

[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 200610114974.8

[51] Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月14日

[11] 公开号 CN 1912623A

[22] 申请日 2006.8.10

[21] 申请号 200610114974.8

[71] 申请人 福建省洪诚生物药业有限公司

地址 351254 福建省莆田市枫亭工业园区规划路2号

[72] 发明人 王京 高淑舫

权利要求书1页 说明书4页

## [54] 发明名称

血浆氨的化学发光测定方法

## [57] 摘要

本发明血浆氨的化学发光测定方法，涉及一种在生化分析中医用试剂的化学发光测定方法。它所解决的是现有检测范围窄、灵敏度低、操作难度大、设备昂贵等技术问题。解决该技术问题的主要技术方案：血浆氨的化学发光测定方法，其特征在于血浆氨在过量的 $\alpha$ -戊酮二酸和NADH存在下，经谷氨酸脱氢酶催下生成谷氨酸；而谷氨酸经其氧化酶(GLOD)氧化而生成过氧化氢；过氧化氢在过氧化物酶的作用下，使化学发光物氧化而发光；血浆氨浓度越大发出的光信号越强；用已知浓度的血浆氨与测出的光信号，作出剂量-反应曲线；未知样品的血浆氨含量可从该曲线推算出来。它灵敏度更高、线性范围宽、安全适用、便于普及，适于各类医疗机构广泛应用。

1、血浆氨的化学发光测定方法，其特征在于血浆氨在过量的 $\alpha$ -戊酮二酸和NADH存在下，经谷氨酸脱氢酶催下生成谷氨酸；而谷氨酸经其氧化酶（GLOD）氧化而生成过氧化氢；过氧化氢在过氧化物酶的作用下，使化学发光物氧化而发光；光信号的大小与血浆氨的浓度呈正相关，即血浆氨浓度越大发出的光信号越强；记录这种光信号即可推测血浆氨的浓度；用已知浓度的血浆氨与测出的光信号，作出剂量-反应曲线；未知样品的血浆氨含量可从该曲线推算出来。

2、根据权利要求1所述的血浆氨的化学发光测定方法，其特征在于所述的化学发光物为鲁米诺。

## 血浆氨的化学发光测定方法

**技术领域：**本发明涉及一种医用试剂检测方法，特别涉及血浆氨的化学发光测定方法。

**背景技术：**利用现代生物技术所开发的超微量测定方法，极大的推动了生物和医学各领域的各项临床和科研工作的快速发展，为人类的科学事业和社会进步作出了非凡的贡献。

上世纪七十年代由 Arakawa 首先发表了应用鲁米诺——过氧化物酶的化学发光反应进行酶免分析的技术，这一技术由于灵敏度高达  $10^{-18}$ mol，可在 20 分钟内快速测定出结果，可简便实现完全自动化，有效期长达一年以上，无放射性和致畸物质，利于环保而受到普遍欢迎，是目前发展最迅速的检测技术。

目前，化学发光技术在免疫分析中已得到相当普及的程度，已发展为能检测多种生物活性物质的常规临床检测方法，从免疫反应方式分，该方法有两种基本类型，即化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 和免疫化学发光分析 (Immunochemiluminometric assay, ICMA)；从发光方式上看，一是将发光物质直接标记到抗体或抗原上，免疫反应后，在起动力剂的作用下而发光，另一种是用酶标记抗体或抗原，免疫反应后，加入化学发光底物，在酶催化作用下而发光。

该方法虽有突出的优点，但目前仅限于免疫分析，而在生化分析中还是空白。

正常情况下，氨在肝脏转变为尿素。严重肝疾病时，引起血氨增高，高血氨有神经毒，引起肝性脑病（肝昏迷）。测定成人血浆氨主要用于肝昏迷的监测和处理；同时测定血浆氨对儿科诊断 REYE' S 综合征非常有用，该病有严重低血糖、大块肝坏死、急性肝衰等，在肝酶谱增高前，即见血氨增高；某些先天性代谢紊乱也出现高血氨。

现在普遍使用的测定血浆氨的方法为比色法，该法是利用氨与  $\alpha$ -戊酮二酸

和 NADH 在谷氨酸脱氢酶催下生成谷氨酸等, NADH 的下降速率与血浆氨的含量成正比, 以此测定血浆氨的浓度。该法的不足之处主要有:

1、线性范围窄。由于检测对颜色的变化分辨率不像化学发光那么敏感, 线性范围不能完全满足临床检测的需要, 对高浓度的样品需要经稀释后测定, 带来一定不便。

2、灵敏度不如化学发光。酶法是比较颜色的深浅, 而化学发光是测定光信号, 灵敏度要高出许多。

3、只能用仪器操作。有的是测定酶促反应的速率, 对时间要求十分严格, 手工或半自动操作均难达到要求, 只能使用全自动设备进行。

4、全自动生化仪昂贵。目前使用的全自动生化仪几乎全为进口, 设备十分昂贵, 大多在几十万到几百万之间, 中小医院难以承受, 普及使用受到限制。

**发明内容:** 本发明所要解决的技术问题是一种提供能克服上述缺陷、且灵敏度高、线性范围宽、方便、安全的血浆氨的化学发光测定方法。解决该技术问题采用的主要技术方案: 血浆氨的化学发光测定方法, 其特征在于血浆氨在过量的  $\alpha$ -戊酮二酸和 NADH 存在下, 经谷氨酸脱氢酶催下生成谷氨酸; 而谷氨酸经其氧化酶 (GLOD) 氧化而生成过氧化氢; 过氧化氢在过氧化物酶的作用下, 使化学发光物氧化而发光; 光信号的大小与血浆氨的浓度呈正相关, 即血浆氨浓度越大发出的光信号越强; 记录这种光信号即可推测血浆氨的浓度; 用已知浓度的血浆氨与测出的光信号, 作出剂量-反应曲线; 未知样品的血浆氨含量可从该曲线推算出来; 所述的化学发光物为鲁米诺。本发明与现有技术相比有如下优点: 用化学发光物代替显色物, 达到更灵敏、更稳定、范围宽、更安全的目的。用该方法可以制备相应的定量测定血浆氨的商品试剂盒。具体优点是: ①灵敏度更高。传统方法是检测颜色深浅, 而化学发光是测光信号, 可一个一个光子计数, 所测的最低限更小, 因而灵敏度更高。②线性范围宽。测颜色的深浅的分辨率比光子计数的精度要低得多, 化学发光的检测范围高达  $10^5$ 。③安全适用。化学发光物如鲁米诺等很安全, 整个检测过程无有害物出现, 无论是检测或处理废物都很安全, 有利于环境保护。④便于普及。本发明所制备的试剂盒, 可用于全自动测量, 也可用于手工或半自动测量, 适宜大、中、小各层

次的医疗和研究机构使用。⑤巨大的社会效益。用化学发光法测定生化指标或免疫物质，可同用一台化学发光仪，不再需要进口昂贵的生化仪，节省大量资金，不只降低了成本，对医疗机构、患者及社会均大有益处。

**具体实施方式：**现举例说明本发明的实施例。血浆氨在过量的 $\alpha$ -戊酮二酸和NADH存在下，经谷氨酸脱氢酶催下生成谷氨酸；而谷氨酸经其氧化酶（GLOD）氧化而生成过氧化氢；过氧化氢在过氧化物酶的作用下，使化学发光物氧化而发光；光信号的大小与血浆氨的浓度呈正相关，即血浆氨浓度越大发出的光信号越强；记录这种光信号即可推测血浆氨的浓度；用已知浓度的血浆氨与测出的光信号，作出剂量-反应曲线；未知样品的血浆氨含量可从该曲线推算出来；所述的化学发光物为鲁米诺；这便是本发明的血浆氨的化学发光测定方法。

#### 一、试剂包括：

混合酶液；

血浆氨标准：单一或系列浓度；

底物液

#### 二、测定程序，按下表进行，加样单位为 $\mu$ l。

|                   | 标准 | 样品 |
|-------------------|----|----|
| 标准                | 20 |    |
| 样品                |    | 20 |
| 酶液                | 50 | 50 |
| 底物液               | 50 | 50 |
| 混匀，室温或37℃温育后测量RLU |    |    |

三、用适当方法处理作出剂量-反应曲线，根据样品的RLU值从该曲线求出其血浆氨的浓度。或直接由公式求出：

血浆氨浓度=（样品RLU/标准RLU）×标准浓度

#### 四、也可用双试剂测定。

本发明的灵敏度更高：因为传统方法是检测颜色深浅，而本发明是测光信号，可一个一个光子计数，所测的最低限更小，因而灵敏度更高。线性范围宽：这是因为传统的测颜色的深浅的分辨率比光子计数的精度要低得多，本发明的

化学发光检测范围高达  $10^5$ 。安全适用：本发明的化学发光物如鲁米诺等很安全，整个检测过程无有害物出现，无论是检测或处理废物都很安全，有利于环境保护。便于普及：本发明所制备的试剂盒，可用于全自动测量，也可用于手工或半自动测量，适宜大、中、小各层次的医疗和研究机构使用。社会效益巨大：用本发明的化学发光测定方法测定生化指标或免疫物质，可同用一台化学发光仪，不再需要进口昂贵的生化仪，节省大量资金，不只降低了成本，对医疗机构、患者及社会均大有益处。本发明方法简单，适于大、中、小医疗机构广泛应用。

|         |  |         |            |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 血浆氨的化学发光测定方法                                   |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN1912623A</a>                     | 公开(公告)日 | 2007-02-14 |
| 申请号     | CN200610114974.8                               | 申请日     | 2006-08-10 |
| [标]发明人  | 王京<br>高淑舫                                      |         |            |
| 发明人     | 王京<br>高淑舫                                      |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/53 G01N21/76                            |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明血浆氨的化学发光测定方法，涉及一种在生化分析中医用试剂的化学发光测定方法。它所解决的是现有检测范围窄、灵敏度低、操作难度大、设备昂贵等技术问题。解决该技术问题的主要技术方案：血浆氨的化学发光测定方法，其特征在于血浆氨在过量的 $\alpha$ -戊酮二酸和NADH存在下，经谷氨酸脱氢酶催化生成谷氨酸；而谷氨酸经其氧化酶(GLOD)氧化而生成过氧化氢；过氧化氢在过氧化物酶的作用下，使化学发光物氧化而发光；血浆氨浓度越大发出的光信号越强；用已知浓度的血浆氨与测出的光信号，作出剂量-反应曲线；未知样品的血浆氨含量可从该曲线推算出来。它灵敏度更高、线性范围宽、安全适用、便于普及，适于各类医疗机构广泛应用。

程序，按下表进行，加样单位为 $\mu$ l。

|                       | 标准 | 样品 |
|-----------------------|----|----|
| 标准                    | 20 |    |
| 样品                    |    | 20 |
| 酶液                    | 50 | 50 |
| 底物液                   | 50 | 50 |
| 混匀，室温或 37°C 温育后测量 RLU |    |    |