



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107250795 B

(45) 授权公告日 2021.07.30

(21) 申请号 201680011235.8

(22) 申请日 2016.02.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107250795 A

(43) 申请公布日 2017.10.13

(30) 优先权数据
62/118,832 2015.02.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.08.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/018667 2016.02.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/134251 EN 2016.08.25

(73) 专利权人 艾德克斯实验室公司

地址 美国缅因州

(72) 发明人 M.V.耶拉米利 解宏智 D.W.帕奇
G.法拉切

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 刘蕾

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G07C 279/12 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

审查员 张婷

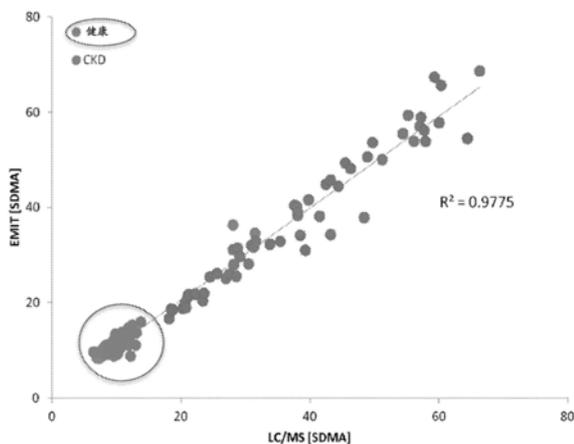
权利要求书5页 说明书27页 附图12页

(54) 发明名称

带有对背景信号的补偿的均相免疫测定

(57) 摘要

允许补偿样品和试剂中固有的背景信号的均相免疫测定法。均相免疫测定法用于检测对称二甲基精氨酸 (SDMA) 在生物样品中的存在或量的用途。用于进行该测定法的试剂和试剂盒。

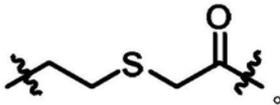


1. 一种轭合物,其包含与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶轭合的对称二甲基精氨酸,其中所述对称二甲基精氨酸通过5、6、7、8或9个原子的连接子与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶轭合。

2. 如权利要求1所述的轭合物,其中所述连接子通过取代氧原子附接到所述对称二甲基精氨酸的羧基基团上。

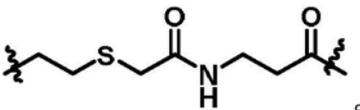
3. 如权利要求1所述的轭合物,其中所述连接子通过酰胺键附接到羧基基团上。

4. 如权利要求3所述的轭合物,其中所述对称二甲基精氨酸通过式A的连接子与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶轭合:



A

5. 如权利要求1所述的轭合物,其中所述对称二甲基精氨酸通过式B的连接子与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶轭合:



B

6. 一种组合物,其包含如权利要求1-5中任一项所述的轭合物和对游离的对称二甲基精氨酸具有特异性的抗体。

7. 如权利要求6所述的组合物,其中所述对游离的对称二甲基精氨酸具有特异性的抗体对于不对称二甲基精氨酸的反应性低于其对游离的对称二甲基精氨酸的反应性的25%。

8. 如权利要求7所述的组合物,其中所述抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对游离的对称二甲基精氨酸的反应性的1%。

9. 一种试剂盒,其包含以下组分:如权利要求1-5中任一项所述的轭合物和对对称二甲基精氨酸具有特异性的抗体。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,还包含以下组分:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

11. 一种反应混合物,其包含如权利要求9或权利要求10所述的试剂盒的组分和疑似含有对称二甲基精氨酸的样品。

12. 一种试剂盒,其包含用于对含有游离的对称二甲基精氨酸的样品进行测定的试剂,包含:

(a) 用于进行第一次测定的第一组试剂,其包括:

- i. 包含对游离对称二甲基精氨酸有特异性的抗体和酶的信号产生底物的第一试剂,和
- ii. 包含如权利要求1-5中任一项所述的轭合物的第二试剂,和

(b) 用于进行第二次测定的第二组试剂,包括:

- i. 包含所述底物的第三试剂。

13. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述第二组试剂还包含含有稀释剂与缓冲剂中至少一种的第四试剂。

14. 如权利要求13所述的试剂盒,其中所述第四试剂还包含所述轭合物或所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

15. 如权利要求14所述的试剂盒,其中试剂中的至少一种包含除所述轭合物的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶之外的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的抑制剂。

16. 如权利要求13所述的试剂盒,其中所述第一试剂中轭合物的浓度比所述第四试剂中轭合物的浓度高5至150倍。

17. 如权利要求12所述的试剂盒,还包含标准品,所述标准品包含在已被去除对称二甲基精氨酸的样品溶液中稀释的已知量的对称二甲基精氨酸。

18. 如权利要求17所述的试剂盒,其中已被去除对称二甲基精氨酸的样品溶液是经分离的血清、经分离的血浆或经预处理的样品。

19. 如权利要求13所述的试剂盒,其中所述第一试剂和所述第二试剂中的至少一种还包含电子介体和染料,并且所述第三试剂还包含所述介体和所述染料,其中所述介体从所述底物接受电子并将其转移到所述染料中。

20. 如权利要求19所述的试剂盒,其中所述第一试剂和所述第二试剂中的至少一种包含电子介体和染料,并且所述第三试剂和所述第四试剂之一的至少一种包含所述介体和所述染料,其中所述介体从所述底物接收电子并将其转移到所述染料。

21. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对于游离对称二甲基精氨酸的反应性的25%。

22. 如权利要求21所述的试剂盒,其中所述抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对游离对称二甲基精氨酸的反应性的1%。

23. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述底物包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

24. 如权利要求12所述的试剂盒,其中所述第二试剂还包含葡萄糖-6-磷酸。

25. 一种用于确定游离对称二甲基精氨酸在样品中的存在或量的方法,包括:

(a) 使所述样品与对游离对称二甲基精氨酸具有特异性的抗对称二甲基精氨酸抗体、如权利要求1-5中任一项所述的轭合物和包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的底物相接触,

(b) 测量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化,

(c) 基于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化确定游离对称二甲基精氨酸在样品中的存在或量。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述测量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化包括测量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化率。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述基于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化确定对称二甲基精氨酸在样品中的存在或量包括将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化率与标准曲线进行比较。

28. 如权利要求25所述的方法,其中所述测量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化包括测量烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化量。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述基于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化确定对称二甲基精氨酸在样品中的存在或量包括将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸至NADH的转化量与标准曲线进行比较。

30. 如权利要求25-29中任一项所述的方法,其中所述样品是血清、血浆、尿液或脑-脊髓液。

31. 如权利要求25-29中任一项所述的方法,其中所述对游离对称二甲基精氨酸具有特

异性的抗对称二甲基精氨酸抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对于游离对称二甲基精氨酸的反应性的25%。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述抗对称二甲基精氨酸抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对游离对称二甲基精氨酸的反应性的1%。

33. 一种用于进行分析物测定的方法,其中所述分析物为游离对称二甲基精氨酸,所述方法包括:

(a) 进行样品第一反应序列,包括:

i. 通过使所述样品与抗分析物抗体、如权利要求1-5中任一项所述的轭合物以及当与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶相接触时产生信号的底物相接触来形成样品第一反应混合物;和

ii. 测量来自所述样品第一反应混合物的信号;

(b) 进行样品第二反应序列,包括:

i. 通过使所述样品与所述底物相接触而形成样品第二反应混合物,

ii. 测量来自所述样品第二反应混合物的信号;

(c) 从来自步骤(a)的信号量减去来自步骤(b)的信号量,以提供净信号,

(d) 使用所述净信号来确定所述样品中分析物的量。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述样品第二反应混合物包含稀释剂、缓冲剂和抗分析物抗体中的至少一种。

35. 如权利要求33所述的方法,还包括:

(e) 进行校准品第一反应序列,包括:

i. 通过使包含已知量分析物的一组校准品中的每个校准品单独与抗分析物抗体、如权利要求1-5中任一项所述的轭合物以及当与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶接触时产生信号的底物接触来形成校准品第一反应混合物,和

ii. 测量来自每个校准品第一反应混合物的信号;

(f) 进行校准品第二反应序列,包括:

i. 通过使一组校准品中的每个校准品与所述底物相接触来形成校准品第二反应混合物,和

ii. 测量来自所述校准品第二反应混合物的信号;

(g) 从步骤(f)的信号量减去步骤(e)的信号量,以便对每个校准品提供净信号,

(h) 使用来自两个或更多个校准品的净信号来生成标准曲线,

(i) 通过将来自所述样品的净信号与标准曲线进行比较来确定所述样品中分析物的量。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述校准品第二反应混合物包含稀释剂、缓冲剂和抗分析物抗体中的至少一种。

37. 一种用于进行分析物测定的方法,其中所述分析物为游离对称二甲基精氨酸,所述方法包括:

(a) 进行样品第一反应序列,包括:

i. 通过使所述样品与抗分析物抗体、如权利要求1-5中任一项所述的轭合物以及当与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶接触时产生信号的底物相接触来形成样品第一反应混合物;和

ii. 测量来自所述样品第一反应混合物的信号；
iii. 通过核算与样品第一反应混合物相关的背景，将所述样品第一反应混合物的反应速率标准化，

(b) 进行样品第二反应序列，包括：

i. 通过使所述样品与所述底物相接触来形成样品第二反应混合物，

ii. 测量来自所述样品第二反应混合物的信号；

iii. 通过核算与样品第二反应混合物相关的背景，使所述样品第二反应混合物的反应速率标准化，

(c) 从步骤(a) (iii) 的经标准化的速率减去步骤(b) (iii) 的标准化速率，以提供含有分析物的样品的最终反应速率，

(d) 使用所述最终反应速率来确定样品中分析物的量。

38. 如权利要求37所述的方法，其中所述第二反应混合物包含稀释剂、缓冲剂和抗分析物抗体中的至少一种。

39. 如权利要求37所述的方法，其中所述核算与样品第一反应混合物相关的背景包括从与所述样品第一反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。

40. 如权利要求37所述的方法，其中所述核算与样品第二反应混合物相关的背景包括从与所述样品第二反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。

41. 如权利要求37所述的方法，还包括：

(e) 进行校准品第一反应序列，包括：

i. 通过使包含已知量分析物的一组校准品中的每个校准品单独与抗分析物抗体、如权利要求1-5中任一项所述的轭合物以及当与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶接触时产生信号的底物相接触来形成校准品第一反应混合物，和

ii. 测量来自所述每个校准品第一反应混合物的信号；

iii. 通过核算与每个校准品第一反应混合物相关的背景，来使每个校准品第一反应混合物的反应速率标准化，

(f) 进行校准品第二反应序列，包括：

i. 通过使一组校准品中的每个校准品与所述底物相接触来形成校准品第二反应混合物，

ii. 测量来自所述校准品第二反应混合物的信号；

iii. 通过核算与校准品第二反应混合物相关的背景，来使所述校准品第二反应混合物中的每个校准品的反应速率标准化，

(g) 从步骤(e) (iii) 的标准化速率减去步骤(f) (iii) 的标准化速率，以提供每个校准品的最终反应速率，

(h) 基于每个校准品的最终反应速率生成标准化标准曲线，

(i) 通过将所述样品的标准化反应速率与标准化标准曲线进行比较来确定样品中分析物的量。

42. 如权利要求41所述的方法，其中所述校准品第二反应混合物包含稀释剂、缓冲剂和

抗分析物抗体中的至少一种。

43. 如权利要求41所述的方法,其中所述核算与校准品第一反应混合物相关的背景包括从与每个校准品第一反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。

44. 如权利要求41所述的方法,其中所述核算与校准品第二反应混合物相关的背景包括从与每个校准品第二反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。

45. 如权利要求33所述的方法,其中所述样品是生物样品。

46. 如权利要求45所述的方法,其中所述样品是血清、血浆、尿液或脑-脊髓液。

47. 如权利要求41所述的方法,其中所述校准品包括在血清或血浆中稀释的分析物。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述血清是经分离的血清或血浆。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述校准品包括预处理样品。

50. 如权利要求35所述的方法,其中所述样品第二反应混合物还包含所述轭合物。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述样品第一反应混合物中轭合物的浓度比所述样品第二反应混合物中轭合物的浓度高5至150倍。

52. 如权利要求50所述的方法,其中所述校准品第二反应混合物还包含所述轭合物。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述校准品第一反应混合物中轭合物的浓度比所述校准品第二反应混合物中轭合物的浓度高5至150倍。

54. 如权利要求33所述的方法,其中所述抗分析物抗体对游离对称二甲基精氨酸具有特异性。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对于游离对称二甲基精氨酸的反应性的25%。

56. 如权利要求54所述的方法,其中所述抗体对于不对称二甲基精氨酸、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的反应性低于其对于游离对称二甲基精氨酸反应性的1%。

57. 如权利要求33所述的方法,其中任何所述反应混合物包含除所述轭合物的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶之外的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的抑制剂。

58. 如权利要求33所述的方法,其中所述样品第一反应混合物和所述样品第二反应混合物还包含电子介体和染料,其中所述介体接受来自所述底物的电子并将其转移到所述染料。

59. 如权利要求41所述的方法,其中所述校准品第一反应混合物和所述校准品第二反应混合物还包含电子介体和染料,其中所述介体接受来自所述底物的电子并将其转移到所述染料。

60. 如权利要求1-5中任一项所述的轭合物用于制备测定动物中慢性肾脏疾病的试剂的用途。

带有对背景信号的补偿的均相免疫测定

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2015年2月20日提交的序列号为62/118,832的美国临时专利申请的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开大体上涉及允许补偿样品和试剂中固有的背景信号的均相免疫测定法。在特定实施方式中,本公开涉及均相免疫测定法用于检测对称二甲基精氨酸(SDMA)在生物样品中的存在或量的用途。

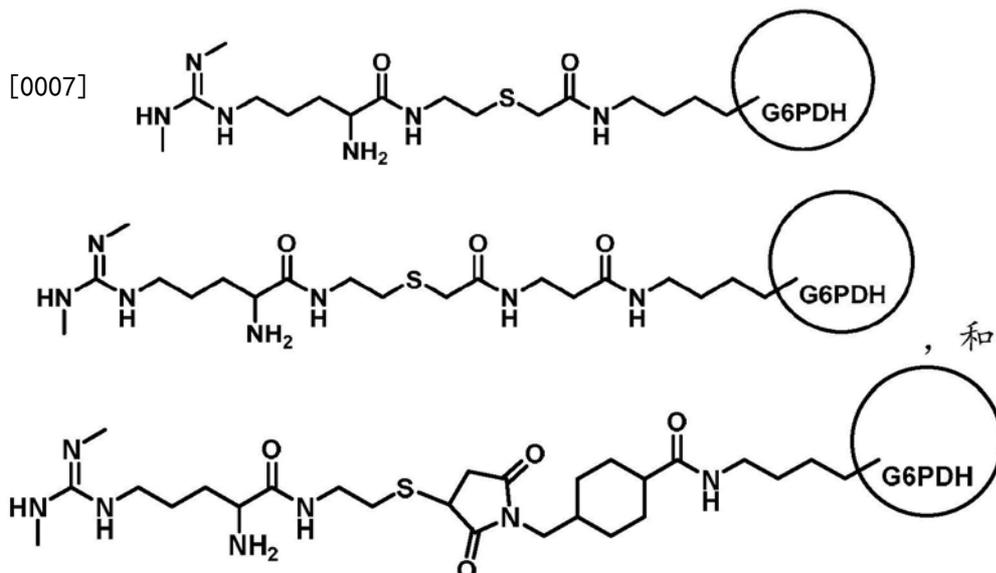
背景技术

[0004] 均相免疫测定法已被实施用于测定各种分析物,最主要是用于药物滥用的分析物。SDMA已被鉴定为在生物样品中用作用于评估例如肾功能、心血管功能和SLE的标志物。与用于药物滥用的分析物相比,SDMA通常以相对低的浓度存在于生物样品中。

[0005] 因此,发明人已确认了在本领域对于更精确和灵敏的均相免疫测定法的需要,特别是对于在生物样品中具有低浓度的分析物,诸如SDMA。

发明内容

[0006] 在一个方面,本公开涉及对称二甲基精氨酸(SDMA)的轭合物(conjugates),例如SDMA和酶的轭合物。在本公开的一个实例中,轭合物是与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)轭合的SDMA。在多个实施方式中,SDMA通过5至15个原子的连接子与酶轭合。类似地,SDMA可以通过长度为约5-15埃连接子的酶。本公开的实例轭合物包括以下:



[0008] 在另一方面,本公开涉及包括本公开的轭合物和对游离SDMA具有特异性的抗体的组合物。在多个实施方式中,对游离SDMA具有特异性的抗体对于不对称二甲基精氨酸(ADMA)的反应性低于其对游离SDMA的反应性的25%。类似地,抗体可以与一种或多种选自

不对称二甲基精氨酸 (ADMA)、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的化合物没有或基本上没有交叉反应性。

[0009] 在另一方面,本公开涉及包括本公开的轭合物和对SDMA具有特异性的抗体的试剂盒。

[0010] 在多个方面,本公开的试剂盒包括用于在含有分析物的样品上进行测定的试剂。所述试剂盒可以包括以下组分:

[0011] (a) 用于进行第一次测定的第一组试剂,包括:

[0012] i. 包括抗分析物抗体和酶的信号产生底物的第一试剂,和

[0013] ii. 包括分析物和所述酶的轭合物的第二试剂,和

[0014] (b) 用于进行第二次测定的第二组试剂,包括

[0015] i. 包括所述底物的第三试剂。

[0016] 在所述试剂盒中,第二组试剂可进一步包括包含稀释剂和缓冲剂中的至少一种的第四试剂。所述第四试剂还可以包括所述轭合物或所述酶。此外,所述试剂盒中的至少一种试剂包括除所述轭合物的酶以外的酶的抑制剂。在一个实施方式中,第一试剂中轭合物的浓度比第四试剂中轭合物浓度高约5至约150倍。所述试剂盒还包括含有在已被去除所述分析物的样品溶液中稀释的已知量分析物的标准品。例如,已被去除分析物的样品溶液可以是经分离的血清(stripped serum)、经分离的血浆(stripped plasma)或预处理的样品。第一试剂和/或第二试剂还可以包括电子介体和染料,第三试剂和/或第四试剂可以进一步包括所述介体和所述染料,其中所述介体从所述底物接受电子并将其转移到所述染料。

[0017] 此外,本公开涉及包括本公开试剂盒的组分和疑似含有SDMA的样品的反应混合物。

[0018] 在另一个实施方式中,本公开涉及用于确定游离SDMA在样品中的存在或量的方法。该方法包括使样品与对游离SDMA具有特异性的抗SDMA抗体、权利要求1的轭合物和包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的底物相接触,测量NAD至NADH的转化,并基于NAD至NADH的转化来确定SDMA在样品中的存在或量。

[0019] 在本公开方法的多个实施方式中,测量NAD至NADH的转化(conversion)可包括测量NAD至NADH的转化率(rate of conversion)。例如,基于NAD至NADH的转化来确定SDMA在样品中的存在或量可以包括将NAD至NADH的转化率与标准曲线比较,或者测量NAD至NADH的转化可包括测量NAD至NADH的转化量。基于NAD至NADH的转化来确定SDMA在样品中的存在或量可以还包括将NAD至NADH的转化量与标准曲线比较。

[0020] 在本公开方法的另一方面,所述方法包括以下步骤:

[0021] (a) 进行样品第一反应序列,包括:

[0022] i. 通过使样品与抗分析物抗体、包括分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物相接触来形成样品第一反应混合物;以及

[0023] ii. 测量来自样品第一反应混合物的信号;

[0024] (b) 进行样品第二反应序列,包括:

[0025] i. 通过使样品与所述底物相接触而形成样品第二反应混合物,

[0026] ii. 测量来自样品第二反应混合物的信号;

[0027] (c) 从来自步骤(a)的信号量减去来自步骤(b)的信号量,以提供净信号,

- [0028] (d) 使用净信号来确定样品中分析物的量。
- [0029] 本公开方法还可以包括以下步骤：
- [0030] (a) 进行校准品第一反应序列，包括：
- [0031] i. 通过将包括已知量分析物的一组校准品中的每个校准品与抗分析物抗体、包括分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物单独接触来形成校准品第一反应混合物，和
- [0032] ii. 测量每个校准品第一反应混合物的信号；
- [0033] (b) 进行校准品第二反应序列，包括：
- [0034] i. 通过将一组校准品中的每个校准品与所述底物相接触来形成校准品第二反应混合物，和
- [0035] ii. 测量校准品第二反应混合物的信号；
- [0036] (c) 从来自步骤 (b) 的信号量减去来自步骤 (a) 的信号量，以提供每个校准品的净信号，
- [0037] (d) 使用来自两个或更多个校准品的净信号来产生标准曲线，
- [0038] (e) 通过将来自样品的净信号与标准曲线进行比较来确定样品中分析物的量。
- [0039] 在本公开方法的其它实施方式中，所述方法可以包括以下步骤：
- [0040] (a) 进行样品第一反应序列，包括：
- [0041] i. 通过使样品与抗分析物抗体、包括分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物相接触来形成样品第一反应混合物；和
- [0042] ii. 测量来自样品第一反应混合物的信号；
- [0043] iii. 通过核算 (accounting for) 与样品第一反应混合物相关的背景，来使样品第一反应混合物的反应速率标准化 (normalizing)，
- [0044] (b) 进行样品第二反应序列，包括：
- [0045] i. 通过使样品与所述底物相接触而形成样品第二反应混合物，
- [0046] ii. 测量来自样品第二反应混合物的信号；
- [0047] iii. 通过核算与样品第二反应混合物相关的背景，来使样品第二样品反应混合物的反应速率标准化，
- [0048] (c) 从步骤 (a) (iii) 的标准化速率减去步骤 (b) (iii) 的标准化速率，以提供含有分析物的样品的最终反应速率，
- [0049] (d) 使用最终反应速率来确定样品中分析物的量。
- [0050] 本公开方法还可以包括以下步骤：
- [0051] (a) 进行校准品第一反应序列，包括：
- [0052] i. 通过使包括已知量分析物的一组校准品中的每个校准品与抗分析物抗体、包括分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物单独接触来形成校准品第一反应混合物，和
- [0053] ii. 测量来自每个校准品第一反应混合物的信号；
- [0054] iii. 通过核算与每个校准品第一反应混合物相关的背景，来使每个校准品第一反应混合物的反应速率标准化，
- [0055] (b) 进行校准品第二反应序列，包括

- [0056] i. 通过使一组校准品中的每个校准品与所述底物相接触形成校准品第二反应混合物,
- [0057] ii. 测量来自校准品第二反应混合物的信号;
- [0058] iii. 通过核算与校准品第二反应混合物相关的背景, 来使校准品第二反应混合物中的每个校准品的反应速率标准化,
- [0059] (c) 从来自步骤 (a) (iii) 的标准化速率减去步骤 (b) (iii) 的标准化速率, 以提供每个校准品的最终反应速率,
- [0060] (d) 基于每个校准品的最终反应速率生成标准化标准曲线,
- [0061] (e) 通过将样品的标准化反应速率与标准化标准曲线进行比较来确定样品中分析物的量。
- [0062] 在本公开方法的多个方面, 所述样品和校准品第二反应混合物可以包括稀释剂、缓冲剂和抗分析物抗体中的任何一种或多种。此外, 与样品第一反应混合物和/或校准品第一反应混合物相关的背景的核算可以包括从与每个样品和/或校准品第一反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。类似地, 与样品和/或校准品第二反应混合物相关的背景的核算包括从与样品第二反应混合物和/或每个校准品第二反应混合物的反应速率的确定相关的多个信号测量中的每一个中减去背景。
- [0063] 在本公开方法中, 所述样品可以是生物样品, 诸如血清、血浆、尿液或脑-脊髓液。
- [0064] 权利要求56的方法, 其中校准品包括稀释在血浆或血清中的分析物, 包括例如经分离的血清或血浆。在另一个实施例中, 校准品可以是预处理样品。
- [0065] 在本公开方法的又一方面, 所述样品和/或校准品第二反应混合物还可包含所述轭合物。例如, 所述样品或校准品第一反应混合物中的轭合物可以以高于所述样品或校准品第二反应混合物中轭合物浓度的约5至约150倍存在。
- [0066] 再者, 在本公开方法的其它方面, 任何反应混合物可以包括除了所述轭合物的酶之外的酶的抑制剂。此外, 任何反应混合物还可以包括电子介体和染料, 其中介体从底物接收电子并将其转移到染料。
- [0067] 在另一方面, 本公开涉及用于测定动物中的慢性肾脏疾病的方法。所述方法包括根据本公开方法测定SDMA在来自动物的生物样品中的存在或量, 以及基于SDMA在样品中的存在量确定动物中的慢性肾脏疾病。

附图说明

- [0068] 图1示出了本公开的检测法在来自正常群体和患有慢性肾脏疾病 (CKD) 的患者的人血清样品上的结果。
- [0069] 图2示出了使用SIA激活G6PDH以将SDMA与G6PDH轭合的过程的示意图。
- [0070] 图3示出了使用SBAP激活G6PDH以将SDMA与G6PDH轭合的过程的示意图。
- [0071] 图4示出了使用SMCC激活G6PDH以将SDMA与G6PDH轭合的过程的示意图。
- [0072] 图5是介体-染料反应机理的示意图, 其中介体将电子转移到染料以便还原染料并使染料的吸光度发生偏移。
- [0073] 图6示出了掺入人血清中并根据本公开方法分析的SDMA的校准曲线。
- [0074] 图7示出了掺入人血清中并根据本公开的固定计算方法和速率计算方法分析的

SDMA的校准曲线。

[0075] 图8示出了根据本公开进行但不减去背景信号的已知浓度SDMA的测定结果。

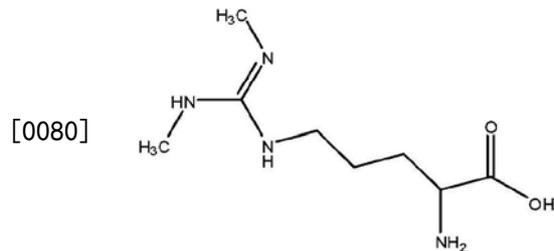
[0076] 图9、10和11示出了根据本公开使用犬科动物(图9)、猫科动物(图10)和马科动物(图11)的经分离的血清校准品的SDMA测定的结果。

[0077] 图12示出了根据本公开使用缓冲剂基校准品的SDMA测定的结果。

具体实施方式

[0078] 在详细描述本发明之前,将定义若干术语。如本文所使用的,单数形式“一/一个/一种(a)”、“一/一个/一种(an)”和“所述/该(the)”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。

[0079] SDMA是对称二甲基精氨酸。SDMA的结构是:



[0081] 尽管SDMA的一个或多个氨基酸残基可以存在于多肽中,但是“游离SDMA”是指非多肽链的一部分的SDMA,包括SDMA的盐。

[0082] 本文所用的术语“类似物”通常是指可与分析物竞争受体的分析物的修饰形式,所述修饰提供了将分析物连接到另一部分的方法,诸如标记物或固相载体。分析物类似物可以与分析物类似的方式结合抗体。

[0083] 本文所用的术语“抗体”通常是指由B淋巴细胞产生的应答于对抗原的暴露并特异性结合该抗原的糖蛋白。术语“抗体”以其最广泛的意义上使用,并且具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物学活性即可。

[0084] 如本文所用,“抗SDMA抗体”、“抗SDMA抗体部分”或“抗SDMA抗体片段”和/或“抗SDMA抗体变体”等包括含有至少一部分免疫球蛋白分子的任何含蛋白质或肽的分子,诸如,但不限于重链或轻链恒定区的互补性决定区(CDR)、构架区或其任何部分。

[0085] 本文所用的术语“抗体片段”是指全长抗体的一部分,通常是其抗原结合或可变域。具体地,例如,抗体片段可以包括Fab、Fab'、F(ab')²和Fv片段;双体抗体(diabodies);线性抗体;单链抗体分子;以及来自抗体片段的多特异性抗体。

[0086] 本文所用的术语“抗原”通常是指能够在适当条件下与对该抗原具有特异性的抗体反应的物质。

[0087] 本文所用的术语“分析物”通常是指样品中被检测和/或测量的物质或物质组。

[0088] 本文所用的术语“生物样品”通常是指来自人或动物的组织或液体样品,包括但不限于全血、血浆、血清、脊髓液(如脑脊髓液);淋巴液,腹液(腹水),皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外部部分,眼泪,唾液,尿液,血细胞,肿瘤,器官,组织和体外细胞培养成分的样品。

[0089] 本文所用的术语“交叉反应性”通常是指抗体的单个抗原结合位点与多于一种抗原决定因子(determinant)反应的能力或抗体分子群体与多于一种抗原反应的能力。一般来说,交叉反应是因为:(i)交叉反应抗原与免疫抗原共有表位,或(ii)其具有与免疫抗原上的表位结构相似的表位(多特异性)。

[0090] 本文所用的术语“标记(label)”是指可以直接或间接地与分析物类似物(例如,SDMA类似物)结合(例如,经由共价或非共价方式,单独或封装(encapsulated))的可检测的化合物或组合物。例如,酶标记可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。本公开中使用的酶可以是但不限于:碱性磷酸酶(AP);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(“G6PDH”); β -半乳糖苷酶(B GAL);和辣根过氧化物酶(HRP),苹果酸脱氢酶(MDH)。对酶的任何表述(诸如本文中的“G6PDH”或“葡萄糖-6-磷酸脱氢酶”)还包括该酶的变体、同种型和突变体,例如US 6,455,288中所述的具有氨基酸取代的G6PDH,该专利的全部内容通过引用并入本文。标记的使用会产生可通过诸如电磁辐射或直接视觉观察的方式检测并且可任选被测量的信号。

[0091] 本文使用的术语“单克隆抗体”通常是指从基本同种的抗体群体获得的抗体,即组成群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。与通常包括针对不同表位的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每个单克隆抗体针对抗原上的单个表位。修饰语“单克隆”仅指抗体的特征,而不应被解释为需要通过任何特定方法生产抗体。具体地,例如,单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法制备,或者可以使用已知技术从噬菌体抗体库分离。

[0092] 本文所用的术语“多肽”通常是指具有通过肽键连接的氨基酸序列的分子。该术语包括蛋白质、融合蛋白、低聚肽、环肽和多肽衍生物。抗体和抗体衍生物在上文分开的部分中讨论,但为了本公开的目的,抗体和抗体衍生物被视为多肽和多肽衍生物的亚类。

[0093] “受体”是指能够识别分子的特定空间和极性机构(例如表位或决定位点)的任何化合物或组合物。示例性受体包括抗体,Fab片段等。

[0094] “结合特异性”或“特异性结合”是指第一分子对第二分子的实质性识别,例如分析物,诸如SDMA,以及多克隆或单克隆抗体,或对分析物具有特异性的抗体片段(例如,Fv、单链Fv、Fab'或F(ab')²片段)。例如,本文使用的“特异性”通常是指单个抗体结合位点仅与一种抗原决定因子反应的能力或抗体分子群体与仅一种抗原反应的能力。一般来说,分析物-抗体反应中具有高度的特异性。抗体可以区分以下中的区别:(i)分析物的一级结构,(ii)分析物的异构体形式,和(iii)如果适用的话,分析物的二级和三级结构。表现出高特异性的抗体-分析物反应显示低交叉反应性。

[0095] “实质结合”或“基本结合”是指在特定测定条件下在测定混合物中的分子之间的特异性结合或识别的量。在其最广泛的方面,实质结合涉及第一分子不能结合或识别第二分子与第一分子能结合或识别第三分子之间的差异,使得该差异足以允许进行在一组特定测定条件下区别特异性结合的有意义的测定,所述一组特定测定条件包括分子的相对浓度和培育的时间和温度。在另一方面,当在一组特定测定条件下第一分子表现出对第二分子的反应性低于其表现出的对第三分子的反应性的25%,例如低于20%、低于15%、低于10%、低于5%或低于1%时,一个分子在交联反应性意义上基本不能结合或识别另一分子。可以使用若干众所周知的方法测试特异性结合,例如,免疫组织化学测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或western印迹测定。

[0096] 本文所用的术语“盐”是指在化合物的酸和碱性官能团之间形成的盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐, 酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡萄糖酸盐, 糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即, 1, 1'-亚甲基-二-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。术语“盐”还指在具有酸官能团(诸如羧酸官能团)的化合物与无机或有机碱之间形成的盐。合适的碱包括但不限于碱金属诸如钠、钾和锂的氢氧化物; 碱土金属诸如钙和镁的氢氧化物; 其他金属诸如铝和锌的氢氧化物; 氨和有机胺, 诸如未取代或羟基取代的单-、二-或三烷基胺; 二环己胺; 三丁胺; 吡啶; N-甲基、N-乙基胺; 二乙胺; 三乙胺; 单-、双-或三-(2-羟基-低级烷基胺), 诸如单-、双-或三-(2-羟乙基)胺, 2-羟基-叔丁胺或三-(羟甲基)甲胺, N,N,-二低级烷基-N-(羟基低级烷基)胺, 诸如N,N,-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三(2-羟乙基)胺; N-甲基-D-葡糖胺; 和氨基酸诸如精氨酸、赖氨酸等。

[0097] 现在转向本公开, 一般来说, 本公开涉及以解决与除分析物之外的样品和试剂组分相关的背景信号的方式对样品中的分析物进行免疫检测。例如, 除分析物之外的样品组分可以相互反应或与用于测定的试剂的组分反应。这种反应可能导致干扰检测方法的准确性。众所周知生物样品包含许多能在测定中产生背景噪音的成分。

[0098] 可以使用基于EMIT(酶放大免疫测定技术)均相免疫测定系统的改进测定来分析样品。在传统的EMIT®测定中, 将含有分析物的样品与抗分析物抗体、分析物和酶的轭合物以及当与该酶接触时产生信号的底物相接触。抗体与轭合物的结合抑制或降低酶活性。当分析物存在于样品中时, 样品分析物与轭合分析物竞争以结合抗体, 这导致从酶/底物生成更多的信号。当不存在分析物时, 抗体和轭合物之间可能会发生更多的结合, 从而限制或防止信号生成。因此, 当存在更多的分析物时会生成更多的信号。动力学测定可以使用信号生成率作为样品在分析物中的存在或量的指标。

[0099] 在本公开的一个方面, 传统的EMIT测定格式在分析物和校准品两者的第一反应序列中进行。为了方便起见, 本第一反应序列可以在本文中被识别为“显色测定”。然后, 在本公开的改进测定中, 在样品和校准品的第二反应序列中进行第二和单独的测定。为方便起见, 本文将第二反应序列识别为“空白测定”。空白测定的试剂不含抗分析物抗体, 且通常不含轭合物。因此, 空白测定提供了与样品相关的背景信号。

[0100] 在多个方面, 公开涉及在两种示例性方法中使用信号来确定分析物的浓度。为了方便起见, 示例性方法在本文中称为“速率”方法和“固定”方法。在两种方法中, 使用显色和空白测定中的信号量或信号之间的差异。在一个方面, 如本领域熟知的那样, 信号被测量为酶/底物系统在特定波长处的吸光度。例如, 测量G6PDH/NAD酶/底物系统在340nm处的吸光度将提供在G6PDH存在下NAD至NADH的相对转化量的值。该值可用于提供反映酶所致的底物转化的净信号(对于固定方法)或反应速率(reaction rate)(对于速率方法)。作为可选的, 酶底物反应可以与介导在底物和多种电子受体(例如, 染料)之间的电子转移的电子载体联合使用, 这将允许在不同于底物的波长下测量反应速率。

[0101] 在固定方法中, 计算净信号。在一个实施方式中, 净信号基于在预定终点处的显色和空白测定之间的信号差异(例如, 吸光度), 其可以是或不是通过全部底物的耗尽来完成

反应。在空白和显色测定的终点处测量的信号的差异量可以用于提供净信号(例如,净信号=[显色信号量]-[空白信号量])。或者,对于显色和空白测定两者,均可以确定它们在预定起始点T1(可以在完成所有试剂的混合时或混合后的另一个预定时间)和预定终止点(T2)之间的信号量的差异。然后可以使用来自这些确定的信号量的差异来确定净信号(例如,净信号=([T2显色]- [T1显色]) - ([T2空白]- [T1空白]))。可以将净信号与校准曲线进行比较,以确定样品在分析物中量。

[0102] 当基于来自显色和空白测定中的每一个的单次测量来计算净信号时,可以在试剂具有足够的时间进行反应之后进行测量。例如,可以在所有试剂混合后的约30秒至约10分钟进行每个测定中的单次测量。更具体地,单个测量可以在所有试剂混合后的30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、330、360、390、420、450、480、510、540、570和600秒钟之一时进行。当在空白和显色测定中的每一个测量两个信号时,在测定开始(样品和所有试剂混合)后的约15秒至2分钟之后进行第一次测量(T1)。这个时间可以根据试剂的浓度和样品的预期浓度进行调整。特别地,T1可以是在所有试剂混合后的15、30、45、60、75、90、105或120秒。第二次测量(T2)可是T1后的15秒至几分钟。例如,T2可以是在第一次测量(T1)之后的例如15秒、18秒、30秒、45秒或1、2、3、4或5分钟。

[0103] 在速率方法中,以确定的时间间隔从显色测定的信号中减去来自空白测定的信号以提供反应速率。校准品的反应速率用于提供校准曲线,其可用于通过将样品上的测定的反应速率的曲线与校准曲线进行比较来确定样品在分析物中的量。

[0104] 在速率方法中,反应速率可以通过在酶介导的反应期间在多个时间点测量信号(例如,吸光度)来确定。考虑试剂的浓度和测定的温度的信号测量的时间和间隔的确定属于本领域的常规技术。例如,速率可以如下测定:于在室温在样品(或校准品)和所有试剂混合后约2-10分钟开始测量吸光度,并且在另外的1-15分钟内每5-60秒再进行测量。反应速率可以表示为吸光度随时间的变化。例如,可以在将样品(或校准品)和所有试剂混合后约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10分钟开始测量吸光度。通常在约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15分钟内以5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60秒的间隔测量吸光度。这些时间可以延长或缩短,这取决于反应条件、分析物和试剂。

[0105] 在固定或速率方法中,来自样品第一反应混合物的背景可以在计算净信号或反应速率时核算以提供标准化信号。在一个实施方式中,从用于代替样品的校准品基质测量背景吸光度。最初在所有试剂与基质的混合之后或其后有限时间之后测量校准品基质的吸光度。校准品基质可以是缺少任何分析物的校准品或对照混合物。例如,缺少分析物的校准品基质可以通过透析或如本文进一步描述的另一预处理方法已去除分析物的样品。在一个实施方式中,经分离的或内源性物种特异性或非特异性血清、血浆或其他生物体液可用作校准品基质。在本文进一步描述的其它实施方式中,校准品基质可以是水或含有蛋白质和/或其它组合物的稀释剂(例如,PBS中的BSA)。校准品基质用于在显色测定和空白测定中代替样品,以提供两个测定的背景信号。

[0106] 如果已经确定了背景,则从固定方法(或T1和T2时的测量)的净信号中或从用于确定速率方法中的样品反应速率的每个测量中减去背景。例如,在速率方法中,从用于确定样品的反应速率的每个吸光度测量(即,吸光度随时间变化)中减去校准品基质(和试剂)的吸光度。在另一方面,以与样品反应速率相似的方式测定背景速率。然后从样品反应速率中减

去背景速率,以提供第一样品反应混合物的标准化反应速率。

[0107] 因此,本公开涉及用于进行分析物测定的方法。所述方法包括通过形成包括样品、抗分析物抗体、包含分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物的样品第一反应混合物,来对样品进行显色测定(样品第一反应序列)。通常,样品第一反应混合物通过如下方式形成:首先使样品与抗体和底物相接触,然后在第二步中加入轭合物。然而,样品可以先与抗体和轭合物组合,并且在第二步中加入底物。在一个方面,酶和轭合物保持分开,直到反应序列准备好开始。除非本文另有说明,本文所用的“接触”在其最广泛的方面以任何顺序组合试剂。一旦样品第一反应混合物已经形成,可以在混合后立即或在之后的一个或多个预定时间之后测量信号量用于本公开的固定或速率方法。

[0108] 在本公开的改进的固定和速率方法中,以与样品第一反应序列相似的方式进行单独的测定序列(样品第二反应序列或“空白测定”)。然而,样品第二反应序列的试剂不含抗分析物抗体。通常,空白测定的试剂不含轭合物,但是在此描述了其中加入少量轭合物或酶的实施方式。特别地,通过使样品与底物相接触形成样品第二反应混合物,在一些情况下,与轭合物接触但没有抗分析物抗体。测量来自样品第二反应混合物的信号。以与样品第一反应序列相同的方式确定使用来自校准品基质的背景的背景的净信号或反应速率,以提供样品第二反应序列的标准化净信号或标准化反应速率。

[0109] 在速率方法中,为了提供样品的最终反应速率,从样品第一反应序列的标准化反应速率中减去样品第二反应序列的标准化速率。最终反应速率可用于确定样品在分析物中的存在或量。通常,这通过将样品的最终反应速率与标准曲线进行比较来完成,该标准曲线可以根据本领域已知的方法制作。

[0110] 用于校准品的显色和空白测定可以以类似于样品的显色和空白测定的方式进行。因此,通过将包括已知量的分析物的一组校准品中的每个校准品与抗分析物抗体、包含分析物和酶的轭合物以及当与所述酶接触时产生信号的底物相接触形成校准品第一反应混合物,从而进行一系列的校准品第一反应序列(显色测定)。测量来自每个校准品第一反应混合物的信号,并且通过上述用于样品第一反应混合物的方式核算与每个校准品第一反应混合物相关的背景来生成每个校准品第一反应混合物的标准化净信号(固定方法)或标准化反应速率(速率方法)。其中一个校准品可以是用于确定背景的校准品基质(其不包括分析物)。

[0111] 在分开的反应序列(空白分析)中,校准品第二反应序列通过形成校准品第二反应混合物来进行,所述校准品第二反应混合物通过组校准品组中的每个校准品在不存在抗分析物抗体和特别是轭合物的情况下与底物相接触来形成。在一些情况下,轭合物也可以存在,通常以如本文进一步描述的少量存在。对于每个校准品第二反应混合物测量信号,并且通过上述方式核算与校准品第二反应混合物相关的背景,对每种混合物的净信号或反应速率进行标准化。

[0112] 因此,在计算固定方法中的背景信号时,从显色测定的标准化净信号中减去来自空白测定的标准化净信号。在速率方法中,通过从校准品第一反应序列中的每个校准品的标准化速率中减去校准品第二反应序列中的校准品的标准化速率来确定每个校准品的最终反应速率。然后可以基于每个校准品的最终反应速率来制作标准化标准曲线,并将其用于将样品的标准化反应速率与标准化标准曲线进行比较来确定样品在分析物中量。

[0113] 在一个实施方式中,与显色测定和空白相关的试剂在表1中示出。将试剂在适当的稀释剂和/或缓冲液中合并。如表1所示,空白测定试剂2 (R2) 不含轭合物,尽管其可以如本文进一步描述的那样存在,以确保反应具有适当体积的缓冲液。在某些方面,空白测定R1可能在未使用空白测定R2的情况下具有额外的体积。在一个实施方式中,用于显色测定的试剂与用于空白测定的试剂相同,除了存在或不存抗体和轭合物。当R2在空白测定中不含有任何轭合物时,它仍然含有稀释剂、缓冲液和其它用于显色测定的组分。

[0114] 表1

试剂组分	显色测定 R1	显色测定 R2	空白测定 R1	空白测定 R2
抗分析物抗体	×			
酶底物	×		×	
酶分析物 轭合物		×		

[0116] 在一些实施方式中,空白测定R1还可以含有抗分析物抗体。

[0117] 由于加入到反应混合物中的分析物-酶轭合物,显色测定中的校准品和测试样品通常可以预期地引起吸光度的增加。当在空白测定中进行测试时,许多样品也产生阳性反应,因为与内源底物或与R1底物反应的内源酶即使没有轭合物存在下也将引起吸光度的增加。然而,通常将样品和校准品稀释到通常较小的背景信号被进一步削弱的程度,使得当在空白测定中测试时,反应混合物在吸光度上几乎不引起变化。因为吸光度的变化可能会低于检测器的灵敏度范围,所以会导致自动分析仪的校准曲线失效。

[0118] 为了避免这个问题,可以将酶或分析物-酶轭合物加入到空白测定中以确保产生小的吸光度的阳性的变化(不管校准品或样品行为如何)。因此,表2示出了本实施方式中存在的试剂。

[0119] 表2

试剂组分	显色测定 R1	显色测定 R2	空白测定 R1	空白测定 R2
抗分析物抗体	×			
酶底物	×		×	
酶分析物 轭合物		×		×(轭合物或酶)

[0121] R2中酶或轭合物的浓度通常保持较低,以防止在校准品基质的测定中不必要的噪音。例如,当酶是G6PDH时,可以将约1-15ng/mL的酶(结合或未结合)加入到空白测定中。特别地,可以加入约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15ng/ml。R2中轭合物的量取决于分析物的大小,因为较大的分析物需要较大量的轭合物以提供相同量的酶。在一个实施方式中,用于显色测定的R2中酶(单独或结合的)的浓度比空白测定的R2中酶的浓度高约10至约150倍。在各种实施方式中,在显色测定中轭合物的浓度比酶在用于空白测定的试剂中的浓度高10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140和150倍。当结合时,酶的活性通常小于未结合的酶的活性。例如,结合酶的活性与未结合酶的活性差异很大,例如,结

合酶的活性为未结合的酶的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。因此,当未结合的酶用于空白测定的R2中时,其可以以比结合时少的量使用,并且仍然提供与结合酶相同的活性。

[0122] 当酶具有多于一种底物时,底物或多种底物可以过量存在于试剂中。

[0123] 在一些方面,测定试剂可以包括测定试剂的稳定剂。例如,当信号产生酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)时,可将葡萄糖-6-磷酸盐(G6P)或NAD加入含有轭合物的试剂中以稳定酶-分析物轭合物。

[0124] 血清含有几种有助于背景的酶。因此,向试剂稀释剂中添加特异性酶抑制剂可以进一步提高测定精度。抑制剂有助于消除显色和空白测定中的一部分干扰噪声。因此,在各个方面,反应组分可以包括内源性样品酶的抑制剂。例如,已知草氨酸钠是乳酸脱氢酶(LDH)的抑制剂,后者是NAD和/或NADP的酶。草氨酸钠通过阻止LDH转换样品中或可能是与测定相关的酶-底物系统的一部分(例如,G6PDH/NAD)的NAD来防止与内源性样品LDH相关的背景信号。超过三十种血清酶和酶抑制剂组合是已知的,并且抑制剂可用于其中许多。

[0125] 在一个方面,校准品包括已知量的分析物(或者校准品基质中不含有)在去离子水或盐水中以提供用于代替样品的校准品基质。在其它方面,使用经分离的血清代替水或盐水。透析的血清是天然的、物种特异性的或非特异性的血清或血浆,其已经在例如透析过程中将分析物去除。已知多种其它样品预处理方法可以除去或钝化分析物。在这些实施方式的每一个中,将溶液用已知量的分析物掺入以提供一系列超过样品在分析物中预期浓度范围的校准品。在另一个实施方式中,校准溶液是蛋白质基的溶液,诸如1-7%BSA在PBS中。在该实施方式中,可能需要将BSA校准品校准为经分离和加标的血清校准品。

[0126] 通常,因为空白测定旨在补偿内源性蛋白质、酶或有助于背景信号的其它大分子组分,水或盐水更适用于非生物样品,尽管在许多情况下使用水或盐水作为生物样品的校准品溶液可获得足够的特异性。此外,在自动分析仪中使用水或盐水缓冲液用于校准品基质可能具有为校准品基质产生错误信息的倾向,因为与使用缓冲液相关的反应速率可导致相比于血清的显著增加的反应速率。在这种情况下,减去校准品基质的吸光度值可能导致负的速率。虽然这些速率可以针对血清校准品基质进行标准化,但在这种情况下,自动分析仪通常会产生错误信息。

[0127] 根据本公开的一个实施方式,分析物是SDMA,且酶-轭合物系统是G6PDH/NAD。在该实施方式中,将SDMA的类似物与G6PDH结合并用作显色和空白测定中的轭合物,以确定来自动物诸如人、猫和狗的血清或血浆样品中SDMA的存在或量。在该实施方式的一个方面,通过将已知量的SDMA与校准品基质(经分离的血清或血浆)组合来制备校准品。如上所述使用如表3所示的示例性量的以下试剂进行显色和空白测定:

[0128] 表3

试剂组分	显色测定 R1	显色测定 R2	空白测定 R1	空白测定 R2
抗 SDMA 抗体 ($\mu\text{g/mL}$)	4-10	0	0	0
[0129] G6P (mM)	8-75	1-5	8-75	2
NAD (mM)	8-75	0	8-75 (XS)	0
SDMA-G6PDH ($\mu\text{g/mL}$)	0	0.25-0.75	0	5-30 (ng/mL)

[0130] 特别地,抗SDMA抗体在显色测定的R1中可以具有的浓度为约4至约10 $\mu\text{g/mL}$,例如,约4、5、6、7、8、9或10 $\mu\text{g/mL}$ 。在显色测定或空白测定的R1中,G6P和NAD可以具有约8-75mM,更特别地约10-65mM或约20-55mM,更特别地约8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70mM的浓度。在显色测定的R2中,SDMA-G6PDH轭合物可以具有约0.25至约0.75 $\mu\text{g/mL}$,更特别地约0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.65、0.70或0.75 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度。在空白测定的R2中,轭合物的浓度可以为约5-30ng/mL,更特别地约5、10、15、20、25或30ng/mL。

[0131] G6P存在于R2试剂中以稳定酶。或者,可以使用NAD。稳定底物是任选的。

[0132] 尽管可以调节体积以适应不同的分析物和反应条件,但是试剂可以与样品和校准品以下列体积混合用于显色和空白测定。

[0133] 样品:5-20 μL

[0134] R1:20-60 μL

[0135] R2:20-150 μL

[0136] 在一个具体的实施方式中,反应混合物含有10 μL 的样品、40 μL 的R1和125 μL 的R2。

[0137] 在显色和空白测定中使用上述试剂,可以制作校准曲线并用于确定血清或血浆样品中SDMA的存在或量。图1示出了使用速率方法用Beckman临床化学分析仪测定正常和慢性肾脏疾病人血清样品中SDMA的结果。结果显示了与金标准LC-MS值相比的SDMA浓度的准确测定。使用人血清(未经分离)作为校准品基质。因此,本公开涉及确定动物包括人和例如家畜、农场和动物园动物中的慢性肾脏疾病的方法。所述方法包括根据本公开的方法确定来自动物受试者的生物样品中的SDMA浓度,并将浓度与标准曲线或其他模型比较,其中样品中的SDMA的量来自与健康受试者和患有慢性肾脏疾病的受试者的相同物种。

[0138] 在一个实施方式中,公开涉及包括用于确定样品在分析物中存在或量的试剂的试剂盒。例如,试剂盒可以包括用于进行显色测定的第一组试剂,诸如包括抗分析物抗体和酶的信号产生底物的第一试剂,以及包括分析物和所述酶的轭合物的第二试剂。试剂盒还可以包括第二组试剂,其包括含有底物的第三试剂。第二组试剂还可以包括含有缓冲液/稀释剂和任选的所述轭合物的第四试剂。仅含缓冲液/稀释剂的第四试剂的目的是确保与第二组试剂相关的反应以适当的体积进行。当第二组试剂不包括第四试剂时,应相应地调整第三试剂的体积。此外,第三或第四试剂可以含有抗分析物抗体。

[0139] 每种试剂中组分的浓度和量可以如上文对于显色和空白测定中的每一个中的R1和R2所述。例如,第一试剂中轭合物的浓度比第四试剂中轭合物的浓度高约5至约150倍。在一个方面,试剂盒中的至少一种试剂包括除了轭合物的酶之外的酶的抑制剂。试剂盒还可

以包括标准品或一组标准品(校准品),其包括在合适的稀释剂,诸如水、盐水或经分离或加工的血清或血浆(例如,预处理的样品)中稀释的已知量的分析物。

[0140] 当分析物是SDMA时,示例性试剂盒在第一试剂中包括抗SDMA抗体(多克隆或单克隆)和底物,诸如NAD和G6P。第二试剂包括SDMA类似物和G6PDH的轭合物作为酶的稳定剂。第三试剂包括SDMA-G6PDH轭合物和任选的第四试剂。第四试剂可以仅含有稀释剂或缓冲液,或者其可以含有所述轭合物。

[0141] 除了试剂盒之外,本公开涉及包括试剂盒的试剂和疑似含有SDMA的样品的反应混合物。例如,反应混合物可以包括样品或校准品、抗SDMA抗体、SDMA-G6PDH轭合物、NAD和G6P。

[0142] 在本公开的试剂盒、方法和反应混合物中的每一个中,可以使用许多酶/底物系统代替G6PDH/NAD。作为另一个实例,苹果酸脱氢酶是类似于G6PDH的使用NAD⁺到NADH的还原来催化苹果酸到草酰乙酸的氧化的酶。此外,已知许多酶突变体可增强酶的信号或稳定性。参见例如第6,455,288号美国专利。

[0143] 分析物-酶轭合物可以通过多种已知方法制备。所用方法和试剂的选择可以提供分析物和酶之间各种长度的连接子。连接子长度可以影响抗体抑制酶活性的能力,从而影响测定灵敏度。通常,可以使用约5-15个原子或2-20埃的连接子。对于根据本公开可检测的许多分析物,酶与分析物的结合属于本领域的普通技术。

[0144] 例如,图2示出了式1的SDMA类似物(如下)与葡萄糖-6-脱氢磷酸酶(G6PDH)的轭合物。结合前,G6PDH被琥珀酰亚氨基碘乙酸酯(SIA)活化。使用SIA的活化导致SDMA和酶(-C-C-S-C-C(O)-)之间的五个原子的连接子,其不包括在SDMA衍生过程中由氮替代氧导致的SDMA上的非原生氮。

[0145] 图3示出了使用3-(溴乙酰氨基)丙酸琥珀酰亚胺酯(SBAP)将式1的SDMA类似物与G6PDH轭合产生了9个原子的连接子(不计非原生氮)(-C-C-S-C-C(O)-C-N-C-C(O)-)。

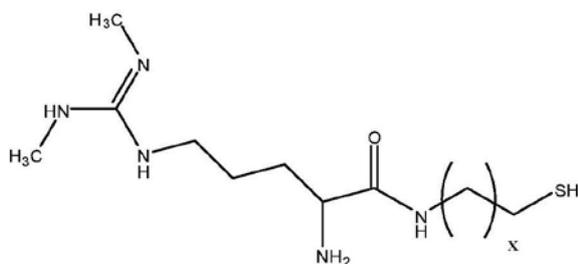
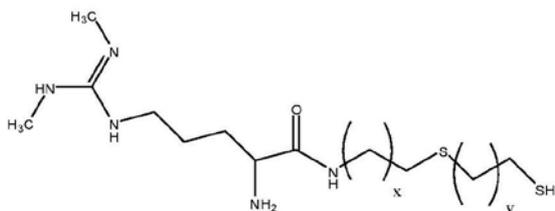
[0146] 图4示出了使用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)将式1的SDMA类似物与G6PDH的轭合产生了12个原子连接子。

[0147] 可以通过用其它试剂修饰G6PDH或在轭合反应中使用其它SDMA类似物来调整连接子的长度,以提供例如约5至约15个原子,特别是约5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个原子的连接子长度。因此,本公开涉及通过5-15个原子的连接子的SDMA和酶的轭合物,其仅包括经过最短路径而直接在连接子链中的那些原子,其排除了不是SDMA和酶之间最短路径的部分的连接子分子中的侧链、取代基或环的原子。

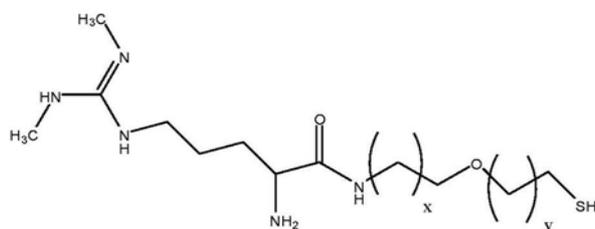
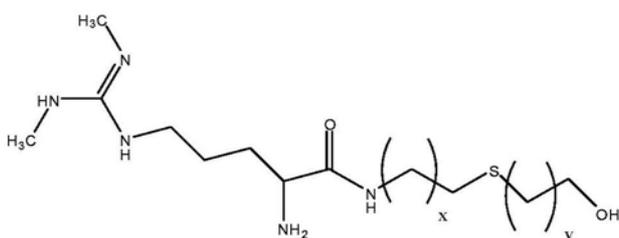
[0148] 连接子长度可以在约2埃至约20埃的范围内,特别是约5至约15埃,更特别地约6-10埃。

[0149] 在一个实施方式中,在G6PDH底物葡萄糖-6-磷酸盐(G6P)和/或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)存在下,将SDMA与G6PDH轭合。通过调节酶、底物和SDMA的比例可以获得最佳的轭合物-酶活性和抗体对该活性的抑制。

[0150] 适用于与G6PDH轭合的SDMA的几个类似物描述于第8,481,690号美国专利中,其全部内容通过引用并入本文。取决于SDMA和G6PDH之间的连接子的期望长度,可以使用以下类似物之一:

**A****B**

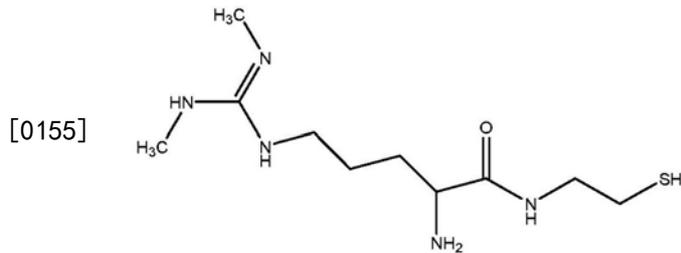
[0151]

**C****D**

[0152] 其中x和y是1至5的整数。

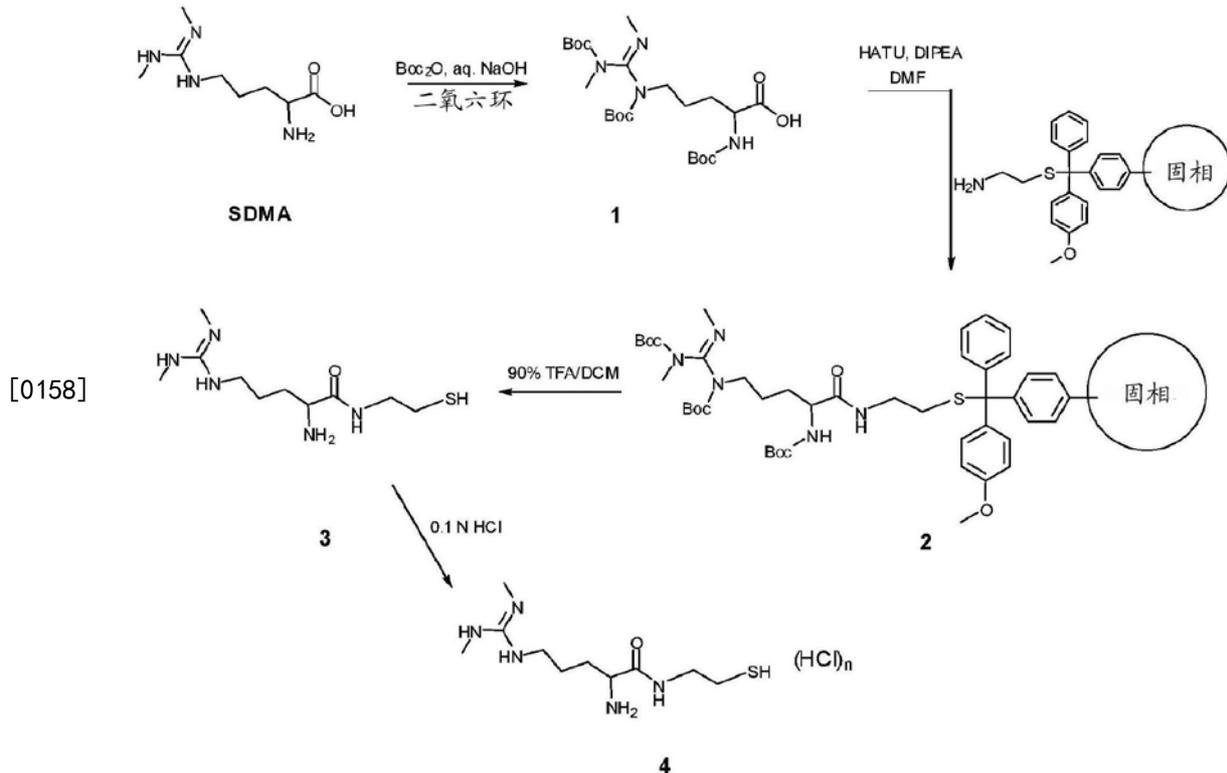
[0153] 式A、B和C提供可与包括适当“硫醇反应性位点”（即，将于硫醇基团反应的位点）的靶反应的可用硫醇。例如，马来酰亚胺、烷基和芳基卤化物以及 α -卤代酰基是可与硫醇反应形成硫醚的说明性硫醇反应性位点。类似地，吡啶基二硫化物可以与硫醇反应形成混合二硫化物。用SIA、SBAP或SMCC活化的G6PDH提供了适当的硫醇反应位点。当X=1时，式A与SIA活化的G6PDH的耦合提供了在SDMA和G6PDH之间五个原子的连接子。式A (X=1) 与SMCC的耦合产生十二个原子的连接子。其它连接子长度可以通过变化X来获得。

[0154] 在X=1的一个具体实施方式中，SDMA类似物具有以下结构式(式1)：



[0156] 式1可以由SDMA(可从EMD Chemicals Inc.,Gibbstown,NJ商购获得)通过以下说明性合成方案制备(1):

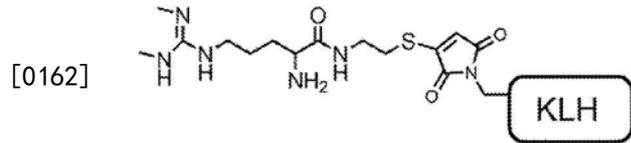
[0157] 方案1:



[0159] 通过使SDMA与二碳酸二叔丁酯(Boc_2O)反应来保护SDMA的一级和二级氨基结构。然后将得到的叔丁氧基羰基(BOC)保护的SDMA(Boc_3 -SDMA,1)与树脂连接。例如, Boc_3 -SDMA(1)可以通过使 Boc_3 -SDMA(1)与树脂在2-(1H-7-氮苯并三氮唑-1)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸甲铵(HATU)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的存在下在二甲基甲酰胺(DMF)中接触而连接到半胱胺-4-甲氧基三苯甲基树脂(EMD Chemicals,Inc.,Gibbstown,NJ)以提供树脂结合 Boc_3 -SDMA胱酰胺(2)。除去树脂结合 Boc_3 -SDMA胱酰胺(2)上的BOC保护基团,并使用例如在二氯甲烷中的三氟乙酸从树脂上切除所得树脂结合的SDMA胱酰胺,以得到SDMA胱酰胺(3),其通过与盐酸反应转化为盐酸盐(4)。

[0160] 传统的EMIT测定通过监测在340nm处的吸光度来测量NADH(或NADPH)的积累。在本公开的另一个实施方式中,向试剂中加入变色染料和电子介体可以允许测量不同于340nm处的吸光度的吸光度。在一个具体实例中,染料是3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT),且介体是1-甲氧基吩嗪甲硫酸盐(PMS)。如图5所示,PMS从NADP中吸收电子并将其转移到MTT,这还原了MTT以提供在约650nm处的吸光度。

[0161] 抗SDMA抗体可以是如第8,481,690号美国专利所述的多克隆或单克隆的。本领域技术人员已知制备多克隆和单克隆抗体的方法。在一个实施方式中,抗体是针对具有以下结构的SDMA-KLH轭合物产生的单克隆抗体:



[0163] 在各方面,用于本公开的改进的测定中的抗SDMA抗体可以对SDMA具有高特异性,并且与一种或多种选自不对称二甲基精氨酸(ADMA)、L-精氨酸和N-甲基精氨酸的化合物没有或基本上没有交叉反应性。例如,抗SDMA抗体对ADMA、L-精氨酸和N-甲基精氨酸具有低于在一组特定的测定条件下其对SDMA的反应性的25%、低于20%、低于15%、低于10%、低于5%或者低于1%的反应性。

[0164] 所有上述组分可用于确定样品中游离SDMA的存在或量的方法。例如,方法包括使样品与抗SDMA抗体、包括SDMA和G6PDH的轭合物以及包括NAD和G6P的底物相接触。如本文所述,测量NAD至NADH的转化率,并将其与标准曲线进行比较,以确定样品中SDMA的存在或量。如本文所述,SDMA与如本文所述具有5-15个原子的连接子(2-10埃)的G6PDH轭合。抗SDMA抗体可以是对于ADMA、L-精氨酸和N-甲基精氨酸没有反应性或基本上没有反应性的单克隆抗体

[0165] 在另一个实施例中,本发明涉及一种用于确定在样品中的SDMA的方法,所述方法包括衍生游离SDMA并使用针对该衍生物的抗体。例如,第2004/0214252号美国专利公开(其全部内容通过引用并入本文)描述了修饰SDMA的胍基氮的方法和修饰的SDMA的抗体。因此,在一个实施方式中,样本中的SDMA在根据本文的公开内容的方法确定之前被修饰。在该实施方式中,抗SDMA抗体应结合修饰的SDMA和轭合物的SDMA,后者也可以是被修饰的具有足够的亲和力以提供合适的测定。

[0166] 实施例

[0167] 实施例1:经分离的血清的制备

[0168] 将未处理的商业的犬科血清(500mL)装载到两英尺SNAKESKIN™透析管(3.5K MWC0,35mm Dry I.D.)(Thermo Scientific),并在4℃下对着带有20g碳粉的PBS缓冲液(20L)透析至少6小时。通过更换缓冲液和碳重复三次该过程。

[0169] 在透析之前和之后通过LC/MS测量血清中的SDMA浓度。在透析前的血清中,SDMA为9.89μg/dL。透析后,SDMA为0.02μg/dL。

[0170] 将用经炭分离的犬科血清储存在-80℃备使用。

[0171] 实施例2:SDMA标准品制备

[0172] 将SDMA.HCl(ChemBio)溶解在去离子水中至最终的SDMA浓度为1000μg/mL。将200μl SDMA水溶液加入到10ml经分离的血清中,使最终储备溶液具有20μg/ml的SDMA浓度。溶液储存在-80℃。将280μl SDMA储备溶液转移到10ml经分离的血清中,以制备56μg/dL的标准SDMA。通过连续地在经分离的血清中稀释储备溶液以制备其它SDMA标准品,提供28.0、14.0、7.0和3.75μl/dL的溶液。这些标准品可以通过LC/MS验证。

[0173] 实施例3:稀释剂的制备

[0174] 稀释剂制剂R1和R2含有表4中标明的组分。草氨酸钠是本文它处所述的可选组分。

[0175] 表4

组分	稀释剂	
	R1	R2
BSA	1%	1%
PEG6000	160 μ M	160 μ M
Brij-35	0.12%	0.12%
NaCl	0.3 M	0.3 M
小鼠血清	1%	1%
EDTA	1 mM	1 mM
Proclin150	0.4%	0.4%
G6P	--	2 mM
Tris	0.05 M	0.1 M
pH	7.0	8.0
草氨酸盐(可选)	0.015 M	0.015 M

[0177] 稀释剂制备方案

[0178] R1稀释剂 (1L比例)。将以下组分加入到500ml去离子水中：

[0179] 10g BSA

[0180] 50ml 1M TRIS,pH 8.0

[0181] 0.372g EDTA钠

[0182] 4ml Brij-35 (30%)

[0183] 4ml Proclin 150

[0184] 0.96g PEG 6000

[0185] 17.6g NaCl

[0186] 10ml小鼠血清

[0187] 1.665g草氨酸钠(可选)

[0188] 使用搅拌棒以低速充分混合该溶液。一旦粉末完全溶解,根据需要用10N NaOH或3N HCl将pH调节至7.0。将溶液加入量筒中,并使用去离子水使其达到1L的最终体积。充分混合后,将溶液轻柔混合,并通过0.2 μ m的氮化纤维素过滤器(cellulose nitride filter)过滤,并在使用前储存在4 $^{\circ}$ C。

[0189] R2稀释剂 (1L比例) :将以下组分加入到500ml去离子水中：

[0190] 10g BSA

[0191] 100ml 1M TRIS,pH 8.0

[0192] 2ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

- [0193] 4ml Brij-35 (30%)
- [0194] 4ml Proclin 150
- [0195] 0.96g PEG 6000
- [0196] 17.6g NaCl
- [0197] 10ml 小鼠血清
- [0198] G6P 0.56g
- [0199] 1.665g 草氨酸钠 (可选)
- [0200] 使用搅拌棒以低速充分混合该溶液。一旦粉末完全溶解, 根据需要用10N NaOH或3N HCl将pH调节至8.0。将溶液加入量筒中, 并使用去离子水使其达到1L的最终体积。充分混合后, 将溶液轻柔混合, 并通过0.2 μ m的氮化纤维素过滤器过滤, 并在使用前储存在4 $^{\circ}$ C。
- [0201] 实施例4: 测定试剂的制备
- [0202] R1试剂和R1空白的制备
- [0203] R1试剂和R1空白在R1稀释剂中含有NAD (35mM)、G6P (56mM)。R1试剂还包括抗体 (10.5 μ g/ml)。G6P是轭合物的稳定剂, 是可选的。
- [0204] 使稀释剂和其它材料在制备试剂前达到室温。通过将4.644g NAD和3.160g葡萄糖-6-磷酸钠 (G6P) 加入到R1稀释剂中来制备2X底物工作溶液 (100ml)。通过温和混合将粉末完全溶解, 并用10M NaOH或3M HCl将pH调节至7.0。将溶液加入量筒中, 加入另外的R1稀释剂, 以得到最终体积为100mL。通过在滚筒上轻柔旋转将溶液充分混合, 并通过0.2 μ m的氮化物纤维素过滤器过滤。
- [0205] 通过将抗体储备 (6.6mg/ml) 在R1稀释剂中以1:10倍预稀释来制备4X抗体工作溶液 (25ml), 得到660 μ g/ml的抗体溶液。将1.59ml预稀释的抗体溶液 (660 μ g/ml) 加入到23.41ml的R1稀释剂中以制备浓度为42 μ g/ml的抗体工作溶液 (4X)。
- [0206] 通过混合40ml底物工作溶液 (2X), 20ml抗体工作溶液 (4X) 和20ml R1稀释剂来制备R1试剂。将溶液轻柔混合, 用铝箔覆盖, 并在使用前在4 $^{\circ}$ C下储存。
- [0207] 通过混合40ml底物工作溶液 (2X) 和40ml R1稀释剂来制备R1空白。将溶液轻柔混合, 用铝箔覆盖, 并在使用前在4 $^{\circ}$ C下储存。
- [0208] R2试剂和R2空白的制备
- [0209] R2试剂含有在R2稀释剂中的SDMA-G6PDH轭合物 (0.42 μ g/ml)。R2空白含有在R2稀释剂中的SDMA-G6PDH轭合物 (0.014 μ g/mL)。
- [0210] 将0.3ml轭合物储备 (批号#5616-80-2, 770 μ g/ml) 加入到29.7ml R2稀释剂以将轭合物预稀释1:100倍, 得到7.7 μ g/ml的最终浓度。
- [0211] 将21.8ml预稀释的轭合物溶液加入到378.2ml的R2稀释剂中以制备R2试剂。
- [0212] 将0.73ml预稀释的轭合物溶液加入到399.27ml R2稀释剂中以制备R2空白。
- [0213] 将溶液充分混合并在使用前在4 $^{\circ}$ C下储存。
- [0214] 实施例5: SDMA类似物N,N'-二甲基精氨酸硫醇 (SDMA-SH) 的制备
- [0215] 材料:
- [0216] -半胱胺4-甲氧基三苯甲基树脂: 装载0.7mmol/g树脂和200-400目共聚物基质 (Novabiochem)
- [0217] -Fmoc-SDMA (Boc) 20Na: MW 624.7, 纯度 \geq 95% (Novabiochem)

[0218] -HATU:MW 380.3 (Novabiochem)

[0219] -N,N-二异丙基乙胺:通过再蒸馏纯化,99.5%,来自Sigma

[0220] -DMF(无水):纯度 $\geq 99.8\%$,来自Sigma

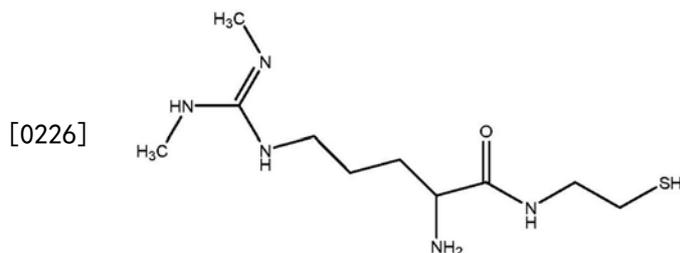
[0221] -哌啶:20%在无水DMF中

[0222] 步骤:

[0223] 向20mL小瓶中加入半胱胺4-甲氧基三苯甲基树脂(1.2g,0.46mmol)、Fmoc-SDMA(Boc)₂ONa(0.9g,1.4mmol,3.0当量)、HATU(0.54g,1.4mmol,3.0当量)、二异丙基乙胺(0.4mL,2.3mmol,5.0当量)和无水DMF(18mL)。将混合物覆盖并在室温下倒置16小时。使用玻璃移液管从小瓶中移出液体。然后用DMF(18mL,4次),接着用甲醇(18mL,4次)洗涤树脂。树脂在含20%哌啶的DMF中在室温下倒置15分钟(18mL,3次)。然后用DMF(18mL,4次),接着用甲醇(18mL,4次)洗涤树脂,并在冻干机上干燥1小时。然后可以将黄/浅粉色树脂储存在4℃或切割以得到SDMA-SH。

[0224] 为将SDMA-SH从树脂(50mg)切割下来,将其在三氟乙酸(3mL)中在室温下转化(inverted)1小时。然后将深红色浆液过滤并用乙腈(1mL)冲洗,得到澄清的黄色溶液。然后将溶液冻干,得到稠黄色油状物的SDMA-SH(7mg)。由于硫醇的氧化,化合物应立即使用或储存于-80℃(储存于-80℃,2个月后氧化 $< 10\%$)。通过LC/MS和NMR确认了SDMA-SH(式1)。

[0225] 式1



[0227] 实施例6:SDMA与G6PDH的轭合

[0228] 通过将SDMA类似物SDMA-SH与用SIA、SBAP或SMCC活化的G6PDH在NAD和G6P存在下轭合来制备SDMA和G6PDH的轭合物。SDMA和G6PDH之间的连接子的长度可以通过选择用于活化的试剂来改变,如图2、3和4所示。

[0229] 用SIA进行酶预活化:一小瓶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)(12mg)溶于3ml MES缓冲液(50mM,pH 8.0)中并旋转1小时以确保酶完全溶解。将酶溶液保持在冰上直至需要。向酶溶液中加入额外的4.5ml MES缓冲液(50mM,pH 8.0),通过涡旋(5秒)充分混合并保持在冰上10分钟。将100g G6P溶于1ml去离子水中并在冰上10分钟。将200mg NADH溶于1ml去离子水中并保持在冰上10分钟。将0.68ml G6P溶液和0.34ml NADH溶液加入到酶溶液中,通过涡旋(5秒)充分混合并保持在冰上10分钟。将一小瓶SIA(50mg)溶于0.5ml DMSO(100mg/ml)中。将0.14ml SIA溶液加入到酶溶液中,通过涡旋(5秒)充分混合,用铝箔覆盖,并在室温下旋转2小时。将溶液转移到G2 Slide-A-Lyzer透析盒中,并在4℃下在黑暗中对PBS缓冲液(4L)透析5小时。将缓冲液更换为新鲜PBS(4L),溶液在4℃下在黑暗中透析整夜。将透析缓冲液更换为MES(4L,25mM,pH 8.0),溶液在4℃下透析3小时。从透析盒中移取12.5ml酶溶液,加入0.32ml MES缓冲液(1M,pH 8.0)和0.32ml EDTA(0.2M,pH 8.0),使溶液的最终浓度达到50mM MES、5mM EDTA。如果需要,如果酶溶液小于12.5ml,则可以相应地调节MES和EDTA

的体积。将溶液用氩气脱气5分钟。

[0230] 用SBAP进行酶预活化:向含有2mg G6PDH的1ml MES缓冲液(50mM, pH8.0)中加入11.3mg G6P和16.8mg NADH,充分混合并保持在冰上10分钟。将SBAP(50mg)溶于0.5ml DMSO(100mg/ml)中。将0.025ml SBAP加入到酶溶液中,通过涡旋(5秒)充分混合,用铝箔覆盖,并在室温下旋转2小时。将溶液转移到G2 Slide-A-Lyzer透析盒中,并在4°C下在黑暗中对PBS缓冲液(2L)透析5小时。将缓冲液更换为新鲜PBS(2L),并将溶液在4°C下在黑暗中透析整夜。将透析缓冲液更换为MES(2L, 25mM, pH 8.0),溶液在4°C下透析3小时。从透析盒中移取2.5ml酶溶液,加入0.060ml MES缓冲液(1M, pH 8.0)和0.025ml EDTA(0.5M, pH 8.0),使溶液的最终浓度达到50mM MES和5mM EDTA。

[0231] 用SMCC进行酶预活化:在含有2mg G6PDH的1ml MES缓冲液(50mM, pH 8.0)中加入11.3mg G6P和16.8mg NADH,充分混合并保持在冰上10分钟。将50mg磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)溶于0.5ml DMSO(100mg/ml)中。将0.035ml SMCC溶液加入到酶溶液中,通过涡旋(5秒)充分混合,用铝箔覆盖,并在室温下旋转2小时。将溶液转移到G2 Slide-A-Lyzer透析盒中,并在4°C下在黑暗中对PBS缓冲液(2L)透析5小时。将缓冲液更换为新鲜PBS(2L),溶液在4°C下在黑暗中透析整夜。将透析缓冲液更换为MES(2L, 25mM, pH 8.0)用于在4°C下共3小时。从透析盒中移取2.5ml酶溶液,加入0.060ml MES缓冲液(1M, pH8.0)和0.025ml EDTA(0.5M, pH 8.0),使溶液的最终浓度达到50mM MES和5mM EDTA。

[0232] SDMA和预活化G6PDH的轭合:将新制备的SDMA-SH(式1)加入到预活化的以下量的酶溶液中:0.35ml(100mg/ml)SIA活化的G6PDH和0.065ml(100mg/ml)SBAP或SMCC活化的G6PDH。将溶液充分混合,并将混合物在4°C下旋转36小时。使用G2 Slide-A-Lyzer透析盒(Thermo Scientific)在4°C对着PBS(2或4L)透析(3或4个循环)反应混合物。通过在4°C下对着Tris HCl缓冲液(25mM, pH 8.0)透析4小时使SDMA酶轭合物溶液平衡。用0.45μm离心过滤器(1500*g, 10分钟)过滤溶液。

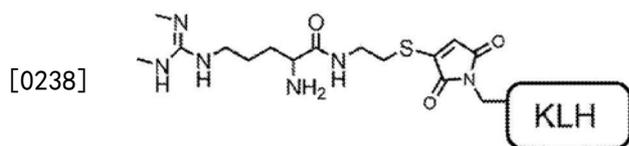
[0233] 表5示出了每种轭合物的连接子长度和活性以及抗体抑制轭合物的G6PDH的能力。连接子长度不包括式1的SDMA衍生物中的非原生氮。在SIA存在下的G6PDH的预活化导致比用SBAP或SMCC制备的轭合物更好的酶活性。

[0234] 表5

	轭合物	连接子长度 (原子)	连接子长度 (埃)	活性 (%)	抑制 (%)
[0235]	SDMA-SMCC-G6PDH	12	13.0	1.5	25
	SDMA-SBAP-G6PDH	9	10.1	10.8	40
	SDMA-SIA-G6PDH	5	6.4	30	70

[0236] 实施例7:抗SDMA单克隆抗体的制备

[0237] 产生单克隆抗体的方法属于本领域的已知技术。在一个实施方式中,抗体是针对具有以下结构的SDMA-KLH轭合物产生的单克隆抗体:



[0239] 抗SDMA抗体的纯化如下进行：

[0240] 材料：

[0241] • 2×2L抗SDMA

[0242] • 专用于抗SDMA IgG纯化的反相(rPA)柱(5ml)(GE Healthcare)

[0243] • Pierce IgG纯化缓冲液

[0244] • IgG联结缓冲液

[0245] • IgG低pH洗脱缓冲液

[0246] • PBS, pH 7.4用于透析

[0247] • 2x 4L@4C

[0248] 方案：

[0249] • rPA柱(5ml)在3ml/min的联结缓冲液中平衡

[0250] 1. 流量由OD 280nm监测

[0251] • 将1000ml抗SDMA在等体积的Pierce IgG联结缓冲液中稀释

[0252] 1. 对额外1000毫升重复步骤

[0253] • 稀释的抗SDMA以6ml/min装载在rPA柱上

[0254] 1. OD 280nm监测

[0255] • 用PBS/IgG联结缓冲液1:1@3ml/min洗涤rPA柱,直到

[0256] 1. OD 280nm达到基线

[0257] • 使用IgG低pH洗脱缓冲液(3min/ml)洗脱抗SDMA IgG

[0258] 1. 手动收集峰

[0259] • 用2次更换的4L PBS立即透析抗SDMA IgG

[0260] 1. 30ml 10k MWCO盒

[0261] 2. 汇集的体积和OD 280nm用于确定IgG浓度

[0262] 通过SDS Page、SEC和基于平板的免疫测定(plate-based immunoassay)分析抗体,如第8,481,690号美国专利所述

[0263] 实施例8:测定步骤

[0264] 在犬科、猫科和人样品中对SDMA进行本公开的改进测定。

[0265] 试剂组分在表5A中示出。

[0266] 表5A

组分/测定试剂	显色测定 R1	显色测定 R2	空白测定 R1	空白测定 R2
抗体($\mu\text{g/mL}$)	6.56	0	0	0
G6P (mM)	56	2	56	2
NAD (mM)	35	0	35	0
SDMA-G6PDH ($\mu\text{g/mL}$)	0	0.42	0	0.014

[0268] 如上所述制备的试剂的移液量对于颜色测定和空白测定是相同的：

	体积(μl)
样品或校准品	10
R1	40
R2	125

[0270] 样品和校准品的显色和空白测定以及相关计算在Beckman AU680®自动分析仪上进行。在校准基质(经分离的犬血清)中含有56.0、28.0、14.0、7.0和3.75以及0 $\mu\text{g/dL}$ SDMA的校准标准品用于猫和狗两者。将分析仪编程为进行显色和空白分析如下：将样品和校准品加入到试剂R1中，并在加入R2之前温育3-4分钟。在加入R2后，在大约36秒开始，在340nm处测量OD。每18秒测量吸光度，进行4次额外的18秒循环。从用于计算显色和空白测定的反应速率(吸光度/分钟的变化)的每个测量中减去校准品基质的吸光度值(0 $\mu\text{g/dL}$ SDMA)以提供归一化的显色和空白反应速率。

[0271] 为了确定标准曲线的速率，从显色测定中的每个校准品的归一化速率中减去来自空白测定的每个校准品的归一化速率。通过从显色测定中的样品的标准化速率中减去空白测定中样品的标准化速率来确定样品SDMA浓度，以提供最终样品反应速率，将其与最终标准曲线进行比较。

[0272] 表6示出了使用单独的显色测定(“无减除”)和当从显色测定速率(“有减除”)中减去空白测定速率时，猫科和犬科血清的SDMA测定结果。样品偏差反映了LC/MS结果与使用上述步骤的结果之间的差异。

[0273] 表6

物种	LC/MS [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$)	有减除的 SDMA 测定	无减除的 SDMA 测定	有减除的 样品偏差	无减除的 样品偏差
猫科	9.7	10.4	12.6	0.7	2.8
猫科	19.1	19.8	31.4	0.7	12.3
犬科	34.1	35.0	37.4	0.9	3.3
猫科	43.3	42.1	49.7	-1.2	6.4
犬科	10.4	10.3	12.4	-0.1	2.1
犬科	6.6	7.3	8.0	0.7	1.4
猫科	18.4	18.9	25.8	0.5	7.4
犬科	6.6	5.6	8.2	-1.0	1.6
猫科	10.8	10.6	17.9	-0.2	7.2
猫科	9.9	10.0	15.9	0.1	5.9
平均值				0.1	5.0

[0275] 表7示出了使用含有已知量的SDMA的已经分离的犬血清制备的校准曲线(有减除和无减除)。为其它物种制备了类似的曲线。

[0276] 表7

SDMA ($\mu\text{g/dL}$)	有减除($\mu\text{g/dL}$)	无减除($\mu\text{g/dL}$)
0.1	0.0	0.0
5.1	4.3	2.8
14.8	17.6	16.2
28.4	38.0	36.6
59.9	75.5	73.9
97.9	116.0	114.3

[0278] 表8示出了使用上述速率测定步骤(即,有减除的显色和空白测定)使用SDMA掺入的未经分离的人血清的图6中所示的校准曲线的值。

[0279] 表8

SDMA ($\mu\text{g/dL}$)	反应速率 ($\Delta A/\text{分钟}$)
0.0	0.0
8.6	20.0
13.2	31.7
29.3	60.7
58.8	98.8

[0281] 该曲线用于确定正常和慢性肾脏疾病人血清样品中的浓度,如图1所示。

[0282] 实施例9:酶抑制剂的使用

[0283] 将乳酸脱氢酶抑制剂草氨酸钠加入到空白试剂稀释剂和如实施例3中所述的试剂中。如表9所示,使用抑制剂可以提高测定的准确度。

[0284] 表9

物种	LC/MS [SDMA] ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	无抑制剂的 测定结果	有草氨酸钠 的测定结果	无抑制剂的 偏差	有抑制剂的 偏差
猫科	35.5	37.3	35.8	1.8	0.3
[0285] 猫科	12.0	14.1	12.1	2.1	0.1
犬科	10.7	12.7	10.9	2.0	0.2
猫科	9.6	11.9	9.3	2.3	-0.3
猫科	6.4	3.9	6.2	-2.5	-0.2
犬科	7.9	9.7	7.9	1.8	0.0
犬科	8.6	9.7	8.5	1.1	-0.1
犬科	12.4	13.5	12.6	1.1	0.2
猫科	14.0	15.0	14.1	1.0	0.1
犬科	7.7	9.1	7.8	1.4	0.1
平均值				1.2	0.0

[0286] 在该实施例中,如表10所示,犬科血清的标准曲线由含有和不含草氨酸钠的制备。可以为其它物种制备类似的曲线。

[0287] 表10

SDMA ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	无草氨酸盐	有草氨酸盐
0.1	0.0	0.0
5.1	4.3	4.1
14.8	17.6	18.0
28.4	38.0	37.9
59.9	75.5	73.7
97.9	116.0	116.0

[0289] 实施例10:用经分离和未经分离的人血清校准品测试人血清样品

[0290] 确定了使用内源和经炭分离的人血清作为校准品基质回收在人血清样品中SDMA。本实验收集的数据可用于制定速率和固定校准方法的校准曲线。

[0291] 如表11所示制备测定试剂。

[0292] 表11

组分	R1	R2
Tris-HCl	50 mM, pH 7.0	100 mM, pH 8.0
EDTA	1.3 mM	1.3 mM
NaCl	0.3 M	0.3 M
Brij 35	0.14%	0.14%
PEG 6000	0.16 mM	0.16 mM
Proclin	0.2%	0.2%
小鼠血清	1%	1%
牛血清白蛋白	1%	1%
G6P	56 mM	2 mM
NAD	35 mM	0 mM

[0294] 如实施例7制备抗SDMA mAb,并以1.5 μ g/mL的测定浓度使用。

[0295] 如实施例6制备SDMA-G6PDH,并以0.3 μ g/mL的测定浓度使用。

[0296] 用经炭分离的人血清,用以下SDMA浓度(μ g/dL)制备校准品:0.0、4.7、15.0、29.0、59.0和111.0(由LC/MS确定)。

[0297] 根据实施例8进行速率方法。

[0298] 在固定方法中,将Beckman仪器设定为测量反应开始后1分钟至3分钟之间的在340nm的吸光度变化。

[0299] 用于确定SDMA浓度的固定和速率计算方法的结果在图7中示出。

[0300] 实施例11:使用缓冲液校准品的未经分离的人校准品剂量

[0301] 使用缓冲液基的校准品(0、6、11、24、46和95 μ g/dL SDMA在含有1%BSA的PBS缓冲液中)校准SDMA测定,并用于测试未经分离的人血清标准品以确定回收率。该实验使用固定方法计算在仪器循环12和16的340nm处的吸光度的变化,其中每个循环为18秒(T1=216秒,T2=288秒)。没有从净吸光度中减去试剂空白(diH₂O)的吸光度。

[0302] 如实施例9所示运行测定。结果在图8中示出。

[0303] 实施例12:手动和自动背景减除的比较

[0304] 测试了载入到Beckman AU680[®]分析仪上的自动背景减除方法,以确定载入解决方案的有效性。依指令运行SDMA测定,且分离地运行测定,以及使用离线方法作为对照进行结果计算。

[0305] 如实施例1制备经炭分离的犬血清校准品。试剂组分在表12中示出。

[0306] 表12

[0307]

组分	试剂1	试剂2	R1空白	R2空白
NAD (mM)	5	0	5	0
G6P (mM)	8	0	8	0

SDMA-mAb ($\mu\text{g/mL}$)	2	0	0	0
SDMA-G6PDH ($\mu\text{g/mL}$)	0	0.4	0	0.004

[0308] 反应体积如下:

[0309] 样品体积:17 μI

[0310] 试剂1体积:25 μI

[0311] 试剂2体积:125 μI

[0312] 显色和空白测定法不连接载入分析仪。每个测定分别生成数据,并脱离仪器处理。从校准品和样品的显色测定反应OD中减去空白测定反应OD。将曲线拟合到校准数据,并使用最佳拟合曲线的方程来从减除的反应OD确定样品浓度。

[0313] 表13示出了固定反应方法中校准品的吸光度的净变化:

[0314] 表13

校准品	LC-MS [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$)	$\Delta\text{A}340\text{ nm}$		
		显色	空白	净
校准品 0	0.0	0.5878	0.0082	0.5796
校准品 0	0.0	0.5842	0.0081	0.5761
校准品 1	4.7	0.6018	0.0081	0.5937
校准品 1	4.7	0.6017	0.0076	0.5941
校准品 2	15.0	0.6530	0.0082	0.6448
校准品 2	15.0	0.6491	0.0071	0.6420
校准品 3	29.0	0.7043	0.0067	0.6976
校准品 3	29.0	0.6957	0.0064	0.6893
校准品 4	59.0	0.7674	0.0062	0.7613
校准品 4	59.0	0.7721	0.0072	0.7649
校准品 5	111.0	0.8503	0.0077	0.8426
校准品 5	111.0	0.8479	0.0075	0.8404

[0315] 表14示出了使用由表13所示的校准品生成的标准曲线的样品中SDMA的测量。

[0316] 表14

样品	LC-MS [SDMA] ($\mu\text{g/dL}$)	显色	空白	净	测定剂量 ($\mu\text{g/dL}$)
1	8.8	0.6643	0.0498	0.6137	8.3
2	8.3	0.6439	0.0298	0.6141	8.4

[0317] 实施例12:来自不同物种的校准品基质的分析

[0318] 分析由不同动物物种的汇集血清制成的校准品组,以便在使用来自不同物种的血

清的校准品时测定SDMA测定的稳健性。

[0321] 使用如实施例10中的固定方法,对来自狗、猫和马的经分离或内源(未经分离)的血清制成的校准品,进行人SDMA的测定。测定结果在图8、9和10中示出。

[0322] 实施例13:缓冲液基的校准

[0323] 使用含有1%BSA的PBS作为校准基质对表13中的校准浓度制作校准曲线。结果在图12中示出。

[0324] 实施例14:没有轭合物加入到空白试剂中的SDMA测定

[0325] 使用实施例8的速率步骤,用表5A的试剂浓度运行SDMA测定,不同的是没有轭合物加入到R2中。测定在Beckman分析仪上运行。结果在表15中示出。

[0326] 表15

物种	样品 ID	[SDMA] LC/MS	测定剂量 ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	偏差
[0327] 犬科	4865	7.0	7.5	0.49
犬科	4868	8.8	9.6	0.89
犬科	4941	7.7	8.3	0.63
犬科	4942	7.3	7.9	0.61

[0328] 尽管本文已经描述了本公开的各种具体实施方式,但是应当理解,本公开不限于这些确切实施方式,并且本领域技术人员可以在不脱离本公开的范围和精神的情况下对做出各种改变或修改。

[0329] 上面给出的实施例仅仅是说明性的,并不意味着是本公开的所有可能的实施方式、应用或修改的详尽列表。因此,在不脱离本公开的范围和精神的情况下,本公开的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。虽然已经结合具体实施方式描述了本公开,但是应当理解,所要求保护的公开内容不应被不适当地限于这些具体实施方式。实际上,用于实施本公开的模式的描述的各种修改对于分子生物学、免疫学、化学、生物化学或相关领域的技术人员是显而易见,且旨在落入所附权利要求的范围内。

[0330] 本文所述的任何数值包括以一个单位的增量从较低值到较高值的所有值,条件是在任何较低值和任何较高值之间存在至少两个单位的间隔。例如,如果说组分的浓度或过程变量的值诸如大小、角度大小、压力、时间等是例如为1至90、具体为20至80、更具体为30至70,也就是说,在本说明书中明确列举了诸如15至85、22至68、43至51、30至32等的值。对于小于1的值,根据需要将一个单位视为0.0001、0.001、0.01或0.1。这些仅仅是特定目的的实例,并且列出的最低值和最高值之间的数值的所有可能的组合将被认为在本申请中以相似的方式明确说明。

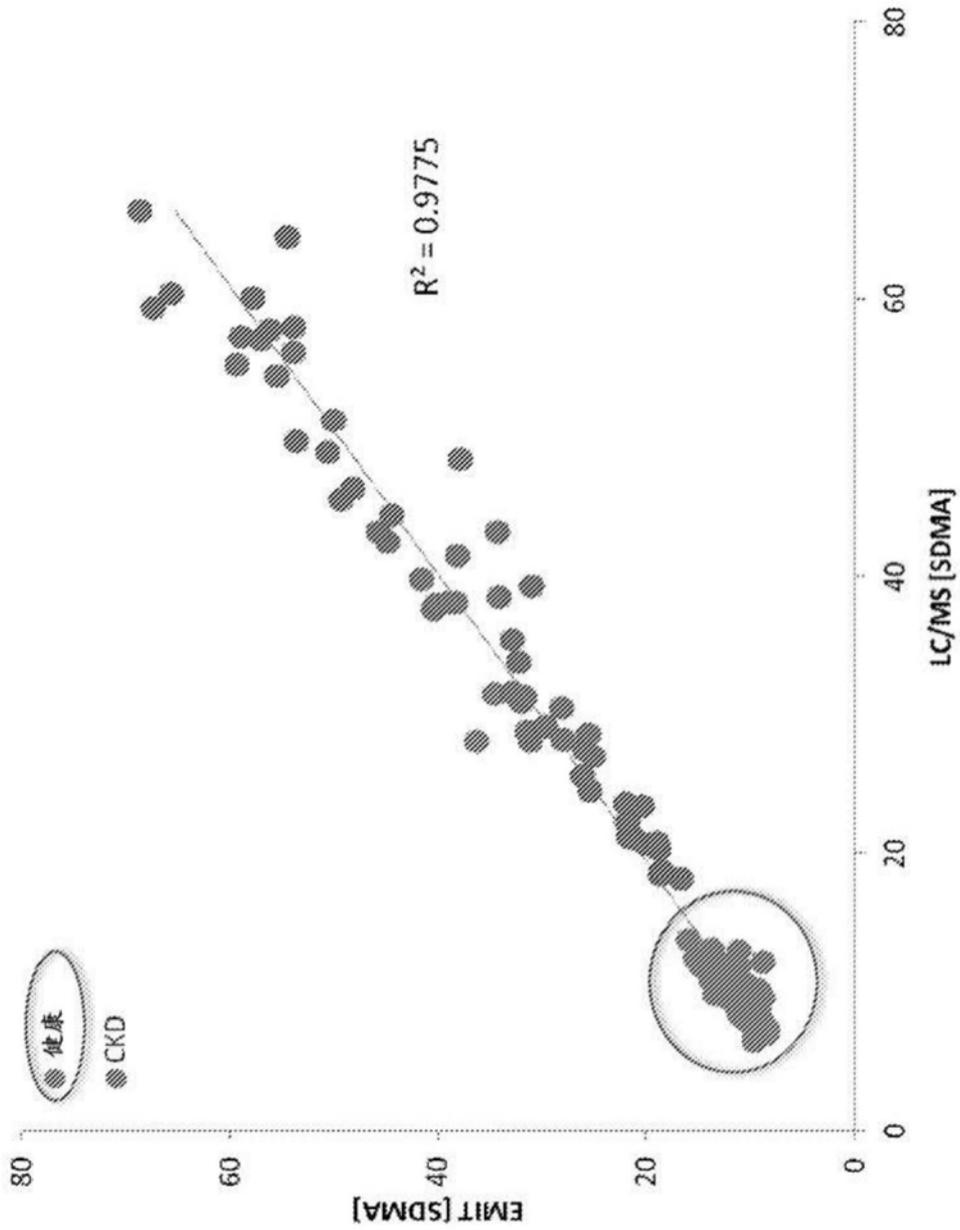


图1

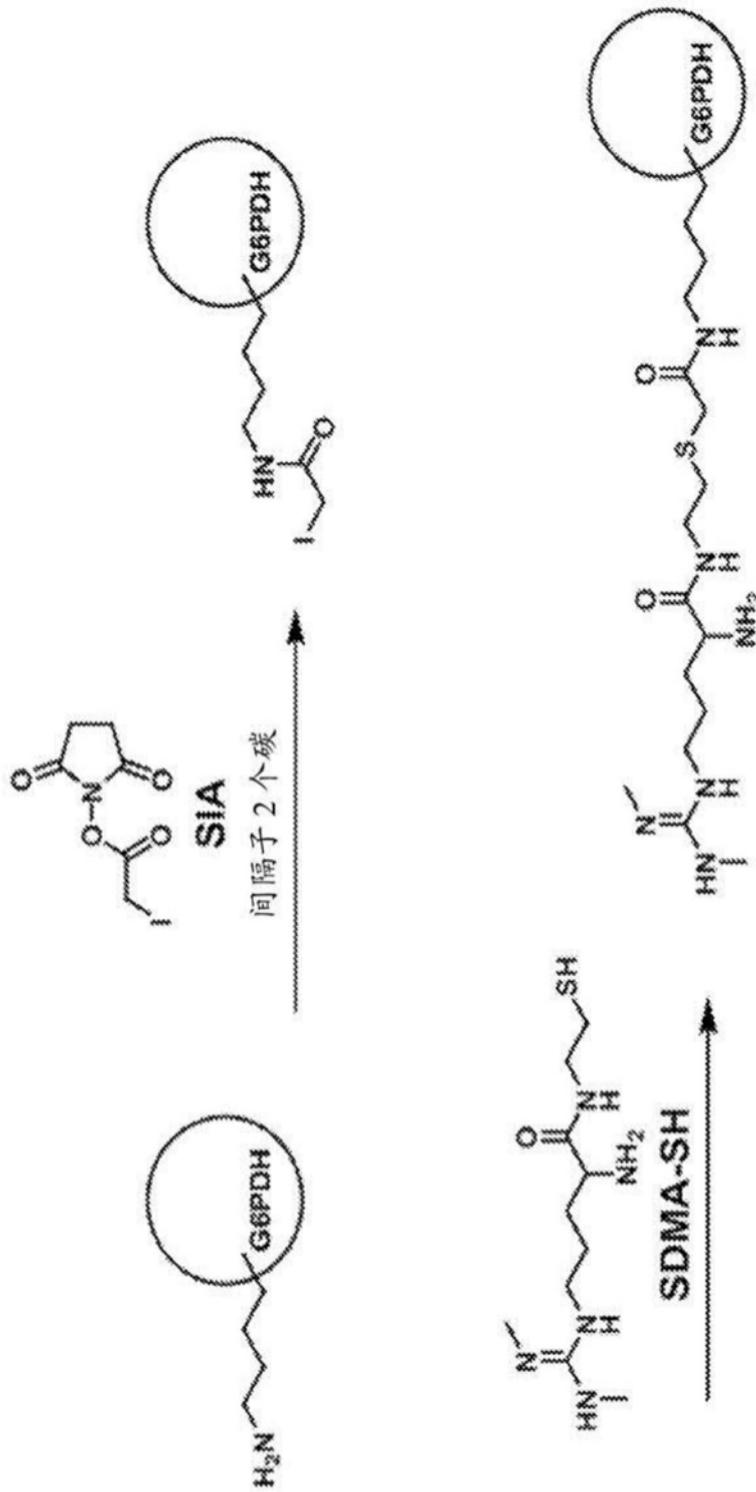


图2

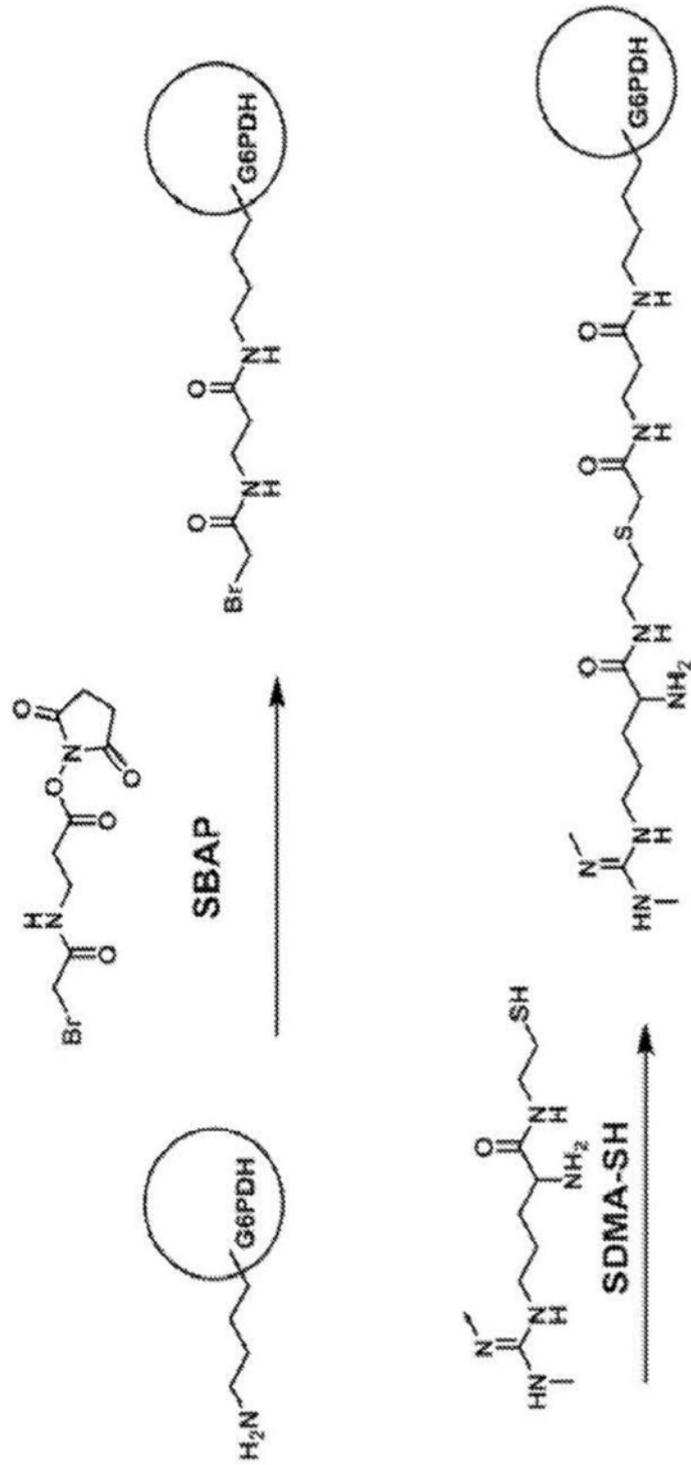


图3

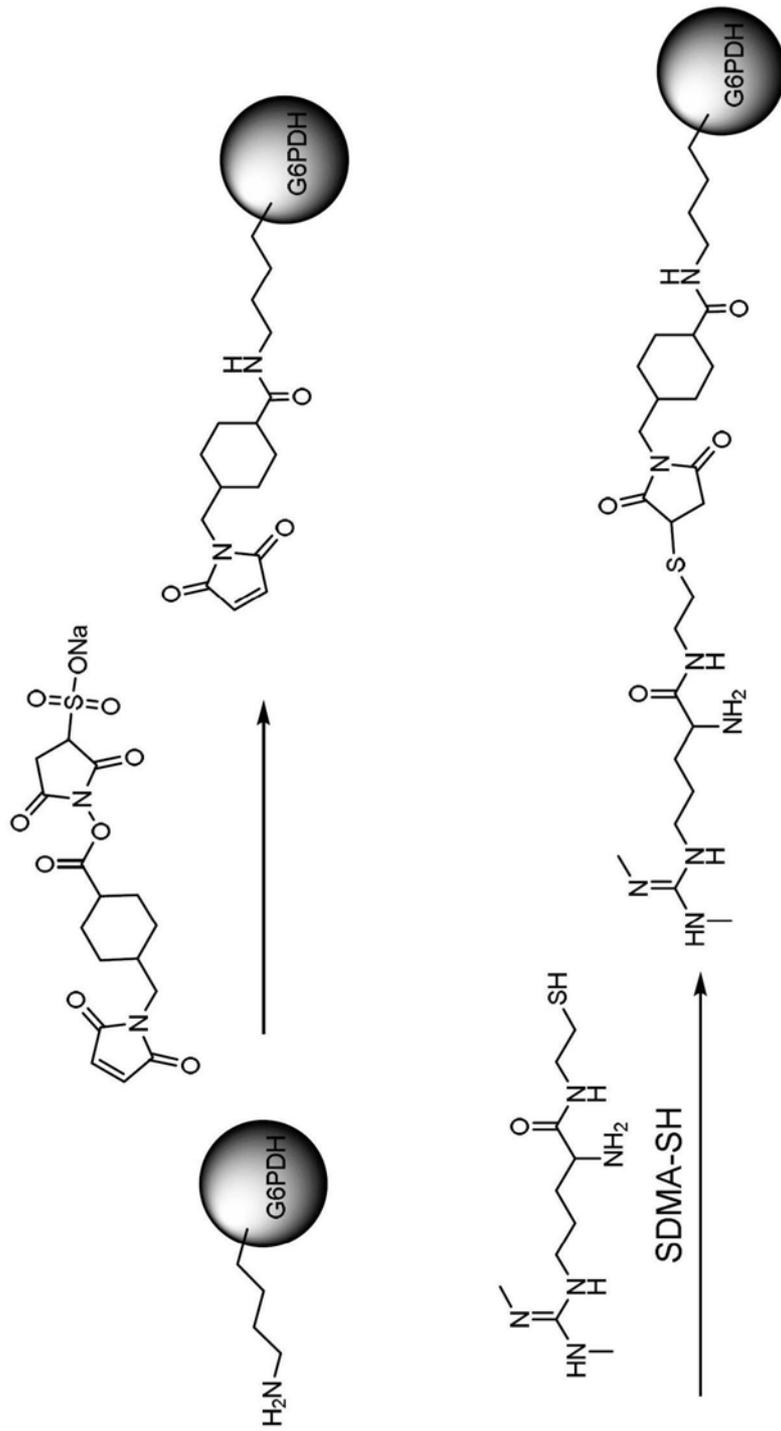


图4

介体 - 染料反应机理

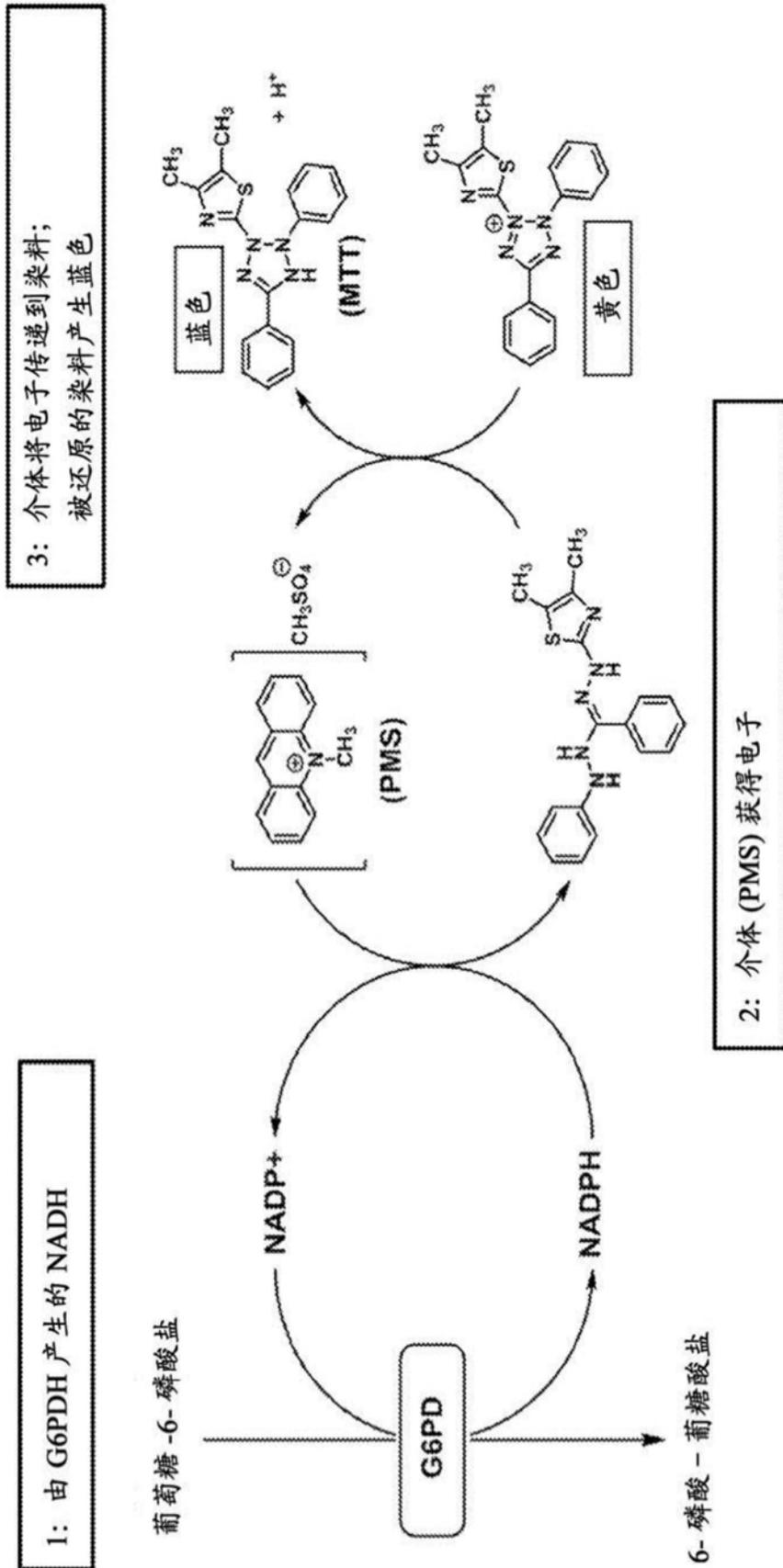


图5

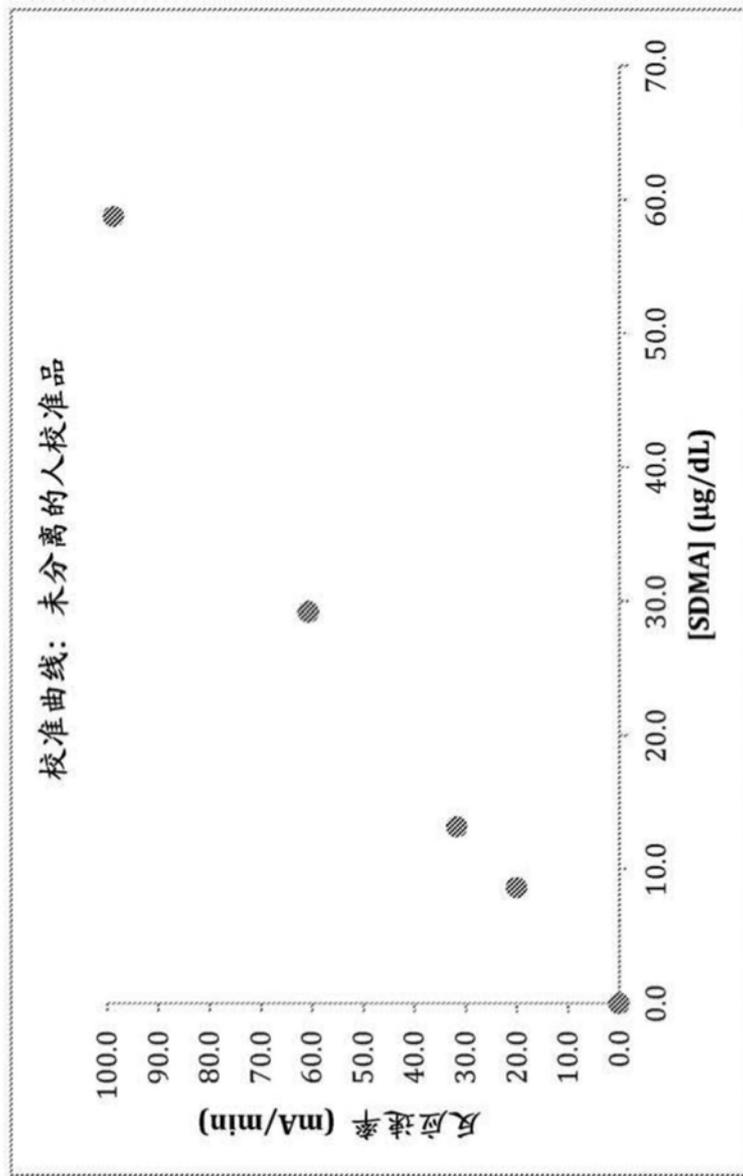


图6

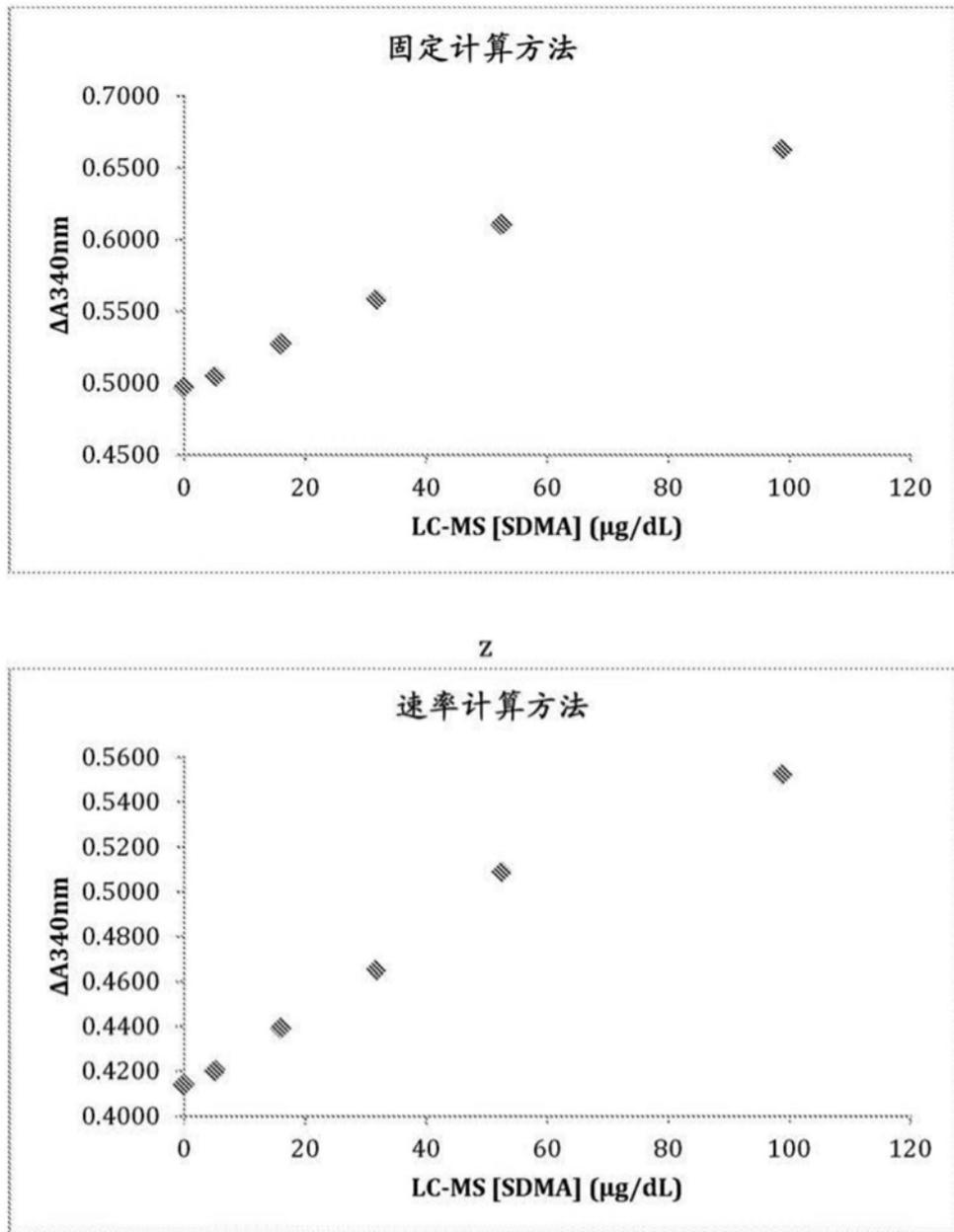


图7

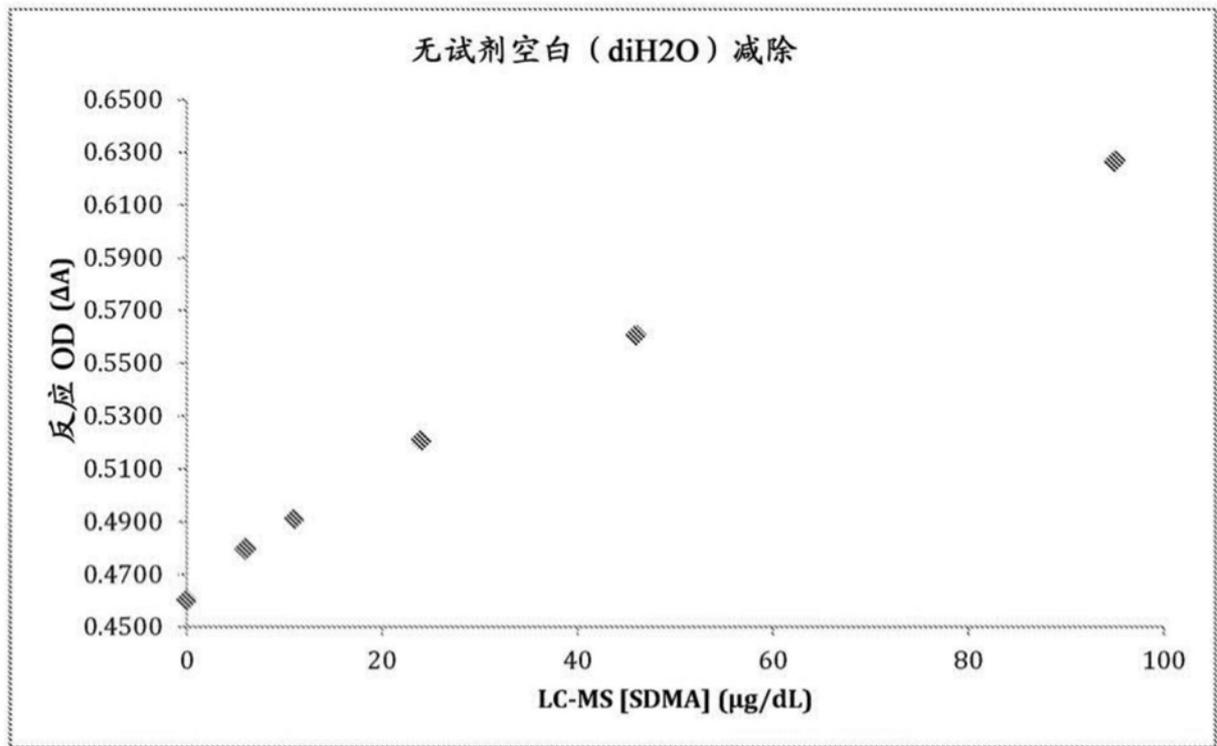


图8

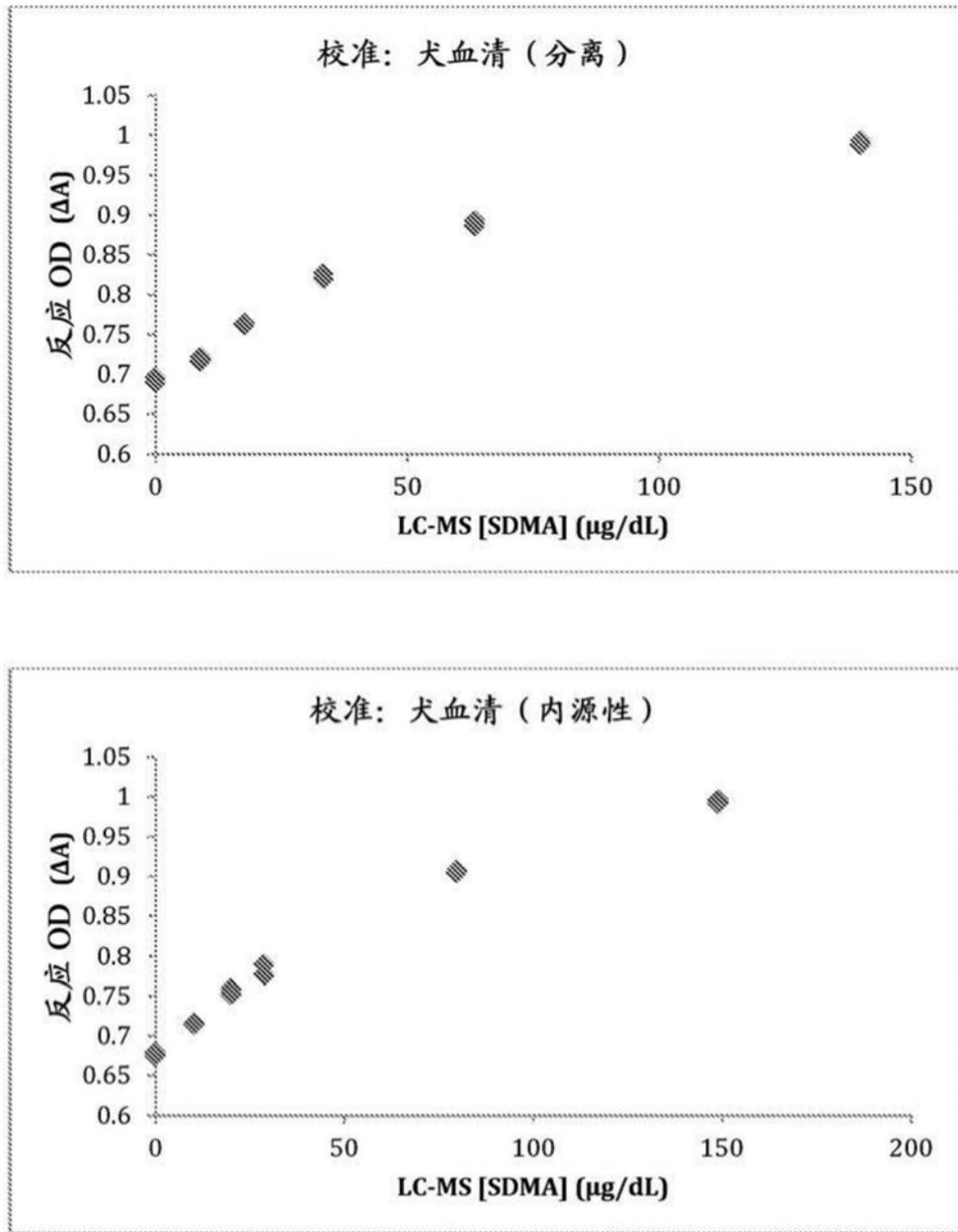


图9

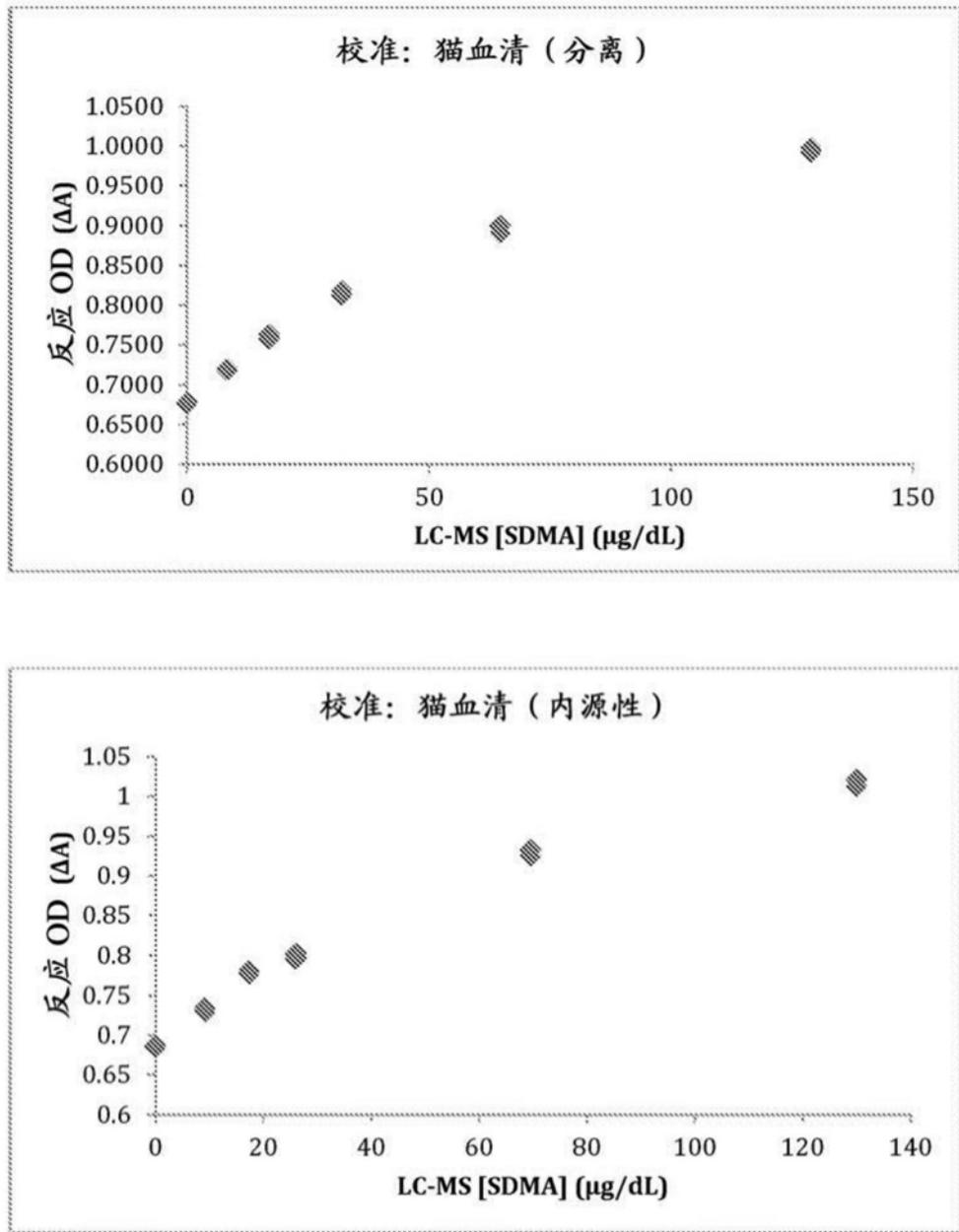


图10

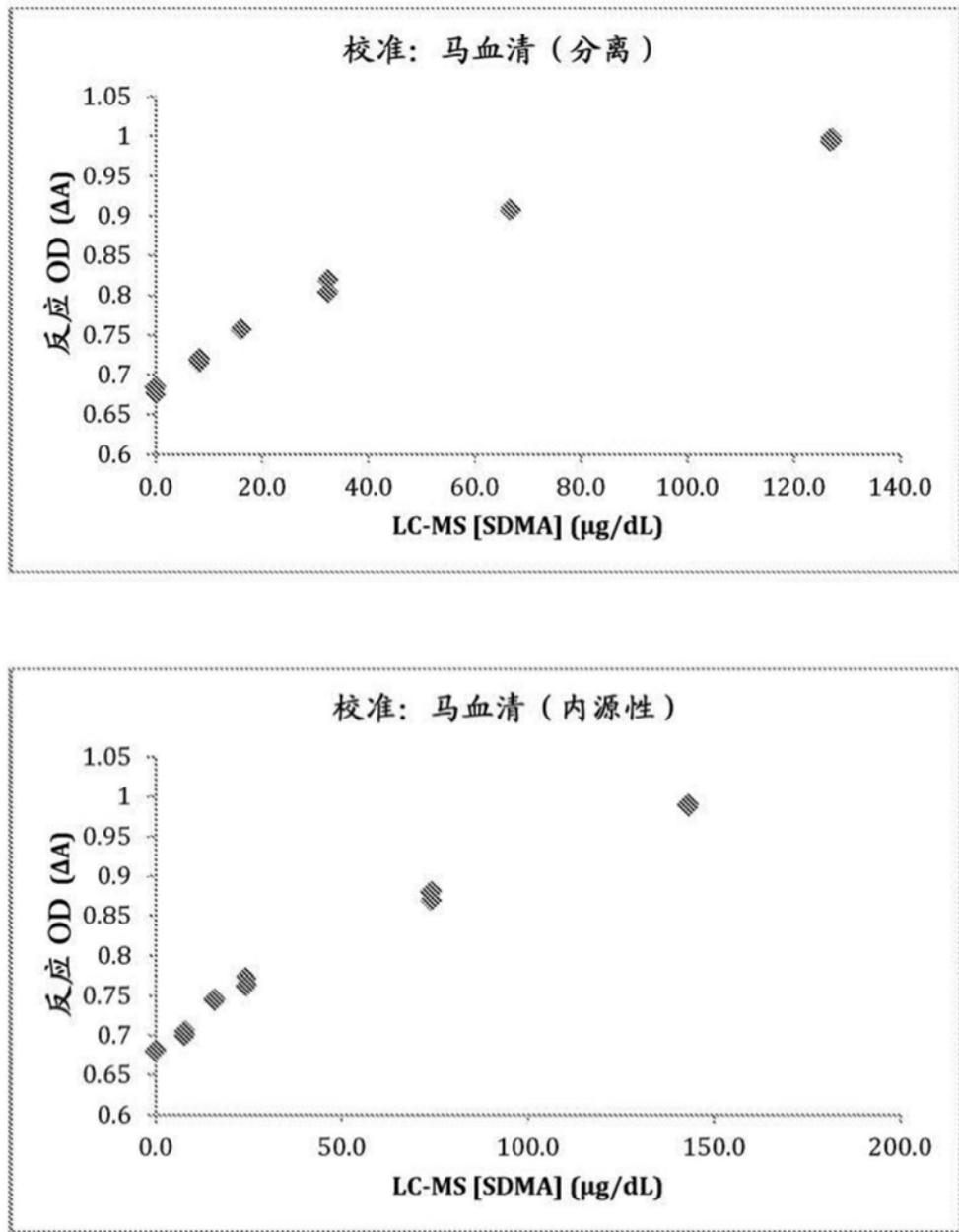


图11

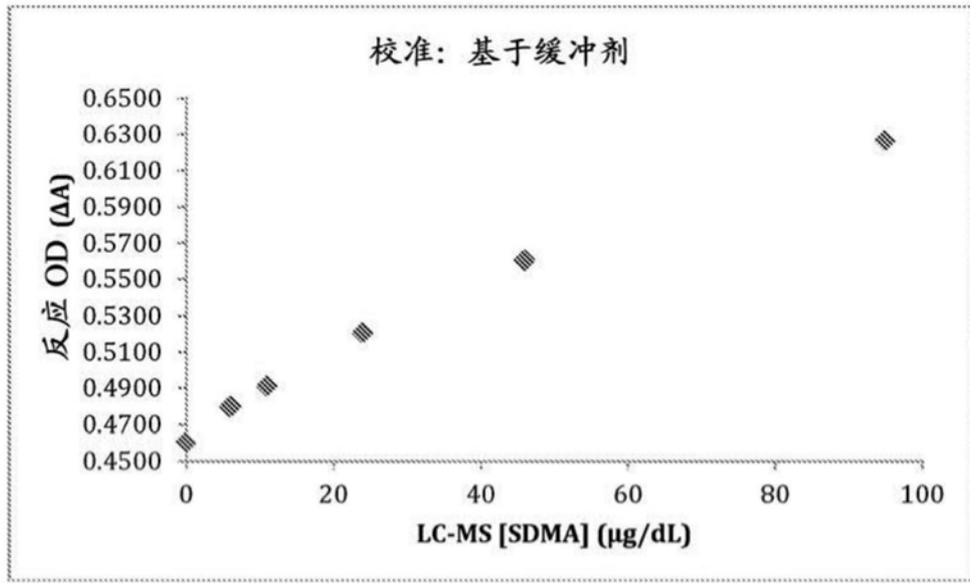


图12