



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107353200 A

(43)申请公布日 2017. 11. 17

(21)申请号 201710499551.0

C07K 1/107(2006.01)

(22)申请日 2017.06.27

C07K 16/44(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

(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 王晓波

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288

代理人 徐朝荣 马簪

(51)Int.Cl.

C07C 59/66(2006.01)

C07C 51/09(2006.01)

C07C 51/093(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

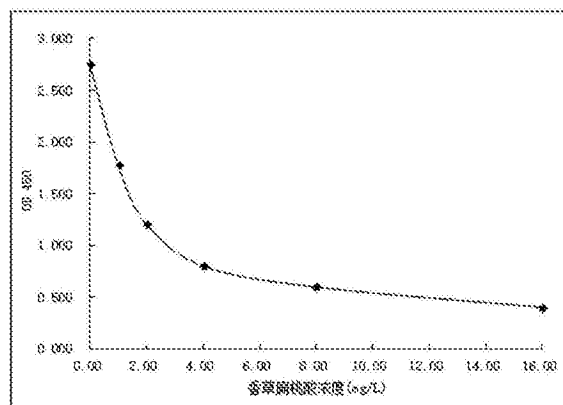
权利要求书3页 说明书21页 附图2页

(54)发明名称

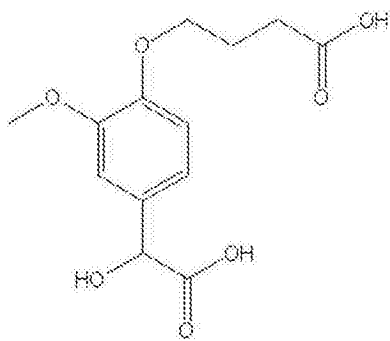
一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种
香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用;以香草扁桃酸衍生物制得的抗香草扁桃酸特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应,因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性;香草扁桃酸免疫原的应用为将香草扁桃酸免疫原用于制备抗香草扁桃酸特异性抗体,和将抗香草扁桃酸特异性抗体用于制备香草扁桃酸检测试剂,该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对香草扁桃酸高通量、快速化的检测。

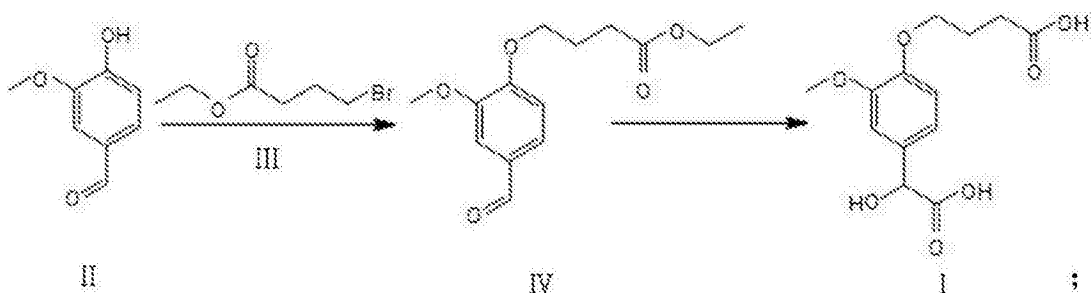


1. 一种香草扁桃酸衍生物, 其特征在于, 其结构式如式 I 所示:



式 I。

2. 一种如权利要求 1 所述的香草扁桃酸衍生物的合成方法, 其特征在于, 所述合成路线如下式所示:



反应过程包括以下:

合成化合物 IV 步骤: 将化合物 II、化合物 III 溶解于 N,N-二甲基甲酰胺中, 并加入 K_2CO_3 进行反应后, 经萃取、干燥、浓缩、纯化得到化合物 IV;

合成化合物 I 步骤: 将化合物 IV 与苄基三乙基氯化铵溶解于氯仿中, 制成反应溶液; 将 NaOH 溶液滴加入反应溶液中, 反应后调节溶液 pH=4, 然后经萃取、干燥、浓缩、纯化, 得到化合物 I 即香草扁桃酸衍生物。

3. 一种香草扁桃酸免疫原的制备方法, 其特征在于, 包括:

溶解载体蛋白步骤: 将载体蛋白 100-300g 溶解于 25-75mL 0.2M、pH=8.5 的磷酸缓冲液中, 得到载体蛋白溶液;

混合液制备步骤: 将以下溶液混合并搅拌溶解反应 30-60min, 得到混合液;

100-300mg 如权利要求 1 所述的香草扁桃酸衍生物;

1.75-5.25mL 二甲基甲酰胺;

1.75-5.25mL 乙醇;

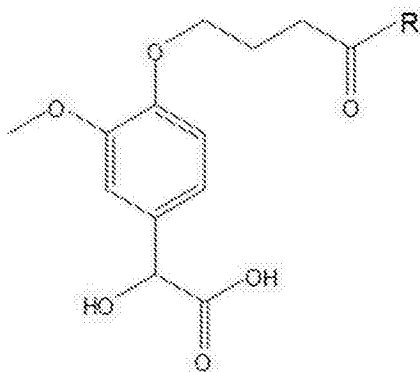
3.5-10.5mL 10mM、pH=5 的磷酸钾缓冲液;

100-300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、

25-75mg N-羟基琥珀酰亚胺;

免疫原制备步骤: 将混合液滴加至载体蛋白溶液中, 并在 2-8℃ 下搅拌至少 8h, 得到抗原; 将抗原经过透析进行纯化, 得到香草扁桃酸免疫原。

4. 一种如权利要求 3 所述的香草扁桃酸免疫原, 其特征在于, 其结构式如式 V 所示:



式V；

其中， $-(CH_2)_3-CO-$ 为连接基团；R为载体，为具有免疫原性的蛋白质或多肽，为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白中的一种。

5. 如权利要求4所述的香草扁桃酸免疫原，其特征在于，所述R为牛血清蛋白。

6. 一种如权利要求3-5任一所述的香草扁桃酸免疫原的应用，其特征在于，包括将香草扁桃酸免疫原用于制备抗香草扁桃酸特异性抗体，和将抗香草扁桃酸特异性抗体用于制备香草扁桃酸检测试剂。

7. 如权利要求6所述的香草扁桃酸免疫原的应用，其特征在于，所述抗香草扁桃酸特异性抗体为免疫实验动物后产生的：完整抗体分子、具有与香草扁桃酸特异性结合能力的抗体片段和抗体衍生物中的一种；所述完整抗体分子、抗体片段和抗体衍生物，为采用单一的香草扁桃酸免疫原对动物加强免疫所得到的多克隆抗体，或者为免疫后经体细胞杂交所得到的单克隆抗体；所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种；

所述抗香草扁桃酸特异性抗体的制备方法为：

免疫步骤：用PBS将香草扁桃酸免疫原稀释至0.1-3mg/mL，得到抗原溶液，然后用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行第一次注射；2-3周后，用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射；之后每隔4周用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次，免疫步骤中共注射三至六次；

分离抗体步骤：对经免疫的实验动物取血并分离纯化，得到效价为1:30000-50000的抗香草扁桃酸特异性抗体。

8. 如权利要求7所述的香草扁桃酸免疫原的应用，其特征在于，所述香草扁桃酸检测试剂包括抗香草扁桃酸特异性抗体、香草扁桃酸酶标偶联物和酶的底物；所述香草扁桃酸酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物；所述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

9. 如权利要求8所述的香草扁桃酸免疫原的应用，其特征在于，所述香草扁桃酸检测试剂包括试剂A和试剂B：

所述试剂A为抗香草扁桃酸特异性抗体和酶的底物混合液，通过以下步骤制备得到：

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的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；将抗香草扁桃酸特异性抗体加到均相酶底物中，抗香草扁桃酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-10000，得到试剂A；

所述试剂B为香草扁桃酸酶标偶联物溶液，通过以下步骤制备得到：

将香草扁桃酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中，香草扁桃酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-10000。

10. 如权利要求9所述的香草扁桃酸免疫原的应用,其特征在于,所述香草扁桃酸酶标偶联物通过以下方法制备得到:

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备步骤:称取7.5-22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,溶解于6-18mL含72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3m M $MgCl_2$ 和100mg NaCl的溶液中,调节pH=9;然后加入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-磷酸和0.375-1.125mL卡必醇;再逐滴加入1-3mL二甲基亚砷,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

香草扁桃酸衍生物的激活步骤:在无水状态下称取5-15mg香草扁桃酸衍生物,溶解于300-900 μ L二甲基甲酰胺中;使溶液温度降至-2~-8 $^{\circ}C$ 后加入1.5-4.5 μ L三丁胺、0.75-2.25 μ L氯甲酸异丁酯,在-2~-8 $^{\circ}C$ 条件下搅拌30-60min;

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与香草扁桃酸衍生物的连接步骤:将已激活的香草扁桃酸衍生物溶液逐滴加入到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8 $^{\circ}C$ 搅拌至少8h,得到连接产物;

纯化产物步骤: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 $^{\circ}C$ 下储存。

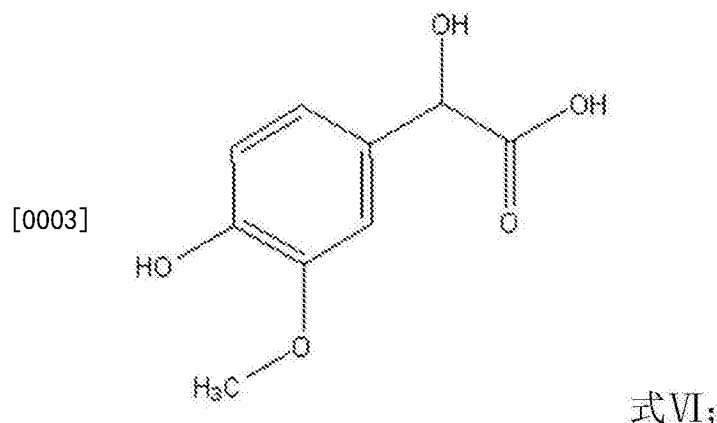
一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 香草扁桃酸 (Vanillylmandelic Acid, VMA), 其结构式如式VI所示:



[0004] 香草扁桃酸又称为3-甲氧基-4-羟基苦杏仁酸 (DL-3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid, MHMA) 或香草苦杏仁酸, 是肾上腺髓质激素儿茶酚胺 (CA) 类物质的终末代谢产物, CA几乎全部在体内代谢, 少部分的CA经单胺氧化酶作用, 生成对-二羟杏仁酸, 大部分CA在CA-O-甲基转移酶作用下转变为3-甲氧肾上腺素或去甲氧肾上腺素, 最终代谢为3-甲氧基-4-羟基苦杏仁酸。体内的CA代谢非常迅速, 其代谢产物多由尿液排出。临床上24h尿中VMA的含量升高见于嗜铬细胞瘤、神经母细胞瘤、原发性高血压、心肌梗塞、慢性肾功能不全、甲状腺机能亢进或减退、肾上腺皮质功能不全、交感神经生理功能异常等。因此, 测定24h尿中VMA的排出量对于上述疾病的临床诊断具有重要意义。

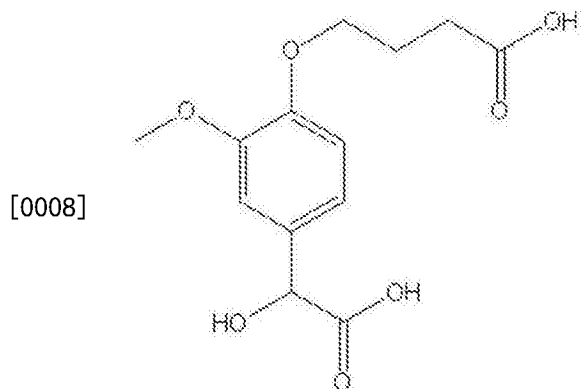
[0005] 经典的VMA检测方法主要有: 可见光分光光度法, 此方法操作过程繁琐, 精确度差; 气象色谱法, 此法对仪器要求比较高, 操作复杂; 高相液相-电化学法, 此方法易受仪器质量和工作环境的干扰, 测定的灵敏度和专一性均需进一步提升; 重氮法, 此方法操作繁琐、可靠性低, 回收率、重复性、稳定性还有待提高。以上测定方法都不能适应VMA临床检验的需要, 目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的VMA检测试剂, 尤其是质量好的自动化检验试剂。因此, 研发一种质量达到临床检验要求、实用性强、性价比高, 可应用于全自动生化分析仪的VMA检测试剂势在必行。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的不足, 本发明的第一个目的在于提供一种香草扁桃酸衍生物, 该衍生物为新合成物质, 自然界中不存在。

[0007] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到: 一种香草扁桃酸衍生物, 其

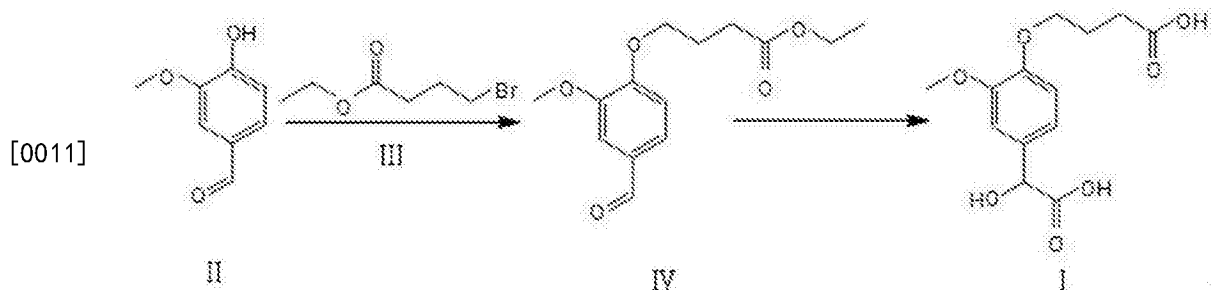
结构式如式I所示：



式 I。

[0009] 本发明的第二个目的在于提供一种香草扁桃酸衍生物的合成方法，该合成方法有别于常规合成方法，并具有良好的合成效果，大大提高香草扁桃酸衍生物的合成效率。

[0010] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到：一种如上所述的香草扁桃酸衍生物的合成方法，合成路线如下式所示：



[0012] 反应过程包括以下：

[0013] 合成化合物IV步骤：将化合物II、化合物III溶解于N,N-二甲基甲酰胺中，并加入 K_2CO_3 进行反应后，经萃取、干燥、浓缩、纯化得到化合物IV；

[0014] 合成化合物I步骤：将化合物IV与苄基三乙基氯化铵溶解于氯仿中，制成反应溶液；将NaOH溶液滴加入反应溶液中，反应后调节溶液pH=4，然后经萃取、干燥、浓缩、纯化，得到化合物I即香草扁桃酸衍生物。

[0015] 本发明的第三个目的在于提供一种香草扁桃酸免疫原的制备方法。

[0016] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到：一种香草扁桃酸免疫原的制备方法，包括：

[0017] 溶解载体蛋白步骤：将载体蛋白100-300g溶解于25-75mL 0.2M、pH=8.5的磷酸缓冲液中，得到载体蛋白溶液；

[0018] 混合液制备步骤：将以下溶液混合并搅拌溶解反应30-60min，得到混合液；

[0019] 100-300mg香草扁桃酸衍生物；

[0020] 1.75-5.25mL二甲基甲酰胺；

[0021] 1.75-5.25mL乙醇；

[0022] 3.5-10.5mL 10mM、pH=5的磷酸钾缓冲液；

[0023] 100-300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、

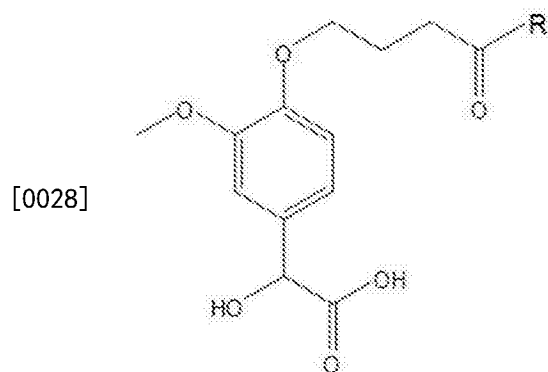
[0024] 25-75mg N-羟基琥珀酰亚胺；

[0025] 免疫原制备步骤：将混合液滴加至载体蛋白溶液中，并在2-8℃下搅拌至少8h，得

到抗原；将抗原经过透析进行纯化，得到香草扁桃酸免疫原。

[0026] 本发明的第四个目的在于提供一种香草扁桃酸免疫原。

[0027] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到：一种如上所述的香草扁桃酸免疫原，其结构式如式V所示：



[0029] 其中， $-(CH_2)_3-CO-$ 为连接基团；R为载体，为具有免疫原性的蛋白质或多肽，为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白中的一种。

[0030] 进一步地，R为牛血清蛋白。

[0031] 本发明的第五个目的在于提供一种香草扁桃酸免疫原的应用，为将香草扁桃酸免疫原用于制备抗香草扁桃酸特异性抗体，和将抗香草扁桃酸特异性抗体用于制备香草扁桃酸检测试剂，该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对香草扁桃酸高通量、快速化的检测。

[0032] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到：一种如上所述的香草扁桃酸免疫原的应用，包括将香草扁桃酸免疫原用于制备抗香草扁桃酸特异性抗体，和将抗香草扁桃酸特异性抗体用于制备香草扁桃酸检测试剂。

[0033] 进一步地，抗香草扁桃酸特异性抗体为免疫实验动物后产生的：完整抗体分子、具有与香草扁桃酸特异性结合能力的抗体片段和抗体衍生物中的一种；完整抗体分子、抗体片段和抗体衍生物，为采用单一的香草扁桃酸免疫原对动物加强免疫所得到的多克隆抗体，或者为免疫后经体细胞杂交所得到的单克隆抗体；所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种；

[0034] 抗香草扁桃酸特异性抗体的制备方法为：

[0035] 免疫步骤：用PBS将香草扁桃酸免疫原稀释至0.1-3mg/mL，得到抗原溶液，然后用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合，对实验动物进行第一次注射；2-3周后，用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射；之后每隔4周用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次，免疫步骤中共注射三至六次；

[0036] 分离抗体步骤：对经免疫的实验动物取血并分离纯化，得到效价为1:30000-50000的抗香草扁桃酸特异性抗体。

[0037] 进一步地，香草扁桃酸检测试剂包括抗香草扁桃酸特异性抗体、香草扁桃酸酶标偶联物和酶的底物；香草扁桃酸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。

[0038] 进一步地，香草扁桃酸检测试剂包括试剂A和试剂B：

[0039] 试剂A为抗香草扁桃酸特异性抗体和酶的底物混合液，通过以下步骤制备得到：

[0040] 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的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物；将抗香草扁桃酸特异性抗体加到均相酶底物中，抗香草扁桃酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100-10000，得到试剂A；

[0041] 试剂B为香草扁桃酸酶标偶联物溶液，通过以下步骤制备得到：

[0042] 将香草扁桃酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中，香草扁桃酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:100-10000。

[0043] 进一步地，香草扁桃酸酶标偶联物通过以下方法制备得到：

[0044] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备步骤：称取7.5-22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，溶解于6-18mL含72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中，调节pH=9；然后加入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-磷酸和0.375-1.125mL卡必醇；再逐滴加入1-3mL二甲基亚砷，得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液；

[0045] 香草扁桃酸衍生物的激活步骤：在无水状态下称取5-15mg香草扁桃酸衍生物，溶解于300-900μL二甲基甲酰胺中；使溶液温度降至-2~-8℃后加入1.5-4.5μL三丁胺、0.75-2.25μL氯甲酸异丁酯，在-2~-8℃条件下搅拌30-60min；

[0046] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与香草扁桃酸衍生物的连接步骤：将已激活的香草扁桃酸衍生物溶液逐滴加入到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中；2-8℃搅拌至少8h，得到连接产物；

[0047] 纯化产物步骤：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。

[0048] 相比现有技术，本发明的有益效果在于：

[0049] 1、本发明的香草扁桃酸衍生物及合成方法均为针对性的新研究与设计，在现有技术中并不存在；

[0050] 2、本发明以香草扁桃酸衍生物制得的香草扁桃酸免疫原和抗体其灵敏度、特异性都比直接用香草扁桃酸原物制备的免疫原和抗体高，制备出的抗香草扁桃酸特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应，因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性；

[0051] 3、本发明的免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对香草扁桃酸高通量、快速化的检测，能同时测定多个样品，具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低香草扁桃酸检测成本，有利于临床推广使用。

附图说明

[0052] 图1为实施例4ELISA检测的标准曲线；

[0053] 图2为实施例7香草扁桃酸免疫检测方法的标准曲线；

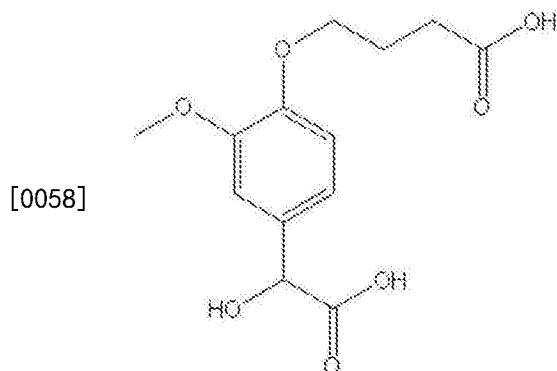
[0054] 图3为实施例9香草扁桃酸临床标本免疫检测与高效液相色谱检测对比数据的散点图。

具体实施方式

[0055] 下面，结合附图以及具体实施方式，对本发明做进一步描述：

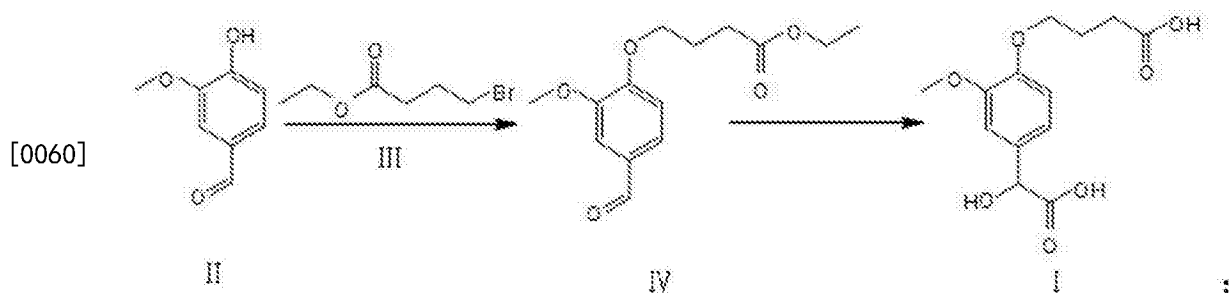
[0056] 一、香草扁桃酸衍生物及其合成：

[0057] 香草扁桃酸衍生物，其结构式如式I所示：



式 I；

[0059] 合成该香草扁桃酸衍生物过程的合成路线为：



[0061] 反应过程包括以下：

[0062] 合成化合物IV步骤：将化合物II、化合物III溶解于N,N-二甲基甲酰胺中，并加入K₂CO₃进行反应后，经萃取、干燥、浓缩、纯化得到化合物IV；

[0063] 合成化合物I步骤：将化合物IV与苄基三乙基氯化铵溶解于氯仿中，制成反应溶液；将NaOH溶液滴加入反应溶液中，反应后调节溶液pH=4，然后经萃取、干燥、浓缩、纯化，得到化合物I即香草扁桃酸衍生物。

[0064] 二、香草扁桃酸免疫原的制备方法：

[0065] 溶解载体蛋白步骤：将载体蛋白100-300g溶解于25-75mL 0.2M、pH=8.5的磷酸缓冲液中，得到载体蛋白溶液；

[0066] 混合液制备步骤：将以下溶液混合并搅拌溶解反应30-60min，得到混合液；

[0067] 100-300mg香草扁桃酸衍生物；

[0068] 1.75-5.25mL二甲基甲酰胺；

[0069] 1.75-5.25mL乙醇；

[0070] 3.5-10.5mL 10mM、pH=5的磷酸钾缓冲液；

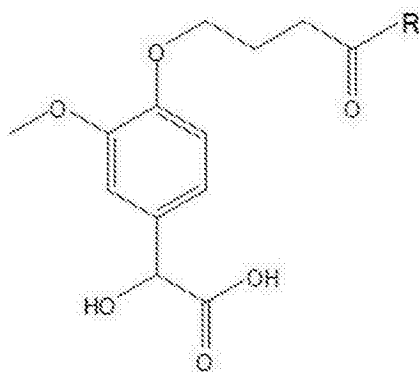
[0071] 100-300mg 1-乙基-3-(-3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、

[0072] 25-75mg N-羟基琥珀酰亚胺；

[0073] 免疫原制备步骤：将混合液滴加至载体蛋白溶液中，并在2-8℃下搅拌至少8h，得到抗原；将抗原经过透析进行纯化，得到香草扁桃酸免疫原；

[0074] 得到的香草扁桃酸免疫原，其结构式如式V所示：

[0075]



式V;

[0076] 其中, $-(CH_2)_3-CO-$ 为连接基团; R 为载体, 为牛血清蛋白。

[0077] 三、香草扁桃酸免疫原的应用:

[0078] 1、制备抗香草扁桃酸特异性抗体:

[0079] 抗香草扁桃酸特异性抗体为免疫实验动物后产生的: 完整抗体分子、具有与香草扁桃酸特异性结合能力的抗体片段和抗体衍生物中的一种; 完整抗体分子、抗体片段和抗体衍生物, 为采用单一的香草扁桃酸免疫原对动物加强免疫所得到的多克隆抗体, 或者为免疫后经体细胞杂交所得到的单克隆抗体; 所述的实验动物包括但不限于兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马中的一种, 优选为兔;

[0080] 抗香草扁桃酸特异性抗体的制备方法为:

[0081] 免疫步骤: 用 PBS 将香草扁桃酸免疫原稀释至 $0.1-3\text{mg/mL}$, 得到抗原溶液, 然后用 $0.5-5\text{mL}$ 抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合, 对实验动物进行第一次注射; 2-3 周后, 用 $0.5-5\text{mL}$ 抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射; 之后每隔 4 周用 $0.5-5\text{mL}$ 抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次, 免疫步骤中共注射三至六次;

[0082] 分离抗体步骤: 对经免疫的实验动物取血并分离纯化, 得到效价为 $1:30000-50000$ 的抗香草扁桃酸特异性抗体。

[0083] 2、制备香草扁桃酸检测试剂:

[0084] 香草扁桃酸检测试剂包括抗香草扁桃酸特异性抗体、香草扁桃酸酶标偶联物和酶的底物; 香草扁桃酸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;

[0085] 具体地, 香草扁桃酸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且分开放置, 所以将酶的底物与上述抗香草扁桃酸特异性抗体混合在一起。因此, 香草扁桃酸检测试剂包括两类试剂, 试剂 A 和试剂 B:

[0086] 试剂 A 为抗香草扁桃酸特异性抗体和酶的底物混合液, 通过以下步骤制备得到:

[0087] 将 $2.018-8.072\text{g}$ 、 $5.625-22.50\text{mM}$ 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 $0.856-3.422\text{g}$ 、 $5.625-22.50\text{mM}$ 葡萄糖-6-磷酸用 $0.5-2\text{L}$ 、 55mM 、 $\text{pH}=8$ 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物; 将抗香草扁桃酸特异性抗体加到均相酶底物中, 抗香草扁桃酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为 $1:100-10000$, 得到试剂 A;

[0088] 试剂 B 为香草扁桃酸酶标偶联物溶液, 通过以下步骤制备得到:

[0089] 将香草扁桃酸酶标偶联物加到 120mM 、 $\text{pH}=8.2$ 的 Tris 缓冲液中, 香草扁桃酸酶标偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 $1:100-10000$;

[0090] 抗香草扁桃酸特异性抗体与均相酶底物的体积优选为1:1250;

[0091] 香草扁桃酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:2500。

[0092] 其中,香草扁桃酸酶标偶联物通过以下步骤制备得到:

[0093] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备步骤:称取7.5-22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,溶解于6-18mL含72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,调节pH=9;然后加入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-磷酸和0.375-1.125mL卡必醇;再逐滴加入1-3mL二甲基亚砷,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液;

[0094] 香草扁桃酸衍生物的激活步骤:在无水状态下称取5-15mg香草扁桃酸衍生物,溶解于300-900μL二甲基甲酰胺中;使溶液温度降至-2~-8℃后加入1.5-4.5μL三丁胺、0.75-2.25μL氯甲酸异丁酯,在-2~-8℃条件下搅拌30-60min;

[0095] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与香草扁桃酸衍生物的连接步骤:将已激活的香草扁桃酸衍生物溶液逐滴加入到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌至少8h,得到连接产物;

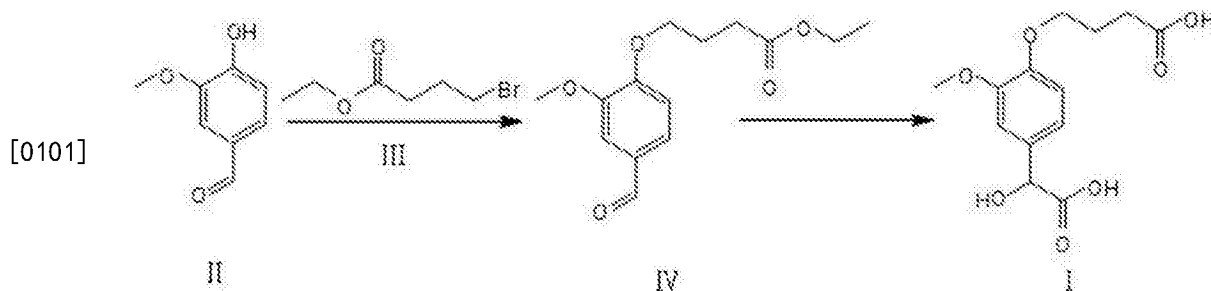
[0096] 纯化产物步骤:通过G-25凝胶层析柱纯化连接产物,获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物,于2-8℃下储存。

[0097] 香草扁桃酸衍生物的结构式同式I。

[0098] 实施例1:

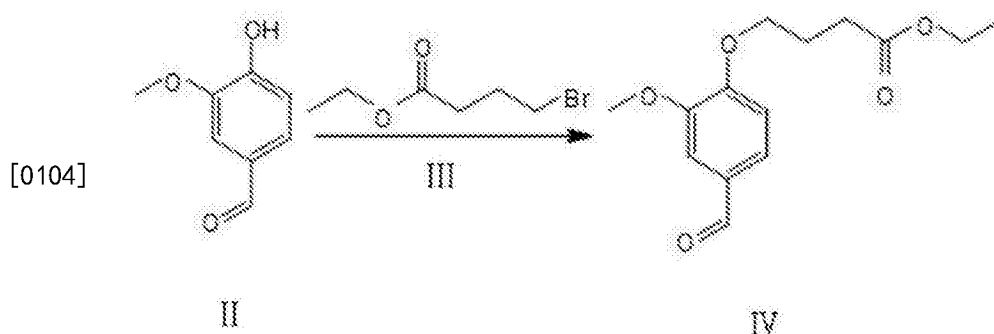
[0099] 香草扁桃酸衍生物的合成及其分析鉴定

[0100] 通过以下合成路线合成香草扁桃酸衍生物:



[0102] 具体的合成步骤如下:

[0103] 1) 化合物IV的合成:

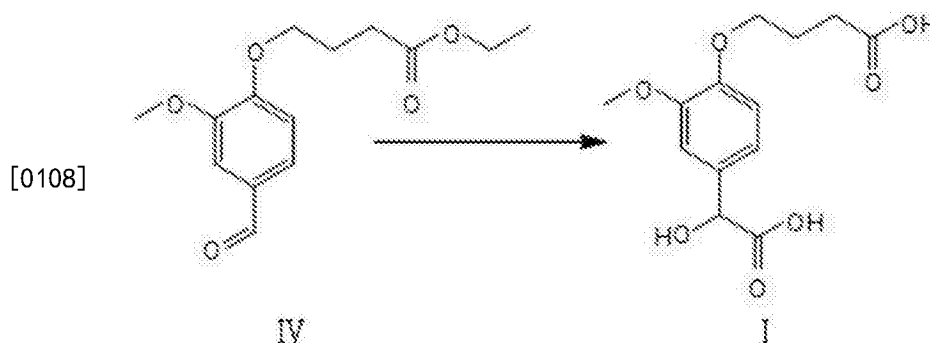


[0105] 称取20g (131.6mmol)的化合物II、33.2g (170mmol)的化合物III,共同溶解于300mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入36.4g (263mmol)的K₂CO₃,制成反应混合液;将反应混合液在室温下搅拌12小时;反应结束后,在反应混合液中加入200mL纯化水,然后用300mL二氯甲烷(DCM)进行萃取,萃取步骤重复3次;将萃取得到的结合的有机相通过Na₂SO₄进行干燥

处理,再进行浓缩;将浓缩后得到的剩余物通过硅胶干燥柱(PE:EA=5:1)进行纯化,得到28g化合物IV,产率80%。

[0106] 检验:利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述化合物IV进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标;结果如下:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 9.86(s,1H),7.46(m,2H),7.01(m,1H),4.19(m,4H),3.93(s,3H),2.58(m,2H),2.22(m,2H),1.26(m,3H)。表征为结构式所示的化合物IV。

[0107] 2) 化合物I的合成:



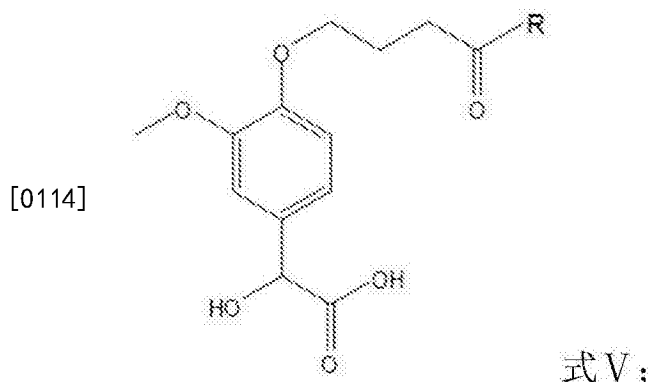
[0109] 称取3g(11.3mmol)的化合物IV、0.15g(0.6mmol)苄基三乙基氯化铵,共同溶解于30mL氯仿(CHCl₃)中制成反应溶液;将浓度为15g/mL NaOH溶液在56℃条件下逐滴加入反应溶液中,并在56℃条件下搅拌2.5小时;反应结束后得到的剩余物用1N的HCl调节至pH=4,进行酸化处理,然后用30mL乙酸乙酯(EA)进行萃取,萃取步骤重复3次;将萃取得到的结合的有机相进行干燥与浓缩处理;将浓缩后得到的剩余物通过pre-HPLC进行纯化,得到0.4g白色固体状的化合物I,即为香草扁桃酸衍生物(VMA衍生物),产率12.4%。

[0110] 检验:利用Bruker Avance 111 plus 400MHz和VARIAN MERCURY plus 300M对上述白色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用TMS作为内标。结果如下:¹H-NMR(400MHz,CD₃OD): δ 7.08(s,1H),6.93(m,2H),5.06(s,1H),4.04(m,2H),3.83(s,3H),2.50(m,2H),2.03(m,2H)。表征为结构式所示的化合物I。

[0111] 实施例2

[0112] 香草扁桃酸免疫原的合成:

[0113] 香草扁桃酸免疫原的结构式如式V所示:



[0115] 香草扁桃酸免疫原由载体与香草扁桃酸衍生物的-(CH₂)₃-CO-基团连接而成;R为牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)。

[0116] 该免疫原的制备方法具体步骤如下:

[0117] 溶解载体蛋白步骤:将牛血清蛋白200g溶解于50mL 0.2M、pH=8.5的磷酸缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

[0118] 混合液制备步骤:将以下溶液混合并搅拌溶解反应30min,得到混合液;

[0119] 200mg香草扁桃酸衍生物;

[0120] 3.5mL二甲基甲酰胺;

[0121] 3.5mL乙醇;

[0122] 7mL 10mM、pH=5的磷酸钾缓冲液;

[0123] 200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、

[0124] 50mg N-羟基琥珀酰亚胺;

[0125] 免疫原制备步骤:将混合液滴加至BAS溶液中,并在2-8℃下搅拌至少8h,得到抗原;将抗原经过透析进行纯化,得到香草扁桃酸免疫原。

[0126] 实施例3

[0127] 抗香草扁桃酸特异性抗体的制备:

[0128] 抗香草扁桃酸特异性抗体的制备方法为:

[0129] 免疫步骤:用PBS将香草扁桃酸免疫原稀释至1mg/mL,得到抗原溶液,然后用1mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行第一次注射;2-3周后,用1mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合进行第二次注射;之后每隔4周用0.5-5mL抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂混合注射一次,免疫步骤中共注射四次;

[0130] 分离抗体步骤:对经免疫的实验动物兔取血并分离纯化,得到效价为1:30000-50000的抗香草扁桃酸特异性抗体。

[0131] 实施例4

[0132] 香草扁桃酸的ELISA检验:

[0133] 1、香草扁桃酸的ELISA检测标准曲线的建立:

[0134] 1) 标准品的制备:

[0135] 将香草扁桃酸粉末(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16mg/L、8mg/L、4mg/L、2mg/L、1mg/L和0mg/L的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50mM Tris,145mM NaCl和体积百分比0.25%的BSA。

[0136] 2) 利用香草扁桃酸的ELISA检验方法制备标准曲线:

[0137] 用PBS将实施例3中所制备的抗香草扁桃酸抗体稀释成1:10000的终浓度溶液,100μL/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h;用PBS将上述包被有抗香草扁桃酸抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200μL/孔的体积百分比0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20μL/孔的标准品。再加入100μL/孔工作浓度的HRP-香草扁桃酸偶联物;室温下孵育30min后PBS洗板5次;然后每孔加入100μL TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100μL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,结果如图1所示。

[0138] 2、待测样品中香草扁桃酸含量的检测:

[0139] 1) 制作待测样品:

[0140] 制备方法:将香草扁桃酸粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1mg/mL的储存液,并将此储存液稀释于空白尿液中,至终浓度分别为0,2,8,16mg/L,分别形成空白、低、

中、高浓度的尿液样本。空白尿液为不含香草扁桃酸的健康人尿液。

[0141] 2) 测试方法:

[0142] 利用上述香草扁桃酸的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的尿液样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的尿液样本在450nm的吸光值。

[0143] 3) 测试结果:

[0144] 对照图1中所示的香草扁桃酸的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中香草扁桃酸含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中香草扁桃酸的实际含量计算回收率,结果如表格1所示。

[0145] 表格1香草扁桃酸的ELISA检测结果

[0146]

尿液样品	空白	低	中	高
样品浓度(mg/L)	0.00	2.00	8.00	16.00
测定 1	0.02	2.01	8.09	16.25

[0147]

测定 2	0.01	2.05	7.97	15.75
测定 3	0.03	1.96	8.03	16.10
平均值(mg/L)	0.02	2.01	8.03	16.03
回收率(%)	-	100.5	100.4	100.2

[0148] 由表格1中结果可知:采用本发明香草扁桃酸的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的香草扁桃酸回收率都较高,均在99%-101%之间,说明本发明所述的抗香草扁桃酸特异性抗体可以用于样本中香草扁桃酸的检测,并且结果准确度高。

[0149] 实施例5

[0150] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备方法为:

[0151] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 溶液的制备步骤:

[0152] 准确称取15mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于12mL含72.6mg0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,调节pH=9,本步骤在烧杯中进行。

[0153] 在烧杯中加入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)和0.75mL卡必醇(Carbitol)。

[0154] 在烧杯中再逐滴加入2mL二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO),得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液。

[0155] 香草扁桃酸衍生物的激活步骤:

[0156] 在无水状态下称取10mg实施例1合成的香草扁桃酸衍生物,溶解于600 μ L二甲基甲酰胺(DMF)中;使上述溶液温度降到-2~-8 $^{\circ}$ C后加入3 μ L三丁胺(tributylamine)、1.5 μ L氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate),-2~-8 $^{\circ}$ C搅拌30min。

[0157] G6PDH与香草扁桃酸衍生物的连接步骤:

[0158] 将已激活的香草扁桃酸衍生物溶液逐滴加入到G6PDH溶液中,2-8 $^{\circ}$ C搅拌过夜(至少8h),得到连接产物。

[0159] 纯化产物步骤:

[0160] 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 $^{\circ}$ C下储存。

[0161] 实施例6

[0162] 香草扁桃酸检测试剂的制备:

[0163] 香草扁桃酸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且分开放置,所以将酶的底物与上述抗香草扁桃酸特异性抗体混合在一起。因此,香草扁桃酸检测试剂包括两类试剂,试剂A和试剂B:

[0164] 试剂A的制备:

[0165] 将4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯中,用1L、55mM、pH=8的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将实施例3中制备的抗香草扁桃酸特异性抗体加到均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:1250,得到试剂A。

[0166] 试剂B的制备:

[0167] 将实施例5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,香草扁桃酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:2500。

[0168] 实施例7

[0169] 香草扁桃酸免疫检验及结果

[0170] 1、获得标准曲线:

[0171] 1) 设置迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数,如表格2所示。

[0172] 表格2生化分析仪参数设置

[0173]

迈瑞 BS-480 参数	
项目名称	香草扁桃酸
试剂 1	200 μ L
试剂 2	50 μ L
样本量	12 μ L
分析方法	终点法
主波长	340 nm
次波长	412 nm
反应时间	10 分钟
孵育时间	5 分钟
反应方向	上升
结果	mg/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0, 1, 2, 4, 8, 16 mg/L

[0174] 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2所示。

[0175] 2、样本检测:通过本发明的香草扁桃酸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:将香草扁桃酸标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为2,8,16mg/L。检测数据及数据分析见表格3。

[0176] 表格3样品的检测结果

[0177]

尿液样品	低	中	高
样品浓度 (mg/L)	2.00	8.00	16.00
1	2.10	8.24	16.29
2	1.94	8.15	16.42
3	2.05	7.86	15.92
4	2.07	7.97	16.08
5	1.99	8.05	15.80
6	1.93	8.29	15.91
7	1.91	8.23	16.38
8	2.09	8.06	16.36
9	2.05	7.98	15.86
10	1.99	7.85	16.11
平均值(mg/L)	2.012	8.068	16.113
标准差 (SD)	0.07	0.16	0.24
精密度 (CV%)	3.48%	1.98%	1.49%
回收率 %	100.6	100.9	100.7

[0178] 检测结果：本发明的香草扁桃酸检测试剂测定的准确度高，回收率均在99%–101%之间，精密度高，CV均低于4%。

[0179] 实施例8

[0180] 药物与激素干扰试验：

[0181] 干扰物选取62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物进行干扰检测，调整浓度至1mg/L，采用实施例7的香草扁桃酸免疫检验进行测定：

[0182] 将待测干扰物与实施例6制备的试剂A接触反应，再加入试剂B；

[0183] 检测上述混合溶液的OD₃₄₀吸光值，根据图2得到相应物质的浓度。

[0184] 62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物名称以及测定结果具体参见表格4。

[0185] 表格4常见干扰物测定结果

[0186]

ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)	ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)
1	阿司匹林	0.0	2	苯丙醇胺	0.0
3	β -苯基乙胺	0.0	4	普鲁卡因酰胺	0.0
5	安非他命	0.0	6	普鲁卡因	0.0
7	氨苄青霉素	0.0	8	奎尼丁	0.0
9	甲氨二氮卓	0.0	10	佐美酸	0.0
11	氯丙嗪	0.0	12	苯肾上腺素	0.0
13	氯拉卓酸	0.0	14	桂皮酰艾克宁	0.0
15	二甲苯氧庚酸	0.0	16	芽子碱	0.0
17	非诺洛芬	0.0	18	地西洋	0.0
19	甲基苯丙胺	0.0	20	可替宁	0.0
21	龙胆酸	0.0	22	阿替洛尔	0.0

[0187]

ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)	ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)
23	吉非贝齐	0.0	24	心得安	0.0
25	氢可酮	0.0	26	苯乙哌啶酮	0.0
27	布洛芬	0.0	28	苯基丁氮酮	0.0
29	丙咪嗪	0.0	30	麦角酸二乙基酰胺	0.0
31	二氨基二苯砜	0.0	32	大麻酚	0.0
33	蔡普生	0.0	34	洛哌丁胺	0.0
35	氢氯噻嗪	0.0	36	异克舒令	0.0
37	哌替啶	0.0	38	苯基丙氨酸	0.0
39	烯丙羟吗啡酮	0.0	40	盐酸氟西汀	0.0
41	麻黄素	0.0	42	柳丁氨醇	0.0
43	烟酰胺	0.0	44	青霉素	0.0
45	甲胺呋硫	0.0	46	甲基二乙醇胺	0.0
47	异戊巴比妥	0.0	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
49	甲撑二氧苯丙胺	0.0	50	琥珀酸多西拉敏	0.0
51	四氢大麻酚	0.0	52	纳布啡	0.0
53	制霉菌素	0.0	54	去甲吗啡	0.0

[0188]

ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)	ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)
55	乙酰吗啡	0.0	56	羟考酮	0.0
57	苯非他明	0.0	58	克他命	0.0
59	异内嗪	0.0	60	苯海拉明	0.0
61	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0
63	皮质醇 (氢化可的松)	0.0	64	醛固酮	0.0
65	雄烯二酮	0.0	66	雄甾酮	0.0
67	皮质脂酮	0.0	68	皮质酮 (可的松)	0.0
69	去氧皮质酮	0.0	70	脱氢表雄酮	0.0
71	硫酸脱氢表雄酮	0.0	72	二氢睾酮	0.0
73	雌二醇	0.0	74	雌三醇	0.0
75	雌酮	0.0	76	本胆烷醇酮	0.0
77	17-羟孕烯醇酮	0.0	78	17-羟孕酮	0.0
79	孕烯醇酮	0.0	80	孕酮	0.0
81	睾酮	0.0	82	孕三醇	0.0
83	孕二醇	0.0	84	17 α -羟基黄体酮	0.0
85	雄烯二酮	0.0	86	17-酮类固醇	0.0
87	17-羟皮质类固醇	0.0	88	肾上腺素	0.0

[0189]

ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)	ID#	化合物名称	等价于香草扁桃酸的浓度 (mg/L)
89	去甲肾上腺素	0.0	90	多巴胺	0.0
91	高香草酸	0.0	92	二羟基杏仁酸	0.0

[0190] 测定结果显示:上述62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物等价于香草扁桃酸的浓度均小于0.01mg/L。由此可见,本发明的抗体是抗香草扁桃酸的特异性抗体,与常见干扰物无交叉反应。

[0191] 实施例9

[0192] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和实施例6的香草扁桃酸检测试剂进行测定,并作相关性分析,测定的数据参见表格5。

[0193] 表格5临床标本测定结果对比数据

[0194]

样本号	香草扁桃酸检测试剂测定值 (mg/L)	高效液相色谱法测定值 (mg/L)
1	14.32	14.11
2	16.09	15.98
3	5.32	5.49
4	2.38	2.32
5	13.35	13.23
6	11.06	11.02
7	14.66	14.85
8	17.94	17.85
9	7.24	7.13
10	2.05	2.04

[0195]

11	6.08	5.95
12	5.23	5.10
13	10.17	10.03
14	2.36	2.25
15	3.36	3.24
16	15.26	15.3
17	11.98	11.81
18	14.69	14.58
19	14.33	14.54
20	4.03	3.98
21	15.21	15.01
22	18.25	18.17
23	16.22	16.05
24	14.25	14.26
25	17.55	17.21
26	0.33	0.36
27	5.03	4.98
28	2.02	1.99
29	16.23	16.01
30	15.25	15.05
31	17.89	17.85
32	17.23	17.15
33	11.22	11.41
34	10.55	10.59
35	18.25	18.03
36	14.06	13.96
37	18.69	18.56
38	17.22	17.15
39	16.23	16.04

[0196]

40	13.12	13.09
41	2.56	2.58
42	6.01	5.87
43	1.18	1.15
44	1.23	1.20
45	5.23	5.19
46	2.36	2.35
47	5.23	5.21
48	18.79	18.59
49	5.22	5.31
50	17.25	17.03
51	9.69	9.56
52	5.02	5.02
53	12.87	12.69
54	14.35	14.16
55	17.22	17.01
56	2.03	2.06
57	4.03	3.99
58	1.22	1.18
59	11.96	11.35
60	10.39	10.02
61	14.21	13.88
62	11.56	11.23
63	2.03	2.01
64	15.36	15.21
65	8.03	8.27
66	17.96	18.05
67	12.33	12.49

[0197]

68	16.13	16.34
69	4.28	4.03
70	6.01	5.88
71	2.23	2.26
72	4.47	4.52
73	15.38	15.69
74	17.29	17.15
75	14.35	14.41
76	10.99	10.96
77	16.33	16.23
78	15.79	15.86
79	3.22	3.41
80	4.05	4.21
81	5.55	5.46
82	17.58	17.91
83	10.99	10.76
84	17.68	17.89
85	2.35	2.42
86	4.22	4.02
87	8.99	8.79
88	15.23	15.48
89	4.39	4.42
90	8.56	8.49
91	7.22	7.36
92	5.23	5.16
93	8.97	8.67
94	1.88	1.96
95	12.58	12.34

[0198]

96	2.55	2.45
97	6.34	6.09
98	15.79	15.62
99	17.69	17.52
100	2.33	2.38

[0199] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y=1.003x-0.0442$,相关系数 $R^2=0.999$,表明香草扁桃酸检测试剂测定香草扁桃酸临床标本的准确度高。

[0200] 对于本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及变形,而所有的这些改变以及变形都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

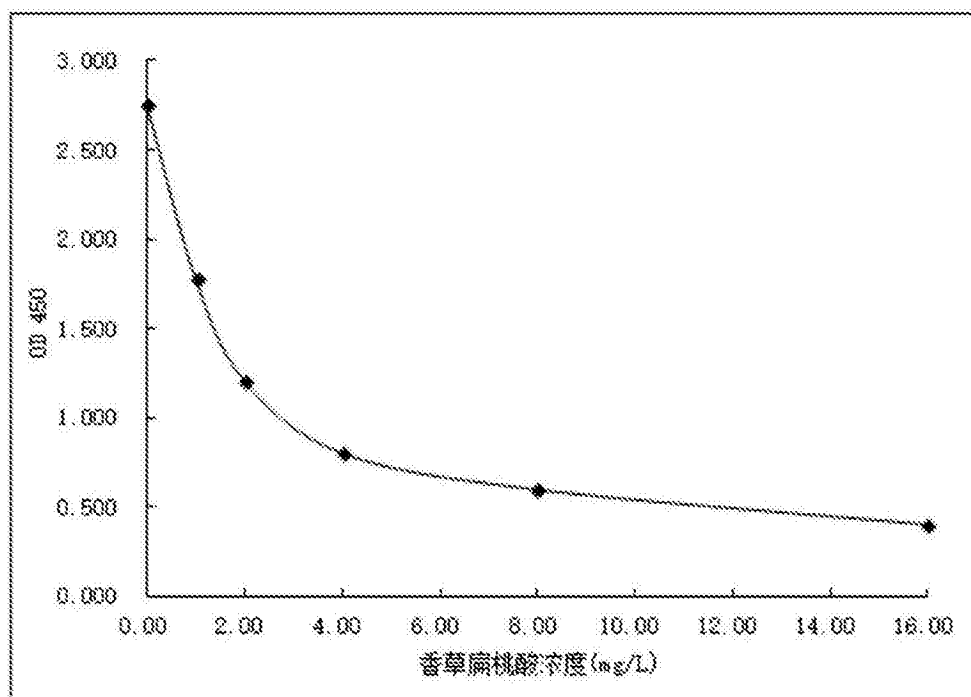


图1

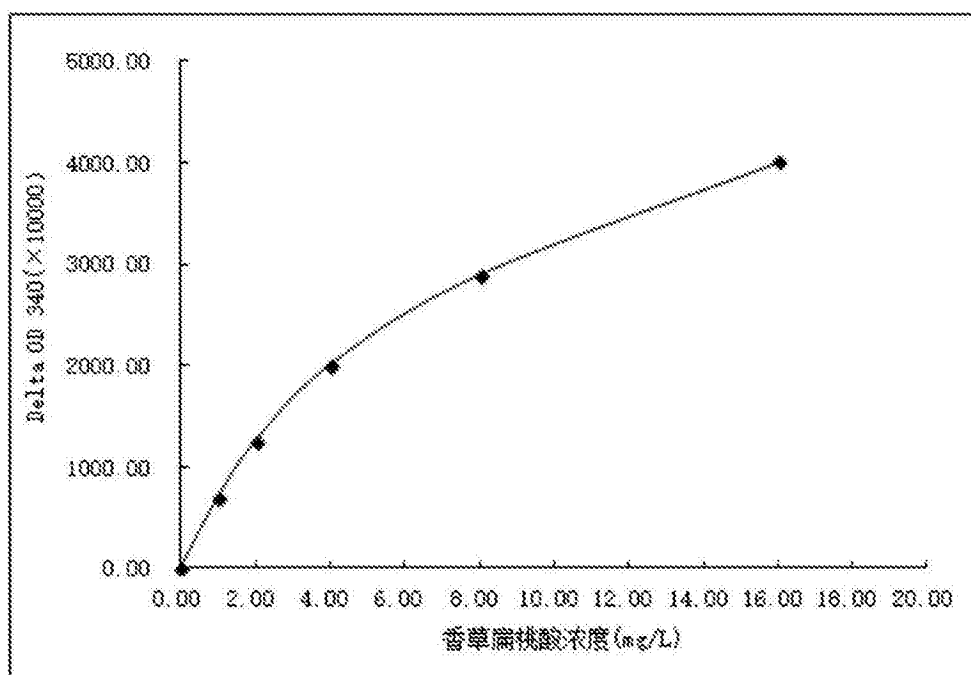


图2

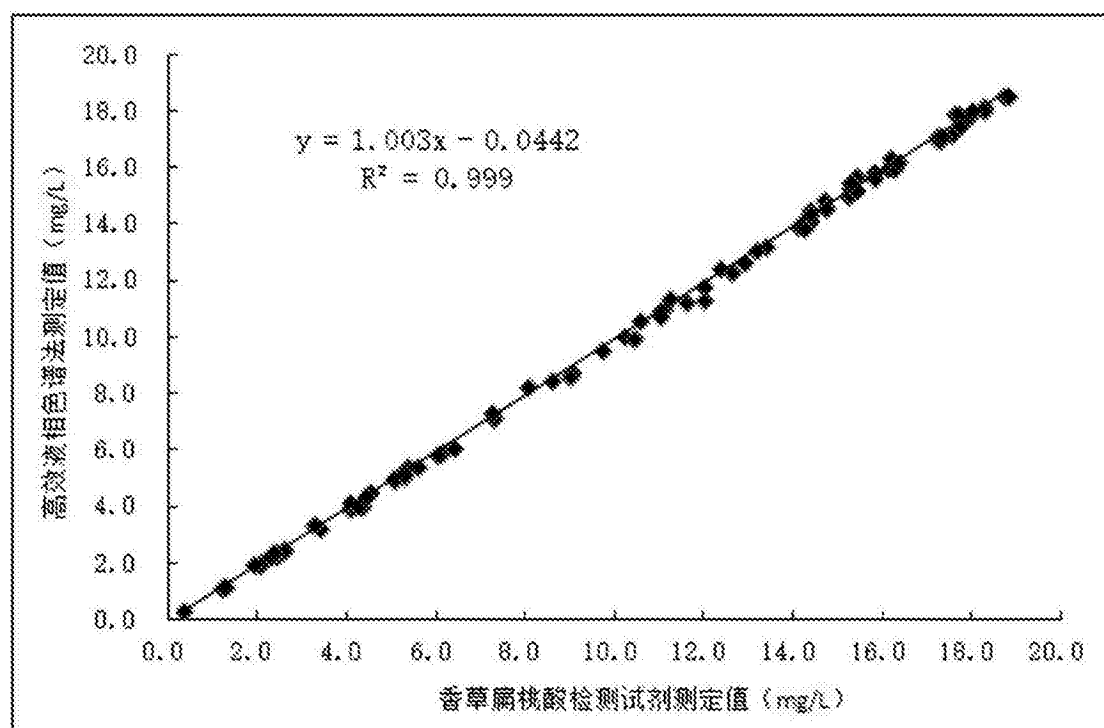


图3

专利名称(译)	一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN107353200A	公开(公告)日	2017-11-17
申请号	CN2017110499551.0	申请日	2017-06-27
[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 王晓波		
发明人	虞留明 王晓波		
IPC分类号	C07C59/66 C07C51/09 C07C51/093 G01N33/531 C07K14/765 C07K1/107 C07K16/44 C07K16/06		
CPC分类号	C07C59/66 C07C51/09 C07C51/093 C07C67/31 C07K14/765 C07K16/06 C07K16/44 C07K19/00 G01N33/531 C07C69/736		
代理人(译)	徐朝荣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种香草扁桃酸衍生物、其合成方法及一种香草扁桃酸免疫原、其制备方法及其应用；以香草扁桃酸衍生物制得的抗香草扁桃酸特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应，因此能够体现出较高的准确性、精密度、灵敏度和特异性；香草扁桃酸免疫原的应用为将香草扁桃酸免疫原用于制备抗香草扁桃酸特异性抗体，和将抗香草扁桃酸特异性抗体用于制备香草扁桃酸检测试剂，该检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对香草扁桃酸高通量、快速化的检测。

