



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105753969 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201610209278.9

(22)申请日 2016.04.06

(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 付卫 虞留明

(51)Int. Cl.

- C07K 14/765(2006.01)
- C07K 14/795(2006.01)
- C07K 14/47(2006.01)
- C07K 1/34(2006.01)
- C07K 16/44(2006.01)
- G01N 35/00(2006.01)
- G01N 33/53(2006.01)
- G01N 33/535(2006.01)
- G01N 33/533(2006.01)

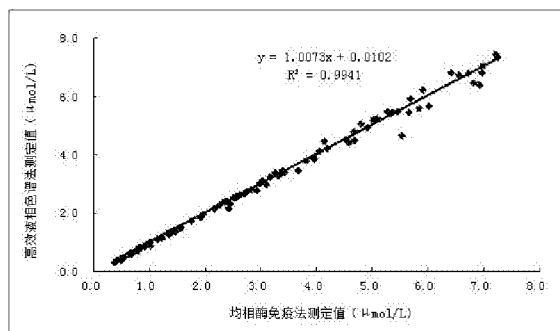
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

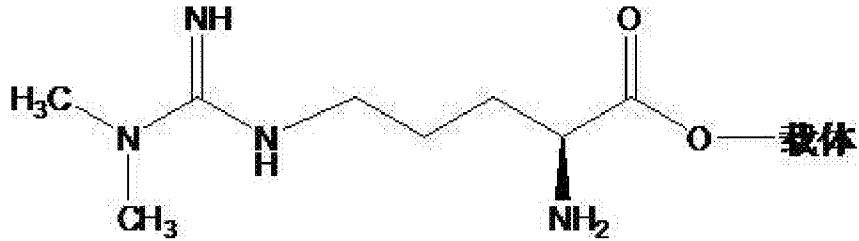
非对称二甲基精氨酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法

(57)摘要

本发明公开了非对称二甲基精氨酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的非对称二甲基精氨酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体,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非对称二甲基精氨酸检测试剂,可以精确快速地确定血清、血浆及尿液等生物样品中的非对称二甲基精氨酸含量。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,还能有效降低非对称二甲基精氨酸检测成本,有利于临床大规模推广使用。



1. 一种非对称二甲基精氨酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

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所述的非对称二甲基精氨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25~75 ml 0.2 M, 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:100~300 mg 非对称二甲基精氨酸、1.75~5.25 ml二甲基甲酰胺、1.75~5.25 ml乙醇、3.5~10.5ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、100~300 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25~75 mg N-羟基琥珀酰亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60 min;

(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,得到非对称二甲基精氨酸免疫原。

3. 一种抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体,由权利要求1所述的非对称二甲基精氨酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与非对称二甲基精氨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所述的一种抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体,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,为采用单一的非对称二甲基精氨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中任一项所述的抗非对称二甲基精氨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将非对称二甲基精氨酸免疫原稀释至0.1~3.0 mg/ml,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0 ml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0.5~5.0 ml 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的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体。

6. 一种非对称二甲基精氨酸检测试剂,含有权利要求3或4所述的抗非对称二甲基精氨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;所述的酶试剂由非对称二甲基精氨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所述的非对称二甲基精氨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、5.625~22.50 mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和

0.856~3.422g、5.625~22.50 mM葡萄糖-6-磷酸用0.5~2 L 55 mM、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所述的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体加到上述均相酶底物中，抗非对称二甲基精氨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:将非对称二甲基精氨酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中，非对称二甲基精氨酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

8.根据权利要求7所述的非对称二甲基精氨酸检测试剂的制备方法，其特征在于所述的非对称二甲基精氨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7.5~22.5 mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，室温溶解于6~18 mL含有 72.6 mg 0.05 M Tris、8mg 3.3 mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中，pH=9.0；在溶液中加入112.5~337.5 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5~202.5 mg 葡萄糖-6-磷酸以及0.375~1.125 mL卡必醇；再逐滴加入1~3 mL 二甲基亚砷；

(2)非对称二甲基精氨酸的激活：在无水状态下称取5~15 mg 非对称二甲基精氨酸，溶解于300~900 μL二甲基甲酰胺中；使上述溶液温度降到 -2 ~ -8℃；加入1.5~4.5 μL 三丁胺；加入0.75~2.25 μL氯甲酸异丁酯；-2 ~ -8℃搅拌30~60分钟；

(3)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与非对称二甲基精氨酸的连接：将步骤(2)激活的非对称二甲基精氨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。

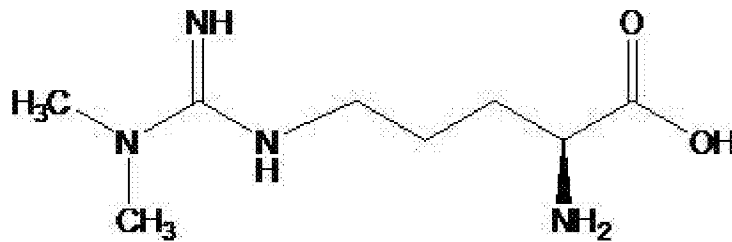
非对称二甲基精氨酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及非对称二甲基精氨酸免疫原、抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体和非对称二甲基精氨酸检测试剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 非对称二甲基精氨酸 (Asymmetric dimethylarginine,ADMA),其结构式如式(II)所示:



式(II)

非对称二甲基精氨酸是一种可在人血清、血浆及尿液中检测到的内源性分子,它是一种甲基化的精氨酸,由组成细胞内蛋白质的精氨酸残基在蛋白精氨酸甲基转移酶催化下发生甲基化,再经水解反应生成。现已证明,体内存在ADMA调节一氧化氮(NO)生成的内源性机制,即ADMA能竞争性抑制一氧化氮合成酶(NOS)的活性,从而减少血管内皮细胞一氧化氮的合成。ADMA广泛存在于组织和细胞中,正常人体内每天产生约300 μ mol(约60mg),体内浓度远远高于其他同样可产生NOS抑制作用的内源性精氨酸,故被认为是最重要的NOS抑制剂。ADMA从细胞进入血液循环后,一小部分被直接分解通过肾脏随尿液排出,但大部分通过广泛分布于肾脏、肝脏和心血管系统的二甲基精氨酸二甲胺水解酶(DDAH)催化降解。国内外大量临床研究证明:ADMA含量异常会造成血管内皮功能紊乱并导致多种心血管疾病的发生,如动脉粥样硬化、冠心病、高脂血症、脑梗死、高血压、心力衰竭和中风等。因此,ADMA已被公认为是一种新的心血管疾病重要标志物。目前有研究指出:ADMA浓度升高不仅与心血管功能异常有关,而且还与慢性肾功能衰竭、糖尿病、先兆子痫、高同型半胱氨酸血症、肝脏衰竭、勃起功能障碍等疾病的发生发展密切相关。

[0003] 鉴于此,建立适用于临床的ADMA检测方法具有重大意义,但是血液中ADMA浓度水平较低,且存在精氨酸和对称性二甲基精氨酸(SDMA)对ADMA检测的交叉反应干扰,因此ADMA检测难度较大。目前,测定ADMA的方法主要包括:高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法以及酶联免疫法等。高效液相色谱及高效液相色谱-质谱联用方法的共同特点是精确性好、特异性高,缺点是操作复杂、样品处理繁琐、试验耗时长、需要特殊昂贵仪器,无法进行高通量分析,难以应用于临床。酶联免疫法相对色谱法略微方便,其缺点在于需手工操作,耗时长,受人为因素影响大,难以实现自动化,目前主要应用于实验研究。此外,文献还报道了用于ADMA测定的荧光偏振免疫测定法、放射免疫测定法、胶乳增强免疫比浊法、克隆酶供体免疫测定法、酶法等可能的检测方法,但是目前市场上还没有大规模临床应用的成熟产品。因此,研发一种能方便、快速、准确地测定人体样本中ADMA含量,灵敏度和特异性

达到临床要求,同时能够应用于全自动生化仪的方法和试剂盒已成为临床检验领域的迫切需求。

发明内容

[0004] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用独特的非对称二甲基精氨酸制备免疫原性强的非对称二甲基精氨酸免疫原及其抗体,用该抗体制备的非对称二甲基精氨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非对称二甲基精氨酸高通量、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,还能有效降低非对称二甲基精氨酸检测成本,有利于临床推广使用。

[0005] 本发明的一个目的在于提供一种免疫原性强的非对称二甲基精氨酸免疫原。

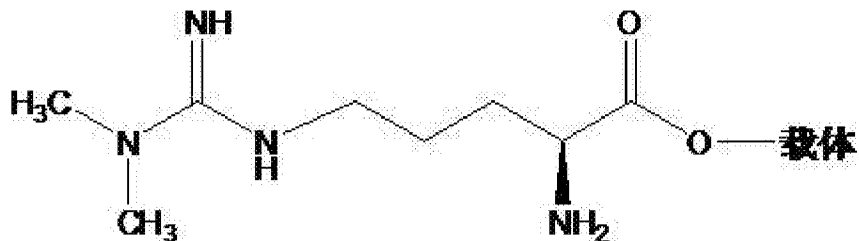
[0006] 本发明的另一个目的在于提供一种非对称二甲基精氨酸免疫原的制备方法。

[0007] 本发明的又一个目的在于提供使用本发明非对称二甲基精氨酸免疫原制备得到的特异性强的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体。

[0008] 本发明的再一个目的在于提供一种非对称二甲基精氨酸检测试剂及其制备方法。

[0009] 本发明的非对称二甲基精氨酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体。该抗体特异性高,与非对称二甲基精氨酸的结合力强。由该抗体制备得到的非对称二甲基精氨酸检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的非对称二甲基精氨酸含量。本发明是通过以下技术方案实现的:

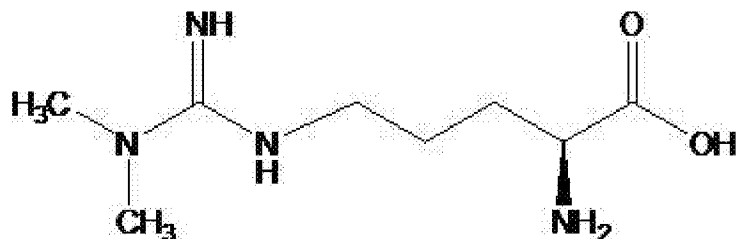
一种非对称二甲基精氨酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

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。

[0010] 所述的非对称二甲基精氨酸免疫原由非对称二甲基精氨酸与上述载体连接而成,非对称二甲基精氨酸的化学结构如式(II)所示:



式(II)

该非对称二甲基精氨酸免疫原的制备方法如下:

- (1)将载体蛋白100~300mg溶解于25~75 ml 0.2 M, 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:100~300 mg 非对称二甲基精氨酸、1.75~5.25 ml 二甲基甲酰胺、1.75~5.25 ml 乙醇、3.5~10.5 ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓

冲液、100~300 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、25~75 mg N-羟基琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30~60 min;

(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,得到非对称二甲基精氨酸免疫原。

[0011] 一种抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体,是由上述的非对称二甲基精氨酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与非对称二甲基精氨酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0012] 所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物,为采用单一的非对称二甲基精氨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。

[0013] 所述的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体由上述制得的非对称二甲基精氨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。

[0014] 抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体的制备方法,具体步骤如下:

(1)用PBS将上述合成的BSA-非对称二甲基精氨酸免疫原稀释至0.1~3.0 mg/ml,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0 ml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0.5~5.0 ml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)对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体。

[0015] 本发明提供一种非对称二甲基精氨酸检测试剂,含有上述的抗非对称二甲基精氨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;所述的酶试剂由非对称二甲基精氨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。

[0016] 非对称二甲基精氨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、5.625~22.50 mM氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和0.856~3.422g、5.625~22.50 mM葡萄糖-6-磷酸用0.5~2 L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将所述的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗非对称二甲基精氨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:将非对称二甲基精氨酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,非对称二甲基精氨酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100~1:10000。

[0017] 所述的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体与均相酶底物的体积比优选为1:800;

所述的非对称二甲基精氨酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:2000。

[0018] 所述的非对称二甲基精氨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7.5~22.5 mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~18 mL含有 72.6 mg 0.05 M Tris、8mg 3.3 mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中, pH=9.0;在溶液中加入112.5~337.5 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、67.5~202.5 mg 葡萄糖-6-磷酸以及0.375~1.125 mL卡必醇;再逐滴加入1~3 mL 二甲基亚砷;

(2)非对称二甲基精氨酸的激活:在无水状态下称取5~15 mg 非对称二甲基精氨酸,

溶解于300~900 μL 二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$;加入1.5~4.5 μL 三丁胺;加入0.75~2.25 μL 氯甲酸异丁酯; $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 搅拌30~60分钟;

(3)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与非对称二甲基精氨酸的连接:将步骤(2)激活的非对称二甲基精氨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; $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 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 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下储存。

[0019] 非对称二甲基精氨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非对称二甲基精氨酸特异性抗体混合在一起。

[0020] 本发明的非对称二甲基精氨酸免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗非对称二甲基精氨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;含有上述抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定血清等生物样品中的非对称二甲基精氨酸含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现非对称二甲基精氨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。

[0021]

附图说明

[0022] 图1是非对称二甲基精氨酸的ELISA检测反应曲线;

图2是非对称二甲基精氨酸的均相酶免疫反应曲线;

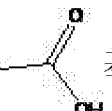
图3是非对称二甲基精氨酸均相酶免疫相关性分析图。

[0023]

具体实施方式

[0024] 实施例一非对称二甲基精氨酸免疫原的合成

非对称二甲基精氨酸免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)

所示的非对称二甲基精氨酸的  基团连接而成,具体步骤如下:

1. 将牛血清白蛋白200 mg溶解于50 ml 0.2 M, 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:200 mg 非对称二甲基精氨酸、3.5 ml 二甲基甲酰胺、3.5 ml 乙醇、7.0 ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、50 mg 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 min;
3. 将溶解好的溶液滴加至BSA溶液中,并在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到非对称二甲基精氨酸免疫原。

[0025]

实施例二:抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体的制备

将实施例一制备得到的非对称二甲基精氨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:

1. 用PBS将上述合成的非对称二甲基精氨酸免疫原稀释至1.0 mg/ml,得到抗原溶液,然后用1.0 ml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。

[0026] 2. 2~3周后,再用1.0 ml 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。

[0027] 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的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体。

[0028]

实施例三:非对称二甲基精氨酸的ELISA检验

1. 非对称二甲基精氨酸的ELISA检测标准曲线的建立

(1) 标准品的制备

将非对称二甲基精氨酸粉末(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4.00 $\mu\text{mol/L}$ 、2.00 $\mu\text{mol/L}$ 、1.00 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 和0.00 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0 mM Tris,145mM NaCl 和0.25%的BSA。

[0029] (2) 利用非对称二甲基精氨酸的ELISA检验方法制备标准曲线

用PBS将实施例二中所制备的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体稀释成1 : 6000 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将上述包被有抗非对称二甲基精氨酸抗体的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8-16 h。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-非对称二甲基精氨酸偶联物;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30 min。再每孔加入100 μL 终止液(2 M 硫酸)。测定450 nm 的吸光值。根据各标准品所对应的450 nm 的吸光值定标,制作标准曲线,结果如附图2所示。

[0030] 2. 待测样品中非对称二甲基精氨酸含量的检测

(1) 制作待测样品

制备方法:将非对称二甲基精氨酸粉末(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血清中,至终浓度分别为0.00,0.10,0.80,2.50 $\mu\text{mol/L}$,形成空白、低、中、高浓度的血清样本。该空白血清为不含非对称二甲基精氨酸的健康人血清。

[0031] (2) 测试方法

利用上述非对称二甲基精氨酸的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血清样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血清样本在450nm 的吸光值。

[0032] (3) 测试结果

对照图1中所示的非对称二甲基精氨酸的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中非对称二甲基精氨酸含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中非对称二甲基精氨酸的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0033] 表1 非对称二甲基精氨酸的ELISA检测回收实验

血清样品	空白	低	中	高
样品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0.00	0.10	0.80	2.50

测试1	0.01	0.09	0.83	2.62
测试2	0.02	0.13	0.77	2.49
测试3	0.02	0.11	0.85	2.53
平均值($\mu\text{mol/L}$)	0.01	0.11	0.82	2.55
回收率(%)	-	110.0	102.5	102.0

由表1中结果可知:采用本发明非对称二甲基精氨酸的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的非对称二甲基精氨酸回收率都较高,均 $>90\%$,说明本发明所述的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体可以用于样本中非对称二甲基精氨酸的检测,并且结果准确度高。

[0034]

实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

(1) 准确称取15 mg规格为100KU的 G6PDH,室温溶解于12mL含有 72.6 mg(0.05 M) Tris、8mg MgCl_2 (3.3 mM)和100mg NaCl的溶液中,该溶液 pH=9.0,本步骤在烧杯C中进行。

[0035] (2)在上述烧杯C中加入225 mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),135 mg 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)以及0.75 mL卡必醇(Carbitol)。

[0036] (3)在上述烧杯C中再逐滴加入2 mL 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO)。

[0037] 2. 非对称二甲基精氨酸的激活:

(1)在无水状态下称取10 mg上述非对称二甲基精氨酸,溶解于600 μL DMF中。

[0038] (2)使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 。

[0039] (3)加入3 μL 三丁胺(tributylamine)。

[0040] (4)加入1.5 μL 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0041] (5) $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 搅拌30分钟。

[0042] 3. G6PDH与非对称二甲基精氨酸的连接:

(1)将上述激活的非对称二甲基精氨酸溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0043] (2) $2-8^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。

[0044] 4. 纯化产物:

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 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存。

[0045]

实施例五:非对称二甲基精氨酸均相酶免疫检测试剂的制备

1. 试剂A的制备:将4.036g(11.25 mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g(11.25 mM)葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯D中,用1L 55 mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗非对称二甲基精氨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。

[0046] 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。

[0047]

实施例六:非对称二甲基精氨酸均相酶免疫检验及结果

1. 获得标准曲线:

(1)设置迈瑞 BS-480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0048] (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。

[0049] 表2 迈瑞 BS-480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	非对称二甲基精氨酸
试剂 1	200 μ L
试剂 2	50 μ L
样本量	12 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	μ mol/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 0.50, 2.00, 8.00, 20.00, 40.00 μ mol/L

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:将非对称二甲基精氨酸标准品溶解于人血清中,至浓度分别为0.50,5.00,20.00 μ mol/L。检测数据及数据分析见表3。

[0050] 表3 样品测定及精密度和回收率评估

血清样品	低	中	高
样品浓度 (μ mol/L)	0.50	5.00	20.00
1	0.56	5.43	21.78
2	0.45	5.39	19.69
3	0.57	4.77	18.72
4	0.54	4.96	20.56
5	0.49	4.91	20.31
6	0.43	5.35	19.77
7	0.55	5.08	19.96
8	0.57	5.76	20.88
9	0.50	5.54	19.98
10	0.52	4.68	21.09
平均值(μ mol/L)	0.52	5.19	20.27
标准差(SD)	0.05	0.36	0.86
精密度(CV%)	9.62%	6.94%	4.24%

回收率 %	104.00	103.80	101.35
-------	--------	--------	--------

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10%。

[0051]

实施例七:药物干扰试验

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:

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;
2. 检测上述混合溶液的OD₃₄₀吸光值,根据实施例六的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0052] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0053] 表4 常见干扰药物测定结果

ID#	化合物名称	等价于非对称二甲基精氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于非对称二甲基精氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
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
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	二氨基二苯砷	0.0	47	大麻酚	0.0
17	萘普生	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	柳丁氨醇	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	苄非他明	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

测定结果显示:上述62种常见药物等价于非对称二甲基精氨酸的浓度均小于0.01 μ mol/L。由此可见,本发明的抗体是抗非对称二甲基精氨酸的特异性抗体,与其它药物无交叉反应。

[0054]

实施例八:相关性分析

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。

[0055] 表5 临床样本测定值

样本号	均相酶免疫法测定值(μ mol/L)	高效液相色谱法测定值(μ mol/L)
1	3.37	3.43
2	1.41	1.42
3	0.65	0.67
4	2.24	2.31
5	0.99	1.03
6	1.23	1.20
7	0.37	0.36
8	1.52	1.56
9	6.98	7.11
10	3.09	3.03
11	1.00	0.94
12	1.14	1.17
13	0.75	0.76
14	5.43	5.52
15	1.33	1.35
16	2.15	2.21
17	4.66	4.54
18	3.02	3.15
19	0.93	0.95
20	0.67	0.70
21	1.35	1.32
22	0.52	0.53
23	0.80	0.77

24	4.89	4.98
25	3.41	3.43
26	5.52	4.69
27	7.25	7.39
28	2.40	2.20
29	5.66	5.95
30	5.64	5.49
31	1.33	1.36
32	2.69	2.72
33	4.58	4.47
34	2.50	2.58
35	1.54	1.56
36	0.77	0.80
37	0.91	0.93
38	3.30	3.33
39	6.95	6.86
40	4.17	4.24
41	2.38	2.45
42	5.25	5.51
43	0.46	0.43
44	3.92	3.96
45	5.35	5.49
46	0.80	0.79
47	2.55	2.58
48	0.79	0.85
49	1.74	1.80
50	0.67	0.66
51	1.21	1.21
52	4.04	4.16
53	2.53	2.62
54	1.39	1.40
55	6.55	6.79
56	3.38	3.50
57	6.72	6.85
58	2.35	2.43
59	0.83	0.86
60	0.91	0.92
61	3.24	3.42
62	2.60	2.63

63	4.52	4.57
64	3.80	3.83
65	2.81	2.86
66	0.66	0.67
67	1.94	2.00
68	7.20	7.49
69	0.63	0.62
70	2.96	3.04
71	3.65	3.51
72	5.32	5.50
73	0.89	0.89
74	1.14	1.14
75	2.72	2.79
76	4.66	4.83
77	5.90	6.26
78	6.00	5.72
79	1.91	1.89
80	0.50	0.51
81	0.64	0.67
82	0.98	1.02
83	5.83	5.61
84	1.45	1.41
85	5.00	5.24
86	3.15	3.30
87	2.67	2.72
88	3.95	3.90
89	6.40	6.87
90	4.12	4.49
91	2.91	2.80
92	0.39	0.40
93	1.55	1.51
94	5.07	5.27
95	2.34	2.43
96	4.78	5.10
97	0.82	0.85
98	6.92	6.46
99	2.44	2.35
100	6.81	6.52

对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y = 1.0073x + 0.0102$,相关系数 $R^2 =$

0.9941,表明本发明的检测试剂测定非对称二甲基精氨酸临床标本的准确度高。

[0056] 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。

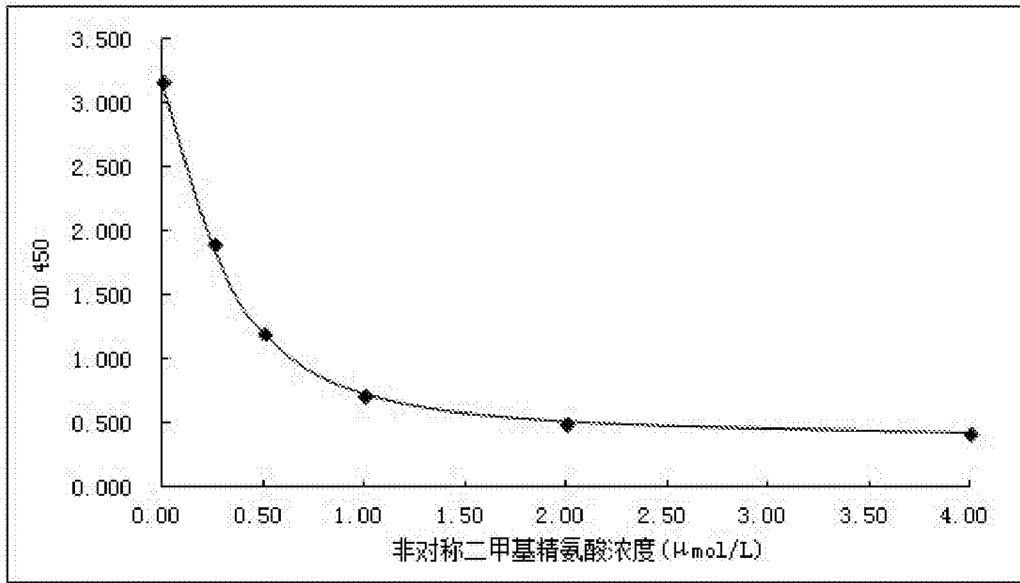


图1

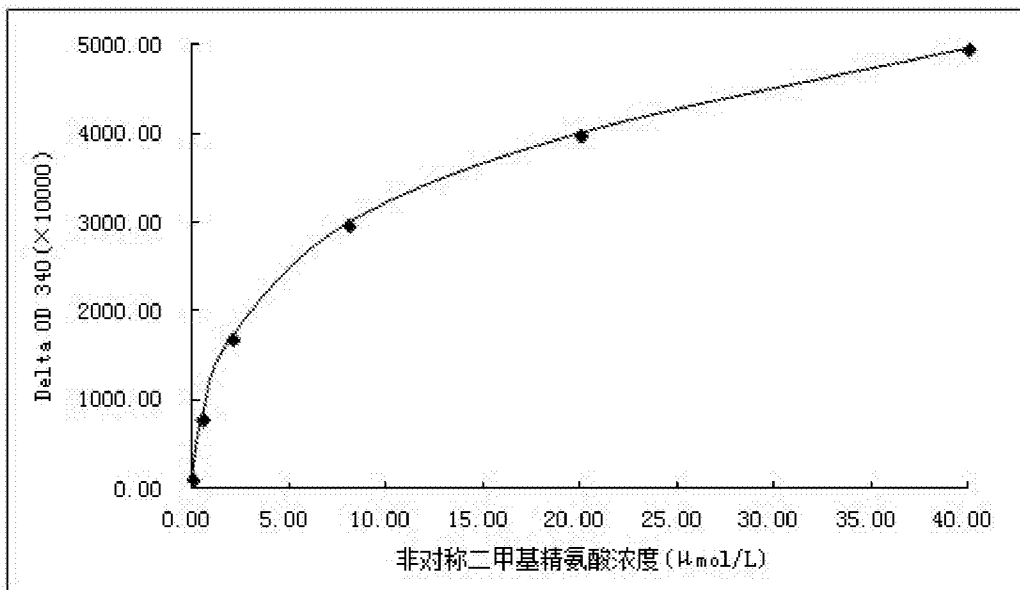


图2

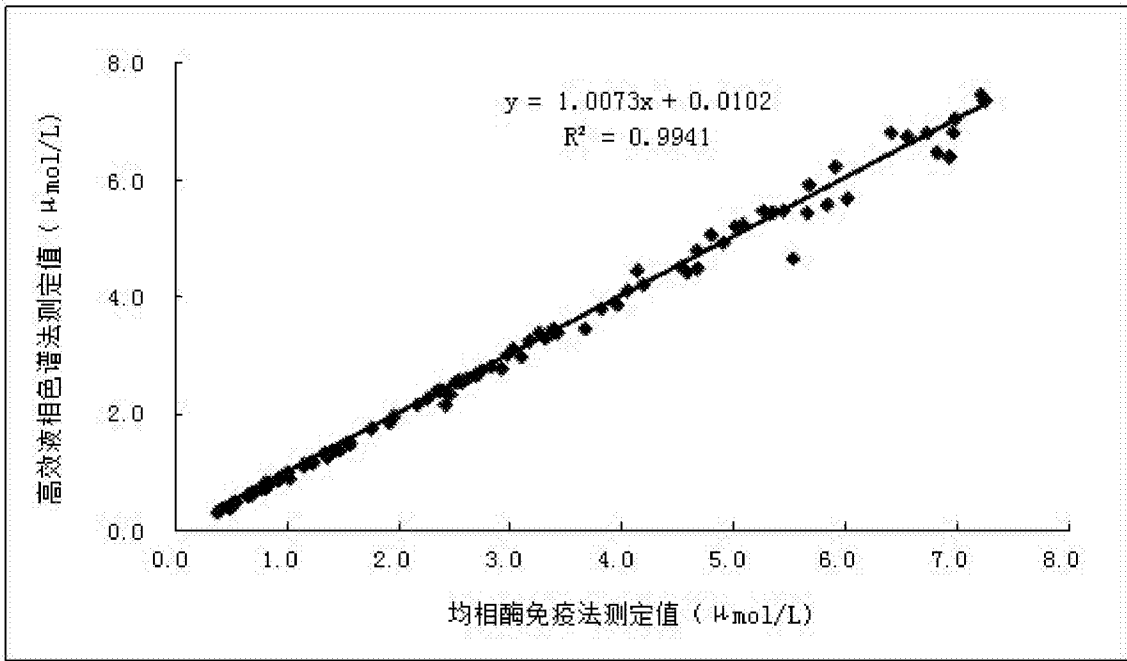


图3

专利名称(译)	非对称二甲基精氨酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法		
公开(公告)号	CN105753969A	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	CN201610209278.9	申请日	2016-04-06
[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	付卫 虞留明		
发明人	付卫 虞留明		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/795 C07K14/47 C07K1/34 C07K16/44 G01N35/00 G01N33/53 G01N33/535 G01N33/533		
CPC分类号	C07K14/765 C07K14/47 C07K14/795 C07K16/44 C07K2317/00 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/535 G01N35/00 G01N2800/044 G01N2800/321 G01N2800/323 G01N2800/324 G01N2800/325		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了非对称二甲基精氨酸免疫原、抗体和检测试剂及制备方法。本发明制备的非对称二甲基精氨酸免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗非对称二甲基精氨酸特异性抗体，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非对称二甲基精氨酸检测试剂，可以精确快速地确定血清、血浆及尿液等生物样品中的非对称二甲基精氨酸含量。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，还能有效降低非对称二甲基精氨酸检测成本，有利于临床大规模推广使用。

