



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107132349 A

(43)申请公布日 2017.09.05

(21)申请号 201710294548.5

(22)申请日 2017.04.28

(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号楼北二层

(72)发明人 虞留明 胡义忠

(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 薛海霞 董建林

(51) Int. Cl.
G01N 33/535(2006.01)
G01N 21/31(2006.01)
G01N 30/02(2006.01)

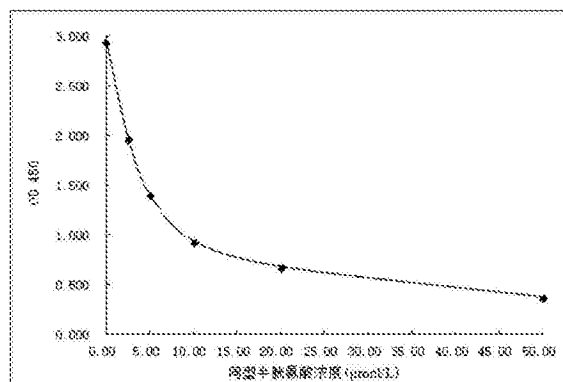
权利要求书3页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法
及检测方法

(57)摘要

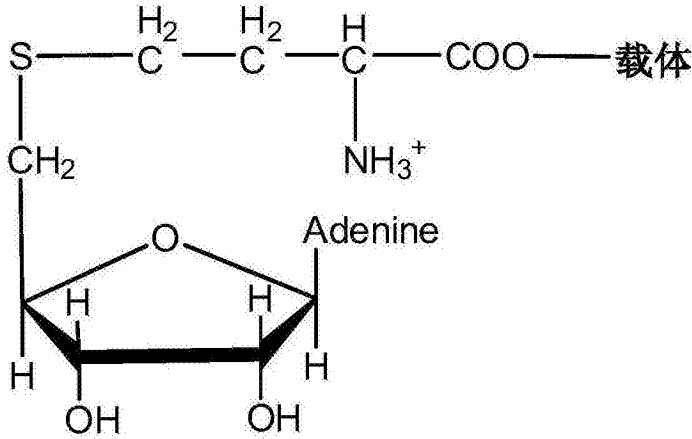
本发明公开了一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法及检测方法,属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的同型半胱氨酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗同型半胱氨酸特异性抗体,并且与常见的62种药物无任何交叉反应;由该抗体制备得到的同型半胱氨酸检测试剂,可以精确快速地确定血清或血浆等生物样品中的同型半胱氨酸含量。与市场上现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较,本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低同型半胱氨酸检测成本,有利于临床大规模推广使用。



1. 一种同型半胱氨酸自动化检测试剂, 含有抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体和酶试剂, 其特征在于: 所述的酶试剂由S-腺苷同型半胱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;

所述的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体由S-腺苷同型半胱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S-腺苷同型半胱氨酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原, 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。

2. 根据权利要求1所述的一种同型半胱氨酸自动化检测试剂, 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S-腺苷同型半胱氨酸免疫原对实验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。

3. 一种如权利要求1所述的同型半胱氨酸自动化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; 将抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:250~1:7500;

(2) 试剂B: 将S-腺苷同型半胱氨酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中, S-腺苷同型半胱氨酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:250~1:7500;

其中, S-腺苷同型半胱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7.5~22.5mg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=8.5~9.0; 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、0.375~1.125mL三乙胺; 加热到30~35摄氏度, 再一次性加入1~3mL二甲基亚砜, 摇匀后静置5~15s;

(2) S-腺苷同型半胱氨酸的激活: 在无水状态下称取5~15mg S-腺苷同型半胱氨酸, 溶解于300~900μL二甲基甲酰胺中; 使上述溶液温度降到-10~-20℃; 加入1.5~4.5μL三丁

胺,加入1.5~4.5 μ L N-甲基吗啉并在-10~-20 $^{\circ}$ C搅拌15~30分钟;加入0.75~2.25 μ L氯甲酸异丁酯;加入0.1~2 μ L碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;0.1~2 μ L甲醇;5~15mg BSA;-10~-20 $^{\circ}$ C搅拌30~60分钟;

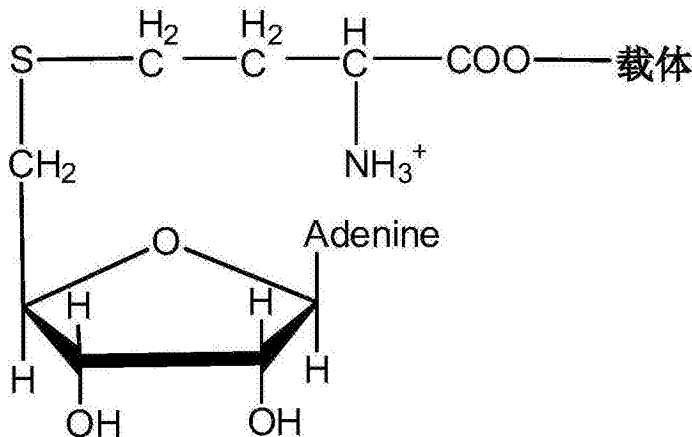
(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与S-腺苷同型半胱氨酸的连接:将步骤(2)激活的S-腺苷同型半胱氨酸溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的温度为30-35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜;

(4) 纯化产物。

4. 一种如权利要求3所述的同型半胱氨酸自动化检测试剂的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,S-腺苷同型半胱氨酸的激活:在无水状态下称取5~15mg S-腺苷同型半胱氨酸,溶解于300~900 μ L二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-15~-20 $^{\circ}$ C;加入1.5~4.5 μ L三丁胺,加入1.5~4.5 μ L N-甲基吗啉并在-15~-20 $^{\circ}$ C搅拌15~30分钟;加入0.75~2.25 μ L氯甲酸异丁酯;加入0.1~2 μ L碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;0.1~2 μ L甲醇;5~15mg BSA;-15~-20 $^{\circ}$ C搅拌30~60分钟。

5. 一种如权利要求3所述的同型半胱氨酸自动化检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体由S-腺苷同型半胱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S-腺苷同型半胱氨酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原,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;

所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原的制备步骤如下:

(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 S-腺苷同型半胱氨酸、1.75~5.25mL二甲基甲酰胺、1.5~2.5mL二氧六环、15~25mg琥珀酸酐、1.75~5.25mL乙醇、3.5~10.5mL 10mM, pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60min,以上操作在暗处进行;

(3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8 $^{\circ}$ 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S-腺苷同型半胱氨酸免疫原。

6. 一种如权利要求3所述的同型半胱氨酸自动化检测试剂的制备方法,其特征在于:抗

S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体的制备过程包含以下步骤：

(1) 用PBS将S-腺苷同型半胱氨酸免疫原稀释至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S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体。

7. 一种如权利要求3所述的同型半胱氨酸自动化检测试剂的制备方法,其特征在于:纯化产物的具体步骤为: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。

8. 同型半胱氨酸含量的检测方法,其特征在于:采用权利要求3-7任意一项所述的制备方法制备得到同型半胱氨酸自动化检测试剂并用于同型半胱氨酸含量的检测,包括如下步骤:

1) 将待测样本与抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体接触;

2) 根据待测样本中同型半胱氨酸与抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中同型半胱氨酸的含量;

所述待测样本为血清或血浆。

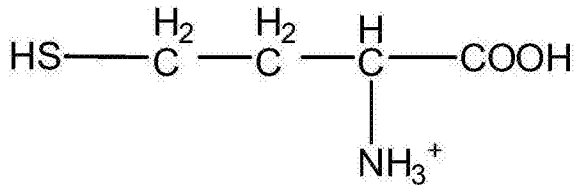
一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测试剂领域,具体涉及一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 同型半胱氨酸(Homocysteine,HCY),其结构式如式(II)所示:



[0003]

式(II)

[0004] 同型半胱氨酸又称高半胱氨酸,是由细胞内的甲硫氨酸去甲基后形成的一种硫醇氨基酸。同型半胱氨酸与心血管疾病密切相关,它是评估心血管疾病发生过程中的一个重要的风险因子,血液中升高的同型半胱氨酸会刺激血管壁引起动脉血管损伤,导致炎症和管壁的斑块形成,最终引起心脏血流受阻。同型半胱氨酸检测在临床上已有多年应用史,其安全性及可靠性已得到验证。另有研究表明,同型半胱氨酸可作为神经管畸形、先兆子痫、帕金森氏病、老年痴呆、胎儿生长迟缓、动脉粥样硬化、慢性肾功能不全、牛皮癣、维生素B₁₂缺乏、叶酸缺乏等多种疾病的临床辅助诊断依据,其临床意义极为重要。

[0005] 目前,临床上测定血清或血浆中同型半胱氨酸的方法较多,但现有方法都较为费时费力,且检测成本较高,不适合大批量临床样品的测定。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的同型半胱氨酸检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的同型半胱氨酸测定试剂盒已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对同型半胱氨酸的高通量、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。

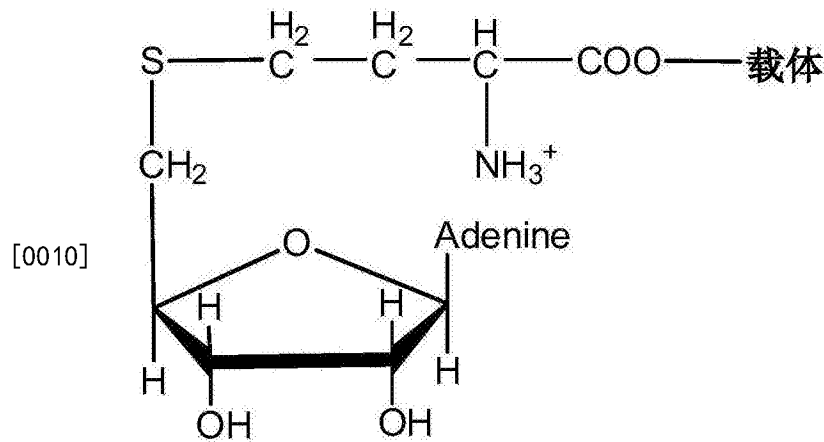
发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用独特的S-腺苷同型半胱氨酸制备免疫原性强的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原及其抗体,用该抗体制备的同型半胱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同型半胱氨酸高通量、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,还能有效降低同型半胱氨酸检测成本,有利于临床推广使用。

[0007] 本发明的一个目的在于提供一种同型半胱氨酸均相酶免疫检测试剂,含有抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体和酶试剂,其特征在于:所述的酶试剂由S-腺苷同型半胱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;

[0008] 所述的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体由S-腺苷同型半胱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S-腺苷同型半胱氨酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

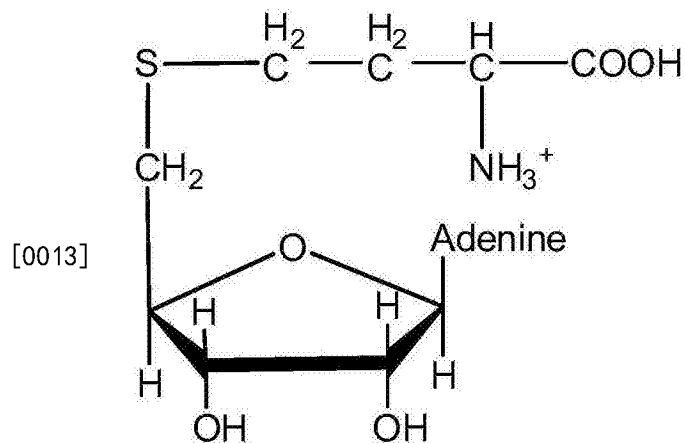
[0009] 所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

[0011] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽。优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白,更优选为血清白蛋白,进一步优选为牛血清白蛋白。

[0012] 所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原由S-腺苷同型半胱氨酸与上述载体连接而成,S-腺苷同型半胱氨酸的化学结构如式(III)所示:



式(III)

[0014] 所述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原的制备步骤如下:

[0015] (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;

[0016] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100~300mg S-腺苷同型半胱氨酸、1.75~5.25mL二甲基甲酰胺、1.5~2.5mL二氧六环、15~25mg琥珀酸酐、1.75~5.25mL乙醇、3.5~10.5mL 10mM,pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60min,以上操作在暗处进行;

[0017] (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S-腺苷同型半胱氨酸免疫原。

[0018] 一种抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体,由上述的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原免

疫实验动物后生产得到。

[0019] 所述的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体由上述制得的S-腺苷同型半胱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,具体步骤如下:

[0020] (1) 用PBS将上述合成的BSA-S-腺苷同型半胱氨酸免疫原稀释至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;

[0021] (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;

[0022] (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S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体。

[0023] 本发明的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与S-腺苷同型半胱氨酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0024] 本发明的抗体为采用单一的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原对实验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。

[0025] 本发明的另一个目的在于提供同型半胱氨酸均相酶免疫检测试剂的制备方法。

[0026] 同型半胱氨酸均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0027] (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;将抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:250~1:7500,优选为1:1500;

[0028] (2) 试剂B:将S-腺苷同型半胱氨酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,S-腺苷同型半胱氨酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:250~1:7500,优选为1:3000;

[0029] 其中,S-腺苷同型半胱氨酸酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

[0030] (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=8.5~9.0;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、0.375~1.125mL三乙胺;加热到30~35摄氏度,再一次性加入1~3mL二甲基亚砷,摇匀后静置5~15s;

[0031] (2) S-腺苷同型半胱氨酸的激活:在无水状态下称取5~15mg S-腺苷同型半胱氨酸,溶解于300~900μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-10~-20℃;加入1.5~4.5μL三丁胺,加入1.5~4.5μL N-甲基吗啉并在-10~-20℃搅拌15~30分钟加入0.75~2.25μL氯甲酸异丁酯;加入0.1~2μL碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;0.1~2μL甲醇;5~15mg BSA;-10~-20℃搅拌30~60分钟;优选地,步骤(2)各温度范围为-15~-20℃。

[0032] (3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与S-腺苷同型半胱氨酸的连接:将步骤(2)激活的S-腺苷同型半胱氨酸溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的温度为30~35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2~8℃搅拌过夜;

[0033] (4) 纯化产物。其中,步骤(4)纯化产物的具体步骤为: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。

[0034] 本发明的又一个目的在于提供同型半胱氨酸含量的检测方法。同型半胱氨酸含量的检测方法,采用前述的制备方法制备得到同型半胱氨酸均相酶免疫检测试剂并用于同型半胱氨酸含量的检测,包括如下步骤:

[0035] 1) 将待测样本与抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体接触;

[0036] 2) 根据待测样本中同型半胱氨酸与抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中同型半胱氨酸的含量;

[0037] 所述待测样本为血清或血浆。

[0038] 本发明的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体。该抗体特异性高,与同型半胱氨酸的结合力强。由该抗体制备得到的同型半胱氨酸检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的同型半胱氨酸含量。

[0039] 同型半胱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S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体混合在一起。

[0040] 本发明的制备方法中,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备时,加热到30-35摄氏度,再一次性而非逐滴加入1~3mL二甲基亚砷,摇匀后静置5-15s,采用相对室温更高的温度,使得一次性加入二甲基亚砷成为可行,且静置时间也比较短,节约了操作时间,且有助于实现同型半胱氨酸的高通量快速化测定,准确度高,特异性强。S-腺苷同型半胱氨酸的激活过程选取-10~-20℃,尤其是-15~-20℃的温度范围,低于常规的-2至-8摄氏度,有助于提高S-腺苷同型半胱氨酸的激活效率且使得S-腺苷同型半胱氨酸与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合时,混合溶液的温度接近于室温。

[0041] 本发明的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗S-腺苷同型半胱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S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定尿液等生物样品中的同型半胱氨酸含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现同型半胱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。

附图说明

[0042] 图1是同型半胱氨酸的ELISA检测反应曲线;

[0043] 图2是同型半胱氨酸的均相酶免疫反应曲线;

[0044] 图3是同型半胱氨酸均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0045] 实施例一:S-腺苷同型半胱氨酸免疫原的合成

[0046] S-腺苷同型半胱氨酸免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)所示的S-腺苷同型半胱氨酸的末端羧基连接而成,具体步骤如下:

[0047] 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;

[0048] 2.将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg S-腺苷同型半胱氨酸、3.5mL二甲基甲酰胺、1.5mL二氧六环、15mg琥珀酸酐、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,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30min,以上操作在暗处进行;

[0049] 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S-腺苷同型半胱氨酸免疫原。

[0050] 采用以上的制备免疫原的方法,以制备免疫原性更高的免疫原。

[0051] 实施例二:抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体的制备

[0052] 将实施例一制备得到的S-腺苷同型半胱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:

[0053] 1.用PBS将上述合成的S-腺苷同型半胱氨酸免疫原稀释至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。

[0054] 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。

[0055] 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S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体。

[0056] 实施例三:同型半胱氨酸的ELISA检验

[0057] 1.同型半胱氨酸的ELISA检测标准曲线的建立

[0058] (1)标准品的制备

[0059] 将同型半胱氨酸粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液,制备成1mg/mL的储存液。用ELISA缓冲液将储存液依次稀释为50.00 μ mol/L、20.00 μ mol/L、10.00 μ mol/L、5.00 μ mol/L、2.50 μ mol/L和0.00 μ 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。

[0060] (2)利用同型半胱氨酸的ELISA检验方法制备标准曲线

[0061] 用PBS将实施例二中所制备的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体稀释成1:8000的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h;用PBS将上述包被有抗S-腺苷同型半胱氨酸抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200 μ L/孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20 μ L/孔的标准品。再加入100 μ L/孔工作浓度的HRP-S-腺苷同型半胱氨酸偶联物;室温下孵育30min后PBS洗板5次;然后每孔加入100 μ L TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100 μ L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。

[0062] 2.待测样品中同型半胱氨酸含量的检测

[0063] (1)制作待测样品

[0064] 制备方法:将同型半胱氨酸粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1mmol/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0.00,5.00,20.00,45.00 μ mol/L,形成空白、低、中、高浓度的血清样本。该空白血清为不含同型半胱氨酸的健康人血清。

[0065] (2)测试方法

[0066] 利用上述同型半胱氨酸的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。

[0067] (3) 测试结果

[0068] 对照图1中所示的同型半胱氨酸的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中同型半胱氨酸含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中同型半胱氨酸的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0069] 表1同型半胱氨酸的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	5.00	20.00	45.00
[0070] 测试 1	0.00	5.20	21.05	46.99
测试 2	0.01	4.96	22.03	43.85
测试 3	0.02	5.07	20.20	47.30
平均值($\mu\text{mol/L}$)	0.01	5.08	21.09	46.05
回收率(%)	-	101.5	105.5	102.3

[0071] 由表1中结果可知:采用本发明同型半胱氨酸的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的同型半胱氨酸回收率都较高,均 $>90\%$,说明本发明所述的抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体可以用于样本中同型半胱氨酸的检测,并且结果准确度高。

[0072] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0073] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0074] (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 MgCl_2 (3.3mM)和100mg NaCl的溶液中,该溶液 $\text{pH}=8.9$,本步骤在烧杯C中进行。

[0075] (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)、0.75mL三乙胺。

[0076] (3) 加热到35摄氏度,在上述烧杯C中一次性加入2mL二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO),摇匀后静置5-15s。

[0077] 2. S-腺苷同型半胱氨酸的激活:

[0078] (1) 在无水状态下称取10mg上述S-腺苷同型半胱氨酸,溶解于600 μL DMF中。

[0079] (2) 使上述溶液温度降到 -15°C 。

[0080] (3) 加入3 μL 三丁胺(tributylamine);3 μL N-甲基吗啉。

[0081] (4) 加入1.5 μL 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0082] (5) 加入0.1~2 μL 碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;0.1~2 μL 甲醇;5~15mg BSA;

[0083] (6) -15°C 搅拌30分钟。

[0084] 以上原料组合及制备方法有利于提高葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的回收率。

[0085] 值得一提的是,另选取 -8°C 、 -12°C 两个不同温度进行S-腺苷同型半胱氨酸的激活,且在室温下逐滴加入二甲基亚砷,其余条件相同。

[0086] 3. G6PDH与S-腺苷同型半胱氨酸的连接:

[0087] (1) 将上述激活的S-腺苷同型半胱氨酸溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0088] (2) $2-8^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。

[0089] 4. 纯化产物:

[0090] 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。

[0091] 分别采用-8摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-12摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-15摄氏度(35摄氏度一次性加入二甲基亚砷,摇匀静置)3个条件进行S-腺苷同型半胱氨酸的激活,最终得到的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的回收率为87.6%、89.5%、97.1%,回收率指的是加入的G6PDH最终生成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的比率。

[0092] 实施例五:同型半胱氨酸均相酶免疫检测试剂的制备

[0093] 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S-腺苷同型半胱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1:1500。

[0094] 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1:3000。

[0095] 实施例六:同型半胱氨酸均相酶免疫检验及结果

[0096] 1. 获得标准曲线:

[0097] (1) 设置迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0098] (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。

[0099] 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	同型半胱氨酸
试剂 1	240μL
试剂 2	60μL
样本量	13μL
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	405 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	μmol/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.00, 2.50, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 μmol/L

[0101] 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:将同型半胱氨酸标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为3.00,15.00,40.00 $\mu\text{mol/L}$ 。检测数据及数据分析见表3。

[0102] 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($\mu\text{mol/L}$)	3.00	15.00	40.00
1	3.11	15.21	42.55
2	2.94	15.43	41.36
3	3.16	14.83	39.86
4	3.10	15.94	42.02
5	3.00	15.01	40.74
6	2.96	14.36	42.85
7	2.98	15.20	38.32
8	3.12	15.06	40.40
9	3.05	14.97	41.78
10	2.92	15.83	42.67
平均值($\mu\text{mol/L}$)	3.03	15.18	41.26
标准差(SD)	0.09	0.47	1.44
精密度(CV%)	2.97%	3.10%	3.49%
回收率 %	101.0	101.2	103.2

[0105] 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%。

[0106] 实施例七:药物干扰试验

[0107] 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:

[0108] 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;

[0109] 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。

[0110] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0111] 表4常见干扰药物测定结果

[0112]

ID#	化合物名称	等价于同型半胱氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于同型半胱氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
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

ID#	化合物名称	等价于同型半胱氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	ID#	化合物名称	等价于同型半胱氨酸的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
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	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	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

[0113]

[0114] 测定结果显示:上述62种常见药物等价于同型半胱氨酸的浓度均小于 $0.01\mu\text{mol/L}$ 。由此可见,本发明的抗体是抗S-腺苷同型半胱氨酸的特异性抗体,与其它药物无交叉反

应。

[0115] 实施例八：相关性分析

[0116] 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法试剂进行相关性分析,测定的数据参见表5。

[0117] 表5临床样本测定值

[0118]

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	13.24	13.41
2	5.56	5.43
3	11.78	11.88
4	9.05	9.11
5	20.13	19.98
6	6.04	6.01
7	17.41	17.68
8	7.99	7.83
9	24.80	25.12
10	12.07	11.93
11	8.00	7.96
12	13.15	13.13
13	4.99	5.05
14	11.33	11.16
15	29.06	28.23
16	7.29	7.33
17	14.30	14.67
18	5.68	5.75
19	22.73	23.06
20	10.07	10.52
21	15.02	15.00
22	9.21	9.38
23	16.29	16.94
24	6.25	6.25
25	11.34	11.22
26	10.01	10.27
27	25.53	24.96
28	8.41	8.89
29	9.87	10.01
30	14.28	14.85
31	17.09	17.69
32	11.25	11.24
33	7.23	7.45
34	18.60	19.28

[0119]

35	4.22	4.24
36	17.79	18.07
37	8.88	8.75
38	11.81	11.56
39	5.77	5.86
40	12.43	12.38
41	21.55	22.09
42	15.00	15.86
43	9.71	10.00
44	6.89	6.91
45	13.20	13.20
46	5.35	5.39
47	25.28	26.01
48	16.79	16.63
49	10.45	10.27
50	9.27	9.45
51	9.87	10.02
52	22.00	21.92
53	14.85	14.69
54	4.49	4.47
55	8.96	9.02
56	11.52	11.77
57	20.24	20.58
58	16.03	16.27
59	7.90	8.00
60	10.08	10.05
61	14.23	13.94
62	5.55	5.50
63	16.01	16.23
64	19.73	20.11
65	10.00	9.98
66	12.44	12.73
67	7.39	7.51
68	15.15	15.64
69	4.28	4.03
70	26.00	25.77
71	11.23	11.35
72	17.82	17.66
73	5.99	5.87
74	17.09	17.55
75	14.45	14.40
76	10.98	10.67
77	6.21	6.25

[0120]

78	15.40	15.82
79	23.26	24.20
80	14.05	14.32
81	19.57	19.89
82	8.50	8.52
83	9.99	10.05
84	17.86	18.12
85	12.36	12.41
86	5.29	5.31
87	8.98	8.85
88	13.25	13.96
89	24.41	25.39
90	8.25	8.40
91	27.27	26.65
92	5.20	5.16
93	18.93	18.38
94	10.17	10.53
95	6.57	6.39
96	11.51	11.64
97	16.36	16.09
98	15.75	16.31
99	17.00	17.83
100	12.99	12.50

[0121] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y = 1.0083x + 0.004$,相关系数 $R^2 = 0.997$,表明本发明的检测试剂测定同型半胱氨酸临床标本的准确度高。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。

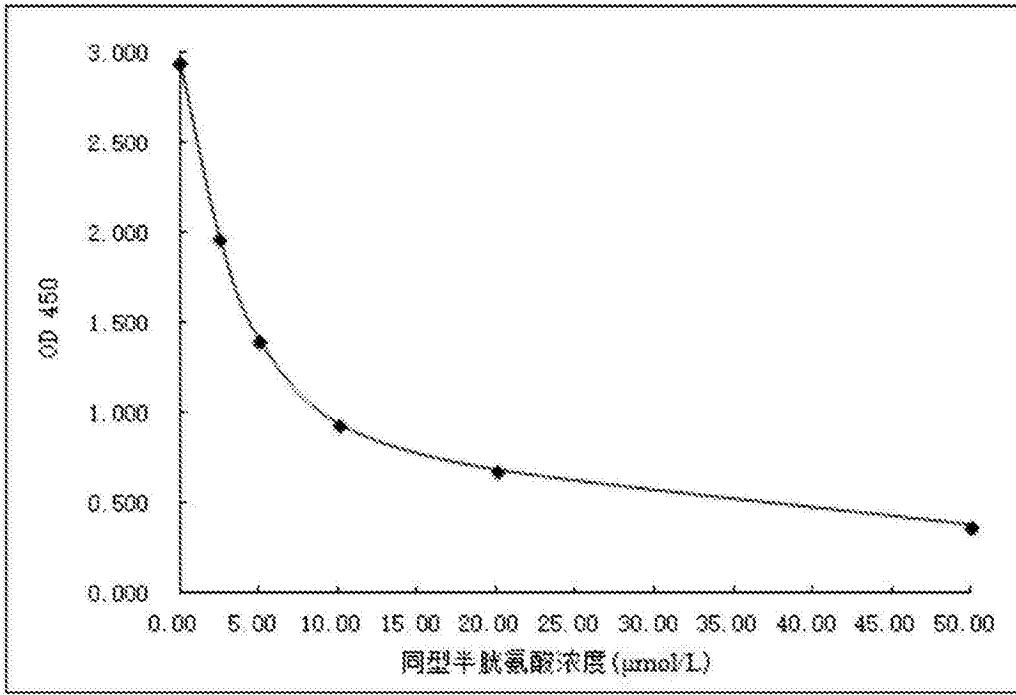


图1

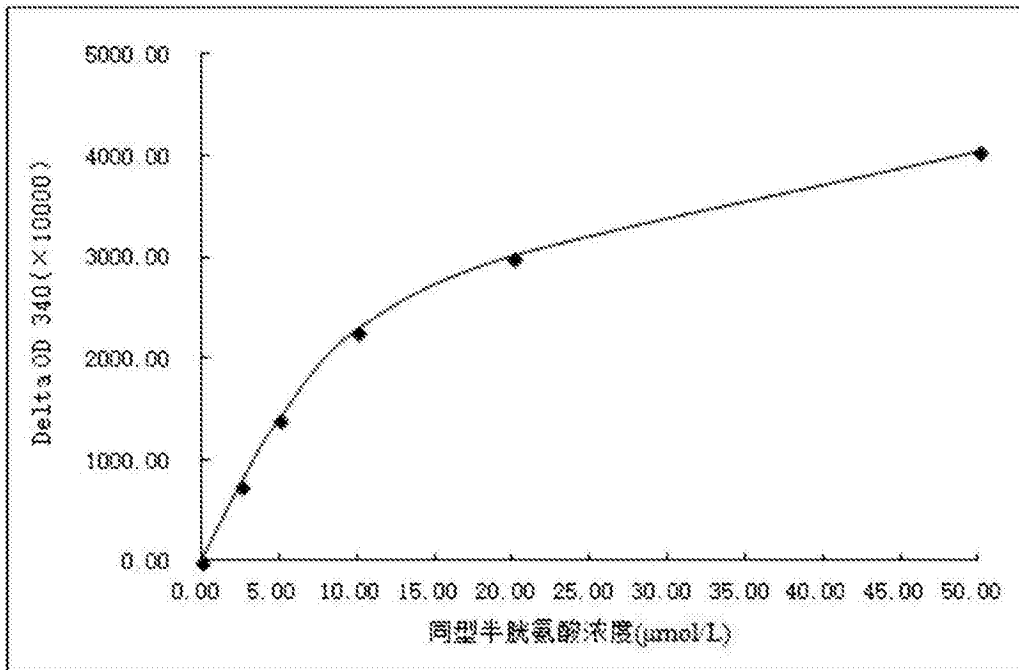


图2

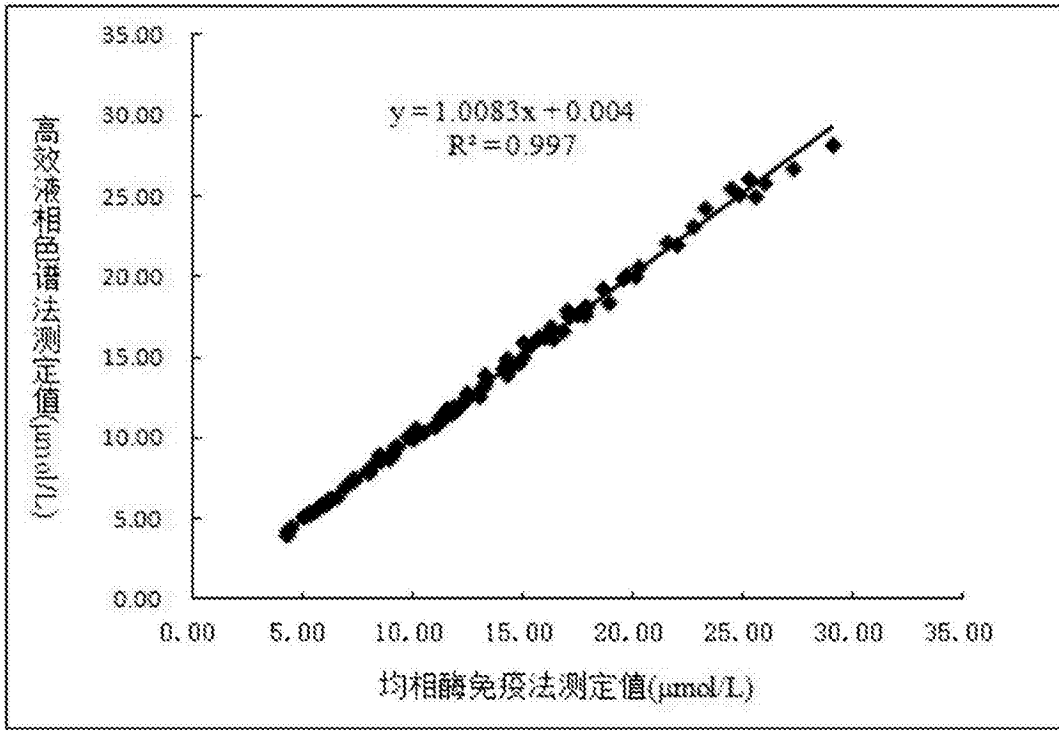


图3

专利名称(译)	一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN107132349A	公开(公告)日	2017-09-05
申请号	CN201710294548.5	申请日	2017-04-28
[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 胡义忠		
发明人	虞留明 胡义忠		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/31 G01N30/02		
CPC分类号	G01N33/535 G01N21/31 G01N30/02		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种同型半胱氨酸自动化检测试剂、制备方法及检测方法，属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的同型半胱氨酸免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗同型半胱氨酸特异性抗体，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同型半胱氨酸检测试剂，可以精确快速地确定血清或血浆等生物样品中的同型半胱氨酸含量。与市场上现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较，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，还能有效降低同型半胱氨酸检测成本，有利于临床大规模推广使用。

