



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108037280 A

(43)申请公布日 2018.05.15

(21)申请号 201711392423.2

(22)申请日 2017.12.22

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司

地址 030000 山西省太原市尖草坪区太原
不锈钢产业园区钢园北路10号

(72)发明人 杨钰祥 于雪纯 康志禹 丁兰艳
杜爱铭 徐兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

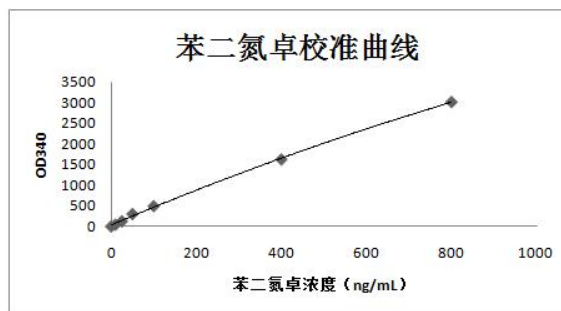
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂；上述酶标苯二氮卓由苯二氮卓和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的苯二氮卓免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中苯二氮卓含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快捷、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。



1. 一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法, 其特征在于: 酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂。

2. 根据权利要求1所述的苯二氮卓的免疫检测试剂, 其特征在于: 所述酶标苯二氮卓由苯二氮卓和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

3. 根据权利要求1所述的苯二氮卓免疫检测试剂, 其特征在于: 所述指示试剂选自酶试剂, 包括: 酶标偶联物和酶的底物; 上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物; 上述酶的底物为葡萄糖。

4. 一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物的制备: 苯二氮卓半抗原的制备, 葡萄糖脱氢酶(GDH)与苯二氮卓半抗原偶联, 纯化偶联的酶标抗原;

(2) 苯二氮卓均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备: 由苯二氮卓抗体和均相酶底物混合而成;

试剂2的制备: 由葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

5. 根据权利要求5所述的一种苯二氮卓免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤(1)具体过程为:

1) 苯二氮卓半抗原的制备

a. 将1-10 g苯二氮卓溶于10-100 mL无水吡啶中, 加入乙酸酐, 室温静置12小时以上, 减压浓缩, 蒸干后称重, 得产物A;

b. 用20-100 mL二甲基甲酰胺溶解50-150 g产物A, 再加入5-30 mL浓度为1M的盐酸, 室温静置12小时以上, 然后用乙醚萃取, 收集有机相用氢氧化钠水溶液萃取, 继续收集有机相减压浓缩, 加入少量石油醚, 蒸干得产物B;

c. 取适量产物B溶于乙酸酐中, 94℃下反应15-30分钟, 冷却结晶过夜, 再减压蒸干得产物C;

d. 产物C加入95%乙醇和5M氢氧化钠, 得到乳白色悬浊物, 加入适量纯化水溶解, 用少量乙酸调pH至酸性, 析出沉淀后过滤, 滤渣干燥过夜, 得产物D;

e. 称取100-500 mg产物D溶于2-10 mL无水吡啶中, 加入100-500 mg丁二酸酐, 95-105℃下反应14小时以上, 减压蒸干, 用38%碳酸钾溶解, 再用乙酸乙酯萃取, 收集水相, 用盐酸调pH至4.8-5.2, 然后用乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 减压蒸干, 得到苯二氮卓半抗原;

2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与苯二氮卓的偶联

a. 将5-35 mg上述苯二氮卓半抗原溶于500-2000 μL 2-(N-吗啡啉)乙磺酸中, 轻微振荡溶解; 取10-45 mg规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡均匀;

b. 将50-150 μL的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到苯二氮卓半抗原溶液中, 旋转混合15-30分钟;

c. 将上述活化好的苯二氮卓溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中, 搅拌反应1-2小时;

3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原, 得到葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物, 于2-8℃下储存。

6. 根据权利要求5所述的一种苯二氮卓免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)的具体过程如下:

试剂1的制备:将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2L磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将苯二氮卓抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物加到磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

7.利用权利要求1至4任意一项所述的苯二氮卓免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)将待测样本与苯二氮卓抗体接触;

2)根据待测样本中苯二氮卓与苯二氮卓抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中苯二氮卓的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,具体是一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 苯二氮卓类(Benzodiazepines,BZD)是一类作用于中枢神经系统的镇静剂,药物种类很多,多为1,4-苯并二氮的衍生物,其基本结构是由两个苯环和一个含有7个原子的杂环组成。具有镇静催眠、抗焦虑、抗惊厥、肌肉松弛等作用,且毒性较小。然而,大剂量使用苯二氮卓类药物会致共济失调,过量急性中毒可致昏迷和呼吸抑制,久服会产生身体和精神依赖性,产生依赖性的风险随剂量的增加及治疗期的延长而增加。一旦出现身体依赖性,立即停药会出现戒断症状,包括头痛、肌肉痛、极度焦虑紧张、烦躁、兴奋和谵妄。严重时会出现失眠、意识障碍、失去理智、听觉过敏、麻木、四肢麻刺感,出现幻觉和癫痫发作。

[0003] 目前检测苯二氮卓的常用方法有:高效液相色谱分析(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、紫外分光光度法和荧光分光光度法等。其中,HPLC法和GC-MS法费时且不易自动化;紫外分光光度法和荧光分光光度法,检测结果准确性差,对样品的纯度要求较高,还需要昂贵的仪器设备。

[0004] 本发明采用的方法为均相酶免疫检测法,其优点为:操作简便、快速、灵敏度高、准确性好、适合于自动化,应用广泛,并且用全自动生化分析仪对小分子物质和大分子物质都能高通量快速测定。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中苯二氮卓检测过程操作复杂、以及测定准确率低的问题,本发明提供了一种快速、灵敏度高、准确检测出待测样本中苯二氮卓含量的苯二氮卓均相酶免疫检测试剂及其制备方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂;上述酶标苯二氮卓由苯二氮卓和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0007] 作为本发明进一步的方案,所述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

[0008] 作为本发明进一步的方案,所述的一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物的制备:苯二氮卓半抗原的制备,葡萄糖脱氢酶(GDH)与苯二氮卓半抗原偶联,纯化偶联的酶标抗原。

[0009] (2)苯二氮卓均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由苯二氮卓抗体和均相酶底物混合而成;

试剂2的制备:由葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

[0010] 作为本发明进一步的方案,所述的一种苯二氮卓免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤(1)具体过程为:

1) 苯二氮卓半抗原的制备

a. 将1-10 g苯二氮卓溶于10-100 mL无水吡啶中,加入乙酸酐,室温静置12小时以上,减压浓缩,蒸干后称重,得产物A;

b. 用20-100 mL二甲基甲酰胺溶解50-150 g产物A,再加入5-30 mL 浓度为1M的盐酸,室温静置12小时以上,然后用乙醚萃取,收集有机相用氢氧化钠水溶液萃取,继续收集有机相减压浓缩,加入少量石油醚,蒸干得产物B;

c. 取适量产物B溶于乙酸酐中,94℃下反应15-30分钟,冷却结晶过夜,再减压蒸干得产物C;

d. 产物C加入95%乙醇和5M氢氧化钠,得到乳白色悬浊物,加入适量纯化水溶解,用少量乙酸调pH至酸性,析出沉淀后过滤,滤渣干燥过夜,得产物D;

e. 称取100-500 mg产物D溶于2-10 mL无水吡啶中,加入100-500 mg丁二酸酐,95-105℃下反应14小时以上,减压蒸干,用38%碳酸钾溶解,再用乙酸乙酯萃取,收集水相,用盐酸调pH至4.8-5.2,然后用乙酸乙酯萃取,收集有机相,减压蒸干,得到苯二氮卓半抗原。

[0011] 2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与苯二氮卓的偶联

a. 将5-35 mg上述苯二氮卓半抗原溶于500-2000 μ L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸中,轻微振荡溶解;取10-45 mg 规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡均匀;

b. 将50-150 μ L的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到苯二氮卓半抗原溶液中,旋转混合15-30分钟;

c. 将上述活化好的苯二氮卓溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中,搅拌反应1-2小时。

[0012] 3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物,于2-8℃下储存。

[0013] 作为本发明进一步的方案,所述的一种苯二氮卓免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤(2)的具体过程如下:

试剂1 的制备:将2-5 g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3 g葡萄糖用0.5-2 L磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将苯二氮卓抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物加到磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0014] 作为本发明进一步的方案,所述的苯二氮卓免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与苯二氮卓抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标苯二氮卓与苯二氮卓抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中苯二氮卓的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0015] 本发明的原理是抗原与酶结合成酶标抗原,保留抗原和酶的生物活性,当酶标抗原与抗体结合后,抗原分子上的酶蛋白与抗体密切接触,使酶的活性中心受到影响,酶的活

性受到抑制。测定时样本中的抗原、酶标抗原与抗体竞争性结合,样本中的抗原含量越高,加底物后其OD值越高。

[0016] 本发明的优点在于:本发明的苯二氮卓免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中苯二氮卓含量。与市场上现有的检测试剂相比,本发明检测试剂具有方便快捷、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点,有利于临床的推广使用。

附图说明

[0017] 图1 是苯二氮卓均相酶免疫反应校准曲线图。

[0018] 图2 是苯二氮卓均相酶免疫线性范围图。

具体实施方式

[0019] 本发明提供了一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法,为使本发明目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进行详细说明。

[0020] 本发明提供了一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂;上述酶标苯二氮卓由苯二氮卓和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0021] 本发明中所指的“苯二氮卓”不仅仅指完整的苯二氮卓分子,也包括保留完整抗原特异性结合能力的苯二氮卓片断或者衍生物。

[0022] 一种苯二氮卓均相酶免疫检测试剂,包括:酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂。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。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0023] 上述的苯二氮卓免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1) 将待测样本与苯二氮卓抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标苯二氮卓与苯二氮卓抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中苯二氮卓的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0024] 下面通过具体的实施例对本发明进行详细说明。

[0025] 实施例一:葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的制备

1) 苯二氮卓半抗原的制备

a. 将2 g苯二氮卓溶于25 mL无水吡啶中,加入25 mL乙酸酐,室温静置16小时,减压浓缩,蒸干后称重,得产物A;

b. 用40 mL二甲基甲酰胺溶解20 g产物A,再加入10 mL 浓度为1M的盐酸,室温静置16小时,然后用50 mL乙醚萃取,收集有机相用30 mL氢氧化钠水溶液萃取,继续收集有机相减压浓缩,加入10 mL石油醚,蒸干得产物B;

c. 取适量产物B溶于20 mL乙酸酐中,94℃下反应20分钟,冷却结晶过夜,再减压蒸干得产物C;

d. 产物C加入30 mL 95%乙醇和5M 3 mL氢氧化钠,得到乳白色悬浊物,加入30 mL纯化水溶解,用少量乙酸调pH至酸性,析出沉淀后过滤,滤渣干燥过夜,得产物D;

e. 称取250 mg产物D溶于5 mL无水吡啶中,加入300 mg丁二酸酐,95-105℃下反应16小时,减压蒸干,用38%碳酸钾10 mL溶解,再用10 mL乙酸乙酯萃取,收集水相,用盐酸调pH至4.8-5.2,然后用15 mL乙酸乙酯萃取,收集有机相,减压蒸干,得到苯二氮卓半抗原。

[0026] 2) 葡萄糖脱氢酶(GDH)与苯二氮卓的偶联

a. 将20 mg上述苯二氮卓半抗原溶于800 μ L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸中,轻微振荡溶解;取30 mg 规格为150 KU的GDH溶解于800 μ L PBS缓冲液中震荡均匀;

b. 将80 μ L的碳二亚胺(EDC)溶液在搅拌下缓慢滴加到苯二氮卓半抗原溶液中,旋转混合30分钟;

c. 将上述活化好的苯二氮卓溶液在搅拌下缓慢加入到GDH溶液中,搅拌反应2小时。

[0027] 3) 纯化偶联的酶标抗原

通过G-25凝胶层析柱纯化偶联的酶标抗原,得到葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物,于2-8℃下储存。

[0028] 实施例二:苯二氮卓均相酶免疫检测试剂的制备

苯二氮卓均相酶免疫检测试剂,包括:酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂。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。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0029] 苯二氮卓均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是分开放置的,因此苯二氮卓均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂,具体如下:

1. 试剂1 的制备:将3.588g(10 mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、1.802g(10 mM)葡萄糖用1L 50 mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将苯二氮卓抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000,在本实施例中具体的比例为1:500。

[0030] 2. 试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物加到50 mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液中,上述偶联物与磷酸盐缓冲液的体积比为1:100~1:10000,在本实施例中具体的比例为1:1800。

[0031] 上述苯二氮卓均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1) 将待测样本与苯二氮卓抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标苯二氮卓与苯二氮卓抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中苯二氮卓的含量;

具体的,检测时将待测样本加到试剂1中,待测样本中的苯二氮卓与试剂1中的苯二氮卓抗体发生特异性结合,生成抗苯二氮卓抗体-苯二氮卓复合物;再加入试剂2,此时试剂2中的葡萄糖脱氢酶-苯二氮卓偶联物与试剂1中的酶的底物混合、接触,发生酶促反应,构成检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中苯二氮卓与上述苯二氮卓抗体的结合情况判断待测样本中苯二氮卓的含量。

[0032] 由于葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与待测样本中的苯二氮卓竞争性结合苯二氮卓抗体,所以,待测样本中苯二氮卓的量越多,均相酶溶液中游离的葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的量越多,酶促反应越快,导致OD₃₄₀ 上升。

[0033] 上述待测样本为生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等,作为一种优选的方案,上述待测样本为血清或血浆。

[0034] 实施例三:苯二氮卓均相酶免疫检测试剂反应校准曲线。

[0035] 1) 校准品配制:将市售人苯二氮卓重组蛋白溶于类似人血清基质的溶液(NaCl 0.9%,BSA 0.2%,NaN₃ 0.1%,Tris-HCl pH 7.4)中,制成不同浓度的校准品。以北京库尔科技有限公司苯二氮卓校准品为原始标准,采用其苯二氮卓试剂盒对不同浓度的校准品分别检测10次,求出均值,得到苯二氮卓校准品的浓度:10,25,50,100,400,800 ng/mL。

[0036] 2) 生化分析仪检测:以日立7170操作为例:测定波长为340 nm,分别取不同浓度的校准品溶液(15μL),加入苯二氮卓R₁试剂(200μL),混匀,再加入苯二氮卓R₂试剂(50μL),混匀后,测定不同时间点的OD₃₄₀ 吸光值,算出不同校准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂1 和试剂2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,每管重复测定3次,以各校准管3次测得的吸光度差值 ΔA的平均值为纵坐标,对应的校准品浓度为横坐标,绘制“浓度-吸光度差值”校准曲线(见图1)。

[0037] 取待测血清或血浆样本,同法测定样本的吸光度差值,代入校准曲线,即可计算出待测样本中苯二氮卓的含量。如果血清或血浆中苯二氮卓的浓度超出校准曲线范围,需对样本进行稀释后再检测以保证检测结果的准确性。

[0038] 本检测试剂不仅适用于日立7170,还适用于其它品牌和型号的半自动、全自动生化分析仪,具体参数可根据仪器进行调整。

[0039] 实施例四:线性范围确定

用接近线性范围上限的苯二氮卓高浓度样本(768 ng/mL),用上述类似人血清基质的溶液将其按1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64 稀释,共配制成6个稀释浓度(x_i)的溶液,用所述生化分析仪检测方法测定各稀释样本浓度。每个稀释浓度测试3次,分别求出每个稀释浓度检测结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定均值(y_i)为因变量求出线性回归方程,根据公式(1)计算线性回归的相关系数r,结果显示回归方程为 $y=0.9764x+0.6697$,相关系数 $r=0.9999$,表明本发明试剂在10 ng/mL-768 ng/mL线性范围内相关性较好(见图2)。

[0040] 由于本发明的检测过程是由仪器全自动化完成,所以对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用。

[0041] 需要说明的是,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明的专利保护范围内。

[0042] 此外,以上所述的仅是本发明的优选实施方案,对于本技术领域的技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做若干的改进和调整,这些改进的调整也应视为本发明的保护范围。

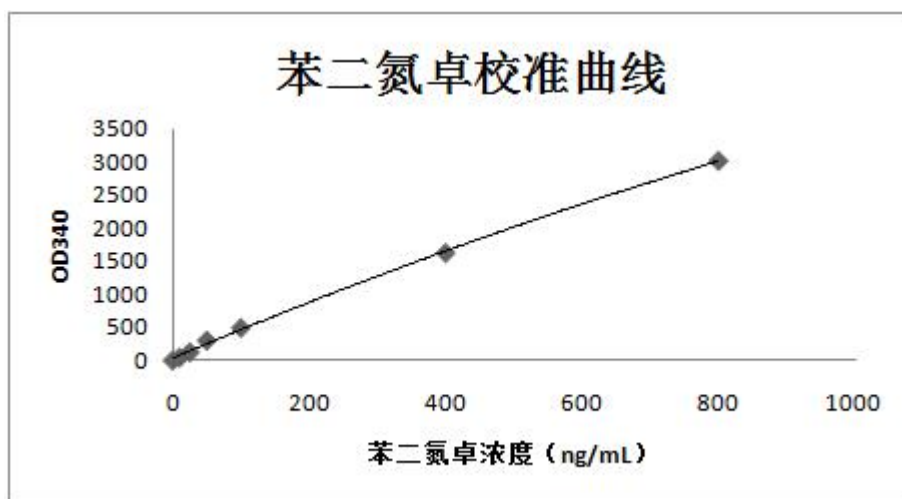


图1

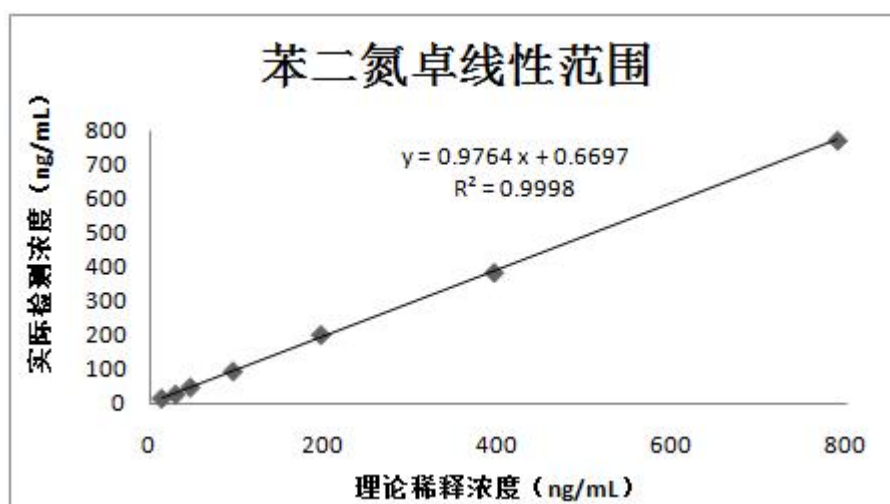


图2

专利名称(译)	一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN108037280A	公开(公告)日	2018-05-15
申请号	CN201711392423.2	申请日	2017-12-22
[标]发明人	杨钰祥 于雪纯 康志禹 丁兰艳 杜爱铭 徐兵		
发明人	杨钰祥 于雪纯 康志禹 丁兰艳 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种苯二氮卓免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标苯二氮卓、用于检测苯二氮卓抗体-酶标苯二氮卓复合物的指示试剂；上述酶标苯二氮卓由苯二氮卓和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的苯二氮卓免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中苯二氮卓含量。与市场上现有的检测试剂相比，本发明检测试剂具有方便快捷、灵敏度高、特异性强、定量准确等优点，有利于临床的推广使用。

