



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102368054 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201110183275. X

CN 101377512 A, 2009. 03. 04, 全文.

(22) 申请日 2011. 06. 30

US 2003/0204062 A1, 2003. 10. 30, 全文.

(73) 专利权人 同昕生物技术(北京)有限公司  
地址 102206 北京市昌平区生命园路29号A座204室

邹德琴等. MEIA 法测定他克莫司全血浓度的问题分析. 《实用临床医学》. 2008, 第9卷(第10期), 第16-17页.

审查员 崔英颖

(72) 发明人 贾凤芹 焦守恕 李全

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004/0219620 A1, 2004. 11. 04, 全文.

CN 101368953 A, 2009. 02. 18, 全文.

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒及其化学发光底物显色液

(57) 摘要

本发明涉及检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒,属于医学检测试剂,包括化学发光酶标板,酶标记物;所述化学发光酶标板上的包被原为抗他克莫司单克隆抗体、二抗或与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原;其特征在于还包括自制的使试剂盒具有更高信噪比,检测灵敏度的化学发光底物显色液,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗体、抗原或抗抗体。既可以应用于开放式的半自动化学发光测量仪,也可用于全自动的测量系统,适合国内现状,成本低,但检测效果与进口试剂无显著差异可实现大批量快速检测,更易推广应用。

1. 用于化学发光酶联免疫检测的化学发光底物显色液,包括底物 A 液和底物 B 液,其中 A 液的组成为:pH 值为 7.2 ~ 8.5,浓度为 10 ~ 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度为 0.02 ~ 0.1% (V/V) 的 Proclin300,0.1 ~ 1.0% (V/V) 的吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液; B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度为 0.02 ~ 0.1% (W/V) Proclin300,1.0 ~ 3.0mM 的 4- 碘苯酚,0.1% ~ 1% (W/V) 的 BSA,0.1 ~ 1% (W/V) 的溴化十六烷基三甲基铵,10 ~ 50mM 鲁米诺溶液。

2. 检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒,包括化学发光酶标板,酶标记物;所述化学发光酶标板上的包被原为抗他克莫司单克隆抗体、二抗或与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原;其特征在于还包括权利要求 1 所述的化学发光底物显色液,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗体、抗原或抗抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述包被原为抗他克莫司单克隆抗体或二抗,所述二抗为羊抗鼠抗抗体或兔抗鼠抗抗体,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的他克莫司半抗原。

4. 根据权利要求 2 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述包被原为二抗,所述二抗为羊抗鼠抗抗体或兔抗鼠抗抗体,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的他克莫司单克隆抗体。

5. 根据权利要求 2 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述包被原为与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗他克莫司单克隆抗体。

6. 根据权利要求 2 ~ 5 任一所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述载体蛋白为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、蓝血蛋白或卵清蛋白。

7. 根据权利要求 6 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述试剂盒还包括前处理液、样品稀释液、他克莫司标准品溶液、他克莫司质量控制溶液、浓缩洗涤液。

8. 根据权利要求 7 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述前处理液为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液,甲醇与乙二醇的体积比 3 :1。

9. 根据权利要求 7 所述的化学发光酶联免疫试剂盒,所述样品稀释液为含 0.3-0.5M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液。

## 检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂 盒及其化学发光底物显色液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术,特别是一种用于人全血中他克莫司药物浓度的检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 他克莫司 (tacrolimus) 是由 Fujisawa 公司 1984 发现的一类大环内酯类免疫抑制剂,于 1989 年首次应用于临床,现在已经被广泛应用于移植后的排斥治疗。其作用机理是,他克莫司与其结合蛋白 FKBP12 相结合后抑制了磷酸酶的活性,从而抑制核调蛋白和 T 细胞活化因子(如白介素 -2)、原癌基因和细胞因子相应受体(如白介素 -2 受体)的表达。但实际情况是,他克莫司的个体吸收率和清除率差别很大,且用药剂量与血药浓度之间缺乏紧密的相关性,在高血浓度时有一定的毒性,主要是神经毒性、肾毒性和糖代谢异常等。由于他克莫司的治疗窗范围较窄,给临床治疗增加了相当大的难度,因此需要反复测定定期血中浓度以调整用药剂量。

[0003] 据相关数据统计,截至 2008 年,我国移植手术总量已经超过 10 万次,现在我国已经成为继美国之后的世界第二大器官移植国家,每年器官移植手术已经超过 1 万例,而且随着经济及医疗水平的发展,以后的器官移植患者会越来越多。他克莫司虽然较环孢霉素 A 上市晚,但其药效更为明显,是环孢霉素类免疫抑制剂的 50-100 倍,并且具有提高移植生存率、降低急性排斥反应发生率、降低感染率、对类固醇无相对依赖性、副作用较少等特点,现在是当前居于市场前几位的免疫抑制剂,约占当前免疫抑制剂市场份额的 10% 左右。现在国内市场上用于他克莫司检测的试剂盒几乎全部依赖进口,而这些进口试剂盒全部用本公司配套的分析仪器进行检测,这样就提高了医院及检测中心的准入门槛,对检测实验操作人员要求也比较高,同样附加于病人的诊疗费用也相应提高。但实际情况是,现在我国人均国民经济水平偏低,医疗卫生检测机构水平差距非常大,器官移植病人的医疗负担很重,很多地方医院及检测中心没有能力购买昂贵的医疗检测设备。这样,市场更需要操作方便简捷,能节约病人、医院经济成本且质量稳定可靠能达到检测要求的适合中国现有国情的检测试剂盒。

[0004] 为达到个体化给药方案,避免毒副作用和排斥反应的发生,只能在有条件的医院才能将监测其血药浓度作为常规工作,目前测定全血中他克莫司浓度的方法主要有两大类:高效液相色谱法和免疫标记分析法。

[0005] 高效液相色谱法是 70 年代发展起来的一种测定血药浓度的物理方法,采用特殊装置的柱色谱法,利用同一种吸附剂对不同物质吸附能力的差别进行分离鉴定,其特异性高,只测定他克莫司母药的浓度而不测定其代谢物的浓度,结果准确可靠,但其样本前处理操作繁琐,且需特殊的技术和昂贵的设备以及高素质的专业技师进行操作,一定程度上妨碍其深入开展和普及。

[0006] 免疫标记分析法是以抗原或半抗原与抗体之间特异性亲和反应为基础的免疫标

记技术目前用于测定血药浓度的免疫分析法常用的标记物有放射性核素、荧光剂和酶三大类,其测定技术分别称为放射免疫分析法 (Radioimmunoassay, RIA)、荧光免疫分析法 (Fluoroimmunoassay, FPIA) 和酶免分析法 (Enzyme immunoassay, EIA)。他们共同的优点是特异性强、灵敏度和精密度高、准确性好、简便、快速,易实现自动化,适用于常规和急诊工作。放射免疫测定法虽然具有高灵敏度、高特异性的优点,但其操作步骤较多,需要特殊的检测设备,并且使操作人员受到放射性危害,同时试剂盒的使用期限也会受标记的放射性物质的衰变期的限制,故近年来许多本来使用 RIA 测定的药物多已改用其他免疫分析方法。荧光偏振免疫测定法是基于待测物和联接了荧光的待测物对特定的待测物抗体上有限的受体结合位点的竞争性结合。当待测样品中存在能与抗体结合的药物时,将形成无荧光药物-抗体复合物,从而引起偏振度的下降,根据该偏振度下降的程度即可确定出样品中待测物的浓度。该法灵敏度高,选择性好,但缺点是需要特殊的检测设备,价格较为昂贵,操作也不太方便。酶免法是用酶代替荧光体标记抗原或抗体,利用该酶的底物显色的程度来确定样品中药物的浓度。

[0007] 化学发光免疫分析是继荧光、放射性同位素和酶免分析之后发展起来的一项新的免疫分析技术,根据大量的实验结果及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性、灵敏性及发展前景来看,在非放射性标记分析技术中化学发光免疫分析处于领先地位,代表了当今世界发展的方向和潮流,它不仅具有免疫反应的特异性,而且具有化学发光反应的高灵敏度,成为取代放射免疫分析和酶免疫分析技术的首选。

[0008] 化学发光显色底物对化学发光免疫检测效果具有重要的影响,直接影响检测试剂盒的灵敏度及稳定性,好的化学发光显色底物能使检测系统的检测限达到皮克级,甚至更高,而效果一般的化学不但灵敏度低,不能满足试验要求,而且稳定性极差,使得每次检测结果差异极大,这样直接影响病人血药浓度的监测结果,导致医生不能根据每次检测结果对病人的用药做出正确的判断。而目前国内市售发光显示底物液用于板式的化学发光检测试剂盒,其发光性能常常达不到检测要求的灵敏性和稳定性。

## 发明内容

[0009] 本发明根据上述领域的需求空白,提供一种用于检测人全血中他克莫司浓度的化学发光 酶联免疫试剂盒,既可以应用于开放式的半自动化学发光测量仪,也可用于全自动的测量系统,适合国内现状,成本低,但检测效果与进口试剂无显著差异可实现大批量快速检测,更易推广应用。

[0010] 一种用于化学发光酶联免疫检测的化学放光底物显色液,包括为底物 A 液和底物 B 液,其中 A 液为的组成为:pH 值为 7.2 ~ 8.5,浓度为 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.05% Proclin300,1.0 ~ 2.0%吐温-20 和 10mM/L 过氧化脲溶液;B 液为 50mM/L 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02 ~ 0.05% Proclin300,0.01 ~ 0.1mmol/L 的四苯硼酸盐,0.2 ~ 0.6mmol/L 的 4-碘苯酚,0.1% ~ 1% 的 BSA,0.1 ~ 1% 的溴化十六烷基三甲基铵,10 ~ 50Mm/L 鲁米诺溶液。

[0011] 一种检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒,包括化学发光酶标板,酶标记物;所述化学发光酶标板上的包被原为抗他克莫司单克隆抗体、二抗或与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原;其特征在于还包括上述化学发光底物显色液,所述酶标记

物为辣根过氧化物酶标记的抗体、抗原或抗抗体。

[0012] 所述包被原为他克莫司单克隆抗体,羊抗鼠抗抗体或兔抗鼠抗抗体,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的他克莫司半抗原。

[0013] 所述包被原为羊抗鼠抗抗体或兔抗鼠抗抗体,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的他克莫司半抗原或他克莫司单克隆抗体。

[0014] 所述包被原为与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原,所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗他克莫司单克隆抗体。

[0015] 所述载体蛋白为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、蓝血蛋白或卵清蛋白。

[0016] 所述试剂盒还包括前处理液、样品稀释液、他克莫司标准品溶液、他克莫司质量控制溶液、浓缩洗涤液。

[0017] 所述样品前处理液为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液,甲醇与乙二醇的体积比 3 : 1。

[0018] 所述样品稀释液为含 0.3-0.5M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液。

[0019] 他克莫司标准品溶液和质量控制品溶液为含有不同浓度他克莫司的人全血溶液。

[0020] 所述浓缩洗涤液 pH 值为 7.2 ~ 8.5,含有终浓度为 0.02 ~ 0.05% Proclin300, 1.0 ~ 2.0%吐温 -20 和 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0021] 本发明将化学发光技术与他克莫司的免疫分析法有效的结合,采用了自制的发光信号强、持续时间长、更高信噪比的化学发光底物显色液,与进口试剂盒检测效果几乎无差别,检测效果明显优于国产试剂盒,而价格上明显低于进口试剂盒,为国内患者所能承受,对国内器官移植患者具有重大意义。另外本发明的试剂盒采用了化学发光酶联免疫方法,比酶免疫分析法灵敏度高,能够简便、快速、灵敏、稳定的检测血中他克莫司药物浓度。

[0022] 本发明的检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光法酶联免疫试剂盒主要采用直接竞争 ELISA 方法定量检测样品中他克莫司的浓度。本试剂盒中采用高特异性的他克莫司的单克隆抗体,保证了检测结果的可靠性。实验结果表明,本试剂盒具有特异性高、灵敏度更高、精确度高、准确度高等特点。本试剂盒的主要试剂都采用工作液形式,使用方便,成本低廉。用本发明试剂盒检测他克莫司的方法,操作简便,简化了传统检测方法的步骤,缩短了检测时间,对样品的前处理要求低,能同时快速检测大批量的样品。试验结果证明,本发明的试剂盒

#### 附图说明

[0023] 图 1 为包被原为他克莫司的单克隆抗体的检测试剂盒的标准曲线。

[0024] 图 2 发光底物比较实验。从上往下依次为进口发光底物,本发明的发光底物,国内现有发光底物。国内现有发光底物明显低于本发明的产品,而本发明的产品与进口发光底物之间无太大差距。

#### 具体实施方式

[0025] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0026] 实施例 1、他克莫司单克隆抗体为包被原,标记物为酶标半抗原的试剂盒制备及使

用

[0027] 一、以他克莫司单克隆抗体为包被原、酶标记他克莫司半抗原为标记物的试剂盒检测原理如下：

[0028] 在微孔条上预包被他克莫司单克隆抗体，样本中的他克莫司与酶标记的他克莫司与微孔条上预包被的抗他克莫司抗体进行竞争性结合，这样，样本吸光值与其样本中所含他克莫司的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中他克莫司的量。

[0029] 二、试剂盒组成：

[0030] I 号试剂盒：

[0031] 1、包被有包被原的化学发光酶标板：包被原为抗他克莫司的鼠源单克隆抗体，包被浓度可以为 0.1-10ng/ml。

[0032] 2、酶标记半抗原为辣根过氧化物酶标记的他克莫司半抗原，其工作稀释度为 1：3000。

[0033] 3、他克莫司标准品溶液：6 瓶，2ml/瓶，浓度分别为 0ng/ml、3ng/ml、6ng/ml、12ng/ml、20ng/ml、30ng/ml。

[0034] 4、他克莫司质量控制液：2 瓶，2ml/瓶，浓度分别为 5ng/ml、25ng/ml。

[0035] 5、样品稀释液：为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液，20ml/瓶，1 瓶

[0036] 6、化学发光底物显色液：A 液和 B 液各 1 瓶，其中 A 液为的组成为：pH 值为 8.0，浓度为 10mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.02% Proclin300, 1.0% 吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液；B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.02% Proclin300, 2mM 的 4-碘苯酚, 0.1% 的 BSA, 0.1% 的溴化十六烷基三甲基铵, 10mM 鲁米诺溶液。

[0037] 7、浓缩洗涤液：pH 值为 7.4，含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.05% Proclin300、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0% 吐温 -20、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液，40ml/瓶，1 瓶。

[0038] 8、样品处理液：为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液，10ml/瓶，1 瓶。

[0039] II 号试剂盒：

[0040] 其它同 I 号，仅化学反光底物显色液成分有改变：A 液和 B 液各 1 瓶，其中 A 液为的组成为：pH 值为 8.0，浓度为 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.05% Proclin300, 0.5% 吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液；B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.05% Proclin300, 3mM 的 4-碘苯酚, 1% 的 BSA, 1% 的溴化十六烷基三甲基铵, 50mM 鲁米诺溶液。

[0041] III 号试剂盒：

[0042] 其它同 I 号，仅化学反光底物显色液成分有改变：A 液和 B 液各 1 瓶，其中 A 液为的组成为：pH 值为 8.0，浓度为 20mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.04% Proclin300, 0.1% 吐温 -20 和 10mM 过氧化脲溶液；B 液为 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.04% Proclin300, 2mM 的 4-碘苯酚, 0.7% 的 BSA, 0.4% 的溴化十六烷基三甲基铵, 30mM 鲁米诺溶液。

[0043] 对照试剂盒：其它同 I 号试剂盒，而化学反光底物显色液为市售显色液（A 液为过氧化脲溶液，B 液为鲁米诺溶液，购自湖州英创生物科技有限公司）。

### [0044] 三、制备方法

#### [0045] 1、包被有他克莫司单克隆抗体的化学发光酶标板的制备

##### [0046] (1) 他克莫司单克隆抗体

[0047] 选择Fitzgerald公司生产的他克莫司单克隆抗体 mouse monoclonal anti-tacrolimus antibody, IgM。

##### [0048] (2) 包被有包被原的化学发光酶标板的制备

[0049] 用包被缓冲液 (pH 值为 9.6、0.1mol/L 碳酸盐缓冲液) 将以上他克莫司抗体进行 1 : 8000 稀释, 加入到化学发光酶标板孔中, 每孔 100  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 甩掉包被液后, 拍干, 每孔加入 200  $\mu$  l 的封闭液 (含终浓度为 2% 牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液), 37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 甩掉封闭液, 拍干, 自然晾干, 用铝箔袋真空包装保存。

#### [0050] 2、酶标半抗原的制备

##### [0051] (1) 半抗原的制备

[0052] 准确称取 250mg 他克莫司, 18mg 琥珀酸酐, 6mg 嘧啶溶解于 6.3ml 二氯甲烷中, 边搅拌边加入 42 $\mu$ l 三乙胺, 在室温下继续搅拌 2 小时, 然后用二氯甲烷稀释至 20ml, 再分别用等量的 0.1 当量盐酸、纯化水、饱和的氯化钠各洗涤一次后用分液漏斗静止分层, 过滤收集下层液 (二氯甲烷)。所得到的有机相放在无水硫酸镁进行干燥, 用磁力搅拌器搅拌 30 分钟后, 除掉硫酸镁, 用旋转蒸发仪浓缩, 直至呈轻微黄色泡沫。在旋转蒸发仪上将上述溶液进行干燥, 得到他克莫司半琥珀酸酯。称取 35mg 上述产物, 5.4mgN- 羟基琥珀酰亚胺和 8.8mgN, N- 二环己基碳化二亚胺溶于 5ml 乙酸乙酯, 在磁力搅拌器上继续搅拌 24 小时。6000rpm 离心 5 分钟, 取上清备用。

##### [0053] (2) 用辣根过氧化物酶对上述半抗原进行标记

[0054] 称取 1mg 上述半抗原溶于 2ml N, N- 二甲基甲酰胺, 室温搅拌 30min, 逐滴加入到 10ml (含 5mg) 的辣根过氧化物酶溶液中, 室温搅拌过夜后, 用 Sephadex G-25 进行层析纯化。实施例 2. 以他克莫司单克隆抗体为包被原、酶标记半抗原为标记物的试剂盒的应用

[0055] 本发明试剂盒用于定量检测人全血中他克莫司的药物浓度。

#### [0056] 1、人全血样品的前处理

[0057] 将 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱保存的人全血他克莫司标准品及质量控制品溶液和待检样品, 在振荡器上充分振荡混匀, 立即精确吸取 150  $\mu$  l 每个样品到相应的离心管中, 加入等体积的样品前处理液后立即盖好管盖, 用漩涡混合仪高速旋转, 确保每个样品充分混匀, 将离心管放入离心机, 13000r/min, 离心 6 分钟。取 20  $\mu$  l 用于分析。

#### [0058] 2、检测

[0059] 向 II 号试剂盒的化学发光酶标板中加入样品稀释液 30  $\mu$  l, 然后在每孔中加入他克莫司标准品溶液、质量控制品溶液及样品溶液 20  $\mu$  l, 每孔中各加入辣根过氧化物酶标记的半抗原 50  $\mu$  l, 用盖板模封板, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中反应 1 小时, 甩干孔内液体, 洗板 5 次, 拍干; 每孔加入底物显色液 A 液过氧化脲, 底物显色液 B 液鲁米诺, 轻轻振荡混匀, 在 2-5min 内, 用化学发光仪, 测定每孔发光值 (RUL 值)。

#### [0060] 3、检测结果分析

[0061] 以标准品浓度标示值为 X 轴, 以检测发光值为 Y 轴, 进行四参数拟合, 得到回归方程及拟合曲线图 1。将待检测样品吸光度带入回归方程, 即可求得样品浓度。本发明中检测

结果的分析还可以利用计算机专业软件,此法更便于大量样品的快速分析。

[0062] 4、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

[0063] (1) 标准品精密度试验：

[0064] 从实施例 1 步骤三制备的同一型号 (II 号) 试剂盒的不同批次 (01 批、02 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 10 个试剂盒,从每个试剂盒的化学发光酶标板中各抽出 20 个微孔,测定 20ng/ml 他克莫司标准溶液的吸光值 (OD 值),计算变异系数 CV%。

[0065] 实验结果如表 1 所示,标准品吸光值的变异系数在 5.46% -15.08%之间,符合精密度小于或者等于 20%的规定。

[0066] 表 1 标准品重复性试验 (CV%)

[0067]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	9.76	8.11	7.35	8.78	11.42	10.73	11.14	9.63	12.94	7.19
	02 批	15.08	11.32	10.85	13.12	7.59	13.04	10.19	13.13	8.19	5.46
	03 批	13.43	11.23	10.48	7.6	11.14	10.4	9.97	5.86	9.12	7.96

[0068] 2、样品的精密度和准确度试验：

[0069] 向不含他克莫司的全血中添加他克莫司标准品,使他克莫司在样品中的终浓度为 5ng/ml、25ng/ml,再按照实施例 1 步骤四中样本的处理方法进行样品前处理。从实施例 1 步骤三中不同时间段制备的不同批次 (01 批、02 批、03 批) 的试剂盒中各抽取 3 个试剂盒,进行实验,每个样品重复 10 次,分别计算变异系数 (CV%)。

[0070] 结果如表 2 所示,结果表明样品的变异系数在 6.27% -16.67%之间,符合精密度小于或者等于 20%的规定。以样品标示浓度为 25ng/ml 的样品计算批间差,见表 3,结果显示该试剂盒批间变异系数为 6.9%。

[0071] 而对照试剂盒的实验结果:样品的变异系数在 9.8% -23.78%之间,试剂盒批间变异系数为 13.2% -24.69%,明显高于本发明的试剂盒。

[0072] 综上所述,该试剂盒批内差、批间差均小于 20%,完全符合试剂盒精密度应该小于或者等于 20%的规定。

[0073] 表 2 样品的重复性试验 (CV%)

[0074]

批次	标示值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	标准差	批内 CV%
01 批	5	6.81	6.24	4.83	5.42	5.91	6.11	7.12	5.31	6.45	5.82	6.00	0.70	11.66
	25	28.41	23.20	26.92	24.95	27.14	22.94	24.15	26.47	25.13	26.35	25.57	1.79	7.01
02 批	5	6.15	5.42	5.91	6.44	7.17	4.66	5.74	6.84	7.23	5.35	6.09	0.84	13.79
	25	28.47	25.41	26.46	23.19	24.93	26.21	27.13	26.34	25.16	23.45	25.68	1.61	6.27
03 批	5	5.17	5.63	6.47	7.81	6.86	6.77	4.91	5.31	4.96	5.34	5.92	0.99	16.67
	25	25.63	24.69	25.64	26.89	29.12	27.13	25.42	24.61	24.13	23.42	25.67	1.67	6.51

[0075] 表 3 样品的批次间差异 (CV%)

[0076]

标示值	01 批	02 批	03 批	平均值	标准差	批间 CV%
25	26.35	23.45	23.42	24.41	1.68	6.90

[0077] 样品准确度 = 实际测量值 / 实际添加值, 根据表 2 的检测结果, 以 02 批试剂盒中标示值为 25ng/ml 的样本为例, 其样品的准确度结果见表 4, 如表中所示, 样本中他克莫司的添加回收率在 92.76% - 113.88% 之间。

[0078] 用使用对照试剂盒的结果显示, 样本中他克莫司的添加回收率在 85.46% - 120.9% 之间,

[0079] 表 4 试剂盒的准确度

[0080]

标示值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
25	28.47	25.41	26.46	23.19	24.93	26.21	27.13	26.34	25.16	23.45	25.68
回收率 (%)	113.88	101.64	105.84	92.76	99.72	104.84	108.52	105.36	100.64	93.8	102.72

[0081] 3、交叉反应率试验:

[0082] 选择与他克莫司有类似结构和类似功能的 3 种药物测定交叉反应率, 通过各种药物的标准曲线分别得到其 50% 抑制浓度。用下面的公式计算步骤三中试剂盒对其他药物的交叉反应率。试剂盒对于他克莫司的交叉反应率越大, 则其对该药物检测的特异性就越好。重复测定 3 次, 结果取平均值。

[0083] 交叉反应率 (%) = (引起 50% 抑制他克莫司的浓度 / 引起 50% 抑制的他克莫司类似物浓度) × 100%

[0084] 实验结果如表 5 所示, 本结果表明本发明试剂盒对他克莫司的特异性好, 即本发明试剂盒可以用于特异性检测人全血中他克莫司的药物浓度。

[0085] 表 5 试剂盒 (三个型号) 的特异性

[0086]

药物名称	交叉反应率 (%)
他克莫司	100
环孢霉素 A	< 1

雷帕霉素	< 1
------	-----

[0087] 4、试剂盒保存期试验

[0088] 试剂盒保存条件为 2-8℃, 经过 6 个月的测定, 试剂盒的最大吸光度值 (零标准)、50% 抑制率、他克莫司添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中, 会有非正常保存条件出现, 将试剂盒在 37℃ 保存的条件下放置 5 天, 进行加速老化试验, 结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。从以上结果可得出试剂盒在 2-8℃ 至少可以保存 6 个月。而对照试剂盒保存 6 个月后, 检测值下降 30% 左右。

[0089] 5、试剂盒的最低检测限 (灵敏度)

[0090] 取不含他克莫司的阴性人的全血样品, 用步骤三中试剂盒分别进行 20 次检测, 测定结果的平均值加上 2 倍标准差作为试剂盒的最低检测限。经过试验表明本发明的三个型号的试剂盒的最低检测限均为 0.05ng/ml。对照试剂盒的最低检测限为 :1.6ng/ml

[0091] 实施例 3. 包被原为他克莫司与载体蛋白偶联物, 酶标二抗为酶标记物的试剂盒

[0092] 本试剂盒的工作原理为 :

[0093] 当在化学发光酶标板微孔条上的包被原为他克莫司半抗原与载体蛋白偶联物时, 向化学发光酶标板微孔中加入标准品溶液或样品溶液后, 加入抗他克莫司的特异性抗体, 样品中的他克莫司与化学发光酶标板上的他克莫司偶联抗原竞争此抗体, 再加入酶标抗体进行放大作用, 用底物显色液显色, 这样样品的吸光度值与他克莫司的含量呈负相关, 根据标准品所得的标准曲线即可得出样品中他克莫司的含量。

[0094] 本试剂盒的组成为 :

[0095] 1) 包被有包被原的化学发光酶标板 : 包被原为他克莫司与牛血清蛋白偶联物 (此处的载体蛋白可以为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、蓝血蛋白或卵清蛋白等), 包被浓度可以为 0.001-0.11 μg/ml。

[0096] 2) 他克莫司特异性抗体工作液 : 他克莫司单克隆抗体工作液, 用稀释液将他克莫司单克隆抗体稀释 8000 倍, 得到特异性抗体工作液。

[0097] 3) 酶标记抗体为辣根过氧化物酶标记的羊 (兔) 抗鼠 IgM, 其工作稀释度为 1 : 8000。

[0098] 4) 他克莫司标准品溶液 : 6 瓶, 2ml/瓶, 浓度分别为 0ng/ml、3ng/ml、6ng/ml、12ng/ml、20ng/ml、30ng/ml。

[0099] 5) 他克莫司质量控制液 : 2 瓶, 2ml/瓶, 浓度分别为 5ng/ml、25ng/ml。

[0100] 6) 样品稀释液 : 为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液, 20ml/瓶, 1 瓶

[0101] 7) 化学发光底物显色液 : 由 A 液和 B 液个一瓶, 同实施例 1 的 II 号试剂盒。

[0102] 8) 浓缩洗涤液 : pH 值为 7.4, 含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.05% Proclin300、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0% 吐温 -20、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液, 40ml/瓶, 1 瓶。

[0103] 9) 样品处理液 : 为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液, 10ml/瓶, 1 瓶。

[0104] 实施例 4. 包被原为他克莫司与载体蛋白偶联物, 酶标记物为酶标他克莫司特异性抗体的试剂盒

[0105] 本试剂盒的工作原理为 :

[0106] 当在化学发光酶标板微孔条上的包被原为他克莫司半抗原与载体蛋白偶联物时,加入样品溶液或标准品溶液后,再加入酶标记的他克莫司特异性抗体,样品中的他克莫司或他克莫司标准品与化学发光酶标板上包被的他克莫司竞争结合酶标记的他克莫司特异性抗体,用底物显色液显色,这样样品的发光值与他克莫司的含量呈负相关,根据标准品所得的标准曲线即可得出样品中他克莫司的含量。

[0107] 本试剂盒的组成为:

[0108] 1) 包被有包被原的化学发光酶标板:包被原为他克莫司与牛血清蛋白偶联物(此处的载体蛋白可以为甲状腺蛋白、鼠血清蛋白、人血清蛋白、牛血清蛋白、兔血清蛋白、蓝血蛋白或卵清蛋白等),包被浓度可以为 0.001-0.13  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0109] 2) 酶标记的他克莫司特异性抗体工作液:酶标记他克莫司单克隆抗体工作液,用稀释液将酶标记的他克莫司单克隆抗体稀释 7000 倍,得到特异性抗体工作液。

[0110] 3) 他克莫司标准品溶液:6 瓶,2ml/瓶,浓度分别为 0ng/ml、3ng/ml、6ng/ml、12ng/ml、20ng/ml、30ng/ml。

[0111] 4) 他克莫司质量控制液:2 瓶,2ml/瓶,浓度分别为 5ng/ml、25ng/ml。

[0112] 5) 样品稀释液:为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液,20ml/瓶,1 瓶

[0113] 6) 化学发光底物显色液:由 A 液和 B 液各一瓶,同实施例 1。

[0114] 7) 浓缩洗涤液:pH 值为 7.4,含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.05% Proclin300、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0%吐温-20、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,40ml/瓶,1 瓶。

[0115] 8) 样品处理液:为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液,10ml/瓶,1 瓶。

[0116] 实施例 5. 包被原为抗抗体,酶标记物为酶标他克莫司半抗原的试剂盒

[0117] 1、工作原理

[0118] 当在化学发光酶标板微孔条上预包被抗抗体时,加入他克莫司特异性抗体孵育后,加入样品溶液或者标准品溶液,再加入酶标记的他克莫司半抗原,这样,样本中的他克莫司与酶标记的他克莫司与微孔条上预包被的抗他克莫司抗体进行竞争性结合,这样,样本发光值与其样本中所含他克莫司的含量成负相关,与标准曲线比较即可得出样本中他克莫司的量。

[0119] 2、本试剂盒的组成为:

[0120] 1) 包被有包被原的化学发光酶标板:包被原为羊(兔)抗鼠抗抗体,包被浓度可以为 0.001-0.13  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0121] 2) 酶标记物:辣根过氧化物酶标记的实施例 1 中所述的他克莫司半抗原。

[0122] 3) 特异性抗体工作液:他克莫司单克隆抗体工作液,用稀释液将酶标记的他克莫司单克隆抗体稀释 8000 倍,得到特异性抗体工作液。

[0123] 4) 他克莫司标准品溶液:6 瓶,2ml/瓶,浓度分别为 0ng/ml、3ng/ml、6ng/ml、12ng/ml、20ng/ml、30ng/ml。

[0124] 5) 他克莫司质量控制液:2 瓶,2ml/瓶,浓度分别为 5ng/ml、25ng/ml。

[0125] 6) 样品稀释液:为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液,20ml/瓶,1 瓶

[0126] 7) 化学发光底物显色液:由 A 液和 B 液个一瓶,同实施例 1 的 II 号试剂盒。

[0127] 8) 浓缩洗涤液 :pH 值为 7.4, 含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.05% Proclin300、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0% 吐温 -20、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液, 40ml/ 瓶, 1 瓶。

[0128] 9) 样品处理液 : 为含 20-100mM 硫酸锌的甲醇溶液与乙二醇混合液, 10ml/ 瓶, 1 瓶。

[0129] 实施例 6. 不同底物显色液的对比实验。

[0130] 步骤 1、在上述实施例 2 中检测标准品做标准曲线时, 用实施例 1 的 II 号自制的试剂盒化学发光显色底物与目前现在市售的国产化学发光底物 (A 液为过氧化脲溶液, B 液为鲁米诺溶液), 及进口的 Thermo Scientific 公司生产的 Supersignal ELISA Pico luminol/Enhancer Solution 和 Supersignal ELISA Pico Stable Peroxide Solution 进行对照, 结果如下 :

[0131] 表 6 用不同化学发光底物检测标准品化学发光值

[0132]

标准品浓度 ng/ml	进口对照发光底物液 相对发光值 RLU	国产对照发光底物液 相对发光值 RLU	实施例 2 所述底物液 相对发光值 RLU
0	183860	101240	161639
3	122754	97895	101257
6	95763	71023	81843
12	48982	40323	46747
20	30183	21694	27646
30	9728	15897	7369

[0133] 取以上数值的最高值和最低值进行比对如下 :

[0134] 表 7 用不同化学发光底物检测标准品化学发光值

[0135]

标准品浓度 ng/ml	进口对照发光底物液 相对发光值 RLU	国产对照发光底物液 相对发光值 RLU	实施例 2 所述底物液 相对发光值 RLU
0	183860	101240	161639
30	9728	15897	7369

[0136] 根据表 7 绘制图 2, 由图 2 可以看出本发明所述化学发光底物发光强度与进口化学底物比较差别不大, 信噪比差别不大, 但是信噪比和发光强度明显高于市场上销售的同类国产化学发光底物。

[0137] 步骤 2、在步骤 1 中检测标准品时, 用在上述实施例 1 中获得的 II 号不同批次的试剂盒检测标记为 0ng/ml 的标准品, 加完底物后, 每隔 2 分钟用发光仪检测一次, 连续检测 40 分钟, 统计相同样本的发光值在 60 分钟内的变化情况, 结果如下 :

[0138] 表 8 不同化学发光底物发光平台测定实验相对发光值表

[0139]

时间 (min)	进口对照发光底物液 相对发光值 RLU	国产对照发光底物液 相对发光值 RLU	实施例 2 所述底物液 相对发光值 RLU
2	183860	101240	161639
4	179896	92341	160231
6	175381	81453	153489
8	164135	70241	149764
10	153947	56553	131865
12	152438	45624	130130
14	149563	34612	129785
16	149012	29634	118931
18	148952	22315	118564
20	139782	20136	109889
22	125689	18679	103564
24	112683	16342	93486
26	109876	14356	83547
28	98452	12486	72864
30	90135	10243	71245
32	89456	9876	69453
34	84569	8694	64875
36	82468	7586	62543
38	80346	6589	62173
40	79546	6321	59674

[0140] 从以上实验结果可以看出,在 40 分钟内,本发明所述化学发光底物与进口对照发光底物发光平台期数据对照,差别不大,明显高于市售国产化学发光底物。

[0141] 采用实施例 1 制备的 I 号和 III 号试剂盒的不同批次产品进行同步骤 1 和步骤 2 相同的对比检测,结果与 II 号试剂盒得出的结果一致,各型号试剂盒之间,及同一型号不同批次之间的数据变异系数在 6.5%左右,低于 13%,都优于国产试剂,而与进口试剂无显著差异。

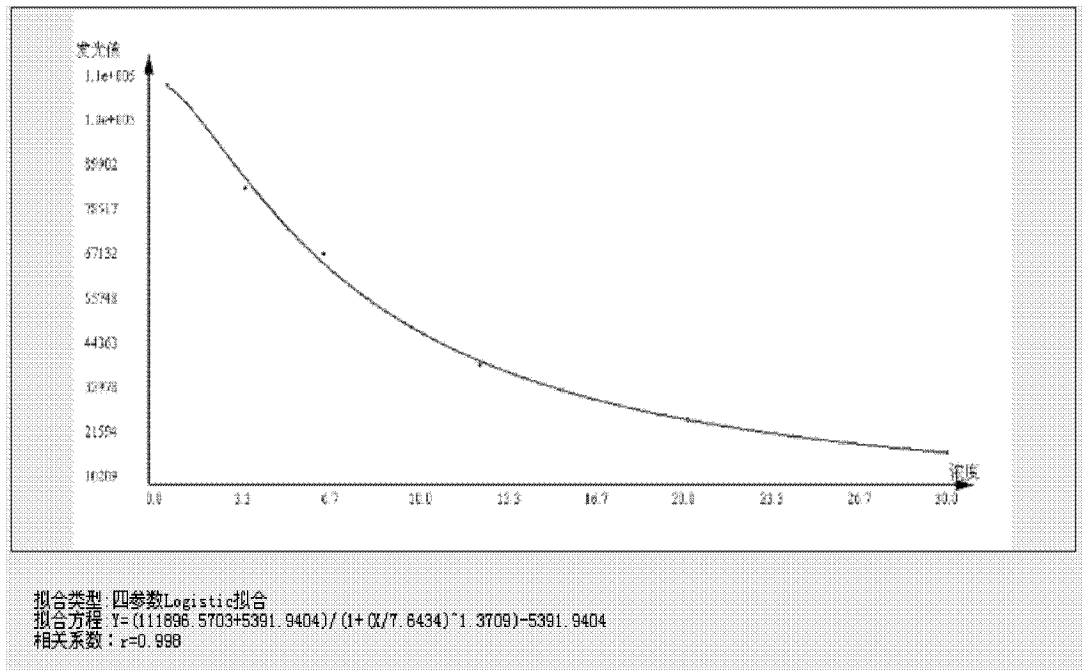


图 1

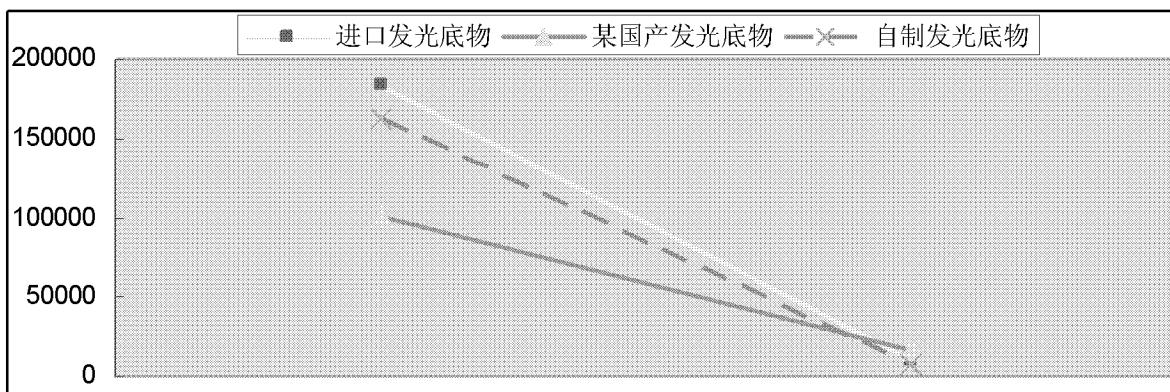


图 2

专利名称(译)	检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒及其化学发光底物显色液		
公开(公告)号	<a href="#">CN102368054B</a>	公开(公告)日	2013-07-31
申请号	CN201110183275.X	申请日	2011-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	贾凤芹 焦守恕 李全		
发明人	贾凤芹 焦守恕 李全		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	张涛		
其他公开文献	CN102368054A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及检测人全血中他克莫司药物浓度的化学发光酶联免疫试剂盒，属于医学检测试剂，包括化学发光酶标板，酶标记物；所述化学发光酶标板上的包被原为抗他克莫司单克隆抗体、二抗或与载体蛋白偶联的他克莫司半抗原；其特征在于还包括自制的使试剂盒具有更高信噪比，检测灵敏度的化学发光底物显色液，所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗体、抗原或抗抗体。既可以应用于开放式的半自动化学发光测量仪，也可用于全自动的测量系统，适合国内现状，成本低，但检测效果与进口试剂无显著差异可实现大批量快速检测，更易推广应用。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
CV% 批	01	9.76	8.11	7.35	8.78	11.42	10.73	11.14	9.63	12.94	7.19
	02	15.08	11.32	10.85	13.12	7.59	13.04	10.19	13.13	8.19	5.46
	03	13.43	11.23	10.48	7.6	11.14	10.4	9.97	5.86	9.12	7.96