



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103954774 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201410195095. 7

(22) 申请日 2014. 05. 09

(71) 申请人 山东博科生物产业有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘市明水经济
开发区山东博科生物产业园

(72) 发明人 谭柏清 罗维晓 甘宜梧 王绮

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 张世静

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒,由试剂1和试剂2组成,本发明提供的试剂盒改善了先前的三试剂甚者更多试剂,在使用之前需要现场将试剂手工按比例混合的麻烦,对试剂在全自动生化分析仪器上的使用和推广起到了很好的作用;同时,对试剂的组分进行了改进,使本试剂具有更好的稳定性。

1. 一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒,其特征在于,包括体积比为 240:65 的试剂 1 和试剂 2,试剂 1 和试剂 2 的组成及含量如下:

试剂 1

EDTA. 2Na	0.1~20mM
ATP	0.1~90mM
S-腺苷甲硫氨酸	0.1~1mM
NADH	0.3~1mM
三(2-羧乙基)膦氯化氢	0.5~1mM
α -酮戊二酸	5~10mM
牛血清白蛋白	0.1~1g/L
叠氮钠	0.1~1 g/L

所用溶剂为 PH 7.1 的 TRIS 缓冲液;

试剂 2

Hcy 甲基转移酶	0.5~5.0KU/L
谷氨酸脱氢酶	1~5.0KU/L
S-腺苷同型半胱氨酸 (SAH) 水解酶	2.5~5.0KU/L
腺苷脱氨酶	1~5.0KU/L
牛血清白蛋白	0.1~1g/L
聚乙二醇	1~5g/L
亚铁氰化钾	15~25 μ mol/L

所用溶剂为 PH7.8 的 TRIS 缓冲液。

一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒,属于临床体外检测技术领域。

背景技术

[0002] 同型半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy) 又称高半胱氨酸,是一种与半胱氨酸同系的、含硫含氨酸分解代谢的重要中间产物,不参与体蛋白质合成。血浆 Hcy 是一个总称,指血浆中所有形式的 Hcy,包括还原型 Hey,双硫 Hcy,混合双硫半胱氨酸—Hcy 和混合双硫蛋白质—Hey:正常情况下游离 Hey 很少,主要以蛋白质形式存在。很多因素如遗传、营养、肾功能不全、药物、激素等因素均可能影响体内同型半胱氨酸的代谢,造成高 Hey 血症。大量研究证明,高 Hey 是引起心、脑、外周血管病的一个新的、重要的独立性危险因素,Hcy 和高血压之间有一定的相关性,提示高 Hcy 水平可能是高血压的一个相对危险因素。有效控制 Hcy 水平对高血压病例意义重大。

[0003] 当前同型半胱氨酸的检测方法多种多样,其中常见的方法有 HPLc 法、HPLC 法、mA 法、EUSA 法和循环酶法等,其中 HPLc 法是经典的方法,循环酶法是最近推出的新的检测方法,HPLC 法和 mA 法都具有较高的灵敏度和精密度,是应用最广泛的两种方法。而 mA 法操作更加简单速度也较快,但两者成本相对较高。EUSA 法和循环酶法操作较简单并且成本也较低,而循环酶法在全自动生化分析仪上用,具操作简单和更快的检测速度,并有着较好的灵敏度和精密度,具有更加广泛的应用前景。样本中的氧化型同型半胱氨酸(Hcy)经还原剂还原后,在同型半胱氨酸转甲基酶(HcyMetase)的催化作用下,与 S-腺苷-L-蛋氨酸(AdoMet)反应,生成 S-腺苷-L-同型半胱氨酸(AdoHcy)和 L-蛋氨酸(Met)。S-腺苷-L-同型半胱氨酸在腺香同型半胱氨酸酶(AdoHcyase)的作用下水解为 L-同型半胱氨酸和腺苷(Ado)。反应生成的蛋氨酸与试剂中的三磷酸腺苷(ATP)在蛋氨酸转腺苷酶(MAT)的作用下生成 S-腺苷-L-蛋氨酸(AdoMet)。样本中的 L-同型半胱氨酸反复循环反应,不断产生腺苷,腺苷的生成速率与样本中同型半胱氨酸的含量成正比,通过测定腺苷的生成速率,就可以达到测定体液样本中同型半胱氨酸含量的目的。

[0004] 现在市面上生产的同型半胱氨酸检测试剂为了提高其稳定性,多将其检测试剂设置为四试剂或者三试剂,甚至更多的试剂,当遇到只能做双试剂的生化分析仪器的時候,需要现场手工将试剂按比例混匀,并尽快用完,这样既增加了操作的繁琐性,又不利于试剂的长期保存,非常不利于检测试剂在全自动生化仪器上的推广。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种稳定性好的同型半胱氨酸检测试剂。

[0006] 本发明的技术方案如下:一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒,包括体积比为 240:65 的试剂 1 和试剂 2,试剂 1 和试剂 2 的组成及含量如下:

试剂 1 (R1)

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,

PH 7.1

EDTA. 2Na (乙二胺四乙酸二钠)	0.1~20mM
ATP	0.1~90mM
S-腺苷甲硫氨酸(SAM)	0.1~1mM
NADH	0.3~1mM
三(2-羧乙基)膦氯化氢(TCEP)	0.5~1mM
α -酮戊二酸	5~10mM
牛血清白蛋白	0.1~1g/L
叠氮钠	0.1~1 g/L ;
试剂 2 (R2)	
TRIS(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,	Ph7.8
Hcy 甲基转移酶(HMTase)	0.5~5.0KU/L
谷氨酸脱氢酶(GLDH)	1~5.0KU/L
S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶(SAHase)	2.5~5.0KU/L
腺苷脱氨酶(ADA)	1~5.0KU/L
牛血清白蛋白	0.1~1g/L
聚乙二醇	1~5g/L
亚铁氰化钾	15~25umol/L。

[0007] 配制方法:把组分放入缓冲溶液中,混匀,使成对应浓度。

[0008] 本发明的有益效果如下:

1) 本发明为双试剂,改善了先前的三试剂甚更多试剂,在使用之前需要现场将试剂手工按比例混合的麻烦,对试剂在全自动生化分析仪器上的使用和推广起到了很好的作用;

2) 本发明优先选择了 Trise (三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,做为检测试剂的缓冲体系,在保证检测试剂检测性能不变的情况下,大大提高了检测试剂的稳定性;

3) 本发明在检测试剂 R1 和 R2 中添加了 0.1-1g/L 的牛血清白蛋白,能够更好地模拟生物环境,保护所添加酶,延长酶的活性;

4) 本发明在检测试剂 R2 中添加了 0.1-1g/L 的热稳定剂聚乙二醇,聚乙二醇能够很好的提高试剂 R2 中所添加酶的热稳定性,能够延长检测试剂的高温条件下的寿命;

5) 本发明还在试剂 R2 中添加了亚铁氰化钾,有效地提高了检测试剂的抗氧化性。

具体实施方式

[0009] 实施例 1 (对比例)

本实施例描述的是一种市面现有的同型半胱氨酸检测试剂的配方,下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0010] 一、试剂组成:

试剂 1 (R1):

EDTA. 2Na (乙二胺四乙酸二钠)	0.5mM
ATP	80mM
S-腺苷甲硫氨酸(SAM)	0.1mM

NADH	0.3mM
三(2 羧乙基) 膦氯化氢 (TCEP)	0.5mM
α - 酮戊二酸	5.0mM
叠氮钠	0.1g/L
溶剂为 磷酸盐缓冲液	PH7.1, 37° C ;
试剂 2 (R2):	
试剂 2a	
磷酸盐缓冲液	PH7.8, 37° C
Hcy 甲基转移酶 (HMTase)	5.0KU/L
谷氨酸脱氢酶 (GLDH)	10KU/L
试剂 2b	
磷酸盐缓冲液	PH7.8, 37° C
S- 腺苷同型半胱氨酸 (SAH) 水解酶 (SAHase)	2.5KU/L
腺苷脱氨酶 (ADA)	5.0KU/L

使用时:

试剂 2 (R2):按 R2a :R2b=8:5 混匀

二、操作方法:

本实施例描述的是一种市面现有的同型半胱氨酸检测试剂,在使用时,首先将试剂 2 中试剂 2a 和试剂 2b 按 R2a :R2b=8:5 混匀,采用具有双试剂功能的自动生化分析仪,如东芝 120 全自动分析仪(操作如表 1),将相同的试剂分别分成 a、b 两组, a 组开瓶放置在仪器的试剂盘中,每天分别检测高中低值的三种质控品,连续检测 15 天, b 组封口放置在 37°C 恒温箱中,同样每天分别检测高中低值的三种质控品,检测完封好放回恒温箱中,连续检测 7 天,并记录统计数据(表 2、表 3、)。

[0011] 表 1 同型半胱氨酸检测试剂检测方法

加入物	空白管	标准管	测定管
试剂 R1	240 μ L	240 μ L	240 μ L
蒸馏水	18 μ L		
标准液		18 μ L	
标本			18 μ L
混合, 置 37°C 预孵育 5 分钟			
试剂 R2	65 μ L	65 μ L	65 μ L
混匀, 置 37°C 预孵育 5 分钟, 在主波长 340nm/辅助波长 700nm 下, 读取各管吸光度 A_1 , 再延迟 2.5 分钟, 开始读数, 读数时间不少于 2.5 分钟。 计算吸光度变化率, 计算出检测结果。			

[0012] 表 2 开瓶 15 天检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天	第九天	第十天	第十一天	第十二天	第十三天	第十四天	第十五天
高值	60.1	59.6	52.3	52.0	49.2	46.3	41.2	40.8	39.6	40.3	36.8	35.1	34.6	33.2	30.1
中值	15.6	15.7	14.9	14.2	13.6	13.5	13.1	12.7	12.3	12.0	11.1	10.9	9.5	8.4	7.1
低值	3.2	3.1	3.3	2.5	2.1	2.1	1.9	1.8	1.9	1.6	1.6	1.5	1.6	1.3	1.1

表 3 开瓶 7 天检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
高值	59.9	57.3	50.1	49.3	40.1	31.9	20.4
中值	15.5	14.1	13.7	13.0	11.1	9.3	7.2
低值	3.2	3.0	2.5	2.1	1.4	1.1	0.9

从以上数据可以看出,时间对检测试剂的稳定性具有显著的影响。

[0013] 实施例 2

一、试剂成分

试剂 1 (R1)

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,	Ph7.1
EDTA. 2Na(乙二胺四乙酸二钠)	0.1mM
ATP	0.1mM
S-腺苷甲硫氨酸(SAM)	0.1mM
NADH	0.3mM
三(2-羧乙基)膦氯化氢(TCEP)	0.5mM
α -酮戊二酸	5mM
牛血清白蛋白	0.1g/L
叠氮钠	0.1g/L ;

试剂 2 (R2)

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)冲液,	Ph7.8
Hcy 甲基转移酶(HMTase)	0.5KU/L
谷氨酸脱氢酶(GLDH)	1KU/L
S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶(SAHase)	2.5KU/L
腺苷脱氨酶(ADA)	1KU/L
牛血清白蛋白	0.1g/L
聚乙二醇	1g/L
亚铁氰化钾	15 μ mol/L。

[0014] 二、操作方法:

本方法是验证的一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂。检测操作方法同实施例 1 中的操作方法,检测情况如下。

[0015] 表 4 一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂开瓶 15 天检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天	第九天	第十天	第十一天	第十二天	第十三天	第十四天	第十五天
高值	59.8	60.1	59.9	58.9	58.4	57.6	59.0	58.6	57.6	58.4	59.1	59.3	58.9	58.6	59.1
中值	15.4	15.5	15.5	15.3	15.4	15.3	15.1	15.0	15.1	15.2	14.9	14.8	15.2	15.3	15.0
低值	3.1	3.2	3.1	3.1	3.3	3.0	3.1	3.0	2.9	3.0	2.9	3.1	3.2	2.9	3.0

表 5 一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂 7 天 37℃ 热稳定性检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
高值	60	60.2	60.0	58.6	56.9	58.3	58.1
中值	15.6	15.4	15.6	15.5	15.4	15.3	15.3
低值	3.2	3.1	3.2	3.0	3.1	3.0	3.1

结果分析：

通过实施例 2 和实施例 1 中检测结果对比分析，可以看出实施例 1 中市面现有的同型半胱氨酸，试剂随着是检测推移，在开瓶和 37 摄氏度环境中都发生衰减，并且衰减幅度很大，而本发明的实施例 2 中，同型半胱氨酸在相同的环境中，试剂很稳定，没有发生衰减的迹象。

[0016] 实施例 3

本实施例提供的是一种将试剂材料量为高限后的稳定的同型半胱氨酸检测试剂的配方

试剂 1 (R1)：

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,	Ph7.1
EDTA. 2Na(乙二胺四乙酸二钠)	20mM
ATP	90mM
S-腺苷甲硫氨酸(SAM)	1 mM
NADH	1mM
三(2-羧乙基)膦氯化氢(TCEP)	1mM
α -酮戊二酸	10mM
牛血清白蛋白	1 g/L
叠氮钠	1 g/L ;

试剂 2 (R2)

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)冲液,	Ph7.8
Hcy 甲基转移酶(HMTase)	5.0KU/L
谷氨酸脱氢酶(GLDH)	5.0KU/L
S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶(SAHase)	5.0KU/L
腺苷脱氨酶(ADA)	5.0KU/L
牛血清白蛋白	1g/L

聚乙二醇 5g/L
 亚铁氰化钾 25 μ mol/L。
 操作方法

本方法是验证的一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂。检测操作方法同实施例 1 中的操作方法。

[0017] 表 6 原材料增加后一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂开瓶 15 天检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第八天	第九天	第十天	第十一天	第十二天	第十三天	第十四天	第十五天
高值	59.8	60.2	59.6	58.9	60.1	59.6	58.3	59.1	60.1	60.5	58.6	58.9	59.1	58.5	59.1
中值	15.3	15.4	15.3	15.5	15.2	14.9	15.0	15.3	14.8	14.9	15.1	15.2	15.1	15.0	15.2
低值	3.2	3.1	3.0	3.3	3.2	3.1	3.3	3.1	3.0	3.1	3.0	3.3	3.1	3.0	3.2

[0018]

表 7 原材料增加后的一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂 7 天 37℃ 热稳定性检测结果

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
高值	60.1	59.6	60.0	58.6	58.3	57.6	58.2
中值	15.4	15.2	15.0	15.6	15.1	14.9	15.1
低值	3.2	3.1	3.2	3.3	3.2	3.1	3.0

结果分析

通过实施例 3 和实施例 2 中检测结果对比分析,可见在试剂的原材料增加后同型半胱氨酸在相同的环境中,试剂都很稳定,也没有发生衰减的迹象。

[0019] 实施例 4

试剂 1 (R1):

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,	Ph7.1
EDTA. 2Na(乙二胺四乙酸二钠)	0.5mM
ATP	50mM
S-腺苷甲硫氨酸(SAM)	0.5 mM
NADH	0.7 mM
三(2-羧乙基)膦氯化氢(TCEP)	0.8 mM
α -酮戊二酸	8 mM
牛血清白蛋白	0.6 g/L
叠氮钠	0.3 g/L ;

试剂 2 (R2)

TRIS(三羟甲基氨基甲烷)冲液,	Ph7.8
Hcy 甲基转移酶(HMTase)	2KU/L
谷氨酸脱氢酶(GLDH)	3KU/L
S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶(SAHase)	3.5KU/L
腺苷脱氨酶(ADA)	3.0KU/L

牛血清白蛋白	0.5g/L
聚乙二醇	3g/L
亚铁氰化钾	20umol/L。
操作方法	

本方法是验证的一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂。检测操作方法同实施例 1 中的操作方法。

专利名称(译)	一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103954774A	公开(公告)日	2014-07-30
申请号	CN201410195095.7	申请日	2014-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	济南鑫贝西生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东博科生物产业有限公司		
[标]发明人	谭柏清 罗维晓 甘宜梧 王绮		
发明人	谭柏清 罗维晓 甘宜梧 王绮		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/6815		
代理人(译)	张世静		
其他公开文献	CN103954774B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种稳定的同型半胱氨酸检测试剂盒，由试剂1和试剂2组成，本发明提供的试剂盒改善了先前的三试剂甚至更多试剂，在使用之前需要现场将试剂手工按比例混合的麻烦，对试剂在全自动生化分析仪器的使用和推广起到了很好的作用；同时，对试剂的组分进行了改进，使本试剂具有更好的稳定性。

天数	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
高值	60	60.2	60.0	58.6	56.9	58.3	58.1
中值	15.6	15.4	15.6	15.5	15.4	15.3	15.3
低值	3.2	3.1	3.2	3.0	3.1	3.0	3.1