



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108291908 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680032653.5

(22)申请日 2016.05.25

(30)优先权数据

62/166044 2015.05.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/034202 2016.05.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/191507 EN 2016.12.01

(71)申请人 黄一菊

地址 421000 湖南省衡阳市石鼓区向农路9号2单元602户

(72)发明人 郝秀娟 邓朝义

(74)专利代理机构 北京远创理想知识产权代理
事务所(普通合伙) 11513

代理人 卫安乐

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

C12Q 1/48(2006.01)

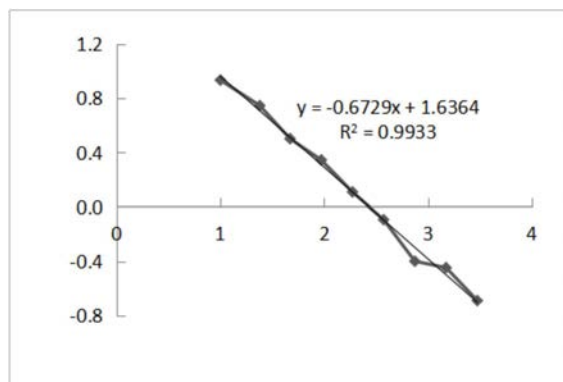
权利要求书2页 说明书23页 附图7页

(54)发明名称

用免疫和化学方法快速简便测定S-腺苷蛋氨酸, S-腺苷同型半胱氨酸和同型半胱氨酸

(57)摘要

本发明提供免疫层析试纸条,均相与非均相免疫测定方法和系统或试剂盒用于检测和定量样品中S-腺苷甲硫氨酸(SAM), S-腺苷高半胱氨酸(SAH)和同型半胱氨酸(HCy)的方法,包括:(a)制备荧光团和抗体的偶联物;(b)将SAM, SAH和HCY固定在固相支持物上;(c)提供样品,将所述样品加入抗SAM,抗SAH或抗-HCY与镧系元素螯合物或量子点(QD)的偶联物上,结合后形成包含所述偶联物,在固体支持物上SAM, SAH或HCY,和可能存在于样品中的SAM, SAH或HCY的竞争性复合物;和(d)通过监测由复合物中的荧光共轭物介导的光谱发射来检测复合物的存在(如果存在),其中荧光信号的出现和数量反映样品中SAM, SAH或HCY的存在和数量。



1. 与选自抗SAM,抗SAH,抗-HCY和抗CRP抗体相结合的荧光染料-抗体偶联物。
2. 权利要求1的荧光偶联物,其中所述荧光材料是荧光镧系螯合物。
3. 权利要求2的偶联物,其中所述镧系元素是铈和铽
4. 根据权利要求1所述的荧光材料,其中所述荧光材料是量子点。
5. 根据权利要求4所述的荧光材料,其中所述量子点选自ZnS,ZnSe,ZnTe,CdS,CdSe,CdTe,HgS,HgSe,HgTe,MgS,MgSe,MgTe,CaS,CaSe,CaTe,SrS,SrSe,SrTe,BaS,BaSe和BaTe。
6. 一种含有权利要求1所述荧光材料的免疫层析试纸条。
7. 利用权利要求1的荧光偶联物,同时测定SAM,SAH,HCy和CRP中至少两种物质的存在。
8. 一种包含有权利要求2的偶联物的免疫层析试纸。
9. 一种检测和定量样品中SAM,SAH和HCy中任意一种待分析物的方法,包括:(a)制备镧系元素螯合物或量子点(QD)与抗待分析物抗体的偶联物;(b)将待分析物固定在固相支持物上;(c)准备样品,将所述样品与步骤(a)所述偶联物混合,在适合的条件下,(a)中所述有偶联物与固体支持物上待分析物,或者与可能存在于样品中的待分析物形成竞争性结合,样品中待分析物越多,固相支持物上待分析物抗原-荧光抗体的复合物就越少;和(d)通过监测抗原-抗体复合物中的荧光共轭物介导的光谱发射来检测复合物的存在(如果存在),其中荧光信号的出现和数量反映样品中待分析物的存在和数量。
10. 使用权利要求8所述免疫层析试纸用来检测和监测抑郁症,骨关节炎,肝和胆囊疾病患者中的S-腺苷甲硫氨酸的水平,然后提出如何正确使用SAM作为药物的治疗方案。
11. 一种利用权利要求9所述方法开发的用于诊断和指导治疗的现场测试或床头测试(POCT)系统。
12. 一种在呈现过急性冠状动脉综合征至少一种症状以后一年以内的患者,确定该患者是否有重大不良心血管事件的风险的方法,包括以下步骤:(a)从所述患者获得测试样品;(b)使用量子点或基于荧光的螯合物的方法测定SAM,SAH,HCy和CRP的含量;(c)将所述四种生物标志物的检测水平与这些生物标志物的参考标准进行比较,其中所述风险由比较的结果确定。
13. 一种用于测定样品中同型半胱氨酸的方法,所述方法包括以下步骤:(i)使所述样品与HMT(同型半胱氨酸甲基转移酶)和S-腺苷蛋氨酸反应产生SAH;(ii)使用免疫层析试纸条测定SAH的含量。
14. 一种用于通过权利要求13所述的方法测定样品中同型半胱氨酸的试剂盒,所述试剂盒包含:将所述样品中同型半胱氨酸转化为SAH的能转化同型半胱氨酸的酶;和免疫层析试纸条。
15. 基于权利要求9所述的方法的一种侧向免疫层析试纸条,用于在液体样品中单独或同时检测和定量SAM,SAH和HCy的存在,由包被有SAM,SAH或HCy与蛋白质偶联物的条带和与其抗体结合的颗粒物质组成。
16. 一种基于均相免疫检测的床头诊断测试方法(POCT)包括:铈螯合物标记的抗SAM、抗SAH、抗HCy和抗CRP抗体与相应的抗原SAM、SAH、HCy和CRP反应,然后通过用光脉冲激发铈螯合物,测定预定时间过后的荧光信号的强度和/或半衰期来计算样品中待分析物的含量。
17. 一种基于权利要求9所述的方法判定对至少一种与饮食有关的疾患患者所使用的饮食计划有效性的方法,包括以下步骤:

- (a) 选择多个患者,每个患者存在至少一种与饮食相关的疾患。
- (b) 用于每个所述膳食有关的疾患,测定患者身体质量指数(BMI)和至少一个其它可量化的指标,其选自甲基化指数,SAM和SAH水平,对每个所述患者,在未给药时(基准期),测定上述至少一个指标。
- (c) 在所述基准期间监测每个所述患者以确定基线生活质量。
- (d) 将所述患者随机分组,分为第一组和第二组。
- (e) 在干预期间对所述第一组中的所述患者施用所述饮食计划。
- (f) 将所述第二组中的每个所述患者保持已知的有益的对照饮食,即在干预期内对上述至少一种膳食有关的疾患具有明确的良好作用的饮食。
- (g) 在干预期后,监测每个患者的每个病况和至少一个指标。

用免疫和化学方法快速简便测定S-腺苷蛋氨酸,S-腺苷同型半胱氨酸和同型半胱氨酸

[0001] 本发明专利申请延续临时美国专利US62/166,044题目为“用免疫和化学方法快速简便测定S-腺苷蛋氨酸,S-腺苷同型半胱氨酸和同型半胱氨酸”,提交日期为2015年5月25日。本专利申请将包括上述临时专利申请的全部内容。

发明领域

[0002] 本发明涉及在S-腺苷甲硫(蛋)氨酸(SAM),S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)和C-反应蛋白(CRP)的免疫测定中使用荧光材料如量子点,荧光镧系元素金属螯合物和胶体微球。本发明还涉及光化学方法用于测定同型半胱氨酸(HCy)的干试纸条方法和两种方法的组合。本发明还涉及使用同时读取免疫荧光和光化学颜色的荧光光密度装置,以便快速方便地报告结果,来定量SAM,SAH和HCy。本发明还涉及临床样品的测定。

[0003] 本发明还涉及检测液体样本中的分析物的存在或浓度的荧光化合物指示剂分子以及用于实现这种检测的方法。更具体地说,本发明涉及荧光镧系元素金属螯合物及其作为指示剂分子的用途,用于检测介质,包括液体介质如生物液体样本或其它生物样本中的SAM,SAH和CRP等分析物的存在或浓度。

[0004] 本发明还涉及开发检测心血管危险因素的多种分析物,用于预测冠心病和中风的测定系统。本发明还涉及SAM和SAH,HCy和CRP的测定以确定心脏保健和心脏预后。本发明在体外诊断(IVD)和POCT领域也特别有用。

[0005] 发明的背景

[0006] 在生物学中,用荧光材料标记诸如细胞或病毒的结构是有意义的,用于准确鉴定,易于检测和显微分析。传统的有机染料荧光团有很多优势,人们可以对一系列荧光材料进行修饰,通过已知或可预知的亲和力和化学特性,使之能够靶向性地结合到广泛的生物结构上。当染料与目标生物材料结合时,使用给定波长的光来激发染料,会产生该有机荧光染料特异的荧光信号。然而,当用于标记生物材料时,传统的有机染料具有许多限制。

[0007] 半导体荧光纳米晶体(“量子点”)是纳米大小的半导体,发光晶体,形状为球形,具有比有机染料优异的荧光性能。量子点通常由周期表中的II-VI族(例如CdSe,CdTe,CdS和ZnSe)或III-V族(例如InP和InAs)元素合成,在外层可以包裹许多壳,层或分子,以使之具有一定的物理性质如表面官能化。量子点在生物学中的应用已经取得了突破,高度发光的量子点可以使用表面修饰技术如二氧化硅/硅氧烷涂层或直接吸附双功能体,使其变成水溶性且随后具有生物相容性,这为生物学提供了有用的工具。量子点作为新的生物标记分子,其应用和性质优于传统荧光蛋白和有机染料。

[0008] 传统有机染料的主要局限性是吸收和发射光谱的能力非常有限。第一个缺点是有机染料的峰值发射不能改变-每种染料天然地对应于不同的发射波长或荧光颜色的不同分子。第二个缺点是有机染料吸收谱很窄-染料虽有显示吸收峰,但是这些吸收峰并不总是在光谱的方便区域,使得激发有机染料具有挑战性和昂贵性。第三个缺点是不均匀的吸收和发射峰-有机染料在其发射和吸收峰的几何形状中具有产生“肩”的趋势,这个主要缺点无

法使需要高斯型发射谱的应用正常实施。另一个缺点是稳定性-有机染料的使用寿命相对于其它标记机制的寿命通常较低,而有机染料荧光完全由每个染料的分子键合性质控制。最后,由有机染料分子吸收的入射光辐射使电子进入激发态,于是它们衰变并释放光辐射。这种发射不能改变,因为它对应于每种类型分子固有的染料分子的预先设定的激发态。

[0009] 尽管有机染料的发光范围和可能形式非常有限,量子点可以在可见光和红外范围内以任何波长发光,并且可以插入几乎任何地方,包括在液体溶液,染料,油漆,环氧树脂和溶胶中。此外,量子点可以连接到各种表面配体,并且在体内或体外插入到各种生物体中。

[0010] 基于特异的化学或生物亲和力,已经有很多方法可以将生物分子与量子点共价连接以产生生物分子共轭物(“生物共轭”)或功能量子点,将量子点附着或结合到生物材料,用于标记,检测和影像应用。这些方法使用各种化学反应将交联剂偶联到水溶性量子点上,以使得能够连接到有主要功能团的生物材料上。能够将各种材料附着到量子点的生物共轭技术的其它实例对于本领域技术人员是已知的。

[0011] 通常,生物共轭方法分为以下机制:(1)生物功能连接;(2)静电吸引;(3)疏水连接;(4)硅烷化;(5)纳米珠键合。使用生物共轭技术的方法的实例包括羧基量子点的聚乙二醇修饰,以及用于高共轭效率和特异性的氨基的表面负载的优化。另一个例子是用肽通过氨基或羧基修饰量子点,或使用其它残基,小分子,蛋白质或核酸以及本领域技术人员已知的其它方法。更具体地说,用于将量子点偶联到抗体上的方案是基于众所周知的使用快速有效耦合硫醇与马来酰亚胺基团,其中反应性基团包括伯胺,醇,用于将抗体与量子点连接的羧酸和硫醇。量子点表现出比标准有机染料明显好的性能,因为它们可以被调整为以任何可见光或红外波长吸收或发射光,并且可以制成各种形式或介质,彻底消除了染料的缺陷。这些独特的能力是由于它们非常小的尺寸(通常在1-10nm直径之间)。尺寸小及与荧光的直接关连形成令人难以置信的多样性和灵活性,使荧光粉可以匹配其底层任何形状的发光二极管(LED)。

[0012] 当光照在量子点上时,它遇到了量子点特有的离散能带。量子点波段的离散性质意味着价带和导带之间的能量分离(带隙),可以通过加上或减去一个原子来改变,从而使带隙具有大小依赖性。根据客户指定的颜色,就可以预先确定量子点的大小,这就决定了发射的光子波长,即使这个波长不是天然存在的-只有量子点有这种能力。

[0013] 此外,还已知一些稀土金属螯合物在用紫外光照射和不同形式的可见光(例如紫色或蓝色光)照射下发出可见光,以螯合阳离子为特征。一些镧系元素离子,如铕(Eu^{3+}),钐(Sm^{3+}),铽(Tb^{3+})以及较少见的镝(Dy^{3+})和钕(Nd^{3+}),表现出典型的离子为特征性的荧光,特别是当螯合适当的介导激发能量的有机配体时。这些化合物的荧光性质-长的斯托克斯位移(Stokes shift),窄带型发射谱线和异常长的荧光寿命-使其成为荧光免疫测定和时间分辨荧光定量技术的有吸引力的候选者。

[0014] 这些荧光镧系元素螯合物的主要发射线由称为敏化转变的过程形成,波长分别是 Eu^{3+} 在613-615nm, Tb^{3+} 在545(和490)nm, Sm^{3+} 在590和643nm, Dy^{3+} 在573。辐射通常由被螯合物吸收(有机配体的波长特性),由于能量从配体到中心金属离子的分子内转移,最后荧光发射的是金属离子的特征性光谱。有机配体吸收能量,将其从其单态基态 S_0 升高或激发到第一单重激发态 S_1 的任何一个振动倍数,然后它迅速失去其过量的振动能。这时,存在两种可能性:通过 $S_1 \rightarrow S_0$ 转变(配体荧光)释放;系统内交叉转移至三重态之一的 T_1 。

[0015] 已知荧光铈螯合物表现出较大的斯托克斯位移(大约290nm),激发和发射光谱之间没有重叠,在615nm峰处具有非常窄的(10-nm带宽)发射光谱。此外,螯合物的荧光寿命长(以微秒为单位而不是可测量的纳秒级别),有助于滤除荧光寿命低的噪声和其它干扰。长荧光寿命因此允许使用螯合物进行微秒级的时间分辨荧光测量,这进一步减少观察到的背景信号。使用铈螯合物的其它优点包括铈螯合物不被氧淬灭。

[0016] 在特异性结合测定中,灵敏度是最重要的,因为被测量的分析物水平通常较低。放射免疫测定灵敏度限制了测定浓度为 10^{-12} M的测定,更常见于 10^{-8} – 10^{-10} M范围内。此外,放射性标记的缺点是半衰期短,处理危险。

[0017] 在荧光光谱测定中,样品在用已知光谱分布(目标荧光物质的激发光谱内)的光照射,测定荧光目标分子的特征发射光谱的强度,该强度与目标分子的数量有关。荧光测定的灵敏度虽然理论上非常高,但受背景荧光的存在限制。背景信号水平不仅来自样品中的竞争荧光物质,而且也来自于样品中的其它组分或材料。这在生物样品中测定含量很低的目标荧光分子尤其是一个特别严重的问题。在许多情况下,不可能充分地减少背景(通过适当的过滤和本领域已知的其它技术)以获得所需要的灵敏度。

[0018] 时间分辨技术提供独立的方法来将感兴趣的特定荧光信号与非特异性背景荧光分离。如果标记物荧光具有比背景更长寿命的荧光,并且如果系统被间歇光源照射,使得长寿命标记物在短时寿命的背景荧光衰变之后的黑暗期(无干扰期)内测量,则时间分辨是可能的策略。

[0019] 通常使用某些荧光分子作为检测分析物的示踪标记物。在本文中通常使用有机荧光染料。但是,这种染料的使用具有化学和物理方面的限制。这些限制之一是不同着色染料的激发波长差别较大。因此,同时使用具有不同激发波长的两个或多个荧光标记物就需要多个激发光源。

[0020] 有机染料的缺点是长时间和/或反复暴露于激发光时的荧光强度下,荧光很快变弱。这种称为光漂白的信号衰落取决于激发光的强度和照明的持续时间。此外,将染料转化成非荧光物质是不可逆的。此外,染料的降解物是有机化合物,这些有机物质可能干扰正在检测的生物过程。

[0021] 另外,从一种染料到另一种染料存在光谱重叠。这部分归因于有机染料的相对宽的发射光谱和尾区附近的光谱的重叠。几乎没有几个低分子量染料具有大的斯托克斯位移(其定义为吸收峰和发射最大值之间的分类情况)和高的荧光输出。此外,低分子量染料对于一些应用可能是不切实际的,因为它们不提供足够亮的荧光信号。

[0022] 此外,标准有机荧光染料的化学性质的差异使得多种测定和平行测定不切实际,因为在各种荧光标记应用中使用的每种染料之间可能涉及不同的化学反应。因此,测定技术中的标记物的需要满足以下条件:(i) 高荧光强度(用于微量检测),(ii) 吸收和发射频率之间的充分分离,(iii) 良好的溶解度,(iv) 能够容易地与其它分子连接,(v) 在恶劣条件和高温下的稳定性好,(vi) 对称的,近高斯形状的发射线条,用于容易地解析多种颜色,以及(vii) 兼容自动化分析。目前,传统的荧光标记物都不能满足这些要求。

[0023] 虽然已经使用功能量子点生物共轭体的荧光发射来检测样品中目标底物的存在或不存在,但是目前仍然没有快速有效的测量SAM和SAH的方法和装置。

附图说明

[0024] 图1显示本发明的侧向流动免疫层析试验条的两个实施方案。

[0025] 图2显示本发明的实施例1的SAM荧光免疫层析试条的标准曲线。

[0026] 图3显示本发明的实施例2的SAH荧光免疫层析试条的标准曲线。

[0027] 图4显示本发明的实施例4的CRP荧光免疫层析试条的标准曲线。

[0028] 图5显示了以4.5 μ g/ml的Alexa Fluor 647偶联的抗SAM抗体118-6 (Cat#MAF00201, Arthus Biosystems, VA) 双染色的细胞的流式细胞术 (FCM) 结果。

[0029] 图6显示了以45 μ g/ml用Alexa Fluor 488偶联的抗SAH抗体301-3 (Cat#MAF00301, Arthus Biosystems, VA) 双染色的细胞的FCM结果。

[0030] 图7显示了培养40小时的L02和HepG2细胞,再用本发明的荧光标记抗SAM和抗SAH抗体染色后的激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 结果。

[0031] 图8显示了说明如何在两种形式的TR-FRET技术中使用本发明中描述的生物偶联物,来定量SAM和SAH的示意图。

[0032] 发明的总结

[0033] 本发明提供了偶联有量子点的抗SAM,抗SAH,抗-HCY和抗CRP抗体。

[0034] 本发明还提供了一种免疫层析试纸条,其中使用了共价键合到抗SAM,抗SAH,抗-HCY和抗CRP抗体的量子点。

[0035] 本发明还涉及基于量子点的免疫测定与化学方法的组合,以同时测量代谢途径中的三个密切相关的生物分子。

[0036] 本发明还是一种在呈现急性冠状动脉综合征的至少一种症状后的一年内,确定患有主要不良心脏事件的风险的方法,包括以下步骤:(a)从所述患者获得测试样品;(b)使用量子点或基于荧光的螯合物测定法测定SAM,SAH,Hcy和CRP的含量;(c)计算所述测试样品中的MI;和(d)将所述四种生物标志物的量与它们的参考标准进行比较,其中所述风险由比较的结果确定。

[0037] 本发明还提供了一种用于测定样品中同型半胱氨酸的方法,所述方法包括以下步骤:(i)使所述样品与产生SAH的同型半胱氨酸转化酶接触,和(ii)然后使用如上所述的测定SAH的层析试纸层析试纸条测定生成的SAH的量。

[0038] 本发明还提供了一种侧向流动免疫层析试纸,用于单独或同时检测和定量在液体样品中的SAM和SAH,其中包含在试验线上涂覆有SAM-蛋白质或SAH-蛋白质偶联物的膜条,以及抗SAM或抗SAH抗体标记的示踪颗粒。

[0039] 本发明还涉及抗SAM、抗SAH和抗CRP抗体偶联的荧光镧系元素螯合物,并且所述偶联物用于制备免疫层析试纸条。

[0040] 本发明还提供了一种检测和定量样品中SAM和SAH的方法,包括:(a)在固体支持物上提供含有或可能含有SAM和SAH的样品;(b)在有利于形成所述偶联物和SAM和SAH样品的复合物的条件下,将所述样品与半导体纳米晶体抗SAM抗体和抗SAH抗体偶联物组合;(c)去除任何未结合的部分;和(d)通过监测由复合物中的半导体纳米晶体介导的光谱发射来检测复合物的存在(如果存在),其中发射光信号的强弱指示样品中SAM和SAH的存在和数量。

[0041] 本发明还涉及使用SAM免疫层析试纸条来确定和监测患有抑郁症、骨关节炎、肝和

胆囊疾病的患者的SAM水平,然后提出施用S-腺苷蛋氨酸的治疗方案。

[0042] 本发明还提供了一种用于判断饮食控制计划(或方法)的有效性的方法。用于管理对至少一种膳食反应性(或相关性)状况或疾病的患者,包括以下步骤:(a)选择多个患者,每个患者具有至少一种饮食相关性问题;(b)在所述患者中测定身体质量指数(BMI)和在甲基化指数或SAM中选至少一个其它可量化的指标,并且在基准(对照)期间测量每个所述患者的所选的至少一个指标;(c)在所述基准期间监测每个所述患者,以确定基准期生活质量;(d)在所述多个患者中随机分为两组;(e)在干预期间对所述第一组中的所述患者施用所述饮食控制计划;(f)在所述干预期期间,保持第二组患者的在对所述至少一种饮食相关性状况或疾病使用已知有益作用饮食的对照饮食;和(g)在所述干预期后,监测每个所述患者的每个所述病况的至少一个指标并进行比较分析。

[0043] 对于本发明的阐述

[0044] 在本发明中,术语“半导体纳米晶体”和“量子点”在本文中可互换使用,是指直径约1nm至约1000nm之间的,或其中整数或分数的无机微晶,优选约2nm至约50nm的任何整数或分数,更优选约2nm至约20nm之间的(例如约2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,或20nm)。半导体纳米晶体能够在激发时发射电磁辐射(即,半导体纳米晶体是发光的),并且包括一个或多个第一半导体材料的“芯”,并且可被第二半导体材料的“外壳”包裹。由半导体壳包围的半导体纳米晶核被称为“核/壳”半导体纳米晶体。优选“壳”材料的带隙能量大于芯材料带隙能量,并且“壳”材料的原子间隔最好接近“芯”的原子间隔。核和/或壳可以是半导体材料,包括但不限于II-VI族(ZnS,ZnSe,ZnTe,CdS,CdSe,CdTe,HgS,HgSe,HgTe,MgS,MgSe,MgTe,CaS,CaSe,CaTe,SrS,SrSe,SrTe,BaS,BaSe,BaTe等)和III-V(GaN,GaP,GaAs,GaSb,InN,InP,InAs,InSb等)和IV(Ge,Si等)材料,以及合金或其混合物。

[0045] 任选地,半导体纳米晶体被有机覆盖剂的“涂层”包围。有机包裹材料可以是任何数量的材料,但对半导体纳米晶体表面具有亲和力。通常,包裹材料可以是分离出的有机分子,聚合物(或聚合反应的单体),无机络合物和延伸的结晶结构。涂层用于提高溶解度(例如将涂覆的半导体纳米晶体均匀地分散到选择的溶剂)、官能性、结合性质等。此外,该涂层可用于调整半导体纳米晶体的光学性能。下面进一步讨论制备具有包裹材料的半导体纳米晶体的方法。

[0046] 本文所用的术语“抗体”包括多克隆和单克隆抗体,以及杂交(嵌合)抗体和从这些分子获得的任何功能片段获得的抗体,其中所述片段保留亲本抗体分子的特异性结合性质。如本文所用,术语“单克隆抗体”是指具有均一抗体组成的群体。该术语不限于抗体的种类或来源,也不受其制备方式的限制。因此,该术语包括从鼠杂交瘤获得的抗体,以及使用人而不是鼠杂交瘤获得的人单克隆抗体。

[0047] 当半导体纳米晶体与特异性结合分子化学偶联或相关联时,半导体纳米晶体与特异性结合分子或结合对的特异成员结合或者偶联。因此,这些术语旨在半导体纳米晶体可以直接连接到特异性结合分子,或者可以通过接头经由下述化学连接体连接。这些术语表示通过例如共价化学键,物理力(如范德华力或疏水相互作用),包封,嵌入等物理连接的物品。作为示例而不限制本发明的范围,纳米晶体可以与生物化合物如细胞,蛋白质,核酸,亚细胞细胞器和其它亚细胞组分直接相互作用而结合。例如,纳米晶体可以与结合蛋白质,抗生物素蛋白和链霉亲和素的生物素相关联。

[0048] 如本文所用,“生物样品”是指分离的细胞,组织或液体的样品,包括但不限于例如血浆,血清,脊髓液,精液,淋巴液,皮肤的外部部分,呼吸,肠道和泌尿生殖道,眼泪,唾液,乳液,血细胞,肿瘤,器官,以及体外细胞培养成分(包括但不限于来源于细胞生长所产生的条件培养基,假想推定病毒感染的细胞,重组细胞和细胞组分)。

[0049] “小分子”也被定义为在实验室合成或在自然界发现的有机或无机化合物。通常,小分子的特征在于它含有几个碳-碳键,并且具有小于1500克/摩尔的分子量。

[0050] 在其最广泛的方面,本发明提供了与S-腺苷蛋氨酸,S-腺苷同型半胱氨酸和同型半胱氨酸和C-反应蛋白相关的生物学异常或情况相关的组合物。通过实施例,这些组合物可以检测上述分子的存在或含量。

[0051] 该组合物由具有特征光谱发射的荧光半导体纳米晶体(也称为量子点)组成,其通过选择半导体纳米晶体的粒度,尺寸分布和组成而可调谐到期望的能量。组合物还包含化合物-抗SAM或SAH的抗体,这种半导体纳米晶体对生物靶具有亲和力。由于化合物与靶标的亲和力,使得组合物能够与生物靶标相互作用或结合。通过监测半导体纳米晶体的发射光谱来检测关联的位置和性质。在操作中,将组合物引入含有生物靶的环境中,该组合物与靶标相结合。组合物-靶复合物可以通过用激发光源照射复合物进行光谱观察或检测。半导体纳米晶体发射特征光谱,可以用光谱学来观察和测量。

[0052] 本发明组合物的优点是半导体纳米晶体的发射光谱波长范围较窄,25-30nm的线宽,这取决于样品群体的大小分布的异质性,以及无尾区的对称高斯或近似高斯的线形光谱分布。可调谐性,窄线宽以及没有拖尾区域的对称发射光谱的组合物,使得多种大小的纳米晶体,(例如具有多个不同大小的单分散半导体纳米晶体的混合群体)具有高分辨率,使得研究人员能够同时检查多种的生物结合部位,如以纳米晶体标记的目标分析物。

[0053] 此外,纳米晶体的激发波长的范围宽并且能量可以高于所有可用的半导体纳米晶体发射波长。因此,这允许在紫外或蓝色光中的单个光源同时激发产生不同发射光谱的所有半导体纳米晶体群体。半导体纳米晶体也比常规有机荧光染料更稳定,并且比有机染料更能抵抗光漂白。纳米晶体的稳定性也使得被检体系中有有机染料降解产物的污染问题减轻。因此,本发明提供用于检测生物分子及其相互作用的唯一有价值的标记物。

[0054] 在一个优选实施方案中,组合物包含可与生物化合物直接相互作用的分子包被的半导体纳米晶体。不限制本发明的范围,包被分子包括可以结合蛋白质,核酸,细胞,亚细胞细胞器和其它生物分子的分子。用于本发明组合物中的化合物优选具有对生物靶有亲和力的。在一些优选的实施方案中,化合物对生物靶具有特异性亲和力。亲和力可以基于化合物的任何固有性质,例如但不限于范德华力吸引力,亲水性吸引力,离子,共价,静电或磁吸引。如本文所用,“生物靶”是指与生物功能相关的任何功能基团,化合物,细胞或亚细胞组分。生物靶标包括但不限于蛋白质,核酸,细胞,亚细胞器和其它生物功能基团。

[0055] 用半导体纳米晶体来检测多个目标物源于其独特的特点。半导体纳米晶体的半径小于聚集体激子玻尔(Bohr)半径,成为分子和聚集体形式物质之间的一类材料。随着微晶尺寸减小,在所有三维空间中电子和空穴的量子限制导致材料的有效带隙的增加。因此,半导体纳米晶体的光吸收和发射都转移到蓝色(较高能量)。

[0056] 量子点的光学性质主要由其物理尺寸和化学特性决定。通常,电磁辐射具有波长在可见光和红外部分的光谱即可激发量子点。量子点的吸收光谱表现为一系列重叠的峰

值,波长越短,峰值越大。每个峰值对应于量子点内离散的电子-空穴能态(激子)之间的能量跃迁。量子点的大小和能量状态之间的差异成反比。因此,较大量子点的能量状态之间的差异小于较小量子点的能量状态之间的差异。本发明的量子点的直径在2-10纳米的范围内。

[0057] 量子点的能量状态之间的差异越小,从其发射的电磁辐射(比如光)就“更红”(或波长越大)。因此,当激发时,较大的量子点会比较小量子点发出“更红”的光,较小量子点会发出“较蓝色”光。作为这些现象的结果,量子点发射的电磁辐射的波长可以通过选择要合成量子点的材料和量子点的大小进行调整。当被激发时,已知的量子点可以发射具有波长约490nm(蓝色)至约705nm(红色)的光。

[0058] 量子点具有很高的量子产率并抵抗光漂白;因此可以用在非常敏感的荧光生物测定。当暴露于不同波长范围的电磁辐射时,不同类型的量子点被激发。当前可用的量子点可以由低至约300nm和高达约2,300nm的波长的电磁辐射激发。目前优选的是,试剂溶液中的标记物具有Stoke的位移约50nm或更大(例如,约658nm的激发波长和约703nm的发射波长之间的差异)或甚至约100nm或更大(例如,在约405nm处被激发在约530nm发射波长的量子点的波长差异)。

[0059] 在暴露于初级光源时,每个半导体纳米晶体分布是能够以窄的12nm至60nm的狭窄光谱线宽发射能量,并且具有对称的近高斯线形光谱,因此这种光谱分布是识别特定半导体纳米晶体的简单方法。应当注意的是,线宽取决于每种半导体纳米晶体粒子的大小异质性或大小差异性,即单分散性。此外,可以容易地制备在35nm至60nm范围内的,具有较大线宽分布的半导体纳米晶体,并且具有跟较窄线宽的半导体纳米晶体一样的物理特性。

[0060] 本发明使用包含与特异性结合分子或亲和分子相关联的半导体纳米晶体的组合物,使得组合物可以检测生物和化学化合物的存在和/或量,检测生物系统中的相互作用,检测生物过程,检测生物过程的变化,或检测生物化合物结构的变化。半导体纳米晶体共轭物包括与半导体纳米晶体连接的任何分子或分子复合物,其可与生物靶相互作用,以检测生物过程或反应,以及改变生物分子或过程,范围不限于此。优选地,分子或分子复合物或共轭物与生物化合物发生实际的物理相互作用。优选地,相互作用是特异性的。相互作用可以是但不限于共价,非共价,疏水,亲水,静电,范德华力或磁性的。优选地,这些分子是小分子、蛋白质、核酸或其相关的组合物。

[0061] 半导体纳米晶体共轭物可以使用本领域已知的技术制备。例如,通常用于制备半导体纳米晶体的功能基团以及其它功能基团可以容易地置换并替换为其它官能部分,包括但不限于羧酸,胺,醛和苯乙烯等等。本领域普通技术人员将认识到与特定置换反应的成功相关的因素包括待置换功能基团的浓度、温度和反应性。因此,为了本发明的目的,可以使用任何能够置换现有功能基团的基团,以提供半导体纳米晶体所需要具有的特定用途。

[0062] 利用一般的置换反应来选择性地改变半导体纳米晶体的表面功能,将赋予其用于特定用途的能力。例如,由于生物化合物的检测最优选在水性介质中进行,本发明的优选实施方案利用溶解在水中的半导体纳米晶体。水溶性半导体纳米晶体的外层包括具有至少一个连接部分的化合物,将其连接到纳米颗粒表面并终止于至少一个亲水功能基。连接和亲水功能基团的两侧由足以防止电荷转移穿过该区域的疏水区组成。疏水区域还为纳米晶体提供了一种“假疏水”环境,从而将其与含水环境屏蔽。亲水部分可以是极性 or 带电荷(正或

负)基团。该功能基团的极性或电荷提供与水的必要的亲水相互作用以提供半导体纳米晶体的稳定溶液或悬浮液。示例性的亲水基团包括极性基团,例如氢氧化物(-OH),胺,聚醚,如聚乙二醇等,以及带电基团,如羧酸盐($-\text{CO}_2^-$),磺酸盐(SO_3^-),磷酸盐($-\text{PO}_4^{2-}$ 和 $-\text{PO}_3^{2-}$),硝酸盐,铵盐($-\text{NH}_4^+$)等。在外涂层的外表面上是水溶性层。

[0063] 可以采用置换反应来修饰半导体纳米晶体以提高在特定有机溶剂中的溶解度。例如,如果希望将半导体纳米晶体与特定溶剂或液体如吡啶相结合,则可以用吡啶或类似吡啶的部分特异性地修饰表面以确保溶剂化。

[0064] 也可以通过置换来修饰表面层以使半导体纳米晶体对于特定的偶联反应有反应活性。例如,某些部分用含有羧酸部分的基团置换后,使得能够使修饰的半导体纳米晶体与含胺部分(通常存在于固体支持单元上)反应以提供酰胺键。还可以进行其它的修改,使得半导体纳米晶体可以与几乎任何固体支持物相关联或结合。本发明中的固体支持物被定义为在合成序列,筛选,免疫测定等中偶联有化合物的不溶性物质。使用固体支持物对于合成文库是特别有利的,因为分离的固相支持物-反应产物可以简单地通过从支持结合物洗掉试剂来完成,因此通过使用过量的试剂可以使反应彻底完成。

[0065] 固体支持物可以是任何不溶性基质材料,并且可以具有刚性或半刚性表面。示例性固体支持物包括但不限于颗粒,圆盘,毛细管,中空纤维,长细针,短粗针,固体纤维,纤维素珠,有孔玻璃珠,硅胶,任选与二乙烯基苯交联的聚苯乙烯珠,接枝共聚珠,聚丙烯酰胺珠,乳胶珠,任选与N-N'-双丙烯酰基乙二胺交联的二甲基丙烯酰胺珠和涂覆有疏水性聚合物的玻璃颗粒。

[0066] 例如,本发明的半导体纳米晶体可以容易地被官能化以产生苯乙烯或丙烯酸酯功能基团,从而能够将半导体纳米晶体结合到聚苯乙烯,聚丙烯酸酯或其它聚合物如聚酰亚胺,聚丙烯酰胺,聚乙烯,聚乙烯基,聚二乙炔,聚亚苯基-亚乙烯基,多肽,多糖,聚砜,聚吡咯,聚咪唑,聚噻吩,聚醚,环氧树脂,二氧化硅玻璃,硅胶,硅氧烷,多磷酸盐,水凝胶,琼脂糖,纤维素等上。

[0067] 本发明的测试条具有如图1所示的结构。参考图1b的实施方案A,元件1是一个PVC板,其上装有用抗体共轭层3的样品垫2,测试装置还包括吸收区7(通常是吸水纸)和硝酸纤维素膜4,其包括质控带(对照带)5和测试带(试验带)7。

[0068] 在图1的实施例B中,该结构类似于测试装置A,但是它包括用于SAM或S-腺苷高半胱氨酸的另一测试带8。

[0069] 图1的实施例A的测试条包括一个测试带和一个控制带。图1的实施例B的测试条分别包括用于检测SAM和SAH的两个测试带(即甲基化指数(MI)干试纸条)。图1显示出了每个组件如何组装(侧视图)。液体样品通过样品垫2的左侧施加,样品立即沿样品流动方向迁移,如图1所示。加样后15分钟内可以读取结果。

[0070] 图1所示的条带包括许多变体。免疫层析试纸的基本结构如下,部分元件是可有可无的,可以根据测试的需要加减。

[0071] 以下详细描述本发明所涉及的测定装置的部分元件。虽然这些元件可以以多种排列方式组装,但是根据预期的测定模式和特定的测定方法,一般来说,本文定义的元件的特征不会因为组成形式或模式而发生改变。如本文所用,所描述的测定装置中的组成元件可以是任何适当的物理形式,不仅仅限于膜,垫,条或其它物理形式。

[0072] A. 层析试纸条

[0073] 在根据本发明的测定装置中使用的层析试纸条,可以由具有高蛋白结合能力并支持侧向流动来测定的任何合适的材料组成。通常,层析试纸条是亲水性元素,蛋白质结合是通过非共价结合。虽然申请人不希望受这一理论的约束,但是蛋白质与硝酸纤维素膜结合的现有理论认为,初始相互作用是静电的,但随后的疏水性相互作用和氢键显著增强了结合。例如层析材料通常使用硝酸纤维素膜,被预先处理好使其具有亲水性。层析材料的另一个实例是由聚合物(例如聚乙烯)颗粒。层析试纸条做成适当的大小,以适合于在荧光读取仪器上或者肉眼即可读取结果。

[0074] 当抗原或抗体被涂覆到层析试纸相应的组分元件上时,由于其多孔性质,蛋白质溶液将在硝酸纤维素膜完全浸透。蛋白质结合到孔的表面。由于应用的方法和结合的物理学特性,与用于将抗原或抗体涂覆到层析试纸条上的溶液润湿的其他区域相比,更多的蛋白质与线的顶部和中心部结合。

[0075] 根据本发明的测定装置中使用的层析试纸条包括下面进一步描述的捕获带(测试带)以及一个或多个质控带,也将在下面进一步描述。

[0076] 本发明的层析试纸条包含至少一个用于捕获分析物的测试带和至少一个质控带或第二质控带。当与卡壳一起使用时,可以通过测试窗口查看测试带和质控带。测试带包含如果分析物存在,能够捕获样品中待分析物的物质。例如,如果侧向层析旨在测量生物样品中的SAM的含量,则捕获条带将预先包被有抗SAM抗体。层析试纸条还需要有偶联物和可用于检测(显示)的试剂,以便方便检测捕获到的待分析物。

[0077] B. 样品过滤器

[0078] 根据本发明的测定装置可以采用样品过滤器(在一些情况下,可以采用两个样品过滤器)。样品过滤器的位置可以有变动,但样品过滤器的位置应该使得样品中的液体在加到样品过滤器上以后,将直接或间接地从样品过滤器流到层析试纸条。在一个替代方案中,通常用于加样的侧向层析检测中的样品过滤器是疏水性元件,或者亲水性元件或合成复合材料。这种样品过滤器的实例包括但不限于疏水性过滤器如玻璃纤维过滤器和亲水性过滤器如纤维素。

[0079] C. 样品垫

[0080] 在一些应用中,特别是当样品不需要去除细胞或其它大颗粒物质时,样品垫可以代替样品过滤器。术语“样品垫”是指可用于接收样品的疏水性元件。

[0081] D. 共轭结合垫

[0082] 术语“共轭结合垫”用于描述在根据本发明的测定装置的许多实施方案中使用的元件。共轭结合垫由诸如玻璃纤维的疏水性材料组成,并且含有可与被捕获在层析试纸条上的样品中的待分析物反应的共轭物或可用于检测的试剂。可检测的试剂包括偶联有可检测材料例如有色材料,荧光材料或化学发光材料或量子点的抗待分析物特异性的抗体或抗原。有色材料的一个例子是胶体金。本文中的共轭结合垫具有适合于所述参数的层析试纸条的尺寸。可以用含有海藻糖和酪蛋白的缓冲溶液预先浸润共轭结合垫,尽管也可以使用其它缓冲溶液进行预封闭。在根据本发明的测定装置的所有实施方案中,共轭结合垫的使用不是必需的。在一些替代方案中,省略了共轭结合垫,并将共轭物施加到层析试纸条上。下面进一步描述这些替代方案。

[0083] E. 液体收集器

[0084] 术语“液体收集器”用于描述根据本发明的测定装置的一些配置中使用的元件。液体收集器,就像共轭结合垫的疏水元件一样通常是疏水元件。与共轭结合垫不同,液体收集器不含任何可检测的试剂,并且用作中间元件,通常将液体直接或间接地传递到层析试纸条。

[0085] F. 捕获带(测试带)

[0086] 如上所述,测试条总是包括至少一个捕获带。本文所用的术语“捕获带”是指层析试纸条上含有至少一种可与待分析物结合的物质(分析物结合剂)的区域或带。分析物结合剂通常固定在带或区域中,使得在与可检测试剂反应之后,带或区产生反映样品中是否存在分析物或分析物量的可观察或可测量的结果。“捕获带”可以由用于捕获样品中多于一种分析物的多于一个捕获区或带组成,此时需要使用多于一种的分析物结合剂。例如在本发明范围内的实施例所示,同时检测两种待分析物测定的组合。

[0087] G. 质控带

[0088] 通常本发明的装置的层析试纸条还包括一个或多个质控带,含有质量控制试剂。

[0089] H. 缓冲垫

[0090] 根据本发明的测定装置的一些实施例采用缓冲垫。缓冲垫是亲水元素或合成复合材料。在所述参数中,缓冲垫的尺寸适合于层析试纸条。

[0091] I. 吸收垫或垫

[0092] 通常本发明的测定装置包括一个或多个吸收垫,用于引导装置内的液体流动。如上所述,这些吸收垫的尺寸和位置很大程度上决定了流动模式。吸收垫是可以吸收液体的亲水性元素,例如纤维素-玻璃纤维复合材料。本文的吸收垫具有适合于所述参数的层析试纸条的尺寸。

[0093] J. 背垫

[0094] 根据本发明的一些测定装置包括用作层析试纸条的背衬的衬垫。衬垫可以由能够支撑层析试纸条的任何惰性材料制成,例如塑料材料。背衬垫的尺寸适用于所述参数中的层析试纸条。

[0095] K. 液体防渗屏障

[0096] 根据本发明的测定装置的一些实施方案包括插入在诸如层析试纸条的一端或附近的样品过滤器的元件和层析试纸条本身之间的液体防渗屏障。

[0097] 在本发明的优选实施方案中,用于定性和定量免疫测定生物样品中SAM和SAH含量的免疫检测方法,例如ELISA(酶联免疫吸附剂试验),其中使用半导体纳米晶体共轭物作为检测试剂。本发明的免疫吸附测定与目前的免疫吸附测定相比具有几个优点,包括但不限于同时多色检测,因此用于多种分析物检测,而不需要酶显示,比其它替代荧光素的光稳定性提高,从而通过长时间监测信号的能力增加检测灵敏度,增加了基于酶的检测系统的灵敏度。

[0098] 不同核心尺寸(10-150Angstroms),组成和/或尺寸分布的半导体纳米晶体与特异性结合SAM以及SAH的特异性结合分子结合。可以使用任何特定的与分析物特异结合的物质,例如抗体,抗体的免疫反应性片段等。优选地,与分析物特异结合的物质是抗体。只要这种特异性结合待分析物的试剂存在,半导体纳米晶体共轭物就可以用于免疫吸附测定该待

分析物。

[0099] 更具体地,特异性结合分子可以衍生自多克隆或单克隆抗体制剂,可以是人抗体,或可以是杂交或嵌合抗体,例如人源化抗体,改变的抗体F(ab')₂片段,F(ab)片段,Fv片段,单结构域抗体,二聚体或三聚体抗体片段构建体,小分子抗体,或功能片段,只要能够结合目的分析物。

[0100] 在本发明中,我们将作为单一单位免疫层析和光化学测试条组合在一起,用于同时测量甲硫氨酸循环中的三个关键分子,即SAM,SAH和HCy,据报道在非常相关生物化学途径的改变和健康状况方面有重要的作用,可作为IVD的生物标志物。本发明还涉及用于POCT用途的实现上述发明的新装置。本发明中使用的光谱仪是荧光光谱仪和吸光度可紫外光/可见光的光谱仪的组合。

[0101] 在另一个实施方案中,本发明提供一种在呈现急性冠状动脉综合征的至少一种症状后一年内确定患有重大不良心脏事件的风险的方法,包括以下步骤:(a)从病人身上获得测试样品(b)使用免疫层析试纸条(基于量子点的测定法)测定SAM,SAH,HCy和C-反应蛋白的量;(c)计算所述测试样品中的甲基化指数(MI);和(c)将所述四种生物标志物的水平与他们各自的参考标准进行比较,其中所述风险由所述比较的结果确定。

[0102] 举例来说,免疫层析试纸条的制备和组装如下进行:简言之,将3.5 μ g(在pH 7.4的10mM磷酸盐缓冲液中)山羊抗小鼠IgG和牛血清白蛋白(BSA)-SAH分别划到硝酸纤维素膜(NCM,2.5 $\times$ 2.0cm)上,分别作为质控线和测试线。质控线与测试线之间的距离为0.5厘米。然后将NCM在37 $^{\circ}$ C下干燥1.5小时以固定抗体和抗原。将NCM粘贴在聚氯乙烯条上,顶端有吸附垫(吸水纸),与样品垫重叠的量子点结合垫的另一端与NCM的底端相重叠粘附。通过将抗SAH或抗SAM的单克隆抗体结合物包被的量子点(即CdSeNP)添加到玻璃纤维(2.5 $\times$ 1.0cm)中来制备量子点结合垫。将所得的结合垫在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时,直到完全干燥。将玻璃纤维样品垫(2.5 $\times$ 2.0cm)浸没在含有0.05%吐温20的pH7.4的10mM磷酸盐缓冲液中,并在37 $^{\circ}$ C下干燥1.5小时。最后,将测试装置切成5mm宽的条,并在使用前于室温储存。

[0103] 当使用基于镧系元素的荧光分子时,SAM或SAH结合抗体与荧光分子偶联,例如但不限于稀土螯合物(例如铈螯合物)。使用免疫学中的常规技术将荧光标记分子与抗体偶联。可以使用荧光计或根据荧光标记分子的已知消光系数用紫外/可见分光光度计来定量荧光。

[0104] 某些镧系元素螯合物,特别是铈和铽的螯合物的荧光性质决定了它们是非常合适的荧光标记物。这些螯合物的吸光度非常强(大于10⁴)并且因配基不同而有所不同。虽然量子产率通常小于有机荧光标记物的产率,但这些螯合物具有其它优点,因此发射在相对长的波长(铽544nm,铈613nm),该波长范围内血清的自然本底荧光值低。此外,最大激发光是在与配基无关的短的紫外范围(铽-螯合物270-320nm,Eu-螯合物320-360nm)内,这使得可以用商品化的灯或激光器激发它们。另外,Stoke位移(Stoke's shift)非常长(在240-270nm),并且发出的荧光光谱带宽很小。然而,最重要的性质是荧光时间长,约50-1000微秒,因此可以使用上述机制或仪器来测量。由于测量荧光有一定的延迟,是在背景荧光衰变期以后,因此可以消除非特异性背景辐射的影响。

[0105] 铈的螯合物和一定程度上包括铽与不同的 β -二酮是最常用的螯合剂,是因为它们在不同溶液和不同温度下的发光能力。最广泛使用的 β -二酮是苯甲酰丙酮(BA),二苯甲酰

甲烷 (DBM), 噻吩甲酰三氟丙酮 (TTA), 苯甲酰三氟丙酮 (BTA), 1-和2-萘甲酰基三氟丙酮 (1-/2-NTA), 乙酰丙酮 (AcA), 三氟乙酰丙酮 (TFAcA) 和六氟乙酰丙酮 (HFAcA)。

[0106] 镧系元素螯合物的强荧光是由配体的吸收激发光引起配体的三重态的能量转移, 产生具有金属特性的长波长的窄带辐射。

[0107] 在上述类型的螯合物可以用作荧光标记物之前, 必须将其连接到待研究的抗体/抗原上。此外, 金属在结合后也必须在水溶液中产生荧光辐射。为了足够稳定, 也以非常稀释的形式 (甚至低于 10^{-9}M), 并且在存在其它螯合形成试剂以及过量的其它金属离子的条件下, 结合体系必须非常强。螯合物的稳定常数必须高于 10^{10} , 另外结合配体必须预留另一个双齿配体的位置。

[0108] 鉴于 SAM, SAH, Hcy 和 C-反应蛋白在各种病理过程中的重要作用, 需要使用在普通研究和临床实验室中可用的方法方便地测量 SAM, SAH, Hcy 和 C-反应蛋白的水平。由于存在可用的针对 SAM, SAH 和 C-反应蛋白的特异性抗体, 多种形式的免疫层析测试条进行的免疫测定在临床环境中会非常有用。测定 SAM, SAH, Hcy 和 C-反应蛋白的免疫层析测试条必将对临床实验室是一个理想的补充项目。

[0109] 在本发明的另一个实施方案中, 通过本发明的荧光标记抗 SAM 和 SAH 抗体, 使用流式细胞仪, 免疫荧光显微镜或共聚焦显微镜 (LSCM) 技术, 可以在细胞水平上进行 SAM 和 SAH 测量, 这些方法跟过去方法相比特异性好, 快速和简单。免疫荧光显微镜具有显示 SAM 和 SAH 的水平和胞内位置的优点, 即使细胞数量很少, 例如, 在胚胎发育早期的细胞中研究 SAM 和 SAH, 只需几百个细胞甚至更少。图 7 的 LSCM 结果显示 SAM 和 SAH 的细胞内定位有些相似。SAM 和 SAH 主要见于线粒体, 胞核周边和核仁附近。在培养 40h 的 HepG2 细胞中, 与 L02 相比, 在细胞质中观察到 SAM 和 SAH 的水平明显降低, 细胞核中 SAH 和 SAM 稍高 (与图 5 的 FCM 结果相一致), 但是它们没有像 L02 细胞那样聚焦在核仁区域。

[0110] 本发明还提供了一种简便且快速的均相免疫测定法, 该方法不需要制备特殊的条带而且没有洗涤和分离的步骤, 除了常用的干试纸条之外也同样可以用于 POCT 情况下方便地使用。图 8 显示了如何使用本发明中描述的生物共轭物以及两种形式的时间分辨荧光共振能量转移技术 (TR-FRET) 用于 SAM 和 SAH 的定量测量的简单图。在图 8 的形式 A 中, 针对 SAM 或 SAH 的特异性抗体通过用受体染料直接标记或通过兔或山羊抗小鼠 IgG 间接与受体染料相连。两种常见的示踪方法是链酶亲和素-生物素和地高辛-抗地高辛抗体等特异性结合对, 用供体荧光染料标记。具有不同接头的生物素偶联 (或地高辛偶联) 的 SAM 或 SAH 将供体和受体染料拉近, 大多数时候间距小于 100 埃 (Angstrom), 使得供体辐射光可以激发受体染料, 供体发生能量转移, 测量从受体染料发射出的具有特定波长的特异性荧光吸收值, 该值只反映将供体和受体连接在一起的那部分待测分子。来自样品的游离 SAM 或 SAH 分子与生物偶联物竞争结合抗 SAM 或抗 SAH 抗体, 因此导致最终可测量的荧光信号降低。可以基于竞争结合的特征来建立竞争性测量方法。

[0111] 使用图 8 的形式 B, SAM、SAM 类似物或 SAH 是共价 (有或没有接头) 连接到受体染料, 其将与来自样品的游离 SAM 或 SAH 竞争结合抗 SAM 或抗 SAH 抗体 (直接或通过兔或山羊抗小鼠 IgG 间接连接到供体) 上。来自受体染料的发射荧光反映了与供体特异性抗体-抗原-受体复合体中 SAM 或 SAH 没有竞争的供体染料结合的 SAM 或 SAH 的部分含量。结合了非共轭 SAM 或 SAH 分子的特异性抗体的量将不会产生荧光信号被读取, 这是竞争性测定中竞争方之一。没有

与供体染料结合的游离抗SAM或抗SAH抗体(如果有的话)将消耗标记或未标记的抗原。供体和受体荧光信号用TR-FRET酶标仪阅读器读取,并且可以计算受体荧光值/供体荧光值,该比值用于测算样品中SAM或SAH的含量。

[0112] BRET(生物发光共振能量转移技术)类似于TR-FRET或FRET,不同之处是供体染料被生物发光酶替代,例如,萤光素酶(EC1.13.12.7)或Luc。该系统的受体染料的选择是以在Luc生物发光光谱和受体染料激发光谱之间有最佳光谱重叠并具有较高的量子产率为标准。例如,SAM或SAH(抗原)与Luc偶联,符合上述标准的荧光染料与抗SAM或抗SAH抗体偶联。加入萤光素(Luc底物)引起萤光素发光,同时,在形成Luc-抗原-抗体-受体染料复合物时激发受体染料发出荧光。记录供体发光值和受体荧光值,并计算BRET指数(受体荧光/供体发光的比值)。样品中的SAM或SAH抗原越多,受体荧光越少,BRET指数越小。

[0113] 经过优化每个条件,可以建立竞争性BRET均相免疫测定法,对SAM或SAH进行定量,从而使线性,灵敏度,可回收性和重复性都令人满意。图8A的一部分显示了该过程的工作原理。基于BRET的方法在检测时不需要激光来激发供体染料,只需要添加萤光素酶的底物。当加入足够的底物开始产生可以测量的荧光时,它也同时激发被特定抗原-抗体拉近的受体荧光材料。它不激发没有与萤光素酶供体结合的受体染料。因此,测量的发射信号反映了含有供体(生物共轭物)和受体的抗原-抗体复合物的部分,而不是仅通过抗体与受体相关的样品或标准物的SAM或SAH抗原。

[0114] 实施例简述

[0115] 以下实施例旨在证明本发明的方法和组合物的有用性,而不应被解释为限制本发明的范围的依据。在本说明书中,术语生物样品旨在包括唾液,尿液,血液,血清,血浆,脑液,脑脊液,组织样品和细胞或源自哺乳动物包括人的任何物质。

[0116] 平均直径为2~10nm的量子点(CdTe/CdSe,CdHgTe/ZnS等)购自NN-Labs,LLC(Fayetteville,AR72701)。荧光染料钨螯合物或其它镧系金属等,平均直径为200nm-300nm,购自Bangslab(Fishers,IN46038)。在本说明书的上下文中,我们将镧系元素荧光染料和量子点称为荧光示踪剂(FTs)。除了将不同的FT与抗体结合的方法之外,其它的方法包括制备测试条的标准曲线等,无论使用量子点还是镧系螯合物都是一样的。使用量子点标记试剂盒(Cat#Q0101,NajingTech,Hangzhou,China)进行量子点与抗体的共价结合。

[0117] 实施例1-SAM定量检测

[0118] 形式1:用于快速量化SAM的均相免疫测定

[0119] 采用均相的免疫测定法,如均相时间分辨荧光技术(HTRF[®],如我们于2016年4月5日提交的申请号15/091,544中所列举的,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)和通过使用抗SAM单克隆抗体和生物共轭物测定样品中SAM含量的竞争性方法(如我们于2016年4月5日提交的我们的申请号15/091,544中所列举的,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)。

[0120] (1)在上图8所示的HTRF[®]方法中使用不同长度接头的生物素、地高辛基或地高辛偶联的SAM或SAM类似物,以及d2偶联的SAM或SAM类似物

[0121] 兔抗小鼠IgG-XL665和钨(Eu³⁺)穴状标记试剂盒购自Cisbio Bioassays。将Eu³⁺标记到小鼠抗地高辛或抗地高辛抗体(抗地高辛抗体,购自PerkinElmer)上。优化以下各组分的剂量:地高辛(地高辛基)-6C-氮杂-SAM,抗地高辛(地高辛基)-抗体-Eu³⁺,小鼠抗SAM抗体

118-6和兔抗小鼠IgG-XL665溶解在含有100mM PB, pH7.0, 0.1%无蛋白酶BSA, 100mM KF, 0.1%吐温20的缓冲液中。在竞争性HTRF[®]测定中, SAM标准品的使用范围为0-3000nM。试验用1-10孔的微孔板条内进行, 最终体积为100 μ l/孔。将所有测定组分合并, 并在室温下温育约30分钟。用HTRF[®]测定的小型微量荧光仪读取测定板。在每个激发脉冲之后以50 μ s (微秒) 延迟测量时间分辨荧光。在665nm波长处测量辐射荧光FRET信号(A计数)和在620nm检测Eu(K)信号(B计数)。所有测定孔的B计数应相同, 作为内部对照和背景吸光度的指标。同时测量两种荧光信号, 算出比值((A计数-10,000)/B计数)。由于665nm和620nm信号同样受到影响, 因此该比值受吸光度的影响最小。将SAM标准品浓度对该比值绘制标准曲线。样本中SAM越多, A计数越小, 因此所测的比值越小。

[0122] (2) 荧光素酶-6-aza-SAM在BRET中的应用

[0123] 使用荧光抗体标记试剂盒(Thermo-Fisher)将小鼠抗SAM抗体118-6与AlexaFluor610-x偶联。优化生物结合物与荧光素酶的摩尔比, 小鼠抗SAM抗体与AlexaFluor610-x的摩尔比, 荧光素酶-6C-氮杂SAM(供体Luc-SAM)的工作浓度, 小鼠抗SAM抗体118-6(受体荧光标记物-抗体(FL-Ab))和溶解在100mM PB, pH 7.0, 0.1%无蛋白酶BSA, 100mM KF, 0.1%吐温20的缓冲液中的样品或标准物(即用于相互竞争的SAM)。在竞争性BRET测定中, SAM标准品测试范围为0-3000nM。试验用1-10孔的微孔板条内进行, 最终体积为100 μ l/孔。将所有测定组分合并, 并在室温下温育约30分钟。用HTRF[®]测定的小型微量荧光仪读取测定板。在每个激发脉冲之后以50 μ s (微秒) 延迟测量时间分辨荧光。在630nm波长处测量辐射的荧光BRET信号, 在550nm波长处检测荧光素信号。找出BRET指数(FL-Ab/Luc-SAM)的适当摩尔比。如果使用正确的Luc-SAM(摩尔比Luc: SAM为1:20)和FL-Ab(摩尔比FL: Ab为4-8:1)偶联物, 结合的抗体量与BRET指数呈线性关系, 以SAM标准品浓度和BRET指数绘制标准曲线。样本中SAM越多, BRET指数越低。

[0124] 形式2: 用于快速定量SAM的荧光免疫层析试纸条

[0125] (1) 将抗SAM的单克隆抗体与标记的荧光示踪剂的结合物均匀地施加到玻璃纤维33GLASS(GEHealthcare Biosciences Corp. Piscataway, NJ)上: 大小均匀一致的钨染料微球体(0.20 μ m直径的聚合物P(S/V-COOH), Bangs Laboratories Inc. Fishers, IN)用MES(2-N-吗啉代乙磺酸)以14,000rpm离心10分钟洗涤两次。将EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺)添加至1.5mg/ml, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)至2mg/ml以活化聚合物。加入终浓度为40 μ g/ml的抗SAM抗体84-3(Cat#MA00202, Arthus Biosystems, VA), 并在室温下摇动2.5小时。将偶联物储存在含有0.5%BSA和EDTA-Na₂的20mM Tris缓冲液中, 适当稀释后, 以4 μ l/cm的量均匀地涂覆到玻璃纤维上, 然后在37 $^{\circ}$ C下干燥12小时。

[0126] (2) 将0.2mg/ml的BSA-SAM为测试线(T)和0.2mg/ml的山羊抗小鼠抗体为质控线(C)固定到硝酸纤维素膜(NC)上: 试剂用pH 7.4的50mM磷酸盐缓冲液溶解。将NC膜在56 $^{\circ}$ C下干燥过夜, 然后与样品垫和吸附膜组装。将得到的多层复合材料切成3.8mm宽的试纸条。将测试条包装在专门的黑色PVC卡壳中, 然后放入含有硅胶作为干燥剂的密封铝箔袋中。

[0127] (3) 用50mM Tris缓冲液溶解的抗RBC(红细胞)抗体, 吐温20, BSA和EDTA-Na₂处理样品垫, 使得全血液样品也可以直接使用。测试条的组成如图1A所示。

[0128] (4) 测量: 将约100 μ l血浆或血清样品或50 μ l全血加50 μ l稀释缓冲液加入到测试卡壳的样品孔中, 在15分钟内, 将该卡壳插入荧光读取仪器的槽中(仪器有365nm激发光)。测

量荧光强度,每批试纸条需要更新标准曲线,根据预定的标准曲线(图2),将计算出实际的SAM水平。对于该特定的条带,标准曲线如图2所示,其中x轴为0至3000nM范围内SAM标准品浓度的以10为底的对数。y轴是测试线(T)的荧光信号与质控线(C)的荧光信号的比率的以10为底的对数。

[0129] 实施例2-SAH定量检测

[0130] 形式1:用于快速定量SAH的均相免疫测定

[0131] 采用均相免疫测定法,如均相时间分辨荧光技术(HTRF[®],如我们于2016年4月5日提交的申请号15/091,544中所列举的,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)和通过使用抗SAM单克隆抗体和生物共轭物测定样品中SAM含量的竞争性方法(如我们于2016年4月5日提交的我们的申请号15/091,544中所列举的,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)。在图8所示的HTRF[®]方法中使用不同长度接头的生物素、地高辛基或地高辛偶联的SAH,以及d2偶联的SAH和BRET中使用不同长度接头的的荧光素酶偶联的SAH,与遇本发明的实施例1形式1类似,只是把抗SAM抗体换成抗SAH抗体,把SAM(或SAM类似物)换成SAH。

[0132] 形式2:用于快速定量SAH的荧光免疫层析条

[0133] 使用与上述实施例1相同的方法,使用终浓度为80 μ g/ml的小鼠抗SAH抗体301-3(Cat#MA00303,Arthus Biosystems,VA)。该特定条带的标准曲线如图3所示,其中x轴为0至3000nM范围内SAH标准品浓度的以10为底的对数。y轴是测试线(T)的荧光信号与质控线(C)的荧光信号的比率的以10为底的对数。

[0134] 实施例3-MI试纸条

[0135] 用于测量甲基化指数(MI)的荧光免疫层析试纸条

[0136] 使用上述实施例1的方法,但是把BSA-SAM(或SAM类似物)和BSA-SAH划线于NC膜的不同区域并干燥。荧光素-抗SAM和荧光素-抗SAH抗体均匀地涂覆到玻璃纤维上,然后如图1B所示组装。分别测量荧光标记物的荧光强度,根据该批次试纸条的标准曲线,计算出样品中SAM和SAH的实际水平。根据用于标记抗SAM和抗SAH抗体的荧光标记物的种类,SAM和SAH测试线可以显示为两个相同或不同的颜色。该试纸条(卡)允许快速轻松地同时测量SAM和SAH,然后计算出MI显示在干式免疫荧光分析仪上。

[0137] 实施例4-CRP定量试纸条

[0138] 荧光免疫层析条,用于快速定量全程CRP

[0139] (1) 将抗CRP单克隆抗体-荧光示踪剂偶联物均匀地加到玻璃纤维33GLASS(GE Healthcare Biosciences Corp.Piscataway,NJ):大小均匀一致的钨微球体(0.20 μ m直径的聚合物P(S/V-COOH),Bangs Laboratories Inc.Inc.Fishers,IN)用MES(2-N-吗啉代乙磺酸)以14,000rpm离心10分钟洗涤两次。将EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺)添加至1.5mg/ml,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)至2mg/ml以活化聚合物。用MES洗涤后,将微球在500 μ lMES pH 6.0中重悬,加入抗CRP抗体M-5191(Biobridge,北京,中国)7 μ l(2.82mg/ml),并在室温下摇动2.5小时。将偶联物储存在含有0.5%BSA和EDTA-Na₂的20mM Tris缓冲液中,以1:3稀释后按4 μ l/cm的量均匀地涂覆到玻璃纤维上,后在37 $^{\circ}$ C下干燥18小时。

[0140] (2) 将0.05mg/ml抗CRP抗体M-5192(Biobridge,北京,中国)作为第一条测试线(T1),0.4mg/ml的同样CRP抗体作为第二条测试线(T2),1.2mg/ml的山羊抗小鼠抗体作为质

控线(C)划线到硝酸纤维素膜上:以50mM磷酸盐缓冲液(pH7.4)作为缓冲液,划膜后,将膜在56℃下干燥过夜,然后与样品垫和吸附纸组装。将得到的多层复合材料切成3.8mm宽的试纸条。将测试条包装在专门的黑色PVC卡壳中,然后放入含有硅胶作为干燥剂的密封铝箔袋中。

[0141] (3) 测试条组成如图1B所示,没有样品垫,因为血液样品将在测试前以约600倍稀释。

[0142] (4) 测量:将约100 μ l稀释的血浆或血清或全血样品加入试纸卡的样品孔中。在15分钟内,将该卡壳插入荧光读取仪器的槽中(仪器有365nm激发光)。测量荧光强度,每批试纸条需要更新标准曲线,根据预定的CRP标准曲线(图4),将计算出样品中实际的CRP水平。对于该特定的条带,标准曲线如图4所示,其中x轴为0-130mg/L的标准品CRP浓度。y轴是第二测试线(T2)的荧光信号与质控线(C)的荧光信号的比。

[0143] 实施例5-HCy定量检测

[0144] 形式1:用于快速定量HCy的均相免疫测定

[0145] 采用均相的免疫测定法,如均质时间分辨荧光(HTRF®技术,如我们于2016年4月5日提交的申请号15/091,544中所列举的,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)和通过使用抗-HCy单克隆抗体或通过测量由生化反应产生的SAH的水平来定量来自样品的HCy的竞争性方法在实施例6中描述。测量SAH的方法与示例2形式1相同。

[0146] 在图8中描述的方法中,所用的在HTRF®中使用不同长度的接头的生物素,地高辛基或地高辛偶联的HCy,以及d2-偶联的HCy,在BRET中含有不同长度接头的的荧光素酶偶联的HCy的方法类似于在本发明的实施例1形式1中所述,除了用抗-HCy抗体替代抗SAM抗体和用HCy替代SAM(或SAM类似物)。

[0147] 形式2:用于快速定量HCy的荧光免疫层析试纸条

[0148] 采用与实施例1形式2相似的方法,通过使用抗-HCy单克隆抗体或通过测量由实施例6中描述的生化反应产生的SAH水平来定量来自样品的HCy。

[0149] 实施例6-HCy定性试纸条

[0150] 用于快速定性测定HCy的免疫层析测试条

[0151] 材料:

[0152]

试剂名称	母液浓度	试剂名称	母液浓度
DTT	100mM	硼酸缓冲液	0.2M pH8.2
SAH-Na	100 μ M	Tris 缓冲液	0.1 M pH 8.2
同型半胱氨酸甲基转移酶(HMT)	0.2mg/ml in 30% 甘油	PBS	0.1M pH 7.4
SAM	100 μ M	碳酸钾	0.2M
HCy	100 μ M	D-海藻糖	30%
山羊抗小鼠 IgG	7.8mg/ml	蔗糖	50%
抗 SAH 抗体	5.1mg/ml	BSA	10%
SAH-BSA	3.73 mg/ml	胶体金	70nm 直径

[0153] 其它材料包括玻璃纤维K88(桐城造纸有限公司,中国安徽),硝酸纤维素膜,Trion X-100,吐温20,酪蛋白,胎牛血清和PVP(聚乙烯吡咯烷酮)。小鼠抗SAH抗体(Cat#MA00307,

Arthus Biosystems,VA)。

[0154] Hcy血浆或血清样品经历了一些化学反应,使得所有HCys以还原形式从结合蛋白中游离出来,然后转化为SAH,如下所示:

[0155] 同型半胱氨酸+S-腺苷甲硫氨酸----(同型半胱氨酸甲基转移酶)---->S-腺苷同型半胱氨酸+甲硫氨酸,

[0156] 测试反应:3 μ l HCl,3 μ l SAM,3 μ l HMT和91 μ l 100mM PBS,pH7.4;对照反应:3 μ l HCl,3 μ l SAM,30%甘油和91 μ l 100mM PBS,pH7.4。充分混匀,反应5分钟,然后向SAH试纸条样品孔中加入80 μ l反应产物。

[0157] 反应产物SAH用定性SAH试纸条测定,SAH阴阳性判定的临界值反映人血浆或血清中较低水平的HCy,即正常受试者具有10 μ M及更低的HCy。HCy水平高于15 μ M就认为属于异常的患者。因此,我们制作了胶体金SAH测试条,显示测试线(T)和质控线(C),具有以下解读:

[0158] C线没有任何胶体金信号:改试纸条无效。

[0159] T和C都具有相似的胶态金信号强度:样品的HCy水平<10 μ M;

[0160] C具有比T线更强的胶体金信号,T线几乎不可见:样品的HCy水平 $\geq$ 15 μ M;

[0161] C具有比T线更强的胶体金信号,T线是可见的:来自样品的HCy水平在10至15 μ M之间;

[0162] SAH试纸条按照以下程序制作:

[0163] (1) 1ml 70nm胶体金,27 μ l碳酸钾,8 μ l小鼠抗SAH抗体,静置20分钟,然后加入100 μ l 10%BSA,静置15分钟,然后以12,000rpm离心15分钟,丢弃的上清液。用含有1%BSA,D-海藻糖和蔗糖的20mM硼酸缓冲液洗涤一次,并在120 μ l硼酸缓冲液中重悬。

[0164] (2) 将4 μ l/cm的偶联抗体均匀地涂布在玻璃纤维K88上。

[0165] (3) 用含有0.1-2%PVP,Triton x-100和酪蛋白的100mM Tris pH8.2处理样品垫。在37 $^{\circ}$ C下干燥过夜。

[0166] (4) 根据图1A所示的方法将试纸条组装在PVC板上。

[0167] 实施例7-MIHC试纸条

[0168] 用于同时测量SAM,SAH和HCy的免疫层析测试条

[0169] MIHC1代表甲基化指数和同型半胱氨酸三重测试条形式1。该卡壳由两条测试条组成:(a)一个是实施例3中的MI条。(b)另一个是实施例5中的HCy条。

[0170] MIHC2表示甲基化指数和同型半胱氨酸三重测试条形式2。该卡壳由两条测试条组成:(a)一个是实施例3中的MI条。(b)另一个是如实施例6中的HCy条。

[0171] 伴随的设备能够同时读取,处理和输出样本中SAM,SAH,MI和HCy的定性或/和定量的结果。

[0172] 实施例8-MIHCR试纸条

[0173] 用于同时测量SAM,SAH,HCy和CRP的免疫层析试纸条

[0174] MIHCR1表示甲基化指数,同型半胱氨酸和C-反应蛋白四重测试条形式1。该卡壳由三条测试条组成:(a)如实施例3一样是MI条。(b)如实施例5中的HCy条。(c)如实施例4中的CRP条。

[0175] MIHCR2代表甲基化指数,同型半胱氨酸和C-反应蛋白四重测试条形式2。该卡壳由

三条测试条组成：(a) 如实施例3一样是MI条。(b) 如实施例6中的HCy条。(c) 如实施例4中的CRP条。

[0176] 伴随的设备能够同时读取,处理和输出样本中SAM,SAH,MI,CRP和HCy的定性或/和定量的结果。

[0177] 实施例9-SAM半定量试纸条

[0178] 用于SAM的胶体金或胶体(有色)微球半定量试纸条

[0179] 不需要任何设备来读取结果。将三个测试条组装成一个单元,每个条带分别具有50nM,400nM,800nM的临界值的检测带。除了50nM,400nM和800nM之外,临界值可以改变为不同的临界值。血样中的值可以解出如下结果:<50nM;50-400nM;400-800nM;>800nM。胶体金或有色微球用于标记小鼠抗SAM抗体(Cat#MA00201,Arthus Biosystems,VA)。抗体的偶联与实施例6相似。测试条的组装是如图1A和实施例1所示的同样。用肉眼可以看到胶体金或微球颜色条带结果。因此,无需使用任何额外的设备,这种方法快速,简单,经济实惠。

[0180] 实施例10-SAH半定量试纸条

[0181] 用于SAH的胶体金或胶体(有色)微球半定量试纸条

[0182] 不需要任何设备来读取结果。将三个测试条组装成一个单元,每个条具有分别具有200nM,600nM,1200nM的截止值的检测带。除了200nM,600nM和1200nM之外,截止值可以改变为不同的值。血样中的值可以读出如下结果:<200nM;200-600nM;600-1200nM;>1200nM。胶体金或微球用于标记小鼠抗SAH抗体839-6(Cat#MA00307,Arthus Biosystems,VA)。抗体的偶联与实施例6相似。测试条的组装是如图1A和实施例1所示。用肉眼可以看到胶体金或微球的颜色条带结果。因此,无需使用任何额外的设备,这种方法快速,简单,经济实惠。

[0183] 实施例11-其它免疫测定系统

[0184] 除了使用如上所述的干试纸形式之外,FT还可用于其它水性系统中作为示踪剂。

[0185] 荧光示踪物标记的抗-SAM抗体和荧光示踪物标记的抗-SAH抗体可用于流式细胞术和免疫荧光显微镜等细胞学技术,以便研究在不同情况下细胞、组织和器官中SAM和SAH的代谢、动力学、分布和水平。

[0186] A.FCM(流式细胞术)

[0187] 用FCM方法测定蛋氨酸(Met)在细胞中刺激蛋氨酸腺苷转移酶(MAT)活性。培养的肝细胞系按如图5所示进行处理,然后进行SAM和SAH双染。FCM结果与ELISA(ELISA数据省略)和LSCM结果一致,但FCM可以提供了关于细胞核和细胞质中SAM水平变化的更多的信息。Met刺激肝细胞系中MAT活性对细胞质和细胞核的作用相似,但是在原发性肝细胞的作用不尽相同。高剂量的Met(1mM)对L02细胞核抑制而不是刺激(如0.5mM Met那样)的MAT活性,而1mM Met连续刺激L02细胞的细胞浆中的MAT活性。Met抑制HepG2细胞质和细胞核中的MAT活性,从而使得SAM水平降低(图5A)。在两种细胞系中,核SAM占总SAM的80-85%,甲基化指数也与此相似。而在正常的小鼠肝细胞中,约4.6%的SAM位于细胞核中。以1mM Met刺激24h,核SAM水平增加4倍,约占总SAM的22.5%。Met刺激的MAT导致核SAM增加,而细胞质SAM在1mM Met剂量内降低。原代肝细胞在无Met培养基中培养20h,诱导MAT活性,SAM水平在细胞核内增加,但细胞质SAM减少(图6)。这表明SAM需要发挥的关键作用是在胞核内迅速响应于甲基饥饿/缺乏(调控某些基因的表达)。在目前的试验条件下,细胞质和总细胞甲基化指数(MI)为1.85~2.55,但在正常肝细胞核中MI为0.3,在1mM Met刺激后增加至1.2。核MI在无Met培

培养基培养20h后为0.98,比正常肝细胞的和MI高约3倍,该变化趋势与SAM水平的变化一致。

[0188] 在所有细胞类型中测试了两种不同类型的细胞固定/透膜缓冲液的,即商品化的核固定/穿膜缓冲液 (Cat#00-5523FoxP3_TF StainingBuffer Set,eBioscience, SanDiego,CA),可以吧细胞胞膜和细胞核靶子都被通透和固定染色;胞内固定/穿膜缓冲液 (Cat#00-8824,eBioscience, SanDiego,CA),仅测量细胞质内靶子,不能穿透细胞核。

[0189] (1) 按照细胞消化方案用胰蛋白酶制备细胞悬液;

[0190] (2) 以1500rpm离心细胞悬浮液5分钟,弃上清液;

[0191] (3) 以至少1mlPBS重悬细胞,使用约 10^6 个细胞/样品;

[0192] (4) 以1500rpm离心5分钟,弃上清液;

[0193] (5) 向每个样品中加入100 μ l固定缓冲液(如果固定缓冲液为4%多聚甲醛,加入400 μ l/样品)。将样品在室温下保持30分钟,然后以1500rpm将悬浮液离心5分钟,弃上清;

[0194] (6) 用100 μ l穿膜缓冲液洗涤,然后离心悬浮液,放弃上清液;

[0195] (7) 室温孵育100 μ l穿膜缓冲液20分钟,离心分离悬浮液,弃上清;

[0196] (8) 用100 μ l穿膜缓冲液重新悬浮。加入10 μ l荧光标记的抗体并孵育30分钟。

[0197] (9) 用PBS洗涤两次,并将细胞重新悬浮于0.5ml PBS中,用BD FACSCanto II流式细胞仪进行测量。结果如图5和图6所示。

[0198] 图5显示了以4.5 μ g/ml的Alexa Fluor 647偶联的抗-118-6抗体 (Cat#MAF00201, Arthus Biosystems,VA) 和图6显示了用45 μ g/ml的Alexa Fluor 488偶联的抗SAH抗体301-3 (Cat#MAF00301, Arthus Biosystems,VA) 双染色的细胞系和正常小鼠肝原代细胞的流式细胞术 (FCM) 结果。显示了来自细胞质和胞核的SAM和SAH水平。正常肝细胞系L02和肝细胞癌细胞系HepG2用0、0.5mM和1mM甲硫氨酸 (Met) 处理24小时。分离小鼠原代肝细胞,用0、0.5mM和1mM Met处理24小时,并在无MetMEM培养基中培养20小时。图5显示了SAM含量,而图6显示了SAH含量。

[0199] B. 免疫荧光激光扫描共焦显微镜 (LSCM)

[0200] (1) 用酒精清洗LSCM的特殊玻片(旨在让细胞容易生长并在显微镜下拍照)。在紫外灯下放置并在超净台内吹风至少10分钟。

[0201] (2) 使用无菌眼科镊子将玻片放入24孔细胞培养板中。基于细胞生长速率的知识,将适量的细胞(正常肝细胞系L02和肝细胞癌细胞系HepG2,例如 5×10^4 /孔)均匀加到24孔细胞培养板内。根据实验设计,加或不加Met,培养24小时。

[0202] (3) 当细胞准备染色时,从孔中取出培养基,用1ml PBS洗涤3次。

[0203] (4) 加入200 μ l的80%储存于-20℃的丙酮,将细胞在-20℃下固定30分钟。

[0204] (5) 用1ml PBS洗涤3次。

[0205] (6) 在200 μ l染色缓冲液(含1%BSA的PBS)中,加入终浓度为40 μ g/ml的AlexaFluor-488-抗-SAH抗体和8 μ g/ml的AlexaFluor647-抗SAM抗体。将板放在4℃约1小时。加入适量的DAPI 5分钟,使核染色。

[0206] (7) 用1ml PBS洗涤3次。

[0207] (8) 用LSCM的专用特殊树脂密封玻璃,防止荧光被淬灭。

[0208] (9) 用630倍放大倍率的Zeiss LSM 780观察并拍照。结果如图7所示,显示了培养40小时,然后用本发明的一样的荧光标记的抗SAM和抗SAH抗体染色的L02和HepG2细胞的激

光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 结果。在图7中,A是用抗SAM抗体染色的L02细胞;B是用抗SAM抗体染色的HepG2细胞;C是用抗SAH抗体染色的L02细胞;D是用抗SAH抗体染色的HepG2细胞。照片由蔡司LSM 780拍摄,放大630倍。

[0209] C. 与链霉亲和素 (SA) 和生物素系统有关的荧光免疫学

[0210] 除了直接或间接将FTs标记到抗SAM和抗SAH抗体上,不同大小或颜色的量子点可以标记到SA上。(1) SAM和SAH通过各种接头与生物素偶联(如我们于2016年4月5日提交的申请号15/091,544中所列举,其全部内容通过引用并入本文,如同它们被完全写到本文)。(2) 不同的FTs标记在SA上。(3) 通过SA和生物素之间的很强的特异性结合,可以将小分子抗原SAM和SAH分别标记为不同的FT,即获得FT-SAM和FT-SAH。(4) 如果希望在样本中同时测量SAM和SAH,将不同颜色的FT-SAM和FT-SAH混合,使用针对SAM和SAH的特异性抗体,通过竞争法,即可对SAM和SAH进行定量。

[0211] D. 与地高辛基-抗地高辛基抗体系统相关的荧光免疫学

[0212] 追踪SAM和SAH的其它间接方法包括(1) 通过各种接头将SAM或/和SAH与地高辛或地高辛基结合(如我们于2016年4月5日提交的专利申请15/091,544中所例示的,其全部内容通过引用被纳入,如同它们被完全写到本文)。(2) 将不同的FT标记在小鼠抗地高辛或小鼠抗地高辛抗体上。(3) 混合步骤(1)和步骤(2)的产物,SAM和SAH被间接标记为不同颜色的荧光示踪物。(4) FT-SAM和FT-SAH的用途如上述实施例11C所述。

[0213] 实施例12-使用试纸条来测量健康人血液样品的SAM和SAH水平,并监测体重控制状况

[0214] 从34名健康受试者(我们研发部门的志愿者,受试者禁食至少5小时)通过静脉抽取大约5ml血样到肝素管。将100 μ l血浆样品加入到上述实施例1和2中所述的SAM和SAH免疫层析试纸条中,并且从干式荧光免疫分析仪(Dry Immunofluorescence Analyzer Model FIC-S2011Series,Arthus Biosystems,VA)上读取测定结果。从表1可以看出,15名女性的SAM,SAH和MI的平均值分别高于18名男性受试者的相应值(各高出的百分比如下:SAM高出25.51%,SAH高出74.25%,MI高出19.15%)。

[0215] 表1不同性别的健康血浆样本中SAM,SAH和MI的水平

[0216]

	BMI	SAM (nM)	SAH (nM)	MI	性别	例数
平均值	22.00	256.80	86.60	5.60	女	15
标准差	3.93	164.24	37.95	4.45	女	15
平均值	22.60	204.60	49.70	4.70	男	18
标准差	2.20	103.85	32.37	2.318	男	18

[0217] 我们根据每个性别组中的BMI(身体质量指数)进一步分组。其中一名男性受试者缺少BMI信息。SAM,SAH和MI的平均值和标准偏差如表2所示。与低BMI(BMI $\leq$ 24)组相比,高BMI(BMI $>$ 24)组的SAM和MI平均值明显降低(对于女性和男性受试者都是一样)。女性高BMI组的SAM平均水平为143.7nM,女性低BMI组SAM平均值为285.07nM。男性高BMI组SAM平均值为185nM,男性低BMI组SAM平均值为214nM。女性高BMI组的平均甲基化指数仅占低BMI组的30.76%,男性高BMI组的平均甲基化指数占低BMI组的63.49%。这意味着高BMI组对女性的甲基化指数的影响(减少)比对男性的影响更显著。一般认为BMI小于24是比较理想的健康

状态。因此,BMI异常与两性的SAM水平相关。低SAM有可能是异常和不利的BMI (通常是一系列健康问题,包括心血管和肾脏疾病,糖尿病,肥胖症和其他代谢紊乱等)的根源(Lydi M.J.W.van Driel报道了年轻女性中BMI与甲基化之间的关系:身体质量指数是育龄期妇女甲基化指标的重要决定因素,J.Nutr.139:2315-2321,2009)。结果提示,SAM,SAH和MI是异常BMI引起的健康问题(如心血管疾病等)的良好指标或生物标志物。

[0218] 表2不同性别和BMI与健康血浆样品中SAM,SAH和MI的水平

[0219]

		BMI $\geq$ 24				BMI<24			
	性别	例数	SAM(nM)	SAH(nM)	MI	例数	SAM(nM)	SAH(nM)	MI
平均值	女	3	143.70	85.05	2.0	12	285.06	86.96	6.5
标准差	女	3	88.46	27.42	1.9	12	168.97	102.43	4.4
平均值	男	4	185.00	69.00	4.0	13	214.00	48.58	6.3
标准差	男	4	76.61	52.27	2.1	13	116.06	30.41	4.6

[0220] 由于BMI大于24可能表示不健康状况,我们将BMI高于24例的3例女性和4例男性受试者去掉,表1变成了如下表3。来自12名正常BMI女性的SAM,SAH和MI的平均值高于13名男性受试者的相应值(SAM高出33.41%,SAH高出97.73%,MI高出25%)。此外,通过去除异常BMI受试者,女性和男性之间的SAM,SAH和MI值差异更为明显,即如果只看正常BMI的受试者,平均女性SAM水平比男性的SAM水平高33.41%(所有BMI值被考虑的时后只高出25.51%)。表4显示异常BMI可能抵消(减少)女性和男性之间SAM,SAH和MI值的差异。这表明BMI是使SAM,SAH和MI的价值复杂化的一个因素,这与SAM和SAH的水平根据种族,性别,体重,年龄和一般健康状况而变化的事实是一致的。

[0221] 表3不同性别的健康血浆样本中SAM,SAH和MI的水平(全部BMI<24)

[0222]

	BMI	SAM (nM)	SAH (nM)	MI	性别	例数
平均值	20.4	285.10	87.00	6.50	女	12
标准差	2.17	168.97	102.43	4.48	女	12
平均值	21.70	213.70	44.00	5.20	男	13
标准差	1.60	116.06	25.40	2.41	男	13

[0223] 表4女性SAM,SAH和MI值比男性增加的百分比(%)

[0224]

组别	SAM	SAH	MI
所有BMI	25.51	74.25	19.15
健康的BMI ($\leq$ 24)	33.41	97.73	25.00

[0225] BMI与MI水平和SAM水平之间的相关性表明,与BMI一起监测这些生物标志物将会为预定组患者人群设计饮食计划提供实用性好的信息。

[0226] 实施例13-使用试纸条来测量健康和心血管患者血样的SAH,HCy,CRP和cTnI

[0227] 本实施例中使用的缩写如下:cTnI(心肌肌钙蛋白I),CRP,CK-MB(肌酸激酶-MB)和Myo(肌红蛋白)。从湖南省长沙市中南大学湘雅医学院第二附属医院临床实验室获得诊断为心脏病发作的患者中取得9例健康人和7例心血管病(CVD)人血液样本。使用本发明实施

例1,2,3和4中的试纸条测量样品中SAM,SAH,MI和CRP水平。表5的结果显示,临床实验室cTnI,CRP,CK-MB和Myo全阴性结果的确定的9例无急性心肌损伤(AMI)病例中,SAM平均值为164nM,SAH平均值为232nM,MI平均值为1.75。其中44.44%的病例HCy高于临界值15 μ M。使用如实施例4中所述的测试条测量的CRP值平均为0.8mg/ml(属于正常值)。然而,在cTnI,CRP,CK-MB和Myo都明显增高的7例确诊为心脏病发作患者中,SAM平均值为94nM,SAH平均值为558nM,MI平均值为0.2,其中85.71%的患者HCy高于临界值15 μ M。7例心脏病发作或AMI患者平均CRP为4.37mg/l,高于正常值,由于不大于10mg/l,因此与炎症反应无关。对于表5中最后2个具有较高Myo(Myo一般在AMI的最初几个小时开始增加)的,

[0228] 表5临床样品中生物标志物的测定(n=16)

[0229]

标志物 (ng/ml)	结果	心血管 疾病	SAM (nM)	SAH (nM)	MI	CRP (mg/l)	HCy
cTnI	0.035	-	367	40	9.12	0.30	-
cTnI	0.22	-	48	50	0.95	0.31	+
cTnI	0.239	-	666	207	3.21	0.58	-
CRP	1.26	-	35	129	0.27	1.21	+
CRP	1.51	-	83	522	0.16	1.49	-
CK-MB	18.92	-	26	303	0.09	1.14	-
Myo	54.98	-	48	273	0.18	0.77	-
Myo	33.93	-	45	466	0.10	0.48	+
Myo	67.88	-	160	95	1.68	0.92	+
		平均值	164	232	1.75	0.80	
		标准差	217	175	2.95	0.42	
cTnI	>50	+	72	405	0.18	5.75	+
cTnI	45.6	+	211	1320	0.16	5.21	-
CRP	7.73	+	33	521	0.06	7.02	+
CK-MB	54.95	+	48	98	0.49	4.51	+

[0230]

CK-MB	33.93	+	85	456	0.19	3.33	+
Myo	119.39	+	138	610	0.23	1.24	+
Myo	152.47	+	73	709	0.10	3.52	+
		平均值	94	588	0.20	4.37	
		标准差	61	376	0.14	1.88	

[0231] CRP水平不高,即将开始增加。对于7个心脏病发病患者中最前两个有cTnI显著升高(cTnI峰值一般发生在AMI后36小时左右)的情况,CRP水平明显升高。这表明CRP升高大约出现在心脏病发作后一天左右。结果表明,SAM和MI降低,SAH和HCy升高也是心脏病的良好生物标志物。7例AMI患者中只有1例显示HCy阴性,但该患者的SAH水平比其它病例高出约5倍,高于正常平均SAH水平。这表明,在诊断心脏病方面SAH和MI是比HCy更好的指标。

[0232] 使用本发明实施例4中所述的免疫层析试纸条测定的所有样品的SAM,SAH,HCy和CRP值可以帮助鉴定和分类某些仅通过单独检测cTnI,CK-MB,Myo和目前通常光化学方法测定的HCY可能被忽略的一些患者。SAM,SAH,HCy和CRP作为目前常用的心脏病发作常规指标的补充指标,是很有用的生物标志物,目的是及时发现、鉴别诊断、预测预后并直接指导治疗心血管疾病。

[0233] 基于前述实施例中所述的实验,据信量子点探针和荧光螯合物比有机荧光分子标记的其它探针具有更高的荧光强度,并且它们更持久的荧光特性使得建立稳定和可靠的检测方法成为可能。因此,相信量子点和荧光螯合物用于测定SAM,SAH和HCy,具有优于使用传统有机荧光分子用于该测定法的一系列优点。

[0234] 以下临时和专利申请的全部内容通过引用并入本专利申请,如同它们被完全写到本文。

[0235] 2014年8月11日提交的美国申请序列号14/457,099;

[0236] 2014年3月18日提交的美国申请序列号14/218,928;

[0237] 2013年3月15日提交的美国临时专利申请No.61/801,547;和

[0238] 2015年4月6日提交的美国临时专利申请No.62/143,790。

[0239] 虽然上述描述(Angres)包含许多具体细节,但是这些不应被解释为限制本发明的范围,而仅仅是提供一些当前优选实施例的示例。类似地,在不脱离本发明的精神或范围的情况下,可以设计其它实施例。来自不同实施方案的特征可以组合使用。因此,本发明的范围仅由所附权利要求及其合法等效物而不是前述描述来指示和限制。对本发明的所有添加,删除和修改,如果属于权利要求的含义和范围,都应该被视为本说明书的内容。

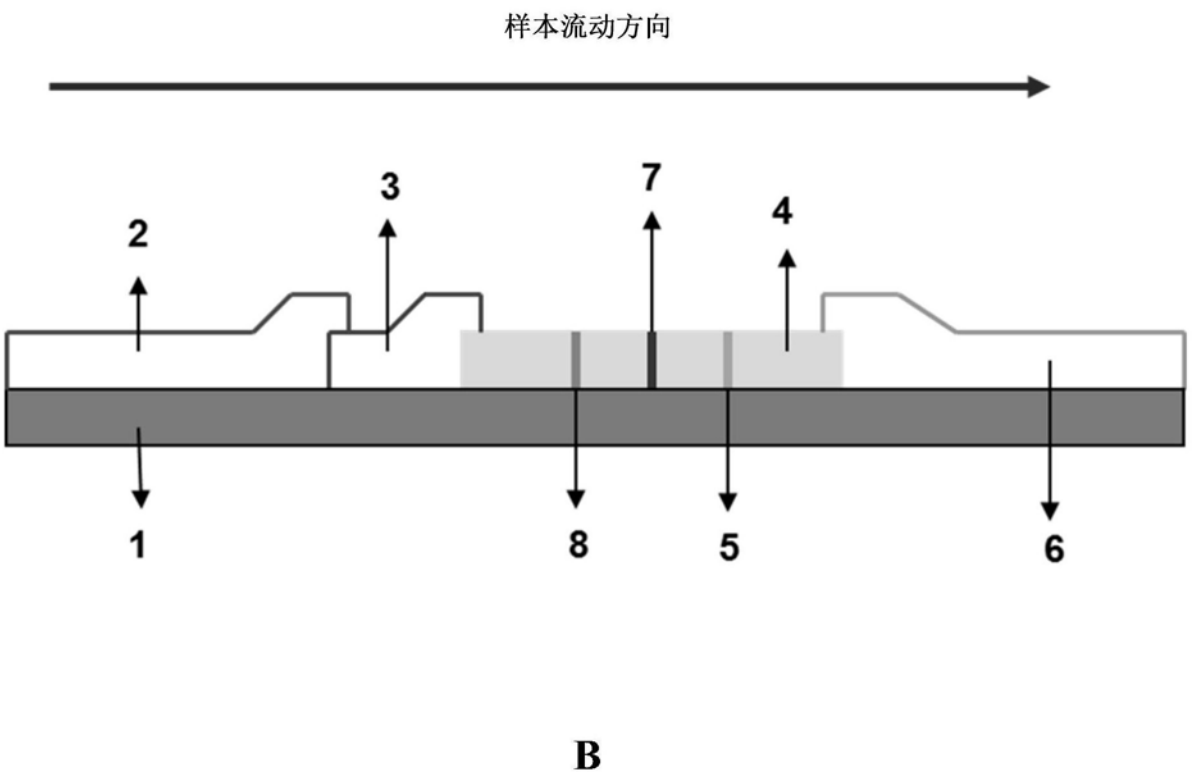
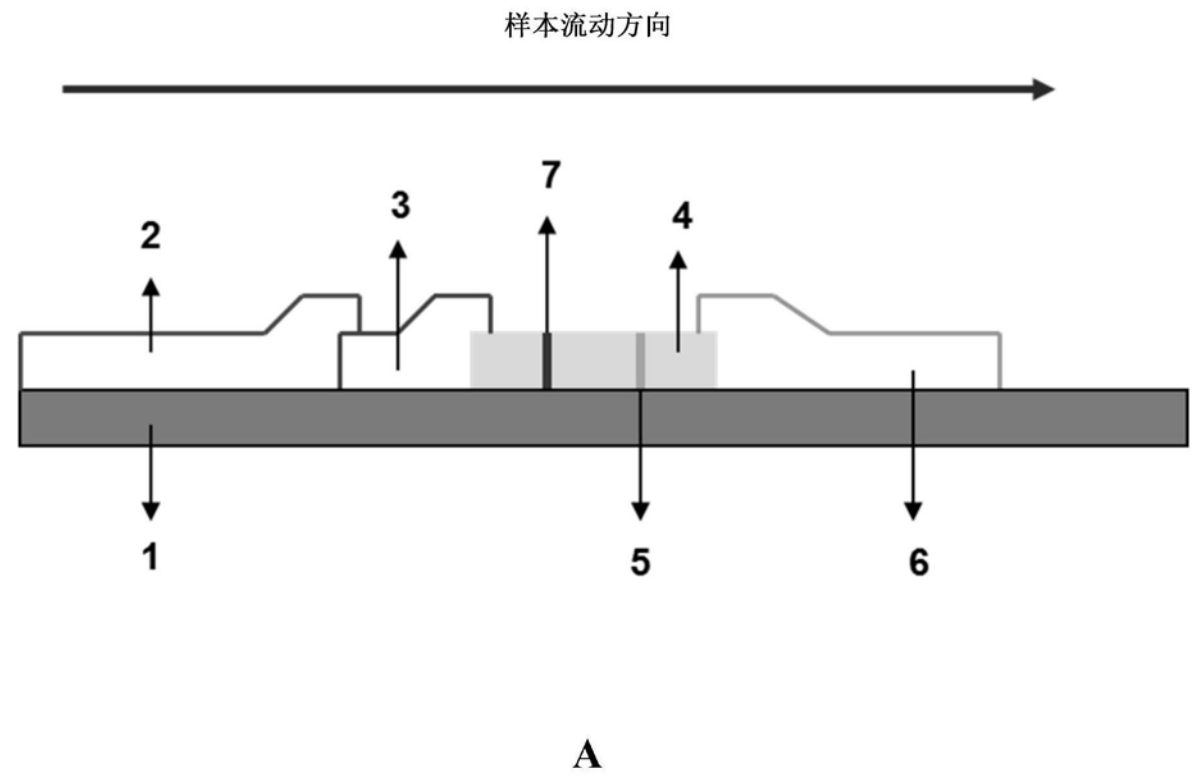


图1

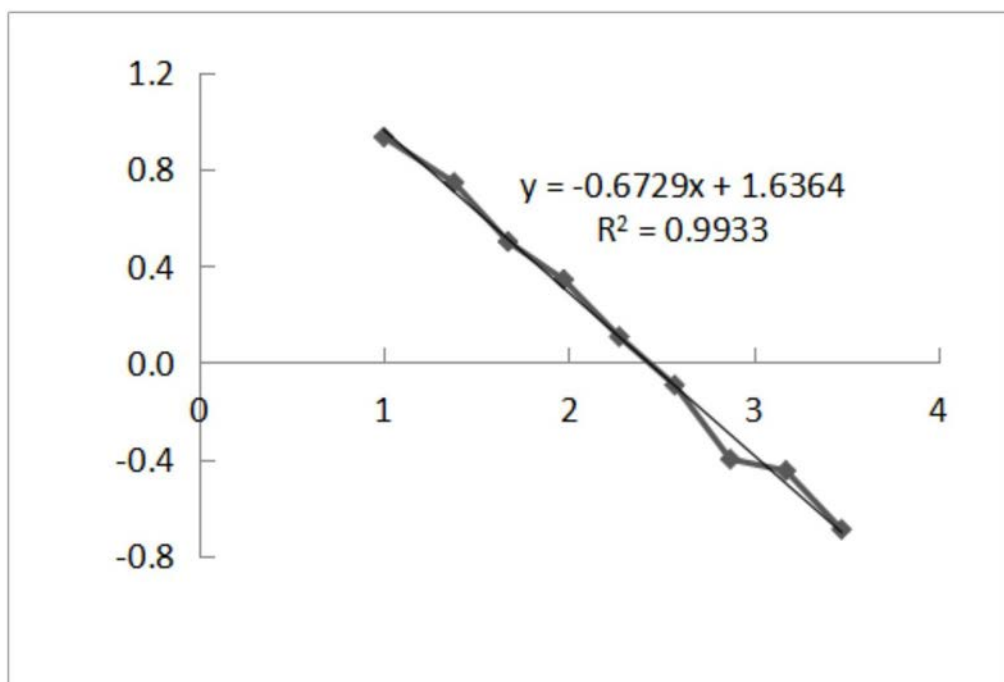


图2

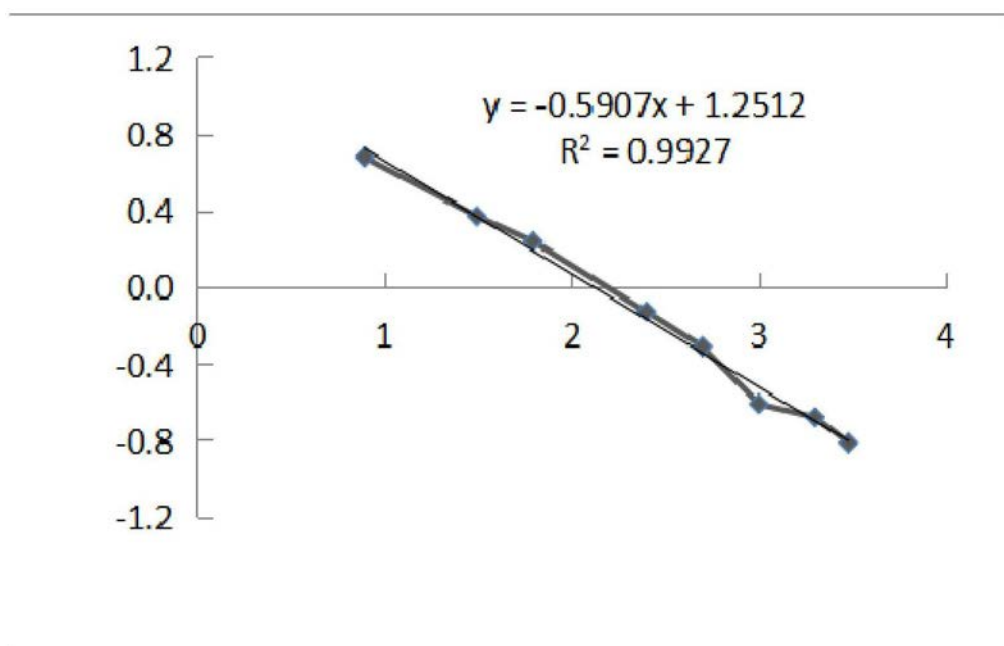


图3

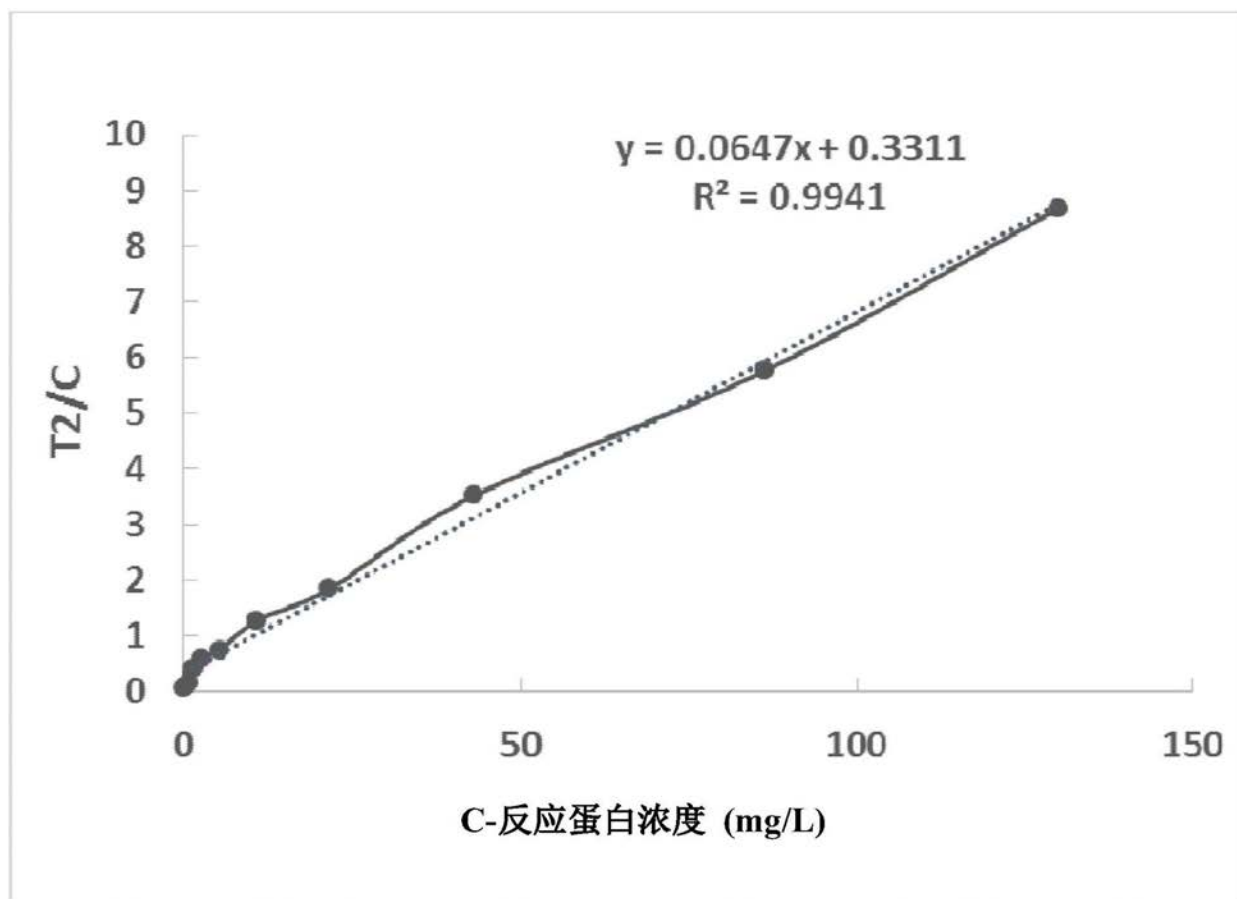


图4

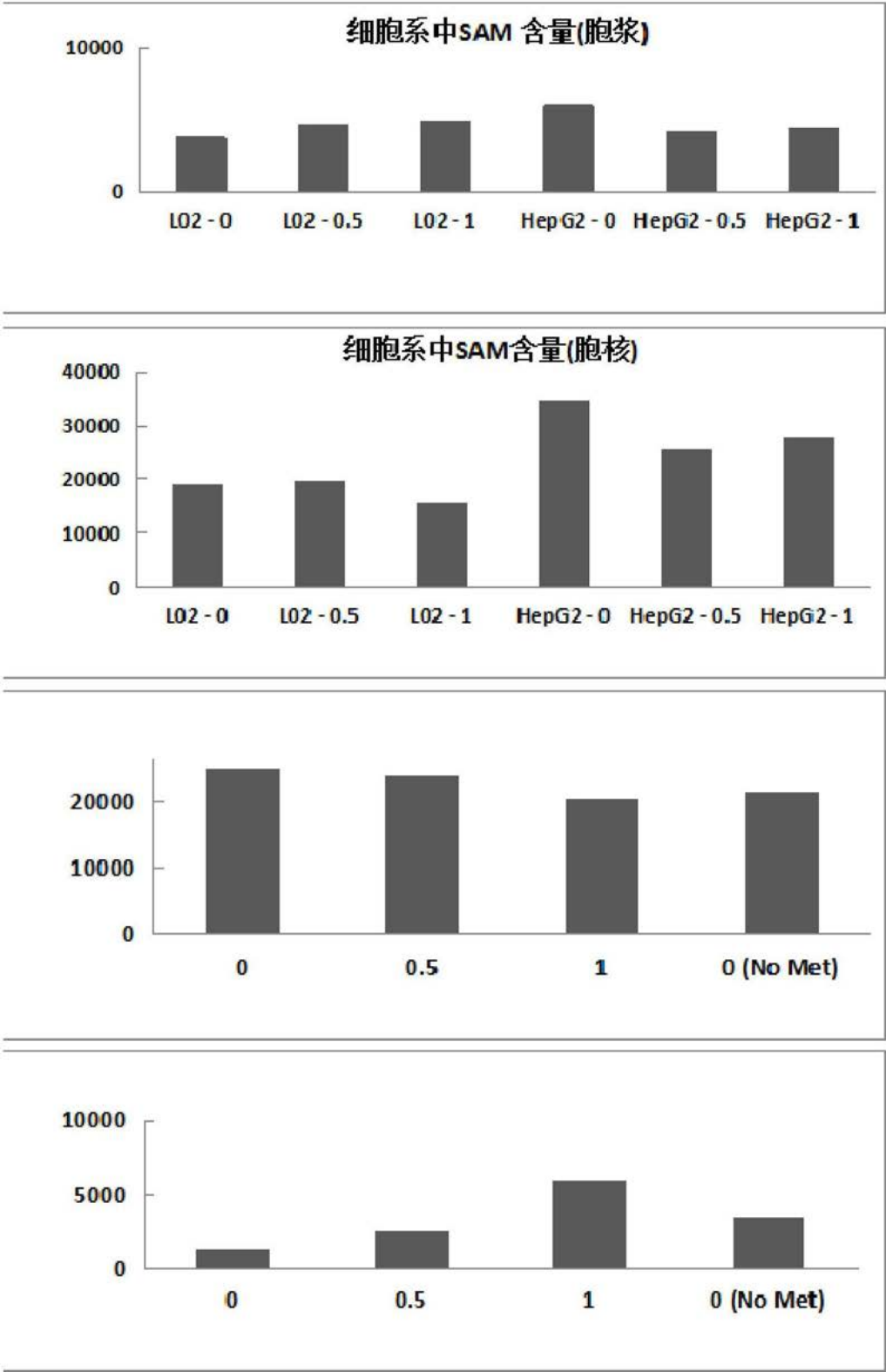


图5

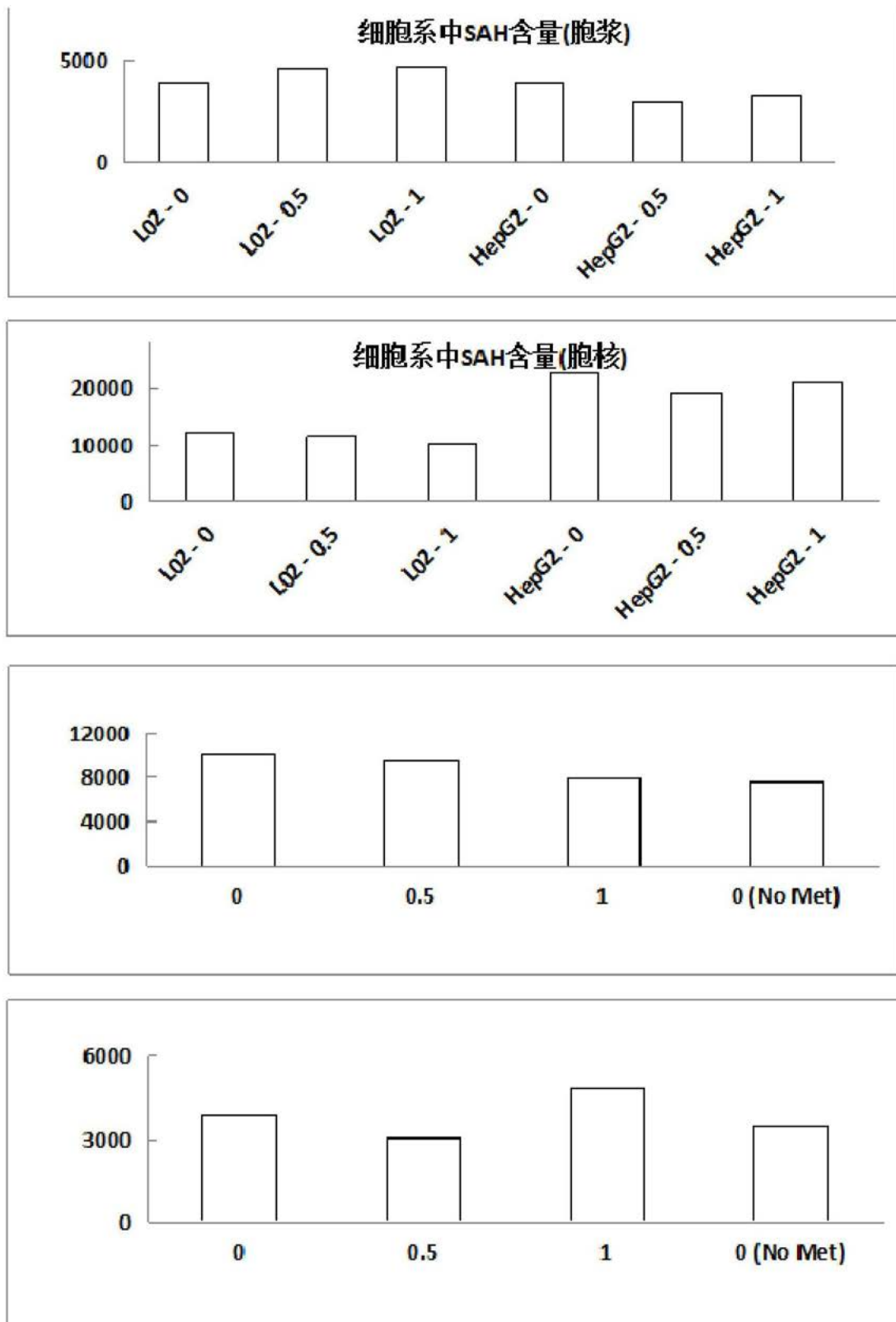


图6

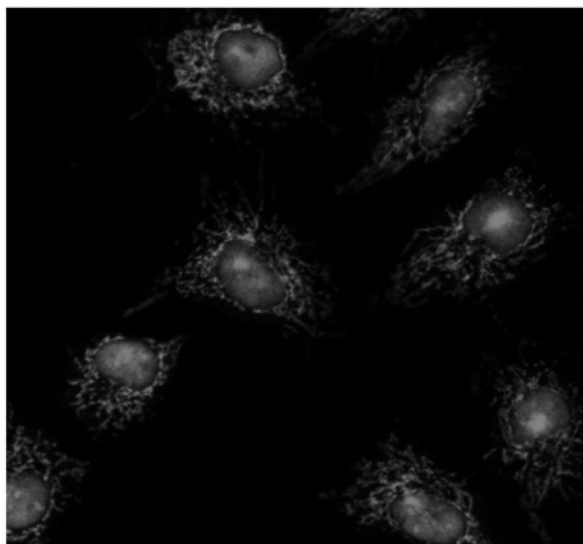
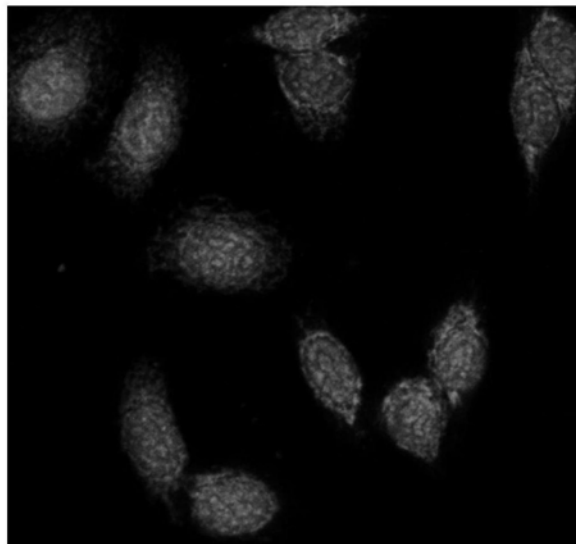
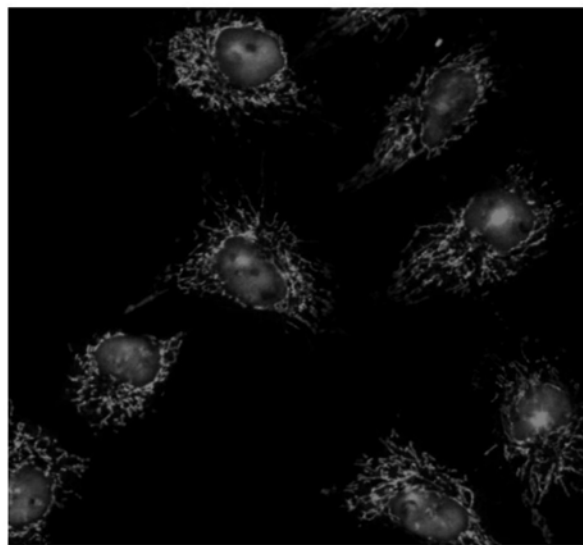
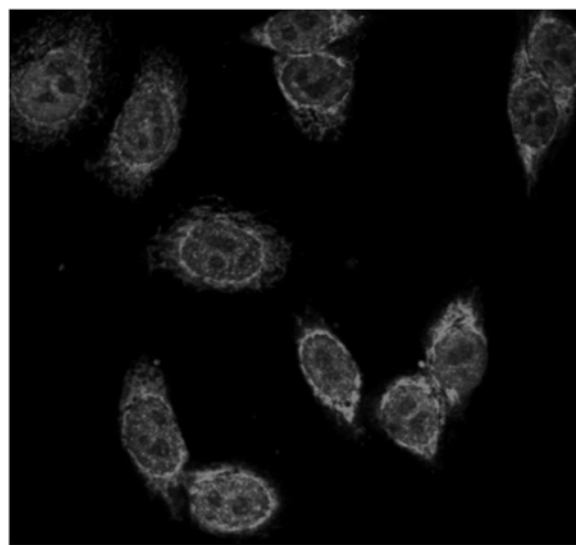
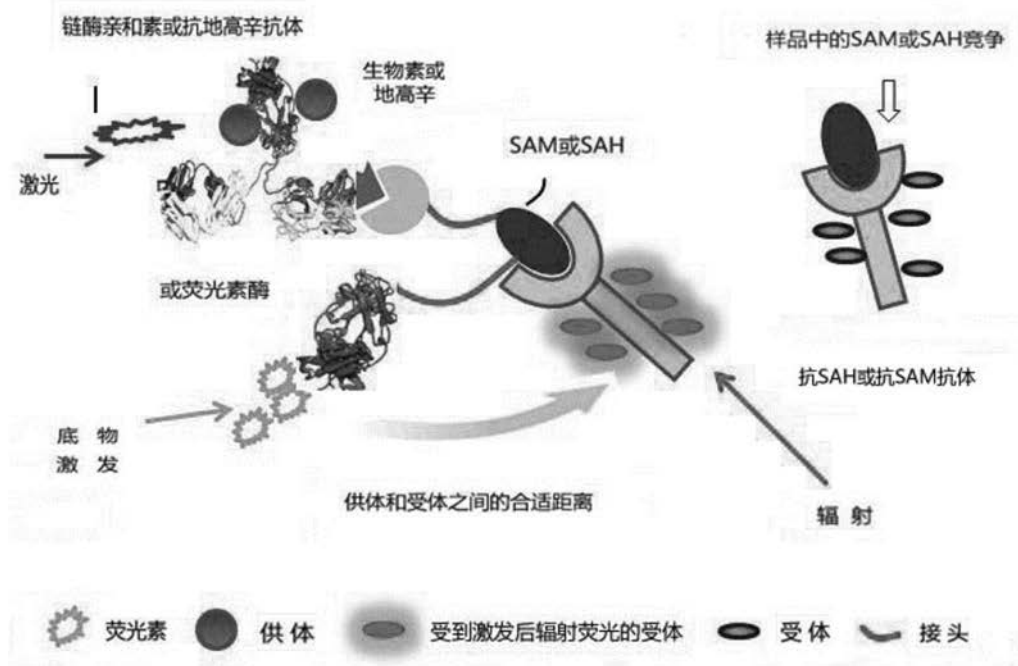
**A****B****C****D**

图7



A



B

图8

专利名称(译)	用免疫和化学方法快速简便测定S-腺苷蛋氨酸，S-腺苷同型半胱氨酸和同型半胱氨酸		
公开(公告)号	CN108291908A	公开(公告)日	2018-07-17
申请号	CN201680032653.5	申请日	2016-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	黄一菊		
申请(专利权)人(译)	黄一菊		
当前申请(专利权)人(译)	黄一菊		
[标]发明人	郝秀娟 邓朝义		
发明人	郝秀娟 邓朝义		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/573 C12Q1/48		
CPC分类号	C07K2319/60 G01N33/533 G01N33/54373 G01N2333/4737 G01N2800/50		
优先权	62/166044 2015-05-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供免疫层析试纸条，均相与非均相免疫测定方法和系统或试剂盒用于检测和定量样品中S-腺苷甲硫氨酸(SAM)，S-腺苷高半胱氨酸(SAH)和同型半胱氨酸(HCY)的方法，包括：(a)制备荧光团和抗体的偶联物；(b)将SAM，SAH和HCY固定在固相支持物上；(c)提供样品，将所述样品加入抗SAM，抗SAH或抗-HCY与镧系元素螯合物或量子点(QD)的偶联物上，结合后形成包含所述偶联物，在固体支持物上SAM，SAH或HCY，和可能存在于样品中的SAM，SAH或HCY的竞争性复合物；和(d)通过监测由复合物中的荧光共轭物介导的光谱发射来检测复合物的存在(如果存在)，其中荧光信号的出现和数量反映样品中SAM，SAH或HCY的存在和数量。

