



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102636637 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201210125533. 3

(22) 申请日 2012. 04. 26

(73) 专利权人 嘉兴九七九生物技术有限公司

地址 314300 浙江省嘉兴市海盐县武原街道
盐北路 211 号西区 2 幢 105 室

(72) 发明人 虞留明 田军 袁红霞 孟雷
蔡江丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102323414 A, 2012. 01. 18, 说明书第
37-40 段, 第 44-50 段、54 段、80 段、表五.

EP 1054258 A1, 2000. 11. 22, 全文.

CN 102253215 A, 2011. 11. 23, 全文.

Paul R. Finley, et al.. Assay of
Phenytoin: Adaptation of "EMIT" to
the Centrifugal analyzer. 《CLINICAL

CHEMISTRY》. 1976, 第 22 卷 (第 6 期), 第 912
页-913 页.

周智善. 苯妥英戊酸牛血清白蛋白免疫原的
合成. 《上海第一医学院学报》. 1982, 第 9 卷 (第
1 期), 第 63 页.

苏薇等. 酶联免疫吸附实验测定血清苯妥英
钠浓度. 《中国医学科学院学报》. 2000, 第 22 卷
(第 1 期), 第 94 页.

审查员 贾静

权利要求书5页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

苯妥因检测方法

(57) 摘要

本发明公开了两种苯妥因的检测方法, 包括
以下步骤: 将待测样本与抗苯妥因特异性抗体接
触; 根据待测样本中的物质与抗体的结合情况,
判断样本中苯妥因的含量, 其中抗苯妥因特异性
抗体由苯妥因免疫原免疫动物得到。本发明的两
种检测方法, 特异性高, 可以准确地测定苯妥因
的含量, 为苯妥因的临床药物浓度实时监测提供
了依据。

1. 一种苯妥因 (5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione) 的均相酶免疫检测方法, 使用苯妥因的均相酶免疫检验试剂, 包括以下操作步骤:

(1) 采用全自动生化分析仪, 将待测样本与苯妥因检测试剂分别放入样本仓和试剂仓;

(2) 按照下表进行检测项目参数设置;

检测方法	样本 体积(μl)	试剂 R1/R2(μl)	定标 类型	波长 1st/2nd(nm)	测光点
2 point rate	2-20	70-150/70-150	Logit-4p	340/405	8-34

(3) 测定 OD340nm 的吸光值;

(4) 制作标准曲线来定量样本中的苯妥因浓度;

所述的检测试剂由 R1 试剂和 R2 试剂组成, 其制备方法如下:

R1 试剂的制备:

将抗苯妥因特异性抗体稀释到 R1 缓冲液中, 均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM 葡萄糖-6-磷酸 (Glucose-6-phosphate, G-6-P) 和 50mM 烟碱腺嘌呤二核苷酸, 抗苯妥因特异性抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 4000;

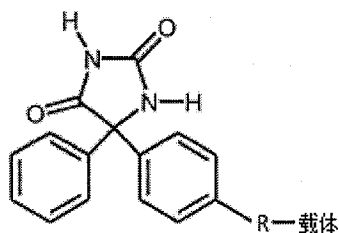
R2 试剂的制备:

a. 酶标偶联物的制备: 酶为 β -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 将酶磷酸盐缓冲液与活化的结构式 (III) 的苯妥因衍生物通过三丁胺法进行交联得到酶-苯妥因偶联物,

b. 将制备好的酶-苯妥因偶联物稀释到 R2 缓冲液中, R2 缓冲液含有 100mM Tris, 0.25% BSA; 抗苯妥因特异性抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 4000;

所述抗苯妥因特异性抗体由苯妥因免疫原免疫动物后生产得到,

所述的苯妥因免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:

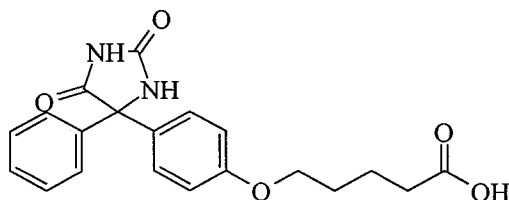


式(I)

式中, R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$, 载体为牛血清蛋白 (BSA);

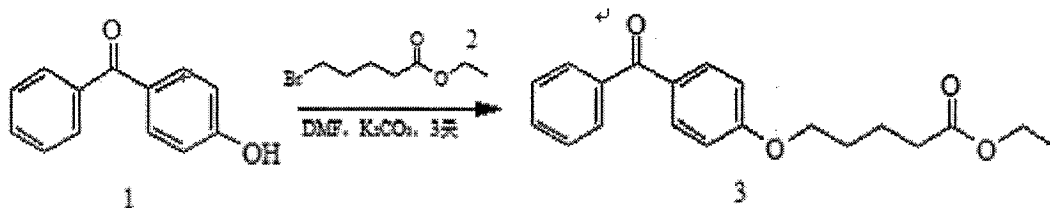
苯妥因免疫原合成方法如下:

A. 苯妥因衍生物的合成: 其化学结构如式 (III) 所示,



式 (III)

(一) 合成化合物 3



- 1) 准确称取 5.3g 的羟基二苯酮 (化合物 1) 和 1.9g 无水碳酸钾, 将这两个化合物加入长颈瓶中;
- 2) 加入 150mL DMF, 超声 15min 溶解化合物,
- 3) 加入 6.5g 5-溴戊酸乙酯 (化合物 2), 在 55℃ 下搅拌 72h,
- 4) 将溶液降至室温后过滤, 用 5mL DMF 溶解反应物, 真空干燥,
- 5) 用 150mL 浓碳酸氢钠溶液溶解残留物, 经 150mL EtOAc 萃取, 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥,
- 6) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 最后得到白色固体化合物 3;

(二) 合成化合物 4



- 1) 称取 5.0g 化合物 3 至 100mL 甲醇中, 加入 80mL 2M NaOH 溶液, 液体逐渐由澄清的无色溶液变为白色沉淀,
- 2) 继续加入 2M NaOH 溶液至溶液重新变为澄清的无色溶液, 室温快速搅拌过夜,
- 3) 将该混合溶液浓缩, 加 150mL 水溶解白色固体, 用 80mL 甲基叔丁基醚洗涤两次,
- 4) 将该混合溶液浓缩并用 4M 盐酸酸化至水层 pH 值为 2-3, 用 100mL EtOAc 萃取两次,
- 5) 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥, 获得油状粗提化合物,
- 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体化合物 4,

(三) 苯妥因衍生物的合成:

- 1) 把下列材料加入到一个不锈钢的压热器中: 3.0g 化合物 4, 0.8g KCN, 6.0g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5mL 水, 35mL DMF,
- 2) 加热至 120℃ 并保温 120h,
- 3) 降温至室温, 用 100mL 2.5M NaOH 溶解混合体, 用 80mL 乙醚洗涤两次,
- 4) 将该混合溶液用 6N 盐酸酸化至水层 pH 值为 4-5, 用 100mL EtOAc 萃取两次,

5) 用盐水洗涤有机合成物,干燥,浓缩后获得油状粗提化合物,

6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物,最后得到白色固体的苯妥因衍生物;

B. 苯妥因免疫原的合成,其结构式如式(I)所示,具体的合成方法如下:

1) 将 200mg BSA 溶解于 50ml 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液中;

2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg 合成的苯妥因衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)、50mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS),将这些化学品在室温下搅拌溶解,反应 30min;

3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中,并在 2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到苯妥因免疫原。

2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其中所述操作步骤(2)还可以通过以下方案实现:

检测方法	样本 体积(μl)	试剂 R1/R2(μl)	定标 类型	波长 1st/2nd(nm)	测光点
2 point rate	2-10	75-100/75-100	Logit-4p	340/405	10-20

3. 一种苯妥因的 ELISA 检测方法,使用苯妥因 ELISA 检验试剂,该检测试剂含有:(1)抗苯妥因特异性抗体;(2)酶标偶联物及底物,包括以下操作步骤:

(1) 用 PBS 将抗苯妥因特异性抗体稀释成 1:1000-1:20000 的终浓度溶液,100 μL/孔包被在 96 孔酶联板上,4℃放置 12-24h;

(2) 用 PBS 洗涤 3 次后,加入 200 μL/孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4℃封闭 8-12h, PBS 洗涤 3 次;

(3) 加入 20 μL/孔的标准品;

(4) 加入 100 μL/孔工作浓度的苯妥因酶标偶联物;

(5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

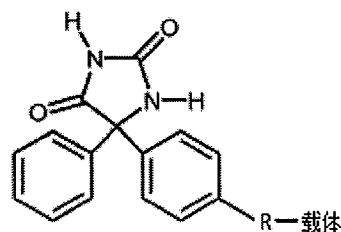
(6) 每孔加入 100 μL TMB, 室温孵育 30min;

(7) 每孔加入 100 μL, 2M 硫酸;

(8) 测定 450nm 的吸光值;

所述抗苯妥因特异性抗体由苯妥因免疫原免疫动物后生产得到,

所述的苯妥因免疫原,其结构式如式(I)所示:

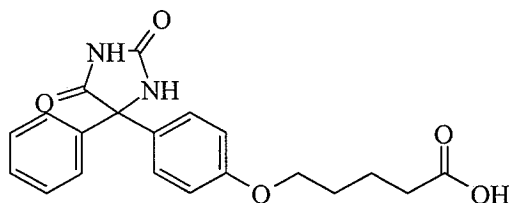


式(I)

式中, R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$, 载体为牛血清蛋白,

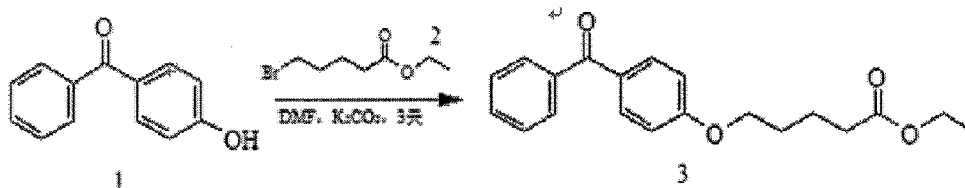
苯妥因免疫原合成方法如下：

A. 苯妥因衍生物的合成：其化学结构如式 (III) 所示，



式 (III)

(一) 合成化合物 3



- 1) 准确称取 5.3g 的羟基二苯酮 (化合物 1) 和 1.9g 无水碳酸钾, 将这两个化合物加入长颈瓶中；
 - 2) 加入 150mL DMF, 超声 15min 溶解化合物,
 - 3) 加入 6.5g 5-溴戊酸乙酯 (化合物 2), 在 55℃ 下搅拌 72h,
 - 4) 将溶液降至室温后过滤, 用 5mL DMF 溶解反应物, 真空干燥,
 - 5) 用 150mL 浓碳酸氢钠溶液溶解残留物, 经 150mL EtOAc 萃取, 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥,
 - 6) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 最后得到白色固体化合物 3；
- (二) 合成化合物 4



- 1) 称取 5.0g 化合物 3 至 100ml 甲醇中, 加入 80mL 2M NaOH 溶液, 液体逐渐由澄清的无色溶液变为白色沉淀,
 - 2) 继续加入 2M NaOH 溶液至溶液重新变为澄清的无色溶液, 室温快速搅拌过夜,
 - 3) 将该混合溶液浓缩, 加 150mL 水溶解白色固体, 用 80mL 甲基叔丁基醚洗涤两次,
 - 4) 将该混合溶液浓缩并用 4M 盐酸酸化至水层 pH 值为 2-3, 用 100mL EtOAc 萃取两次,
 - 5) 得到的有机相加入硫酸钠进行干燥, 获得油状粗提化合物,
 - 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体化合物 4；
- (三) 苯妥因衍生物的合成：

- 1) 把下列材料加入到一个不锈钢的压热器中：3.0g 化合物 4, 0.8g KCN, 6.0g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5mL 水, 35mL dmf,
- 2) 加热至 120℃ 并保温 120h,

- 3) 降温至室温,用 100mL 2.5M NaOH 溶解混合体,用 80mL 乙醚洗涤两次,
 - 4) 将该混合溶液用 6N 盐酸酸化至水层 pH 值为 4-5,用 100mL EtOAc 萃取两次,
 - 5) 用盐水洗涤有机合成物,干燥,浓缩后获得油状粗提化合物,
 - 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物,最后得到白色固体的苯妥因衍生物;
- B. 苯妥因免疫原的合成,其结构式如式 (I) 所示,具体的合成方法如下:

- 1) 将 200mg BSA 溶解于 50ml 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液中,

2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg 合成的苯妥因衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (EDAC)、50mg N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS),将这些化学品在室温下搅拌溶解,反应 30min,

3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中,并在 2~8℃下搅拌过夜,得到抗原,将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到苯妥因免疫原;

酶标偶联物的酶是辣根过氧化物酶,底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB),所述的酶标偶联物由以下制备方法得到:

- a) 称取酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/ml;

b) 用有机溶剂溶解连接有 R 连接基团的苯妥因衍生物,终浓度为 1-50mg/ml,通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经透析纯化后得到苯妥因酶标偶联物,所述的有机溶剂为 DMF。

4. 根据权利要求 3 所述的检测方法,所述操作步骤 (1) 为用 PBS 将抗苯妥因特异性抗体稀释成 1:2000-1:10000 的终浓度溶液,100L/孔包被在 96 孔酶联板上,4℃过夜。

5. 根据权利要求 1 或 3 所述的检测方法,其中所述的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的检测方法,其中所述的抗体为多克隆抗体;所述的动物选自家兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马中的一种。

7. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其中所述的动物为家兔。

8. 根据权利要求 2 或 6 所述的检测方法,其特征在于待测样本为生理样本。

9. 根据权利要求 8 所述的检测方法,其特征在于生理样本为血液样本或者尿液样本。

苯妥因检测方法

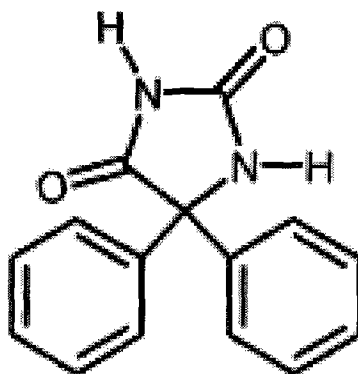
技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及两种苯妥因检测方法,包括苯妥因均相酶免疫测定法与苯妥因酶联免疫吸附测定法。

背景技术

[0002] 苯妥因 (5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione),其结构式如式 (II) 所示。

[0003]



[0004] 式 (II)

[0005] 苯妥因是一种抗癫痫药物、癫痫是一种常见的神经系统疾病,也是我国神经系统疾病中仅次于脑血管疾病的第二大顽症。目前,抗癫痫类药物仍然是控制癫痫发作的主要手段。传统的抗癫痫类药物苯妥因由于治疗窗窄、个体差异大、疗效和毒性反应与血药浓度密切相关,临床医生仅凭经验给药往往达不到有效血药浓度。因此,苯妥因血药浓度的监测对癫痫的诊断和治疗具有重要的临床指导意义。

[0006] 利用抗苯妥因特异性抗体建立的免疫检验方法已经运用于病人血液中苯妥因的跟踪和监测。现有的抗苯妥因特异性抗体都是利用与苯妥因咪唑啉环上其中一个氨基偶联的免疫原而获得的 (即苯妥因通过其氨基基团与载体蛋白进行偶联) (美国专利号 5306617,美国专利号 5747352)。但是通过这种衍生方法制备的抗体使咪唑啉环不能够充分体现其整体免疫性,本发明获得的抗体,以及利用此抗体开发的检测方法特异性强,灵敏度高,能够用于各种样品中苯妥因浓度的检测。

发明内容

[0007] 本发明就是为了克服现有技术存在的缺陷,采用苯妥因全新衍生物制备出的特异性抗体的免疫试剂及检测方法弥补了上述这些缺点。

[0008] 本发明的目的之一在于提供一种苯妥因的均相酶免疫检测方法 (Homogeneous Immunoassay)。

[0009] 本发明的再一个目的是提供一种苯妥因的酶联免疫吸附剂检测方法 (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA)。

[0010] 本发明提供的两种苯妥因检测方法操作方便、特异性强、灵敏度高,克服了现有技

术存在的检测苯妥因方法特异性不强、灵敏度不高的缺陷。本发明是通过以下技术方案实现的：

[0011] 一种苯妥因的均相酶免疫检验方法，使用苯妥因的均相酶免疫检验试剂，该检测试剂由抗苯妥因特异性抗体和苯妥因酶标偶联物组成，包括以下操作步骤：

[0012] (1) 采用全自动生化分析仪，将待测样本与苯妥因均相酶免疫检验试剂分别放入样本仓和试剂仓；

[0013] (2) 按照表 1 进行检测项目参数设置；

[0014] 表 1 苯妥因均相酶免疫检验参数设置表

[0015]

检测方法	样本 体积(μl)	试剂 R1/R2(μl)	定标 类型	波长 1st/2nd(nm)	测光点
2 point rate	2-20	70-150/70-150	Logit-4p	340/405	8-34

[0016] (3) 测定 OD_{340nm} 的吸光值；

[0017] (4) 制作标准曲线来定量样本中的苯妥因浓度。

[0018] 以上操作 (2) 步骤还可以通过以下优选方案进行：

[0019] 苯妥因均相酶免疫检验参数设置表

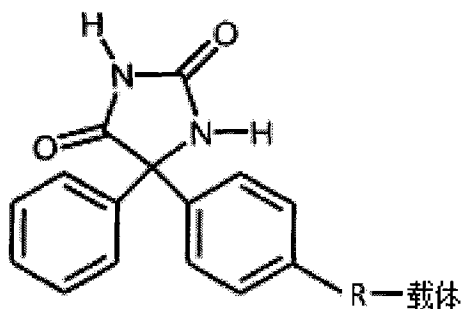
[0020]

检测方法	样本 体积(μl)	试剂 R1/R2(μl)	定标 类型	波长 1st/2nd(nm)	测光点
2 point rate	2-10	75-100/75-100	Logit-4p	340/405	10-20

[0021] 所述抗苯妥因特异性抗体由苯妥因免疫原免疫动物后生产得到。

[0022] 所述的苯妥因免疫原，结构式如 (I) 所示：

[0023]



[0024] 式 (I)

[0025] 式中, R 为连接基团, 载体具有免疫原性。

[0026] R 可以为 $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$ 或 $-NH-(CH_2)_n-COO-$ 等, n 是 1 至 20 之间的整数。优选 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 值为 1 至 10。更优选 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

[0027] 载体为具有免疫原性的物质, 常选用蛋白质。优选为血清蛋白, 血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。更优选为牛血清蛋白。

[0028] 当 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 时, 该苯妥因免疫原的合成途径和方法如下:

[0029] 1. 苯妥因衍生物的合成

[0030] (1) 用 50-200ml 有机溶剂 A 溶解 1.0-10.0g 的羟基二苯酮和 1.0-5.0g 的碳酸盐, 得到溶液 1; 将 1.0-10.0g 的 5-溴戊酸乙酯加入到溶液 1 中, 反应完成后用 5-20ml 的有机溶剂 A 溶解反应物, 经有机溶剂 B 萃取、干燥、浓缩得到白色固体状化学物 3。

[0031] (2) 用 50-200ml 有机溶剂 C 溶解 1.0-10.0g 的化学物 3, 加入强碱溶液反应, 得到白色固体; 将此白色固体经有机溶剂 C 萃取、无机酸溶液酸化、干燥、浓缩、纯化等步骤得到白色固体状化学物 4。

[0032] (3) 用 10-50ml 的有机溶剂 A 溶解下列化合物: 1.0-5.0g 化学物 4, 0.1-2.0g 氰化钾, 1.0-10.0g 碳酸铵和 1-10ml 水。经加热反应得到的物质用强碱溶液溶解, 经无机酸中和、有机溶剂 B 萃取、干燥、浓缩和纯化等步骤得到白色固体的苯妥因衍生物。

[0033] 2. 载体溶液的制备: 将具有免疫原性的蛋白质 100-300mg 溶于 10-100ml 的 0.2M, pH 8.5 磷酸盐缓冲液中。

[0034] 3. 苯妥因衍生物的活化及免疫原的合成: 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的苯妥因衍生物, 通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide, EDAC) 的方法^[1]进行活化并与载体溶液进行交联反应, 经透析纯化后得到具有免疫原性的苯妥因免疫原。

[0035] 上述方法中所述的有机溶剂 A 为二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺 (N,N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇, 优选 DMF; 所述的有机溶剂 B 为: 乙酸乙酯 (Ethyl acetate, EtOAc), 乙醚或氯仿, 优选乙酸乙酯; 所述的有机溶剂 C 为: 乙酸乙酯, 乙醚, 甲基叔丁基醚 (Methyl tertbutyl ether) 或氯仿, 优选甲基叔丁基醚; 所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液, 优选盐酸溶液, 所述强碱溶液为氢氧化钠溶液或氢氧化钾溶液。

[0036] 当 R 为 $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$ 或 $-NH-(CH_2)_n-COO-$ 等时, 苯妥因免疫原的合成途径与 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 时基本相同。

[0037] 抗苯妥因特异性抗体的制备方法:

[0038] (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的苯妥因免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL;

[0039] (2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射获得抗体, 注射后抽取动物特异性抗血清, 得到有效的抗体。

[0040] 上述方法中, 优选用磷酸盐缓冲液将苯妥因免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。

[0041] 本发明中所指的“抗体”不仅仅指完整的抗体分子, 也包括保留完整抗体特异性结合能力的抗体片断或者衍生物。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体, 优选为多克隆抗体。

[0042] 本发明的抗体可以通过现有技术制备得到。获得多克隆抗体的典型方法是使用单一的免疫原,在加或者不加佐剂后,在动物的一个或者多个部位进行免疫,宿主动物包括:兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马。优选地,上述宿主动物为家兔。动物定时采血得到适量的特异抗血清,抗血清可以纯化。单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0043] 本发明苯妥因均相酶免疫检验方法中所用的苯妥因检验试剂中的苯妥因酶标偶联物的制备方法如下:

[0044] (3) 酶溶液制备:称取酶,选自 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G6PDH),优选 G6PDH,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/mL;

[0045] (4) 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成:用有机溶剂溶解上文所述的 6-MMP 衍生物,使其终浓度为 10-50mg/mL,通过三丁胺法^[3](Wong, Jameson. Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation. 2nd edition, 368-369 中记载的方法)进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到苯妥因酶标偶联物。

[0046] 上述制备方法中所述的有机溶剂选自 DMF、DMSO、甲醇或乙醇。优选地,有机溶剂为 DMF。

[0047] 本发明苯妥因的均相酶免疫检测方法中所用的苯妥因检测试剂制备方法如下:

[0048] 1. R1 试剂的制备

[0049] 将上述抗苯妥因特异性抗体稀释到 R1 缓冲液中,均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM 葡萄糖-6-磷酸(Glucose-6-phosphate, G-6-P)和 50mM 烟碱腺嘌呤二核苷酸。抗苯妥因特异性抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 10000。优选抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 4000。

[0050] 2. R2 试剂的制备

[0051] (1) 酶标偶联物的制备:酶可以是 β -半乳糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH)等。将酶磷酸盐缓冲液与活化的苯妥因衍生物通过三丁胺法(tributylamine)^[2]进行交联得到酶-苯妥因偶联物。优选酶标偶联物的酶为 G6PDH,

[0052] (2) 将制备好的酶-苯妥因偶联物稀释到 R2 缓冲液中。R2 缓冲液为 100mM Tris, 0.25% BSA。抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 10000。优选抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 4000。

[0053] 本发明苯妥因均相酶免疫检测方法通过全自动生化分析仪,加入样品,再加入 R1 试剂(抗体与 R1 缓冲液的混合液),最后加入 R2 试剂(酶-苯妥因偶联物与 R2 缓冲液的混合液),测定不同时间点的 OD₃₄₀ 吸光值,计算不同浓度标准品的反应速率。实际操作过程中需要不断调整 R1 试剂和 R2 试剂的比例,得到较理想的反应标准曲线。通过样本的 OD 值,并根据标准曲线中反应速率与标准品浓度的关系式得到样本的浓度值。

[0054] 该检测方法是一种竞争性反应,反应体系中与抗体结合的苯妥因和游离的苯妥因不需要通过固相来分离,其基本原理是:液体样本中游离的苯妥因与偶联在 G6PDH 上的苯妥因衍生物对特异性抗体的结合位点进行竞争。液体样本中的苯妥因竞争性的取代与抗体结合的苯妥因酶偶联物,并使其从抗体的结合位点上释放出来,从而使酶恢复活性。因此,液体样本中苯妥因的含量越多,游离的苯妥因衍生物-G6PDH 酶偶联物就越多,从而能得到

更强的信号。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中苯妥因的浓度。

[0055] 本发明还提供一种苯妥因的 ELISA 检测方法,使用苯妥因 ELISA 检测试剂,该检测试剂由抗苯妥因特异性抗体、苯妥因酶标偶联物和酶底物组成,包括以下步骤:

[0056] (1) 用 PBS 将抗苯妥因抗体稀释成 1 : 1000-1 : 20000 的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在 96 孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C 放置 12-24h ;

[0057] (2) 用 PBS 洗涤 3 次后,加入 200 μ L/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}$ C 封闭 8-12h,PBS 洗涤 3 次 ;

[0058] (3) 加入 20 μ L/ 孔的标准品 ;

[0059] (4) 加入 100 μ L/ 孔工作浓度的苯妥因酶标偶联物 ;

[0060] (5) 室温下孵育 30min,PBS 洗板 5 次 ;

[0061] (6) 每孔加入 100 μ L 底物,优选 TMB 底物,室温孵育 30min。

[0062] (7) 每孔加入 100 μ L 终止液 (2M 硫酸)。

[0063] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0064] 以上操作步骤 (1) 中优选用 PBS 将抗苯妥因抗体稀释成 1 : 2000-1 : 10000 的终浓度溶液,100 μ L/ 孔包被在 96 孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C 过夜。

[0065] 本发明所述的苯妥因 ELISA 检测试剂含有 :

[0066] (1) 上述的抗苯妥因特异性抗体

[0067] (2) 苯妥因酶标偶联物及酶底物

[0068] 其中苯妥因酶标偶联物的制备方法如下 :

[0069] (1) 称取酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/mL,优选终浓度为 3-5mg/mL ;

[0070] (2) 苯妥因衍生物的活化及偶联物的合成 :用有机溶剂溶解苯妥因衍生物,终浓度为 1-50mg/mL,优选浓度为 1-20mg/mL。通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经透析纯化后得到苯妥因酶标偶联物。

[0071] 上述酶标偶联物的酶可以是辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase,HRP) 或碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP),优选为 HRP。

[0072] 上述底物为对应酶的底物。优选为 TMB。

[0073] 上述有机溶剂为 DMF、DMSO、甲醇或乙醇。优选地,有机溶剂为 DMF。

[0074] 该检测方法是一种常规的固相竞争性 ELISA 反应。液体样本中苯妥因的含量越多,与固相支持物上的抗体结合的苯妥因-酶偶联物就越少,显色越浅。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的苯妥因浓度。其基本原理是 :液体样本中游离的苯妥因与 HRP 标记的苯妥因衍生物对包被在固相支持物上的特异性抗体的结合位点进行竞争,通过洗涤去掉未结合的分子,再加入 HRP 酶的底物进行显色反应。液体样本中苯妥因的含量越多,与固相支持物上的抗体结合的苯妥因衍生物-HRP 酶偶联物就越少,显色越浅。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的苯妥因浓度。

附图说明

[0075] 图 1 是苯妥因固相酶免疫反应定标曲线

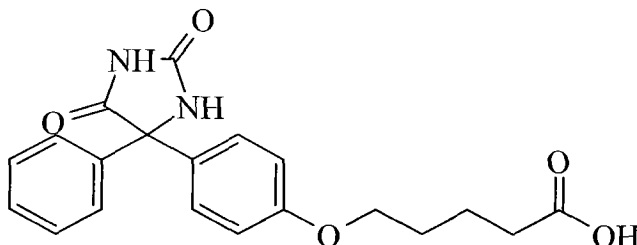
[0076] 图 2 是苯妥因 ELISA 检测反应定标曲线

具体实施方式

[0077] 实施例 1 苯妥因免疫原的合成

[0078] 以下实施例中使用的苯妥因衍生物化学结构如式 (III) 所示。

[0079]

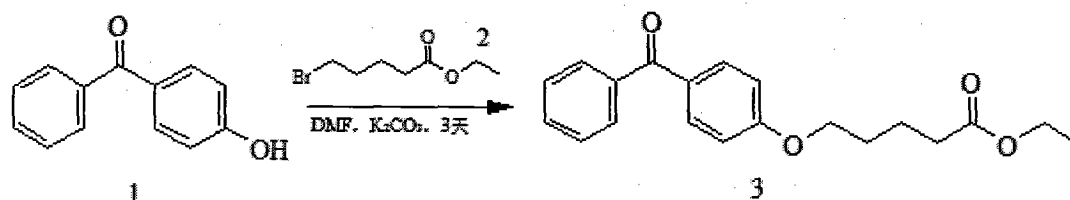


[0080] 式 (III)

[0081] 1. 苯妥因衍生物的合成, 其化学结构式如式 (III) 所示

[0082] (1) 合成化学物 3

[0083]



[0084] 1) 准确称取 5.3g, 26.6mmol 的化合物 1 (羟基二苯酮) 和 1.9g, 14mmol 无水碳酸钾 (K_2CO_3), 将这两个化合物加入长颈瓶中。

[0085] 2) 加入 150mL DMF, 超声 15min 溶解化合物。

[0086] 3) 加入 6.5g, 31.2mmol 化学物 2 (5-溴戊酸乙酯), 在 55℃ 下搅拌 72h。

[0087] 4) 将溶液降至室温后过滤, 用 5mL DMF 溶解反应物, 真空干燥。

[0088] 5) 用 150mL 浓碳酸氢钠 ($NaHCO_3$) 溶液溶解残留物, 经 150mL EtOAc 萃取, 得到的有机相加入硫酸钠 (Na_2SO_4) 进行干燥。

[0089] 6) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化, 最后得到白色固体化学物 3 (7.8g, 80%)。

[0090] (2) 合成化学物 4

[0091]



[0092] 1) 称取 5.0g, 15mmol 化学物 3 至 100mL 甲醇 (MeOH) 中, 加入 80mL 2MNaOH 溶液, 液体逐渐由澄清的无色溶液变为白色沉淀。

[0093] 2) 继续加入 2M NaOH 溶液至溶液重新变为澄清的无色溶液, 室温快速搅拌过夜。

[0094] 3) 将该混合溶液浓缩, 加 150mL 水溶解白色固体, 用 80mL 甲基叔丁基醚 (Methyl tertbutyl ether) 洗涤两次。

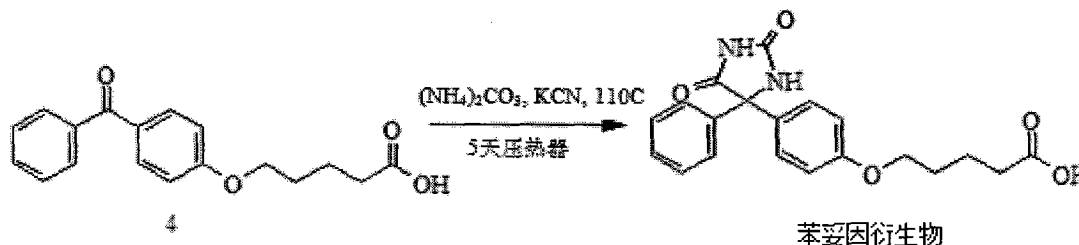
[0095] 4) 将该混合溶液浓缩并用 4M 盐酸 (HCl) 酸化至水层 pH 值为 2-3。用 100mL EtOAc 萃取两次。

[0096] 5) 得到的有机相加入硫酸钠 (Na_2SO_4) 进行干燥, 获得油状粗提化合物。

[0097] 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体化学物 4 (4.5g, 92%)。

[0098] (3) 苯妥因衍生物的合成:

[0099]



[0100] 1) 把下列材料加入到一个不锈钢的压热器中: 3.0g 10mmol 化学物 4, 0.8g 12mmol KCN, 6.0g 30mmol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 5mL 水, 35mL DMF。

[0101] 2) 加热至 120°C 并保温 120h。

[0102] 3) 降温至室温, 用 100mL 2.5M NaOH 溶解混合体, 用 80mL 乙醚 (ether) 洗涤两次。

[0103] 4) 将该混合溶液用 6N 盐酸 (HCl) 酸化至水层 pH 值为 4-5。用 100mL EtOAc 萃取两次。

[0104] 5) 用盐水洗涤有机合成物, 干燥, 浓缩后获得油状粗提化合物。

[0105] 6) 用硅胶键合柱进行快速层析纯化粗提化合物, 最后得到白色固体的苯妥因衍生物 (1.2g)。LCMS 结果显示: 纯度为 99.65%, 分子量 368, 分子离子为 367 (M-1)。

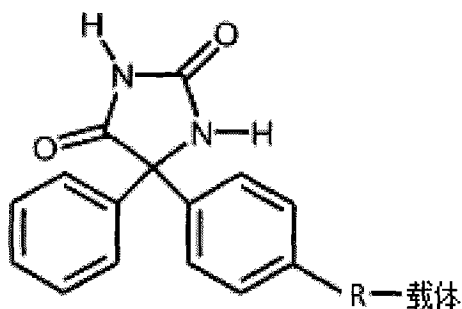
[0106] 7) 采用质谱和核磁对得到的衍生物进行分析鉴定。

[0107] 利用色谱/质谱技术 (LC/MS) 对得到的衍生物进行分析鉴定, 仪器为安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 系列, 离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为: Welchrom XB-C18 (50×4.6mm, 5μm), 柱温为 30°C, 流速为 1.5mL/min, 流动相为乙腈-水比例为 5%-60%。

[0108] LCMS 结果显示: 纯度为 99.65%, 保留时间为 3.65min, 分子量 368, 分子离子为 367 (M-1)。利用 Bruker Avance III plus 400MHz 对该苯妥因衍生物进行核磁共振光谱扫描, 内标采用 TMS。结果如下: NMR (400MHz, 6d-DMSO): 1.63-1.72 (4H, m), 2.25-2.29 (2H, m), 3.94-3.97 (2H, m), 6.93-6.96 (2H, m), 7.22-7.25 (2H, m), 7.33-7.39 (5H, m), 9.23 (1H, s), 11.04 (1H, s), 12.04 (1H, s)。表征为式 (III) 的苯妥因衍生物。

[0109] 苯妥因免疫原的合成, 其结构式如式 (I) 所示:

[0110]



[0111] 式 (I)

[0112] 苯妥因免疫原由血清蛋白, 血蓝蛋白和甲状腺球蛋白与苯妥因通过 $-O-(CH_2)_4-COOH$ 基团连接而成, 以牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 为例, 具体的合成方法如下:

[0113] (1) 将 200mg BSA 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0114] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 合成的苯妥因衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mgEDAC、50mg N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 将这些化学品在室温下搅拌溶解, 反应 30min;

[0115] (3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析进行纯化, 得到苯妥因免疫原。

[0116] 实施例 2 抗苯妥因特异性抗体的制备

[0117] (1) 用 PBS 将合成的苯妥因免疫原稀释至 1.5mg/ml, 得到抗原溶液, 然后用抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对家兔进行注射;

[0118] (2) $2 \sim 3$ 周后, 再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合后对家兔注射一次, 之后每隔四周一次, 共两次, 抽取家兔的抗血清, 获得有效的抗体。

[0119] 实施例 3 一种苯妥因的均相酶免疫检验

[0120] 1. 均相酶免疫检验试剂制备

[0121] (1) R1 试剂的制备

[0122] 将制备好的抗体稀释到 R1 缓冲液中, 均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM G-6-P 和 50mM NAD。抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 2000。

[0123] (2) R2 试剂的制备

[0124] 1) G6PDH-苯妥因的制备

[0125] a) 称取 15mg G6PDH, 溶解于 12ml, 0.05M Tris 缓冲液中, 依次加入 100mg NADH、0.5ml 卡必醇和 1ml 的 DMF 混匀;

[0126] b) 将 10mg 的苯妥因衍生物溶解于 $420 \mu\text{l}$ DMSO 和 $180 \mu\text{l}$ DMF 中, 加入 $6 \mu\text{l}$ 三丁胺和 $3 \mu\text{l}$ 氯甲酸异酯, 在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下搅拌反应 30min;

[0127] c) 随后在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下搅拌过夜, 并将得到的 G6PDH-苯妥因进行纯化。

[0128] 2) 将制备好的 G6PDH-苯妥因稀释到 R2 缓冲液中。R2 缓冲液为 100mM Tris, 0.25% BSA。抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 3000。

[0129] 2. 苯妥因均相酶免疫检验及定标结果

[0130] 表 1 日立 7180 分析仪苯妥因均相酶免疫检验参数表

[0131]

检测 方法	样本 体积(μ l)	试剂 R1/R2(μ l)	定标 类型	波长 1st/2nd(nm)	测光点
2 point rate	5	100/100	Logit-4p	340/405	10-20

[0132] 通过全自动生化分析仪,按照表 1 数据进行参数设置。首先加入样品,再加入 R1 试剂(抗体与 R1 缓冲液的混合液),最后加入 R2 试剂(G6PDH-苯妥因偶联物与 R2 缓冲液的混合液),测定不同时间点的 OD340 吸光值,计算不同浓度标准品的吸光度变化率,得到较理想的反应标准曲线,结果如图 1 所示。

[0133] 实施例 4 一种苯妥因 ELISA 检验方法及试剂

[0134] 1. 苯妥因 ELISA 检验试剂

[0135] (1) 含有抗苯妥因特异性抗体

[0136] (2) 含有 HRP-苯妥因偶联物及底物

[0137] 酶标偶联物的制备方法:

[0138] a) 称取 20mg HRP 在室温条件下溶解于 5ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0139] b) 活化苯妥因衍生物:称取 10mg 苯妥因衍生物于小烧杯中,并依次加入 350 μ L DMF、350 μ L 无水乙醇、700 μ L 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、20mg EDAC 和 3mg Sulfo-NHS,在室温条件下搅拌反应 30min;

[0140] c) 随后将活化的苯妥因衍生物滴加到 HRP 酶溶液中,在 2-8℃ 条件下搅拌过夜,并将偶联的抗原进行透析纯化得到苯妥因-HRP 酶标偶联物。

[0141] 2. 苯妥因 ELISA 检验方法及定标结果

[0142] (1) 苯妥因 ELISA 检验方法步骤

[0143] 1) 用 PBS 将抗苯妥因抗体稀释成 1 : 10000 的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在 96 孔酶联板上,4℃ 过夜;

[0144] 2) 用 PBS 洗涤 3 次后,加入 200 μ L/孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4℃ 封闭过夜,PBS 洗涤 3 次;

[0145] 3) 加入 20 μ L/孔的标准品;

[0146] 4) 加入 100 μ L/孔工作浓度的 HRP-苯妥因偶联物;

[0147] 5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

[0148] 6) 每孔加入 100 μ L TMB 底物,室温孵育 30min。

[0149] 7) 每孔加入 100 μ L 终止液(2M 硫酸)。

[0150] 8) 测定 450nm 的吸光值。

[0151] (2) 定标结果如图 2 所示。

[0152] 实施例 5 应用苯妥因均相酶检测试剂进行血清中苯妥因的回收试验

[0153] 该回收实验的目的是确定所述的苯妥因均相酶免疫检测方法可以用于血清样本中苯妥因的检测。

[0154] 1. 通过苯妥因的均相酶免疫检验的定标曲线,重复测定空白、低、中、高浓度血清(将苯妥因粉末(购买于Sigma)溶解于甲醇溶液,制成 1mg/mL 的储存液,再将此储存液稀释于空白血清中,至终浓度分别为 0.00, 2.50, 10.00, 40.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 次,结果样品的回收率高($> 95\%$))。

[0155] 2. 测定方法:如实施例 3 中的苯妥因的均相酶免疫方法所述,结果见表 2。

[0156] 表 2 苯妥因的均相酶免疫检验回收率实验

[0157]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.00	2.50	10.00	40.00
测试 1	0.00	2.62	10.30	41.32
测试 2	0.00	2.45	10.2	38.89.
测试 3	0.00	2.47	10.80	39.51
平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.00	2.51	10.43	39.91
标准差 ($\mu\text{g/mL}$)	0.00	0.09	0.32	1.26
CV(%)	—	4.00	3.00	3.00
回收率(%)	—	101	104	100

[0158] 该实验结果显示:不同浓度的样品中的苯妥因回收率高,均 $> 95\%$,说明所述的苯妥因均相酶免疫检测方法可以用于血清样本中苯妥因的检测,并且结果准确,可信。

[0159] 实施例 6 应用苯妥因 ELISA 检测进行血清中苯妥因的回收试验

[0160] 该回收实验的目的是确定所述的苯妥因 ELISA 检测方法可以用于血清样本中苯妥因的检测。

[0161] 1. 通过苯妥因的 ELISA 检验的定标曲线,重复测定空白、低、中、高浓度血清(将苯妥因粉末(购买于Sigma)溶解于甲醇溶液,制成 1mg/mL 的储存液,再将此储存液稀释于空白血清中,至终浓度分别为 0.00, 2.50, 10.00, 40.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 次,结果样品的回收率高($> 90\%$))。

[0162] 2. 测定方法:如实施例 4 中的苯妥因的 ELISA 方法所述,结果见表 3。

[0163] 表 3 苯妥因的 ELISA 检测回收实验

[0164]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.00	2.50	10.00	40.00
测试 1	0.10	2.56	11.90	43.30

测试 2	0.07	2.97	8.24	46.42
测试 3	0.08	2.78	8.12	39.33
平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	0.08	2.77	9.42	43.01
回收率 (%)	—	111	94.2	108

[0165] 该实验结果显示：不同浓度的样品中的苯妥因回收率高，均 $>90\%$ ，说明所述的苯妥因 ELISA 酶免疫检测方法可以用于血清样本中苯妥因的检测，并且结果准确，可信。

[0166] 参考文献

[0167] [1]Hermanson. Bioconjugate techniques. 2nd edition, 215-221.

[0168] [2]Wong, Jameson. Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation. 2nd edition, 368-369

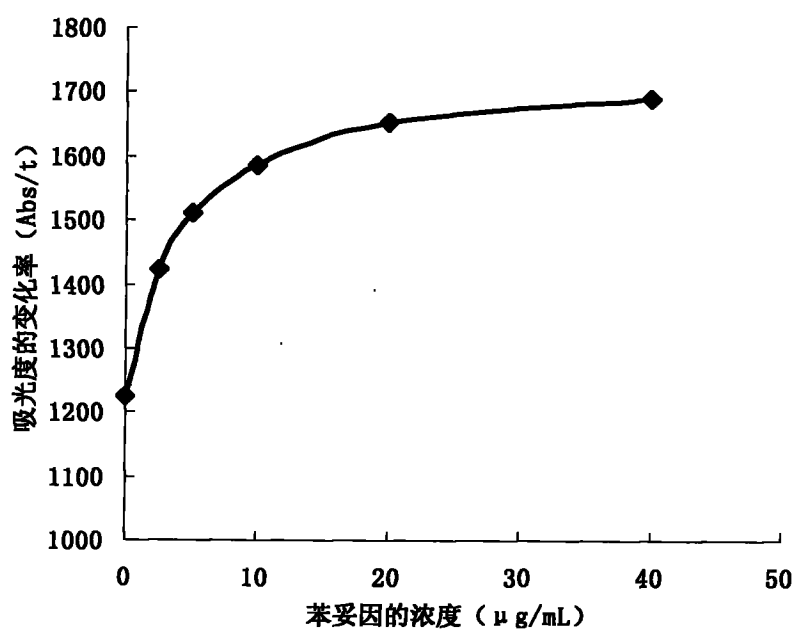


图 1

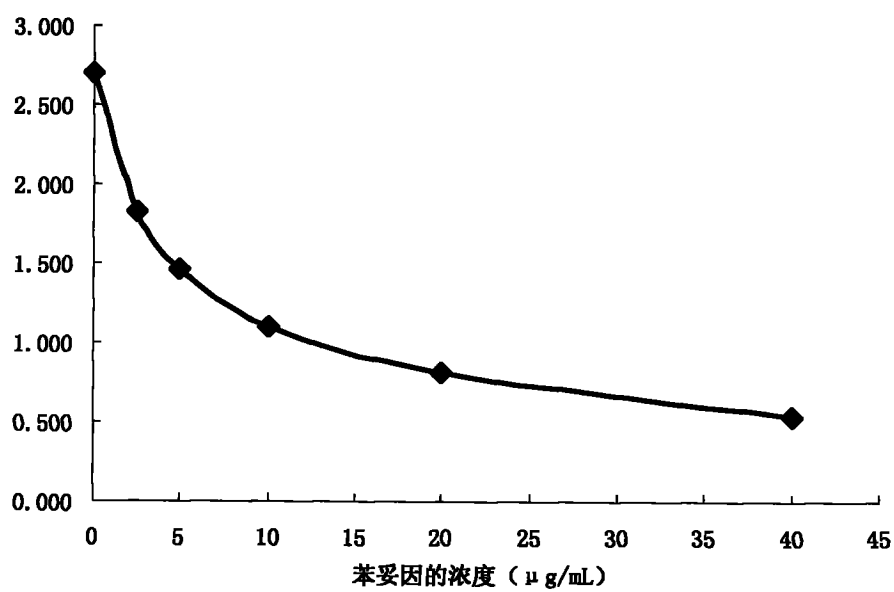


图 2

专利名称(译)	苯妥因检测方法		
公开(公告)号	CN102636637B	公开(公告)日	2014-07-09
申请号	CN201210125533.3	申请日	2012-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	嘉兴九七九生物技术有限公司		
[标]发明人	虞留明 田军 袁红霞 孟雷 蔡江丽		
发明人	虞留明 田军 袁红霞 孟雷 蔡江丽		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/531		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN102636637A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了两种苯妥因的检测方法，包括以下步骤：将待测样本与抗苯妥因特异性抗体接触；根据待测样本中的物质与抗体的结合情况，判断样本中苯妥因的含量，其中抗苯妥因特异性抗体由苯妥因免疫原免疫动物得到。本发明的两种检测方法，特异性高，可以准确地测定苯妥因的含量，为苯妥因的临床药物浓度实时监测提供了依据。

