



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103242445 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201210258576. 9

(22) 申请日 2012. 07. 25

(73) 专利权人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区科灵路
78 号

(72) 发明人 虞留明 田军 蔡江丽

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 曹毅

EP 0028795 A2, 1981. 05. 20, 权利要求 1, 说明书第 3 页左栏第 2 段.

Siegmund Lorenz Braun 等. Evaluation of a New Valproic Acid Enzyme Immunoassay and Comparison with a Capillary Gas-Chromatographic Method. 《CLINICAL CHEMISTRY》. 1981, 第 27 卷 (第 1 期), 第 169-172 页.

审查员 夏颖

(51) Int. Cl.

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 1/113(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102180965 A, 2011. 09. 14, 权利要求 3.

CN 102507917 A, 2012. 06. 20, 说明书第
0026-0027 段.

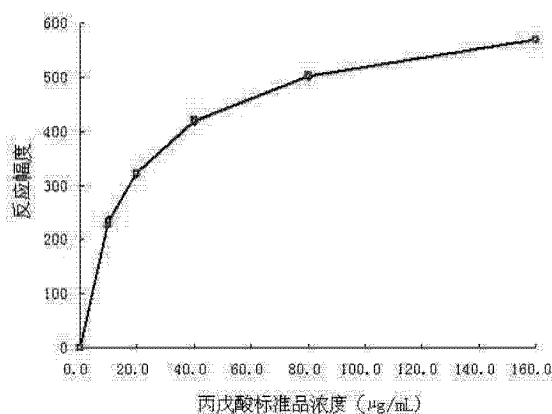
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

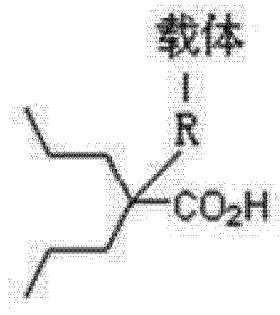
丙戊酸免疫原及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了丙戊酸免疫原及其制备方法和应用, 以及由该免疫原获得的一种抗丙戊酸特异性抗体和丙戊酸均相酶免疫检测试剂。本发明的高效价的丙戊酸特异性抗体研制的免疫试剂可以精确地测定血清和血浆样本中丙戊酸的含量。与传统方法相比, 本发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强, 结合自动化分析仪使用具有操作简便、高通量、检测结果准确等优点, 对指导临床合理用药具有重要的意义。



1. 一种丙戊酸免疫原, 其结构式如式(I)所示:



式(I)

式中, R 为 $-(\text{CH}_2)_4-\text{COO}^-$, 载体为具有免疫原性的蛋白质, 所述具有免疫原性的蛋白质为牛血清白蛋白。

丙戊酸免疫原及其制备方法和应用

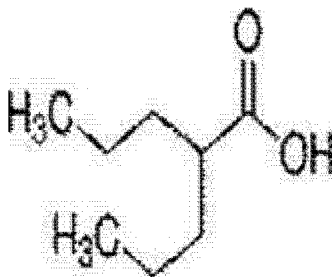
技术领域

[0001] 本发明涉及药物制剂,具体涉及的是丙戊酸免疫原及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 丙戊酸,其结构式如下:

[0003]



[0004] 丙戊酸是一种广谱性抗癫痫药物,由于其疗效显著、安全性好等优点,临床主要用于治疗全身性或部分性类型的癫痫发作,包括各种癫痫、躁郁症和少见的重性抑郁障碍。在丙戊酸的临床给药治疗过程中,由于患者个体药物代谢动力学差异,造成丙戊酸的给药量与血药浓度之间的相关性较差,同时由于丙戊酸的有效治疗窗窄,临床血药浓度的参考范围为 50-100 $\mu\text{g/ml}$,而在高于参考范围的血药浓度时会出现中枢神经系统抑制、呼吸不足、心动过速、低血压和肝毒性等毒副作用,严重时会导致昏迷,而低于有效的浓度时又达不到相关疗效。因此在治疗期间对病人的血液药物水平进行监测非常重要。

[0005] 现有的丙戊酸药物浓度监测的方法主要有荧光偏振法、微粒子化学发光法和比浊法。高度自动化的荧光偏振法和微粒子化学发光法因其简便快速的优点成为临床丙戊酸血药浓度监测最常用的方法,但其试剂盒全部依赖进口,价格昂贵和有效期较短是其不可避免缺点,造成临床使用难以普及。

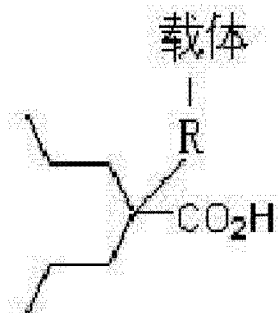
发明内容

[0006] 为解决上述问题,本发明提出了一种新型的丙戊酸免疫原及其制备方法和应用,研制出一种含有丙戊酸特异性抗体和酶标偶联物的免疫检验试剂。

[0007] 为达到上述技术目的,实现上述技术效果,本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 丙戊酸免疫原,有式(I)的结构式:

[0009]



[0010] 式(I)

[0011] 其中：

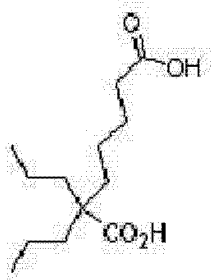
[0012] R 为连接基团，是 $-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $O-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-COO^-$ 中的一种，所述 n 为 1 至 20 之间的整数；优选地，R 为 $-(CH_2)_n-COO^-$ ，n 为 1 至 20 之间的整数；更为优选地，所述 R 为 $-(CH_2)_4-COO^-$ ；

[0013] 载体为具有免疫原性的蛋白质，最常用的免疫原性载体包括牛血清白蛋白，血蓝蛋白(KLH)和甲状腺球蛋白等。

[0014] 进一步的，丙戊酸免疫原的制备方法，包括以下步骤：

[0015] 步骤1) 制备具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物；

[0016]



[0017] 式(II)

[0018] 步骤2) 将具有免疫原性的载体溶解成具有免疫原性的载体溶液；

[0019] 步骤3) 将具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物加入到所述具有免疫原性的载体溶液中，使具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物中连接基团所在部分和具有免疫原性的载体发生缩聚反应，形成丙戊酸免疫原。

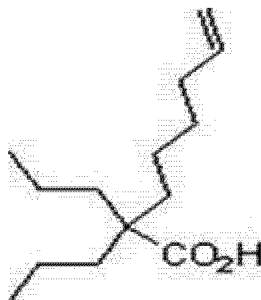
[0020] 进一步的，当所述 R 为 $-(CH_2)_4-COO^-$ 时，丙戊酸免疫原的制备方法，包括以下步骤：

[0021] (1)、合成具有式(II)结构的丙戊酸衍生物

[0022] 1、制备化合物2：

[0023] 用有机溶剂A溶解1-10 g 经正己烷洗涤的 NaH，形成溶液1；用有机溶剂A溶解5-30 g 的丙戊酸，形成溶液2，将溶液2全部逐滴加入溶液1中进行混合。其中有机溶剂A的使用量根据需要在100-300 mL左右。经通入惰性气体反应后，加入1-10 g 的二异丙胺、0.1-1.0g 的丁基锂和5-20 g 的6-溴-1-己烯，待反应完成后经减压浓缩、萃取、过滤、干燥和抽真空浓缩得到化合物2，即如下结构式(IV)中的化合物。

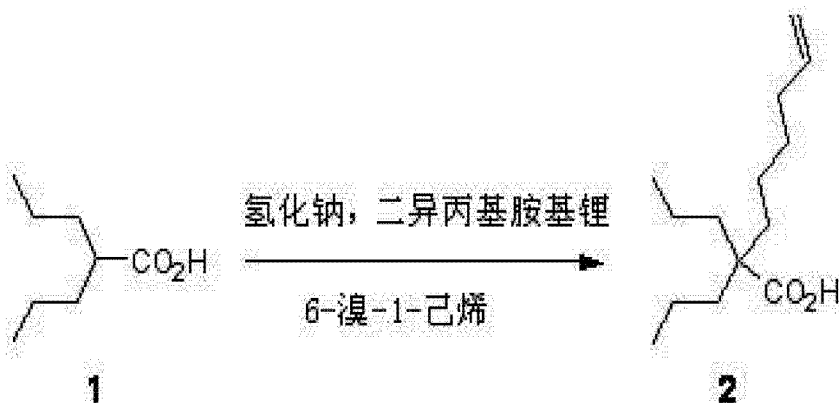
[0024]



[0025] 式(IV)

[0026] 利用丙戊酸制备化合物2的化学反应式如下：

[0027]

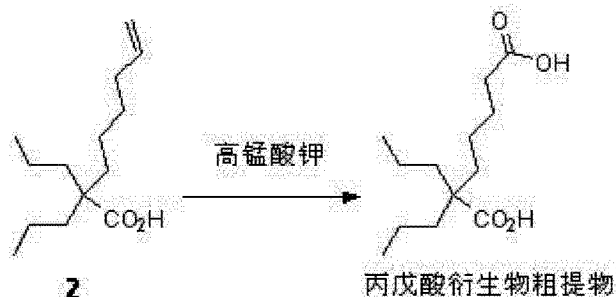


[0028] 2、制备丙戊酸衍生物粗提物

[0029] 用有机溶剂 B 溶解 5-20 g 的化合物 2, 1-10 g NaHCO_3 , 经冰浴至 0°C 反应一定时间后得到溶液 3, 有机溶剂 B 的使用量根据需要在 50-100 mL 左右。先后分别向反应溶液中加入 20-40 g 高锰酸钾和 20-40 g 亚硫酸氢钠, 冰浴至 0°C 反应一段时间后, 经过滤、减压浓缩、萃取、洗涤、干燥等步骤得到具有式 (II) 中结构的丙戊酸衍生物粗提物。

[0030] 利用化合物 2 制备丙戊酸衍生物粗提物的化学反应式如下：

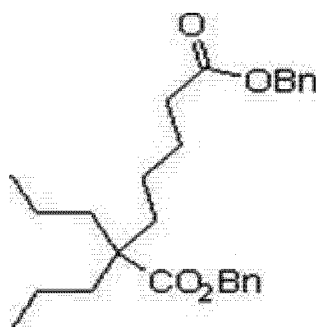
[0031]



[0032] 3、制备化合物 3

[0033] 用有机溶剂 C 溶解 1-10 g 的丙戊酸衍生物粗提物、1-10 g 三乙基胺和 1-10 g 苄基溴, 有机溶剂 C 的使用量根据需要在 100-200 mL 左右。反应产物经减压浓缩、萃取、洗涤、过滤、干燥和纯化得到具有式 (V) 中结构的化合物 3。

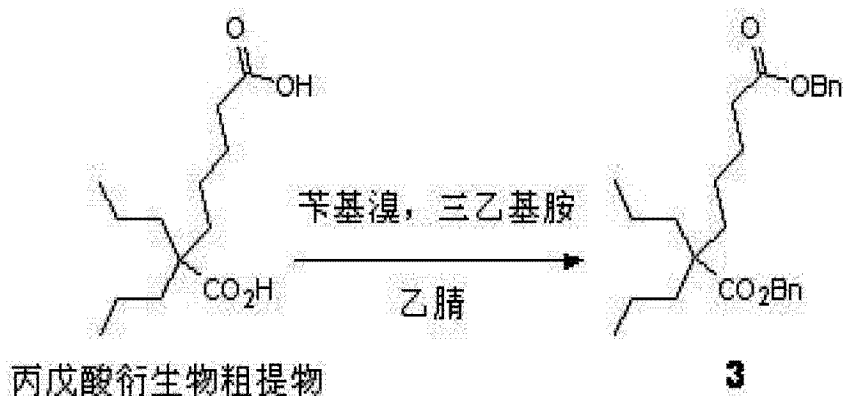
[0034]



[0035] 式 (V)

[0036] 利用丙戊酸衍生物粗提物制备化合物 3 的化学反应式如下：

[0037]



[0038] 4、制备丙戊酸衍生物

[0039] 用有机溶剂 D 溶解 1-5 g 化合物 3,并在通入 H₂的环境下加入 50-150 mg 的第一催化剂,反应完成后经过滤和减压浓缩等步骤得到具有式(II)结构的丙戊酸衍生物。

[0040] 利用化合物 3 制备丙戊酸衍生物的化学反应式如下：

[0041]



[0042] (2)、载体溶液的制备:将具有免疫原性的蛋白质 100 - 300 mg 溶于 10-100 ml 的 0.2 M, pH 8.5 磷酸盐缓冲液中。

[0043] (3)、丙戊酸衍生物的活化及免疫原的合成:用有机溶剂 E 溶解 50 - 500 mg 的具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物,此处有机溶剂 E 的使用量根据需为 5-50 ml 左右,通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的方法(EDAC)或 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺联合使用的方法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丙戊酸免疫原。

[0044] 进一步的,所述有机溶剂 A 包括但不限于二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲醇或四氢呋喃,优选四氢呋喃;所述有机溶剂 B 包括但不限于二甲基甲酰胺、乙醇或丙酮,优选丙酮;所述有机溶剂 C 包括但不限于二甲基甲酰胺、乙腈,优选乙腈;所述有机溶剂 D 包括但不限于甲醇、乙醇和二甲基甲酰胺,优选甲醇;所述的有机溶剂 E 包括但不限于二甲基亚砷、二甲基甲酰胺,优选二甲基甲酰胺;可选的第一催化剂包括但不限于碳负载钯,碳负载铂,优选碳负载钯。

[0045] 进一步的,一种抗丙戊酸特异性抗体,由所述丙戊酸免疫原免疫动物生产后得到。

[0046] 进一步的,所述抗体包括以下步骤:

[0047] (1)用磷酸盐缓冲液将合成的丙戊酸免疫原稀释至 0.5 - 5.0 mg/mL;

[0048] (2)经常规弗氏佐剂法对动物进行注射,注射后抽取动物特异性抗血清,得到有效

的抗体。

[0049] 进一步的,一种丙戊酸均相酶免疫检测试剂,含有所述抗丙戊酸特异性抗体和指示试剂;所述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂;优选地,所述指示试剂为酶试剂,由丙戊酸酶标偶联物和底物所组成,该酶标偶联物的酶优选葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0050] 所述酶标偶联物的制备方法,包括以下步骤:

[0051] (1) 酶溶液制备

[0052] 称取选自 β -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为2-10 mg/mL;

[0053] (2) 使上述具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物活化及偶联物的合成。

[0054] 用有机溶剂溶解所示的具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物,使其终浓度为1-50 mg/mL,通过三丁胺法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到丙戊酸衍生物酶标偶联物。

[0055] 上述步骤(2)中所使用的有机溶剂为:二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇或乙醇。

[0056] 在本发明中,优选采用如下制备方法获取酶标偶联物:

[0057] (1) 酶溶液制备:称取葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为3-5 mg/mL;

[0058] (2) 丙戊酸衍生物的活化及偶联物的合成:用二甲基甲酰胺溶解丙戊酸衍生物,浓度为1-20 mg/mL,通过三丁胺法进行活化,并与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-丙戊酸偶联物。所述的有机溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇或乙醇,优选地,有机溶剂为二甲基甲酰胺。

[0059] 本发明的有益效果是:

[0060] 本发明制备的丙戊酸免疫原免疫性高,诱导得到的高效价的抗丙戊酸特异性抗体研制出的免疫试剂灵敏度高、特异性强,可用于血清或血浆样本中丙戊酸含量的检测,用于正确指导临床给药剂量。

附图说明

[0061] 图1是丙戊酸均相酶免疫检验标准曲线;

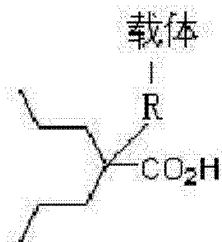
[0062] 图2是80例样本的均相酶免疫法测定值与荧光偏振法测定值相关性分析。

具体实施方式

[0063] 下面将参考附图并结合实施例,来详细说明本发明。

[0064] 丙戊酸免疫原,其特征在于有式(I)的结构式:

[0065]



[0066] 式(I)

[0067] 其中：

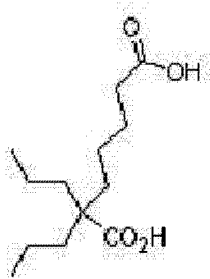
[0068] R 为连接基团，是 $-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $O-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO^-$ 、 $-NH-(CH_2)_n-COO^-$ 中的一种，所述 n 为 1 至 20 之间的整数。

[0069] 进一步的，所述载体为具有免疫原性的蛋白质。

[0070] 丙戊酸免疫原的制备方法，包括以下步骤：

[0071] 步骤 1) 制备具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物；

[0072]



[0073] 式(II)

[0074] 步骤 2) 将具有免疫原性的载体溶解成具有免疫原性的载体溶液；

[0075] 步骤 3) 将具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物加入到所述具有免疫原性的载体溶液中，使具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物中连接基团所在部分和具有免疫原性的载体发生缩聚反应，形成丙戊酸免疫原。

[0076] 进一步的，丙戊酸免疫原的制备方法，当所述 R 为 $-(CH_2)_4-COO^-$ 时，所述步骤(3)包括用所述有机溶剂 A 溶解所述具有式(II)中结构的丙戊酸衍生物，通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺的方法或 EDAC 和 N-羟基琥珀酰亚胺联合使用的方法进行活化并与载体溶液进行交联反应，反应获取物经透析纯化后得到具有免疫原性的丙戊酸免疫原。

[0077] 进一步的，一种抗丙戊酸特异性抗体，由丙戊酸免疫原免疫动物生产后得到。

[0078] 进一步的，一种丙戊酸均相酶免疫检测试剂，含有所述的抗丙戊酸特异性抗体和指示试剂。

[0079] 进一步的，丙戊酸均相酶免疫检测试剂，其特征在于：所述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂；优选地，所述指示试剂为酶试剂，由丙戊酸酶标偶联物和底物所组成，该酶标偶联物的酶优选葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0080] 实施例 1

[0081] 丙戊酸免疫原，其中 R 为 $-(CH_2)_4-COO^-$ ，载体为牛血清白蛋白。

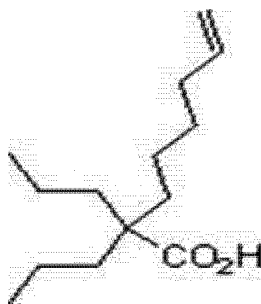
[0082] 制备方法如下：

[0083] 步骤一、具有式(II)结构的丙戊酸衍生物的合成

[0084] (1) 制备具有式(IV)结构的化合物 2：

[0085] 在氩气反应器中,用正己烷洗涤 3.2 g, 80 mmol 的氢化钠 2 次后倾去洗涤液,加入 150 ml 四氢呋喃将其溶解,形成溶液 1;用 200 ml 四氢呋喃溶解 10 g, 70 mmol 丙戊酸,形成溶液 2,将溶液 2 逐滴加入溶液 1 中进行反应。将形成的钠盐温度降至 0℃时加入 8.5 g, 84 mmol 二异丙胺,加热至 55℃反应 15 分钟后,降至室温静置 2 小时;再将溶液温度降至 -1℃,加入丁基锂并将反应溶液温度控制在 0-5℃持续反应 15 分钟后将温度降至 0℃。向上述混合物中逐滴加入溶于 20 ml 12.4 g, 70 mmol 6-溴-1-己烯的四氢呋喃溶液,持续搅拌反应 30 分钟后,30℃保温 1 小时。待 NaBr 以沉淀物形式析出后,经过滤除去,室温搅拌反应过夜。待减压浓缩后,将剩余液体用 2N HCl 溶液调节其 pH=1,用 50 ml 乙酸乙酯溶液进行萃取 3 次。将有机相合并,经 Na₂SO₄干燥,过滤,真空浓缩得到 13.5 g,产率 85.5% 油状化合物 2,即式(IV)所示的化合物。

[0086]



式(IV)

[0087]

[0088] (2) 制备丙戊酸衍生物粗提物

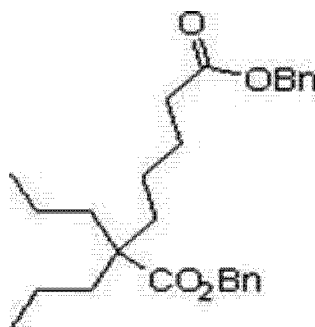
[0089] 用 75 ml 丙酮溶解 13.5 g, 60 mmol 化合物 2,加入 2 g NaHCO₃, 0℃持续搅拌反应 4 小时后,加入 38 g, 240 mmol 高锰酸钾, 0℃持续搅拌 1 小时后,再加入 32 g NaHSO₃,用 5N H₂SO₄调节 pH=2。经过滤后,滤液经减压浓缩得到油状残留物,用 100 ml 乙酸乙酯进行萃取,经蒸馏水洗涤、MgSO₄干燥、过滤和浓缩得到 12.8 g,产率为 87 % 的油状丙戊酸衍生物粗提物,即式(II)所示的化合物粗提物。

[0090] (3) 制备化合物 3

[0091] 用 150 ml ACN 溶解 5 g, 20 mmol 丙戊酸衍生物粗提物、8 g, 80 mmol Et₃N 和 8.6 g, 50 mmol BnBr,将反应体系冰浴至 0℃,随后 60℃搅拌过夜。反应混合液经减压浓缩,用 100 ml 乙酸乙酯稀释得到的残留油状物,连续经 50 ml 1N HCl、50 ml 蒸馏水、浓盐水各洗涤 3 遍后,用 Na₂SO₄进行干燥。经过滤、减压浓缩、快速硅胶色谱纯化得到 3 g,产率为 35.5% 的油状化合物 3。

[0092] 利用 Bruker Avance III plus 400 MHz 对上述所获取的化合物 3 进行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下:¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.87-0.90 (t, 6H), 1.12-1.18 (m, 6H), 1.52-1.62 (m, 8H), 2.32-2.36 (m, 2H), 5.12-5.13 (d, 4H), 7.35-7.40 (m, 10H)。表征为式(V)所示的化合物。

[0093]



[0094] 式(V)

[0095] (4) 利用化合物 3 制备含有 $-(CH_2)_4-COO^-$ 基团的丙戊酸衍生物

[0096] 丙戊酸衍生物的制备方法如下:用 50 ml 甲醇溶解 2.5 g, 7 mmol 化合物 3, 加入 100 mg 碳负载铂作为催化剂, 持续通入 H_2 , 室温持续搅拌反应过夜。经过滤和减压浓缩得到 1.3 g, 产率为 86% 的白色丙戊酸衍生物。

[0097] 利用 Bruker Avance III plus 400 MHz 对上述所获取的 1.1g 白色物质进行核磁共振光谱扫描, 采用 TMS 作为内标。结果如下: 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.91-0.95 (t, 6H), 1.20-1.26 (m, 6H), 1.51-1.65 (m, 8H), 2.38-2.41 (m, 2H), 9.43 (bs, 2H)。其表征为式(II)所示的化合物, 即具有式(II)结构的丙戊酸衍生物。

[0098] (5) 利用色谱/质谱技术对得到的具有式(II)结构的丙戊酸衍生物进行分析鉴定

[0099] 仪器: 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* 4.6 mm, 5 μ m), 柱温为 30 $^{\circ}C$, 流速为 1.5 mL/min, 流动相为乙腈-水, 比例为 5%-95%-60%-40%。

[0100] 鉴定结果: 该具有式(II)结构的丙戊酸衍生物纯度为 99.8%, 分子量为 244, 分子离子为 245 ($M+1$)。

[0101] 步骤二、将具有免疫原性的载体溶解形成具有免疫原性的载体溶液:

[0102] 将牛血清白蛋白 200 mg 溶解于 50 ml 0.2 M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中, 得到 BSA 溶液;

[0103] 步骤三、将 BSA 与丙戊酸衍生物通过 $-(CH_2)_4-COO^-$ 基团连接形成所述的丙戊酸免疫原

[0104] 丙戊酸免疫原的合成方法如下: 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200 mg 合成的丙戊酸衍生物、3.5 ml DMF、3.5 ml 乙醇、7.0 ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200 mg EDAC、50 mg N-羟基琥珀酰亚胺, 将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30 min, 得到混合溶液; 将溶解好的混合溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在 2~8 $^{\circ}C$ 下搅拌 8-16 小时, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析进行纯化, 得到丙戊酸免疫原。

[0105] 抗丙戊酸特异性抗体的制备, 制备方法如下:

[0106] (1) 用磷酸盐缓冲液将由实施例 1 合成的丙戊酸免疫原稀释至 1.0 mg/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;

[0107] (2) 2~3 周后, 再用 1.0 ml 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, 共四次, 抽取家兔的抗血清, 获得有效的抗体。

[0108] 丙戊酸均相酶免疫检测试剂的制备

[0109] (1) R1 试剂的制备

[0110] 将制备好的抗体稀释到 R1 缓冲液中,得到 R1 试剂。均相 R1 缓冲液含 50 mM Tris, 0.25% BSA, 50 mM 葡萄糖六磷酸(G-6-P)和 50mM 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD),抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1:2500。

[0111] (2) R2 试剂的制备

[0112] 1) G6PDH- 丙戊酸的制备

[0113] a) 称取 15 mg G6PDH, 溶解于 12 ml, 0.05M Tris 缓冲液中, 依次加入 100 mg NADH、0.5 ml 卡必醇和 1 ml 的 DMF 混匀;

[0114] b) 将 10 mg 的丙戊酸衍生物溶解于 420 μ l DMSO 和 180 μ l DMF 中, 加入 6 μ l 三丁胺和 3 μ l 氯甲酸异丁酯, 在 2 ~ 8℃条件下搅拌反应 30 min;

[0115] c) 在 2~8℃条件下搅拌过夜, 并将得到的 G6PDH- 丙戊酸用透析的方法进行纯化。

[0116] 2) 将制备好的 G6PDH- 丙戊酸稀释到 R2 缓冲液中, 得到 R2 试剂。R2 缓冲液为 100 mM Tris, 0.25% BSA。抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1:2000。

[0117] 丙戊酸均相酶免疫检验定标结果及相关试验结果

[0118] (1) 标准品的制备:

[0119] 将丙戊酸粉末溶解于溶液, 制备成 10 mg/ml 的储存液。用标准品稀释缓冲液将储存液依次稀释为 160.0 μ g/ml、80.0 μ g/ml、40.0 μ g/ml、20.0 μ g/ml、10.0 μ g/ml 和 0 μ g/ml 的标准溶液。其中, 标准品稀释缓冲液含有 50.0 mM Tris, 145 mM NaCl 和 0.25% 的 BSA。

[0120] (2) 利用丙戊酸的均相酶免疫检验方法制作标准曲线:

[0121] 表 1 迈瑞 BS-200 分析仪丙戊酸均相酶免疫检验参数表

[0122]

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)	反应 时间
动力学方法	10	150/150	Logistic-Log5P	340/405	10-20

[0123] 利用迈瑞 BS-200 全自动生化分析仪, 按照表 1 数据进行参数设置。首先加入 R1 试剂(抗体与 R1 缓冲液的混合液), 再加入样品, 最后加入 R2 试剂(G6PDH- 丙戊酸偶联物与 R2 缓冲液的混合液), 测定不同时间点的吸光值, 计算不同浓度标准品的反应幅度, 得到浓度对反应幅度理想的标准曲线, 结果如图 1 所示。

[0124] (3) 应用实施例 1 中所制备的丙戊酸检测试剂进行样本中丙戊酸的回收试验, 以确定实施例 1 中所制备的丙戊酸检测试剂可以用于血清和血浆样本中丙戊酸的检测。步骤如下:

[0125] 制作血清样本, 制备方法为: 将丙戊酸粉末溶解于标准品稀释缓冲液中制成 10 mg/ml 的储存液, 并将此储存液稀释于空白血清中, 至终浓度分别为 0.0, 15.0, 30.0, 120.0 μ g/ml, 形成空白、低、中、高浓度的血清样本。上述空白血清为不含丙戊酸的健康人血清。

[0126] 测试方法: 利用上述丙戊酸的均相酶免疫检测方法, 将上述空白、低、中、高浓度的

血清样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血清样本在相应条件下的反应幅度。对照图 1 中所示的丙戊酸均相酶免疫检测的标准曲线,计算每个样本中丙戊酸含量,并对每个样本进行 3 个复孔测定,根据上述样本中丙戊酸的实际含量计算回收率,结果如表 2 所示。

[0127] 表 2 丙戊酸的均相酶免疫检验回收实验

[0128]

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.0	15.0	30.0	120.0
测试 1	0.06	14.8	28.2	115.7
测试 2	0.09	14.2	29.9	116.9
测试 3	0.06	14.6	29.2	115.3
平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	0.07	14.5	29.1	116.0
回收率 (%)	—	96.9	97.0	96.6

[0129] 由表 2 中结果可知:采用本发明丙戊酸检测试剂测定不同浓度的样品中的丙戊酸回收率大于 95%,小于 100%,说明本发明所述的丙戊酸检测试剂可以用于样本中丙戊酸的检测,并且结果准确,可信。

[0130] (4) 药物干扰试验

[0131] 试验方法:选取 52 种常用化合物和药物进行药物干扰检测,调整其浓度为 $80.0 \mu\text{g/ml}$,利用均相酶免疫方法进行测定,根据标准曲线得到相应物质的浓度,结果显示浓度均小于 $0.8 \mu\text{g/ml}$,说明所有检测药物与丙戊酸无任何交叉反应,可见,本发明所获得的丙戊酸抗体具有很强的特异性。

[0132] 表 3 药物干扰试验

[0133]

化合物名称	化合物名称	化合物名称	化合物名称
阿司匹林	烟酰胺	甲基二乙醇胺	氢氯噻嗪
异戊巴比妥	青霉素	二亚甲基双氧苯丙胺	二氨基二苯砜
氨苄青霉素	苯丙醇胺	甲撑二氧苯丙胺	甲胺呋硫
β -苯基乙醇	普鲁卡因酰胺	琥珀酸多西拉敏	柳丁氨醇
甲氨二氮卓	普鲁卡因	四氢大麻酚	纳布啡
氯丙嗪	奎尼丁	羟吗啡酮	大麻酚
氯拉卓酸	佐美酸	制霉菌素	洛派丁胺
甲基苯丙胺	桂皮酰艾克宁	去甲吗啡	异克舒令
非诺洛芬	芽子碱	乙酰吗啡	苯基丙氨酸
二甲苯氧庚酸	地西洋	羟考酮	盐酸氟西汀
龙胆酸	可替宁	苯非他明	克他命
氢可酮	阿替洛尔	异丙嗪	苯海拉明
布洛芬	心得安	阿司帕坦	苯丁胺

[0134] (5) 与荧光偏振法相关性分析

[0135] 选取 80 例临床血清样本(包括 60 例阳性和 20 例阴性)分别使用雅培的荧光偏振法和本发明中的均相酶免疫法进行测定,并进行相关性分析,结果如图 2 所示。图中显示 $R^2 > 0.98$,说明两种方法具有很好的相关性,进一步证明了本研究的丙戊酸均相酶免疫试剂测定临床样本的准确性。

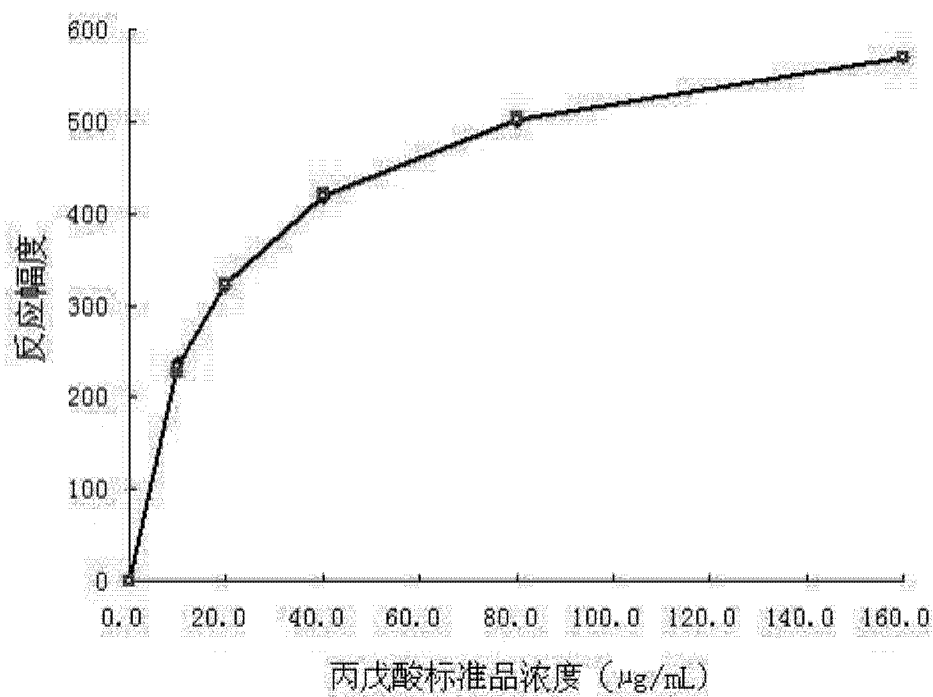


图 1

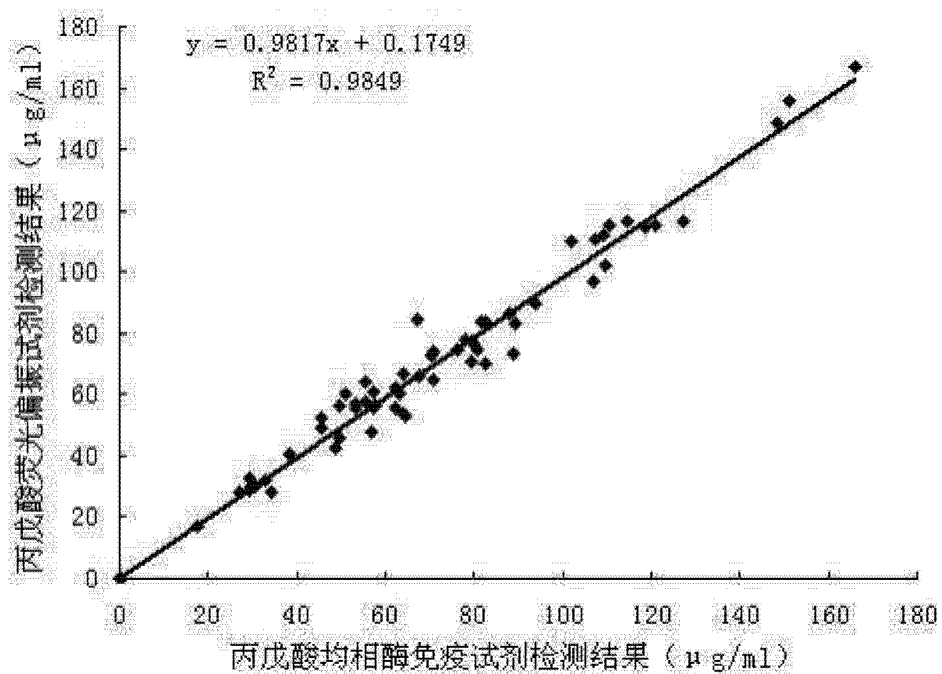


图 2

专利名称(译)	丙戊酸免疫原及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103242445B	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201210258576.9	申请日	2012-07-25
[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 田军 蔡江丽		
发明人	虞留明 田军 蔡江丽		
IPC分类号	C07K14/795 C07K14/765 C07K14/47 C07K11/113 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	曹毅		
审查员(译)	夏颖		
其他公开文献	CN103242445A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了丙戊酸免疫原及其制备方法和应用，以及由该免疫原获得的一种抗丙戊酸特异性抗体和丙戊酸均相酶免疫检测试剂。本发明的高效价的丙戊酸特异性抗体研制的免疫试剂可以精确地测定血清和血浆样本中丙戊酸的含量。与传统方法相比，本发明提供的免疫检测试剂灵敏度高、特异性强，结合自动化分析仪使用具有操作简便、高通量、检测结果准确等优点，对指导临床合理用药具有重要的意义。

