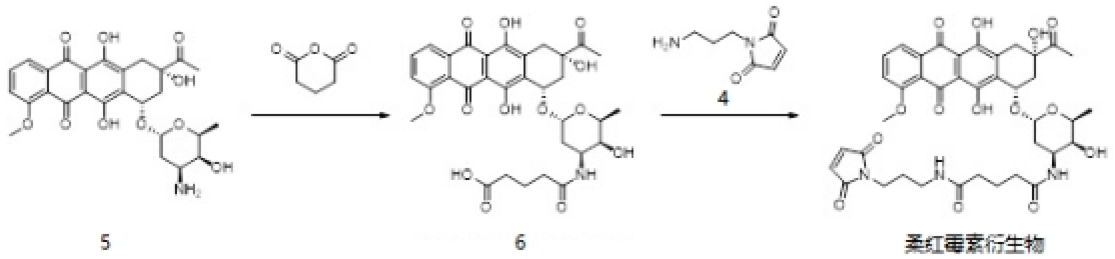


式I。

2.一种如权利要求1所述的柔红霉素衍生物的合成方法,其特征在于,所述合成方法的具体路线如下所示:



。



3.一种柔红霉素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试剂包含抗柔红霉素特异性抗体1与R1缓冲液,所述R2试剂包含柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物与R2缓冲液;所述抗柔红霉素特异性抗体1为柔红霉素血蓝蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的柔红霉素血蓝蛋白免疫原,由权利要求1所述的柔红霉素衍生物与血蓝蛋白偶联而成,其结构式如式Ⅱ所示:

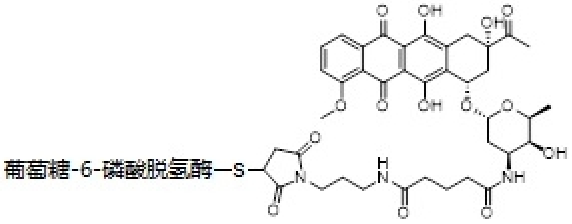
式Ⅱ;

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;

所述的柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物由权利要求1所述的柔红霉素衍生

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所述的柔红霉素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,再将抗柔红霉素特异性抗体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,再将柔红霉素葡萄糖-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;

所述抗柔红霉素特异性抗体1的制备方法,包含以下步骤:

a. 将柔红霉素血蓝蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml,得到抗原溶液,然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

b. 1-4周后,再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物注射一次,之后每隔1-4周注射一次,共计注射3-8次;

c.对免疫后的实验动物取血,分离纯化抗血清,得到抗柔红霉素特异性抗体1;

所述的柔红霉素血蓝蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中,调节pH至7.8-8.3,制成缓冲溶液A;

b.称取3.0-6.0 mg血蓝蛋白,0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液A中,制成血蓝蛋白载体溶液;

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液A中,制成柔红霉素衍生物溶液A;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液A刚变澄清时,将其逐滴加入上述血蓝蛋白载体溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液,在柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞,于-20℃下储存;

所述的柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法,包含以下步骤:

a.称取1.0-3.0 g磷酸二氢钾、1.0-5.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-3.0 g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中,调节pH至7.8-8.3,制成缓冲溶液B;

b.称取3.0-6.0 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,0-8℃下溶解于3.0-6.0 mL上述缓冲溶液B

中，制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液B中，制成柔红霉素衍生物溶液B；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液B刚变澄清时，将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物溶液，在柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物溶液中加入质量分数0.5-1.0%的BSA和质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于0～8℃下储存。

5.一种如权利要求3所述的柔红霉素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：

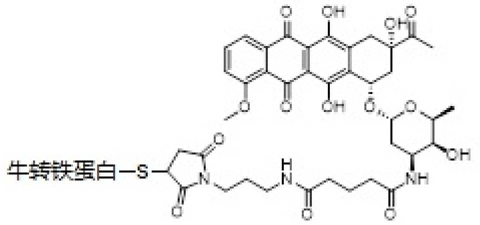
(1)在全自动生化分析仪中加入校准品、R1试剂，混匀，37℃温育3-5分钟；加入R2试剂，混匀，37℃恒温5-10分钟后，340nm主波长/405nm次波长进行检测，连续监测3分钟内的吸光度变化率，由全自动生化分析仪制作校准曲线；

(2)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柔红霉素的含量；

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。

6.一种柔红霉素ELISA检测试剂，其特征在于，该检测试剂含有：抗柔红霉素特异性抗体2、柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物及反应底物；

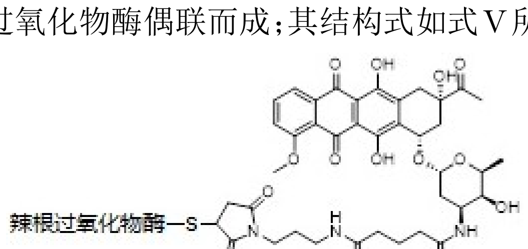
所述抗柔红霉素特异性抗体2为柔红霉素牛转铁蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体；所述的柔红霉素牛转铁蛋白免疫原，由权利要求1所述的柔红霉素衍生物与牛转铁蛋白偶联而成，其结构式如式Ⅳ所示：



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；

所述的柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物由权利要求1所述的柔红霉素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；

所述抗柔红霉素特异性抗体2的制备方法，包含以下步骤：

a．将柔红霉素牛转铁蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml，得到抗原溶液，然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b．1-4周后，再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔1-4周注射一次，共计注射3-8次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体2；

所述的柔红霉素牛转铁蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液C；

b.称取3.0-6.0 mg牛转铁蛋白，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液C中，制成人甲状腺球蛋白载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液C中，制成柔红霉素衍生物溶液C；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液C刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛转铁蛋白载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液C进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液，在柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存；

所述的柔红霉素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1.0-3.0 g磷酸二氢钾、1.0-5.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-3.0 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液D；

b.称取3.0-6.0 mg辣根过氧化物酶，0-8℃下溶解于3.0-6.0 mL上述缓冲溶液D中，制成辣根过氧化物酶溶液；

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液B中，制成柔红霉素衍生物溶液D；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液D刚变澄清时，将其逐滴加入上述辣根过氧化物酶溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液D进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液，在柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液中加入质量分数0.5-1.0%的BSA和质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于0～8℃下储存。

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

(a)将抗柔红霉素特异性抗体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；

(b)用磷酸盐缓冲液洗涤3次后，加入200μL/孔的0.5%的牛血清白蛋白溶液，4℃封闭过夜，磷酸盐缓冲液洗涤3次；

(c)加入20μL/孔的校准品及待测样本；

(d)加入100μL/孔工作浓度的柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物；

(e)室温下孵育30分钟,磷酸盐缓冲液洗板5次;

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

(g)每孔加入100μL 的浓度为2mol/L的硫酸,终止反应;

(h)使用酶标仪测定450nm波长的吸光值;

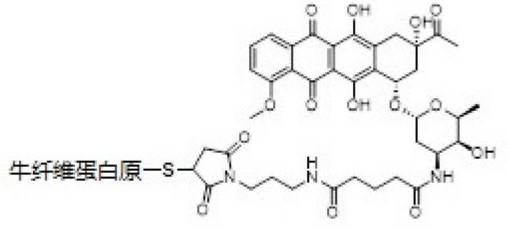
(i)根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线,并根据校准曲线与待测样本的吸光值计算待测样本中柔红霉素的含量;

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。

8.一种柔红霉素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L1试剂由柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物和L1缓冲液组成,所述L2试剂由抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒和L2缓冲液组成;

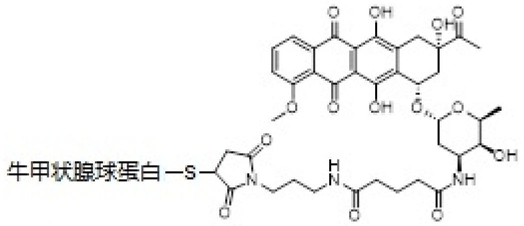
所述的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物由权利要求1所述的柔红霉素衍生物与牛纤维蛋白原偶联而成,其结构式如式Ⅵ所示:



式Ⅵ;

所述L1缓冲液为含有牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸、PEG-8000、乙基汞硫代硫酸钠的Tirs-HCl缓冲液;

所述的抗柔红霉素特异性抗体3为柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原,由权利要求1所述的柔红霉素衍生物与牛甲状腺球蛋白偶联而成,其结构式如式Ⅶ所示:



式Ⅶ;

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;

所述胶乳颗粒为表面带有羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒,直径范围为50-450nm;

所述L2缓冲液为含有牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸二钠、Triton X-100、乙基汞硫代硫酸钠的硼酸盐缓冲液。

9.一种如权利要求8所述的柔红霉素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:

(1)将浓度为0.05-2 mg/mL的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶解于浓度为10-100 mmol/L、pH值为7.0-8.0的Tirs-HCl缓冲液中,然后添加质量分数为0.1%-2.0%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、1.0%-5.0%的PEG-8000以及0.01%-0.1%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，调节pH=7.5，制成L1试剂；

(2)将质量分数为0.05-1.0%的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒加入浓度为20-100 mmol/L的硼酸盐缓冲液中，然后添加质量分数为0.1%-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%的乙二胺四乙酸二钠、0.1-1.0%的Triton X-100以及0.01%-0.1%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，制成L2试剂；

所述的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液E；

b.称取3.0-6.0 mg牛纤维蛋白原，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液E中，制成牛纤维蛋白原载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液E中，制成柔红霉素衍生物溶液E；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液E刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛纤维蛋白原载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液E进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液，在柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存；

所述的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒的制备方法，包含以下步骤：

a.将0.5-1.5 mg直径为50-450 nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入1.5-4.5 mL、0.08mol/L、pH=6.2的MES缓冲液中，然后加入5.0 mg碳二亚胺与2.5 mgN-羟基琥珀酰亚胺，在37℃下搅拌1小时，15000 r/min离心15分钟后去除上清液，然后用15 ml浓度为0.1 mol/L、PH=8.2的磷酸盐缓冲液将沉淀物重悬，制成胶乳颗粒溶液；

b.将0.5-1.5 mg抗柔红霉素特异性抗体3用1.5-4.5 mL、0.1mol/L、pH=8.2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℃下振荡反应12小时，然后加入1.0-3.0 mL、0.1 mol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时，反应结束后加入0.5-1.5 mg牛血清白蛋白，搅拌均匀后室温静置12小时，然后9000 r/mim离心15分钟，去除上清液，再将沉淀物用10 mL、50 mmol/L、pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次，最后用25 mL、50 mmol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液将沉淀物重悬，即为抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒悬浊液；

所述抗柔红霉素特异性抗体3的制备方法，包含以下步骤：

a. 将柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml，得到抗原溶液，然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b. 1-4周后，再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔1-4周注射一次，共计注射3-8次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体3；

所述的柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液F；

b.称取3.0-6.0 mg牛甲状腺球蛋白，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液F中，制成牛甲状腺球蛋白载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg权利要求1所述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液F中，制成柔红霉素衍生物溶液F；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液F刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛甲状腺球蛋白载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液F进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液，在柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存。

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、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml、1600ng/ml、3200ng/ml的柔红霉素，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%的乙基汞硫代硫酸钠，50mmol/L pH=7.2的Tris-HCl缓冲液组成的一组校准品。

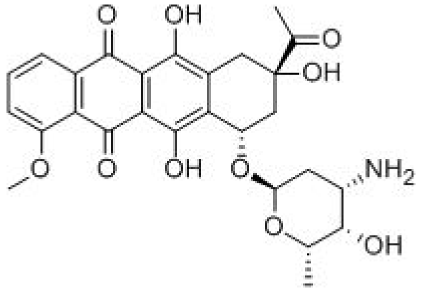
一种柔红霉素衍生物及其制备方法与柔红霉素检测试剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种柔红霉素衍生物及其制备方法与柔红霉素检测试剂。

背景技术

[0002] 柔红霉素(Daunorubicin),其化学结构式如式Ⅷ所示:



式Ⅷ。

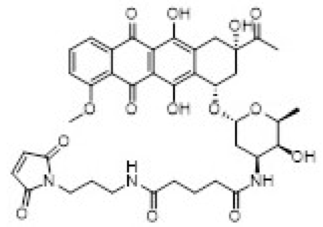
[0003] 柔红霉素是一种强效蒽环类抗肿瘤抗生素,主要用于治疗对常用抗肿瘤药物产生耐药性的急性粒细胞白血病或急性淋巴细胞白血病,对淋巴肉瘤、神经母细胞瘤、骨骼肌瘤、绒癌也有一定疗效。柔红霉素的作用机理与阿霉素类似,能直接与DNA结合,抑制DNA复制与RNA合成,对RNA的影响尤为显著,能选择性地作用于嘌呤核苷。使用柔红霉素治疗的不良反应较多,主要包括:1.较为严重的骨髓抑制;2.口腔溃疡(此不良反应多在骨髓毒性之前出现);3.胃肠道反应(恶心、呕吐、腹痛等);4.心脏毒性,可引起心肌损害、心电图异常、心律失常、严重者可致心力衰竭,滴速过快时也可出现心律失常;5.漏出血管外时可致局部组织坏死等。因此,对使用柔红霉素进行治疗的患者需要进行严格的血药浓度监测,以保证血药浓度控制在有效的治疗范围之内,能显著提高治疗效果并减少不良反应,对临床合理用药与个体化治疗也具有重要意义。

[0004] 传统的柔红霉素检验方法主要有:高效液相色谱法(HPLC)与液相色谱/串联质谱联用法(LC/MS-MS)等,这些方法操作复杂、速度较慢、且成本较高。而利用新型柔红霉素衍生物研制的抗柔红霉素特异性系列抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的柔红霉素免疫检验试剂,能有效弥补传统方法的缺点。本发明的3种柔红霉素检测试剂,可以对柔红霉素的含量进行定量检测,有效指导临床个体化合理用药。与HPLC、LC/MS-MS等传统方法相比,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,有利于将来临床大规模推广应用,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

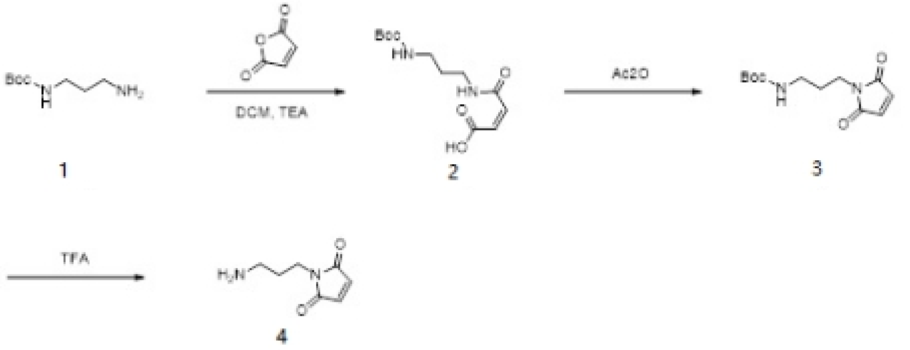
[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明所采用的技术方案是:

一、提供一种柔红霉素衍生物,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:

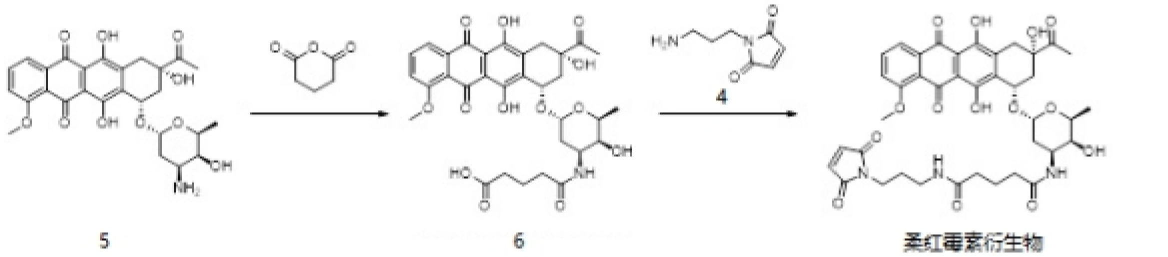


式I。

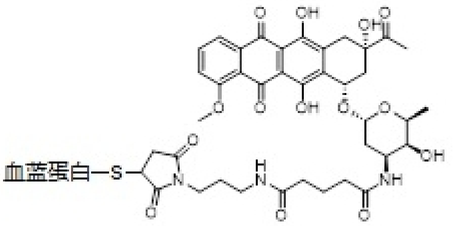
[0006] 二、提供一种如上所述的柔红霉素衍生物的合成方法，该合成方法有别于常规合成方法，并具有良好的合成效果，显著提高柔红霉素衍生物的合成效率，具体合成路线如下所示：



。



[0007] 三、提供一种柔红霉素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试剂包含抗柔红霉素特异性抗体1与R1缓冲液，所述R2试剂包含柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物与R2缓冲液；所述抗柔红霉素特异性抗体1为柔红霉素人转铁蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体；所述的柔红霉素血蓝蛋白免疫原，由上述的柔红霉素衍生物与血蓝蛋白偶联而成，其结构式如式Ⅱ所示：

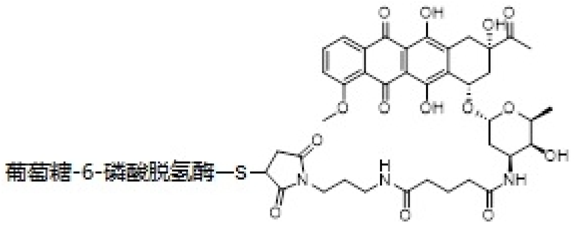


式Ⅱ；

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；

所述的柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物由上述的柔红霉素衍生物与葡萄糖-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柔红霉素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，再将抗柔红霉素特异性抗体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，再将柔红霉素葡萄糖-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。

[0009] 所述抗柔红霉素特异性抗体1的制备方法，包含以下步骤：

a. 将柔红霉素血蓝蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml，得到抗原溶液，然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b. 1-4周后，再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔1-4周注射一次，共计注射3-8次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体1。

[0010] 所述的柔红霉素血蓝蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液A；

b.称取3.0-6.0 mg血蓝蛋白，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液A中，制成血蓝蛋白载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液A中，制成柔红霉素衍生物溶液A；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液A刚变澄清时，将其逐滴加入上述血蓝蛋白载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液，在柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存。

[0011] 所述的柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法，包含以下步骤：

a.称取1.0-3.0 g磷酸二氢钾、1.0-5.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-3.0 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液B；

b.称取3.0-6.0 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，0-8℃下溶解于3.0-6.0 mL上述缓冲溶液B中，制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液B中,制成柔红霉素衍生物溶液B;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液B刚变澄清时,将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物溶液,在柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物溶液中加入质量分数0.5-1.0%的BSA和质量分数0.05-0.20%的硫柳汞,于0～8℃下储存。

[0012]　五、提供一种如上所述的柔红霉素均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下操作步骤:

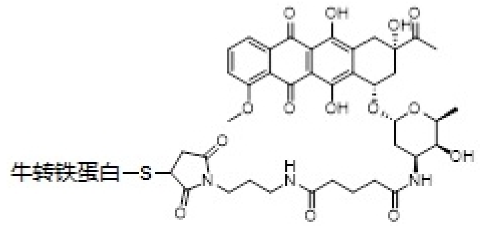
(1)在全自动生化分析仪中加入校准品、R1试剂,混匀,37℃温育3-5分钟;加入R2试剂,混匀,37℃恒温5-10分钟后,340nm主波长/405nm次波长进行检测,连续监测3分钟内的吸光度变化率,由全自动生化分析仪制作校准曲线;

(2)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(1)中制作的校准曲线自动计算待测样本中柔红霉素的含量;

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。

[0013]　六、提供一种柔红霉素酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂,该检测试剂含有:抗柔红霉素特异性抗体2、柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物及反应底物;

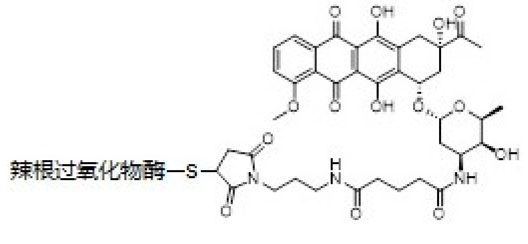
所述抗柔红霉素特异性抗体2为柔红霉素人甲状腺球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的柔红霉素人甲状腺球蛋白免疫原,由上述的柔红霉素衍生物与牛转铁蛋白偶联而成,其结构式如式Ⅳ所示:



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;

所述的柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物由上述的柔红霉素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;

所述抗柔红霉素特异性抗体2的制备方法,包含以下步骤:

a. 将柔红霉素牛转铁蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml,得到抗原溶液,然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

b. 1-4周后,再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物注射一次,之后每隔1-4周注射一次,共计注射3-8次;

c.对免疫后的实验动物取血,分离纯化抗血清,得到抗柔红霉素特异性抗体2。

[0014] 所述的柔红霉素牛转铁蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中,调节pH至7.8-8.3,制成缓冲溶液C;

b.称取3.0-6.0 mg牛转铁蛋白,0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液C中,制成牛转铁蛋白载体溶液;

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液C中,制成柔红霉素衍生物溶液C;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液C刚变澄清时,将其逐滴加入上述牛转铁蛋白载体溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液C进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液,在柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞,于-20℃下储存。

[0015] 所述的柔红霉素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1.0-3.0 g磷酸二氢钾、1.0-5.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-3.0 g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中,调节pH至7.8-8.3,制成缓冲溶液D;

b.称取3.0-6.0 mg辣根过氧化物酶,0-8℃下溶解于3.0-6.0 mL上述缓冲溶液D中,制成辣根过氧化物酶溶液;

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液B中,制成柔红霉素衍生物溶液D;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液D刚变澄清时,将其逐滴加入上述辣根过氧化物酶溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液D进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液,在柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液中加入质量分数0.5-1.0%的BSA和质量分数0.05-0.20%的硫柳汞,于0～8℃下储存。

[0016] 七、提供一种如上所述的柔红霉素ELISA检测试剂的使用方法,包括以下操作步骤:

(a)将抗柔红霉素特异性抗体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;

(b)用磷酸盐缓冲液洗涤3次后,加入200μL/孔的0.5%的牛血清白蛋白溶液,4℃封闭过夜,磷酸盐缓冲液洗涤3次;

(c)加入20μL/孔的校准品及待测样本;

(d)加入100μL/孔工作浓度的柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物;

(e)室温下孵育30分钟,磷酸盐缓冲液洗板5次;

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

(g)每孔加入100μL 的浓度为2mol/L的硫酸,终止反应;

(h)使用酶标仪测定450nm波长的吸光值;

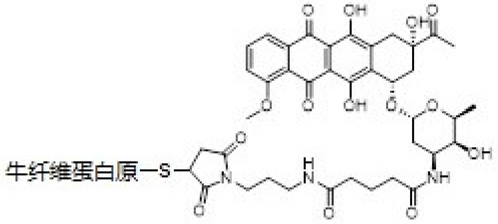
(i)根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线,并根据校准曲线与待测样本的吸光值计算待测样本中柔红霉素的含量;

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。

[0017] 八、提供一种柔红霉素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L1试剂由柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物和L1缓冲液组成,所述L2试剂由抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒和L2缓冲液组成;

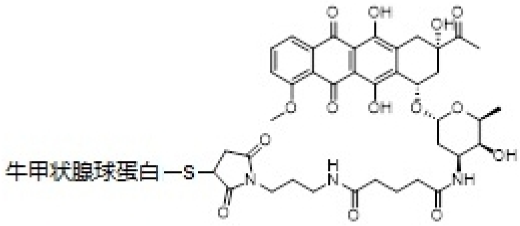
所述的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物由上述的柔红霉素衍生物与牛纤维蛋白原偶联而成,其结构式如式Ⅵ所示:



式Ⅵ;

所述L1缓冲液为含有牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸、PEG-8000、乙基汞硫代硫酸钠的Tirs-HCl缓冲液;

所述的抗柔红霉素特异性抗体3为柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原免疫实验动物后生产得到的抗体;所述的柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原,由上述的柔红霉素衍生物与牛甲状腺球蛋白偶联而成,其结构式如式Ⅶ所示:



式Ⅶ;

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;

所述胶乳颗粒为表面带有羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基修饰的聚苯乙烯胶乳颗粒,直径范围为50-450nm;

所述L2缓冲液为含有牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、丙三醇、乙二胺四乙酸二钠、Triton X-100、乙基汞硫代硫酸钠的硼酸盐缓冲液。

[0018] 九、提供一种如上所述的柔红霉素胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备方法,包含以下步骤:

(1)将浓度为0.05-2 mg/mL的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶解于浓度为10-100 mmol/L、pH值为7.0-8.0的Tirs-HCl缓冲液中,然后添加质量分数为0.1%-2.0%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、1.0%-5.0%的PEG-8000以及0.01%-0.1%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，调节pH=7.5，制成L1试剂；

(2)将质量分数为0.05-1.0%的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒加入浓度为20-100 mmol/L的硼酸盐缓冲液中，然后添加质量分数为0.1%-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%的乙二胺四乙酸二钠、0.1-1.0%的Triton X-100以及0.01%-0.1%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，制成L2试剂。

[0019] 所述的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液E；

b.称取3.0-6.0 mg牛纤维蛋白原，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液E中，制成牛纤维蛋白原载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液E中，制成柔红霉素衍生物溶液E；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液E刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛纤维蛋白原载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液E进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液，在柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存。

[0020] 所述的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒的制备方法，包含以下步骤：

a.将0.5-1.5 mg直径为50-450 nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入1.5-4.5 mL、0.08 mol/L、pH=6.2的MES缓冲液中，然后加入5.0 mg碳二亚胺与2.5 mgN-羟基琥珀酰亚胺，在37℃下搅拌1小时，15000 r/min离心15分钟后去除上清液，然后用15 ml浓度为0.1mol/L、PH=8.2的磷酸盐缓冲液将沉淀物重悬，制成胶乳颗粒溶液；

b.将0.5-1.5mg抗柔红霉素特异性抗体3用1.5-4.5 mL、0.1mol/L、pH=8.2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℃下振荡反应12小时，然后加入1.0-3.0 mL、0.1 mol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时，反应结束后加入0.5-1.5 mg牛血清白蛋白，搅拌均匀后室温静置12小时，然后9000 r/mim离心15分钟，去除上清液，再将沉淀物用10 mL、50 mmol/L、pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次，最后用25 mL、50 mmol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液将沉淀物重悬，即为抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒悬浊液。

[0021] 所述抗柔红霉素特异性抗体3的制备方法，包含以下步骤：

a. 将柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至2.0-5.0 mg/ml，得到抗原溶液，然后将2.0-5.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b. 1-4周后，再用2.0-5.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔1-4周注射一次，共计注射3-8次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体3。

[0022] 所述的柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.0-5.0 g磷酸二氢钾、3.0-6.0 g磷酸氢二钠、7.5-15.0 g氯化钠、1.0-2.5 g氯化镁，共同溶解于1.0-2.5 L去离子水中，调节pH至7.8-8.3，制成缓冲溶液F；

b.称取3.0-6.0 mg牛甲状腺球蛋白，0-8℃下溶解于3.0-6.0 ml上述缓冲溶液F中，制成牛甲状腺球蛋白载体溶液；

c.称取3.0-8.0 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于300-800 μl上述缓冲溶液F中，制成柔红霉素衍生物溶液F；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液F刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛甲状腺球蛋白载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌3-10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液F进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液，在柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的硫柳汞，于-20℃下储存。

[0023] 所述的柔红霉素胶乳增强免疫比浊检测试剂的使用方法与上述的柔红霉素均相酶免疫检验试剂的使用方法基本相同。

[0024] 所述的校准品是由浓度分别为0ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml、1600ng/ml、3200ng/ml的柔红霉素，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%的乙基汞硫代硫酸钠，50mmol/L pH=7.2的Tris-HCl缓冲液组成的一组校准品。

[0025] 本发明利用一种新型柔红霉素衍生物研制的系列抗柔红霉素特异性抗体可以用于制备多种灵敏度高、特异性强、检测效果好的柔红霉素免疫检验试剂。本发明还提供了3种柔红霉素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种柔红霉素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、血浆等样本中的柔红霉素含量进行定量检测。克服了现有技术中柔红霉素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

[0026] 图1是柔红霉素均相酶免疫检测试剂的校准曲线；

图2是柔红霉素ELISA检测试剂的校准曲线；

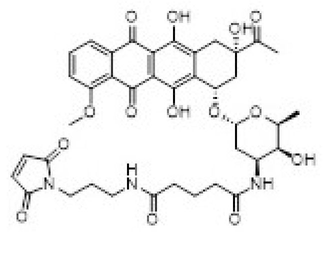
图3是柔红霉素胶乳增强免疫比浊检测试剂的校准曲线。

具体实施方式

[0027] 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。

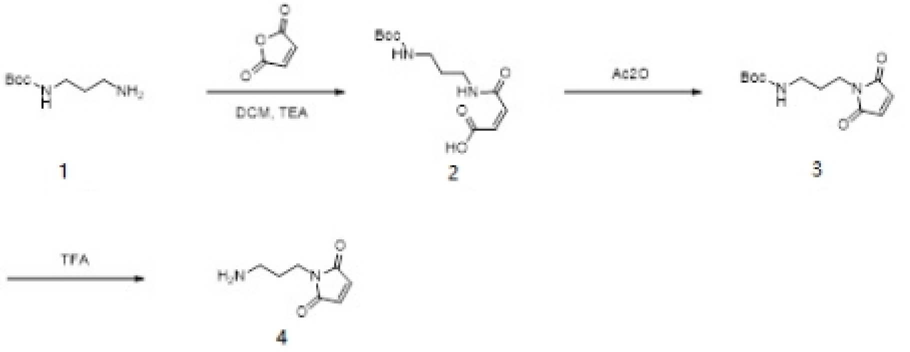
[0028] 实施例1. 柔红霉素衍生物的合成

柔红霉素衍生物的化学结构如式I所示：

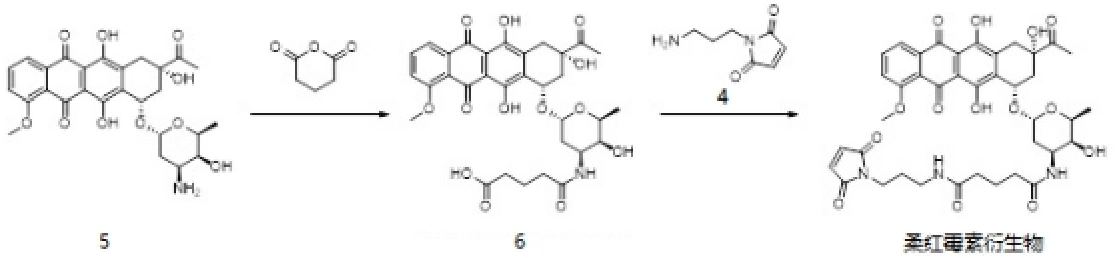


式I。

[0029] 上述柔红霉素衍生物的合成方法的具体路线如下所示：

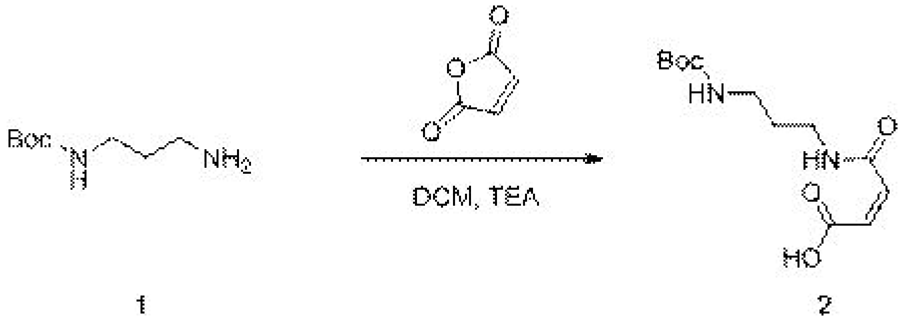


。



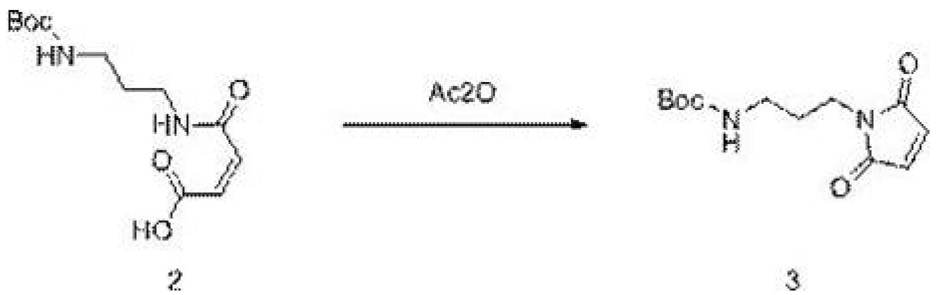
[0030] 具体的合成步骤如下：

1.化合物2的合成



将10g化合物1与8.7 g Et_3N共同加入100 mL CH_2Cl_2中溶解制成溶液1，再将5.6 g顺丁烯二酸酐溶解于30 mL CH_2Cl_2中制成溶液2，然后将溶液2在0°C下逐滴加入溶液1中制成反应混合液，然后将此反应混合液在室温下搅拌4小时，反应结束后将反应混合液浓缩得到20g黄色油状的化合物2粗品，产率41%。

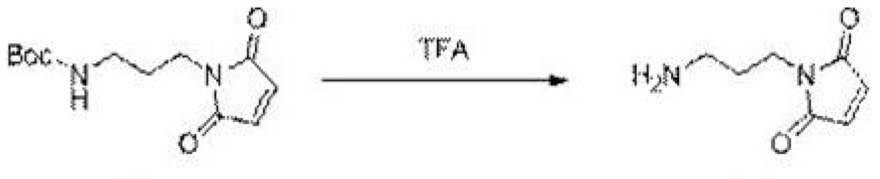
[0031] 2.化合物3的合成



将20 g化合物2溶解于200 mL乙酸酐中制成反应溶液，将此反应溶液加热至120 °C 保持2小时，然后将反应溶液用800mL纯化水淬熄，并用EA进行萃取，萃取得到的有机层用500 mL Na_2CO_3溶液冲洗，重复2次，通过Na_2SO_4进行干燥，过滤，再通过减压蒸发的方法除去滤液，得到的粗产物再经过乙酸乙酯:己烷=1:3的硅胶柱进行纯化，得到6 g白色固体化合物

3,产率41% 。

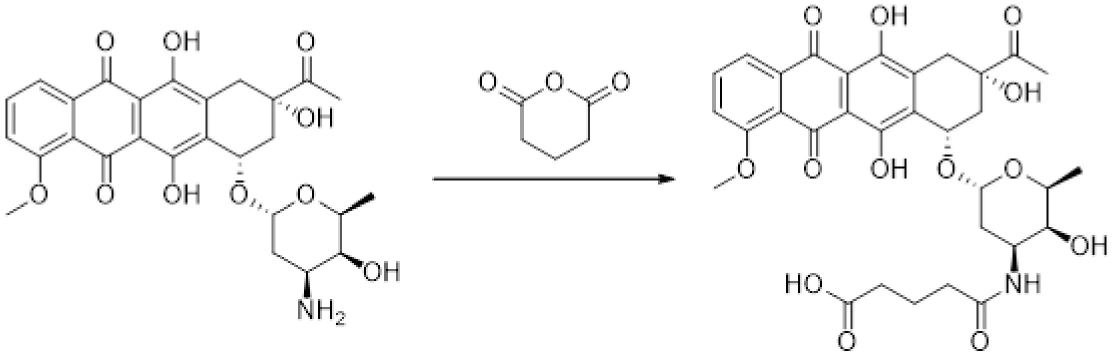
[0032]　3.化合物4的合成



3　　　　　　4

将6 g化合物3加入100 mL DCM中溶解,然后在室温下加入10 mL TFA制成反应液。将此反应液在室温下搅拌2小时,再将反应得到的沉淀物进行过滤,并用MTBE对沉淀物进行洗涤,得到2.6 g黄色油状的化合物4粗品,产率72%。

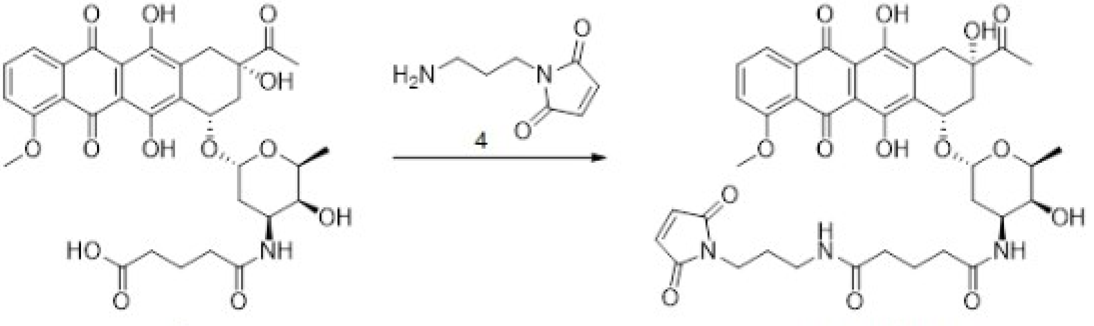
[0033]　4.化合物6的合成



5　　　　　　6

将5 g化合物5与2 g TEA一起溶解于50 mL DCM中,然后在室温下一次性加入2 g二氢-2H -吡喃-2,6(3H)-二酮制成反应混合液,将此反应混合液在室温下搅拌2小时,薄层色谱分析显示反应彻底完成时,用100 mL纯化水将反应混合液淬熄,并用1mol/L盐酸调节至PH=3,然后再用100 mL DCM进行萃取,重复3次,将萃取得到的有机层合并,用200 mL纯化水与200 mL卤水冲洗,然后在真空中干燥浓缩,得到的粗产物经过制备型高效液相色谱纯化,得到500 mg红色固体柔红霉素酸衍生物,产率8.2%。

[0034]　5.柔红霉素衍生物的合成



6　　　　　　柔红霉素衍生物

将1 g柔红霉素酸衍生物、308 mg化合物4、202 mg TEA及760 mg HATU共同溶解于20 mL DCM中制成反应液,将此反应液在室温下搅拌1小时,然后用20mL Na_2CO_3水溶液将反应淬熄,并用EA进行萃取,萃取得到的有机层用20 mL浓盐水冲洗,重复2次,使用Na_2SO_4进行干燥,过滤,再通过减压蒸发的方法除去滤液,得到的粗产物经过制备型高效液相色谱纯化,

最终得到380 mg红色固体柔红霉素衍生物，产率31.4%。

[0035] 实施例2. 柔红霉素均相酶免疫检测试剂的制备

柔红霉素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，再将抗柔红霉素特异性抗体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，再将柔红霉素葡萄糖-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；

所述抗柔红霉素特异性抗体1的制备方法，包含以下步骤：

a. 将柔红霉素血蓝蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至3.5 mg/ml，得到抗原溶液，然后将3.5 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b. 2周后，再用3.5 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔2周注射一次，共计注射5次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体1。

[0036] 所述的柔红霉素血蓝蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取3.25 g磷酸二氢钾、4.5 g磷酸氢二钠、10.5 g氯化钠、1.75 g氯化镁，共同溶解于2.0 L去离子水中，调节pH至8.1，制成缓冲溶液A；

b.称取5.0 mg血蓝蛋白，0-8℃下溶解于5.0 ml上述缓冲溶液A中，制成血蓝蛋白载体溶液；

c.称取7.5 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于750 μl上述缓冲溶液A中，制成柔红霉素衍生物溶液A；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液A刚变澄清时，将其逐滴加入上述血蓝蛋白载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌6小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液A进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液，在柔红霉素血蓝蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.15%的硫柳汞，于-20℃下储存。

[0037] 所述的柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物的制备方法，包含以下步骤：

a.称取2.25 g磷酸二氢钾、3.45 g磷酸氢二钠、12.5 g氯化钠、1.75 g氯化镁，共同溶解于2.0 L去离子水中，调节pH至7.9，制成缓冲溶液B；

b.称取4.5 mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，0-8℃下溶解于4.5 mL上述缓冲溶液B中，制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

c.称取6.25 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于625 μl上述缓冲溶液B中，制成柔红霉素衍生物溶液B；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液B刚变澄清时，将其逐滴加入上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌5小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液B进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联物溶液，在柔红霉素葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记偶联

物溶液中加入质量分数0.75%的BSA和质量分数0.15%的硫柳汞，于0～8℃下储存。

[0038] 实施例3.柔红霉素校准品的制备

将柔红霉素纯品粉末分别加入6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、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml、1600ng/ml、3200ng/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，即为柔红霉素校准品(一组6个浓度)。

[0039] 实施例4. 柔红霉素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。

[0040] 表1. 迈瑞 BS480全自动生化分析仪反应参数

项目名称	柔红霉素
R1试剂	180μl
R2试剂	45μl
样本量	5μl
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
校准品浓度	0ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml、1600ng/ml、3200ng/ml

2. 质控实验：

将柔红霉素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柔红霉素的健康人血浆中，至终浓度分别为0.00、300.00、1200.00、3000.00ng/mL，制成空白、低、中、高浓度的质控样本。利用上述的柔红霉素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柔红霉素的含量，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。

[0041] 表2. 柔红霉素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	300.00	1200.00	3000.00
测试1	0.00	304.45	1215.00	3056.74
测试2	0.00	305.38	1207.75	3043.18
测试3	0.00	229.80	1213.32	3017.65
测试4	0.00	308.62	1186.07	3051.50

测试5	0.00	303.01	1225.40	2939.00
测试6	0.00	337.56	1209.53	2967.16
测试7	0.00	297.53	1193.88	3082.87
测试8	0.00	309.24	1218.41	2995.99
测试9	0.00	300.93	1210.52	3062.24
测试10	0.00	306.77	1201.46	3076.33
平均值(ng/ml)	0.00	307.33	1208.13	3029.27
标准差(SD)	/	11.27	11.64	48.15
精密度(CV%)	/	3.67	0.96	1.59
回收率(%)	/	102.44	100.68	100.98

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

[0042] 实施例5. 柔红霉素 ELISA检测试剂中关键组分的制备

(1)抗柔红霉素特异性抗体2的制备方法,包含以下步骤:

a. 将柔红霉素牛转铁蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至3.75 mg/ml,得到抗原溶液,然后将3.75 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

b. 3周后,再用3.75 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物注射一次,之后每隔3周注射一次,共计注射6次;

c.对免疫后的实验动物取血,分离纯化抗血清,得到抗柔红霉素特异性抗体2。

[0043] 所述的柔红霉素牛转铁蛋白免疫原的制备方法,包含以下步骤:

a.称取3.8 g磷酸二氢钾、5.2 g磷酸氢二钠、9.0 g氯化钠、1.8 g氯化镁,共同溶解于2.0 L去离子水中,调节pH至8.0,制成缓冲溶液C;

b.称取5.2 mg牛转铁蛋白,0-8℃下溶解于5.2 ml上述缓冲溶液C中,制成牛转铁蛋白载体溶液;

c.称取6.8 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于680 μl上述缓冲溶液C中,制成柔红霉素衍生物溶液C;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液C刚变澄清时,将其逐滴加入上述牛转铁蛋白载体溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌8小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液C进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液,在柔红霉素牛转铁蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.15%的硫柳汞,于-20℃下储存。

[0044] (2)柔红霉素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2.6 g磷酸二氢钾、4.2 g磷酸氢二钠、12.0 g氯化钠、2.4 g氯化镁,共同溶解于2.0 L去离子水中,调节pH至7.9,制成缓冲溶液D;

b.称取4.0 mg辣根过氧化物酶,0-8℃下溶解于4.0 mL上述缓冲溶液D中,制成辣根过氧化物酶溶液;

c.称取6.0 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于600 μl上述缓冲溶液B中,制成柔红霉素衍生物溶液D;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液D刚变澄清时，将其逐滴加入上述辣根过氧化物酶溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌5小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液D进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液，在柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物溶液中加入质量分数0.75%的BSA和质量分数0.15%的硫柳汞，于0～8℃下储存。

[0045] 实施例6.柔红霉素 ELISA检测试剂性能评估实验

1.柔红霉素 ELISA检测校准曲线的制作

(a)将抗柔红霉素特异性抗体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 100μL/孔的用量包被在96孔酶联板上，4℃过夜；

(b)用磷酸盐缓冲液洗涤3次后，加入200μL/孔的0.5%的牛血清白蛋白溶液，4℃封闭过夜，磷酸盐缓冲液洗涤3次；

(c)加入20μL/孔的校准品；

(d)加入100μL/孔工作浓度的柔红霉素辣根过氧化物酶标记偶联物；

(e)室温下孵育30分钟，磷酸盐缓冲液洗板5次；

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

(g)每孔加入100μL 的浓度为2mol/L的硫酸，终止反应；

(h)使用酶标仪测定450nm波长的吸光值；

(i)根据不同浓度校准品的吸光值制作校准曲线，如图2所示。

[0046] 2.质控实验

将柔红霉素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柔红霉素的健康人血浆中，至终浓度分别为0.00、300.00、1200.00、3000.00ng/mL，制成空白、低、中、高浓度的质控样本。利用上述的柔红霉素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所示的柔红霉素ELISA检测的校准曲线，计算每个质控样本中柔红霉素的含量，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。

[0047] 表3. 柔红霉素 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	300.00	1200.00	3000.00
测试1	0.00	300.00	1255.54	3021.30
测试2	0.00	320.36	1204.60	3063.52
测试3	0.00	289.43	1173.89	2959.08
平均值(ng/mL)	0.00	303.26	1211.34	3014.63
回收率(%)	/	101.09	100.95	100.49

实验结果显示：本发明柔红霉素ELISA检测试剂测定不同浓度样品中柔红霉素含量的回收率都在95%-105%的范围之内，说明本发明的柔红霉素ELISA检测试剂测定生物样本中柔红霉素含量的准确度较高。

[0048] 实施例7.柔红霉素胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备

柔红霉素胶乳增强免疫比浊检测试剂的制备方法，包含以下步骤：

(1)将浓度为1.25 mg/mL的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶解于浓度为50 mmol/L、

pH值为7.6的Tirs-HCl缓冲液中，然后添加质量分数为0.12%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、0.75%的乙二胺四乙酸、2.25%的PEG-8000以及0.05%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，调节pH=7.5，制成L1试剂；

(2)将质量分数为0.5%的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒加入浓度为80 mmol/L的硼酸盐缓冲液中，然后添加质量分数为1.25%的牛血清白蛋白、0.45%的氯化钠、0.25%的吐温-20、3.0%的丙三醇、0.65%的乙二胺四乙酸二钠、0.5%的Triton X-100以及0.05%的乙基汞硫代硫酸钠，搅拌均匀，制成L2试剂；

所述的柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物的制备方法，包含以下步骤：

a.称取4.1 g磷酸二氢钾、3.9 g磷酸氢二钠、11.6 g氯化钠、1.8 g氯化镁，共同溶解于2.0 L去离子水中，调节pH至8.0，制成缓冲溶液E；

b.称取5.0 mg牛纤维蛋白原，0-8℃下溶解于5.0 ml上述缓冲溶液E中，制成牛纤维蛋白原载体溶液；

c.称取6.5 mg上述的柔红霉素衍生物，0-8℃下溶解于650 μl上述缓冲溶液E中，制成柔红霉素衍生物溶液E；

d.当上述柔红霉素衍生物溶液E刚变澄清时，将其逐滴加入上述牛纤维蛋白原载体溶液中，然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌10小时；

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液E进行透析，透析后所得溶液即为柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液，在柔红霉素-牛纤维蛋白原偶联物溶液中加入质量分数0.15 %的硫柳汞，于-20℃下储存。

[0049] 所述的抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒的制备方法，包含以下步骤：

a.将1.2 mg直径为250 nm的聚苯乙烯胶乳颗粒加入3.6 mL、0.08mol/L、pH=6.2的MES缓冲液中，然后加入5.0 mg碳二亚胺与2.5 mgN-羟基琥珀酰亚胺，在37℃下搅拌1小时，15000 r/min离心15分钟后去除上清液，然后用15 ml浓度为0.1mol/L、PH=8.2的磷酸盐缓冲液将沉淀物重悬，制成胶乳颗粒溶液；

b.将1.0 mg抗柔红霉素特异性抗体3用3.0 mL、0.1mol/L、pH=8.2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℃下振荡反应12小时，然后加入3.0 mL、0.1 mol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液搅拌2小时，反应结束后加入1.0 mg牛血清白蛋白，搅拌均匀后室温静置12小时，然后9000 r/mim离心15分钟，去除上清液，再将沉淀物用10 mL、50 mmol/L、pH=8.0的Tris-HCl缓冲液洗涤3次，最后用25 mL、50 mmol/L、pH=8.5的甘氨酸缓冲液将沉淀物重悬，即为抗柔红霉素特异性抗体3包被的胶乳颗粒悬浊液；

所述抗柔红霉素特异性抗体3的制备方法，包含以下步骤：

a. 将柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原用PBS缓冲液稀释至4.0 mg/ml，得到抗原溶液，然后将4.0 ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行注射；

b. 3周后，再用4.0 ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合，对上述实验动物注射一次，之后每隔4周注射一次，共计注射5次；

c.对免疫后的实验动物取血，分离纯化抗血清，得到抗柔红霉素特异性抗体3。

[0050] 所述的柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原的制备方法，包含以下步骤：

a.称取3.75 g磷酸二氢钾、4.25 g磷酸氢二钠、12.5 g氯化钠、1.65 g氯化镁，共同溶解于2.0 L去离子水中，调节pH至8.0，制成缓冲溶液F；

b.称取6.0 mg牛甲状腺球蛋白,0-8℃下溶解于6.0 ml上述缓冲溶液F中,制成牛甲状腺球蛋白载体溶液;

c.称取4.0 mg上述的柔红霉素衍生物,0-8℃下溶解于400 μl上述缓冲溶液F中,制成柔红霉素衍生物溶液F;

d.当上述柔红霉素衍生物溶液F刚变澄清时,将其逐滴加入上述牛甲状腺球蛋白载体溶液中,然后将此混合溶液在-18～-2℃下搅拌7小时;

e.将反应结束后的上述混合溶液用上述缓冲溶液F进行透析,透析后所得溶液即为柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液,在柔红霉素牛甲状腺球蛋白免疫原溶液中加入质量分数0.15%的硫柳汞,于-20℃下储存。

[0051] 实施例8.柔红霉素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。

[0052] 表4. 奥林巴斯AU480全自动生化分析仪反应参数

项目名称	柔红霉素
R1试剂	200μl
R2试剂	50μl
样本量	10μl
定标方法	终点法
主波长	570nm
次波长	412nm
反应时间	10分钟
温育时间	8分钟
反应方向	下降
结果	ng/ml
结果精度	0.01
拟合方法	logit-log(5p)
校准品浓度	0ng/ml、200ng/ml、400ng/ml、800ng/ml、1600ng/ml、3200ng/ml

2. 质控实验:

将柔红霉素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柔红霉素的健康人血浆中,至终浓度分别为0.00、300.00、1200.00、3000.00ng/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柔红霉素的含量,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。

[0053] 表5. 柔红霉素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	300.00	1200.00	3000.00

测试1	0.00	312.63	1202.15	3016.60
测试2	0.00	304.87	1235.93	3024.53
测试3	0.00	309.91	1213.26	2982.79
测试4	0.00	290.02	1206.01	3038.64
测试5	0.00	303.38	1196.83	3099.31
测试6	0.00	294.09	1187.95	2950.75
测试7	0.00	310.22	1223.78	2973.77
测试8	0.00	301.78	1205.92	2990.84
测试9	0.00	298.34	1190.08	3037.05
测试10	0.00	303.96	1217.53	3026.98
平均值(ng/ml)	0.00	302.92	1207.94	3014.13
标准差(SD)	/	7.21	15.05	41.94
精密度(CV%)	/	2.38	1.25	1.39
回收率(%)	/	100.97	100.66	100.47

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

[0054] 以上述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。

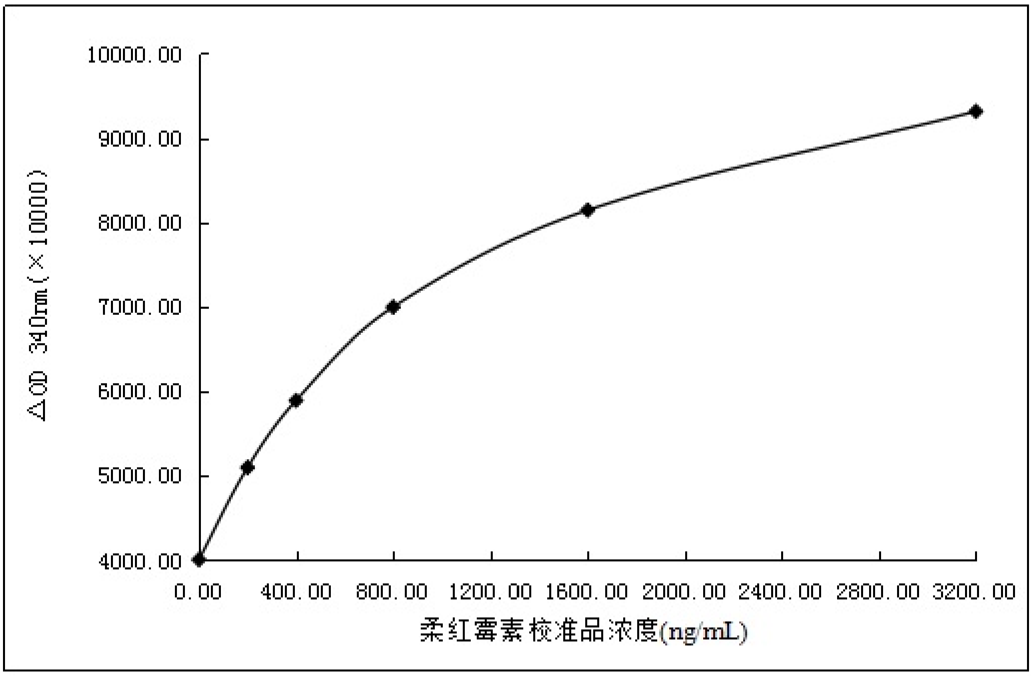

10000.00
9000.00
8000.00
7000.00
6000.00
5000.00
4000.00
ΔOD 340nm(×10000)
0.00 400.00 800.00 1200.00 1600.00 2000.00 2400.00 2800.00 3200.00
柔红霉素校准品浓度(ng/mL)

图1

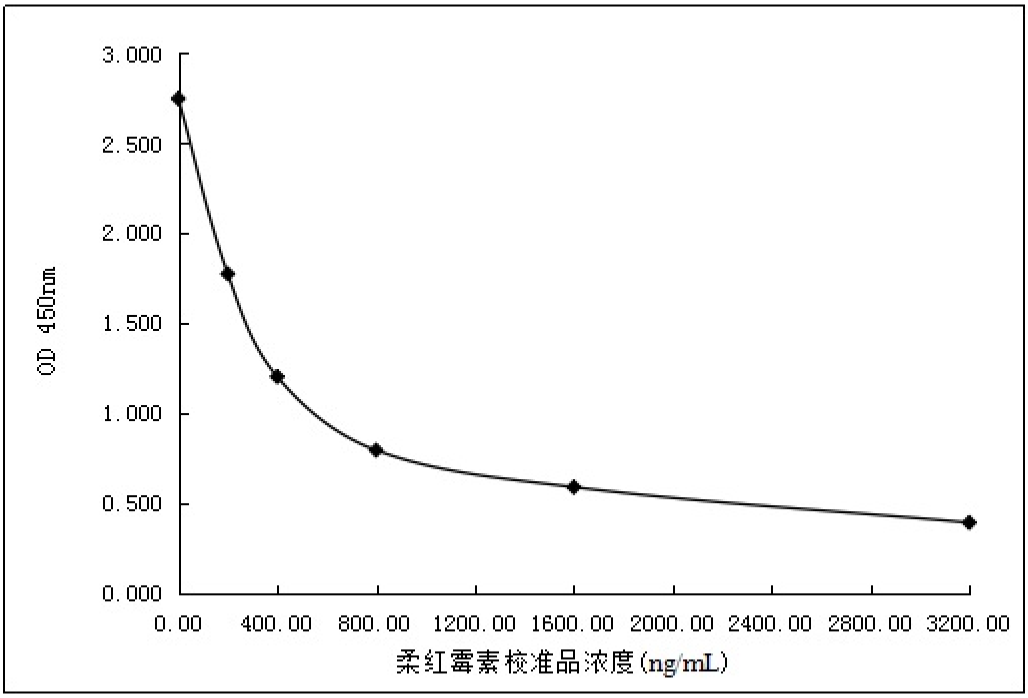

3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
OD 450nm
0.00 400.00 800.00 1200.00 1600.00 2000.00 2400.00 2800.00 3200.00
柔红霉素校准品浓度(ng/mL)

图2

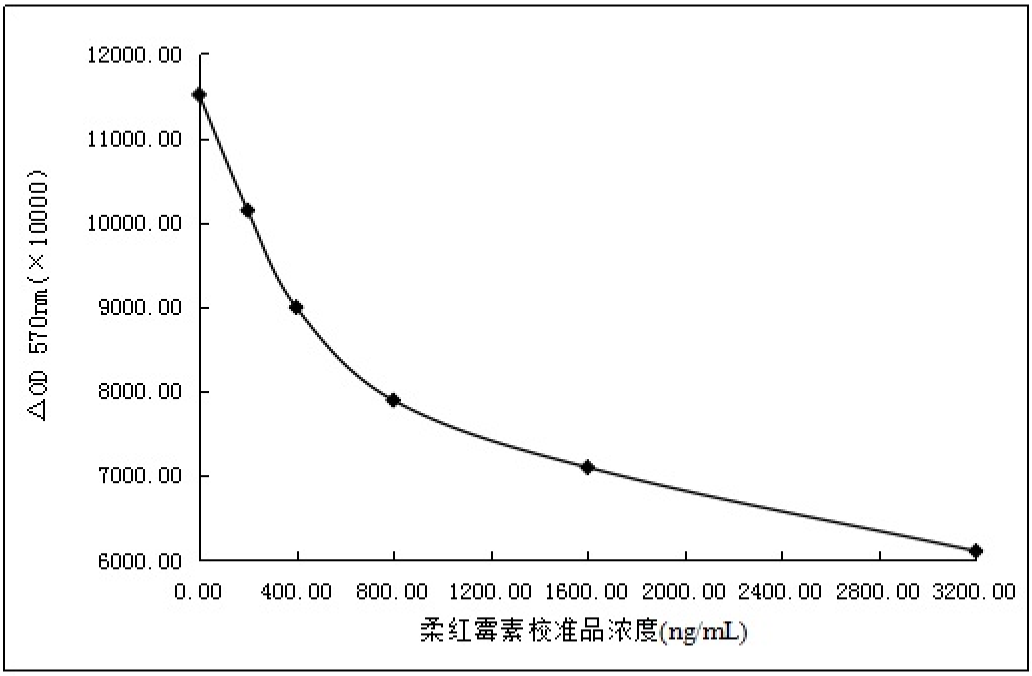
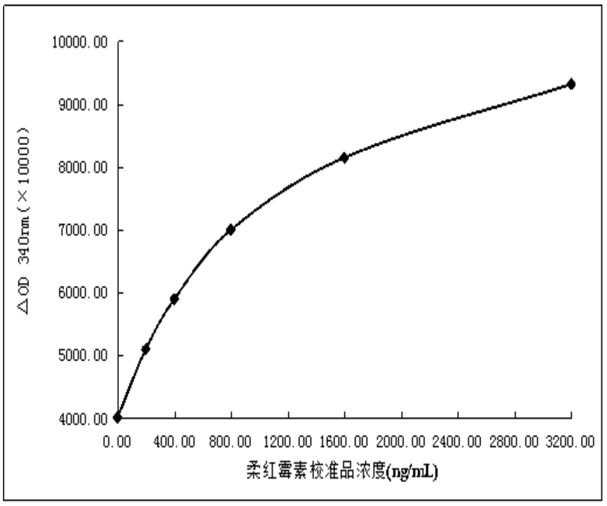

12000.00
11000.00
10000.00
9000.00
8000.00
7000.00
6000.00
ΔOD 570nm(×10000)
0.00
400.00
800.00
1200.00
1600.00
2000.00
2400.00
2800.00
3200.00
柔红霉素校准品浓度(ng/mL)

图3

patsnap

专利名称(译)	一种柔红霉素衍生物及其制备方法与柔红霉素检测试剂

公开(公告)号	CN111018924A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911316831.9	申请日	2019-12-19
[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	C07H1/00 C07H15/252 C07K14/795 C12N9/04 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	C07B2200/07 C07H1/00 C07H15/252 C07K14/795 C07K16/44 C12N9/0006 C12Y101/01049 G01N33/53 G01N33/531		
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柔红霉素含量检测的柔红霉素衍生物及其制备方法。使用该柔红霉素衍生物获得了3种高免疫原性的柔红霉素免疫原与相应的3种抗柔红霉素特异性抗体以及3种柔红霉素酶标偶联物，并制备出了3种灵敏度高、特异性强、检测效果好的柔红霉素免疫学检验试剂。本发明还提供了3种柔红霉素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种柔红霉素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柔红霉素含量进行定量检测。克服了现有技术中柔红霉素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。