



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107132347 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(21)申请号 201611063177.1

(22)申请日 2016.11.25

(71)申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北1838号

(72)发明人 吴英松 刘天才 林冠峰 梁君瑜

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 单香杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

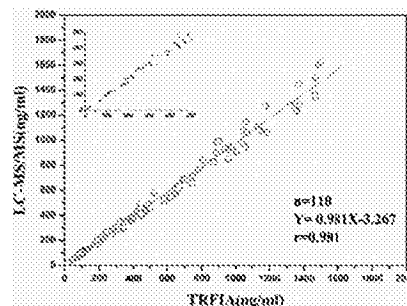
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

## (54)发明名称

一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒

## (57)摘要

本发明公开了一种5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒。所述试剂盒包括校准品5-FU,校准品稀释液,销标5-FUA-OVA抗原,抗5-FU鼠源多克隆抗体,分析缓冲液,洗涤液,增强液,羊抗鼠IgG包被反应板。本发明的试剂盒可定量测定化疗后患者外周血中5-FU的血药浓度,其测试结果显示,本发明的试剂盒灵敏度高,灵敏度为2.1ng/ml,稳定性好,重复性好,省时高效,操作简便、检测范围宽、无放射性污染等特点,有利于化疗药物即时监测的实现,适合用于临床氟尿嘧啶类药物血药监测,指导临床用药。



1. 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,包括其特征在于,包括浓度为0、10、50、100、750、1500 ng/mL的校准品5-FU、校准品稀释液、铕标5-FUA-OVA、抗5-FU鼠源多克隆抗体、分析缓冲液、洗涤液、增强液、羊抗鼠IgG包被的反应板;所述铕标5-FUA-OVA中5-FUA-OVA与Eu<sup>3+</sup>标记物的质量比为5:1,所述5-FUA-OVA中5-FUA与OVA的偶联质量比为10:1;所述抗5-FU鼠源多克隆抗体制备使用的抗原为5-FUA-KLH,所述5-FUA-KLH中5-FUA与KLH偶联摩尔比为20:1。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述5-FUA-OVA的制备方法为:将5-FUA溶于MES溶液中,加入EDC和NHS对其进行活化,活化后的5-FUA与溶于磷酸盐缓冲液的载体蛋白OVA偶联并纯化。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述铕标5-FUA-OVA抗原的制备方法,包括如下步骤:

S1. 5-FUA-OVA中加入Eu<sup>3+</sup>标记试剂,充分混匀,25℃振荡过夜;

S2. 用层析柱分离纯化,用洗脱液洗脱,收集流出液,逐管测量吸光度,合并峰管,测蛋白含量并计算标记率;

S3. 稀释并管后的标记物,分装真空冷冻干燥。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗5-FU鼠源多克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:

S1. 5-FUA-KLH抗原的制备:将KLH溶解于磷酸盐缓冲液中,将5-FUA溶于MES溶液中,往5-FUA溶液中加入EDC和NHS,室温活化30min,将KLH加入反应液中,37℃避光反应过夜,用磷酸盐缓冲液透析24h,分装冻干;

S2. 小鼠免疫:纯水溶解5-FUA-KLH抗原,免疫方式采用皮下多点注射免疫,每只BaIb/c小鼠接种剂量为50μg,三周后同样对小鼠皮下多点注射,加强免疫2次;

S3. 测定血清效价,血清效价高于1/128000时,收集小鼠血清,分装保存。

## 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物技术与分子诊断领域,具体地,涉及一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)是一种广谱、高效的治疗消化道和呼吸系统肿瘤的首选药,以5-FU为基础的联合用药也是结直肠癌术后的标准辅助治疗。虽然5-FU的疗效显著,但存在骨髓抑制,黏膜炎等毒副作用,限制了其临床应用。临床药物流行病学调查显示,其毒副作用存在明显的个体差异,这与其体内的分解代谢限速酶-二氢嘧啶脱氢酶(Dihydropyrimidinedehydrogenase,DPD)不同的个体表达水平有关。剂量累积的毒性作用可能影响5-FU的药物代谢,研究表明,5-FU的药物浓度-时间曲线下面积(AUC)为: $8.7 \pm 4.1 \text{h} \times \text{mg/L}$ ;清除率(CL)为: $51.5 \pm 24.8 \text{L/h/m}^2$ ;表观分布容积(Vd): $18.0 \pm 15.2 \text{L/m}^2$ ;半衰期( $t_{1/2}$ ): $0.26 \pm 0.19 \text{h}$ ;血药峰值( $C_{\text{max}}$ ): $21.0 \pm 14.9 \text{mg/L}$ 。血浆中稳态药物浓度在25~25,000ng/mL,个体差异大。大多数药物的疗效与该药到作用部位的浓度或相关受体浓度密切相关,而药物在受体部位的浓度直接与血药浓度有关,两者呈现平行关系,因此,血药浓度的测定可作为间接衡量药物在作用部位或受体浓度的指标。

[0003] 大量研究表明,等同体重给药( $\text{mg/kg}$ )或体表面积给药( $\text{mg/m}^2$ )下的稳态血药浓度在个体间存在显著差异,仅仅根据体表面积给药,大部分患者未能达到最优的药物暴露量。而基于的药物剂量选择,将稳态血药浓度维持在一定水平,能够使患者在疗效和毒性之间获得最佳平衡。因此,需要建立一套简便即时的血药监测方法来控制有效药物浓度。

[0004] 临床上5-FU的血药监测手段主要有紫外检测-高效液相色谱法(UV-HPLC)、高效液相色谱法(HPLC)、气质联用色谱(GC-MS)和液质联用色谱(LC-MS/MS)以及紫外分光光度法。色谱质谱定量所需血清样本量大,且检测前须对样本前处理,操作复杂繁琐,检测时间长,不符合即时监测及难以推广应用。紫外分光光度法同样样品需求量大、灵敏度低、抗干扰能力差、专属性差,临床普及意义不大,已逐渐被淘汰。

### 发明内容

[0005] 本发明为了克服现有技术的上述不足,提供一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒。本发明需要对试剂盒所使用的原料进行制备与筛选,从而确定最佳原料,这一过程包括人工抗原的合成及偶联比的确定,多克隆抗体的制备,标记物和抗体的比例,包被抗体的浓度,标记物的稀释度,包被板的吸附性能和变异大小等。通过反复摸索和比对,确定了小分子人工抗原标记和纯化的最佳条件。

[0006] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案予以实现的。

[0007] 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,包括浓度为0、10、50、100、750、1500ng/mL的校准品5-FU、校准品稀释液、钨标5-FUA-OVA、抗5-FU鼠源多克

隆抗体、分析缓冲液、洗涤液、增强液、羊抗鼠 IgG 包被的反应板；所述铕标 5-FUA-OVA 中 5-FUA-OVA 与  $\text{Eu}^{3+}$  标记物的质量比为 5:1，所述 5-FUA-OVA 中 5-FUA 与 OVA 的偶联质量比为 10:1；所述抗 5-FU 鼠源多克隆抗体制备使用的抗原为 5-FUA-KLH，所述 5-FUA-KLH 中 5-FUA 与 KLH 偶联摩尔比为 20:1。

[0008] 优选地，所述校准品稀释液为含有 2mg/ml 的 BSA 及 0.1%  $\text{NaN}_3$  的 50mmol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液。

[0009] 根据本发明一个优选的实施方案，包被反应板为按每孔 0.5ug 羊抗鼠 IgG，100uI 包被缓冲液加入 96 孔透明微孔板，并封闭冻干制备而成。其中封闭液成分为 50mM Tris-HCl，0.1% BSA、4% 海藻糖、0.05%  $\text{NaN}_3$ ，pH 7.2。

[0010] 优选地，所述分析缓冲液成分为 50mM、pH 7.8 的 Tris-HCl，1.5% PEG6000，0.2% BSA，0.1% ProcIn300，0.02% 牛 IgG，0.1% Tween 20 和 0.84% NaCl。

[0011] 优选地，所述洗涤液成分为 1.25mmol/L pH 7.8 Tris-HCl，2.5% Tween 20 和 21% NaCl。

[0012] 优选地，所述增强液成分为 15umol/L  $\beta$ -萘甲酰三氟丙酮，50umol/L 三辛基氧化磷，0.1% TritonX-100，0.6% 醋酸，用邻苯二甲酸氢钾调整 pH 3.0~3.2。

[0013] 优选地，所述 5-FUA-OVA 的制备方法为：将 5-FUA 溶于 MES 溶液中，加入 EDC 和 NHS 对其进行活化，活化后的 5-FUA 与溶于磷酸盐缓冲液的载体蛋白 OVA 偶联并纯化

[0014] 优选地，所述铕标 5-FUA-OVA 抗原的制备方法，包括如下步骤：

[0015] S1. 向 5-FUA-OVA 中加入  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂，充分混匀，25℃ 振荡过夜；

[0016] S2. 用层析柱分离纯化，用洗脱液洗脱，收集流出液，逐管测量吸光度，合并峰管，测蛋白含量并计算标记率；

[0017] S3. 稀释并管后的标记物，分装真空冷冻干燥。

[0018] 优选地，所述铕标记 5-FU-OVA 合成抗原的制备步骤如下：

[0019] (1) 抗原纯化和浓缩：1mg 5-FUA-OVA 合成抗原，用市售的带有滤膜的 G-10 离心管 9000rpm 离心 5min，弃滤液，并加入 200uI 标记缓冲液（50mmol/L， $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ，pH 9.0）重复洗涤 6 次，倒转 G10 离心管，1500rpm 离心 2min 收集抗原。

[0020] (2) 抗原标记：往纯化好的 5-FU-OVA 抗原中加入 0.2mg  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂，充分混匀，25℃ 振荡过夜。

[0021] (3) 上样与洗脱：用 Sephadex G-50 层析柱（1×30cm）分离纯化，洗脱液（含 0.9% NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl）洗脱，同时收集流出液（1ml/管），逐管测量吸光度（ $A_{280}$ ），合并峰管，测蛋白含量并计算标记率。

[0022] (4) 确定稀释度：并管后的铕标记物，进行稀释度摸索，选择线性较好，灵敏度较好的稀释度；优选稀释度为 1/200，以此为基准稀释并管后的标记物。

[0023] (5) 分装标记物：分装体积为 1.0ml/瓶，真空冷冻干燥。

[0024] (6) 保存：冻干后在 2~8℃ 条件下保存。

[0025] 优选地，所述抗 5-FU 鼠源多克隆抗体的制备方法，包括如下步骤：

[0026] S1. 5-FUA-KLH 抗原的制备：将 KLH 溶解于磷酸盐缓冲液中，将 5-FUA 溶于 MES 溶液中，往 5-FUA 溶液中加入 EDC 和 NHS，室温活化 30min，将 KLH 加入反应液中，37℃ 避光反应过夜，用磷酸盐缓冲液透析 24h，分装冻干；

[0027] S2. 小鼠免疫:纯水溶解5-FUA-KLH抗原,免疫方式采用皮下多点注射免疫,每只BaIb/c小鼠接种剂量为50 $\mu$ g,三周后同样对小鼠皮下多点注射,加强免疫 2次;

[0028] S3. 测定血清效价,血清效价高于1/128000时,收集小鼠血清,分装保存。

[0029] 血清效价测定的具体方法为:取小鼠尾静脉血,9000rpm,离心10min,取上清,对小鼠血清的效价测定采用时间分辨荧光免疫分析法,将5-FUA-OVA抗原溶于包被液中,37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h,拍干,加入封闭液,4 $^{\circ}$ C封闭过夜,拍干,加入小鼠血清,37 $^{\circ}$ C孵育2h,洗涤液洗4次,加入铕标羊抗鼠IgG,置37 $^{\circ}$ C孵育1h,洗涤液洗6次,加入增强液,37 $^{\circ}$ C孵育5min,测值;

[0030] 利用上述试剂盒检测5-FU血药浓度的方法,包括如下步骤:

[0031] S1. 羊抗鼠IgG包被的反应板在23~28 $^{\circ}$ C平衡30min,向反应孔中加入抗体工作液,室温振荡孵育1h;

[0032] S2. 洗涤液用离子水稀释25倍作为洗涤液工作液,洗板4次,拍干;

[0033] S3. 加入校准品或待测样品,加入铕标抗原工作液,37 $^{\circ}$ C振荡孵育1h;

[0034] S4. 洗涤液洗6次,拍干;

[0035] S5. 加入增强液,37 $^{\circ}$ C振荡孵育5min;

[0036] S6. 用时间分辨免疫荧光检测仪,在激发波长340nm,发射波长613nm时测定铕的荧光值,以校准品中5-FUA-OVA浓度的Log值为横坐标,测定的荧光值扣除本底后的Log值为纵坐标,绘制5-FUA-OVA的剂量-反应曲线,得出标准方程,待测样品测定值代入标准方程计算出血样中5-FU的具体浓度。

[0037] 本发明试剂盒的工作原理如下:羊抗鼠二抗包被的96孔微孔板,作为反应中的固相介质,通过包被抗体捕获鼠源抗5-氟尿嘧啶多克隆抗体,通过竞争的反应模式,铕标记的5-氟尿嘧啶人工抗原与5-氟尿嘧啶校准品(或待测样品中的5-氟尿嘧啶)竞争结合抗5-氟尿嘧啶的鼠源多抗,洗涤后,加入增强液解离铕原子增大荧光信号,用时间分辨荧光检测仪测值。

[0038] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0039] 本发明的试剂盒以血清样本作检测样本,并自制抗-5-FU多克隆抗体,在化疗用药组合中氟尿嘧啶类药物遵循单一选择配伍其他类型化疗药物的用药原则,且5-氟尿嘧啶属于外源性物质,体内物质对其测定影响较小。因此,本试剂盒可定量测定化疗后患者外周血5-氟尿嘧啶的血药浓度。其测试结果显示,本发明的试剂盒灵敏度高,稳定性好,重复性好,省时高效,方便,有利于化疗药物即时监测的实现。

[0040] 本发明的5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,可定量测定化疗后患者外周血5-FU的血药浓度。其测试结果显示,本发明的试剂盒灵敏度高,灵敏度为2.1ng/ml。稳定性好,重复性好,省时高效,操作简便、检测范围宽、无放射性污染等特点,有利于化疗药物即时监测的实现,适合用于临床氟尿嘧啶类药物血药监测,指导临床用药。

## 附图说明

[0041] 图1为5-氟尿嘧啶与合成产物5-氟尿嘧啶-1-基乙酸结构示意图。

[0042] 图2为本试剂盒5-氟尿嘧啶的剂量反应曲线(双对数拟合)。

[0043] 图3为用本发明的试剂盒与液质联用色谱方法(LC-MS/MS)测定临床样本5-氟尿嘧啶测值的相关性分析(回归分析)。

[0044] 图4为实施例1和对比例1、2抗体的反应荧光值比较。

[0045] 图5为实施例1和对比例1、2检测抗原的反应荧光值比较。

### 具体实施方式

[0046] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0047] 实施例1

[0048] 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,包括浓度为 0、10、50、100、750及1500ng/mL的校准品5-FU,成分为2mg/mL BSA,0.1%NaN<sub>3</sub>, 50mM pH7.8Tris-HCl缓冲液的校准品稀释液;钕标5-FUA-OVA抗原;抗5-FU 鼠源多克隆抗体;成分为50mM pH 7.8Tris-HCl,1.5%PEG6000,0.2%BSA, 0.1%ProcIn300,0.02%牛IgG, 0.1%Tween 20和0.84%NaCl的分析缓冲液;成分为1.25mM/L pH 7.8Tris-HCl,2.5% Tween 20和21%NaCl的25×洗涤液;成分为15μM/Lβ-萘甲酰三氟丙酮,50μM/L三辛基氧化磷,0.1%TritonX-100, 0.6%醋酸,用邻苯二甲酸氢钾调整pH3.0~3.2的增强液;羊抗鼠IgG包被的反应板;还包括封片3片和说明书1份。

[0049] 其中,钕标记5-FUA-OVA抗原的制备步骤如下:

[0050] (1) 5-FUA-OVA抗原的制备:将5mg的OVA溶解于0.5mL磷酸盐缓冲液中 (pH 7.2, 0.1M),分别配制10mg/mL的EDC和NHS溶液,称量适量5-氟尿嘧啶-1-基乙酸溶于MES溶液中 (pH 5.0,50mM),往5-氟尿嘧啶-1-基乙酸溶液中加入15μL EDC溶液和10μL NHS溶液,室温条件下活化30min。活化后,将OVA 加入反应液中,37℃避光反应过夜。反应后,用磷酸盐缓冲液 (pH 7.2,0.1M) 透析24小时。抗原1mg分装冻干,-20℃贮存。

[0051] (2) 抗原纯化和浓缩:1mg 5-FUA-OVA合成抗原,用市售的带有滤膜的G-10 离心管9000rpm离心5min,弃滤液,并加入200μL标记缓冲液 (50mM/L,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,pH 9.0) 重复洗涤6次,倒转G10离心管,1500rpm离心2min 收集抗原。

[0052] (3) 抗原标记:往纯化好的5-FUA-OVA抗原中加入0.2mg的Eu<sup>3+</sup>标记试剂,充分混匀,25℃振荡过夜。

[0053] (4) 上样与洗脱:用Sephadex G-50层析柱(1×30cm)分离纯化,洗脱液(含 0.9% NaCl的50mM/L Tris-HCl)洗脱,同时收集流出液(1mL/管),逐管测量吸光度(A<sub>280</sub>),合并峰管,测蛋白含量并计算标记率。

[0054] (5) 确定稀释度:并管后的钕标记物,进行稀释度摸索,选择线性较好,灵敏度较好的稀释度;优选稀释度为1/200,以此为基准稀释并管后的标记物。

[0055] (6) 分装标记物:分装体积为1.0mL/瓶,真空冷冻干燥。

[0056] (7) 保存:冻干后在2~8℃条件下保存。

[0057] 所述抗5-氟尿嘧啶鼠源多克隆抗体的制备步骤如下:

[0058] (1) 5-FU-KLH完全抗原的制备:将5mg血蓝蛋白(KLH)溶解于0.5mL磷酸盐缓冲液中 (pH 7.2,0.1M),分别配制10mg/mL EDC和NHS溶液,称量适量5-氟尿嘧啶-1-基乙酸溶于MES溶液中 (pH 5.0,50mM);往5-氟尿嘧啶-1-基乙酸溶液中加入15μL EDC溶液和10μL NHS溶

液,室温条件下活化30min。活化后,将 KLH加入反应液中,37℃避光反应过夜。反应后,用磷酸盐缓冲液(pH 7.2,0.1M)透析24小时。抗原1mg分装冻干,-20℃贮存。

[0059] (2) 小鼠免疫:将5-FU-KLH完全抗原,用1mI纯水溶解,免疫方式采用皮下多点注射免疫,每只BaIb/c小鼠接种剂量为50μg,三周后同样用1mI纯水溶解5-FU-KLH完全抗原冻干粉,对小鼠皮下多点注射,每只小鼠接种剂量为 50μg,加强免疫2次。

[0060] (3) 血清效价测定:取小鼠尾静脉血,9 000rpm,离心10min,将上清转入新的EP管中,对小鼠血清的效价测定采用时间分辨荧光免疫分析法,将 5-FU-OVA抗原溶于包被液中,配成5ug/ml包被液,每孔加入100μI,37℃振荡孵育1小时。弃液,拍干,加入封闭液,每孔200μI,4℃封闭过夜。次日,弃液,拍干。往包被好的反应孔内加入倍比稀释好的小鼠血清100μI/孔,并设阳性对照、阴性对照和空白对照,37℃孵育2小时。用洗涤液洗4次,加入用分析缓冲液以1:10000倍稀释钨标羊抗鼠IgG,100μI/孔,置37℃孵育1小时。用洗涤液洗6次,加入增强液,200μI/孔,37℃孵育5min,测值。

[0061] (4) 血清效价高于1/128000时,收集小鼠血清,分装,-20℃贮存。

[0062] 本实施例所述试剂盒的具体使用方法如下:

[0063] 1、样本收集:采静脉血1~2mI于凝血管中,4℃放置2h以上,待血清析出后取100uI血清即可。血清样品在2~8℃可以保存7d,如果需要长期保存,可在-20℃保存,避免反复冻融。样品需要在含干冰的保温瓶或其它装置条件下运输。

[0064] 2、试剂的准备

[0065] (1) 洗涤液:将50mI的25×洗液和1200mI去离子水混合,作为工作洗涤液。

[0066] (2) 钨标工作液:使用前1小时将每瓶标记物用1mI无菌去离子水溶解,用分析缓冲液按1:5 0倍稀释作为钨标工作液。

[0067] (3) 抗体工作液:抗5-FU鼠源多克隆抗体冻干品,用100uI去离子水重溶,按测试用量以分析缓冲液1/3000稀释,作为抗体工作液。

[0068] (4) 校准品使用前用1mI去离子水溶解,4℃保存。

[0069] 3、操作步骤:

[0070] (1) 包被反应板在23~28℃平衡30min,向反应孔加入100uI抗体工作液,室温振荡孵育1h。

[0071] (2) 25×洗涤液用离子水稀释25倍作为洗涤液,洗涤液洗板4次,拍干。

[0072] (3) 加入校准品和待测样品,加入钨标工作液,37℃振荡孵育1h。

[0073] (4) 洗涤液洗6次,拍干。

[0074] (5) 加入200uI增强液,37℃振荡孵育5分钟。

[0075] (6) 用时间分辨免疫荧光检测仪,在激发波长340nm,发射波长613nm是测定钨的荧光值。分别以校准品中5-FUA-OVA浓度的Log值为横坐标,测定的荧光值扣除本底后的Log值为纵坐标,绘制5-FUA-OVA的剂量-反应曲线,得出标准方程,待测样品测定值代入标准方程计算出血样中5-FU的具体浓度。

[0076] 实施例2

[0077] 本发明的试剂盒的方法学检定,按照本领域中常规的制造和检定规程对通过上述制备的试剂盒进行检定,结果如下:

[0078] (1) 分析灵敏度和线性范围:以零参考标准品当作样品测量10次,计算其荧光值及

标准差。以该点荧光测定平均值减去2倍标准差所得的荧光值代入标准方程计算得出的浓度值为其分析灵敏度,经测定本试剂分析灵敏度为2.1ng/ml。将抗原稀释成不同浓度进行测定,测得标准曲线线性范围为2.1~1500ng/ml,标准曲线为 $LOG(Y) = 5.024 - 0.194LOG(X)$ ,  $R = 0.9986$ ,标准曲线见图2。

[0079] (2) 精密度(CV%) :用本发明的试剂盒对自制5-FU质控品(质控品I、II、III,预期浓度分别为8.5、100、1500ng/ml)进行测定,各设10个复孔。结果本发明试剂盒的批内变异系数(CV%)为5.1%~7.0%和批间变异系数(CV%)为6.6%~7.3%。

[0080] 表1批内精密度测试结果(n=10)

[0081]

批号	135001		135002		135003	
	5-FU(ng/mL)	CV%	5-FU(ng/mL)	CV%	5-FU(ng/mL)	CV%
质控品 I	8.45 ± 0.58	6.8	8.27 ± 0.45	5.4	9.04 ± 0.64	7.0
质控品 II	99.08 ± 7.01	7.0	98.24 ± 6.03	5.1	101.72 ± 6.73	6.7
质控品 III	1521.15 ± 90.74	5.9	1492.12 ± 78.66	5.2	1529.78 ± 79.19	5.1

[0082] 表2批间精密度测试结果(三批,n=3\*10)

[0083]

测定值	5-FU (ng/mL)	CV%
质控品 I	8.36 ± 0.55	6.6
质控品 II	100.03 ± 7.31	7.3
质控品 III	1500.57 ± 101.12	6.7

[0084] (3) 稳定性实验:取一批本发明的试剂盒,分别放置37℃,7天或者4℃三个月,观察各阶段试剂的物理外观,鉴定保存期间标准品活性变化,评价其最低检测量、准确度、线性、精密度指标。测定结果表明,各项指标均符合质量标准,试剂盒稳定可靠。

[0085] 实施例3

[0086] 本发明的试剂盒与液质联用色谱法(LC-MS/MS)临床血样测值比较:用本发明的试剂盒和液质联用色谱法(LC-MS/MS)同时对110份血清样本进行检测。以本发明方法测定血样的5-FU浓度结果为横坐标,以LC-MS/MS法测定的5-FU浓度结果为纵坐标做回归分析,相关方程为: $Y = 0.981X - 3.267$ ,相关系数 $r = 0.981$ (图3)。经统计学处理结果表明,本发明方法与LC-MS/MS法临床血样测值均具有显著相关性。

[0087] 对比例1

[0088] 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,组成成分同实施例1,唯一不同的是制备抗体所用5-FUA-KLH免疫原的偶联比例,本对比例中5-FUA:KLH=15:1(摩尔比),免疫后收集小鼠尾静脉血清,测得抗体效价为1/64000。抗体的效价显著低于实施例1制备的抗体的效价。

[0089] 对比例2

[0090] 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒,组成成分同实施例1,唯一不同的是制备抗体所用5-FUA-KLH免疫原的偶联比例,本对比例中5-FUA:KLH=

30:1 (摩尔比), 免疫后收集小鼠尾静脉血清, 测得抗体效价为1:75000。抗体的效价显著低于实施例1制备的抗体的效价。

[0091] 实施例1与对比例1和对比例2制备的抗体在同样稀释度下的荧光值比较如图4所示。

[0092] 对比例3

[0093] 一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒, 组成成分同实施例1, 唯一不同的是检测抗原5-FUA-OVA的偶联比例, 本对比例中5-FUA: OVA=5:1 (摩尔比), 5-FUA: OVA=15:1 (摩尔比) 分别在实施例1相同检测条件下测得反应荧光值, 并与实施例1中检测抗原进行比较, 结果如图5。

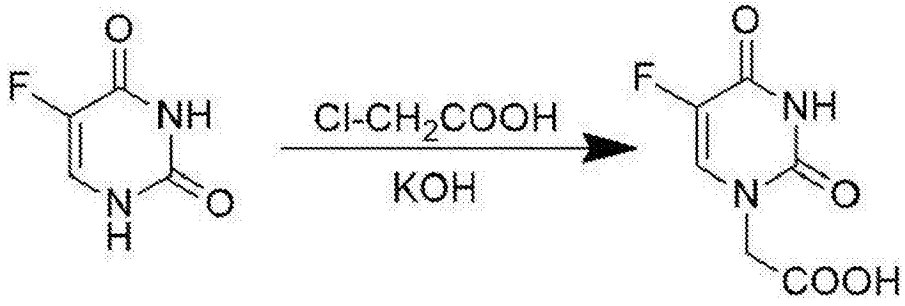


图1

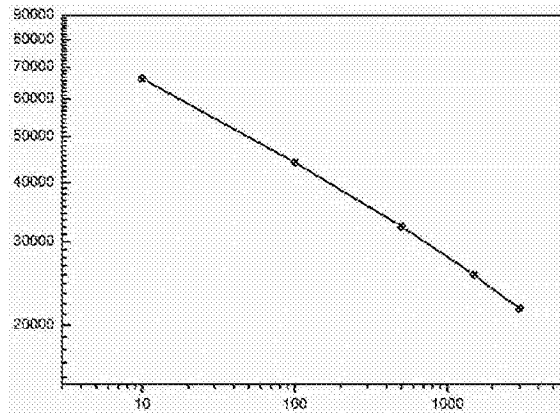


图2

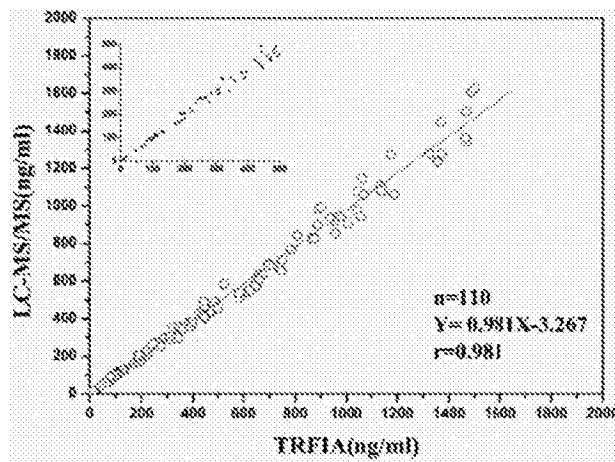


图3

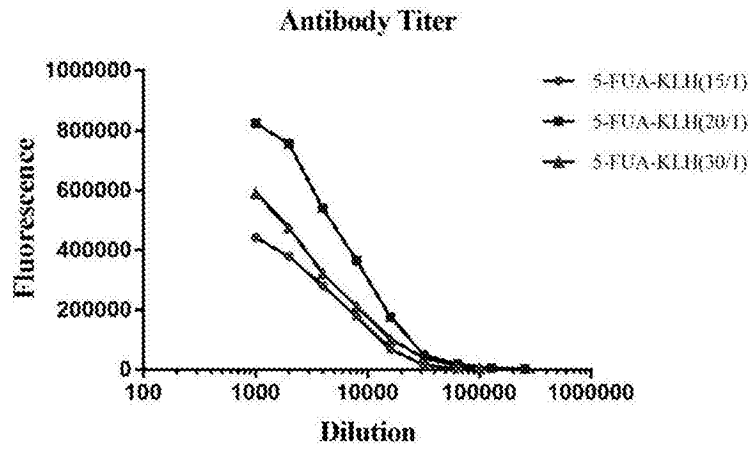


图4

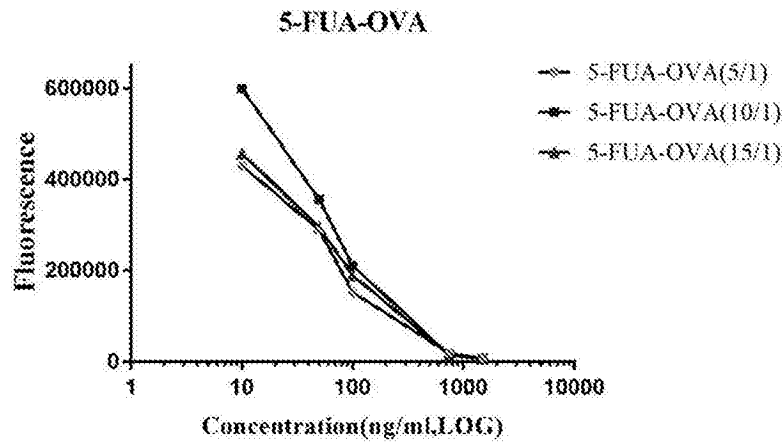


图5

专利名称(译)	一种实时监测5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107132347A</a>	公开(公告)日	2017-09-05
申请号	CN201611063177.1	申请日	2016-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	吴英松 刘天才 林冠峰 梁君瑜		
发明人	吴英松 刘天才 林冠峰 梁君瑜		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6408 G01N21/643 G01N2021/6439		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种5-氟尿嘧啶血药浓度的时间分辨荧光检测试剂盒。所述试剂盒包括校准品5-FU，校准品稀释液，钡标5-FUA-OVA抗原，抗5-FU鼠源多克隆抗体，分析缓冲液，洗涤液，增强液，羊抗鼠IgG包被反应板。本发明的试剂盒可定量测定化疗后患者外周血中5-FU的血药浓度，其测试结果显示，本发明的试剂盒灵敏度高，灵敏度为2.1ng/ml，稳定性好，重复性好，省时高效，操作简便、检测范围宽、无放射性污染等特点，有利于化疗药物即时监测的实现，适合用于临床氟尿嘧啶类药物血药监测，指导临床用药。

