



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102621323 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 201210089892. 8

(22) 申请日 2012. 03. 30

(73) 专利权人 苏州博源医疗科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州高新技术产业  
业开发区科灵路 78 号

(72) 发明人 虞留明 田军 袁红霞 蔡江丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 14/435(2006. 01)

审查员 贾静

权利要求书4页 说明书9页 附图1页

### (54) 发明名称

6-(甲巯基)嘌呤的检测方法

### (57) 摘要

本发明公开了 6-(甲巯基)嘌呤(6-Methylmercaptapurine, 6-MMP) 的均相酶免疫检测方法和酶联免疫吸附剂检测方法以及上述两种检测方法包含的检测试剂。本发明的两种检测方法, 用抗 6-MMP 特异性抗体研制的检测试剂能够确定待测样本中是否存在 6-MMP, 同样可以对 6-MMP 的含量进行定量测定。与传统的基因分型和 HPLC 方法相比, 本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、费用低等优势, 对于将来进行临床大面积推广应用, 特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。

1. 一种 6-(甲巯基)嘌呤(6-MMP)的均相酶免疫检测方法,使用 6-(甲巯基)嘌呤的均相酶免疫检验试剂,该检测试剂由 R1 试剂和 R2 试剂组成,包括以下操作步骤:

(1) 采用全自动生化分析仪,将待测样本与 6-(甲巯基)嘌呤检测试剂分别放入样本仓和试剂仓;

(2) 按照下表进行检测项目参数设置;

| 检测方法            | 样本<br>体积( $\mu$ l) | 试剂<br>R1/R2( $\mu$ l) | 定标<br>类型 | 波长<br>1st/2nd(nm) | 测光点  |
|-----------------|--------------------|-----------------------|----------|-------------------|------|
| 2 point<br>rate | 2-20               | 70-150/70-150         | Logit-4p | 340/405           | 8-34 |

(3) 测定 OD340nm 的吸光值;

(4) 制作标准曲线来定量样本中的 6-(甲巯基)嘌呤浓度;

其中:

R1 试剂的制备:将抗 6-MMP 特异性抗体稀释到均相 R1 缓冲液中,均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM 葡萄糖-6-磷酸和 50mM 烟碱腺嘌呤二核苷酸,所述 6-MMP 特异性抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 3000;

R2 试剂的制备:将酶-6MMP 偶联物稀释到 R2 缓冲液中, R2 缓冲液含 100mM Tris 和 0.25% 牛血清蛋白,所述酶-6MMP 偶联物与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 3000;

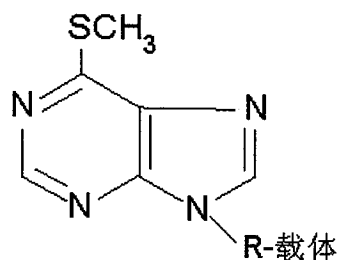
所述的酶-6MMP 偶联物的制备如下:

A. 酶溶液制备:称取酶,其选自  $\beta$ -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/mL;

B. 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成:用 DMF 溶解结构式 (II) 的 6-MMP 衍生物,使其终浓度为 10-50mg/mL,通过三丁胺法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经纯化和透析后得到 6-MMP 酶标偶联物;

所述抗 6-MMP 特异性抗体由 6-MMP 免疫原免疫动物后生产得到,

所述的 6-MMP 免疫原,其结构式如式 (I) 所示:

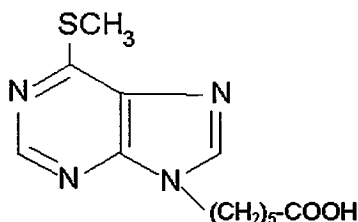


式 (I)

式中, R 为  $-(CH_2)_5-COO-$ , 载体为牛血清蛋白,

所述 6-MMP 免疫原合成方法如下:

(一) 6-MMP 衍生物的合成,其化学结构如式 (II) 所示:



式 (II)

1) 用 30ml DMF 溶解 5.0g 6-MMP 和 4.45g  $K_2CO_3$ , 加入 10ml 含 4.06g 6-溴己酸乙脂的 DMF 溶液, 在 40℃ 条件下搅拌反应 30min;

2) 随后将反应后溶液用 1N HCl 溶液中和, 并用乙酸乙酯萃取, 有机相经干燥、过滤、真空干燥以及正相硅胶纯化, 用 25ml 甲醇溶解 1.5g 纯化产物, 随后加入含 600mg LiOH·H<sub>2</sub>O 的水溶液, 室温搅拌反应 4 小时, 产物经浓缩后用水稀释、乙醚洗涤, 水相溶液用 1N HCl 溶液调整 pH 至 5.0, 最后用二氯甲烷萃取, 有机相经  $Na_2SO_4$  干燥、过滤和浓缩后得到白色固体状 6-MMP 衍生物;

## (二) 6-MMP 免疫原的合成

1) 将 200mg 牛血清蛋白 (BSA) 溶解于 50ml 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液中;

2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 合成的 6-MMP 衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg EDAC、50mg N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 将其搅拌溶解, 在室温下反应 30min;

3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在 2~8℃ 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析纯化, 得到 6-MMP 免疫原。

2. 根据权利要求 1 所述的 6-(甲巯基)嘌呤的均相酶免疫检测方法, 其中步骤 (2) 还可以通过以下方案实现:

| 检测方法            | 样本<br>体积(μl) | 试剂<br>R1/R2(μl) | 定标<br>类型 | 波长<br>1st/2nd(nm) | 测光点   |
|-----------------|--------------|-----------------|----------|-------------------|-------|
| 2 point<br>rate | 2-10         | 75-100/75-100   | Logit-4p | 340/405           | 10-20 |

。

3. 一种 6-(甲巯基)嘌呤的 ELISA 检测方法, 使用 6-(甲巯基)嘌呤 ELISA 检验试剂, 该检测试剂含有: (1) 抗 6-(甲巯基)嘌呤 (6-MMP) 特异性抗体; (2) 酶标偶联物及底物, 包括以下操作步骤:

1) 用 PBS 将抗 6-MMP 特异性抗体稀释成 1:2000-1:10000 的终浓度溶液, 100μL/孔包被在 96 孔酶联板上, 4℃ 过夜;

2) 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 200μL/孔的 0.5% 的 BSA 溶液, 4℃ 封闭过夜, PBS 洗涤 3 次;

3) 加入 20μL/孔的标准品;

4) 加入 100μL/孔工作浓度的 6-(甲巯基)嘌呤酶标偶联物;

5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

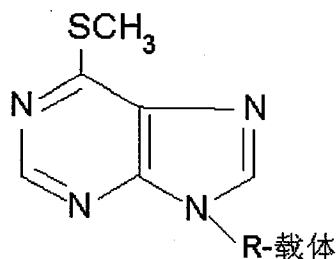
6) 每孔加入 100μL TMB, 室温孵育 30min;

7) 每孔加入 100μL 2M 硫酸;

8) 测定 450nm 的吸光值;

所述抗 6-MMP 特异性抗体由 6-MMP 免疫原免疫动物后生产得到,

所述的 6-MMP 免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:

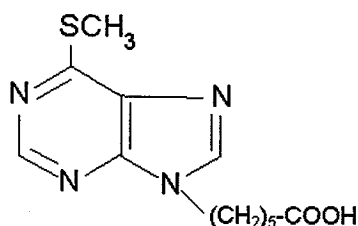


式 (I)

式中, R 为  $-(CH_2)_5-COO-$ , 载体为牛血清蛋白;

所述 6-MMP 免疫原合成方法如下:

(一) 6-MMP 衍生物的合成, 其化学结构如式 (II) 所示:



式 (II)

a). 用 30ml DMF 溶解 5.0g 6-MMP 和 4.45g  $K_2CO_3$ , 加入 10ml 含 4.06g 6-溴己酸乙酯的 DMF 溶液, 在  $40^\circ C$  条件下搅拌反应 30min;

b). 随后将反应后溶液用 1N HCl 溶液中和, 并用乙酸乙酯萃取, 有机相经干燥、过滤、真空干燥以及正相硅胶纯化, 用 25ml 甲醇溶解 1.5g 纯化产物, 随后加入含 600mg LiOH·H<sub>2</sub>O 的水溶液, 室温搅拌反应 4 小时, 产物经浓缩后用水稀释、乙醚洗涤, 水相溶液用 1N HCl 溶液调整 pH 至 5.0, 最后用二氯甲烷萃取, 有机相经  $Na_2SO_4$  干燥、过滤和浓缩后得到白色固体状 6-MMP 衍生物;

(二) 6-MMP 免疫原的合成

a). 将 200mg 牛血清蛋白 (BSA) 溶解于 50ml 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液中;

b). 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 合成的 6-MMP 衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg EDAC、50mg N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 将其搅拌溶解, 在室温下反应 30min;

c). 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在  $2 \sim 8^\circ C$  下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析纯化, 得到 6-MMP 免疫原;

所述的酶标偶联物的酶是辣根过氧化物酶 (HRP)、底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB), 所述的酶标偶联物由以下制备方法得到:

a) 称取酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中, 终浓度为 2-6mg/ml;

b) 用有机溶剂溶解链接有 R 连接基团的 6-MMP 衍生物, 终浓度为 10-50mg/ml, 通过 EDAC 的方法进行活化, 并与酶溶液进行交联反应, 经透析纯化后得到 6-MMP 酶标偶联物, 所述的有机溶剂为 DMF。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的检测方法, 其中所述的抗体为多克隆抗体或单克隆抗体, 所述的动物选自家兔, 山羊, 小鼠, 绵羊, 豚鼠或马中的一种。

5. 根据权利要求 4 所述的检测方法, 所述的动物为家兔。

6. 根据权利要求 2 或 3 所述的检测方法,其中所述的抗 6-(甲巯基)嘌呤特异性抗体的制备方法包括以下步骤:

- (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的 6-(甲巯基)嘌呤免疫原稀释至 0.5-5.0mg/mL;
- (2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射,注射后抽取动物特异抗血清,得到有效的抗体。

7. 根据权利要求 2 或 3 所述的检测方法,其可用于全血样本中 6-MMP 的检测。

## 6-(甲巯基)嘌呤的检测方法

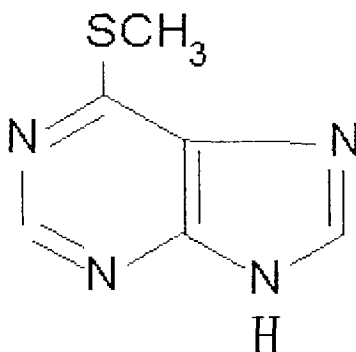
### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及 6-(甲巯基)嘌呤检测方法。

### 背景技术

[0002] 6-(甲巯基)嘌呤(6-Methylmercaptapurine,6-MMP),其结构式如式(I)所示。

[0003]



式(I)

[0004] 6-MMP 是 6-(巯基)嘌呤(6-Mercaptopurine,6-MP)的代谢物。临床上 6-MP 广泛用于多种重要疾病的治疗,包括:急性白血病、器官移植和一些自身免疫疾病等,但此药物如果使用不当可产生严重的甚至可危及生命的血液毒性,Mardini<sup>[1]</sup> 建议在使用 6-MP 时通过测定其代谢物 6-MMP 在病人血液中的浓度来决定 6-MP 的用药剂量,该文献结果显示,当血液中的 6-MMP 浓度  $< 0.6 \mu\text{g/mL}$  时,用药剂量达不到相关疗效;而当 6-MMP 浓度  $> 5.0 \mu\text{g/mL}$  时,则会对肝脏造成毒性。因此,一般需要将代谢物 6-MMP 的浓度控制在  $0.6 \mu\text{g/mL} \sim 5.0 \mu\text{g/mL}$  之内。

[0005] 传统检验 6-MMP 使用的方法是 HPLC 和 LC/MS-MS。这些方法操作复杂,费用高,而利用抗 6-MMP 特异性抗体研制的免疫检验则弥补了这些缺点。传统方法需要对标本进行复杂的前处理,时间长,费用高;本发明的检测方法,可以确定待测样本中是否存在 6-MMP,同样可以对 6-MMP 的含量进行定量测定。用抗 6-MMP 特异性抗体研制的免疫检验可通过测定反应产物 6-MMP 直接指导临床的合理规范化用药。与基因分型和 HPLC 方法相比,本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、费用低等优势,对于将来进行临床大面积推广应用,特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。

### 发明内容

[0006] 本发明就是为了克服现有技术存在的检测 6-MMP 方法复杂的缺陷,采用 6-MMP 特异性抗体研制的免疫检验试剂来弥补。本发明提供了使用本发明的免疫检验试剂来进行检验的方法。

[0007] 本发明的目的之一在于提供一种 6-MMP 的均相酶免疫检测方法。

[0008] 本发明的另一个目的在于提供一种6-MMP的酶联免疫吸附剂检测 (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA) 方法。

[0009] 本发明提供的两种6-MMP检测方法操作方便、结果准确、灵敏度高,克服了现有技术存在的检测6-MMP方法复杂的缺陷。本发明是通过以下技术方案实现的:

[0010] 一种6-MMP的均相酶免疫检验方法,使用6-MMP的均相酶免疫检验试剂,该检测试剂由抗6-MMP特异性抗体和6-MMP酶标偶联物组成,包括以下操作步骤:

[0011] (1) 采用全自动生化分析仪,将待测样本与6-MMP检验试剂分别放入样本仓和试剂仓;

[0012] (2) 按照表1进行检测项目参数设置;

[0013] 表1 6-MMP均相酶免疫检验参数设置表

[0014]

| 检测方法            | 样本<br>体积(μl) | 试剂<br>R1/R2(μl) | 定标<br>类型 | 波长<br>1st/2nd(nm) | 测光点  |
|-----------------|--------------|-----------------|----------|-------------------|------|
| 2 point<br>rate | 2-20         | 70-150/70-150   | Logit-4p | 340/405           | 8-35 |

[0015] (3) 测定 OD340nm 的吸光值;

[0016] (4) 制作标准曲线来定量样本中的6-MMP浓度。

[0017] 以上操作(2)步骤还可以通过以下优选方案进行:

[0018] 6-MMP均相酶免疫检验参数设置表

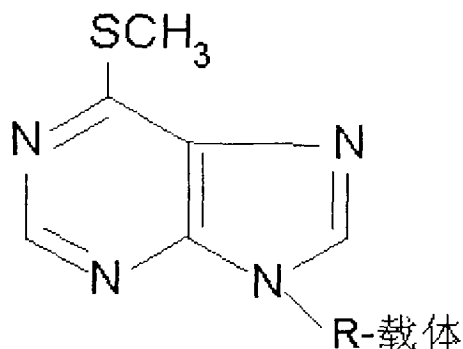
[0019]

| 检测方法            | 样本<br>体积(μl) | 试剂<br>R1/R2(μl) | 定标<br>类型 | 波长<br>1st/2nd(nm) | 测光点   |
|-----------------|--------------|-----------------|----------|-------------------|-------|
| 2 point<br>rate | 2-10         | 75-100/75-100   | Logit-4p | 340/405           | 10-20 |

[0020] 所述抗6-MMP特异性抗体由6-MMP免疫原免疫动物后生产得到。

[0021] 所述的6-MMP免疫原,其结构式如式(I)所示:

[0022]



式 ( I )

[0023] 式中, R 为连接基团, 载体具有免疫原性。

[0024] R 可以为  $-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$  或  $-NH-(CH_2)_n-COO-$  等, n 是 1 至 20 之间的整数。优选 R 为  $-(CH_2)_n-COO-$ , n 值为 1 至 10。更优选 R 为  $-(CH_2)_5-COO-$ 。

[0025] 上述载体为具有免疫原性的物质, 常选用蛋白质。优选为血清蛋白, 血蓝蛋白和甲状腺球蛋白。更优选为牛血清蛋白。

[0026] 当 R 为  $-(CH_2)_5-COO-$  时, 该 6-MMP 免疫原的合成途径和方法如下:

[0027] (1) 6-MMP 衍生物的合成:

[0028] 用 10-100ml 有机溶剂 A 溶解 1.0-10.0g 的 6-MMP 和 1.0-5.0g 的碳酸盐, 得到溶液 1; 将 1.0-5.0g 的 6-溴己酸乙脂加入到 5-50ml 的有机溶剂 A 中, 得到溶液 2, 将溶液 1 和 2 合并进行搅拌反应。将反应后的溶液用无机酸溶液中和, 经有机溶剂 B 萃取分离后纯化、干燥, 得到白色粉末状 6-MMP 衍生物。

[0029] (2) 载体溶液的制备: 将具有免疫原性的蛋白质 100-300mg 溶于 10-100ml 的 0.2M, pH 8.5 磷酸盐缓冲液中。

[0030] (3) 6-MMP 衍生物的活化及免疫原的合成: 用 1.0-5.0ml 的有机溶剂 A 溶解 50-500mg 的 6-MMP 衍生物, 通过 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimide, EDAC) 的方法<sup>[2]</sup>进行活化并与载体溶液进行交联反应, 经透析纯化后得到具有免疫原性的 6-MMP 免疫原。

[0031] 上述方法中所述的有机溶剂 A 为二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺 (N, N-Dimethylformamide, DMF)、甲醇或乙醇, 优选 DMF。所述的有机溶剂 B 为: 乙酸乙酯, 乙醚或氯仿, 优选乙酸乙酯; 所述的碳酸盐为  $Na_2CO_3$  或  $K_2CO_3$ , 优选  $Na_2CO_3$ ; 所述的无机酸溶液为盐酸溶液或硫酸溶液, 优选盐酸溶液。

[0032] 当 R 为  $-O-(CH_2)_n-COO-$ 、 $-S-(CH_2)_n-COO-$  或  $-NH-(CH_2)_n-COO-$  等时, 6-MMP 免疫原的合成途径与 R 为  $-(CH_2)_n-COO-$  时基本相同。

[0033] 抗 6-MMP 特异性抗体的制备方法:

[0034] (1) 用磷酸盐缓冲液将合成的 6-MMP 免疫原稀释至 0.5-5.0mg/ml;

[0035] (2) 经常规弗氏佐剂法对动物进行注射获得抗体, 注射后抽取动物特异性抗血清, 得到有效的抗体。

[0036] 上述方法中, 优选用磷酸盐缓冲液将 6-MMP 免疫原稀释至 1.0-2.0mg/mL。

[0037] 本发明中所指的“抗体”不仅仅指完整的抗体分子, 也包括保留完整抗体特异性结



合能力的抗体片断或者衍生物。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体，优选为多克隆抗体。

[0038] 本发明的抗体可以通过现有技术制备得到。获得多克隆抗体的典型方法是使用单一的免疫原，在加或者不加佐剂后，在动物的一个或者多个部位进行免疫，宿主动物包括：兔，山羊，小鼠，绵羊，豚鼠或马。优选地，上述宿主动物为家兔。动物定时采血得到适量的特异抗血清，抗血清可以纯化。单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0039] 本发明 6-MMP 的均相酶免疫检验方法中所用的 6-MMP 检验试剂中的 6-MMP 酶标偶联物的制备方法如下：

[0040] (3) 酶溶液制备：称取酶，选自  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase) 或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G6PDH)，优选 G6PDH，在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中，终浓度为 2-6mg/mL；

[0041] (4) 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成：用有机溶剂溶解上文所述的 6-MMP 衍生物，使其终浓度为 10-50mg/mL，通过三丁胺法<sup>[3]</sup> (Wong, Jameson. Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation. 2<sup>nd</sup> edition, 368-369 中记载的方法) 进行活化，并与酶溶液进行交联反应，经纯化和透析后得到 6-MMP 酶标偶联物。

[0042] 上述制备方法中所述的有机溶剂选自 DMF、DMSO、甲醇或乙醇。优选地，有机溶剂为 DMF。

[0043] 本发明 6-MMP 的均相酶免疫检验方法中所述的 6-MMP 检验试剂的制备方法如下：

[0044] (1) R1 试剂的制备：将上述抗 6-MMP 特异性抗体稀释到均相 R1 缓冲液中，均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM 葡萄糖-6-磷酸和 50mM 烟碱腺嘌呤二核苷酸，所述 6-MMP 特异性抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 10000，优选抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 3000；

[0045] (2) R2 试剂的制备：将酶-6MMP 偶联物稀释到 R2 缓冲液 (100mM Tris, 0.25% BSA) 中，所述酶-6MMP 偶联物与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 10000，优选酶-6MMP 偶联物与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000-1 : 3000。

[0046] 本发明 6-MMP 的均相酶免疫检验方法，检测时通过全自动生化分析仪，加入样品，再加入 R1 试剂，最后加入 R2 试剂，测定不同时间点的 OD340 吸光值，计算不同浓度标准品的反应速率。实际操作过程中需要不断调整 R1 试剂和 R2 试剂的比例，得到较理想的反应标准曲线。通过样本的反应速率值，并根据标准曲线中反应速率与标准品浓度的关系式得到样本的浓度值。

[0047] 该检测方法是一种竞争性反应，反应体系中与抗体结合的 6-MMP 和游离的 6-MMP 不需要通过固相来分离，其基本原理是：液体样本中游离的 6-MMP 与偶联在 G6PDH 上的 6-MMP 衍生物对特异性抗体的结合位点进行竞争。液体样本中的 6-MMP 竞争性的取代与抗体结合的 6-MMP 酶偶联物，并使其从抗体的结合位点上释放出来，从而使酶恢复活性。因此，液体样本中 6-MMP 的含量越多，游离的 6-MMP 衍生物-G6PDH 酶偶联物就越多，从而能得到更强的信号。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的 6-MMP 浓度。

[0048] 本发明还提供了一种 6-MMP 的 ELISA 检测方法，使用 6-MMP ELISA 检验试剂，该检测试剂由：抗 6-MMP 特异性抗体、6-MMP 酶标偶联物和底物组成，包括以下操作步骤：

[0049] (1) 用 PBS 将抗 6-MMP 抗体稀释成 1 : 1000-1 : 20000 的终浓度溶液，100  $\mu$  L/

孔包被在 96 孔酶联板上,4℃过夜;

[0050] (2) 用 PBS 洗涤 3 次后,加入 200  $\mu$  L/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液,4℃封闭过夜,PBS 洗涤 3 次;

[0051] (3) 加入 20  $\mu$  L/ 孔的标准品;

[0052] (4) 加入 100  $\mu$  L/ 孔工作浓度的 6-MMP 酶标偶联物;

[0053] (5) 室温下孵育 30min,PBS 洗板 5 次;

[0054] (6) 每孔加入 100  $\mu$  L 底物,优选 TMB 底物,室温孵育 30min。

[0055] (7) 每孔加入 100  $\mu$  L 终止液 (2M 硫酸)。

[0056] (8) 测定 450nm 的吸光值。

[0057] 以上操作步骤 (1) 中优选用 PBS 将抗 6-MMP 抗体稀释成 1 : 2000-1 : 10000 的终浓度溶液,100  $\mu$  L/ 孔包被在 96 孔酶联板上,4℃过夜;

[0058] 本发明所述的 6-MMP ELISA 检验试剂,含有:

[0059] (1) 抗 6-MMP 特异性抗体

[0060] (2) 酶标偶联物及底物:酶标偶联物的酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP) 等,优选为 HRP,底物为对应酶的底物,优选为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB),其中酶标偶联物的制备方法:

[0061] a) 称取酶在室温条件下溶解于磷酸缓冲液中,终浓度为 2-6mg/ml;

[0062] b) 6-MMP 衍生物的活化及偶联物的合成:用有机溶剂溶解 6-MMP 衍生物,终浓度为 10-50mg/ml,通过 EDAC 的方法进行活化,并与酶溶液进行交联反应,经透析纯化后得到 6-MMP 酶标偶联物。

[0063] 上述制备方法中所述的有机溶剂选自 DMF、DMSO、甲醇或乙醇。优选地,有机溶剂为 DMF。

[0064] 该检验是一种常规的固相竞争性 ELISA 反应。液体样本中 6-MMP 的含量越多,与固相支持物上的抗体结合的 6-MMP 衍生物-酶偶联物就越少,显色越浅。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的 6-MMP 浓度。

[0065] 该 ELISA 检验方法的基本原理是:液体样本中游离的 6-MMP 与 HRP 标记的 6-MMP 衍生物对包被在固相支持物上的特异性抗体的结合位点进行竞争,通过洗涤去掉未结合的分子,再加入 HRP 的底物进行显色反应。液体样本中 6-MMP 的含量越多,与固相支持物上的抗体结合的 6-MMP 衍生物-HRP 酶偶联物就越少,显色越浅。因此可以通过制作标准曲线来定量样本中的 6-MMP 浓度。

#### 附图说明

[0066] 图 1 是 6-MMP 均相酶免疫检测反应曲线

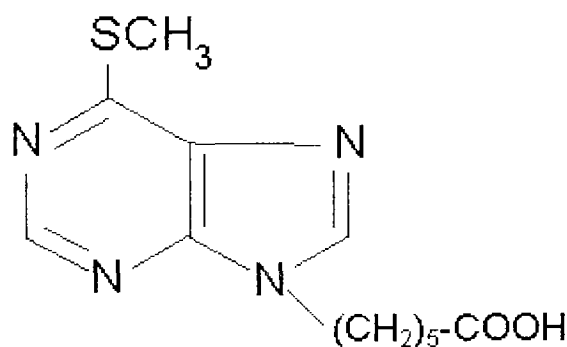
[0067] 图 2 是 6-MMP 的 ELISA 检测反应曲线

#### 具体实施方式

[0068] 实施例 1 抗 6-MMP 特异性抗体的制备

[0069] 1. 6-MMP 衍生物的合成,其化学结构如式 (II) 所示。

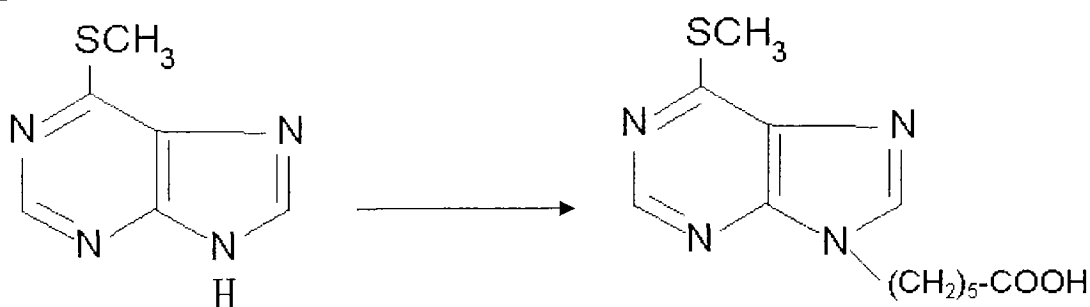
[0070]



式 (II)

[0071] 该 6-MMP 衍生物的合成途径和方法如下：

[0072]



6-MMP

6-MMP 衍生物

[0073] (1) 用 30ml DMF 溶解 5.0g 6-MMP 和 4.45g  $K_2CO_3$ , 加入 10ml 含 4.06g 6-溴己酸乙酯的 DMF 溶液, 在 40°C 条件下搅拌反应 30min。

[0074] (2) 随后将反应后溶液用 1N HCl 溶液中和, 并用乙酸乙酯萃取。有机相经干燥、过滤、真空干燥以及正相硅胶纯化。用 25ml 甲醇溶解 1.5g 纯化产物, 随后加入含 600mg LiOH·H<sub>2</sub>O 的水溶液, 室温搅拌反应 4 小时。产物经浓缩后用水稀释、乙醚洗涤, 水相溶液用 1N HCl 溶液调整 pH 至 5.0。最后用二氯甲烷萃取, 有机相经  $Na_2SO_4$  干燥、过滤和浓缩后得到白色固体状 6-MMP 衍生物。LCMS 结果显示: 纯度为 99.7%; 分子量为 281; 分子离子为 282 (M+1)。

[0075] 2. 6-MMP 免疫原的合成

[0076] 6-MMP 免疫原由血清蛋白, 血蓝蛋白或甲状腺球蛋白与 6-MMP 通过  $-(CH_2)_5-COOH$  基团连接而成, 以牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 为例具体的合成方法如下:

[0077] (1) 将 200mg BSA 溶解于 50ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0078] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解: 200mg 合成的 6-MMP 衍生物、3.5ml DMF、3.5ml 乙醇、7.0ml 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、200mg EDAC、50mg N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 将其搅拌溶解, 在室温下反应 30min;

[0079] (3) 将溶解好的溶液滴加至 BSA 溶液中, 并在 2~8°C 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过透析纯化, 得到 6-MMP 免疫原。

[0080] 3. 抗 6-MMP 特异性抗体的制备

[0081] (1) 用 PBS 将合成的 6-MMP 免疫原稀释至 1.5mg/ml, 然后用抗原溶液与弗氏完全

佐剂混合,对家兔进行注射;

[0082] (2) 2~3周后,再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂混合后对家兔注射一次,之后每隔四周一次,共两次,抽取家兔的抗血清,获得有效的抗体。

[0083] 实施例 2 6-MMP 的均相酶免疫检验试剂制备

[0084] (1) R1 试剂的制备:将制备好的抗体稀释到 R1 缓冲液中,均相 R1 缓冲液含 50mM Tris, 0.25% BSA, 50mM G-6-P 和 50mM NAD。抗体与 R1 缓冲液的体积比为 1 : 1000。

[0085] (2) R2 试剂的制备

[0086] 1) G6PDH-6MMP 的制备

[0087] a) 称取 15mg G6PDH,溶解于 12ml, 0.05M Tris 缓冲液中,依次加入 100mg NADH、0.5ml 卡必醇和 1ml 的 DMF 混匀;

[0088] b) 将 10mg 的 6-MMP 衍生物溶解于 420  $\mu$ l 二甲基亚砷和 180  $\mu$ l DMF 中,加入 6  $\mu$ l 三丁胺 (tributylamine) 和 3  $\mu$ l 氯甲酸异酯 (isobutylchloroformate),在 2~8℃ 条件下搅拌反应 30min;

[0089] c) 随后在 2~8℃ 条件下搅拌过夜,并将得到的 G6PDH-6MMP 进行纯化。

[0090] 2) 将制备好的 G6PDH-6MMP 稀释到 R2 缓冲液中。R2 缓冲液为 100mM Tris, 0.25% BSA。抗体与 R2 缓冲液的体积比为 1 : 1000。

[0091] 实施例 3 6-MMP 的均相酶免疫检验方法及标定结果

[0092] 表 1 日立 7180 分析仪 6-MMP 均相酶免疫检验参数表

[0093]

| 检测<br>方法        | 样本<br>体积( $\mu$ l) | 试剂<br>R1/R2( $\mu$ l) | 定标<br>类型 | 波长<br>1st/2nd(nm) | 测光点   |
|-----------------|--------------------|-----------------------|----------|-------------------|-------|
| 2 point<br>rate | 10                 | 100/100               | Logit-4p | 340/405           | 10-20 |

[0094] 通过全自动生化分析仪,按照表 1 数据进行参数设置。首先加入样品,再加入实施例 2 中的 R1 试剂(抗体与 R1 缓冲液的混合液),最后加入 R2 试剂(G6PDH-6MMP 偶联物与 R2 缓冲液的混合液),测定不同时间点的 OD340 吸光值,计算不同浓度标准品的吸光度变化率,得到较理想的反应标准曲线,结果如图 1 所示。

[0095] 实施例 4 6-MMP 的 ELISA 检验试剂的制备

[0096] (1) 含有实施例 1 制备的抗 6-MMP 特异性抗体

[0097] (2) 含有 HRP-6MMP 偶联物及底物。

[0098] 酶标偶联物的制备方法:

[0099] a) 称取 20mg HRP 在室温条件下溶解于 5ml 0.2M, pH 8.5 的磷酸缓冲液中;

[0100] b) 活化 6-MMP 衍生物:称取 10mg 6-MMP 衍生物于小烧杯中,并依次加入 350  $\mu$ l DMF、350  $\mu$ l 无水乙醇、700  $\mu$ l 10mM, pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、40mg EDAC 和 5mg Sulfo-NHS,在室温条件下搅拌反应 30min;

[0101] c) 随后将活化的 6-MMP 衍生物滴加到 HRP 酶溶液中, 在 2-8℃ 条件下搅拌过夜, 并将偶联物进行透析纯化得到 HRP-6-MMP 偶联物。

[0102] 实施例 5 6-MMP ELISA 检验方法及定标结果

[0103] (1) 6-MMP ELISA 检验方法步骤

[0104] 1) 用 PBS 将抗 6-MMP 抗体稀释成 1 : 5000 的终浓度溶液, 100  $\mu$  L/ 孔包被在 96 孔酶联板上, 4℃ 过夜;

[0105] 2) 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入 200  $\mu$  L/ 孔的 0.5% 的 BSA 溶液, 4℃ 封闭过夜, PBS 洗涤 3 次;

[0106] 3) 加入 20  $\mu$  L/ 孔的标准品;

[0107] 4) 加入 100  $\mu$  L/ 孔工作浓度的 HRP-6-MMP 偶联物;

[0108] 5) 室温下孵育 30min, PBS 洗板 5 次;

[0109] 6) 每孔加入 100  $\mu$  L TMB 底物, 室温孵育 30min。

[0110] 7) 每孔加入 100  $\mu$  L 终止液 (2M 硫酸)。

[0111] 8) 测定 450nm 的吸光值。

[0112] (2) 定标结果如图 2 所示。

[0113] 实施例 6 应用 6-MMP 均相酶检测试剂进行血清中 6-MMP 的回收试验

[0114] 该回收实验的目的是确定所述的 6-MMP 均相酶免疫检测方法可以用于全血样本中 6-MMP 的检测。

[0115] 1. 通过 6-MMP 的均相酶免疫检验的定标曲线, 重复测定空白、低、中、高浓度血清 (将 6-MMP 标准品溶解于空白全血中, 至终浓度分别为 0, 0.6, 2.0, 4.0  $\mu$  g/mL) 3 次, 结果样品的回收率高 (> 95%)。

[0116] 2. 测定方法: 如实施例 3 中的 6-MMP 的均相酶免疫方法所述, 结果见表 2。

[0117] 表 2 6-MMP 的均相酶免疫检验回收率实验

[0118]

| 血清样品               | 空白   | 低    | 中    | 高    |
|--------------------|------|------|------|------|
| 样品浓度 ( $\mu$ g/mL) | 0.0  | 0.60 | 2.0  | 4.0  |
| 测试 1               | 0.00 | 0.62 | 2.10 | 4.10 |
| 测试 2               | 0.00 | 0.58 | 1.90 | 4.07 |
| 测试 3               | 0.00 | 0.63 | 2.06 | 4.05 |
| 平均值 ( $\mu$ g/mL)  | 0.00 | 0.61 | 2.02 | 4.07 |
| 标准差 ( $\mu$ g/mL)  | 0.00 | 0.02 | 0.09 | 0.02 |
| CV(%)              | —    | 3.5  | 4.3  | 0.5  |
| 回收率 (%)            | —    | 102  | 101  | 102  |

[0119] 该实验结果显示: 不同浓度的样品中的 6-MMP 回收率高, 均 > 90%, 说明所述的 6-MMP 均相酶免疫检测方法可以用于全血样本中 6-MMP 的检测, 并且结果准确, 可信。

[0120] 实施例 7 应用 6-MMP ELISA 检测进行血清中 6-MMP 的回收试验

[0121] 该回收实验的目的是确定所述的 6-MMP ELISA 检测方法可以用于全血样本中 6-MMP 的检测。

[0122] 1. 通过 6-MMP 的 ELISA 检验的定标曲线, 重复测定空白、低、中、高浓度血清 (将 6-MMP 标准品溶解于空白全血中, 至终浓度分别为 0, 0.6, 2.0, 4.0  $\mu$  g/mL) 3 次, 结果样品的回收率高 (> 90%)。

[0123] 2. 测定方法 :如实施例 4 中的 6-MMP 的 ELISA 方法所述,结果见表 3。

[0124] 表 3 6-MMP 的 ELISA 检测回收率实验

[0125]

| 血清样品                      | 空白   | 低    | 中    | 高    |
|---------------------------|------|------|------|------|
| 样品浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0.0  | 0.60 | 2.0  | 4.0  |
| 测试 1                      | 0.02 | 0.68 | 1.92 | 4.13 |
| 测试 2                      | 0.10 | 0.61 | 2.27 | 3.84 |
| 测试 3                      | 0.03 | 0.65 | 2.15 | 3.87 |
| 平均值 ( $\mu\text{g/ml}$ )  | 0.05 | 0.65 | 2.11 | 3.95 |
| 回收率 (%)                   | —    | 107  | 106  | 99   |

[0126] 该实验结果显示 :不同浓度的样品中的 6-MMP 回收率高,均  $> 90\%$ ,说明所述的 6-MMP ELISA 检测方法可以用于全血样本中 6-MMP 的检测,并且结果准确,可信。

[0127] 参考文献 :

[0128] [1]Mardini et al.Utility of Measuring 6-Methylmercaptopurine and 6-Thioguanine Nucleotide Levels in Managing Inflammatory Bowel Disease Patients Treated With 6-Mercaptopurine in a Clinical Practice Setting. Journal of Clinical Gastroenterology. 2003,36(5) :390-395.

[0129] [2]Hermanson. Bioconjugate techniques. 2<sup>nd</sup> edition,215-221.

[0130] [3]Wong,Jameson. Chemisty of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation. 2<sup>nd</sup> edition,368-369。

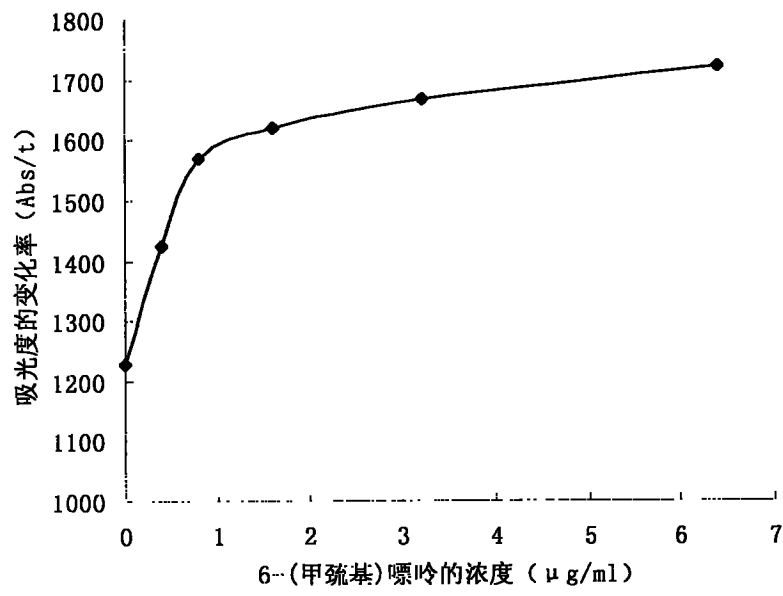


图 1

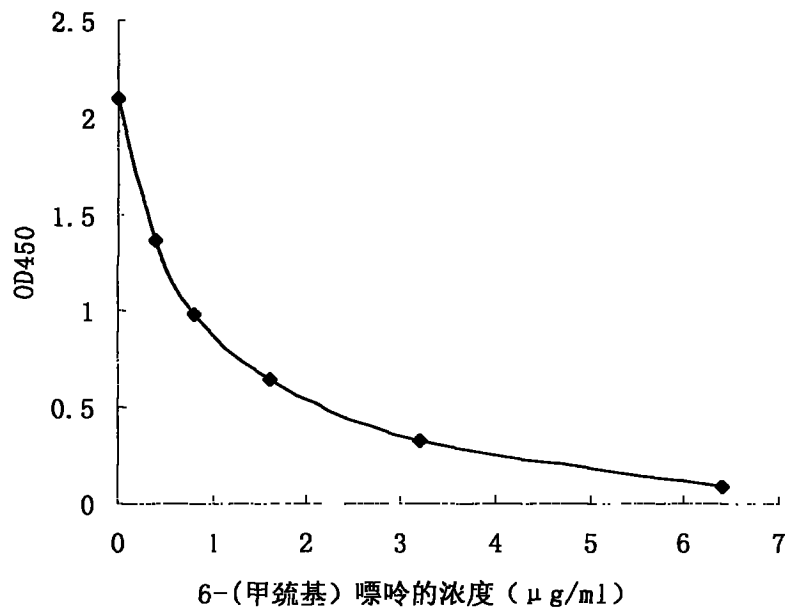
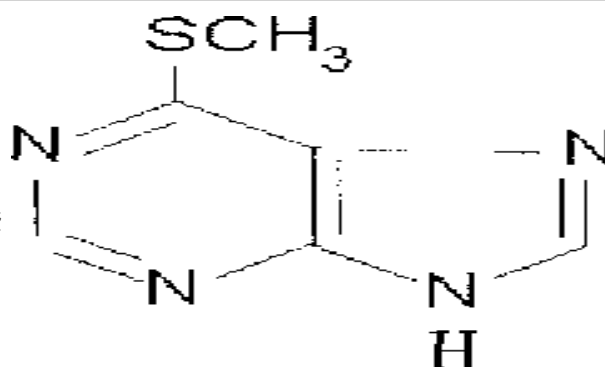


图 2

|                |                                                                            |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 6-(甲巯基)嘌呤的检测方法                                                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102621323B</a>                                               | 公开(公告)日 | 2014-06-11 |
| 申请号            | CN201210089892.8                                                           | 申请日     | 2012-03-30 |
| [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<br>田军<br>袁红霞<br>蔡江丽                                                    |         |            |
| 发明人            | 虞留明<br>田军<br>袁红霞<br>蔡江丽                                                    |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/577 G01N33/53 G01N33/535 C07K16/06 C07K14/765 C07K14/795 C07K14/435 |         |            |
| 审查员(译)         | 贾静                                                                         |         |            |
| 其他公开文献         | CN102621323A                                                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                             |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了6-(甲巯基)嘌呤(6-Methylmercaptopurine, 6-MMP)的均相酶免疫检测方法和酶联免疫吸附剂检测方法以及上述两种检测方法包含的检测试剂。本发明的两种检测方法, 用抗6-MMP特异性抗体研制的检测试剂能够确定待测样本中是否存在6-MMP, 同样可以对6-MMP的含量进行定量测定。与传统的基因分型和HPLC方法相比, 本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、费用低等优势, 对于将来进行临床大面积推广应用, 特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。



式 (1)