



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108181460 A

(43)申请公布日 2018.06.19

(21)申请号 201711400717.5

(22)申请日 2017.12.22

(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 余琳 程黎明 虞留明

(74)专利代理机构 苏州知途知识产权代理事务所(普通合伙) 32299

代理人 靳苗静

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

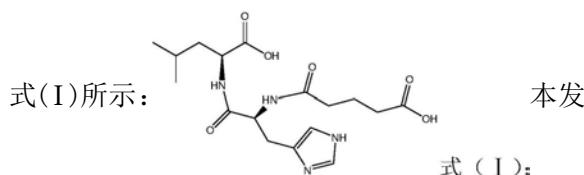
权利要求书3页 说明书17页 附图3页

(54)发明名称

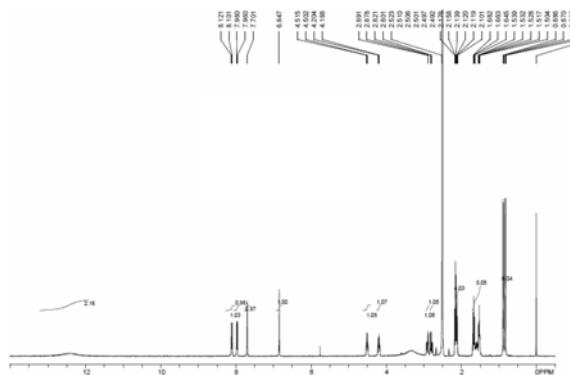
用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用

(57)摘要

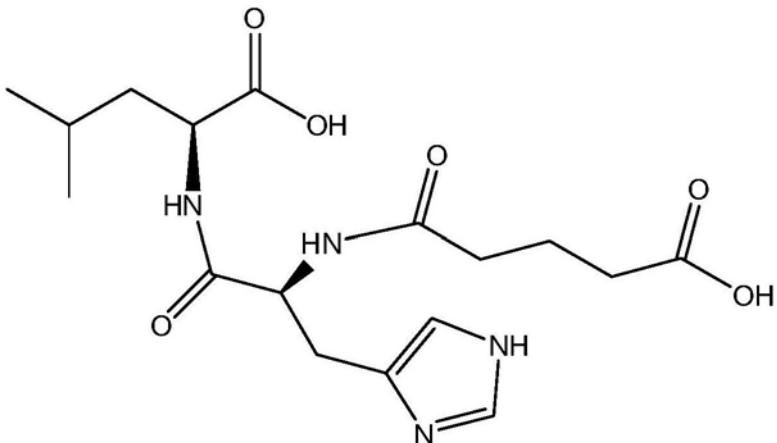
本发明涉及一种用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用,其中二肽衍生物为亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,其结构式如下述



明通过反复的试验,选取血管紧张素I羧基末端的两个氨基酸残基开拓性地制备亮氨酸-组氨酸二肽衍生物、免疫原及相应抗体,得到的抗体能很好的识别并结合血管紧张素I,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现血管紧张素I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。



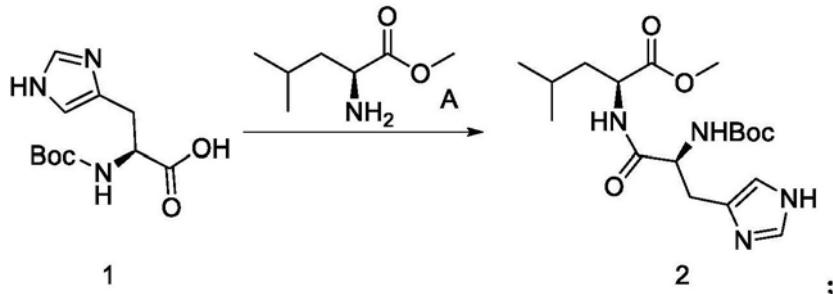
1. 一种亮氨酸-组氨酸二肽衍生物, 其结构式如下述式(I)所示:



式 (I)。

2. 根据权利要求1所述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的制备方法, 包括以下步骤:

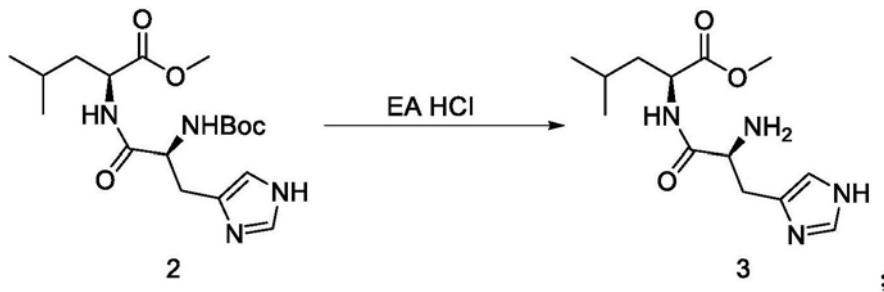
1) 将适量的化合物1溶于二氯甲烷中, 然后加入化合物A和反应溶剂配制成反应混合溶液I反应, 得到反应后的混合液I, 再将反应后的混合液I萃取得到有机相, 然后将所述有机相浓缩纯化后, 得到化合物2, 具体反应如下述所示:



优选地, 所述化合物1与所述化合物A的摩尔比为86.2:103.5, 所述反应溶剂包括HOBT、EDCI和TEA;

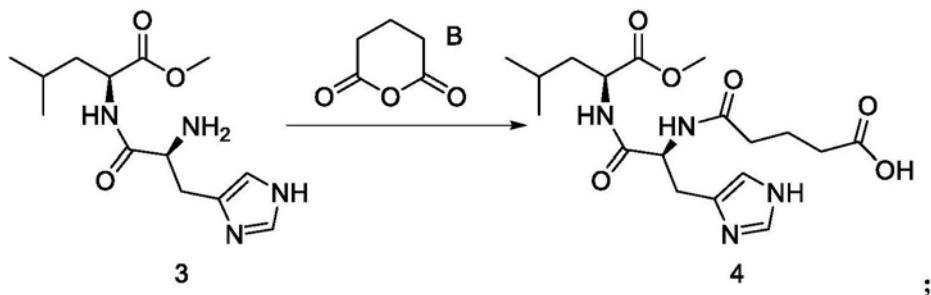
更优选地, 将所述反应混合溶液I于30℃下搅拌过夜反应;

2) 将适量的化合物2溶于乙酸乙酯中, 然后加入EA/HCl, 配制成反应混合溶液II反应, 得到反应后的混合液II, 再将所述反应后的混合液II浓缩, 得到化合物2, 具体反应如下述所示:



优选地, 所述化合物2与所述乙酸乙酯的摩尔体积比为26:50, 将反应混合溶液II于30℃下搅拌3小时;

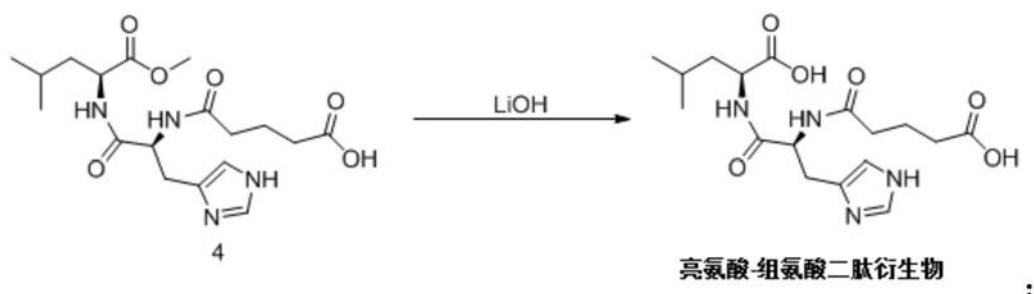
3) 称适量的化合物3溶解于DCM中, 然后加入适量的化合物B和TEA配制成反应混合液III; 再将所述反应混合液III搅拌反应, 得到反应后的混合液III, 然后将反应后的混合液III进行浓缩以得到化合物4, 具体反应如下述所示:



优选地,所述化合物3与所述化合物B的摩尔比为1:1,将所述反应混合液Ⅲ在40℃下搅拌过夜反应;

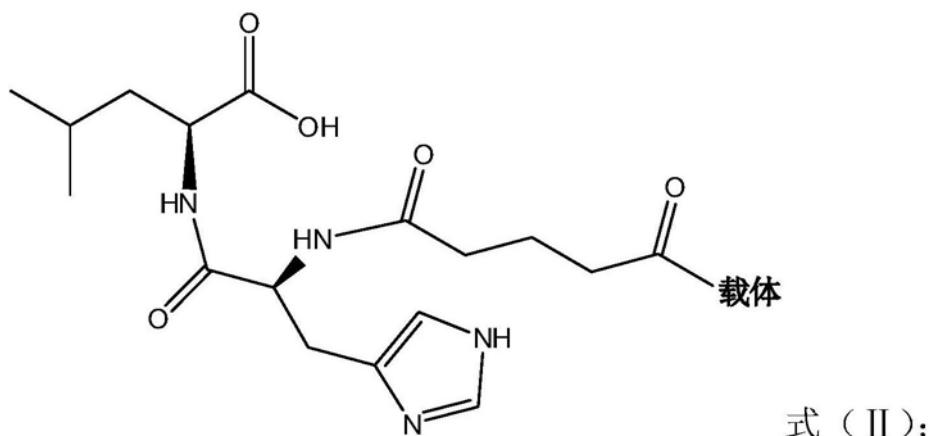
更优选地,将反应后的混合液Ⅲ进行浓缩后得到粗产物,再将所述粗产物通过硅胶柱(DCM:ACOH=10:1)进行纯化,得到化合物4;

4) 称取适量的化合物4溶于THF和H<sub>2</sub>O中,然后加入适量的LiOH配制成反应混合液IV,再将所述反应混合液IV搅拌反应,得到反应后的混合液IV,再将所述反应后的混合液IV浓缩纯化,得到亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,具体反应如下述所示:



优选地,所述化合物4与LiOH、H<sub>2</sub>O的摩尔体积比为1.01:4:2,  
反应混合液IV在室温下搅拌过夜。

3. 一种亮氨酸-组氨酸二肽免疫原,由权利要求1所述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物和载体连接而成,其结构式如下述式(II)所示:



所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽,选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。

4. 根据权利要求3所述的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将适量的载体蛋白溶解于磷酸缓冲液中,得到载体蛋白溶液;

(2) 将适量的权利要求1中的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,二甲基甲酰胺、乙醇、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺溶解于磷酸钾缓冲液中,搅拌反应,

得到溶解后的混合液；

(3) 将所述溶解后的溶混合液滴加至步骤(1)得到的载体蛋白溶液中，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，得到亮氨酸-组氨酸二肽免疫原。

5. 一种抗血管紧张素I特异性抗体，所述抗体由权利要求3所述的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原免疫实验动物后产生，所述抗体为完整抗体分子，或者为保留与血管紧张素I特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

6. 根据权利要求5所述的抗血管紧张素I特异性抗体，其特征在于，所述抗体为抗兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马抗体。

7. 根据权利要求5或6所述的抗血管紧张素I特异性抗体的制备方法，包括以下步骤：

A. 将权利要求3所述的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原稀释得到抗原溶液，将所述抗原溶液与弗氏完全佐剂混合间隔重复注射动物，得到注射后的动物；

B. 取注射后的动物的血，分离纯化后得到抗血管紧张素I特异性抗体。

8. 一种血管紧张素I检测试剂，包括试剂A和试剂B，所述试剂A中包括权利要求5或6所述的抗血管紧张素I特异性抗体和均相酶底物，所述试剂B包括亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物。

9. 根据权利要求8所述的血管紧张素I检测试剂，其特征在于，所述亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物，所述均相酶底物由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液制得；所述试剂B中还包括Tris缓冲液。

10. 根据权利要求8或9所述的血管紧张素I检测试剂的制备方法，包括以下步骤：

a. 试剂A的制备：将适量的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸用Tris缓冲液溶解制成均相酶底物，再将权利要求5或6所述的抗血管紧张素I特异性抗体加入所述均相酶底物中，得到试剂A，所述抗血管紧张素I特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000；

优选地，所述的抗血管紧张素I特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:520；

b. 试剂B的制备：制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液，再将权利要求1中所述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物激活，然后将激活的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物与所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合，得到混合液，再将所述混合液纯化，得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物，然后将所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物与所述Tris缓冲液以1:100~1:10000的体积比混合，制得试剂B；

优选地，所述的亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:2350；

c. 检测血管紧张素I时，将所述试剂A与试剂B按1:1~4:1的体积比使用，优选按4:1的体积比使用。

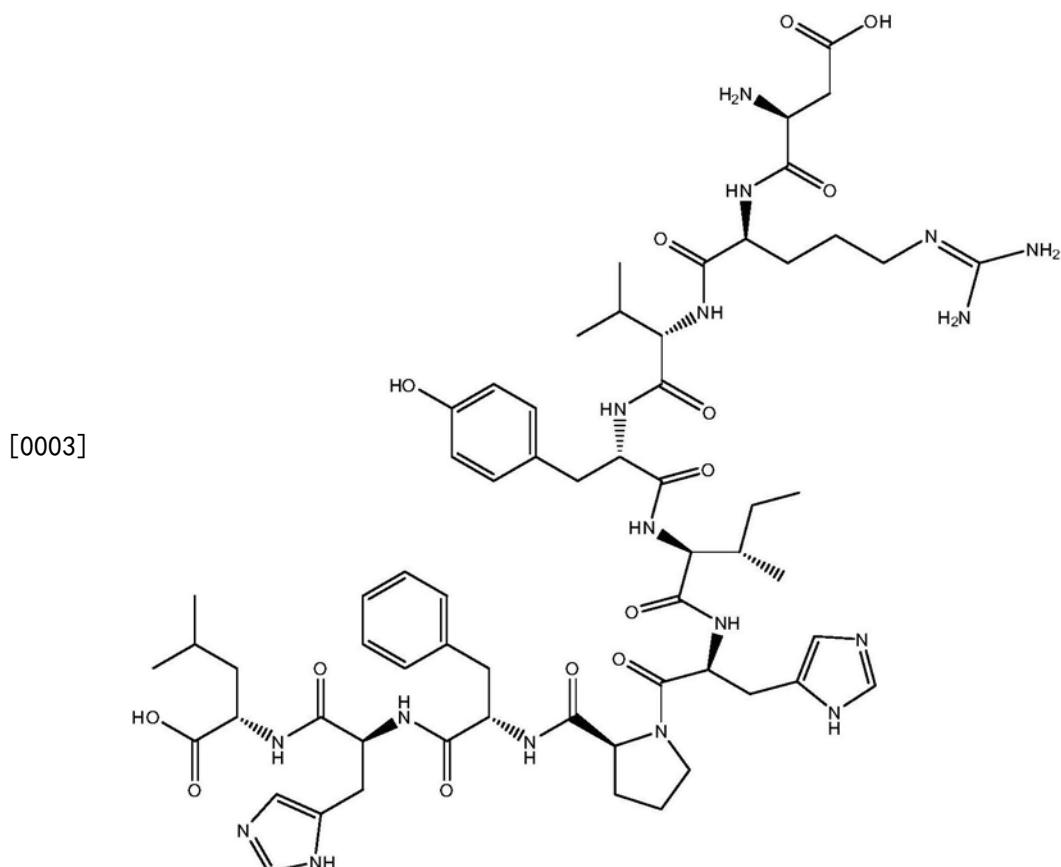
## 用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用，属于生物检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 血管紧张素I的化学结构式如式(III)所示：



[0004] 高血压是一种发病率很高的严重危害人类健康的世界性常见疾病，全球人口的患病率高达10%~20%。高血压是心脑血管疾病的独立危险因素，可导致心脑血管、心脏、肾脏等的病变，是危害人类健康的主要疾病之一。根据国家卫计委最新数据，我国现有高血压患者2亿多人，随着经济水平的发展，人民生活水平的提高，高血压已成为一个重要的公共卫生问题。研究表明：有效控制血压可以使脑卒中发生率降低35~40%、心肌梗死发生率降低20~25%、心力衰竭发生率降低50%。

[0005] 高血压的发病机制十分复杂，目前的研究认为肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS系统)在高血压的发病过程中扮演了重要角色。RAAS系统是一种复杂、高效地调节血流量、电解质平衡以及动脉血压所必需的反馈调节系统。这个系统的两个主要成分是肾素和血管紧张素转移酶。肾素是一种天冬氨酰蛋白酶，它能催化血管紧张素原肽链亮氨酸(Leu)与缬氨酸(Val)之间的肽键水解产生十肽血管紧张素I(Angiotensin I, Ang I)，血管紧张素I在血管紧张素转化酶的作用下生成血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)，最后转化

为能促进醛固酮分泌的血管紧张素Ⅲ并灭活。肾血管长期痉挛或狭窄的患者,由于肾血流量减少,血管紧张素生成增多可导致肾性高血压。血管紧张素I在正常血浆浓度下没有生物学活性,而是作为血管紧张素Ⅱ的前体存在。血管紧张素I能刺激肾上腺髓质分泌肾上腺素,它直接收缩血管的作用并不明显;但作为RAAS系统的关键组分,检测血液中血管紧张素I的含量,对高血压相关疾病的诊断与治疗具有重要作用。

[0006] 目前临幊上常用的测定血管紧张素I含量的方法主要有放射免疫分析法、酶联免疫分析法、时间分辨免疫分析法、免疫荧光法、化学发光发等,但是这些方法在临幊大规模应用上都有一定的缺陷性。目前市场上缺乏稳定性好、灵敏度高、特异性强的血管紧张素I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幊要求、实用性强、性价比高,可应用于全自动生化分析仪的血管紧张素I测定试剂已成为国内外体外诊断试剂行业的热点。

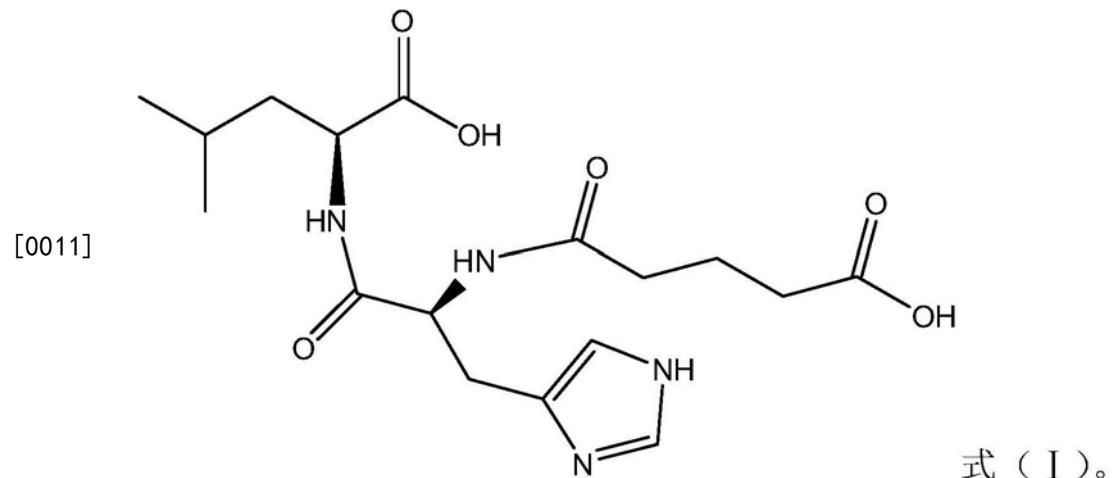
## 发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是:现有技术中血管紧张素I检测试剂检测灵敏度低、特异性差,且不存在用于检测血管紧张素I的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,无法通过均相酶试剂对其进行检测,检测灵敏度低,特异性差。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用,从而制备免疫原性强的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原及其抗体,用该抗体制备的血管紧张素I均相酶免疫检测试剂可以实现在全自动生化分析仪上对血管紧张素I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,还能有效降低血管紧张素I检测成本,有利于临幊推广使用。

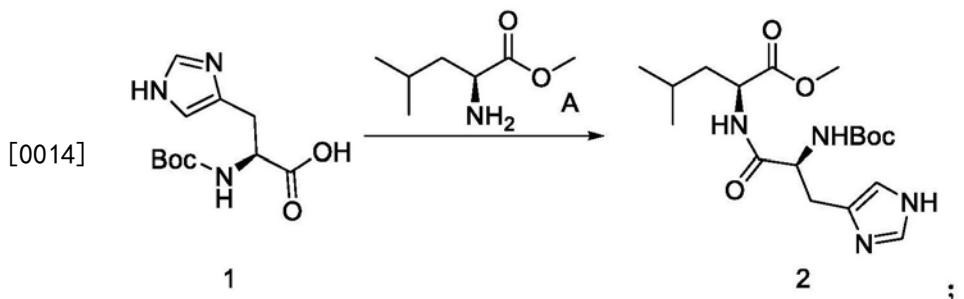
[0009] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0010] 本发明提供一种亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,其结构式如下述式(I)所示:



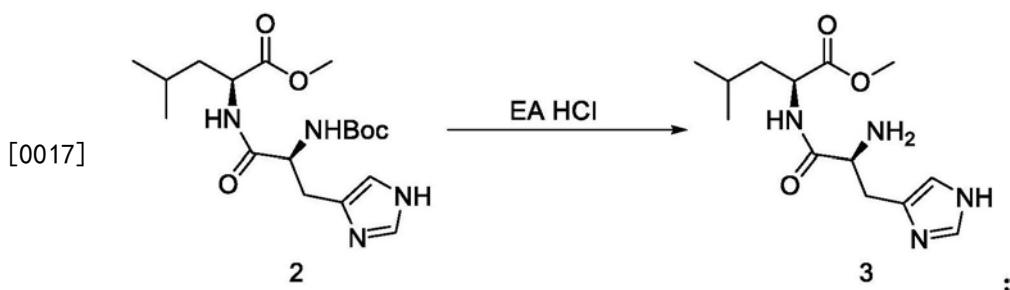
[0012] 本发明还提供一种亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 将适量的化合物1溶于二氯甲烷中,然后加入化合物A和反应溶剂配制成为反应混合溶液I反应,得到反应后的混合液I,再将反应后的混合液I萃取得到有机相,然后将所述有机相浓缩纯化后,得到化合物2,具体反应如下述所示:



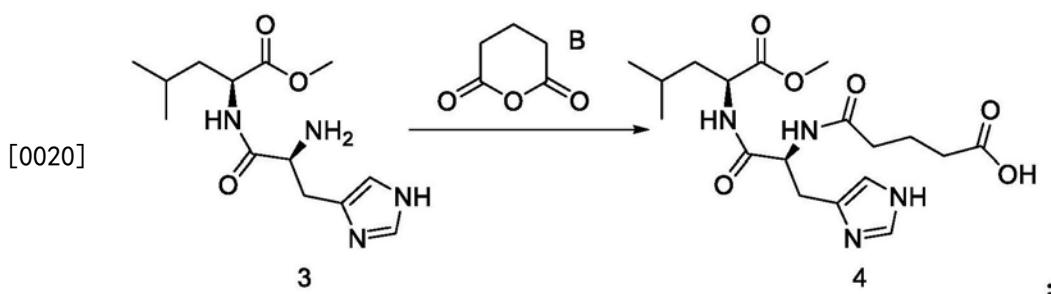
[0015] 优选地，所述化合物1与所述化合物A的摩尔比为86.2:103.5，所述反应溶剂包括HOBT、EDCI和TEA，将所述反应混合溶液I于30℃下搅拌过夜反应；

[0016] 2) 将适量的化合物2溶于乙酸乙酯中,然后加入EA/HCl,配制成反应混合溶液Ⅱ反应,得到反应后的混合液Ⅱ,再将所述反应后的混合液Ⅱ浓缩,得到化合物2,具体反应如下述所示:



[0018] 优选地，所述化合物2与所述乙酸乙酯的摩尔体积比为26:50，将反应混合溶液Ⅱ于30℃下搅拌3小时：

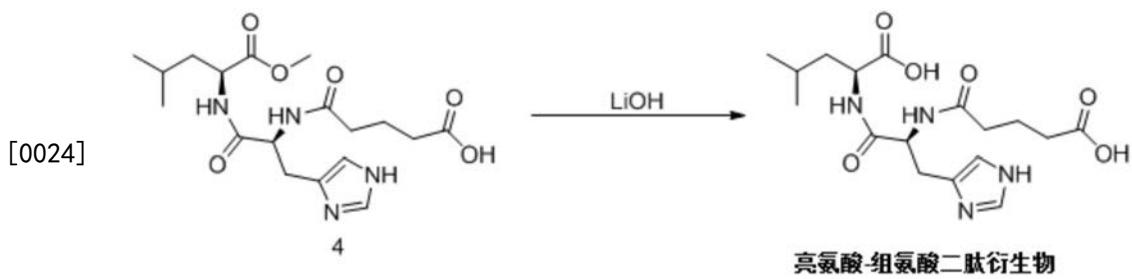
[0019] 3) 称适量的化合物3溶解于DCM中,然后加入适量的化合物B和TEA配制成为反应混合液Ⅲ;再将所述反应混合液Ⅲ搅拌反应,得到反应后的混合液Ⅲ,然后将反应后的混合液Ⅲ进行浓缩以得到化合物4,具体反应如下述所示:



[0021] 优选地，所述化合物3与所述化合物B的摩尔比为1:1，将所述反应混合液Ⅲ在40℃下搅拌过夜反应：

[0022] 更优选地，将反应后的混合液Ⅲ进行浓缩后得到粗产物，再将所述粗产物通过硅胶柱(DCM:ACOH=10:1)进行纯化，得到化合物4：

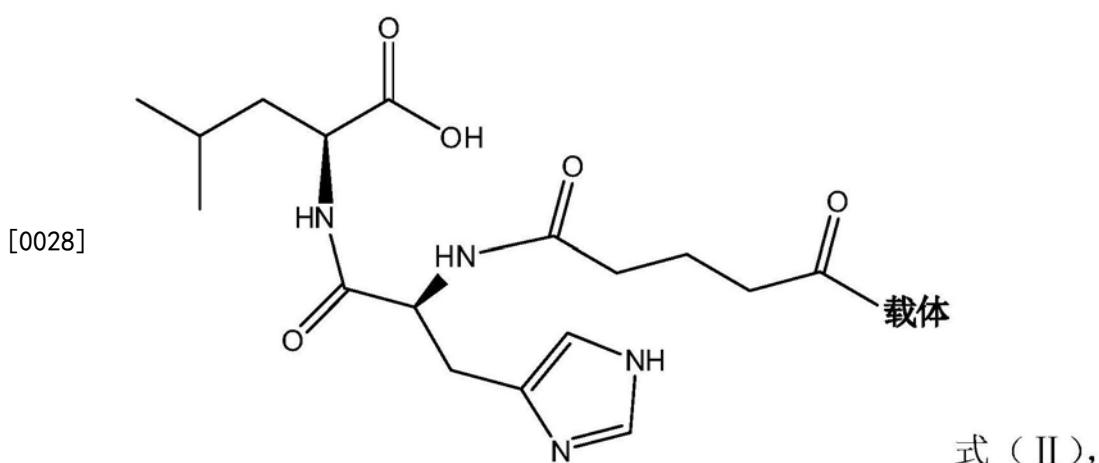
[0023] 4) 称取适量的化合物4溶于THF和H<sub>2</sub>O中,然后加入适量的LiOH配制成反应混合液IV,再将所述反应混合液IV搅拌反应,得到反应后的混合液IV,再将所述反应后的混合液IV浓缩纯化,得到亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,具体反应如下述所示:



[0025] 优选地，所述化合物4与LiOH、H<sub>2</sub>O的摩尔体积比为1.01:4:2，所述反应混合液IV在室温下搅拌过夜。

[0026] 优选地，然后加入适量的LiOH，于30℃配制成反应混合液IV。

[0027] 本发明还提供一种亮氨酸-组氨酸二肽免疫原，由上述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物和载体连接而成，其结构式如下述式(II)所示：



[0029] 所述载体为具有免疫原性的蛋白质或多肽，选自血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白中的一种。

[0030] 本发明还提供一种亮氨酸-组氨酸二肽免疫原的制备方法，包括以下步骤：

[0031] (1) 将适量的载体蛋白溶解于磷酸缓冲液中，得到载体蛋白溶液；

[0032] (2) 将适量的上述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物，二甲基甲酰胺、乙醇、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺溶解于磷酸钾缓冲液中，搅拌反应，得到溶解后的混合液；

[0033] (3) 将所述溶解后的溶混合液滴加至步骤(1)得到的载体蛋白溶液中，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，得到亮氨酸-组氨酸二肽免疫原。

[0034] 本发明还提供一种抗血管紧张素I特异性抗体，所述抗体由上述的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原免疫实验动物后产生，所述抗体为完整抗体分子，或者为保留与血管紧张素I特异性结合能力的抗体片段或抗体衍生物。

[0035] 优选地，所述抗体为抗兔、山羊、小鼠、绵羊、豚鼠或马抗体。

[0036] 本发明还提供一种上述的抗血管紧张素I特异性抗体的制备方法，包括以下步骤：

[0037] A. 将上述的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原稀释得到抗原溶液，将所述抗原溶液与弗氏完全佐剂混合间隔重复注射动物，得到注射后的动物；

[0038] B. 取注射后的动物的血，分离纯化后得到抗血管紧张素I特异性抗体。

[0039] 本发明还提供一种血管紧张素I检测试剂,包括试剂A和试剂B,所述试剂A中包括上述的抗血管紧张素I特异性抗体和均相酶底物,所述试剂B包括亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物。

[0040] 优选地,所述亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,所述均相酶底物由葡萄糖-6-磷酸、氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和Tris缓冲液制得;所述试剂B中还包括Tris缓冲液。

[0041] 本发明还提供一种上述的血管紧张素I检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

[0042] a. 试剂A的制备:将适量的氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和葡萄糖-6-磷酸用Tris缓冲液溶解制成均相酶底物,再将上述的抗血管紧张素I特异性抗体加入所述均相酶底物中,得到试剂A,所述抗血管紧张素I特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:100~1:10000;

[0043] b. 试剂B的制备:制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液,再将上述的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物激活,然后将激活的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物与所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液混合,得到混合液,再将所述混合液纯化,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,然后将所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物与所述Tris缓冲液以1:100~1:10000的体积比混合,制得试剂B;

[0044] c. 检测血管紧张素I时,将所述试剂A与试剂B按1:1~4:1的体积比使用,优选按4:1的体积比使用。

[0045] 优选地,所述的抗血管紧张素I特异性抗体与均相酶底物的体积比为1:520,在该配比下制备血管紧张素I检测试剂,灵敏度更高,特异性更强。

[0046] 优选地,所述的亮氨酸-组氨酸二肽酶标偶联物与Tris缓冲液的体积比优选为1:2350,在该配比下制备血管紧张素I检测试剂,灵敏度更高,特异性更强。

[0047] 本发明的有益效果是:通过反复的试验,选取血管紧张素I羧基末端的两个氨基酸残基开拓性地制备亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,并通过制得的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物获得了高免疫原性的小分子免疫原及相应抗体,首次获得了亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,并通过该衍生物制得了均相酶免疫检测试剂,得到的抗体能很好的识别并结合血管紧张素I;亮氨酸-组氨酸二肽免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗血管紧张素I特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的92种干扰物无任何交叉反应;得到的含有抗血管紧张素I特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定生物样品中血管紧张素I的含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现血管紧张素I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

[0048] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0049] 图1是本发明的实施例1合成的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的质谱图( $H^1NMR$ );

[0050] 图2是本发明的血管紧张素I的ELISA检测反应曲线;

[0051] 图3是本发明的血管紧张素I的均相酶免疫检测反应曲线;

[0052] 图4是本发明的血管紧张素I均相酶免疫法与高效液相色谱法相关性分析图。

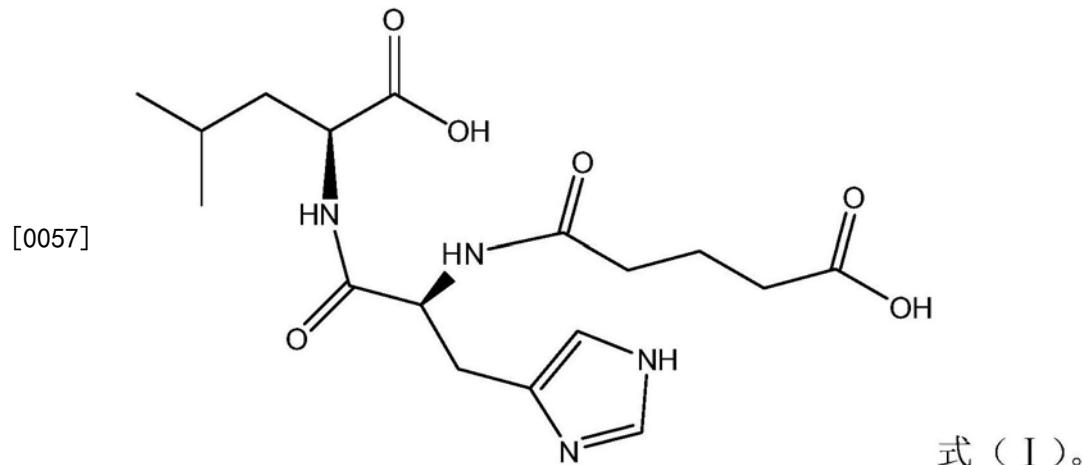
### 具体实施方式

[0053] 现在结合附图对本发明作进一步详细的说明。这些附图均为简化的示意图，仅以示意方式说明本发明的基本结构，因此其仅显示与本发明有关的构成。

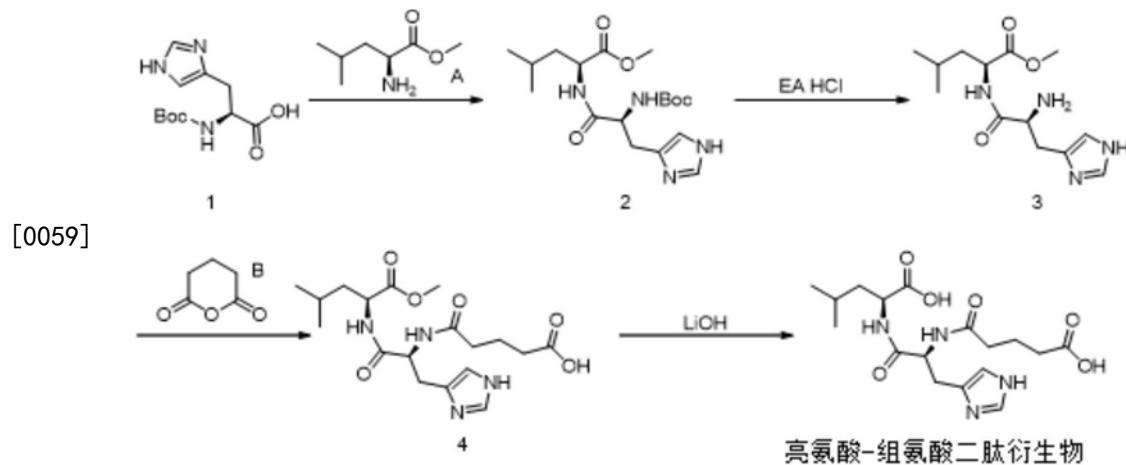
[0054] 除非特别指明，以下实施例中所用的试剂、仪器、设备、耗材均可从正规渠道商购得。

[0055] 实施例1：亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的合成

[0056] 亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的化学结构如式(I)所示：



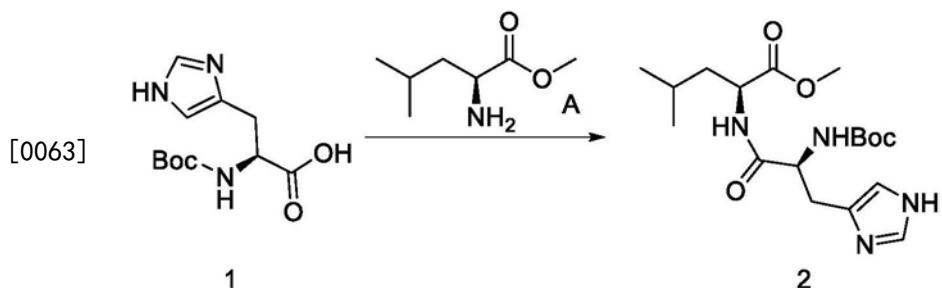
[0058] 上述亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的合成路线及制备步骤如下：



[0060] 具体的合成步骤如下：

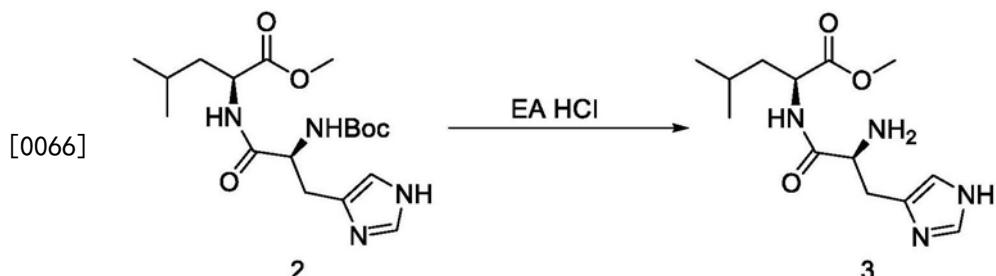
[0061] (1) 化合物2的合成

[0062] 称取25g (86.2mmol) 的化合物1溶解于250mL的二氯甲烷 (DCM) 中，然后加入17.2g (103.5mmol) 的化合物A、26.5g (172.4mmol) 的1-羟基苯并三唑 (HOBT)、38g (172.4mmol) 的碳化二亚胺 (EDCI)、50g (500mmol) 的三乙醇胺 (TEA) 配制成反应混合溶液I。将此反应混合溶液I在30℃下搅拌过夜。反应结束后，在反应混合溶液I中加入适量纯化水，然后用150mL的DCM进行萃取，萃取步骤重复4次。将萃取得到的有机相用适量卤水进行洗涤，然后通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>进行干燥处理，再进行浓缩，并将得到粗产物通过硅胶柱 (DCM:ACOH=20:1) 进行纯化，得到10g黄色固体化合物2，产率27%；具体反应过程如下式所示：



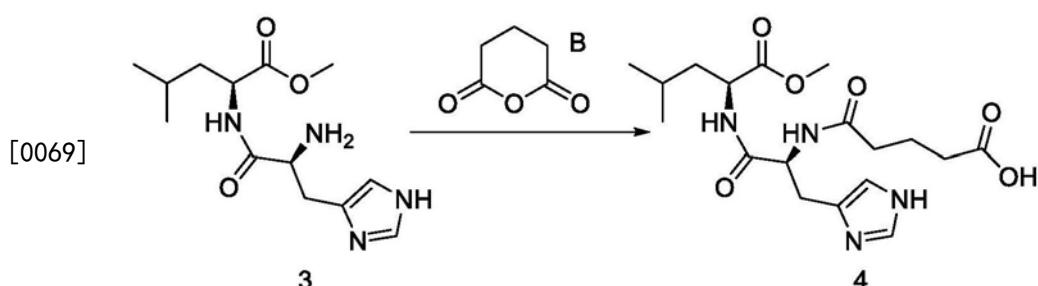
[0064] (2) 化合物3的合成

[0065] 称取10g (26mmol) 的化合物2溶解于50mL的乙酸乙酯 (EA) 中, 然后加入50mL EA/HCl, 配制成反应混合溶液 II。将此反应混合溶液 II 在30℃下搅拌3小时。然后将反应后的混合溶液 II 进行浓缩得到9g黄色油状的化合物3粗品; 具体反应过程如下式所示:



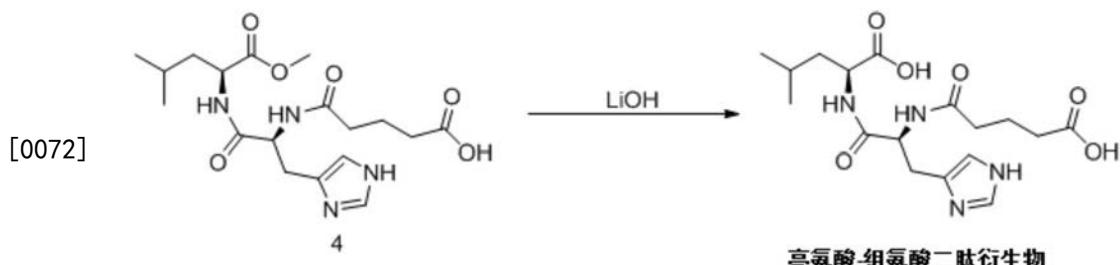
[0067] (3) 化合物4的合成

[0068] 称取9g (31.9mmol) 的化合物3溶解于100mL的DCM中, 然后加入3.64g (31.9mmol) 化合物B和1.62g (16mmol) 的TEA配制成反应混合液 III。将此反应混合液 III 在40℃下搅拌过夜, 然后将反应后的混合液 III 进行浓缩以得到粗产物, 而后将此粗产物通过硅胶柱 (DCM:ACOH = 10:1) 进行纯化, 得到8g黄色油状的化合物4, 产率63%; 具体反应过程如下式所示:



[0070] (4) 亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的合成

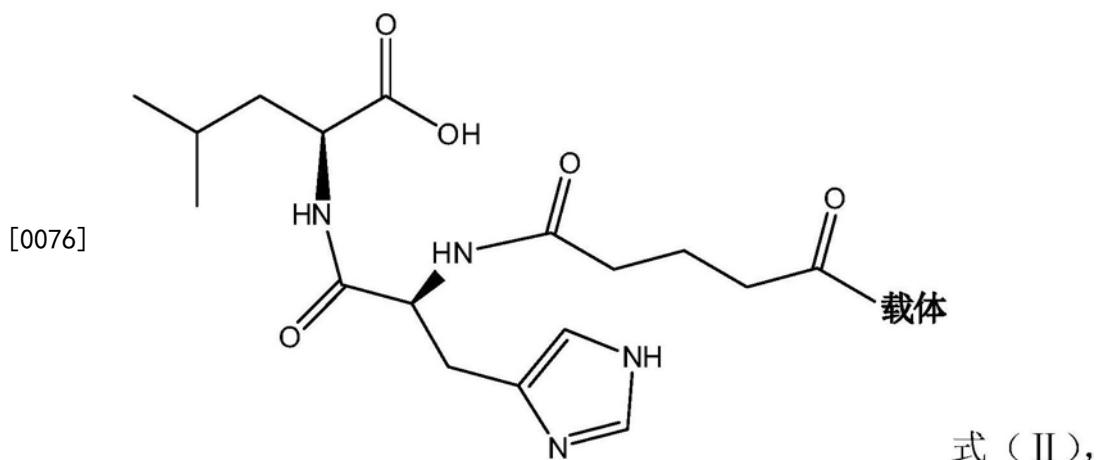
[0071] 称取8g (20.2mmol) 化合物4溶解于80mL的四氢呋喃 (THF) 和40mL的H<sub>2</sub>O中, 然后在30℃条件下加入2.68g (63.6mmol) 的LiOH配制成反应混合液IV。将此反应混合液IV在室温下搅拌过夜, 然后将反应后的混合液IV进行浓缩得到的残余物通过制备级HPLC进行纯化, 最终得到500mg白色固体状的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物, 产率7%; 具体反应过程如下式所示:



[0073] 测定上述制备的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的质谱图,结果如图1所示,从图1中可知本发明成功合成了亮氨酸-组氨酸二肽衍生物。

[0074] 实施例2:亮氨酸-组氨酸二肽免疫原的合成

[0075] 亮氨酸-组氨酸二肽免疫原由牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)与式(I)所示的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-基团连接而成,结构式如下述式(II)所示:



[0077] 该免疫原的合成方法具体步骤如下:

[0078] 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;

[0079] 2. 将如下化学品加入到小烧杯中搅拌溶解:200mg实施例1合成的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物、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、50mg N-羟基硫代琥珀酰亚胺,将这些化学品在室温下搅拌溶解反应30min;

[0080] 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,得到亮氨酸-组氨酸二肽免疫原。

[0081] 合成亮氨酸-组氨酸二肽免疫原所用的载体还可以是血蓝蛋白或甲状腺球蛋白。

[0082] 实施例3:抗血管紧张素I特异性抗体的制备

[0083] 将实施例2制备得到的亮氨酸-组氨酸二肽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:

[0084] 1. 用PBS将上述合成的亮氨酸-组氨酸二肽免疫原稀释至1.0mg/ml,得到抗原溶液,然后用1.0ml抗原溶液与弗氏完全佐剂混合,对实验动物兔进行注射。

[0085] 2. 2~3周后,再用1.0ml相同的抗原溶液与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。

[0086] 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的抗血管紧

张素I特异性抗体。

[0087] 实施例4:血管紧张素IELISA检验

[0088] 1. 血管紧张素IELISA检测标准曲线的建立

[0089] (1) 标准品的制备

[0090] 将血管紧张素I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40.00pg/mL、20.00pg/mL、10.00pg/mL、5.00pg/mL、2.50pg/mL和0.00pg/mL的标准溶液。其中,ELISA缓冲液含有50.0mM Tris,145mM NaCl和0.25%的BSA。

[0091] (2) 利用血管紧张素I的ELISA检验方法制备标准曲线

[0092] 用PBS将实施例3中所制备的抗血管紧张素I抗体稀释成1:9000的终浓度溶液,100μL/孔包被在96孔酶联板上,4℃放置12-24h;用PBS将上述包被有抗血管紧张素I抗体的96孔酶联板洗涤3次后,加入200μL/孔的0.5%的BSA溶液,4℃封闭放置8-16h。然后用PBS洗涤3次,加入20μL/孔的标准品。再加入100μL/孔工作浓度的辣根过氧化物酶(HRP)-亮氨酸-组氨酸二肽偶联物;室温下孵育30min后PBS洗板5次;然后每孔加入100μL TMB底物,室温孵育30min。再每孔加入100μL终止液(2M硫酸)。测定450nm的吸光值。根据各标准品所对应的450nm的吸光值定标,制作标准曲线,结果如图2所示。

[0093] 2. 待测样品中血管紧张素I含量的检测

[0094] (1) 制作待测样品

[0095] 制备方法:将血管紧张素I粉末(购于Sigma公司)溶解于甲醇溶液制成1μg/mL的储存液,并将此储存液稀释于空白血浆中,至终浓度分别为0.00,1.00,10.00,40.00pg/mL,形成空白、低、中、高浓度的血浆样本。该空白血浆为不含血管紧张素I的健康人血浆。

[0096] (2) 测试方法

[0097] 利用上述血管紧张素I的ELISA检验方法,将上述空白、低、中、高浓度的血浆样本代替标准品,测试上述空白、低、中、高浓度的血浆样本在450nm的吸光值。

[0098] (3) 测试结果

[0099] 对照图1中所示的血管紧张素IELISA检验的标准曲线,计算每个样本中血管紧张素I含量,并对每个样本进行3个复孔测定,根据上述样本中血管紧张素I的实际含量计算回收率,结果如表1所示。

[0100] 表1血管紧张素I的ELISA检测回收实验

	血清样品	空白	低	中	高
	样品浓度 (pg/mL)	0.00	1.00	10.00	40.00
[0101]	测试 1	0.01	1.05	10.67	39.06
	测试 2	0.00	0.99	10.25	41.51
	测试 3	0.02	1.12	10.09	41.00
	平均值(pg/mL)	0.01	1.05	10.34	40.52
	回收率(%)	-	105.00	103.40	101.31

[0102] 由表1中结果可知:采用本发明血管紧张素IELISA检测试剂测定不同浓度样品中的血管紧张素I回收率都较高,均>95%,说明本发明所述的抗血管紧张素I特异性抗体可

以用于样本中血管紧张素I的检测，并且结果准确度高。

[0103] 实施例5：葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0104] 1. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备：

[0105] (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 MgCl<sub>2</sub>(3.3mM)和100mg NaCl的溶液中，该溶液pH=9.0，本步骤在烧杯C中进行。

[0106] (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)。

[0107] (3) 在上述烧杯C中再逐滴加入2mL二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)。

[0108] 2. 亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的激活：

[0109] (1) 在无水状态下称取10mg实施例1合成的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物，溶解于600μL DMF中。

[0110] (2) 使上述溶液温度降到-2~-8℃。

[0111] (3) 加入3μL三丁胺(tributylamine)。

[0112] (4) 加入1.5μL氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0113] (5) -2~-8℃搅拌30分钟。

[0114] 3.G6PDH与亮氨酸-组氨酸二肽衍生物的连接：

[0115] (1) 将上述激活的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的G6PDH溶液中。

[0116] (2) 2~8℃搅拌过夜。

[0117] 4. 纯化产物：

[0118] 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。

[0119] 实施例6：血管紧张素I均相酶免疫检测试剂的制备

[0120] 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；将上述制备的抗血管紧张素I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可以为1:100~1:10000，在本实施例中的比例为1:520。

[0121] 2. 试剂B的制备：将实施例5制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到120mM、pH=8.2的Tris缓冲液中，上述偶联物与Tris缓冲液的体积比可以为1:100~1:10000，在本实施例中的比例为1:2350。

[0122] 实施例7：血管紧张素I均相酶免疫检验及结果

[0123] 1. 获得标准曲线：

[0124] (1) 设置迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数(见表2)。

[0125] (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OD<sub>340</sub>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。

[0126] 表2迈瑞BS480全自动生化分析仪反应参数

迈瑞 BS480 参数	
[0127]	项目名称 血管紧张素 I
	试剂 1 200 $\mu$ l
	试剂 2 50 $\mu$ l
	样本量 12 $\mu$ l
	分析方法 终点法
	主波长 340 nm
	次波长 412 nm
	反应时间 10 分钟
[0128]	孵育时间 5 分钟
	反应方向 上升
	结果 pg/ml
	结果精度 0.01
	定标方法 Logistic-Log 5P
	标准品浓度 0.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00, 100.00 pg/ml

[0129] 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:将血管紧张素I标准品溶解于人血浆中,至浓度分别为2.00,25.00,80.00pg/ml。检测数据及数据分析见表3。

[0130] 表3样品测定及精密度和回收率评估

[0131]

血液样品	低	中	高
样品浓度 (pg/ml)	2.00	25.00	80.00
1	1.94	25.89	80.00
2	2.15	26.11	79.14
3	2.08	25.02	78.69
4	1.96	24.27	81.01
5	2.00	24.00	79.80
6	2.05	24.91	80.35
7	1.96	25.30	78.97
8	1.89	25.25	82.12
9	2.11	24.72	80.33
10	1.92	25.19	79.65
平均值 (pg/ml)	2.01	25.07	80.01
标准差 (SD)	0.087	0.649	1.023
精密度 (CV%)	4.33%	2.59%	1.28%
回收率%	100.50	100.28	100.01

[0132] 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%。

- [0133] 实施例8:药物与激素干扰试验
- [0134] 选取62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物进行干扰检测,调整浓度至1.00ng/ml,采用实施例7的均相酶免疫方法进行测定:
- [0135] 1.将待测干扰物与实施例6制备的试剂A接触反应,再加入试剂B;
- [0136] 2.检测上述混合溶液的OD<sub>340</sub>吸光值,根据实施例7的标准曲线得到相应物质的浓度。
- [0137] 62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物名称以及测定结果具体参见表4。
- [0138] 表4常见干扰物测定结果

ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)
1	阿司匹林	0.00	2	苯丙醇胺	0.00
3	β -苯基乙胺	0.00	4	普鲁卡因酰胺	0.00
5	安非他命	0.00	6	普鲁卡因	0.00
7	氨苄青霉素	0.00	8	奎尼丁	0.00
9	甲氨二氮卓	0.00	10	佐美酸	0.00
11	氯丙嗪	0.00	12	苯肾上腺素	0.00
13	氯拉卓酸	0.00	14	桂皮酰艾克宁	0.00
15	二甲苯氧庚酸	0.00	16	芽子碱	0.00
17	非诺洛芬	0.00	18	地西洋	0.00
19	甲基苯丙胺	0.00	20	可替宁	0.00
21	龙胆酸	0.00	22	阿替洛尔	0.00

[0139]

[0140]

ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)
22	吉非贝齐	0.00	24	心得安	0.00
25	氢可酮	0.00	26	苯乙哌啶酮	0.00
27	布洛芬	0.00	28	苯基丁氮酮	0.00
29	丙咪嗪	0.00	30	麦角酸二乙基酰胺	0.00
31	二氨基二苯砜	0.00	32	大麻酚	0.00
33	萘普生	0.00	34	洛哌丁胺	0.00
35	氢氯噻嗪	0.00	36	异克舒令	0.00
37	哌替啶	0.00	38	苯基丙氨酸	0.00
39	烯丙羟吗啡酮	0.00	40	盐酸氟西汀	0.00
41	麻黄素	0.00	42	柳丁氨醇	0.00
43	烟酰胺	0.00	44	青霉素	0.00
45	甲胺吠硫	0.00	46	甲基二乙醇胺	0.00
47	异戊巴比妥	0.00	48	二亚甲基双氧苯丙胺	0.00
49	甲撑二氧苯丙胺	0.00	50	琥珀酸多西拉敏	0.00
51	四氢大麻酚	0.00	52	纳布啡	0.00
53	制霉菌素	0.00	54	去甲吗啡	0.00
55	乙酰吗啡	0.00	56	羟考酮	0.00
57	苯非他明	0.00	58	克他命	0.00
59	异丙嗪	0.00	60	苯海拉明	0.00
61	阿司帕坦	0.00	62	苯丁胺	0.00
63	皮质醇(氢化可的松)	0.00	64	香草扁桃酸	0.00
65	雄烯二酮	0.00	66	雄甾酮	0.00
67	皮质脂酮	0.00	68	皮质酮(可的松)	0.00

ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)	ID#	化合物名称	等价于血管紧张素 I 的浓度 (pg/ml)
[0141]	69 去氧皮质酮	0.00	70 脱氢表雄酮	0.00	
	71 硫酸脱氢表雄酮	0.00	72 二氢睾酮	0.00	
	73 雌二醇	0.00	74 雌三醇	0.00	
	75 雌酮	0.00	76 本胆烷醇酮	0.00	
	77 17-羟孕烯醇酮	0.00	78 17-羟孕酮	0.00	
	79 孕烯醇酮	0.00	80 孕酮	0.00	
	81 睾酮	0.00	82 孕三醇	0.00	
	83 孕二醇	0.00	84 17 $\alpha$ -羟基黄体酮	0.00	
	85 雄烯二酮	0.00	86 17-酮类固醇	0.00	
	87 17-羟皮质类固醇	0.00	88 肾上腺素	0.00	
	89 去甲肾上腺素	0.00	90 多巴胺	0.00	
	91 高香草酸	0.00	92 二羟基杏仁酸	0.00	

[0142] 从上述测定结果可以看出：上述62种常见药物与30种常见激素及激素代谢物等价于血管紧张素I的浓度均小于1.00pg/ml。由此可见，本发明的抗体是抗血管紧张素I的特异性抗体，与常见干扰物无交叉反应。

[0143] 实施例9：相关性分析

[0144] 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试剂进行相关性分析，测定的数据参见表5。

[0145] 表5临床样本测定值

样本号	均相酶免疫法测定值 (pg/ml)	高效液相色谱法测定值 (pg/ml)
1	3.13	3.08

[0147]

2	13.73	13.85
3	5.93	6.02
4	3.37	3.41
5	2.26	2.24
6	12.85	13.07
7	5.76	5.80
8	8.53	8.71
9	6.67	6.70
10	1.35	1.39
11	20.80	21.75
12	4.43	4.49
13	1.09	1.08
14	6.72	6.65
15	4.43	4.77
16	22.32	22.50
17	1.45	1.46
18	9.75	10.00
19	7.37	7.51
20	9.09	9.00
21	5.20	5.62
22	7.12	7.15
23	1.87	1.96
24	3.76	3.73
25	6.41	6.36
26	8.06	7.76
27	26.43	26.69
28	5.28	5.35
29	6.07	6.37
30	3.36	3.41
31	1.88	1.87
32	9.65	9.50
33	2.23	2.25
34	8.26	8.12
35	21.19	22.22
36	4.76	4.81
37	2.98	3.00
38	13.08	12.81
39	7.86	8.01
40	5.00	4.95
41	0.79	0.80
42	2.59	2.68
43	3.33	3.45
44	5.34	5.40

45	7.82	7.89
46	4.21	4.29
47	6.03	6.15
48	3.23	3.10
49	24.96	25.12
50	10.00	10.51
51	5.39	5.35
52	7.76	7.85
53	4.28	4.33
54	20.91	21.01
55	1.85	1.87
56	12.06	12.39
57	6.38	6.29
58	3.85	3.90
59	7.29	7.41
60	3.78	3.89
61	2.89	2.91
62	19.97	20.00
63	0.90	0.92
64	5.35	5.41
65	3.83	3.97
[0148]	5.28	5.25
66	2.22	2.21
67	7.38	7.56
68	4.38	4.33
69	8.30	8.35
70	2.29	2.31
71	2.65	2.69
72	19.62	20.81
73	5.38	5.30
74	6.62	6.65
75	5.60	5.66
76	2.88	2.87
77	4.05	4.12
78	1.87	1.88
79	9.29	9.17
80	6.33	6.52
81	3.00	2.95
82	10.60	10.95
83	2.70	2.73
84	24.50	25.88
85	4.27	4.32
86	7.33	7.49

[0149]	88	3.21	3.29
	89	1.50	1.56
	90	3.33	3.30
	91	5.24	5.89
	92	6.26	6.40
	93	3.08	3.11
	94	5.01	5.55
	95	3.27	3.28
	96	1.98	2.00
	97	12.05	11.91
	98	8.56	8.61
	99	2.57	2.69
	100	26.52	26.96

[0150] 对上述数据作图,参见图4,得到的线性方程为: $y=1.023x-0.0473$ ,相关系数 $R^2=0.9987$ ,表明本发明的检测试剂测定血管紧张素I临床标本的准确度高。

[0151] 综上,本发明通过反复的试验,选取血管紧张素I羧基末端的两个氨基酸残基开拓性地制备亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,并通过制得的亮氨酸-组氨酸二肽衍生物获得了高免疫原性的小分子免疫原及相应抗体,首次获得了亮氨酸-组氨酸二肽衍生物,并通过该衍生物制得了均相酶检测试剂,得到的抗体能很好的识别并结合血管紧张素I;该亮氨酸-组氨酸二肽免疫原得到的抗体,特异性高,准确度高,与常见干扰物无交叉反应,含有上述抗血管紧张素I特异性抗体的均相酶检测试剂可以方便、快速、准确地确定生物样品中血管紧张素I的含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现血管紧张素I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。

[0152] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

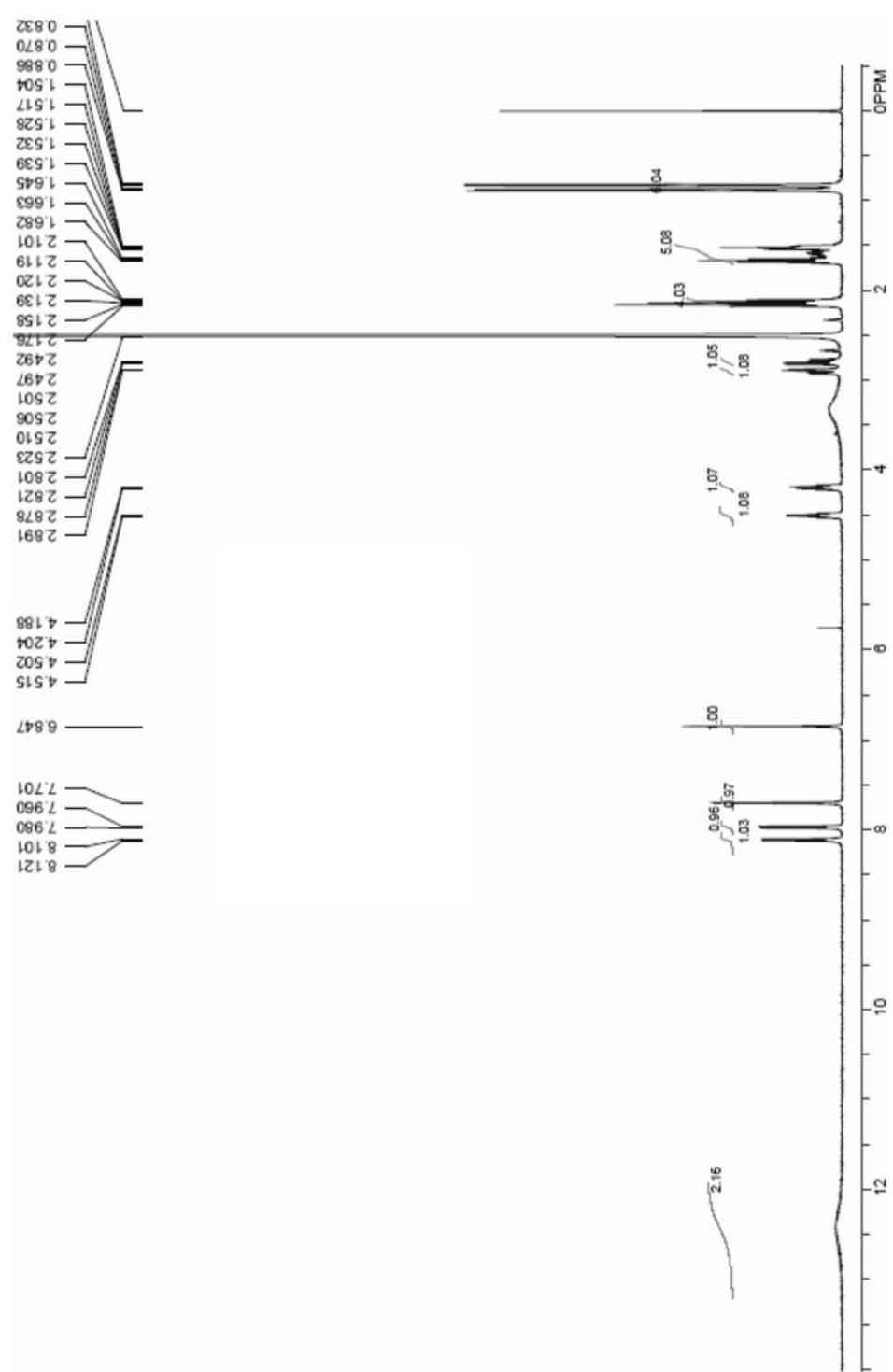


图1

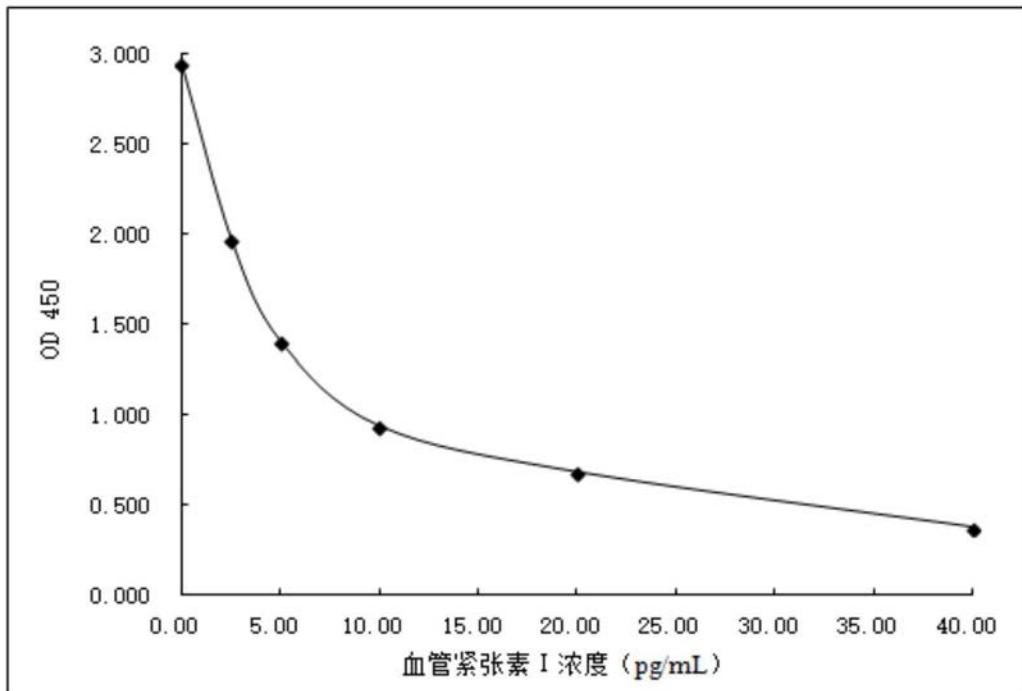


图2

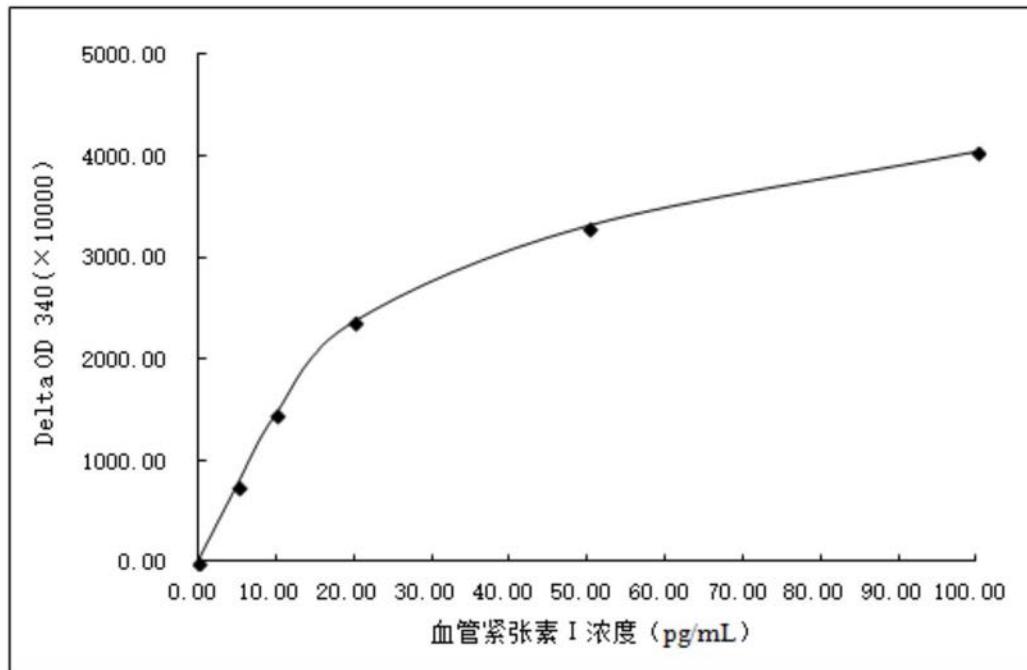
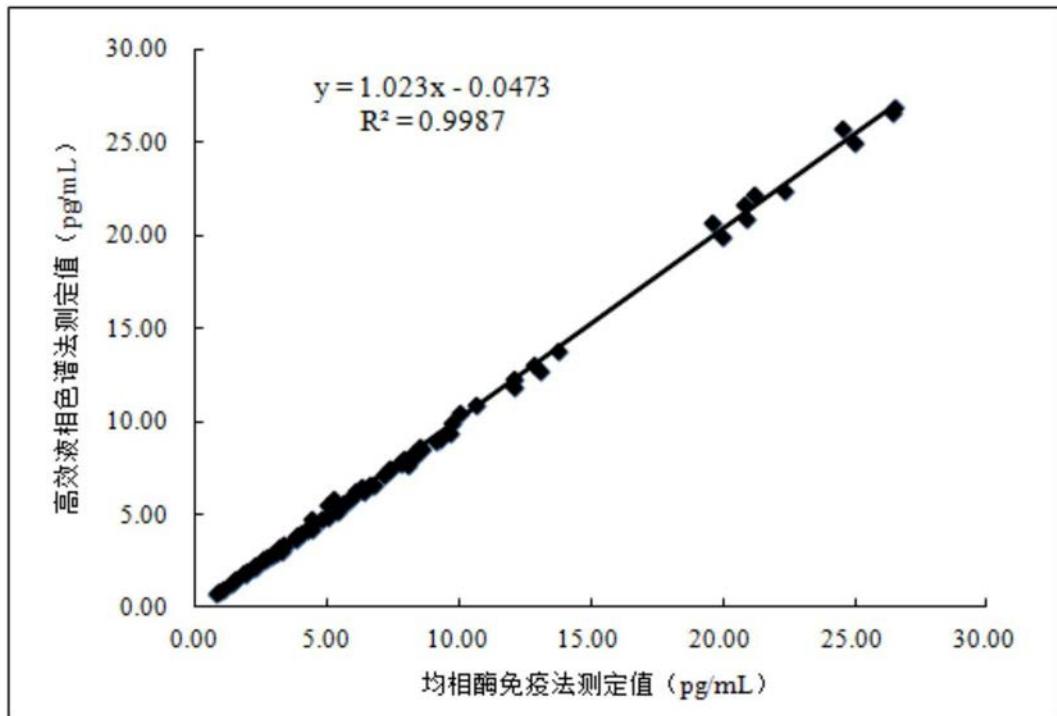


图3



专利名称(译)	用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108181460A</a>	公开(公告)日	2018-06-19
申请号	CN201711400717.5	申请日	2017-12-22
[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	余琳 程黎明 虞留明		
发明人	余琳 程黎明 虞留明		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及一种用于血管紧张素I检测的二肽衍生物及其制备方法和应用，其中二肽衍生物为亮氨酸-组氨酸二肽衍生物，其结构式如下述式(I)所示：本发明通过反复的试验，选取血管紧张素I羧基末端的两个氨基酸残基开拓性地制备亮氨酸-组氨酸二肽衍生物、免疫原及相应抗体，得到的抗体能很好的识别并结合血管紧张素I，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现血管紧张素I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。

