



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108593908 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201711402528.1

(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 李瑶 冯丽昕 许殊荣 张轩
杜爱铭 徐兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

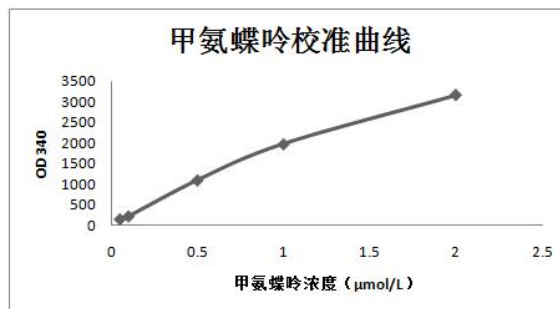
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂；上述酶标甲氨蝶呤由甲氨蝶呤和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的甲氨蝶呤免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中甲氨蝶呤含量。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. 一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法, 其特征在于: 酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂。

2. 根据权利要求1所述的甲氨蝶呤的免疫检测试剂, 其特征在于: 所述酶标甲氨蝶呤由甲氨蝶呤和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

3. 根据权利要求1所述的甲氨蝶呤免疫检测试剂, 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-甲氨蝶呤偶联物; 上述酶的底物为葡萄糖。

4. 一种甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤偶联物的制备: 制备葡萄糖脱氢酶 (GDH) 溶液, 甲氨蝶呤的活化, 将GDH与甲氨蝶呤偶联, 纯化偶联的酶标抗原;

(2) 甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备: 由甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

5. 根据权利要求5所述的一种甲氨蝶呤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) 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 溶液的制备:

a. 称取5-20 mg 规格为100-300 KU的GDH, 室温溶解于6-10 mL 含有Tris、MgCl₂和NaCl的溶液中, pH为8.0-10.0;

2) 甲氨蝶呤的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解: 10-30 mg 甲氨蝶呤、10-40 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、2-10 mg N-羟基琥珀酰亚胺, 溶解于吗啉乙磺酸 (MES) 溶液中, 于室温下搅拌溶解, 反应15-60分钟;

3) GDH 与甲氨蝶呤的偶联

a. 将上述活化的甲氨蝶呤溶液逐滴加入到上述溶解的GDH溶液中;

b. 2-8℃搅拌过夜;

4) 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-甲氨蝶呤偶联物, 于2-8℃下储存。

6. 根据权利要求5所述的一种甲氨蝶呤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; 将甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤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任意一项所述的甲氨蝶呤免疫检测试剂的检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

1) 将待测样本与甲氨蝶呤抗体接触;

2) 根据待测样本中甲氨蝶呤与甲氨蝶呤抗体的结合情况, 利用指示试剂判断样本中甲

氨蝶呤的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体是一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 甲氨蝶呤 (Methotrexate, MTX) 是一种抗代谢性广谱抗肿瘤药物,属于细胞周期特异性药物。由于四氢叶酸是在体内合成嘌呤核苷酸和嘧啶脱氧核苷酸的重要辅酶,MTX作为一种叶酸还原酶抑制剂,主要抑制二氢叶酸还原酶而使二氢叶酸不能被还原成具有生理活性的四氢叶酸,导致DNA的生物合成受到明显抑制。此外,本药也可抑制胸腺核苷酸合成酶,但抑制RNA与蛋白质合成的作用较弱。在自身免疫疾病中,特别是在类风湿性关节炎的治疗中,MTX似乎影响几种通路,抑制T细胞的活化,MTX还有很强的抗炎作用。大剂量MTX具有抗肿瘤作用。能选择性抑制增殖中的细胞,阻止免疫母细胞的分裂增殖,对细胞免疫及体液免疫均有抑制作用。检测MTX水平对于确保在治疗或治疗期间适当水平是非常重要的。高水平的MTX可以导致毒性和潜在的肾衰竭以及免疫抑制。

[0003] 目前检测甲氨蝶呤的常用方法有:高效液相色谱分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫发光法等。其中,高效液相色谱分析费时且不易自动化;ELISA法定量准确性差、操作时间长、自动化程度低,多用于定性检测;RIA法所需时间较长,检测结果不稳定,重复性比ELISA差,且存在放射性污染危险。免疫发光法特异性强,敏感性高,但需要昂贵的仪器设备和经验丰富的操作人员,一般多在特定医疗机构使用。

[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甲氨蝶呤检测过程操作复杂、以及测定准确度低的问题,本发明提供了一种快速、灵敏度高、准确检测出待测样本中甲氨蝶呤含量的甲氨蝶呤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:

一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂;上述酶标甲氨蝶呤由甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

[0008] 作为本发明进一步的方案,所述的一种甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤偶联物的制备:制备葡萄糖脱氢酶(GDH)溶液,甲氨蝶呤的

活化,将GDH与甲氨蝶呤偶联,纯化偶联的酶标抗原;

(2) 甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由甲氨蝶呤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。

[0009] 作为本发明进一步的方案,所述的一种甲氨蝶呤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) 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 溶液的制备:

a. 称取5-20mg规格为100-300KU的GDH,室温溶解于6-10mL含有Tris、MgCl₂和NaCl的溶液中,pH为8.0-10.0;

[0010] 2) 甲氨蝶呤的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解:10-30mg甲氨蝶呤、10-40mg 1-乙基 -3-(-3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、2-10mg N-羟基琥珀酰亚胺,溶解于吗啉乙磺酸(MES)溶液中,于室温下搅拌溶解,反应15-60分钟;

3) GDH与甲氨蝶呤的偶联

a. 将上述活化的甲氨蝶呤溶液逐滴加入到上述溶解的GDH溶液中;

b 2-8℃搅拌过夜;

4) 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-甲氨蝶呤偶联物,于2-8℃下储存。

[0011] 作为本发明进一步的方案,所述的一种甲氨蝶呤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2-5g氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、0.5-3g葡萄糖用 0.5-2L磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物;将甲氨蝶呤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-甲氨蝶呤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。

[0012] 作为本发明进一步的方案,所述的甲氨蝶呤免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将待测样本与甲氨蝶呤抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标甲氨蝶呤与甲氨蝶呤抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0013] 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。

[0014] 本发明的优点在于:本发明的甲氨蝶呤免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中甲氨蝶呤含量。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

[0015] 图1是甲氨蝶呤均相酶免疫反应校准曲线图。

[0016] 图2是甲氨蝶呤均相酶免疫线性范围图。

[0017] 图3是甲氨蝶呤均相酶免疫与德灵诊断的酶放大免疫测定法检测结果的相关性分析图。

具体实施方式

[0018] 本发明提供了一种甲氨蝶呤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。

[0019] 本发明提供了一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂;上述酶标甲氨蝶呤由甲氨蝶呤和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0020] 本发明中所指的“甲氨蝶呤”不仅仅指完整的甲氨蝶呤分子,也包括保留完整抗原特异性结合能力的甲氨蝶呤片断或者衍生物。

[0021] 一种甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂,包括:酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂。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。

[0022] 上述的甲氨蝶呤免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1) 将待测样本与甲氨蝶呤抗体接触;

2) 根据待测样本中酶标甲氨蝶呤与甲氨蝶呤抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量;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。

[0023] 下面通过具体的实施例对本发明进行详细说明。

[0024] 实施例一:葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物的制备

1) 葡萄糖脱氢酶 (GDH) 溶液的制备:

a. 称取10mg规格为100KU的GDH,室温溶解于8mL含有48.4mg Tris、8mg $MgCl_2$ 和100mg NaCl的溶液中,pH=9.0;

[0025] 2) 甲氨蝶呤的活化

将如下化学品加入到烧杯中搅拌溶解:25mg甲氨蝶呤、20mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、5mg N-羟基琥珀酰亚胺,溶解于600 μ L吗啉乙磺酸(MES) 溶液中,于室温下搅拌溶解,反应30分钟;

3) GDH与甲氨蝶呤的偶联

a. 将上述活化的甲氨蝶呤溶液逐滴加入到上述溶解的GDH溶液中;

b 2-8℃搅拌过夜;

4) 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-甲氨蝶呤偶联物,于2-8℃下储存。

[0026] 实施例二：甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的制备

甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂，包括：酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂。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。

[0027] 甲氨蝶呤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，因此甲氨蝶呤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 (10mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、1.802g (10mM) 葡萄糖用1L 50mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液溶解制成均相酶底物；将甲氨蝶呤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。

[0028] 2. 试剂2的制备：将制备的葡萄糖脱氢酶-甲氨蝶呤偶联物加到50mM、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。

[0029] 上述甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂的使用方法，包括以下步骤：

- 1) 将待测样本与甲氨蝶呤抗体接触；
- 2) 根据待测样本中酶标甲氨蝶呤与甲氨蝶呤抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中甲氨蝶呤的含量；

具体的，检测时将待测样本加到试剂1中，待测样本中的甲氨蝶呤与试剂1中的甲氨蝶呤抗体发生特异性结合，生成抗甲氨蝶呤抗体-甲氨蝶呤复合物；再加入试剂2，此时试剂2中的葡萄糖脱氢酶-甲氨蝶呤偶联物与试剂1中的酶的底物混合、接触，发生酶促反应，构成检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂，指示试剂根据待测样本中甲氨蝶呤与上述甲氨蝶呤抗体的结合情况判断待测样本中甲氨蝶呤的含量。

[0030] 由于葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与待测样本中的甲氨蝶呤竞争性结合甲氨蝶呤抗体，所以，待测样本中甲氨蝶呤的量越多，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。

[0031] 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。

[0032] 实施例三：甲氨蝶呤均相酶免疫检测试剂反应校准曲线。

[0033] 1) MTX校准品配制：将市售人甲氨蝶呤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。以德灵诊断产品 (上海) 有限公司甲氨蝶呤校准品为原始标准，采用其甲氨蝶呤试剂盒对不同浓度的校准品分别检测10次，求出均值，得到甲氨蝶呤校准品的浓度：0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00 μmol/L。

[0034] 2) 生化分析仪检测：以日立7170操作为例：测定波长为340nm，分别取不同浓度的校准品溶液 (15 μL)，加入甲氨蝶呤R₁试剂 (200 μL)，混匀，再加入甲氨蝶呤R₂试剂 (50 μL)，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)。

[0035] 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甲氨蝶呤的含量。如果血清或血浆中甲氨蝶呤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。

[0036] 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。

[0037] 实施例四:线性范围确定

用接近线性范围上限的甲氨蝶呤高浓度样本($19.20\mu\text{mol/L}$),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 $y = 1.0184x + 0.0305$,相关系数 $r = 0.9998$,表明本发明试剂在 $0.30\mu\text{mol/L}$ - $19.20\mu\text{mol/L}$ 线性范围内相关性较好(见图2)。

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots (1)$$

[0038] 实施例五:相关性分析

对 80 例临床标本分别使用德灵诊断的酶放大免疫测定法和本发明的均相酶免疫法分别对样本重复测定 2 次,分别计算平均值,对 80 例样本检测结果进行线性回归分析,计算两种试剂检测结果的相关系数。

[0039] 结果显示,两种试剂盒检测结果的相关系数 $r = 0.9989$,线性回归方程为 $y = 0.9905x + 0.0156$ (见图3),表明本发明甲氨蝶呤均相酶免疫法检测试剂和市售德灵诊断的酶放大免疫测定法检测试剂具有很好的一致性。

[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。

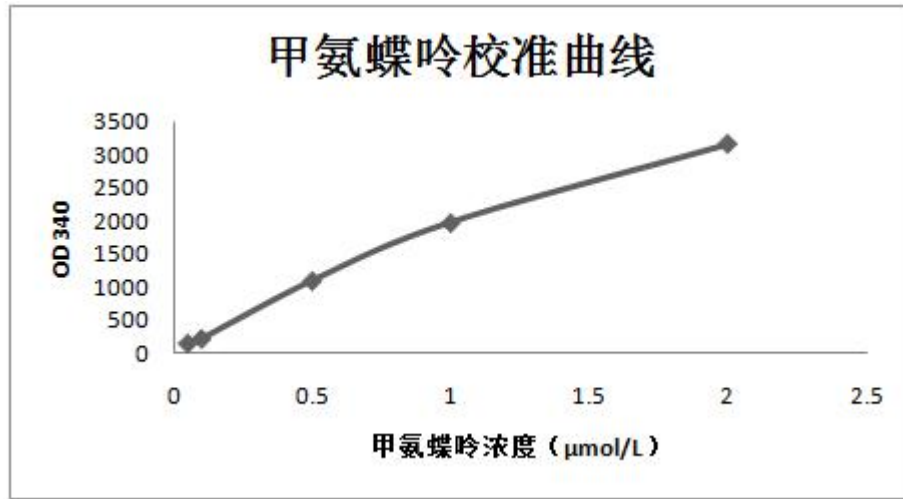


图1

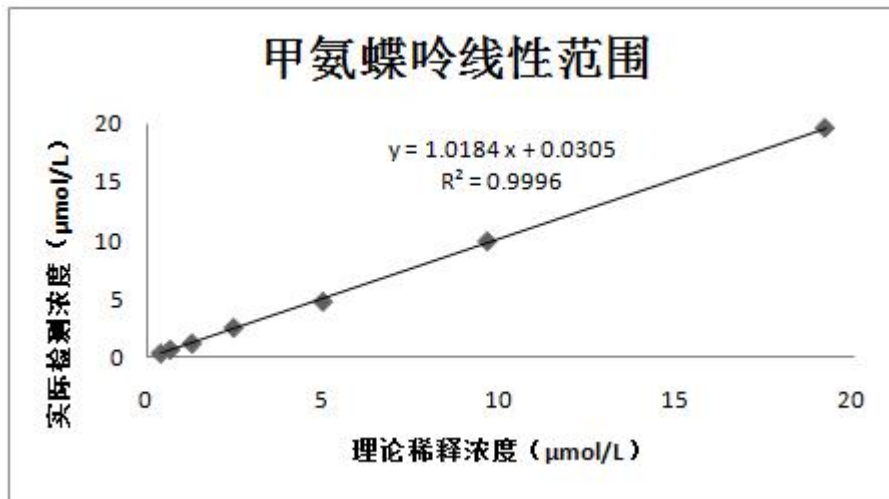


图2

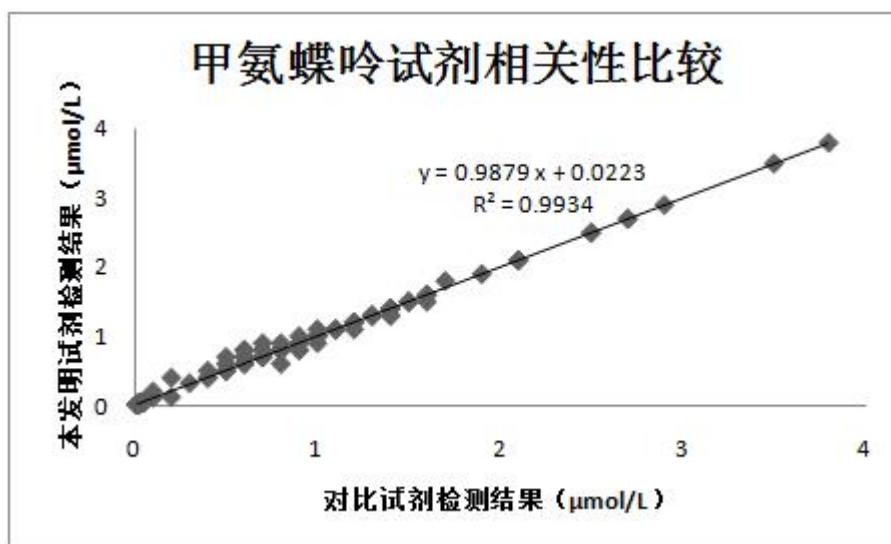


图3

专利名称(译)	一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN108593908A	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201711402528.1	申请日	2017-12-22
[标]发明人	李瑶 冯丽昕 许殊荣 张轩 杜爱铭 徐兵		
发明人	李瑶 冯丽昕 许殊荣 张轩 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甲氨蝶呤免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标甲氨蝶呤、用于检测甲氨蝶呤抗体-酶标甲氨蝶呤复合物的指示试剂；上述酶标甲氨蝶呤由甲氨蝶呤和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的甲氨蝶呤免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中甲氨蝶呤含量。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。

