



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102368072 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 07

(21) 申请号 201110183670. 8

(22) 申请日 2011. 06. 30

(71) 申请人 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

(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 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 1/28(2006. 01)

G01N 1/38(2006. 01)

G01N 1/34(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 2 页

(54) 发明名称

检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒

(57) 摘要

本发明“检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒”,属于医学检测试剂。本发明的试剂盒主要在环孢霉素 A 的制备方法与化学发光底物的配方上做出了改进,使试剂盒既适应国内普及的检测设备,又具备高灵敏度、良好稳定性和重复性,使环孢霉素 A 的检测成本大大降低又不影响检测结果的可靠性。

1. 检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括:抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体或抗抗体包被的酶标板,酶标记的环孢霉素 A 半抗原;或与载体蛋白偶联的环孢霉素 A 半抗原包被的酶标板,酶标记的抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体或抗抗体;其特征在于:所述用于包被酶标板的环孢霉素 A 半抗原和酶标记的环孢霉素 A 半抗原采用以下处理方法制备而得:

(1) 环孢霉素 A 按质量体积比 3g : 1ml 比例溶于嘧啶中,再逐滴加入与嘧啶等体积的二氯甲烷,在常温充氩气环境中搅拌过夜;

(2) 将步骤 (1) 的产物真空蒸发干燥得到固体残渣溶于二氯甲烷,溶液过凝胶柱分离纯化,得到二氧化硅化环孢霉素 A

(3) 制备一级粗产品:

按质量体积比 5g : 1ml 将 TMS-CsA 溶于乙醚中,再按 TMS-CsA 与甲苯的质量体积比为 1g : 30ml 加入甲苯和按 TMS-CsA 与氢化钠质量比 2 : 1 加入氢化钠,在通氩气的条件下常温搅拌 30min 后冷却到 4℃,按 TMS-CsA 与环氧乙烷的质量体积比为 1g : 6ml 用注射器加入环氧乙烷,然后将反应器加盖封口,常温搅拌反应 24 小时后,加入 2 ~ 3 倍反应物体积的水,用 1M 的 HCL 酸化,加入 4 ~ 6 倍反应物体积的二氯甲烷混合,分离有机相后,加水洗提,洗提产物用硫酸镁干燥并过凝胶柱分离纯化得到一级粗产品;

于常温、通氩气的条件下,将一级粗产品 2 份和 1,4 丁二醇二缩水甘油醚按质量 1 份溶于甲苯中,一级粗产品与甲苯的质量体积比为 1g : 5 ~ 10ml,常温搅拌 2h 后,按一级粗产品与乙酸乙酯质量体积比为 1g : 100 ~ 200ml 加入乙酸乙酯,及与乙酸乙酯等体积的水,分离混合液中有有机相,用 50% 的氯化钠溶液洗提有机相,洗提产物用硫酸镁干燥并过凝胶柱分离纯化得到二级粗产品;

(4) 在搅拌状态下,按二级粗产品与甲醇的质量体积比为 1g : 40ml 将二级粗产品加入甲醇中,补充水直至混合液有明显雾团,加入与二级粗产品质量比为 1 : 0.5 ~ 1.5 的无水碳酸钾,常温通氩气搅拌过夜,用 1M 盐酸酸化处理,加入与甲醇等体积的水,用二氯甲烷提取有机相,用与甲醇等体积的盐水洗涤有机相,硫酸镁干燥得到环孢霉素 A 半抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,所述抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体包被的酶标板的包被浓度为 :0.01-0.08 μ g/ml。

3. 根据权利要求 1 所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,所述与载体蛋白偶联的环孢霉素 A 半抗原包被的酶标板的包被浓度为 0.05-0.15 μ g/ml。

4. 根据权利要求 1 所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,所述抗抗体包被的酶标板的包被浓度为 :0.05-0.15 μ g/ml。

5. 根据权利要求 1 ~ 4 任一所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,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、蓝血清蛋白或卵清蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,所述试剂盒还包括样品前处理液、样品稀释液、环孢霉素 A 标准品溶液、环孢霉素 A 质量控制溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液。

7. 根据权利要求 6 所述的化学发光酶联免疫检测试剂盒,所述酶标记所用的标记酶为辣根过氧化物酶,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 10 ~ 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,0.1 ~

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0.02~0.1%Proclin300,1.0~3.0mM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鲁米诺溶液。

检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测试剂,特别是一种检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 环孢霉素 A(cyclosporin A) 是一种从真菌中提取,由瑞士山德士药厂 1976 年首次发现并报告有免疫抑制作用的药物。同年英国剑桥的 R. Calne 在动物的器官移植上应用取得了令人难忘的结果,并于 1978 年成功地试用于临床肾脏移植和骨髓移植。环孢霉素 A 的出现对器官移植的发展起了巨大的推动作用,如今被称之为“器官移植的环孢霉素”,是目前最常用的免疫抑制剂,也用于自身免疫疾病的治疗。其主要作用是通过可选择性地抑制免疫应答,有选择性地抑制活性 T 细胞增殖依赖的细胞因子 IL-2,致使 T 细胞分化、发育产生障碍,从而保护移植体(器官)免遭 T 细胞毒性作用的破坏,而对其他的免疫细胞的抑制作用则相对较弱。

[0003] 在临床上,环孢霉素 A 的使用剂量、血药浓度与疗效、药物毒性密切相关,在高血浓度时有一定的毒性,主要是神经毒性和肾毒性。因此临床使用需要制定合理的用药方案,经常测定血中环孢霉素 A 的浓度来监测环孢霉素 A 的用量是否合适。

[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,在有条件的医院都将监测其血药浓度列为了常规工作,目前测定全血中环孢霉素 A 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,只测定环孢霉素 A 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] 现有技术中的化学发光免疫分析试剂盒为封闭式全自动化学发光测量系统,需要昂贵的全自动化学发光测量仪,从而限制了推广使用,无法广泛的应用于临床诊断和科研工作。本发明的试剂盒采用微孔板化学发光免疫分析技术,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,可实现大批量快速检测,适用成本低,更易推广应用。

[0009] 发明专利内容

[0010] 本发明根据上述领域的缺陷及国内现状,特别是一种能够简便、快速、灵敏、稳定的检测血中环孢霉素 A 药物浓度的试剂盒,适用于国内检测仪器。

[0011] 检测环孢霉素 A 药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒,包括:抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体或抗抗体包被的酶标板,酶标记的环孢霉素 A 半抗原;或与载体蛋白偶联的环孢霉素 A 半抗原包被的酶标板,酶标记的抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体或抗抗体;其特征在于所述用于包被酶标板的环孢霉素 A 半抗原和酶标记的环孢霉素 A 半抗原采用以下处理方法制备而得:

[0012] (1) 环孢霉素 A 按质量体积比 3g : 1ml 比例溶于嘧啶中,再逐滴加入与嘧啶等体积的二氯甲烷,在常温充氩气环境中搅拌过夜;

[0013] (2) 将步骤 (1) 的产物真空蒸发干燥得到固体残渣溶于二氯甲烷,溶液过凝胶柱分离纯化,得到 TMS-CsA (二氧化硅化环孢霉素 A);

[0014] (3) 制备一级粗产品:

[0015] 按质量体积比 5g : 1ml 将 TMS-CsA 溶于乙醚中,再按 TMS-CsA 与甲苯的质量体积比为 1g : 30ml 加入甲苯和按 TMS-CsA 与氢化钠质量比 2 : 1 加入氢化钠,在通氩气的条件下常温搅拌 30min 后冷却到 4℃,按 TMS-CsA 与环氧乙烷的质量体积比为 1g : 6ml 用注射器加入环氧乙烷,然后将反应器加盖封口,常温搅拌反应 24 小时后,加入 2 ~ 3 倍反应物体积的水,用 1M 的 HCL 酸化,加入 4 ~ 6 倍反应物体积的二氯甲烷混合,分离有机相后,加水洗提,洗提产物用硫酸镁干燥并过凝胶柱分离纯化得到一级粗产品;

[0016] (4) 于常温、通氩气的条件下,将一级粗产品 2 份和 1,4 丁二醇二缩水甘油醚按质量 1 份溶于甲苯中,一级粗产品与甲苯的质量体积比为 1g : 5 ~ 10ml,常温搅拌 2h 后,按一级粗产品与乙酸乙酯质量体积比为 1g : 100 ~ 200ml 加入乙酸乙酯,及与乙酸乙酯等体积的水,分离混合液中有有机相,用 50% 的氯化钠溶液洗提有机相,洗提产物用硫酸镁干燥并过凝胶柱分离纯化得到二级粗产品;

[0017] (5) 在搅拌状态下,取按二级粗产品与甲醇的质量体积比为 1g : 40ml 将二级粗产品加入甲醇中,补充水直至混合液有明显雾团,加入与二级粗产品质量比为 1 : 0.5 ~ 1.5 的无水碳酸钾,常温通氩气搅拌过夜,用 1M 盐酸酸化处理,加入与甲醇等体积的水,用二氯

甲烷提取有机相,用与甲醇等体积的盐水洗涤(有机相),硫酸镁干燥得到环孢霉素 A 半抗原。

[0018] 所述抗环孢霉素 A 的特异性单克隆抗体包被的酶标板的包被浓度为: 0.01-0.08 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0019] 所述与载体蛋白偶联的环孢霉素 A 半抗原包被的酶标板的包被浓度为 0.05-0.15 $\mu\text{g/ml}$;

[0020] 所述抗抗体包被的酶标板的包被浓度为 :0.05-0.15 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0021] 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。

[0022] 所述试剂盒还包括样品前处理液、样品稀释液、环孢霉素 A 标准品溶液、环孢霉素 A 质量控制溶液、显色液、终止液、浓缩洗涤液。

[0023] 所述酶标记所用的标记酶为辣根过氧化物酶,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 10 ~ 30mM 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (V/V) 为 0.02 ~ 0.1% Proclin300,0.1 ~ 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 ~ 0.1% Proclin300,1.0 ~ 3.0mM 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 鲁米诺溶液。

[0024] 本发明提供的试剂盒采用的自己研发的环孢霉素 A 的制备方法,经该方法制备得到的环孢霉素 A 能够用于制备用于化学发光免疫检测的酶标板。与现有技术相比,该方法制备后的环孢霉素 A 半抗原制备的酶标板具有检测灵敏度高,稳定性好等优点,检测效果与进口试剂相近,可用国内大多数医疗机构具备的检测设备进行定量检测器官移植患者全血中的环孢霉素 A 的浓度。

[0025] 本发明的试剂盒的另一个特征在于采用了自制的化学发光底物,其具有发光信号强、持续时间长、更高信噪比的优点,更进一步提高了本发明的试剂盒的检测灵敏性和稳定性。

[0026] 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环孢霉素 A 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。

附图说明

[0027] 图 1 为包被原为环孢霉素 A 的单克隆抗体的检测试剂盒的标准曲线。

[0028] 图 2 为环孢霉素与二氯甲烷反应后产生的中间产品。

[0029] 图 3 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

[0030] 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。

[0031] 实施例 1、环孢霉素 A 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

[0032] 一、以环孢霉素 A 单克隆抗体为包被原、酶标记半抗原为标记物的试剂盒检测原理如下：

[0033] 在微孔条上预包被环孢霉素 A 抗体，样本中的环孢霉素 A 与酶标记的环孢霉素 A 与微孔条上预包被的抗环孢霉素 A 抗体进行竞争性结合，这样，样本发光值与其样本中所含环孢霉素 A 的含量成负相关，与标准曲线比较即可得出样本中环孢霉素 A 的量。

[0034] 二、以环孢霉素 A 单克隆抗体为包被原、酶标记半抗原为标记物的试剂盒组成一般可以包括如下组分：

[0035] 1、包被有包被原的化学发光酶标板：包被原为抗环孢霉素 A 的鼠源单克隆抗体，包被浓度可以为 0.01-0.08 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0036] 2、酶标记半抗原为辣根过氧化物酶标记的环孢霉素 A 半抗原，其工作稀释度为 1 : 2000。

[0037] 3、环孢霉素 A 标准品溶液：6 瓶，2ml/ 瓶，浓度分别为 0ng/ml、30ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、800ng/ml、1500ng/ml。

[0038] 4、环孢霉素 A 质量控制液：2 瓶，2ml/ 瓶，浓度分别为 200ng/ml、1000ng/ml。

[0039] 5、样品稀释液：为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液，20ml/ 瓶，1 瓶

[0040] 6、底物显色液：包括为底物 A 液和底物 B 液，

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 三、以环孢霉素 A 单克隆抗体为包被原、酶标记半抗原为标记物的试剂盒的制备，包括如下步骤：

[0045] 1、包被有环孢霉素 A 单克隆抗体的化学发光酶标板的制备

[0046] (1) 环孢霉素 A 单克隆抗体

[0047] 选择 Fitzgerald 公司生产的环孢霉素 A 单克隆抗体 mouse monoclonal anti-Cyclosporine Antibody, IgG。

[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) 将以上环孢霉素 A 抗体进行 1 : 10000 稀释，加入到化学发光酶标板孔中，每孔 100 μl ，37℃ 反应 2 小时，甩掉包被液后，拍干，每孔加入 200 μl 的封闭液 (含终浓度为 2% 牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液)，37℃ 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] 1) 称取 1800mg 环孢霉素 A (CsA) 溶于 6ml 嘧啶，再逐滴加入 6ml 二氯甲烷，在常温

充氩气环境中搅拌过夜；

[0053] 2) 将以上产物进行真空蒸发干燥后的固体残渣溶于二氯甲烷,过凝胶柱分离纯化,得到 TMS-CsA(二氧化硅化环孢霉素 A)(1700mg,89%)；

[0054] 3) 取以上产物(1000mg,0.78mmol)加入 0.2ml 乙醚中,加入 30ml 甲苯,加入氢化钠(450mg,形成 50%矿物油悬浮液,用甲苯提取),在通氩气的条件下常温搅拌 30min 后,冷却到 4℃,用注射器加入 6ml 环氧乙烷后,将反应器加盖,用石蜡封口,常温搅拌 24 后,加入 100ml 水,用 (1N)HCL 酸化,加 200ml 二氯甲烷。将有机相分离后,加 100ml 水洗提,用硫酸镁干燥处理后,将粗产品进行凝胶分离纯化；

[0055] 4) 常温,通氩气的条件下,取以上产物(300mg ;0.23mmol)加入 1,4 丁二醇二缩水甘油醚(150mg)溶于 2ml 甲苯,加入甲基异氰酸酯甘氨酸,常温搅拌 2h,加入 50ml 乙酸乙酯,50ml 水,将有机相分离后,用盐水/水(1 : 1,2×50ml)洗提,用硫酸镁干燥处理后,将粗产品进行凝胶分离纯化；

[0056] 5) 在搅拌状态下,取以上产品(250mg,0.17mmol)加入到 10ml 甲醇,补充水直至混合液有明显雾团,加无水碳酸钾 200mg,常温通氩气搅拌过夜。用 (1N) 盐酸酸化处理,加 20ml 水。用二氯甲烷(3×75ml)提取有机相,用 10ml 盐水洗涤,硫酸镁干燥处理得到半抗原,如图 2 所示。

[0057] 对照环孢霉素 A 半抗原的制备:方法参照文献《环孢霉素 A 免疫全抗原合成及检测用单克隆抗体制备研究》(陈米娜,2004 年博士论文)中方法进行,具体操作为:用电子天平准确称量 60.0mg CsA 和 12.0mg BBa(4- 苯甲酰苯甲酸)。于 721 型分光光度计比色皿(b = 5mm)中,加入丙酮约 1.5ml 充分溶解,少量取样(0")。用针管导入小股氮气(N₂)流均匀鼓泡约 25 分钟(min),打开冷却风扇及紫外光源开始光照。比色皿外部用冰水冷却,反应过程持续通入 N₂。由于氮气夹带及光照使溶液温度升高致溶剂挥发,皿内液面不断下降,当残余液量降至约 0.4-0.5ml 时停止光照,少量取样(1)。补加丙酮至 1.8ml 左右,继续通入 N₂ 并光照及取样。重复以上操作直至所取样品在小薄层层析板跑样结果非常接近,即反应速度已十分缓慢时最终结束光照。

[0058] 在光解反应后的残余液(约 0.4-0.5ml 略呈淡黄色)加入少量丙酮使终体积在 1ml 左右。用带 S 号针头的 2ml 注射器吸取该混合溶液,在干燥的大薄层板一端划一道粗细均匀的样品线,用吹风使溶剂挥发完全。将板末端浸入盛有层析液的层析缸中层析,待溶剂展开完全时取出层析板,标记溶剂的前沿。将板置于通风橱中,待溶剂挥发至干,在 254nm 紫外灯下显色,用铅笔标出各带的大致范围。刮下 Rf 值约为 0.55 的颜色较深带的硅胶,压碎后用 2×20ml 甲醇抽提,合并抽提液,离心、过滤并旋转蒸干即可得到白色固体粉末状产物。取少量在相同展开体系中进行薄层层析,分析所含杂质情况,如仍含 CsA 和 BBa,可换种展开体系 CH₂Cl₂/CH₃OH/CH₃COOH = 95 : 4 : 1(体积比)再次薄层层析分离。最终得到的产物即为环孢霉素 A 半抗原

[0059] (2) 用辣根过氧化物酶对上述半抗原进行标记

[0060] 分别称取 1mg 上述半抗原和对照环孢霉素 A 半抗原溶于 3ml N,N- 二甲基甲酰胺,室温搅拌 30min,逐滴加入到 10ml(含 3mg)的辣根过氧化物酶溶液中,室温搅拌过夜后,用 Sephadex G-25 进行层析纯化得到酶标环孢霉素 A 半抗原和对照酶标环孢霉素 A 半抗原。

[0061] 四、以环孢霉素 A 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

[0062] 本发明试剂盒用于定量检测人全血中环孢霉素 A 的药物浓度。

[0063] 1、人全血样品的前处理

[0064] 将 2-8℃ 冰箱保存的人全血环孢霉素 A 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 μ 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 μ l 用于分析。

[0065] 2、检测

[0066] 向包被有环孢霉素 A 单克隆抗体的化学发光酶标板中加入样品稀释液 30 μ l,然后在每孔中加入环孢霉素 A 标准品溶液、质量控制品溶液及样品溶液 20 μ l,每孔中各加入辣根过氧化物酶标记的半抗原 50 μ l,用盖板模封板,37℃ 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)。

[0067] 对照检测同上,区别仅在于酶标半抗原为对照环孢霉素 A 半抗原。

[0068] 3、检测结果分析

[0069] 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。

[0070] 五、试剂盒灵敏度、精密度、准确度和保存期检测

[0071] 1、标准品精密度试验:

[0072] 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 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 300ng/ml 环孢霉素 A 标准溶液的吸光值 (OD 值),计算变异系数 CV%。

[0073] 实验结果如表 1 所示,标准品吸光值的变异系数在 4.35% -13.12% 之间,符合精密度小于或者等于 20% 的规定。

[0074] 而采用对照环孢霉素 A 半抗原的对照试剂盒的检测结果显示:8.69% -22.16%。

[0075] 表 1 标准品重复性试验 (CV%)

[0076]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.7	7.91	9.35	5.78	10.8	5.73	9.74	11.63	10.84	7.9
	02 批	6.18	9.51	12.9	13.12	9.5	11.14	9.9	10.3	6.9	4.9
	03 批	10.36	12.13	9.8	7.6	8.4	4.35	6.97	5.16	9.44	8.6

[0077] 2、样品的精密度和准确度试验:

[0078] 向不含环孢霉素 A 的全血中添加环孢霉素 A 标准品,使环孢霉素 A 在样品中的终浓度为 200ng/ml、1000ng/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%)。

[0079] 结果如表 2 所示,结果表明样品的变异系数在 6.2% -10.3%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 1000ng/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 1.468%。而采用对照环孢霉素 A 半抗原的试剂盒的检测结果样品批内变异系数为 4.33% -20.73%,批间变异系数为 13.62% -22.15%

[0080] 综上所述,该试剂盒批内差、批间差均小于 10%,完全符合符合试剂盒精密度应该小于或者等于 20%的规定。而对照试剂盒却不能很好的满足这一要求。

[0081] 表 2 样品的重复性试验 (CV%)

[0082]

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	200	203	215	209	200.7	209.9	223.8	207.9	205.9	177	193	204.52	12.69	6.20
	1000	1120	1100	1108	1114	1060	1000.8	975.3	1197	976.3	1069	1072.04	71.10	6.63
02 批	200	219	204	200.6	224	212.4	191.8	174.9	213.9	215.8	218.7	207.51	15.02	7.24
	1000	928	983.9	1128	1144.9	1204	1038.3	1173	1048	1231	1004.3	1088.34	101.9	9.36
03 批	200	218	176	194	212.9	214.8	238	228.6	211.8	203.9	205	210.3	17.3	8.23
	1000	987	929.9	1010.1	1129.5	1134	1012	1004	1246	1200.9	987.9	1056.86	109.	10.3

[0083] 表 3 样品的批次间差异 (CV%)

[0084]

标示值	01 批	02 批	03 批	平均值	标准差	批间 CV%
1000	1072.04	1088.34	1056.86	1072.413	15.74332	1.468

[0085] 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 200ng/ml 的样本为例,其样品的准确度结果见表 4,如表中所示,样本中环孢霉素 A 的添加回收率在 87.45% -112%之间。

[0086] 而对照试剂盒的结果显示,样本中环孢霉素 A 的添加回收率在 69.98% ~ 122.4%%之间

[0087] 表 4 试剂盒的准确度

[0088]

标示值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
200	219	204	200.6	224	212.4	191.8	174.9	213.9	215.8	218.7	207.51
回 收 率 (%)	109.5	102	100.3	112	106.2	95.9	87.45	106.95	107.9	109.35	103.75

[0089] 3、交叉反应率试验：

[0090] 选择与环孢霉素 A 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。试剂盒对于环孢霉素 A 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。

[0091] 交叉反应率(%) = (引起 50%抑制环孢霉素 A 的浓度 / 引起 50%抑制的环孢霉素 A 类似物浓度) × 100%

[0092] 实验结果如表 5 所示,本结果表明本发明试剂盒对环孢霉素 A 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环孢霉素 A 的药物浓度。而对照试剂盒特异性也良好。

[0093] 表 5 试剂盒的特异性

[0094]

药物名称	交叉反应率(%)
环孢霉素 A	100
他克莫司	< 1
雷帕霉素	< 1

[0095] 4、试剂盒保存期试验

[0096] 试剂盒保存条件为 2-8℃,经过 6 个月的测定,试剂盒的最大发光值(零标准)、50%抑制率、环孢霉素 A 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。

[0097] 5、试剂盒的最低检测限(灵敏度)

[0098] 取不含环孢霉素 A 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。经过试验表明试剂盒的最低检测限为 0.1ng/ml。对照试剂盒最低检测限为 2.5ng/ml。

[0099] 实施例 2、用于检测人全血中环孢霉素 A 药物浓度的试剂盒还可以有如下几种:

[0100] 一、包被原为环孢霉素 A 与载体蛋白偶联物,酶标二抗为酶标记物的试剂盒

[0101] 1、本试剂盒的工作原理为:

[0102] 当在化学发光酶标板微孔条上的包被原为环孢霉素 A 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,加入抗环孢霉素 A 的特异性抗体,样品中的环孢霉素 A 与化学发光酶标板上的环孢霉素 A 偶联抗原竞争此抗体,再加入酶标抗抗体进行放大作用,用底物显色液显色,这样样品的发光值与环孢霉素 A 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环孢霉素 A 的含量。

[0103] 2、本试剂盒的组成为:

[0104] 1) 包被有包被原的化学发光酶标板:包被原为环孢霉素 A 半抗原(制备方法同实施例 1 步骤 3(1))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 0.05-0.15 μg/ml。

[0105] 2) 环孢霉素 A 特异性抗体工作液:环孢霉素 A 单克隆抗体工作液,用稀释液将环孢霉素 A 单克隆抗体稀释 5000 倍,得到特异性抗体工作液。

[0106] 3) 酶标记抗抗体为辣根过氧化物酶标记的羊(兔)抗鼠 IgG,其工作稀释度为

1 : 7000。

[0107] 4) 环孢霉素 A 标准品溶液 :6 瓶, 2ml/ 瓶, 浓度分别为 0ng/ml、30ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、800ng/ml、1500ng/ml。

[0108] 5) 环孢霉素 A 质量控制液 :2 瓶, 2ml/ 瓶, 浓度分别为 200ng/ml、1000ng/ml。

[0109] 6) 样品稀释液 :为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液, 20ml/ 瓶, 1 瓶

[0110] 7) 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 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 二、包被原为环孢霉素 A 与载体蛋白偶联物, 酶标记物为酶标环孢霉素 A 特异性抗体的试剂盒

[0114] 1、本试剂盒的工作原理为 :

[0115] 当在化学发光酶标板微孔条上的包被原为环孢霉素 A 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, 再加入酶标记的环孢霉素 A 特异性抗体, 样品中的环孢霉素 A 或环孢霉素 A 标准品与化学发光酶标板上包被的环孢霉素 A 竞争结合酶标记的环孢霉素 A 特异性抗体, 用底物显色液显色, 这样样品的发光值与环孢霉素 A 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环孢霉素 A 的含量。

[0116] 2、本试剂盒的组成为 :

[0117] 1) 包被有包被原的化学发光酶标板 :包被原为环孢霉素 A (制备方法同实施例 1 步骤 3(1)) 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 0.05-0.15 μ g/ml。

[0118] 2) 酶标记的环孢霉素 A 特异性抗体工作液 :酶标记环孢霉素 A 单克隆抗体工作液, 用稀释液将酶标记的环孢霉素 A 单克隆抗体稀释 6000 倍, 得到特异性抗体工作液。

[0119] 3) 环孢霉素 A 标准品溶液 :6 瓶, 2ml/ 瓶, 浓度分别为 0ng/ml、30ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、800ng/ml、1500ng/ml。

[0120] 4) 环孢霉素 A 质量控制液 :2 瓶, 2ml/ 瓶, 浓度分别为 200ng/ml、1000ng/ml。

[0121] 5) 样品稀释液 :为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液, 20ml/ 瓶, 1 瓶

[0122] 6) 底物显色液 :A 液和 B 液各 1 瓶, pH 值为 7.2-8.5, 浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中加入终浓度 (W/V) 为 0.04% Proclin300, 1.5% 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 0.04% Proclin300, 0.061mmol/L 的四苯硼酸盐, 0.4mmol/L 的 4- 碘苯酚, 0.7% 的 BSA, 0.4% 的溴化十六烷基三甲基铵, 30mM/L 鲁米诺溶液。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 三、包被原为抗抗体, 酶标记物为酶标环孢霉素 A 半抗原的试剂盒

[0126] 1、工作原理

[0127] 当在化学发光酶标板微孔条上预包被抗抗体时, 加入环孢霉素 A 特异性抗体孵育后, 加入样品溶液或者标准品溶液, 再加入酶标记的环孢霉素 A 半抗原, 这样, 样本中的环孢霉素 A 与酶标记的环孢霉素 A 与微孔条上预包被的抗环孢霉素 A 抗体进行竞争性结合, 这样, 样本发光值与其样本中所含环孢霉素 A 的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出样本中环孢霉素 A 的量。

[0128] 2、本试剂盒的组成为:

[0129] 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 0.05-0.14 μ g/ml。

[0130] 2) 酶标记物: 辣根过氧化物酶标记的环孢霉素 A 半抗原(实施例 1 步骤 3(1))。

[0131] 3) 特异性抗体工作液: 环孢霉素 A 单克隆抗体工作液, 用稀释液将酶标记的环孢霉素 A 单克隆抗体稀释 5000 倍, 得到特异性抗体工作液。

[0132] 4) 环孢霉素 A 标准品溶液: 6 瓶, 2ml/瓶, 浓度分别为 0ng/ml、30ng/ml、100ng/ml、300ng/ml、800ng/ml、1500ng/ml。

[0133] 5) 环孢霉素 A 质量控制液: 2 瓶, 2ml/瓶, 浓度分别为 200ng/ml、1000ng/ml。

[0134] 6) 样品稀释液: 为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液, 20ml/瓶, 1 瓶

[0135] 7) 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 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 实施例 3 采用不同发光显示底物液的试剂盒比较试验

[0139] 第一组: 参与比较的试剂盒为实施例 1 步骤 3 制备的试剂盒。

[0140] 第二组: 对照试剂盒(其它同实施例 1 步骤 3 制备的试剂盒, 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)。

[0141] 第三组: 进口显色底物(Thermo Scientific 公司生产的 Supersignal ELISA Pico luminol/Enhancer Solution)。

[0142] 样品为溶有不同浓度环孢霉素 A 的血清标准品, 结果如下:

[0143] 表 6 用不同化学发光底物检测标准品化学发光值

[0144]

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	383860	301240	361639
30	322754	267895	301257
100	195763	153023	181843
300	68982	42135	56747
800	30372	19694	24612
1500	7728	10346	8369

[0145] 取以上数值的最高值和最低值进行比对如下：

[0146] 表 7 用不同化学发光底物检测标准品化学发光值

[0147]

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	383860	301240	361639
1500	7728	10346	7369

[0148] 根据表 7 绘制图 3, 由图 3 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。

[0149] 步骤 2、在步骤 1 中检测标准品时, 用在“实施例 1 步骤 3 中获得的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：

[0150] 表 8 不同化学发光底物发光平台测定实验相对发光值表

[0151]

时间 (min)	进口对照发光底物液 相对发光值 RLU	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	383860	301240	361639
4	375524	295245	360341
6	371023	283185	353488
8	369728	276412	349764
10	352864	255793	331345
12	351438	245624	330186
14	348363	236496	329435
16	347012	219781	318729
18	346952	206895	318143
20	339346	180243	309648
22	326246	178679	303167
24	314694	154613	293467
26	311876	140216	289487
28	293947	129751	279648
30	291349	100243	271614
32	289346	99876	269467
34	288324	88694	266346
36	282506	76586	265143
38	280035	64589	262143
40	279728	63321	259864

[0152] 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。

[0153] 采用实施例 2 制备的另外三种试剂盒的不同批次产品进行同步步骤 1 和步骤 2 相同的对比检测,结果与实施例 1 的试剂盒得出的结果一致,其信噪比,发光强度和发光值均显著高于国产显示底物,而与进口试剂无显著差异。

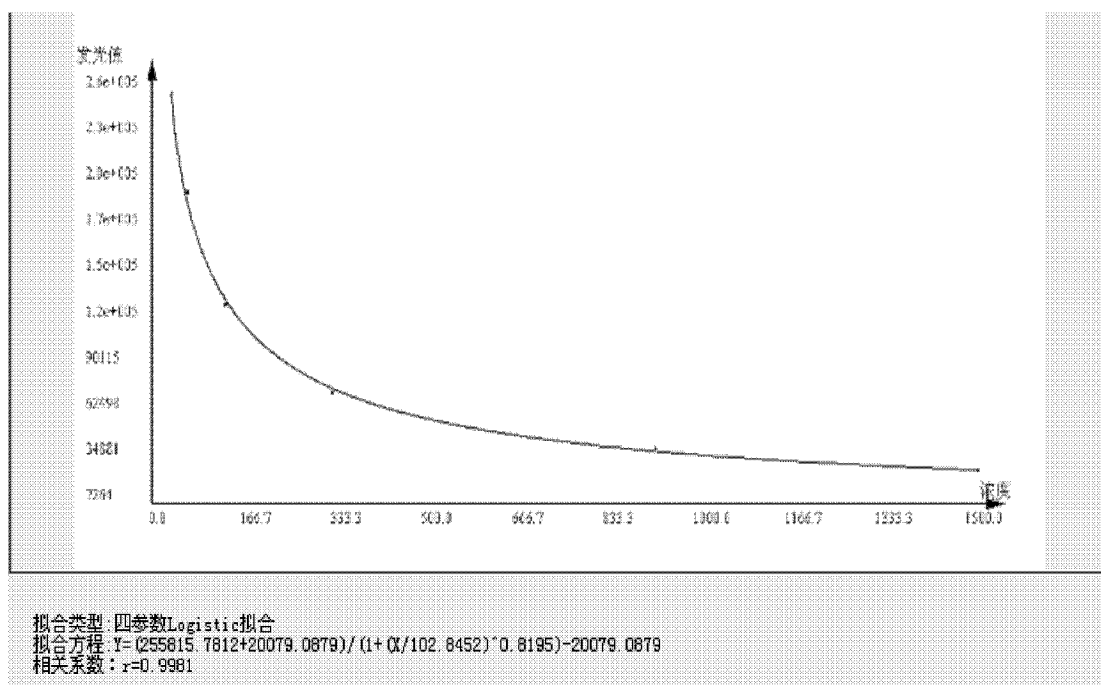


图 1

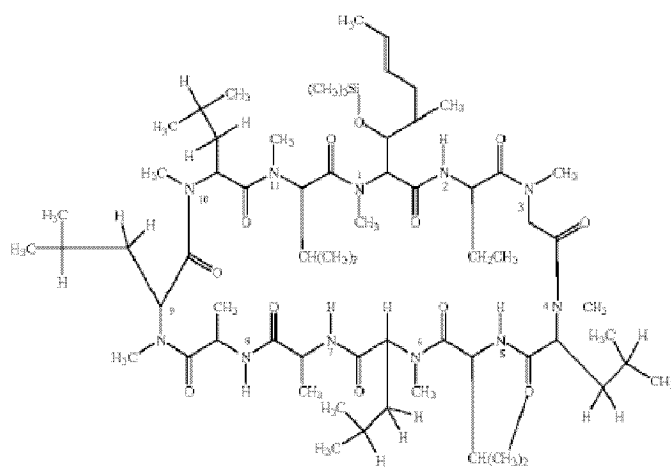


图 2

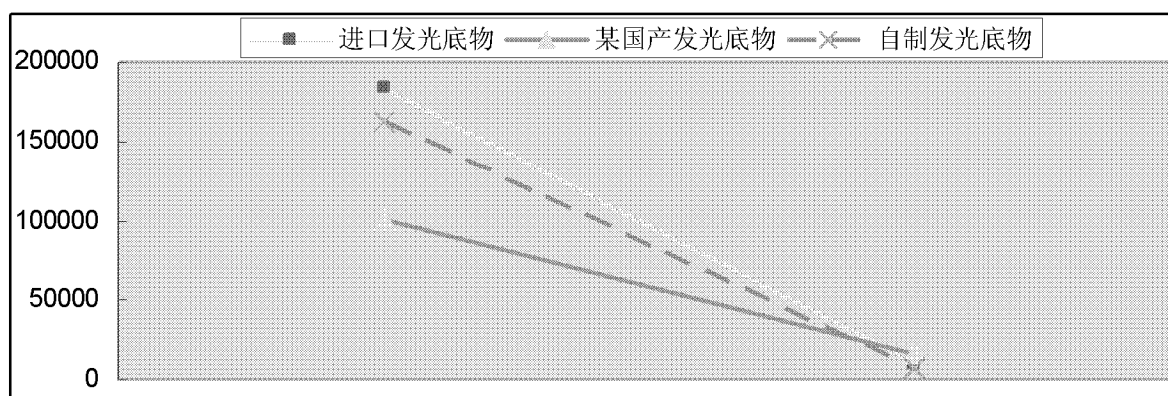


图 3

专利名称(译)	检测环孢霉素A药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102368072A	公开(公告)日	2012-03-07
申请号	CN201110183670.8	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	G01N33/577 G01N33/535 G01N1/28 G01N1/38 G01N1/34		
代理人(译)	张涛		
其他公开文献	CN102368072B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明“检测环孢霉素A药物浓度的化学发光酶联免疫检测试剂盒”，属于医学检测试剂。本发明的试剂盒主要在环孢霉素A的制备方法与化学发光底物的配方上做出了改进，使试剂盒既适应国内普及的检测设备，又具备高灵敏度、良好稳定性和重复性，使环孢霉素A的检测成本大大降低又不影响检测结果的可靠性。

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	01 批	6.7	7.91	9.35	5.78	10.8	5.73	9.74	11.63	10.84	7.9
	02 批	6.18	9.51	12.9	13.12	9.5	11.14	9.9	10.3	6.9	4.9
	03 批	10.36	12.13	9.8	7.6	8.4	4.35	6.97	5.16	9.44	8.6