



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813691 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201811600900.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.12.26

(71)申请人 北京丹大生物技术有限公司

地址 100000 北京市通州区中关村科技园
区通州园光机电一体化产业基地嘉创
路5号1号楼301-303室

(72)发明人 许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/15(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

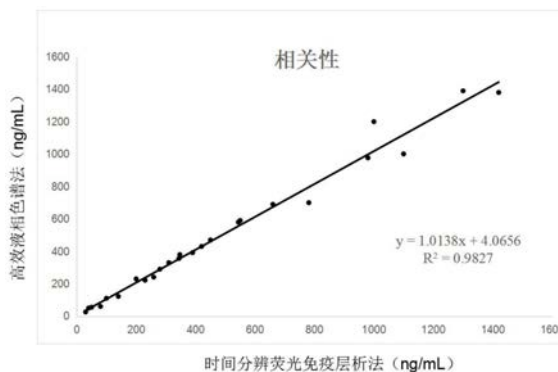
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

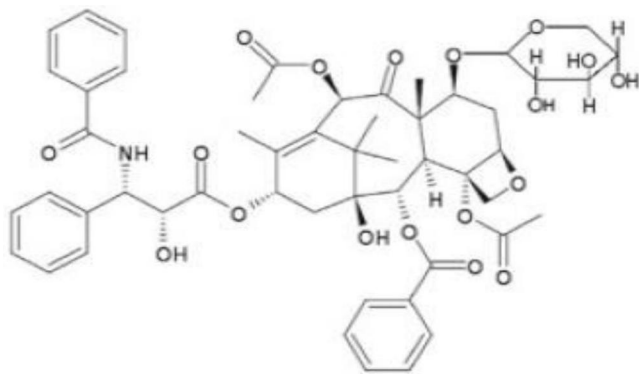
一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用,属于体外诊断试剂技术领域。本发明所述试纸条包括试纸和样品稀释液,所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫;所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体,所述结合垫上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;所述紫杉醇类药物单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物的分子结构式为式I。本发明提供的试纸条检测灵敏度高,特异性强,制作成本低,使用简单。



1. 一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 包括试纸和样品稀释液, 所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫, 其特征在于: 所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体, 所述结合垫上固定有检测区和质控区, 所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物, 所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体; 所述抗紫杉醇单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得, 所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物是由7-木糖基紫杉醇半抗原与载体蛋白偶联得到, 其分子结构式如式I所示:



式 I。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球是用聚苯乙烯包裹稀土离子 Eu^{3+} 的微球, 所述微球表面含有羧基基团。

3. 根据权利要求2所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球的直径为100~300nm。

4. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 其特征在于, 所述样本稀释液为0.008~0.012mol/L的PB缓冲液, 所述PB缓冲液的pH值为7.2~7.6, 所述PB缓冲液中含有0.15~0.25% (W/V) 的Triton x-100。

5. 权利要求1~4任意一项所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法, 包括样品吸收垫的制备方法, 荧光微球垫的制备方法, 结合垫的制备方法, 样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫、吸水垫的组装和剪切。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述样品吸收垫的制备方法包括如下步骤: 用0.08~0.12mol/L, pH值7.0~7.4的磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜1.5~3h; 37℃干燥1.5~3h; 所述磷酸盐缓冲液中含有0.4~0.6%体积份的牛血清白蛋白。

7. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述荧光微球垫的制备方法包括如下步骤:

- (1) 用荧光微球标记抗紫杉醇单克隆抗体, 得到标记抗体;
- (2) 用贮存缓冲液稀释所述标记抗体, 得到5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标记抗体稀释液;
- (3) 将所述标记抗体稀释液喷涂到玻璃纤维膜上, 喷涂量为1~6 $\mu\text{l}/\text{cm}$, 37℃干燥12~18h, 得到荧光微球垫。

8. 根据权利要求7所述的制备方法, 其特征在于, 所述贮存缓冲液为0.008~0.012mol/L的PB缓冲液, 所述PB缓冲液的pH值为7.2~7.6, 所述PB缓冲液中含有0.008~0.012% (W/V) 的 NaN_3 和0.08~0.12%的牛血清白蛋白。

9. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于, 所述结合垫的制备方法包括如下步

骤:

I, 在硝酸纤维素膜上划定检测区和质检区;

II, 用0.04~0.06mol/L, pH值7.0~7.4的PB缓冲液稀释紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物, 得到160~240 μ g/ml的偶联物稀释液; 再将所述偶联物稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的检测区, 喷涂量为1~1.5 μ L/cm;

III, 用0.04~0.06mol/L, pH值7.0~7.4的PB缓冲液稀释羊抗鼠抗抗体, 得到160~240 μ g/ml的羊抗鼠抗抗体稀释液; 再将所述羊抗鼠抗抗体稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的质控区, 喷涂量为1~1.5 μ L/cm;

IV, 将喷涂完成的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C条件下干燥4~6h, 得到结合垫;

所述步骤II和步骤III无时间顺序限定。

10. 权利要求1~4任意一项所述的时间分辨荧光免疫层析试纸条, 或者权利要求5~9任意一项所述的制备方法制备得到的时间分辨荧光免疫层析试纸条在检测紫杉醇类药物中的应用, 其特征在于, 包括如下步骤:

①用所述样品稀释液对样品进行前处理, 得到待测样品;

②用所述时间分辨荧光免疫层析试纸条对所述待测样品进行检测, 得到检测后的试纸条;

③用荧光检测分析仪分析检测后的试纸条, 得到检测结果。

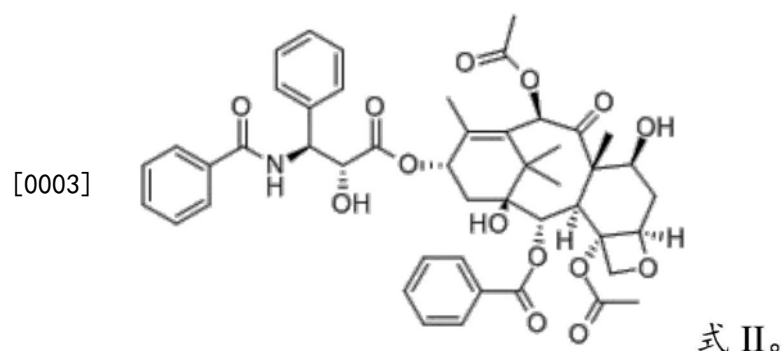
一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断试剂技术领域,具体涉及一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 紫杉醇 (Paclitaxel, PTX) 结构式如式II所示:



[0004] 紫杉醇是从红豆杉属植物中分离出来的一种三环二萜化合物,具有独特的诱导微管蛋白聚合而抑制细胞分裂的抗肿瘤机制。紫杉醇在1992年被美国食品与药物管理局 (FDA) 批准作为抗晚期癌症的新药上市,到目前为止仍然是治疗乳腺癌、子宫癌、卵巢癌等癌症的临床一线用药。由于紫杉醇的市场需求量不断增大,其成产的主要原料红豆杉又属于稀缺资源,再加上它在植物中的含量极低,因此紫杉醇医疗价值和研究价值有着很大的上升潜力。

[0005] 在临床治疗中,紫杉醇具有骨髓密度减小、过敏反应、嗜中性粒细胞减少、低血压、心动过缓、恶心和呕吐等副作用,治疗效果与其血药浓度具有高度的相关性。但由于紫杉醇的非线性药动力学特征和机体的个性化差异,使得紫杉醇疗效难以掌握,不良反应的发生也不易控制。目前,对紫杉醇药动力学的研究结果还不够统一,因此需要对紫杉醇进行血药浓度监测和个体化药动力学研究。

[0006] 目前,国内外监测紫杉醇类药物浓度的方法,有薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC), 毛细管电泳法 (Capillary Electrophoresis, CE), 高效液相色谱法 (HPLC), 生物化学法,但是这些方法都不适合临床大规模推广使用。虽然目前市场上有胶乳免疫比浊法 (Turbidimetric inhibition immuno assay, TIA) 用于测定紫杉醇,但是其灵敏度低,成本高,不能满足不断增长的临床监测需求。

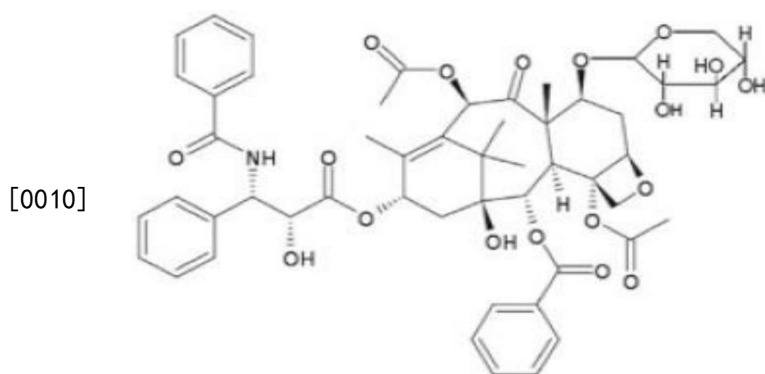
[0007] 目前市场上缺乏灵敏度高、特异性强的紫杉醇类药物检测试剂,因此研发质量高、成本低、使用简单的紫杉醇类药物检测试剂已成为临床检测的迫切需求。

发明内容

[0008] 有鉴于背景技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种检测灵敏度高、特异

性强、制作成本低且使用简单的检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0009] 本发明提供了一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括试纸和样品稀释液,所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫;所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体,所述结合垫上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;所述抗紫杉醇单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物是由7-木糖基紫杉醇半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式如式I所示:



[0011] 优选的,所述荧光微球是用聚苯乙烯包裹稀土离子 Eu^{3+} 的微球,所述微球表面含有羧基基团。

[0012] 优选的,所述荧光微球的直径为100~300nm。

[0013] 优选的,所述样本稀释液为0.008~0.012mol/L的PB缓冲液,所述PB缓冲液的pH值为7.2~7.6,所述PB缓冲液中含有0.15~0.25% (W/V) 的Triton x-100。

[0014] 本发明提供了上述的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括样品吸收垫的制备方法,荧光微球垫的制备方法,结合垫的制备方法,样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫、吸水垫的组装和剪切。

[0015] 优选的,所述样品吸收垫的制备方法包括如下步骤:用0.08~0.12mol/L, pH值7.0~7.4的磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜1.5~3h;37℃干燥1.5~3h;所述磷酸盐缓冲液中含有0.4~0.6%体积份的牛血清白蛋白。

[0016] 优选的,所述荧光微球垫的制备方法包括如下步骤:

[0017] (1) 用荧光微球标记抗紫杉醇单克隆抗体,得到标记抗体;

[0018] (2) 用贮存缓冲液稀释所述标记抗体,得到5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标记抗体稀释液;

[0019] (3) 将所述标记抗体稀释液喷涂到玻璃纤维膜上,喷涂量为1~6 $\mu\text{L}/\text{cm}$,37℃干燥12~18h,得到荧光微球垫。

[0020] 优选的,所述贮存缓冲液为0.008~0.012mol/L的PB缓冲液,所述PB缓冲液的pH值为7.2~7.6,所述PB缓冲液中含有0.008~0.012% (W/V) 的 NaN_3 和0.08~0.12%的牛血清白蛋白。

[0021] 优选的,所述结合垫的制备方法包括如下步骤:

[0022] I,在硝酸纤维素膜上划定检测区和质检区;

[0023] II,用0.04~0.06mol/L, pH值7.0~7.4的PB缓冲液稀释紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,得到160~240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的偶联物稀释液;再将所述偶联物稀释液喷涂到硝酸纤

纤维素膜的检测区,喷涂量为1~1.5 μ L/cm;

[0024] III,用0.04~0.06mol/L,pH值7.0~7.4的PB缓冲液稀释羊抗鼠抗抗体,得到160~240 μ g/ml的羊抗鼠抗抗体稀释液;再将所述羊抗鼠抗抗体稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的质控区,喷涂量为1~1.5 μ L/cm;

[0025] IV,将喷涂完成的硝酸纤维素膜置于37 $^{\circ}$ C条件下干燥4~6h,得到结合垫;

[0026] 所述步骤II和步骤III无时间顺序限定。

[0027] 本发明还提供了上述时间分辨荧光免疫层析试纸条在检测紫杉醇类药物中的应用,包括如下步骤:

[0028] ①用所述样品稀释液对样品进行前处理,得到待测样品;

[0029] ②用所述时间分辨荧光免疫层析试纸条对所述待测样品进行检测,得到检测后的试纸条;

[0030] ③用荧光检测分析仪分析检测后的试纸条,得到检测结果。

[0031] 有益效果:本发明提供了一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括试纸和样品稀释液,所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫;所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体,所述结合垫上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;所述抗紫杉醇单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物是由7-木糖基紫杉醇半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式为式I。本发明提供的试纸条容易制作,成本低廉,检测过程操作简单、迅速;所用紫杉醇免疫原特异性强、免疫原性好,制备出的紫杉醇抗体特异性强、效价高,与多种紫杉醇代谢物无交叉反应。此外,时间分辨荧光具有较大stock位移,减少了由激发光引起的特异杂散光对检测的干扰,提高荧光检测稳定性;不仅使用寿命长,还能消除环境中荧光物质对待测物的干扰;本发明提供的时间分辨荧光免疫层析试纸条在测定时激发波长较宽,发射光谱范围较窄,本底荧光强度低,分辨率高。利用本发明提供的时间分辨荧光免疫层析试纸条与高效液相色谱法分别对人血清中的紫杉醇进行测定,二者的测定结果拟合良好。

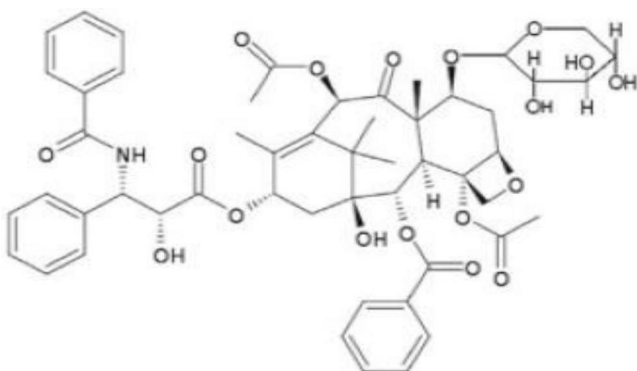
附图说明

[0032] 图1为本发明实施例4所述两种检测方法的相关性曲线图。

具体实施方式

[0033] 本发明提供了一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括试纸和样品稀释液,所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫,所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体,所述结合垫上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;所述抗紫杉醇单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物是由7-木糖基紫杉醇半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式为式I:

[0034]



式 I。

[0035] 本发明提供的试纸条包括样品稀释液。在本发明中,所述样品稀释液优选为PB缓冲液;所述PB缓冲液的浓度优选为0.008~0.012mol/L,更优选为0.01mol/L;所述PB缓冲液的pH值优选为7.2~7.6,更优选为7.4;所述PB缓冲液中优选含有Tritonx-100,所述Tritonx-100的质量体积分数(W/V)优选为0.15~0.25%,更优选为0.2%。

[0036] 本发明提供的试纸条包括试纸,所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫。

[0037] 在本发明中,所述底板优选采用PVC底板。PVC底板具有层析平稳、无荧光物质、粘合强度高的优点。

[0038] 在本发明中,所述样品吸收垫的制备方法优选包括如下步骤:用磷酸盐缓冲液浸泡玻璃纤维膜后干燥。在本发明中,所述磷酸盐缓冲液的浓度优选为0.08~0.12mol/L,更优选为0.1mol/L,所述磷酸盐缓冲液的pH值优选为7.0~7.4,更优选为7.2。所述磷酸盐缓冲液中优选含有牛血清白蛋白,所述牛血清白蛋白的体积百分比优选为0.4~0.6%,更优选为0.5%。所述浸泡的时间优选为1.5~3h,更优选为2h。所述干燥的温度优选为37℃。所述干燥的时间优选为1.5~3h,更优选为2h。

[0039] 在本发明中,所述荧光微球垫的制备方法优选包括如下步骤:

[0040] (1) 用荧光微球标记抗紫杉醇单克隆抗体,得到标记抗体;

[0041] (2) 用贮存缓冲液稀释所述标记抗体,得到5~20μg/mL的标记抗体稀释液;

[0042] (3) 将所述标记抗体稀释液喷涂到玻璃纤维膜上,喷涂量为1~6μl/cm,37℃干燥12~18h,得到荧光微球垫。

[0043] 本发明先用荧光微球标记抗紫杉醇单克隆抗体,得到标记抗体。在本发明中,所述荧光微球优选为用聚苯乙烯包裹稀土离子Eu³⁺的微球,所述微球表面含有羧基基团。所述荧光微球的直径优选为100~300nm,更优选为150~250nm。所述抗紫杉醇单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物是由7-木糖基紫杉醇半抗原与载体蛋白偶联得到,其分子结构式为式I。

[0044] 得到标记抗体后,本发明用贮存缓冲液稀释所述标记抗体,得到标记抗体稀释液。在本发明中,所述贮存缓冲液优选为PB缓冲液。所述PB缓冲液的浓度优选为0.008~0.012mol/L,更优选为0.01mol/L的PB缓冲液。所述PB缓冲液的pH值优选为7.2~7.6,更优选为7.4。所述PB缓冲液中优选含有NaN₃和牛血清白蛋白,所述NaN₃的质量体积份优选为0.008~0.012%,更优选为0.01%;所述牛血清白蛋白的体积分数优选为0.08~0.12%,更优选为0.1%。在本发明中,所述标记抗体稀释液的浓度优选为5~20μg/mL,更优选为10μg/mL。

[0045] 得到标记抗体稀释液后,本发明将所述标记抗体稀释液喷涂到玻璃纤维膜上。在本发明中,所述喷涂的量优选为 $1\sim 6\mu\text{L}/\text{cm}$,更优选为 $3\mu\text{L}/\text{cm}$ 。喷涂后干燥,所述干燥的温度优选为 37°C ,干燥的时间优选为 $12\sim 18\text{h}$,更优选为 15h 。干燥后得到荧光微球垫。

[0046] 在本发明中,所述结合垫的制备方法优选包括如下步骤:

[0047] I,在硝酸纤维素膜上划定检测区和质检区;

[0048] II,用 $0.04\sim 0.06\text{mol}/\text{L}$,pH值 $7.0\sim 7.4$ 的PB缓冲液稀释紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,得到 $160\sim 240\mu\text{g}/\text{ml}$ 的偶联物稀释液;再将所述偶联物稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的检测区,喷涂量为 $1\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$;

[0049] III,用 $0.04\sim 0.06\text{mol}/\text{L}$,pH值 $7.0\sim 7.4$ 的PB缓冲液稀释羊抗鼠抗抗体,得到 $160\sim 240\mu\text{g}/\text{ml}$ 的羊抗鼠抗抗体稀释液;再将所述羊抗鼠抗抗体稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的质检区,喷涂量为 $1\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$;

[0050] IV,将喷涂完成的硝酸纤维素膜置于 37°C 条件下干燥 $4\sim 6\text{h}$,得到结合垫;

[0051] 所述步骤II和步骤III无时间顺序限定。

[0052] 本发明先在硝酸纤维素膜上划定检测区和质检区,所述检测区喷涂紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物;所述质检区喷涂羊抗鼠抗抗体。

[0053] 本发明优选PB缓冲液稀释紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物,在本发明中,所述PB缓冲液的浓度优选为 $0.04\sim 0.06\text{mol}/\text{L}$,更优选为 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 。所述PB缓冲液的pH值优选为 $7.0\sim 7.4$,更优选为 7.2 。稀释后得到偶联物稀释液。所述偶联物稀释液的浓度优选为 $160\sim 240\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 。得到偶联物稀释液后,本发明优选将所述偶联物稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的检测区,所述喷涂的量优选为 $1\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$,更优选为 $1.2\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0054] 本发明优选PB缓冲液稀释羊抗鼠抗抗体,在本发明中,所述PB缓冲液的浓度优选为 $0.04\sim 0.06\text{mol}/\text{L}$,更优选为 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 。所述PB缓冲液的pH值优选为 $7.0\sim 7.4$,更优选为 7.2 。稀释后得到羊抗鼠抗抗体稀释液。所述羊抗鼠抗抗体稀释液的浓度优选为 $160\sim 240\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选为 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 。得到羊抗鼠抗抗体稀释液后,本发明优选将所述羊抗鼠抗抗体稀释液喷涂到硝酸纤维素膜的质检区,所述喷涂的量优选为 $1\sim 1.5\mu\text{L}/\text{cm}$,更优选为 $1.2\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0055] 本发明对所述检测区和质检区的喷涂顺序不作限定;喷涂结束后,本发明优选将喷涂完成的硝酸纤维素膜置于 37°C 条件下干燥,所述干燥的时间优选为 $4\sim 6\text{h}$,更优选为 5h 。干燥后得到结合垫。

[0056] 在本发明中,所述吸水垫优选采用纯植物纤维制备的纯白吸水纸。该吸水纸厚度适宜,吸水量大,吸水速度中等。本发明提供了上述时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,包括样品吸收垫的制备方法,荧光微球垫的制备方法,结合垫的制备方法,样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫、吸水垫的组装和剪切。在本发明中,所述样品吸收垫的制备方法、荧光微球垫的制备方法以及结合垫的制备方法参见前文。

[0057] 本发明优选在底板上依次搭接粘贴样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫,然后根据需要将粘贴完成的板材切成试纸条状。本发明对所述试纸条的宽度不作特别限定,本领域根据需要常规设置的宽度均可。

[0058] 本发明还提供了上述的时间分辨荧光免疫层析试纸条在检测紫杉醇类药物中的

应用,包括如下步骤:

[0059] ①用所述样品稀释液对样品进行前处理,得到待测样品;

[0060] ②用所述时间分辨荧光免疫层析试纸条对所述待测样品进行检测,得到检测后的试纸条;

[0061] ③用荧光检测分析仪分析检测后的试纸条,得到检测结果。

[0062] 在本发明中,所述样品稀释液的检测温度优选为20~25℃,检测时间优选为15min。测试完成后,本发明优选用仪器获得试纸条上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,基于预先内置的试纸卡上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值与紫杉醇类药物浓度的关系曲线,获得待测样品中紫杉醇类药物的含量,最后经换算即得待测样品中紫杉醇类药物的含量。若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0063] 下面结合实施例对本发明提供的一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0064] 实施例1

[0065] 1,紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物的合成和鉴定:

[0066] 紫杉醇小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答。7-木糖基紫杉醇是紫杉醇的类似物,可直接通过7-木糖基紫杉醇的邻酚羟基同载体蛋白偶联而具有免疫原性。

[0067] (1) 7-xylosyltaxol-BSA免疫原的制备:

[0068] 在1ml 10mg/mLNaIO₄溶液中,加入0.5mL溶解有5mg的7-xylosyltaxol的甲醇溶液。室温避光搅拌反应1h。将反应混合物加入至1m15mg/mL的BSA溶液(50mmol/L碳酸盐缓冲液,pH9.6)中,用1mol/L的Na₂CO₃溶液调节至pH9左右,搅拌12h,对水透析5次,-20℃保存,备用。

[0069] (2) 7-xylosyltaxol-OVA包被原的制备:

[0070] 在1ml 10mg/mLNaIO₄溶液中,加入0.5mL溶解看3mg的7-xylosyltaxol的甲醇溶液,室温避光搅拌反应1h。将反应混合物加入至1m15mg/mL的OVA溶液(50mmol/L碳酸盐缓冲液,pH9.6)中,用1mol/L的Na₂CO₃溶液调节至pH9左右,搅拌12h,对水透析5次,-20℃保存,备用。

[0071] 紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物的鉴定

[0072] 用Native SDS-PAGE电泳同时进行BSA、7-xylosyltaxol-BSA,OVA,7-xylosyltaxol-OVA四种蛋白质的分子量分析。结果显示,7-xylosyltaxol-BSA的分子量明显大于BSA,7-xylosyltaxol-OVA的分子量明显大于OVA,表明7-xylosyltaxol均已成功偶联到BSA和OVA上。

[0073] 2,紫杉醇类药物单克隆抗体的制备

[0074] 将上述制得的7-xylosyltaxol-BSA免疫原采用常规方法免疫Balb/c,加强免疫后取产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0075] 将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7~10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,-20℃保存。

[0076] 3, 荧光微球标记紫杉醇类药物单克隆抗体的制备

[0077] (1) 活化:取市售的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100uL混悬于400uL活化缓冲液中(50mmol/L MES pH6.0),加入0.5mg EDC和0.5mg NHS,混匀后室温震荡活化15min;

[0078] (2) 偶联:将(1)所述混悬液于4℃,10000r/min离心10min后弃上清,重悬于活化缓冲液中,加入20ug紫杉醇类药物单克隆抗体溶液,混匀后室温震荡偶联120min;

[0079] (3) 封闭:将(2)所述混悬液加入10%的BSA溶液100uL,混匀后室温震荡封闭过夜;

[0080] (4) 贮存:将(3)所述混悬液于4℃,10000r/min离心10min后弃上清,重悬于贮存缓冲液中(0.01%NaN₃、0.1%BSA的pH 7.4的PB缓冲液),以此法洗涤微球1次,混匀后于4℃避光保存。

[0081] (5) 玻璃纤维垫的制备

[0082] 将贮存的荧光微球标记的紫杉醇类药物单克隆抗体以贮存缓冲液稀释至10μg/mL后,用金标点膜喷金仪喷金,喷涂量为3μL/cm,37℃干燥15h,取出密封保存。

[0083] (6) 硝酸纤维素(NC)膜的制备

[0084] 用0.05mol/L、pH 7.2的PB缓冲液将紫杉醇类药物半抗原-OVA偶联物稀释到200ug/mL,用金标点膜喷金仪将其喷涂于NC膜上的检测区(T),喷膜量为1.2uL/cm;用0.05mol/L、pH7.2的PB缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200ug/mL,用金标点膜喷金仪将其喷涂于NC膜上的检测区(C),喷膜量为1.2uL/cm;37℃干燥5h,备用。

[0085] (7) 样品吸收垫的制备

[0086] 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH 7.2、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h,备用。

[0087] (8) 试纸条的组装

[0088] 将样品吸收垫、玻璃纤维垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,样品吸收垫的末端与玻璃纤维垫始端相连,玻璃纤维垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成3.96mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸条。

[0089] 实施例2

[0090] 测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条的应用

[0091] 1、样品前处理

[0092] 准确吸取20uL样本加入到180uL样本稀释液,充分混匀。

[0093] 2、用试纸条检测

[0094] 用微量移液器准确吸取80uL待检样品溶液于试纸条加样孔中,室温(20~25℃)作用15min;将试纸卡插入荧光检测仪的承载器中,通过触摸显示屏选择待检项目,按下“开始检测”按键,荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试;通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

[0095] 3、检测结果分析

[0096] 定量检测:测试完成后,仪器获得试纸卡上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值,基于预先内置的试纸卡上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值与紫杉醇类药物浓度的关系曲线,获得待测样品中紫杉醇类药物的含量,最后经换算即得待测样品中紫杉醇类药物的含量。

[0097] 无效:若质控区未检出荧光信号强度,表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

[0098] 实施例3

[0099] 按照实施例2的方法,进行交叉反应率的测定

[0100] 选择几种紫杉醇的类似物,进行干扰试验。结果见表1

[0101] 表1紫杉醇类似物干扰试验结果

[0102]

化合物名称	测试浓度	交叉反应率
Paclitaxel	100 ng/mL	100%
Docetaxel	1000 ng/mL	<1%
7-Xylosyltaxol	1000 ng/mL	<1%

[0103]

Cephalomannine	1000 ng/mL	<0.04%
Baccatin III	1000 ng/mL	<0.01%
10-Deacetyl-baccatin III	1000 ng/mL	<0.01%
1-Hydroxybaccatin I	1000 ng/mL	<0.01%
13-Acetyl-9-dihydrobaccatin III	1000 ng/mL	<0.01%
1-Acetoxy-5-deacetyl-baccatin I	1000 ng/mL	<0.01%

[0104] 表1结果表明,本发明的紫杉醇类药物检测试纸条特异性高,对多种紫杉醇类似物无交叉反应。

[0105] 实施例4

[0106] 相关性分析:按照实施例2的方法,用本发明提供的紫杉醇类药物时间分辨荧光免疫分析测定试纸条检测试纸条检测人血清中紫杉醇类药物含量。其检测结果与高效液相色谱法测定人血清中紫杉醇类药物含量的结果相比较,结果见表2。

[0107] 表2两种方法检测人血清中紫杉醇类药物含量的统计结果

[0108]

样本编号	荧光免疫层析 (ng/mL)	高效液相色谱 (ng/mL)
样品 1	30	26
样品 2	40	50
样品 3	50	55
样品 4	80	60
样品 5	100	110
样品 6	140	122
样品 7	200	230
样品 8	259	241
样品 9	280	290

[0109]

样品 10	310	330
样品 11	450	470
样品 12	230	222
样品 13	344	356
样品 14	420	430
样品 15	550	590
样品 16	660	690
样品 17	781	700
样品 18	1000	1200
样品 19	1100	1001
样品 20	980	977
样品 21	1420	1380
样品 22	1300	1390
样品 23	347	380
样品 24	390	392
样品 25	544	580

[0110] 将上述统计结果制成相关性曲线图(见图1)。根据图1显示的结果可知,本发明提供的紫杉醇类药物时间分辨荧光免疫分析测定试纸条检测人血清中紫杉醇类药物含量与高效液相色谱法测定的结果相关性很高,相关系数为 $r=0.991$,说明本发明提供的紫杉醇类药物时间分辨荧光免疫分析测定试纸条,测定结果准确可靠,满足临床的需求。

[0111] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

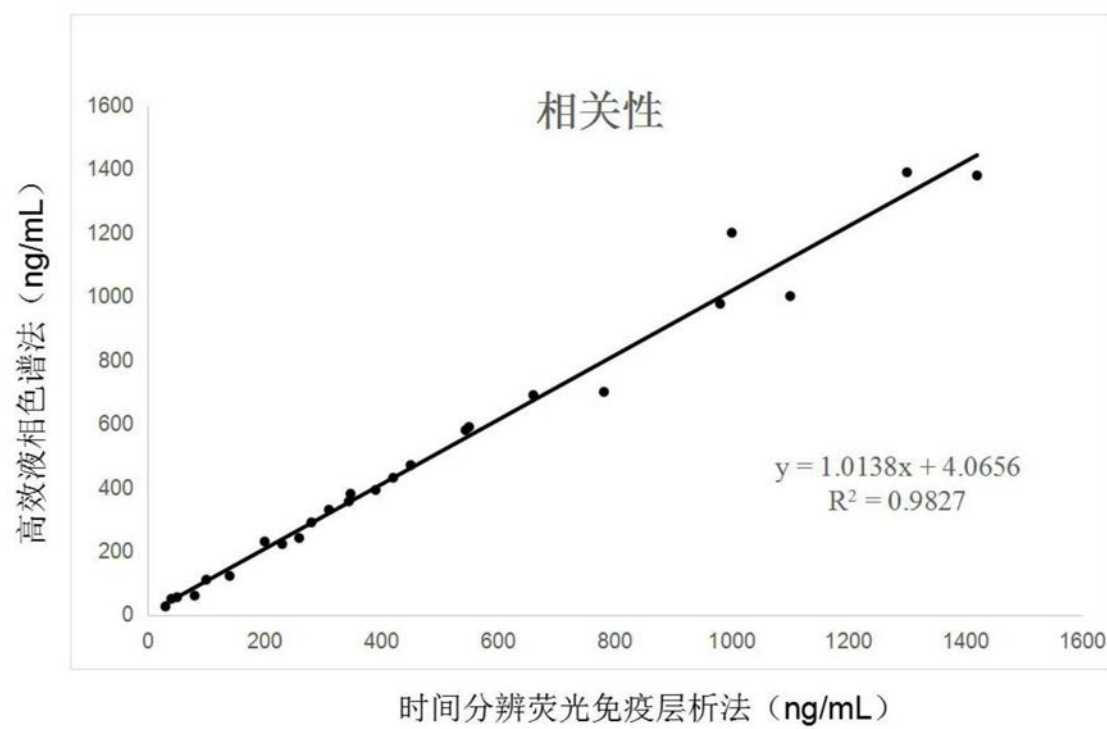


图1

专利名称(译)	一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109813691A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN201811600900.4	申请日	2018-12-26
[标]发明人	许秀丽 王艳新 周建平		
发明人	许秀丽 王艳新 常缘荣 周建平		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/577 G01N33/94 G01N21/6428 G01N21/8483 G01N33/5308 G01N33/533 G01N33/54366 G01N2407/02 G01N2458/10 G01N2800/52		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测紫杉醇类药物的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用，属于体外诊断试剂技术领域。本发明所述试纸条包括试纸和样品稀释液，所述试纸包括底板及在底板上依次搭接的样品吸收垫、荧光微球垫、结合垫和吸水垫；所述荧光微球垫喷涂有荧光微球标记的抗紫杉醇单克隆抗体，所述结合垫上固定有检测区和质控区，所述检测区喷涂有紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物，所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体；所述紫杉醇类药物单克隆抗体是以紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得，所述紫杉醇类药物半抗原-载体蛋白偶联物的分子结构式为式I。本发明提供的试纸条检测灵敏度高，特异性强，制作成本低，使用简单。

