

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580037166. X

[51] Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月3日

[11] 公开号 CN 101048660A

[22] 申请日 2005.8.26

[21] 申请号 200580037166. X

[30] 优先权

[32] 2004. 8. 27 [33] US [31] 10/927,823

[86] 国际申请 PCT/US2005/030794 2005.8.26

[87] 国际公布 WO2006/026601 英 2006.3.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.27

[71] 申请人 灵芝国际股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 林正义 林陈梅怡 贾 荟

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书4页 说明书51页 附图6页

[54] 发明名称

口腔液的同质酶免疫分析

[57] 摘要

本发明公开了适用于对口腔液样品中的分析物进行定性和定量测定的同质酶免疫分析系统、方法以及试剂盒。所述系统涉及使用含有葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和分析物的共轭物的竞争性酶免疫分析。所述方法和试剂盒特别适用于检测近期药物使用以及使用自动分析仪对分析物进行快速测定。

1. 确定口腔液样品中分析物含量的同质酶免疫分析系统，其中同质酶免疫分析具有 0-100ng/ml 的动态范围，且在所述动态范围内以低于 10% 的变异系数产生 0 至大于 100 毫吸收单位的吸收信号，所述系统包括水性介质，其包含：

- (a) 酶-分析物共轭物，其包含与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)；
- (b) 能与所述分析物反应的抗体；
- (c) 怀疑含有所述分析物的口腔液样品；
- (d) G6PDH 的酶作用底物；和
- (e) G6PDH 的辅酶；并且

进一步的条件是：

- (i) 所述 G6PDH 具有至少 800 单位/mg 的起始特异活性，并且由于所述 G6PDH 与所述分析物的共价连接，所述酶-分析物共轭物失活约 30% 至约 65%；以及
- (ii) 其中由于所述抗体与所述酶-分析物共轭物的分析物的结合，所述失活的酶-分析物共轭物被进一步抑制约 40% 至约 85%。

2. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统，其中所述口腔液样品被缓冲至 pH 7.2-8.3 的范围。

3. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统，其中所述口腔液样品是经过过滤或离心的。

4. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统，其中所述分析物选自合法药物、违禁药物及其类似物、衍生物与代谢物。

5. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统, 其中所述分析物选自鸦片, 阿片类镇痛剂, 安非他明, 可卡因, 美沙酮, 美沙酮代谢物, MDMA, PCP, 丙氧芬, 苯(并)二氮革类, 巴比妥类, THC, 乙醇及上述的类似物, 代谢物和衍生物。

6. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统, 其中所述 G6PDH 是从天然来源获得的。

7. 如权利要求 1 所述的同质酶免疫分析系统, 其中所述 G6PDH 是重组酶。

8. 如权利要求 2 所述的同质酶免疫分析系统, 其中所述口腔液样品的体积为约  $20\mu\text{l}$  至约  $50\mu\text{l}$ 。

9. 如权利要求 3 所述的同质酶免疫分析系统, 其中所述口腔液样品的体积为约  $20\mu\text{l}$  至约  $50\mu\text{l}$ 。

10. 使用同质酶免疫分析测定口腔液样品中分析物含量的方法, 其中所述免疫分析具有 0-100ng/ml 的动态范围, 且在所述动态范围以低于 10% 的变异系数产生 0 至大于 100 毫吸收单位的吸收信号, 所述方法包括以下步骤:

(I) 在水性介质中组合:

(a) 酶-分析物共轭物, 其包含与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH);

(b) 能与所述分析物反应的抗体;

(c) 怀疑含有所述分析物的口腔液样品;

(d) G6PDH 的酶作用底物; 和

(e) G6PDH 的辅酶; 以及

(II) 测定由于所述酶-分析物共轭物的分析物与所述口腔液样品中的分析物对所述抗体的竞争性结合而产生的所述

酶-分析物共轭物的酶活性的变化；并且  
进一步的条件是：

- (i) 所述 G6PDH 具有至少 800 单位/mg 的起始特异活性,且由于所述 G6PDH 与所述分析物的共价连接,所述酶-分析物共轭物失活约 30%至约 65%;
- (ii) 其中由于所述抗体与酶-分析物共轭物的分析物的结合,所述失活的酶-分析物共轭物被进一步抑制约 40%至约 85%; 且
- (iii) 其中所述酶活性的变化与所述口腔液样品中的所述分析物的含量相关。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述口腔液样品被缓冲至 pH 7.2-8.3 的范围。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述口腔液样品是经过过滤或离心的。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述分析物选自合法药物、违禁药物及其类似物、衍生物与代谢物。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述分析物选自鸦片,阿片类镇痛剂,安非他明,可卡因,美沙酮,美沙酮代谢物,MDMA,PCP,丙氧芬,苯(并)二氮葸类,巴比妥类,THC,乙醇及上述的类似物,代谢物和衍生物。

15. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述 G6PDH 是从天然来源获得的。

16. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述 G6PDH 是重组酶。

17. 如权利要求 11 所述的方法，其中所述口腔液样品的体积为约 20 $\mu$ l 至约 50 $\mu$ l。

18. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述口腔液样品的体积为约 20 $\mu$ l 至约 50 $\mu$ l。

19. 在测定口腔液样品中分析物含量的分析中使用的试剂盒，所述样品怀疑含有分析物，所述试剂盒在包装组合中包括以下试剂组合物：

- (a) 酶-分析物共轭物，其包含与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)；
- (b) 能与所述分析物反应的抗体；
- (c) G6PDH 的酶作用底物；和
- (d) G6PDH 的辅酶。

20. 如权利要求 19 所述的试剂盒，还包括口腔液校准物。

## 口腔液的同质酶免疫分析

### 发明领域

[0001]本发明涉及免疫分析领域。本发明提供了测定口腔液标本中分析物含量的组合物和方法，该口腔液样品怀疑含有所述的分析物。特别地，本发明的免疫分析组合物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)-分析物共轭物、与所述分析物反应的抗体、怀疑含有所述分析物的口腔液样品、酶作用底物、及 G6PDH 的辅酶。本发明还涉及用于对口腔液标本中的分析物进行测定的试剂盒，该分析使用同质免疫分析。

### 发明背景

[0002] 目前，持续需求开发新的、更简单、更快速和更灵敏的技术在怀疑含有分析物的样品中测定分析物的存在。特别是，对痕量分析物，尤其是化学物质的测定，对制药研究中的许多卫生保健应用、治疗性药物监测和药物滥用测定都至关重要。在许多情况下，需要对样品，尤其是从个体获得的生物学液体样品，进行一种或多种分析物存在的分析。例如，出于某些许可或认可，需要对来自申请人的血液、尿液或其它生物学液体样品进行检测以确定存在有乙醇或违禁药物。可以在事故之后对来自司机的样品，或根据商业许可或认可或他们的再次申请，进行检测从而确定存在有这些物质。可对接受药物治疗计划的个体样品进行筛查从而确定药物的存在。可对运动员的样品进行筛查从而确定存在有被禁止使用的物质，例如毒品，类固醇，或其它增强表现的物质。

[0003] 这些筛查可以不仅限于违禁药物等等的物质。例如，可能需要对允许住院的患者同时检查合法和违禁药物，包括镇静剂等等，从而可以给予适当的治疗或采取预防措施。这些患者有可能是无意识的或有创伤并且有可能不愿意成为志愿者，或有可能不愿意提供关于摄入了某些物质的信息。同样，也需要在某些场合对雇员，工人或其它人员进行检查，从而确定这些个体是否暴露在工作场所使用的或在工作场所附近、

或释放至环境中的各种化学物质。

[0004] 在上述情况中，通常要进行筛查从而确定在检查的个体的机体中(换言之，存在于生物液体的样品中)是否存在所检查的物质。通常，进行筛查不仅仅是确定在所述样品中是否存在可检测量的检查的物质，而且还要确定特定物质的量是否高于预定的水平。这样的水平也被称为“临界值(cutoff level)”。可通过组织机构的规定来设定这些水平，例如，雇主的规定，或通过法律，例如，对驾驶车辆的人员而言血液中乙醇的最高水平，或对体育竞赛中的竞争个体而言类固醇或其它表现增强物质的最大量进行设定。

[0005]有多种专利和出版物公开了不同的免疫分析技术(参见，例如，美国专利第 3,646,346 号和第 4,062,733 号，其采用了放射活性标记；美国专利第 3,654,090 号、第 3,791,932 号和第 3,817,837 号，其采用了酶标记；美国专利第 3,996,345 号，其采用了荧光猝灭标记；美国专利第 4,067,959 号，其采用了荧光剂或酶标记；以及美国专利第 4,160,645 号，其采用了非酶学催化剂标记)。通常，这些免疫分析都使用了抗体，其能够特异性地识别待检测的分析物，以及采用了能够响应所述抗体与分析物的结合而在信号中产生可检测变化的信号发生系统。

[0006] 特别是，美国专利第 3,817,837 号提供，为在样品中对个体的分析物的存在进行筛查，使用酶扩增分析而进行分析的常见方法，并且描述了对多种不同类型的化学物质的存在进行测定的过程，该化学物质包括合法和违禁药物。该过程涉及所述药物本身或以其含有的连接基团形式与该过程中所用的酶能够结合的竞争性结合分析。酶学活性的抑制可用来确定存在于样品中所述化学物质的存在和数量。该方法经常被称作酶放大免疫分析技术(EMIT)。本申请在此对其全文进行引用。

[0007] 在此全文引用的美国专利申请第 10/163,018 号(公开号 US-2003-0224373-A1)，描述了对多种分析物进行同时测定的同质酶免疫分析。该同质酶免疫分析根据的是酶-分析物的共轭物的形成对由酶所获得的信号进行调节。可以通过将抗体与所述酶-分析物共轭物的分析物进行结合，来实现对所述酶-分析物共轭物的酶活性进行进一步调节，即，由所述共轭物内的酶产生不同水平的信号。这样的结果可以根据抗体与

分析物的结合并引起酶的空间阻抑或酶活性的别构修饰而得到解释。检测样品中存在的分析物可以降低结合于酶-分析物共轭物的抗体的含量，并由此引起了所述酶-分析物共轭物的酶活性变化。因此，通过测定由酶所产生的信号，本领域技术人员可以将所述信号的水平和在所述检测样品中分析物的含量进行相关分析。

[0008]美国专利第 6,033,890 号、第 6,090,567 号和第 6,455,288 号公开了使用突变的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)对分析物进行免疫分析的共轭物和方法。特别是，美国专利第 6,033,890 号的发明涉及分析物或分析物类似物与突变的  $\text{NAD}^+$  依赖的 G6PDH 的共轭物的应用，该突变的  $\text{NAD}^+$  依赖的 G6PDH 在每个亚基的至少一个氨基酸上通过缺失、取代或插入或其任意组合与任意前体 G6PDH 相区别。然而，在美国专利第 6,033,890 号、第 6,090,567 号和第 6,455,288 号中，并未教导使用该发明对口腔液样品进行分析。因此，将美国专利第 6,033,890 号、第 6,090,567 号和第 6,455,288 号全文引用作为参考。

[0009]由于在尿液、血液、血清或血浆样品中具有较高的分析物浓度，这些体液代表了进行分析物检测所选择的样品。然而，这些样品受到分析的个体的隐私及其希望或需要来可视化的控制检测样品的收集，以及在收集血液、血清或血浆样品所涉及到的健康考虑(HIV，肝炎等)，通常使得对这些样品的采集难以实现。因此，更希望的是收集口腔液样品来取代尿液，血液，血清或血浆样品。

[0010]近年来，口腔液被广泛地用作制药研究、治疗性药物监测以及药物滥用检测中的标本。目前可提供的口腔液检测方法包括常规的 ELISA 和现场试纸条检测，这样的方法耗时长、劳动强度大、费用高且准确率低。

[0011]虽然免疫分析的用途广泛，但是在对从特定的样品类型、尤其是口腔液中得到的分析物进行测定时依然存在某些困难，其中的分析物浓度可能非常低。因此，尽管在美国专利第 3,817,837 号、第 6,033,890 号、第 6,090,567 号和第 6,455,288 号以及美国专利申请第 10/163,018 号中所述的技术在相当大的程度上改善了检测多种分析物的准确率，但是它们并未解决在较低分析物浓度的液体样品，例如口腔液样品中，测定

分析物存在的问题。在美国专利申请第 10/163,018 号中所述的对口腔液应用同质酶免疫分析的主要困难在于口腔液标本中较低的分析物浓度。

[0012]例如，由物质滥用与精神健康服务署(SAMHSA; Federal Register, 2004; 69(71), 19673-19719)提供的指导表明，测定限，即在口腔液样品中针对各种分析物的推荐界值都远远低于在尿液样品中的水平：

药物类别	尿液	口腔液(OF)	处理的 OF
安非他明	1000 ng/mL	50 ng/mL	12.5-25 ng/mL
可卡因代谢物	150 ng/mL	20 ng/mL	5-10 ng/mL
脱氧麻黄碱	500 ng/mL	50 ng/mL	12.5-25 ng/mL
Ecstasy(MDMA)	300 ng/mL	50 ng/mL	12.5-25 ng/mL
美沙酮	300 ng/mL	40 ng/mL	10-20 ng/mL
鸦片剂	2000 ng/mL	40 ng/mL	10-20 ng/mL
苯环利定	25 ng/mL	10 ng/mL	2.5-5 ng/mL
THC	50 ng/mL	4 ng/mL	1-2 ng/mL

[0022]然而，口腔液中较低的分析物临界值使得不可能简单地将对尿液进行测定的方法应用于对口腔液标本进行测定。由于在口腔液收集过程中还要加入某些缓冲液以保存口腔液样品，在这样的口腔液样品中测定业已很低的分析物浓度甚至更具有挑战性的。通常这样的保存过程可将分析物浓度稀释额外的 2-4 倍从而进一步降低该分析物浓度 (参见处理的 OF, 如上所述)。因此，例如，如联邦指导所述，必须实现 1-2ng/ml THC 的检测。

[0023]因此，在开发测定口腔液样品中的分析物的分析方法时，需要考虑的问题众多，而不仅仅是灵敏度。其它的考虑是存在于口腔液样品中物质的干扰或由于口腔液样品的粘度引起的干扰。以上所述的专利并未对这些问题提供解决方案。

[0024]因此，本发明的目的之一在于提供可用于快速和可靠地确定有某些特定的、相关的临界值的口腔液标本中分析物含量的分析系统、方法和试剂盒。特别是，本发明的目的之一在于提高目前可用分析的灵敏度从而达到在口腔液样品中违禁药物进行检测和确定的联邦标准。

[0025]本发明克服了现有技术中的缺陷并且提供了可用于口腔液标本中定性和定量测定出低浓度分析物的同质酶免疫分析系统、方法和试剂盒。该系统涉及竞争性酶免疫分析，其中应用了包含葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和分析物的共轭物。所述方法和试剂盒特别用于近期药物使用的测定以及使用自动分析仪快速测定分析物。

## 发明概述

[0026]在最广泛的应用中，本发明可用于在任意样品中测定任意分析物。在最局限的应用中，根据口腔液样品中游离分析物所引起的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)-分析物共轭物/抗体复合物的特异性可逆抑制，本申请提供特异用于口腔液样品的定量同质酶免疫分析。

[0027]本发明包括适于确定口腔液样品或口腔液标本中分析物含量的同质酶免疫分析系统。该系统涉及同质酶免疫分析，其具有 0-100ng/ml 的动态范围，且在所述动态范围内以低于 10%的变异系数产生了 0 至大于 100 毫吸收单位(milli-absorbant units)的吸收信号。所述系统还包括水性介质，其包含：(a) 酶-分析物共轭物，其含有与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)；(b) 能与所述分析物反应的抗体；(c) 怀疑含有所述分析物的口腔液样品；(d) G6PDH 的酶作用底物；和(e) G6PDH 的辅酶。进一步的条件是，(i) 所述 G6PDH 具有至少 800 单位/mg 的起始特异活性，且由于 G6PDH 与所述分析物的共价连接，所述酶-分析物共轭物失活约 30%至约 65%；以及(ii) 其中由于所述抗体与酶-分析物共轭物的分析物的结合，所述失活的酶-分析物共轭物被进一步抑制约 40%至约 85%。

[0028]在本发明的其它实施方案中，所述口腔液样品被缓冲至 pH 7.2-8.3 的范围。在又一个实施方案中，所述口腔液样品是经过过滤或离心的。

[0029]在本发明的一个实施方案中，所述分析物选自合法药物、违禁药物及其类似物、衍生物与代谢物。在其它实施方案中，所述分析物选自鸦片、阿片类镇痛剂、安非他明、可卡因、美沙酮、美沙酮代谢物、MDMA、PCP、丙氧芬、苯(并)二氮革类、巴比妥类、THC，

乙醇以及上述的类似物、代谢物和衍生物。

[0030]在本发明的一个实施方案中，所述 G6PDH 是从天然来源获得的。在其它实施方案中，G6PDH 是重组酶。

[0031]在本发明的一个实施方案中，所述口腔液样品的体积为约 20 $\mu$ l 至约 50 $\mu$ l。

[0032]本发明还提供了测定口腔液样品中分析物含量的方法。该方法涉及同质酶免疫分析，其具有 0-100ng/ml 的动态范围，且在所述动态范围以低于 10%的变异系数产生了 0 至大于 100 毫吸收单位的吸收信号。所述方法还包括以下步骤，(I) 在水性介质中组合：(a) 酶-分析物共轭物，其包含与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)；(b) 能与所述分析物反应的抗体；(c) 怀疑含有所述分析物的口腔液样品；(d) G6PDH 的酶作用底物；和(e) G6PDH 的辅酶；以及(II)测定由于酶-分析物共轭物的分析物和口腔液样品中分析物对所述抗体的竞争性结合而产生的所述酶-分析物共轭物酶活性的变化。并且进一步的条件是，(i)所述 G6PDH 具有为至少 800 单位/mg 的起始特异活性，且由于 G6PDH 与所述分析物的共价连接，所述酶-分析物共轭物失活约 30%至约 65%；以及(ii) 其中由于所述抗体与酶-分析物共轭物的分析物的结合，所述失活的酶-分析物共轭物被进一步抑制约 40%至约 85%；以及(iii)其中酶活性的变化与口腔液样品中的所述分析物含量相关。

[0033]本发明的方法涵盖了如上所概述的免疫分析系统的具体内容。

[0034]本发明还提供了利用本发明的方法测定怀疑含有分析物的口腔液样品中分析物含量的试剂盒，所述试剂盒在包装组合中包括一种或多种试剂组合物，该组合物包含(a) 酶-分析物共轭物，其含有与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)；(b) 与所述分析物反应的抗体；(c) G6PDH 的酶作用底物；和(d) G6PDH 的辅酶。在其它实施方案中，该试剂盒还含有口腔液校准物。

## 附图的简要描述

[0035]图 1 所示为使用口腔液(OF)同质酶免疫分析(EIA)测定安非他明含量获得的标准曲线。该图是通过实施例 7 中所得的结果作图得到

的,其中如本发明所述对含有安非他明的样品进行了分析。以安非他明的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

[0036]图 2 所示为使用口腔液(OF)同质酶免疫分析(EIA)测定苯环利定含量获得的标准曲线。该图是通过对实施例 8 中所得的结果作图得到的,其中如本发明所述对含有苯环利定的样品进行了分析。以苯环利定的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

[0037]图 3 所示为使用口腔液(OF)同质酶免疫分析(EIA)测定鸦片剂含量获得的标准曲线。该图是通过对实施例 10 中所得的结果作图得到的,其中如本发明所述对含有鸦片剂的样品进行了分析。以鸦片剂的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

[0038]图 4 所示为使用口腔液同质酶免疫分析测定可卡因代谢物含量获得的标准曲线。该图是通过对实施例 12 中所得的结果作图得到的,其中如本发明所述对含有可卡因代谢物的样品进行了分析。以可卡因代谢物的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

[0039]图 5 所示为使用口腔液(OF)同质酶免疫分析测定 Ecstasy(MDMA)含量获得的标准曲线。该图是通过对实施例 13 中所得的结果作图得到的,其中如本发明所述对含有 Ecstasy(MDMA)的样品进行了分析。以 Ecstasy(MDMA)的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

[0040]图 6 所示为使用口腔液(OF)同质酶免疫分析(EIA)测定美沙酮代谢物(EDDP)含量获得的标准曲线。该图是通过对实施例 14 中所得的结果作图得到的,其中如本发明所述对含有美沙酮代谢物(EDDP)的样品进行了分析。以美沙酮代谢物(EDDP)的浓度对 X-轴作图,以 340nm 的吸收值对 Y-轴作图。

## 定义

[0041]在本申请中所使用的:

[0042]“约”是指具体值加或减 10% 的值范围。例如,短语“约 200”包括 200 的加或减 10%, 或为 180-220。

[0043]“吸收值”或“吸收信号”是指在分光光度计或类似装置中测

定的信号。该信号被称作‘吸收单位’或‘毫吸收单位’。

[0044]“分析物”是指其在样品或标本中的存在或浓度需要被测定的物质、化合物或组合物。在本申请的上下文中，“分析物”可用作“分析物和/或半抗原”的替换从而使得行文流畅并且减少赘述。其与在美国专利第 3,817,837 号中所使用的单词“配体”是等同的。更特别地，当在酶-分析物共轭物的上下文中进行使用时，该术语可包括药物、该药物的代谢物，或该药物的代表性表位。分析物可以是单表位或多表位的。

[0045]“抗体”是指功能性定义为结合蛋白的蛋白(能够结合于抗原上特异表位的分子)以及结构性定义为含有从免疫球蛋白编码基因框架区衍生出的可以为本领域技术人员识别的氨基酸序列。其包括了全部抗体，抗体的功能性片断、修饰物或衍生物。其可以是遗传操作的产物或嵌合抗体，例如人源化抗体。抗体可以是多克隆混合物或单克隆抗体。抗体可以从天然来源或重组来源衍生而来的完整免疫球蛋白，并且可以是具有免疫反应性的完整免疫球蛋白的一部分。抗体可以多种形式存在，包括，例如，Fv，Fab，以及 F(ab)<sub>2</sub>，以及单链。还可以使用单链抗体，其中可将针对于重链和轻链的基因合并成单一的编码序列。

[0046]“与分析物反应的抗体”是指该抗体在其表面或孔洞中具有这样的区域，该区域能够特异性地结合于特定的分析物，即，其具有对所述分析物的结合亲和性(通常表达为  $K_a$ )。

[0047]“生物学液体”是指来自宿主的液体且包括全血、血清、血浆、尿液、泪液、粘液腹水(mucus ascites fluid)、口腔液、精液、粪便、痰液、脑脊液和胎液(fetal fluid)。

[0048]“生物样品”是指从活的或死亡的有机体获得的任意样品。生物样品的实例包括生物学液体标本。

[0049]“校准材料”是指含有公知量待测定分析物的任意标准或参考材料。

[0050]“变异系数”或“CV”或“%CV”是指标准差除以平均值。

[0051]“辅酶”或“辅因子”是指酶催化反应所必需的底物。

[0052]“竞争性分析”是指这样的分析，其中结合于酶-分析物共轭物的抗体竞争与检测样品中的分析物的结合。对这两种分析物而言，存

在于检测样品和酶-分析物共轭物中的“分析物”都可以同时或顺序地加入抗体或受体溶液中。

[0053] “共轭”是这样的过程，其中两个亚基连接到一起形成了共轭物，特别是，在本发明的上下文中，形成了酶-分析物共轭物。

[0054] “共价连接”是指连个分子相互连接。

[0055] “临界值”，“临界的浓度”或“临界浓度”是指处于或高于预定浓度的待测给定分析物的浓度。临界值是指由政府机构或政府主体，例如管理运动的政府主体的规范或标准确定的浓度。由国家药物滥用研究院(NIDA)和由药物滥用与精神健康服务署(SAMHSA)同样也可提供临界值的指导。

[0056] “失活的”或“失活”是指分析物在结合，共价连接或共轭于酶之后，能够降低或减少酶活性的能力。特别是，在本发明中，在分析物共轭于 G6PDH 之后，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的活性被失活。

[0057] “药物”是指物质、化合物或组合物，其包括了用于医疗或医药效用的合法和违禁药物、物质以及用于产生麻醉或其它成瘾性质的物质。在本说明书中，术语“药物”也可以指待测定的化学物质，其并非被局限地认为是药物，但其可被运动员出于增强表现效果(包括营养物质)的目的而使用，且由此需要从运动员的样品中进行筛查来确定其存在。这样的物质包括，例如，氨基酸、类固醇和激素等等。

[0058] “动态范围”是指待测定分析物浓度的范围。

[0059] “酶-分析物共轭物”是指在感兴趣的酶，例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与分析物之间的共价融合或共价连接。

[0060] “酶作用底物”是指适合酶的底物，例如，葡萄糖-6-磷酸(G6P)是 G6PDH 的底物。

[0061] “赋形剂”是指用作稀释剂的惰性物质。

[0062] “G6PDH”是指葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，其既可以从天然来源，例如天然或突变的形式的酵母、细菌或真菌中获得，又可以通过重组方法制备。在本说明中，“G6PDH”包括了在天然种群中发现的正常的别构变异，以及通过重组技术引入的改变。在这一定义之内包括了可通过将葡萄糖-6-磷酸和 NAD(或 NADP)转化成 6-P-葡萄糖醛酸和 NADH(NADPH)

的蛋白质和多肽。本领域技术人员应该理解可以多种方式，包括氨基酸的添加，缺失和替代对 G6PDH 蛋白或 G6PDH 多肽进行修饰。

[0063] “半抗原”是指具有适当官能团的修饰药物或分析物，因此其可共价地连接于所希望的蛋白从而形成免疫原或酶共轭物等。

[0064] “违禁药物”是指其制备、拥有、使用或供应均是违法的物质、化合物或组合物。

[0065] “抑制”是指在当结合于分析物所具有的表位上时，抗体或受体能够抑制酶或酶-分析物共轭物活性的能力。

[0066] “配体”是指任意有机化合物，其中可存在有天然的受体或从中制备天然的受体。

[0067] 短语“测定分析物量”的同义短语也包含在本发明的范围中，并包括，但不限于，检测、测定或确定分析物；检测、测定或确定分析物的存在；检测、测定或确定分析物的含量。

[0068] “毫-吸收单位”或“mA”是指千分之一的吸收单位。

[0069] “合法药物”是指其制备、拥有、使用或供应均是合法的物质、化合物或组合物。

[0070] “连接基团”是指将两个或更多结构连接起来的结构部分，连接基团具有至少一个所述结构之间伸展的未被破坏的原子链。

[0071] “NAD”或“NAD<sup>+</sup>”是指烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸，G6PDH 的辅酶。

[0072] “NADH”是指还原的烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸。其通过监测分光光度计 340nm 波长的吸收，即，NADH 的特征性吸收区域来进行测定。

[0073] “NADP”或“NADP<sup>+</sup>”是指烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸磷酸，G6PDH 的辅酶。

[0074] “NADPH”是指还原的烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸磷酸。

[0075] 来自于“天然来源”或“天然发生”G6PDH 的 G6PDH 是指从天然来源，包括，但不限于，细菌、酵母、真菌、脊椎动物以及哺乳动物纯化而来的 G6PDH。

[0076] “口腔液”是指生物学液体，例如，唾液，其可从个体的口腔

区域获得。

[0077] “受体”是指能够识别分子的特定空间和极性组织，即配体上的表位或决定簇位点的任意化合物或组合物。

[0078] “与分析物反应的受体”是指该受体在其表面或孔洞中具有这样的区域，该区域能够特异性地结合于特定的分析物，即，其具有对所分析物的结合亲和性(通常表示为  $Ka$ )。

[0079] “重组酶”或“重组 G6PDH”是指通过重组 DNA 技术产生的酶(或 G6PDH)，其中将编码该酶(或 G6PDH)的 DNA 导入适于表达这些 DNA 的宿主中，且其中对由这些宿主所产生的酶(或 G6PDH)蛋白进行纯化。

[0080] “灵敏度”被用来表示检测极限的灵敏性，即，能够产生与从缺乏分析物所得的信号相区别的信号的最低分析物含量。

[0081] “信号产生系统”是指能够产生与分析物的存在或含量相关联信号的系统。信号产生系统具有至少两种组分：(1)催化组分和(2)底物组分，其经历了由催化组分所催化的反应，并直接或间接地导致了产物的产生，该产物产生了可检测的信号。具有催化活性的部分可以是酶学的或非酶学的，优选为酶学的，例如 G6PDH。信号产生化合物可以提供电磁信号，例如，分光光电作用或可视的、电化学或电子可检测的信号。

[0082] “起始特异性活性”是指未共轭于或连接于分析物的天然或重组酶，例如 G6PDH 的酶活性。

## 参考的引用

[0083]在本说明书中引用的全部出版物和专利申请在此被全文引用作为参考，就像每个单独的出版物或专利申请被特别地或单独地指明作为参考引用一样。

## 发明详述

[0084]本发明提供了信号产生系统，其能够在怀疑含有分析物的样品中产生与分析物的存在和含量相关的信号。本发明与那些之前所述的对尿液、血清或血浆标准进行检测的信号产生系统具有某些相似性。然而，

本发明的信号产生系统与其它系统的区别在于，其提高的灵敏度能够在分析物以较低浓度存在的口腔液中，进行诸如鉴定分析物的应用中相当有效。

[0085]作为本发明的目的，所述信号产生系统包括至少一种酶和至少一种底物，并且可以包括两种或更多种酶以及多种底物。特别是，本发明提供了在口腔液样品中测定分析物含量的同质酶免疫分析系统。总体上，本发明的免疫分析是按如下描述工作的：提供 G6PDH，且(通过测定由 G6PDH 产生的 NADH 或 NADPH)确定其起始特异活性，或者通过 G6PDH 的供应商提供。G6PDH 分别将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)转变成 NADH 或 NADPH，从而产生了可在 340nm 被分光光度测定的吸收变化。然后，将 G6PDH 共价地连接于分析物，得到 G6PDH-分析物共轭物。由于与分析物的共价连接，G6PDH-分析物共轭物的 G6PDH 酶活性有所降低。这种酶活性的降低可称为‘失活’。然后，将能与分析物反应的抗体或受体结合于 G6PDH-分析物共轭物的分析物。抗体或受体的结合导致了 G6PDH 活性的进一步降低。这种进一步的降低称为‘抑制’，从而与失活相区别。在加入含有与连接于 G6PDH 的相同分析物的样品之后，原先结合于 G6PDH-分析物共轭物的一些抗体或受体则结合于该样品中的游离分析物，并且释放出导致 G6PDH 活性升高的 G6PDH-分析物共轭物。这样的升高称为‘可逆性抑制’。一旦进行了校正，如上所述，样品中的分析物浓度就可按照升高的 G6PDH 酶活性进行测定。因此，所述分析是基于样品中 G6PDH-分析物共轭物与游离分析物对固定含量的特异性抗体或受体之间的竞争来进行的。下文中将同质酶免疫分析的单独成分和参数进行详细地描述。

### 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)

[0086]本发明提供了包括酶-分析物共轭物的同质酶分析系统，该酶-分析物共轭物包含酶和分析物。在本发明的优选实施方案中，所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)。G6PDH 可以利用诸如那些得自肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、醋酸杆菌(*A. suboxydans*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、假单胞菌 W6(*Pseudomonas W6*)、*H. eutropha H-16*、敏

捷氢单胞菌(*Hydrogenomonas facilis*)、节杆菌 7C(*Arthrobacter 7C*)、*A. beijerickii*、氧化亚铁硫杆菌(*T. ferrooxidans*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、脱氮假单胞菌(*P. denitrificans*)、新月柄杆菌(*C. crescentus*)、乳酸明串珠菌(*L. lactis*)和球形红假单胞菌(*R. spheroids*)的  $\text{NADP}^+$ 和  $\text{NAD}^+$ 。或者，G6PDH 可以是利用诸如那些得自荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)的  $\text{NAD}^+$ 作为优选辅因子，以及得自 *P. multivorans* 的 G6PDH 的一种，或者可以是  $\text{NAD}^+$ 特异性的，例如那些得自木质醋酸菌(*A. xylinum*)的 G6PDH 中的一种。

[0087]例如，肠膜明串珠菌葡萄糖 6-磷酸脱氢酶是二聚酶，其具有利用  $\text{NAD}^+$ 或  $\text{NADP}^+$ 将 D-葡萄糖-6-磷酸氧化成 D-葡糖酸- $\delta$ -内酯-6-磷酸的能力。利用  $\text{NAD}^+$ 的这一性质可将这些酶与人的 G6PDH 区别开来，人的 G6PDH 仅能有效地利用  $\text{NADP}^+$ ，并且允许在存在人 G6PDH 的情况下测定肠膜明串珠菌-特异性的 G6PDH 活性，以人类样品为例。得自肠膜明串珠菌的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶已被用于目前的 EMIT 同质免疫分析中(EMIT 是 Syva 公司(现为 Dade-Behring)的注册商标, Palo Alto, 加利福尼亚州, 美国)。

[0088]可从中进行编码 G6PDH 的 DNA 选择的两个优选属的细菌是明串珠菌属(*Leuconostoc*)和酵单胞菌属(*Zymomonas*)。在这些属中，肠膜明串珠菌(*L. mesenteroides*)、柠檬明串珠菌(*L. citreum*)、乳酸明串珠菌(*L. lactis*)、葡聚糖明串珠菌(*L. dextranicum*)和运动发酵单胞菌(*Z. mobilis*)是优选的，而肠膜明串珠菌(*L. mesenteroides*)、柠檬明串珠菌(*L. citreum*)、乳酸明串珠菌(*L. lactis*)是特别优选的。因为来自明串珠菌属的 G6PDH 不含有半胱氨酸残基，其优选地适于突变策略，可向其中引入一个或多个半胱氨酸。

[0089]在将其全文引用作为参考的美国专利第 6,033,890 号的表 1 中，描述了各种明串珠菌种的示例性菌株。这些菌株纯粹是示例性的，且并非旨在将本发明说明书范围内对 G6PDH 使用的选择局限于任意特定的属、种或菌株。在对 G6PDH 进行的选择中，最优选的菌株是肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)ATCC 12291，柠檬明串珠菌(*Leuconostoc citreum*)NCIMB 3351，乳酸明串珠菌(*Leuconostoc lactis*)NCDO 546 以及

葡聚糖明串珠菌(*Leuconostoc dextranicum*) ATCC 19255。

[0090]其它适于在本发明中使用的 G6PDH 包括,但不限于那些在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) M1286 (Heilman et al., *Eur. J. Biochem.* (1988) vol. 174, 485-490) 的 G6PDH; 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)(Jeffrey et al., *Biochemistry*, (1985) vol. 24, 666- 671) 的 G6PDH; *Pichia jadinii*(Jeffrey et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (1989) vol. 160:3, 1290- 1295) 的 G6PDH, 大肠杆菌(*E. coli*) K-12 (Rowley et al., *J. Bacterid.*, (1991) vol. 173:3, 968-977) 的 G6PDH, 以及来自于人类 (Bhadbade et al., *FEBS Lett.* (1987) vol. 211, 243-246)的 G6PDH。

[0091]在适合对口腔液样品中较低分析物浓度进行测定的本发明同质免疫分析中,需要对若干因素进行考虑才能达到上述分析的灵敏度。这些因素包括:(1)天然 G6PDH(即,在与分析物共轭之前)的起始特异活性,(2)酶-分析物共轭物的酶活性(即,%失活),(3)针对所述分析物的抗体或受体的亲和性( $K_a$ ),(4)结合有能与所述分析物反应的抗体或受体的酶-分析物共轭物的活性(即,%抑制),(5)释放出抗体或受体的酶-分析物共轭物的活性(即,由于抗体或受体竞争性地结合于样品中的游离分析物而导致的可逆抑制),(6)口腔液样品的稀释,(7)缓冲成分,以及(8)口腔液样品体积。

[0092]通常,天然 G6PDH 的起始特异活性越高,即,与分析物共轭之前的活性,则所述分析的灵敏度也越高。本发明的目的之一是提供具有最低起始特异活性的 G6PDH。因此,在本发明的一个实施方案中,G6PDH 的起始特异活性处于约 500 单位/mg 至约 2,000 单位/mg 的范围,优选处于约 600 单位/mg 至约 1,500 单位/mg 的范围,且更优选为处于约 700 单位/mg 至约 1,000 单位/mg 的范围。在本发明的一个优选实施方案中,G6PDH 具有的起始特异活性为至少约 800 单位/mg。在又一个优选实施方案中,G6PDH 具有的起始特异活性为至少约 900 单位/mg。

## G6PDH 底物

[0093]本发明测定了 G6PDH、G6PDH-分析物共轭物,结合有抗体的 G6PDH-分析物共轭物以及有待检测样品中分析物竞争结合的具有抗

体的 G6PDH-分析物共轭物的酶活性。酶活性的确定依赖于适合于 G6PDH 的底物和辅酶。适合于 G6PDH 的底物是葡萄糖-6-磷酸(G6P)。适合于 G6PDH 的辅酶或辅因子是 NAD(NAD<sup>+</sup>)和 NADP(NADP<sup>+</sup>)。G6PDH 可将 G6P 和辅酶分别转化成 6-P-葡糖醛酸和 NADH 和 NADPH。因此,一般地,为了测定 G6PDH 的活性,需要向所述分析中加入 G6P 和 NAD<sup>+</sup> 或 NADP<sup>+</sup>。还可使用辅因子类似物,例如硫代-NAD<sup>+</sup>, 硫代-NADH, 硫代-NADP<sup>+</sup>或硫代-NADPH。

[0094]通常,并不会对 G6PDH 的底物和辅酶或辅因子进行标记,而由 G6PDH 所产生的信号,即 NADPH 或 NADH 的含量,是如本发明所述在分光光度计中测定的。或者,可对所述底物或辅酶进行标记,并通过其它方式,根据所述标记,例如荧光计或闪烁计数器等,来测定由 G6PDH 所产生的信号。

### 天然来源的 G6PDH

[0095]不同的 G6PDH 酶,即,来自不同物种的 G6PDH,通常都具有不同的特异性酶活性。本发明的目的之一在于提供具有最低起始特异活性的 G6PDH。因此,在本发明的一个实施方案中,G6PDH 的起始特异活性处于约 500 单位/mg 至约 2,000 单位/mg 的范围,优选处于约 600 单位/mg 至约 1,500 单位/mg 的范围,且更优选为处于约 700 单位/mg 至约 1,000 单位/mg 的范围。在本发明的一个优选实施方案中,G6PDH 具有的起始特异活性为至少约 800 单位/mg。在又一个优选实施方案中,G6PDH 具有的起始特异活性为至少约 900 单位/mg。

[0096]为了提供具有所希望起始特异活性的 G6PDH 酶,本发明涉及使用来自天然或重组来源的 G6PDH,或指定位点的突变体,并且可以使用任意的异构体,指定位点的突变体或异构体和指定位点突变体的混合物。

[0097]若干公知的来自不同物种的 G6PDH 酶可见于美国专利第 6,033,890 号和 Levy (Adv. Enzym. (1979) vol. 48, 97-192)的文献中。采用以下方法对来自天然来源的 G6PDH 进行纯化是本领域所属技术人员公知的。

### 来自重组来源的 G6PDH

[0098]在本发明的一个实施方案中，G6PDH 是重组 G6PDH。应用于产生重组 G6PDH 的基本分子生物学技术，即，诸如 DNA 和质粒纯化，限制性酶消化，DNA 连接，通过聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行纯化和表征，DNA 的标记和杂交，Southern 印迹，转化，细菌菌株的维持与生长，蛋白表达和蛋白纯化的方法，以及其它常用的技术在文献中有详细描述。具体地，分子生物学的常见技术可以参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T 等人编纂的，由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 于 1989 年出版的 *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 第二版，或 Bernard Perbal 编纂的，由 John Wiley & Sons, New York 于 1984 年出版的 “A Practical Guide to Molecular Cloning” 两本著作。

[0099]通常，可将编码需要的 G6PDH 的 DNA 克隆入表达载体，并转化至适当的宿主细胞中，其可表达所述重组的 G6PDH。然后可使用本领域技术人员公知的方法对重组 G6PDH 进行纯化。本发明对重组 G6PDH 酶进行了表述，这些酶包括，但不限于，来自肠膜明串珠菌 (*L. mesenteroides*) (Adams et al., *J. Biol. Chem.*, (1983) vol. 258:9, 5867-5868; Murphy et al., *J. Bacteriol.*, (1987) vol. 169:1, 334-339; Lee et al., *J. Biol. Chem.*, (1991) vol. 266:20, 13028-13034); 运动发酵单孢菌 (*Z. mobilis*) (Barnell et al., *J. Bacteriol.*, (1990) vol. 172:12, 7227- 7240); 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) M1286 (Heilmann et al., *Eur. J. Biochem.*, (1988) vol. 174, 485- 490); 及 *E.coli* K-12 (Rowley et al. *J. Bacteriol.*, (1991) vol. 173:3, 968-977) 的 G6PDH。

### 突变的 G6PDH 酶

[0100]通过使用不同形式的 G6PDH，可根据所要确定的分析物浓度对本发明免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的又一实施方案中，所述 G6PDH 是突变的 G6PDH。因此，可使用本领域公知的分子 DNA 克隆技术产生与来自于任意天然发生的 G6PDH 不同的 G6PDH。因此可产生具有氨基酸替代、缺失或插入或其任意组合的 G6PDH (参见美国专利第

6,033,890 号)并将其应用于本发明的方法之中。

### 商业可获得的 G6PDH

[0101]多种来源的 G6PDH 同样是也商业获得的,例如,可得自 Sigma, Biochemica, Boehringer Mannheim, USB Biochemical 以及 OYC International Inc.

### 适合用于本发明的其它酶

[0102]本发明提供了包含酶和分析物的酶-分析物共轭物。在本发明的优选实施方案中,所述酶是 G6PDH。在本发明的其它实施方案中,所述酶是除 G6PDH 之外的酶。可适用于本发明并将 NAD(NAD<sup>+</sup>)用作辅酶且产生 NADH 的其它酶包括乙醇脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、乳酸脱氢酶以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶。可适用于本发明并将 NADP(NADP<sup>+</sup>)用作辅酶且产生 NADPH 的其它酶包括谷胱甘肽还原酶、奎宁还原酶、硝酸还原酶和谷氨酸脱氢酶。此外,大量可用于本发明所述方法中的酶和辅酶已公开于美国专利第 4,275,149 号和第 4,318,980 号,在此将其全文引用作为参考。使用一种或多种上述的酶可进一步提高本发明免疫分析的灵敏度。

### 分析物

[0103]本发明提供了包含酶和分析物的酶-分析物共轭物。因此,所述分析物可连接于或共轭于诸如 G6PDH 的酶,或者游离于样品中。本发明的分析物可以是其在样品或标本中的存在或浓度是待测定的任意物质、化合物或组合物。

[0104]分析物可以是多表位或单表位的。单表位分析物通常具有约 100-5,000 的分子量,优选为从 125-2,000 的分子量。应用于本发明中的多表位分析物通常具有至少 5,000 的分子量,优选为至少约 10,000 的分子量。感兴趣的多聚氨基酸分析物包括蛋白、多肽和肽,且通常具有约 5,000-5,000,000 的分子量,优选为约 20,000-1,000,000 的分子量。

[0105]以下分析物也包括在本发明的范围之内:合法和违禁药物,糖

类(包括,但不限于,单-,双-和聚碳水化合物),氨基酸,肽,核酸,核苷,核苷酸,维生素,激素,类固醇,抗生素,细菌或微生物抗原,毒素,化学和生物学战剂,杀虫剂,除草剂,以及工业化学品和污染物质。包括在这些类别中的还有这些化合物的类似物,衍生物和代谢物。

[0106]可以使用本发明在样品中测定其存在和浓度的分析药物包括,但不限于,鸦片,阿片类镇痛剂(opioid analgesics),生物碱,儿茶酚胺(catecholamines),肾上腺素(epinephrine),安非他明(amphetamines),巴比妥类(barbiturates),苯并二氮革(benzodiazepines),心脏药物,抗癫痫药,免疫抑制剂,四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(THC,大麻的活性成分),可卡因,可卡因代谢物((苯甲酰爱康宁, benzoylecgonine),快克(一种经过高度化学提纯的可卡因药丸)(crack),吸入剂(例如,硝酸戊酯或硝酸丁酯),苯环利定(phencyclidine, PCP), 3,4-亚甲二氧基甲基安非他明(3,4-methylenedioxyamphetamine, MDMA, 或 ecstasy)及其相关化合物,例如 3,4-亚甲二氧基安非他明(3,4-methylenedioxyamphetamine, MDA)和 3,4-亚甲二氧基乙基安非他明(3,4-methylenedioxyethylamphetamine, MDEA), 克他命(ketamine), 麦角酰二乙胺(lysergic acid diethylamide)(LSD),  $\gamma$ -羟基丁酸(GHB), 安眠酮(methaqualone)(也称为喹唑酮(quinazolinone)), 镇静剂,乙醇等。包括在这些类别中的还有这些化合物的类似物、衍生物和代谢物。

[0107]在本发明的优选实施方案中,所述分析物是阿片类镇痛剂。阿片类镇痛剂包括,但不限于,鸦片,吗啡,海洛因,可待因,二氢可待因(DF-118),氢化吗啡酮,芬太奴,氧可酮,丁丙诺啡叔丁啡,布托啡诺,环丁甲羟氢吗啡,美沙酮,6-二甲氨基-4,4-二苯基庚子酮盐酸盐,哌鱼替啶,dioconal, palium, 右旋吗酰胺,二苯哌己酮,非那多松,丙氧芬(达尔丰®),右旋丙氧芬,哌鱼替啶,哌醋甲酯(利他林)和乙酰美沙醇。本实施方案中还包括这些阿片类镇痛剂的类似物,代谢物和衍生物。

[0108]在本发明的又一实施方案中,所述分析物是生物碱。可使用本发明进行测定的生物碱包括,但不限于,类固醇生物碱, iminazolyl 生物碱,异喹啉生物碱,喹啉生物碱(包括喹啉),以及双萜生物碱。本实施方案中还包括这些生物碱的类似物、代谢物和衍生物。

[0109]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是儿茶酚胺。儿茶酚胺包括，但不限于，可他宁，罂粟碱，诺司卡品和罂粟碱肾上腺素，L-多巴和肾上腺素。本实施方案中还包括这些儿茶酚胺的类似物、代谢物和衍生物。

[0110]在本发明的又一个实施方案中，所述分析物是安非他明或相关化合物。安非他明或相关化合物包括，但不限于，安非他明，脱氧麻黄碱等。本实施方案中还包括这些安非他明或相关化合物的类似物、代谢物和衍生物。

[0111]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是巴比妥类。巴比妥类包括，但不限于，巴比妥，戊巴比妥(耐波他)，异戊巴比妥，司可巴比妥(速可眠)，苯巴比妥，和硫巴比妥等。本实施方案中还包括这些巴比妥类的类似物、代谢物和衍生物。

[0112]在本发明的又一个实施方案中，所述分析物是苯并二氮革类。苯并二氮革类包括，但不限于，安定(Valium)，甲氧二氮革(利眠宁)，硝西洋(Mogodon,硝基安定)和替马西洋。本实施方案中还包括这些苯并二氮革类的类似物，代谢物和衍生物。

[0113]在本发明的优选实施方案中，所述分析物是迷幻剂。迷幻剂包括，但不限于，酶斯卡灵，赛洛西宾，右旋吗酰胺(右旋摩拉胺)，LSD，MDA(3,4-亚甲二氧基安非他明)，Ecstasy(MDMA, 3,4-亚甲二氧基甲基安非他明)，MDEA(3,4-亚甲二氧基乙基安非他明)，PMA(对甲氧基安非他明，para-methoxyamphetamine)，PMMA(对甲氧基甲基安非他明，para-methoxymethylamphetamine)和PCP(苯环利定)。本实施方案中还包括这些迷幻剂的类似物，代谢物和衍生物。

[0114]在本发明的另一个实施方案中，所述分析物是心脏药物。心脏药物包括，但不限于，地高辛，洋地黄毒甙，N-乙酰普鲁卡因胺，普鲁卡因胺，奎尼丁和利多卡因。本实施方案中还包括这些心脏药的类似物、代谢物和衍生物。

[0115]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是抗癫痫药。抗癫痫药包括，但不限于，苯妥英(phenytoin)，苯巴比妥，普里米酮(primidone)，丙戊酸，乙琥胺和卡马西平。本实施方案中还包括这些抗癫痫药的类似

物、代谢物和衍生物。

[0116]在本发明的另一个实施方案中，所述分析物是免疫抑制剂。免疫抑制剂包括，但不限于，MPA(霉酚酸)，环孢多肽，雷帕霉素(西罗莫司)和FK506(他克莫司)。本实施方案中还包括这些免疫抑制剂的类似物、代谢物和衍生物。

[0117]其它包含于在本发明中的分析物是维生素和膳食添加剂，例如叶酸，硫胺，维生素B<sub>12</sub>，生物素，维生素A，维生素B，维生素C，维生素D，维生素E，维生素K，诸如甲丙氨酯和三环抗抑郁药的镇静剂，食品添加剂以及其它增强表现的制剂。本实施方案中还包括这些化合物的类似物、代谢物和衍生物。

[0118]在本发明的又一个实施方案中，所述分析物是氨基酸。可测定其存在的氨基酸包括，但不限于，甘氨酸，丙氨酸，丝氨酸，组氨酸和甲硫氨酸。本实施方案中还包括这些氨基酸的类似物、代谢物和衍生物。

[0119]在一个实施方案中，所述分析物是抗生素。抗生素包括，但不限于，青霉素，氯霉素，放线菌素，四环素，土霉素，庆大霉素，卡那霉素，土布霉素(tobromycin)，妥布霉素，乙基西梭霉素，氨丁卡霉素和万古霉素。本实施方案中还包括这些抗生素的类似物、代谢物和衍生物。

[0120]在本发明的又一个实施方案中，所述分析物是微生物抗原。微生物抗原包括，但不限于，艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*)抗原，毒素A和黄曲霉毒素B<sub>1</sub>。本实施方案中还包括这些微生物抗原的类似物、代谢物和衍生物。

[0121]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是激素。激素包括，但不限于，甲状腺激素(T3和T4)，甲状腺素，促甲状腺激素，雌激素，孕酮，睾酮，催乳素，促卵泡素，绒毛膜促性腺激素和黄体素。本实施方案中还包括这些激素的类似物、代谢物和衍生物。

[0122]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是类固醇。类固醇包括，但不限于，多种雌激素和雄激素，例如乙炔雌二醇，睾酮和雄甾酮。本实施方案中还包括这些类固醇的类似物、代谢物和衍生物。

[0123]在本发明的一个实施方案中，所述分析物是化学或生物战争毒剂。化学或生物战争毒剂包括，但不限于，芥子气，沙林，塔崩，炭疽

杆菌(炭疽)抗原和天花病毒抗原。本实施方案中还包括这些化学或生物战争毒剂的类似物、代谢物和衍生物。

[0124]在本发明的一个实施方案中,所述分析物是工业化学物质。工业化学物质包括,但不限于,调味剂,食品添加剂,防腐剂,食品污染物,空气和化学污染物,杀虫剂和除草剂。本实施方案中还包括这些工业化学物质的类似物、代谢物和衍生物。

## 共轭

[0125]本发明提供了酶-分析物共轭物,其包含与分析物共价连接或共轭的酶。在优选实施方案中,G6PDH共轭于所述分析物从而产生G6PDH-分析物共轭物。与诸如G6PDH的酶的共轭反应,受多种因素影响。这些因素包括,但不限于,pH,温度,缓冲液,离子强度,能够保护酶活性位点的物质,助溶剂的量和类型,反应时间和活化化学。对这些变量的适当操作可以获得在以下一种或多种性质中有所改善的G6PDH-分析物共轭物:1)降低的失活;2)更大的标准曲线;3)提高的分析精确度;或4)增强的热稳定性。

[0126]可通过本领域公知的常规化学反应完成共轭。其中,将分析物(或半抗原)与G6PDH连接的最简单的反应是通过肽键(-CONH<sub>2</sub>)的形成。例如,使用分析物(或半抗原)上的羧基基团(-COOH)与G6PDH酶上的氨基基团(-NH<sub>2</sub>)反应(Biochem. and Biophys. Res. Comm., (1989) vol. 160:3, 1290-1295)。据报道,来自肠膜明串珠菌的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶含有总计38个赖氨酸残基(Levy, Adv. Enzym, (1979) vol. 48, 97-192; FEBS Lett. 211 :2, 243-246, 1987)。在适当的连接条件下,可以容易地对来自于这些赖氨酸半族的ε-氨基基团进行修饰。因此,会有分析物(或半抗原)的多个分子和/或多个分析物(或半抗原)共轭于G6PDH的每个分子。

[0127]一些分析物可以直接结合于G6PDH。其它的则不能直接地进行共价连接。这些分析物可以通过加上能够与G6PDH上的基团(例如,与氨基、羟基、羧基或巯基基团)共价连接的基团(即,半抗原的定义)而与G6PDH共价连接。这样的连接基团可以包括,例如,具有一个或多个游离氨基或游离羟基基团的氨基酸,或可还有羰基、硫代羰基或羧基基

团，或含有这些基团的化合物。通常用于这一目的的连接基团包括 N-羧基琥珀酰亚胺以及其它琥珀酰亚胺或含有马来酰亚胺的半族，以及 1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺。对这些连接基团的详细讨论可见于美国专利第 3,817,837 号，在此将其全文引用作为参考。

[0128]适用于本发明的连接基团包括，但不限于，除氢之外低于 50 个原子的化合物，优选为除氢之外低于 20 个原子的化合物，更优选为除氢之外低于 6 个原子的化合物，且具有长度通常不超过 35，优选为低于 15，更优选为低于 10，且最优选为低于 5 个原子的链(即，间隔物)。

[0129]例如，适用于制备本发明共轭物的连接基团包括双官能交联或连接剂，即，含有两个具有反应活性基团或“末端”的分子，其可被具有可变长度的间隔物连接。反应活性的末端可以是任意种类的官能团，包括，但不限于，氨基反应末端，例如 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯，酰亚胺酯，醛，环氧化物，磺酰卤素，异氰酸盐，异硫氰酸盐，和硝基芳基卤素；以及硫基反应末端，例如吡啶二硫化物，马来酰亚胺，以及硫代苯邻二甲酰亚胺(thiophthalimide)。异双官能交联剂具有两种不同的反应活性末端，例如，氨基-反应活性末端和硫基-反应活性末端，而可用于制备本发明共轭物的同双官能试剂则具有两种具有类似反应活性的末端。这样的例子包括双马来酰亚胺己烷(bismaleimido-hexane, BMH)，其允许含巯基化合物的交联，以及 NHS 同双官能交联剂，例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)，以及水可溶性类似物，磺基-NHS 酯。

[0130]适用于本发明的其它连接基团包括，但不限于，马来酰亚胺-NHS 活性酯连接剂，例如间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羧基-琥珀酰亚胺酯(MBS)；琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)；琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)及其衍生物，包括磺基琥珀酰亚胺基衍生物，例如磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)；间-马来酰亚胺苯甲酰-磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)和磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(磺基-SMPB)(Pierce)。其它适合的异双官能试剂包括商业可获得的活性卤素-NHS 活性酯连接剂，例如 N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯和 N-琥珀酰亚胺基-(4-碘乙酰)-氨基苯甲酸酯(SIAB)以及磺基琥珀酰亚胺基衍生物，例如硫

磺基琥珀酰亚胺-(4-碘乙酰)-氨基苯甲酸酯(磺基-SIAB)(Pierce)。连接剂的另一基团是异双官能的并且是巯基可剪切的试剂，例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯(SPDP)(Pierce)。

[0131]其它商业可获得的同源双官能交联剂包括，但不限于酰亚胺酯，例如己二亚氨酸二甲酯二盐酸盐(dimethyl adipimidate dihydrochloride, DMA)；庚二亚氨酸二甲酯二盐酸盐庚(dimethyl pimelimidate dihydrochloride, DMP)；和辛二亚氨酸二甲酯二盐酸盐(dimethyl suberimidate dihydrochloride, DMS)。

[0132]对能与酰胺反应的修饰试剂，巯基引入制剂或其它活化剂的选择并不是最关键的，但是本领域技术人员应该了解在对存在于样品中的特定分析物进行测定时所适合或优选的制剂。因此，一般是根据经验确定所使用的连接基团。

[0133]为了形成这样的共轭物，通过在常规条件下将活化的分析物或半抗原与 G6PDH 的缓冲液相接触来制备共轭物。形成这些共轭物的常规条件包括约 2°C 至约 25°C 的温度，约 5 至约 10 的 pH 值，以及低于 1 小时至数天的接触时间。

[0134]在共轭完成之后，可对酶-分析物共轭物进行纯化。适合的纯化过程是本领域所公知的，并且包括针对于水性/有机和水性溶液，例如水/DMF 或水的透析，或在诸如 Sephadex 的支持物上的凝胶过滤层析等等。

## G6PDH 的失活

[0135]通常，将分析物共价连接于 G6PDH 会导致 G6PDH 酶活性的变化，可以使用本发明的方法测量所述变化。一般地，当与天然 G6PDH，即，未共轭于分析物的 G6PDH 的活性相比较时，这样的酶活性变化都是由 G6PDH-分析物共轭物造成的酶活性降低。由分析物与 G6PDH 的共价连接所造成的酶活性的下降被称为失活。

[0136]共轭于 G6PDH 的分析物的比率通常都依赖于所希望的 G6PDH 的失活%以及所得 G6PDH-分析物共轭物在结合于特异性抗体或受体(如本说明书所述)时所表现出的所期望的抑制%。通常，失活的程度

与共轭的程度成正比。可以对失活的程度进行控制，例如通过在共轭的不同时间对样品的酶活性进行测定。

[0137]在本发明的一个实施方案中，G6PDH失活约20%至约60%，并且失活的G6PDH-分析物共轭物的酶活性被进一步抑制约40%至约80%。

[0138]在本发明的另一实施方案中，G6PDH失活约30%至约65%，并且失活的G6PDH-分析物共轭物的酶活性被进一步抑制约40%至约85%。

[0139]通常，G6PDH-分析物共轭物的特异活性越高，分析的灵敏度也越高。本发明的目的在于提供具有最低特异活性的G6PDH-分析物共轭物。

[0140]因此，在失活约10%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性为约450单位/mg至约1,800单位/mg的范围，优选处于约540单位/mg至约1,350单位/mg的范围，且更优选为处于约630单位/mg至约900单位/mg的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约720单位/mg。在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约810单位/mg。

[0141]因此，在失活约20%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性处于约400单位/mg至约1,600单位/mg的范围，优选处于约480单位/mg至约1,200单位/mg的范围，且更优选为处于约560单位/mg至约800单位/mg的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约640单位/mg。在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约720单位/mg。

[0142]因此，在失活约30%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性处于约350单位/mg至约1,400单位/mg的范围，优选处于约420单位/mg至约1,050单位/mg的范围，且更优选为处于约490单位/mg至约700单位/mg的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约560单位/mg。

在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 630 单位/mg。

[0143]因此，在失活约 40%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性处于约 30 单位/mg 至约 1,200 单位/mg 的范围，优选处于约 360 单位/mg 至约 900 单位/mg 的范围，且更优选为处于约 420 单位/mg 至约 600 单位/mg 的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 480 单位/mg。在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 540 单位/mg。

[0144]因此，在失活约 50%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性处于约 250 单位/mg 至约 1,000 单位/mg 的范围，优选处于约 300 单位/mg 至约 750 单位/mg 的范围，且更优选为处于约 350 单位/mg 至约 500 单位/mg 的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 400 单位/mg。在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 450 单位/mg。

[0145]因此，在失活约 60%的情况下，在本发明的一个实施方案中，G6PDH-分析物共轭物的特异活性处于约 200 单位/mg 至约 800 单位/mg 的范围，优选处于约 240 单位/mg 至约 600 单位/mg 的范围，且更优选为处于约 280 单位/mg 至约 400 单位/mg 的范围。在本发明的一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 320 单位/mg。在另一个优选实施方案中，G6PDH-分析物共轭物具有的特异活性为至少约 360 单位/mg。

## 抗体

[0146]在本发明的一个实施方案中，抗体结合于酶-分析物共轭物的分析物。本发明涵盖的抗体包括基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片断编码的一种或多种多肽。免疫球蛋白基因包括  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , 和  $\mu$  恒定区基因，以及不计其数的免疫球蛋白可变区基因。免疫球蛋白轻链可分为  $\kappa$  或  $\lambda$ 。免疫球蛋白重链可分为  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  或  $\epsilon$ ，其分别

将免疫球蛋白定义为 IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE 类。

[0147]公知通常的免疫球蛋白(抗体)结构单位包含四聚体。每个四聚体都由两对完全一样的多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约 25KD)和一条“重”链(约 50-70KD)。每条链的 N-末端都定义了约 100 至 110 或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链( $V_L$ )和可变重链( $V_H$ )分别是指这些轻链和重链。

[0148]抗体以完整的免疫球蛋白存在,或者以被各种肽酶消化而产生的许多已被详细表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区的二硫键以下对抗体进行消化从而产生 Fab 的二聚体  $F(ab)_2$ , 其是通过二硫键连接于  $V_H-C_{H1}$  的轻链。可以在温和条件下对  $F(ab)_2$  进行还原,从而破坏铰链区中的二硫键,进而将  $(Fab)_2$  二聚体转变为 Fab 单体。Fab 单体基本上是具有部分铰链区的 Fab (关于对其它抗体片段更详细的描述,参见, *Fundamental Immunology* (基础免疫学), W.E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993))。尽管多种抗体片段是按照对完整抗体的消化进行定义的,但本领域所属技术人员应该理解可以通过化学或利用重组 DNA 方法重新合成这样的 Fab 片段。

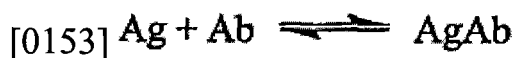
[0149]因此,术语抗体一词,正如本文中所用,还包括通过对整个抗体进行修饰所产生的抗体片断或者使用重组 DNA 方法重新合成的抗体片段。优选的抗体包括单链抗体(以单多肽链存在的抗体),更优选为单链 Fv 抗体(sFv 或 scFv),其中可变重链和可变轻链结合在一起(直接或通过肽接头)形成连续的多肽。单链 Fv 抗体是共价连接的  $V_H-V_L$  异源二聚体,其可由包括  $V_H$  和  $V_L$  编码序列的核酸表达,所述编码序列或者直接连接或者通过编码肽的接头连接(Huston, et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883)。虽然  $V_H$  和  $V_L$  是作为单多肽链相互连接的,但  $V_H$  和  $V_L$  结构域却是非共价连接的。在丝状噬菌体表面上得到表达的第一个功能的抗体分子是单链 Fv'(scFv),然而,其它的表达策略也是成功的。例如,如果一条链(重链或轻链)融合于 g3 衣壳蛋白,则能够在噬菌体上展示 Fab 分子,并且其互补链作为可溶性分子输出至周质中。两条链可以是由相同或不同的复制子所编码的;重点在于在每个 Fab 分子中,这两条抗体链是在翻译后进行组装的,并且通过所述链中的一条与 g3p 连

接将所述二聚体引入噬菌体颗粒中(参见, 例如, 美国专利第 5,733,743 号)。本领域技术人员已知 scFv 抗体和许多其它结构, 它们将来自抗体 V 区的自然聚集但化学分离的轻和重多肽链转化成折叠成与抗原结合位点的结构基本类似的三维结构的分子(参见, 例如, 美国专利第 5,091,513 号, 第 5,132,405 号和第 4,956,778 号)。

[0150]特别优选的抗体包括那些已经被展示在噬菌体上的抗体(例如, scFv, Fv, Fab 和二硫键连接的 Fv (Reiter et al. Protein Eng., (1995) vol. 8, 1323-1331)。抗体还可以包括双抗体, 小抗体, 人源化抗体或嵌合抗体。

[0151]抗体与非互补抗原的结合常数, 例如, 安非他明与针对于脱氧麻黄碱的抗体结合的结合常数, 或脱氧麻黄碱与针对于安非他明的抗体结合的结合常数, 低于所述抗体与其互补抗原结合常数的 10%。

[0152]通常, 在同质酶免疫分析中, 分析物(抗原)与抗体的结合是可逆的。具有单抗原决定簇(称为 Ag) 的抗原和单抗原结合位点(称为 Ab) 之间的可逆结合反应可表示为:



[0154]结合相互作用的强度通常表示为亲和常数( $K_a$ ), 其中  $K_a = [\text{AgAb}] / [\text{Ag}][\text{Ab}]$ 。

[0155]对同质酶免疫分析而言, 为了获得来自酶-分析物共轭物的可调制信号(即, 可被进一步抑制的酶活性), 通常, 每种成分的浓度都是处于平衡的, 即, 一半的结合位点是被填充的, 因此  $[\text{AgAb}] = [\text{Ab}]$ , 而一半的抗体(未结合的)可以结合抗原-酶共轭物。因此, 在平衡点上,  $K_a = 1 / [\text{Ag}]$ 。产生最大结合半数的抗原浓度的倒数等于该抗体对于抗原的亲和常数。亲和常数的常见值范围可从  $5 \times 10^4$  直到高达  $10^{11}$  升/摩尔( $\text{M}^{-1}$ )。

[0156]所期望的抗体亲和性, 其可以根据口腔液中分析物的 SAMHSA 期望测定范围的一半(即, 在对口腔液样品稀释 1 至 2 倍之后)进行计算, 如下所示:

分析物	临界值	Ab 的 $K_a$
安非他明	25ng/ml	$\geq 5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$
可卡因代谢物	10ng/ml	$\geq 2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$
脱氧麻黄碱	25ng/ml	$\geq 5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$

美沙酮	20ng/ml	$\geq 10^9 M^{-1}$
鸦片剂	20ng/ml	$\geq 10^9 M^{-1}$
苯环利定	5ng/ml	$\geq 10^9 M^{-1}$
THC	1ng/ml	$\sim 4 \times 10^{10} M^{-1}$

[0165]可通过对本领域公知的细胞系进行筛选并随后选择用于口腔液同质酶免疫分析的适当抗体，鉴定如以上说明书所述的抗体。

[0166]通常，与分析物反应的抗体所具有的针对该分析物的亲和性 ( $K_a$ ) 的范围为至少  $1 \times 10^8 M^{-1}$  至至少  $5 \times 10^8 M^{-1}$ ，更优选为至少  $5 \times 10^8 M^{-1}$  至至少  $2 \times 10^9 M^{-1}$  的范围，最优选为至少  $2 \times 10^9 M^{-1}$  至至少  $5 \times 10^9 M^{-1}$  的范围。在本发明的优选实施方案中， $K_a \geq 10^{10} M^{-1}$ 。在本发明的另一优选实施方案中， $K_a \geq 1 \times 10^{11} M^{-1}$ 。

[0167]可通过本领域公知的技术制备抗体。可通过向如制备抗体的常规方法所述的各种脊椎动物注射抗原来制备多克隆抗体，该抗原例如分析物。类似地，可根据杂交细胞系技术制备用于本发明的单克隆抗体。可从商业来源，例如 Cortex Biochem, Inc., Biodesign International 和 Fitzgerald Industry, Inc. 获得对分析物具有特异性的抗体。

## 受体

[0168]在本发明的一个实施方案中，使用受体与分析物相结合。将酶-分析物共轭物，更具体地，G6PDH-分析物共轭物，与受体相混合，该受体对 G6PDH-分析物共轭物中的分析物和游离分析物都具有特异的反应活性。该受体可以是与分析物有效和特异性结合的任意组合物，并且当与酶-分析物共轭物结合时能引起对酶活性的抑制，该酶例如是 G6PDH。适当的受体可包括，但不限于，针对配体/分析物的天然受体的可溶形式，例如凝集素(例如，对于碳水化合物)，阿片受体(例如，对于吗啡和阿片肽)，激素结合受体(例如，对于激素)，类固醇受体(例如，对于类固醇)，酶受体(例如，对于底物，抑制剂，或辅因子)，内在因子的受体(例如，对于维生素 B<sub>12</sub> 和其它维生素)等等。

### 通过抗体/受体抑制 G6PDH-分析物共轭物

[0169]本发明的目的是通过结合与酶-分析物共轭物中的分析物反应的抗体或受体进一步抑制已经失活的酶-分析物共轭物，更具体地，所述酶-分析物共轭物是 G6PDH-分析物共轭物。

[0170]分析物与 G6PDH 共轭的程度和与 G6PDH-分析物共轭物中的分析物反应的抗体或受体的抑制%成正比。通常，与 G6PDH 共轭的分析物越多，就有越多的抗体或受体可以结合于该分析物，并且抑制%也越高。

[0171]优选地，失活 G6PDH-分析物共轭物被进一步抑制约 40%至约 85%。换言之，结合于 G6PDH-分析物共轭物的抗体或受体具有 G6PDH-分析物共轭物特异活性的约 15%至约 60%。

[0172]在本发明的另一实施方案中，失活 G6PDH-分析物共轭物被进一步抑制约 30%至约 65%。换言之，结合于 G6PDH-分析物共轭物的抗体或受体具有 G6PDH-分析物共轭物特异活性的约 35%至约 70%。

[0173]在本发明的另一实施方案中，失活 G6PDH-分析物共轭物被进一步抑制约 40%至约 75%。换言之，结合于 G6PDH-分析物共轭物的抗体或受体具有 G6PDH-分析物共轭物特异活性的约 25%至约 60%。

[0174]优选地，失活酶-分析物共轭物被进一步抑制约 60%至约 80%。换言之，结合于酶-分析物共轭物的抗体或受体具有 G6PDH-分析物共轭物特异活性的约 20%至约 40%。

[0175]优选地，抑制%/失活% >1，优选为>2，更优选为>3，更优选为>4，且最优选为>5。

### 口腔液样品制备

[0176]可使用本发明的方法对有理由怀疑含有分析物的任意样品进行分析。在本发明的优选实施方案中，所述样品是体液。在更优选的实施方案中，所述样品是口腔液样品，例如唾液。可从个体收集口腔液样品，并且使用本发明的方法在短时间之后对其进行分析。或者，口腔液样品可以是加入了本领域公知防腐剂的口腔液样品。

[0177]有时，由于其粘性和某些不可溶物质的存在，从个体收集而来的口腔液可能并不适合直接用作分析标本。因此，在本发明的一个实施

方案中，对口腔液样品进行预处理从而确保对该待测样品中的分析物能够进行准确和可靠的测定。预处理使得口腔液适合于在大多数常用的分析仪中进行分析。预处理可包括用缓冲液对口腔液进行稀释，然后进行过滤和/或离心。通常，预处理提供清澈的标本。考虑到口腔液的预处理，有四方面内容需要注意并且为了免疫分析的表现和准确性限定了这四方面内容。它们是(1)稀释因子，(2)稀释缓冲液，(3)缓冲液组成，以及(4)样品体积。

### 口腔液样品的稀释

[0178]本发明提供对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的优选实施方案中，通过对怀疑含有分析物的样品，特别是含有分析物的口腔液样品进行稀释来调节灵敏度。需要对稀释因子和稀释缓冲液成分进行评估从而确保使用口腔液样品进行的同质酶免疫分析的准确和可靠的表现。

[0179]如本文所述，某些分析物的口腔液临界值浓度的 SAMGSA 指南远低于在尿液标本中相同分析物的指南，所述分析物例如滥用药物。在对口腔液样品进行稀释之后，这些分析物的临界值浓度会更低。最新的口腔液收集器使用 1-4 倍稀释(例如，1ml 口腔液+3ml 稀释缓冲液)，其经常导致在所得样品中分析物浓度下降至目前所用分析的检测限以下。本发明的目的是提供对怀疑含有分析物的口腔液样品进行预处理的方法。在本发明的一个实施方案中，口腔液样品被稀释成 1: 1(例如，1ml 口腔液+1ml 稀释缓冲液)。在本发明的另一个实施方案中，口腔液样品被稀释成 1: 0.5(例如，1ml 口腔液+0.5ml 稀释缓冲液)。使用这些预处理方法，通常，标本处于所述同质酶免疫分析的灵敏度范围之内。

### 对口腔液样品进行缓冲

[0180]本发明提供对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的优选实施方案中，通过向怀疑含有分析物的样品，特别是含有分析物的口腔液样品中加入缓冲液来调节灵敏度。

[0181]需要对稀释缓冲液的 pH 和成分进行评估，从而确保使用口腔

液样品的同质酶免疫分析的准确和可靠性。口腔液的pH范围为6.2至7.4。目前,可获得的口腔液收集器提供的稀释缓冲液的pH要低于正常口腔液的pH。作为此方法的结果,大多数样品都不适于使用同质酶免疫分析来获得准确和可靠的分析。因此,本发明的目的是提供口腔液稀释缓冲液,当其被用于稀释口腔液时,得到适于采用同质酶免疫分析获得准确和可靠分析的口腔液样品。在本发明的优选实施方案中,口腔液缓冲液的缓冲能力为80 mM至100 mM,且pH值为7.0至9.0。在本发明的另一实施方案中,所述口腔液缓冲液的pH范围为7.5至8.5。在本发明的一个实施方案中,所述口腔液缓冲液的pH范围为7.5至8.2。

[0182]使用本发明的口腔液缓冲液,可将口腔液样品调节至pH最终范围为7.2至7.8,其适合于同质酶免疫分析。通常将口腔液样品的pH缓冲至pH范围为4.0至11.0,更常见的为5.0至10.0,优选为6.0至9.0,更优选为7.0至8.5,且最优选为7.2至8.3。在一个实施方案中,将口腔液样品缓冲至pH范围为7.2至7.8。本领域所属技术人员应该理解,可根据在同质酶免疫分析中使用的特定G6PDH酶来对所述酶反应的pH进行调节,因此,将所述pH调节至G6PDH酶具有其最大酶活性的范围。

[0183]可使用各种缓冲液来达到所需要的pH并且在大多数同质酶免疫分析中保持所希望的pH。说明性的缓冲液包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、tris、巴比妥等等。然而,并非所有缓冲液都适于分析口腔液样品中较低的分析物浓度。特别地,某些缓冲成分并不适合于使用G6PDH的同质酶免疫分析。因此,本发明的目的是提供口腔液缓冲液成分,其适合于分析怀疑含有分析物的口腔液样品。在本发明的优选实施方案中,所述口腔液缓冲液含有tris(Tris-(羟甲基)-氨基甲烷)。通常,在本发明的同质酶免疫分析中,tris的终浓度范围为50-200 mM,优选为75-150 mM,更优选为80-100 mM。使用本发明的口腔液缓冲液,可将口腔液样品调节至pH的最终范围为7.2至8.3,其适合于使用G6PDH的同质酶免疫分析。

### 口腔液样品体积

[0184]本发明提供了对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明

的优选实施方案中，通过对怀疑含有分析物的样品，特别是含有分析物的口腔液样品的体积进行调节来调节灵敏度。需要对用于本发明方法中的口腔液样品体积进行评估从而确保使用口腔液样品进行同质酶免疫分析的准确和可靠性。如本文所述，由 G6PDH-分析物共轭物所产生的信号与酶活性调制，即，抗体的可逆抑制成正比。抗体结合的可逆抑制与样品中存在的分析物的含量成正比。因此，通常，增加样品的体积将提高可逆抑制的%。基于对缓冲液稀释、抗体亲和性、酶-分析物共轭物的失活和抑制的考虑，以及通过实验结果的证实，发现样品体积是准确和可靠分析表现的重要因素。本文中的计算和实施例 4、8、9、10 和 11 清楚地说明了样品体积的重要性。

[0185]因此，本发明的目的在于提供待分析口腔液样品的样品体积，该待分析口腔液样品用于对分析物的存在和含量进行分析。使用目前可获得的商业分析仪，其采用约 250  $\mu\text{l}$  或更多的总分析体积，通常，口腔液样品的样品体积为约 10  $\mu\text{l}$  至约 90  $\mu\text{l}$ ，更常见为约 20  $\mu\text{l}$  至约 70  $\mu\text{l}$ ，优选为约 30  $\mu\text{l}$  至约 60  $\mu\text{l}$ ，最优选为约 40  $\mu\text{l}$  至约 50  $\mu\text{l}$ 。在本发明的优选实施方案中，口腔液的样品体积为约 20  $\mu\text{l}$  至约 50  $\mu\text{l}$ 。

[0186]发明的目的是提供口腔液样品的同质酶免疫分析，该口腔液样品适于在可商购的分析仪中进行自动或半自动分析。如果使用的可商购分析仪要求总分析体积低于 250  $\mu\text{l}$ ，那么本发明的目的在于对以上所列的口腔液样品体积的范围进行相应地调节。因此，举例来说，如果分析仪要求的分析体积为 50  $\mu\text{l}$ ，那么在一个实施方案中，该口腔液样品的样品体积为约 4  $\mu\text{l}$  至约 10  $\mu\text{l}$ 。通常，都会对口腔液样品的体积进行调节从而获得最佳的分析表现。

### 过滤口腔液样品

[0187]本发明提供了对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的优选实施方案中，通过过滤怀疑含有分析物的样品，特别是怀疑含有分析物的口腔液样品来对灵敏度进行调节。

### 离心口腔液样品

[0188]本发明提供了对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的优选实施方案中，通过离心怀疑含有分析物的样品，特别是怀疑含有分析物的口腔液样品来对灵敏度进行调节。

### 稳定口腔液样品

[0189]本发明提供了对同质酶免疫分析的灵敏度进行调节。在本发明的优选实施方案中，通过向分析介质或分析成分中加入稳定剂进行调节。这样的稳定剂可以包括，但不限于，蛋白质，例如白蛋白，以及表面活性剂，例如非离子表面活性剂，结合增强剂，例如，聚乙二醇，等等。

[0190]在本发明的一个实施方案中，将本领域公知的非离子去污剂加入至口腔液样品中。在本发明的方法中还可以使用从约 200 至 20,000 道尔顿的聚氧亚烷基化合物。可加入这些化合物从而防止疏水性分析物与样品容器结合导致的疏水性分析物损失。

### 同质酶免疫分析的校准

[0191]由于用于同质酶免疫分析的试剂性质、对口腔液样品的处理、以及对口腔液体积的要求，如本文所述，需要特别的校准剂配方和对照来对免疫分析的表现进行验证并且确定怀疑含有分析物的口腔液样品中分析物的含量。

[0192]通过比较所观察到的通过分析口腔液样品所获得的 G6PDH 酶活性和从具有已知量分析物的免疫分析所获得的 G6PDH 酶活性，本领域所属技术人员可以定性和定量地确定被分析口腔液样品中的感兴趣分析物。

[0193]因此，在本发明的一个实施方案中，提供了校准成分(或校准剂)。校准成分含有已知量的待测定分析物。例如，校准成分可包含含有 0、5、10、20、50、100、250、500 或 1,000 ng/ml 分析物的分析物样品。

[0194]在类似的条件下(即，类似的缓冲液和样品体积，等等)对怀疑含有感兴趣分析物的样品和含有已知量相同分析物的校准成分(或校准剂)进行分析。对已知分析物样品的分析得出标准校准曲线(参见实施例 7、8、10、12、13 和 14，以及图 1 至图 6)。然后通过比较未知标本所获得的结

果与标准所获得的结果来计算出怀疑含有感兴趣分析物样品中的分析物浓度。

[0195]因此,本发明的目的是提供校准化合物的配方缓冲液。所述缓冲液可含有 tris 缓冲液、蛋白质、氯化钠、非离子去污剂或叠氮化钠。通常,校准化合物配方缓冲液的缓冲能力范围为 50-200 mM,优选为 75-150 mM,更优选为 80-100 mM。

[0196]同样地,还可以向对待测分析物显示清楚阴性的口腔液样品中加入已知量的分析物。

### 同质酶免疫分析

[0197]可以使用本发明的方法对有理由怀疑含有分析物的任意样品进行分析。尽管本发明的同质酶免疫分析有效地鉴定任意体液中的分析物,但本发明特别有效地鉴定和测定口腔液样品中的分析物的含量。因此,在优选实施方案中,将怀疑含有分析物的口腔液样品与优选为 G6PDH-分析物共轭物的酶-分析物共轭物、与所述分析物反应的抗体或受体、所述酶的底物(例如,葡萄糖 6-磷酸和针对 G6PDH 的  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$ )相接触,并进行如本文所述的同质竞争性酶免疫分析。

[0198]通常,该分析工作如下:提供 G6PDH,并且确定其起始特异活性(通过测定由 G6PDH 产生的 NADH 或 NADPH),或由 G6PDH 的供应商提供其起始特异活性。G6PDH 将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $\text{NAD}^+$ )或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸( $\text{NADP}^+$ )分别转化为 NADH 或 NADPH,从而产生分光光度计可测定的 340 nm 处的吸收改变。然后,将 G6PDH 共价连接到分析物,产生 G6PDH-分析物共轭物。由于与分析物的共价连接,G6PDH-分析物共轭物的 G6PDH 的酶活性有所降低。酶活性的这种降低被称为‘失活’。然后,将与分析物反应的抗体或受体结合到 G6PDH-分析物共轭物的分析物。抗体或受体的结合导致 G6PDH 活性的进一步降低。这种进一步的降低被称为‘抑制’,从而与失活相区别。一旦加入含有与 G6PDH 连接的相同分析物的样品,一些原本结合于 G6PDH-分析物共轭物的抗体和受体现在则会与样品中的游离分析物结合,并且释放出 G6PDH-分析物共轭物,从而导致 G6PDH 活性的上升。这样的上升被称

为‘可逆抑制’。经过校准，如本文所述，就可以以上升的 G6PDH 酶活性测定样品中的分析物浓度。因此，所述分析基于 G6PDH-分析物共轭物与样品中游离分析物之间对固定含量的特异性抗体或受体的竞争。

[0199]在样品中缺乏分析物时，特异性抗体或受体保持与 G6PDH-分析物共轭物的结合并且不引起酶活性的变化。另一方面，当样品中存在有分析物时，抗体或受体可结合于样品中的游离分析物，并且此时未结合的 G6PDH-分析物共轭物的酶活性升高(‘可逆抑制’)。因此，G6PDH 的活性依赖于样品中分析物的浓度。样品，例如口腔液中分析物的浓度越高，则 G6PDH 的活性越大。通过在 340 nm 测定还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的形成确定酶活性。因此，可以将以吸收或毫吸收单位测定的吸收改变与给定样品中的分析物浓度相关联。

[0200]在本发明的优选实施方案中，所述同质酶免疫分析具有 0-100 ng/ml 的动态范围，并且以低于 10%的变异系数产生在所述动态范围内从 0 至大于 100 毫吸收单位的吸收信号。

[0201]在本发明的一个实施方案中，所述同质酶免疫分析具有 0-50 ng/ml 的动态范围。在本发明的另一实施方案中，所述同质酶免疫分析具有大于 100 ng/ml 的动态检测范围。

[0202]为了实施本发明的方法，对该系统中抗体或受体和 G6PDH-分析物共轭物的浓度进行调节，从而获得所希望的抑制%。

[0203]通过本文所述的常规方法、EMIT 文献和美国专利第 3,817,837 号来测定由于与分析物的共轭所造成的 G6PDH 的失活程度以及由于与抗体(或受体)的结合所造成的 G6PDH-分析物共轭物的抑制程度。

[0204]在本发明的优选实施方案中，G6PDH 失活约 10%至约 85%，优选为约 20%至约 85%，更优选为约 40%至约 85%，且最优选为约 30%至约 65%。

[0205]在本发明的另一优选实施方案中，失活的酶-分析物共轭物被进一步抑制约 20%至约 85%，优选为约 30%至约 85%，更优选为约 40%至约 85%。在另一实施方案中，所述抑制为约 30%至约 65%。

[0206]用于同质酶免疫分析的溶剂是水性介质。所述水性介质可含有高至 40%重量比，但更常见为低于约 20%重量比，优选为低于 10%重量

比的其它极性溶剂，特别是 1-6 个碳原子，更优选为 1-4 个碳原子的氧化溶剂，包括醇、醚等等。其它有用的溶剂包括，但不限于，DMF(二甲基甲酰胺，N,N-二甲基甲酰胺)和 DMS(二甲硫)等等。

[0207]所述分析的 pH 范围通常为 4.0 至 11.0，更通常为 5.0 至 10.0，优选为 6.0 至 9.0，更优选为 7.0 至 8.5，且最优选为 7.2 至 8.3。在本发明的一个实施方案中，所述分析的 pH 范围为 7.2 至 7.8。

[0208]一般采用适中的温度来进行同质酶免疫分析。在本发明方法中所采用的可接受温度是这样的温度，在该温度下，酶-分析物共轭物，特别是 G6PDH-分析物共轭物具有酶活性，并且因此，产生可检测的信号并且在该温度下抗体或受体能与所述分析物结合。通常，用于所述分析的温度范围为约 4°C 至 50°C，更通常的范围为约 10°C 至 40°C，优选的范围为 20°C 至 40°C，更优选的范围为 30°C 至 40°C，最优选为 37°C。本领域公知同工酶、来自不同物种的酶或天然存在酶的突变酶的酶活性可能在不同的温度各不相同。因此，可能需要根据经验来确定产生所希望的高特异酶活性的温度。那些方法是本领域公知的。

[0209]在实施所述分析时，加入的顺序并不重要。各种试剂的加入顺序可以有很大不同。在优选实施方案中，将口腔液样品首先与含有针对 G6PDH 的抗体或受体、底物和辅因子的试剂溶液(在实施例 1 中称为 R<sub>1</sub>)混合。在孵育之后，G6PDH-分析物共轭物(在实施例 1 中称为 R<sub>2</sub>)。在又一次孵育之后，如本文所述测定所产生的信号。

[0210]在本发明的一个实施方案中，混合试剂的顺序如下：(1)酶-分析物共轭物，(2)与分析物反应的抗体或受体，(3)针对酶的底物和辅因子，和(4)怀疑含有分析物的口腔液样品。一旦加入含有分析物的口腔液样品，如果所述口腔液样品含有如本文所述的分析物的话，则应当观察到酶活性的升高(可逆抑制)。

[0211]在本发明的另一优选实施方案中，加入的顺序如下：(1)酶-分析物共轭物，(2)怀疑含有分析物的口腔液样品，(3)与分析物反应的抗体或受体，和(4)针对酶的底物和辅因子。一旦加入底物和辅酶，对酶活性进行测定。口腔液样品中的分析物越多，就会有越多的抗体或受体结合于游离分析物而不是酶-分析物共轭物，从而产生较高的酶活性。如果样

品中不存在分析物，那么抗体或受体就会专有地结合到酶-分析物共轭物并且酶活性受到抑制。影响加入顺序只是应用平衡模式或速率模式。

[0212]因此，实施同质酶免疫分析可能涉及一个或多个孵育步骤。例如，需要将酶-分析物共轭物与该分析物反应的抗体或受体进行孵育，并且在加入口腔液样品之前对结合有抗体或受体的酶-分析物共轭物进行纯化。

[0213]是否实施孵育阶段以及该孵育阶段的长度，都很大程度上依赖于应用平衡模式还是速率模式，以及抗体或受体与分析物的结合速率。通常，孵育步骤从约 5 秒(secs)至 6 小时(hrs)，更常见的为约 30 secs 至 1 hr。

### 测定 NADH-自动分析仪

[0214]可以通过定量、半定量和定性的方法测定 G6PDH 的酶活性。通过向分析介质中加入葡萄糖-6-磷酸和  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  以及测定这些底物中某一种的消失或者是 NADH、NADPH 或 D-葡糖酸- $\delta$ -内酯-6-磷酸的出现来测定 G6PDH 酶活性。通常使用分光光度计来测定每单位时间(通常以分钟计) NADH 或 NADPH 的产生。

[0215]测定信号的时间依赖于使用速率还是平衡模式、所要求的灵敏度、信号产生系统的性质等等。对速率模式而言，读数之间的时间通常从 5 秒至 2 分钟，通常从约 30 秒至 90 秒，更通常从约 10 秒至约 60 秒。对平衡模式而言，在达到稳定状态之后，单次读数可能就已足够，或者在任何方便时间间隔的两次读数即可满足。

[0216]可将测定由本发明方法所产生信号的这一过程方便地应用于实验室、临床或高通量分析的自动分析仪。自动实验室分析仪的实例有 COBAS INTEGRA 和 ROCHE/HITACH 系列分析仪(Roche Diagnostic, Indianapolis, Ind.)和 Olympus 系列(Texas)。通常，可以将能够保持恒温、吸入 30  $\mu\text{l}$  至 70  $\mu\text{l}$  样品、混合试剂、在 340 nm 波长测定酶速率以及准确定时反应的化学分析仪用于实施本发明的方法。

[0217]还预期测定 NADH 和 NADPH 的其它方法。例如，Babson 和 Babson (Clinical Chemistry 19(7):766-769, [1973])描述了一种方法，其中

NAD 的还原与四唑盐, 氯化 2-对-硝基苯基-5-苯基四唑(INT)的还原偶联, 而吩嗪硫酸甲酯则作为中间电子载体。

[0218]信号产生系统还可以包括 G6PDH 和生色底物, 其中该生色底物被酶促转化为吸收紫外或可见区域的光的染料。本发明还预期了磷或荧光剂底物。

[0219]其它的测定方法对本领域所属技术人员而言是显而易见的。通过适当地选择产生可检测信号的成分, 可视觉地或通过多种装置, 即, 检测手段, 例如分光光度计、荧光计、闪烁计数器等观察到可检测的信号。

[0220]可采用多种技术和试剂组合来增强可检测信号的产生。

### 在口腔液样品中测定分析物的试剂盒

[0221]本发明还提供用于方便地检测怀疑含有分析物的口腔液样品中分析物的存在以及准确和可靠地确定该分析物含量的试剂盒。本发明的试剂盒可含有一种或多种以下成分, 如本文中充分描述的: (a) 酶-分析物共轭物, 其包含与分析物共价连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH), (b) 与所述分析物反应的抗体或受体, (c) G6PDH 的酶作用底物, (d) G6PDH 的辅酶, (e)缓冲液, (f)校准剂或标准等等, 以及(g)描述如何实施所述同质酶免疫分析的指导手册。

[0222]在本发明的一个实施方案中, 在包装的组合中提供了用于本发明方法的试剂和组合物。根据所述试剂或组合物的交叉反应性和/或稳定性, 所述试剂或组合物可以装在同一个人或分别的容器中。所述试剂或组合物可以是液体或冻干的形式。当以干粉, 即, 通常是冻干形式提供试剂或组合物时, 包括赋形剂或缓冲液, 从而经稀释, 所述试剂溶液将会具有适当的浓度来实施本发明的方法。

[0223]在本发明的一个实施方案中, 试剂盒包括两种或更多种不同的 G6PDH-分析物共轭物。可以使用这两种或更多种 G6PDH-分析物代替物来顺序或同时确定口腔液样品中的两种或更多种分析物的含量, 如美国专利申请第 10/163,018 号(公开号为 US-2003-0224373-A1)所述, 在此将其全文引用。

[0224]在本发明的一个实施方案中,提供对康复的药物成瘾者或缓刑罪犯的血液进行检测的试剂盒。该试剂盒包括两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物,其中所述共轭物包含常见的滥用药物,例如 THC/大麻、吗啡或海洛因、PCP、安非他明、美沙酮、美沙酮代谢物,丙氧芬和可卡因等。

[0225]在本发明的另一实施方案中,提供对住院患者进行检测的试剂盒。该试剂盒含有该试剂盒包括两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物,其中所述共轭物包含本文充分描述过的全部合法或违禁药物。例如,一个试剂盒可以包含在入职前药物滥用筛查中常用违禁药物的共轭物,该常用违禁药物通常包括所谓的 NIDA-5(国家药物滥用研究院)名单:即鸦片剂,可卡因,THC/大麻,PCP 和安非他明(包括安非他明和脱氧麻黄碱)。

[0226]本发明的又一实施方案提供包括两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物的试剂盒,其中所述共轭物包含合法药物,该合法药物通常被过量摄入或者为了对患者进行适当的治疗需要确认其存在。这样的试剂盒可以包括,例如,含有巴比妥类、水杨酸盐或酯、诸如丙咪嗪、地昔帕明、阿米替林和去甲替林等三环抗抑郁剂等的共轭物。

[0227]本发明的又一实施方案提供对预期雇员进行检测的试剂盒。该试剂盒含有两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物,其中所述共轭物含有乙醇、利尿剂、心血管药物等等。

[0228]在本发明的一个实施方案中,提供检测暴露于工业化学品的试剂盒。该试剂盒含有两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物,其中所述共轭物含有常见的危险化学品,或者与特定位置或职业相关的化学品。这样的试剂盒可以含有指向某些溶剂、化学中间体、预期产物等等的共轭物。类似地,还可以制备用于监测工人或其它人暴露于杀虫剂的试剂盒,所述共轭物包含所要检测的杀虫剂类型或特定的杀虫剂。

[0229]在本发明的另一实施方案中,提供检测化学或生物战争毒剂存在的试剂盒。该试剂盒含有两种或更多种 G6PDH-分析物共轭物,其中所述共轭物含有神经毒剂(例如沙林、塔崩和索曼等)、芥子气、葡萄球菌 B 肠毒素、肉毒杆菌毒素、炭疽抗原和天花抗原。

[0230]通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例仅具有说明性作用而非旨在以任何方式对本发明的定义进行限制。

## 实施例

### [0231] 实施例 1: 酶-分析物共轭物的酶活性计算

[0232] 为了在怀疑含有分析物的样品中准确地测定分析物的浓度, 由 G6PDH 在阴性校准剂与高校准剂之间产生的信号(表示为  $\Delta A/\text{min}$ ) 优选地应该为约 100mA/分钟(速率模式), 所述阴性校准剂即具有 0 ng/ml 分析物的校准剂, 所述高校准剂例如具有 50 ng/ml 分析物的校准剂。因此, 在本发明的常规同质酶免疫分析中, G6PDH 产生了约 100 mA/分钟。以下等式表明了信号强度, 酶活性以及反应体积之间的关系。

$$[0233] \text{酶活性} = \Delta A \times V_t / \epsilon_{\text{NADH}} \times V_{R2},$$

[0234] 其中  $\Delta A$  是由 G6PDH 产生的信号(以吸收或毫吸收单位表示);  $V_t$  是以毫升(ml)计算的总反应体积并且包括检测样品、R1(抗体或受体, 底物, 辅因子的体积)和 R2(酶-分析物共轭物)的体积;  $\epsilon_{\text{NADH}}$  是 NADH 的消光系数, 相当于 6,220; 并且  $V_{R2}$  是以毫升计算的酶试剂体积。

[0235] 为了满足目前可获得的自动分析仪, 例如 Hitachi717 的最低体积要求, 每次免疫分析的总体积应该低于 250  $\mu\text{l}$ , 包括样品体积, 酶试剂体积和抗体或受体体积。在本实施例中, 使用 20  $\mu\text{l}$  样品(例如口腔液), 150  $\mu\text{l}$  抗体或受体( $R_1$ )和 75  $\mu\text{l}$  酶试剂( $R_2$ ), 要产生 100 mA/分钟的信号, 所需要的酶活性应该为 0.0525 单位/ml。其计算如下:

$$[0236] \Delta A = 0.1A(100\text{mA})$$

$$[0237] V_t = 0.02\text{ml} + 0.150\text{ml} + 0.075\text{ml} = 0.245\text{ml}$$

$$[0238] \epsilon_{\text{NADH}} = 6,220 \text{ 摩尔消光系数}(=6.22 \text{ 毫摩尔消光系数})$$

$$[0239] \text{酶活性} = (0.1 \times 0.245) / (6.22 \times 0.075) = 0.0525 \text{ 单位/ml}$$

[0240] 所计算出的 0.0525 单位/ml 的酶活性是要在抑制(阴性分析物)和逆转(通过高校准剂分析物)酶共轭物之间产生 100mA/分钟区别所需要有效(活性)酶量。换言之, 从阴性校准剂(最大抑制)到高校准剂(50ng/ml; 可逆抑制)之间需要 0.0525 单位/ml 的酶活性。这是天然酶特异活性(在共轭到分析物之前)、酶-分析物共轭物的酶活性(失活)、抗体或受体抑制和由于检测样品中分析物导致的可逆抑制的组合。

[0241] 为了达到 0.0525 单位/ml 酶活性的要求, 并且考虑到(1)天然

G6PDH 的起始特异活性, (2)由于分析物共轭导致的失活%, (3)由抗体或受体引起的抑制% (考虑到针对分析物的抗体亲和性,  $K_a$ ), (4)由于在样品中抗体或受体与游离分析物的竞争而引起的可逆抑制% (也称为调制), 推荐以下条件:

[0242](a) 天然 G6PDH 的起始特异活性为至少 800 单位/mg, 优选为大于 900 单位/mg。

[0243](b) 分析物-酶共轭物, 其在 37°C 的酶活性大于 400 单位/mg 蛋白。

[0244](c) 对分析物的亲和性为  $K_a > 5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  的抗体或受体。

[0245](d) 由于抗体或受体的结合导致的酶-分析物共轭物的抑制超过 60%。

[0246](e) 用口腔液缓冲液适当稀释地口腔液样品(唾液)。

[0247](f) 口腔液样品(唾液)的适当体积。

## **实施例 2: G6PDH-PCP 共轭物**

[0248]从 USB Biochemical 购买了起始特异活性为 860 单位/mg 的 G6PDH。19mg 的 G6PDH 与 PCP 半抗原的共轭导致了 45%的失活。在经过纯化之后, 分离到了 13ml 的酶-PCP 共轭物(1.4mg/ml)。在和与 PCP 反应的抗体结合之后, 所纯化的酶-PCP 共轭物被进一步抑制了高达 60%。配制了含有 0.731 $\mu\text{g}/\text{ml}$  酶-PCP 共轭物的 1-2,000 倍稀释的酶试剂。在希望的免疫分析中, 使用了 20 $\mu\text{l}$ -45 $\mu\text{l}$  样品, 75 $\mu\text{l}$  酶-PCP 共轭物, 以及 150 $\mu\text{l}$  抗体溶液。以下计算说明了失活%, 抑制%和样品体积的重要性。

- |                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| 1. 试剂中的酶浓度:                           | 0.000731mg/ml  |
| 2. 每次分析中的酶(75 $\mu\text{l}$ /分析):     | 0.0000548mg/分析 |
| 3. 标准化至 1.0ml(从 0.245ml 的分析体积):       | 0.000224mg/ml  |
| 4. 失活 45%之后的酶活性:                      | 0.1058 单位/ml   |
| 5. 产生 100mA 所需要的酶:                    | 0.0525 单位/ml   |
| 6. 采样 20 $\mu\text{l}$ 将会具有 30%的可逆抑制: | 0.0370 单位/ml   |
| 7. 由 0.0370 单位的酶所产生的信号:               | 70.5mA         |
| 8. 采样 45 $\mu\text{l}$ 将会具有 51%的可逆抑制: | 0.0540 单位/ml   |

9. 由 0.0540 单位的酶所产生的信号: 102.8mA  
使用以下计算:
- [0259] 1. = (19 mg/13 ml)/2,000 = 0.000731 mg/ml  
[0260] 2. = 0.000731 x 0.075/l = 0.0000548 mg/分析  
[0261] 3. 从 0.245 ml (20  $\mu$ l+150  $\mu$ l+75  $\mu$ l/分析)标准化至 1 ml  
[0262] 4. = 0.000224 x 860 单位/mg x (1-45%) = 0.1058 单位/ml  
[0263] 5. 参见本文中的计算(0.0525 单位/ml)  
[0264] 6. 实验观察, 与抗体亲和性相关。  
[0265] 7. = 100 mA x 0.0370/0.0525 = 70.5mA  
[0266] 8. 实验观察, 与抗体亲和性相关。  
[0267] 9. = 100 mA x 0.0540/0.0525 = 102.8mA  
[0268]所述结果可见于实施例 3 的 PCP 口腔液同质酶免疫分析中。

### **实施例 3: G6PDH-鸦片剂共轭物**

[0269]将 G6PDH 酶(4mg, 起始特异活性为 860 单位/ml)与鸦片剂半抗原共轭。对 8.5ml G6PDH-鸦片剂共轭物进行纯化。该共轭导致了 G6PDH 的 45%失活。结合与 G6PDH-鸦片剂共轭物的鸦片剂抗体导致了 52%的抑制。以 1: 450 的稀释倍数将所述共轭物配制入酶试剂中。采用与实施例 1 相同的计算方式, 得到了以下结果:

1. 试剂中的酶浓度: 0.00106 mg/ml
2. 每次分析中的酶(75  $\mu$ l/分析): 0.0000784 mg/分析
3. 标准化至 1.0 ml (从 0.245 ml 的分析体积): 0.000320 mg/ml
4. 失活 45%之后的酶活性: 0.1514 单位/ml
5. 产生 100mA 所需要的酶: 0.0525 单位/ml
6. 采样 20 $\mu$ l 将会具有 15%的可逆抑制: 0.02270 单位/ml
7. 由 0.0370 单位的酶所产生的信号: 43.3mA
8. 采样 45 $\mu$ l 将会具有 20%的可逆抑制: 0.0303 单位/ml
9. 由 0.0540 单位的酶所产生的信号: 57.7mA

由于鸦片剂抗体的亲和性较低, 所以#6 和#8 的抑制可逆性较低。实施例 4 和 11 说明了实验结果。

**实施例 4: 在分析 PCP 和鸦片剂中样品体积的重要性**

[0280]如本文中所述制备和分析 G6PDH-PCP 和 G6PDH-鸦片剂共轭物。保持总分析体积为 250 $\mu$ l, 对不同体积的 PCP 和鸦片剂口腔液样品进行分析: 对 PCP, 20 $\mu$ l 和 45 $\mu$ l; 对鸦片剂, 20 $\mu$ l 和 50 $\mu$ l。

分析	PCP					
	45 $\mu$ l 样品			20 $\mu$ l 样品		
精确度	(ng/mL)	平均值	%CV	(ng/mL)	平均值	%CV
	3 ng/ml	2.4	6.35%	3 ng/ml	2.8	8.18%
	5 ng/ml	4.8	4.70%	5 ng/ml	4.9	6.90%
	10 ng/ml	11.2	5.36%	10 ng/ml	10.6	8.09%
灵敏度	1.6 ng/ml			5 ng/ml		

分析	鸦片剂					
	50 $\mu$ l 样品			20 $\mu$ l 样品		
精确度	(ng/ml)	平均值	%CV	(ng/ml)	平均值	%CV
	10 ng/ml	9.1	15.29%	10 ng/ml	9.9	27.8%
	20 ng/ml	18.3	8.12%	20 ng/ml	18.3	19.3%
	30 ng/ml	28.4	11.06%	30 ng/ml	29.7	12.2%
灵敏度	3 ng/ml			6 ng/ml		

[0281]通过增加口腔液样品的样品体积, 提高了检测和测定分析物的灵敏度而降低了%CV。因此, 例如, 使用具有不同 PCP 浓度的 20 $\mu$ l 样品, 可以测定 5 ng/ml 的 PCP。然而, 将样品体积升高至 45  $\mu$ l, 则可检测到 1.6 ng/ml 的 PCP, 因此, 明显地增加了同质酶免疫分析的灵敏度。类似地, 使用具有不同鸦片剂浓度的 20  $\mu$ l 样品, 可以测定 6 ng/ml 的鸦片剂。然而, 将样品体积升高至 50  $\mu$ l, 则可检测到 3 ng/ml 的鸦片剂, 因此, 再次, 明显地增加了同质酶免疫分析的灵敏度。

[0282]通常, 对每个样品会分析 21 个样品(平均值)并且得到变异系数

(%CV)。

### **实施例 5: 酶-分析物共轭物的制备**

[0283]半抗原活化: 可从商业来源或通过客户合成合同服务获得许多种半抗原(鸦片剂, 安非他明, 脱氧麻黄碱, 苯甲酰爱康宁, 苯环利定, 美沙酮, 美沙酮代谢物, MDMA)。按照美国专利第 3,817,837 号或美国专利申请第 10/163,018 号(公开号为 US-2003-0224373-A1)报告的方法对所有半抗原进行活化。可将半抗原, N-羧基琥珀酰亚胺和 1-(3-二甲基丙基)-3-乙基碳二亚胺溶解于无水 DMF 中, 并将所述溶液在共轭前搅拌 3-4 小时。

[0284]酶溶液: 将硫酸铵混悬液中的 G6PDH 在 50 mM Tris 缓冲液, pH8.1 的条件下进行透析, 并随后调节至终浓度为 3-10 mg/ml。以 6 mg/ml 的浓度将重组酶溶解于 50 mM 的 pH8.1 的 Tris 缓冲液中。

[0285]共轭: 将活化的半抗原转移至合适尺寸的注射器中, 并通过注射器泵缓慢地加入至搅拌的酶溶液中。在冷房中实施共轭, 并通过对分析物特异性抗体对酶失活(%失活)和抑制(%抑制)的定期测定来进行监测。在所希望的抑制%下终止所述共轭, 并通过将叠氮化钠用作防腐剂的 Sephadex 50 柱对所得的粗共轭物进行纯化。通过直接加入异硫氰化的半抗原来制备苯甲酰爱康宁酶共轭物。通过相同的方法监测和逐步获得所述共轭物。

[0286]下述 G6PDH-分析物共轭物适用于对怀疑含有分析物的口腔液样品进行同质酶免疫分析:

共轭物	%失活	%抑制
安非他明	40%	70%
苯甲酰爱康宁	55%	60%
Ecstasy(MDMA)	55%	65%
鸦片剂	50%	65%
脱氧麻黄碱	40%	78%
美沙酮	55%	60%
EDDP	45%	70%
PCP	45%	65%

### 实施例 6: 校准剂和分析试剂

[0296]校准剂和对照: 下表描述了针对每种分析物的校准剂和对照。通过向阴性口腔液缓冲液中添加分析物制备校准剂和对照。按照 SAMHSA 指南设计每种分析物的浓度。

分析物	Cont.I	界值 cal.	Cont.II	高 cal.
安非他明	15 ng/ml	25 ng/ml	35 ng/ml	50 ng/ml
可卡因	5 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml
脱氧麻黄碱	15 ng/ml	25 ng/ml	35 ng/ml	50 ng/ml
MDMA	15 ng/ml	25 ng/ml	35 ng/ml	50 ng/ml
美沙酮	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml	50 ng/ml
EDDP	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml	50 ng/ml
鸦片剂	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml	50 ng/ml
苯环利定	3 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml	15 ng/ml

[0306]Cont.,对照; cal.,校准剂。通常,校准剂被用于校准试剂而对照则被用于验证所述试剂。

[0307]抗体缓冲液: 含有 40 mM G6P, 35 mM  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD), 0.5%氯化钠, 0.09%叠氮化钠, 0.1%BSA, pH5.4 的 20 mM Tris 缓冲液。

[0308]抗体试剂: 将单克隆抗体稀释至抗体缓冲液中。每种抗体抑制酶活性的约 50%-60%。

[0309]酶缓冲液: 含有 0.9%氯化钠, 0.09%叠氮化钠, 0.1%BSA, pH8.2 的 50 mM Tris 缓冲液。

[0310]酶试剂: 将半抗原标记的酶共轭物稀释至抗体缓冲液中, 其浓度为按照本文所述的分析方案, 能够产生在 37°C 测定时每分钟约 200mA-550mA 的最大速率。

### 实施例 7: 分析方案

[0311]将 150 微升(150  $\mu$ l)抗体试剂与 40  $\mu$ l 至 50  $\mu$ l 校准剂或标本在 37°C 孵育 300 秒, 然后加入 75  $\mu$ l 酶试剂。在 340 nm 进行第一次光吸收测定之前, 将所述溶液在 37°C 孵育 20 秒。在第一次测定之后 60 秒进行第二次光吸收测定。

[0312]用第一次和第二次测定之间的光吸收差除以间隔时间并记录为 mA/分钟(速率方式)。通过用抗体缓冲液替换抗体试剂来测定最大酶速率。

### 实施例 7: 在口腔液同质酶免疫分析中安非他明的校准和测定

[0313]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的安非他明的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-安非他明共轭物, 抗体, 和口腔液校准剂。

Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟
0	264
15	305
25	325
35	340
50	360

[0314]Cal./Contl.,校准/对照。所得数据用来生成如图 1 所示的校准标准曲线。

### 实施例 8: 在口腔液同质酶免疫分析中苯环利定(PCP)的校准和测定

[0315]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的苯环利定(PCP)的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-苯环利定共轭物, 抗体, 和口腔液校准剂。

样品:	45 $\mu$ l	20 $\mu$ l
抗体:	150 $\mu$ l	150 $\mu$ l
酶-苯环利定共轭物:	75 $\mu$ l	75 $\mu$ l
总体积	265 $\mu$ l	245 $\mu$ l
Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟	速率, mA/分钟
0	175.8	179.0
3	194.6	188.1
5	208.8	195.3
10	239.3	209.0
25	284.3	254.0
总间距	108.5	75.0

[0316]Cal./Contl.,校准/对照; Ab, 抗体; Enz, 酶-苯环利定共轭物。总间距是指阴性校准剂(0 ng/ml 分析物)和高校准剂之间的速率差。所得数据用来生成如图 2 所示的校准标准曲线。

### 实施例 9: 使用口腔液同质酶免疫分析和不同的 PCP 样品体积获得的苯环利定分析精确度

[0317]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的苯环利定(PCP)的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-苯环利定共轭物、抗体和口腔液校准剂。在 3 ng/ml、5 ng/ml 和 10 ng/ml 三种不同的苯环利定浓度的各总共 12 个重复中,对 20  $\mu$ l 和 45  $\mu$ l 两种不同体积口腔液样品进行了分析。

45 $\mu$ l 样品体积				20 $\mu$ l 样品体积			
重复	3 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml	重复	3 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml
1	2.3	5.3	12.7	1	2.7	4.8	10.7
2	2.1	5.1	11.2	2	2.6	4.7	9.3
3	2.2	4.8	10.7	3	2.9	5.3	11.3
4	2.3	4.8	10.9	4	3.0	4.7	11.7
5	2.5	4.9	11.1	5	2.6	4.6	9.8
6	2.3	4.8	10.6	6	2.8	4.4	10.1
7	2.3	4.7	11.2	7	2.6	5.1	10.3
8	2.6	4.7	11.3	8	2.6	4.7	10.1
9	2.5	4.6	11.4	9	2.6	4.9	9.8
10	2.5	4.5	10.5	10	2.9	5.5	11.6
11	2.6	4.9	10.9	11	3.1	5.0	11.5
12	2.5	5.1	11.7	12	3.2	5.2	11.1
Avg.	2.4	4.8	11.2	Avg.	2.8	4.9	10.6
Std.	0.15	0.23	0.60	Std.	0.23	0.34	0.86
%CV	6.35%	4.70%	5.36%	%CV	8.18%	6.90%	8.09%

[0318]Avg., 平均值; Std., 标准差; %CV, 变异系数的百分数。

### 实施例 10: 在口腔液同质酶免疫分析中鸦片剂的校准和测定

[0319]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的鸦片剂的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-鸦片剂共轭物、抗体和口腔液校准剂。

样品:	50 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟	速率, mA/分钟
0	270	332
10	287	342
20	306	349
30	319	359
50	330	376
总间距	60	44

[0320]Cal./Contl.,校准/对照。总间距是指阴性校准剂(0ng/ml 分析物)和高校准剂之间的速率差。所得数据用来生成如图 3 所示的校准标准曲线。

### 实施例 11: 使用口腔液同质酶免疫分析和不同的鸦片剂样品体积获得的鸦片剂分析精确度

[0321]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的鸦片剂的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-鸦片剂共轭物、抗体和口腔液校准剂。在 10 ng/ml, 20 ng/ml 和 30 ng/ml 三种不同的苯环利定浓度的总共 21 个重复中, 对 20  $\mu$ l 和 50  $\mu$ l 两种不同体积的口腔液样品进行了分析。

50 $\mu$ l 样品体积				20 $\mu$ l 样品体积			
重复	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml	重复	10 ng/ml	20 ng/ml	30 ng/ml
1	10.8	19.5	29.3	1	12.8	22.5	33.2
2	9.5	15.7	26.5	2	10.2	14.3	29.6
3	8.0	18.1	27.0	3	6.5	14.5	26.7
4	7.7	17.3	28.6	4	9.6	21.7	27.5
5	6.8	16.7	25.2	5	6.4	14.8	36.5
6	6.7	19.4	28.6	6	7.6	18.6	29.7
7	9.1	18.1	22.3	7	9.5	22.9	24.3
8	8.4	16.2	26.4	8	7.1	13.6	28.9
9	8.4	21.0	28.4	9	6.5	24.7	33.2
10	10.8	17.2	32.1	10	12.3	15.2	31.5
11	10.7	20.1	31.1	11	11.5	22.1	32.6
12	10.6	20.6	32.7	12	15.3	21.5	26.8
13	10.0	18.7	32.9	13	11.2	15.8	31.7
14	8.4	17.9	22.4	14	8.9	18.6	21.8
15	8.9	16.4	29.6	15	15.6	13.6	33.2
16	8.0	18.6	26.2	16	7.6	18.9	33.6
17	9.3	17.7	31.4	17	8.7	16.4	30.2
18	8.1	18.1	25.2	18	9.8	19.2	25.8
19	8.5	18.4	28.6	19	7.8	16.7	25.6
20	11.0	20.4	30.3	20	10.4	22.4	29.8
21	11.3	17.7	32.3	21	13.2	15.8	31.7
Avg.	9.1	18.3	28.4	Avg.	9.9	18.3	29.7
Std.	1.4	1.5	3.1	Std.	2.8	3.5	3.6
%CV	15.3%	8.1%	11.1%	%CV	27.8%	19.3%	12.2%

[0322]Avg., 平均值; Std., 标准差; %CV, 变异系数的百分数。

### **实施例 12: 在口腔液同质酶免疫分析中可卡因代谢物的校准和测定**

[0323]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中的可卡因代谢物(苯并-芽子碱)的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-可卡因代谢物共轭物、抗体和口腔液校准剂。

Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟
0	226.9
5.0	252.7
10.0	266.0
20.0	282.2
50.0	311.7

[0324]Cal./Contl.,校准/对照。所得数据用来生成如图 4 所示的校准标准曲线。

### **实施例 13: 在口腔液同质酶免疫分析中 Ecstasy (MDMA)的校准和测定**

[0323]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中 Ecstasy (MDMA)的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-Ecstasy (MDMA)共轭物、抗体和口腔液校准剂。

Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟
0	232
15	263
25	288
35	322
50	368

[0326]Cal./Contl.,校准/对照。所得数据用来生成如图 5 所示的校准标准曲线。

### 实施例 14: 在口腔液同质酶免疫分析中美沙酮代谢物(EDDP)的校准和测定

[0327]以下数据是通过使用同质酶免疫分析对口腔液样品中美沙酮代谢物(EDDP)的含量进行检测和测定获得的。如本文所述制备和使用 G6PDH-美沙酮代谢物(EDDP)共轭物、抗体和口腔液校准剂。

Cal./Contl., ng/ml	速率, mA/分钟
0	216
10	251
20	300
30	347
50	415

[0328]Cal./Contl.,校准/对照。所得数据用来生成如图 6 所示的校准标准曲线。

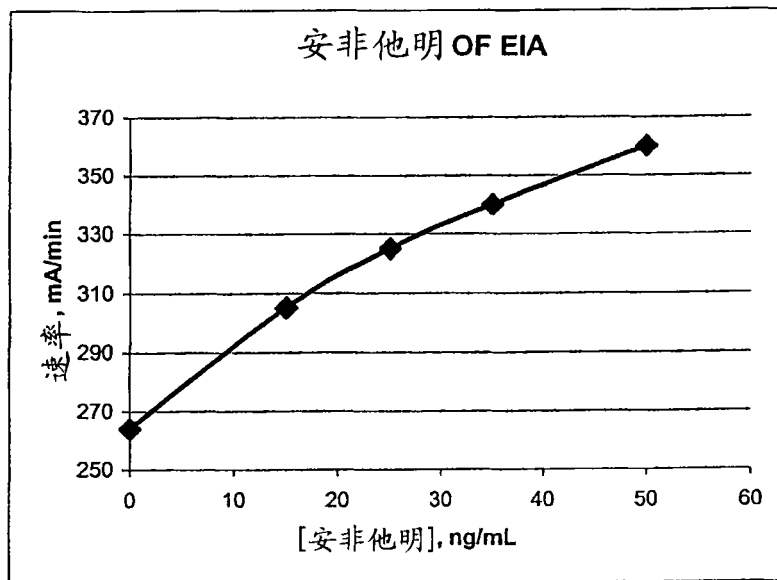


图 1

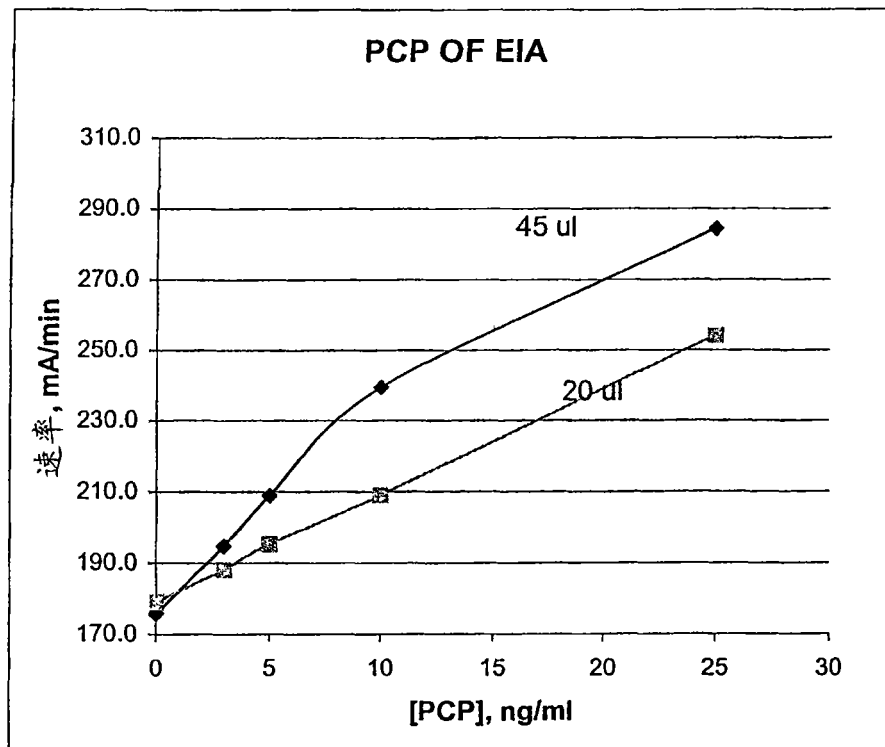


图 2

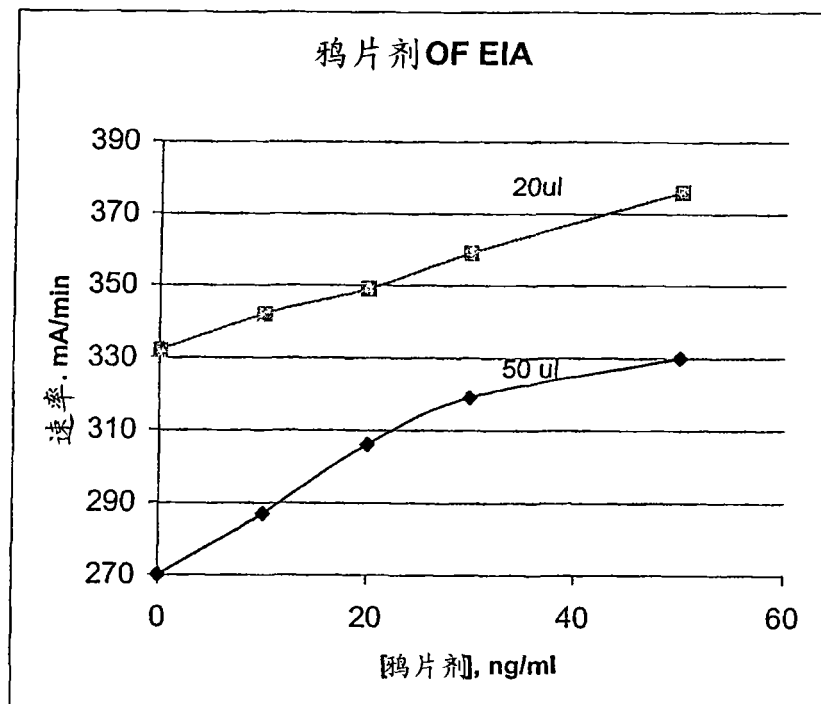


图 3

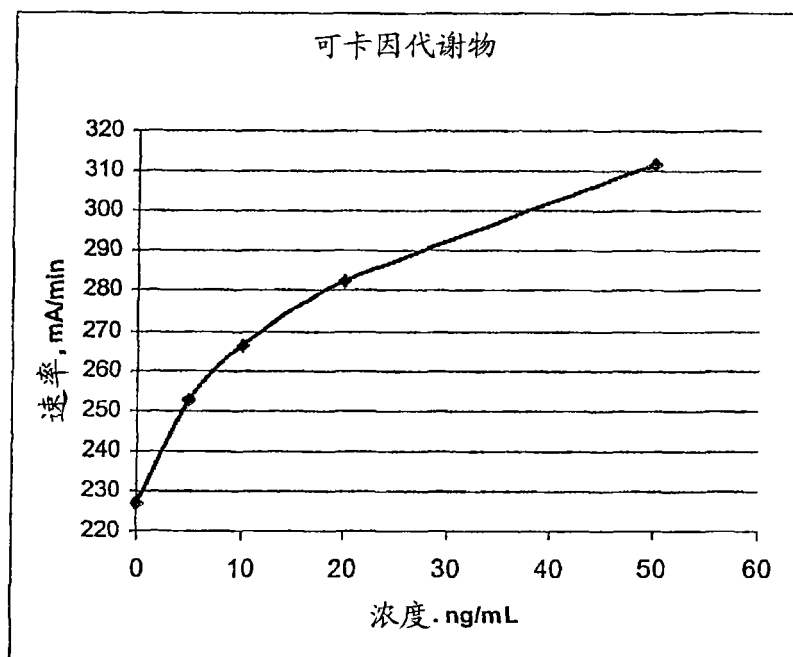


图 4

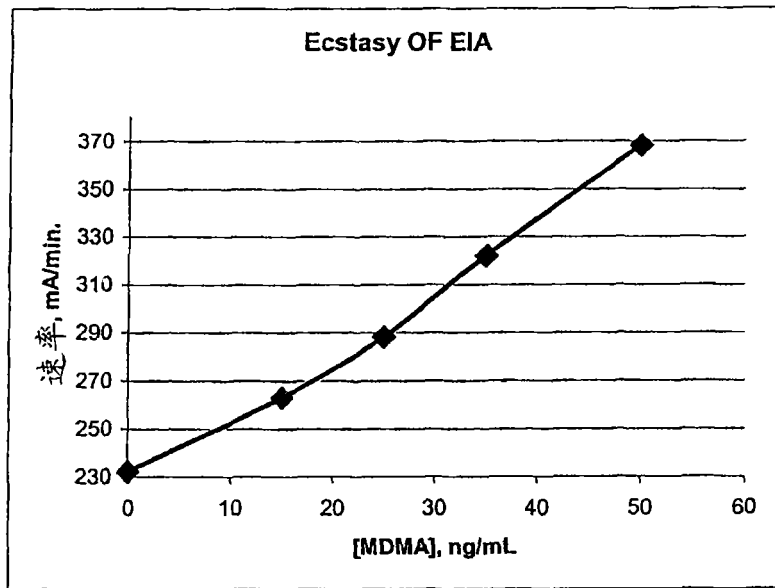


图 5

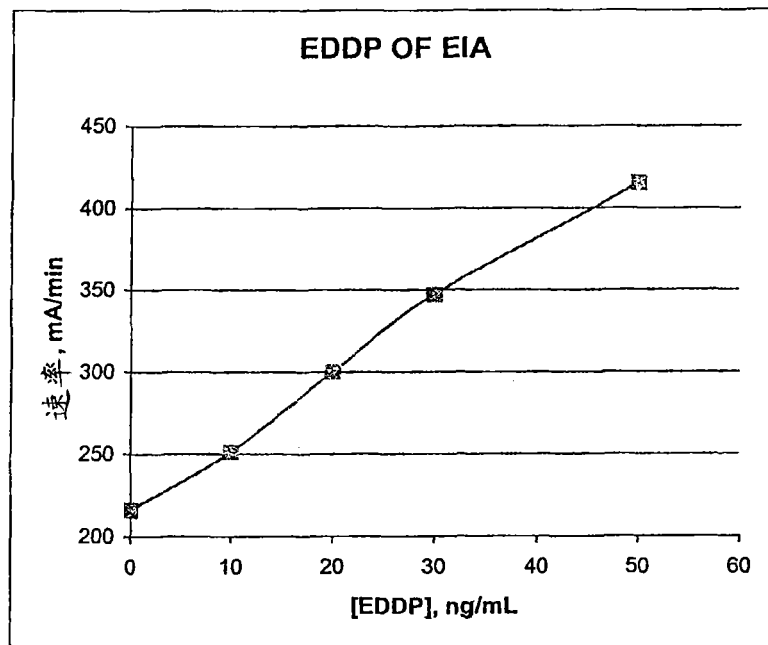


图 6

专利名称(译)	口腔液的同质酶免疫分析		
公开(公告)号	<a href="#">CN101048660A</a>	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	CN200580037166.X	申请日	2005-08-26
[标]发明人	林正义 林陈梅怡 贾荟		
发明人	林正义 林陈梅怡 贾荟		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/536 G01N33/542 G01N33/94 C07K16/44		
CPC分类号	G01N33/94 G01N33/581 G01N2333/904		
代理人(译)	韩克飞		
优先权	10/927823 2004-08-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了适用于对口腔液样品中的分析物进行定性和定量测定的同质酶免疫分析系统、方法以及试剂盒。所述系统涉及使用含有葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶(G6PDH)和分析物的共轭物的竞争性酶免疫分析。所述方法和试剂盒特别适用于检测近期药物使用以及使用自动分析仪对分析物进行快速测定。

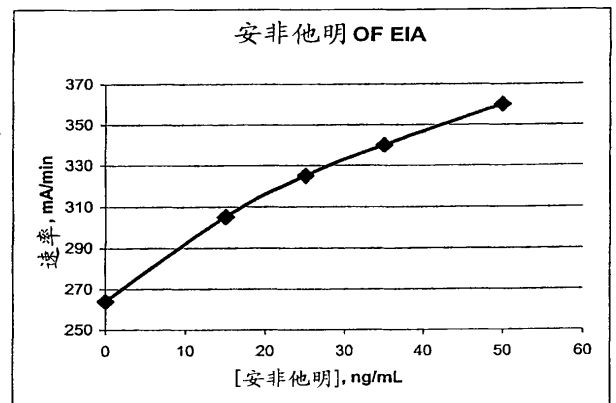


图 1