



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110967481 A

(43)申请公布日 2020.04.07

(21)申请号 201911238579.4

(22)申请日 2019.12.06

(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 林观样 胡卢丰 周子晔 虞留明

(74)专利代理机构 北京精金石知识产权代理有
限公司 11470

代理人 刘俊玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

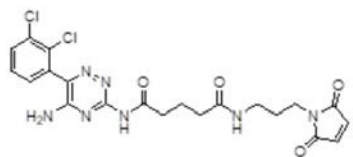
权利要求书2页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

一种拉莫三嗪衍生物、其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用

(57)摘要

本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种拉莫三嗪衍生物,其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用。所述拉莫三嗪衍生物的结构式如下述式(I)所示:

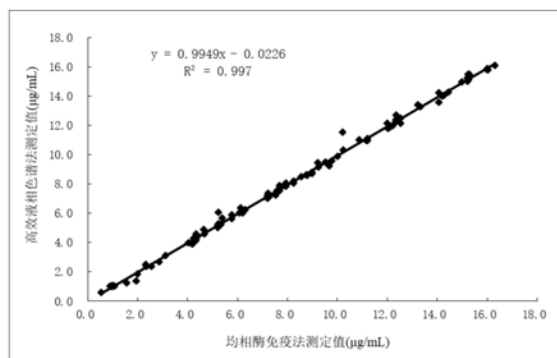


使用所述式(I)化

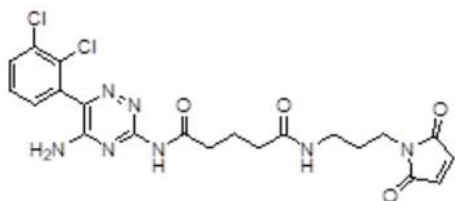
式(I)。

合物获得了高免疫原性的拉莫三嗪免疫原与相应抗体、拉莫三嗪酶标偶联物,以及拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂。该拉莫三嗪免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗拉莫三嗪抗体特异性强、效价高,制成的均相酶免疫检测试剂可以快速、准确地确定生物样品中的拉莫三嗪含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现拉莫三嗪的高通量、快速化测定,准确

度高,特异性强,精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高。

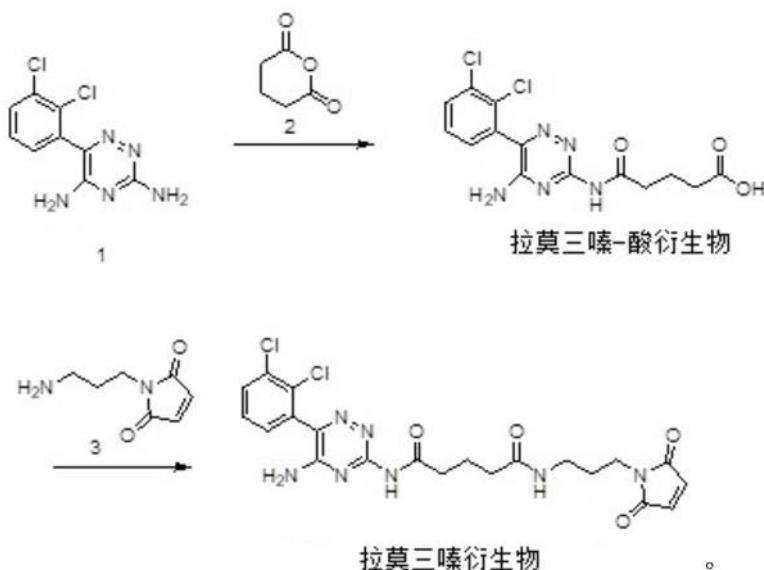


1. 一种拉莫三嗪衍生物, 其特征在于, 其结构式如下述式 (I) 所示:

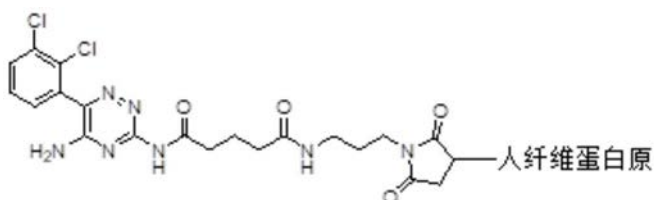


式 (I)。

2. 一种如权利要求1所述的拉莫三嗪衍生物的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法的合成路线如下:



3. 一种拉莫三嗪免疫原, 其特征在于, 由权利要求1所述的拉莫三嗪衍生物与人纤维蛋白原连接而成, 其结构式如下述式 (II) 所示:



式 (II)。

4. 一种如权利要求3所述的拉莫三嗪免疫原的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

a. 将权利要求1所述的拉莫三嗪衍生物溶解于pH为7.0-9.0的磷酸盐缓冲溶液中, 制成拉莫三嗪衍生物溶液;

b. 将人纤维蛋白原溶解于pH为7.0-9.0的磷酸盐缓冲溶液中制成载体溶液;

c. 将拉莫三嗪衍生物溶液与载体溶液混合反应完全后透析即得拉莫三嗪免疫原溶液。

5. 一种抗拉莫三嗪特异性抗体, 其特征在于, 由权利要求3所述的拉莫三嗪免疫原免疫实验动物后产生, 所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体, 所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马。

6. 一种如权利要求5所述的抗拉莫三嗪特异性抗体的制备方法, 其特征在于, 包括以下

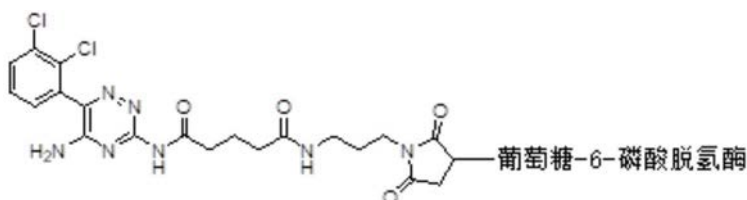
步骤:

a. 将权利要求3所述的拉莫三嗪免疫原用PBS缓冲液稀释, 得到抗原溶液, 然后将所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合后注射实验动物;

b. 1-4周后, 再用相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合后注射实验动物, 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, 得到抗拉莫三嗪特异性抗体。

7. 一种拉莫三嗪酶标偶联物, 其特征在于, 由权利要求1所述的拉莫三嗪衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成, 其结构式如下述式(III)所示:



式(III)。

8. 一种如权利要求7所述的拉莫三嗪酶标偶联物的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

a. 将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶解于pH为7.0-9.0的磷酸盐缓冲溶液中制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

b. 将权利要求1所述的拉莫三嗪衍生物溶解于pH为7.0-9.0的磷酸盐缓冲溶液中, 制成拉莫三嗪衍生物溶液;

c. 将拉莫三嗪衍生物溶液与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合反应完全后透析所得溶液即为拉莫三嗪酶标偶联物溶液。

9. 一种拉莫三嗪检测试剂, 其特征在于, 包括R1试剂和R2试剂, 所述R1试剂中包含权利要求5所述的抗拉莫三嗪特异性抗体和均相酶底物溶液, 所述均相酶底物溶液由葡萄糖-6-磷酸和Tris缓冲液配制而成; 所述R2试剂包含权利要求7所述的拉莫三嗪酶标偶联物和辅酶溶液, 所述辅酶溶液由氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液配制而成。

10. 一种如权利要求9所述的拉莫三嗪检测试剂的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

a. R1试剂的制备: 将葡萄糖-6-磷酸用Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液; 再将权利要求5所述的抗拉莫三嗪特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中, 搅拌均匀得到R1试剂, 所述抗拉莫三嗪特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:100-1:10000; 优选地, 所述抗拉莫三嗪特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:625;

b. R2试剂的制备: 将氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸用Tris缓冲液溶解制成辅酶溶液; 再将权利要求7所述的拉莫三嗪酶标偶联物加入所述辅酶溶液中, 搅拌均匀得到R2试剂, 所述拉莫三嗪酶标偶联物与辅酶溶液的体积比为1:100-1:10000; 优选地, 所述拉莫三嗪酶标偶联物与辅酶溶液的体积比为1:1875。

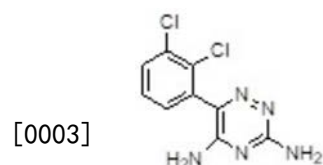
一种拉莫三嗪衍生物、其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种拉莫三嗪衍生物、其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用。

背景技术

[0002] 拉莫三嗪 (Lamotrigine) 的化学结构式如下述式 (IV) 所示:



式 (IV)。

[0004] 拉莫三嗪是一种电压性的钠离子通道阻滞剂,主要用于抗癫痫治疗,也可用于治疗合并有Lennox-Gastaut综合征的癫痫发作。药代动力学研究表明:拉莫三嗪在肠道内迅速而完全地被吸收,口服给药后在2.5小时达到血浆峰浓度,当单次最高给药剂量达450mg时,药代动力学曲线仍呈线性,稳态的最高血药浓度在个体之间差异颇大,但在同一个体浓度的差异很小,血浆蛋白结合率约为55%,分布容积为 0.92-1.22L/mg。在拉莫三嗪作为单药治疗的试验中,不良反应包括:头痛、疲倦、皮疹、恶心、头晕、嗜睡和失眠等。在标准的抗癫痫药物治疗方案中添加拉莫三嗪时,不良反应包括:复视、视力模糊、结膜炎、头昏、瞌睡、头痛、疲倦、胃肠道紊乱、攻击行为、共济失调、焦虑、精神混乱及血液学异常等。拉莫三嗪代谢物主要随尿液排出体外。因此,检测使用拉莫三嗪治疗的患者血液、尿液等生物样本中拉莫三嗪的含量能为临床个体化精准用药提供重要依据。

[0005] 目前,检测拉莫三嗪常用的方法主要有:气相色谱法、气质联用法、液相色谱法、高效液相色谱法等,这些仪器分析方法虽然灵敏度较高,检测结果精密度高、准确性好,但是存在样品的前处理较繁琐、测定时间较长、需要配备专门的仪器设备,操作流程复杂,单个样品的检测时间较长,不能快速提供检测结果等缺陷,不适用于临床上大批量样品的检验。因此,研发一种高通量、快速化、高灵敏度、结果精确、操作简便、成本低廉的拉莫三嗪检测方法具有重要意义。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是:提供一种用于生物样本中拉莫三嗪检测的拉莫三嗪衍生物及其制备方法,使用该拉莫三嗪衍生物制备出免疫原性强的拉莫三嗪免疫原,从而免疫实验动物得到高效价的抗拉莫三嗪特异性抗体;同时,使用该拉莫三嗪衍生物制备得到拉莫三嗪酶标偶联物。利用该抗体和酶标偶联物制备的拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对拉莫三嗪高通量、快速化的检测。

[0007] 均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了防止葡萄糖-6-磷酸脱氢- 半抗原酶标偶

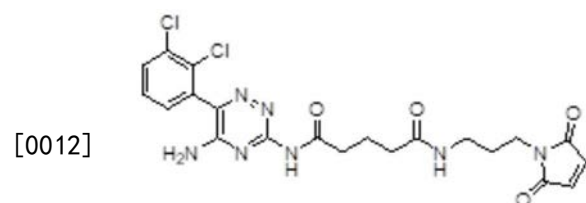
联物与酶的底物(葡萄糖-6-磷酸)及辅酶(氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)发生反应,必须将酶标偶联物与底物分开放置,不能混合。所以传统的均相酶免疫检测试剂是将底物、辅酶与半抗原特异性抗体混合在一起制成R1试剂,而将葡萄糖-6-磷酸脱氢-半抗原酶标偶联物单独加入R2试剂中的。也就是说,传统的均相酶免疫检测试剂在使用前底物与辅酶是混合在一起的。然而,如果在使用前操作者不慎将少量R2试剂混入R1试剂中,或者全自动生化分析仪运行过程中存在携带污染情况,就会使酶和底物提前发生反应,而且在底物和辅酶充足的情况下,反应会持续进行,导致底物被大量消耗,同时氧化态的辅酶会被大量还原成还原态的辅酶,从而导致检测试剂本底信号持续升高,严重影响检测结果的准确度,甚至导致试剂完全报废。

[0008] 本发明改进了传统均相酶免疫试剂的配方,将辅酶添加到R2试剂中,而R1试剂中只添加抗体与底物,不再添加辅酶,这样即使使用前有少量R2试剂混入R1试剂中,反应也会在辅酶消耗完后立刻终止。因此本发明可以有效避免试剂使用前R1试剂与R2试剂发生交叉污染导致的本底反应信号升高,避免了试剂浪费,提高了检测准确度。

[0009] 本发明的拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低拉莫三嗪检测成本,有利于临床推广使用。

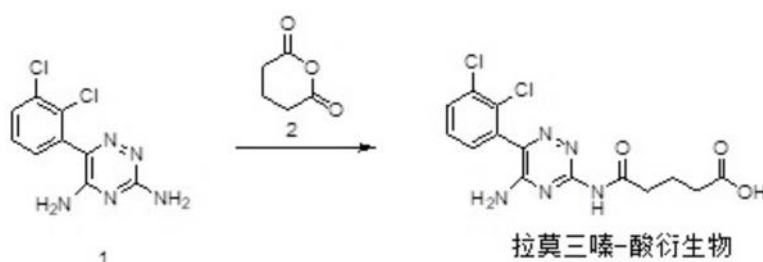
[0010] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0011] 一、提供一种拉莫三嗪衍生物,其结构式如下述式(I)所示:

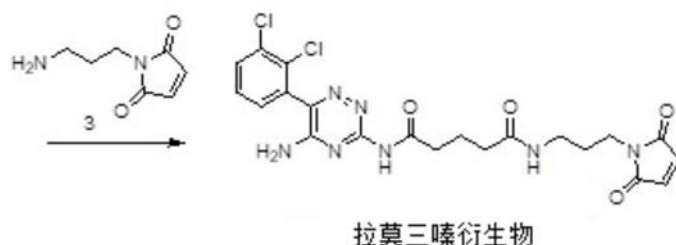


式(I)。

[0013] 二、提供一种上述的拉莫三嗪衍生物的制备方法,所述制备方法的合成路线如下:

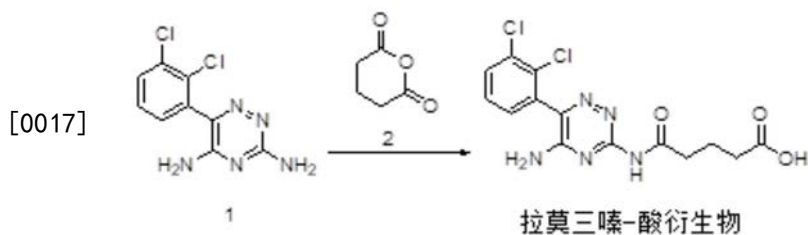


[0014]



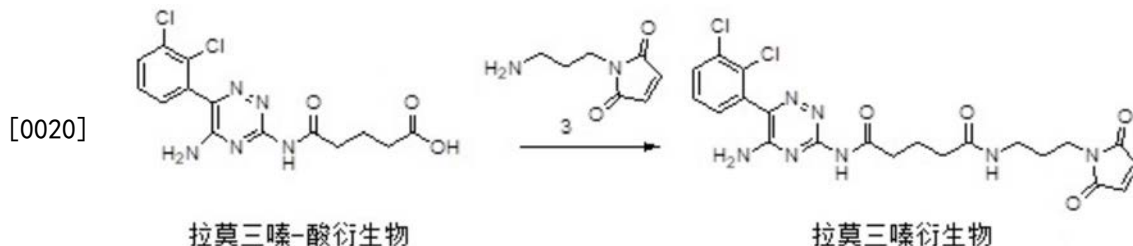
[0015] 具体的制备步骤如下:

[0016] a. 合成拉莫三嗪-酸衍生物



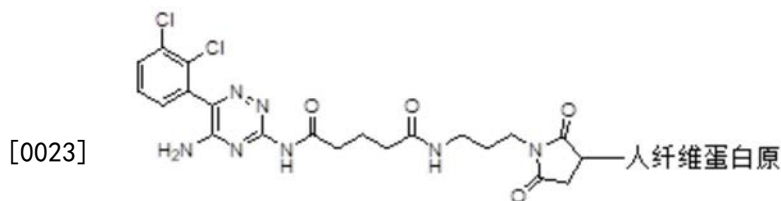
[0018] 称取5g化合物1、3.35g化合物2共同溶解于50mL的THF中制成反应液,然后将反应液加热回流72小时,反应结束后去除溶剂,然后将剩余物通过硅胶柱进行纯化,得到拉莫三嗪-酸衍生物。

[0019] b. 合成拉莫三嗪衍生物



[0021] 称取2g拉莫三嗪-酸衍生物溶解于40mL DCM中,然后加入1.25 g化合物3、1g TEA及3.1g HATu配制成反应混合液,然后将反应混合液在室温下搅拌过夜,反应结束后将反应混合液用纯化水和卤水冲洗,然后通过Na₂SO₄干燥、浓缩处理,再将浓缩产物通过硅胶柱进行纯化,得到拉莫三嗪衍生物。

[0022] 三、提供一种拉莫三嗪免疫原,由上述的拉莫三嗪衍生物与人纤维蛋白原连接而成,其结构式如下述式(II)所示:



式 (II)。

[0024] 四、提供一种上述的拉莫三嗪免疫原的制备方法,包括以下步骤:

[0025] a. 称取2.0-5.0g磷酸二氢钾、3.0-6.0g磷酸氢二钠、7.5-15.0g氯化钠、1.0-2.5g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5L去离子水中,调节pH 至7.0-9.0,制成缓冲溶液A;

[0026] b.称取3.0-6.0mg人纤维蛋白原,0-8℃下溶解于3.0-6.0ml上述缓冲溶液A中,制成载体溶液;

[0027] c.称取3.0-8.0mg上述式(I)所示的拉莫三嗪衍生物,0-8℃下溶解于300-800μl上述缓冲溶液A中,制成拉莫三嗪衍生物溶液;

[0028] d. 当上述拉莫三嗪衍生物溶液刚变澄清时, 将其逐滴加入上述载体溶液中, 然后将此混合溶液在-18~-2℃下搅拌3-10小时;

[0029] e.将反应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拉莫三嗪免疫原溶液,在拉莫三嗪免疫原溶液中加入质量分数0.05-0.20%的 NaN_3 ,于 -20°C 下储存。

[0030] 五、提供一种抗拉莫三嗪特异性抗体,所述抗体由上述的拉莫三嗪免疫原免疫实验动物后产生,所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体,所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种。

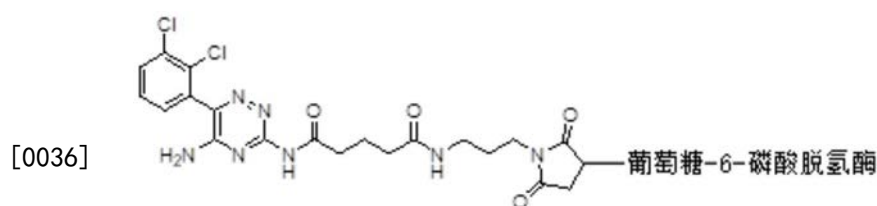
[0031] 六、提供一种上述的抗拉莫三嗪特异性抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0032] a.将上述式(II)所示的拉莫三嗪免疫原用PBS缓冲液稀释至 2.0-5.0mg/ml,得到抗原溶液,然后将2.0-5.0ml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;

[0033] b.1-4周后,再用2.0-5.0ml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;

[0034] c.对免疫后的实验动物取血,分离纯化抗血清,得到抗拉莫三嗪特异性抗体。

[0035] 七、提供一种拉莫三嗪酶标偶联物,由上述的拉莫三嗪衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成,其结构式如下述式(III)所示:



式(III)。

[0037] 八、提供一种上述的拉莫三嗪酶标偶联物的制备方法,包括以下步骤:

[0038] a.称取1.0-3.0g磷酸二氢钾、1.0-5.0g磷酸氢二钠、7.5-15.0g氯化钠、1.0-3.0g氯化镁,共同溶解于1.0-2.5L去离子水中,调节pH至7.0-9.0,制成缓冲溶液B;

[0039] b.称取3.0-6.0mg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;

[0040] c.称取3.0-8.0mg上述式(I)所示的拉莫三嗪衍生物,0-8℃下溶解于300-800μl上述缓冲溶液B中,制成拉莫三嗪衍生物溶液;

[0041] d.当上述拉莫三嗪衍生物溶液刚变澄清时,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;

[0042] e.将反应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拉莫三嗪酶标偶联物溶液,在拉莫三嗪酶标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NaN₃,于 0~8℃下储存。

[0043] 九、提供一种拉莫三嗪检测试剂,包括R1试剂和R2试剂,所述R1试剂中包含上述的抗拉莫三嗪特异性抗体和均相酶底物溶液,所述均相酶底物溶液由葡萄糖-6-磷酸和Tris缓冲液配制而成;所述R2试剂包含上述的拉莫三嗪酶标偶联物和辅酶溶液,所述辅酶溶液由氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液配制而成;使用时将所述R1试剂与R2试剂按1:1-4:1的体积比混合,优选按4:1的体积比使用。十、提供一种上述的拉莫三嗪检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0044] a.R1试剂的制备:将2.5-7.5g的葡萄糖-6-磷酸用1.0-2.5L、55 mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液;再将上述的抗拉莫三嗪特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中,搅拌均匀得到 R1试剂,所述抗拉莫三嗪特异性抗体与均相酶底物溶液的体

积比为 1:100-1:10000;优选地,所述抗拉莫三嗪特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:625;

[0045] b.R2试剂的制备:将5.0-15.0g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸用2.0-5.0L、120mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液溶解制成辅酶溶液;再将上述的拉莫三嗪酶标偶联物加入所述辅酶溶液中,搅拌均匀得到 R2试剂,所述拉莫三嗪酶标偶联物与辅酶溶液的体积比为1:100~ 1:10000;优选地,所述拉莫三嗪酶标偶联物与辅酶溶液的体积比为 1:1875。

[0046] 本发明的有益效果是:通过反复的试验获得了一种全新的拉莫三嗪衍生物,并使用该拉莫三嗪衍生物获得了高免疫原性的拉莫三嗪免疫原与相应抗体以及拉莫三嗪酶标偶联物,并制备出了拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂。该拉莫三嗪免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗拉莫三嗪特异性抗体特异性强、效价高,能很好地识别并结合拉莫三嗪,并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应;含有上述抗拉莫三嗪特异性抗体与拉莫三嗪酶标偶联物的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定生物样品中的拉莫三嗪含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现拉莫三嗪的高通量、快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高,同时实现了检测过程的全自动化。此外,本发明还可以有效避免试剂使用前R1试剂与R2试剂发生交叉污染导致的本底反应信号升高,避免了试剂浪费,进一步提高了检测准确度。

附图说明

[0047] 图1是本发明的拉莫三嗪ELISA检测反应曲线;

[0048] 图2是本发明的拉莫三嗪均相酶免疫检测反应曲线;

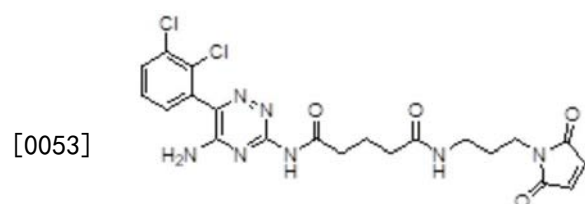
[0049] 图3是本发明的拉莫三嗪均相酶免疫法与高效液相色谱法相关性分析图。

具体实施方式

[0050] 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。

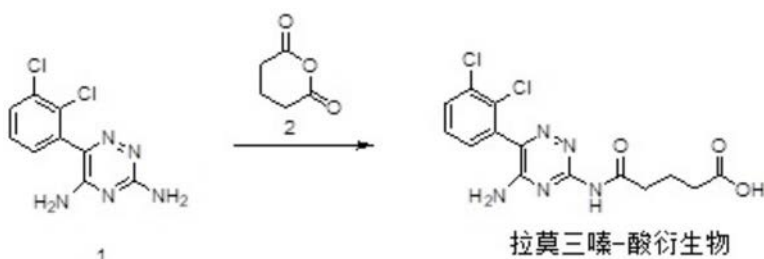
[0051] 实施例1.拉莫三嗪衍生物的合成

[0052] 拉莫三嗪衍生物的化学结构如式(I)所示:

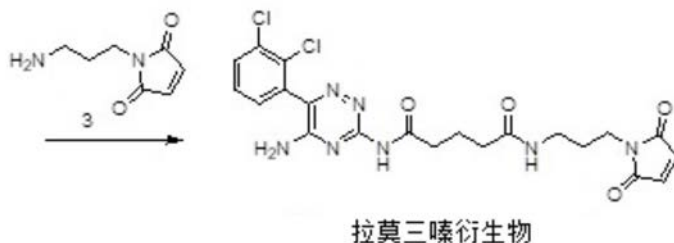


式(I)。

[0054] 上述拉莫三嗪衍生物的制备方法,其合成路线如下:

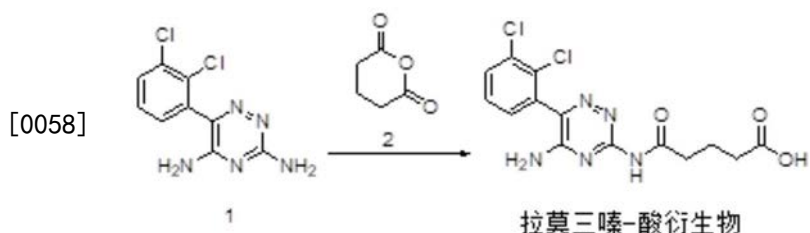


[0055]



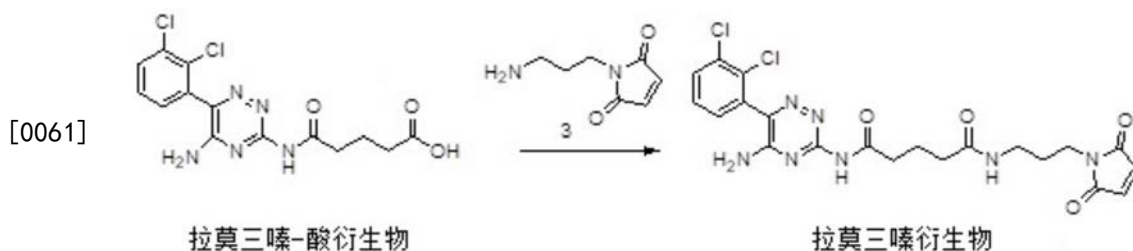
[0056] 具体的制备步骤如下：

[0057] a. 合成拉莫三嗪-酸衍生物



[0059] 称取5g化合物1、3.35g化合物2共同溶解于50mL的THF中制成反应液，然后将反应液加热回流72小时，反应结束后去除溶剂，然后将剩余物通过硅胶柱进行纯化，得到3.1g白色固体状的拉莫三嗪-酸衍生物。

[0060] b. 合成拉莫三嗪衍生物

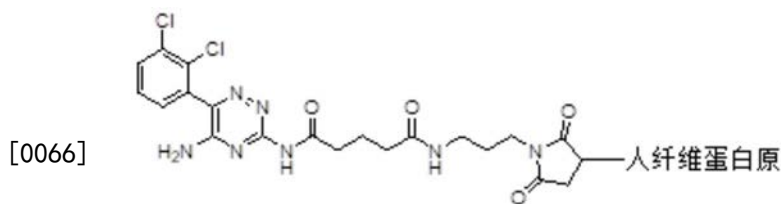


[0062] 称取2g拉莫三嗪-酸衍生物溶解于40mL DCM中，然后加入1.25 g化合物3、1g TEA及3.1g HATu配制成反应混合液，然后将反应混合液在室温下搅拌过夜，反应结束后将反应混合液用纯化水和卤水冲洗，然后通过Na₂SO₄干燥、浓缩处理，再将浓缩产物通过硅胶柱进行纯化，得到1g白色固体状的拉莫三嗪衍生物。

[0063] 利用Bruker Avance III plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体拉莫三嗪衍生物进行核磁共振光谱扫描，采用 TMS作为内标，结果如下：¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ1.24-1.26 (m, 1H), 1.61-1.65 (m, 2H), 1.77-1.81 (m, 2H), 2.09-2.14 (m, 2H), 2.46-2.48 (m, 2H), 2.99-3.04 (m, 2H), 3.40-3.47 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 7.42-7.52 (m, 2H), 7.75-7.77 (d, 1H), 7.83-7.84 (m, 1H), 10.38 (s, 1H)。LC-MS分析上述拉莫三嗪衍生物的结果为:m/z=506 (M+1)。

[0064] 实施例2.拉莫三嗪免疫原的合成

[0065] 本实施例中的拉莫三嗪免疫原由式 (I) 所示的拉莫三嗪衍生物与人纤维蛋白原连接而成,其结构式如下述式 (II) 所示:



式 (II)。

[0067] 该拉莫三嗪免疫原的合成方法具体步骤如下:

[0068] a. 称取3.2g磷酸二氢钾、4.5g磷酸氢二钠、11.8g氯化钠、1.8g 氯化镁,共同溶解于1.8L去离子水中,调节pH至8.0,制成缓冲溶液A;

[0069] b. 称取5.0mg人纤维蛋白原,3℃下溶解于5.0ml上述缓冲溶液 A中,制成载体溶液;

[0070] c. 称取5.0mg上述式 (I) 所示的拉莫三嗪衍生物,3℃下溶解于500μl上述缓冲溶液 A中,制成拉莫三嗪衍生物溶液;

[0071] d. 当上述拉莫三嗪衍生物溶液刚变澄清时,将其逐滴加入上述载体溶液中,然后将此混合溶液在-12℃下搅拌8小时;

[0072] e. 将反应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拉莫三嗪免疫原溶液,在拉莫三嗪免疫原溶液中加入质量分数0.10%的NaN₃,于-20℃下储存。

[0073] 实施例3.抗拉莫三嗪特异性抗体的制备

[0074] 将实施例2制备得到的拉莫三嗪免疫原采用弗氏佐剂免疫法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0075] a. 将上述式 (II) 所示的拉莫三嗪免疫原用PBS缓冲液稀释至 4.0mg/ml,得到抗原溶液,然后将4.0ml所述抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射;

[0076] b. 3周后,再用4.0ml相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物兔注射一次,之后每隔3周注射一次,共计注射 5次;

[0077] c. 对免疫后的实验动物兔取血,分离纯化抗血清,得到抗拉莫三嗪特异性抗体。

[0078] 实施例4.拉莫三嗪ELISA检验

[0079] 1. 拉莫三嗪ELISA检测标准曲线的建立

[0080] (1) 标准品的制备

[0081] 将拉莫三嗪粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液,制备成1 mg/ml的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为32.00μg/ml、16.00μg/ml、8.00μg/ml、4.00μg/ml、2.00μg/ml和0.00μg/ml的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0mmol/L Tris,145mmol/L NaCl和0.25%的BSA。

[0082] (2) 利用拉莫三嗪的ELISA检验方法制备标准曲线

[0083] 用PBS将实施例3中所制备的抗拉莫三嗪抗体稀释成1:5000 的终浓度溶液,100μL/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24小时;用PBS将上述包被有抗拉莫三嗪抗体的96孔

酶联板洗涤3次后,加入200 μ L/孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16小时。然后用 PBS洗涤3次,加入20 μ L/孔的标准品。再加入100 μ L/孔工作浓度的辣根过氧化物酶 (HRP)-拉莫三嗪偶联物;室温下孵育30分钟后 PBS洗板5次;然后每孔加入100 μ L TMB底物,室温孵育30分钟。再每孔加入100 μ L终止液(2mol/L硫酸)。测定450nm的吸光度值。根据各标准品所对应的450nm的吸光度值定标,制作标准曲线,结果如附图1所示。

[0084] 所述辣根过氧化物酶-拉莫三嗪偶联物的制备方法,包含以下步骤:

[0085] (a) 称取3.5mg辣根过氧化物酶,在室温条件下溶解于1ml、pH 为8.0的磷酸缓冲液中,制成辣根过氧化物酶溶液;

[0086] (b) 称取35mg实施例1中所述的拉莫三嗪-酸衍生物,加入1ml 的异丙醇中溶解,然后再加入5.0mg的N,N'-二环己基碳二亚胺进行活化,并与步骤(a)中制备的辣根过氧化物酶溶液进行偶联反应,反应结束后经透析纯化得到辣根过氧化物酶-拉莫三嗪偶联物。

[0087] 2. 待测样品中拉莫三嗪含量的检测

[0088] (1) 制作待测样品

[0089] 制备方法:将拉莫三嗪粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1mg/ml的储存液,并将此储存液稀释于不含拉莫三嗪的健康人血浆中,至终浓度分别为0.00,1.00,10.00,30.00 μ g/ml,形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。

[0090] (2) 测试方法

[0091] 利用上述拉莫三嗪的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血浆样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血浆样本在450nm的吸光度值。

[0092] (3) 测试结果

[0093] 对照图1中所示的拉莫三嗪ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中拉莫三嗪含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中拉莫三嗪的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

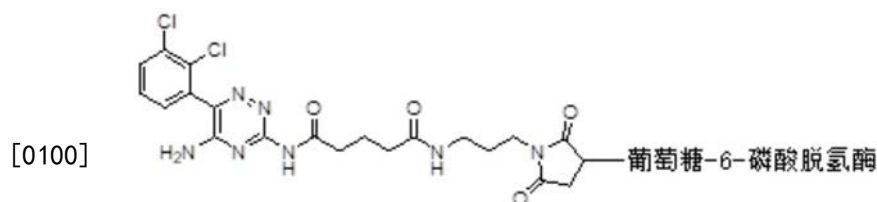
[0094] 表1拉莫三嗪的ELISA检测回收实验

[0095]	血浆样本	空白	低	中	高
	样本浓度(μ g/ml)	0.00	1.00	10.00	30.00
	测试 1	0.01	1.03	9.25	32.31
	测试 2	0.00	0.96	9.80	30.70
	测试 3	0.00	1.01	11.06	29.75
	平均值(μ g/ml)	0.00	1.00	10.04	30.92
[0096]	回收率(%)	-	100.00	100.37	103.07

[0097] 由表1中结果可知:采用本发明的拉莫三嗪ELISA检测试剂测定不同浓度血浆样本中的拉莫三嗪回收率都高于95%,说明本发明所述的抗拉莫三嗪特异性抗体可以用于临床样本中拉莫三嗪的检测,并且结果准确度高。

[0098] 实施例5.拉莫三嗪酶标偶联物的制备

[0099] 本实施例中的拉莫三嗪酶标偶联物由式(I)所示的拉莫三嗪衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)连接而成,其结构式如下述式(III)所示:



[0101] 该拉莫三嗪酶标偶联物的合成方法具体步骤如下:

[0102] a. 称取2.2g磷酸二氢钾、3.8g磷酸氢二钠、12.5g氯化钠、2.1g 氯化镁,共同溶解于2.0L去离子水中,调节pH至8.0,制成缓冲溶液B;

[0103] b. 称取5.0mg葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,3℃下溶解于5.0ml上述缓冲溶液B中,制成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0104] c. 称取5.0mg上述式 (I) 所示的拉莫三嗪衍生物,3℃下溶解于500μl上述缓冲溶液B中,制成拉莫三嗪衍生物溶液;

[0105] d. 当上述拉莫三嗪衍生物溶液刚变澄清时,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-10℃下搅拌6小时;

[0106] e. 将反应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拉莫三嗪酶标偶联物溶液,在拉莫三嗪酶标偶联物溶液中加入质量分数0.75%的BSA和质量分数0.10%的NaN₃,于0℃下储存。

[0107] 实施例6. 拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂的制备

[0108] 该拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂的制备方法具体步骤如下:

[0109] a. R1试剂的制备:将4.5g的葡萄糖-6-磷酸用1.8L、60mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液;再将上述的抗拉莫三嗪特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中,搅拌均匀得到R1试剂,所述抗拉莫三嗪特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:625。

[0110] b. R2试剂的制备:将9.2g的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸用 1.8L、120mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液溶解制成辅酶溶液;再将上述的拉莫三嗪酶标偶联物加入所述辅酶溶液中,搅拌均匀得到R2 试剂,所述拉莫三嗪酶标偶联物与辅酶溶液的体积比为1:1875。

[0111] 实施例7. 拉莫三嗪均相酶免疫检验及结果

[0112] 1. 获得标准曲线:

[0113] (1) 设置迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0114] (2) 操作步骤为:先加R1试剂,再加入标准品,最后加入R2 试剂。加入R2试剂后,测定不同时间点的OD340吸光度值,算出不同标准品浓度时的反应速率,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,最后得出较理想的反应标准曲线图,如附图2所示。

[0115] 表2迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

[0116]

迈瑞 BS480 参数	
项目名称	拉莫三嗪
R1 试剂	160 μ l
R2 试剂	40 μ l
样本量	3 μ l
分析方法	终点法
主波长	340 nm
副波长	405 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	μ g/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00, 32.00 μ g/ml

[0117] 2. 样本检测: 通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线, 重复测定低、中、高浓度质控样本10次, 上述质控样本为: 将拉莫三嗪标准品溶解于健康人血浆中, 至浓度分别为5.00, 10.00, 20.00 μ g/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0118] 表3样品测定值及精密度和回收率评估

[0119]

血浆样本	低	中	高
样本浓度(μ g/ml)	5.00	10.00	20.00
1	5.33	10.09	20.07
2	4.98	9.97	19.84
3	4.87	10.03	21.62
4	5.20	10.20	19.74
5	5.00	9.88	19.81
6	5.05	10.41	20.39
7	5.30	10.39	20.90
8	4.89	9.98	19.58
9	5.24	10.55	19.79
10	5.01	10.12	20.60

[0120]

平均值($\mu\text{g/ml}$)	5.09	10.16	20.23
标准差 (SD)	0.17	0.22	0.65
精密度 (CV%)	3.34	2.17	3.21
回收率 (%)	101.80	101.60	101.15

[0121] 检测结果:本发明的拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂测定血浆样本中拉莫三嗪含量的准确度高,回收率均在95%–105%之间;精密度高, CV均低于5%。

[0122] 实施例8. 药物与激素干扰试验

[0123] 选取62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物进行干扰检测,调整浓度至1.00mg/ml,采用实施例七的均相酶免疫检测方法进行测定,62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物名称以及测定结果详见表4。

[0124] 表4常见干扰物测定结果

[0125]

ID#	化合物名称	等价于拉莫三嗪的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于拉莫三嗪的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	阿司匹林	0.00	2	苯丙醇胺	0.00
3	β -苯基乙胺	0.00	4	普鲁卡因酰胺	0.00
5	安非他命	0.00	6	普鲁卡因	0.00
7	氨苄青霉素	0.00	8	奎尼丁	0.00
9	甲氨二氮卓	0.00	10	佐美酸	0.00
11	氯丙嗪	0.12	12	苯肾上腺素	0.00
13	氯拉卓酸	0.00	14	桂皮酰艾克宁	0.00
15	二甲苯氧庚酸	0.00	16	芽子碱	0.00
17	非诺洛芬	0.00	18	地西洋	0.00
19	甲基苯丙胺	0.00	20	可替宁	0.00

[0126]

ID#	化合物名称	等价于拉莫三 嗪的浓度 (µg/ml)	ID#	化合物名称	等价于拉莫三 嗪的浓度 (µg/ml)
21	龙胆酸	0.00	22	阿替洛尔	0.00
22	吉非贝齐	0.00	24	心得安	0.00
25	氢可酮	0.00	26	苯乙哌啶酮	0.00
27	布洛芬	0.00	28	苯基丁氮酮	0.00
29	丙咪嗪	0.03	30	麦角酸二乙基酰胺	0.00
31	二氨基二苯砒	0.00	32	大麻酚	0.00
33	蔡普生	0.00	34	洛哌丁胺	0.00
35	氢氯噻嗪	0.06	36	异克舒令	0.00
37	哌替啶	0.00	38	苯基丙氨酸	0.00
39	烯丙羟吗啡酮	0.00	40	盐酸氟西汀	0.00
41	麻黄素	0.00	42	柳丁氨醇	0.00
43	烟酰胺	0.00	44	青霉素	0.00
45	甲胺呋硫	0.00	46	甲基二乙醇胺	0.00
47	异戊巴比妥	0.00	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.00
49	甲撑二氧苯丙胺	0.00	50	琥珀酸多西拉敏	0.00
51	四氢大麻酚	0.00	52	纳布啡	0.00
53	制霉菌素	0.00	54	去甲吗啡	0.00
55	乙酰吗啡	0.00	56	羟考酮	0.00
57	苄非他明	0.00	58	克他命	0.00
59	异丙嗪	0.00	60	苯海拉明	0.00
61	阿司帕坦	0.00	62	苯丁胺	0.00
63	皮质醇(氢化可的松)	0.00	64	香草扁桃酸	0.00
65	雄烯二酮	0.00	66	雄甾酮	0.00
67	皮质脂酮	0.00	68	皮质酮(可的松)	0.00
69	去氧皮质酮	0.00	70	脱氢表雄酮	0.00

[0127]

ID#	化合物名称	等价于拉莫三 嗪的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于拉莫三 嗪的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
71	硫酸脱氢表雄酮	0.00	72	二氢睾酮	0.00
73	醛固酮	0.00	74	雌三醇	0.00
75	雌酮	0.00	76	本胆烷醇酮	0.00
77	17-羟孕烯醇酮	0.00	78	17-羟孕酮	0.00
79	孕烯醇酮	0.00	80	孕酮	0.00
81	睾酮	0.00	82	孕三醇	0.00
83	孕二醇	0.00	84	17 α -羟基黄体酮	0.00
85	雄烯二酮	0.00	86	17-酮类固醇	0.00
87	17-羟皮质类固醇	0.00	88	肾上腺素	0.00
89	去甲肾上腺素	0.00	90	多巴胺	0.00
91	高香草酸	0.00	92	二羟基杏仁酸	0.00

[0128] 测定结果显示：上述62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物等价于拉莫三嗪的浓度均小于1.00 $\mu\text{g/ml}$ 。由此可见，本发明的抗拉莫三嗪特异性抗体的特异性强，与常见干扰物无交叉反应。

[0129] 实施例9. 相关性分析

[0130] 分别使用高效液相色谱法和本发明的拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂对100例临床样本进行检测，并对检测数据进行相关性分析，结果如附图3所示，得到的线性方程为： $y = 0.9949x - 0.0226$ ，相关系数为： $R^2 = 0.997$ ，表明本发明的拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂测定拉莫三嗪临床样本的结果与高效液相色谱法相关性较好，可用于临床检测。

[0131] 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。

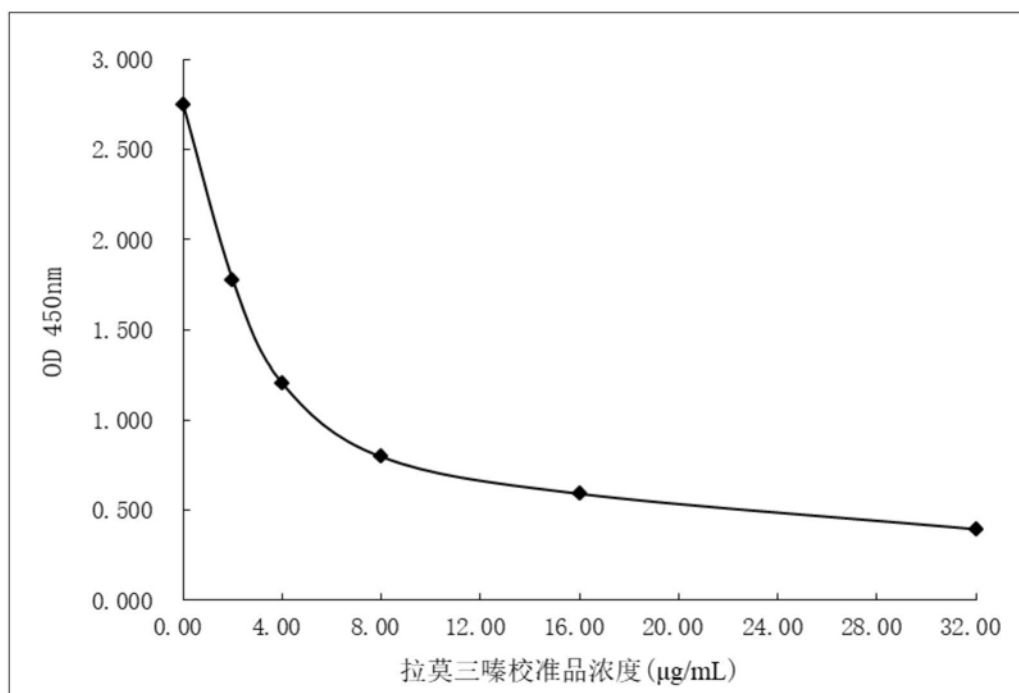


图1

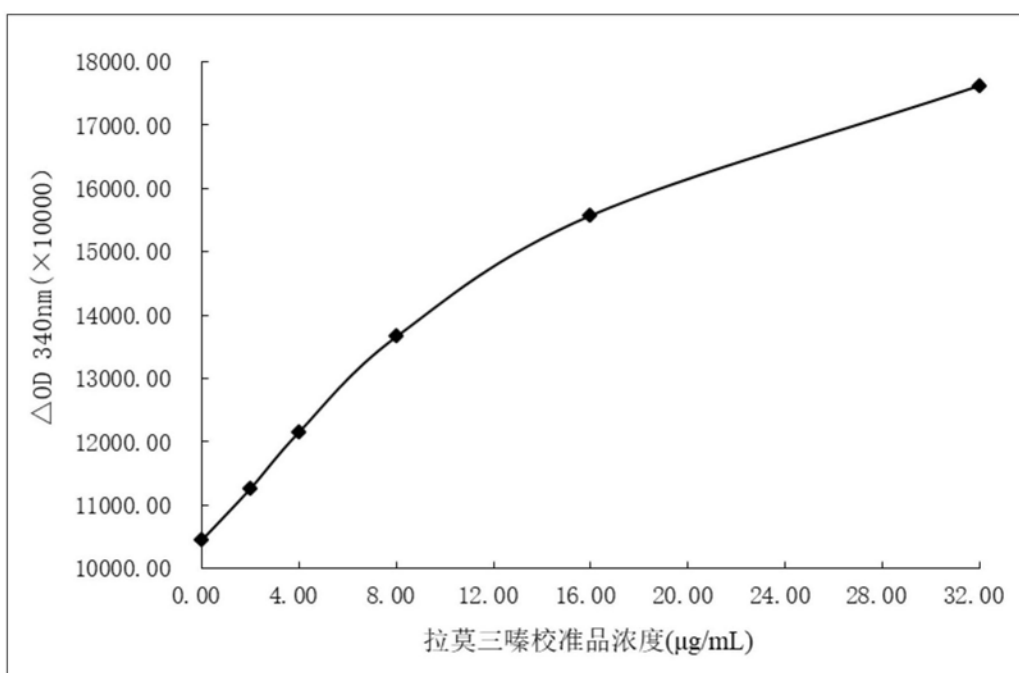


图2

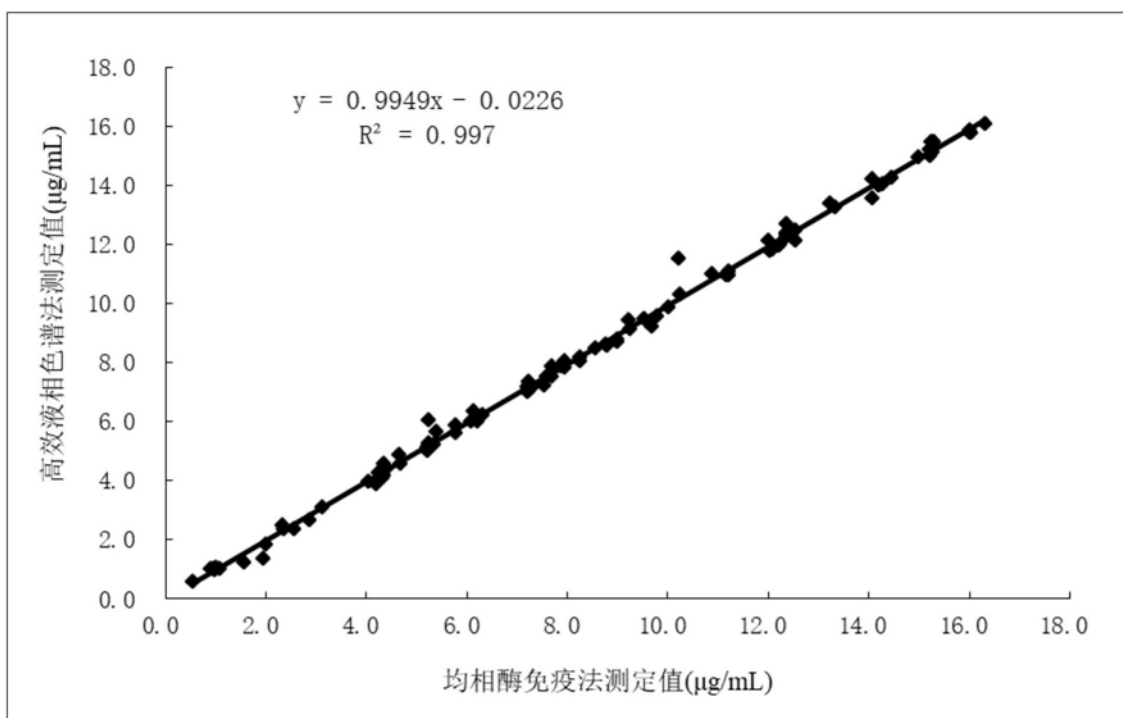


图3

专利名称(译)	一种拉莫三嗪衍生物、其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用		
公开(公告)号	CN110967481A	公开(公告)日	2020-04-07
申请号	CN201911238579.4	申请日	2019-12-06
[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	林观样 周子晔 虞留明		
发明人	林观样 胡卢丰 周子晔 虞留明		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
代理人(译)	刘俊玲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物检测技术领域，具体涉及一种拉莫三嗪衍生物，其制备方法及其在均相酶免疫检测试剂中的应用。所述拉莫三嗪衍生物的结构式如下述式(I)所示：使用所述式(1)化合物获得了高免疫原性的拉莫三嗪免疫原与相应抗体、拉莫三嗪酶标偶联物，以及拉莫三嗪均相酶免疫检测试剂。该拉莫三嗪免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗拉莫三嗪抗体特异性强、效价高，制成的均相酶免疫检测试剂可以快速、准确地确定生物样品中的拉莫三嗪含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现拉莫三嗪的高通量、快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高。

