

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610097225.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月30日

[11] 公开号 CN 101169409A

[22] 申请日 2006.10.24

[21] 申请号 200610097225.9

[71] 申请人 苏州艾杰生物科技有限公司

地址 215021 江苏省苏州市工业园区机场路  
328 号国际科技园 122B

[72] 发明人 王尔中

权利要求书 2 页 说明书 7 页

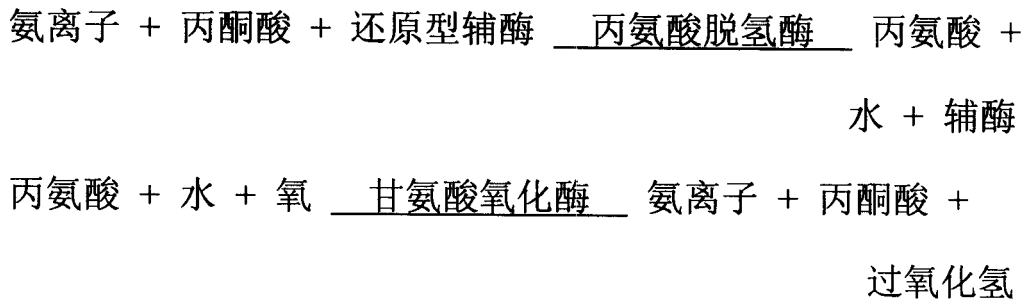
[54] 发明名称

氨诊断/测定试剂盒及氨浓度测定方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用酶循环扩增法、酶比色法及酶联法技术的氨诊断/测定试剂盒，同时本发明还涉及测定氨浓度的方法原理、试剂的组成及成分，属于医学/食品/环境检验测定技术领域。本发明的试剂盒主要成分包括：缓冲液、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶及稳定剂；通过将样品与试剂按一定的体积比混合，使之发生一系列的酶促反应，再将反应物置于紫外/可见光分析仪下，检测主波长 340nm 处吸光度下降的速度，从而测算出氨的浓度大小。采用本发明完全可以通过紫外/可见光分析仪器得出所需的测定结果。

1. 一种酶循环扩增法、酶比色法及酶联法的氨浓度测定方法，其方法原理如下：



将最终反应物置于紫外/可见光分析仪或半、全自动生化分析仪下，检测主波长 340nm 吸光度下降的速度，测算出氨浓度大小测定结果。

2. 一种氨诊断/测定试剂盒，主要成分包括：

缓冲液	20——500 mmol/L
稳定剂	1—— 50 mmol/L
还原型辅酶	0.1——0.35 mmol/L
丙氨酸脱氢酶	1000——80000 U/L
甘氨酸氧化酶	1000——80000 U/L
丙酮酸	2—— 50 mmol/L

其特征在于：试剂盒可以是干粉状态，在使用前加水溶解后使用；也可以配制成液体试剂，直接使用。

3. 根据权利要求 2 所述氨诊断/测定试剂盒，其特征在于：

由缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶组成单剂试剂。

4. 根据权利要求 2 所述氨诊断/测定试剂盒，其特征在于：

由缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶组成双剂试剂；试剂 1，由缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸组成；试剂 2，由缓冲液、稳定剂、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶组成。还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶在试剂 1 或试剂 2 中的位置可以不限。

5. 根据权利要求 2 所述氨诊断/测定试剂盒，其特征在于：

由缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶组成多剂试剂；试剂 1，由缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、组成；试剂 2，由缓冲液、丙酮酸组成；试剂 3，由缓冲液、稳定剂、丙酮酸组成。还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶在试剂 1、试剂 2 或试剂 3 中的位置可以不限。

6. 根据权利要求 2 所述氨诊断/测定试剂盒，其特征在于：还包括稳定剂 1—4000 mmol/L 或 0.1%-100% 体积比。所述稳定剂为：硫酸铵 (Ammonia Sulfate)、甘油 (Glycerol)、丙二醇 (Propylene Glycol)、乙二醇 (Ethylene glycol) 及防腐剂中的至少一种。

## 氨诊断/测定试剂盒及氨浓度测定方法

### 技术领域

本发明涉及一种氨诊断/测定试剂盒，同时本发明还涉及测定氨浓度的方法，属于医学/食品/环境检验测定技术领域。

### 背景技术

氨测定的方法有微量扩散法、离子交换法、酶法和氨电极法等。目前应用最多的方法是酶法和基于离子选择电极的血氨测定仪分析法。

扩散法是标本碱化后，释放出  $\text{NH}_3$ ，用酸滴定释放出的氨，或用 Nessler 反应形成棕黄色碘化双汞胺进行比色。这些方法需要碱化，内源性的氨形成造成影响，使其准确性和精密度受到影响，目前已很少应用；离子交换法比扩散法更准确，CV 为 8%~13%；离子选择电极法是利用  $\text{NH}_3$  扩散到电极表面，引起电极的 PH 发生变化进行测定，该方法的 CV 为 3.5%~4.8%，回收率高。结合具体实际，应以酶法测定为实用。

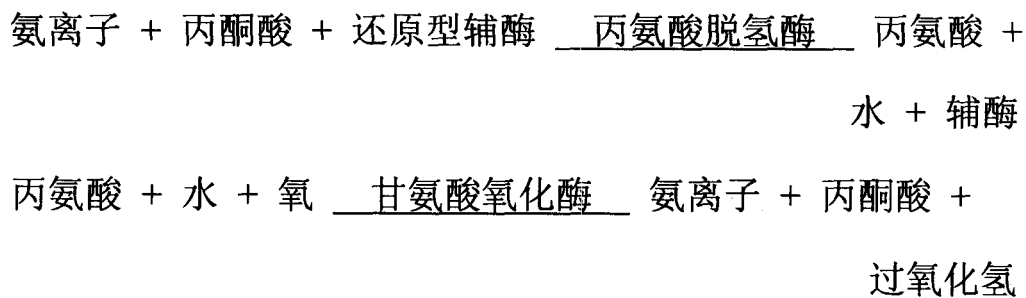
检索中国专利，仅查出 87105593.7 专利申请公开了一种血氨测定速冻杯，却未发现比较理想的血氨测定方法。

### 发明内容

本发明要解决的技术问题是：提出一种利用酶循环扩增法（Enzymatic Recycling Method）、酶比色法（Enzymatic Colorimetric Method）及酶（偶）联法（Couple Reaction）技术，连续监测还原型烟酰胺辅酶（还原型辅酶）在 340nm 波长处吸光度的变化，得以测定

氨浓度的方法，同时，本发明还将给出用以实现该方法的氨诊断/测定试剂盒，采用该试剂盒不仅可以在紫外/可见光分析仪或半、全自动生化分析仪上进行氨浓度测定，而且测定速度快、准确度高，因而可以得到切实的推广应用。

本发明氨浓度测定方法原理如下：



丙氨酸脱氢酶（alanine dehydrogenase ; EC 1.4.1.1）作为作用酶，功能为将氨酶解产生丙氨酸。甘氨酸氧化酶（glycine oxidase ; EC 1.4.3.19）作为循环酶：再将丙氨酸再次变回氨，使氨不断地被重复循环利用。丙氨酸脱氢酶（alanine dehydrogenase ; EC 1.4.1.1）同时又作为显色酶，使还原型辅酶变成为辅酶，在 340nm 波长下发生吸光度下降，从而可以测算出氨的浓度。

实验表明，从测定结果的准确性和配制成本的经济性两方面综合考虑，无论是单剂、双剂还是三剂，如下成分关系的本发明氨诊断/测定试剂盒较为理想：

缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
还原型辅酶	0.25 mmol/L
丙氨酸脱氢酶	6000 U/L

甘氨酸氧化酶 8000 U/L

丙酮酸 16 mmol/L

本发明的氨诊断/测定试剂盒可以是单剂，包括：

缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶。

试剂盒可以是干粉状态，在使用前加水溶解后使用；也可以配制成液体试剂，直接使用。

也可以将上述单剂试剂配成如下双剂试剂：

试剂 1

缓冲液、稳定剂、还原型辅酶、丙酮酸。

试剂 2

缓冲液、稳定剂、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶。

还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶在试剂 1 或试剂 2 中的位置可以不限。试剂盒可以是干粉状态，在使用前加水溶解后使用；也可以配制成液体试剂，直接使用。

还可以将上述单剂试剂配成如下三剂试剂：

试剂 1

缓冲液、稳定剂、还原型辅酶。

试剂 2

缓冲液、丙酮酸。

试剂 3

缓冲液、稳定剂、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶。

还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶在试剂 1、试剂 2 或试剂 3 中的位置可以不限。试剂盒可以是干粉状态，在使用前加水溶解后使用；也可以配制成液体试剂，直接使用。

无论是单剂、双剂还是三剂，本发明测定氨浓度的方法，其还原型辅酶可以是 NADPH、NADH 或 thio-NADH 中的一种。

### 具体实施方式

下面结合实施例子对本发明作进一步的说明。

#### 实施例一

本实施例的氨诊断/测定试剂为单试剂，包括：

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
还原型辅酶	0.25 mmol/L
丙氨酸脱氢酶	6000 U/L
甘氨酸氧化酶	8000 U/L
丙酮酸	16 mmol/L

试剂全部溶解配好后，分装入瓶，进行冷冻干燥，制成干粉试剂；使用前，加入纯净水，复溶后使用。

在全自动生化分析仪上设定：温度 37℃，反应时间 10 分钟，起始吸光度  $1.8 \pm 0.7$ ，测试主波长 340nm，测试副波长 405nm，被测氨样品与试剂的体积比例为 1/25，反应方向为负反应（下降反应），延迟时间大约 1 分钟左右，检测时间 2 分钟左右。

加入样品和试剂后，使之混合并发生反应，最终将反应物置于生化

分析仪下，检测主波长 340nm 吸光度下降的速度，从而测算出氨的浓度大小。

## 实施例二

本实施例的氨诊断/测定试剂为双试剂，包括：

### 试剂 1

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
还原型辅酶	0.25 mmol/L
丙酮酸	20 mmol/L

### 试剂 2

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
丙氨酸脱氢酶	8000 U/L
甘氨酸氧化酶	8000 U/L

试剂全部溶解配好后，分装入瓶，制成液体双试剂，可以直接使用。

在全自动生化分析仪上设定：温度 37℃，反应时间 10 分钟，起始吸光度  $1.8 \pm 0.7$ ，测试主波长 340nm，测试副波长 405nm，被测氨样品与试剂 1、试剂 2 的体积比例为 2/20/5，反应方向为负反应（下降反应），延迟时间大约 1 分钟左右，检测时间 2 分钟左右。

加入样品和试剂后，使之混合并发生反应，最终将反应物置于生化分析仪下，检测主波长 340nm 吸光度下降的速度，从而测算出氨的浓度大小。



### 实施例三

本实施例的氨诊断/测定试剂为三试剂，包括：

#### 试剂 1

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
还原型辅酶	0.25 mmol/L

#### 试剂 2

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
丙酮酸	12 mmol/L

#### 试剂 3

三（羧甲基）氨基甲烷—盐酸缓冲液	100 mmol/L
稳定剂	50 mmol/L
丙氨酸脱氢酶	4000 U/L
甘氨酸氧化酶	6000 U/L

试剂全部溶解配好后，分装入瓶，制成液体三试剂，可以直接使用。

测定氨浓度时，在全自动生化分析仪上设定：温度 37℃，反应时间 10 分钟，起始吸光度  $1.8 \pm 0.7$ ，测试主波长 340nm，测试副波长 405nm，被测氨与试剂 1、试剂 2、试剂 3 的体积比例为 4/40/5/5，反应方向为负反应（下降反应），延迟时间大约 1 分钟左右，检测时间 2 分钟左右。

加入样品和试剂后，使之混合并发生反应，最终将反应物置于生化分析仪下，检测主波长 340nm 吸光度下降的速度，从而测算出氨的浓

---

度大小。

总之，实验证明，采用本发明的测定方法完全可以通过一般生化分析仪器得出所需的测定结果，并且灵敏度高、精确度好，便于推广应用。

专利名称(译)	氨诊断/测定试剂盒及氨浓度测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101169409A</a>	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200610097225.9	申请日	2006-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	苏州艾杰生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州艾杰生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州艾杰生物科技有限公司		
[标]发明人	王尔中		
发明人	王尔中		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78 G01N21/25 C12Q1/32 C12Q1/26 C12Q1/00		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种利用酶循环扩增法、酶比色法及酶联法技术的氨诊断/测定试剂盒，同时本发明还涉及测定氨浓度的方法原理、试剂的组成及成分，属于医学/食品/环境检验测定技术领域。本发明的试剂盒主要成分包括：缓冲液、还原型辅酶、丙酮酸、丙氨酸脱氢酶、甘氨酸氧化酶及稳定剂；通过将样品与试剂按一定的体积比混合，使之发生一系列的酶促反应，再将反应物置于紫外/可见光分析仪下，检测主波长340nm处吸光度下降的速度，从而测算出氨的浓度大小。采用本发明完全可以通过紫外/可见光分析仪器得出所需的测定结果。

