



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102169118 B

(45) 授权公告日 2012.01.25

(21) 申请号 201110095478.3

(22) 申请日 2011.04.15

(73) 专利权人 华瑞同康生物技术(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区高心中一道生物孵化器大楼 2-304

(72) 发明人 周际 施艾马克·华科奥斯特 李远

(74) 专利代理机构 深圳市世纪恒程知识产权代理事务所 44287

代理人 胡海国

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(56) 对比文件

US 2007065834 A1, 2007.03.22, 全文.

EP 1385932 A2, 2004.02.04, 全文.

CN 1860227 A, 2006.11.08, 全文.

CN 101490085 A, 2009.07.22, 全文.

Nicola Machella et al..

Immunofluorescent detection of 8-oxo-dG and PAH bulky adducts in fish liver and mussel digestive gland. 《Aquatic Toxicology》. 2005, 第 71 卷(第 4 期), 335-343.

审查员 杨冀川

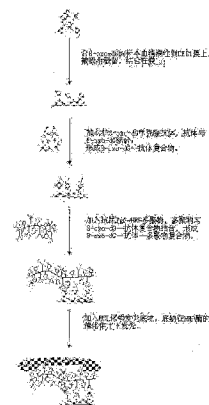
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

血清或尿液中 8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法

(57) 摘要

本发明公开了 8-氧代脱氧鸟苷的检测方法,包括:将含 8-oxo-dG 待测物加入到固相载体;加入抗 8-oxo-dG 抗体,使 8-oxo-dG 与抗 8-oxo-dG 抗体反应形成特异性结合物;加入抗鼠 IgG-HRP 多聚物,使抗鼠 IgG-HRP 多聚物与特异性结合物反应形成 8-oxo-dG、抗 8-oxo-dG 抗体和抗鼠 IgG-HRP 多聚物的三元复合物;加入 ECL 化学发光底物,ECL 化学发光底物在三元复合物作用下发光;检测 ECL 化学发光底物的发光强度,根据发光强度计算待测物中 8-oxo-dG 的含量。本发明的方法,回收率高、检测限低、交叉反应低、操作简单,检测时间短、无需复杂的前期处理和采用贵重仪器,检测成本低。



1. 一种血清或尿液中 8- 氧代脱氧鸟苷的定量检测方法, 包括步骤:

将含 8-oxo-dG 的待测物加入到固相载体中;

向固相载体中加入抗 8-oxo-dG 抗体, 使 8-oxo-dG 与抗 8-oxo-dG 抗体反应形成特异性结合物;

向固相载体中加入抗鼠 IgG-HRP 多聚物, 使抗鼠 IgG-HRP 多聚物与所述特异性结合物反应形成 8-oxo-dG、抗 8-oxo-dG 抗体和抗鼠 IgG-HRP 多聚物的三元复合物;

向固相载体中加入 ECL 化学发光底物, 所述 ECL 化学发光底物在所述三元复合物的作用下发光;

通过化学发光数字成像分析仪获得相应的灰度值, 根据灰度值计算待测物中 8-oxo-dG 的含量, 最低检出限为 0.2734ng/ml, 检测结果偏差小于 15%。

2. 根据权利要求 1 所述的血液或尿液中 8- 氧代脱氧鸟苷的定量检测方法, 其特征在于, 所述固相载体为 DE81 膜。

血清或尿液中 8- 氧代脱氧鸟苷的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和免疫学领域,尤其是涉及一种血清或尿液中 8- 氧代脱氧鸟苷的定量检测方法。

背景技术

[0002] 机体在细胞中的线粒体、微粒体、质膜和胞质中的酶系统和非酶系统在代谢过程中,可以产生活性氧自由基。同时机体在受到外源化学物质和电离辐射等条件下也可能产生活性氧自由基。所述活性氧自由基可以与 DNA 的碱基形成加合物如脱氧鸟苷,所述脱氧鸟苷加合物在羟化酶的作用下,形成羟基脱氧核苷,其中 8- 氧代脱氧鸟苷 (8-oxo-dG) 是羟基脱氧核苷中的主要一种,全名为 8- 羟基 -2-, - 脱氧鸟苷 (8-oxo-dG),其化学结构如图 1 所示。

[0003] 8-oxo-dG 可直接引起基因突变和癌基因表达。如 Kuchino 等报道 :8- 羟基脱氧鸟嘌呤具有同任何碱基配对的能力。脱氧鸟嘌呤的 C₈ 被羟基化后,脱氧鸟嘌呤同胞嘧啶特异性配对的能力丧失,导致 DNA 复制时碱基的错配,从而出现多种基因突变的形式。Wood 等曾证实 :在大肠杆菌中,8- 氧代脱氧鸟苷具有诱导 G → T 置换的能力。Cheng 等也报道 :8- 氧代脱氧鸟苷可以引起 G → T 和 A → C 置换。8- 氧代脱氧鸟苷可以引起突变,ras 基因激活的主要原因为点突变。Kamiya 等^[4]证实 :用人工合成的第 12 位密码子碱基 G 置换的原癌基因 c-Ha-ras 转染 NTS3T3 细胞,可使部分细胞发生恶性转化。在已知的大约 20 种 DNA 的加合物中,8-oxo-dG 易于检出,且 8-oxo-dG 与基因突变明显相关,8-oxo-dG 已成为研究最多的 DNA 碱基氧化损伤修复产物,成为研究 DNA 损伤修复最常用的生物学标志物 (Biomarker)。

[0004] 8-oxo-dG 作为内源性或外源性因素对 DNA 氧化损伤作用的生物标志物,是一种极有前景的生物标志,通过 8-oxo-dG 的检测可以评估体内氧化损伤和修复的程度。氧化应激与 DNA 损伤的相互关系,对研究退行性疾病、衰老机制、癌发生机制、环境毒物与氧化应激的关系等具有重要意义,也可以用来评价抗氧化剂治疗 DNA 氧化损伤的效果。目前 8-oxo-dG 的检测方法主要有 ³²P 后标记法、免疫荧光组织化学检测法、酶联免疫吸附 (ELISA) 法、高效液相色谱 - 电化学法、气质联用分析法和高效毛细管电泳等。

[0005] ³²P 后标记法,³²P 后标记技术是 20 世纪 90 年代后发展起来的,具有灵敏度高、样品用量少、应用范围广等优点。其操作过程包括 :DNA 的消化、标记、层析分离、放射自显影。但该方法的特异性有待提高,且容易造成放射性污染。

[0006] 酶联免疫吸附 (ELISA) 法,应用单克隆抗体的 ELISA 法具有很高的灵敏度和很好的重复性。抗 8-oxo-dG 多克隆抗体的发展和单克隆抗体的使用为免疫亲和柱的发展提供了条件,可以用于分析生物样品,尤其是尿中 DNA 和 RNA 的氧化损伤产物。该方法不用对 DNA 进行分解处理,不需使用昂贵的仪器,测定时间短,样本预处理程序简单,是一种很有应用价值的方法。

[0007] 高效液相色谱 - 电化学检测器分析 (HPLC-ECD) 法,是将 DNA 的酶水解样品通过 HPLC 分离后,使用 ECD 进行测定。该方法是 Floyd 等提出的一种定量测定 8-oxo-dG 的有效

方法。HPLC-ECD 在检测 8-oxo-dG 中得到广泛应用,具有较高的灵敏度,其最低检测限大约为 1/50 核苷,所需样品量少,对机体不会产生损伤性、且选择性好,对组织细胞 DNA 及尿中 8-oxo-dG 均可检测,是目前应用广泛、较为成熟的方法。

[0008] 气质联用分析法 (GC-MS),是一种将气相色谱仪与质谱仪联合使用检测方法,可为 DNA 损伤中的氧化产物的鉴定提供可靠而明确的数据,其检测下限为 1/50 核苷。然而由于质谱仪价格昂贵,无法广泛应用于实验室的检测。同时 DNA 碱基必须首先进行衍生化反应,这一过程容易导致副产物的形成,从而容易产生假阳性的显示结果。

[0009] 高效毛细管电泳 (HPCE) 是利用 8-oxo-dG 与其他脱氧鸟苷在电场中泳动方向和速率的不同而进行分离,应用保留时间而进行定性,通过外标法来进行定量。其优点是进样量小、分离效率高、保留时间短,比 HPLC 分离更为迅速,使用紫外检测器灵敏度较低,应用电化学检测器则大大提高灵敏度。

[0010] 上述的多种检测方法中,都存在某些缺陷,如利用液相色谱-电化学法检测的过程中,存在酶解不完全、生存副产物、放射性污染、检测周期长,且检测成本高,只能局限于很小范围的临床应用。ELISA 免疫学方法相比 HPLC 法存在交叉反应使测定结果偏高。

[0011] 从现有的上述检测方法可知,将 8-oxo-dG 与其他干扰物质分离,检测仪器对 8-oxo-dG 的特异性响应的灵敏度还有待提高。

发明内容

[0012] 本发明的主要目的在于提供一种血液或尿液中 8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法,避免免疫检测的非特异性交叉,简化检测步骤。

[0013] 本发明提出一种血清或尿液中 8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法,包括步骤:

[0014] 将含 8-oxo-dG 的待测物加入到固相载体中;

[0015] 向固相载体中加入抗 8-oxo-dG 抗体,使 8-oxo-dG 与抗 8-oxo-dG 抗体反应形成特异性结合物;

[0016] 向固相载体中加入抗鼠 IgG-HRP 多聚物,使抗鼠 IgG-HRP 多聚物与所述特异性结合物反应形成 8-oxo-dG、抗 8-oxo-dG 抗体和抗鼠 IgG-HRP 多聚物的三元复合物;

[0017] 向固相载体中加入 ECL 化学发光底物,所述 ECL 化学发光底物在所述三元复合物的作用下发光;

[0018] 通过化学发光数字成像分析仪获得相应的灰度值,根据灰度值计算待测物中 8-oxo-dG 的含量,最低检出限为 0.2734ng/ml,检测结果偏差小于 15%。

[0019] 优选地,所述血液或尿液中 8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法,所述固相载体为 DE81 膜。

[0020] 本发明提供的血液或尿液中 8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法,相对现有检测方法,其回收率高、检测限低、交叉反应低、操作简单,检测时间短(不超过 3.5 小时)、无需对样本进行复杂的前期处理,以及无需采用贵重仪器,检测成本低。

附图说明

[0021] 图 1 是 8-羟基-2'-脱氧鸟苷的化学结构图;

[0022] 图 2 是本发明的 8-oxo-dG 含量检测原理示意图;

[0023] 图 3 是本发明根据标准样本浓度及其对应的灰度值,拟合而成的标准曲线图。

具体实施方式

[0024] 下面通过实施例对本发明进行进一步的说明。

[0025] 参见图 2,本发明检测 8-oxo-dG 的原理如下:将 8-oxo-dG 与抗 8-oxo-dG 抗体反应形成特异性结合物;向特异性结合物加入抗鼠-HRP 多聚物,使抗鼠-HRP 多聚物与所述特异性结合物反应形成 8-oxo-dG、抗 8-oxo-dG 抗体和抗鼠-HRP 多聚物的三元复合物;然后向三元复合物中加入 ECL 化学发光底物,所述 ECL 化学发光底物在所述三元复合物的作用下发光;然后检测 ECL 化学发光底物的发光强度,根据发光强度计算待测物中 8-oxo-dG 的含量。

[0026] 实施例 1:8-oxo-dG 含量的检测

[0027] 本发明采用上述检测方法检测待测物中 8-oxo-dG 的含量,根据标准品测量结果做出的标准曲线计算出待测物中 8-oxo-dG 的含量。制作标准曲线需用到 8-oxo-dG 标准样本浓度包括:20ng/ml、10ng/ml、4ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml 共 6 个不同浓度的标准液。该 6 各不同浓度的标准样本是通过 PBS 缓冲液(磷酸二氢钠 0.01M/L,NaCl 0.15M/L,pH 7.4)对 8-oxo-dG 标准品稀释成的。

[0028] 制作标准曲线、检测待测物中 8-oxo-dG 含量,以及分析特异性的具体过程如下:

[0029] S1、将内含 DE81 膜的模板平放在干净滤纸上,将浓度为 0ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、4ng/ml、10ng/ml、20ng/ml 的标准液依次点样 DE81 膜中编号为 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7 孔内,每孔点样 3 μ l。将浓度为 15ng/ml 的待检样本点样到 DE81 膜中编号为 A8、A9 孔内,每个孔点样 3 μ l;浓度为 1.5ng/ml 的待检样本点样到 A10 和 A11 孔内,每个孔点样 3 μ l。将浓度为 10ng/ml 的 dG 干扰样本点样到编号为 A12 和 A13 孔内,每个孔点样 3 μ l。将 PBS 缓冲液点样到编号为 A14 至 A23 孔内,每个孔内点样 3 μ l。将 4ng/ml 的标准样本点样的编号为 A24 孔内,点样 3 μ l。

[0030] S2、将所述模板置于室温下 30 ~ 60 分钟使 DE81 膜干透至自然翘起。

[0031] S3、打开模板将 DE81 膜放入反应盒内,用去离子水振摇洗膜 2 次,每次 1 分钟,倒掉洗涤后的去离子水,然后加入封闭液(1% BSA,用 PBS 稀释,BSA 要求使用片段 5,纯度 95%以上),将反应盒置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温箱内振摇封闭 20 分钟。

[0032] S4、倒掉封闭液,加入通过 PBS 稀释的抗 8-oxo-dG 抗体,并将反应盒置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温箱内振摇孵育 60 分钟。

[0033] S5、倒掉多余的抗 8-oxo-dG 抗体液,并用洗涤液(PBS,0.1% Tween-20)振摇洗涤 3 次,每次洗涤 5 分钟。

[0034] S6、加入通过 PBS 稀释的抗鼠 IgG-HRP 聚合物,并将反应盒置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温箱内振摇孵育 10 分钟。

[0035] S7、用洗涤液(PBS,0.1% Tween-20)振摇洗涤 3 次,每次洗涤 5 分钟。加入 ECL 底物液液,反应盒中的 DE81 膜过膜浸湿,开始计时,精确反应 1 分钟后,用吸水纸将 DE81 膜吸干,然后将 DE81 膜放入压膜透明胶片内,挤干剩余的溶液。

[0036] S8、6 分钟后将 DE81 膜放入化学发光数字成像分析仪内拍摄并分析,得到相应的灰度值。

[0037] 编号为 A1 至 A24 孔内对应样品的灰度值。ECL 试剂从反应开始 6 分钟后达到峰值,此时拍摄获取的灰度值比较准确。

[0038] 其中,7 个不同浓度的标准样本对应的灰度值如下表 1。

[0039] 表 1

[0040]

孔编号	A7	A6	A5	A4	A3	A2	A1
浓度	20ng/ml	10ng/ml	4ng/ml	2ng/ml	1ng/ml	0.5ng/ml	0ng/ml
灰度值	139158.6	77043.3	29609	15821.1	7598.3	3785.6	0

[0041] 根据上述 7 个标准样本的不同浓度值和对应的灰度值,用直线数学模型拟合,得到如图 3 的标准曲线,其相关系数 R^2 值为 0.9973。

[0042] 计算分析内精密度:

[0043] 同一次实验内重复测定精密度样本,计算灰度测量值的平均值(\bar{x})和标准差(S),则分析内精密度(CV%)= $S/\bar{x} \times 100\%$ 。

[0044] 其中,本实施例中的样本浓度为 4ng/ml,该浓度样本测两次,其在 DE81 膜上对应为 A5 和 A24,对应的灰度值分别为:25984、28719,从而计算得出:灰度平均值 $X_1 = 27351.5$; 标准差 $S_1 = 2461.6$; 分析内精密度(CV%)= $S/\bar{x} \times 100\% = 2461.6/27351.7 \times 100\% = 8.99\%$ 。

[0045] 分析间精密度:

[0046] 连续三个不同的实验中重复测定精密度样本 ($n \geq 10$, 样本浓度为 4ng/ml), 计算灰度测量值的平均值(\bar{x})和标准差(S),分析间精密度(CV%)= $S/\bar{x} \times 100\%$ 。

[0047] 用另外两个 DE81 膜重复上述步骤 S2-S8,检测浓度为 4ng/ml 标准样本的灰度值。

[0048] 其中,三次检测的浓度为 4ng/ml 的标准样本对应的灰度值分别为:27750、27370; 28669、30533; 26898、26397,从而计算得出:灰度平均值 $X_2 = 28269.4$; 标准差 $S_2 = 3742.5$; 则分析间精密度(CV%)= $S/\bar{x} \times 100\% = 3742.5/28269.4 \times 100\% = 13.24\%$ 。

[0049] 检测限

[0050] 平行测定 10 个 PBS 缓冲液的灰度测量值,其在 DE81 膜上对应为 A14 至 A23,根据标准曲线计算各平行样本的浓度值,求得样本平均值(\bar{x})与标准差(S);则最低检出限= $\bar{x} + 2S$

[0051] 其中,上述 10PBS 缓冲液的灰度测量值分别为 1788、1821、1220、970、1208、1630、1097、1927、882、2122,根据标准曲线计算得出 10PBS 缓冲液中 8-oxo-dG 含量分别为 0.21、0.21、0.14、0.11、0.14、0.18、0.12、0.22、0.10、0.25ng/ml,因此计算得出:10 个 PBS 样本的平均浓度为 0.170738ng/ml,标准差 S 为 0.05133,最低检出限= $\bar{x} + 2S = 0.170738 + 2 * 0.05133 = 0.2734 \text{ ng/ml}$ 。

[0052] 回收率

[0053] 用 PBS 将 8-oxo-dG 标准品稀释成 15ng/ml 和 1.5ng/ml 两个浓度作为回收率测试样本,双孔平行测试,根据其灰度值及标准曲线计算得到测试样本浓度 A;回收率₁ = $A/15 \times 100\%$;回收率₂ = $A/1.5 \times 100\%$ 。

[0054] 其中,浓度为 15ng/ml 标准样本在 DE81 膜上对应为 A8 和 A9,其对应的灰度值为 51386、48681,根据标准曲线计算得出浓度分别为 13.3ng/ml、12.6ng/ml;浓度为 1.5ng/ml 标准样本在 DE81 膜上对应为 A10 和 A11,其对应的灰度值为 51388、5668,根据标准曲线计算得出浓度分别为 1.26ng/ml、1.39ng/ml。

[0055] 对于浓度为 15ng/ml 标准样本的回收率 $\eta = A/15 \times 100\% = (13.3+12.6)/15 \times 100\% = 86.3\%$ 。

[0056] 对于浓度为 1.5ng/ml 标准样本的回收率 $\eta = A/1.5 \times 100\% = (1.26+1.39)/1.5 \times 100\% = 88.3\%$ 。

[0057] 从上述的 15ng/ml 和 1.5ng/ml 标准样本检测结果可知其偏差小于 15%。

[0058] 特异性

[0059] 选用脱氧鸟苷 (dG) 作为干扰试验测试样本,将 dG 稀释成 10ng/ml,双孔平行测试,根据其灰度值及标准曲线计算得到测试样本浓度 B。

[0060] 本实例中, dG 样本在 DE81 膜上对应为 A12 和 A13,其对应的灰度值分别为 1264、734,根据标准曲线计算得出对应的浓度分别为 0.31ng/ml 和 0.18ng/ml,由此可见其交叉反应低,不影响 8-oxo-dG 含量的正常检测。

[0061] 从上述实施例可以看出,本发明的 8-oxo-dG 检测的方法,回收率高、检测限低,交叉反应低,同时其操作简单,检测时间短(不超过 3.5 小时),无需对样本进行复杂的前期处理,以及无需采用贵重仪器,检测成本低。因此可广泛利用本发明的 8-oxo-dG 检测方法,可以检测人类血清或尿液中 8-oxo-dG 的含量。

[0062] 以上所述 DE81 膜购自英国 WHATMAN,其产品货号为 3658-917。该 DE81 膜具有如下性能:薄(0.20mm)、流速为 95mm/30min、离子交换强度为 18.0 μ eq/cm²、所用材料为二乙氨基乙基纤维素 (DEAE) 纸,其带有二乙氯乙基功能团的弱碱性阴离子交换剂。

[0063] 所述 8-oxo-dG 标准品:为从 SIGMA 购买获得,其纯度级别为 $\geq 98\%$ LDC,全称为 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine,英文缩写为 8-oxo-dG,其分子式: $C_{10}H_{13}N_5O_5$;分子量:283.24;货号:88847-89-6。

[0064] 所述抗鼠 IgG-HRP 聚合物:为抗鼠葡聚糖骨架多聚 IgG-HRP,该聚合物用葡聚糖链为骨架,把多个(50~100个)抗鼠 IgG 及 HRP 酶分子标记在葡聚糖链上,形成一个抗体-酶链条,可以将检测信号放大,同时缩短孵育时间,该抗鼠 IgG-HRP 聚合物由福州迈新生物技术有限公司生产制备,货号为 kit-5903。

[0065] 所述 ECL 发光底物:主要成分是鲁米诺及其衍生物,鲁米诺及其衍生物在过氧化物酶如 HRP 催化作用下,与过氧化物如 H₂O₂ 反应发光。该 ECL 发光底物由 PIERCE 厂家生产。

[0066] 所述化学发光数字成像分析仪:用于拍摄免疫印迹发出的光信号,可以分析标准品等斑点灰度值,生成标准曲线并根据标准曲线计算样本值。该化学发光数字成像分析仪由华瑞同康生物技术(深圳)有限公司生产,其对应的医疗器械注册证号为粤食药监械(准)字 2009 第 2400742 号。

[0067] 所述抗 8-oxo-dG 抗体全称为鼠抗人 8-oxo-dG 单克隆抗体,由美国 abcam 公司生产,其产品货号为 ab48508。抗体类型为 IgG₁,分子量约 150KD。

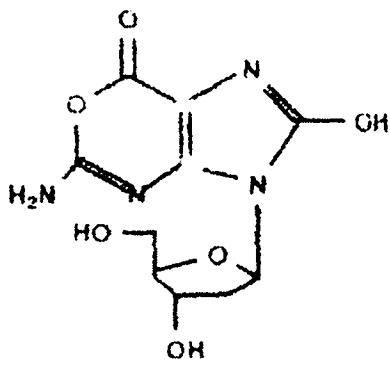


图 1

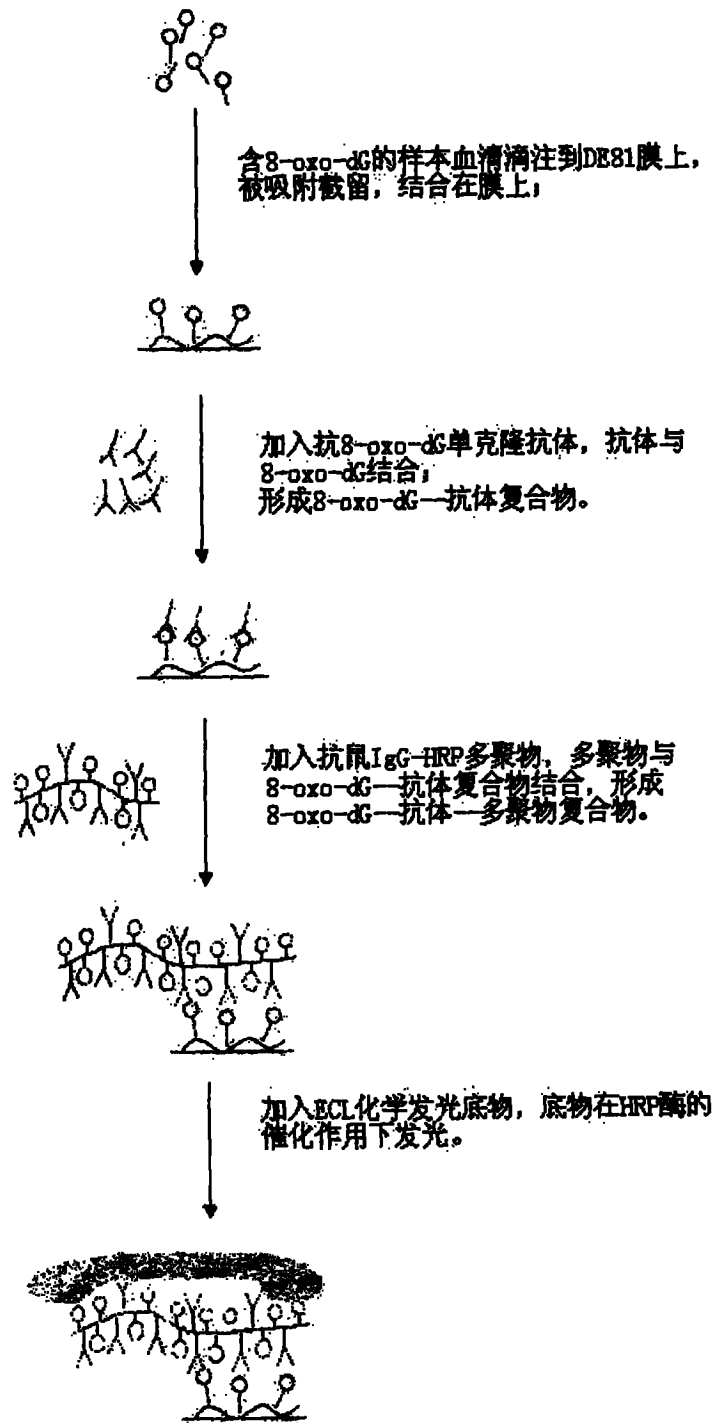


图 2

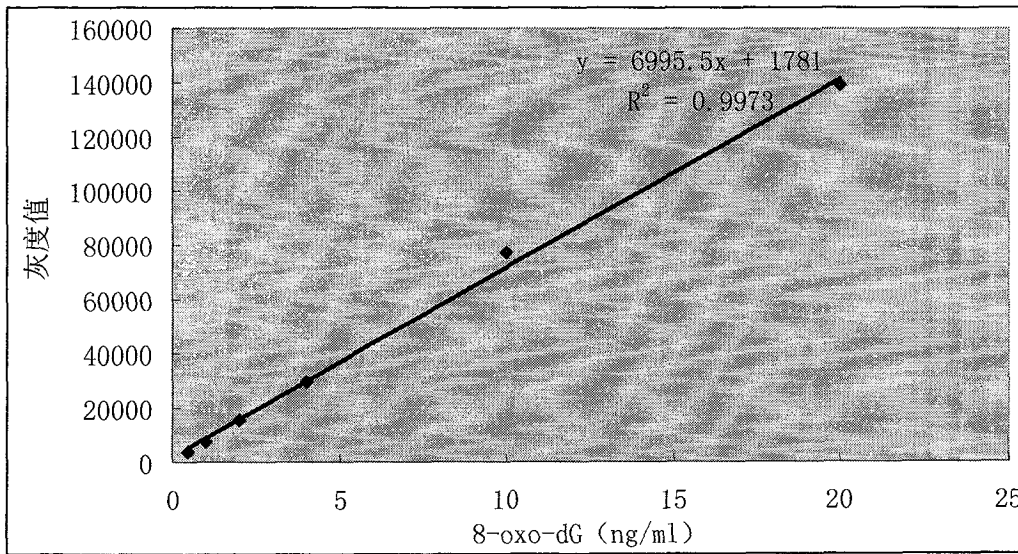


图 3

专利名称(译)	血清或尿液中8-氧代脱氧鸟苷的定量检测方法		
公开(公告)号	CN102169118B	公开(公告)日	2012-01-25
申请号	CN201110095478.3	申请日	2011-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华瑞同康生物技术(深圳)有限公司		
[标]发明人	周际 施艾马克·华科奥斯特 李远		
发明人	周际 施艾马克·华科奥斯特 李远		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
代理人(译)	胡海国		
其他公开文献	CN102169118A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了8-氧代脱氧鸟苷的检测方法，包括：将含8-oxo-dG待测物加入到固相载体；加入抗8-oxo-dG抗体，使8-oxo-dG与抗8-oxo-dG抗体反应形成特异性结合物；加入抗鼠IgG-HRP多聚物，使抗鼠IgG-HRP多聚物与特异性结合物反应形成8-oxo-dG、抗8-oxo-dG抗体和抗鼠IgG-HRP多聚物的三元复合物；加入ECL化学发光底物，ECL化学发光底物在三元复合物作用下发光；检测ECL化学发光底物的发光强度，根据发光强度计算待测物中8-oxo-dG的含量。本发明的方法，回收率高、检测限低、交叉反应低、操作简单，检测时间短、无需复杂的前期处理和采用贵重仪器，检测成本低。

