



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802367 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201710319411.0

(22)申请日 2017.05.04

(71)申请人 南开大学

地址 300350 天津市津南区海河教育园区
同砚路38号南开大学

(72)发明人 郝日沫 董亚庆 刘玮 尹永梅
孟萌 王玉芬 宋兆瑞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

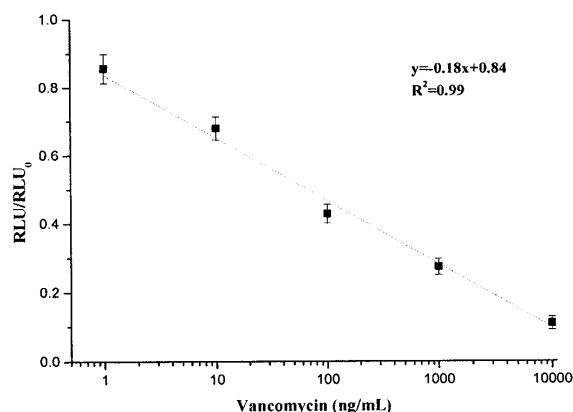
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒

(57)摘要

本发明公布了一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒,属于酶联免疫吸附分析技术领域。所述的试剂盒中的组分包括:包被有万古霉素包被抗原的化学发光板;万古霉素特异性抗体;酶标二抗;万古霉素标准品溶液;磷酸盐缓冲液;洗涤液;底物显色液。本发明的化学发光酶联免疫试剂盒利用万古霉素多克隆抗体进行免疫检测,灵敏度 $IC_{50}=143.94ng/mL$,在血浆中回收率为93.92~106.90%之间,变异系数小于15.07%。本发明的化学发光酶联免疫试剂盒检验方法简便易行,具有特异性强,灵敏度高,准确度高特点,将在临床中实时监测万古霉素血药浓度发挥重要作用。



1. 一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于该试剂盒中试剂的组成包括:

- (1) 包被有万古霉素包被抗原的化学发光板;
- (2) 万古霉素特异性抗体;
- (3) 酶标二抗;
- (4) 万古霉素标准品溶液;
- (5) 磷酸盐缓冲液;
- (6) 洗涤液;
- (7) 底物显色液。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的化学发光板中包被的万古霉素包被抗原是将万古霉素半抗原与卵清蛋白偶联得到的; 所述的万古霉素包被抗原的浓度为0.25~0.5 μ g/mL。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的万古霉素特异性抗体是由万古霉素与分子量范围在6.7KDa~6.8KDa的牛血清蛋白的偶联物作为免疫原免疫新西兰大白兔制备得到; 其中所述的生物素特异性抗体工作浓度为1:20000。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体, 工作浓度为1:10000。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的万古霉素标准品溶液的浓度依次为0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL, 1 000ng/mL, 10 000ng/mL, 100 000ng/mL。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的磷酸盐缓冲液是8g NaCl, 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2g KCl, 0.2g KH_2PO_4 溶于1000mL蒸馏水中制得的水溶液。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的洗涤液是含有体积分数0.05%吐温20的pH为7.4, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于所述的底物显色液包括显色液A, 显色液B和显色液C。显色液A为pH为8.5的对碘苯酚溶液, 显色液B为pH为8.5的

鲁米诺溶液, 显色液C为0.01% (v/v) 的双氧水溶液。使用时显色液A, B, C的使用体积比为1:1:2。

9. 根据权利要求1所述的化学发光酶联免疫试剂盒在检测血浆中万古霉素含量的应用。

一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测血浆中万古霉素含量的化学发光酶联免疫检测试剂盒，属于药品的检测分析技术领域。

背景资料

[0002] 万古霉素 (Vancomycin)，其分子量为1449.26，是通过放线菌属的东方拟无枝酸菌发酵产生，是三环糖苷化非核糖体肽的一种分支产物，属于抗生素的一种，其作用机制是抑制革兰氏阳性菌细胞壁中的磷脂和多肽的合成而使细菌无法生存，该药对耐青霉素葡萄球菌具有极强的作用效果，是对抗革兰阳性菌最有力的抗生素之一。现主要用于耐药菌感染的治疗，也用在难辨梭菌酿成的抗生素耐药性的伪膜性肠炎的治疗，及抵抗“超级细菌”的终极防线。万古霉素具有良好的抗菌效果，但其通常不作为一线药物应用，主要原因是由于其治疗窗狭窄，一般认为谷浓度高于15 $\mu\text{g/mL}$ ，峰浓度超过80 $\mu\text{g/mL}$ 为中毒范畴，会引起一定的不良反应。不良反应包括肾损害严重，耳毒性，有时伴有荨麻疹等过敏现象。

[0003] 当前用于检测万古霉素血药浓度的手段主要有高效液相色谱法，微生物分析法及免疫分析法。高效液相色谱法需要专业人士操作，操作相对繁琐耗时，而且仪器、试剂、耗材及后期维护等费用相对较高，不利于高通量监测万古霉素的血药浓度，尤其是在欠发达地区，应用受限。微生物分析法灵敏度高，但存在操作复杂、耗时长等局限性，需要进行改良，简化实验步骤，缩短实验周期。免疫分析法，包括放射性免疫分析法及荧光偏振免疫分析法。其中放射免疫分析是以放射性同位素为标记物的免疫分析方法，该法因存在放射性污染等不足而逐渐被取代。而荧光偏振免疫分析法检出限一般在0.1–10ng之间，灵敏度较其他免疫分析法较低且合成的tracer具有选择性较低等缺点。化学发光酶联免疫分析法作为一种新型有效的检测，近年来获得了迅速的发展，已广泛应用到食品，环境及药品领域当中。

[0004] 化学发光酶免疫分析法是建立在酶联免疫分析法基础上，利用化学发光强度与抗原抗体特异性反应结合而建立起来的分析方法，具有灵敏度高且及线性范围宽等优点。

基于抗原-抗体反应，省去了样品冗长而繁琐的前处理过程，更适于成分较为复杂难于分离处理的样品检测。化学发光酶免疫分析法运用到各个领域，包括医疗领域，食品安全，环保问题等。化学发光酶免疫分析法体系中一般采用的是鲁米诺-双氧水-辣根过氧化物酶 (HRP) /碱性磷酸酯酶 (ALP) 发光系统^[39]，并且采用对碘苯酚 (PIP) 作为发光增强剂。

发明内容

[0005] 本发明的目的是解决传统检测方法存在的不足，提供一种操作简便，费用低廉，灵敏度高，能够现场监控且适合大量样本筛查的，用于检测血浆中万古霉素含量的化学发光酶联免疫检测试剂盒及方法。

[0006] 本研究在获得完全抗原，制备万古霉素特异性抗体的基础上，建立了针对万古霉素的间接竞争化学发光酶联免疫分析方法，用于定量检测血浆中万古霉素的含量，结果表明该方法简便，快速，特异性强，灵敏度高。

[0007] 本发明的检测原理为：

[0008] 当在微孔条上预包被生物素包被抗原时，加入样本溶液或标准品溶液后，再加入万古霉素特异性抗体溶液，样本中的万古霉素或万古霉素标准品与微孔中包被的万古霉素包被抗原竞争万古霉素特异性抗体，加入酶标二抗进行放大作用，用显色液显色，样本发光值与样本中万古霉素的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中万古霉素的含量。

[0009] 本发明提供的万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒中的试剂组成包括：

[0010] 包被有万古霉素包被抗原的化学发光板；

[0011] 万古霉素特异性抗体；

[0012] 酶标二抗；

[0013] 万古霉素标准品溶液；

[0014] 磷酸盐缓冲液；

[0015] 洗涤液；

[0016] 底物显色液。

[0017] 其中：所述的万古霉素包被抗原是将万古霉素半抗原与卵清蛋白偶联得到的，万古霉素包被抗原的浓度为0.25~0.5 μ g/mL。

[0018] 所述的万古霉素特异性抗体是由万古霉素与分子量范围在6.7KDa~6.8KDa的牛血清蛋白的偶联物作为免疫原免疫新西兰大白兔制备得到；其中所述的生物素特异性抗体工作浓度为1:20000。

[0019] 所述的酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体，工作浓度为1:10000。

[0020] 所述的万古霉素标准品溶液的浓度依次为0ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL, 1 000ng/mL, 10 000ng/mL, 100 000ng/mL。

[0021] 所述的磷酸盐缓冲液是8g NaCl, 2.9g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.2g KCl, 0.2g KH₂PO₄溶于1000mL蒸馏水中制得的水溶液。

[0022] 所述的洗涤液是含有体积分数0.05%吐温20的pH为7.4, 0.01mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0023] 所述的底物显色液包括显色液A, 显色液B和显色液C。显色液A为pH为8.5的对碘苯酚溶液，显色液B为pH为8.5的鲁米诺溶液，显色液C为0.01% (v/v) 的双氧水溶液。使用时显色液A, B, C的使用体积比为1:1:2。

[0024] 本发明提供的化学发光酶联免疫试剂盒用于血浆中万古霉素含量的检测。

[0025] 本发明的优点和有益效果：

[0026] 本发明中检测血浆中万古霉素的化学发光酶联免疫试剂盒采用间接竞争法定性或定量检测血浆中万古霉素的含量，样品前处理过程简单，能同时检测大批样品。

[0027] 本发明采用高特异性的万古霉素多克隆抗体，检验方法简便易行，具有特异性高，灵敏度高，准确度高等特点，将在血浆中万古霉素含量的检测中发挥重要作用。

附图说明

[0028] 图1为本发明万古霉素抗体的抑制率曲线。

[0029] 图2为本发明万古霉素的化学发光酶联免疫试剂盒的工作曲线。

[0030] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。

具体实施方式

[0031] 实施例1,试剂盒关键组分的制备

[0032] 免疫原的合成

[0033] A、准确称取29.838mg的万古霉素,溶于5mL磷酸盐缓冲溶液中;

[0034] B、磁力搅拌下,滴入1mL新鲜配制的0.1mol/L的 NaIO_4 的水溶液。将反应器用锡箔纸避光,在室温条件下反应1小时,得到“a”液;

[0035] C、用5%的 K_2CO_3 溶液调节“a”液的pH值,将pH值调节至9.5;

[0036] D、准确称取40mg牛血清白蛋白(cBSA),溶解于6mL的磷酸盐缓冲溶液中,得到“b”液;

[0037] E、将“a”液缓慢逐滴滴入至“b”液中,并实时监测溶液的pH值,用5%的 K_2CO_3 调节反应液的pH在9.0左右,注意滴加速度一定要缓慢。反应在室温条件下,封闭避光反应1小时,最终得到黄色澄清溶液;

[0038] F、将所得黄色澄清溶液转移至透析袋中,于磷酸盐缓冲溶液中透析3天,再于蒸馏水中透析3天,透析过程中每6-8小时更换一次透析液,均在4℃下进行。

[0039] G、冷冻干燥所得透析产物,于-20℃冷冻封存备用。

[0040] 万古霉素宝贝抗原的合成

[0041] 将万古霉素和卵清蛋白(OVA)采用高碘酸钠氧化法进行偶联得到包被抗原,具体步骤与免疫原合成相似,仅用OVA代替BSA进行偶联。

[0042] 万古霉素特异性抗体的制备

[0043] 采用雄性新西兰大白兔作为免疫动物,以万古霉素与牛血清蛋白的偶联物为免疫原。本实验采用的微量长程免疫法,共免疫5次。因为采用研磨法将免疫原与佐剂充分混合,研磨过程中会有损耗,故免疫原与佐剂剂量同时加倍。首次免疫采用的是免疫原溶液与佐剂溶液等体积混合,即称取2mg的免疫原溶于2mL生理盐水中,之后与2mL的弗氏完全佐剂充分混合,将混合溶液注射入动物体内进行免疫(每只兔子免疫剂量为1mL,浓度为0.5mg/mL)。接下来四次免疫均为加强免疫,避免由于免疫反应过强而导致动物致死,之后三次免疫原剂量减半且免疫佐剂采用弗氏不完全佐剂,即1mg免疫原溶于2mL生理盐水中,再与2mL弗氏不完全佐剂混合(每只兔子免疫剂量为1mL,浓度为0.25mg/mL)。第五次免疫直接称取1mg免疫原溶于4mL生理盐水中来给兔子进行免疫。第五次免疫之后时隔一周,进行心脏穿刺取血。

[0044] 化学发光板的制备

[0045] 用碳酸盐缓冲液(0.05M, pH 9.6)将制备的万古霉素包被抗原稀释成0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,化学发光板每孔加入100 μL ,37℃温育2h,倾去包被液,每孔加入300 μL 洗涤液洗涤3次,拍干;然后每孔加入封闭液250 μL ,37℃温育2h,倾去孔内液体,洗涤液洗涤3次,拍干,用铝膜真空密封4℃保存。

[0046] 实施例2,化学发光酶联免疫分析方法的建立

[0047] 抗体与包被抗原浓度的优选

[0048] 采用间接竞争酶免疫分析法,筛选出最佳包被浓度与抗体稀释度。同时采用固定变量法,先后筛出最佳抗体稀释度与包被浓度。在化学发光酶免疫分析法中,首先将抗体稀

释度固定为4000,包被浓度分别为0.25 μ g/mL,0.5 μ g/mL,1 μ g/mL,2 μ g/mL,5 μ g/mL,以IC₅₀以及RLU₀/IC₅₀作为筛选最佳包被浓度的评价标准,其中RLU₀代表的是未加待测物的孔的发光值。我们选择的包被浓度应该是其所对应的IC₅₀最小,RLU₀/IC₅₀最大。由于在0.25 μ g/mL处是体系的灵敏度和信号值最大化的浓度,所以0.25 μ g/mL是最佳的包被浓度。与筛选最佳包被浓度类似,筛选最佳抗体稀释度,则需将包被原浓度固定为最佳浓度0.25 μ g/mL,变化多抗稀释度,抗体稀释度分别为4 000,10 000,20 000,40 000,其他条件保持不变,结果显示,当抗体稀释度为20 000时RLU₀/IC₅₀达最大值,且同时IC₅₀最小,选取20 000作为抗体的最佳稀释度。

[0049] 抗体灵敏度的测定

[0050] 根据上述对抗体及包被抗原浓度的优选实验,选择并确定抗体浓度为1:20000,包被抗原浓度为0.25 μ g/mL进行抗体的灵敏度的测定。

[0051] A、包被:万古霉素包被抗原0.25 μ g/mL包被化学发光板,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置2小时;

[0052] B、封闭:洗板后,用封闭溶液封闭各反应孔,每孔250 μ L,4 $^{\circ}$ C放置过夜;

[0053] C、加待测抗体:洗板后,加待测抗体(稀释度1:20000)和一系列浓度(0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1 000ng/mL,10 000ng/mL,100 000ng/mL)的万古霉素标准品溶液各50 μ L/孔,0浓度用PBS代替,37 $^{\circ}$ C放置30min;

[0054] D、加酶标二抗:洗板后,加入稀释度1:10000的酶标二抗100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置30分钟;

[0055] E、加显色底物:洗板后,每孔加入临时配制的显色底物溶液100 μ L,37 $^{\circ}$ C显色;

[0056] F、化学发光仪测定相对发光强度RLU;

[0057] G、绘制抑制率曲线:以万古霉素标准品溶液浓度(ng/mL)的对数值为X轴,吸光度比值RLU/RLU₀为Y轴,绘制抑制率曲线图。其中RLU代表的是某浓度小分子对应的发光值减去未包被的孔加入底物发光溶液之后所对应的发光值(空孔值),RLU₀代表的是小分子浓度为0ng/mL对应的发光值减去空孔值。计算药物的半数抑制率浓度(IC₅₀)即为抗体的灵敏度。

[0058] 测定结果:抗体灵敏度IC₅₀=143.94ng/mL。

[0059] 实施例3,检测万古霉素的化学发光酶联免疫试剂盒的组建

[0060] 组建检测万古霉素的化学发光酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0061] A包被有万古霉素包被抗原(万古霉素与卵清蛋白的偶联物)的固相载体(化学发光板);

[0062] B万古霉素特异性抗体工作液(体积比浓度为1:20000);

[0063] C万古霉素标准品溶液,浓度分别为:0ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1 000ng/mL,10 000ng/mL,100 000ng/mL。

[0064] 酶标二抗工作浓度为1:10000;

[0065] 磷酸盐缓冲液是8g NaCl,2.9g Na₄HPO₄·12H₂O,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄溶于1000mL蒸馏水中制得的水溶液。

[0066] 洗涤液是含有体积分数0.05%吐温20的pH为7.4,0.01mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0067] 底物显色液包括显色液A,显色液B和显色液C。显色液A为pH为8.5的对碘苯酚溶液,显色液B为pH为8.5的鲁米诺溶液,显色液C为0.01%(v/v)的双氧水溶液。

[0068] 实施例4,血浆中万古霉素含量的检测

[0069] 样品前处理

[0070] 血浆处理方式:样品于4℃,10000转/分钟离心15分钟,取上清得血浆,用盐酸盐缓冲溶液稀释100倍,得到待测样品。

[0071] 用实施3中的组建的试剂盒检测

[0072] A加样:向包被有万古霉素包被抗原的化学发光板微孔中加入万古霉素标准品溶液或样本溶液50μL,加入万古霉素抗体溶液50μL,用盖板膜封板,37℃放置30min;

[0073] B加酶标二抗:洗板后,加入稀释度1:10000的酶标二抗100μL/孔,37℃放置30分钟;

[0074] C加显色底物:洗板后,每孔加入临时配制的显色底物溶液100μL,37℃显色;

[0075] D化学发光仪测定相对发光强度RLU值。

[0076] 检测结果分析

[0077] 以万古霉素标准品溶液浓度 (ng/mL) 的对数值为X轴,吸光度比值RLU/RLU₀为Y轴,其中RLU代表的是某浓度小分子对应的发光值减去未包被的孔加入底物发光溶液之后所对应的发光值(空孔值),RLU₀代表的是小分子浓度为0ng/mL对应的发光值减去空孔值。绘制抑制率曲线图(图1)和工作曲线(图2),用同样的方法计算样品溶液的百分吸光度值,相对应每一个样品的浓度,则可从标准曲线上读出样本中万古霉素的含量。

[0078] 实施例5,试剂盒的灵敏度,精密度和准确度实验。

[0079] 向空白血浆中添加万古霉素标准品,是万古霉素在血浆中的终浓度分别为50ng/mL,100ng/mL,500ng/mL,来检测万古霉素的回收率与变异系数。每个浓度的回收率和变异系数都以不同的3天的5个重复数据进行计算,根据绘制的工作曲线(图2)线性方程进行回收率的定量计算,结果见下表。

[0080]

万古霉素 (ng/mL)	天数	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	批内 CV (%)	批间 CV (%)
50	1	46.96 ± 2.20	93.92%	4.68%	9.95%
	2	51.15 ± 4.70	102.29%	9.19%	
	3	47.68 ± 7.18	95.35%	15.07%	
100	1	100.09 ± 5.98	100.09%	5.98%	6.13%
	2	106.90 ± 4.27	106.90%	4.00%	
	3	97.80 ± 5.82	97.80%	5.95%	
500	1	506.11 ± 8.63	101.22%	1.70%	1.18%
	2	504.31 ± 7.72	100.86%	1.53%	
	3	502.91 ± 0.91	100.58%	0.18%	

[0081] 从上述测定结果看,变异系数均低于15.07%,回收率在93.92%~106.90%之间,表明本试剂盒有很好的重复性和准确度。

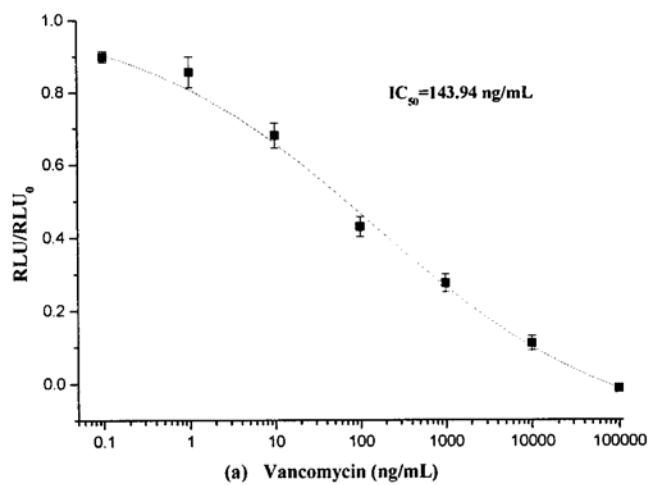


图1

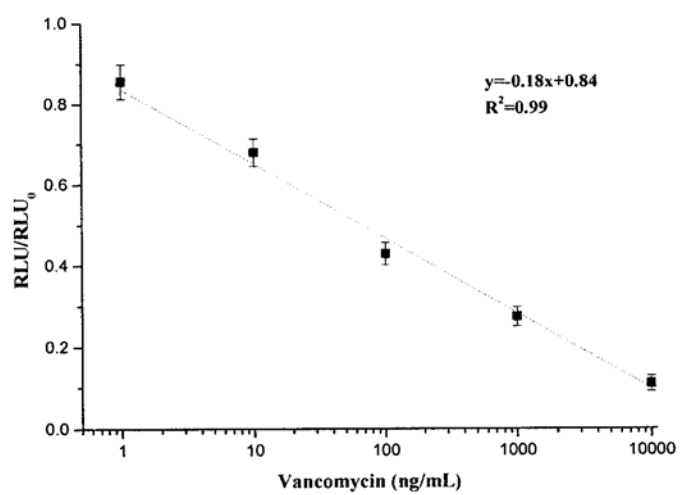


图2

专利名称(译)	一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN108802367A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN2017110319411.0	申请日	2017-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	郝日沫 董亚庆 刘玮 尹永梅 孟萌 王玉芬 宋兆瑞		
发明人	郝日沫 董亚庆 刘玮 尹永梅 孟萌 王玉芬 宋兆瑞		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公布了一种万古霉素的化学发光酶联免疫检测试剂盒，属于酶联免疫吸附分析技术领域。所述的试剂盒中的组分包括：包被有万古霉素包被抗原的化学发光板；万古霉素特异性抗体；酶标二抗；万古霉素标准品溶液；磷酸盐缓冲液；洗涤液；底物显色液。本发明的化学发光酶联免疫试剂盒利用万古霉素多克隆抗体进行免疫检测，灵敏度 $IC_{50} = 143.94 \text{ ng/mL}$ ，在血浆中回收率为93.92 ~ 106.90%之间，变异系数小于15.07%。本发明的化学发光酶联免疫试剂盒检验方法简便易行，具有特异性强，灵敏度高，准确度高等特点，将在临床中实时监测万古霉素血药浓度发挥重要作用。

