(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108761062 A
(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810484515.1

(22)申请日 2018.05.23

(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 刘丽青 胡雪婷 曹晶

(51)Int.Cl.
G01N 33/535(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂;上述酶标普鲁卡因胺由普鲁卡因胺和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的普鲁卡因胺免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中普鲁卡因胺含量。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速、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。

CN 108761062 A

1.一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法,其特征在于:酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂。

2.根据权利要求1所述的普鲁卡因胺的免疫检测试剂,其特征在于:所述酶标普鲁卡因胺由普鲁卡因胺和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

3.根据权利要求1所述的普鲁卡因胺免疫检测试剂,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-普鲁卡因胺偶联物;上述酶的底物为葡萄糖。

4.一种普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺偶联物的制备:葡萄糖脱氢酶(GDH)与普鲁卡因胺偶联,纯化偶联的酶标抗原。

5.(2)普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂1的制备:由普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺偶联物与磷酸盐缓冲液混合而成。

6.根据权利要求5所述的一种普鲁卡因胺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)与普鲁卡因胺的偶联

a. 将5-30 mg普鲁卡因胺溶于100-500 μL二甲基甲酰胺(DMF)中,轻微振荡溶解;同时,取10-40 mg规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡、均匀溶解。

7.b. 将普鲁卡因胺溶液在搅拌下缓慢加入GDH溶液中,同时缓慢滴入10-40 μL戊二醛溶液,滴加完毕后将溶液置于4℃搅拌反应过夜。

8.2)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-普鲁卡因胺偶联物,于2-8℃下储存。

9.根据权利要求5所述的一种普鲁卡因胺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;将普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺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。

10.利用权利要求1至4任意一项所述的普鲁卡因胺免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)将待测样本与普鲁卡因胺抗体接触;

2)根据待测样本中普鲁卡因胺与普鲁卡因胺抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中普鲁卡因胺的含量;所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

一种普鲁卡因胺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，具体是一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 普鲁卡因胺(Procainamide)是一种应用多年的Ia类抗心律失常药物，其抗心律失常的作用主要在于减慢心肌的电传导，延长心肌组织的复极时间，作用的电生理机理为抑制Na^+、K^+、Ca^{2+}通道。普鲁卡因胺对心室复极的影响通常表现为动作电位时程和有效不应期的延长，稳定心肌细胞膜，降低应激性及传导性，抑制心肌自律性。用奎尼丁无效患者用本品可能有效。研究表明，普鲁卡因胺还具有抑制血小板聚集作用。但是，大剂量口服出现恶心、呕吐、腹泻等胃肠道反应，长期用药可导致系统性红斑狼疮样综合样综合征，患者出现抗DNA抗体阳性，用量过大还能导致血白细胞减少等。所以在有关食品等样品中对普鲁卡因胺进行快速、灵敏的测定很有必要。

[0003] 目前检测普鲁卡因胺的常用方法有：高效液相色谱分析、分光光度法和毛细管电泳法等。其中，高效液相色谱分析费时且不易自动化，并且使用紫外检测时需要衍生；分光光度法检测结果准确度相对不高；毛细管电泳法灵敏度较低并且重现性较差。

[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普鲁卡因胺检测过程操作复杂、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普鲁卡因胺含量的普鲁卡因胺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：

一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法，其特征在于：酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂；上述酶标普鲁卡因胺由普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺偶联物；上述酶的底物为葡萄糖。

[0008] 作为本发明进一步的方案，所述的一种普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺偶联物的制备：葡萄糖脱氢酶(GDH)与普鲁卡因胺偶联，纯化偶联的酶标抗原。

[0009] (2)普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂的制备：

试剂1的制备：由普鲁卡因胺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,所述的一种普鲁卡因胺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)与普鲁卡因胺的偶联

a.将5-30 mg普鲁卡因胺溶于100-500 μL二甲基甲酰胺(DMF)中,轻微振荡溶解;同时,取10-40 mg规格为100-300 KU的GDH溶解于PBS缓冲液中震荡、均匀溶解。

[0011] b.将普鲁卡因胺溶液在搅拌下缓慢加入GDH溶液中,同时缓慢滴入10-40 μL戊二醛溶液,滴加完毕后将溶液置于4℃搅拌反应过夜。

[0012] 2)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-普鲁卡因胺偶联物,于2-8℃下储存。

[0013] 作为本发明进一步的方案,所述的一种普鲁卡因胺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;将普鲁卡因胺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-普鲁卡因胺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,所述的普鲁卡因胺免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)将待测样本与普鲁卡因胺抗体接触;

2)根据待测样本中酶标普鲁卡因胺与普鲁卡因胺抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中普鲁卡因胺的含量;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:本发明的普鲁卡因胺免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中普鲁卡因胺含量。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速、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 是普鲁卡因胺均相酶免疫反应校准曲线图。

[0018] 图2 是普鲁卡因胺均相酶免疫线性范围图。

具体实施方式

[0019] 本发明提供了一种普鲁卡因胺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] 本发明提供了一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括:酶标普

鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂;上述酶标普鲁卡因胺由普鲁卡因胺和葡萄糖脱氢酶偶联而成。

[0021] 本发明中所指的“普鲁卡因胺”不仅仅指完整的普鲁卡因胺分子,也包括保留完整抗原特异性结合能力的普鲁卡因胺片断或者衍生物。

[0022] 一种普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂,包括:酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂。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] 上述的普鲁卡因胺免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

1)将待测样本与普鲁卡因胺抗体接触;

2)根据待测样本中酶标普鲁卡因胺与普鲁卡因胺抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中普鲁卡因胺的含量;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)葡萄糖脱氢酶(GDH)与普鲁卡因胺的偶联

a. 将30 mg普鲁卡因胺溶于350 μL二甲基甲酰胺(DMF)中,轻微振荡溶解;同时,取30.0 mg规格为100 KU的GDH溶解于5 mL 0.01mol/L的PBS (pH7.4)缓冲液中,震荡、均匀溶解;

b. 将普鲁卡因胺溶液在搅拌下缓慢加入GDH溶液中,同时缓慢滴入30 μL 25%戊二醛溶液,滴加完毕后将溶液置于4℃搅拌反应过夜。

[0026] 2)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-普鲁卡因胺偶联物,于2-8℃下储存。

[0027] 实施例二:普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂的制备

普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂,包括:酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂。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。

[0028] 普鲁卡因胺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,因此普鲁卡因胺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3.588 g(10 mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD、1.802 g(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;将普鲁卡因胺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1:650。

[0029] 2.试剂2的制备:将制备的葡萄糖脱氢酶-普鲁卡因胺偶联物加到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1:1900。

[0030] 上述普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂的使用方法，包括以下步骤：

1)将待测样本与普鲁卡因胺抗体接触；

2)根据待测样本中酶标普鲁卡因胺与普鲁卡因胺抗体的结合情况，利用指示试剂判断样本中普鲁卡因胺的含量；

具体的，检测时将待测样本加到试剂1中，待测样本中的普鲁卡因胺与试剂1中的普鲁卡因胺抗体发生特异性结合，生成普鲁卡因胺抗体-普鲁卡因胺复合物；再加入试剂2，此时试剂2中的葡萄糖脱氢酶-普鲁卡因胺偶联物与试剂1中的酶的底物混合、接触，发生酶促反应，构成检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂，指示试剂根据待测样本中普鲁卡因胺与上述普鲁卡因胺抗体的结合情况判断待测样本中普鲁卡因胺的含量。

[0031] 由于葡萄糖脱氢酶-抗原偶联物与待测样本中的普鲁卡因胺竞争性结合普鲁卡因胺抗体，所以，待测样本中普鲁卡因胺的量越多，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OD_{340}上升。

[0032] 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。

[0033] 实施例三：普鲁卡因胺均相酶免疫检测试剂反应校准曲线。

[0034] 1)校准品配制：将市售人普鲁卡因胺重组蛋白溶于类似人血清基质的溶液(NaCl 0.9%，BSA 0.2%，NaN_3 0.1%，Tris-HCl pH 7.4)中，制成不同浓度的校准品。以罗哲(上海)生物科技有限公司普鲁卡因胺校准品为原始标准，采用其普鲁卡因胺试剂盒对不同浓度的校准品分别检测10次，求出均值，得到普鲁卡因胺校准品的浓度：0.5，1，5，10，20，40μg/mL。

[0035] 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)，加入普鲁卡因胺R_1试剂(160μL)，混匀，再加入普鲁卡因胺R_2试剂(40μL)，混匀后，测定不同时间点的OD_{340} 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)。

[0036] 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普鲁卡因胺的含量。如果血清或血浆中普鲁卡因胺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。

[0037] 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。

[0038] 实施例四：线性范围确定

用接近线性范围上限的普鲁卡因胺高浓度样本(38.68μg/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(xi)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(yi)。以稀释浓度(xi)为自变量，以测定均值(yi)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=0.9793x+0.0142，相关系数r=0.9997，表明本发明试剂在0.63μg/mL-38.68μg/mL线性范围内相关性较好(见图2)。

[0039] $$r=\frac{\sum(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i-\bar{x})^2\sum(y_i-\bar{y})^2}}\cdots\cdots(1)$$

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。

[0040] 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。

[0041] 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。

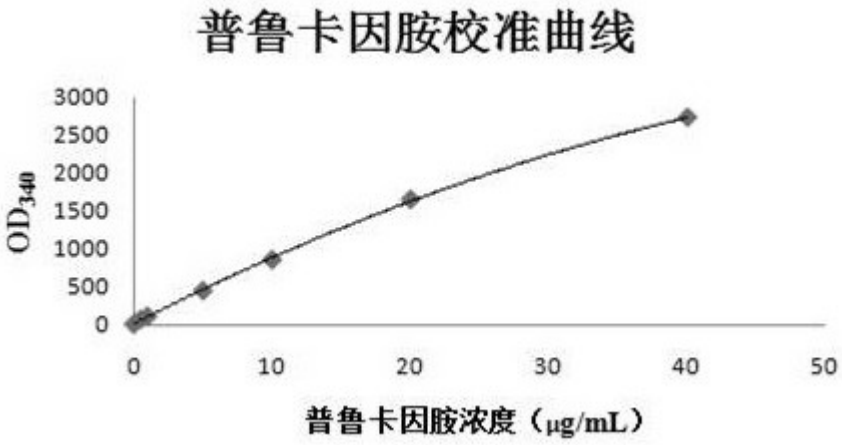

普鲁卡因胺校准曲线
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
OD340
0
10
20
30
40
50
普鲁卡因胺浓度（μg/mL）

图1

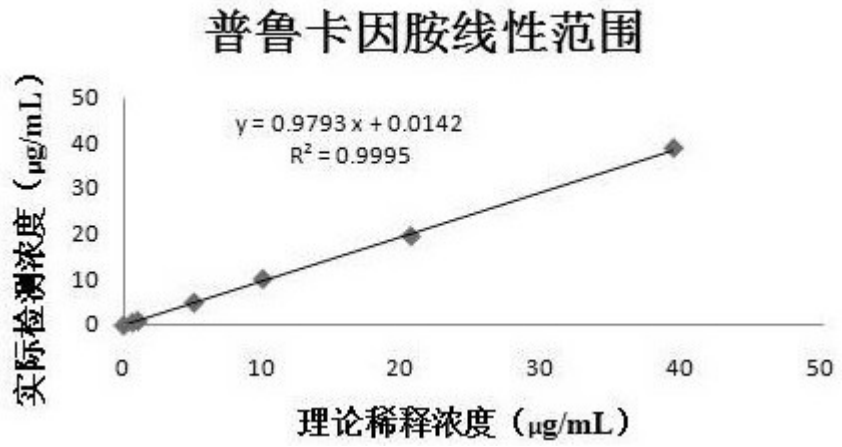
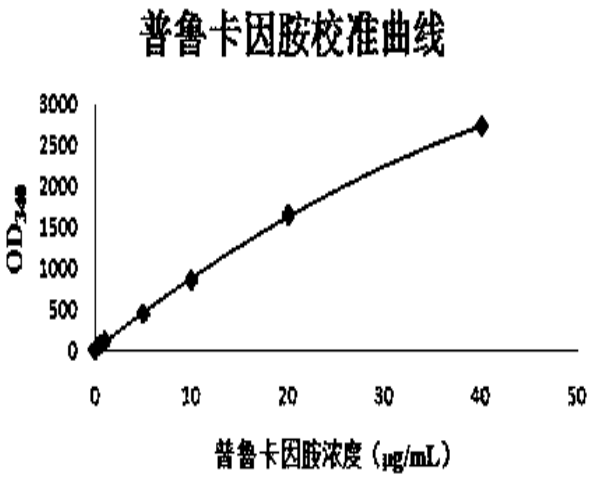

普鲁卡因胺线性范围
y = 0.9793 x + 0.0142
R² = 0.9995
50
40
30
20
10
0
实际检测浓度（μg/mL）
0
10
20
30
40
50
理论稀释浓度（μg/mL）

图2

专利名称(译)	一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN108761062A	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201810484515.1	申请日	2018-05-23
[标]发明人	李瑶 刘丽青 胡雪婷 曹晶		
发明人	李瑶 刘丽青 胡雪婷 曹晶		
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)

本发明公开了一种普鲁卡因胺免疫检测试剂及其制备和检测方法。包括：酶标普鲁卡因胺、用于检测普鲁卡因胺抗体-酶标普鲁卡因胺复合物的指示试剂；上述酶标普鲁卡因胺由普鲁卡因胺和葡萄糖脱氢酶偶联而成。本发明的普鲁卡因胺免疫检测试剂可以精确快速地确定人体血液等样品中普鲁卡因胺含量。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速、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。