



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884322 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910233418.X

(22)申请日 2019.03.26

(71)申请人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路8
号9号楼101、201室

(72)发明人 虞留明

(51)Int.Cl.

G01N 33/72(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

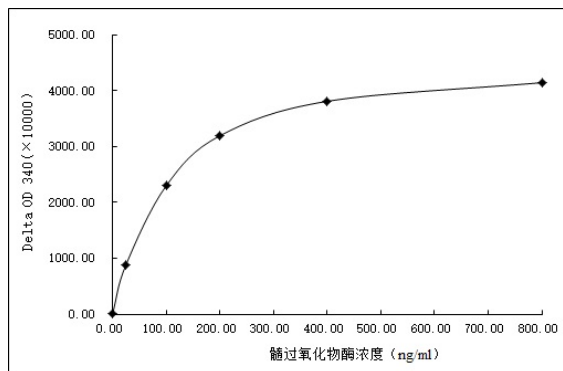
权利要求书5页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法。应用该检测试剂可以实现全自动生化分析仪上对髓过氧化物酶含量的自动化测定,可以高通量、快速化、精确地测定生物样本中髓过氧化物酶的含量,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,有效降低髓过氧化物酶检测成本,有利于临床广泛推广使用。



1. 一种髓过氧化物酶检测试剂, 其特征在于, 包括试剂R1和试剂R2, 所述试剂R1中包含抗髓过氧化物酶特异性抗体和均相酶底物溶液; 所述试剂R2包含髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物和R2缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的髓过氧化物酶检测试剂, 其特征在于, 制备方法包括以下步骤:

A. 试剂R1的制备: 将质量分数5.0%的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5.0%的葡萄糖-6-磷酸、0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的NaN₃的用55 mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液; 再将抗髓过氧化物酶特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中混匀, 得到试剂R1, 所述抗髓过氧化物酶特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:100~1:10000; 优选地, 所述抗髓过氧化物酶特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:450;

B. 试剂R2的制备: 将质量分数0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的NaN₃用120 mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液溶解制成R2缓冲液, 再将髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物加入所述R2缓冲液中混匀, 得到试剂R2, 所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物与R2缓冲液的体积比为1:100~1:10000; 优选地, 所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物与R2缓冲液的体积比为1:1350。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 所述的抗髓过氧化物酶特异性抗体, 由髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原免疫实验动物后产生, 所述抗体为完整抗体分子, 或者为保留与髓过氧化物酶氨基末端三肽特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物, 所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种, 优选为兔;

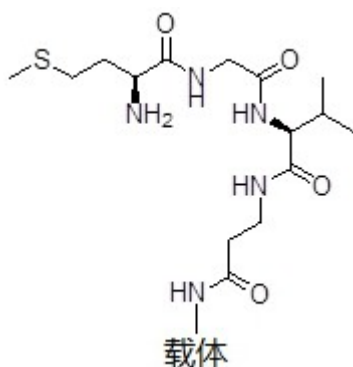
所述抗髓过氧化物酶特异性抗体的制备方法, 包括以下步骤:

a. 用PBS缓冲液将髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原稀释至3.0 mg/ml, 得到免疫原溶液, 然后用3.0 ml所述免疫原溶液与等量弗氏完全佐剂混合, 对实验动物进行注射;

b. 2周后, 再用3.0 ml相同的免疫原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合, 对上述实验动物注射一次, 之后每隔2~5周注射一次, 共计注射3~8次;

c. 对免疫后的实验动物取血, 分离纯化得到抗髓过氧化物酶特异性抗体。

4. 根据权利要求3所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 所述髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原由髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与载体连接而成, 其结构式如下式(I)所示:



式(I);

所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽, 选自血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或甲状

腺球蛋白中的一种,优选为血清蛋白,更优选为牛血清白蛋白;

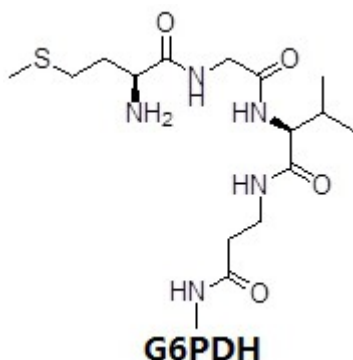
所述髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原的制备方法,包括以下步骤:

(1)将质量分数1.0%的载体蛋白溶解于0.2 mmol/L, pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

(2)将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物、5.0%的二甲基甲酰胺、5.0%的乙醇溶解于10 mmol/L, pH=5.0的磷酸钾缓冲液中,再加入质量分数0.5%的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学物质在25~35℃下搅拌反应30~60分钟;

(3)将步骤(2)中溶解好的溶液缓慢滴加至步骤(1)中的载体蛋白溶液中,并在-4~0℃下搅拌12~24小时,得到偶联物溶液,将反应后的偶联物溶液进行透析纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液中加入质量分数0.10%的NaN₃,于-20℃下储存。

5.根据权利要求1-2中任一项所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂,其特征在于,所述的髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物由髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成,其结构式如下述式(II)所示:



式(II);

所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物的制备方法,包括以下步骤:

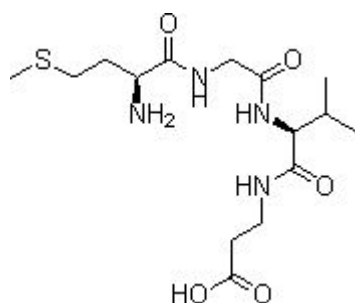
①葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将质量分数2.5%的规格为200KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于含有0.05 mol/L Tris、3.6 mmol/L MgCl₂和1.8 mmol/L NaCl, pH=8.5~9.0的溶液中;在此溶液中加入质量分数10.0%的还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、7.5%的葡萄糖-6-磷酸以及1.5%的卡必醇;加热到30~35℃,再缓慢加入质量分数0.5%的二甲基亚砷,摇匀后静置15~25秒;

②髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的激活:在无水状态下将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,溶解于5.0%的二甲基甲酰胺中;将此溶液温度降到-10~-15℃;然后加入1.5%的三丁胺、2.5%的氯甲酸异丁酯、1.5%的碳二亚胺;0.5%的N-羟基琥珀酰亚胺;-10~-15℃搅拌30~60分钟;

③葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的连接:将步骤②中激活的温度为-10~-15℃的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物溶液逐滴加入到步骤①中溶解的温度为30~35℃的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2~8℃搅拌12~24小时;

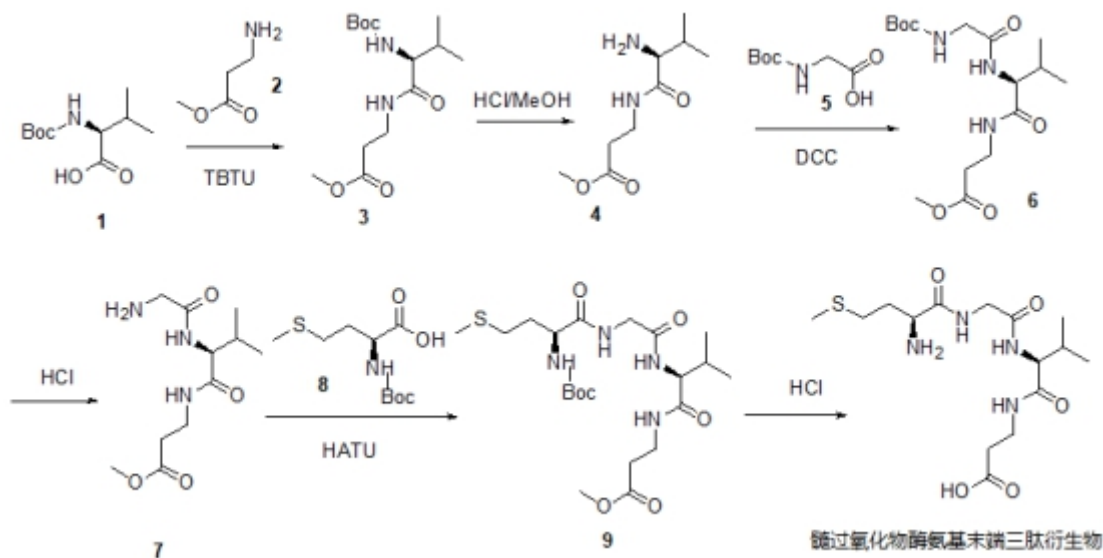
④纯化产物:将反应后的连接产物通过G-25葡聚糖凝胶层析柱进行纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液中加入质量分数0.65%的BSA和质量分数0.10%的NaN₃,于2~8℃下储存。

6. 根据权利要求4-5中任一项所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 所述的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物, 其结构式如下述式(III)所示:



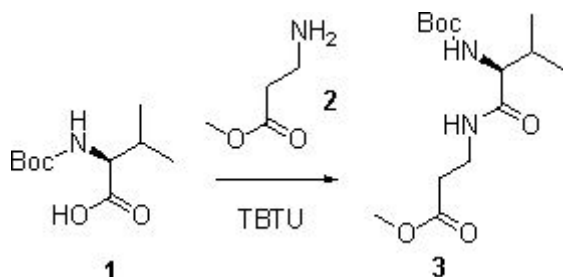
式(III);

上述式(III)所示的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成路线如下:

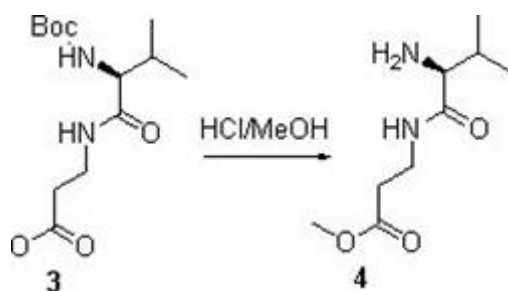


7. 根据权利要求6所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂, 其特征在于, 所述的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成路线, 具体制备步骤如下:

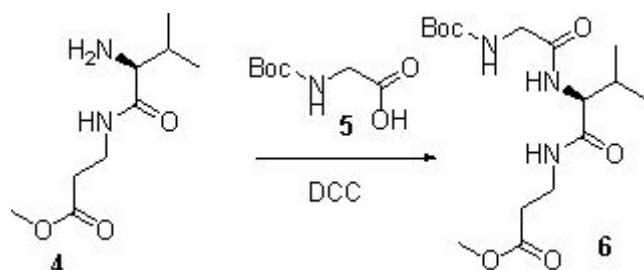
(I) 合成化合物3: 将22 g 化合物1溶解于100 ml 二甲基甲酰胺(DMF)中, 然后加入32 g 四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)、10 g 化合物2和20 g 三乙胺(TEA)制成反应混合物, 将上述混合物在室温下搅拌2小时, 然后倒入200ml的纯化水中, 过滤, 将滤饼在真空中干燥, 得到化合物3;



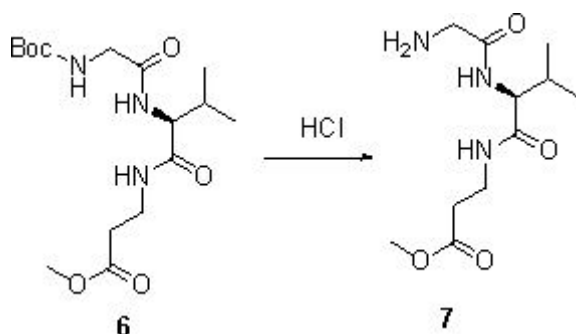
(II) 合成化合物4: 在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入24 g 化合物3, 在0℃下加入20 ml 的HCl/MeOH(2 mol/L), 将此混合物在室温下搅拌12小时, 然后减压蒸发, 得到化合物4;



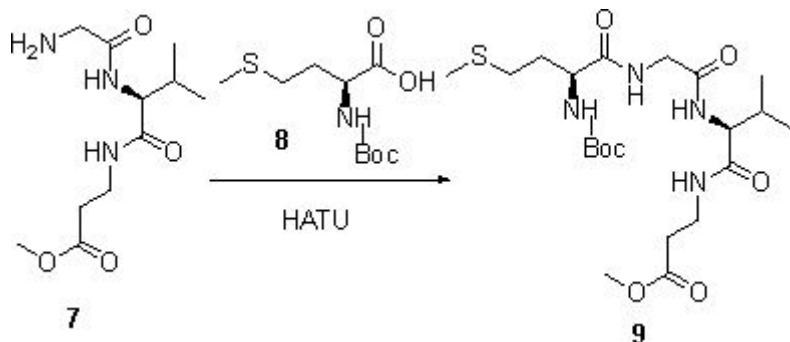
(III) 合成化合物6:将15 g化合物4和8 g 三乙胺在100 ml二氯甲烷(DCM)中搅拌混合,然后加入15 g N,N'-二环己基卡二亚胺和12 g化合物5,将反应混合物在室温条件下搅拌5小时,然后用饱和碳酸氢钠水溶液冲洗,使用无水硫酸镁进行干燥,过滤后在真空中进行浓缩,所得粗产物经硅胶层析纯化,经洗脱得到化合物6;



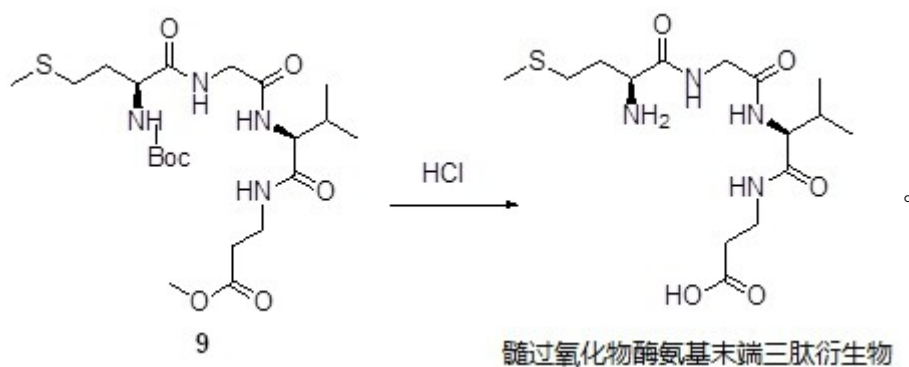
(IV) 合成化合物7:在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入17 g化合物6,在0℃下加入15 ml的HCl/MeOH(2 mol/L),将此混合物在室温下搅拌12小时,然后减压蒸发,得到化合物7;



(V) 合成化合物9:将13 g化合物7溶解于100 ml二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入26 ml二异丙基乙胺(DIEA)、23 g四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)和15 g化合物8,将此反应混合物在室温下搅拌12小时,反应结束后在反应混合物中加入250 mL纯化水,过滤,将滤饼在真空中干燥,得到化合物9;



(VI) 合成髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物:将20 g化合物9溶解于250ml HCl溶液(6mol/L)中,在25℃下搅拌12小时,然后进行减压浓缩,浓缩产物在室温下用乙腈研磨12小时,所得浆料经过滤后减压干燥过夜,得到髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物;



8. 一种如权利要求1所述的随过氧化物酶检测试剂的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(一) 在全自动生化分析仪中加入待测样本、R1试剂,混匀,37℃温育3-5分钟;

(二) 加入R2试剂,混匀,37℃恒温5-10分钟后,340 nm波长进行检测,连续监测3分钟内的吸光度变化率,由全自动生化分析仪自动计算待测样本中随过氧化物酶的含量;

所述试剂R1与试剂R2按1:1~4:1的体积比使用,优选按4:1的体积比使用。

9. 根据权利要求8所述的随过氧化物酶检测试剂的使用方法,其特征在于,所述的待测样本为生理样本;优选地,所述的生理样本为血清、血浆、尿液、唾液;更优选地,所述的生理样本为血清或血浆。

一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)是一种血色素蛋白,它存在于嗜中性多核细胞的嗜天青颗粒和巨嗜细胞中,其主要功能是利用过氧化氢和氯离子产生次氯酸盐,并形成具有氧化能力的自由基,在吞噬细胞内杀灭微生物。而且MPO可释放到细胞外,破坏多种靶物质,如肿瘤细胞、血小板、NK细胞、原虫、毒素等,对机体产生和调节炎症反应等多方面发挥作用。因此,MPO含量在炎症病变中是一项灵敏的指标。

[0003] 目前,国内外用于髓过氧化物酶含量检测的方法主要有:气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、酶联免疫分析法(ELISA)、放射免疫法(RIA)、时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)和化学发光免疫分析法(CLIA)等,这些方法在临床应用上均具有一定的局限性。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的髓过氧化物酶检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发一种质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的髓过氧化物酶测定试剂盒已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。本发明的髓过氧化物酶检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对髓过氧化物酶的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,能有效满足国内日益增长的临床检测需求。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是:针对现有技术的上述缺陷,提供一种操作简便、灵敏度高、特异性强的髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法。应用该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对髓过氧化物酶含量的自动化测定,可以高通量、快速化、精确地测定生物样本中髓过氧化物酶的含量,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,有效降低髓过氧化物酶检测成本,有利于临床广泛推广使用。

[0005] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:提供一种髓过氧化物酶检测试剂,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1中包含抗髓过氧化物酶特异性抗体和均相酶底物溶液;所述试剂R2包含髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物和R2缓冲液。

[0006] 本发明所述的髓过氧化物酶检测试剂,制备方法包括以下步骤:

A. 试剂R1的制备:将质量分数5.0%的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5.0%的葡萄糖-6-磷酸、0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的 NaN_3 的用55 mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液;再将抗髓过氧化物酶特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中混匀,得到试剂R1,所述抗髓过氧化物酶特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:100~1:10000;优选地,所述抗髓过氧化物酶特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:450;

B. 试剂R2的制备:将质量分数0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的 NaN_3 用120 mmol/L、pH=

8.2的Tris缓冲液溶解制成R2缓冲液,再将髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物加入所述R2缓冲液中混匀,得到试剂R2,所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物与R2缓冲液的体积比为1:100~1:10000;优选地,所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物与R2缓冲液的体积比为1:1350。

[0007] 本发明所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂,所述的抗髓过氧化物酶特异性抗体,由髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原免疫实验动物后产生,所述抗体为完整抗体分子,或者为保留与髓过氧化物酶氨基末端三肽特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物,所述实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种,优选为兔。

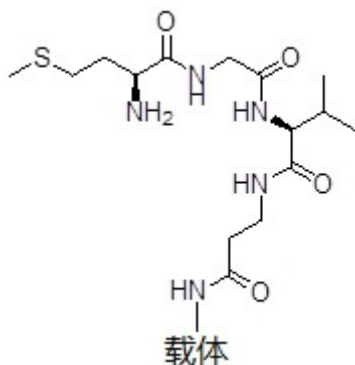
[0008] 所述抗髓过氧化物酶特异性抗体的制备方法,包括以下步骤:

a. 用PBS缓冲液将髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原稀释至3.0 mg/ml,得到免疫原溶液,然后用3.0 ml所述免疫原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

b.2周后,再用3.0 ml相同的免疫原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动物注射一次,之后每隔2~5周注射一次,共计注射3~8次;

c.对免疫后的实验动物取血,分离纯化得到抗髓过氧化物酶特异性抗体。

[0009] 本发明所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂,其中,所述髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原由髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与载体连接而成,其结构式如下述式(I)所示:



式(I)；

所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,选自血清蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种,优选为血清蛋白,更优选为牛血清白蛋白。

[0010] 所述髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原的制备方法,包括以下步骤:

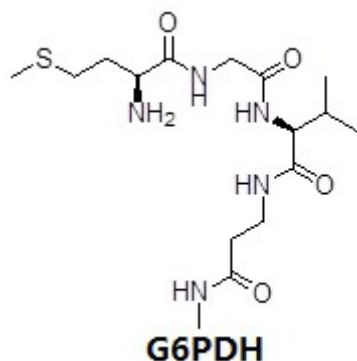
(1)将质量分数1.0%的载体蛋白溶解于0.2 mmol/L, pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

(2) 将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物、5.0%的二甲基甲酰胺、5.0%的乙醇溶解于10 mmol/L, pH=5.0的磷酸钾缓冲液中, 再加入质量分数0.5%的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺, 将上述化学物质在25~35℃下搅拌反应30~60 分钟;

(3) 将步骤(2)中溶解好的溶液缓慢滴加至步骤(1)中的载体蛋白溶液中,并在-4~0℃下搅拌12~24小时,得到偶联物溶液,将反应后的偶联物溶液进行透析纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液中加入质量分数0.10%的 NaN_3 ,于-20℃下储存。

[0011] 本发明所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂,其中,所述的髓过氧化物酶氨

基末端三肽酶标偶联物由髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶连接而成,其结构式如下述式(II)所示:



式(II)。

[0012] 所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物的制备方法,包括以下步骤:

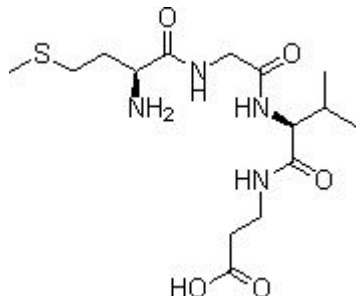
①葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将质量分数2.5%的规格为200KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于含有0.05 mol/L Tris、3.6 mmol/L $MgCl_2$ 和1.8 mmol/L NaCl, pH=8.5~9.0的溶液中;在此溶液中加入质量分数10.0%的还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、7.5%的葡萄糖-6-磷酸以及1.5%的卡必醇;加热到30~35℃,再缓慢加入质量分数0.5%的二甲基亚砷,摇匀后静置15~25秒;

②髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的激活:在无水状态下将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,溶解于5.0%的二甲基甲酰胺中;将此溶液温度降到-10~-15℃;然后加入1.5%的三丁胺、2.5%的氯甲酸异丁酯、1.5%的碳二亚胺;0.5%的N-羟基琥珀酰亚胺;-10~-15℃搅拌30~60分钟;

③葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的连接:将步骤②中激活的温度为-10~-15℃的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物溶液逐滴加入到步骤①中溶解的温度为30~35℃的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2~8℃搅拌12~24小时;

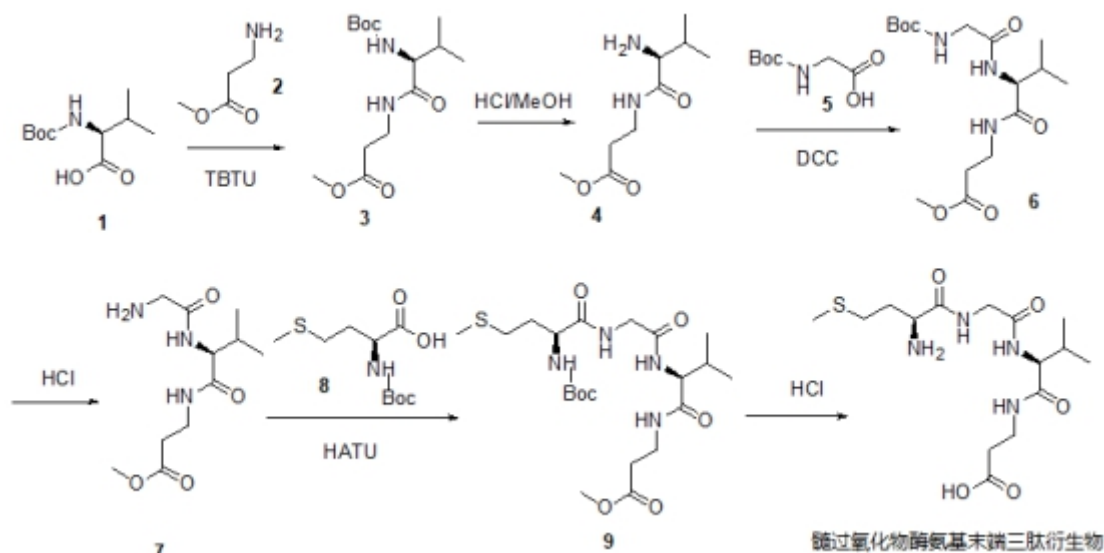
④纯化产物:将反应后的连接产物通过G-25葡聚糖凝胶层析柱进行纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液中加入质量分数0.65%的BSA和质量分数0.10%的 NaN_3 ,于2~8℃下储存。

[0013] 本发明所述的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂,其中,所述的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,其结构式如下述式(III)所示:



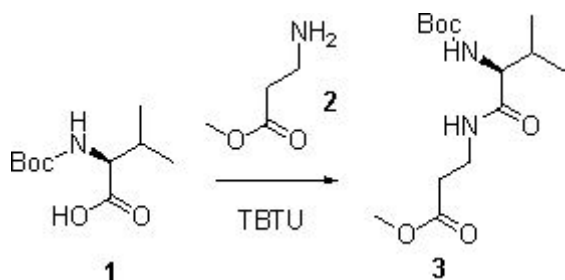
式(III);

上述式(III)所示的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成路线如下:

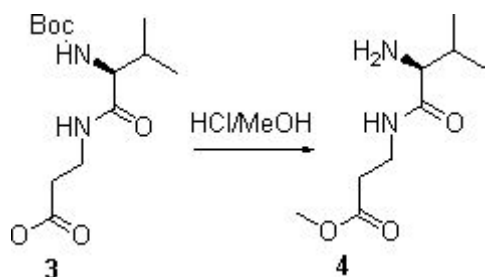


[0014] 本发明所述的髓过氧化物酶均相免疫检测试剂,其中,所述的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成路线,具体制备步骤如下:

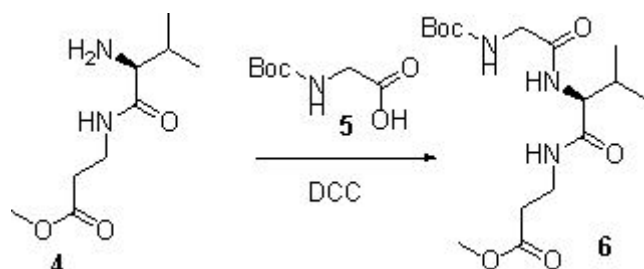
(I) 合成化合物3:将22 g化合物1溶解于100 ml 二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入32 g四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)、10 g化合物2和20 g三乙胺(TEA)制成反应混合物,将上述混合物在室温下搅拌2小时,然后倒入200ml的纯化水中,过滤,将滤饼在真空中干燥,得到化合物3;



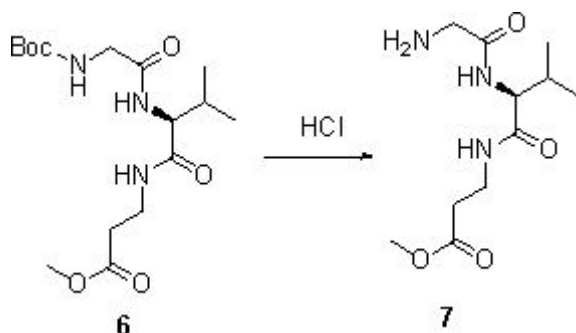
(II) 合成化合物4:在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入24 g化合物3,在0℃下加入20 ml的HCl/MeOH(2 mol/L),将此混合物在室温下搅拌12小时,然后减压蒸发,得到化合物4;



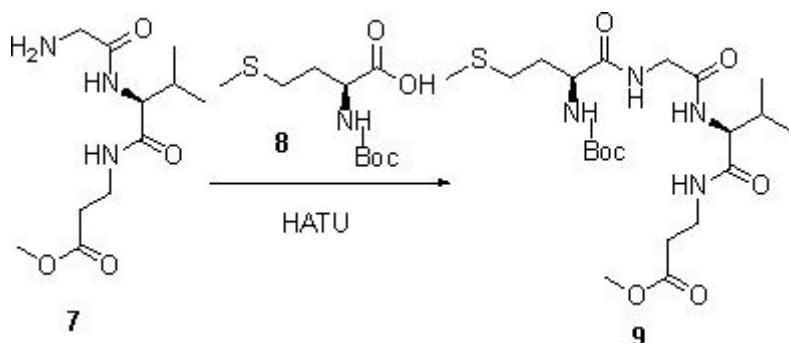
(III) 合成化合物6:将15 g化合物4和8 g 三乙胺在100 ml二氯甲烷(DCM)中搅拌混合,然后加入15 g N,N'-二环己基卡二亚胺和12 g化合物5,将反应混合物在室温条件下搅拌5小时,然后用饱和碳酸氢钠水溶液冲洗,使用无水硫酸镁进行干燥,过滤后在真空中进行浓缩,所得粗产物经硅胶层析纯化,经洗脱得到化合物6;



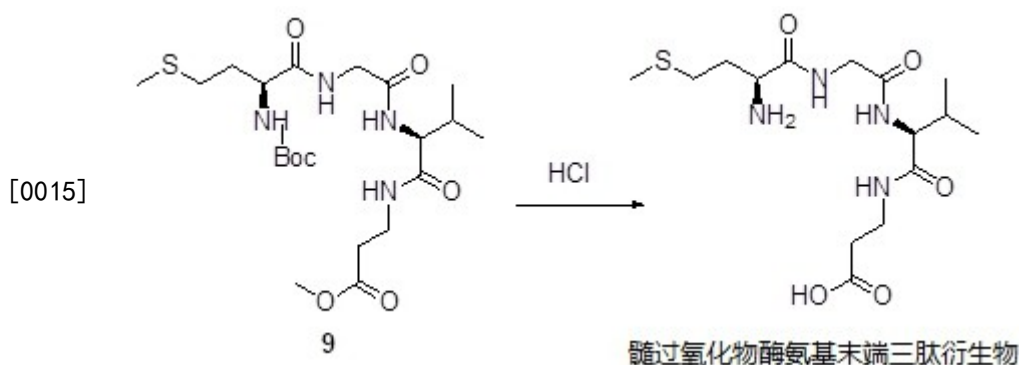
(IV) 合成化合物7: 在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入17 g化合物6, 在0℃下加入15 ml 的HCl/MeOH(2 mol/L), 将此混合物在室温下搅拌12小时, 然后减压蒸发, 得到化合物7;



(V) 合成化合物9: 将13 g化合物7溶解于100 ml二甲基甲酰胺(DMF)中, 然后加入26 ml二异丙基乙胺(DIEA)、23 g四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)和15 g化合物8, 将此反应混合物在室温下搅拌12小时, 反应结束后在反应混合物中加入250 mL纯化水, 过滤, 将滤饼在真空中干燥, 得到化合物9;



(VI) 合成髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物: 将20 g化合物9溶解于250ml HCl溶液(6mol/L)中, 在25℃下搅拌12小时, 然后进行减压浓缩, 浓缩产物在室温下用乙腈研磨12小时, 所得浆料经过滤后减压干燥过夜, 得到髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物。



本发明还提供一种如上所述的髓过氧化物酶检测试剂的使用方法, 包括以下步骤:

(一) 在全自动生化分析仪中加入待测样本、R1试剂, 混匀, 37℃温育3-5分钟;

(二)加入R2试剂,混匀,37℃恒温5-10分钟后,340 nm波长进行检测,连续监测3分钟内的吸光度变化率,由全自动生化分析仪自动计算待测样本中髓过氧化物酶的含量;

所述试剂R1与试剂R2按1:1~4:1的体积比使用,优选按4:1的体积比使用。

[0016] 本发明所述的髓过氧化物酶检测试剂的使用方法,其中,所述的待测样本为生理样本;优选地,所述的生理样本为血清、血浆、尿液、唾液;更优选地,所述的生理样本为血清或血浆。

[0017] 本发明的有益效果是:通过反复的试验获得了一种全新的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,并使用该髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物制备得到高免疫原性的髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原,进而免疫实验动物得到高效价的抗髓过氧化物酶特异性抗体;同时,使用该髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物制备得到髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物。含有上述抗髓过氧化物酶特异性抗体与髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物的髓过氧化物酶检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对髓过氧化物酶高通量、快速化的检测。该检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低髓过氧化物酶检测成本,有利于临床推广使用。

附图说明

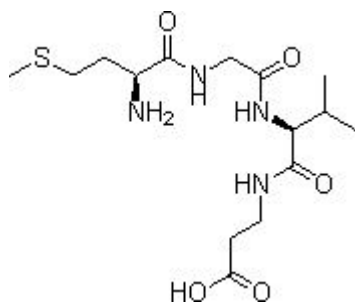
[0018] 图1是本发明的髓过氧化物酶的均相酶免疫检测反应曲线。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图以及具体实施方式,对本发明做进一步描述,这些附图均为简化的示意图,仅以示意方式说明本发明的基本结构,因此其仅显示与本发明有关的构成。除非特别指明,以下实施例中所用的试剂、仪器、设备、耗材均可从正规渠道商购买获得。

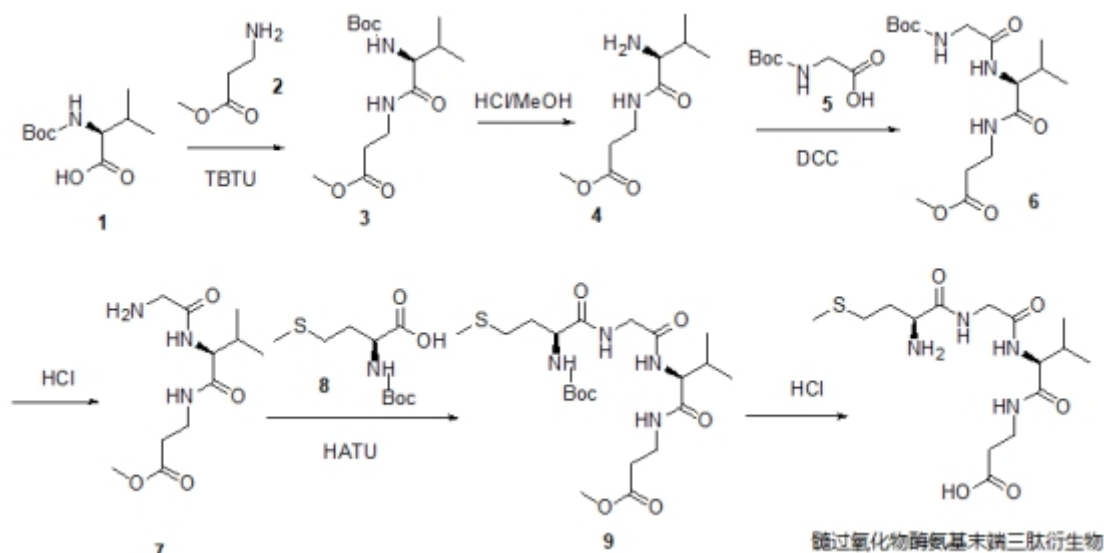
[0020] 实施例1.髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成

髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的化学结构式如式(III)所示:



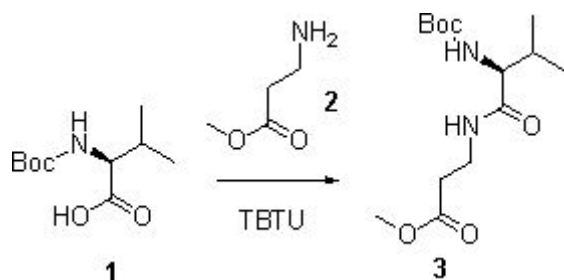
式(III)。

[0021] 上述髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的合成路线及制备步骤如下:

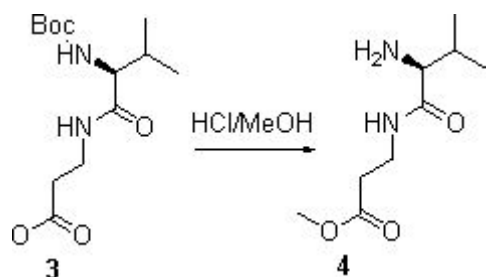


[0022] 具体的合成步骤如下：

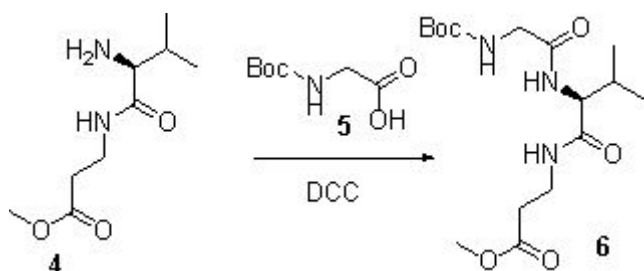
(I) 合成化合物3: 将22 g 化合物1溶解于100 ml 二甲基甲酰胺(DMF)中, 然后加入32 g 四甲基脒四氟硼酸酯(TBTU)、10 g 化合物2和20 g 三乙胺(TEA)制成反应混合物, 将上述混合物在室温下搅拌2小时, 然后倒入200ml的纯化水中, 过滤, 将滤饼在真空中干燥, 得到24 g 化合物3, 为灰色固体, 收率79%。



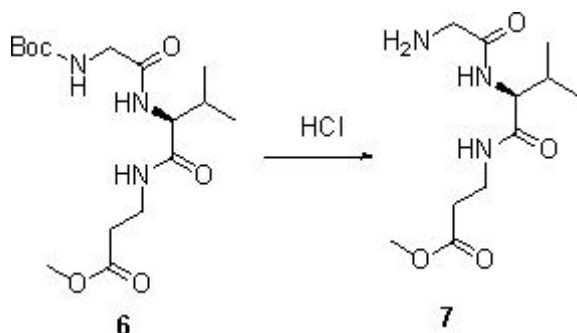
[0023] (II) 合成化合物4: 在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入24 g 化合物3, 在0℃下加入20 ml的HCl/MeOH(2 mol/L), 将此混合物在室温下搅拌12小时, 然后减压蒸发, 得到15 g 化合物4, 收率94%。



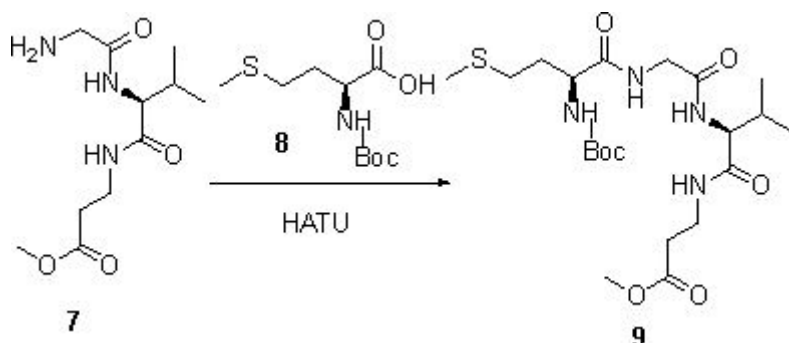
[0024] (III) 合成化合物6: 将15 g 化合物4和8 g 三乙胺在100 ml 二氯甲烷(DCM)中搅拌混合, 然后加入15 g N,N'-二环己基卡二亚胺和12 g 化合物5, 将反应混合物在室温条件下搅拌5小时, 然后用饱和碳酸氢钠水溶液冲洗, 使用无水硫酸镁进行干燥, 过滤后在真空中进行浓缩, 所得粗产物经硅胶层析纯化, 经洗脱得到17 g 化合物6, 为黄色固体, 收率68%。



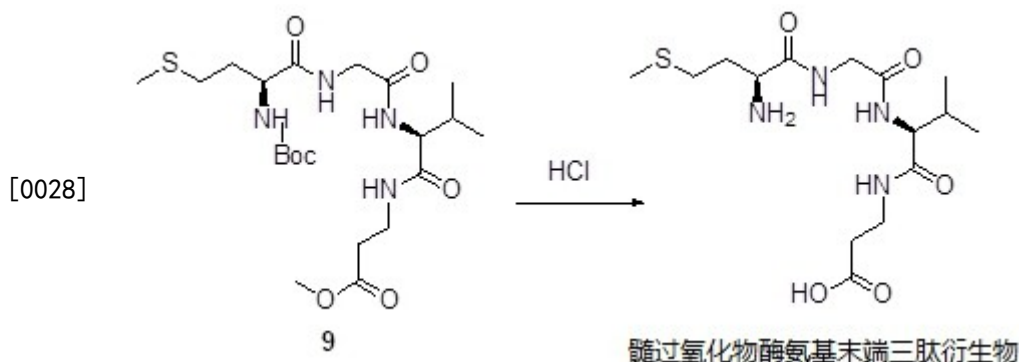
[0025] (IV) 合成化合物7: 在100 ml 二氯甲烷(DCM)中加入17 g化合物6,在0℃下加入15 ml的HCl/MeOH(2 mol/L),将此混合物在室温下搅拌12小时,然后减压蒸发,得到14 g化合物7,收率100%。



[0026] (V) 合成化合物9: 将13 g化合物7溶解于100 ml二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入26 ml二异丙基乙胺(DIEA)、23 g四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)和15 g化合物8,将此反应混合物在室温下搅拌12小时,反应结束后在反应混合物中加入250 mL纯化水,过滤,将滤饼在真空中干燥,得到22 g化合物9,为黄色固体,收率90%。



[0027] (VI) 合成髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物: 将20 g化合物9溶解于250ml HCl溶液(6mol/L)中,在25℃下搅拌12小时,然后进行减压浓缩,浓缩产物在室温下用乙腈研磨12小时,所得浆料经过滤后减压干燥过夜,得到5.2 g髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,为棕色固体,收率55%。



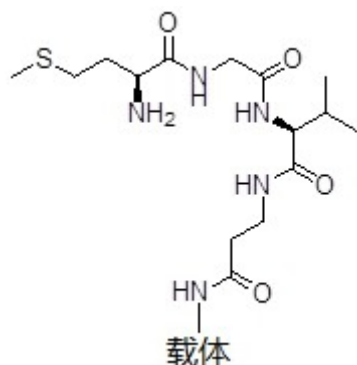
对上述合成步骤得到的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物进行结构鉴定,方法如下:

利用VARIAN MERCURY plus 400MHz对上述棕色固体化合物进行¹H核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下:¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ4.48-4.53 (m, 1H), 4.01-4.08 (m, 2H), 3.47-3.56 (m, 3H), 2.61-2.68 (m, 1H), 2.41-2.49 (m, 4H), 2.09-2.17 (m, 5H), 1.09-1.12 (m, 6H)。

[0029] LC-MS检测方法:Agilent 1200A, column : C18; column size: 4.6 * 50mm; mobile phase: B (ACN), A (0.05%FA in water); gradient (B%): as Acq.Method above; LC-MS检测条件:mobile phase: from 30% water (0.05% FA) and 70% CH₃CN (0.05% FA) to 5% water (0.05% FA) and 95% CH₃CN (0.05% FA) in 6.0 min, finally under these conditions for 0.5 min; LC-MS检测结果:purity is 95.1%, Rt = 0.661 min; MS Calcd.: 376; MS Found: 377 ([M+1]⁺)。

[0030] 实施例2. 髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原的制备

本实施例中的髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原由式(III)所示的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与牛血清白蛋白(BSA)连接而成,其结构式如下述式(I)所示:



式(I)。

[0031] 该髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原的合成方法具体步骤如下:

(1) 将质量分数1.0%的载体蛋白溶解于0.2 mmol/L, pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

(2) 将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物、5.0%的二甲基甲酰胺、5.0%的乙醇溶解于10 mmol/L, pH=5.0的磷酸钾缓冲液中,再加入质量分数0.5%的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学物质在30℃下搅拌反应45分钟;

(3) 将步骤(2)中溶解好的溶液缓慢滴加至步骤(1)中的载体蛋白溶液中,并在-4℃下搅拌18小时,得到偶联物溶液,将反应后的偶联物溶液进行透析纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原溶液中加入质量分数0.10%的NaN₃,于-20℃下储存。

[0032] 实施例3. 抗髓过氧化物酶特异性抗体的制备

将实施例2制备得到的髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原采用常规方法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

a. 用PBS缓冲液将髓过氧化物酶氨基末端三肽免疫原稀释至3.0 mg/ml,得到免疫原溶液,然后用3.0 ml所述免疫原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射;

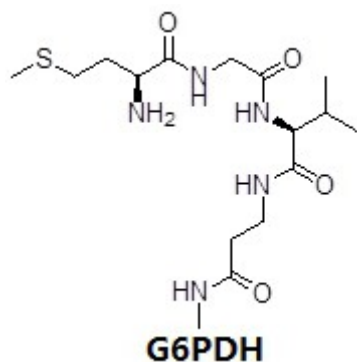
b. 2周后,再用3.0 ml相同的免疫原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合,对上述实验动

物兔注射一次,之后每隔3周注射一次,共计注射5次;

c.对免疫后的实验动物兔取血,分离纯化得到抗髓过氧化物酶特异性抗体,测定其效价为1:9500。

[0033] 实施例4.髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物的制备

本实施例中的髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物由式(III)所示的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)连接而成,其结构式如下式(II)所示:



式(II);

该髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物的合成方法具体步骤如下:

①葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:将质量分数2.5%的规格为200KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温下溶解于含有0.05 mol/L Tris、3.6 mmol/L MgCl₂和1.8 mmol/L NaCl, pH=8.8的溶液中;在此溶液中加入质量分数10.0%的还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、7.5%的葡萄糖-6-磷酸以及1.5%的卡必醇;加热到33℃,再缓慢加入质量分数0.5%的二甲基亚砷,摇匀后静置20秒;

②髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的激活:在无水状态下将质量分数0.5%的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物,溶解于5.0%的二甲基甲酰胺中;将此溶液温度降到-12℃;然后加入1.5%的三丁胺、2.5%的氯甲酸异丁酯、1.5%的碳二亚胺;0.5%的N-羟基琥珀酰亚胺;-12℃搅拌45分钟;

③葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物的连接:将步骤②中激活的温度为-12℃的髓过氧化物酶氨基末端三肽衍生物溶液逐滴加入到步骤①中溶解的温度为33℃的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;4℃搅拌18小时;

④纯化产物:将反应后的连接产物通过G-25葡聚糖凝胶层析柱进行纯化,纯化后所得溶液即为髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液,在髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物溶液中加入质量分数0.65%的BSA和质量分数0.10%的NaN₃,于4℃下储存。

[0034] 实施例5.髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂的制备

A.试剂R1的制备:将质量分数5.0%的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、5.0%的葡萄糖-6-磷酸、0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的NaN₃的用55 mmol/L、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物溶液;再将抗髓过氧化物酶特异性抗体加入所述均相酶底物溶液中混匀,得到试剂R1,所述抗髓过氧化物酶特异性抗体与均相酶底物溶液的体积比为1:450;

B.试剂R2的制备:将质量分数0.1%的牛血清白蛋白、0.05%的NaN₃用120 mmol/L、pH=8.2的Tris缓冲液溶解制成R2缓冲液,再将髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物加入所

述R2缓冲液中混匀,得到试剂R2,所述髓过氧化物酶氨基末端三肽酶标偶联物与R2缓冲液的体积比为1: 1350。

[0035] 实施例6. 髓过氧化物酶均相酶免疫检验及结果

1. 获得标准曲线:

(1) 设置迈瑞 BS480全自动生化分析仪反应参数(表1)。

[0036] (2) 操作步骤为:先加试剂R1,再加入标准品,最后加入试剂R2。加入试剂R2后,测定不同时间点的OD340吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂R1和试剂R2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,如图1所示。

[0037] 表1 迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS480 参数设置	
项目名称	髓过氧化物酶
试剂 R1 用量	200 μ l
试剂 R2 用量	50 μ l
样本量	15 μ l
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	412 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果单位	ng/mL
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 25.00, 100.00, 200.00, 400.00, 800.00 ng/mL

2. 样本检测:通过本发明的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本10次,上述质控样本为:将髓过氧化物酶标准品溶解于空白人造血浆中,至浓度分别为50.00,250.00,750.00 ng/mL。检测结果及数据分析见表2。

[0038] 表2 样本测定值及精密度和回收率评估

血液样本	低	中	高
样本浓度 (ng/mL)	50.00	250.00	750.00
1	52.54	257.33	763.27
2	53.29	255.19	759.18
3	49.77	245.78	741.60
4	51.53	251.22	765.15
5	52.01	256.10	750.34
6	53.50	247.43	759.89
7	50.69	255.92	740.56
8	47.83	252.00	759.67

9	52.51	247.58	762.03
10	49.75	250.21	759.20
平均值 (ng/mL)	51.34	251.88	756.09
标准差 (SD)	1.81	4.13	8.82
精密度 (CV%)	3.53	1.64	1.17
回收率 (%)	102.68	100.75	100.81

检测结果：本发明的髓过氧化物酶均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率均在95%-105%之间；精密度高，CV均低于5%。

[0039] 以上述依据本发明的理想实施例为启示，通过上述的说明内容，相关技术人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内，进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容，必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

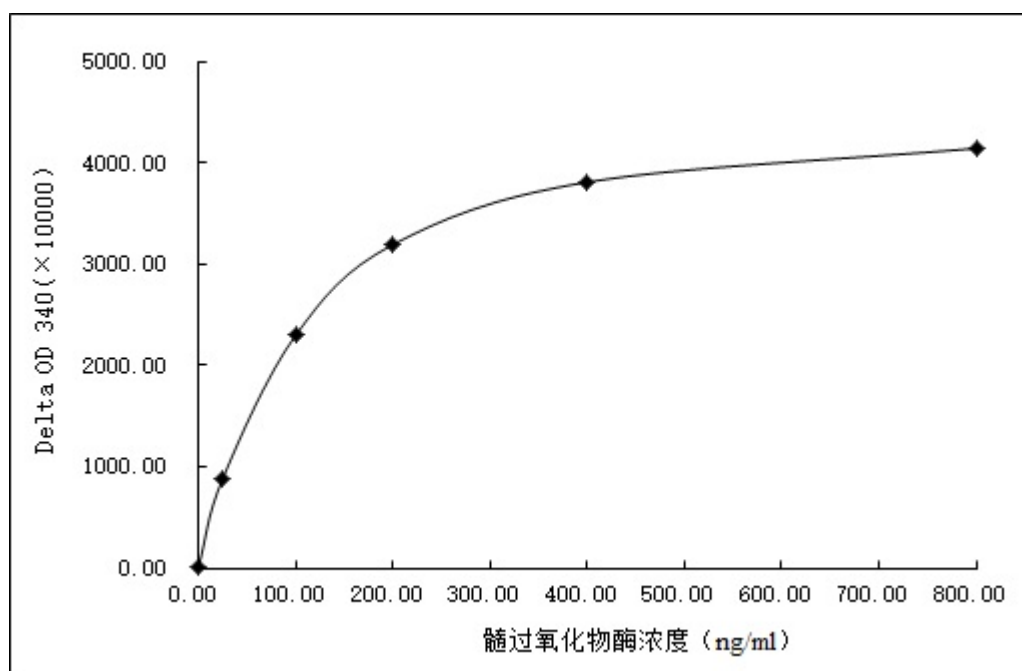


图1

专利名称(译)	一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN109884322A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201910233418.X	申请日	2019-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明		
发明人	虞留明		
IPC分类号	G01N33/72 G01N33/573 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种髓过氧化物酶检测试剂及其制备和使用方法。应用该检测试剂可以实现全自动生化分析仪上对髓过氧化物酶含量的自动化测定，可以高通量、快速化、精确地测定生物样本中髓过氧化物酶的含量，且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，有效降低髓过氧化物酶检测成本，有利于临床广泛推广使用。

