



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105131106 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510445921. 3

G01N 33/535(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 27

G01N 33/534(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(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

(72) 发明人 虞留明 贾玫 成志鹏

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

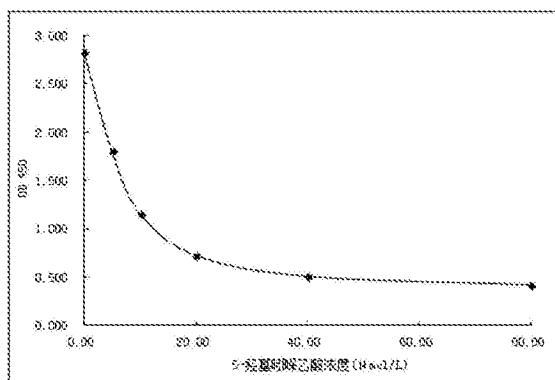
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

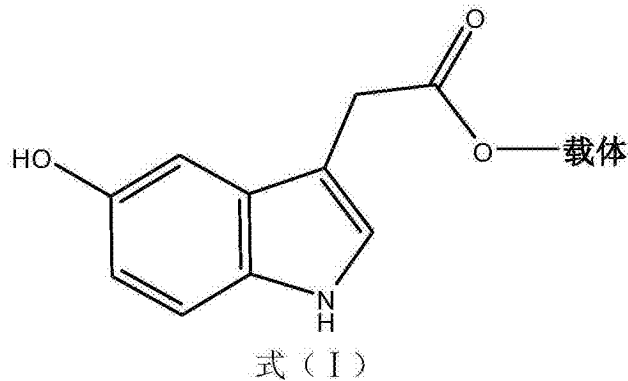
5-羟基吡啶乙酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了 5-羟基吡啶乙酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的 5-羟基吡啶乙酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体,并且与常见的 62 种药物无任何交叉反应;由该抗体制备得到的 5-羟基吡啶乙酸检测试剂,可以精确快速地确定尿液等生物样品中的 5-羟基吡啶乙酸含量。与市场上现有的检测试剂比较,本发明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 5-羟基吡啶乙酸检测成本,有利于临床大规模推广使用。



1. 一种 5-羟基吲哚乙酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。

2. 一种如权利要求1所述的5-羟基吲哚乙酸免疫原的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 将载体蛋白 100 ~ 300g 溶解于 25 ~ 75ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

(2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100 ~ 300mg 5-羟基吲哚乙酸、1.75 ~ 5.25ml 二甲基甲酰胺、1.75 ~ 5.25ml 乙醇、3.5 ~ 10.5ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、100 ~ 300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25 ~ 75mg N-羟基琥珀酰亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应 30 ~ 60min;

(3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在 2 ~ 8℃ 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到 5-羟基吲哚乙酸免疫原。

3. 一种抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体,由权利要求1所述的 5-羟基吲哚乙酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与 5-羟基吲哚乙酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

4. 根据权利要求3所述的一种抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体,其特征在于所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物,为采用单一的 5-羟基吲哚乙酸免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体。

5. 一种如权利要求3-4中任一项所述的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 用 PBS 将 5-羟基吲哚乙酸免疫原稀释至 0.1 ~ 3.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用 0.5 ~ 5.0ml 抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

(2) 2 ~ 3 周后,再用 0.5 ~ 5.0ml 相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射 3 ~ 6 次;

(3) 对步骤(2)的实验动物取血,分离纯化得到效价为 1:30000 ~ 1:50000 的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体。

6. 一种 5-羟基吲哚乙酸检测试剂,含有权利要求3或4所述的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体和指示试剂,所述的指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或发光试剂中的一种;所述的酶试剂由 5-羟基吲哚乙酸酶标偶联物和酶的底物组成,酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

7. 一种如权利要求6所述的5-羟基吡啶乙酸检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(1) 试剂A:将2.018~8.072g、5.625~22.50mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和0.856~3.422g、5.625~22.50mM葡萄糖-6-磷酸用0.5~2L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将权利要求3或4所述的抗5-羟基吡啶乙酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗5-羟基吡啶乙酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

(2) 试剂B:将5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

8. 根据权利要求7所述的5-羟基吡啶乙酸检测试剂的制备方法,其特征在于所述的5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

(1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取7.5~22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~18mL含有72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,pH=9.0;在溶液中加入112.5~337.5mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5~202.5mg葡萄糖-6-磷酸以及0.375~1.125mL卡必醇;再逐滴加入1~3mL二甲基亚砷;

(2) 5-羟基吡啶乙酸的激活:在无水状态下称取5~15mg 5-羟基吡啶乙酸,溶解于300~900μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-2~-8℃;加入1.5~4.5μL三丁胺;加入0.75~2.25μL氯甲酸异丁酯;-2~-8℃搅拌30~60分钟;

(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与5-羟基吡啶乙酸的连接:将步骤(2)激活的5-羟基吡啶乙酸溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌过夜;

(4) 纯化产物:通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

5-羟基吲哚乙酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法

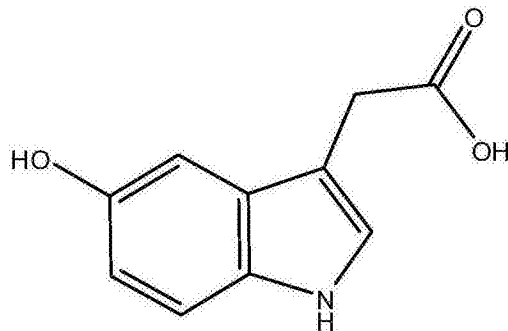
技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及5-羟基吲哚乙酸免疫原、抗5-羟基吲哚乙酸特异性抗体和5-羟基吲哚乙酸检测试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 5-羟基吲哚乙酸(5-Hydroxyindole-3-acetic acid,5-HIAA),其结构式如式(II)所示:

[0003]



式(II)

[0004] 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)作为5-羟色胺(5-HT)的代谢产物,是由单胺氧化酶催化经5-羟基吲哚乙醛转变而来。5-HIAA在肝脏中代谢,并随尿液排泄至体外。5-HT水平在中午时分最高,午夜最低,故其代谢产物5-HIAA的含量白天较夜晚高,因此测定24h尿液更能准确的反应5-HIAA的含量水平。临床上5-HIAA含量升高常见于类癌瘤、热带口炎性腹泻、支气管燕麦细胞癌等疾病;而其含量降低常见于肾病、抑郁症、强迫性神经症。因此,测定尿液中5-HIAA含量可为多种疾病的诊断、治疗以及发病机制的研究提供重要依据。

[0005] 目前用于5-HIAA含量检测的方法主要有:高效液相色谱法、离子色谱法等。但是这些方法耗时长、成本高、检测规模小,并不适用于临床患者尿液中5-HIAA含量的检测。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的5-HIAA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检验要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的5-HIAA检测试剂势在必行。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用独特的5-羟基吲哚乙酸制备免疫原性强的5-羟基吲哚乙酸免疫原及其抗体,用该抗体制备的5-羟基吲哚乙酸均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对5-羟基吲哚乙酸高通量、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5-羟基吲哚乙酸检测成本,有利于临床推广使用。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种免疫原性强的5-羟基吲哚乙酸免疫原。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种5-羟基吲哚乙酸免疫原的制备方法。

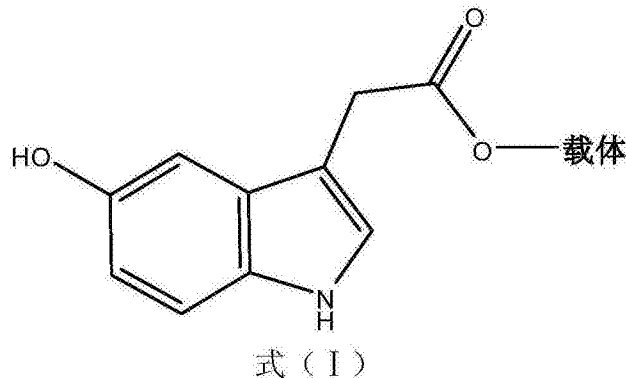
[0009] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明 5-羟基吲哚乙酸免疫原制备得到的特异性强的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体。

[0010] 本发明的再一个目的在于提供一种 5-羟基吲哚乙酸检测试剂及其制备方法。

[0011] 本发明的 5-羟基吲哚乙酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体。该抗体特异性高,与 5-羟基吲哚乙酸的结合力强。由该抗体制备得到的 5-羟基吲哚乙酸检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的 5-羟基吲哚乙酸含量。本发明是通过以下技术方案实现的:

[0012] 一种 5-羟基吲哚乙酸免疫原,其结构式如式(I)所示:

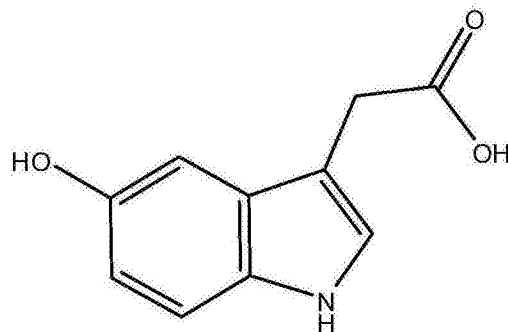
[0013]



[0014] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。更优选为血清白蛋白,进一步优选为牛血清白蛋白。

[0015] 所述的 5-羟基吲哚乙酸免疫原由 5-羟基吲哚乙酸与上述载体连接而成,5-羟基吲哚乙酸的化学结构如式(II)所示:

[0016]



[0017] 该 5-羟基吲哚乙酸免疫原的制备方法如下:

[0018] (1) 将载体蛋白 100 ~ 300mg 溶解于 25 ~ 75ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0019] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100 ~ 300mg 5-羟基吲哚乙酸、1.75 ~ 5.25ml 二甲基甲酰胺、1.75 ~ 5.25ml 乙醇、3.5 ~ 10.5ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、100 ~ 300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25 ~ 75mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30 ~ 60min;

[0020] (3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在 2 ~ 8°C 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到 5-羟基吲哚乙酸免疫原。

[0021] 一种抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体,是由上述的 5-羟基吲哚乙酸免疫原免疫实

验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与 5-羟基吡啶乙酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0022] 所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物,为采用单一的 5-羟基吡啶乙酸免疫原对动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体。所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种,优选为兔。

[0023] 所述的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体由上述制得的 5-羟基吡啶乙酸免疫原采用常规方法接种实验动物,加强免疫后取抗血清。

[0024] 抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体的制备方法,具体步骤如下:

[0025] (1) 用 PBS 将上述合成的 BSA-5-羟基吡啶乙酸免疫原稀释至 0.1 ~ 3.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用 0.5 ~ 5.0ml 抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

[0026] (2) 2 ~ 3 周后,再用 0.5 ~ 5.0ml 相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射 3 ~ 6 次;

[0027] (3) 对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为 1:30000 ~ 1:50000 的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体。

[0028] 本发明提供一种 5-羟基吡啶乙酸检测试剂,含有上述的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体和指示试剂,所述的指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或发光试剂中的一种;所述的酶试剂由 5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物和酶的底物组成,酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0029] 5-羟基吡啶乙酸检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0030] (1) 试剂 A:将 2.018 ~ 8.072g、5.625 ~ 22.50mM 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 0.856 ~ 3.422g、5.625 ~ 22.50mM 葡萄糖-6-磷酸用 0.5 ~ 2L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物;将所述的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为 1:100 ~ 1:10000;

[0031] (2) 试剂 B:将 5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物加到 120mM、pH = 8.2 的 Tris 缓冲液中,5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000。

[0032] 所述的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为 1:800;

[0033] 所述的 5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比优选为 1:2000。

[0034] 所述的 5-羟基吡啶乙酸酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

[0035] (1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取 7.5 ~ 22.5mg 规格为 100KU 的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于 6 ~ 18mL 含有 72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和 100mg NaCl 的溶液中,pH = 9.0;在溶液中加入 112.5 ~ 337.5mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5 ~ 202.5mg 葡萄糖-6-磷酸以及 0.375 ~ 1.125mL 卡必醇;再逐滴加入 1 ~ 3mL 二甲基亚砷;

[0036] (2) 5-羟基吡啶乙酸的激活:在无水状态下称取 5 ~ 15mg 5-羟基吡啶乙酸,溶解于 300 ~ 900 μ L 二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到 -2 ~ -8 $^{\circ}$ C;加入 1.5 ~ 4.5 μ L 三丁胺;加入 0.75 ~ 2.25 μ L 氯甲酸异丁酯;-2 ~ -8 $^{\circ}$ C 搅拌 30 ~ 60 分钟;

[0037] (3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与 5-羟基吡啶乙酸的连接:将步骤 (2) 激活的 5-羟基吡啶乙酸溶液逐滴加入到步骤 (1) 溶解的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8 $^{\circ}$ C 搅拌过夜;

[0038] (4) 纯化产物：通过 G-25 凝胶层析柱纯化连接产物，获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物，于 2-8℃ 下储存。

[0039] 5-羟基吡啶乙酸均相酶免疫检测试剂在使用之前，为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应，酶标偶联物和酶的底物是不混合的且分开放置，所以将酶的底物与上述抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体混合在一起。

[0040] 本发明的 5-羟基吡啶乙酸免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的 62 种药物无任何交叉反应；含有上述抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定尿液等生物样品中的 5-羟基吡啶乙酸含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现 5-羟基吡啶乙酸的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化，对检测人员的要求不高，易于实现和推广使用。

附图说明

[0041] 图 1 是 5-羟基吡啶乙酸的 ELISA 检测反应曲线；

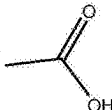
[0042] 图 2 是 5-羟基吡啶乙酸的均相酶免疫反应曲线；

[0043] 图 3 是 5-羟基吡啶乙酸均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0044] 实施例一 5-羟基吡啶乙酸免疫原的合成

[0045] 5-羟基吡啶乙酸免疫原由牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 与式 (II)

所示的 5-羟基吡啶乙酸的  基团连接而成，具体步骤如下：

[0046] 1. 将牛血清白蛋白 200mg 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中；

[0047] 2. 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解：200mg 5-羟基吡啶乙酸、3.5ml 二甲基甲酰胺、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50mg N-羟基琥珀酰亚胺，将这些化学品在室温下搅拌溶解反应 30min；

[0048] 3. 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中，并在 2~8℃ 下搅拌过夜，得到抗原；将合成好的抗原经过透析进行纯化，得到 5-羟基吡啶乙酸免疫原。

[0049] 实施例二：抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体的制备

[0050] 将实施例一制备得到的 5-羟基吡啶乙酸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：

[0051] 1. 用 PBS 将上述合成的 5-羟基吡啶乙酸免疫原稀释至 1.0mg/ml，得到抗原溶液，然后用 1.0ml 抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物兔进行注射。

[0052] 2. 2~3 周后，再用 1.0ml 相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次，之后每隔四周注射一次，共计注射 4 次。

[0053] 3. 对步骤 2 的实验动物兔取血，分离纯化得到效价为 1:30000~1:50000 的抗

5-羟基吲哚乙酸特异性抗体。

[0054] 实施例三:5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检验

[0055] 1. 5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检测标准曲线的建立

[0056] (1) 标准品的制备

[0057] 将 5-羟基吲哚乙酸粉末(购于 Sigma 公司)溶解于甲醇溶液,制备成 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液。用 ELISA 缓冲液将储存液依次稀释为 80.00 $\mu\text{mol/L}$ 、40.00 $\mu\text{mol/L}$ 、20.00 $\mu\text{mol/L}$ 、10.00 $\mu\text{mol/L}$ 、5.00 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.00 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液。其中,ELISA 缓冲液含有 50.0mM Tris,145mM NaCl 和 0.25% 的 BSA。

[0058] (2) 利用 5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检验方法制备标准曲线

[0059] 用 PBS 将实施例二中所制备的抗 5-羟基吲哚乙酸特异性抗体稀释成 1:8000 的终浓度溶液,100 μL /孔包被在 96 孔酶联板上,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12-24h;用 PBS 将上述包被有抗 5-羟基吲哚乙酸抗体的 96 孔酶联板洗涤 3 次后,加入 200 μL /孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭放置 8-16h。然后用 PBS 洗涤 3 次,加入 20 μL /孔的标准品。再加入 100 μL /孔工作浓度的 HRP-5-羟基吲哚乙酸偶联物;室温下孵育 30min 后 PBS 洗板 5 次;然后每孔加入 100 μL TMB 底物,室温孵育 30min。再每孔加入 100 μL 终止液(2M 硫酸)。测定 450nm 的吸光值。根据各标准品所对应的 450nm 的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图 2 所示。

[0060] 2. 待测样品中 5-羟基吲哚乙酸含量的检测

[0061] (1) 制作待测样品

[0062] 制备方法:将 5-羟基吲哚乙酸粉末(购于 Sigma 公司)溶解于甲醇溶液制成 1000 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液,并将此储存液稀释于空白尿液中,至终浓度分别为 0.00,10.00,40.00,80.00 $\mu\text{mol/L}$,形成空白、低、中、高浓度的尿液样本。该空白尿液为不含 5-羟基吲哚乙酸的健康人尿液。

[0063] (2) 测试方法

[0064] 利用上述 5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的尿液样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的尿液样本在 450nm 的吸光值。

[0065] (3) 测试结果

[0066] 对照图 1 中所示的 5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检验的标准曲线,计算每个样本中 5-羟基吲哚乙酸含量,并对每个样本进行 3 个复孔测定,根据上述样本中 5-羟基吲哚乙酸的含量计算回收率,结果如表 1 所示。

[0067] 表 1 5-羟基吲哚乙酸的 ELISA 检测回收实验

[0068]

尿液样品	空白	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.00	10.00	40.00	80.00
测试 1	0.02	9.96	40.23	80.52
测试 2	0.04	10.3	40.32	80.46
测试 3	0.03	10.15	40.39	80.3
平均值($\mu\text{mol/L}$)	0.01	10.14	40.31	80.43
回收率(%)	-	101.4	100.77	100.54

[0069] 由表 1 中结果可知:采用本发明 5-羟基吡啶乙酸的 ELISA 检测试剂测定不同浓度样品中的 5-羟基吡啶乙酸回收率都较高,均 > 90%,说明本发明所述的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体可以用于样本中 5-羟基吡啶乙酸的检测,并且结果准确度高。

[0070] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0071] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0072] (1) 准确称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH,室温溶解于 12mL 含有 72.6mg(0.05M) Tris、8mg MgCl₂(3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中,该溶液 pH = 9.0,本步骤在烧杯 C 中进行。

[0073] (2) 在上述烧杯 C 中加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),135mg 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及 0.75mL 卡必醇(Carbitol)。

[0074] (3) 在上述烧杯 C 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

[0075] 2. 5-羟基吡啶乙酸的激活:

[0076] (1) 在无水状态下称取 10mg 上述 5-羟基吡啶乙酸,溶解于 600 μL DMF 中。

[0077] (2) 使上述溶液温度降到 -2 ~ -8℃。

[0078] (3) 加入 3 μL 三丁胺(tributylamine)。

[0079] (4) 加入 1.5 μL 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0080] (5) -2 ~ -8℃ 搅拌 30 分钟。

[0081] 3. G6PDH 与 5-羟基吡啶乙酸的连接:

[0082] (1) 将上述激活的 5-羟基吡啶乙酸溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。

[0083] (2) 2-8℃ 搅拌过夜。

[0084] 4. 纯化产物:

[0085] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化步骤 3 中的溶液,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于 2-8℃ 下储存。

[0086] 实施例五:5-羟基吡啶乙酸均相酶免疫检测试剂的制备

[0087] 1. 试剂 A 的制备:将 4.036g(11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g(11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯 D 中,用 1L 55mM、pH = 8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗 5-羟基吡啶乙酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为 1:800。

[0088] 2. 试剂 B 的制备:将实施例四制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到 120mM、pH = 8.2 的 Tris 缓冲液中,上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:2000。

[0089] 实施例六:5-羟基吡啶乙酸均相酶免疫检验及结果

[0090] 1. 获得标准曲线:

[0091] (1) 设置迈瑞 BS-480 全自动生化分析仪反应参数(见表 2)。

[0092] (2) 操作步骤为:先加试剂 A,再加入标准品,最后加入试剂 B。加入试剂 B 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 A 和试剂 B 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 3 所示。

[0093] 表 2 迈瑞 BS-480 全自动生化分析仪反应参数

[0094]

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	5-羟基吲哚乙酸
试剂 1	200 μL
试剂 2	50 μL
样本量	12 μL
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	$\mu\text{mol/L}$
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 5.00, 10.00, 20.00, 40.00, 80.00 $\mu\text{mol/L}$

[0095] 2. 样本检测: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,上述质控样本为:将 5-羟基吲哚乙酸标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为 10.00, 100.00, 200.00 $\mu\text{mol/L}$ 。检测数据及数据分析见表 3。

[0096] 表 3 样品测定及精密度和回收率评估

[0097]

尿液样品	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	10.00	100.00	200.00
1	10.26	99.82	200.78
2	11.05	102.35	199.69
3	9.87	104.29	198.72
4	10.09	101.96	203.55
5	9.89	98.63	205.32

[0098]

6	9.43	99.95	199.74
7	10.29	103.56	197.96
8	9.87	101.37	200.23
9	10.33	99.87	199.98
10	10.12	100.28	201.09
平均值($\mu\text{mol/L}$)	10.12	101.21	200.71
标准差 (SD)	0.40	1.72	2.09
精密度 (CV%)	3.97%	1.70%	1.04%
回收率 %	101.20	101.21	100.35

[0099] 检测结果：本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率达到 95% -105%，精密度高，CV 均低于 5%。

[0100] 实施例七：药物干扰试验

[0101] 选取 62 种常见药物进行干扰检测，调整浓度至 $1.00 \mu\text{mol/L}$ ，采用实施例六的均相酶免疫方法进行测定：

[0102] 1. 将待测干扰药物与实施例五制备的试剂 A 接触反应，再加入试剂 B；

[0103] 2. 检测上述混合溶液的 OD_{340} 吸光值，根据实施例六的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0104] 常见的 62 种药物名称以及测定结果具体参见表 4。

[0105] 表 4 常见干扰药物测定结果

[0106]

ID#	化合物名称	等价于 5-羟基 吲哚乙酸的浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于 5-羟基 吲哚乙酸的浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	β -苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0
4	氨苄青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0

[0107]

ID#	化合物名称	等价于 5-羟基 吲哚乙酸的浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于 5-羟基 吲哚乙酸的浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砒	0.0	47	大麻酚	0.0
17	蔡普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氮醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苯非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0108] 测定结果显示:上述 62 种常见药物等价于 5-羟基吲哚乙酸的浓度均小于 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 。由此可见,本发明的抗体是抗 5-羟基吲哚乙酸的特异性抗体,与其它药物无

交叉反应。

[0109] 实施例八：相关性分析

[0110] 对 100 例临床标本分别使用高效液相色谱法和本发明的均相酶免疫试剂进行相关性分析,测定的数据参见表 5。

[0111] 表 5 临床样本测定值

[0112]

样本号	均相酶免疫法测定值 ($\mu\text{mol/L}$)	高效液相色谱法测定值 ($\mu\text{mol/L}$)
1	56.32	55.63
2	68.43	67.32
3	11.65	10.95
4	8.24	8.09
5	29.39	28.63
6	84.23	82.00
7	40.37	38.96
8	19.52	20.77
9	66.92	68.01
10	83.09	81.03
11	63.90	59.14
12	39.34	42.37
13	33.65	34.96
14	56.73	57.42
15	21.36	19.65
16	28.15	30.71
17	44.66	43.24
18	23.42	25.66
19	87.93	89.45
20	36.67	37.00
21	58.35	57.22
22	10.32	10.76
23	20.40	21.65
24	34.89	36.28
25	78.41	80.83
26	58.52	57.84
27	88.25	89.39
28	89.40	90.20
29	55.66	54.55
30	75.68	74.29
31	22.33	22.66
32	19.69	18.33

[0113]

33	47.08	48.27
34	27.50	28.88
35	16.54	17.36
36	19.77	20.10
37	77.99	79.03
38	38.32	39.53
39	87.95	89.36
40	27.17	29.14
41	42.38	45.65
42	15.24	15.52
43	58.43	60.33
44	83.92	85.76
45	67.35	65.09
46	60.10	56.93
47	62.54	63.98
48	69.59	70.35
49	53.74	50.97
50	85.67	86.43
51	99.21	96.38
52	14.02	12.16
53	26.53	24.23
54	19.39	20.99
55	36.44	32.79
56	48.38	52.00
57	16.73	19.05
58	78.35	74.24
59	29.83	33.66
60	88.91	85.37
61	25.24	26.92
62	62.65	66.33
63	45.52	46.17
64	23.88	25.83
65	32.81	36.64
66	45.66	48.29
67	78.99	80.30
68	88.20	85.69
69	59.43	62.53
70	78.96	81.34
71	45.65	48.21
72	25.37	26.58
73	36.89	36.49
74	56.14	60.20
75	25.72	29.37

[0114]

76	45.88	46.83
77	58.90	60.06
78	46.08	48.32
79	15.92	16.09
80	48.50	50.31
81	75.64	79.67
82	23.98	25.32
83	56.83	60.71
84	15.45	16.01
85	75.00	79.94
86	23.16	25.35
87	58.67	60.72
88	23.95	26.93
89	36.43	39.11
90	56.12	59.34
91	26.91	27.80
92	55.29	54.44
93	78.55	77.51
94	45.07	46.28
95	25.36	24.37
96	58.78	57.18
97	58.82	55.15
98	66.97	60.46
99	36.44	32.33
100	56.81	51.39

[0115] 对上述数据作图,参见图 3,得到的线性方程为: $y = 0.984x + 1.2274$, 相关系数 $R^2 = 0.9903$, 表明本发明的检测试剂测定 5- 羟基吲哚乙酸临床标本的准确度高。

[0116] 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。

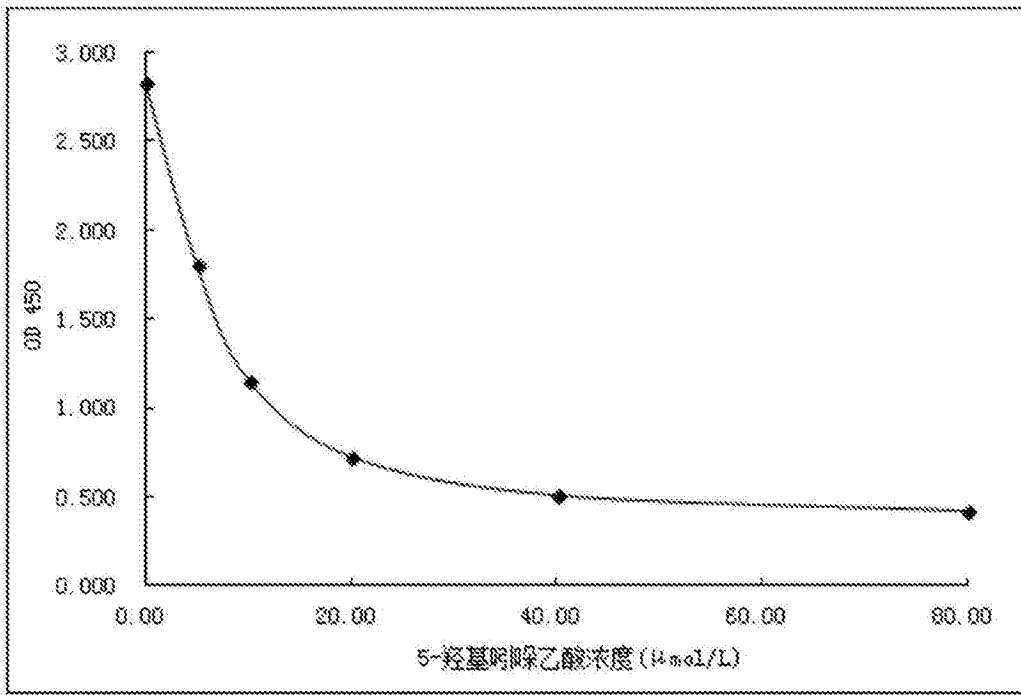


图 1

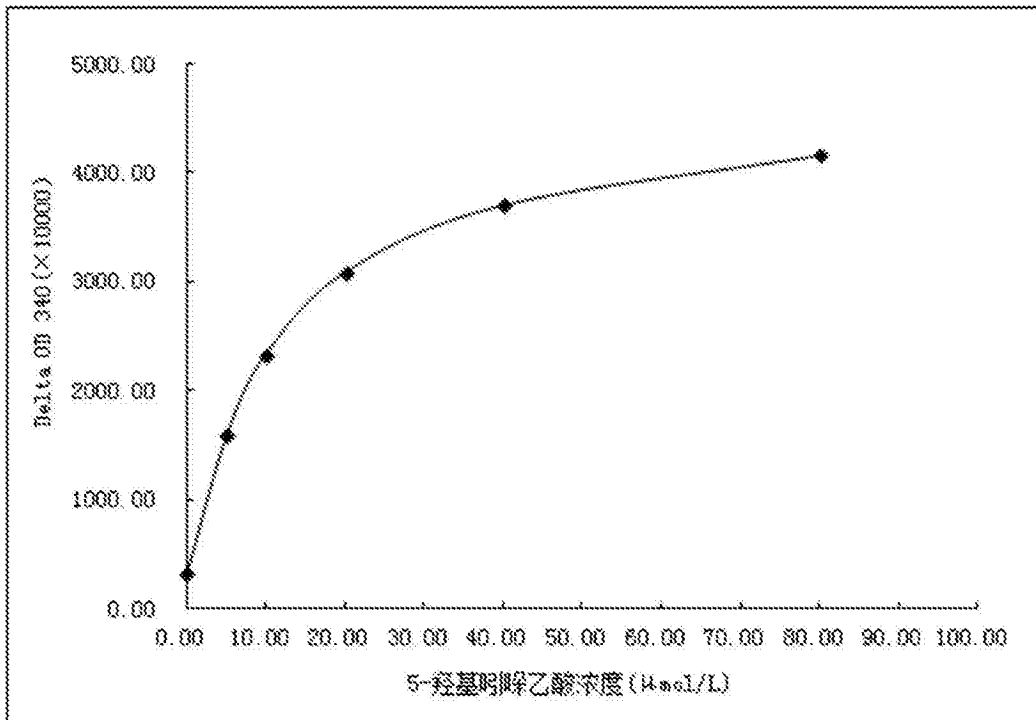


图 2

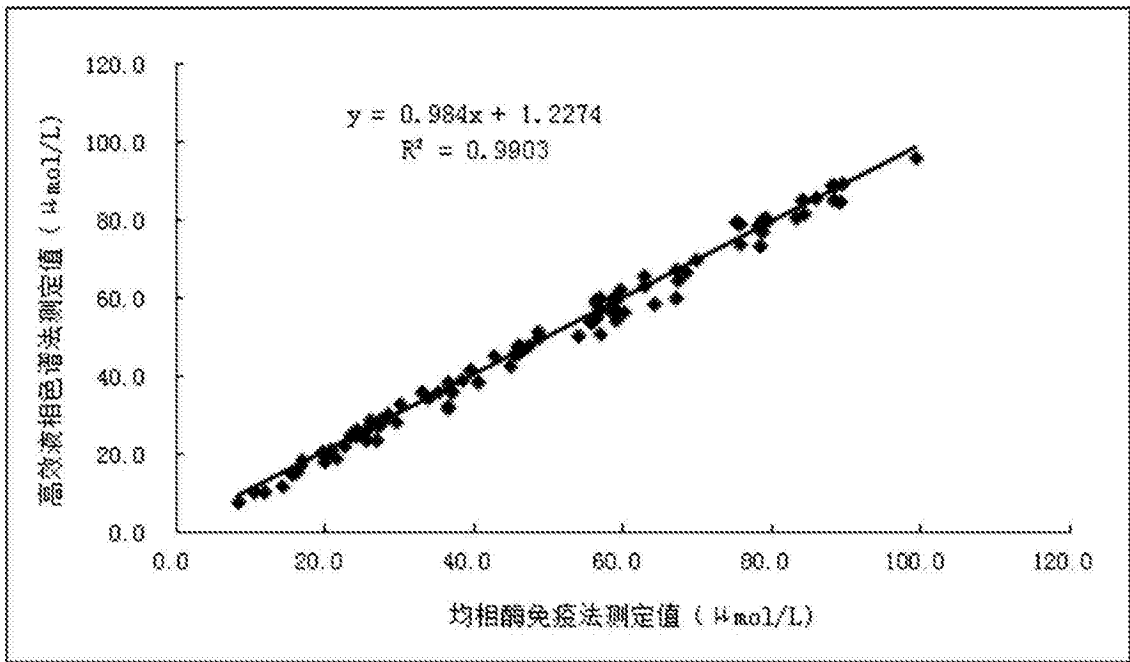


图 3

专利名称(译)	5-羟基吡啶乙酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN105131106A	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	CN201510445921.3	申请日	2015-07-27
[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 贾玫 成志鹏		
发明人	虞留明 贾玫 成志鹏		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 C07K1/34 C07K16/06 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/535 G01N33/534 G01N33/533		
CPC分类号	C07K19/00 C07K14/435 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/06 C07K16/44 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了5-羟基吡啶乙酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的5-羟基吡啶乙酸免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗5-羟基吡啶乙酸特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；由该抗体制备得到的5-羟基吡啶乙酸检测试剂，可以精确快速地确定尿液等生物样品中的5-羟基吡啶乙酸含量。与市场上现有的检测试剂比较，本发明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5-羟基吡啶乙酸检测成本，有利于临床大规模推广使用。

