



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106290903 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610628595.4

(22)申请日 2016.08.03

(71)申请人 北京德奥平生物技术有限公司  
地址 100071 北京市通州区中关村科技园  
区通州园光机电一体化产业基地嘉创  
路5号8号楼2层02号

(72)发明人 周建平

(51) Int. Cl.  
G01N 33/68(2006.01)  
G01N 33/531(2006.01)

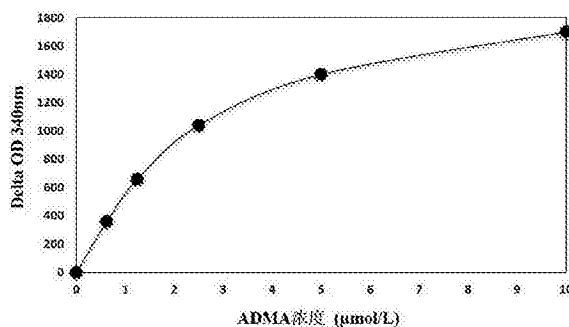
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

## (54)发明名称

一种不对称二甲基精氨酸免疫法测定试剂及检测方法

## (57)摘要

本发明是一种均相酶测定技术的免疫学检测的方法及其试剂,用于测定样品中不对称二甲基精氨酸( $N^G, N^G$ , dimethyl-L-arginine, asymmetric dimethylarginine, ADMA)的含量。该方法采用抗ADMA特异性抗体、酶-ADMA复合物,利用酶-ADMA复合物与抗ADMA特异性抗体免疫学反应,形成抗原抗体复合物后,酶-ADMA复合物活性受到抑制,通过测定反应体系中酶活性的变化,从而得到结合的酶标记物数量,从而得到待测样品中ADMA的含量。该方法的优点是可以像普通生物化学酶方法一样,实现免疫学测定,从而在全自动生化分析仪上同时测定多个样品。



1. 一种测定样品中ADMA的方法,由试剂R1、试剂R2和ADMA参考标准品的组成,其特征在于,(a)试剂R1中含有抗ADMA特异性抗体、缓冲剂、酶反应底物、稳定剂、防腐剂 and 表面活性剂;(b)试剂R2含有酶-不对称二甲基精氨酸复合物、缓冲剂、酶反应底物、稳定剂、防腐剂和表面活性剂;(c)当试剂R1和R2反应时,样品中的ADMA与酶-ADMA复合物竞争性结合抗ADMA特异性抗体,样品中的ADMA越多,结合的抗体就越多,酶-ADMA复合物结合的抗体就越少,通过测定反应体系中酶活性的变化,可以得到样品中ADMA的含量。

2. 根据权利要求1所述的抗ADMA特异性抗体由ADMA免疫原免疫动物得到,ADMA免疫原的结构式图2所示,载体为兔血清白蛋白、人血清白蛋白和鼠血清白蛋白,载体蛋白通过ADMA的羧基基团定向选择性地连接到ADMA,A1为连接臂,连接臂为甘氨酸、赖氨酸、氨基己酸,以及 $-(CH_2)_n-O-CH_2-COO-$ 等, $n$ 为1至15之间的任意整数(如图1A);载体蛋白通过ADMA的氨基基团定向选择性地连接到ADMA;A2为连接臂,连接臂为甘氨酸、赖氨酸、氨基己酸,以及基团 $-(CH_2)_n-O-CH_2-NH-$ , $n$ 为1至15之间的任意整数(如图1B);免疫的动物包含但不限于为兔、小鼠、山羊、马、羊、鸡及驼。

3. 根据权利要求1所述的酶-ADMA复合物的制备,其特征在于,上述酶-ADMA复合物中的酶可以是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49),苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.37),溶菌酶(EC 3.2.1.17),己糖激酶(EC 2.7.1.1), $\beta$ -D-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23),淀粉酶(EC 3.2.1.2);优选的为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH),上述G6PDH对特定底物具有高效催化效率,制备的试剂具有极高的灵敏度。

4. 根据权利要求3所述的ADMA-G6PDH酶复合物,其特征在于,上述ADMA-G6PDH酶复合物由不对称二甲基精氨酸衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联形成,上述ADMA衍生物的结构式图3所示:G6PDH可以同ADMA衍生物1交联,A1为连接臂,连接臂为甘氨酸、赖氨酸、氨基己酸,以及连接基团 $-(CH_2)_n-O-CH_2-COO-$ 等, $n$ 为1至15之间的任意整数;G6PDH也可以同ADMA衍生物2交联,A2为连接臂,连接臂为甘氨酸、赖氨酸、氨基己酸,以及连接基团 $-(CH_2)_n-O-CH_2-NH-$ 等, $n$ 为1至15之间的任意整数。

5. 根据权利要求4中所述的ADMA-G6PDH复合物,其特征在于,G6PDH与ADMA衍生物偶联的方式为戊二醛法、碳二亚胺法、混合酸酐法或N-羟基琥珀酰亚胺法。

6. 根据权利要求4和5中所述的ADMA-G6PDH复合物,G6PDH与ADMA偶联过程中的G6PDH酶活性保护剂为葡萄糖,蔗糖,山梨醇,葡萄糖-6-磷酸,NAD,NADH,NADP,NADPH;上述包含剂的浓度为0.01mM-500mM。

7. 根据权利要求1所述的检测ADMA的试剂盒,

试剂R1:甘氨酸10-200mM

NaCl 10-200mM

葡萄糖-6-磷酸 10-200mM

$NAD^+$  10-100mM

吐温-20 0.01%-0.1%

BSA 0.01%-0.5%

抗ADMA抗体 0.01-2%

防腐剂 0.001%-0.01%

PH 4.0-8.0;

试剂R2:

TRIS 10-200mM

0.2%-0.5% 牛血清白蛋白

甘油 5%-20%

甘露醇 1%-5%

防腐剂 0.001%-0.01%

EDTA 0.1-2mM

PEG20000 0.1%-1%

G6PDH-ADMA复合物 0.01%-0.5%

PH7.0-10.0。

## 一种不对称二甲基精氨酸免疫法测定试剂及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到小分子与蛋白质定向连接、小分子成分和检测方法,属于医学免疫体外诊断领域。是基于均相的免疫学酶法测定。尤其涉及一种检测方法和试剂盒的制备,特别是一种ADMA检测试剂及其制备和检测方法。

### 背景技术

[0002] 不对称二甲基精氨酸( $N^G$ ,  $N^G$ , dimethyl-L-arginine, asymmetric dimethylarginine, ADMA)也叫非对称二甲基精氨酸。1970年Kakimoto首次从人类尿液中分离出不对称二甲基精氨酸。ADMA由含有精氨酸残基的蛋白质在蛋白质精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferases, PRMT)的作用下甲基化,甲基化的蛋白水解后即可释放出ADMA。ADMA能竞争性抑制一氧化氮合酶(NOS)使一氧化氮(NO)生成减少,在体内起内源性NO合成抑制剂的作用,造成血管内皮功能发生紊乱,进而导致动脉粥样硬化等一系列的心脑血管疾病的发生发展。ADMA与脑梗死及其危险因素有显著相关性,其对缺血性脑血管病的发生率和死亡率有着强大的预测能力。血浆ADMA水平在心血管疾病出现临床表现之前就已经开始升高。因此,ADMA作为一种前瞻性,独立的心血管病诊断指标具有重大意义。同时ADMA水平的升高不仅能作为心脑血管疾病的先兆,还能作为心衰,高血压,冠心病,糖尿病,肾衰肝脏衰竭,勃起功能障碍等疾病的一个重要危险因素。因此,ADMA作为一种新型的内皮功能不全和心血管疾病标志物在临床诊断方面具有重要意义。

[0003] 目前,定量测定ADMA的方法,有高效液相色谱法(HPLC),液质联用法(HPLC-MS),酶联免疫吸附法(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)。均存在操作复杂,检测时间长,自动化程度低,重复性较差,不利于仪器自动化和标准化。

[0004] 也有报道,ADMA酶法检测,所需反应都在3步或以上,所需酶的种类也在3种以上,且有的关键酶如瓜氨酸水解酶未见公开文献报道,来源途径不明,不易获得。增加了不确定性和不稳定性,不容易实现仪器的自动化和标准化。

[0005] 抗ADMA抗体的制备难度较高,存在特异性不好的缺点。与对称二甲基精氨酸,甲基精氨酸以及L-精氨酸等存在较大的交叉反应,特异性差,制备的试剂特异性差。有文献报道类似ADMA这种小分子的半抗原制备方法决定了制备的抗体的特异性和亲和力。小分子同载体蛋白的连接位点决定了制备抗体的特异性,要保证小分子的特异性抗原决定簇不在半抗原偶联过程中被破坏。载体蛋白同半抗原合适的连接臂长度能够保证小分子的充分暴露,如果过长,会大大降低小分子的免疫原性,太短,载体蛋白会影响小分子的结构。本发明采用特异性的连接臂,通过连接位点的定向选择,羧基位点或者氨基位点,充分暴露ADMA的免疫位点,从而获得高亲和力及高特异性的抗体。本发明还采用特异性的连接载体兔白蛋白、人白蛋白和鼠白蛋白,而不采用通用的连接载体如牛血清白蛋白,血蓝蛋白和甲状腺球蛋白等,主要是因为与牛血清白蛋白和甲状腺球蛋白等耦联的ADMA刺激产生的抗血清也含有针对牛血清白蛋白和甲状腺球蛋白等的抗体,可能导致假阳性结果;而血蓝蛋白的分子量较大,偶联得到的半抗原容易影响甚至屏蔽小分子的抗原表位,造成制备的抗体亲和力低。

而使用兔血清白蛋白做载体免疫的兔子不太可能产生针对兔子自身的蛋白的抗体,采用鼠血清蛋白载体筛选得到的鼠抗人ADMA特异性单克隆抗体,亲和力和特异性更优于其他载体。

[0006] 目前市场上缺乏灵敏度高、特异性强的不对称二甲基精氨酸检测试剂,尤其是适合自动化检验的试剂。

[0007] 本发明采用酶偶联不对称二甲基精氨酸复合物,与不对称二甲基精氨酸特异性抗体免疫学反应,形成抗原抗体复合物后,酶-ADMA复合物的活性就受到抑制。样品中的ADMA与酶-ADMA复合物竞争性结合抗ADMA特异性抗体。样品中的ADMA越多,结合的抗体就越多。酶-ADMA复合物结合的抗体就越少,通过测定反应体系中酶活性的变化,可以得到样品中ADMA的含量。检测速度快、操作简单、灵敏度高、特异性强且可以在全自动生化分析仪上实现对小分子物质的高通量快速化检测的优点,具有较高的应用价值。

### 发明内容

[0008] 本检测方法基于免疫学反应,采用均相免疫的酶学测定方法,将小分子ADMA与酶通过蛋白质连接技术形成复合物,与样品中的待测ADMA与抗ADMA特异性抗体竞争结合,通过酶活性的高低来实现样品中ADMA浓度的检测。该方法可以提供一种既安全又可快速、高效、灵敏、准确检测出待测样本中ADMA含量的均相酶免疫检测试剂及其制备方法。该试剂可应用于临床中广泛使用的各种类型的自动生化分析仪,从而达到大规模样品的测定要求,提高了实用性。

[0009] 本发明提供了检测ADMA的试剂盒,包含试剂R1,试剂R2,缓冲液,稳定剂,ADMA参考标准品的液体试剂盒或包含试剂R1,试剂R2,ADMA参考标准品的干粉试剂盒。

[0010] 进一步的,一个优选的技术方案是:一种ADMA均相免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗ADMA特异性抗体、用于检测抗ADMA特异性抗体-ADMA复合物的检测试剂制备及检测方法;上述ADMA均相免疫检测试剂盒基于以下原理:含有ADMA的生物样品同ADMA-G6PDH酶复合物竞争结合抗ADMA特异性抗体;ADMA-G6PDH酶复合物与抗ADMA特异性抗体形成免疫结合物后,其催化底物葡萄糖-6-磷酸的活性降低或丧失,反应产物NADH的量也降低;测定样品中ADMA的浓度量越高,竞争到的抗ADMA特异性抗体越多,抗ADMA特异性抗体对ADMA-G6PDH酶复合物的活性抑制越低,则反应生成的NADH量越多;根据测定NADH的量计算,从而得到样品中的ADMA含量。

[0011] 根据这一发明目的,进一步的一个优选实施方案:其中制备ADMA免疫原用于制备抗ADMA特异性抗体。优选的利用ADMA的羧基基团同载体蛋白交联,优选的连接基团氨基己酸;载体蛋白优选兔白蛋白和小鼠白蛋白;免疫动物优选新西兰大白兔和Ba1b/c小鼠;化学偶联方式优选碳二亚胺法;上述优选方法制备的抗ADMA特异性抗体对ADMA亲和力高,特异性好,同对称二甲基精氨酸、单甲基精氨酸、L-精氨酸均无交叉反应。

[0012] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,其中制备ADMA-酶复合物用于测定ADMA测定试剂盒。优选的酶为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49);优选的采用ADMA氨基基团同葡萄糖-6-磷酸脱氢酶交联,连接基团为氨基己酸;ADMA与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的交联方法优选戊二醛法;ADMA与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶交联的酶活保护剂优选葡萄糖-6-磷酸NADH;上述保护剂葡萄糖-6-磷酸优选浓度10-100mM,NADH优选浓度为10-100mM;采用合理

的酶保护剂,优先占据G6PDH的酶活性中心,避免ADMA-G6PDH偶联过程中酶活中心的破坏而导致的酶活丧失。

[0013] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,其中ADMA测定试剂盒中R1试剂缓冲液优选甘氨酸缓冲液;PH优选4.0-8.0;葡萄糖-6-磷酸浓度优选10-100mM;NaCl 浓度优选10-200mM;NAD<sup>+</sup>浓度优选10-100mM;0.001%-0.01%叠氮钠;吐温-20 浓度优选的为0.01%-0.1%;BSA优选的为 0.1%-0.5%;

抗ADMA抗体优选的为0.01-2%。

[0014] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,其中ADMA测定试剂盒中R2试剂缓冲液优选TRIS缓冲液;PH优选7.0-9.0。

[0015] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,其中R2的稳定剂是0.2%-0.5% 牛血清白蛋白,5%-20%甘油,1%-5%甘露醇,0.001%-0.01%叠氮钠,0.1-2mM EDTA,0.1%-1% PEG20000。

[0016] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,其中所述的ADMA标准品为添加了ADMA纯品人血清或其它类似血清基质的液体。优选地,选择添加了ADMA纯品的人血清的液体。

[0017] 根据这一发明目的的一个优选实施方案,利用不对称二甲基精氨酸免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1)将待测样本与抗ADMA特异性抗体接触;
  - 2)根据待测样本中ADMA与抗ADMA特异性抗体的结合情况;
- 优选利用自动分析仪测定NADH产生速率,判断样本中ADMA的含量;
- 所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0018] 本发明和已有技术比较,其技术进步是显著的。本发明中通过蛋白质定向连接技术所获得的ADMA免疫原特异性强、免疫原性高。通过载体蛋白的优选,采用兔白蛋白定向偶联ADMA小分子,获得抗ADMA多克隆抗体。采用鼠白蛋白定向偶联ADMA小分子,获得抗ADMA单克隆抗体。所制备出的抗ADMA特异性抗体特异性强、亲和力高。本发明通过将载体蛋白与ADMA羧基和氨基位点的定向选择性连接,同时中间加入连接臂,大大提高了ADMA抗体的特异性识别能力,与结构类似的对称二甲基精氨酸、单甲基精氨酸、精氨酸无交叉反应。并且ADMA半抗原的合成和ADMA酶复合物的制备采用ADMA上不同的连接位点,制备的ADMA均相酶免测定试剂具有很高的特异性。含有上述抗ADMA特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的ADMA含量,本试剂为液体双试剂,可用于检测血清或血浆中ADMA的浓度,适用于临床全自动生化分析仪。

## 附图说明

- [0019] 图1:ADMA免疫原结构图;
- 图2:ADMA衍生物1的合成路径;
- 图3:ADMA衍生物2的合成路径;
- 图4:ADMA均相酶免疫反应标准曲线图;
- 图5:ADMA均相酶免疫相关性分析图。

## 具体实施方式

[0020] 实施例一:ADMA衍生物1的合成及其结构确认

以下实施例中使用的ADMA衍生物1的生物化学结构如图2中的化合物3所示,合成路线如图2。

[0021] 具体合成步骤:

1)称取900mg化合物1 (ADMA)溶解于90ml吡啶中,立即加入360 mg EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride)和540mg NHS(N-hydroxysuccinimide),将此溶液在室温下搅拌30小时,得到化合物2的合成溶液;

2)向上述溶液中加入126ul的 $\beta$ -巯基乙醇,室温搅拌30min,灭活过量的EDC,脱盐至pH 7.2的PBS中;

3)取15.00g的氨基己酸溶于10mL pH 7.2的PBS溶液,取50mL上述合成溶液缓慢滴加到氨基己酸的溶液中,室温搅拌,滴加完成后继续室温反应2h。合成溶液用水稀释后再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取,使用水和卤水冲洗有机层,使用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到白色固体化合物3。

[0022] 对上述白色固体纯化产物进行结构鉴定

利用色谱/质谱技术(LCMS)对得到的衍生物进行分析鉴定,采用安捷伦公司的串联四级杆质谱仪LC/MSD1200系列,离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为:Symmetry C18(70 $\times$ 4.6mm,5 $\mu\text{m}$ ),柱温为30 $^\circ\text{C}$ ,流速为0.6 mL/min,检测波长为224nm,流动相为10-70%乙腈。LCMS结果显示:纯度>95%;保留时间3.012min。上述结果,可以确定该白色固体化合物为上述的ADMA衍生物1。

[0023] 实施例二:ADMA衍生物2的合成及其结构确认

以下实施例中使用的ADMA衍生物2的生物化学结构如图3中的化合物8所示,其合成路线如如图3。

[0024] 具体合成路线如下:

1)称取100mg的ADMA溶于浓硫酸中,加入1200mg甲醇,加热回流2h。合成溶液用水稀释后,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到白色固体化合物4;

2)称取500mg化合物5(氨基己酸)溶解于50ml吡啶中,立即加入400mg EDC (1-ethyl-3-3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)和600mg NHS(N-hydroxysuccinimide),将此溶液在室温下搅拌30小时,得到化合物6的合成溶液;

3)向上述溶液中加入90ul的 $\beta$ -巯基乙醇,室温搅拌30min,灭活过量的EDC,脱盐至pH7.2的PBS中;

4)50mg的化合物4溶于5mL pH7.2的PBS溶液,向其中缓慢滴加50mL上述化合物6合成溶液,室温搅拌,滴加完成后继续室温反应2h。合成溶液用水稀释后再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取,使用水和卤水冲洗有机层,使用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到白色固体化合物7;

5)50mg化合物7溶解在5mL DMF中,加入5ml甲醇,1g的NaOH,加热反应2小时,得到合成溶液;

6)将上述合成溶液用水稀释后再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取,使用水和卤水冲洗有机层,使用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到白色固体化合物8。

[0025] 对上述白色固体纯化产物进行结构鉴定

利用色谱/质谱技术(LCMS)对得到的衍生物进行分析鉴定,采用安捷伦公司的串联四

级杆质谱仪LC/MSD1200系列,离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为:Symmetry C18(70×4.6mm,5μm),柱温为25℃,流速为0.6 mL/min,检测波长为224nm,流动相为10-70%乙腈。LCMS结果显示:纯度>95%;保留时间2.336min。上述结果,可以确定该白色固体化合物8即为ADMA衍生物2。

#### [0026] 实施例三:ADMA免疫原合成

ADMA免疫原由兔白蛋白或小鼠白蛋白与图1所示的ADMA衍生物的连接基团连接而成,在本实施例中,以连接臂为氨基己酸的ADMA衍生物为例详细说明该免疫原的合成方法。

#### [0027] 兔白蛋白-ADMA羧基衍生物A1免疫原合成:

具体步骤如下:

- 1)将40mg 兔白蛋白溶解于4mL 0.1M pH 5.0的MES缓冲液中,上述溶液置于烧杯A中;
- 2)将30mg ADMA衍生物1溶于6mL 0.1M pH 5.0的MES缓冲液中,加入到烧杯A中;
- 3)加入50mg EDC到烧杯A中,得到混合溶液,室温搅拌反应2小时;将上述搅拌后的混合溶液经过中性PBS缓冲液透析纯化,得到兔白蛋白-ADMA免疫原,储存于-70℃。

#### [0028] 鼠白蛋白-ADMA羧基衍生物A1免疫原合成:

具体步骤如下:

- 1)将40mg 鼠白蛋白溶解于4mL 0.1M pH5.0的MES缓冲液中,上述溶液置于烧杯A中;
- 2)将30mg ADMA衍生物1溶于6mL 0.1M pH5.0的MES缓冲液中,加入到烧杯A中;
- 3)加入50mg EDC到烧杯A中,得到混合溶液,室温搅拌反应2小时;将上述搅拌后的混合溶液经过中性PBS缓冲液透析纯化,得到鼠白蛋白-ADMA免疫原,储存于-70℃。

[0029] 类似的,当ADMA衍生物为甘氨酸、赖氨酸、氨基己酸,以及连接基团 $-(CH_2)_n-O-CH_2-COO-$ 时,用同样的方法可以制备出如式1所示的ADMA免疫原。当然,载体仍为具有免疫原性的蛋白质。

[0030] 本发明仅公开了连接基团为氨基己酸的不对称二甲基精氨酸衍生物的合成实施例并进行了相关后续实验,连接基团主要起小分子衍生物与载体的连接作用,但是不同长度连接臂对ADMA结构暴露程度不同;免疫原性强弱与所合成的ADMA衍生物分子结构及所选载体种类有关,并且不同的载体类型对小分子的结构影响也不同,另外使用不同的连接臂制备出的抗原,相应制备的特异性抗体均具有不同的性能。

#### [0031] 实施例四:ADMA-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶复合物的制备

本发明实例中,制备ADMA-G6PDH酶复合物由ADMA衍生物2(实施例一中)同G6PDH酶偶联得到,不同于本发明实施例三中合成ADMA免疫原所用到的ADMA衍生物1。大量文献及试验数据表明,在制备小分子多克隆抗体时候,会产生一部分抗体是识别载体蛋白与小分子的连接处的,因此这部分抗体能够同小分子免疫原结合,但是却不能识别测定样品中的小分子,因此会大大影响小分子免疫检测试剂的性能,而利用小分子不同的位点进行免疫原和酶偶联物的制备则可以避免该问题发生。

#### [0032] 戊二醛法制备ADMA-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶复合物

- 1)称取20mg规格为300KU的G6PDH,室温溶解于5ml含有0.1M MES、3mM MgCl<sub>2</sub>、100mg NADH、150mg葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)和0.9% NaCl的溶液中,该溶液pH=8.0;
- 2)称取30mg的ADMA衍生物2,溶于1mL的二甲基亚砷;
- 3)将ADMA衍生物2溶液同G6PDH溶液混合;

- 4)缓慢滴加1%的戊二醛60u1;
- 5)加入10mL的PBS,并继续搅拌反应2h;
- 6)纯化产物。

[0033] 通过透析纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-ADMA酶复合物,于2-8℃下储存。

[0034] 实施例五:ADMA免疫检测试剂的制备

ADMA均相酶免疫检测试剂,包括:上述抗ADMA特异性抗体、用于检测抗ADMA特异性抗体-ADMA复合物的酶试剂,包括:ADMA-G6PDH酶复合物和酶的底物。

[0035] ADMA均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免酶试剂中的酶复合物和酶的底物发生反应,酶复合物和酶的底物是分开放置的,不混合,所以将酶的底物与上述抗ADMA特异性抗体混合在一起。也就是说,ADMA均相酶免疫检测试剂包括两种分开设定的试剂,具体如下:

试剂R1的制备:20 mM NAD,30 mM葡萄糖-6-磷酸G6P、100 mM pH=6.0 的甘氨酸缓冲液溶解制成均相酶底物;加入0.1%-1%的抗ADMA特异性单克隆抗体到上述均相酶底物中,在本实施例中具体比例为0.5%;加入0.2%BSA、0.01% Twen 20、0.01%叠氮钠;

试剂R2的制备:0.1M、pH=9的Tris缓冲液中加入0.01%-1%制备的ADMA-G6PDH酶复合物,在本实施例中具体比例为0.05%;加入0.2%BSA、2%甘油、1mM EDTA、0.1%PEG20000、叠氮钠0.01%。

[0036] 上述ADMA免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

- 1)将待测样本与抗ADMA特异性抗体接触;
- 2)根据待测样本中ADMA与抗ADMA特异性抗体的结合情况,利用酶试剂判断样本中ADMA的含量;

具体的,检测时,将待测样本加到试剂R1中,待测样本中的ADMA与试剂A中的抗ADMA特异性抗体发生特异性结合,生成抗ADMA特异性抗体-ADMA复合物;再加入试剂R2,此时试剂R2中的ADMA-G6PDH酶复合物与试剂R1中抗ADMA特异性抗体发生特异性结合,未与抗ADMA特异性抗体结合的ADMA-G6PDH酶复合物与底物混合、接触,发生酶促反应,构成检测抗ADMA特异性抗体-ADMA复合物的酶试剂,酶试剂根据待测样本中ADMA上述抗ADMA特异性抗体的结合情况判断待测样本中ADMA的含量。

[0037] 由于ADMA-G6PDH酶复合物与待测样本中的ADMA竞争性结合抗ADMA特异性抗体,所以,待测样本中ADMA的量越多,均相酶溶液中游离的ADMA-G6PDH酶复合物的量越多,酶促反应越快,导致OD<sub>340</sub>上升。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。

[0038] 实施例六:不对称二甲基精氨酸均相酶免疫检验

1、获得标准曲线:设置日立7060全自动生化分析仪反应参数(见表1)。操作过程为:先加试剂R1,再加入标准品,37度孵育5min,最后加入试剂R2。加入试剂R2后,测定不同时间点的OD<sub>340</sub> 吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,得到较理想的反应曲线如图4 所示。

[0039] 表1 日立7060全自动生化分析仪反应参数

项目名称	ADMA
试剂R1	1600u1

试剂R2	40ul
样本量	15ul
分析方法	两点速率法
主波长	340nm
副波长	405nm
反应时间	15min
孵育时间	5min
反应方向	向上
定标方法	Spline
校准品浓度	0、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{mol/L}$

## 2、样本的测定、精密度和回收率评估

通过本发明的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,本实例中,质控样本为ADMA标准品溶解在人血清中,浓度至分别为0.63、2.50、10.00  $\mu\text{mol/L}$ ,结果如表2所示。

[0040] 表2 ADMA均相酶免试剂的分析性能评价

质控品	低	中	高
样品浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.63	2.50	10.00
1	0.61	2.2	10.21
2	0.59	2.41	10.35
3	0.63	2.52	10.01
4	0.67	2.48	9.30
5	0.58	2.6	11.13
6	0.69	2.71	10.75
7	0.62	2.39	10.94
8	0.60	2.51	9.84
9	0.64	2.43	9.98
10	0.59	2.34	10.40
平均值 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.62	2.46	10.29
标准差 (SD)	0.0361	0.1410	0.5496
精密度 (CV%)	5.81	5.73	5.34
回收率 (%)	98	98	103

检测结果表明：本发明制备的ADMA均相酶免试剂精密度高，CV<6%，准确度高，回收率在95%-105%之间。

[0041] 实施例七：干扰物试验

内源性的L-精氨酸(L-arg)、单甲基精氨酸(MMA)、对称二甲基精氨酸(SDMA)、胆酸(CA)和鹅去氧胆酸(CD-CA)是影响ADMA准确测定的几种重要干扰物。用本发明中的ADMA均相酶免试剂测定上述三种干扰物，结果见表3

表3干扰物试验

化合物名称	测试浓度	交叉反应率
ADMA	10 $\mu\text{mol/L}$	100%
L-精氨酸	100 $\mu\text{mol/L}$	<0.01%
单甲基精氨酸	100 $\mu\text{mol/L}$	<0.01%
对称二甲基精氨酸	100 $\mu\text{mol/L}$	<0.09%
胆酸	100 $\mu\text{mol/L}$	<0.05%
鹅去氧胆酸	100 $\mu\text{mol/L}$	<0.08%

检测结果说明上述干扰物的交叉反应率均小于0.1%，表明本发明制备的ADMA均相酶免试剂能够准确测定ADMA的含量。

[0042] 实施例八：相关性分析

将本发明的ADMA均相酶免测定试剂与高效液相色谱法测定人血清中ADMA方法比较，结果见表4。

[0043] 表4 ADMA均相酶免测定同高效液相色谱测定结果相关性分析

	均相酶免法 ( $\mu\text{mol/L}$ )	高效液相色谱 ( $\mu\text{mol/L}$ )
样品 1	0.234	0.251
样品 2	0.312	0.305
样品 3	0.362	0.371
样品 4	0.400	0.410
样品 5	0.461	0.521
样品 6	0.552	0.602
样品 7	0.723	0.789
样品 8	0.938	1.028
样品 9	0.982	0.992
样品 10	0.999	1.029
样品 11	1.089	1.023
样品 12	1.113	1.010
样品 13	1.214	1.294
样品 14	1.299	1.301
样品 15	1.315	1.384
样品 16	1.345	1.452
样品 17	1.422	1.572
样品 18	1.720	1.864
样品 19	2.031	2.109
样品 20	2.323	2.332
样品 21	2.840	2.793
样品 22	3.041	3.321
样品 23	5.821	5.500
样品 24	5.901	5.72
样品 25	7.312	7.540
样品 26	9.823	9.210

相关性曲线见图5,可见二者拟合良好。

[0044] 需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

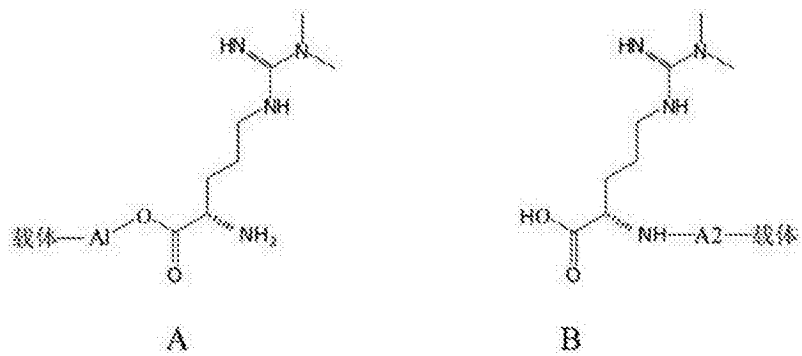


图1

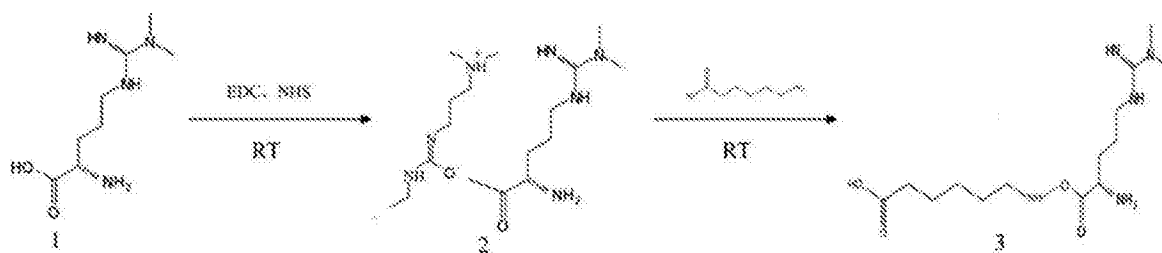


图2

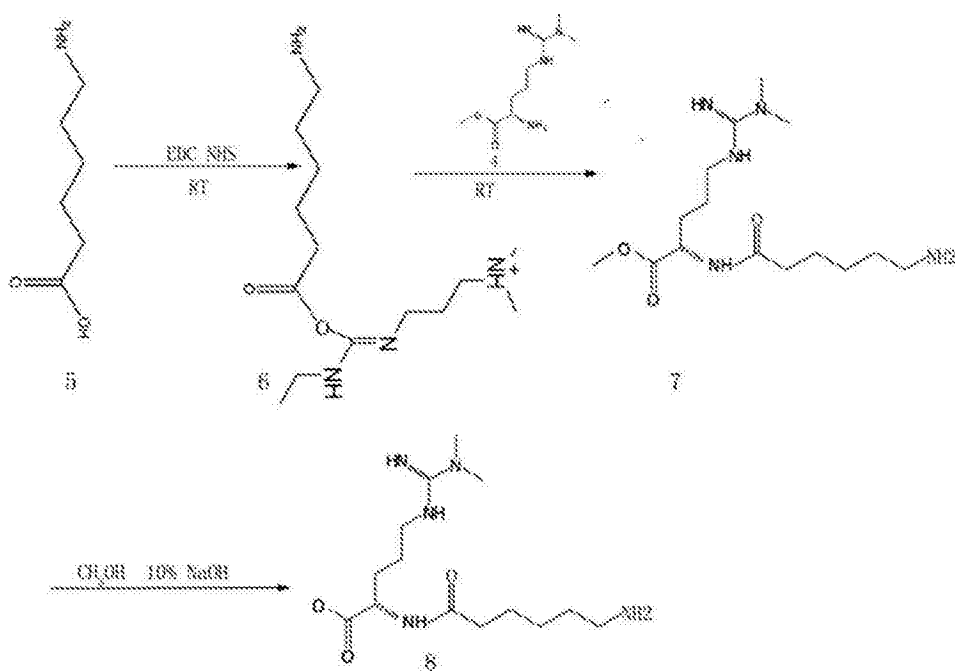


图3

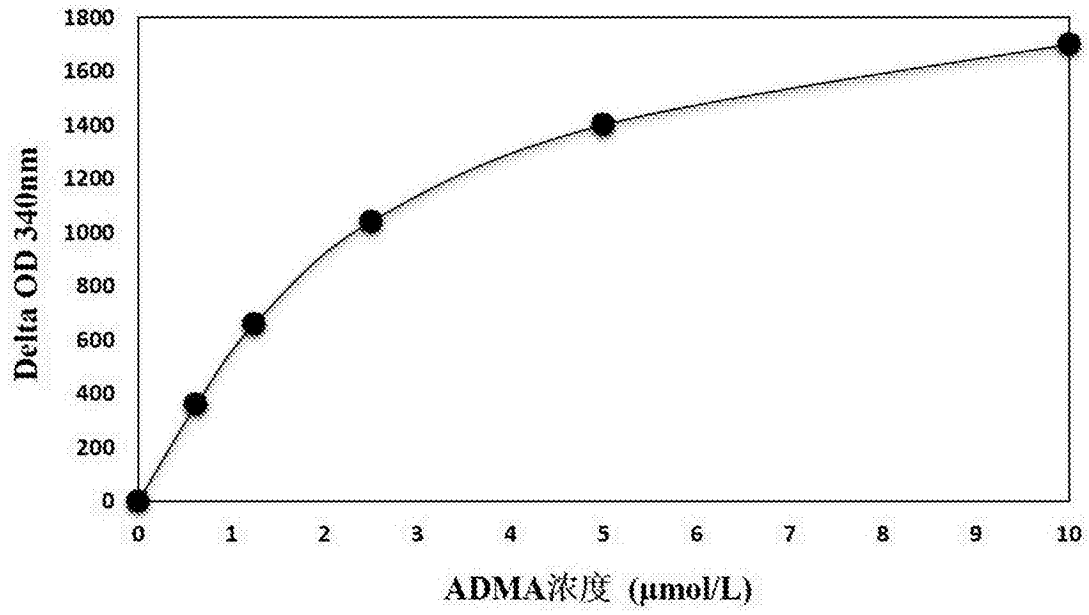


图4

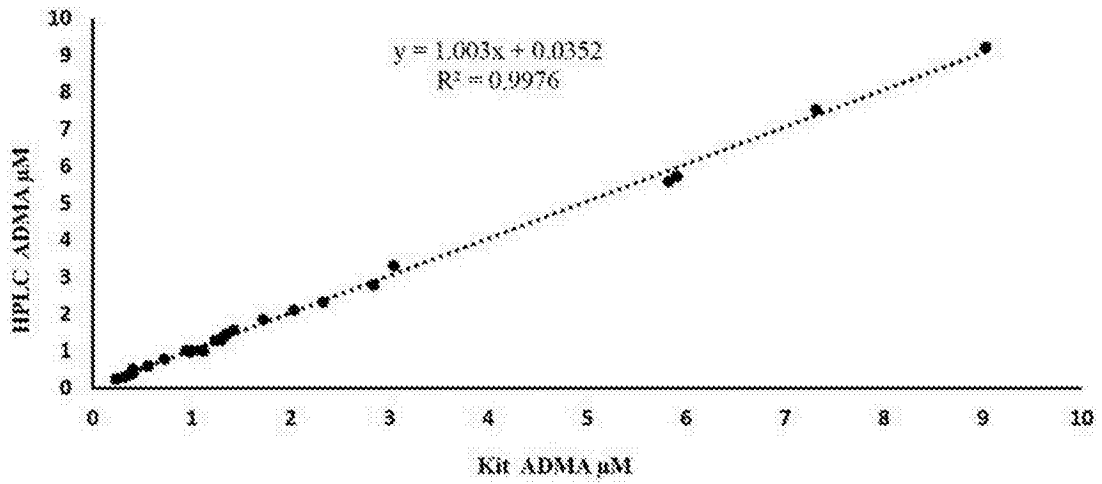


图5

专利名称(译)	一种不对称二甲基精氨酸免疫法测定试剂及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106290903A</a>	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610628595.4	申请日	2016-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	北京德奥平生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京德奥平生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京德奥平生物技术有限公司		
[标]发明人	周建平		
发明人	周建平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6806 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明是一种均相酶测定技术的免疫学检测的方法及其试剂，用于测定样品中不对称二甲基精氨酸 ( NG,NG,dimethyl-L-arginine,asymmetric dimethylarginine , ADMA ) 的含量。该方法采用抗ADMA特异性抗体、酶-ADMA复合物，利用酶-ADMA复合物与抗ADMA特异性抗体免疫学反应，形成抗原抗体复合物后，酶-ADMA复合物活性受到抑制,通过测定反应体系中酶活性的变化,从而得到结合的酶标记物数量，从而得到待测样品中ADMA的含量。该方法的优点是可以像普通生物化学酶方法一样，实现免疫学测定，从而在全自动生化分析仪上同时测定多个样品。

