



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106596917 A

(43)申请公布日 2017.04.26

(21)申请号 201611182781.6

(22)申请日 2016.12.19

(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 王春新

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 薛海霞 董建林

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/554(2006.01)

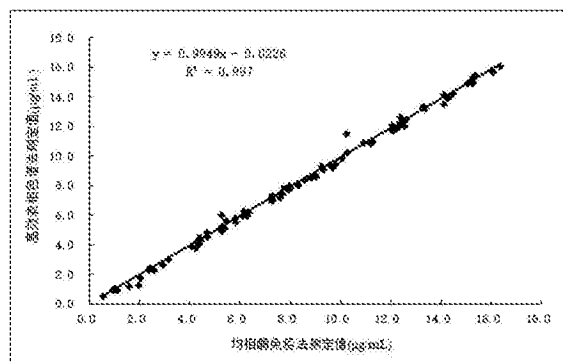
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及
检测方法

(57)摘要

本发明公开了高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法,属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的高香草酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗高香草酸特异性抗体,并且与常见的62种药物无任何交叉反应;由该抗体制备得到的高香草酸检测试剂,可以精确快速地确定尿液等生物样品中的高香草酸含量。与市场上现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较,本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低高香草酸检测成本,有利于临床大规模推广使用。

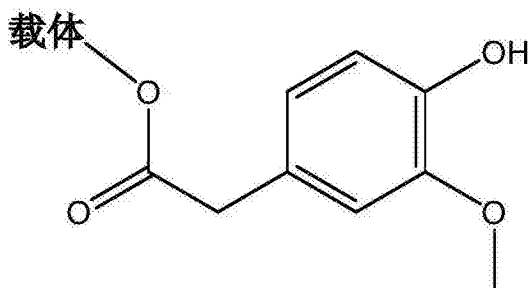


1. 一种高香草酸均相酶免疫检测试剂, 含有抗高香草酸特异性抗体和酶试剂, 其特征在于:

所述的酶试剂由高香草酸酶标偶联物和酶的底物组成, 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;

所述的抗高香草酸特异性抗体由高香草酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子, 或者为保留与高香草酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

所述的高香草酸免疫原, 其结构式如式 (I) 所示:



式 (I)

载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽。

2. 根据权利要求1所述的一种高香草酸均相酶免疫检测试剂, 其特征在于: 所述的完整的抗体分子、抗体片段或抗体衍生物, 为采用单一的高香草酸免疫原对实验动物加强免疫所获得的多克隆抗体, 或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体; 所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种。

3. 一种如权利要求1所述的高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于包含以下步骤:

(1) 试剂A: 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=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物; 将抗高香草酸特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗高香草酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:300~1:6000;

(2) 试剂B: 将高香草酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中, 高香草酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:300~1:8000;

其中, 高香草酸酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

(1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备: 称取7.5~22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 室温溶解于6~18mL含有72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中, pH=8.5~9.0; 在溶液中加入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-磷酸以及0.375~1.125mL卡必醇; 加热到30~35摄氏度, 再一次性加入1~3mL二甲基亚砜, 摇匀后静置5~15s;

(2) 高香草酸的激活: 在无水状态下称取5~15mg高香草酸, 溶解于300~900μL二甲基甲酰胺中; 使上述溶液温度降到-10~-14℃; 加入1.5~4.5μL三丁胺; 加入0.75~2.25μL氯甲酸异丁酯; 加入0.1~2μL碳二亚胺EDC; 5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺; -10~-14℃搅拌30~60分钟;

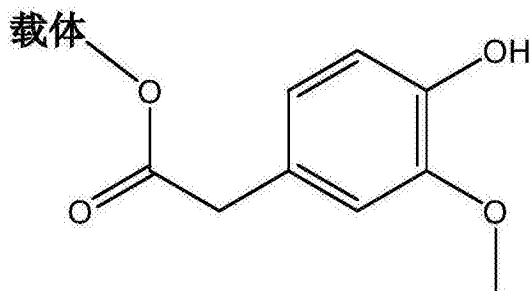
(3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与高香草酸的连接: 将步骤(2) 激活的温度为-9~-10℃的高

香草酸溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的温度为30-35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2-8℃搅拌过夜;

(4)纯化产物。

4.一种如权利要求3所述的高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于,所述的抗高香草酸特异性抗体由高香草酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或者为保留与高香草酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

所述的高香草酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽;

所述的高香草酸免疫原的制备步骤如下:

(1)将载体蛋白100~300g溶解于25~75mL 0.2M, pH 8.5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:100~300mg高香草酸、1.75~5.25mL二甲基甲酰胺、1.75~5.25mL乙醇、3.5~10.5mL 10mM, pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60min;

(3)将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到高香草酸免疫原。

5.一种如权利要求3-4中任一项所述的高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于:抗高香草酸特异性抗体的制备过程包含以下步骤:

(1)用PBS将高香草酸免疫原稀释至0.1~3.0mg/mL,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

(2)2~3周后,再用0.5~5.0mL相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射3~6次;

(3)对步骤(2)的实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗高香草酸特异性抗体。

6.一种如权利要求3所述的高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于:

纯化产物的具体步骤为: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。

7.高香草酸含量的检测方法,其特征在于:采用权利要求3-6的制备方法制备得到高香草酸均相酶免疫检测试剂并用于高香草酸含量的检测,包括如下步骤:

1)将待测样本与抗高香草酸特异性抗体接触;

2)根据待测样本中高香草酸与抗高香草酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中高香草酸的含量;

所述待测样本为尿液。

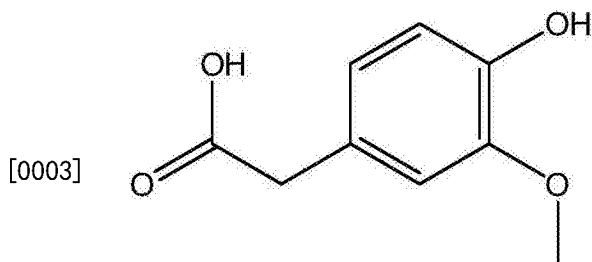
高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测试剂领域,具体涉及一种高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法。

背景技术

[0002] 高香草酸(Homovanillic acid,HVA),其结构式如式(II)所示:



式(II)

[0004] 高香草酸(Homovanillic acid,HVA)是儿茶酚胺最主要的终末代谢产物之一,测定尿液中高香草酸含量主要用于评价体内儿茶酚胺的代谢水平,从而对与其相关的某些神经系统疾病做出诊断。准确、高效地测定尿液中高香草酸的含量,对神经母细胞瘤、精神分裂症等神经系统疾病的诊断及病情监测都具有重要意义。有研究表明:机体长期接触金属锰会导致职业性锰中毒的发生,以帕金森症为典型的临床表现,尿液中高香草酸的含量可以用来评价机体锰中毒的情况。由于高香草酸在人尿液中的含量较低,且尿液基质非常复杂,因此对检测方法的灵敏度和特异性都提出了较高的要求。

[0005] 目前,测定尿液中高香草酸的方法主要有酶荧光光度法、比色法、伏安法、气相色谱法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、质谱法、薄层色谱法以及电离子透入法等。但这些方法都较为费时费力,且检测成本较高,不适合大批量临床样品的测定。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的高香草酸检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。因此,研发生产质量达到临床要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的高香草酸测定试剂盒已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对高香草酸的高通量、快速化检测,且具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,能有效满足国内日益增长的临床检测需求。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有技术存在的缺陷,采用独特的高香草酸制备免疫原性强的高香草酸免疫原及其抗体,用该抗体制备的高香草酸均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对高香草酸高通量、快速化的检测。该检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点,还能有效降低高香草酸检测成本,有利于临床推广使用。

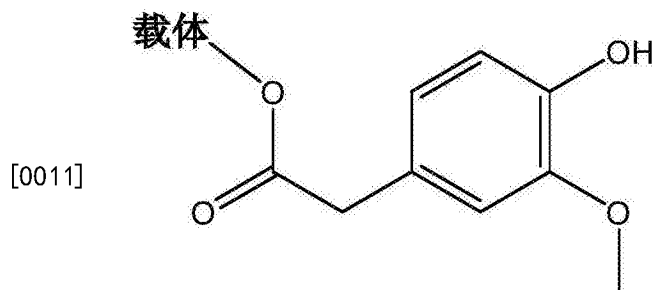
[0007] 本发明的一个目的在于提供一种高香草酸均相酶免疫检测试剂,含有抗高香草酸特异性抗体和酶试剂,其特征在于:所述的酶试剂由高香草酸酶标偶联物和酶的底物组成,

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;

[0008] 所述的抗高香草酸特异性抗体由高香草酸免疫原免疫实验动物后产生的完整抗体分子,或

[0009] 者为保留与高香草酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物;

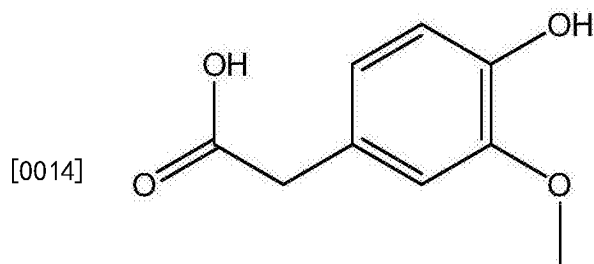
[0010] 所述的高香草酸免疫原,其结构式如式(I)所示:



式(I)

[0012] 载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽。优选为血清蛋白、血蓝蛋白和甲状腺球蛋白,更优选为血清白蛋白,进一步优选为牛血清白蛋白。

[0013] 所述的高香草酸免疫原由高香草酸与上述载体连接而成,高香草酸的化学结构如式(II)所示:



式(II)

[0015] 所述的高香草酸免疫原的制备步骤如下:

[0016] (1) 将载体蛋白100~300g溶解于25~75mL 0.2M, pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0017] (2) 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:100~300mg高香草酸、1.75~5.25mL二甲基甲酰胺、1.75~5.25mL乙醇、3.5~10.5mL 10mM, pH 5.0的磷酸钾缓冲液、100~300mg1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将上述化学品在室温下搅拌溶解反应30~60min;

[0018] (3) 将溶解好的溶液滴加至载体蛋白溶液中,并在2~8℃下搅拌过夜,得到抗原;将合成好的抗原经过透析进行纯化,得到高香草酸免疫原。

[0019] 一种抗高香草酸特异性抗体,由上述的高香草酸免疫原免疫实验动物后生产得到。

[0020] 所述的抗高香草酸特异性抗体由上述制得的高香草酸免疫原采用常规方法接种实验动物,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0021] (1) 用PBS将上述合成的BSA-高香草酸免疫原稀释至0.1~3.0mg/mL,得到抗原溶液,然后用0.5~5.0mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物进行注射;

[0022] (2) 2~3周后,再用0.5~5.0mL相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实

验动物注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射3~6次;

[0023] (3) 对上述实验动物取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗高香草酸特异性抗体。

[0024] 本发明的抗高香草酸特异性抗体为完整的抗体分子,也包括保留与高香草酸特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0025] 本发明的抗体为采用单一的高香草酸免疫原对实验动物加强免疫所获得的多克隆抗体,或者为免疫后经体细胞杂交获得的单克隆抗体;所述的实验动物为兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马的一种,优选为兔。

[0026] 本发明的另一个目的在于提供高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法。

[0027] 高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

[0028] (1) 试剂A: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=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将抗高香草酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗高香草酸特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:300~1:6000,优选为1:2000;

[0029] (2) 试剂B:将高香草酸酶标偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,高香草酸酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:300~1:8000,优选为1:5000;

[0030] 其中,高香草酸酶标偶联物的制备方法包含以下步骤:

[0031] (1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备:称取7.5~22.5mg规格为100KU的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,室温溶解于6~18mL含有72.6mg 0.05M Tris、8mg 3.3mM MgCl₂和100mg NaCl的溶液中,pH=8.5~9.0;在溶液中加入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-磷酸以及0.375~1.125mL卡必醇;加热到30~35摄氏度,再一次性加入1~3mL二甲基亚砷,摇匀后静置5~15s;

[0032] (2) 高香草酸的激活:在无水状态下称取5~15mg高香草酸,溶解于300~900μL二甲基甲酰胺中;使上述溶液温度降到-10~-14℃;加入1.5~4.5μL三丁胺;加入0.75~2.25μL氯甲酸异丁酯;加入0.1~2μL碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;-10~-14℃搅拌30~60分钟;

[0033] (3) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与高香草酸的连接:将步骤(2)激活的温度为-10~-14℃的高香草酸溶液逐滴加入到步骤(1)溶解的温度为30~35摄氏度的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液中;2~8℃搅拌过夜;

[0034] (4) 纯化产物。其中,步骤(4)纯化产物的具体步骤为: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。

[0035] 本发明的又一个目的在于提供高香草酸含量的检测方法。高香草酸含量的检测方法,采用前述的制备方法制备得到高香草酸均相酶免疫检测试剂并用于高香草酸含量的检测,包括如下步骤:

[0036] 1) 将待测样本与抗高香草酸特异性抗体接触;

[0037] 2) 根据待测样本中高香草酸与抗高香草酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中高香草酸的含量;

[0038] 所述待测样本为尿液。

[0039] 本发明的高香草酸免疫原,免疫原性高,可以诱导得到高效价的抗高香草酸特异

性抗体。该抗体特异性高,与高香草酸的结合力强。由该抗体制备得到的高香草酸检测试剂,可以快速、准确地确定样品中的高香草酸含量。

[0040] 高香草酸均相酶免疫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的且分开放置,所以将酶的底物与上述抗高香草酸特异性抗体混合在一起。

[0041] 本发明的制备方法中,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液的制备时,加热到30-35摄氏度,再一次性而非逐滴加入1~3mL二甲基亚砷,摇匀后静置5-15s,采用相对室温更高的温度,使得一次性加入二甲基亚砷成为可行,且静置时间也比较短,节约了操作时间,且有助于实现高香草酸的高通量快速化测定,准确度高,特异性强。高香草酸的激活过程选取-10~-14℃的温度范围,低于常规的-2至-8摄氏度,有助于提高高香草酸的激活效率且使得高香草酸与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合时,混合溶液的温度接近于室温。

[0042] 本发明的高香草酸免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗高香草酸特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的62种药物无任何交叉反应;含有上述抗高香草酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定尿液等生物样品中的高香草酸含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现高香草酸的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高,同时实现了检测过程的全自动化,对检测人员的要求不高,易于实现和推广使用。

附图说明

[0043] 图1是高香草酸的ELISA检测反应曲线;

[0044] 图2是高香草酸的均相酶免疫反应曲线;

[0045] 图3是高香草酸均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0046] 实施例一 高香草酸免疫原的合成

[0047] 高香草酸免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)与式(II)所示的高香草酸的末端羧基连接而成,具体步骤如下:

[0048] 1.将牛血清白蛋白200mg溶解于50mL 0.2M,pH 8.5的磷酸缓冲液中;

[0049] 2.将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg高香草酸、3.5mL二甲基甲酰胺、3.5mL乙醇、7.0mL 10mM,pH 5.0的磷酸钾缓冲液、200mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30min;

[0050] 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进行纯化,得到高香草酸免疫原。

[0051] 实施例二:抗高香草酸特异性抗体的制备

[0052] 将实施例一制备得到的高香草酸免疫原采用常规方法接种实验动物兔,加强免疫后取抗血清,具体步骤如下:

[0053] 1.用PBS将上述合成的高香草酸免疫原稀释至1.0mg/mL,得到抗原溶液,然后用1.0mL抗原溶液与等量弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射。

[0054] 2.2~3周后,再用1.0mL相同的抗原溶液与等量弗氏不完全佐剂对上述实验动物

兔注射一次,之后每隔四周注射一次,共计注射4次。

[0055] 3.对步骤2的实验动物兔取血,分离纯化得到效价为1:30000~1:50000的抗高香草酸特异性抗体。

[0056] 实施例三:高香草酸的ELISA检验

[0057] 1.高香草酸的ELISA检测标准曲线的建立

[0058] (1)标准品的制备

[0059] 将高香草酸粉末(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16.00 μ g/mL、8.00 μ g/mL、4.00 μ g/mL、2.00 μ g/mL、1.00 μ g/mL和0.00 μ g/mL的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0mM Tris,145mM NaCl和0.25%的BSA。

[0060] (2)利用高香草酸的ELISA检验方法制备标准曲线

[0061] 用PBS将实施例二中所制备的抗高香草酸特异性抗体稀释成1:6000的终浓度溶液,100 μ L/孔包被在96孔酶联板上,4 $^{\circ}$ C放置12-24h;用PBS将上述包被有抗高香草酸抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200 μ L/孔的0.5%的BSA溶液,4 $^{\circ}$ C封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20 μ L/孔的标准品。再加入100 μ L/孔工作浓度的HRP-高香草酸偶联物;室温下孵育30min后PBS洗板5次;然后每孔加入100 μ L TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100 μ L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,结果如附图2所示。

[0062] 2.待测样品中高香草酸含量的检测

[0063] (1)制作待测样品

[0064] 制备方法:将高香草酸粉末(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0.00,2.00,8.00,16.00 μ g/mL,形成空白、低、中、高浓度的尿液样本。该空白尿液为不含高香草酸的健康人尿液。

[0065] (2)测试方法

[0066] 利用上述高香草酸的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。

[0067] (3)测试结果

[0068] 对照图1中所示的高香草酸的ELISA检验的标准曲线,计算每个样本中高香草酸含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中高香草酸的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0069] 表1高香草酸的ELISA检测回收实验

[0070]	尿液样品	空白	低	中	高
	样品浓度(μ g/mL)	0.00	2.00	8.00	16.00
	测试 1	0.03	2.20	8.18	16.33
	测试 2	0.02	2.07	7.96	15.86
	测试 3	0.01	1.97	8.21	16.10
[0071]	平均值(μ g/mL)	0.02	2.08	8.12	16.10
	回收率(%)	-	103.7	101.5	100.7

[0072] 由表1中结果可知:采用本发明高香草酸的ELISA检测试剂测定不同浓度样品中的高香草酸回收率都较高,均>90%,说明本发明所述的抗高香草酸特异性抗体可以用于样本中高香草酸的检测,并且结果准确度高。

[0073] 实施例四:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0074] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0075] (1) 准确称取15mg规格为100KU的G6PDH,室温溶解于12mL含有72.6mg(0.05M) Tris、8mg MgCl₂(3.3mM)和100mg NaCl的溶液中,该溶液pH=8.9,本步骤在烧杯C中进行。

[0076] (2) 在上述烧杯C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)以及0.75mL卡必醇(Carbitol)。

[0077] (3) 加热到35摄氏度,在上述烧杯C中一次性加入2mL二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO),摇匀后静置5-15s。

[0078] 2. 高香草酸的激活:

[0079] (1) 在无水状态下称取10mg上述高香草酸,溶解于600μL DMF中。

[0080] (2) 使上述溶液温度降到-10℃。

[0081] (3) 加入3μL三丁胺(tributylamine)。

[0082] (4) 加入1.5μL氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0083] (5) 加入0.1~2μL碳二亚胺EDC;5~15mg N-羟基琥珀酰亚胺;

[0084] (6) -12℃搅拌30分钟。

[0085] 值得一提的是,另选取-4摄氏度、-8摄氏度两个不同温度进行高香草酸的激活,且在室温下逐滴加入二甲基亚砷,其余条件相同。

[0086] 3. G6PDH与高香草酸的连接:

[0087] (1) 将上述激活的高香草酸溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0088] (2) 2-8℃搅拌过夜。

[0089] 4. 纯化产物:

[0090] 通过G-25凝胶层析柱纯化步骤3中的溶液,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。

[0091] 分别采用-4摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-8摄氏度(逐滴加入二甲基亚砷,室温)、-10摄氏度(35摄氏度一次性加入二甲基亚砷,摇匀静置)3个条件进行高香草酸的激活,最终得到的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的回收率为85.6%、87.5%、96.1%,回收率指的是加入的G6PDH最终生成葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的比率。

[0092] 实施例五:高香草酸均相酶免疫检测试剂的制备

[0093] 1. 试剂A的制备:将4.036g(11.25mM)氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、1.711g(11.25mM)葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)置于烧杯D中,用1L 55mM、pH=8.0的Tris缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗高香草酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比为1:2000。

[0094] 2. 试剂B的制备:将实施例四制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中,上述偶联物与Tris缓冲液的体积比为1:5000。

[0095] 实施例六:高香草酸均相酶免疫检验及结果

[0096] 1. 获得标准曲线:

[0097] (1) 设置迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0098] (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3所示。

[0099] 表2迈瑞BS-480全自动生化分析仪反应参数

[0100]	迈瑞 BS-480 参数	
	项目名称	高香草酸
	试剂 1	200μL
	试剂 2	50μL
	样本量	12μL
	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	μg/mL
	结果精度	0.01
	定标方法	Logistic-Log 5P
	标准品浓度	0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00μg/mL

[0101] 2. 样本检测:通过本发明的均相酶免疫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:将高香草酸标准品溶解于人尿液中,至浓度分别为2.00,8.00,16.00μg/mL。检测数据及数据分析见表3。

[0102] 表3样品测定及精密度和回收率评估

[0103]

尿液样品	低	中	高
样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	2.00	8.00	16.00
1	2.11	8.21	16.55
2	1.94	8.43	16.36
3	2.16	7.83	15.86
4	2.10	7.94	16.02
5	2.00	8.01	15.74
6	1.96	8.36	15.85
7	1.88	8.20	16.32
8	2.12	8.06	16.40
9	2.05	7.97	15.78
10	1.92	7.83	16.67
平均值($\mu\text{g/mL}$)	2.024	8.090	16.165
标准差 (SD)	0.09	0.20	0.32
精密度 (CV%)	4.45%	2.47%	1.98%
回收率 %	101.2	101.1	101.0

[0104] 检测结果：本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率达到95%–105%，精密度高，CV均低于5%。

[0105] 实施例七：药物干扰试验

[0106] 选取62种常见药物进行干扰检测，调整浓度至 $1.00\mu\text{g/mL}$ ，采用实施例六的均相酶免疫方法进行测定：

[0107] 1. 将待测干扰药物与实施例五制备的试剂A接触反应，再加入试剂B；

[0108] 2. 检测上述混合溶液的 OD_{340} 吸光值，根据实施例六的标准曲线得到相应物质的浓度。

[0109] 常见的62种药物名称以及测定结果具体参见表4。

[0110] 表4常见干扰药物测定结果

[0111]

ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
-----	-------	--	-----	-------	--

[0112]

ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
1	阿司匹林	0.0	32	苯丙醇胺	0.0
2	β -苯基乙胺	0.0	33	普鲁卡因酰胺	0.0
3	安非他命	0.0	34	普鲁卡因	0.0
4	氨基青霉素	0.0	35	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	36	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	37	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	38	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	39	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	40	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	41	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	42	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	43	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	44	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	45	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	46	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砒	0.0	47	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	48	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	49	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	50	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	51	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	52	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	53	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0	54	甲基二乙醇胺	0.0
24	异戊巴比妥	0.0	55	二亚甲基双氧苯丙胺	0.0
25	甲撑二氧苯丙胺	0.0	56	琥珀酸多西拉敏	0.0
26	四氢大麻酚	0.0	57	纳布啡	0.0

[0113]

ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	ID#	化合物名称	等价于高香草 酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
27	制霉菌素	0.0	58	去甲吗啡	0.0
28	乙酰吗啡	0.0	59	羟考酮	0.0
29	苡非他明	0.0	60	克他命	0.0
30	异丙嗪	0.0	61	苯海拉明	0.0
31	阿司帕坦	0.0	62	苯丁胺	0.0

[0114] 测定结果显示:上述62种常见药物等价于高香草酸的浓度均小于 $0.01\mu\text{g/mL}$ 。由此可见,本发明的抗体是抗高香草酸的特异性抗体,与其它药物无交叉反应。

[0115] 实施例八:相关性分析

[0116] 对100例临床标本分别使用高效液相色谱法和本发明的均相酶免疫法试剂进行相关性分析,测定的数据参见表5。

[0117] 表5临床样本测定值

[0118]

样本号	均相酶免疫法测定 值 ($\mu\text{g/mL}$)	高效液相色谱法 测定值 ($\mu\text{g/mL}$)
1	4.31	4.10
2	6.08	5.99
3	15.31	15.48
4	12.37	12.33
5	9.67	9.24
6	1.07	1.01
7	4.64	4.86
8	7.95	7.84
9	9.25	9.12
10	12.08	11.82
11	16.05	15.76
12	15.26	15.13
13	0.96	1.02
14	12.37	12.24
15	13.33	13.27
16	5.24	5.28
17	1.99	1.82
18	4.68	4.57
19	4.35	4.56
20	14.07	13.58
21	5.22	5.00
22	8.24	8.18

[0119]

23	6.21	6.04
24	4.25	4.25
25	7.54	7.22
26	10.21	11.54
27	15.22	14.99
28	12.23	11.98
29	6.22	6.02
30	5.24	6.06
31	7.88	7.86
32	7.24	7.14
33	9.23	9.43
34	0.54	0.58
35	8.24	8.04
36	4.05	3.97
37	8.78	8.57
38	7.21	7.16
39	6.21	6.06
40	3.11	3.08
41	12.55	12.49
42	16.00	15.86
43	11.17	10.96
44	11.21	11.09
45	15.22	15.20
46	2.35	2.36
47	15.22	15.21
48	8.77	8.60
49	10.23	10.30
50	7.24	7.04
51	9.78	9.55
52	15.00	14.94
53	2.86	2.68
54	4.34	4.17
55	7.21	7.02
56	12.02	11.77
57	14.21	13.98
58	11.21	10.97
59	1.95	1.36
60	0.90	1.03
61	4.20	3.87
62	1.55	1.24
63	12.01	12.13
64	5.35	5.22
65	10.01	9.85
66	7.94	8.03

[0120]

67	2.34	2.50
68	6.14	6.35
69	14.27	14.02
70	16.00	15.79
71	12.22	11.95
72	14.46	14.26
73	5.39	5.68
74	7.28	7.14
75	4.34	4.42
76	0.98	0.97
77	6.32	6.24
78	5.78	5.87
79	13.24	13.40
80	14.07	14.23
81	9.54	9.47
82	7.59	7.52
83	0.99	1.05
84	7.69	7.88
85	12.36	12.41
86	14.21	14.01
87	8.98	8.78
88	15.25	15.46
89	4.40	4.41
90	8.55	8.48
91	7.23	7.35
92	5.22	5.15
93	8.98	8.68
94	10.89	10.98
95	2.57	2.35
96	12.53	12.12
97	16.33	16.08
98	5.78	5.61
99	7.68	7.53
100	12.35	12.70

[0121] 对上述数据作图,参见图3,得到的线性方程为: $y=0.9949x-0.0226$,相关系数 $R^2=0.997$,表明本发明的检测试剂测定高香草酸临床标本的准确度高。

[0122] 需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

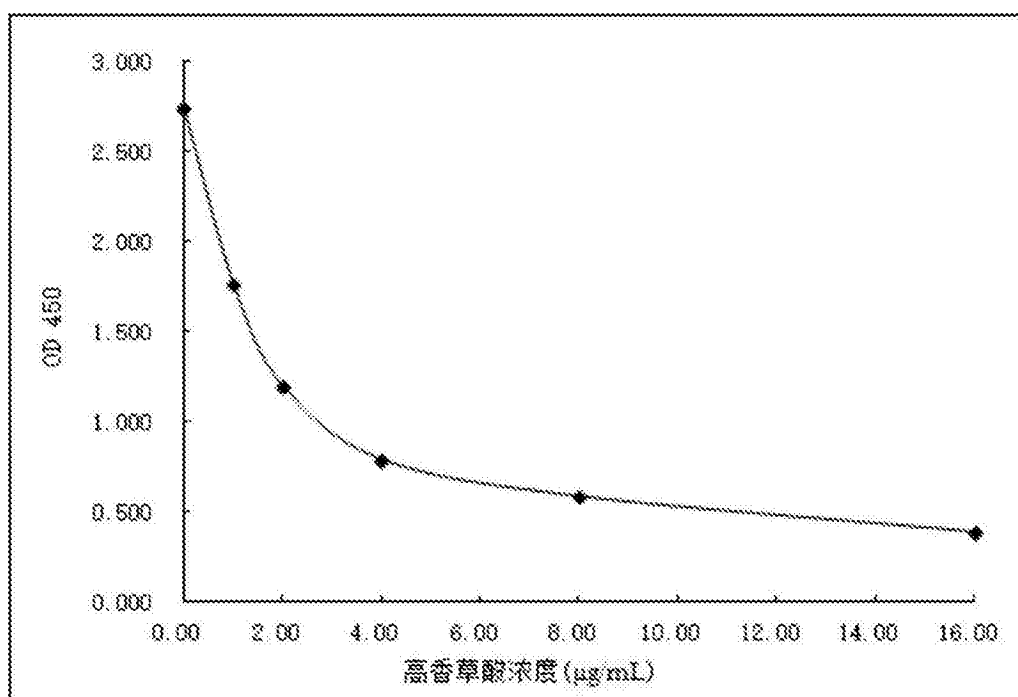


图1

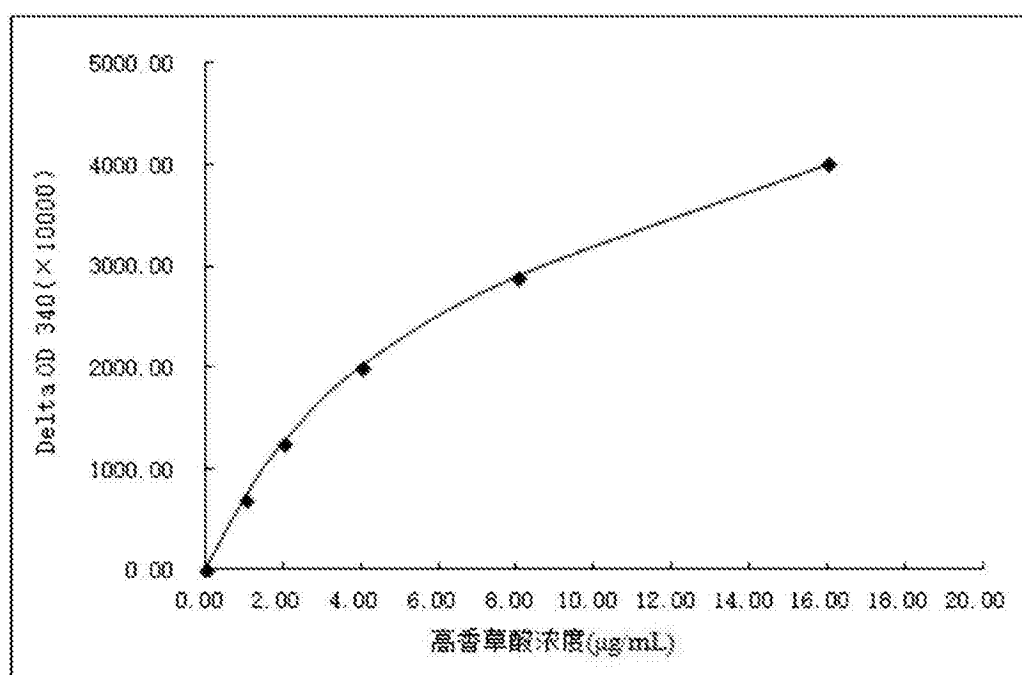


图2

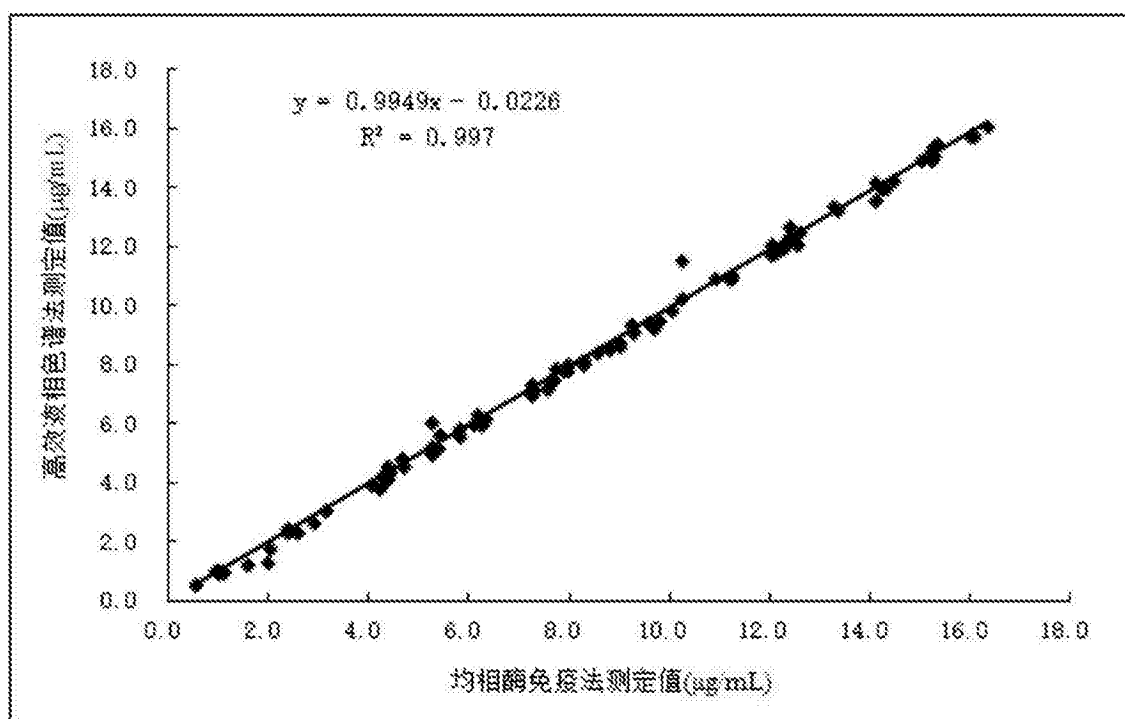


图3

专利名称(译)	高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法		
公开(公告)号	CN106596917A	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	CN201611182781.6	申请日	2016-12-19
[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	王春新		
发明人	王春新		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/554		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/531 G01N33/554		
代理人(译)	薛海霞 董建林		
其他公开文献	CN106596917B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了高香草酸均相酶免疫检测试剂、制备方法及检测方法，属于免疫检测试剂技术领域。本发明制备的高香草酸免疫原，免疫原性高，可以诱导得到高效价的抗高香草酸特异性抗体，并且与常见的62种药物无任何交叉反应；由该抗体制备得到的高香草酸检测试剂，可以精确快速地确定尿液等生物样品中的高香草酸含量。与市场上现有的检测试剂、检测方法、制备方法比较，本发明检测试剂具有操作简便、灵敏度高、特异性强、结果准确等优点，还能有效降低高香草酸检测成本，有利于临床大规模推广使用。

